

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**OPTIMIZACIJA TEHNOLOŠKEGA PROCESA
MODIFIKACIJE MONOLITNIH CIM[®] NOSILCEV Z
DIETILAMINOM**

DIPLOMSKO DELO

Rok OBLAK

Mentor: dr. Urh Černigoj

Nova Gorica, 2012

IZJAVA

Izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Rezultati, ki so nastali v okviru skupnega raziskovanja z drugimi raziskovalci, ali so jih prispevali drugi raziskovalci (strokovnjaki), so eksplicitno prikazani oziroma navedeni (citirani) v diplomskem delu.

Rok Oblak

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju dr. Urhu Černigoju za pomoč pri izdelavi diplomske naloge, za potrpežljivost in vse nasvete, ki mi jih je dal. Prav tako se zahvaljujem podjetju BIA Separations d.o.o., da mi je omogočilo eksperimentalno opravljanje dela. Rad bi se zahvalil tudi vsem v oddelku Razvoj, kjer so mi s svojimi nasveti pomagali pri izdelavi diplomske naloge. Nazadnje pa bi se rad zahvalil še svoji mami za podporo in finančno pomoč pri študiju.

POVZETEK

Odpadki v vseh vrstah industrije predstavljajo velik strošek. Nič drugače ni v kemijski industriji, kjer se je v zadnjih letih na področju zmanjševanja odpadkov napravil velik napredek. Ključno vlogo pri zmanjševanju odpadnih produktov pa igra optimizacija tehnoloških procesov. V svoji diplomski nalogi sem poizkušal optimizirati postopek modifikacije CIM[®] monolitnih kolon z dietilaminom (DEA). Eksperimente sem izvajal na 0,34 ml diskah in 8 ml cevnih modulih. Pri diskah sem isto modifikacijsko raztopino uporabil na več zaporednih modifikacijah diskov. Pri prvi paralelki diskov sem po vsaki modifikaciji izmeril koncentracijo DEA v modifikacijski raztopini in na podlagi rezultata dodal svež DEA do začetne koncentracije, pri drugi paralelki pa svežega DEA med posameznimi modifikacijami nisem dodajal. Pri 8 ml cevnih modulih sem prav tako uporabil eno modifikacijsko raztopino v več zaporednih modifikacijah, pri čemer sem spremljal koncentracijo DEA v raztopini in ga pred naslednjo funkcionalizacijo dodajal do začetne koncentracije. Uspešnost modifikacij sem spremljal z merjenjem ionske kapacitete. Optimizacija procesa je bila uspešna, prihranki DEA pri 8 ml cevnih modulih znašajo 43%, prihranki etanola pa kar 63%. Posledično se je zmanjšala tudi količina odpadnih aminov, in sicer za 51%.

KLJUČNE BESEDE

Optimizacija tehnoloških postopkov, dietilamin, CIM monoliti, kromatografija

SUMMARY

Wastes represent a significant cost in all types of industries. It is the same with the chemical industry, where a great progress in the area of waste reduction has been made in recent years. Optimization of technological processes plays a key role in reducing waste products. In my thesis I tried to optimize the process of modification of CIM[®] monolithic columns with diethylamine (DEA). Experiments have been conducted on 0,34 ml disks and 8 ml tubes. For disks the same modification solution has been used for several consecutive disk modifications. In the first part of disk experiment, a DEA concentration was measured in a modification solution after every immobilization experiment. Then the known amount of DEA was added to get the initial concentration of DEA in modification solution, which was used for functionalisation of the consecutive disk. In the second part, no fresh DEA was added to modification solution between modifications. The experiments with 8 ml monolithic tubes were conducted in the same way as in the first part of disk experiment. The success of modifications has been rated by measuring an ion exchange capacity of DEA columns. The optimization of the process was substantial, savings of DEA in modifications of 8 ml tubes were 43%, and ethanol savings were as much as 63%. As a result the amount of waste amines has also been reduced, namely 51%.

KEY WORDS

Optimization of technological processes, Diethylamine, CIM monoliths, Chromatography

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
2	TEORETIČNE OSNOVE	2
2.1	Monoliti	2
2.1.1	Sinteza monolitov	2
2.1.2	Modifikacija osnovnega monolitnega skeleta	4
2.1.3	Karakterizacija modificiranega monolita.....	5
2.2	Amini	6
2.2.1	Dietilamin.....	7
2.3	Optimizacija tehnološkega postopka.....	7
2.4	Uporabljene metode	8
2.4.1	Plinska kromatografija (GC).....	8
2.4.2	Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC)	11
3	NAMEN IN CILJI NALOGE	14
4	EKSPERIMENTALNI DEL	15
4.1	Uporabljene kemikalije.....	15
4.2	Priprava glavnih raztopin	15
4.2.1	Priprava pufrov za merjenje ionskih kapacitet.....	15
4.2.2	Priprava pufrov za merjenje proteinskih kapacitet.....	16
4.2.3	Priprava raztopine BSA	16
4.2.4	Priprava raztopin DEA v etanolu	16
4.2.5	Priprava kontrolne raztopine za meritve na GC.....	16
4.2.6	Priprava vzorcev za umeritveno krivuljo na GC.....	16
4.2.7	Priprava vzorcev iz modifikacijskih raztopin za meritve na GC.....	17
4.3	GC metoda	17
4.4	Modifikacija monolitnih diskov in cevnih modulov z raztopino DEA	17
4.4.1	Modifikacija 0,34 ml diskov 1	17
4.4.2	Modifikacija 0,34 ml diskov 2	18
4.4.3	Modifikacija 8 ml cevnih modulov.....	18
4.5	Merjenje ionskih kapacitet DEA diskov in cevnih modulov	19
4.5.1	Kondicioniranje diskov	19
4.5.2	Kondicioniranje 8 ml cevnih modulov.....	19
4.5.3	Metoda za merjenje ionskih kapacitet ter izračun ionskih kapacitet.....	20
4.6	Merjenje proteinskih kapacitet 8 ml cevnih modulov	20
4.6.1	Kondicioniranje 8 ml cevnih modulov	20
4.6.2	Metoda za merjenje proteinskih kapacitet ter izračun ionskih kapacitet..	20
4.7	Tehtanje diskov	21
4.8	Merjenje mrtvih volumnov ohišij	21
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	23
5.1	Stanje pred optimizacijo.....	23
5.2	Umeritvena krivulja za GC	23
5.3	Kinetika reakcij modifikacije	26

5.4	Modifikacije diskov s ponovno uporabo odpadne modifikacijske raztopine ...	27
5.5	Modifikacije 8 ml cevnih modulov s prečrpavanjem.....	29
5.6	Prihranki	32
6	ZAKLJUČKI.....	34
7	VIRI.....	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema reakcije polimerizacije (Simonič, 2011).....	3
Slika 2: CIM 8 ml cevni modul	4
Slika 3: CIM 0,34 ml disk.....	4
Slika 4: Funkcionalizacija monomera z DEA (prirejeno po Simonič, 2011).....	4
Slika 5: Primer grafa ionske kapacitete	6
Slika 6: Skeletna formula DEA	7
Slika 7: Shema plinskega kromatografa (prirejeno po Luterotti, 2002).....	9
Slika 8: GC sistem, ki sem ga uporabljal pri eksperimentalnem delu.....	9
Slika 9: Primer GC kromatograma.....	11
Slika 10: Glavni sestavni deli HPLC sistema	12
Slika 11: Shematski prikaz modifikacije diskov v dveh paralelkah	18
Slika 12: Shema sistema za prečrpavanje 8 ml cevnih modulov	19
Slika 13: Shema poteka merjenja proteinske kapacitete in prikaz odziva na detektorju	21
Slika 14: Umeritvena krivulja: odvisnost površine kromatografskega vrha DEA od koncentracije DEA v viali [ppm].....	25
Slika 15: Umeritvena krivulja: odvisnost površine kromatografskega vrha DEA od koncentracije DEA v modifikacijski raztopini [%]	25
Slika 16: Kinetika reakcij modifikacij diskov pri 40°C	26
Slika 17: Modifikacija diskov z DEA: Spreminjanje ionske kapacitete v odvisnosti od zaporedne modifikacije	27
Slika 18: Primerjava ionskih in proteinskih kapacitet na cevnih modulih	30

KAZALO TABEL

Tabela 1: Koncentracije vzorcev za pripravo umeritvene krivulje na GC.....	17
Tabela 2: Analiza rezultatov vzorcev za umeritveno krivuljo	24
Tabela 3: Rezultati meritev kinetike reakcij modifikacij diskov pri 40°C	26
Tabela 4: Ionske in proteinske kapacitete z DEA modificiranih 8ml cevnih modulov... 30	30
Tabela 5: Koncentracije DEA v različnih stopnjah modifikacij	31
Tabela 6: Volumni porabljenega DEA in etanola po modifikacijah	32
Tabela 7: Linearna ekstrapolacija prihrankov pri modifikacij kolon.....	33

1 UVOD

Odpadek je po eni izmed definicij Slovarja slovenskega knjižnega jezika to, *kar se pri predelavi, obdelavi česa odstrani, izloči kot neuporabno za prvotni namen*. In prav odpadki so v vseh vrstah industrije zelo velik problem. Nič drugače ni s kemijsko in farmacevtsko industrijo, kjer kot stranski produkt proizvodnje nastane ogromno odpadkov, ki so označeni kot okolju oziroma človeku nevarni, saj so toksični in potencialno kancerogeni. Zmanjšanje tovrstnih odpadkov je ključno, če želimo ohranjati okolje in varovati zdravje ljudi.

Tako kot pri vseh odpadkih je tudi tu potrebno upoštevati ekološko načelo 3R. To načelo upošteva hierarhijo ravnanja z odpadki. Najpomembnejši del je zmanjševanje količine odpadkov (reduce). Potem je potrebno vse nastale odpadke, če se le da, ponovno uporabiti v proizvodnih procesih (reuse) in nazadnje vse, kar ne more biti ponovno uporabljeno kot surovina, recikliramo (recycle). To pomeni, da s tehnološkimi procesi odpadke predelamo v surovine, ki se lahko ponovno uporabijo. Odlaganje je zadnji izhod, ko odpadkov res ne moremo več predelati v uporabne surovine. Tovrstna načela so dandanes že zelo uveljavljena in prav zaradi tega je pomembno, da se industrijski procesi razvijajo predvsem v smeri zmanjševanja porabe surovin in ponovne uporabe odpadnih produktov proizvodnje.

Eden izmed predstavnikov kemijske industrije pri nas je tudi podjetje BIA Separations d.o.o. V podjetju se ukvarjajo z izdelovanjem različnih monolitnih kromatografskih kolon pod blagovno oznako CIM[®] (Convective Interaction Media). Uporabljajo se za čiščenje in ločevanje bioloških makromolekul. Tako pri procesih izdelave kolon kot tudi pri razvoju novih procesov in vrst kolon nastaja veliko odpadkov, ki bi jih lahko z ustreznimi prilagoditvami zmanjšali. Med odpadki je veliko odpadnega etanola in drugih organskih topil ter aminov. V svoji diplomski nalogi se bom osredotočil na industrijski proces modifikacije CIM monolitnih kolon z dietilaminom (DEA). Glavni cilj je bil zmanjšati porabo DEA, s tem pa se posledično zmanjša tudi količina odpadnega DEA.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Monoliti

Ime monolit izhaja iz grškega jezika (monolithos pomeni en kamen) in predstavlja nekaj, kar je narejeno iz enega samega kosa. Izraz se uporablja pretežno v arhitekturi in umetnosti, vendar pa ima še en pomen, ki z umetnostjo nima prav nobene zveze. Gre za termin, ki se uporablja v znanosti, označuje pa monolitni kromatografski nosilec, ki ga krajše imenujemo monolit. Monolite se uporablja pri visokotlačni tekočinski kromatografiji (high pressure liquid chromatography = HPLC). CIM monolitni kromatografski nosilci so porozni organski polimeri v obliki diska ali valja. Če monolit vstavimo v ustrezno kromatografsko ohišje, dobimo kromatografsko kolono, ki jo lahko neposredno vpnemo na HPLC sistem in jo uporabimo v postopkih tekočinske kromatografije.

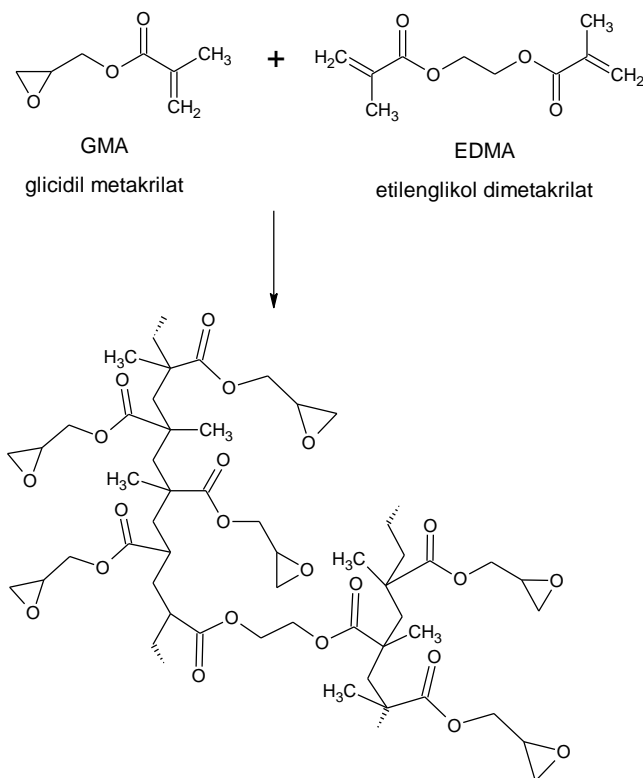
CIM monolitne kromatografske kolone se uporablja za izolacijo, čiščenje in koncentracijo bioloških molekul. V primerjavi z delčnimi (klasičnimi) stacionarnimi fazami, razvitimi za ločevanje biomolekul, pride do izraza konkurenčnost monolitov predvsem pri čiščenju velikih proteinov (npr. imunoglobulinov), plazmidne deoksiribonukleinske kisline (DNK), virusov ter virusom podobnih delcev (Frankovič, 2009). Glede na velikost stacionarne faze izdeluje podjetje celo paletno produkto, in sicer od zelo majhnih, t.i. analitskih kolon, ki se uporabljajo za medprocesno analizo industrijske proizvodnje biomolekul, pa vse do 8 l monolitov, ki se uporabljajo za čiščenje in separacije biomolekul na pilotnem in industrijskem nivoju. V primerjavi z ostalimi kromatografskimi nosilci (predvsem delčnimi nosilci), ki se uporabljajo v procesih čiščenja biomolekul, imajo monoliti določene prednosti:

- Poli(GMA-co-EDMA) monoliti so zelo stabilni, tako mehansko kot kemijsko. Uporabni so v zelo širokem območju pH (1-13) (Vidič, 2009).
- Monoliti so odporni na večje pretoke mobilne faze; ločevanje biomolekul je hitrejše (Mihelič in sod., 2005).
- V monolitih ni zaprtih por, kjer bi mobilna faza mirovala; večji izkoristek nosilca (Podgornik in Štrancar, 2005).
- Monoliti imajo zaradi pretočnosti por večjo vezno kapaciteto za velike molekule (Barut in sod., 2008).
- Monoliti imajo zaradi velikega števila majhnih por zelo veliko specifično površino (Barut in sod., 2008).
- Uporaba je zelo enostavna, zaradi posebno zasnovanih ohišji se jih preprosto poveže na HPLC sisteme (Barut in sod., 2003).

2.1.1 Sinteza monolitov

Če želimo monolite kakorkoli uporabiti v postopkih kromatografije, jih je potrebno najprej izdelati. Sinteza CIM monolitov poteka s termično radikalno polimerizacijo (slika 1). Uporabimo dva osnovna reagenta (kemijsko spadata med alkene), in sicer glicidil metakrilat (GMA) in etilenglikol dimetakrilat (EDMA). GMA je monomer, funkcionaliziran z reaktivno epoksi skupino, EDMA pa služi kot premreževalec, ki daje večjo trdnost nastalemu polimeru. V monomerni mešanici je prisoten tudi dibenzoil peroksid (BPO), ki je iniciator, in alkoholi (cikloheksanol in dodekanol), ki služijo kot porogeni. Ti služijo kot inertna topila monomerov in so neobhodni pri oblikovanju por. Epoksidno skupino lahko po končani polimerizaciji z relativno preprostimi reakcijami

pretvorimo v različne funkcionalne skupine, primerne za različne kromatografske aplikacije.

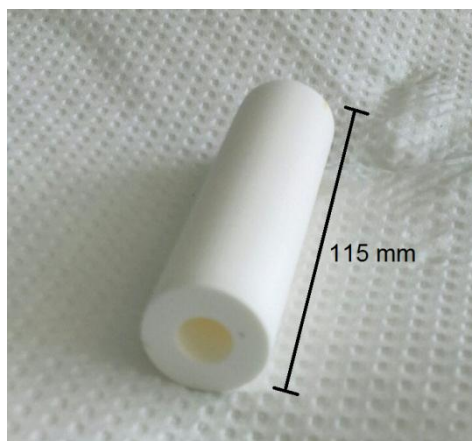


Slika 1: Shema reakcije polimerizacije (Simonič, 2011)

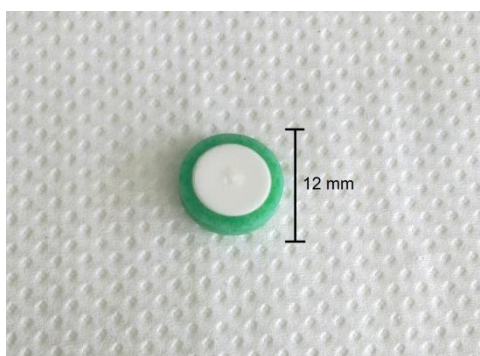
Ko se polimerizacija začne, se v raztopini tvorijo polimerizacijska jedra. Ko postanejo dovolj velika, se začnejo obarjati, in sicer v obliki kroglic. Te so v porogenih netopne. Ko reakcija dokončno poteče, oziroma jo ustavimo, porogeni še vedno ostanejo ujeti v strukturo in jih je potrebno spirati iz kolone s topilom, kot je etanol. Ko monolit osušimo, izoblikovane pore ostanejo, polimerni skelet se ne poruši.

Pogoji, pri katerih se reakcija izvaja, so zelo pomembni. Večji kot je masni delež porogenov v monomerni mešanici, večja je poroznost monolitov. Če pa povišamo temperaturo in koncentracijo iniciatorja, to vpliva na povečanje hitrosti reakcije polimerizacije. Slaba stran tega je, da se povprečni premer por manjša (Beneš in sod., 2005).

CIM tehnologija obsega dve osnovni obliki monolitov, in sicer cevne module ter diske (sliki 2, 3). Uporablja se monolite zelo različnih volumnov, in sicer 0,1 ml, 0,34 ml, 1 ml, 8 ml, 80 ml, 800 ml, 8 l, razvija pa se tudi monolite še večjih volumnov.



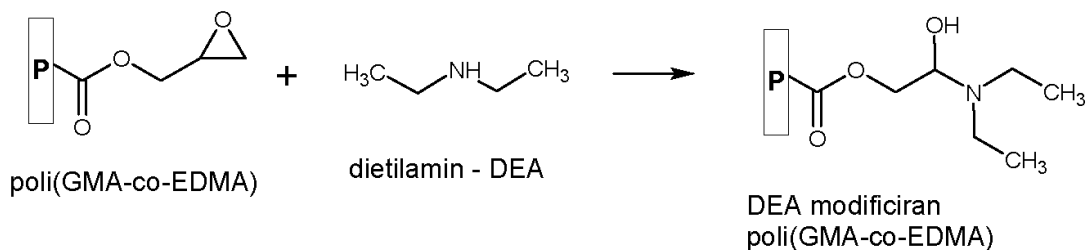
Slika 2: CIM 8 ml cevni modul



Slika 3: CIM 0,34 ml disk

2.1.2 Modifikacija osnovnega monolitnega skeleta

S kemijskimi reakcijami lahko aktivne epoksi skupine v polimernem skeletu pretvorimo v druge funkcionalne skupine, ki jih v kromatografiji imenujemo ligandi. To lahko storimo prav zaradi lastnosti, ki jih imajo epoksi skupine, in sicer zaradi njihove visoke reaktivnosti lahko vstopajo v veliko število kemijskih reakcij s spojinami, ki vsebujejo nukleofilne funkcionalne skupine, kot so hidroksi, tiolne ali aminske. Pomembna reakcija funkcionalizacije osnovnega polimera je reakcija z DEA, pri čemer dobimo kromatografsko fazo, ki jo imenujemo šibki anionski izmenjevalec. Reakcija funkcionalizacije je prikazana na sliki 4.



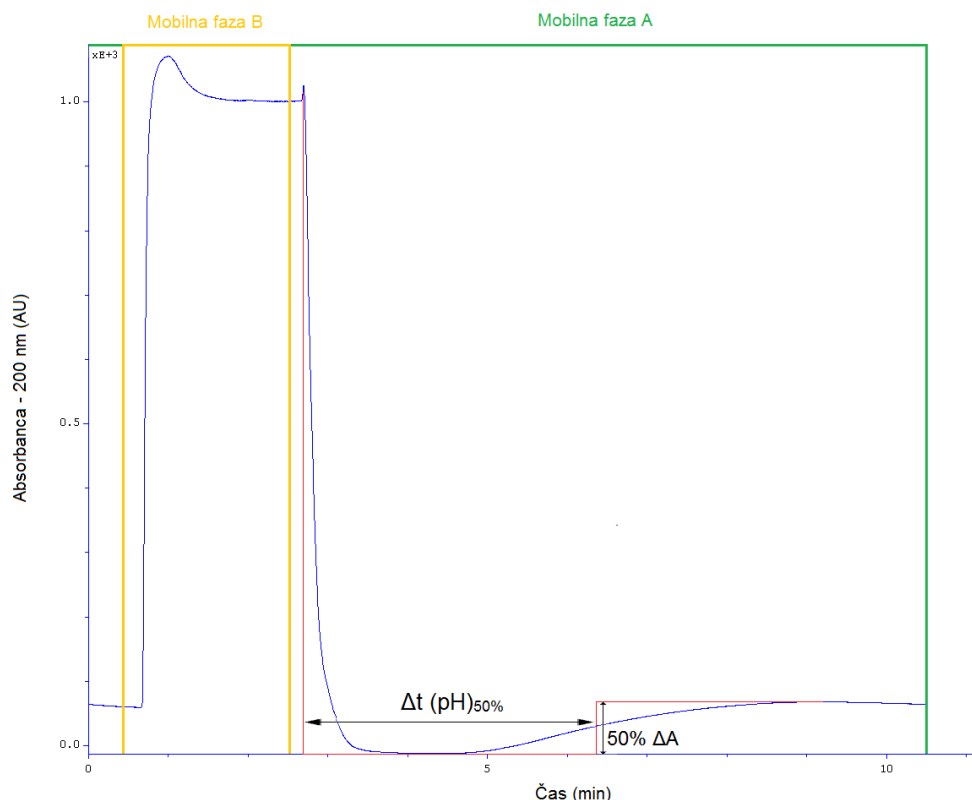
Slika 4: Funkcionalizacija monomera z DEA (prirejeno po Simonič, 2011)

2.1.3 Karakterizacija modificiranega monolita

Učinkovitost modifikacij na monolitih lahko določimo z elementno analizo, titracijami nabitih funkcionalnih skupin, jedrsko magnetno resonanco, infrardečo spektrometrijo, gravimetrijo in ostalimi metodami (Simonič, 2011). V kolikor pa želimo katero izmed zgoraj naštetih metod izvesti (izjema je gravimetrija), moramo za meritev odvzeti del vzorca iz monolita oz. uničiti cel monolit. S tem postane le-ta neuporaben za nadaljnjo uporabo. Namesto omenjenih metod pa lahko za karakterizacijo določenih funkcionalnih skupin na monolitih uporabimo posredne metode merjenja uspešnosti reakcij. Dve zelo pogosto uporabljeni metodi sta merjenje ionske kapacitete in dinamične proteinske kapacitete (Simonič, 2011).

2.1.3.1 Ionska kapaciteta

Ionska kapaciteta nam posredno pove število ionsko-izmenjevalnih skupin na kromatografskem nosilcu. Poznamo dve vrsti ionske kapacitete, in sicer relativno ter efektivno kapaciteto. Relativno ionsko kapaciteto se določi z nedestruktivno metodo, ki so jo na monolitih razvili Lendero in sodelavci (2008). Ta temelji na pH prehodu (glej sliko 5), do katerega pride pri uporabi pufrov z istim pH in različno ionsko jakostjo (ta je odvisna od koncentracije soli v pufrih). Rezultati, ki jih dobimo, so odvisni od pH in koncentracije pufrov, pretoka mobilne faze čez HPLC sistem, volumna kolone ter temperature pufrov. Za merjenje ionske kapacitete DEA diskov se uporablja 20 mM fosfatni pufer, pH = 7,1, (pufer A) in 0,5 M fosfatni pufer, pH = 7,1 (pufer B) (Lendero in sod., 2008). Možno je izvesti korelacijo med številom vezanihaminskih skupin na monolit ter ionsko kapaciteto. Tako lahko z merjenjem ionske kapacitete pod identičnimi kromatografskimi pogoji kot pri umeritveni krivulji posredno izračunamo masno konverzijo funkcionalizacije.



Slika 5: Primer grafa ionske kapacitete

2.1.3.2 Proteinska kapaciteta

Dinamično proteinsko kapaciteto, prav tako kot ionsko kapaciteto, merimo na HPLC sistemih, in sicer z merjenjem prebojnih krivulj. Pri merjenju proteinske kapacitete dobimo preboj in ta nam pove, koliko proteina se veže na kolono, preden se ta zasiti z njim. Tako lahko izračunamo teoretično proteinsko kapaciteto monolita. Proteinska kapaciteta je odvisna od lastnosti monolitnega nosilca (velikost, volumen, struktura in porazdelitev por,...), lastnosti proteina ter od eksperimentalnih pogojev (pretok, pH puffrov, koncentracija puffrov, temperatura,...) (Frankovič, 2009).

2.2 Amini

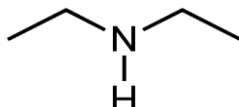
Amini so organske dušikove spojine, pri katerih so atomi vodika deloma ali povsem nadomeščeni z organskimi radikali. So derivati amoniaka. Glede na število organskih radikalov razlikujemo primarne, sekundarne in terciarne amine.

Amine se uporabljajo v izdelavi topil, barvil, farmacevtskih sredstev in površinsko aktivnih snovi. Prav tako jih najdemo tudi v naravnem okolju. Med najpogostejšimi aminami so histamin (prisoten v ribah, siru, alkoholnih pijačah), dopamin (prisoten v bananah in drugem sadju ter v zelenjavi) ter triptamin (prisoten v mesu in mesnih izdelkih ter kuhani zelenjavi). Ob preveliki zaužiti količini le-teh se lahko pojavijo stranski učinki, kot so: astmatični napad, glavobol, povišan krvni tlak, želodčne težave,... (Olivieri in sod., 2011). Sekundarni amini so znani kot izhodne spojine za nastanek N-nitrozaminov, ki so kancerogeni (Sander, 1971). Sekundarni amini se lahko nahajajo v hrani in pitni

vodi. Neurath in sod. (1976) so preučevali, katere amine lahko najdemo v hrani, in prišli do zanimivih zaključkov. V vzorcih hrane, ki so jo preučevali, so odkrili kar 40 primarnih in sekundarnih aminov. Med slednjimi sta bila najpogostejša dimetilamin in DEA.

2.2.1 Dietilamin

DEA (slika 6) je sekundarni amin z molekulsko formulo $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_3$. Spada v skupino dialkilaminov. Pri standardnih pogojih (pri temperaturi 25°C in tlaku $101,3\text{ kPa}$) je brezbarvna vnetljiva tekočina z vonjem po amoniaku.



Slika 6: Skeletna formula DEA

DEA je nevaren v primeru, če ga vdihujemo, oziroma če pride v stik s kožo. Zaradi svoje bazične narave lahko povzroča draženje in celo opekline. V primeru, da ga vdihujemo dlje časa, pa lahko povzroči nastanek pljučnega edema (nabiranje tekočine v pljučih) in s tem oteženega dihanja (Diethylamine fact sheet, 2005). Z DEA vedno delamo v dobro prezračenih prostorih, oziroma digestoriju. Pri tem uporabljamo zaščitno obleko, rokavice, očala ter masko.

DEA se uporablja kot surovina za proizvodnjo dietilaminoetanola (DEAE), N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) in za proizvodnjo drugih kemikalij in aktivnih učinkovin. DEAE se uporablja kot inhibitor korozije na sistemih za čiščenje vod, DEET pa je najpogostejša sestavina sredstev za odganjanje mrčesa. V podjetju BIA Separations se DEA uporablja za modifikacijo monolitnih kolon. In prav optimizacija tega postopka je bila cilj moje diplomske naloge. V procesih modifikacije se porabi ogromno DEA, ki se ga po uporabi zavrže, čeprav je raztopina še delno oz. v celoti uporabna.

2.3 Optimizacija tehnološkega postopka

Prva točka programskih ciljev s področja odpadnih kemikalij je *uvajanje tehnologij za proizvodnjo in uporabo kemikalij, ki zmanjšujejo nastajanje odpadkov kemikalij pri viru in njihovo morebitno nevarnost* (ReNPKV, 2006). Direktiva je usmerjena predvsem v zmanjševanje nastajanja odpadkov, njihovo čim večjo izrabo in v razvoj tehnologij, ki to omogočajo. Optimizacija tehnoloških postopkov je proces, pri katerem poizkušamo z različnimi metodami izboljšati dosedanje procese, pri tem pa zmanjšamo vložek energije in povečamo izkoristek. Pomembno pa je tudi, da z optimizacijo postopkov prihranimo denar.

Kemijska industrija se je prav zaradi želje po prihrankih in čim večji učinkovitosti v zadnjih 30 letih močno razvila. Večino razvoja te industrije je predstavljala prav optimizacija tehnoloških postopkov. Ena izmed dobrih strani optimizacije je zmanjšanje stroškov vzdrževanja ter povečanje produktivnosti zaposlenih (Edgar in sod., 2001). Optimizacije se vedno lotimo postopoma, za kar so Edgar in sod. (2001) navedli šest glavnih korakov:

1. Analiziramo in definiramo spremenljivke v procesu.
2. Določimo kriterije ter glavne cilje optimizacije.

3. S pomočjo matematičnih enačb razvijemo proces, ki povezuje spremenljivke vnosa in iznosa. Z upoštevanjem osnovnih fizikalnih načel (ravnovesje mas, ravnovesje energij) razvijemo koncept optimiranega procesa.
4. Če problem zavzema preveliko področje, ga bodisi razdelimo na manjše, lažje obvladljive dele, bodisi poenostavimo koncept.
5. Odvisno od zastavljenega cilja in problema uporabimo primerno optimizacijsko tehniko.
6. Preučimo učinkovitost nove oz. izboljšane tehnike ter jo primerjamo s pričakovanji.

Tako kot povsod v kemijski industriji je optimizacija tehnoloških postopkov pomembna tudi v podjetju BIA Separations d.o.o. V podjetju se je na področju modifikacije monolitov že izvajalo optimizacijo, in sicer je šlo za optimizacijo uporabe trimetilamina (TMA) pri funkcionalizaciji CIM monolitnih kromatografskih nosilcev (Lokar, 2011). Pri tem so določali najbolj optimalne in robustne pogoje za funkcionalizacijo, spreminjali so koncentracijo reagentov, temperaturo ter čas funkcionalizacije. Z optimizacijo so uspeli prihraniti od 21% (pri CIM QA-8ml kolonah) do 50% (pri CIM QA-1ml kolonah) reagenta (Lokar, 2011).

Modifikacije oz. funkcionalizacije na CIM kolonah se v podjetju izvaja tudi z DEA. Maloprodajna cena za liter DEA s čistočo $\geq 99\%$ proizvajalca Sigma-Aldrich pri slovenskem uvozniku Mikro-Polo na dan 29.8.2012 znaša 19,08€ (odgovor na povpraševanje). Eden izmed glavnih parametrov pri načrtovanju optimizacije je tudi količina porabljenih reagentov. Za modifikacijo ene 8 ml kolone se porabi 8,7A* ml DEA. V podjetju se izdeluje tudi večje kolone, tako da je poraba DEA na mesečni ravni kar precejšnja in se z razvojem novih kolon še povečuje. Prav poraba oz. potencialna poraba surovine je bila povod za optimizacijo postopka modifikacije monolitnih CIM nosilcev.

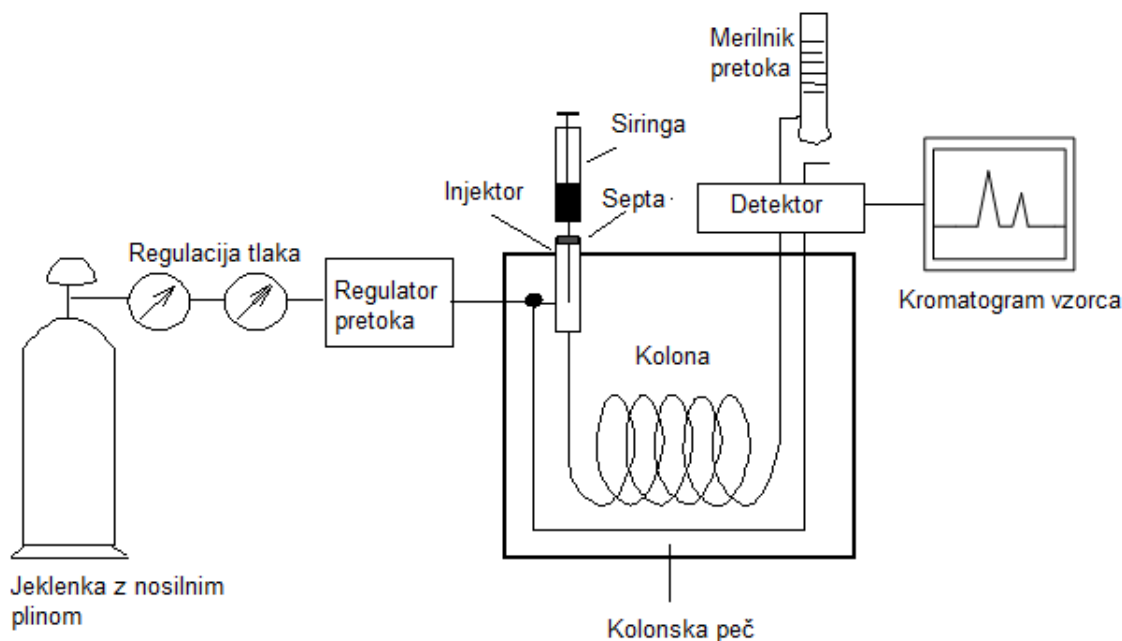
Opombe:

A*: Zaradi zaupnosti podatkov je bil uporabljen iracionalni večkratnik A

2.4 Uporabljene metode

2.4.1 Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija (gas chromatography - GC) je kromatografska tehnika, ki se uporablja za ločevanje tekočih hlapnih vzorcev. Mobilna faza je inertni plin (helij, dušik, argon, vodik,...), stacionarna faza pa mikroskopska plast tekočine ali polimerov na inertnem nosilcu, imenovanem kolona. Naprava vzorcu počasi dviguje temperaturo in malo pod točko vrelišča se hlapne spojine začnejo premikati skupaj z mobilno fazo skozi kolono. Vzpostavi se temperaturni gradient, tako da na detektorju najprej zaznamo najbolj hlapne spojine in na koncu najmanj hlapne (Gas Chromatography, 2012). Na sliki 7 je prikazana shema plinskega kromatografa, na sliki 8 pa je plinski kromatograf, ki sem ga uporabljal pri svojem delu.



Slika 7: Shema plinskega kromatografa (prirejeno po Luterotti, 2002)



Slika 8: GC sistem, ki sem ga uporabljal pri eksperimentalnem delu

Kadar za analizo vzorcev uporabljamo plinsko kromatografijo, je vedno najprej potrebno narediti umeritveno krivuljo, saj le tako lahko kasneje določimo količino iskane snovi v našem vzorcu. Prav tako je potrebno paziti, da so nastavitve metode, ki jo uporabljamo, pravilne. Lahko se nam zgodi, da je več komponent vzorca približno enako hlapnih in bi ob prehitrem dvigu temperature detektor vse spojine zaznal kot eno samo. Tako bi dobili izkrivljeno sliko. V vzorce, ki jih analiziramo, navadno dodamo tudi standard. Vrelišče standarda se ne sme prekrivati z vrelišči potencialnih vzorcev, pomaga pa nam pri kvantifikaciji vzorčne kemikalije.

2.4.1.1 Kolona

Kolona je kapilara s premerom 1-2 mm in dolžino tudi 30 in več metrov. Je glavni sestavni del plinskega kromatografa, saj na njej prihaja do ločevanja komponent vzorca. Kolone morajo biti izdelane iz temperaturno odpornih materialov, saj temperature v peči dosežajo tudi do 300°C. Izbira kolone je odvisna od vrste vzorca, ki ga analiziramo, prav tako je vzorcu potrebno prilagoditi dolžino in premer kolone ter izbiro stacionarne faze. Tudi tu, tako kot povsod v kemiji, velja načelo, da podobno reagira s podobnim, zato se za polarne vzorce uporablja polarna stacionarna faza, za nepolarne vzorce pa nepolarna (Novak, 1988).

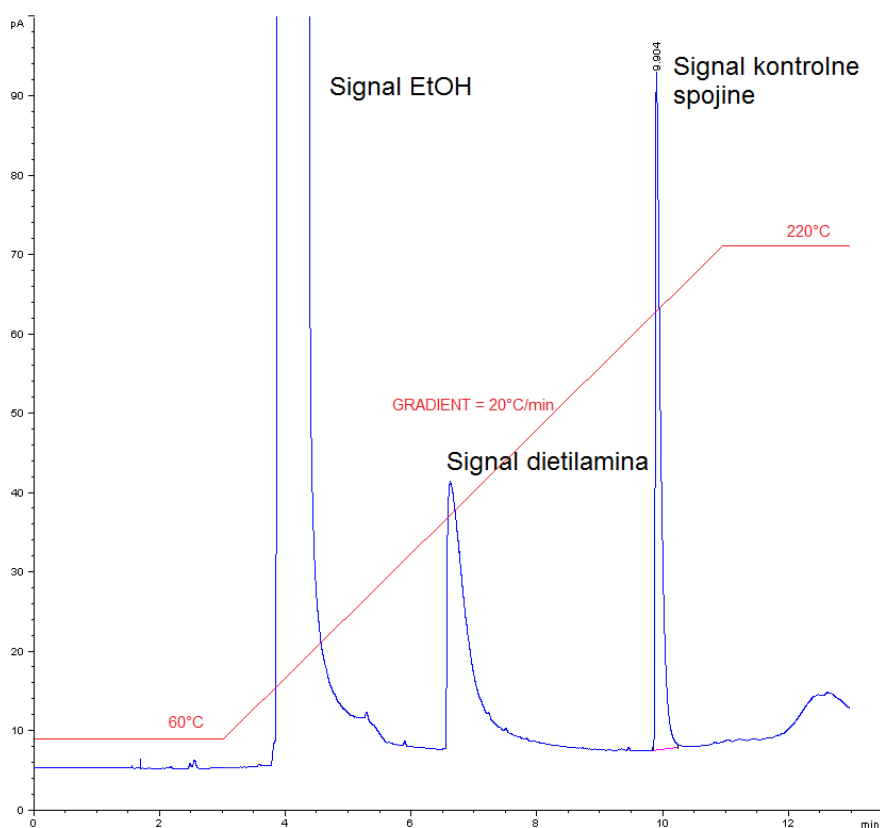
2.4.1.2 Detektor

Poznamo več vrst detektorjev. Najpogosteje se uporabljajo t.i. FID (flame ionization detector) in TCD (thermal conductivity detector) detektorji. Oba lahko zaznata veliko število spojin, prav tako sta sposobna zaznati široke razpore koncentracij. TCD detektorji so univerzalni in se jih lahko uporablja za analizo zelo različnih vzorcev, FID detektorji pa se predvsem uporabljajo za analizo organskih spojin, saj so nanje veliko bolj občutljivi kot TCD detektorji.

Kot že ime pove, FID detektor deluje na principu zaznavanja ionov. Plamen gori pri tako visoki temperaturi, da zgore večina organskih spojin, zaradi česar nastajajo ioni in elektroni. Dve elektrodi nato zaznata ione, ki pri tem nastanejo, in na podlagi le-teh detektor določi sestavo vzorca.

TCD detektor zaznava spremembe termične prevodnosti v toku skozi kolono in jih primerja z referenčnim tokom nosilnega plina. Glede na to, da ima večina spojin termično prevodnost, lahko na TCD detektorju zaznamo zelo veliko število raznolikih spojin (Gas Chromatography, 2012).

Detektor nazadnje s pomočjo primerne programske opreme na računalniku prikaže kromatogram našega vzorca.



Slika 9: Primer GC kromatograma

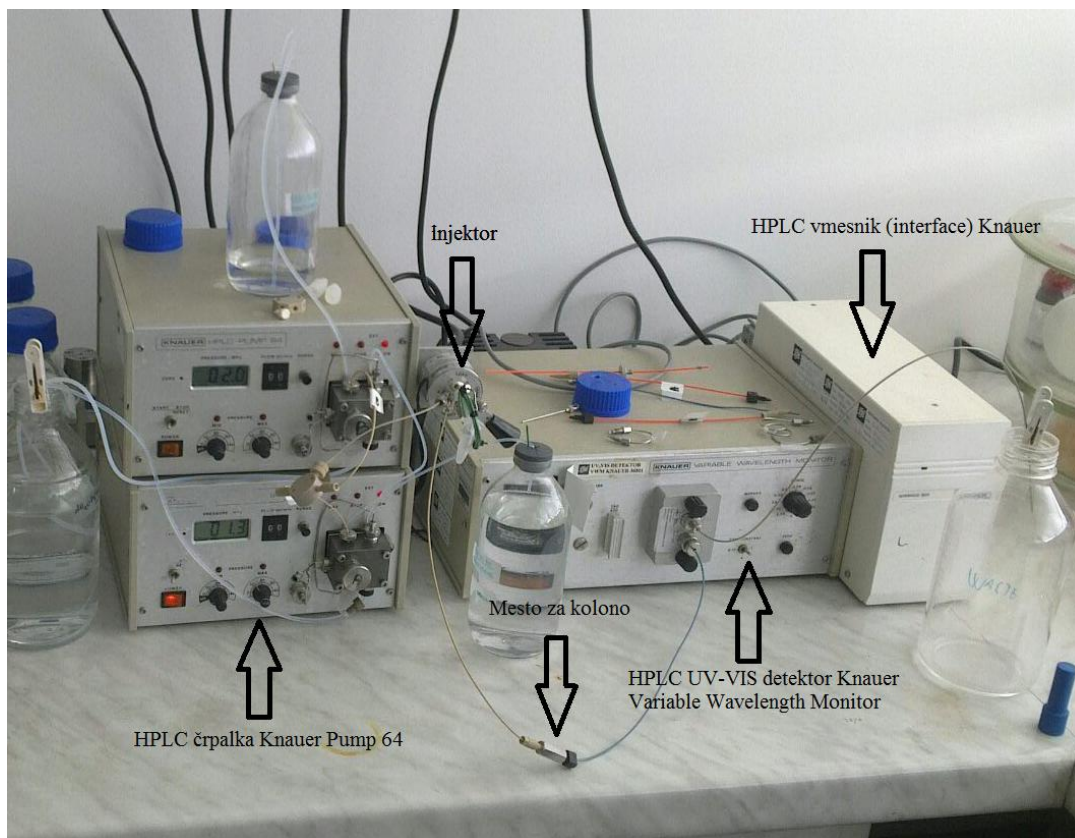
2.4.1.3 Inlet oz. injektor

Naloga injektorja je, da injicira vzorce na kolono. Volumen injiciranja vzorca določimo v metodi in lahko variira od 1 μ l pa vse do 250 μ l, odvisno od uporabljenega injektorja. Glavni del injektorja je brizga (siringa), ki zajame vzorec iz vial in ga injicira na sistem. Pred vsakim injiciranjem sistem brizgo dobro spere z 2-propanolom, kar preprečuje kontaminiranje drugih vzorcev (Gas Chromatography, 2012).

2.4.2 Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC)

HPLC je kromatografska tehnika, ki se uporablja za ločevanje organskih molekul, ionov, biomolekul, polimerov itn. Uporablja se za ločevanje tekočih vzorcev. Glavni sestavni deli HPLC sistema so (slika 10):

- črpalke,
- injektor,
- detektor,
- kolona,
- vmesnik (interface).



Slika 10: Glavni sestavni deli HPLC sistema

2.4.2.1 Črpalka

Črpalka je osnova vsakega HPLC sistema. Naloga črpalke je, da pod visokim tlakom skozi sistem poganja mobilno fazo. Potrebno je, da je pretok na črpalkah enakomeren, saj le tako dobimo natančne in realne meritve. Črpanje mobilne faze na kolono je lahko izokratsko ali gradientno. Pri izokratskem črpanju črpalka na kolono mobilno fazo črpa s konstantnim razmerjem topil. Pri gradientnem črpanju pa črpalka na kolono mobilno fazo črpa s poljubnim spreminjanjem razmerij med topili (Žorž, 1991).

2.4.2.2 Injektor

Injektor se uporablja za vbrizgavanje vzorcev na kolono. Omogočati mora dobro ponovljivost injiciranja in pa injiciranje različnih volumnov. Danes se uporabljajo injektorji z dozirno zanko. Volumni zank so lahko zelo različni, od 1 μ l pa do nekaj mililitrov. Injiciranje vzorcev je lahko ročno z brizgo oz. dozirno iglo in pa avtomatsko, z avtomatskim injektorjem (Žorž, 1991).

2.4.2.3 Detektor

Z detektorjem zaznavamo komponente vzorca, ki pridejo iz kolone. Pri svojih eksperimentih sem uporabljal UV-VIS detektor. Ta meri spremembo absorbance, ki jo povzroči prehod snovi skozi merilno pretočno celico detektorja. Detektor mora biti občutljiv, da lahko zaznamo vse spremembe, ki se dogajajo na vzorcu. Na podlagi

velikosti signala z detektorja lahko določamo tudi koncentracije posameznih komponent. Retencijski ali zadrževalni čas je čas, ki nam pove, koliko časa se je določena komponenta vzorca zadrževala na koloni, hkrati pa nam določi tudi položaj vrha na grafu. Dalj časa kot se komponenta zadržuje na koloni, kasneje se bo na grafu pojavil vrh, značilen za to komponento (Žorž, 1991).

2.4.2.4 Vmesnik (Interface) in programska oprema

Naloga vmesnika je, da pretvori in prenaša signale iz HPLC detektorja na računalnik. S pomočjo primerne programske opreme (ChromGate, EuroChrom,...) nam izriše celoten potek signala. Na dobljenih grafih lahko potem vidimo, kje so vrhovi, značilni za določene komponente vzorcev. Prav tako vmesnik omogoča krmiljenje HPLC sistema preko računalnika. Vse pretoke, časovne intervale, gradiente in druge parametre lahko nastavimo na računalniku, ta pa potem sam prilagaja vse spremenljivke. S prej omenjeno programsko opremo lahko dobljene podatke tudi analiziramo.

2.4.2.5 Kolona

Na koloni poteka separacija komponent. Kolone morajo biti zaradi pritiskov, ki jih ustvarjajo HPLC črpalke, mehansko odporne. Kolone, ki se uporabljajo, imajo različne notranje premere in so različnih velikosti, odvisno od namena kolone. Analitske kolone so manjših dimenzij, medtem ko so industrijske kolone lahko zelo velike (Žorž, 1991). Večinoma so kolone narejene iz nerjavečega jekla.

3 NAMEN IN CILJI NALOGE

Predvidevanja so, da je koncentracija DEA v odpadni raztopini še sorazmerno visoka. Namen mojega diplomskega dela je bil spremeniti postopek modifikacije in poizkušati doseči čim večji izkoristek raztopine. Iz diplomske naloge, ki je bila v podjetju opravljena leta 2011 (Lokar, 2011) je razvidno, da se pri modifikaciji s TMA najbolj obnese zmanjševanje koncentracije reagenta in podaljševanje časa reakcije. Ker tako TMA kot DEA spadata med amine, je bila prva ideja ponoviti tak postopek, s tem, da se nekateri koraki prilagodijo lastnostim DEA. V nadaljevanju bi poizkusil tudi z alternativnimi modifikacijskimi pogoji. V vsakem primeru bi meril in spremljal koncentracijo DEA v reagentu pred in po reakciji. Reagenčno raztopino po prvi modifikaciji bi uporabil ponovno, odvisno od koncentracije DEA pa je, ali bi jo pred naslednjo modifikacijo obogatil s svežim DEA. Če bi bila koncentracija v odpadni raztopini še zadostna, to ne bi bilo potrebno.

Kako uspešne bi bile modifikacije po novi metodi, bi spremljal z merjenjem ionskih in proteinskih kapacitet na HPLC sistemu, koncentracije DEA v odpadni raztopini pa bi spremljal s plinsko kromatografijo. Tako bi dobili podatke o tem, koliko DEA se je po stari metodi zavrlo, oz. kako uporabna je še raztopina.

Cilj naloge je torej čim bolj zmanjšati porabo DEA, hkrati pa zmanjšati še količino odpadne raztopine.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Uporabljene kemikalije

Pri izvajanju eksperimentov sem uporabljal naslednje snovi:

- Deionizirana voda (ENOOB, Vipava),
- 96% denaturiran etanol (EtOH) (P1*),
- 99% denaturiran etanol (EtOH) (P2*),
- $\geq 99\%$ dietilamin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen),
- $\geq 37\%$ klorovodikova kislina (Sigma-Aldrich, Taufkirchen),
- $\geq 97\%$ natrijev hidroskid (Sigma by Sigma-Aldrich, Taufkirchen),
- $\geq 97\%$ bis(2-dimetilaminoetil)metilamin (Sigma by Sigma-Aldrich, Taufkirchen),
- $\geq 99\%$ trimetilamin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen),
- $\sim 99\%$ tetrametiletilenamin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen),
- $\geq 99\%$ 3-dietilaminpropilamin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen),
- $\geq 98\%$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen),
- $\geq 98\%$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen),
- $\geq 98\%$ goveji serumski albumin (BSA) (Fluka by Sigma-Aldrich, Taufkirchen),
- $\geq 99\%$ NaCl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen),
- $\geq 99\%$ 2-amino-2-(hidroskimetil)-1,3-propandiol (TRIS) (Sigma by Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

Opombe:

P1* in P2*: Zaradi neposredne primerjave med dvema proizvajalcema iste kemikalije sta bili uporabljeni oznaki P1 in P2.

4.2 Priprava glavnih raztopin

4.2.1 Priprava pufrov za merjenje ionskih kapacitet

Pri svojem delu sem uporabljal dva, in sicer pufer A in pufer B. Pufer A je bil 20 mM fosfat pH = 7,1, pufer B pa 0,5 M fosfat pH = 7,1.

Pufer A: pufer sem pripravljaj na maso. Na analitski tehtnici (Metler Toledo XS 205 DUIM) sem zatehtal 1,153 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 2,243 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Nato sem na laboratorijski tehtnici (Tehtnica Železniki HJ 6200 CE) dopolnil z deionizirano vodo do celokupne mase 1000 g. Ob konstantnem mešanju in merjenju pH vrednosti (Metler Toledo: Seven Multi S47-KS) sem s kapalko dodajal koncentrirano HCl do pH vrednosti 7,1. Pred uporabo sem mobilno fazo prefiltriral skozi 0,2 μm filter (TRP "RAPID" 500).

Pufer B: pufer sem pripravljaj na maso. Na laboratorijski tehtnici (Tehtnica Železniki HJ 6200 CE) sem zatehtal 20 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 66,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Nato sem na laboratorijski tehtnici (Tehtnica Železniki HJ 6200 CE) dopolnil z deionizirano vodo do celokupne mase 1000 g. Ob konstantnem mešanju in merjenju pH vrednosti (Metler Toledo: Seven Multi S47-KS) sem s kapalko dodajal koncentrirano HCl do pH vrednosti 7,1. Pred uporabo sem mobilno fazo prefiltriral skozi 0,2 μm filter (TRP "RAPID" 500).

4.2.2 Priprava pufrov za merjenje proteinskih kapacitet

Uporabljal sem dva pufra. Pufer A je bil 20 mM TRIS pH = 7,4, pufer B pa 20 mM TRIS + 1 M NaCl pH = 7,4.

Pufer A: pufer sem pripravljaj na maso. Na analitski tehtnici (Metler Toledo XS 205 DUIM) sem zatehtal 2,423 g TRIS. Nato sem na laboratorijski tehtnici (Tehtnica Železniki HJ 6200 CE) dopolnil z deionizirano vodo do celokupne mase 1000 g. Ob konstantnem mešanju in merjenju pH vrednosti (Metler Toledo: Seven Multi S47-KS) sem s kapalko dodajal 1 M NaOH do pH vrednosti 7,4. Pred uporabo sem mobilno fazo prefiltriral skozi 0,2 µm filter (TRP "RAPID" 500).

Pufer B: pufer sem pripravljaj volumsko. Na analitski tehtnici (Metler Toledo XS 205 DUIM) sem zatehtal 2,423 g TRIS. Nato sem na laboratorijski tehtnici (Tehtnica Železniki HJ 6200 CE) zatehtal 58,4 g NaCl. Dolil sem približno 800 ml deionizirane vode. Ob konstantnem mešanju in merjenju pH vrednosti (Metler Toledo: Seven Multi S47-KS) sem s kapalko dodajal 1 M NaOH do pH vrednosti 7,4. Potem sem pufer prelij v valj, do oznake 1000 ml dodal deionizirano vodo in še enkrat pomeril pH. Če ni bil ustrezen, sem dodal še toliko 1 M NaOH, da sem dosegel želeni pH. Pred uporabo sem mobilno fazo prefiltriral skozi 0,2 µm filter (TRP "RAPID" 500).

4.2.3 Priprava raztopine BSA

BSA sem pripravil volumsko. Koncentracija je bila 2 mg ml⁻¹. Na analitski tehtnici (Metler Toledo XS 205 DUIM) sem zatehtal 2,00 g BSA. Potem sem BSA raztopil v 1 l 20 mM TRIS pufra pH = 7,4 (pufer A). Raztopino BSA sem pred uporabo prefiltriral skozi 0,2 µm filter (TRP "RAPID" 500).

4.2.4 Priprava raztopin DEA v etanolu

Za modifikacije sem uporabljal tri raztopine DEA, in sicer 13,4B*%, 22,4B*% in 26,8B*%. V valj sem natočil ustrezen volumen DEA (17,3A*, 28,9A* ali 34,6A* ml) in dopolnil do 100 ml z 99% etanolom (EtOH).

Opombe:

A*: Zaradi zaupnosti podatkov je bil uporabljen iracionalni večkratnik A

B*: Zaradi zaupnosti podatkov je bil uporabljen iracionalni večkratnik B

4.2.5 Priprava kontrolne raztopine za meritve na GC

V 25 ml bučko sem pipetiral 20 µl bis(2-dimetilaminoetil)metilamina, trimetilamina, tetrametiletilenamina oz. 3-dietilaminpropilamina in do 25 ml dopolnil z 99% EtOH.

4.2.6 Priprava vzorcev za umeritveno krivuljo na GC

V 25 ml bučko sem pipetiral 40 µl DEA in do 25 ml dopolnil z 99% EtOH. To raztopino sem uporabil kot izhodiščno raztopino (stock solution). Pri pripravi vseh vzorcev sem vedno uporabljal 99% EtOH. Meritev vsakega vzorca sem ponovil trikrat.

Tabela 1: Koncentracije vzorcev za pripravo umeritvene krivulje na GC

Koncentracija DEA [ppm]	V(izhodiščne r.) [ml]	V(kontrolne r.) [ml]	V (EtOH) [ml]
0	0	1	9
8,4D*	0,25	1	8,75
16,9D*	0,5	1	8,5
25,6D*	0,75	1	8,25
34,1D*	1	1	8
42,8D*	1,25	1	7,75
68,1D*	2	1	7

Opombe:

D*: Zaradi zaupnosti podatkov je bil uporabljen iracionalni večkratnik D

4.2.7 Priprava vzorcev iz modifikacijskih raztopin za meritve na GC

Vsak vzorec sem pripravil tako, da sem v 25 ml bučko dodal 40 µl vzorca iz modifikacijske raztopine, ter do 25 ml dopolnil z 99% EtOH. Potem sem v 10 ml bučko dodal 1 ml kontrolne raztopine, 2 ml vzorca iz 25 ml bučke ter dopolnil do 10 ml z 99% EtOH. Dobro sem premešal ter iz 10 ml bučke odvzel 1,5 ml za meritev na GC.

4.3 GC metoda

GC sistem, na katerem sem izvajal meritve, je bil Agilent 6890 Series s FID detektorjem, proizvajalca Hewlett-Packard. Metodo sem predhodno nastavljal in shranil na računalniku, potem jo je bilo za vsak vzorec potrebno le zagnati. Pri metodi sem uporabljal 5 µl siringo, volumen injiciranja je bil 1 µl, način injiciranja enkraten (splitless). Temperatura inleta je bila nastavljena na 180°C, temperatura detektorja pa na 280°C. Uporabljena kolona je bila J&W 125-3232 DB-FFAP. Temperaturni program: kolona je bila 3 minute pri 60°C, sledi temperaturni gradient 20°C min⁻¹ do 220°C. Do konca metode je bila temperatura kolone 220°C. Po vsaki meritvi se je morala kolona ohladiti na 60°C.

4.4 Modifikacija monolitnih diskov in cevnih modulov z raztopino DEA

4.4.1 Modifikacija 0,34 ml diskov 1

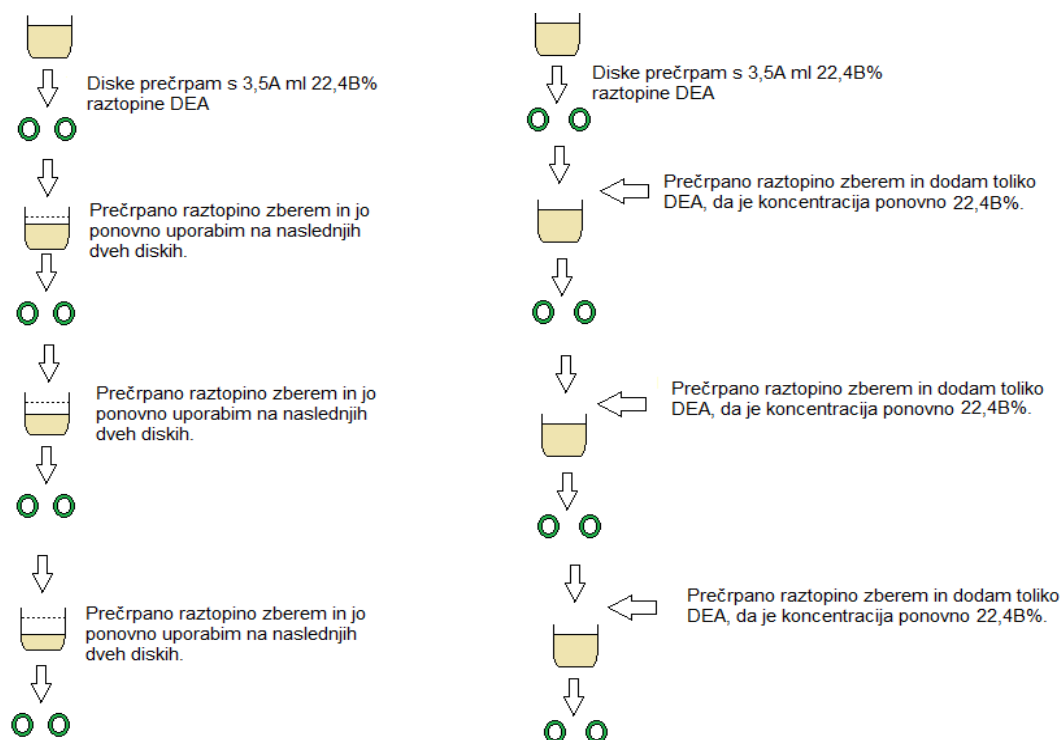
Skozi modifikacijsko ohišje z vstavljenim diskom sem z brizgo prečrpal modifikacijsko raztopino. Vsak disk sem najprej prečrpal s 6-7 ml EtOH (P1). Nato sem jih prečrpal z 3,5A-4A ml modifikacijske raztopine DEA (13,4B% oz. 22,4B%). Ohišja sem dobro zatesnil in jih postavil v kopel na 40°C. Časi modifikacije so bili različni (1h, 3h, 7h, 22h, 48h, 72h). Po modifikaciji sem skozi diske prečrpal še 100 ml EtOH (P1) in jih shranil v deionizirani H₂O.

4.4.2 Modifikacija 0,34 ml diskov 2

Diske sem prečrpaval ročno. Skozi vsak disk sem najprej prečrpal 6-7 ml EtOH (P1). Nato sem jih prečrpal s 3,5A ml 22,4B% modifikacijske raztopine DEA. Raztopino sem lovil v centrifugirko in jo shranil. Ohišja sem dobro zatesnil in jih postavil za 21h v vodno kopel (Kambič WB-84E) na 40°C. Po modifikaciji sem diske spral z vsaj 3 ml EtOH (P1). Nato sem jih postavil za 5h v 10 ml EtOH, pri čemer sem ga vmes dvakrat zamenjal. V EtOH so se difuzijsko spirali. Nazadnje so bili še difuzijsko sprani z deionizirano H₂O in nato v deionizirani H₂O tudi shranjeni.

Raztopino, ki sem jo shranil v centrifugirko, sem analiziral na GC. Glede na rezultate GC analize sem pri eni paralelki eksperimentov dodal toliko svežega DEA in etanola, da je bila koncentracija DEA in volumen raztopine enak začetni (22,4B%, 3,5A ml). Pri drugi paralelki DEA in EtOH nisem dodajal.

Modifikacijo diskov sem ponovil še trikrat, kot je razvidno s slike 11. Pri tem sem za vsako modifikacijo uporabil 2 nova, še nemodificirana diska.



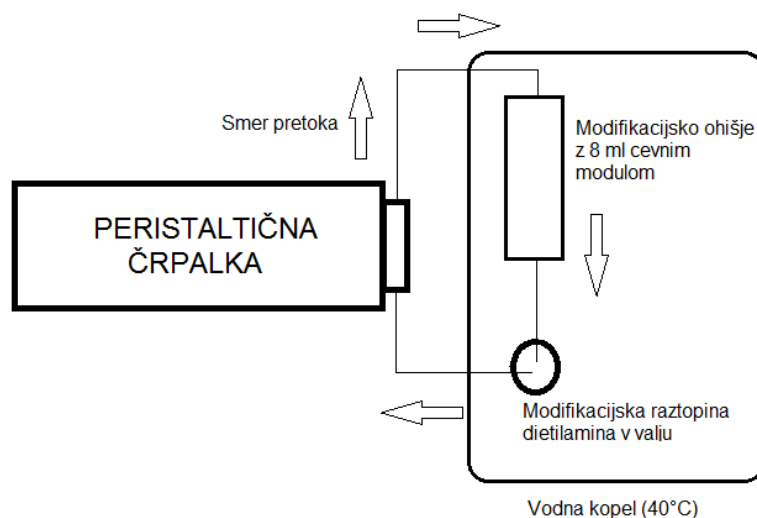
Slika 11: Shematski prikaz modifikacije diskov v dveh paralelkah

4.4.3 Modifikacija 8 ml cevnih modulov

Skozi cevni modul sem najprej prečrpal 25 ml EtOH (P1). Nato sem skozenj prečrpal 14,4A ml 26,8B% raztopine DEA. Pri tem se je raztopina razredčila s 25 ml etanola, ki je bil predhodno že v sistemu. Dobil sem 28,9A ml 13,4B% raztopine DEA v etanolu. Modifikacija je potekala 48 ur. Cevni modul sem vsak dan modifikacije na peristaltični črpalki (ACCU CP-120 Tandem) pri pretoku približno 8 ml min⁻¹ dvakrat prečrpal z modifikacijsko raztopino iz valja. Tako stekleni valj z modifikacijsko raztopino kot ohišje

s cevni modulom sta bila ves čas modifikacije v kopeli (Kambič WB-84E) pri temperaturi 40°C. Po koncu modifikacije sem skozi ohišje prečrpal 25 ml EtOH (P2), ki je izpodrnil modifikacijsko tekočino v ohišju. To raztopino sem lovil v valj, v katerem je bil preostanek modifikacijske raztopine. Valj sem tesno zaprl s parafilmom. Cevni modul sem vzel iz kopeli in ga najprej prečrpal s 45 ml EtOH, pustil stati 15 minut in nato prečrpal še s 100 ml EtOH (P1). Vsako fazo prečrpavanja sem posebej ulovil v reagenčno steklenico, cevni modul pa sem shranil v hladilniku v 96% EtOH.

Modifikacijsko raztopino v valju sem analiziral na GC in glede na rezultate dodal toliko DEA, da je bila koncentracija 14,3B%. Nato sem postopek ponovil na naslednjem svežem epoksi cevni modulu. Na ta način sem modificiral 3 cevne module. Shema sistema za prečrpavanje 8 ml cevnih modulov je prikazana na sliki 12.



Slika 12: Shema sistema za prečrpavanje 8 ml cevnih modulov

4.5 Merjenje ionskih kapacitet DEA diskov in cevnih modulov

4.5.1 Kondicioniranje diskov

Vsak disk je bilo potrebno pred meritvijo kondicionirati. Diske sem pri pretoku 2 ml min^{-1} najprej 10 minut spiral s pufrom B. Potem sem jih 10 minut spiral s pufrom A in pri tem spremljal odziv na detektorju. Če se po 10 minutah odziv še ni ustalil, sem spiral z pufrom B toliko časa, da se je odziv ustalil.

4.5.2 Kondicioniranje 8 ml cevnih modulov

Vsak cevni modul je bilo potrebno pred meritvijo kondicionirati. Delal sem pri pretoku 20 ml min^{-1} . Cevni modul sem najprej 10 minut spiral s pufrom B. Potem sem ga 30 minut prečrpaval s pufrom B. Sledilo je 10 minut spiranja s pufrom A in nato še 30 minut prečrpavanja s pufrom A.

4.5.3 Metoda za merjenje ionskih kapacitet ter izračun ionskih kapacitet

Meritev ionskih kapacitet pri diskih sem izvajal pri valovni dolžini $\lambda=200$ nm. Metoda za merjenje ionske kapacitete je bila sledeča:

- 0,5 minute pufer A; pretok 2 ml min^{-1}
- 1,5 minute pufer B; pretok 2 ml min^{-1}
- 20 minut pufer A; pretok 2 ml min^{-1}

Meritev ionskih kapacitet pri 8 ml cevnih modulih sem izvajal pri valovni dolžini $\lambda=200$ nm. Metoda za merjenje ionske kapacitete je bila sledeča:

- 0,5 minute pufer A; pretok 20 ml min^{-1}
- 1,5 minute pufer B; pretok 20 ml min^{-1}
- 20 minut pufer A; pretok 20 ml min^{-1}

Ionsko kapaciteto sem izračunal po enačbi (1):

$$q_r = \frac{c_A * \Phi * (t_{50} - t_m)}{V_k} \quad (1)$$

q_r = ionska kapaciteta [mmol l^{-1}]

t_{50} = odčitamo v točki na kromatogramu $\Delta A/2$ (glej sliko 5) [min]

t_m = odčitamo s kromatograma [min]

Φ = pretok [ml min^{-1}]

c_A = koncentracija pufera A (20mM) [mM]

V_k = volumen kolone [ml]

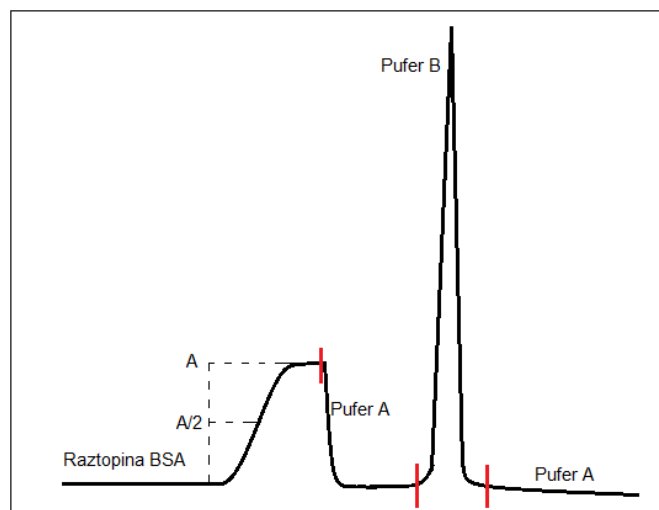
4.6 Merjenje proteinskih kapacitet 8 ml cevnih modulov

4.6.1 Kondicioniranje 8 ml cevnih modulov

Vsak cevni modul je bilo potrebno pred meritvijo kondicionirati. Delal sem pri pretoku 20 ml min^{-1} . Cevni modul sem najprej 10 minut spiral s pufrom B. Potem sem ga 30 minut prečrpaval s pufrom B. Sledilo je 10 minut spiranja s pufrom A in nato še 30 minut prečrpavanja s pufrom A.

4.6.2 Metoda za merjenje proteinskih kapacitet ter izračun ionskih kapacitet

Meritev proteinskih kapacitet pri 8 ml cevnih modulih sem izvajal pri valovni dolžini $\lambda=280$ nm. Po kondicioniranju sem cevni modul spiral z 20 ml pufera A. Potem sem kolono odklopil s HPLC sistema in cevke sistema napolnil z raztopino BSA. Kolono sem nato zopet povezal v sistem. Raztopino BSA sem črpal čez kolono toliko časa, da je prebojna krivulja dosegla maksimum in se tam ustalila. Potem sem začel čez kolono prečrpavati pufer A, dokler se signal na detektorju ni ustalil. Sledilo je prečrpavanje kolone s pufrom B. Tako se je iz kolone spral vezani BSA. Nazadnje sem kolono dobro spiral s pufrom A.



Slika 13: Shema poteka merjenja proteinske kapacitete in prikaz odziva na detektorju

Proteinsko kapaciteto sem izračunal po enačbi (2):

$$q = \frac{(t_{50} * \Phi - V_m) * C_{BSA}}{V_k} \quad (2)$$

q = proteinska kapaciteta [mg ml^{-1}]

t_{50} = čas, ki je potreben, da signal na detektorju doseže polovično vrednost maksimalnega odziva (odčitamo ga iz kromatograma ($A/2$)) (glej sliko 13) [min]

V_m = mrtvi volumen sistema [ml]

Φ = pretok [ml min^{-1}]

C_{BSA} = koncentracija BSA raztopine [mg ml^{-1}]

V_k = volumen kolone [ml]

4.7 Tehtanje diskov

Diske sem najprej dobro spral z etanolom. Potem sem jih vzel iz ohišij in jih prestavil v petrijevke. Sledilo je sušenje v sušilniku (Kambič VS-25C), in sicer 2 uri pri 50°C . Po dveh urah sem diske za 30 minut prestavil v eksikator, da so se ohladili. Tehtal sem jih na analitski tehtnici (Metler Toledo XS 205 DUIM) na desetinko mg natančno. Če je bilo le mogoče, sem posebej tehtal diske in obročke.

4.8 Merjenje mrtvih volumnov ohišij

Kovinska modifikacijska ohišja za diske: Vsako ohišje sem najprej dobro spihal z zrakom, da je bilo suho. Potem sem ga na tehtnici (Tehtnica Železniki HJ 6200 CE) tehtal skupaj s pripadajočimi fritami, čepi in tesnili. Nato sem vstavil že predhodno tehtan disk z obročkom (Metler Toledo XS 205 DUIM). Ohišje sem pod tlakom napolnil z deionizirano vodo in ga dobro zatesnil. Pred tem sem ohišje pod tlakom prečrpaval z deionizirano vodo, da sem izpodrinil zrak. Nato sem celotno ohišje še enkrat tehtal in od dobljene mase odštel maso diska, skupaj z obročkom in maso praznega ohišja. Tako sem dobil maso vode v ohišju, kar je enako »mrtvemu« oz. »praznemu« volumnu ohišja.

Modifikacijska ohišja za 8 ml cevne module: Vsako ohišje sem najprej dobro spihal z zrakom, da je bilo suho. Potem sem ga na tehtnici (Tehtnica Železniki HJ 6200 CE) tehtal, skupaj s pripadajočo frito, čepi in tesnili. Ohišje sem na spodnji strani zatesnil in do vrha napolnil z vodo. Pri tem sem ga nekajkrat pretresel, da sem izpodrinil zrak, ki bi lahko ostal v ohišju. Nato sem vstavil že predhodno tehtan cevni modul (Metler Toledo XS 205 DUIM). Ohišje sem dobro zaprl in ga še enkrat tehtal. Od dobljene mase sem odštél maso cevnega modula in maso praznega ohišja. Tako sem dobil maso vode v ohišju, kar je enako »mrtvemu« oz. »praznemu« volumnu ohišja.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Stanje pred optimizacijo

Nemodificiran monolit je bil shranjen v modifikacijskem ohišju. Skozenj se je prečrpalo približno 3,8C* cevnih volumnov (CV = cevni volumen = volumen monolita) 22,4B% raztopine DEA, potem se je ohišje začepilo. Za modifikacijo diska je bilo na voljo toliko raztopine, kot je bil mrtvi volumen ohišja skupaj z monolitom. Postopek je potekal v vodni kopeli pri temperaturi 40°C. Del DEA iz raztopine se je med modifikacijo vezal na monolit. Osiromašeno raztopino se je po prečrpavanju prelilo v ustrezne embalaže in odložilo kot odpadke. Domnevali smo, da je koncentracija DEA v odpadni raztopini še precej velika. Koncentracije DEA v odpadni raztopini se ni nikoli pomerilo, saj v podjetju še ni bilo razvitih ustreznih metod.

Opombe:

C*: Zaradi zaupnosti podatkov je bil uporabljen iracionalni večkratnik C

5.2 Umeritvena krivulja za GC

Če smo želeli kakorkoli spremljati koncentracije DEA v modifikacijskih raztopinah, je bilo najprej potrebno izdelati umeritveno krivuljo. Pripravljene vzorce sem analiziral na GC. Izračunal sem povprečje treh meritev in določil velikost odziva na detektorju, ki pripada določeni koncentraciji DEA. Tako sem potem lahko določal koncentracije DEA v raztopinah, ki sem jih analiziral.

Pri pripravi umeritvene krivulje sem kot topilo za DEA najprej uporabljal deionizirano vodo, saj naj bi bile tudi modifikacije narejene v vodni raztopini DEA. Izkazalo se je, da voda ni najbolj primerna, saj sem pri analizi dobili veliko različnih vrhov, tudi vrh DEA ni bil simetričen, ponovljivost je bila nizka. Nekateri vrhovi so bili tudi dvojni. Pred eksperimentom smo pričakovali tri vrhove, in sicer naj bi prvi vrh predstavljal etanol, drugi vrh DEA in tretji vrh kontrolno spojino (glej sliko 8). Možni vzrok za ta problem je bila velika ekspanzivnost vode. Problem nastane, ko pride do uparevanja vzorca, saj ima liner (sestavni del GC, kjer pride do uparevanja) svoj lastni volumen. Če pa se vzorec ob uparjanju razširi preko tega volumna, meritve niso ponovljive. Po posvetu z mentorjem sem se odločil, da bilo dobro namesto deionizirane vode, ki ima zelo visok ekspanzijski volumen, kot topilo uporabiti etanol. Ta je zaradi nižje ekspanzivnosti bolj primerno topilo za GC analize. Preizkusil sem dve vrsti denaturiranega etanola, in sicer običajni 96% (P1) in pa čistejši 96% (P2). Po predvidevanjih se je bolje obnesel etanol proizvajalca P2, saj je bil pri analizi etanola viden samo pričakovani vrh, bazna linija pa je bila ravna. Glede na rezultate sem se odločil, da bom tudi pri modifikacijah kot topilo uporabljal etanol proizvajalca P2.

Naslednji korak pri izdelavi umeritvene krivulje je bil iskanje kontrolne spojine, ki služi za to, da lahko preverimo, če so bili vzorci pripravljene pravilno in če so bile analize na plinskem kromatografu izvedene ponovljivo. Odziv kontrolne spojine pri analizi bi moral biti pri uporabi iste metode vedno enak. Odstopanja bi bila minimalna, predvsem zaradi možnih napak pri pripravi raztopine oz. minimalno spreminjajočih se pogojev na GC sistemu. Pogoj za kontrolno raztopino je bil, da le-ta ne bi vplivala na kromatografsko spiranje DEA, poleg tega pa bi bil vrh simetričen in na bazni liniji ločen tako od etanola kot tudi DEA. Najbolje bi bilo, če bi imela kontrolna spojina podobne lastnosti kot DEA, zato smo jo iskali med amini. Preizkusil sem trimetilamin, tetrametiletilenamin, 3-

dietilaminpropilamin in bis(2-dimetilaminoetil)metilamin. Vsem iskanim kriterijem je ustrezal le zadnji. Zadrževalni čas je bil daljši od zadrževalnega časa etanola in DEA, zato ni bilo nobenega prekrivanja, vsi trije vrhovi so bili med seboj popolnoma ločeni (slika 9). Priprava vzorcev je opisana v poglavju 4.2.4.

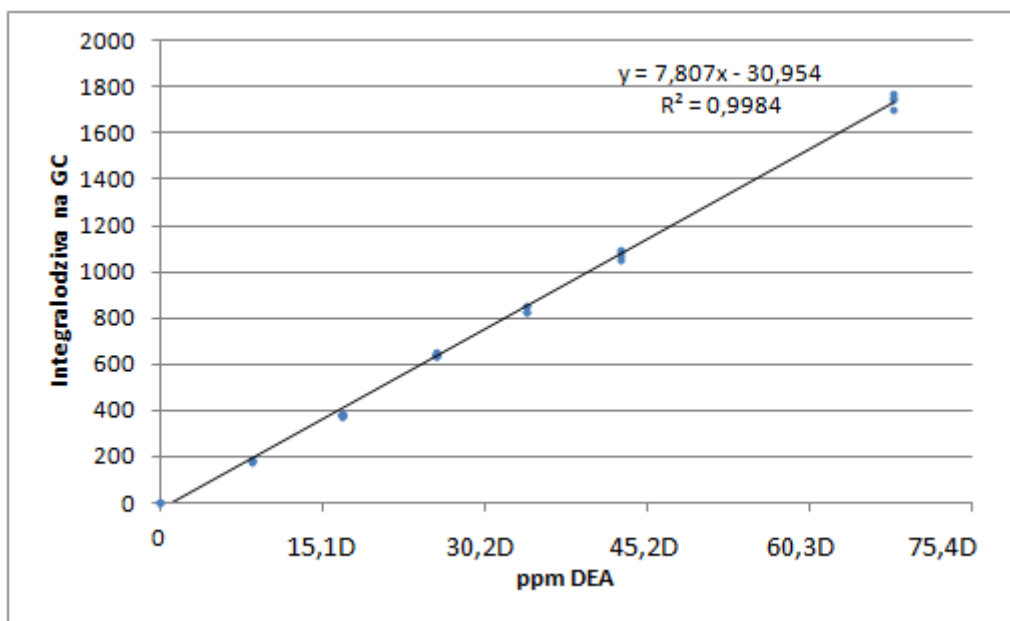
Teoretična koncentracija bis(2-dimetilaminoetil)metilamina v viali je bila 80 ppm (1 ppm = 1 mg ml⁻¹), pri tem sem dobil povprečni odziv na GC 512 enot z napako ± 5%.

V naslednjih opisih uporabljam dve vrsti podajanja koncentracij DEA, med katerima velja sledeča korelacija. Najprej sem pripravil 22,4B% modifikacijsko raztopino, ki je sestavljena iz DEA in etanola. Potem sem vzel 1 ml raztopine, ji dodal 1 ml kontrolne raztopine in dopolnil do oznake s 96% etanolom v 10 ml bučki. Nato sem preračunal, kolikšna je koncentracija DEA (v ppm) v tako pripravljenem vzorcu, in dobil rezultat 34,1D ppm. Vzorec sem na koncu še pomeril na GC. Koncentracija v ppm pomeni koncentracijo DEA v vzorcu za GC, medtem ko koncentracija v odstotkih pomeni koncentracijo DEA v modifikacijski raztopini, iz katere je bil vzorec pripravljen.

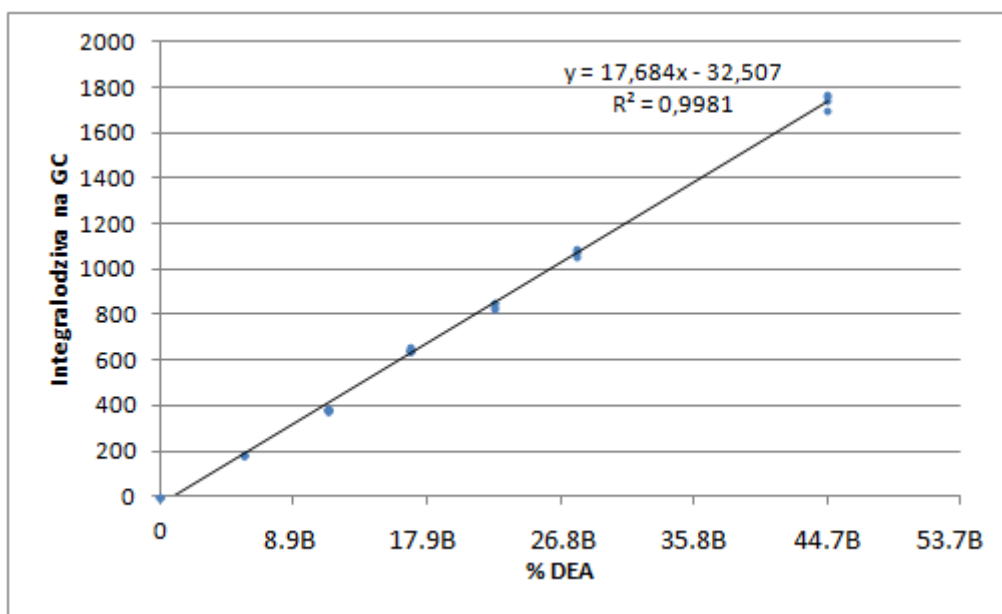
Tabela 2: Analiza rezultatov vzorcev za umeritveno krivuljo

Koncentracija DEA [%]	Koncentracija DEA [ppm]	Integral DEA	% DEA	ppm DEA	Integral DEA
0	0	0	22,4B	34,1D	849
0	0	0	22,4B	34,1D	850
0	0	0	22,4B	34,1D	831
0	0	0	22,4B	34,1D	827
5,6B	8,4D	182	28,0B	42,8D	1070
5,6B	8,4D	180	28,0B	42,8D	1056
5,6B	8,4D	182	28,0B	42,8D	1093
5,6B	8,4D	183	28,0B	42,8D	1085
11,2B	16,9D	383	44,7B	68,1D	1702
11,2B	16,9D	380	44,7B	68,1D	1770
11,2B	16,9D	380	44,7B	68,1D	1740
11,2B	16,9D	387	44,7B	68,1D	1758
16,8B	25,6D	640			
16,8B	25,6D	640			
16,8B	25,6D	642			
16,8B	25,6D	637			

Po analizi rezultatov sem dobil dve umeritveni krivulji z enačbama, ki prikazujeta razmerje med integriranim vrhom na GC in koncentracijo DEA v ppm (slika 14) in odstotkih (slika 15). Kot je razvidno iz tabele 2, višja kot je koncentracija DEA, večja so odstopanja pri integralu DEA. Vendar če spremljamo relativno napako, je približno enaka pri vseh koncentracijah.



Slika 14: Umeritvena krivulja: odvisnost površine kromatografskega vrha DEA od koncentracije DEA v viali [ppm]



Slika 15: Umeritvena krivulja: odvisnost površine kromatografskega vrha DEA od koncentracije DEA v modifikacijski raztopini [%]

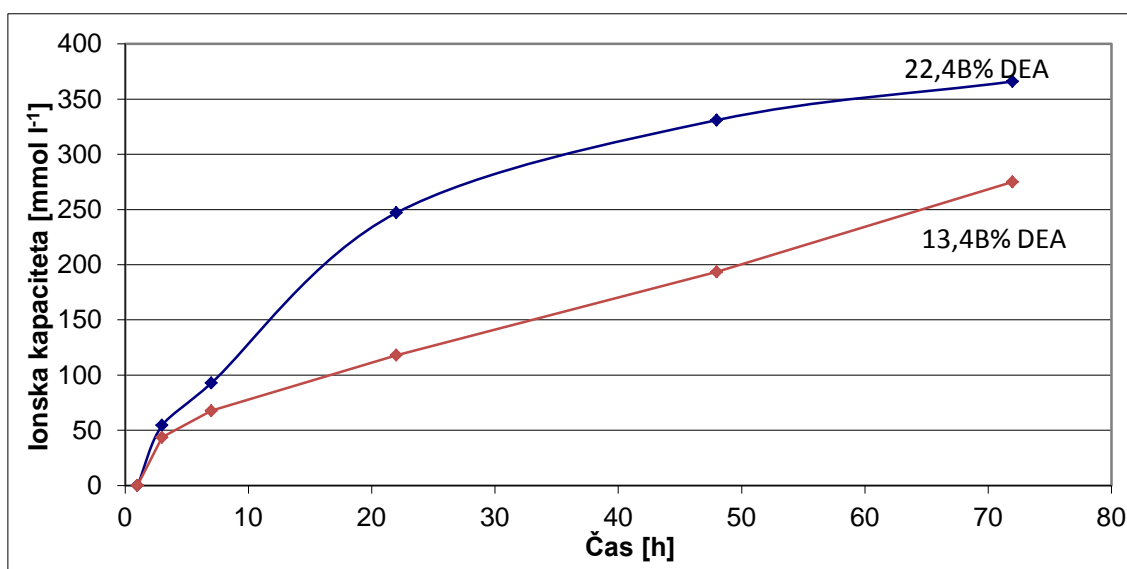
5.3 Kinetika reakcij modifikacije

S kinetiko reakcije sem določal optimalen čas za trajanje modifikacije 0,34 ml diskov z DEA. Kinetiko sem meril pri dveh pogojih, in sicer pri modifikacijah s 13,4B% in 22,4B% raztopino DEA. Diski so bili modificirani po postopku, opisanem v poglavju 4.4.1. Na diskih sem po modifikacijah izmeril ionsko kapaciteto. Ionska kapaciteta je posledica prisotnosti pozitivno nabitega liganda na monolitu, v tem primeru DEA. Posledično nam velikost ionske kapacitete posredno prikaže, koliko DEA se je vezalo na monolitni nosilec. Z drugimi besedami, poznamo korelacijo med masno konverzijo monolita in ionsko kapaciteto. Višja kot je masna konverzija, višja je ionska kapaciteta. Pri 50% masni konverziji (to pomeni, da je reagiralo 50% vseh prisotnih epoksi skupin) je npr. vrednost ionske kapacitete med 160 in 220 mmol l⁻¹. Ionska kapaciteta je tudi tehnološko merilo za ustreznost monolitov; kriterij za 0,34 ml diske je ≥200 mmol l⁻¹, za cevne module pa znaša 200 – 300 mmol l⁻¹. Ker je korelacija med masno konverzijo in ionsko kapaciteto znana že od prej, podajam v svojem diplomskem delu kot merilo učinkovitosti modifikacije le vrednosti ionske kapacitete.

Rezultati so prikazani v tabeli 3.

Tabela 3: Rezultati meritev kinetike reakcij modifikacij diskov pri 40°C

Čas modifikacije	Odstotek DEA	Povprečna ionska kapaciteta
1h	13,4B%	neizmerljivo nizka
1h	22,4B%	neizmerljivo nizka
3h	13,4B%	44 mmol l ⁻¹
3h	22,4B%	55 mmol l ⁻¹
7h	13,4B%	68 mmol l ⁻¹
7h	22,4B%	93 mmol l ⁻¹
22h	13,4B%	118 mmol l ⁻¹
22h	22,4B%	247 mmol l ⁻¹
48h	13,4B%	194 mmol l ⁻¹
48h	22,4B%	331 mmol l ⁻¹



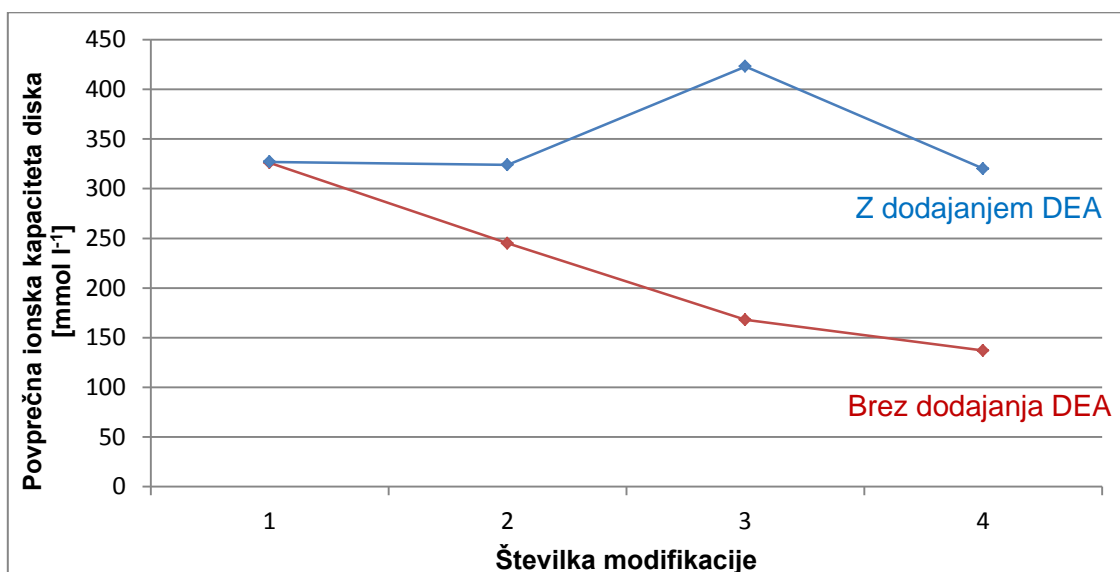
Slika 16: Kinetika reakcij modifikacij diskov pri 40°C

Kot je razvidno iz tabele 3, na diskih, ki so se modificirali eno uro, ni bilo možno izmeriti ionske kapacitete. Iz slike 16 je razvidno, da koncentracija DEA v modifikacijski raztopini vpliva na ionsko kapaciteto monolitov. Višja koncentracija DEA se odraža na hitrejši reakciji. Glavni del modifikacije poteče v 48 urah. Glede na to, da tudi modifikacija s 13,4B% raztopino DEA daje zadovoljive rezultate (izmerjene ionske kapacitete so v željenih mejah), sem za nadaljnje delo na cevnih modulih izbral postopek modifikacije s 13,4B% raztopino DEA, in sicer 48 ur. Čeprav so ionske kapacitete dosežene z modifikacijo v 22,4B% raztopini DEA višje, je pomembno tudi varčevanje z DEA, kar je tudi eden izmed ciljev moje naloge. Tako že v začetku prihranimo 8,9B% DEA, rezultati pa so vseeno zadovoljivi.

5.4 Modifikacije diskov s ponovno uporabo odpadne modifikacijske raztopine

S tem eksperimentom sem želel preizkusiti, če je možno odpadno raztopino DEA iz ene modifikacije kakorkoli uporabiti v naslednji modifikaciji. To sem preveril na dva načina, in sicer sem pri eni paralelki odpadno raztopino iz prve modifikacije neposredno uporabil na naslednjem disku (slika 17: rdeča krivulja), pri drugi paralelki pa sem prej pomeril koncentracijo DEA v raztopini in dodal toliko svežega DEA, da je koncentracija ponovno znašala toliko kot na začetku prve modifikacije (slika 17: modra krivulja). Tako je bila koncentracija DEA v modifikacijski raztopini po vsaki modifikaciji nižja, pri drugi paralelki pa je bila koncentracija DEA vedno enaka.

Kot izhodiščno raztopino za modifikacije diskov sem uporabil 22,4B% raztopino DEA v čistejšem etanolu. Glede na rezultate kinetike reakcij je bila višja koncentracija primernejša, saj sem tako lahko opravil več zaporednih modifikacij z isto raztopino. Če bi pri modifikacijah uporabil še višjo koncentracijo DEA, bi lahko modificiral več diskov, pri tem pa ne bi bilo izrazitega padca ionske kapacitete. Ker pa sem pri merjenju kinetike reakcij modifikacij uporabljal le 13,4B% in 22,4B% raztopino DEA, nisem imel podatkov o kinetiki za višje koncentracije, in zato modifikacije nisem izvajal z višjo koncentracijo DEA v modifikacijski raztopini.



Slika 17: Modifikacija diskov z DEA: Spreminjanje ionske kapacitete v odvisnosti od zaporedne modifikacije

Ionska kapaciteta pri četrty modifikaciji je brez dodajanja DEA že zelo nizka, kar je posledica dveh razlogov. Prvi je ta, da se ob vsaki modifikaciji del DEA veže na monolit in tako je koncentracija DEA v modifikacijski raztopini po vsaki modifikaciji nižja. Drugi razlog pa je redčenje, saj pri vsakem prečrpavanju in spiranju diska, v katerem je modifikacijska raztopina, pride do mešanja le-te z etanolom, s katerim je bil monolit predhodno spran. Že razlika v ionski kapaciteti med prvo in drugo modifikacijo je velika, zato sem tovrstni postopek modifikiranja opustil.

Bolj uporaben je drugi postopek, kjer sem po modifikaciji številka 1 izmeril koncentracijo DEA v raztopini, in nato dodal toliko čistega DEA, da sem dobil zahtevano začetno koncentracijo. Količina potrebnega DEA je bila izračunana po enačbah (3) in (4):

$$V_K = \frac{X_{MR} \cdot V_{MR} - X_{DEA} \cdot V_{MR}}{X_{DEA} - X_K} \quad (3)$$

$$V_{DEA} = V_K - V_{MR} \quad (4)$$

V_K = Končni volumen modifikacijske raztopine [ml]

X_{MR} = Delež DEA v modifikacijski raztopini po prečrpavanju diskov [%]

V_{MR} = Volumen modifikacijske raztopine po prečrpavanju [ml]

X_{DEA} = Delež DEA v raztopini, ki se jo doda (100%) [%]

X_K = Delež DEA, ki ga želimo v končni modifikacijski raztopini [%]

V_{DEA} = Volumen čistega DEA, ki ga moramo dodati v modifikacijsko raztopino [ml]

Nato sem modifikacijo ponovil na novih diskih. Postopek se je izkazal kot zelo učinkovit, saj je bila ionska kapaciteta bolj ali manj konstantna (slika 17). Odstopa le modifikacija tri, vendar je bilo pri tej modifikaciji z meritvijo na GC sistemu dokazano, da je bila narejena napaka pri pripravi modifikacijske raztopine. Koncentracija DEA je bila približno 26,8B%. Če upoštevam to, je posledično tudi ionska kapaciteta višja. Z eksperimentom sem dokazal, da morebitne nečistoče, ki se nabirajo v modifikacijski raztopini med zaporednimi modifikacijami, ne vplivajo na kinetiko in ne na mehanizem modifikacije epoksi monolitov.

Kot sem zapisal že v poglavju o modifikaciji diskov (4.3.1 in 4.3.2), sem diske modifikiral v zaprtih ohišjih. To pomeni, da je bilo za modifikacijo na voljo le toliko modifikacijske raztopine, kot je mrtvi volumen modifikacijskih ohišij, in sicer 0,29A ml, kar znaša 0,57C CV. Naredil sem tudi teoretični izračun, koliko DEA bi se porabilo za samo reakcijo z epoksi skupinami ob modifikaciji v zaprtem modifikacijskem ohišju, če bi reagiral 50% vseh epoksi skupin na monolitu.

Podatki:

$V(\text{modifikacijske raztopine v ohišju}) = 0,29A \text{ ml}$

$\text{Vol}(\text{DEA v modifikacijski raztopini}) = 0,224B$

$M(\text{DEA}) = 73 \text{ g mol}^{-1}$

$\rho(\text{DEA}) = 707 \text{ g l}^{-1}$

$n(\text{epoksi skupin v disku}) = 0,66 \text{ mmol (oznaka X)}$

Konverzija epoksi skupin = 0,5 (oznaka Z)

Najprej sem izračunal, koliko molov DEA je v 0,5 ml 22,4B% modifikacijske raztopine:

$$n_{DEA} = \frac{\rho_{DEA} \text{ g/l} \cdot V_{DEA} \text{ l} \cdot \text{vol}(\text{DEA v mod.r.})}{M(\text{DEA}) \text{ g/mol}} = 2,421 \text{ mmol} \quad (5)$$

Nato sem izračunal, koliko DEA je v presežku pri eni modifikaciji:

$$n_{DEA \text{ v presežku}} = n_{DEA \text{ mmol}} - X \text{ mmol} * Z = 2,091 \text{ mmol} \quad (6)$$

Izračunal sem še, koliko odstotkov DEA se porabi pri eni modifikaciji:

$$\eta_{DEA} = 1 - \frac{n_{DEA \text{ v presežku}} [\text{mmol}]}{n_{DEA} [\text{mmol}]} = 0,14 \quad (7)$$

Pri modifikaciji enega diska se torej porabi 14% prisotnega DEA. To pomeni, da je prebitna koncentracija DEA v modifikacijskem ohišju po modifikaciji najmanj 40%. Tako ostane še veliko nezreagirane DEA, ki se ga da uporabiti.

5.5 Modifikacije 8 ml cevnih modulov s prečrpavanjem

Mrtvi volumen modifikacijskih ohišji za 8 ml cevne module znaša približno 10,7A ml, kar je približno 0,76C CV. To je v primerjavi z mrtvim volumnom modifikacijskih ohišij za 0,34 ml diske v cevnih volumnih nekoliko več. To je sicer boljše, saj je zaradi tega na voljo več DEA v pribitku. Vendar problem pri modifikaciji cevnih modulov nastane zaradi oblike monolita. Pri diskah se, ko zapremo ohišja, modifikacijska raztopina razporedi čez celoten monolit. Pri cevnih modulih, ki imajo obliko plašča valja, pa je večji del modifikacijske raztopine v sredini. Tako se zgodi, da je notranja stran cevnega modula bolj modificirana kot zunanja stran. Zato je lahko monolit povsem neuporaben. Rešitev je, da se ohišje postavi v zaprti cikel in se tekom modifikacije cevni modul večkrat prečrpa z modifikacijsko raztopino. Tako se zagotovi, da je modifikacijska raztopina med modifikacijo razporejena preko celotnega monolita.

Pri modifikacijah s prečrpavanjem je bilo potrebno paziti predvsem na to, da je sistem popolnoma zaprt in zatesnjen na vseh mestih, kjer je bila možnost puščanja. Tako DEA, kot tudi etanol sta hlapna že pri sobnih pogojih, če pa je raztopina segreta na 40°C, pa je njun parni tlak še višji in posledično prihaja do izgub že zaradi hlapenja.

Pred modifikacijami sem naredil še teoretičen izračun, koliko DEA bi se porabilo za reakcijo, če bi reagiralo 50% uporabnih epoksi skupin na monolitu, kar teoretično ustreza ionski kapaciteti približno 160 mmol l⁻¹.

Podatki:

V(modifikacijske raztopine v sistemu) = 28,9A ml

Vol%(DEA v modifikacijski raztopini) = 0,13B

M(DEA) = 73 g mol⁻¹

ρ(DEA) = 707 g l⁻¹

□n(epoksi skupin v cevnem modulu) = 12,6 mmol (oznaka X)

Konverzija epoksi skupin = 0,5 (oznaka Z)

Najprej sem izračunal, koliko molov DEA je v 28,9A ml 13,4B% modifikacijske raztopine:

$$n_{DEA} = \frac{\rho_{DEA} \text{ g/l} * V_{DEA} \text{ l} * \text{vol}\%(DEA \text{ v mod.r.})}{M(DEA) [\text{g/mol}]} = 177 \text{ mmol} \quad (8)$$

Nato sem izračunal, koliko DEA je v presežku pri eni modifikaciji, če reagira 50% uporabnih epoksi skupin na monolitu:

$$n_{DEA \text{ v presežku}} = n_{DEA \text{ mmol}} - X \text{ mmol} * Z = 170,7 \text{ mmol} \quad (9)$$

Izračunal sem še, koliko odstotkov DEA se porabi pri eni modifikaciji:

$$\eta_{DEA} = 1 - \frac{n_{DEA \text{ v presežku [mmol]}}}{n_{DEA \text{ [mmol]}}} = 0,036 \quad (10)$$

Iz izračunov je razvidno, da se pri eni modifikaciji porabi približno 4% razpoložljivega DEA.

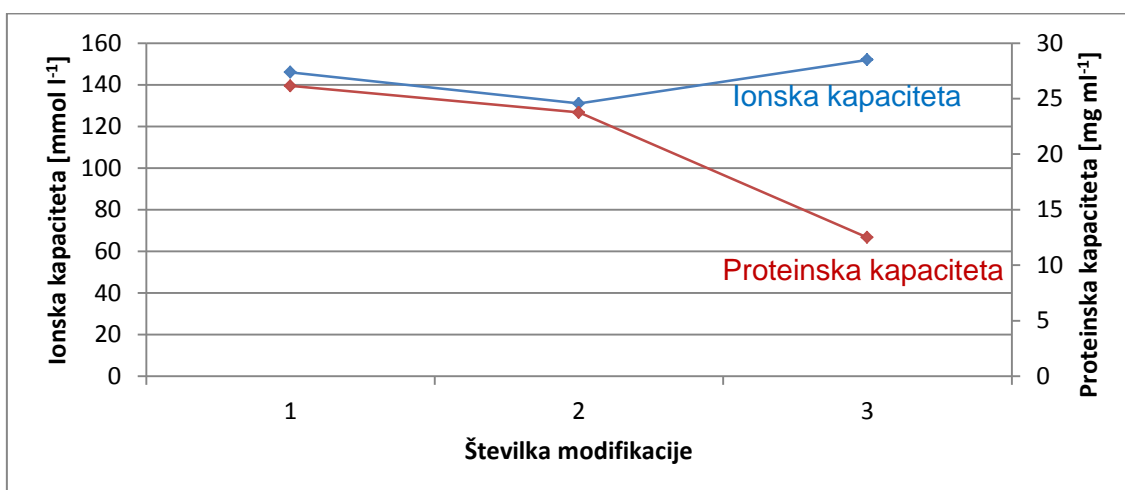
Modifikacije so potekale po podobnem principu kot modifikacije diskov z dodajanjem DEA, le da sem modifikacijsko raztopino med modifikacijo večkrat prečrpal skozi ohišje. Preden sem modifikacijo sploh začel, je bilo potrebno ohišje s cevnim modulom in samo modifikacijsko raztopino ogreti na 40°C. Količino DEA, ki ga je bilo potrebno dodati v raztopino, sem izračunal po enačbah (3) in (4).

Celoten poizkus sem začel s 14,4A ml 26,8B% raztopine. To sem prečrpal v modifikacijsko ohišje s cevnim modulom, predhodno prečrpano z EtOH. Mrtvi volumen sistema (cevke in modifikacijsko ohišje) je znašal 14,4A ml. Pred modifikacijo je bilo tako v sistemu 14,4A ml čistega etanola, po prečrpanju 14,4A ml 26,8B% DEA pa sem dobil 28,9A ml 13,4B% raztopine DEA, ki je potem krožila po zaprtem tokokrogu.

Pri vsaki naslednji modifikaciji pa sem celoten sistem dopolnil s 13,4B% modifikacijsko raztopino. Tako sem izpodrinil etanol, ki je ostal v sistemu po spiranju in preprečil, da bi se modifikacijska raztopina dodatno redčila. Izpodrinjen etanol sem zbiral v valj, tako sem lahko izmeril tudi koncentracijo DEA v izpodrinjenem etanolu. To je bilo preverjanje, da nisem skozi sistem prečrpal preveč modifikacijske raztopine, sicer bi etanol šel med odpadni etanol. Če pa bi vseboval še DEA, bi ga moral odložiti med odpadne amine, katerih prevzem, predelava in recikliranje je precej dražje.

Tabela 4: Ionske in proteinske kapacitete z DEA modificiranih 8ml cevnih modulov

Ekspiriment	Povprečna ionska kapaciteta cevnega modula	Povprečna proteinska kapaciteta cevnega modula
1	155 mmol l ⁻¹	26,15 mg ml ⁻¹
2	135 mmol l ⁻¹	23,75 mg ml ⁻¹
3	161 mmol l ⁻¹	12,5 mg ml ⁻¹



Slika 18: Primerjava ionskih in proteinskih kapacitet na cevnih modulih

Ionska kapaciteta in proteinska kapaciteta sta dobro povezani, a ne povsem neposredno (slika 18). Če pade ionska kapaciteta, pade tudi proteinska kapaciteta. Vzrokov za nizko proteinsko kapaciteto pri tretjem cevnem modulu je več. Zaradi večkrat uporabljene modifikacijske raztopine ni bilo mogoče več doseči ponovljive funkcionalizacije z DEA, saj so se posledično spremenile lastnosti modificirane kromatografske kolone. Vsekakor bi bilo to treba ponovno preveriti, preden bi lahko dokončno potrdili hipotezo. Kljub temu, da je pri tretjem poizkusu zaradi neznanega vzroka proteinska kapaciteta nizka, lahko v celoti vidimo, da je princip nove modifikacije deloval, saj je vsaj ionska kapaciteta v mejah pričakovanj. V tabeli 5 so predstavljene tudi spremembe v koncentraciji DEA v modifikacijski raztopini med eksperimenti.

Tabela 5: Koncentracije DEA v različnih stopnjah modifikacij

Eksperiment	Vzorec	Koncentracija modifikacijske raztopine DEA
1	Začetna raztopina (pred prečrpavanjem)	26,8B%
	Raztopina po 40 minutah modifikacije	13,0B%
	Raztopina po končani modifikaciji, vzeta iz cikla	11,2B%
	Koncentracija DEA v 100 ml etanola, pri drugem spiranju cevnega modula po modifikaciji	Ni bilo možno zaznati
2	Začetna raztopina (pred prečrpavanjem)	14,8B%
	Raztopina po končani modifikaciji, vzeta iz cikla	12,5B%
	Koncentracija DEA v 100ml etanola, pri drugem spiranju cevnega modula po modifikaciji	Ni bilo možno zaznati
3	Začetna raztopina (pred prečrpavanjem)	16,1B%
	Raztopina po končani modifikaciji, vzeta iz cikla	12,5B%
	Koncentracija DEA v 100ml etanola, pri drugem spiranju cevnega modula po modifikaciji	Ni bilo mogoče zaznati

Po starem postopku se je cevne module po modifikaciji prečrpalo s 150 ml etanola, da se je iz njih spralo DEA, ki se ni modificiral. Ta etanol je šel med odpadne amine. V mojem primeru sem cevne module najprej prečrpal s 35 ml etanola, jih 30 minut pustil v etanolu in jih nato prečrpal še z 10 ml etanola, ter še dodatno s 100 ml etanola. Pri tem sem v prvih 45 ml pričakoval tudi DEA, medtem ko je bila prisotnost DEA manj verjetna v 100 ml etanola, s katerim sem monolit spiral nazadnje. Izkazalo se je, da DEA v zadnjih 100 ml etanola ni bilo dovolj, da bi ga GC zaznal.

V odpadnem etanolu, s katerim sem spirala cevni modul po modifikaciji, instrumentalno ni bilo mogoče zaznati DEA, zato sem zaključil, da je etanol primeren za odlaganje kot odpadni proizvod. S prirejenim postopkom se je količina odpadnih aminov močno zmanjšala.

Vzrok za razliko v odstotkih DEA v modifikacijski raztopini je najverjetneje napaka pri pripravljanju vzorca, nekaj pa doda še merilna negotovost GC sistema. Iz podatkov o eksperimentu 1 je razvidno, da se je raztopina po 40 minutah že dobro premešala in razredčila, tako da s tem, ko smo na začetku dodali 14,4A ml 26,8B% raztopine DEA, ni bilo narejene nobene napake. Razvidno je tudi, da po modifikaciji koncentracija DEA v raztopini pade za približno 2,2B%.

V tabeli 6 so navedeni porabljeni volumni DEA ter etanola pri eksperimentu s cevnimi moduli.

Tabela 6: *Volumni porabljenega DEA in etanola po modifikacijah*

Modifikacija	1	2	3
Volumen dodanega DEA	8,7A ml	1,2A ml	5,0A ml
Volumen dodanega EtOH	5,8A ml +14,4A ml (že v sistemu)	2,3A ml	0 ml
Volumen modifikacijske raztopine pred začetkom prečrpavanja	28,9A ml	28,9A ml	31,0A ml
Volumen modifikacijske raztopine po koncu prečrpavanja	25,4A ml	26,6A ml	30,0A ml
Razlika med začetnim in končnim volumnom modifikacijske raztopine	3,5A ml	2,3A ml	1,0A ml

Poraba DEA je največja pri prvi modifikaciji. Predvsem pri prvih dveh eksperimentih je opaziti primanjkljaj modifikacijske raztopine (3,1B-5,4B%). Delni vzrok za tako razliko je hlapenje DEA in etanola, saj kljub dobro zatesnjenemu sistemu raztopina še vedno hlapi, predvsem pri spojih. Do napake je lahko prišlo tudi pri prečrpavanju z etanolom, (izpodrivanje modifikacijske raztopine iz sistema), saj je lahko nekaj modifikacijske raztopine ostalo tudi v sistemu, modifikacijska raztopina se lahko ob spiranju z etanolom tudi razredči. Za primanjkljaj DEA pa je eden izmed pomembnih razlogov tudi sama poraba DEA v modifikaciji, saj se pri modifikaciji porabi 4% celokupne DEA, kar pri 8 ml koloni znaša približno 0,29A ml porabljenega DEA.

5.6 Prihranki

Prihranke so izračunani za poizkus z 8 ml cevnimi moduli, saj sem samo tam natančno spremljal porabljene količine surovin. Skupna poraba DEA v poizkusu znaša 14,9A ml. Če bi za vsako modifikacijo pripravil novo modifikacijsko raztopino, bi pri tem porabil 26,1A ml DEA. Iz tega lahko izračunam prihranek, ki znaša 11,2A ml na 3 modifikacije, kar v odstotkih predstavlja 43%. Če prihranek preračunam v veljavno valuto, to znaša približno 0,55€ na modifikacijo ene 8 ml kolone. Če to apliciram na večje kolone, kjer je tudi poraba DEA bistveno večja, lahko pridemo do bistvenih prihrankov. Tudi prihranek etanola je bil velik, saj sem ga za pripravo raztopin namesto 60,6A ml porabil 22,5A ml, kar v odstotkih znaša 63% prihranka.

Velja omeniti tudi prihranek pri odpadnih kemikalijah, saj je pri samih postopkih modifikacije nastalo le toliko odpadnih aminov, kot se jih je zavrnilo po zadnji modifikaciji. Drugače se je celotna raztopina uporabila pri naslednji modifikaciji. Nekaj odpadnih aminov je nastalo še pri spiranju cevnega modula po modifikaciji, in sicer pri

vsakem cevnem modulu 45 ml. Kot je razvidno iz tabele 5, po dodatnem spiranju s 100 ml etanola, v frakciji spiranja ni bilo več prisotnih aminov. Če zaokrožimo, je pri vsaki modifikaciji nastalo v povprečju 46,8 ml manj odpadnih aminov kot pri starem postopku. V odstotkih to znaša 51%. Cena za odvoz odpadnih aminov je 0,85 € l⁻¹ (brez DDV). Če to apliciramo na večje kolone, se seveda prihranek linearno poveča.

Vsota prihrankov DEA, EtOH in odpadnih aminov za proizvodnjo ene 8 ml kolone 0,72€. To pomeni 0,09€ ml⁻¹ monolita. V tabeli 7 je prikazana teoretična linearna ekstrapolacija prihrankov pri modifikacij kolon. Prihranek pri 8 l koloni znaša 720 €. Pri izračunu prihrankov sicer nisem upošteval dela, vendar je dejstvo, da količina dela ne korelira z naraščajočim volumnom monolita, zato pri velikih monolitih zanemarljivo vpliva na sam strošek proizvodnje.

Tabela 7: Linearna ekstrapolacija prihrankov pri modifikacij kolon

Volumen kolone	0,1 ml	0,34 ml	1 ml	8 ml	80 ml	800 ml	8000 ml
Prihranek DEA	0,06A ml	0,18A ml	0,54A ml	4,3A ml	43A ml	430A ml	4,3A l
Prihranek EtOH	1,4 ml	4,7 ml	14 ml	110 ml	1,1 l	11 l	110 l
Prihranek odpadnih aminov	0,6 ml	2 ml	5,9 ml	46,8 ml	468 ml	4,7 l	47 l
Skupen prihranek	0,009 €	0,03 €	0,09 €	0,72 €	7,2 €	72 €	720 €

6 ZAKLJUČKI

Modifikacije 0,34 ml diskov bi se lahko izvajalo po postopku, kjer bi modifikacijsko raztopino uporabili večkrat, pri tem pa bi pred vsako modifikacijo raztopino dopolnili z čistim DEA do zelene koncentracije. Natančnih podatkov o prihrankih sicer ni, vendar je dejstvo, da prihranki pri reagentih so. Večja težava novega postopka modifikacije je količina dela, ki jo je treba opraviti. Potrebno je pripraviti raztopine za GC, sprotno je treba izvajati meritve koncentracij, pojavlja pa se tudi problem nabiranja nečistoč v modifikacijski raztopini med modifikacijami. Pri vsaki naslednji modifikaciji je možnost za onesnaženje modifikacijske raztopine večja. Če pod celoten eksperiment na 0,34 ml diskih potegnem črto, tovrsten način modifikacije za posamezne diske ni primeren. Če pa bi naenkrat modificirali več diskov, bi bila uporaba novega postopka upravičena.

Izkazalo se je, da pri modifikaciji 8 ml kolon z novim modifikacijskim postopkom nastanejo večji prihranki. Pri tem priprava GC raztopin in merjenje koncentracij reagentov ne predstavljata težav, zato je dodatno delo upravičeno. Problem bi bile le nečistoče, ki bi se v raztopini nabirale med modifikacijami. Rezultati so pokazali, da so prihranki pri DEA do 43%, s tem da prihranimo tudi na etanolu in pa posledično tudi pri odvozu odpadnih kemikalij. Poraba etanola je nižja tudi do 63%. Prihranki pri 8 ml kolonah morda niso veliki, vendar če bi postopke modifikacije uvedli tudi na večjih kolonah, 43% prihranek DEA pomeni bistveno nižji proizvodni strošek kolone.

Pri svoji diplomski sem uspešno optimiziral postopek modifikacije 8 ml kolon, optimiziran postopek modifikacije 0,34 ml diskov pa bi prišel v poštev ob enkratnem večjem številu modificiranih diskov.

7 VIRI

- Barut M., Podgornik A., Merhar M., Štrancar A. v: Švec F., Tennikova T.B., Deyl Z. (editors). 2003. Monolithic Materials: preparation, properties and applications. Elsevier. Amsterdam: 51-75
- Barut M., Podgornik A., Urbas L., Gabor B., Brne P., Vidič J., Plevčak S., Štrancar A. 2008. Methacrylate-based short monolithic columns: Enabling tools for rapid and efficient analyses of biomolecules and nanoparticles. Journal of Separation Science, Vol. 31 (11): 1867-1880
- Beneš M. J., Horák D., Švec F. 2005. Methacrylate-based chromatographic media. Journal of Separation Science, Vol. 28 (15): 1855-1875
- Edgar T. F., Himmelblau D. M., Lasdon L. 2001. Optimization of Chemical Processes 2nd Edition. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Frankovič V. 2009. Vpliv funkcionalizacij in struktru metakrilatnih monolitov na pretočnost in kapacitete za različno velike molekule. Doktorska disertacija, Ljubljana: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
- Gas Chromatography: Theory, analysis and methods of gas liquid chromatography, dosegljivo na spletu dne 29.8.2012: <http://www.gas-chromatography.net/gas-chromatography.php>
- Hazardous Substance Fact Sheet – Diethylamine. 2005. New Jersey Department of Health and Senior Services
- Lendero N., Vidič J., Brne P., Frankovič V., Štrancar A., Podgornik A. 2008. Characterization of ion exchange stationary phases via pH transition profiles. Journal of Chromatography A, 1185: 59-70
- Lokar B. 2011. Optimizacija uporabe reagentov pri funkcionalizaciji CIM monolitnih kromatografskih nosilcev. Diplomsko delo, Nova Gorica: Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za znanosti o okolju
- Mihelič I., Nemeč D., Podgornik A., Koloini T. 2005. Pressure drop in CIM disk monolithic columns. Journal of Chromatography A, 1065: 59-67
- Lutteroti S. 2002. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu: Farmaceutsko-biokemijski fakultet
- Neurath G. B., Dünger M., Pein F. G., Ambrosius D., Schreiber O. 1976. Primary and secondary amines in the human environment. Food and Cosmetics Toxicology, Vol. 15 (4): 275-282
- Novak J. 1988. Quantitative analysis by gas chromatography, 2nd edition. Dekker. M, New York.
- Olivieri A., Rico D., Khiari Z., Henahan G., O'Sullivan J., Tipton K. 2011. From caffeine to fish waste: amine compounds present in food and drugs and their

interactions with primary amine oxidase. *Journal of Neural Transmission*, Vol. 118 (7): 1079-1089

- Podgornik A., Štrancar A. 2005. Convective Interaction Media[®] (CIM) – Short layer monolithic chromatographic stationary phase. *Biotechnology Annual Review*, Vol. 11: 281-333
- Resolucija o nacionalnem programu za kemijsko varnost z akcijskimi načrti za prednostna področja v obdobju 2006 – 2010 (ReNPKV), Uradni list republike Slovenije, 119/2006, 12519-12619
- Sander J. 1971. Untersuchungen über die Entstehung cancerogener Nitroverbindungen im Magen von Versuchstieren und ihre Bedeutung für den Menschen. *Arzneimittel-Forsch*, Vol. 21: 1572-1580, 1707-1713 & 2034-2039
- Simonič M. 2011. Vezava 2-aliloksietanola na CIM[®] epoksi monolite in njihova karakterizacija. Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
- Vidič J. 2009. Mehanska in kemijska stabilnost kromatografskih metakrilatnih monolitov in njihova miniaturizacija. Doktorska disertacija. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
- Žorž M. 1991. HPLC, Ljubljana: samozaložba