

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Boris Nesek

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2004.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Inženjerstvo u zaštiti okoliša

Boris Nesek

**Razvoj matematičkog modela procesa gel-filtracije u
kromatografskoj koloni**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Dr. sc. Bruno Zelić, docent

Članovi ispitnog povjerenstva: Dr. sc. Bruno Zelić, docent

Dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, red. prof.

Dr. sc. Marin Hraste, red. prof.

Zagreb, studeni 2004.

SAŽETAK

Gel-filtracijska kromatografija je separacijska metoda temeljena na razdvajanju molekula prema njihovoj relativnoj veličini i/ili hidrodinamičkim volumenima pri čemu manje molekule ulaze u pore čestica punila, i u odnosu na veće koje samo prolaze između čestica punila, zaostaju u koloni. Upotrebljava se u preparativnim i industrijskim procesima separacije i pročišćavanja makromolekula (proteina, polimera i sl.).

U ovom radu je razvijen matematički model procesa gel-filtracije u kromatografskoj koloni uzimajući u obzir tri mehanizma prijenosa tvari: aksijalnu disperziju u mobilnoj fazi, prijenos tvari na međufaznoj površini mobilna-stacionarna faza i difuziju u pore punila. Dodatno su uzete u obzir i sljedeće pretpostavke: izoterman rad kolone, difuzijski i koeficijenti prijenosa tvari su konstantni, čestice punila su jednake i sferičnog oblika i zanemariv utjecaj difuzije u radijalnom smjeru. Rezultirajuće diferencijalne jednadžbe matematičkog modela su riješene numeričkom metodom konačnih razlika.

Eksperimentalno su određene karakteristike punila i kolone (poroznost čestica punila, dostupna poroznost čestica punila i slobodni volumen), retencijska vremena molekula različitih poznatih molekularnih masa i izračunati parametri modela. Mjerenja su provedena na dvije različite kolone pri različitim protocima mobilne faze.

Usporedba rezultata simulacije pomoću modela i rezultata pokusa za kolonu Superdex 75 HR 10/30 pokazuje odstupanje modela pri nižim protocima, te za molekule manjih molekularnih masa ($M \leq 20000$ Da) upućujući na značajan utjecaj difuzije u radijalnom smjeru. Suprotno tome, dobro slaganje rezultata simulacije modela i rezultata pokusa dobiveno je za molekule većih molekularnih masa ($M \geq 40\ 000$ Da) te kod većih protoka, za obje kolone.

Usporedba rezultata simulacija pomoću modela i rezultata pokusa za kolonu BioSep SEC S2000 pokazuje odstupanje pri nižim protocima za molekule većih molekularnih masa izazvano nezadovoljavajućim punjenjem kolone, što je rezultiralo dugim ispiranjem komponenata sa kolone odnosno pogrešno određenim poroznostima čestica punila.

Ključne riječi: gel-filtracijska kromatografija, matematički model procesa, aksijalna disperzija, difuzija, metoda konačnih razlika

SUMMARY

Size exclusion chromatography (SEC) is also known as gel permeation or gel filtration chromatography. It separates macromolecules on the basis of their relative size or hydrodynamic volumes. SEC is widely used as a tool for the preparative and large-scale separation and purification of macromolecules such as proteins and polymers.

In this work mathematical model of the gel-filtration process in the chromatographic column has been developed. It considers the following three mass transfer processes in the SEC column: axial dispersion in the bulk-fluid phase, interfacial film mass-transfer between the stationary and mobile phases, and diffusion of solutes within the macropores of the packing particles. Additionally, following assumptions are taken into account to formulate the model: the column is isothermal, there is no interaction between different solutes, diffusion and mass-transfer coefficients remain constant, packing particles can be treated as spherical and uniform in size, the packing density is even along the column, and diffusion in the radial direction is negligible. Process model differential equations were solved by the finite difference method.

Characteristics of the column and the packing particles (bed void volume fraction, particle porosity, accessible particle porosity) were obtained experimentally, as well as retention times of different molecules with known molecular weights. Experiments were performed with two different columns containing two different packing materials.

Comparisons of the experimental results with simulation results for the Superdex 75 HR 10/30 column were performed. For small molecules ($M \leq 20000$ Da) and low flow rates of eluent deviation of simulation results was bigger indicating existence of the diffusion in radial direction. On the other hand, good agreement of the experimental results with simulation results was obtained for the bigger molecules ($M \leq 20000$ Da) and higher eluent flow rates.

Comparisons of the experimental results with simulation results for the BioSep SEC S2000 column were performed as well. For bigger molecules and low flow rates deviation of the simulation results was bigger indicating unsatisfactory packing of the column which caused long elution of the molecules connected with wrong calculation of the packing particle characteristics.

Key words: gel-filtration chromatography, mathematical model of the process, axial dispersion, diffusion, finite difference method

Želio bih se zahvaliti dr. sc. Bruni Zeliću na uloženom trudu i vremenu te na pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se Istraživačkom institutu Pliva što su mi omogućili izvedbu eksperimentalnog dijela rada te posebno mr. sc. Stjepanu Bogdanu na pruženoj pomoći i korisnim savjetima.

Zahvaljujem se i dr. sc. Đurđi Vasić-Rački na korisnim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Na neizmjerne ljubavi i potpori zahvaljujem se Ivani.

A, najviše se želim zahvaliti svojim roditeljima što su mi omogućili stjecanje fakultetskog obrazovanja te na neiscrpnj ljubavi, potpori i strpljenu tijekom godina studija.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	4
2.1 Kromatografija	5
2.1.1 Podjela kromatografskih procesa.....	5
2.1.1.1 Kolonska kromatografija.....	5
2.1.1.2 Plošna kromatografija.....	6
2.1.2 Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC).....	7
2.1.2.1 Razvoj kapljevinske kromatografije visokog učinka.....	7
2.1.2.2 Mehanizam separacije u kapljevinskoj kromatografiji visokog učinka.....	8
2.1.2.3 Shema HPLC procesa.....	9
2.1.3 Podjela kapljevinske kolonske kromatografije visokog učinka.....	9
2.2 Gel-filtracijska kromatografija	12
2.2.1 Mehanizam separacije procesa gel-filtracijske kromatografije.....	12
2.2.2 Učinkovitost kromatografskog procesa.....	13
2.2.2.1 Selektivnost kromatografskog procesa.....	14
2.2.2.2 Širina pika.....	15
2.2.3 Gel-filtracijski medij (punilo).....	16
2.2.3.1 Parametri punila.....	17
2.3 Matematički model	18
2.3.1 Pretpostavke modela procesa gel-filtracijske kromatografije.....	18
2.3.2 Formulacija modela.....	19
2.3.3 Parametri modela.....	20
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1 Materijali	24
3.1.1 Kemikalije.....	24
3.1.2 Otopine.....	24
3.1.3 Oprema.....	24
3.1.3.1 Kolone.....	25
3.2 Metode	26
3.2.1 Provedba procesa gel-filtracijske kromatografije.....	26

3.2.1.1 Mjerenje retencijskih vremena.....	27
3.2.2 Metoda konačnih razlika.....	27
3.2.2.1 Aproksimacija parcijalne diferencijalne jednačbe prvog reda.....	28
3.2.2.2 Aproksimacija parcijalne diferencijalne jednačbe drugog reda.....	29
3.2.3 Metoda konačnih razlika primjenjena na proces gel-filtracije.....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	31
4.1 Kolona Superdex 75 HR 10/30.....	32
4.1.1 Određivanje parametara kolone i punila.....	32
4.1.1.1 Određivanje udjela mrtvog volumena kolone, ε_b	32
4.1.1.2 Određivanje poroznosti čestice punila, ε_p	33
4.1.1.3 Određivanje dostupne poroznosti čestice punila, ε_p^a	34
4.1.2 Određivanje molekularne mase za nepoznati uzorak i bovine serum albumin...34	
4.1.3 Prikaz rezultata simulacija.....	36
4.1.3.1 Rezultati simulacija procesa gel-filtracijske kromatografije za BSA.....	36
4.1.3.2 Nepoznati uzorak (komponenta 1 i komponenta 2).....	40
4.2 Kolona BioSep SEC S2000.....	45
4.2.1 Određivanje parametara kolone i punila.....	46
4.2.1.1 Određivanje udjela mrtvog volumena kolone, ε_b	46
4.2.1.2 Određivanje poroznosti čestice punila, ε_p	47
4.2.1.3 Određivanje dostupne poroznosti čestice punila, ε_p^a	47
4.2.2 Prikaz rezultata simulacije.....	48
4.2.2.1 Gel-filtracijski standardi.....	48
5. ZAKLJUČAK.....	51
6. LITERATURA.....	53
7. POPIS SIMBOLA I OZNAKA.....	55
8. PRILOG.....	58

1. UVOD

Gel-filtracijska kromatografija (engl. *size exclusion chromatography*, SEC) je često korištena bioseparacijska metoda. U procesu gel-filtracijske kromatografije razdvajanje molekula posljedica je njihove relativne veličine, odnosno hidrodinamskog volumena. Naziv potječe od poroznog gela koji se u ranijim fazama razvoja ovog procesa koristio kao stacionarna faza. Danas, ova metoda nije ograničena samo na gel, nego se često koriste i različite porozne čestice¹.

Proces gel-filtracijske kromatografije se temelji na penetraciji molekula u poroznu matricu stacionarne faze. Ovisno o promjeru pora matrice i relativnoj veličini molekula, manje molekule će difundirati u pore i zaostati, dok će suprotno tome veće brže izaći iz kolone. Dodatno, kako postoji raspodjela veličina pora, samo najveće molekule bit će u potpunosti izuzete od difuzije u pore, dok će sve druge ulaziti sa većom ili manjom učestalosti (manje češće, veće rjeđe), te će zaostajati, u stacionarnoj fazi.

Proces gel-filtracije se koristi za pročišćavanje enzima, polisaharida, nukleinskih kiselina, proteina i drugih makromolekula. Ovaj proces je najblaža i najjednostavnija od svih kromatografskih metoda. Može se primijeniti u sljedećim slučajevima²:

1. Grupiranu separaciju – komponente uzorka su podijeljene, na temelju veličine molekule, na dvije grupe molekula. Ovakva separacija se može koristiti za izdvajanje molekula nusprodukata s većom ili manjom molekulskom masom, te za odsoljavanje i izmjenu pufera.
2. Visokorezolucijsko razdvajanje biomolekula – komponente uzorka se razdvajaju na temelju razlike u molekularnim masama. Ovakva separacija se može koristiti za izolaciju pojedine komponente, za odvajanje monomera od polimera, za određivanje molekularne mase te za izvedbu analize distribucije molekularnih masa.

Može se još koristiti i za refolding denaturiranih proteina pažljivim promjenama puferskih uvjeta.

Zbog toga što se kod procesa gel-filtracije ne stvara veza između komponenata uzorka i stacionarne faze, njen pojni volumen (engl. *feed volume*), naspram volumena kolone (engl. *bed volume*) je relativno mali, za razliku od drugih kromatografskih metoda kao što su npr. ionsko-izmjenjivačka (engl. *ionic exchange chromatography*, IEC) i afinitetna kromatografija (engl. *affinity chromatography*, AC). Zbog toga komercijalne SEC kolone mogu biti vrlo velike, s volumenom punila i do nekoliko stotina litara. Kako se kao punilo koristi gel, koji je mekan, povećavanje visine kolone je ograničeno zbog povećanja tlaka, te stoga SEC kolone u pravilu imaju velike promjere. U takvim kolonama, difuzijski efekti i efekti prijenosa tvari mogu biti značajni.

Izdane su brojne monografije na temu teorije i primjene procesa SEC-a, te postoje brojni matematički modeli koji uzimaju u obzir efekte prijenosa tvari, u ovom procesu.

U ovom radu korišten je Gu-ov model³ koji uvodi pojam dostupna poroznost čestica da bi opisao razdvajanje molekula u procesu gel-filtracijske kromatografije. Model pretpostavlja tri procesa prijenosa tvari: aksijalnu disperziju u mobilnoj fazi, međufazni prijenos tvari između stacionarne i mobilne faze i difuziju u pore čestica punila.

Model je formuliran u obliku dvaju parcijalnih diferencijalnih jednadžbi koje su numerički riješene metodom konačnih razlika.

Metoda konačnih razlika⁴ ili metoda aproksimacija parcijalnih diferencijalnih jednadžbi konačnim razlikama je približna numerička metoda, i temelji se na pretpostavci da se derivacija u svakoj točki može prikazati kao razlika vrijednosti funkcije u točkama oko promatrane točke, uz uvjet da je promatrani interval podijeljen na dovoljno veliki konačni broj elemenata.

Dobiveni sustav linearnih jednadžbi riješen je u programskom paketu Matlab. Eksperimentalno su određeni parametri modela (poroznost čestica, dostupna poroznost čestice, udio mrtvog volumena itd.) te su određena retencijska vremena za niz molekulskih vrsta, na različitim protocima. Mjerenja su izvođena na dvije kolone različitih promjera, s različitim punilima. Na kraju su eksperimentalni rezultati uspoređeni s rezultatima simulacija procesa, te je ustanovljeno njihovo dobro slaganje.

2. OPĆI DIO

2.1 Kromatografija

Kromatografija je tehnika koja služi za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka, prisutnih u složenim smjesama, u kojoj se sastojci smjese odjeljuju ovisno o brzinama kojima ih pokretna (mobilna) faza nosi kroz nepokretnu (stacionarnu) fazu.

Pri procesu kromatografije postoji reverzibilno međudjelovanje između sastojaka smjese (mobilne faze) i sorbensa (stacionarne faze). Mobilna faza (plin ili kapljevina) nosi sastojke smjese i kreće se iznad sorbensa. Prilikom svog putovanja molekule sastojaka smjese neprestano se sorbiraju i desorbiraju. Stacionarna faza mora biti tako odabrana da je zadržavanje na njoj selektivno, pa različiti sastojci putuju različitom brzinom i tako se jedan od drugog odjeljuju.

2.1.1 Podjela kromatografskih procesa

Procesi kromatografije u osnovi se mogu podijeliti na dvije grupe metoda (Slika 2.1):

- kromatografiju u koloni (na stupcu)
- plošnu kromatografiju

2.1.1.1 Kolonska kromatografija

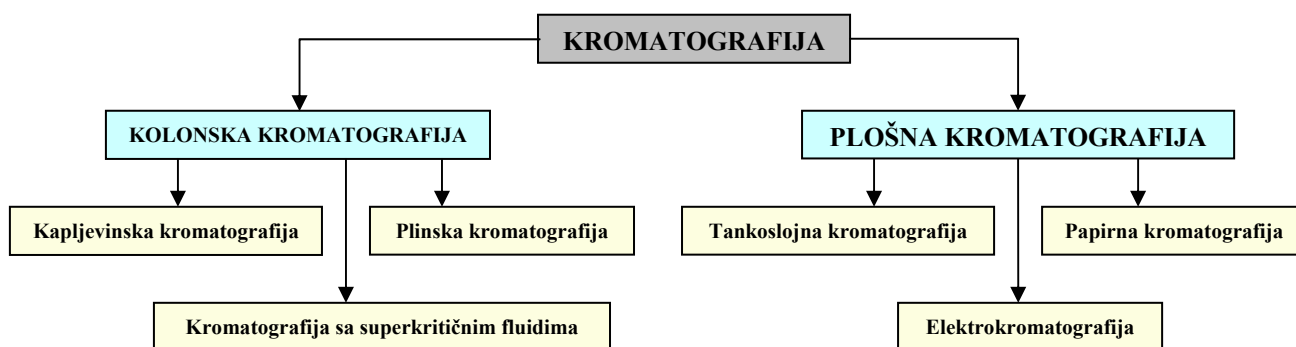
Kod kromatografije u koloni stacionarna faza ispunjava usku cijev kroz koju se mobilna faza kreće pod utjecajem tlaka ili rjeđe gravitacije. Postoje tri načina provedbe kromatografskog procesa u koloni:

- eluiranje ili ispiranje - u kojem struja inertne mobilne faze nosi sastojke smjese koji se razdvajaju na nepokretnoj fazi;
- frontalna analiza - u kojoj je mobilna faza smjesa koju razdvajamo;
- istiskivanje - u kojem se mobilna faza adsorbira jače od bilo kojeg sastojka u razdvajanoj smjesi i tako istiskuje sastojke s adsorbensa.

Dodatno, procesi kolonske kromatografije dijele se na:

- plinsku kromatografiju - mobilna faza je inertni plin (He, N₂, H₂, Ar i dr.), dok je stacionarna faza čvrsta tvar ili čvrsta tvar presvučena slojem kapljevine. Može se podijeliti na plinsko-adsorpcijsku i plinsko-kapljevinsku kromatografiju;

- kapljevinska kromatografija - kao mobilnu fazu ima kapljevinu (eluent) koja prolazi kroz kolonu punjenu stacionarnom čvrstom fazom;
- kromatografija sa superkritičnim fluidima.



Slika 2.1. Podjela kromatografskih procesa

2.1.1.2 Plošna kromatografija

Kod plošne kromatografije stacionarna faza nanosena je na ravnu plohu ili u pore papira, a mobilna faza prolazi kroz stacionarnu fazu pod utjecajem kapilarnih sila ili gravitacije. Pri tome razlikujemo:

- tankoslojnu kromatografiju - stacionarna faza se nanosi na ravnu površinu te se u dodiru s otapalom, kao mobilnom fazom, komponente uzorka razdvajaju. Detekcija odijeljenih sastojaka na kromatogramu je vizualna;
- papirnu kromatografiju - identična je tankoslojnoj kromatografiji, samo je stacionarna faza papir, tj. celuloza;
- elektrokromatografiju - razdvajanje se izvodi pod utjecajem električnog potencijala.

2.1.2 Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Kapljevinska kromatografija visokog učinka (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) danas je najrazvijeniji oblik kromatografije. U usporedbi s klasičnim kromatografskim tehnikama karakteriziraju je sljedeća svojstva:

- mali promjer čestica punila (3-50 μm);
- relativno visoki radni tlak;
- kontrolirani protok mobilne faze;
- mali promjer kolone i mogućnost višekratnog korištenja kolone (punila);
- precizno injektiranje malih volumena uzorka;
- osjetljivi detektori za detekciju malih količina analita;
- automatizirani standardizirani instrumenti;
- brza analiza;
- visoki stupanj razdvajanja.

U HPLC sustavu može se provoditi bilo koji oblik kapljevinske kolonske kromatografije.

2.1.2.1 Razvoj kapljevinske kromatografije visokog učinka

Do 70-ih godina prošlog stoljeća u laboratorijima se komercijalno primjenjivalo svega nekoliko pouzdanih kromatografskih metoda. Većina separacija provodila se tehnikama poput kromatografije s otvorenim kolonama, papirne ili tankoslojne kromatografije. Te su kromatografske tehnike bile neprikladne za kvantifikaciju komponenata i razdvajanje molekula sličnih fizikalno-kemijskih svojstava.

Sredinom 70-tih godina prošlog stoljeća pojavila se visokotlačna kapljevinska kromatografija (engl. *high pressure liquid chromatography*, HPLC), koju odlikuju brzi razvoj materijala za punjenje kolona i pogodnih *on-line* detektora. U kasnim 70-tim, nove metode, poput kapljevinske kromatografije s reverznom fazom (engl. *reverse phase liquid chromatography*), omogućile su poboljšanu separaciju vrlo sličnih komponenata. Početkom 1980-tih HPLC je već postala uobičajena metoda u razdvajanju kemijskih komponenata.

Nove metode su znatno poboljšale razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju. Prikladnosti HPLC-a pogoduje i ubrzana automatizacija metode uz primjenu računala. S pojavom mikrokolona, afinitetnih kolona, itd. dolazi do poboljšanja ponovljivosti mjerenja.

Danas postoji vrlo veliki broj različitih vrsta HPLC kolona, koje uz širok izbor detektora povezanih s HPLC-om omogućuju optimalnu analizu komponenata. HPLC nalazi

primjenu u najraznovrsnijim industrijskim područjima kao što su kozmetika, energetika, prehrana i zaštita okoliša.

Izvorno ime metode potječe od povišenog radnog tlaka kao osnovnog svojstva moderne kapljevinske kromatografije. Napredak metode nije, međutim, uzrokovan jedino povišenjem radnog tlaka, već je rezultat mnogih čimbenika kao što su razvoj punila (manje dimenzija čestica, uža raspodjela veličina čestica, jednolika veličina pora), razvoj samih kolona, napredak u tehnici punjenja kolona, pojava preciznih injektora s mogućnošću injektiranja malih volumena, razvoj osjetljivijih detektora i boljih pumpi. Uzevši sve to u obzir, ispravnije je govoriti o kapljevinskoj kromatografiji visokog učinka (engl. *high performance liquid chromatography*) što ujedno omogućuje i korištenje iste skraćenice, HPLC.

2.1.2.2 Mehanizam separacije u kapljevinskoj kromatografiji visokog učinka

Svaki kromatografski proces zahtijeva postojanje dvije faze, stacionarne i mobilne. Kod HPLC-a stacionarna se faza sastoji od finih čvrstih čestica malog promjera (3-50 μm), ravnomjerno raspodijeljenih unutar metalne, staklene ili plastične cijevi – kromatografske kolone. Mobilna faza je kapljevina koja služi kao otapalo za prenošenje otopljenog uzorka kroz kolonu. Do razdvajanja sastojaka uzorka neke smjese dolazi uslijed fizikalno-kemijskih interakcija sastojaka s mobilnom i stacionarnom fazom. Spojevi s malim afinitetom za stacionarnu fazu i dobre topljivosti u mobilnoj fazi brzo se ispiru iz kolone. Spojevi koji se dobro vežu za stacionarnu fazu i slabo su topljivi u mobilnoj kreću se mnogo sporije kroz kolonu.

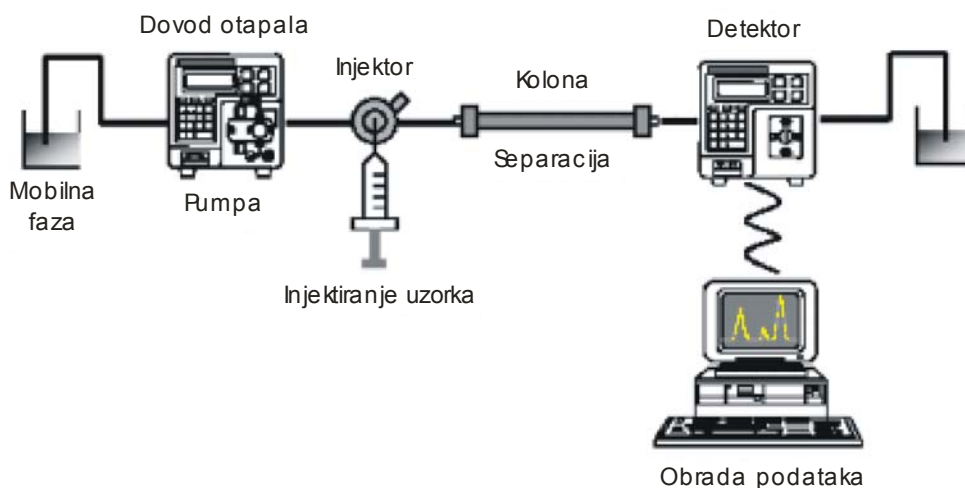
Razvoj HPLC metode zahtijeva pronalaženje kombinacije procesnih parametara (izbor punila kolone, sastav i koncentracija mobilne faze i sl.), koji omogućavaju da se različiti spojevi kreću različitim brzinama kroz kolonu i na taj način razdvajaju.

Idealan kromatografski proces karakterizira ravnomjerna raspodjela sastojaka uzorka između stacionarne i mobilne faze u bilo koje vrijeme i na bilo kojem položaju u koloni. Kako mobilna faza prolazi kroz kolonu, dolazi do stalnog narušavanja ravnotežne raspodjele sastojaka uzorka između dviju faza – svježja mobilna faza dolazi u kontakt sa stacionarnom fazom koja sadrži vezani spoj i tada se uspostavlja nova ravnoteža. Različiti sastojci uzorka imaju različite ravnotežne raspodjele između stacionarne i mobilne faze pa tako svaka komponenta provodi različito (prosječno) vrijeme vezana na stacionarnoj fazi. Područja bogata različitim sastojcima pomiču se kroz kolonu različitim brzinama što dovodi do

odjeljivanja sastojaka uzorka na koloni, nakon čega se razdvojene tvari eluiraju s kolone u različitim vremenima od trenutka injektiranja. To dovodi do karakterističnih koncentracijskih profila eluiranih sastojaka u eluatu s kolone, koji se na detektoru detektiraju kao kromatografski vršci, pikovi (engl. *peak*), iz čega se onda mogu odrediti kvantitativna i/ili kvalitativna svojstva detektirane tvari.

2.1.2.3 Shema HPLC procesa

Suvremeni se HPLC proces sastoji od automatskog uzorkivača (engl. *autosampler*), injektora, jedinice za pripravu mobilne faze umješavanjem dvaju ili više otapala, pumpe i otplinjača (degazera), kolone, detektora i sustava za prikupljanje podataka. Na slici 2.2 shematski je prikazan jedan takav proces.



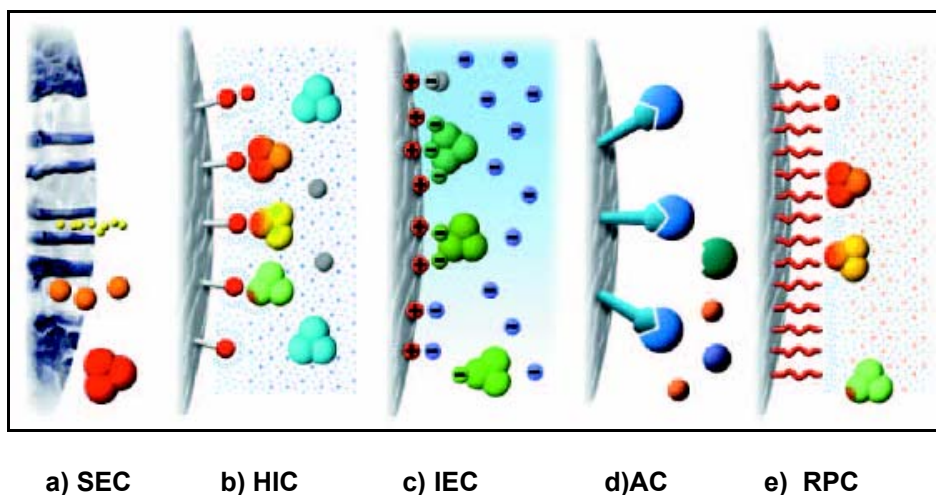
Slika 2.2. Shematski prikaz HPLC procesa

2.1.3. Podjela kapljevinske kolonske kromatografije visokog učinka

S obzirom na prirodu separacijskog procesa razlikuje se pet metoda kapljevinske kolonske kromatografije:

- gel-filtracijska kromatografija;
- kromatografija hidrofobnom interakcijom;
- ionsko-izmjenjivačka kromatografija;

- afinitetna kromatografija;
- adsorpcijska kromatografija;
 - kromatografija s normalnom fazom;
 - kromatografija s reverznom fazom.



Slika 2.3. Mehanizmi separacije u različitim HPLC metodama

U procesu adsorpcijske kromatografije stacionarna faza je adsorbens (poput silikagela ili nekog drugog punjenja na bazi silikata), a separacija se temelji na razlikama polarnosti tvari koje se razdvajaju, uz uzastopno ponavljanje adsorpcijskih i desorpcijskih procesa.

Proces kromatografije s normalnom fazom (engl. *normal phase chromatography*, NPC) koristi polarnu stacionarnu fazu (npr. silikagel) i manje polarnu mobilnu fazu (npr. n-heksan ili tetrahidrofur). U takvim će se kolonama komponente uzorka s polarnim funkcionalnim skupinama jače vezati za stacionarnu fazu nego one manje polarne. Prema tome, manje polarne komponente će se brže eluirati iz kolone od polarnijih komponenata.

Kod procesa kromatografije s reverznom fazom (engl. *reversed phase chromatography*, RPC) stacionarna faza je punilo na bazi silikata s vezanim n-alkilnim lancima ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) koji stupaju u interakciju s uzorkom. Postoje tri uobičajene dužine lanca, C₄, C₈, i C₁₈. C₄ se obično koristi za proteine, a C₁₈ za peptide i manje molekule. Mobilna faza je polarna kapljevina, kao što je smjesa vode i metanola ili acetonitrila. U takvim će se sustavima polarne komponente eluirati brže od nepolarnih (Slika 2.3e).

U procesu gel-filtracijske kromatografije analizirane komponente se razdvajaju prema razlikama u dimenzijama molekula. Mehanizam separacije se temelji na penetraciji molekula

u pore čestica punila, tako da manje molekule, koje mogu penetrirati u pore, zaostaju, dok veće, koje to ne mogu, prolaze između čestica punila te prije izlaze iz kolone (Slika 2.3a).

Proces ionsko-izmjenjivačke kromatografije (engl. *ionic exchange chromatography*, IEC) temelji se na selektivnoj izmjeni iona u uzorku s protuionima u stacionarnoj fazi. Kolone na polimernoj matrici sadrže kovalentno vezane, električki nabijene funkcionalne skupine. Prolaskom kroz kolonu komponente uzorka izmjenjuju svoje ione s protuionima na stacionarnoj fazi i time se vezuju na nju. Uzorak se eluira iz kolone promjenom svojstava mobilne faze (pH i ionske jakosti) na način da mobilna faza zamjenjuje ione uzorka vezane na stacionarnu fazu. Što je naboj komponente veći, to će komponenta biti jače vezana i njeno retencijsko vrijeme (vrijeme zadržavanja u koloni) bit će dulje (Slika 2.3c).

Kromatografija hidrofobnom interakcijom (engl. *hydrophobic interaction chromatography*, HIC) razdvaja proteine prema hidrofobnosti. Separacija se temelji na hidrofobnim interakcijama između proteina i hidrofobnog liganda na kromatografskom nosaču (Slika 2.3b).

Kod afinitetne kromatografije (engl. *affinity chromatography*, AC) stacionarna faza se sastoji od dva dijela: kromatografski neaktivnog dijela koji se naziva matrica i kromatografski aktivnih biospecifičnih liganada. Ligand sadržava kemijske skupine koje omogućavaju da se kovalentnim vezama fiksira na matricu, a da pri tom ne izgubi sposobnost vezivanja biokomponente koja se separira iz smjese. Vrlo je važna i selektivnost liganda, koji treba reagirati samo s željenom komponentom uzorka. Promjenom uvjeta u koloni (modificiranje mobilne faze u smislu promjene pH, dodatka nekih soli, i dr.) dolazi do eluiranja pročišćene komponente (Slika 2.3d).

U nekim se slučajevima na istoj kromatografskoj koloni mogu kombinirati razni tipovi kromatografskih tehnika i separacijskih načela. To su tzv. kombinirane metode. Promjenom mobilne faze mijenja se način separacije, što omogućava postizanje željene selektivnosti.

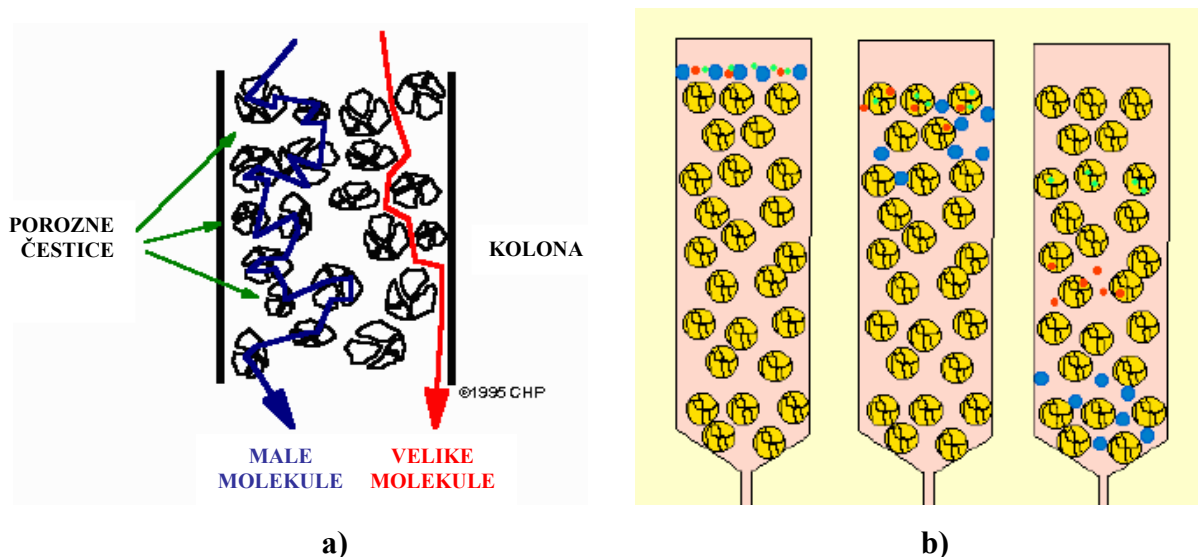
2.2 Gel-filtracijska kromatografija

Već više od četrdeset godina gel-filtracija jedan je od ključnih procesa u pročišćavanju enzima, polisaharida, nukleinskih kiselina, proteina i drugih makromolekula. Koristi se u sljedećim slučajevima:

- Grupiranoj separaciji – komponente uzorka su podijeljene, na temelju veličine molekule, na dvije grupe. Ovakva separacija se može koristiti za izdvajanje molekula nusprodukata s većom ili manjom molekulskom masom, te za odsoljavanje i izmjenu pufera;
- Visokorezolucijsko razdvajanje biomolekula – komponente uzorka se razdvajaju na temelju razlike u molekularnim masama. Ovakva separacija se može koristiti za izolaciju pojedine komponente, za odvajanje monomera od agregata, za određivanje molekularne mase te za izvedbu analize distribucije molekularnih masa.

2.2.1 Mehanizam separacije procesa gel-filtracijske kromatografije

Proces se temelji na penetraciji molekula u pore čestica punila. Kada otopina, koja sadrži molekule različitih dimenzija (molekularnih masa), prolazi kroz kolonu, molekule promjera većeg od promjera pora ne ulaze u pore, nego prolaze prostorom između čestica punila (Slika 2.4a, crvena linija). Manje molekule ulaze i izlaze iz pora sa vjerojatnošću koja raste sa smanjenjem veličine molekule, te se stoga sporije kreću kroz kolonu (Slika 2.4a, plava linija). Tako će najprije izaći najveće molekule, pa onda srednje i na kraju najmanje molekule (Slika 2.4b). Prema tome, gel-filtracijska kromatografija razdvaja molekule po njihovoj veličini⁵.

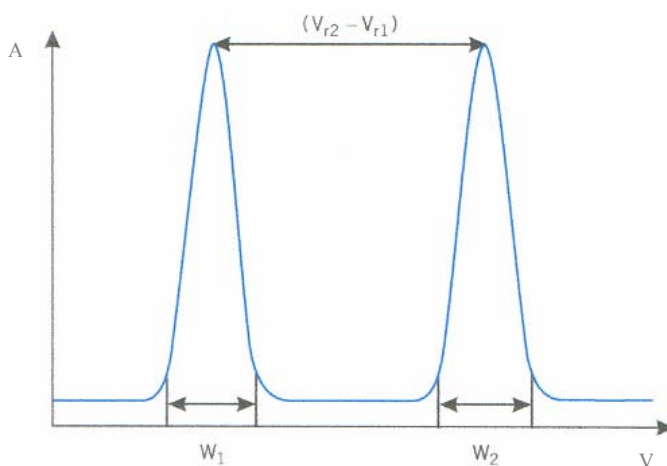


Slike 2.4. Mehanizam separacije molekula u procesu gel-filtracijske kromatografije

Za razliku od ionsko-izmjenjivačke kromatografije i afinitetne kromatografije, molekule se ne vežu za stacionarnu fazu pa sastav eluata ne utječe izravno na rezoluciju (razmak između dva pika). Zbog toga se mogu mijenjati uvjeti gel-filtracije da bi se ona prilagodila vrsti uzorka ili olakšalo daljnje pročišćavanje, analiza i skladištenje uzorka bez utjecaja na samu separaciju. Proces gel-filtracijske kromatografije je vrlo primjenjiva metoda separacije biomolekula koje su osjetljive na promjenu pH, koncentraciju metalnih iona i na nepovoljne uvjete.

2.2.2 Učinkovitost kromatografskog procesa

U svim kromatografskim tehnikama, komponente uzorka izlaze iz kolone sa vremenskom razlikom (različitim vremenima eluiranja). Učinkovitost separacije² izražena je rezolucijom, R_s (Slika 2.5 i jednačba 1).



Slika 2.5. Rezolucija

$$R_s = \frac{V_{r2} - V_{r1}}{\frac{W_1 + W_2}{2}} \quad (1)$$

Pri čemu su V_{r1} i V_{r2} volumeni eluata, za dva susjedna pika, koji su mjereni na sredini pikova, a W_1 i W_2 širine pikova.

Učinkovitost sa kojom neki kromatografski proces odvaja komponente iz uzorka ovisi o dva svojstva⁶:

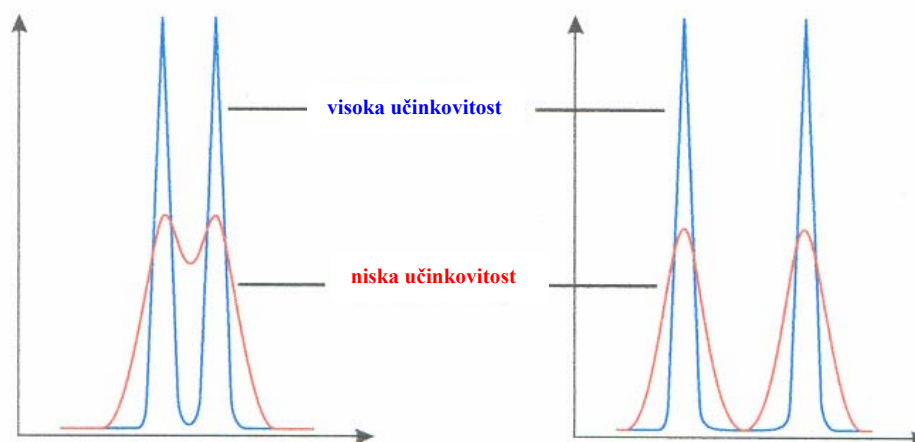
1. Selektivnosti, koja se definira kao vrijeme (volumen eluata) između dva maksimuma susjednih pikova koji predstavljaju dvije komponente uzorka koje su prošle kroz kolonu;
2. Širini pika (engl. *band-broadening*).

2.2.2.1 Selektivnost kromatografskog procesa

Kao što je već spomenuto, selektivnost kromatografskog procesa je vremenski razmak (volumen eluata) između dva susjedna pika. Kako je veličina pora odlučujući faktor u procesu gel-filtracijske kromatografije, selektivnost ovisi isključivo o stacionarnoj fazi (punilu). Za određenu stacionarnu fazu, postojat će konstantni odnos između retencijskog vremena i veličine molekule (za isti protok). U koloni, postoji raspodjela veličina pora čestica punila i što je ta raspodjela uža, to je bolja selektivnost stacionarne faze, odnosno selektivnost kromatografskog procesa.

Drugo važno svojstvo stacionarne faze je ukupni volumen pora, koji nam govori koji udio stacionarne faze sudjeluje u separacijskom procesu. Uska raspodjela veličina pora je

nedovoljna ako je volumen pora mali. Zato je, kad se radi kod povišenih tlakova, ključna mehanička stabilnost punila.



Slika 2.6. Zavisnost rezolucije o učinku proširenja vrpce i selektivnosti

2.2.2.2. Širina pika

Kvaliteta separacije ne ovisi isključivo o selektivnosti, nego i o tome kako pojedina molekulska vrsta uspijeva suzbiti širenje pika. To je posebno važno za gel-filtracijsku kromatografiju jer je selektivnost fiksna, za odabranu stacionarnu fazu.

Nakon injektiranja, uska kromatografska vrpca se prolaskom kroz kolonu proširuje. Što je to proširenje veće, manji broj komponenti se može separirati u datom vremenu. Drugim riječima, oštrina (širina) pika je mjera učinkovitosti kolone. Širina pika ovisi o duljini kolone, protoku i veličini čestica punila. Za određenu kolonu, protok je jedini parametar na koji se može utjecati.

Širenje pika se javlja zbog tri razloga:

- složeni put komponenti uzorka kroz punilo u koloni;
- molekularna (longitudinalna) difuzija;
- efekt prijenosa tvari između faza.

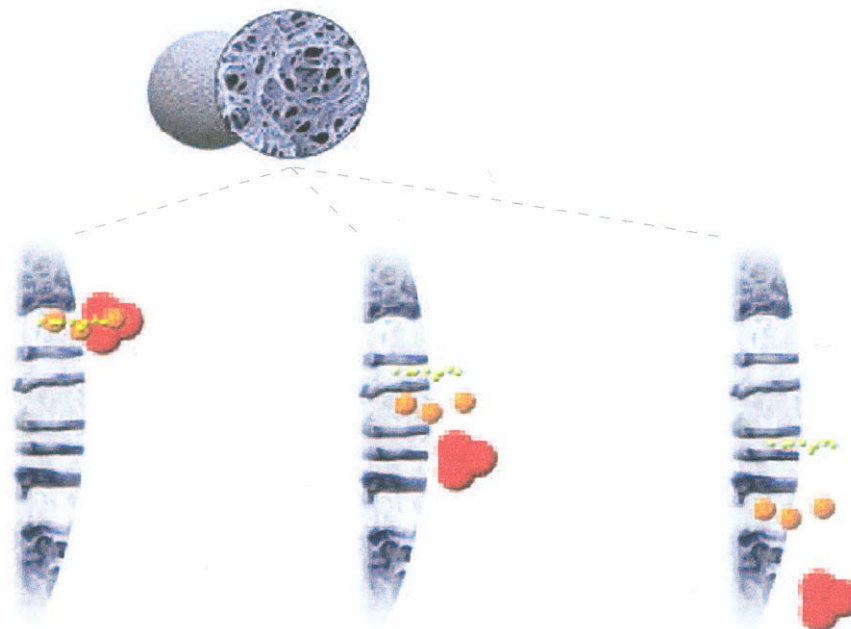
Zbog složenog puta komponenti uzorka kroz kolonu može doći do različitih brzina protoka mobilne faze, što uzrokuje proširenje vrpce. Brzina mobilne faze može značajno varirati unutar promjera kolone, ovisno o obliku čestica, poroznosti i strukturi punila.

Longitudinalna difuzija unutar kolone dovodi do proširenja vrpce. Ona ovisi o brzini eluenta, odnosno što je veća brzina to je manji utjecaj tog efekta. Za standardne brzine u procesu gel-filtracijske kromatografije ovaj učinak je skoro zanemariv.

Zamislimo zonu molekula uzorka koje se kreću kroz kolonu stalno izmjenjujući mobilnu i stacionarnu fazu. Na početku zone, molekule uzorka ulaze u stacionarnu fazu difuzijom zbog koncentracijske razlike između dvije faze. Na kraju zone, molekule uzorka difundiraju iz stacionarne faze, ponovo zbog koncentracijske razlike. Ovaj proces difuzije u i van iz stacionarne faze zove se prijenos tvari. Ako se zone kreću kroz kolonu prebrzo, neke molekule uzorka neće imati dovoljno vremena ući u stacionarnu fazu te će proći dalje niz kolonu. Na kraju zone, molekule unutar stacionarne faze neće imati dovoljno vremena za izlazak iz pora te će zaostajati. Posljedica ova dva efekta je značajno proširenje vrpce uzrokovano nepotpunim prijenosom tvari (Slika 2.6).

2.2.3 Gel-filtracijski medij (punilo)

Medij u procesima gel-filtracijske kromatografije je porozna matrica u obliku sferičnih čestica (Slika 2.7), koje moraju biti kemijski i fizikalno stabilne, te inertne. Najčešće se koristi umreženi dekstran ili polistiren. Stupanj umreženosti određuje promjer pora i područje razdvajanja molekula. O veličini čestica i raspodjeli veličina pora ovisi selektivnost medija. Veličina čestica punila kreće se od 10 do 500 μm . Današnji gel-filtracijski mediji pokrivaju područje molekularnih masa od 100 do 80 000 000 Da.



Slika 2.7. Porozna čestica punila i mehanizam separacije procesa gel-filtracijske kromatografije

2.2.3.1 Parametri punila

Jedan od parametara koji najbolje karakterizira punilo koje se koristi u procesima gel-filtracijske kromatografije je poroznost čestica punila³, ε_p , a računa se iz retencijskog vremena za male molekule koje ulaze u sve pore (jednadžba 2),

$$t_0 = t_d \left[1 + \frac{(1 - \varepsilon_b) \varepsilon_p}{\varepsilon_b} \right] \quad (2)$$

pri čemu su:

t_0 – retencijsko vrijeme za male molekule koje ulaze u sve pore;

t_d – retencijsko vrijeme za velike molekule koje ne ulaze u pore,

ε_b – udio mrtvog volumena kolone, a ovisi o veličini čestica punila i proceduri pakiranja kolone. Za dobro 'zapakirane' kolone može se smatrati konstantnim. Za različite kolone sa istim punilom ε_b se određuje eksperimentalno iz sljedeće relacije:

$$t_d = L / v = \frac{\pi d^2 L \varepsilon_b}{4Q} \quad (3)$$

pri čemu su:

L – duljina kolone;

d – promjer kolone;

Q – protok;

v – linearna brzina.

No, kako pore nisu jednako dostupne za sve molekule (ovisno o njihovoj veličini), uvodi se novi parametar, ε_p^a , dostupna poroznost čestica, koji predstavlja volumni udio dostupnih pora (u odnosu na ukupni volumen čestice) za određenu molekulsku vrstu. ε_p^a je za tipičnu makromolekulu, kao što je protein, manji od ε_p . To znači da protein može penetrirati u neke veće pore, dok u manje ne može. Ako je $\varepsilon_p^a = 0$, to znači da ta molekula ne ulazi ni u jednu poru (npr. Blue dextran). Različita vrijednost ε_p^a , ovisno o veličini molekule, je ključni faktor odgovoran za separaciju molekula u SEC koloni. ε_p^a se računa, za pojedinu molekulsku vrstu, iz retencijskog vremena za tu molekulu. Određuje se za svaku molekulsku vrstu posebno iz sljedeće jednadžbe:

$$t_R = t_d \left[1 + \frac{(1 - \varepsilon_b) \varepsilon_p^a}{\varepsilon_b} \right] \quad (4)$$

gdje je t_R retencijsko vrijeme za pojedinu molekulsku vrstu u uzorku.

Također, važan podatak koji karakterizira punila procesa gel-filtracijske kromatografije je i radijus čestice punila R_p , a njega specificira proizvođač punila.

2.3 Matematički model procesa

Matematički opis ili matematički model⁷ pojedinog procesa je opis procesa pomoću matematičkih pojmova, kao što su npr. linearne, nelinearne i/ili diferencijalne jednačbe. Pri postavci pojedinog problema potrebno je voditi računa o svim podsustavima i svim pojavama koje se odvijaju u promatranom procesu. Potrebno je ocijeniti koje su pojave i koji mehanizmi dominantni u nekom procesu, kako se konačni model procesa ne bi opteretio pojavama i/ili mehanizmima koji zanemarivo utječu na veličinu(e) koju(e) promatramo u danom procesu.

Matematički modeli povezuju međusobno pojedine mehanizme i pojave, u promatranom procesu, preko funkcijskih zavisnosti pojedinih varijabli koje opisuju mehanizme i pojave koje se želi karakterizirati pojedinim modelom. Mehanizmi su obično definirani nekim konstantama koje se zovu parametri modela. Parametar modela može imati jednu ili više brojevanih vrijednosti, a može i ne mora imati fizikalno značenje. Parametre možemo podijeliti i na one koji su prije postavljanja modela poznati, i na one čija je vrijednost nepoznata i koju trebamo procijeniti iz rezultata mjerenja.

Model procesa gel-filtracijske kromatografije¹ pretpostavlja sljedeća tri procesa prijenosa tvari:

- aksijalnu disperziju u mobilnoj fazi;
- međufazni prijenos tvari između stacionarne i mobilne faze;
- difuziju u pore čestica punila.

2.3.1 Pretpostavke modela procesa gel-filtracijske kromatografije

Za formulaciju modela procesa gel-filtracijske kromatografije³ uzete su u obzir sljedeće pretpostavke:

- izoterman rad kolone;
- nepostojanje interakcije između različitih tvari;
- konstantnost difuzijskog koeficijenta i koeficijenta prijenosa tvari;
- čestice punila su sferične i jednake veličine;
- gustoća punila je konstantna kroz cijelu kolonu;

- difuzija u radijalnom smjeru je zanemariva.

Važno je napomenuti da se pri postavljanju modela procesa uzima u obzir da su sve čestice iste (nominalne) veličine i da imaju isti (nominalni) promjer pora.

2.3.2 Formulacija modela

Uzevši u obzir navedene pretpostavke, postavljene su sljedeće jednačbe iz diferencijalnih bilanci tvari za promjenu koncentracije u mobilnoj fazi (jednačba 5), te u stacionarnoj fazi (jednačba 6):

$$-D_b \frac{\partial^2 C_b}{\partial Z^2} + v \frac{\partial C_b}{\partial Z} + \frac{\partial C_b}{\partial t} + \frac{3k(1-\varepsilon_b)(C_b - C_{p,R=R_p})}{\varepsilon_b R_p} = 0 \quad (5)$$

$$\frac{\partial C_p}{\partial t} = D_p \left(\frac{\partial^2 C_p}{\partial R^2} + \frac{2}{R} \frac{\partial C_p}{\partial R} \right) \quad (6)$$

pri čemu jednačbe 5 i 6 imaju sljedeće granične uvjete:

$$t=0, \quad C_b=C_b(0,R,Z), \quad C_p=C_p(0,R,Z);$$

$$Z=0, \quad \frac{\partial C_b}{\partial Z} = \frac{v}{D_b} [C_b - C_f(t)]; \quad Z=L, \quad \frac{\partial C_b}{\partial Z} = 0;$$

$$R=0, \quad \frac{\partial C_p}{\partial R} = 0; \quad R=R_p, \quad \frac{\partial C_b}{\partial Z} = \frac{v}{D_b} [C_b - C_f(t)].$$

Bezdimenzijske veličine definirane su kako slijedi:

$$z=Z/L, \quad \tau=vt/L, \quad r=R/R_p, \quad c_b=C_b/C_0, \quad c_p=C_p/C_0;$$

$$Pe_L=vL/D_p, \quad Bi=kR_p/(\varepsilon_p^a D_p), \quad \eta=\varepsilon_p^a D_p L/(R_p^2 v), \quad \xi=3Bi\eta(1-\varepsilon_b)/\varepsilon_b$$

Uz ove granične uvjete i bezdimenzijske veličine jednačbe 5 i 6 mogu se pisati u sljedećem obliku:

$$-\frac{1}{Pe_L} \frac{\partial^2 c_b}{\partial z^2} + \frac{\partial c_b}{\partial \tau} + \frac{\partial c_b}{\partial z} + \xi(c_b - c_{p,r=1}) = 0 \quad (7)$$

$$\frac{\partial c_p}{\partial \tau} = \frac{\eta}{\varepsilon_p^a} \left(\frac{\partial^2 c_p}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_p}{\partial r} \right) \quad (8)$$

uz bezdimenzijske početne uvjete:

$$\tau=0, \quad c_b=c_b(0,r,z), \quad c_p=c_p(0,r,z);$$

i bezdimenzijske granične uvjete:

$$z=0, \quad \frac{\partial c_b}{\partial z} = Pe_L \left[c_b - \frac{C_f(\tau)}{C_0} \right]; \quad \text{gdje je: } \frac{C_f(\tau)}{C_0} = \begin{cases} 1 & 0 \leq \tau \leq \tau_{imp} \\ 0 & \text{ostalo} \end{cases}$$

$$z=1, \quad \frac{\partial c_b}{\partial z} = 0;$$

$$r=0, \quad \frac{\partial c_p}{\partial r} = 0;$$

$$r=1, \quad \frac{\partial c_p}{\partial r} = Bi(c_b - c_{p,r=1}).$$

U ovom radu pretpostavljeno je da se koncentracija na površini čestica punila ($r=1$) može izraziti sljedećom jednadžbom:

$$r=1, \quad c_{p,r=1} = K_{SEC} c_b \quad (9)$$

gdje je K_{SEC} koeficijent distribucije i računa se:

$$K_{SEC} = \frac{t_r - t_d}{t_0 - t_d} \quad (10)$$

2.3.3 Parametri modela

Parametri modela gel-filtracijske kromatografije su :Peclet-ov broj, Biot-ov broj, eta broj, udio mrtvog volumena, poroznost čestica i dostupna poroznost čestica.

Peclet-ov broj računa se iz sljedeće jednadžbe:

$$Pe_L = \frac{vL}{D_p} = \frac{L}{2R_p \varepsilon_b} (0,2 + 0,0011Re^{0,48}), \quad 10^{-3} \leq Re \leq 10^3 \quad (11)$$

Za male Re , doprinos drugog člana u zagradi je zanemariv, zato se jednadžba 11 može pisati u obliku:

$$Pe_L = \frac{vL}{D_p} = \frac{0,1L}{R_p \varepsilon_b}, \quad Re \leq 0,02 \quad (12)$$

Da bi se izračunao eta broj ($\eta = \varepsilon_p^a D_p L / (R_p^2 v)$), potrebno je odrediti vrijednost efektivne difuzivnosti, D_p . On utječe na širinu pikova u procesu gel-filtracijske kromatografije, a može se odrediti iz molekularne difuzivnosti, D_m :

$$D_p = \frac{D_m}{\tau_{tor}} (1 - 2,104\lambda + 2,09\lambda^3 + 0,95\lambda^5) \quad (13)$$

Da bi se pomoću jednadžbe 13 izračunao D_p potrebno je odrediti začepljenost pora (τ_{tor}), molekularnu difuzivnost (D_m) i odnos promjera molekule naspram promjera čestice punila (λ).

Začepljenost pora određuje se eksperimentalno. Molekularna difuzivnost za velike sferične molekule određuje se pomoću Stokes-Einstein-ove jednadžbe:

$$D_m = \frac{\kappa T}{6\pi\mu R_m} \quad (14)$$

gdje je κ Boltzman-ova konstanta, T apsolutna temperatura, μ viskoznost mobilne faze, a R_m radijus molekule uzorka.

Radijus molekule uzorka može se odrediti iz njenog specifičnog volumena (v_s) i molekularne mase, M , uz pretpostavku da je molekula sferična. Računa se iz izraza:

$$R_m = \left[\frac{3Mv_s}{4\pi N} \right]^{\frac{1}{3}} \quad (15)$$

Prema Marshal-u, vrijednost v_s , za proteine, je u uskom području (0,728-0,751). Ako se za prosječnu vrijednost v_s uzme 0,7384, dobijemo izraz:

$$R_m = 0,66M^{\frac{1}{3}} \quad (16)$$

Obično su proteini u otopinama hidratizirani, što rezultira povećanjem njihovog volumena. Ako se uzme da je hidrodinamski radijus proporcionalan $(M)^{1/3}$, može se dobiti poluempirijska relacija iz jednadžbe 14:

$$D_m = C / M^{\frac{1}{3}} \quad (17)$$

gdje je C eksperimentalno određen i može se smatrati konstantom, sa vrlo malim devijacijama za organske molekule veće od 1000 Da, te se može pisati:

$$D_m = 2,74 \times 10^{-9} M^{-\frac{1}{3}} \quad (18)$$

Podatak o promjeru pora može biti dan od proizvođača punila, no za mekane porozne materijale to najčešće nije tako. U tom slučaju, aproksimacija promjera pora može se dobiti iz gornje granice razdvajanja čestica punila:

$$\lambda = \frac{d_m}{d_p} = \lambda_0 \left[\frac{M}{M_0} \right] \quad (19)$$

gdje je $\lambda_0=0,35$ prema Stegman-u. Ta se vrijednost λ_0 temelji na pretpostavci da u slučaju kad promjer molekule dosegne 35% promjera pora čestica punila, ta molekula ne može ući u pore.

Vrijednost Biot-ovog broja može se odrediti iz efektivne difuzivnosti (D_p) i koeficijenta prijenosa tvari (k). D_p se računa iz jednadžbe 10, dok se k dobije iz izraza:

$$k = \frac{ShD_m}{2R_p} \quad (20)$$

gdje je Sh Sherwood-ov broj koji se računa se iz:

$$Sh = \frac{1,09}{\varepsilon_b} (ReSc)^{0,33} = \frac{1,37 \left(\frac{\nu R_p}{D_m} \right)^{0,33}}{\varepsilon_b} \quad 0,0015 \leq Re \leq 55 \quad (21)$$

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

Tijekom provedbe pokusa korištene su sljedeće kemikalije:

- bovine serum albumin, BSA, (*Merck*),
- Blue dextran 2000 (Amersham Biosciences),
- Gel-filtration standard (Bio-Rad),
- aceton (Kemika).

3.1.2 Otopine

Za izvedbu eksperimentalnog djela rada su upotrebljene sljedeće otopine:

- vodena otopina acetona 2% (vol%),
- fiziološka otopina (0,9 % NaCl) BSA-a koncentracija 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,0 mg cm⁻³,
- vodena otopina Blue dextran-a koncentracije 0,5 mg cm⁻³
- eluent: Na₃PO₄ (0,1 mol dm⁻³); NaCl (0,15 mol dm⁻³); Na-azid (0,01 mol dm⁻³); pH=6,8

3.1.3 Oprema

Sustav za gel-filtracijsku kromatografiju (Slika 3.1) sastoji se od pumpe (Knauer K-1001), otplinjača (Knauer DEG/4), jedinice za organiziranje otopina (Knauer K-1500), UV detektora (Knauer K-2600 (280 nm)), automatskog uzorkivača (Spark Triathlon), kolone, sakupljača frakcija (Biorad 2128), računala (Hewlett Packard), te kontrolnog sustava ECW (Eurochrom for Windows).



Slika 3.1. Sustav za gel-filtracijsku kromatografiju

3.1.3.1 Kolone

Tijekom provedbe eksperimenta korištene su dvije kolone i dva različita punila:

BioSep SEC S2000

- dimenzije: 300x7,8 mm
- veličina čestica punila: 5 μm
- područje razdvajanja (engl. *exclusion range*): 1000-300 000 Da
- proizvođač: Phenomenex

Superdex 75 HR 10/30⁸ (Slika 3.2)

- dimenzije: 300x10 mm
- veličina čestica punila: 13 μm
- područje razdvajanja: 3000-70 000 Da
- proizvođač: Amersham Biosciences



Slika 3.2. Kolona Superdex 75 HR 10/30

3.2 Metode

3.2.1 Provedba procesa gel-filtracijske kromatografije

Nakon spajanja kolone na HPLC sustav, kolona se ispiri sa mobilnom fazom 15 minuta. Mikroviale napunjene uzorcima se stave na određenu poziciju u automatskom uzorkivaču. U programu Eurochrom namjesti se protok mobilne faze, vrijeme trajanja pojedine metode, broj mikroviale u uzorkivaču i volumen injektiranja, te se pokrene postupak mjerenja.

Uvjeti provedbe procesa bili su sljedeći:

- protoci:
 - 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mL min⁻¹ (Superdex 75 HR 10/30);
 - 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 mL min⁻¹ (BioSep SEC S2000);
- volumen injektiranja: 30 μL ;
- temperatura: 20°C;

- UV detekcija: $\lambda=280$ nm.

3.2.1.1 Mjerenje retencijskih vremena

Eksperimentalno su određena retencijska vremena za molekule poznatih molekulskih masa (na obje kolone i za sve protoke):

- aceton (60 Da)
- gel-filtracijski standardi:
 - thyroglobulin (bovine) (670 000 Da)
 - gamma globulin (bovine) (157 000 Da)
 - ovalbumin (chicken) (44 000 Da)
 - myoglobin (horse) (17 000 Da)
 - vitamin B-12 (1350 Da)
- Blue dextran (2 000 000 Da)

Na temelju retencijskih vremena gel-filtracijskih standarada i njihovih poznatih molekulskih masa napravljen je baždarni dijagram $\log(M)-K_{SEC}$.

Zatim su određena retencijska vremena za molekule nepoznatih molekulskih masa (na koloni Superdex 75 HR 10/30, za sve protoke). Na temelju retencijskih vremena iz baždarnog dijagrama je određena molekulska masa za sljedeće molekule:

- BSA
- nepoznati uzorak
 - 1. komponenta
 - 2. komponenta

3.2.2 Metoda konačnih razlika

Metoda konačnih razlika ili metoda aproksimacija parcijalnih diferencijalnih jednadžbi konačnim razlikama je približna numerička metoda, i temelji se na pretpostavci da se derivacija u svakoj točki može prikazati kao razlika vrijednosti funkcije u točkama oko promatrane točke, uz uvjet da je promatrani interval podijeljen na dovoljno veliki konačni broj elemenata. Što je broj segmenata, na koji je podijeljeno područje definicije promatrane diferencijalne jednadžbe veći, odnosno što je korak deriviranja manji, to je točnost veća.

3.2.2.1 Aproksimacija parcijalne diferencijalne jednačbe prvog reda

Postoji više načina za aproksimaciju diferencijalne jednačbe prvog reda numeričkom metodom konačnih razlika⁷. Ako se pretpostavi da je $u(x)$ funkcija jedne varijable (x), te konačna i neprekidna funkcija, može se pretpostaviti da je i derivacija ove funkcije također konačna, neprekidna i funkcija jedne varijable.

Na temelju toga razvile su se tri različita načina aproksimacija diferencijalnih jednačbi prvog reda konačnim razlikama funkcije $u(x)$ u točki x .

a) Aproksimacija u centralnoj točki. Derivacija funkcije $u(x)$ u točki x koristeći aproksimaciju u centralnoj točki glasi:

$$\frac{du(x)}{dx} = \frac{u(x+h) - u(x-h)}{2h} + O(h^2) \quad (22)$$

b) Unaprijedna aproksimacija. Derivacija funkcije $u(x)$ u točki x koristeći unaprijednu aproksimaciju glasi:

$$\frac{du(x)}{dx} = \frac{u(x+h) - u(x)}{h} + O(h) \quad (23)$$

c) Povratna aproksimacija. Derivacija funkcije $u(x)$ u točki x koristeći povratnu aproksimaciju glasi:

$$\frac{du(x)}{dx} = \frac{u(x) - u(x-h)}{h} + O(h) \quad (24)$$

Do istih izraza može se doći i razvojem u Taylorov red funkcije $u(x)$ u okolišu točke x :

$$u(x+h) = u(x) + h \frac{du}{dx} + \frac{h^2}{2!} \frac{d^2u}{dx^2} + \frac{h^3}{3!} \frac{d^3u}{dx^3} + \dots \quad (25)$$

$$u(x-h) = u(x) - h \frac{du}{dx} + \frac{h^2}{2!} \frac{d^2u}{dx^2} - \frac{h^3}{3!} \frac{d^3u}{dx^3} + \dots \quad (26)$$

Time je dobiveno značenje članova $O(h^2)$ i $O(h)$ na desnim stranama jednačbi. Ti članovi ukazuju na grešku proizašlu iz zanemarivanja članova Taylorovog reda od drugog na dalje. Ta greška je reda veličine h^2 , za centralnu, odnosno reda veličine h , za povratnu i unaprijednu aproksimaciju. Stoga se može zaključiti da je aproksimacija u centralnoj točki puno bolji izbor za numeričko rješavanje parcijalnih diferencijalnih jednačbi od unaprijedne i povratne aproksimacije.

3.2.2.2 Aproksimacija parcijalne diferencijalne jednačbe drugog reda

Identični postupak se primjenjuje kod aproksimacije diferencijalne jednačbe drugog reda, metodom konačnih razlika. Razvojem promatrane funkcije $u(x)$ u Taylorov red u okolišu točke x , te kombinacijom izraza (25) i (26) dobije se aproksimacija parcijalne diferencijalne jednačbe drugog reda:

a) U centralnoj točki:

$$\frac{d^2u(x)}{dx^2} = \frac{u(x+h) - 2u(x) + u(x-h)}{h^2} + 0(h^2) \quad (27)$$

b) Unaprijedna aproksimacija:

$$\frac{d^2u(x)}{dx^2} = \frac{u(x+2h) - 2u(x+h) + u(x)}{h^2} + 0(h^2) \quad (28)$$

c) Povratna aproksimacija:

$$\frac{d^2u(x)}{dx^2} = \frac{u(x-2h) - 2u(x-h) + u(x)}{h^2} + 0(h^2) \quad (29)$$

Greška uključena u ove aproksimacije je reda veličine h^2 .

U postupku numeričkog rješavanja diferencijalnih jednačbi, metodom konačnih razlika, rješavanje diferencijalnih jednačbi svodi se na rješavanje sustava linearno nezavisnih jednačbi. U ovakvom postupku rješavanja diferencijalnih jednačbi greška metode javlja se na dva mjesta, u postupku aproksimacije diferencijalne jednačbe (zbog zanemarivanja viših članova Taylorovog reda), kao i u postupku rješavanja sustava linearno nezavisnih jednačbi nekom od numeričkih metoda.

3.2.3 Metoda konačnih razlika primjenjena na proces gel-filtracije¹⁰

Za jednačbu 7 koristimo unaprijednu aproksimaciju za vremensku promjenu koncentracije u mobilnoj fazi:

$$\frac{dc_b}{d\tau} = \frac{c_b(i, j+1) - c_b(i, j)}{dt}, \quad (30)$$

te aproksimaciju oko centralne točke za promjenu koncentracije po duljini kolone:

$$\frac{dc_b}{dz} = \frac{c_b(i+1, j) - c_b(i-1, j)}{2dz}, \quad (31)$$

$$\frac{dc_b}{dz} = \frac{c_b(i+1, j) - 2c_b(i, j) + c_b(i-1, j)}{dz^2} \quad (32)$$

3. Materijali i metode

Kombinacijom izraza 7, 30, 31 i 32 dobijemo promjenu koncentracije u mobilnoj fazi:

$$c_b(i, j+1) = \left[\left(\frac{1}{Pe_L dz^2} - \frac{1}{2dz} \right) C_b(i+1, j) + \left(-\frac{2}{Pe_L dz^2} + \frac{1}{dt} \right) c_b(i, j) + \left(\frac{1}{Pe_L dz^2} - \frac{1}{2dz} \right) c_b(i-1, j) + \xi c_{p,r=1} \right] / \left(\xi + \frac{1}{dt} \right) \quad (33)$$

Za jednadžbu 8 u točki $r=1$ koristimo unaprijednu aproksimaciju za vremensku promjenu koncentracije na površini čestice punila:

$$\frac{dc_p}{d\tau} = \frac{c_p(i, j+1) - c_p(i, j)}{dt} \quad (34)$$

te povratnu aproksimaciju za promjenu koncentracije po radijusu čestice punila:

$$\frac{dc_p}{dr} = Bi(c_b - c_{p,r=1}); \quad \frac{c_p(i+1, j) - c_b(i, j)}{dr} = Bi(c_b(j) - c_p(i, j)) \quad (35)$$

Kombinacijom izraza 8, 34 i 35 dobijemo promjenu koncentracije u točki $r=1$;

$$c_p(i, j+1) = \frac{\eta dt}{\varepsilon_p^a} \left[\frac{c_p(i-2, j) - 2c_p(i-1, j) + c_p(i, j)}{dr^2} + \frac{2}{r} Bi(c_b(1, j) - c_p(i, j)) \right] + c_p(i, j) \quad (36)$$

Za ostale točke koristimo unaprijednu aproksimaciju za vremensku promjenu koncentracije na površini čestica punila (jednadžba 33), te aproksimaciju oko centralne točke za promjenu koncentracije po radijusu čestice punila:

$$\frac{d^2 c_p}{dr^2} = \frac{c_p(i+1, j) - 2c_p(i, j) + c_p(i-1, j)}{dr^2} \quad (37)$$

Kombinacijom izraza 8, 34, 37 dobijemo promjenu koncentracije u stacionarnoj fazi:

$$c_p(i, j+1) = \frac{\eta dt}{\varepsilon_p^a} \left[\frac{c_p(i+1, j) - 2c_p(i, j) + c_p(i-1, j)}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{c_p(i+1, j) - c_p(i-1, j)}{dr} \right] + c_p(i, j) \quad (38)$$

Sustav ovako dobivenih linearnih jednadžbi riješen je u programskom paketu Matlab.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Kolona Superdex 75 HR 10/30

U svrhu određivanja parametara punila i kolone, te ocjene valjanosti pretpostavljenog matematičkog modela gel-filtracijske kromatografije na koloni Superdex 75 HR 10/30 napravljena su mjerenja sa sljedećim uzorcima:

- aceton;
- Blue dextran;
- gel-filtracijski standardi;
- Bovine serum albumine (BSA);
- nepoznati uzorak.

Mjerenja su provedena pri protocima prikazanim u tablici 4.1.

Tablica 4.1. Radni protoci pri kojima je provedena karakterizacija kolone Superdex 75 HR 10/30

	1	2	3	4	5
$Q / \text{mL min}^{-1}$	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0

Dimenzije kolone bile su: promjer kolone, $d=10$ mm; duljina kolone, $L=300$ mm; dok je promjer čestica punila, $R_p=5$ μm .

4.1.1 Određivanje parametara kolone i punila

Da bi se mogao postaviti model procesa gel filtracijske kromatografije najprije se mora odrediti parametre koji karakteriziraju kolonu i punilo. Osnovni parametri koji karakteriziraju punilo su poroznost čestice punila (ε_p) i dostupna poroznost čestice punila (ε_p^a), a najvažniji parametar koji karakterizira kolonu je udio mrtvog volumena kolone (ε_b).

4.1.1.1 Određivanje udjela mrtvog volumena kolone, ε_b

Da bi se odredio udio mrtvog volumena kolone (jednadžba 3), potrebno je prethodno eksperimentalno odrediti retencijsko vrijeme za molekule koje ne ulaze u pore čestica punila (t_d). Kako je iz teorije mehanizma separacije u procesu gel-filtracijske kromatografije poznato

molekule velikih molekulskih masa ne ulaze u pore čestica punila. Takva je molekula primjerice Blue dextran, sa molekulskom masom od 2000 kDa.

U tablici 4.2 prikazana su retencijska vremena za Blue dextran pri različitim protocima.

Tablica 4.2 Retencijska vremena za Blue dextran pri različitim protocima

$Q/\text{mL min}^{-1}$	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
t_d/min	38,02	19,02	12,70	9,53	7,68

Iz poznate duljine i promjera kolone, protoka eluenta i retencijskog vremena Blue dextrana izračunao se udio mrtvog volumena kolone (jednadžba 3) koji iznosi:

$$\varepsilon_b = 0,3176.$$

Ovako izračunati ε_b korišten je kao konstantna vrijednost za sve protoke i različite tipove kolona. Potrebno je napomenuti da je u slučaju pravilnog punjenja kolone punilom ε_b samo funkcija fizikalno-kemijskih svojstava punila.

4.1.1.2 Određivanje poroznosti čestice punila, ε_p

Da bi se izračunala poroznost čestice punila potrebno je eksperimentalno odrediti retencijsko vrijeme za molekule manjih molekularnih masa koje ulaze u sve pore (t_0). Aceton ($M=60$ Da) je primjer takve molekule, koja ulazi u sve pore punila. U tablici 4.3 prikazana su retencijska vremena za aceton pri različitim primijenjenim protocima.

Tablica 4.3 Retencijska vremena za aceton pri različitim protocima

$Q/\text{mL min}^{-1}$	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
t_0/min	99,57	48,80	33,27	24,97	19,95
t_d/min	38,02	19,02	12,70	9,53	7,68

Iz eksperimentalno određenih retencijskih vremena za molekulu koja ulazi u sve pore (aceton) se računa poroznost čestice iz jednadžbe 2 koja iznosi:

$$\varepsilon_p = 0,7431.$$

4.1.1.3 Određivanje dostupne poroznosti čestice punila, ε_p^a

Dostupna poroznost čestice punila računa se iz jednadžbe 4, za svaku molekulsku vrstu posebno. Vrijednosti dostupne poroznosti čestica, za različite molekulske vrste pri protoku eluenta od 1 mL min^{-1} prikazane su u tablici 4.4.

Tablica 4.4 Dostupna poroznost čestica za različite molekulske vrste pri protoku eluenta od $1,0 \text{ mL min}^{-1}$

M/kDa	670	157	77	44	41	19	17	1,35
t_r/min	7,82	9,20	10,40	11,42	12,47	13,57	13,43	19,25
ε_p^a	0,008	0,092	0,165	0,226	0,290	0,356	0,348	0,701

4.1.2 Određivanje molekularne mase za nepoznati uzorak i bovine serum albumin

Gel-filtracijska kromatografija često se koristi za određivanje nepoznatih molekularnih masa uzoraka. Određivanje se izvodi izradom baždarnog pravca $\log(M)$ - K_{SEC} (jednadžba 10). Za izradu baždarne krivulje koriste se gel-filtracijski standardi koji sadrže komponente poznatih molekularnih masa, a koje prekrivaju cijelo područje razdvajanja, za određenu kolonu i punilo.

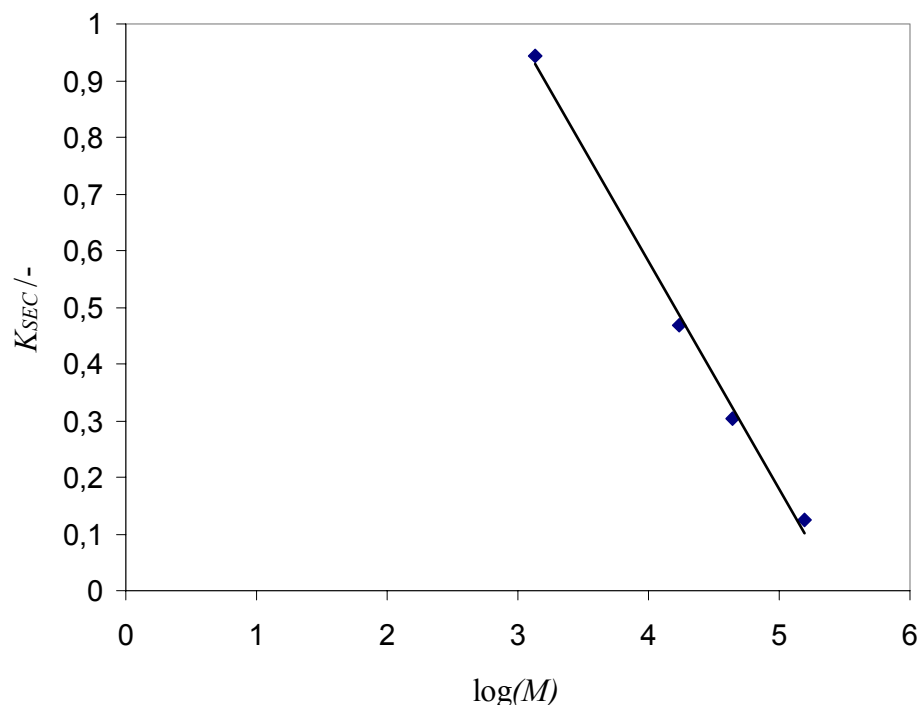
U tablici 4.5 prikazane su molekulske mase pojedinih komponenti u gel-filtracijskom standardu, njihovo vrijeme zadržavanja i K_{SEC} .

Tablica 4.5 Vrijednosti K_{SEC} za gel-filtracijske standarde pri protoku od $1,0 \text{ mL min}^{-1}$

M/kDa	$\log(M)$	t_r/min	K_{SEC}
670	5,826	7,82	0,011
157	5,196	9,20	0,124
44	4,643	11,42	0,304
17	4,230	13,43	0,469
1,35	3,130	19,25	0,943

Iz eksperimentalno dobivenih vrijednosti konstruirao se baždarni pravac $\log(M)$ - K_{SEC} (Slika 4.1). Za svaku molekulsku vrstu, koja se nalazi u području razdvajanja, određivanjem

retencijskog vremena (na istoj koloni i pri istom protoku) može se odrediti molekulska masa nepoznatog uzorka.



Slika 4.1. Baždarni pravac za određivanje molekulske mase nepoznatog uzorka pri protoku od $1,0 \text{ mL min}^{-1}$

Jednadžba baždarnog pravca za određivanje molekulske mase nepoznatog uzorka pri protoku od $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ glasi:

$$K_{SEC} = -0,4012 \log(M) + 2,1852 \quad (39)$$

Tablica 4.6 Vrijednosti molekulskih masa dobivenih iz baždarnog pravca

Uzorak	t_r/min	K_{SEC}	M/kDa
BSA	10,40	0,221	≈ 77
Komp. 1	13,57	0,480	≈ 19
Komp. 2	12,47	0,390	≈ 41

Za molekule veće molekulske mase ovisnost $\log(M)$ - K_{SEC} nije linearna, te se određivanje molekulske mase nepoznatog uzorka u danom primjeru ne može provesti za molekule čija je molekulska masa veća od 157 kDa.

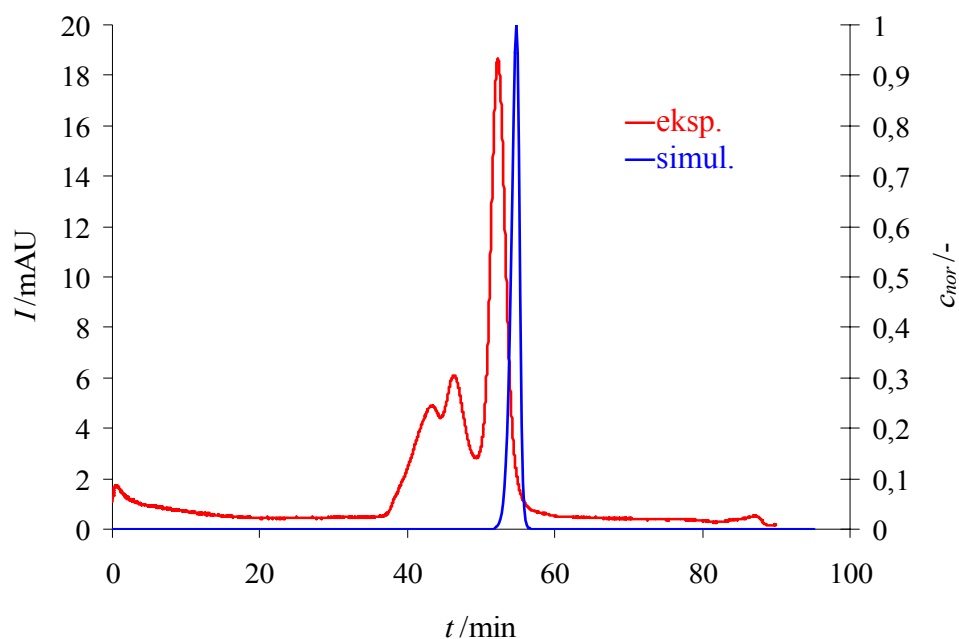
Iz ovako dobivenog baždarnog pravca izračunate su molekulske mase nepoznatih komponenti. Vidljivo je da je izračunata molekulska masa za BSA jednaka njenoj stvarnoj vrijednosti.

4.1.3 Prikaz rezultata simulacija

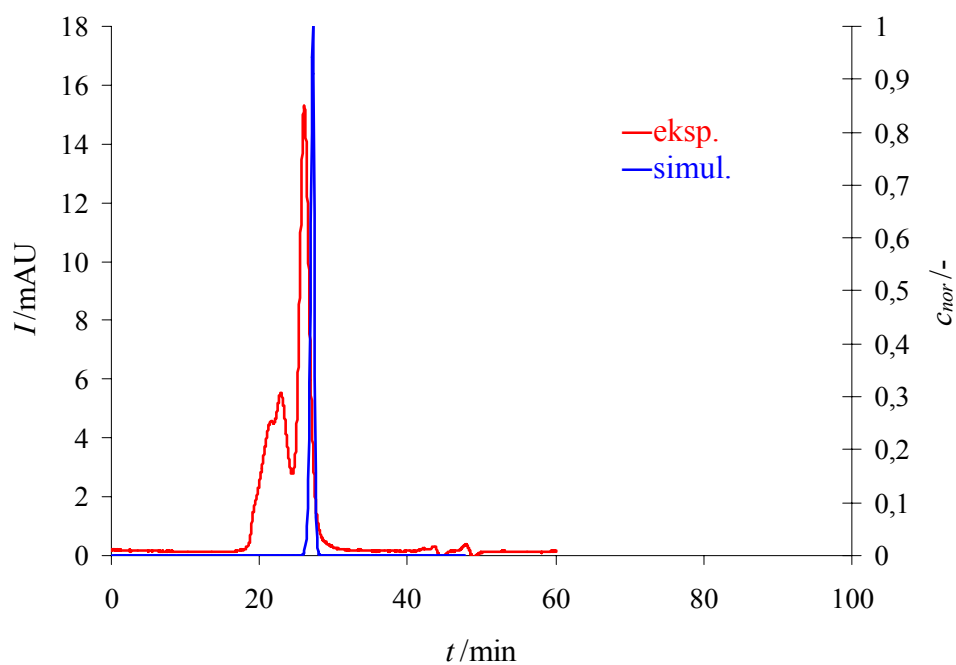
Na temelju eksperimentalno određenih karakterističnih parametara kolone i punila ($\varepsilon_p^a, \varepsilon_p, \varepsilon_b$), te postavljenog matematičkog modela provedene su simulacije procesa gel-filtracijske kromatografije. Eksperimentalni rezultati (kromatogrami) uspoređeni su sa rezultatima simulacije procesa pomoću modela za BSA i nepoznate uzorke (komponenta 1 i 2) pri različitim protocima eluenta (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mL min⁻¹)

4.1.3.1 Rezultati simulacija procesa gel-filtracijske kromatografije za BSA

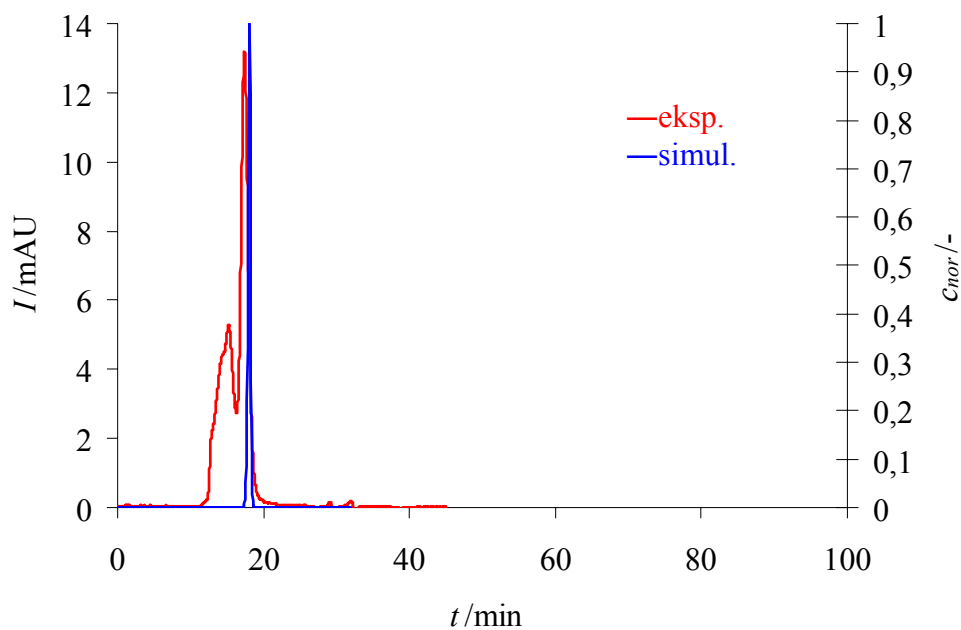
Na slikama 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 i 4.6 prikazana je usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela za BSA ($M= 77$ kDA) pri sljedećim protocima :0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mL min⁻¹. Koncentracije dobivene simulacijom procesa pomoću modela su normalizirane, kako bi se visine pikova eksperimentalnih kromatograma mogle usporediti sa visinama pikova simuliranih kromatograma.



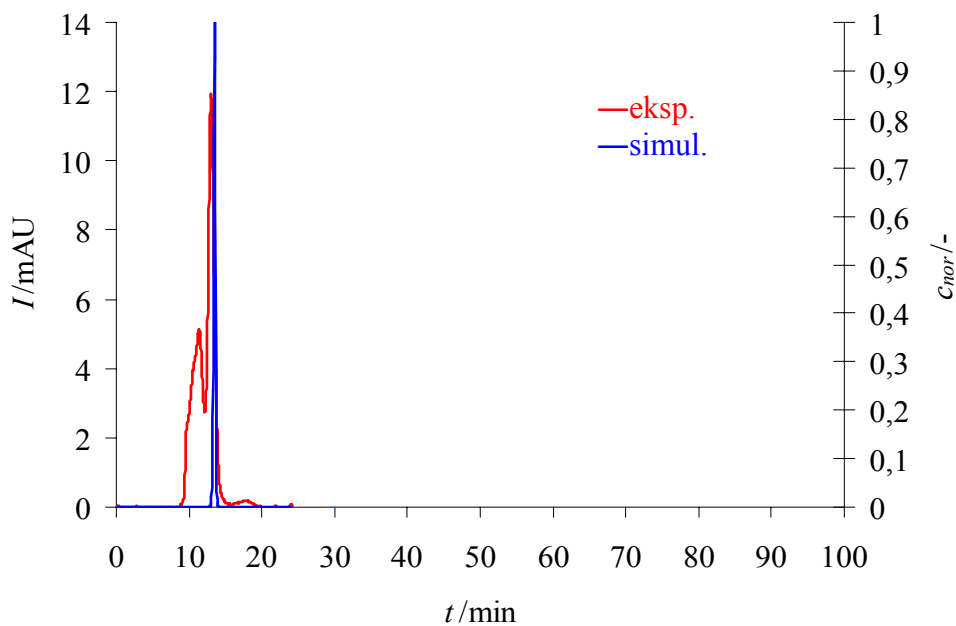
Slika 4.2. Usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela za BSA pri protoku od $0,2 \text{ mL min}^{-1}$



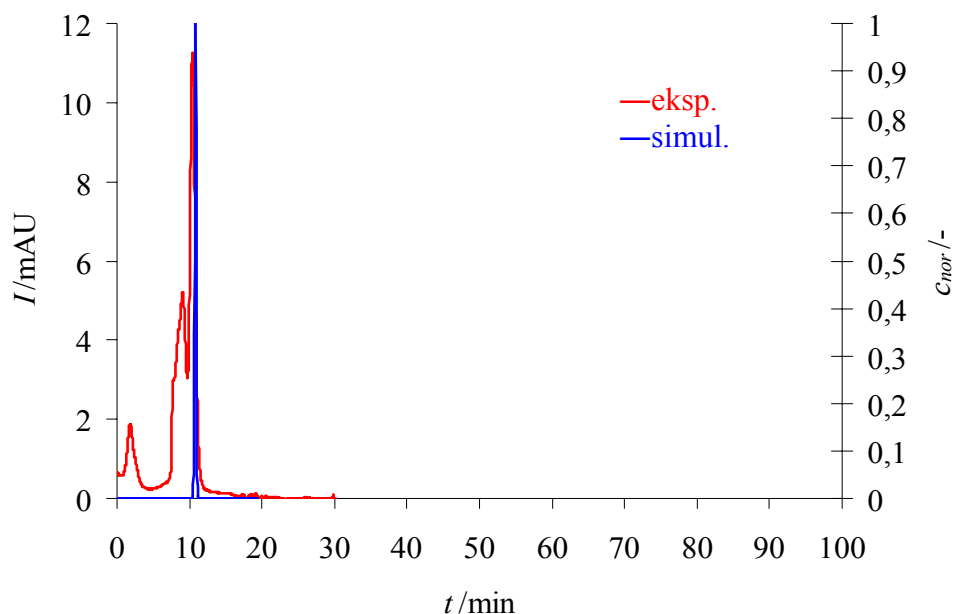
Slika 4.3. Usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela za BSA pri protoku od $0,4 \text{ mL min}^{-1}$



Slika 4.4. Usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela za BSA pri protoku od $0,6 \text{ mL min}^{-1}$



Slika 4.5. Usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela za BSA pri protoku od $0,8 \text{ mL min}^{-1}$



Slika 4.6. Usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela za BSA pri protoku od $1,0 \text{ mL min}^{-1}$

Usporedbom rezultata simulacija procesa pomoću modela s eksperimentalnim rezultatima, za BSA, može se uočiti njihovo zadovoljavajuće slaganje. Odstupanja između eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela vjerojatno su uzrokovana postojanjem radijalne disperzije u koloni. Kako je vidljivo iz rezultata (tablica 4.7) utjecaj radijalne disperzije posebno je izražen na nižim protocima.

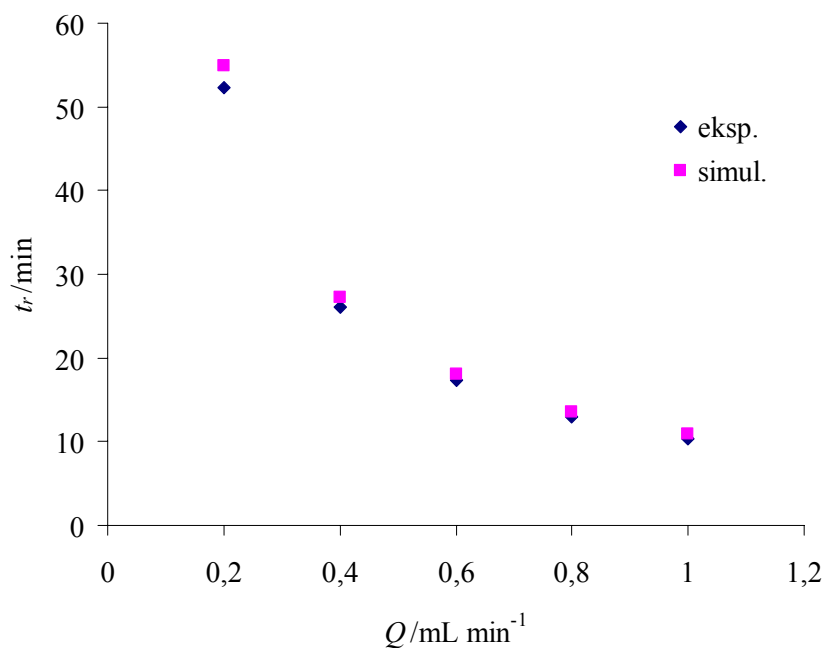
Tablica 4.7 Odstupanje rezultata simulacije procesa pomoću modela od eksperimentalnih rezultata na primjeru retencijskih vremena za različite protoke

$Q/\text{mL min}^{-1}$	$t_r(\text{exp})/\text{min}$	$t_r(\text{model})/\text{min}$	$\Delta t/\text{min}$	$\delta/-$
0,2	52,27	54,90	2,63	0,05
0,4	26,05	27,19	1,14	0,04
0,6	17,38	18,10	0,72	0,04
0,8	13,02	13,54	0,52	0,04
1,0	10,40	10,87	0,47	0,05

Odstupanje rezultata simulacija od eksperimentalnih rezultata računato je prema sljedećem izrazu:

$$\delta = \frac{t_r(\text{exp}) - t_r(\text{model})}{t_r(\text{exp})} \quad (40)$$

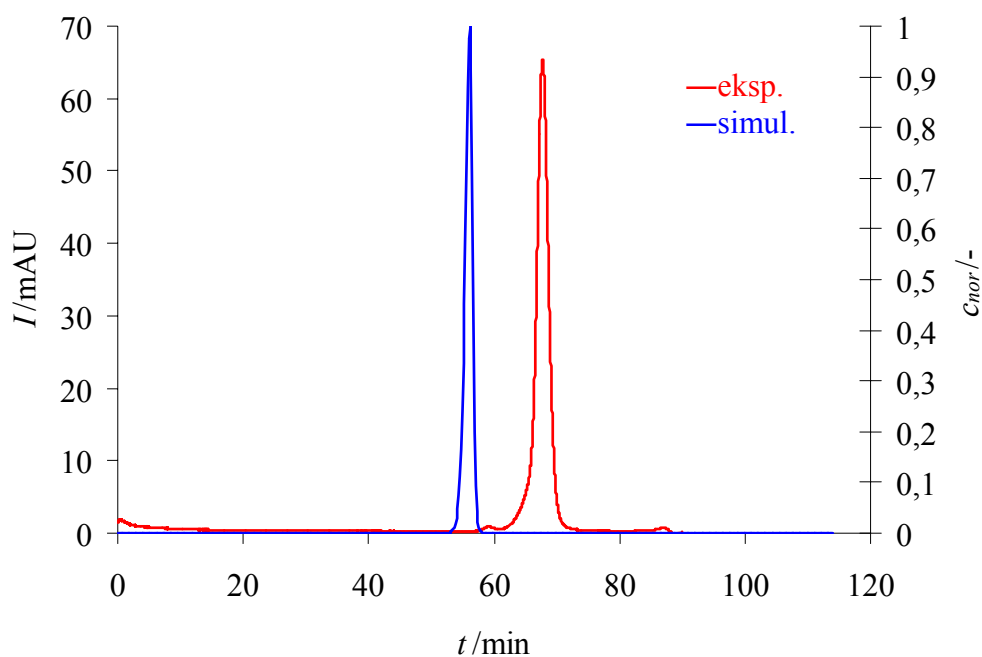
Odstupanje je najveće za najmanji protok ($0,2 \text{ mL min}^{-1}$) i iznosi 2,63 min, a najmanje je za najveći protok ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$), 0,47 min. Odstupanje eksperimentalnih vrijednosti, od vrijednosti dobivenih simulacijom procesa pomoću modela, za različite protoke prikazano je i grafički (Slika 4.7):



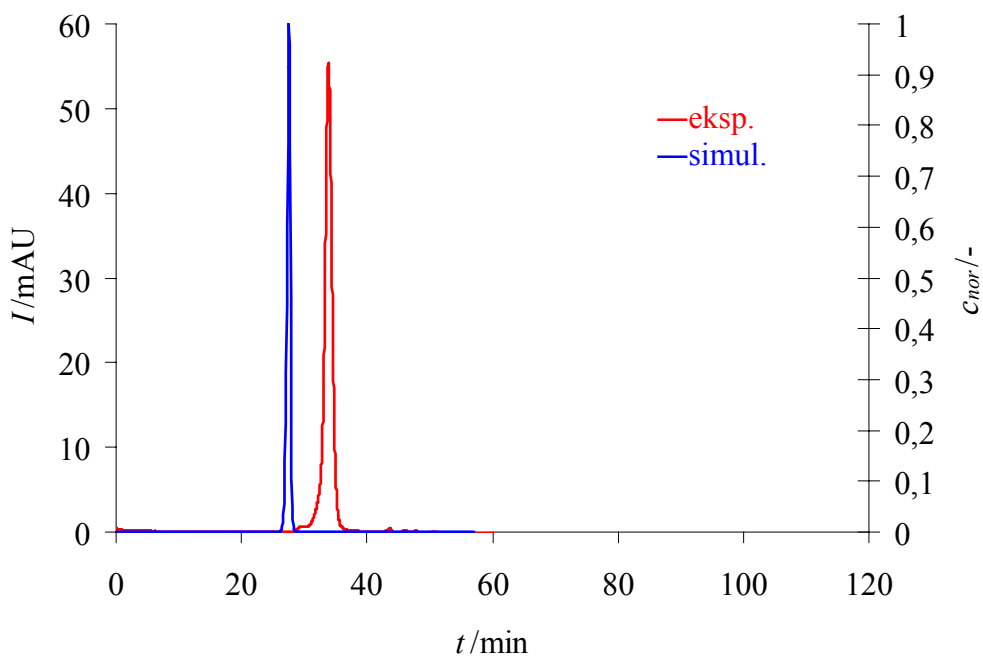
Slika 4.7. Ovisnost retencijskih vremena, dobivenih eksperimentom te simulacijom procesa pomoću modela, o protoku

4.1.3.2 Nepoznati uzorak (komponenta 1 i komponenta 2)

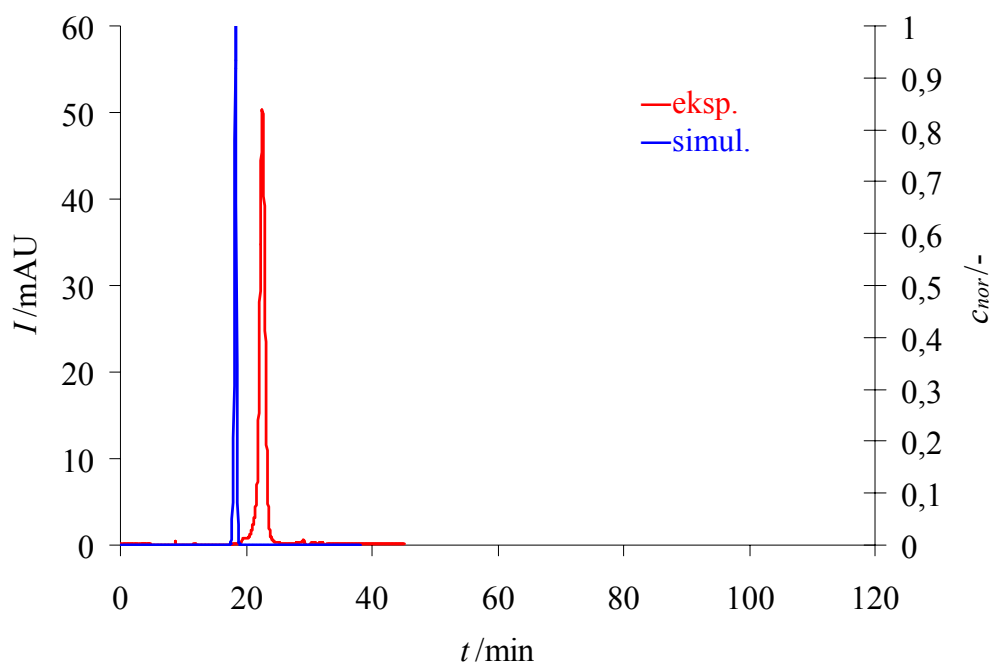
Na slikama 4.8, 4.9, 4.10 i 4.11 prikazana je usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela, za komponentu 1 ($M=19 \text{ kDa}$) nepoznatog uzorka pri sljedećim protocima $0,2; 0,4; 0,6; 0,8 \text{ mL min}^{-1}$:



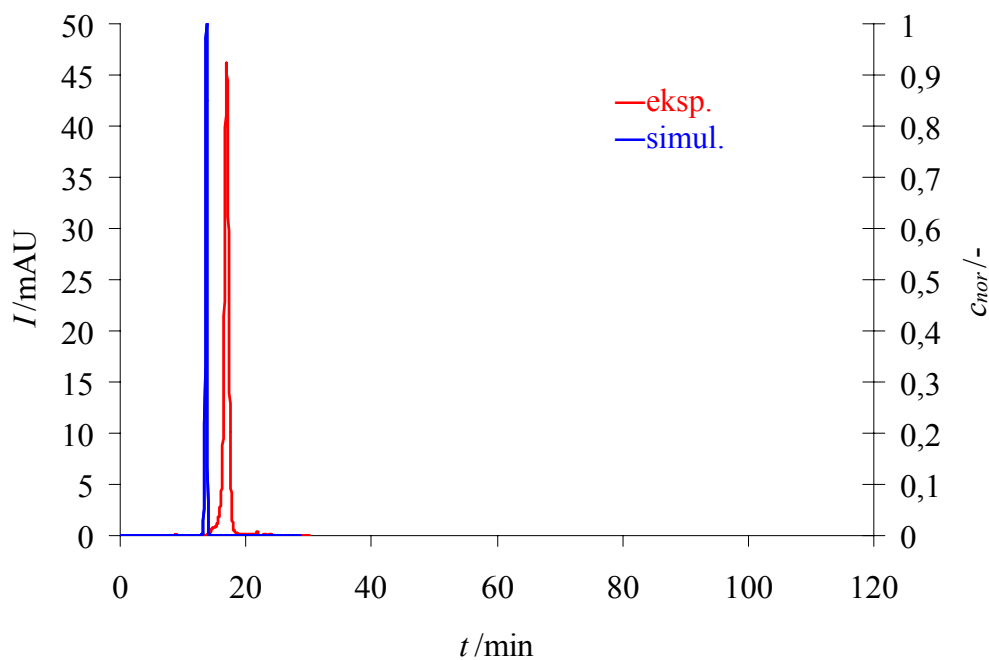
Slika 4.8. Usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela za komponentu 1 nepoznatog uzorka pri protoku $0,2 \text{ mL min}^{-1}$



Slika 4.9. Usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela za komponentu 1 nepoznatog uzorka pri protoku $0,4 \text{ mL min}^{-1}$



Slika 4.10. Usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela za komponentu 1 nepoznatog uzorka pri protoku $0,6 \text{ mL min}^{-1}$



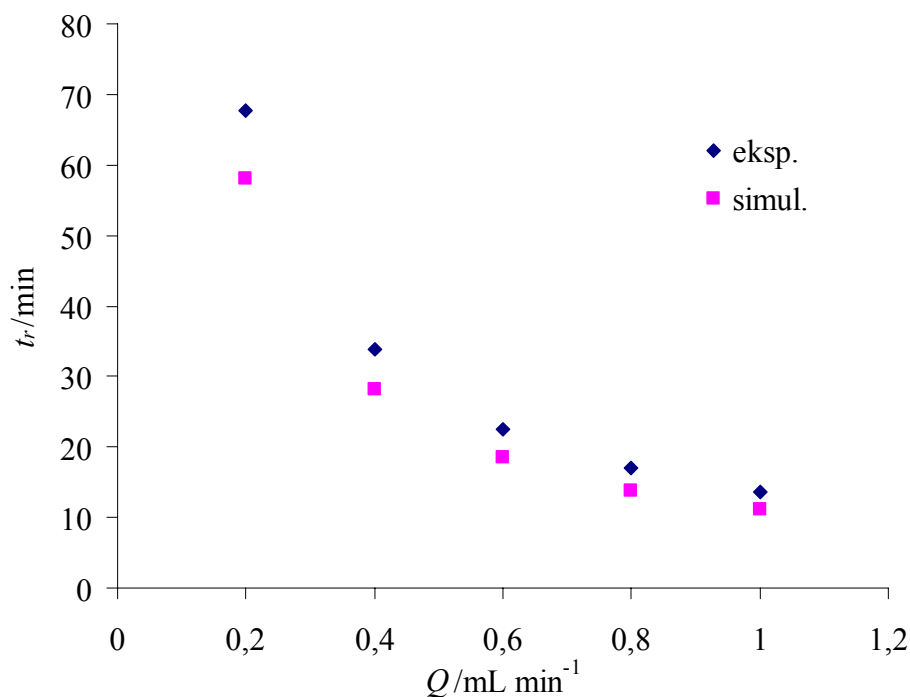
Slika 4.11. Usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela za komponentu 1 nepoznatog uzorka pri protoku $0,8 \text{ mL min}^{-1}$

Usporedbom rezultata simulacija procesa pomoću modela s eksperimentalnim rezultatima, za ovaj dvokomponentni nepoznati uzorak može se uočiti značajno odstupanje eksperimentalnih rezultata od rezultata dobivenih modelom. Odstupanja su veća za komponentu manje molekulske mase (19 kDa), dok su za nepoznatu komponentu veće molekulske mase (41 kDa) odstupanja prihvatljiva (Tablica 4.8).

Tablica 4.8 Odstupanje rezultata simulacije procesa pomoću modela od eksperimentalnih rezultata na primjeru retencijskih vremena za različite protoke

Nepoznata komponenta 1 (19 kDa)					Nepoznata komponenta 2 (41 kDa)			
Q mL min^{-1}	$t_r(\text{exp})$ min	$t_r(\text{model})$ min	Δt min	δ -	$t_r(\text{exp})$ min	$t_r(\text{model})$ min	Δt min	δ -
0,2	67,71	58,14	-9,57	0,14	59,01	56,16	-2,85	0,05
0,4	33,86	28,18	-5,68	0,17	29,55	27,55	-2,00	0,07
0,6	22,58	18,58	-4,00	0,18	20,65	18,34	-2,31	0,11
0,8	16,93	13,86	-3,07	0,18	15,61	13,72	-1,89	0,12
1,0	13,56	11,09	-2,47	0,18	12,46	11,02	-1,44	0,12

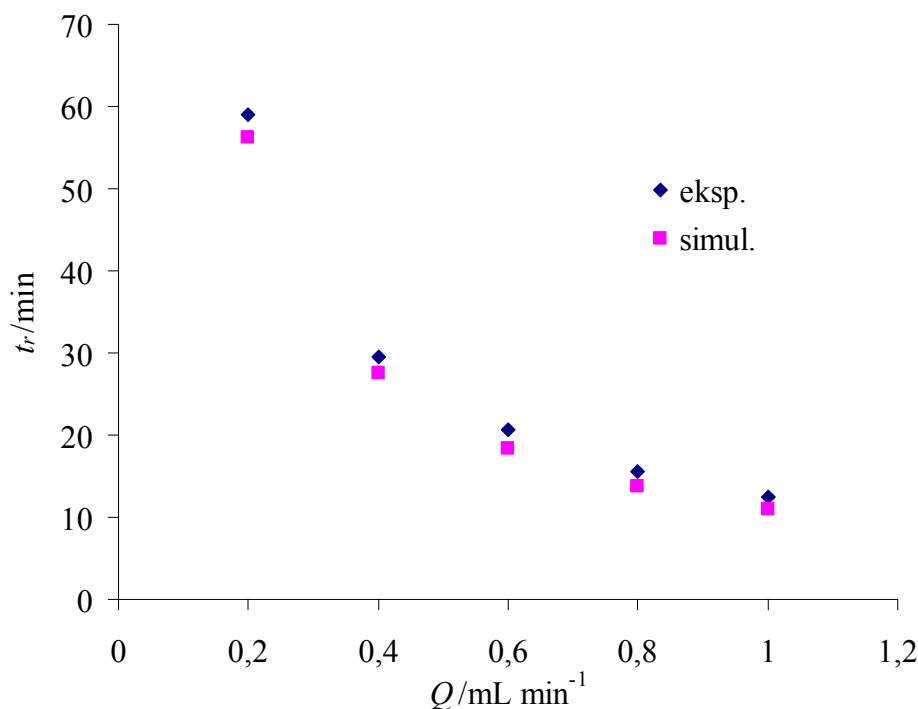
Za prvu komponentu (19 kDa) odstupanje je najveće za najmanji protok ($0,2 \text{ mL min}^{-1}$) i iznosi 9,577 min (pogreška 0,14). Najmanje je za najveći protok ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$), 2,477 min sa pogreškom 0,18. Odstupanje eksperimentalnih rezultata, od vrijednosti dobivenih simulacijom procesa pomoću modela, u ovisnosti o protoku prikazano na primjeru retencijskih vremena dano je na slici 4.12.



Slika 4.12. Ovisnost retencijskih vremena, dobivenih eksperimentom te simulacijom procesa, o protoku (za komponentu 1)

Kao što je vidljivo iz slike 4.12, sa povećanjem protoka smanjuje se odstupanje rezultata simulacije procesa od eksperimentalnih rezultata. Iz toga se može zaključiti da je uzrok odstupanju kao i u slučaju BSA, radijalna disperzija u koloni.

Za drugu nepoznatu komponentu (41 kDa) odstupanje je najveće za najmanji protok ($0,2 \text{ mL min}^{-1}$) i iznosi $2,857 \text{ min}$ (pogreška $0,05$). Najmanje je za najveći protok ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$), $1,477 \text{ min}$ sa pogreškom $0,12$. Odstupanje eksperimentalnih rezultata, od vrijednosti dobivenih simulacijom procesa pomoću modela, u ovisnosti o protoku prikazano na primjeru retencijskih vremena dano je na slici 4.13:



Slika 4.13. Ovisnost retencijskih vremena, dobivenih eksperimentom te simulacijom procesa, o protoku (za komponentu 2)

Kao i za komponentu 1, povećanjem protoka smanjuje se odstupanje rezultata simulacije procesa od eksperimentalnih rezultata. No odstupanja su manja za komponentu 2 (kao i za BSA). Uzrok tomu, je vjerojatna široka raspodjela veličina pora čestica punila, a kako je modelom definirana određena srednja vrijednost veličine pora, moguće je da, model zbog toga ne opisuje dobro područje malih molekulskih masa.

4.2 Kolona BioSep SEC S2000

U svrhu određivanja parametara punila i kolone neophodnih za ocjenu postavljenog matematičkog modela procesa gel-filtracijske kromatografije, na koloni BioSep SEC S2000, provedena su mjerenja sa sljedećim uzorcima:

- aceton
- Blue dextran
- gel-filtracijski standardi

Mjerenja su provedena pri protocima prikazanim u tablici 4.9.

Tablica 4.9. Protoci pri kojima je provedena karakterizacija kolone BioSep SEC S2000

	1	2	3	4	5	6
$Q / \text{mL min}^{-1}$	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,5

Korištena kolona BioSep bila je duljine $L=300$ mm, promjer kolone bio je $d=7,8$ mm, a promjer čestica punila bio je $R_p=13$ μm .

4.2.1 Određivanje parametara kolone i punila

Kao i kod Superdex kolone prvo su određeni parametri kolone i punila: poroznost čestica punila (ε_p), dostupna poroznost čestica punila (ε_p^a) i udio mrtvog volumena kolone (ε_b).

4.2.1.1 Određivanje udjela mrtvog volumena kolone, ε_b

Udio mrtvog volumena kolone ε_b računa se iz izraza (3). Prethodno je potrebno eksperimentalno odrediti retencijsko vrijeme za molekule velikih molekulskih masa koje ne ulaze u pore čestica punila (t_d). Kako je područje razdvajanja ove kolone do 200 kDa, za thyroglobulin (670 kDa) se pretpostavlja da ne ulazi ni u jednu poru čestica punila.

U tablici 4.10 prikazana su retencijska vremena za thyroglobulin pri različitim protocima:

Tablica 4.10 Retencijska vremena za thyroglobulin pri različitim protocima

$Q / \text{mL min}^{-1}$	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,5
t_d / min	36,42	18,20	12,12	9,10	7,28	4,85

Iz poznate duljine i promjera kolone, te protoka eluata i retencijskog vremena izračunao se udio mrtvog volumena kolone koji iznosi:

$$\varepsilon_b = 0,5083.$$

4.2.1.2 Određivanje poroznosti čestice punila, ε_p

Da bi se izračunala poroznost čestice punila potrebno je eksperimentalno odrediti retencijsko vrijeme za molekule malih molekulskih masa koje ulaze u sve pore (t_0). Za aceton ($M=60$ Da) se pretpostavlja da je takva molekula, odnosno da ulazi u sve pore čestica punila.

U tablici 4.11 prikazana su retencijska vremena za aceton pri različitim protocima.

Tablica 4.11 Retencijska vremena za aceton pri različitim protocima

$Q/\text{mL min}^{-1}$	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,5
t_0/min	77,48	38,60	25,70	19,23	15,37	10,18

Na temelju eksperimentalno određenih retencijskih vremena za molekule koje ulaze u sve pore (aceton), poroznost čestice se izračunala iz jednadžbe 2, te je njena vrijednost:

$$\varepsilon_p = 1,1367.$$

4.2.1.3 Određivanje dostupne poroznosti čestice punila, ε_p^a

Dostupna poroznost čestice punila računa se iz jednadžbe 4, za svaku molekulsku vrstu posebno. Vrijednosti dostupne poroznosti čestica, za različite molekulske vrste (molekule različitih molekulskih masa) prikazane su u tablici 4.12.

Tablica 4.12 Dostupna poroznost čestica punila za različite molekulske vrste pri protoku eluenta od $0,2 \text{ mL min}^{-1}$

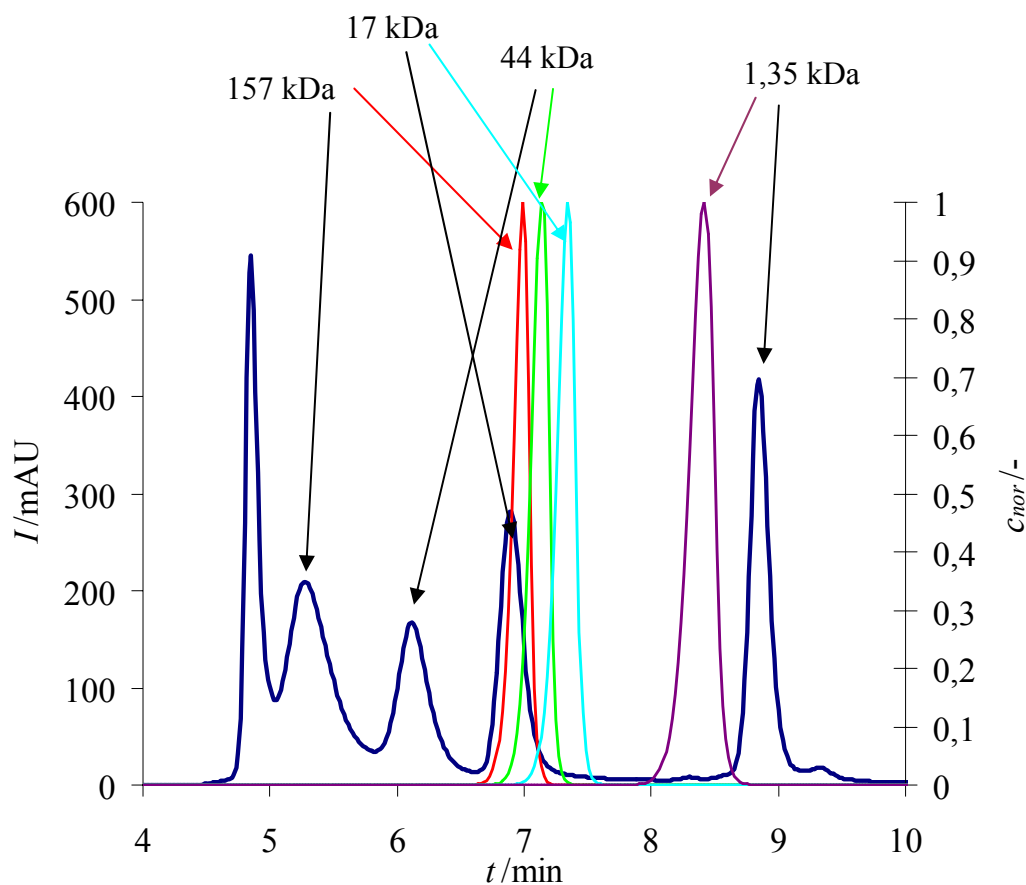
M/kDa	157	44	17	1,35
t_r/min	39,93	46,18	51,87	66,53
$\varepsilon_p^a/-$	0,1177	0,3269	0,5171	1,0080

4.2.2 Prikaz rezultata simulacije

Na temelju eksperimentalno određenih karakterističnih parametara punila i kolone provedene su simulacije procesa pomoću postavljenog matematičkog modela procesa te su rezultati simulacije, pri protoku eluenta od $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, uspoređeni s eksperimentalnim rezultatima.

4.2.2.1 Gel-filtracijski standardi

Na slici 4.14 prikazana je usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije, za gel-filtracijske standarde, pri protoku eluenta od $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.



Slika 4.14. Usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata simulacije procesa pomoću modela za gel-filtracijske standarde pri protoku eluenta $1,5 \text{ mL min}^{-1}$

Usporedbom rezultata simulacija procesa pomoću modela s eksperimentalnim rezultatima, za gel-filtracijski standard može se uočiti odstupanje eksperimentalnih rezultata od rezultata dobivenih simulacijom procesa pomoću modela. Odstupanja su velika za veće molekulske mase, dok su za komponente manjih molekulskih masa (≥ 17 kDa) odstupanja manja pri manjim protocima (Tablica 4.13 a i b).

Tablica 4.13a Retencijska vremena, odstupanja eksperimentalnih rezultata od rezultata simulacija i pogreške za gel-filtracijske standarde ($M=157$ kDa; $M=44$ kDa), pri različitim protocima

Q mL min ⁻¹	157 kDa				44 kDa			
	$t_r(exp)$ min	$t_r(model)$ min	Δt min	δ -	$t_r(exp)$ min	$t_r(model)$ min	Δt min	δ -
0,2	39,93	53,01	13,08	0,33	46,18	56,89	10,69	0,23
0,4	19,93	26,41	6,48	0,32	23,03	27,72	4,69	0,20
0,6	13,25	17,52	4,27	0,32	15,33	18,23	2,90	0,19
0,8	9,93	13,16	3,23	0,32	11,48	13,55	2,07	0,18
1	7,93	10,5	2,52	0,32	9,18	10,81	1,63	0,18
1,50	5,28	6,99	1,71	0,32	6,11	7,13	1,02	0,17

Tablica 4.13b Retencijska vremena, odstupanja eksperimentalnih rezultata od rezultata simulacija i pogreške za gel-filtracijske standarde ($M=17$ kDa; $M=0,135$ kDa), pri različitim protocima

Q mL min ⁻¹	17 kDa				1,35 kDa			
	$t_r(exp)$ min	$t_r(model)$ min	Δt min	δ -	$t_r(exp)$ min	$t_r(model)$ min	Δt min	δ -
0,2	51,86	62,35	10,48	0,20	66,53	93,69	27,16	0,41
0,4	25,9	29,49	3,59	0,14	33,25	39,52	6,27	0,19
0,6	17,25	18,81	1,56	0,09	22,13	24,14	2,00	0,09
0,8	12,93	14,13	1,20	0,09	16,6	17,25	0,65	0,04
1	10,33	11,20	0,87	0,08	13,28	13,31	0,03	0,00
1,50	6,90	7,34	0,44	0,06	8,85	8,42	-0,43	0,05

Za razliku od prve kolone (Superdex) pretpostavljeni matematički model procesa bolje je opisivao retencijska vremena molekula manjih molekulskih masa. Razlog je, prije svega, nezadovoljavajuće punjenje kolone s punilom što je vidljivo iz nesimetričnih pikova za

molekule malih molekulskih masa (vidi Prilog 6 i 7). Naime, zbog dugog ispiranja komponente male molekulske mase sa kolone, vrijednost dostupne porozivnosti punila pogrešno je određena. Stoga je pogreška modela najveća za molekule velikih molekulskih masa.

Drugi razlog velikog odstupanja rezultata simulacija od eksperimentalnih rezultata je u upotrebljenoj numeričkoj metodi konačnih razlika. Metoda konačnih razlika je približna metoda, čiji rezultati ovise o velikom broju faktora (veličina koraka; aproksimacija oko centralne točke; unaprijedna ili povratna aproksimacija i sl.).

Za bolju ocjenu pretpostavljenog matematičkog modela bilo bi potrebno upotrijebiti i neku drug numeričku metodu, primjerice metoda kolokacija, te ponoviti mjerenja za drugu kolonu (BioSep) nakon njenog ispravnog punjenja. Dodatno, kako bi se umanjio učinak radijalne disperzije opažen pri simulaciji retencijskih vremena molekula malih molekulskih masa u koloni Superdex, pretpostavljeni matematički model trebalo bi proširiti na član koji u sebi ima sadržanu radijalnu disperziju.

5. ZAKLJUČAK

Provedena su mjerenja pri različitim protocima (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0) i sa dvije različite kolone (BioRad SEC S2000 proizvođača Phenomenex i Superdex 75 HR 10/30 proizvođača Amersham Bioscience).

Određena su retencijska vremena za molekule poznatih molekularnih masa, za obje kolone i sve protoke.

Načinjen je baždarni dijagram ovisnosti $\log(M)-K_{SEC}$.

Određena su retencijska vremena za BSA i dvokomponentni nepoznati uzorak (na koloni Superdex 75 HR 10/30, za sve protoke) te je pomoću baždarnog dijagrama određena njihova molekulska masa. Također, iz retencijskih vremena, određeni su parametri koji definiraju punilo i kolonu (poroznost čestica, dostupna poroznost čestica, mrtvi volumen i dr.)

Postavljen je matematički model, u obliku dvije parcijalne diferencijalne jednačbe te su te jednačbe numerički riješene metodom konačnih razlika. Pri tome je za simulaciju korišten programski paket MatLab.

Usporedbom rezultata simulacije procesa pomoću modela i eksperimentalnih rezultata za prvu kolonu (Superdex) vidljivo je odstupanje modela na krajnjim točkama (za male i velike molekulske mase) te za male protoke. Za veće protoke model pokazuje zadovoljavajuće slaganje s eksperimentalnim rezultatima. Razlog odstupanju je vjerojatno radijalna disperzija u koloni te široka raspodjela veličina pora čestica punila, koja se ne može opisati nekom srednjom vrijednošću.

Kod druge kolone (BioSep) pretpostavljeni matematički model procesa bolje je opisivao retencijska vremena molekula manjih molekularnih masa. Razlog tomu, najvjerojatnije je nezadovoljavajuće punjenje kolone punilom što je rezultiralo asimetričnim pikovima te krivim određivanjem parametara punila i kolone.

Drugi razlog odstupanja rezultata simulacija od eksperimentalnih rezultata je u upotrebljenoj numeričkoj metodi konačnih razlika, koja je približna metoda te može biti uzrok znatne pogreške.

6. LITERATURA

1. Barth, H. G., Boyes, B. E., Size Exclusion Chromatography, Anal. Chem. (1992) 64 428R-442R
2. Gel filtration-Principles and methods, Amersham Biosciences, Uppsala, 2002.
3. Li, Z.; Gu, Y.; Gu, T.: Mathematical modeling and scale-up of size-exclusion chromatography, Biochem. Eng. J. 2 (1998) 145-155
4. Carley, A. F., Morgan, P. H., Computational Methods in the Chemical Sciences, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1989.
5. <http://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/gelfiltration.html>
6. <http://www.ntri.tamuk.edu/fplc/siz.html>
7. Kreyszig, E., Advanced Engineering Mathematics, John William and Sons Inc., New York, 1993.
8. Kagedal L., Chemical, physical and chromatographic properties of Superdex 75 prep grade and Superdex 200 prep grade gel filtration media. J Chromatogr. 537 (1991) 17-32
9. Farlow, S. J., Partial Diferential Equations for Scientists & Engineers, John Wiley & Sons, New York, 1982.
10. Ladish M. R., Bioseparations engineering, Wiley-interscience, New York, 2001.

7. POPIS SIMBOLA I OZNAKA

- Bi – Biot-ov broj [-]
 C – korelacijski parametar [-]
 C_0 – maksimalna koncentracija otopljene tvari u uzorku [mol l^{-1}] [mol m^{-3}]
 C_b – koncentracija tvari u mobilnoj fazi [mol l^{-1}] [mol m^{-3}]
 c_b – C_b/C_0 [-]
 C_f – početna koncentracija tvari [mol l^{-1}] [mol m^{-3}]
 C_p – koncentracija otopljene tvari unutar makropora čestica punila [mol l^{-1}] [mol m^{-3}]
 c_p – C_p/C_0 [-]
 D_b – koeficijent aksijalne disperzije [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
 D_m – unutarčestična molekularna difuzivnost [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
 D_p – efektivna difuzivnost u pore čestica punila [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
 d – unutarnji promjer kolone [m]
 d_m – promjer molekule [m]
 d_p – promjer makropora unutar čestica punila [m]
 k – koeficijent prijenosa tvari [m s^{-1}]
 K_{SEC} – koeficijent distribucije [-]
 L – duljina kolone [m]
 M – molekulska masa [Da]
 N – Avogadrov broj [-]
 Q – volumni protok eluata [$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$]
 Pe_L – Peclet-ov broj [-]
 R – radijalna koordinata za česticu punila u cilindričnom koordinatnom sustavu [m]
 r – R/R_p [-]
 R_m – radijus molekule [m]
 R_p – radijus čestice punila [m]
 R_s – rezolucija [-]
 Re – Reynolds-ov broj [-]
 Sc – Schmitd-ov broj [-]
 Sh – Sherwood-ov broj [-]
 T – apsolutna temperatura [K]
 t_0 – retencijsko vrijeme za molekule koje ulaze u sve pore [min] [s]
 t_d – retencijsko vrijeme za molekule koje ne ulaze u pore [min] [s]
 t_r – retencijsko vrijeme molekule uzorka [min] [s]
 v – linearna brzina [m s^{-1}]

V_0 – mrtvi volumen kolone [m³]

V_r – volumen eluata [m³]

v_s – specifični volumen molekule [m³ kg⁻¹]

V_t – ukupni volumen kolone [m³]

W – širina pika [m]

Z – aksijalna koordinata kolone u cilindričnom koordinatnom sustavu [m]

z – Z/L [-]

Grčki simboli:

η – eta broj [-]

κ – Boltzmann-ova konstanta [J K⁻¹]

λ – d_m/d_p [-]

λ_0 – odnos promjera molekule uzorka i promjera pora čestica punila za velike molekule koje ne ulaze u pore [-]

μ – viskoznost eluata [Pa s]

ζ – bezdimenzijska konstanta [-]

ρ – gustoća otapala [kg m⁻³]

τ – bezdimenzijsko vrijeme [-]

τ_{imp} – bezdimenzijsko vrijeme trajanja impulsne pobude [-]

τ_{ior} – onečišćenost pora [-]

ε_b – udio mrtvog volumena kolone [-]

ε_p – poroznost čestica punila [-]

ε_p^a – dostupna poroznost čestica punila [-]

δ – pogreška [-]

8. PRILOG

Prilog 1. Ispis programa za rješavanje sustava linearnih jednadžbi napisanog u programskom paketu MatLab

```

clear all
close all
clc
% *****EKSPERIMENTALNI PODACI*****
Q=(0.2E-6)/60    %protok
L=30E-2        %duljina kolone
d=7.8E-3       %promjer kolone
tr=39.933*60   %retencijsko vrijeme molekule uzorka
td=36.8*60     %retencijsko vrijeme za velike molekule koje ne ulaze u pore
tpoc=77.483*60 %retencijsko vrijeme za male molekule koje ulaze u sve pore
v=L/td
M=157000      %molekularna masa molekule uzorka
tau=1
% *****LITERATURNI PODACI*****
Rp=5E-6       %radius cestice punila
lambda0=0.35
MW0=2000000  %exclusion limit

% *****PARAMETRI*****
Pe=(0.1*3.14*d^2*L^2)/(4*Rp*Q*td)
Dm=2.74E-9*MW^(-1/3)*1E-4
lambda=lambda0*(MW/MW0)^(1/3)
Dp=Dm*(1-2.104*lambda+2.09*lambda^3-0.95*lambda^5)/tau
epsb=(4*Q*td)/(3.14*d^2*L)
epsps=-epsb/(1-epsb)+(epsb/(1-epsb))*(tr/td)
eta=(epsps*Dp*L)/(Rp^2*v)
Bi=(1.09*(v*Rp)^(0.33)*Dm^(0.67)*3.14*d^2*L)/(2*epsps*Dp*4*Q*td)
ksi=3*Bi*eta*((1-epsb)/epsb)

% *****SIMULACIJA*****
z0=0;
zmax=1;
dz=0.005;
z=z0:dz:zmax;
n=length(z);

r0=0;
rmax=1;
dr=0.1;
r=r0:dr:rmax;
f=length(r);
r1=rmax;

t0=0
tmax=3
dt=Pe*dz^2/(2+Pe*dz)
t=t0:dt:tmax

```

```

m=length(t)
tau=t*L/(v*60)
cb=zeros(n,m)
cp=zeros(1,m)
cb(1,2)=1
Ksec=(tr-td)/(tpoc-td)
for j=1:m

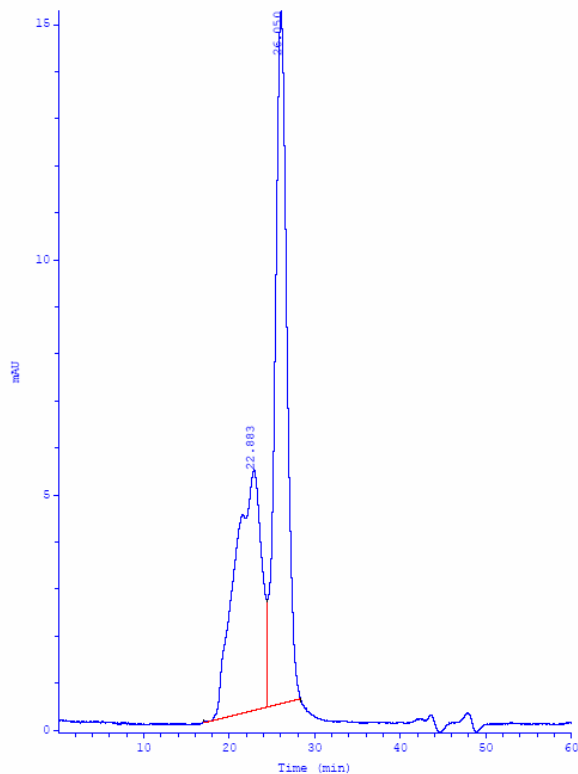
    for i=2:n-1
        cb(i,j+1)=(cb(i-1,j)*(1/(Pe*dz^2)+1/(2*dz))+cb(i,j)*(-
2/(Pe*dz^2)+1/dt)+cb(i+1,j)*(1/(Pe*dz^2)-1/(2*dz))+cb(i,j)*Ksec*ksi)/(1/dt+ksi);
        if cb(i,j+1)<0;
            cb(i,j+1)=0;
        end
    end
end

cb(n,j+1)=cb(n-1,j+1);
v_cb(j)=cb(n,j);
end

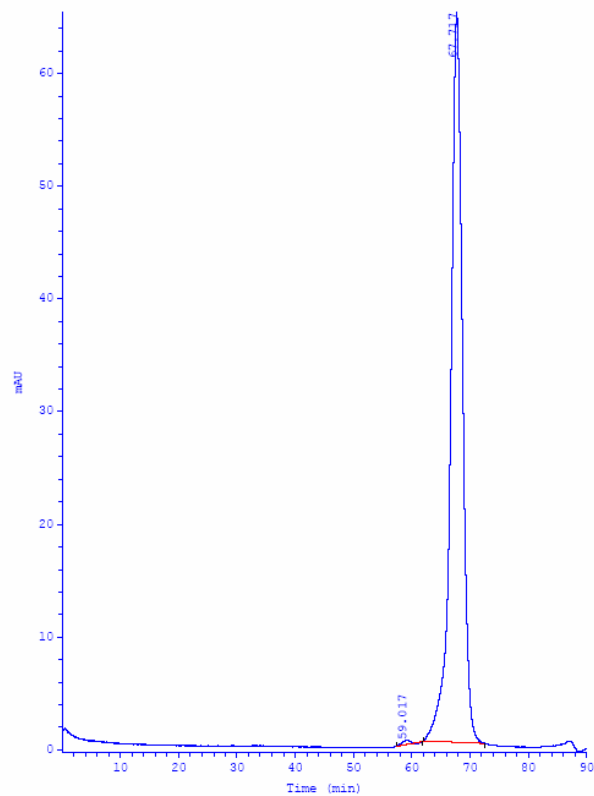
% *****
%
%          GRAFICKI PRIKAZ I ISPIS U DATOTEKU
% % *****
figure(1)
plot(tau,v_cb),xlabel('tau [-]'),ylabel('cb [-]'),title('promjena koncentracije u mobilnoj fazi');
datoteka=[v_cb;tau];
fid = fopen('datoteka.txt','W')
fprintf(fid,'%6.2e %12.8e\n',datoteka);
fclose(fid)

```

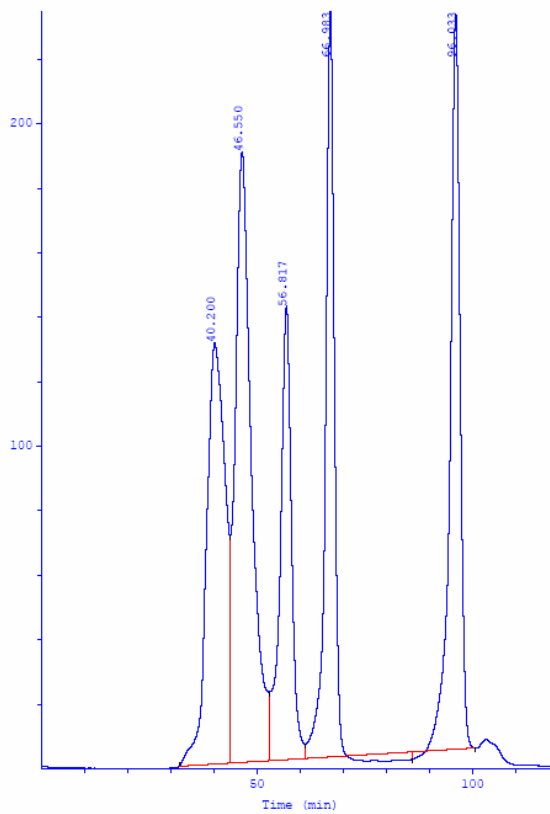
Prilog 2. Kromatogram za BSA pri protoku eluenta od $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ na koloni Superdex 75 HR 10/30



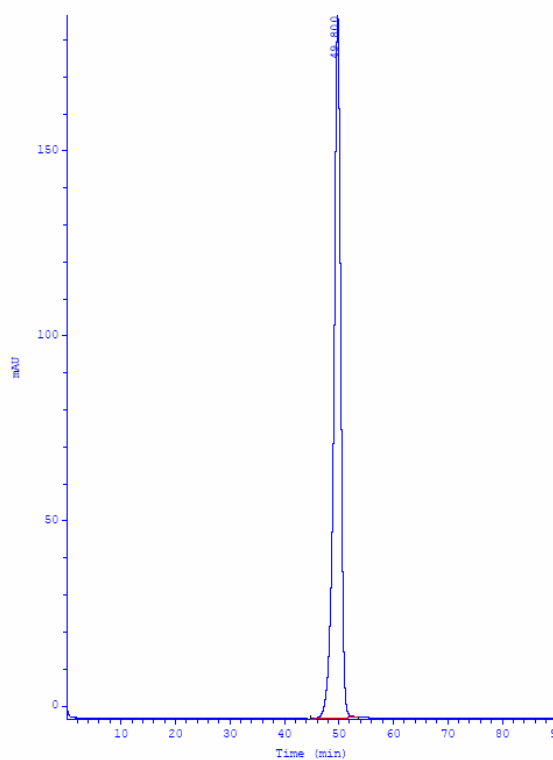
Prilog 3. Kromatogram za nepoznati uzorak pri protoku eluenta od $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ na koloni Superdex 75 HR 10/30



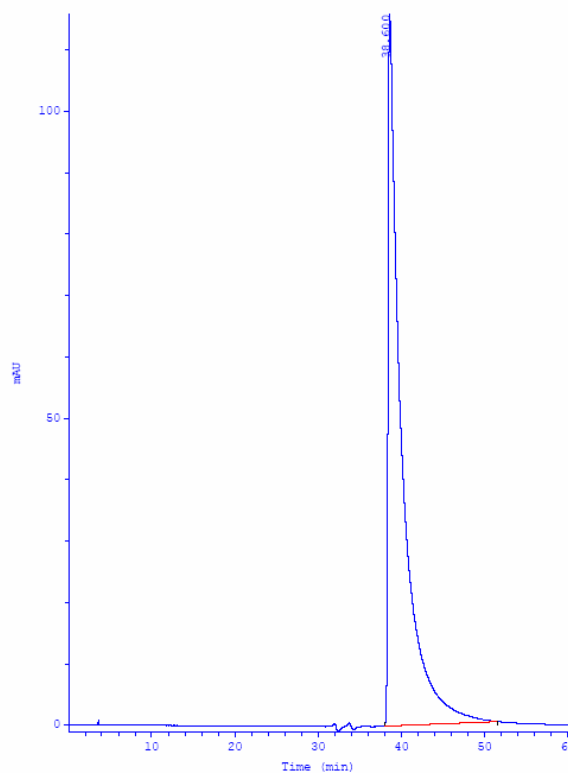
Prilog 4. Kromatogram za gel-filtracijske standarde pri protoku eluenta od $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ na koloni Superdex 75 HR 10/30



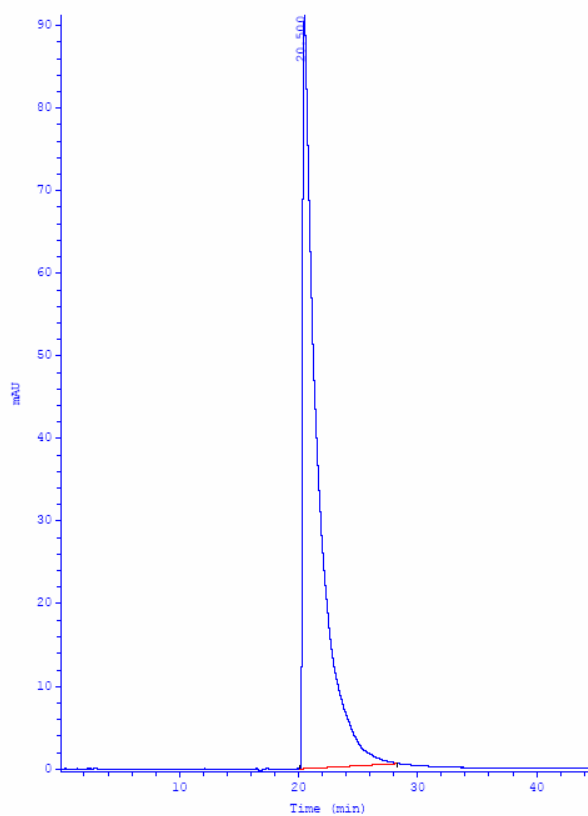
Prilog 5. Kromatogram za aceton pri protoku eluenta od $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ na koloni Superdex 75 HR 10/30



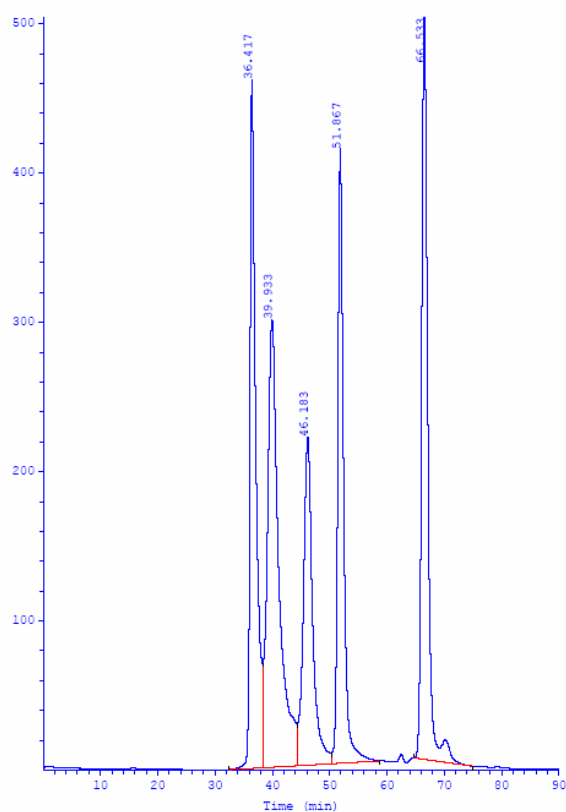
Prilog 6. Kromatogram za aceton pri protoku eluenta od $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ na koloni BioSep SEC S2000



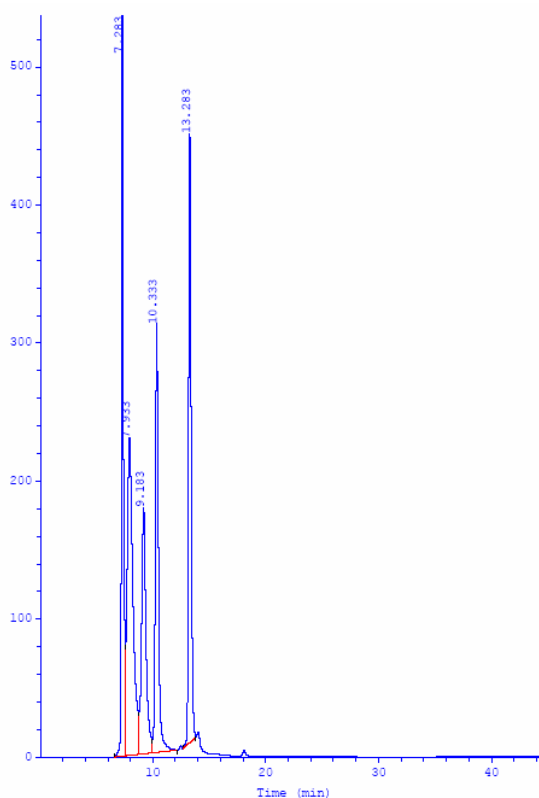
Prilog 7. Kromatogram za aceton pri protoku eluenta od $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ na koloni BioSep SEC S2000



Prilog 8. Kromatogram za gel-filtracijske standarde pri protoku eluenta od $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ na koloni BioSep SEC S2000



Prilog 9. Kromatogram za gel-filtracijske standarde pri protoku eluenta od $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ na koloni BioSep SEC S2000



ŽIVOTOPIS

Boris Neseck rođen je 22. kolovoza 1980. u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole upisuje 3. gimnaziju u Zagrebu. 1998. godine upisuje se na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Sudjelovao je na V. susretu mladih kemijskih inženjera 2004. godine. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije završava 2004. godine.