

# Parallel-Chromatographie im Miniaturmaßstab

## eine neue Plattformtechnologie

Die rasche Evaluierung biochromatographischer Trennungen wird an aliquotierten Proben unter freier Auswahl an Trennmedien in einem Durchgang ausgeführt. Im Miniaturmaßstab können prozessnahe Bedingungen synchron und einheitlich realisiert werden. Plattform sind Minisäulen-Einheiten im 96er Mikroplattenformat, in denen kommerziell erhältliche Chromatographiemedien schon einheitlich und in vorschrittmäßig gepackter Form vorliegen.

Diese Minisäulen erlauben nun den schnellen und qualifizierten Vergleich der Leistung von Chromatographiematerialien sowie die Opti-

mierung prozessrelevanter Parameter auf frühester Stufe der Prozessentwicklung. Darüber hinaus ist die Plattform für vielfältige Anwendungen mit hohem Probendurchsatz geeignet.

### Die Aufgabenstellung

Viele der in der Bio-Chromatographie eingesetzten Trennmaterialien sind den semi-rigiden Chromatographieträgern zuzuordnen, wie z.B. den Kohlehydrat basierenden Trägern (z.B. Agarose, Sepharose) oder den synthetischen Polymeren wie Methacrylaten (z.B. Toyopearl, Fractogel, UNOsphere), oder Polystyrolen (z.B.

Source, Poros, Amberchrom) basierenden Trägern. Diese hochporösen Materialien nehmen, im Unterschied

zu rigiden Trägermaterialien wie Kieselgel oder „controlled pore glass“ (CPG), im gepackten Zustand in einer Chromatographiesäule aus mehreren Gründen ein geringeres Volumen als nur unter Sedimentation ein.

Beim Packen der semi-rigiden Materialien in Chromatographiesäulen wird insbesondere das zwischen den Partikeln befindliche Volumen an Flüssigkeit dadurch verringert, dass die Partikel räumlich näher zusammenrücken. Dadurch ist das Interpartikel-Volumen in der gepackten Säule kleiner als in einem nur durch Sedimentation erhaltenen Gesamtvolumen derselben Menge des Chromatographiematerials. Dies führt letztlich zu einer Erhöhung der Anzahl theoretischer Böden in der Säule, was einer der wichtigsten Leistungsparameter chromatographischer Trennungen ist.



Abb. 1: a) Mit definiert gepackten Minisäulen bestückte mediascout Minisäuleneinheit im 96er Mikroplattenformat, mit partiell abgenommener oberer Verschlussmatte; b) Einsetzen einer Minisäuleneinheit in den Ausschwingrotor einer Laborzentrifuge. Zwei oder vier Einheiten mit insgesamt bis zu 384 Minisäulen können simultan betrieben werden.



### Keywords

Chromatographie, parallel, Minisäulen, Media scouting, 96er Mikroplatten

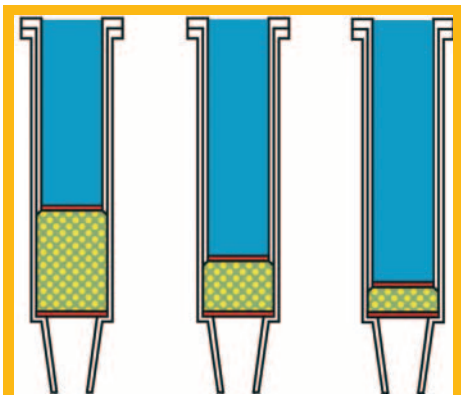


Abb. 2: Schematische Darstellung der mediascout Minisäule in drei verschiedenen Standardgrößen (Dimensionen s. in Tab. 1). Die definiert verdichtete Gelpackung (gelb) wird zwischen ortsfest angebrachten Filterplatten (rot) dauerhaft und unter allen Betriebsbedingungen gehalten. Proben oder Laufmittel (blau) können in unterschiedlicher Menge in das im oberen Teil der Säulen befindliche Reservoir eingefüllt werden.

graphischer Säulen ist. Damit wird aber auch klar, dass die Einhaltung einer wohldefinierten Packungsdichte der Chromatographiematerialien von großem Einfluss auf die Reproduzierbarkeit chromatographischer Trennungen ist. So gelingt dann die wichtigste Aufgabe in der Entwicklung chromatographischer Prozesse zur Aufreinigung biopharmazeutischer Wirkstoffe: die Auswahl des geeigneten Trennmediums und die parameter-treue Übertragbarkeit von Variablen vom kleinen Maßstab in größere Verhältnisse. Aus einer großen Menge an Konkurrenzmaterialien muss also das richtige Medium gefunden werden.

### Das Problem

Zu Beginn einer Entwicklung sind chromatographische Trennungen in großer Zahl unter Verwendung der Trennmedien verschiedener Hersteller und unter einer Reihe unterschiedlicher Bedingungen im kleinen Maßstab erforderlich. Gerade hier hat es in der Vergangenheit an geeigneten Werkzeugen gefehlt, diese rasch und unkompliziert durchzuführen. Die unmittelbare Vergleichbarkeit von Chromatogrammen, die mit verschiedenen Trennmedien erhalten wurden, scheiterte bisher an den unterschiedlichen Geometrien der Säulen, die von einigen Herstellern zu bekommen sind oder an fehlenden Minisäulen. Abgesehen davon, sind die Chromatographieträger in diesen Säulen unterschiedlich gepackt. Der Anwender kennt diese entweder nicht, kann sie nicht beeinflussen und es sind meist nicht diejenigen, die später in Säulen des Produktionsmaßstabs für einen stabilen Betrieb notwendig sind.

### Die Lösung

Die Atoll GmbH nimmt sich der aufgezeigten Problematik durch die neu entwickelte Produkt-Plattform an. Angeboten werden Minisäulen, bei denen beliebige Chromatographiematerialien in vorschrittmäßiger wohl definierter Verdichtung und in einheitlicher Geometrie gepackt sind. Eine große Anzahl

von Trennungen kann simultan in einer Zentrifuge durchgeführt werden.

Unter der Handelsmarke mediascout Minicolumn werden auftragspezifisch zusammengestellte Anordnungen von Minisäulen-Einheiten (Abb. 1a) angeboten. Diese sind kompatibel mit 96er Mikrotiterplatten und können also mit gängigen Laborrobotersystemen, – aber auch manuell – mit Proben und Laufmitteln betrieben werden. Ein Vierfachrotor mit Ausschwingensätzen für Mikrotiterplatten erlaubt so den synchronen Einsatz von bis zu 384 Minisäulen (Abb. 1b). Nach kurzer Zentrifugation erhält man aus jeder Minisäule eine Fraktion, die in Mikrotiterplatten aufgefangen und z.B. durch UV-Messung ausgewertet wird.

### Produkteigenschaften

Die patentierte mediascout Minicolumn ist so konstruiert, dass das in definierter Menge als Suspension eingefüllte Chromatographiematerial mit der vorgegebenen Verdichtung auf Anschlag komprimiert und fixiert wird. Hiervon abweichende Geometrien, z.B. für geringere Bettthöhen bei gleichzeitig vergrößertem Volumen des Probenreservoirs sind dadurch einfach zu realisieren (Abb. 2). Die mittlere lineare Flussrate und somit die Kontaktzeiten von Proben mit dem Chromatographiemedium können durch die Wahl der Zentrifugationsparameter in weiten Grenzen beeinflusst werden. Dabei sind auch hohe Durchsätze für schnelle Trennungen leicht erreichbar (z.B. 1 Bettvolumen in 1 min bei 1.000 rpm).

Die reproduzierbare chromatographische Leistung der neuen Minicolumns wurde mit Hilfe von Pseudo-Chromatogrammen nachgewiesen. Dies geschah durch Auftragung der UV-Absorptionen aufeinanderfolgender Fraktionen des Eluats gegen das Elutionsvolumen und rechnerischer Kurvenanpassung. Die Überlagerung derartiger Pseudo-Chromatogramme, die von einer Stichproben-Auswahl gleichartiger Minisäulen herrühren, zeigt, dass die individuellen Säulen sich nur geringfügig voneinander unterscheiden (Abb. 3). Somit sind sie für schnelle und kostengünstige Reihenversuche, etwa bei der Parameteroptimierung für chromatographische Trennschritte absolut geeignet, gestatten sie doch die simultane Veränderung von je zwei Parametern auf einer einzigen 96er Säulen-anordnung, wie beispielsweise Variation des pH-Werts in der ersten Dimension und der Ionenstärke in der zweiten.

Die Anwendungsmöglichkeiten der patentierten Minisäuleneinheiten sind vielfältig.

### Anwendungsbeispiele

Mit mediascout Minicolumns können die vorher beschriebenen Parameteroptimierungen (Medienauswahl und Chromatographiebedingungen) übersichtlich, reproduzierbar und schnell durchgeführt werden.

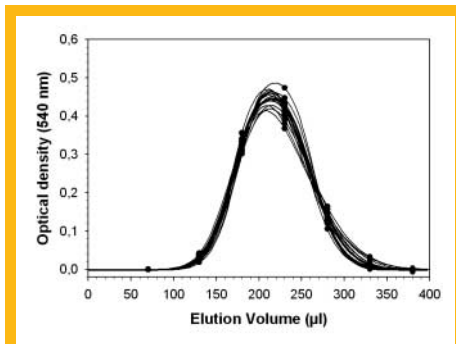


Abb. 3: Überlagerung der Elutionsprofile („Pseudo-Chromatogramme“) von 20 gleichzeitig betriebenen mediascout Minisäulen (willkürlich ausgewählt aus 96 gleichartigen Säulen mit 0,216 ml Bettvolumen, 11 mm Betthöhe; gepackt mit Toyopearl SuperQ 650 (M), Kompression 15%, bezogen auf unter der Schwerkraft erhaltenes Sediment) für eine Probe von 70 µl Vitamin B12 (1 mg/ml in 1 M Natriumchlorid Lösung). Die Fraktionsgröße betrug 50 µl, das Elutionsmittel war 0,1 M Natriumchlorid Lösung. Die in Mikrotiterplatten aufgefangenen Fraktionen wurden in einem UV/Vis-Mikroplattenlesegerät bei 540 nm bezüglich ihrer Lichtabsorption vermessen. Die Elutionsmaxima lagen bei  $214 \pm 3,2$  µl, die Zahl der theoretischen Böden betrug  $24 \pm 2,2/cm$  und der Asymmetriefaktor  $1,2 \pm 0,15$ , mit jeweils größten Abweichungen vom Mittelwert von +4,8 und -8 µl beim Elutionsmaximum, +3 und -4 bei der Bodenzahl und +0,4 und -0,2 beim Asymmetriefaktor.

Tab. 1: Verfügbare Größen von Minisäulen (v.l. in Abb. 2) für 200, 100 und 50 µl gepacktes Chromatographiematerial.

Säule	Gelkammer- volumen µl	Volumen Proben- reservoir µl	Betthöhe mm
10–5	200	200	10
5–5	100	270	5
2,5–5	50	305	2,5

Auch die Probenvorbereitung von protein- wie auch nukleinsäurehaltigen biologischen Materialien kommt in Betracht. Dazu gehören u.a. Aufkonzentrieren sowie Abtrennen spezifischer hochmolekularer Komponenten (z. B. mittels Ionenaustauschern, Affinitätsgelelen), deren Entsalzen und Umpuffern (mit Gelfiltration). Des weiteren verschiedene chromatographische Trennungen biologischer Substanzen, die mit Hilfe von stufenweiser Elution (z.B. Stufengradienten bei Ionenaustauschern) durchgeführt werden können. Mit dem zunehmenden Verbreitungsgrad entstehen überall dort, wo es auf kostengünstige Optimierungsprozesse ankommt, neue Anwendungen wie z. B. refolding von Proteinen in der Säule und vieles mehr.

### DER AUTOR

#### Dr. habil Dipl.-Chem. Lothar Britsch

Chemiestudium an der Universität Freiburg i.Br.; 1986 Promotion in Biochemie; 1994 Habilitation in der Fakultät für Biologie; 1993–2003 Laborleiter im Bereich Processing (Biochromatographie) bei der Merck KGaA, Darmstadt. Seit 2004 Leiter der Produktentwicklung bei der Atoll GmbH  
Ettishofer Str. 10, 88250 Weingarten  
l.britsch@atoll-ger.de, www.atoll-ger.com

### INFORMATIONEN