

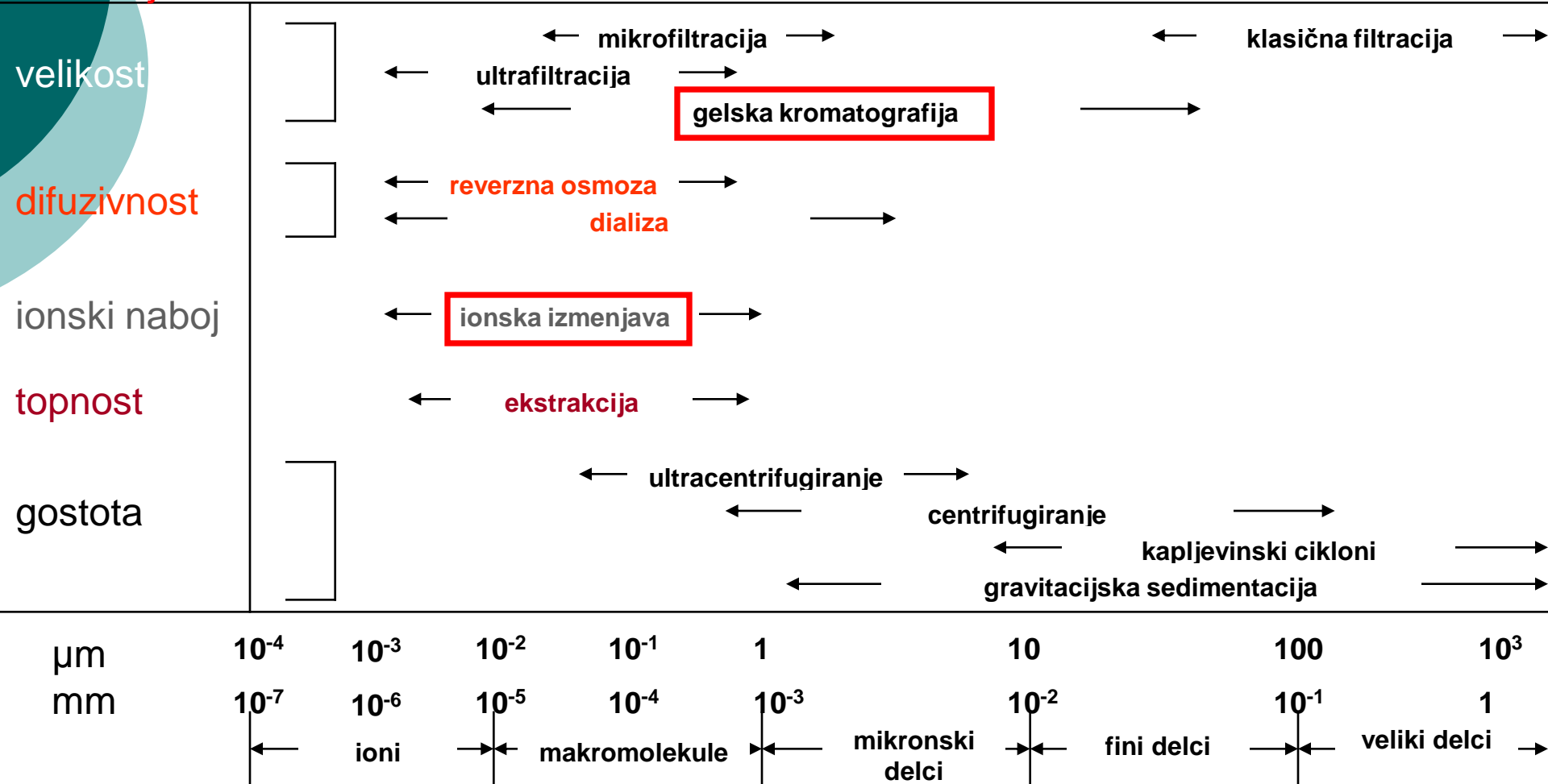


ZAKLJUČNI PROCESI V BIOTEHNOLOGIJI

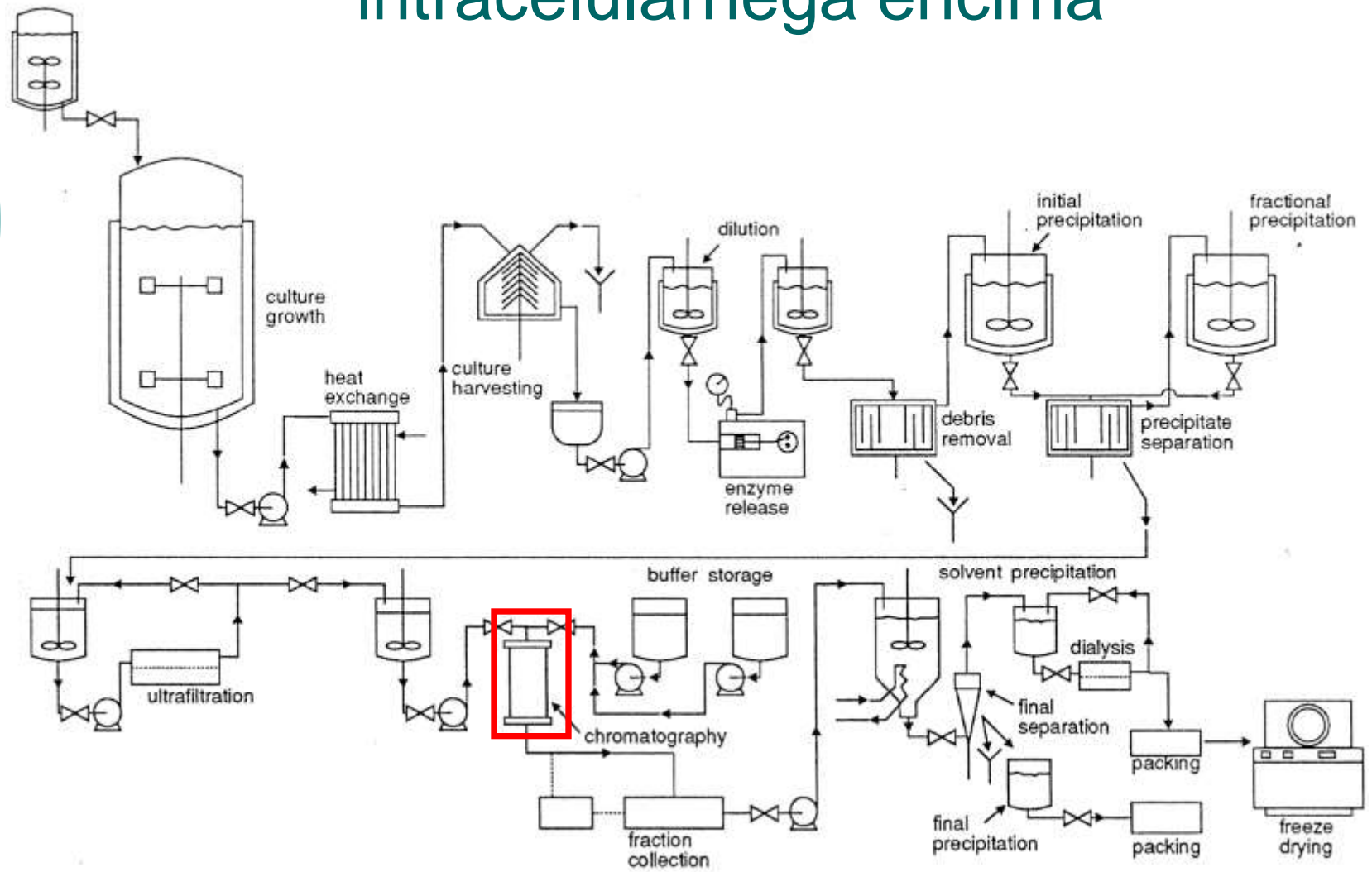
Kromatografija - čiščenje

Ločevanje glede na lastnosti snovi

osnovni
parameter
ločevanja



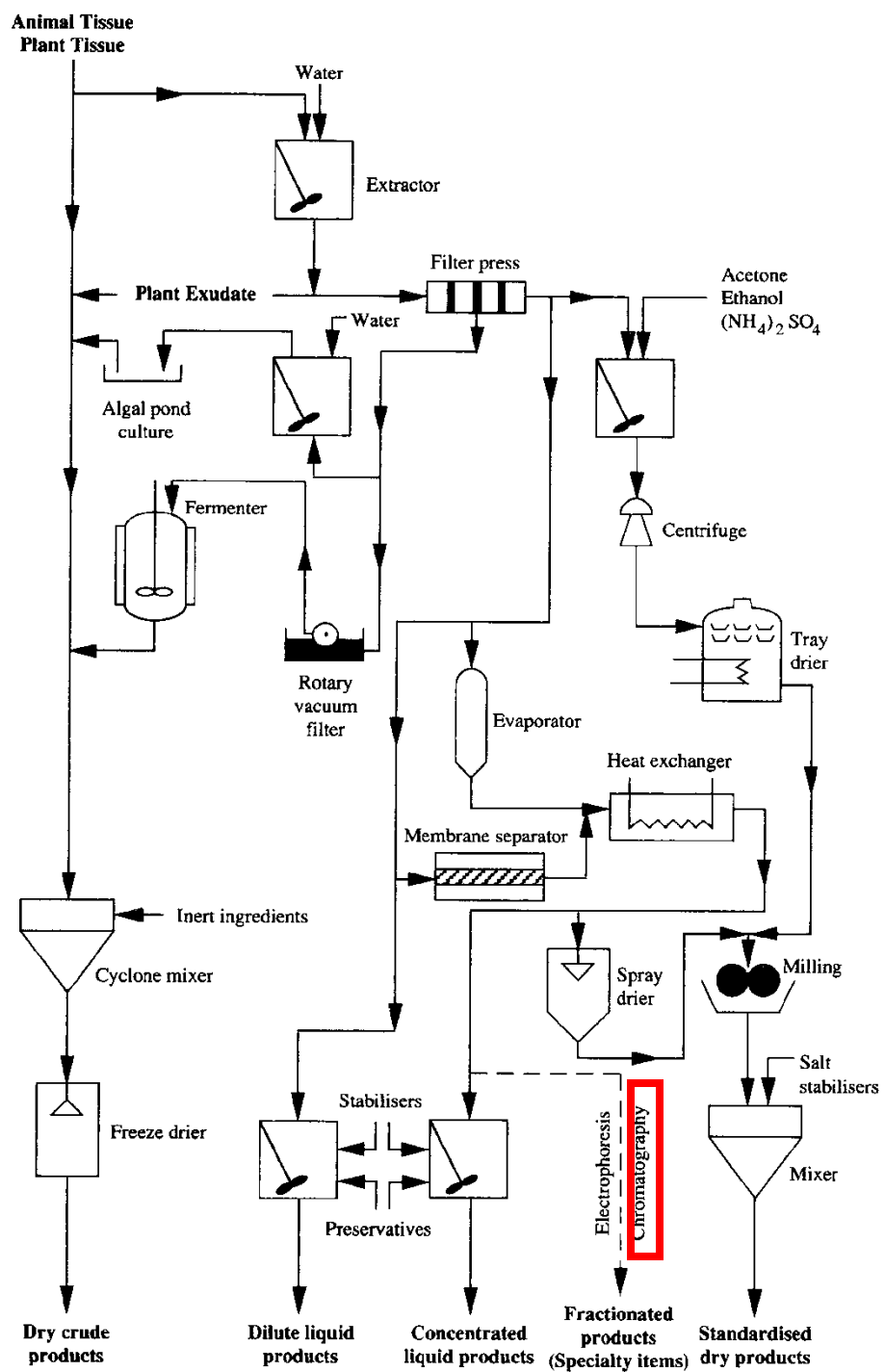
Primer: izolacija in čiščenje intracelularnega encima



Shema procesa

Proizvodnja encimov

vir: Doran, 1995.
Bioprocess Engineering
Principles, str. 219



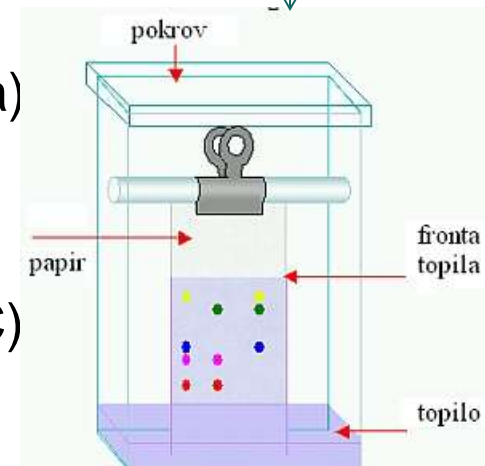
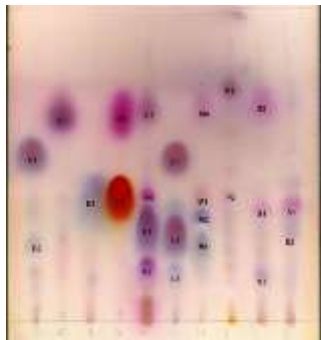
Zahteve preparatov za medicinsko uporabo

Kriterij	Zahteva
<i>Čistost</i>	
Vsebnost proteina	> 99.9 %
Vsebnost di- in oligomerov	< 1.0
Izluževanje liganda	navadno > 1 ppm
Vsebnost virusov	odsotnost z verjetnostjo <10 ⁻⁹
Vsebnost DNA	< 10 pg/dozo
Vsebnost endotoksinov	1 E.U./dozo
Vsebnost prionov	odsotnost z verjetnostjo <10 ⁻⁹
<i>Konsistenca</i>	
mikroheterogenost	dovoljena, a konsistentna
nečistoče	dovoljene, a konsistentne
<i>Aktivnost</i>	
zvitje	pravilno zvit
mutacije	pravilna ekspresija, nobenih mutacij
procesiranje	pravilno procesiranje

Kromatografija je trenutno edina metoda, ki omogoča očiščenje ciljne makromolekule do stopnje, ki je potrebna za uporabo v medicini.

Kromatografija

- *chromos* (gr.): barva; *grafein* (gr.): pisati
- razvil leta 1903 ruski botanik M. Cvet: ločeval zmesi barvil v zelenih rastlinah
- ločevanje molekul na osnovi njihove porazdelitve med dve fazi:
 - stacionarna faza:
 - filtrirni papir (papirna kromatografija)
 - plošče iz stekla, plastike ali aluminijeve folije, ki so prekrte s tanko plastjo adsorpcijskega materiala (tankoplastna kromatografija, TLC)
 - delci ali monoliti (kolonska kromatografija)
 - mobilna faza (tekočina, ki potuje)
 - plin (plinska kromatografija, GC)
 - kapljevina (tekočinska kromatografija, LC)



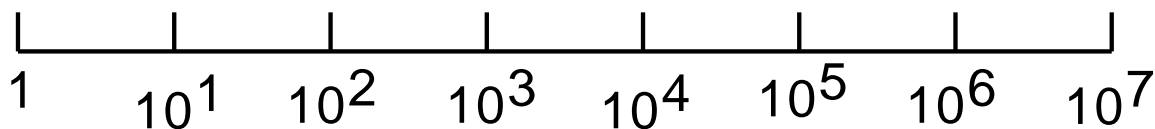
Kromatografija

Vrste kromatografij glede na velikost molekul topljenca

IZKLJUČITVENA KROMATOGRFIJA

TEKOČINSKA KROMATOGRFIJA

PLINSKA KROMATOGRFIJA



DALTON

GC: gas chromatography
= plinska kromatografija

LC: liquid chromatography
= tekočinska
kromatografija

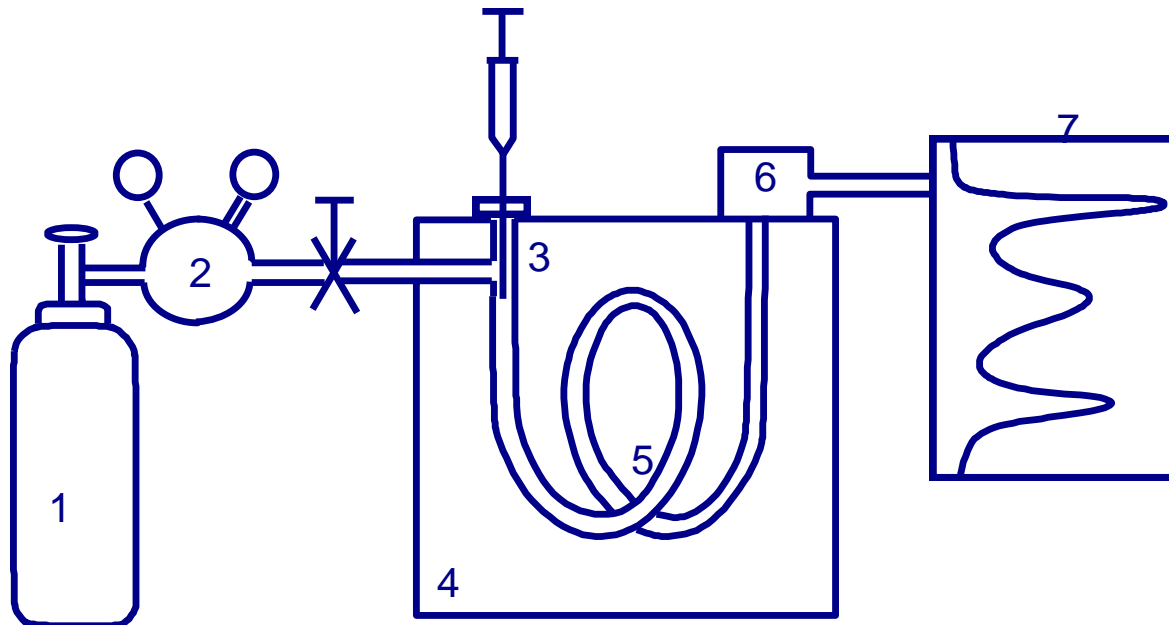
SEC: size exclusion
chromatography
= gelska filtracija oz.
izključitvena
kromatografija

Potekajo lahko različni procesi:
površinska adsorpcija, porazdelitev, raztapljanje, ionska izmenjava...

Plinska kromatografija

Plinski kromatograf

- injektor
- kromatografska kolona (polnjene in kapilarne kolone)
- detektor (FID-flame ionization detector, TCD – thermal conductivity detector, ...)



Kolone v plinski kromatografiji

Polnjene kolone ('packed columns'):

kovinske ali steklene z d_i od 2 – 8 mm in L okrog 3 m. Napolnjene so s trdnim, inertnim polnilom, ki je prevlečen s tekočo stacionarno fazo.

Velikost delcev polnila: 150 – 125 μm .

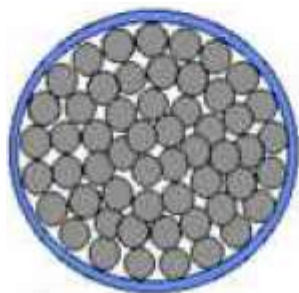
Notranji premer kolone: vsaj 8-krat večji od premera delcev polnila.

Kapilarne kolone ('capillary columns')

iz staljenega kvarca ('fused silica') d_i manjši od 1 mm, L do 50 m.

Stene so prevlečene z ustrezno stacionarno fazo (1-2 μm) - WCOT ('Wall-Coated-Open-Tubular'). Prednosti: krajši časi analize, večja inertnost, daljša življenjska doba, boljša ponovljivost in visoke vrednosti N (učinkovitost) ter manjše izločanje stacionarne faze.

POLNJENE



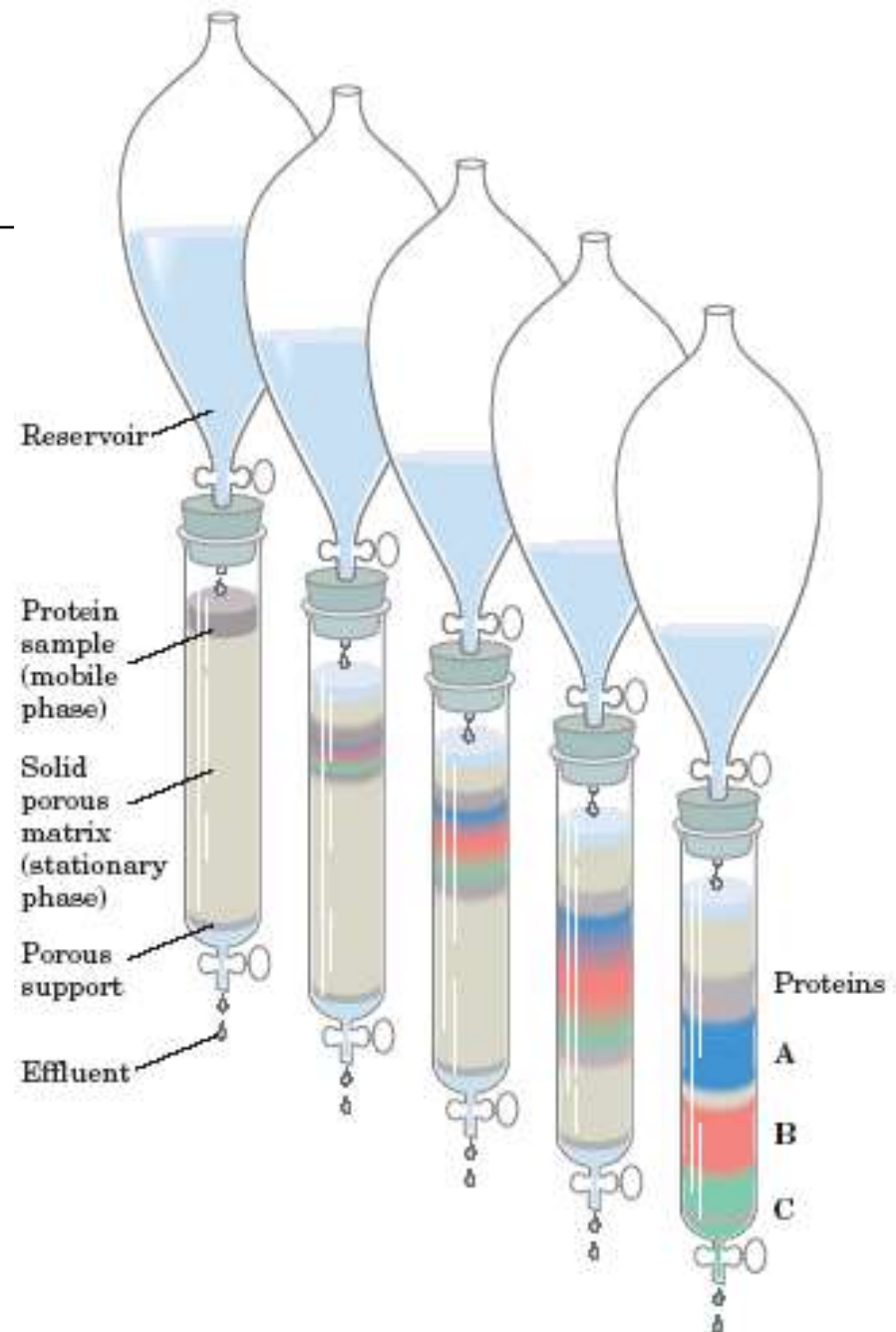
KAPILARNE



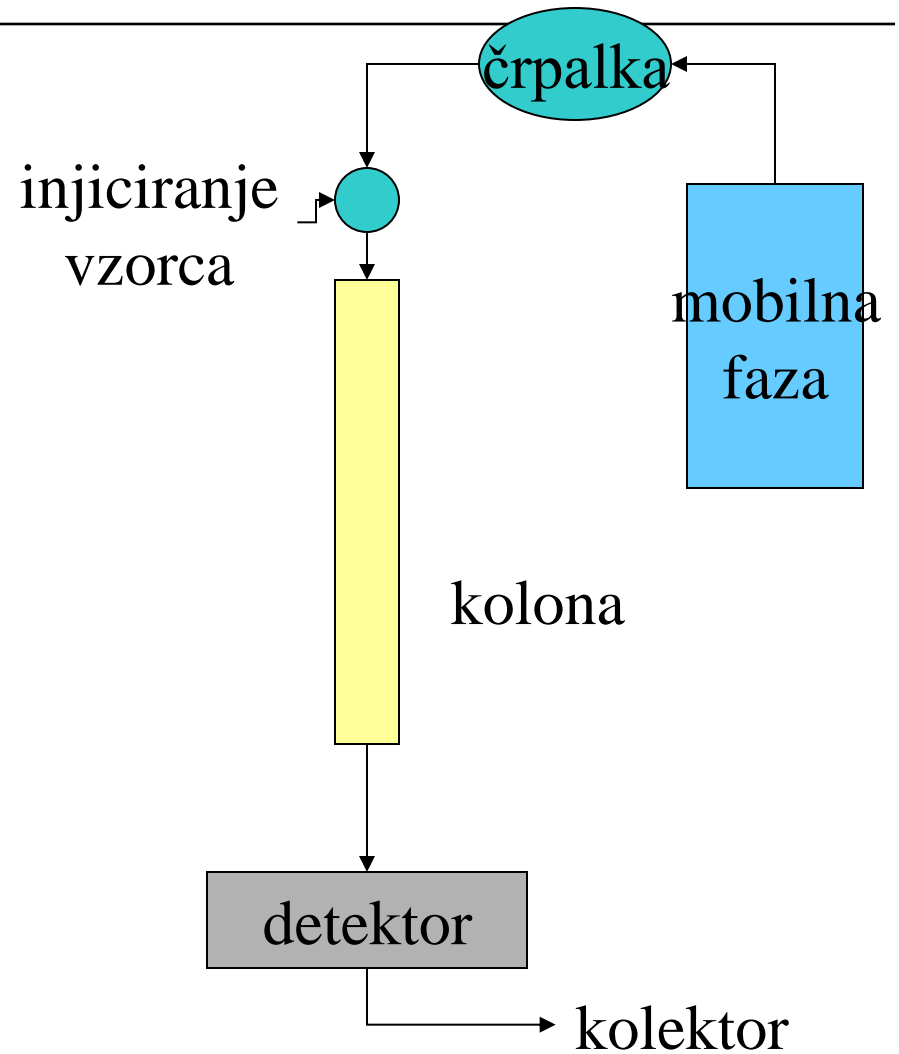
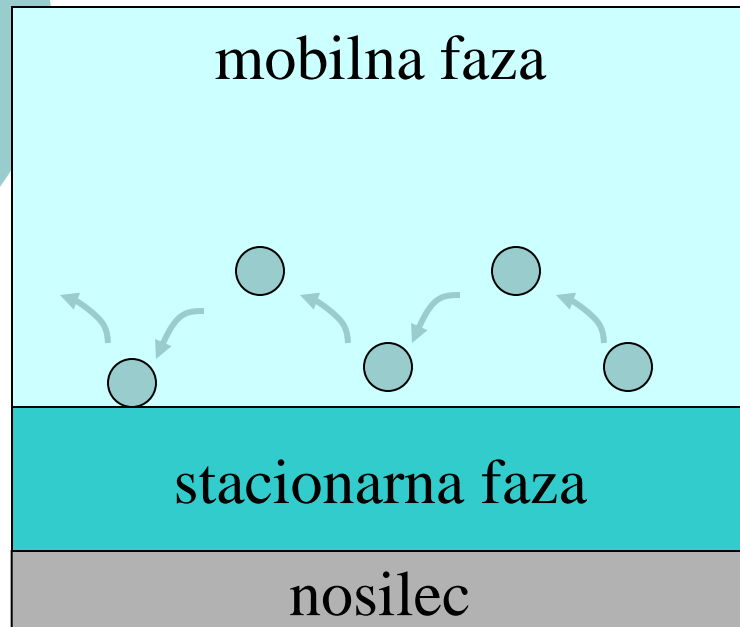
Tekočinska kromatografija

Klasične kolone: gravitacija

Sodobnejše: sistemi s črpalkami

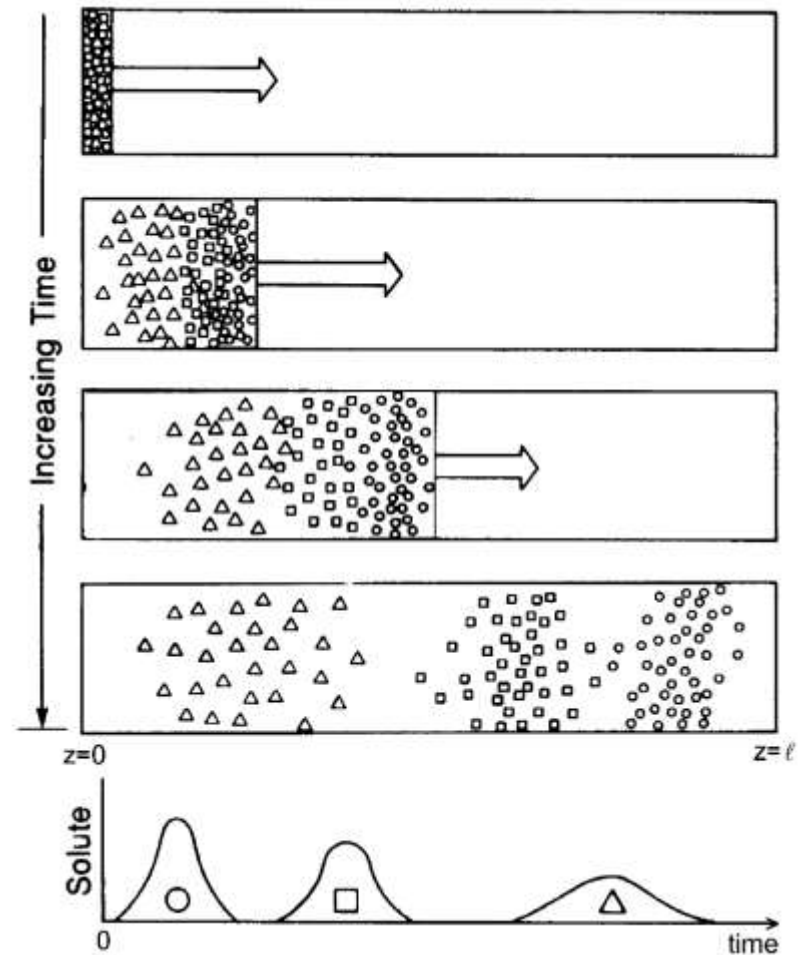
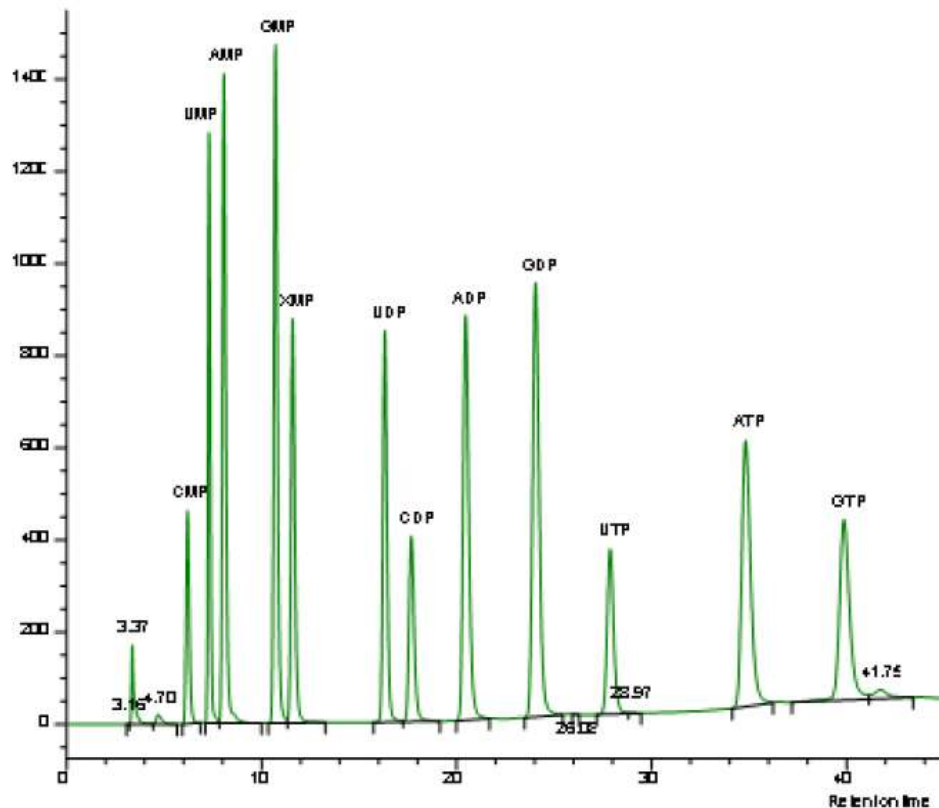


Kolonska kromatografija



Kolonska kromatografija

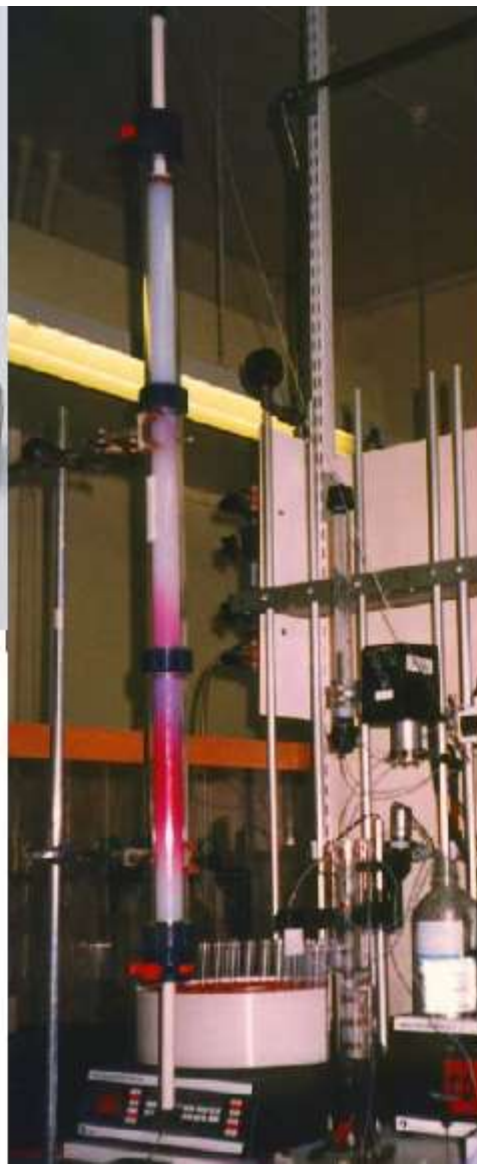
kromatografija: fizikalno-kemijski proces ločevanja zmesi v posamezne komponente



Kromatografija: analizna in preparativna

- Preparativna: za izolacijo posamezne molekule (produkt ločino od ostalih, frakcije zbiramo)
- Analizna:
 - kvalitativna analiza
»slepa« tehnika, dokažemo lahko prisotnost neke substance, ne moremo pa neposredno ugotoviti, za katero substanco gre. Iz primerjave retencijskih časov za standardne substance določimo identiteto analita
 - kvantitativna analiza
Računanje koncentracij
 - a) Umeritev s standardom (eksterni standard)
 - b) Umeritev z internim standardom
 - c) Normalizacija površin vrhov

Kromatografske kolone

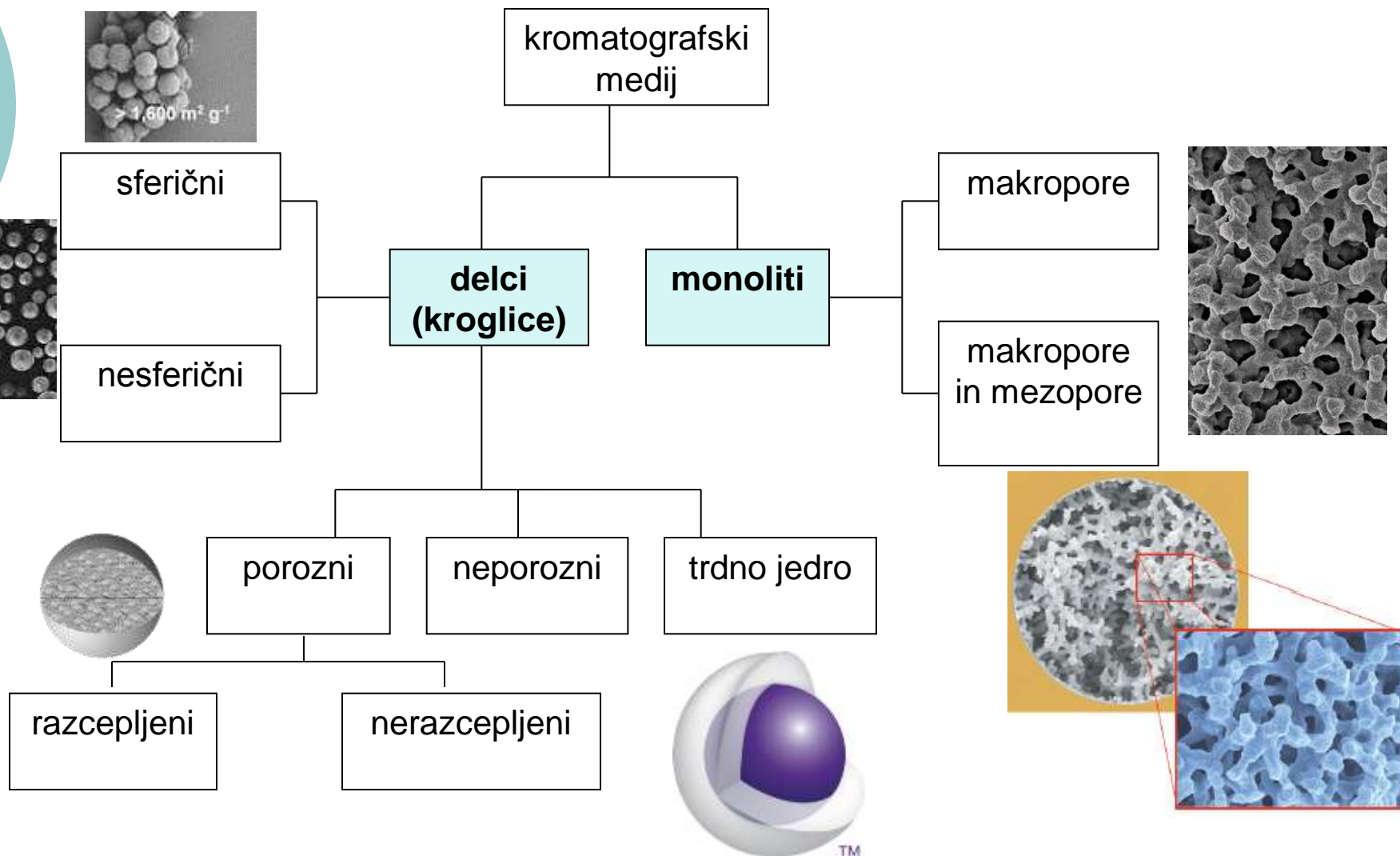


Kromatografski sistemi

HPLC: high performance liquid chromatography
= tekočinska kromatografija visoke ločljivosti



Stacionarne faze v kromatografiji



Stacionarne faze v kromatografiji

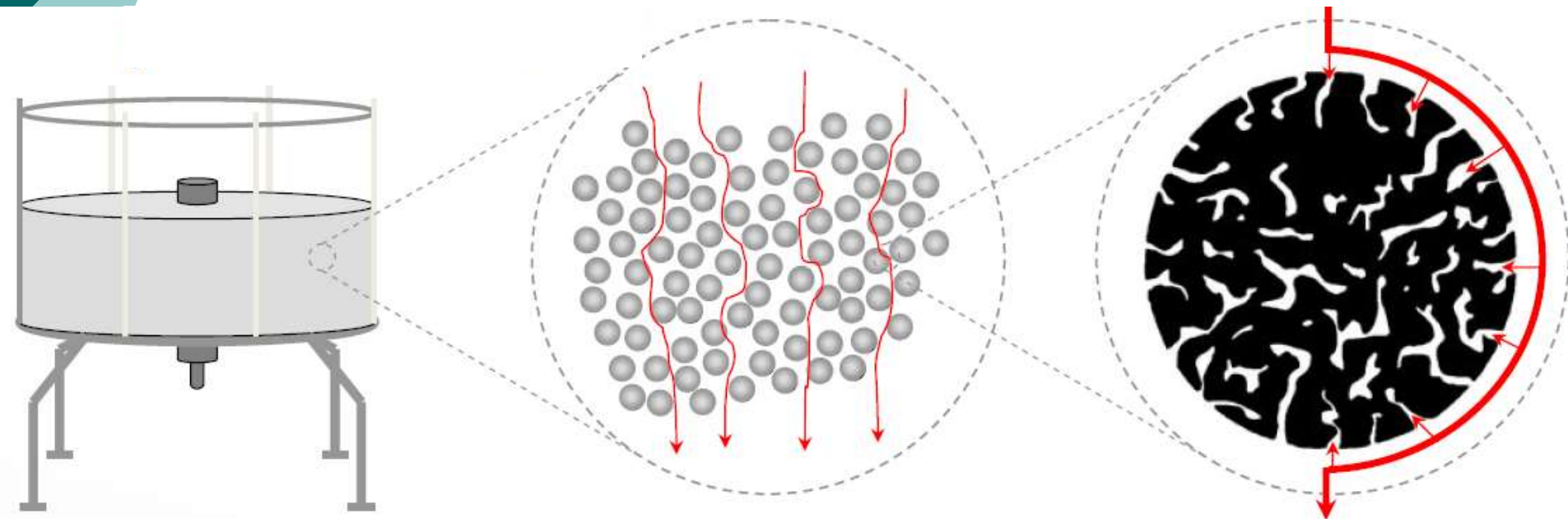
- Inertni materiali z razpoložljivimi skupinami za funkcionalizacijo
- Ustrezna površinska kemija
- Velika medfazna površina
- Poroznost in velikost por ter porazdelitev velikosti por glede na uporabo
- Velikost delcev in porazdelitev velikosti delcev glede na uporabo:
 - < 10 μm za visoko resolucijo
 - > 50 μm za preparativno in industrijsko uporabo v biotehnologiji
- Povezanost por
- Visoka mehanska stabilnost na tlak

Stacionarne faze

- naravni polimeri
 - celuloza (Cellufine, Sephacel, DE 32, DE 52,...)
 - dekstran (Sephadex G-25, DEAE-Sephadex,...)
 - agarozna (DEAE-Sepharose 4B,...)
- organski polimeri
 - derivati poliakrilamida
 - poliakrilamid
 - derivati polistirena,...
- anorganski materiali
 - kremenovo steklo – silika (Kromasil, LiChrospher, Chromolith,...)
 - steklo kontrolirane poroznosti (Prosep A)
 - hidroksiapatit
 - TiO_2

Princip kromatografije s poroznimi delci

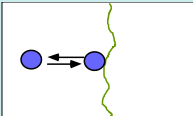
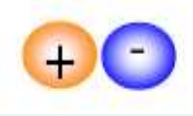


- v kromatografski koloni običajno porozni delci
- 2 vrsti preznegega prostora: med delci in v delcih



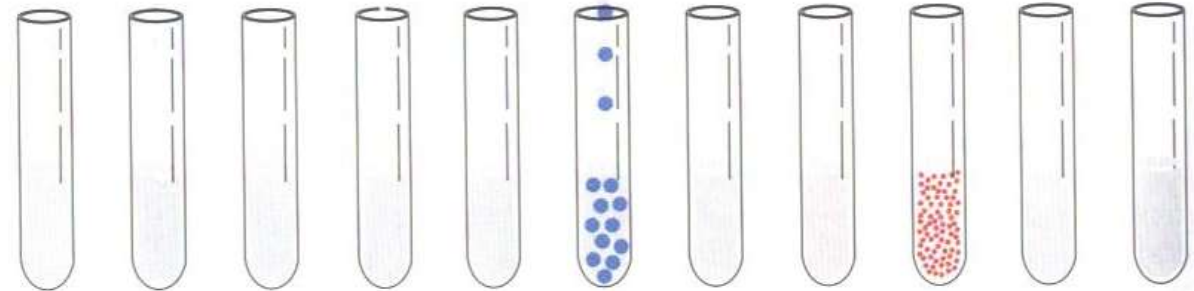
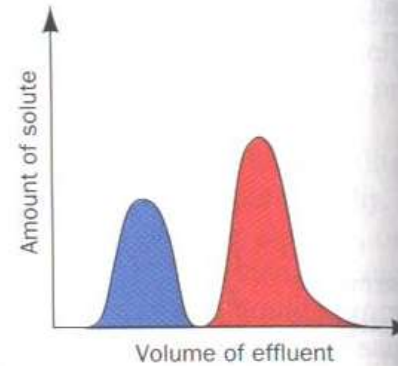
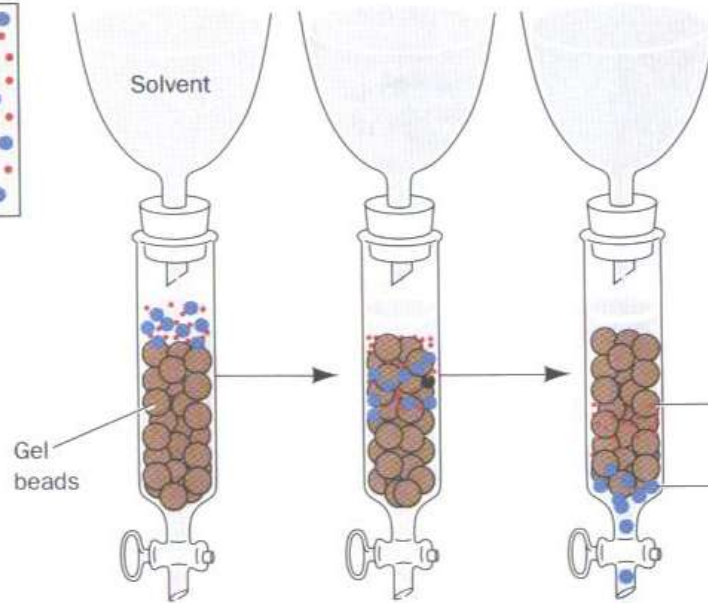
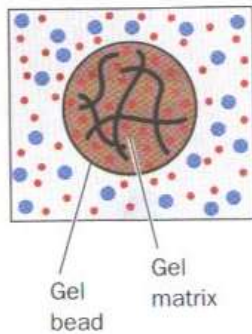
Tekočina potuje v prostoru
med delci

Znotrajdelčni prostor
(vsebuje preko 90 % specifične
površine za vezavo)

Vrste kromatografij glede na princip ločevanja

ime	princip delovanja	osnova ločevanja
adsorpcijska kromatografija	vezava na površino 	struktura molekul
ionsko-izmenjevalna kromatografija	ionska vezava 	površinski naboj
gelska filtracija (izključitvena kromatografija)	izključitev velikih delcev 	velikost in oblika molekul
hidrofobna (interakcija) kromatografija	tvorba hidrofobnih kompleksov	hidrofobnost in hidrofobni predeli
kovalentna kromatografija	kovalentna vezava	funkcionalne skupine
(kovinsko-) kelatna kromatografija	koordinacijski kompleksi 	tvorba kompleksov s kovinami prehoda
reverzno-fazna kromatografija	tvorba hidrofobnih kompleksov	hidrofobnost
afinitetna kromatografija	biospecifična adsorpcija/ desorpcija 	struktura molekul

Kromatografija na osnovi velikosti delcev – gelska filtracija



porozni delci

male molekule velike molekule

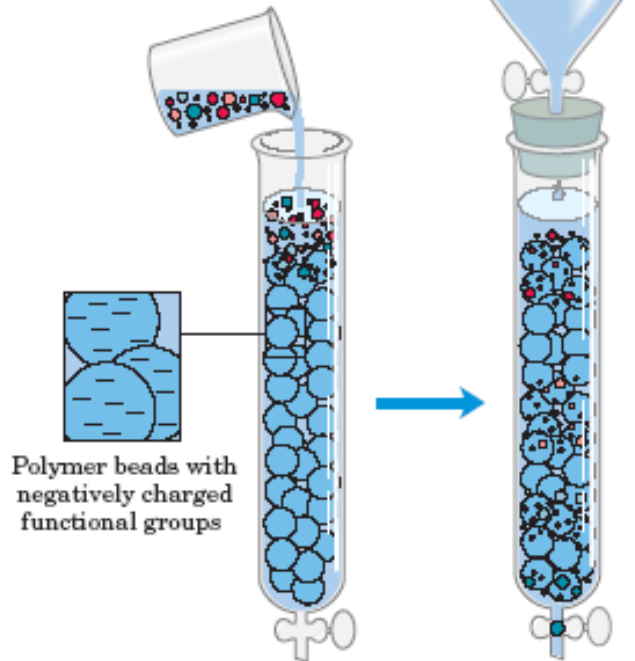
Ionsko-izmenjevalna kromatografija

ionski privlak



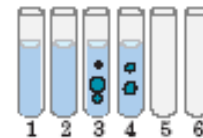
ionski odboj

- Large net positive charge
- Net positive charge
- Net negative charge
- Large net negative charge



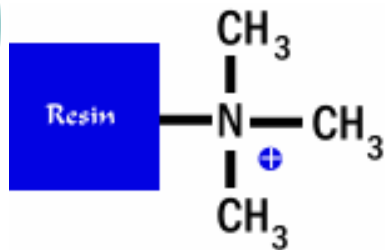
Polymer beads with negatively charged functional groups

Protein mixture is added to column containing cation exchangers.

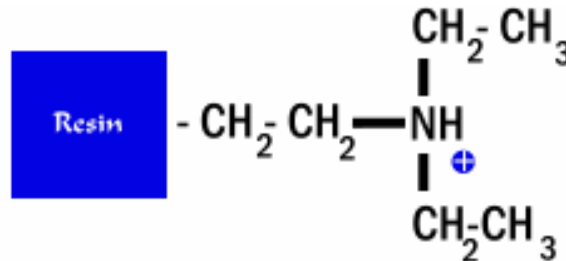


Proteins move through the column at rates determined by their net charge at the pH being used. With cation exchangers, proteins with a more negative net charge move faster and elute earlier.

Ionsko-izmenjevalna kromatografija



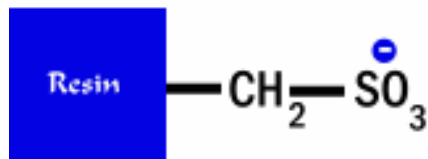
Q-anion exchanger



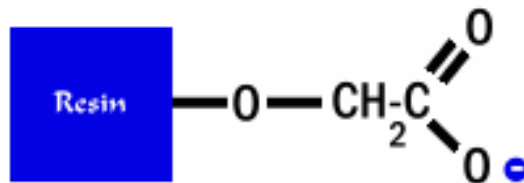
DEAE-anion exchanger

anionski izmenjevalec:
hitreje potujejo
pozitivno nabite
molekule, privlači
anione

+



S-cation exchanger



CM-cation exchanger

kationski izmenjevalec:
hitreje potujejo
negativno nabite
molekule, privlači
katione

-

Ionsko-izmenjevalna kromatografija

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

—

—

—

—

—

—

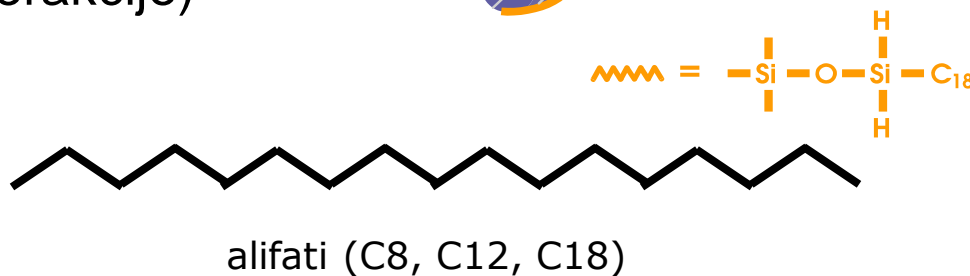
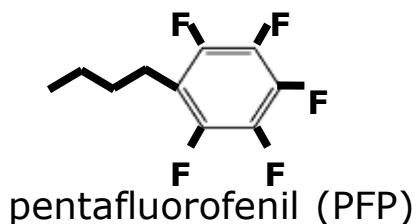
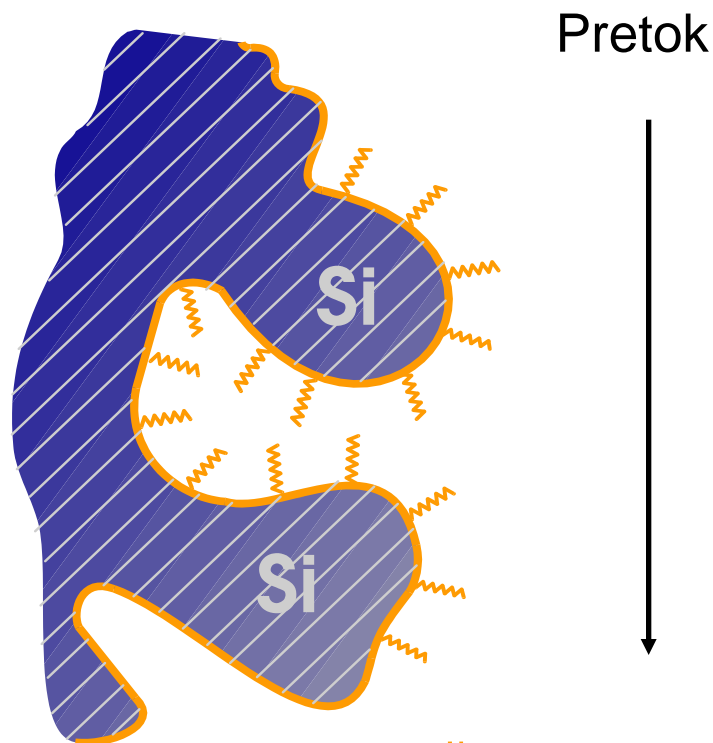
—

—

Osnova ionsko-izmenjevalne kromatografije je reverzibilna vezava nabitih delcev na nasprotno nabite skupine, pripete na netopen matriks (stacionarna faza)

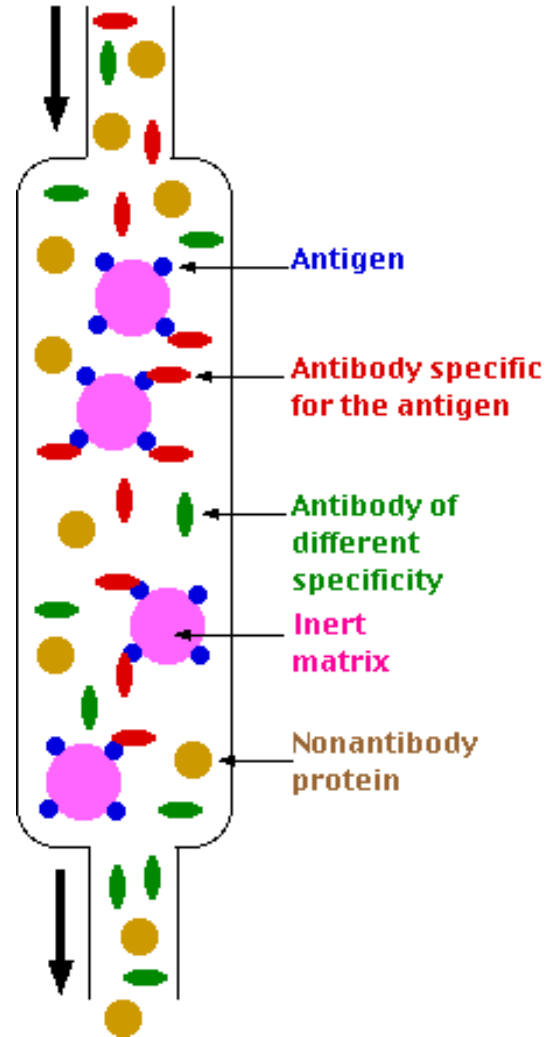
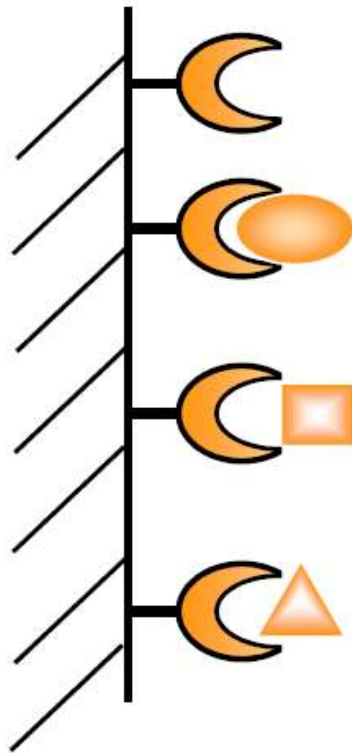
Reverzno-fazna kromatografija (RP)

- Nepolarna stacionarna faza (npr., C18, C12, C8)
- Polarna mobilna faza (voda, metanol, acetonitril)
- Ločujemo nepolarne spojine
- Primerna za ločevanje majhnih molekul
- Ločevanje temelji na porazdelitvi analita med mobilno in stacionarno fazo (hidrofobne interakcije)



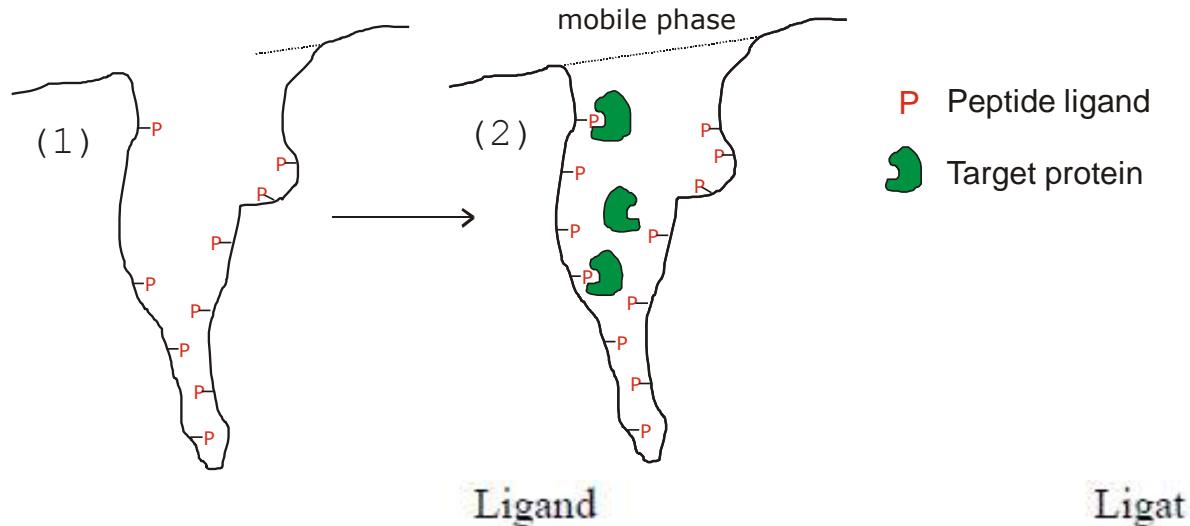
Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija



Afinitetna kromatografija

Selektivne interakcije biomolekul z imobiliziranimi ligandi



Ta mehanizem se uporablja pri pridobivanju protiteles – ligand je protein.

Substrat, Inhibitor, Kofaktor
Protitelo
Lektin
Nukleinska kislina
Barvila
Peptid

Encim, Receptor
Antigen
Glikoprotein
Komplementarna sekvenca
Protein
Protein

Osnove teorije ločevanja na koloni

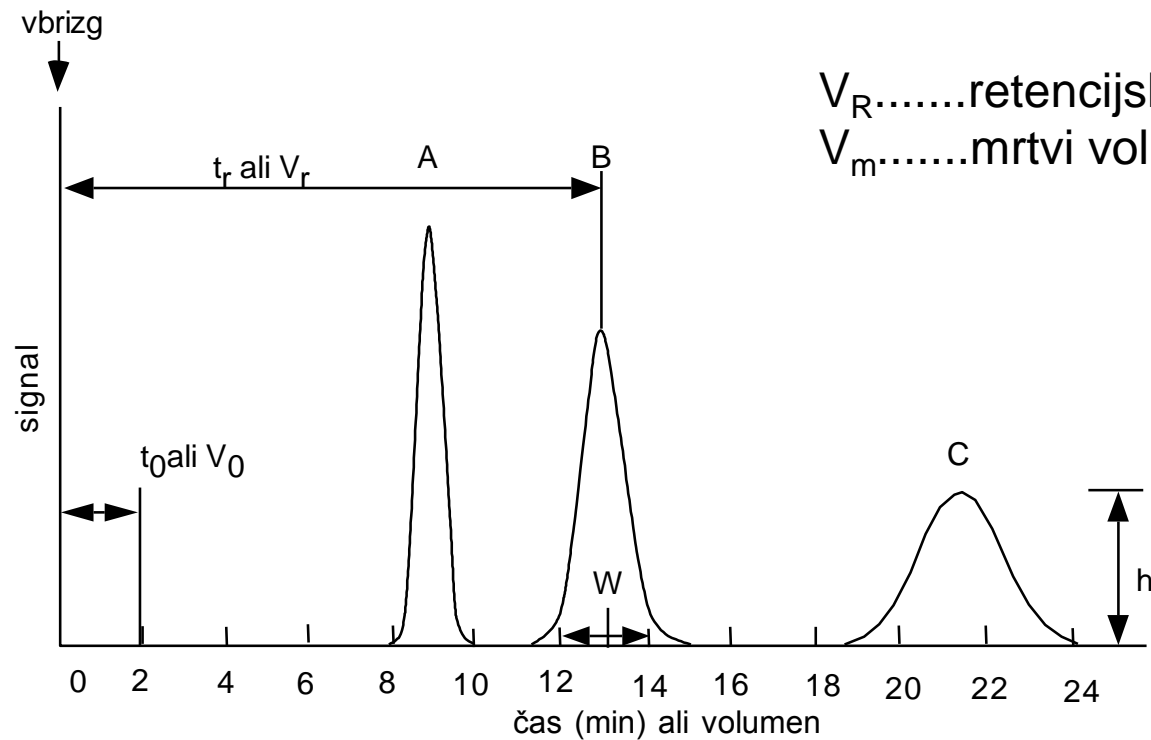
Parametri:

- Retencijski čas (t_r) - čas zadrževanja komponente na koloni
- Retencijski volumen (V_r)
- Število teoretskih prekatov oz. podov (N) = zmogljivost kolone
- Kapacitivnost kolone
- Porazdelitveno razmerje kolone (k')
- Selektivnost (α)
- Resolucija (R)

Retencijski čas t_R , mrtvi čas t_0

t_R - retencijski čas komponente je čas, ki ga le ta potrebuje za potovanje od injektorja do detektorja skozi kromatografsko kolono in je ob danih kromatografskih pogojih specifičen za posamezno substanco.

t_0 – mrtvi čas je čas, ki je potreben za prehod mobilne faze po enaki poti in je odvisen od volumna kolone ter preoka mobilne faze



V_Rretencijski volumen komponente
 V_mmrtvi volumen

Porazdelitveni koeficient (K_D) in kapacitivnost (K')

Vsaka komponenta X se porazdeli med stacionarno in mobilno fazo

Ravnotežna konstanta – *porazdelitveni (termodinamski) koeficient*

$$K_D = \frac{[X_s]}{[X_m]}$$

X_s koncentracija komponente v stacionarni fazi
 X_mkoncentracija komponente v mobilni fazi

Kapacitivnost (porazdelitveno razmerje)

$$K' = \frac{\text{štev. molov X v stac. fazi}}{\text{štev. molov X v mob. fazi}}$$

$$K' = \frac{V_s \cdot [X_s]}{V_m \cdot [X_m]} = K_D \frac{V_s}{V_m}$$

V_Rretencijski volumen komponente
 V_mmrtvi volumen

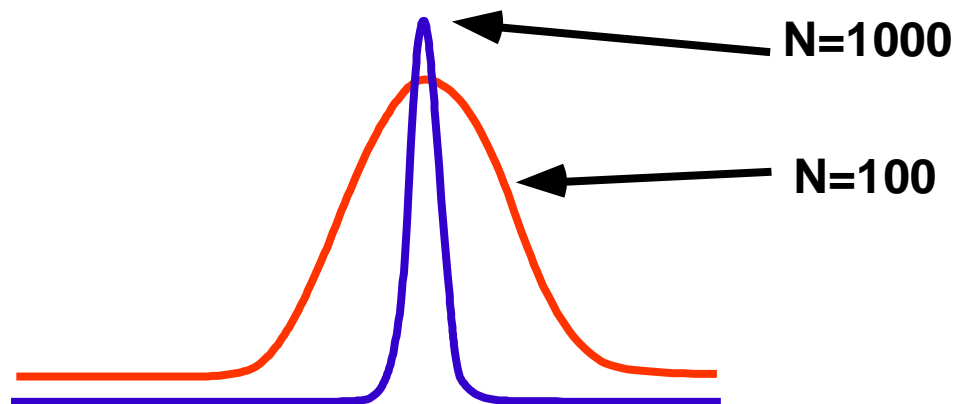
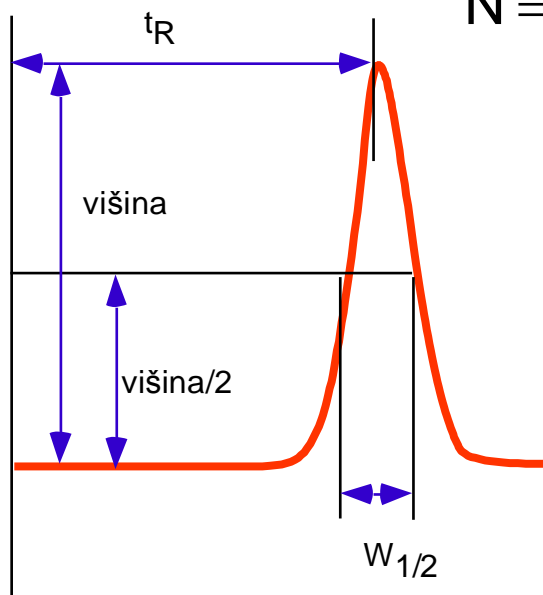
$$K' = \frac{(V_R - V_m)}{V_m} = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} = \frac{t_R'}{t_0}$$

Učinkovitost kolone – število teoretskih prekatov (podov)

Učinkovitost kolone kvantitativno izrazimo s **število teoretskih prekatov ali podov N** ('theoretical plates') – boljši čim višji.

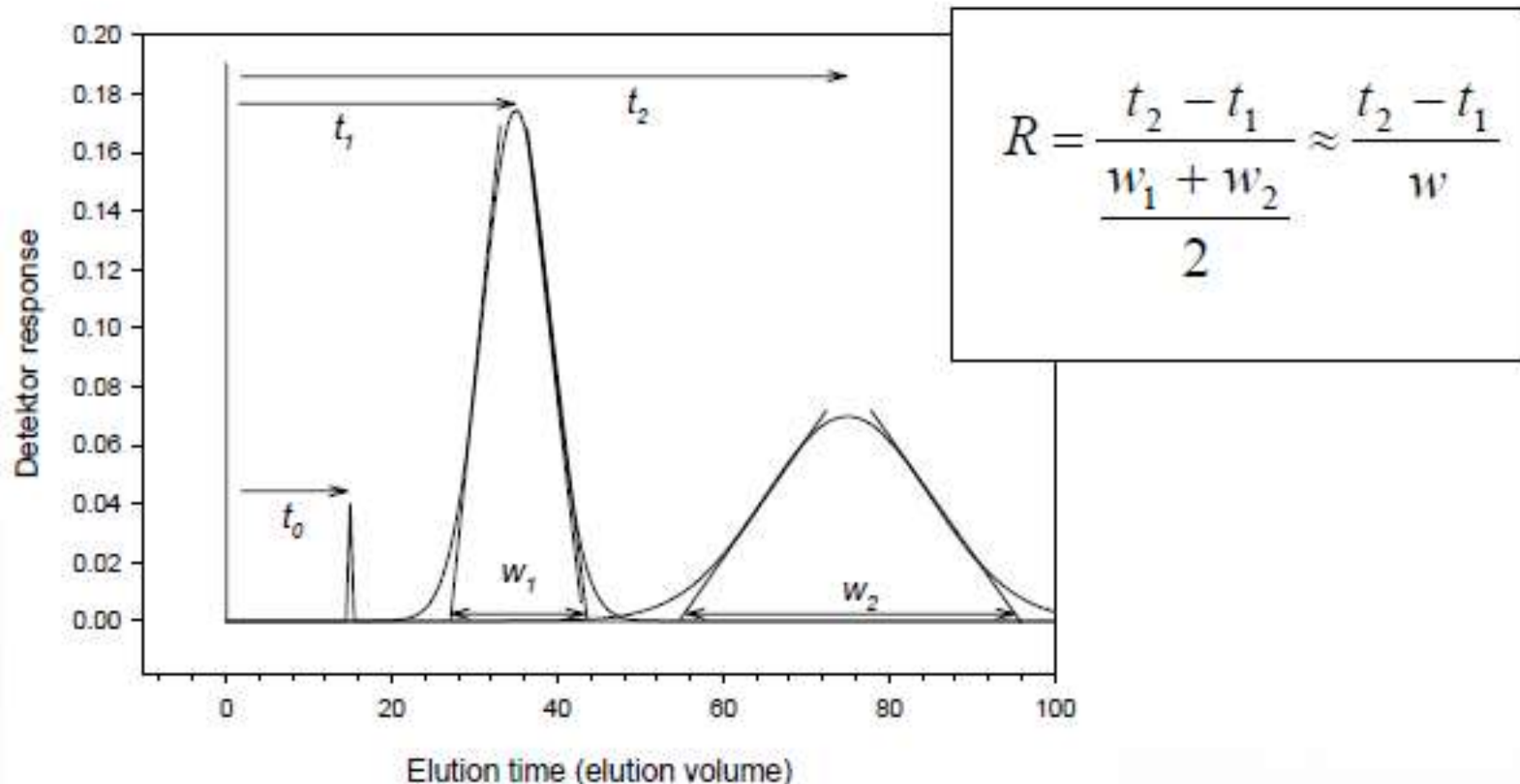
To število pomeni, **kolikokrat se topljenec porazdeli med stacionarno in mobilno fazo** pri prehodu skozi kolono:

$$N = \frac{L}{H} = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5,434 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$



Resolucija oz. ločljivost

kvaliteta ločitve - ločljivost med dvema vrhoma, ki se lahko tudi deloma prekrivata; odčitamo iz kromatograma



Višina teoretskega prekata: van Deemterjeva enačba

$$H = A \cdot d_p + \frac{B}{u} + C \cdot d_e^2 \cdot u$$

Eddy difuzija,
naključna difuzija med
delci stacionarne faze
(v več smeri)

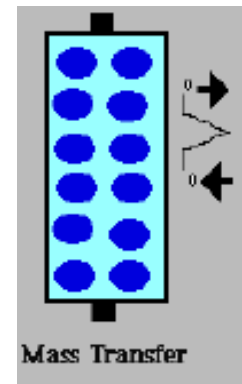
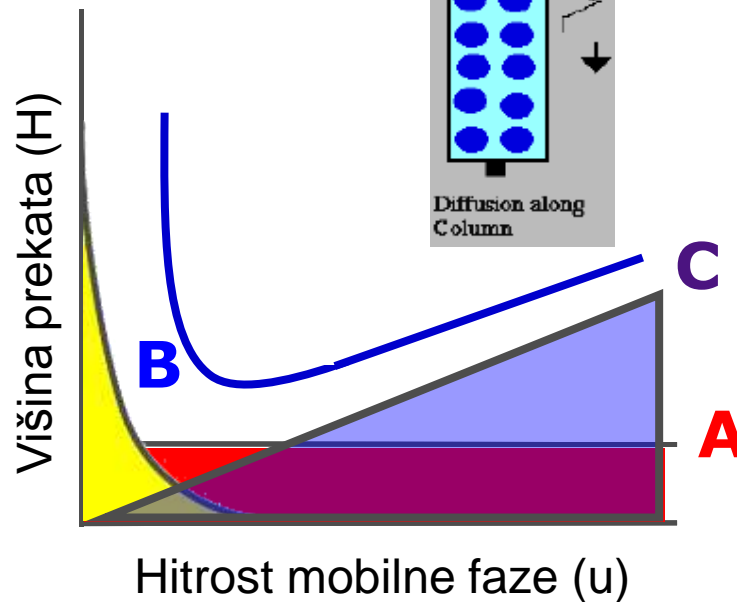
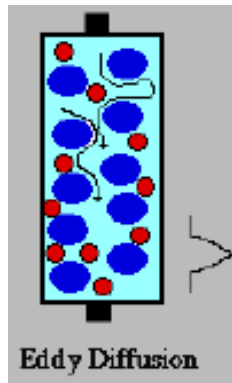
longitudinalna difuzija

hitrost prenosa snovi

u = linearna hitrost
mobilne faze

d_e = "efektivna velikost
delca" (povsem porozni
delci $\Rightarrow d_e = d_p$)

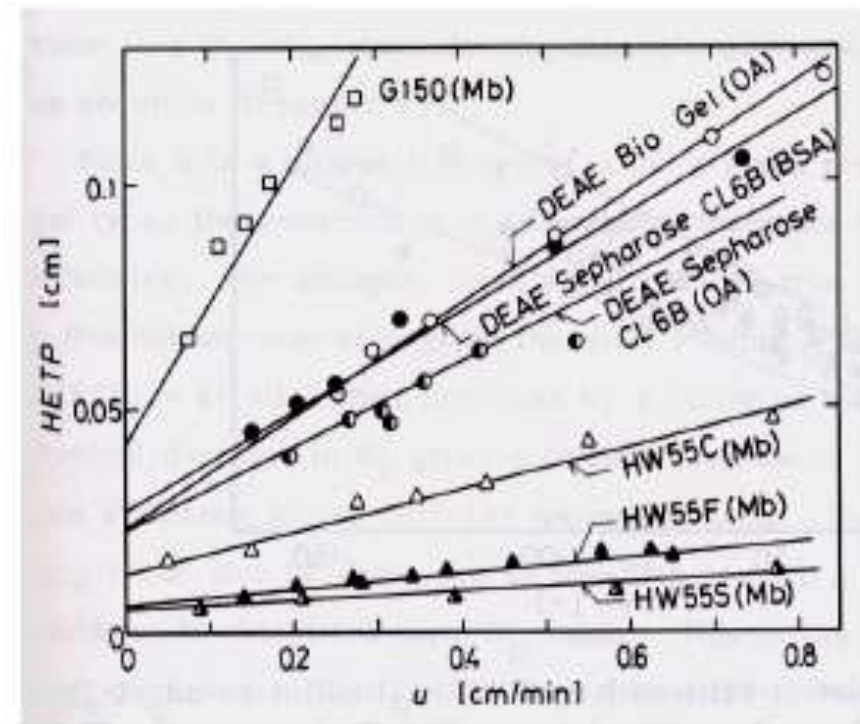
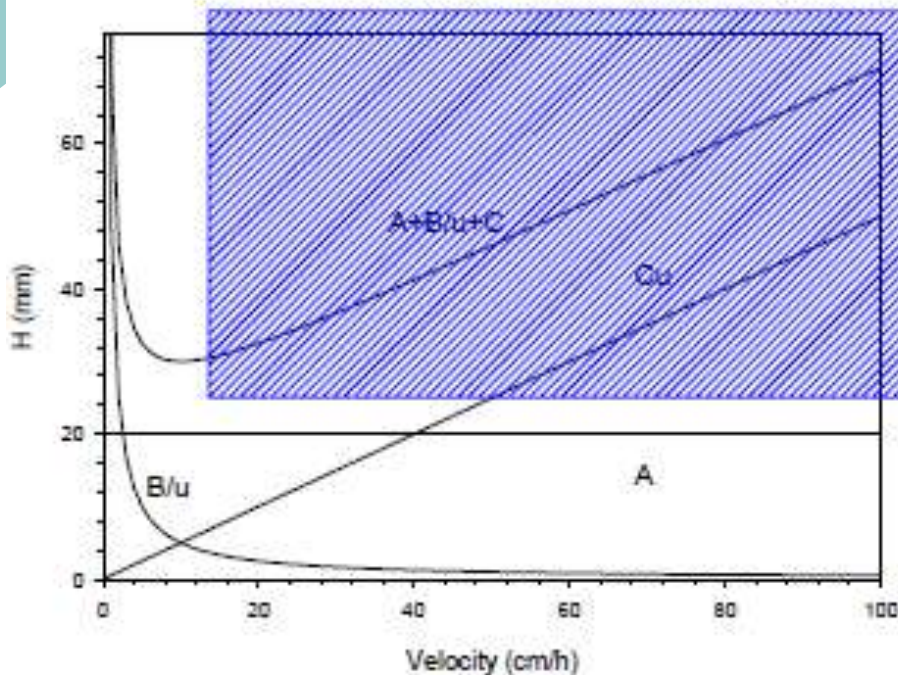
d_p = premer delca
 A odvisen od kvalitete
pakiranja kolone



Vpliv polnila na učinkovitost kolone

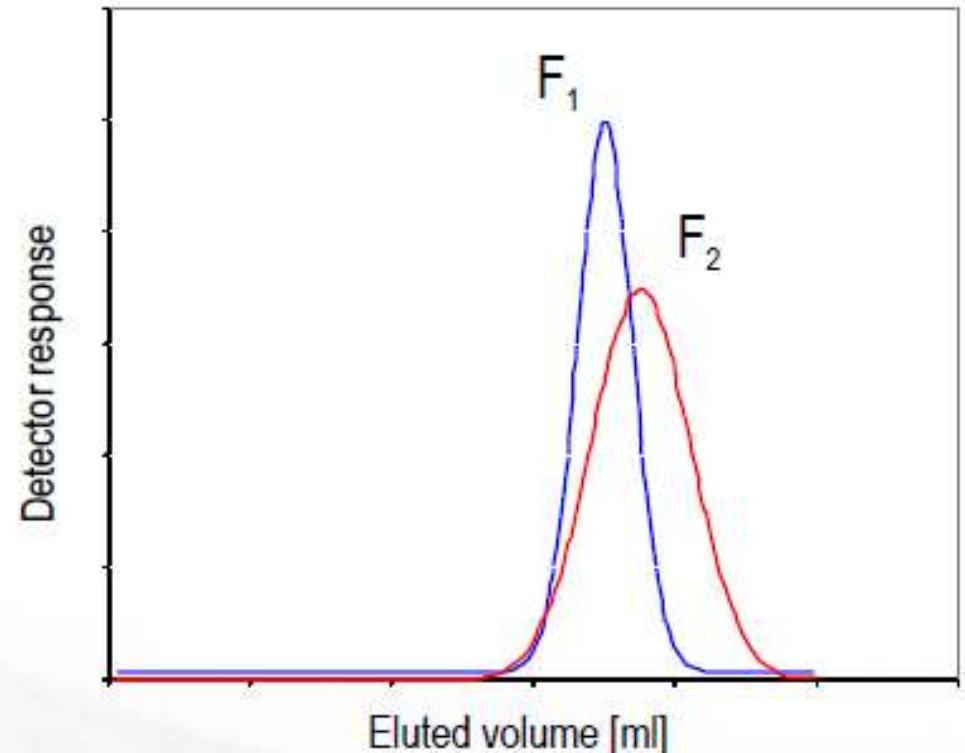
Čim manjši je H , učinkovitejša je kolona

Biochromatography

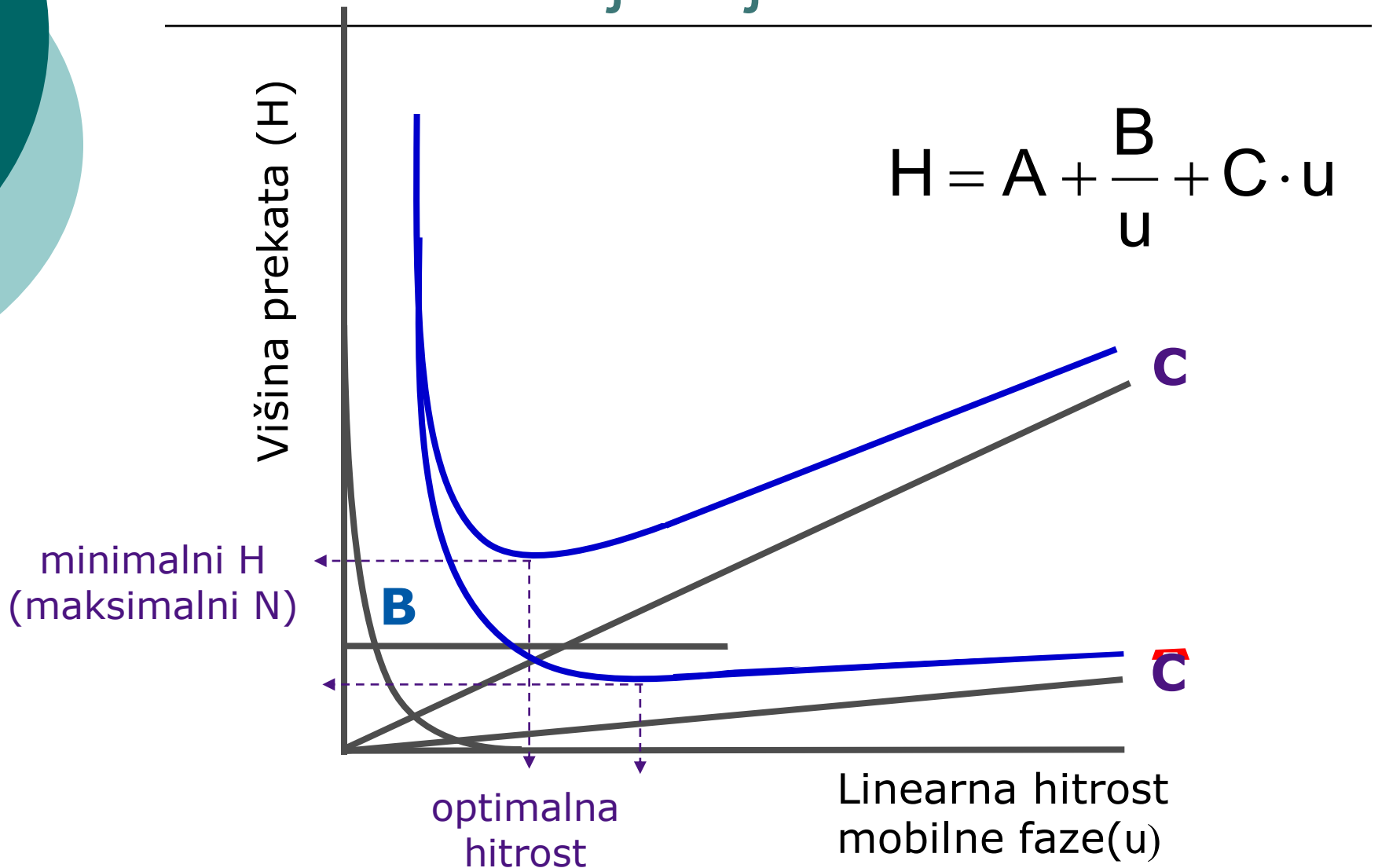


Vpliv pretoka na učinkovitost kolone

- Pretok: $F_2 > F_1$

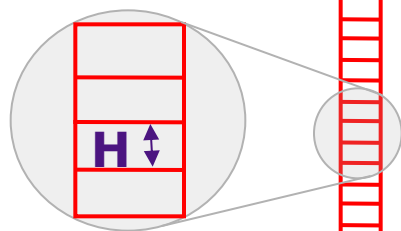


Optimizacija učinkovitosti kolone z izboljšanjem delcev

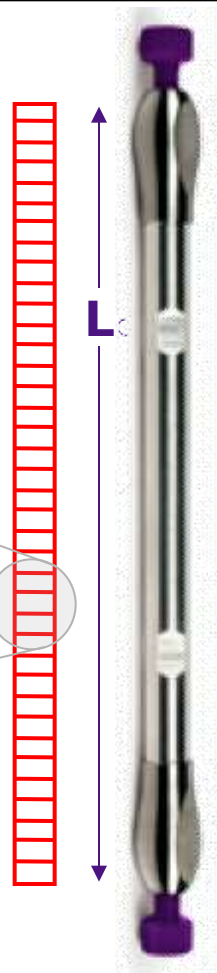


Učinkovitost kolone – število teoretskih prekatov (podov)

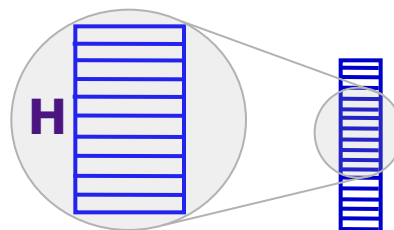
$$N = \frac{L}{H}$$



slabše polnilo \Rightarrow
višji H,
manjši N



N = 140,000 p/m
R_s = 1.5
20 min

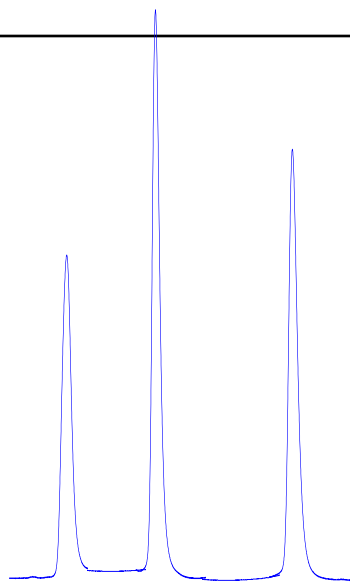
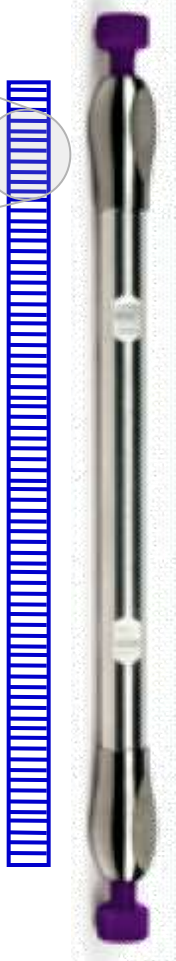
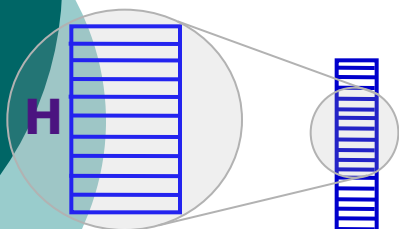


N = 280,000 p/m
R_s = 2.1
20 min

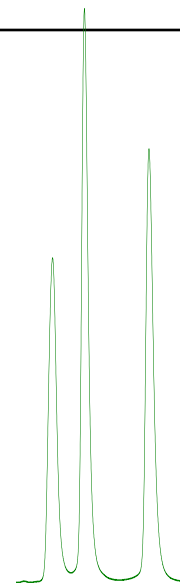
boljše polnilo \Rightarrow
nižji H, večji N

Vpliv polnila na število teoretskih prekatov in resolucijo

Prednosti ultra visoke učinkovitosti



$N = 280,000$ p/m
 $R_s = 2.1$
20 min



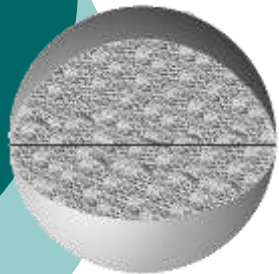
$N = 280,000$ p/m
 $R_s = 1.5$
5 min

Višja učinkovitost kolon daje možnosti tudi za krajše zadrževalne čase

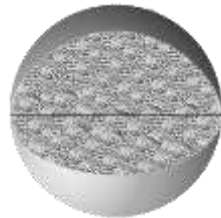
Razvoj tehnologije LC delcev

Standardna učinkovitost

Konvencionalni HPLC



10 µm



5 µm

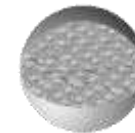


3 µm

Delovni tlak do 400 bar (6,000 psi)

Ultra-visoka učinkovitost

UHPLC/UPLC®

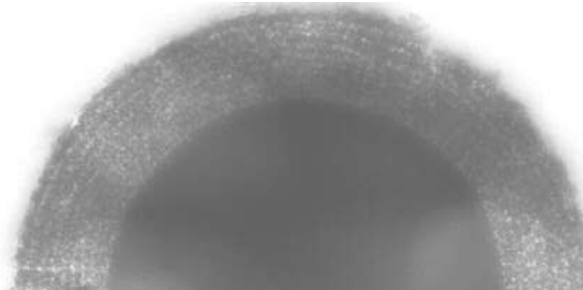


sub-2 µm

Tlak 400-1000 bar (15,000 psi)

Ultra-visoka učinkovitost Kinetex™ 2.6 µm Core-Shell katerikoli LC sistem

Obnašanje kot sub-2 µm pri bistveno nižjem tlaku

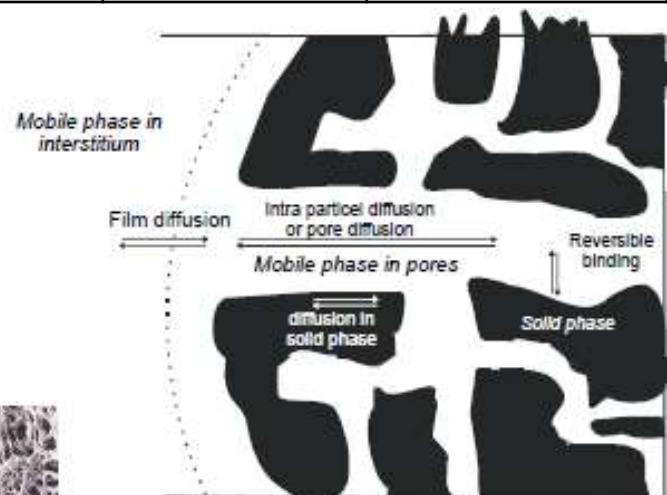
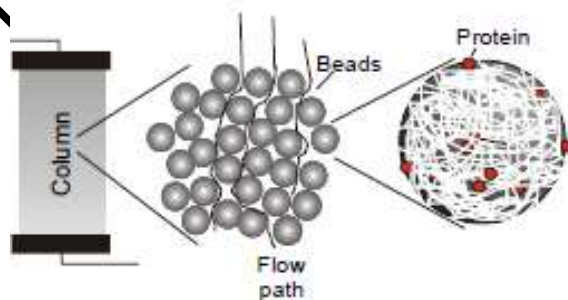
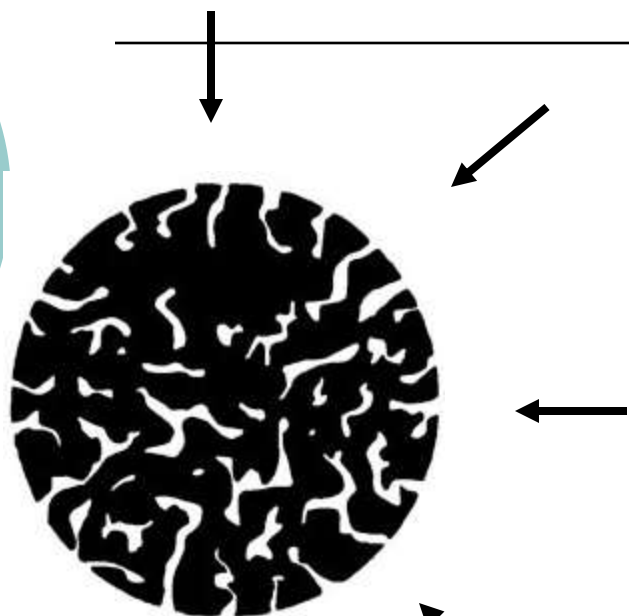


} 0.35 µm

Delovni tlak kompatibilen s konvencionalnim LC in UHPLC/UPLC®

Prenos snovi v pore – “C” člen

molekula (oz. virus)	MW	D_e (m ² /s)
majhne molekule	58 Da	1.4×10^{-8}
hemoglobin	64 kDa	7×10^{-10}
BSA	66 kDa	6.1×10^{-10}
ureaza	482 kDa	3.5×10^{-10}
virus paradižnikovega mozaikovca (ToMV)	40 000 kDa	5×10^{-11}
DNA	4.4 kbp	1.9×10^{-11}
DNA	33 kbp	4×10^{-12}

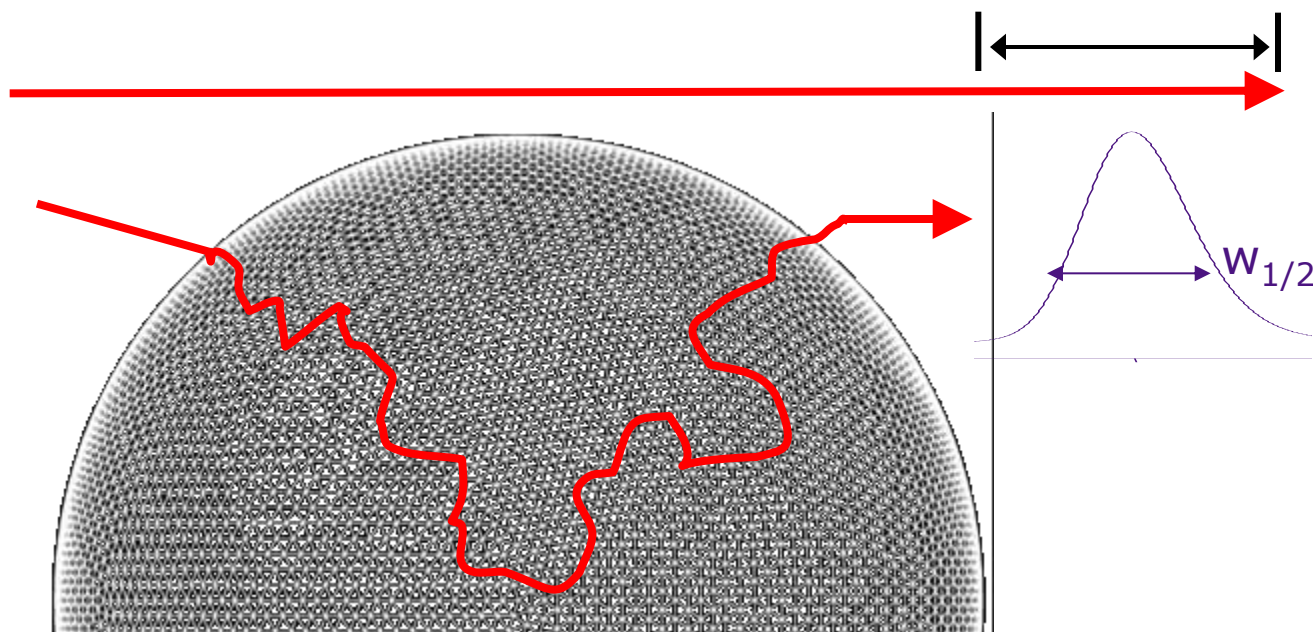


Večje molekule
počasneje
difundirajo v pore



Hitrejši prenos snovi (manjši "C" člen)

Disperzija zaradi upora proti prenosu snovi

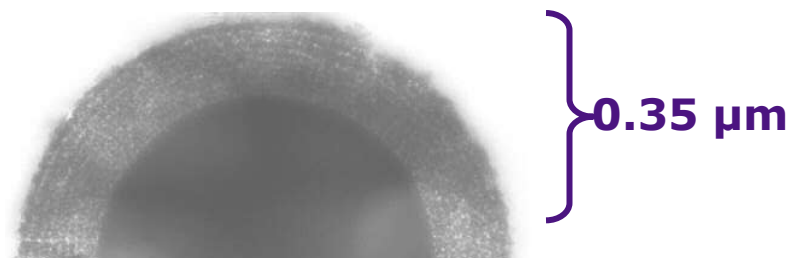
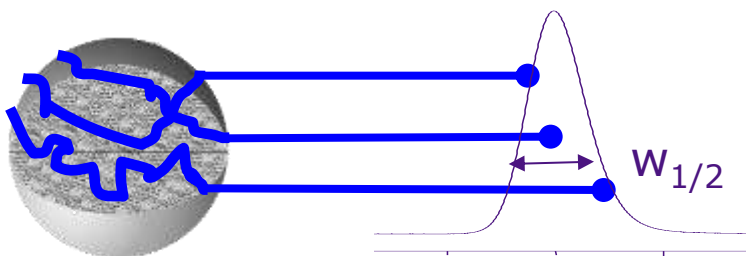


Popolnoma porozni delci niso optimizirani za hiter prenos snovi (difuzija!)

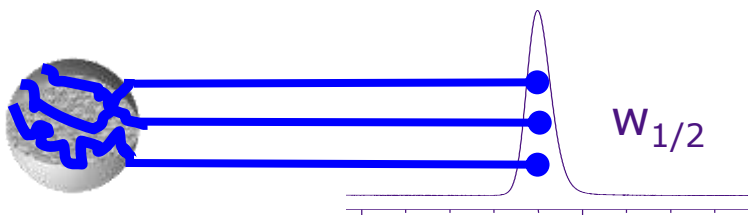
Hitrejši prenos snovi (manjši "C" člen)

Optimizacija LC delcev za višjo učinkovitost

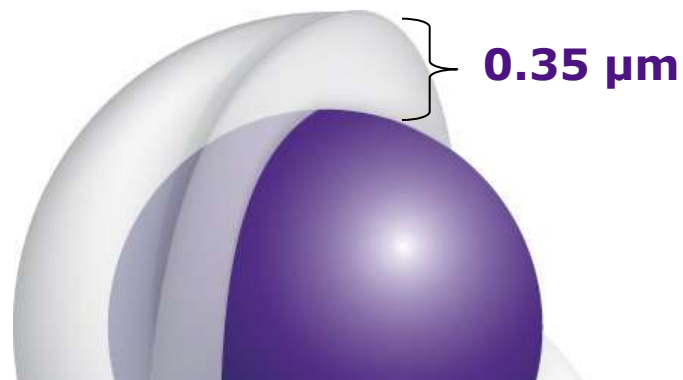
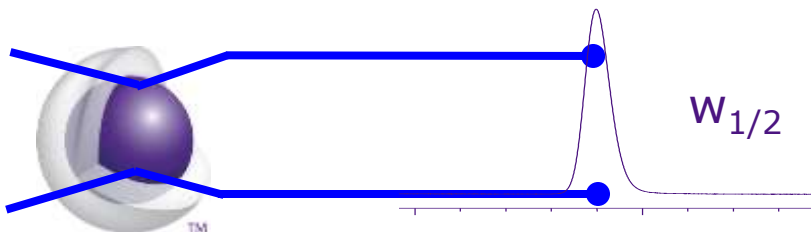
3 μm



Sub-2 μm

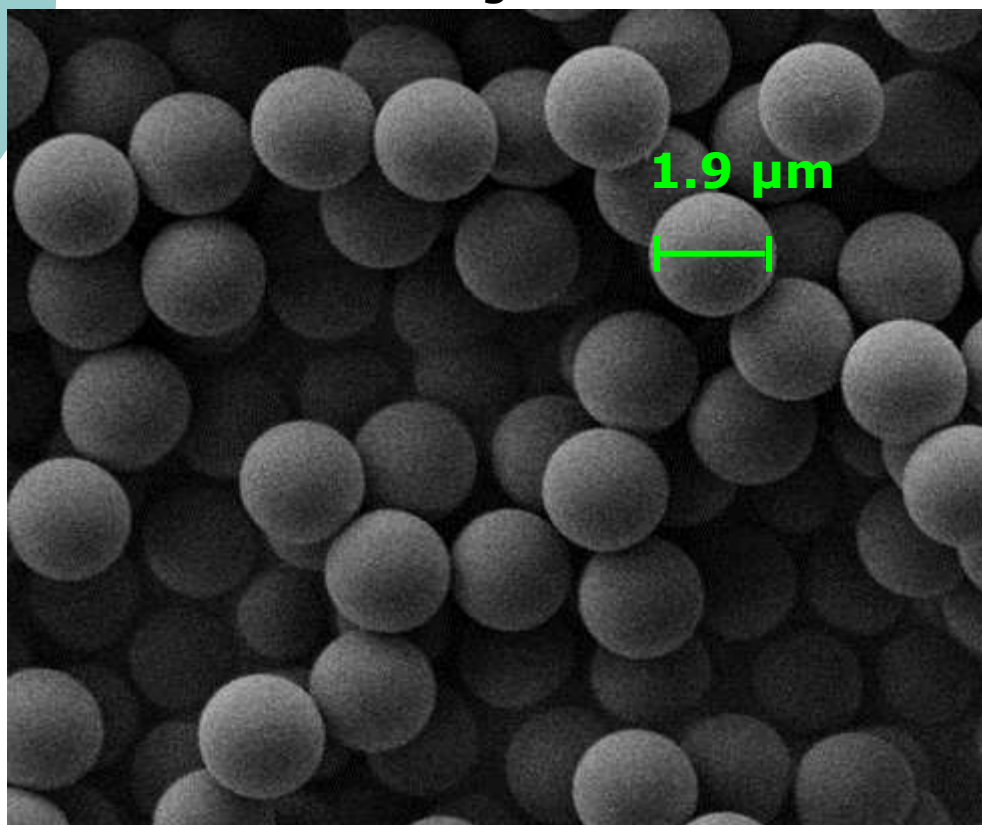


Kinetex™

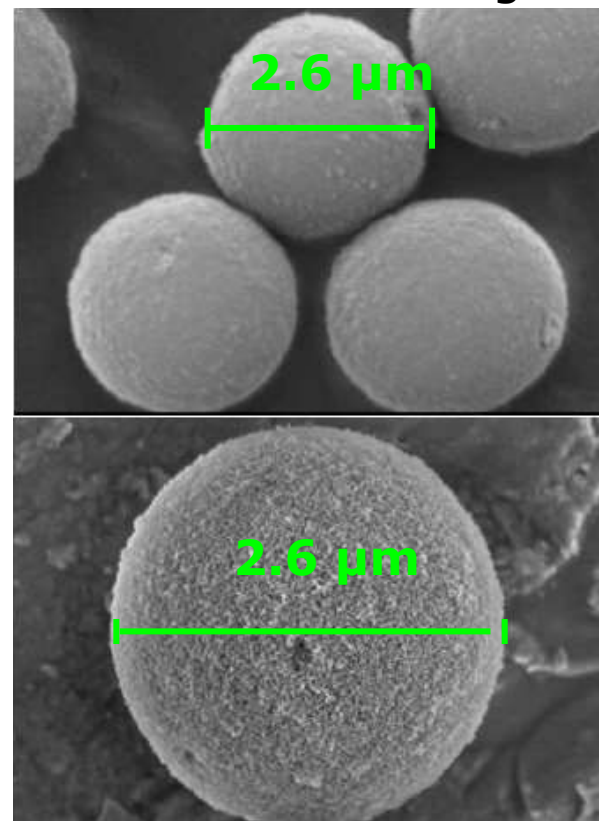


Ožja porazdelitev velikosti delcev (manjši "A" člen)

Core SEM image



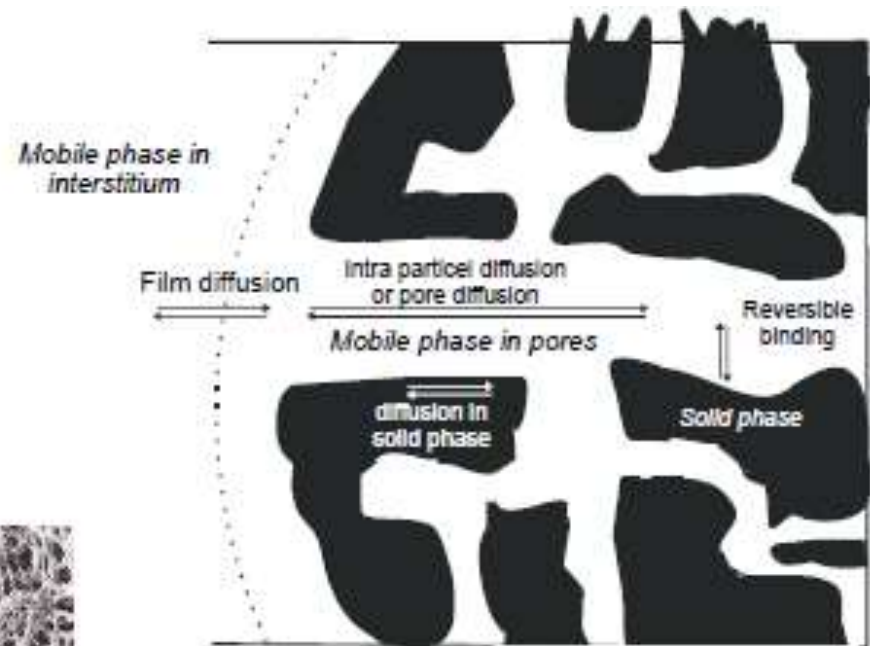
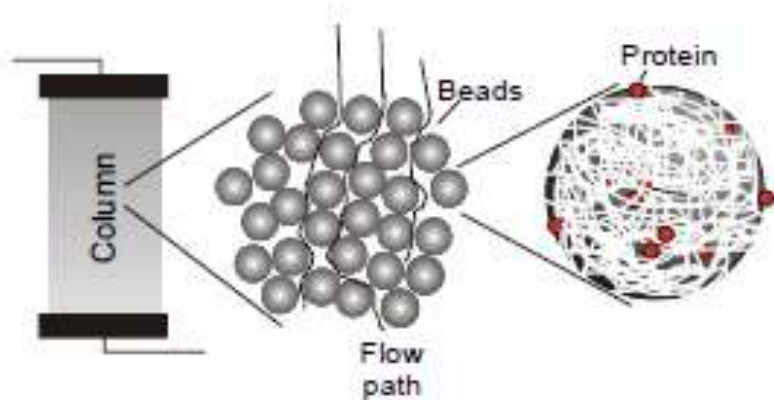
Core-Shell SEM image



Kinetex™ Core-Shell – uniformnost velikosti in oblike delcev

Prenos snovi v delčnih kromatografskih kolonah

- Velike molekule: počasna difuzija v pore

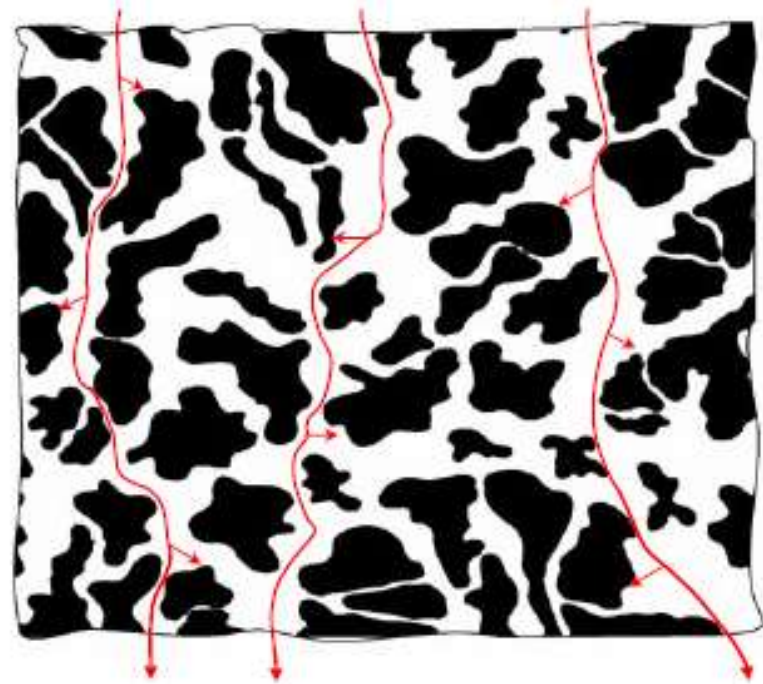


Alternative delčnim nosilcem - monoliti



Difuzijske umejitve povzročijo:

- nižjo učinkovitost
- nižjo kapaciteto

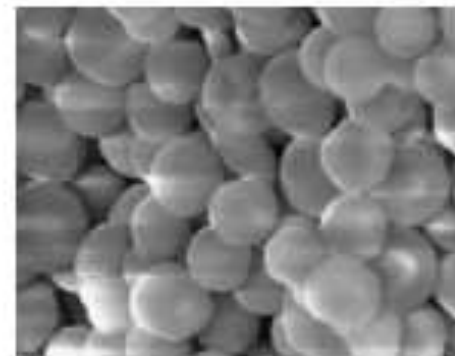
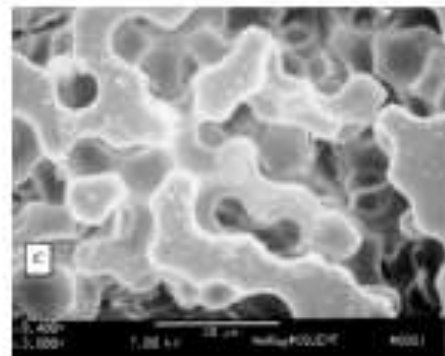
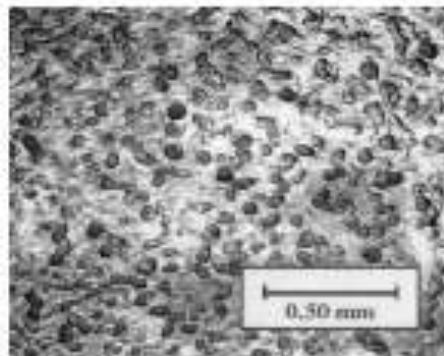
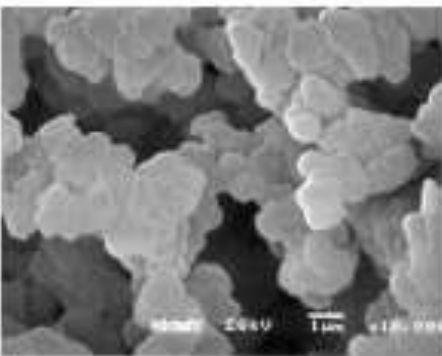
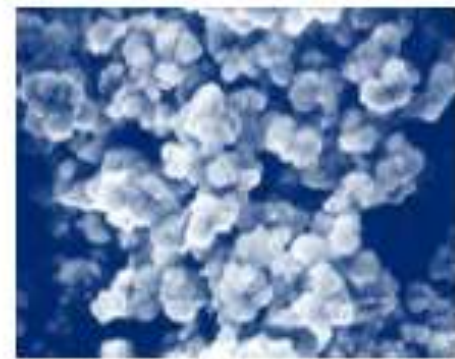
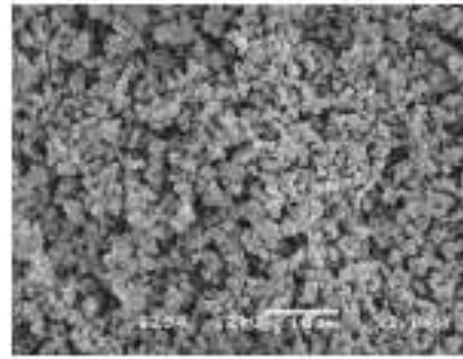
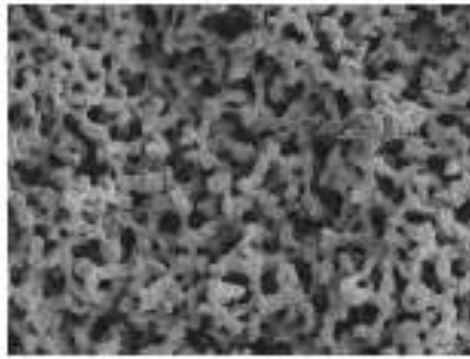
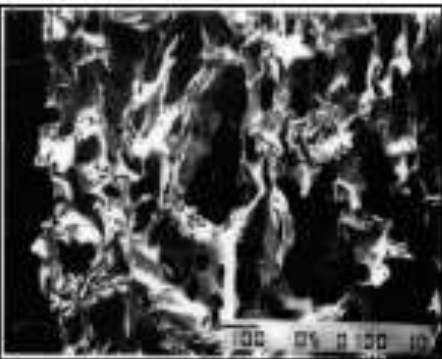


Konvektivni prenos:

- Učinkovitost neodvisna od pretoka
- Kapaciteta neodvisna od pretoka

Struktura monolitov

Monoliti imajo različno strukturo in kemijsko zgradbo

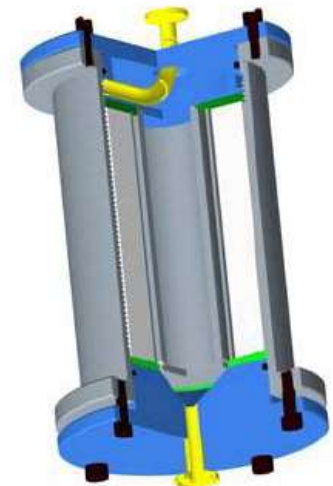
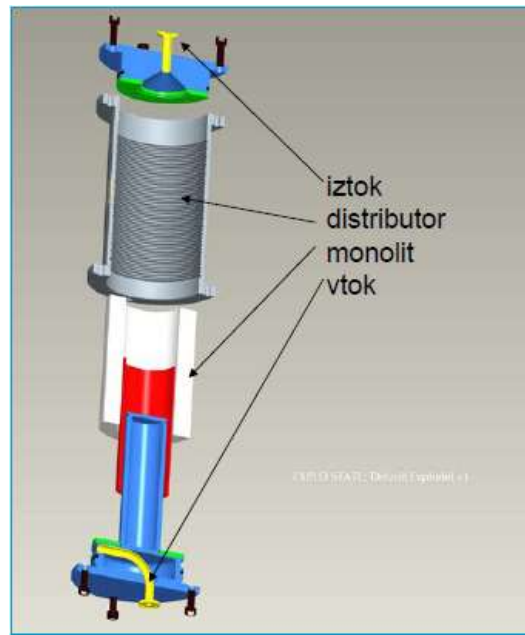


CIM diski in monolitne kolone

CIM = convective interaction media (Bia separations)



Monolitne preparativne kolone (Bia separations)



Lastnosti monolitov

- Transport molekul temelji na konvekciji → ločba neodvisna od pretoka
- Nizek padec tlaka
- Visoka dinamična kapaciteta za zelo velike biomolekule

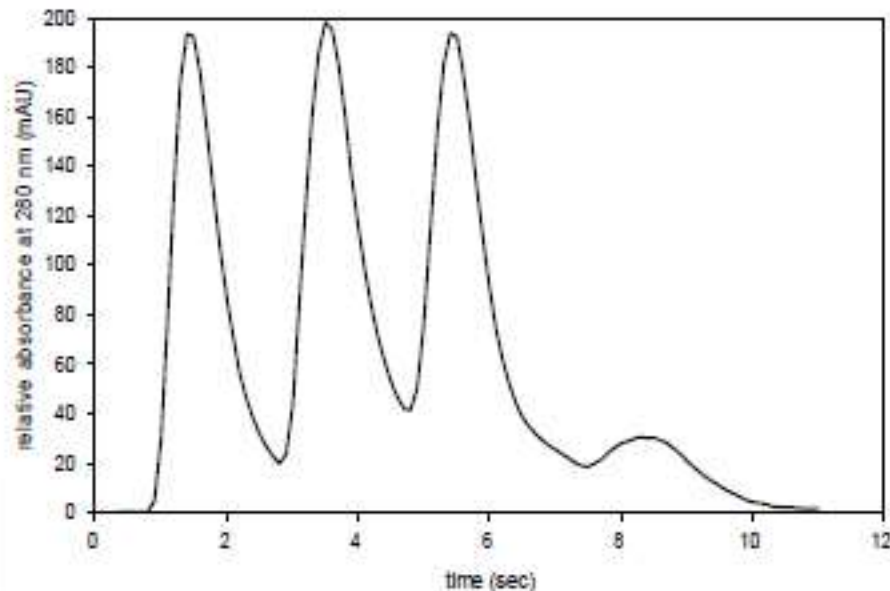
Struktura metakrilatnih monolitov (Bia separations)

- Velike pretočne pore (okoli $1,5 \mu\text{m}$), ki zagotavljajo visoko pretočnost
- Majhne pretočne pore (pod 100 nm), ki zagotavljajo visoko specifično površino



Konvektivni transport

Izjemno hitra ločba makromolekul



To postaja vedno bolj pomembno z novimi FDA regulativami – PAT (Procesna analitika in tehnologija), ki zahteva znatno sledenje procesov (npr. bioprocesi ali procesi industrijskega čiščenja)