

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**OPTIMIZACIJA UPORABE REAGENTOV PRI
FUNKCIONALIZACIJI CIM MONOLITNIH
KROMATOGRAFSKIH NOSILCEV**

DIPLOMSKO DELO

Blaž LOKAR

Mentor: dr. Peter Brne

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.

Blaž Lokar

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju dr. Petru Brnetu za ves trud, nasvete in pomoč pri nastajanju diplomskega dela. Prav tako se zahvaljujem vsem sodelavcem podjetja BIA Separations d.o.o. za vse praktične nasvete, pomoč in prijetno delovno okolje. Še posebej bi se rad zahvalil doc. dr. Alešu Štrancarju za zaupanje in za možnost opravljanja diplomskega dela, Boštjanu Koširju za nasvete pri tehničnih problemih in Sašu Plevčaku za napotke pri delu s HPLC sistemi.

POVZETEK

Trimetilamin je hlapen alifatski amin z nizko molekulsko maso in z značilnim neprijetnim vonjem. Izpostavljenost trimetilaminu je problematična, saj je strupen. Trimetilamin se uporablja tudi pri izdelavi ionskih izmenjevalcev. V raziskavi smo želeli čim bolj racionalizirati uporabo trimetilamina pri proizvodnji Convective Interaction Media[®] QA monolitnih nosilcev. Racionalizacijo smo poskušali doseči s funkcionalizacijo, pri kateri je bilo v raztopini prisotnega manj reagenta. Najprej smo raziskovali mehanizme funkcionalizacije Convective Interaction Media[®] monolitnih nosilcev s kvarternim aminom, na nosilcih volumna 1 mL. Določali smo najoptimalnejše in robustne pogoje za funkcionalizacijo z optimizacijo uporabljene koncentracije reagentov, temperature in časa funkcionalizacije. Stopnjo funkcionaliziranosti Convective Interaction Media[®] QA nosilcev smo preverjali z uporabo metod prehodnega pH. Tako smo določili postopek, ki je po porabi reagenta in učinkovitosti optimalen za funkcionalizacijo Convective Interaction Media[®] monolitnih nosilcev s kvarternim aminom. Ustreznost metode za funkcionalizacijo smo nato preverili tudi na večjih (8 mL in 80 mL) Convective Interaction Media[®] monolitnih kolonah. Na koncu smo primerjali porabo reagenta pri uveljavljeni funkcionalizaciji in pri optimizirani funkcionalizaciji. Prihranek reagenta je pri optimizirani funkcionalizaciji CIM QA-1mL kolon znašal 50 %, pri CIM QA-8 mL 21 %, pri CIM QA-80 mL pa 47 %.

KLJUČNE BESEDE:

Trimetilamin, Convective Interaction Media[®], funkcionalizacija, metoda prehodnega pH, optimizacija

SUMMARY

Trimethylamine is a volatile aliphatic amine of low molecular weight and typical unpleasant odor. Exposure to trimethylamine is problematic, because trimethylamine is toxic. Trimethylamine is used in production of ion exchangers. In this study we wanted to rationalize the use of trimethylamine in the production of Convective Interaction Media® QA monolithic media as much as possible. We tried to achieve rationalization by using low concentrated solution of reagent. First, we investigated the mechanisms for functionalization of 1 mL Convective Interaction Media® monolithic media with quaternary amine. We determined optimal and the most robust conditions for the functionalization, by optimizing concentration of reagent, temperature and time of functionalization. Rate of functionalization of Convective Interaction Media® QA media was tested using the transitional pH method. In that way we establish a process which is optimal in reagent consumption and efficiency for functionalization Convective Interaction Media® monolithic media with quaternary amines. Relevance of functionalization methods was then tested on larger (8 mL and 80 mL) Convective Interaction Media® monolithic columns. In the end we compared the reagent consumption in the established functionalization and the reagent consumption in optimized functionalization. New, optimized method for functionalization of CIM QA-1mL columns was 50% more efficient than established method, in case of CIM QA-8mL the efficiency was higher for 21% and in case of CIM QA-80mL 47% higher.

KEYWORDS:

Trimethylamine, Convective Interaction Media®, functionalization, pH transition method, optimization

SEZNAM UPORABLJENIH KRATIC

TMA	Trimetilamin
CIM	Convective Interaction Media®
QA	Kvarterni amin, angl. <i>quaternary amine</i>
GMA	Glicidil metakrilat
EDMA	Etilen dimetakrilat
BSA	Goveji serumski albumin, angl. <i>bovine serum albumin</i>
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, angl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
TMACI	Trimetilamin klorid

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
2	TEORETIČNE OSNOVE	3
2.1	Ionska kromatografija.....	3
2.1.1	Separacije makromolekul na ionsko izmenjevalnih kolonah	4
2.1.2	Vrste ionskih izmenjevalcev	5
2.1.3	Lastnosti dobrega ionskega izmenjevalca za separacijo večjih biomolekul ..	5
2.2	Vrste kromatografskih nosilcev	6
2.2.1	Porozni delci.....	6
2.2.2	CIM Monoliti	6
2.2.3	Sinteza in zgradba CIM nosilcev	7
2.3	Funkcionalizacija CIM monolitnih nosilcev	8
2.4	Preverjanje stopnje funkcionalizacije CIM QA nosilca	9
2.4.1	Ionska kapaciteta	10
2.4.2	Dinamična vezavna kapaciteta za makromolekule	11
3	MATERIALI IN METODE	13
3.1	Materiali	13
3.2	Metode	15
3.2.1	Določanje mrtvih volumnov ohišij uporabljenih pri funkcionalizaciji 1 mL, 8 mL in 80 mL CIM monolitov	15
3.2.2	Postopek funkcionalizacije CIM monolitov.....	16
3.2.3	Merjenje ionske kapacitete	19
3.2.4	Merjenje dinamične vezavne kapacitete za BSA	20
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	22
4.1	Mrtvi volumni ohišij, uporabljenih pri funkcionalizaciji 1 mL, 8 mL in 80 mL CIM monolitov.....	22
4.2	Funkcionalizacija 1 mL CIM kolon s TMACl	22
4.2.1	Funkcionalizacija 1 mL CIM kolon pri X °C in X+10 °C s končno količino in konstantno koncentracijo TMACl	22
4.2.2	Funkcionalizacija CIM Epoksi 1 mL kolon pri X+10 °C (9,01Z ur) s končno in neskončno količino TMACl.....	26
4.2.3	Odklonskost ionske kapacitete CIM QA nosilca od porabe TMACl.....	28
4.3	Aplikacija novega načina funkcionalizacije na večjih CIM monolitnih kolonah.....	32
4.3.1	Funkcionalizacija 8 mL enote	32
4.3.2	Funkcionalizacija 80 mL enote	34
4.4	Primerjava porabe reagenta pri starem in optimiziranem postopku funkcionalizacije	36
5	ZAKLJUČKI	37
6	VIRI	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Separacija makromolekul	4
Slika 2: Anionski in kationski izmenjevalec	5
Slika 3: Porozni delec	6
Slika 4: SEM (Scanning Electron Microscope - Vrstični elektronski mikroskop) posnetek poli(glicidil metakrilat-ko-etilen dimetakrilat)-a.	7
Slika 5: Sinteza in zgradba GMA-EDMA CIM monolitnega nosilca	8
Slika 6: Funkcionalizacija površine CIM monolitnega nosilca s TMA	9
Slika 7: Kromatogram meritve ionske kapacitete z razlago	11
Slika 8: Prikaz vezave majhnih in velikih molekul na površino kromatografskega nosilca	12
Slika 9: Kromatogram meritve dinamične vezavne kapacitete za BSA (prebojne krivulje) z razlago poteka	12
Slika 10: Shema HPLC sistemov, uporabljenih pri delu (pri merjenju ionske in dinamične vezavne kapacitete za BSA injicirni ventil ni bil povezan na sistem)....	14
Slika 11: Kromatografska ohišja 1 mL, 8 mL in 80 mL enote	14
Slika 12: A) Normalen odziv na pulzno motnjo; B) Bradičenje (angl. fronting); C) Repičenje (angl. tailing)	16
Slika 13: Kromatogram meritve pulzne motnje z označenim zadrževalni časom acetona	17
Slika 14: Prikaz funkcionalizacije CIM monolita v reagenčni steklenici	18
Slika 15: Kromatogram meritve ionske kapacitete	20
Slika 16: Kromatogram meritve dinamične vezavne kapacitete za BSA	21
Slika 17: Odvisnost ionske in dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 1 mL kolon od časa funkcionalizacije ($T = X \text{ }^\circ\text{C}$; $c(\text{TMACl}) = 1,81y \%$)	24
Slika 18: Odvisnost ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 1 mL kolon od časa funkcionalizacije ($T = X + 10 \text{ }^\circ\text{C}$; $c(\text{TMACl}) = 1,81Y\% \text{ TMACl}$)	25
Slika 19: Odvisnost ionske kapacitete CIM QA 1 mL kolon od časa funkcionalizacije ($T = X \text{ }^\circ\text{C}$ in $X + 10 \text{ }^\circ\text{C}$; $c(\text{TMACl}) = 1,81Y\% \text{ TMACl}$)	26
Slika 20: Odvisnost ionske kapacitete CIM QA 1 mL kolon od koncentracije raztopine TMACl ($t = 9,01Z \text{ h}$; $T = X + 10 \text{ }^\circ\text{C}$)	27
Slika 21: Odvisnost ionske kapacitete CIM QA 1 mL kolon od mase TMACl na volumen CIM monolita ($t = 9,01Z \text{ h}$; $T = X \text{ }^\circ\text{C}$)	30
Slika 22: Odvisnost dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 1 mL kolon od mase TMACl na volumen CIM monolita ($t = 9,01Z \text{ h}$; $T = X \text{ }^\circ\text{C}$)	31
Slika 23: Dimenzije CIM Epoxy 8 mL monolita	32
Slika 24: Dimenzije CIM Epoxy 80 mL monolita	34

KAZALO TABEL

Tabela 1: Tabela ionskih izmenjevalcev	6
Tabela 2: Uporabljene kemikalije	13
Tabela 3: HPLC za delo z 1 mL kolonami	13
Tabela 4: HPLC za delo z 8 mL kolonami	13
Tabela 5: HPLC za delo z 80 mL kolonami	14
Tabela 6: Tabela rezultatov tehtanja pri določanju mrtvega volumna 1 mL, 8 mL in 80 mL ohišij za funkcionalizacijo	22
Tabela 7: Ionske kapacitete na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X °C z 1,81Y % TMACl reagentom – povzetek vseh meritev	23
Tabela 8: Dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X °C z 1,81Y % TMACl reagentom – povzetek vseh meritev	23
Tabela 9: Ionske kapacitete na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X+10 °C z 1,81Y % TMACl reagentom – povzetek vseh meritev	24
Tabela 10: Dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X+10 °C z 1,81Y % TMACl reagentom – povzetek vseh meritev.....	25
Tabela 11: Ionske kapacitete CIM QA1 mL kolon, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X+10 °C z reagenti različne koncentracije	27
Tabela 12: Dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 1 mL kolon, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X+10 °C z reagenti različne koncentracije	28
Tabela 13: Povzetek ionskih kapacitet na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X °C z reagenti različne koncentracije	29
Tabela 14: Dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 1 mL kolon, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X °C z reagenti, različnih koncentracij	30
Tabela 15: Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 8 mL kolon, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X °C.....	34
Tabela 16: Tabela primerjave porabe reagenta pri starem in optimiziranem postopku funkcionalizacije.....	36

1 UVOD

Trimetilamin (TMA) je majhna polarna molekula, ki lahko tvori soli in/ali hidrate. Je hlapen alifatski amin z nizko molekulsko maso in značilnim neprijetnim vonjem, ki spominja na razkrajajoče ribe [1]. Od odkritja in prve sinteze TMA pred več kot 150 leti [2] pa do danes je bil identificiran v mnogih živalskih in rastlinskih tkivih. Skupaj z nekaterimi drugimi amini je razpadni produkt organskega materiala, ki vsebuje dušik. Uporablja se v proizvodnji kvarternih amonijevih soli. TMA se uporablja v proizvodnji insekticidov, poznana pa sta še njegova protivirusna aktivnost in sposobnost privabljanja nekaterih insektov, uporablja pa se tudi kot odorant v jeklenkah gospodinjskega plina [3].

Izpostavljenost TMA je lahko problematična iz industrijskih in naravnih virov, saj je TMA strupen. Študije akutne strupenosti z vnosom snovi preko dihal (z inhalacijo), ki so bile narejene na miših, so pokazale, da TMA povzroča depresijo, moteno koordinacijo, v najhujših primerih pa nastopi tudi smrt, in sicer kot posledica močnih mišičnih krčev. Kronična izpostavljenost se odraža v spremembah delovanja živčnega sistema in žlez z notranjim izločanjem [4]. Večkratno vbrizgavanje TMA v podkožje brejih miši je delovalo zaviralno na rast mladičev, in sicer selektivno. V rasti so zaostajali le moški potomci, saj TMA najverjetneje zavira sintezo testosterona [5]. Na primeru morskega prašička je bilo dokazano, da TMA povzroča krče na vitem črevesu [6]. V primerih nesreč s TMA sta bila pri ponesrečencih, ki so vdihavali hlape TMA, prisotna slabost in glavobol. Resne opekline na koži in očeh pa so se pojavile pri tistih, ki so prišli v stik z visoko koncentriranimi raztopinami TMA [7]. TMA zlahka prehaja kožo in preko nje prehaja v krvni obtok [8]. TMA je lahko metabolno oksidiran v trimetilamin N-oksid $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$ ali pa encimsko demetiliran v dimetilamin $(\text{CH}_3)_2\text{NH}$, ta pa lahko prehaja v dimetilnitrozamin $(\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{O})$, ki je dokazano rakotvoren [9].

Convective Interaction Media[®] (CIM) monolit je enovita (makro)molekula s skrbno kontroliranimi strukturnimi lastnostmi, pripravljena s polimerizacijo v masi [10], ki je zgrajena iz med seboj združenih mikronskih kroglic [11]. Med mikronskimi zrni so večje in manjše pore. CIM nosilci so bili prvotno narejeni za čiščenje in ločevanje biomolekul («Short Monolithic Columns» [12].

S funkcionalizacijo kromatografskih nosilcev spremenimo površino osnovnega skeleta in tako spremenimo lastnosti samega kromatografskega nosilca. Tako lahko dobimo nosilce, primerne za ionsko izmenjevalno kromatografijo, nosilce za kromatografijo na obrnjeni fazi, nosilce za afinitetno kromatografijo [13] in nosilce za druge manj pogoste vrste kromatografije.

Pri izdelavi ionskih izmenjevalcev se uporabljajo tudi trimetilamini [14], ki dražijo oči, kožo in dihalni sistem [15], klasificirani pa so kot nevarni odpadki [16]. Zato ima optimizacija uporabe trimetilaminov pri funkcionalizaciji kromatografskih nosilcev pomembno vlogo pri obremenjevanju okolja, saj se tako izogibamo neučinkoviti izrabi reagentov.

Namen mojega diplomskega dela je bil čim bolj racionalizirati uporabo TMA pri proizvodnji CIM QA (kvarterni amin, angl. *quaternary amine*) monolitnih nosilcev. Racionalizacijo lahko dosežemo z reciklažo reagentov ali pa z metodo, pri kateri je po funkcionalizaciji prisotnega v raztopini malo reagenta.

Diplomsko delo je sestavljeno iz dveh delov.

V prvem delu smo raziskovali mehanizme funkcionalizacije CIM monolitnih nosilcev s kvarternim aminom (QA). Na nosilcih volumna 1 mL smo določali najbolj optimalne in robustne pogoje za funkcionalizacijo. Optimirali smo sledeče parametre:

-koncentracijo reagentov

-temperaturo

-čas funkcionalizacije

Stopnjo funkcionaliziranosti CIM QA nosilcev smo preverjali z uporabo metod prehodnega pH [17].

Po končanem prvem delu smo določili postopek, ki je optimalen (po porabi reagenta in učinkovitosti) za funkcionalizacijo CIM monolitnih nosilcev z QA. V drugem delu pa smo ustreznost metode za funkcionalizacijo preverili tudi na večjih (8 mL in 80 mL) CIM monolitnih kolonah.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Ionska kromatografija

Kromatografske metode so analitske tehnike in preparativne - industrijske tehnike, ki spadajo med separacijske metode in se v analizni kemiji uporabljajo za kvalitativno in kvantitativno določevanje analitov v vzorcih, v industriji pa za čiščenje in izolacijo ciljnih molekul/proteinov in kompleksnih vzorcev. Kromatografski sistem sestavljata mobilna in stacionarna faza. Za vse kromatografske ločitve velja, da je vzorec raztopljen v mobilni fazi, ki je lahko plin, tekočina ali superkritični fluid. Osnova delovanja vseh kromatografskih sistemov je porazdelitev analita med mobilno in stacionarno fazo, pri tem pa se mobilna in stacionarna faza ne smeta mešati oziroma raztapljati druga v drugi [18].

Ionsko izmenjevalna kromatografija je predstavnica tekočinske kromatografije. Glavni element v ionsko izmenjevalni kromatografiji predstavlja kolona, ki je napolnjena z ionskim izmenjevalcem, ki ga imenujemo nosilec (stacionarna faza). Mobilno fazo črpamo preko kolone s črpalkami. Komponente vzorca, ki ga injiciramo na kolono, različno hitro potujejo skozi kolono, zato se iz nje ločeno eluirajo, saj ionsko izmenjevalna kromatografija temelji na interakciji, ki je bila prva uporabljena pri separaciji makromolekul. To je med nabitimi makromolekulami v raztopini in nasprotno nabitimi funkcionalnimi skupinami molekul, kovalentno vezanih na kromatografski nosilec [19].

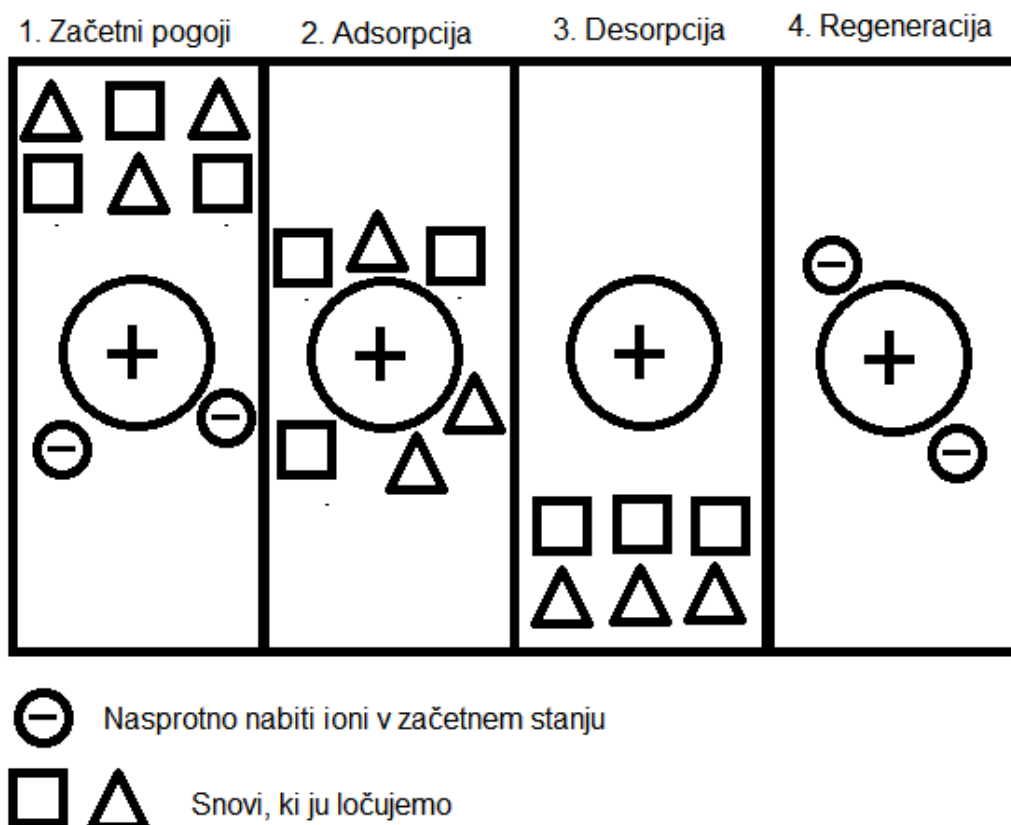
Ločbo lahko zaznamo z različnimi detektorji. Za detekcijo proteinov se ponavadi spremlja absorpcijo svetlobe v različnih delih spektra. Električni signali, ki jih posreduje detektor, se v vmesniku pretvorijo v digitalen zapis in se kažejo kot vrhovi, na krivulji, ki jo imenujemo kromatogram, se ta izrisuje tako, da je na osi x podan čas, na osi y pa odziv detektorja. Čas, potreben, da posamezna komponenta pri idealnih pogojih preteče skozi kolono, imenujemo zadrževalni čas. Pri določenih pogojih je zadrževalni čas za vsako komponento konstanta. Na osnovi primerjave teh časov z zadrževalnimi časi znanih spojin lahko ugotovljamo kvalitativno sestavo vzorca. Površina vrha pa je sorazmerna koncentraciji in nam daje kvantitativno informacijo. V praksi poskušamo doseči čim boljše ločitev v čim krajšem času z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema. Za uspešno kromatografsko ločitev je potrebno poiskati kompromis med ločljivostjo med posameznimi vrhovi, hitrostjo ločitve in kapaciteto kolone [18].

Ionsko izmenjevalna kromatografija je nepogrešljiva v industrijskih zaključnih procesih izolacije in čiščenja proteinov, peptidov, nukleinskih kislin, polinukleotidov, endotoksinov in virusov, ker je večina bioloških molekul v vodnih raztopinah elektrostatsko nabita [20]. Odlikujeta jo visoka kapaciteta in možnost doseganja visoke stopnje čistosti zelenih produktov pri relativno nizki ceni kromatografskega procesa. Zaradi visokih kapacitet je ionsko izmenjevalna kromatografija pogosto vključena že v začetne stopnje zaključnih procesov, imenovane tudi lovilni koraki (angl. *capture step*), kjer je izbrana molekula izolirana in koncentrirana, zato izbiro kromatografskega nosilca pogojuje predvsem njegova kapaciteta za vezavo ciljne molekule [21]. Prednosti uporabe kromatografije pred ostalimi metodami čiščenja bioloških molekul,

kot so obarjanje in ekstrakcija z organskimi topili ter ultrafiltracija, sta predvsem visoka ločljivost in možen prenos na velik obseg proizvodnje [22].

2.1.1 Separacije makromolekul na ionsko izmenjevalnih kolonah

Večina separacij v ionski kromatografiji poteka v štirih glavnih korakih, ki so predstavljeni sliki 1.



Slika 1: Separacija makromolekul [19]

Prvi korak prikazuje skondicionirano kolono (kolono v ravnotežju), v kateri je ionski izmenjevalec v začetnem stanju v smislu pH in ionske moči, kar omogoča vezavo želenih molekul. Skupine izmenjevalcev so v tem stanju navadno povezane s preprostimi nasprotno nabitimi ioni, kot sta Na^+ in Cl^- .

Drugi korak predstavlja prihod vzorca na ionski izmenjevalec, kjer molekule s primernim nabojem izpodrinejo nasprotno nabite ione, ki so bili predhodno vezani na stacionarni fazi. Tam se adsorbirajo - reverzno vežejo. Nevezan vzorec pa je lahko spran z mobilno fazo - začetnim pufrom.

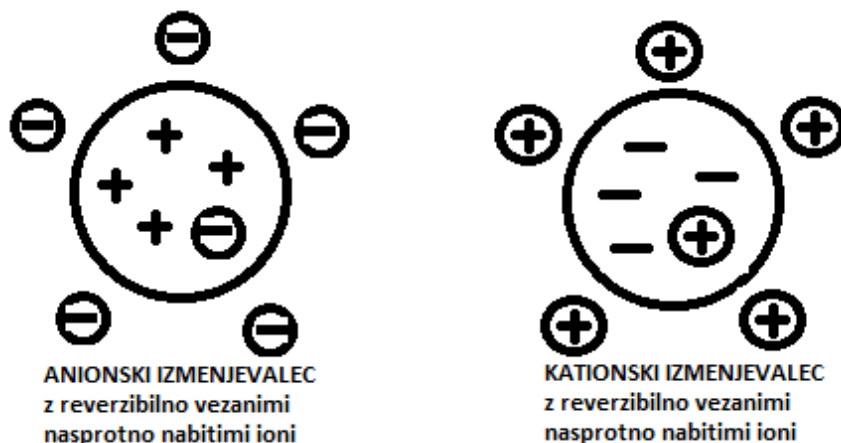
V tretjem koraku vidimo spiranje vzorca iz kolone - elucijo, ta se zgodi zaradi spremembe pogojev, kjer je adsorpcija vzorca energijsko manj ugodno stanje. To je navadno doseženo s povečanjem ionske moči ali spremembo pH mobilne faze. Koncentracija soli v mobilni fazi je lahko povečana postopoma – gradientno - ali naenkrat - koračni gradient. Pri postopnem povečevanju koncentracije soli v mobilni fazi se najprej eluirajo najšibkeje vezane snovi.

Zadnja koraka predstavljata spiranje še ne eluiranega vzorca iz kolone pod prvotnimi pogoji in vračanje kolone v začetno stanje [19].

2.1.2 Vrste ionskih izmenjevalcev

Ionski izmenjevalec je sestavljen iz nosilca, na katerega so kovalentno vezane nabite skupine. Na te so reverzibilno vezani ioni z obratnim nabojem. Ti se lahko izmenjujejo z ostalimi ioni z enakim nabojem, ne da bi spreminjali osnovni nosilec.

Obstajata dve glavni vrsti ionskih izmenjevalcev: pozitivno in negativno nabiti. Pozitivno nabiti izmenjevalec obdajajo negativno nabiti ioni - anioni, ki jih lahko izmenjujejo. Zato takim izmenjevalcem pravimo anionski izmenjevalci. Negativno nabiti izmenjevalec pa obdajajo pozitivno nabiti ioni - kationi, zato takemu izmenjevalcu pravimo kationski izmenjevalec (slika 2) [19].



Slika 2: Anionski in kationski izmenjevalec [19]

2.1.3 Lastnosti dobrega ionskega izmenjevalca za separacijo večjih biomolekul

Prvi ionski izmenjevalci so bili delčni nosilci, namenjeni demineralizaciji vode. Sestavljeni so bili iz hidrofobnega polimernega nosilca, na katerem so bile zelo goste na strukturo kovalentno vezane ionske skupine. Zaradi velike gostote ionskih skupin, majhnih por in posledično - velike specifične površine - so bile kapacitete takih nosilcev za majhne ione zelo velike [19].

Prisotnost nabitih skupin določa temeljne lastnosti ionskega izmenjevalca. Skupine določajo vrsto in moč ionskega izmenjevalca. Njihovo število in dostopnost pa določa kapaciteto. Na voljo je veliko skupin, ki se uporabljajo kot ionski izmenjevalci [23].

Sulfitne (SO_3^-) in skupine QA, med katere spada tudi TMA, se uporabljajo kot ligandi za močne ionske izmenjevalce, ostali primeri pa spadajo pod šibke. Izraza močan in šibek se ne nanašata na moč vezave, ampak na širino pH območja, v katerem je ionski izmenjevalec v celoti ioniziran. Močni ionski izmenjevalci delujejo v širšem razponu pH [19]. Primeri anionskih in kationskih izmenjevalcev so podani v tabeli 1.

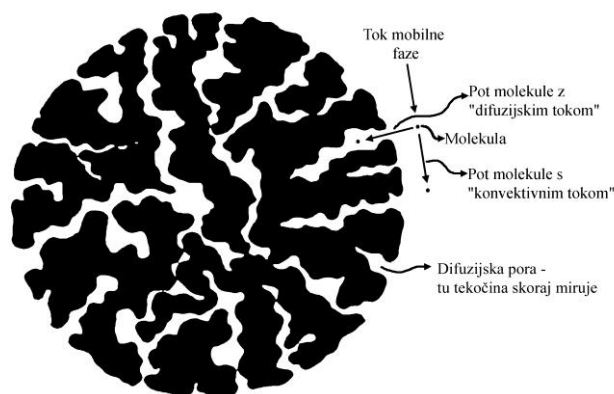
Tabela 1: Tabela ionskih izmenjevalcev [19]

Anionski izmenjevalec	Funkcionalna skupina
Dimetilaminoetil	$-O-CH_2-CH_2-N^+(CH_2CH_3)_2$
Kvarterni aminoetil	$-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_2-CH_2-CHOH-CH_3$
Kvarterni amonij	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N^+(CH_3)_3$
Kationski izmenjevalci	Funkcionalna skupina
Karboksimetil	$-O-CH_2-COO^-$
Sulfopropil	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2SO_3^-$
Metil sulfonat	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2SO_3^-$

2.2 Vrste kromatografskih nosilcev

2.2.1 Porozni delci

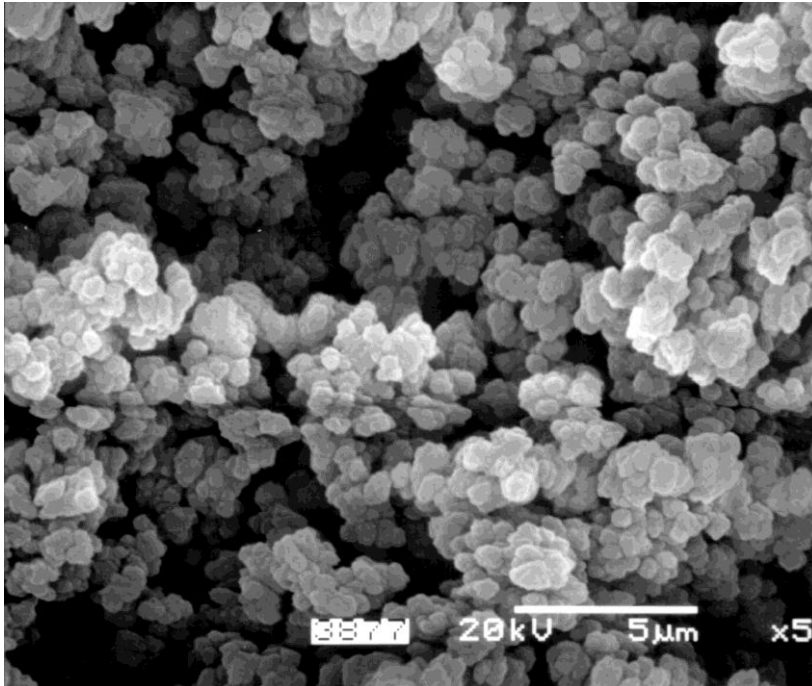
Porozni delci so bili dolgo časa prevladujoči nosilci (in so v splošnem še danes) predvsem zaradi dobre ločljivosti in visoke kapacitete vezave. Te lastnosti pa se relativno hitro slabšajo pri povečevanju linearne hitrosti, torej pri višanju pretoka skozi sloj takih delcev. Razlog za to je v dejstvu, da večina aktivne površine, na kateri poteka separacija, leži znotraj zaprtih por. Tekočina v teh porah skoraj miruje, kar pomeni, da potujejo molekule v pore predvsem na podlagi difuzijskega transporta (slika 3) [11]. Danes so tipični premeri poroznih delcev 5-20 μm za analitske ter 20-300 μm za preparativne namene [11].



Slika 3: Porozni delec [24]

2.2.2 CIM Monoliti

CIM monolit je enovita (makro)molekula s skrbno kontroliranimi strukturnimi lastnostmi, ki jo pripravimo s polimerizacijo v masi [10]. Zgrajena je iz mikronskih kroglic, ki so med seboj združene [11]. Ta struktura je prikazana na sliki 4.



Slika 4: SEM (Scanning Electron Microscope - Vrščni elektronski mikroskop) posnetek poli(glicidil metakrilat-ko-etilen dimetakrilat)-a. [24]

Iz slike 4 lahko vidimo, da obstajajo med mikronskimi zrnji večje in manjše pore. Tako imenovana bimodalna porazdelitev por omogoča dvoje: nizke povratne tlake zaradi pretoka skozi makropore (1 μm) ob hkrati visoki specifični površini pretočnih mezopor, v katerih se vrši proces adsorpcije/desorpcije [11].

Pri delcih je vedno prisoten vmesni prazen prostor, ki predstavlja 26 ali več odstotkov celotnega volumna kolone [25]. V primeru CIM monolitov teh praznih prostorov ni, zato mora vsa tekočina teči skozi pretočne pore. Prenos molekul poteka v celoti na osnovi konvekcije [11].

CIM nosilci so bili prvotno narejeni za čiščenje in ločevanje biomolekul («Short Monolithic Columns» [12]). Najpomembnejše lastnosti CIM nosilcev (za biomolekule), če jih primerjamo s klasičnimi delci, so:

- od pretoka neodvisna ločljivost in dinamična vezavna kapaciteta [26],
- sposobnost doseganja zelo hitrih separacij z dobro ločljivostjo [27], [28], [29],
- zmanjšana inaktivacija biomolekul zaradi kratkega kontaktnega časa s kromatografskim nosilcem,
- velika dinamična kapaciteta za zelo velike molekule,
- zračni mehurčki se ne ujamejo v CIM monolitu – izpere se jih z mobilno fazo [30].

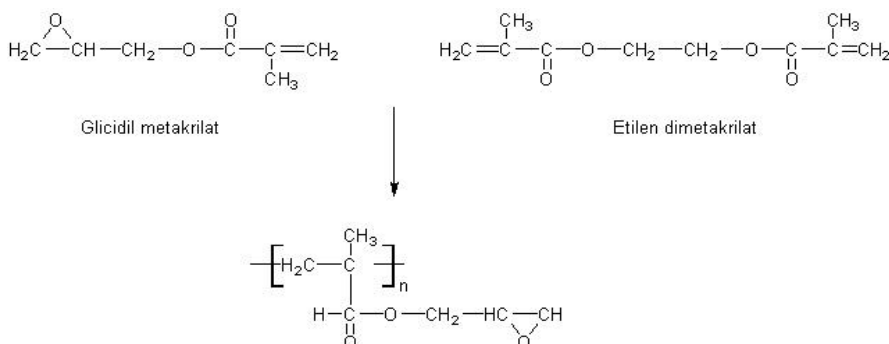
2.2.3 Sinteza in zgradba CIM nosilcev

Večina CIM nosilcev je pripravljenih s pomočjo radikalske kopolimerizacije monovinilnega monomera (GMA – glicidil metakrilat) in zamreževalca - divinilnega monomera (EDMA – etilen dimetakrilat) - v prisotnosti višjih alkoholov - ter iniciatorja

polimerizacije [31]. Tipična sestava raztopine monomerov in višjih alkoholov, ki so potrebni za tvorbo porozne strukture, je [32]:

24 % GMA
 16 % EDMA
 54 % cikloheksanola
 6 % dodekanola

Rezultat polimerizacije je makroporozen polimer, ki vsebuje reaktivne epoksi skupine [31] (slika 5).



Slika 5: Sinteza in zgradba GMA-EDMA CIM monolitnega nosilca [11]

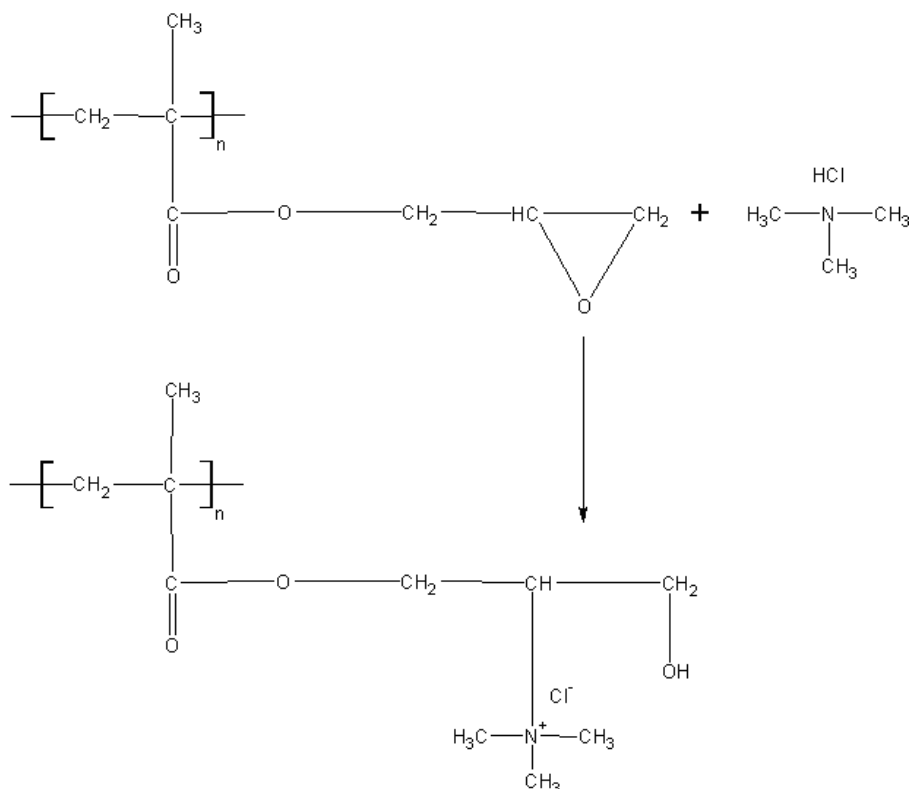
2.3 Funkcionalizacija CIM monolitnih nosilcev

Pomemben trend v makromolekulski kemiji je priprava novih oblik polimerov z želenimi lastnostmi, ki omogočajo rabo takega materiala v kromatografske namene. V principu obstajata dve poti za pripravo novih nosilcev.

Prva možnost je priprava monomerne mešanice z želeno skupino ali prekursorjem le te in homopolimerizacija ali kopolimerizacija mešanice.

Druga možnost je pridobivanje polimerov z reaktivnimi skupinami, ki jih nato funkcionaliziramo z različnimi skupinami, tako da dobimo želene lastnosti polimera [33]. Tako lahko dobimo nosilce, primerne za ionsko izmenjevalno kromatografijo, nosilce za kromatografijo na obrnjeni fazi, nosilce za afinitetno kromatografijo [34] in nosilce za druge, to je manj pogoste, vrste kromatografije.

V našem primeru smo epoksi skupine, ki so zelo reaktivne in lahko vstopajo v veliko število kemijskih reakcij [35], funkcionalizirali s TMA in tako dobili CIM monolitni nosilec z lastnostmi močnega anionskega izmenjevalca (slika 6).



Slika 6: Funkcionalizacija površine CIM monolitnega nosilca s TMA

2.4 Preverjanje stopnje funkcionalizacije CIM QA nosilca

Kapaciteta ionskega izmenjevalca je kvantitativna mera za njegovo sposobnost vezave nasprotno nabitih ionov. Lahko jo podajamo kot ionsko kapaciteto ali kot dinamično vezavno kapaciteto za določeno molekulo [19].

Kromatografske kolone, ki se uporabljajo v procesih čiščenja bioloških makromolekul, morajo biti mehansko in kemično stabilne, učinkovite in omogočati morajo velike izkoristke. Pred začetkom uporabljanja takšne kolone v farmacevtski industriji ter v intervalih med samo uporabo se pojavlja zahteva regulatomih organov po poznavanju kapacitete kromatografskega nosilca, sposobnosti učinkovite ločbe in s tem zagotavljanja kakovosti očiščenega produkta. Za razliko od navadnih delčnih kolon, iz katerih lahko odvezamo vzorec stacionarne faze, to analiziramo; pri CIM monolitih in membranah to ni mogoče, saj je celotna stacionarna faza v tem primeru le iz enega dela in kot takšna ne sme biti onesnažena ali poškodovana [36]. Poleg poroznosti in same velikosti por je ena ključnih lastnosti kromatografskih kolon, ki delujejo na principu ionske izmenjave, količina aktivnih skupin na gram nosilca. Meritev kapacitete ionskih izmenjevalcev je kvantitativna meritev, ki nam pove o sposobnosti stacionarne faze za vezavo nasprotno nabitih ionov nanjo. Lahko jo določamo na več različnih načinov: z elementno analizo, s potenciometričnimi titracijami, s frontalno analizo (pri kateri se uporabljajo majhni proteini in druge podobne molekule) ali gravimetrično ter z drugimi standardnimi metodami [20]. Večina metod je v primeru CIM monolitnih kromatografskih nosilcev manj uporabna, saj sta potenciometrična titracija in elementna analiza destruktivni metodi, pri merjenju proteinske kapacitete pa pride do onesnaženja nosilca, ki ne sme biti uporabljen v farmacevtske in medicinske namene.

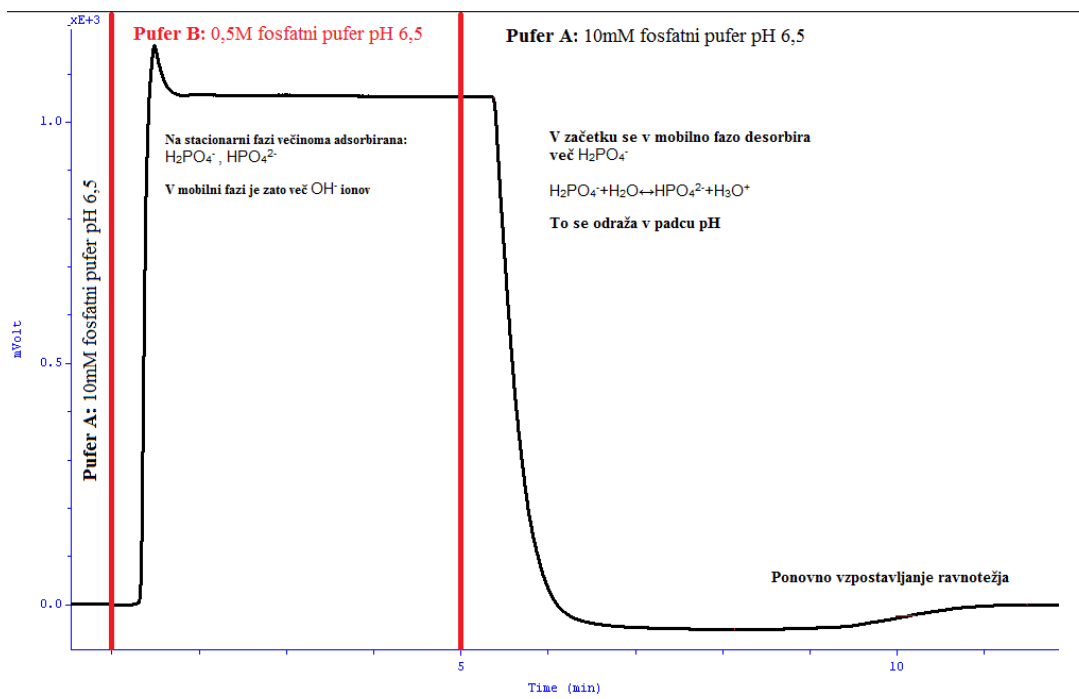
Frontalna analiza z uporabo majhnih molekul, npr. NaNO_3 , ki je sicer hitra in elegantna metoda, vendar le za anionske izmenjevalce, je zelo potratna glede kemikalij, kar je lahko problematično pri večjih enotah [37].

2.4.1 Ionska kapaciteta

Za karakterizacijo ionsko izmenjevalnih kolon je bila razvita univerzalna metoda, ki ni destruktivna in ne onesnaži nosilca. Metoda temelji na pH prehodu, ki se zgodi na ionsko izmenjevalni koloni, in sicer pri preskoku med pufroma z enakim pH, vendar različno ionsko močjo [37]. Pri merjenju ionske kapacitete močnih anionskih izmenjevalcev, med katere sodi tudi CIM QA, se uporabljata fosfatna pufra pH 6,5, in sicer 10 mM in 0,5 M. pH prehod je induciran zaradi preskoka iz pufra visoke koncentracije na pufer nizke koncentracije in je posledica ionske izmenjave OH^- , monovalentnega H_2PO_4^- in divalentnega HPO_4^{2-} . Ko skozi kolono teče pufer z visoko koncentracijo, je na stacionarno fazo adsorbirano zanemarljivo malo OH^- ionov, saj predstavljata večino fosfatna aniona. Nenadna sprememba na nižjo koncentracijo pufra povzroča desorpcijo vezanih anionov. Ker pa so divalentni anioni močnejše vezani na pozitivno nabito površino nosilca, se v začetni fazi desorbira v mobilno fazo več monovalentnih anionov, ki reagirajo z vodo tako, da nastanejo oksonijevi ioni, kar se odraža v padcu pH.



V primeru anionskega izmenjevalca fosfatnih pufrov se tvorita samo dva prehoda. Prvi, ki potuje s hitrostjo pretoka, in drugi, ki je zadržan zaradi vzpostavljanja novega ravnotežja ionske izmenjave. Relativni elucijski volumen K in ionska kapaciteta q_r sta linearno povezana. Kromatogram meritve ionske kapacitete z razlago je prikazan na sliki 7.



Slika 7: Kromatogram meritve ionske kapacitete z razlago

Izkaže se, da je čas trajanja prehodnega pH linearno sorazmeren številu ionsko izmenjevalnih skupin na nosilcu (celotni ionski kapaciteti nosilca Q_t). Če čas trajanja pomnožimo s pretokom mobilne faze skozi nosilec in dobljeni volumen normiramo na volumen monolita, dobimo relativni elucijski volumen K , ki je neodvisen od pretoka in volumna kolone [37]. Če K koreliramo s številom ionsko izmenjevalnih skupin na koloni, dobimo univerzalno umeritveno krivuljo, ki velja za vse kolone s podobno strukturo, ne glede na njihovo velikost ali obliko. Tako lahko z merjenjem pH prehoda določimo dejansko količino ionsko izmenjevalnih skupin ali t. i. celotno ionsko kapaciteto Q_t na monolitnih nosilcih, ne da bi jih pri tem poškodovali.

Linearnost te metode je vprašljiva v primeru visoke koncentracije aktivnih skupin na površini kromatografskega nosilca, saj bi lahko prišlo do medsebojnega vpliva med skupinami, ki bi preprečevale ionizacijo sosednjih skupin (večje število aktivnih skupin, manjša stopnja ionizacije) [38].

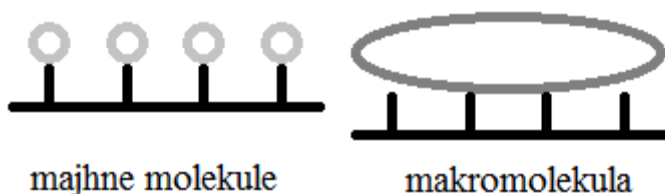
2.4.2 Dinamična vezavna kapaciteta za makromolekule

Dejanska količina proteina, ki je lahko vezan na ionski izmenjevalec pod definiranimi eksperimentalnimi pogoji, je imenovana totalna vezavna kapaciteta. Če pa definirani pogoji vsebujejo tudi podatek o pretoku, s katerim smo delovali na ionskem izmenjevalcu, lahko govorimo o dinamični vezavni kapaciteti, ki je odvisna od:

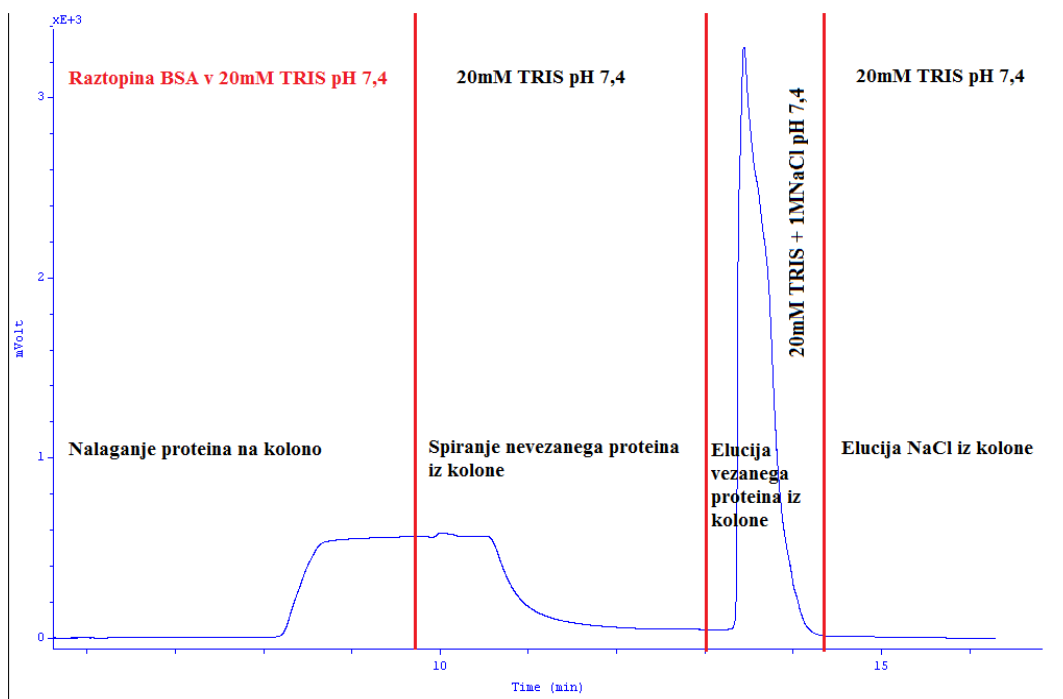
- lastnosti proteina
- lastnosti ionskega izmenjevalca
- izbranih eksperimentalnih pogojev

Lastnosti proteina, ki najbolj določajo dinamično vezavno kapaciteto določenega ionskega izmenjevalca, so velikost molekule in izoelektrična točka. Zato je kapaciteta ionskega izmenjevalca za različne proteine različna. Prav tako je za ionsko interakcijo z

nosilec pomemben neto naboj proteina pri izbranih pufrnih pogojih. Lastnosti matriksa ionskega izmenjevalca opredeljuje število aktivnih mest in sposobnost teh, da ohranjajo naboj v čim širšem območju eksperimentalnih pogojev. Tisti, ki vplivajo na kapaciteto, so: pH, ionska moč pufov, narava nasprotno nabitih ionov, ki so reverzibilno vezani na aktivna mesta, pretok in temperatura. Povečanje pretoka vpliva na dinamično kapaciteto tako, da se ta zmanjša, kar velja le za klasične delčne nosilce. Pri CIM monolitih je dinamična vezavna kapaciteta neodvisna od pretoka [19]. Ionsko izmenjevalne kolone se pogosto uporabljajo za čiščenje bioloških makromolekul. Za delo z njimi je pomembno poznati, v kakšni povezavi sta ionska kapaciteta in kapaciteta za biološke makromolekule. V primeru CIM QA kolon se za določevanje dinamične vezavne kapacitete uporablja protein albumin iz govejega seruma (angl. bovine serum albumin, BSA). Pri CIM QA je vidna linearna povezava med ionsko in dinamično vezavno kapaciteto za BSA, dokler se dinamična vezavna kapaciteta za BSA ne približa limitnim vrednostim in postane neodvisna od ionske kapacitete [39]. To je posledica popolnega prekritja aktivne površine CIM nosilca s proteinom (ena molekula proteina prekriva več veznih mest) [17] (slika 8). Prikaz kromatograma meritve dinamične vezavne kapacitete za BSA z razlago je podan na sliki 9.



Slika 8: Prikaz vezave majhnih in velikih molekul na površino kromatografskega nosilca



Slika 9: Kromatogram meritve dinamične vezavne kapacitete za BSA (prebojne krivulje) z razlago poteka

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Pri delu smo uporabljali kemikalije podane v tabeli 2.

Tabela 2: Uporabljene kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec	Čistost
Etanol	KEFO	Puriss p.a.
Aceton	MERCK	Puriss p.a.
Trimetilamin hidroklorid (TMACI)	ALDRICH	>98%
H ₂ SO ₄	MERCK	>99%
NaOH	SIGMA-ALDRICH	>99%
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	SIGMA-ALDRICH	>99,5%
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	SIGMA-ALDRICH	>99,5%
Trizma	SIGMA	>99,9%
NaCl	SIGMA-ALDRICH	>99,8%
BSA (goveji serumski albumin)	FLUKA (SIGMA-ALDRICH)	>=92%
dH ₂ O		Prevodnost < 1μS/cm

Pri delu smo uporabljali sledečo opremo:

- tehnica: Tehnica Železniki, precizna elektronska tehnica Vibra
- peristaltična črpalka: ACCU, Scilog Tandem 1081
- digestorij: Waldner
- vodna kopel: Labo VKNMPa 305025
- HPLC sistemi

Komponente HPLC sistemov so navedene v tabelah 3, 4 in 5. Shema uporabljenih HPLC sistemov pa je podana na sliki 10.

Za delo z 1 mL kolonami smo uporabljali:

Tabela 3: HPLC za delo z 1 mL kolonami

Črpalke	Biorad BioLogic HR Workstation
Detektor	Knauer Variable wavelength monitor
Vmesnik	Biorad
Injicirni ventil	Biorad
Software	Biorad BioLogic

Za delo z 8 mL kolonami smo uporabljali:

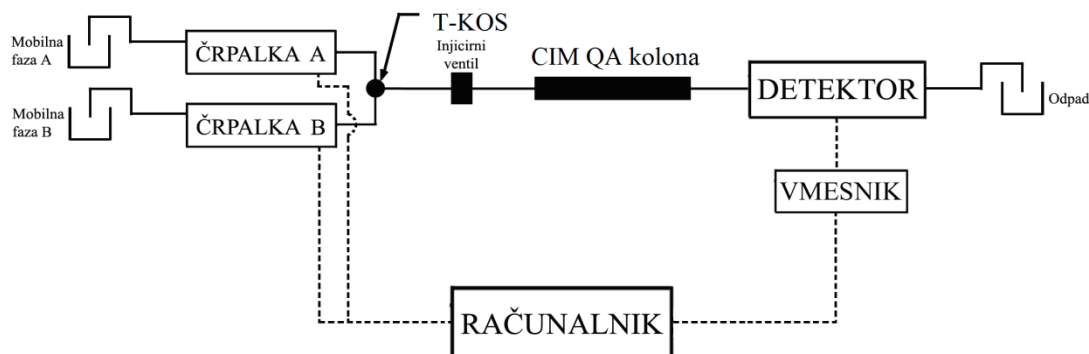
Tabela 4: HPLC za delo z 8 mL kolonami

Črpalke	Knauer HPLC pump 64
Detektor	Knauer Variable wavelength monitor
Vmesnik	Knauer
Injicirni ventil	Knauer
Software	Eurochrom for Windows 2.05

Za delo z 80 mL kolono smo uporabljali:

Tabela 5: HPLC za delo z 80 mL kolonami

Črpalke	Knauer Preparative pump K-1800
Detektor	Knauer UV detector K-2500
Vmesnik	Knauer
Injicirni ventil	Knauer
Software	Eurochrom for Windows 2.05



Slika 10: Shema HPLC sistemov, uporabljenih pri delu (pri merjenju ionske in dinamične vezavne kapacitete za BSA injicirni ventil ni bil povezan na sistem)

Pri delu smo uporabljali še: CIM monolite za 1 mL, 8 mL in 80 mL kolone, ohišja za funkcionalizacijo 8 mL in 80 mL CIM monolitov in kromatografska ohišja za 1 mL, 8 mL in 80 mL kolone (slika 11).



Slika 11: Kromatografska ohišja 1 mL, 8 mL in 80 mL enote [40]

3.2 Metode

3.2.1 Določanje mrtvih volumnov ohišij uporabljenih pri funkcionalizaciji 1 mL, 8 mL in 80 mL CIM monolitov

V primeru 1 mL enot smo pri funkcionalizaciji uporabljali kromatografska ohišja. Mrtvi volumen kromatografskega ohišja smo določili tako, da smo v sušilnik na 35 °C dali dve 1 mL kromatografski ohišji za 24 ur. Dva 1 mL CIM monolita pa v vakuumski sušilnik za 130 min na temperaturo 100 °C in tlak 7 mbar. Kromatografski ohišji in CIM monolita smo nato stehali. Vsako kromatografsko ohišje smo napolnili z dH₂O, v njiju vstavili CIM monolita in nato koloni na HPLC sistemu pri pretoku 5 mL/min prečrpavali z dH₂O. Kapilaro na iztoku smo imeli potopljeno v dH₂O, da smo lahko opazovali izhajanje zračnih mehurčkov. Cilj je bil iztisniti ves zrak iz sestavljene kolone. Po 15 min prečrpavanja (ko smo bil prepričani, da v koloni ni več zraka) smo kolone ponovno stehali. Iz razlike v masi suhe kolone in kolone napolnjene z vodo smo lahko izračunali mrtvi volumen kolone.

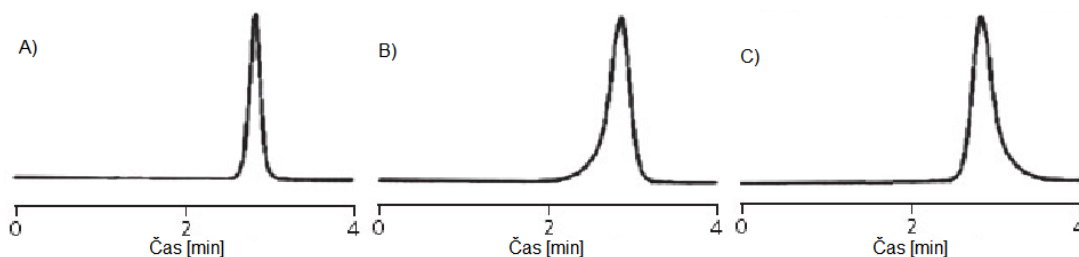
Pri funkcionalizaciji 8 mL CIM monolitov smo uporabljali ohišja za funkcionalizacijo 8 mL CIM monolitov. Mrtvi volumen takšnega ohišja smo določili tako, da smo v sušilnik na 35 °C dali ohišje za funkcionalizacijo 8 mL CIM monolitov za 24 ur, 8 mL CIM monolit pa v vakuumski sušilnik za 130 min na temperaturo 100 °C in tlak 7 mbar. V ohišje smo vstavili CIM monolit in ga stehali. Nato smo ohišje razdrli in ga napolnili z dH₂O tako, da v njem ni bilo nič zraka in vanj vstavili predhodno z difuzijo omočen CIM monolit. Nato smo ohišje na HPLC sistemu pri pretoku 20 mL/min prečrpavali z dH₂O, kapilaro na iztoku pa imeli potopljeno v dH₂O, da smo lahko opazovali izhajanje zračnih mehurčkov. Po 30 min prečrpavanja smo ohišje ponovno stehali. Razlika v masi omočene in suhe kolone nam je dala mrtvi volumen kolone.

Ohišju za funkcionalizacijo 80 mL enot smo mrtvi volumen določili tako, da smo v sušilnik na 35 °C dali ohišje za funkcionalizacijo 80 mL CIM monolitov za 24 ur, 80 mL CIM monolit pa v vakuumski sušilnik za 130 min na temperaturo 100 °C in tlak 7 mbar. V ohišje smo vstavili CIM monolit in ga stehali. Nato smo ohišje razdrli in ga napolnili z dH₂O tako, da v njem ni bilo nič zraka in vanj vstavili predhodno z difuzijo omočen CIM monolit. Nato smo ohišje na HPLC sistemu pri pretoku 80 mL/min prečrpavali z dH₂O, kapilaro na iztoku pa imeli potopljeno v dH₂O, da smo lahko opazovali izhajanje zračnih mehurčkov. Po 75 min prečrpavanja smo ohišje ponovno stehali. Razlika v masi omočene in suhe kolone nam je dala mrtvi volumen kolone.

3.2.2 Postopek funkcionalizacije CIM monolitov

CIM monolit smo vstavili v ohišje, napolnjeno z etanolom. V primeru 1 mL kolon v kromatografsko ohišje, pri 8 mL in 80 mL kolonah pa v ohišje, namenjeno funkcionalizaciji. Kolono smo nato priklopili na HPLC sistem in iz nje spirali etanol z dH₂O, vidna je bila dobra pretočenost kolone z dH₂O, ko se je signal na detektorju ustalil pri valovni dolžini 280 nm.

Tesnenje sestavljene kolone smo preverili z analizo odziva na pulzno motnjo. Slaba tesnost CIM monolita v ohišju neposredno vpliva na razporeditev toka skozi CIM monolitno kolono in zmanjša učinkovitost ločbe (širjenje vrhov) ali povzroča puščanje kolone med nanašanjem vzorca (prisotnost molekul vzorca v nevezavni frakciji), podobno, kot je pri slabo napoljenih delčnih kolonah [41]. Tokovni prerez se za CIM monolitne in delčne kromatografske kolone določa z analizo odziva na pulzno motnjo oziroma zadrževalnega časa in oblike vrha sledilca. Na nepravilnosti v strukturi opozarjajo bradičenje (angl. fronting), repičenje (angl. tailing) (slika 12) oziroma pri nastanku večjih utorov ali razpok v CIM monolitu, dvojčičenje kromatografskega vrha.



Slika 12: A) Normalen odziv na pulzno motnjo; B) Bradičenje (angl. fronting); C) Repičenje (angl. tailing)

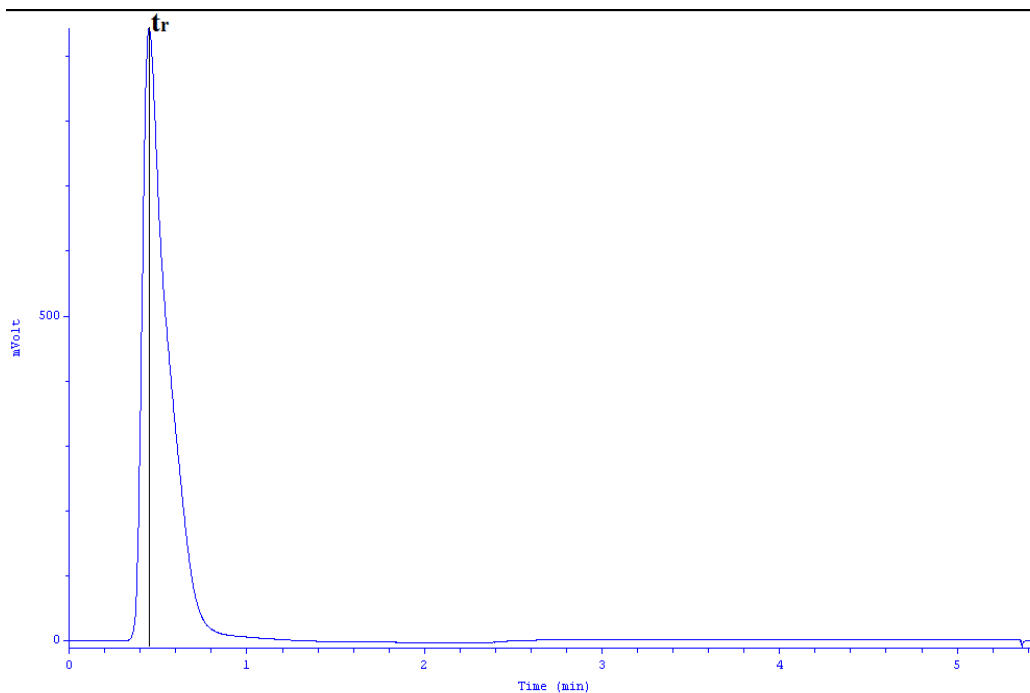
Z analizo odziva na pulzno motnjo smo zagotovili dobro delovanje kolone pred funkcionalizacijo ali testiranjem (slika 13). Analize smo izvajali na HPLC sistemu. Ko je bil CIM monolit dobro pretočen z dH₂O, smo injicirali aceton na kolono. Iz oblike vrha acetona in zadrževalnega časa acetona smo lahko določili, ali dana kolona pušča. Za natančno izvedbo takšne meritve moramo poznati mrtve volumnne kolone, kapilar od injektorja do detektorja in pretok. Ker je volumen kapilar veliko manjši od mrtvega volumna kolone, lahko predpostavimo, da moramo pri dobrem tesnjenju iz zadrževalnega časa acetona in izmerjenega pretoka dobiti ustrezno velik mrtvi volumen (približno enak mrtvememu volumnu kolone). Tako lahko s pomočjo enačbe 2 določimo, ali kolona tesni.

$$V_m = t_r \times \Phi \quad (2)$$

V_m = mrtvi volumen sistema [mL]

t_r = zadrževalni čas (acetona) [min]

Φ = pretok [mL/min]



Slika 13: Kromatogram meritve pulzne motnje z označenim zadrževalni časom acetona

Pulzne motnje smo merili pri sledečih pogojih:

1 mL kolone:

mobilna faza: dH₂O

pretok: 5 mL/min

volumen injiciranja: 20 µL

vzorec: aceton:dH₂O=1:50

valovna dolžina: 280 nm

8 mL kolone:

mobilna faza: dH₂O

pretok: 20 mL/min

volumen injiciranja: 200 µL

vzorec: aceton:dH₂O=1:50

valovna dolžina: 280 nm

80 mL kolone:

mobilna faza: dH₂O

pretok: 80 mL/min (pred funkcionalizacijo) 160 mL/min (po funkcionalizaciji - uporabljena frit)

volumen injiciranja: 1 mL

vzorec: aceton:dH₂O=3:1

valovna dolžina: 280 nm

Reagent za funkcionalizacijo smo pripravljali v digestoriju na tehtnici. Najprej smo v reagenčno steklenico natehtali ustrezno količino TMACI (Trimetilamin klorid) in dopolnili z dH₂O, tako da smo dobili želeno koncentracijo reagenta.

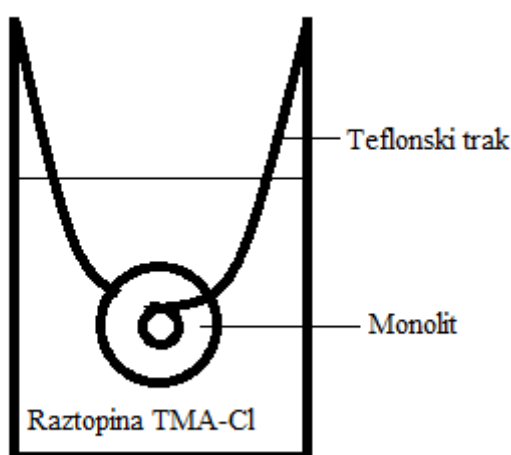
V primeru funkcionalizacije CIM monolitnih kromatografskih nosilcev s končno količino TMACl smo pripravljen TMACl reagent črpali preko kolone s peristaltično črpalko. V primeru 1 mL kolon smo skozi monolit prečrpali 20 mL reagenta, pri 8 mL koloni pa 70 mL reagenta in nato kolono zaprli s slepimi čepi.

Pri 80 mL koloni smo preko kolone prečrpali 1000 mL reagenta. Zadnjih 200 mL smo na koncu krožno prečrpavali 15 min. Kolono smo nato zaprli s slepimi čepi. Za funkcionalizacijo CIM monolita je bilo tako na voljo toliko reagenta, kot je mrtvi volumen ohišja.

Kolone smo funkcionalizirali v vodnih kopelih, ogreth na želeno temperaturo. Po času, ki smo ga predvideli za funkcionalizacijo, smo kolone pobrali iz kopeli in na peristaltični črpalki spirali z dH_2O . 1 mL kolono s 30 mL, 8 mL kolono z 200 mL in 80 mL kolono s 1000 mL dH_2O .

V primeru funkcionalizacije CIM monolitnih kromatografskih nosilcev z neskončno količino TMACl je bil cilj eksperimentov določiti, kakšna je maksimalna konverzija epoksi skupin, ki jo lahko dosežemo s funkcionalizacijo s TMACl reagentom. Eksperiment je bil zastavljen tako, da smo pri temperaturi X^*+10 °C uporabili za funkcionalizacijo 0,72Y** %, 1,81Y % in 3,62Y % raztopino TMACl. Pripravili smo štiri 1 mL CIM epoksi kolone v ohišjih za funkcionalizacijo. Funkcionalizacijo smo izvedli v dveh paralelkah. Prvi dve ohišji smo prečrpali z reagentom (20 mL) in jih zaprli s slepimi čepi, drugi dve koloni smo po prečrpavanju odprli, iz njiju pobrali CIM monolita in ju, obešene na teflonski trak, dali v 250 mL reagenčni steklenici, napolnjeni z reagentom enake koncentracije (slika 14). V reagenčnih steklenicah smo imeli: v primeru 0,72Y % raztopine 24,1-kratni presežek reagenta, v primeru 1,81Y % raztopine 60,2-kratni presežek reagenta in v primeru 3,62Y % raztopine 120,4-kratni presežek reagenta. Eksperiment smo izvajali 9,01Z*** h ali 28,76Z h.

Opombe:
-X*: Zaradi zaupnosti podatkov je bil uporabljen iracionalni večkratnik X
-Y**: Zaradi zaupnosti podatkov je bil uporabljen iracionalni večkratnik Y
-Z***: Zaradi zaupnosti podatkov je bil uporabljen iracionalni večkratnik Z



Slika 14: Prikaz funkcionalizacije CIM monolita v reagenčni steklenici

Funkcionalizaciji je sledila hidroliza epoksi skupin, ki so na nosilcu ostale nezreagirane. Hidrolizo smo izvedli tako, da smo preko kolon črpali 0,36A**** M H₂SO₄. Preko 1 mL kolone smo prečrpali 20 mL, preko 8 mL kolone pa 100 mL. Preko 80 mL kolone smo prečrpali 1000 mL kisline, od tega smo na koncu 200 mL 0,36Q M H₂SO₄ 15 min krožno prečrpavali.

Kolone smo nato dali v vodno kopel na 63 °C in jih po treh urah pobrali iz kopeli ter prečrpavali z dH₂O, dokler ni pH na iztoku iz kolone narastel na pH dH₂O na vtoku.

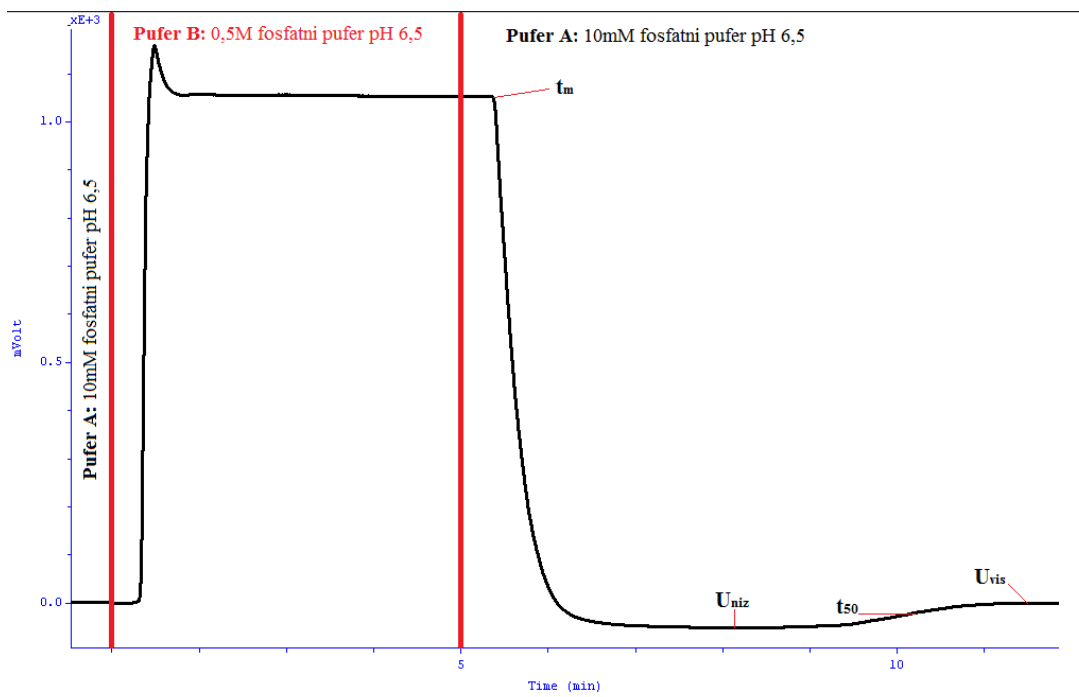
Opombe:

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

Kolone smo po hidrolizi regenerirali z uporabo 1 M NaOH tako, da smo preko kolon s peristaltično črpalko prečrpali enake volumne 1 M NaOH, kot smo to predhodno storili z žveplovo kislino pri hidrolizi. Prečrpane kolone smo v 1 M NaOH pustili na sobni temperaturi dve uri. Po končani regeneraciji smo kolone prečrpavali kolone z vodo, nato z 0,5 M fosfatnim pufrom pH 6,5 in nato z 10 mM fosfatnim pufrom pH 6,5. 1 mL CIM kolone smo prečrpali z 20 mL vsake raztopine, 8 mL CIM kolone z 100 mL vsake raztopine in 80 mL CIM kolone z 1000 mL vsake raztopine.

3.2.3 Merjenje ionske kapacitete

Ionsko kapaciteto CIM QA monolitnih nosilcev smo določali z merjenjem prehodnega pH, ki nastane pri zaporednem črpanju dveh pufrnih raztopin z različno ionsko močjo in enakim pH skozi kolono. Pri tem smo beležili absorbanco pri 200 nm. Skozi kolono smo najprej črpali pufer z visoko ionsko močjo (0,5 M fosfatni pufer pH 6,5), dokler se nista absorbanca in pH raztopine na iztoku izenačili z absorbanco in pH na vtoku kolone. Ko je bila kolona uravnovežena, smo preklopili na črpanje pufra z nizko ionsko močjo (10 mM fosfatni pufer pH 6,5) in tako povzročili spremembo pH pufra na iztoku kolone (prehodni pH). Meritev je bila zaključena, ko sta se absorbanca in pH raztopine na iztoku kolone vrnili na vrednosti na vtoku. Pri tem smo določili čas med preklopom mobilne faze in 50 % spremembe pH. Pretok smo merili s tehtanjem mobilne faze, ki je preko kolone pretekla v času med preklopom mobilne faze in 50 % spremembe pH. Prikaz kromatograma meritve ionske kapacitete je podan na sliki 15. Ionsko kapaciteto smo izračunali po enačbi 3. Vsako meritev smo dvakrat ponovili.



Slika 15: Kromatogram meritve ionske kapacitete

$$q_r = \frac{(t_{50\%} - t_m) \times \Phi \times C_{puf.A}}{V_k} \quad (3)$$

q_r = ionska kapaciteta [mmol/L]

$t_{50\%}$ = odčitamo v točki na kromatogramu [min] $y = U_{niz} + \left(\frac{\Delta}{2}\right)$; $\Delta = U_{vis} - U_{niz}$

t_m = odčitamo s kromatograma [min]

Φ = pretok [mL/min]

$C_{puf.A}$ = koncentracija pufera A (10mM) [mM]

V_k = volumen kolone (volumen CIM monolita v koloni) [mL]

3.2.4 Merjenje dinamične vezavne kapacitete za BSA

Dinamično vezavno kapaciteto za BSA smo določali z nalaganjem raztopine BSA ($c=1\text{mg/mL}$) na kolono. Iz prebojne krivulje smo odčitali čas pri 50 % maksimalne vrednosti signala. Pri tem smo beležili absorbanco pri 280 nm. Skozi kolono smo najprej črpali pufer z visoko ionsko močjo (20 mM TRIS + 1 M NaCl pH 7,4), dokler se nista absorbanca in pH raztopine na iztoku izenačili z absorbanco in pH na vtoku kolone. Nato smo preklpili na črpanje pufera z nizko ionsko močjo (20 mM TRIS pH 7,4). Tako smo iz kolne sprali NaCl. Ko je bila kolona uravnovežena, smo začeli nalagati BSA. Pri doseženi maksimalni absorbanci smo začeli preko kolone črpati 20 mM TRIS pH 7,4 tako smo sprali na kolono nevezan BSA. Nato smo s kolone z 20 mM TRIS + 1 M NaCl pH 7,4 eluirali še BSA, ki je bil vezan na nosilcu. Meritev smo zaključili s črpanjem 20 mM TRIS pH 7,4. Pretok smo merili s tehtanjem mobilne faze, ki je preko kolone pretekla v času med začetkom nalaganja BSA in 50 % maksimalne vrednosti signala. Vsako meritev smo ponovili dvakrat. Iz prebojnega volumna lahko

preprosto izračunamo dinamično vezavno kapaciteto kolone. Za določitev prave vrednosti dinamične vezavne kapacitete moramo upoštevati tudi mrtev volumen kolone [31]. Na prebojnih krivuljah smo odčitali čase pri 50 % vrednosti maksimalnega signala spojine in izračunali dinamične vezavne kapacitete. Kromatogram meritve dinamične vezavne kapacitete za BSA je podan na sliki 16.

Dinamično vezavno kapaciteto smo izračunali po enačbi 4:

$$q_r = \frac{(t_{50\%} \times \Phi - V_m) \times C_{BSA}}{V_k} \quad (4)$$

Q = dinamična vezavna kapaciteta [mg/mL]

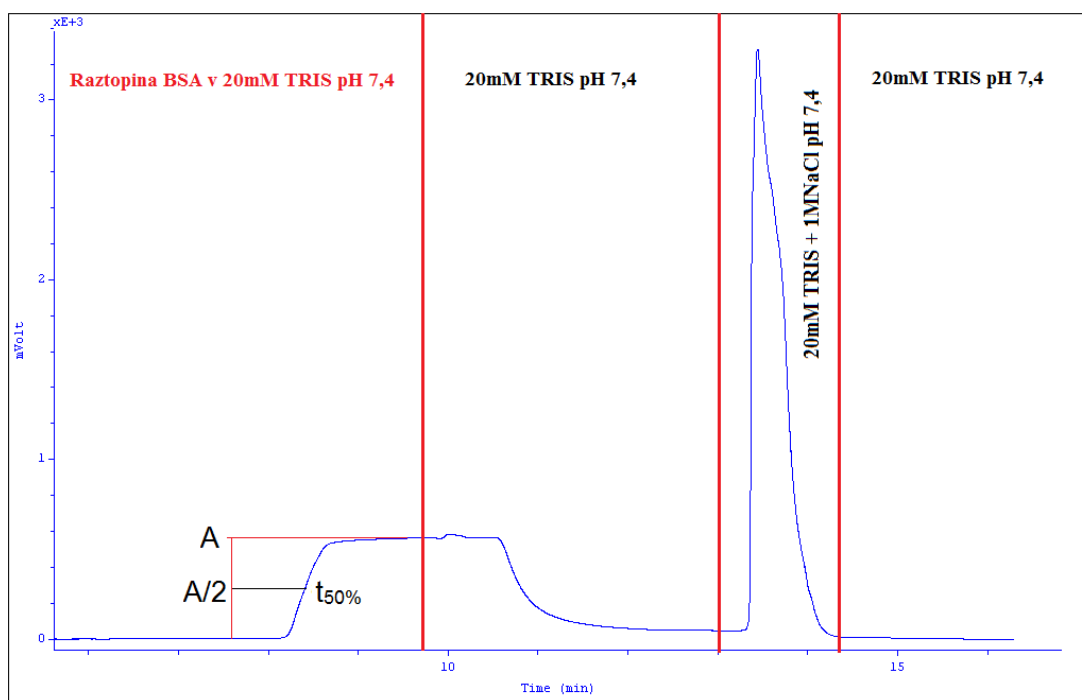
$t_{50\%}$ = čas pri 50% vrednosti maksimalnega signala [min]

Φ = pretok [mL/min]

V_m = mrtvi volumen sistema [mL]

C = koncentracija spojine [mg/mL]

V_k = Volumen nosilca (volumen CIM monolita v koloni) [mL]



Slika 16: Kromatogram meritve dinamične vezavne kapacitete za BSA

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Mrtvi volumni ohišij, uporabljenih pri funkcionalizaciji 1 mL, 8 mL in 80 mL CIM monolitov

Mrtve volumne ohišij za funkcionalizacijo smo določali po postopkih opisanih v poglavju 3.2.1. V primeru 1 mL enot smo določali mrtvi volumen kromatografskega ohišja v dveh paralelkah (Priloga A), v tabeli 6 je podano povprečje obeh meritev. V primeru 8 mL in 80 mL enot pa smo določili mrtvi volumen le po enem ohišju za funkcionalizacijo. Tudi rezultatata teh dveh meritev sta podana v tabeli 6.

Tabela 6: Tabela rezultatov tehtanja pri določanju mrtvega volumna 1 mL, 8 mL in 80 mL ohišij za funkcionalizacijo

	Masa ohišja in monolita omočenega z dH ₂ O [g]	Masa ohišja s posušenim CIM monolitom [g]	Δm [g]	V_m [mL]
Ohišje 1 mL	75,28	73,70	1,59	1,59
Ohišje 8 mL	1404,6	1386,1	18,5	18,5
Ohišje 80 mL	1379,3	1287,6	91,7	91,7

4.2 Funkcionalizacija 1 mL CIM kolon s TMACI

V prvem delu diplomskega dela smo opazovali vpliv temperature in časa na hitrost reakcije vezave TMA na epoksi skupine CIM monolita. To smo izvedeli pri temperaturah X °C in X+10 °C. Koncentracija TMACI reagenta je bila vedno konstantna, medtem ko smo spreminjali čas funkcionalizacije. Delali smo z 1 mL CIM monoliti v ustreznih ohišjih. CIM kolonom smo po funkcionalizaciji izmerili ionsko kapaciteto in dinamično vezavno kapaciteto za BSA.

4.2.1 Funkcionalizacija 1 mL CIM kolon pri X °C in X+10 °C s končno količino in konstantno koncentracijo TMACI

1 mL CIM kolone smo si pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2. Vsako CIM kolono smo prečrpali z 1,81Y % TMACI reagentom in ju dali v vodno kopel na X °C. Funkcionalizacije so trajale med 1,5Z ure in 28,76Z ur. Na vseh CIM kolonah smo po funkcionalizaciji izvedli hidrolizo nezreagiranih epoksi skupin in nato še regeneracijo z 1 M NaOH.

Vsaki tako pripravljeni CIM koloni smo izmeril ionsko kapaciteto (metoda - poglavje 3.2.3) in dinamično vezavno kapaciteto za BSA (metoda - poglavje 3.2.4). Vsako meritev smo ponovili dvakrat. Če je katera izmed dveh meritev izstopala, smo meritev ponovili še tretjič.

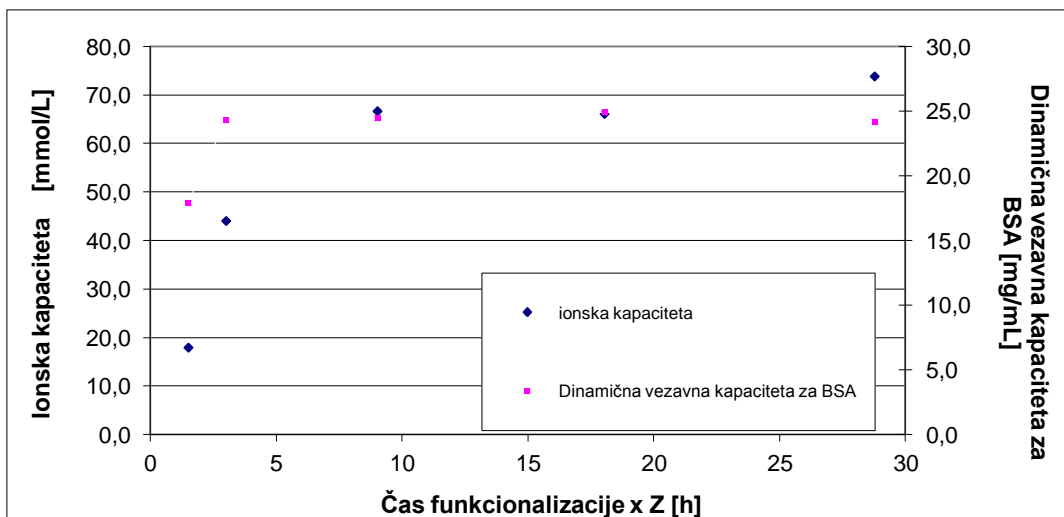
Posamezni rezultati so podani v prilogah B1, B2, B3, B4 in B5. Povprečje rezultatov obeh meritev ionske kapacitete je podan v tabeli 7 in na sliki 17, dinamične vezavne kapacitete za BSA pa v tabeli 8 in na sliki 17.

Tabela 7: Ionske kapacitete na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X °C z 1,81Y % TMACl reagentom – povzetek vseh meritev

t[h]	1,5Z	3,0Z	9,01Z	18,03Z	28,76Z
Ionska kapaciteta [mmol/L]	16,7	46,4	55,4	61,4	73,0
	18,6	41,7	74,9	66,8	70,8
	17,4	38,9	72,4	71,0	74,7
	19,1	49,3	66,1	62,5	72,7
			68,1	60,9	78,1
			64,5	68,6	
			60,1	68,9	
			64,5	65,9	
			74,2	72,5	
				62,9	
povprečje	18,0	44,1	66,7	66,1	73,9

Tabela 8: Dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X °C z 1,81Y % TMACl reagentom – povzetek vseh meritev

t[h]	1,5Z	3,0Z	9,01Z	18,03Z	28,76Z
Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	17,4	25,0	24,6	25,4	22,9
	19,0	24,5	24,3	25,5	22,6
	17,0	22,5	24,0	25,7	25,2
	18,3	25,2	23,3	23,9	25,1
			24,3	24,2	25,2
			25,3	24,7	
			24,4	24,5	
			24,2	24,6	
			25,8	25,9	
				25,0	
Povprečje	17,9	24,3	24,5	24,9	24,2



Slika 17: Odvisnost ionske in dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 1 mL kolon od časa funkcionalizacije ($T = X \text{ } ^\circ\text{C}$; $c(\text{TMACl}) = 1,81y \%$)

Iz slike 17 je razvidno, da z omejeno količino TMACl pri $T = X \text{ } ^\circ\text{C}$ po 28,76Z urah na CIM monolitnih kolonah dosežemo ionsko kapaciteto okrog 74 mmol/L. Ker se ionska kapaciteta že po 9,01Z urah zelo počasi veča, lahko predpostavimo, da je to maksimalna ionska kapaciteta, ki jo dosežemo pri teh pogojih.

Po 9,01Z urah dosežemo že okrog 90% maksimalne možne konverzije pri teh pogojih.

V primeru funkcionalizacije 1 mL CIM kolon pri $X+10 \text{ } ^\circ\text{C}$ smo si kolone pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2. Vsako CIM kolono smo prečrpali z 1,81Y % TMACl reagentom in jo dali v vodno kopel na $X+10 \text{ } ^\circ\text{C}$. Funkcionalizacije so trajale med 1,5Z ure in 28,76Z ur. Na vseh CIM kolonah smo po funkcionalizaciji izvedli hidrolizo nezreagiranih epoksi skupin in nato še regeneracijo z 1 M NaOH

Vsaki tako pripravljeni CIM koloni smo izmerili ionsko kapaciteto (metoda – poglavje 3.2.3) in dinamično vezavno kapaciteto za BSA (metoda - poglavje 3.2.4). Vsako meritev smo ponovili dvakrat.

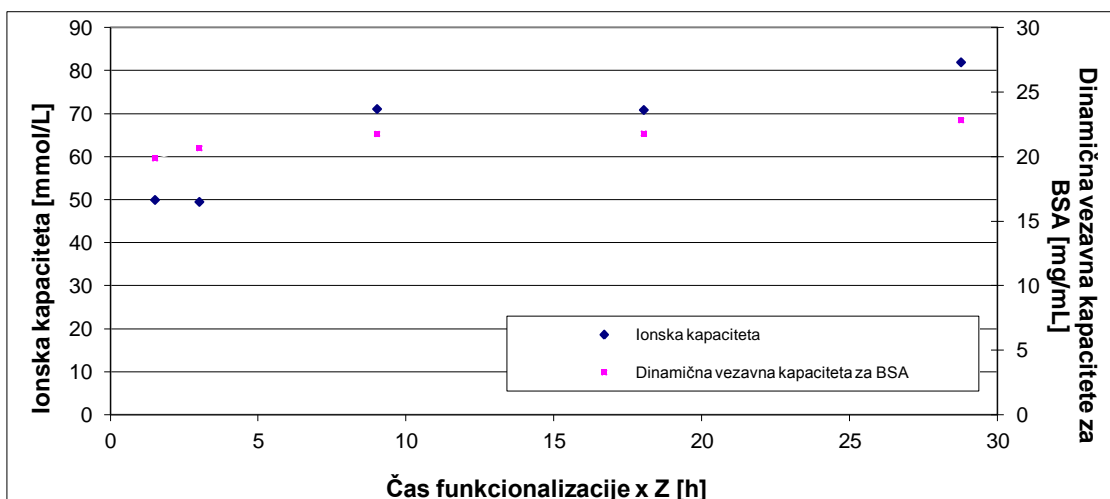
Posamezni rezultati so podani v prilogah C1, C2, C3, C4 IN C5. Povprečje rezultatov obeh meritev ionske kapacitete je podan v tabeli 9 in na sliki 18, dinamične vezavne kapacitete za BSA pa v tabeli 10 in na sliki 18.

Tabela 9: Ionske kapacitete na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri $X+10 \text{ } ^\circ\text{C}$ z 1,81Y % TMACl reagentom – povzetek vseh meritev

Trajanje funkcionalizacije [h]	1,5Z	3,0Z	9,01Z	18,03Z	28,76Z
Ionske kapacitete [mmol/L]	55,6	54,9	61,4	74,9	77,3
	53,9	51,2	63,4	69,0	80,1
	48,4	45,2	82,3	64,3	85,9
	41,8	48,5	68,6	72,9	76,9
		49,9	83,6	73,0	89,3
		47,1	66,9	70,9	
Povprečje	49,9	49,5	71,1	70,8	81,9

Tabela 10: Dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri $X+10$ °C z 1,81Y % TMACl reagentom – povzetek vseh meritev

Trajanje funkcionalizacije [h]	1,5Z	3,0Z	9,01Z	18,03Z	28,76Z
Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	18,3	20,4	18,0	18,2	21,8
	18,8	20,9	17,8	18,1	23,0
	20,3	21,2	24,5	23,4	23,0
	22,0	20,3	23,6	24,0	22,2
		20,0	23,2	23,3	24,2
		21,2	23,4	23,7	
Povprečje	19,9	20,7	21,8	21,8	22,8

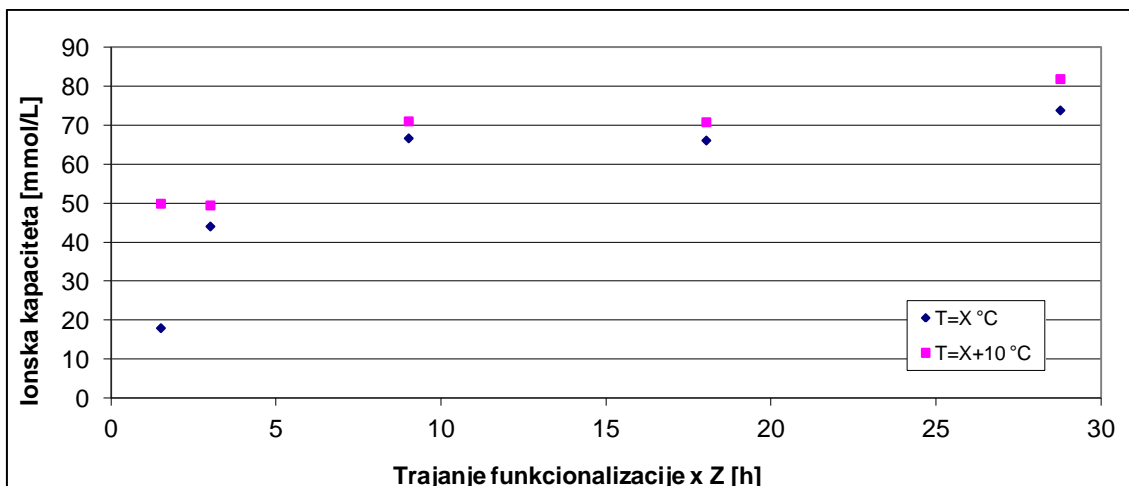


Slika 18: Odvisnost ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 1 mL kolon od časa funkcionalizacije ($T = X+10$ °C; $c(\text{TMACl}) = 1,81Y\%$ TMACl)

Iz slike 18 je razvidno, da z omejeno količino TMACl pri $T = X+10$ °C po 28,76Z urah na CIM monolitnih kolonah dosežemo ionsko kapaciteto okrog 82 mmol/L. Ker se ionska kapaciteta že po 9,01Z urah zelo počasi veča, lahko predpostavimo, da je to maksimalna ionska kapaciteta, ki jo dosežemo pri teh pogojih.

Po 9,01Z urah dosežemo že okrog 87% maksimalne možne konverzije pri teh pogojih.

Ko smo imeli na voljo vse podatke ionskih in dinamičnih vezavnih kapacitetah za BSA izmerjenih pri enakih pogojih funkcionalizacije, ki pa so se razlikovali v temperaturi (X °C in $X+10$ °C), pri kateri smo funkcionalizacijo izvedli, smo izdelali graf (slika 19) in primerjali hitrost in izkoristek reakcije, kot je iz podatkov razvidno je reakcija predvsem v začetni fazi mnogo hitrejša pri višji temperaturi. Pri daljšem trajanju funkcionalizacije je pri $X+10$ °C tudi izkoristek reagenta nekoliko večji kot pri X °C, na kar lahko sklepamo iz večje konverzije.



Slika 19: Odvisnost ionske kapacitete CIM QA 1 mL kolon od časa funkcionalizacije ($T=X$ °C in $X+10$ °C; $c(\text{TMACl})= 1,81Y\%$ TMACl)

4.2.2 Funkcionalizacija CIM Epoksi 1 mL kolon pri $X+10$ °C (9,01Z ur) s končno in neskončno količino TMACl

V tabeli 11 in na sliki 20 so podani rezultati meritev ionskih kapacitet, ki smo jih izvedli na kolonah, ki so bile funkcionalizirane na različne načine in sicer z 0,72Y %, 1,81Y % in 3,62Y % reagentom pri temperaturi $X+10$ °C, 9,01Z ur v paralelkah s končno in neskončno količino reagenta (glej poglavje 3.2.2).

Za CIM epoksi 1 mL kolone, ki smo jih pred funkcionalizacijo le prečrpali z reagentom in pustili v ohišjih, lahko trdimo, da so bile funkcionalizirane s končno količino TMACl, saj smo v poglavju 4.1.1 izmerili, da mrtvi volumen 1 mL enote znaša 1,58 mL. Iz tega lahko sklepamo, da je bil CIM monolit v primeru prečrpavanja z 0,72Y % raztopino TMACl v ohišju "obdan" z $1,21A^{*****} \cdot 10^{-4}$ mol TMA. V primeru prečrpavanja z 1,81Y % raztopino TMACl pa "obdan" s $3,03A \cdot 10^{-4}$ mol TMA ter v primeru prečrpavanja s 3,62Y % raztopino TMACl "obdan" z $6,05A \cdot 10^{-4}$ mol TMA. Množina epoksi skupin na CIM monolitu mase 1 g znaša 3,06A mmol, gostota CIM monolita pa je 0,45 g/mL, iz tega lahko sklepamo, da je množina epoksi skupin na mL CIM monolita 1,38A mmol. Če predpostavimo, da vse epoksi skupine reagirajo s TMA, vemo, da potrebujemo za popolno funkcionalizacijo nosilca $1,38A \cdot 10^{-3}$ mol TMA, kar je več, kot ga je bilo prisotnega v ohišju, in sicer v vsakem od treh primerov.

Funkcionalizacija z neskončno količino TMACl reagenta je potekala v reagenčnih steklenicah z 250 mL reagenta, torej je bila množina TMACl v reagenčni steklenici z 0,72Y % reagentom enaka $19,16A \cdot 10^{-3}$ mol, v reagenčni steklenici z 1,81Y % reagentom $47,89A \cdot 10^{-3}$ mol in v reagenčni steklenici s 3,62Y % reagentom $95,76A \cdot 10^{-3}$ mol. V reagenčnih steklenicah smo tako imeli v primeru 0,72Y % raztopine približno 13,92-kratni presežek reagenta, v primeru 1,81Y % raztopine 34,78-kratni presežek reagenta in v primeru 3,62Y % raztopine 69,56-kratni presežek reagenta.

Na vseh CIM kolonah smo po funkcionalizaciji izvedli hidrolizo nezreagiranih epoksi skupin in nato še regeneracijo z 1 M NaOH.

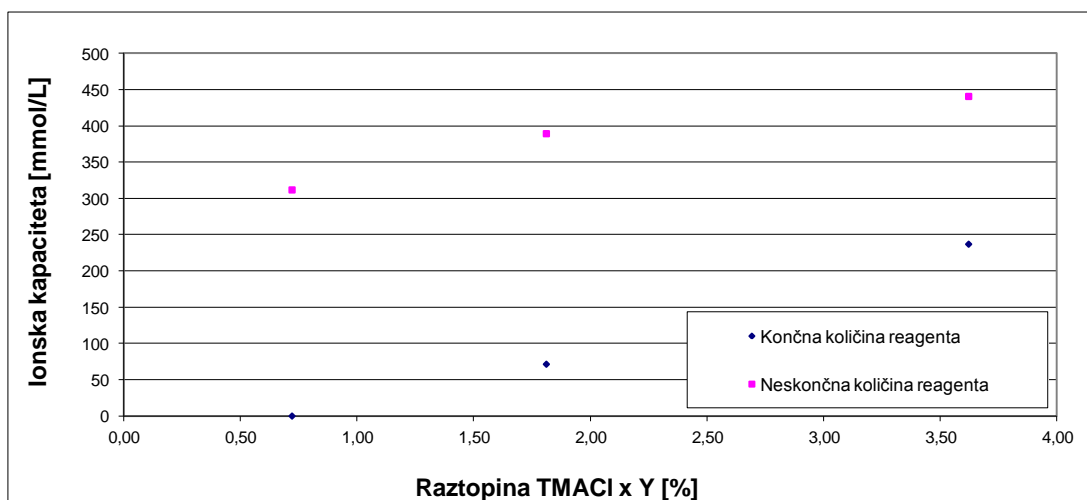
Vsaki tako pripravljeni CIM koloni smo izmeril ionsko kapaciteto (metoda - poglavje 3.2.3) in dinamično vezavno kapaciteto za BSA (metoda - poglavje 3.2.4). Vsako meritev smo ponovili dvakrat.

Posamezni rezultati so podani v prilogah D1, D2, D3 in D4. Povprečje rezultatov obeh meritev ionske kapacitete je podan v tabeli 11 in na sliki 20, dinamične vezavne kapacitete za BSA pa v tabeli 12 in na sliki 25.

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

Tabela 11: Ionske kapacitete CIM QA1 mL kolon, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X+10 °C z reagenti različne koncentracije

Raztopina TMACI	kolona	Ionska kapaciteta [mmol/L]	
		Končna količina reagenta	Neskončna količina reagenta
0,72Y %	k1	nemerljivo	305,9
	k2	nemerljivo	317,8
	povprečje	nemerljivo	311,8
1,81Y %	k1	79,1	391,7
	k2	63,9	387,1
	povprečje	71,5	389,4
3,62Y %	k1	247,6	469,2
	k2	226,4	412,3
	povprečje	237,0	440,7



Slika 20: Odvisnost ionske kapacitete CIM QA 1 mL kolon od koncentracije raztopine TMACI ($t=9,01Z$ h; $T=X+10$ °C)

Iz tabele 11 in grafa 20 je razvidno, da CIM kolonam, ki so bile funkcionalizirane tako, da smo jih prečrpali z 0,72Y % raztopino TMACI, nismo mogli izmeriti ionske kapacitete. To je posledica dejstva, da je metoda optimirana za meritve višjih ionskih kapacitet (nad 50 mmol/L) na CIM monolitih. Če bi znižali koncentracijo mobilne faze A (20mM fosfatni pufer pH 6,5), bi sicer lahko merili tudi nižje fosfatne kapacitete a bi na ta način zmanjšali robustnost metode. Ker smo kolonam funkcionaliziranim z 0,72Y % raztopino TMACI lahko izmerili dinamično vezavno kapaciteto za BSA (tabela 12),

vemo, da je funkcionalizacija na teh kolonah v določeni meri potekala. Pri CIM kolonah, ki so bile prečrpane z 1,81Y % in s 3,62Y % raztopino, lahko opazimo, da ionska kapaciteta narašča skoraj linearno. Pri CIM monolitih, ki so bili funkcionalizirani v reagenčnih steklenicah z velikim pribitkom reagenta, lahko predvidevamo iz oblike krivulje, da se ionske kapacitete bližajo limitnim vrednostim, saj so te ekstremno visoke.

Iz tabele 11 in slike 20 razberemo tudi, da je pri končni količini reagenta dosežena ionska kapaciteta relativno nizka, pri neskončni količini reagenta pa se približuje maksimalni vrednosti. Iz tega lahko sklepamo, da vezane skupine na CIM monolitu ne delujejo odbojno, zato je dostop reagenta do veznih mest v monolitu mogoč z difuzijskim transportom

Tabela 12: Dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 1 mL kolon, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X+10 °C z reagenti različne koncentracije

Raztopina TMACI	kolona	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	
		Končna količina reagenta	Neskončna količina reagenta
0,72Y %	k1	6,7	27,0
	k2	7,0	26,3
	povprečje	6,8	26,7
1,81Y %	k1	17,9	29,9
	k2	17,2	29,8
	povprečje	17,6	29,8
3,62Y %	k1	30,2	37,5
	k2	29,5	39,0
	povprečje	29,8	38,3

Iz tabele 12 je razvidno, da se dinamična vezavna kapaciteta za BSA pri koncentracijah 0,72Y %, 1,81Y % in s 3,62Y % obnaša podobno kot ionska kapaciteta, saj v odvisnosti od koncentracije reagenta uporabljenega pri funkcionalizaciji pri CIM monolitih funkcionaliziranih s končno količino reagenta narašča skoraj linearno, pri CIM monolitih funkcionaliziranih s neskončno količino reagenta pa se dinamična vezavna kapaciteta za BSA prav tako kot ionska bliža limitnim vrednostim.

4.2.3 Odvisnost ionske kapacitete CIM QA nosilca od porabe TMACI

Pri funkcionalizaciji CIM 1 mL kromatografskih nosilcev s TMA smo predpostavljali, da lahko z omejenimi (končnimi) količinami reagenta, pri enakih pogojih (temperatura, trajanje funkcionalizacije), dosežemo enake ionske kapacitete tudi na večjih CIM monolitnih kolonah.

Iz koncentracije reagenta, ki smo ga uporabili pri funkcionalizaciji, smo z upoštevanjem mrtvega volumna kromatografskega ohišja CIM 1 mL kolone in volumna CIM monolita izračunali maso TMACI, ki smo ga porabili za funkcionalizacijo 1 mL CIM monolita.

Iz podatkov o porabljeni masi TMACI na volumen CIM monolita in izmerjeni ionski kapaciteti, ki smo jo po funkcionalizaciji dosegli, smo izdelali umeritveno krivuljo, ki naj bi bila uporabna za napovedovanje funkcionalizacije večjih enot.

V prejšnjih eksperimentih se je funkcionalizacija pri X+10 °C pokazala kot preveč agresivna, saj so nam CIM monoliti pogosto zaradi preveč bume reakcije razpokali. Zato smo kot optimalno temperaturo za eksperiment izbrali X °C. Čas funkcionalizacije smo določili na 9,01Z h, saj je bil po takem času izkoristek reakcije že dovolj velik. Tokrat smo 1 mL CIM kolone prečrpavali z 0,72Y %, 1,81Y %, s 2,72Y %, s 3,62Y %, s 5,43Y % in z 7,25Y % raztopino TMACl. Kolone so bile funkcionalizirane s končno količino reagenta, hidrolizirane in regenerirane po postopku iz Poglavlja 3.2.2.

Rezultati meritev ionske in dinamične vezavne kapacitete za BSA so podani v prilogah E1, E2, E3, E4, E5 in E6. Pred merjenjem dinamične vezavne kapacitete za BSA so bile kolone ponovno regenerirane. Meritev na vsaki funkcionalizirani CIM koloni smo dvakrat ponovili povprečja dveh meritev ionske kapacitete so podana v tabeli 13 in na sliki 21, povprečja dveh meritev dinamične vezavne kapacitete za BSA pa v tabeli 14 in na sliki 22.

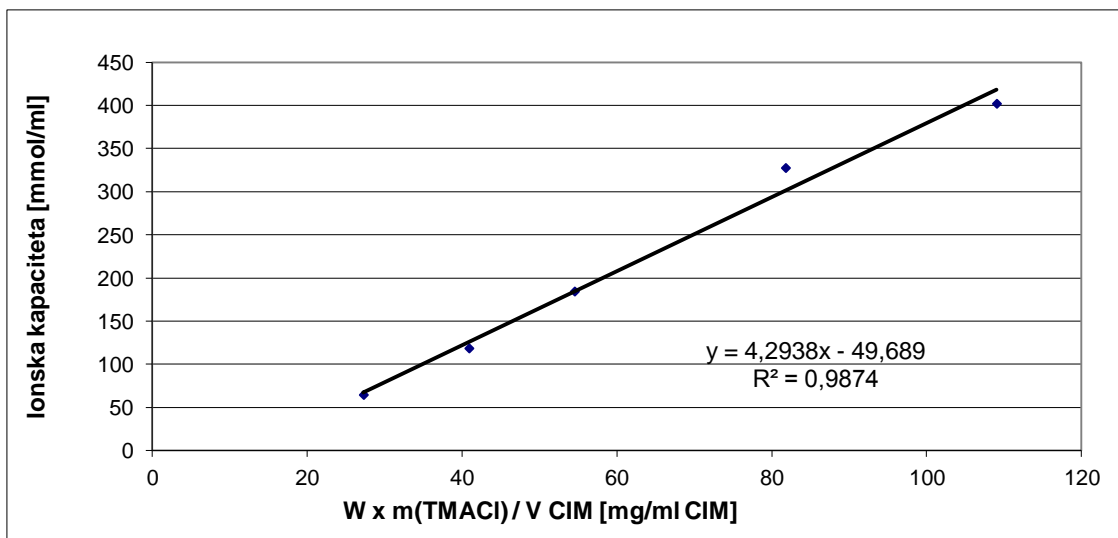
Tabela 13: Povzetek ionskih kapacitet na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X °C z reagenti različne koncentracije

Uporabljena raztopina TMACl [%]	0,72Y	1,81Y	2,72Y	3,62Y	5,43Y	7,25Y
Masa TMACl na volumen CIM [mg/mL]	10,90W*****	27,26W	40,89W	54,52W	81,78W	109,04W
kolona 1	nemerljivo	63,2	113,3	196,9	312,2	403,7
kolona 2	nemerljivo	55,5	138,0	181,8	300,1	425,0
kolona 3	nemerljivo	56,6	104,3	171,7	316,4	294,0
kolona 4	nemerljivo	55,4		184,3	369,5	441,6
kolona 5	nemerljivo	74,9		176,1	340,5	446,7
kolona 6		72,4		196,3		
kolona 7		66,1				
kolona 8		68,1				
kolona 9		64,5				
kolona 10		60,1				
kolona 11		64,5				
kolona 12		74,2				
Ionska kapaciteta [mmol/l CIM]	nemerljivo	64,6	118,6	184,5	327,7	402,2

Opombe:

-W*****: Zaradi zaupnosti podatkov je bil uporabljen iracionalni večkratnik W

Iz tabele 13 smo nato izdelali graf odvisnosti ionske kapacitete od m (TMACl), ki smo ga porabili za funkcionalizacijo 1 mL CIM monolita (slika 21). Takšen graf nam je pri nadaljnjem delu služil kot umeritvena krivulja pri izračunu koncentracije reagenta, ki ga moramo pripraviti za funkcionalizacijo večjih enot.

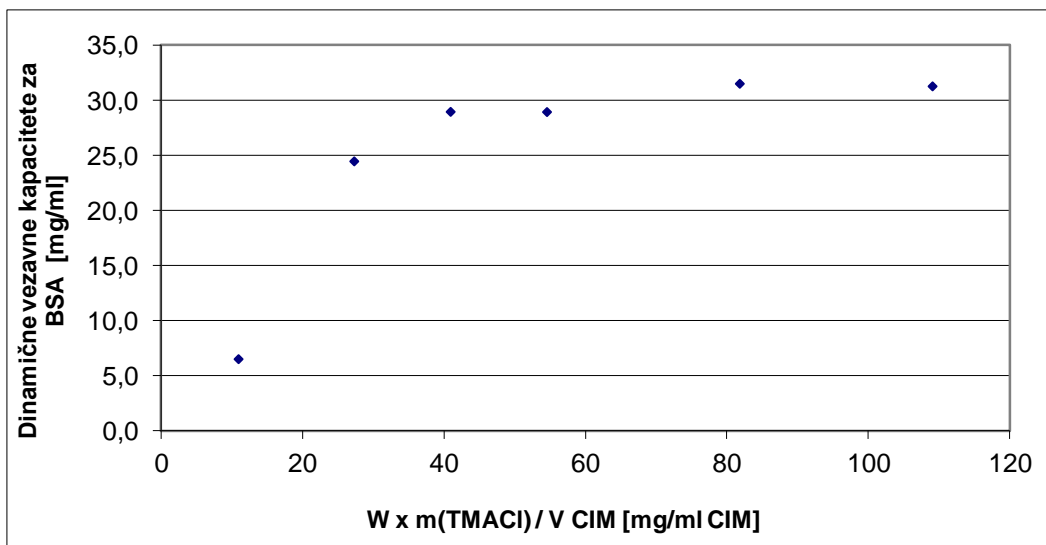


Slika 21: Odvisnost ionske kapacitete CIM QA 1 mL kolon od mase TMACI na volumen CIM monolita ($t=9,01Z$ h; $T=X$ °C)

Pri izdelavi grafa smo uporabili povprečne vrednosti meritev ionskih kapacitet, doseženih pri funkcionalizacijah s TMACI reagenti, različnih koncentracij. Iz grafa smo lahko razbrali, da ionska kapaciteta narašča linearno pri povečevanju količine reagenta, ki smo ga uporabljali za funkcionalizacijo CIM monolitnih kolon s TMACI.

Tabela 14: Dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 1 mL kolon, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X °C z reagenti, različnih koncentracij

uporabljena raztopina TMACI [%]	0,72Y	1,81Y	2,72Y	3,62Y	5,43Y	7,25Y
masa TMACI na ml CIM [mg/mL]	10,9W	27,26W	40,89W	54,52W	81,78W	109,04W
kolona 1	6,2	24,6	29,2	29,0	31,8	32,3
kolona 2	6,6	24,3	30,3	29,3	30,2	31,5
kolona 3	6,7	24,0	27,5	28,8	31,5	25,9
kolona 4	6,5	23,3		29,2	32,4	32,5
kolona 5		24,3		28,6	31,6	34,1
kolona 6		25,3		28,9		
kolona 7		24,4				
kolona 8		24,2				
kolona 9		25,8				
Dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/ml CIM]	6,5	24,5	29,0	28,9	31,5	31,3



Slika 22: Odvisnost dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 1 mL kolon od mase TMACI na volumen CIM monolita ($t=9,01Z$ h; $T=X$ °C)

CIM kolonam smo izmerili tudi dinamično vezavno kapaciteto za BSA, ki pa se zaradi omejene specifične površine CIM nosilca in velikosti molekule BSA ne veča linearno z večanjem ionske kapacitete. Relativno velike molekule proteina prekrijejo vezavna mesta, ki pa so dostopna fosfatnim ionom. Iz oblike krivulje je razvidno, da se dinamična vezavna kapaciteta za BSA hitro približa limitnim vrednostim.

Na podlagi podatkov, ki smo jih dobili iz meritev ionske kapacitete, smo izdelali graf odvisnosti ionske kapacitete CIM QA 1 mL kolon (funkcionaliziranih 9,01Z h pri X °C) od mase TMACI reagenta na volumen CIM Epoxy nosilca (slika 21). Prav tako smo iz teh podatkov razvili empirično formulo za izračun koncentracije TMACI [%], ki je potrebna za doseganje izbrane ionske kapacitete na 1 mL koloni, funkcionalizirani 9,01Z h pri X °C (enačba 5). Formula je izpeljana iz premice, ki smo jo dobili s pomočjo metode linearne regresije (slika 21) in ima obliko:

$$C_{TMACI} = \frac{\frac{m_{TMACI}}{1\text{mL CIM}} \times V_{CIM}}{V_m \times 7,25W \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \quad (5)$$

- C_{TMACI} (uporabljena raztopina TMACI v dH₂O [%])

- $\frac{m_{TMACI}}{1\text{mL CIM}}$ (masa TMACI reagenta na volumen CIM Epoxy nosilca) [mg/mL]

- $V_{CIM}=1,05$ mL (volumen CIM monolita) [mL]

- V_m (mrtvi volumen kromatografskega ohišja 1 mL CIM kolone) [mL]

-7,25W mg/mL (faktor za pretvorbo iz koncentracije TMACI [%] v koncentracijo TMACI [mg/mL])

Iz umeritvene krivulje (slika 21), smo odčitali maso TMACI, ki smo jo potrebovali za funkcionalizacijo 1 mL CIM monolita, da bi dosegli izbrano ionsko kapaciteto. Za cilj smo si na CIM QA monolitnih kolonah postavili doseči ionsko kapaciteto 125 mmol/mL. Iz enačbe premice (slika 21) smo lahko izračunali (enačba 6), da takšno ionsko kapaciteto dosežemo pri uporabljeni masi 40,68W mg TMACI/mL CIM.

$$y = 4,2938x - 49,689$$

$$q_r = 4,2938m - 49,689$$

$$m = \frac{125 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} + 49,689}{4,2938} = 40,68W \frac{\text{mg}}{\text{mL CIM}} \quad (6)$$

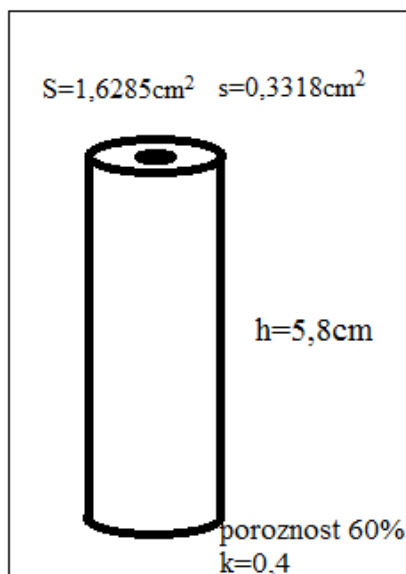
S pomočjo enačbe 6 smo tako izračunali tudi, da bi za to, da dosežemo pri funkcionalizaciji CIM QA 1 mL enote ionsko kapaciteto 125 mmol/mL potrebovali reagent z koncentracijo 2,70Y %. Pri funkcionalizaciji 1mL enot smo uporabljali 20 mL raztopine TMACl. Po starem postopku funkcionalizacije se je za funkcionalizacijo CIM QA 1 mL enote porabilo 15 mL 7,25Y % raztopine TMACl. To pomeni, da smo porabo TMACl pri funkcionalizaciji CIM QA 1 mL enote iz 1,09Q g zmanjšali na 0,541Q g. Z optimizacijo pogojev funkcionalizacije: koncentracije, temperature in časa funkcionalizacije smo določili optimalne pogoje za funkcionalizacijo, tako smo dosegli 50,3 % prihranek reagenta pri funkcionalizaciji CIM QA 1 mL enote, s tem smo dosegli namen, ki smo si ga zadali v prvem delu diplomskega dela.

4.3 Aplikacija novega načina funkcionalizacije na večjih CIM monolitnih kolonah

Da bi potrdili, da je naš postopek funkcionalizacije uporaben tudi na večjih CIM monolitnih kolonah, smo se odločili izvesti tudi funkcionalizacijo večjih CIM monolitnih kolon. Prenos postopka smo izvedli na CIM 8 mL in CIM 80 mL monolitnih kolonah.

4.3.1 Funkcionalizacija 8 mL enote

Da bi lahko uspešno izvedli funkcionalizacijo CIM Epoxy 8 mL monolitne kolone s TMACl reagentom, smo najprej izmerili dimenzije CIM Epoxy 8 mL monolita (slika 23), ki smo ga želeli funkcionalizirati.



Slika 23: Dimenzije CIM Epoxy 8 mL monolita

Izračun volumna CIM Epoxy 8 mL monolita je prikazan z enačbo 7.

$$\begin{aligned}\Delta S &= S - s = 1,2967 \text{ cm}^2 \\ V_{mon} &= \Delta S \times h = 7,52 \text{ cm}^2\end{aligned}\quad (7)$$

Da bi dobili čim bolj reprezentativne podatke uspešnosti funkcionalizacije, smo se odločili, da bomo poskus izvedli na dveh CIM Epoxy 8 mL kolonah.

Po postopku, opisanem v poglavju 3.2.1, smo izmerili mrtvi volumen funkcionalizacijskega ohišja za 8 mL enote. Izračun mrtvega volumna je podan v Poglavju 4.1.1 in znaša 18,46 mL.

Iz umeritvene krivulje smo izračunali, da bi za ciljno ionsko kapaciteto, z vrednostjo 125 mmol/mL, potrebovali 40,68W mg TMACI/mL CIM.

Tako smo iz podatkov izračunali (enačba 8), da za ustrezno funkcionalizacijo 7,52 mL CIM monolita potrebujemo 305,80Q^{*****} mg TMACI.

Izračun:

$$\begin{aligned}m_{TMACI} &= V_{mon} \times m\left(\frac{TMACI}{mL/CIM}\right) \\ m_{TMACI} &= 7,52 \text{ mL} \times 40,68 \frac{\text{W mg}}{\text{mL CIM}} = 305,80 \text{ Q mg}\end{aligned}\quad (8)$$

Opombe:

-Q^{*****}: Zaradi zaupnosti podatkov je bil uporabljen iracionalni večkratnik Q

Ker je mrtvi volumen funkcionalizacijskega ohišja za 8 mL enote 18,46 mL in za funkcionalizacijo takšnega CIM monolita potrebujemo 305,80Q mg TMACI, sledi iz tega (enačba 9), da v funkcionalizacijskem ohišju potrebujemo 1,66Y % raztopino TMACI v dH₂O.

$$\begin{aligned}C_{TMACI} &= \frac{m_{TMACI}}{V_m} \\ C_{TMACI} &= \frac{305,80 \text{ Q mg}}{18,46 \text{ mL}} = 16,59 \text{ W} \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 1,66 \text{ Y} \%\end{aligned}\quad (9)$$

Preko obeh funkcionalizacijskih ohišij smo s peristaltično črpalko prečrpali 70 mL 1,66Y % raztopine TMACI in tako zagotovili, da je bila povsod v funkcionalizacijskem ohišju raztopina TMACI iste koncentracije. Funkcionalizacijski ohišji s CIM monolitoma smo nato zaprili z slepimi čepi in potopili v vodno kopel na X °C za 9,01Z h.

Po končani funkcionalizaciji smo preko ohišji s peristaltično črpalko pretočili 200 mL dH₂O (spiranje nezreagirane reagenta iz ohišja). Nato smo preostale epoksi skupine na CIM monolitu hidrolizirali in izvedli regeneracijo.

Funkcionalizacijski ohišji smo zatem odprli, iz njihju pobrali CIM monolita ter ju vstavili v kromatografski ohišji. Tesnjenje CIM kolon smo preverili z meritvijo pulzne motnje.

Kolonama smo nato izmerili ionsko kapaciteto po postopkih opisanih v poglavju 3.2.3 in dinamično vezavno kapaciteto za BSA po postopkih opisanih v poglavju 3.2.4.

Izmerjene ionske kapacitete so bile blizu ciljani vrednosti, ki je znašala 125 mmol/L CIM in so podane v tabeli 15.

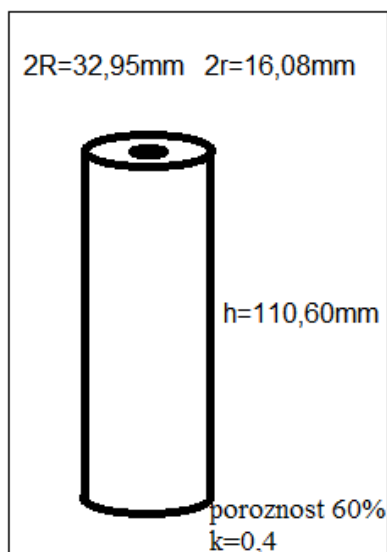
Tabela 15: Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 8 mL kolon, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X °C

Ime kolone	Meritev	Ionska kapaciteta [mmol/l]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/l]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/ml]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/ml]
CIM 8 mL / 1	1.	121,9	122,3	24,6	24,5
	2.	122,7		24,4	
CIM 8 mL / 2	1.	120,2	120,4	24,9	24,8
	2.	120,6		24,7	

S tem smo potrdili hipotezo, da lahko z omejenimi (končnimi) količinami reagenta, pri enakih pogojih (temperatura, trajanje funkcionalizacije) dosežemo enake ionske kapacitete tudi na večjih CIM monolitnih kolonah. Pri starem postopku funkcionalizacije se je za funkcionalizacijo CIM QA 8 mL enote porabilo 150 mL 3,62Y % raztopine TMACI. Po postopku funkcionalizacije, ki smo ga optimirali v tem diplomskem delu, pa se pri funkcionalizaciji CIM QA 8 mL enote porabi 70 mL 1,66Y % raztopine TMACI. To pomeni, da smo porabo TMACI pri funkcionalizaciji CIM QA 8 mL enote iz 5,43Q g zmanjšali na 1,162Q g. Prihranek reagenta pri funkcionalizaciji CIM QA 8 mL enote znaša 78,6 %. Tako smo tudi v primeru CIM QA 8 mL enot dosegli namen racionalizacije porabe reagenta pri funkcionalizaciji. Hipotezo pa smo nato preverili še na 80 mL enoti.

4.3.2 Funkcionalizacija 80 mL enote

Da smo lahko uspešno izvedli funkcionalizacijo CIM Epoxy 80 mL monolitne kolone s TMACI reagentom, smo izmerili dimenzije CIM Epoxy 80 mL monolita (sliko 24) in izračunali njegov volumen (enačba 10).



Slika 24: Dimenzije CIM Epoxy 80 mL monolita

Izračun volumna CIM Epoxy 80 mL monolita:

$$\begin{aligned} S &= \pi \times R^2 = \pi \times (16,48 \text{ mm})^2 = 852,71 \text{ mm}^2 \\ s &= \pi \times R^2 = \pi \times (8,04 \text{ mm})^2 = 203,08 \text{ mm}^2 \\ \Delta S &= S - s = 852,71 \text{ mm}^2 - 203,08 \text{ mm}^2 = 649,63 \text{ mm}^2 \\ V_{\text{CIM Epoxy-80mL}} &= \Delta S \times h = 6,50 \text{ cm}^2 \times 1,06 \text{ cm} = 71,89 \text{ cm}^3 \end{aligned} \quad (10)$$

Po postopku, opisanem v poglavju 3.2.1, smo izmerili mrtvi volumen funkcionalizacijskega ohišja za 80 mL enote. Izračun mrtvega volumna je podan v poglavju 4.1.1 in znaša 91,74 mL.

Iz umeritvene krivulje smo izračunali, da bi za ciljno ionsko kapaciteto, z vrednostjo 125 mmol/L, potrebovali 40,68W mg TMACl/mL CIM.

Tako smo iz podatkov izračunali (enačba 11), da za ustrezno funkcionalizacijo 71,89 mL CIM monolita potrebujemo 2924,57Q mg TMACl.

$$m_{\text{TMACl}} = 71,89 \text{ mL} \times 40,68W \frac{\text{mg TMACl}}{\text{mL CIM}} = 2924,57Q \text{ mg} \quad (11)$$

Ker je mrtvi volumen funkcionalizacijskega ohišja za 80 mL enote 91,74 mL in ker potrebujemo za funkcionalizacijo takšnega CIM monolita 2924,57Q mg TMACl, sledi (enačba 12), da v funkcionalizacijskem ohišju potrebujemo 3,18Y % raztopino TMACl v dH₂O.

$$C_{\text{TMACl}} = \frac{2924,57Q \text{ mg}}{91,74 \text{ mL}} = 31,74W \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 3,18Y \% \quad (12)$$

Preko funkcionalizacijskega ohišja smo s peristaltično črpalko prečrpali 320 mL 3,18Y % raztopine TMACl in tako zagotovili, da je bila posoda v funkcionalizacijskem ohišju raztopina TMACl iste koncentracije. Funkcionalizacijsko ohišje s CIM monolitom smo potopili za 9,01Z h v vodno kopel na X °C.

Po končani funkcionalizaciji smo preko ohišja s peristaltično črpalko pretočili 1000 mL dH₂O (spiranje nezreagirane reagenta iz ohišja). Nato smo koloni hidrolizirali in regenerirali.

Funkcionalizacijsko ohišje smo zatem odprli, iz njega pobrali CIM monolit ter ga vstavili v kromatografsko ohišje. Tesnjenje CIM kolone pa smo preverili z meritvijo pulzne motnje.

CIM koloni smo nato izmerili ionsko kapaciteto po postopkih, opisanih v poglavju 3.2.3, in dinamično vezavno kapaciteto za BSA po postopkih, opisanih v poglavju 3.2.4.

Prva ponovitev meritve ionske kapacitete je znašala 144,6 mmol/L, druga pa 144,7 mmol/L. Dinamična vezavna kapaciteta za BSA je pri prvi meritvi znašala 33,2 mg/mL in pri drugi 28,4 mg/mL. Povprečni vrednosti meritve ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA sta tako znašali 144,7 mmol/L in 30,8 mg/mL. Izmerjena ionska kapaciteta je bila nekoliko višja od pričakovane, a še vedno blizu ciljni vrednosti, ki je znašala 125 mmol/L CIM, da smo lahko ponovno potrdili hipotezo.

Pri starem postopku funkcionalizacije se je za funkcionalizacijo CIM QA 80 mL enote porabilo 600 mL 3,62Y % raztopine TMACl. Po postopku funkcionalizacije, ki smo ga

optimizirali v tem diplomskem delu, pa se pri funkcionalizaciji CIM QA 80 mL enote porabi 320 mL 3,18Y % raztopine TMACI. To pomeni, da smo porabo TMACI pri funkcionalizaciji CIM QA 80 mL enote iz 21,74Q g zmanjšali na 10,180Q g. S tem smo tudi pri CIM QA-80 mL enoti dosegli namen diplomskega dela in racionalizirali porabo reagenta za 53,2 %.

4.4 Primerjava porabe reagenta pri starem in optimiziranem postopku funkcionalizacije

Pri dosedanjih postopkih funkcionalizacije se je za funkcionalizacijo CIM QA 1 mL enote porabilo 15 mL 7,25Y % raztopine TMACI, za funkcionalizacijo CIM QA 8 mL enote 150 mL 3,62Y % raztopine TMACI in za funkcionalizacijo CIM QA 80 mL enote 600 mL 3,62Y % raztopine TMACI.

Po postopku funkcionalizacije, ki smo ga optimirali v tem diplomskem delu, pa se pri funkcionalizaciji CIM QA 1 mL enote porabi le 20 mL 2,70Y % raztopine TMACI, za funkcionalizacijo CIM QA 8 mL enote 70 mL 1,66Y % raztopine TMACI in za funkcionalizacijo CIM QA 80 mL enote 320 mL 3,18Y % raztopine TMACI.

To pomeni, da smo porabo TMACI pri funkcionalizaciji CIM QA 1 mL enote iz 1,09Q g zmanjšali na 0,541Q g, pri funkcionalizaciji CIM QA 8 mL enote iz 5,43Q g na 1,162Q g in pri funkcionalizaciji CIM QA 80 mL enote iz 21,74Q g na 10,180Q g. Prihranek reagenta pri funkcionalizaciji CIM QA 1 mL enote znaša tako 50,3 %, pri funkcionalizaciji CIM QA 8 mL enote 78,6 % in pri funkcionalizaciji CIM QA-80 mL enote 53,2 % (tabela 16).

Tabela 16: Tabela primerjave porabe reagenta pri starem in optimiziranem postopku funkcionalizacije

Nosilec	Star postopek			Optimiziran postopek			Prihranek	
	V (reagenta) [mL]	C (TMACI) [%]	m (TMACI) [g]	V (reagenta) [mL]	C (TMACI) [%]	m (TMACI) [g]	m (TMACI) [g]	Prihranek [%]
CIM QA 1mL	15	7,25Y	1,09Q	20	2,70Y	0,541Q	0,549Q	50,3
CIM QA 8mL	150	3,62Y	5,43Q	70	1,66Y	1,162Q	4,268Q	78,6
CIM QA 80mL	600	3,62Y	21,74Q	320	3,18Y	10,180Q	11,560Q	53,2

5 ZAKLJUČKI

V diplomskem delu smo na CIM monolitnih nosilcih volumna 1 mL raziskovali mehanizme funkcionalizacije le teh s trimetilaminom. Optimizirali smo temperaturo, trajanje funkcionalizacije in koncentracijo reagenta. Primerjali smo hitrosti reakcije pri X °C in pri 10 °C višji temperaturi ter ugotovili, da je reakcija pri višji temperaturi predvsem v začetni fazi mnogo hitrejša. Izkoristek porabe reagenta pri daljšem trajanju funkcionalizacije pa ni veliko večji. V nadaljevanju diplomskega dela se je reakcija pri višji temperaturi pokazala kot preveč agresivna, kar se je kazalo na poškodbah monolitov. Zato smo kot optimalno temperaturo funkcionalizacije izbrali X °C.

Optimalno trajanje funkcionalizacije smo določili na 9,01Z ur, saj smo se ob takšnem trajanju funkcionalizacije že zelo približali ionskim kapacitetam, ki smo jih dosegli pri več kot trikrat daljšem času.

S primerjavo funkcionalizacije v končni in neskončni količini reagenta smo pokazali, da skupine trimetilamina vezane na CIM monolit ne delujejo odbojno in je dostop reagenta do veznih mest v monolitu mogoč z difuzijskim transportom.

S spreminjanjem koncentracije reagenta pri določenima trajanju in temperaturi funkcionalizacije (9,01Z h in X °C) smo izdelali umeritveno krivuljo za izdelavo CIM QA monolitnih kolon z želeno ionsko kapaciteto. Kot cilj smo si zastavili doseči ionsko kapaciteto 125 mmol/L. Izračunali smo, da bi za dosego takšne ionske kapacitete na CIM QA 1 mL koloni porabili 0,541Q g TMACI. Po starem postopku funkcionalizacije smo porabili 1,09Q g TMACI. V primeru CIM QA 1 mL smo tako dosegli cilj zmanjšanja porabe reagenta, saj je bila poraba manjša za 50,3 %.

Nov postopek funkcionalizacije smo nato preverili pri izdelavi 8 mL in 80 mL enote. V obeh primerih smo se približali ciljani vrednosti ionske kapacitete in na tak način porabo reagenta v primeru 8 mL enote zmanjšali iz 5,43Q g na 1,162Q g, torej za 78,6 %, v primeru 80 mL enote pa iz 21,74Q g na 11,56Q g, torej za 53,2 %.

Z optimizacijo uporabe TMACI pri funkcionalizaciji monolitnih kromatografskih nosilcev smo našli način, kako se izogniti neučinkoviti izrabi reagenta. S sedanjim boljšim razumevanjem poteka reakcij lahko zagotovimo v prihodnosti še manjšo porabo reagenta tudi z uporabo novejših tehnoloških rešitev. Optimizacija pa se bo pokazala kot še pomembnejši faktor varovanja okolja pri izdelavi večjih serij ali večjih enot CIM QA monolitnih nosilcev. Podoben način optimizacije je uporaben tudi pri racionalizaciji drugih reagentov, ki se uporabljajo pri različnih funkcionalizacijah CIM monolitnih nosilcev.

6 VIRI

- [1] Willey G.R. Trimethylamine-a pungent experience. *Education in Chemistry* 22, (1985) 175-178
- [2] Hoffman W. Beitrage zur kenntnifs der fluchtigen organischen basen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 79, (1851) 11-39
- [3] Hartley G.S., Howes R. 1963 Agricultural chemical compositions. British patent 945,059 (Fisons Pest Control Ltd.) *Chemical Abstracts* (1964) 60
- [4] Rotenberg Y.S., Mashbits F.D., The toxic effect of low concentrations of trimethylamine. *Gigiena Truda i Professional'nye Zabolevaniia* 11, (1967) 26-30 *Chemical Abstracts* (1967) 67, 36131
- [5] Guest I., Varma D.R. Selective growth inhibition of the male progeny of mice treated with trimethylamine during pregnancy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 71, (1993) 185–187
- [6] Anthoni U., Christophersen C., Gram L., Nielsen N.H., Nielsen P. Poisonings from flesh of the Greenland shark *Somniosus microcephalus* may be due to trimethylamine. *Toxicon* 29, 10 (1991) 1205-1212
- [7] Grant W.M., Schuman J.S. 1993 *Toxicology of the Eye*, 4th edition Charles C. Thomas: 104 str.
- [8] Kenyon S., Carmichael P.L., Khalaque S., Panchal S., Waring R., Harris R., Smith R.L., Mitchell S.C. The passage of trimethylamine across rat and human skin. *Food and Chemical Toxicology* 42 (2004) 1619-1628
- [9] Coccia S.P., Saimona M. Liver DNA alkylatation after a single carcinogenic dose of dimethylnitrosamine to newborn and adult CFW Swiss mice. *Chemical and Biological Interactions* 68, (1988) 259–271
- [10] Švec F., Tennikova T.B. Polymeric separation media for chromatography of biopolymers in a novel shape. Macroporous membranes. *The Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 6, (1991) 393
- [11] Podgornik A. Imobilizacija in karakterizacija lastnosti nekaterih encimov in protiteles vezanih na kompaktnem poli-(glicidilmetakrilatnemetilen-dimetakrilatnem) nosilcu. Doktorska disertacija, FKKT, Univerza v Ljubljani 1998
- [12] Štrancar A., Podgornik A., Barut M., Necina R. Short Monolithic Columns as Stationary Phases for Biochromatography. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 76, (2002) 71
- [13] Heftmann E. *Chromatography 6th edition – fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods*, Elsevier B.V. 2004, *Journal of chromatography library* – vol. 69A, str. 95 – 364.
- [14] Arshady R. Development of new hydrophilic polymer supports based on dimethylacrylamide. *Colloid Polym Science* 268, (1990) 948-958

- [15] Cháfer-Pericás C., Herráez-Hernández R., Campins-Falco P. Selective determination of trimethylamine in air by liquid chromatography using solid phase extraction cartridges for sampling. *Journal of Chromatography A* 1042, (2004) 219-223
- [16] Uradni list RS - L 377 (31991L0689) , 31/12/1991 str. 0020 – 0027.
- [17] Lendero N., Vidič J., Brne P., Frankovič V., Štrancar A., Podgornik A. Characterization of ion exchange stationary phases via pH transition profiles. *Journal of Chromatography A* 1185, (2008) 59 – 70.
- [18] Brodnjak Vončina D. 2006. Analizna kemija I. Zbrano gradivo. Univerza v Mariboru. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 69 str.
- [19] Anonimen avtor. 2002 Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods. AA izdaja, Amersham Biosciences Uppsala: 159 str.
- [20] Anonimen avtor. 2004 Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods. AA izdaja, Amersham Biosciences Uppsala: 184 str.
- [21] Jungbauer A., Hahn R. Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies. *Journal of Chromatography A* 1184, (2008) 62-79
- [22] Han Y., Liu S., Ho J., Danquah M.K., Forde G.M. Using DNA as a drug-Bioprocessing and delivery strategies. *Chemical Engineering Research and Design* 87, (2009) 343-348
- [23] Himmelhoch S.R. Chromatography of proteins on ion-exchange adsorbents. *Methods in Enzymology*. 22, (1971) 273-286
- [24] Brne P., 2002: Primerjava predkolon za ekstrakcijo na trdni fazi, Diplomsko delo, FKKT, UL
- [25] Švec F., Frechet J.M.J. New Designs of Macroporous Polymers From Separation to Biocatalysis, *Science* 273, (1996) 206
- [26] Štrancar A., Barut M., Podgornik A., Koselj P., Josič D., Buchacher A. Convective Interaction Media: polymer-based supports for fast separation of biomolecules. *LC-GC International* 10, (1998) 660
- [27] Podgornik A., Barut M., Štrancar A., Josič D., Koloini T. Construction of Large-Volume Monolithic Columns. *Analytical Chemistry* 72, (2000) 5693
- [28] Štrancar A., Koselj P., Schwinn H., Josič D.; Application of compact porous disks for fast separations of biopolymers and in-process control in biotechnology. . *Analytical Chemistry* 68, (1996) 3483
- [29] Merhar M., Podgornik A., Barut M., Jakša S., Žigon M., Štrancar A. High performance reversed-phase liquid chromatography using novel (CIM®) RP-SDVB monolithic supports. *The Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 24, (2001) 2429

- [30] Štrancar A., Podgornik A., Barut M., Necina R. Short Monolithic Columns as Stationary Phases for Biochromatography. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 76, (2002) 71
- [31] Barut M. Polimerni makroporozni materiali za hitro industrijsko separacijo Biomolekul. Doktorska disertacija, FKKT, Univerza v Ljubljani 1999.
- [32] Tennikova T.B., Švec F. High-Performance Membrane Chromatography: Highly Efficient Separation Method for Proteins in Ion-Exchange, Hydrophobic Interaction and Reversed-Phase Modes. *Journal of Chromatography* 646, (1993) 279
- [33] Kalal J., Švec F., Maroušek V. Reactions of epoxide groups of glycidyl methacrylate copolymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia* 47, (1974) 155-166
- [34] Hennion M.C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 856, (1999) 5-8
- [35] Lee H., Newille K. 1981 Handbook of Epoxy Resins, McGraw Hill: 960 str.
- [36] F.Švec, J.M.J. Frechet. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Analytical Chemistry* 64, (1992) 820-822
- [37] Lendero N., Vidič J., Brne P., Frankovič V., Štrancar A., Podgornik A. Characterization of ion exchange stationary phases via pH transition profiles. *Journal of Chromatography* 1185, (2008) 59–70
- [38] Mandel M., Mark H.F., Bikales N.M., Overberger C.G., Menges G, Kroschwitz J.I. 1988 Encyclopedia of Polymer Science and Engineering vol. 11. John Wiley & Sons: 739 str.
- [39] Lendero N., Vidič J., Brne P., Podgornik A., Štrancar A., Simple method for determining the amount of ion-exchange groups on chromatographic supports. *Journal of Chromatography A* 1065, (2005) 29-38
- [40] Virus downstream processing using CIM monoliths. 2010. Bia Separations d.o.o. <http://www.biaseparations.com/f/405/virus-dsp-brochure-pdf> (25.8.2011)
- [41] Hahn R., Jungbauer A. Control method for integrity of continuous beds. *Journal of Chromatography A* 908, (2001) 179-184

Priloga A

Tabela rezultatov tehtanja pri določanju mrtvega volumna 1 mL kromatografskega ohišja

	Masa ohišja in monolita omočenega z dH ₂ O [g]	Masa ohišja s posušenim CIM monolitom [g]	Δm [g]	V_m [mL]
Kolona 1	75,65	74,10	1,55	1,55
Kolona 2	74,91	73,29	1,62	1,62
Povprečje	75,28	73,70	1,59	1,59

Priloga B1

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X °C z 1,81Y % reagentom TMACI, trajanje funkcionalizacije 1,5Z h

Kolona	Meritev	Ionska kapaciteta [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	16,9	16,8	17,5	17,4
	2	16,6		17,2	
2	1	18,9	18,6	19,1	19,0
	2	18,3		18,9	
3	1	17,6	17,5	17,1	17,0
	2	17,3		16,9	
4	1	19,1	19,1	18,3	18,3
	2	19		18,3	

Priloga B2

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri x °C z 1,81Z % reagentom TMACl, trajanje funkcionalizacije 3Z h

Kolona	Meritev	Ionska kapaciteta [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	46,7	46,4	25,2	25,0
	2	46,1		24,8	
2	1	42,2	41,7	24,6	24,5
	2	41,2		24,4	
3	1	38,5	38,9	22,6	22,5
	2	39,3		22,5	
4	1	49,2	49,3	25,3	25,2
	2	49,4		25,1	

Priloga B3

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X °C z 1,81Y % reagentom TMACl, trajanje funkcionalizacije 9,01Z h

Kolona	Meritev	Ionska kapaciteta [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	55,4	55,5	25,0	24,6
	2	55,7		24,3	
2	1	75,7	74,9	24,6	24,3
	2	74,1		24,1	
3	1	72,8	72,4	24,1	24,0
	2	72,0		23,9	
4	1	66,1	66,1	23,3	23,3
	2	66,1		23,2	
5	1	68,2	68,1	24,3	24,3
	2	68,0		24,4	
6	1	65,3	64,5	25,4	25,3
	2	63,7		25,1	
7	1	59,9	60,1	24,5	24,4
	2	60,3		24,2	
8	1	63,6	64,5	24,1	24,2
	2	65,5		24,4	
9	1	74,2	74,2	25,7	25,8
	2	74,2		25,9	

Priloga B4

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X °C z 1,81Y % reagentom TMACl, trajanje funkcionalizacije 18,03Z h

Kolona	Meritev	Ionska kapaciteta [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	61,9	61,4	25,5	25,4
	2	60,9		25,3	
2	1	66,8	66,8	25,5	25,5
	2	66,8		25,4	
3	1	70,9	71,0	25,6	25,7
	2	71,1		25,7	
4	1	62,5	62,5	23,8	23,9
	2	62,5		23,9	
5	1	61,4	60,9	24,2	24,2
	2	60,5		24,2	
6	1	68,0	71,0	24,9	24,7
	2	74,0		24,5	
	3	63,7			
7	1	69,3	68,9	24,7	24,5
	2	68,5		24,3	
8	1	64,7	65,9	24,5	24,6
	2	67,0		24,6	
9	1	73,1	72,5	26,4	25,9
	2	71,9		25,5	
10	1	62,2	62,9	25,0	25,0
	2	63,6		24,9	

Priloga B5

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X °C z 1,81Y % reagentom TMACI, trajanje funkcionalizacije 28,76Z h

Kolona	Meritev	Ionska kapaciteta [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	73,4	73,0	22,9	22,9
	2	72,7		22,9	
2	1	70,7	70,8	22,7	22,6
	2	71,0		22,4	
3	1	74,7	74,7	25,2	25,2
	2	74,7		25,2	
4	1	72,2	72,7	25,2	25,1
	2	73,1		25,0	
5	1	78,3	78,1	25,3	25,2
	2	77,9		25,2	

Priloga C1

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X+10 °C z 1,81Y % reagentom TMACl, trajanje funkcionalizacije 1,5Z h

Kolona	Meritev	Kapaciteta-ionska [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	54,3	55,6	18,3	18,3
	2	56,9		18,3	
2	1	53,2	53,9	18,7	18,8
	2	54,5		18,8	
3	1	48,6	48,4	20,3	20,3
	2	48,1		20,3	
4	1	42,0	41,8	22,1	22,0
	2	41,5		22,0	

Priloga C2

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X+10 °C z 1,81Y % reagentom TMACl, trajanje funkcionalizacije 3,0Z h

Kolona	Meritev	Kapaciteta-ionska [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	54,8	54,9	20,3	20,4
	2	55,0		20,4	
2	1	51,3	51,2	20,9	20,9
	2	51,0		20,8	
3	1	44,7	45,2	21,2	21,2
	2	45,6		21,1	
4	1	48,7	48,5	20,4	20,3
	2	48,4		20,1	
5	1	50,1	49,9	20,2	20,0
	2	49,6		19,9	
6	1	47,6	47,1	21,2	21,2
	2	46,7		21,2	

Priloga C3

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X+10 °C z 1,81Y % reagentom TMACl, trajanje funkcionalizacije 9,01Z h

Kolona	Meritev	Kapaciteta-ionska [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	60,9	61,4	18,1	18,0
	2	61,8		17,9	
2	1	63,1	63,4	17,8	17,8
	2	63,8		17,8	
3	1	82,7	82,3	24,4	24,5
	2	82,0		24,5	
4	1	68,2	68,6	23,7	23,6
	2	69,0		23,5	
5	1	83,7	83,6	23,2	23,2
	2	83,6		23,3	
6	1	66,4	66,9	23,5	23,4
	2	67,5		23,3	

Priloga C4

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X+10 °C z 1,81Y % reagentom TMACI, trajanje funkcionalizacije 18,03Z h

Kolona	Meritev	Kapaciteta-ionska [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	73,9	74,9	18,2	18,2
	2	75,9		18,2	
2	1	69,1	69,0	18,1	18,1
	2	68,8		18,0	
3	1	64,5	64,3	23,2	23,4
	2	64,0		23,5	
4	1	70,7	72,9	24,1	24,0
	2	75,1		23,9	
5	1	73,0	73,0	23,5	23,3
	2	73,0		23,1	
6	1	70,2	70,9	23,8	23,7
	2	71,6		23,7	

Priloga C5

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih pri X+10 °C z 1,81Y % reagentom TMACI, trajanje funkcionalizacije 28,76Z h

Kolona	Meritev	Kapaciteta-ionska [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	77,8	77,3	21,8	21,8
	2	76,8		21,7	
2	1	79,9	80,1	22,9	23,0
	2	80,3		23,0	
3	1	85,6	85,9	23,1	23,0
	2	86,2		22,9	
4	1	77,0	76,9	22,2	22,2
	2	76,8		22,2	
5	1	89,1	89,3	24,1	24,2
	2	89,6		24,2	

Priloga D1

Ionske kapacitete CIM QA1 mL kolon, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X+10 °C z reagenti različne koncentracije (končna količina reagenta)

Raztopina TMACl (Končna količina reagenta)	kolona	Ionska kapaciteta [mmol/L]		
		meritev 1	meritev 2	povprečje
0,72Y %	k1	nemerljivo	nemerljivo	nemerljivo
	k2	nemerljivo	nemerljivo	nemerljivo
	povprečje	nemerljivo		
1,81Y %	k1	80	78,2	79,1
	k2	63,5	64,3	63,9
	povprečje	71,5		
3,62Y %	k1	245,1	250,1	247,6
	k2	225,3	227,5	226,4
	povprečje	237		

Priloga D2

Ionske kapacitete CIM QA1 mL kolon, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X+10 °C z reagenti različne koncentracije (neskončna količina reagenta)

Raztopina TMACI (Neskončna količina reagenta)	kolona	Ionska kapaciteta [mmol/L]		
		meritev 1	meritev 2	povprečje
0,72Y %	k1	304,6	307,2	305,9
	k2	316,2	319,4	317,8
	povprečje	311,8		
1,81Y %	k1	392	391,4	391,7
	k2			387,1
	povprečje	389,4		
3,62Y %	k1	469,2	469,2	469,2
	k2	411,3	413,3	412,3
	povprečje	440,7		

Priloga D3

Dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 1 mL kolon, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X+10 °C z reagenti različne koncentracije (končna količina reagenta)

Raztopina TMACI (Končna količina reagenta)	kolona	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]		
		meritev 1	meritev 2	povprečje
0,72Y %	k1	6,5	6,9	6,7
	k2	6,8	7,2	7
	povprečje	6,8		
1,81Y %	k1	18	17,8	17,9
	k2	17,5	16,9	17,2
	povprečje	17,6		
3,62Y %	k1	31,2	29,2	30,2
	k2	31,3	27,7	29,5
	povprečje	29,8		

Priloga D4

Dinamične vezavne kapacitete za BSA CIM QA 1 mL kolon, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X+10 °C z reagenti različne koncentracije (neskončna količina reagenta)

Raztopina TMACl (Neskončna količina reagenta)	kolona	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]		
		meritev 1	meritev 2	povprečje
0,72Y %	k1	25,9	28,1	27
	k2	26,3	26,3	26,3
	povprečje	26,7		
1,81Y %	k1	30	29,8	29,9
	k2	31,2	29,4	29,8
	povprečje	29,8		
3,62Y %	k1	37,5	37,5	37,5
	k2	41,1	37,9	39
	povprečje	38,3		

Priloga E1

Ionske kapacitete na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X °C z 0,72Y % reagentom

Kolona	Meritev	Ionska kapaciteta [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	nemerljivo	nemerljivo	6,2	6,2
	2	nemerljivo		6,2	
2	1	nemerljivo	nemerljivo	6,6	6,6
	2	nemerljivo		6,6	
3	1	nemerljivo	nemerljivo	7,6	6,7
	2	nemerljivo		5,8	
4	1	nemerljivo	nemerljivo	6,5	6,5
	2	nemerljivo		6,5	

Priloga E2

Ionske in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih
9,01Z h pri X °C z 1,81Y % reagentom

Kolona	Meritev	Ionska kapaciteta [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	63,9	63,2		pušča
	2	62,6			
2	1	55,4	55,5		pušča
	2	55,7			
3	1	52,8	56,6		pušča
	2	64,0			
	3	52,9			
4	1	54,3	55,4	25,0	23,3
	2	56,6		24,3	
5	1	75,7	74,9	24,6	24,3
	2	74,1		24,1	
6	1	72,8	72,4	24,1	25,3
	2	72,0		23,9	
7	1	66,1	66,1	23,3	24,4
	2	66,1		23,2	
8	1	68,2	68,1	24,3	24,2
	2	68,0		24,4	
9	1	65,3	64,5	25,4	25,8
	2	63,7		25,1	
10	1	59,9	60,1	24,5	24,4
	2	60,3		24,2	
11	1	63,6	64,5	24,1	24,2
	2	65,5		24,4	
12	1	74,2	74,2	25,7	25,8
	2	74,2		25,9	

Priloga E3

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah, funkcionaliziranih 9,01Z h pri X °C s 2,72 % reagentom

Kolona	Meritev	Ionska kapaciteta [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	115,2	113,3	29,2	29,2
	2	111,5		29,1	
2	1	131,4	138,0	30,4	30,3
	2	141,3		30,2	
	3	141,4			
3	1	104,9	104,3	27,5	27,5
	2	103,7		27,5	

Priloga E4

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah,
funkcionaliziranih 9,01Z h pri X °C s 3,62Y % reagentom

Kolona	Meritev	Ionska kapaciteta [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	196,9	196,9	29,3	29,0
	2	196,9		28,7	
2	1	181,8	181,8	29,4	29,3
	2	181,8		29,1	
3	1	171,3	171,7	28,9	28,8
	2	172,2		28,7	
4	1	184,3	184,3	29,3	29,2
	2	184,3		29,1	
5	1	177,0	176,1	28,5	28,6
	2	175,3		28,7	
6	1	196,3	196,3	29,0	28,9
	2	196,3		28,9	

Priloga E5

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah,
funkcionaliziranih 9,01Z h pri X °C s 5,43Y % reagentom

Kolona	Meritev	Ionska kapaciteta [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	312,2	312,2	31,9	31,8
	2	pušča		31,7	
2	1	285,5	285,8	30,2	30,2
	2	286,1		30,2	
3	1	296,8	301,3	31,8	31,5
	2	305,8		31,3	
4	1	350,8	351,9	32,3	32,4
	2	353,1		32,5	
5	1	322,4	324,3	31,7	31,6
	2	326,1		31,5	

Priloga E6

Ionske kapacitete in dinamične vezavne kapacitete za BSA na CIM QA 1 mL kolonah,
funkcionaliziranih 9,01Z h pri X °C s 7,25Y% reagentom

Kolona	Meritev	Ionska kapaciteta [mmol/L]	Povprečje ionske kapacitete [mmol/L]	Dinamična vezavna kapaciteta za BSA [mg/mL]	Povprečje dinamične vezavne kapacitete za BSA [mg/mL]
1	1	403,2	403,7	32,6	32,3
	2	404,2		32,1	
2	1	421,7	425,0	31,4	31,5
	2	428,2		31,7	
3	1	307,1	294,0	25,8	25,9
	2	289,2		26,1	
	3	285,7			
4	1	442,1	441,6	32,4	32,5
	2	441,1		32,7	
5	1	451,3	446,7	34,0	34,1
	2	437,4		34,1	
		451,3			