

*Miteinander forschen
Wirtschaft stärken
Perspektiven schaffen*



Lagerbeständigkeit von Kryoröhrchen – Erfahrungen und Tests

12. Nationales Biobanken-Symposium
Berlin, 23.09.-24.09.2024

René Kretschmer
Holger Reinsch
Ronald Miksche
Alexander Türke

Agenda



- Einleitung / Anforderungen
- Prüfmethoden
 - Gravimetrischer Dichtheitsnachweis
 - Dichteit gegen CO₂
 - Thermische Wechselbelastung
 - Dichteit gegen GN2
 - Thermisches Fügen
- Ausgewählte Ergebnisse
- Zusammenfassung



1



Anforderungen

Was sollten die Probenbehälter können?



Was sollen die Probenbehälter können?

- Einfache Handhabung → Einfach zu schließen & öffnen, Füllstandserkennung, Rückverfolgbarkeit
- Wirtschaftlichkeit (Verfügbarkeit und Preis)
- Automatisierbarkeit (z.B. SBS Racks und Tubes)
- Probe soll sich nicht verändern → (Langzeit-)Beständigkeit des Materials
 - Chemisch beständig gegen z.B. EtOH, DMSO, Säuren/ Basen, Puffer, etc.
 - Biologische Beständigkeit (keine Interaktion mit Probenmaterial)
 - Frei von Leachables / Extractables & RNA / DNA
 - Kontaminationsfreiheit → **möglichst dicht gegen Partikel/ Gasmoleküle**



Einflüsse auf die Probenbehälter während...

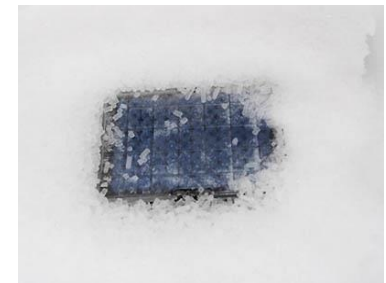
... der Probenlagerung

- Tiefkühltruhe
 - Temperaturen ca. -80°C bis -85°C
- Stickstofflagertank
 - Temperatur ca. -150°C bis -180°C
 - LN_2 oder GN_2 -Umgebung



... dem Probenhandling

- (mehrfaches) Einfrieren und Auftauen der Proben
 - ca. -180°C bis ca. 37°C
- Transport (Flugzeug, Straße)
 - ggf. **Unterdruck**
 - Temperaturen von -80°C (Trockeneis) bis $+50^{\circ}\text{C}$
- CO_2 -Umgebung





2



Prüfmethoden

Was haben wir am ILK Dresden geprüft?

Und was könnten wir noch prüfen?



Was prüfen wir am ILK Dresden?

– **Dichtheit / Transportsicherheit**

- Gravimetrischer Dichtheitsnachweis (IATA-Test)
- Dichtheit gegen CO₂ beim Transport auf Trockeneis
- Dichtheit gegen das Eindringen von LN₂ unter Lagerbedingungen
- (Tiefemperatur)-Permeation / Dichtheit gegen GN₂ bei der Lagerung im Stickstofftank

– **Mechanische/ Thermische Stabilität**

- Zugprüfung (in Abhängigkeit der Lagerdauer/ der Temperatur)
- Thermische Messungen (Phasenübergänge)
- Thermische Wechselbelastung (künstlichen Alterung durch erhöhten Stress für das Material)

– **Chemische Stabilität**

- Prüfung auf Leachables/ Extractables aus dem Behältermaterial



Gravimetrische Dichtheitsprüfung (IATA-Test)

Richtlinien für den Transport biologischer Proben

- IATA / U.S. Code of Federal Regulations (CFR), Title 49 – Transportation & ADR
→ Flugtransport bzw. Transport auf der Straße

Ziel der Prüfung:

- Nachweis der Dichtheit des Probenbehälters im Temperaturbereich von -40°C bis $+55^{\circ}\text{C}$ bei einer Druckdifferenz von 95 kPa
- ABER: fehlende Definition von Dichtheit

Durchführung

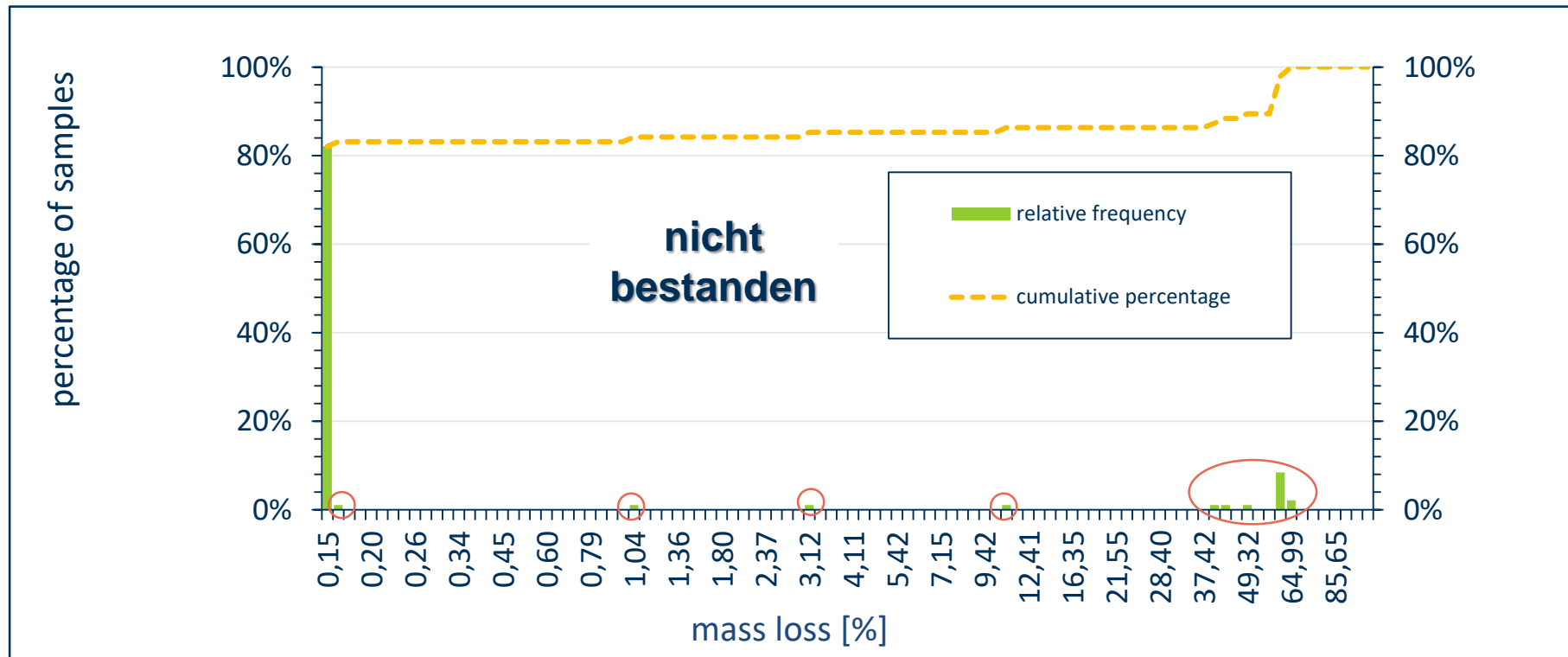
- Befüllen der Kryoröhrchen mit einem farbmarkierten Testfluid & Vorkühlung von -40°C
- Vakuumprüfkammer mit konstanter Erwärmung auf 55°C bei einem Differenzdruck von 99 kPa

Auswertung

- Sichtprüfung und Berechnung des Masseverlustes: Bestimmung von Leergewicht, Einwaage und Rückwaage
- Definition als „dicht“ bei **< 0,1 % Masseverlust**



Gravimetrische Dichtheitsprüfung (IATA-Test)



Ergebnisse der gravimetrischen Dichtheitsprüfung für Röhrrchen Typ E3



Dichtheit gegen CO₂ beim gefrorenen Transport

Transport gefrorener Proben

- Verwendung von Trockeneis für z.B. Blutbestandteile (FFP (Fresh Frozen Plasma), Blutplasma, Biopsien, etc.)

Risiken beim Transport auf Trockeneis

- Sublimation des CO₂ → akkumuliert im Headspace → CO₂ diffundiert beim Tauen in die Probe und reagiert zu Kohlensäure
- pH-Wert-Änderung führt zu Beeinflussung/ Degradation der Probe

Durchführung

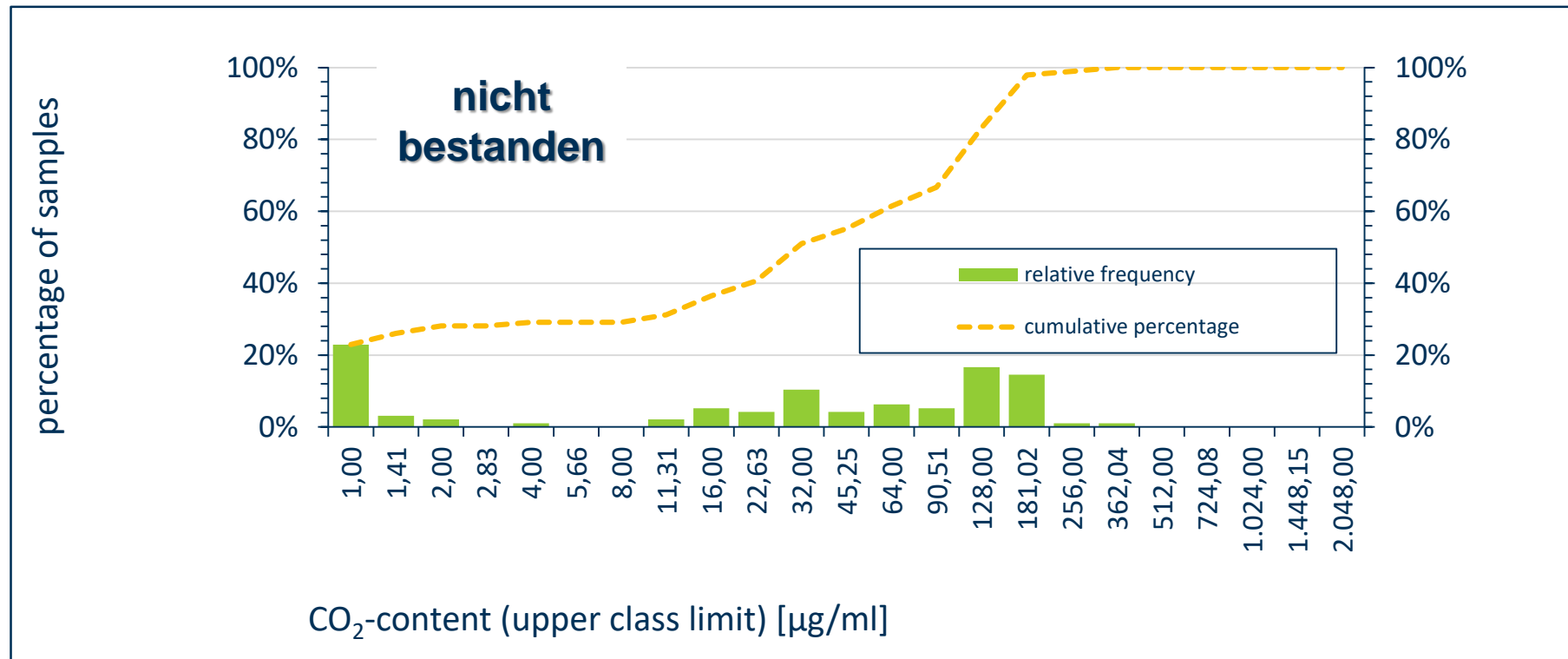
- Befüllen der Kryoröhrchen mit einem CO₂-Absorptionspuffer und definiertes Einfrieren der befüllten Röhrchen
- Probeninkubation für 24 Stunden unter Trockeneis → Tauen und Lagern bei 5°C bis zur Auswertung

Auswertung

- Ermittlung des CO₂-Gehaltes aus dem pH-Wert über Kalibrierfunktion
- Elimination des Einflusses von atmosphärischen CO₂ durch nicht in Trockeneis inkubierten Vergleichsprobe
- Definition von „**dicht**“ bei **< 1 µg/ml** CO₂-Gehalt



Dichtheit gegen CO₂ beim gefrorenen Transport



Ergebnisse der Dichtheit gegen CO₂ für Rörchchen Typ E4.



Thermische Wechselbelastung

IDEE

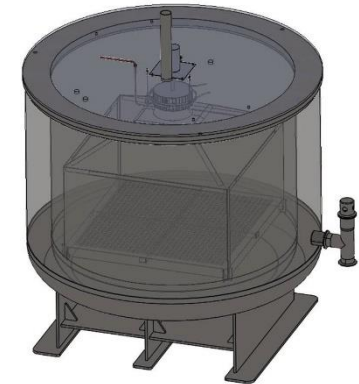
Ersetzen der Echtzeitlagerung durch mehrfache thermische Wechselbelastung analog dem Prinzip der beschleunigten Lagerung bei Polymeren

Auslegung und Entwicklung einer Zyklierkammer

- Temperaturbereich: $-190\text{ °C} \leq T \leq 120\text{ °C}$ (150°C)
- Kühlrate bis zu 60 K/min, Heizrate bis zu 10 K/min
- Optimierte Luftführung: $\Delta T < 8\text{ K}$ (Lufttemperatur)

Simulation der Beanspruchung während Lagerung und Probenhandling

- 50-facher Temperaturwechsel von $-190\text{ °C} < T < +37\text{ °C}$ mit einer Rate von 3 K/min
- fünf Zyklen mit Medium und direktem LN2-Kontakt und Erwärmung für 30 min bei 40 °C
- 20 Zyklen ohne Medium mit direktem LN2-Kontakt und Erwärmung bei 70 °C
Umgebungstemperatur bis zu einer Temperatur am Tube von ca. +25 °C





Permeation bei Kaltgaslagerung

IDEE

Messung der Gasdichtheit des Dichtsystems und der Permeation durch das Material des Probenbehältnisses

- Verschluss der Probenbehälter unter Inertgas (CO_2) in einer Glovebox
- Definierte Verweildauer im Stickstofftank (Lagertank) → 24h / 72h / 168h
- Entnahme von 100 μL bis 200 μL Gas
- Bestimmung der Gehalte an Sauerstoff und Stickstoff im Tube
 - Gaschromatograf mit Wärmeleitdetektor
 - 1:50 Split über eine Carboxen-Säule bei 40°C
- Auswertung erfolgt peakflächenbezogen
 - Als Referenzwert dient die Zusammensetzung der Umgebungsluft

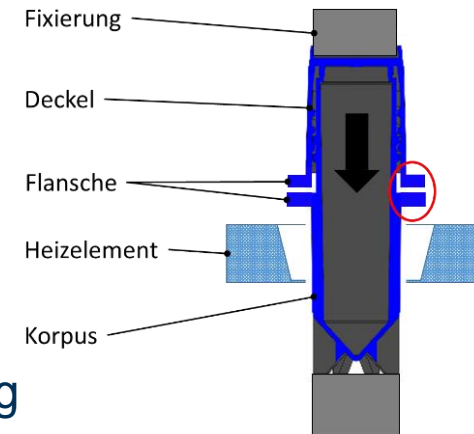


Verschweißen von Probenbehältern

IDEE

Das thermische Fügen der Kryoröhrchen basiert auf dem Verschlussprinzip für Straws

- kurze definierte Wärme- und Druckeinwirkung
- Probenbehälter und Deckel mit Flanschen versehen
- Deckel und Röhrchen werden mit einer am ILK Dresden entwickelten Apparatur verschlossen.
- Kryoröhrchen wird durch einen beheizbaren, konischen Metallring gedrückt
 - Temperatur des Metallrings zwischen 410K und 435K
- Die Prüfung der gefügten Kryoröhrchen erfolgte analog zu marktverfügbaren Kryovials





3



Ausgewählte Ergebnisse





Die Ergebnisse sind größtenteils anonymisiert, um keinen der Hersteller zu diskreditieren. Gleiche Bezeichnungen bezeichnen das gleiche Produkt (Röhrchentyp).

Eine Ausnahme bilden die Ergebnisse der am ILK entwickelten Probenbehälter, welche vollumfänglich dargestellt werden.



Gravimetrische Dichtheitsprüfung (IATA-Test)

- Relativ großer Anteil dichter Packmittel
- Grundsätzlich gibt es tendenziell sehr geringe Masseverluste (keine „leeren Röhren“)

Typ	Status	Bestanden [%]
A	unbehandelt	100
B	unbehandelt	100
B	gelagert seit 2009	100
C1	unbehandelt	31,3
D	unbehandelt	100
E1	unbehandelt	97,9
E2	unbehandelt	100
J	unbehandelt	98



Gravimetrische Dichtheitsprüfung (IATA-Test)

- Relativ großer Anteil dichter Packmittel
- Grundsätzlich gibt es tendenziell sehr geringe Masseverluste (keine „leeren Röhren“)
 - Die vorher gefrorenen Prüflinge sind teilweise minimal schlechter

Typ	Status	Bestanden [%]
A	unbehandelt	100
A	50x zyklert	100
B	unbehandelt	100
B	gelagert seit 2009	100
B	50x zyklert	99
C1	unbehandelt	31,3
C1	50x zyklert	60,4
D	unbehandelt	100
D	50x zyklert	96,9
E1	unbehandelt	97,9
E2	unbehandelt	100
J	unbehandelt	98



Gravimetrische Dichtheitsprüfung (IATA-Test)

- Relativ großer Anteil dichter Packmittel
- Grundsätzlich gibt es tendenziell sehr geringe Masseverluste (keine „leeren Röhren“)
 - Die vorher gefrorenen Prüflinge sind teilweise minimal schlechter
- Vereinzelt ungeeignete Behälter, zumindest nach dieser Prüfmethode
- Typen A, B, D und E2 perfekt

Typ	Status	Bestanden [%]
A	unbehandelt	100
A	50x zyklert	100
B	unbehandelt	100
B	gelagert seit 2009	100
B	50x zyklert	99
C1	unbehandelt	31,3
C1	50x zyklert	60,4
D	unbehandelt	100
D	50x zyklert	96,9
E1	unbehandelt	97,9
E2	unbehandelt	100
J	unbehandelt	98



Dichtheit gegen CO₂

- Grundsätzlich geringer Prozentsatz dichter Prüflinge
 - A, B und D (perfekt bei IATA) hier schlecht
 - E2 hingegen perfekt

Typ	Status	bestanden [%]
A	Unbehandelt	0
B	Unbehandelt	22,9
B	gelagert seit 2009	18,7
C1	Unbehandelt	0
C2	Unbehandelt	91,7
C3	Unbehandelt	0
D	Unbehandelt	1,7
E1	Unbehandelt	4,2
E2	unbehandelt	100



Dichtheit gegen CO₂

- Grundsätzlich geringer Prozentsatz dichter Prüflinge
 - A, B und D (perfekt bei IATA) hier schlecht
 - E2 hingegen perfekt
- **Verschiedene Probenbehälter des gleichen Herstellers (C, E) erzielen sehr unterschiedliche Ergebnisse**

Typ	Status	bestanden [%]
A	Unbehandelt	0
A	50x zyklert	0
B	Unbehandelt	22,9
B	gelagert seit 2009	18,7
B	50x zyklert	93,8
C1	50x zyklert	0
C1	Unbehandelt	0
C2	Unbehandelt	91,7
C3	Unbehandelt	0
D	Unbehandelt	1,7
D	50x zyklert	97,9
E1	Unbehandelt	4,2
E2	unbehandelt	100



Dichtheit gegen CO₂

- Grundsätzlich geringer Prozentsatz dichter Prüflinge
 - A, B und D (perfekt bei IATA) hier schlecht
 - E2 hingegen perfekt
- Verschiedene Probenbehälter des gleichen Herstellers (C, E) erzielen sehr unterschiedliche Ergebnisse
- Grundsätzlich relativ **große Dichtheitsunterschiede** zwischen frischen (nativen) und zyklerten Behältern
 - Vorher mehrfach gefrorene Prüflinge schneiden besser ab

Typ	Status	bestanden [%]
A	Unbehandelt	0
A	50x zyklert	0
B	Unbehandelt	22,9
B	gelagert seit 2009	18,7
B	50x zyklert	93,8
C1	50x zyklert	0
C1	Unbehandelt	0
C2	Unbehandelt	91,7
C3	Unbehandelt	0
D	Unbehandelt	1,7
D	50x zyklert	97,9
E1	Unbehandelt	4,2
E2	unbehandelt	100



Veränderungen durch LN2 Kontakt – Thermische Wechselbelastung

- Gravimetrischer Dichtheitsnachweis (IATA-Test) vor und nach thermischer Wechselbelastung

Typ	Gewinde- typ	Bestanden [%]	Bestanden nach LN2 [%]
C	IG	64,6	0,0
C	AG	85,4	75,0
E	IG	100,0	60,4
L	AG	76,0	76,0
F	AG	60,0	4,0
J	AG	100,0	92,0



Veränderungen durch LN2 Kontakt – Thermische Wechselbelastung

- Gravimetrischer Dichtheitsnachweis (**IATA-Test**) vor und nach thermischer Wechselbelastung
 - Teilweise **eklatante Undichtheiten** nach LN2-Kontakt

Typ	Gewinde- typ	Bestanden [%]	Bestanden nach LN2 [%]
C	IG	64,6	0,0
C	AG	85,4	75,0
E	IG	100,0	60,4
L	AG	76,0	76,0
F	AG	60,0	4,0
J	AG	100,0	92,0



Veränderungen durch LN2 Kontakt – Thermische Wechselbelastung

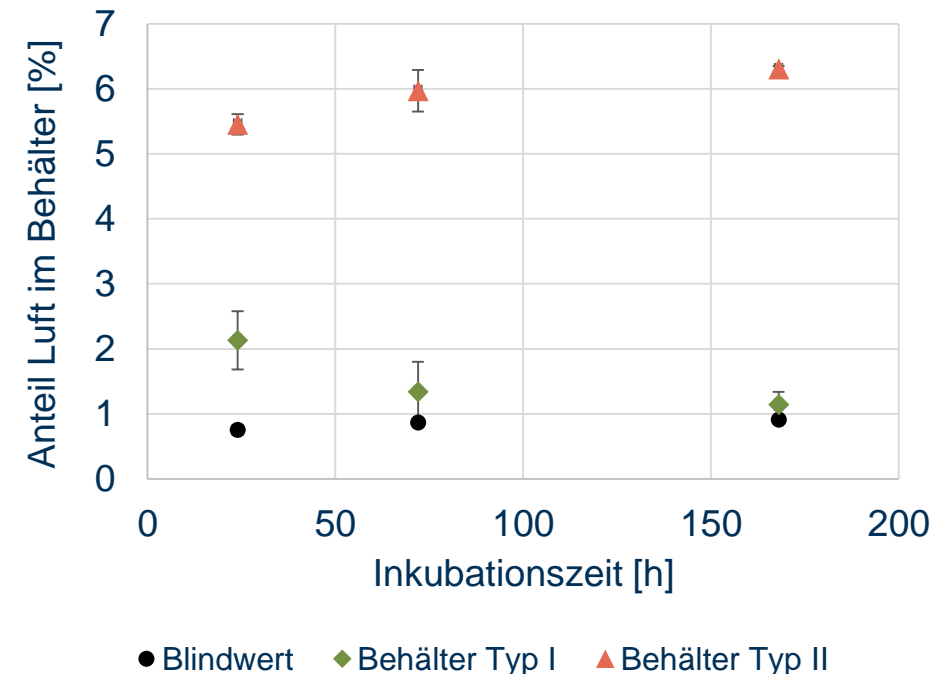
- Gravimetrischer Dichtheitsnachweis (**IATA-Test**) vor und nach thermischer Wechselbelastung
 - Teilweise eklatante Undichtheiten nach LN2-Kontakt
- Bei Hersteller C deutliche **Unterschiede zwischen Innengewinde/Außengewinde**
- Grundsätzlich keine besseren Ergebnisse für einen der Gewindetypen

Typ	Gewinde-typ	Bestanden [%]	Bestanden nach LN2 [%]
C	IG	64,6	0,0
C	AG	85,4	75,0
E	IG	100,0	60,4
L	AG	76,0	76,0
F	AG	60,0	4,0
J	AG	100,0	92,0



Permeation bei Klatgaslagerung (GN2-Permeation)

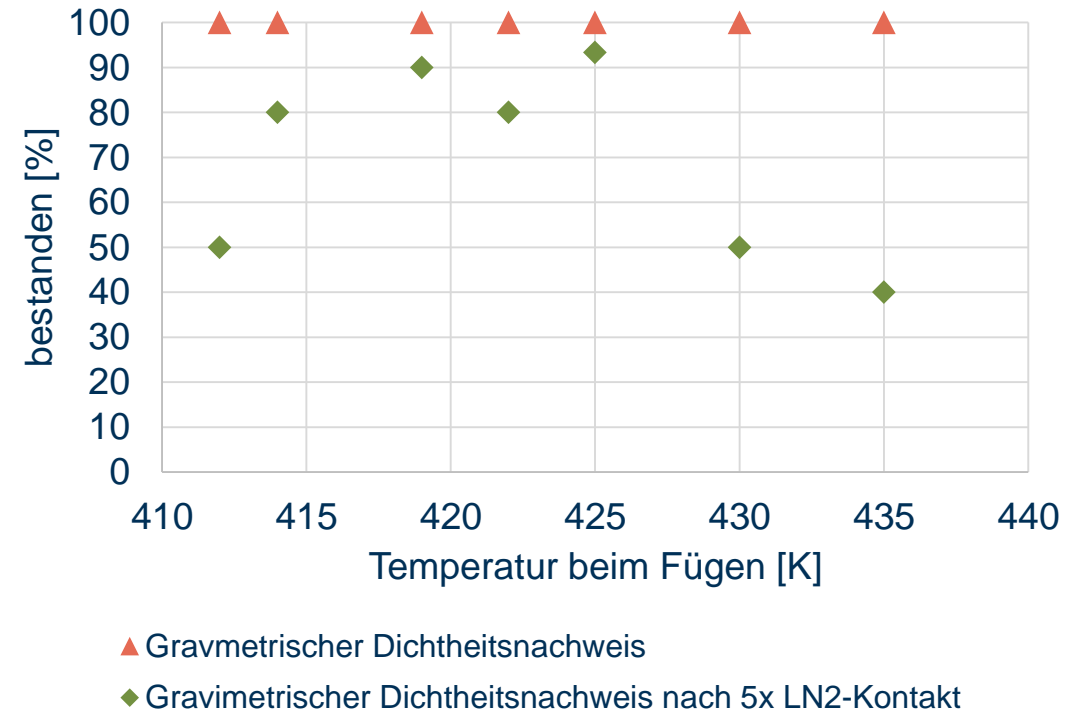
- Völlig unterschiedliches Verhalten der beiden getesteten Probenbehälter
 - Blindwert (Kreis) bleibt im Rahmen der Messungengenauigkeit auf niedrigem Niveau stabil
 - Behälter I (Dreieck) erreicht noch kein Gleichgewicht
 - Behälter II (Viereck) scheint im Rahmen der Messunsicherheit stabil auf niedrigem Niveau
- Methode erlaubt Aussagen zum Permeations- und Dichtverhalten bei Kaltgaslagerung





Thermisch gefügte Probenbehälter

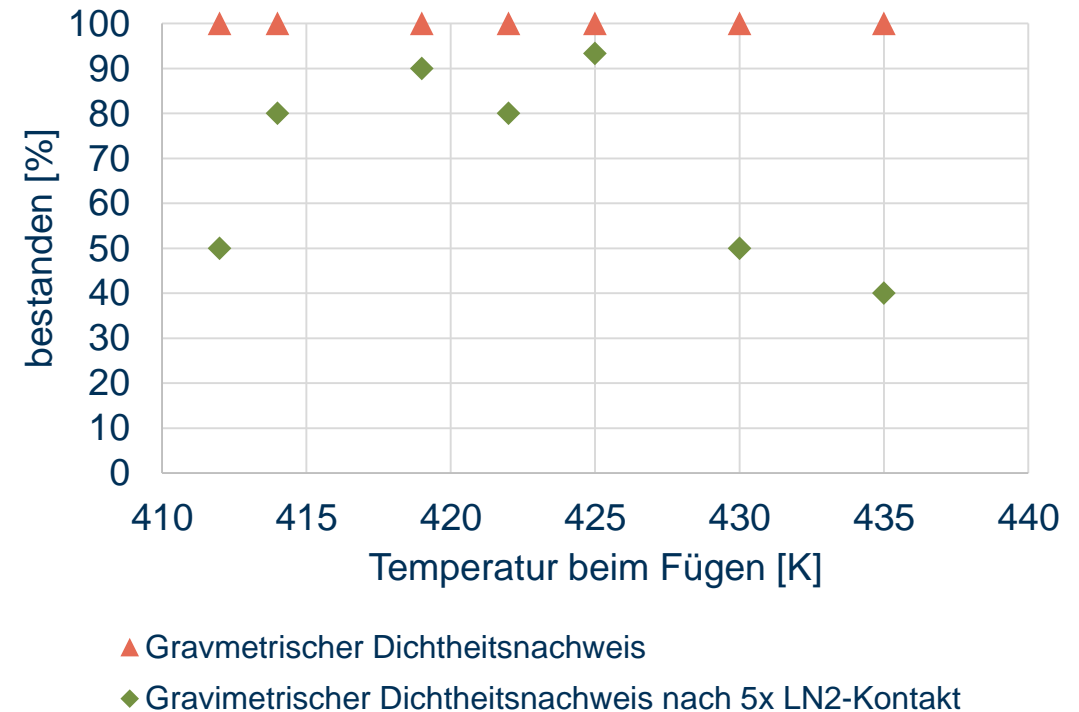
- Alle gefügten Behälter bestehen den „normalen“ Gravimetrischen Dichtheitsnachweis (**IATA-Test**)
- Die Ergebnisse der Prüfung nach dem 5-maligen **Kontakt mit LN2** sind sehr stark von der Fügetemperatur abhängig
 - Optimum bei 425K Fügetemperatur
 - Zyklieren vor Befüllung hat keinen messbaren Einfluss





Thermisch gefügte Probenbehälter

- Alle gefügten Behälter bestehen den „normalen“ Gravimetrischen Dichtheitsnachweis (**IATA-Test**)
- Die Ergebnisse der Prüfung nach dem 5-maligen **Kontakt mit LN2** sind sehr stark von der Fügetemperatur abhängig
 - Optimum bei 425K Fügetemperatur
 - Zyklieren vor Befüllung hat keinen messbaren Einfluss
- Ergebnisse **CO₂-Test**
 - Thermisch gefügt: 100 %
 - Nur verschraubt: 97 %
 - 20x LN2-Kontakt: 90 %





Take-home messages

- Die vorgestellten **Prüfmethoden sind geeignet**, um die Dichtheit der Röhrrchen unter verschiedenen Bedingungen zu charakterisieren



Take-home messages

- Die vorgestellten **Prüfmethoden sind geeignet**, um die Dichtheit der Röhrrchen unter verschiedenen Bedingungen zu charakterisieren
- Das **Dichtverhalten** der Röhrrchen ist maßgeblich **von der Prüfung abhängig** – die meisten Röhrrchen sind in allen Temperaturbereichen gleich gut (oder schlecht) dicht



Take-home messages

- Die vorgestellten **Prüfmethoden sind geeignet**, um die Dichtheit der Röhrrchen unter verschiedenen Bedingungen zu charakterisieren
- Das **Dichtverhalten** der Röhrrchen ist maßgeblich **von der Prüfung abhängig** – die meisten Röhrrchen sind in allen Temperaturbereichen gleich gut (oder schlecht) dicht
- Die **thermische Wechselbelastung** (Lagerung) der Packmittel **verändert** teilweise die **Dichtheitseigenschaften**



Take-home messages

- Die vorgestellten **Prüfmethoden sind geeignet**, um die Dichtheit der Röhren unter verschiedenen Bedingungen zu charakterisieren
- Das **Dichtverhalten** der Röhren ist maßgeblich **von der Prüfung abhängig** – die meisten Röhren sind in allen Temperaturbereichen gleich gut (oder schlecht) dicht
- Die **thermische Wechselbelastung** (Lagerung) der Packmittel **verändert** teilweise die **Dichtheitseigenschaften**
- Der **Kontakt** der Röhren **mit flüssigem Stickstoff** ist möglichst zu **vermeiden**



Take-home messages

- Die vorgestellten **Prüfmethoden sind geeignet**, um die Dichtheit der Röhrrchen unter verschiedenen Bedingungen zu charakterisieren
- Das **Dichtverhalten** der Röhrrchen ist maßgeblich **von der Prüfung abhängig** – die meisten Röhrrchen sind in allen Temperaturbereichen gleich gut (oder schlecht) dicht
- Die **thermische Wechselbelastung** (Lagerung) der Packmittel **verändert** teilweise die **Dichtheitseigenschaften**
- Der **Kontakt** der Röhrrchen **mit flüssigem Stickstoff** ist möglichst zu **vermeiden**
- **Verschweißen** von Röhrrchen könnte für besonders wichtige Proben **eine Alternative** sein

Vielen Dank



M. Sc. René Kretschmer

Hauptbereich Kryotechnik & Tieftemperaturphysik

Center of Cryo Competence in Life Sciences

rene.kretschmer@ilkdresden.de

Institut für Luft- und Kältetechnik gemeinnützige Gesellschaft mbH

Bertolt-Brecht-Allee 20 | 01309 Dresden | www.ilkdresden.de



Welchen Gefahren sind die Packmittel ausgesetzt?

- Kontamination durch Undichtheit (Röhrchen <-> Deckel bzw. Schweißnaht bei Straws)
- Kontamination durch Diffusion / Leachables / Extractables
- Gefriertrocknungseffekte → Aufkonzentrierung der Inhaltsstoffe
- Platzen beim Auftauen (als Folge der Undichtheit nach Kontakt mit LN₂)
- Herunterfallen beim Handling → Undichtheit / Probenverlust
- Abnutzung des Materials durch die Lagerung → Mikrorisse / Änderung des Dichtverhaltens
- Unlesbarkeit der Beschriftung / des Barcodes
- etc...