

Studiengang Life Technologies

Vertiefungsrichtung Biotechnologie

Diplom 2008

Isabelle Savoy

*Der Einsatz von Radialflusssäulen
im Capture-Schritt von
Antikörperaufreinigungen*

Dozent

Simon Crelier

Experte

Christian Frech

Confidentiel / Vertraulich

☐ oui / ja ☐ non / nein

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2007/2008	No PS / Nr. PS bt/2008/60
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Ecole hôte Hochschule Mannheim	Etudiant / Student Isabelle Savoy	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Ecole hôte
Professeur / Dozent Simon Crelrier	Expert / Experte (données complètes) Prof. Dr. Christian Frech Fakultät für Biotechnologie Hochschule Mannheim Paul-Wittsackstrasse 10, D—68163 Mannheim	

Titre / Titel

Der Einsatz von Radialflusssäulen im Capture-Schritt von Antikörperaufreinigungen

Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

Monoklonale Antikörper stellen eine der wichtigsten Klassen pharmazeutischer Proteine dar. Der Herstellung in Zellkulturfermentern folgt ein mehrstufiger Aufreinigungsprozess, der bis zu 80 % der Produktionskosten verursachen kann. Der primäre Reinigungsschritt ist meist eine Protein A Affinitätschromatographie. Alternativ wird auch ein Capture Schritt mittels Kationenaustauschchromatographie durchgeführt.

Die Diplomarbeit untersucht die Einsatzmöglichkeiten von Radialflusssäulen im Capture Schritt von Antikörperreinigungen.

Arbeitsziel I:

- Optimierung der Packstrategie im *recycle mode* für eine RFC Säule.
- Vergleichende Untersuchungen an einer Prototyp-Axialsäule.

Arbeitsziel II:

- Bestimmung der optimalen Parameter zum Capture eines Antikörpers mittels Kationenaustauschchromatographie.
- Capture eines Antikörpers mittels Kationenaustauschchromatographie auf einer RFC Säule.
- Vergleichende Untersuchungen auf der Prototyp-Axialsäule.

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

 Resp. de filière
 Studiengangsleiter:

Etudiant/Student:

Délais / Termine

Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:

Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:

 Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:
 Défense orale / Mündliche Verfechtung:

Einsatz von Radialflusssäulen im Capture-Schritt von Antikörperaufreinigungen

Résumé

Objectif : Le but de ce travail consiste à déterminer l'enjeu d'une colonne de chromatographie radiale dans la purification d'anticorps au niveau de l'étape de capture. La stratégie de package d'une colonne radiale en « recycling mode » sera optimisée et comparée avec celle d'une colonne axiale prototype. La détermination des paramètres de capture permettra la réalisation d'essai sur les 2 colonnes déjà citées, afin de les comparer.

Résultats : Une nouvelle méthode a été développée pour le package de la CRIO-MD 62 (colonne radiale). Celle-ci a permis d'augmenter l'efficacité qui s'élève ainsi à 1800 N/m ainsi que d'améliorer le coefficient d'asymétrie à 1.05. Les paramètres de package optimaux de la CRIO-MD 63 n'ont pas été trouvés. L'effet positif du conditionnement de la colonne sur la qualité du lit packé a été démontré. A l'aide d'essais avec inversion de flux, l'effet du système de distribution du liquide à l'entrée de la colonne a été mis en évidence. L'efficacité s'élève à 1500 N/m et tombe à environ 270 N/m du moment que l'effet du système de distribution est tenu en compte.

Les éluions par gradient linéaire (LGE) d'un échantillon de EGFP sur du fractogel SO_3^- ont permis, sur la base des courbes K-I, de développer une élution par étape, qui permis la séparation des composants du mélange. Ces essais n'ont pas permis de constater une différence entre la conformation radiale et axiale des colonnes utilisées, car l'échantillon n'était pas suffisamment pur. Les LGE d'un échantillon de lysozyme ont permis de mettre en évidence une différence entre les deux géométries des colonnes. Le traitement des résultats a été fait avec la même formule. Cette formule n'est cependant pas applicable à une géométrie radiale. De ce fait, une nouvelle expression reliant les valeurs GH à I_R a été développée, mais ne peut pas être résolue analytiquement.

Faute de temps, l'apport d'une colonne radiale dans la purification d'anticorps n'a pas pu être déterminé.

Mots-clés : colonne de chromatographie radiale, Package, Fractogel SO_3^- , Nombre de plateaux théoriques, Linear gradient elution

Zusammenfassung

Ziel : Ziel dieser Arbeit besteht aus den Untersuchungen zur Aufreinigung von Antikörper mittels Radial fluss chromatographie Säule. Die Packstrategie zur Packung einer Radial Fluss Säule im « recycling mode » wird optimiert. Die Parameter zum Capture von Antikörper werden bestimmt und Capture Versuche werden ermöglichen, ein axial Prototyp Säule mit einer radialen Säule zu vergleichen.

Ergebnisse : Die optimierte Packstrategie im recycling mode der CRIO-MD 62 ermöglicht eine höhere Effizienz als bei der standard Methode, und zwar 1800 N/m und ein Asymmetriekoeffizient von ca. 1.05. Die optimalen Packparameter zum Packen der CRIO-MD 63 wurden nicht gefunden. Es wurde gezeigt, dass die Konditionierung die Qualität der Packung bzw. die Effizienz stark positiv beeinflusst. Der Einfluss des Verteilersystems wurde mittels Flussumkehrversuche hervorgehoben. Dieses verschlechtert die Effizienz der Säule sehr stark. Von einer Effizienz von ca. 1500 N/m senkt die Effizienz auf ca. 270 N/m sobald der Effekt des Verteilersystems berücksichtigt wird.

Die lineare Gradienten Elution (LGE) einer EGFP Probe auf Fractogel SO_3^- ermöglichte auf Basis der K-I Kurven eine Stufenelution durchzuführen und die Trennung der verschiedenen Komponenten der Probe zu erreichen. Aufgrund der Unreinheit der Probe war einen Vergleich zwischen radialer und axialer Säule nicht möglich. Die LGE von Lysozym konnte einen Unterschied zwischen radialer und axialer Säule sichtbar machen. Aus diesem Versuch wurde gemerkt, dass der GH-I_R Zusammenhang einer axialen Säule nicht auf eine radiale Säule übertragbar war. Von daher wurde eine neue Expression entwickelt, um diesen Zusammenhang zu repräsentieren. Die Gleichung ist nicht analytisch lösbar.

Schlüsselwörter : Radialflussschromatographie, Packstrategie, Fractogel SO_3^- , Bodenzahlbestimmung, Lineare Gradienten Elution

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	2
INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGENVERZEICHNIS UND GRIECHISCHE SYMBOLE	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	7
1 ZIEL UND AUFGABENSTELLUNG	8
2 EINLEITUNG	8
2.1 CHROMATOGRAPHIE	8
2.1.1 Allgemein	8
2.1.2 Radialflusschromatographie Säule	9
2.1.3 Berechnung der linearen Geschwindigkeit bei Radialflusssäulen	10
2.1.4 Das Packen der RFCS	12
2.1.5 Auswertung der Qualität einer Packung	14
2.2 ENTWICKLUNG EINER STUFENELUTION BEI DER IEC	18
2.2.1 Ionenaustausch Chromatographie	18
2.2.2 Lineares Gradienten Elutions Modell	19
2.2.3 Optimierung einer Linearen Gradienten Elution	21
2.3 EGFP-R ₈ C	22
3 MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 MATERIAL	23
3.1.1 Gelmaterial	23
3.1.2 Lösungen	23
3.1.3 Säulen	25
3.1.4 Anlagen und Systeme	25
3.1.5 Software	26
3.2 METHODEN	27
3.2.1 Packen der CRIO-MD 62 und 63 im „recycling mode“	27
3.2.2 Bestimmung der Packungseffizienz	30
3.2.3 Aufarbeitung der exportierten Kurven mit TableCurve2D	31
3.2.4 Aufreinigung der EGFP Probe	32
3.2.5 SDS-PAGE mit Silberfärbung	35
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	36
4.1 DAS PACKEN DER CRIO-MD 62	36
4.2 VERSUCHE ZUM PACKEN DER CRIO-MD 63	39
4.3 LINEARE GRADIENTEN ELUTION	50
4.3.1 K' und K_{crit} Bestimmung	50
4.3.2 Gradientenelution bei der Merck Scout Säule	51
4.3.3 Stufenelution bei der Merck Scouting Säule mit reduzierter Probe	53
4.3.4 Gradientenelution der EGFP Probe mit der CRIO-MD 62	54
4.3.5 Gradientenelution von Lysozym mit der CRIO-MD 62 und mit der Scouting Merck axialer Säule	60
5 SCHLUSSDISKUSSION	64
6 SCHLUSSFOLGERUNG	64
7 QUELLEN	65
8 ANHÄNGE	66

Abkürzungenverzeichnis

A	Asymmetriekoeffizient [-]
A	Konstante: $K_{eq} \cdot \Lambda^Z$
AC	Affinitätschromatographie
AFCS	Axialflussschromatographiesäule
B	Z
C_0	Proteinkonzentration in der mobilen Phase [M]
C_b	Proteinkonzentration in der stationären Phase (gebunden) [M]
CRIO-MD	Column Radial InOxidable-Method Development
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
g	Gradientensteigung [M/ml]
GH	normierte Gradientensteigung [M]
H	Phasenverhältnis [-]
HETP	Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens [cm oder μm]
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
I	Ionenstärke [M]
I_0	Anfangsionenstärke [M]
I_b	Konzentration des gebundenen Salz [M]
IEC	Ionenaustauschchromatographie
I_F	Endionenstärke [M]
I_o	Konzentration des freien Salz [M]
I_R	Ionenstärke bei Retentionsvolumen [M]
K	Verteilungskoeffizient [-]
K'	Salzverteilungskoeffizient [-]
	Proteinverteilungskoeffizient unter unbindenden Bedingungen
K_{crit}	[-]
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante [-]
LGE	Linear Gradient Elution
LV	lineare Geschwindigkeit [cm/h]
N	Bodenzahl
Q	Volumetrische Flussrate [ml/min]
RFCS	Radialflussschromatographiesäule
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Ausschlusschromatographie
V_c	Volumen der Säule [ml]
V_g	Gradientenvolumen [ml]
V_0	Zwischenkornvolumen [ml]
Z	Anzahl freigegebene Ionen

Griechische Symbole

α	Winkel [rad]
ε_0	Zwischenkornporosität [-]
ε_t	Totale Porosität [-]
Λ	Ionenkapazität
μ_1	1. Moment, entspricht Retentionsvolumen [ml]
σ_2	Varianz = μ_2 [ml]

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Flussrichtung bei Axialflusssäulen (links) und Radialsäulen (rechts) ^[4]	9
Abb. 2.2 Labormaßstabsäulen ^[4]	10
Abb. 2.3 Graphische Darstellung des Volumens in Abhängigkeit von der Trennstrecke bei der CRIO-MD 62	11
Abb. 2.4 Schematische Darstellung der CRIO-MD 62 mit Angabe der nötigen Daten für die Berechnung des Volumens [9]	11
Abb. 2.5 Schematische Darstellung der linearen Geschwindigkeit zur Bestimmung des Sollwertes bei einer radialen Säule mit 18 cm Trennweg mit einem Seitenverhältnis von 2:1 [4]	11
Abb. 2.6 Schematische Darstellung der linearen Geschwindigkeit in einer 18 cm Säule mit einem Seitenverhältnis von 2:1 (blau). Die grüne konstante Linie ist der Mittelwert der linearen Geschwindigkeit über dem ganzen Gelbett [4]	12
Abb. 2.7 Schematische Darstellung des sedimentierten Gels während des Packvorgangs (von links nach rechts)[9]	13
Abb. 2.8 Photo der CRIO-MD 62 und einer Packanlage [4]	13
Abb. 2.9 Zusammenhang zwischen Bodenhöhe (H) und lineare Fließgeschwindigkeit u [10]	15
Abb. 2.10 Schematische Darstellungen eines Chromatogramms mit Beschriftungen zur Bodenzahl- [11] und Asymmetriestimmung [12]	16
Abb. 2.11 Schematische Darstellung einer Gradientenelutionsprofil (blau : Leitfähigkeit, schwarz, UV Signal, rosa : Ablesen der Leitfähigkeit)	19
Abb. 2.12 K-I Plot von 3 Proteinen mit Stufendesign als Beispiel	20
Abb. 3.1 Photo und schematische Darstellung der Äkta Pilot	25
Abb. 3.2 Schema der Packanlage zum „standard“ Packvorgang im „recycling mode“ mit der CRIO-MD 62 und 63	27
Abb. 3.3 Schema der Packanlage zum „optimierten“ Packvorgang im „recycling mode“ mit der CRIO-MD 62 und 63 [4]	28
Abb. 3.4 Schema der Packanlage für das Packen der CRIO-MD 63. Links, die „Inlet 1 – Inlet 2“ Methode und Rechts die „Inlet 2“ Methode	29
Abb. 3.5 Schematische Darstellung der Äkta Pilot System	30
Abb. 3.6 Schematische Darstellung der Äkta Purifier System [19]	32
Abb. 4.1 Entwicklung des Drucks während des Packvorgangs für die standard und optimierte Methode	36
Abb. 4.2 Graphische Darstellung der Effizienz N/m für die Packung nach standard (links) und optimierter (rechts) Methode	37
Abb. 4.3 Vergleich zwischen von standard und optimierter erhaltenen N/m für Salzdurchbruchskurve (links) und Acetonpeaks (rechts)	37
Abb. 4.4 Schematische Darstellung der benutzten « 2 Inlet offen » Methode und Chromatogramm des Salzdurchbruch bei 150 cm/h (105.8 ml/min) durchgeführt. (In braun kontinuierliche Linie, die Leitfähigkeit, in orange die Ableitung der Leitfähigkeitskurve)	39
Abb. 4.5 Schematische Darstellung der standard Methode und Chromatogramm des Salzdurchbruch bei 150 cm/h (105.8 ml/min) durchgeführt. (In braun kontinuierliche Linie, die Leitfähigkeit, in orange die Ableitung der Leitfähigkeitskurve)	39
Abb. 4.6, Abb. 4.7 Salzdurchbrüche bei 150 cm/h (105.8 ml/min). Die beiden Chromatogrammen entsprechen einem Packversuch bei 850 cm/h (0.6 L/min) und zwar links mit zweitem Inlet offen und rechts ohne zweites Inlet offen. (In braun die Leitfähigkeit und in orange die Ableitung der Leitfähigkeitskurve)	40
Abb. 4.8 Entwicklung der Salzdurchbrüche bei 150 cm/h im Laufe der Konditionierung. Das Packen war nach der optimierten Methode und bei 850 cm/h durchgeführt	41
Abb. 4.9 Entwicklung (von links nach rechts) der Salzdurchbrüche bei 150 cm/h im Laufe der Konditionierung. (1. vor der Konditionierung, 2. 4Mal Flussrichtung gewechselt, 3. 8 Mal Flussrichtung gewechselt)	42
Abb. 4.10 Schematische Darstellung der Packmethode und Chromatogramm der Durchbruchskurve, nach Konditionierung, bei 150 cm/h (105.8 ml/min)	42
Abb. 4.11 Chromatogramm der Salzdurchbruchskurven (braun) und entsprechenden Ableitungen (orange - -) mit 300 cm/h (211.7 ml/min) mit den „normalen“ Anschlüssen vor Konditionierung (links) und nach Konditionierung (rechts)	43

Abb. 4.12 Chromatogramm der Salzdurchbruchskurven (braun) und entsprechenden Ableitungen (orange) mit 300 cm/h (211.7 ml/min) mit den „anderen“ Anschlüssen vor Konditionierung (links) und nach Konditionierung (rechts)	43
Abb. 4.13 Graphische Darstellung der mittels Salzdurchbrüche bestimmte Effizienz der Packung vor (voll) und nach (leer) der Konditionierung, mit normalen (blau) und anderen (orange) Anschlüssen	44
Abb. 4.14 Graphische Darstellung der Effizienz der Packung nach der Konditionierung mit „normalen“ (blau) und „anderen“ (orange) Anschlüsse. Die Effizienz ist in Böden pro Meter angegeben und wurde mittels Salzdurchbrüchen, Salzpulsen und Dextranblaupulsen berechnet.	44
Abb. 4.15 Chromatogramm des Dextranblaupeaks mit „normalen“ (links) und anderen (rechts) Anschlüsse bei 150 cm/h (105.8 ml/min)	45
Abb. 4.16 Photos des Vorwärtstommens des Dextranblaupeaks während des Laufes bei 150 cm/h (105.8 ml/min)	45
Abb. 4.17 Chromatogramm des Lysozympeaks, Puffer A und B NaP 500 mM pH 7, 200 cm/h (141.1 ml/min)	46
Abb. 4.18 Chromatogrammen der Versuchen wo der Fluss nach einem bestimmten Volumen umgekehrt wurde (links: nach ca. 35 ml, mitte: nach ca. 65 ml, rechts : nach ca. 95 ml)	47
Abb. 4.19 Chromatogrammen der Versuchen bei denen der Fluss nach einem bestimmten Volumen umgekehrt wurde (links: nach ca. 35 ml, mitte: nach ca. 65 ml, rechts : nach 95 ml), Säule wurde von Outlet zu Inlet angeschlossen	48
Abb. 4.20 Chromatogrammen von Acetonpulsen mit Säule in normaler Richtung (links) und in umgekehrter (rechts) Richtung angeschlossen, Versuche wurden mit 141.1 ml/min durchgeführt	48
Abb. 4.21 Graphische Darstellung der Effizienz in N/m angegeben in Abhängigkeit der Position in der Säule, wo der Fluss umgekehrt wird. Die dunklen Punkte wurden mit der Säule in normaler Richtung angeschlossen und die hellen Punkte wurden mit der Säule in umgekehrter Richtung angeschlossen durchgeführt.	49
Abb. 4.22 Chromatogramme von einer 15 Säulenvolumen Gradientelution. Links ist die Probe nicht reduziert und rechts ist die reduziert. (in blau der UV Signal bei 220 nm, in braun das Leitfähigkeitssignal)	51
Abb. 4.23 SDS-PAGE Gele: 1. unreduzierte Probe, 2. reduzierte Probe. M: Marker, D: Durchlauf.	51
Abb. 4.24 GH-I _R Plot und K-I-Plot für die Gradientenversuchen bei der Merck Scouting Säule,	52
Abb. 4.25 Stufenelution (rot: UV 220 nm, braun - - - Leitfähigkeit) 1. Stufe bei 0.1 M, 2. Stufe bei 0.7 M, 3. Stufe bei 1 M, Regeneration bei 2M.	53
Abb. 4.26 25 CV Gradientenelution (braun - - - Leitfähigkeit, rot kontinuierlich UV 220 nm)	54
Abb. 4.27 SDS-PAGE Analyse mit Fraktionen der 25 CV Gradientenversuch mit der CRIO-MD 62 (M: Marker, P : Probe)	54
Abb. 4.28 15 CV Gradient mit neuer Probe und neuer Puffer (braun - - - Leitfähigkeit, blau kontinuierlich UV 220 nm)	55
Abb. 4.29 GH-I _R mit der CRIO-MD 62 und mit der axialen Scouting Säule	56
Abb. 4.30 K-I Kurven mit der CRIO-MD 62 und mit der axialen Scouting Säule	56
Abb. 4.31 Stufenelution bei der CRIO-MD 62 (braun - - - Leitfähigkeit, blau kontinuierlich UV 220 nm)	57
Abb. 4.32 Photo der SDS-PAGE Gel, silbergefärbt. M : Marker	57
Abb. 4.33 Stufenelution bei der CRIO-MD 62 (braun - - - Leitfähigkeit, blau kontinuierlich UV 220 nm)	58
Abb. 4.34 Photo der SDS-PAGE Gel, silbergefärbt. M : Marker, F2' F3' F4' sind die Fraktionen die durch DTT reduziert wurden	58
Abb. 4.35 Stufenelution in Rückwärtsrichtung (braun - - - Leitfähigkeit, blau kontinuierlich UV 220 nm) ...	58
Abb. 4.36 Photo der SDS-PAGE Gel, silbergefärbt. M : Marker	58
Abb. 4.37 GH-I _R Kurve für die axiale Scouting Säule (rosa X) und die CRIO-MD 62 (blau)	60
Abb. 4.38 K-I Kurve für die axiale Scouting Säule und die CRIO-MD 62	60
Abb. 4.39 Graphische Darstellung der LV in Abhängigkeit der Position in der Säule (CRIO-MD 62) für eine Flussrate von 100 ml/min	61
Abb. 4.40 Schematische Darstellung eines Kuchenstückes aus einem hohlen Zylinder	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Bioproducte, die in dessen Produktionsprozesse einen RFCS-Schritt enthalten und Maßstab der RFCS [6]	10
Tab. 2 Allgemeine Spezifikationen der benutzten Radialflusssäulen CRIO-MD 62 und 63	25
Tab. 3 Beschreibung der benutzten Lösung für die Durchführung der Peaksversuchen	31
Tab. 4 Effizienzbestimmung und Asymmetrie für das Packen der CRIO-MD 62 nach der standard Methode	38
Tab. 5 Effizienzbestimmung und Asymmetrie für das Packen der CRIO-MD 62 nach der optimierten Methode	38
Tab. 6 Effizienz und Asymmetrie im Laufe der Konditionierung	41
Tab. 7 Effizienzbestimmung für die Flussumkehrversuchen	48
Tab. 8 Daten der Säulen und Verteilungskoeffizienten	50
Tab. 9 Effizienzbestimmung bei der axialen und der radialen Säule	50
Tab. 10 Retentionsvolumenberechnung für die Stufenelution in normaler Richtung und umgekehrter Richtung	59

1 Ziel und Aufgabenstellung

Die Diplomarbeit besteht aus Untersuchungen zur Aufreinigung von Antikörper mittels Radial Fluss Chromatographie Säule. Es wird zuerst die Packstrategie zur Packung einer Radial Fluss Säule im « recycling mode » optimiert und die Ergebnisse werden mit dem Prototyp einer Axialsäule verglichen.

Die optimalen Parameter zur Capture von Antikörpern aus Zellkulturüberstand mit Kationenaustauschchromatographie werden bestimmt. Die Ergebnissen von der Capture werden ermöglichen, den Prototyp Axialsäule und die Radial Fluss Säule zu vergleichen.

2 Einleitung

2.1 Chromatographie

2.1.1 Allgemein

Die Chromatographie ist ein Trennverfahren, das in der Biotechnologie sehr oft bei der Proteinaufreinigung verwendet wird. Diese Technik ist immer noch die am meisten angewandte Technik zur Aufreinigung in der Pharma- und Biotechnologieindustrie [1]. Sie wird präparative Chromatographie genannt. Sie unterscheidet sich von der analytischen Chromatographie darin, dass die präparative Chromatographie das Ziel hat, eine bestimmte Komponente einer Mischung zu isolieren, während bei der analytischen Chromatographie eher die Konzentration jeder Komponente einer Mischung zu bestimmen ist. Da eine Trennung immer optimiert werden muss, wird die beste Kombination von verschiedenen Faktoren gesucht, z. B:

- Mobile Phase
- Stationäre Phase
- Detektionsmethoden
- Volumenstrom
- pH
- Temperatur
- Gradienten (pH, Lösungsmittel, Salzkonzentration, usw...)
- Säulendurchmesser
- Pumpe, usw ...

Die Moleküle können dank ihrer Ladung, Grösse, Hydrophobizität oder Affinität zur stationären Phase getrennt werden. Die verschiedenen Arten von flüssigen Chromatographie sind:

- | | |
|---|-----------------|
| - Ionenaustauschchromatographie (IEC) | Ladung |
| - Reversed-Phase Chromatographie | Hydrophobizität |
| - Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) | Hydrophobizität |
| - Affinitätschromatographie (AC) | Affinität |
| - Ausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography SEC) | Grösse, Form |

Bei Wechselwirkungen zwischen der Probenmoleküle und der stationäre Phase ist das Trennverfahren in unterschiedlichen Phasen eingeteilt. Diese sind:

- Äquilibrierung der Säule
- Auftragen der Probe
- Spülen der nicht-bindenden Molekülen
- Gradient oder Step Elution der Zielmoleküle
- Regenerieren der stationären Phase ^[2]

Die Ionenaustauschchromatographie ist die am häufigsten angewendete Trennmethode und wird oft als erster Schritt des Reinigungsprozesses eingesetzt.

2.1.2 Radialflusschromatographie Säule

Axialflusschromatographiesäulen (AFCS) werden meistens zur Proteinaufreinigung benutzt. Die Probe wird am Eingang (oben) der Säule aufgetragen und wird während der axialen Wanderung durch die Höhe des Betts getrennt. Der allgemeine Packvorgang bei einer Axialsäule besteht in der Übertragung der Partikeln (z. B. Slurry) in die Säule und die Senkung eines Stempels. Dieses Piston ermöglicht das Totvolumen am Eingang zu entfernen und eine bestimmte Gelkompression zu erreichen. Bei dem Scale-up muss ein Kompromiss zwischen einer Erhöhung des Durchmessers und der Betthöhe gefunden werden [3].



Abb. 2.1 Flussrichtung bei Axialflusssäulen (links) und Radialflusssäulen (rechts) ^[4]

Bei den Radialflusschromatographiesäulen (RFCS) wird die Probe am Inlet aufgetragen und fließt radialerwise bis zum Outlet (Mitte der Säule). Der Abstand zwischen dem äußeren und dem inneren Zylinder ist die Trennstrecke. Der Packvorgang bei RFS ist normalerweise schneller und kann unter saubereren Bedingungen durchgeführt werden als bei Axialsäulen. Da die Eingangsfläche groß ist und die Trennstrecke kurz ist, sind die Radialflusssäulen (RFS) eher für Adsorptionschromatographie, wie IEC, AC, HIC oder irgendwelche Adsorptions-Desorptions Prozesse geeignet. Es hat zur Folge, dass der Säulendruckabfall niedrig ist und dass die Flussraten oft bis 1 oder 2 Säulenvolumen pro Minute gehen können. Es ermöglicht den Prozess zu verkürzen und dadurch es rentabler zu sein. Die Produkte in verdünnten Lösungen sind mittels RFCS oft besser abgeschlossen [3] und in den Biotechnologieprozessen sind oft die Produktkonzentrationen sehr niedrig. Dank des niedrigen Druckabfalls sind RFCS für Soft Gels oder Affinitätsmatrixmaterialien gut geeignet, denn es verhindert die Kompression des Bettes [6]. Außerdem eine RFCS hat eine kleinere Grundfläche als die von Volumen und Eingangsfläche entsprechende AFCS. In dem Produktionsmaßstab spielt es eine wichtige Rolle.

Der Vergleich zwischen Leistung einer axialen und einer radialen Säule der Firma Proxcys wurde bei Cabanne *et al.* untersucht. Die beiden Säulen hatten einen Trennweg von 6 cm und einen Volumen von 120 ml. Sie haben gezeigt, dass die RFCS eine bessere Effizienz hat [5].

Die untenstehende Tabelle stellt einige Anwendungen der RFCS in der Industrie dar.

Tab. 1 Bioprodukte, die in dessen Produktionsprozesse einen RFCS-Schritt enthalten und Maßstab der RFCS [6]

Produkt	Maßstab
Monoklonal and polyklonal Antikörper	nicht bekannt
Interleukine	10 L
Interferone	350 L
Rekombinantes Albumin	100 L
Diagnostische Enzyme, Restriktionsenzyme	nicht bekannt
Vakzine (Hepatitis B, etc.)	5 L
Menschliche Wachstumsfaktoren (Biotropin, Somatotropin)	100 L
Wachstumsfaktoren	50 L

Die RFCS ist heutzutage in vielen erfolgreichen Produktionsprozessen bei unterschiedlichen Maßstäben integriert. Die RFCS wurden aber ursprünglich für katalytische Reaktionen zwischen gasförmiger mobilen Phase und fester stationärer Phase entwickelt. Nach weiteren Entwicklungen von Firmen wie CUNO und Sepragen wurden die RFCS für die Aufreinigung Produkte aus der Biotechnologie Industrie angewendet [7].

Das Scale-up bei RFCS besteht darin, die Trennstrecke konstant zu halten und nur die Säulenhöhe zu vergrößern. Als Labormaßstab gibt es Radialsäulen sowie ein Kuchenstück, das z. B. 13° (für die CRIO-MD 62 und 63) einer ganzen Säule entspricht [3]. CRIO-MD steht für Column Radial InOxidable-Method Development. Diese kuchenstückartige Ausschnitte der CRIO Prozesssäulen ermöglichen die Optimierung und Entwicklung des Packvorgangs und Aufreinigungsprozesse zu entwickeln und sind, laut des Herstellers, in deren Funktion, Trennstrecke und Hydrodynamik repräsentativ einer „full-size“ Säule [8]

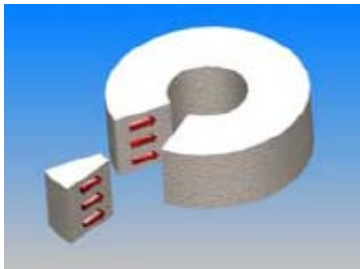


Abb. 2.2 Labormaßstabsäulen [4]

Der Hauptnachteil der RFCS ist die niedrige Auflösung, die durch die kurze Trennstrecke verursacht wird. Deswegen sind auch RFCS nicht für Analysen oder für Prozesse die hohe Auflösung erfordern geeignet [7].

2.1.3 Berechnung der linearen Geschwindigkeit bei Radialflusssäulen

Durch die spezielle Konfiguration der radialen (Kuchenstück) Säule, müssen einige Parameter berücksichtigt werden. Das Volumen der Säule variiert nicht in linearer Weise mit der Position auf dem Trennweg, es impliziert die Änderung der Fläche und daher der linearen Geschwindigkeit. Die nächste Abbildung zeigt an, wie das Volumen mit der Position in der Trennstrecke variiert.

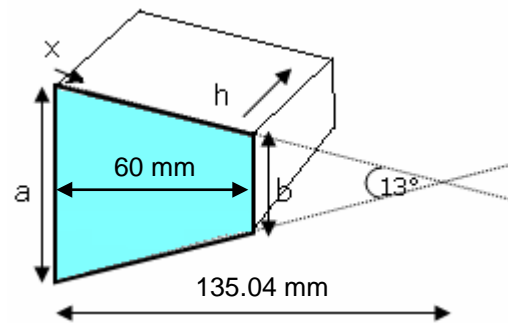
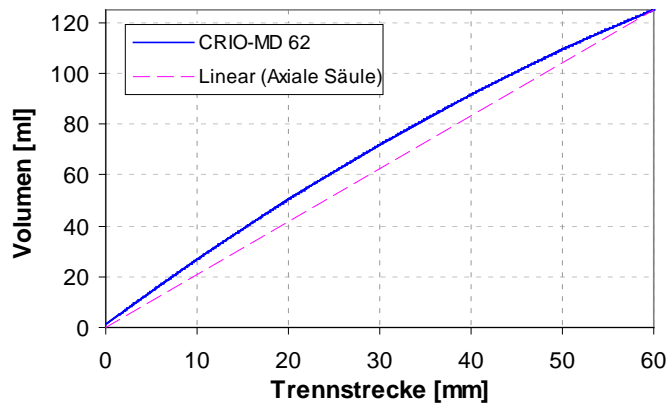


Abb. 2.3 Graphische Darstellung des Volumens in Abhängigkeit von der Trennstrecke bei der CRIO-MD 62
Abb. 2.4 Schematische Darstellung der CRIO-MD 62 mit Angabe der nötigen Daten für die Berechnung des Volumens [9]

Mittels einer polynomialen Regression kann die Gleichung, die das Volumen der Säule mit der Trennstrecke in Zusammenhang stellt gefunden werden. Die Gleichung, die das Volumen der Säule bei jeder Position (x) in der Trennstrecke angibt, lautet folgendermaßen:

$$V = \left(\frac{1}{2} \cdot a \cdot h \cdot 135.04 \text{ mm} \right) - \left\{ \frac{1}{2} \cdot [b + 2 \cdot [\sin(\alpha/2) \cdot [(\cos(\alpha/2) \cdot 60 \text{ mm}) - x]] \cdot h \cdot [135.04 \text{ mm} - (\cos(\alpha/2) \cdot x)] \right\} \quad (2.1) [9]$$

wobei:

- a : Eingangsfrittenbreite = 30.8 mm
- b : Ausgangsfrittenbreite = 17.1 mm
- x : Position in der Trennstrecke [mm]
- h : Höhe der Säule = 87 mm
- α : Winkel $13^\circ = 0.227$ radians
- V : Volumen bei jeder Position in der Säule [mm³]

Laut des Herstellers (Proxcys) wird die lineare Geschwindigkeit der Säule in folgender Weise berechnet. Diese Berechnung gilt für eine Säule mit einer Trennstrecke von 18 cm, kann aber auch für andere Längen verwendet werden.

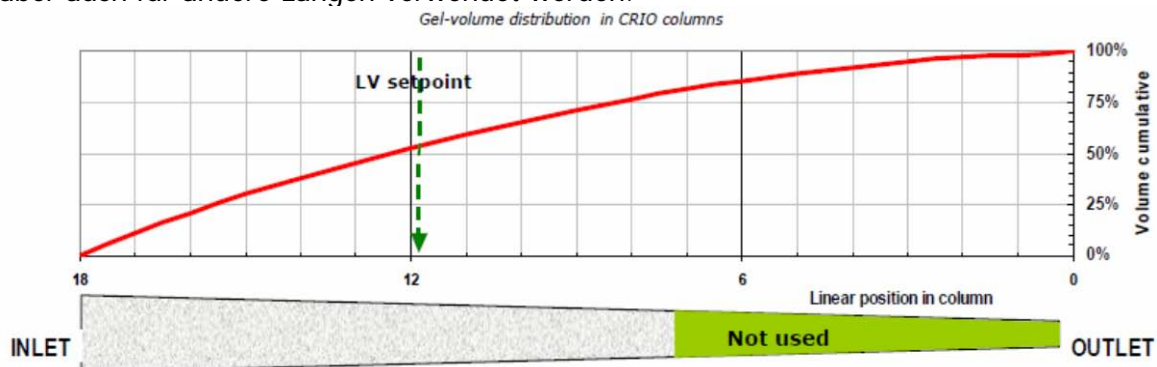


Abb. 2.5 Schematische Darstellung der linearen Geschwindigkeit zur Bestimmung des Sollwertes bei einer radialen Säule mit 18 cm Trennweg mit einem Seitenverhältnis von 2:1 [4]

Bei 50 % des Volumens befindet man sich bei einem Drittel der radialen Achse (Trennweg), denn die Verteilung des Volumens verändert sich nicht linear mit der Position auf der radialen Achse.

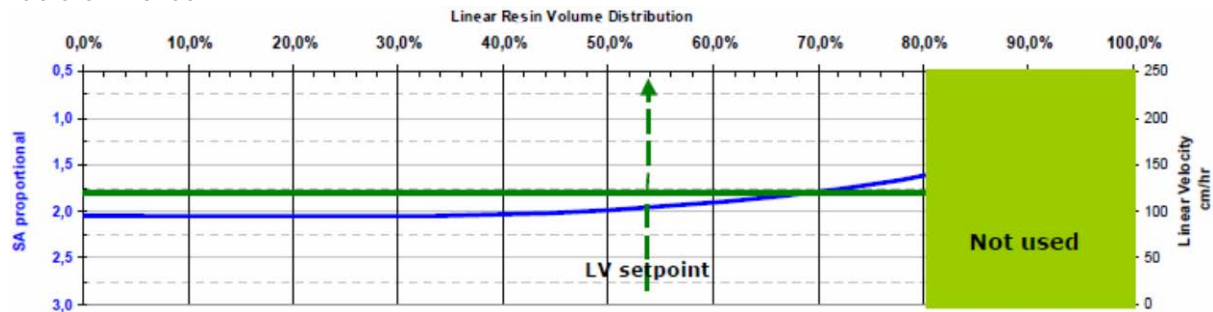


Abb. 2.6 Schematische Darstellung der linearen Geschwindigkeit in einer 18 cm Säule mit einem Seitenverhältnis von 2:1 (blau). Die grüne konstante Linie ist der Mittelwert der linearen Geschwindigkeit über dem ganzen Gelbett [4]

Die Mittelwertlinie und die linearen Geschwindigkeit kreuzen sich bei 70 % des Volumens. Ab diesen Punkt steigt die LV drastisch an, was auch kein Problem ist, weil in den meisten Fällen in der Pharmaindustrie die letzten 20 % der Säule aus Sicherheitsgründen nicht benutzt werden. Dies vermeidet einen Verlust an Produkt. Daher wird dieser Punkt zu 55 % verschoben, wenn nur 80 % der Säule benutzt werden. Diese 55 % entsprechen einer durchströmten Fläche von 85 % der Eingangsfläche. Bei den ersten 70 % des Volumens ist die LV niedriger als bei einer entsprechenden axialen Säule, was vorteilhaft für die Bindungskinetik ist [5].

Vorherige Untersuchungen wurden mit der CRIO-MD 62 und die XK 50 (axiale Säule) durchgeführt. Der Punkt, der gleicher linearen Geschwindigkeit war bei 67 % des Volumens, dies entspricht 73 % der Eingangsfläche. Um einen Sicherheitsfaktor mit einzubeziehen wurde die LV bei 79 % bestimmt. Bei jedem Vergleich zwischen axialer und radialer Säule soll der Punkt gleicher LV bestimmt werden [9]. Da diese Diplomarbeit die Fortsetzung dieser Arbeit ist, wird die LV auch bei 79 % der Eingangsfläche bestimmt.

Die volumetrische Flussrate wird wie folgend berechnet:

$$Q = \frac{LV \cdot A_{79\%}}{60} \quad (2.2)$$

Q : volumetrische Flussrate [ml/min]

LV: lineare Fliessgeschwindigkeit [cm/h]

$A_{79\%}$: 79 % der Eingangsfläche [cm²]

2.1.4 Das Packen der RFCS

Eine Säule packen heißt eine Säule mit stationärer Phase möglichst homogen zu befüllen. Bei axialen Säulen wird das Gelmaterial in die Säule gepackt und mittels oberes Adapter zur gewünschten Kompression gebracht. Eine andere Möglichkeit existiert und besteht darin, das Slurry in die Säule zu pumpen, entweder bei konstanter Flussrate oder konstantem Druck. Dort wird der obere Adapter benutzt, um das Gel zu komprimieren. Im Gegenteil zur axialen Säulen besitzen die radialen Säulen keinen Adapter, diese sind „fixed-bed“ Säulen genannt. Die gewünschte Kompression wird daher von der Packgeschwindigkeit oder von der Slurrykonzentration erreicht [8].

Die Packtechnik ist bei RFCS ziemlich einfach im Vergleich zur AFCS [3]. Die nächste Abbildung zeigt an, schematisch, wie das Gel während des Packprozesses auf der Inlet Seite sedimentiert.

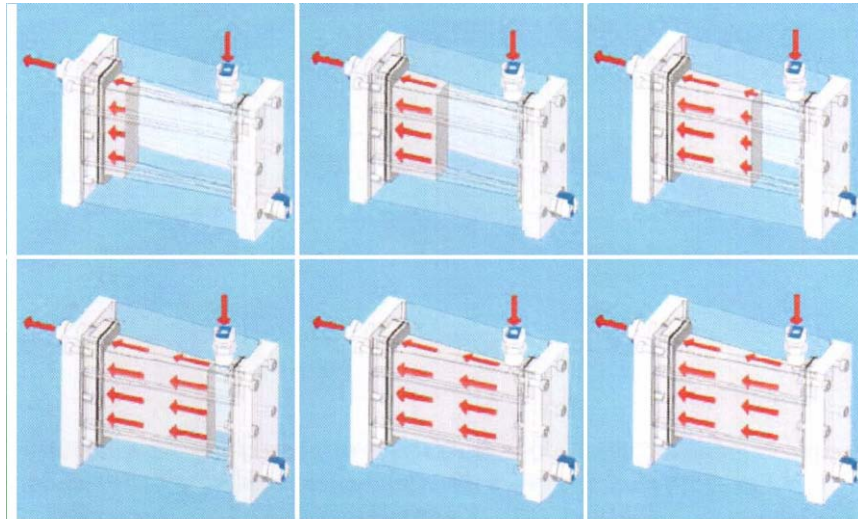


Abb. 2.7 Schematische Darstellung des sedimentierten Gels während des Packvorgangs (von links nach rechts)[9]

Die stationäre Phase, die als Slurry, Suspension von Gelpartikeln in der Packlösung vorbereitet ist, ist durch den Packanschluss bei einem bestimmten Fluss in die Säule eingeleitet. Die Gelpartikeln sedimentieren an der Wand der großen Fritte und die Flüssigkeit fließt durch die Fritte heraus. Diese kann entweder zurück in den Vorlagetank oder in einen anderen Behälter geführt werden. Dadurch wird zwischen „Single Pass“ und „Recycling“ Methode unterschiedet.

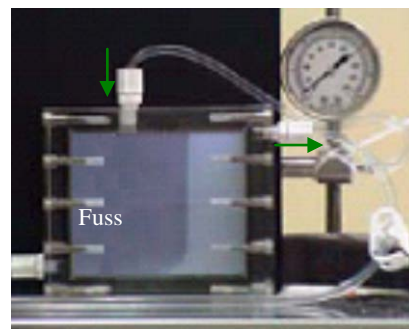
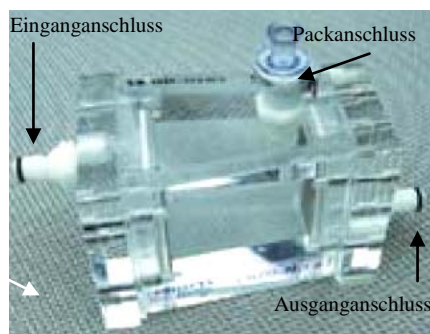


Abb. 2.8 Photo der CRIO-MD 62 und einer Packanlage [4]

Bei schnell sedimentierten Gels ist beim Packvorgang die Bildung eines Fußes zu sehen. Laut des Herstellers stört es die Qualität der Packung nicht.

Die Kompression wird mittels folgender Formel berechnet:

$$K = \left(\frac{V_{\text{sed}}}{V_{\text{Säule}}} \cdot 100\% \right) - 100\% \quad (2.3)$$

K = Kompression [%]

V_{sed} = sedimentiertes Gelvolumen [ml]

$V_{\text{säule}}$ = Volumen der Säule [ml]

Die volumetrische Flussrate während des Packens wird mittels Gleichung(2.2) berechnet.

Die Flussrate und die Slurrykonzentration haben einen Einfluss auf die Kompression und die Dichte des Gelbetts. Die Packlösung muss in der Theorie eine entweder höhere oder gleiche starke Ionenstärke haben, als die höchst Ionenstärke der Prozesspuffer. Dies stellt sicher, dass das Gel unter höchst komprimierter Form gepackt ist. Es vermeidet, Spalt in der Packung zu bekommen [3]. Je höher ist die Viskosität des Packpuffers oder die Packgeschwindigkeit, desto kompakter werden die Gelpartikeln komprimiert. Die Kompression kann von vielen Faktoren beeinflusst werden, aber allgemein gilt, dass je länger ist die Packdauer, umso dichter wird das aufgebaute Gelbett. [9]

2.1.5 Auswertung der Qualität einer Packung

Die Qualität einer Packung kann mithilfe des HETP-Wertes (height equivalent to a theoretical plate), Number of Plates oder Number of Plates per Meter angewandt dargestellt werden. Der Zusammenhang zwischen Bodenhöhe (HETP) und Bodenzahl (N) ist mit folgender Gleichung zu berechnen.

$$H = \frac{L}{N} \quad (2.4)$$

H: Bodenhöhe [cm]

L: Länge der Trennstrecke [cm]

N: Bodenzahl

Der Zusammenhang zwischen Bodenhöhe und lineare Fliessgeschwindigkeit u ist von der Van Deemter Gleichung beschrieben. Diese gibt die Höhe eines theoretischen Trennungsboden in Abhängigkeit der durchschnittlichen Geschwindigkeit der mobilen Phase an.

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (2.5)$$

A = $2\lambda d_p$ [cm] : Eddy Diffusion

B = $2\gamma D_G$ [cm²/s] : longitudinale Diffusion

C : Massentransfereffekte [s]

u: lineare Geschwindigkeit [cm/h]

Der Faktor A beschreibt den Einfluss der Säulenpackung auf die Peakverbreiterung. Die Grösse der Partikeln d_p , ihre Verteilung und die Regelmäßigkeit der Packung λ sind

verantwortlich für bevorzugte Wege und führen zu höhere Werte. A ist für eine vorgegebene Säule konstant. Der Faktor B steht für die Diffusion der Probenmoleküle in der mobilen Phase D_G im Verlauf der Trennstrecke und Gewundenheit γ . Der Faktor C beschreibt die Wechselwirkungen der Probenmoleküle mit der stationären Phase (Massentransfereffekte). C wird durch den Massentransferwiderstand zwischen mobiler und stationärer Phase verursacht. Die flüssige Chromatographie wird durch den Faktor C beherrscht [2]. Bei der Arbeit mit großen Molekülen so wie Proteinen ist die longitudinale Diffusion niedrig, aber der Massentransferwiderstand hoch. Es muss daher versucht werden diesen Widerstand zu erniedrigen.

Der Einfluss jeden Elementes der Gleichung ist untenstehend graphisch dargestellt.

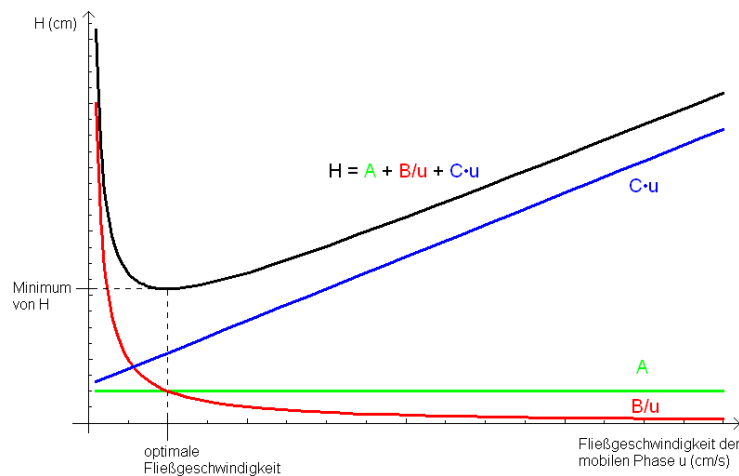


Abb. 2.9 Zusammenhang zwischen Bodenhöhe (H) und lineare Fließgeschwindigkeit u [10]

H ist die Summe der drei Kurven. Das Minimum der Kurve entspricht der optimalen linearen Geschwindigkeit für ein bestimmtes System. Die Herausforderung ist, ein Kompromiss zwischen Effizienz und Produktivität zu finden. Höhere Flussrate ermöglicht höhere Produktivität aber weniger Effizienz und mehr Druckabfall über das Gelbett. Der Druckabfall ist mittels der Darcy Gleichung ausgedrückt:

$$\Delta P = \Phi \frac{\eta L u}{d_p^2} \quad (2.6)$$

- ΔP : Druckabfall [Pa]
- Φ : Fliesswiderstandskonstant [-]
- η : Viskosität der mobilen Phase [Pa·s]
- L : Länge des Gelbettes [m]
- u : Lineare Geschwindigkeit [m/s]
- d_p : Partikeldurchmesser [m]

Diese Gleichung kann nur für axiale Säulen benutzt werden, denn dort ändert sich lineare Geschwindigkeit nicht.

Praktischerweise kann HETP bzw. N mittels Retentionszeit bzw. Retentionsvolumen und Breite des Peaks berechnet werden. Wenn der Peak symmetrisch ist kann die klassische Formel angewendet werden:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma_t} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_{R,i}}{w_i} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_{R,i}}{w_{1/2,i}} \right)^2 \quad (2.7)$$

t_R : Retentionszeit (min oder ml)
 w_i : Peakbreite (Basis) (min oder ml)
 $w_{1/2,i}$: Peakbreite auf halber Höhe (min oder ml)

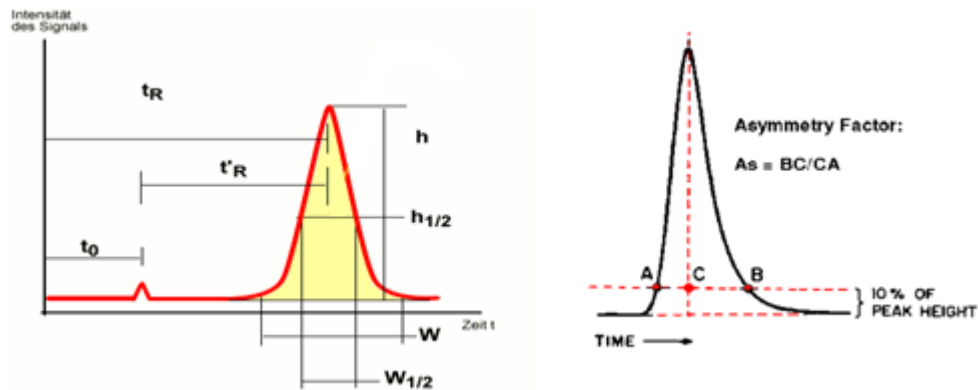


Abb. 2.10 Schematische Darstellungen eines Chromatogramms mit Beschriftungen zur Bodenzahl- [11] und Asymmetriebestimmung [12]

Die Peaks zeigen normalerweise eine Asymmetrie. Es wird als „Fronting“ beschrieben wenn der Asymmetriekoeffizient A kleiner als 1 ist und „Tailing“ wenn es größer als 1 ist.

Die Asymmetrie A ist wie folgt berechnet: $A = \frac{BC}{AC}$ (2.8)

Da die meisten Peaks nicht symmetrisch sind kann die Gleichung 2.6 nicht verwendet werden. Die unsymmetrischen Peaks können aber mit der Berechnung der Momente ausgewertet werden. Diese Methode ist immer anwendbar und erfordert keine Annahme über die Form des Peaks.

Der 1. Moment μ_1 ist der Schwerpunkt des Peaks und entspricht der Retentionszeit für einen gaussischen Peak. Der 2. Moment μ_2 ist die Varianz σ^2 des Peaks. Die Bodenzahlberechnung lautet wie folgend:

$$N = \frac{\mu_1^2}{\mu_2} = \frac{t_R^2}{\sigma^2} \quad (2.9)$$

Die allgemeine Gleichung für die Bestimmung von Momenten höher als 2 lautet wie folgend:

$$\mu_i = \frac{1}{\mu_0} \int_0^\infty C(t) \cdot (t - \mu_1)^i dt \quad (2.10)$$

mit $i \geq 2$

Der 3. Moment ermöglicht es den Asymmetriekoeffizienten (Skewness) zu berechnen und der 4. Moment die Steilheitskonstant (Excess or kurtosis) eines Peaks [13]. Der Excess ist

ein Wert der Abweichung der gemessenen Kurve zur normalen gaussische Kurve, dieser Werten kann auch durch σ/τ (Peakbreite d/Asymmetrie e, siehe nächste Gleichung) ausgedrückt werden [14]. Nur der 1. und 2. Moment werden aber für die Auswertungen der Peaks angewendet. Die Berechnung des 1. und 2. Moments erfordert die Anwendung geeigneter Software. Die Peaks können mittels eine EMG-Fit Funktion (Exponentially modified Gaussian, 8165 in TableCurve 2D) ausgewertet werden. Diese Funktion lautet:

$$y = a + bd(2\pi)^{0.5} e^{\frac{d^2}{2e^2} + \frac{(c-x)}{e}} \frac{\text{erf}\left(\frac{c-x}{2^{0.5}d} + \frac{d}{2^{0.5}e}\right) - \frac{e}{|e|}}{-2e} \quad (2.11)$$

Das Programm TableCurve2D ermöglicht die Modellierung des experimentellen Peaks mittels einer Funktion mit 5 Parametern, die vom Programm berechnet sind:

- a = Basislinieverschiebung
- b = Amplitude
- c = Schwerpunkt des Peaks
- d = Breite des Peaks
- e = Asymmetrie bezogenen Wert

Die Werte können also benutzt werden, um den 1. und 2. Moment zu berechnen.

$$\mu_1 = c + e \quad (2.12)$$

$$\mu_2 = d^2 + e^2 \quad (2.13)$$

Die Bodenzahlberechnung erfolgt nach Gleichung (2.7)

Von dem 1. bzw 2. Moment des Peaks können noch die entsprechenden Momenten der ohne Säule erhaltenen Peaks abgezogen werden, um eine genauere Schätzung der Effizienz der Packung zu erreichen.

$$N = \frac{\mu_{1,\text{mitSäule}}^2 - \mu_{1,\text{ohneSäule}}^2}{\mu_{2,\text{mitSäule}} - \mu_{2,\text{ohneSäule}}} \quad (2.14)$$

Es ermittelt die Effizienz nur von der Packung, die getrennt analysieren werden kann. Mit axialen Säulen muss der Versuch ohne Säule mit einem Zwischenadapter durchgeführt werden, um deren Effekt auch abziehen zu können. Mit der Radialsäule kann das leider nicht gemacht werden. Der Versuch ohne Säule kann daher nur mit den benutzten Schläuchen durchgeführt werden. Der Effekt vom Verteilersystem und von den Fritten kann dann nicht abgezogen werden.

2.2 Entwicklung einer Stufenelution bei der IEC

2.2.1 Ionenaustausch Chromatographie

Die präparative Ionenaustauschchromatographie ist eine Technik zum Abtrennen von Biomolekülen, die auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladener stationärer Phase und geladenen Molekülen in der mobilen Phase beruht. Es ist ein Adsorptions/Desorptions Prozess, der auf dem Gleichgewicht der Konzentration der Zielmoleküle in der mobilen und stationären Phase beruht. Die Gleichgewichtsreaktion lautet:



wobei C_o und C_b für die Proteinkonzentration [M] in der stationären Phase bzw. gebundenes Protein steht, und I_o und I_b für die Konzentration des freien bzw. gebundenen Salzes [M] steht und Z für die Anzahl an Ionen die während des Adsorptionsprozesses verschoben wurden steht [15].

Als Folge der oben genannten Gleichung erhält man die Gleichgewichtskonstante K_{eq} :

$$K_{eq} = \frac{[C_b] \cdot [I_o]^Z}{[C_o] \cdot [I_b]^Z} \quad (2.16)$$

Der Verteilungskoeffizient K beschreibt das Verhältnis zwischen der Konzentration des gebundenen Proteins und der Konzentration des Proteins in der mobilen Phase. Die ionischen Kapazität Λ gilt:

$$\Lambda = I_b + ZC_b \quad (2.17)$$

Bei geringer Proteinkonzentration, wie oft in Aufreinigungsprozessen gilt Λ als I_b . Bei dem Zusammenschließen von (2.15) und (2.16) erhält man die folgende Gleichung [16]:

$$K = \frac{C_b}{C_o} = K_{eq} \left(\frac{I_o}{I_b} \right)^{-Z} = K_{eq} \cdot \Lambda^Z \cdot I_o^{-Z} \quad (2.18)$$

Diese Gleichung setzt den Verteilungskoeffizient des Proteins mit der Konzentration des Salzes in der mobilen Phase in Verbindung. Diese Beziehung kann in der Praxis gefunden werden und ermöglicht das Design einer Stufenelution.

2.2.2 Lineares Gradienten Elutions Modell

Das Lineare Gradienten Elutions Modell ermöglicht es, die Beziehung zwischen Verteilungskoeffizient und Ionenstärke zu finden. Dafür werden verschiedene Gradienten durchgeführt. Die anderen Bedingungen werden für alle Versuche gleich gehalten. Der pH-Wert muss während des Versuches konstant bleiben.

Die normierte Steigung des Gradienten wird mit folgender Gleichung berechnet:

$$GH = (gV_o) \left(\frac{V_c - V_o}{V_o} \right) = g(V_c - V_o) \quad (2.19)$$

V_c = Säulenvolumen [ml]

V_o = Zwischenkornvolumen [ml]

$G = gV_o$ [M]

$H = (V_t - V_o)/V_o$ = Phasenverhältnis [-]

GH = normierte Gradientensteigung [M]

$$g = \frac{I_F - I_0}{V_g} \quad (2.20)$$

I_F = Salzkonzentration am Ende des Gradienten [M]

I_0 = Salzkonzentration am Anfang des Gradienten [M]

V_g = Gradientenvolumen [ml]

g = Gradientensteigung [M/ml]

Jeder Gradienten entspricht eine Salzkonzentration I_R beim Retentionsvolumen eines bestimmten Peaks. Beim Peak Maximum (R_T) wird die entsprechende Leitfähigkeit abgelesen.

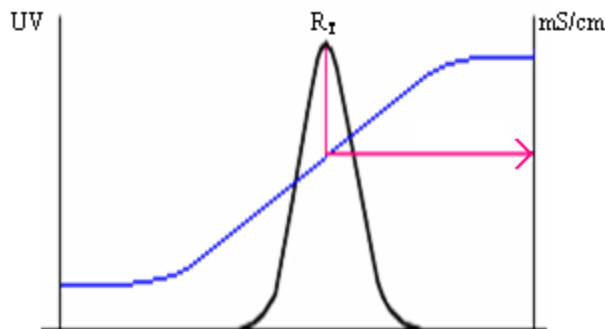


Abb. 2.11 Schematische Darstellung einer Gradientenelutionsprofil (blau : Leitfähigkeit, schwarz, UV Signal, rosa : Ablesen der Leitfähigkeit)

Die normalisierte Steigungen GH ist Funktion der Salzkonzentration I_R .

$$GH = \frac{I_R^{(B+1)}}{[A(B+1)]} \quad (2.21)$$

$$A = K_{eq} \cdot \Lambda^Z$$

$$B = Z \quad (2.15)$$

Die Beziehung zwischen GH und I_R hängt nicht von der Flussrate ab und auch nicht von der Größe der Säule [17]. Durch die Linearisierung der Gleichung (2.21) können die Parameter A und B gefunden werden. Die linearisierte Gleichung lautet wie folgend:

$$\log(\text{GH}) = (B + 1) \cdot \log(I_R) - \log[A(B + 1)] \quad (2.22)$$

Mittels der Steigung der Gerade kann der Parameter B berechnet werden: Steigung = B+1
Der Parameter A kann mittels des y-Achsenabschnitts berechnet werden: $y = -\log[A(B + 1)]$

Die A und B Parameter ermöglichen die K-I Kurve zu zeichnen. Die K-I Kurve ist mittels untenstehender Gleichung graphisch gebracht:

$$K = A \cdot I_R^{-B} + K' \quad (2.23)$$

wobei K [-] der Proteinverteilungskoeffizient ist, K' [-] der Salzverteilungskoeffizient. Für jeden Peak eines Chromatogramms ist diese Analyse durchzuführen, um eine Stufenelution zu entwickeln. Auf der Basis der K-I Kurve jeder Substanz können die Stufen ausgewählt werden. Ein Verteilungskoeffizient von $K < 1$ bedeutet eine Stufenelution Typ I, es heißt, dass das Protein mit dem Salzfront zusammen eluiert. Eine Stufenelution Typ II findet statt, wenn der K zwischen 1 und 7 ist [18]. Bei einem K von > 10 kann gesagt werden, dass das Protein an der stationären Phase binden bleibt. Die Stufen müssen daher so gewählt werden, dass bei jeder Stufe nur ein Protein eluiert. Dafür muss eine Ionenstärke gefunden werden, bei der der Unterschied zwischen den Verteilungskoeffizienten der betroffenen Proteine groß genug ist.

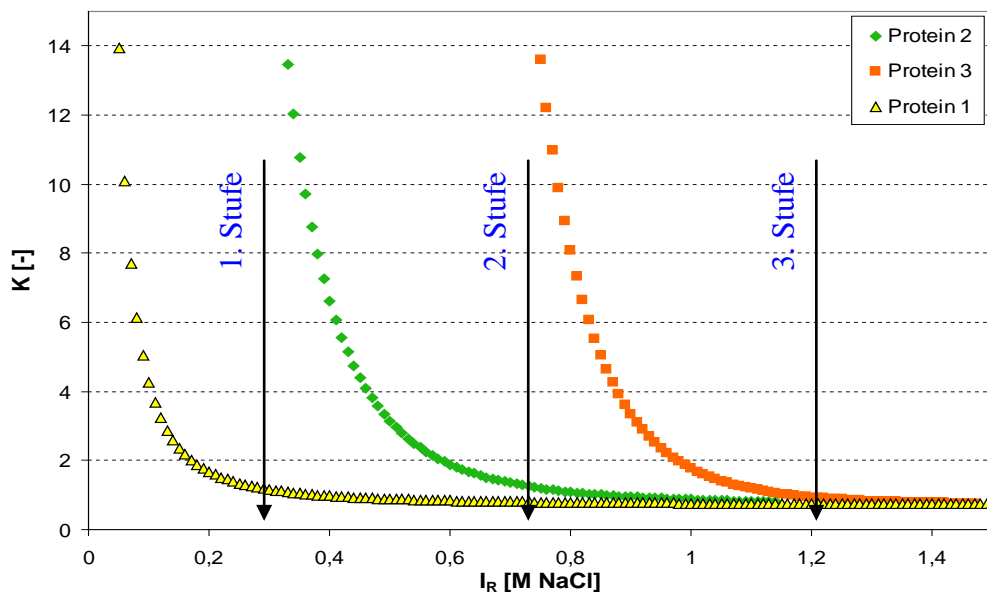


Abb. 2.12 K-I Plot von 3 Proteinen mit Stufendesign als Beispiel

Als Beispiel könnte die 1. Stufe bei 0.3 M, die 2. Stufe bei 0.72 M und die 3. Stufe bei 1.2 M NaCl sein.

Eine Änderung des B-Wertes, beziehungsweise der Steigung der GH- I_R Kurve wird die K-I Kurve nach rechts oder links verschieben ohne ihr Aussehen zu beeinflussen. Die Steilheit der K-I Kurve hingegen ist von A und B beeinflusst.

Der Wert K' muss experimentell bestimmt werden. Die Formel (2.23) kann auch mit K_{crit} anstatt K' benutzt werden. K_{crit} entspricht dem dem Protein zugänglichen Retentionsvolumen in der Säule.

Aus den K-I Kurven kann die Retentionszeit bzw. Retentionsvolumen berechnet werden. Die Gleichung lautet:

$$t_R = [(I_R - I_0)/G + (1 + HK') \cdot (L/u)] \quad (2.24) [18]$$

$$V_R = V_0 + (V_c - V_0)K = V_0(1 + HK) \quad (2.25) [16]$$

wobei L die Länge der Trennstrecke und u die lineare Geschwindigkeit. Für einen ausgewählten Verteilungskoeffizient kann das Retentionsvolumen V_R [ml] über die Säule für eine isokratische Elution bestimmt werden. Diese Gleichung können auch für eine Stufenelution benutzt werden, bei einer Typ II Elution.

2.2.3 Optimierung einer Linearen Gradienten Elution

Es wurde gezeigt, dass die Auflösung in einer LGE von Proteinen ist proportional zu einem dimensionslosen Parameter, O . Die Steigung des Gradienten, die Länge der Trennstrecke oder die Flussrate können geändert werden und die gleiche Auflösung wird erreicht, sobald dieser Parameter konstant gehalten ist. Die Gleichung läuft wie folgt:

$$O = \left(\frac{L \cdot I_a}{G \cdot (HETP_{LGE})} \right) \propto R_s^2 \quad (2.26)$$

mit $HETP_{LGE}$ = Die äquivalente Höhe eines theoretischen Bodens bei einer LGE [cm]
 I_a = dimensionale Konstante [M] = 1

Die Effizienz bei einer LGE kann nicht berechnet werden, wie die Effizienz bei einer isokratischen Elution. Die Formel lautet:

$$HETP_{LGE} = \frac{L}{\left(\frac{w_{LGE}}{w_{iso}} \right)^2} \cdot \left[\frac{(w_{LGE}/4)}{V_{R,LGE}} \right]^2 \quad (2.27)$$

mit w_{LGE} = Basispeakbreite des Peaks bei der LGE [ml]
 w_{iso} = Basispeakbreite des Peaks bei der isokratischen Elution [ml]
 $V_{R,LGE}$ = Retentionsvolumen bei der LGE [ml]

Bei einem konstanten O -Wert soll die Chromatogramme gleich aussehen.

2.3 EGFP-R₈C

Die EGFP (E steht für enhanced) besteht aus einem Monomer und wurde aus dem Green Fluorescent Protein (GFP) entwickelt, das in der Molekular- oder Zellbiologie häufig benutzt wird. Sein Vorteil ist es zu fluoreszieren ohne dass eine chemische Substanz hinzugesetzt werden muss. Es wurde ursprünglich aus einer Qualle, *Aequorea victoria*, isoliert.

Das EGFP-R₈C ist in E. Coli BL21 aus dem Plasmid pET21bEGFP-R₈C exprimiert. Die Proteinexpression wird durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Dieses Protein besitzt einen positiven geladenen Tag, der aus 8 Arginin (R₈) und eine Cystein (C) besteht. Das Protein besitzt insgesamt 4 Cysteine und besteht aus 254 Aminosäuren. Sein Molekulargewicht ist 28750 kDa. Der berechnete pI ist 7.15. Diese Werten wurden beim Eintragen der Proteinsequenz in ExPASy ProtParam tool von der Webseite: www.expasy.org/cgi-bin/protparam gefunden.

Die EGFP-R₈C kann durch ein Fluoreszenzphotometer gut detektiert werden. Bei 280 nm ist sie kaum detektierbar.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Gelmaterial

- Fractogel EMD SO_3^- (M), Cat. No. 1.16882, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Fractogel SO_3^- ist ein starker Kationenaustauscher bestehend aus einem synthetischen polymethylacrylatharz, das eine mittlere Porengrösse von 800 \AA besitzt. Die Polymerketten können mit Tentakel verglichen werden, auf denen die SO_3^- Gruppe gebunden ist. Es besitzt den Vorteil, dass keine sterische Hinderung, auch für Biomoleküle nicht auftritt. Das Fractogel EMD SO_3^- besitzt folgende Eigenschaften:

Partikelgrösse : 40 – 90 μm
pH Bereich: $1 < \text{pH} < 13$
Druckgrenze : 8 bar
Lineare Flussrate : $> 800 \text{ cm/h}$
Lagerung : 150 mM NaCl + 20 % Ethanol
Regenerierung : 1 – 2 M NaCl
Sanitization : 0.1 – 0.5 M NaOH

3.1.2 Lösungen

Die Lösungen, die in Kontakt mit dem Gelmaterial kommen werden mit VE-Wasser (Millipore Anlage) vorbereitet, durch einen 0.22 μm Filter abfiltriert und im Ultraschallbad für 20 Minuten entgast.

Allgemeine Lösungen

- VE-Wasser
- Lagerlösung: 150 mM NaCl + 20 % Ethanol (unvergällt)
- Reinigungslösung: NaOH 0.5 M

Effizienzbestimmung

- Packlösung: 1 M NaCl
- Lagerlösung für die Anlagen: 20 % Ethanol (vergällt)
- VE-Wasser aus der Millipore Anlage
- 1 M NaCl
- 1 % Aceton, nur entgast
- Dextranblaulösung für die Flussvisualisierung, je nach Farbe, damit der Fluss beim Puls genügend sichtbar ist, in VE-Wasser entgast lösen
- Dextranblaulösung 1 mg/ml
- Natriumphosphatpuffer (NaP) 50 mM, 500 mM, pH 7

EGFP Aufreinigung

- Zellaufschlusspuffer pH 7.7 : Tris 50 mM + NaCl 150 mM + EDTA 1mM + Glycerol 5%
- Benzonase[®] endonuclease [21], Merck KGaA, Darmstadt --> 250 U/ μl Lösung

- NaH_2PO_4 500 mM
- Puffer A pH 5.8 : NaP 50 mM + NaCl 50 mM + EDTA 1 mM + Glycerol 5%
- Puffer B pH 5.8 : NaP 50 mM + NaCl 2 M + EDTA 1 mM + Glycerol 5%
- Reduktion : TCEP HCl (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride) 0.5 M, pH 6.7

Die Puffer A (20 L) und B (15 L) die für die Versuche mit der CRIO-MD 62 gemacht wurden, wurden filtriert aber nicht entgast.

Lysozym LGE

- Puffer A pH 6.8: NaP 50 mM
- Puffer B pH 6.8: NaP 50 mM + 1 M NaCl
- Lysozym 1 mg/ml , in Puffer A gelöst (nicht filtriert, nicht entgast)

SDS PAGE [22]

Gel

- 10%-ige SDS-Lösung
- Sammelgel Stammlösung: Tris 0.5 M pH 6.8
- Trenngel Stammlösung: Tris 1.5 M pH 8.8
- Laufpuffer: Tris 0.02 M; Glycin 0.2 M, SDS 0.1 %
- Probenpuffer, nicht reduzierend: Sammelgel-Stlsg. 12.5 %
SDS10%-lsg 30%
Bromophenolblau 0.02 % (Volumen%)
- Probenpuffer, reduzierend: 0.1 M Dithiothreitol (DTT) in Probenpuffer nicht reduzierend
- Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10 %
- Trenngel (12 %), Menge für 2 Gele: H₂O dest 3.3 ml
Trenngel-STlsg. 2.5 ml
SDS 10% lsg 100 µl
Acrylamid 30% 4.0 ml
APS 10% 100 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED) 4 µl
- Sammelgel, Menge für 2 Gele: H₂O dest 3.05 ml
Trenngel-STlsg. 1.25 ml
SDS 10% lsg 50 µl
Acrylamid 30% 0.67 ml
APS 10% 25 µl
TEMED 5 µl
- AppliChem Protein Marker III (6.5 – 200) #A4402, (Protein sizes: 200, 116, 68, 43, 29, 20, 14.4, 6.5 kDa)

Silberfärbung

- fixing solution: Methanol 40 ml, Essigsäure 10 ml, H₂O dest 50 ml, Formaldehyd 37 % 50 µl
- washing solution: Ethanol 50 %
- Sensitizing solution: Na₂S₂O₃ x 5 H₂O 43%-lsg, 45 µl auf 100 ml
- staining solution: 1M AgNO₃-lsg 1.18 ml, Formaldehyd 37 % 50 µl, auf 100 ml
- developing solution: Na₂CO₃ 6g, H₂O 94 ml, Formaldehyd 37% 50 µl, Na₂S₂O₃ x 5 H₂O 43 %-lsg 1 µl
- stopping solution: 0.5 % Glycin

Der Formaldehyd und die $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ 43%-Isg müssen immer kurz vor der Anwendung zugegeben werden.

3.1.3 Säulen

- CRIO-MD 62 und 63 (Proxcys Downstream Biosystems, Emmen, NL)

Tab. 2 Allgemeine Spezifikationen der benutzten Radialflusssäulen CRIO-MD 62 und 63

Dimensionen	Betthöhe	60 mm
	Bettvolumen	125 / 250 ml
	Inlet-Frittenbreite	17.1 mm
	Outlet-Frittenbreite	30.8 mm
	Frittenhöhe	87 / 174 mm
	Winkel	13°
	Pressure rating	300 kPa
	Temperature	0 - 40 °C
	Frittenporosität	10 µm
Rating	Operating Pressure	> 3 bar
Materials	Seals & Gaskets	EPDM / NR-SBR
	Säulenkörper	PMMA
	Fritten	Edelstahl 316L
Connections	CPC Quick connect	ACETAL
Schläuche		Tygon
Tube Pinchevalve		PP

- Scouting Säule Merck K34715182

3.1.4 Anlagen und Systeme

- Äkta Pilot von GE Healthcare, Life Sciences

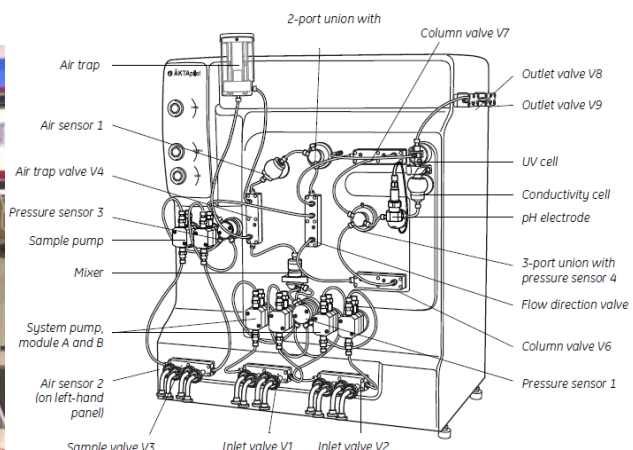
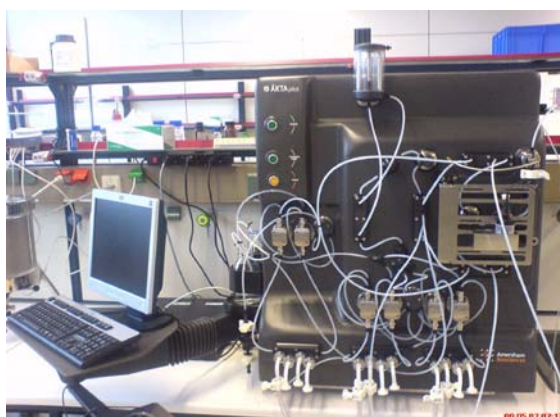


Abb. 3.1 Photo und schematische Darstellung der Äkta Pilot

Eigenschaften des Äkta Pilot Systems

- Flussrate : 4 – 800 ml/min
- Maximaler Druck: 20 bar

- Flussumkehr möglich
 - Zwei Säulen System
 - Detektion: UV Detektor (Wellenlängenbereich 190 – 700 nm), Leitfähigkeitsdetektor und pH-Meter
-
- o Äkta Purifier von GE Healthcare, Life Sciences
 - o Frenchpress Cell Disrupter, Thermo Electron Corporation
 - o Ultrazentrifuge WX Ultra 100, Sorvall WX Ultra Series, Thermo Electron Corporation

3.1.5 Software

- o QUATTROF : Programm zum Verfolgen von Druck und Flussrate während des Packvorgangs
- o UNICORN 5.01: Programm zur Steuerung der Äkta Pilot. Das Programm bietet an, die Daten auszuwerten. Die Daten wurden jedoch mittels TableCurve2D ausgewertet, da UNICORN 5.01 nur für die Auswertung von symmetrischen Peaks geeignet ist. Deshalb wurde nur die Asymmetrie von dem Programm angenommen. Die von Programm angewendete Formel ist die Gleichung (2.11).
- o TableCurve2D, Version 5.01, Systat: Programm zur Auswertung der Peaks und Durchbruchskurven.

3.2 Methoden

3.2.1 Packen der CRIO-MD 62 und 63 im „recycling mode“

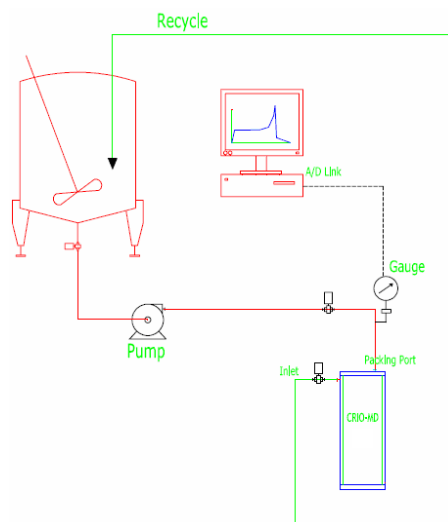
Vorbereitung des Gels und der Packanlage

Das Gel wird normalerweise in 20% Ethanol geliefert oder steht in Lagerlösung. Diese muss entfernt werden. Der Grund dafür ist, dass der Druck während des Packvorgangs ansteigen könnte und dass die Gelpartikeln nicht in ihrer kompaktesten Form vorliegen. Deshalb wird die Lagerlösung durch die Packlösung (1 M NaCl) ersetzt. Um das Gel umzupuffern wird er in einem Messzylinder gegeben und sedimentieren gelassen. Der Überstand wird dann abdekantiert und durch die Packlösung ersetzt. Dies wird wiederholt bis kein Ethanol mehr vorhanden ist. Das Gel wird dann über Nacht (14 – 18 Stunden) sedimentieren gelassen. Dieses Volumen muss danach für die Kompressionsberechnung angenommen werden. Das Gel kann noch weiter sedimentieren, deshalb muss drauf geachtet werden, dass immer ungefähr die gleiche Sedimentationsdauer eingehalten wird.

Die Packanlage muss mit der Packlösung gefüllt werden. Die Säule wird dann luftblasenfrei angeschlossen. Der Eingangsschlauch muss dann vom Packlösungsvorlagentank in dem Slurryvorlagentank ohne Luftblase transferiert werden. Der Packvorgang kann beginnen.

Verschiedene Packmethoden

Standard Methode



Der Slurry mit einer bestimmten Konzentration ist im Vorlagentank enthalten und wird ständig während des ganzen Packprozesses gerührt, damit die Gelpartikeln nicht sedimentieren. Der Fluss, der partikelfrei raus von der Säule kommt wird in den Vorlagentank zurückgeführt. Es heißt, dass die Konzentration im Vorlagentank immer verdünnt wird, und sollte am Ende des Packvorgangs keine Gelpartikeln mehr enthalten.

Die Flussrate muss während des Prozesses immer nachjustieren werden, denn die Lösung im Tank verdünnt sich ständig. Die Flussrate muss auf dem Rechner abgelesen werden, obwohl es meistens dem Flussmesser der Anlage entspricht.

Abb. 3.2 Schema der Packanlage zum „standard“ Packvorgang im „recycling mode“ mit der CRIO-MD 62 und 63

Der Druck und die Flussraten können mittels des Rechners gefolgt werden. Der Drucksensor ist an der Pumpe verbunden und stoppt automatisch die Pumpe, wenn der Druck über 3 bar steigt.

Der Packvorgang kann sich dann entweder von selbst stoppen oder muss manuell gestoppt werden, und zwar wenn die Kammer mit dem Gel ganz gefüllt ist.

Diese „standard“ Methode kann für das Packen von der CRIO-MD 62 und 63 benutzt werden.

„Optimierte“ Methode

Bei der optimierten Methode ändert sich, dass der Fluss durch zwei Ausgänge (Inlet 1 und Outlet) fließt. Das Outlet wird erst aufgemacht, wenn der Front auf der Höhe des Packanschlusses ankommt. Der Fluss muss dann erhöht werden, damit die lineare Geschwindigkeit in beiden Richtungen ähnlich bleibt. Damit die Geschwindigkeit gleich bleibt, muss die Oberfläche von der kleinen Fritte zu der Oberfläche der großen Fritte gezählt werden. Die Geschwindigkeit wird aber nicht in beiden Richtungen gleich bleiben, denn die Oberfläche auf beiden Seiten leicht unterschiedlich sind. Darüber hinaus ist auf der Inletseite schon ein Teil des Volumens des Gels gepackt, das heißt, mehr Gegendruck und ein größerer Druckabfall auf der Inlet- als auf der Outletseite tritt auf. Praktischerweise geht es um ein Spiel mit den Klammern beider Seiten, in dem versucht wird, die beiden Fronten gleichmäßig vorwärts zu erhalten, damit die Lücke zwischen beiden Seiten genau unter dem Packanschluss sich schließt.

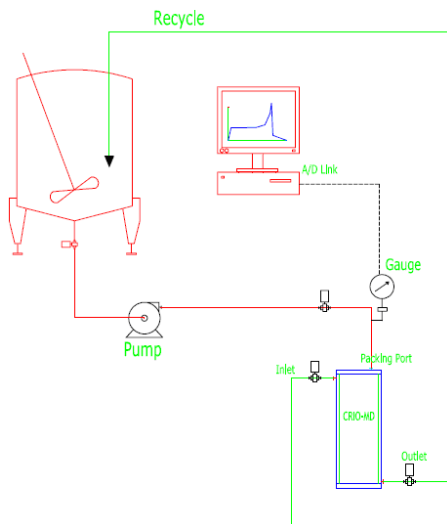


Abb. 3.3 Schema der Packanlage zum „optimierten“ Packvorgang im „recycling mode“ mit der CRIO-MD 62 und 63 [4]

Das Ende des Packvorgangs und die Konditionierung verläuft genau wie bei der standard Methode. Die „optimierte“ Methode kann bei dem Packen der CRIO-MD 62 und 63 benutzt werden.

Packmethode bei der CRIO-MD 63

Die folgenden Methoden können nur bei dem Packen der CRIO-MD 63 benutzt werden, da die CRIO-MD 63 ein zweites Inlet besitzt.

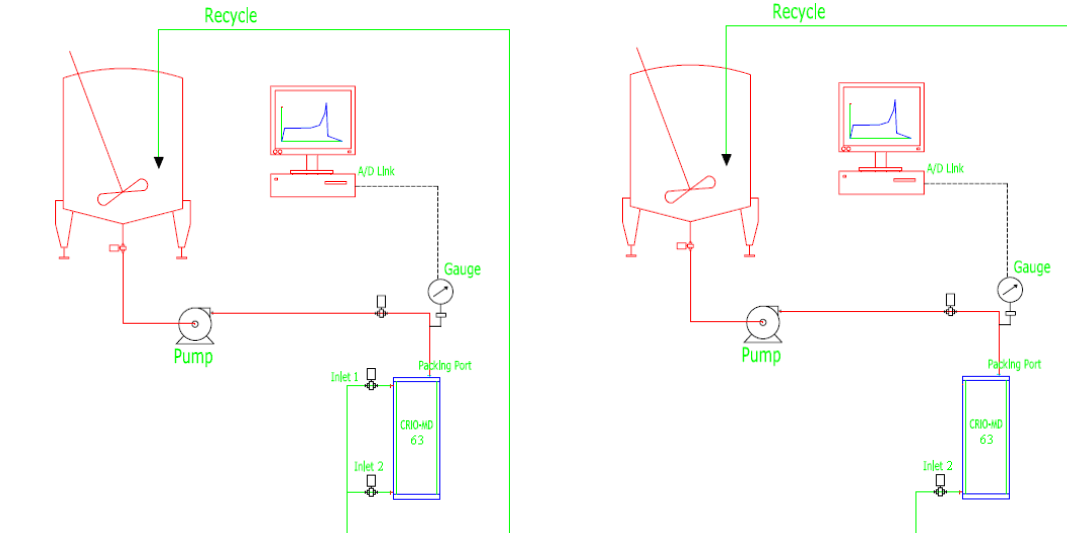


Abb. 3.4 Schema der Packanlage für das Packen der CRIO-MD 63. Links, die „Inlet 1 – Inlet 2“ Methode und Rechts die „Inlet 2“ Methode

Diese Packmethoden laufen wie die standard Methode. Der Unterschied liegt nur am Inlet 2. Für die „Inlet 1 – Inlet 2“ Methode sind die beiden Inlet während des ganzen Prozess offen. Bei der „Inlet 2“ Methode ist nur die Inlet 2 offen.

Konditionierung einer Packung

Die Konditionierung der Packung bewirkt, dass sich die Partikeln besser homogen im Bett verteilen. Die Konditionierung kann entweder mit der Packanlage oder mit der Äkta Pilot durchgeführt werden. Eine bestimmte Flussrate (je nach Druck aber bis zu der Hälfte der Packgeschwindigkeit) wird in Richtung der normalen Richtung (Inlet → Outlet) und dann umgekehrt (Outlet → Inlet) angelegt. Das wird dann 5 bis 10 Mal wiederholt und in jeder Richtung ca. 2 Minuten gehalten. Die Äkta Pilot ermöglicht den Fluss umzukehren, deswegen ist es leichter die Konditionierung an der Äkta Pilot zu machen. Es kann aber auch bei der Packanlage gemacht werden.

3.2.2 Bestimmung der Packungseffizienz

Die Packungseffizienz wird an der Äkta Pilot bestimmt. Die Packungseffizienz wird durch den HETP-Wert, Number of plates (N) oder Number of plates per meter (N/m) dargestellt. Diese sind mittels Durchbruchkurven oder Pulsen erhalten.

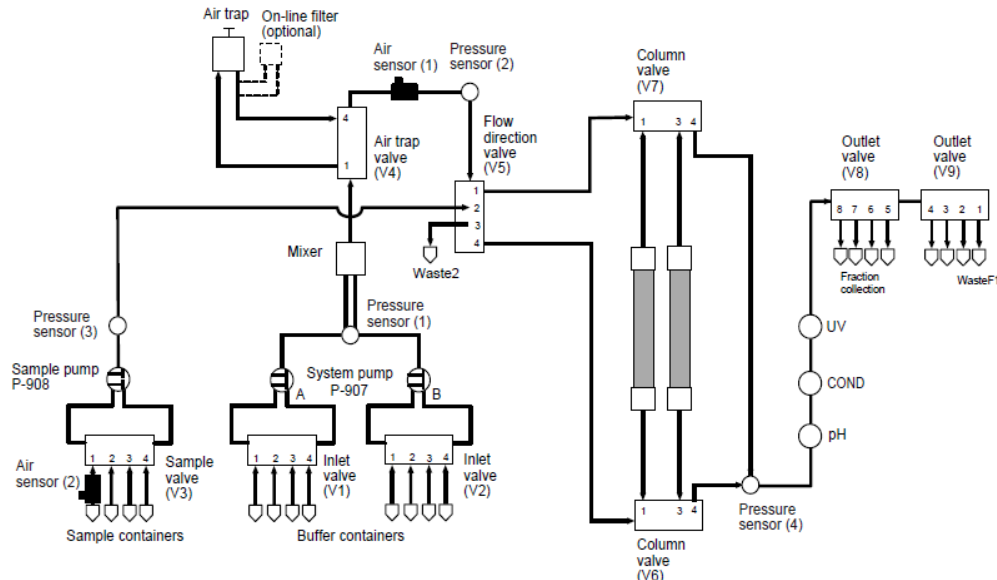


Abb. 3.5 Schematische Darstellung der Äkta Pilot System

Allgemeine Handhabungen an der Äkta Pilot System

Jede Pumpe hat 4 verschieden Eingänge. Normalerweise werden nur die A1, B1, und die S1 bei der Probenpumpe benutzt und die WasteF1.

Die Lagerlösung muss zuerst durch Spülen des Systems entfernt werden und durch die Äquilibrationslösung ersetzt werden. Die benutzten Schläuche müssen mit dieser Lösung befüllt werden. Vor dem Anschließen der Säule müssen die Alarmer in UNICORN eingeschaltet werden. Dann kann die Säule mit einer niedrigen Flussrate (ca. 15 ml/min) von Outlet zur Inlet Richtung (im UNICORN heißt es „1Bypass2up“) angeschlossen werden. Es muss drauf geachtet werden, keine Luftblasen in die Packung einzutragen. Zum Schluss wird der Fluss mehrmals umgekehrt, um alle möglichen Luftblasen, die vor den Fritten sein können zu entfernen. Für die Versuche muss der Fluss von dem Inlet zum Outlet gehen. Dies heißt in UNICORN „1Bypass2down“

Bei einer regelmäßigen Benutzung der Äkta Pilot muss das System alle drei Wochen mit 0.5 M NaOH regeneriert werden. Alle Schläuche der Anlage werden dafür mit NaOH 0.5 M gefüllt und 30 Minuten stehen gelassen. Dann wird die Anlage bis zu einem neutralen pH mit VE-Wasser gespült. Wenn die Anlage über das Wochenende gelagert werden muss, werden die Schläuche mit 20 % Ethanol (vergällt) gefüllt und sonst mit VE-Wasser. Die Schläuche sind gespült, wenn der Leitfähigkeitsdetektor 0.000 mS/cm anzeigt.

Salzdurchbruchskurven

Bei A1 ist H₂O entgast und bei B1 ist die 1 M NaCl Lösung angeschlossen. Der Step geht von 10% B bis 100% B. Die Säule wird dann zuerst mit 10% B äquilibriert, die Flussrate eingestellt und dann auf 100 % B erhöht.

Zur Auswertung der Kurve ist die Leitfähigkeitskurve in Excelformat exportiert und wird dann mit TableCurve2D aufgearbeitet.

Aceton-, Salz-, Dextranblau-, und Lysozympeak

Die Aceton-, Salz-, Dextranblau- und Lysozympeak werden mittels einer vorgeschriebenen Methode durchgeführt. Bei der Methode wurden die Druckgrenze ausgewählt (0.2 kPa), die Äquilibrierungs-, die Proben-, die Elutionsflussrate in ml/min eingestellt. Das Probenvolumen wird auf 5 ml eingestellt.

Tab. 3 Beschreibung der benutzten Lösung für die Durchführung der Peaksversuchen

Beschreibung	A1	B1	Probe
Acetonpeak	H ₂ O	1 M NaCl	1 % Aceton
Salzpeak	H ₂ O	1 M NaCl	1 M NaCl
Salzpeak in Pufferhintergrund	NaP 50 mM, pH 7	NaP 50 mM, pH 7 + 1 M NaCl	NaP 50 mM, pH 7 + 1 M NaCl
NaNO ₃ peak	H ₂ O	1 M NaNO ₃	1 M NaNO ₃
NaNO ₃ peak in Pufferhintergrund	NaP 50 mM, pH 7	NaP 50 mM, pH 7 + 1 M NaNO ₃	NaP 50 mM, pH 7 + 1 M NaNO ₃
Dextranblaupeak	H ₂ O	1 M NaCl	Dextranblaulösung
Lysozympeak	NaP 500 mM, pH 7	NaP 500 mM, pH 7	Lysozymlösung ca. 10 mg/ml in NaP 500 mM, pH 7

Vor dem Starten muss den Probenschlauch manuell gefüllt und die Säule mit 10% B äquilibriert werden. Die Probe wird durch den Probenschlauch auf die Säule gepumpt und die Elution wird von den Systempumpen übernommen. Die Methode kann gestoppt werden, wenn der Peak in der Software zu sehen ist.

Für die Auswertung der Aceton-, NaNO₃-, Dextranblau- und Lysozympeaks werden die UV 280 nm – Kurven exportiert. Für den Salzpeak wird die Leitfähigkeitskurve exportiert.

3.2.3 Aufarbeitung der exportierten Kurven mit TableCurve2D

Die Unicorn Daten werden in ExcelFormat exportiert. Das Programm TableCurve2D wird geöffnet und die Daten aufgerufen. Zur Auswertung der Durchbruchskurven wird die Leitfähigkeitkurve exportiert und behandelt. Diese muss mit einem 15 % Level nach Savitzky-Golay geglättet werden, dann abgeleitet und zuletzt mit Exp Mod Gaussian und Medium (Lorentz) minimisation gefittet. Das Modell mit 5 Parametern wird ausgewählt. Die Werte von a, b, c, d, e werden zur Momentenbestimmung angewendet.

Zur Auswertung von Peaks werden die entsprechenden Kurven (UV 280 nm oder Leitfähigkeit) in Excel exportiert. In TableCurve2D werden sie geglättet und gefittet so wie die Durchbruchskurven.

Der Asymmetriekoeffizient A wird aber mittels UNICORN berechnet. Dadurch müssen die Kurven auch in UNICORN aufgearbeitet werden, geglättet (15 %), abgeleitet (bei den Durchbrüchen) und integriert.

3.2.4 Aufreinigung der EGFP Probe

Vorbereitung der Probe

Die E. Coli Zellen wurden fermentiert, abzentrifugiert und bei -80 °C tief gefroren. Die Zellen wurden aufgetaut. Es wird genau soviel Aufschlusspuffer zugegeben wie Zellmasse. Die Zellen werden mittels Vortex so homogen wie möglich resuspendiert,. Dann werden die Zellen mittels Frenchpress bei 950 bar (medium) aufgeschlossen. Danach wird Benzonasen (250 U/ml) mit 7 mM MgCl₂ zugegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wird der pH-Wert der Probe auf 5.8 mittels 500 mM NaH₂PO₄ gesenkt. Die Probe wird bei 108000 g für 30 Minuten abzentrifugiert [23]. Vor dem Injizieren muss immer kontrolliert werden, dass die Probe klar ist. Ansonsten muss die Probe abfiltriert oder wieder abzentrifugiert werden.

Für weitere Versuche wurde die Probe reduziert, um die Bildung von Dimeren zu verhindern. Die TCEP wirkt spezifisch auf die Disulfidbrücken. Die Reduktion wird mit Zugabe einer 0.5 M TCEP Lösung durchgeführt, so dass eine Endkonzentration von 15 mM TCEP erreicht ist. Der pH-Wert der TCEP-Lösung wurde auf pH 6.7 mittels 5 M NaOH eingestellt. Wenn dieser Schritt nicht gemacht wird, ist die TCEP-Lösung zu sauer und verursacht das Ausfallen des Proteins. Die Reaktionszeit dauert ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die Probe darf nicht mit einem Rührfisch vermischt werden, sonst wird das Protein geschädigt. Die reduzierte Probe wurde bei 4 °C gelagert, sie ist reduziert geblieben. Als Kontrolle wurde der Ellman's Test durchgeführt.

Gradientenführung bei Scouting Merck Säule mittels Äkta Purifier

Die Gradienten mit der Scouting Säule wurden mit der Äkta Purifier durchgeführt.

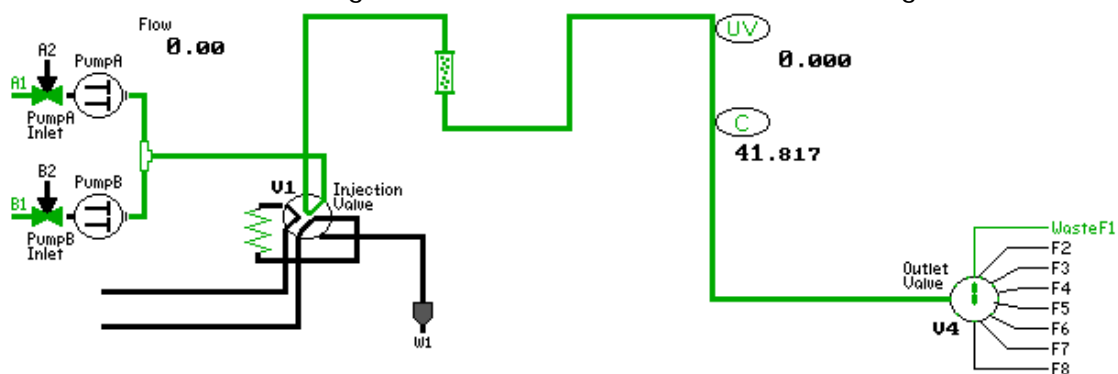


Abb. 3.6 Schematische Darstellung der Äkta Purifier System [19]

Die obere Abbildung zeigt den Weg (grün) wenn das Injektionsventil auf Position Load ist. Bei A1 ist Puffer A und bei B1 ist Puffer B angeschlossen.

Die Schläuche sind zuerst mit Wasser zum Entfernen der Lagerlösung zu füllen, dann mit Puffer. Die Luftblasen werden entfernt, entweder mit Fluss oder mit der Spritze die die Luftblasen aufsaugen kann. Die Säule ist an der Position 2 luftblasenfrei angeschlossen und

die Probenschleife ist am Injektionsventil Position 2 bis 6 angeschlossen. Vor Anschluss der Säule darf nicht vergessen werden, die Druckalarme einzustellen. Die Säule wird mit 0 % B äquilibriert. Die Probenschleife wird mehrmals mit Puffer gespült.

Beim Start des Versuches muss folgendes eingestellt werden:

- Flussrate
- Gradient (0 %B)
- Position des Injektionsventils (Load)
- Säulenposition (Position 2)
- Ausgangsventil (F2)
- Wellenlänge (280, 220, 488 nm)
- Druckalarm (0.4 MPa)

Wenn das Injektionsventil zum ersten Mal auf Position Injekt gestellt wird, wird die Zeit- oder Volumenskala auf 0 gestellt. Die Probe wird dann auf die Säule aufgetragen. Wenn der Durchlaufpeak vollständig eluiert ist kann der Gradient gestartet werden. Dafür muss in den Einstellungen Gradient folgendes ausgewählt werden: 100 % B in x Minuten. Die Minuten bestimmen dann die Steigung des Gradienten. Am Ende des Gradienten kann die Konzentration auf 100 % B für 3 Säulenvolumen (CV) gehalten werden dann kann ein bisschen 0.5 M NaOH injiziert werden oder einfach direkt auf 0 % B zum Reäquilibrieren der Säule gebracht werden.

Auswertung der Gradientenversuche

Zwischen Leitfähigkeit und UV Messzelle gibt es eine Verschiebung. Um es zu berücksichtigen muss das Totvolumen der UV und der Leitfähigkeit bekannt sein. Dafür muss ein NaNO_3 Puls ohne Säule gemacht werden, um zu beobachten was der Unterschied zwischen den Maxima von Leitfähigkeit bzw. UV Signal gibt. Bei der Äkta Purifier ist in der Reihenfolge: zuerst UV- und dann Leitfähigkeitsdetektor. Die Berechnung des Versatzvolumens V_{delay} läuft wie folgt:

$$V_{\text{delay}} = V_{\text{Cond.}} - V_{\text{UV}} \quad (3.1)$$

wobei V_{cond} und V_{UV} dem Retentionsvolumen der Leitfähigkeits- bzw. UV-Signal entsprechen. Dieser „Delay“ ist zum Peakmaximum (UV gemessen) zu addieren, um die beim Peakmaximum entsprechende Leitfähigkeit richtig abzulesen.

Bei der Äkta Pilot kommt zuerst die Leitfähigkeit- und dann die UV Messzelle. Die Berechnung lautet wie bei (3.1), allerdings da wird ein negativer Wert erhalten.

Das Maximum vom Peak wird entweder abgelesen oder mittels UNICORN Integrationsfunktion angegeben. Es muss jedes Mal kontrolliert werden, wie das UNICORN System den Peak integriert und das Retentionsvolumen angibt.

Um die GH- I_R und die K-I Kurven zu erhalten müssen verschiedene Daten der Säule mittels Versuche bestimmt werden, und zwar das Zwischenkornvolumen (V_0), das totale Volumen der Säule (V_t), das für EGFP zugängliche Volumen (V_{GFP}).

Um diese Werte zu bestimmen müssen verschiedene Daten mittels Pulsen berechnet werden.

$$\text{Zwischenkornvolumen : } V_0 = V_{\text{Dextranblau}} - V_{\text{Dextranblau,system}} \quad (3.2)$$

$$\text{Totales Volumen in der Säule: } V_t = V_{\text{Salz}} - V_{\text{Salz,system}} \quad (3.3)$$

$$\text{Proteins zugängliches Volumen: } V_{\text{GFP}} = V_{\text{GFPmitSäule}} - V_{\text{GFP,system}} \quad (3.4)$$

$$\text{Zwischenkornporosität: } \varepsilon_0 = \frac{V_0}{V_c} \quad (3.5)$$

$$\text{Totale Porosität: } \varepsilon_t = \frac{V_t}{V_c} \quad (3.6)$$

$$\text{Protein bezogene Porosität: } \varepsilon_{\text{GFP}} = \frac{V_{\text{GFP}}}{V_c} \quad (3.7)$$

$$\text{Salzverteilungskoeffizient: } K' = \left(\frac{\varepsilon_t}{\varepsilon_0} - 1 \right) / \left(\frac{1 - \varepsilon_0}{\varepsilon_0} \right) \quad (3.8)$$

$$\text{Proteinverteilungskoeffizient: } K_{\text{crit}} = \left(\frac{\varepsilon_{\text{GFP}}}{\varepsilon_0} - 1 \right) / \left(\frac{1 - \varepsilon_0}{\varepsilon_0} \right) = \left(\frac{V_{\text{GFP}}}{V_0} - 1 \right) / H \quad (3.9) [16]$$

Bei der 1 ml Merck Scout Säule ist das Injektionsvolumen 30 µl und wurde mit der Probenschleife injiziert. Der Hintergrund war 150 mM Salz. Der EGFP Peak wurde mit einer Probe durchgeführt, die bereits mittels CIEX aufgereinigt war und aufkonzentriert war.

Bei der CRIO-MD 62 (125 ml) wurde der Dextranblau, der NaNO₃ Peak mittels „Ira Salzpeak“ Methode mit 5 ml Probenvolumen durchgeführt. Der Salzpeak wurde mit der 1.5 ml Probenschleife in 100 mM NaCl durchgeführt.

Da die Dextranblaumoleküle ziemlich groß sind, werden sie von den Poren ausgeschlossen. Mittels Salz kann das Totvolumen der Säule bestimmt werden und mit dem Protein kann bestimmt werden, welches Volumen für dieses zugänglich ist.

Der 1. Moment (μ_1) vom Peak wurde mittels TableCurve2D ausgewertet und als Retentionsvolumen V genommen.

Injektion der Probe bei der Äkta Pilot mittels Injektionsventil

Um das Injizieren der Probe zu ermöglichen, wurde extra ein Injektionsventil für die Äkta bestellt. Die läuft nach dem gleichen Prinzip wie die Injektionsventile bei der Äkta Purifier, aber besitzt nur 2 Wege. In Load Position geht der Fluss von der Äkta auf die Säule, in Injektionsposition von der Injektionsspritze auf die Säule. Der Fluss muss auf 0 ml/min gestoppt werden, bevor das Ventil manuell in die Injektionsposition verschoben wird. Das System kann nicht auf „Pause“ gesetzt werden, denn alle Ventile der Anlage sind dann fixiert und die Probe kann gar nicht injiziert werden. Sobald die Probe injiziert wird kann das Ventil wieder manuell in die Load Position gedreht werden und die Flussrate wieder eingestellt werden.

Korrelation zwischen Leitfähigkeit und Anteil Puffer B (%B)

Es wurde bemerkt, dass die Leitfähigkeit sich nicht linearerweise mit der prozentualen Änderung von Puffer B ändert. Um diese Korrelation zu finden müssen Stufen von unterschiedlichen Anteilen an Puffer B durchgeführt werden. Diese Korrelation muss jedes Mal neu bestimmt werden, wenn entweder Puffer oder Anlage gewechselt ist.

Stufen von 0 % B bis 100 % B in Intervall von 10 % B wurden gemacht. Bei jeder Stufe wurde gewartet, bis das Leitfähigkeitssignal konstant bleibt und erst dann kann die nächste Stufe eingestellt werden. Jede Stufe entspricht einer Leitfähigkeit. Die erhaltenen Werte wurden in eine Graphik übertragen und durch eine polynomiale Trendlinie dargestellt. Die Gleichung der Trendlinie ermöglicht der Zusammenhang zwischen Leitfähigkeit und Anteil Puffer B zu finden.

3.2.5 SDS-PAGE mit Silberfärbung

Vorbereitung des Gels und Durchführung des Laufs

Das nötige Material zum Durchführen dieser Analyse ist im Protokoll beschrieben. Die Gele müssen gegossen werden. Dafür wird zuerst die Trenngel 12%-Isg vorbereitet und zwischen den Scheiben bis 1.5 cm vom Rand der kleinen Scheibe gegossen. Sobald die APS-Isg und die TEMED in der Lösung sind muss zügig gearbeitet werden, da die Polymerisation beginnt. Da das Gel nur in Abwesenheit von Sauerstoff polymerisiert, ist der Front von Trenngel-Isg mit Isobutanol 30% abgedeckt. Nach 45 Minuten stehen lassen kann das Isobutanol mit H₂O entfernt werden und abgetrocknet werden bevor die Sammelgel-Isg gegossen wird. Die muss auch frisch vorbereitet werden. Der Kamm muss dann vorsichtig zwischen den Glasscheiben gesetzt werden, ohne Luftblasen zu bilden. Nach 45 Minuten ist das Gel fertig. Die Proben müssen in zwischen Zeit vorbereitet werden (25 µl Probe + 25 µl Probenpuffer) und bei 95 °C 5 Min gekocht werden. Nachdem die wieder auf Raumtemperatur gekommen sind, werden die auf dem Gel aufgetragen, und zwar 15 µl. Um die Luftblasen zu vermeiden muss die innere Kammer zwischen den beiden Gels ganz gefüllt werden, die muss auch dicht sein. Danach wird die äußere Kammer bis zum Faden gefüllt und die Spannung zwischen 125 und 200 V, je nach Zeit, gestellt. Die Spannung muss gehalten bis die blaue Front das Ende des Gels erreicht hat. Danach kann das Gel von den Scheiben befreit werden und in die fixing solution gestellt werden für 60 Minuten.

Silberfärbung

- Fixing: 60 Minuten in fixing solution
- Washing : 3x 10 Minuten washing solution
- Washing : 2x 5 Minuten mit H₂O dest.
- Sensitizing : 1 Minute mit sensitizing solution
- Washing : kurz mit H₂O dest. das Gel spülen
- Staining: 20 Minuten mit staining solution
- Washing: kurz mit H₂O dest. das Gel spülen
- Devellopping: 1 – 5 Minuten je nach Intensität
- Stopping: 5 Minuten mit stopping solution

Das Gel kann gescannt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Das Packen der CRIO-MD 62

Die CRIO-MD 62 wurde nach standard und optimierter Methode unter gleichen Bedingungen gepackt, um einen Vergleich zu ermöglichen. In beiden Fällen war die berechnete Kompression 25 %, die Packgeschwindigkeit 650 cm/h (0.23 L/min) und die Slurrykonzentration 20 %. Die nächste Abbildung zeigt die Entwicklung des Drucks während des Packvorgangs.

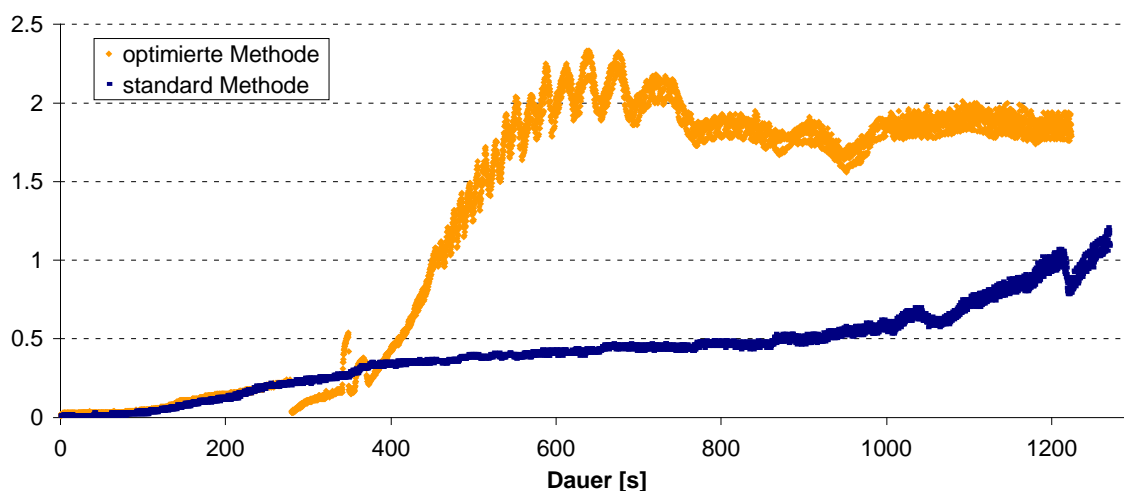


Abb. 4.1 Entwicklung des Drucks während des Packvorgangs für die standard und optimierte Methode

Von 0 bis 100 Sekunden ist der Druck bei beiden Methoden konstant. Danach fängt eine mehr oder weniger lineare Steigerung des Drucks. Bei der standard Methode ist dann ein Plateau erreicht gefolgt von einer starken Druckerhöhung. Der Packvorgang wird bei beiden Methoden manuell gestoppt.

Bei der optimierten Methode ist das Outlet bei ca. 280 Sekunden geöffnet, es hat einen drastischen Abfall des Drucks zur Folge, denn die durchströmte Oberfläche wurde stark vergrößert. Deswegen ist die Flussrate so erhöht, dass theoretisch die gleiche lineare Geschwindigkeit auf beiden Seiten durchströmt.

Die Berechnung der neuen Flussrate läuft wie folgend:

$$Q = \frac{LV \cdot (A_{79\%} + A_{\text{kleine Fritte}})}{60} \quad (4.1)$$

Q : neue volumetrische Flussrate [ml/min]

LV : lineare Geschwindigkeit [cm/h], in diesem Fall 650 cm/h

$A_{79\%}$: 21.169 cm²

$A_{\text{kleine Fritte}}$: 14.87 cm²

Die Flussrate ist dann auf 0.39 L/min erhöht. Es dauert allerdings ein bisschen Zeit bis diese

Flussrate erreicht ist. Direkt nach der Öffnung des Outlets sedimentiert das Gel auf der Outlet Fritte aber auch noch auf der Inlet Fritte. Der Widerstand ist aber auf der Inlet Seite höher, deswegen sedimentiert das Gel bevorzugend auf der Outlet Seite. Mit den Klammern, die an beiden Schläuchen angeschlossen sind, wurde versucht den Spalt genau unter dem Packanschluss zu halten, bis das Bett sich ganz abschließt. Nachdem der Spalt sich ganz geschlossen hat, wurde eine Luftblase unten dem Packanschluss beobachtet. Dieses Phänomen wurde bei der standard Methode auch beobachtet. Diese Luftblase darf eigentlich nicht da sein, aber sie ist anscheinend am Ende des Packvorgangs durch den Packanschluss entwichen, denn sie ist am Ende des Packvorgangs nicht mehr sichtbar.

Da am Ende der Druck bei der optimierten Methode höher ist als bei der standard bedeutet es, dass das Gel dichter gepackt ist und dass eine größere Menge am Gel in der Kammer ist. Es wurde aber nicht gemessen welches Volumen gepackt wurde.

Die Effizienz der Packungen wurde mittels Salzdurchbruchskurven, Aceton- und Salzpeak bewertet. Die Effizienz ist in Bodenzahl pro Meter angegeben. Die lineare Geschwindigkeit ist immer für 79 % der Eingangsfläche berechnet.

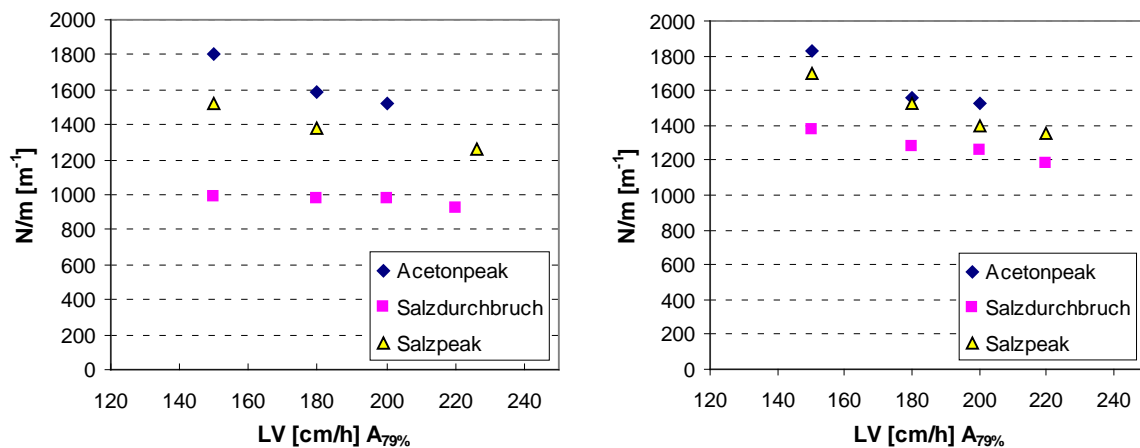


Abb. 4.2 Graphische Darstellung der Effizienz N/m für die Packung nach standard (links) und optimierter (rechts) Methode

Mit den Durchbruchskurven ist die berechnete Effizienz kleiner als bei den Pulsen. Die Effizienz variiert zwischen ca. 1000 und 1800 N/m was ziemlich gut ist.

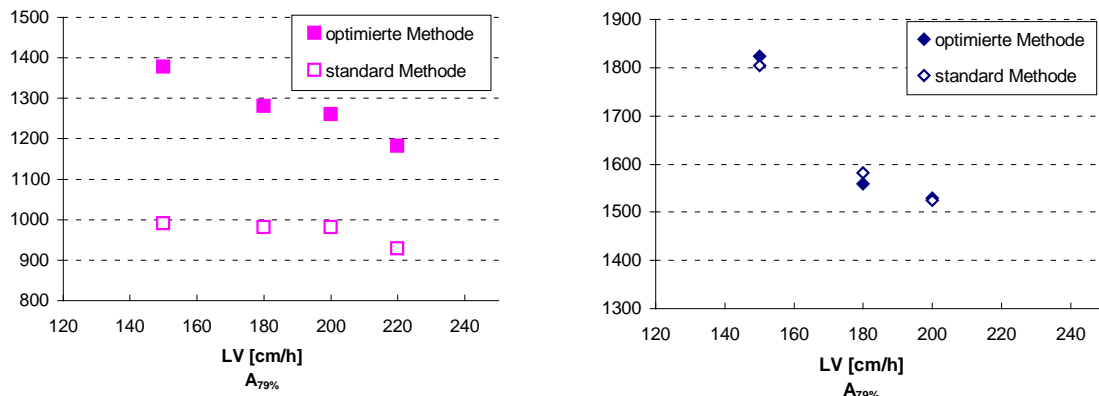


Abb. 4.3 Vergleich zwischen von standard und optimierter erhaltenen N/m für Salzdurchbruchskurve (links) und Acetonpeaks (rechts)

Der Unterschied zwischen beiden Methoden ist besonders bei den Salzdurchbruchskurven sichtbar. Die mittels Acetonepulsen berechneten Effizienzen stimmen überein. Die Salzpeaks konnten nicht verglichen werden, denn sie wurden nicht mit gleicher Art durchgeführt. Der Unterschied liegt aber bei der Asymmetrie der Peaks und der Durchbruchskurven. Die Werte sind in den nächsten Tabellen dargestellt.

Tab. 4 Effizienzbestimmung und Asymmetrie für das Packen der CRIO-MD 62 nach der standard Methode

standard Methode	LV [cm/h]	Ni	N/m [m ⁻¹]	HETP [μm]	Asymmetry
Salzdurchbruch	200	59.41	990.18	1009.92	0.81
Salzdurchbruch	150	58.88	981.33	1019.02	0.81
Salzdurchbruch	180	58.82	980.39	1020.00	0.79
Salzdurchbruch	220	55.67	927.84	1077.78	0.84
Salzpeak mit Probenschleife	200	91.14	1518.94	658.35	0.67
Salzpeak mit Probenschleife	180	82.83	1380.55	724.35	0.65
Salzpeak mit Probenschleife	150	89.01	1483.42	674.12	0.67
Salzpeak mit Probenschleife	226	75.80	1263.40	791.52	0.65
Acetonepuls	150	108.29	1804.80	554.08	0.74
Acetonepuls	180	94.95	1582.54	631.90	0.75
Acetonepuls	200	91.46	1524.30	656.04	0.76

Tab. 5 Effizienzbestimmung und Asymmetrie für das Packen der CRIO-MD 62 nach der optimierten Methode

optimierte Methode	LV [cm/h]	Ni	N/m [m ⁻¹]	HETP [μm]	Asymmetry
Salzdurchbruch	150	82.62	1376.93	726.26	0.88
Salzdurchbruch	180	76.80	1279.98	781.26	1.05
Salzdurchbruch	200	75.56	1259.42	794.02	1.04
Salzdurchbruch	220	70.93	1182.13	845.93	1.06
Salzpeak	150	101.70	1695.01	589.97	0.91
Salzpeak	180	91.46	1524.34	656.02	0.88
Salzpeak	200	83.90	1398.33	715.14	0.91
Salzpeak	220	81.52	1358.66	736.02	0.9
Acetonepuls	150	109.45	1824.18	548.19	1.04
Acetonepuls	180	93.56	1559.26	641.33	1.05
Acetonepuls	200	91.77	1529.51	653.80	1.05

Die Tabellen zeigen klar an, dass die Symmetrie, bei dem Packen nach optimierter Methode besser ist. Diese ist oft in der Nähe von 1. Eine gute Effizienz entspricht einem HETP-Wert von 5 Mal der Partikelgröße. Im Fall vom Fractogel haben die Gelpartikel ein Durchmesser zwischen 40 und 90 μm. Ein guter HETP-Wert wäre daher um die 450 μm. Beim Untersuchen der Packparameter dieser optimierten Methode kann die Effizienz sicher noch verbessert werden.

Bei beiden Versuchen wurde die Packung konditioniert und eine Durchbruchskurve wurde vor und nach der Konditionierung durchgeführt. Der Unterschied war nicht deutlich, es bedeutet dass der Packvorgang ziemlich gut ist und dass die Gelpartikel gleichmäßig in der Kammer verteilt sind.

Als Zusammenfassung dieser Ergebnissen wurde festgestellt, dass das Packen mit der optimierten Methode eine bessere Effizienz und eine bessere Symmetrie bringt und dass die Konditionierung nicht viel bringt.

4.2 Versuche zum Packen der CRIO-MD 63

Verschiedene Packversuche wurden durchgeführt. Es gibt bei der CRIO-MD 63 mehr Packmöglichkeiten als bei der CRIO-MD 62, weil die CRIO-MD 63 ein zweites Inlet besitzt. Es wurde versucht, die Bedingungen, die bei der CRIO-MD 62 galten für das Packen der CRIO-MD 63 zu übertragen.

Der erste Packversuch wurde aber direkt mit den beiden Inlet unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Packgeschwindigkeit 650 cm/h, berechnete Kompression 25 %, Slurrykonzentration 20 % nach nebenstehendem Schema. Es wurde einen Salzdurchbruch bei 150 cm/h gemacht. Die Salzdurchbruchskurve ist auf dem Chromatogramm zu sehen.

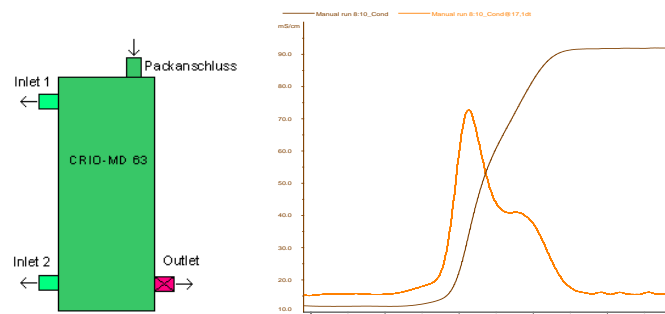


Abb. 4.4 Schematische Darstellung der benutzten « 2 Inlet offen » Methode und Chromatogramm des Salzdurchbruch bei 150 cm/h (105.8 ml/min) durchgeführt. (In braun kontinuierliche Linie, die Leitfähigkeit, in orange die Ableitung der Leitfähigkeitskurve)

Die dargestellte Salzdurchbruchskurve zeigt von der Form her an, dass die Packung nicht homogen ist. Dies ist bei der Ableitungskurve noch klarer dargestellt. Zwei Peaks sind zu sehen, der erste bei ca. 210 ml und der zweite bei ca. 280 ml, obwohl der Versuch nur mit NaCl durchgeführt worden ist. Wenn man die Kurve in zwei Teilen teilt, kann man sich vorstellen, dass es zwei verschiedene Durchbrüche gibt. Zum Prüfen, ob dieses Phänomen bei der Öffnung des zweiten Inlets während des Packens verursacht worden sein könnte wurde ein Packversuch nach der standard Packmethode mit gleichen Bedingungen durchgeführt.

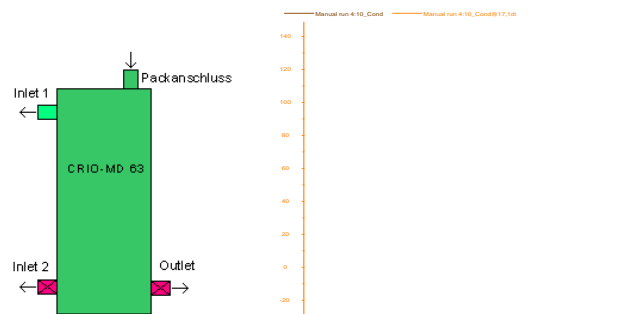


Abb. 4.5 Schematische Darstellung der standard Methode und Chromatogramm des Salzdurchbruch bei 150 cm/h (105.8 ml/min) durchgeführt. (In braun kontinuierliche Linie, die Leitfähigkeit, in orange die Ableitung der Leitfähigkeitskurve)

Das Phänomen wiederholt sich. Ein Nachpeak ist zu sehen. Das bedeutet, dass es nicht an der Öffnung des zweiten Inlets liegt. Was sich der CRIO-MD 63 zur CRIO-MD 62 ändert ist nur die Höhe. Beim Packen haben vermutlich die Gelpartikel nicht genug Geschwindigkeit

um sich auf der ganzen Höhe zu verteilen, es könnte somit einen Bereich geben, der leicht untergepackt ist.

Die nächsten Packversuche wurden bei einer Geschwindigkeit von 850 cm/h durchgeführt. Es befand sich mit genügend Fractogel im Vorlagetank, dass es bei dieser Geschwindigkeit für eine Packung mit ca. 38 % Kompression ausreicht.

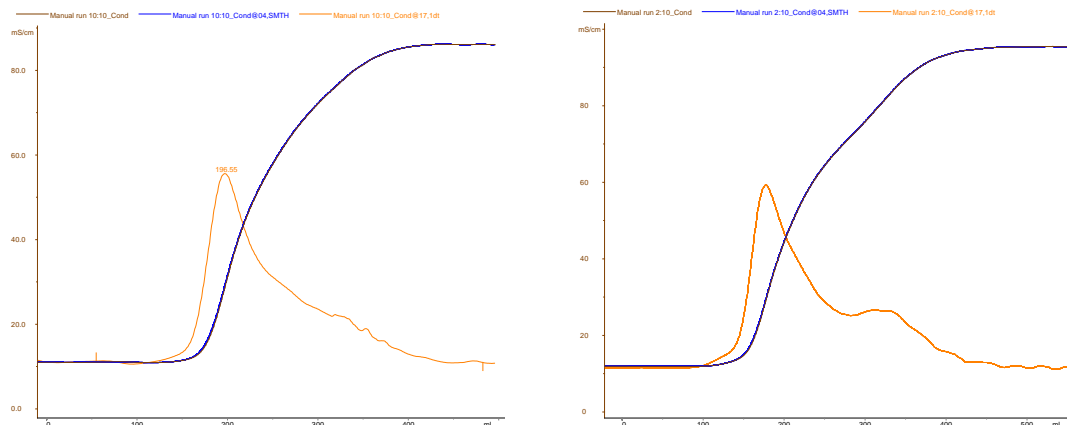


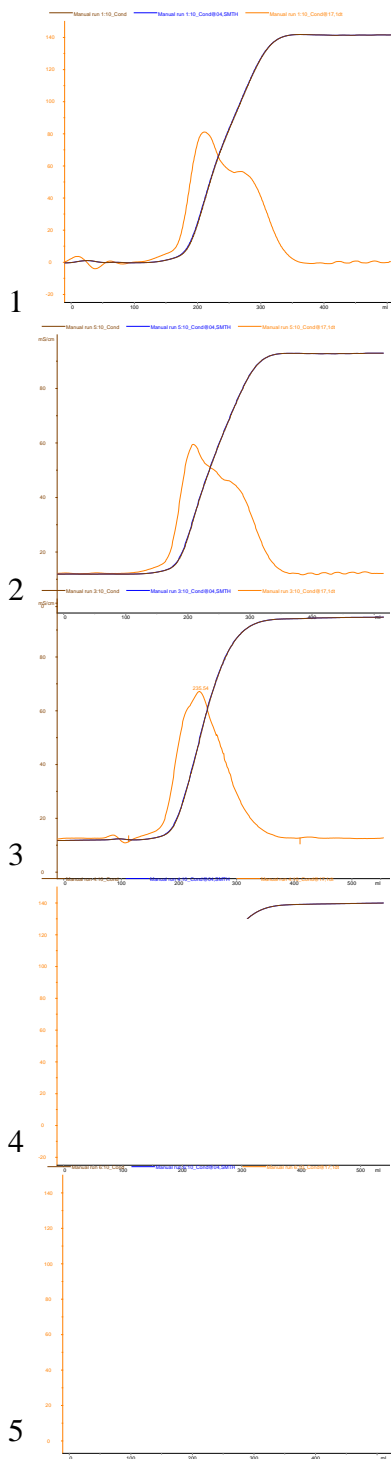
Abb. 4.6, Abb. 4.7 Salzdurchbrüche bei 150 cm/h (105.8 ml/min). Die beiden Chromatogrammen entsprechen einem Packversuch bei 850 cm/h (0.6 L/min) und zwar links mit zweitem Inlet offen und rechts ohne zweites Inlet offen. (In braun die Leitfähigkeit und in orange die Ableitung der Leitfähigkeitskurve)

Die Abb. 4.6 repräsentiert den Salzdurchbruch für eine Packung die bei 850 cm/h durchgeführt wurde. Der Nachpeak ist nur noch ganz leicht zu sehen. Der Peak ist sogar evaluierbar und gibt folgende Effizienz:

$$\begin{aligned} N &= 11.48 \\ N/m &= 191 \text{ m}^{-1} \\ \text{HETP} &= 5228.72 \text{ } \mu\text{m} \\ A &= 4.68 \end{aligned}$$

Der Peak besitzt ein starkes „Tailing“, was natürlich einen schlechten Einfluss auf die Effizienz hat. Da dieser Nachpeak noch nur leicht sichtbar ist, scheint es zu helfen, die Packgeschwindigkeit höher zu stellen.

Auf der Abb. 4.7 ist der Nachpeak aber immer noch zu sehen. Dies bedeutet, dass die Öffnung des zweiten Inlets trotzdem ein bisschen hilft.



Bei dem nächsten Packversuch wurde versucht, die optimierte Methode für das Packen der CRIO-MD 63 zu übernehmen. Die Anfangsflussrate war 0.6 L/min (850 cm/h) und wurde bei der Öffnung der Outlet auf 1 L/min erhöht. Es wurde auch getestet, ob die Konditionierung einen Effekt auf der Qualität der Packung hat.

Die nebenstehenden Chromatogrammen zeigen die Entwicklung der Salzdurchbruchskurven und der Ableitungen im Laufe des Konditionierens. Die Durchbrüche wurden bei 150 cm/h (105.8 ml/min) durchgeführt. Der erste Chromatogramm zeigt den Durchbruch vor der Konditionierung, der zweite nach einmaligem Konditionieren, der dritte bei 2 Mal, der vierte bei 4 Mal und der fünfte bei 6 Mal.

Im Laufe der Konditionierung verschwindet der Nachpeak und der Hauptpeak wird immer regelmäßiger. Die Peaks wurden ausgewertet. Die Ergebnisse sind in der nächsten Tabelle dargestellt.

Tab. 6 Effizienz und Asymmetrie im Laufe der Konditionierung

N°	A [-]	HETP [μm]	N/m [m^{-1}]
3	1.48	2028	493
4	1.7	1961	510
5	1.63	1773	564

Die Tab. 5 enthält die Effizienz und Asymmetriewerte von den auswertbaren Peaks. Die Effizienz wird ständig besser im Laufe des Konditionierens. Die Asymmetrie verbessert sich aber nicht, der Peak besitzt ein „Tailing“. Die Effizienz ist sehr niedrig im Vergleich zu der bei der CRIO-MD 62 erhaltenen Effizienz, die um die 1380 Böden pro Meter beträgt.

Dieser Versuch zeigt an, dass die Konditionierung, bei dem Packen der CRIO-MD 63 eine wichtige Rolle spielt. Es bedeutet daher, dass der Packvorgang nicht optimal ist und dass es keine gute Verteilung der Partikeln ermöglicht. Es hat auch zur Folge, dass die Packung an manchen Orten weicher ist und dass an diesen Zonen die Partikeln sich rearrangieren können, obwohl eine Kompression von 24 % erreicht wurde.

Abb. 4.8 Entwicklung der Salzdurchbrüche bei 150 cm/h im Laufe der Konditionierung. Das Packen war nach der optimierten Methode und bei 850 cm/h durchgeführt.

Aus diesem Versuch kann gefolgert werden, dass die Bedingungen, die bei dem Packen der CRIO-MD 62 gelten für das Packen der CRIO-MD 63 nicht gelten.

Der weitere Versuch wurde durchgeführt, um zu sehen, ob noch höhere Packgeschwindigkeiten eine bessere Packung bringen.

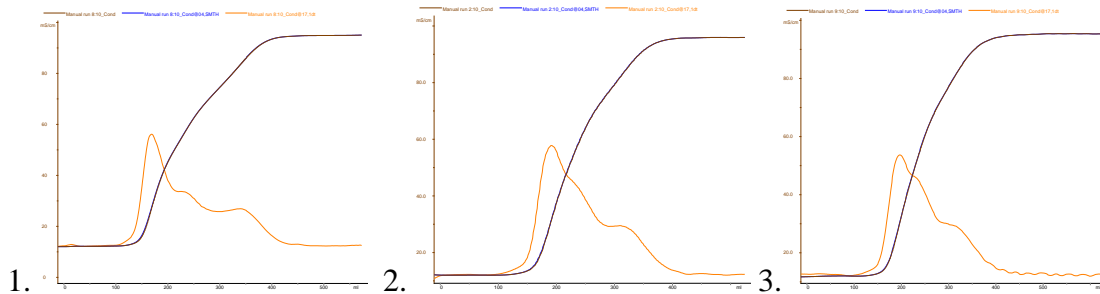


Abb. 4.9 Entwicklung (von links nach rechts) der Salzdurchbrüche bei 150 cm/h im Laufe der Konditionierung. (1. vor der Konditionierung, 2. 4Mal Flussrichtung gewechselt, 3. 8 Mal Flussrichtung gewechselt)

Die Durchbruchskurve vor der Konditionierung hat keine normale Form. Im Laufe der Konditionierung verbessert sie sich, aber der Nachpeak ist immer noch zu sehen. Die Konditionierung bringt zwar etwas, aber kann nicht auf zu schlechten Packungen einwirken. Ein Packversuch mit der optimierten Methode wurde auch durchgeführt und danach konditioniert, dies hat aber gar nichts gebracht. Es wurde erwartet, dass die Wirkung der Konditionierung bei weicheeren Packungen besser hilft.

Bei den Packversuchen mit beiden Inlets offen, wurde bemerkt, dass die Flussrate nicht gleichmäßig durch beide Inlet durchströmt, was eigentlich zu erwarten ist. Die Slurry kommt durch den Packanschluss und fließt bevorzugt durch das obere Inlet. Es wurde auch manchmal bei der Packanlage konditioniert und wurde bemerkt, dass sich ein Spalt bildet, wenn zu hoch gefahren wird, was normal ist, aber dass dieses Spalt nur sich nach unten bildet, abgesehen von welcher Frittenseite die Flüssigkeit eingeht. Es wurde deswegen vermutet, dass die Packung nach unten, untergepackt ist im Vergleich zum oberen Bereich.

Es wurde deshalb nach der unterstehenden Abbildung gepackt, und zwar nur dem zweiten Inlet geöffnet. Gepackt wurde mit 850 cm/h, 20 % Slurrykonzentration und 25 % berechneter Kompression

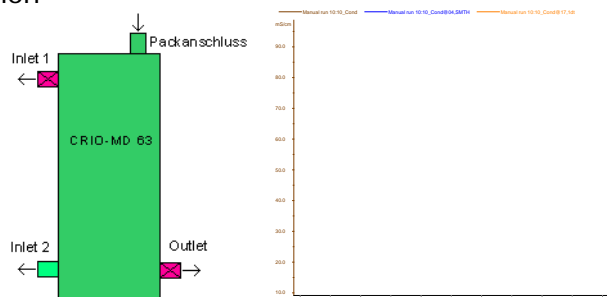


Abb. 4.10 Schematische Darstellung der Packmethode und Chromatogramm der Durchbruchskurve, nach Konditionierung, bei 150 cm/h (105.8 ml/min)

Die Durchbruchskurve sieht schlecht aus. Der Nachpeak ist sogar mehr ausgeprägt. Der gleiche Packversuch wurde wiederholt, aber mit 650 cm/h, es sah genau so schlecht aus. Anscheinend sind die Gelpartikeln noch schlechter verteilt, wenn das Inlet 1 geschlossen wird.

Dieser zweite Durchbruch kommt vielleicht von einer schlechten Verteilung des Flusses an der Eingangsritze. Der Fluss könnte nicht ganz nach unten fließen, was diesen verspäteten Durchbruch verursachen könnte.

Es kann auch sein, dass dieser Nachpeak nicht nur an der Packung liegt, aber eher am System. Zuerst können die Fritten getestet werden. Die Säule war mit den 10 µm Fritten montiert. Diese wurden gegen die 5 µm Fritten ausgetauscht, zum sehen, ob es daran liegt. Der gleiche Versuch wie in Abb. 4.10 dargestellt wurde wiederholt. Das erhaltene Chromatogramm sah ähnlich aus. Zur Folge können die Fritten ausgeschlossen werden.

Es wurde bemerkt, dass die Anschlüsse, die die Säule an die Äkta Pilot den Anschluss ermöglichen haben einen kleineren Durchmesser als die Anschlüsse, die zum Packen gebraucht werden. Kleinerer Durchmesser bedeutet höhere lineare Geschwindigkeit, vielleicht so hoch dass der Fluss direkt durch die Säule durchgeht und dass es erst später der Boden erreicht. Es könnte diesen verspäteten Nachpeak einigermaßen erklären.

Der beste Packversuch der CRIO-MD 63 Packversuche war nach der „optimierten Methode“ und bei 850 cm/h. Deswegen wurden die gleichen Bedingungen genommen, und zwar: 850 cm/h, 20% Slurrykonzentration, 25 % berechnete Kompression, um zu testen, ob es an den Anschlüssen liegen kann.

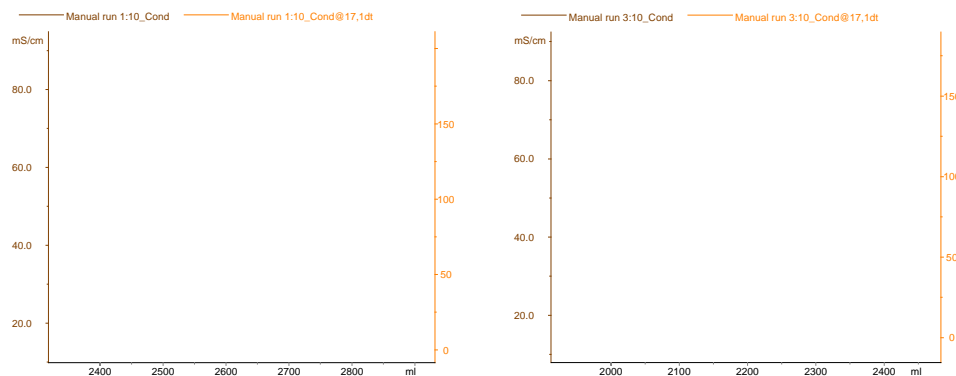


Abb. 4.11 Chromatogramm der Salzdurchbruchskurven (braun) und entsprechenden Ableitungen (orange - - -) mit 300 cm/h (211.7 ml/min) mit den „normalen“ Anschlüssen vor Konditionierung (links) und nach Konditionierung (rechts)

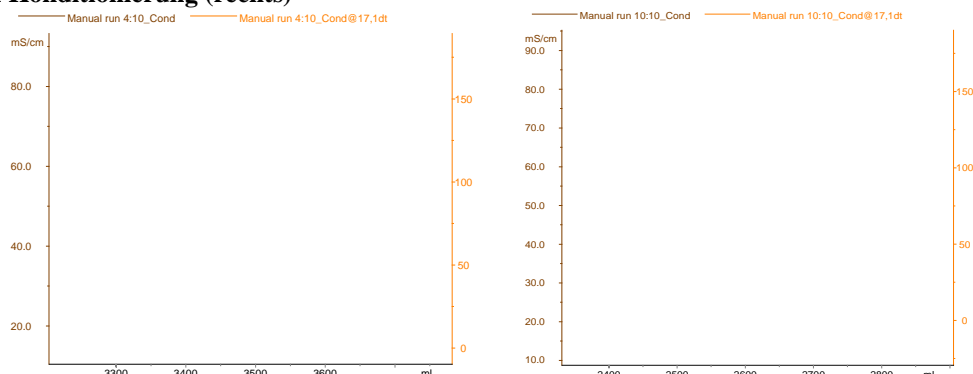


Abb. 4.12 Chromatogramm der Salzdurchbruchskurven (braun) und entsprechenden Ableitungen (orange) mit 300 cm/h (211.7 ml/min) mit den „anderen“ Anschlüssen vor Konditionierung (links) und nach Konditionierung (rechts)

Was « normale » Anschlüsse » genannt ist, sind die Anschlüsse die einen kleineren Durchmesser als der Eingangsdurchmesser besitzen. Die « anderen » Anschlüsse sind die,

die einen ähnlichen Durchmesser wie der Eingangsdurchmesser besitzen. Deren Einfluss ist getestet. Was auf die Abb. 4.11 und Abb. 4.12 zu sehen ist, ist der niedrige Einfluss der Konditionierung über die Form der Durchbruchskurve. Dieser Einfluss ist auf nächster Abbildung klarer dargestellt.

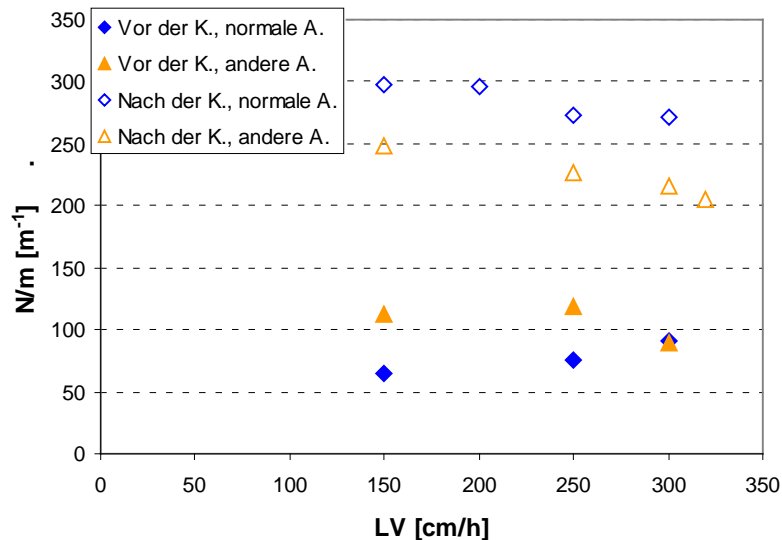


Abb. 4.13 Graphische Darstellung der mittels Salzdurchbrüche bestimmte Effizienz der Packung vor (voll) und nach (leer) der Konditionierung, mit normalen (blau) und anderen (orange) Anschlüssen

Die Abb. 4.13 zeigt an, dass die Effizienz in Böden pro Meter nach der Konditionierung höher ist. Dieser Unterschied ist besonders groß für die Versuche mit den « normalen » Anschlüsse zu sehen, was wahrscheinlich nicht wirklich bedeutungsvoll ist. Obwohl die Effizienz nach der Konditionierung wesentlich höher ist, ist die Effizienz immer noch ziemlich niedrig im Vergleich zu der erhaltenen Effizienz bei dem Packen der CRIO-MD 62 (1376 m^3 bei 150 cm/h). Die nächste Abbildung stellt die Ergebnissen nach der Konditionierung dar. Die Ergebnisse sind als Tabelle im Anhang 7.1 angegeben.

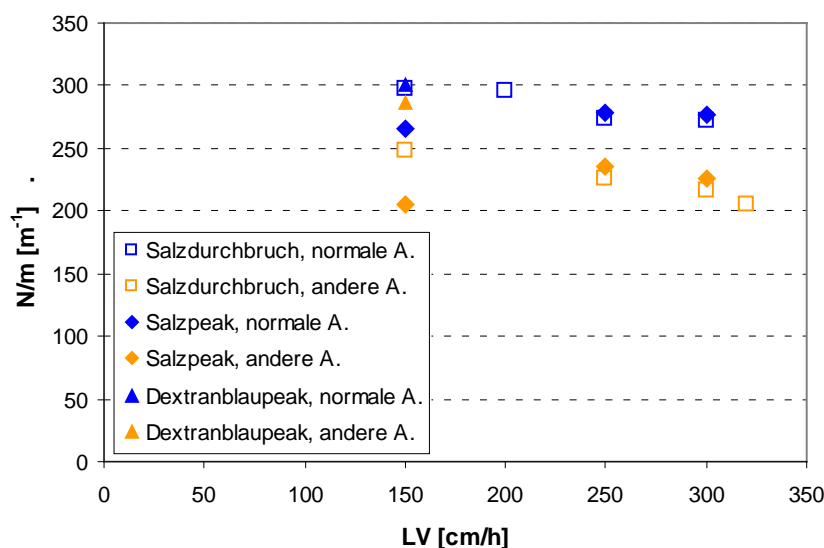


Abb. 4.14 Graphische Darstellung der Effizienz der Packung nach der Konditionierung mit „normalen“ (blau) und „anderen“ (orange) Anschlüsse. Die Effizienz ist in Böden pro Meter angegeben und wurde mittels Salzdurchbrüchen, Salzpulsen und Dextranblaupulsen berechnet.

Auf der Abb. 4.14 ist zu sehen, dass die Versuche mit den « anderen » (orange) Anschlüsse eine schlechtere Effizienz als die Versuche mit den « normalen » (blau) Anschlüsse. Bei beiden ist aber immer noch der Nachpeak anwesend, und das auch für die Salzpeaks. Dieser Nachpeak ist bei den Dextranblaupeaks nicht zu sehen, wie es auf den nächsten Abbildungen zu sehen ist.

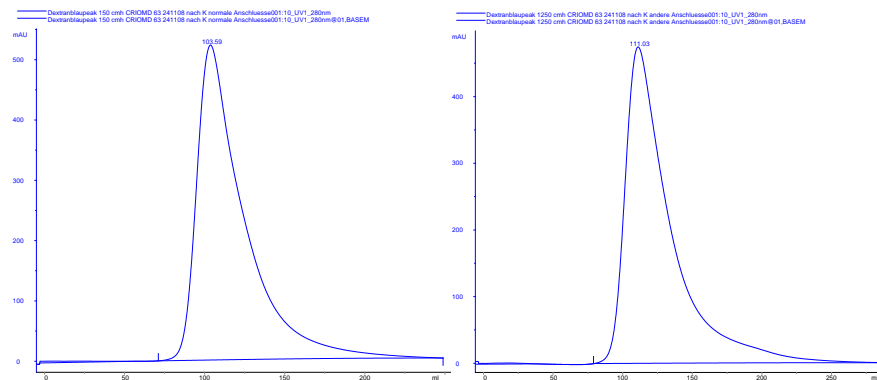
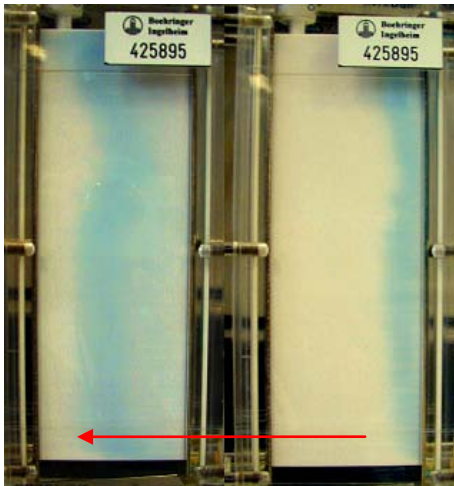


Abb. 4.15 Chromatogramm des Dextranblaupeaks mit „normalen“ (links) und anderen (rechts) Anschlüsse bei 150 cm/h (105.8 ml/min)

Zwischen « normalen » und « anderen » Anschlüssen ist fast kein Unterschied. Beide Peaks haben ein starkes « Tailing », die Asymmetrie ist 3.09 und bzw. 3.21. Da diesen Nachpeak nicht anwesend ist kann bedeuten, dass es etwas mit den Poren schief geht. Allerdings ist das Dextranblau Molekül viel größer als die Salz-Ionen und hat daher keinen Zugriff auf die Poren. Die Dextranblau wurde für die Flussvisualisierung angewendet. Photos wurden zu verschiedenen Momenten der Versuch genommen, um der Lauf des Front darzustellen.



Auf die Abb. 4.16 ist das Vorwärtskommen des Flusses sichtbar. Es ermöglicht die allgemeine Form der Front zu beobachten. Er soll normalerweise leicht schiefwinkelig sein aber eine gerade Form haben und nicht eine Kurve machen. Die Kurve dehnt sich im Laufe des Versuchs aus und die Bande des Fronts auch, was zum Teil von dem « Tailing » verantwortlich ist. Diese Kurve bewirkt anscheinend das größte Teil des « Tailings ».

Abb. 4.16 Photos des Vorwärtskommens des Dextranblaupeaks während des Laufes bei 150 cm/h (105.8 ml/min)

Diese Kurve ist möglicherweise auf einem dichteren Bereich der Packung zurückzuführen oder auf was anders, dass vor der Eingangsfrötte passieren kann, wie z. B. Rückmischung. Dieses Problem ist wahrscheinlich beim Salzpuls besonders sichtbar, denn es noch in den Poren geht. Zum Prüfen, ob es nicht von dem Leitfähigkeitssignal kommen könnte wurden zusätzlichen Versuchen durchgeführt. Bei dem Salzdurchlauf sind eigentlich dadurch H^+ -Ionen freigegeben, dies kann den Leitfähigkeitsdetektor beeinflussen.

Versuche mit NaNO_3 und NaCl in Wasser und in Puffer wurden durchgeführt, aber führen zur Tatsache, dass es überhaupt keinen Unterschied in der Form des Peaks bewirkt, in UV noch in Leitfähigkeitssignal, gepuffert oder nicht. Dieser Nachpeak kommt daher nicht von der Detektionsart.

Da die Salze noch Wechselwirkungen mit der stationären Phase haben, wurde es noch mit Acetonpülse geprüft, aber diese sahen genau so aus wie die Salzpeaks. Diesen Weg kann ausgeschlossen werden.

Ein Lysozympeak wurde unter unbindenden Bedingungen durchgeführt.

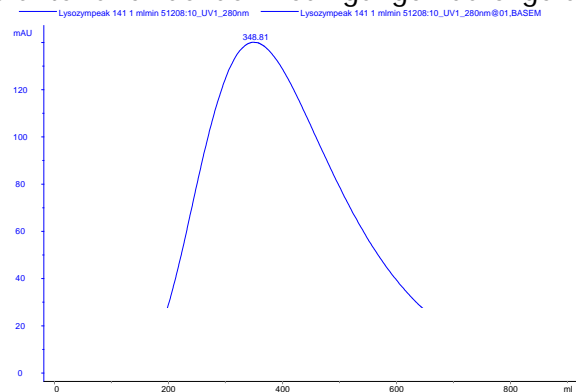


Abb. 4.17 Chromatogramm des Lysozympeaks, Puffer A und B NaP 500 mM pH 7, 200 cm/h (141.1 ml/min)

Auf die Abb. 4.17 ist zu sehen, dass der Lysozympeak sehr spät (ca. 348 ml) auf dem Detektor kommt, im Vergleich zu dem Acetonpeak (ca. 112 ml). Der Lysozym ist größer als die Acetonmolekül, es heißt, dass der Lysozym trotzdem Wechselwirkungen mit dem Fractogel gehabt hat. Wenn nicht, soll der Lysozym früher als der Acetonpeak kommen, denn es wahrscheinlich von den Poren ausgeschlossen wurde. Sein Durchfluss wurde wegen der Wechselwirkungen verlangsamt. Bei diesem Peak ist auch keinen Nachpeak zu sehen. Der Peak hat einen Asymmetriekoeffizient von 2.13 und eine Effizienz von 433 Böden pro Meter. Es kann sein, dass dieser Nachpeak auch an den Gelpartikeln liegen kann. Auch mit dem Dextranblau wurde keinen Nachpeak zu sehen, obwohl der Peak ein großes Tailing besitzt. Die beiden sind von den Poren ausgeschlossen. Der Nachpeak ist vielleicht in dem Tailing versteckt. Dieser „Nachpeak“ Phänomen ist nicht so stark ausgeprägt als bei kleinen Molekülen, weil dank ihrer Größe die großen Molekülen schneller durch das Gelbett gehen als die kleinen.

Ein Modell wurde entwickelt, um Stufengradienten zu beschreiben. Dafür wurden verschiedene Durchbruchkurven mit unterschiedlichen Flussraten und unterschiedliche Stufenhöhe (von 0 M NaCl bis 0.1, 0.2, 0.3, usw, ...) durchgeführt. Es wurde gefunden, dass die S-Form der Durchbruchkurve und die Zeitspanne bis Anfang der Durchbruchkurve von der Flussrate und Stufenhöhe beeinflusst sind. Das Modell kann aber nur monotone Kurven, die keinen Wendepunkt besitzen beschreiben. In Wirklichkeit hat die Durchbruchkurve eine S-Form und daher einen Wendepunkt. Die Asymmetrie soll mit der Erhöhung der Flussrate senken. Die Kurve wird steiler mit der Erhöhung der Flussrate und die maximale Salzkonzentration ist schneller erreicht, wenn die Höhe der Stufen niedrig ist [14]. Diese Verhalten gelten aber nur für Systemversuche (ohne Säule). Hier ist gemeint, dass es nicht vergessen werden muss, dass der Salzfront schon deformiert auf die Säule ankommt. Außerdem wurden diese Versuche mit Zwischenadapter von axialer Säule durchgeführt. Der

Effekt von dem Verteilersystem am Eingang der Säule ist bei den Versuchen mit der radialen Säule nicht berücksichtigt. Da die Fritten nicht die gleiche Oberfläche haben, ist deren Effekt schwer zu simulieren, deswegen wurden die Versuche ohne Säule auch ohne Zwischenadapter durchgeführt. Es hat zur Folge, dass nur die Verbreitung und die Deformation, die durch die Schläuche verursacht wird, ist vom Peak oder Durchbruchskurve mit Säule abgezogen.

Eine Technik ermöglicht es zu trennen, die unvermeidbaren Effekten des mikroskopischen Prozesses von den Effekten der Missverteilung des Flusses. Außerdem ermöglicht sie die Missverteilung des Flusses von dem Effekt des gepackten Bettes zu unterscheiden. Diese Technik besteht darin, den Fluss umzukehren, wenn theoretisch der Tracer Mitte der Säule sich befindet. Der Tracer wird zurück in die Säule kehren und durch die Eingangsritze durchgehen. Jede Dispersion bei makroskopischen Fluss Variationen wird dadurch entfernt. Der Effekt, der zur Bandverbreiterung gebunden ist ist irreversibel und ist von der Richtung unabhängig. Dieser wird hingegen addiert. Durch solche Versuche können diese mikro- und makroskopischen Effekt abkuppeln werden und sogar quantifiziert werden [24].

Drei Versuchen wurden bei der CRIO-MD 63 durchgeführt, wobei der Fluss nach einem bestimmten Volumen umgekehrt wird. Ein Acetonpuls von 5 ml wurde durch die Probenpumpe injiziert, mit einer vorgeschriebenen Methode. Nach einem bestimmten Volumen in normaler Richtung wurde die Methode gestoppt und dann der Fluss bei selber Flussrate manuell umgekehrt.

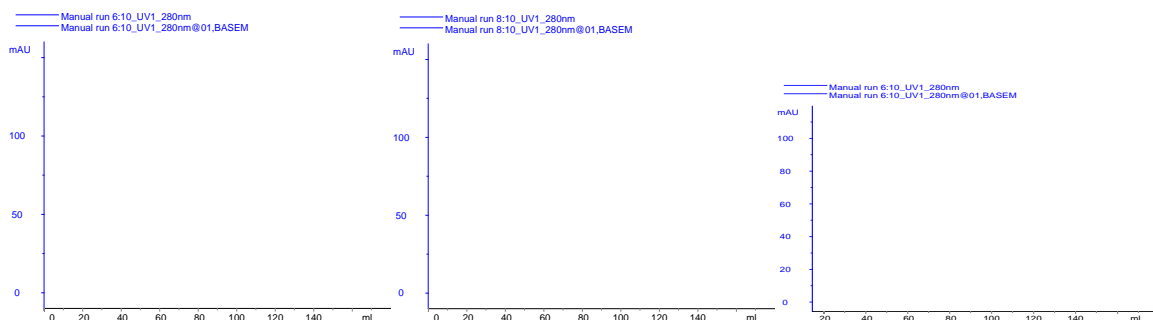


Abb. 4.18 Chromatogrammen der Versuchen wo der Fluss nach einem bestimmten Volumen umgekehrt wurde (links: nach ca. 35 ml, mitte: nach ca. 65 ml, rechts : nach ca. 95 ml)

Die Chromatogrammen zeigen alle einen Peak, der keinen Nachpeak besitzt. Je weiter in der Säule der Tracer fließt, desto flacher wird der Peak, was zu erwarten ist. Der Nachpeak liegt nicht an der Packung, denn der Effekt der makroskopischen Flussvariationen wurde durch die Flussumkehr aufgehoben. Die gleichen Versuche wurden durchgeführt, aber mit der Säule umgekehrt (Outlet → Inlet) angeschlossen.

Ergebnisse und Diskussion

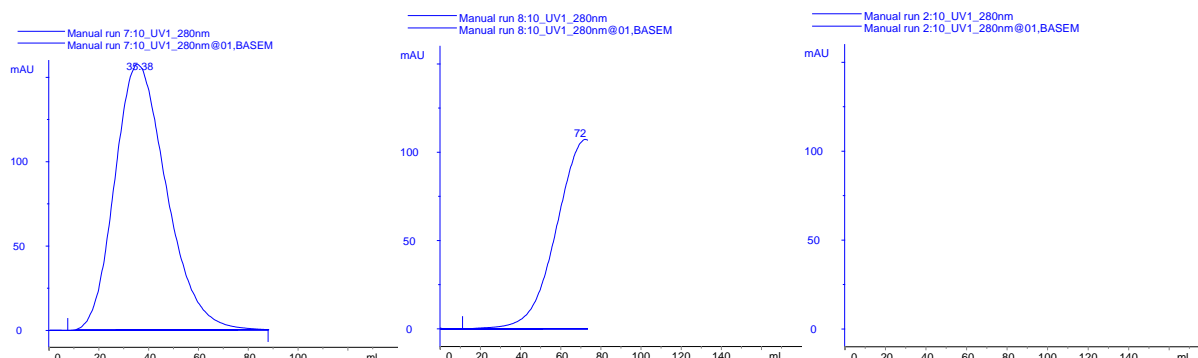


Abb. 4.19 Chromatogrammen der Versuchen bei denen der Fluss nach einem bestimmten Volumen umgekehrt wurde (links: nach ca. 35 ml, mitte: nach ca. 65 ml, rechts : nach 95 ml), Säule wurde von Outlet zu Inlet angeschlossen

Die Peaks die auf die Chromatogramm zu sehen sind, besitzen auch keinen Nachpeak. Das gilt als Bestätigung, dass dieser Nachpeak nicht durch die Packung verursacht wurde. Als Abschluss dieses Teil wurden noch Acetonpulsen gemacht und zwar mit der Säule von Inlet → Outlet (normale Richtung) und von Outlet → Inlet (umgekehrte Richtung) angeschlossen.

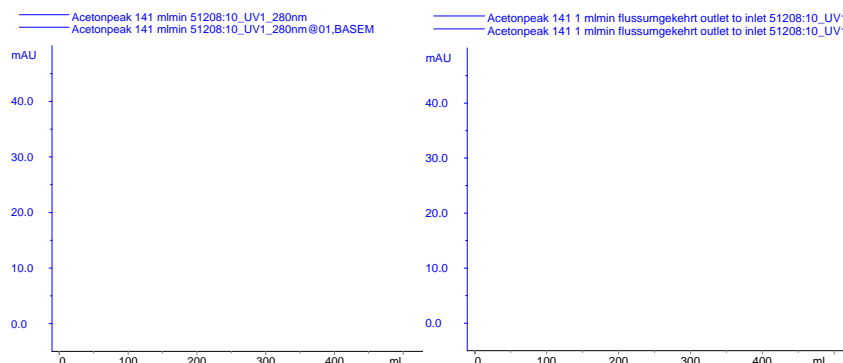


Abb. 4.20 Chromatogrammen von Acetonpulsen mit Säule in normaler Richtung (links) und in umgekehrter (rechts) Richtung angeschlossen, Versuche wurden mit 141.1 ml/min durchgeführt

In beiden Richtung ist dieser Nachpeak zu sehen. Der liegt definitiv nicht an der Packung sondern eher an Verteilersystem. Die Flussumkehrversuchen ermöglichen die Effizienz der Packung zu bestimmen. Da diese von dem Weg in der Säule beeinflusst ist, soll diese für jeden Peak konstant bleiben, sobald die Packung homogen ist. Mit dem Retentionsvolumen der Peaks wurde gefunden, welche Strecke der Tracer durchlaufen ist. Das Volumen der Schläuchen und deren Effekt über die Verbreitung des Peaks wurde abgezogen. Die untenstehende Tabelle dargestellt.

Tab. 7 Effizienzbestimmung für die Flussumkehrversuchen

	μ_1 [ml]	$(\mu_1 * 2) - R_{T, \text{Schläuchen}}$ [ml]	σ^2 [ml]	$\sigma^2 - \sigma^2_{\text{Schläuchen}}$ [ml]	$\sigma^2/(\mu_1 * 2)$ [ml]	A	N	Strecke (1x) [mm]	N/m [m ⁻¹]
Inlet → Outlet	38,25	46,50	110,05	80,05	1,44	1,37	27,01	7,59	1779,99
	70,15	110,29	201,06	171,06	1,43	1,25	71,11	14,66	2426,00
	100,22	170,44	313,75	283,75	1,57	1,26	102,38	21,73	2356,16
Outlet → Inlet	38,22	46,43	116,09	86,09	1,52	1,45	25,04	12,88	971,99
	74,83	119,66	224,59	194,59	1,50	1,27	73,59	23,66	1555,02
	99,17	168,34	297,17	267,17	1,50	1,19	106,07	30,22	1755,15

Die Effizienz in Böden pro Meter variiert mit der Position, wo der Fluss umgekehrt ist. Das Verhältnis zwischen Varianz σ^2 und 1. Moment μ_1 ist aber ziemlich konstant und daher unabhängig von der Position. Als totale Porosität ε_t wurde 0.92 genommen. Das Retentionsvolumen wurde in Strecke in der Säule umgewandelt.

Aus diesen Werten kann die Effizienz als Anzahl Böden pro Meter in Abhängigkeit der Position in der Säule dargestellt werden.

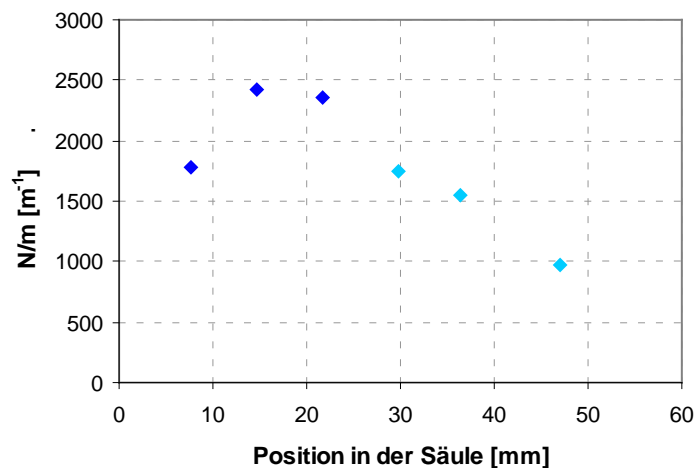


Abb. 4.21 Graphische Darstellung der Effizienz in N/m angegeben in Abhängigkeit der Position in der Säule, wo der Fluss umgekehrt wird. Die dunklen Punkte wurden mit der Säule in normaler Richtung angeschlossen und die hellen Punkte wurden mit der Säule in umgekehrter Richtung angeschlossen durchgeführt.

Die Abb. 4.21 zeigt es klar, dass die Effizienz im Laufe der Trennstrecke nicht konstant bleibt. Das bestätigt nochmals, dass das Bett nicht homogen gepackt wurde. Was auch zu merken ist, ist, für einen Acetonpuls bei gleicher Flussrate und für einen normalen Lauf wird eine Effizienz von 234 Böden pro Meter erreicht und einen Asymmetriekoeffizienten von 2.84. Bei jedem Punkt des Graphs ist die Effizienz viel höher. Dies bedeutet, dass der Einfluss des Verteilersystems auf die Effizienz sehr gross ist. Die Packung an sich hat im schlechteren Fall 971.99 Böden pro Meter Effizienz. Diese fällt runter, wenn es dazu der Effekt der Fritten gezählt ist. Da der Effekt der Schläuchen schon abgezogen wurde, liegt diese starke Abnahme an der Eingangsfritte oder an dem Raum vor der Fritte. Als Bestätigung wurden noch Versuche mit kürzeren Schläuchen durchgeführt, und deren Chromatogramm zeigen auch noch einen Nachpeak.

Als Zusammenfassung dieses Teils kann zusammengeschlossen werden, dass die Bedingungen zu einer optimalen Packung der CRIO-MD 63 nicht gefunden wurden. Alle mögliche Positionen zur Anschließung der Säule bei dem Packvorgang wurden versucht, keine hat was relevantes gebracht. Es muss daher die Packflussrate, Kompression oder noch die Slurrykonzentration optimieren werden. Der Einfluss der Konditionierung ist groß und kann die Packung in manchen Fällen stark verbessern. Der Eingangsverteilteraum hat einen großen und schlechten auf die Effizienz, dieser ist als Nachpeak dargestellt. Dies gilt nur für kleine Tracermolekülen wie Salz oder Aceton. Der Nachpeak ist bei grösseren Molekülen nicht vorliegend, weil es anscheinend von einem starken Tailing versteckt ist. Diese Scale-

down Säule ist laut dieser Feststellungen kein gutes Modell, um das Verhalten einer ganzen Säule zu repräsentieren.

4.3 Lineare Gradienten Elution

4.3.1 K' und K_{crit} Bestimmung

Die benötigten Werte wurden bestimmt, um die Verteilungskoeffizienten zu berechnen.

Tab. 8 Daten der Säulen und Verteilungskoeffizienten

	Scout Säule (axial)	CRIO-MD 62 (radial)
V_c [ml]	1	125
V_0 [ml]	0,33	53,63
V_{GFP} [ml]	0,93	-
V_t [ml]	0,83	105,00
H [-]	2,03	1,33
ε_0 [-]	0,33	0,43
ε_t [-]	0,83	0,84
ε_{Poren} [-]	0,50	0,41
K'	0,74	0,72
K_{crit}	0,90	-

Die Tab. 8 stellt einige zur Säule bezügliche Daten dar. Der Salzverteilungskoeffizient K' ist bei beiden Säulen ähnlich. Die Zwischenkornporosität ist aber bei der radialen größer als bei der axialen. Der ε_{Poren} ist kleiner bei der radialen als bei der axialen, was bedeutet dass die Poren der Gelpartikel verstopft. Die Kompression der Packung ist größer bei der axialen. Der K_{crit} wurde bei der axialen nicht bestimmt, denn bei dem Versuch mit der axialen wurde bemerkt, dass die Probe nicht genügend rein war, um den Wert benutzen zu können. Der steht nur in der Tabelle als Indikation. Für die Berechnung der K-I Kurven wird der K' angewendet.

Tab. 9 Effizienzbestimmung bei der axialen und der radialen Säule

	Scout Säule (axial)	CRIO-MD 62 (radial)
HETP [μ m]	495.91	784.88
N/m [m^{-1}]	2016.49	1274.08
N [-]	38.92	76.44

In der Tab. 9 wurden die Effizienzdaten jeder Säule angezeigt. Die HETP und die Anzahl Böden pro Meter ermöglichen die Effizienz der Säule zu vergleichen. Die Säule an sich ist besser gepackt als die radiale, aber da die radiale einen längeren Trennweg hat ist die effizienter, wie die Böden es zeigen.

Nach der Charakterisierung der Säulen können die Elutionsversuche beginnen.

4.3.2 Gradientenelution bei der Merck Scout Säule

Wegen eines Fehlers in Probenaufarbeitung wurde die Leitfähigkeit der Probe ziemlich höher als der von dem Puffer A. Versuche wurden durchgeführt: mit unreduzierter Probe, mit reduzierter Probe und mit reduzierter Probe bei der die Leitfähigkeit nachjustiert wurde. Die ist dadurch verdünnt worden und ist in der nächsten Abbildung als verdünnt genannt.

Die lineare Geschwindigkeit wurde als 120 cm/h für alle Versuche gehalten. Die wurde so ausgewählt, dass es eine mögliche Flussrate für die axiale und die radiale Säule ist.

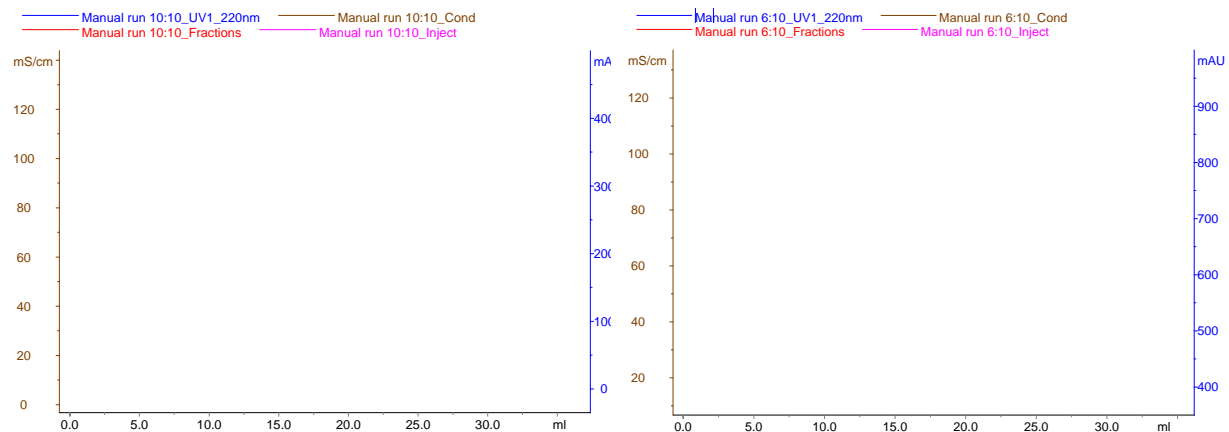


Abb. 4.22 Chromatogramme von einer 15 Säulenvolumen Gradientelution. Links ist die Probe nicht reduziert und rechts ist die reduziert. (in blau der UV Signal bei 220 nm, in braun das Leitfähigkeitssignal)

Auf den Chromatogrammen sind 3 Peaks zu sehen, der erste ist der Durchlauf, der zweite kommt aus der Elution und der dritte ist durch die Injektion von NaOH 0.5 M verursacht und ist aber keine Proteinen, nur die selbst Absorption der NaOH-Lösung bei 220 nm. Bei der linken Chromatogramm ist ein Nachpeak zu sehen, was bei der rechten nicht zu sehen ist. Dieser Nachpeak ist durch die Anwesenheit von Dimeren verursacht, wie es die untenstehende SDS-PAGE Analyse anzeigt.

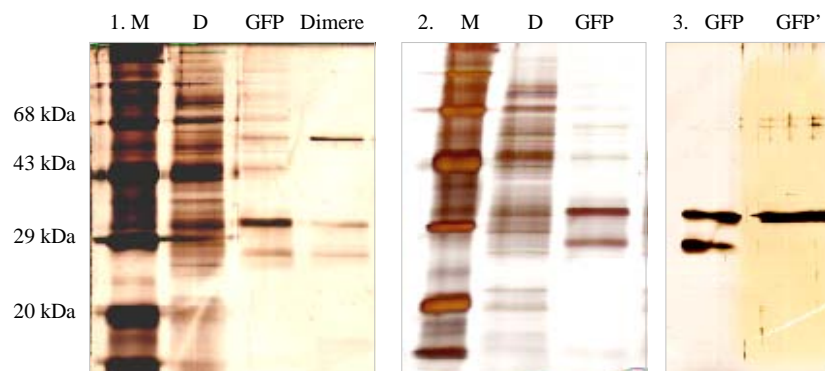


Abb. 4.23 SDS-PAGE Gele: 1. unreduzierte Probe, 2. reduzierte Probe. M: Marker, D: Durchlauf. Gel 3: GFP: Probe reduziert, GFP': Probe reduziert mit Probenpuffer + DTT

Was auf dem Gel klar zu sehen ist, viele in der Probe enthaltene Proteinen laufen direkt durch. Die GFP und Dimeren Fraktionen sind ziemlich rein im Vergleich zum Durchlauf. Der Capture Schritt ist daher effizient.

Bei beider GFP Probe sind 2 Banden um die 29 kDa zu sehen. Das 3. Gel erklärt die Entstehung der kleineren Bande. Wenn DTT in Probenpuffer zugegeben ist, sind die Disulfidbrücken während des ganzen Laufs sicher offen. Die kleinere Bande ist dann von einer kompakteren EGFP Form verursacht, die anscheinend innerhalb von sich selbst eine oder 2 Disulfidbrücken gebildet hat.

Was aber auch berücksichtigen muss ist die starke Verdünnung der erhaltenen Fraktionen. Das injizierte Volumen ist 0.4 ml und das gesammelte Volumen der GFP Fraktion ist um die 7 ml und je größer das Gradientenvolumen wird, desto verdünnter wird die gesammelte Fraktion sein. Für die Weiteraufarbeitung der GFP muss einen Aufkonzentrationsschritt folgen.

Diese Gradienten ermöglichten die GH-I_R und die K-I Kurven zu zeichnen. Die Gradienten waren 15, 25, 35 und 45 Säulenvolumen (CV).

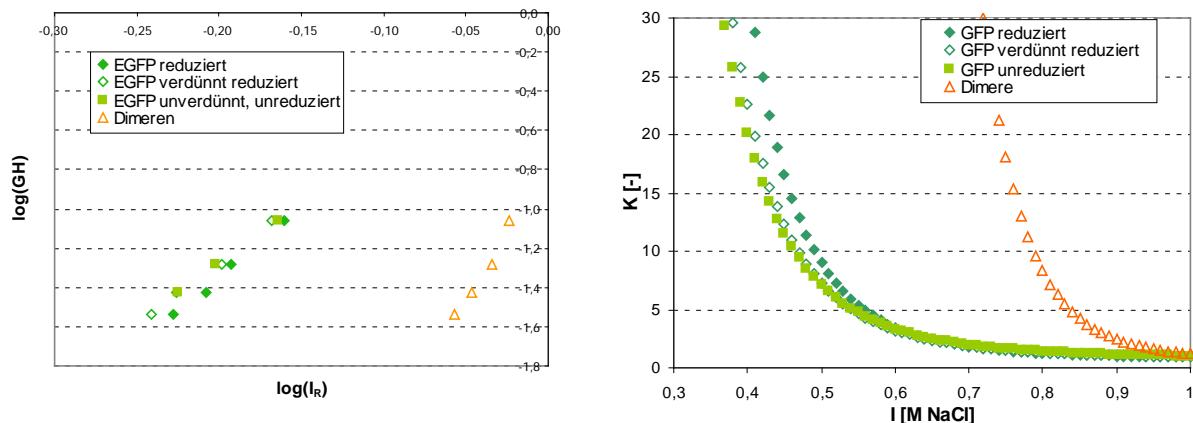


Abb. 4.24 GH-I_R Plot und K-I-Plot für die Gradientenversuchen bei der Merck Scouting Säule, Flussrate 120 cm/h (1.16 ml/min), Probenvolumen 400 µl

Die Werte, die das Zeichnen der Kurven ermöglicht haben sind in der Anhang 7.2 angezeigt. Es gibt einen leichten Unterschied zwischen den drei Versuchen zu sehen. Der Unterschied zwischen GFP reduziert und unreduziert bei einem K von 15 ist von ca. 30 mM und zwischen den beiden reduzierten Proben von ein bisschen weniger als 30 mM.

Die Reduktion hat für Effekt gehabt, dass das Protein bei der reduzierten Probe stärker bindet als das bei der unreduzierten. Die Reduktion macht es sicher, dass die Cystein in tag nicht Disulfidbrücken innerhalb der Moleküle oder mit anderen Molekülen bildet. Der stark positivgeladene tag ist daher frei, um sich mit der SO₃⁻ Gruppen des Fractogels zu binden.

Die Nachjustierung der Probenleitfähigkeit, und dazu ihre Verdünnung, hat eine Verschiebung der reduzierten Kurve in die Richtung einer niedrigeren Ionenstärke verursacht. Diese Beobachtungen sind für einen Verteilungskoeffizient von höher als 7 machbar, denn unter diesem K-Wert treffen sich die K-I Kurven.

In jedem Fall ist die EGFP von den Dimeren leicht trennbar, durch z. B. eine 1. Stufe bei 700 mM und die 2. Stufe 1 M NaCl.

Was aber noch zu merken ist, ist dass die Benzonsasen noch in der Probe sein können. Laut dem Hersteller der Benzonsase, die für die Reduktion der Viskosität der EGPF Probe benutzt wurden, können die Benzonsase bei 100 mM NaCl, 20 mM Phosphat und pH 6 auf dem Fractogel SO₃⁻ binden [21]. Die Benzonsasen sind nicht durch EGFP Probe Aufarbeitungsprozess entfernt. Diese haben sogar ein Molekulargewicht von 30 kDa, so wie die EGFP. Laut dem Hersteller sollen die Benzonsasen bei 200 mM NaCl und pH 6 eluieren [21]. Da diese ein pI von 6.85 besitzen sind sie bei pH 5.8 (pH vom Prozess) positivgeladen und können deswegen binden. Die Benzonsasen könnten von der Probe entfernt werden, wenn nach dem Verdau, der pH-Wert auf 6.85 runtergebracht wurde. Es würde deren Ausfallen verursachen. Durch eine Ultrazentrifugation würden sie leicht entfernt. Die SDS-PAGE wird aber von deren Anwesenheit nicht gestört, denn ihre Konzentration im Vergleich zur EGFP Konzentration sehr niedrig ist.

4.3.3 Stufenelution bei der Merck Scouting Säule mit reduzierter Probe

Auf Basis der bereits vorgestellten K-I Kurven wurde eine Stufenelution mit der reduzierten und Leitfähigkeitsnachjustierte Probe durchgeführt.

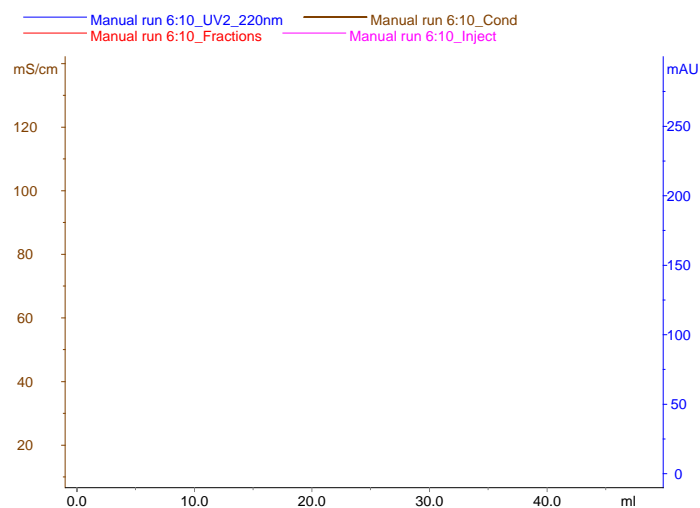


Abb. 4.25 Stufenelution (rot: UV 220 nm, braun - - - Leitfähigkeit) 1. Stufe bei 0.1 M, 2. Stufe bei 0.7 M, 3. Stufe bei 1 M, Regeneration bei 2M.

Der EGFP Peak eluiert mit der 2. Stufe. Die 3. Stufe wurde gemacht, um zu sehen, ob eventuell noch Dimeren in der Probe waren. Die Puffer absorbieren anscheinend ein bisschen das UV-Signal, da wenn die Leitfähigkeit hoch geht wird das UV-Signal ein bisschen gestört und stabilisiert bei einem niedrigeren Wert. Dieses Phänomen kann der letzte Peak erklären. Der EGFP Peak hat nicht eine normale Form, es ist anscheinend nicht nur EGFP die eluiert.

Diese Stufenelution hat die Trennung von dem Vorpeak und der EGFP Peak ermöglicht. Eine Stufenelution ist aber relevanter wenn mehrere Proteinen zu trennen sind. Deswegen werden die Gradientenelutionsversuche bei der CRIO-MD 62 mit einer unreduzierten Probe durchgeführt.

4.3.4 Gradientenelution der EGFP Probe mit der CRIO-MD 62

Neue Puffer und neue Probe wurden für diese Versuche vorbereitet. Die Probe wurde 14x verdünnt und das Probenvolumen bei jedem Versuch ist von 30 ml. Die Flussrate ist 42.3 ml/min, es entspricht 120 cm/h bei $A_{79\%}$. Da wurden 3 Gradienten geführt, und zwar 15, 25 und 35 CV.

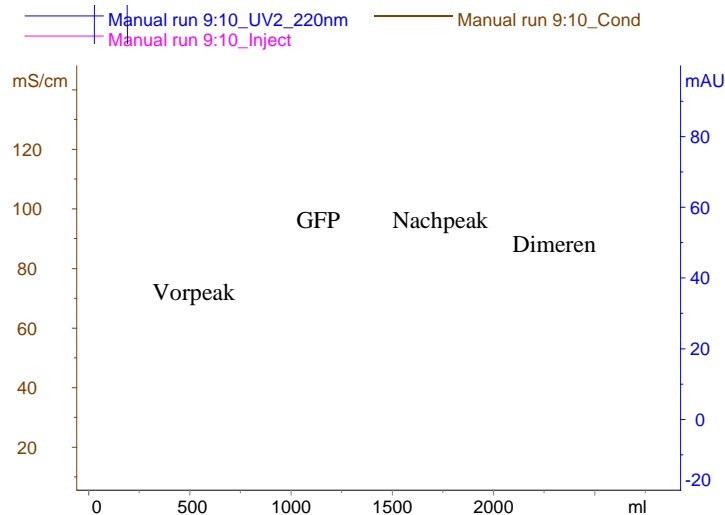


Abb. 4.26 25 CV Gradientenelution (braun - - - Leitfähigkeit, rot kontinuierlich UV 220 nm)

Der Gradient ist nicht regelmäßig. Sobald alle Peaks eluiert wurden, wurde die Leitfähigkeit für Regeneration auf 2 M gesetzt und auf 50 mM als Reäquilibration runter gesetzt. Mehrere Peaks sind zu sehen. Die Fraktionen von denen wurden gesammelt und per SDS-PAGE analysiert.

Bei F1 befindet sich die stärkste Bande um die 45 kDa. Bei der F2 sind mehrere Banden zu sehen, die mehr als 43 kDa sind. Die stärkste ist aber bei ca. 30 kDa und soll die EGFP entsprechen. Bei F3, F4, F5 und F6 sind immer 2 Banden um die 29 kDa zu sehen, das sollte die EGFP sein. Bei F5, F6 und F7 liegt eine Bande zwischen 43 und 68 kDa, die entspricht den Dimeren. Die Peaks sind auf dem Chromatogramm nicht gut getrennt, das ist bei den Fraktionen auch zu merken, denn in fast allen Fraktionen ist eine EGFP Bande zu sehen.

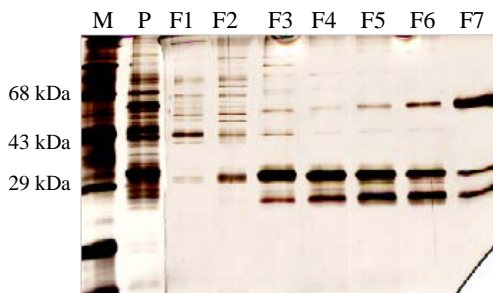


Abb. 4.27 SDS-PAGE Analyse mit Fraktionen der 25 CV Gradientenversuch mit der CRIO-MD 62 (M: Marker, P : Probe)

Es heißt, dass die Fraktionen F3, F4, F5 und F6, die eigentlich nur 2 Hauptpeaks entsprechen, sind nur EGFP. Grob gesagt binden nur 3 Molekülen der Probe an dem Fractogel. Das erste liegt bei 43 kDa, das zweite ist die GFP und liegt bei 30 kDa und das dritte ist GFP Dimeren. Es ist aber komisch, dass 2 Peaks für die EGFP eluieren. Die EGFP ist vielleicht an dem Fractogel anders gebunden und eluiert später. Bei F4 und F5 sind sehr kleine Peaks zu sehen, die sind vielleicht von der Unregelmäßigkeit des Leitfähigkeitssignals verursacht.

Da das allgemeine Aussehen des Chromatogramms ein bisschen erstaunlich war im Vergleich zu den anderen Gradientenelutionsversuchen bei der Scouting Säule, wurden Versuche bei der Scouting Säule mit gleicher Probe, und gleicher Puffer wie bei der CRIO-MD 62 durchgeführt. Eine Eichkurve der Leitfähigkeit in Funktion des Anteils an Puffer B wurde gemacht. Drei Gradientenelutionen wurden gefahren, 15, 25 und 35 CV. Die untenstehende Abbildung repräsentiert der 15 CV Versuch.

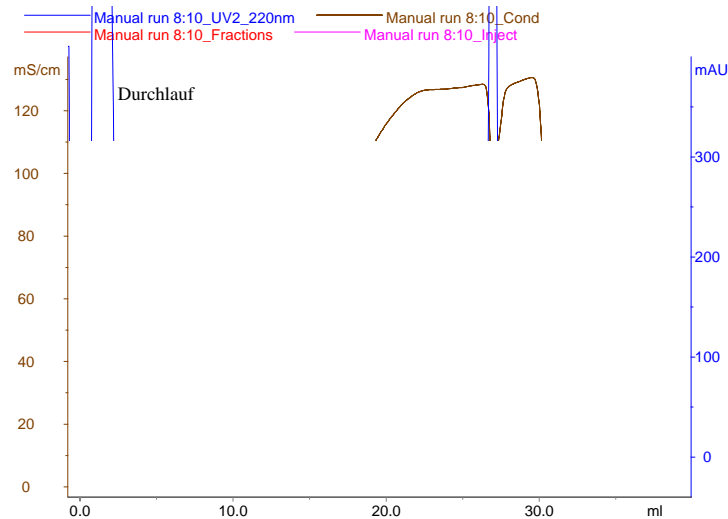


Abb. 4.28 15 CV Gradient mit neuer Probe und neuer Puffer (braun - - Leitfähigkeit, blau kontinuierlich UV 220 nm)

Bei der Abb. 4.28 sind 4 Peaks zu sehen, während bei der Scouting Säule Versuch nur 2 zu sehen sind, der EGFP-Peak und der Dimeren Peak. Es ist klar, dass die Trennung bei der CRIO-MD 62 effizienter ist, denn die Säule besitzt mehr Böden. Das liegt an der Trennstrecke die von 6 cm bei der CRIO-MD 62 ist und nur von 1.93 cm bei der Scouting Säule ist. Laut dieser Versuch wurden die weiteren Gradienten (25, 35 und 45 CV) durchgeführt, um eine GH-I_R Kurve zu bilden und ein direkter Vergleich zwischen beider Säulen zu ermöglichen.

Die GH-I_R und K-I Kurven wurden dann für den Vorpeak, den EGFP Peak, den Nachpeak und den Dimeren Peak durchgeführt. Als Vergleich stehen auch die Punkten des EGFP-Peaks bei der Scouting Säule. Die Werte, die zur GH-I_R Kurve gehören befinden sich an der Anhang 7.3.

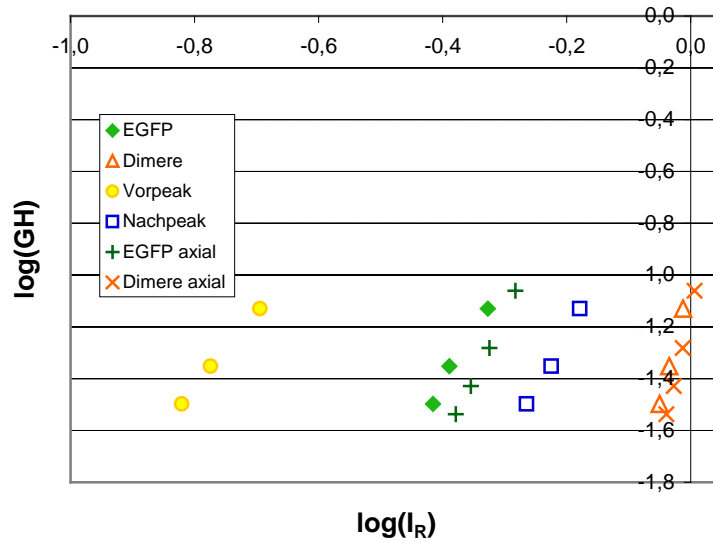


Abb. 4.29 GH- I_R mit der CRIO-MD 62 und mit der axialen Scouting Säule

Auf Abb. 4.29 ist zu sehen, dass zwischen der axialen und den radialen Versuch einen Unterschied gibt. Allerdings sind die EGFP Kurven und die Dimeren Kurven leicht verschoben im Vergleich zu den Kurven der axialen Säule. Ihre Steigung ist auch kleiner. Die Konsequenz ist auf nächster Abbildung zu sehen. Obwohl die Gradienten, die mit der Äkta Pilot durchgeführt wurden nicht regelmäßig waren, sind die GH- I_R Kurve gerade, wie die Bestimmungskoeffizienten es zeigen (siehe Anhang 7.3).

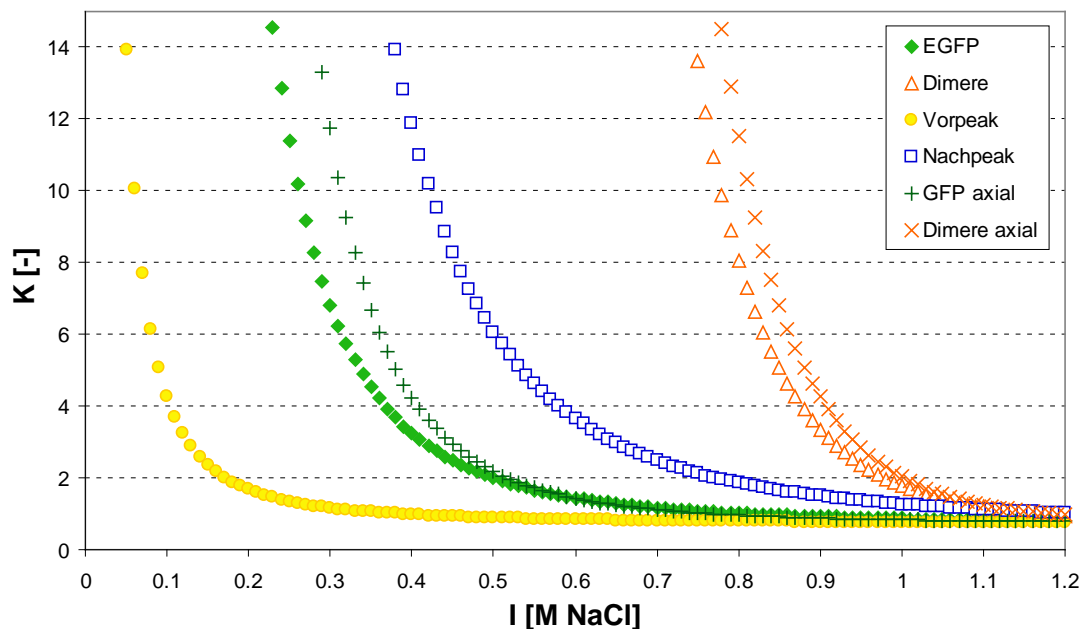


Abb. 4.30 K-I Kurven mit der CRIO-MD 62 und mit der axialen Scouting Säule

Die K-I Kurven zeigen an, dass die Dimeren und der Vorpeak bei der radialen Säule durch Stufenelution leicht von der GFP Peak getrennt werden können. Die Trennung des EGFP Peaks und des Nachpeaks wird nicht so eindeutig sein. Es existiert eine leichte Unterschied zwischen den axialen Kurven und den radialen Kurven. Dies ist aber nicht relevant. Die GFP

axial Kurve befindet sich zwischen der EGFP und der Nachpeak Kurve. Es liegt daran, da bei den Versuchen mit der Scouting Säule dieser Nachpeak nicht von Hauptpeak getrennt werden konnte, aufgrund der kürzeren Trennstrecke.

Laut der K-I Kurven wurde ein Stufenelutionsversuch entwickelt, und zwar: 1. Stufe bei 200 mM, 2. Stufe bei 410 mM, 3. Stufe bei 600 mM, 4. Stufe bei 1 M.

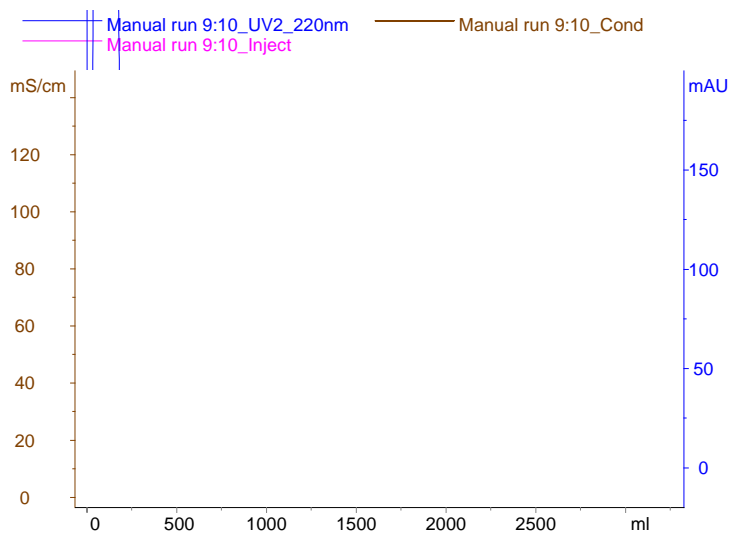


Abb. 4.31 Stufenelution bei der CRIO-MD 62 (braun - - - Leitfähigkeit, blau kontinuierlich UV 220 nm)

Abb. 4.32 Photo der SDS-PAGE Gel, silbergefärbt. M : Marker

Alle 4 Peaks kommen mit der Salzfront, das ist eine Elution Typ I. Die Fraktionen von den Peaks wurden gesammelt und sind in der rechten Abbildung angezeigt. Was bei der zweiten Stufe (410 mM) zu sehen ist, sind zwei Peaks. Die höhere Spitze gehört laut der SDS-PAGE Analyse noch zum ersten Peak. Der Hauptpeak ist bei dieser Stufe die EGFP. Die SDS-PAGE Analyse ermöglicht es zu sehen, dass die Trennung der Komponenten nicht erfolgreich gelaufen ist. Bei der Fraktion F5 soll im Prinzip nur Dimeren vorliegend sein, da ist aber noch EGFP zu sehen. Was bei der Fraktionen F3, F4 und F5 zu sehen ist, ist dass die untenstehende Bande (<29 kDa) immer dunkler wird. Dies bedeutet, dass in der Probe eigentlich mehrere Formen der EGFP existieren, und zwar: EGFP, die EGFP-Dimeren und die kompakter gefaltete EGFP. Diese weitere Arten der EGFP sollen bei der Reduktion verschwinden. Dieser Nachpeak ist anscheinend diese kompakter gefaltete EGFP. Laut der K-I Kurven (Abb. 4.30) soll diese kompaktere Form (Nachpeak) von der EGFP trennen werden können.

Bei dem nächsten Versuch wurden die Stufen anders designt, um die Trennung zu optimieren. Erste Stufe wurde höher gestellt damit der Vorpeak schneller eluiert. Die 2. Stufe wurde tiefer gestellt, damit der Unterschied zwischen Vorpeak und EGFP es ermöglicht, die beiden zu trennen. Bei der 2. Stufe soll die Elution der EGFP ein bisschen verschoben werden, da diese ein K von 3.45 besitzt. Die 3. Stufe wird auf 700 mM und die 4. Stufe wird auf 1 M gestellt.

Ergebnisse und Diskussion

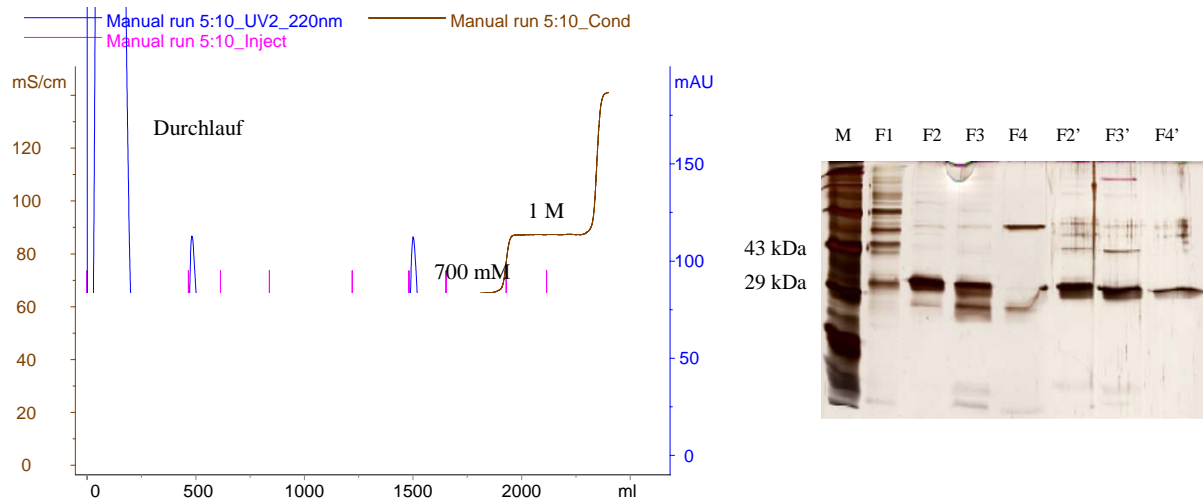


Abb. 4.33 Stufenelution bei der CRIO-MD 62 (braun - - - Leitfähigkeit, blau kontinuierlich UV 220 nm)

Abb. 4.34 Photo der SDS-PAGE Gel, silbergefärbt. M : Marker, F2' F3' F4' sind die Fraktionen die durch DTT reduziert wurden

Laut der SDS-PAGE Analyse ist diesmal die Trennung besser gelaufen. In der Fraktion F2 ist fast nur EGFP und in der Fraktion F4 fast nur Dimeren. Die F1 enthält aber schon ein bisschen EGFP und die F3 auch ein bisschen. Die F2, F3 und F4 wurden mit DTT laufengelassen. Da ist nur eine Bande zu sehen, die der EGPF entspricht. Bei der Reduktion verschwinden die anderen Formen der EGFP.

Um konzentriertere Fraktionen zu erhalten ist es teilweise auch bei axialen Säulen benutzt, die Elution in umgekehrter Richtung durchzuführen. Bei dem nächsten Versuch wurde die Richtung des Flusses nach dem Durchlauf geändert. Die Stufen wurden aber gleich gehalten.

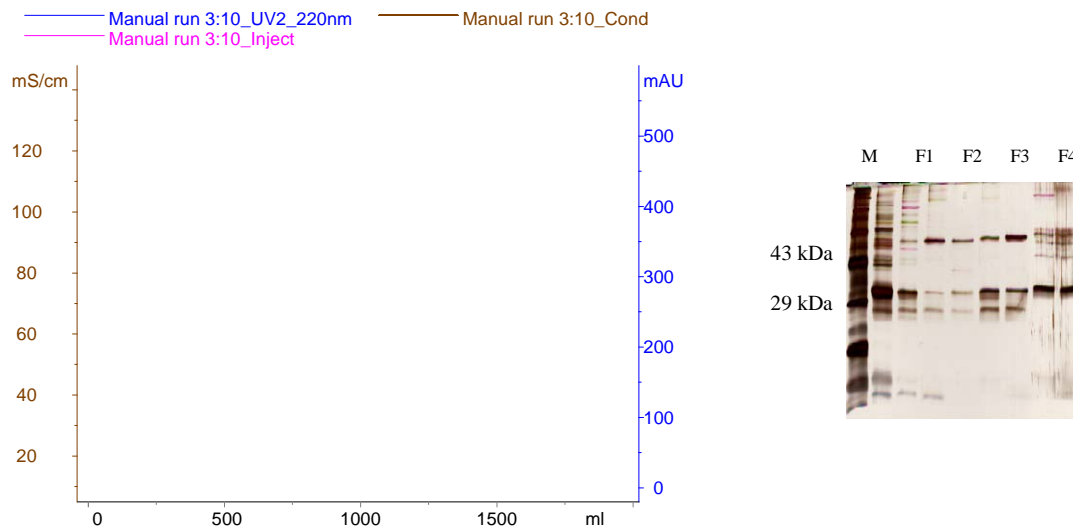


Abb. 4.35 Stufenelution in Rückwärtsrichtung (braun - - - Leitfähigkeit, blau kontinuierlich UV 220 nm)

Abb. 4.36 Photo der SDS-PAGE Gel, silbergefärbt. M : Marker

Der Elutionsprofil sieht anders aus, als der vorherige Versuch. Das Gel und das Chromatogramm zeigen an, dass fast alles bei der ersten Stufe durchgelaufen ist. Bei F2 hat noch ein bisschen EGFP mit Vorpeak eluiert. Die Elution der Dimeren hat erst bei F3 angefangen. Diese Elution in anderer Richtung hat nicht ermöglicht die Substanzen zu trennen, da alle Substanzen bei einer niedrigeren Ionenstärke durchgelaufen sind.

Mit der Gleichung (2.25) kann das Retentionsvolumen für eine isokratische Elution oder für eine Elution Typ II berechnet werden, das gilt dann nur für der EGFP Peak denn die anderen haben eine Elution Typ I gehabt.

Tab. 10 Retentionsvolumenberechnung für die Stufenelution in normaler Richtung und umgekehrter Richtung

$V_R = V_0 (1+HK)$	Elution in normaler Richtung		Elution in umgekehrter Richtung	
Stufe bei	390 mM	230 mM	390 mM	230 mM
K [-]	3,45	14,54	3,45	14,54
V_0 [ml]	53,63	53,63	3,4	3,4
H [-]	1,33	1,33	1,33	1,33
V_R [ml]	299,71	1090,74	19,00	69,15

Für jede Stufe wird der Verteilungskoeffizient abgelesen und in die Formel eingetragen. In der Formel ist auch das Zwischenkornvolumen vorhanden. Dieses ändert sich mit der Richtung der Elution. In normaler Richtung braucht die Probe durch das ganze Zwischenkornvolumen zu fließen, während in umgekehrter Richtung nur ca. 3 mm des Trennwegs gebraucht wird. Diese 3 mm entsprechen einem Zwischenkornvolumen von 3.4 ml, was ein großer Einfluss auf dem Retentionsvolumen hat. In normaler Richtung soll das Retentionsvolumen der EGFP für eine Stufe bei 390 mM ca. 300 ml sein. Es entspricht dem Retentionsvolumen des EGFP Peaks (siehe Abb. 4.33). Das wirkliche Retentionsvolumen der EGFP ist eher um die 250 ml, was sich erklären lässt, durch die 1. Stufe, die bei 230 mM liegt. Bei der 1. Stufe eluiert schon die EGFP, was auch bei der SDS-PAGE Gel bestätigt wurde. Die Ionenstärke der 2. Stufe (390 mM) muss ein niedriger gestellt werden, damit die EGFP eine richtige Elution Typ II haben kann.

Für die Elution in umgekehrter Richtung wird die EGFP bei 230 mM innerhalb von ca. 70 ml eluieren, das erklärt wieso die EGFP schon bei der 1. Stufe eluiert hat. Es heißt, dass für eine 1. Stufe von 230 mM ist es schwer eine gute Trennung zwischen den 4 Peaks zu erreichen.

Der Dimeren eluieren erst bei der 3. Stufe, 700 mM. Bei 700 mM besitzt der Dimerepeak einen Verteilungskoeffizient von 24.19, was in normaler Richtung zu einem Retentionsvolumen von 1779.05 ml und in umgekehrter Richtung zu 112.8 ml führt. Der Peak kommt aber direkt mit der Salzfront, was wahrscheinlich durch die 2. vorherigen Stufen verursacht wurde.

Um dieses Teil abzuschließen, sind folgende Punkte zu merken:

- Es gibt keinen Unterschied zwischen der LGE einer reduzierter EGFP Probe und einer reduzierter Probe, außer der Anwesenheit von Dimeren.
- Die Trennung der EGFP unreduzierter Probe Komponenten (Vorpeak, EGFP, EGFP kompakt und Dimeren) auf der CRIO-MD 62 mit einer LGE ist nicht effizient.
- Die Komponenten der EGFP unreduzierter Probe konnten mit einer Stufenelution mit folgender Stufen (230, 390, 700 mM und 1 M) gut getrennt werden. Dieses ermöglichte auch zu merken, dass 3 Formen der EGFP in der unreduzierter Probe vorhanden sind, und zwar die EGFP, eine kompakter gefaltete EGFP und die EGFP-Dimeren. Die Reduktion der 2 letzten Formen führt zu einer richtig gefalteten EGFP.

- Die Stufenelution in umgekehrter Richtung auf der CRIO-MD 62 ermöglichte die Trennung der 4 Komponenten der unreduzierten Probe nicht.
- Der Unterschied in Bezug GH- I_R und K-I Kurven zwischen axialer und radialer Säule konnte mit der EGFP Probe schlecht beobachten werden, aufgrund der Unreinheit der Probe.

4.3.5 Gradientenelution von Lysozym mit der CRIO-MD 62 und mit der Scouting Merck axialer Säule

Der Unterschied zwischen axialer und radialer Säule war mit der EGFP Probe dort schwer zu sehen, von daher wurden die nächsten Versuche mit einer reinen Probe durchgeführt, und zwar eine Lysozymbösung. Die Ergebnisse der LGE von Lysozym mit der axialen und der radialen Säule sind in untenstehender Abbildung graphisch dargestellt.

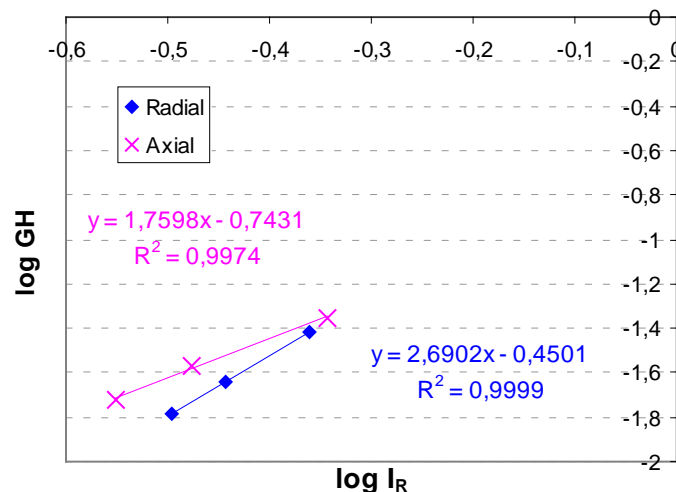


Abb. 4.37 GH- I_R Kurve für die axiale Scouting Säule (rosa X) und die CRIO-MD 62 (blau)

Die Bestimmungskoeffizienten zeigen an, dass die Trendlinien gut den experimentellen Punkten beschreiben. Die Steigung der radialen GH- I_R Kurve ist deutlich steiler als die der axialen Säule. Mittels der Steigung und dem Y-Achsenabschnitt wurden die Parameter A und B gefunden und benutzt, um die K-I Kurven zu bilden.

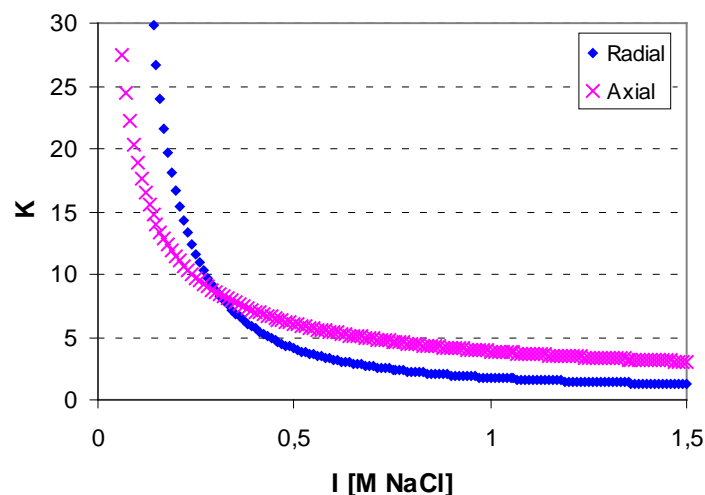


Abb. 4.38 K-I Kurve für die axiale Scouting Säule und die CRIO-MD 62

Der Unterschied zwischen den Steigungen der axialen und der radialen Säule hat zur Folge auch unterschiedliche K-I Kurven. Die K-I Kurve der axialen Säule ist ein bisschen flacher als die der radialen Säule.

Dieser Unterschied kann sich erklären lassen, bei der Tatsache, dass es ein GH Gradient in der Säule sich bildet. Der Gradient sieht aber für eine radiale und eine axiale Säule unterschiedlich aus. Der GH-Wert ändert sich nämlich mit dem Zwischenkornvolumen. Es heißt, das der GH Wert, der für die GH- I_R Kurve benutzt ist, ist ein gestammter GH-Wert, der für die ganze Säule gilt. Dieser GH-Wert ist die Summe der GH-Werten jedes einzelnen Teils der Säule. Diese Annahme wird mit der folgenden Gleichung bestimmt. Die hat für Basis die Gleichung (2.21).

$$GH = \frac{I_R^{(B+1)}}{[A(B+1)]} \quad (2.21)$$

$$GH_{\text{gesamt}} = \sum_0^i \frac{GH}{i} = \frac{I_R^{(B+1)}}{A(B+1) \cdot i} \quad (4.2)$$

Dieser GH-Wert kann variiert mit dem Zwischenkornvolumen, der in Funktion der Position auf der Trennstrecke auch variiert. Diese Variation ist aber unterschiedlich zwischen einer axialen und einer radialen Säule. Der GH-Wert in Funktion der Position ist linear in einer axialen Säule, denn das kumulierte Volumen variiert linearweise. Das gilt für eine radiale Säule nicht. Bei einer radialen Säule muss auch die Berechnung der GH Wert mit dem I_R Wert korrigiert werden. Bei der Entwicklung dieser GH- I_R Gleichung ist es angenommen, dass die lineare Geschwindigkeit konstant über das Gelbett ist. Das ist für eine radiale Säule nicht der Fall. Die lineare Geschwindigkeit in Funktion der Position in der Säule ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

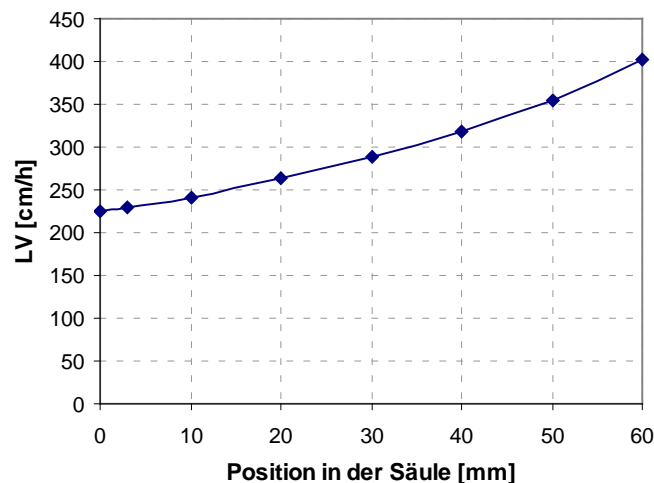


Abb. 4.39 Graphische Darstellung der LV in Abhängigkeit der Position in der Säule (CRIO-MD 62) für eine Flussrate von 100 ml/min

Daran liegt der Hauptunterschied zwischen einer axialen und einer radialen Säule in Bezug auf die GH-Werten. Da die LV nicht konstant ist, kann die normale Gleichung (2.21) nicht angenommen werden. Von daher muss einen neuen Zusammenhang zwischen GH und I_R Wert entwickelt werden.

Die CRIO-MD 62 wird als Kuchenstück eines hohlen Zylinders betrachtet. Ihre Größen sind:

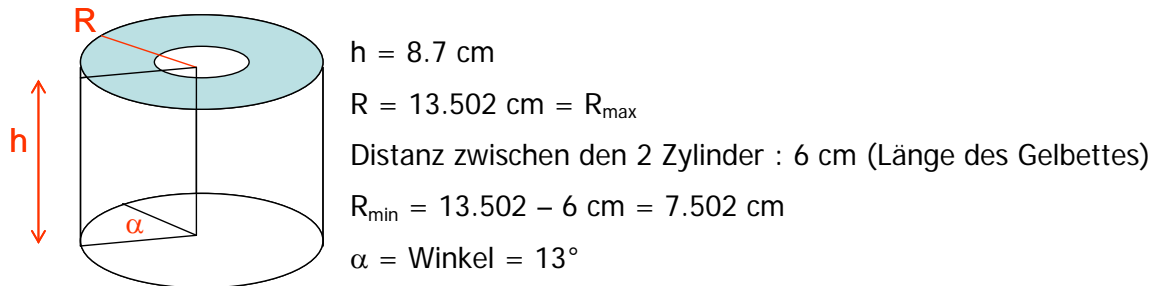


Abb. 4.40 Schematische Darstellung eines Kuchenstückes aus einem hohlen Zylinder

Die durchgeströmte Oberfläche A ist mit folgender Gleichung zu berechnen:

$$A = 2\pi R \cdot h \cdot \frac{13}{360} \quad (4.3)$$

Das Volumen des Stückes lautet folgendermassen:

$$V_c = \left(\pi \cdot R_{\max}^2 \cdot h - \pi \cdot R_{\min}^2 \cdot h \right) \cdot \frac{13}{360} \quad (4.4)$$

Die lineare Geschwindigkeit der mobilen Phase u ändert sich mit der durchströmten Fläche und lautet wie folgt:

$$u = \frac{Q}{A} = \frac{Q}{2\pi R \cdot h} \cdot \frac{360}{13} > \frac{Q}{X} \cdot \frac{1}{r} \quad \text{wobei } X = \frac{360}{2\pi \cdot h \cdot 13} \quad (4.5)$$

Die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins u_p ist die Variation der Strecke r_p mit der Zeit und ist definiert als:

$$u_p = \frac{dr_p}{dt} = \frac{u}{1+HK} = \frac{Q}{X} \cdot \frac{1}{r_p} \cdot \frac{1}{(1+HK)} \quad (4.6)$$

Salz [18]:

$$I = I_0 + g \cdot Q \cdot \left(t - \frac{(1+HK') \cdot r_p}{u} \right) \quad (4.7)$$

$$I = I_0 + g \cdot Q \cdot \left(t - \frac{(1+HK') \cdot r_p}{Q} \cdot X \cdot r_p \cdot (1+HK) \right) \quad (4.8)$$

$$I - I_0 = g \cdot \left(Qt - (1+HK') \cdot r_p^2 \cdot X \cdot (1+HK) \right) \quad (4.9)$$

Die Gleichung (4.9) wurde nach der Position in der Säule r_p abgeleitet:

$$\frac{dI}{dr_p} = g \cdot \left(Q \cdot \frac{dt}{dr_p} - 2 \cdot r_p X \cdot (1+HK') \cdot (1+HK) \right) \quad (4.10)$$

In der Gleichung (4.10) wurde die Gleichung (4.6) injiziert.

$$\frac{dl}{dr_p} = g \cdot \left(Q \cdot \frac{X \cdot r_p \cdot (1 + HK)}{Q} - 2 \cdot r_p \cdot X \cdot (1 + HK') \cdot (1 + HK) \right) \quad (4.11)$$

$$\frac{dl}{dr_p} = g \cdot X \cdot r_p \cdot (1 + HK) \cdot (1 - 2 \cdot (1 + HK')) \quad (4.12)$$

$$\int_{l_0}^{l_R} \frac{1}{(1 + HK) \cdot (1 - 2 \cdot (1 + HK'))} dl = g \cdot X \cdot \int_{R_{min}}^{R_{max}} r_p \cdot dr_p \quad (4.13)$$

Um die variable l in das linke Teil einzutragen müssen die K und K' mit der Gleichung, die K mit l in Zusammenhang stellt, und zwar die Gleichung (2.21). Diese Gleichung gilt für eine axiale Säule. Die A und B Werten wurden für die Scouting Säule bestimmt könnten in der Gleichung eingetragen werden. Das linke Teil wäre aber immer noch nicht analytisch lösbar. Durch die Entwicklung des rechten Teils kann ermöglichen, den GH-Wert in Zusammenhang mit dem linken Teil zu stellen. Die Gleichung wäre aber immer noch nicht analytisch lösbar. Die Entwicklung des rechten Teils steht nachfolgend:

$$\int_{l_0}^{l_R} \frac{1}{(1 + HK) \cdot (1 - 2 \cdot (1 + HK'))} dl = g \cdot X \cdot \frac{1}{2} \cdot [R_{max}^2 - R_{min}^2] \quad (4.14)$$

$$\int_{l_0}^{l_R} \frac{1}{(1 + HK) \cdot (1 - 2 \cdot (1 + HK'))} dl = g \cdot X \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{V_c \cdot 360}{\pi \cdot h \cdot 13} \quad (4.15)$$

$$H \cdot \int_{l_0}^{l_R} \frac{1}{(1 + HK) \cdot (1 - 2 \cdot (1 + HK'))} dl = g \cdot H \cdot X \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{V_0 \cdot 360}{\varepsilon \cdot \pi \cdot h \cdot 13} \quad (4.16)$$

$$H \cdot \int_{l_0}^{l_R} \frac{1}{(1 + HK) \cdot (1 - 2 \cdot (1 + HK'))} dl = G \cdot H \cdot X \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{360}{\varepsilon \cdot \pi \cdot h \cdot 13} \quad (4.17)$$

All diese Entwicklung bringt es nicht vorwärts. Es kann trotzdem festgestellt werden, dass die GH-I Gleichung für eine radiale Säule ziemlich komplizierter als die für eine axiale Säule. Die Ergebnisse, die mit der CRIO-MD 62 erhalten wurden wurden mit einer ungeeigneten Gleichung behandelt. Dies kann den Unterschied in Bezug auf die GH- l_R und die K-I erklären.

Die Frage „gibt es einen Unterschied zwischen axialer und radialer in Bezug auf LGE“ kann von daher nicht beantwortet werden.

5 Schlussdiskussion

Die Packstrategie der CRIO-MD 62 wurde optimiert. Mit dieser „optimierten“ Methode wurde eine bessere Effizienz und Symmetrie erreicht. Die Konditionierung hat kaum einen Einfluss auf die Qualität der Packung gehabt.

Das Packen der CRIO-MD 63 wurde untersucht, dabei wurden alle möglichen Packvorgänge getestet. Die Konditionierung hat die Qualität der Packung ziemlich verbessert. Durch weitere Experimenten bei der Effizienzbestimmung wurde festgestellt, dass das Verteilersystem (Raum vor der Fritte) der Säule stark die Effizienz verschlechterte.

Die LGE der EGFP Probe ermöglichen nicht, einen Vergleich zwischen axialer und radialer Säule zu machen, wegen der Unreinheit der Probe und der unterschiedlichen Auflösungen beider Säulen. Aus den K-I Kurven konnte eine Stufenelution für jede Säule entwickelt werden. Mittels der CRIO-MD 62, die eine bessere Effizienz leistet wurde bemerkt, dass die EGFP Probe 3 EGFP-Arten enthielt, die mit einer Stufenelution getrennt werden konnten. Die erhaltenen Fraktionen sind außerdem ziemlich rein.

Ein Unterschied zwischen der radialen und der axialen ermittelten GH- I_R Kurven konnte hervorgehoben werden. Diesen Unterschied liegt aber wahrscheinlich an der benutzten Formel, die für die Behandlung der radialen erhaltenen Ergebnisse nicht geeignet ist. Eine zur axialen geltende Gleichung wurde für eine radiale Säule entwickelt. Deren Lösung kann aber nicht analytischerweise berechnet werden.

6 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war die Packstrategie der radialen CRIO-MD 62 zu optimieren. Dieser Packvorgang musste mit dem Packvorgang einer Prototypen Axial Säule verglichen werden. Die Packstrategien der CRIO-MD 62 und 63 wurden untersucht und eine neue Methode für das Packen der CRIO-MD wurde entwickelt. Mit dieser wurde eine bessere Effizienz als bei der standard Methode erreicht. Der Vergleich mit dem Prototyp wurde nicht gemacht. Die Packparameter zum Packen der CRIO-MD 62 könnten noch optimiert werden, um eine noch bessere Effizienz zu erreichen.

Unterwegs wurde vorgeschlagen, die axiale und die radiale Konformation in Bezug auf LGE einer EGFP Probe zu vergleichen. Diese EGFP Probe ermöglichte nicht die beiden Säule zu vergleichen. Deshalb wurden LGE mit einer Lysozymprobe durchgeführt. Bei diesen Versuchen konnte einen Unterschied zwischen axialer und radialer Säule beobachtet werden. Dies fuhr zur Entwicklung einer neuen Expression, um ein Zusammenhang zwischen GH-Wert und I_R Wert für eine radiale Säule zu stellen. Diese Gleichung ist aber nicht analytisch lösbar. Aufgrund dieser Untersuchungen konnte den eventuellen Vorteil einer radialen Säule gegenüber einer axialen nicht hingewiesen werden. Zum Prüfen, ob das Verhalten der GH- I_R Kurven des Lysozyms auch für andere Proteine gilt, könnten weitere Versuche mit anderen Proteinen durchgeführt werden.

Wegen Zeitmangels konnten die Capture Bedingungen für einen Antikörper nicht untersucht werden. Von daher wurde der Capture Schritt des Antikörpers mittels RFCS nicht getestet und deren Einsatz konnte nicht bestimmt werden.

7 Quellen

- [1] Rathore A. S., Velayudhan A., « Scale-Up and Optimization in Preparative Chromatography », Chromatographic Science Series; Volume 88, Chap. 1, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 2003
- [2] Crelier S., Vorlesung „Chapitre 7: Chromatographie, Downstream Processing II, 6ème semestre“, Sion, 2008
- [3] Wallworth D. M., « Practical Aspects and Applications of Radial Flow Chromatography », Methods in Biotechnology, Vol. 9, M. A. Desai © Humana Press Inc., Totowa, NJ
- [4] Schematische Darstellungen von Axial und Radial Säulen, 26.11.08,
<http://www.proxcys.nl/cms/UserFiles/File/CRIO-Annular.pdf>
- [5] Cabanne C. *et al*, "Evaluation of radial chromatography versus axial chromatography, practical approach", Journal of Chromatography B, 845 (2007), 191-199
- [6] Gu T., Tsai G.-J., Tsao G. T., "Multicomponent Radial Flow Chromatography", Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, Vol. 49, 1993
- [7] Gu T., "Radial Flow Chromatography for Bioseparations", Wiley Encyclopedia of Industrial Biotechnology, 31.08.2007
- [8] Buch T., „Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Packungsmethoden auf die Effizienz und das Trennvermögen in der Radialflusschromatographie“, Bachelor-Thesis Hochschule Mannheim, Januar 2007
- [9] Schmalen I., „Untersuchung zur Optimierung der Packparameter in der Radialflusschromatographie“, Bachelor-Thesis Hochschule Mannheim, Juni 2007
- [10] Van Deemter Gleichung Abbildung, 15.12.08
<http://de.wikipedia.org/wiki/Van-Deemter-Gleichung>,
- [11] Abbildung einer Chromatogramm mit Beschriftung, 5.01.09
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/chromatographie_grundlagen.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/basics/saülen_chr/chromatogramm/chromatogrammm65ht1100.vscml.html
- [12] Abbildung eines Peaks mit Beschriftung der Asymmetrie, 5.01.09
www.ipl.be/download/formation_continue/aspects_theoriques_de_la_chromatographie.ppt
- [13] Crelier S., Pott J., „Chromatographie, Travaux pratiques GeB2“, HES-SO Valais Wallis, Februar 2008, Sion
- [14] Kaltenbrunner O., Jungbauer A., „Simple model for blending aqueous salt buffers, Application to preparative chromatography“, Journal of Chromatography A. 764 (1997) 37-48, Wien, Österreich
- [15] Jacob L., Frech C., „Ion-exchange Chromatography in Biopharmaceutical Manufacturing“, Bioseparation and Bioprocessing, Volume 1, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (D), 2007
- [16] Urmann M., „Untersuchungen zur chromatographischen Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern mittels Ionenaustauschchromatographie“, Diplomarbeit Hochschule Mannheim, Oktober 2007
- [17] Ishihara T., Yamamoto S., „Optimisation of monoclonal antibody purification by ion-exchange chromatography, Application of simple methods with linear gradient elution experimental data“, Journal of Chromatography A, 1069 (2005) 99-106
- [18] Frech C., „ Introduction to linear gradient separation experiments (LGE), Workshop Downstream Processing, Hochschule Mannheim, Mannheim, 10 – 12.09.2008

- [19] Schematische Darstellung Äkta Purifier, 02.02.2009
[http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/ODB87F71D03BB814C125719200812586/\\$file/28407956AA.pdf](http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/ODB87F71D03BB814C125719200812586/$file/28407956AA.pdf)
- [20] GFP allgemeine Beschreibung, 03.02.2009
http://de.wikipedia.org/wiki/Gr%C3%BCn fluoreszierendes_Protein
- [21] Benzonase endonuclease, 04.02.2009
<http://www.rona.biz/lifescience/literature/Benzonase%20Endonuclease.pdf>
- [22] SDS-PAGE, Hochschule Mannheim, Fakultät für Biotechnologie, Institut für Biochemie, Mannheim, 16.09.2008
- [23] Expression und Reinigung von EGFP-R₈C, Boeringer Mannheim, 07.01.2009
- [24] Teeters M. , Root T. , Lightfoot E., "Performance and scale-up of adsorptive membrane chromatography", Journal of Chromatography A, 944 (2002), 129-139, Madison, USA

8 Anhänge

- Anhang 7.1 Effizienzwerten für die Versuche mit der CRIO-MD 63 mit normalen und anderen Anschlüssen
- Anhang 7.2 GH-I_R Werten für die LGE der EGFP Probe unreduziert, reduziert und reduziert mit Nachjustierung der Leitfähigkeit der Probe
- Anhang 7.3 GH-I_R Werten für die Versuche mit der CRIO-MD 62 und die Scouting Säule
- Anhang 7.4 GH-I_R Werten für die LGE mit der Lysozym Probe mit der CRIO-MD 62 und die Scouting Säule

Anhang 7.1 : Effizienzwerten für die Versuche mit der CRIO-MD 63 mit normalen und anderen Anschlüssen

Beschreibung	LV [cm/h]	Ni	HETP [μm]	N/m
vor dem Konditionieren normale Anschlüsse				
Salzdurchbruch	150	3,86	15561	64,3
Salzdurchbruch	250	4,53	13244	75,5
Salzdurchbruch	300	5,44	11023	90,7
Salzpeak	250	6,13	9793	102,1
Vor dem Konditionieren andere Anschlüsse				
Salzdurchbruch	150	6,78	8848	113,0
Salzdurchbruch	250	7,14	8401	119,0
Salzdurchbruch	300	5,36	11192	89,4
Salzpeak	250	8,50	7059	141,7
Nach dem Konditionieren normale Anschlüsse				
Salzdurchbruch	150	17,89	3354	298,2
Salzdurchbruch	200	17,75	3380	295,8
Salzdurchbruch	250	16,38	3663	273,0
Salzdurchbruch	300	16,28	3686	271,3
Salzpeak	250	16,70	3592	278,4
Dextranblauppeak	150	18,09	3317	301,4
Nach dem Konditionieren andere Anschlüsse				
Salzdurchbruch	150	14,88	4031	248,1
Salzdurchbruch	250	13,57	4423	226,1
Salzdurchbruch	300	12,94	4636	215,7
Salzdurchbruch	320	12,27	4891	204,5
Salzpeak	250	14,10	4256	234,9
Dextranblauppeak	150	17,14	3500	285,7

Anhang 7.2 : GH- I_R Werten für die LGE der EGFP Probe unreduziert, reduziert und reduziert verdünnt mit Nachjustierung der Leitfähigkeit der Probe

Polynomiale Gleichung		a	b	c					
$y = ax^2 + bx + c$ wo $x = \%B$, $y = \text{Leitfähigkeit}$		-0.0039	1.6461	10.285					
Scouting Säule	V_0	0.33 ml	0 %B =	0.05 M NaCl					
	V_c	1.00 ml	100 % B =	2 M NaCl					
Gradient [CV]	mS/cm (EGFP unreduziert)	%B	I_R	$\log I_R$	g	GH	$\log(GH)$		
15	63.31	35.14	0.69	-0.164	0.130	0.087	-1.060	Steigung	6.0099
25	59.24	32.19	0.63	-0.202	0.078	0.052	-1.282	o.o	-0.0715
35	56.91	30.53	0.60	-0.225	0.056	0.037	-1.428	A	0.19617
45	56.31	30.11	0.59	-0.231	0.043	0.029	-1.537	B	5.0099
Gradient [CV]	mS/cm (Dimere)	%B	I_R	$\log I_R$	g	GH	$\log(GH)$		
15	81.08	48.61	0.95	-0.023	0.130	0.087	-1.060	Steigung	13.902
25	79.52	47.38	0.92	-0.034	0.078	0.052	-1.282	o.o	-0.7673
35	77.90	46.11	0.90	-0.046	0.056	0.037	-1.428	A	0.42094
45	76.41	44.96	0.88	-0.057	0.043	0.029	-1.537	B	12.902
Gradient [CV]	mS/cm (EGFP reduziert)	%B	I_R	$\log I_R$	g	GH	$\log(GH)$		
15	63.73	35.44	0.69	-0.160	0.130	0.087	-1.060	Steigung	7.1764
25	60.27	32.94	0.64	-0.192	0.078	0.052	-1.282	o.o	0.089
35	58.64	31.76	0.62	-0.208	0.056	0.037	-1.428	A	0.11353
45	56.60	30.31	0.59	-0.228	0.043	0.029	-1.537	B	6.1764
Gradient [CV]	mS/cm (EGFP reduziert verdünnt)	%B	I_R	$\log I_R$	g	GH	$\log(GH)$		
15	62.85	34.80	0.68	-0.168	0.130	0.087	-1.060	Steigung	6.4298
25	59.61	32.46	0.63	-0.199	0.078	0.052	-1.282	o.o	0.0142
35	56.80	30.46	0.59	-0.226	0.056	0.037	-1.428	A	0.15052
45	55.38	29.45	0.57	-0.241	0.043	0.029	-1.537	B	5.4298

Anhang 7.3 : GH- I_R Werten für die Versuche mit der CRIO-MD 62 und die Scouting Säule

Polynomiale Gleichung (Äkta Pilot)

$y = ax^2 + bx + c$ wo $x = \%B$, $y = \text{Leitfähigkeit}$

CRIO-MD 62 V_0 53.63 ml
 V_c 125.00 ml

a	b	c
-0.005	1.8248	9.4406
0 %B =	0.05	M NaCl
100 % B =	2	M NaCl

Polynomiale Gleichung (Äkta Purifier)

$y = ax^2 + bx + c$ wo $x = \%B$, $y = \text{Leitfähigkeit}$

Scouting Säule V_0 0.33 ml
 V_c 1.00 ml

a	b	c
-0.0023	1.4971	8.7063

CRIO-MD 62									
Gradient [CV]	mS/cm (EGFP)	%B	I_R	$\log I_R$	g	GH	$\log(GH)$	Steigung	
15	50.56	24.13	0.47	-0.327	0.001	0.074	-1.129	o.o	0.2111
25	45.44	20.92	0.41	-0.389	0.001	0.045	-1.351	A	0.150995591
35	43.46	19.70	0.38	-0.415	0.000	0.032	-1.497	B	3.0732
Gradient [CV]	mS/cm (Dimere)	%B	I_R	$\log I_R$	g	GH	$\log(GH)$	Steigung	
15	87.96	49.83	0.97	-0.012	0.001	0.074	-1.129	o.o	-1.0099
25	84.59	47.32	0.92	-0.035	0.001	0.045	-1.351	A	1.054915856
35	82.34	45.66	0.89	-0.050	0.000	0.032	-1.497	B	8.698
Gradient [CV]	mS/cm (Nachpeak)	%B	I_R	$\log I_R$	g	GH	$\log(GH)$	Steigung	
15	65.68	33.98	0.66	-0.179	0.001	0.074	-1.129	o.o	-0.3702
25	60.53	30.55	0.60	-0.225	0.001	0.045	-1.351	A	0.546679243
35	56.42	27.87	0.54	-0.265	0.000	0.032	-1.497	B	3.2901
Gradient [CV]	mS/cm (Vorpeak)	%B	I_R	$\log I_R$	g	GH	$\log(GH)$	Steigung	
15	27.82	10.36	0.20	-0.694	0.001	0.074	-1.129	o.o	0.8848
25	24.81	8.63	0.17	-0.774	0.001	0.045	-1.351	A	0.045002487
35	23.278	7.747431771	0.15107492	-0.821	0.000	0.032	-1.497	B	1.8971

Anhänge

Scouting Säule (axial)									
Gradient [CV]	mS/cm (EGFP axial)	%B	IR	logIR	g	GH	log(GH)		
15	47.08	26.73	0.52	-0.283	0.130	0.087	-1.060	Steigung	4.9825
25	43.70	24.28	0.47	-0.325	0.078	0.052	-1.282	o.o	0.3438
35	41.46	22.67	0.44	-0.355	0.056	0.037	-1.428	A	0.090939527
45	39.73	21.43	0.42	-0.379	0.043	0.029	-1.537	B	3.9825
Gradient [CV]	mS/cm (Dimere axial)	%B	I _R	logI _R	g	GH	log(GH)		
15	80.33	52.00	1.01	0.006	0.130	0.087	-1.060	Steigung	10.539
25	77.52	49.77	0.97	-0.013	0.078	0.052	-1.282	o.o	-1.1319
35	75.41	48.11	0.94	-0.028	0.056	0.037	-1.428	A	1.285584405
45	73.80	46.85	0.91	-0.039	0.043	0.029	-1.537	B	9.539

Anhang 7.4 : GH-I_R Werten für die LGE mit der Lysozym Probe mit der CRIO-MD 62 und die Scouting Säule

Polynomiale Gleichung (Äkta Pilot)

$y = ax^2 + bx + c$ wo $x = \%B$, $y =$

Leitfähigkeit

			a	b	c
			-0,0015	1,0285	5,9853
CRIO-MD 62	V ₀	53.63 ml	0 %B =	0 M NaCl	
	V _c	125.00 ml	100 % B =	1 M NaCl	

Polynomiale Gleichung (Äkta Purifier)

$y = ax^2 + bx + c$ wo $x = \%B$, $y =$

Leitfähigkeit

			a	b	c
			-0,0012	0,9796	5,7303
Scouting Säule	V ₀	0.33 ml			
	V _c	1.00 ml			

CRIO-MD 62 (radial)

Gradient [CV]	mS/cm	%B	I _R	logI _R	g	GH	log(GH)	Steigung	
15	47,75	43,35	0,434	-0,363	0,00053	0,03806	-1,420	o.o	-0,4282
25	40,94	35,87	0,359	-0,445	0,00032	0,02284	-1,641	A	0,9823
35	37,17	31,79	0,318	-0,498	0,00023	0,01631	-1,787	B	1,7288

Scouting Säule (axial)

Gradient [CV]	mS/cm	%B	I _R	logI _R	g	GH	log(GH)		
15	47,75	45,42	0,454	-0,343	0,0667	0,0447	-1,3500	Steigung	1,7598
25	37,05	33,34	0,333	-0,477	0,0400	0,0268	-1,5719	o.o	-0,7431
35	32,38	28,18	0,282	-0,550	0,0286	0,0191	-1,7180	A	3,1451
45	27,58	22,95	0,230	-0,639	0,0222	0,0149	-1,8271	B	0,7598