

Einfluss von Salzen auf die Kationenaustauschchromatographie von Proteinen

Impact of Salt Selection on Cation-Exchange Chromatography of Proteins

Von der Fakultät für Maschinenwesen der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Ingenieurwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Thomas Leonard Fuchs

Berichter: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Andreas Jupke
Hon.-Prof. Dr.-Ing. Eric von Lieres und Wilkau

Tag der mündlichen Prüfung: 11.08.2025

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Danksagung

Diese Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Fluidverfahrenstechnik der RWTH Aachen University. In dieser Zeit habe ich vielfältige Unterstützung von Kollegen und Freunden erhalten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr.-Ing. Andreas Jupke, der mir die Durchführung dieser Forschungsarbeit an seinem Lehrstuhl ermöglicht hat. Hierbei hat er stets dafür gesorgt, dass mir alle benötigten Ressourcen zur Verfügung standen und half mir darüber hinaus mit tiefgehenden fachlichen Diskussionen weiter. Seine Unterstützung und sein Vertrauen haben mir große Freiheiten in der Formulierung und Ausarbeitung der Forschungsfragen für diese Arbeit ermöglicht. Die in dieser Zeit gesammelten Erfahrungen haben mich persönlich und fachlich sehr bereichert. Darüber hinaus danke ich Prof. Dr.-Ing. Eric von Lieres, sowohl für die Übernahme des Ko-Referats als auch für seine jahrelange Arbeit an den CADET Open-Source Tools, die ich in dieser Arbeit verwenden konnte. Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr.-Ing. Dirk Müller für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ebenfalls danke ich allen Kollegen des Lehrstuhls, die stets für eine angenehme und unterstützende Atmosphäre gesorgt haben. Die verschiedenen Lehrstuhlfeste und die regelmäßigen Versammlungen am Kickertisch waren eine wertvolle Bereicherung des Arbeitsalltags. Auch möchte ich mich bei den Kollegen der Arbeitsgruppe Chromatographie bedanken, insbesondere bei Martin Leipnitz, Andreas Biselli, Rafael Reifsteck und Christina Kregel, die mich in dieser Zeit durch einen tiefen fachlichen Austausch und Ermunterungen unterstützt haben. Martin danke ich an dieser Stelle auch für seine Hilfe bei der Orientierung im Themenfeld und der Unterstützung bei den ersten Planungsschritten. Ebenfalls bedanke ich mich bei Janik Hense für die fruchtbaren fachlichen Diskussionen. Darüber hinaus gilt mein Dank dem gesamten CADET-Team und insbesondere Johannes Schmölder für die tatkräftige Unterstützung bei Software-Problemen und die kontinuierliche Weiterentwicklung des Open-Source Tools.

Auch verschiedene Studierende haben zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Daher möchte ich Lorenz Lehmann, Leonie Crombach und Lukas Thiel danken, die mit ihren Abschlussarbeiten einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung des Themenfeldes geleistet haben. Insbesondere danke ich Alina Pälchen für ihre großartige Unterstützung im Labor.

Doch auch aus dem privaten Umfeld habe ich über die Promotionszeit viel Unterstützung erhalten. Hier möchte ich meinen Eltern Anette Fuchs und Prof. Dr. iur. Andreas Fuchs für ihre Unterstützung und Ermutigungen danken. Mein besonderer Dank gilt abschließend Nina Hopfinger, die mich über die gesamte Promotionszeit mit großer Geduld und bedingungsloser Unterstützung begleitet hat.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	i
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	viii
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	x
Abstract	xiii
Kurzfassung	xiv
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund und Zielsetzung	1
1.2 Gliederung der Arbeit.....	2
1.3 Publikation von Ergebnissen	3
2 Stand der Technik	5
2.1 Die Stoffklasse der Proteine	5
2.1.1 Hintergrund und Anwendungen.....	5
2.1.2 Aufbau und Struktur.....	6
2.2 Grundlagen der Chromatographie	8
2.2.1 Funktionsweise und Grundbegriffe.....	9
2.2.2 Adsorption und Stofftransport.....	12
2.2.3 Chromatographie-Arten und Betriebsweisen	15
2.3 Salzeinfluss in der Chromatographie.....	18
2.3.1 Ionenaustauschchromatographie	18
2.3.2 Hydrophobe-Interaktions- und Mixed-Mode-Chromatographie.....	20
2.4 Modellierung chromatographischer Systeme	21
2.4.1 Modellierungsansätze und Modellparameter.....	21
2.4.2 Diskretisierung, Start- und Randbedingungen	25
2.4.3 CADET-Toolbox.....	28
2.5 Bestimmung von Modellparametern	30
2.5.1 Yamamoto-Methode	30
2.5.2 Inverses Fitting	31
2.5.3 Kombinierte Ansätze	33
3 Einfluss der Salzspezies auf Modellproteine	34
3.1 Material und Methoden	34

3.1.1	Experimentelles Setup	34
3.1.2	Zusammensetzung der Puffer	35
3.1.3	Versuchsdurchführung	37
3.2	Vergleichbarkeit für Ionen mit unterschiedlicher Valenz.....	37
3.3	Auswirkung der Auswahl von Kationen- und Anionenspezies	38
3.3.1	Untersuchung des Retentionsverhaltens	38
3.3.2	Einfluss auf die Proteintrennung	42
3.4	Fazit	44
4	Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine.....	45
4.1	Material und Methoden	45
4.1.1	Experimentelles Vorgehen und Pufferzusammensetzung	45
4.1.2	Anpassung der Modellgleichung	46
4.2	Binäre Salzmischungen.....	48
4.3	Kalibrierung und Validierung der Modellgleichung.....	51
4.4	Einfluss auf die Proteintrennung.....	55
4.5	Untersuchungen für Cytochrom C.....	58
4.6	Fazit	59
5	Beschreibung von Mischungseinflüssen mit der Yamamoto-Methode	61
5.1	Material und Methoden	61
5.1.1	Charakterisierung der Chromatographie-Säule	61
5.1.2	Bestimmung von K_{eq} und v	61
5.1.3	Validierung der Parameter	62
5.1.4	Untersuchungen mit Cytochrom C.....	63
5.2	Bestimmung von Modellparametern	64
5.3	Sensitivität der Modellparameter	69
5.4	Berechnung von Retentionsfaktoren	71
5.5	Untersuchungen mit Cytochrom C.....	78
5.6	Fazit	79
6	Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten.....	80
6.1	Material und Methoden	80
6.1.1	Aufbau des Simulationstools	80
6.1.2	Zusätzliche Experimente	84
6.1.3	Aufbereitung der experimentellen Daten	85
6.2	Parameterbestimmung	87
6.2.1	Säulencharakterisierung und Vorversuche	87

6.2.2	Fitting der Modellparameter für die untersuchten Proteine	89
6.3	Validierung der Modellparameter.....	95
6.4	Fazit	97
7	Simulationsstudie zum Einfluss der Salzzusammensetzung auf die Proteintrennung	99
7.1	Material und Methoden	99
7.1.1	Durchführung der Modellierung	99
7.1.2	Validierungsversuche	100
7.2	Aufreinigung einer einzelnen Zielkomponente	100
7.2.1	Berechnung von Ausbeuten	100
7.2.2	Validierung der Prozessparameter.....	107
7.3	Aufreinigung mehrerer Zielkomponenten	110
7.3.1	Berechnung von Ausbeuten	110
7.3.2	Validierung der Prozessparameter.....	111
7.4	Fazit	112
8	Zusammenfassung und Ausblick	114
8.1	Überblick über die gewonnenen Erkenntnisse	114
8.2	Ansätze für weiterführende Forschung.....	117
A.	Mathematische Herleitungen	118
A.1	SMA-Isotherme für mehrere Komponenten	118
A.2	Yamamoto-Gleichung in gebräuchlicher Form.....	119
A.3	Detaillierte Berechnung der Citrat- und Tartrat-Spezieskonzentrationen.....	120
B.	Zusätzliche experimentelle Daten	123
B.1	Retentionsfaktoren von BSA und LYZ mit Salzmischungen.....	123
B.2	Experimentelle Daten zur Parameterbestimmung	129
C.	Weitere berechnete Daten	130
C.1	Zusätzliche Retentionsfaktoren nach der Yamamoto-Methode.....	130
C.2	Zusätzliche modellierte Chromatogramme.....	132
	Literaturverzeichnis.....	133

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Grundlegender Aufbau einer Aminosäure.....	6
Abbildung 2.2: Bildung einer Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren	7
Abbildung 2.3: Schematischer Verlauf der Nettoladung eines Proteins über den pH-Wert	8
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Trennprinzips der Chromatographie	9
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Querschnitts einer Chromatographie-Säule	10
Abbildung 2.6: Beispielhaftes Chromatogramm für ein Tracer-Molekül und zwei bindende Komponenten	11
Abbildung 2.7: Prinzipieller Verlauf einer linearen Adsorptions-Isotherme (a) und der hieraus resultierenden Peakform (c) sowie der Verlauf einer konkaven Adsorptions-Isotherme (b) und der hieraus resultierenden Peakform (d)	13
Abbildung 2.8: Transport-Phänomene beim Übergang eines Moleküls von der mobilen Phase im interpartikulären Raum zur stationären Phase	15
Abbildung 2.9: Typische Verläufe der Zusammensetzung der mobilen Phase aus zwei Eluenten A und B	16
Abbildung 2.10: Qualitative Einordnung einiger Ionen in die Hofmeister Reihe	19
Abbildung 2.11: Prinzip der differentiellen Massenbilanz an einer Chromatographiesäule	22
Abbildung 2.12: Beispielhafte Diskretisierung einer Chromatographiesäule der Länge L_c in N Zellen mit der finiten-Volumen Methode.....	25
Abbildung 2.13: Überblick über den Aufbau des CADET-Process Tools.....	29
Abbildung 3.1: Fließbild der verwendeten Chromatographie Anlage	34
Abbildung 3.2: Retentionsfaktoren der Modellproteine mit den untersuchten Salzen bei a) einer konstanten Kationenstärke von 1 M und b) einer konstanten Anionenstärke von 1 M.....	38
Abbildung 3.3: Retentionsfaktoren der Modellproteine mit Standardabweichungen für Chlorid-Salze von verschiedenen Kationen bei einer Kationenstärke von 1 M im Hochsalzpuffer	39
Abbildung 3.4: Retentionsfaktoren der Modellproteine mit Standardabweichungen für Natrium-Salze von verschiedenen Anionen bei einer Kationenstärke von 1 M im Hochsalzpuffer	41
Abbildung 3.5: Verhältnis des maximalen Separationsfaktors α_{max} zum minimalen Separationsfaktor α_{min} für sowohl die verschiedenen Anionen von Natrium- Salzen als auch die verschiedenen Kationen von Chlorid-Salzen	43
Abbildung 4.1: Zusammensetzungen der verwendeten Hochsalzpuffer zur Bestimmung von Mischungseffekten von Salzen auf das Retentionsverhalten von BSA und LYZ.	46
Abbildung 4.2: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen mit dem selben Anion bei einer Gradientenlänge von 15 CV	48
Abbildung 4.3: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen mit demselben Kation bei einer Gradientenlänge von 15 CV.....	49
Abbildung 4.4: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen mit verschiedenen Kationen und Anionen bei einer Gradientenlänge von 15 CV	49
Abbildung 4.5: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für Mischungen aus NaCl und $(NH_4)_2SO_4$ bei verschiedenen Gradientenlängen.....	50
Abbildung 4.6: Retentionsfaktoren von a) BSA und b) LYZ bei einer Gradientenlänge von 15 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung	52
Abbildung 4.7: Retentionsfaktoren von a) BSA und b) LYZ bei einer Gradientenlänge von 3 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung	53

Abbildung 4.8: Separationsfaktoren α von BSA und LYZ bei einer Gradientenlänge von 15 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung.....	56
Abbildung 4.9: Separationsfaktoren α von BSA und LYZ bei einer Gradientenlänge von 3 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung.....	57
Abbildung 4.10: Retentionsfaktoren von CYC für Mischungen aus NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei verschiedenen Gradientenlängen.....	59
Abbildung 5.1: Yamamoto-Plot von BSA und LYZ mit reinem NaCl.	65
Abbildung 5.2: Die mit der Yamamoto-Methode bestimmten Parameter a) Gleichgewichtskonstante K_{eq} und b) charakteristische Ladung v von BSA in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung.	66
Abbildung 5.3: Die mit der Yamamoto-Methode bestimmten Parameter a) Gleichgewichtskonstante K_{eq} und b) charakteristische Ladung v von LYZ in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung.	67
Abbildung 5.4: Vergleich der mit der Yamamoto-Methode berechneten mit den durch die kalibrierte Modellgleichung erhaltenen Retentionsfaktoren bei einer Gradientenlänge von 15 CV.....	72
Abbildung 5.5: Vergleich der mit der Yamamoto-Methode berechneten mit den durch die kalibrierte Modellgleichung erhaltenen Retentionsfaktoren bei einer Gradientenlänge von 3 CV.....	73
Abbildung 5.6: Vergleich der mit der Yamamoto-Methode berechneten Retentionsfaktoren mit den Validierungsversuchen bei einer Gradientenlänge von 7 CV.....	76
Abbildung 5.7: Vergleich der mit der Yamamoto-Methode berechneten Retentionsfaktoren mit den Validierungsversuchen bei einer Gradientenlänge von 17 CV.....	77
Abbildung 5.8: SMA-Parameter von CYC nach der Yamamoto-Methode für Mischungen zwischen NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	78
Abbildung 6.1: Schematischer Aufbau des Simulationsprogramms zur Chromatographie- Modellierung und Parameterbestimmung.....	81
Abbildung 6.2: Baseline-Korrektur und Ausschneiden des relevanten Peak-Bereichs für LYZ mit 50% NaCl bei einer Gradientenlänge von 5 CV.....	86
Abbildung 6.3: Ausschneiden des relevanten Peak-Bereichs für BSA mit 50% NaCl bei einer Gradientenlänge von 3 CV.....	86
Abbildung 6.4: Experimentelles und mit Parameterfitting simuliertes Chromatogramm für Aceton.....	88
Abbildung 6.5: Vergleich der Streudiagramme für eine Parameterbestimmung mit dem Simulationsmodell mit der Adsorption als a) Gleichgewicht und b) kinetische Reaktion.....	89
Abbildung 6.6: Experimentelle (Exp) und mit Parameterfitting simulierte (Sim) Chromatogramme für BSA für die untersuchten Gradientenlängen und Salzzusammensetzungen.....	90
Abbildung 6.7: Experimentelle (Exp) und mit Parameterfitting simulierte (Sim) Chromatogramme für LYZ für die untersuchten Gradientenlängen und Salzzusammensetzungen.....	91
Abbildung 6.8: Experimentelle (Exp) und mit Parameterfitting simulierte (Sim) Chromatogramme für CYC für die untersuchten Gradientenlängen und Salzzusammensetzungen.....	92
Abbildung 6.9: Regression der auf die Referenzgrößen bezogenen Gleichgewichtskonstante $K_{\text{eq,ref}}$ aus dem inversen Parameterfit für die untersuchten Proteine.....	93

Abbildung 6.10: Validierungsversuche der untersuchten Proteine mit NaCl bei einer Gradientenlänge von 20 CV	95
Abbildung 6.11: Validierungsversuche der untersuchten Proteine bei einer Salzzusammensetzung von 50% NaCl und 50% (NH ₄) ₂ SO ₄	96
Abbildung 7.1: Ausbeuten von BSA über die Gradientenlänge und die Salzzusammensetzung	100
Abbildung 7.2: Simulierte Chromatogramme mit Fraktionierung von BSA an ausgewählten Salzzusammensetzungen und Gradientenlängen.....	102
Abbildung 7.3: Ausbeuten von LYZ über die Gradientenlänge und die Salzzusammensetzung	104
Abbildung 7.4: Simulierte Chromatogramme mit Fraktionierung von LYZ an ausgewählten Salzzusammensetzungen und Gradientenlängen.....	105
Abbildung 7.5: Ausbeuten von CYC über die Gradientenlänge und die Salzzusammensetzung	106
Abbildung 7.6: Simulierte Chromatogramme mit Fraktionierung von CYC an ausgewählten Salzzusammensetzungen und Gradientenlängen.....	107
Abbildung 7.7: Validierung des ausgewählten Betriebspunkts für die Aufreinigung von BSA	108
Abbildung 7.8: Validierung des ausgewählten Betriebspunkts für die Aufreinigung von LYZ	109
Abbildung 7.9: Validierung des ausgewählten Betriebspunkts für die Aufreinigung von CYC	110
Abbildung 7.10: Kombinierte Gesamt-Ausbeute von BSA, LYZ und CYC über die Gradientenlänge und die Salzzusammensetzung.....	111
Abbildung 7.11: Validierung des ausgewählten Betriebspunkts für die simultane Aufreinigung von BSA, LYZ und CYC.....	112
Abbildung B.1: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen für eine Gradientenlänge von 3 CV	123
Abbildung B.2: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen für eine Gradientenlänge von 5 CV	124
Abbildung B.3: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen für eine Gradientenlänge von 10 CV	125
Abbildung B.4: Retentionsfaktoren von a) BSA und b) LYZ bei einer Gradientenlänge von 10 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung	126
Abbildung B.5: Retentionsfaktoren von a) BSA und b) LYZ bei einer Gradientenlänge von 5 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung	127
Abbildung B.6: Separationsfaktoren α von BSA und LYZ bei einer Gradientenlänge von 10 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung.....	128
Abbildung B.7: Separationsfaktoren α von BSA und LYZ bei einer Gradientenlänge von 5 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung.....	128
Abbildung B.8: Chromatogramme der Durchbruchversuche für die Bestimmung des sterischen Faktors.....	129
Abbildung C.1: Vergleich der mit der Yamamoto-Methode berechneten mit den durch die kalibrierte Modellgleichung erhaltenen Retentionsfaktoren bei einer Gradientenlänge von 10 CV	130
Abbildung C.2: Vergleich der mit der Yamamoto-Methode berechneten mit den durch die kalibrierte Modellgleichung erhaltenen Retentionsfaktoren bei einer Gradientenlänge von 5 CV	131
Abbildung C.3: Vergleich von drei Modellierungen mit einem einzelnen Protein mit einer Modellierung mit drei Proteinen	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht der bereits veröffentlichten Fachartikel im Rahmen dieser Arbeit	3
Tabelle 1.2: Übersicht der öffentlichen Vorträge im Rahmen dieser Arbeit.....	4
Tabelle 2.1: Beispiele für Restgruppen von proteinogenen Aminosäuren mit unterschiedlichen Eigenschaften.....	6
Tabelle 2.2: Modellparameter zur Beschreibung verschiedener Phänomene in gängigen Modellierungsansätzen in der Chromatographie.....	23
Tabelle 2.3: Vorgehen bei der Parameterbestimmung mit einem sequenziellen Ansatz für das Transport-Dispersive Modell.....	33
Tabelle 3.1: Übersicht über die verwendeten Salze und ihre Valenzen sowie die resultierenden Kationenstärken I_c beziehungsweise Anionenstärken I_a	35
Tabelle 3.2: Separationsfaktor $\alpha_{1,2}$ für jedes Paar der untersuchten Proteine für die verwendeten Salze bei einer Kationenstärke von 1 M im Hochsalzpuffer.....	42
Tabelle 4.1: Ionenanteile x_i der Salzzusammensetzungen für die Validierungsversuche	46
Tabelle 4.2: Parameter der angepassten Modellgleichung für BSA und LYZ für die untersuchten Gradientenlängen	51
Tabelle 4.3: NRMSE-Werte der parametrisierten Modellgleichung für die Kalibrierungs- und Validierungsversuche.....	54
Tabelle 5.1: Ergebnisse der experimentellen Bestimmung der Säulenparameter	64
Tabelle 5.2: Parameter der angepassten Modellgleichung für BSA und LYZ zur Bestimmung von $\log K_{eq}$ und v	65
Tabelle 5.3: NRMSE-Werte für die Kalibrierungs- und Validierungsversuche für die $\log K_{eq}$ und v -Werte von BSA und LYZ	68
Tabelle 5.4: MAPE-Werte für K_{eq} , v und daraus abgeleitete $c_{s,R}$ -Werte mit der Yamamoto-Methode bei Änderungen einzelner Experimente	70
Tabelle 5.5: MAPE-Werte für die mit den regressierten Modellparametern der SMA-Isotherme berechneten Retentionsfaktoren für die beim Fitting berücksichtigten Gradientenlängen	74
Tabelle 5.6: MAPE-Werte für die mit den regressierten Modellparametern der SMA-Isotherme berechneten Retentionsfaktoren für weitere, nicht beim Fitting berücksichtigten Gradientenlängen	75
Tabelle 5.7: NRMSE-Werte für die Kalibrierungs- und Validierungsversuche für die $\log K_{eq}$ und v -Werte von CYC.....	78
Tabelle 6.1: Vorgehen bei der Parameterbestimmung mit dem adaptierten sequenziellen Ansatz für das Transport-Dispersive Modell.....	81
Tabelle 6.2: Startwerte mit zugehöriger Quelle sowie Ober- und Untergrenzen für die Optimierungsgrößen X_{var}	82
Tabelle 6.3: Diskretisierung und Fehlertoleranzen für das verwendete Simulationsmodell in CADET-Core.....	84
Tabelle 6.4: Ergebnisse der Anlagen- und Säulencharakterisierung für die Versuche 1-3 des sequenziellen Ansatzes sowie der Kapazitätsbestimmung	87
Tabelle 6.5: Ergebnisse der Berechnungen aus den Durchbruchversuchen sowie die Säulenparameter der kleinen Säule.....	88
Tabelle 6.6: Parameter für die Regressionsgleichungen der Modellparameter der SMA-Isotherme als Funktion der Salzzusammensetzung.....	94
Tabelle 6.7: Ergebnisse der Parameterbestimmung der k_{eff} -Werte für die untersuchten Proteine bei verschiedenen Salzzusammensetzungen.....	94

Tabelle 6.8: Abweichungen der simulierten und experimentellen Retentionszeiten für die Validierungsversuche.....	97
Tabelle A.1: Speziesverteilung, Verhältnis zur Natrium Konzentration und verwendete pK _s -Werte von Citrat und Tartrat.....	121

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzungen

ACH	α -Chymotrypsin
AEC	Anionenaustauschchromatographie
BSA	bovines Serumalbumin
CADET	Chromatographie Analyse und Design Toolkit
CEC	Kationenaustauschchromatographie
CV	Säulenvolumen
CYC	Cytochrom C
FFT	schnelle Fourier-Transformation
FVM	finite-Volumen-Methode
GA	genetischer Algorithmus
HETP	Höhenäquivalent einer theoretischen Stufe
HIC	hydrophobe Interaktions-Chromatographie
IEC	Ionenaustauschchromatographie
LGE	lineare Gradientenelution
LYZ	Lysozym
MAPE	mittlere prozentuale Abweichung
MMC	Mixed-Mode-Chromatographie
NRMSE	normalisierte Wurzel der mittleren Fehlerquadrate
NSGA3	nicht-dominierter genetischer Such-Algorithmus 3
pl	isoelektrischer Punkt
RPC	Umkehrphasenchromatographie
SEC	Größenausschlusschromatographie
SMA	sterisches Massenwirkungsgesetz
SSE	Summe der Fehlerquadrate
WENO	gewichtet, im Wesentlichen nicht oszillierend

Lateinische Symbole

<i>a</i>	Regressionsparameter
<i>A</i>	Flächeninhalt
<i>c</i>	Konzentration
<i>d</i>	WENO-Konstante
<i>D</i>	Diffusionskoeffizient
<i>h</i>	Ionenfaktoren für angepasste Modellgleichung
<i>H</i>	Henry-Konstante
<i>I</i>	Ionenstärke
<i>k</i>	Massentransport-Koeffizient
<i>k'</i>	Retentionsfaktor
<i>K</i>	Reaktionskonstante

l	Ionenfaktoren
L	Länge
m	Masse
M	WENO-Matrix
N	Anzahl
q	Beladung
r	Radius
t	Zeit
u	Fließgeschwindigkeit
V	Volumen
x	Salzanteil
X	Parametersatz
z	axiale Ortskoordinate

Griechische Symbole

α	Separationsfaktor
β	WENO-Glattheitspolynom
ε	Porosität
κ	WENO-Ordnungszahl
ν	charakteristische Ladung
ξ	WENO-Einzelgewicht
Λ	Säulenkapazität
σ	sterischer Abschirmungsfaktor
ψ	Reaktionsrate
φ	WENO-Sicherheitssummand
ω	WENO-Gewichtungsfaktor

Indizes

acc	Akkumulation
ads	Adsorption
ax	axial
c	Säule
comp	Komponente
conv	Konvektion
D	Gegenion
des	Desorption
disp	Dispersion
eq	Gleichgewicht
eff	effektiv
final	Endwert

fix	festgelegt
G	Gradient
<i>i</i>	Komponente i
in	Säuleneinlass
inj	Injektion
int	interpartikulär
<i>j</i>	Komponente j
max	maximaler Wert
meas	Messwert
min	minimaler Wert
mt	Massentransport
net	Netto
p	Partikel
plant	Anlagenperipherie
pore	Pore
pred	Vorhersage
R	Retention
reac	Reaktion
ref	Referenzgröße
s	Salz
S	Feststoffgerüst
sat	Sättigung
V	Verteilung
var	variabel
W	Waschschritt

Abstract

Ion-exchange chromatography is an important process step for the purification of proteins in the biotechnological industry. The significance of the salt type employed in the mobile phase is disputed in literature. Moreover, a possible impact of mixed salts on ion-exchange chromatography has not been investigated yet, despite the occurrence of synergetic effects of salt mixtures for hydrophobic interaction chromatography (HIC).

In this work, the salt impact on cation-exchange chromatography (CEC) on the model proteins bovine serum albumin (BSA), lysozyme (LYZ), α -chymotrypsin (ACH) and cytochrome C (CYC) is investigated. Therefore, linear gradient elution experiments are conducted at a pH-value of 4. In a first step, the impact of various ion species on the proteins BSA, LYZ and ACH is studied. The use of the same cationic strength for experiments with ions of different valences was identified as a suitable approach for the comparison of salt effects. It was demonstrated that protein specific salt effects occur frequently and can have a significant impact on protein separation. For the used model system, the impact of the anion selection was higher than that of the cation selection, even though the cation directly participates in the ion-exchange process in CEC.

Furthermore, the effects of mixed salts in CEC were studied for the proteins BSA and LYZ with the ions sodium, ammonium, chloride and sulfate. The retention time of LYZ changes in a linear way with the salt composition, while BSA shows synergetic effects towards shorter retention times for mixtures with chloride and low sulfate fractions. An adjusted, semi-empirical model equation from literature could describe the occurring effects with single ion factors and interaction factors. The impact of these synergetic salt effects was, however, lower in IEC than for HIC. Moreover, the Yamamoto-method was employed to determine the equilibrium constant K_{eq} as well as the characteristic charge ν for various salt compositions. The use of the adjusted model equation for a regression of these parameters lead to high deviations between measured and regressed values, as the Yamamoto-method showed a high sensitivity for small experimental deviations. However, the deviations for K_{eq} and ν occurred in opposite directions and canceled each other's impact out. Thus, retention times calculated with the Yamamoto-equation and the regressed parameters showed a high agreement with experimental data.

For a detailed process modeling, the mechanistic modeling tools CADET-Core, CADET-Match and CADET-Process were employed. The parameter determination by the Yamamoto-method was combined with an inverse fitting approach to calculate the chromatograms of the proteins BSA, LYZ and CYC for any salt mixtures of sodium chloride and ammonium sulfate as well as any gradient length. This tool was then used for a simulation study to investigate the impact of salt mixtures on the separation process. The benefit of employing mixed salts for this system depends on the defined product. For the purification of BSA as well as of all proteins in one separation step, the use of salt mixtures lead to a significant improvement of the process. For LYZ or CYC as products, the use of salt mixtures showed no improvement of the process. Thus, it was demonstrated that salt type and salt mixtures can have a significant impact on CEC processes for protein separation and should be investigated during process development. The method for parameter determination and modeling described in this work is a suitable approach to describe these salt effects in a mechanistic model.

Kurzfassung

Die Ionenaustauschchromatographie ist ein bedeutender Prozessschritt zur Aufreinigung von Proteinen in der biotechnologischen Industrie. Die Bedeutung der in der mobilen Phase verwendeten Salzspezies ist hierbei in der Literatur umstritten. Darüber hinaus wurde ein möglicher Einfluss von der Mischung verschiedener Salze in der Ionenaustauschchromatographie bisher nicht untersucht, obwohl Salzmischungen für die hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) synergetische Effekte zeigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Salzeinfluss auf die Kationenaustauschchromatographie (*cation-exchange chromatography* [CEC]) anhand der Modellproteine bovines Serumalbumin (BSA), Lysozym (LYZ), α -Chymotrypsin (ACH) und Cytochrom C (CYC) untersucht. Hierzu wurden lineare Gradienten-Elutionen bei einem pH-Wert von 4 durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde der Einfluss verschiedener Salzspezies auf die Proteine BSA, LYZ und ACH betrachtet. Als geeigneter Ansatz für den Vergleich des Retentionsverhaltens der Proteine bei Salzen mit unterschiedlicher Valenz wurde hierbei eine zwischen den Versuchen konstante Kationenstärke identifiziert. Es konnte demonstriert werden, dass proteinspezifische Salzeffekte häufig auftreten und einen großen Einfluss auf die Proteintrennung haben können. Hierbei war der Einfluss der Anionen auf das verwendete Modellsystem größer als der Einfluss der Kationen, obwohl die Kationen in der CEC direkt an der Ionenaustausch-Reaktion beteiligt sind.

Darauf aufbauend wurden Einflüsse von Salzmischungen aus den Ionen Natrium, Ammonium, Chlorid und Sulfat auf die Modellproteine BSA und LYZ untersucht. Das Retentionsverhalten von LYZ ändert sich linear mit der Salzzusammensetzung, während bei BSA synergetische Effekte in Richtung niedriger Retentionszeiten bei Mischungen mit hohen Chlorid- und geringen Sulfat-Anteilen auftreten. Eine angepasste, semi-empirische Modellgleichung aus der Literatur war in der Lage, die Einflüsse über Ionen- und Interaktionsfaktoren zu beschreiben. Die Ausprägung dieser Effekte ist allerdings geringer als in der HIC. Des Weiteren wurde die Yamamoto-Methode angewendet, um die Gleichgewichtskonstante K_{eq} sowie die charakteristische Ladung ν in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung zu bestimmen. Die Verwendung der angepassten Modellgleichung zur Regression dieser Parameter führte auf Grund der hohen Sensitivität auf leichte experimentelle Abweichungen zu großen Differenzen zwischen den gemessenen und den regressierten Parameter-Werten. Die Abweichungen von K_{eq} und ν verliefen dabei gegensätzlich und glichen sich in ihrem Einfluss aus, sodass die mit den regressierten Parametern über die Yamamoto-Gleichung berechneten Retentionszeiten sehr gut mit experimentellen Daten übereinstimmten.

Für eine detaillierte Prozessmodellierung wurde ein mechanistisches Modell eingesetzt. Hierzu wurden die Simulationstools CADET-Core, CADET-Match und CADET-Process verwendet. Die Parameterbestimmung über die Yamamoto-Methode wurde mit einem inversen Fitting kombiniert, um das Trennverhalten der Proteine BSA, LYZ und CYC für beliebige Mischungen aus Natriumchlorid und Ammoniumsulfat und beliebige Gradientenlängen zu berechnen. Mit diesem Modell wurde anschließend eine Simulationsstudie zur Untersuchung des Salzeinflusses auf den Trennprozess durchgeführt. Der Nutzen von Salzmischungen für die Proteintrennung hängt bei diesem Stoffsystem stark vom betrachteten Produkt ab. Für die Aufreinigung von BSA oder von allen Proteinen in einem Schritt bringt die Verwendung von Salzmischungen große Vorteile mit sich und verbessert die Trenneffizienz signifikant, während sie für CYC und LYZ zu keiner Verbesserung des Prozesses führen. Somit wurde demonstriert, dass Salzspezies und Salzmischungen einen großen Einfluss auf die CEC von Proteinen haben können und in der Prozessentwicklung berücksichtigt werden sollten. Die hier verwendete Methodik zur Modellierung und Parameterbestimmung stellt dabei einen vielversprechenden Ansatz zur Beschreibung dieser Effekte in der mechanistischen Modellierung dar.

1 Einleitung

1.1 Hintergrund und Zielsetzung

Die Chromatographie ist ein thermisches Trennverfahren, das zur Abtrennung und Aufreinigung verschiedenster Moleküle eingesetzt wird [1]. Das Trennprinzip basiert auf unterschiedlichen adsorptiven Wechselwirkungen der verschiedenen Komponenten mit einer Oberfläche. Chromatographische Verfahren werden in vielen verschiedenen Branchen eingesetzt, beispielsweise in der Lebensmittel- und der Pharmaindustrie [2,3]. Eine der am weitesten verbreiteten Chromatographie-Arten ist dabei die Ionenaustauschchromatographie (*ion-exchange chromatography* [IEC]) [4]. Eine hochrelevante Produktklasse bilden die Proteine. Diese komplexen, biologischen Makromoleküle werden industriell meist über eine Fermentation hergestellt, was zu herausfordernden Trennprozessen führt. Gerade für die pharmazeutischen Anwendungen müssen die Proteine wie etwa Antikörper dabei mit höchster Reinheit gewonnen werden. [5,6] Aufgrund dieser hohen Reinheitsanforderungen ist das Downstream-Processing für bis zu über 70% der Prozesskosten in der biopharmazeutischen Produktion verantwortlich [7,8]. Die IEC wird hierbei aufgrund ihrer hohen Selektivität und milden Prozessbedingungen häufig für die Proteintrennung eingesetzt [9].

In der IEC wird der mobilen Phase Salz zugegeben. Die genaue Salzspezies hat hierbei einen Einfluss auf das resultierende Trennverhalten. Grundsätzlich können auftretende Salzeffekte nicht-spezifisch oder proteinspezifisch sein. Ein nicht-spezifischer Effekt beeinflusst alle beteiligten Komponenten auf die gleiche Weise und führt beispielsweise bei allen Komponenten zu höheren Verweilzeiten in der Chromatographie-Säule. Ein proteinspezifischer Effekt beeinflusst verschiedene Proteine auf unterschiedliche Art und kann etwa zu einer Änderung der Elutionsreihenfolge führen. Das Auftreten von proteinspezifischen Effekten wird in der Literatur beschrieben, die Signifikanz dieser Effekte für die Proteintrennung ist allerdings umstritten. Des Weiteren werden bei der Untersuchung von Salzeffekten in der IEC häufig nur die direkt an die Säule bindenden Gegenionen betrachtet und mögliche Einflüsse der Co-Ionen nicht näher berücksichtigt. [10–16]

Eine weitere Chromatographie-Art, bei der relevante Einflüsse der verwendeten Salzspezies auftreten, ist die hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) [17]. Bei der HIC wurden darüber hinaus synergetische Effekte durch das Mischen von Salzen beobachtet. So kann eine Mischung aus zwei Salzen beispielsweise zu einer höheren Beladung oder besseren Trennung von Proteinen führen als jedes der beiden Reinsalze. [18] Für die IEC wurde der Einfluss von Salzmischungen bisher noch nicht untersucht.

Ein wichtiger Aspekt in der Entwicklung und dem Scale-Up von Chromatographie-Prozessen ist die mechanistische Modellierung [19]. Das chromatographische System wird hierbei durch eine Reihe von Differentialgleichungen beschrieben, welche numerisch gelöst werden können [20]. Hiermit kann computergestützt das Trennverhalten von verschiedenen Molekülen innerhalb eines Chromatographie-Schrittes berechnet werden. Durch die Modellierung von vielen verschiedenen Betriebsbedingungen können Prozesse optimiert werden. Der Einsatz von Simulationstools reduziert dabei den experimentellen Aufwand in der Prozessentwicklung erheblich und trägt zu einer verkürzten Entwicklungszeit bei [8,21,22]. Des Weiteren generiert eine präzise, mechanistische Modellierung Prozessverständnis und ermöglicht einen Einblick in die inneren Vorgänge des Prozesses, die mit experimentellen Methoden nicht zugänglich sind [23].

Eine entscheidende Voraussetzung für die mechanistische Modellierung ist die Bestimmung der Modellparameter [8]. Für jede beteiligte Komponente müssen bei der Modellierung beispielsweise

Einleitung

die Isothermen-Parameter bekannt sein. Diese Parameterbestimmung erfolgt in der Regel mit experimentellen Daten. Der experimentelle Aufwand zur Kalibrierung des Modells ist dabei im Allgemeinen deutlich geringer als eine rein experimentelle Prozessentwicklung. [22] Üblicherweise ist ein Set an Parametern nur für ein festes chromatographisches System gültig. Es gibt aber bereits Modellierungs- und Parameterbestimmungsansätze, die Parameter in der IEC als Funktion des pH-Werts abbilden und somit über einen pH-Wert Bereich gültig sind [24,25]. Eine Betrachtung von variablen Salzzusammensetzungen in der Parameterbestimmung der IEC wurde bisher nicht untersucht.

Zielsetzung und Arbeitshypothesen

Ausgehend von dem aktuellen Stand der Forschung ergeben sich einige offene Punkte im Bereich der IEC von Proteinen, die in dieser Arbeit untersucht werden sollen: Der Einfluss von verschiedenen Salzspezies auf das Retentionsverhalten soll genauer betrachtet und die Signifikanz von proteinspezifischen Effekten ermittelt werden. Hierbei soll der Einfluss von Gegen- und Co-Ionen systematisch miteinander verglichen werden. Das Ziel dieser Betrachtungen ist es, herauszufinden, ob eine solche Untersuchung von verschiedenen Gegen- und Co-Ionen in der Prozessentwicklung generell sinnvoll ist.

Anschließend soll das Verhalten von Proteinen in der IEC mit Salzmischungen ermittelt werden. Hierbei soll insbesondere das Auftreten von synergetischen Effekten untersucht und mit den Phänomenen in der HIC verglichen werden. Hierauf aufbauend soll eine Parameterbestimmung für Systeme mit Salzmischungen entwickelt werden. Mit Hilfe dieser Parameter soll der Einfluss der Salzzusammensetzung auf die Proteintrennung in einem Modellsystem über die Anwendung von mechanistischer Modellierung systematisch untersucht werden. Bei diesen Untersuchungen soll ein geeigneter Ansatz zur Parameterbestimmung sowie eine Einschätzung zum Nutzen von Salzmischungen in IEC-Prozessen generiert werden.

Aus dieser Zielsetzung lassen sich die folgenden Hypothesen ableiten, die im Rahmen der Arbeit untersucht werden sollen:

1. Salze haben einen relevanten und proteinspezifischen Einfluss auf die IEC.
2. Die Wahl des Co-Ions ist für IEC-Prozesse von großer Bedeutung.
3. Es können synergetische Effekte bei Salzmischungen in der IEC auftreten.
4. Der Einfluss von Salzmischungen kann über eine passende Parameterbestimmung in der mechanistischen Modellierung abgebildet werden.
5. Die Trennung von Proteinen kann in der IEC durch die Anwendung von Salzmischungen verbessert werden.

In dieser Arbeit wird die IEC in Form von Kationenaustauschprozessen untersucht. Da diese Arbeit den Einfluss der Salzzusammensetzung ermitteln soll, wird der pH-Wert für alle durchgeführten Untersuchungen konstant gehalten.

1.2 Gliederung der Arbeit

Kapitel 2 dieser Arbeit gibt einen Überblick über den aktuellen Stand der Technik. Dabei werden sowohl die Stoffklasse der Proteine als auch die Grundlagen der Chromatographie erörtert. Ebenfalls wird der Stand der Forschung im Bereich des Salzeinflusses auf die Chromatographie diskutiert. Des Weiteren werden Methoden zur mechanistischen Modellierung und zur Parameterbestimmung vorgestellt.

Einleitung

In den Kapiteln 3 und 4 werden experimentelle Arbeiten zur Untersuchung des Einflusses der Salzspezies (Kapitel 3) und von Salzmischungen (Kapitel 4) auf die Kationenaustauschchromatographie (*cation-exchange chromatography* [CEC]) von Proteinen dargestellt. Es wird eine geeignete Methodik zum Vergleich des Retentionsverhaltens von Proteinen mit Salzen mit unterschiedlicher Valenz ermittelt. Darauf aufbauend wird die Signifikanz der auftretenden Effekte für die Proteintrennung untersucht.

Die Bestimmung von Isothermen-Parametern von Modellproteinen für verschiedene Salzmischungen über eine einfache Regression und die Entwicklung einer Funktion, um die Parameter in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung zu beschreiben, wird in Kapitel 5 erläutert. Hierbei werden beliebige Salzzusammensetzungen für Mischungen aus vier Salzen betrachtet.

In Kapitel 6 wird der Aufbau und die Kalibrierung eines mechanistischen Modells beschrieben. Die Parameterbestimmung aus Kapitel 5 wird aufgegriffen und weiterentwickelt, wobei das Stoffsystem auf Mischungen aus zwei Salzen reduziert wird. Hiermit sollen CEC-Prozesse für die Modellproteine für beliebige Mischungen der zwei Salze berechnet werden können.

In Kapitel 7 wird das kalibrierte, mechanistische Modell angewendet, um den Einfluss der Salzzusammensetzung auf die Proteintrennung des Modellsystems systematisch zu untersuchen. Hierbei werden verschiedene Komponenten als mögliche Produkte betrachtet und der Nutzen von Salzmischungen in CEC-Prozessen wird bewertet.

Abschließend erfolgt in Kapitel 8 eine Zusammenfassung der Arbeit sowie ein Ausblick auf weitere offene Fragestellungen, die sich aus dieser Arbeit ergeben.

1.3 Publikation von Ergebnissen

Teile der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht. Eine Übersicht über die veröffentlichten Fachartikel wird in Tabelle 1.1 gegeben. Des Weiteren wurden einige Voruntersuchungen im Rahmen von studentischen Arbeiten durchgeführt. Eine erste Untersuchung der Einflüsse von verschiedenen Salzspezies wurden in den Bachelorarbeiten von Lehmann (2021) und Crombach (2021) durchgeführt. In der Masterarbeit von Thiel (2023) wurde die Parameterbestimmung für die mechanistische Modellierung in Form einer Funktion von Eigenschaften der mobilen Phase am Beispiel des pH-Werts durchgeführt und auf eine Proteintrennung angewandt.

Tabelle 1.1: Übersicht der bereits veröffentlichten Fachartikel im Rahmen dieser Arbeit.

Titel	Journal	Autoren	Datum
Comparison of the impact of anion and cation selection onto cation exchange chromatography of model proteins	Journal of Chromatography A	T. Fuchs, A. Jupke	21.06.2022
Influence of mixed salts on retention behavior of model proteins in cation exchange chromatography	Journal of Chromatography A	T. Fuchs, A. Pälchen, A. Jupke	10.05.2023

Einleitung

Das Thema wurde ebenfalls auf verschiedenen internationalen Fachtagungen vorgestellt. Die öffentlichen Vorträge im Zusammenhang mit dieser Arbeit sind in Tabelle 1.2 aufgeführt [26].

Tabelle 1.2: Übersicht der öffentlichen Vorträge im Rahmen dieser Arbeit.

Titel	Tagung	Autoren	Datum, Ort
Effect of Salt Selection onto Ion-Exchange Chromatography of Proteins	16th International PhD Seminar on Chromatographic Separation Science (SoCSS)	T. Fuchs, L. Lehmann, A. Jupke	28.07.2021, Wien
Influence of Salt Selection onto Cation-Exchange Chromatography of Proteins	35th International Symposium on Preparative and Process Chromatography (PREP)	T. Fuchs, A. Jupke	17.05.2022, Baltimore
Influence of Salt Selection onto Cation-Exchange Chromatography of Proteins	17th International PhD Seminar on Chromatographic Separation Science (SoCSS)	T. Fuchs, A. Jupke	29.06.2022, Karlsruhe
Impact of Salt Selection on Ion-Exchange Chromatography of Model Proteins [26]	(Bio)Process Engineering - a Key to Sustainable Development	T. Fuchs, A. Jupke	14.09.2022, Aachen
Einfluss von Salzmischungen auf die Ionenaustauschchromatographie von Proteinen	Jahrestreffen der DECHEMA-Fachgruppe Adsorption	T. Fuchs, A. Jupke	22.03.2023, Frankfurt
Impact of Mixed Salts on Ion-Exchange Chromatography of Model Proteins	18th International PhD Seminar on Chromatographic Separation Science (SoCSS)	T. Fuchs, A. Pälchen, A. Jupke	07.06.2023, Düren

2 Stand der Technik

In diesem Kapitel werden die theoretischen Hintergründe der Arbeit und der aktuelle Stand der Technik erläutert. Hierzu wird zuerst auf die Stoffklasse der Proteine eingegangen (Kapitel 2.1). Anschließend werden die Grundlagen (Kapitel 2.2) und Erkenntnisse zu Salzeinflüssen (Kapitel 2.3) in der Chromatographie vorgestellt. Daraufhin wird die Modellierung chromatographischer Systeme (Kapitel 2.4) sowie die Parameterbestimmung (Kapitel 2.5) erläutert.

2.1 Die Stoffklasse der Proteine

2.1.1 Hintergrund und Anwendungen

Proteine sind Makromoleküle, die in allen biologischen Systemen vorkommen. Sie spielen eine entscheidende Rolle in allen lebenden Zellen, in denen sie üblicherweise mehr als 50% des Trockengewichts ausmachen. Viele Proteine können chemische Reaktionen in biologischen Systemen katalysieren und die Reaktionsgeschwindigkeiten dabei um mehrere Größenordnungen erhöhen. Diese katalytisch aktiven Proteine werden Enzyme genannt. Weitere Proteine sind beispielsweise die Strukturproteine, die maßgeblich an der Strukturierung und mechanischen Stabilität von Zellen beteiligt sind. [27] Biotechnologische Verfahren weisen einige Vorteile gegenüber klassischen, chemisch katalysierten Verfahren auf. So sind enzymatisch katalysierte Prozesse hoch spezifisch (Umsetzung nur von bestimmten Substraten) und selektiv (Bildung nur von bestimmten Produkten), sodass von Produkten mit Chiralitätszentren oft nur ein einzelnes Isomer gebildet wird. Des Weiteren laufen sie im Allgemeinen unter mildereren Reaktionsbedingungen als chemische Prozesse in Bezug auf Druck, Temperatur und pH-Wert ab. [28]

Proteine werden auf vielfältige Weise industriell eingesetzt [29]. Besonders in der sogenannten weißen Biotechnologie und der roten Biotechnologie sind sie von herausragender Bedeutung. Unter roter Biotechnologie versteht man hierbei den Einsatz von biotechnologischen Produkten und Methoden in der Pharma- und Medizin-Branche. Weiße Biotechnologie deckt die sonstigen industriellen Anwendungsfelder von Mikroorganismen oder Enzymen zur Herstellung von Produkten ab [28,30]. Zu der Produktpalette der weißen Biotechnologie zählen beispielsweise Fein- und Bulkchemikalien, Wasch- und Reinigungsmittel, Lebensmittel sowie Textilien [30]. Zu den wichtigsten Produkten der roten Biotechnologie zählen Antikörper. Diese therapeutischen Moleküle bilden eine der am schnellsten wachsenden Produktklasse in der pharmazeutischen Industrie. [6,31] Darüber hinaus stellt die Untersuchung und Charakterisierung von Proteinen und Enzymen auch einen wichtigen Bestandteil der akademischen Forschung dar [32].

Proteine werden in der roten und weißen Biotechnologie in der Regel durch eine Fermentation hergestellt. Hierbei werden Mikroorganismen angezchtet, die das Zielprotein herstellen. Dies kann ein natürlich in diesem Mikroorganismus vorkommendes Protein sein, heutzutage werden allerdings oftmals rekombinante Proteine erzeugt. Das bedeutet, dass einem Mikroorganismus die DNA-Abschnitte zur Protein-Herstellung künstlich hinzugefügt werden. [33] Nach der Fermentation liegen die Zielproteine intra- oder extrazellulär im Bioreaktor vor. Bei intrazellulären Produkten müssen die Zellen noch aufgeschlossen werden, um die Zielkomponente zugänglich zu machen. Der gesamte Prozess bis zu dieser Stelle wird als Upstream-Prozess bezeichnet. Die Aufreinigungsschritte von der Abtrennung der Zellen oder Zellreste bis zum Erhalt der Zielkomponente in gewünschter Reinheit werden als Downstream-Prozess bezeichnet. [34,35]

Gerade für die therapeutische Anwendung müssen die Proteine in sehr hoher Reinheit vorliegen [33,36,37]. Hierfür beinhaltet der Downstream-Prozess in der Regel mehrere Chromatographie-Schritte (siehe Kapitel 2.2) [5,34]. Bei diesen müssen unter anderem DNA und unerwünschte

Stand der Technik

Proteine des Expressions-Organismus (prozessbezogene Verunreinigungen) sowie Gewichts- und Ladungsvarianten des Zielmoleküls (produktbezogene Verunreinigungen) abgetrennt werden [37,38]. Die am weitesten verbreitete Chromatographie-Methode für die Aufreinigung von biotechnologischen Produkten ist die IEC (siehe Kapitel 2.2.3) [4,5,9,39,40].

2.1.2 Aufbau und Struktur

Die grundlegenden Bausteine von Proteinen sind α -Aminosäuren. Deren grundsätzliche Struktur ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Jede Aminosäure verfügt über mindestens eine Amino- und eine Carboxygruppe. Bei den α -Aminosäuren sind diese beiden Gruppen an dasselbe C-Atom gebunden (α C-Atom). Sie werden anhand ihrer Restgruppe R unterschieden, welche ebenfalls an das α C-Atom bindet. [41] Die Aminosäure Prolin weicht leicht von der dargestellten Struktur ab, da bei ihr die Restgruppe zusätzlich an das Stickstoff-Atom gebunden ist [27]. Mit Ausnahme der Aminosäure Glycin (siehe Tabelle 2.1) sind vier verschiedene Gruppen an das α C-Atom gebunden, wodurch die Aminosäuren Chiralitätszentren aufweisen. Dadurch können α -Aminosäuren in einer L- oder einer D-Form vorliegen. In lebenden Zellen und Proteinen finden praktisch nur α -L-Aminosäuren Anwendung. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird der Begriff Aminosäure daher synonym zu α -L-Aminosäure verwendet. [41]

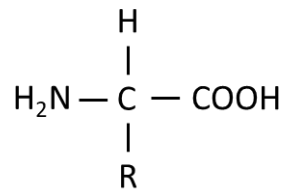


Abbildung 2.1: Grundlegender Aufbau einer Aminosäure [41].

Proteine sind hauptsächlich aus 20 verschiedenen Aminosäuren zusammengesetzt. Diese proteinbildenden Aminosäuren werden als proteinogen bezeichnet. In Tabelle 2.1 sind einige Beispiele für die Restgruppen von proteinogenen Aminosäuren mit einer möglichen Einteilung nach Eigenschaften gegeben. Die unterschiedlichen Charakteristika von Aminosäuren werden vollständig durch ihre Restgruppen bestimmt. Wie in Tabelle 2.1 dargestellt können die Restgruppen auch Säure- oder Aminogruppen beinhalten. Dadurch können sie in Abhängigkeit des pH-Werts positive oder negative Ladungen tragen. [27,41]

Die proteinogenen Aminosäuren fungieren als Monomere für die polymeren Proteine. Hierbei bildet sich eine sogenannte Peptidbindung zwischen einer α -Amino- und einer α -Carboxygruppe zweier Aminosäuren aus. Diese Kondensationsreaktion ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt.

Tabelle 2.1: Beispiele für Restgruppen von proteinogenen Aminosäuren mit unterschiedlichen Eigenschaften [27].

Name der Aminosäure	Strukturformel der Restgruppe (-R)	Eigenschaft
Glycin	H —	Aliphatisch
Alanin	CH ₃ —	Aliphatisch
Glutaminsäure	COOH — CH ₂ — CH ₂ —	Sauer
Lysin	NH ₂ — CH ₂ — CH ₂ — CH ₂ — CH ₂ —	Basisch

Stand der Technik

Es lässt sich erkennen, dass das abgebildete Dimer selbst wiederum über eine α -Amino- und eine α -Carboxygruppe verfügt. Mit diesen freien Gruppen können weitere Aminosäuren zusätzliche Peptidbindungen eingehen. So entsteht eine Kette an Aminosäuren, an deren Enden jeweils eine Aminogruppe (N-Terminus) und eine Carboxygruppe (C-Terminus) sitzt. Mit zunehmender Kettenlänge nimmt die Bedeutung dieser beiden Endgruppen gegenüber den Restgruppen in Bezug auf die Eigenschaften des Gesamtmoleküls immer weiter ab. Relativ kurze Aminosäureketten werden Polypeptide genannt. Ein Beispiel für ein biologisch und pharmazeutisch bedeutendes Polypeptid ist das Insulin. Bei längeren Aminosäureketten spricht man hingegen von Proteinen. Die Trennlinie zwischen Polypeptiden und Proteinen ist nicht klar definiert und liegt üblicherweise im Bereich zwischen 50 und 100 Aminosäuren. Da das durchschnittliche Molekulargewicht \bar{M} von Aminosäuren bei etwa 120 Da liegt, sind Proteine häufig schwerer als 10 kDa, wobei manche sogar die Marke von 1000 kDa überschreiten können. [41]

Die Abfolge von Aminosäuren in der Kette ist ein eindeutiges Merkmal eines Proteins. Sie wird auch Primärstruktur genannt und bestimmt sowohl die chemischen Eigenschaften des Proteins als auch seine höhere Struktur. Proteine liegen nämlich im Allgemeinen nicht in einer linearen oder frei drehbaren Ausrichtung vor, sondern die Restgruppen der Aminosäuren interagieren miteinander und durch anziehende und abstoßende Wechselwirkungen von benachbarten Aminosäuren bildet sich eine sogenannte Sekundärstruktur aus. Es gibt zwei Haupttypen von repetitiv auftretenden Sekundärstrukturen: die α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen. Die Anzahl der an einer Sekundärstruktur beteiligten Aminosäuren ist stark variabel, für die α -Helix wird eine Durchschnittslänge von zehn Aminosäuren angegeben [27]. Die Interaktion verschiedener Sekundärstrukturen innerhalb einer Aminosäurekette führt zu der sogenannten Tertiärstruktur, die die komplexe räumliche Anordnung der Kette definiert. Manche Proteine bestehen aus mehreren Aminosäureketten. Die Verknüpfung und Anordnung der verschiedenen Tertiärstrukturen wird Quartärstruktur genannt. Diese Anordnung der Aminosäuren in eine definierte Struktur bezeichnet man auch als Proteinfaltung. [27,41]

Während die Peptidbindungen selbst stabile, kovalente Bindungen sind, ist die Bindungsenergie der strukturgebenden Interaktionen gering. Somit können auch schon geringe Änderungen in äußeren Bedingungen wie Temperatur, Lösungsmittel oder pH-Wert zu einer Änderung oder Auflösung der Proteinfaltung führen.

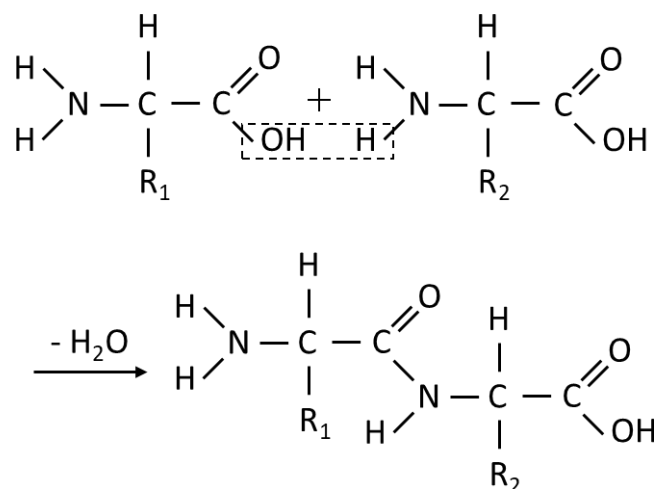


Abbildung 2.2: Bildung einer Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren [41].

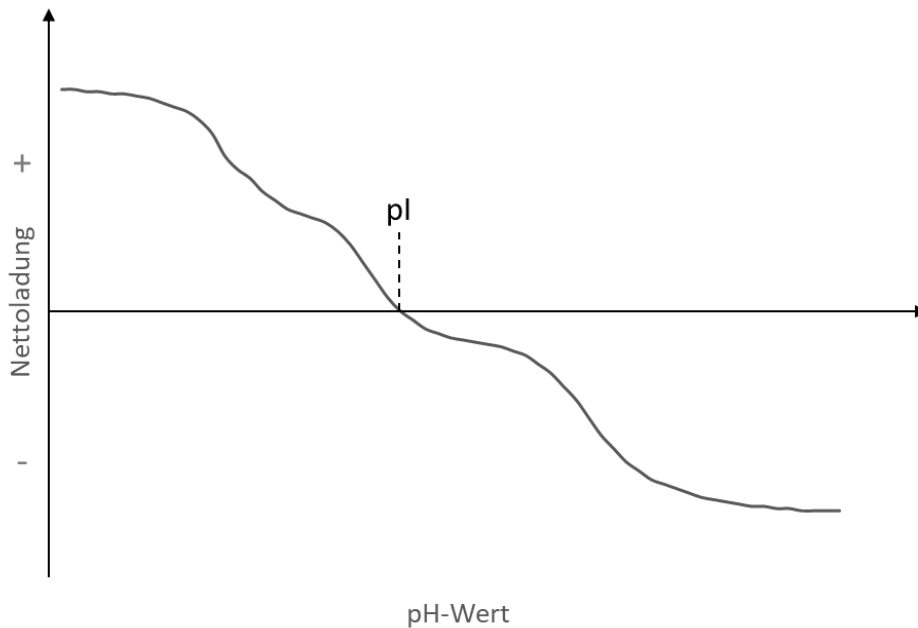


Abbildung 2.3: Schematischer Verlauf der Nettoladung eines Proteins über den pH-Wert.

Dieser Vorgang wird Denaturierung genannt und kann sowohl reversibler als auch irreversibler Natur sein. Die biologische Aktivität von Enzymen ist eng an ihre strukturelle Integrität gekoppelt, sodass insbesondere während der Prozessführung von Enzymprozessen auf eine native Struktur geachtet werden muss. Durch diese limitierte Stabilität kann mit Proteinen oft nur unter milden Prozessbedingungen gearbeitet werden. [29,41]

Eine wichtige Eigenschaft eines Proteins ist seine elektrische Ladung. Durch die sauren und basischen Restgruppen mit ihren pK_a - und pK_b -Werten bildet sich in Abhängigkeit des pH-Werts eine komplexe Ladungsverteilung über das Protein aus. Oft sind dabei sowohl positive als auch negative Ladungen am Protein vorhanden. Die Summe über alle Ladungswerte (negative Ladungen gehen mit einem negativen Vorzeichen ein) wird als Nettoladung bezeichnet. Ein typischer Verlauf der Nettoladung als Funktion des pH-Werts ist in Abbildung 2.3 skizziert [42]. Je höher der pH-Wert, desto stärker werden die Amino- und Carboxygruppen deprotoniert, wodurch die Nettoladung sinkt beziehungsweise stärker negativ wird. Es gibt einen pH-Wert, bei dem ein Protein eine Nettoladung von null aufweist. Dies wird auch als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet. Bei pH-Werten unterhalb des pI ist ein Protein in Summe positiv geladen und bei pH-Werten oberhalb negativ. Im Allgemeinen ist ein Protein aber auch am pI nicht ungeladen, sondern die Anzahl an negativen und positiven Ladungen gleichen sich aus.

2.2 Grundlagen der Chromatographie

Die Chromatographie ist ein Prozessschritt, der zur Trennung von verschiedenen Molekülen eingesetzt wird. Sie wird zu den thermischen Trennverfahren gezählt. [1] Hierbei werden zwei grundlegende Anwendungsfelder unterschieden: zum einen gibt es die analytische Chromatographie, die zum qualitativen oder quantitativen Nachweis von Molekülen verwendet wird, zum anderen die präparative Chromatographie, bei der ein Produkt zur weiteren Verwendung hergestellt wird [43,44]. Diese Arbeit befasst sich mit der präparativen Chromatographie und behandelt daher die chromatographischen Grundlagen unter dem Aspekt der Produktherstellung.

2.2.1 Funktionsweise und Grundbegriffe

Die Chromatographie trennt Moleküle auf Grund ihrer unterschiedlich starken adsorptiven Wechselwirkungen mit einer Oberfläche. In Abbildung 2.4 ist die Bewegung des Konzentrationsprofils von zwei Komponenten für drei Zeitpunkte entlang einer Chromatographie-Säule skizziert. Die unterschiedlich starke adsorptive Wechselwirkung der Komponenten resultiert in einer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit. Hierdurch lassen sich die Komponenten durch das Sammeln von unterschiedlichen Fraktionen am Säulenauslass trennen. [45,46] Die gängigste Form der Anwendung ist die Flüssigchromatographie. Hierbei sind die zu trennenden Moleküle in einer Flüssigkeit gelöst und die adsorptive Oberfläche wird von einer festen Phase bereitgestellt.

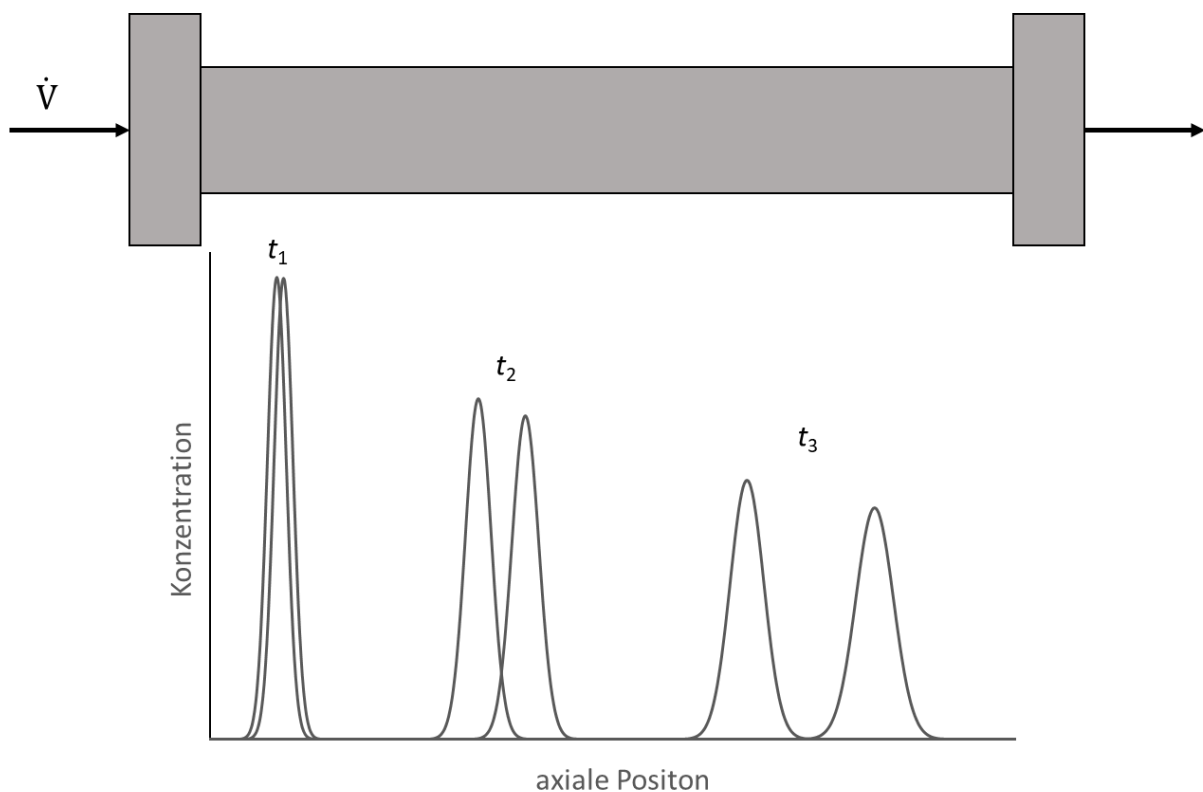


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Trennprinzips der Chromatographie. Zwei Komponenten wandern unterschiedlich schnell durch die Chromatographiesäule. Ihr Konzentrationsprofil innerhalb der Säule ist zu den drei Zeitpunkten $t_1 < t_2 < t_3$ skizziert. Die Ausrichtung der Säule und die Strömungsrichtung des Volumenstroms \dot{V} sind ebenfalls dargestellt, verändert nach [45].

Aufbau und Charakteristika einer Chromatographie-Säule

Die feste Phase wird üblicherweise in der Form von kleinen, porösen Partikeln in einen Hohlzylinder gefüllt, die sogenannte Chromatographie-Säule. Die Partikel werden durch Filter in der Säule gehalten und verbleiben während des Trennprozesses in der Säule, daher werden sie auch stationäre Phase genannt. Die Flüssigkeit wird im Laufe des Trennprozesses durch die Säule gepumpt und wird auch als mobile Phase bezeichnet. [44] Die schematische Querschnitts-Ansicht einer Säule mit mobiler und stationärer Phase ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Hier ist auch die Aufteilung der stationären Phase in Porenvolumen und Feststoffvolumen skizziert. In der Flüssigkeitschromatographie sind sowohl das Porenvolumen als auch das interpartikuläre Volumen mit Flüssigkeit gefüllt. [1]

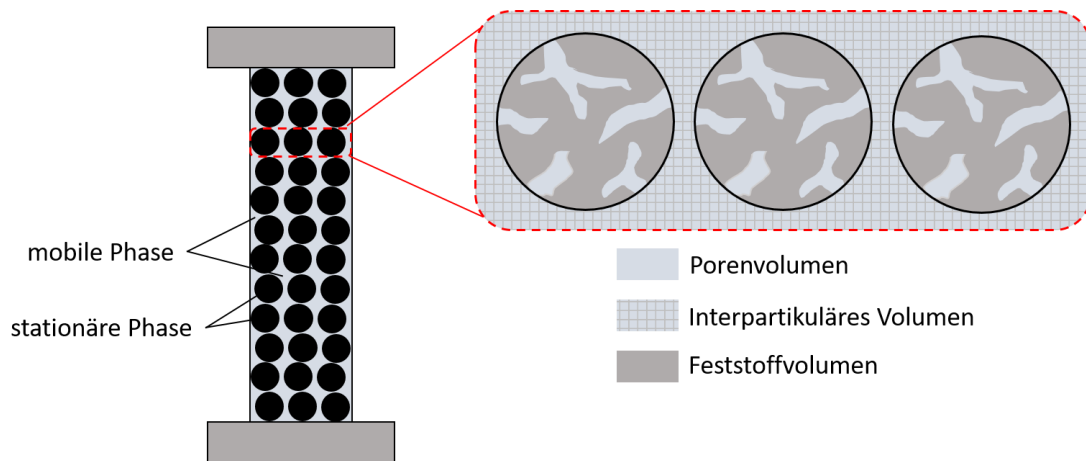


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Querschnitts einer Chromatographie-Säule.

Die Zusammensetzung der mobilen Phase kann sich im Laufe eines Chromatographie-Prozesses verändern. Enthält sie am Säuleneinlass die zu trennenden Komponenten, wird auch vom Feed gesprochen. Dient sie zum Austrag der adsorbierten Moleküle, wird sie als Eluent bezeichnet. Der Volumenstrom der mobilen Phase wird als Flussrate bezeichnet. In vielen Trennprozessen wird die Flussrate konstant gehalten.

Die Verhältnisse der verschiedenen Säulen-Teilvolumina zueinander sind wichtige Charakteristika der Chromatographie-Säule. Die Säulenporosität ε_c beschreibt den Anteil des interpartikulären Volumens V_{int} am gesamten Säulenvolumen V_c , welches sich aus V_{int} , dem Porenvolumen V_{pore} und dem Feststoffvolumen V_s zusammensetzt (Gleichung 2.1) [1]:

$$\varepsilon_c = \frac{V_{\text{int}}}{V_c} = \frac{V_{\text{int}}}{V_{\text{int}} + V_{\text{pore}} + V_s} \quad 2.1$$

Eine weitere wichtige Kenngröße ist die Partikelporosität ε_p , die sich wie in Gleichung 2.2 dargestellt aus dem Verhältnis von V_{pore} zu dem Partikelvolumen V_p berechnet [1]:

$$\varepsilon_p = \frac{V_{\text{pore}}}{V_p} = \frac{V_{\text{pore}}}{V_{\text{pore}} + V_s} \quad 2.2$$

Der Gesamtanteil des Flüssigkeitsvolumens innerhalb der Chromatographie-Säule wird durch die totale Porosität ε_t ausgedrückt, welche aus den Porositäten ε_c und ε_p berechnet werden kann (Gleichung 2.3) [1]:

$$\varepsilon_t = \frac{V_{\text{pore}} + V_{\text{int}}}{V_{\text{pore}} + V_{\text{int}} + V_s} = \varepsilon_c + (1 - \varepsilon_c)\varepsilon_p \quad 2.3$$

Ein alternativer Ansatz zu dieser Art von Aufbau ist die Membran-Chromatographie. Hier wird statt poröser Kugeln eine durchströmte Membran verwendet. Durch die gezielte Einstellung der Porengrößen soll die Diffusionszeit im Vergleich zu den Partikeln reduziert werden. Dadurch kann die Fließgeschwindigkeit erhöht werden und es ergibt sich eine reduzierte Prozessdauer. Die Bindekapazität der Membran-Adsorber ist allerdings im Allgemeinen geringer. [47]

Beschreibung von Chromatogrammen

Eine der gängigsten Methoden zur Darstellung der Ergebnisse eines Chromatographie-Schrittes ist das sogenannte Chromatogramm. Dies bezeichnet einen Graphen, der ein Messsignal am Auslass der Säule gegen die Zeit aufträgt. Üblicherweise wird hier die UV-Absorption verwendet, die sich gut inline messen lässt. Da die Adsorption mit den Konzentrationen von gelösten Stoffen korreliert, wird

das Chromatogramm auch oft als Konzentrations-Zeit Diagramm aufgetragen. Ein beispielhaftes Chromatogramm ist in Abbildung 2.6 dargestellt. Im Gegensatz zu Abbildung 2.4, welche Konzentrationsprofile innerhalb der Säule über die axiale Komponente darstellt, ist hier die Konzentration an einem festen Ort hinter der Säule über die Zeit abgebildet.

Es sind die resultierenden Konzentrationsverläufe für ein nicht-bindendes Tracer-Molekül sowie für zwei unterschiedlich stark adsorbierende Moleküle 1 und 2 dargestellt. In diesem Chromatogramm sind die wichtigen Größen zur Beschreibung der Retentionszeiten eingezeichnet. Die Retentionszeiten für symmetrische Peaks, wie sie hier dargestellt sind, können am Punkt der maximalen Konzentration der jeweiligen Komponente abgelesen werden. Die Größe t_{plant} bezeichnet die Zeit, die ein Tracer-Molekül bei derselben konstanten Flussrate braucht, um ohne Säule von der Injektionsstelle zum Detektor zu gelangen. Sie beschreibt somit das Volumen der Anlagenperipherie, die sich um die Säule herum vor dem Detektor befindet. Die Zeit t_{plant} wird von den gemessenen Zeiten der anderen Größen abgezogen, da hierin keine Informationen über das Adsorptionsverhalten enthalten sind. Die Zeit t_0 beschreibt die Zeit, die ein nicht-bindendes, porengängiges Tracer-Molekül benötigt, um die Säule zu durchqueren. Die Retentionszeiten t_R der weiteren Komponenten sind ebenfalls in Abbildung 2.6 skizziert. Die Netto-Retentionszeit $t_{R,\text{net}}$ ist als die Differenz von t_R und t_0 definiert (Gleichung 2.4). Sie beschreibt die Dauer, die ein Molekül durchschnittlich im adsorbierten Zustand verbringt. Da die Retentionszeiten stark von Faktoren wie der Flussrate oder der Säulengeometrie abhängen, werden die Daten oft normalisiert. Dazu wird der Retentionsfaktor k' verwendet, der als das Verhältnis von $t_{R,\text{net}}$ (der Zeit des Moleküls auf der stationären Phase) zu t_0 (der Zeit eines Moleküls in der mobilen Phase) definiert ist (Gleichung 2.5).

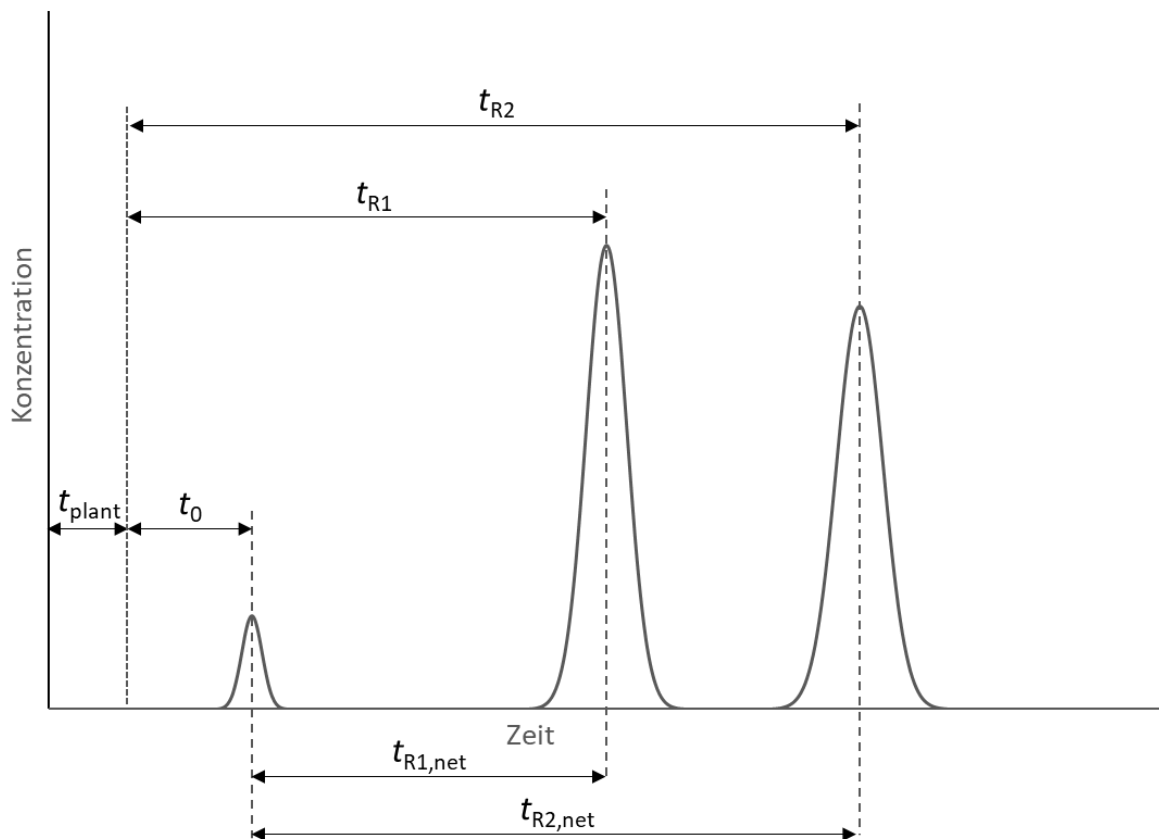


Abbildung 2.6: Beispielhaftes Chromatogramm für ein Tracer-Molekül und zwei bindende Komponenten, nach [1].

Um auch die Trennung zweier Moleküle i und j unabhängig von etwa der Säulengröße zu beschreiben wird der Separationsfaktor $\alpha_{i,j}$ eingeführt (Gleichung 2.6). Hierbei wird üblicherweise die später eluierende Komponente in den Zähler gestellt, sodass $\alpha > 1$ gilt. [1]

$$t_{R,net,i} = t_{R,i} - t_0 \quad 2.4$$

$$k' = \frac{t_{R,net,i}}{t_0} = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_0} \quad 2.5$$

$$\alpha_{i,j} = \frac{k'_i}{k'_j} \quad 2.6$$

2.2.2 Adsorption und Stofftransport

Die Form der Chromatogramme wird durch die Adsorptions- und Stofftransport-Eigenschaften des Systems bestimmt. In diesem Abschnitt wird erst die Beschreibung des Adsorptionsverhaltens erläutert, bevor die Stofftransport-Effekte erklärt werden.

Adsorptions-Isothermen

Die Bindung von Molekülen an das Adsorbens kann über Adsorptions- und Desorptions-Reaktionen beschrieben werden. Hierbei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Molekülen an der stationären Phase und in der mobilen Phase ein. Der Verlauf dieses Gleichgewichts für verschiedene Konzentrationen wird als Adsorptions-Isotherme bezeichnet. Die Beladung der stationären Phase q_i mit einer Komponente i wird gegen die sich einstellende Konzentration in der mobilen Phase c_i für mehrere Messpunkte aufgetragen. Da das Adsorptionsverhalten im Allgemeinen temperaturabhängig ist, werden diese Untersuchungen bei konstanter Temperatur durchgeführt. Die resultierende Form der Isotherme beinhaltet wichtige Informationen über die Bindungseigenschaften des untersuchten Stoffsystems. Zwei häufige Isothermenformen sind in Abbildung 2.7 skizziert. [1,46]

Bei der Bestimmung von q wird die adsorbierte Masse oder Stoffmenge durch das Volumen oder die Masse des Adsorbens geteilt. Hierbei werden in der Literatur teilweise verschiedene Bezugsvolumina verwendet [1,48,49]. In dieser Arbeit wird die adsorbierte Stoffmenge auf das Feststoffvolumen V_s bezogen.

Bei einer linearen Adsorptions-Isotherme, auch Henry-Isotherme genannt, ist die Steigung unabhängig von der Konzentration der Komponente. Sie lässt sich mit Gleichung 2.7 beschreiben, wobei die Steigung H_i als Henry-Konstante bezeichnet wird [1].

$$q_i = H_i c_i \quad 2.7$$

Wenn keine asymmetrischen Stofftransport-Effekte auftreten, führt dies zu einer symmetrischen Peak-Form der Komponente. Eine konkave Isotherme, bei der die Isothermensteigung bei höheren Konzentrationen abnimmt, führt hingegen zu einem Peak mit Tailing, also zu einem Peak mit einer in die Länge gezogenen hinteren Hälfte. Dieses Verhalten ist allerdings nur bei höheren Konzentrationen der Komponente zu beobachten. Im Bereich geringer Konzentration verlaufen auch viele konkave Isothermen näherungsweise linear und können somit zu symmetrischen Peaks führen. Eine häufige Ursache für einen konkaven Verlauf einer Isotherme ist eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen auf dem Adsorbens. Die mögliche Beladung einer Komponente wird daher durch einen Maximalwert begrenzt. [46,48]

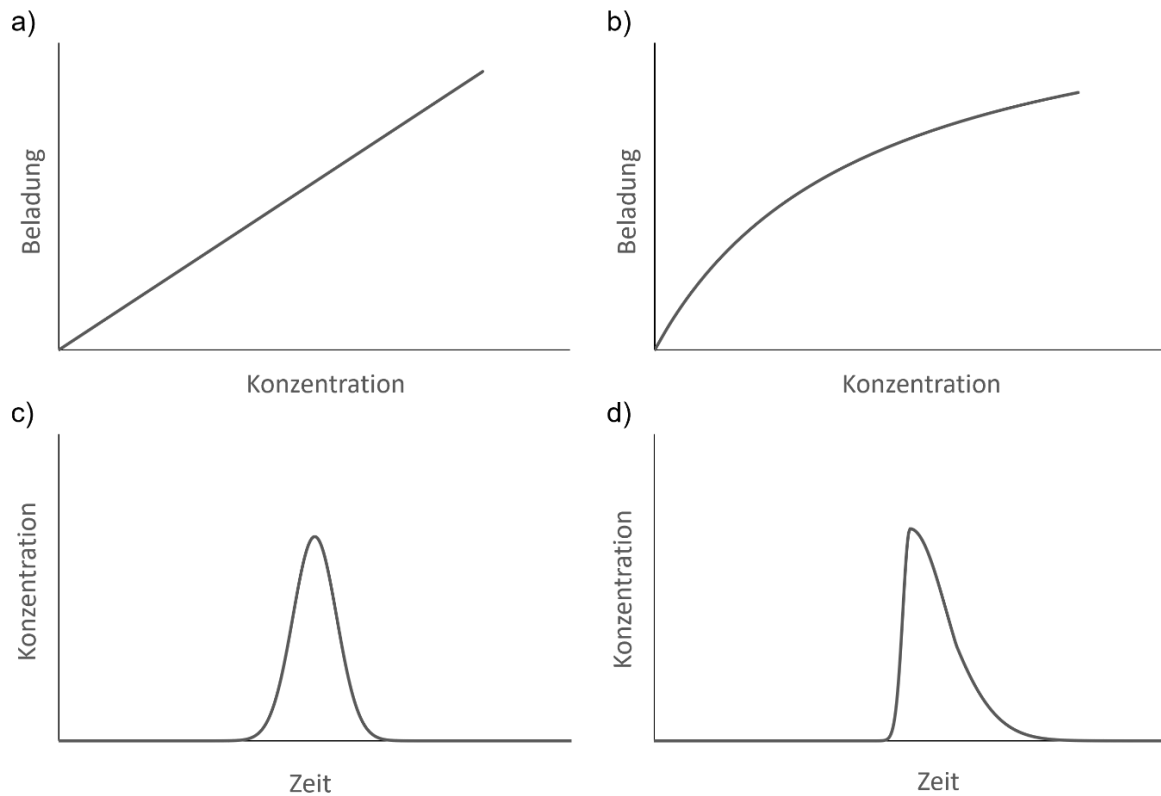


Abbildung 2.7: Prinzipieller Verlauf einer linearen Adsorptions-Isotherme (a) und der hieraus resultierenden Peakform (c) sowie der Verlauf einer konkaven Adsorptions-Isotherme (b) und der hieraus resultierenden Peakform (d), verändert nach [1].

Die SMA-Isotherme

Die sterische Massenwirkung (*Steric Mass-Action* [SMA])-Isotherme wurde 1992 von Brooks und Cramer veröffentlicht [50]. Sie wurde für die Beschreibung der Adsorption von Makromolekülen wie Proteinen auf Ionenaustauschern entwickelt und berücksichtigt den Einfluss von sterischer Abschirmung der Adsorbensoberfläche. Da in dieser Isotherme die begrenzten Bindestellen des Adsorbens berücksichtigt werden, handelt es sich um eine Isotherme mit einer konkaven Form. Die Definition des Gleichgewichtskoeffizienten $K_{eq,i}$ der Spezies i ist in Gleichung 2.8 dargestellt. Hierbei beschreibt ν_i die charakteristische Ladung des Makromoleküls, während c_s die Salzkonzentration in der mobilen Phase und \bar{q}_s die zum Austausch verfügbare Salzbeladung des Adsorbens bezeichnet.

$$K_{eq,i} = \frac{q_i}{c_i} \left(\frac{c_s}{\bar{q}_s} \right)^{\nu_i} \quad 2.8$$

Die charakteristische Ladung beschreibt, mit wie vielen Bindestellen des Adsorbens das Makromolekül interagiert, das heißt wie viele Salzionen beim Adsorptionsvorgang ausgetauscht werden. Die Differenz zwischen der gesamten Salzbeladung q_s und der verfügbaren Salzbeladung \bar{q}_s ist die abgeschirmte Salzbeladung \hat{q}_s . Dies beschreibt die Bindestellen, die von adsorbierten Makromolekülen überdeckt werden, ohne direkt mit ihnen zu interagieren. Diese Bindestellen stehen durch die sterische Abschirmung nicht für eine weitere Interaktion zur Verfügung. Der sterische Abschirmungsfaktor σ_i beschreibt dabei, wie viele zusätzliche Bindestellen durch das Makromolekül i abgedeckt werden:

$$\bar{q}_s = q_s - \hat{q}_s = q_s - \sigma_i q_i \quad 2.9$$

Stand der Technik

Da die Elektroneutralität an der Oberfläche gewährleistet sein muss, entspricht die Summe aus Salz- und Makromolekülbeladung, unter Berücksichtigung der charakteristischen Ladung ν_i , der Kapazität der Säule Λ :

$$\Lambda = q_s + \nu_i q_i = \bar{q}_s + (\nu_i + \sigma_i) q_i \quad 2.10$$

Aus den Gleichungen 2.8 und 2.10 lässt sich die Gleichung der SMA-Isotherme für ein einzelnes Makromolekül i und ein Salz s ableiten:

$$c_i = \frac{q_i}{K_{\text{eq},i}} \left(\frac{c_s}{\Lambda - (\nu_i + \sigma_i) q_i} \right)^{\nu_i} \quad 2.11$$

Die drei Größen K_{eq} , ν und σ werden auch als Modellparameter der SMA-Isotherme bezeichnet und sind spezifisch für das jeweilige chromatographische System. [50] Die Erweiterung des SMA-Formalismus für mehrere Komponenten ist im Anhang A.1 dargestellt. In dieser Form wird die Isotherme grundsätzlich für einen beliebigen Konzentrationsbereich des Salzes und des Makromoleküls verwendet. Die Kapazität der Säule und die Gleichgewichtskonstante werden als unabhängig von den einzelnen Konzentrationen betrachtet. Praktisch treten jedoch Einschränkungen auf. Bei hohen Konzentrationen können beispielsweise Unterschiede zwischen Konzentrationen und Aktivitäten relevant werden [51]. In dem für Ionenaustauschprozessen gängigen Konzentrationsbereich wird dieser Faktor jedoch üblicherweise vernachlässigt. Ändert sich hingegen die Makromolekül-Ladung mit dem pH-Wert, so ist ein Set an Modellparametern nur für einen pH-Wert gültig [24].

Eine Erweiterung der SMA-Isotherme wurde 2017 von Hunt et al. entwickelt [24]. Um den Einfluss des pH-Werts abzubilden, können die Modellparameter als Funktion dargestellt werden. Hierfür schlagen die Autoren wie in den Gleichungen 2.12 und 2.13 dargestellt eine lineare Funktion für ν und eine exponentielle Funktion für K_{eq} vor.

$$K_{\text{eq},i}(\text{pH}) = K_{0,i} 10^{K_{\text{lin},i} \text{pH} + K_{\text{quad},i} \text{pH}^2} \quad 2.12$$

$$\nu_i(\text{pH}) = \nu_{0,i} (\nu_{\text{lin},i} \text{pH} + 1) \quad 2.13$$

In diesem empirischen Ansatz sind die Faktoren $K_{0,i}$, $K_{\text{lin},i}$, $K_{\text{quad},i}$, $\nu_{0,i}$ und $\nu_{\text{lin},i}$ Fitting-Parameter, die an experimentelle Daten angepasst werden können. Hierdurch ist es möglich, das Verhalten von Proteinen in einem begrenzten pH-Bereich modelltechnisch zu beschreiben [24,25,52].

Stofftransport-Effekte

Neben Adsorptions- haben auch Transport-Effekte einen großen Einfluss auf das Retentionsverhalten von Molekülen und den daraus resultierenden Chromatogrammen. Wie in Abbildung 2.4 dargestellt verbreitern sich Konzentrationsprofile von Molekülen beim Durchqueren einer Chromatographie-Säule. Da sich die Stoffmenge nicht verändert, bleibt der Flächeninhalt der Peaks konstant und eine Verbreiterung geht mit einer Verringerung des Peak-Maximums einher. Diese sogenannte Bandenverbreiterung hat neben adsorptiven (siehe Abbildung 2.7) auch verschiedene transportbedingte Ursachen. Zum einen unterliegen die Moleküle innerhalb der mobilen Phase der normalen Diffusion, wodurch ein Transport vom Ort hoher zum Ort niedriger Konzentration stattfindet. Des Weiteren ist auch das konvektive Strömungsprofil in einer realen Säule nicht ideal gleichmäßig über den interpartikulären Raum verteilt. Durch Wandeffekte an der Grenzfläche zu den Partikeln oder der Säule entstehen lokal parabelförmige, laminare Strömungsprofile, was zu einer unterschiedlichen Transportgeschwindigkeit für einzelne Moleküle führt. Eine weitere Ursache für Bandenverbreiterung ist die Eddy-Diffusion. Bei der Durchströmung eines Haufwerks gelangen manche Moleküle über längere und manche über kürzere Pfade durch die Packung. Dieser Effekt wird stärker, je weiter sich die Anordnung der Partikel von einer idealen Packung entfernt. [53,54]

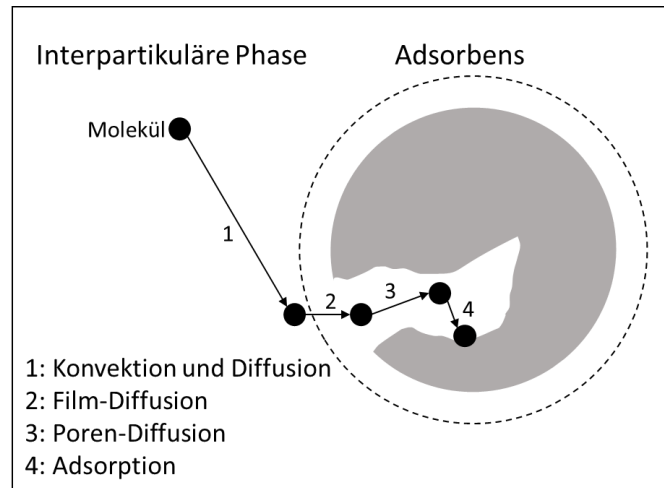


Abbildung 2.8: Transport-Phänomene beim Übergang eines Moleküls von der mobilen Phase in die interpartikuläre Phase, verändert nach [1].

Der in Abbildung 2.8 skizzierte Stoffübergang von Molekülen aus der mobilen Phase in die interpartikuläre Phase spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für die Performance von chromatographischen Prozessen. Das betrachtete Molekül gelangt in einem ersten Schritt durch Konvektion und Diffusion an die ein Adsorbenspartikel umgebende Grenzschicht. In diesem Grenzfilm selbst findet keine Konvektion statt und das Molekül muss diesen diffusiv durchqueren. In der eigentlichen Pore findet ebenfalls ein rein diffusiver Transport statt. Dieser ist oft durch den geringen Durchmesser der Poren beeinflusst, was zu einer langsameren Diffusion als in der interpartikulären Phase führen kann. In der Pore finden Adsorption und Desorption als kinetische Prozesse statt. [1]

Ein wichtiger Parameter zur Beschreibung eines chromatographischen Systems ist die theoretische Stufenanzahl N . Diese Anzahl beschreibt, wie die zugehörige Höhe einer theoretischen Trennstufe (*height of an equivalent theoretical plate [HETP]*), den Einfluss von Transport-Effekten und ist ein Maß für die Ausprägung von Nicht-Idealitäten in der Säulenpackung. Der Zusammenhang der beiden Parameter ist in Gleichung 2.14 dargestellt, wobei L_c die Gesamtlänge der Säule bezeichnet:

$$HETP = \frac{L_c}{N} \quad 2.14$$

Je höher der *HETP*-Wert desto höher ist der Einfluss der Nicht-Idealitäten und desto stärker fällt die Bandenverbreiterung aus. Hierbei werden fluiddynamische Effekte sowie der Einfluss von geringen Adsorptions- und Desorptions-Raten kombiniert betrachtet. Der *HETP*-Wert kann über Gleichung 2.15 aus einem Chromatogramm einer Komponente mit der Standardabweichung des Peaks σ_t berechnet werden: [1]

$$HETP = \left(\frac{\sigma_t}{t_R} \right)^2 L_c \quad 2.15$$

2.2.3 Chromatographie-Arten und Betriebsweisen

Chromatographische Prozesse können in verschiedenen Betriebsmodi angewendet werden. Hierbei kann grundsätzlich zwischen kontinuierlichen und diskontinuierlichen Verfahren unterschieden werden. Diese Arbeit fokussiert sich auf diskontinuierliche Anwendungen, welche im Allgemeinen eine einfachere Implementierung und höhere Flexibilität aufweisen. Die einfachste Art der Prozessführung ist die isokratische Elution. Hierbei ändert sich die Zusammensetzung der mobilen Phase nach der Injektion der zu trennenden Komponenten nicht.

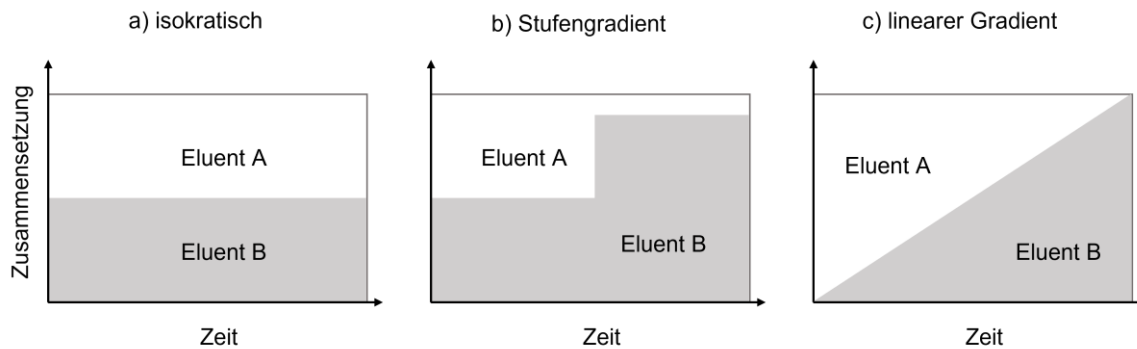


Abbildung 2.9: Typische Verläufe der Zusammensetzung der mobilen Phase aus zwei Eluenten A und B. Eluent B steht hier für die stärker eluierende Phase, nach [55].

Dieser Ansatz führt oft zu sehr unterschiedlichen Retentionszeiten für verschiedene Komponenten, was den Trennprozess lang und ineffizient werden lässt. Um die Zusammensetzung der mobilen Phase im Laufe des Prozesses ändern zu können, wird sie oft durch eine Mischung von mehreren Eluenten hergestellt. Meist wird dabei ein Eluent mit geringer Elutionsstärke mit einem Eluenten mit hoher Elutionsstärke kombiniert. Häufig verwendete Elutionsarten sind in Abbildung 2.9 skizziert. Die Einstellung der Elutionsstärke erfolgt in der Regel über die Zugabe eines Modulators zu dem Eluenten. Dabei kann es sich je nach Chromatographie-Art etwa um Salze oder organische Lösungsmittel handeln. [55]

Die in Abbildung 2.9 c) dargestellte lineare Gradientenelution (LGE) ist besonders weit verbreitet, da die kontinuierliche Erhöhung der Elutionsstärke mehrere Vorteile mit sich bringt. Komponenten mit stark unterschiedlichem Adsorptionsverhalten können in geringer Zeit eluiert werden, während Komponenten mit ähnlichem Adsorptionsverhalten oft immer noch gut getrennt werden können. Des Weiteren wirkt die LGE einer Peakverbreiterung entgegen. [55] Durch die steigende Elutionsstärke wird die hintere Seite des Peaks bei der Wanderung durch die Säule beschleunigt. Hierdurch wird das Auftreten von Tailing-Effekten reduziert (siehe Abbildung 2.7 in Kapitel 2.2.2). Es lassen sich auch mehrere Elutionsarten miteinander kombinieren. So kann etwa eine LGE mit einem anschließenden Stufengradienten zur Elution von stark bindenden Verunreinigungen verwendet werden.

Je nach Aufbau und Adsorptionsmechanismus der stationären Phase können chromatographische Systeme in verschiedene Klassen eingeteilt [56]. Der folgende Abschnitt gibt einen kurzen Überblick über typische Chromatographie-Arten.

Größenausschluss-Chromatographie

Bei der Größenausschluss-Chromatographie (*size exclusion chromatography* [SEC]) treten keine adsorptiven Wechselwirkungen auf. Stattdessen werden Moleküle über das ihnen zugängliche Porenvolumen getrennt. Kleine Moleküle können das Porensystem gut durchdringen und haben daher ein hohes zugängliches Porenvolumen. Größere Moleküle können die kleinen Poren nicht mehr durchdringen, sodass das zugängliche Porenvolumen mit der Molekülgröße abnimmt. Dadurch reduziert sich die Zeit, die größere Moleküle innerhalb der Partikel verbringen. Größere Moleküle eluieren somit bei einer SEC schneller als kleinere. Da dieser Trenneffekt nicht durch adsorptive Effekte unterstützt wird, ist die Kapazität der Säule gering. Für die Trennung von Molekülen mit ähnlichen Größen sind lange Säulen notwendig. Um eine vollständige Diffusion in das Porensystem zu ermöglichen, sind zudem die Flussraten oft gering. Somit gestaltet sich die effiziente Anwendung von SEC in präparativen Anwendungen als schwierig. Die Größenausschluss-Effekte treten jedoch

auch in anderen Chromatographie-Arten auf und beeinflussen somit das Retentionsverhalten der Moleküle. [56]

Normalphasen-Chromatographie

Die Normalphasen-Chromatographie verwendet eine stationäre Phase, die hydrophiler als die mobile Phase ist. Da es sich hierbei um die ersten angewandten chromatographischen Systeme handelte, wurde dieses Verhältnis „Normalphase“ genannt. Typische Beispiele sind Silica-Gele mit einem unpolaren oder semi-polaren Lösungsmittel. Die adsorptiven Effekte beruhen auf hydrophilen Wechselwirkungen zwischen dem Adsorbens und den gelösten Komponenten. Hydrophilere Moleküle verbleiben somit länger in der Säule. Da Wasser selbst hydrophil ist, interagiert es stark mit der stationären Phase und kann die gelösten Komponenten direkt von dem Adsorbens verdrängen. Daher eignet es sich nicht als mobile Phase für die Normalphasen-Chromatographie. Es kann jedoch in geringen Anteilen einer organischen mobilen Phase zugesetzt werden. [56]

Umkehrphasen- und hydrophobe Interaktions-Chromatographie

Bei der Umkehrphasen-Chromatographie (*reversed phase chromatography* [RPC]) ist die stationäre Phase hydrophober als die mobile Phase. Der Name rührt von der gegenteiligen Hydrophobizität der Phasen im Vergleich zur Normalphasen-Chromatographie her [56]. Die HIC verwendet ebenfalls hydrophobe stationäre Phasen. Für die RPC werden hierbei stärker hydrophobe Adsorbentien verwendet als für die HIC [48]. Bei diesen Chromatographie-Arten weisen hydrophobere Moleküle höhere Retentionszeiten auf. In der HIC werden üblicherweise Salze als Modulator zur wässrigen mobilen Phase hinzugegeben. Dabei werden die gelösten Moleküle ausgesalzt, das heißt mit höherem Salzanteil adsorbieren die Moleküle stärker an die stationäre Phase. Bei der RPC wird als mobile Phase oft eine Mischung aus Wasser und anderen hydrophilen Lösungsmitteln verwendet. [48,56,57] Eine detaillierte Beschreibung der Salzeffekte der HIC erfolgt in Kapitel 2.3.2.

Affinitäts-Chromatographie

Treten die adsorptiven Wechselwirkungen aufgrund von molekülspezifischen chemischen Interaktionen auf, spricht man von Affinitäts-Chromatographie. Hierbei adsorbieren nur Moleküle mit einer bestimmten chemischen Struktur an die stationäre Phase. Diese Art der Adsorption wird auch mit dem „Schlüssel und Schloss“-Prinzip analog zur enzymatischen Selektivität beschrieben. [46] Die am weitesten verbreitete Affinitäts-Chromatographie ist der Protein A-Schritt in der Herstellung von Antikörpern. An diese stationäre Phase bindet eine spezifische Region von Antikörpern, während übrige Komponenten aus der Säule ausgewaschen werden können. Durch eine Änderung des pH-Werts können anschließend die Antikörper von der Säule eluiert werden. [56] Da hier die Trennung nicht direkt über eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der Komponenten erreicht wird, sondern die Schritte Adsorption und Desorption vollständig hintereinander ablaufen, spricht man auch von Affinitäts-Adsorption [46].

Ionenaustausch-Chromatographie

Die IEC beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen von einer geladenen stationären Phase mit Molekülen mit einer gegenteiligen Ladung. Zur Wahrung der Elektroneutralität ist immer ein gegenteilig geladenes Ion an die geladenen Stellen der stationären Phase gebunden. Dieses Gegenion kann während des Adsorptionsprozesses durch ein anderes Ion ausgetauscht werden. Die stationären Phasen werden je nach ihrer Ladung unterschieden. Positiv geladene Adsorbentien können mit Anionen in der mobilen Phase interagieren und werden deshalb Anionentauscher genannt, während negativ geladene Adsorbentien als Kationentauscher bezeichnet werden. Von beiden Varianten gibt es sowohl starke als auch schwache Ionentauscher. Schwache Ionentauscher

verhalten sich wie eine schwache Säure oder Base, sodass sich ihr Ladungszustand mit dem pH-Wert ändern kann. Starke Ionentauscher verfügen hingegen über einen weiten pH-Bereich über eine konstante Ladung. Als Modulator wird in der IEC der mobilen Phase Salz zugegeben. Bei höheren Salzkonzentrationen werden andere Komponenten stärker von den ionischen Bindeplätzen verdrängt, was zu geringeren Retentionszeiten führt. [9,56,58] Eine detaillierte Beschreibung von Salzeinflüssen auf die IEC erfolgt in Kapitel 2.3.1.

Mixed-Mode-Chromatographie

Bei der Mixed-Mode-Chromatographie (MMC) werden verschiedene Adsorptionsmechanismen in einer stationären Phase kombiniert. Die gängigste Kombination ist die Verwendung von ionischen und hydrophoben Gruppen, sodass die stationäre Phase als Mischung aus HIC und IEC betrachtet werden kann. Über die komplexen Interaktionsmechanismen von MMC-Adsorbentien sind hohe Selektivitäten möglich, die Bestimmung von Betriebsparametern ist jedoch deutlich komplexer, da die verschiedenen Adsorptionsmechanismen berücksichtigt werden müssen. [56,59]

2.3 Salzeinfluss in der Chromatographie

In mehreren Chromatographie-Arten und Anwendungen besteht die mobile Phase aus mit Salz versetztem Wasser. Die Salzkonzentration hat hierbei in der Regel einen großen Einfluss auf die resultierenden Retentionseigenschaften. Ein weiterer wichtiger Punkt ist aber auch die genaue Salzspezies. In diesem Abschnitt wird der Stand des Wissens zum Einfluss der Salzspezies auf die IEC sowie auf die HIC und MMC dargestellt. Die Funktionsweisen dieser Chromatographie-Arten werden in Kapitel 2.2.3 beschrieben.

2.3.1 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionen in der mobilen Phase der IEC lassen sich in zwei Kategorien einteilen: Gegenionen, auch Austausch-Ionen genannt, die direkt an die gegensätzlich geladene Oberfläche des Adsorbens binden können, und Co-Ionen, die dieselbe Ladungsart wie die Oberfläche aufweist. Im Fall der CEC sind die Kationen die Gegenionen und die Anionen die Co-Ionen [10,60,61]. Die Spezies der Gegenionen haben einen direkt ersichtlichen Einfluss auf das Retentionsverhalten von Molekülen: Je stärker die Gegenionen an die geladene Oberfläche binden, desto stärker verdrängen sie andere Moleküle. Das führt dazu, dass etwa mehrwertige Gegenionen bei gleicher Konzentration in der mobilen Phase zu geringeren Retentionszeiten führen als einwertige [10,12,62]. Dieser elektrostatische Effekt ist nicht-spezifisch [63]. Er geht direkt auf die Salz – Adsorbens Interaktion zurück und beeinflusst alle anderen Moleküle auf die gleiche Weise. Hieraus resultierende Einflüsse auf ein Chromatogramm, also beispielsweise die frühere Elution mehrerer Proteine nach einem Wechsel von einem einwertigen zu einem zweiwertigen Gegenion, könnten theoretisch auch durch die Anpassung der Salzkonzentration statt der Salzspezies erreicht werden. Auf Kenngrößen wie Reinheit oder Produktivität hätte die Anpassung der Salzzusammensetzung in dem Fall keinen Einfluss, der nicht auch durch eine Anpassung der Salzkonzentration erreicht werden könnte [10].

Auch das Co-Ion hat einen Einfluss auf das Retentionsverhalten von gelösten Stoffen. Co-Ionen tragen zur Ladungsabschirmung in der mobilen Phase bei und haben somit auch einen Einfluss auf die nicht-spezifischen elektrostatischen Effekte [63]. Zusätzlich üben Ionen einen Einfluss auf die Wasserstruktur aus, der als chaotroper oder kosmotroper Effekt bezeichnet wird. Ein Ion mit einem kosmotropen Effekt bindet stark an Wassermoleküle, wodurch sich die Ordnung des Systems erhöht. Dadurch wird etwa die Bildung einer Hydrathülle um ein Protein erschwert. Ein chaotropes Ion interagiert schwächer mit Wassermolekülen und verringert deren Ordnung, wodurch die Bildung von Hydrathüllen gefördert wird. [17]

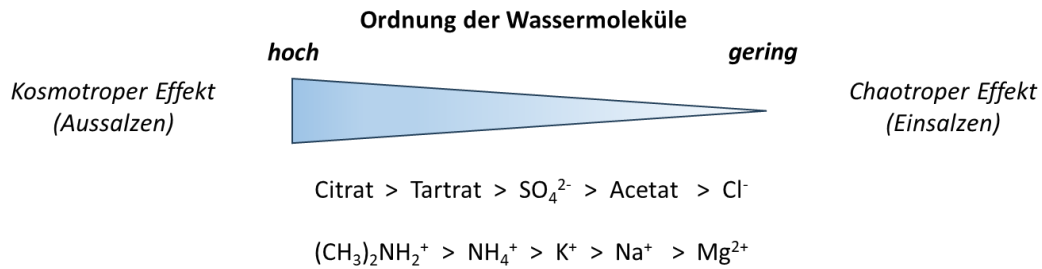


Abbildung 2.10: Qualitative Einordnung einiger Ionen in die Hofmeister Reihe. Je weiter links ein Ion steht, desto stärker ist sein kosmotroper Effekt und desto stärker reduziert es die Löslichkeit von Proteinen. Die Anordnungen der Kationen und der Anionen sind nicht miteinander vergleichbar.

Hierüber werden hydrophobe Effekte von gelösten Stoffen moduliert [17]. Ein chaotropes Salz erhöht so die Löslichkeit von etwa Proteinen, während ein kosmotropes Salz sie reduziert. Diese Phänomene werden auch als Einsalzen oder Aussalzen bezeichnet. In der Hofmeister-Reihe werden Anionen oder Kationen nach der Ausprägung dieser Eigenschaft sortiert. In Abbildung 2.10 ist beispielhaft die Einordnung einiger Ionen dargestellt. Die abgebildete Reihenfolge ermöglicht dabei keinen Vergleich zwischen den Effekten der Anionen und der Kationen. [17,64–66]

Neben den nicht-spezifischen Salzeffekten können auch proteinspezifische Einflüsse in der Proteinchromatographie auftreten. Hierbei werden verschiedene Proteine durch die Salze unterschiedlich beeinflusst. Dies könnte sich beispielsweise in einer Änderung der Retentionsreihenfolge zeigen, wenn das Elutionsverhalten von zwei Proteinen für zwei Salze miteinander verglichen wird [10]. Proteinspezifische Salzeffekte könnten einen großen Einfluss auf die Separation von Proteinen haben und die Effizienz des IEC-Schrittes deutlich erhöhen, wenn ein passendes Salz verwendet wird. Während nicht-spezifische Salzeffekte hauptsächlich auf die Salz – Adsorbens Interaktion zurückgeht, werden proteinspezifische Effekte auf Salz – Protein Interaktionen zurückgeführt [13]. Somit sind die in der Hofmeister-Reihe charakterisierten Effekte mögliche Ursachen für proteinspezifische Effekte [63]. Das grundsätzliche Auftreten von proteinspezifischen Effekten wird in der Literatur bestätigt, die Signifikanz dieser Phänomene ist allerdings umstritten. Die meisten Studien im Zusammenhang mit dem Salzeinfluss in der IEC fokussieren sich dabei auf das Gegenion. [10–16]

Für einen Vergleich der Retentionszeiten für Salze mit verschiedenen Valenzen werden in der Literatur verschiedene Ansätze verwendet. Es kann die selbe Konzentration der Salze verwendet werden, allerdings führen in diesen Untersuchungen alle mehrwertigen Gegenionen zu geringeren Retentionszeiten für alle Proteine als einwertige Gegenionen, da die höhere Ladung eine höhere Affinität der Ionen zum Adsorbens bedeutet und somit alle anderen Komponenten stärker verdrängt werden [11,16,67]. Alternativ kann die Ionenstärke der Eluenten konstant gehalten werden [12–14]. Die nach Gleichung 2.16 berechnete Ionenstärke I ist ein Maß für die Konzentration c_i aller vorhandenen Ionenarten i , bei der ebenfalls deren Valenz z berücksichtigt wird.

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N c_i z_i^2 \quad 2.16$$

Des Weiteren kann auch die Stärke der Gegenionen konstant gehalten werden, da diese entscheidend für den Ionenaustausch-Prozess sind [10]. Die Berechnung der Kationen- oder Anionenstärke I_D ist in Gleichung 2.17 dargestellt. Hierbei bezeichnet der Index i_D in der Summe entweder alle Kationenarten oder alle Anionenarten in der Lösung.

$$I_D = \sum_{i_D=1}^{N_D} c_{i_D} z_{i_D}^2 \quad 2.17$$

In einer umfangreichen Untersuchung des Salzeinflusses auf die Anionenaustauschchromatographie (*anion-exchange chromatography* [AEC]) von Proteinen beobachteten Malmquist und Lundell einen starken Einfluss der Gegenionen und einen geringeren Einfluss der Co-Ionen auf das Retentionsverhalten. Sie identifizieren auch einzelne proteinspezifische Effekte der Salze, führen den Großteil der beobachteten Phänomene aber auf nicht-spezifische Einflüsse zurück und erklären ihre Beobachtungen über eine Änderung der gesamten Elutionsstärke. [10] Liu und Shi beschreiben für verschiedene Kationen in der CEC relevante proteinspezifische Effekte, stellen jedoch keinen Zusammenhang mit der Hofmeister-Reihe fest [13]. Gooding und Schmuck berichten ebenfalls von einem CEC Retentionsverhalten, bei dem je nach zu trennenden Proteinen andere Salze zur optimalen Separation führen [15].

2.3.2 Hydrophobe-Interaktions- und Mixed-Mode-Chromatographie

Für HIC-Prozesse wird in der Literatur ebenfalls ein relevanter Einfluss von der Salzspezies auf das Adsorptionsverhalten von Proteinen beschrieben. Hierbei spielt die Einordnung der Ionen in der Hofmeister-Reihe eine entscheidende Rolle, da die Salze so die für die Adsorption relevanten hydrophoben Effekte verstärken oder verringern können. Obwohl diese Einordnung unabhängig von den Proteinen ist, treten dennoch proteinspezifische Effekte wie die Änderung der Elutionsreihenfolge auf. [17] In der HIC werden meist kosmotrope Salze verwendet, da diese die Wechselwirkungen der Proteine mit dem Adsorbens verstärken [18].

Darüber hinaus ist für die HIC ein synergetischer Effekt von Salzmischungen auf die Protein-Beladung beschrieben. Das Mischen von sowohl zwei kosmotropen [68] als auch von einem kosmotropen und einem chaotropen Salz [18,69] kann zu höheren Beladungen führen, als nur ein einzelnes Salz bei der selben Ionenstärke. Dies verdeutlicht, dass auch bei der HIC die Interaktionen zwischen Salz und Protein komplexer sind als die reinen Aussalzungs-Effekte der Hofmeister-Reihe. Werner und Hase schlagen für die Beschreibung der Mischungseinflüsse auf die Adsorption in der HIC eine Modellgleichung vor, die den Einfluss über Einzelfaktoren der Ionen sowie über Interaktionsparameter beschreibt (Gleichung 2.18) [70].

$$\ln\left(\frac{y}{\text{Einheit von } y}\right) = l_0 + \sum_i l_i \frac{c_i}{c_0} + \frac{1}{2} \sum_i \sum_j l_{ij} \frac{c_i c_j}{c_0 c_0} \quad 2.18$$

Hierbei steht y für einen beliebigen Adsorptionsparameter wie etwa die Beladung. l_0 beschreibt den natürlichen Logarithmus von y , wenn kein Salz präsent ist. Die Indizes i und j bezeichnen jeweils die in der Lösung vorhandenen Ionenspezies. Sämtliche Konzentrationen werden durch einen willkürlichen Konzentrationswert c_0 geteilt, um dimensionslose Parameter zu erhalten. l_i beschreibt den Einfluss der einzelnen Ionenspezies i auf die Adsorptionsgröße, während der Interaktionsparameter l_{ij} die Mischungseinflüsse der Spezies i und j abbildet. Die Interaktionsparameter für ein Anion und ein Kation werden auf null gesetzt, da die Kombination aus einem Anion und einem Kation einem Reinsalz entspricht und dieser Einfluss bereits in den Einzelfaktoren der Ionen abgebildet wird. Ebenfalls tritt kein Mischungseffekt für eine einzelne Ionenspezies auf, sodass die Interaktionsparameter der Form l_{ii} auf null gesetzt werden. Des Weiteren wird eine Symmetrie der Interaktionsparameter vorausgesetzt, sodass l_{ij} und l_{ji} identisch sind. Für ein System aus zwei Anionen und zwei Kationen bleiben somit zwei verschiedene Interaktionsparameter übrig: einer für die beiden Kationen und einer für die beiden Anionen. [70]

Gleichung 2.18 wurde in der Literatur zur Beschreibung des Adsorptionsverhaltens von den beiden Modellproteinen bovines Serumalbumin (BSA) und Lysozym (LYZ) verwendet [70–74]. Dabei wurde gezeigt, dass für beide Proteine synergetische Salzeffekte bei der Mischung von Natrium (Na^+)-, Ammonium (NH_4^+)-, Chlorid (Cl^-)- und Sulfat (SO_4^{2-})-Ionen auftreten. Für BSA führen diese Effekte zu einer reduzierten Beladung, während sie für LYZ zu einer erhöhten Beladung führen. Somit lässt sich die Separation dieser Proteine über die HIC mit einer Salzmischung verbessern. Die optimale Salzzusammensetzung für eine Trennung dieser Proteine besteht dabei aus einem hohen Anteil an Natriumchlorid (NaCl) und einem geringeren Anteil an Natriumsulfat (Na_2SO_4). [71,74] Diese entgegengesetzten Effekte für BSA und LYZ zeigen auch auf, dass in der HIC der Salzeinfluss auf Proteine mechanistisch hochkomplex ist.

Bei der MMC werden Mechanismen von HIC und IEC kombiniert. Bei geringer Ionenstärke dominieren hierbei die Ionenaustausch-Effekte, während bei hoher Ionenstärke die hydrophoben Wechselwirkungen überwiegen. Untersuchungen der Protein-Beladung mit verschiedenen Salzen zeigen auch hier unterschiedliche Effekte für verschiedene Proteine. [59,75,76]

2.4 Modellierung chromatographischer Systeme

Die Modellierung ist ein gängiges Werkzeug in der chromatographischen Prozessentwicklung, um die benötigte Anzahl an Experimenten zu reduzieren [37,45]. Die Wichtigkeit einer geringen Prozessentwicklungsdauer gerade in der pharmazeutischen Industrie („time-to-market“) trägt dazu bei, dass Modellierungsansätze eine immer wichtigere Rolle in der Industrie übernehmen [23,52,77,78]. Hierbei kann die Modellierung sowohl in der frühen Phase der Produktentwicklung eingesetzt werden, um geeignete Wirkstoffmoleküle früh zu identifizieren, als auch zum Scale-up und zur Prozesskontrolle [78–81].

Diese Modelle können empirischer oder mechanistischer Natur sein, wobei die mechanistische Modellierung in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen hat [82]. Die mechanistische Modellierung setzt auf chemisch-physikalische Gleichungen, um Vorgänge während eines Chromatographie-Prozesses quantitativ zu beschreiben. Hierzu können Massen-, Energie- oder Impulsbilanzen sowie Gleichungen zur Beschreibungen des thermodynamischen Gleichgewichts zwischen den verschiedenen Phasen gehören [81].

In Kapitel 2.4.1 werden mechanistische Modellierungsansätze verschiedenen Detaillierungsgrades vorgestellt und die hierzu benötigten Modellparameter erläutert. Kapitel 2.4.2 beschreibt die für diese Arbeit relevanten Start- und Randbedingungen sowie Diskretisierungsverfahren, während Kapitel 2.4.3 die Open-Source Toolbox Cadet vorstellt, die in dieser Arbeit zur Modellierung angewendet wurde.

2.4.1 Modellierungsansätze und Modellparameter

Übersicht gängiger Chromatographie-Modelle

In Abbildung 2.11 ist das Prinzip der differentiellen Massenbilanz für eine Chromatographiesäule dargestellt. Hierbei wird ein differentielles Volumenelement mit der Länge dz betrachtet. Eine üblicherweise getroffene Vereinfachung ist, dass die Konzentrationen der Komponenten in radialer Richtung als konstant betrachtet werden. Ebenfalls wird die Säulenpackung im Allgemeinen als homogen angenommen, wodurch Größen wie Porosität und Partikelradius für die Säule als konstant angesehen werden. Die Querschnittsfläche des differentiellen Volumenelements kann somit mit der Grundfläche der Säule gleichgesetzt werden. Das differentielle Volumenelement lässt sich analog zu Kapitel 2.1.2 in das interpartikuläre Volumen dV_{int} und das Volumen der Partikel dV_p unterteilen, welches sich wiederum aus dem Porenvolumen dV_{pore} und dem Feststoffvolumen dV_s zusammensetzt.

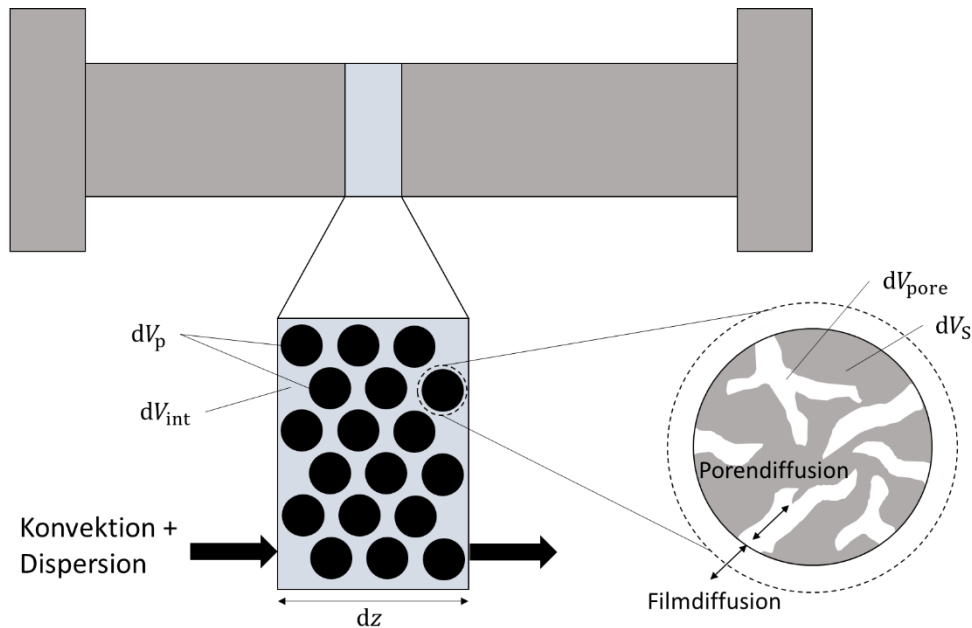


Abbildung 2.11: Prinzip der differentiellen Massenbilanz an einer Chromatographiesäule, verändert nach [81].

In Tabelle 2.2 sind hierauf aufbauend gängige Modellierungsansätze verschiedener Detaillierungsgrade mit ihren zugehörigen Modellparametern für unterschiedliche Effekte aufgeführt. Das einfachste hier vorgestellte Modell ist das Ideal-Modell. Hier werden weitere Bandenverbreitende Effekte wie die Dispersion in der Säule oder der Massentransport-Widerstand vernachlässigt. Das Ideal-Modell geht von gleichbleibenden Konzentrationen in der Flüssigkeit innerhalb und außerhalb einer Pore aus. Der konvektive Stofftransport durch die Säule wird mithilfe der interpartikulären Fließgeschwindigkeit u_{int} beschrieben. Das Adsorptionsgleichgewicht wird mithilfe einer passenden Adsorptionsisotherme berechnet. Dabei wird die Beladung $q(c)$ in Abhängigkeit der Konzentration aller beteiligten Komponenten bestimmt. [81]

Das Dispersive- und das Transport-Modell erweitern das Ideal-Modell um jeweils einen weiteren Parameter: Im Dispersive-Modell wird die effektive Dispersion D_{eff} berücksichtigt, die die Dispersion aufgrund der Säulenpackung mit allen anderen Dispersionseffekten zusammenfasst, und im Transport-Modell der effektive Filmdiffusionskoeffizient k_{eff} , der die Diffusion durch den Flüssigkeitsfilm um die Partikel und die Poren der Partikel zusammenfasst. Diese Modelle werden verwendet, wenn einer der bandenverbreitenden Effekte Dispersion oder Massentransport-Widerstand einen deutlich größeren Einfluss hat und der jeweils andere vernachlässigt werden kann. [53,81]

Das Transport-Dispersive-Modell verbindet diese beiden Ansätze und berücksichtigt mit dem axialen Dispersionskoeffizienten D_{ax} die Dispersion durch die Säulenpackung sowie mit k_{eff} den Massentransport-Widerstand durch die Partikel. [81]

Das General-Rate-Modell berücksichtigt dieselben Effekte wie das Transport-Dispersive-Modell, betrachtet den Massentransport-Widerstand der Filmdiffusion durch den Flüssigkeitsfilm um die Partikel und der Porendiffusion jedoch separat. Statt des kombinierten Parameters k_{eff} werden im General-Rate Model daher der Filmdiffusionskoeffizient k_{film} und der Porendiffusionskoeffizient D_{pore} berücksichtigt. [81]

Im Bereich der Protein-Chromatographie werden meist das Transport-Dispersive- oder das General-Rate-Modell verwendet [37].

Tabelle 2.2: Modellparameter zur Beschreibung verschiedener Phänomene in gängigen Modellierungsansätzen in der Chromatographie.

Modell-Name	Konvektion	Adsorptions-Gleichgewicht	Dispersion	Massentransport-Widerstand	
				Filmdiffusion	Porendiffusion
Ideal	u_{int}	$q(c)$	-	-	-
Dispersive	u_{int}	$q(c)$	D_{eff}	-	-
Transport	u_{int}	$q(c_p)$	-	k_{eff}	
Transport-Dispersive	u_{int}	$q(c_p)$	D_{ax}	k_{eff}	
General-Rate	u_{int}	$q(c_p(r))$	D_{ax}	k_{film}	D_{pore}

Mathematische Beschreibung des Transport-Dispersive-Modells

In dieser Arbeit wird das Transport-Dispersive-Modell verwendet (siehe Kapitel 6). Gleichung 2.19 beschreibt die Massenbilanz im interpartikulären Volumen einer Säule in einem differentiellen Volumen mit der Höhe dz und der Querschnittsfläche der Säule A_c . Die zeitliche Änderung der Masse der Komponente i in diesem Volumen $m_{\text{acc},i}$ setzt sich aus einem konvektiven, einem diffusiven und einem Massentransport-Anteil zusammen. Der konvektive und diffusive Anteil beschreiben jeweils die Differenz des ein- und austretenden konvektiven beziehungsweise diffusiven Massenstroms $\dot{m}_{\text{conv},i}$ beziehungsweise $\dot{m}_{\text{disp},i}$ über die Änderung dieser Terme über die Höhe des Volumenelements dz . Der Massenstrom der Komponente i , der dieses Volumenelement über die Grenzfläche zu den Partikeln verlässt, wird als Massentransport-Anteil $\dot{m}_{\text{mt},i}$ bezeichnet. [81]

$$\frac{\partial m_{\text{acc},i}}{\partial t} = -\frac{\partial \dot{m}_{\text{conv},i}}{\partial z} dz - \frac{\partial \dot{m}_{\text{disp},i}}{\partial z} dz - \dot{m}_{\text{mt},i} \quad 2.19$$

In den Gleichungen 2.20-2.23 werden diese Massengrößen aus der Konzentration der Komponente i in der interpartikulären Phase c_i berechnet. In Gleichung 2.20 ist außerdem die Berechnung des differentiellen interpartikulären Volumenelements dV_{int} aus dem Lückengrad ε_c , A_c und dz angegeben. Gleichung 2.21 beschreibt den konvektiven Massentransport als Produkt der Konzentration und des Volumenstroms, welcher sich wiederum aus der Fließgeschwindigkeit und dem für die Konvektion zugänglichen Teil der Querschnittsfläche ($\varepsilon_c A_c$) zusammensetzt. Analog wird in Gleichung 2.22 der dispersive Massentransport als Produkt von D_{ax} , der Änderung der Konzentration in axialer Säulenrichtung und der zugänglichen Querschnittsfläche berechnet. Der Term erhält ein negatives Vorzeichen, da die Diffusion entgegen dem Konzentrationsgradienten wirkt, also Masse vom Ort hoher zum Ort niedriger Konzentration transportiert wird. $\dot{m}_{\text{mt},i}$ kann wie in Gleichung 2.23 dargestellt als Produkt des Stoffübergangskoeffizienten $k_{\text{eff},i}$, der Differenz der Konzentration der Komponente i außerhalb (c_i) und innerhalb ($c_{p,i}$) der Partikel und der Oberfläche aller Partikel innerhalb des differentiellen Volumenelements dA_p bestimmt werden. [81]

$$m_{\text{acc},i} = c_i dV_{\text{int}} = c_i \varepsilon_c A_c dz \quad 2.20$$

$$\dot{m}_{\text{conv},i} = c_i \dot{V} = \varepsilon_c A_c u_{\text{int}} c_i \quad 2.21$$

$$\dot{m}_{\text{disp},i} = -\varepsilon_c A_c D_{\text{ax}} \frac{\partial c_i}{\partial z} \quad 2.22$$

$$\dot{m}_{\text{mt},i} = k_{\text{eff},i} (c_i - c_{p,i}) dA_p \quad 2.23$$

Um dA_p mit bekannten Größen auszudrücken, wird in Gleichung 2.24 das Verhältnis des Partikelvolumens dV_p und des interpartikulären Volumens dV_{int} innerhalb des differentiellen Volumenelements bestimmt. Gleichung 2.25 beschreibt das Verhältnis von dA_p zu dV_p . Die

Stand der Technik

Partikelanzahl innerhalb des differentiellen Volumenelements N_p wird hierzu sowohl mit der Kugeloberfläche als auch mit dem Kugelvolumen eines Partikels mit dem Radius r_p multipliziert und kann somit gekürzt werden.

$$\frac{dV_p}{dV_{\text{int}}} = \frac{1 - \varepsilon_c}{\varepsilon_c} \quad 2.24$$

$$\frac{dA_p}{dV_p} = \frac{N_p 4 \pi r_p^2}{N_p \frac{4}{3} \pi r_p^3} = \frac{3}{r_p} \quad 2.25$$

Aus den Gleichungen 2.24 und 2.25 lässt sich nun Gleichung 2.26 ableiten.

$$dA_p = \frac{1 - \varepsilon_c}{\varepsilon_c} \frac{3}{r_p} dV_{\text{int}} = \frac{1 - \varepsilon_c}{\varepsilon_c} \frac{3}{r_p} \varepsilon_c A_c dz \quad 2.26$$

Durch Einsetzen der Gleichungen 2.20-2.23 und 2.26 in Gleichung 2.19 ergibt sich Gleichung 2.27.

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_i}{\partial t} \varepsilon_c A_c dz = & - \frac{\partial c_i}{\partial z} dz \varepsilon_c A_c u_{\text{int}} - \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2} dz \varepsilon_c A_c D_{\text{ax}} \\ & - k_{\text{eff},i} (c_i - c_{p,i}) \frac{1 - \varepsilon_c}{\varepsilon_c} \frac{3}{r_p} \varepsilon_c A_c dz \end{aligned} \quad 2.27$$

Durch Kürzen des in allen Termen auftretenden Faktors $\varepsilon_c A_c dz$ und Umstellen der Gleichung 2.27 ergibt sich Gleichung 2.28. Diese stellt die Erhaltungsgleichung für die Komponente i in der interpartikulären Phase in ihrer gebräuchlichen Form dar [78,81].

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -u_{\text{int}} \frac{\partial c_i}{\partial z} + D_{\text{ax}} \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2} - \frac{1 - \varepsilon_c}{\varepsilon_c} k_{\text{eff},i} \frac{3}{r_p} (c_i - c_{p,i}) \quad 2.28$$

Zusätzlich wird die Massenbilanz innerhalb eines Partikels benötigt. Gleichung 2.29 beschreibt, dass der Massenstrom der Komponente i durch die Grenzfläche $\dot{m}_{\text{mt},i}$ der Summe der Änderungen der Masse der Komponente i in der intrapartikulären Flüssigphase $m_{\text{acc},i,p}$ und der direkt an die feste Phase gebundenen Masse $m_{\text{acc},i,s}$ entspricht.

$$\frac{\partial m_{\text{acc},i,p}}{\partial t} + \frac{\partial m_{\text{acc},i,s}}{\partial t} = \dot{m}_{\text{mt},i} \quad 2.29$$

In den Gleichungen 2.30 und 2.31 werden die Massen $m_{\text{acc},i,p}$ und $m_{\text{acc},i,s}$ in Abhängigkeit der interpartikulären Konzentration $c_{p,i}$ bzw. der Beladung q_i dargestellt.

$$m_{\text{acc},i,p} = c_{p,i} dV_p = c_{p,i} \varepsilon_p (1 - \varepsilon_c) A_c dz \quad 2.30$$

$$m_{\text{acc},i,s} = q_i dV_s = q_i (1 - \varepsilon_p) (1 - \varepsilon_c) A_c dz \quad 2.31$$

Das Einsetzen der Gleichungen 2.23, 2.30 und 2.31 in Gleichung 2.29 liefert Gleichung 2.32. Durch Kürzen des Ausdrucks $(1 - \varepsilon_c) A_c dz$ erhält man Gleichung 2.33, welche die Erhaltungsgleichung für die Komponente i in der intrapartikulären Phase in ihrer gebräuchlichen Form darstellt. [81]

$$\begin{aligned} \varepsilon_p (1 - \varepsilon_c) A_c dz \frac{\partial c_{p,i}}{\partial t} + (1 - \varepsilon_p) (1 - \varepsilon_c) A_c dz \frac{\partial q_i}{\partial t} \\ = k_{\text{eff},i} (c_i - c_{p,i}) \frac{1 - \varepsilon_c}{\varepsilon_c} \frac{3}{r_p} \varepsilon_c A_c dz \end{aligned} \quad 2.32$$

$$\varepsilon_p \frac{\partial c_{p,i}}{\partial t} + (1 - \varepsilon_p) \frac{\partial q_i}{\partial t} = k_{\text{eff},i} \frac{3}{r_p} (c_i - c_{p,i}) \quad 2.33$$

Die Beladung q_i kann grundsätzlich entweder als Ergebnis einer kinetischen Bindereaktion oder als Gleichgewichtsgröße betrachtet werden. Die kinetische Modellierung wird in Gleichung 2.34 beschrieben. Die Rate der Bindereaktion ψ_{reac} wird als Differenz der Adsorptionsgeschwindigkeit mit der Adsorptionskonstante $K_{\text{ads},i}$ und der Sättigungbeladung $q_{\text{sat},i}$ sowie der Desorptionsgeschwindigkeit mit der Desorptionskonstante $K_{\text{des},i}$ betrachtet. N_{comp} bezeichnet hierbei die Anzahl der beteiligten Komponenten. [81]

$$\psi_{\text{reac},i} = K_{\text{ads},i} q_{\text{sat},i} \left(1 - \sum_{j=1}^{N_{\text{comp}}} \frac{q_j}{q_{\text{sat},j}} \right) c_{\text{p},i} - K_{\text{des},i} q_i \quad 2.34$$

Wenn die Raten für Adsorption und Desorption ausreichend hoch sind, kann der Vorgang stattdessen als Gleichgewicht zwischen der intrapartikulären Flüssigkeit und der festen Phase betrachtet werden. Die Beladung berechnet sich dann wie in Gleichung 2.35 dargestellt als Funktion der Konzentrationen aller beteiligten Komponenten und wendet somit direkt die zu Grunde liegende Isotherme an (siehe Kapitel 2.2.1). [81]

$$q_i = f(c_{\text{p},1}, \dots, c_{\text{p},N_{\text{comp}}}) \quad 2.35$$

Die Bilanzen für ein differentielles Volumenelement mit dem Transport-Dispersive-Modell lassen sich somit mit den Gleichungen 2.28, 2.33 und, je nachdem, ob eine kinetische Modellierung erfolgen soll oder nicht, Gleichung 2.34 oder 2.35 beschreiben.

2.4.2 Diskretisierung, Start- und Randbedingungen

Die in Kapitel 2.4.1 vorgestellten Differentialgleichungen müssen diskretisiert sowie mit Start- und Randbedingungen versehen werden, um numerisch lösbar zu werden. Bei der Diskretisierung werden die Differentialgleichungen aus ihrer kontinuierlichen Form in eine örtlich und zeitlich in endliche Punkte diskretisierte Form überführt.

Finite-Volumen-Methode

Eines der gängigsten Diskretisierungsverfahren für partielle Differentialgleichungssysteme ist die finite-Volumen-Methode (FVM). Hierbei wird der betrachtete Bereich in eine endliche Zahl an Volumenzellen unterteilt. Alle Größen (wie beispielsweise die Konzentration) werden als Mittelwert über ein Volumenelement betrachtet. Über die Grenzflächen der Volumenelemente findet ein Fluss der Transportgrößen statt, der im Einklang mit der Massenerhaltung die Änderungen innerhalb der Volumenelemente im Verlauf eines Zeitschritts definiert. [83]

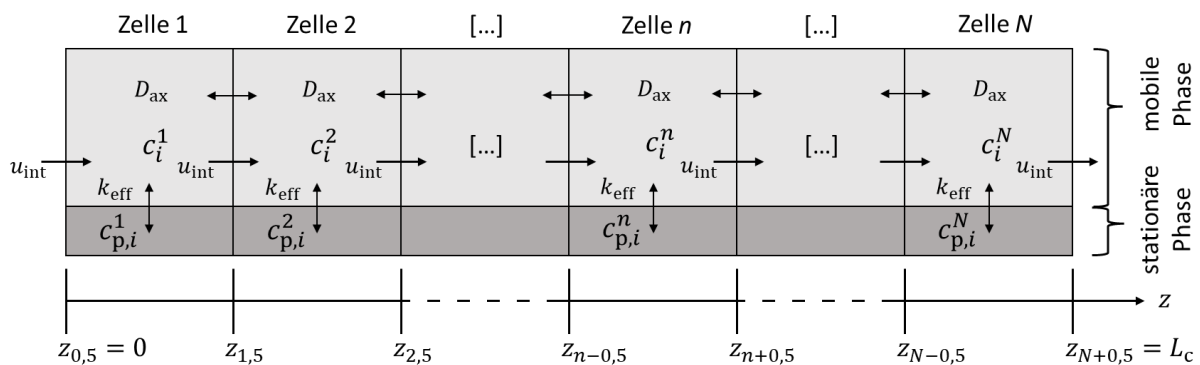


Abbildung 2.12: Beispielhafte Diskretisierung einer Chromatographiesäule der Länge L_c in N Zellen mit der finiten-Volumen Methode, verändert nach [84] und [53].

Abbildung 2.12 skizziert die Anwendung der FVM auf eine Chromatographiesäule. Der Nullpunkt der Ortsachse z ist als Einlass und die Länge L_c als Auslass der Säule definiert. Die Konzentration c_i^n einer Komponente i in der mobilen Phase einer Zelle n kann als das Integral zwischen den Grenzen des Volumenelements $z_{n-0,5}$ und $z_{n+0,5}$ betrachtet werden [84]:

$$c_i^n = \frac{1}{\Delta z} \int_{z_{n-0,5}}^{z_{n+0,5}} c_i(z) dz \quad 2.36$$

Über den Filmdiffusionskoeffizienten k_{eff} steht c_i^n in Austausch mit der Porenkonzentration $c_{p,i}^n$. Der konvektive Transport erfolgt mit der Strömungsgeschwindigkeit u_{int} in die benachbarte Zelle in Flussrichtung, während der diffusive Transport mit dem Dispersionskoeffizienten D_{ax} sowohl mit als auch gegen die Flussrichtung stattfindet. Die in Gleichung 2.28 benötigten örtlichen Ableitungen der Konzentration werden in der FVM über die Konzentrationen an den Grenzflächen und den benachbarten Zellen berechnet. Hierbei werden symmetrische Differenzen der ersten Ordnung verwendet. Die resultierende örtliche Diskretisierung ist in Gleichung 2.37 dargestellt. [84]

$$\frac{\partial c_i^n}{\partial t} = -u_{\text{int}} \frac{c_i^{n+0,5} - c_i^{n-0,5}}{\Delta z} + D_{\text{ax}} \frac{c_i^{n+1} - 2c_i^n + c_i^{n-1}}{\Delta z^2} - \frac{1 - \varepsilon_c}{\varepsilon_c} k_{\text{eff},i} \frac{3}{r_p} (c_i^n - c_{p,i}^n) \quad 2.37$$

Für die Berechnung des konvektiven Terms werden die Konzentrationen an den Grenzen des Volumenelements benötigt. Eine Möglichkeit, diese zu berechnen ist das gewichtete, im Wesentlichen nicht oszillierende (*Weighted Essentially Non-oscillatory* [WENO]) Berechnungsschema [84,85]. Das WENO-Schema berücksichtigt bei der Berechnung von Größen an einer Grenzfläche mehrere benachbarte Zellen, wodurch die Werte geglättet werden und eine höhere numerische Stabilität erreicht wird. Hierfür wird die gesuchte Größe $c_i^{n+0,5}$ wie in Gleichung 2.38 beschrieben aus einer frei wählbaren Anzahl κ an Polynomen $c_{i,r}^{n+0,5}$ approximiert, welche jeweils mit einem Gewichtungsfaktor ω_r multipliziert werden [85]. Jedes dieser Polynome setzt sich wie in Gleichung 2.39 beschrieben aus κ Termen zusammen, in denen die Konzentrationen in benachbarten Zellen mit Faktoren aus der Matrix $M^{(\kappa)}$ multipliziert werden.

$$c_i^{n+0,5} = \sum_{r=0}^{\kappa-1} \omega_r c_{i,r}^{n+0,5} \quad 2.38$$

$$c_{i,r}^{n+0,5} = \sum_{j=0}^{\kappa-1} M_{r,j}^{(\kappa)} c_i^{n-r+j} \quad 2.39$$

Die Gewichtungsfaktoren ω_r setzen sich aus Einzelgewichtungen ξ_r zusammen, welche wiederum aus den Glattheitspolynomen $\beta_r^{(\kappa)}$ und den Konstanten $d_r^{(\kappa)}$ berechnet werden (Gleichungen 2.40 und 2.41). φ bezeichnet hierbei einen numerischen Sicherheitssummanden, der eine Division durch null verhindert und für den eine niedrige positive Zahl willkürlich festgelegt wird. [84]

$$\omega_r = \frac{\xi_r}{\sum_{s=0}^{\kappa-1} \xi_s} \quad 2.40$$

$$\xi_r = \frac{d_r^{(\kappa)}}{(\varphi + \beta_r^{(\kappa)})^2} \quad 2.41$$

Im Folgenden wird die Berechnung mit $\kappa=3$ näher erläutert, was einem gängigen Wert in der Chromatographie-Modellierung entspricht. Gleichung 2.42 stellt die zugehörige Matrix $M^{(3)}$ dar, woraus sich die drei in Gleichung 2.43 beschriebenen Polynome ergeben. [84]

$$M^{(3)} = \begin{bmatrix} \frac{1}{3} & \frac{5}{6} & -\frac{1}{6} \\ -\frac{1}{6} & \frac{5}{6} & \frac{1}{3} \\ \frac{1}{3} & -\frac{7}{6} & \frac{11}{6} \end{bmatrix} \quad 2.42$$

$$\begin{pmatrix} c_{i,0}^{n+0,5} \\ c_{i,1}^{n+0,5} \\ c_{i,2}^{n+0,5} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{3}c_i^n + \frac{5}{6}c_i^{n+1} - \frac{1}{6}c_i^{n+2} \\ -\frac{1}{6}c_i^{n-1} + \frac{5}{6}c_i^n + \frac{1}{3}c_i^{n+1} \\ \frac{1}{3}c_i^{n-2} - \frac{7}{6}c_i^{n-1} + \frac{11}{6}c_i^n \end{pmatrix} \quad 2.43$$

Die für die Berechnung der Einzelgewichte ξ_r benötigten Größen für $\kappa=3$ sind in den Gleichungen 2.44 und 2.45 dargestellt. An den Rändern der betrachteten Geometrie muss die Ordnung des WENO-Schemas reduziert werden, da weniger benachbarte Zellen zur Verfügung stehen. [84]

$$d^{(3)} = \begin{bmatrix} \frac{3}{10} & \frac{6}{10} & \frac{1}{10} \end{bmatrix} \quad 2.44$$

$$\begin{pmatrix} \beta_0^{(3)} \\ \beta_1^{(3)} \\ \beta_2^{(3)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{13}{12}(c_i^n - 2c_i^{n+1} + c_i^{n+2})^2 + \frac{1}{4}(3c_i^n - 4c_i^{n+1} + c_i^{n+2})^2 \\ \frac{13}{12}(c_i^{n-1} - 2c_i^n + c_i^{n+1})^2 + \frac{1}{4}(c_i^{n-1} - c_i^{n+1})^2 \\ \frac{13}{12}(c_i^{n-2} - 2c_i^{n-1} + c_i^n)^2 + \frac{1}{4}(c_i^{n-2} - 4c_i^{n-1} + 3c_i^n)^2 \end{pmatrix} \quad 2.45$$

Start- und Randbedingungen

Um das so erhaltene Gleichungssystem lösen zu können, müssen die Startwerte von Beladungen und Konzentrationen in der gesamten betrachteten Domäne vorgegeben werden. Bei Pulsversuchen sind üblicherweise zu Beginn der Injektion am Zeitpunkt $t=0$ die Konzentration und Beladung der Zielkomponente i an jeder Stelle z innerhalb des Systems null [81] (Gleichung 2.46):

$$c_i(t = 0, z) = c_{p,i}(t = 0, z) = q_i(t = 0, z) = 0 \quad 2.46$$

Bei der IEC hingegen ist die Säule auch vor der Probeninjektion vollständig mit Salz beladen. Des Weiteren ist im Allgemeinen auch zu Beginn von LGE-Versuchen Salz in der mobilen Phase vorhanden. Es wird angenommen, dass die Start-Salzkonzentration der mobilen Phase $c_{s,0}$ in der gesamten Säule sowohl im interpartikulären als auch im intrapartikulären Raum vorliegt. Für die Komponente Salz werden bei der Modellierung von IEC-Prozessen daher folgende Startbedingungen gesetzt (Gleichungen 2.47 und 2.48): [86]

$$c_s(t = 0, z) = c_{p,s}(t = 0, z) = c_{s,0} \quad 2.47$$

$$q_s(t = 0, z) = \Lambda \quad 2.48$$

Des Weiteren müssen an den Rändern der zu diskretisierenden Geometrie die Einflüsse dieser Grenzflächen beschrieben werden. Bei der Eindimensionalen Chromatographie-Modellierung bilden der Einlass und der Auslass der Säule oder der Anlagenperipherie diese Ränder. Hierzu werden sogenannte Randbedingungen verwendet. Diese müssen über die gesamte Dauer der Simulation vorgegeben werden. Da lediglich die mobile Phase mit den Rändern der Geometrie interagiert (siehe Abbildung 2.12), müssen auch nur für diese Randbedingungen definiert werden. In der Chromatographie-Modellierung haben sich die Vorgabe des Konzentrationsprofils am Einlass $c_{i,in}$

(Gleichung 2.49) sowie das Verschwinden des Konzentrationsgradienten am Auslass (Gleichung 2.50) als geeignete Bedingungen durchgesetzt. [20,81]

$$c_i(t, z = 0) = c_{i,in}(t) \quad 2.49$$

$$\frac{\partial c_i(t, z = L_c)}{\partial z} = 0 \quad 2.50$$

Für eine Pulsinjektion mit der Dauer t_{inj} und der Konzentration $c_{feed,i}$ kann das Konzentrationsprofil der Zielkomponenten wie in Gleichung 2.51 dargestellt beschrieben werden [20,87]. Bei beispielsweise der LGE weist die Salzkonzentration $c_{s,in}$ ein anderes Profil auf und muss als $c_{s,Eluent}$ vollständig vorgegeben werden (Gleichung 2.52). [88]

$$c_{i,in}(t) = \begin{cases} c_{feed,i} & t \leq t_{inj} \\ 0 & t > t_{inj} \end{cases} \quad 2.51$$

$$c_{s,in}(t) = c_{s,Eluent}(t) \quad 2.52$$

2.4.3 CADET-Toolbox

In dieser Arbeit wird die vom Forschungszentrum Jülich entwickelte Open-Source-Software Chromatographie Analyse und Design Toolkit (CADET) zur Modellierung der Chromatographie-Prozesse verwendet. Die Software wird über ein Matlab- oder Python-Interface angesteuert. Hierbei können drei Teilprogramme der CADET-Familie unterschieden werden.

Das eigentliche Chromatographie-Simulationstool wird im Folgenden als CADET-Core bezeichnet. In CADET-Core kann aus einer Vielzahl von Bindungsmodellen (Isothermen) und Modellierungsansätzen das passende Setup ausgewählt werden. Der Ablauf des Prozesses wird über Flussraten, Verschaltungen von Unit-Operations und Einlasskonzentrationen ebenfalls vorgegeben. Des Weiteren werden die Parameter für die Diskretisierung und den Solver gesetzt (beispielsweise Anzahl der Zellen oder Fehlertoleranzen). Es kann ebenfalls angegeben werden, ob eine kinetische Modellierung erfolgen soll. CADET-Core führt daraufhin eine Diskretisierung mit der FVM und dem WENO-Schema durch. Für die Zeitdiskretisierung wird eine variable Zeitschrittweite mit einer optionalen Obergrenze verwendet. Die Berechnung selbst erfolgt in C++. Standardmäßig verwendet CADET-Core SI-Einheiten, es können allerdings auch andere Einheitensysteme verwendet werden. Neben der klassischen Chromatographie-Säule können auch zusätzliche Unit-Operations wie Rührkessel simuliert werden, um beispielsweise Totvolumina der Anlage abzubilden. Aufgrund der vielen Einstellungsmöglichkeiten ist CADET-Core ein stark anpassbares Programm, dass sich dank geringer Rechenzeiten auch gut für eine Kopplung mit Tools zur Parameterbestimmung oder zur Prozess-Optimierung eignet. [23]

Mit CADET-Match verfügt die CADET-Familie über ein flexibles Tool zum Parameter-Fitting. Hiermit können aus experimentellen Chromatogrammen Parameter für die Modellierung abgeleitet werden. CADET-Match ruft im Lauf des Fitting-Prozesses CADET-Core für eine Vielzahl von einzelnen Simulationen auf, wobei verschiedene Such-Algorithmen verwendet werden können. Das grundsätzliche Vorgehen beim Parameter-Fitting wird in Kapitel 2.5.2 näher beschrieben. CADET-Match beinhaltet hierbei eine Funktion, um Datensätze zu glätten, was die Vergleichbarkeit von experimentellen und simulierten Daten verbessert. Hierzu kombiniert CADET-Match eine schnelle Fourier Transformation (*fast Fourier transform* [FFT]) mit der Verwendung von Splines, um über eine große Bandbreite an Zeitintervallen Rauschen effektiv zu entfernen, ohne relevante Charakteristika aus den Daten zu entfernen. Bei der FFT wird Rauschen im hohen Frequenzbereich effektiv automatisiert erkannt und kann herausgefiltert werden.

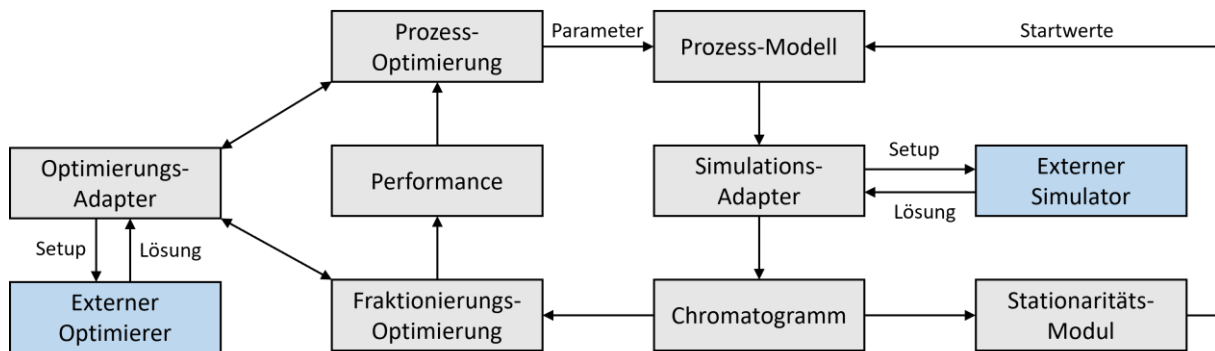


Abbildung 2.13: Überblick über den Aufbau des CADET-Process Tools, nach [89].

Splines sind ebenfalls eine robuste und automatisierbare Methodik, für hochfrequentes Rauschen aber rechenintensiv. Indem zuerst mit dem FFT-Filter das hochfrequente Rauschen entfernt wird, bevor mit den Splines das so erhaltene Chromatogramm weiter geglättet wird, kann die Rechenzeit reduziert werden. Darüber hinaus bietet CADET-Match eine Vielzahl von Zielfunktionen an, die bspw. auch Ungenauigkeiten in den experimentellen Daten berücksichtigen. [90]

CADET-Process ist ein Tool zur Prozessoptimierung. Der grundsätzliche Aufbau des Programms ist in Abbildung 2.13 dargestellt. Das Prozess-Modell enthält die Konfiguration des chromatographischen Setups, also bspw. Informationen über die verwendeten Unit-Operations und deren Verschaltung sowie über die Verläufe von Feed-Konzentrationen und Flussraten. Der Simulations-Adapter bereitet hieraus Daten vor, mit denen ein externer Simulator aufgerufen werden. Dies kann grundsätzlich ein beliebiges-Chromatographie-Simulationstool sein, in dieser Arbeit wird hierfür CADET-Core verwendet. Der Adapter bestimmt aus der Lösung des Simulators die benötigten Chromatogramme. CADET-Process bietet an dieser Stelle die Möglichkeit, cyclische Prozesse auf ihre Stationarität zu überprüfen. Ist Stationarität erreicht oder nicht erforderlich wird mit dem Chromatogramm eine Optimierung der Fraktionierung durchgeführt und hieraus eine Performance ermittelt. Diese Performance wird mit den Prozessparametern verknüpft, um über die Auswertung verschiedener Parameter eine Optimierung des Prozesses zu erreichen. Als externer Optimierer kann ebenfalls eine beliebige Optimierungs-Software verwendet werden. Standardmäßig wird das Open-Source Python-Paket COBYLA [91] verwendet. [89]

Die Optimierung der Fraktionierung erfolgt in CADET-Process vollständig automatisiert. Hierbei kann eine beliebige Anzahl der beteiligten Komponenten als Produkt deklariert werden. Für jedes Produkt wird eine erforderliche Reinheit vorgegeben. Hierbei können Komponenten definiert werden, die für die Betrachtung der Reinheit ignoriert werden. Hierzu zählt üblicherweise das Salz in der IEC. Das Chromatogramm wird daraufhin nach Regionen durchsucht, in denen die Reinheit der Komponenten über dem geforderten Minimalwert liegt. Anschließend erweitert der Optimierer die Fraktionierungsfenster und versucht, die Produktmenge unter Einhaltung der Reinheitsanforderung zu maximieren. Als Performance-Kriterium für die Prozess-Optimierung sind neben der Produktmenge auch die Größen Ausbeute, Produktivität und Eluent-Verbrauch vorimplementiert. Es besteht auch die Möglichkeit, diese Größen beliebig in einer neuen Funktion zu kombinieren. [89]

2.5 Bestimmung von Modellparametern

2.5.1 Yamamoto-Methode

Yamamoto et al. schlagen einen Ansatz zur Korrelation der Gradientensteigung in LGE-Versuchen und der Retentionszeit eines Proteins zur Bestimmung von Isothermen-Parametern vor [92]. Hierbei wird die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteinpulses durch die Säule betrachtet. In Gleichung 2.53 ist die Änderung der axialen Position des Peak-Maximums $z_{\text{peak},i}$ eines Proteins i über der Zeit dargestellt:

$$\frac{dz_{\text{peak},i}}{dt} = \frac{u_{\text{int}}}{1 + \frac{1 - \varepsilon_c}{\varepsilon_c} K_{V,i}} \quad 2.53$$

Hierbei beschreibt $K_{V,i}$ den Verteilungskoeffizienten zwischen der stationären und der mobilen Phase. Dieser wird nach Gleichung 2.54 bestimmt, wobei $V_{R,i}$ das Retentionsvolumen von i und V_0 das Retentionsvolumen eines nicht porengängigen Tracers beschreibt [92,93]:

$$K_{V,i} = \frac{V_{R,i} - V_0}{V_c - V_0} \quad 2.54$$

Die Integration von Gleichung 2.53 führt mit weiteren Umformungen (siehe Anhang A.2) zu Gleichung 2.55. GH beschreibt hierbei die normalisierte Gradientensteigung, $c_{s,R}$ die Salzkonzentration am Säulenauslass zum Zeitpunkt der Protein-Elution und $K_{V,s}$ den Verteilungskoeffizienten des Salzes.

$$GH = g (1 - \varepsilon_t) V_{\text{col}} = \frac{1 - \varepsilon_t}{1 - \varepsilon_c} \int_{c_{s,0}}^{c_{s,R}} \frac{1}{K_{V,i}(c_s) - K_{V,s}} dc_s \quad 2.55$$

Der Faktor g wird in Gleichung 2.56 definiert. Der Ausdruck $c_{s,\text{final}}$ beschreibt dabei die Endkonzentration und $c_{s,0}$ die Startkonzentration des Salzes bei einem Gradienten mit dem Gradientenvolumen V_G .

$$g = \frac{c_{s,\text{final}} - c_{s,0}}{V_G} \quad 2.56$$

Durch Integration lässt sich aus Gleichung 2.55 mit Verwendung der SMA-Isotherme und unter Annahme einer gegen null gehenden Proteinkonzentration Gleichung 2.57 ableiten (siehe Anhang A.2). Da im Allgemeinen $c_{s,R} \gg c_{s,0}$ gilt, kann der zweite Term im Zähler vernachlässigt werden.

$$GH = \frac{c_{s,R}^{\nu_i+1} - c_{s,0}^{\nu_i+1}}{K_{\text{eq}} \Lambda^{\nu_i} (\nu_i + 1)} \approx \frac{c_{s,R}^{\nu_i+1}}{K_{\text{eq}} \Lambda^{\nu_i} (\nu_i + 1)} \quad 2.57$$

Durch Ziehen des Logarithmus auf beiden Seiten der Gleichung erhält man Gleichung 2.58, welche die Yamamoto-Gleichung in gebräuchlicher Form darstellt [25]. Dieser Ansatz vernachlässigt Stofftransport-Effekte und ist nur für geringe Proteinkonzentrationen und $c_{s,0}$ -Werte gültig. [92–94]

$$\log(GH) = (\nu_i + 1) \log(c_{s,R}) - \log(K_{\text{eq}} \Lambda^{\nu_i} (\nu_i + 1)) \quad 2.58$$

Gleichung 2.58 stellt einen Zusammenhang zwischen der Gradientensteigung GH und dem resultierenden $c_{s,R}$ für ein Protein her. Ist die Kapazität Λ der Säule bekannt, so sind die Modellparameter der SMA-Isotherme K_{eq} und ν die einzigen unbekannt Parameter der Formel. Sofern aus experimentellen Daten mindestens zwei Werte für $c_{s,R}$ bei unterschiedlichen Gradientenlängen bekannt sind, können die Werte für $\log(GH)$ über $\log(c_{s,R})$ aufgetragen und eine Regressionsgerade durch die Messpunkte gelegt werden. Die Steigung der Geraden entspricht hierbei ν_i+1 . Mit dem so bestimmten Wert für ν_i kann daraufhin aus dem Achsenabschnitt K_{eq}

berechnet werden. Mit bekannten Parametern K_{eq} und v lässt sich mit Gleichung 2.58 $c_{s,R}$ und somit t_R eines Proteins für beliebige Gradientenlängen bestimmen. [93,95]

2.5.2 Inverses Fitting

Beim inversen Fitting werden die Parameter eines mechanistischen Modells variiert, um eine möglichst hohe Übereinstimmung zwischen simulierten und experimentellen Daten zu erreichen [35,81]. Dazu wird das experimentelle Chromatogramm, das üblicherweise aus UV-Absorptionsmessungen besteht, in eine Konzentrations-Zeit-Reihe $c_{meas}(t_i)$ umgewandelt. Dies kann etwa durch eine vorherige Kalibrierung des Detektors erfolgen. Das mechanistische Modell generiert mit dem Parametersatz X ebenfalls eine Konzentrations-Reihe $c_{pred}(t_i, X)$, welche an dem selben Ort und den selben Zeitpunkten ausgewertet wird wie die experimentellen Daten. Dazu muss ein mechanistisches Modell und eine Isotherme ausgewählt werden (siehe Abschnitt 2.4.1 und 2.2.2). [8]

Zielfunktionen und Such-Algorithmen

Für die Quantifizierung der Abweichung zwischen den berechneten und den experimentellen Chromatogrammen gibt es eine Vielzahl an möglichen Bewertungsfunktionen. Die einfachste dieser Methoden ist die Summe der Fehlerquadrate (*sum of squared errors* [SSE]). Die Berechnung des SSE-Werts wird in Gleichung 2.59 dargestellt. Dabei bezeichnet t_0 die Start- und t_{final} die Endzeit des Versuchs. [8,22,90]

$$SSE = \sum_{i=0}^{final} (c_{pred}(t_i, X) - c_{meas}(t_i))^2 \quad 2.59$$

Die SSE-Metrik gehört zu den am häufigsten verwendeten Bewertungsfunktionen in der Chromatographie. Sie weist allerdings Schwächen bei der Berücksichtigung von Datenfehlern und der Abstufung von Fehlern bei fehlender Überschneidung der Chromatogramme auf. Heymann et al. [90] schlagen daher alternative Methoden vor. Die Shape-Metrik berücksichtigt etwa die Form der Peaks. Es können auch verschiedene Metriken in eine Zielfunktion kombiniert werden. Die Peak-Front-Funktion kann für Peaks verwendet werden, bei denen durch nicht-ideales Verhalten der Komponenten nur der vordere Teil des Chromatogramms verwendet werden kann. Hierbei isoliert die Peak-Front-Methode den entsprechenden Bereich und betrachtet in diesem Abschnitt die Form und die Position des Peaks. Grundsätzlich gilt, dass es keine Zielfunktion gibt, die für alle Problemstellungen die optimale Wahl darstellt. Je nach den genauen Bedingungen des Optimierungsproblems muss daher eine passende Zielfunktion ausgewählt werden. [90]

Mit einer Zielfunktion kann dann die Optimierung des Parametersatzes X durchgeführt werden. Hierfür muss eine Such-Strategie angewendet werden, die bestimmt, wie X für die nächste Auswertung angepasst wird. Eine Möglichkeit dazu bildet die Gradientensuche. Dabei werden benachbarte Punkte im Parameterraum untersucht. Daraus ergibt sich ein Gradient der Zielfunktion, dem der Algorithmus in Richtung geringerer Werte (Minimierung) folgt. Diese Methodik ist sehr effizient, wenn die aktuellen Werte für X nah am gesuchten Optimum liegen. Es besteht allerdings die Gefahr, nur lokale Optima statt des globalen Optimums zu finden. [90]

Ein weiterer Ansatz zur Optimierung ist der genetische Algorithmus (GA). Diese Methodik ist der biologischen Evolution nachempfunden. Die Optimierungsgrößen, im Fall des Parameterfittings das zu optimierende Parameterset, werden als Genom eines Organismus betrachtet. Ein Set an Parametern wird hierbei als Individuum bezeichnet. Bei einem GA werden mehrere unterschiedliche Individuen betrachtet. Die Summe aller Individuen bildet die sogenannte Population. Zu Beginn der Optimierung kann die Startgeneration zufällig erzeugt werden, wobei für jeden Parameter eine Ober- und Untergrenze definiert werden muss. Für jedes Individuum der Population wird ein als Fitness

bezeichneter Wert mithilfe einer Zielfunktion berechnet. Die Individuen werden anhand ihrer Fitness sortiert und beispielsweise die Kandidaten mit dem niedrigsten Wert (Minimierung) als Grundlage für die nächste Generation ausgewählt. Die Individuen der neuen Generation werden dabei über Mutation und Rekombination dieser besten Individuen der alten Generation erzeugt. Mutation bezeichnet bei einem GA eine zufällige Veränderung eines einzelnen Parameter-Werts, während bei der Rekombination die Parameter-Sets verschiedener Individuen gekreuzt werden. Mit diesem Vorgehen werden so viele neue Individuen erzeugt, bis die ursprüngliche Populationsgröße erreicht ist. Mit dieser neuen Generation wird das Vorgehen dann wiederholt. Dieser Ansatz wird fortgesetzt, bis ein Abbruchkriterium erreicht wird. Als Abbruchkriterium kann etwa eine maximale Generationenanzahl oder eine bestimmte Anzahl an Generationen ohne weitere Verbesserung der Fitness gesetzt werden. Die genauen Auswahlbedingungen für die nächste Generation sowie Häufigkeit von Mutation und Rekombination oder zusätzliche Vorkehrungen zur Erhöhung der Diversität der Individuen können variieren, sodass es verschiedene Algorithmen innerhalb dieser Kategorie gibt. Für die Chromatographie-Anwendung empfehlen Heymann et al. den nicht-dominierten genetischen Such-Algorithmus 3 (*non-dominated sorting genetic algorithm 3* [NSGA3]) [90]. Der GA ist durch die zufälligen Sprünge gut für die Vermeidung von lokalen Minima geeignet. Es handelt sich um einen Ansatz, der ohne Vorkenntnisse über den Verlauf der Zielfunktion angewendet werden kann. [22,90,96]

Vorgehen für den sequenziellen Ansatz

Für die mechanistische Chromatographie-Modellierung muss eine Vielzahl von Parametern bestimmt werden. Um die benötigte Rechenkapazität zu reduzieren und Uneindeutigkeiten zu vermeiden, können einzelne Parameter getrennt voneinander ermittelt werden. Dazu werden verschiedene Experimente durchgeführt, die aufeinander aufbauend die isolierte Betrachtung von Parametern ermöglichen [90,97]. Grundsätzlich wird der Parametersatz X aus Gleichung 2.59 dabei in einen Teil X_{fix} mit festen Größen für die Modellierung, die nicht angepasst werden, und X_{var} mit zu fittenden Parametern aufgeteilt [8]. Zu den von Anfang an bekannten und somit zu X_{fix} gehörenden Größen gehört beispielsweise die Flussrate, welche experimentell direkt eingestellt wird. Die in einem Schritt bestimmten Parameter X_{var} werden für die nächste Parameterschätzung X_{fix} zugeordnet, während die in diesem Aufbau neu hinzukommenden Parameter für den Fit zu X_{var} zählen [81,90,97].

Eine Möglichkeit für die Abfolge dieser Versuche und die ermittelten Parameter für eine Modellierung mit dem Transport-Dispersive-Modell (siehe Kapitel 2.4.1) ist in Tabelle 2.3 dargestellt [90]. In einem ersten Schritt wird ein Versuch mit einem Tracer ohne Säule durchgeführt. Dabei beinhaltet X_{fix} das Setup des Versuchs, was etwa die Konzentrationsprofile am Einlass und den Volumenstrom umfasst. An diesen Versuch kann nun das Totvolumen der Anlage V_{plant} und somit die Totzeit t_{plant} gefittet werden. Ab dem zweiten Schritt besteht der Versuchsaufbau auch aus der Chromatographie-Säule. Das Setup beinhaltet dabei auch Informationen über die Säulengeometrie wie das Volumen V_c . In Versuchsaufbau zwei wird ein Puls eines nicht-porengängigen Tracers auf die Säule gegeben. An das resultierende Chromatogramm lassen sich die Werte ϵ_c und D_{ax} fitten. Dazu wird in dem Modell Gleichung 2.28 vereinfacht, in dem k_{eff} auf null gesetzt wird. Mit diesen Parametern kann im dritten Schritt mittels eines porengängigen Tracers ϵ_p bestimmt werden. Dazu wird in dem Modell q in Gleichung 2.33 auf null gesetzt. Je nach Versuchsdesign besteht auch die Möglichkeit, an dieser Stelle k_{eff} zu fitten. Eine Möglichkeit für einen Tracer ist es nämlich, das zu untersuchende, grundsätzlich bindende Molekül unter nicht bindenden Bedingungen zu verwenden (beispielsweise hohe Salzkonzentration in der IEC) [98]. In diesem Fall kann der Stofftransport dieses Moleküls über k_{eff} mitbestimmt werden. Darüber hinaus bietet dieser Ansatz den Vorteil, dass die ermittelte Porosität tatsächlich dem diesen Molekül zur Verfügung stehenden Porenvolumen entspricht [99]. [90]

Tabelle 2.3: Vorgehen bei der Parameterbestimmung mit einem sequenziellen Ansatz für das Transport-Dispersive Modell.

Versuchsaufbau	Beschreibung	X_{fix}	X_{var}
1	Ohne Säule	Setup	V_{plant}
2	Nicht-porengängiger Tracer	Setup, V_{plant}	$\varepsilon_c, D_{\text{ax}}$
3	Porengängiger Tracer	Setup, $V_{\text{plant}}, \varepsilon_c, D_{\text{ax}}$	$\varepsilon_p, (k_{\text{eff}})$
4	Bindendes Molekül	Setup, $V_{\text{plant}}, \varepsilon_c, D_{\text{ax}}, \varepsilon_p, (k_{\text{eff}})$	$q(c), (k_{\text{eff}})$

Wird stattdessen ein Tracer wie Aceton verwendet, lässt sich k_{eff} des bindenden Moleküls in diesem Schritt nicht ermitteln und das zugängliche Porenvolumen wird für große Moleküle tendenziell überschätzt, da Aceton auch in Poren eindringen kann, die für diese Moleküle zu klein sind. Auf der anderen Seite führt es zu Problemen, wenn einzelne Komponenten (verschiedene bindende Moleküle) unterschiedliche zugängliche Porenvolumina aufweisen, da dies standardmäßig nicht im Modell abgebildet werden kann. [90]

Im vierten Versuchsaufbau werden dann (meist mehrere) Experimente zur Bestimmung des Adsorptionsverhaltens durchgeführt [90,100]. Das Fitting der Isothermen-Parameter und gegebenenfalls von k_{eff} erfolgt dann simultan an alle Chromatogramme dieses Schritts. Hierbei muss die Art der Isotherme bereits bekannt sein. Ebenfalls muss festgelegt werden, ob die Bindung kinetisch modelliert werden soll.

2.5.3 Kombinierte Ansätze

Die Ansätze der Parameterbestimmung aus den vorherigen Abschnitten lassen sich miteinander oder mit anderen Methoden kombinieren [101]. Rüdt et al. schlagen eine Kombination der Yamamoto-Methode mit der Betrachtung der sogenannten van Deemter-Gleichung vor [49]. Die Isothermen-Parameter werden mit der Yamamoto-Methode bestimmt, während HETP-Werte aus der Breite der Peaks nach Gleichung 2.15 für verschiedene Fließgeschwindigkeiten berechnet werden. Hieraus können mittels Regression der in Gleichung 2.60 dargestellten modifizierten van Deemter-Gleichung die Parameter D_{ax} und k_{eff} bestimmt werden. Die so erhaltenen Parameter können verwendet werden, um ein mechanistisches Modell zu betreiben. [49]

$$HETP = 2 D_{\text{ax}} + 2 \frac{1}{\varepsilon_t k_{\text{eff}}} u'_{\text{int}} \quad 2.60$$

Ein anderer Ansatz zur Bestimmung von Modellparametern der SMA-Isotherme wurde von Saleh et al. entwickelt [25]. Bei diesem Vorgehen werden das Totvolumen und die Säulenporositäten sequenziell bestimmt. Anschließend wird der Filmdiffusions-Parameter k_{eff} mithilfe von Erfahrungswerten aus einer Korrelationsgleichung ermittelt. Die Isothermen-Parameter werden in einem ersten Schritt mit der Yamamoto-Methode im niedrig konzentrierten Bereich bestimmt. Anschließend werden diese Parameter in ein kinetisches, mechanistisches Modell übernommen. Hierbei bleiben die Werte für ν und K_{eq} konstant. Die kinetische Ad- bzw. Desorptionsrate wird hingegen zusammen mit dem sterischen Faktor σ über inverses Fitting an weitere experimentelle Daten im hohen Konzentrationsbereich ermittelt. Die so erhaltene Isotherme wird durch weitere Yamamoto-Plots für verschiedene pH-Werte erweitert. Mit diesen Daten werden die zusätzlichen Parameter des pH-abhängigen SMA-Modells (siehe Gleichungen 2.12 und 2.13) regressiert. [25] Mit diesen Parametern kann ein mechanistisches Modell präzise Vorhersagen über das Retentionsverhalten bei verschiedenen pH-Werten und Prozessbedingungen treffen [25,102].

3 Einfluss der Salzspezies auf Modellproteine

In diesem Kapitel werden die Untersuchungen zur Bestimmung der Auswirkung der Salzspezies in der CEC von Modellproteinen dargestellt, wobei die Einflüsse von Kationen und Anionen separat betrachtet werden. Hierdurch sollen die aufgestellten Arbeitshypothesen, dass Salze einen relevanten und proteinspezifischen Einfluss auf die IEC haben und die Wahl des Co-Ions ebenfalls von großer Bedeutung ist, überprüft und somit die Relevanz der Salzspezies in der Prozessentwicklung von CEC-Schritten ermittelt werden. Nach der Beschreibung der verwendeten Materialien und Methoden (Kapitel 3.1) werden zuerst verschiedene Ansätze zur Vergleichbarkeit von Ionen mit unterschiedlicher Valenz untersucht (Kapitel 3.2), bevor die Einflüsse von verschiedenen Anionen- und Kationenspezies auf das Retentionsverhalten von Proteinen aufgezeigt werden (Kapitel 3.3). Abschließend werden die in diesem Kapitel gewonnen Erkenntnisse zusammengefasst (Kapitel 3.4). Teile dieses Kapitels und der hier dargestellten Ergebnisse sind bereits in der Fachliteratur veröffentlicht worden [103].

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Experimentelles Setup

Die experimentellen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an einer semi-präparativen „Azura“ Chromatographie-Anlage der Firma Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Das schematische Fließbild der Anlage ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Anlage verfügt über das Pumpensystem „Azura P6.1L“. Dieses besteht aus zwei Eluent-Pumpen (Pumpen A und B), worüber zwei Eluenten in einem beliebigen Verhältnis gefördert werden können. Beide Pumpen verfügen über ein weiteres Auswahlventil und können aus einem der Vorratsbehälter A1 oder A2 beziehungsweise B1 oder B2 fördern. Die Ströme der Pumpen werden in einer statischen Mischkammer mit 100 μL Volumen vermischt, bevor der Eluent-Strom das Injektionsventil erreicht. Hier kann der Inhalt der 50 μL Probenschleife injiziert werden.

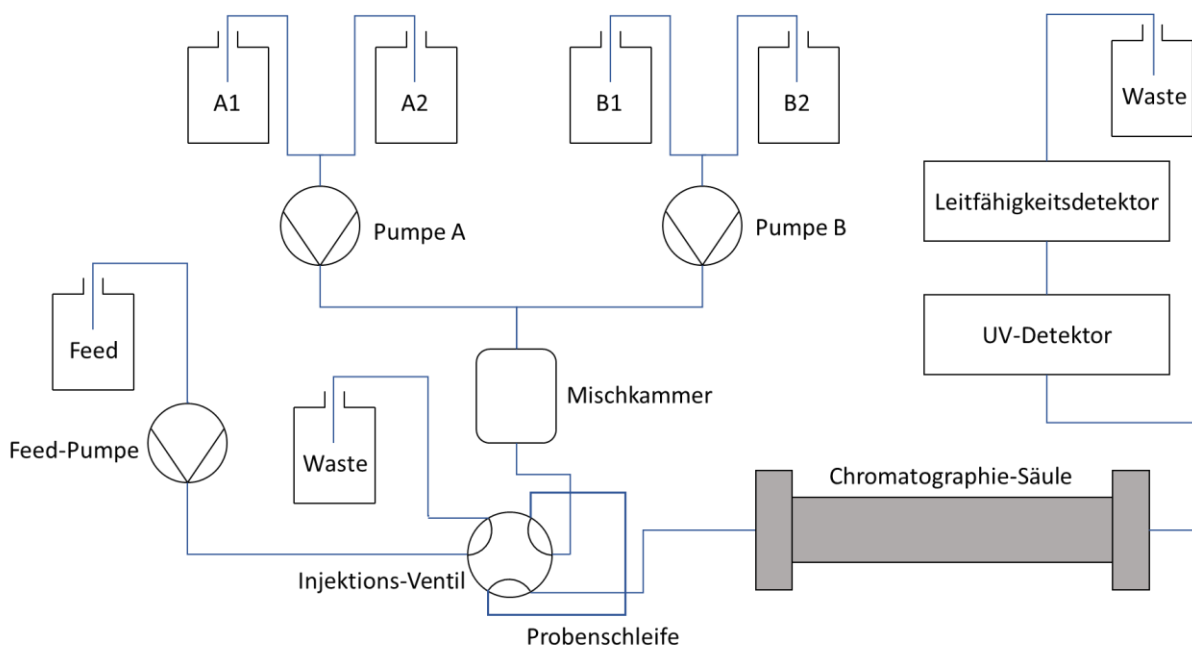


Abbildung 3.1: Fließbild der verwendeten Chromatographie Anlage.

Einfluss der Salzspezies auf Modellproteine

Die ebenfalls an das Injektionsventil angeschlossene Feed-Pumpe kann die Probenschleife vor einer Injektion mit einer Feed-Lösung befüllen. Der Eluent beziehungsweise die injizierte Feed-Lösung werden daraufhin über die Chromatographie-Säule geleitet. Am Auslass der Säule sind ein UV-Detektor „MWD 2.1L“ und ein Leitfähigkeitssensor angeschlossen. Die Anlage wird über einen angeschlossenen Computer mit der Software „PurityChrom Version 5.09.036“ von Knauer gesteuert. Die verwendete Chromatographie-Säule ist die vorgepackte Kationenaustausch-Säule „HiScreen SP Sepharose High Performance“ von Cytiva (Marlborough, USA). Die Säule besteht aus Polypropylen und verfügt bei einer Länge von 10 cm über ein Volumen von 4,7 mL. Sie ist mit Agarosepartikeln mit einem mittleren Durchmesser von 34 μm gepackt, die mit der starken Kationenaustausch-Gruppe Sulfopropyl funktionalisiert sind.

3.1.2 Zusammensetzung der Puffer

Für die Untersuchung des Salzeinflusses werden verschiedene Puffer hergestellt. Diese können grundsätzlich in Hochsalz- und Niedrigsalzpuffer eingeteilt werden. Ein Niedrigsalzpuffer besteht aus einem 20 mM Essigsäure/Acetat Puffer. Dazu werden die Massen für 15,5 mM Essigsäure und 4,5 mM Acetat-Salz abgewogen. Das Kation des Acetat-Salzes entspricht dabei für jeden Versuch dem im Hochsalzpuffer zugegebenen Kation (beispielsweise wird Natriumacetat für die Untersuchungen mit NaCl verwendet). Der Hochsalzpuffer enthält ebenfalls dieses Puffersystem und darüber hinaus Salz mit einer Kationen- oder Anionenstärke von 1 M (siehe Gleichung 2.17 in Kapitel 2.3.1). Abschließend werden alle Puffer auf einen pH-Wert von vier titriert, wobei die Säure beziehungsweise Base des im Hochsalzpuffer bereits enthaltenen Anions beziehungsweise Kations verwendet wird. So wird für die Untersuchung mit NaCl Salzsäure (HCl) oder Natriumhydroxid (NaOH) zur Titration verwendet. Es werden die Chlorid-Salze von fünf verschiedenen Kationen sowie die Natrium-Salze von fünf verschiedenen Anionen betrachtet. Die verwendeten Salze und ihre Valenzen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Übersicht über die verwendeten Salze und ihre Valenzen sowie die resultierenden Kationenstärken I_c beziehungsweise Anionenstärken I_a .

Salz		Valenz z_i		I_c bei I_a von 1 M	I_a bei I_c von 1 M
Name	Summenformel	Anion	Kation		
Natriumchlorid	NaCl	1	1	1	1
Kaliumchlorid	KCl	1	1	1	1
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	1	1	1	1
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	1	2	2	0,5
3-Hydroxy-1-propanaminiumchlorid	C ₃ H ₁₀ NOCl	1	1	1	1
Natriumsulfat	Na ₂ SO ₄	2	1	0,5	2
Natriumcitrat	NaC ₆ H ₇ O ₇	1-3	1	0,57	1,74
Natriumtartrat	NaC ₄ H ₅ O ₆	1-2	1	0,56	1,81
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	1	1	1	1

Einfluss der Salzspezies auf Modellproteine

Es werden die Einflüsse auf die drei Modellproteine α -Chymotrypsin (ACH), BSA und LYZ untersucht. Mit diesen Modellproteinen wird eine große Bandbreite an Eigenschaften abgedeckt, da sich die Proteine sowohl in ihrem pI als auch in ihrer molekularen Masse \tilde{M} stark unterscheiden. BSA hat eine molekulare Masse von 66,4 kDa und einen pI von 4,7, LYZ eine molekulare Masse von 14,3 kDa und einen pI von 11 sowie ACH eine molekulare Masse von 25 kDa und einen pI von 7,8 [59,104,105]. Es wurden Proteinlösungen angefertigt, indem jeweils ein Protein mit einer Konzentration von 0,2 mM in Niedrigsalzpuffer gelöst wurde.

Für eine Evaluierung der Vergleichbarkeit von Ionen mit unterschiedlichen Valenzen werden für jedes Salz zum einen Hochsalzpuffer mit einer Kationenstärke von 1 M und zum anderen Hochsalzpuffer mit einer Anionenstärke von 1 M angesetzt. Haben Anion und Kation dieselbe Valenz, entspricht wie in Tabelle 3.1 zu erkennen die Anionenstärke der Kationenstärke und es wird nur ein Puffer benötigt.

Für die Berechnung der Valenzen und Ionenstärken wird davon ausgegangen, dass alle Salze außer Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4), Natriumcitrat ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$) und Natriumtartrat ($\text{NaC}_4\text{H}_5\text{O}_6$) vollständig dissoziiert vorliegen [13,70]. NaH_2PO_4 wird als vollständig monovalent vorliegend betrachtet [106]. Der 3-Hydroxy-1-propanaminiumchlorid-Puffer wird durch die äquimolare Zugabe von HCl und Aminopropanol hergestellt. Das Dissoziationsverhalten von $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ und $\text{NaC}_4\text{H}_5\text{O}_6$ ist bei pH 4 stark von der Ionenstärke abhängig. Die Speziesverteilung wurde mit den von DeRobertis et al. veröffentlichten Daten für die pK_s Werte in einer 1 M NaCl-Lösung berechnet [107,108].

Pufferzusammensetzung für Citrat- und Tartrat-Salze

Die Zusammensetzung der Citrat- und Tartrat-Puffer ist aufgrund der vier (Citrat) beziehungsweise drei (Tartrat) Ladungsvarianten der Moleküle komplexer als bei den anderen Salzen. Es wird ein Ansatz benötigt, mit dem die Pufferzusammensetzung für einen festen pH-Wert berechnet werden kann. Hierzu wird zunächst die Henderson-Hasselbach-Gleichung betrachtet (Gleichung 3.1) [109]:

$$\text{pH} = \text{pK}_s + \log\left(\frac{c_{A^-}}{c_{\text{HA}}}\right) \quad 3.1$$

Hierbei steht c_{HA} für die Konzentration der protonierten Spezies und c_{A^-} für die Konzentration der deprotonierten Spezies. Für die Citronensäure gibt es drei pK_s Werte und somit vier Spezies. Diese unterschiedlich protonierten Varianten werden im Folgenden als H_3A , H_2A^- , HA^{2-} und A^{3-} bezeichnet. Auch die pK_s Werte werden nummeriert. $\text{pK}_{s,1}$ beschreibt dabei den Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der Spezies H_3A und H_2A^- , $\text{pK}_{s,2}$ zwischen H_2A^- und HA^{2-} und $\text{pK}_{s,3}$ zwischen HA^{2-} und A^{3-} . Zusätzlich ergibt die Summe aller Spezies-Konzentrationen die Gesamtkonzentration c_{ges} :

$$c_{\text{ges}} = c_{\text{H}_3\text{A}} + c_{\text{H}_2\text{A}^-} + c_{\text{HA}^{2-}} + c_{\text{A}^{3-}} \quad 3.2$$

Bei gegebener Gesamtkonzentration und pH-Wert lässt sich somit mit den drei Henderson-Hasselbach-Gleichungen der verschiedenen pK_s Werte sowie Gleichung 3.2 ein Gleichungssystem aus vier Gleichungen mit den vier unbekanntenen Spezieskonzentrationen aufstellen. Somit ist das Gleichungssystem vollständig bestimmbar. Gleichung 3.3 stellt die resultierende Gleichung für das Verhältnis von $c_{\text{H}_2\text{A}^-}$ zu c_{ges} dar:

$$\frac{c_{\text{H}_2\text{A}^-}}{c_{\text{ges}}} = (10^{\text{pH}-\text{pK}_{s,2}} \cdot 10^{\text{pH}-\text{pK}_{s,3}} + 10^{\text{pH}-\text{pK}_{s,2}} + 10^{-(\text{pH}-\text{pK}_{s,1})} + 1)^{-1} \quad 3.3$$

Aus den Henderson-Hasselbach-Gleichungen können nun die weiteren Verhältnisse der Spezies-Konzentrationen zu der Gesamtkonzentration berechnet werden. Die detaillierte Berechnung der Speziesverteilung und des daraus resultierenden Verhältnisses von Natrium- zu Citrat-beziehungsweise Tartrat-Ionen sowie die Herleitung von Gleichung 3.3 ist im Anhang A.3 dargestellt. Für die Puffererstellung wurde die benötigte Natrium Konzentration in Form von NaOH vorgelegt und

Einfluss der Salzspezies auf Modellproteine

dann Citronensäure im berechneten Stoffmengenverhältnis 1:1,4 oder Weinsäure im Verhältnis 1:1,6 zugegeben. Der sich einstellende pH-Wert zeigte eine gute Übereinstimmung mit dem Zielwert von 4.

3.1.3 Versuchsdurchführung

Alle Versuche wurden unter Umgebungsbedingungen in einem auf 22°C temperierten Labor durchgeführt. Die Retentionszeiten der Komponenten wurde am UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Zur Ermittlung der Totzeit der Anlage wurden Tracer-Versuche mit einer 1% Aceton-Lösung durchgeführt. Anschließend wurde dieser Tracer ebenfalls verwendet, um die Retentionszeit t_0 einer nicht bindenden Komponente zu bestimmen (siehe Kapitel 2.2.1). Für diese Experimente wurde eine Flussrate von 0,5 mL/min verwendet.

Vor Beginn eines Proteinversuchs wurde die Säule bei einer Flussrate von 1 mL/min mit 6 Säulenvolumen (*Column Volumes* [CV]) Hochsalzpuffer gespült und anschließend mit 6 CV Niedrigsalzpuffer equilibriert. Für die LGE wurde die Flussrate auf 0,5 mL/min verringert. Zu Beginn eines Versuchs wurden 50 µL der jeweiligen Proteinlösung über die Probenschleife injiziert. Anschließend wurde für 2 CV mit Niedrigsalzpuffer gespült, bevor über eine Dauer von 15 CV der Anteil des Hochsalzpuffers bei konstanter Flussrate linear von 0% auf 100% erhöht wurde. Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und die erhaltenen Retentionszeiten gemittelt.

Im Laufe der LGE verändert sich die Ionenstärke der mobilen Phase. Hierdurch wird das Dissoziationsverhalten von Citrat und Tartrat beeinflusst, was zu einer leichten Erhöhung des pH-Werts führt. Diese Erhöhung ist bei einem Anteil des Hochsalzpuffers von etwa 6% maximal und liegt bei 0,2 für Citrat und 0,19 für Tartrat. Bei höheren Anteilen an Hochsalzpuffer sinkt der pH-Wert wieder und nähert sich wieder einem Wert von 4 an.

Für die Auswertung der Retentionszeiten werden der Retentionsfaktor k' und der Separationsfaktor α verwendet (siehe Kapitel 2.2.1). Um eine mögliche Änderung der Retentionsreihenfolge sichtbar zu machen, werden die Komponenten 1 und 2 von $\alpha_{1,2}$ nach dem Retentionsverhalten mit NaCl zugewiesen (siehe Gleichung 2.6). Ein $\alpha_{1,2} < 1$ bedeutet in diesem Fall, dass die Komponenten ihre Retentionsreihenfolge im Vergleich zu NaCl geändert haben

3.2 Vergleichbarkeit für Ionen mit unterschiedlicher Valenz

Abbildung 3.2 zeigt die Retentionsfaktoren der drei Proteine ACH, LYZ und BSA mit allen untersuchten Salzen bei a) einer konstanten Kationenstärke sowie b) einer konstanten Anionenstärke (siehe Tabelle 3.1). An dieser Stelle soll noch keine detaillierte Untersuchung von Effekten der Salzspezies sondern eine Betrachtung von grundsätzlichen Trends durch den Einfluss von Ionenvalenzen erfolgen. Es gibt fünf Datenpunkte pro Protein bei einer a) Anionenstärke und b) Kationenstärke von 1 M. Diese Punkte gehören zu den fünf Salzen, die aus einem monovalenten Kation und einem monovalenten Anion bestehen und deren Anionen- und Kationenstärke somit immer denselben Wert haben. Daher sind diese Datenpunkte in den beiden Graphen identisch. In Abbildung 3.2 b) fehlen zwei Datenpunkte für BSA. Bei Na_2SO_4 mit einer Kationenstärke von 0,5 M und bei $\text{NaC}_4\text{H}_5\text{O}_6$ mit 0,56 M konnten keine klaren BSA-Peaks identifiziert werden, da das Messsignal zu gering war und vom Baseline-Rauschen überlagert wurde.

Abbildung 3.2 a) lässt keinen klaren Trend zwischen der Anionenstärke und dem resultierenden k' -Wert eines Proteins erkennen. Über das gesamte Spektrum der Anionenstärke liegen die Retentionsfaktoren in einem ähnlichen Bereich. Abbildung 3.2 b) zeigt andererseits einen klaren Zusammenhang zwischen den k' -Werten und der Kationenstärke: Für jedes der untersuchten Proteine sinkt der Retentionsfaktor mit steigender Kationenstärke.

Einfluss der Salzspezies auf Modellproteine

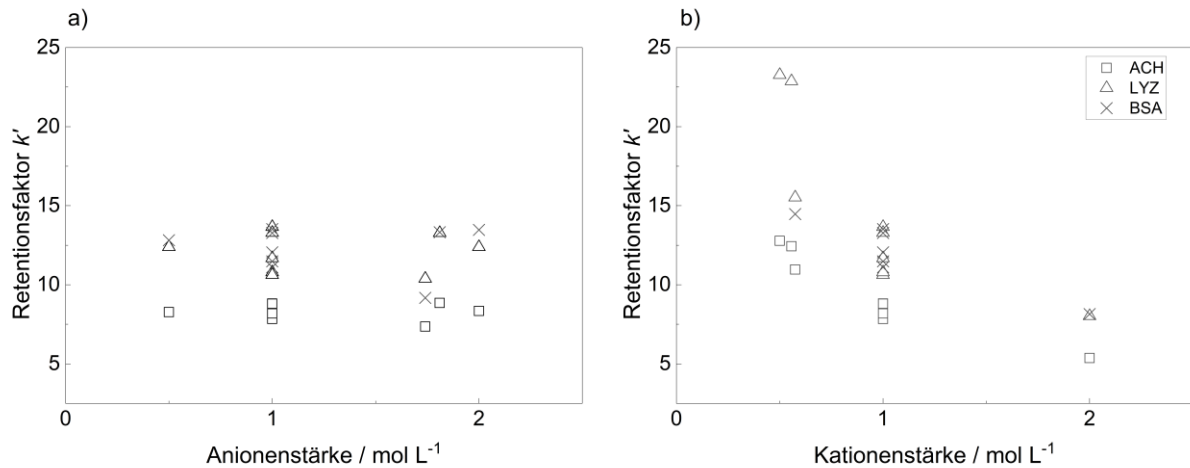


Abbildung 3.2: Retentionsfaktoren der Modellproteine mit den untersuchten Salzen bei a) einer konstanten Kationenstärke von 1 M und b) einer konstanten Anionenstärke von 1 M über der resultierenden a) Anionenstärke beziehungsweise b) Kationenstärke im Hochsalzpuffer, nach [103].

Diese deutliche Korrelation zwischen der Austauschionenstärke und dem Retentionsverhalten passt zu dem in Literaturdaten erkennbaren Verhalten von niedrigeren Retentionszeiten bei höheren Valenzen der Austauschionen bei gleicher Austauschionen-Konzentration [11,16]. Das Verhalten lässt sich gut mit der Wirkweise des Ionentauschers erklären: Die höhere Ladung der Ionen führt zu einer stärkeren elektrostatischen Anziehung zu der stationären Phase, wodurch sie bereits gebundene Moleküle besser von dieser verdrängen können.

Für die Untersuchung von Salz-Effekten auf das Retentionsverhalten von Proteinen und die Identifikation von proteinspezifischen Effekten ist ein solches Verhalten bei konstanter Co-Ionenstärke ungünstig. Vergleicht man unter diesen Bedingungen die Retentionszeiten eines Proteins bei zwei Salzen mit unterschiedlichen Valenzen, so führt die Änderung der Austausch-Ionenstärke zu einer Änderung der Retentionszeit, die hauptsächlich von den Valenzen der beteiligten Ionen bestimmt wird. Weitere Effekte, die an die konkrete Ionenspezies gekoppelt sind, wie etwa proteinspezifische Effekte, könnten hiervon überlagert werden und wären schwieriger zu erkennen. Das Fehlen eines klaren Trends für die konstante Kationenstärke bestätigt, dass dieses Verhalten nicht bei einer Änderung der Co-Ionenstärke auftritt. Diese Herangehensweise ist daher gut dazu geeignet, den Einfluss von Salzspezies losgelöst von ihrer Valenz auf das Retentionsverhalten von Proteinen zu beschreiben und proteinspezifische Effekte zu identifizieren. Daher werden für die weitere Auswertung nur die Versuche bei konstanter Kationenstärke aus Abbildung 3.2 a) berücksichtigt.

3.3 Auswirkung der Auswahl von Kationen- und Anionenspezies

3.3.1 Untersuchung des Retentionsverhaltens

Einfluss der Kationenspezies

Die Retentionsfaktoren der Modellproteine für die Chlorid-Salze der untersuchten Kationen bei einer Kationenstärke von 1 M im Hochsalzpuffer sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Retentionsfaktoren von ACH sind signifikant geringer als die von BSA und LYZ, welche bei allen Kationen jeweils ähnliche Retentionsfaktoren zueinander aufweisen. ACH weist den geringsten k' -Wert bei NaCl und den höchsten bei NH₄Cl auf, während die Retentionsfaktoren für die weiteren Kationen sehr ähnlich sind. Bei BSA erhöhen sich die Retentionsfaktoren in der Reihenfolge NaCl < KCl < NH₄Cl < MgCl₂ < C₃H₁₀NOCl. Diese Reihenfolge der BSA-Elution ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Liu

Einfluss der Salzspezies auf Modellproteine

und Shi für verschiedene Kationenaustauscher-Harze [13]. Die Reihenfolge der Retentionsfaktoren von LYZ mit den verschiedenen Salzen ist $\text{KCl} < \text{NaCl} < \text{NH}_4\text{Cl} < \text{MgCl}_2 < \text{C}_3\text{H}_{10}\text{NOCl}$. Die relative Änderung zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Retentionsfaktor mit den verschiedenen Kationen beträgt 25% für LYZ, 20% für BSA und 12% für ACH.

In diesen Daten lassen sich sowohl proteinspezifische als auch nicht-spezifische Salzeinflüsse erkennen. Die Ähnlichkeiten im Retentionsverhalten von BSA und LYZ deuten auf eine Abstufung der Elutionsstärke der Ionen hin, nach der $\text{C}_3\text{H}_{10}\text{NOCl}$ die geringste Elutionsstärke aufweist, gefolgt von MgCl_2 und NH_4Cl . Dies deutet auf nicht-spezifische Einflüsse hinter diesen Effekten hin. Die geringe Elutionsstärke von $\text{C}_3\text{H}_{10}\text{NOCl}$ lässt sich gut durch die Molekülstruktur erklären: Es ist das mit Abstand größte der untersuchten Ionen, sodass eine sterische Hinderung der elektrostatischen Interaktion mit dem Adsorbens wahrscheinlich ist. Des Weiteren üben die an die geladene Amin-Gruppe angrenzenden CH_2 -Gruppen einen induktiven Effekt auf diese aus, welcher das Elektronendefizit an der geladenen Gruppe verringert [110]. Diese Effekte beeinflussen die Kation – Adsorbens Interaktion und sind somit unabhängig vom jeweiligen Protein. Auch in der Literatur führen für andere Proteine Magnesium und Ammonium zu höheren Retentionsfaktoren als Natrium und Kalium [13]. Für ACH konnte dieser Trend nicht beobachtet werden. Die sehr ähnlichen Retentionsfaktoren von KCl , MgCl_2 und NH_4Cl sind daher auf proteinspezifische Effekte zurückzuführen. Diese Abweichung von der üblichen Elutionsreihenfolge könnte dafür genutzt werden, die Trennung von ACH von BSA oder LYZ zu verbessern, indem Magnesium oder Ammonium statt Natrium oder Kalium als Kation verwendet werden. Eine weitergehende Diskussion des Einflusses auf die Trennung erfolgt in Kapitel 3.3.2.

Ein weiterer proteinspezifischer Effekt lässt sich auf LYZ erkennen: Während für ACH und BSA die geringsten Retentionszeiten mit Natrium erreicht werden, ist dies für LYZ mit Kalium der Fall. Diese einwertigen Ionen stammen beide aus der Gruppe der Alkali-Metalle, was die Vermutung nahelegt, dass die beobachtbaren Effekte hauptsächlich auf die Größe der Ionen zurückzuführen sind.

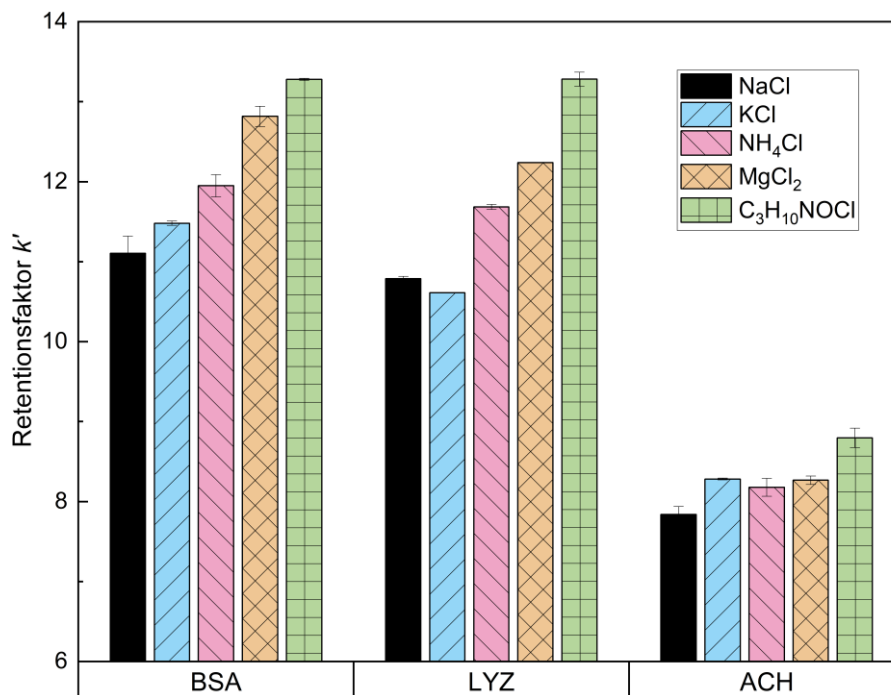


Abbildung 3.3: Retentionsfaktoren der Modellproteine mit Standardabweichungen für Chlorid-Salze von verschiedenen Kationen bei einer Kationenstärke von 1 M im Hochsalzpuffer, nach [103].

Einfluss der Salzspezies auf Modellproteine

Das bedeutet, dass die Ionengröße nicht nur für die Ion – Adsorbens Interaktion eine wichtige Rolle spielen kann, sondern auch für die Ion – Protein Interaktion. Eine Möglichkeit, diese Beobachtung zu erklären, ist die Abschirmung von negativen Proteinladungen: Je nach Struktur und Ladungsverteilung der Proteinoberfläche können die negativen Ladungen besser oder schlechter erreichbar sein und die Ladungsabschirmung somit stärker oder schwächer von der Kationengröße abhängig sein.

Ein möglicher Einfluss der Salzspezies auf die Proteine ist die Modulierung von hydrophoben Effekten, die in der Hofmeister-Reihe eingeordnet werden (siehe Kapitel 2.3.1). Die beobachtete Elutions-Reihenfolge der Proteine mit den verschiedenen Kationen steht allerdings in keinem Zusammenhang mit der Einordnung der Kationen in die Hofmeister-Reihe, bei der die chaotropen Effekte in der Reihe Ammonium < Kalium < Natrium < Magnesium zunehmen [111]. Für 3-Hydroxy-1-propanaminium wurde keine Einordnung in der Literatur gefunden. Bei der Auswertung muss auch berücksichtigt werden, dass $MgCl_2$ in geringeren Konzentrationen vorliegt als die monovalenten Kationen. Das Fehlen eines klaren Trends entlang der Hofmeister-Reihe zeigt auf, dass die kosmotropen Effekte der Salze nicht der alleinige Faktor für deren Einfluss auf das Elutionsverhalten der Proteine sind.

Einfluss der Anionenspezies

Die Retentionsfaktoren der Modellproteine für die Natrium-Salze der untersuchten Anionen bei einer Kationenstärke von 1 M im Hochsalzpuffer sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Die k' -Werte für NaCl entsprechen denen in Abbildung 3.3. Die Retentionsfaktoren für LYZ erhöhen sich in der Reihenfolge $NaC_6H_7O_7 < NaCl < Na_2SO_4 < NaC_4H_5O_6 < NaH_2PO_4$ und für ACH in der Reihenfolge $NaC_6H_7O_7 < NaCl < Na_2SO_4 < NaH_2PO_4 < NaC_4H_5O_6$, wobei die Änderung zwischen den beiden letztgenannten Salzen sehr gering ist und innerhalb der Standardabweichung liegt. Für BSA folgen die k' -Werte dem Trend $NaC_6H_7O_7 < NaCl < NaC_4H_5O_6 < Na_2SO_4 < NaH_2PO_4$, wobei die Änderung zwischen Sulfat und Phosphat ebenfalls innerhalb der Standardabweichung liegt. Die relative Änderung der Retentionsfaktoren mit den verschiedenen Anionen beträgt 47% für BSA, 32% für LYZ und 20% für ACH.

Für alle Proteine ist die Elutionsreihenfolge mit den verschiedenen Anionen ähnlich, was das Vorhandensein von nicht-spezifischen Effekten der Co-Ionenspezies auf das Retentionsverhalten der Proteine zeigt. Wie für die Kationen lässt sich auch für die Anionen kein klarer Zusammenhang mit der Einordnung der Ionen in die Hofmeister-Reihe erkennen, wonach Citrat den geringsten und Chlorid den stärksten chaotropen Effekt aufweist [66,111,112]. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Modulation der hydrophoben Effekte einen entscheidenden Anteil für diesen nicht-proteinspezifischen Beitrag zur Proteinretention der Co-Ionen hat. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Anionen unterschiedliche Valenzen haben und daher in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen, was den Vergleich der insgesamt resultierenden chaotropen Effekte erschwert.

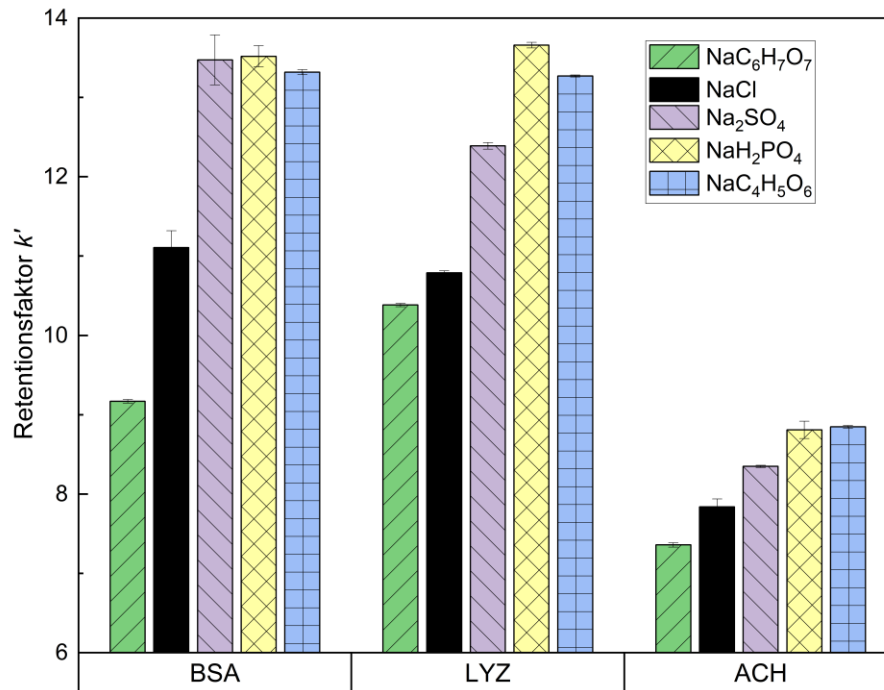


Abbildung 3.4: Retentionsfaktoren der Modellproteine mit Standardabweichungen für Natrium-Salze von verschiedenen Anionen bei einer Kationenstärke von 1 M im Hochsalzpuffer, nach [103].

Darüber hinaus lassen sich jedoch auch proteinspezifische Effekte der Anionen erkennen. Für BSA ist der k' -Wert mit $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ um 21% geringer als der mit NaCl , während dieses Verhältnis für ACH nur 7% und für LYZ nur 4% beträgt. Des Weiteren sind die Retentionsfaktoren von BSA mit Na_2SO_4 und NaH_2PO_4 mit einer Abweichung von 1% fast identisch, während die Änderungen für ACH 4% und für LYZ 9% betragen. Die höchsten k' -Werte für BSA und LYZ treten mit NaH_2PO_4 auf, während der höchste Retentionsfaktor von ACH mit $\text{NaC}_4\text{H}_5\text{O}_6$ zu sehen ist. Ein Vergleich der Retentionsfaktoren zwischen den Proteinen für einzelne Salze zeigt außerdem, dass sich die Reihenfolge der Elution von BSA und LYZ ändert: Mit $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ und NaH_2PO_4 eluiert BSA vor LYZ, während mit NaCl und Na_2SO_4 LYZ den geringeren k' -Wert aufweist. Diese Änderung der Elutions-Reihenfolge ist ein klarer Indikator für das Auftreten von proteinspezifischen Effekten bei den untersuchten Anionen. Die Änderungen der Retentionsfaktoren mit den Co-Ionen folgen keinem erkennbaren Trend bei dem Einfluss der Ladung oder der Größe. Die beiden Anionen organischer Säuren, Citrat und Tartrat, welche eine relativ hohe Ladung aufweisen und die größten der untersuchten Anionen sind, liegen an unterschiedlichen Enden des Retentionsfaktor-Spektrums. Für alle untersuchten Proteine führt Citrat zu den niedrigsten und Tartrat zu hohen k' -Werten. Die Werte für das kleine und monovalente Chlorid liegt jeweils zwischen den Werten von Citrat und Tartrat. Daraus folgt, dass sich kein direkter Zusammenhang zwischen den Anionen-Charakteristika wie Größe oder Ladung und dem resultierenden Retentionsfaktor eines Proteins ableiten lässt.

Insgesamt ist der beobachtete Einfluss der Anionen-Spezies auf das Retentionsverhalten der Proteine größer als der Einfluss der Kationen-Spezies, obwohl die Kationen die Austausch-Ionen in der CEC sind. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass mit Citrat und Tartrat zwei der Anionen auch zu leichten Schwankungen des pH-Werts führen, was ein weiterer Einflussfaktor sein und die verschiedenen Proteine unterschiedlich beeinflussen könnte. Dieser Effekt könnte auch zu dem besonders niedrigen Retentionsfaktor von BSA mit Citrat beitragen, da der pI von BSA am nächsten am pH-Wert der Experimente liegt. Da jedoch derselbe pH-Effekt auch für Tartrat auftritt, das für alle Proteine zu hohen k' -Werten führt und bei dem LYZ und BSA zur gleichen Zeit eluieren, wird der

Einfluss der Salzspezies auf Modellproteine

Einfluss von Citrat auf BSA vermutlich nicht hauptsächlich durch die pH-Schwankung erzeugt. Hearn et al. beschreiben einen größeren Einfluss der Anionenspezies in der AEC als den der Kationenspezies in der CEC unter isokratischen Bedingungen [61]. Sie schreiben diesen Effekt der größeren Varianz der untersuchten Anionen in Ladung und Größe zu. Auch in dieser Arbeit sind die untersuchten Anionen insgesamt vielseitiger in Bezug auf Größe und Ladungsverteilung als die untersuchten Kationen. Auch wenn mit 3-Hydroxy-1-propanaminium ein Kation mit deutlich höherer molekularer Masse verwendet wird, ist der Größenbereich, den die Anionen abdecken, immer noch weiter gefasst. Daher kann der hier beobachtete größere Einfluss der Anionenspezies auch mit ihrer größeren Vielfältigkeit und Komplexität zusammenhängen.

3.3.2 Einfluss auf die Proteintrennung

Die Auswahl der Anionen führt für die hier untersuchten Moleküle zwar zu einer stärkeren Änderung der Retentionszeiten für die einzelnen Proteine als die der Kationen, der Einfluss auf die Proteintrennung wird aber durch die Unterschiede in den Einflüssen auf die einzelnen Proteine verursacht. Um diese Effekte zu untersuchen, wird der Separationsfaktor α (siehe Kapitel 2.2.1) für die möglichen Protein-Paare BSA/LYZ, BSA/ACH und LYZ/ACH berechnet. Tabelle 3.2 bietet eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse. Ein $\alpha < 1$ bedeutet hierbei eine Änderung der Retentionsreihenfolge der Proteine im Vergleich zu NaCl.

Die Separationsfaktoren für die Trennung von BSA oder LYZ von ACH sind alle größer als 1 und weisen signifikant höhere Werte als für die Trennung von BSA und LYZ auf, da ACH allgemein deutlich früher eluiert als BSA und LYZ. Die Trennung von BSA und LYZ ist schwieriger, sodass die Separationsfaktoren näher um den Wert 1 liegen. Für die Salze $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ und NaH_2PO_4 ergeben sich Werte von $\alpha < 1$, die Elutionsreihenfolge von BSA und LYZ ändert sich also bei einzelnen Anionen. Es lässt sich erkennen, dass sowohl $\alpha_{\text{BSA,LYZ}}$ als auch $\alpha_{\text{BSA,ACH}}$ für $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ deutlich niedrigere Werte als für die anderen Salze annehmen. Dies bestätigt noch einmal das Vorhandensein eines proteinspezifischen Effekts von Citrat auf BSA.

Tabelle 3.2: Separationsfaktor $\alpha_{1,2}$ für jedes Paar der untersuchten Proteine für die verwendeten Salze bei einer Kationenstärke von 1 M im Hochsalzpuffer. Die Zuordnung als Komponente (Komp.) 1 oder 2 erfolgt nach absteigenden Retentionsfaktoren mit NaCl, nach [103].

Salz	Separationsfaktor $\alpha_{1,2}$					
	Komp. 1	Komp. 2	Komp. 1	Komp. 2	Komp. 1	Komp. 2
	BSA	LYZ	BSA	ACH	LYZ	ACH
NaCl	1,03		1,42		1,38	
KCl	1,08		1,39		1,28	
NH ₄ Cl	1,03		1,46		1,42	
MgCl ₂	1,05		1,55		1,48	
C ₃ H ₁₀ NOCl	1,00		1,51		1,51	
Na ₂ SO ₄	1,09		1,55		1,48	
NaC ₆ H ₇ O ₇	0,88		1,22		1,41	
NaC ₄ H ₅ O ₆	1,00		1,51		1,50	
NaH ₂ PO ₄	0,99		1,48		1,55	

Einfluss der Salzspezies auf Modellproteine

Für eine weitere Untersuchung der Auswirkung der Kationen- und der Anionen-Auswahl wird das Verhältnis des maximalen Separationsfaktors α_{\max} zum minimalen Separationsfaktor α_{\min} für jedes Protein-Paar betrachtet, die über die Kationen- bzw. Anionen Auswahl erreicht werden kann. Für die Anionen-Auswahl werden also alle Natrium-Salze aus Tabelle 3.2 in Betracht gezogen und für die Kationen-Auswahl alle Chlorid-Salze. Die resultierende Separationsänderung ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Für die Trennung von BSA und LYZ wird die maximale Separationsänderung durch die Anionen-Auswahl über $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ und Na_2SO_4 und durch die Kationen-Auswahl über NaCl und KCl erreicht. Die Änderung von $\alpha_{\text{BSA,ACH}}$ durch die Anionen-Auswahl ist maximal mit $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_7$ und Na_2SO_4 und durch die Kationen-Auswahl mit KCl und MgCl_2 . Die Salz-Paare mit der höchsten Auswirkung auf $\alpha_{\text{LYZ,ACH}}$ sind NaCl und NaH_2PO_4 für die Anionen-Auswahl sowie KCl und MgCl_2 für die Kationen-Auswahl.

Beide Separationsfaktoren, die BSA beinhalten, werden am stärksten durch einen Anionen-Wechsel von Citrat zu Sulfat beeinflusst, während $\alpha_{\text{LYZ,ACH}}$ die höchste Änderung bei einem Kationen-Wechsel von Kalium zu Magnesium zeigt. Für jedes Protein-Paar beinhaltet die maximale Separationsänderung somit ein Salz, das einen proteinspezifischen Einfluss aufweist (siehe Kapitel 3.3.1). Die erreichbaren Separationsänderungen liegen hierbei zwischen 16% und 30%. Die beobachteten proteinspezifischen Effekte der Salze haben somit einen signifikanten Einfluss auf die erreichbare Separation der Proteine, wodurch die erste Arbeitshypothese bestätigt wird (siehe Kapitel 1.1).

Die Trennung von BSA und LYZ sowie die Trennung von BSA und ACH werden deutlich stärker von der Anionen-Auswahl beeinflusst, während die Kationen-Auswahl einen höheren Einfluss auf die Trennung von LYZ und ACH hat. Insgesamt hat die Anionen-Auswahl bei den untersuchten Molekülen einen größeren Einfluss auf die Proteintrennung als die Kationen-Auswahl. Hierbei sollte beachtet werden, dass dies hauptsächlich durch einen proteinspezifischen Effekt von Citrat auf BSA verursacht wird. Doch auch ohne die Berücksichtigung von Citrat sind die erreichbaren Änderungen über die Kationen- und die Anionen-Auswahl in einem ähnlichen Bereich. Diese Ergebnisse zeigen die Möglichkeit von signifikanten Verbesserungen der Proteintrennung in der CEC durch die Anionen-Auswahl. Daher sollte beim Design eines IEC-Schrittes sowohl der Einfluss verschiedener Gegenionen als auch verschiedener Co-Ionen untersucht werden.

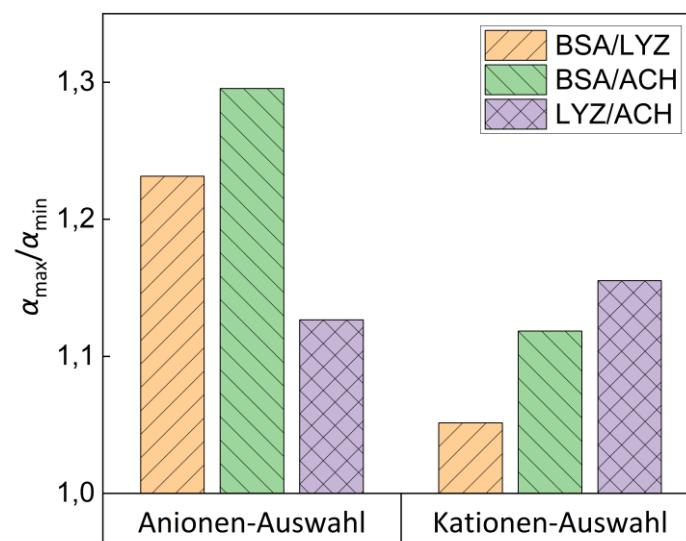


Abbildung 3.5: Verhältnis des maximalen Separationsfaktors α_{\max} zum minimalen Separationsfaktor α_{\min} für sowohl die verschiedenen Anionen von Natrium-Salzen als auch die verschiedenen Kationen von Chlorid-Salzen, nach [103].

Einfluss der Salzspezies auf Modellproteine

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muss beachtet werden, dass die Experimente mit einer festen Kationenstärke und somit einer variablen Anionenstärke durchgeführt wurden. Daraus folgt, dass die Änderungen der gesamten Ionenstärke für multivalente Anionen höher ausfallen. Zwar folgen die Retentionsfaktoren keinem klaren Trend im Zusammenhang mit der Anionenstärke (siehe Kapitel 3.2), die höhere Varianz der Lösungseigenschaften könnte aber dennoch die Proteintrennung beeinflussen. Unter diesen Bedingungen kann die Auswahl der Anionen in der CEC von der gleichen oder sogar von einer höheren Bedeutung sein als die Auswahl der Kationen. Somit wird die zweite Arbeitshypothese, dass auch die Wahl des Co-Ions für IEC-Prozesse von großer Bedeutung ist, durch die vorliegenden Daten bestätigt.

3.4 Fazit

In diesem Kapitel wurde der Einfluss der Kationen- und der Anionen-Auswahl auf das Retentionsverhalten von Modellproteinen in der CEC untersucht. Hierzu wurde in einem ersten Schritt die Eignung von konstanten Kationen- und konstanten Anionenstärken zum Vergleich von Salzeffekten von Ionen mit unterschiedlicher Valenz bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass bei der Verwendung derselben Kationenstärke die resultierende Anionenstärke keinen eindeutigen Einfluss auf das Retentionsverhalten aufweist. Somit wurde die Verwendung der konstanten Austausch-Ionenstärke als ein geeigneter Ansatz zum Vergleich von Salzeffekten von Ionen mit unterschiedlicher Valenz in der CEC nachgewiesen.

Hierauf aufbauend wurden die Retentionszeiten von BSA, LYZ und ACH mit fünf unterschiedlichen Anionen sowie mit fünf unterschiedlichen Kationen bestimmt und miteinander verglichen. Hierbei wurden sowohl nicht-spezifische als auch proteinspezifische Effekte der Salzspezies beobachtet. Zu den proteinspezifischen Effekten zählen ein Einfluss von Citrat auf BSA in Richtung niedriger Retentionszeiten und ein Einfluss von Sulfat auf BSA in Richtung höherer Retentionszeiten. Es ließ sich kein klarer Zusammenhang zwischen resultierender Retentionszeit und der Einordnung der Salze in die Hofmeister-Reihe oder der Ionengröße oder -ladung feststellen. Insgesamt war der Einfluss der Anionenspezies größer als der Einfluss der Kationenspezies. Dies unterstreicht die große Bedeutung, die die Auswahl des Co-Ions haben kann.

Somit wurden in diesem Kapitel sowohl die erste Arbeitshypothese, dass Salze einen relevanten und proteinspezifischen Einfluss auf die CEC von Proteinen ausüben, als auch die zweite Arbeitshypothese, dass die Wahl der Co-Ionen Spezies einen signifikanten Einfluss auf die Proteintrennung ausübt, bestätigt (siehe Kapitel 1.1). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Auswahl der Salzspezies einen wichtigen Aspekt in der Prozessentwicklung darstellt und für eine Optimierung von CEC-Schritten detailliert untersucht werden sollte. Durch eine signifikante Erhöhung der Trenneffizienz kann die Salzauswahl dazu beitragen, die aktuell hohen Kosten der Downstream-Prozesse von Proteinen zu senken.

4 Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine

In diesem Kapitel werden die Untersuchungen zum Einfluss von Salzmischungen auf das Retentionsverhalten von Modellproteinen in der CEC dargestellt. Hierbei wird das mögliche Auftreten von synergetischen Mischungseffekten in der CEC untersucht und somit die dritte Arbeitshypothese überprüft. In Kapitel 4.1 wird neben der Darstellung der experimentellen Materialien und Methoden auch die Anpassung der Modellgleichung aus der Literatur auf LGE-Experimente in der IEC beschrieben. Anschließend werden die Einflüsse von binären Salzmischungen auf das Retentionsverhalten betrachtet (Kapitel 4.2). In Kapitel 4.3 wird daraufhin der Salzeinfluss für die Mischung von vier Ionensorten sowie die Anwendbarkeit der angepassten Modellgleichung untersucht. In Kapitel 4.4 wird mithilfe der Modellgleichung der Einfluss von Salzmischungen auf die Trennung der Proteine BSA und LYZ mittels CEC beschrieben. Kapitel 4.5 stellt daraufhin die experimentellen Daten für die Untersuchung von Cytochrom C (CYC) dar, welche für die mechanistische Modellierung in Kapitel 6 benötigt werden. Die in diesem Kapitel gewonnenen Erkenntnisse werden in Kapitel 4.6 zusammengefasst. Teile dieses Kapitels und der hier dargestellten Ergebnisse sind bereits in der Fachliteratur veröffentlicht worden [113].

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Experimentelles Vorgehen und Pufferzusammensetzung

Das verwendete experimentelle Setup wird in Kapitel 3.1.1 beschrieben. Das grundsätzliche Vorgehen zur Puffererstellung wie das Ansetzen eines Hoch- und eines Niedrigsalzpuffers sowie der LGE-Versuchsdurchführung inklusive Proteinkonzentration und Injektionsvolumen ist ebenfalls analog zu Kapitel 3.1.2 und Kapitel 3.1.3. Als Niedrigsalzpuffer wird ein 20 mM Essigsäure/Natriumacetat-Puffer verwendet. Für die Hochsalzpuffer wird zusätzlich Salz mit einer Kationenstärke von 1 M zugegeben (siehe Gleichung 2.17). In dieser Untersuchung werden die Ionen Na^+ , NH_4^+ , Cl^- und SO_4^{2-} betrachtet.

Es werden unterschiedliche Gradientenlängen untersucht. Die betrachteten Volumina, innerhalb derer der Anteil des Hochsalzpuffers in den LGE-Versuchen von 0% auf 100% erhöht wird, betragen 3 CV, 5 CV, 10 CV und 15 CV. Zur Beschreibung der Salzzusammensetzung im Hochsalzpuffer wird der Ionenanteil x_i von jedem Ion i verwendet:

$$x_i = \frac{z_i c_i}{\sum_j z_j c_j} \quad 4.1$$

Die Summe im Nenner von Gleichung 4.1 wird dabei über alle Kationen gebildet, wenn das Ion i ein Kation ist, und über alle Anionen, wenn das Ion i ein Anion ist. Die Valenz des Ions wird durch z ausgedrückt. Dieser Ansatz führt zu Werten für x_i , die zwischen null und eins liegen. Die verwendeten Salzzusammensetzungen sind über die jeweiligen Ionenanteile in Abbildung 4.1 dargestellt. Für die Kalibrierung der Modellgleichung (siehe Abschnitt 4.1.2) wurden Reinsalze und binäre Mischungen untersucht (rote Kreise in Abbildung 4.1). Die binären Mischungen wurden an vier verschiedenen Mischungsverhältnissen pro Salz-Paar betrachtet. Dabei wurden monodistante Änderungen der x_i Werte verwendet. Um die Vorhersagekraft der Modellgleichung zu untersuchen, wurden mit weiteren Zusammensetzungen Validierungsversuche durchgeführt (blaue Quadrate in Abbildung 4.1). Die Salzzusammensetzungen der Validierungsversuche ist mit allen Ionenanteilen in Tabelle 4.1 aufgeführt. Hier lässt sich erkennen, dass die Summe aller x_i für die Kationen sowohl die Summe aller x_i für die Anionen immer 1 entspricht. Daher wird die Zusammensetzung eines Systems aus zwei Kationen und zwei Anionen mit einem Kationenanteil und einem Anionenanteil bereits vollständig beschrieben.

Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine

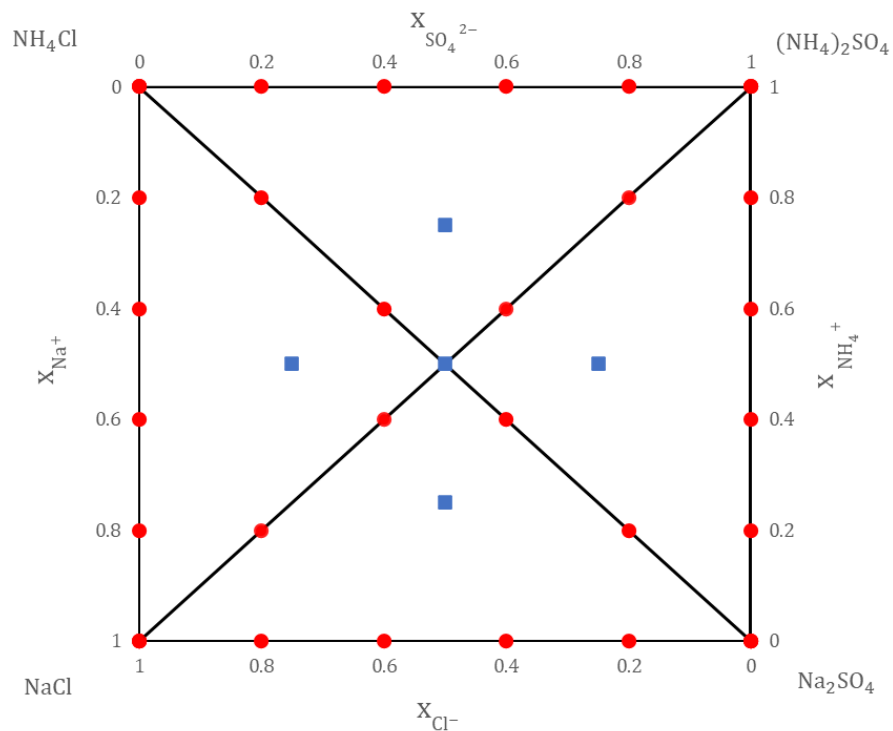


Abbildung 4.1: Zusammensetzungen der verwendeten Hochsalzpuffer zur Bestimmung von Mischungseffekten von Salzen auf das Retentionsverhalten von BSA und LYZ. Die Zusammensetzungen werden über die Ionenanteile x beschrieben. Reinsalze entsprechen den Ecken des Diagramms und die schwarzen Linien entsprechen einer binären Salzmischung. Die roten Kreise stellen die Versuchspunkte zur Modellkalibrierung dar, während die blauen Quadrate die Validierungspunkte beschreiben. [113]

Für die Proteine BSA und LYZ wurden alle Zusammensetzung aus Abbildung 4.1 untersucht und der Einfluss auf die Proteintrennung betrachtet. Für CYC wurden lediglich Versuche mit Mischungen aus NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ betrachtet (Diagonale von unten links nach oben rechts in Abbildung 4.1), da diese für die mechanistische Modellierung in Kapitel 6 benötigt werden.

Tabelle 4.1: Ionenanteile x_i der Salzzusammensetzungen für die Validierungsversuche [113].

x_{Na^+}	x_{Cl^-}	$x_{\text{NH}_4^+}$	$x_{\text{SO}_4^{2-}}$
0,5	0,5	0,5	0,5
0,75	0,5	0,25	0,5
0,25	0,5	0,75	0,5
0,5	0,75	0,5	0,25
0,5	0,25	0,5	0,75

4.1.2 Anpassung der Modellgleichung

Die von Werner und Hasse entwickelte Modellgleichung (Gleichung 2.18) muss angepasst werden, um auf LGE-Experimente in der IEC angewendet werden zu können [70]. Als Zielgröße y der Gleichung wurde der Retentionsfaktor k' ausgewählt. Aufgrund des erwarteten Wertebereichs wurde eine lineare anstelle einer logarithmischen Skalierung verwendet. Da sich die Konzentration der Ionen innerhalb eines LGE-Laufs ändert, wurde stattdessen der Ionenanteil x verwendet. Da dieser bereits dimensionslos ist, wird kein zusätzlicher Parameter zur Entdimensionierung analog zu c_0 benötigt (Gleichung 4.2).

Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine

$$k' = l_0 + \sum_i l_i x_i + \frac{1}{2} \sum_i \sum_j l_{ij} x_i x_j \quad 4.2$$

Wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, sind ein Anionenanteil und ein Kationenanteil ausreichend, um das vorliegende System aus Na^+ , NH_4^+ , Cl^- und SO_4^{2-} vollständig zu beschreiben. Die Ionenanteile x_{Na^+} und x_{Cl^-} werden hierfür verwendet. Dazu werden die Ionenanteile $x_{\text{NH}_4^+}$ beziehungsweise $x_{\text{SO}_4^{2-}}$ durch die Ausdrücke $(1-x_{\text{Na}^+})$ beziehungsweise $(1-x_{\text{Cl}^-})$ ersetzt. Durch Anwendung der in Kapitel 2.3.2 vorgestellten Annahmen für die Interaktionsfaktoren und Umstellen der Terme erhält man Gleichung 4.3:

$$k' = l_0 + l_{\text{NH}_4^+} + l_{\text{SO}_4^{2-}} + (l_{\text{Na}^+} - l_{\text{NH}_4^+})x_{\text{Na}^+} + (l_{\text{Cl}^-} - l_{\text{SO}_4^{2-}})x_{\text{Cl}^-} + l_{\text{Na}^+, \text{NH}_4^+}x_{\text{Na}^+}(1 - x_{\text{Na}^+}) + l_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}x_{\text{Cl}^-}(1 - x_{\text{Cl}^-}) \quad 4.3$$

Die Anwendung dieser Gleichung auf ein LGE-System steht vor zwei Problemen: Zum einen ist der Faktor l_0 , der den Retentionsfaktor ohne die Gegenwart von Salz beschreibt, kein sinnvoller Wert für LGE-Experimente, die inhärent auf die Verwendung von Salz angewiesen sind. Zum anderen gibt es vier lineare Einzelionenfaktoren und nur zwei Zusammensetzungsparameter. Das System ist somit unterbestimmt. Um eindeutige Modellparameter zu erhalten, muss die Anzahl der Variablen reduziert werden. Dazu werden die Faktoren $l_{\text{NH}_4^+}$ und $l_{\text{SO}_4^{2-}}$ mit l_0 zu dem Parameter $h_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ kombiniert, um den Retentionsfaktor bei reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ abzubilden. Die Terme $(l_{\text{Na}^+} - l_{\text{NH}_4^+})$ und $(l_{\text{Cl}^-} - l_{\text{SO}_4^{2-}})$ werden durch die Faktoren h_{Na^+} beziehungsweise h_{Cl^-} ersetzt, die die Änderung des Retentionsfaktors mit höheren Na^+ beziehungsweise Cl^- Anteilen beschreiben. Für eine konsistente Nomenklatur wurden auch die Interaktionsparameter in $h_{\text{Na}^+, \text{NH}_4^+}$ und $h_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}$ umbenannt, welche identisch zu den Parametern $l_{\text{Na}^+, \text{NH}_4^+}$ und $l_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}$ aus Gleichung 4.3 sind:

$$k' = h_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} + h_{\text{Na}^+}x_{\text{Na}^+} + h_{\text{Cl}^-}x_{\text{Cl}^-} + h_{\text{Na}^+, \text{NH}_4^+}x_{\text{Na}^+}(1 - x_{\text{Na}^+}) + h_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}x_{\text{Cl}^-}(1 - x_{\text{Cl}^-}) \quad 4.4$$

Die Parameter $h_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$, h_{Na^+} , h_{Cl^-} , $h_{\text{Na}^+, \text{NH}_4^+}$ und $h_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}$ werden über eine Regression mittels der geringste-Fehlerquadrat-Methode bestimmt. Dazu werden die experimentell ermittelten k' -Werte mit den nach Gleichung 4.4 berechneten Werten verglichen. Die Parameter werden variiert, bis das Parameterset mit der geringsten Abweichung zwischen experimentellen und berechneten Daten gefunden ist. Hierzu wird die *fminsearch* Funktion der Matlab Software (Version 9.8.0, MathWorks Inc., Natick, USA) verwendet [114]. Auf diese Weise werden die Parameter für jede untersuchte Gradientenlänge einzeln bestimmt.

Um die Präzision der Ergebnisse der Modellgleichung zu bestimmen, wird die normalisierte Wurzel der mittleren Fehlerquadrat (*normalized root mean square error [NRMSE]*) verwendet (Gleichung 4.5) [115]:

$$\text{NRMSE} = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_n (y_{\text{meas},n} - y_{\text{pred},n})^2}}{y_{\text{meas},\text{max}} - y_{\text{meas},\text{min}}} \quad 4.5$$

Dabei bezeichnet N die Anzahl der Datenpunkte, y_{meas} die experimentell gemessenen und y_{pred} die von der Modellgleichung berechneten Werte. Für die Auswertung von Gleichung 4.4 wird der Retentionsfaktor k' als y verwendet. Die Daten werden durch die Division mit dem experimentellen Wertebereich für das jeweilige Protein bei dieser Gradientenlänge $y_{\text{meas},\text{max}} - y_{\text{meas},\text{min}}$ normalisiert [115]. Diese Normalisierungsmethode wurde verwendet, da der experimentelle Wertebereich für jede Gradientenlänge den sinnvollen Bereich der regressierten Werte darstellt, und der *NRMSE* somit

sowohl ein realistisches Maß für die tatsächlichen Abweichungen darstellt als auch für eine Vergleichbarkeit der Werte bei verschiedenen Gradientenlängen sorgt.

4.2 Binäre Salzmischungen

Die Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen mit verschiedenen Kationen (Na^+ und NH_4^+) und dem gleichen Anion (a: Cl^- , b: SO_4^{2-}) sind für die Gradientenlänge von 15 CV in Abbildung 4.2 dargestellt. BSA weist bei allen Salzzusammensetzungen einen höheren k' -Wert auf als LYZ. Für beide Proteine lässt sich eine klare Erhöhung des Retentionsfaktors mit steigendem NH_4^+ -Anteil beobachten. Dieses Ergebnis stimmt gut mit der Studie von Liu und Shi überein, die den Einfluss verschiedener Kationen in der CEC untersucht, sowie mit den Beobachtungen aus Kapitel 3 [13]. Hierdurch wird bestätigt, dass NH_4^+ im Vergleich zu Na^+ eine geringere Affinität zu der Säule hat und unabhängig vom verwendeten Co-Ion und Mischungseffekten das schwächere Austausch-Ion ist. Für BSA ist dieser Effekt stärker ausgeprägt, sodass der Abstand zwischen den Retentionsfaktoren mit steigendem NH_4^+ -Anteil wächst. Des Weiteren lässt sich erkennen, dass beide Proteine mit SO_4^{2-} als Co-Ion später eluieren als mit Cl^- . Dies bestätigt, dass dieser bereits in Kapitel 3 für Na^+ beobachtete Trend unabhängig vom Austausch-Ion ist.

In Abbildung 4.3 sind die entsprechenden Daten für binäre Salzmischungen mit verschiedenen Anionen (Cl^- und SO_4^{2-}) und dem gleichen Kation (a: Na^+ , b: NH_4^+) bei einer Gradientenlänge von 15 CV dargestellt. Der Trend der höheren Retentionsfaktoren mit höheren SO_4^{2-} -Anteilen lässt sich für beide Proteine bei allen Mischungsverhältnissen bestätigen. Die Unterschiede zwischen den k' -Werten der Proteine nehmen mit steigendem SO_4^{2-} -Anteil ebenfalls zu. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung zu dem in Kapitel 3 beschriebenem proteinspezifischen Effekt von SO_4^{2-} auf BSA. In der HIC treten die synergetischen Mischungseffekte hauptsächlich für verschiedene Anionen auf [69–71]. Für die IEC lässt sich in Abbildung 4.3 allerdings kein klarer synergetischer Effekt erkennen, die Kurven steigen kontinuierlich mit höheren SO_4^{2-} -Anteilen an und die maximalen und minimalen k' -Werte treten für die reinen Salze auf.

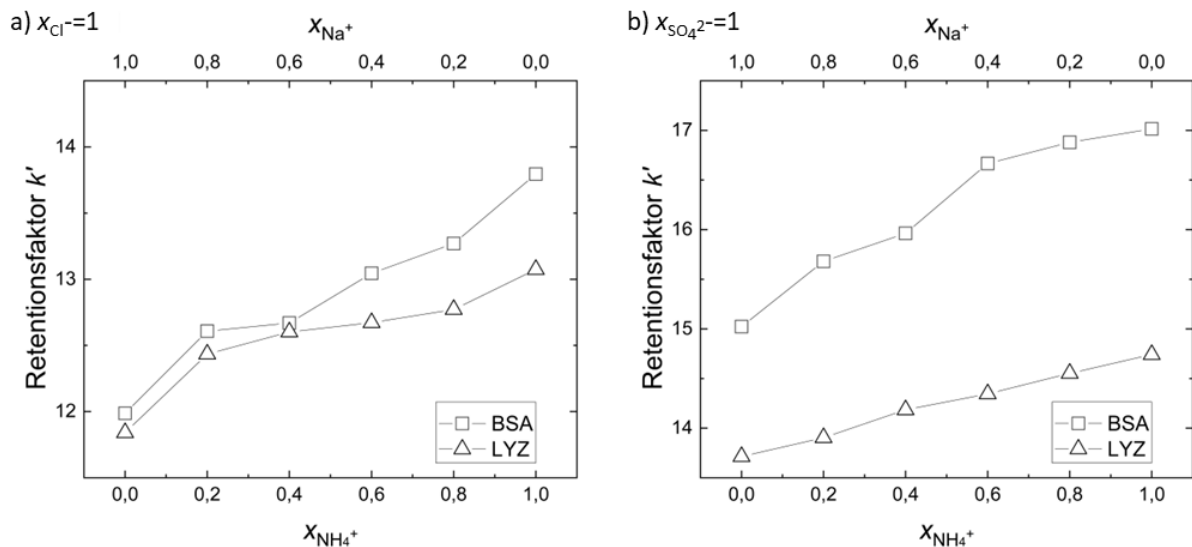


Abbildung 4.2: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen mit dem selben Anion bei einer Gradientenlänge von 15 CV. Es werden die Mischungen aus NaCl und NH_4Cl (a) sowie aus Na_2SO_4 und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (b) dargestellt, nach [113].

Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine

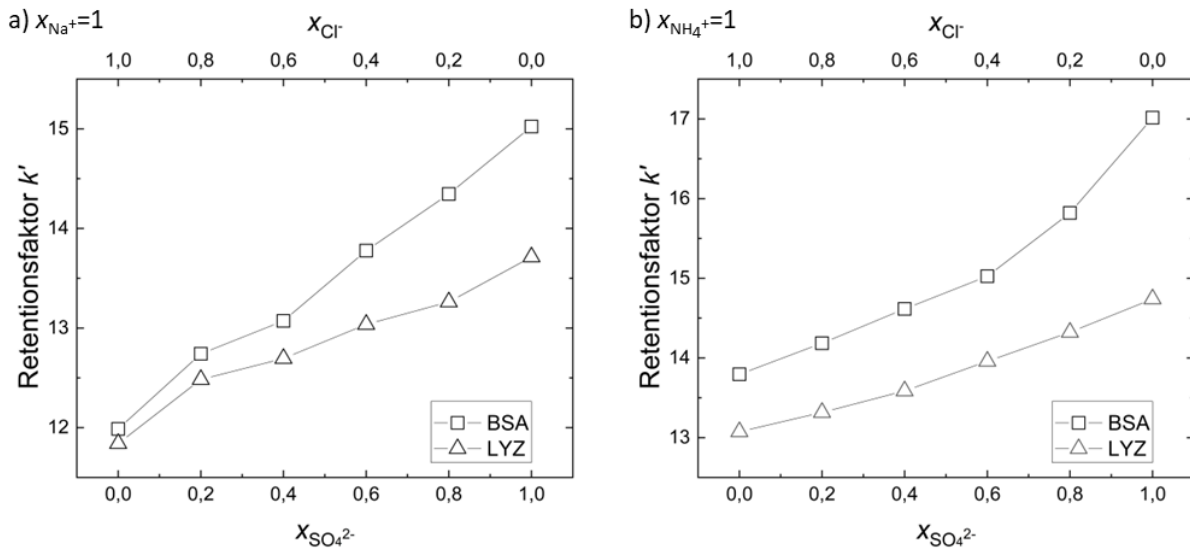


Abbildung 4.3: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen mit demselben Kation bei einer Gradientenlänge von 15 CV. Es werden die Mischungen aus NaCl und Na_2SO_4 (a) sowie die Mischungen aus NH_4Cl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (b) dargestellt, nach [113].

Abbildung 4.4 stellt die Retentionsfaktoren von BSA und LYZ bei einer Gradientenlänge von 15 CV für Mischungen aus Salzen dar, bei denen sich sowohl das Kation als auch das Anion unterscheiden. In Abbildung 4.4 a) sind die Ergebnisse für Mischungen aus NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu sehen und in Abbildung 4.4 b) für Mischungen aus NH_4Cl und Na_2SO_4 . Für die Mischungen aus NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bestätigen die Retentionsfaktoren für beide Proteine die Trends für Mischungen aus Salzen mit demselben Kation oder Anion. Höhere Na^+ - oder SO_4^{2-} -Anteile führen bei beiden Proteinen zu höheren k' -Werten, wobei diese Zunahme für BSA stärker ausgeprägt ist. Bei Salzmischungen aus NH_4Cl und Na_2SO_4 zeigt LYZ eine kontinuierliche Abnahme des Retentionsfaktors mit höheren NH_4Cl -Anteilen. Für BSA bleiben die k' -Werte zwischen NH_4Cl -Anteilen von 0 und 0,2 beinahe konstant.

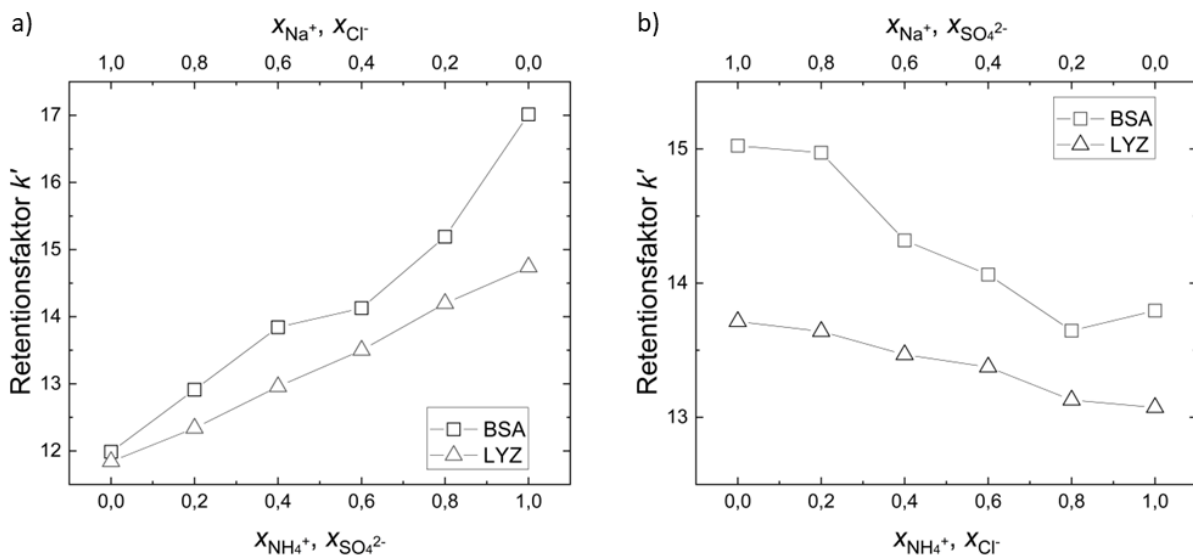


Abbildung 4.4: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen mit verschiedenen Kationen und Anionen bei einer Gradientenlänge von 15 CV. Es werden die Mischungen aus NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (a) sowie die Mischungen aus Na_2SO_4 und NH_4Cl (b) dargestellt, nach [113].

Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine

Des Weiteren weist BSA den minimalen Retentionsfaktor bei einem NH_4Cl -Anteil von 0,8 auf. Dieses Phänomen lässt sich bei allen untersuchten Gradientenlängen beobachten (siehe Anhang B). BSA weist somit einen klaren synergetischen Effekt bei der Mischung von NH_4Cl und Na_2SO_4 Salzen auf. Beide Salze beinhalten je ein Ion, das in dem untersuchten System mit vier Ionenarten zu kürzeren Retentionszeiten führt (Na^+ or Cl^-), sowie je ein Ion, das zu längeren Retentionszeiten führt (NH_4^+ oder SO_4^{2-}). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass synergetische Effekte bei der IEC auch auftreten können, aber schwächer ausgeprägt sind als bei der HIC.

Der Einfluss der Gradientenlänge auf die Retentionsprofile von BSA und LYZ ist anhand der binären Mischungen von NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in Abbildung 4.5 dargestellt. Die weiteren Ergebnisse für binäre Salzmischungen bei den anderen Gradientenlängen sind in Anhang B zu finden. Es lässt sich erkennen, dass sich die Retentionsprofile der einzelnen Proteine bei den verschiedenen Gradientenlängen sehr ähneln. Der prinzipielle Verlauf ist unabhängig von der Gradientensteigung. Das Verhältnis von BSA zu LYZ verschiebt sich jedoch deutlich. In Abbildung 4.5 lässt sich erkennen, dass mit abnehmender Gradientenlänge BSA im Vergleich zu LYZ immer früher eluiert.

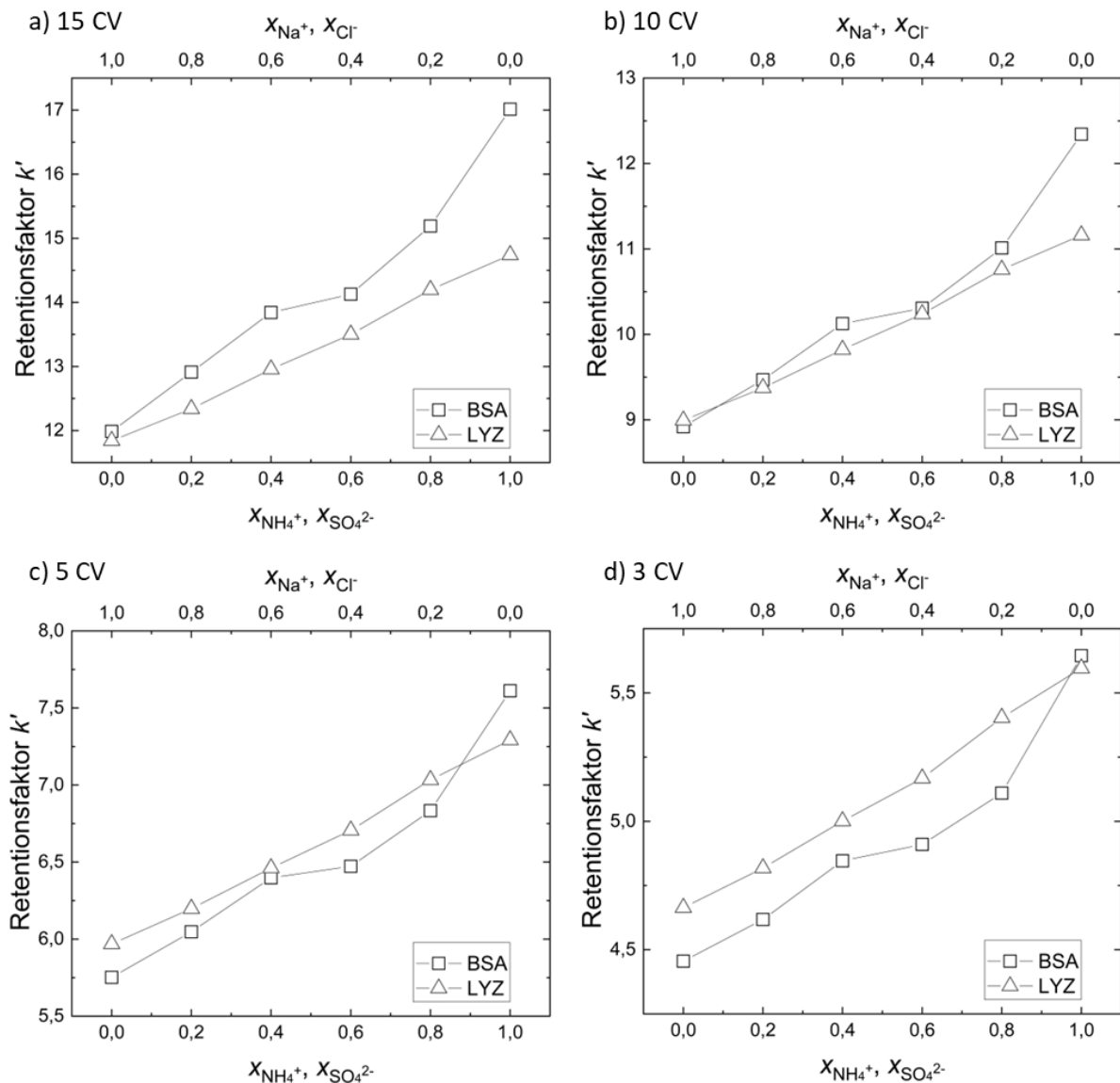


Abbildung 4.5: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für Mischungen aus NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei verschiedenen Gradientenlängen.

Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine

Bei 15 CV (a) eluiert BSA bei allen Zusammensetzungen später als LYZ, während es bei 5 CV (c) und 3 CV (d) nur bei reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ später eluiert. Dieser Trend ist bei allen binären Salzmischungen zu erkennen. Die Ursache hierfür wird in der höheren Ladung von BSA vermutet. Dieses Phänomen wird in Kapitel 5.2 näher diskutiert.

4.3 Kalibrierung und Validierung der Modellgleichung

Die experimentellen Daten für die binären Salzmischungen bei je einer Gradientenlänge wurden verwendet, um die Modellgleichung zu kalibrieren. Die so erhaltenen Parameter für Gleichung 4.4 sind für BSA und LYZ bei allen Gradientenlängen in Tabelle 4.2 aufgeführt. Mit diesen Parametern und Gleichung 4.4 kann der Retentionsfaktor über die Salzzusammensetzung als Regressions-Ebene dargestellt werden. In Abbildung 4.6 ist diese Ebene zusammen mit den Kalibrierungs- und Validierungsversuchen bei einer Gradientenlänge von 15 CV und in Abbildung 4.7 bei einer Gradientenlänge von 3 CV für BSA (a) und LYZ (b) dargestellt. Die Ergebnisse für 10 CV und 5 CV sind in Anhang B zu finden. Für beide Proteine beschreibt die Regressionsebene die Trends im Retentionsverhalten gut, wobei geringe Abweichungen zwischen experimentellen und regressierten Daten existieren. Die nach Gleichung 4.5 berechneten *NRMSE*-Werte sind für alle Gradientenlängen in Tabelle 4.3 aufgeführt. Der maximale *NRMSE* tritt mit einem Wert von 5,81% bei den Kalibrierungsversuchen von LYZ bei einer Gradientenlänge von 5 CV auf. Der durchschnittliche *NRMSE* der Kalibrierungsversuche von BSA beträgt 4,35% und der von LYZ 3,76%, während der gemittelte *NRMSE* der Validierungsversuche von BSA bei 2,21% und der von LYZ bei 3,43% liegt.

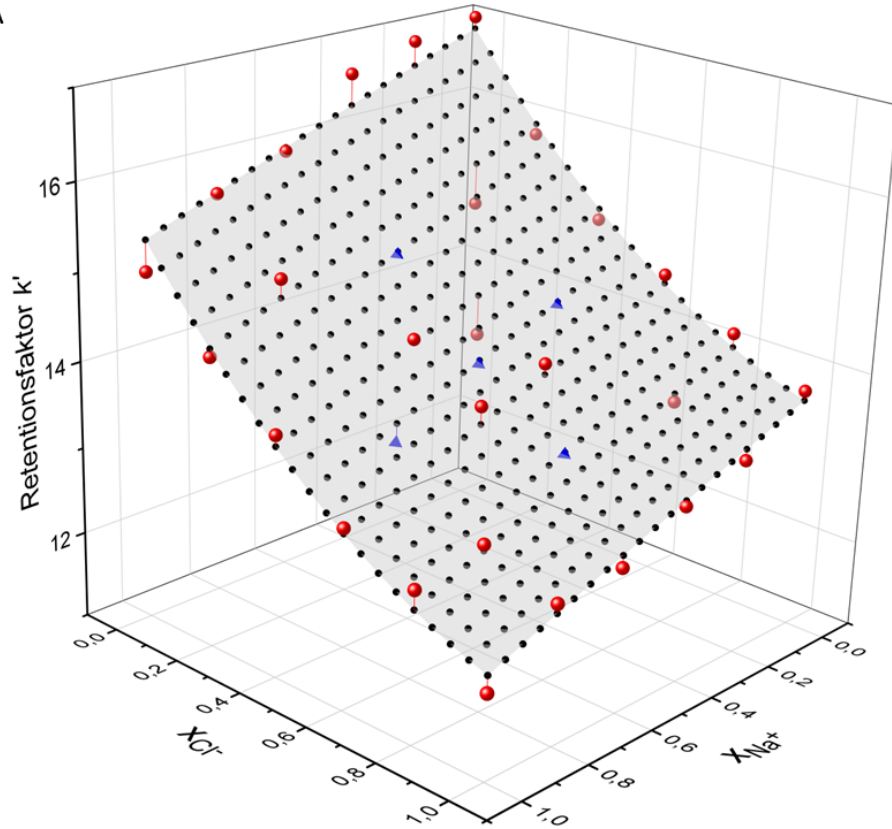
Insgesamt werden die Validierungsversuche also etwas besser von der Modellgleichung getroffen als die Kalibrierungsversuche. Diese unerwartete Beobachtung könnte durch die Verteilung der Kalibrierungs- und Validierungspunkte erklärt werden: Die Zusammensetzungen zur Kalibrierung sind über alle untersuchten Salzzusammensetzungen verteilt, während sich die Validierungspunkte im mittleren Bereich der Zusammensetzungen befinden. Somit könnte der geringere Fehler bei den Validierungsversuchen bedeuten, dass die Modellgleichung besonders gut geeignet ist, um Retentionsfaktoren bei ausgeglicheneren Mischungsanteilen zu beschreiben. Für beide Proteine sticht ein besonders hoher Fehler in den Validierungsversuchen bei einer Gradientenlänge von 3 CV heraus.

Tabelle 4.2: Parameter der angepassten Modellgleichung für BSA und LYZ für die untersuchten Gradientenlängen.

Parameter	BSA				LYZ			
	15 CV	10 CV	5 CV	3 CV	15 CV	10 CV	5 CV	3 CV
$h_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$	16,88	12,20	7,51	5,56	14,71	11,16	7,31	5,62
h_{Na^+}	-1,50	-1,21	-0,64	-0,42	-0,99	-0,72	-0,42	-0,29
h_{Cl^-}	-3,20	-2,14	-1,14	-0,72	-1,69	-1,31	-0,84	-0,62
$h_{\text{Na}^+, \text{NH}_4^+}$	0,11	0,50	0,26	0,21	0,18	0,13	0,08	0,08
$h_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}$	-1,88	-1,25	-0,72	-0,55	-0,33	-0,28	-0,23	-0,20

Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine

a) BSA



b) LYZ

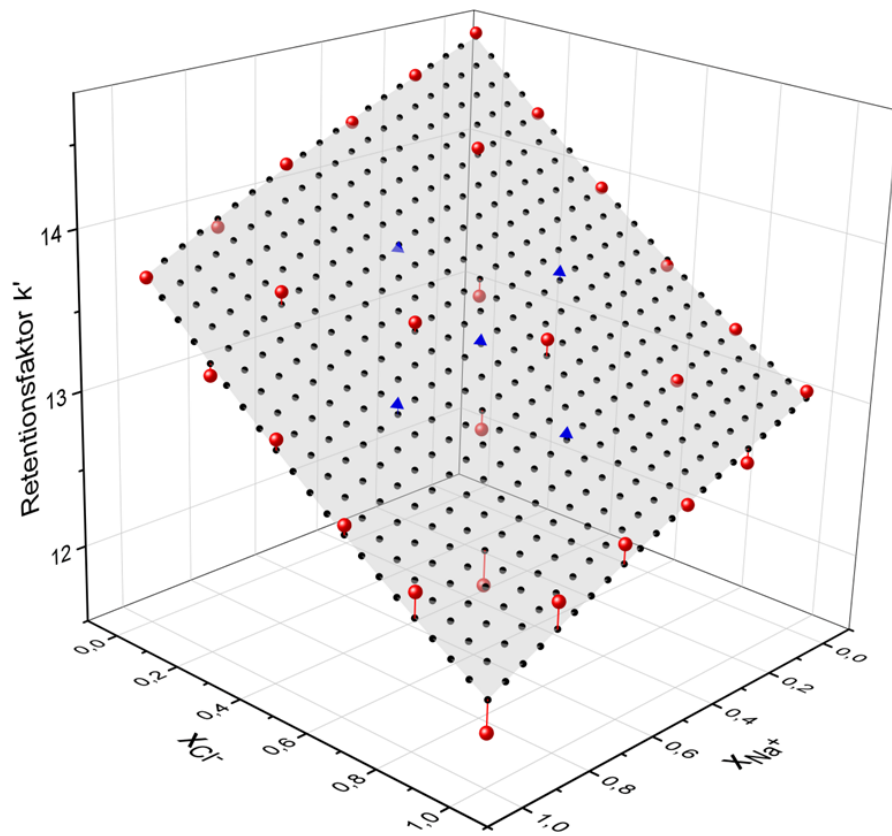
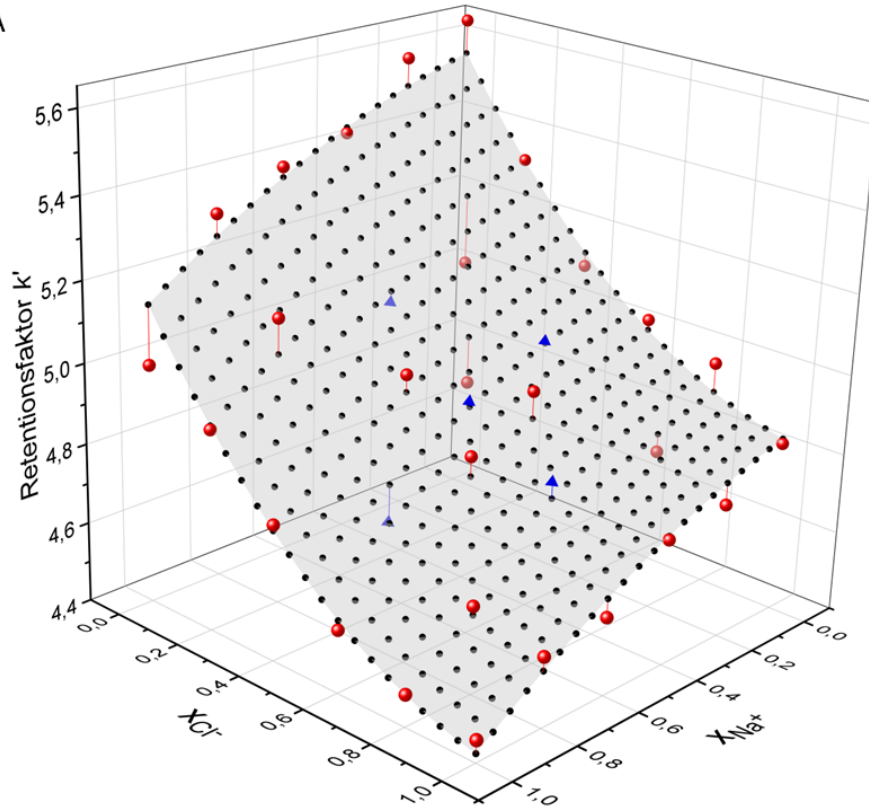


Abbildung 4.6: Retentionsfaktoren von a) BSA und b) LYZ bei einer Gradientenlänge von 15 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung. Die roten Kugeln stellen die Kalibrierungsversuche und die blauen Tetraeder die Validierungsversuche dar. Die Ebene zeigt die Regression durch die Modellgleichung an, nach [113].

a) BSA



b) LYZ

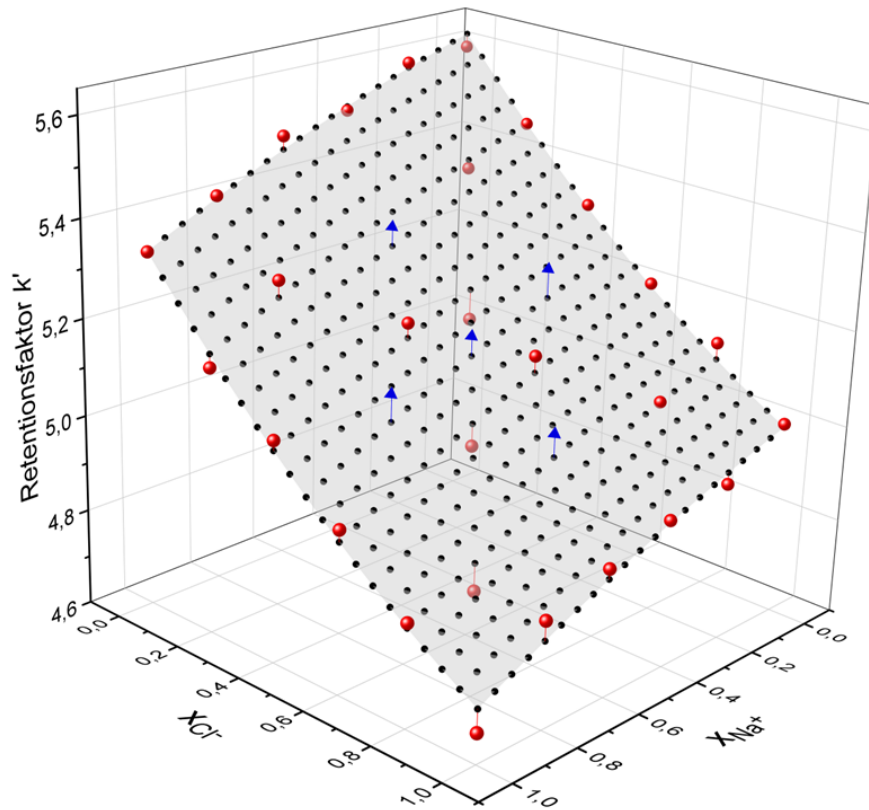


Abbildung 4.7: Retentionsfaktoren von a) BSA und b) LYZ bei einer Gradientenlänge von 3 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung. Die roten Kugeln stellen die Kalibrierungsversuche und die blauen Tetraeder die Validierungsversuche dar. Die Ebene zeigt die Regression durch die Modellgleichung an.

Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine

Tabelle 4.3: *NRMSE*-Werte der parametrisierten Modellgleichung für die Kalibrierungs- und Validierungsversuche.

Parameter	BSA				LYZ			
	15 CV	10 CV	5 CV	3 CV	15 CV	10 CV	5 CV	3 CV
<i>NRMSE</i> Kalibrierung	4,05%	5,08%	5,29%	2,99%	3,11%	2,93%	5,81%	3,19%
<i>NRMSE</i> Validierung	2,00%	1,45%	1,10%	4,28%	1,47%	2,88%	3,97%	5,39%

In Abbildung 4.7 lässt sich erkennen, dass bei BSA ein einzelner Ausreißer bei den Ionenanteilen von $x_{\text{Na}^+}=0,75$ und $x_{\text{Cl}^-}=0,5$ für diese Abweichung verantwortlich ist. Bei LYZ sind alle Retentionsfaktoren der Validierungsversuche etwas höher als die der Regressionsebene. Hier könnte eine systematische Unterschätzung der Retentionszeiten durch die Modellgleichung vorliegen. Ein Vergleich mit den Kalibrierungsversuchen deutet allerdings eher auf leichte Ungenauigkeiten in den experimentellen Daten hin. Bei den sehr geringen k' -Werten bei den kurzen Gradienten spielen kleine Messungenauigkeiten relativ gesehen eine größere Rolle und könnten zu dem hohen *NRMSE*-Wert beigetragen haben. Insgesamt werden die Kalibrierung und Validierung der Modellgleichung auf Grund von *NRMSE*-Werten von unter 6% als erfolgreich bewertet. Hierdurch wird bestätigt, dass die in Gleichung 4.4 vorgeschlagene Anpassung der Modellgleichung mit Einzelionenfaktoren für jede Ionenart sowie mit Interaktionsparametern zwischen Ionen der gleichen Ladung ein geeigneter Ansatz zur Beschreibung des Einflusses von Salzmischungen auf die CEC von Proteinen ist.

In Abbildung 4.6 lässt sich erkennen, dass die Retentionsfaktoren von BSA eine klare Krümmung entlang der Anionen-Achse aufweisen, während sie für LYZ hauptsächlich linear sind. Für beide Proteine fällt die Steigung entlang der Anionen-Achse stärker aus als entlang der Kationen-Achse. Dies bestätigt den höheren Einfluss der Anionen auf das Retentionsverhalten, obwohl die Kationen die Austausch-Ionen in der CEC sind. Ein Vergleich der Interaktionsparameter ($h_{\text{Na}^+, \text{NH}_4^+}$ und $h_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}$) aus Tabelle 4.2 zeigt, dass der Betrag der $h_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}$ -Werte von BSA bei allen Gradientenlängen deutlich größer ist als der Betrag aller anderen Interaktionsparameter. Zusammen mit der resultierenden Form der Ebenen in Abbildung 4.6 wird somit lediglich der $h_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}$ -Parameter von BSA als relevant und die anderen Interaktionsparameter als vernachlässigbar bewertet.

Bei der Parametrisierung der HIC-Modellgleichung für das gleiche Ionensystem haben Hackemann und Hasse für BSA auch den Interaktions-Parameter der Kationen als vernachlässigbar eingestuft [71]. Für LYZ haben Werner und Hasse ebenfalls einen relevanten Anionen-Interaktions-Parameter und einen vernachlässigbaren Kationen-Interaktions-Parameter festgestellt [70]. Für BSA ist die grundsätzliche Relevanz der Anionen- und Kationen-Interaktion in der CEC also vergleichbar mit der HIC, während sie für LYZ in der CEC eine schwächere Rolle spielen.

In Abbildung 4.6 a) und Abbildung 4.7 a) weist die Regressionsebene für BSA eine leichte Abnahme der Retentionsfaktoren für NH_4Cl mit geringem Na_2SO_4 -Anteil im Vergleich zu reinem NH_4Cl auf. Der grundsätzliche Trend des in Abbildung 4.4 b) beobachteten synergetischen Salzeffekts wird also auch durch die Modellgleichung beschrieben, auch wenn die Ausprägung des Effekts geringer ausfällt als bei den experimentellen Daten. Da der Interaktions-Parameter $h_{\text{Na}^+, \text{NH}_4^+}$ für BSA positiv ist, trägt er zu einer leichten Erhöhung der k' -Werte bei gemischten Kationen bei. Daher wird die Abnahme der Regressionsebene vollständig durch den negativen Interaktions-Parameter $h_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}$ und die Mischung der Anionen verursacht. Das deutet darauf hin, dass auch der synergetische Effekt in Abbildung 4.4 b) rein durch einen synergetischen Effekt der Anionen verursacht werden könnte und nicht durch eine Kombination von Anionen- und Kationen-Effekten. Dass dieser Effekt nur bei den binären

Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine

Salzversuchen mit NH_4Cl und Na_2SO_4 sichtbar ist und nicht bei den anderen Anionen-Mischungen, könnte an einer Überlagerung mit den Einflüssen der Einzelionenfaktoren liegen. Höhere Na^+ - und Cl^- -Anteile führen grundsätzlich zu geringeren Retentionsfaktoren. Bei Mischungen von Cl^- und SO_4^{2-} Ionen mit demselben Kation überwiegt dieser Effekt des Faktors h_{Cl^-} gegenüber dem Interaktionsfaktor $h_{\text{Cl}^-,\text{SO}_4^{2-}}$. Werden sowohl Kationen als auch Anionen gemischt wird dieser Effekt für das Salz-Paar NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sogar noch verstärkt, da beide Einzelionen-Parameter zu höheren Retentionszeiten führen. Lediglich bei der Mischung von NH_4Cl und Na_2SO_4 wirkt der Effekt des Faktors h_{Na^+} dem von h_{Cl^-} entgegen, sodass der Einfluss der Anionen-Mischungseffekte am deutlichsten wird.

In Kapitel 3 wurde bereits herausgestellt, dass SO_4^{2-} neben einem nicht-spezifischen auch einen proteinspezifischen Einfluss auf BSA in Richtung höherer Retentionsfaktoren hat. Da die stärkste Abweichung von linearem Verhalten in Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7 entlang der Anionen-Achse bei BSA auftritt, könnte dieser Effekt mit dem proteinspezifischen Einfluss von SO_4^{2-} auf BSA zusammenhängen. Wie der beobachtete Einfluss von Salzmischungen in der HIC beweist, treten bei der Modulierung von hydrophoben Effekten synergetische Salzeinflüsse auf. Müller et al. weisen explizit auf die Möglichkeit von synergetischen Effekten in der HIC bei der Mischung von einem kosmotropen und einem chaotropen Salz hin [18]. Mischungen aus SO_4^{2-} und Cl^- fallen in diese Kategorie [111,112]. Somit liegt als Ursache für den proteinspezifischen Effekt von SO_4^{2-} auf BSA die Modulierung von hydrophoben Effekten nahe. Diese Vermutung wird durch die Struktur von BSA gestützt. BSA weist eine vergleichsweise hohe Hydrophobizität auf [116]. Darüber hinaus zählt BSA zu den sogenannten weichen Proteinen, die ihre Struktur und Konformation leicht ändern [117]. Somit könnte eine Veränderung der Salzzusammensetzung leicht zu einer Konformationsänderung von BSA führen, was einen auf Salz – Protein Interaktionen beruhenden, proteinspezifischen Effekt wahrscheinlich macht. Die geringere Ausprägung dieses Phänomens für die CEC im Vergleich zur HIC kann aus der Überlagerung mit nicht-spezifischen elektrostatischen Effekten erklärt werden. Des Weiteren könnte dies bedeuten, dass synergetische Mischungseffekte in der CEC hauptsächlich für Salze mit Proteinen auftreten, auf die sie einen proteinspezifischen Einfluss haben, sowie insbesondere für Anionen, die hydrophobe Effekte im Allgemeinen stärker modulieren als Kationen [61]. Um diese Schlussfolgerung zu bestätigen, müsste die experimentelle Datenbasis an Salzen und Proteinen jedoch noch erweitert werden.

4.4 Einfluss auf die Proteintrennung

Da die angepasste Modellgleichung (Gleichung 4.4) die Kalibrierungs- und Validierungsexperimente gut beschreiben kann und als hinreichend genau zur Beschreibung des Retentionsverhaltens für Salzmischungen betrachtet wird, kann sie zur Berechnung des Separationsfaktors α in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung verwendet werden. Die Komponenten gehen analog zu Kapitel 3.3 in den Separationsfaktor ein, sodass der k' -Wert von BSA immer im Zähler und der von LYZ im Nenner steht (siehe Gleichung 2.6). Ein α kleiner eins bedeutet daher, dass sich die Retentionsreihenfolge geändert hat und BSA vor LYZ eluiert.

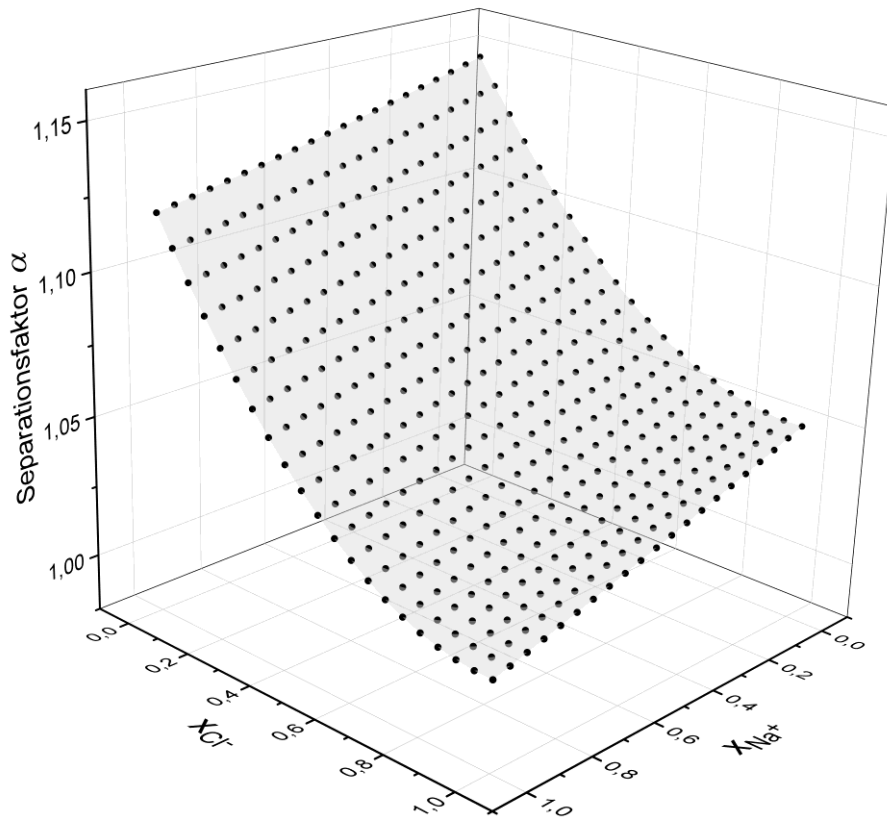


Abbildung 4.8: Separationsfaktoren α von BSA und LYZ bei einer Gradientenlänge von 15 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung [113]. Die zu Grunde liegenden k' -Werte wurden mit der kalibrierten Modellgleichung berechnet.

Abbildung 4.8 stellt die so erhaltenen Separationsfaktoren $\alpha_{\text{BSA,LYZ}}$ bei einer Gradientenlänge von 15 CV für die vier untersuchten Ionen dar. Da BSA bei allen Zusammensetzungen den höheren Retentionsfaktor aufweist, ist der Separationsfaktor durchgehend größer als eins. Die beste Trennung der Proteine wird mit einem α -Wert von 1,147 bei reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erreicht. Ein höherer Na^+ -Anteil führt dabei zu einer geringen und ein höherer Cl^- -Anteil zu einer starken Abnahme des Separationsfaktors. Dies ist hauptsächlich auf den proteinspezifischen Effekt von SO_4^{2-} auf BSA zurückzuführen. Der geringste Separationsfaktor tritt bei NaCl mit einem sehr geringen Anteil an Na_2SO_4 (etwa 1,5%) auf. Dieses Minimum liegt mit einem Wert von 1,012 allerdings weniger als 0,01% unterhalb des Wertes bei reinem NaCl , wodurch seine Bedeutung für die Proteintrennung vernachlässigbar ist. Somit zeigen die Ergebnisse, dass bei einer Gradientenlänge von 15 CV die synergetischen Effekte von Salzmischungen keinen positiven Einfluss auf die Trennung von BSA und LYZ haben.

Abbildung 4.9 stellt die Separationsfaktoren $\alpha_{\text{BSA,LYZ}}$ bei einer Gradientenlänge von 3 CV dar. Es ist eine deutlich ausgeprägtere Krümmung der Fläche als bei der Gradientenlänge von 15 CV zu erkennen. Entlang der Anionen-Achse gibt es ein klares Minimum und auch entlang der Kationen-Achse tritt eine erkennbare Krümmung auf. Der minimale Separationsfaktor tritt mit reinem Na^+ bei einem Cl^- -Anteil von 69,4% mit einem Wert von etwa 0,931 auf. Im Vergleich zur Ausprägung der synergetischen Effekte in der HIC für dasselbe Stoffsystem ist die Änderung der α -Werte aber gering.

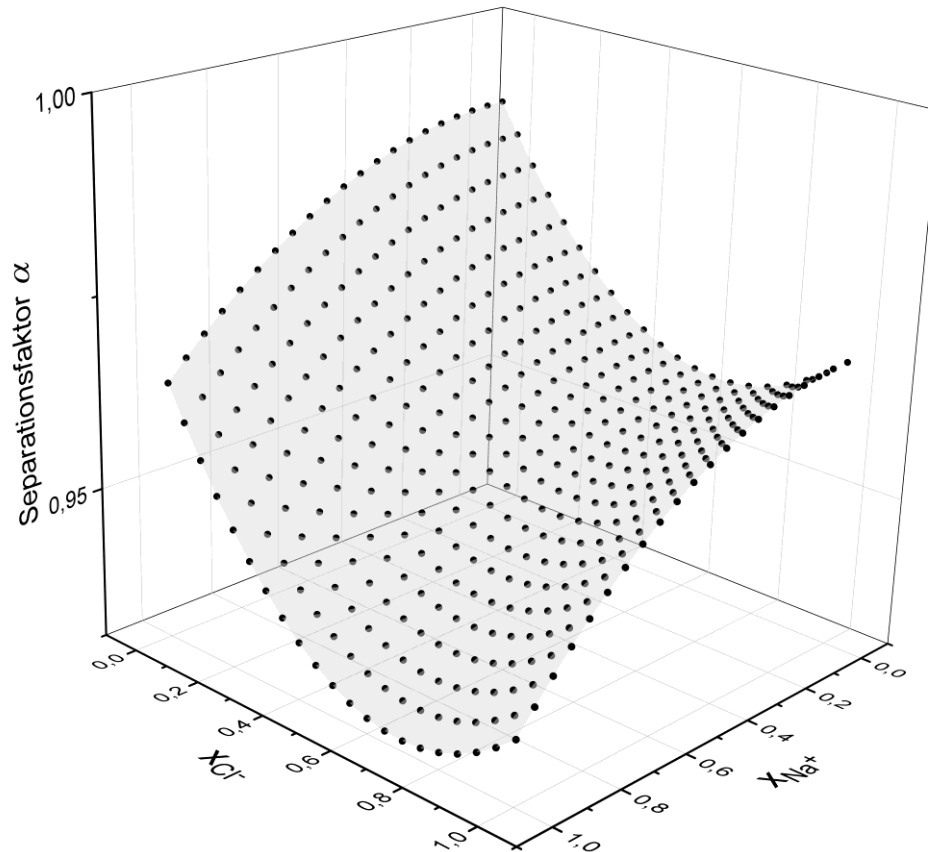


Abbildung 4.9: Separationsfaktoren α von BSA und LYZ bei einer Gradientenlänge von 3 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung. Die zu Grunde liegenden k' -Werte wurden mit der kalibrierten Modellgleichung berechnet.

Hackemann und Hasse berichten von einer Zunahme der Beladung um etwa 10% durch das Mischen von Salzen [71]. Der Separationsfaktor am Minimum ist für dieses System nur etwa 1% unter dem Wert für reines NaCl. Der maximale Wert von etwa 0,989 ist bei reinem SO_4^{2-} mit einem Na^+ -Anteil von 0,2% zu sehen. Dieses Maximum ist aber sehr schwach ausgeprägt und liegt nur weniger als 0,00001% über dem Wert von reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, wodurch es als vernachlässigbar betrachtet werden kann. Die berechneten Separationsfaktoren für die Gradientenlängen von 10 CV und 5 CV sind in Anhang B zu finden.

Es lässt sich erkennen, dass mit abnehmender Gradientenlänge die Krümmung der Separationsebene zunimmt. Das bedeutet, dass die synergetischen Salzeffekte bei kurzen, aber steilen Gradienten einen größeren Einfluss auf die Proteintrennung haben und bei 3 CV zu einer signifikanten Verbesserung der Trennung beitragen. Insgesamt lässt sich jedoch mit einer höheren Gradientenlänge eine bessere Trennung der Proteine erzielen. Ein $\alpha_{\text{BSA,LYZ}}$ von 0,931 entspricht einem $\alpha_{\text{LYZ,BSA}}$ von 1,074. Die Differenz des Separationsfaktors zu einem Wert von 1 ist für die Trennung bei 15 CV also etwa doppelt so hoch wie bei 3 CV. Für eine Trennung von LYZ und BSA sind somit lange Gradienten mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ideal.

Eine Ursache für die Änderungen der α -Werte mit der Gradientenlänge ist der in Abschnitt 4.2 erwähnte Unterschied im Einfluss auf die Retention von BSA und LYZ, der unabhängig von der Salzzusammensetzung zu einer Änderung der Elutionsreihenfolge führen kann. Dies erklärt jedoch nicht die Zunahme der Krümmung und die stärkere Bedeutung der synergetischen Effekte. Eine Erklärung wäre die Bedeutung der Salzkonzentration bei der Elution. Bei kürzeren Gradienten

Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine

befinden sich die Proteine durchschnittlich in Medium mit höherer Salzkonzentration (siehe Kapitel 2.5.1). So nimmt etwa die Ionenstärke bei der Elution von BSA mit NaCl von 0,594 M bei einer Gradientenlänge von 15 CV um etwa 12% auf 0,649 M bei einer Gradientenlänge von 3 CV zu. Höhere Salzkonzentrationen könnten somit eine stärkere Ausprägung der synergetischen Salzeffekte bedeuten. Hierzu würde auch die Beobachtung passen, dass die synergetischen Effekte in der HIC insgesamt stärker ausgeprägt sind als in der CEC. In den Untersuchungen von Werner und Hasse sowie von Hackemann und Hasse wurden Ionenstärken zwischen 2,4 M und 4,2 M verwendet [70,71].

Eine weitere Erklärung für die unterschiedliche Ausprägung der synergetischen Effekte in HIC und CEC liegt in der anderen Wirkweise der Salze auf die Adsorptionsmechanismen: In der HIC bewirkt das Salz hauptsächlich ein Aussalzen der Proteine durch einen Einfluss auf die Struktur der Wassermoleküle [68,118]. Während die Struktur der Wassermoleküle auch von großer Bedeutung in der CEC sein kann, bewirkt das Salz hauptsächlich eine Verdrängung der Proteine von den geladenen Bindestellen des Adsorbens. Der große Einfluss der Anionen auf das Retentionsverhalten in der CEC (siehe Kapitel 3) zeigt zwar auf, dass auch Salz – Protein Interaktionen eine wichtige Rolle spielen, doch der elektrostatische Verdrängungseffekt ist der entscheidende Faktor für das Retentionsverhalten der Proteine.

Die vorliegenden Daten bestätigen somit die dritte Arbeitshypothese, dass synergetische Effekte von Salzmischungen auch bei der IEC von Proteinen auftreten können (siehe Kapitel 1.1). Diese Effekte fallen allerdings geringer aus als in der HIC und führen für das untersuchte Stoffsystem nicht zu einer Verbesserung der Separation.

4.5 Untersuchungen für Cytochrom C

Für die in Kapitel 6 betrachtete mechanistische Modellierung und die in Kapitel 7 durchgeführte Optimierung eines Trennproblems wird ebenfalls das Protein CYC betrachtet. Die Ergebnisse für Mischungen aus NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sind für alle untersuchten Gradientenlängen in Abbildung 4.10 dargestellt.

Der grundsätzliche Verlauf der Retentionsfaktoren gegen die Salzzusammensetzung ist bei CYC analog zu den anderen Proteinen für alle Gradientenlängen gleich. Es lässt sich erkennen, dass der Trend von höheren Retentionsfaktoren mit höheren Anteilen an Na^+ und SO_4^{2-} auch auf CYC zutrifft. Bei den Verläufen der Retentionsfaktoren lässt sich zudem eine klare Zunahme der Steigung mit höheren $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Anteilen erkennen, was an einen exponentiellen Verlauf erinnert. Hieraus folgt eine hohe Sensitivität der Retentionsfaktoren gegenüber dem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Anteil bei hohen Werten für diesen Anteil und eine geringe Sensitivität bei niedrigen Werten.

Dieses Verhalten deutet auf das Auftreten von Mischungseffekten der Salze hin. Da sich dieser Verlauf von CYC von denen von BSA und LYZ unterscheidet (siehe Abbildung 4.5), ist dieses Phänomen proteinspezifisch. Die Auswirkungen auf die Proteintrennung werden in Kapitel 7 näher betrachtet.

Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine

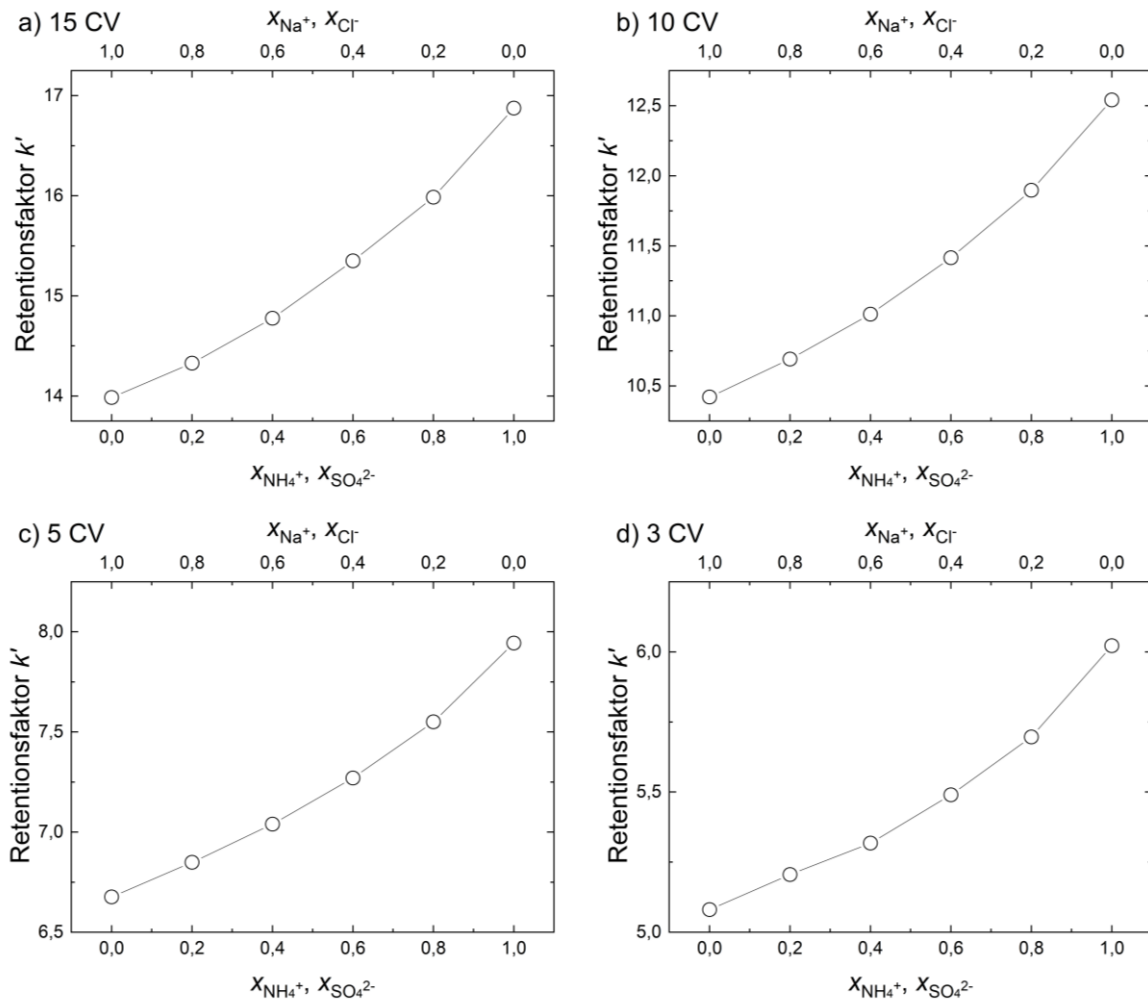


Abbildung 4.10: Retentionsfaktoren von CYC für Mischungen aus NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei verschiedenen Gradientenlängen.

4.6 Fazit

In diesem Kapitel wurde der Einfluss von Salzmischungen auf das Retentionsverhalten von Modellproteinen in der CEC untersucht und mit dem in der Literatur in der HIC beobachteten Phänomen der synergetischen Mischungseffekte verglichen. Die semi-empirische Modellgleichung, die in der Literatur zur Beschreibung der Mischungseffekte verwendet wurde, wurde für die Anwendung in einem LGE-Setup angepasst. Dabei wurde die Eignung des Ansatzes von Einzelionenfaktoren und Interaktionsfaktoren für Ionen mit der gleichen Ladung für die CEC unter Beweis gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass in einem System aus vier unterschiedlichen Ionen die Kalibrierung der Modellgleichung mit Daten für binäre Salzmischungen ausreicht, um k' -Werte für weitere Zusammensetzungen vorhersagen zu können.

LYZ zeigte einen hauptsächlich linearen Einfluss der Salzzusammensetzung auf den Retentionsfaktor. Bei BSA ließ sich ein synergetischer Effekt der Anionen-Zusammensetzung erkennen. Dieser Einfluss wurde auf den proteinspezifischen Effekt von SO_4^{2-} auf BSA zurückgeführt. Da sich hier die Effekte der HIC und der CEC ähneln, wurde postuliert, dass der proteinspezifische Einfluss von SO_4^{2-} auf die Modulation von hydrophoben Kräften zurückgeht, die gegebenenfalls eine Strukturänderung bei BSA hervorrufen könnte. Dadurch wurde die dritte Arbeitshypothese, dass synergetischen Effekte von Salzmischungen in der IEC auftreten können, bestätigt (siehe Kapitel 1.1). Der Einfluss auf die Proteintrennung ist jedoch gering, sodass die synergetischen Mischungseffekte als von geringerer

Auswirkung von Salzmischungen auf Modellproteine

Intensität als in der HIC eingestuft wurden. Als eine mögliche Ursache hierfür wurde die durchschnittliche Salzkonzentration der verschiedenen Chromatographiearten identifiziert, welche bei der HIC deutlich höher liegt. Hierzu passt auch eine stärkere Ausprägung der Mischungseffekte bei geringen Gradientenlängen in der CEC, da die Elutions-Salzkonzentration mit steigender Gradientenlänge abnimmt. Ebenfalls kann die Überlagerung der verschiedenen Ioneneffekte in der IEC für die geringere Ausprägung der synergetischen Effekte verantwortlich sein: In der IEC werden elektrostatische Ionen-Effekte, die ausschlaggebend für den Elutions-Mechanismus sind, und die Modulation von hydrophoben Effekten, die einen Einfluss auf die Struktur der Proteine haben können, kombiniert, während in der HIC der Einfluss auf die hydrophoben Kräfte dominiert. Ein Wirken der synergetischen Salzeffekte auf die Modulation der Hydrophobizität würde somit den stärkeren Effekt auf die HIC erklären.

Darüber hinaus wurde ein signifikanter Einfluss der Gradientenlänge auf den Verlauf der Separation über der Salzzusammensetzung beobachtet. Bei kurzen Gradientenlängen eluiert BSA vor LYZ, was sich bei höheren Gradientenlängen umkehrt. Die optimale Trennung von BSA und LYZ wird mit reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei langen Gradienten erreicht.

5 Beschreibung von Mischungseinflüssen mit der Yamamoto-Methode

In diesem Abschnitt wird die Yamamoto-Methode zur Bestimmung von Modellparametern für die SMA-Isotherme angewendet. Dabei sollen die in Kapitel 4 beobachteten Einflüsse von Salzmischungen auf die untersuchten Proteine in der CEC berücksichtigt werden, indem die Modellparameter der Isotherme als Funktion der Salzzusammensetzung beschrieben werden. Eine geeignete Bestimmung von Modellparametern stellt hierbei die Grundlage für eine mechanistische Modellierung der CEC-Prozesse in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung dar. Kapitel 5.1 beschreibt die für dieses Vorgehen verwendete Methoden. In Kapitel 5.2 werden die erhaltenen Modellparameter vorgestellt und in Kapitel 5.3 auf ihre Sensitivität für die experimentellen Daten untersucht. Die Genauigkeit von mit den erhaltenen Parametern berechneten Retentionsfaktoren wird in Kapitel 5.4 betrachtet. Anschließend werden in Kapitel 5.5 die Ergebnisse für CYC vorgestellt, welche für die mechanistische Modellierung in Kapitel 6 benötigt werden, bevor in Kapitel 5.6 eine Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse erfolgt.

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Charakterisierung der Chromatographie-Säule

Für die Bestimmung der Modellparameter der SMA-Isotherme wird die Kapazität Λ der Säule benötigt. Um diese zu ermitteln, müssen die Porositäten der Säule ermittelt werden. Hierzu wurden die ersten drei Schritte des sequenziellen Verfahrens (siehe Tabelle 6.1) durchgeführt. Dabei wurde 1 g/L Blue-Dextran als nicht-porengängiger Tracer und 1% Aceton als porengängiger Tracer sowie zur Bestimmung der Totzeit beziehungsweise des Totvolumens der Anlage V_{plant} verwendet. Die Bestimmung von ϵ_t wird in Kapitel 6.1.1 näher beschrieben. Die Kapazitätsbestimmung selbst erfolgte über eine Titration. Die Säule wird für mindestens 90 min bei einer Flussrate von 1 mL/min mit einer Essigsäure-Lösung bei pH 3 gespült, um sämtliche Bindeplätze mit H^+ -Ionen zu besetzen [119]. Anschließend erfolgt ein Waschschrift mit reinem Wasser, bevor NaOH-Lösung mit einem genau bestimmten pH-Wert auf die Säule gegeben wird [120].

Die Na^+ -Ionen verdrängen die H^+ -Ionen von den Bindeplätzen, welche daraufhin die OH^- -Ionen neutralisieren und zu H_2O reagieren. Wenn alle H^+ -Ionen ausgetauscht sind, beginnt NaOH am Säulenauslass auszutreten. Dies kann im Leitfähigkeitsdetektor an einer Zunahme der Leitfähigkeit beobachtet werden. Aus dem Volumen der verbrauchten NaOH-Lösung V_{NaOH} bis zum Durchbruch, der aus dem pH-Wert errechneten Konzentration an NaOH c_{NaOH} sowie der Porosität der Säule kann nun die Kapazität der Säule mit Gleichung 5.1 bestimmt werden. [8,120]

$$\Lambda = \frac{c_{\text{NaOH}}(V_{\text{NaOH}} - V_0)}{V_S} = \frac{c_{\text{NaOH}}(V_{\text{NaOH}} - \epsilon_t V_C - V_{\text{plant}})}{(1 - \epsilon_t) V_C} \quad 5.1$$

Die Größe Λ ist hierbei auf das Feststoffvolumen V_S des Adsorbens bezogen. Wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben können für die Beschreibung der Adsorption verschiedene Bezugsgrößen verwendet werden. Da in dieser Arbeit q auf V_S bezogen wird, muss für Λ analog vorgegangen werden.

5.1.2 Bestimmung von K_{eq} und ν

Die experimentellen Daten aus Kapitel 4 werden mit der Yamamoto-Gleichung (Gleichung 2.58) ausgewertet. An den in Kapitel 4 verwendeten Salzzusammensetzungen für Mischungen aus Na^+ , NH_4^+ , Cl^- und SO_4^{2-} (siehe Abbildung 4.1) werden die experimentellen Daten für BSA und LYZ für die Gradientenlängen von 3 CV, 5 CV, 10 CV und 15 CV verwendet, um die Gleichgewichtskonstante K_{eq}

Beschreibung von Mischungseinflüssen mit der Yamamoto-Methode

und die charakteristische Ladung ν für diese Salzzusammensetzung zu bestimmen. Die hierfür benötigte Salzkonzentration während der Protein-Elution $c_{s,R}$ wird wie in Gleichung 5.2 beschrieben aus der Retentionszeit des Proteins t_R , der Dauer des Waschschrittes t_w , der Retentionszeit eines porengängigen Tracers t_0 sowie der Dauer des Gradienten t_G berechnet:

$$c_{s,R} = c_{s,0} + (c_{s,final} - c_{s,0}) \frac{t_R - t_0 - t_w}{t_G} \quad 5.2$$

Mit den dazugehörigen normalisierten Gradientensteigungen GH (siehe Gleichung 2.55) lassen sich über eine lineare Regression mit den Gleichungen 5.3 und 5.4 die Steigung a_1 und der Achsenabschnitt a_0 der Auftragung von $\log(GH)$ gegen $\log(c_{s,R})$ bestimmen [121]. Hierbei bezeichnen $\overline{\log(c_{s,R})}$ und $\overline{\log(GH)}$ die Mittelwerte der entsprechenden Größe.

$$a_1 = \frac{\sum_n (\log(c_{s,R,n}) - \overline{\log(c_{s,R})}) (\log(GH_n) - \overline{\log(GH)})}{\sum_n (\log(c_{s,R,n}) - \overline{\log(c_{s,R})})^2} \quad 5.3$$

$$a_0 = \overline{\log(GH)} - a_1 \overline{\log(c_{s,R})} \quad 5.4$$

Aus a_0 und a_1 können anschließend mit den Gleichungen 5.5 und 5.6 K_{eq} und ν berechnet werden (vergleiche Abschnitt 2.5.1):

$$\nu = a_1 - 1 \quad 5.5$$

$$K_{eq} = \frac{10^{-a_0}}{A^\nu (\nu + 1)} \quad 5.6$$

Mit den so erhaltenen Werten kann mit den Kalibrierungsversuchen (siehe Abbildung 4.1) eine Regression für K_{eq} und ν über die Salzzusammensetzung erfolgen (vergleiche Kapitel 4). Analog zu Gleichung 4.4 werden mit den Gleichungen 5.7 und 5.8 K_{eq} und ν über Einzelionen-Faktoren sowie Interaktions-Parameter für Anionen beziehungsweise Kationen berechnet. Aufgrund des Wertebereichs wird K_{eq} wie von Werner und Hasse für die HIC empfohlen als logarithmische Größe beschrieben [70].

$$\nu = h_{\nu,(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} + h_{\nu,\text{Na}^+} x_{\text{Na}^+} + h_{\nu,\text{Cl}^-} x_{\text{Cl}^-} + h_{\nu,\text{Na}^+,\text{NH}_4^+} x_{\text{Na}^+} (1 - x_{\text{Na}^+}) + h_{\nu,\text{Cl}^-,\text{SO}_4^{2-}} x_{\text{Cl}^-} (1 - x_{\text{Cl}^-}) \quad 5.7$$

$$\log(K_{eq}) = h_{K_{eq},(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} + h_{K_{eq},\text{Na}^+} x_{\text{Na}^+} + h_{K_{eq},\text{Cl}^-} x_{\text{Cl}^-} + h_{K_{eq},\text{Na}^+,\text{NH}_4^+} x_{\text{Na}^+} (1 - x_{\text{Na}^+}) + h_{K_{eq},\text{Cl}^-,\text{SO}_4^{2-}} x_{\text{Cl}^-} (1 - x_{\text{Cl}^-}) \quad 5.8$$

5.1.3 Validierung der Parameter

Analog zur Validierung in Kapitel 4 werden K_{eq} und ν auch an den Validierungspunkten in Abbildung 4.1 mit den Gleichungen 5.3 bis 5.6 bestimmt. Die *NRMSE*-Werte können für beide Parameter mit Gleichung 4.5 bestimmt werden. Für die Gleichgewichtskonstante wird auch für diese Auswertung eine logarithmische Skala verwendet und somit $\log K_{eq}$ als y eingesetzt.

Für die Bewertung von Abweichungen von K_{eq} und ν wird die Sensitivität der Parameter am Beispiel von BSA mit NaCl betrachtet. Dazu werden die Yamamoto-Gleichung (Gleichung 2.58) und die ermittelten Parameter K_{eq} und ν an dieser Stelle als absolute Wahrheit (sogenannte „ground truth“) betrachtet. Hiermit werden die Salzkonzentrationen bei der Elution $c_{s,R}$ für die Gradientenlängen 3 CV, 5 CV, 10 CV und 15 CV berechnet. Diese Werte stellen nun für diese Betrachtung die absolut wahren

$c_{s,R}$ -Werte dar. Anschließend wird jeweils einer dieser $c_{s,R}$ -Werte um 2% erhöht oder verringert und aus dem so erhaltenen Set erneut Werte für K_{eq} und v berechnet. Dieses neue Parameter-Set kann wiederum verwendet werden um neue $c_{s,R}$ -Werte für die betrachteten Gradientenlängen zu erhalten. Zur Betrachtung der Abweichungen der Salzkonzentrationen und Parameter von den wahren Werten wird der in Gleichung 5.9 beschriebene mittlere, absolute prozentuale Fehler (*mean absolute percentage error* [MAPE]) verwendet [122,123]. Für die Salzkonzentrationen werden die Gradientenlängen 3 CV, 5 CV, 10 CV und 15 CV als Messpunkte betrachtet und $c_{s,R}$ als y in Gleichung 5.9 eingesetzt. Für K_{eq} und v ist jeweils nur ein einzelner Wert zum Vergleich vorhanden, sodass $N=1$ gilt. Die als absolute Wahrheit betrachteten Werte werden hierbei als die experimentellen Daten $y_{meas,n}$ eingesetzt. Für die Gleichgewichtskonstante wird weiterhin eine logarithmische Skala verwendet und somit $\log K_{eq}$ als y eingesetzt.

$$MAPE = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \left| \frac{y_{meas,n} - y_{pred,n}}{y_{meas,n}} \right| \quad 5.9$$

Darüber hinaus ist mit K_{eq} und v mit der Yamamoto-Gleichung eine Berechnung von Retentionszeiten beziehungsweise -faktoren für unterschiedliche Gradientenlängen möglich (Gleichungen 2.58 und 5.2). Mit den regressierten K_{eq} und v -Werten werden k' -Werte in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung bei den Gradientenlängen 3 CV, 5 CV, 10 CV und 15 CV berechnet und mit den Ergebnissen der direkten k' -Regression aus Kapitel 4 sowie den Validierungsversuchen verglichen. Des Weiteren werden an den Validierungspunkten (siehe Tabelle 4.1) weitere experimentelle k' -Werte für die Gradientenlängen 7 CV und 17 CV aufgenommen und mit den Vorhersagen der Yamamoto-Gleichung verglichen. Die Qualität der Vorhersagen wird ebenfalls mit dem MAPE-Wert beschrieben, wobei nur die Validierungsversuche als experimentelle Daten betrachtet werden.

5.1.4 Untersuchungen mit Cytochrom C

Für die in Kapitel 6 betrachtete mechanistische Modellierung und die in Kapitel 7 durchgeführte Simulationsstudie eines Trennproblems wird ebenfalls das Protein CYC verwendet. Hierbei werden nur Mischungen aus NaCl und $(NH_4)_2SO_4$ betrachtet. Analog zu dem Vorgehen bei BSA und LYZ werden aus den in Abbildung 4.10 dargestellten Retentionsfaktoren bei den Gradientenlängen 3 CV, 5 CV, 10 CV und 15 CV bei der entsprechenden Zusammensetzung mit der Yamamoto-Methode jeweils ein Wert für v und K_{eq} bestimmt. Da in diesem Fall die Anteile x_{Na^+} und x_{Cl^-} immer identisch sind, vereinfachen sich die Regressionsgleichungen 5.7 und 5.8 zu einer einfachen quadratischen Regression (Gleichung 5.10).

$$y(x) = a_0 + a_1 x + a_2 x^2 \quad 5.10$$

Die Salzzusammensetzung kann hierbei über den NaCl-Anteil x beschrieben werden, der identisch zu x_{Na^+} und x_{Cl^-} ist. Hierzu werden dieselben Salzzusammensetzungen wie für die anderen Proteine entlang der Mischungsachse aus NaCl und $(NH_4)_2SO_4$ als Kalibrierungs- und Validierungsversuche verwendet. Die Zielgröße y steht für $\log K_{eq}$ oder v . Der Zusammenhang der quadratischen Regressionsparameter mit den Parametern der Gleichungen 5.7 und 5.8 ist in den Gleichungen 5.11-5.13 dargestellt. Somit vereinfacht sich die Regression durch die Betrachtung dieser binären Salzmischungen von fünf auf drei unterschiedliche Parameter.

$$a_0 = h_{(NH_4)_2SO_4} \quad 5.11$$

$$a_1 = h_{Na^+} + h_{Cl^-} + h_{Na^+,NH_4^+} + h_{Cl^-,SO_4^{2-}} \quad 5.12$$

$$a_2 = -(h_{\text{Na}^+, \text{NH}_4^+} + h_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}) \quad 5.13$$

5.2 Bestimmung von Modellparametern

Die mit den Vorversuchen ermittelten Porositäten der Säule ε_c und ε_t sowie die Kapazität Λ sind in Tabelle 5.1 aufgelistet. Die Werte für die Porositäten liegen in einem üblichen Bereich für vergleichbare Ionentauscher [8,124]. Der Hersteller gibt für die Säule eine Kapazität von 0,15 M bis 0,2 M bezogen auf das gesamte Säulenvolumen an. Die ermittelte Bindekapazität liegt, wird sie ebenfalls auf das gesamte Säulenvolumen statt auf das Feststoffvolumen bezogen, mit einem Wert von 0,177 M innerhalb dieses Bereichs. Die Bestimmung der Säulenparameter wird daher als erfolgreich betrachtet.

Die Größen K_{eq} und ν werden an allen untersuchten Salzzusammensetzungen mit der Yamamoto-Gleichung bestimmt. In Abbildung 5.1 ist beispielhaft der Yamamoto-Plot mit Regressionsgeraden für die Ergebnisse von BSA und LYZ mit NaCl dargestellt. Je länger ein Gradient ist, desto geringer ist seine Gradientensteigung (siehe Gleichung 2.56). Somit sind Messpunkte mit längeren Gradienten bei niedrigeren $\log(GH)$ -Werten zu finden. Es lässt sich erkennen, dass sich die Regressionsgeraden von BSA und LYZ schneiden, was mit einer Änderung der Retentionsreihenfolge einhergeht. Dies stimmt mit den in Kapitel 4.2 beschriebenen Beobachtungen überein. Die Anwendung der Yamamoto-Gleichung liefert auch eine Erklärung für dieses Phänomen: Wie in Gleichung 5.5 dargestellt steht die Steigung im Yamamoto-Plot im direkten Zusammenhang mit der charakteristischen Ladung ν . Ein hohes ν bedeutet hierbei eine hohe Steigung, was eine stärkere Änderung der Salzkonzentration bei der Elution $c_{s,R}$ beziehungsweise der Retentionszeit t_R für andere Gradientenlängen mit sich bringt. Die Regressionsgeraden zweier Proteine mit unterschiedlichen charakteristischen Ladungen haben somit rechnerisch immer einen Schnittpunkt im Yamamoto-Plot, an dem sich die Elutionsreihenfolge umkehrt. Hierbei kann es vorkommen, dass der Schnittpunkt außerhalb des relevanten Wertebereichs liegt, so dass für die praktische Anwendung diese theoretische Änderung der Elutionsreihenfolge keine Rolle spielt. Für BSA und LYZ liegt dieser Schnittpunkt aber für alle untersuchten Salze in einem relevanten Wertebereich.

Dieses Verhalten lässt sich auch durch die Betrachtung der Bindereaktion erklären: Moleküle mit einer hohen charakteristischen Ladung interagieren mit vielen Bindestellen des Adsorbens gleichzeitig. Hierdurch wird das Bindeverhalten dieser Moleküle besonders stark durch die Salzkonzentration beeinflusst. Wie in Gleichung 2.8 dargestellt geht ν als Exponent der Salzkonzentration c_s in die Gleichgewichtskonstante ein. Ein hohes ν sorgt somit bei geringen Salzkonzentrationen für eine besonders hohe und bei hohen Salzkonzentrationen für eine besonders geringe Beladung q . Bei langen Gradienten wird das Bindeverhalten der Moleküle bei geringen Salzkonzentrationen wichtiger, da diese Bedingungen eine längere Zeit vorherrschen und die Salzkonzentration bei der Elution sinkt.

Tabelle 5.1: Ergebnisse der experimentellen Bestimmung der Säulenparameter.

Größe	Wert
Λ	1,715 M
ε_c	0,275
ε_t	0,897

Beschreibung von Mischungseinflüssen mit der Yamamoto-Methode

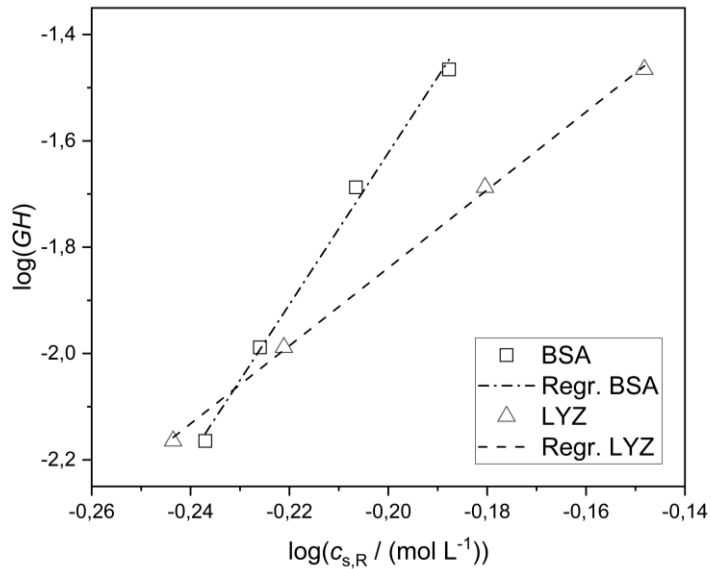


Abbildung 5.1: Yamamoto-Plot von BSA und LYZ mit reinem NaCl. Die Symbole stellen die experimentellen Daten bei Gradientenlängen von 3 CV, 5 CV, 10 CV und 15 CV dar und die Linien repräsentiert die Regressionsgeraden.

Die im Vergleich höhere Beladung q von Molekülen mit hoher charakteristischer Ladung bei geringen Salzkonzentrationen führt zu einer verhältnismäßig höheren Retentionszeit unter diesen Bedingungen.

In Abbildung 5.1 lässt sich erkennen, dass die Steigung von BSA deutlich höher als die von LYZ ist. Der hieraus ableitbare signifikant höhere ν -Wert von BSA entspricht hierbei den aus der Molekülgröße gefolgerten Erwartungen. Die molare Masse \tilde{M} von BSA ist mehr als viermal so hoch wie die von LYZ, was eine Interaktion mit mehr Bindestellen des Adsorbens wahrscheinlicher macht.

Mit den so erhaltenen Werten für K_{eq} und ν werden die in Tabelle 5.2 dargestellten Parameter für die Gleichungen 5.7 und 5.8 bestimmt. Die resultierenden Verläufe von K_{eq} und ν über die Salzzusammensetzung werden zusammen mit den Kalibrierungs- und Validierungspunkten für BSA in Abbildung 5.2 und für LYZ in Abbildung 5.3 dargestellt. Hierbei ist zu beachten, dass für eine bessere Sichtbarkeit des Ebenenverlaufs die Achsen der Salzzusammensetzung für die Daten von ν in einer anderen Ausrichtung gezeigt werden.

Tabelle 5.2: Parameter der angepassten Modellgleichung für BSA und LYZ zur Bestimmung von $\log K_{eq}$ und ν .

Parameter	$\log K_{eq}$		ν	
	BSA	LYZ	BSA	LYZ
$h_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$	-2,6125	-0,2777	12,416	4,3926
h_{Na^+}	-1,2584	-0,376	1,1153	0,2603
h_{Cl^-}	-1,8604	-1,1629	0,5729	1,5474
$h_{\text{Na}^+, \text{NH}_4^+}$	1,0064	0,1123	-1,9408	-0,1053
$h_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}$	-3,0298	-0,0927	5,8687	0,2804

Beschreibung von Mischungseinflüssen mit der Yamamoto-Methode

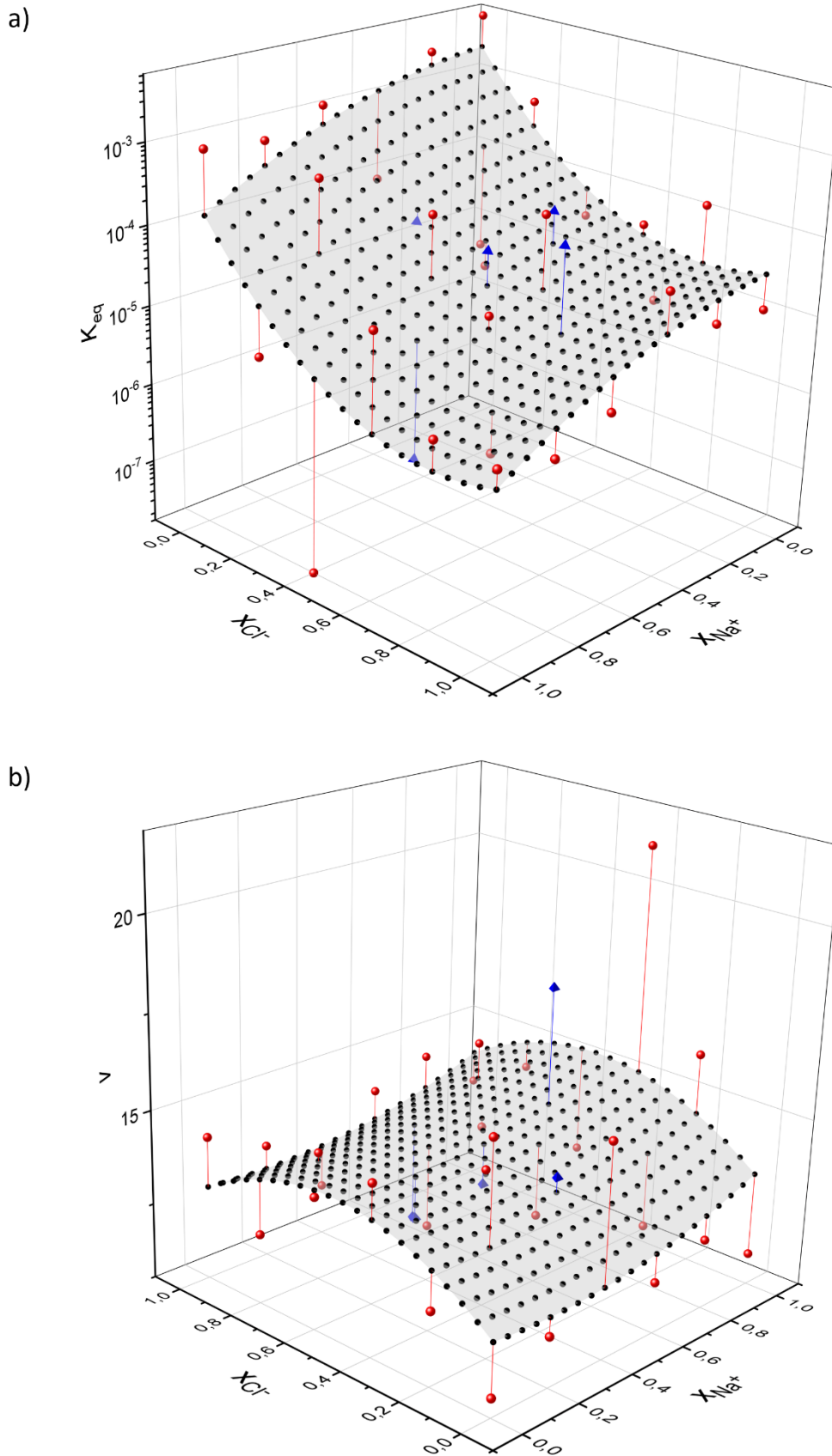
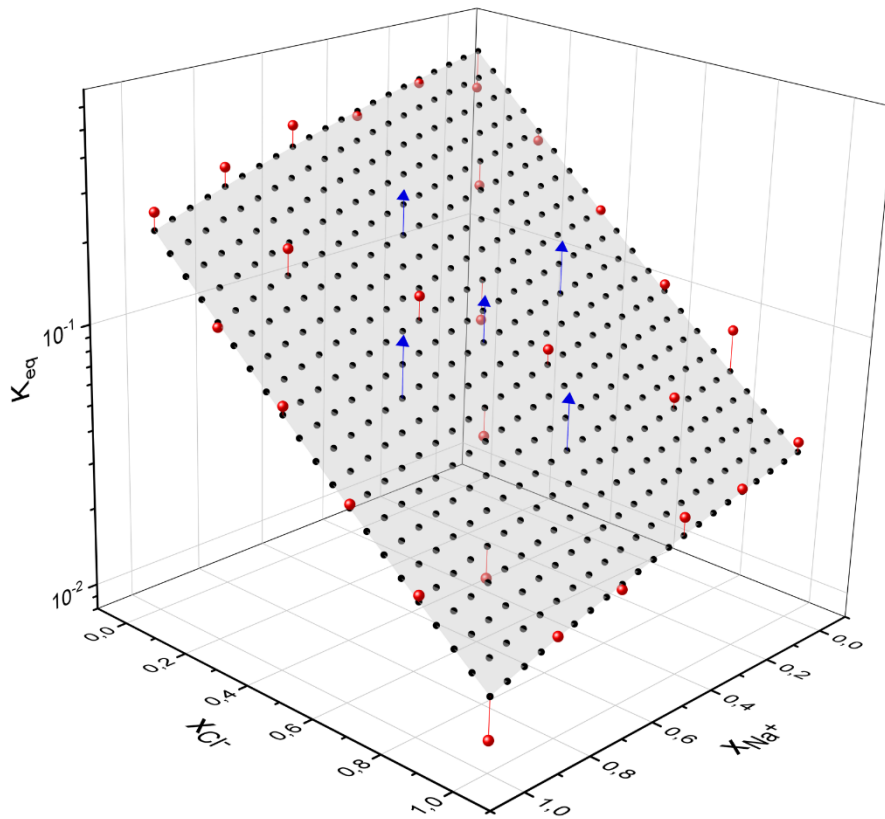


Abbildung 5.2: Die mit der Yamamoto-Methode bestimmten Parameter a) Gleichgewichtskonstante K_{eq} und b) charakteristische Ladung v von BSA in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung. Die roten Kugeln stellen die Kalibrierungsversuche und die blauen Tetraeder die Validierungsversuche dar. Die Ebene zeigt die Regression durch die Modellgleichung an. In Plot b) ist die Ausrichtung der Achsen für eine bessere Sichtbarkeit gedreht.

a)



b)

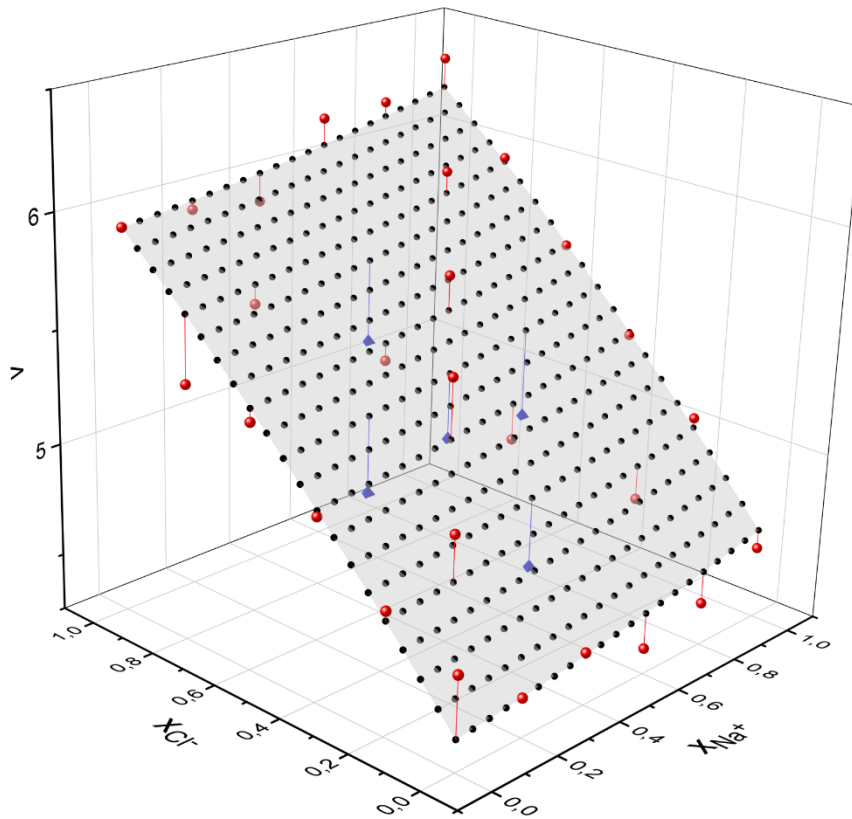


Abbildung 5.3: Die mit der Yamamoto-Methode bestimmten Parameter a) Gleichgewichtskonstante K_{eq} und b) charakteristische Ladung v von LYZ in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung. Die roten Kugeln stellen die Kalibrierungsversuche und die blauen Tetraeder die Validierungsversuche dar. Die Ebene zeigt die Regression durch die Modellgleichung an. In Plot b) ist die Ausrichtung der Achsen für eine bessere Sichtbarkeit gedreht.

Beschreibung von Mischungseinflüssen mit der Yamamoto-Methode

Tabelle 5.3: NRMSE-Werte für die Kalibrierungs- und Validierungsversuche für die $\log K_{eq}$ und v -Werte von BSA und LYZ.

Parameter	$\log K_{eq}$		v	
	BSA	LYZ	BSA	LYZ
NRMSE Kalibrierung	13,73%	4,90%	18,54%	6,67%
NRMSE Validierung	15,55%	10,67%	19,05%	17,15%

Im Folgenden wird für eine bessere Einordnung der Beobachtungen der Zusammenhang der Parameter mit den resultierenden Retentionsfaktoren betrachtet. Aus der Definition von K_{eq} (Gleichung 2.8) folgt, dass wenn die anderen Werte konstant sind, eine höhere Gleichgewichtskonstante mit einer höheren Beladung und somit einer höheren Retentionszeit einhergeht. Der Einfluss von v auf die Beladung q ist komplexer: Bei konstantem K_{eq} nimmt die Beladung bei der gleichen, geringen Proteinkonzentration mit steigendem v zu, wenn $c_s < \Lambda - (v_i + \sigma_i)q_i$ gilt (siehe Gleichung 2.11). Hierbei spielt die Definition des Referenzvolumens von q und Λ eine wichtige Rolle (vergleiche Kapitel 2.2.2), was verdeutlicht, dass die Modellparameter der SMA Isotherme von diesen Definitionen abhängen. Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und die Definition des Feststoffvolumens V_s als Referenzvolumen führen zu Werten für Λ , die über der finalen Salzkonzentration der Versuche liegen (siehe Kapitel 3.1 und Tabelle 5.1). Da sich die Proteinkonzentration bei den betrachteten Versuchen im geringen Bereich befindet, sorgt ein steigendes v bei konstantem K_{eq} für steigende Retentionsfaktoren. Die von Chen et al. veröffentlichten Daten bestätigen, dass sich dieser Trend bei höheren Protein- und Salzkonzentrationen umkehren kann [125].

Die NRMSE-Werte für die Kalibrierungs- und Validierungsversuche sind in Tabelle 5.3 aufgeführt. Die Daten von BSA zeigen eine weite Streuung um die Regressionsebene. Die resultierenden NRMSE-Werte spiegeln diese geringe Übereinstimmung der Daten mit Werten von deutlich über 10% wider. Die Abweichungen der Kalibrierungs- und Validierungsversuche liegen in einem ähnlichen Bereich, wobei die Werte für die Validierungsversuche etwas höher liegen. Der Messpunkt bei $x_{Na^+} = 1$ und $x_{Cl^-} = 0,4$ weist sowohl für v als auch für $\log K_{eq}$ besonders hohe Abweichungen auf. Hierbei fällt auf, dass die Regressionsebene an dieser Stelle für v unterhalb und für $\log K_{eq}$ oberhalb des Kalibrierungsversuchs liegt. Ein Vergleich der anderen Messpunkte bestätigt diese Beobachtung: Wenn die Differenz zwischen den Messpunkten und der Regressionsebene $y_{meas} - y_{pred}$ betrachtet wird, weist diese an jeder Stelle ein anderes Vorzeichen für v als für K_{eq} auf. Die Regressionsebene für K_{eq} weist insgesamt abfallende Werte für höhere Anteile an Na^+ und Cl^- auf, wobei die Abnahme entlang der Anionenachse stärker ausgeprägt ist. Zusätzlich führt der stark negative $h_{Cl^-,SO_4^{2-}}$ -Wert zu einer sichtbaren Krümmung nach unten entlang dieser Achse. Für v lässt sich insgesamt eine leichte Zunahme der Regressionswerte mit steigenden Anteilen an Na^+ und Cl^- beobachten. Des Weiteren tritt entlang der Anionenachse eine deutliche Krümmung nach oben auf.

Die Daten von LYZ weisen eine geringere Streuung auf. Die NRMSE-Werte der Kalibrierungsversuche liegen insgesamt etwas oberhalb der Werte von der Retentionsfaktor-Regression (siehe Kapitel 4.3) aber deutlich unterhalb der Werte von BSA. Die Abweichungen für die Validierungsversuche fallen im Verhältnis hierzu deutlich höher aus und liegen auf einem ähnlichen Niveau wie für BSA. Ein Vergleich der Messpunkte mit der Regressionsebene zeigt, dass an den Validierungsstellen die Messpunkte alle mit einem ähnlichen Abstand für v unterhalb und für $\log K_{eq}$ oberhalb der Regressionsebene liegen. Für die Kalibrierungspunkte lässt sich ebenfalls der gleiche Trend von wechselnden Vorzeichen der Differenz $y_{meas} - y_{pred}$ für v und K_{eq} wie bei BSA beobachten. Die

Regressionsebene für K_{eq} weist analog zu den Beobachtungen für BSA abfallende Werte für höhere Anteile an Na^+ und Cl^- auf, wobei die Abnahme entlang der Anionenachse stärker ausgeprägt ist. Für ν lässt sich eine hohe Zunahme der Werte mit steigenden Cl^- -Anteilen und eine geringe Zunahme mit steigenden Na^+ -Anteilen beobachten. Die Interaktionsparameter $h_{\text{Na}^+, \text{NH}_4^+}$ und $h_{\text{Cl}^-, \text{SO}_4^{2-}}$ weisen nur geringe Werte auf und die resultierende Krümmung ist zu vernachlässigen.

Bei den hier erhaltenen Regressionsebenen treten insbesondere für BSA hohe *NRMSE*-Werte auf. Eine Untersuchung der Sensitivität der Modellparameter und eine Bewertung der Aussagekraft der Abweichungen erfolgt in Kapitel 5.3. Die grundsätzlichen Verläufe der Regressionsebenen von ν und K_{eq} weisen für BSA und LYZ einige Gemeinsamkeiten auf. Der Vergleich der Parameter in Tabelle 5.2 bestätigt, dass für LYZ und BSA die Vorzeichen aller Einzelionen- und Interaktionsparameter für eine Größe immer dasselbe Vorzeichen haben. Dies deutet darauf hin, dass die Parameter von beiden Proteinen hauptsächlich durch ähnliche Effekte beeinflusst werden. Für LYZ lässt sich eine große Ähnlichkeit im Verlauf der Regressionsebenen für $\log K_{eq}$ (Abbildung 5.3) und den Retentionsfaktoren (Abbildung 4.6) beobachten. Dies würde zu dem erwarteten Zusammenhang zwischen Gleichgewichtskonstante und Retentionsverhalten passen. Dieser direkte Zusammenhang ist allerdings nur gültig, wenn ν als konstant betrachtet wird. Im Fall von LYZ nimmt ν gegenläufig zu K_{eq} ab und trägt somit zu einer Verringerung der Retentionszeit bei. Besonders ausgeprägt ist dieser Abfall in Richtung von höheren SO_4^{2-} -Anteilen. Somit könnte dieser Einfluss auf die charakteristische Ladung durch die erhöhte Anionenstärke erklärt werden. Die zweiwertigen Ionen sorgen für eine stärkere elektrostatische Abschirmung und könnten so dazu beitragen, dass das Protein in einer etwas anderen Ausrichtung an das Adsorbens bindet. Die stärkere Ladungsabschirmung verhindert dabei die Anziehung von weiteren positiven Ladungen des Proteins durch die negative Adsorbensoberfläche. Die steigenden Werte für K_{eq} können ebenfalls mit der Ladungsabschirmung durch die Anionen zusammenhängen, da hiermit auch die Affinität der Austausch-Ionen Na^+ oder NH_4^+ zu dem Adsorbens sinkt. Darüber hinaus können aber auch leichte Strukturänderungen der Proteine auftreten. Bei dieser Interpretation muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Yamamoto-Methode viele Annahmen und Vereinfachungen trifft. In einem solchen Fall ist die Übersetzung des Parameters in eine direkte physikalische Bedeutung, also etwa die Interpretation von ν als tatsächliche Anzahl an interagierenden Bindestellen auf molekularer Ebene, nur bedingt möglich.

5.3 Sensitivität der Modellparameter

Zur Einordnung der hohen Abweichungen wird der Einfluss von geringen Fehlern in experimentellen Daten auf resultierende Parameter sowie deren Vorhersagekraft mit der Yamamoto-Methode betrachtet. Ausgehend von den für BSA mit NaCl bestimmten Parametern wird der Einfluss von leichten Änderungen in einzelnen experimentellen Daten auf die Parameter K_{eq} und ν sowie auf aus diesen neuen Parametern berechneten Salzkonzentrationen $c_{s,R}$ betrachtet. Die resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle 5.4 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass eine einzelne, recht geringe Abweichung einer gemessenen Salzkonzentration zu massiven Änderungen der zugehörigen Modellparameter der SMA-Isotherme führen kann. Die *MAPE*-Werte der aus diesen Parametern bestimmten Salzkonzentrationen fallen hingegen wieder deutlich geringer aus. Ein Vergleich der Vorzeichen der Differenz von den neu berechneten zu den als wahr betrachteten Werten von K_{eq} und ν bestätigt die Beobachtung der gegensätzlichen Änderungen.

Beschreibung von Mischungseinflüssen mit der Yamamoto-Methode

Tabelle 5.4: MAPE-Werte für K_{eq} , v und daraus abgeleitete $c_{s,R}$ -Werte mit der Yamamoto-Methode bei Änderungen einzelner Experimente. Die Vorzeichenfunktion sgn gibt an, ob die Parameter nach der Änderung größer (1) oder kleiner (-1) als die ursprünglichen Werte sind.

Veränderter Gradient	Änderung von $c_{s,R}$	MAPE($c_{s,R}$)	MAPE(log K_{eq})	MAPE(v)	sgn(ΔK_{eq})	sgn(Δv)
15 CV	+2%	0,60%	17,16%	15,57%	-1	1
10 CV	+2%	0,50%	3,37%	3,44%	-1	1
5 CV	+2%	0,51%	11,69%	9,71%	1	-1
3 CV	+2%	0,71%	19,04%	16,08%	1	-1
15 CV	-2%	0,73%	17,74%	15,80%	1	-1
10 CV	-2%	0,56%	11,82%	10,71%	1	-1
5 CV	-2%	0,50%	3,02%	2,11%	-1	1
3 CV	-2%	0,62%	21,11%	17,88%	-1	1

Diese Sensitivität der Modellparameter beschreibt eine Uneindeutigkeit in der Parameterbestimmung. Zwar ist die Regression mit der Yamamoto-Methode mit festen Datenpunkten eindeutig lösbar, doch gibt es hierbei mehrere Parameterpaare mit ähnlich geringen Abweichungswerten. Eine leichte Änderung des Datensatzes reicht dann aus, um ein anderes Parameterpaar aus der Regression zu erhalten.

In der Literatur beschreiben Osberghaus et al. ebenfalls Beobachtungen im Zusammenhang mit Uneindeutigkeiten der Modellparameter der SMA-Isotherme [8]. Wenn für ein experimentelles Datenset der Wert für K_{eq} für verschiedene festgesetzte v -Werte bestimmt wird, so erhält man verschiedene Parameterpaare die eine ähnliche, hohe Bestimmtheit zu den experimentellen Daten aufweisen. Hierbei beobachten sie ebenfalls, dass höhere Werte für einen Parameter geringere Werte für den anderen bedeuten. [8]

Hiermit wird bestätigt, dass geringe experimentelle Abweichungen einen großen Einfluss auf die resultierenden Modellparameter der SMA-Isotherme haben können. Da hierbei aber gegenläufige Änderungen von K_{eq} und v auftreten, ist der Einfluss auf die Salzkonzentrationen beziehungsweise Retentionszeiten deutlich geringer ausgeprägt, da sich die Effekte teilweise ausgleichen. Eine Uneindeutigkeit in der Parameterbestimmung bedeutet in diesem Fall nicht, dass die ermittelten Parameter für eine Beschreibung der experimentellen Daten ungeeignet sind, sondern dass es verschiedene Parameterpaare von K_{eq} und v gibt, die die experimentellen Daten gut abbilden. Nach der Modellvorstellung der SMA-Isotherme beschreibt die charakteristische Ladung v die Anzahl der Bindestellen auf dem Adsorbens, mit der ein Protein interagiert (siehe Kapitel 2.2.2). Allerdings bestätigt die hier beschriebene Uneindeutigkeit in der Parameterbestimmung, dass die direkte physikalische Bedeutung der ermittelten Modellparameter im Allgemeinen nicht gesichert ist.

Ebenfalls stellen uneindeutige Parameterpaare ein Problem bei der Extrapolierbarkeit zu weiteren Gradientenlängen dar. So werden die Abweichungen von den wahren Werten der Salzkonzentrationen für zusätzliche Gradienten außerhalb der betrachteten Messpunkte im Allgemeinen auf Grund der unterschiedlichen Steigungen der Regressionsgeraden zunehmen. Die Extrapolation auf weitere Gradienten außerhalb der zum Fitting verwendeten Messpunkte könnte daher zu Problemen führen.

Um die Bestimmbarkeit der Parameter zu erhöhen, könnten weiter LGE-Versuche mit längeren Gradienten berücksichtigt werden. Die Abdeckung eines größeren Wertebereichs im Yamamoto-Plot würde die Identifizierbarkeit der Steigung und somit der charakteristischen Ladung erhöhen. Dies würde allerdings ebenfalls zu einem deutlich höheren experimentellen Aufwand führen. Ein weiterer

Einflussfaktor, der die Parameterbestimmung insgesamt positiv beeinflussen könnte, ist die Regression der ermittelten Parameter mit den Gleichungen 5.7 und 5.8. Durch die Form der semi-empirischen Gleichung wird ein ständiger Wechsel von steigenden und fallenden Parameterwerten über der Salzzusammensetzung verhindert. Hierdurch findet über eine große Datenmenge von 28 Kalibrierungspunkten, in welche jeweils vier experimentelle Retentionszeiten eingehen, eine Glättung der Parameterverläufe statt. Die hierbei erfolgende Mittelung der aus den zahlreichen experimentellen Daten ermittelten Parameter könnte also dazu führen, dass die resultierenden Ebenen sinnvolle Parameterpaare beinhalten, die zu einer Berechnung von Retentionszeiten bei unterschiedlichen Gradientenlängen geeignet sind.

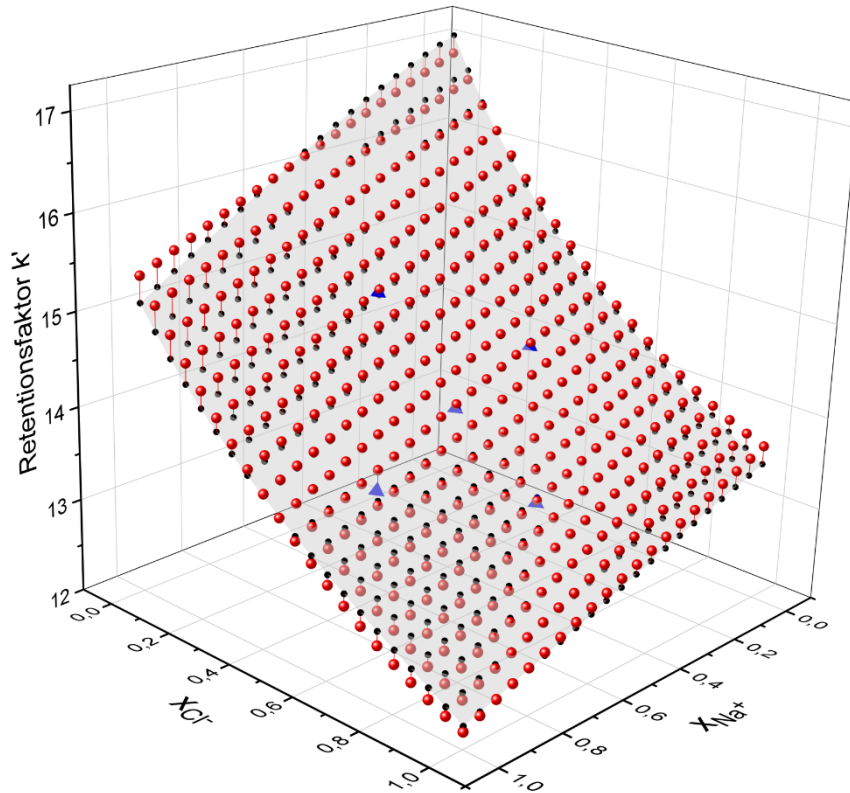
Aufgrund der hier beschriebenen Beobachtungen werden die hohen Abweichungen zwischen der Regressionsebene und den Messpunkten bei der Anwendung der Regressionsgleichung zur Bestimmung von K_{eq} und v als nicht zwangsläufig problematisch betrachtet. Die Abweichungen in den Messpunkten, mit gegenläufig nach oben und unten springenden Verläufen, sind durch kleine experimentelle Ungenauigkeiten und die Sensitivität der Parameter zu erklären. Durch die Regression mit einer semi-empirischen Gleichung werden diese Abweichungen über eine Vielzahl von Experimenten gemittelt und in einen klareren Verlauf überführt. Ob die so erhaltenen Parameter für die Berechnung von Retentionszeiten geeignet sind, wird im folgenden Kapitel untersucht.

5.4 Berechnung von Retentionsfaktoren

Mit dem so erhaltenen Verlauf der Parameter kann mithilfe der Gleichungen 2.58 und 5.2 die Retentionszeit für eine beliebige Salzzusammensetzung und eine beliebige Gradientenlänge berechnet werden. In einem ersten Schritt werden die auf diese Weise vorhergesagten Retentionsfaktoren mit den Ergebnissen der direkten Retentionsfaktor-Regression und den entsprechenden Validierungsversuchen (siehe Kapitel 4) verglichen. Die Ergebnisse für die Gradientenlängen von 15 CV und 3 CV sind in Abbildung 5.4 und Abbildung 5.5 dargestellt. Die Daten für die Gradientenlängen von 10 CV und 5 CV sind in Anhang C.1 zu finden. In Tabelle 5.5 sind die *MAPE*-Werte für die berechneten Retentionsfaktoren an den Validierungspunkten aufgetragen.

Es lässt sich erkennen, dass die Ebene aus der direkten Regression der Retentionsfaktoren insgesamt eine hohe Übereinstimmung mit den aus der Regression von K_{eq} und v berechneten Werten aufweist. Insbesondere im mittleren Bereich der Zusammensetzungen bei Mischungen mit hohen Anteilen verschiedener Ionen sind die Werte fast identisch, während in den Ecken der Grafiken bei den Reinsalzen die Abweichungen etwas größer sind. Somit entsprechen auch die grundsätzlichen Verläufe der mit der Yamamoto-Methode berechneten Retentionsfaktor-Ebenen denen der direkten Regression, mit einem hauptsächlich linearen Verlauf für LYZ und einer erkennbaren Krümmung entlang der Anionen-Achse für BSA (siehe Kapitel 4).

a) BSA



b) LYZ

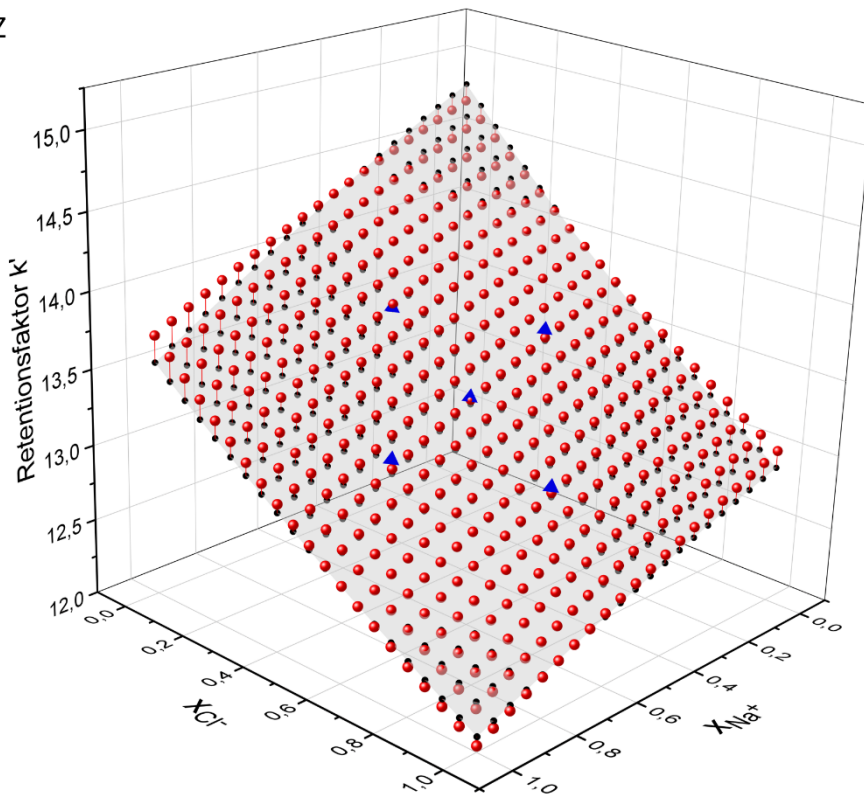
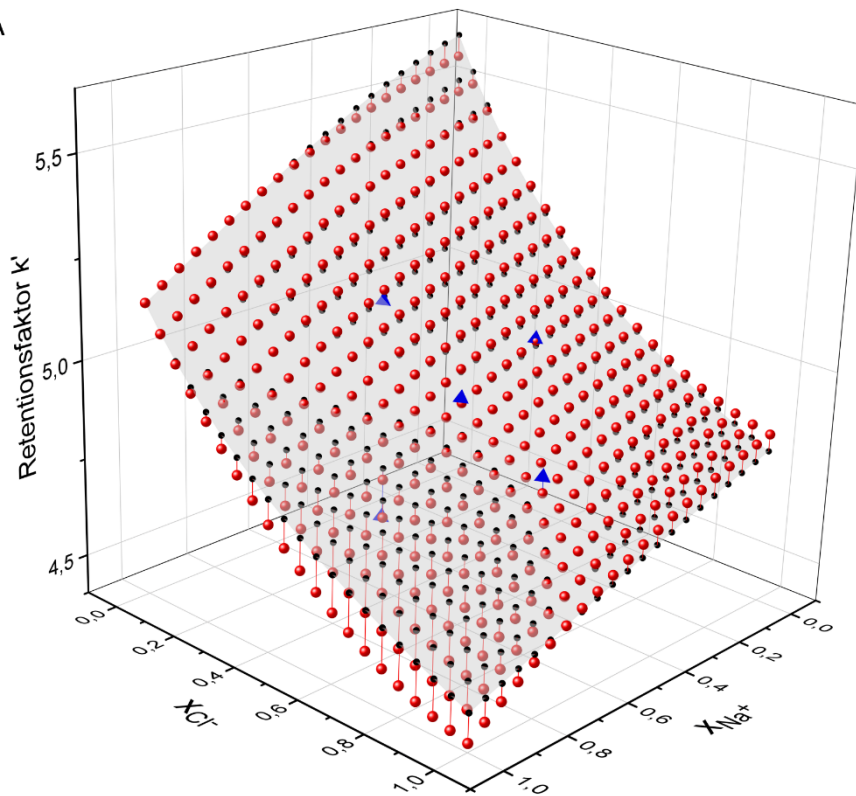


Abbildung 5.4: Vergleich der mit der Yamamoto-Methode berechneten mit den durch die kalibrierte Modellgleichung erhaltenen Retentionsfaktoren bei einer Gradientenlänge von 15 CV. Die Vorhersagen der Yamamoto-Methode sind als Ebene dargestellt, die Ergebnisse der direkten Retentionsfaktor-Regression als rote Kugeln und die Validierungsversuche als blaue Tetraeder. Es werden die Ergebnisse für a) BSA und b) LYZ gezeigt.

a) BSA



b) LYZ

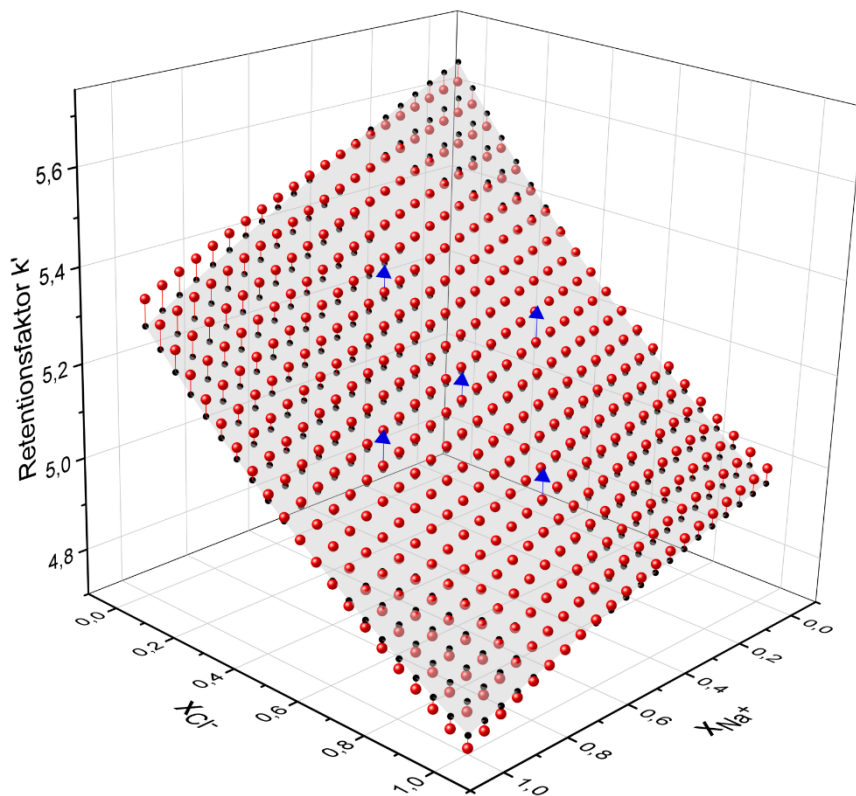


Abbildung 5.5: Vergleich der mit der Yamamoto-Methode berechneten mit den durch die kalibrierte Modellgleichung erhaltenen Retentionsfaktoren bei einer Gradientenlänge von 3 CV. Die Vorhersagen der Yamamoto-Methode sind als Ebene dargestellt, die Ergebnisse der direkten Retentionsfaktor-Regression als rote Kugeln und die Validierungsversuche als blaue Tetraeder. Es werden die Ergebnisse für a) BSA und b) LYZ gezeigt.

Tabelle 5.5: MAPE-Werte für die mit den regressierten Modellparametern der SMA-Isotherme berechneten Retentionsfaktoren für die beim Fitting berücksichtigten Gradientenlängen. Als experimentelle Daten wurden die fünf Validierungsversuche der jeweiligen Gradientenlänge verwendet.

	Protein	Gradientenlänge			
		15 CV	10 CV	5 CV	3 CV
MAPE(k')	BSA	0.55%	0.70%	0.30%	0.85%
	LYZ	0.45%	0.46%	0.59%	1.13%

Die Übereinstimmung der Ebenen nimmt insgesamt für BSA in den Bereichen der Reinsalze mit kürzeren Gradientenlängen ab, während sie für LYZ auf einem ähnlichen Niveau bleibt. Die Betrachtung der MAPE-Werte in Tabelle 5.5 zeigt sehr geringe Abweichungen der Validierungsversuche von den berechneten Werten. Mit Ausnahme des MAPE-Werts für LYZ bei einer Gradientenlänge von 3 CV sind alle Fehler unterhalb von 1%. Hierbei ist zu beachten, dass die Validierungspunkte eher im Zentrum der Ebene liegen und die Vorhersagequalität für die Reinsalze somit etwas geringer ausfallen kann.

Die hohe Übereinstimmung der Vorhersage mit der Yamamoto-Methode und der direkten Regression der k' -Werte im Zentrum der Ebene impliziert, dass die beiden Methoden in diesem Bereich nahezu äquivalent sind. Die Abweichungen in den Ecken der Ebene deuten darauf hin, dass der Grad der Übereinstimmung mit der Anzahl der benachbarten Messpunkte zunimmt. Die hohe Sensitivität der Modellparameter K_{eq} und ν mit den resultierenden großen Sprüngen in den ermittelten Werten könnte dazu führen, dass die Mittelung durch die Regression auf Grund der vielen benachbarten Messpunkte im Zentrum der Ebene gut funktioniert, während hierfür in den Ecken nur ungenügend Datenpunkte zur Verfügung stehen. Hierdurch wird die Notwendigkeit einer guten Datenbasis deutlich, um die Modellparameter der SMA-Isotherme für verschiedene Salzzusammensetzungen zu interpolieren.

Die hohe Übereinstimmung der Yamamoto-Vorhersage mit den Validierungsversuchen bei allen betrachteten Gradientenlängen mit jeweils einem einzelnen Set an Modellparametern bestätigt nochmal die grundsätzliche Anwendbarkeit der Yamamoto-Methode auf das vorliegende System. Darüber hinaus zeigt sie, dass die interpolierten Parameter K_{eq} und ν trotz der hohen Abweichungen der Regressionsebenen von den Messwerten (siehe Abschnitt 5.2) eine hohe Vorhersagequalität mit sich bringen. Die Methodik der Interpolation von Modellparametern für verschiedene Salzzusammensetzungen ist somit erfolgreich und in der Lage, sinnvolle Modellparameter mit hoher Vorhersagekraft für neue Zusammensetzungen, welche nicht in die Regression eingeflossen sind, zu bestimmen. Hierbei wird bestätigt, dass die Regression von ν direkt und von K_{eq} mit den logarithmischen Werten erfolgen sollte. Diese hohe Übereinstimmung mit experimentellen Daten bei allen betrachteten Gradientenlängen deutet auch darauf hin, dass die Modellparameter der SMA-Isotherme und die Yamamoto-Methode für weitere Gradientenlängen geeignet sind.

Untersuchung weiterer Gradientenlängen

Für eine weitergehende Untersuchung der Vorhersagekraft der regressierten Modellparameter der SMA-Isotherme werden die Retentionsfaktoren daher an den Validierungspunkten noch für zusätzliche, nicht in die Regression eingegangene Gradientenlängen berechnet und mit experimentellen Daten verglichen. In Abbildung 5.6 sind die Ergebnisse für eine Gradientenlänge von 7 CV zu sehen, die zwischen den für das Fitting verwendeten Gradientenlängen liegt. In Abbildung 5.7 werden die Daten für eine Gradientenlänge von 17 CV dargestellt, die außerhalb dieses Bereichs liegt. Die resultierenden *MAPE*-Werte sind für beide Gradientenlängen in Tabelle 5.6 aufgeführt.

Für die Gradientenlänge von 7 CV lässt sich für beide Proteine mit *MAPE*-Werten von deutlich unter 1% eine sehr hohe Übereinstimmung der berechneten und experimentellen k' -Werte erkennen. Diese Abweichung liegt in demselben Bereich wie bei den in der Regression berücksichtigten Gradientenlängen. Hierdurch ist die Fähigkeit des Ansatzes zur Interpolation sowohl bei der Salzzusammensetzung als auch bei der Gradientenlänge bestätigt.

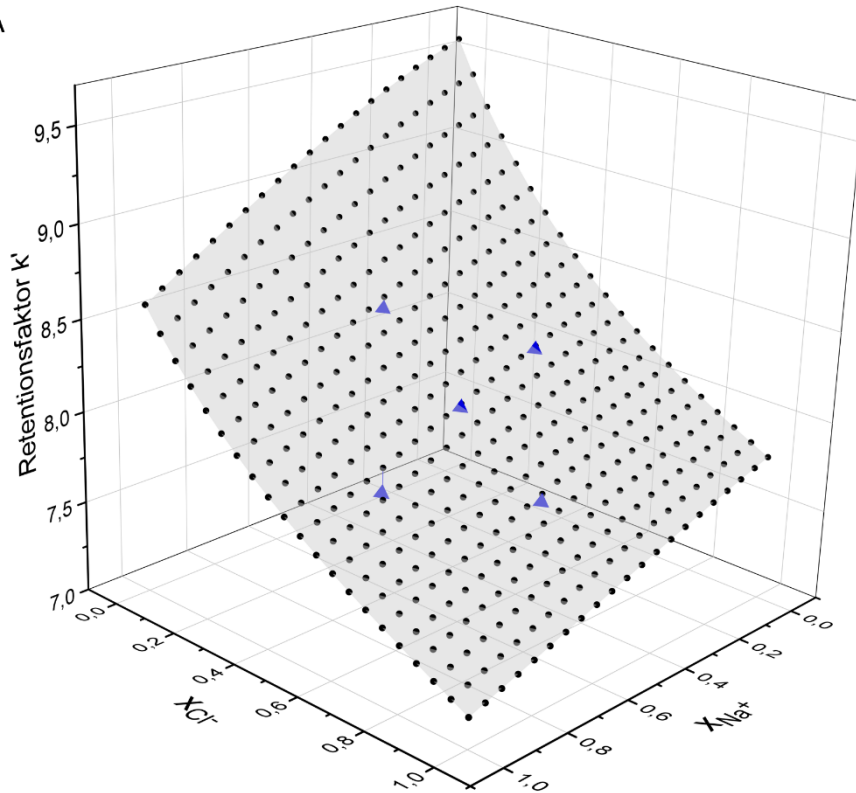
Die Betrachtung der Daten für die Gradientenlänge von 17 CV bestätigen, dass auch die Extrapolation auf neue Gradientenlängen mit den interpolierten SMA-Parametern möglich ist. Die *MAPE*-Werte liegen für LYZ unter und für BSA knapp über 1%, was auch in diesem Fall eine hohe Vorhersagequalität für beide Proteine aufzeigt. Der Trend des nichtlinearen Einflusses der Anionenzusammensetzung auf die Retentionsfaktoren für BSA wird hierbei auch für weitere Gradientenlängen bestätigt.

Mit diesen Ergebnissen kann der gewählte Ansatz, die Modellparameter der SMA-Isotherme aus verschiedenen Gradientenlängen für unterschiedliche Salzzusammensetzungen zu bestimmen und mit der angepassten Modellgleichung zu regressieren, als erfolgreich betrachtet werden. Die Fähigkeit dieser Parameter, auch extrapolierend präzise Retentionszeiten berechnen zu können, deutet auf eine mechanistische Signifikanz der Modellparameter hin.

Tabelle 5.6: MAPE-Werte für die mit den regressierten Modellparametern der SMA-Isotherme berechneten Retentionsfaktoren für weitere, nicht beim Fitting berücksichtigten Gradientenlängen. Als experimentelle Daten wurden die fünf Validierungsversuche der jeweiligen Gradientenlänge verwendet.

	Protein	Gradientenlänge	
		17 CV	7 CV
<i>MAPE(k')</i>	BSA	1,09%	0,71%
	LYZ	0,76%	0,55%

a) BSA



b) LYZ

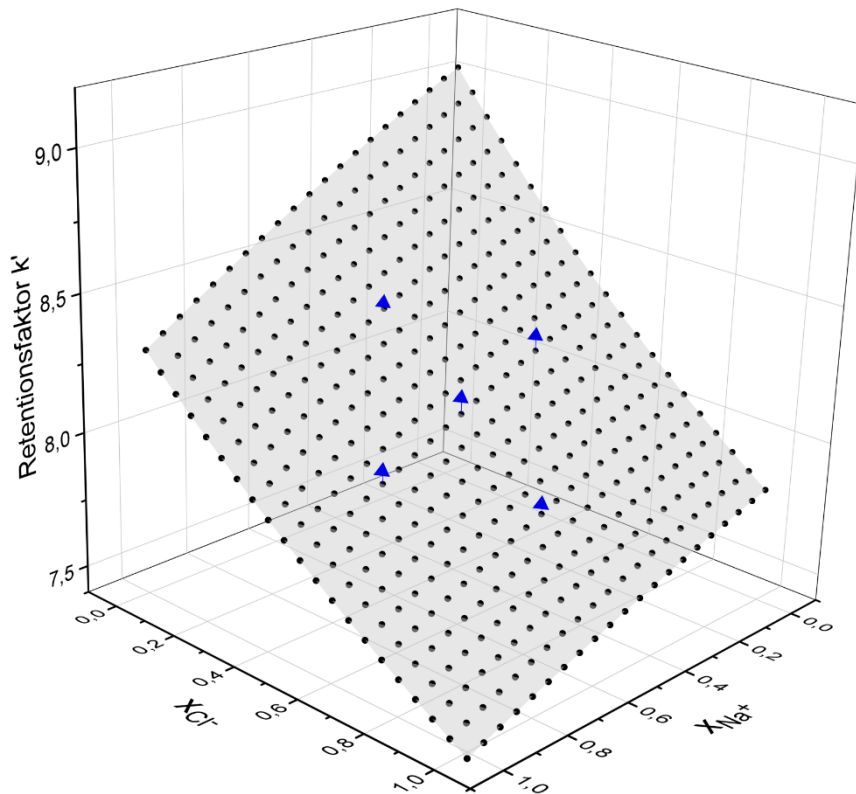
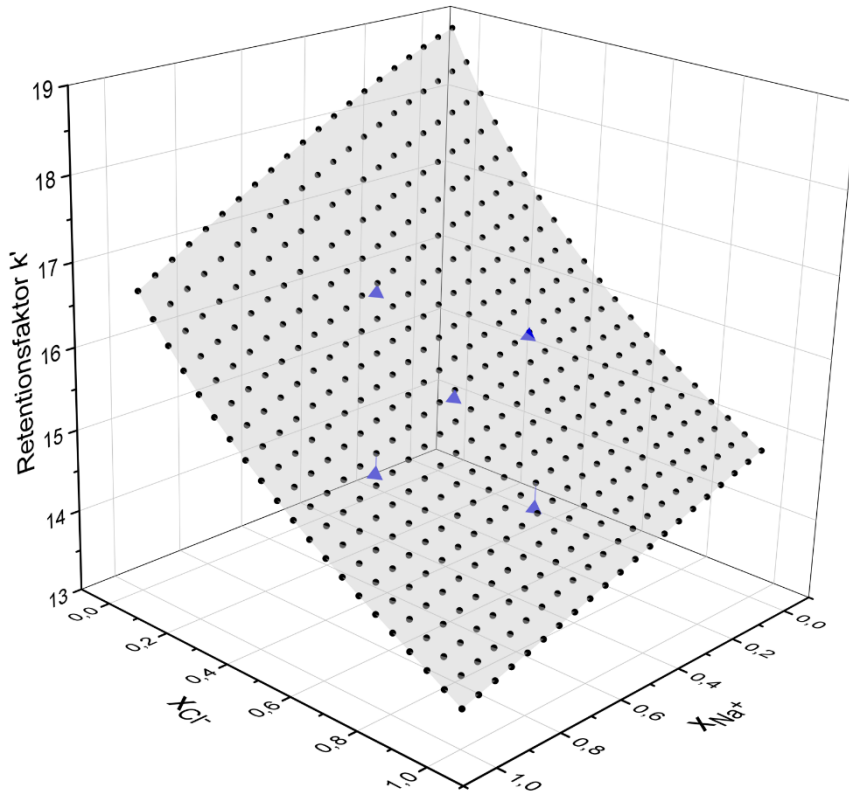


Abbildung 5.6: Vergleich der mit der Yamamoto-Methode berechneten Retentionsfaktoren mit den Validierungsversuchen bei einer Gradientenlänge von 7 CV. Die Vorhersagen der Yamamoto-Methode sind als Ebene dargestellt und die Ergebnisse der der Validierungsversuche als blaue Tetraeder. Es werden die Daten für a) BSA und b) LYZ gezeigt.

a) BSA



b) LYZ

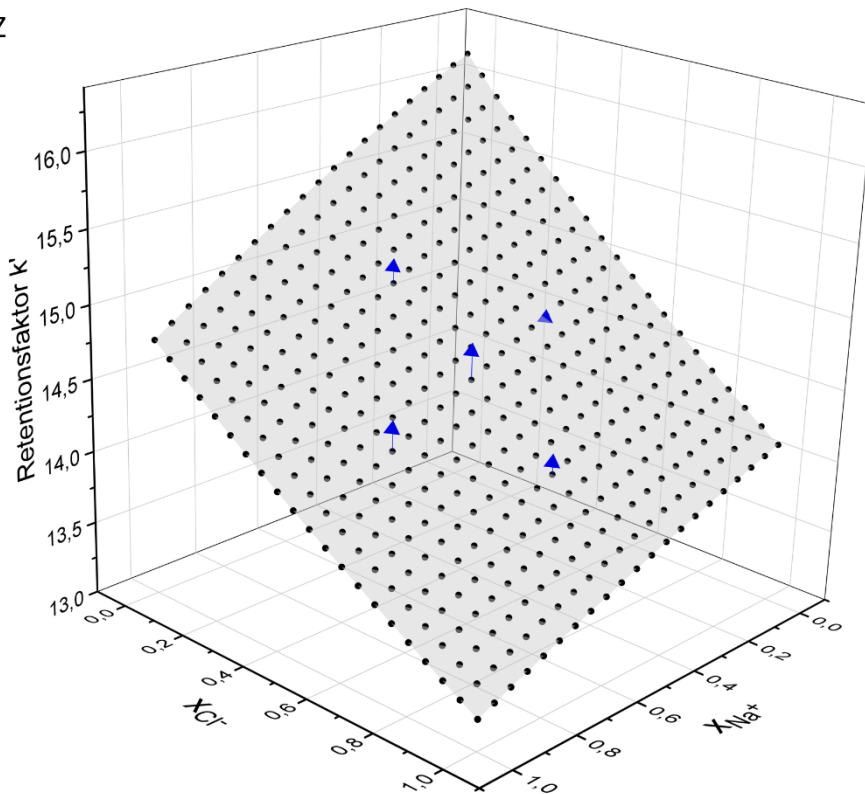


Abbildung 5.7: Vergleich der mit der Yamamoto-Methode berechneten Retentionsfaktoren mit den Validierungsversuchen bei einer Gradientenlänge von 17 CV. Die Vorhersagen der Yamamoto-Methode sind als Ebene dargestellt und die Ergebnisse der der Validierungsversuche als blaue Tetraeder. Es werden die Daten für a) BSA und b) LYZ gezeigt.

5.5 Untersuchungen mit Cytochrom C

Die über die Yamamoto-Methode bestimmten Parameter K_{eq} und ν von CYC für binäre Salzmischungen mit NaCl und $(NH_4)_2SO_4$ sind in Abbildung 5.8 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass der grundsätzliche Verlauf der Größen eine hohe Ähnlichkeit zum Verlauf für LYZ entlang der NaCl und $(NH_4)_2SO_4$ Achse aufweist. Für beide Proteine zeigen die Verläufe steigende ν - und fallenden K_{eq} -Werte für höhere NaCl-Anteile. Die *NRMSE*-Werte für diese Regression sind in Tabelle 5.7 aufgeführt.

Es lässt sich erkennen, dass die Abweichungen der regressierten Modellparameter von den Kalibrierungs- und Validierungsversuchen für CYC deutlich geringer ausfallen als für die beiden anderen Proteine. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass das Fitting für CYC nur entlang einer diagonalen der Ebene stattgefunden hat, an die BSA und LYZ gefittet wurden. Für die Regressionskurve von CYC standen drei Parameter zur Beschreibung von sechs Messpunkten zur Verfügung. Für die Regressionsebenen von BSA und LYZ standen fünf Parameter zur Beschreibung von 28 Kalibrierungspunkten zur Verfügung. Hierdurch können größere *NRMSE*-Werte für BSA und LYZ zustande kommen, sodass diese Werte nicht miteinander vergleichbar sind. Für alle Kalibrierungs- und den Validierungsversuche von CYC lässt sich die Beobachtung bestätigen, dass wenn die Regressionslinie für ν oberhalb der Messwerte liegt, sie für K_{eq} unterhalb dieser liegt und umgekehrt.

Tabelle 5.7: *NRMSE*-Werte für die Kalibrierungs- und Validierungsversuche für die $\log K_{eq}$ und ν -Werte von CYC.

Parameter	CYC	
	$\log K_{eq}$	ν
<i>NRMSE</i> Kalibrierung	3,18%	5,46%
<i>NRMSE</i> Validierung	4,36%	7,86%

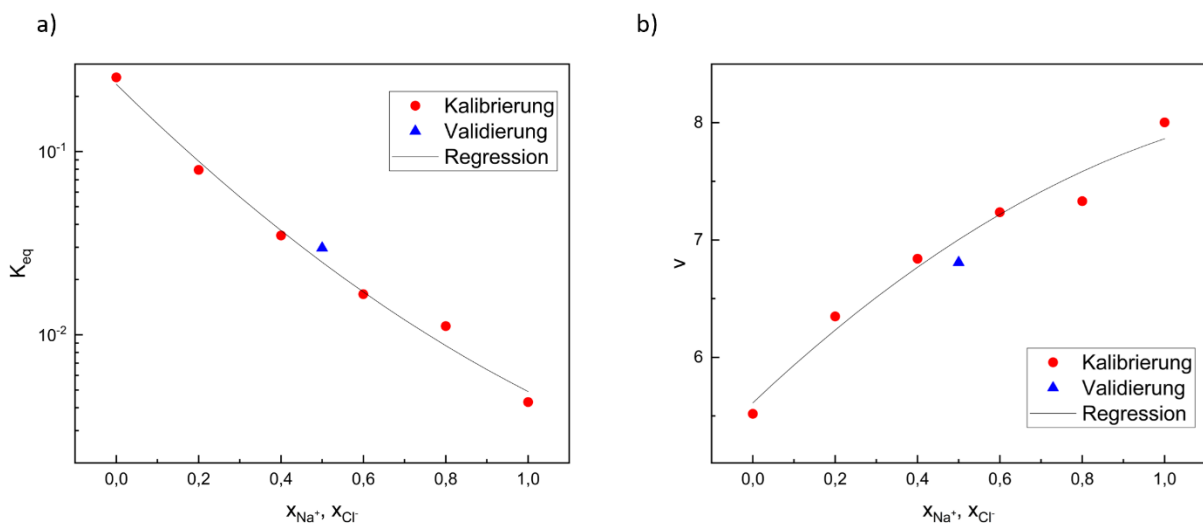


Abbildung 5.8: SMA-Parameter von CYC nach der Yamamoto-Methode für Mischungen zwischen NaCl und $(NH_4)_2SO_4$.

5.6 Fazit

In diesem Kapitel wurde die Eignung der Yamamoto-Methode zur Beschreibung des Einflusses von Salzmischungen in der CEC untersucht. Hierzu wurden nach der Charakterisierung der Säuleneigenschaften die Modellparameter der SMA-Isotherme K_{eq} und v von BSA und LYZ an allen in Kapitel 4 beschriebenen Salzzusammensetzungen ermittelt. Die angepasste Modellgleichung wurde angewandt, um eine Regressionsgleichung für diese Größen zu erhalten. Dabei ging v direkt und K_{eq} mit logarithmierten Werten in die Regression ein. Die so erhaltene Regressionsebene zeigte teilweise große Abweichungen von den Messpunkten. Auffällig hierbei war, dass wenn der Messpunkt von v unterhalb der Regressionsebene lag, der Messpunkt von K_{eq} darüber lag und umgekehrt. Eine Sensitivitätsanalyse bestätigte, dass leichte Abweichungen in den experimentellen Daten zu großen Abweichungen in den Modellparametern führen können. Die Änderungen der beiden Parameter verlaufen dabei jedoch gegensätzlich und können sich somit teilweise ausgleichen, sodass dennoch präzise Vorhersagen mit diesen Werten getroffen werden können. Diese Uneindeutigkeit der Parameterbestimmung bedeutet auch, dass die Interpretation der Modellparameter als direkte physikalische Eigenschaft nicht gesichert ist. Die Glättung und Mittelung der vielen Datenpunkte über die angepasste Modellgleichung könnte dazu beitragen, einen Parameterverlauf in einem sinnvollen Wertebereich zu erhalten.

Um die Vorhersagekraft der Parameter zu überprüfen, wurden mit den regressierten Modellparametersätzen der SMA-Isotherme Retentionsfaktoren für verschiedene Gradientenlängen berechnet. Die so erhaltenen k' -Werte zeigten auch für nicht bei der Kalibrierung berücksichtigte Salzzusammensetzungen hohe Übereinstimmungen mit den experimentellen Daten, sowohl an den Gradientenlängen, die für die Kalibrierung verwendet wurden, als auch an interpolierten und extrapolierten Gradientenlängen.

Somit ist die verwendete Methodik zur Bestimmung von aussagekräftigen Parametersätzen geeignet. Die Modellgleichung ist in der Lage, die Änderungen der Parameter in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung gut zu beschreiben. Durch die Regression werden die sprunghaften Verläufe der diskreten experimentellen Parameter geglättet und es lassen sich kontinuierliche Funktionen aufstellen. Die so ermittelten Parametersätze können zu der Berechnung von Separationsfaktoren für beliebige Salzzusammensetzungen der untersuchten Ionen und Gradientenlängen eingesetzt werden, wodurch relevante Prozessbereiche identifiziert werden können. Des Weiteren kann diese Parameterbestimmung als Grundlage für die mechanistische Modellierung betrachtet werden, welche im folgenden Kapitel näher untersucht wird.

6 Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

In diesem Kapitel wird die Anwendung der mechanistischen Modellierung zur Beschreibung des Einflusses der Salzzusammensetzung auf die CEC untersucht. Hierbei soll die vierte Arbeitshypothese, dass der Einfluss von Salzmischungen über eine passende Parameterbestimmung in der mechanistischen Modellierung abgebildet werden kann, überprüft werden. Zuerst wird das verwendete mechanistische Modell zum Parameterfitting beschrieben (Kapitel 6.1). Anschließend werden die Ergebnisse für die Parameterbestimmung (Kapitel 6.2) und die Validierung der Modellierung (Kapitel 6.3) der Proteine BSA, LYZ und CYC mit Salzmischungen aus NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dargestellt, bevor die gewonnenen Erkenntnisse zusammengefasst werden (Kapitel 6.4).

6.1 Material und Methoden

In diesem Abschnitt wird zuerst das verwendete Simulationstool beschrieben und die Anwendung zur Parameterbestimmung und zur Validierung erläutert. Anschließend werden die zusätzlich durchgeführten Experimente und die Aufarbeitung aller experimentellen Daten für die Verwendung in der mechanistischen Modellierung beschrieben.

6.1.1 Aufbau des Simulationstools

Parameterfitting

In dieser Arbeit wurde ein Modellierungstool in Python erstellt. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 6.1 dargestellt. Dieses Programm baut auf den Tools CADET-Match und CADET-Core auf und verwendet das Transport-Dispersive Modell sowie die SMA-Isotherme. Die in das Transport-Dispersive Modell eingehenden Annahmen wie konstante Konzentrationen entlang des Säulenradius, eine homogene Säulenpackung sowie die Beschreibbarkeit der Stofftransportphänomene mit einem kombinierten Parameter k_{eff} für die Film- und Porendiffusion werden in Kapitel 2.4.1 näher beschrieben. Für die Berechnungen mit der SMA-Isotherme werden wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben direkt die Ionenkonzentrationen verwendet und somit mögliche Einflüsse von Aktivitätskoeffizienten vernachlässigt. Ob die Verwendung einer kinetischen Berechnung notwendig ist, soll in einer Voruntersuchung ermittelt werden.

In einem ersten Schritt wird ein diskretisiertes Modell erstellt. Hierzu werden dem Programm das Setup des Prozesses sowie die Eigenschaften der Säule vorgegeben. Für die Adsorptions- und Stofftransport-Parameter der einzelnen Komponenten findet eine Bestimmung der Startwerte statt. Ist die entsprechende Größe bereits aus einer vorhergegangenen Parameterbestimmung bekannt, wird der entsprechende Wert ausgelesen. Andernfalls wird dieser Größe ein festgelegter Startwert zugewiesen (siehe Tabelle 6.2). Mit den vorgegebenen Diskretisierungseinstellungen kann daraufhin ein Modell erzeugt werden, das nun in der Lage ist, Chromatogramme zu berechnen.

In einem zweiten Schritt kann dieses Modell verwendet werden, um mit Hilfe von experimentellen Daten eine Parameterbestimmung durchzuführen. In dieser Arbeit werden mehrere, aufeinander aufbauende Parameterbestimmungen nach dem sequenziellen Ansatz durchgeführt. Der in Tabelle 2.3 dargestellte Ansatz wird leicht für das verwendete System angepasst. Da mehrere Komponenten gleichzeitig modelliert werden sollen, wird in Versuch 3 Aceton als porengängiger Tracer verwendet und der Stofftransport-Parameter k_{eff} wird für das jeweilige Protein in Versuch 4 bestimmt (siehe Abschnitt 2.5.2). Die Versuche 1 und 2 werden direkt über die Retentionszeit des Tracers ausgewertet. Die axiale Dispersion wird daher in Versuch 3 zusammen mit der Partikelporosität ermittelt.

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

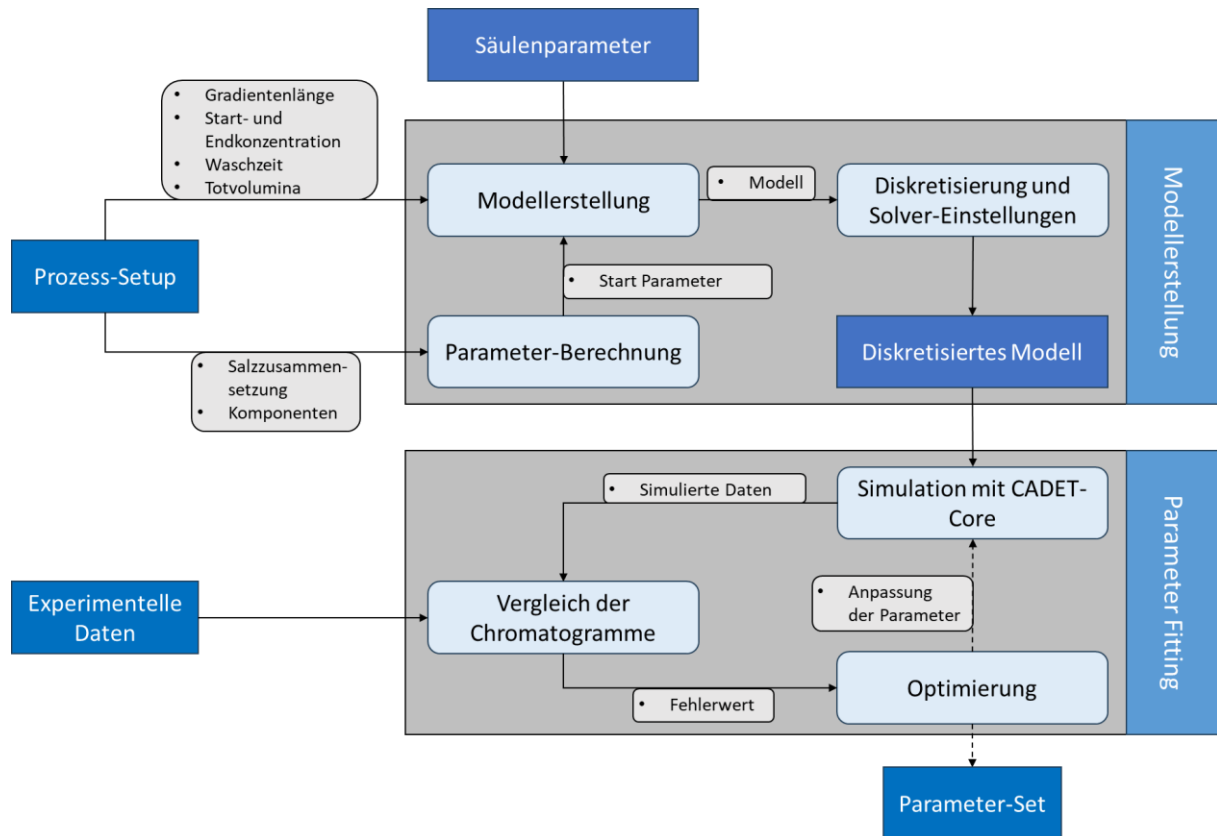


Abbildung 6.1: Schematischer Aufbau des Simulationsprogramms zur Chromatographie-Modellierung und Parameterbestimmung.

Das resultierende Vorgehen wird in Tabelle 6.1 dargestellt. Die experimentelle Durchführung der Versuche 1 bis 3 wird in Abschnitt 5.1.1 und der Versuchsgruppe 4 in Abschnitt 4.1.1 beschrieben. Für dieses Kapitel wird eine neue Säule desselben Typs verwendet („HiScreen SP Sepharose High Performance“, siehe Kapitel 3.1.1), daher werden die Versuche 2-4 erneut mit der neuen Säule durchgeführt. Im Prozess-Setup werden die relevanten Versuchsbedingungen gebündelt. Hierzu zählen die Konzentrationsprofile am Einlass der Säule und die Flussrate der mobilen Phase. Im Folgenden wird das Vorgehen für die verschiedenen Parameterbestimmung näher beschrieben, wobei zwischen den Optimierungsgrößen X_{var} und festen Werten X_{fix} unterschieden wird.

Tabelle 6.1: Vorgehen bei der Parameterbestimmung mit dem adaptierten sequenziellen Ansatz für das Transport-Dispersive Modell.

Versuchsaufbau	Beschreibung	X_{fix}	X_{var}	Ansatz
1	Ohne Säule	Setup	V_{plant}	Berechnung aus t_R
2	Dextran-Tracer	Setup, V_{plant}	ε_c	Berechnung aus t_R
3	Aceton-Tracer	Setup, V_{plant} , ε_c	$\varepsilon_p, D_{\text{ax}}$	Parameterfitting
4	Protein	Setup, V_{plant} , ε_c , $\varepsilon_p, D_{\text{ax}}, \nu, \sigma$	$K_{\text{eq,ref}}, k_{\text{eff}}$	Parameterfitting

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

Zur Darstellung der Anlagenperipherie wird eine lange und dünne Säule ohne stationäre Phase ($\varepsilon_c=1$) modelliert. Der Durchmesser dieser Säule wird auf den Durchmesser der verwendeten Schläuche der Anlage mit 0,25 mm gesetzt. Die zugehörige Länge der Säule wird aus dem Totvolumen der Anlagenperipherie V_{plant} berechnet. Diese wird nicht über das Simulationstool, sondern rechnerisch aus der Retentionszeit bei Versuch 1 des sequenziellen Ansatzes bestimmt. Analog wird bei Versuch 2 die Säulenporosität ε_c aus der Retentionszeit des nicht-porengängigen Tracers Dextran $t_{R,\text{Dextran}}$ berechnet. Hierzu wird Gleichung 6.1 verwendet [48]:

$$\varepsilon_c = \frac{t_{R,\text{Dextran}} \dot{V}}{V_c} \quad 6.1$$

Ebenfalls wird das Volumen der Anlage zwischen Mischkammer und Probenschleife rechnerisch ermittelt, indem die Zeit von einer Änderung der Pufferzusammensetzung bis zu einer Änderung des Messsignals ermittelt wird (siehe Abschnitt 6.1.2). Da das Modellierungstool das experimentelle Setup ab der Probenschleife beschreibt, muss das Einsetzen des Gradienten in der Modellierung um dieses Volumen verzögert werden.

Für die weitere Parameterbestimmung nach Tabelle 6.1 wird das Modellierungstool eingesetzt. Die Startwerte sowie die Ober- und Untergrenzen der Optimierung der zu bestimmenden Parameter X_{var} werden in Tabelle 6.2 zusammengefasst. In Versuch 3 des sequenziellen Ansatzes werden die Partikel-Porosität und die axiale Dispersion der Säule bestimmt. Die weiteren Säulenparameter Säulenvolumen V_c und Querschnittsfläche A_c werden den Herstellerangaben entnommen und ebenfalls an das Modell übergeben. Die Säulenkapazität wird mit den Ergebnissen für die Porosität und das Totvolumen wie in Gleichung 5.1 dargestellt berechnet.

Tabelle 6.2: Startwerte mit zugehöriger Quelle sowie Ober- und Untergrenzen für die Optimierungsgrößen X_{var} . Die Gleichgewichtskonstante wird in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung x mit der Regressionsgleichung 5.8 berechnet.

Komponente	Größe	Versuch	Startwert X_{start}	Quelle	Untergrenze	Obergrenze
alle	D_{ax}	3	$5 * 10^{-8} \frac{m^2}{s}$	[126]	$1 * 10^{-10} \frac{m^2}{s}$	$1 * 10^{-4} \frac{m^2}{s}$
alle	ε_p	3	0,85	[8]	0	1
BSA	$K_{\text{eq,ref}}$	4	Yamamoto-Methode	Kapitel 5	$0,1 * X_{\text{start}}$	$10^3 * X_{\text{start}}$
	k_{eff}	4	$5 * 10^{-7} \frac{m}{s}$	[24]	$1,1 * 10^{-7} \frac{m}{s}$	$1 * 10^{-4} \frac{m}{s}$
LYZ	$K_{\text{eq,ref}}$	4	Yamamoto-Methode	Kapitel 5	$0,1 * X_{\text{start}}$	$10^3 * X_{\text{start}}$
	k_{eff}	4	$5 * 10^{-6} \frac{m}{s}$	[24]	$1,1 * 10^{-7} \frac{m}{s}$	$1 * 10^{-4} \frac{m}{s}$
CYC	$K_{\text{eq,ref}}$	4	Yamamoto-Methode	Kapitel 5	$0,1 * X_{\text{start}}$	$10^3 * X_{\text{start}}$
	k_{eff}	4	$5 * 10^{-6} \frac{m}{s}$	[24]	$1,1 * 10^{-7} \frac{m}{s}$	$1 * 10^{-4} \frac{m}{s}$

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

Insbesondere bei Komponenten mit einer hohen charakteristischen Ladung ν kann die direkte Modellierung mit der SMA-Isotherme zu numerischen Problemen führen. Zur Erhöhung der numerischen Stabilität und für eine Verbesserung der Parameterbestimmung werden die Werte für K_{eq} über Referenzkonzentrationen angepasst (Gleichung 6.2). Die Einheit der so erhaltenen Größe $K_{eq,ref}$ ist unabhängig von dem Wert für ν . [127]

$$K_{eq,ref,i} = K_{eq,i} \left(\frac{q_{ref}}{c_{ref}} \right)^{\nu_i} = \frac{q_i}{c_i} \left(\frac{c_s}{c_{ref}} \frac{q_{ref}}{\bar{q}_s} \right)^{\nu_i} \quad 6.2$$

Wie von Heymann et al. empfohlen wird die Referenzkonzentration für die stationäre Phase q_{ref} auf die Kapazität Λ und die Referenzkonzentration der mobilen Phase c_{ref} auf den Wert der maximal auftretenden Salzkonzentration gesetzt [90]. Das Modell rechnet mit dieser angepassten Größe $K_{eq,ref}$ und optimiert somit auch diesen Wert.

In Versuchsgruppe 4 werden jeweils für ein Protein (BSA, LYZ oder CYC) die in Kapitel 4 beschriebenen Versuche mit einer Salzzusammensetzung (Mischungen aus NaCl und $(NH_4)_2SO_4$) bei Gradientenlängen von 3 CV, 5 CV, 10 CV und 15 CV zusammengefasst. Dieses Fitting wird für jedes Protein bei jeder untersuchten Salzzusammensetzung durchgeführt. Die Werte von ν und die Startwerte von K_{eq} werden aus der Yamamoto-Modellgleichung übernommen. Da für die mechanistische Modellierung nur binäre Salzmischungen aus NaCl und $(NH_4)_2SO_4$ betrachtet werden, vereinfachen sich die entsprechenden Regressionsgleichungen der Modellparameter 5.7 und 5.8 für BSA und LYZ analog zu CYC zu Gleichung 5.10. Hierbei wird die Salzzusammensetzung über den NaCl-Anteil x beschrieben. Da rechnerisch mehrere Parameterpaare von K_{eq} und ν zu ähnlich guten Regressionsergebnissen führen können (siehe Kapitel 5.3), wird der Wert von ν auf diesen Wert festgesetzt und nur die Gleichgewichtskonstante wird als Fitting-Parameter betrachtet. Die Auswahl von ν und nicht K_{eq} als fixe Größe begründet sich durch die Bestimmung der beiden Parameter über die Yamamoto-Methode: ν hängt direkt von der Steigung der Gerade ab, während K_{eq} von dem Achsenabschnitt und von ν abhängt. Des Weiteren ist der Wert von K_{eq} deutlich fehleranfälliger, da er nur in logarithmischer Form direkt aus der Regressionsgerade bestimmt werden kann (siehe Kapitel 2.5.1). Somit werden für das jeweilige Protein bei der jeweiligen Salzzusammensetzung beim Parameter-Fitting mit der Versuchsgruppe 4 zeitgleich die Größen $K_{eq,ref}$ und k_{eff} an die vier LGE-Versuche gefittet. Die in Tabelle 6.2 beschriebene Untergrenze für k_{eff} wurde auf Grund der folgenden Beobachtung festgelegt: Wird ein geringeres k_{eff} für die Simulation verwendet, so ergibt sich ein zusätzlicher, schmaler Peak dieser Komponente, der die Retentionszeit eines nicht-porengängigen Tracers hat. Die sehr geringe Filmdiffusion sorgt somit dafür, dass ein Teil dieser Komponente überhaupt nicht in das Porensystem hineinkommt und die Säule ohne zu binden wieder verlässt. Da dieses Phänomen in der Realität nicht auftritt, wurde es auch im Modell durch die Untergrenze von k_{eff} unterbunden.

Die Werte für die Diskretisierung und die Solver-Einstellungen des CADET-Core Modells sind in Tabelle 6.3 aufgeführt. Das so diskretisierte Modell kann zusammen mit den zugehörigen experimentellen Daten an das Parameter Fitting übergeben werden. Hierzu wird CADET-Match verwendet. Die Zielgrößen X_{var} werden wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben angepasst, um die Abweichungen zwischen Modell und Experiment zu minimieren. Hierzu wurde die NSGA3-Methodik verwendet. Die Populationsgröße beträgt 100 pro gleichzeitig optimiertem Parameter, wodurch insgesamt 200 Individuen pro Generation erzeugt werden. Als Abbruchkriterium ist das Ausbleiben einer weiteren Verbesserung der Fitness über fünf Generationen festgelegt. Als Fehlerwert wird hierbei der SSE verwendet. Nach Abschluss des genetischen Algorithmus erfolgt mit dem so gefundenen Optimum noch eine Gradientenoptimierung. Abschließend wird das optimierte Parameterset ausgegeben.

Tabelle 6.3: Diskretisierung und Fehlertoleranzen für das verwendete Simulationsmodell in CADET-Core.

Zeitliche Diskretisierung	Zeitschrittweite	Startwert	$1 * 10^{-6} \text{ s}$
		Maximalwert	$1 * 10^{-1} \text{ s}$
	Fehlertoleranz	Relativ	$1 * 10^{-6}$
		Absolut	$1 * 10^{-6}$
Örtliche Diskretisierung	Anzahl Volumenelemente	Säule	100
		Anlagenperipherie	50
	WENO-Parameter	φ	$1 * 10^{-8}$
		κ	3

Die Adsorption wird in einer ersten Sensitivitätsbetrachtung für die Proteine einmal als kinetische Reaktion und einmal als sofortiges Gleichgewicht modelliert (siehe Abschnitt 2.4.1). Ausgehend von diesen Ergebnissen wird festgelegt, ob für die Parameterbestimmung K_{ads} und K_{des} getrennt ermittelt werden (Gleichung 2.34), oder ob K_{des} auf einen Wert von 1 s^{-1} festgelegt und K_{ads} äquivalent zu K_{eq} betrachtet werden kann (Gleichung 2.35).

Validierung der Ergebnisse

Das Simulationstool soll in der Lage sein, für verschiedene Gradientenlängen und beliebige Salzmischungen aus NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ das Retentionsverhalten der verschiedenen Proteine korrekt zu berechnen. Hierzu wird die Modellerstellung erneut wie in der oberen Hälfte von Abbildung 6.1 dargestellt durchgeführt. Die Parameter-Berechnung liefert in dieser Anwendung nicht die Startwerte für die Optimierung, sondern die finalen Parameter für die Simulation. Sämtliche Modellparameter mit Ausnahme der Optimierungsgrößen aus der Versuchsgruppe 4, $K_{\text{eq,ref}}$ und k_{eff} , werden direkt aus der Parameterbestimmung übernommen. Die Salzzusammensetzung x wird als bekannte Größe an das Modell übergeben. Von k_{eff} wird für jedes Protein der Mittelwert aus den sechs Salzzusammensetzungen der Kalibrierung gebildet. Die Werte für $K_{\text{eq,ref}}$ aus dem Parameterfitting werden einer weiteren Regression unterzogen. Um aus den sechs einzelnen Punkten eine Funktion für beliebige NaCl-Anteile zu erhalten, wird mit Gleichung 5.10 eine weitere quadratische Regression von $\log K_{\text{eq,ref}}$ gegen x durchgeführt. Mit den so erhaltenen Werten für die Regressionsparameter a_0 , a_1 und a_2 kann der Wert von $K_{\text{eq,ref}}$ für die vorgegebene Salzzusammensetzung berechnet werden.

Um das Modell zu validieren, werden Gradientenlängen und Salzzusammensetzungen untersucht, die nicht in die Parameterbestimmung eingeflossen sind. Um die Extrapolierbarkeit der Gradientenlängen zu untersuchen, wird das Retentionsverhalten der Proteine mit NaCl bei einer Gradientenlänge von 20 CV berechnet. Des Weiteren werden Simulationen bei einem NaCl-Anteil von 50% mit den Gradientenlängen 3 CV, 5 CV, 10 CV und 15 CV durchgeführt. Diese Ergebnisse werden mit experimentellen Daten verglichen, um die Vorhersagekraft des Modells zu überprüfen.

6.1.2 Zusätzliche Experimente

Wenn im experimentellen Setup (siehe Abbildung 3.1) eine Änderung der Zusammensetzung zwischen den Puffern A und B eingestellt wird, so ändert sich diese Zusammensetzung im Moment der Anpassung an der Mischkammer. Bis dieses geänderte Verhältnis an der Probenschleife ankommt, vergeht die Zeit, die der Puffer bei der eingestellten Flussrate benötigt, um durch die Mischkammer und den verbindenden Schlauch zu fließen. Da das Modell das System erst ab der Probenschleife abbildet, muss der Beginn des Gradienten in der Simulation um diese Zeit verzögert

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

werden. Um diesen Wert zu ermitteln, wird ein zusätzlicher Versuch durchgeführt. Hierbei wird das System ohne Säule mit Niedrigsalzpuffer equilibriert. Zu Beginn des Versuchs wird die Zusammensetzung von 100% Niedrigsalzpuffer auf 100% Hochsalzpuffer umgeschaltet. Das UV-Signal wird bei 200 nm aufgenommen und die benötigte Zeit wird bei 50% des Maximalwerts abgelesen.

Zur Bestimmung des sterischen Faktors σ der SMA-Isotherme werden Durchbruchversuche mit den Proteinen BSA, LYZ und CYC durchgeführt. Um die Menge an benötigten Proteinen zu reduzieren, wird hierzu eine kleinere Säule mit einem Volumen von 1 mL verwendet. Hierbei handelt es sich um die „HiTrap SP Sepharose High Performance“ von Cytiva (Marlborough, USA), die mit dem gleichen CEC-Adsorbens gefüllt ist wie die für die anderen Versuche verwendete Säule. Die Kapazität und Porosität der Säule wird wie in Abschnitt 5.1.1 beschrieben bestimmt.

Für die Durchbruchversuche wird die Säule mit mindestens 10 CV NaCl-Hochsalzpuffer gespült und anschließend für mindestens 10 CV mit Niedrigsalzpuffer equilibriert (siehe Kapitel 4.1.1 für die Pufferzusammensetzung). Anschließend wird kontinuierlich Proteinlösung mit 0,2 mM Protein in Niedrigsalzpuffer mit einer Flussrate von 0,5 mL/min auf die Säule gegeben. Am Säulenauslass wird das UV-Signal bei 280 nm aufgezeichnet. Es wird Proteinlösung aufgegeben, bis ein klarer Durchbruch am Detektor erkennbar ist. Die Durchbruchzeit $t_{BT,i}$ einer Komponente i wird bei 50% des Maximalwerts abgelesen. Hieraus kann mit Gleichung 6.3 das gebundene Proteinvolumen $V_{bind,i}$ berechnet werden. Der sterische Faktor σ lässt sich daraufhin mit Gleichung 6.4 bestimmen [50]. Für v_i werden hierbei die Werte aus Kapitel 5 mit NaCl verwendet.

$$V_{bind,i} = V_{BT,i} - V_0 = \dot{V} t_{BT,i} - \varepsilon_t V_c - V_{plant} \quad 6.3$$

$$\sigma_i = \frac{\Lambda V_s - c_{feed,i} V_{bind,i} v_i}{c_{feed,i} V_{bind,i}} = \frac{\Lambda(1 - \varepsilon_t)V_c}{c_{feed,i} V_{bind,i}} - v_i \quad 6.4$$

Für die Validierung des Simulationstools werden, zusätzlich zu den bereits in Kapitel 4.1 beschriebenen Versuchen mit 50% NaCl und 50% $(NH_4)_2SO_4$, weitere LGE-Versuche durchgeführt. Das in Kapitel 4.1 beschriebene experimentelle Vorgehen wird für jedes der drei Proteine BSA, LYZ und CYC mit einem NaCl-Hochsalzpuffer und einer Gradientenlänge von 20 CV durchgeführt.

6.1.3 Aufbereitung der experimentellen Daten

Zur Auswertung der experimentellen Daten und zum Vergleich mit den Simulationen müssen die aufgezeichneten Chromatogramme aufbereitet werden. Hierzu wird in einem ersten Schritt der Verlauf der Grundlinie (auch Baseline genannt) des Chromatogramms betrachtet und, falls notwendig, eine sogenannte Baseline-Korrektur durchgeführt [128,129]. Falls die Baseline in der Umgebung des Peaks einen von null abweichenden Wert aufweist, wird dieser Blindwert von den gemessenen Adsorptionswerten abgezogen [130]. Des Weiteren wird der relevante Peak-Bereich des Chromatogramms identifiziert. Um den Einfluss von zum Beispiel Messrauschen oder leichten Verunreinigungen zu reduzieren, wird dieser Bereich des Haupt-Peaks ausgeschnitten und das Signal außerhalb dieses Bereichs auf null gesetzt. Dieses Vorgehen wird in Abbildung 6.2 für den 5 CV Versuch von LYZ mit 50% NaCl und in Abbildung 6.3 für den 3 CV Versuch von BSA mit 50% NaCl gezeigt.

In Abbildung 6.2 a) lässt sich erkennen, dass bei diesem Versuch ein starker Baseline-Drift stattfindet. In der Umgebung des Peaks ist die regressierte Grundlinie deutlich oberhalb der tatsächlichen Nulllinie. Ebenfalls lässt sich deutlich eine Peak-Schulter am Ende des Haupt-Peaks erkennen. Das aus der Datenaufbereitung resultierende Chromatogramm ist in Abbildung 6.2 b) zu sehen.

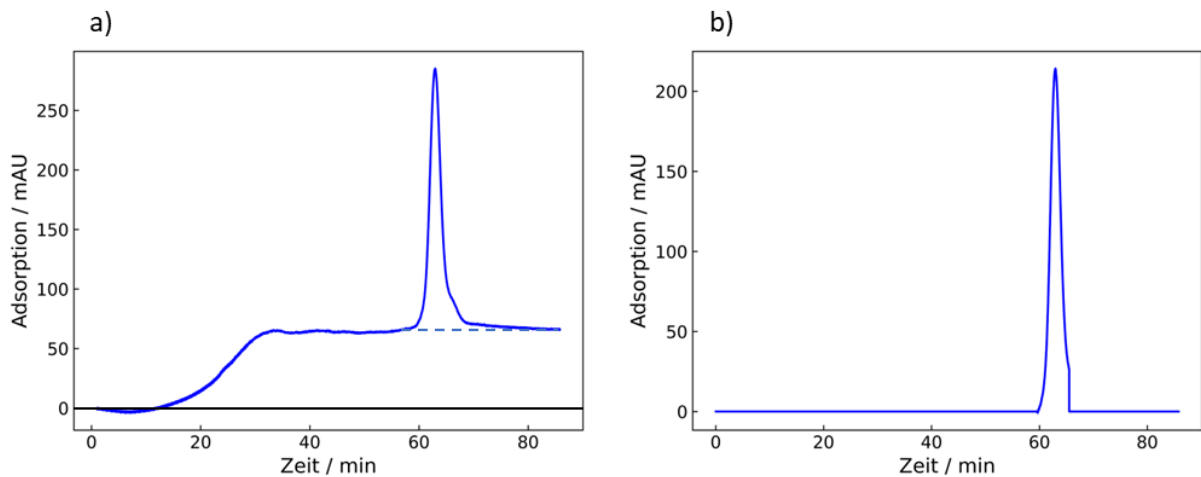


Abbildung 6.2: Baseline-Korrektur und Ausschneiden des relevanten Peak-Bereichs für LYZ mit 50% NaCl bei einer Gradientenlänge von 5 CV. In a) werden die Rohdaten dargestellt und in b) die Daten nach der Anpassung. In a) ist in schwarz die Nulllinie sowie als gestrichelte Linie die regressive Baseline im Peak-Bereich eingezeichnet.

In Abbildung 6.3 a) ist zu Beginn des Chromatogramms eine automatisierte Aktualisierung des Nullwerts nach 60 s Versuchszeit zu sehen. Der vordere Chromatogramm-Bereich mit den erhöhten Adsorptionswerten wird durch das Ausschneiden des Peak-Bereichs abgetrennt und hat keinen Einfluss auf das finale Chromatogramm. Bei dem hier gezeigten Versuch war keine Baseline-Korrektur notwendig. Wie an diesem Chromatogramm zu erkennen, tritt bei den BSA-Versuchen ein starkes Tailing des Peaks auf. Dies ist ein typisches Verhalten von BSA und kann auf die teilweise Zusammenlagerung der BSA Moleküle zu Dimeren zurückgeführt werden [131]. Um den Einfluss des Dimers zu reduzieren und das BSA-Monomer als einzelne Spezies zu betrachten, wird der Tailing-Bereich nicht als Teil des Peaks betrachtet und abgetrennt. Der resultierende Peak-Verlauf ist in Abbildung 6.3 b) dargestellt.

In einem letzten Schritt wird das Adsorptions-Signal noch in einen Konzentrationsverlauf umgewandelt. Hierzu wird das Integral über die Adsorptionskurve gebildet. Der Signalverlauf $A_i(t)$ wird hierzu zwischen den einzelnen Messpunkten linear interpoliert.

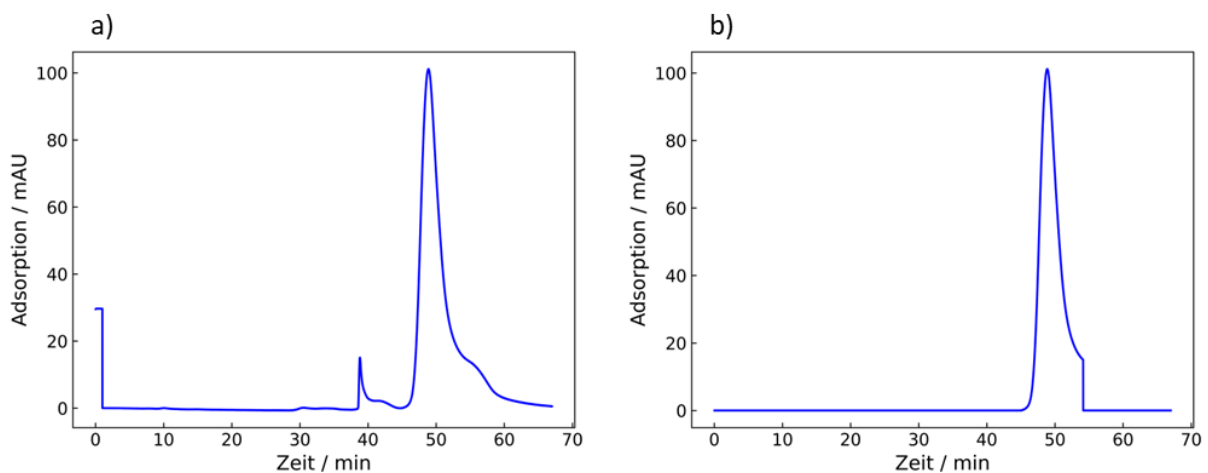


Abbildung 6.3: Ausschneiden des relevanten Peak-Bereichs für BSA mit 50% NaCl bei einer Gradientenlänge von 3 CV. In a) werden die Rohdaten dargestellt und in b) die Daten nach der Anpassung.

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

Da eine bekannte Stoffmenge an Protein n_i über die Probenschleife mit dem Volumen V_{inj} injiziert wird, kann ein Konversionsfaktor α_F bestimmt werden, mit dem das Adsorptions-Integral multipliziert werden muss, um auf die vorgegebene Stoffmenge zu kommen (Gleichung 6.5). Das Adsorptionssignal $A_i(t)$ kann nun an jedem Messpunkt mit α_F multipliziert werden, um die Konzentration $c_i(t)$ zu erhalten. Hierbei wird die Annahme getroffen, dass die Adsorption linear mit der Konzentration der Zielkomponente korreliert.

$$n_i = c_{feed,i} V_{inj} = \int_{t_{start}}^{t_{end}} c_i(t) dt = \alpha_F \int_{t_{start}}^{t_{end}} A_i(t) dt \quad 6.5$$

6.2 Parameterbestimmung

6.2.1 Säulencharakterisierung und Vorversuche

Die Ergebnisse der Säulencharakterisierung mit den Versuchen 1-3 des sequenziellen Ansatzes sowie der Titration zur Kapazitätsbestimmung sind in Tabelle 6.4 dargestellt. Das experimentelle und modellierte Chromatogramm von Versuch 3 sind in Abbildung 6.4 zu sehen.

Der Wert für die axiale Dispersion D_{ax} liegt in derselben Größenordnung wie Literaturdaten für Ionentauscherharze [51,126]. Die ermittelten Porositäten und Kapazität dieser Säule sind sehr nah an den Ergebnissen für die erste charakterisierte Säule (siehe Kapitel 5.2). Des Weiteren lässt sich in Abbildung 6.4 eine hervorragende Übereinstimmung von experimentellen und simulierten Daten für Versuch 3 beobachten. Die Parameterbestimmung für diese Werte wird daher als erfolgreich betrachtet.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der kleinen Säule sowie die sterischen Faktoren aus den Durchbruchversuchen sind in Tabelle 6.5 zusammengefasst. Die zugehörigen Chromatogramme sind in Anhang B.2 dargestellt. Für LYZ und CYC sind Literaturdaten für σ bei einer vergleichbaren Säule verfügbar. Bei einem pH-Wert von 5 haben Ladiwala et al. für LYZ einen Wert von 17 und für CYC einen Wert von 15,8 ermittelt [132]. Somit liegen die hier errechneten Werte in der gleichen Größenordnung und zeigen eine ähnliche Abweichung zueinander. Daher kann die Bestimmung der Parameter als erfolgreich betrachtet werden.

Tabelle 6.4: Ergebnisse der Anlagen- und Säulencharakterisierung für die Versuche 1-3 des sequenziellen Ansatzes sowie der Kapazitätsbestimmung.

Größe	Versuch	Ergebnis
V_{plant}	1	0,952 mL
ϵ_c	2	0,260
D_{ax}	3	$8,401 * 10^{-8} \frac{m^2}{s}$
ϵ_p	3	0,816
Λ	Titration	1,867 M

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

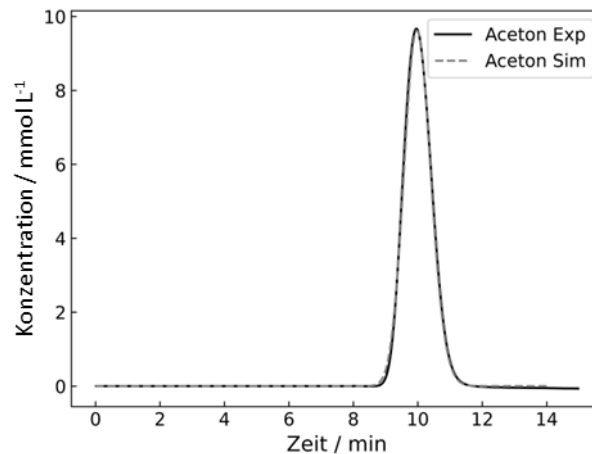


Abbildung 6.4: Experimentelles und mit Parameterfitting simuliertes Chromatogramm für Aceton.

In Abbildung 6.5 sind Streudiagramme der SSE-Werte für eine Optimierung von K_{ads} aufgetragen. Es werden hier beispielhaft die Daten von LYZ mit NaCl gezeigt. In Abbildung 6.5 a) wird die Adsorption als Gleichgewicht betrachtet, so dass $K_{ads} = K_{eq,ref} s^{-1}$ gilt. In Abbildung 6.5 b) wird die Adsorption als kinetische Reaktion modelliert und parallel zu K_{ads} wird noch K_{des} gefittet, wobei $K_{ads} = K_{eq,ref} K_{des}$ gilt (vergleiche Kapitel 2.4.1). Jeder Punkt steht für eine einzelne Simulation in CADET-Core, die während der Optimierung mit CADET-Match durchgeführt wurde. Der entsprechende Fehlerwert wird gegen den der Simulation zu Grunde liegenden K_{ads} Wert aufgetragen. Die Farbe der Punkte richtet sich ebenfalls nach dem Fehlerwert. Die Werte der anderen Optimierungsvariablen (k_{eff} und in b) auch noch K_{des}) können dieser Darstellung nicht entnommen werden. Es lässt sich erkennen, dass die Gleichgewichtsbetrachtung zu einem klaren Minimum und einem gut bestimmten Wert für K_{ads} bei etwa $0,4 s^{-1}$ führt. Die kinetische Modellierung weist hingegen kein klares Minimum auf, hier bleibt der erreichbare Fehlerwert ab einem K_{ads} -Wert von etwa $10 s^{-1}$ nahezu konstant. Das bedeutet, dass für die kinetische Modellierung kein eindeutiger Wert für K_{ads} bestimmt werden kann. Der Fehlerwert bleibt auf einem konstanten, niedrigen Niveau, solange die Adsorptionsrate hoch genug ist. Hieraus folgt, dass die kinetische Modellierung keine Vorteile mit sich bringt und zu unbestimmten Parametern führt. Daher wird für die weiteren Anwendungen des Simulationstools die Adsorption als Gleichgewicht modelliert.

Darüber hinaus bestätigt das klar erkennbare Minimum für die Betrachtung der Adsorption als Gleichgewicht in Abbildung 6.5 a) eine eindeutige Identifizierbarkeit der Gleichgewichtskonstante. Für einen festgelegten Wert von v lässt sich K_{eq} also eindeutig bestimmen. Dies bestätigt den Kalibrierungsansatz, die Werte von v aus der Regression der Yamamoto-Werte zu verwenden und von den Modellparametern der SMA-Isotherme nur K_{eq} an dieser Stelle zu fitten.

Tabelle 6.5: Ergebnisse der Berechnungen aus den Durchbruchversuchen sowie die Säulenparameter der kleinen Säule.

Größe	Wert
Λ	2,252 M
ϵ_t	0,933
σ_{BSA}	44,583
σ_{LYZ}	14,137
σ_{CYC}	12,641

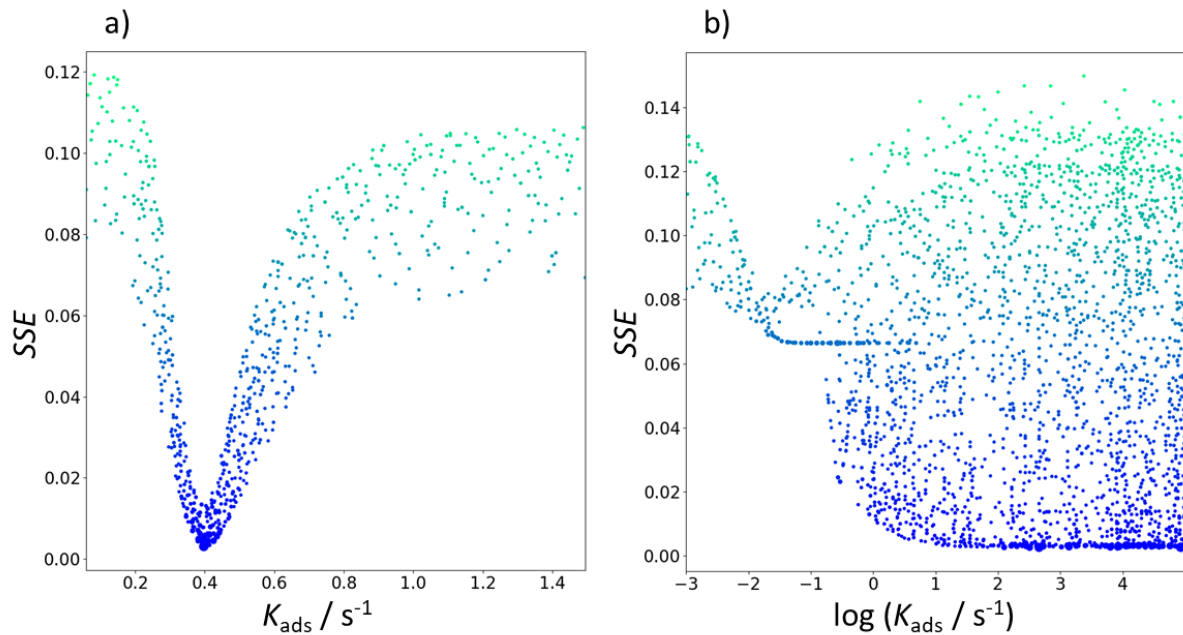


Abbildung 6.5: Vergleich der Streudiagramme für eine Parameterbestimmung mit dem Simulationsmodell mit der Adsorption als a) Gleichgewicht und b) kinetische Reaktion. Es werden die Ergebnisse für LYZ mit NaCl gezeigt.

6.2.2 Fitting der Modellparameter für die untersuchten Proteine

Die experimentellen Daten und die mit den optimierten Parametern modellierten Daten sind für die verschiedenen Salzkonzentrationen für BSA in Abbildung 6.6, für LYZ in Abbildung 6.7 und für CYC in Abbildung 6.8 dargestellt. In Abbildung 6.6 lässt sich erkennen, dass die grundsätzlichen Trends von BSA für die verschiedenen Salzzusammensetzungen und Gradientenlängen von der Simulation gut getroffen werden. Es sind allerdings auch Ungenauigkeiten sowohl in Bezug auf die Position des Peak-Maximums als auch auf die Peak-Höhe und -Breite zu sehen. Hierbei tritt, wie beispielsweise in Abbildung 6.6 a) und b) zu sehen, häufig das Phänomen auf, dass die Peak-Höhe für kurze Gradienten von der Simulation unterschätzt wird, während sie für lange Gradienten besser getroffen wird. Darüber hinaus zeigen die simulierten Daten eine tendenziell breitere vordere und schmalere hintere Peak-Hälfte als die experimentellen Daten. Des Weiteren ist in Abbildung 6.6 d) und f) zu erkennen, dass die Position des Peak-Maximums für kurze Gradienten präzise vorhergesagt wird, während sie bei längeren Gradienten in der Simulation im Vergleich zu den experimentellen Daten leicht überschätzt wird. Der *MAPE*-Wert für die Position des Peak-Maximums, welche der Retentionszeit t_R entspricht, für alle in Abbildung 6.6 gezeigten Gradienten liegt bei 1,53%, was eine insgesamt gute Übereinstimmung von Modellierung und Experiment bedeutet.

Die Abweichungen der Peak-Höhe und -Breite in Abhängigkeit der Gradientenlänge können über die Neigung von BSA zur Dimer-Bildung erklärt werden (siehe Kapitel 6.1.3) [131]. Durch die in Kapitel 6.1.3 beschriebene Aufarbeitung der experimentellen Daten wird der Einfluss des zum Tailing führenden Dimers zwar reduziert, doch lässt sich in Abbildung 6.6 erkennen, dass das Dimer immer noch einen erkennbaren Einfluss auf das Chromatogramm hat.

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

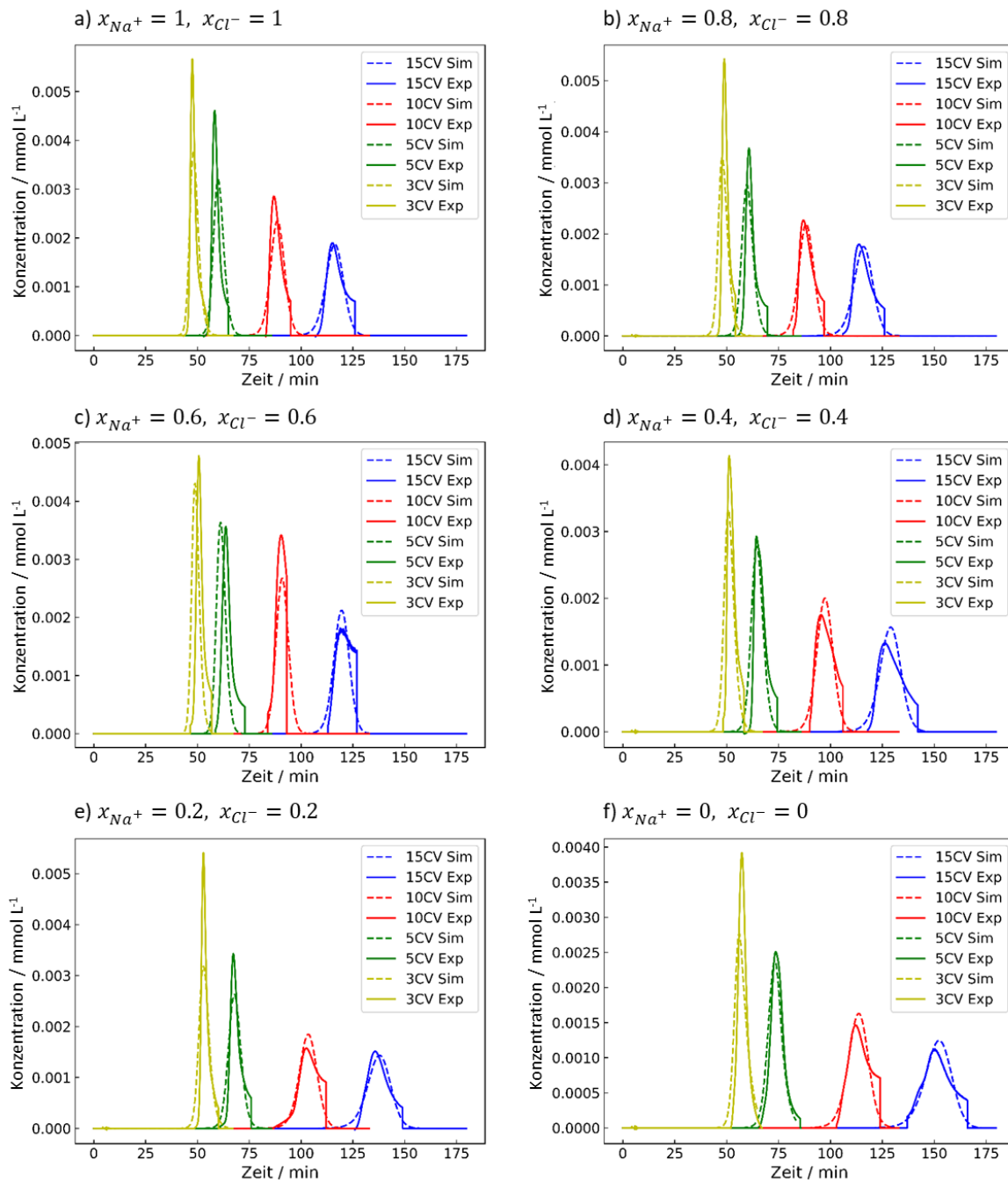


Abbildung 6.6: Experimentelle (Exp) und mit Parameterfitting simulierte (Sim) Chromatogramme für BSA für die untersuchten Gradientenlängen und Salzzusammensetzungen.

Bei kurzen Gradientenlängen liegen die Peaks für Monomer und Dimer beinahe übereinander, sodass der resultierende Gesamtpeak auch nur ein geringes Tailing aufweist. Bei langen Gradienten werden die Peaks für die beiden Spezies immer weiter auseinandergezogen, was zu einem stärkeren Tailing führt, welches nicht vollständig durch die Datenaufarbeitung behoben werden konnte. Bei langen Gradienten tritt somit ein zusätzlicher bandenverbreitender Effekt auf. Ein geringer k_{eff} -Wert führt zu höheren HETP-Werten und somit ebenfalls zu breiteren Peaks (siehe Gleichung 2.15) [81]. Daher werden die k_{eff} -Werte für BSA durch das Parameter-Fitting tendenziell unterschätzt. Dies führt zu einer erhöhten Peak-Breite bei kurzen Gradienten, während dieser Effekt bei langen Gradienten durch die zusätzliche Bandenverbreiterung durch das Dimer ausgeglichen wird. Analog lassen sich auch die Unterschiede in der Breite der vorderen und hinteren Peak-Hälfte erklären. Die bei diesen

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

niedrigen Konzentrationen auftretende asymmetrische Peak-Form ist durch das Modell mit einer einzelnen Komponente nicht abzubilden. Somit führt die Optimierung von k_{eff} zu einem Kompromiss zwischen dem schmalen vorderen und dem durch das Dimer verursachten breiten hinteren Peak-Verlauf. Da die Trends und Verläufe der Chromatogramme insgesamt gut getroffen werden, wird die Parameterbestimmung für BSA als erfolgreich betrachtet.

In Abbildung 6.7 ist eine gute Übereinstimmung der simulierten und experimentellen Daten für LYZ erkennbar. Die Retentionszeit t_R wird mit einem MAPE-Wert von 0,32% durchgehend sehr präzise getroffen, während es für die Peak-Höhe vereinzelt zu Abweichungen kommen kann.

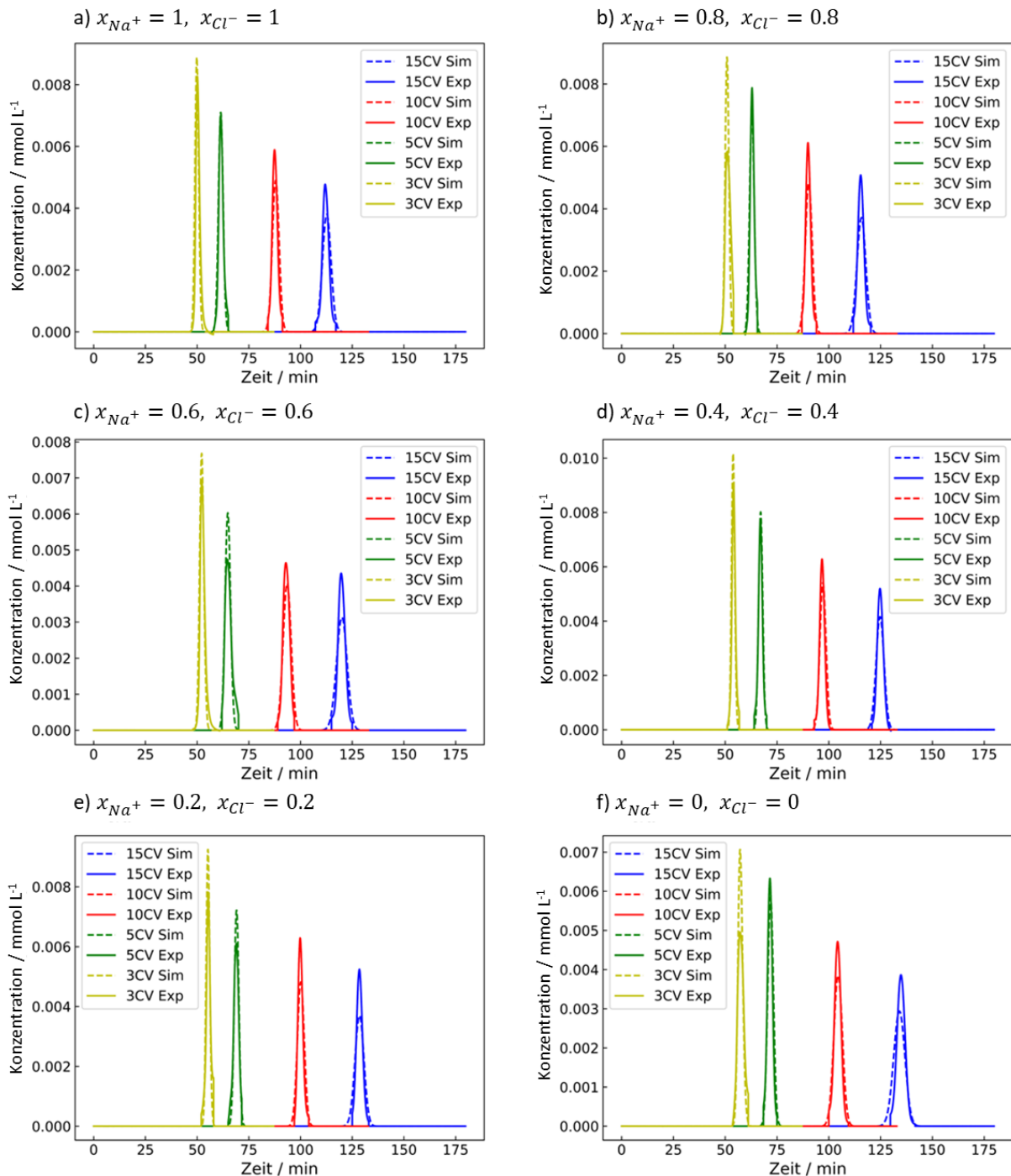


Abbildung 6.7: Experimentelle (Exp) und mit Parameterfitting simulierte (Sim) Chromatogramme für LYZ für die untersuchten Gradientenlängen und Salzzusammensetzungen.

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

Bei langen Gradienten wird die Peak-Höhe für LYZ durchgehend etwas unterschätzt. Für den 3 CV Gradienten wird die Höhe durch die Simulation dagegen überschätzt. Dieses Phänomen ist ebenfalls durch die Datenaufbereitung zu erklären. Wie in Abbildung 6.3 zu sehen, weist LYZ durch Verunreinigungen bei langen Gradienten einen kleinen Peak vor und einen kleinen Peak nach dem Hauptpeak auf. Bei langen Gradienten können diese Signale problemlos abgeschnitten werden. Bei langen Gradienten können diese Signale problemlos abgeschnitten werden. Wenn die Peaks bei kurzen Gradienten aber ineinander laufen und keine klar erkennbare Trennung mehr erfolgt, werden auch diese Bereiche der LYZ Hauptkomponente zugerechnet.

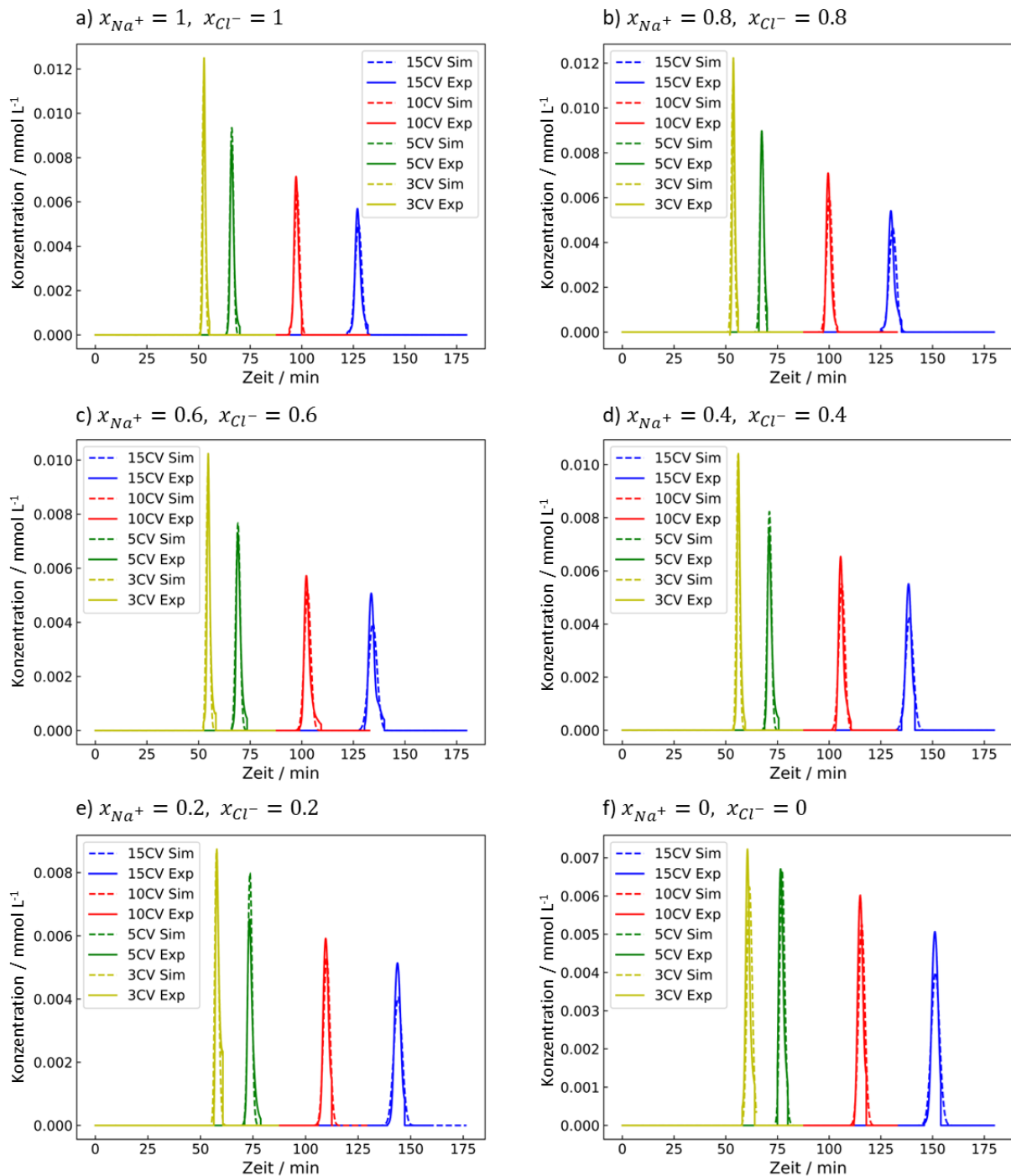


Abbildung 6.8: Experimentelle (Exp) und mit Parameterfitting simulierte (Sim) Chromatogramme für CYC für die untersuchten Gradientenlängen und Salzzusammensetzungen.

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

Hierbei ist zu beachten, dass gerade bei den kurzen Gradienten die Peak-Höhe auf Grund der schmalen Peaks sehr sensitiv auf die Peak-Breite ist, da der Flächeninhalt der Peaks konstant ist. Wie etwa in Abbildung 6.7 b) und f) zu sehen führt eine signifikante Abweichung in der Peak-Höhe nur zu einer geringen Abweichung in der Peak-Breite, sodass die Modellierung und somit die Parameterbestimmung für LYZ als erfolgreich betrachtet werden kann.

Wie in Abbildung 6.8 zu erkennen, werden die experimentellen Daten von CYC ebenfalls sehr gut von dem Modell abgebildet. Die simulierten Retentionszeiten weisen einen *MAPE* von 0,43% auf. Wie bei LYZ kommt es zu leichten Abweichungen bei der Peak-Höhe, wobei die Peak-Breite weiterhin gut getroffen wird. Dies ist analog zu LYZ auf gering konzentrierte Verunreinigungen von CYC zurückzuführen, die bei längeren Gradienten von dem Hauptpeak abgetrennt werden. Die Parameterbestimmung für CYC kann somit ebenfalls als erfolgreich betrachtet werden.

Die erhaltenen $K_{eq,ref}$ -Werte werden wie in Abbildung 6.9 dargestellt für jedes Protein in logarithmischer Form einer quadratischen Regression nach Gleichung 5.10 gegen den NaCl-Anteil x_{NaCl} unterzogen. Die so erhaltenen Regressionsparameter für $\log K_{eq,ref}$ werden zusammen mit den nach den Gleichungen 5.11-5.13 berechneten Regressionsparametern für v in Tabelle 6.6 aufgeführt.

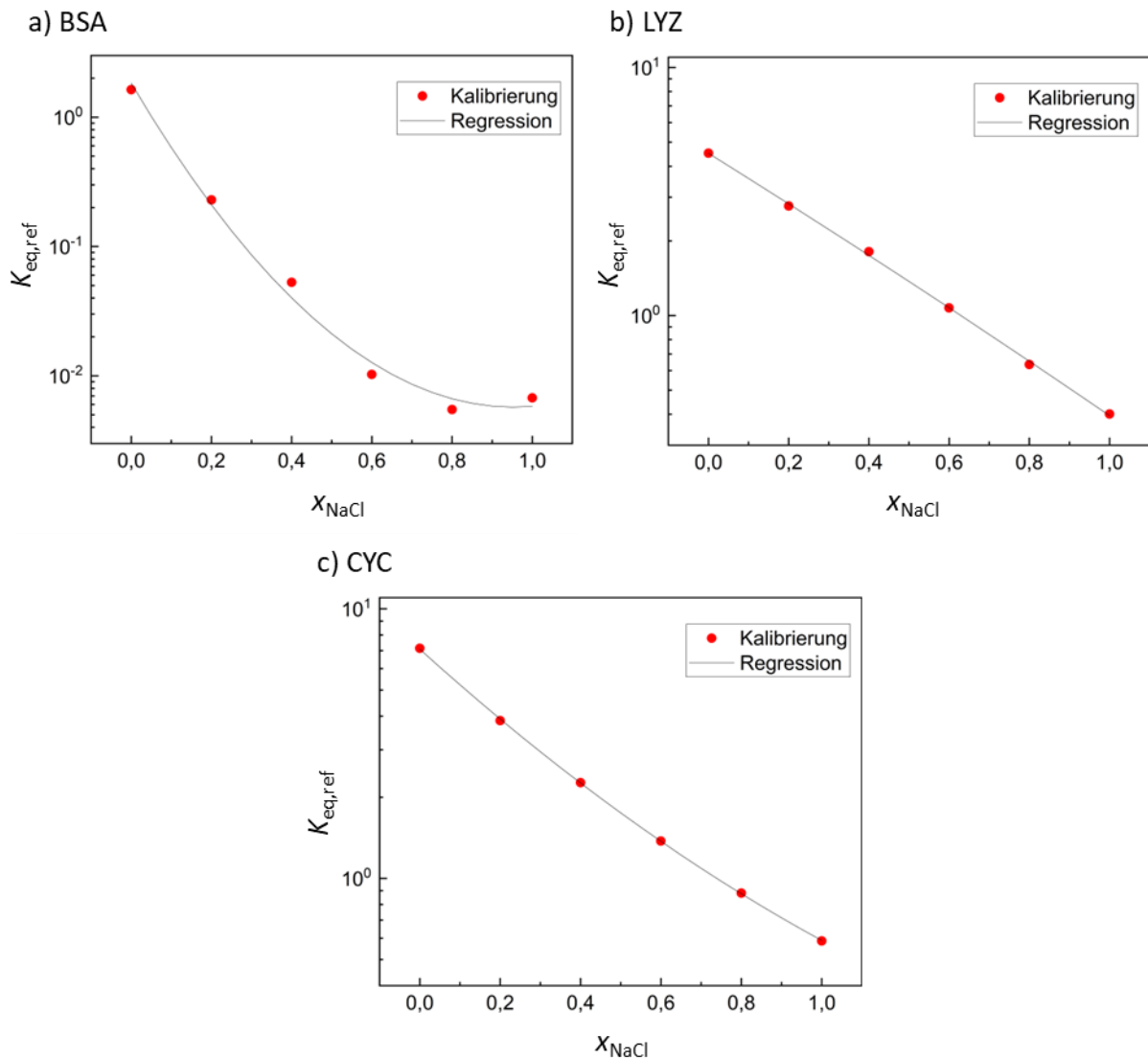


Abbildung 6.9: Regression der auf die Referenzgrößen bezogenen Gleichgewichtskonstante $K_{eq,ref}$ aus dem inversen Parameterfit für die untersuchten Proteine.

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

Tabelle 6.6: Parameter für die Regressionsgleichungen der Modellparameter der SMA-Isotherme als Funktion der Salzzusammensetzung.

	BSA		LYZ		CYC	
	$\log K_{\text{eq,ref}}$	ν	$\log K_{\text{eq,ref}}$	ν	$\log K_{\text{eq,ref}}$	ν
a_0	0,2638	12,416	0,6540	4,3926	0,8505	5,6118
a_1	-5,2558	5,6161	-1,0090	1,9828	-1,3494	3,3171
a_2	2,7559	-3,9279	-0,0486	-0,1751	0,2687	-1,0651

Es lässt sich erkennen, dass $K_{\text{eq,ref}}$ für BSA ein Minimum bei geringen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Anteilen aufweist. Dieser Trend entspricht den Beobachtungen für die Parameterbestimmung über die Yamamoto-Methode (siehe Kapitel 5). Der NRMSE-Wert für diese quadratische Regression liegt für BSA bei 3,23%. Für LYZ und CYC sind die Verläufe der Regressionskurve hauptsächlich linear. Die Regression stimmt für diese Proteine sehr gut mit den Kalibrierungspunkten überein. Für LYZ beträgt der NRMSE-Wert 0,88% und für CYC 0,29%.

Die hohe Übereinstimmung der quadratischen Regression und der aus dem Parameterfitting erhaltenen $K_{\text{eq,ref}}$ -Werte bestätigt noch einmal die grundsätzliche Interpolierbarkeit der Modellparameter über die Salzzusammensetzung für die mechanistische Modellierung sowie eine gute Identifizierbarkeit der Gleichgewichtskonstante bei vorgegebener charakteristischer Ladung. Das Vermeiden eines gleichzeitigen Fittings dieser beiden Modellparameter verhindert einen sprunghaften Verlauf der Parameter wie er in Kapitel 5.2 beobachtet wurde und vereinfacht somit die Regression über die quadratische Gleichung.

Die ermittelten Werte für k_{eff} sind in Tabelle 6.7 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass dieser Parameter keinem klaren Trend im Zusammenhang mit der Salzzusammensetzung folgt. Des Weiteren liegen die verschiedenen Werte für ein Protein jeweils in derselben Größenordnung. Die Werte für LYZ und CYC sind dabei ähnlich zueinander, während der für BSA deutlich geringer ist. Für BSA lässt sich darüber hinaus erkennen, dass in vier von sechs Fällen der k_{eff} -Wert der Untergrenze des Parameterbereichs entspricht. Da ein noch geringerer k_{eff} -Wert aber zu unrealistischen Phänomenen führen würde (siehe Abschnitt 6.1.1) und die Peak-Breite in Abbildung 6.6 insgesamt gut zu den experimentellen Daten passt, wird die Untergrenze für diesen Parameter nicht angepasst.

Tabelle 6.7: Ergebnisse der Parameterbestimmung der k_{eff} -Werte für die untersuchten Proteine bei verschiedenen Salzzusammensetzungen.

NaCl-Anteil x	$k_{\text{eff}} / (10^{-6} \text{ m s}^{-1})$		
	BSA	LYZ	CYC
1	0,130	1,66	3,04
0,8	0,110	1,84	2,84
0,6	0,171	1,48	2,22
0,4	0,110	3,79	3,19
0,2	0,110	3,44	3,67
0	0,110	2,48	5,12
Mittelwert	0,124	2,45	3,35

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

Da die k_{eff} -Werte keinem Trend in Zusammenhang mit der Salzzusammensetzung folgen, wird keine Regression in Abhängigkeit des NaCl-Anteils erstellt. Stattdessen wird für jedes Protein der Mittelwert aus den sechs einzelnen Parameterbestimmungen gebildet.

Die Verläufe der k_{eff} -Werte deuten auf eine geringe Bestimmtheit des Parameters hin. Geringe Änderungen dieses Parameters führen nur zu einer geringen Änderung der SSE-Werte der Optimierungsfunktion, sodass bereits leichte Variationen in den experimentellen Daten zu einem anderen k_{eff} -Wert führen können. Die Daten aus Tabelle 6.7 deuten hierbei darauf hin, dass zumindest die Größenordnung des Parameters für die verschiedenen Proteine identifiziert werden kann. Analog zu der Parameterbestimmung in Kapitel 5 ist es nicht zwangsläufig problematisch, wenn durch die geringe Bestimmtheit verschiedene Parameter-Werte eine gute Beschreibung der experimentellen Daten ermöglichen. Ob die Genauigkeit der nach diesem Vorgehen bestimmten k_{eff} -Werte für eine Extrapolation der Gradientenlänge ausreichend ist, muss in der Validierung anhand von zusätzlichen experimentellen Daten überprüft werden.

6.3 Validierung der Modellparameter

Für die weitere Nutzung des Modells wird zusätzlich zu v auch $K_{\text{eq,ref}}$ über die Regressionsgleichung 5.10 mit den Parametern aus Tabelle 6.6 in Abhängigkeit des NaCl-Anteils x berechnet. Für k_{eff} werden für jedes Protein die Mittelwerte aus Tabelle 6.7 verwendet. Der Vergleich von experimentellen und modellierten Daten für einen längeren Gradienten von 20 CV mit NaCl ist in Abbildung 6.10 dargestellt. In Abbildung 6.11 werden die experimentellen und modellierten Daten für einen im Parameterfitting nicht betrachteten NaCl-Anteil von 50% gezeigt. Die MAPE-Werte der Retentionszeiten sind in Tabelle 6.8 zusammengefasst.

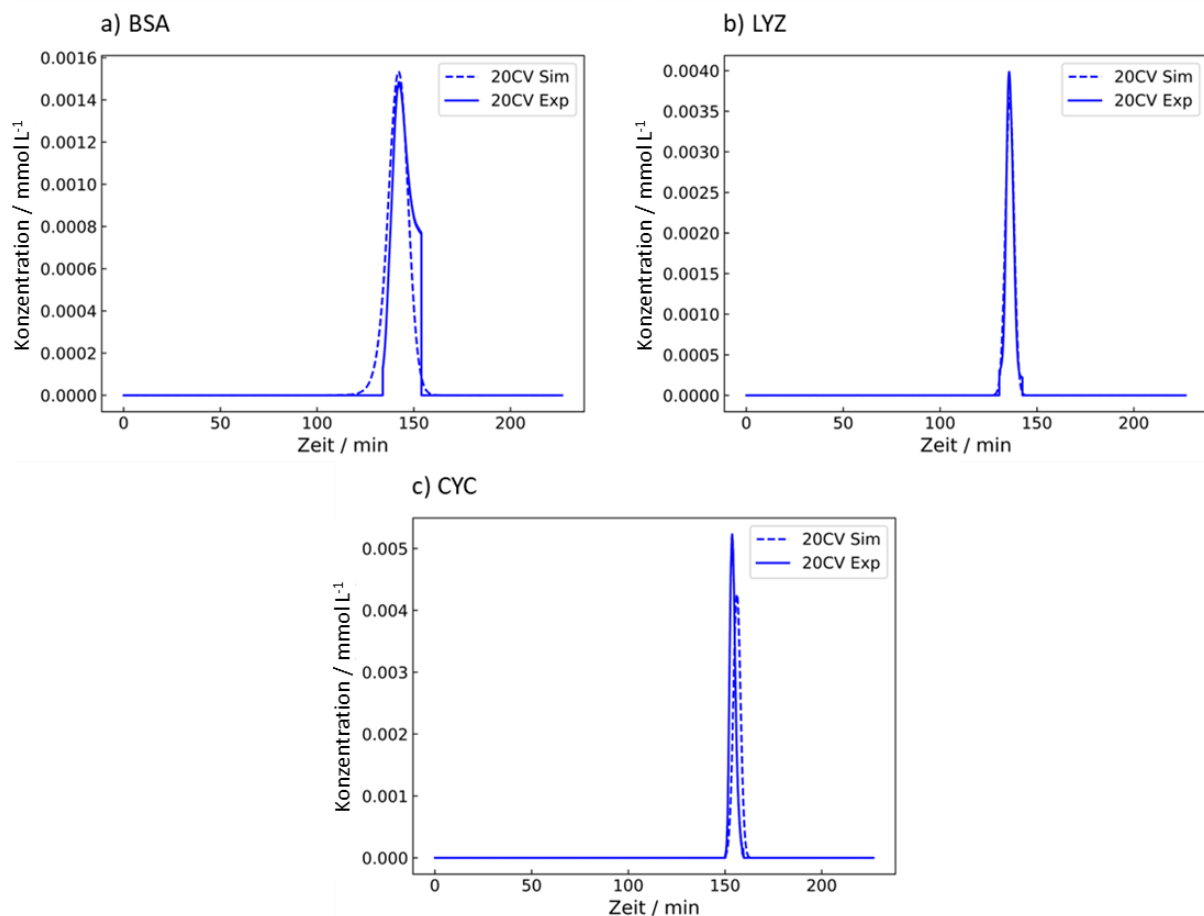


Abbildung 6.10: Validierungsversuche der untersuchten Proteine mit NaCl bei einer Gradientenlänge von 20 CV.

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

In Abbildung 6.10 lässt sich erkennen, dass die Retentionszeit für BSA und LYZ für den längeren Gradienten sehr präzise vorhergesagt wird, während bei CYC die simulierte Retentionszeit mit 1,63% leicht über der experimentellen liegt. Bei BSA gibt es leichte Abweichungen in der Peak-Breite und Form, da in den experimentellen Daten noch das Tailing-Verhalten des Dimers zu erkennen ist. Der Peak-Verlauf für LYZ wird sehr gut getroffen. Bei CYC wird die Höhe des Peak-Maximums in der Simulation etwas unterschätzt, insgesamt wird die Peak-Form aber gut vorhergesagt.

Die hohe Übereinstimmung der Simulationen mit den experimentellen Daten bei einem NaCl-Anteil von 50% ist in Abbildung 6.11 zu erkennen. Die MAPE-Werte der Retentionszeiten liegen für jedes Protein klar unter 0,5%. Bei BSA führt analog zu den Versuchen zur Parameterbestimmung die Simulation tendenziell zu einer etwas breiteren Vorder- und einer schmalen Hinterseite des Peaks.

Die Übereinstimmung von simulierten und experimentellen Daten sind für die Validierungsversuche auf einem ähnlich guten Niveau wie für die Kalibrierungsversuche der Parameterbestimmung. Die Regression der Gleichgewichtskonstante in einer logarithmischen und der charakteristischen Ladung in einer linearen Skala sorgt für eine gute Vorhersage der Mischungseffekte der Salze, sodass das Retentionsverhalten der Proteine auch für neue Salzzusammensetzungen vorhergesagt werden kann. Des Weiteren ist das Modell für einen großen Bereich an Gradientenlängen einsetzbar.

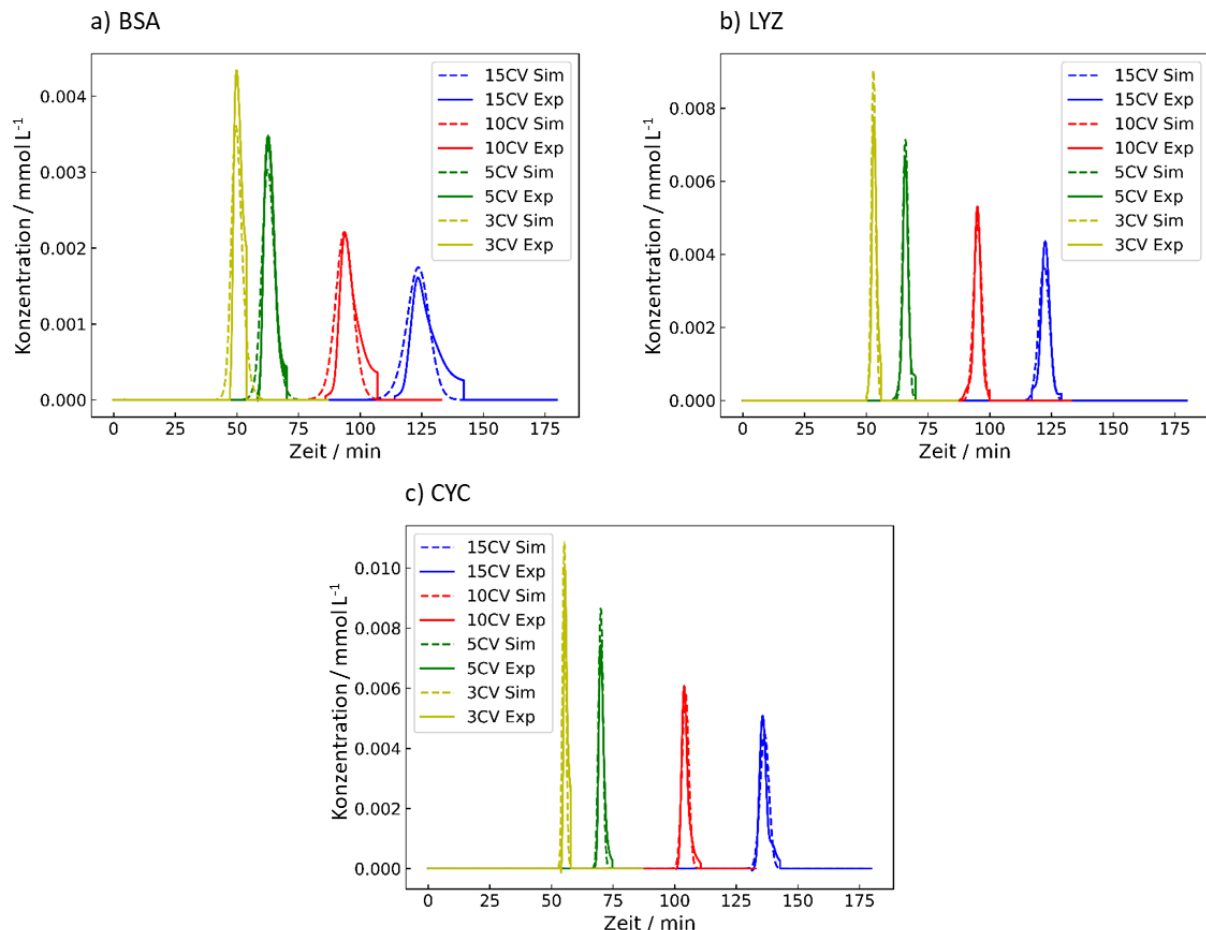


Abbildung 6.11: Validierungsversuche der untersuchten Proteine bei einer Salzzusammensetzung von 50% NaCl und 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Tabelle 6.8: Abweichungen der simulierten und experimentellen Retentionszeiten für die Validierungsversuche.

NaCl-Anteil x	Untersuchte Gradienten	MAPE(t_R)		
		BSA	LYZ	CYC
1	20 CV	0,17%	0,23%	1,63%
0,5	3 CV, 5 CV, 10 CV und 15 CV	0,22%	0,18%	0,42%

Die Mittelung der k_{eff} -Werte führt zu einer guten Beschreibung der Peak-Breiten. Dies verdeutlicht noch einmal, dass die Peak-Form nicht hochgradig sensitiv auf den k_{eff} -Wert ist. Vielmehr ist die richtige Größenordnung des Wertes ausreichend, um auch für höhere Gradientenlängen eine präzise Vorhersage der Peak-Breite zu erreichen. Der vernachlässigbare Einfluss der Salzzusammensetzung auf k_{eff} wird hierdurch bestätigt.

Somit kann mit dem kalibrierten Modell das Retentionsverhalten von BSA, LYZ und CYC in LGE-Versuchen für beliebige Mischungen aus NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und eine beliebige Gradientenlänge präzise vorhergesagt werden. Daher ist die vierte Arbeitshypothese, dass der Einfluss von Salzmischungen über eine passende Parameterbestimmung in der mechanistischen Modellierung abgebildet werden kann, mit dem hier verwendeten Ansatz bestätigt (siehe Kapitel 1.1). Die Kombination von der Yamamoto-Methode zur Bestimmung einer Funktion für v sowie des inversen Fittings zur Bestimmung einer Funktion von K_{eq} führt zu Parametersätzen, die das Verhalten bei beliebigen Mischungen der beiden Salze beschreiben können. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass sämtliche Versuche, die bei der mechanistischen Modellierung berücksichtigt werden, im gering konzentrierten Bereich liegen. Zwar gehen über die Bestimmung des sterischen Faktors auch die Durchbruchversuche der kleineren Säule in die Modellparameter ein, doch werden diese Prozessbedingungen weder im inversen Fitting noch in der Validierung betrachtet. Die prädiktive mechanistische Modellierung ist daher nur für den Bereich geringer Proteinbeladungen validiert. Für eine direkte Anwendung in industriellen Trennprozessen, die meist bei höheren Beladungen ablaufen, wäre daher eine Erweiterung der experimentellen Daten erforderlich. Da sich diese Arbeit auf die grundlegende Beschreibbarkeit der auftretenden Mischungseffekte über die Modellparameter fokussiert, welche gut im niedrig beladenen Bereich identifiziert werden können, werden höhere Beladungen hier nicht detaillierter betrachtet.

6.4 Fazit

In diesem Kapitel wurde ein Simulationstool zur Modellierung von CEC-Prozessen von Proteinen vorgestellt. In einem ersten Schritt wurde die verwendete Säule und die Anlage charakterisiert. Anschließend wurden für die Proteine BSA, LYZ und CYC für verschiedene NaCl- und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Anteile in der mobilen Phase Parameterbestimmungen für $K_{\text{eq,ref}}$ und k_{eff} durchgeführt, wobei für die charakteristische Ladung v die in Kapitel 5 ermittelte Funktion verwendet wurde. Mit diesen Parametern konnten die experimentellen Daten, mit denen das Parameter-Fitting durchgeführt wurde, gut beschrieben werden. Hierauf aufbauend wurden die Werte für $K_{\text{eq,ref}}$ in logarithmischer Form mit einer quadratischen Gleichung als Funktion des Salzanteils beschrieben. Da die k_{eff} -Werte keinen klaren Trend mit der Salzzusammensetzung zeigten und für ein Protein jeweils in der gleichen Größenordnung waren, wurde für jedes Protein ein Mittelwert bestimmt. Es wurde festgestellt, dass im Gegensatz zu den k_{eff} -Werten das Fitting von $K_{\text{eq,ref}}$ bei vorgegebenem v zu eindeutig bestimmbar Parameterwerten führt. Die Funktionen für $K_{\text{eq,ref}}$ und die Mittelwerte für k_{eff} wurden für die weiteren Simulationen als Parameter des kalibrierten Modells verwendet.

Mechanistische Modellierung der experimentellen Daten

Um die Kalibrierung zu überprüfen und die Vorhersagekraft des Modells zu validieren, wurden für jedes der untersuchten Proteine Versuche bei einer neuen Salzzusammensetzung und einer neuen Gradientenlänge durchgeführt. Die neue Gradientenlänge lag mit 20 CV außerhalb der Gradientenlänge der Kalibrierungsversuche. Die experimentellen Chromatogramme dieser Validierungsversuche wiesen eine hohe Übereinstimmung mit den simulierten Daten auf. Hierdurch wurde bestätigt, dass die Interpolation der Modellparameter $K_{eq,ref}$ und v über verschiedene Salzzusammensetzungen möglich ist sowie dass die Bestimmung von k_{eff} als Mittelwert eine ausreichende Genauigkeit für die Modellierung aufweist. Die Kalibrierung des Modells war somit erfolgreich und das erhaltene Modell kann verwendet werden, um Chromatogramme von BSA, LYZ und CYC für beliebige Mischungen aus NaCl und $(NH_4)_2SO_4$ und eine beliebige Gradientenlänge zu berechnen. Hierdurch wurde die vierte Arbeitshypothese, dass der Einfluss von Salzmischungen über eine passende Parameterbestimmung in der mechanistischen Modellierung abgebildet werden kann, bestätigt. Der hier vorgestellte Ansatz zur Modellierung und Kalibrierung ermöglicht daher eine detaillierte modellbasierte Untersuchung des Salzeinflusses auf den Trennprozess. Hierbei wurde das Modell nur für Prozesse mit geringer Proteinbeladung kalibriert und validiert, sodass eine Anwendung für höher beladene Prozesse zusätzliche Untersuchungen erfordern würde.

7 Simulationstudie zum Einfluss der Salzzusammensetzung auf die Proteintrennung

In diesem Kapitel wird das kalibrierte Modell verwendet, um den Einfluss der Salzzusammensetzung auf die Separation der drei Proteine BSA, LYZ und CYC detailliert zu untersuchen und geeignete Betriebspunkte für einen Trennprozess zu identifizieren. Hierbei wird sowohl das Mischungsverhältnis der Salze NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als auch die Gradientenlänge des Prozesses berücksichtigt. Dabei soll die fünfte Arbeitshypothese, dass die Trennung von Proteinen in der IEC durch die Verwendung von Salzmischungen verbessert werden kann, überprüft werden (siehe Kapitel 1.1). Das methodische Vorgehen wird in Kapitel 7.1 beschrieben. Kapitel 7.2 stellt die Ergebnisse für den Fall dar, dass jeweils eines der drei Proteine als Zielkomponente betrachtet wird. In Kapitel 7.3 werden alle Proteine als Zielkomponenten betrachtet, die in einem Chromatographie-Schritt voneinander getrennt werden sollen. Die Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse erfolgt in Kapitel 7.4.

7.1 Material und Methoden

7.1.1 Durchführung der Modellierung

Das kalibrierte Modell wird mit CADET-Process kombiniert. Dieses Tool kann automatisiert die Fraktionierung des Chromatogramms in Produkt- und Waste-Bereiche für eine vorgegebene Reinheit durchführen (siehe Kapitel 2.4.3). Die betrachtete Zielgröße ist die Ausbeute bei einer Reinheit von 90%.

Das Modell berechnet den Verlauf eines LGE-Versuchs bei dem eine Proteinmischung mit je 0,2 mM BSA, LYZ und CYC injiziert wird. Hierbei kann sowohl die Salzzusammensetzung als auch die Gradientenlänge variiert werden. In dieser Studie werden Simulationen mit NaCl – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Mischungen mit NaCl-Anteilen von 0% bis 100% bei einer Schrittweite von 1% durchgeführt. Diese Zusammensetzungen werden an jeder untersuchten Gradientenlänge betrachtet. Die Gradientenlängen bilden den Bereich von 1 CV bis 25 CV mit einer Schrittweite von 0,5 CV ab. Somit werden 101 verschiedene Salzzusammensetzungen und 49 verschiedene Gradientenlängen betrachtet, was zu insgesamt 4949 untersuchten Betriebsbedingungen führt. An jeder dieser Stellen wird die Ausbeute berechnet, sodass der Verlauf der Ausbeute über Salzzusammensetzung und Gradientenlänge approximiert werden kann.

In einem ersten Schritt wird die Ausbeute für ein einzelnes Protein als Produkt betrachtet. Hierzu wird jeweils ein Protein als Produkt und die anderen beiden als Verunreinigungen betrachtet. Anschließend wird noch die simultane Aufreinigung mehrerer Wertkomponenten untersucht. Hierzu wird jedes Protein gleichzeitig als Produkt betrachtet, dass mit einer Reinheit von 90% von den anderen Proteinen getrennt werden muss. Die Gesamt-Ausbeute wird hierbei als Mittelwert der Ausbeuten der einzelnen Proteine betrachtet. Wenn ein Protein nicht in der benötigten Reinheit fraktioniert werden kann, schlägt die Berechnung der Fraktionierung mit Cadet-Process fehl. Daher wird die Gesamt-Ausbeute auf null gesetzt, sobald mindestens ein Protein an dem untersuchten Betriebspunkt nicht in der geforderten Reinheit fraktioniert werden kann.

Aus diesen Verläufen der Ausbeuten können für jedes Produkt geeignete Betriebsbedingungen bestimmt werden. Für jedes Produkt soll eine Salzzusammensetzung und eine Gradientenlänge für einen effizienten Trennprozess bestimmt werden.

7.1.2 Validierungsversuche

An den ausgewählten Betriebspunkten für einen effizienten Trennprozess wird die Berechnung des Tools erneut mit experimentellen Daten verglichen. Hierfür wird die in Kapitel 4.1.1 dargestellte experimentelle Methodik mit den entsprechenden Salzzusammensetzungen und Gradientenlängen angewandt. Für den Validierungsversuch des Trennprozesses mit BSA als Produkt wird auf Grund von Lieferproblemen CYC von einem anderen Hersteller verwendet (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Bei den durchgeführten Versuchen wird jedes der Proteine einzeln untersucht, um einen klaren experimentellen Konzentrationsverlauf für jede beteiligte Komponente zu erhalten und die Datenaufbereitung nach Kapitel 6.1.3 zu ermöglichen.

Dies ist eine Abweichung von einer tatsächlichen Trennung, da sich die Komponenten nicht gleichzeitig in der Säule befinden und nicht miteinander interagieren. Allerdings werden sämtliche Versuche und Modellierungen im niedrig-konzentrierten Bereich durchgeführt. In dem hier betrachteten Konzentrationsbereich verhalten sich die Isothermen linear [79]. Im linearen Isothermen-Bereich beeinflussen sich die verschiedenen Komponenten nicht gegenseitig [19,79]. Zur Bestätigung dieses Verhaltens für die vorliegenden Betriebsbedingungen, werden die Ergebnisse der drei Modellierungen von den einzelnen Proteinen mit dem Ergebnis der gleichzeitigen Modellierung der drei Proteine verglichen. Hierzu wird der Versuch mit einer Gradientenlänge von 15 CV und einem NaCl-Anteil von 100% betrachtet. Die Ergebnisse dieser Betrachtung sind im Anhang C.2 dargestellt.

7.2 Aufreinigung einer einzelnen Zielkomponente

7.2.1 Berechnung von Ausbeuten

BSA als Produkt

Die berechneten Ausbeuten von BSA bei einer Reinheit von 90% sind in Abbildung 7.1 über der Salzzusammensetzung und der Gradientenlänge aufgetragen.

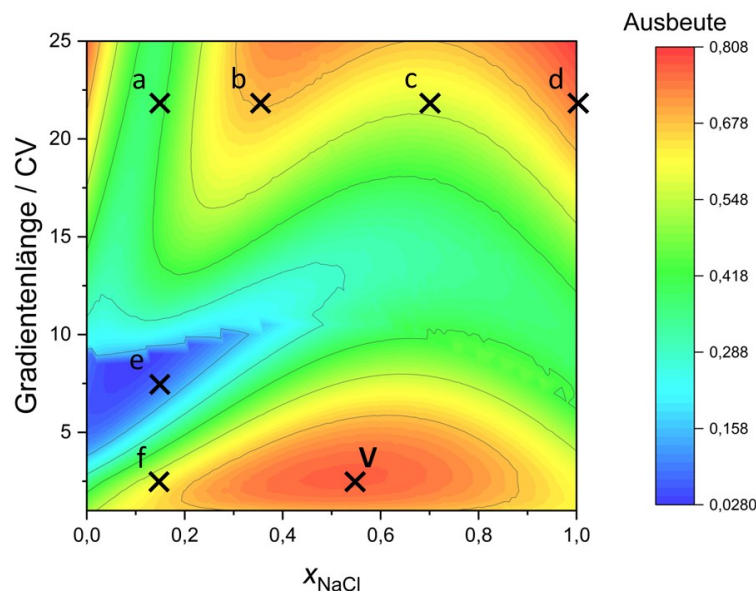


Abbildung 7.1: Ausbeuten von BSA über die Gradientenlänge und die Salzzusammensetzung. Die Ausbeuten beziehen sich auf eine Reinheit von 90%. Die Chromatogramme der Punkte a) bis f) werden zur Untersuchung der auftretenden Phänomene näher untersucht. Punkt v beschreibt den vorgeschlagenen Betriebspunkt zur BSA-Aufreinigung.

Einige Punkte, die im Folgenden näher betrachtet werden, sind in der Abbildung mit Buchstaben markiert. Es lässt sich erkennen, dass die Ausbeute mehrere starke Schwankungen über der Gradientenlänge und der Salzzusammensetzung aufweist. Wenn man beispielsweise die eingezeichneten Punkte a), b), c) und d) betrachtet lässt sich erkennen, dass bei einer Gradientenlänge von 22 CV die Ausbeute von a) nach b) stark ansteigt. Anschließend fällt die Ausbeute von b) nach c) ab, um dann von c) nach d) wieder anzusteigen. Ein ähnlich wechselhaftes Verhalten lässt sich bei einer Salzzusammensetzung von 15% NaCl am Verlauf der Punkte a), e) und f) beobachten. Insgesamt schwankt die Ausbeute zwischen knapp 3% und knapp 81%. Ein geringer Teil des BSA kann also innerhalb der untersuchten Betriebsbedingungen immer mit der angesetzten Reinheit von 90% fraktioniert werden. Da die Ausbeute stets unterhalb von 100% bleibt gibt es analog dazu im untersuchten Bereich keine Betriebsbedingungen, die eine vollständige Abtrennung von BSA ermöglichen.

Auffällig sind im Verlauf der Ausbeuten ein Bereich besonders geringer Ausbeuten bei niedrigen NaCl-Anteilen und einer Gradientenlänge um 7 CV im Umfeld von Punkt e) und ein Bereich hoher Ausbeuten bei mittleren NaCl-Anteilen und kurzen Gradientenlängen. Hierbei liegt das lokale Maximum mit einer Ausbeute von etwa 80% bei einer Gradientenlänge von 2,5 CV und einem NaCl-Anteil von 56%, wobei sowohl längere als auch kürzere Gradienten wieder zu Einbußen in der Ausbeute führen. Weitere lokale Maxima sind bei NaCl-Anteilen von 0%, 41% und 100% jeweils bei einer Gradientenlänge von 25 CV und somit am Rand des untersuchten Bereichs zu sehen. Hierbei erreicht die Ausbeute bei 100% NaCl mit etwa 81% den höchsten Wert aller untersuchten Betriebsbedingungen. Als geeigneter Betriebspunkt wird das lokale Minimum bei kurzen Gradienten ausgewählt, da hier eine hohe Ausbeute mit sehr kurzen Prozesszeiten kombiniert wird. Die minimale Erhöhung der Ausbeute, die bei einer Gradientenlänge von 25 CV zu erreichbar ist, rechtfertigt nicht die um das Zehnfache erhöhte Dauer des Gradienten. Der entsprechende Punkt ist in Abbildung 7.1 mit einem V dargestellt.

Zur näheren Untersuchung der auftretenden Phänomene sind die simulierten Chromatogramme der Punkte a) bis f) mit der berechneten Fraktionierung in Abbildung 7.2 dargestellt. Die hervorgehobenen Bereiche der Produktfraktionierung zeigen, dass das Produkt bei allen Betriebsbedingungen zu mehreren Zeitpunkten gesammelt wird. Dies ist durch die hohe Peak-Breite zu erklären, die beispielsweise in Chromatogramm a) dazu führt, dass eine Fraktion an BSA bei etwa 150 min vor dem LYZ Peak gesammelt wird. Die Konzentration an BSA ist hier sehr gering und im Chromatogramm nicht zu erkennen, sie liegt allerdings über null. Die geringere Breite des LYZ Peaks sorgt dafür, dass an dieser Stelle dennoch die benötigte Reinheit erreicht wird. Analog dazu führt die Peak-Breite in Chromatogramm f) zu einer Produkt Fraktion hinter dem CYC Peak. Ebenfalls fällt auf, dass bei allen Chromatogrammen eine Produkt Fraktion nach etwa 5 min gesammelt wird, bei welcher die Konzentration ebenfalls so gering ist, dass sie in der Abbildung nicht direkt sichtbar ist. Diese frühe Fraktion ist durch den niedrigen k_{eff} -Wert von BSA zu erklären. Wie in Kapitel 6.1.1 beschrieben führen sehr geringe k_{eff} -Werte dazu, dass ein Teil des Proteins nicht in das Porensystem gelangt und das System mit der Retentionszeit eines nicht-porengängigen Tracers verlässt. Die Untergrenze von k_{eff} wurde so gewählt, dass dieses real nicht auftretende Phänomen auch in den simulierten Chromatogrammen nicht sichtbar ist. Die gewählte Untergrenze führt aber offenbar dazu, dass eine sehr geringe Menge des Proteins weiterhin nicht in das Porensystem gelangt. Dies verdeutlicht noch einmal, dass der geringe k_{eff} -Wert von BSA durch die Überlagerung mit dem zusätzlich bandenverbreitenden Effekt der Trennung von dem Dimer zustande kommt (vergleiche Kapitel 6.2.2). Aufgrund der sehr geringen Konzentrationen in diesen Fraktionierungsbereichen ist deren Anteil an der berechneten Ausbeute zu vernachlässigen. Somit stellt dieses unphysikalische Phänomen keine relevante Einschränkung für die Modellgültigkeit dar.

Simulationsstudie zum Einfluss der Salzzusammensetzung auf die Proteintrennung

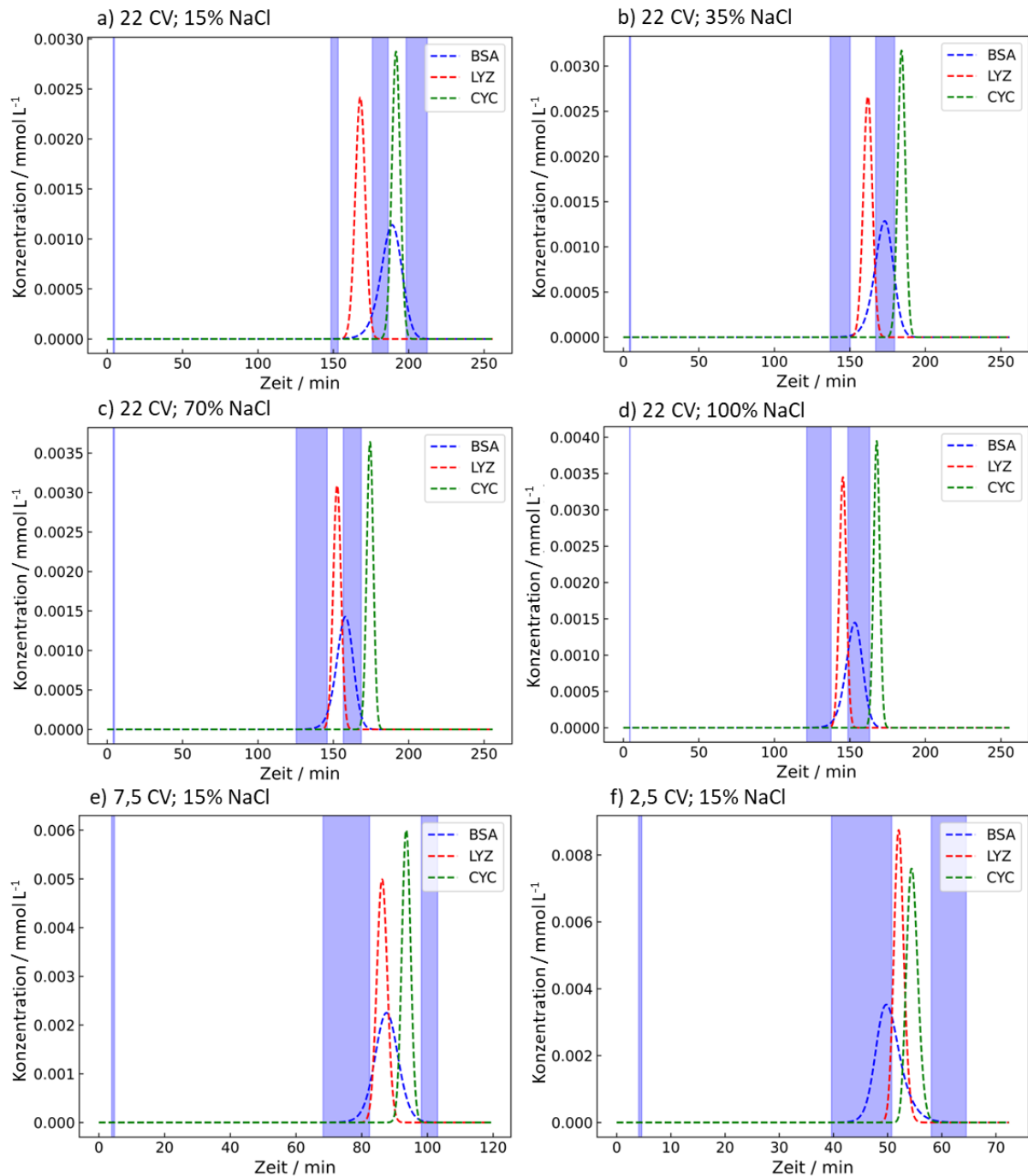


Abbildung 7.2: Simulierte Chromatogramme mit Fraktionierung von BSA an ausgewählten Salzzusammensetzungen und Gradientenlängen. Der Bereich der Produktfraktion ist blau dargestellt.

Der Vergleich der Chromatogramme a), b) und c) lässt erkennen, dass bei konstanter Gradientenlänge sämtliche Proteine bei einem steigenden NaCl-Anteil früher eluieren. Hierbei findet jedoch eine Verschiebung der Peaks zueinander statt. Bei 15% NaCl in a) überlagern sich größtenteils die Peaks von BSA und CYC, was zu geringen BSA-Ausbeuten führt. Bei 35% NaCl in b) liegt der BSA-Peak genau zwischen den Peaks von LYZ und CYC, wodurch die Fraktionierung mit einer hohen Ausbeute möglich ist. Steigt der NaCl-Anteil wie in c) dargestellt auf 70% überlagern sich die Peaks von LYZ und BSA. Dies stimmt mit den Beobachtungen in Kapitel 4 überein, wonach hohe $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Anteile (und somit geringe NaCl-Anteile) bei langen Gradienten eine gute Trennung von BSA und LYZ bewirken. Dem gegenüber steht hier der erkennbare Effekt, dass die Trennung von BSA und CYC mit steigendem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Anteil schlechter wird. Eine Mischung mit etwa 35% NaCl führt hierbei wie in

Chromatogramm b) erkennbar zu einem guten Kompromiss zwischen diesen beiden Effekten, da das Peak-Maximum von BSA mittig zwischen den anderen liegt. Wird ein höherer NaCl-Anteil als 70% betrachtet setzt sich dieser Trend nicht fort. Wie in Chromatogramm d) bei einem Anteil von 100% zu erkennen, verschiebt sich der BSA-Peak im Verhältnis zu den anderen Peaks wieder nach hinten, was zu einer erneuten Zunahme der Ausbeute führt. Dieses Phänomen lässt sich auf den Verlauf der Gleichgewichtskonstanten über der Salzzusammensetzung zurückführen. Die in Kapitel 6 in

Abbildung 6.9 dargestellten Graphen lassen erkennen, dass die $K_{eq,ref}$ -Werte von allen Proteinen von 0% NaCl bis etwa 70% NaCl näherungsweise linear abnehmen. Bei höheren NaCl-Anteilen flacht die Kurve für BSA ab, während die Regressionslinien für LYZ und CYC weiter abfallen. Dies führt zu im Vergleich höheren Retentionszeiten für BSA. Dies stimmt mit dem in Kapitel 4 beschriebenen Verhalten überein. In Abbildung 4.9 führt ein Cl⁻-Anteil von etwa 70% zu der im Verhältnis zu LYZ frühesten Elution von BSA. Die auftretenden synergetischen Effekte von Salzmischungen mit hohem Cl⁻- und geringem SO₄²⁻-Anteilen auf BSA in Richtung kürzerer Retentionszeiten sind somit für das hier betrachtete Trennproblem bei einer Gradientenlänge von 22 CV nachteilig und führen zu den geringen Ausbeuten um den Punkt c) in Abbildung 7.1.

Um den Einfluss der Gradientenlänge näher zu untersuchen, werden die Chromatogramme a), e) und f) in Abbildung 7.2 betrachtet. Es lässt sich erkennen, dass bei kurzen Gradienten BSA im Verhältnis zu den anderen Proteinen früher eluiert. Bei 7,5 CV in Chromatogramm e) liegen die Peak-Maxima von BSA und LYZ nah beieinander, was in einer geringen Ausbeute resultiert. Bei einem noch kürzeren Gradienten von 2,5 CV lässt sich in Chromatogramm f) erkennen, dass BSA als erstes Protein eluiert, was zu einem starken Anstieg der Ausbeute führt. Wie in Kapitel 5.2 beschrieben führt die hohe charakteristische Ladung von BSA dazu, dass sich die Retentionszeit stark mit der Gradientenlänge ändert und es bei kurzen Gradienten vor LYZ eluiert. Die Trennung zwischen LYZ und CYC nimmt mit kürzeren Gradienten ab und eine zunehmende Überlappung der Peaks tritt auf. Wie in Tabelle 6.6 erkennbar liegen die charakteristischen Ladungen von LYZ und CYC in derselben Größenordnung. Der Einfluss der Gradientenlänge ist somit auf diese beiden Proteine ähnlich. Die verringerte Trennung zwischen den beiden Proteinen ist daher durch die verkürzte Prozessdauer zu erklären, die bei 2,5 CV nicht mehr für eine signifikante Trennung zwischen den beiden Proteinen ausreicht. Bei BSA hingegen überwiegt in diesem Bereich der Einfluss durch die hohe charakteristische Ladung v .

Im Umfeld von Punkt V) in Abbildung 7.1 lässt sich erkennen, dass eine weitere Absenkung des Gradienten wieder zu einer Abnahme der Ausbeute führt. In diesem Bereich überwiegt auch für BSA die abnehmende Prozesszeit den Einfluss durch die charakteristische Ladung v . Die Betrachtung eines Yamamoto-Plots mit der logarithmierten Gradientensteigung $\log GH$ gegen die logarithmierte Salzkonzentration bei der Elution $\log c_{s,R}$ analog zu Abbildung 5.1 würde für BSA und LYZ zwar auch in diesem Bereich eine größere Differenz der $c_{s,R}$ -Werte für noch kürzere Gradienten aufzeigen, jedoch tritt diese Differenz der Salzkonzentration durch den steileren Gradienten in einer kürzeren Zeit auf. Die Peaks überlagern sich somit stärker und die erreichbare Ausbeute sinkt. Das Retentionsverhalten am vorgeschlagenen Betriebspunkt V wird in Abschnitt 7.2.2 näher untersucht. Die Kombination von hohen BSA-Ausbeuten und geringen Prozesszeiten ist für dieses System nur mit Salzmischungen möglich. Die auftretenden proteinspezifischen und synergetischen Salzeffekte führen somit dazu, dass die Trennung durch die Verwendung von Salzmischungen effizienter abläuft als es durch die Verwendung von Reinsalzen möglich wäre.

LYZ als Produkt

Die berechneten Ausbeuten von LYZ bei einer Reinheit von 90% sind für die untersuchten Gradientenlängen und Salzzusammensetzungen in Abbildung 7.3 dargestellt. Es ist ein größerer Bereich mit der maximalen Ausbeute von 1 bei geringen NaCl-Anteilen und langen Gradienten zu erkennen. Angrenzend hierzu befindet sich ein schmaler Übergangsbereich, indem die Ausbeute stark abfällt. Im gesamten restlichen Bereich beträgt die Ausbeute 0, mit Ausnahme eines sehr kleinen Bereichs bei langen Gradienten und hohen NaCl-Anteilen, bei dem die Ausbeute ebenfalls im mittleren Bereich liegt. Zur näheren Untersuchung der auftretenden Phänomene sind die Punkte a), b) und c) in Abbildung 7.3 markiert.

Als geeigneter Betriebspunkt zur Aufreinigung von LYZ wird eine Gradientenlänge von 15 CV bei einem NaCl-Anteil von 0% vorgeschlagen. Der entsprechende Punkt ist in Abbildung 7.3 mit einem V markiert. Bei reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ist der Gradientenlängen-Bereich mit einer Ausbeute von 1 am größten und noch mit den geringsten Gradientenlängen erreichbar. Eine noch geringere Gradientenlänge als 15 CV wäre ohne Verluste in der Ausbeute möglich. Allerdings weist der LYZ-Peak durchgehend einen sehr steilen Verlauf auf, was die Ausbeute in den Grenzbereichen sehr sensitiv für leichte Verschiebungen der Retentionszeiten macht. Dies wird durch den schmalen Übergangsbereich in Abbildung 7.3 verdeutlicht. Für einen robusten Prozess wird daher ein Betriebspunkt ausgewählt, der nicht direkt an der Grenze des Bereichs mit hoher Ausbeute liegt.

Die Chromatogramme der Punkte a), b) und c) werden in Abbildung 7.4 zusammen mit den berechneten LYZ-Fractionen dargestellt. In Chromatogramm c) ist keine Fraktion eingezeichnet, da die benötigte Reinheit von LYZ an keiner Stelle erreicht wird. Die Ausbeute an dieser Stelle ist somit 0. Es lässt sich erkennen, dass an Punkten a), b) und c) CYC vollständig von LYZ getrennt wird. Die unterschiedlichen Ausbeuten werden allein durch das Trennverhalten von BSA und LYZ verursacht. Dementsprechend führen nach den Ergebnissen aus Kapitel 4 für die Trennung von BSA und LYZ lange Gradienten mit reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu den besten Resultaten.

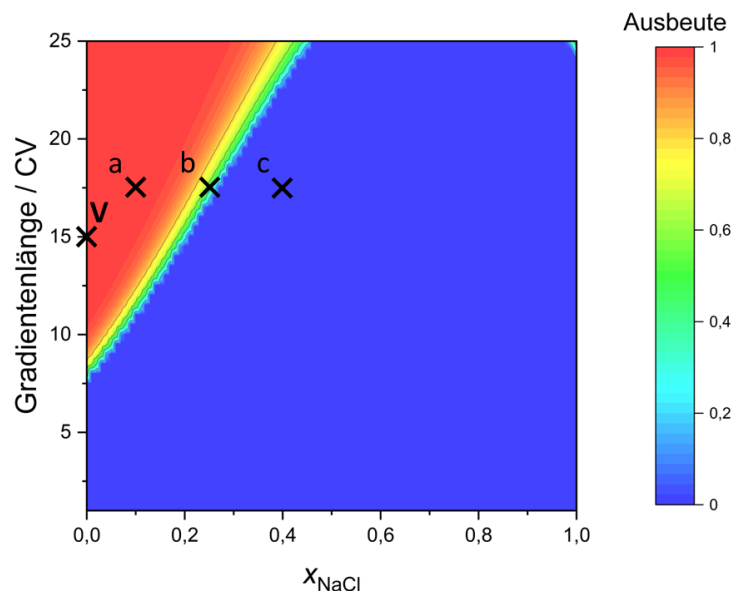


Abbildung 7.3: Ausbeuten von LYZ über die Gradientenlänge und die Salzzusammensetzung. Die Ausbeuten beziehen sich auf eine Reinheit von 90%. Die Chromatogramme der Punkte a) bis c) werden zur Untersuchung der auftretenden Phänomene näher untersucht. Punkt V beschreibt den vorgeschlagenen Betriebspunkt zur LYZ-Aufreinigung.

Simulationsstudie zum Einfluss der Salzzusammensetzung auf die Proteintrennung

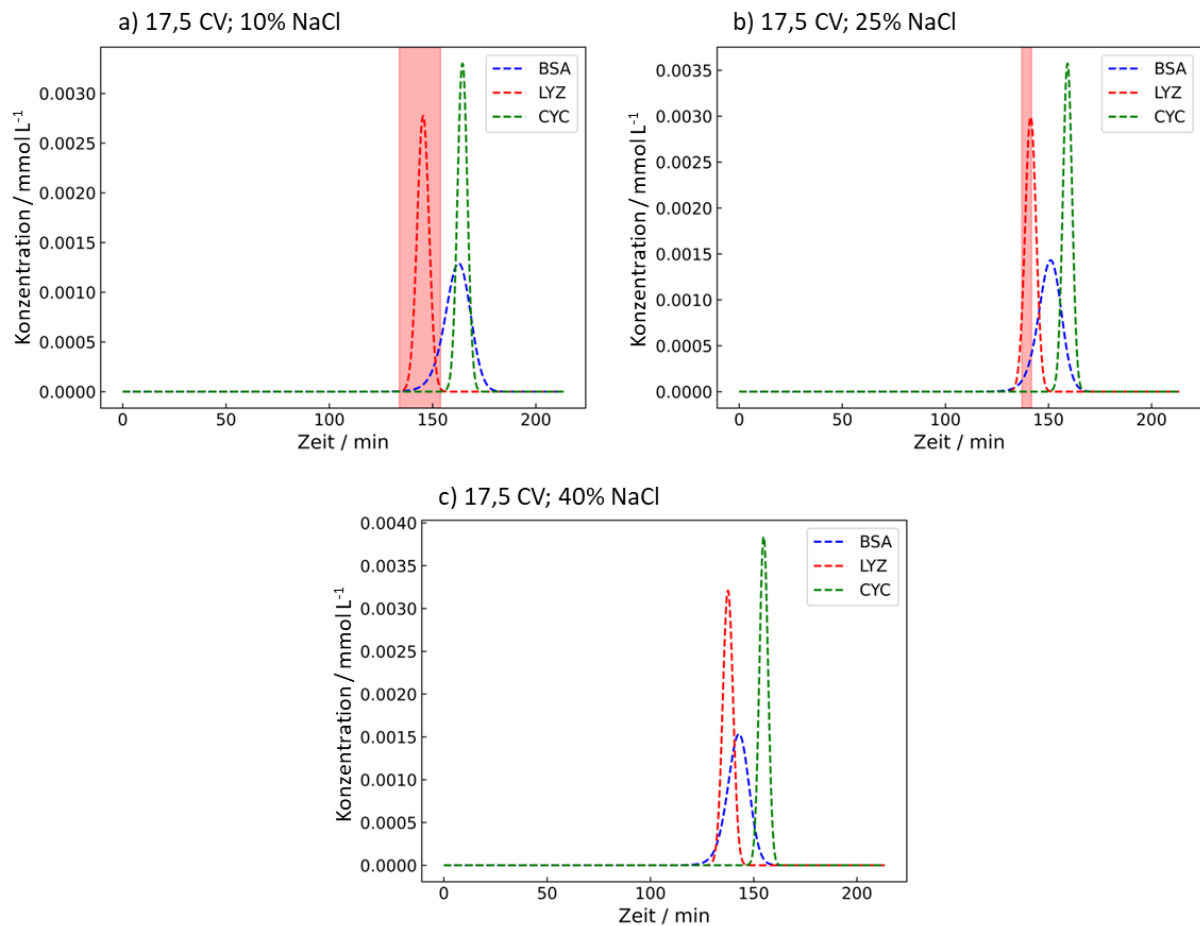


Abbildung 7.4: Simulierte Chromatogramme mit Fraktionierung von LYZ an ausgewählten Salzzusammensetzungen und Gradientenlängen. Der Bereich der Produktfraktion ist rot dargestellt.

In Chromatogramm a) bei einem NaCl-Anteil von 10% ist zu erkennen, dass sich der LYZ-Peak mit dem Anfangsbereich des BSA-Peaks überlappt. Durch die Reinheitsanforderung von 90% ist dennoch der gesamte LYZ-Peak als Produkt-Fraktion geeignet. Bei einem NaCl-Anteil von 25% in Chromatogramm b) sorgt die geringere Trennung von BSA dafür, dass nur noch ein Teil des Peaks über die ausreichende Reinheit verfügt. Ein NaCl-Anteil von 40% führt wie in Chromatogramm c) zu erkennen zu einer weiteren Überlagerung der Peaks, sodass kein LYZ in der benötigten Reinheit produziert werden kann. Das Retentionsverhalten am vorgeschlagenen Betriebspunkt V wird in Abschnitt 7.2.2 näher untersucht.

CYC als Produkt

Die berechneten Ausbeuten von CYC bei einer Reinheit von 90% sind in Abbildung 7.5 über der Salzzusammensetzung und der Gradientenlänge aufgetragen. Es lässt sich erkennen, dass in einem großen Bereich die maximale Ausbeute von 1 erreicht wird. Ähnlich wie bei LYZ gibt es einen schmalen Übergangsbereich mit mittleren Ausbeuten. Bei sehr kurzen Gradienten oder sehr geringen NaCl-Anteilen kann kein CYC mit der geforderten Reinheit fraktioniert werden. Bei längeren Gradienten verschiebt sich der Übergang vom Bereich niedriger zum Bereich hoher Ausbeuten dabei zu höheren NaCl-Anteilen. Hierbei fällt auf, dass mit Ausnahme der geringen Werte bei sehr kurzen Gradienten, die Ausbeuten für CYC beinahe gegenteilig zu denen für LYZ verlaufen (vergleiche Abbildung 7.3), wobei eine geringe Überlappung der Bereiche mit hohen Ausbeuten gibt. An den eingezeichneten Punkten a), b) und c) werden die modellierten Chromatogramme näher untersucht.

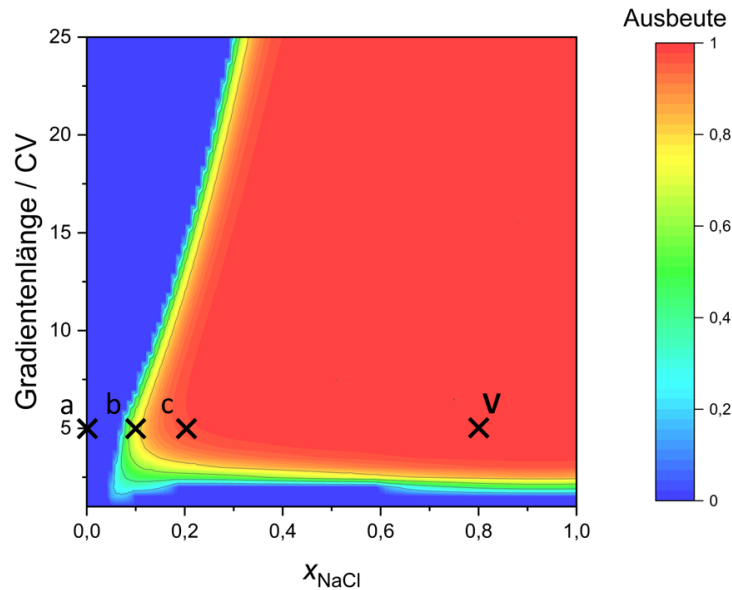


Abbildung 7.5: Ausbeuten von CYC über die Gradientenlänge und die Salzzusammensetzung. Die Ausbeuten beziehen sich auf eine Reinheit von 90%. Die Chromatogramme der Punkte a) bis c) werden zur Untersuchung der auftretenden Phänomene näher untersucht. Punkt V beschreibt den vorgeschlagenen Betriebspunkt zur CYC-Aufreinigung.

Punkt V stellt den vorgeschlagenen Betriebspunkt mit einer Gradientenlänge von 5 CV bei einem NaCl-Anteil von 80% zur CYC-Aufreinigung dar. Bei diesen Betriebsbedingungen ist die Prozesszeit auf Grund des kurzen Gradienten gering. Um einen robusten Prozess zu erhalten, wird hierbei kein Punkt ausgewählt, der direkt an der Grenze zu geringeren Ausbeuten liegt. Das Retentionsverhalten am vorgeschlagenen Betriebspunkt V wird in Abschnitt 7.2.2 näher untersucht.

Die Chromatogramme der Punkte a), b) und c) sind in Abbildung 7.6 zusammen mit den berechneten CYC-Fractionen abgebildet. CYC weist in allen Chromatogrammen die höchste Retentionszeit auf. In Chromatogramm a) bei reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ist keine Fraktion eingezeichnet, da die benötigte Reinheit von CYC an keiner Stelle erreicht wird. An allen drei Punkten ist eine ähnliche, geringe Überlappung der CYC- und LYZ-Peaks zu sehen. Dies bestätigt, dass die Trennung von CYC und LYZ kaum durch die Salzzusammensetzung beeinflusst wird. Die Änderung der Ausbeute mit der Salzzusammensetzung wird daher durch das Trennverhalten von BSA und CYC verursacht. In Chromatogramm b) bei einem NaCl-Anteil von 10% ist der BSA-Peak weiter vom CYC-Peak getrennt und weist in etwa dieselbe Retentionszeit wie LYZ auf. Aufgrund der hohen Peak-breite für BSA findet nach wie vor eine Überlappung des CYC-Peaks mit der Hinterseite des BSA-Peaks statt. Die sehr viel höhere CYC-Konzentration im Bereich des Peak-Maximums ermöglicht aber dennoch eine Fraktion mit der geforderten Reinheit von 90%. Bei einem NaCl-Anteil von 20% in Chromatogramm c) wird der BSA-Peak im Vergleich zu den anderen weiter nach vorne verschoben, wodurch die Ausbeute an CYC deutlich ansteigt.

LYZ und CYC sind bei den betrachteten Betriebsparametern mit Ausnahme von sehr kurzen Gradienten gut voneinander zu trennen, wobei CYC das später eluierende Protein ist. Somit hängt bei beiden Proteinen die Ausbeute vor allem von der Trennung von BSA ab. Dies erklärt die gegensätzlichen Verläufe der Ausbeuten von LYZ und CYC. Hohe $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Anteile führen durch den proteinspezifischen Effekt auf BSA zu hohen Retentionszeiten für dieses Protein. Analog erhöht sich aufgrund der hohen charakteristischen Ladung die Retentionszeit von BSA besonders stark mit der Gradientenlänge.

Simulationsstudie zum Einfluss der Salzzusammensetzung auf die Proteintrennung

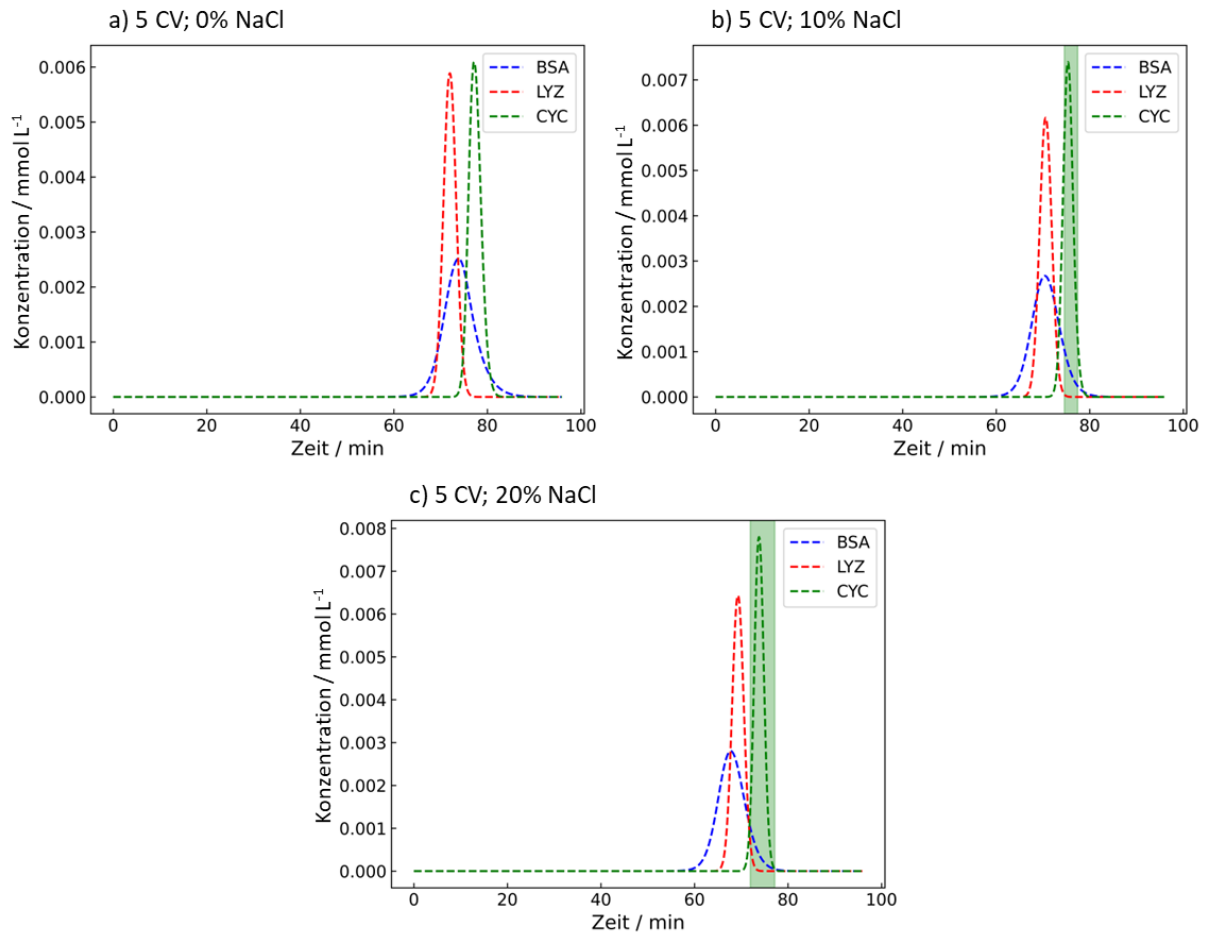


Abbildung 7.6: Simulierte Chromatogramme mit Fraktionierung von CYC an ausgewählten Salzzusammensetzungen und Gradientenlängen. Der Bereich der Produktfraktion ist grün dargestellt.

Bei hohen Gradientenlängen und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Anteilen wird BSA somit in Richtung des CYC-Peaks und weg vom LYZ-Peak verschoben, sodass die LYZ-Ausbeute steigt und die CYC Ausbeute sinkt. Bei geringen Gradientenlängen und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Anteilen tritt der genteilige Effekt auf.

7.2.2 Validierung der Prozessparameter

BSA als Produkt

Die Validierung des gewählten Betriebspunkts für BSA ist in Abbildung 7.7 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass BSA hauptsächlich vor den anderen Proteinen eluiert. Der hintere Teil des Peaks kann nicht für die Produkt-Fraktion verwendet werden, da er sich mit den anderen Peaks überschneidet. Auf Grund der hohen Peak-Breite kann der auslaufende Teil des Peaks mit sehr geringer Konzentration wieder in der benötigten Reinheit fraktioniert werden. Der Beitrag dieser hinteren Fraktion zu der Gesamt-Ausbeute ist wegen der geringen Konzentration zu vernachlässigen. Die frühe Elution von BSA ist ausschlaggebend für die hohe Ausbeute mit diesen Prozessparametern. Die Fraktionierung führt zu einer Ausbeute von etwa 80% und einer Reinheit von 90%, wobei die 10% Verunreinigung aus LYZ bestehen.

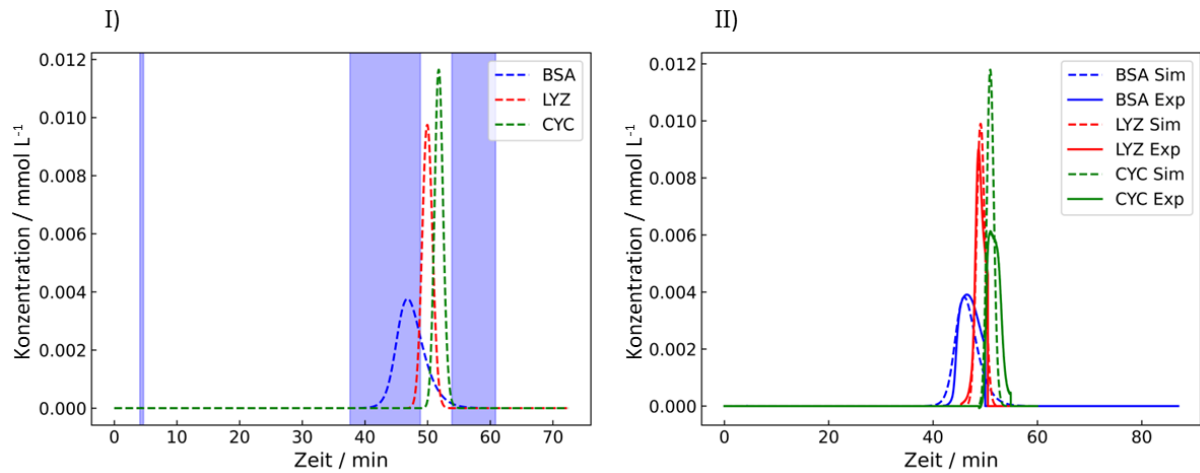


Abbildung 7.7: Validierung des ausgewählten Betriebspunkts für die Aufreinigung von BSA. In I) ist die Fraktionierung des simulierten Chromatogramms dargestellt und in II) der Vergleich mit den experimentellen Daten. Die betrachtete Gradientenlänge beträgt 2,5 CV und der NaCl-Anteil 56%.

Der Vergleich mit den experimentellen Daten zeigt eine gute Vorhersagequalität des Modells. Die Form des BSA-Peaks zeigt leichte Abweichungen zu den Messdaten. Ebenso ist der berechnete CYC-Peak deutlich schmaler als der experimentelle. Der relativ breite und niedrige experimentelle CYC-Peak mit einem leichten Tailing-Verhalten stellt eine Abweichung von allen anderen Versuchen dar. Die ist auf die Verwendung von Protein eines anderen Herstellers zurückzuführen. Dieses Material weist vermutlich verschiedene Varianten des Proteins auf, beispielsweise Dimere. Wie bei BSA würde dies das Auftreten des breiteren Peaks erklären. Dieses Verhalten trat bei der Modellkalibrierung nicht auf und kann daher in dem Modell nicht berücksichtigt werden. Da die Retentionszeit sehr gut mit dem Modell übereinstimmt wird die Simulation als Erfolg betrachtet. Des Weiteren beeinflusst die erhöhte Peak-Breite nicht die mögliche Produkt Fraktionierung, welche durch den LYZ-Peak bestimmt wird.

Die Prozessparameter mit einer Gradientenlänge von 2,5 CV und einem NaCl-Anteil von 56% werden hierdurch als gut geeignete Betriebsbedingungen zur Aufreinigung von BSA bestätigt. Hiermit wird die fünfte Arbeitshypothese, dass die Verwendung von Salzmischungen große Vorteile für die chromatographische Proteintrennung beinhalten kann, bestätigt (siehe Kapitel 1.1).

LYZ als Produkt

Die Validierung der Prozessparameter zur Aufreinigung von LYZ ist in Abbildung 7.8 zu sehen. Es lässt sich erkennen, dass LYZ an diesem Betriebspunkt als erste Komponente eluiert. Der gesamte LYZ-Peak kann unter Einhaltung der Reinheit von 90% in einer Fraktion gesammelt werden. Dabei setzt sich die Verunreinigung hauptsächlich aus BSA und einem sehr kleinen Teil CYC zusammen. Im hinteren Teil der gesammelten Fraktion ist die BSA-Konzentration deutlich höher als die LYZ Konzentration. Durch ein schmaleres Fraktionierungsfenster könnte daher mit geringen Einbußen bei der Ausbeute die Reinheit signifikant gesteigert werden.

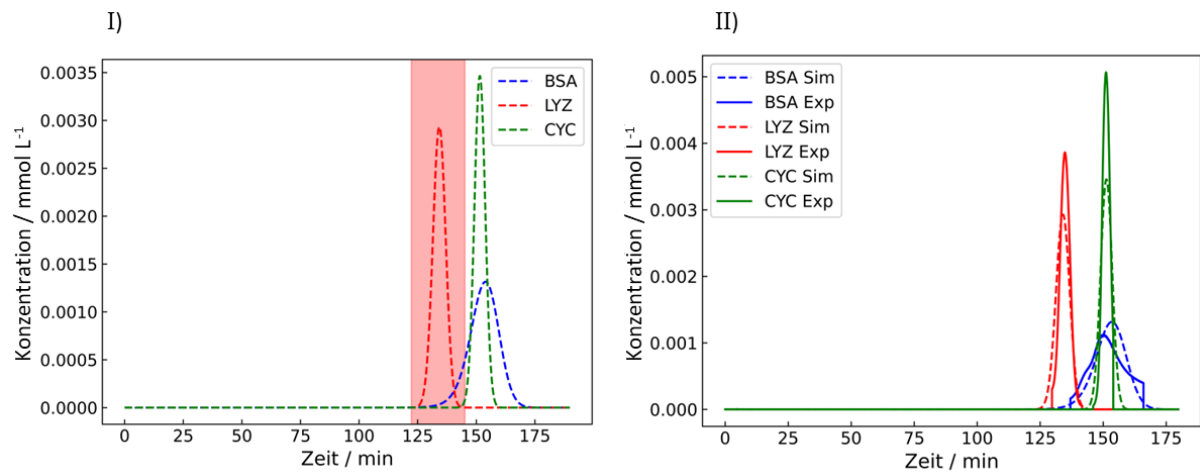


Abbildung 7.8: Validierung des ausgewählten Betriebspunkts für die Aufreinigung von LYZ. In I) ist die Fraktionierung des simulierten Chromatogramms dargestellt und in II) der Vergleich mit den experimentellen Daten. Die betrachtete Gradientenlänge beträgt 15 CV und der NaCl-Anteil 0%.

Die Prozessparameter mit einer Gradientenlänge von 15 CV bei reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurden bereits zur Kalibrierung des Modells verwendet (siehe Kapitel 6). Der Vergleich mit den experimentellen Daten zeigt, dass der modellierte BSA-Peak Abweichungen in der Peak-Form und auch in der Position des Peak-Maximums aufweist. Die für die Fraktionierung entscheidende Vorderseite des Peaks stimmt allerdings gut mit den experimentellen Daten überein. Die Peak-Breite von LYZ und CYC wird in der Simulation etwas unterschätzt, während die Retentionszeit präzise berechnet wird. Die experimentellen Daten bestätigen somit die Modellierung und zeigen ebenfalls die gute Trennung von LYZ von den anderen beiden Proteinen. Die optimale Trennung von LYZ erfolgt somit mit reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und wird durch die Verwendung von Salzmischungen nicht verbessert.

CYC als Produkt

Abbildung 7.9 zeigt die Ergebnisse der Validierung des ausgewählten Betriebspunkts für die Aufreinigung von CYC. CYC ist die am spätesten eluierende Komponente, wobei sich der Peak leicht mit den Ausläufern der anderen Peaks überschneidet. Der gesamte CYC-Peak kann unter Einhaltung der Reinheitsbedingung von 90% in einer Fraktion gesammelt werden, wobei es zu geringen Verunreinigungen durch sowohl BSA als auch LYZ kommt.

Die Prozessparameter mit einer Gradientenlänge von 5 CV bei reinem NaCl-Anteil von 80% wurden bereits zur Kalibrierung des Modells verwendet (siehe Kapitel 6). Die simulierten Chromatogramme von LYZ und CYC stimmen sehr gut mit den experimentellen Daten überein. Für BSA sind leichte Abweichungen im Verlauf der Peak-Vorderseite sowie in der Peak-Höhe zu sehen. Die experimentellen Daten bestätigen die gute Aufreinigung von CYC am betrachteten Betriebspunkt. Während dieser Prozess eine Salzmischung verwendet, zeigt CYC eine ähnlich effiziente Trennung auch bei reinem NaCl. Für die erreichbare Trennqualität oder Prozesszeit bringt die Verwendung von Salzmischungen für die Trennung von CYC von BSA und LYZ also keinen signifikanten Vorteil.

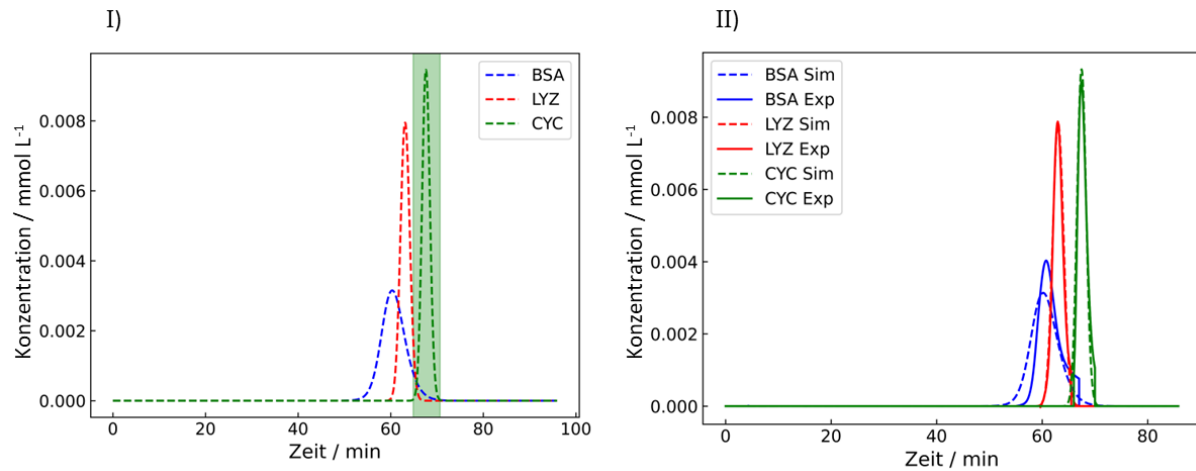


Abbildung 7.9: Validierung des ausgewählten Betriebspunkts für die Aufreinigung von CYC. In I) ist die Fraktionierung des simulierten Chromatogramms dargestellt und in II) der Vergleich mit den experimentellen Daten. Die betrachtete Gradientenlänge beträgt 5 CV und der NaCl-Anteil 80%.

7.3 Aufreinigung mehrerer Zielkomponenten

Im Folgenden wird nicht mehr ein einzelnes Protein als Produkt betrachtet, sondern alle drei Proteine sollen in einem einzelnen Prozess voneinander getrennt werden. Dabei ist die geforderte Reinheit für jedes Protein weiterhin 90%.

7.3.1 Berechnung von Ausbeuten

Die Gesamt-Ausbeute des Prozesses ist für die untersuchten Gradientenlängen und Salzzusammensetzungen in Abbildung 7.10 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass an den meisten untersuchten Betriebsbedingungen die kombinierte Ausbeute 0 beträgt. Hohe Ausbeuten werden lediglich in einem schmalen Bereich bei langen Gradienten und im Umfeld eines NaCl-Anteils von etwa 35% erreicht, wobei die maximale Ausbeute 85% beträgt. Ein weiterer sehr kleiner Bereich mit mittleren Ausbeuten ist bei langen Gradienten und einem NaCl-Anteil von 100% zu erkennen. Die vorgeschlagenen Prozessparameter für die zeitgleiche Aufreinigung von BSA, LYZ und CYC sind eine Gradientenlänge von 25 CV und ein NaCl-Anteil von 35%. Unter diesen Bedingungen wird die maximale Gesamtausbeute erreicht. Der entsprechende Punkt ist in Abbildung 7.10 durch den Punkt V markiert. Das Retentionsverhalten an diesem Betriebspunkt wird in Kapitel 7.3.2 näher beschrieben.

Der große Bereich mit einer Ausbeute von 0 für die kombinierte Aufreinigung der verschiedenen Proteine folgt aus den Verläufen der Ausbeuten für LYZ und CYC (siehe Abbildung 7.3 und Abbildung 7.5). Da die kombinierte Fraktionierung von Cadet-Process nur berechnet werden kann, wenn jede Zielkomponente auch in der vorgegebenen Reinheit gesammelt werden kann, führt eine Ausbeute von 0 für ein einzelnes Protein als Produkt auch zu einer Ausbeute von 0 für die kombinierte Aufreinigung. Die Fläche mit einer Ausbeute von 0 in Abbildung 7.10 stellt daher die Kombination der Flächen mit einer Ausbeute von 0 von LYZ und CYC dar, da für BSA die Ausbeute an keinem Betriebspunkt auf 0 fällt.

Der schmale Streifen mit hohen Ausbeuten für die kombinierte Aufreinigung wird aus den Bereichen gebildet, in denen sowohl LYZ als auch CYC mit hohen oder mittleren Ausbeuten gesammelt werden können. Die Ausbeute von BSA (siehe Abbildung 7.1) weist in diesem Bereich ebenfalls ein lokales Maximum auf.

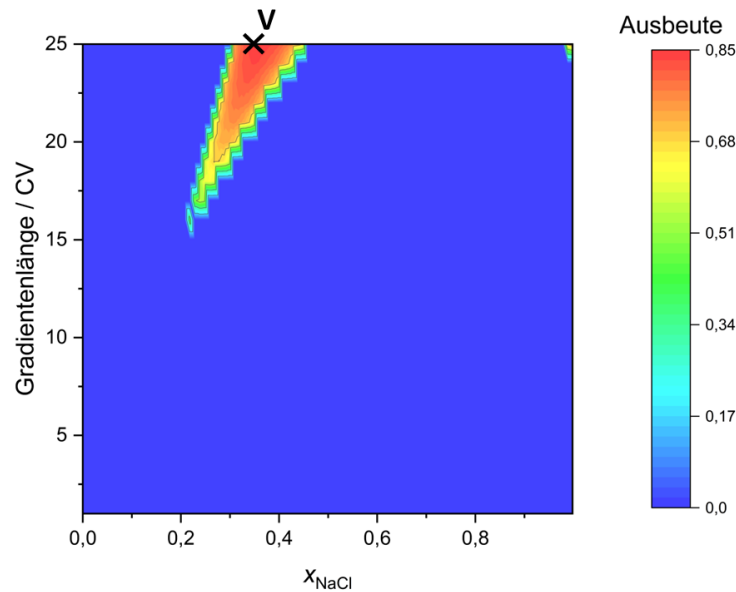


Abbildung 7.10: Kombinierte Gesamt-Ausbeute von BSA, LYZ und CYC über die Gradientenlänge und die Salzzusammensetzung. Die Ausbeuten beziehen sich auf eine Reinheit von 90%. Kann mindestens ein Protein nicht in der geforderten Reinheit fraktioniert werden, wird die Gesamt-Ausbeute des Prozesses auf 0 gesetzt. Punkt V beschreibt den vorgeschlagenen Betriebspunkt zur kombinierten Protein Aufreinigung.

Die Fraktionierungsfenster können sich für die kombinierte Aufreinigung zwar im Vergleich zu den Aufreinigungen der einzelnen Produkte verschieben, der grundsätzliche Trend, ob eine Komponente in ausreichender Reinheit von den anderen Proteinen getrennt wird, bleibt aber erhalten. Der kleine Bereich von mittleren Ausbeuten bei hohen NaCl-Anteilen und langen Gradienten geht auf das analoge Phänomen für die LYZ-Aufreinigung zurück. Der Verlauf der Ausbeuten bestätigt, dass für das Proteinsystem BSA, LYZ und CYC die Verwendung von Salzmischungen vorteilhaft für die Trennung der Komponenten ist.

7.3.2 Validierung der Prozessparameter

Die Validierung des Prozesses am ausgewählten Betriebspunkt ist in Abbildung 7.11 zu sehen. Für die Fraktionierung von BSA treten erneut Produkt-Bereiche vor dem erkennbaren Protein-Peak auf. Diese Phänomene wurden bereits in Kapitel 7.2 diskutiert. Der BSA-Peak liegt bei der Modellierung mittig zwischen LYZ und CYC, wobei es zu einer leichten Überlagerung der Peaks kommt. Die Ausbeute an BSA beträgt 72%, die an LYZ 91% und die an CYC 89%. Die Fraktionen an LYZ und CYC enthalten jeweils als gering konzentrierte Verunreinigung BSA, während die BSA-Fraktion geringe Konzentrationen an LYZ und CYC enthält. Als mittlere Komponente geht ein Teil des BSA an der Vorder- sowie an der Hinterseite des Peaks verloren, während bei LYZ nur ein Teil der Peak-Hinterseite und bei CYC der Peak-Vorderseite nicht Teil der Produktfraktion ist. Dies führt zu der im Vergleich mit LYZ und CYC geringeren Ausbeute an BSA.

Der schmale Bereich an Prozessparametern, an dem eine gleichzeitige Trennung der drei Proteine möglich ist, lässt sich durch das Zusammenspiel des Gradientenlängen- und des Salzzusammensetzungseinflusses erklären. Wie in Abbildung 7.11 erkennbar würde eine Verschiebung des BSA-Peaks nach vorne beziehungsweise nach hinten dazu führen, dass LYZ oder CYC nicht mehr erfolgreich fraktioniert werden könnte.

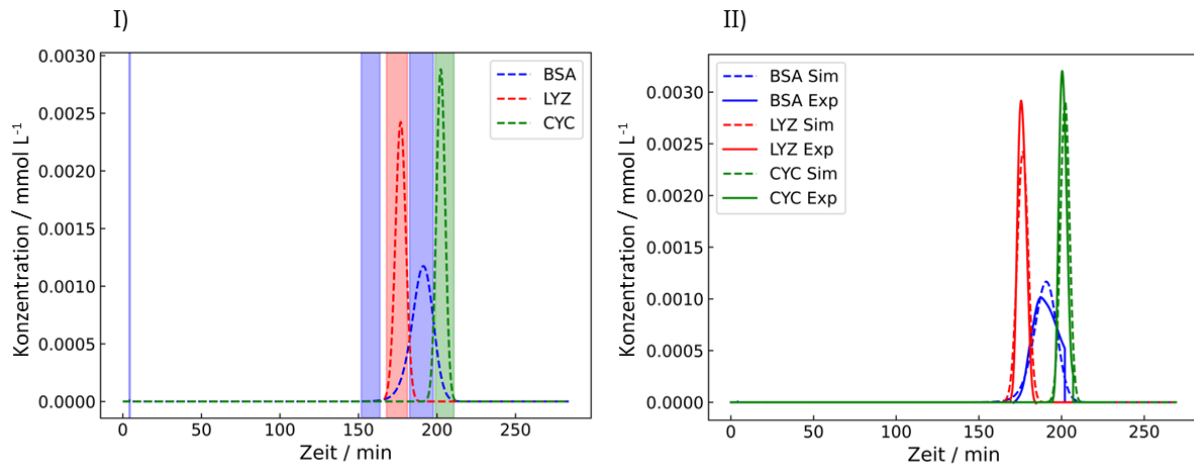


Abbildung 7.11: Validierung des ausgewählten Betriebspunkts für die simultane Aufreinigung von BSA, LYZ und CYC. In I) ist die Fraktionierung des simulierten Chromatogramms dargestellt und in II) der Vergleich mit den experimentellen Daten. Die betrachtete Gradientenlänge beträgt 25 CV und der NaCl-Anteil 35%.

Bei kürzeren Gradienten verschiebt sich der BSA-Peak auf Grund der hohen charakteristischen Ladung stark nach vorne. Durch die hohe Peak-Breite wäre unter diesen Bedingungen eine vollständige Elution von BSA vor LYZ nicht möglich, wodurch sich diese Peaks stark überschneiden würden und LYZ nicht mehr in der erforderlichen Reinheit fraktioniert werden könnte. Ein höherer NaCl-Anteil führt im Verhältnis zu LYZ zu einer früheren Elution von BSA, während ein geringerer NaCl-Anteil im Verhältnis zu CYC zu einer späteren Elution führt. Dieses proteinspezifische Verhalten sorgt dafür, dass die Verwendung von Salzmischungen einen großen Vorteil für die gleichzeitige Trennung des Proteinsystems BSA, LYZ und CYC beinhaltet. Da dieser Effekt vollständig über das Verhalten von BSA erklärt werden kann, ist dieses eine Protein für den vorteilhaften Einfluss von Salzmischungen verantwortlich. Die stärkere Ausprägung von hydrophoben Eigenschaften bei BSA im Vergleich zu den anderen Proteinen könnte daher für die stärkere Ausprägung des Einflusses von Salzmischungen verantwortlich sein [116]. Für eine abschließende Beurteilung dieses Zusammenhangs sowie für eine Einschätzung zur Häufigkeit des Auftretens von synergetischen Effekten in der IEC sind allerdings weitere experimentelle Untersuchungen mit zusätzlichen Proteinen notwendig. Des Weiteren wird durch diese Untersuchung demonstriert, dass die Bestimmung von Modellparametern und die Durchführung einer Simulationsstudie zur Generierung von Prozessverständnis beitragen kann. So ermöglicht beispielsweise die Betrachtung der Werte der charakteristischen Ladung, den Einfluss der Gradientenlänge auf die Trennung zu bestimmen und nachzuvollziehen.

Der Vergleich mit den experimentellen Daten zeigt eine hohe Übereinstimmung der Chromatogramme. Die Kalibrierung des Modells erfolgte mit Gradientenlängen bis 15 CV. Die erfolgreiche Vorhersage des Trennverhaltens für eine Gradientenlänge von 25 CV und eine nicht bei der Kalibrierung betrachtete Salzzusammensetzung bestätigt die gute Extrapolierbarkeit und die breite Anwendbarkeit des entwickelten Modells.

7.4 Fazit

In diesem Kapitel wurde das kalibrierte mechanistische Modell verwendet, um den Einfluss der Prozessparameter Salzzusammensetzung und Gradientenlänge auf die Trennung der Komponenten BSA, LYZ und CYC zu untersuchen und geeignete Betriebsbedingungen zu identifizieren. Die Zielreinheit für die Produkte betrug 90%. Dabei wurde gezeigt, dass sich die optimalen Bedingungen je nach Produkt stark unterscheiden. Für BSA war eine erfolgreiche Trennung mit einem kurzen

Gradienten von 2,5 CV bei einem NaCl-Anteil von 56% möglich, wobei eine Ausbeute von 80% erreicht wurde. Hierbei verbesserte die Verwendung von Salzmischungen das Potential des Trennprozesses signifikant, was die hohe Bedeutung der proteinspezifischen und synergetischen Salzeffekte unterstreicht. Für die Aufreinigung von LYZ bei einer Ausbeute von 100% wurden die Prozessparameter auf einen NaCl-Anteil von 0% und eine Gradientenlänge von 15 CV festgelegt. Für dieses Produkt war die Verwendung von Salzmischungen nachteilig gegenüber der Verwendung von reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Aufreinigung von CYC konnte bei einer Gradientenlänge von 5 CV und einem NaCl-Anteil von 80% mit einer Ausbeute von 100% durchgeführt werden. Hierbei war der Einfluss der Salzzusammensetzung gering, solange der NaCl-Anteil mindestens 35% betrug. Für die gleichzeitige Trennung aller drei Proteine mit hoher Ausbeute war die Verwendung von Salzmischungen und langen Gradienten notwendig. Bei einem NaCl-Anteil von 35% und einer Gradientenlänge von 25 CV betrug die Ausbeute an BSA 72%, an LYZ 91% und an CYC 89%.

Das Retentionsverhalten der Proteine wurde an den ausgewählten Betriebspunkten mit experimentellen Daten validiert. Hierdurch wurde die Fähigkeit des Modells erneut bestätigt, für beliebige NaCl-Anteil und Gradienten die Chromatogramme der Proteine präzise vorherzusagen. Die durchgeführte Simulationsstudie demonstrierte die Möglichkeit einer signifikanten Verbesserung der Prozessausbeute durch die Anwendung von Salzmischungen. Es wurde gezeigt, dass je nach Produkt die Anwendung von Reinsalzen oder von Salzmischungen vorteilhaft ist.

Für das in dieser Arbeit verwendete Modellsystem mit den Proteinen BSA, LYZ und CYC zeigte sich der Einfluss von Salzmischungen vor allem in der Separation von BSA von den anderen beiden Proteinen, während der Einfluss auf die Trennung von LYZ und CYC gering ausgeprägt war. Dies stellte erneut die Abhängigkeit des Salzeinflusses von der genauen Proteinspezies heraus. Da BSA über eine vergleichsweise hohe Hydrophobizität verfügt, könnte die Ausprägung des Einflusses von Salzmischungen von den hydrophoben Eigenschaften der Proteine abhängen. Insgesamt wurde die fünfte Arbeitshypothese, dass die Verwendung von Salzmischungen zu einer Verbesserung der chromatographischen Proteintrennung führen kann, durch die in diesem Kapitel beschriebenen Beobachtungen bestätigt (siehe Kapitel 1.1). Somit konnte demonstriert werden, dass die Berücksichtigung von Salzmischungen bei der Prozessentwicklung zu empfehlen ist, da diese dazu beitragen kann, die hohen Kosten im Downstream-Prozess von Proteinen durch eine signifikante Erhöhung der Ausbeute zu reduzieren. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass für eine umfassende Bewertung zur Häufigkeit des Auftretens von synergetischen Effekten in der IEC Daten für zusätzliche Proteine benötigt werden. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass das kalibrierte Modell für die Betrachtung von geringen Proteinbeladungen ausgelegt ist und für einen Transfer zu höheren Beladungen weitere Untersuchungen benötigt werden.

Die Bestätigung der grundsätzlichen Eignung des verwendeten Modellierungs- und Kalibrierungsansatzes zur Beschreibung des Salzeinflusses ermöglicht es, diese Einflüsse auch für weitere Stoffsysteme modellbasiert zu untersuchen und in Kombination mit anderen Prozessparametern wie der Gradientenlänge auszuwerten. Der experimentelle Aufwand zur Untersuchung der verschiedenen Prozessparameter wird hierbei durch die erfolgreiche Modellierung signifikant reduziert, was in einer günstigeren und schnelleren Prozessentwicklung resultieren kann. Des Weiteren führt die Betrachtung der erhaltenen Modellparameter und eine Simulationsstudie zu zusätzlichem Prozessverständnis, da die Einflüsse der verschiedenen Prozessparameter mathematisch nachvollzogen werden können. Hierdurch stellt der vorgestellte Modellierungsansatz eine vielversprechende Möglichkeit dar, die Einflüsse von Salzmischungen in die Prozessentwicklung einzubinden und für die Auslegung eines effizienten Trennprozesses zu berücksichtigen.

8 Zusammenfassung und Ausblick

8.1 Überblick über die gewonnenen Erkenntnisse

Salze spielen eine entscheidende Rolle im Trennprinzip der IEC. Es gibt bereits einige Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Salzspezies auf das Retentionsverhalten von Proteinen, jedoch wird hierbei insbesondere das Gegenion untersucht, während das Co-Ion oft vernachlässigt wird [11,13–16]. Die Signifikanz von proteinspezifischen Effekten der Salze ist dabei umstritten [10]. Darüber hinaus gibt es für die IEC bisher keine Untersuchungen über den Einfluss von Salzmischungen. Des Weiteren spielt die mechanistische Modellierung von Chromatographie-Prozessen eine zunehmend wichtige Rolle in der Prozessentwicklung. Hierfür ist eine präzise Parameterbestimmung notwendig, die die auftretenden Effekte abdeckt.

Diese Dissertationsschrift befasst sich mit dem Einfluss von Salzen und Salzmischungen auf die CEC von Proteinen, um zusätzliche Erkenntnisse über deren Signifikanz und mögliche Rolle in der Prozessentwicklung zu generieren. Hierzu wurden Modellproteine in LGE-Versuchen bei einem pH-Wert von 4 betrachtet. Ausgehend von den offenen Forschungsfragen wurden fünf Arbeitshypothesen formuliert, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollten:

1. Salze haben einen relevanten und proteinspezifischen Einfluss auf die IEC.
2. Die Wahl des Co-Ions ist für IEC-Prozesse von großer Bedeutung.
3. Es können synergetische Effekte bei Salzmischungen in der IEC auftreten.
4. Der Einfluss von Salzmischungen kann über eine passende Parameterbestimmung in der mechanistischen Modellierung abgebildet werden.
5. Die Trennung von Proteinen kann in der IEC durch die Anwendung von Salzmischungen verbessert werden.

In einem ersten Schritt wurde der Einfluss von verschiedenen Kationen und Anionen auf die Modellproteine BSA, LYZ und ACH untersucht. Hierzu wurde ein geeigneter Ansatz für den Vergleich von Retentionszeiten für ein- und mehrwertige Ionen gesucht. Es wurde demonstriert, dass bei einer konstanten Kationenstärke kein systematischer Einfluss der resultierenden Anionenstärke und somit der Ionenvaleanz auf die Retentionszeit besteht. Für die weiteren Versuche wurde daher ein Hochsalzpuffer mit einer Kationenstärke von 1 M verwendet. Hierbei wurde neben nicht-spezifischen Ioneneinflüssen auch eine Vielzahl von proteinspezifischen Effekten festgestellt, die einen großen Einfluss auf die Proteintrennung haben. In dem untersuchten System wurde ein stärkerer Einfluss der Anionen auf die Proteinretention und -separation beobachtet, obwohl die Kationen als Gegenionen direkt an der Ionenaustausch-Reaktion beteiligt sind. Für den Salzeinfluss auf die Retentionszeit konnte kein klarer Trend in Bezug auf die Anionengröße oder -ladung sowie die Einordnung der Salze in die Hofmeister-Reihe festgestellt werden. Hiermit wurde die hohe Bedeutung der Salzauswahl für CEC-Prozesse herausgestellt, bei der insbesondere auch das Anion berücksichtigt werden sollte, wodurch die erste und zweite Arbeitshypothese bestätigt wurden.

Darauf aufbauend wurde der Einfluss von Salzmischungen auf die Modellproteine BSA und LYZ untersucht und mit den in der Literatur beschriebenen Effekten von Salzmischungen auf diese Proteine in der HIC verglichen. Die von Werner und Hasse entwickelte semi-empirische Modellgleichung zur Beschreibung synergetischer Salzeffekte in der HIC wurde an die Gegebenheiten der IEC angepasst und auf das Ionen-System Na^+ , NH_4^+ , Cl^- und SO_4^{2-} angewendet [70]. Die Parameter der Modellgleichung wurden an experimentellen Retentionszeiten bei verschiedenen Salzzusammensetzungen gefittet. Daraufhin war die Gleichung in der Lage, die auftretenden Effekte und Verläufe der Retentionszeiten quantitativ gut zu beschreiben und die Retentionszeiten für

Zusammenfassung und Ausblick

weitere Salzzusammensetzungen vorherzusagen. In den Verläufen der Retentionszeiten über die Salzzusammensetzung ließ sich für LYZ ein linearer Zusammenhang zu den einzelnen Ionen-Anteilen erkennen. Für BSA traten bei hohen Cl^- und geringen SO_4^{2-} -Anteilen synergetische Salzeffekte in Richtung niedriger Retentionszeiten auf. Die Trennung von BSA und LYZ wird durch diese synergetischen Effekte anders als in der HIC nicht positiv beeinflusst. Die Separation dieser beiden Proteine läuft am effizientesten bei reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ab. Somit wurde das Auftreten von synergetischen Salzeffekten für die CEC nachgewiesen und die dritte Arbeitshypothese bestätigt. Die Ausprägung dieser Effekte fällt für das verwendete Stoffsystem jedoch geringer als in der HIC aus. Als mögliche Ursachen hierfür wurden zum einen die deutlich höhere Salzkonzentration in der HIC und zum anderen die Unterschiedliche Gewichtung von hydrophoben Effekten in den beiden Chromatographie-Arten vermutet: Während in der IEC die Salze durch elektrostatische Kräfte direkt an der Verdrängung der Proteine beteiligt sind und gleichzeitig durch eine Modulation hydrophober Effekte einen Einfluss auf die Proteinstruktur ausüben, ist für die HIC lediglich der zweitgenannte Effekt relevant. Das Wirken von synergetischen Effekten über die Modulation hydrophober Kräfte könnte somit die stärkere Ausprägung für die HIC erklären.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Salzmischungen für dasselbe Ionen-System auf die Isothermen-Parameter von BSA und LYZ untersucht. Die semi-empirische Modellgleichung wurde weiter angepasst, um jeweils die Gleichgewichtskonstante K_{eq} und die charakteristische Ladung ν der SMA-Isotherme in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung zu beschreiben. Für K_{eq} wurde einer logarithmische und für ν eine lineare Skala gewählt. An den Kalibrierungspunkten der Salzzusammensetzung wurden K_{eq} und ν über die Yamamoto-Methode bestimmt und die Parameter der Modellgleichungen hieran gefittet. Die resultierenden Verläufe der Modellparameter der SMA-Isotherme zeigten teilweise große Abweichungen zwischen den Ergebnissen der Yamamoto-Methode und den Regressionen der Modellgleichungen. Die Parameter-Verläufe nach der Yamamoto-Methode waren dabei sehr sprunghaft und folgten keinem klaren Trend. Eine Sensitivitätsanalyse ergab, dass die Yamamoto-Methode bei leichten experimentellen Abweichungen zu großen Unterschieden in den beiden Modellparametern führen kann. Diese Unterschiede wirken hierbei für K_{eq} und ν in gegensätzliche Richtungen, sodass sich die Effekte auf aus diesen Parametern berechneten Retentionszeiten wieder ausgleichen können. Die Modellgleichung führte durch die Regression zu geglätteten Parameter-Verläufen. Mit diesen Parameter-Verläufen konnten Retentionszeit-Verläufe über der Salzzusammensetzung für beliebige Gradientenlängen berechnet werden. Hiermit konnten die experimentellen Retentionszeiten präzise vorhergesagt werden, wobei sowohl zusätzliche Salzzusammensetzungen als auch zusätzliche Gradientenlängen untersucht wurden, die nicht an der Kalibrierung der Modellgleichung beteiligt waren. Die Bestimmung der Parameter für $\log K_{\text{eq}}$ und ν mit der angepassten Modellgleichung aus den Datenpunkten der Yamamoto-Methode war somit erfolgreich. Dieser Ansatz führt zu einer Funktion, die die Modellparameter K_{eq} und ν von BSA und LYZ in Abhängigkeit der Ionen-Anteile des Systems Na^+ , NH_4^+ , Cl^- und SO_4^{2-} beschreibt. Die synergetischen Effekte der Mischungen aus Cl^- und SO_4^{2-} -Ionen auf BSA lassen sich ebenfalls in den Parameter-Verläufen beobachten.

Anschließend wurde unter Verwendung der CADET-Toolbox ein mechanistisches Modell auf Basis des Transport-Dispersive Modells entwickelt und kalibriert, dass das Retentionsverhalten der Proteine BSA, LYZ und CYC in LGE-Versuchen mit Mischungen aus NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ berechnen soll. Die Anlagen- und Säuleneigenschaften wurden in einem sequenziellen Verfahren bestimmt. Von den Modellparametern der Proteine wurde die charakteristische Ladung ν aus der Regression der Yamamoto-Methode übernommen. Eine Voruntersuchung ergab, dass die Adsorption im Modell als Gleichgewicht betrachtet werden kann. Die Gleichgewichtskonstante K_{eq} und der effektive Filmdiffusionskoeffizient k_{eff} wurden durch ein inverses Fitting an jeweils vier LGE-Versuche an sechs

Zusammenfassung und Ausblick

Salzzusammensetzungen bestimmt. Die resultierenden k_{eff} -Werte lagen für ein Protein jeweils in derselben Größenordnung und wurden für das kalibrierte Modell gemittelt. Mit den erhaltenen sechs $\log K_{\text{eq}}$ -Werten pro Protein wurde eine weitere quadratische Regression durchgeführt, um K_{eq} im kalibrierten Modell als Funktion der Salzzusammensetzung ausdrücken zu können. Das kalibrierte Simulationstool war in der Lage, die Chromatogramme von LGE-Versuchen auch für zusätzliche Salzzusammensetzungen und Gradientenlängen der Proteine BSA, LYZ und CYC präzise vorherzusagen. Über den verwendeten Ansatz zur Parameterbestimmung konnte somit der Einfluss von Salzmischungen auf die CEC von Proteinen erfolgreich in einem mechanistischen Modell abgebildet werden, wodurch die vierte Arbeitshypothese bestätigt wurde.

Dieses kalibrierte Simulationstool wurde daraufhin verwendet, um die Proteintrennung von BSA, LYZ und CYC für verschiedene Salzzusammensetzungen und Gradientenlängen von LGE-Versuchen detailliert zu untersuchen. Hierzu wurde die Ausbeute bei einer Reinheit von 90% betrachtet. Die berechneten Chromatogramme wurden an den ermittelten Betriebspunkten erfolgreich mit experimentellen Daten validiert. Die proteinspezifischen Effekte zeigten einen großen Einfluss auf das Trennverhalten. So führte ein hoher NaCl-Anteil zu einer guten Trennung von BSA und CYC, während ein hoher $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Anteil zu einer guten Trennung zwischen BSA und LYZ führte. Des Weiteren veränderte sich die Retentionszeit von BSA auf Grund seiner hohen charakteristischen Ladung besonders stark mit der Gradientenlänge. Je nach Produkt ergaben sich hieraus andere geeignete Prozessparameter für den Trennprozess. Für LYZ führte die Verwendung von reinem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu den kürzesten Prozesszeiten für eine Ausbeute von 100%. Hierbei konnte eine Gradientenlänge von 15 CV verwendet werden. Für CYC konnte jeder NaCl-Anteil von über 35% für eine effektive Trennung eingesetzt werden. Hierbei wirkte sich die Verwendung von reinem NaCl im Vergleich zu entsprechenden Mischungen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ weder positiv noch negativ auf die Prozesszeit aus. Bei einer Gradientenlänge von 5 CV ließ sich an diesen Salzzusammensetzungen eine Ausbeute von 100% erreichen. BSA konnte bei einer Salzmischung mit einem NaCl-Anteil von 56% mit einem sehr kurzen Gradienten von 2,5 CV mit einer Ausbeute von 80% fraktioniert werden. Hierbei leisteten die synergetischen Effekte der Salzmischung auf BSA einen entscheidenden Beitrag, um den Trennprozess signifikant zu verbessern. Bei der Betrachtung aller drei Proteine als Produkte, die in einem einzelnen Prozessschritt voneinander getrennt werden sollen, stellte sich die Verwendung von Salzmischungen als notwendig heraus, um hohe Ausbeuten zu erhalten. Die Kombination der proteinspezifischen Salzeffekte, die entweder zu einer guten Separation von BSA und LYZ oder BSA und CYC führten, ermöglichte eine effiziente Trennung in einem Prozessschritt. An dem ermittelten Betriebspunkt mit einem NaCl-Anteil von 35% und einer Gradientenlänge von 25 CV betrug die Gesamt-Ausbeute 85%.

Somit wurde anhand eines Beispielsystems demonstriert, dass proteinspezifische und synergetische Salzeffekte das Potential haben, die CEC-Prozesse von Proteinen signifikant zu verbessern, wodurch die fünfte Arbeitshypothese bestätigt wurde. Die synergetischen Mischungseffekte zeigten in dem verwendeten Stoffsystem lediglich auf BSA einen für die Separation relevanten Einfluss, sodass über die Häufigkeit des Auftretens von synergetischen Effekten noch keine abschließende Schlussfolgerung gezogen werden konnte.

Durch die Bestätigung der fünf Arbeitshypothesen konnte in dieser Arbeit dargelegt werden, dass verschiedenen Gegen- und Co-Ionen sowie Salzmischungen in der Entwicklung von CEC-Prozessen zur Proteintrennung berücksichtigt werden sollten. Die Kombination von Yamamoto-Methode und inversem Fitting stellt hierbei einen vielversprechenden Ansatz zur Parameterbestimmung dar, um die Salzeffekte für die mechanistische Modellierung zu berücksichtigen.

8.2 Ansätze für weiterführende Forschung

Aufbauend auf den in dieser Arbeit herausgestellten Einflüssen der Salzspezies auf die CEC von Proteinen bieten sich einige Aspekte für zukünftige Untersuchungen an. Die experimentelle Basis könnte durch die Betrachtung zusätzlicher Proteine und Salze erweitert werden. Hierbei könnte versucht werden, die auftretenden Effekte mit Eigenschaften der Proteine zu korrelieren, beispielsweise Proteinklasse, Form oder Hydrophobizität. Hierdurch könnten für neue Trennaufgaben auf Grundlage der Eigenschaften der beteiligten Proteine geeignete Salze zur näheren Untersuchung für den Trennprozess ausgewählt werden. Des Weiteren könnte untersucht werden, ob das Säulenmaterial und der pH-Wert einen Einfluss auf die proteinspezifischen Effekte haben. Hierdurch könnten wichtige Erkenntnisse für die Prozessentwicklung sowie über die Wirkweise der zu Grunde liegenden Effekte gewonnen werden. Darüber hinaus könnten diese Untersuchungen auch für die AEC durchgeführt und die Einflüsse auf die beiden Chromatographie-Arten verglichen werden. Dies würde Verständnis für die Wirkweise der Salzeffekte sowie die Übertragbarkeit der Beobachtungen zwischen diesen beiden Methoden generieren.

Analog hierzu könnte auch die experimentelle Basis für den Einfluss von Salzmischungen erweitert werden. Hierbei könnten sowohl die Effekte in der AEC sowie zusätzliche Salze, Proteine, Säulen und pH-Werte in der CEC untersucht werden. Dies würde das Verständnis zur Häufigkeit und Signifikanz vom Auftreten der synergetischen Salzeffekte stärken. Darüber hinaus könnten auch noch komplexere Mischsysteme aus beispielsweise jeweils drei Anionen und Kationen betrachtet werden.

Das entwickelte Modell mit dem Ansatz zur Parameterbestimmung könnte für eine ganzheitliche Prozessentwicklung erweitert werden. Zum einen bietet es sich an, den pH-Wert als Prozessvariable mitzubetrachten. Die Isothermen-Parameter würden hierbei als Funktion sowohl des pH-Werts als auch der Salzzusammensetzung beschrieben werden. Zum anderen sollte das Modell für Systeme mit hohen Beladungen im nicht-linearen Bereich untersucht werden. Diese Betriebsbereiche sind für kommerzielle Anwendungen von großer Wichtigkeit. Darauf aufbauend könnte die Optimierung der Betriebsparameter als Schritt in Richtung einer kommerziellen Prozessentwicklung erweitert werden, indem die Feed-Dauer als Teil der Optimierungsgrößen betrachtet wird. Hierfür sollte ebenfalls die Prozessführung für die Optimierung flexibilisiert werden, um konstante Salzkonzentrationen sowie Konzentrations sprünge zu ermöglichen.

Anhang

A. Mathematische Herleitungen

A.1 SMA-Isotherme für mehrere Komponenten

Für die Betrachtung von Mehrkomponentensystemen mit der SMA-Isothermen bietet es sich an, eine Summe über alle beteiligten Komponenten zu bilden. Hierbei wird konventionell dem Salz der Index $i=1$ zugewiesen [50]. Die anderen Komponenten, zum Beispiel verschiedene Makromoleküle, erhalten die Indizes $i=2$ bis $i=N$. Für das Salz folgt aus den Definitionen der charakteristischen Ladung und des Abschirmungsfaktors $\nu_1=1$ und $\sigma_1=0$. Der Gleichgewichtsfaktor der Komponenten wird auch immer auf das binäre Gleichgewicht mit dem betrachteten Salz bezogen (siehe Gleichung 2.8), sodass ebenfalls $K_{\text{eq},1}=1$ für das Salz folgt. Die Ladungsbilanz für ein Mehrkomponentensystem ist in Gleichung A.1 dargestellt, wobei für q_1 in diesem Fall nur die frei verfügbare Salzbeladung \bar{q}_1 berücksichtigt wird [50]:

$$\Lambda = \sum_{i=1}^N (\nu_i + \sigma_i) q_i \quad \text{A.1}$$

Diese Gleichung kann auf beiden Seiten mit der Beladung q_j einer beliebigen Komponente multipliziert werden. Durch Division der Gleichung durch den Summen-Term erhält man:

$$\frac{\Lambda q_j}{\sum_{i=1}^N (\nu_i + \sigma_i) q_i} = q_j \quad \text{A.2}$$

Das Ersetzen der Beladungen auf der linken Seite der Gleichung mit Hilfe von Gleichung 2.8 führt nun auf Gleichung A.3:

$$\frac{\Lambda K_{\text{eq},j} c_j \left(\frac{\bar{q}_1}{c_1}\right)^{\nu_j}}{\sum_{i=1}^N (\nu_i + \sigma_i) K_{\text{eq},i} c_i \left(\frac{\bar{q}_1}{c_1}\right)^{\nu_i}} = q_j \quad \text{A.3}$$

Die charakteristische Ladung ist im Allgemeinen für alle bindenden Komponenten mindestens 1. Daher werden ausgehend von Gleichung A.3 der Zähler und der Nenner des Bruchs durch $\left(\frac{\bar{q}_1}{c_1}\right)$ dividiert. Für das Salz vereinfacht sich der Term hierdurch und wird in Gleichung A.4 aus der Summe herausgezogen. Dies stellt die Mehrkomponenten-SMA-Isotherme in einer gängigen Schreibweise dar. [50]

$$\frac{\Lambda K_{\text{eq},j} c_j \left(\frac{\bar{q}_1}{c_1}\right)^{\nu_j-1}}{c_1 + \sum_{i=2}^N (\nu_i + \sigma_i) K_{\text{eq},i} c_i \left(\frac{\bar{q}_1}{c_1}\right)^{\nu_i-1}} = q_j \quad \text{A.4}$$

A.2 Yamamoto-Gleichung in gebräuchlicher Form

Durch Integration von Gleichung 2.53 nach der Ionenstärke erhalten Yamamoto et al. die Gleichung A.5 [92].

$$GH_{Yam} = g (1 - \varepsilon_c) V_{col} = \int_{I_0}^{I_R} \frac{1}{K_{V,i}(I) - K_{V,s}} dI \quad A.5$$

Für die hierbei definierte normalisierte Gradientensteigung GH_{Yam} wird der Faktor g mit dem gesamten Adsorbens-Volumen inklusive des Poren-Volumens multipliziert, da auch für die Betrachtung von Beladungen dieses Volumen als Bezugsvolumen verwendet wird [92,93,133]. Wenn hingegen das Feststoff-Volumen V_s als Bezugsvolumen verwendet wird, wird GH wie in Gleichung A.6 dargestellt definiert [25,49]. Darüber hinaus kann statt der Ionenstärke die Salzkonzentration verwendet werden, da diese Größen für ein Salz direkt proportional zueinander sind.

$$GH = g (1 - \varepsilon_t) V_{col} = \frac{1 - \varepsilon_t}{1 - \varepsilon_c} GH_{Yam} = \frac{1 - \varepsilon_t}{1 - \varepsilon_c} \int_{c_{s,0}}^{c_{s,R}} \frac{1}{K_{V,i}(c_s) - K_{V,s}} dc_s \quad A.6$$

Die in Gleichung 2.54 dargestellte Definition von $K_{V,i}$ lässt sich durch Teilen des Zählers und Nenners durch V_c in Gleichung A.7 überführen.

$$K_{V,i} = \frac{V_{R,i}/V_c - \varepsilon_c}{1 - \varepsilon_c} \quad A.7$$

Das Retentionsvolumen einer Spezies i lässt sich im Bereich geringer Proteinkonzentration mit Gleichung A.8 ausdrücken [1,48]. $V_{0,p}$ bezeichnet hierbei das Retentionsvolumen eines porenhängigen, nicht bindenden Tracers.

$$V_{R,i} = V_{0,p} + V_{0,p} \frac{1 - \varepsilon_t}{\varepsilon_t} \frac{q_i}{c_i} \quad A.8$$

Das Teilen beider Seiten der Gleichung durch V_c führt bei Vernachlässigung von Stofftransport-Effekten zu Gleichung A.9.

$$V_{R,i}/V_c = \varepsilon_t + (1 - \varepsilon_t) \frac{q_i}{c_i} \quad A.9$$

Das Einsetzen dieses Ausdrucks in Gleichung A.7 führt zu Gleichung A.10.

$$K_{V,i} = \frac{\varepsilon_t + (1 - \varepsilon_t) \frac{q_i}{c_i} - \varepsilon_c}{1 - \varepsilon_c} \quad A.10$$

Der Verteilungskoeffizient des Salzes $K_{V,s}$ beinhaltet das Retentionsvolumen des Salzes $V_{R,s}$, das dem Wert $V_{0,p}$ entspricht:

$$K_{V,s} = \frac{V_{R,s}/V_c - \varepsilon_c}{1 - \varepsilon_c} = \frac{\varepsilon_t - \varepsilon_c}{1 - \varepsilon_c} \quad A.11$$

Die Differenz von $K_{V,i}$ und $K_{V,s}$ lässt sich somit wie in Gleichung A.12 dargestellt ausdrücken.

$$K_{V,i} - K_{V,s} = \frac{(1 - \varepsilon_t) \frac{q_i}{c_i}}{1 - \varepsilon_c} \quad A.12$$

Dadurch vereinfacht sich Gleichung A.6 wie in Gleichung A.13 beschrieben.

$$GH = \frac{1 - \varepsilon_t}{1 - \varepsilon_c} \int_{c_{s,0}}^{c_{s,R}} \frac{1}{\frac{(1 - \varepsilon_t) q_i}{(1 - \varepsilon_c) c_i}} dc_s = \int_{c_{s,0}}^{c_{s,R}} \left(\frac{q_i}{c_i} \right)^{-1} dc_s \quad \text{A.13}$$

Der Quotient innerhalb des Integrals kann durch die SMA-Isotherme (Gleichung 2.8) ausgedrückt werden. Da im Bereich geringer Proteinkonzentration die freie Salzbeladung \bar{q}_s etwa der Kapazität der Säule Λ entspricht, lässt sich dieser Term wie in Gleichung A.14 beschrieben vereinfachen.

$$GH = \int_{c_{s,0}}^{c_{s,R}} \left(K_{\text{eq}} \left(\frac{\bar{q}_s}{c_s} \right)^{v_i} \right)^{-1} dc_s \approx \int_{c_{s,0}}^{c_{s,R}} \frac{c_s^{v_i}}{K_{\text{eq}} \Lambda^{v_i}} dc_s \quad \text{A.14}$$

Die Integration dieses Ausdrucks führt zu Gleichung A.15, die in Kapitel 2.5.1 weiterverwendet wird.

$$GH = \frac{c_{s,R}^{v_i+1} - c_{s,0}^{v_i+1}}{K_{\text{eq}} \Lambda^{v_i} (v_i + 1)} \quad \text{A.15}$$

A.3 Detaillierte Berechnung der Citrat- und Tartrat-Spezieskonzentrationen

Für die Berechnung der Konzentrationen der Citrat Spezies-Konzentrationen kann das folgende Gleichungssystem durch die drei Henderson-Hasselbach-Gleichungen [109] und die Spezies-Bilanz aufgestellt werden:

$$\text{pH} = \text{p}K_{s,1} + \log \left(\frac{c_{\text{H}_2\text{A}^-}}{c_{\text{H}_3\text{A}}} \right) \quad \text{A.16}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_{s,2} + \log \left(\frac{c_{\text{HA}^{2-}}}{c_{\text{H}_2\text{A}^-}} \right) \quad \text{A.17}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_{s,3} + \log \left(\frac{c_{\text{A}^{3-}}}{c_{\text{HA}^{2-}}} \right) \quad \text{A.18}$$

$$c_{\text{ges}} = c_{\text{H}_3\text{A}} + c_{\text{H}_2\text{A}^-} + c_{\text{HA}^{2-}} + c_{\text{A}^{3-}} \quad \text{A.19}$$

Die Gleichungen A.16 bis A.18 können nun nach der Konzentration der jeweils deprotonierten Spezies und Gleichung 3.2 nach $c_{\text{A}^{3-}}$ umgestellt werden:

$$c_{\text{H}_2\text{A}^-} = c_{\text{H}_3\text{A}} \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_{s,1}} \quad \text{A.20}$$

$$c_{\text{HA}^{2-}} = c_{\text{H}_2\text{A}^-} \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_{s,2}} \quad \text{A.21}$$

$$c_{\text{A}^{3-}} = c_{\text{HA}^{2-}} \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_{s,3}} \quad \text{A.22}$$

$$c_{\text{A}^{3-}} = c_{\text{ges}} - c_{\text{H}_3\text{A}} - c_{\text{H}_2\text{A}^-} - c_{\text{HA}^{2-}} \quad \text{A.23}$$

Das Einsetzen von Gleichung A.23 in Gleichung A.22 führt zu Gleichung A.24:

$$c_{\text{ges}} - c_{\text{H}_3\text{A}} - c_{\text{H}_2\text{A}^-} = c_{\text{HA}^{2-}} \cdot (1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{s,3}}) \quad \text{A.24}$$

Diese kann nach $c_{\text{HA}^{2-}}$ umgeformt und in Gleichung A.21 eingesetzt werden:

$$\frac{c_{\text{ges}} - c_{\text{H}_3\text{A}} - c_{\text{H}_2\text{A}^-}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{s,3}}} = c_{\text{H}_2\text{A}^-} \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_{s,2}} \quad \text{A.25}$$

Wird hier nun $c_{\text{H}_3\text{A}}$ durch eine umgestellte Gleichung A.20 ersetzt ergibt sich Gleichung A.26:

$$\frac{c_{\text{ges}} - \frac{c_{\text{H}_2\text{A}^-}}{10^{\text{pH}-\text{p}K_{s,1}}} - c_{\text{H}_2\text{A}^-}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{p}K_{s,3}}} = c_{\text{H}_2\text{A}^-} \cdot 10^{\text{pH}-\text{p}K_{s,2}} \quad \text{A.26}$$

Diese Gleichung kann nun nach der gesuchten Größe umgestellt werden und führt zu der verwendeten Gleichung 3.3 beziehungsweise Gleichung A.27.

$$\frac{c_{\text{H}_2\text{A}^-}}{c_{\text{ges}}} = (10^{\text{pH}-\text{p}K_{s,2}} \cdot 10^{\text{pH}-\text{p}K_{s,3}} + 10^{\text{pH}-\text{p}K_{s,2}} + 10^{-(\text{pH}-\text{p}K_{s,1})} + 1)^{-1} \quad \text{A.27}$$

Dieses Ergebnis kann in Gleichung A.20 als $c_{\text{H}_2\text{A}^-} = \frac{c_{\text{H}_2\text{A}^-}}{c_{\text{ges}}} c_{\text{ges}}$ eingesetzt werden, sodass diese Gleichung nach $\frac{c_{\text{H}_3\text{A}}}{c_{\text{ges}}}$ aufgelöst werden kann. Analog kann mit Gleichung A.21 das Verhältnis $\frac{c_{\text{HA}^{2-}}}{c_{\text{ges}}}$ ermittelt werden, welches wiederum zur Bestimmung von $\frac{c_{\text{A}^{3-}}}{c_{\text{ges}}}$ in Gleichung A.22 eingesetzt werden kann. Mit diesen Speziesanteilen kann das für die Puffererstellung entscheidende Verhältnis von Natrium zu Citrat Molekülen $\frac{c_{\text{Na}^+}}{c_{\text{ges}}}$ berechnet werden. Dazu wird die Anzahl an negativen Ladungen aller Spezies mit der Anzahl an Natrium-Ionen gleichgesetzt:

$$\frac{c_{\text{Na}^+}}{c_{\text{ges}}} = 0 \cdot \frac{c_{\text{H}_3\text{A}}}{c_{\text{ges}}} + 1 \cdot \frac{c_{\text{H}_2\text{A}^-}}{c_{\text{ges}}} + 2 \cdot \frac{c_{\text{HA}^{2-}}}{c_{\text{ges}}} + 3 \cdot \frac{c_{\text{A}^{3-}}}{c_{\text{ges}}} \quad \text{A.28}$$

Tabelle A.1: Speziesverteilung, Verhältnis zur Natrium Konzentration und verwendete pK_s-Werte von Citrat und Tartrat [107].

Molekül	Größe	Wert
Citrat	pK _{s,1}	2,79
	pK _{s,2}	4,079
	pK _{s,3}	5,275
	$\frac{c_{\text{H}_3\text{A}}}{c_{\text{ges}}}$	0,03179
	$\frac{c_{\text{H}_2\text{A}^-}}{c_{\text{ges}}}$	0,5156
	$\frac{c_{\text{HA}^{2-}}}{c_{\text{ges}}}$	0,4298
	$\frac{c_{\text{A}^{3-}}}{c_{\text{ges}}}$	0,02282
	$\frac{c_{\text{Na}^+}}{c_{\text{ges}}}$	1,44
Tartrat	pK _{s,1}	2,705
	pK _{s,2}	3,691
	$\frac{c_{\text{H}_2\text{A}}}{c_{\text{ges}}}$	0,01642
	$\frac{c_{\text{HA}^-}}{c_{\text{ges}}}$	0,3239
	$\frac{c_{\text{A}^{2-}}}{c_{\text{ges}}}$	0,6597
	$\frac{c_{\text{Na}^+}}{c_{\text{ges}}}$	1,64

Die so erhaltenen Speziesanteile sind zusammen mit den pK_s -Werten von DeRobertis et al. und dem Verhältnis zur Natrium Konzentration in Tabelle A.1 aufgeführt [107]. Für die Tartrat Speziesverteilung wurde analog vorgegangen.

B. Zusätzliche experimentelle Daten

B.1 Retentionsfaktoren von BSA und LYZ mit Salzmischungen

Binäre Salzmischungen

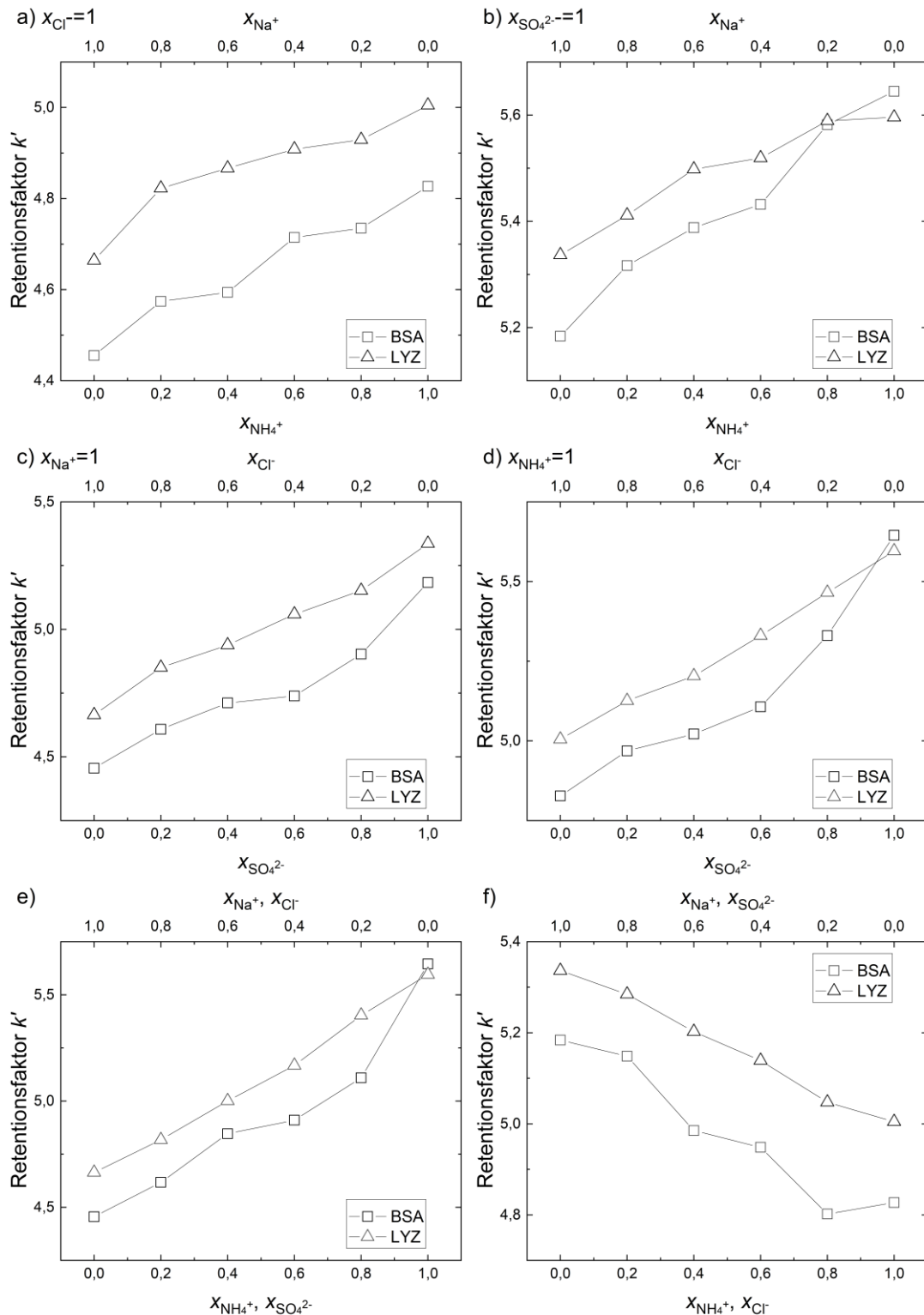


Abbildung B.1: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen für eine Gradientenlänge von 3 CV. Es werden die Daten für die Mischungen aus NaCl und NH_4Cl (a), Na_2SO_4 und $(NH_4)_2SO_4$ (b), NaCl und Na_2SO_4 (c), NH_4Cl und $(NH_4)_2SO_4$ (d), NaCl und $(NH_4)_2SO_4$ (e) sowie aus Na_2SO_4 und NH_4Cl (e) gezeigt.

Die Retentionsfaktoren von BSA und LYZ mit binären Salzmischungen aus den Ionen Na^+ , NH_4^+ , Cl^- und SO_4^{2-} werden in Abbildung B.1 für eine Gradientenlänge von 3 CV, in Abbildung B.2 für eine Gradientenlänge von 5 CV und in Abbildung B.3 für eine Gradientenlänge von 10 CV dargestellt.

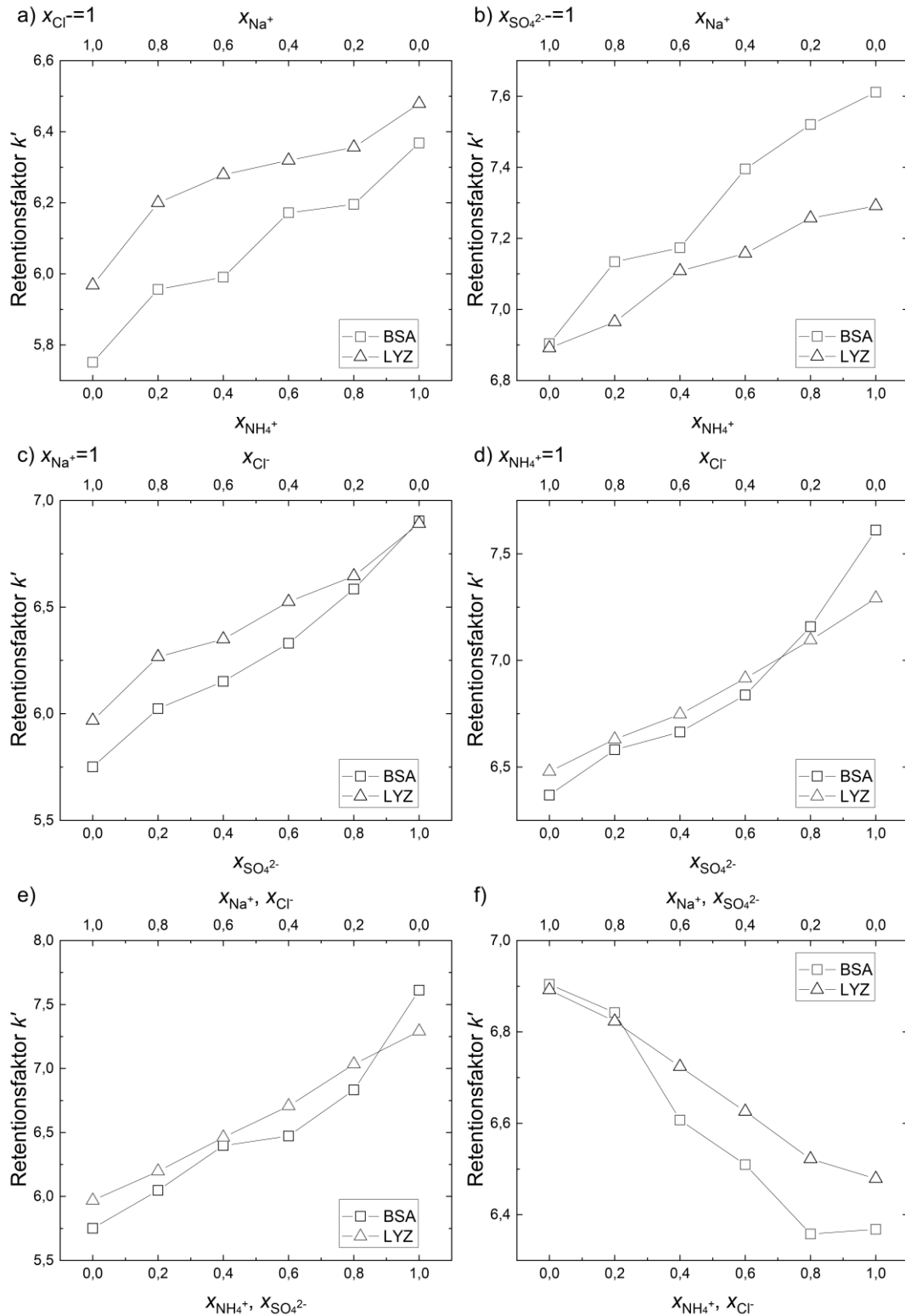


Abbildung B.2: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen für eine Gradientenlänge von 5 CV. Es werden die Daten für die Mischungen aus NaCl und NH_4Cl (a), Na_2SO_4 und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (b), NaCl und Na_2SO_4 (c), NH_4Cl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (d), NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (e) sowie aus Na_2SO_4 und NH_4Cl (e) gezeigt.

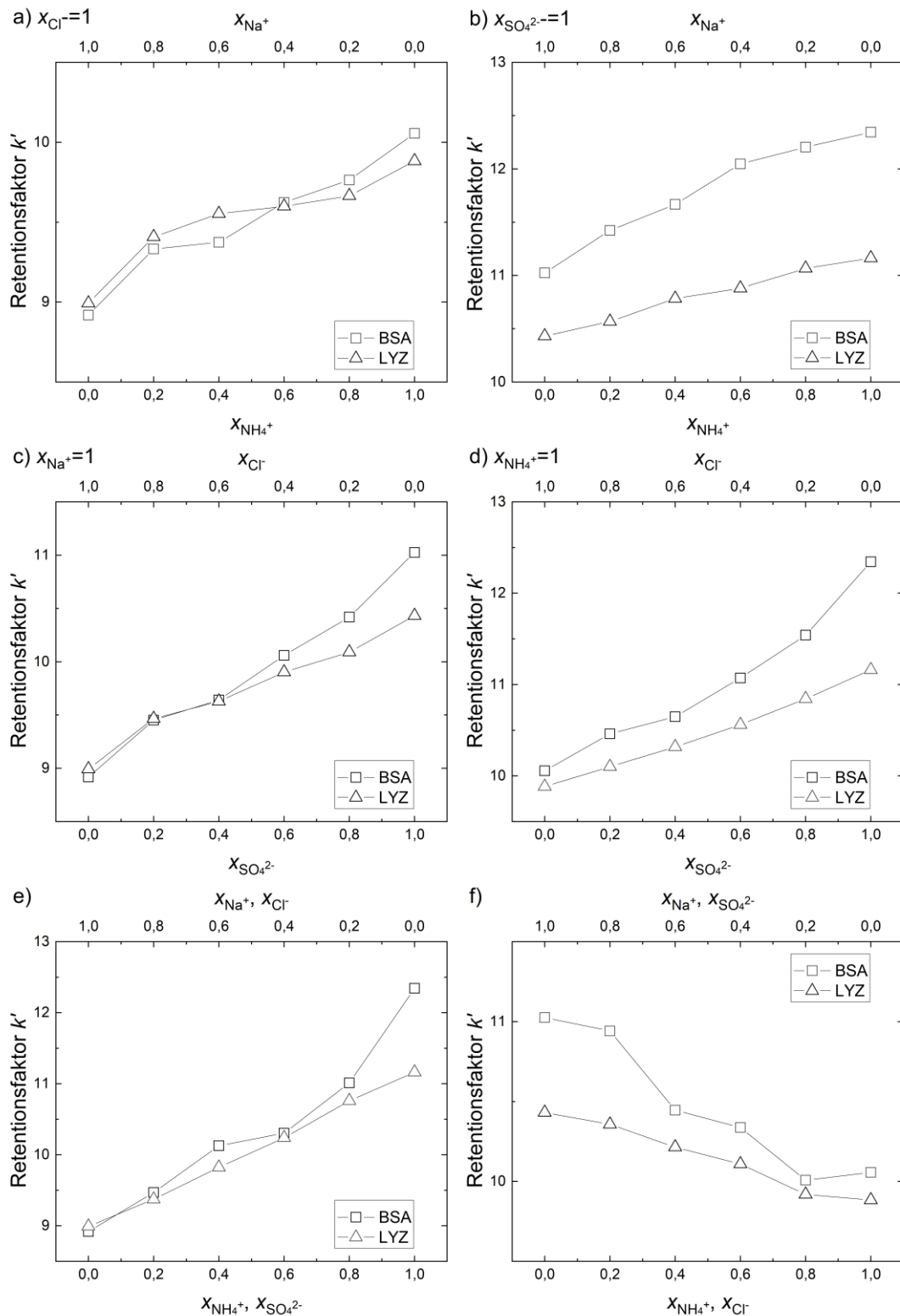
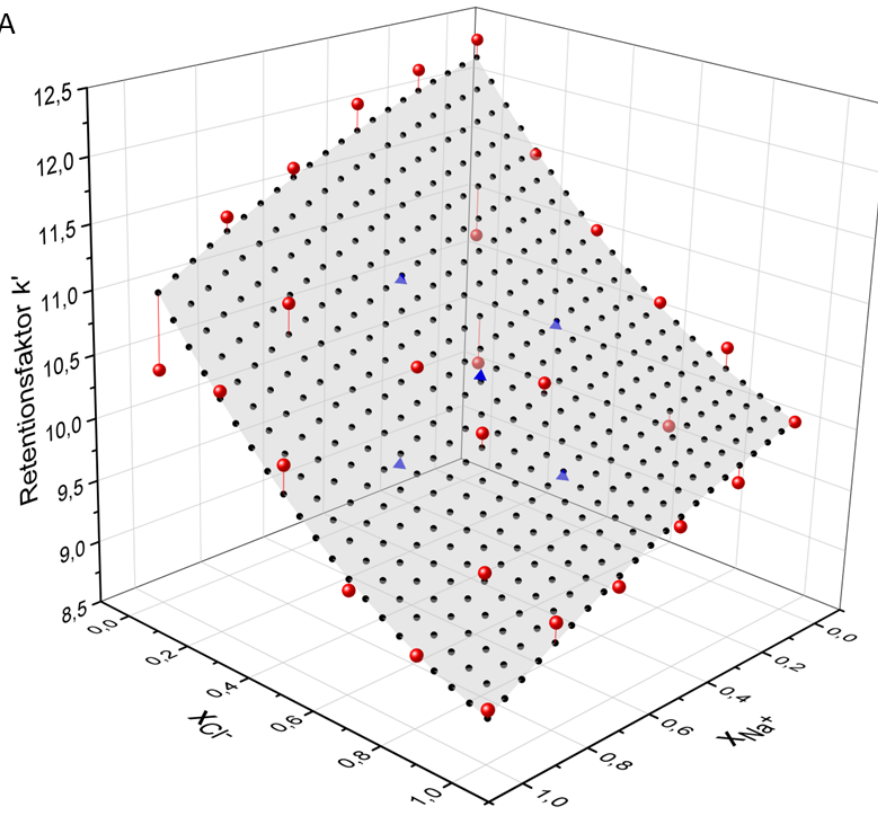


Abbildung B.3: Retentionsfaktoren von BSA und LYZ für binäre Salzmischungen für eine Gradientenlänge von 10 CV. Es werden die Daten für die Mischungen aus NaCl und NH_4Cl (a), Na_2SO_4 und $(NH_4)_2SO_4$ (b), NaCl und Na_2SO_4 (c), NH_4Cl und $(NH_4)_2SO_4$ (d), NaCl und $(NH_4)_2SO_4$ (e) sowie aus Na_2SO_4 und NH_4Cl (e) gezeigt.

Kalibrierungs- und Validierungsversuche

Die Regressionsebenen mit den Kalibrierungs- und Validierungsversuchen sind für die weiteren Gradientenlängen in Abbildung B.4 und Abbildung B.5 dargestellt.

a) BSA



b) LYZ

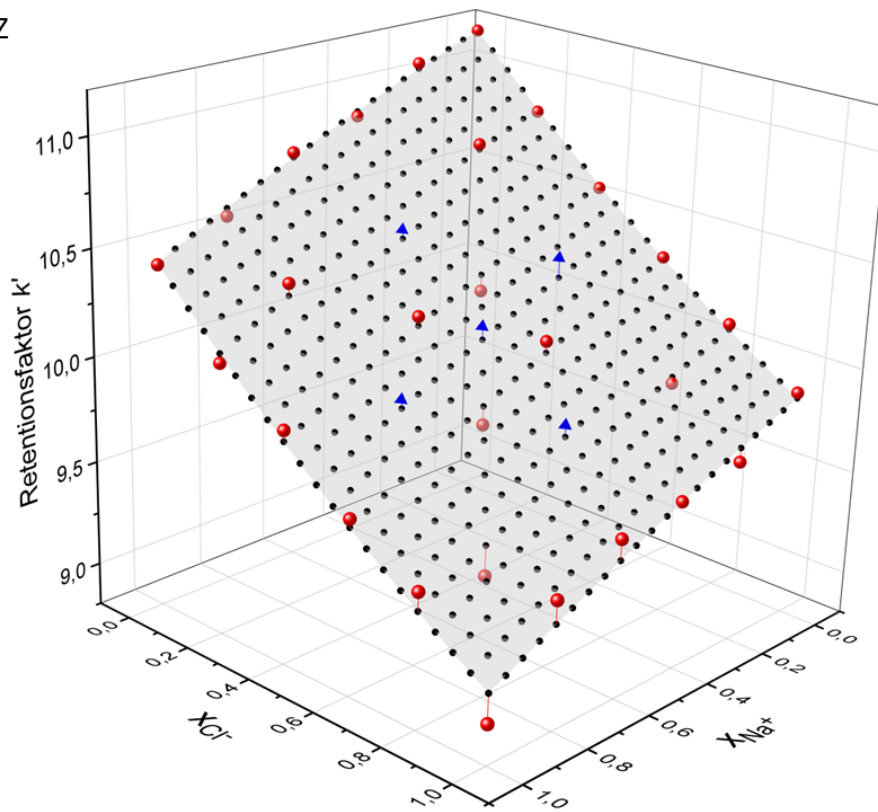
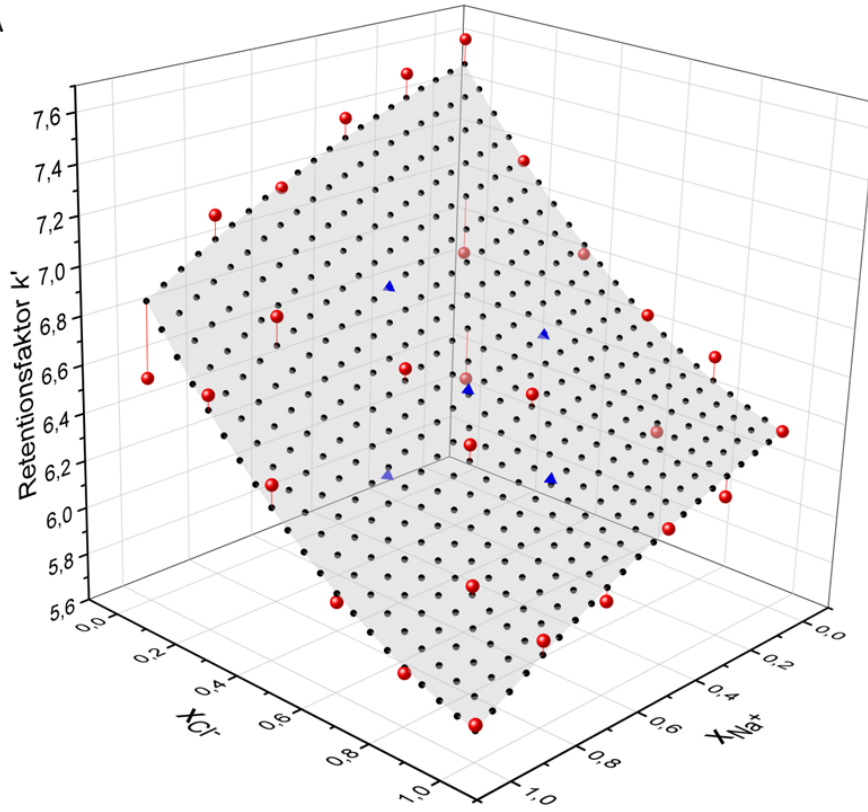


Abbildung B.4: Retentionsfaktoren von a) BSA und b) LYZ bei einer Gradientenlänge von 10 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung. Die roten Kugeln stellen die Kalibrierungsversuche und die blauen Tetraeder die Validierungsversuche dar. Die Ebene zeigt die Regression durch die Modellgleichung an.

a) BSA



b) LYZ

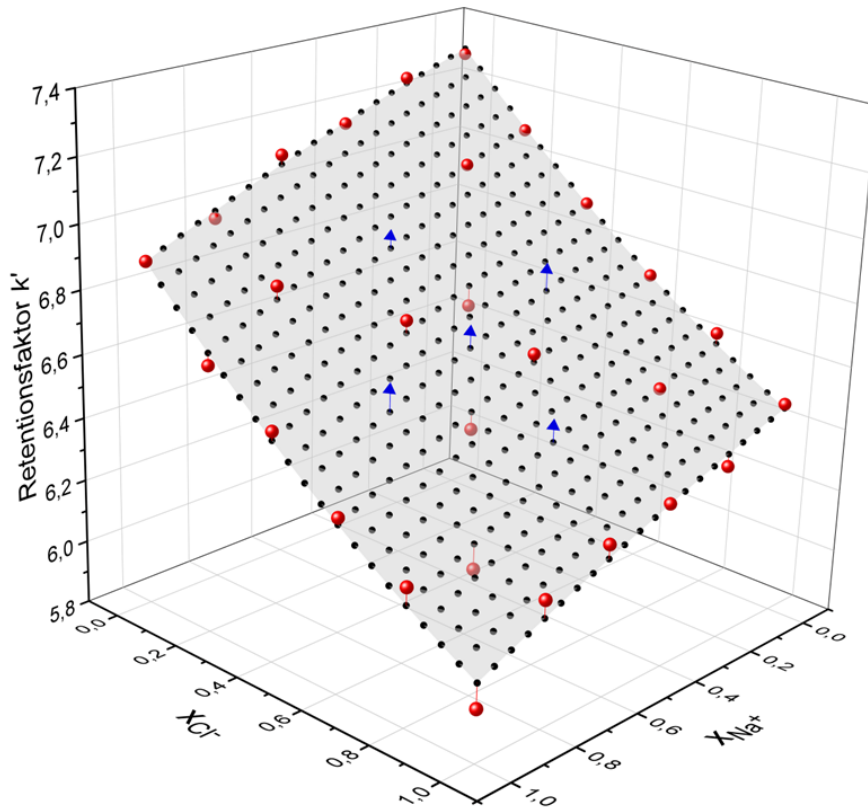


Abbildung B.5: Retentionsfaktoren von a) BSA und b) LYZ bei einer Gradientenlänge von 5 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung. Die roten Kugeln stellen die Kalibrierungsversuche und die blauen Tetraeder die Validierungsversuche dar. Die Ebene zeigt die Regression durch die Modellgleichung an.

Separationsfaktoren

Die sich aus den regressierten k' -Werten ergebenden Separationsfaktoren sind für die weiteren Gradientenlängen in Abbildung B.6 und Abbildung B.7 dargestellt.

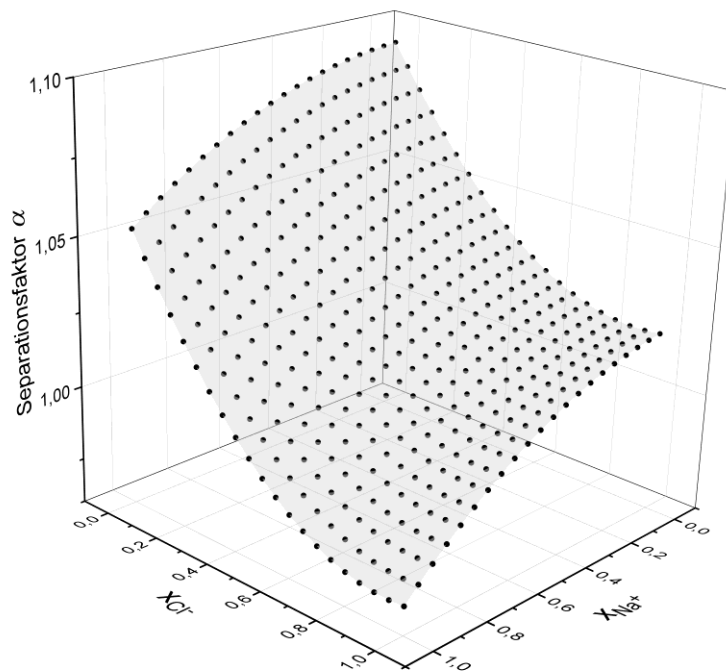


Abbildung B.6: Separationsfaktoren α von BSA und LYZ bei einer Gradientenlänge von 10 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung. Die zu Grunde liegenden k' -Werte wurden mit der kalibrierten Modellgleichung berechnet.

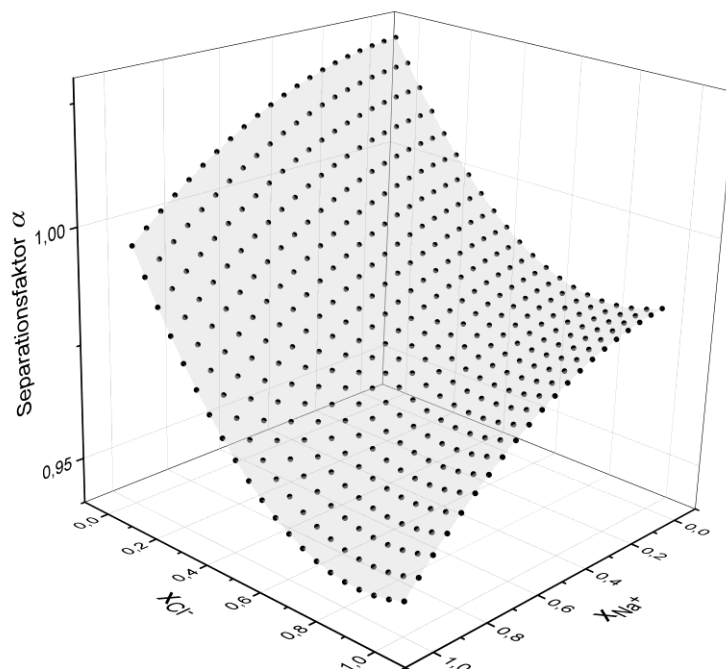


Abbildung B.7: Separationsfaktoren α von BSA und LYZ bei einer Gradientenlänge von 5 CV in Abhängigkeit der Salzzusammensetzung. Die zu Grunde liegenden k' -Werte wurden mit der kalibrierten Modellgleichung berechnet.

B.2 Experimentelle Daten zur Parameterbestimmung

Die zur Berechnung des sterischen Faktors σ verwendeten Durchbruchversuche sind für die drei Proteine BSA, LYZ und CYC in Abbildung B.8 zu sehen.

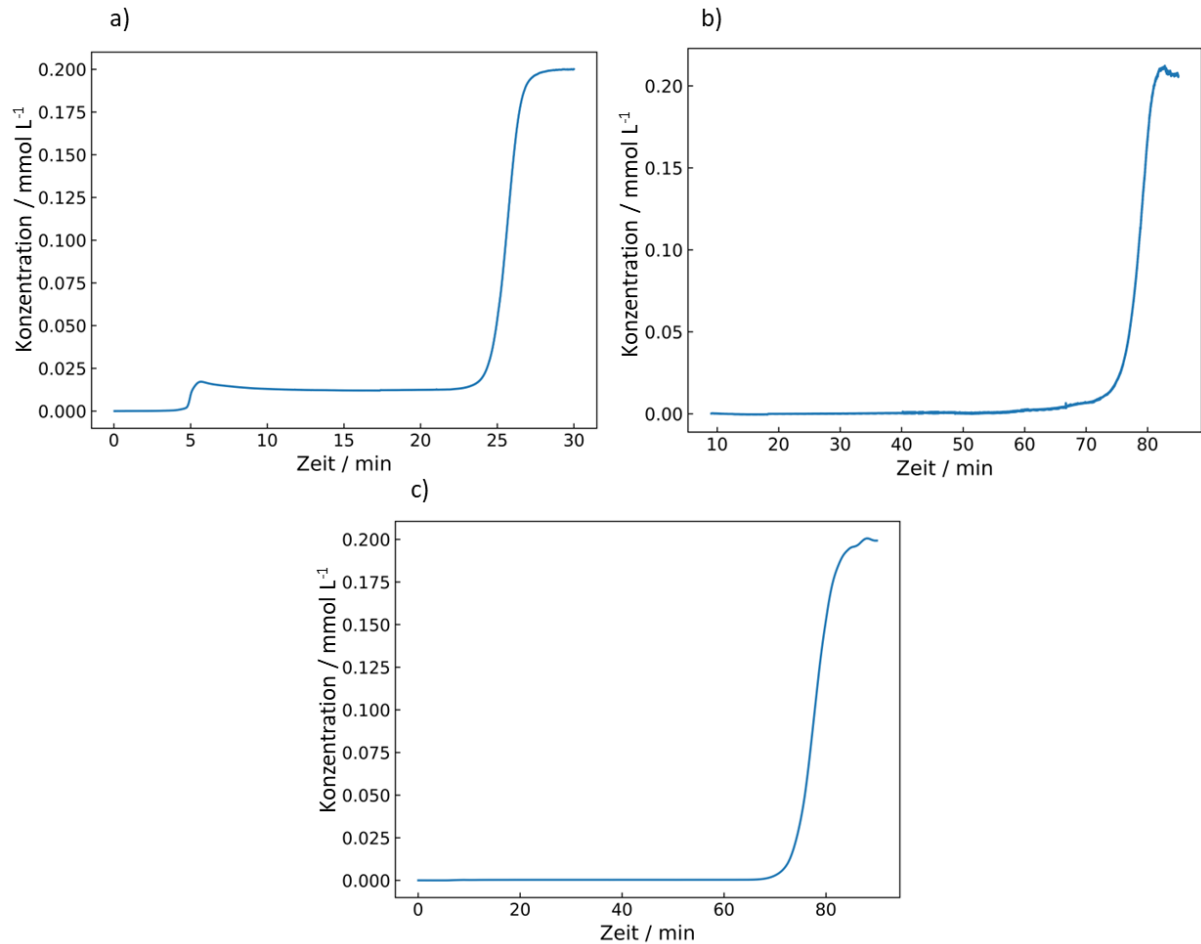


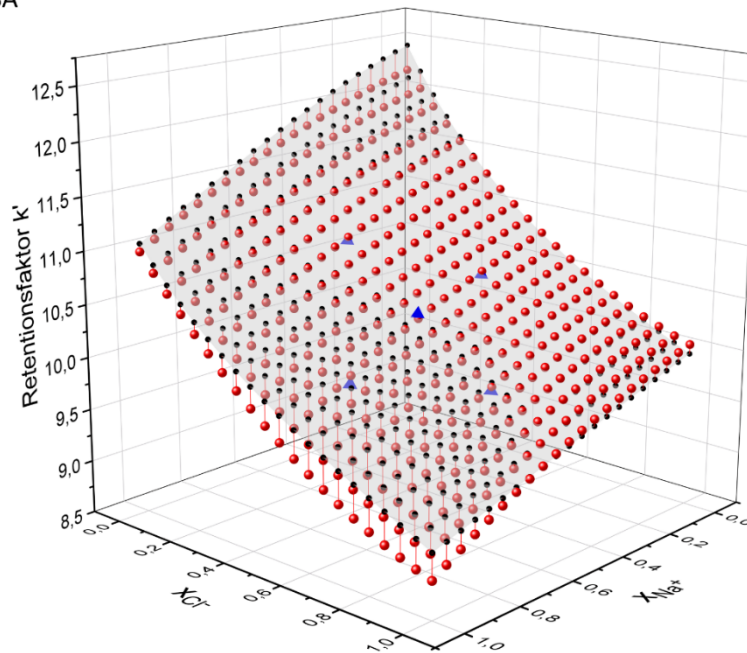
Abbildung B.8: Chromatogramme der Durchbruchversuche für die Bestimmung des sterischen Faktors. Es werden die Ergebnisse von a) BSA, b) LYZ und c) CYC gezeigt.

C. Weitere berechnete Daten

C.1 Zusätzliche Retentionsfaktoren nach der Yamamoto-Methode

Die mit den regressierten Yamamoto-Parametern und der Yamamoto-Gleichung berechneten Retentionsfaktoren für BSA und LYZ sind für eine Gradientenlänge von 10 CV in Abbildung C.1 und für eine Gradientenlänge von 5 CV in Abbildung C.2 dargestellt.

a) BSA



b) LYZ

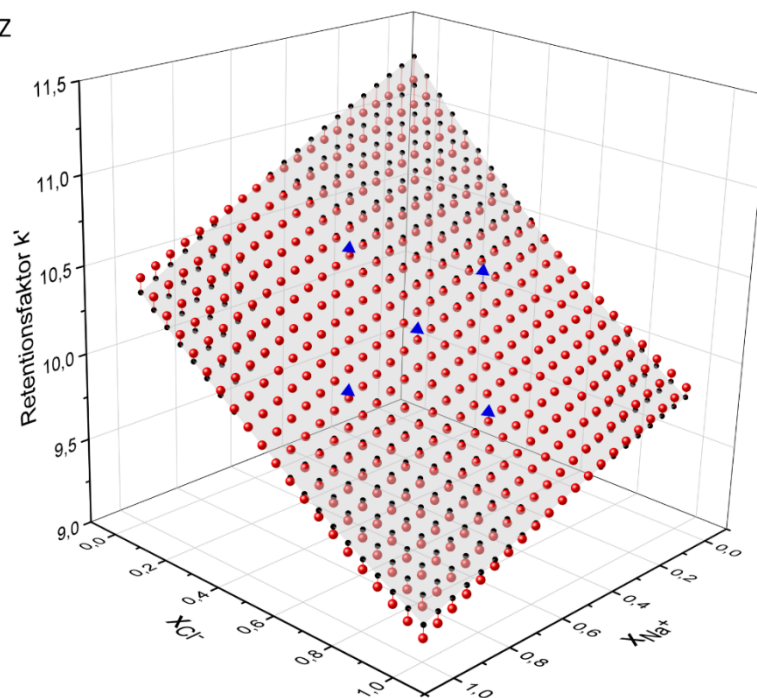
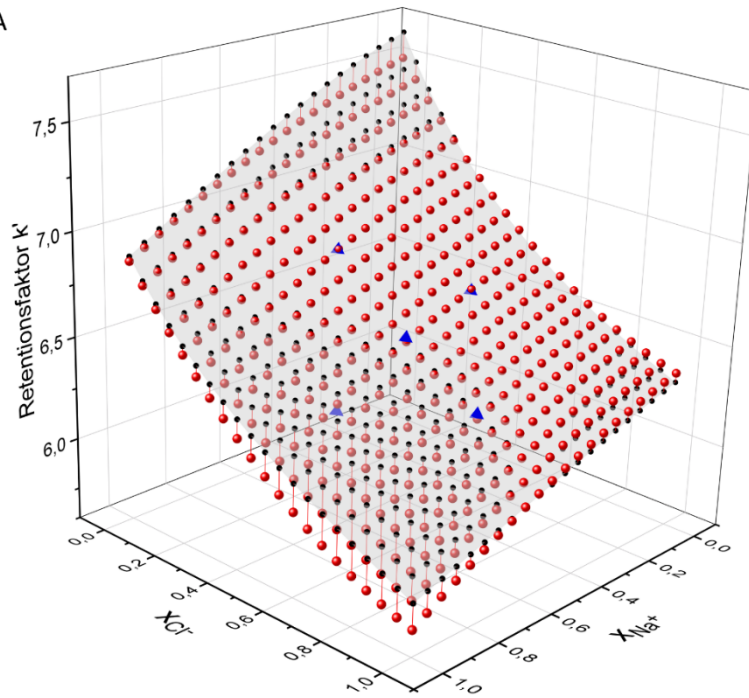


Abbildung C.1: Vergleich der mit der Yamamoto-Methode berechneten mit den durch die kalibrierte Modellgleichung erhaltenen Retentionsfaktoren bei einer Gradientenlänge von 10 CV. Die Vorhersagen der Yamamoto-Methode sind als Ebene dargestellt, die Ergebnisse der direkten Retentionsfaktor-Regression als rote Kugeln und die Validierungsversuche als blaue Tetraeder. Es werden die Ergebnisse für a) BSA und b) LYZ gezeigt.

a) BSA



b) LYZ

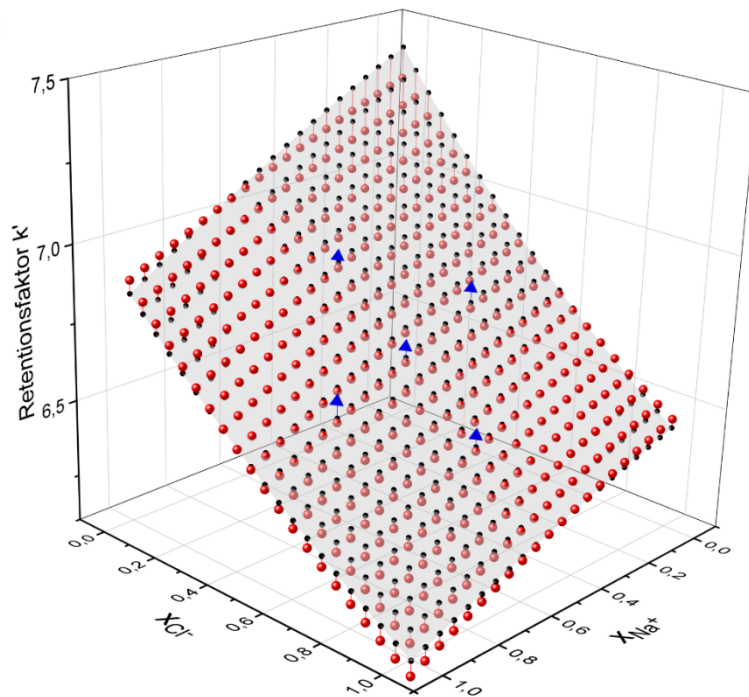


Abbildung C.2: Vergleich der mit der Yamamoto-Methode berechneten mit den durch die kalibrierte Modellgleichung erhaltenen Retentionsfaktoren bei einer Gradientenlänge von 5 CV. Die Vorhersagen der Yamamoto-Methode sind als Ebene dargestellt, die Ergebnisse der direkten Retentionsfaktor-Regression als rote Kugeln und die Validierungsversuche als blaue Tetraeder. Es werden die Ergebnisse für a) BSA und b) LYZ gezeigt.

C.2 Zusätzliche modellierte Chromatogramme

Die modellierten Chromatogramme von BSA, LYZ und CYC sind sowohl für den Fall der einzelnen Modellierung als auch für den Fall der Modellierung mit allen Komponenten gleichzeitig in Abbildung C.3 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die Konkurrenz der Proteine um die Bindestellen keinen Einfluss auf das resultierende Chromatogramm hat. Der Prozess findet somit ausschließlich im linearen Bereich der Isotherme statt.

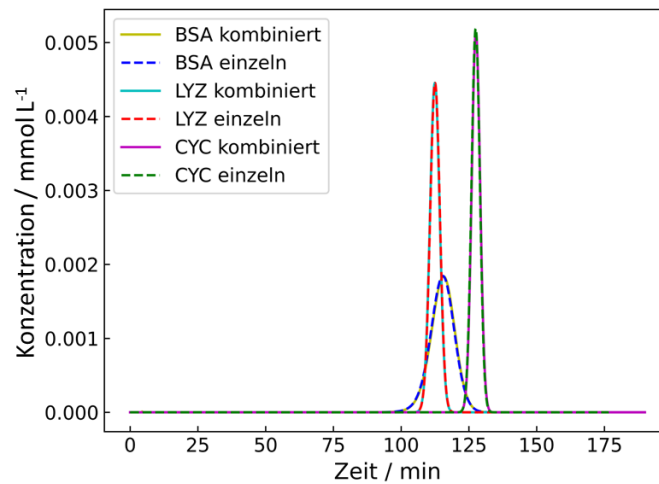


Abbildung C.3: Vergleich von drei Modellierungen mit einem einzelnen Protein mit einer Modellierung mit drei Proteinen. Es werden die Parameter der Proteine BSA, LYZ und CYC von NaCl und eine Gradientenlänge von 15 CV verwendet.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Seidel-Morgenstern, M. Schulte, A. Epping, Fundamentals and General Terminology, in: H. Schmidt-Traub, M. Schulte, A. Seidel-Morgenstern (Eds.), *Preparative Chromatography*, second ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 7–46.
- [2] A. Staby, S. Ahuja, A.S. Rathore, Model - Based Preparative Chromatography Process Development in the QbD Paradigm, in: A. Staby, A.S. Rathore, S. Ahuja (Eds.), *Preparative Chromatography for Separation of Proteins*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2017.
- [3] M. Kearney, Chromatographic applications in the cane sugar industry, *International Sugar Journal* (2002) 194.
- [4] P.H. Roos, Ion Exchange Chromatography, in: M. Kastner (Ed.), *Protein liquid chromatography*, Elsevier, Amsterdam, New York, 2000, pp. 3–88.
- [5] M. Kalyanpur, Downstream processing in the biotechnology industry, *Mol. Biotechnol.* 22 (2002) 87–98. <https://doi.org/10.1385/MB:22:1:087>.
- [6] E. Moorkens, N. Meuwissen, I. Huys, P. Declerck, A.G. Vulto, S. Simoens, 2017. The Market of Biopharmaceutical Medicines: A Snapshot of a Diverse Industrial Landscape. *Front. Pharmacol.* 8, 314. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00314>.
- [7] H.B. Costa, P.M. Fernandes, W. Romão, J.A. Ventura, A new procedure based on column chromatography to purify bromelain by ion exchange plus gel filtration chromatographies, *Ind. Crop. Prod.* 59 (2014) 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.042>.
- [8] A. Osberghaus, S. Hepbildikler, S. Nath, M. Haindl, E. von Lieres, J. Hubbuch, Determination of parameters for the steric mass action model--a comparison between two approaches, *J. Chromatogr. A* (2012) 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.004>.
- [9] A. Jungbauer, R. Hahn, Ion-exchange chromatography, *Methods Enzymol.* 463 (2009) 349–371. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63022-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63022-6).
- [10] G. Malmquist, N. Lundell, Characterization of the influence of displacing salts on retention in gradient elution ion-exchange chromatography of proteins and peptides, *J. Chromatogr. A* (1992) 107–124. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)87191-A](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)87191-A).
- [11] S. Al-Jibbouri, The influence of salt type on the retention of bovine serum albumin in ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.079>.
- [12] M.A. Rounds, F.E. Regnier, Evaluation of a Retention Model for High-Performance Ion-Exchange Chromatography Using Two Different Displacing Salts, *J. Chromatogr. A* (1984) 37–45. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96240-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96240-X).
- [13] R. Liu, Q. Shi, Protein retention in dextran-grafted cation exchange chromatography: The influence of pHs, counterions and polymer structure, *Chinese J. Chem. Eng.* 28 (2020) 1904–1910. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.01.006>.
- [14] N. Liu, L. Yu, Y. Sun, Protein adsorption to poly(ethylenimine)-modified Sepharose FF: V. Complicated effects of counterions, *J. Chromatogr. A* 1404 (2015) 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.046>.
- [15] K.M. Gooding, M.N. Schmuck, Purification of Trypsin and other basic Proteins by high-performance cation-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* (1983) 633–642. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)90933-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)90933-1).
- [16] N. Tugcu, M. Song, C.M. Breneman, N. Sukumar, K.P. Bennett, S.M. Cramer, Prediction of the effect of mobile-phase salt type on protein retention and selectivity in anion exchange systems, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3563–3572. <https://doi.org/10.1021/ac0263519>.

- [17] F. Xia, D. Nagrath, S. Garde, S.M. Cramer, Evaluation of selectivity changes in HIC systems using a preferential interaction based analysis, *Biotechnol. Bioeng.* 87 (2004) 354–363. <https://doi.org/10.1002/bit.20120>.
- [18] E. Müller, J. Vajda, D. Josic, T. Schröder, D. Romain, T. Frey, Mixed electrolytes in hydrophobic interaction chromatography†, *J. Sep. Sci.* (2013) 1327–1334. <https://doi.org/10.5194/gi-2016-11-RC2>.
- [19] K. Behere, S. Yoon, Chromatography bioseparation technologies and in-silico modelings for continuous production of biotherapeutics, *J. Chromatogr. A* 1627 (2020) 461376. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461376>.
- [20] S. Golshan-Shirazi, G. Guichon, Modeling of Preparative Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A* (1994) 149–171. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80013-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80013-8).
- [21] A. Susanto, K. Treier, E. Knieps-Grünhagen, E. von Lieres, J. Hubbuch, High Throughput Screening for the Design and Optimization of Chromatographic Processes: Automated Optimization of Chromatographic Phase Systems, *Chem. Eng. Technol.* 32 (2009) 140–154. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800350>.
- [22] T. Hahn, T. Huuk, A. Osberghaus, K. Doninger, S. Nath, S. Hepbildikler, V. Heuveline, J. Hubbuch, Calibration-free inverse modeling of ion-exchange chromatography in industrial antibody purification, *Engineering in Life Sciences* 16 (2016) 107 – 113. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400248>.
- [23] S. Leweke, E. von Lieres, Chromatography Analysis and Design Toolkit (CADET), *Computers & Chemical Engineering* 113 (2018) 274–294. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2018.02.025>.
- [24] S. Hunt, T. Larsen, R.J. Todd, Modeling Preparative Cation Exchange Chromatography of Monoclonal Antibodies, in: A. Staby, A.S. Rathore, S. Ahuja (Eds.), *Preparative Chromatography for Separation of Proteins*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2017, pp. 399–427.
- [25] D. Saleh, G. Wang, B. Müller, F. Rischawy, S. Kluters, J. Studts, J. Hubbuch, Straightforward method for calibration of mechanistic cation exchange chromatography models for industrial applications, *Biotechnol. Prog.* 36 (2020) e2984. <https://doi.org/10.1002/btpr.2984>.
- [26] T. Fuchs, A. Jupke, Impact of Salt Selection on Ion-Exchange Chromatography of Model Proteins, *Chemie Ingenieur Technik* 94 (2022) 1284. <https://doi.org/10.1002/cite.202255137>.
- [27] A.J. Cozzone, Proteins: Fundamental Chemical Properties, *Encyclopedia of Life Sciences* (2002). <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001330>.
- [28] E. Flaschel, D. Sell, Charme und Chancen der Weißen Biotechnologie, *Chemie Ingenieur Technik* 77 (2005) 1298–1312. <https://doi.org/10.1002/cite.200500105>.
- [29] R.K. Singh, M.K. Tiwari, R. Singh, J.-K. Lee, From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 1232–1277. <https://doi.org/10.3390/ijms14011232>.
- [30] H. Aichinger, B. Hüsing, S. Wydra, *Weiße Biotechnologie: Stand und Perspektiven der industriellen Biotechnologie: Verfahren, Anwendungen, ökonomische Perspektiven*, Büro für Technikfolgen-Abschätzung beim Deutschen Bundestag, Berlin, 2016.
- [31] P.J. Carter, Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective, *Exp. Cell Res.* 317 (2011) 1261–1269. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.02.013>.
- [32] A. Kornberg, Why Purify Enzymes?, in: R.R. Burgess, M.P. Deutscher (Eds.), *Guide to protein purification*, second. ed., Elsevier, Amsterdam, 2009, pp. 3–6.
- [33] J. Puetz, F.M. Wurm, Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing, *Processes* 7 (2019) 476. <https://doi.org/10.3390/pr7080476>.
- [34] A. Jungbauer, Continuous downstream processing of biopharmaceuticals, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 479–492. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.05.011>.

- [35] D. Keulen, G. Geldhof, O. Le Bussy, M. Pabst, M. Ottens, Recent advances to accelerate purification process development: A review with a focus on vaccines, *J. Chromatogr. A* 1676 (2022) 463195. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463195>.
- [36] T.J. Graddis, D.L. Oxender, An Introduction to Protein Engineering, in: G. Schneider, P. Wrede (Eds.), *Concepts in Protein Engineering and Design: An Introduction*, Reprint twentiethentieth, De Gruyter, Berlin, Boston, 2020, pp. 1–45.
- [37] P. Baumann, J. Hubbuch, Downstream process development strategies for effective bioprocesses: Trends, progress, and combinatorial approaches, *Engineering in Life Sciences* 17 (2017) 1142–1158. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600033>.
- [38] O. Khanal, V. Kumar, A.M. Lenhoff, Displacement to separate host-cell proteins and aggregates in cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies, *Biotechnol. Bioeng.* 118 (2021) 164–174. <https://doi.org/10.1002/bit.27559>.
- [39] J. Li, W. Han, Y. Yu, Chromatography Method, in: T. Ogawa (Ed.), *Protein Engineering - Technology and Application*, InTech, 2013, pp. 33–61.
- [40] A. Kenney, Ion-Exchange Chromatography of Proteins, in: A. Kenney, S. Fowell (Eds.), *Practical Protein Chromatography: Methods in Molecular Biology*, 1992, pp. 249–258.
- [41] J.E. Bailey, D.F. Ollis, *Biochemical Engineering Fundamentals*, Second Edition, McGraw-Hill, New York, 1986.
- [42] A.S. Yang, B. Honig, On the pH dependence of protein stability, *J. Mol. Biol.* 231 (1993) 459–474. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1294>.
- [43] H. Schmidt-Traub, R. Ditz, Introduction: Development of Chromatography, in: H. Schmidt-Traub, M. Schulte, A. Seidel-Morgenstern (Eds.), *Preparative Chromatography*, second ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 1–3.
- [44] K.K. Unger, R. Ditz, E. Machtejavas, R. Skudas, Liquid Chromatography—Its Development and Key Role in Life Science Applications, *Angew. Chem.* (2010) 2300–2312. <https://doi.org/10.1002/anie.200906976>.
- [45] J. Strube, *Technische Chromatographie: Auslegung, Optimierung, Betrieb und Wirtschaftlichkeit*, Shaker, Aachen, 2000.
- [46] P.A. Belter, E.L. Cussler, W.-S. Hu, *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology*, John Wiley & Sons, Inc, New York, 1988.
- [47] L.K. Shekhawat, A.P. Manvar, A.S. Rathore, Enablers for QbD implementation: Mechanistic modeling for ion-exchange membrane chromatography, *Journal of Membrane Science* 500 (2016) 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.10.063>.
- [48] J.M. Mollerup, Adsorption Isotherms: Fundamentals and Modeling Aspects, in: A. Staby, A.S. Rathore, S. Ahuja (Eds.), *Preparative Chromatography for Separation of Proteins*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2017, pp. 11–80.
- [49] M. Rüdts, F. Gillet, S. Heege, J. Hitzler, B. Kalbfuss, B. Guélat, Combined Yamamoto approach for simultaneous estimation of adsorption isotherm and kinetic parameters in ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1413 (2015) 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.025>.
- [50] C. Brooks, S.M. Cramer, Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients, *AIChE J.* (1992) 1969–1978.
- [51] T.C. Huuk, T. Hahn, K. Doninger, J. Griesbach, S. Hepbildikler, J. Hubbuch, Modeling of complex antibody elution behavior under high protein load densities in ion exchange chromatography using an asymmetric activity coefficient, *Biotechnology Journal* 12 (2017). <https://doi.org/10.1002/biot.201600336>.
- [52] F. Rischawy, D. Saleh, T. Hahn, S. Oelmeier, J. Spitz, S. Kluters, Good modeling practice for industrial chromatography: Mechanistic modeling of ion exchange chromatography of a

- bispecific antibody, *Computers & Chemical Engineering* 130 (2019) 106532. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2019.106532>.
- [53] M. Leipnitz, Modellbasierte Optimierung der Struktureigenschaften von polymeren Adsorbentien für die chromatographische Trennung von Glucose und Xylose, Dissertation, RWTH Aachen University, 2021.
- [54] S. Khirevich, A. Höltzel, A. Daneyko, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, Structure-transport correlation for the diffusive tortuosity of bulk, monodisperse, random sphere packings, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6489–6497. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.066>.
- [55] M. Kaspereit, M. Schulte, K. Wekenborg, W. Wewers, Process Concepts, in: H. Schmidt-Traub, M. Schulte, A. Seidel-Morgenstern (Eds.), *Preparative Chromatography*, second ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 273–320.
- [56] M. Schulte, M. Jöhnck, R. Skudas, K.K. Unger, J. Kinkel, Stationary Phases and Chromatographic System, in: H. Schmidt-Traub, M. Schulte, A. Seidel-Morgenstern (Eds.), *Preparative Chromatography*, second ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 47–198.
- [57] F.E. Regnier, K.M. Gooding, High-Performance Liquid Chromatography of Proteins, *Analytical Biochemistry* (1980) 1–25. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90229-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90229-8).
- [58] M. Berrios, J.A. Siles, M.A. Martin, A. Martin, Ion Exchange, in: S. Ramaswamy (Ed.), *Separation and purification technologies in biorefineries*, John Wiley & Sons Inc, Hoboken, 2013, pp. 149–165.
- [59] J. Kreuzer, H. Hasse, F. Jirasek, Adsorption of bovine serum albumin on a mixed-mode resin - influence of salts and the pH value, *Adsorption* (2023). <https://doi.org/10.1007/s10450-023-00384-0>.
- [60] E. Hallgren, Prediction of protein retention at gradient elution conditions in ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* (1999) 351–359. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00646-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00646-9).
- [61] M.T.W. Hearn, A.N. Hodder, M.I. Aguilar, High-Performance Liquid Chromatography of Amino Acids, Peptides and Proteins: LXXXVI. The Influence of Different Displacer Salts on the Retention and Bandwidth Properties of Proteins Separated by Isocratic Anion-Exchange Chromatography, *Journal of Chromatography* (1988) 97–118.
- [62] K.M. Gooding, M. Schmidt, Ion selectivity in the high-performance cation-exchange chromatography of proteins, *J. Chromatogr. A* (1984) 321–328. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)96426-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)96426-X).
- [63] K. Tsumoto, D. Ejima, A.M. Senczuk, Y. Kita, T. Arakawa, Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 1677–1690. <https://doi.org/10.1002/jps.20821>.
- [64] N. Nelson, D.K. Schwartz, Specific Ion (Hofmeister) Effects on Adsorption, Desorption, and Diffusion at the Solid–Aqueous Interface, *J. Phys. Chem. Lett.* 4 (2013) 4064–4068. <https://doi.org/10.1021/jz402265y>.
- [65] F. Hofmeister, Zur Lehre von der Wirkung der Salze, *Arch. Exp. Pathol. Phar.* (1888) 247–260.
- [66] K.P. Gregory, G.R. Elliott, H. Robertson, A. Kumar, E.J. Wanless, G.B. Webber, V.S.J. Craig, G.G. Andersson, A.J. Page, Understanding specific ion effects and the Hofmeister series, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 24 (2022) 12682–12718. <https://doi.org/10.1039/d2cp00847e>.
- [67] M.L. Heinitz, L. Kennedy, W. Koopaciewicz, F.E. Regnier, Chromatography of Proteins on Hydrophobic Interaction and Ion-Exchange Chromatographic Matrices: Mobile Phase Contributions to Selectivity, *J. Chromatogr. A* (1988) 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)94791-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)94791-5).

- [68] A.M. Senczuk, R. Klinke, T. Arakawa, G. Vedantham, Y. Yigzaw, Hydrophobic interaction chromatography in dual salt system increases protein binding capacity, *Biotechnol. Bioeng.* 103 (2009) 930–935. <https://doi.org/10.1002/bit.22313>.
- [69] K. Baumgartner, S. Amrhein, S.A. Oelmeier, J. Hubbuch, The influence of mixed salts on the capacity of HIC adsorbers: A predictive correlation to the surface tension and the aggregation temperature, *Biotechnol. Prog.* 32 (2016) 346–354. <https://doi.org/10.1002/btpr.2166>.
- [70] A. Werner, H. Hasse, Experimental study and modeling of the influence of mixed electrolytes on adsorption of macromolecules on a hydrophobic resin, *J. Chromatogr. A* (2013) 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.071>.
- [71] E. Hackemann, H. Hasse, Influence of mixed electrolytes and pH on adsorption of bovine serum albumin in hydrophobic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1521 (2017) 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.024>.
- [72] E. Hackemann, A. Werner, H. Hasse, Influence of mixed electrolytes on the adsorption of lysozyme, PEG, and PEGylated lysozyme on a hydrophobic interaction chromatography resin, *Biotechnol. Prog.* 33 (2017) 1104–1115. <https://doi.org/10.1002/btpr.2474>.
- [73] E. Hackemann, H. Hasse, Mathematical modeling of adsorption isotherms in mixed salt systems in hydrophobic interaction chromatography, *Biotechnol. Prog.* 34 (2018) 1251–1260. <https://doi.org/10.1002/btpr.2683>.
- [74] N. Galeotti, E. Hackemann, F. Jirasek, H. Hasse, Prediction of the elution profiles of proteins in mixed salt systems in hydrophobic interaction chromatography, *Separation and Purification Technology* 233 (2020) 116006. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.116006>.
- [75] J. Kreusser, F. Jirasek, H. Hasse, Influence of Salts on the Adsorption of Lysozyme on a Mixed-Mode Resin, *Adsorption Science & Technology* 2021 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2021/6681348>.
- [76] J. Kreusser, F. Jirasek, H. Hasse, Influence of pH Value and Salts on the Adsorption of Lysozyme in Mixed-Mode Chromatography, *Engineering in Life Sciences* (2021) 753–768. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100058>.
- [77] D. Karlsson, N. Jakobsson, K.-J. Brink, A. Axelsson, B. Nilsson, Methodologies for model calibration to assist the design of a preparative ion-exchange step for antibody purification, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.072>.
- [78] D. Saleh, R. Hess, M. Ahlers-Hesse, N. Beckert, M. Schönberger, F. Rischawy, G. Wang, J. Bauer, M. Blech, S. Kluters, J. Studts, J. Hubbuch, Modeling the impact of amino acid substitution in a monoclonal antibody on cation exchange chromatography, *Biotechnol. Bioeng.* 118 (2021) 2923–2933. <https://doi.org/10.1002/bit.27798>.
- [79] W.K. Marek, D. Sauer, A. Dürauer, A. Jungbauer, W. Piątkowski, D. Antos, Prediction tool for loading, isocratic elution, gradient elution and scaling up of ion exchange chromatography of proteins, *J. Chromatogr. A* 1566 (2018) 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.057>.
- [80] K. Westerberg, N. Borg, N. Andersson, B. Nilsson, Supporting Design and Control of a Reversed-Phase Chromatography Step by Mechanistic Modeling, *Chem. Eng. Technol.* 35 (2012) 169–175. <https://doi.org/10.1002/ceat.201000505>.
- [81] A. Seidel-Morgenstern, H. Schmidt-Traub, M. Michel, A. Epping, A. Jupke, Modeling and Model Parameters, in: H. Schmidt-Traub, M. Schulte, A. Seidel-Morgenstern (Eds.), *Preparative Chromatography*, second ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 321–424.
- [82] A.T. Hanke, M. Ottens, Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development, *Trends Biotechnol.* 32 (2014) 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.02.001>.

- [83] A. Veress, J. Rohacs, Application of Finite Volume Method in Fluid Dynamics and Inverse Design Based Optimization, in: R. Petrova (Ed.), *Finite Volume Method - Powerful Means of Engineering Design*, InTech, Rijeka, 2012.
- [84] E. von Lieres, J. Andersson, A fast and accurate solver for the general rate model of column liquid chromatography, *Computers & Chemical Engineering* 34 (2010) 1180–1191. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2010.03.008>.
- [85] C.W. Shu, Essentially Non-oscillatory and Weighted Essentially Non-oscillatory Schemes for Hyperbolic Conservation Laws, in: A. Quarteroni (Ed.), *Advanced numerical approximation of nonlinear hyperbolic equations: Lectures given at the 2nd Session of the Centro Internazionale Matematico Estivo (C.I.M.E.) held in Cetraro, Italy, June 23 - 28, 1997*, Springer, Berlin, 1998, pp. 325–431.
- [86] J. Morgenstern, G. Wang, P. Baumann, J. Hubbuch, Model-Based Investigation on the Mass Transfer and Adsorption Mechanisms of Mono-Pegylated Lysozyme in Ion-Exchange Chromatography, *Biotechnology Journal* (2017) 1700255. <https://doi.org/10.1002/biot.201700255>.
- [87] S. Gallant, A. Kundu, S.M. Cramer, Modeling non-linear elution of proteins in ion-exchange chromatography.
- [88] S. Gallant, S. Vunnum, S.M. Cramer, Modeling gradient elution of proteins in ion-exchange chromatography, *AIChE J.* (1996) 2511.
- [89] J. Schmölder, M. Kaspereit, A Modular Framework for the Modelling and Optimization of Advanced Chromatographic Processes, *Processes* 8 (2020) 65. <https://doi.org/10.3390/pr8010065>.
- [90] W. Heymann, J. Glaser, F. Schlegel, W. Johnson, P. Rolandi, E. von Lieres, Advanced score system and automated search strategies for parameter estimation in mechanistic chromatography modeling, *J. Chromatogr. A* 1661 (2022) 462693. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462693>.
- [91] M.J.D. Powell, A Direct Search Optimization Method That Models the Objective and Constraint Functions by Linear Interpolation, in: J.-P. Hennart, S. Gómez (Eds.), *Advances in Optimization and Numerical Analysis*, Springer, Dordrecht, 1994, pp. 51–67.
- [92] S. Yamamoto, K. Nakanishi, R. Matsuno, T. Kamikubo, Ion exchange chromatography of proteins - prediction of elution curves and operating conditions. I. Theoretical considerations, *Biotechnol. Bioeng.* (1983) 1465–1483.
- [93] S. Yamamoto, M. Nomura, Y. Sano, Adsorption chromatography of proteins: Determination of optimum conditions, *AIChE J.* 33 (1987) 1426–1434. <https://doi.org/10.1002/aic.690330903>.
- [94] O. Kaltenbrunner, O. Giaverini, D. Woehle, J.A. Asenjo, Application of chromatographic theory for process characterization towards validation of an ion-exchange operation, *Biotechnol. Bioeng.* 98 (2007) 201–210. <https://doi.org/10.1002/bit.21358>.
- [95] N. Yoshimoto, S. Yamamoto, Simplified Methods Based on Mechanistic Models for Understanding and Designing Chromatography Processes for Proteins and Other Biological Products-Yamamoto Models and Yamamoto Approach, in: A. Staby, A.S. Rathore, S. Ahuja (Eds.), *Preparative Chromatography for Separation of Proteins*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2017, pp. 111–158.
- [96] S.M. Thede, An Introduction to Genetic Algorithms, *Journal for Computing Sciences in Colleges* (2004) 115–123.
- [97] U. Altenhöner, M. Meurer, J. Strube, H. Schmidt-Traub, Parameter estimation for the simulation of liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 769 (1997) 59–69. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00173-8).

- [98] J.M. Mollerup, T.B. Hansen, S. Kidal, L. Sejergaard, A. Staby, Development, modelling, optimisation and scale-up of chromatographic purification of a therapeutic protein, *Fluid Phase Equilibria* 261 (2007) 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2007.07.047>.
- [99] T. Barz, V. Löffler, H. Arellano-Garcia, G. Wozny, Optimal determination of steric mass action model parameters for beta-lactoglobulin using static batch experiments, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4267–4277. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.001>.
- [100] S. Chan, N. Titchener-Hooker, D.G. Bracewell, E. Sørensen, A systematic approach for modeling chromatographic processes—Application to protein purification, *AIChE J.* 54 (2008) 965–977. <https://doi.org/10.1002/aic.11441>.
- [101] Y.-C. Chen, S.-J. Yao, D.-Q. Lin, Parameter-by-parameter method for steric mass action model of ion exchange chromatography: Theoretical considerations and experimental verification, *J. Chromatogr. A* 1680 (2022) 463418. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463418>.
- [102] D. Saleh, G. Wang, B. Mueller, F. Rischawy, S. Kluters, J. Studts, J. Hubbuch, Cross-scale quality assessment of a mechanistic cation exchange chromatography model, *Biotechnol. Prog.* 37 (2021) 1-13. <https://doi.org/10.1002/btpr.3081>.
- [103] T. Fuchs, A. Jupke, Comparison of the impact of anion and cation selection onto cation exchange chromatography of model proteins, *J. Chromatogr. A* (2022) 463054. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463054>.
- [104] M.C. Stone, Y. Tao, G. Carta, Protein adsorption and transport in agarose and dextran-grafted agarose media for ion exchange chromatography: Effect of ionic strength and protein characteristics, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4465–4474. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.044>.
- [105] Serge N. Timasheff/Kirk C. Aune, Dimerization of .alpha.-chymotrypsin. I. pH dependence in the acid region.
- [106] D.R. Migneault, R.K. Forcé, Dissociation constants of phosphoric acid at 25°C and the ion pairing of sodium with orthophosphate ligands at 25°C, *J. Solution Chem.* (1988) 987–997. <https://doi.org/10.1007/BF00649742>.
- [107] A. DeRobertis, C. DeStefano, C. Foti, Medium Effects on the Protonation of Carboxylic Acids at Different Temperatures, *J. Chem. Eng. Data* 44 (1999) 262–270. <https://doi.org/10.1021/je980239j>.
- [108] F. Crea, C. de Stefano, F.J. Millero, V.K. Sharma, Dissociation Constants for Citric Acid in NaCl and KCl Solutions and their Mixtures at 25 °C, *J. Solution Chem.* 33 (2004) 1349–1366. <https://doi.org/10.1007/s10953-004-1046-z>.
- [109] A. Gorman Hills, pH and the Henderson-Hasselbalch equation, *The American Journal of Medicine* (1973) 131–133. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(73\)90160-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(73)90160-5).
- [110] O. Exner, The inductive effect: theory and quantitative assessment, *J. Phys. Org. Chem.* (1999) 265–274. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1395\(199904\)12:4%3C265:AID-POC124%3E3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1395(199904)12:4%3C265:AID-POC124%3E3.0.CO;2-O).
- [111] C.P. Schneider, D. Shukla, B.L. Trout, Arginine and the Hofmeister Series: the role of ion-ion interactions in protein aggregation suppression, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 7447–7458. <https://doi.org/10.1021/jp111920y>.
- [112] Y. Koga, T. Kondo, Y. Miyazaki, A. Inaba, The Effects of Sulphate and Tartrate Ions on the Molecular Organization of Water: Towards Understanding the Hofmeister Series (VI), *J. Solution Chem.* (2012) 1388–1400. <https://doi.org/10.1007/s10953-012-9880-x>.
- [113] T. Fuchs, A. Pälchen, A. Jupke, Influence of mixed salts on retention behavior of model proteins in cation exchange chromatography, *Journal of Chromatography A* (2023) 463968. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463968>.

- [114] G. Flodberg, I. Helland, L. Thomsson, S. Bodil Fredriksen, Barrier properties of polypropylene carbonate and poly(lactic acid) cast films, *Eur. Polym. J.* 63 (2015) 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.12.020>.
- [115] C.N. Obiora, A.N. Hasan, A. Ali, N. Alajarmeh, Forecasting Hourly Solar Radiation Using Artificial Intelligence Techniques, *IEEE Can. J. Electr. Comput. Eng.* 44 (2021) 497–508. <https://doi.org/10.1109/ICJECE.2021.3093369>.
- [116] C.A. Haskard, E.C.Y. Li-Chan, Hydrophobicity of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin Determined Using Uncharged (PRODAN) and Anionic (ANS -) Fluorescent Probes, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 2671–2677. <https://doi.org/10.1021/jf970876y>.
- [117] Y.L. Jeyachandran, E. Mielczarski, B. Rai, J.A. Mielczarski, Quantitative and qualitative evaluation of adsorption/desorption of bovine serum albumin on hydrophilic and hydrophobic surfaces, *Langmuir* 25 (2009) 11614–11620. <https://doi.org/10.1021/la901453a>.
- [118] G. Wang, T. Hahn, J. Hubbuch, Water on hydrophobic surfaces: Mechanistic modeling of hydrophobic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1465 (2016) 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.085>.
- [119] N. Tugcu, S.S. Bae, J.A. Moore, S.M. Cramer, Stationary phase effects on the dynamic affinity of low-molecular-mass displacers, *Journal of Chromatography A* 954 (2002) 127–135. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00164-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00164-4).
- [120] T.C. Huuk, T. Briskot, T. Hahn, J. Hubbuch, A versatile noninvasive method for adsorber quantification in batch and column chromatography based on the ionic capacity, *Biotechnol. Prog.* 32 (2016) 666–677. <https://doi.org/10.1002/btpr.2228>.
- [121] S. Weisberg, *Applied linear regression*, Fourth edition, Wiley, Hoboken, NJ, 2014.
- [122] D. Chicco, M.J. Warrens, G. Jurman, The coefficient of determination R-squared is more informative than SMAPE, MAE, MAPE, MSE and RMSE in regression analysis evaluation, *PeerJ Comput. Sci.* 7 (2021) e623. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.623>.
- [123] S. Prayudani, A. Hizriadi, Y.Y. Lase, Y. Fatmi, Al-Khowarizmi, Analysis Accuracy Of Forecasting Measurement Technique On Random K-Nearest Neighbor (RKNN) Using MAPE And MSE, *J. Phys.: Conf. Ser.* 1361 (2019) 12089. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1361/1/012089>.
- [124] T.C. Huuk, T. Hahn, A. Osberghaus, J. Hubbuch, Model-based integrated optimization and evaluation of a multi-step ion exchange chromatography, *Separation and Purification Technology* 136 (2014) 207–222. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.09.012>.
- [125] W.-D. Chen, H.-H. Hu, Y.-D. Wang, Analysis of steric mass-action model for protein adsorption equilibrium onto porous anion-exchange adsorbent, *Chemical Engineering Science* 61 (2006) 7068–7076. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.07.036>.
- [126] S. Kluters, F. Wittkopp, M. Jöhnck, C. Frech, Application of linear pH gradients for the modeling of ion exchange chromatography: Separation of monoclonal antibody monomer from aggregates, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 663–675. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500994>.
- [127] J. Diedrich, W. Heymann, S. Leweke, S. Hunt, R. Todd, C. Kunert, W. Johnson, E. von Lieres, Multi-state steric mass action model and case study on complex high loading behavior of mAb on ion exchange tentacle resin, *Journal of Chromatography A* 1525 (2017) 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.039>.
- [128] C.R. Bernau, R.C. Jäpel, J.W. Hübbes, S. Nölting, P. Opdensteinen, J.F. Buyel, Precision analysis for the determination of steric mass action parameters using eight tobacco host cell proteins, *J. Chromatogr. A* 1652 (2021) 462379. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462379>.
- [129] L.E. Niezen, P.J. Schoenmakers, B.W.J. Pirok, Critical comparison of background correction algorithms used in chromatography, *Anal. Chim. Acta* 1201 (2022) 339605. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339605>.

- [130] F. Gan, G. Ruan, J. Mo, Baseline correction by improved iterative polynomial fitting with automatic threshold, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 82 (2006) 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.08.009>.
- [131] A.K. Hunter, G. Carta, Effects of bovine serum albumin heterogeneity on frontal analysis with anion-exchange media, *J. Chromatogr. A* (2001) 13–19. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01301-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01301-2).
- [132] A. Ladiwala, K. Rege, C.M. Breneman, S.M. Cramer, A priori prediction of adsorption isotherm parameters and chromatographic behavior in ion-exchange systems.
- [133] M. Schmidt, M. Hafner, C. Frech, Modeling of salt and pH gradient elution in ion-exchange chromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 5–13. <https://doi.org/10.1002/jssc.201301007>.