



POLITECHNIKA RZESZOWSKA
im. Ignacego Łukasiewicza
WYDZIAŁ CHEMICZNY
Katedra Inżynierii Chemicznej i
Procesowej



PRACA DOKTORSKA

**BADANIE PRZEPIYWU PLYNÓW
W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ
METODĄ NUMERYCZNEJ MECHANIKI
PŁYNÓW**

mgr inż. Bartłomiej Filip

Promotor:

prof. dr hab. inż. Dorota Antos

Składam serdeczne podziękowania:

***Pani Promotor prof. dr hab. inż. Dorocie Antos** za pełną opiekę naukową, ogromne wsparcie merytoryczne i wszelki poświęcony czas, a także za przekazaną wiedzę.*

***Promotorowi Pomocniczemu dr inż. Romanowi Bochenkowi** za wsparcie merytoryczne, przeprowadzone dyskusje nad wynikami badań oraz cenne wskazówki.*

***Panu dr hab. inż. Wojciechowi Piątkowskiemu** za pomoc i wszelkie cenne wskazówki udzielone podczas pisania pracy doktorskiej.*

Koleżankom i Kolegom z Katedry Inżynierii Chemicznej i Procesowej.

*Niniejszą pracę doktorską
dedykuję mojej **Źonie**, moim **Rodzicom**,
dziękując za ogrom wsparcia.*

*Dedykuję także **śp. Jackowi Polakowi**
za naukę cierpliwości i pokory.*

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	5
WSTĘP	9
CEL I ZAKRES PRACY	12
1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	13
1.1. Przetwarzanie produktów biotechnologicznych	13
1.1.1. Produkcja białek (<i>USP</i>)	13
1.1.2. Procesy oczyszczania biofarmaceutyków (<i>DSP</i>)	14
1.1.3. Techniki chromatograficzne	15
1.1.4. Projektowanie chromatografii białek	17
1.2. Mechanika płynów w chromatografii cieczowej.....	18
1.2.1. Przepływ płynu w <i>ECV</i>	19
1.2.2. Mechanizmy przepływu płynu w kolumnie chromatograficznej	19
1.2.2.1. Dyfuzja molekularna	19
1.2.2.2. Dyfuzja wirowa	20
1.2.2.3. Kinetyka procesu sorpcji	21
1.3. Palcowanie lepkościowe – problematyczne zjawisko, pogarszające zdolność separacji.....	21
1.3.1. Charakterystyka zjawiska oraz mechanizm jego działania	21
1.3.2. Zjawisko <i>VF</i> w chromatografii cieczowej.....	22
1.4. Analiza ilościowa rozmycia piku chromatograficznego	23
1.4.1. Metoda momentów	23
1.4.2. Sumaryczne rozmycie piku chromatograficznego	24
1.5. Metody numeryczne w chromatografii cieczowej.....	24
1.5.1. Metody rozwiązywania cząstkowych równań różniczkowych (<i>CRR</i>)	26
1.5.1.1. Metoda Różnic Skończonych (<i>MRS</i>).....	26
1.5.1.2. Metoda Elementów Skończonych (<i>MES</i>).....	27
1.5.1.3. Metoda Objętości Skończonych (<i>MOS</i>)	28

1.5.2. Obliczeniowa Mechanika Płynów (<i>CFD</i>).....	29
1.5.3. Oprogramowanie firmy <i>ANSYS</i>	30
1.5.4. Wykorzystanie <i>CFD</i> w badaniach nad chromatografią cieczą białek	31
1.6. Równania modeli numerycznych zestawów chromatograficznych	32
1.6.1. Równania zastosowane w modelu <i>ECV</i>	32
1.6.2. Równania zastosowane w złożu porowatym kolumny chromatograficznej	33
1.6.3. Parametry modelu	34
1.6.3.1. Wyznaczanie współczynnika dyfuzji molekularnej.....	34
1.6.3.2. Wyznaczanie efektywnego współczynnika dyspersji	34
1.6.4. Problem badawczy będący przedmiotem pracy.....	35
2. CZĘŚĆ BADAWCZA	37
2.1. Badania eksperymentalne	37
2.1.1. Zastosowane materiały.....	37
2.1.2. Aparatura i sprzęt badawczy	37
2.1.3. Zestaw chromatograficzny <i>ECV</i>	38
2.1.4. Zestaw z zamontowaną kolumną chromatograficzną	40
2.1.5. Analiza frakcji metodą <i>SEC-HPLC</i>	41
2.1.6. Procedury i warunki prowadzenia procesu	42
2.1.6.1. Pakowanie kolumny chromatograficznej złożem	42
2.1.6.2. Elucje w układzie chromatograficznym.....	42
2.1.6.3. Wyznaczanie porowatości fryt oraz złoża w kolumnie	43
2.2. Symulacje numeryczne	43
2.2.1. Opracowanie modeli numerycznych badanych zestawów chromatograficznych.....	43
2.2.1.1. Aproksymacja zestawu <i>ECV</i>	43
2.2.1.2. Geometria zestawu chromatograficznego	45
2.2.2. Dyskretyzacja modelu geometrycznego	46

2.2.2.1. Domena obliczeniowa 2D	46
2.2.2.2. Domena obliczeniowa 3D	48
2.2.3. Zastosowane metody numeryczne.....	50
2.2.3.1. Elucja roztworów bez uwzględnienia wpływu lepkości.....	50
2.2.3.2. Elucja roztworów z uwzględnieniem wpływu lepkości przy pomocy <i>UDF</i> ów	50
3. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW BADAŃ	51
3.1. Hydrodynamika związków mało- i wielkocząsteczkowych w <i>ECV</i>	51
3.1.1. Wpływ czasu przebywania i dyfuzyjności na rozmycie profili stężenia.	51
3.1.2. Model geometrii zestawu <i>ECV</i>	52
3.1.3. Predykcja modelu dla różnych układów geometrii <i>ECV</i>	52
3.1.3.1. Mała objętość iniekcji.....	52
3.1.3.2. Duża objętość iniekcji	57
3.1.4. Graficzna prezentacja konturów profilu stężenia	58
3.2. Hydrodynamika roztworów białek w zestawie chromatograficznym z kolumną	61
3.2.1. Ewolucja profili stężenia mAb2	62
3.2.2. Analiza wariancji profili stężenia mAb2.....	63
3.2.3. Wpływ lepkości próbki na hydrodynamikę w układzie chromatograficznym.....	67
3.2.3.1. Profile stężenia roztworów glicerolu.....	67
3.2.3.2. Ewolucja profili stężenia białka z glicerolem.....	71
4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	73
5. SPIS RYSUNKÓW	75
6. SPIS TABEL	79
7. NOMENKLATURA.....	80
8. BIBLIOGRAFIA	82
9. STRESZCZENIE.....	91

10. SUMMARY	93
11. DOROBEK NAUKOWY	95
11.1. Publikacje.....	95
11.2. Wystąpienia konferencyjne	95
12. UDZIAŁ W BADANIACH NAUKOWYCH	97

WSTĘP

Chromatografia jest obecnie podstawowym procesem izolacji, rozdzielania oraz oczyszczania białek. Projektowanie tego procesu stanowi bardzo istotny etap w jego rozwoju od skali laboratoryjnej do przemysłowej, ponieważ pozwala określić parametry operacyjne niezbędne do jego prawidłowej realizacji. Projektowanie wymaga doświadczalnego wykonania szeregu cykli eksperymentalnych, aby na ich podstawie wyznaczyć parametry operacyjne i zakresy ich zmian. We wstępnych badaniach laboratoryjnych używa się kolumn o małych objętościach, tj. 1 mL lub mniejszych. Miniaturyzacja kolumn pozwala w znacznym stopniu przyspieszyć konieczne do wykonania cykle doświadczalne oraz zmniejszyć zużycie bardzo drogiego materiału biologicznego.

Negatywnym skutkiem miniaturyzacji kolumny jest rosnący stosunek objętości pustych występujących w geometrii zestawu chromatograficznego (*SVV*) do objętości samego czynnego złoża kolumny chromatograficznej. Na *SVV* składają się zarówno objętości puste przestrzeni pozakolumnowych (*ECV*) jak i objętości puste przestrzeni wewnątrzcolumnowej (*ICV*). Każdy z elementów *SVV* różni się długością kanału przepływowego, średnicą oraz krętością, co powoduje różnice w rozkładzie prędkości w kierunkach osiowym i promieniowym i skutkuje deformacją profilu stężenia (piku chromatograficznego). Efekt ten jest spotęgowany dodatkowo w przypadku przepływu roztworów o dużej lepkości, a takimi są roztwory białek. Lepkość fazy ruchomej utrudnia jeszcze bardziej mobilność ich cząsteczek. Gdy różnica lepkości między fazą ruchomą a badaną próbką wprowadzaną na wlot układu jest duża, pojawia się niestabilność przepływu, której powstające wzory przypominają struktury Saffmanna-Taylor, określane ogólnie jako palcowanie lepkościowe (*VF*). Wyżej wymienione zjawiska „falszują” wyniki, czyli kształty profili stężenia. Jeśli się efektów tych zjawisk nie wychwyci i nie zinterpretuje poprawnie, prawidłowe przenoszenie skali procesu będzie niemożliwe.

Efekty opisane powyżej można prognozować. Do opisu przepływu wykorzystywane są modele dynamiczne, dzięki którym możliwe jest określenie optymalnych warunków rozdzielania chromatograficznego. Ich rozwiązanie wymaga zastosowania metod numerycznych, wśród których do najczęściej stosowanych należy metoda różnic skończonych oraz metoda kolokacji ortogonalnej na elementach skończonych. Zastosowanie tych metod dotyczy głównie dynamiki samej kolumny chromatograficznej. Zastosowanie tych metod do predykcji dynamiki całego zestawu chromatograficznego wymaga wprowadzenia uproszczeń, takich jak przybliżenie geometrii układu za pomocą prostych, dwuwymiarowych kapilar, w których rozkład prędkości jest laminarny. Geometria pełnej drogi elucji jest jednak

w rzeczywistości znacznie bardziej skomplikowana, dlatego też wyniki rozwiązania tych modeli mogą być niedokładne.

Prognozy numeryczne mogą być dużo bardziej efektywne i dokładne dzięki zastosowaniu metody Obliczeniowej Mechaniki Płynów (*CFD*). Pozwala ona nie tylko na uwzględnienie wpływu geometrii wszystkich elementów zestawu chromatograficznego na hydrodynamikę oraz kształt pików chromatograficznych, ale daje znacznie więcej możliwości dodatkowych analiz rozmycia profilu stężenia badanych związków.

Do tej pory wykorzystanie *CFD* w modelowaniu przepływu w układach chromatograficznych ograniczało się wyłącznie do prognozy i opisu hydrodynamiki wewnątrz samych kolumn chromatograficznych różnego typu oraz dystrybutorów przepływu o różnej strukturze, przy czym zaniedbywano udział *ECV*. W przypadku badań nad zjawiskiem *VF* w chromatografii ciekłowej, przeprowadzone do tej pory symulacje komputerowe nie porównywały wyników modeli numerycznych z danymi eksperymentalnymi w postaci profili stężenia. Zakładano przy tym izotropowość dyspersji badanej substancji oraz rozpuszczalnika w złożu porowatym.

Analiza danych literaturowych wykazała, że brakuje prac dotyczących wykorzystania *CFD* do modelowania całej drogi elucji w geometrii zestawu chromatograficznego. Skoncentrowano się głównie na badaniach numerycznych przepływu w poszczególnych jego elementach, bez uwzględnienia wpływu obecności *ECV* i zjawiska *VF* oraz anizotropii współczynnika dyspersji w porowatym złożu. Dlatego też w ramach niniejszej pracy doktorskiej uzupełniono wiedzę o te kwestie.

Przeprowadzono odpowiednie cykle eksperymentalne w zakresie hydrodynamiki zestawu chromatograficznego oraz wykonano symulacje numeryczne stosując *CFD*. Badania dotyczyły pełnej drogi elucji związków, uwzględniając obecność *ECV*, *ICV* oraz złoża porowatego. Dokonano także analizy hydrodynamiki lepkiego płynu w złożu porowatym kolumny oraz zjawiska *VF*. Opracowano modele numeryczne, które nie tylko odtworzyły wyniki eksperymentalne, ale pozwoliły także na pełną analizę profili stężenia badanych substancji w trakcie ich elucji w układzie chromatograficznym.

Praca doktorska opiera się na dwóch spójnych tematycznie artykułach, które opublikowano w renomowanym czasopiśmie „*Journal of Chromatography A*”. Wyniki badań eksperymentalnych i numerycznych uzupełniają obecny stan wiedzy na temat wykorzystania metod numerycznych w chromatografii ciekłowej, zaś zaprezentowane modele prognozyjne mogą być wykorzystane z powodzeniem w etapie projektowania procesu chromatograficznego

w skali laboratoryjnej, tj. dla kolumn o małych objętościach, dla przemysłu biofarmaceutycznego.

CEL I ZAKRES PRACY

Celem pracy doktorskiej było opracowanie modeli matematycznych metodą *CFD*, służących do przewidywania i opisu hydrodynamiki w całej drodze elucji zestawu chromatograficznego, stosowanego typowo do separacji i oczyszczania białek. Do opracowania modeli oraz ich weryfikacji posłużyły odpowiednie cykle badań doświadczalnych. Polegały one na serii eksperymentów przy zastosowaniu chromatografu cieczowego firmy Äkta w skali laboratoryjnej. Modele *CFD* rozwiązano przy pomocy oprogramowania firmy *ANSYS* i zweryfikowano poprzez porównanie symulacji z danymi eksperymentalnymi. W celu określenia udziału poszczególnych elementów zestawu chromatograficznego przeprowadzono badania nad hydrodynamiką dla różnych konfiguracji, od najprostszej dotyczącej tylko *ECV* do pełnej drogi elucji obejmującej *ECV*, *ICV* oraz złożę porowate.

1. Układy obejmujące *ECV*

Cykl doświadczalny dostarczył informacji dotyczących efektów rozmycia profilu stężenia badanych związków w *ECV*. Badania skoncentrowano na elucji białek. Dodatkowo pozwolił w sposób ilościowy określić udział poszczególnych elementów składających się na *ECV* w całkowitym rozmyciu profili stężenia. Analiza numeryczna w tej części pozwoliła także zbadać hydrodynamikę zakrzywionych elementów geometrii zestawu chromatograficznego oraz jej wpływ na rozmycie i kształt profili stężenia.

2. Układy obejmujące *ECV* i *ICV*

Cykl doświadczalny pozwolił na odtworzenie profili stężenia badanych związków przez model numeryczny w obecności pustej kolumny. Określono w nim w sposób ilościowy udział *ICV* w całkowitym rozmyciu pików chromatograficznych.

3. Układy obejmujące *ECV*, *ICV* oraz porowate złożę

W tym cyklu doświadczalnym określono udział elementów zestawu chromatograficznego w rozmyciu profili stężenia przy obecności kolumny wypełnionej porowatym, inertnym złożem. Dodatkowo określono wpływ długości złoża.

4. Układy z lepkiemi roztworami

W ostatnim cyklu doświadczalnym analizie poddano wpływ lepkości płynu na przepływ oraz kształt profili stężenia. Opracowany model uwzględniał anizotropię dyspersji w porowatym złożu, zależność lepkości, gęstości oraz współczynnika dyfuzji roztworu od jego stężenia.

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1.1. Przetwarzanie produktów biotechnologicznych

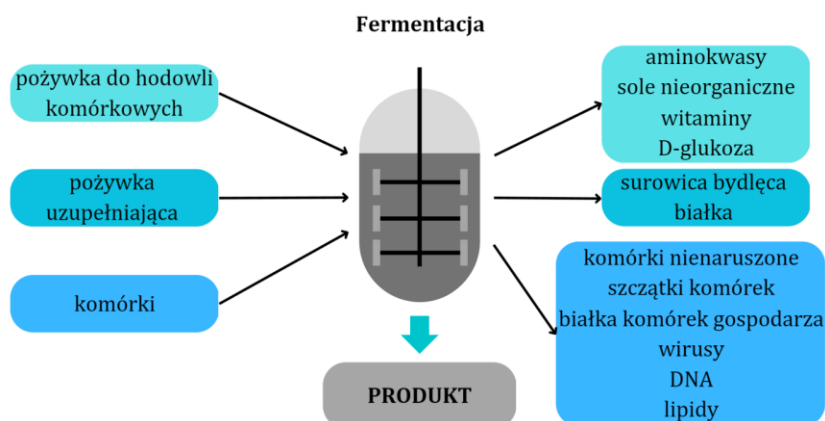
Produkty biologiczne mają wiele istotnych zastosowań w przemyśle farmaceutycznym, m. in. w diagnostyce, badaniach i rozwoju czy biotransformacji. Rynek biofarmaceutyków jest bardzo zróżnicowany pod względem typów produktów. Wśród nich można wymienić takie jak: przeciwciała monoklonalne (mAb), rekombinowane czynniki wzrostu, rekombinowane białka, enzymy oraz hormony i wiele innych [1]. Współcześnie przybywa coraz więcej modyfikowanych białek służących jako leki terapeutyczne, m.in.: lipidowane, albuminowane i glikozylowane, które nadają się do obrotu komercyjnego [2]. Ogólnoświatowe szacunkowe wydatki na badania oraz rozwój biofarmaceutyków (160 mld \$ w 2016 roku i prognozowane 213 mld \$ w 2024 roku) dobitnie pokazują, że rynek ten nieustannie się rozwija i wymaga ciągłego opracowania nowych rozwiązań. Biofarmaceutyki rewolucjonizują bowiem możliwości leczenia pacjentów, zwiększając tym samym przeżywalność osób z ciężkimi schorzeniami [3].

Produkcja takich związków jest dwuetapowa i polega na wytwarzaniu tzw. aktywnego składnika czynnego farmakologicznie w etapie technologicznym (ang. Upstream processing, *USP*) oraz dalej jego wychwytu i oczyszczania w etapie prowadzącym do otrzymania gotowego produktu białkowego (ang. Downstream processing, *DSP*). *DSP* polega zatem na wieloetapowym podejściu obejmującym odzyskiwanie, izolację oraz oczyszczanie białka. W przemyśle farmaceutycznym wymagania dotyczące czystości produktów biologicznych są bardzo wysokie zanim będą one dopuszczone do wejścia na rynek i dalej do konsumenta [4].

1.1.1. Produkcja białek (*USP*)

Głównym celem etapu *USP* jest stworzenie odpowiedniego środowiska niezbędnego dla hodowli komórkowej do wytworzenia białka docelowego. Materiał biologiczny może być wydzielony z komórek (w głównej mierze komórek ssaczych) lub wewnątrzkomórkowy (w przypadku komórek bakteryjnych). W etapie *USP* następuje wzrost produktów białkowych, powstałych na skutek procesu fermentacji mikrobiologicznej lub hodowli komórek ssaków. Na rys. 1.1. przedstawiono proces pozyskiwania produktów białkowych z udziałem fermentacji w postaci: białek terapeutycznych, antybiotyków, enzymów, aminokwasów i innych. Określone są one jako aktywne składniki farmaceutyczne (ang. *API*). Wykorzystanie ich w formie

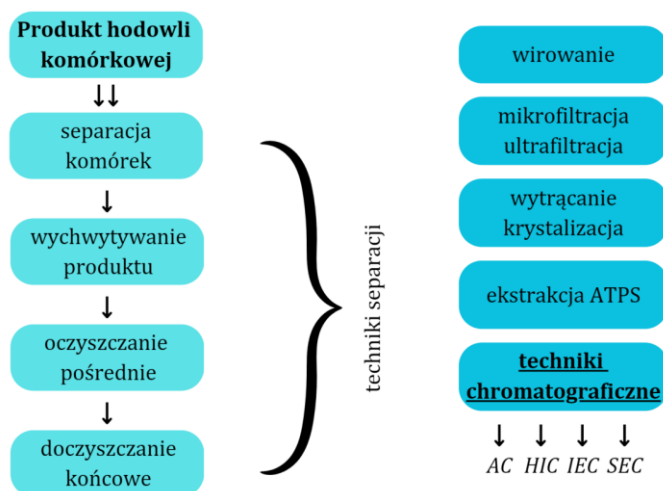
bioaktywnej wymaga zastosowania szeregu operacji jednostkowych, które stanowią drugi etap przetwarzania biofarmaceutyków – *DSP* [5].



Rys. 1.1. Upstream processing (*USP*) jako proces produkcji biofarmaceutyków. Opracowanie własne.

1.1.2. Procesy oczyszczania biofarmaceutyków (*DSP*)

DSP składa się z serii operacji wymaganych do wychwytu oraz oczyszczania materiału biologicznego uzyskanego z etapu *USP*, mających na celu uzyskanie z niego czystego i jednorodnego produktu białkowego [6]. Początkowo produkt znajduje się w matrycy biologicznej, która w przeważającej masie zawiera cząsteczki inne niż białko docelowe. Przeprowadzenie wieloetapowych procesów charakteryzujących się możliwością rozdzielania złożonych mieszanin związków na podstawie różnic w parametrach fizykochemicznych zwiększa stopniowo czystość produktu kluczowego i oddziela go od zanieczyszczeń. *DSP* obejmuje takie procesy wychwytywania oraz oczyszczania białek jak: separację komórek, wychwytywanie, oczyszczanie pośrednie oraz doczyszczanie końcowe. Każdy z etapów wiąże się z zastosowaniem odpowiednich technik separacji, wymienionych na rys. 1.2. Są to takie techniki (operacje) jak: wirowanie, filtracja, strącanie, krystalizacja oraz ekstrakcja. Na szczególną uwagę zasługują jednak techniki chromatograficzne, które stanowią główne narzędzie na wszystkich poziomach części technologicznej *DSP*. Zaletą chromatografii jest to, że pozwala osiągnąć dużą selektywność i czystość produktu końcowego, sięgającą aż $\geq 99\%$ stopnia czystości wymaganego dla biofarmaceutyków. Jest to jednak bardzo kosztowny i trudny do przeprowadzenia proces, dlatego też jego optymalizacja w kierunku uzyskania wyższej wydajności może prowadzić do obniżenia całkowitych kosztów produkcji i przetwarzania biofarmaceutyków [7].



Rys. 1.2. Downstream processing (*DSP*) jako proces prowadzący do uzyskania głęboko oczyszczonego produktu. Opracowanie własne.

1.1.3. Techniki chromatograficzne

Podstawą procesu chromatograficznego jest wykorzystanie różnic we właściwościach fizycznych i chemicznych rozdzielanych substancji, rozpuszczalnika (fazy ruchomej, eluentu) oraz adsorbentu (fazy stacjonarnej, złoża), czyli mechanizmu procesu adsorpcji. To sprawia, że rozdzielanie chromatograficzne jest procesem skomplikowanym. Prowadzi się go w aparacie wyposażonym w kolumnę, w której rozdzielanie chromatograficzne przebiega zwykle metodą elucji, tj. przez stopniowe wymywanie zaadsorbowanych na złożu składników rozdzielanej mieszaniny. Szereg procesów zachodzących w kolumnie jest zależnych od hydrodynamiki. Wśród powszechnie stosowanych metod chromatograficznych, wyróżniają się takie jak:

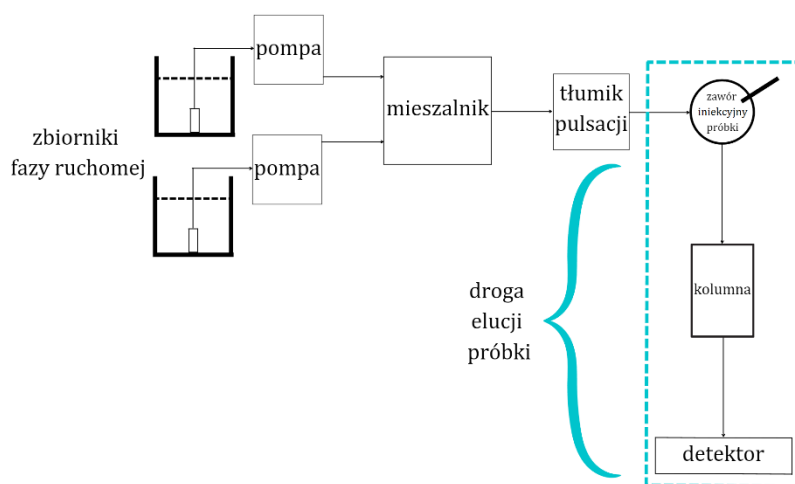
- chromatografia powinowactwa (ang. *AC*),
- chromatografia oddziaływań hydrofobowych (ang. *HIC*),
- chromatografia jonowymienna (ang. *IEC*),
- chromatografia wykluczania (ang. *SEC*).

Podział ten wynika ze stosowania różnego rodzaju faz stacjonarnych, dla których występują odmienne typy oddziaływań składnika zaadsorbowanego na złożu, tj. adsorbentu.

Przebieg procesu chromatograficznego rozpoczyna się od wprowadzenia do aparatu pewnej objętości roztworu, czyli próbki w skali laboratoryjnej (analizie chromatograficznej) lub strumienia zasilającego w skali przemysłowej, który zawiera rozpuszczony w fazie ruchomej składnik rozdzielany mieszaniny (adsorptyw) o dobranym stężeniu. Składnik ten adsorbuje się na powierzchni złoża i jest on następnie wymywany z kolumny, a rozkład wypływającego w eluacie w czasie adsorptywu w płynie jest rejestrowany w postaci profilu stężenia, zwanego pikiem chromatograficznym [8]. Proces ten prowadzi się w zestawie chromatograficznym, który typowo składa się z następujących elementów (rys. 1.3.):

- a) zbiorników fazy ruchomej,
- b) pomp dozujących z mieszalnikiem, zapewniających podawanie fazy ruchomej w odpowiednich proporcjach oraz ze stałym przepływem,
- c) układu dozującego próbkę, zwykle składającego się z zaworu sześciodrożnego wraz z pętlą iniekcyjną lub tzw. *superloop*, zapewniających podawanie próbki,
- d) kolumny rozdzielającej,
- e) układu detektorów rejestrujących sygnał,
- f) komputera wraz z oprogramowaniem.

Laboratoryjny zestaw chromatograficzny pokazany na rys. 1.3. wykorzystano do badań eksperymentalnych w pracy doktorskiej. Obszar wyróżniony stanowi droga elucji próbki. Jest to ta część zestawu, która odpowiada za podanie próbki od wlotu pętli iniekcyjnej w zaworze sześciodrożnym do kolumny chromatograficznej, aż do detektora rejestrującego sygnał. Droga elucji próbki to nie tylko część iniekcyjna próbki, kolumna oraz detektor, ale jest to także rozbudowana sieć kapilar łączących poszczególne elementy zestawu chromatograficznego. Objętość kapilar łączących wraz z układem dozującym i celką pomiarową detektorów składa się na objętość pozakolumnową (*ECV*), która wraz z objętościami pustych przestrzeni wewnątrz kolumny (*ICV*) stanowi sumarycznie objętości puste zestawu chromatograficznego (*SVV*).



Rys. 1.3. Zestaw chromatograficzny z wyróżnieniem drogi elucji badanego związku. Opracowanie własne na podstawie [4]

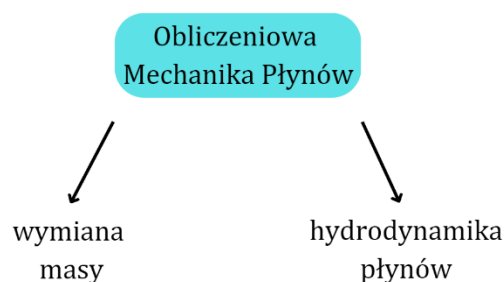
1.1.4. Projektowanie chromatografii białek

Ekonomika technologii wymusza potrzebę udoskonalania metod chromatograficznych z uwagi na rosnące zapotrzebowanie na produkty biofarmaceutyczne, a zatem na ich wychwytywanie i oczyszczanie. Wymaga to wdrażania nowych technologii, które zintensyfikują procesy chromatograficzne [9-12]. Wraz z rozwojem badań nad nowymi białkami, pojawia się także szereg problemów i wyzwań. Należą do nich te związane *stricte* z doбором właściwego układu chromatograficznego oraz te związane z modelowaniem, aż do projektowania całego procesu [8, 13-14]. Projektowanie chromatografii białek polega w głównej mierze na przenoszeniu skali procesu z laboratoryjnej na przemysłową w oparciu o opracowany na podstawie danych doświadczalnych w skali laboratoryjnej adekwatny model dynamiki procesu.

W związku z tym rośnie objętość geometryczna zestawu chromatograficznego, przede wszystkim kolumny, która w skali przemysłowej może mieć nawet do 1000 L i więcej [4]. Przenoszenie skali procesu chromatograficznego rozpoczyna się od etapu właściwej interpretacji wyników cykli doświadczalnych w małej skali [15], które są nie tylko czasochłonne, ale dodatkowo kosztowne z uwagi na wykorzystanie drogich materiałów [16].

Minimalizowanie kosztów i przyspieszenie projektowania chromatografii białek jest możliwe, jak napisano powyżej, poprzez wykorzystanie komputerowego wspomaganie procesów projektowania. Narzędzia symulacyjne służą nie tylko kontroli całych procesów produkcyjnych, ale poprawiają przebieg poszczególnych procesów jednostkowych, przy możliwości uwzględniania ich sporej złożoności, bez prowadzenia nierzadko kosztownych eksperymentów [9, 17]. Symulacje komputerowe umożliwiają zestawienie wyników obliczeń z danymi uzyskanymi z cykli doświadczalnych, dzięki czemu pozwalają ocenić i przeanalizować wpływ istotnych parametrów na ich przebieg. Wśród oprogramowania, które może do tego celu służyć, warto wymienić takie jak *DryLab* czy *ASPEN* [18-19]. Najnowsze doniesienia literaturowe pokazują, że projektowanie wspomagane komputerowo (*CAD*) znajduje także swoje zastosowanie do rozwiązywania modeli retencji pozwalających na określenie optymalnych warunków chromatograficznych [20-22].

Na szczególną uwagę zasługuje możliwość wykorzystania *CFD*, które jest uznanym środowiskiem obliczeń numerycznych. Narzędzie to obejmuje możliwości badawcze nad wieloma zagadnieniami, istotnymi w realizacji technik chromatograficznych. Przedstawiono je na rys. 1.4.



Rys. 1.4. *CFD* jako narzędzie do rozwiązywania wielu zagadnień. Opracowanie własne na podstawie [23].

Numeryczna mechanika płynów daje możliwość analizy zjawisk towarzyszących przepływowi płynów w zestawie chromatograficznym oraz kwestii związanych z wymianą masy. Ze względu na znikomy wpływ efektów cieplnych na przebieg procesu chromatograficznego, są one pomijane w modelowaniu matematycznym. Szczegółowe omówienie podstaw mechaniki płynów, a także wykorzystania *CFD* w kontekście badań nad chromatografią białek, zostanie omówione w dalszych rozdziałach rozprawy doktorskiej.

1.2. Mechanika płynów w chromatografii ciekowej

Rozdzielana mieszanina składników zostaje podzielona między fazę stacjonarną i fazę ruchomą za pomocą wielu różnych mechanizmów procesu adsorpcji w układach chromatograficznych. U podstaw chromatografii leżą zatem efekty nie tylko chemiczne i biochemiczne, ale także fizyczne. Na pełen obraz przepływu składają się bowiem zarówno ogólne zjawiska przepływowe oraz transportowe jak i procesy przenoszenia masy w ośrodkach porowatych złoża w kolumnie chromatograficznej, a także adsorpcja. Dlatego też efekty towarzyszące przepływowi w zestawie chromatograficznym są złożone. Efekty te wpływają na wydajność procesu separacji, której miarą są takie parametry jak:

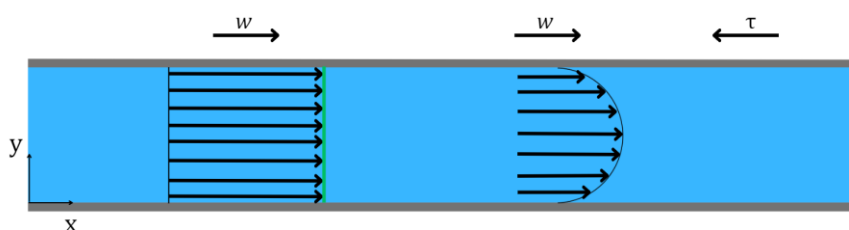
- sprawność kolumny, czyli stopień zbliżenia się do idealnych warunków chromatografii, wyrażony za pomocą tzw. wysokości równoważnej półce teoretycznej, określający tym samym stopień rozmycia profilu stężenia, czyli pików chromatograficznych,
- współczynnik rozdzielania chromatograficznego, który definiuje efektywność rozdzielania pików chromatograficznych na oddzielne profile stężenia opuszczające kolumnę w różnym czasie wyjścia.

Wydajność procesu separacji maleje z uwagi na wpływ czynników dyspersyjnych, takich jak efekty dyspersji fazy ruchomej w złożu chromatograficznym i kinetyki transportu masy [4]. Należy jednak pamiętać, że oprócz samej kolumny chromatograficznej, cały zestaw składa się jeszcze z wielu innych elementów stanowiska roboczego, co zaprezentowano już na rys. 1.3.

Każdy z nich jest tak samo istotny w całej drodze elucji z uwagi na wymienione wyżej efekty panujące w *ECV* oraz w złożu kolumny, wpływające na efektywność separacji [24].

1.2.1. Przepływ płynu w *ECV*

W *ECV* zestawu chromatograficznego stosowane są kapilary o małych średnicach, zaś prędkości przepływu fazy ruchomej są małe, dlatego w praktycznym zastosowaniu przeważają głównie warunki przepływu laminarnego, będące odstępstwem od przepływu tłokowego [25]. Zjawisko dyfuzji w kapilarach chromatografu cieczowego wpływa na kształtowanie się profilu stężenia. Zobrazowano to na rys. 1.5., który przedstawia formowanie się profilu laminarnego w kapilarze o małej średnicy.



Rys. 1.5. Kształtowanie profilu laminarnego podczas przepływu cieczy w kapilarze chromatografu cieczowego.

W warunkach idealnych, gdy na ciecz nie działają naprężenia ścinające, przepływ powinien mieć charakter tłokowy. Jednak wskutek działania naprężeń ścinających, profil prędkości jest paraboliczny, co powoduje rozmycie piku. Dochodzi do niego nie tylko w kapilarach łączących, ale także w innych elementach drogi elucji, w tym w złożu chromatograficznym. Jak wspomniano powyżej, w przypadku układów laboratoryjnych, w których stosuje się kolumny o małej objętości, udział rozmycia profilu stężenia w *ECV* jest znaczący [26].

1.2.2. Mechanizmy przepływu płynu w kolumnie chromatograficznej

Na ruch cząsteczek płynu w kolumnie chromatograficznej wpływ mają trzy podstawowe mechanizmy i procesy, które oddziałują na przemieszczanie się cząsteczek. Należą do nich:

- dyfuzja molekularna,
- dyfuzja wirowa,
- kinetyka procesu sorpcji-desorpcji [27].

1.2.2.1. Dyfuzja molekularna

Dyfuzja to samorzutny, nieodwracalny proces makroskopowy, w którego wyniku wyrównuje się początkowo niejednorodny rozkład materii, polegający na przemieszczaniu się składnika dyfundującego z obszaru o wyższym stężeniu do obszaru o niższym stężeniu pod

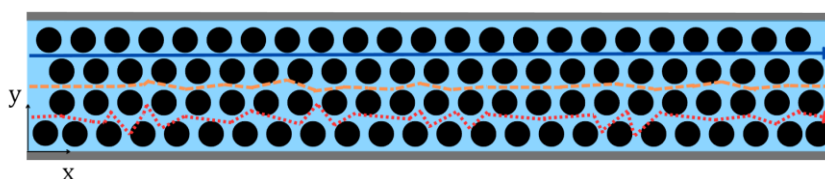
wpływem siły napędowej, czyli różnicy stężenia, opisywany równaniem dyfuzji zwanym prawem Ficka, którego skutkiem jest wyrównywanie stężenia każdej z dyfundujących substancji w układzie. Prawo Ficka podaje, że strumień dyfuzji jest proporcjonalny do gradientu stężenia, co opisuje równanie [28]:

$$J_i = - \rho D_{i,m} \nabla x_i \quad (1.1)$$

Zgodnie z równaniem (1.1) J_i to strumień dyfuzji, ρ to gęstość, $D_{i,m}$ to współczynnik dyfuzji molekularnej zależny od własności cząsteczki i lepkości ośrodka, x_i to ułamek masowy i -tego składnika. W przepływie uwarstwionym dyfuzja zachodzi pomiędzy poszczególnymi warstwami laminarnymi. Cząsteczki płyną wówczas zgodnie z kierunkiem przepływu w obrębie warstwy, ale z różną prędkością względem innej warstwy. Dzięki temu powstaje gradient stężenia, który jest prostopadły do kierunku przepływu, powodując dyfuzję wzdłuż linii prądu oraz kształtuje się niejednorodny profil prędkości w kierunku promieniowym [26]. Współczynniki dyfuzji zależą od substancji rozpuszczonej. W przypadku białek, tj. molekuł charakteryzujących się dużą masą cząsteczkową, ich wartość współczynnika dyfuzji jest bardzo niska [29]. W związku z tym ruchliwość cząsteczek białka jest bardzo mała, co przyczynia się do rozmycia ich profili stężenia w *ECV* [30-32].

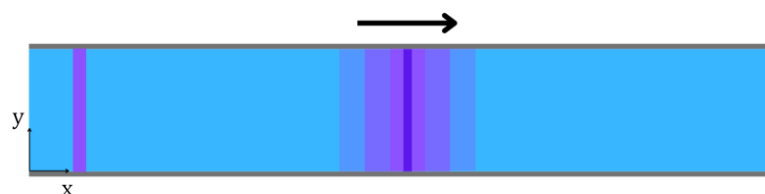
1.2.2.2. Dyfuzja wirowa

Obecność porów w złożu porowatym kolumny wypełnionej sprawia, że cząsteczki próbki nie poruszają się po tych samych ścieżkach o takich samych długościach, ponieważ w różnym stopniu wnikają w pory, co warunkuje różną długość czasu przebywania [33]. Rozkład przepływu, wynikający z jego laminarnego charakteru, prowadzi dodatkowo do zróżnicowania prędkości pomiędzy cząstkami, dlatego też jedne poruszają się szybciej niż pozostałe. Sytuację tą odzwierciedla rys. 1.6.



Rys. 1.6. Dyfuzja wirowa w przestrzeniach kolumny wypełnionej złożem porowatym. Opracowanie własne na podstawie [33].

Działająca w kierunku osiowym kanału przepływowego dyspersja osiowa prowadzi do rozmycia profilu stężenia, podobnie jak w *ECV*. Rozmycie piku chromatograficznego na skutek dyspersji pokazano na rys. 1.7.



Rys. 1.7. Dyspersja wzdłużna w kolumnie chromatograficznej. Rozmycie piku wynika z przepływu. Opracowanie własne na podstawie [34]

Do znacznego rozmycia profilu stężenia dochodzi na złożu kolumny, dlatego w *ECV* powinno ono być jak najmniejsze [35].

1.2.2.3. Kinetyka procesu sorpcji

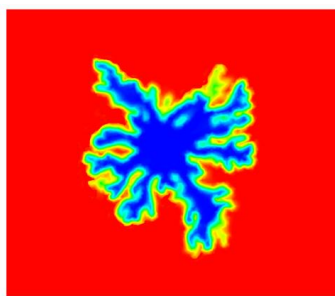
Obniżenie sprawności kolumny wynika nie tylko ze zjawiska dyspersji, ale jest także limitowane kinetyką procesów transportu masy. Do procesów tych należą m. in. dyfuzja zewnętrzna w płynie oraz wewnętrzna w porach ziarna, czyli opory transportu masy, a także proces powierzchniowy adsorpcji i desorpcji [8]. Spadek wydajności separacji wynika z braku równowagi termodynamicznej między rozdzielaną substancją w płynie i fazie zaadsorbowanej.

Z racji tego, że przedmiotem badania były związki nieadsorbujące, dyspersja wywierała dominujący wpływ na rozmycie profilu stężenia, natomiast udział oporów transportu masy miał znacznie mniejsze znaczenie. W związku z tym kinetyka przenoszenia masy nie została uwzględniona.

1.3. Palcowanie lepkościowe – problematyczne zjawisko, pogarszające zdolność separacji

1.3.1. Charakterystyka zjawiska oraz mechanizm jego działania

Zjawisko rozmycia piku rośnie ze wzrostem lepkości roztworu. Duża lepkość płynu powoduje redukcję dyfuzyjności cząsteczek. W skrajnych przypadkach, gdy różnica pomiędzy lepkością próbki i fazy ruchomej jest duża, występuje zjawisko palcowania lepkościowego (*VF*). Jest definiowane jako niestabilność, która powstaje i ewoluuje podczas wypierania cieczy w materiałach porowatych. Jego mechanizm ma związek ze zmianą lepkości, gdy ciecz wypierana ma inną lepkość od cieczy wypierającej [36]. Dotyczy to nie tylko roztworów wielofazowych, które nie mieszają się ze sobą, ale problem ten może pojawiać się także w przypadku płynów w pełni ze sobą mieszalnych [37]. Zjawisko to uwidacznia się w postaci specyficznych struktur, które wyglądem przypominają palce, co zobrazowane zostało na rys. 1.8.



Rys. 1.8. Struktury palcowe tworzące się podczas wprowadzania wody do glicerolu. Opracowanie własne na podstawie [37]

Podczas gdy dwa płyny są ze sobą mieszalne, zjawisko *VF* pojawia się w momencie, gdy mniej lepka ciecz zaczyna przenikać przez ciecz bardziej lepka, co jest dodatkowo efektem mieszania dyfuzyjnego między nimi [36]. Zjawisko zostało opisane jako niestabilności Saffmana-Taylora, występujące w ośrodkach porowatych [38]. Pomimo tego, że w przypadku mieszalnych cieczy brak jest powierzchni międzyfazowej, na zjawisko *VF* wpływ mają efekty dyfuzyjne, które są spowodowane lokalną zmianą stężenia. Mowa zatem o dwóch dominujących czynnikach:

- gradient ruchliwości wynikający z różnicy lepkości płynów,
- gradient stężenia wynikający z silnych efektów dyfuzyjnych [39].

Tworzące się struktury palcowe w mieszalnych cieczach są bardziej skomplikowane pod względem stopnia ich wydłużenia i kształtów, w odróżnieniu od struktur powstałych w przypadku płynów nie mieszających się. Wynika to ze wpływu nie tylko samej różnicy lepkości, ale także wspomnianych silnych efektów dyfuzyjnych.

1.3.2. Zjawisko *VF* w chromatografii cieczowej

Z racji stosowanych złóż porowatych jako wypełnienia kolumn, zjawisko *VF* może wystąpić podczas elucji próbek, w momencie gdy stosowana faza ruchoma ma mniejszą lepkość [40]. Na sposób przemieszczania się próbki poprzez złożę porowate w kolumnie chromatograficznej ma wpływ wiele czynników, w tym efekty dyspersyjne. Jak dowiedziono, na potencjalne formowanie się struktur palcowych wpływ ma czas przebywania próbki, ponieważ przy stałym rozcieńczaniu próbki kontrast lepkościowy zanika [41]. Czas przebywania zależy między innymi od długości kolumny i wpływa na efekty dyspersyjne wywołane palcowaniem lepkościowym. Ale najważniejszy wpływ na *VF* ma różnica lepkości. Przyjmuje się, że palcowanie lepkościowe może wystąpić już przy trzykrotnej różnicy pomiędzy wartościami lepkości fazy ruchomej oraz próbki [42]. Warto zaznaczyć, że mimo tego, iż *VF* jest zjawiskiem *stricte* chaotycznym i trudnym do opisania ilościowego, przy niskich wartościach liczby Reynoldsa ($Re < 0,01$) profile stężenia badanego związku są w dosyć dobrym stopniu odtwarzalne [43]. Zatem niestabilność przepływu przez kolumnę

chromatograficzną wymaga zaistnienia kilku czynników, które w większym lub mniejszym stopniu powodują pogorszenie separacji związków.

Stężone roztwory białek są często strumieniami o wysokiej lepkości zasilającymi kolumnę [4, 16]. Duża lepkość powoduje zmniejszenie i tak już małej dyfuzyjności białek, maleje zatem ich mobilność. W przypadku białek o znaczeniu biofarmaceutycznym jest to o tyle istotne, że VF przyczyni się tym samym do braku możliwości uzyskania wysokiego stopnia czystości produktu, ponieważ prowadzi do dodatkowego rozmycia i zniekształcenia pików chromatograficznych makrocząsteczek [40, 44-45, 46-49]. Tym samym, każda forma możliwości dogłębnego zbadania tego zjawiska jest potrzebna.

1.4. Analiza ilościowa rozmycia piku chromatograficznego

1.4.1. Metoda momentów

Do analizy ilościowej rozmycia piku chromatograficznego stosuje się tzw. metodę momentów, która służy także do określania ich czasu retencji, wariancji oraz kształtu. Pierwszy moment, zwany też absolutnym, określa zwyczajowo czas retencji piku, wyrażony równaniem [8]:

$$\mu_1 = \frac{\int_0^{\infty} t c(t) dt}{\int_0^{\infty} c(t) dt} \quad (1.2)$$

gdzie μ_1 oznacza pierwszy moment absolutny, t to czas, a $c(t)$ oznacza stężenie próbki zmienne w czasie.

Drugi moment, zwany także centralnym, określa z kolei wariancję, która z matematycznego punktu widzenia oznacza miarę rozproszenia wyników wokół średniej. Przedstawia się ją w postaci równania:

$$\mu_2' = \frac{\int_0^{\infty} (t - \mu_1)^2 c(t) dt}{\int_0^{\infty} c(t) dt} \quad (1.3)$$

gdzie μ_2' oznacza drugi moment centralny. Odpowiada on wariancji piku chromatograficznego, oznacza się go jako σ^2 .

Z uwagi na statystyczny charakter rozkładów Gaussa, szerokość piku nie może się równać sumie poszczególnych odchyłeń standardowych σ , a jedynie wariancji piku, jako kwadratowi odchyłeń standardowych [50]. Wynika to w głównej mierze z losowego ruchu cząsteczek na skutek dyfuzji, która wymaga użycia bezwzględnej wartości wszystkich wektorów dyfundujących cząsteczek, a więc podniesienia wartości σ do kwadratu.

Analiza momentów pozwala na określenie ilościowe całkowitego rozmycia pików chromatograficznych.

1.4.2. Sumaryczne rozmycie piku chromatograficznego

Udział poszczególnych procesów w rozmyciu piku został omówiony w poprzednich rozdziałach. Sumarycznie, asymetria piku chromatograficznego, określana poprzez kwadrat odchylenia standardowego (σ_{SVV}^2), będzie zatem równa sumie wariancji dla każdego z etapów drogi elucji (σ_i^2), traktowanych jako niezależne. Wynika zatem z tego stwierdzenia równanie:

$$\sigma_{SVV}^2 = \sum \sigma_i^2 \quad (1.4)$$

Jest to ilościowy opis rozmycia profilu stężenia badanego związku, który przebywa pełną drogę elucji w zestawie chromatograficznym od pętli iniekcyjnej aż po celkę detektora. Na sumę określoną w równaniu (1.4) składać się będą wariancje poszczególnych etapów, dlatego też dalej zapisać można:

$$\sigma_{SVV}^2 = \sigma_{iniekcja}^2 + \sigma_{kapilary}^2 + \sigma_{ICV}^2 + \sigma_{złozę}^2 + \sigma_{detektor}^2 \quad (1.5)$$

gdzie $\sigma_{iniekcja}^2$ odpowiada rozmyciu piku pochodzącego z układu iniekcyjnego pętli dozującej, $\sigma_{kapilary}^2$ to udział pochodzący ze wszystkich kapilar łączących, najczęściej różnej średnicy, σ_{ICV}^2 odpowiada rozmyciu piku w osprzęcie kolumny, $\sigma_{złozę}^2$ wynika z przepływu przez złożę porowate kolumny wypełnionej, $\sigma_{detektor}^2$ to udział wynikający z przepływu przez celki detektorów, np. ultrafioletowego, konduktometrycznego lub innych [51]. Udział kapilar łączących, pętli iniekcyjnych oraz celek pomiarowych detektora w równaniu (1.5) można zsumować do postaci σ_{ECV}^2 , zatem sumaryczną wariancję można zapisać poprzez równanie:

$$\sigma_{SVV}^2 = \sigma_{ECV}^2 + \sigma_{ICV}^2 \quad (1.6)$$

Z równania (1.6) wynika, że przy ilościowym określaniu rozmycia piku chromatograficznego, bardzo istotnym jest uwzględnienie udziału każdego z elementów całego zestawu chromatograficznego.

1.5. Metody numeryczne w chromatografii cieczonej

W związku z tym, że cały proces chromatograficzny wymaga dogłębnego rozważenia wszystkich aspektów wspomnianych w poprzednich rozdziałach niniejszej rozprawy doktorskiej, należy wypracować odpowiednie modele predykcyjne, dzięki którym przebieg procesu chromatograficznego białek będzie możliwy do przewidzenia. Koniecznym jest zatem przygotowanie opisu procesu przy pomocy równań modelu matematycznego. Warto jednak na tym etapie przedstawić podstawy związane z metodami numerycznymi, w odniesieniu do ich wykorzystania w *CFD* oraz użyteczność tej techniki w udoskonalaniu metod separacji i oczyszczania białek farmaceutycznych poprzez chromatografię cieczową.

Dokładne rozwiązanie niektórych problemów matematycznych jest trudne z uwagi na ich duży stopień skomplikowania. Wręcz niemożliwe wydaje się być rozwiązanie analityczne zagadnienia, które składa się z kilkuset równań liniowych, dla kilkuset niewiadomych. Wówczas należy dążyć do rozwiązania przybliżonego, które w zależności od złożoności problemu, powinno być w miarę możliwości wystarczające. Do tego celu służą metody numeryczne, jako techniki, które pomagają w uzyskaniu przybliżonego rozwiązania trudnego problemu matematycznego [8,52]. Jednym z podejść do rozwiązania złożonych problemów matematycznych przy pomocy prostszych operacji arytmetycznych są obliczenia numeryczne [53]. Ogromna liczba algorytmów stosowanych w celu przeprowadzenia obliczeń arytmetycznych przekłada się na zapotrzebowanie na wydajne maszyny obliczeniowe. Postęp w rozwoju technologicznym sprawił, że gwałtownie poprawiła się funkcjonalność komputera, a co za tym idzie jego moc obliczeniowa [54]. Przyspieszyło i ułatwiło to w znaczący sposób możliwość prowadzenia obliczeń.

Analiza numeryczna bazuje na kilku istotnych czynnikach ją charakteryzujących. Należą do nich, m. in.:

- stabilność rozwiązania,
- zbieżność,
- dokładność,
- błędy numeryczne.

Niezawodność oraz wysoka wydajność rozwiązania numerycznego zagadnienia wynika ze stabilności obliczeń. Są to zatem jedne z ważniejszych cech analizy numerycznej. Drugim istotnym czynnikiem jest stabilność rozwiązania, która wynika z braku wpływu jakichkolwiek źródeł perturbacji na końcowy wynik obliczeń numerycznych [55]. Z kolei z dokładnością analizy numerycznej wiążą się nieodłącznie błędy, które na nią wpływają, pogarszając w ten sposób precyzyjność numerycznie uzyskanego wyniku końcowego. Przybliżone rozwiązanie jest obarczone błędem, wynikającym z różnicy pomiędzy dokładnym a przybliżonym wynikiem obliczeń. Z natury obliczeń numerycznych prowadzonych przez komputer powstają kolejne błędy tzw. błąd arytmetyczny oraz błąd matematyczny stanowiące błąd całkowity. Z racji tego, że cyfrowe urządzenia, takie jak komputer, mają ograniczoną pamięć, tylko przybliżona wartość może zostać w nim zapisana. Zamiast dokładnej wartości liczby, jej przybliżenie jest używane do dalszych obliczeń. Właśnie to powoduje zmniejszenie dokładności rezultatu obliczeń uzyskanego metodą numeryczną [56].

1.5.1. Metody rozwiązywania cząstkowych równań różniczkowych (*CRR*)

Równanie różniczkowe wiąże pochodne funkcji skalarnej w zależności od jednej lub więcej zmiennych [57]. Do pełnego opisu danego zagadnienia, stosuje się często układy równań różniczkowych, będących zbiorem jednego lub więcej równań, które odnoszą się do pochodnych jednej lub większej ilości funkcji. Jeśli w zestawie zmiennych, od których zależą funkcje, jest tylko jedna (zwana niezależną), wówczas ma się do czynienia ze zwyczajnymi równaniami różniczkowymi. Jednak w przypadku, gdy zmiennych niezależnych jest więcej, wówczas taki układ równań różniczkowych będzie nazywany cząstkowym (*CRR*). Równania te służą opisywaniu i modelowaniu podstawowych zjawisk fizycznych, takich jak np. dynamika płynów opisana przez naukowców Claude-Louisa Naviera oraz George'a Stokesa, którzy w XIX w. zaproponowali układ nieliniowych *CRR* będących fundamentalnymi w mechanice płynów [58]. Jednocześnie, są one bardzo trudne do rozwiązania, przede wszystkim analitycznego, ale także i numerycznego. Równania Naviera-Stokesa przedstawia się zwyczajowo w postaci układu równań, którego rozwiązanie analityczne, nawet przybliżone, stanowi ogromne wyzwanie dla naukowców zajmujących się zagadnieniami analizy numerycznej [59]. Istnieją jednak pewne metody, które pozwalają uzyskać takie rozwiązanie. Do tego celu służy metoda dyskretyzacji, która jest niczym innym jak przeniesieniem czasowej oraz przestrzennej struktury rzeczywistej do postaci numerycznej [60]. Dyskretyzacja z punktu widzenia matematycznego, polega na przekształcaniu funkcji ciągłej do funkcji dyskretnej. Wartości rozwiązania są wówczas obliczane w każdym miejscu zarówno w czasie, jak i przestrzeni [61]. W przestrzeni rozwiązań znajdują się punkty, które są od siebie fizycznie oddzielone. Wynika to z faktu podziału struktury geometrycznej na tzw. siatkę, złożoną z elementów składających się na przestrzeń rozwiązania. Do technik dyskretyzacji należą: Metoda Różnic Skończonych, Metoda Elementów Skończonych oraz Metoda Objętości Skończonych [62].

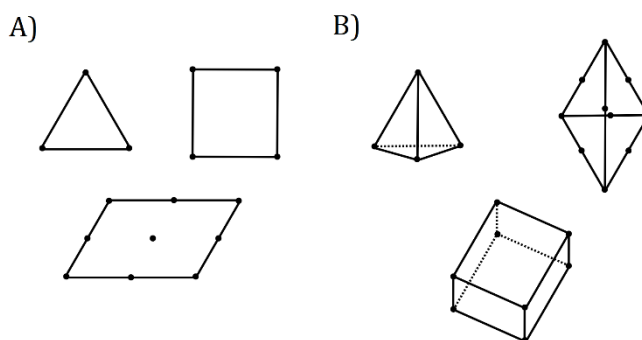
1.5.1.1. Metoda Różnic Skończonych (*MRS*)

MRS należy do stabilnych metod dających szybko zbieżność obliczeń oraz ich dużą dokładność. Jest stosunkowo prosta do rozwiązywania *CRR*, jednak najlepiej się sprawdza w przypadkach jednowymiarowych. Ideą *MRS* jest dyskretyzacja dziedziny ciągłej, dzięki czemu następuje przekształcenie różniczkowych równań do znacznie prostszych, algebraicznych równań liniowych, czyli tzw. równań różnic skończonych. W przypadku zmiennych zależnych, uwzględniane są one tylko w punktach dyskretnych [8,63]. Z uwagi na ograniczenia stosowania tej techniki dyskretyzacji do przypadków jednowymiarowych, metoda

ta nie daje możliwości obliczeń numerycznych uwzględniających rozkład pewnych wartości w kierunku nie tylko osiowym, ale także promieniowym.

1.5.1.2. Metoda Elementów Skończonych (*MES*)

MES służy do znajdowania przybliżonych rozwiązań równań algebraicznych, znacznie łatwiejszych do rozwiązania, dzięki technice dyskretyzacji opartej na podziale dziedziny na pewne segmenty zwane elementami skończonymi. Wówczas używane są funkcje ciągłe, ze stosowną ich wartością w każdym segmencie [8,64]. Elementy skończone dzielą model geometryczny na siatkę, która składać się może z fragmentów o różnych kształtach. Ich różnorodność przedstawiono na rys. 1.9. Wspomniane wcześniej funkcje ciągłe są nazywane także funkcjami kształtu, które służą do interpolacji wartości zmiennej w punkcie wewnętrznym elementu od jej wartości w określonych punktach kluczowych, tj. węzłach pojedynczego elementu skończonego [65]. Te punkty węzłowe łączą elementy skończone, a znajdują się w narożach oraz wzdłuż boków, a także na powierzchniach segmentów (rys. 1.9. A)) w przypadku dwuwymiarowych elementów takich jak trójkąt, kwadrat oraz równoległobok, a także elementy typowe dla przestrzeni trójwymiarowej jak czworościan czy prostopadłościan, a więc dla przypadków objętościowych (rys. 1.9 B)).



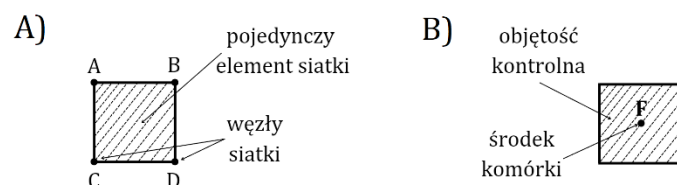
Rys. 1.9. Graficzna ilustracja elementów skończonych **A)** dwuwymiarowych, **B)** typowych dla przestrzeni trójwymiarowej. Opracowanie własne na podstawie [64].

Dzięki swojej dokładności i elastyczności, *MES* daje możliwość zastosowania w przypadku mniej jak i bardziej skomplikowanych geometrii, dlatego też znajduje swoje miejsce w przypadku różnych dziedzin nauki oraz inżynierii, w tym także w przypadku zagadnień związanych z dynamiką płynów. Podobnie jak w przypadku pozostałych metod stosowanych w analizie numerycznej, wymagane jest, aby spełnić kilka wymogów w celu znalezienia optymalnego rozwiązania. Należą do nich:

- poprawne zdefiniowanie problemu fizycznego, dającego rozwiązanie dzięki analizie numerycznej,
- właściwe określenie problemu, w tym: przyjęcie pewnych założeń, znalezienie równań rządzących panującymi zjawiskami oraz stosowanie pewnych uproszczeń,
- wykonanie stosownej dyskretyzacji,
- określenie warunków brzegowych w analizowanym przypadku,
- wybór odpowiednich parametrów numerycznych,
- poprawna analiza uzyskanych z analizy wyników [66].

1.5.1.3. Metoda Objętości Skończonych (*MOS*)

MOS jest metodą dyskretyzacji, która dobrze nadaje się do symulacji numerycznej różnych typów praw fizyki, dzięki czemu znajduje swoje zastosowanie w wielu dziedzinach, w tym także w przypadku mechaniki ośrodków ciągłych, tj. płynów. Niektóre z istotnych cech tej metody dyskretyzacji są podobne do tych w *MES*, np. zakres stosowalności dla różnych geometrii i sposób dyskretyzacji przy użyciu zarówno strukturalnych jak i niestructuralnych siatek. Jednak w wypadku tej metody pojawiają się dodatkowe cechy. Na przykład w odróżnieniu od *MRS*, *MOS* daje bardziej adekwatne rozwiązanie dla złożonych problemów numerycznych, ponieważ nie wymaga stosowania tylko prostej geometrii, ale może być stosowana dla dowolnych geometrii. Ponadto, ciągłość strumieni jest zachowana od jednej komórki dyskretyzacyjnej do sąsiedniej, a lokalne bilanse równowagowe strumieni są zapisywane w każdej z komórek. Stąd taka komórka jest często nazywana objętością kontrolną. Całkowe sformułowanie strumienia na granicy takiej objętości kontrolnej otrzymuje się przy pomocy rozbieżności między rozwiązaniem dokładnym a tym uzyskanym z *MOS*, przy czym strumienie są dyskretyzowane względem dyskretnych niewiadomych. W porównaniu do *MRS*, nieciągłość pewnych zmiennych nie stanowi problemu w rozwiązaniu numerycznym, o ile dobór siatki sprawi, że nieciągłość ta wystąpi na granicach objętości kontrolnej. Jest to niewątpliwie spora zaleta tej metody [67]. Różnica pomiędzy siatką uzyskaną poprzez *MOS* a *MES* została pokazana na rys. 1.10. Element uzyskany na drodze dyskretyzacji *MES* zapewnia rozwiązanie ciągle do danego punktu w węzłach A, B, C, D, zgodnie z rys. 1.10. A), podczas gdy *MOS* zapewnia rozwiązanie dyskretne, gdzie scałkowane *CRR* daje wartości uśrednionych zmiennych w całej objętości kontrolnej. Dyskretyzacja dziedziny obliczeniowej opiera się na tworzeniu skończonych objętości, dla których rozwiązywane są równania [68]. Pojedyncza objętość kontrolna wraz ze środkiem komórki, została pokazana na rys. 1.10. B)



Rys. 1.10. Ilustracja pojedynczego elementu siatki **A)** ustrukturyzowanej przez *MES*, **B)** komórki uzyskanej poprzez *MOS*. Opracowanie własne na podstawie [68]

1.5.2. Obliczeniowa Mechanika Płynów (*CFD*)

Do numerycznej symulacji przepływu płynu służy technika, która wspomagana komputerowo daje pełen obraz rzeczywistego zachowania się cieczy w badanej przestrzeni obliczeniowej. *CFD* opiera się na podstawowych prawach, wśród których wymienić można:

- drugą zasadę dynamiki Newtona,
- prawo zachowania energii,
- prawo zachowania masy,

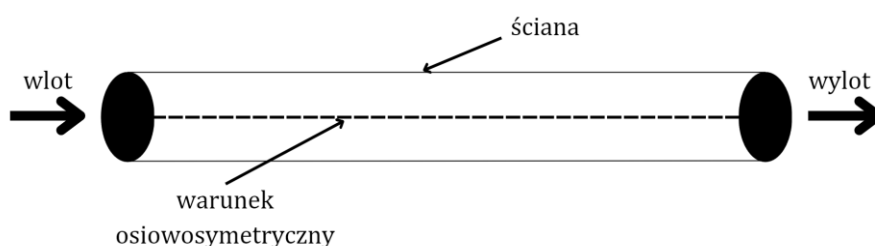
określające fizyczne aspekty dowolnego płynu. Matematyczne równania mają w głównej mierze postać omówionych we wcześniejszym podrozdziale *CRR*, które z powodzeniem opisują zachowanie płynu w dziedzinie przepływu [69]. *CFD* jest techniką, która spaja ze sobą aspekty związane z fizyką, matematyką (w tym matematyką stosowaną), a także informatyką, dzięki czemu służy modelowaniu, wizualizacji w formie graficznej, a ponadto przewidywaniu hydrodynamiki. Jest to zatem potężne narzędzie, pomocne dodatkowo w rozumieniu wszelkich prawideł związanych z ruchem cieczy [70]. Spójność opisanych dziedzin w ujęciu *CFD* została przedstawiona na rys. 1.11.



Rys. 1.11. Różne dyscypliny zawarte w ramach *CFD*. Opracowanie własne na podstawie [70]

Oprócz *stricto* numerycznego podejścia do kwestii dynamiki płynów, istnieją jeszcze dwa, tj. eksperymentalna oraz analityczna mechanika płynów. Wszystkie trzy są ze sobą silnie powiązane i wzajemnie się uzupełniają. Jednak wraz z rozwojem mocy obliczeniowej

komputerów wyraźny jest trend, który zmierza w kierunku większego polegania na podejściu obliczeniowym [71]. Pełne rozwiązanie numeryczne wymaga prowadzenia obliczeń, w oparciu o podstawowe prawa, przy podejściu wykorzystującym jedną z metod rozwiązywania *CRR*, np. *MOS*, dla zdyskretyzowanego modelu geometrycznego do postaci siatki. Oprócz tego, w przypadku skończonych dziedzin obliczeniowych bardzo ważne jest wyznaczenie ich granic. W ujęciu *CFD* nazywa się je warunkami brzegowymi (*WB*). Niezależnie od przypadku, dobrze sformułowany model numeryczny powinien mieć określone warunki brzegowe dla prędkości, temperatury, a także wszelkich innych zmiennych [72]. Przykład prawidłowo zastosowanych *WB* w przepływie przez prostą rurę pokazano na rys. 1.12.



Rys. 1.12. Przykład poprawnie zdefiniowanych warunków brzegowych w przepływie przez prostą rurę. Opracowanie własne na podstawie [72].

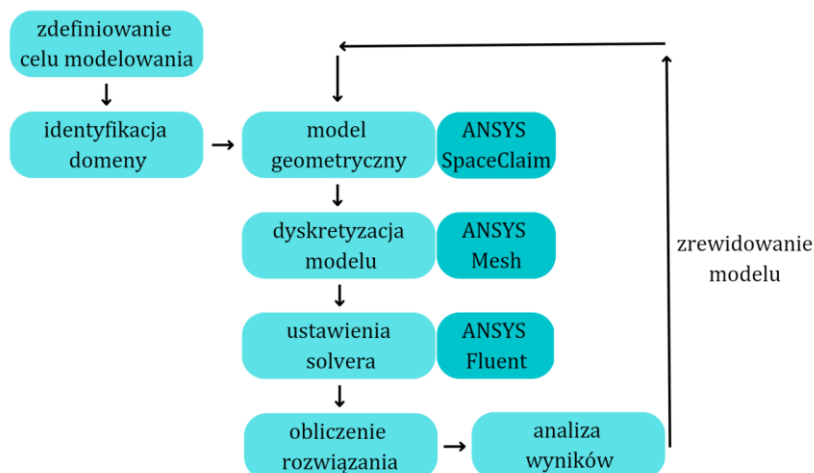
1.5.3. Oprogramowanie firmy ANSYS

We współczesnych obliczeniach komputerowych stosuje się różne komercyjne oprogramowania ogólnego przeznaczenia do symulacji przepływu płynów oraz wymiany ciepła i masy. Powszechność ich stosowania wynika z tego, że pozwalają na obliczenia numeryczne w bardzo szeroko pojętym przemyśle, firmach inżynierskich, a także w badaniach naukowych [73]. Stosowane są takie programy jak:

- *Converge*,
- *Star CCM+*,
- *Open-Foam*,
- *ABAQUS*,
- *ANSYS*.

Ostatni z wymienionych, *ANSYS*, jest komercyjnym programem służącym w pełni funkcjonalnie do rozwiązywania zagadnień związanych z dynamiką płynów oraz innych, powiązanych z przepływem zjawisk fizycznych. Oprogramowanie to zapewnia szereg narzędzi, które są niezbędne do kompletnej analizy numerycznej według odpowiedniej kolejności. Właśnie ten program został wykorzystany do badań numerycznych hydrodynamiki w zestawie chromatograficznym, z uwagi na jego ogromne możliwości.

Pakiet firmy *ANSYS*, przygotowany do zagadnień związanych z przepływem płynów, pozwala na symulacje według schematu zaprezentowanego na rys. 1.13.



Rys. 1.13. Schemat prezentujący kolejne kroki prowadzące do kompletnej analizy numerycznej. Opracowanie własne na podstawie [74].

Solvery obliczeniowe programu są solidne i wydajne, dzięki czemu zapewniona jest nie tylko duża dokładność, ale i szybkość uzyskania rozwiązania numerycznego [75]. Bazują one na dyskretyzacji w oparciu o *MES* lub *MOS*. Ogólne równania zachowania masy, pędu, energii oraz innych, są rozwiązywane w zestawie objętości kontrolnych, poprzez dyskretyzację *CRR* do układu równań algebraicznych. Te ostatnie są następnie rozwiązywane numerycznie, dzięki czemu możliwe jest graficzne przedstawienie obszaru rozwiązania [76]. Ogółem, *ANSYS Fluent* pozwala na połączenie szerokiego zakresu modeli matematycznych zjawisk transportowych z modelowaniem złożonych geometrii.

1.5.4. Wykorzystanie *CFD* w badaniach nad chromatografią cieczową białek

Symulacje komputerowe stają się coraz bardziej cenne jako narzędzie, mogące służyć projektowaniu, optymalizacji, a także przenoszeniu skali procesu chromatograficznego [77]. Korzyści wynikające ze stosowania *CFD* dotyczą przede wszystkim możliwości głębszego zrozumienia badanego procesu, z wyszczególnieniem tych prawidłowości, których nie da się w prosty sposób zmierzyć ani ocenić na podstawie wyłącznie eksperymentalnej. Kolejną zaletą jest fakt, że możliwe jest przeprowadzenie symulacji przy uwzględnieniu trójwymiarowej geometrii układu chromatograficznego, co pozwala uniknąć ograniczenia się wyłącznie do stosowania uproszczonych korelacji, które działają zazwyczaj wyłącznie w wąskim zakresie ich stosowalności.

Coraz większa liczba publikacji na ten temat daje dowód na to, że idea wykorzystania technik numerycznych w przypadku chromatografii ma sens, a także kluczowe znaczenie przy interpretacji nie tylko uzyskiwanych chromatograficznych profili stężenia, ale też przy ocenie

hydrodynamiki w obrębie poszczególnych części zestawu badawczego [78-82]. Trendy w literaturze dotyczące *CFD* wyraźnie pokazują, że zainteresowanie tą tematyką stale rośnie, co dowodzi ważności wykorzystania metod numerycznych w badaniach nad poprawą skuteczności rozdzielania białek, a przede wszystkim ich oczyszczania do celów terapeutycznych [44-45, 83-85]. Ponadto służą ocenie parametrów związanych z przepływem cieczy poprzez złożę porowate kolumny chromatograficznej i pozwalają na zrozumienie wpływu charakterystycznych parametrów uzyskanych numerycznie na przebieg procesu. Rozwiązywane modele numeryczne dodatkowo pozwalają na dołączenie do standardowych równań rozwiązywanych przez solver obliczeniowy własnych członów źródłowych, poprzez funkcje zdefiniowane przez użytkownika (ang. *UDF*). W związku z tym, z powodzeniem możliwe jest poszerzenie *CRR* rozwiązywanych przez program *ANSYS Fluent* o modele dynamiczne kolumny chromatograficznej, a także o równania z uwzględnieniem zjawiska palcowania lepkościowego [83-89].

1.6. Równania modeli numerycznych zestawów chromatograficznych

Jak wspomniano powyżej, program *ANSYS* umożliwia rozwiązywanie równań Naviera-Stokesa poprzez dyskretyzację. W niniejszej pracy doktorskiej równania zostały użyte do opisu hydrodynamiki w *ECV* i *ICV* oraz w porowatym złożu chromatograficznym.

1.6.1. Równania zastosowane w modelu *ECV*

W strefie *ECV* określono równania zachowania pędu oraz masy, które są słuszne dla cieczy nieściśliwych. Równanie zachowania pędu przedstawia równanie:

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho \vec{w}) + \nabla \cdot (\rho \vec{w} \vec{w}) = -\nabla p + \nabla \cdot \vec{\tau} + \rho \vec{g} \quad (1.7)$$

w którym \vec{w} to prędkość liniowa płynu, p oznacza ciśnienie, \vec{g} stanowi przyspieszenie grawitacyjne, natomiast $\vec{\tau}$ jest tensorem naprężenia, które określa równanie:

$$\vec{\tau} = \eta \left[(\nabla \vec{w} + \nabla \vec{w}^T) - \frac{2}{3} \nabla \vec{w} I \right] \quad (1.8)$$

gdzie η oznacza lepkość dynamiczną płynu, natomiast I jest tensorem jednostkowym.

Równanie (1.7) uzupełnia równanie zachowania masy, które opisuje równanie:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \vec{w}) = 0 \quad (1.9)$$

oraz równanie, które stanowi bilans masy składników płynu:

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho x_i) + \nabla \cdot (\rho \vec{w} x_i) = -\nabla J_i \quad (1.10)$$

w którym x_i to ułamek masowy dla i -tego składnika, zaś J_i opisano powyżej w równaniu 1.1.

$$J_i = -\rho D_{i,m} \nabla x_i$$

Lepkość wodnego roztworu glicerolu $\eta_{Gly,m}$ opisano równaniem [92]:

$$\eta_{Gly,m} = \eta_{Gly} \exp(A \alpha) \quad (1.11)$$

do którego obliczenia niezbędne było rozwiązanie następujących kolejno po sobie równań od 1.12 do 1.17:

$$A = \ln \frac{\eta_{H_2O}}{\eta_{Gly}} \quad (1.12)$$

gdzie η_{H_2O} oznacza lepkość wody, zaś η_{Gly} lepkość glicerolu.

$$\alpha = \ln \left(\frac{\eta_{Gly,m}}{\eta_{Gly}} \right) / A = 1 - x_{Gly} + \frac{a b x_{Gly} (1-x_{Gly})}{a x_{Gly} + b (1-x_{Gly})} \quad (1.13)$$

$$a = 0,705 - 0,0017 T \quad (1.14)$$

$$b = (4.9 + 0.36 T) a^{2.5} \quad (1.15)$$

$$\eta_{H_2O} = 1.79 \exp \left(\frac{(-1230-T) T}{36100+360 T} \right) \quad (1.16)$$

$$\eta_{Gly} = 12000 \exp \left(\frac{(-1233+T) T}{9900+70 T} \right) \quad (1.17)$$

gdzie T wyraża temperaturę.

Gęstość roztworu glicerolu $\rho_{Gly,m}$ została określona na podstawie równania [93]:

$$\rho_{Gly,m} = \sum_i x_i \rho_i \quad (1.18)$$

w którym i oznacza zarówno wodę, jak i glicerol.

1.6.2. Równania zastosowane w złożu porowatym kolumny chromatograficznej

W złożu porowatym oraz we frytach, równanie zachowania pędu zostało wyrażone w następujący sposób:

$$\frac{\partial}{\partial t} (\varepsilon_e \rho \vec{w}) + \nabla (\varepsilon_e \rho \vec{w} \vec{w}) = -\varepsilon_e \nabla p + \nabla (\varepsilon_e \vec{\tau}) + \varepsilon_e \rho \vec{g} + \vec{F} \quad (1.19)$$

gdzie \vec{w} oznacza prędkość powierzchniową w złożu porowatym, $\vec{\tau}$ jest wyrażone równaniem (1.8), ε_e to porowatość zewnętrzna złoża, natomiast \vec{F} stanowi dodatkowy człon źródłowy określający lepkościowe i bezwładnościowe straty w ośrodku porowatym. Człon ten opisany został poprzez równanie:

$$\vec{F} = - \left(\frac{\varepsilon_e^2 \eta}{K} + \frac{\varepsilon_e^3 C_2 \rho |\vec{w}|}{2} \right) \vec{w} \quad (1.20)$$

w którym C_2 stanowi współczynnik oporu bezwładności, zaś K to przepuszczalność, do policzenia której w jednorodnym ośrodku porowatym wykorzystano równanie Carmana-Kozeny:

$$K = \frac{\varepsilon_e^3 d_p^2}{150 (1 - \varepsilon_e)^2} \quad (1.21)$$

w którym d_p oznacza wielkość cząstek złoża. Wartość C_2 w równaniu (1.20) dla laminarnego charakteru przepływu jest równa 0.

Równanie zachowania masy w złożu porowatym zostało wyznaczone w następujący sposób:

$$\frac{\partial(\varepsilon_t \rho)}{\partial t} + \nabla(\rho \vec{w}) = 0 \quad (1.22)$$

będące jednocześnie połączone z równaniem zachowania masy:

$$\frac{\partial}{\partial t}(\varepsilon_t \rho x_i) + \nabla \cdot (\rho \vec{w} x_i) = -\nabla J_i \quad (1.23)$$

Strumień dyfuzji cząstek w złożu porowatym, J_i , został wyrażony w równaniu:

$$J_i = -\varepsilon_e \rho D_{i,Leff} \nabla x_i \quad (1.24)$$

gdzie ε_t oznacza porowatość całkowitą, natomiast $D_{i,Leff}$ jest efektywnym współczynnikiem dyspersji.

Porowatość zewnętrzna oraz całkowita, są skorelowane między sobą poprzez równanie:

$$\varepsilon_t = \varepsilon_e + (1 - \varepsilon_e)\varepsilon_p \quad (1.25)$$

gdzie ε_p oznacza porowatość wewnętrzną ziarna.

1.6.3. Parametry modelu

1.6.3.1. Wyznaczanie współczynnika dyfuzji molekularnej

Przedmiotem badań były wodne roztwory białka, acetonu i glicerolu (substancje do elucji) oraz ich mieszaniny w fazie ruchomej (eluent). Ponieważ stężenie związków białka i acetonu było niskie, ich współczynniki dyfuzji, gęstość oraz lepkość były ustalone niezależnie od składu.

Współczynnik dyfuzji acetonu wzięto z chemicznej bazy danych GSC:

$$D_{acet,m} = 1.1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$$

Współczynnik dyfuzji białka $D_{B,m}$ obliczono na podstawie korelacji, proponowanej przez Tyna oraz Guska w równaniu [90]:

$$\frac{D_{B,m} \eta}{T} = \frac{9.2 \cdot 10^{-12}}{M^{0.333}} \quad (1.26)$$

gdzie M oznacza masę cząsteczkową białka.

W przypadku wyznaczenia wpływu lepkości na przebieg elucji białka, aby określić współczynnik dyfuzji roztworu glicerolu $D_{Gly,m}$, zastosowano równanie [91]:

$$D_{Gly,m} \times 10^9 = \frac{1.024 - 0.91 x_{Gly}}{1 + 7.5 x_{Gly}} \quad (1.27)$$

1.6.3.2. Wyznaczanie efektywnego współczynnika dyspersji

Efektywny współczynnik dyspersji, $D_{i,Leff}$, wyrażony jest równaniem [86]:

$$D_{i,Leff} = y_1 D_{i,m} + y_2 d_p \frac{w}{\varepsilon_e} = y_1 D_{i,m} + D_{i,L} \quad (1.28)$$

gdzie y_1 oraz y_2 oznaczają empiryczne współczynniki, przyjmujące standardowo wartości $y_1 = 0.7$ i $y_2 = 0.5$, $D_{i,m}$ stanowi współczynnik dyfuzji molekularnej, zaś $D_{i,L}$ określa

dyspersję hydrodynamiczną [43]. Z równania (1.28) wynika, że efektywny współczynnik dyspersji opisują dwa człony, z których pierwszy wyraża udział dyfuzji molekularnej, natomiast drugi odpowiada za dyspersję hydrodynamiczną. Wartość drugiego członu można wyznaczyć z korelacji liczby Pecleta, która wyraża się równaniem [94]:

$$Pe = \frac{w d_p}{D_{i,L} \varepsilon_e} = 0.2 + 0.011Re^{0.48} \quad (1.29)$$

w którym Re oznacza liczbę Reynoldsa:

$$Re = \frac{w \rho d_p}{\eta} \quad (1.30)$$

Z połączenia równań (1.29) oraz (1.30) otrzymano równanie opisujące wartość współczynnika dyspersji hydrodynamicznej:

$$D_{i,L} = \frac{w d_p}{Pe \varepsilon_e} \quad (1.31)$$

Dla typowych wartości prędkości osiowej, które stosuje się w przypadku kolumn chromatograficznych, pierwszy człon równania (1.28) wyrażający współczynnik dyfuzji molekularnej białek jest pomijalnie mały, dlatego też w przypadku białek dyspersja w złożu porowatym jest zdominowana przez człon $D_{i,L}$. Jednak współczynnik dyfuzji molekularnej białek $D_{i,m}$ przyjmuje bardzo małe wartości, zatem pierwszy człon równania (1.28) jest aktywny tylko wtedy, gdy wartość prędkości jest bardzo mała, ponieważ wówczas wartość drugiego członu równania (1.28) dąży do zera.

1.6.4. Problem badawczy będący przedmiotem pracy

Jak wspomniano powyżej, we wstępnym etapie projektowania procesu chromatograficznego białek stosuje się kolumny o małej objętości. W tym przypadku udział SVV jest duży w stosunku do objętości samej kolumny. Dlatego też warunki hydrodynamiczne w SVV mają istotny wpływ na przebieg elucji w układzie chromatograficznym [24-25, 83-85]. Opisane zjawiska rozmycia i deformacji profilu stężenia wpływają na sprawność rozdzielania. Wyznaczenie parametrów pracy kolumny bez uwzględnienia wpływu SVV prowadzi do błędów w interpretacji procesu rozdzielania i niepowodzeń w przenoszeniu skali. Badania te są potrzebne i kluczowe z uwagi na powszechność stosowania chromatografii cieczonej w oczyszczaniu biofarmaceutyków oraz na ogromne znaczenie białek w przemyśle farmaceutycznym, co zostało omówione w poprzednich rozdziałach części teoretycznej [95-96].

W niniejszej pracy skupiono się nie tylko na opisie hydrodynamiki drogi elucji zestawu chromatograficznego, ale analizowano także zaburzenia przepływu płynu w złożu kolumny chromatograficznej wywołane różnicą lepkości badanych roztworów.

Nowością w pracy jest wykonanie symulacji numerycznych dla całej drogi elucji zestawu chromatograficznego i porównanie uzyskanych wyników z danymi doświadczalnymi. Ponadto nowością jest analiza wpływu dyspersji w złożu porowatym z uwzględnieniem anizotropii współczynnika dyspersji przy jednoczesnym uwzględnieniu wpływu lepkości płynu.

2. CZĘŚĆ BADAWCZA

2.1. Badania eksperymentalne

2.1.1. Zastosowane materiały

Do eksperymentów prowadzonych w zestawie chromatograficznym wykorzystano związki modelowe, które zostały zaprezentowane w tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Związki modelowe wykorzystane do badań eksperymentalnych

Nazwa związku modelowego	Masa molowa Da	Czystość %	Dostawca
Aceton	58,8	≥ 99,8	Sigma-Aldrich, Poznań, Polska
Albumina surowicy bydlęcej (BSA)	6650	≥ 96	Sigma-Aldrich, Poznań, Polska
Immunoglobulina typu G (mAb2)	148000	≥ 96	Polpharma Biologics, Gdańsk, Polska
Glicerol	92,1	≥ 99	Sigma-Aldrich, Poznań, Polska

Aceton reprezentował związek małowcząsteczkowy, glicerol - związek o dużej lepkości. BSA oraz mAb2 reprezentowały makrocząsteczki białek. Do wypełnienia kolumny zastosowano złożo kationowymienne POROSTM XS o średnicy cząstek 50 μm, które jest często wykorzystywanym w chromatografii białek. Do analizy frakcji użyto kolumny analitycznej SEC-HPLC MAbPac SEC 1 (Thermo Fisher Scientific) o I.D. 4 mm i długości 300 mm. Wielkość cząstek złoża wynosiła 5 μm.

2.1.2. Aparatura i sprzęt badawczy

Aparaturę zastosowaną do badań przedstawiono na rys. 2.1. Do badania elucji chromatograficznej użyto chromatografu cieczowego Äkta purifier, wyposażonego w detektory: konduktometryczny i UV oraz stację danych (Cytiva, Uppsala, Szwecja). Analiza SEC-HPLC została przeprowadzona przy wykorzystaniu aparatu DIONEX UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, USA).

A**B**

Rys. 2.1. Ilustracja zestawów chromatograficznych użytych do badań **A)** Chromatograf cieczowy Äkta Purifier. **B)** Chromatograf do SEC firmy Thermo Fisher Scientific. Opracowanie własne






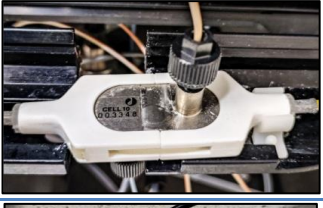

2.1.3. Zestaw chromatograficzny ECV

Zestaw badawczy ECV składał się z następujących elementów:

- układu iniekcyjnego, stanowiącego początek drogi elucji, składającego się z wielodrożnego zaworu iniekcyjnego oraz pętli iniekcyjnych o różnej objętości i średnicy wewnętrznej, w tym *superloop*,
- różnej długości i średnicy wewnętrznej kapilar łączących,
- celki detektora stanowiącego koniec drogi elucji.

Szczegóły dotyczące geometrii poszczególnych elementów stosowanych w zestawie ECV przedstawiono w tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Szczegółowe informacje dotyczące geometrii elementów stosowanych w zestawie badawczym ECV

Nazwa elementu układu ECV	Objętość mL	Średnica wewnętrzna (I.D.) mm	Długość mm	Fotografia przedstawiająca element
Pętle iniekcyjne	0.01	0.25	204	
	0.5	0.75	1131	
	1.0	0.75	2264	
	10 (<i>superloop</i>)	30	14	
Kapilary łączące	0.019 0.024 0.25	0.5	100 120 1273	
Kapilara w zaworze wielodrogowym	0.007	0.8	14	-
Celka detektora UV	0.013	1.0	16	
Celka detektora kondukcyjnego	0.014	1.0	18	

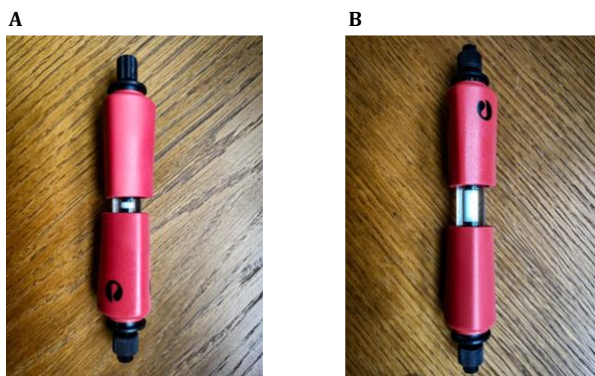
Jeden z zestawów chromatograficznych zastosowanych do badań hydrodynamiki ECV z zaznaczonymi elementami drogi elucji zaprezentowano na rys. 2.2. Na fotografii przedstawiono układ, który stanowiła: pętla dozująca 0.01 mL wraz z zaworem wielodrogowym, kapilary łączące oraz celka pomiarowa detektora UV.



Rys. 2.2. Zestaw eksperymentalny ECV z opisanymi elementami drogi elucji

2.1.4. Zestaw z zamontowaną kolumną chromatograficzną

W przedstawiony na rys. 2.2. zestaw chromatograficzny zamontowano kolumnę chromatograficzną Tricorn (I.D. 5 mm, Cytiva). Ponadto w tym wypadku droga elucji została uzupełniona o dodatkowe kapilary łączące kolumnę z zaworem wielodrogowym układu iniecyjnego oraz z detektorami. W przypadku badań z udziałem lepkich roztworów glicerolu wykorzystano dodatkowo detektor konduktometryczny wraz z prowadzącą do niego kapilarą z detektora UV. Szczegóły dotyczące elementów zestawu z zamontowaną kolumną chromatograficzną przedstawiono w tabeli 2.3. Kolumnę Tricorn bez wypełnienia pokazano na rys. 2.3. A), zaś tą samą kolumnę wraz ze złożem chromatograficznym POROSTMXS pokazano na rys. 2.3. B). Przykładową drogę elucji z zamontowaną kolumną Tricorn bez wypełnienia złożem pokazano na rys. 2.4.



Rys. 2.3. Ilustracja kolumny chromatograficznej użytej do badań. **A)** Kolumna Tricorn bez wypełnienia; **B)** Kolumna Tricorn upakowana złożem POROS XS

Tabela 2.3. Szczegółowe informacje dotyczące wymiarów elementów stosowanych w zestawie z kolumną chromatograficzną.

Nazwa elementu	Objętość elementu mL	Średnica wewnętrzna elementu (I.D.) mm	Długość elementu mm
Kapilara łącząca zawór z kolumną	0.019	0.5	100
Kapilara łącząca kolumnę z celką detektora UV	0.024	0.5	120
Kapilara łącząca celkę detektora UV z celką detektora konduktometrycznego	0.0079	0.25	161



Rys. 2.4. Droga elucji w zestawie chromatograficznym z zamontowaną kolumną

2.1.5. Analiza frakcji metodą *SEC-HPLC*

Do ilościowej analizy profili stężenia mAb2 w mieszaninie z glicerolem frakcjonowano po 1 mL wyjściowy profil stężenia, a zebrane frakcje poddano analizie *SEC-HPLC*. Wartość stężenia mAb2 obliczano z powierzchni pod pikiem mAb2 przeliczonych na jednostki stężenia poprzez wykonaną krzywą wzorcową.

Analiza *SEC-HPLC* została przeprowadzona przy zastosowaniu buforu fosforanowego o pH = 6.8 z dodatkiem 0.3 M NaCl. Natężenie przepływu wynosiło $Q = 0.2 \text{ mL min}^{-1}$.

2.1.6. Procedury i warunki prowadzenia procesu

2.1.6.1. Pakowanie kolumny chromatograficznej złożem

50% zawiesinę żywicy kationowymiennej POROS™ XS przeniesiono do kolumny Tricorn, pozostawiono do sedymentacji i kilkakrotnie przepłukano, aby zapobiec jej wysychaniu. Złoże następnie skonsolidowano poprzez przepompowanie przez kolumnę 1 M roztworu NaCl w buforze fosforanowym, przy kontrolowanym maksymalnym natężeniu przepływu, tj. $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$. Położenie adaptera dostosowano do wysokości złoża, tj. aż do momentu, gdy nie było dalszej możliwości jego ściśnięcia. Wysokość złoża po skompresowaniu wynosiła ok. 11 mm lub 55 mm.

2.1.6.2. Elucje w układzie chromatograficznym

Poszczególne związki modelowe oraz ich mieszaniny zostały przygotowane poprzez rozpuszczenie ich w fazie ruchomej, którą stosowano do elucji, tj. w buforze fosforanowym o $\text{pH} = 7$ i 1 M NaCl (w przypadku badań *ECV*) oraz w tym samym buforze, ale o $\text{pH} = 8.5$ (w badaniach z zamontowaną kolumną upakowaną złożem). W tych ostatnich warunkach zarówno mAb2 jak i glicerol nie adsorbowały się w złożu. Szczegółowe informacje dotyczące próbek przygotowanych do badań i warunków elucji zaprezentowano w tabeli 2.4. Iniekcja próbek do kolumny chromatograficznej przebiegała przy użyciu pętli dozujących o objętościach 0.01, 0.5 i 1 mL lub *superloop*. Natężenie przepływu fazy ruchomej zmieniano w zakresie od $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$ do 1 mL min^{-1} . Profile eluowanych próbek acetonu, mAb2 i BSA rejestrowano za pomocą detektora UV, przy długości fali wynoszącej 280 nm. Profile elucji próbek glicerolu rejestrowano przy pomocy detektora konduktometrycznego. Uzyskane profile zostały przeliczone na jednostki stężenia, stosując w tym celu krzywe kalibracji detektora.

Tabela 2.4. Informacje dotyczące składu próbek, warunków elucji i detekcji stosowanych w eksperymentach elucyjnych.

Związek	Stężenie	Bufor	Detekcja	Objętościowe natężenie przepływu
Aceton	1% w/w	Fosforanowy $\text{pH} = 7$ z 1 M NaCl	UV przy 280 nm	0.1 mL min ⁻¹ oraz 1 mL min ⁻¹
BSA	1 lub 2 mg mL ⁻¹			
mAB2	0.7; 1; 1.4 lub 2 mg mL ⁻¹	Fosforanowy $\text{pH} = 7$ z 1 M NaCl lub fosforanowy $\text{pH} = 8.5$ z 1 M NaCl		
Glicerol (Gly)	20%, 40% lub 60% w/w	Fosforanowy $\text{pH} = 8.5$ z 1 M NaCl	konduktometryczna	

2.1.6.3. Wyznaczanie porowatości fryt oraz złoża w kolumnie

Do zestawu chromatograficznego z kolumną o zerowej długości, tj. bez złoża, a z zamontowanymi frytami (rys. 2.6. B)) wprowadzano próbkę roztworu mAb2. Rozwiązanie modelu *CFD* (rozdz. 2.2.1.2) dopasowywano do doświadczalnego profilu stężenia poprzez zmianę porowatości. Wyznaczona w ten sposób porowatość fryt wyniosła $\varepsilon_t = \varepsilon_e = 0.26$. Porowatość złoża POROS™ XS została określona analogicznie po wpięciu do zestawu kolumny zawierającej upakowane złoże (rys 2.6. C)). W przypadku mAb2, które ze względu na rozmiar cząstki nie wniknęło do wszystkich porów złoża, wartość ε_t wyniosła 0.55, zaś w przypadku glicerolu $\varepsilon_t = 0.75$. Porowatość cząstek złoża POROS™ XS zgodnie z danymi literaturowymi wynosiła $\varepsilon_p = 0.63$ [97], natomiast porowatość zewnętrzna, wyliczona na podstawie równania (1.25), była równa $\varepsilon_e = 0.32$.

2.2. Symulacje numeryczne

2.2.1. Opracowanie modeli numerycznych badanych zestawów chromatograficznych

Modele numeryczne zostały przygotowane w oparciu o dostępne w środowisku *ANSYS* oprogramowanie *CAD* do modelowania – *ANSYS SpaceClaim*.

2.2.1.1. Aproksymacja zestawu *ECV*

Schemat ideowy zestawu *ECV* zaprezentowano na rys. 2.5. Składał się on z następujących elementów:

- układu dozowania, w tym: pętli dozujących o różnej objętości (s_1 , s_2) lub *superloop* (s_3), kapilary w zaworze wielodrogowym (v),
- kapilar łączących (c_1 , c_2), stanowiących połączenie między układem dozującym próbkę, a celką pomiarową detektora UV (d).

Poszczególne elementy *ECV* aproksymowano za pomocą geometrii o różnym stopniu złożoności. Przygotowano w ten sposób cztery warianty geometrii. Pokazane na rys. 2.5. oznaczenia przedstawiają:

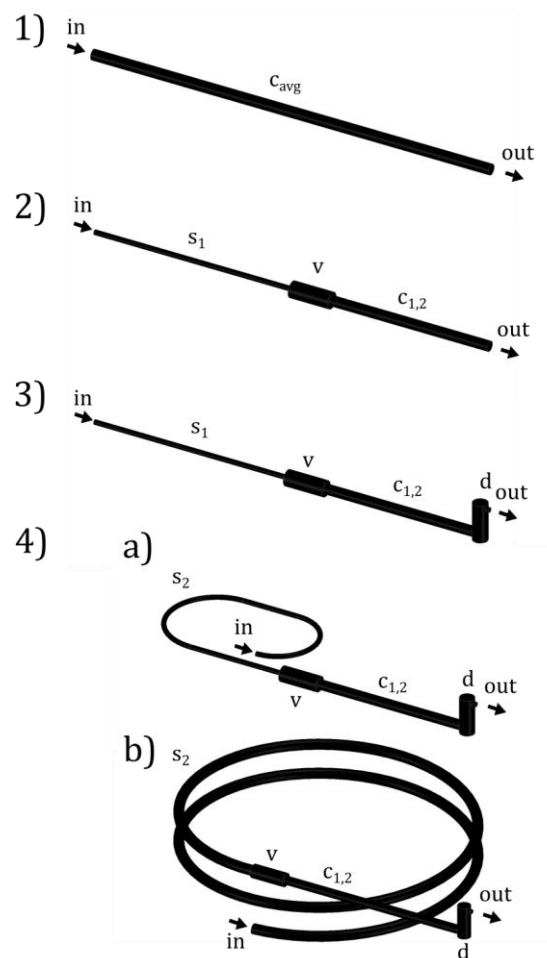
- s_1 – prosta kapilara iniekcyjna układu dozowania (w układach nr 1, 2, 3),
- s_2 – pętla uwzględniająca krzywiznę układu dozującego próbkę (układ nr 4 a) – pętla o małej objętości, układ 4 b) – pętla o dużej objętości),
- $c_{1,2}$ – krótkie lub długie kapilary łączące,
- d – celka pomiarowa detektora UV.

Układ 1 zawierał prostą, poziomą kapilarę o średnicy stanowiącej wartość uśrednioną ze wszystkich części geometrii (s , v , c , d) stanowiących *ECV* (geometria 2D: c_{avg}),

Układ 2 składał się z prostej kapilary w orientacji poziomej, o różnych średnicach, odpowiadających średnicom poszczególnych elementów *ECV*, tj. proste kapilary układu dozowania i kapilar łączących, bez uwzględnienia celki pomiarowej detektora UV (geometria 2D: $s_1vc_{1,2}$),

Układ 3 zawierał te same elementy jak w układzie 2, jednak z uwzględnieniem celki pomiarowej detektora UV, ukierunkowanej pionowo w stosunku do kierunku przepływu w kapilarze łączącej (geometria 3D: $s_1vc_{1,2}d$),

Układ 4 miał strukturę taką samą jak w przypadku układu nr 3, ale zawierał dodatkowo pętlę w układzie dozującym, zamiast prostej kapilary (geometria 3D: $s_2vc_{1,2}d$).



Rys. 2.5. Graficzna ilustracja różnych konfiguracji układów *ECV*. Opracowanie własne

Szczegółowe informacje dotyczące wymiarów poszczególnych konfiguracji zestawów *ECV* zostały zaprezentowane w tabeli 2.5.

Tabela 2.5. Wymiary różnych konfiguracji układów *ECV*

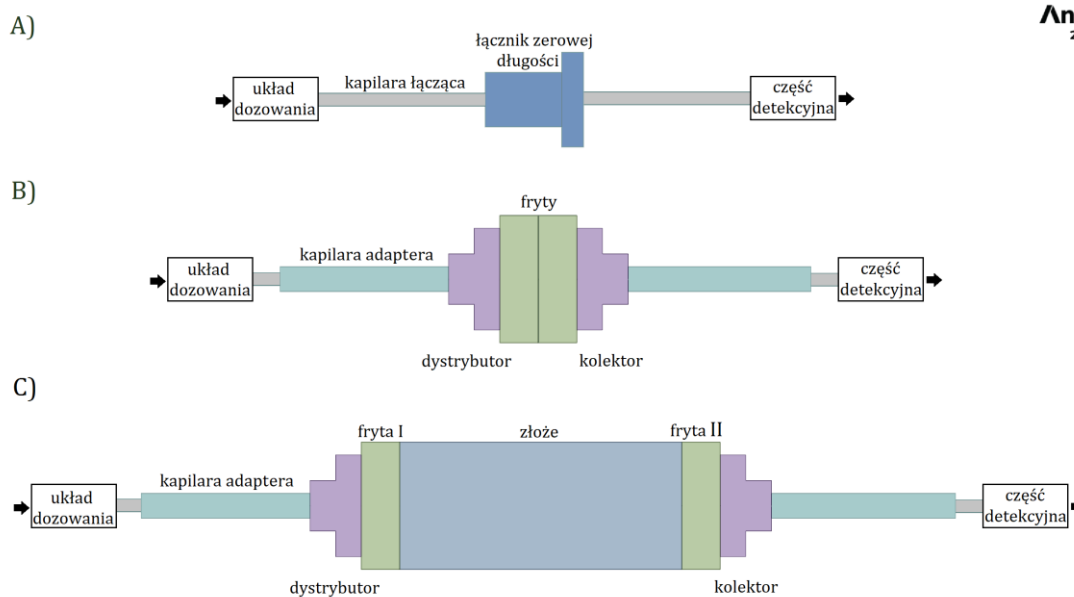
Wymiary poszczególnych elementów <i>ECV</i>	Prosta kapilara (s_1)	$V = 0.01$ mL (I.D. 0.25 mm, $L = 204$ mm) $V = 1$ mL (I.D. 0.75 mm, $L = 2264$ mm)			
	Pętla dozująca (s_2)	$V = 0.01$ mL (I.D. 0.25 mm, kapilara z dwoma łukami (180°) i trzema odcinkami prostymi o łącznej długości jak dla s_1 ; $V = 1$ mL (I.D. 0.75 mm, 16 zwojów (promień krzywizny 170 mm), całkowita długość jak w przypadku s_1)			
	Kapilara w zaworze wielodrogowym (v)	$V = 0.007$ mL (I.D. 0.8 mm, $L = 14$ mm)			
	Kapilary łączące (c)	Krótsza c_1 : $V = 0.019$ mL (I.D. 0.5 mm, $L = 100$ mm) Dłuższa c_2 : $V = 0.25$ mL (I.D. 0.5 mm, $L = 1273$ mm)			
	Celka pomiarowa detektora UV (d)	$V = 0.013$ mL (I.D. 1 mm, $L = 16.6$ mm)			
Model numeryczny		1	2	3	4
	C_{avg} 2D		s_1vc_1 , s_1vc_2 2D	s_1vc_1d , s_1vc_2d 3D	s_2vc_1d , s_2vc_2d 3D

Przedstawione wymiary odpowiadają elementom stanowiącym drogę elucji w zestawie eksperymentalnym *ECV*.

2.2.1.2. Geometria zestawu chromatograficznego

Geometrię zestawu chromatograficznego przybliżono za pomocą trzech różnych konfiguracji:

- A) bez kolumny, gdzie została ona zastąpiona łącznikiem o zerowej długości (rys. 2.6. A)). Model ten wykorzystano do analizy hydrodynamiki w *ECV*.
- B) z kolumną o zerowej długości, która nie zawierała wypełnienia w postaci złoża (rys. 2.6. B)). Konfigurację tą wykorzystano do zbadania wpływu *ICV* na rozmycie profilu stężenia.
- C) z kolumną chromatograficzną upakowaną złożem (rys. 2.6. C)) służący do określenia wpływu obecności złoża chromatograficznego na rozmycie profilu stężenia.



Rys. 2.6. Droga elucji układu chromatograficznego: **A)** z łącznikiem o zerowej długości, **B)** z kolumną o zerowej długości, **C)** z kolumną zawierającą upakowane złożo

Wymiary poszczególnych elementów SVV zaprezentowano w tabeli 2.6.

Tabela 2.6. Wymiary elementów zestawu SVV.

Nazwa elementu	Objętość elementu mL	Średnica wewnętrzna elementu (I.D.) mm	Długość elementu mm
Łącznik o zerowej długości	0.0014	0.6	5
Kapilara adaptera kolumny	0.031	1.0	40
Dystrybutor i kolektor	0.0031 0.013	2.0 4.0	1.0
Fryta I i II	0.029	2.5	1.5

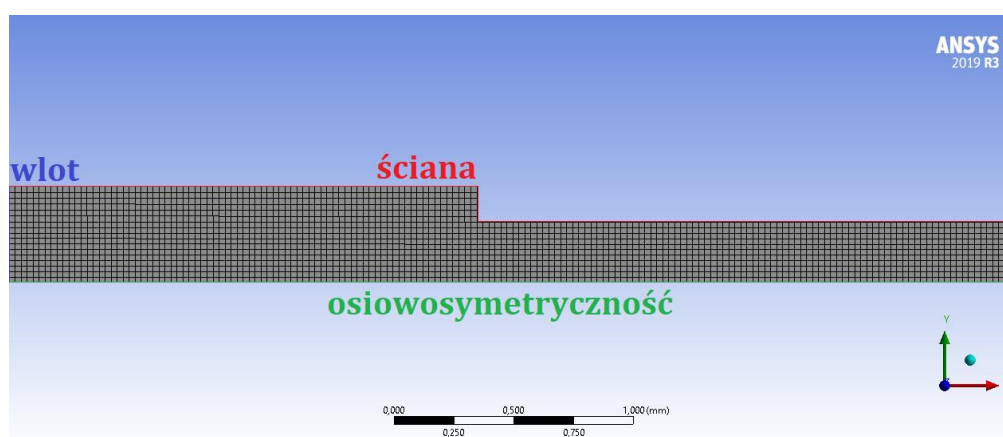
2.2.2. Dyskretyzacja modelu geometrycznego

Dyskretyzacja domeny obliczeniowej została przygotowana w oparciu o oprogramowanie dostępne w środowisku ANSYS – ANSYS Meshing.

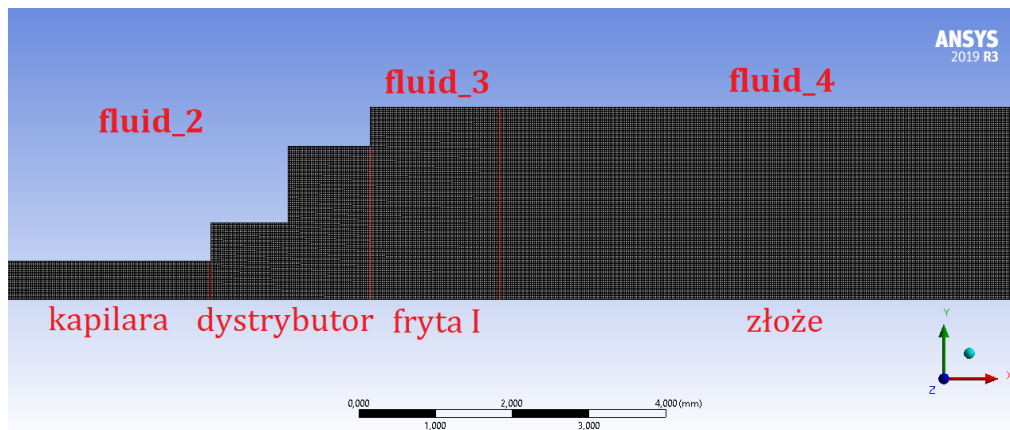
2.2.2.1. Domena obliczeniowa 2D

W przypadku prostych modeli 2D możliwe było wykorzystanie modelu geometrii osiowosymetrycznej, który w znaczący sposób ułatwił dyskretyzację domeny. Do budowy siatki zastosowano metodę *MultiZone*, która zapewnia automatyczną dekompozycję geometrii na regiony ustrukturyzowane. W celu zagęszczenia strefy przyściennej, wykorzystano funkcje *Sizing* oraz *Bias*. Wartość *Element Size* w ustawieniach globalnych siatki dobrano tak, aby wraz z odpowiednią wartością *Sizing* utrzymywać *Aspect Ratio* na poziomie ≤ 5 oraz minimalną wartość *Orthogonal Quality* ≥ 0.2 , która służyła jakościowej ocenie siatki. Dla siatek 2D

wartość tego kryterium była równa 1. Liczba elementów siatki zależała od wielkości modelu geometrycznego, jednak nie przekraczała wartości 600 000. W badaniach *ECV* domena obliczeniowa została podzielona na dwie części: *fluid_1*, odpowiadająca kapilarze lub pętli iniekcyjnej oraz *fluid_2* jako pozostała część drogi elucji zestawu chromatograficznego. Miało to na celu ułatwienie dopasowania domeny do części, w której znajdowała się próbka oraz pozostałej, wypełnionej fazą ruchomą. W badaniach z udziałem kolumny chromatograficznej wydzielono dodatkowe dwie domeny: *fluid_3*, odpowiadające frytom oraz *fluid_4*, czyli domena stanowiąca złożę porowate kolumny. Dzięki temu możliwe było dostosowanie parametrów dla każdej przestrzeni całego układu. Przykład dwuwymiarowej siatki numerycznej w miejscu połączenia kapilar wraz z zastosowanymi warunkami brzegowymi pokazano na rys. 2.7. Rozmiar siatki numerycznej był na tyle mały, aby nie wpływał na rozwiązanie modelu. Błąd numeryczny kontrolowano poprzez odpowiedni dobór liczby elementów siatki w kierunku promieniowym i osiowym, tj. siatkę dobrano tak, aby kształt profili stężeń wyjściowych z układu był niezależny od jego wielkości a bilans masowy był zachowany z błędem mniejszym niż 1% w stosunku do masy wprowadzonej do układu. Otrzymana wielkość siatki wahała się w zakresie 0.01–0.1 mm w kierunku osiowym i 0.05–0.005 mm w kierunku promieniowym, w zależności od stosowanego modelu. Najmniejszą siatkę promieniową zastosowano w pobliżu ściany kapilary oraz w miejscach łączenia kapilar o różnych średnicach, z uwagi na wstępujące w tych rejonach duże gradienty prędkości i stężeń. Siatkę 2D fragmentu zestawu z kolumną chromatograficzną upakowaną złożem wraz z wyszczególnionymi obszarami domen obliczeniowych pokazano na rys. 2.8.



Rys. 2.7. Zdyskretyzowany model 2D z opisanymi warunkami brzegowymi, widok w miejscu połączenia kapilar.

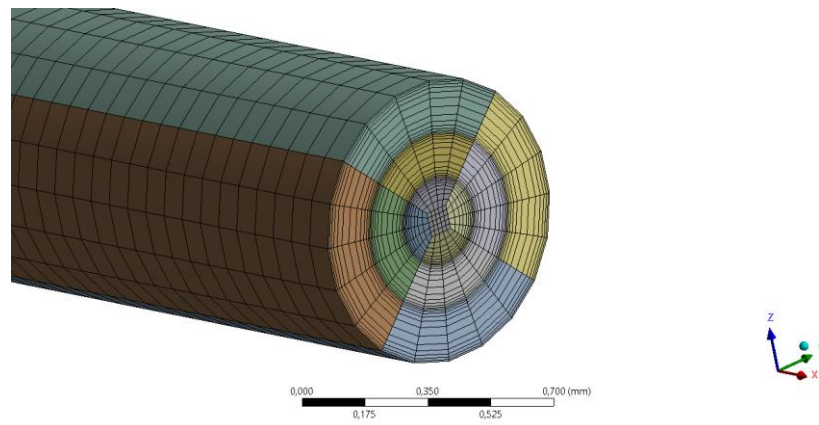


Rys. 2.8. Zdyskretyzowany model 2D fragmentu układu z upakowaną złożem kolumną chromatograficzną. Określono także typowe warunki brzegowe dla tak przygotowanych modeli numerycznych:

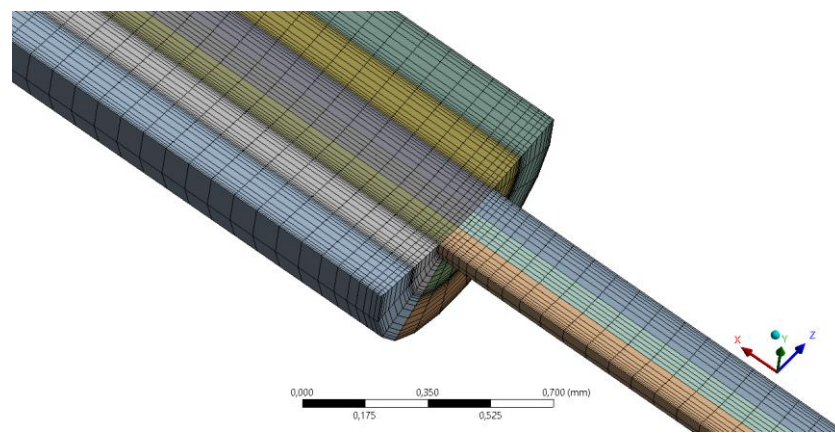
- *velocity-inlet* – warunek brzegowy wlotowy do układu, w którym założono laminarny rozkład prędkości,
- *wall* – warunek brzegowy ściany modelu, który zakładał brak poślizgu,
- *axis* – warunek brzegowy osiowosymetryczny, który zastosowano jako linia środkowa geometrii osiowosymetrycznej,
- *pressure-outlet* – warunek brzegowy wylotowy z układu, stanowiący koniec modelowanej drogi elucji.

2.2.2.2. Domena obliczeniowa 3D

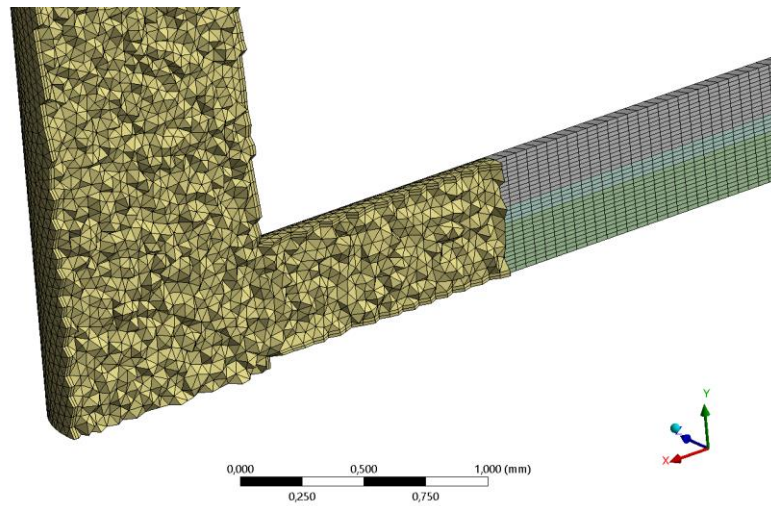
Modele 3D wykorzystano tam, gdzie nie można było skorzystać z geometrii osiowosymetrycznej, a więc głównie w przypadku modeli z pętlą iniekcyjną w układzie dozowania. Podobnie jak wcześniej, w odcinkach prostych wykorzystano *MultiZone*, a w elementach zakrzywionych metodę *Sweep*. Ocena jakości siatki polegała na utrzymywaniu minimalnej wartości *Orthogonal Quality* ≥ 0.2 . Dla siatek 3D wartość ta w większości wynosiła 0.5. W najbardziej rozbudowanych modelach geometrycznych liczba elementów siatki osiągała wartość do 900 000. Przykłady trójwymiarowej siatki numerycznej kapilar zaprezentowano na rys. 2.9. oraz na rys. 2.10. Z kolei na rys. 2.11. zaprezentowano fragment połączenia kapilary z celką pomiarową detektora pod kątem prostym.



Rys. 2.9. Ilustracja siatki dla modelu 3D miejsca wlotowego pętli dozującej.



Rys. 2.10. Przekrój siatki modelu 3D w miejscu połączenia kapilar.



Rys. 2.11. Przekrój siatki 3D w miejscu połączenia kapilary z celką pomiarową detektora.

2.2.3. Zastosowane metody numeryczne

Jak wspomniano powyżej, symulacje numeryczne wykonano przy użyciu komercyjnego oprogramowania do symulacji przepływu płynów *ANSYS Fluent*. Dyskretyzacja modelu 2D oparta była na metodzie *MES* zaś modelu 3D na metodzie *MOS*, których szczegóły opisano w rozdz. 1.5.1. Obliczenia przeprowadzono dla niestacjonarnego przepływu laminarnego w modelu transportowym, który uwzględniał układy jednofazowe wieloskładnikowe. Wykorzystano w tym celu model *Species*. Analizę numeryczną hydrodynamiki wykonano w oparciu o schemat zaprezentowany na rys. 1.13. w rozdz. 1.5.3. Krok czasowy dobrano na podstawie wartości liczby Couranta, która utrzymywana była na poziomie mniejszym od 1. Typowa wartość kroku czasowego wynosiła ok. 0.001 s. Profil prędkości obliczono przy użyciu *pressure based solver*. Układ dozujący próbkę, kapilary łączące, adaptory w kolumnie, dystrybutor, kolektor oraz łącznik o zerowej długości zamodelowano jako otwarte przestrzenie. Fryty oraz złożo w kolumnie chromatograficznej zamodelowano jako strefy porowate.

2.2.3.1. Elucja roztworów bez uwzględnienia wpływu lepkości

W badaniach nad roztworami próbki o lepkości zbliżonej do lepkości fazy ruchomej równania modelu rozwiązano dla binarnego układu nieściśliwego składającego się z eluentu i próbki. Z racji tego, że stężenie związków było niskie w przypadku acetonu oraz białek, ich współczynniki dyfuzji oraz gęstość i lepkość były ustalone niezależnie od składu.

2.2.3.2. Elucja roztworów z uwzględnieniem wpływu lepkości przy pomocy *UDF*ów

Elucja roztworów o dużej lepkości zawierających glicerol wymagała zastosowania funkcji zdefiniowanych przez użytkownika (*UDF*). Posłużyły one do wprowadzenia do równań modelu numerycznego zależności lepkości, gęstości oraz współczynnika dyfuzji roztworu od lokalnego stężenia glicerolu (równania (1.11) – (1.18) oraz równanie (1.27)). Funkcje *UDF* pozwoliły także na zaimplementowanie efektywnego współczynnika dyspersji (1.28), przy czym anizotropię dyspersji w złożu porowatym kolumny uwzględniono przy użyciu skalarów zdefiniowanych przez użytkownika (*UDS*).

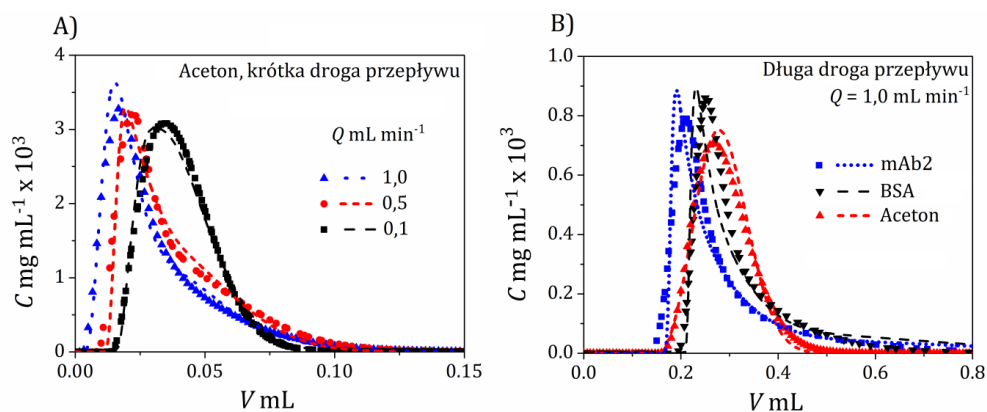
3. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW BADAŃ

3.1. Hydrodynamika związków mało- i wielkocząsteczkowych w *ECV*

W tej części badań do symulacji zastosowano metodę *CFD*, aby określić wpływ hydrodynamiki *ECV* na kształt pików chromatograficznych. Symulacje numeryczne przeprowadzono dla związków małowcząsteczkowych (aceton) i makrocząsteczkowych (BSA, mAb2). Badania przeprowadzono przy różnej długości kapilar i objętościowego natężenia przepływu (Q) fazy ruchomej, dla różnej objętości iniekcji oraz różnej geometrii układu dozującego. Wyniki uzyskane numerycznie porównano z danymi doświadczalnymi.

3.1.1. Wpływ czasu przebywania i dyfuzyjności na rozmycie profili stężenia

Profile stężeń acetonu, oraz białek BSA i mAb2 eluowanych z *ECV* rejestrowano dla objętościowych natężeń przepływu eluentu wahających się od 0.1 do 1 mL min⁻¹, przy użyciu kapilar łączących o różnych długościach (krótka droga przepływu, c_1 : $L = 100$ mm oraz długa droga przepływu, c_2 : $L = 1273$ mm – rys. 2.5., tabela 2.5). W zastosowanych układach uzyskano różne czasy przebywania związków eluowanych w *ECV*. Przykładowe profile stężeń przedstawiono na rys. 3.1. Wzrost natężenia przepływu eluentu powodował odchylenie profili stężeń od kształtu Gaussa (rys. 3.1. A)). Deformacja piku chromatograficznego jest charakterystyczna dla reżimu przepływu laminarnego, gdy czas przebywania jest zbyt krótki, aby eluowane związki osiągnęły jednorodny rozkład prędkości promieniowej. Gradient prędkości osiowej powoduje, że substancja rozpuszczona porusza się szybciej w pobliżu środka kapilary, a wolniej przy jej ścianie. Wzrost masy cząsteczkowej eluowanego związku nasila to zjawisko, ponieważ ruch w kierunku promieniowym jest dodatkowo utrudniony przez niską dyfuzyjność. Sytuację tą obrazuje rys. 3.1. B), gdzie nałożono profile stężeń BSA i mAb2 oraz acetonu. Symbole na wykresach prezentują dane doświadczalne, linie zaś symulacje numeryczne.



Rys. 3.1. Ilustracja wpływu **A)** natężenia przepływu i **B)** masy cząsteczkowej na kształt profili stężenia w *ECV*. Objętość retencji oznaczono przez V . Symbole – dane eksperymentalne, linie – symulacje numeryczne

3.1.2. Model geometrii zestawu *ECV*

Jak wspomniano w rozdz. 2.2.1.1., geometrię zestawu *ECV* aproksymowano czterema różnymi układami (rys. 2.5.):

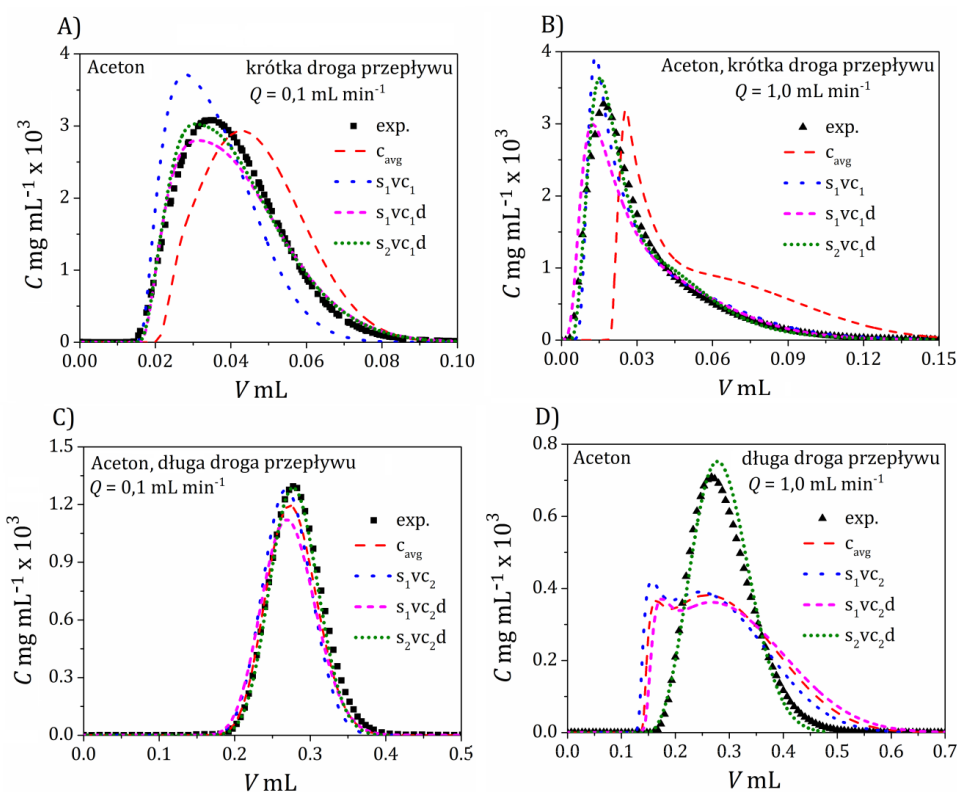
- najprostszym układem 1: c_{avg} ,
- układem 2: $s_1vc_{1,2}$,
- układem 3: $s_1vc_{1,2d}$,
- najbardziej złożonym układem 4: s_2vc_{1d} (krótka droga przepływu) i s_2vc_{2d} (długa droga przepływu).

Podejście to umożliwiło identyfikację elementów *ECV* mających istotny wpływ na rozmycie profilu stężenia i pozwoliło na dobór modelu geometrii zestawu, który zapewnił najdokładniejsze odwzorowanie numeryczne pików doświadczalnych w *ECV*. Symulacje przeprowadzono dla układu *ECV* wyposażonego w różne pętle iniekcyjne i kapilary łączące (tabela 2.5). Odpowiadało to różnym czasom przebywania związków i różnym objętościom iniekcji związków. W eksperymentach i symulacjach numerycznych uwzględniono trzy typy pętli iniekcyjnych: pętlę dozującą o objętości 0.01 mL (iniekcja o małej objętości) oraz pętlę dozującą o objętości 1 mL i *superloop* (iniekcja o dużej objętości).

3.1.3. Predykcja modelu dla różnych układów geometrii *ECV*

3.1.3.1. Mała objętość iniekcji

Porównanie danych eksperymentalnych i numerycznych profili stężenia acetonu dla wszystkich czterech układów *ECV* przy minimalnym i maksymalnym natężeniu przepływu oraz dla krótkiej i długiej drogi przepływu przedstawiono na rys. 3.2.

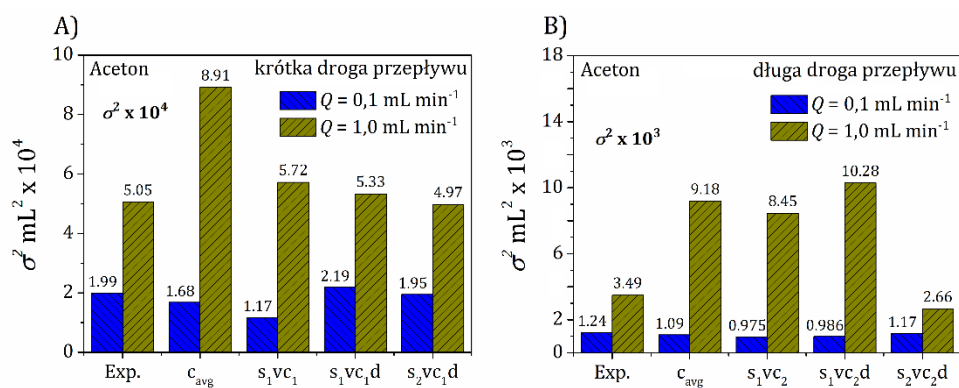


Rys. 3.2. Eksperymentalne i numeryczne profile stężenia acetonu dla różnej geometrii układu *ECV*. **A)** Krótka droga przepływu, $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, **B)** krótka droga przepływu, $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$, **C)** długa droga przepływu, $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, **D)** długa droga przepływu, $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$

Dla krótkiej drogi przepływu (rys. 3.2. A), B)) predykcja modelu numerycznego układu 1 z prostą kapilarą o stałej średnicy (c_{avg}) nie była dokładna; asymetria pików została niedoszacowana. Dla układu 2 (s_1vc_1), który uwzględniał różnicę w średnicach wszystkich kapilar, dokładność predykcji kształtu pików chromatograficznych była nieco lepsza. Model nadal jednak nie doszacowywał asymetrii pików. W układzie 3 (s_1vc_1d), który dodatkowo uwzględnił przepływ w celce pomiarowej detektora UV, osiągnięto dalszą poprawę dokładności predykcji modelu. Układ 4 (s_2vc_1d), w którym zaimplementowano geometrię 3D pętli dozującej, doprowadził do uzyskania najlepszej dokładności obliczeń. Różnica między kształtami profili stężeń dla układów 3 i 4 była niewielka, co wskazuje na to, że zmiany średnic elementów *ECV* najbardziej przyczyniły się do rozmycia profili stężenia, natomiast wpływ krzywizny kanału pętli dozującej miał mniejsze znaczenie. Jak omówiono już wcześniej, wzrost natężenia przepływu eluentu zaburzył symetrię pików i spowodował jego deformację, choć efekt ten był znacznie słabszy, niż oczekiwany dla reżimu przepływu laminarnego w prostych kapilarach, na co wskazują symulacje przeprowadzone dla układu 1 (rys. 3.2. A), B)).

W przypadku długiej drogi przepływu (rys. 3.2. C), D)), rozbieżności między przewidywaniami modelu uzyskanymi dla różnych układów geometrii *ECV* były o wiele

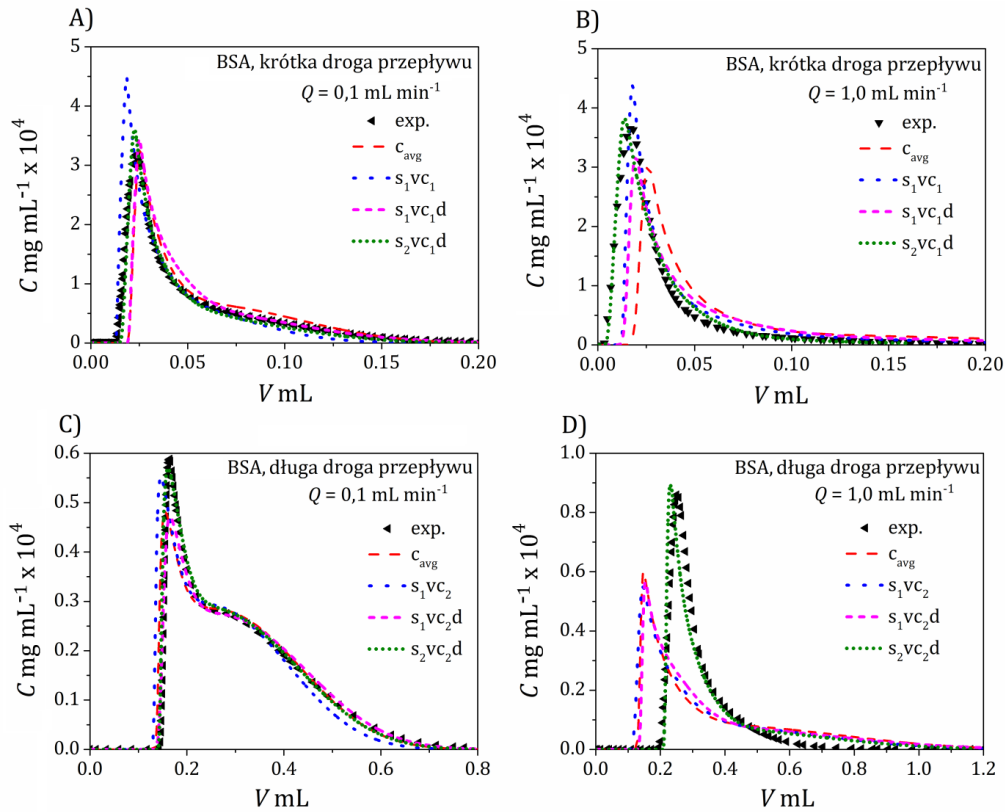
wyraźniejsze, w porównaniu z tymi przedstawionymi dla krótkiej drogi przepływu. Jest to szczególnie widoczne dla dużego natężenia przepływu (rys. 3.2. D)), dla którego dokładność predykcji była akceptowalna wyłącznie dla układu 4. Oznacza to, że w tym przypadku hydrodynamika w pętli dozującej w największym stopniu wpłynęła na kształt pików. Zaobserwowane zmiany kształtu profili stężenia podano także w postaci wartości wariancji pików, co zilustrowano na rys. 3.3. Błędy predykcji wariancji pików są największe w przypadku układu 1, najmniejsze zaś dla układu 4, co widoczne jest szczególnie dla długiej drogi przepływu.



Rys. 3.3. Wariancje pików obliczone dla eksperymentalnych profili stężenia acetonu (exp.) oraz przewidziane przez model numeryczny dla różnej geometrii ECV, przy dwóch objętościowych natężeniach przepływu Q . **A)** Krótka droga przepływu, **B)** długa droga przepływu.

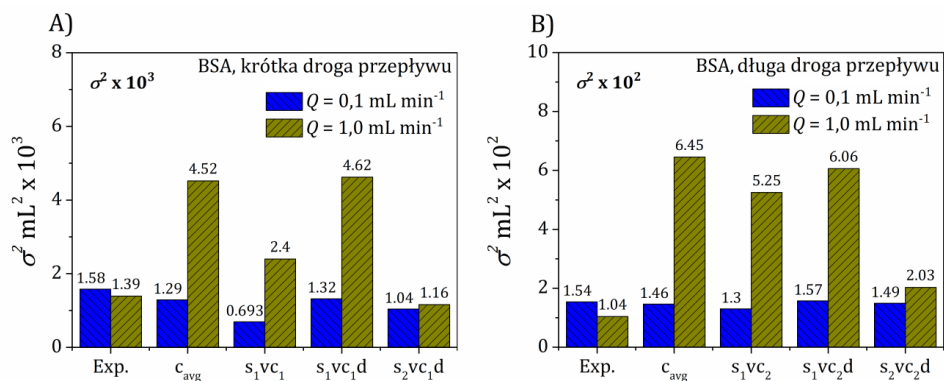
Analiza powyższych wyników wykazała, że zmiany czasu przebywania spowodowane wzrostem natężenia przepływu lub długości drogi przepływu nie mają takiego samego wpływu na kształt profili stężenia, zaś wpływ hydrodynamiki układu ECV na rozmycie pików zależy od jego geometrii.

Podobne efekty zaobserwowano dla białka BSA, którego profile stężeń uległy deformacji również dla małego natężenia przepływu (rys. 3.4.). Wynika to z niskiej dyfuzyjności białka, o czym wspomniano powyżej ($D_{m,BSA} = 6.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). Rozbieżność między kształtami pików eksperymentalnych BSA a przewidywaniami modelu numerycznego dla różnych układów ECV jest wyraźna dla wyższych natężeń przepływu (rys. 3.4. B), D)). W tym przypadku zwiększenie natężenia przepływu eluentu nie pogorszyło symetrii pików BSA, a nawet w pewnym stopniu ją poprawiło. Błędy predykcji modelu dla układów 1, 2 i 3 były szczególnie istotne dla długiej drogi przepływu (rys. 3.4. D)). Akceptowalną dokładność uzyskano tylko dla układu 4.



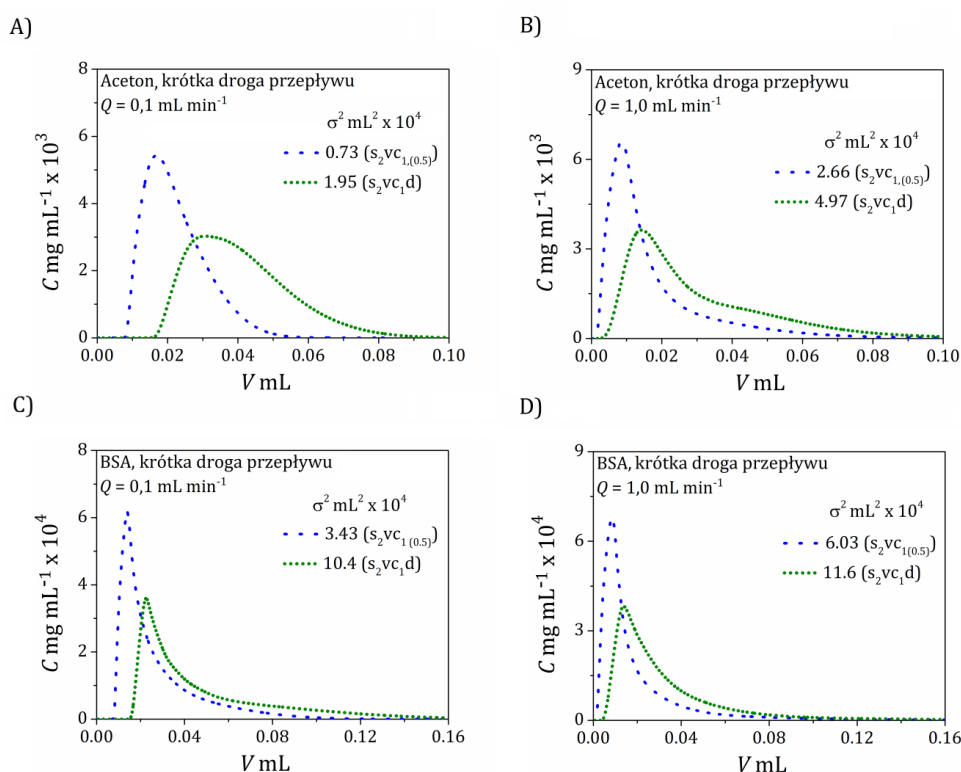
Rys. 3.4. Doświadczalne i numeryczne profile stężenia BSA dla różnej geometrii *ECV*, przy różnych natężeniach przepływu oraz długościach dróg przepływu. **A)** Krótka droga przepływu, $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, **B)** krótka droga przepływu, $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$, **C)** długa droga przepływu, $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, **D)** długa droga przepływu, $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$

Wartości wariancji pików obliczone dla profili stężeń eksperymentalnych oraz przewidywanych modelem numerycznym, które przedstawiono na rys. 3.5., potwierdzają obserwowane różnice w kształtach pików.



Rys. 3.5. Wariancje pików obliczone dla eksperymentalnych profili stężenia BSA (exp.) oraz przewidziane przez model numeryczny dla różnej geometrii *ECV*, przy dwóch objętościowych natężeniach przepływu. **A)** Krótka droga przepływu, **B)** długa droga przepływu.

Jak już wspomniano wcześniej, wpływ hydrodynamiki w poszczególnych elementach *ECV* na rozmycie profilu stężenia może być inny. Oznacza to, że w obecności kolumny chromatograficznej rozmycie profilu stężenia przed i po kolumnie nie jest takie samo. Do zilustrowania tego efektu, przeprowadzono symulacje dla profili acetonu oraz BSA w układzie 4 dla dwóch lokalizacji na drodze przepływu, które wybrano tak, aby odtworzyć obecność objętości martwych przed i po kolumnie. Pierwsza część (objętość „przed-kolumnowa”) obejmowała układ dozowania i połowę długości kapilar łączącej, druga część składała się z pozostałej połowy kapilary łączącej i celki pomiarowej detektora (objętość „za-kolumnowa”). Profile stężeń wraz z wariancjami pików pokazano na rys. 3.6.



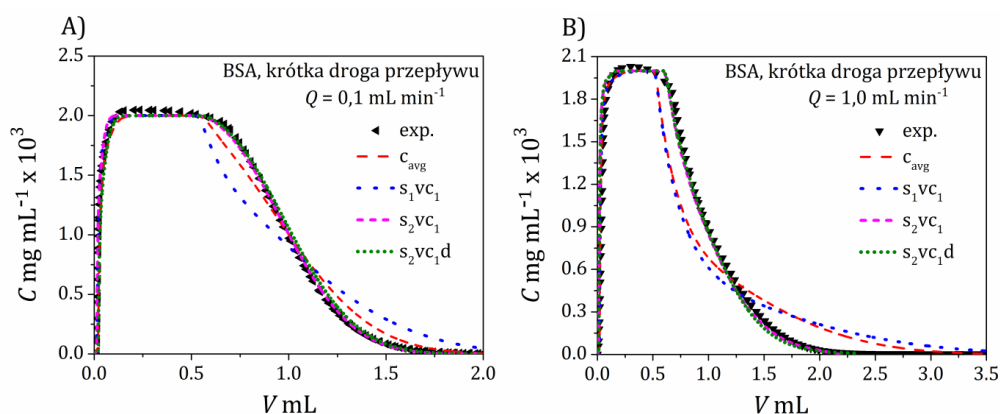
Rys. 3.6. Symulacje profili stężenia w środku kapilary łączącej ($s_2vc_{1(0.5)}$) i na końcu *ECV* (s_2vc_{1d}). **A)** Aceton, krótka droga przepływu, $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, **B)** Aceton, krótka droga przepływu, $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$, **C)** BSA, krótka droga przepływu, $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, **D)** BSA, krótka droga przepływu, $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$

Jak można zauważyć, stosunek wariancji pików „przed i po” kolumnie zależy od masy cząsteczkowej eluowanego związku i natężenia przepływu fazy ruchomej. Zarówno dla acetonu, jak i BSA udział objętości „przed kolumną” ($s_2vc_{1(0.5)}$) w całkowitej wariancji pików (s_2vc_{1d}) zwiększał się wraz ze wzrostem natężenia przepływu, jednak efekt ten był znacznie silniejszy w przypadku BSA.

3.1.3.2. Duża objętość iniekcji

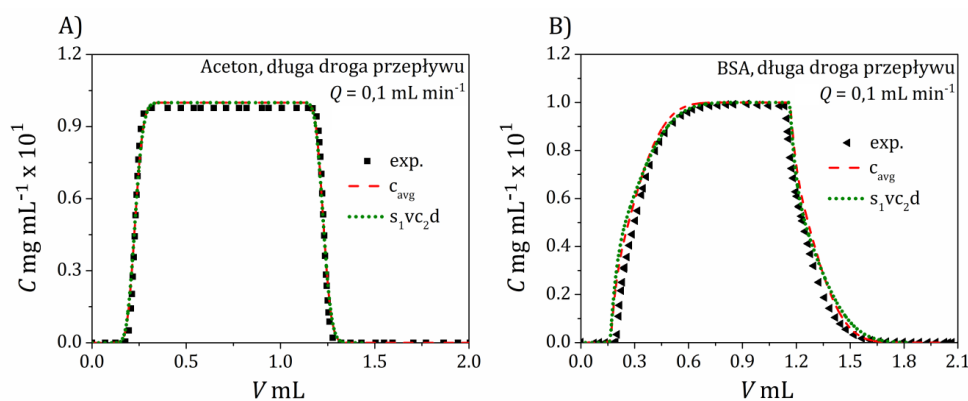
Model *CFD* wykorzystano także do przewidywania profili stężenia dla iniekcji o dużej objętości, wykonanych przy użyciu pętli dozującej lub *superloop*. Wyniki symulacji numerycznych wraz z odpowiadającymi im pikami uzyskanymi doświadczalnie przedstawiono na rys. 3.7. i rys. 3.8.

Hydrodynamika w pętli dozującej miała dominujący wpływ na kształt pików chromatograficznych (rys. 3.7.). Fakt ten można przypisać dużej odległości, jaką musiała pokonać próbka, aby eluować z długiej pętli. Dlatego tylko symulacje wykonane dla geometrii 3D (układ 4), które uwzględniły hydrodynamikę w zakrzywionym kanale pętli dozującej, odtworzyły poprawnie kształt pików eksperymentalnych. Profile obliczone dla układów 1, 2 i 3 wykazywały nadmierne ogonowanie w porównaniu z danymi eksperymentalnymi. Udział hydrodynamiki płynu w celce pomiarowej detektora na rozmycie profilu stężenia był znikomy. Ilustrują to wyniki symulacji dla dwóch układów, w których uwzględniono lub pominięto obecność celki pomiarowej: s_2vc_1 i s_2vc_1d .



Rys. 3.7. Eksperymentalne i numeryczne profile stężenia BSA w iniekcjach o dużej objętości z pętli dozującej dla różnej geometrii *ECV*, przy różnych natężeniach przepływu. **A)** Krótka droga przepływu, $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, **B)** krótka droga przepływu, $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$

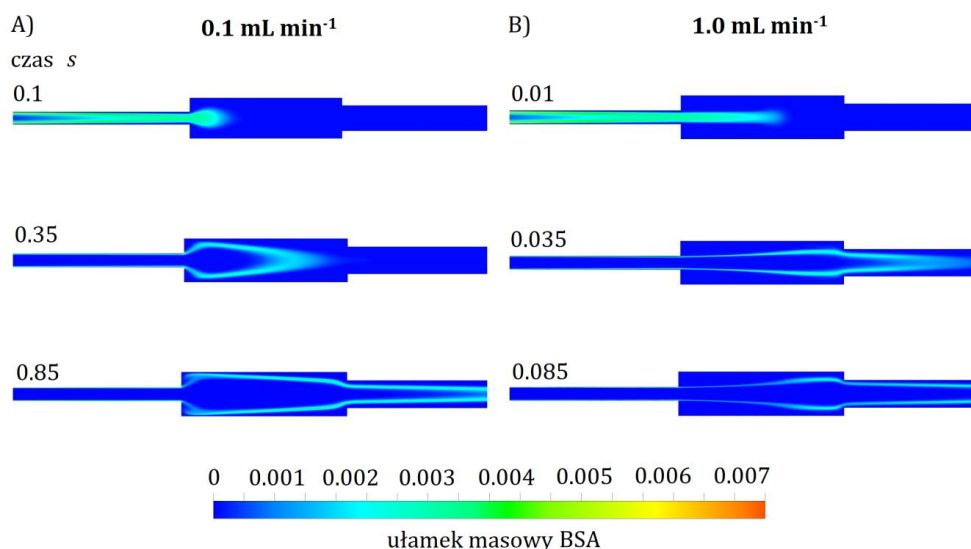
Kształty profili stężenia związków, których iniekcję do układu przeprowadzono z użyciem *superloop* były znacznie bardziej symetryczne w porównaniu z kształtami analogicznych profili uzyskanych poprzez iniekcję pętlą dozującą (rys. 3.8.). Geometria *ECV* z *superloop* była prosta, dlatego iniekcję próbki symulowano numerycznie jak w rurze prostej przy użyciu odpowiednich warunków brzegowych na wlocie kapilary w zaworze wielodrogowym. Kształt pików zależał od hydrodynamiki, dlatego symulacja profili stężenia dla układu 1 była wystarczająco dokładna.



Rys. 3.8. Eksperymentalne i numeryczne profile stężenia acetonu i BSA w iniekcjach o dużej objętości z użyciem *superloop* dla różnych geometrii *ECV* dla długiej drogi przepływu. **A)** Aceton, długa droga przepływu, $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, **B)** BSA, długa droga przepływu, $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$

3.1.4. Graficzna prezentacja konturów profilu stężenia

Aby wyjaśnić wpływ geometrii układu na kształt pików chromatograficznych, wygenerowano kontury profili stężeń w różnych elementach *ECV*. Na rys. 3.9. przedstawiono ewolucję profili BSA w miejscu połączenia kapilar o różnej średnicy (np. kapilary pętli dozującej z kapilarą w zaworze wielodrogowym i tej samej kapilary z kapilarą łączącą). Poszczególne kolory konturów ilustrują stężenie białka w fazie ruchomej; od koloru czerwonego przypisanego najbardziej skoncentrowanej substancji eluowanej, poprzez żółty, jasnoniebieski, aż do ciemnoniebieskiego odpowiadającego czystej fazie ruchomej. Można zauważyć, że przy niskim natężeniu przepływu białko dociera do ściany kapilary o większej średnicy pod koniec czasu przebywania, ale tylko w pobliżu miejsca łączącego dwie kapilary, ponieważ promieniowy profil prędkości nie jest równomierny wzdłuż całej kapilary. Cząsteczki białka, które dotarły do ściany, pozostawały w tyle za głównym strumieniem, co było przyczyną zwiększonego ogonowania piku chromatograficznego białka. Przy wysokim natężeniu przepływu większość masy białka nie docierała do ściany kapilary o większej średnicy, ale przemieszczała się bliżej jej środka.

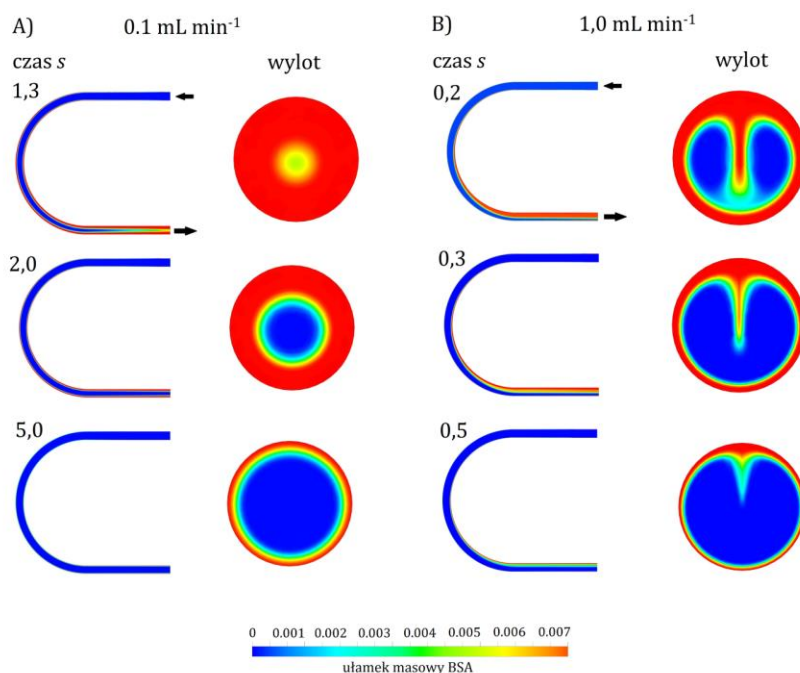


Rys. 3.9. Ewolucja profili stężenia BSA; wpływ zmiany średnicy kapilary. Kontury profilu stężenia przy **A)** małym, **B)** dużym natężeniu przepływu, w różnych odstępach czasu

Najbardziej złożone kształty konturów stężeń otrzymano dla elucji przez pętlę dozującą, w której trajektoria przepływu płynu była zakrzywiona. Przy niskim natężeniu przepływu rozkład stężenia białka był niemalże symetrycznie rozmieszczony w przekroju pętli (rys. 3.10 .A)), natomiast przy wysokim natężeniu przepływu kontur stężenia białka był silnie asymetryczny i podzielony na części (rys. 3.10. B)). Część masy białka przylegająca do wewnętrznej części pętli dozującej eluowała najpóźniej. Złożoność kształtów konturów stężenia białka wynikała nie tylko z naprężeń ścinających na ścianie kapilary, ale także z turbulencji przepływu w pętli, które występowały w wyniku działania sił odśrodkowych, zwanych wirami Deana. Do ilościowego określenia tego zjawiska użyto liczby Deana (Dn), która jest zdefiniowana jako iloczyn liczby Reynoldsa i pierwiastka kwadratowego ze współczynnika krzywizny:

$$Dn = \frac{\rho w d}{\eta} \sqrt{\frac{d}{2 R_c}} = Re \sqrt{\frac{d}{2 R_c}} \quad (1.32)$$

gdzie ρ i η to lepkość i gęstość płynu, w oznacza prędkość liniową, d stanowi średnicę kapilary, zaś R_c określa promień krzywizny pętli.



Rys. 3.10. Ewolucja profili stężeń BSA w łuku pętli dozującej przy prędkości **A)** 0.1 mL min⁻¹, **B)** 1 mL min⁻¹

Wpływ siły odśrodkowej na hydrodynamikę w pętli jest pomijalny, gdy iloczyn Dn do kwadratu i liczby Schmidta (Sc) jest mniejszy od 100 [98-99]:

$$Dn^2 Sc < 100 \quad Sc = \frac{\eta}{\rho D_m} \quad (1.33)$$

Wyniki obliczeń otrzymane za pomocą równania (1.32) oraz (1.33), zestawione w tabeli 3.1, przedstawiają wartości liczby Deana oraz iloczynu kwadratu liczby Deana i Schmidta.

Tabela 3.1. Wyniki obliczeń liczby Dn oraz $Dn^2 Sc$ obliczone dla małej i dużej pętli dozującej.

Nazwa elementu <i>ECV</i>	Objętość mL	Promień krzywizny pętli R_c mm	I.D. pętli dozującej d mm	Objętościowe natężenie przepływu mL min ⁻¹	Liczba Dn [-]	Iloczyn $Dn^2 Sc$ [-]
Mała pętla dozująca	0.01	15	0.25	0.1	1.8	1300
				1.0	18	130000
Duża pętla dozująca	1	22	0.75	0.1	0.88	295
				1.0	8.8	29500

Wyniki obliczeń wskazują, że we wszystkich badanych przypadkach można oczekiwać, iż siła odśrodkowa w pętlach dozujących będzie miała wpływ na hydrodynamikę. Symulacje numeryczne nie wykazały jednak istotnego odchylenia od promieniowej symetrii profilu prędkości w małej pętli dozującej dla $Dn^2 Sc$ mniejszego niż ok. 2000, co odpowiadało

przepływowi mniejszym niż 0.15 mL min^{-1} . Wyraźną obecność wirów Deana zaobserwowano dla natężeń przepływu większych niż 0.2 mL min^{-1} .

Zaburzenie przepływu w pętlach dozujących, w miejscu połączenia kapilar oraz w celce pomiarowej detektora UV częściowo tłumili efekt niskiej dyfuzyjności białka i powodowały, że jego profile stężenia były bardziej symetryczne niż przewidywano dla prostej kapilary w reżimie przepływu laminarnego. Może to wyjaśniać poprawę symetrii pików przy dużym natężeniu przepływu, co wykazano na rys. 3.4. D) w rozdz. 3.1.3.1. Oznacza to, że wyższe wartości prędkości przepływu płynu w etapie iniekcji są korzystne dla zachowania symetrii profilu stężenia białka. Jednak wzrost natężenia przepływu podczas elucji adsorbujących się białek może pogorszyć skuteczność rozdzielania na złożu chromatograficznym w związku z rosnącymi oporami transportu masy. Aby temu zaradzić, można zastosować stopniową zmianę natężenia przepływu, tj. wyższą prędkość podczas iniekcji białka w celu stłumienia efektów dyfuzyjnych i mniejszą prędkość przepływu w przypadku elucji z kolumny w celu złagodzenia efektów przenoszenia masy w złożu porowatym. Podejście to ogranicza się jednak do stosunkowo małych objętości pętli dozujących substancję eluowaną. Zagadnienie to będzie przedmiotem osobnej pracy.

3.2. Hydrodynamika roztworów białek w zestawie chromatograficznym z kolumną

W kolejnej części pracy opracowano model *CFD* do symulacji hydrodynamiki na całej drodze elucji zestawu chromatograficznego, w tym:

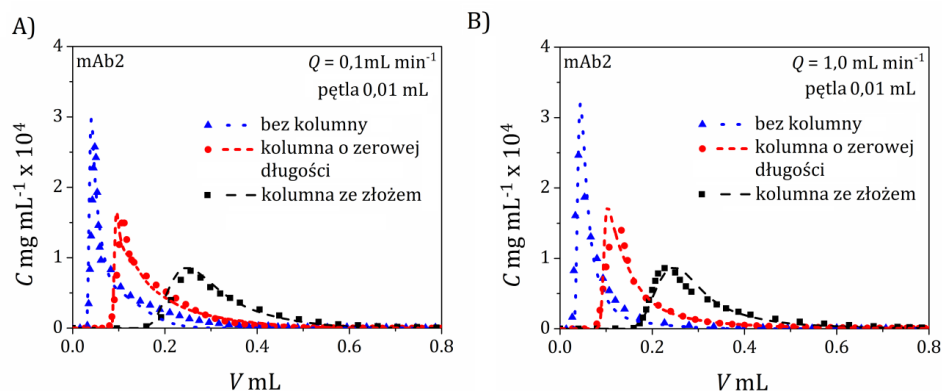
- *ECV*, tj. układ dozowania, kapilary łączące, celki detektorów pomiarowych których hydrodynamikę opisano w rozdz. 3.1.,
- *ICV*, tj. osprzęt kolumny: adaptory, fryty, dystrybutor i kolektor przepływu,
- złożo porowate.

Model opracowano dla białka modelowego mAb2 w buforowanym roztworze wodnym oraz w tym samym roztworze z dodatkiem glicerolu. Model uwzględniał zależność stężeniową: lepkości, gęstości i współczynnika dyfuzji roztworów, a także anizotropię dyspersji w upakowanym złożu. Określono wpływ każdego elementu zestawu chromatograficznego na rozmycie profilu stężenia białka dla różnych objętościowych natężeń przepływu, objętości iniekcji oraz długości złoża w kolumnie. Przeanalizowano także wpływ lepkości próbki na kształt pików chromatograficznych. Model numeryczny rozwiązano dla geometrii 2D i 3D zestawu chromatograficznego. Weryfikacja dokładności predykcji opierała się na porównaniu eksperymentalnych profili stężenia z wynikami symulacji numerycznych, w różnych warunkach procesowych.

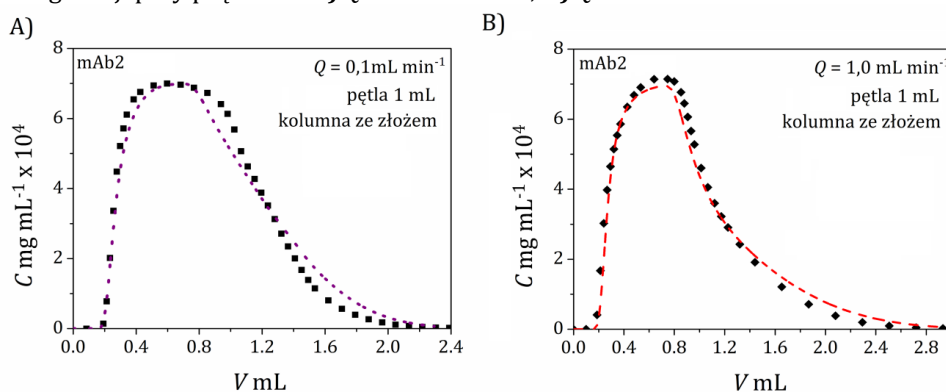
Wpływ lepkości próbki na elucję białka przebadano dla modelowego substytutu lepkiego środowiska rozpuszczalnika, tj. glicerolu (Gly). Jego właściwości reologiczne wykazały, że w badanym zakresie stężeń jest to płyn newtonowski [100]. Glicerol w małym stopniu zakłócał sygnał detektora pochodzący od białek, był wykrywalny przez detektor konduktometryczny nawet przy niskich stężeniach. Wpłynęło to na wybór glicerolu jako modelowego substytutu lepkiego środowiska rozpuszczalnika spośród możliwych innych, tj. niebieskiego dekstranu oraz glikolu polietylenowego.

3.2.1. Ewolucja profili stężenia mAb2

Numeryczną predykcję profili stężeń roztworów białka mAb2 w fazie ruchomej przeprowadzono przy użyciu modelu *CFD* dla trzech różnych układów odzwierciedlających drogę elucji (rys. 2.6., rozdz. 2.2.1.2). Zastosowano pętle dozujące o różnych objętościach, tj. 0.01, 0.5 i 1 mL. Z racji tego, że stężenie mAb2 było małe, w tej pracy pominięto wpływ lepkości. Do obliczenia współczynnika dyspersji w złożu porowatym zastosowano równanie (1.28) dla krótkiej drogi przepływu ($D_{mAb2,L\,ef.} = y_1 D_{m,mAb2} + y_2 d_p \frac{w}{\varepsilon_e} = y_1 D_{m,mAb2} + D_{mAb2,L}$). Ponieważ współczynnik dyfuzji białka był niski ($D_{m,mAb2} = 5.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) udział pierwszego członu równania (1.28) przy typowej wartości $y_1 = 0.7$ był pomijalny. Drugi wyraz równania (1.28), $D_{mAb2,L}$, obliczono z korelacji dla liczby Pecleta, tj. równania (1.31) ($D_{i,L} = \frac{w d_p}{Pe \varepsilon_e}$). Przykładowo, przy natężeniu przepływu równym $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ współczynnik dyspersji białka wynosił $D_{mAb2,L} = 3.8 \times 10^{-8} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. Ponieważ eksperymenty elucji prowadzono w warunkach nieadsorbujących, kinetyka transportu masy w złożu upakowanym miała niewielki wpływ na rozmycie profilu stężenia, które determinowała głównie dyspersja. Słuszności tego twierdzenia dowodzi porównanie predykcji modelu numerycznego z uzyskanymi doświadczalnie profilami stężenia białka. Wyniki uzyskane dla objętości iniekcji równej 0.01 mL, przy prędkościach przepływu 0.1 i 1.0 mL min^{-1} przedstawiono na rys. 3.11. Profile stężeń mAb2 pokazano na wylocie z różnych układów elucji, tj. bez kolumny, z kolumną o zerowej długości i kolumny ze złożem. Weryfikację modelu przeprowadzono także dla drogi elucji z pętlą dozującą o większej objętości, tj. 1 mL (rys. 3.12.). We wszystkich przypadkach symulacje numeryczne prawidłowo odtwarzały dane doświadczalne, co potwierdziło dokładność i przewidywalność modelu.



Rys. 3.11. Doświadczalne i numeryczne profile stężeń mAb2 dla pętli dozującej 0,01 mL na wylocie z różnych dróg elucji przy prędkości **A)** $Q = 0,1 \text{ mL min}^{-1}$, **B)** $Q = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$.



Rys. 3.12. Eksperymentalne i numeryczne profile stężeń mAb2 uzyskane na wylocie z drogi elucji z kolumną upakowaną złożem porowatym przy prędkości **A)** $Q = 0,1 \text{ mL min}^{-1}$, **B)** $Q = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$

3.2.2. Analiza wariancji profili stężenia mAb2

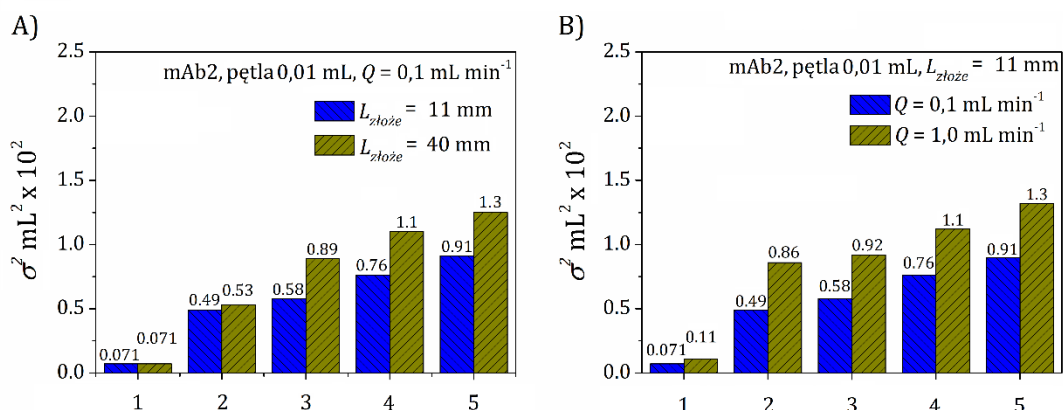
Model *CFD* wykorzystano także do ilościowego określenia wpływu różnych elementów drogi elucji na rozmycie profilu stężenia. Rys. 3.13. oraz rys. 3.14. przedstawiają wariancję pików uzyskaną na podstawie predykcji modelu numerycznego w różnych miejscach wzdłuż drogi elucji, tj.: przed frytą I, za frytą I, przed frytą II, za kolumną i na wylocie z układu. Wyniki zaprezentowano dla różnych długości złoża w kolumnie oraz dla różnych natężeń przepływu eluentu. Z rys. 3.13. A) przedstawiającego wariancję pików obliczoną dla układu z pętlą dozującą o małej objętości 0,01 mL wynika, że w tym przypadku część iniecyjna zestawu chromatograficznego (wariancja profilu przed frytą I) ma najmniejszy wpływ na ogólne rozmycie profilu stężenia. Udział pozostałych elementów drogi elucji w stosunku do całkowitej wariancji profilu stężenia na wylocie z zestawu chromatograficznego przedstawiono w tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Udział elementów zestawu chromatograficznego w całkowitej wariancji piku na wylocie z układu dla pętli iniekcyjnej 0.01 mL

Nazwa elementu układu	Udział elementu w stosunku do całkowitej wariancji profilu stężenia przy $L_{złozę} = 11 \text{ mm}$	Udział elementu w stosunku do całkowitej wariancji profilu stężenia przy $L_{złozę} = 40 \text{ mm}$
Osprzęt wlotowej części kolumny (adapter, dystrybutor, fryta I)	46%	35%
Osprzęt wylotowej części kolumny (adapter, kolektor, fryta II)	20%	16%
Całkowity osprzęt kolumny	74%	56%
Złoże porowate	10%	28%

Największy wpływ na rozmycie profilu stężenia miał całkowity osprzęt kolumny, przy czym część wlotowa miała większy udział wariancji niż część wylotowa. Wpływ natężenia przepływu eluentu na rozmycie profilu stężenia przedstawiono na rys. 3.13. B). Jak widać, zwiększenie prędkości przepływu fazy ruchomej powoduje wzrost wariancji pików białka dla wszystkich elementów drogi elucji układu. Jednocześnie, zgodnie z wcześniej poczynionymi obserwacjami, wzrost prędkości przepływu zwiększa zaburzenie przepływu w zakrzywionych elementach układu, co poprawia ruchliwość makrocząsteczek i tym samym częściowo niweluje promieniową niejednorodność profilu stężenia. To powoduje, że 10-krotny wzrost prędkości przepływu wywołuje 35-43% wzrostu wariancji piku. Zjawisko zostało już opisane powyżej, w rozdz. 3.1.4.

Model numeryczny posłużył też do predykcji wariancji pików białek eluowanych w układzie z pętlą dozującą o większej objętości, tj. 0.5 mL. Symulacje zaprezentowano na rys. 3.14. w postaci wariancji pików oraz na rys. 3.15. w postaci pików chromatograficznych. Udział poszczególnych elementów drogi elucji w stosunku do całkowitej wariancji profilu stężenia na wylocie z układu chromatograficznego dla pętli dozującej 0.5 mL przedstawiono w tabeli 3.3.



Rys. 3.13. Wariancje profili stężenia białka w różnych miejscach drogi elucji dla zestawu chromatograficznego z pętlą dozującą o objętości 0.01 mL. **A)** Wpływ długości złoża porowatego, **B)** wpływ natężenia przepływu eluentu. Oznaczenia liczbowe na górnym rysunku: 1 – przed frytą I, 2 – za frytą I, 3 – przed frytą II, 4 – za kolumną, 5 – wylot

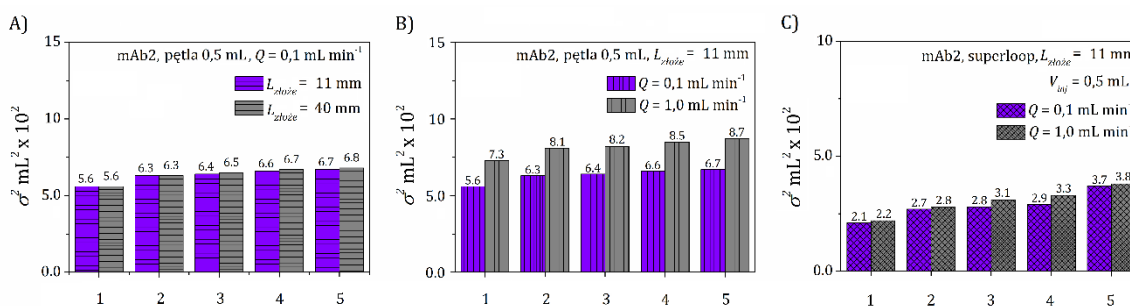
Tabela 3.3. Udział elementów zestawu chromatograficznego w całkowitej wariancji piku na wylocie z układu dla pętli iniekcyjnej 0.5 mL

Nazwa elementu układu	Udział elementu w stosunku do całkowitej wariancji profilu stężenia przy $L_{\text{złoże}} = 11 \text{ mm}$	Udział elementu w stosunku do całkowitej wariancji profilu stężenia przy $L_{\text{złoże}} = 40 \text{ mm}$
Osprzęt wlotowej części kolumny (adapter, dystrybutor, fryta I)	10%	10%
Osprzęt wylotowej części kolumny (adapter, kolektor, fryta II)	3%	3%
Całkowity osprzęt kolumny	97%	96%
Złoże porowate	2%	3%

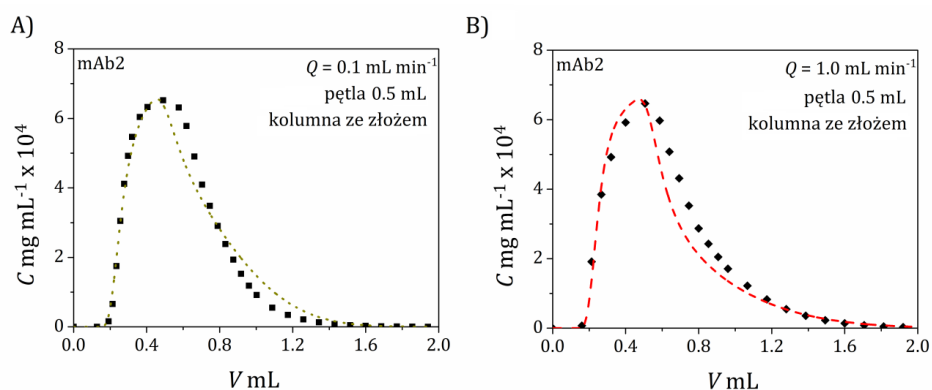
Niezależnie od długości złoża w kolumnie, rozmycie profilu stężenia zdominowane zostało przez hydrodynamikę w pętli iniekcyjnej. Długa droga migracji substancji rozpuszczonej przez pętlę powodowała, że wpływ hydrodynamiki w układzie dozowania na rozmycie profilu stężenia był dominujący, natomiast wpływ innych elementów *ECV* i *ICV*, a także długości złoża upakowanego w kolumnie był znacznie mniejszy. Zaburzenie przepływu po zakrzywionej trajektorii w dużej pętli dozującej było silniejsze niż w przypadku pętli o mniejszej objętości,

dlatego 10-krotny wzrost prędkości fazy ruchomej spowodował jedynie 22-23% wzrostu wariancji pików.

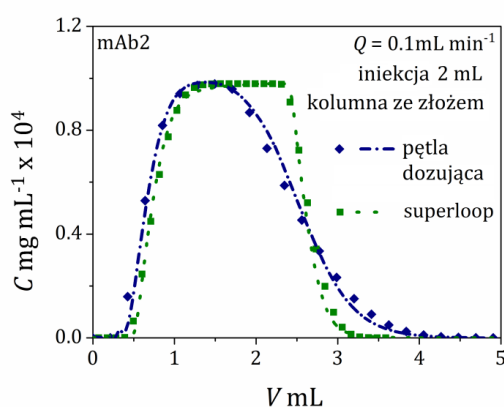
Rozmycie profilu stężenia białka było znacznie mniejsze, gdy w układzie dozowania zastosowano *superloop*. Porównanie profili stężenia mAb2 uzyskanych przez iniekcję z pętli dozującej oraz *superloop* pokazano na rys. 3.16. Zastąpienie pętli dozującej *superloop* spowodowało, że całkowita długość elementów z kapilarą była znacznie krótsza, przez co niejednorodność promieniowego rozkładu prędkości była mniejsza. Dlatego też wpływ objętościowego natężenia przepływu eluentu na rozmycie profilu stężenia białka był słabszy (rys. 3.14. C)). Oznacza to, że w przypadku zestawów chromatograficznych w skali laboratoryjnej z kolumnami o małej objętości w układzie dozowania, nie powinny być stosowane długie pętłe dozujące. Jest to istotne w przypadku technik chromatograficznych nieadsorpcyjnych, takich jak chromatografia wykluczania (*SEC*), a także w przypadku, gdy roztwór próbki zawiera związki słabo adsorbujące lub nieadsorbujące. Rozmycie profilu stężenia w przypadku związków silnie adsorbujących podawanych do układu za pomocą pętli dozujących może być zmniejszone przez efekty termodynamiczne.



Rys. 3.14. Wariancje pików białka w różnych miejscach drogi elucji. **A)** Wpływ długości złoża upakowanego na rozmycie profilu stężenia w układzie z pętlą dozującą, **B)** wpływ natężenia przepływu fazy ruchomej na rozmycie profilu stężenia dla układu z pętlą dozującą objętości 0.5 mL, **C)** wpływ prędkości przepływu na rozmycie profilu białka w przypadku użycia *superloop* w układzie dozowania, przy tej samej objętości iniekcji. Oznaczenia liczbowe 1, 2, 3, 4, 5 jak na rysunku 3.13.



Rys. 3.15. Eksperymentalne i numeryczne profile stężenia mAb2 przy iniekcji za pomocą pętli dozującej o objętości 0.5 mL; **A)** $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, **B)** $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$. Długość złoża 11 mm.



Rys. 3.16. Eksperymentalne i numeryczne profile stężenia mAb2 uzyskane przez iniekcję z pętli dozującej oraz *superloop* przy prędkości $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$

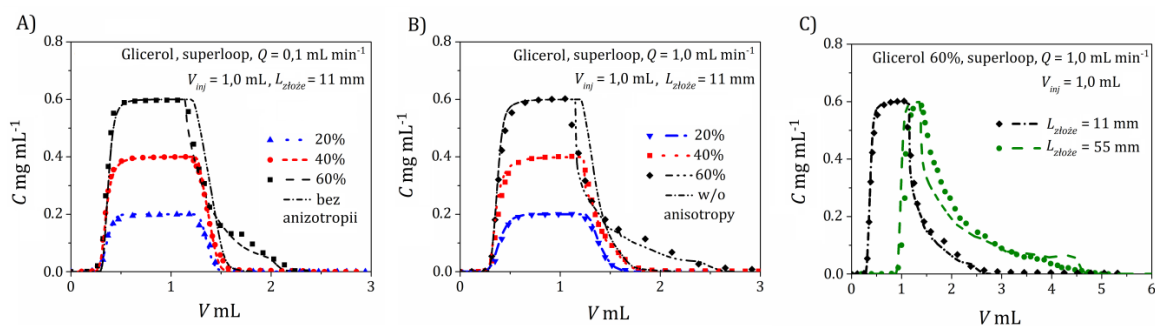
3.2.3. Wpływ lepkości próbki na hydrodynamikę w zestawie chromatograficznym

Do zbadania wpływu lepkości próbki na hydrodynamikę w układzie chromatograficznym, przeprowadzono elucje roztworów glicerolu o różnych stężeniach, roztworów mAb2 w obecności glicerolu oraz odpowiednie symulacje numeryczne.

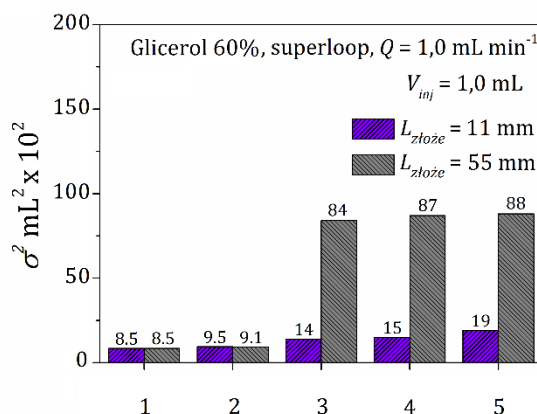
3.2.3.1. Profile stężenia roztworów glicerolu

W przypadku iniekcji z użyciem pętli dozującej o objętości 0.01 mL, różnica lepkości między fazą ruchomą a próbką nie wpływała na profile stężenia, nawet dla wysokich stężeń roztworów glicerolu, tj. do 60% w/w, co stanowiło granicę rozpuszczalności w roztworze buforowym. Dla objętości iniekcji poniżej 0.5 mL także nie zaobserwowano zjawiska *VF* ze względu na rozcieńczenie profili stężeń podczas migracji próbki w zestawie chromatograficznym. W celu wyeliminowania nadmiernego rozmycia profilu stężenia w długich pętlach dozujących, próbka została podana do układu poprzez *superloop*. Do symulacji przebiegu elucji zastosowano model *CFD* z geometrią 2D, ponieważ w ten sposób skrócono czas obliczeń, jednak dokładność predykcji była w tym przypadku wystarczająca.

Ponieważ niejednorodność upakowania cząstek złoża w kolumnie pominięto, predykcje pików chromatograficznych były takie same dla geometrii 2D jak i 3D. W modelu *CFD* uwzględniono lokalne zmiany lepkości, gęstości a także dyfuzyjności glicerolu w zależności od jego stężenia. W złożu chromatograficznym uwzględniono anizotropię dyspersji. Wartość współczynnika y_1 z równania (1.28) przyjęto taką samą jak w rozdz. 3.2.1 ($y_1 = 0.7$), natomiast wartość współczynnika $D_{Gly,L}$ wyznaczono z liczby Pecleta (równanie (1.31)). Model numeryczny rozwiązano bez stosowania żadnych poprawek. Symulacje numeryczne nałożono na dane doświadczalne na rys. 3.17. A) i B). Stwierdzono, że kształty pików chromatograficznych w zastosowanych warunkach procesu są powtarzalne i przewidywalne. Iniekcje przeprowadzono przy różnych stężeniach glicerolu w próbce, tj. 20, 40 i 60% w/w, co odpowiadało stosunkowi lepkości $\frac{\eta_{glic}}{\eta_{woda}}$ (tzw. współczynnik mobilności) odpowiednio 1.7, 3.5 oraz 9.9. Zjawisko *VF* można zaobserwować przy najwyższym stosunku lepkości, tym samym przy najwyższym stężeniu glicerolu, tj. 60% w/w oraz przy nastrzyku 1 mL. Długość złoża porowatego w kolumnie zwiększyła rozmycie profilu stężenia, co zobrazowano na rys. 3.17. C) w postaci pików chromatograficznych, zaś na rys. 3.18. w postaci ich wariancji. Liniami kreskowo-kropkowanymi na rys 3.17 A) i B) zaprezentowano symulacje bez uwzględnienia anizotropii dyspersji w złożu kolumny chromatograficznej.

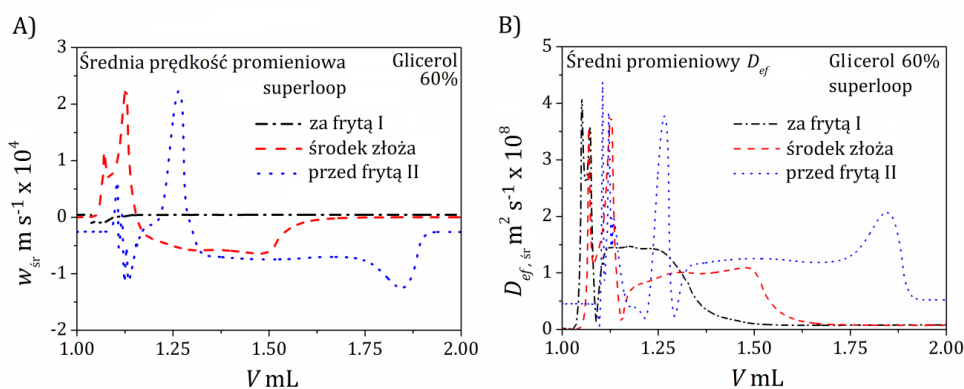


Rys. 3.17. Eksperymentalne i numeryczne profile stężenia glicerolu na wyjściu z zestawu chromatograficznego: **A)** $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$ i $L_{\text{złoże}} = 11 \text{ mm}$, **B)** $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$ i $L_{\text{złoże}} = 11 \text{ mm}$, **C)** $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$ i $L_{\text{złoże}} = 55 \text{ mm}$.



Rys. 3.18. Wariancja pików glicerolu w różnych miejscach drogi elucji przy różnych długościach złoża upakowanego w kolumnie

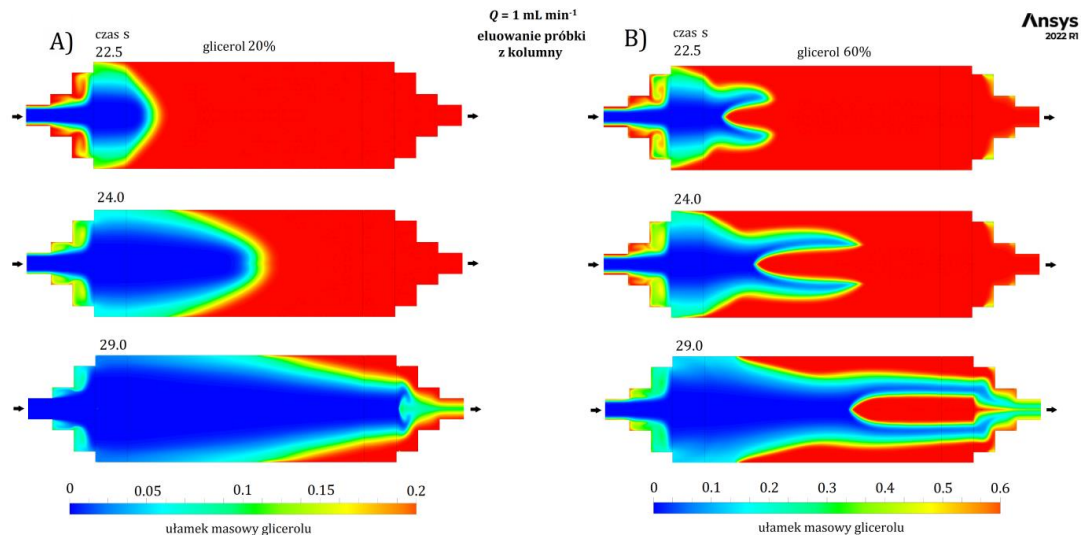
Deformacja pików chromatograficznych próbki glicerolu 60% w/w wynikała z silnej anizotropii dyspersji w kierunku promieniowym, wywołanej przez bardzo skomplikowany rozkład prędkości w złożu kolumny, co zilustrowano na rys. 3.19. A) i współczynnika dyspersji w kierunku promieniowym na rys. 3.19 B). Przy prędkościach bliskich zeru mechanizm transportu masy był zdominowany przez dyfuzję, co znacznie umacniało promieniową heterogeniczność profili stężeń (równanie (1.31)). Wartości ujemne prędkości na rys. 3.19. A) odpowiadają przepływowi wstecznemu w kolumnie. Wzrost objętościowego natężenia przepływu powoduje duże różnice w lokalnych wartościach prędkości, a tym samym anizotropię dyspersji. Właśnie to wywołuje zjawisko *VF*, które przejawia się w postaci deformacji pików chromatograficznych, nasilające się wraz ze wzrostem stężenia glicerolu i prędkości przepływu fazy ruchomej.



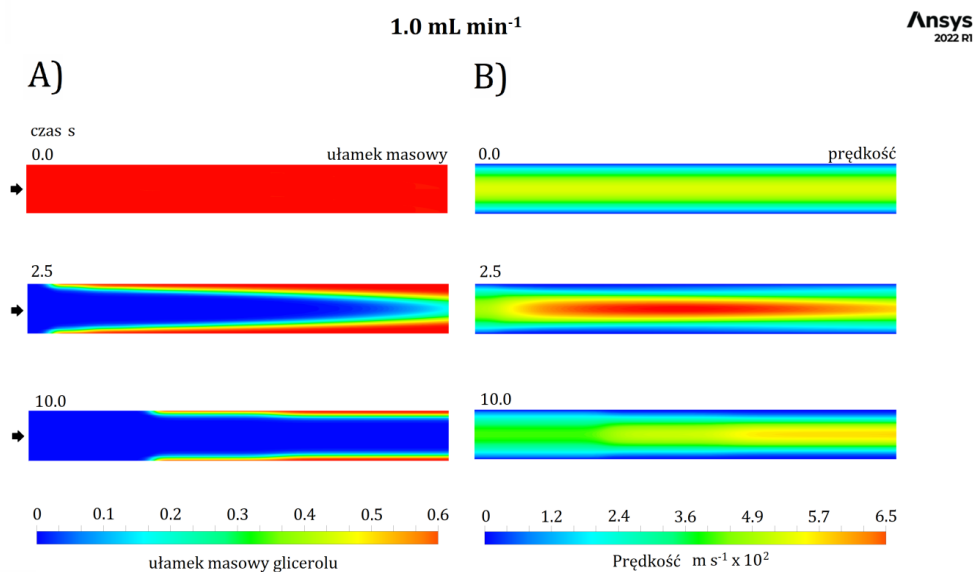
Rys. 3.19. Promieniowa niejednorodność hydrodynamiki w różnych miejscach złoża porowatego w kolumnie. **A)** Profile średniej prędkości promieniowej, **B)** profile średniego efektywnego współczynnika dyspersji promieniowej. $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$.

Na rysunkach 3.20. i 3.21. zaprezentowano kontury stężenia dla elucji próbek glicerolu 60% w/w wzdłuż kolumny w różnych odstępach czasu dla warunków odpowiadających rys. 3.17. B).

Na rys. 3.21. przedstawiono kontury prędkości i stężenia w różnych odstępach czasu dla tej samej próbki, ale eluowanej z kapilary łączącej. Długi czas przylegania lepkiej próbki do ściany kapilary jest spowodowany spadkiem prędkości w kierunku promieniowym.

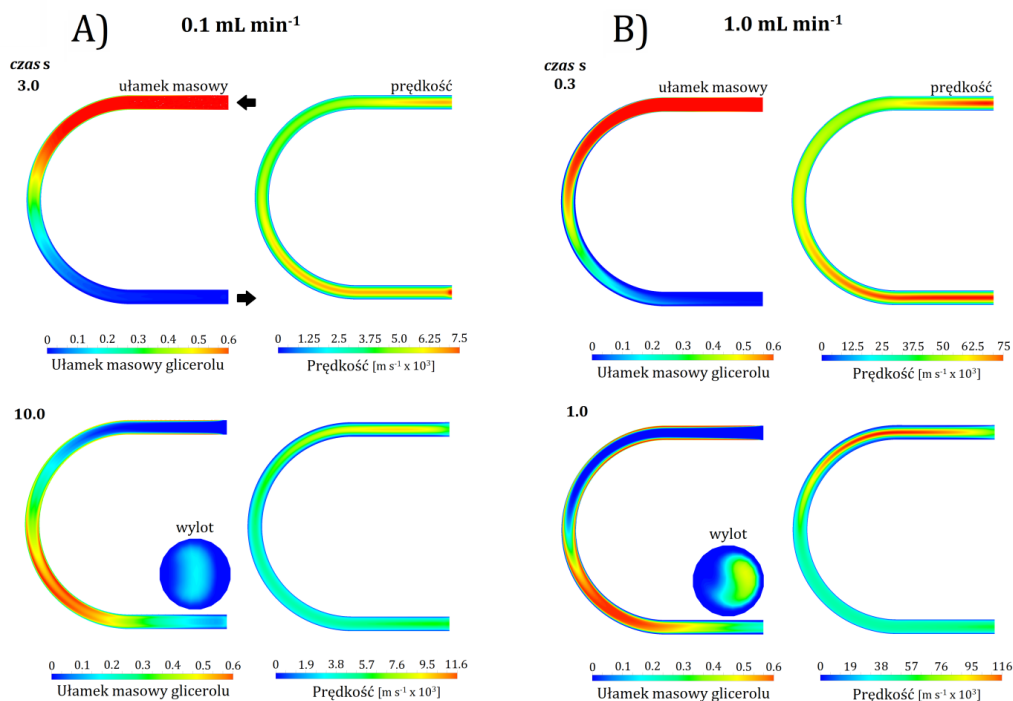


Rys. 3.20. Ilustracja ewolucji konturów stężenia dla elucji próbek glicerolu z kolumny wraz z osprzętem i złożem ($L = 11$ mm). **A)** 20% w/w glicerol w próbce, **B)** 60% w/w glicerol w próbce



Rys. 3.21. Ewolucja konturów stężenia i prędkości dla próbki 60% w/w glicerolu eluowanego z kapilary łączącej w *ECV*, przy $Q = 1$ mL min^{-1} . **A)** Kontury stężenia, **B)** odpowiadające im kontury prędkości. Obecność krzywizn w geometrii drogi elucji komplikuje dodatkowo hydrodynamikę w układzie. Predykcje modelu 3D konturów stężenia oraz prędkości dla próbki glicerolu 60% w/w eluowanego z zakrzywionej części układu, tj. z fragmentu łuku pętli dozującej przedstawiono na rys. 3.22. Jak można zaobserwować, silna heterogeniczność profilu stężenia

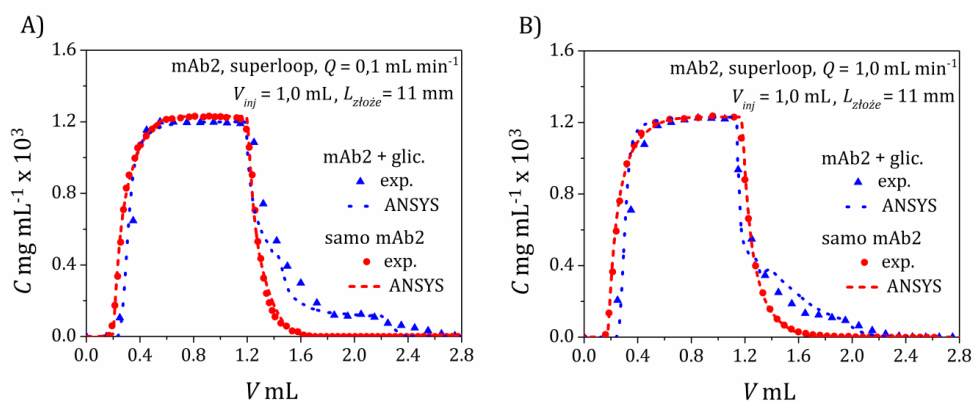
oraz prędkości w promieniowym i osiowym kierunku nasilają się wraz ze wzrostem natężenia przepływu fazy ruchomej. Duża lepkość roztworu sprawia, że nie tworzą się typowe dla przepływu po zakrzywionej geometrii kształty konturów, pokazane powyżej na rys. 3.10. w rozdz. 3.1.4.



Rys. 3.22. Predykcja dla modelu 3D ewolucji konturów stężenia glicerolu w zakrzywionej geometrii. **A)** $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, **B)** $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$

3.2.3.2. Ewolucja profili stężenia białka z glicerolem

W celu określenia wpływu lepkości próbki na przebieg elucji białka przeprowadzono odpowiednie eksperymenty i symulacje komputerowe. Jak już wspomniano, roztwór glicerolu zastosowano, aby naśladować lepki materiał białkowy po wstępnej obróbce. Na rys. 3.23 zilustrowano efekt *VF* dla mAb2 rozpuszczonego w roztworze 60% w/w glicerolu eluowanego z kolumny o długości złoża 11 mm przy prędkościach przepływu 0.1 i 1 mL min^{-1} . Symulacje numeryczne nałożono na profile doświadczalne uzyskane za pomocą analizy *SEC-HPLC* zebranych frakcji. Ponadto, przedstawiono profile stężenia mAb2 bez glicerolu. Deformacja piku i jego ogonowanie jest skorelowane z odkształceniem profilu elucji glicerolu, które przedstawiono na rys. 3.17. Jednak w przypadku mAb2 wpływ natężenia przepływu na intensywność *VF* jest odwrotny niż w przypadku samego glicerolu, tj. wzrost prędkości zmniejsza do pewnego stopnia zjawisko *VF*. Można to tłumaczyć nasileniem zaburzenia przepływu przy wzrastającym natężeniu przepływu, co łagodzi efekt bardzo niskiej dyfuzyjności mAb2 ($D_{\text{mAb2}, m} = 5.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$).



Rys. 3.23. Eksperymentalne i numeryczne profile stężenia mAb2 na wyjściu z całego zestawu chromatograficznego. **A)** $Q = 0,1 \text{ mL min}^{-1}$, **B)** $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$.

4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Metodę numeryczną *CFD* wykorzystano do predykcji profili hydrodynamicznych oraz profili stężenia związków modelowych w pełnym zestawie chromatograficznym systemu ÄKTA, stosowanym typowo do chromatografii białek. Na drogę elucji składały się *ECV*: układ dozowania, kapilary łączące, celki pomiarowe detektorów, *ICV*: adaptory, fryty, dystrybutor i kolektor kolumny oraz złoża chromatograficzne. Model pozwolił na wyjaśnienie przyczyny rozmycia profili stężenia w różnych elementach drogi elucji zestawu chromatograficznego. Do obliczeń numerycznych wykorzystano komercyjny solver *CFD ANSYS Fluent*. Do badań eksperymentalnych i numerycznych użyto związki modelowe: aceton, glicerol oraz białka mAb2 i BSA.

W części badawczej poświęconej *ECV* geometrię zestawu aproksymowano różnymi układami: prostą kapilarą o stałej średnicy, układem prostych kapilar o zmiennej średnicy, odpowiadającej poszczególnym elementom *ECV* oraz układem, w którym uwzględniono krzywiznę drogi przepływu. Rozmycie profilu stężenia zależało od czasu przebywania związków modelowych w układzie, zmiany natężenia przepływu fazy ruchomej oraz zmiany długości drogi przepływu. Wzrost zaburzenia przepływu zaobserwowano w miejscach łączenia kapilar o różnych średnicach, w celce pomiarowej detektora, a także w zakrzywionych elementach drogi elucji, gdzie tworzyły się wiry Deana redukujące wpływ powolnej dyfuzji makrocząstek. Skrócenie czasu przebywania związków małych cząstek o wysokiej dyfuzyjności pogarszało symetrię piku. W przypadku makrocząstek o niskiej dyfuzyjności, zaburzenie przepływu płynu przyspieszało transport masy i poprawiało w pewnym stopniu symetrię piku.

Krętość drogi przepływu to czynnik, który można wykorzystać do poprawy symetrii pików białek eluowanych w *ECV*. Wzrost natężenia przepływu eluentu podczas iniekcji białka może poprawiać wydajność całego układu chromatograficznego.

Zbadano także doświadczalnie i numerycznie rozmycie profili stężenia białek w zestawie chromatograficznym z kolumną w skali laboratoryjnej. W modelu *CFD* zaimplementowano funkcje uwzględniające zależność stężeniową gęstości, lepkości, współczynnika dyfuzyjności oraz anizotropię dyspersji w złożu porowatym kolumny. Symulacje numeryczne dostarczyły informacji o wpływie różnych elementów układu chromatograficznego na rozmycie profilu stężenia przy odmiennych warunkach, tzn. dla różnych długości złoża upakowanego w kolumnie, przy różnych prędkościach przepływu fazy ruchomej oraz dla różnych układów dozowania.

Hydrodynamika *ICV* podczas iniekcji przy użyciu pętli dozującej o najmniejszej objętości oraz w elementach zakrzywionych geometrii pętli iniekcyjnych o większej objętości powodowały największe rozmycie profilu stężenia. Poprawy symetrii profilu stężenia uzyskano przy zastosowaniu *superloop* w układzie dozowania. Zwiększanie objętościowego natężenia przepływu powodowało wzrost wariancji piku, jednak efekt ten był częściowo tłumiony przez zaburzenie przepływu w zakrzywionych częściach *ECV*, które łagodziło efekt niejednorodności promieniowego profilu stężenia.

Zjawisko *VF* zaobserwowano dla dużego stężenia glicerolu, dla którego stosunek lepkości względem fazy ruchomej wynosił ok. 10. Zjawisko *VF* zaobserwowano również podczas elucji białka modelowego mAb2 dodanego do roztworu glicerolu o dużym stężeniu. Zwiększanie prędkości przepływu eluentu częściowo niwelowało ten efekt. Występowanie zjawiska *VF* powodowało, że hydrodynamika w złożu upakowanym w kolumnie miała dominujący wpływ na rozmycie profilu stężenia.

Z racji tego, że wszystkie obserwowane trendy były powtarzalne i przewidywalne, model *CFD* może być wykorzystany do predykcji rozmycia profili stężenia w układach chromatograficznych dla różnych związków oraz przy różnych warunkach prowadzenia procesu. Dzięki temu możliwe jest rozróżnienie udziału efektów hydrodynamicznych zachodzących w *SVV* oraz efektów termodynamicznych i kinetycznych panujących podczas adsorpcji białek. Ma to ogromne znaczenie dla pomyślnego przenoszenia skali procesu rozdzielania od małej skali, w której efekty hydrodynamiczne dominują w elucji białek, do skali przemysłowej, w której efekty związane ze złożem upakowanym w kolumnie determinują wydajność procesu separacji.

W celu dokładnego opisu wpływu lepkości na przebieg procesu chromatograficznego konieczne jest wyznaczenie właściwości reologicznych lepkich zanieczyszczeń dla konkretnych roztworów białka poddanych przetworzeniu.

Temat pracy jest rozwojowy. Podstawą dalszych badań będzie nałożenie przebadanych w niniejszej pracy efektów hydrodynamicznych na proces adsorpcji, który jest podstawowym mechanizmem, na którym opiera się rozdzielanie chromatograficzne oraz opis towarzyszących zjawisk.

5. SPIS RYSUNKÓW

Rozdział I

Rys. 1.1. UPSTREAM PROCESSING (<i>USP</i>) JAKO PROCES PRODUKCJI BIOFARMACEUTYKÓW. OPRACOWANIE WŁASNE.	14
Rys. 1.2. DOWNSTREAM PROCESSING (<i>DSP</i>) JAKO PROCES PROWADZĄCY DO UZYSKANIA GŁĘBOKO OCZYSZCZONEGO PRODUKTU. OPRACOWANIE WŁASNE.....	15
Rys. 1.3. ZESTAW CHROMATOGRAFICZNY Z WYRÓŻNIENIEM DROGI ELUCJI BADANEGO ZWIĄZKU. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [4]	16
Rys. 1.4. <i>CFD</i> JAKO NARZĘDZIE DO ROZWIĄZYWANIA WIELU ZAGADNIENI. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [23].	18
Rys. 1.5. KSZTAŁTOWANIE PROFILU LAMINARNEGO PODCZAS PRZEPLYWU CIECZY W KAPILARZE CHROMATOGRAFU CIECZOWEGO.....	19
Rys. 1.6. DYFUZJA WIROWA W PRZESTRZENIACH KOLUMNY WYPEŁNIONEJ ZŁOŻEM POROWATYM. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [33].	20
Rys. 1.7. DYSERSJA WZDŁUŻNA W KOLUMNIE CHROMATOGRAFICZNEJ. ROZMYCIE PIKU WYNIKŁE Z PRZEPLYWU. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [34]	21
Rys. 1.8. STRUKTURY PALCOWE TWORZĄCE SIĘ PODCZAS WPROWADZANIA WODY DO GLICEROLU. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [37]......	22
Rys. 1.9. GRAFICZNA ILUSTRACJA ELEMENTÓW SKOŃCZONYCH A) DWUWYMIAROWYCH, B) TYPOWYCH DLA PRZESTRZENI TRÓJWYMIAROWEJ. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [64].	27
Rys. 1.10. ILUSTRACJA POJEDYNCZEGO ELEMENTU SIATKI A) USTRUKTURYZOWANEJ PRZEZ <i>MES</i> , B) KOMÓRKI UZYSKANEJ POPRZECZ <i>MOS</i> . OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [68]	29
Rys. 1.11. RÓŻNE DYSZYPLINY ZAWARTE W RAMACH <i>CFD</i> . OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [70]	29
Rys. 1.12. PRZYKŁAD POPRAWNIE ZDEFINIOWANYCH WARUNKÓW BRZEGOWYCH W PRZEPLYWIE PRZEZ PROSTĄ RURĘ. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [72]......	30
Rys. 1.13. SCHEMAT PREZENTUJĄCY KOLEJNE KROKI PROWADZĄCE DO KOMPLETNEJ ANALIZY NUMERYCZNEJ. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [74].	31

Rozdział II

- RYS. 2.1.** ILUSTRACJA ZESTAWÓW CHROMATOGRAFICZNYCH UŻYTYCH DO BADAŃ **A)** CHROMATOGRAF CIECZOWY ÄKTA PURIFIER. **B)** CHROMATOGRAF DO SEC FIRMY THERMO FISHER SCIENTIFIC. OPRACOWANIE WŁASNE 38
- RYS. 2.2.** ZESTAW EKSPERYMENTALNY ECV Z OPISANYMI ELEMENTAMI DROGI ELUCJI 40
- RYS. 2.3.** ILUSTRACJA KOLUMNY CHROMATOGRAFICZNEJ UŻYTEJ DO BADAŃ. **A)** KOLUMNA TRICORN BEZ WYPEŁNIENIA; **B)** KOLUMNA TRICORN UPAKOWANA ZŁOŻEM POROS XS 41
- RYS. 2.4.** DROGA ELUCJI W ZESTAWIE CHROMATOGRAFICZNYM Z ZAMONTOWANĄ KOLUMNĄ 41
- RYS. 2.5.** GRAFICZNA ILUSTRACJA RÓŻNYCH KONFIGURACJI UKŁADÓW ECV. OPRACOWANIE WŁASNE 44
- RYS. 2.6.** DROGA ELUCJI UKŁADU CHROMATOGRAFICZNEGO: **A)** Z ŁĄCZNIKIEM O ZEROWEJ DŁUGOŚCI, **B)** Z KOLUMNĄ O ZEROWEJ DŁUGOŚCI, **C)** Z KOLUMNĄ ZAWIERAJĄCĄ UPAKOWANE ZŁOŻE 46
- RYS. 2.7.** ZDYSKRETYZOWANY MODEL 2D Z OPISANYMI WARUNKAMI BRZEGOWYMI, WIDOK W MIEJSCU POŁĄCZENIA KAPILAR. 47
- RYS. 2.8.** ZDYSKRETYZOWANY MODEL 2D FRAGMENTU UKŁADU Z UPAKOWANĄ ZŁOŻEM KOLUMNĄ CHROMATOGRAFICZNĄ. 48
- RYS. 2.9.** ILUSTRACJA SIATKI DLA MODELU 3D MIEJSCA WLOTOWEGO PĘTLI DOZUJĄCEJ. 49
- RYS. 2.10.** PRZEKRÓJ SIATKI MODELU 3D W MIEJSCU POŁĄCZENIA KAPILAR. 49
- RYS. 2.11.** PRZEKRÓJ SIATKI 3D W MIEJSCU POŁĄCZENIA KAPILARY Z CELKĄ POMIAROWĄ DETEKTORA. 49

Rozdział III

- RYS. 3.1.** ILUSTRACJA WPŁYWU **A)** NATĘŻENIA PRZEPLYWU I **B)** MASY CZĄSTECZKOWEJ NA KSZTAŁT PROFILI STĘŻENIA W ECV. OBJĘTOŚĆ RETENCJI OZNACZONO PRZEZ V . SYMBOLE – DANE EKSPERYMENTALNE, LINIE – SYMULACJE NUMERYCZNE 52
- RYS. 3.2.** EKSPERYMENTALNE I NUMERYCZNE PROFILE STĘŻENIA ACETONU DLA RÓŻNEJ GEOMETRII UKŁADU ECV. **A)** KRÓTKA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **B)** KRÓTKA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **C)** DŁUGA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **D)** DŁUGA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$ 53
- RYS. 3.3.** WARIANCJE PIKÓW OBLICZONE DLA EKSPERYMENTALNYCH PROFILI STĘŻENIA ACETONU (EXP.) ORAZ PRZEWIDZIANE PRZEZ MODEL NUMERYCZNY DLA RÓŻNEJ GEOMETRII ECV, PRZY DWÓCH OBJĘTOŚCIOWYCH NATĘŻENIACH PRZEPLYWU Q . **A)** KRÓTKA DROGA PRZEPLYWU, **B)** DŁUGA DROGA PRZEPLYWU. 54

- Rys. 3.4.** DOŚWIADCZALNE I NUMERYCZNE PROFILE STĘŻENIA BSA DLA RÓŻNEJ GEOMETRII *ECV*, PRZY RÓŻNYCH NATĘŻENIACH PRZEPLYWU ORAZ DŁUGOŚCIACH DRÓG PRZEPLYWU. **A)** KRÓTKA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **B)** KRÓTKA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **C)** DŁUGA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **D)** DŁUGA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$ 55
- Rys. 3.5.** WARIANCJE PIKÓW OBLICZONE DLA EKSPERYMENTALNYCH PROFILI STĘŻENIA BSA (EXP.) ORAZ PRZEWIDZIANE PRZEZ MODEL NUMERYCZNY DLA RÓŻNEJ GEOMETRII *ECV*, PRZY DWÓCH OBJĘTOŚCIOWYCH NATĘŻENIACH PRZEPLYWU. **A)** KRÓTKA DROGA PRZEPLYWU, **B)** DŁUGA DROGA PRZEPLYWU..... 55
- Rys. 3.6.** SYMULACJE PROFILI STĘŻENIA W ŚRODKU KAPILARY ŁĄCZĄCEJ ($S_2VC_1(0,5)$) I NA KOŃCU *ECV* (S_2VC_1D). **A)** ACETON, KRÓTKA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **B)** ACETON, KRÓTKA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **C)** BSA, KRÓTKA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **D)** BSA, KRÓTKA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$ 56
- Rys. 3.7.** EKSPERYMENTALNE I NUMERYCZNE PROFILE STĘŻENIA BSA W INIEKCJACH O DUŻEJ OBJĘTOŚCI Z PĘTLI DOZUJĄCEJ DLA RÓŻNEJ GEOMETRII *ECV*, PRZY RÓŻNYCH NATĘŻENIACH PRZEPLYWU. **A)** KRÓTKA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **B)** KRÓTKA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$ 57
- Rys. 3.8.** EKSPERYMENTALNE I NUMERYCZNE PROFILE STĘŻENIA ACETONU I BSA W INIEKCJACH O DUŻEJ OBJĘTOŚCI Z UŻYCIEM *SUPERLOOP* DLA RÓŻNYCH GEOMETRII *ECV* DLA DŁUGIEJ DROGI PRZEPLYWU. **A)** ACETON, DŁUGA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **B)** BSA, DŁUGA DROGA PRZEPLYWU, $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$ 58
- Rys. 3.9.** EWOLUCJA PROFILI STĘŻENIA BSA; WPŁYW ZMIANY ŚREDNICY KAPILARY. KONTURY PROFILU STĘŻENIA PRZY **A)** MAŁYM, **B)** DUŻYM NATĘŻENIU PRZEPLYWU, W RÓŻNYCH ODSTĘPACH CZASU 59
- Rys. 3.10.** EWOLUCJA PROFILI STĘŻEŃ BSA W ŁUKU PĘTLI DOZUJĄCEJ PRZY PRĘDKOŚCI **A)** 0.1 mL MIN^{-1} , **B)** 1 mL MIN^{-1} 60
- Rys. 3.11.** DOŚWIADCZALNE I NUMERYCZNE PROFILE STĘŻEŃ MAb2 DLA PĘTLI DOZUJĄCEJ 0.01 mL NA WYLOCIE Z RÓŻNYCH DRÓG ELUCJI PRZY PRĘDKOŚCI **A)** $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **B)** $Q = 1.0 \text{ mL MIN}^{-1}$. 63
- Rys. 3.12.** EKSPERYMENTALNE I NUMERYCZNE PROFILE STĘŻEŃ MAb2 UZYSKANE NA WYLOCIE Z DROGI ELUCJI Z KOLUMNĄ UPAKOWANĄ ZŁOŻEM POROWATYM PRZY PRĘDKOŚCI **A)** $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **B)** $Q = 1.0 \text{ mL MIN}^{-1}$ 63
- Rys. 3.13.** WARIANCJE PROFILI STĘŻENIA BIAŁKA W RÓŻNYCH MIEJSCACH DROGI ELUCJI DLA ZESTAWU CHROMATOGRAFICZNEGO Z PĘTLĄ DOZUJĄCĄ O OBJĘTOŚCI 0.01 mL . **A)** WPŁYW DŁUGOŚCI ZŁOŻA POROWATEGO, **B)** WPŁYW NATĘŻENIA PRZEPLYWU ELUENTU.

- OZNACZENIA LICZBOWE NA GÓRNYM RYSUNKU: 1 – PRZED FRYTĄ I, 2 – ZA FRYTĄ I, 3 – PRZED FRYTĄ II, 4 – ZA KOLUMNĄ, 5 – WYLOT..... 65
- Rys. 3.14.** WARIANCJE PIKÓW BIAŁKA W RÓŻNYCH MIEJSCACH DROGI ELUCJI. **A)** WPŁYW DŁUGOŚCI ZŁOŻA UPAKOWANEGO NA ROZMYCIE PROFILU STĘŻENIA W UKŁADZIE Z PĘTLĄ DOZUJĄCĄ, **B)** WPŁYW NATĘŻENIA PRZEPLYWU FAZY RUCHOMEJ NA ROZMYCIE PROFILU STĘŻENIA DLA UKŁADU Z PĘTLĄ DOZUJĄCĄ OBJĘTOŚCI 0.5 mL, **C)** WPŁYW PRĘDKOŚCI PRZEPLYWU NA ROZMYCIE PROFILU BIAŁKA W PRZYPADKU UŻYCIA *SUPERLOOP* W UKŁADZIE DOZOWANIA, PRZY TEJ SAMEJ OBJĘTOŚCI INIEKCJI. OZNACZENIA LICZBOWE 1, 2, 3, 4, 5 JAK NA RYSUNKU 3.13. 66
- Rys. 3.15.** EKSPERYMENTALNE I NUMERYCZNE PROFILE STĘŻENIA MAB2 PRZY INIEKCJI ZA POMOCĄ PĘTLI DOZUJĄCEJ O OBJĘTOŚCI 0.5 mL; **A)** $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **B)** $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$. DŁUGOŚĆ ZŁOŻA 11 MM..... 67
- Rys. 3.16.** EKSPERYMENTALNE I NUMERYCZNE PROFILE STĘŻENIA MAB2 UZYSKANE PRZEZ INIEKCJĘ Z PĘTLI DOZUJĄCEJ ORAZ *SUPERLOOP* PRZY PRĘDKOŚCI $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$ 67
- Rys. 3.17.** EKSPERYMENTALNE I NUMERYCZNE PROFILE STĘŻENIA GLICEROLU NA WYJŚCIU Z ZESTAWU CHROMATOGRAFICZNEGO: **A)** $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$ I $L_{\text{ZŁOŻE}} = 11 \text{ MM}$, **B)** $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$ I $L_{\text{ZŁOŻE}} = 11 \text{ MM}$, **C)** $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$ I $L_{\text{ZŁOŻE}} = 55 \text{ MM}$ 68
- Rys. 3.18.** WARIANCJA PIKÓW GLICEROLU W RÓŻNYCH MIEJSCACH DROGI ELUCJI PRZY RÓŻNYCH DŁUGOŚCIACH ZŁOŻA UPAKOWANEGO W KOLUMNIE..... 69
- Rys. 3.19.** PROMIENIOWA NIEJEDNORODNOŚĆ HYDRODYNAMIKI W RÓŻNYCH MIEJSCACH ZŁOŻA POROWATEGO W KOLUMNIE. **A)** PROFILE ŚREDNIEJ PRĘDKOŚCI PROMIENIOWEJ, **B)** PROFILE ŚREDNIEGO EFEKTYWNEGO WSPÓŁCZYNNIKA DYSPERSJI PROMIENIOWEJ. $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$ 69
- Rys. 3.20.** ILUSTRACJA EWOLUCJI KONTURÓW STĘŻENIA DLA ELUCJI PRÓBЕК GLICEROLU Z KOLUMNY WRAZ Z OSPRZĘTEM I ZŁOŻEM ($L = 11 \text{ MM}$). **A)** 20% W/W GLICEROL W PRÓBCE, **B)** 60% W/W GLICEROL W PRÓBCE 70
- Rys. 3.21.** EWOLUCJA KONTURÓW STĘŻENIA I PRĘDKOŚCI DLA PRÓBKI 60% W/W GLICEROLU ELUOWANEGO Z KAPILARY ŁĄCZĄCEJ W *ECV*, PRZY $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$. **A)** KONTURY STĘŻENIA, **B)** ODPOWIADAJĄCE IM KONTURY PRĘDKOŚCI. 70
- Rys. 3.22.** PREDYKCJA DLA MODELU 3D EWOLUCJI KONTURÓW STĘŻENIA GLICEROLU W ZAKRZYWIONEJ GEOMETRII. **A)** $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **B)** $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$ 71
- Rys. 3.23.** EKSPERYMENTALNE I NUMERYCZNE PROFILE STĘŻENIA MAB2 NA WYJŚCIU Z CAŁEGO ZESTAWU CHROMATOGRAFICZNEGO. **A)** $Q = 0.1 \text{ mL MIN}^{-1}$, **B)** $Q = 1 \text{ mL MIN}^{-1}$ 72

6. SPIS TABEL

Rozdział II

TABELA 2.1. ZWIĄZKI MODELOWE WYKORZYSTANE DO BADAŃ EKSPERYMENTALNYCH	37
TABELA 2.2. SZCZEGÓŁOWE INFORMACJE DOTYCZĄCE GEOMETRII ELEMENTÓW STOSOWANYCH W ZESTAWIE BADAWCZYM <i>ECV</i>	39
TABELA 2.3. SZCZEGÓŁOWE INFORMACJE DOTYCZĄCE WYMIARÓW ELEMENTÓW STOSOWANYCH W ZESTAWIE Z KOLUMNĄ CHROMATOGRAFICZNĄ	41
TABELA 2.4. INFORMACJE DOTYCZĄCE SKŁADU PRÓBEK, WARUNKÓW ELUCJI I DETEKЦИИ STOSOWANYCH W EKSPERYMENTACH ELUCYJNYCH.	42
TABELA 2.5. WYMIARY RÓŻNYCH KONFIGURACJI UKŁADÓW <i>ECV</i>	45
TABELA 2.6. WYMIARY ELEMENTÓW ZESTAWU <i>SVV</i>	46

Rozdział III

TABELA 3.1. WYNIKI OBLICZEŃ LICZY D_N ORAZ $D_N^2 S_C$ OBLICZONE DLA MAŁEJ I DUŻEJ PĘTLI DOZUJĄCEJ	60
TABELA 3.2. UDZIAŁ ELEMENTÓW ZESTAWU CHROMATOGRAFICZNEGO W CAŁKOWITEJ WARIANCJI PIKU NA WYLOCIE Z UKŁADU DLA PĘTLI INIEKCYJNEJ 0.01 mL	64
TABELA 3.3. UDZIAŁ ELEMENTÓW ZESTAWU CHROMATOGRAFICZNEGO W CAŁKOWITEJ WARIANCJI PIKU NA WYLOCIE Z UKŁADU DLA PĘTLI INIEKCYJNEJ 0.5 mL	65

7. NOMENKLATURA

AC – affinity chromatography- z ang. chromatografia powinowactwa

API – active pharmaceutical ingredient – z ang. aktywny składnik farmaceutyczny

CAD – computer aided design – z ang. projektowanie wspomagane komputerowo

CFD – computational fluid dynamics– z ang. obliczeniowa (numeryczna) mechanika płynów

CRR – cząstkowe równania różniczkowe

DSP – downstream processing– z ang. proces dalszego przetwarzania

ECV – extra-column volume – z ang. pusta objętość układu pozakolumnowego

ICV – intra-column volume – z ang. pusta objętość przestrzeni wewnątrzcolumnowej

I.D. – inner diameter – z ang. średnica wewnętrzna

IEC – ion exchange chromatography - z ang. chromatografia jonowymienna

HIC – hydrophobic interaction chromatography - z ang. chromatografia oddziaływań hydrofobowych

LC – liquid chromatography – z ang. chromatografia cieczowa

mAb2 – monoclonal antibody – z ang. przeciwciało monoklonalne

MES – metoda elementów skończonych

MOS – metoda objętości skończonych

MRS – metoda różnic skończonych

SEC – size-exclusion chromatography - z ang. chromatografia wykluczania

SVV – system void volume – z ang. pusta objętość układu chromatograficznego

UDF – user-defined functions – z ang. funkcje definiowane przez użytkownika

USP – upstream processing – z ang. proces przetwarzania wstępnego

VF – viscous fingering – z ang. palcowanie lepkościowe

WB – warunki brzegowe

C_2 – współczynnik oporu bezwładności [–],

$D_{i,L}$ – dyspersja hydrodynamiczna $\left[\frac{m^2}{s}\right]$,

$D_{i,L,ef.}$ – efektywny współczynnik dyspersji $\left[\frac{m^2}{s}\right]$,

$D_{i,m}$ – współczynnik dyfuzji molekularnej $\left[\frac{m^2}{s}\right]$,

dp – wielkość cząstek złoża [m],

ε_e –porowatość zewnętrzna złoża [–],

ε_p – porowatość wewnętrzna ziarna [–],

ε_t – porowatość całkowita złoża [-],

\vec{F} – lepkościowe i bezwładnościowe straty w ośrodku porowatym [-],

\vec{g} – przyspieszenie grawitacyjne $\left[\frac{m}{s^2}\right]$,

J_i – strumień dyfuzji molekularnej $\left[\frac{kg}{m^2s^{-1}}\right]$,

K – przepuszczalność [m^2],

p – ciśnienie $\left[\frac{N}{m^2}\right]$,

R_c – promień krzywizny [m],

T – temperatura [$^{\circ}C$],

\vec{w} – prędkość liniowa $\left[\frac{m}{s}\right]$,

w/w – procent wagowy [%],

x_i – ułamek masowy [-],

η – lepkość dynamiczna $\left[\frac{kg}{m\ s}\right]$,

$\frac{\eta_{glic}}{\eta_{woda}}$ – współczynnik mobilności [-],

ρ – gęstość $\left[\frac{kg}{m^3}\right]$,

$\vec{\tau}$ – tensor naprężeń [Pa],

Dn – liczba kryterialna Deana [-],

Pe – liczba kryterialna Pecleta [-],

Re – liczba kryterialna Reynoldsa [-],

Sc – liczba kryterialna Schmidta [-].

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] *BIOPHARMACEUTICALS MARKET - GROWTH, TRENDS, COVID-19 IMPACT, AND FORECASTS* (2023 - 2028), <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biopharmaceuticals-market-industry>, dostęp dnia: 20.04.2023.
- [2] C. Sánchez-Trasviña, M. Flores-Gatica, D. Enriquez-Ocho, M. Rito-Palomares, K. Mayolo-Deloisa, *Purification of Modified Therapeutic Proteins Available on the Market: An Analysis of Chromatography-Based Strategies*, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021), doi: 10.3389/fbioe.2021.717326.
- [3] M. Kozorog, S. Caserman, M. Grom, F. A. Vicente, A. Pohar, B. Likozar, *Model-based process optimization for mAb chromatography*, *Separation and Purification Technology* 305 (2023) 122528, doi: 10.1016/j.seppur.2022.122528.
- [4] G. Carta, A. Jungbauer, *Protein Chromatography. Process Development and Scale-Up*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, (2010) IX.
- [5] *Introduction to Biomanufacturing, Chapter 10: Introduction to Upstream Processing*, <https://biomanufacturing.org/uploads/files/316679799610163545-chapter-10-restricted.pdf>, dostęp dnia 20.04.2023.
- [6] U. Gottschalk, *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. 3.57 - Overview of *Downstream Processing in the Biomanufacturing Industry*, Academic Press 3 (2011) 669-682, doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00238-5.
- [7] R. Freitag, *Chromatographic Techniques in the Downstream Processing of Proteins in Biotechnology*, *Animal Cell Biotechnology. Methods in Molecular Biology* 1104 (2013) 419-458, doi: 10.1007/978-1-62703-733-4_25.
- [8] D. Antos, K. Kaczmarski, W. Piątkowski, *Chromatografia preparatywna jako proces rozdzielania mieszanin*, Red. Warszawa: Wydawnictwo WNT (2014) ISBN 978-83-7926-181-9, s. 15-16, 98-110.
- [9] S. P. Schwaminger, I. Zimmermann, S. Berensmeier, *Current research approaches in downstream processing of pharmaceutically relevant proteins*, *Current Opinion in Biotechnology*, 77 (2022) 102767, doi: 10.1016/j.copbio.2022.102768.
- [10] D. Pfister, M. Morbidelli, *Process for Protein PEGylation*. *J. Control Release* 180 (2014) 134–149, doi:10.1016/j.jconrel.2014.02.002.
- [11] N. T. T. Nguyen, J. S. Lee, S. Yun, E. K. Lee, *Separation of Mono- and Di-PEGylate of Exenatide and Resolution of Positional Isomers of Mono-PEGylates by Preparative Ion Exchange Chromatography*, *J. Chromatogr. A.* 1457 (2016) 88–96, doi: 10.1016/j.chroma.2016.06.035.

- [12] Y. Huang, Y. Zhai, and Z. Su, *Microspheres for Separation of PEG-Modified Biomolecules in Microspheres and Microcapsules in Biotechnology: Design, Preparation, and Applications*. New York: Pan Stanford Publishing, (2013) 183–202. doi: 10.1201/b14540.
- [13] A. Matte, *Recent Advances and Future Directions in Downstream Processing of Therapeutic Antibodies*, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (15) (2022) 8663, doi: 10.3390/ijms23158663.
- [14] D. K. Babi, J. Griesbach, S. Hunt, F. Insaïdo, D. Roush, R. Todd, A. Staby, J. Welsh, F. Wittkopp, *Opportunities and challenges for model utilization in the biopharmaceutical industry: Current versus future state*, *Curr. Opin. Chem. Eng.* 36 (2022) 100813, doi: 10.1016/j.coche.2022.100813.
- [15] A. Schultze-Jena, M.A. Boon, P.J.Th. Bussmann, A.E.M. Janssen, A. van der Padt, *The counterintuitive role of extra-column volume in the determination of column efficiency and scaling of chromatographic processes*, *J. Chromatogr. A* 1493 (2017) 49-56.
- [16] M. Kołodziej, D. G. Sauer, J. Beck, W. K. Marek, R. Hahn, A. Jungbauer, A. Dürauer, W. Piątkowski, D. Antos, *Scale up of a chromatographic capture step for a clarified bacterial homogenate – Influence of mass transport limitation and competitive adsorption of impurities*, *J. Chromatogr. A* 1618 (2020) 460856, doi: 10.1016/j.chroma.2020.460856
- [17] I. Gosling, *Process simulation and modeling for industrial bioprocessing: Tools and techniques*, *Ind. Biotech.* 1:2 (2005) 106-109, doi: 10.1089/ind.2005.1.106
- [18] T. H. Hoang, D. Cuerrier, S. McClintock, M. Di Maso, *Computer Assisted Method Development in High-Performance Liquid Chromatography*, *J. Chromatogr. A* 991 (2) (2003) 281-287, doi: 10.1016/S0021-9673(03)00206-1
- [19] S.H. Lee, E. Lee, I.H. Kim, *Simulation of SMB [Simulated Moving Bed] Chromatography for Separation of L-ribose and L-arabinose by ASPEN chromatography*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 23 (2) (2008) 135-141
- [20] F. Gritti, *Perspective on the Future Approaches to Predict Retention in Liquid Chromatography*, *Anal. Chem.* 93 (14) (2021) 5653–5664, doi: 10.1021/acs.analchem.0c05078
- [21] S. Sachio, C. Kontoravdi, M. M. Papathanasiou, *Model-Based Design Space for Protein A Chromatography Resin Selection*, *Comp. Aid. Chem. Eng.* 51 (2022) 733-738, doi: 10.1016/B978-0-323-95879-0.50123-5
- [22] I. A. Haidar Ahmad, R. Bennett, D. Makey, V. Shchurik, H. Lhotka, B. F. Mann, R. McClain, T. Lu, X. Hua, C. A. Strulson, J. W. Loughney, I. Mangion, A. A. Makarov, E. L. Regalado, *In silico method development for the reversed-phase liquid chromatography separation of proteins using chaotropic mobile phase modifiers*, *J. Chromatogr. B* 1173 (2021) 122587, doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122587

- [23] C. Sharma, D. Malhotra, A. S. Rathore, *Review of Computational fluid dynamics applications in biotechnology processes*, *Biotechnol Progress*, 27 (2011) 1497-1510, doi: 10.1002/btpr.689
- [24] K. Baran, W. K. Marek, W. Piątkowski, D. Antos, *Effect of flow behavior in extra-column volumes on the retention pattern of proteins in a small column*, *J. Chromatogr. A* 1598 (2019) 154-162, doi: 10.1016/j.chroma.2019.03.060
- [25] R. S. Subramanian, *Unsteady convective diffusion in capillary chromatography*, *J. Chromatogr. A* 101 (1974) 253-270, doi: 10.1016/S0021-9673(00)82843-5
- [26] A. Shankar, A. M. Lenhoff, *Dispersion in round tubes and its implications for extracolumn dispersion*, *J. Chromatogr. A*, 556 (1-2) (1991) 235-248, doi: 10.1016/S0021-9673(01)96224-7
- [27] J. C. Giddings, *Dynamics of Chromatography Principles and Theory*, Marcel Dekker, Inc.: New York (1965), s. 325-340
- [28] N. D. Katopodes, *Free-Surface Flow. Chapter 3 – Diffusive Mass Transfer*, *Environmental Fluid Mechanics* (2019) 184-270, doi: 10.1016/B978-0-12-815489-2.00003-4
- [29] A. Siouffi, G. Guiochon, *CHROMATOGRAPHY: THIN-LAYER (PLANAR) | Theory Of Thin-Layer (Planar) Chromatography*, *Encyclopedia of Separation Science* (200) 915-930, doi: 10.1016/B0-12-226770-2/00401-4
- [30] S. Mori, *Aqueous Size-Exclusion Chromatography. Chapter 7- Column Efficiency*, *J. Chromatogr. Lib.* 40 (1998) 171-190, doi: 10.1016/S0301-4770(08)60711-3
- [31] T. Fornstedt, P. Forssén, D. Westerlund, *Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution*, *Anal. Sep. Sci.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany (2015) s. 1–24, doi: 10.1002/9783527678129.assep001
- [32] E. L. Cussler, *Diffusion Mass Transfer in Fluid Systems*, Cambridge University Press, New York (2008), s. 11, 79
- [33] V. R. Meyer, *CHROMATOGRAPHY| Principles*, *Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier (2005) 7-18, doi: 10.1016/B0-12-369397-7/00218-1
- [34] D. Harvey, *Analytical Chemistry 2.1.*, McGraw-Hill, New York (2000), s. 753-770
- [35] J. P. Grinias, J. M. Godinho, *Liquid Chromatography Column Design and Dimensional Analysis of the van Deemter Equation*, *LCGC North America* 40 (8) (2022) 367-370, doi: 10.56530/lcgc.na.kh7671g4
- [36] G. M. Homsy, *Viscous Fingering in Porous Media*, *Ann. Rev. Fluid Mech.* 19 (1987) 271-311, doi: 10.1146/annurev.fl.19.010187.001415

- [37] P. G. Saffman, *Viscous fingering in Hele-Shaw cells*, J. Fluid Mech. 173 (1986) 73-94, doi: 10.1017/S0022112086001088
- [38] P. G. Saffman, G. I. Taylor, *The penetration of a fluid into a porous medium or Hele-Shaw cell containing a more viscous liquid*, Royal Society 245 (1242) (1958), doi: 10.1098/rspa.1958.0085
- [39] A. Pinilla, M. Asuaje, N. Ratkovich, *Experimental and computational advances on the study of Viscous Fingering: An umbrella review*, Heliyon 7 (7) (2021), doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07614
- [40] G. Rousseaux, M. Martin, A. De Wit, *Viscous fingering in packed chromatographic columns: Non-linear dynamics*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 8353 – 8361, doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.040
- [41] W. De Malsche, J. Op De Beeck, H. Gardeniers, G. Desmet, *Visualization and quantification of the onset and the extent of viscous fingering in micro-pillar array columns*, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5511-5517, doi: 10.1016/j.chroma.2009.04.098
- [42] G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, R. A. Shalliker, *Implementations of two-dimensional liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 1189 (1-2) (2008) 109-168, doi: 10.1016/j.chroma.2008.01.086
- [43] G. Guiochon, A. Felinger, D. G. Shirazi, A. M. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography. Chapter 5: Transer Phenomena in Chromatography*, Elsevier Academic Press, USA (2006), s. 269-271
- [44] A. Moussa, S. Deridder, K. Broeckhoven, G. Desmet, *Detailed computational fluid dynamics study of the parameters contributing to the viscous heating band broadening in liquid chromatography at pressures up to 2500 bar in 2.1 mm columns*, J. Chromatogr. A 1661 (2022) 462683, doi: 10.1016/j.chroma.2022.462683
- [45] A. Moussa, S. Deridder, K. Broeckhoven, G. Desmet, *Computational fluid dynamics study of potential solutions to alleviate viscous heating band broadening in 2.1 millimeter liquid chromatography columns*, J. Chromatogr. A 1654 (2021) 462452, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462452
- [46] M. Ch. Kim, S. Pramanik, *Miscible viscous fingering in a packed cylindrical column: Theory and numerics*, Phys. Rev. Fluids 8 (1) (2023) 013901, doi: 10.1103/PhysRevFluids.8.013901
- [47] V. D. Luzanova, N. B. Rozhmanova, Y. V. Volgin, P. N. Nesterenko, *The use of zeolite 13X as a stationary phase for direct determination of water in organic solvents by high-*

performance liquid chromatography, Anal. Chim. Acta 1239 (2023) 340697, doi: 10.1016/j.aca.2022.340697

[48] J. Guo, A. D. Creasy, G. Barker, G. Carta, *Surface induced three-peak elution behavior of a monoclonal antibody during cation exchange chromatography*, J. Chromatogr. A 1474 (2016) 85-94, doi: 10.1016/j.chroma.2016.10.061

[49] B. N. Nwani, C. Merhaben, I. D. Gates, A. M. Benneker, *Numerical simulation of electrokinetic control of miscible viscous fingering*, Phys. Flu. 34 (2022) 124104, doi: 10.1063/5.0126381

[50] H. G. Barth, *Chromatography Fundamentals, Part VI: The Gaussian Distribution and Moment Analysis*, LCGC North America 47 (4) (2019) 269-273.

[51] Y. Kazakevich, R. LoBrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, John Wiley & Sons, Inc. (2007), s. 263-279, 641-677, doi: 10.1002/0470087951

[52] M. Gaur, A. S. Chouhan, *Current Role of Numerical Analysis in Mathematics*, Int. J. Mod. Tren. Sci. Tech. 8 (6) (2022), 412-418, doi: 10.46501/IJMTST0806071

[53] P. Dhere, *Introduction to Numerical Computing*, J. Appl. Computat. Math . 7 (4) (2019), doi: 10.4172/2168-9679.1000423

[54] G. Dahlquist, Å. Björck, N. Andreson, *Numerical Methods*, Dover Publications, Inc., New York (1974), s.1-3

[55] M. Sabawi, *Errors Analysis and Basic Definitions in Numerical Analysis*, Lecture Notes

[56] S. Bakar, S. S. Ganesh, *Introduction to Numerical Analysis*, Lecture Notes for SI 507, Indian Institute of Technology, Bombay

[57] P. J. Olver, *Introduction to Partial Differential Equations*, Undergraduate Texts in Mathematics, Springer (2020), s. 1-5

[58] B. J. Lewis, E. N. Onder, A. A. Prudil, *Advanced Mathematics for Engineering Students. Chpater 5 – Partial differential equations*, Butterworth-Heinemann (2022) 131-164, doi: 10.1016/B978-0-12-823681-9.00013-7

[59] X. Cai, H. P. Langtangen, O. Munthe, *An Object-Oriented Software Framework for Building Parallel Navier-Stokes Solvers*, *Parallel Computational Fluid Dynamics*, North-Holland (1999) 147-154, doi: 10.1016/B978-0444482851-4.50019-0

[60] B. Stoevesandt, G. Steinfeld, L. Höning, *Computational Fluid Dynamics*, Carl von Ossietzky University of Oldenburg, Niemcy (2017), s. 14

[61] D. Patil, S. Kadam, *Basics of computational fluid dynamics: An overview*, IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 1130 (2023) 012042, doi: 10.1088/1755-1315/1130/1/012042

- [62] J. Blazek, *Principles of Solution of the Governing Equations. Computational Fluid Dynamics: Principles and Applications*, Butterworth-Heinemann (2015) 29–72, doi: 10.1016/b978-0-08-099995-1.00003-8
- [63] M. Zeneli, A. Nikolopoulos, S. Karellas, N. Nikolopoulos, *Ultra-High Temperature Thermal Energy Storage, Transfer and Conversion. Chapter 7 - Numerical methods for solid-liquid phase-change problems*, Woodhead Publishing (2021) 165-199, doi: 10.1016/B978-0-12-819955-8.00007-7
- [64] P. Seshu, *Textbook of Finite Element Analysis*, PHI Learning Private Limited, New Delhi (2012), s. 1-3
- [65] K. J. Bathe, *Finite Element Method*. Wiley Encyclopedia of Computer Science and Engineering (2008), doi: 10.1002/9780470050118.ecse159
- [66] A. E. Tekkaya, C. Soyarslan, *Finite Element Method*, CIRP Encyclopedia of Production Engineering, Springer, Berlin (2014) 508-514, doi: 10.1007/978-3-642-20617-7_16699
- [67] R. Eymard, T. Gallouët, R. Herbin. Finite Volume Methods, *Techniques of Scientific Computing (Part 3)* Elsevier (7) (2000) 713-1020, doi: 10.1016/S1570-8659(00)07005-8
- [68] W. Jeong, J. Seong, *Comparison of effects on technical variances of computational fluid dynamics (CFD) software based on finite element and finite volume methods*, Int. J. Mech. Sci. 78 (2014) 19-26, doi: 10.1016/j.ijmecsci.2013.10.017
- [69] M. H. Bhatti, M. Marin, A. Zeeshan, S. I. Abdelsalam, *Editorial: Recent Trends in Computational Fluid Dynamics*, Front. Phys., Sec. Statistical and Computational Physics 8 (2020), doi: 10.3389/fphy.2020.593111
- [70] S. Thabet, T. H. Thabit, *Computational Fluid Dynamics: Science of the Future*, Int. J. Res. Engine. 5 (6) (2018) 430-433, doi: 0.21276/ijre.2018.5.6.2
- [71] J. Tu, G. H. Yeoh H. Liu., *Computational Fluid Dynamics: A Practical Approach*, Elsevier, Butterworth-Heinemann (2018), s. 2-6
- [72] O. Zikanov, *Essential Computational Fluid Dynamics*, Wiley & Sons Inc., USA (2019), s. 27-28
- [73] B. Sundén, *Advances in Heat Transfer. Chapter Two - Advanced Heat Transfer Topics in Complex Duct Flows*, 49 (2017) 37-89, doi: 10.1016/bs.aiht.2017.09.001
- [74] Materiały szkoleniowe firmy ANSYS: *Module 01: Overview of the CFD Process: Introduction to ANSYS Fluent*, <https://www.scribd.com/document/484155978/Fluent-Intro-17-0-Module01-IntroCFD#>, dostępna: 29.03.2023
- [75] ANSYS: ANSYS Fluent Brochure,

<https://www.ansys.com/content/dam/product/fluids/fluent/ansys-fluent-brochure-140.pdf>,
dostęp dnia 29.03.2023

[76] ANSYS Fluent Theory Guide, ANSYS, Inc. (2018),
<http://www.pmt.usp.br/academic/martoran/notasmodelosgrad/ANSYS%20Fluent%20Theory%20Guide%2015.pdf>,
dostęp dnia 29.03.2023

[77] S. Babnik, V. Erklavec-Zajec, B. Oblak, B. Likozar, A. Pohar, *A Review of Computational Fluid Dynamics (CFD) Simulations of Mixing in the Pharmaceutical Industry*, Biomed. J. Scien. Tech. Res. 27 (3) (2020) 20732-20736, doi: 10.26717/BJSTR.2020.27.004494

[78] D. Andresson, R. Sjögren, B. Corbett, *Numerical simulation of the general rate model of chromatography using orthogonal collocation*, Comp. Chem. Eng. 170 (2023) 108068, doi: 10.1016/j.compchemeng.2022.108068

[79] T. Werres, T. C. Schmidt, T. Teutenberg, *Peak broadening caused by using different micro-liquid chromatography detectors*, Anal. Bioanal. Chem. 414 (2022) 6107-6114, doi: 10.1007/s00216-022-04170-9

[80] V. Kumar, O. Khanal. M. Jin, *Modeling the Impact of Holdup Volume from Chromatographic Workstations on Ion-Exchange Chromatography*, Ind. Eng. Chem. Res. 61 (28) (2022), doi: 10.1021/acs.iecr.2c01266

[81] F. Hagemann, D. Wypysek, K. Baitalow, P. Adametz, M. Wessling, *Why device design is crucial for membrane adsorbers*, J. Chromatogr. Op. 2 (2022) 10002, doi: 10.1016/j.jcoa.2021.100029

[82] B. Filip, R. Bochenek, K. Baran, D. Strzałka, D. Antos, *Influence of the geometry of extra column volumes on band broadening in a chromatographic system. Predictions by computational fluid dynamics*, J. Chromatogr. A 1653 (2021) 462410.

[83] M. Ch. Kim, S. Pramanik, *Miscible viscous fingering in a packed cylindrical column: Theory and numerics*, Phys. Rev. Fluids 8 (2023) 013901, doi:10.1103/PhysRevFluids.8.013901

[84] A. Moussa, K. Broeckhoven, G. Desmet, *Fundamental investigation of the dispersion caused by a change in diameter in nano liquid chromatography capillary tubing*, J. Chromatogr. A 1688 (2023) 463719, doi: 10.1016/j.chroma.2022.46371

[85] A. Javidanbardan, V. Chu, J.P. Conde, A. M. Azevedo, *Microchromatography integrated with impedance sensor for bioprocess optimization: Experimental and numerical study of column efficiency for evaluation of scalability*, J. Chromatogr. A 1661 (2022) 462678, doi: 10.1016/j.chroma.2022.462678

- [86] 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, doi: 10.1016/j.chroma.2018.06.057
- [87] H. Boysen, G. Wozny, T. Laiblin, W. Arlt, *CFD Simulation of Preparative HPLC Columns with Consideration of Nonlinear Isotherms*, Chem. Eng. Tech. 26 (6) (2003) 651-655, doi: 10.1002/ceat.200390098
- [88] S. Golshan-Shirazi, G. Guiochon, *Comparison of the various kinetic models of non-linear chromatography*, J. Chromatogr. A 603 (1-2) (1992) 1-11, doi: 10.1016/0021-9673(92)85340-Y
- [89] J. C. Coimbra, M. A. Martins, L. A. Minim, *A simplified CFD model to describe fluid dynamics, mass transport and breakthrough curves performance in cryogel supports for chromatographic separation*, Chem. Eng. Res. Des. 179 (2022) 56-65, doi: 10.1016/j.cherd.2021.12.044
- [90] M. T. Tyn, T. W. Gusek, *Prediction of diffusion coefficients of proteins*, Biotechnol. Bioeng. 35 (1990) 327-338
- [91] G. D'Errico, O. Ortona, F. Capuano, V. Vitagliano, *Diffusion Coefficients for the Binary System Glycerol + Water at 25 °C. A Velocity Correlation Study*, Chem. Eng. Data 49 (6) (2004) 1665-1670.
- [92] N. Cheng, *Formula for the Viscosity of a Glycerol-Water Mixture*, Ind. Eng. Chem. Res. 47 (2008) 3285-3288.
- [93] K. Takamura, H. Fischer, N. R. Morrow, *Physical properties of aqueous glycerol solutions*, J. Petr. Sci. Eng. 98-99 (2012) 50-60.
- [94] S. F. Chung, C. Y. Wen, *Longitudinal dispersion of liquid flowing through fixed and fluidized beds*, J. A. I. Ch. E. 14 (1968) 857-866.
- [95] J. Wu, Y. Wei, S. Li, J. Zhou, Z. Xu, *Computational fluid dynamics simulation and the experimental verification of protein adsorption on a hollow fiber membranes module*, J. Chromatogr. A1687 (2023) 463706, doi: 10.1016/j.chroma.2022.46370
- [96] K. Baran, P. Zimoch, A. Stańczak, W. Piątkowski, D. Antos, *Separation of charge variants of a monoclonal antibody by overloaded ion exchange chromatography*, J. Chromatogr. A, 1658 (2021) 462607, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462607
- [97] T. Hahn, T. Huuk, A. Osberghaus, K. Doninger, S. Nath, S. Hepbildikle, V. Heuveline, J. Hubbuch, *Calibration-free inverse modeling of ion-exchange chromatography in industrial antibody purification*, Eng. Life Sci. 16 (2016) 107-113, doi: 10.1002/elsc.201400248

- [98] A. M. Janssen, *Axial dispersion in laminar flow through coiled tubes*, Chem. Eng. Sci. 31 (1976) 215-218, doi: 10.1016/0009-2509(76)85059-2
- [99] H. Song, Y. Vanderheyden, E. Adams, G. Desmet, D. Cabooter, *Extensive database of liquid phase diffusion coefficients of some frequently used test molecules in reversed-phase liquid chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1455 (2016) 102-112, doi: 10.1016/j.chroma.2016.05.054
- [100] G. Bognár, A. Vencl, *Experimental investigation of viscosity of glycerol based nanofluids containing carbon nanotubes*, Tribology in Industry 41 (2019) 267-273, doi: 10.24874/ti.2019.41.02.12

9. STRESZCZENIE

We wstępnym etapie projektowania procesu chromatografii białek stosuje się laboratoryjne kolumny o małych objętościach, tj. 1 mL lub mniejszych. Miniaturyzacja kolumn powoduje wzrost stosunku objętości pustych układu chromatograficznego (*SVV*) do objętości złoża w kolumnie chromatograficznej. *SVV* zawiera puste przestrzenie pozakolumnowe (*ECV*) oraz puste przestrzenie wewnątrzcolumnowe (*ICV*). Różnice w rozkładzie prędkości w kierunkach osiowym i promieniowym występujące w elementach *SVV* skutkują rozmyciem profilu stężenia. Jest to dodatkowo spotęgowane dużą lepkością roztworów białek, która może spowodować niestabilność przepływu określaną jako palcowanie lepkościowe (*VF*). Błędna interpretacja efektów tych zjawisk uniemożliwia prawidłowe przenoszenie skali procesu.

Niniejsza praca doktorska dotyczy prognozowania i opisu hydrodynamiki zestawu chromatograficznego w skali laboratoryjnej za pomocą modelowania matematycznego przy zastosowaniu Obliczeniowej Mechaniki Płynów (*CFD*). *CFD* wykorzystano do modelowania całej drogi elucji w zestawie chromatograficznym. Do tej pory w doniesieniach literaturowych koncentrowano się głównie na badaniach numerycznych i eksperymentalnych hydrodynamiki wewnątrz kolumny: w *ICV* i na złożu, bez uwzględnienia wpływu *ECV* i zjawiska *VF* na rozmycie profilu stężenia badanych związków.

W ramach realizacji pracy przeprowadzono odpowiednie cykle doświadczalne w zakresie hydrodynamiki całego zestawu chromatograficznego oraz opracowano modele numeryczne, które wykorzystano do predykcji stopnia rozmycia profilu stężenia. Prace badawcze zrealizowano dla różnych związków mało- i wielkocząsteczkowych (białek) oraz przy różnych warunkach procesowych. Badania dotyczyły układów zarówno samych *ECV* jak i *SVV* oraz złoża porowatego, czyli pełnej drogi elucji związków. Dokonano także analizy numerycznej hydrodynamiki lepkiego płynu w złożu porowatym kolumny oraz zjawisko *VF*. Badania zrealizowano w kilku etapach.

W pierwszej części badań przeprowadzono serię eksperymentów i opracowano modele numeryczne hydrodynamiki *ECV*. Analiza numeryczna dostarczyła informacji na temat rozmycia profilu stężenia w *ECV*. Wyniki numeryczne zestawiono z danymi eksperymentalnymi oraz określono w sposób ilościowy wpływ poszczególnych elementów *ECV* na rozmycie pików chromatograficznych.

Druga część badań obejmowała cykle eksperymentalne i symulacje numeryczne dla całego zestawu chromatograficznego z dołączoną kolumną chromatograficzną. Opracowane modele *CFD* obejmowały *ECV*, *ICV* oraz złożo porowate. Określono w sposób ilościowy wpływ

poszczególnych elementów całej drogi elucji zestawu chromatograficznego oraz długość złoża kolumny na rozmycie pików chromatograficznych.

W trzeciej części badań poddano analizie wpływ lepkości płynu na hydrodynamikę oraz kształt profili stężenia. Opracowano model uwzględniający anizotropię dyspersji w porowatym złożu, zależność lepkości, gęstości oraz współczynnika dyfuzji eluowanych związków od ich stężenia w roztworze. Określono wpływ VF na całkowite rozmycie profilu stężenia.

Wyniki badań eksperymentalnych i numerycznych uzupełniają obecny stan wiedzy na temat wykorzystania metod numerycznych w chromatografii cieczowej, zaś zaprezentowane modele predykcyjne mogą być wykorzystane z powodzeniem w etapie projektowania procesu chromatograficznego. Wyniki opublikowano w renomowanym czasopiśmie „*Journal of Chromatography A*” w postaci dwóch spójnych tematycznie publikacji.

10. SUMMARY

In the development stage of protein chromatography columns with small volumes, i.e. 1 mL or less, are used. The miniaturization of columns increases the ratio of the empty volume of the chromatographic system (*SVV*) to the volume of the chromatographic column bed. *SVV* comprises the extra-column void volume (*ECV*) and the intra-column void volume (*ICV*). Differences in the velocity distribution in the axial and radial directions occurring in the *SVV* elements result in band broadening. This can be enhanced by high viscosity of protein solutions, which may result in flow instability, termed as viscous fingering (*VF*). Incorrect interpretation of the effects triggered by these phenomena renders successful scaling up of the process impossible.

This Ph.D. project concerns the prediction and description of the hydrodynamics of a laboratory chromatography system by means of mathematical modeling using Computational Fluid Dynamics (*CFD*). *CFD* was used to model the entire elution path in the chromatography system. So far, literature reports have been mainly focused on numerical studies of hydrodynamics inside the column: *ICV* and the packed bed, without taking into account the impacts of *ECV* and *VF* on band broadening. In the frame of this project, to examine hydrodynamics of a laboratory chromatographic system appropriate experimental cycles were designed and conducted and numerical models were developed, which were used to predict band broadening in the whole system. The study was performed for various low- and high-molecular compounds (proteins) and under various process conditions. The analysis accounted for the presence of both *ECV* and *SVV* as well as the porous bed, i.e. entire elution path in the chromatographic system. Moreover, hydrodynamics of viscous fluid in the porous bed were analyzed both experimentally and numerically. The research was realized in several stages.

In the first part of the research, a series of elution experiments in *ECV* was performed and the underlying numerical models were developed. The numerical analysis provided information on band broadening in *ECV*. The numerical results were compared with the experimental data and the influence of the individual *ECV* elements on band broadening was quantified.

The second part of the research included experimental cycles and numerical simulations for the entire chromatographic system in the presence of a chromatographic column. The *CFD* models developed accounted for hydrodynamics of the whole elution path, including: *ECV*, *ICV* and the porous bed. The influence of the individual elements of the path and the length of the column bed on band broadening was determined.

In the third part of the study, the influence of fluid viscosity on hydrodynamics and shape of band profiles was analyzed. A mathematical model was developed that accounted for

anisotropy of dispersion in porous bed, the concentration dependences of viscosity, density and the diffusion coefficient of the eluted compounds. The effect of VF on band broadening was quantified.

The results of the experimental and numerical studies performed complement the state-of-the-art implementation of numerical methods in liquid chromatography. The predictive models developed can be applied in the design stage of the chromatographic process. The results were published in the renowned journal "Journal of Chromatography A" in the form of two thematically coherent publications.

11. DOROBEK NAUKOWY

11.1. Publikacje

- 1) B. Filip, R. Bochenek, K. Baran, D. Strzałka, D. Antos, *Influence of the geometry of extra column volumes on band broadening in a chromatographic system. Predictions by computational fluid dynamics*, J. Chromatogr. A, 1653 (2021) 462410, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462410
- 2) B. Filip, R. Bochenek, W. K. Marek, D. Antos, *Flow behavior of protein solutions in a lab-scale chromatographic system*, J. Chromatogr. A, 1705 (2023) 464178, doi: 10.1016/j.chroma.2023.464178

11.2. Wystąpienia konferencyjne

- 1) B. Filip, R. Bochenek, D. Antos, „Badanie hydrodynamiki w przestrzeniach pozakolumnowych układów w chromatografii cieczowej metodą *CFD*”. Konferencja Młodych Naukowców nt. Analiza Zagadnienia, Analiza Wyników – Wystąpienie Młodego Naukowca. Uzyskany dyplom wyróżnienia referatu spośród 25. uczestników. (17.10.2020r., Kraków)
- 2) B. Filip, R. Bochenek, D. Antos, „Modelowanie trójwymiarowe układów dozujących w chromatografii cieczowej metodą *CFD*”. Konferencja Młodych Naukowców nt. Analiza Zagadnienia, Analiza Wyników – Wystąpienie Młodego Naukowca. (18.10.2020r., Kraków)
- 3) D. Antos, M. Kołodziej, B. Filip, D. G. Sauer, J. Beck, W. K. Marek, R. Hahn, A. Jungbauer, A. Dürauer, W. Piątkowski, „Model-based Procedure for Design and Scale up of a Chromatographic Capture Step for a Clarified Bacterial Homogenate”. 34th International Symposium on Preparative and Process Chromatography, e-PREP 2021. (7-9.06.2021r., UK)
- 4) B. Filip, R. Bochenek, D. Antos, „Fluid flow research in liquid chromatography by Computational Fluid Dynamics (*CFD*) method”, XXV Fluid Mechanics Conference. (7-9.09.2022r., Rzeszów)
- 5) B. Filip, R. Bochenek, W. Marek, D. Antos, „Determination of the fluid phase behavior in liquid chromatography by the *CFD* method”, 24th Polish Conference of Chemical and Process Engineering. Uzyskany dyplom III miejsca spośród 25. młodych naukowców. (13-16.06.2023r., Szczecin)

12. UDZIAŁ W BADANIACH NAUKOWYCH

W ramach prowadzonych badań naukowych nad omawianą tematyką, przeprowadziłem odpowiednie cykle doświadczalne. Merytoryczne wsparcie w tym zakresie udzielił mi dr inż. Wojciech Marek z Katedry Inżynierii Chemicznej i Procesowej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej. Opracowałem pełną analizę przepływu w zestawie chromatograficznym, wykorzystując oprogramowanie firmy ANSYS. Składały się na nią: przygotowanie modeli geometrycznych zestawu chromatograficznego, dyskretyzacja domeny obliczeniowej, rozwiązanie modelu oraz opracowanie wyników numerycznych. Cenne wskazówki dotyczące analizy numerycznej dostarczyli mi członkowie firmy SYMKOM (dr inż. Maciej Ginalski, dr inż. Maciej Szudarek i dr inż. Piotr Buliński) oraz dr inż. Roman Bochenek z Katedry Inżynierii Chemicznej i Procesowej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej.

Nadzór merytoryczny nad całością pracy prowadził promotor, tj. prof. dr hab. inż. Dorota Antos z Katedry Inżynierii Chemicznej i Procesowej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej.



Influence of the geometry of extra column volumes on band broadening in a chromatographic system. Predictions by computational fluid dynamics

Bartłomiej Filip^a, Roman Bochenek^b, Krystian Baran^b, Dominik Strzałka^c, Dorota Antos^{b,*}

^a Doctoral School of Engineering and Technical Sciences, Rzeszów University of Technology, Rzeszow, Poland

^b Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland

^c Department of Complex Systems, Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2021

Revised 8 July 2021

Accepted 9 July 2021

Available online 14 July 2021

Keywords:

Computational fluid dynamics

Extra-column volume effect

Protein chromatography

ABSTRACT

A computational fluid dynamics method was used for prediction of flow behavior and band profiles of small- and macro-molecule compounds eluting in extra-column volumes (ECV) of an Äkta chromatographic system. The model compounds were: acetone, bovine serum albumin and an antibody. The construction of ECV was approximated by different types of geometries, starting from the simplest two-dimensional (2D) arrangement consisting of a straight capillary tube, and ending with a three-dimensional system (3D), which accounted for the flow path curvature of individual elements of ECV, including: injection loop capillary, multi-way valve, connecting capillary and detector cell. The accuracy of the model predictions depended on the flow path length and the eluent flowrate. 2D-geometry models reproduced pretty well the shapes of band profiles recorded at the lowest eluent flowrate used, but they failed for increased flowrates. The 3D-geometry model was found to be sufficiently accurate for all conditions investigated. It was exploited to analyze band broadening in the individual ECV elements. The simulation results revealed that the flow behavior in the injection loop capillaries strongly influenced the shape of band profiles, particularly at higher eluent velocities. This was attributed to the formation of Dean vortices triggered by centrifugal forces in curved parts of the eluent flow path.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

1. Introduction

Chromatographic columns of very small volumes are often used in the development stage of protein chromatography. They are frequently implemented in high throughput robotic stations, where pipetting robots are used for loading extremely small samples of proteins, which are bound and then eluted under different conditions [1–3]. Such a technique allows acquiring a high number of elution data that can be used to determine the process operating window and optimize operating variables for large scale chromatographic purifications [4–7].

However, reduction in the column size results in enhancement of the so called extra-column volume (ECV) effect that is induced by dispersion in different parts of chromatographic system outside the column. The ECV effect influences the shape of peaks eluted from the column and their retention, therefore it can be a cause of misinterpretation of adsorption data and failure in scaling up

the separation process. The ECV effect has been thoroughly analyzed for small-molecule compounds eluted from HPLC or UHPLC systems [8–13]. It was found that for highly efficient columns, dispersion in ECV can be a dominating factor contributing to band broadening, and thus determining the separation efficiency.

The performance of chromatographic columns destined for bulk protein purification is significantly lower compared to HPLC systems for separation of small-molecule compounds. This stems from low diffusivity of macromolecules and slow rates of mass transport accompanying adsorption. On the other hand, diffusivity limitations induce distortion of concentration profile, since the elution period in ECV is too short for macromolecules to ensure attainment of uniformity of radial velocity distribution in connecting capillaries. This causes that the ECV effect is much more pronounced for proteins than for small molecules, thus it can significantly contribute to band broadening or even overwhelm all on-column mass transfer effects [14–16].

Various approaches have been used for quantifying the ECV effect based on: (a) theoretical analysis, in which additive contributions of individual parts of the ECV system to band broaden-

* Corresponding author.

E-mail address: dorota.antos@prz.edu.pl (D. Antos).

ing were assessed, or (b) on experimental elution profiles using: zero dead volume connectors or zero-length columns, extrapolation from columns of different lengths or different retention times of solutes [17–20]. The band broadening is typically quantified in the form of peak variances in individual parts of the system, which are assumed to contribute additively to the total-system peak variance [17–23]. In another approach, a dynamic model is used to calculate band profiles along with the velocity distribution in laminar flow in ECV capillaries [24–30]. Such an approach was also used in a previous study, where the geometry of the ECV system was simplified to a straight tube with laminar velocity distribution [15]. The band shape predicted by the dynamic model reproduced the eluting peaks of macromolecules for low flowrates corresponding to low linear velocities in connecting capillaries. However, for higher flowrates, the model overpredicted the band deformation and the experimental band profiles were more symmetrical compared with the model predictions. This is against to the trend anticipated for laminar flow regimes, as increase in flowrate causes the residence time of eluting species to reduce, which in turn enhances the ECV effect due to diffusivity limitations.

Therefore, in this study we employed computational fluid dynamics (CFD) method to account for the influence of ECV geometry on flow behavior and peak shape and to elucidate that unusual retention pattern.

So far, some attempts have been made to utilize CFD to predict dispersion in chromatographic systems, however they were focused on description of flow behavior inside the column, i.e., in packed beds [20,31–36] or in column flow distributors of different structures [37–41]. The flow behavior in the injection system HPLC was studied by Deridder et al., who simulated velocity distribution in flow-through needle and fixed loop sample injectors [40]. In the latter case, the geometry of injection system was simplified to a straight tube in a two-dimensional (2D) coordinate system.

In this study, CFD was utilized to simulate 2D and 3D flow patterns in ECV of an Äkta chromatographic system, including the injection system, connecting capillaries and detector cell. The simulations were performed for small- and macro-molecules injected through different injection systems (loop capillaries, superloop) and eluted at different velocities, and compared with the experimental data. Flow behavior of macromolecules (bovine serum albumin and an antibody) markedly departed from that observed for a small-molecule compound (acetone), which was attributed to the differences in molecular diffusivity of those species. The CFD model in which 3D geometry was implemented, reproduced the most correctly the band profiles under different injection conditions. The model predictions were used to identify the ECV elements that most influenced velocity distribution and shapes of band profiles.

2. Theory

The CFD model consisted of momentum balance equation:

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho w) + \nabla \cdot (\rho w w) = -\nabla p + \nabla \cdot (\tau) + \rho g \quad (1)$$

where w is the fluid velocity, ρ is the fluid density, p is pressure, g is acceleration of gravity, τ is the stress tensor given by the following equation:

$$\tau = \mu \left[(\nabla v + \nabla v^T) - \frac{2}{3} \nabla \cdot v I \right] \quad (2)$$

where μ is the fluid viscosity, I is the unit tensor.

Eq. (1) is coupled with the mass continuity equation:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho w) = 0 \quad (3)$$

and with the species mass balance equation:

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho Y_i) + \nabla \cdot (\rho w Y_i) = -\nabla \cdot J_i \quad (4)$$

where Y_i is the mass fraction of i th component, J is the diffusion flux:

$$J_i = -\rho D_{im} \nabla Y_i \quad (5)$$

where D_{im} is the molecular diffusion coefficient.

The set of Eqs. (1)–(5) was solved for binary incompressible system that consisted of the solvent (eluent) and the species to be eluted. Since the species concentration was low, their diffusion coefficients as well as the eluent density and viscosity were set independent of the composition.

The diffusion coefficient of macromolecules was calculated according to the correlation suggested by Tyn and Gusek [42]:

$$\frac{D_{im} \eta}{T} = \frac{9.2 \cdot 10^{-8}}{M^{0.333}} \quad (6)$$

where D_{im} is in $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, viscosity η of the protein solution in Pa s, temperature T in K, molecular weight M in Da.

3. Materials and methods

3.1. Materials and process conditions

Three model compounds were used for the elution experiments, i.e., two proteins: bovine serum albumin, BSA (MW = 66.5 kDa purity $\geq 96\%$) purchased from Sigma–Aldrich (Sigma–Aldrich, Poznań, Poland), an antibody, mAb2 (MW = 148 kDa purity $\geq 96\%$) provided by Polpharma Biologics (Gdańsk, Poland), as representatives of large macromolecules, and acetone (MW = 58.8 Da) as a representative of small-molecule compounds. All experiments were performed at room temperature (av. 22 °C). As eluent phosphate buffer was used with pH = 7, the eluent flowrate was changed from 0.1 to 1.0 mL min^{-1} .

3.2. Chromatographic system

An Äkta purifier with a UV detector and a data station (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) was used for chromatographic experiments. The ECV system consisted of the injection valve, equipped with loop capillaries with different dimensions or a superloop. The injection system was connected with a UV detector cell by a capillary tubes with different lengths.

3.3. Geometry and meshing of the chromatographic system

The individual elements of the ECV system were approximated using different types of geometries with different degree of complexity. As a consequence, four variants of the ECV geometry were considered (Fig. 1, Table 1):

- System 1: a straight tube positioned horizontally with the diameter averaged over the lengths of all capillaries that were included in ECV, i.e., in the multi-way valve, injection loops (loop capillaries or the superloop), connection capillaries and the channel in the detector cell (2D geometry: c_{avg}).
- System 2: straight tubes positioned horizontally, but with different diameters corresponding to the individual ECV elements, including: capillaries in the injection system (s_1) and in the multi-way valve (v), and the connection capillary with different lengths (c_1 or c_2), but the flow behavior in the detector cell was not directly accounted for (2D geometry: $s_1 v c_{1,2} s$).
- System 3: geometry as in the system 2, but the flow behavior in the detector cell (positioned vertically to the flow direction in the connection capillary) was accounted for (3D geometry: $s_1 v c_{1,2} d$).

Table 1
Geometry and meshing of the ECV system (see Fig. 1).

Dimensions of individual elements	Straight tube (s_1, s_3)	0.01 mL (ID 0.25 mm, length $L = 203.7$ mm) 1 mL (ID 0.75 mm, $L = 2264$ mm)
	Loop capillary (s_2)	0.01 mL (ID 0.25 mm, a tube with 2 arcs (180°) and 3 straight distances, total length as for s_1) 1 mL (ID 0.75 mm, 16 coils radius 22 mm, total length as for s_1)
	Capillary in the multi-way valve (v)	0.007 mL (ID 0.8 mm, $L = 13.93$ mm)
	Connection capillary (c)	Shorter c_1 : 0.0196 mL (ID 0.5 mm, $L = 100$ mm) Longer c_2 : 0.250 mL (ID 0.5 mm, $L = 1273$ mm)
Numerical systems and dimensions	detector cell (d)	0.013 mL (ID 1 mm, $L = 16.55$ mm)
	1: C_{avg} , 2D	2: $s_1vc_{1,2}$, 2D 3: $s_1vc_{1,2}d$, 3D 4: $s_2vc_{1,2}d$, 3D
Elements of the mesh	hex and tetrahedral mesh	
Meshing methods	straight tube: MultiZone method, edge sizing, bias factor	loop capillary: Sweep and MultiZone methods, edge sizing, bias factor

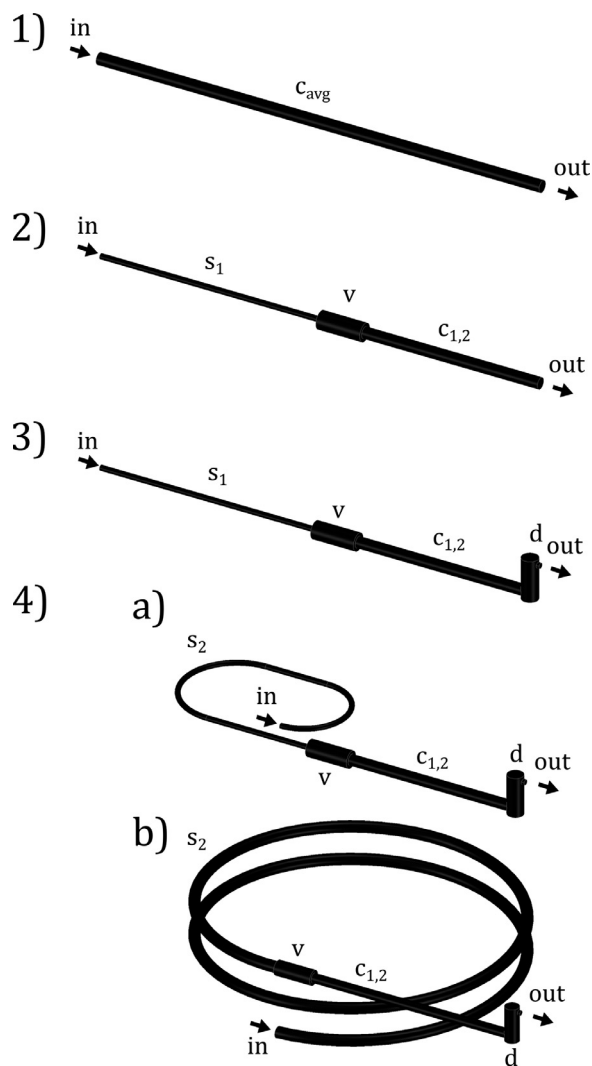


Fig. 1. Illustration of the geometry systems 1, 2, 3, 4; s_1 denotes the straight capillary tube for the sample injection (in the systems 1, 2, 3), s_2 is the injection loop capillary (in the system 4a-short loop capillary, 4b – large loop capillary), c_1, c_2 are the short and long connection capillary tubes, respectively, d is the detector cell.

- System 4: geometry as in the system 3, but with accounting for the curvatures of the loop capillaries in the injection system (3D geometry: $s_2vc_{1,2}d$).

3.4. Numerical method

The velocity and concentration profiles were calculated using a commercial fluid simulation software ANSYS Fluent v. 2019 R3.

The ANSYS software was also used for drawing and meshing the system geometry, which determined the spatial discretization. The numerical error was controlled by proper choice of the number of elements in the radial and axial directions, i.e., the mesh was chosen in such a way that the shape of the outlet concentration profiles was independent of its size and mass balance was conserved with the error less than 1% in relation to the mass introduced into the system. The resulting mesh size varied within the range 0.01–0.1 mm in the axial direction and 0.05–0.005 mm in the radial direction, depending on the flow path curvature. The smallest radial mesh was used at the vicinity of the capillary wall and connection points of capillaries of different diameters. The time increment was selected based on the value of the Courant number, which was maintained at the level less than 1. Typical time increment was about 0.001 s.

The calculations were performed for non-stationary laminar flow in *transport model*, which accounts for multicomponent systems (software options: *transient, laminar, species*). Standard boundary conditions for the fluid phase (*fluid*) were assumed: *inlet, outlet, and wall*; at the inlet laminar flow velocity distribution was assumed, at the outlet no *backflow* conditions and at the wall *no-slip* conditions were used, the outlet gauge pressure was set 0.

The diffusion coefficient of acetone was taken from the GSC chemical database; $D_m = 1.1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$, the diffusion coefficients of the proteins were obtained from Eq. (6), as follows: for BSA $D_m = 6.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$ and for mAb2 $D_m = 5.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$.

4. Results and discussion

4.1. Impact of the residence time and diffusivity on band shape

The band profiles of acetone, BSA and mAb2 eluting from ECV were recorded for different eluent flowrates varied from 0.1 to 1 mL min^{-1} using the connecting capillaries of different lengths, L (for c_1 : $L = 100$ mm and for c_2 : $L = 1273$ mm; Fig. 1, Table 1). This corresponded to different residence times of the eluting species in ECV. The experimental band profiles depicted in Fig. 2A and in Fig. 2B illustrate typical trends in the retention behavior. As expected, increase in the eluent flowrate (reduction in the residence time) caused the band profiles to deviate from the Gaussian shape (Fig. 2A). As mentioned above, the band deformation is characteristic for laminar flow regimes, when the residence time is not sufficient for the eluting species to reach uniformity of radial velocity distribution. Radial velocity gradient causes the solute to move faster in vicinity of the capillary center and slower at the column wall [24–30]. The phenomenon enhances with increasing molecular weight of the solute, as its movement in the radial direction is hindered by low diffusivity. This is illustrated in Fig. 2B, where the band profiles recorded for acetone, BSA and mAb2 are superimposed. Though the retention behavior seemed to follow a pattern

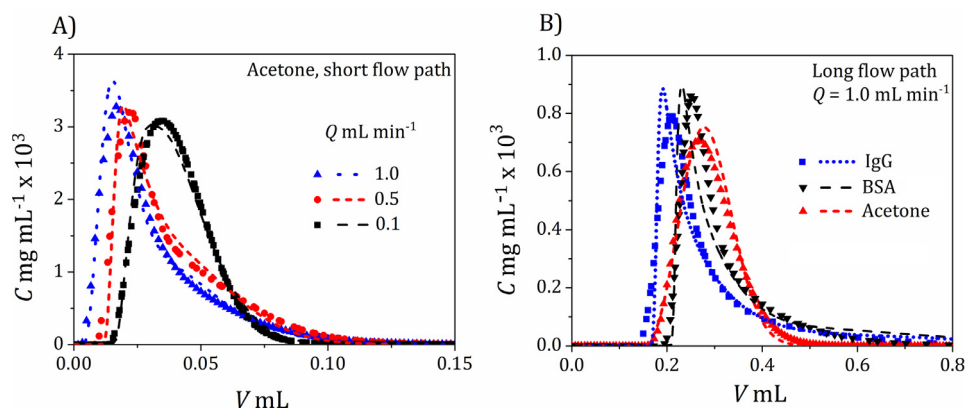


Fig. 2. Illustration of the influence of flowrate (A) and the molecular weight (B) on the band shape in ECV. Symbols - experimental data, lines - the model simulation performed for the system 4 ($s_2vc_{1,2}d$), short flow path (c_1 with $L = 100$ mm), long flow path (c_2 with $L = 1273$ mm).

specific for laminar flow, a departure of band profiles from the expected shapes was detected. This issue could not be elucidated in the previous study, where a simple 2D-geometry model was used [15]. Therefore, in this study CFD was employed, which provided a better understanding of the observed trends.

4.2. CFD calculations

4.2.1. System geometries

The band profiles were simulated using the ANSYS Fluent software according to the procedure described in Section 3.4. As mentioned above, the construction of the ECV system was approximated by four different types of geometries (Fig. 1): the simplest system 1 (c_{avg}), in which ECV was represented by a straight horizontal capillary with the diameter averaged over all ECV tubes, system 2 ($s_1vc_{1,2}d$), where difference in the diameters was accounted for, system 3 ($s_1vc_{1,2}d$) in which the flow behavior in the detector cell was additionally accounted for, and the most complex system 4, in which the curvature of the injection loop capillaries was included ($s_2vc_{1,2}d$). That approach allowed identification of ECV elements making a major contribution to band broadening and selection of geometry which provided the most correct reproduction of band profiles in ECV. The simulations were performed for all model species eluted at different flowrates from the ECV system equipped with different injection loops and connection capillaries of different lengths (Table 1). This corresponded to different residence times of species in ECV and different injection volumes. The latter was aimed at simulating different loading conditions. Three types of the injection loops were considered in the experiments and the model calculations: a 0.010 mL loop capillary that was used to mimic small-volume injections, and a 1 mL loop capillary or a superloop to mimic large-volume injections.

4.2.2. Accuracy of the model predictions for different ECV geometries

4.2.2.1. Small-volume injections. A comparison between the experimental data and the calculated band profiles for all types of ECV geometry at minimum and maximum flowrates used, i.e., 0.1 and 1 mL min⁻¹, for the short and long connection capillaries (short and long flow path) is presented in Fig. 3. It can be seen that for the short flow path (Fig. 3A and B), the prediction obtained for the system 1 with a straight capillary of constant diameter (c_{avg}) was not accurate; it overestimated the peak symmetry. For the system 2 (s_1vc_1), in which the difference in the diameters of the injection loop capillary, the capillary in the injection multi-way valve and the connection capillary was accounted for, the accuracy of the predictions of band shape was improved, though the simulations still overestimated the peak symmetry. Further improvement in the

accuracy of the predictions was achieved for the system 3 (s_1vc_1d) that included the flow behavior in the detector cell. The predictions for the system 4 (s_2vc_1d) that accounted for the 3D geometry of the injection loop capillary provided the best accuracy. However, the difference between the band shapes predicted for the systems 3 and 4 was minor, which indicated that in that case the changes in the diameters of ECV elements contributed most to band broadening, whereas the influence of the flow behavior in the injection loop capillary was of minor importance.

As discussed above, increase in the eluent flowrate impaired peak symmetry and caused band deformation, though the effect was much weaker than expected for the regime of laminar flow in straight capillaries, which was indicated by the courses of the simulations performed for the system 1 (Fig. 3B).

In case of the long flow path (Fig. 3C and D), the discrepancies between the model predictions obtained for different geometries were much more distinct compared with those shown for the short flow path. It is particularly visible for the high flowrate (Fig. 3D), for which the accuracy of the predictions was acceptable only for the system 4. This means that in that case, the flow behavior in the injection loop capillary most significantly affected the band shapes.

The observed changes in band shapes reflected the values of peak variances, which is illustrated in Fig. 4A and 4B. The errors in the predictions of peak variances is the largest for the system 1 and the smallest for the system 4, which is particularly evident for the long flow path. This reveals that changes in the residence time due to increase in the flow velocity or in the length of the flow path do not have the same impact on the shape of band profiles, and the contribution of flow behavior in different ECV elements to band broadening depends on the arrangement of the ECV system.

Similar effects were observed for BSA, whose band profiles were deformed also for the low flowrate (Fig. 5). It stems from low diffusivity of the protein, as discussed above. The discrepancy between the shapes of the experimental profiles of BSA and the model predictions performed for different geometries are distinct for the higher flowrate (Fig. 5B and D). In this case, increase in flowrate did not deteriorate the symmetry of the BSA peak, but even improved it to some extent. The errors of the model predictions for the systems 1, 2 and 3 were again particularly significant for the long flow path (Fig. 5D). In that case, an acceptable accuracy was achieved only for the system 4. The values of peak variances calculated for the experimental and predicted profiles, which are presented in Fig. 6A and B, confirm the observed differences in band shapes. The shapes of band profiles recorded for mAb2 followed the same trend with a slight enhancement of the phenomena reported for BSA (data not shown).

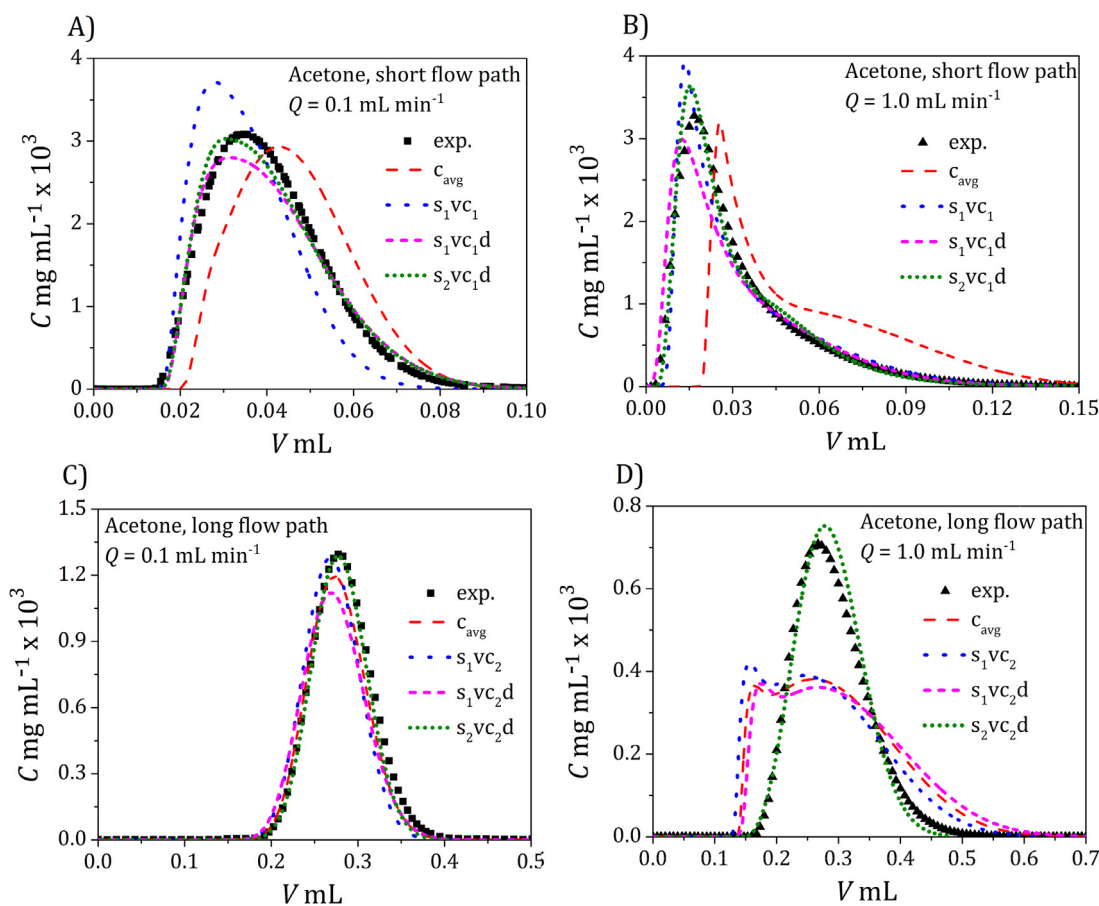


Fig. 3. Comparison of the band profiles of acetone recorded experimentally and simulated for different ECV geometries. Q is the eluent flow rate, c_{avg} is the capillary with the average diameter, c_1 - short flow path, c_2 - long flow path.

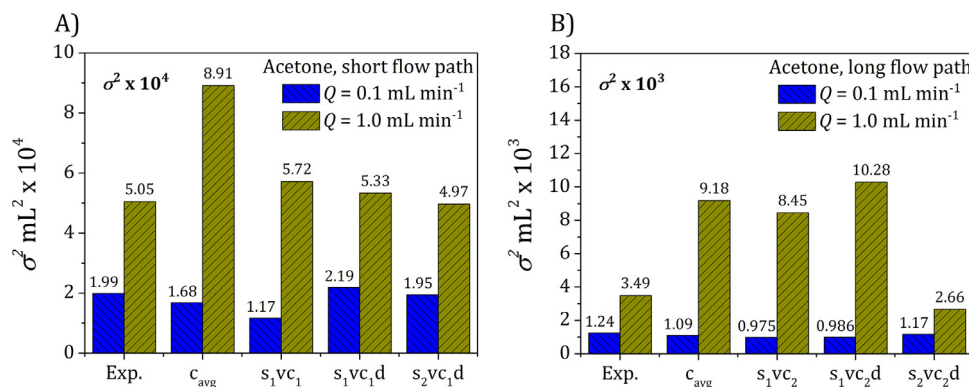


Fig. 4. Peak variances calculated for the experimental band profiles of acetone (Exp.) and predicted by the model for different ECV geometries for two flow rates 0.1 and 1.0 mL min^{-1} . (A) Short flow path (c_1), (B) long flow paths (c_2).

As reported above, the contribution of flow behavior in different ECV elements to band broadening can be different. This implies that in the presence of chromatographic column, the band broadening in pre- and post-column ECV may be not the same. To illustrate that effect, the intermediate profiles of acetone and BSA were simulated for the geometry system 4 at two localizations, which were selected to mimic the presence of pre- and post-column volumes, i.e., in the midpoint of the short connection capillary and at the end of the ECV system. The first part (“pre-column” volume) included the injection system and half the length of the short connection capillary, the second one consisted of the remaining half of the capillary and the detector cell (“post-column” volume). The simulated bands along with the peak variances are shown in

Fig.7A–D. It can be observed that the ratio between the variances of the pre- and post-column peaks depends on the solute molecular weight and the eluent flowrate. For both acetone and BSA, the contribution of the pre-column volume ($s_2vc_{1(0.5)}$) to the total peak variance (s_2vc_1d) increased with increasing flowrate, however that effect was much stronger for BSA. A detailed study on the combination of the effects of flow behavior in ECV and in a small column is a subject of a forthcoming study.

4.2.2.2. *Large injections.* The CFD model was used to predict band profiles for large-volume injections performed by use of the loop capillary and the superloop. The results of the model simulations along with the corresponding experimental band profiles are pre-

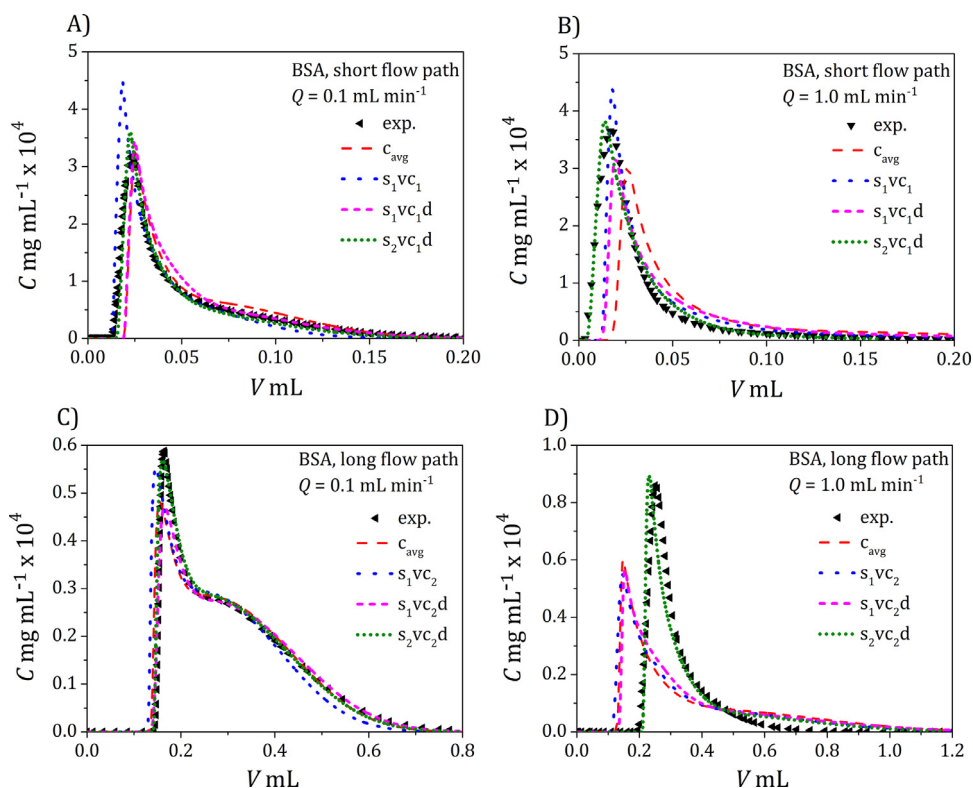


Fig. 5. Comparison of the band profiles of BSA recorded experimentally and predicted for different ECV geometries at different flowrates Q and flow path lengths.

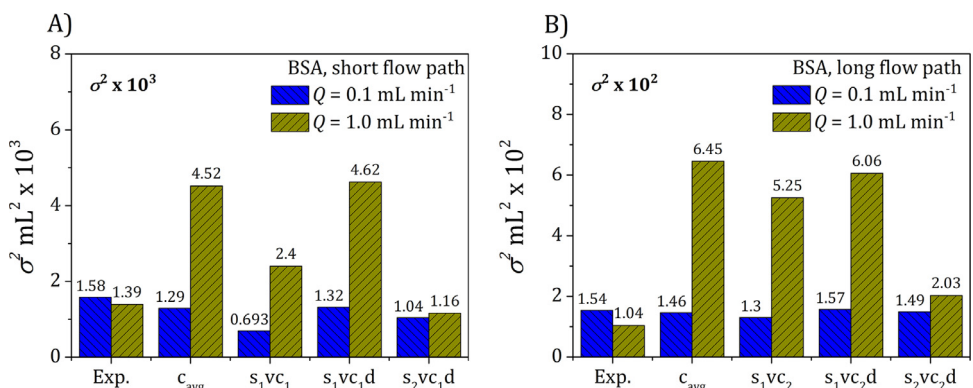


Fig. 6. Peak variances calculated for the experimental band profiles of BSA and predicted by the model for different ECV geometries at different flowrates Q and flow path lengths.

sented in Figs. 8 and 9. The flow behavior in the loop capillary exerted dominating influence on the shape of the band profiles (Fig. 8). It can be attributed to a long distance that the sample had to cover to elute from the long loop. Therefore, only the predictions for the 3D geometry (system 4) that accounted for flow behavior in the capillary coils, reproduced well the shape of the experimental band profiles. The simulations for the remaining geometries: systems 1, 2 and 3, overpredicted peak tailing. The contribution of flow behavior in the detector cell to the band broadening was negligible. This is illustrated by the results of simulations for two arrangements in which the presence of the detector cell was included or skipped: s_2vc_1 and s_2vc_1d .

The band shapes of the species injected through the superloop were much more symmetrical compared with those obtained for the injection loop capillary (Fig. 9). In this case the geometry of ECV was simple; the sample injection was simulated using proper boundary condition at the inlet of the capillary in the injection valve. The band shape was determined by the flow behavior in the

straight connection capillary tube; therefore, the model with the system 1 provided sufficiently accurate predictions.

4.2.3. Concentration contours. To elucidate the influence of the system geometry on band profiles, the contours of the internal concentration profiles in two different elements of ECV were generated. Figs 10A and 10B show the time evolution of the BSA profiles in the vicinity of connection points, in which capillaries of different diameters were coupled (e.g., the injection loop capillary with the multi-way capillary and the multi-way capillary with the connection capillary). The contour colours illustrate the protein concentrations in the mobile phase; from the red colour assigned to the most concentrated solute, through yellow, light blue, to dark blue corresponding to pure mobile phase. It can be observed that for the low flow rate, the protein eventually reached the wall of the larger diameter capillary at the end of the residence time, but only in the vicinity of the inlet connection point, as the velocity profile was not uniformly distributed along the capillary. The amount

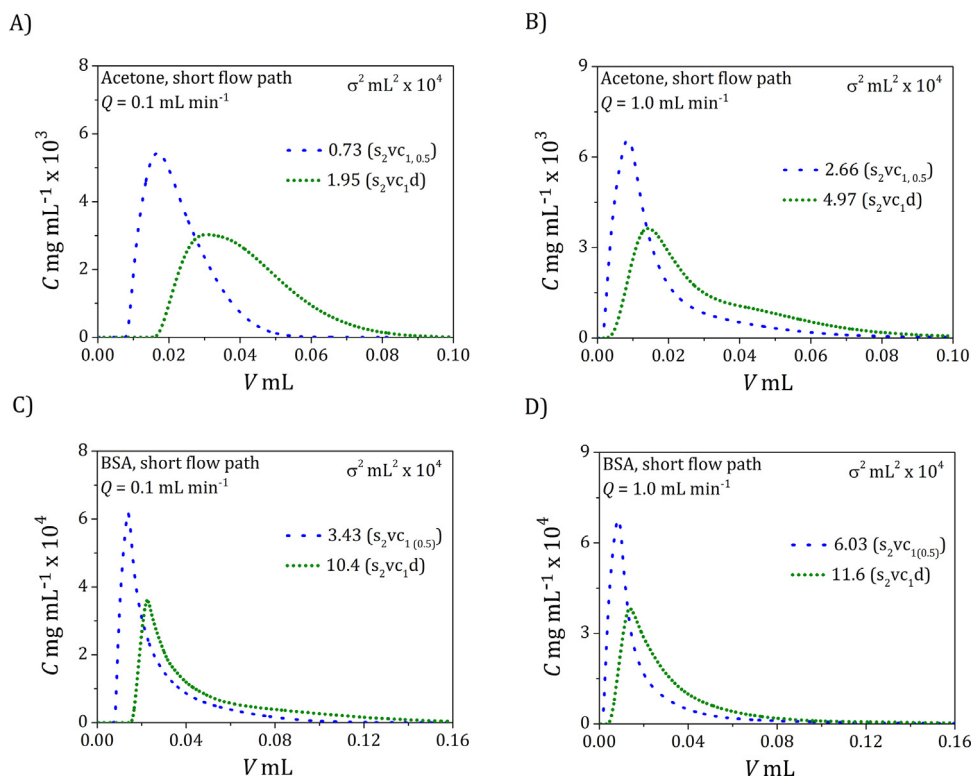


Fig. 7. Comparison of band profiles simulated at the midpoint of the connection capillary ($s_2vc_{1,0.5}$) and at the end of ECV (s_2vc_1d).

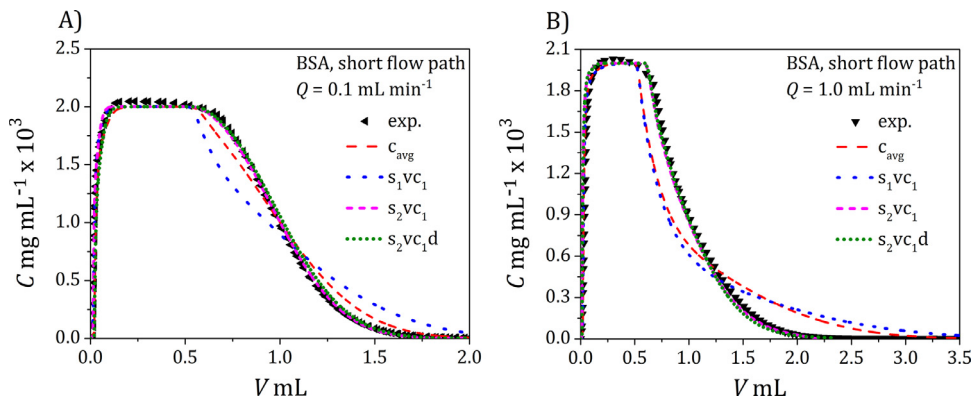


Fig. 8. Comparison of band profiles of BSA in large-volume injections from the loop capillary recorded experimentally and simulated for different ECV geometries at different flowrates Q for the short flow path.

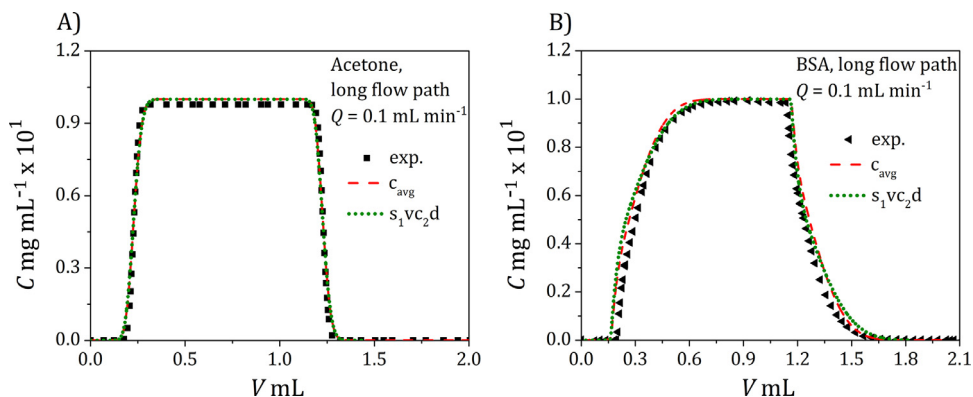


Fig. 9. Comparison of band profiles of acetone and BSA in the superloop injections recorded experimentally and simulated for different ECV geometries (only systems 1 and 4) at different flow rates Q for the long flow path.

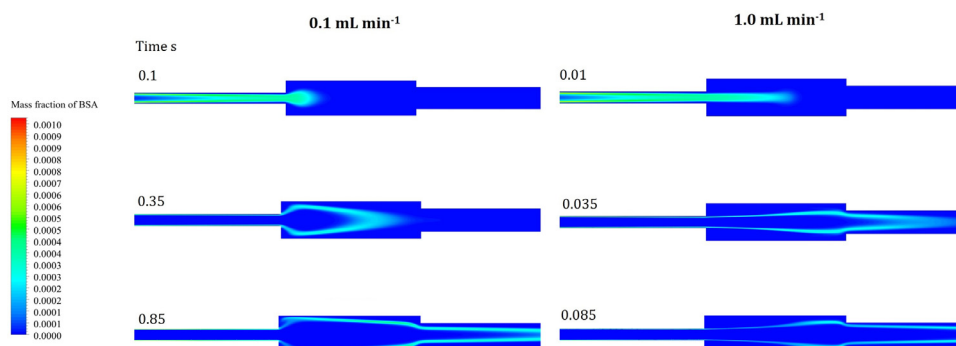


Fig. 10. Time evolution of the concentration profiles of BSA; the influence of change in the capillary diameter. The contours of concentration profiles at: (A) the low, and (B) high flowrates. Snapshots at different time intervals.

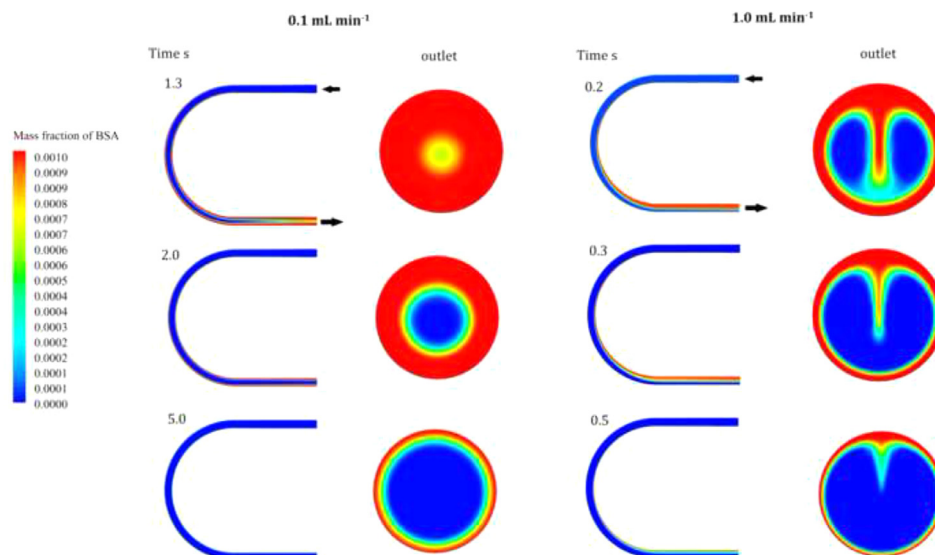


Fig. 11. Time evolution of the concentration profiles of BSA in an arc of the injection loop capillary. The contours of concentration profiles in a fragment of coil arc (left-hand side) and in its cross-section (right-hand side) at: (A) low flowrate, (B) high flowrate. Snapshots at different time intervals.

that reached the wall lagged behind the main stream, which was the cause of enhanced tailing of BSA band profiles. For the high flowrate, the most amount of the protein did not reach the wall of the larger diameter capillary and travelled closer to its centre. Therefore, the residua of the protein did not adhere to the capillary wall.

The most complex pattern of the concentration contours was predicted for the elution through the injection loop capillary, where the flow trajectory was most curved. At the low flowrate, the protein was almost symmetrically distributed along the cross-section area of the loop (Fig. 11A), while at the high one the contour was strongly asymmetrical and split into two parts (Fig. 11B). The residua of the protein adhered to the internal part of the loop coil were eluted at the latest, at the end of the residence time. The complexity of contour shapes aroused from both shear stress at the capillary wall and flow turbulence in the coil, which occurred due to centrifugal forces known as the Dean vortices. To quantify that phenomena, the Dean number can be used, which is defined as a product of the Reynolds number and the square root of the curvature ratio:

$$Dn = \frac{\rho w d}{\eta} \sqrt{\frac{d}{2R}} = Re \sqrt{\frac{d}{2R}} \quad (7)$$

Where ρ , η are the fluid density and viscosity, respectively, w is the linear velocity, d is the diameter of the tube, R_c is the radius of the coil.

It has been shown that the influence of the centrifugal forces on the flow behavior in the coil is negligible when the product of the Dean number squared and the Schmidt number is smaller than 100 [43,44]:

$$Dn^2 Sc < 100 \quad Sc = \frac{\eta}{\rho D_m} \quad (8)$$

For the flowrate of 0.1 mL min⁻¹, the product $Dn^2 Sc$ was the lowest for acetone: $Dn^2 Sc = 1300$ for the small loop capillary ($Dn = 1.8$, $R_c = 15$ mm, $d = 0.25$ mm), and $Dn^2 Sc = 295$ for the large loop capillary ($Dn = 0.88$, $R_c = 22$ mm, $d = 0.75$ mm). For the flowrate of 1 mL min⁻¹ the Dn numbers were 10 times higher and the $Dn^2 Sc$ products 100 times higher, e.g., for acetone: $Dn = 18$, $Dn^2 Sc = 130000$ for the small loop capillary, and $Dn = 8.8$, $Dn^2 Sc = 29500$ for the large loop capillary.

This indicates that in all investigated cases the centrifugal forces in the loop capillaries can be expected to contribute to the flow behavior. However, the model simulations did not reveal significant deviation from the radial symmetry of the velocity profiles in the small loop capillary for $Dn^2 Sc$ less than about 2000, which corresponded to flowrates less than about 0.15 mL min⁻¹. A

distinct presence of Dean vortices was observed for the flowrates higher than 0.2 mL min^{-1} .

The flow turbulence in the loop capillaries, at the connection points of capillaries and in the detector cell partly suppressed the effect of low diffusivity of the protein and caused its band profiles to be more symmetrical than predicted for a straight capillary tube in the laminar flow regime. This can explain the improvement in the peak asymmetry at the high flowrate demonstrated in Section 4.2.2.1.

This also implies that higher flowrates are preferable for the protein injections. However, increase in flowrate during the protein elution along the column may impair the efficiency of the separation according to the course of the van Deemter curve. As a remedy, a stepwise change in the flowrate may be used, i.e., an increased flowrate for the injection period to suppress the diffusion effects, and a reduced flowrate for the column elution to mitigate the mass transfer effects in packed bed. However, that approach is limited to relatively small injection volumes, for which the concentration front of the solute insignificantly penetrates the column during the injection period.

5. Conclusion

The CFD method was used to predict flow behavior and band profiles of small and macro-molecule compounds (acetone, BSA, an antibody) in ECV of an Äkta chromatographic system as well as to elucidate the reason of band broadening in different elements of the system. The ECV construction was approximated by different geometries: a straight capillary tube with constant average diameter, a system of straight capillaries with different diameters corresponding to the individual ECV elements and, finally, the system in which curvature of flow path was accounting for. As expected, the contribution of flow behavior to band broadening depended on the residence time of the eluting species, however changes in the eluent flowrate affected band profiles differently than changes in the flow path length. Moreover, the flowrate effect was found to be much weaker than anticipated for laminar flow regime. This was explained by contradictory impact of flow behavior in straight and curved elements of the ECV system. Flow turbulence was induced in connection points of capillaries of different diameters, in the detector cell, in the injection loop capillaries, where Dean vortices were formed. The effect depended on the diffusion rate attributed to molar weight of the eluting species. In case of small-molecule acetone, reduction in the residence time made a major contribution to band broadening, thus increase in flowrate impaired the peak symmetry. For macromolecules, which are characterized by very low diffusivity, turbulences in flow path accelerated mass transport, which improved peak symmetry. This concerned both small and large injections. Therefore, increase in the flowrate during the protein injection may be favorable for the system performance. This is not applicable for large injection volumes, when the protein concentration front spreads over the column during the injection interval. Another factor, which can be exploited to improve the symmetry of protein peaks eluting from ECV, is flow path tortuosity. Increase in tortuosity induces flow turbulences due to the formation of Dean vortices, which may mitigate effects arising from slow diffusion rate.

Funding

This work was partially supported by Polish Ministry of Science and Higher Education under the program 'Regional Initiative of Excellence' in 2019–2022. Project No. 027/RID/2018/19.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

Bartłomiej Filip: Investigation, Methodology, Conceptualization, Writing – review & editing. **Roman Bochenek:** Conceptualization, Methodology. **Krystian Baran:** Investigation, Methodology. **Dominik Strzałka:** Methodology. **Dorota Antos:** Conceptualization, Writing – review & editing.

Acknowledgment

We thank Maciej Ginalski from the SYMKOM company for assistance with developing our CFD procedure.

References

- [1] T. Schroeder, Automated parallel chromatography in downstream process development, *Bioprocess Int.* 8 (2010) 92–93.
- [2] A. Susanto, E. Knieps-Grünhagen, E. von Lieres, R. Bhambure, K. Kumar, A.S. Rathore, High-throughput process development for biopharmaceutical drug substances, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 127–135.
- [3] S. Chhatre, N.J. Titchener-Hooker, Review: Microscale methods for high-throughput chromatography development in the pharmaceutical industry, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 927–940.
- [4] A. Susanto, E. Knieps-Grünhagen, E. von Lieres, J. Hubbuch, High throughput screening for the design and optimization of chromatographic processes: assessment of model parameter determination from high throughput compatible data, *Chem. Eng. Technol.* 31 (2008) 1846–1855.
- [5] W.R. Keller, S.T. Evans, G. Ferreira, D. Robbins, S.M. Cramer, Understanding operational system differences for transfer of miniaturized chromatography column data using simulations, *J. Chromatogr. A* 1515 (2017) 154–163.
- [6] A. Osberghaus, S. Hepbildikler, S. Nath, M. Haindl, E. von Lieres, J. Hubbuch, Optimizing a chromatographic three component separation: a comparison of mechanistic and empiric modeling approaches, *J. Chromatogr. A* 1237 (2012) 86–95.
- [7] R. Khalaf, J. Heymann, X. LeSaout, F. Monard, M. Costioli, M. Morbidelli, Model-based high-throughput design of ion exchange protein chromatography, *J. Chromatogr. A* 1459 (2016) 67–77.
- [8] K. Vanderlinden, K. Broeckhoven, Y. Vanderheyden, G. Desmet, Effect of pre- and post-column band broadening on the performance of high-speed chromatography columns under isocratic and gradient conditions, *J. Chromatogr. A* 1442 (2016) 73–82.
- [9] D.V. McCalley, Instrumental considerations for the effective operation of short, highly efficient fused-core columns. investigation of performance at high flow rates and elevated temperatures, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4561–4567.
- [10] K.J. Fountain, U.D. Neue, E.S. Grumbach, D.M. Diehl, Effects of extra column band spreading, liquid chromatography system operating pressure, and column temperature on the performance of sub-2- μm porous particles, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5979–5988.
- [11] F. Gritti, G. Guiochon, On the minimization of the band-broadening contributions of a modern, very high pressure liquid chromatograph, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4632–4648.
- [12] S.Z. Fekete, J. Fekete, The impact of extra-column band broadening on the chromatographic efficiency of 5 cm long narrow-bore very efficient columns, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5286–5291.
- [13] N. Wu, A.C. Bradley, Ch.J. Welch, L. Zhang, Effect of extra-column volume on practical chromatographic parameters of sub-2- μm particle-packed columns in ultra-high pressure liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2018–2202.
- [14] W. 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.
- [15] K. Baran, W.K. Marek, W. Piątkowski, D. Antos, Effect of flow behavior in extra-column volumes on the retention pattern of proteins in a small column, *J. Chromatogr. A* 1598 (2019) 154–162.
- [16] M. Kołodziej, D.G. Sauer, J. Beck, W.K. Marek, R. Hahn, A. Jungbauer, A. Dürauer, W. Piątkowski, D. Antos, Scale up of a chromatographic capture step for a clarified bacterial homogenate- influence of mass transport limitation and competitive adsorption of impurities, *J. Chromatogr. A* 1618 (2020) 460856.
- [17] F. Gritti, G. Guiochon, Accurate measurements of peak variances: importance of this accuracy in the determination of the true corrected plate heights of chromatographic columns, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4446–4452.
- [18] F. Gritti, A. Felinger, G. Guiochon, Influence of the errors made in the measurement of the extra-column volume on the accuracies of estimates of the column efficiency and the mass transfer kinetics parameters, *J. Chromatogr. A* 1136 (2006) 57–72.

- [19] F. Gritti, G. Guiochon, On the minimization of the band-broadening contributions of a modern, very high pressure liquid chromatograph, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4632–4648.
- [20] S. Schweiger, A. Jungbauer, Scalability of pre-packed preparative chromatography columns with different diameters and lengths taking into account extra column effects, *J. Chromatogr. A* 1537 (2018) 66–74.
- [21] E.V. Dose, G. Guiochon, Effects of extra column convolution on preparative chromatographic peak shapes, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1723–1730.
- [22] O. Kaltenbrunner, A. Jungbauer, S. Yamamoto, Prediction of the preparative chromatography performance with a very small column, *J. Chromatogr. A* 760 (1997) 41–53.
- [23] K.M. Usher, C.R. Simmons, J.G. Dorsey, Modeling chromatographic dispersion: a comparison of popular equations, *J. Chromatogr. A* 1200 (2008) 122–128.
- [24] J.G. Atwood, M.J.E. Golay, Early phases of the low dispersion of a sample injected in poiseuille flow, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 353–370.
- [25] J.G. Atwood, M.J.E. Golay, Dispersion of peaks by short straight open tubes in liquid chromatography systems, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 97–122.
- [26] J.S. Vrentas, C.M. Vrentas, Dispersion in laminar tube flow at low Peclet numbers or short times, *AIChE J.* 34 (1988) 1423–1430.
- [27] A. Shankar, A.M. Lenhoff, Dispersion in round tubes and its implications for extra column dispersion, *J. Chromatogr. A* 556 (1991) 235–248.
- [28] A. Shankar, A.M. Lenhoff, Dispersion in laminar flow in short tubes, *AIChE J.* 35 (1989) 2048–2052.
- [29] K. Broeckhoven, G. Desmet, Numerical and analytical solutions for the column length-dependent band broadening originating from axisymmetrical trans-column velocity gradients, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1325–1337.
- [30] U. Tallarek, E. Rapp, T. Scheenen, E. Bayer, H. Van As, Electroosmotic and pressure-driven flow in open and packed capillaries: velocity distributions and fluid dispersion, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2292–2301.
- [31] G. Rousseaux, M. Martin, A. De Wit, Viscous fingering in packed chromatographic columns: non-linear dynamics, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8353–8361.
- [32] S. Gerontas, M.S. Shapiro, D.G. Bracewell, Chromatography modelling to describe protein adsorption at bead level, *J. Chromatogr. A* 1284 (2013) 44–52.
- [33] A. Püttmann, M. Nicolai, M. Behr, E. von Lieres, Stabilized space–time finite elements for high-definition simulation of packed bed chromatography, *Finite Elem. Anal. Des.* 86 (2014) 1–11.
- [34] C. Jungreuthmayer, P. Steppert, G. Sekot, A. Zankel, H. Reingruber, J. Zanghellini, A. Jungbauer, The 3D pore structure and fluid dynamics simulation of macroporous monoliths: high permeability due to alternating channel width, *J. Chromatogr. A* 1425 (2015) 141–149.
- [35] D. Iurashev, S. Schweiger, A. Jungbauer, J. Zanghellini, Dissecting peak broadening in chromatography columns under non-binding conditions, *J. Chromatogr. A* 1599 (2019) 55–65.
- [36] U. Umatheva, G. Chen, R. Ghosh, Computational fluid dynamic (CFD) simulation of a cuboid packed-bed chromatography device, *Chem. Eng. Res. Des.* 152 (2019) 393–401.
- [37] U. Umatheva, P. Madadkar, P.Ravi Selvaganapathy, R. Ghosh, Computational fluid dynamic (CFD) simulation of laterally-fed membrane chromatography, *Chem. Eng. Res. Des.* 137 (2018) 412–420.
- [38] M. Harasek, G. Paul, C. Jordan, A. Friedl, CFD-simulation of preparative chromatographic columns: effect of the distributor and the column design on the separation performance, *Chem. Ingen. Tech.* 73 (2001) 639.
- [39] R. Ghosh, G. Chen, U. Umatheva, P. Gatt, A flow distribution and collection feature for ensuring scalable uniform flow in a chromatography device, *J. Chromatogr. A* 1618 (2020) 460892.
- [40] W. Smits, S. Deridder, G. Desmet, The impact of flow distribution on column performance: a computational fluid dynamics study, *J. Chromatogr. A* 1369 (2014) 125–130.
- [41] S. Deridder, G. Desmet, K. Broeckhoven, Numerical investigation of band spreading generated by flow-through needle and fixed loop sample injectors, *J. Chromatogr. A* 1369 (2014) 125–130.
- [42] M.T Tyn, T.W. Gusek, Prediction of diffusion coefficients of proteins, *Biotechnol. Bioeng.* 35 (1990) 327–338.
- [43] A.M. Janssen, Axial dispersion in laminar flow through coiled tubes, *Chem. Eng. Sci.* 31 (1976) 215–218.
- [44] H. Song, Y. Vanderheyden, E. Adams, G. Desmet, D. Cabooter, Extensive database of liquid phase diffusion coefficients of some frequently used test molecules in reversed-phase liquid chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1455 (2016) 102–112.



Flow behavior of protein solutions in a lab-scale chromatographic system



Bartłomiej Filip^a, Roman Bochenek^b, Wojciech K. Marek^b, Dorota Antos^{b,*}

^a Doctoral School of the Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland

^b Department of Chemical and Process Engineering, Rzeszów University of Technology, Rzeszów, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2023

Revised 20 June 2023

Accepted 21 June 2023

Available online 22 June 2023

Keywords:

Computational fluid dynamics

Protein chromatography

Extra column volume

Viscous fingering

ABSTRACT

A fluid dynamics model has been developed to describe flow behavior in a lab-scale chromatographic system dedicated for protein processing. The case study included a detailed analysis of elution pattern of a protein, which was a monoclonal antibody, glycerol, and their mixtures in aqueous solutions. Glycerol solutions mimicked viscous environment of the concentrated protein solutions. The model accounted for concentration dependences of solution viscosity and density, and dispersion anisotropy in the packed bed. It was implemented into a commercial computational fluid dynamics software using user-defined functions. The prediction efficiency was successfully verified by comparing the model simulations in the form of the concentration profiles and their variances with the corresponding experimental data. The contribution of the individual elements of the chromatographic system to protein band broadening was evaluated for different configurations: for the extra-column volumes in the absence of the chromatographic column, for the zero-length column without the packed bed and for the column containing the packed bed. The influence of the operating variables, including: the mobile phase flowrate, the type of the injection system, i.e., the injection loop capillary or the superloop, the injection volume and the length of the packed bed, on band broadening of the protein was determined under nonadsorbing conditions. For protein solutions having viscosity comparable with the mobile phase, the flow behavior either in the column hardware or in the injection system made major contributions to band broadening, which depended on the type of the injection system. For highly viscous protein solution, the flow behavior in the packed bed exerted a dominant influence on band broadening.

© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The development of protein chromatography for large-scale operations is preceded by the design stage, which is aimed at the determination of the operating parameters. For that purpose, lab-scale chromatographic systems are used, which are equipped with columns of small volumes, i.e., of 1 mL or less. Column miniaturization allows accelerating the process design and reducing material consumption. On the other hand, it causes the ratio of the void volumes of the chromatographic system (SVV) to the packed bed volume to increase. SVV consists of the extra-column void volume of the workstation (ECV), including: connecting capillaries, valves and detector cells, and the intra-column void volume (ICV) in the column hardware, including: inlet and outlet adaptors, frits, a flow distributor and a collector. Dispersion in the ECV system stems from non-uniform radial velocity distribution in its ele-

ments [1–10]. This triggers formation of radial concentration gradients, where slowly diffusing macromolecules are unable to diffuse over the tube cross-section and reach a latter equilibrium. Therefore, they are segregated into a faster-moving region near the capillary center and a slow-moving region at the column wall [11,12]; the resulting deformation and broadening of band profiles cause reduction in the performance of chromatographic system [1–9].

To predict band broadening in ECV, simplified dynamic models can be used, in which the geometries of the ECV elements are approximated by straight tubes with a laminar velocity distribution in two-dimensional (2D) coordinate system (e.g. [2,6,8]).

In reality, the geometry of ECV is much more complex, hence predictions of band profiles using 2D models can be inaccurate [8,9]. In a previous study, we showed that the accuracy of the numerical predictions could be improved by use of the computational fluid dynamics (CFD) method, in which 3D geometry of the ECV system was implemented [9]. Nevertheless, that study was limited to the analysis of flow behavior in ECV, it did not include the contribution of IVC to band broadening, as well as its evolution in the packed bed.

* Corresponding author.

E-mail address: dorota.antos@prz.edu.pl (D. Antos).

Furthermore, the attempts made so far to utilize CFD for predictions of dispersion in chromatographic systems were mainly focused on the description of flow behavior inside chromatographic columns of different types (e.g., [6,13–22]) or in column flow distributors of different structures, while neglecting the ECV contribution [18,23,24]. Another issue that is lacking of detailed examination, is the effect of sample viscosity on flow behavior in chromatographic system. That effect can occur in chromatographic processing of proteins, whose concentrated solutions are often highly viscous. This is typical for bacterial homogenates, which contain a high amount of viscous impurities [25]. In particular, presence of DNA or DNA fragments in the solution causes dramatic increase in viscosity [26].

High viscosity reduces diffusivity of proteins, which even more hinders their mobility and intensifies the SVV effect. Furthermore, increased fluid viscosity in the sample plug migrating through the packed bed induces on-column band broadening [25]. In an extremal situation, when the difference in viscosity between the feed sample and the mobile phase is very high and the residence time in the chromatographic column is long enough, a flow instability referred to the Saffman–Taylor instability termed as viscous fingering (VF) develops [27–30]. In general, the VF phenomena occurs at the interface between two fluids of differing viscosities which percolate through a porous bed. When the high-viscosity fluid is displaced by the low-viscosity fluid, the interface between them can be unstable, which results in elution patterns resembling fingers.

In case of fully miscible liquids, which applies to chromatographic processes, the occurrence of the VF phenomenon is driven not only by the viscosity contrast between them, but also by diffusion effects triggered by local concentration gradients [31]. The occurrence of miscible displacement in porous media have been reported in many industrial applications [32]. Therefore, a number of studies have been devoted to elucidate VF in porous beds in different settings in general [32–38], and in particular in beds packed into chromatographic columns [39–48]. To study the onset and evolution of VF in packed bed, a visualization technique based on a balanced refractive index method was used by Shalliker et al. [39,41]. Carta and Jungbauer presented resonance images of VF to examine the elution pattern of a protein from an anion exchange chromatography column [46]. Suekane et al. [43] used an x-ray computerized tomographic technique to visualize the onset and the three-dimensional growth of viscous fingering in a cylindrical column.

To quantify the VF effect in chromatographic columns, CFD methods have also been employed, in which the mass and momentum conservation equations in porous media were implemented along with proper initial and boundary conditions. Norton and Fernandes [44] and Dickson et al. [45] developed a CFD model to simulate the VF evolution of viscous solution for nonadsorbing species. In that model, isotropic dispersion of species in packed bed was assumed, i.e., the values of radial and axial dispersion coefficients were set to be the same. The numerical simulations reproduced qualitatively the morphology and dynamics of VF recorded by magnetic resonance.

Wit et al. provided a quantitative analysis of the contribution of VF to broadening of chromatographic bands for nonadsorbing species as a function of different process and system parameters, such as the bed length, the Peclet number, the ratio of the viscosity of the sample and the viscosity of the displacing fluid termed as the mobility ratio, and the ratio between radial and axial dispersion coefficients in anisotropic dispersion [30]. Rousseaux et al. continued that study and performed the numerical analysis of the influence of the mobile phase flowrate, the column diameter, the particle diameter, and the mobility ratio on the VF evolution and its consequences for peak characteristics [42]. Rana et al. [47] ana-

lyzed the transport an absorbing solute in a porous bed. The study revealed that the coupled effect of viscous fingering and Langmuir adsorption can enhance the mixing efficiency of the solute. The authors in their model assumed isotropic dispersion of species in the packed bed.

In all above studies, the CFD models were not confronted with the experimental data in the form of chromatographic band profiles. Such a verification has been provided only in case of supercritical fluid chromatography by Subraveti et al. [48]. Also in that model, isotropic diffusion of the solute and the solvent in the packed bed was assumed.

In this study, we have developed a CFD model for simulation of flow behavior in the whole elution path in the chromatographic system, including: ECV (i.e., the injection system, connection capillaries, detector cell), ICV (i.e., the column hardware: adaptors, frits, flow distributors, collectors), and the packed bed. The model accounted for the concentration dependences of viscosity, density, and dispersion anisotropy in packed bed. The contribution of each system element to band broadening of a protein, which was a monoclonal antibody (mAb), was determined for different flow velocities, injection volumes, and lengths of packed bed. The effect of the sample viscosity on band shape was studied for different mobility ratios. The model was solved for both 2D and 3D geometries of the chromatographic system. To verify the model predictability, the model simulations were compared with the experimental band profiles recorded under different process and system conditions.

This study supplemented our previous work, in which the presence of the column and the viscosity effects were not included [9], as well as the literature reports, in which the flow patterns in ECV and inside the column were analyzed separately.

2. Theory

2.1. Governing equations for ECV

In the ECV zone, the momentum and mass conservation equations were specified for incompressible solutions. The study subjects were aqueous solutions of the protein and glycerol and their mixtures. Glycerol was used to mimic viscous solvent environment of the protein.

For the momentum conservation equation, it holds:

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho \bar{w}) + \nabla \cdot (\rho \bar{w} \bar{w}) = -\nabla p + \nabla \cdot (\bar{\tau}) + \rho \bar{g} \quad (1)$$

where, \bar{w} is the fluid velocity, ρ is the fluid density, p is pressure, \bar{g} is the acceleration of gravity, $\bar{\tau}$ is the stress tensor given by the following equation:

$$\bar{\tau} = \mu \left[(\nabla \bar{w} + \nabla \bar{w}^T) - \frac{2}{3} \nabla \cdot \bar{w} I \right] \quad (2)$$

where, μ is the fluid viscosity, I is the unit tensor.

Eq. (1) is supplemented with the mass continuity equation:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \bar{w}) = 0 \quad (3)$$

and with the species mass balance equation:

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho Y_i) + \nabla \cdot (\rho \bar{w} Y_i) = -\nabla \cdot J_i \quad (4)$$

where, Y_i is the mass fraction of the i th component, J_i is the diffusion flux:

$$J_i = -\rho D_{i,m} \nabla Y_i \quad (5)$$

where, $D_{i,m}$ is the molecular diffusion coefficient.

The diffusion coefficient of the protein in aqueous solution, P , was calculated according to the correlation suggested by Tyn and Gusek [49]:

$$\frac{D_{p,m} \mu}{T} = \frac{9.2 \cdot 10^{-8}}{M^{0.333}} \quad (6)$$

where, $D_{p,m}$ is in $[\text{cm}^2 \text{s}^{-1}]$, viscosity μ of the solution in Pa s, temperature T in K, molecular weight M in Da.

The diffusion coefficient of glycerol in aqueous solution (gly) was calculated according to the correlation [50]:

$$D_{gly,m} \times 10^9 = \frac{1.024 - 0.91 Y_{gly}}{1 + 7.5 Y_{gly}} \quad (7)$$

where, $D_{gly,m}$ is in $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

Viscosity of aqueous solutions of glycerol, $\mu_{gly,m}$, was calculated according to the formula [51]:

$$\mu_{gly,m} = \mu_{gly} \exp(A \alpha) \quad (8)$$

where, $A = \ln \frac{\mu_{water}}{\mu_{gly}}$, $\alpha = \ln \left(\frac{\mu_{gly,m}}{\mu_{gly}} \right) / \ln \left(\frac{\mu_{water}}{\mu_{gly}} \right)$, where μ_{water} , μ_{gly} , is viscosity of water and glycerol, respectively, $\mu_{gly,m}$ additionally includes the concentration and temperature dependences (see Supplementary materials, Eqs. (S1)–(S6)).

The density of the glycerol in the mixture $\rho_{gly,m}$ was calculated as follows [52]:

$$\rho_{gly,m} = \sum_i Y_i \rho_i \quad (9)$$

where, $i = \text{water, gly}$

2.2. Governing equations for the chromatographic column

The momentum conservation equation in porous bed was expressed as follows:

$$\frac{\partial}{\partial t} (\varepsilon_e \rho \vec{w}) + \nabla \cdot (\varepsilon_e \rho \vec{w} \vec{w}) = -\varepsilon_e \nabla p + \nabla \cdot (\varepsilon_e \vec{\tau}) + \varepsilon_e \rho \vec{g} + \vec{F} \quad (10)$$

where, \vec{w} is the superficial velocity, $\vec{\tau}$ is given by Eq. (2), ε_e is the external porosity, \vec{F} denotes viscous and inertial losses in porous media:

$$\vec{F} = - \left(\frac{\varepsilon_e^2 \mu}{K} + \frac{\varepsilon_e^3 C_2 \rho |\vec{w}|}{2} \right) \vec{w} \quad (11)$$

where, C_2 is the inertial resistance factor which is equal to 0 for the laminar flow.

The Carman-Kozeny equation was used to calculate the permeability of homogenous porous media:

$$K = \frac{\varepsilon_e^3 d_p^2}{150 (1 - \varepsilon_e)^2} \quad (12)$$

where, K is the permeability, d_p is the bed particle diameter.

The mass conservation equation in porous bed was expressed as:

$$\frac{\partial (\varepsilon_t \rho)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \vec{w}) = 0 \quad (13)$$

which was coupled with the species mass conservation equation:

$$\frac{\partial}{\partial t} (\varepsilon_t \rho Y_i) + \nabla \cdot (\rho \vec{w} Y_i) = -\nabla \cdot J_i \quad (14)$$

$$J_i = -\varepsilon_e \rho D_{i,Leff} \nabla Y_i \quad (15)$$

where, ε_t is the total porosity, $D_{i,Leff}$ is the effective dispersion coefficient.

The external and total porosities are correlated as follows:

$$\varepsilon_t = \varepsilon_e + (1 - \varepsilon_e) \varepsilon_p \quad (16)$$

where, ε_p is the intrinsic bed porosity.

The effective dispersion coefficient $D_{i,Leff}$ in the packed bed was calculated according to the formula [53]:

$$D_{i,Leff} = \gamma_1 D_{i,m} + \gamma_2 d_p \frac{w}{\varepsilon_e} = \gamma_1 D_{i,m} + D_{i,L} \quad (17)$$

where, the first term corresponds to the contribution of molecular diffusion, the second one to the contribution of hydrodynamic dispersion, $D_{i,L}$, γ_1 and γ_2 are empirical coefficients, which typically take values of $\gamma_1 = 0.7$ and $\gamma_2 = 0.5$, respectively [53]. The anisotropy of the dispersion coefficient in chromatographic bed is accounted for by the velocity distribution in the second term. As the molecular diffusion coefficient of proteins takes very low values and even lower in their highly viscous solutions, the first term of Eq. (17) is active only for extremely low velocities in radial direction, for which the value of the second term tends to zero. For typical values of axial velocity in chromatographic columns that term is negligibly small, and dispersion is governed by the second term determined by $D_{i,L}$, whose value can be calculated from the Peclet number correlation [54]:

$$Pe = \frac{w d_p}{D_L \varepsilon_e} = 0.2 + 0.011 Re^{0.48} \quad (18)$$

where, Re is the Reynolds number:

$$Re = \frac{w \rho d_p}{\mu} \quad (19)$$

which provides the following formula for $D_{i,L}$:

$$D_{i,L} = \frac{w d_p}{Pe \varepsilon_e} \quad (20)$$

The species mass balance equation (Eq. (14)), does not include kinetics of mass transfer. In case of nonadsorbing species, which were the subject of this study, dispersion exerts the dominant influence on band broadening, whereas the contribution of extra and intra particle mass transport limitations in porous packed bed are of minor importance.

3. Materials and methods

3.1. Equipment

The Äkta purifier with a UV and conductometric detector and a data station (Cytiva, Uppsala, Sweden) was used for the chromatographic elution experiments. The injector system consisted of a multi-way injection valve and loop capillaries of different volumes and I.D.: 0.01 mL with I.D. 0.25 mm, 0.5 or 1 mL with I.D. 0.75 mm, and a superloop with the maximum volume of 10 mL, I.D. 30 mm.

The SEC-HPLC analysis of the eluted fractions was performed using the DIONEX UltiMate 3000 system from Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

3.2. Materials

The compounds used for the elution experiments were: a monoclonal antibody (mAb2 with MW = 148 kDa, purity $\geq 96\%$) provided by Polpharma Biologics (Gdańsk, Poland) and glycerol (MW = 92 Da, purity $\geq 99\%$) purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland).

The elution experiments were performed using a Tricorn column, I.D. 5 mm (Cytiva). For the column packing, the POROS XS strong cation exchange resin with the average particle size of 50 μm was used (Thermo Fisher Scientific). The length of the

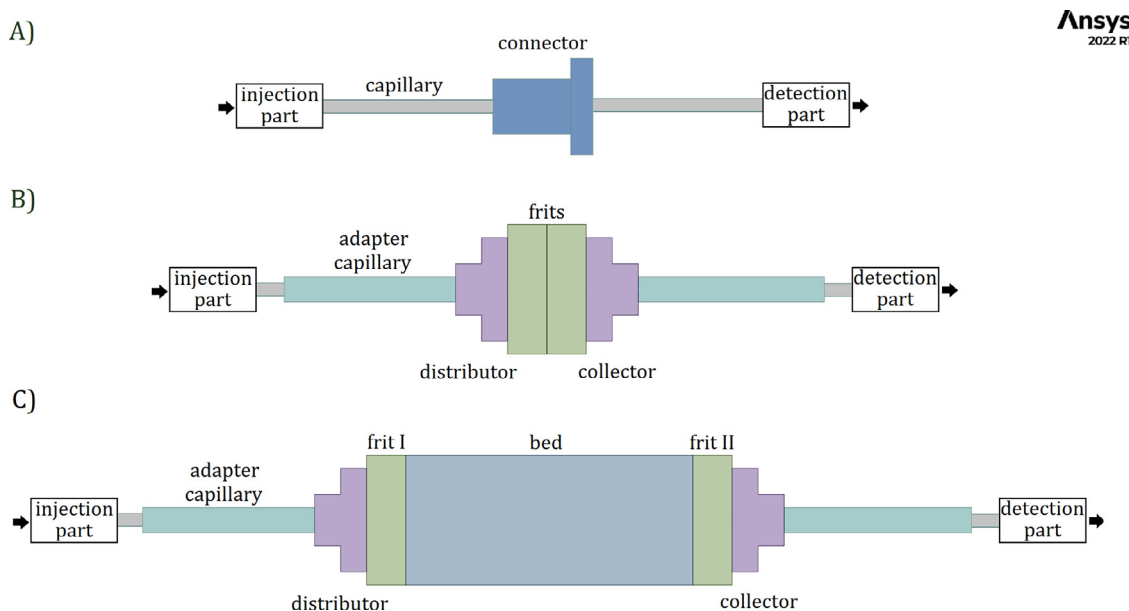


Fig. 1. Elution path of the chromatographic system: (A) with the zero-length connector instead of the column (ECV), (B) with the zero-length column without the packed bed (ECV and ICV), (C) with the column containing the packed bed (the whole elution path: ECV, ICV and the packed bed).

packed bed was changed from about 10 mm to 50 mm, which corresponded to the bed volume in the range 0.2–1 mL.

For the analysis of the concentration profiles of the protein in glycerol solutions, the analytical size exclusion column (SEC-HPLC) MAbPac SEC-1 (Thermo Fisher Scientific) with I.D. 4 mm and length 300 mm, the resin particle size of 5 μm and the pore size of 300 \AA was used.

3.3. Geometry of the chromatographic system

Three different configurations of the chromatographic system were experimentally and numerically examined. Each of them consisted of the injection part containing the multi-way valve equipped with the injection capillary loop or with the superloop, capillaries of different diameters connecting the individual elements of the elution path, and the detection part containing the UV detector cell and the conductivity detector cell. The elution paths differed in the presence or absence of the chromatographic column and the packed bed (Fig. 1), i.e.:

- without the column, where the column was replaced with the zero-length connector (Fig. 1A), and used to analyze flow behavior in ECV,
- with the zero-length column, i.e., the column without the packed bed (Fig. 1B), in which the inner length was reduced to zero by proper adjusting the position of the column adapters. This system was used to examine the contribution of ICV to band broadening,
- with the chromatographic column containing the packed bed (Fig. 1C), and used to determine the contribution of dispersion in packed bed to band broadening

The dimensions of all elements of the elution path are given in Supplementary materials.

3.4. Elution experiments

The effect of sample viscosity on the elution pattern of the protein was preliminary examined for different model surrogates of viscous solvent environment, such as: blue dextran, PEG-3.3 kDa or glycerol. In general, rheological properties of all those compounds

were similar; they exhibited Newtonian fluid properties within the concentration and viscosity ranges investigated, which was confirmed by the literature data for glycerol [55] and dextran [56], and by own measurements of the shearing stress for PEG-3.3 kDa (data not shown).

Nevertheless, glycerol was found to interfere the least of all those compounds with the protein detector signal. Moreover, it could be easily detected by the conductometric detector, even at high concentrations.

For the final tests, samples of mAb2 (0.7 or 1.4 mg mL^{-1}), glycerol (20, 40, or 60% w/w) and their mixtures were prepared in the mobile phase, i.e., phosphate buffer pH 8.5 with 1 M NaCl. Under those conditions, both mAb2 and glycerol were not adsorbed on the resin.

The samples were injected into the chromatographic system of different configurations (Fig. 1) using the injection loop capillaries of different volumes or the superloop. The mobile phase flowrate was changed from 0.1 to 1.0 mL min^{-1} . The elution profiles of samples of mAb2 dissolved in the mobile phase were recorded with the UV detector at 280 nm wavelength. As mentioned above, the elution profiles of samples of glycerol in the mobile phase were recorded with the conductometric detector. The profiles obtained were converted to the concentration units using the adequate detector calibration curves. To determine the profiles of mAb2 in mixtures with glycerol, the column outlet profile was fractionated, and the samples collected were subjected to the SEC-HPLC analysis. The concentration of mAb2 was calculated from the areas of the SEC-HPLC peaks converted into the concentration units.

The SEC-HPLC analysis was performed using phosphate buffer pH 6.8 with 0.3 M NaCl at flowrate 0.2 mL min^{-1} . All experiments were performed at room temperature (av. 25 $^{\circ}\text{C}$).

3.5. Numerical methods

The numerical simulations were performed using a commercial CFD software, i.e., ANSYS Fluent v.2022 R1. The elution paths with the capillary injection loops in the injection system were described by 3D geometry, whereas for the elution paths with the superloop, 2D geometry was used. The size of the numerical mesh was chosen small enough not to affect the model solution. The size of the

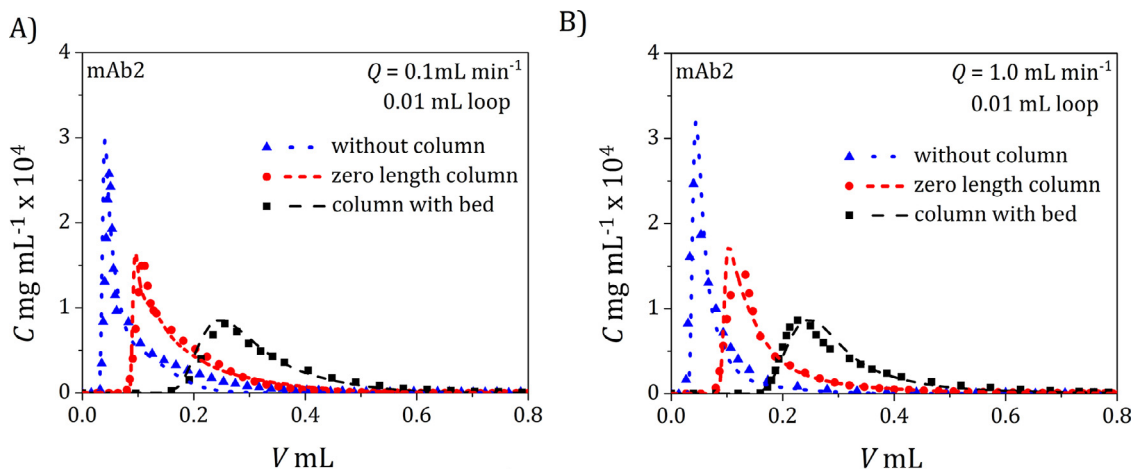


Fig. 2. Concentration profiles of mAb2 predicted by the CFD model and experimentally recorded at the outlet of different elution paths, i.e., without the column, with the zero-length column and with the column with the packed bed, for the injection loop capillary of 0.01 mL at different flowrates (Q) of the mobile phase: (A) $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, (B) $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$. The injection concentration $C_{inj,mAb2} = 1.4 \text{ mg mL}^{-1}$. V is the retention volume; it includes the ECV elements. The ordinate values are multiplied by 10^4 . Symbols – experimental data, lines – model simulations.

mesh was the same for all space coordinates, i.e., 0.01 mm, the aspect ratio was preserved at level 1. Typical time step size was about 0.001 s. The mass balance closure was controlled to ensure negligible percentage error in relation to the mass introduced into the system. As the Reynolds number was low or very low for all elution paths, the computational solver was assigned to the option of the laminar flow. The solutions were generated using the non-stationary transport model. Typical boundary conditions were used for the inlet, wall and outlet. At the inlet laminar flow velocity distribution was assumed, at the outlet no backflow conditions was used and no-slip conditions at the wall, the outlet gage pressure was set equal to 0. The velocity profile was calculated using the pressure based solver. The capillary, adapters, distributor and collector were modelled as the open spaces. The frits and the packed bed were modelled as porous zones.

The concentration dependences of the solution viscosity, density and diffusion coefficient Eqs. (6)–(9) were implemented into the model equations using user-defined functions (UDF). The user-defined scalars (UDS) were used to account for dispersion anisotropy (Eq. (17)).

4. Results and discussion

4.1. Determination of the porosities of the frits and the packed bed

The porosity of the frits was determined by fitting the solution of the 3D-geometry CFD model to the experimental retention profiles of the mAb2 pulses injected using the 0.01 mL capillary loop and eluted through the elution path of the system with the zero-length column (Fig. 1B). The porosity of the frits found was $\varepsilon_t = \varepsilon_e = 0.26$. The total porosity of the packed bed was determined in the similar way, but in the presence of the resin in the column. For mAb2, which did not penetrate all pores of the resin, the value $\varepsilon_t = 0.55$ was obtained, for glycerol $\varepsilon_t = 0.75$. The particle porosity of the resin was $\varepsilon_p = 0.63$ (according to Ref. [50]), the external bed porosity was calculated from Eq. (16) and it was equal $\varepsilon_e = 0.32$.

4.2. Evolution of the mAb2 band profiles in the chromatographic system

The band profiles of mAb2 were predicted using the 3D-geometry CFD model for all three elution paths containing the in-

jection loop capillaries with different volumes (Fig. 1): 0.01 mL, 0.5 mL and 1 mL. Since the concentration of mAb2 in the injection profile was low, the viscosity effect was neglected. The effective dispersion coefficient was calculated according to Eq. (17). As diffusion coefficient of the protein was very low ($5.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ in water, Eq. (6)), the contribution of the first term of Eq. (17) at the typical value of $\gamma_1 = 0.7$ was negligible. The second term equivalent to $D_{mAb2,L}$ was calculated from Eq. (20) (e.g., the dispersion coefficient of mAb2 at 0.1 mL min^{-1} was equal $D_{mAb2,L} = 3.8 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). Since the elution experiments were performed under nonadsorbing conditions, mass transport kinetics in the packed bed were of minor importance for the mechanism of band broadening, which was mainly governed by dispersion. This was confirmed by comparing the model predictions with the experimental band profiles. Typical results obtained for the packed bed with the length of 11 mm at the smallest injection volume of 0.01 mL and the flowrates 0.1 and 1 mL min^{-1} are depicted in Fig. 2. Similar verification was performed for the injection loop capillaries of different volumes; exemplary results obtained for the elution path with the 1-mL injection loop capillary are depicted in Fig. 3. In all cases, the model simulations reproduced experimental data quite well, which confirmed the accuracy of the model and its predictability. A similar quality of the comparison was achieved for the packed beds with higher lengths (an example is shown in Section 4.3.1).

In the next step, the model was used to quantify the contribution of different elements of the elution path to broadening of the protein bands. Figs. 4 and 5 show the predictions of the variances of the protein bands at different locations along the elution path (see Fig. 1); before the frit I, after the frit I, before the frit II, after the collector and at the system outlet. The results are presented for different lengths of the packed bed and different flowrates. From Fig. 4A, which shows the band variances calculated for the smallest injection, i.e., using the injection loop capillary of 0.01 mL, it is evident that the injection part of the chromatographic system contributes the least to the overall band broadening. The contributions of different parts of the elution path to the overall variance of the band profile at the system outlet are: the inlet column hardware (adaptor, distributor, frit I): 46% for the shorter length of the packed bed and 35% for the longer one, the packed bed: 10% for the shorter length and 28% for the longer one, the outlet column hardware (adaptor, collector, frit II): 20% for the shorter length and 16% for the longer one, and for the post-column ECV (dominated

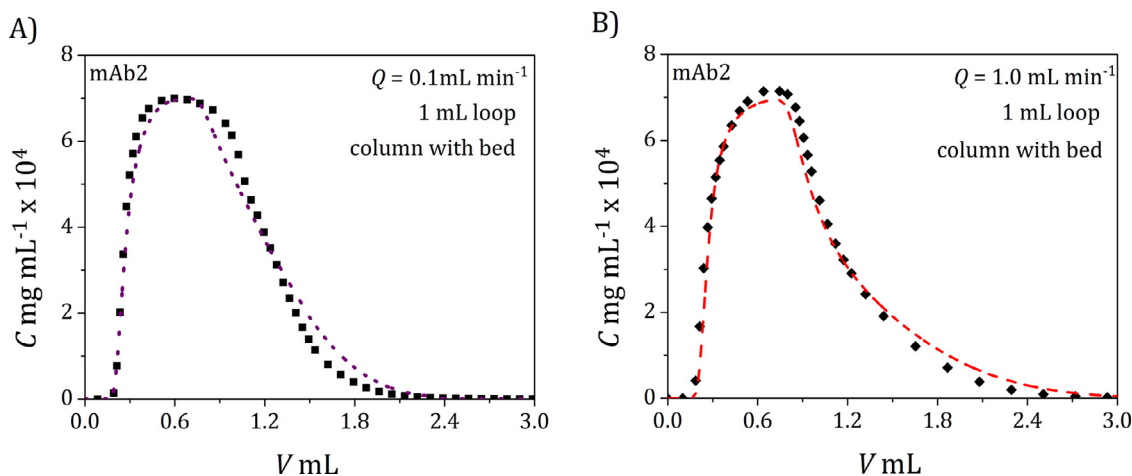


Fig. 3. Concentration profiles of mAb2 predicted and experimentally recorded at the outlet of the whole elution path (including the column with the packed bed), for the injection loop capillary of 1 mL at different flowrates of the mobile phase: (A) $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, (B) $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$. The injection concentration $C_{inj,mAb2} = 0.7 \text{ mg mL}^{-1}$. Symbols - experimental data, lines - model simulations.

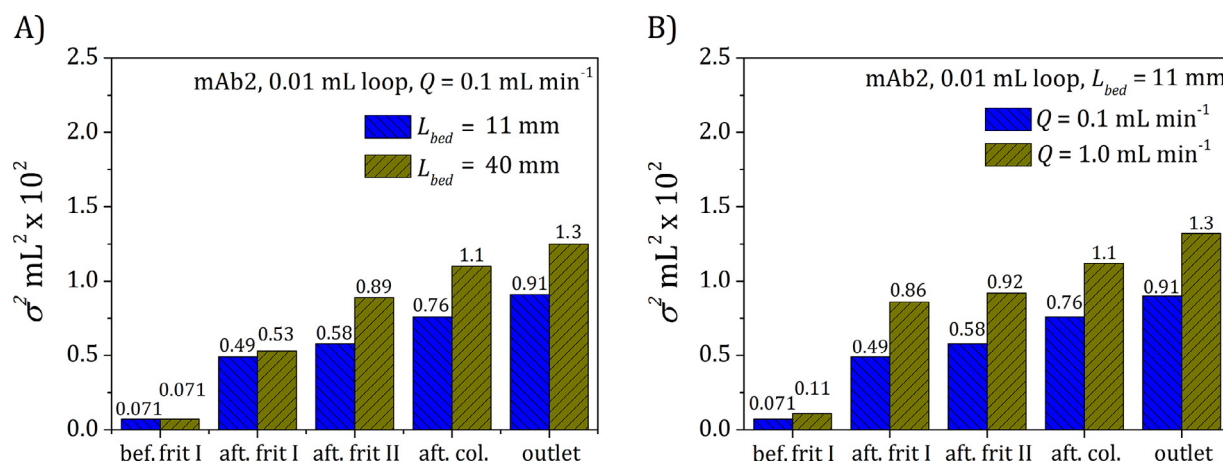


Fig. 4. Variances of the protein bands at different locations in the elution path for 0.01 mL injection loop capillary. (A) Effect of the length of the packed bed, (B) effect of the flowrate.

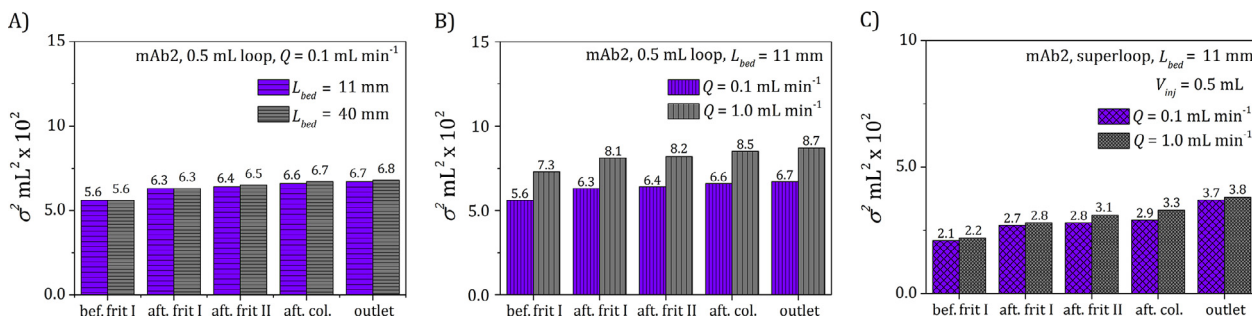


Fig. 5. Variances of the protein bands at different locations in the elution path. (A) Effect of the column length for the 0.5 mL loop capillary in the injection system, (B) effect of flowrate for the 0.5 mL loop capillary, (C) effect of flowrate for the superloop of the injection volume of 0.5 mL.

by the contribution of the detector cell): 16%. The overall contribution of the column hardware (inlet and outlet) is dominant for both lengths of the packed bed: 74% for the shorter one and 56% for the longer one.

The influence of flowrate on broadening of the protein bands is illustrated in Fig 4B. It can be observed that increasing flowrate causes increase in the variance of the protein bands for all elements of the elution path. Yet, increase in flowrate enhanced flow turbulence in the curved elements of the system, which improved the mobility of the macromolecule, hence partially mitigated radial heterogeneity of the concentration profiles. Thus, tenfold in-

crease in flowrate induced only 35–43% increase in the band variance. That phenomena has already been reported in our previous study [9].

The predictions of the variances of the protein bands injected from the injection loop capillary of the larger volume (0.5 mL) are presented in Fig 5; an illustration of the corresponding band profiles along with the experimental data is shown in Supplementary materials (Fig. S1). In that case, the band broadening was dominated by the flow behavior in the injection loop capillary. Long path for the sample migration through the capillary caused the contribution of flow behavior in the injection system to the overall

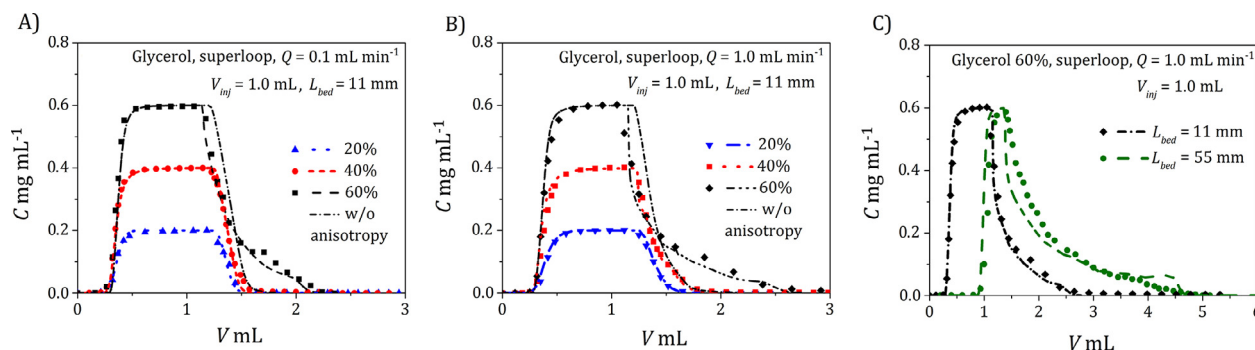


Fig. 6. Band profiles of glycerol at the outlet of the chromatographic system including the column with the packed bed. (A) influence of the glycerol concentration for $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, $L_{bed} = 11 \text{ mm}$, (B) influence of the glycerol concentration for $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$, $L_{bed} = 11$, (C) influence of the column length for $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$, $L_{bed} = 11$ or 55 mm . Symbols - experimental data, lines - model simulations, dash-dotted lines (in A, B) - model simulations with and without dispersion isotropy.

band broadening to become dominant, whereas the effect of other elements of ECV and ICV and the length of the packed bed were of minor importance. Flow turbulence in the coils of the larger capillary loop was stronger than in the smaller one, therefore the values of the band variances increased only by 22–23% for tenfold increase in the flowrate.

Band broadening was much less pronounced when the superloop was used in the injection system, which is illustrated in the form of the band variances in Fig. 5C, and the band profiles in Fig. S2 (Supplementary materials). The replacement of the injection loop capillary with the superloop caused that the total length of the capillary elements in the elution path was much shorter, therefore the effect of radial heterogeneity of the velocity distribution was weaker. Hence, the influence of flowrate on band broadening was also weaker (Fig. 5C). This indicates that the injection systems with long capillary loops should not be used in lab-scale chromatographic systems with small columns. This is of major importance for non-adsorptive chromatographic techniques, such as SEC, as well as for adsorptive ones, in case when the sample solution contains nonadsorbing or weakly adsorbing compounds. For strongly adsorbing compounds, band deformation in the injection loop can be suppressed by thermodynamic effects stemming from the formation of self-sharpening fronts in packed bed.

4.3. Effect of flow viscosity on the band profile

4.3.1. Elution profiles of glycerol

To examine the effect of sample viscosity on flow behavior in the chromatographic system, the elution profiles of the solutions of glycerol with different concentrations were experimentally measured and predicted.

For the smallest injections of 0.01 mL, the band profiles were not affected by the difference in viscosity between the mobile phase and the sample (mobility ratio) even for the highest concentrations of glycerol, i.e., up to 60% w/w, which was the solubility limit in the buffer solution. This was due to dilution of concentration profiles while migrating along the elution path of the chromatographic system. For the injection volumes less than 0.5 mL, VF was also not observed. The VF phenomena activated for large volume injections and the concentrated solutions of glycerol, i.e., for injections of 1 mL or larger of 60% w/w solutions. To eliminate the excess of band broadening in long and curved injection loop capillaries, the sample was injected from the superloop. In that case, to reduce the computation time, the 2D-geometry CFD model was used, as its accuracy was sufficient to reproduce the band profiles. Since the heterogeneity of the packing of bed particles was neglected, the predictions of band profiles were the same for both the 2D and 3D-geometry models. The local changes in viscosity, density and diffusivity due to their concentration depen-

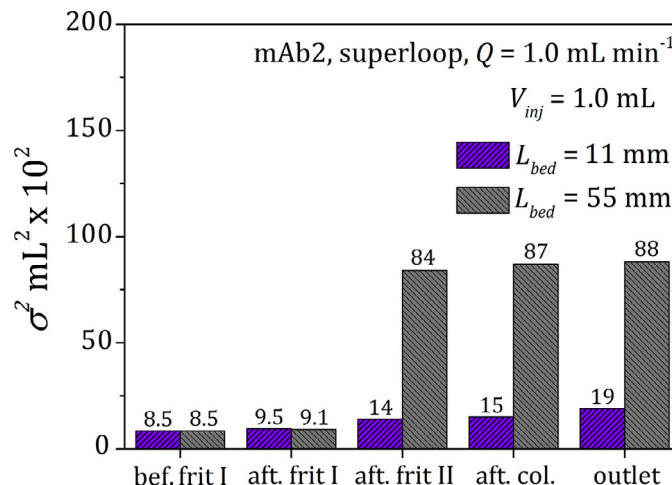


Fig. 7. Variances of the glycerol bands at different locations in the elution path for different lengths of the packed bed.

dences were accounted for in the model, as well as dispersion anisotropy in the packed bed. The coefficient γ_1 in Eq. (17) was set the same as for mAb2 elution ($\gamma_1 = 0.7$), the coefficient $D_{gly,L}$ was determined from the Peclet number. The model was solved without adjustments. The model predictions were overlaid on the experimental data. The band shapes were found to be reproducible and predictable under the process conditions used. This is illustrated in Fig. 6A–C. In Fig. 6A and B the band profiles of glycerol are presented for different concentrations in the injected samples: 20, 40, 60% w/w, which corresponded to the mobile ratio $\mu_{gly}/\mu_{water} = 1.7, 3.5$ and 9.9 , respectively (calculated from Eq. (8)). The VF effect can be observed for the highest mobile ratio at the highest concentration of glycerol, i.e., 60% w/w. Increase in the mobile phase flowrate and the length of the packed bed enhanced band broadening, which is shown in Fig. 6B and C in the form of the band profiles, and Fig. 7 in the form of the band variances.

The band distortion of glycerol at the concentration of 60% w/w in the sample resulted from strong dispersion anisotropy in radial direction, which was induced by complex velocity distribution, as illustrated in Fig. 8A and B. For the velocity values close to zero, the mass transport mechanism was mainly governed by diffusion, which strongly enhanced radial heterogeneity of the concentration profiles (Eq. (20)). Negative velocity values that appear in Fig. 8A correspond to backflow in the column. Increase in flowrate enlarged differences in local values of velocity, and thus dispersion anisotropy. This induced the VF effect in the form of disturbances in the concentration profiles, which intensified with increasing the

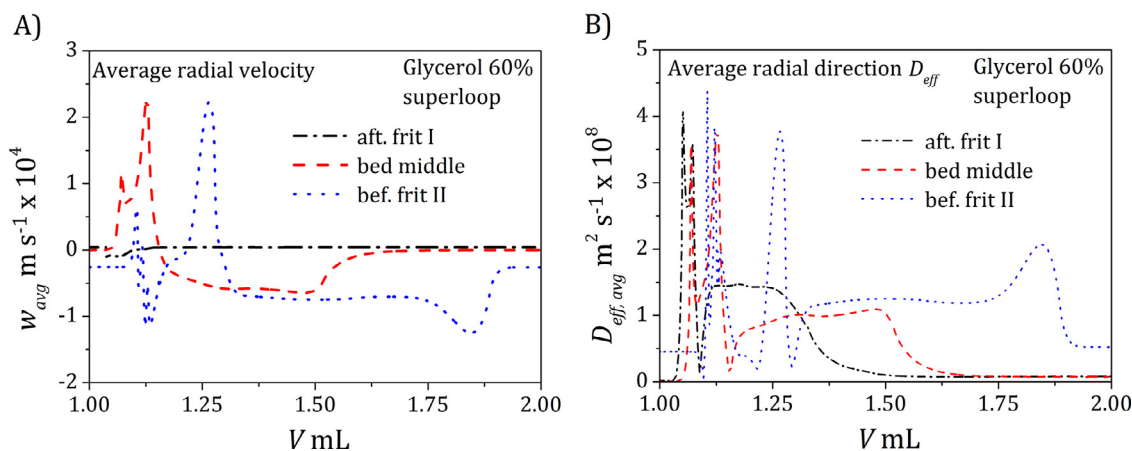


Fig. 8. Illustration of radial heterogeneity of flow behavior at different locations in the packed bed (total length $L_{bed} = 11$ mm), $Q = 1$ mL min^{-1} . (A) profiles of average radial velocity elution, (B) values of average radial effective dispersion coefficient.

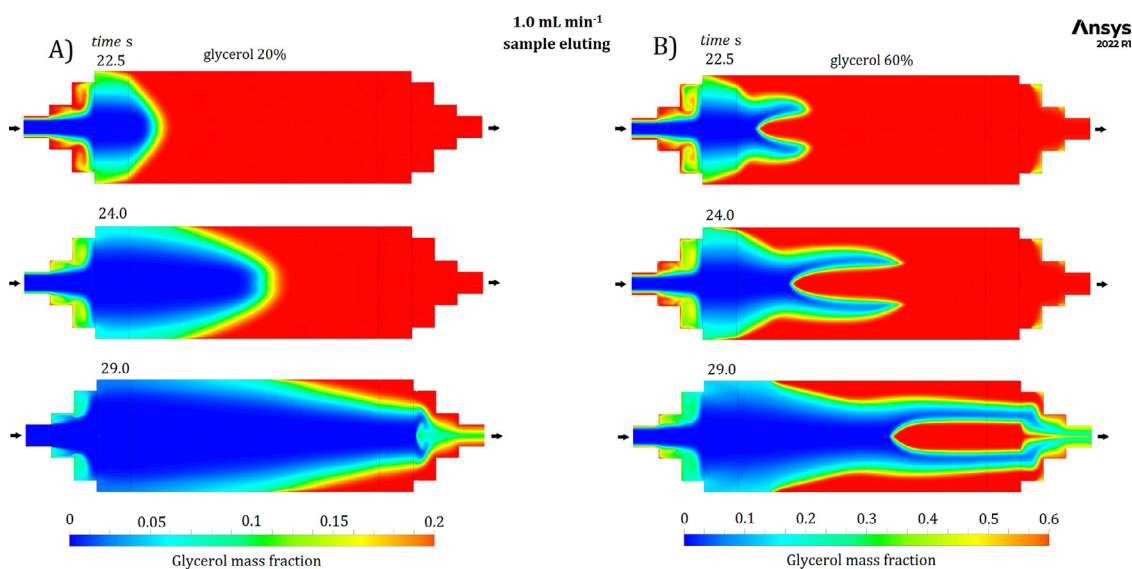


Fig. 9. Illustration of the evolution of the concentration contours for elution of glycerol samples along the column (including the column hardware and the packed bed). (A) 20% w/w glycerol in the sample, (B) 60% w/w glycerol in the sample.

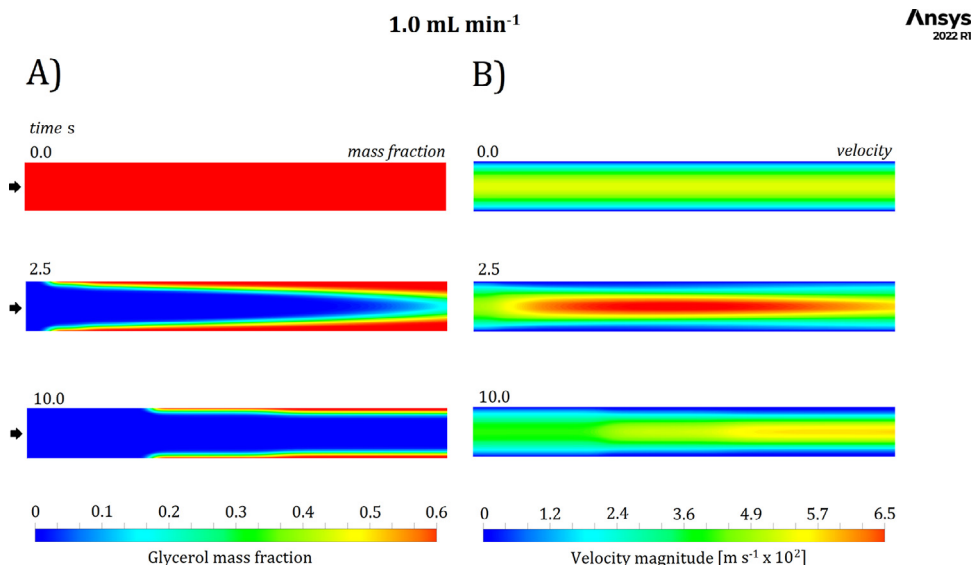


Fig. 10. Illustration of the evolution of the concentration and velocity contours for a sample of 60% w/w glycerol eluting from a connection capillary in ECV, $Q = 1$ mL min^{-1} . (A) Snapshot of the concentration contours, (B) the corresponding velocity contours.

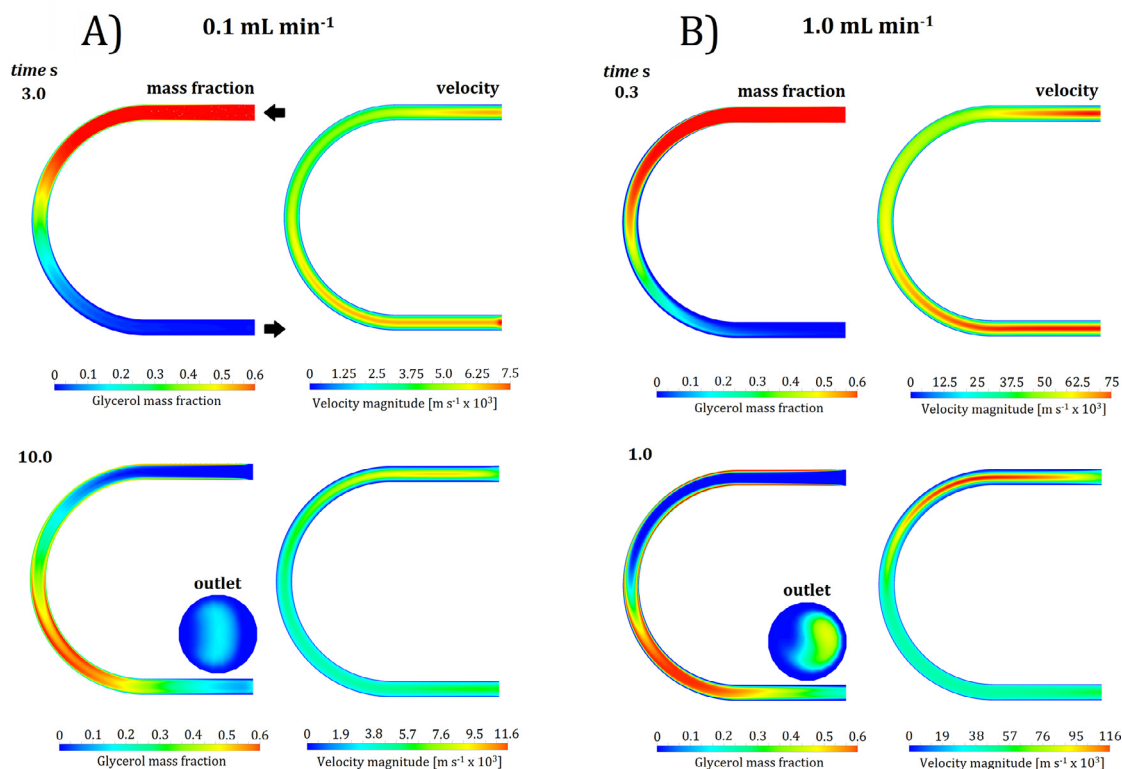


Fig. 11. 3D-model predictions of the evolution of the concentration and velocity contours for a sample of 60% w/w glycerol eluting from a coil of the injection loop capillary. (A) $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$ (B) $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$.

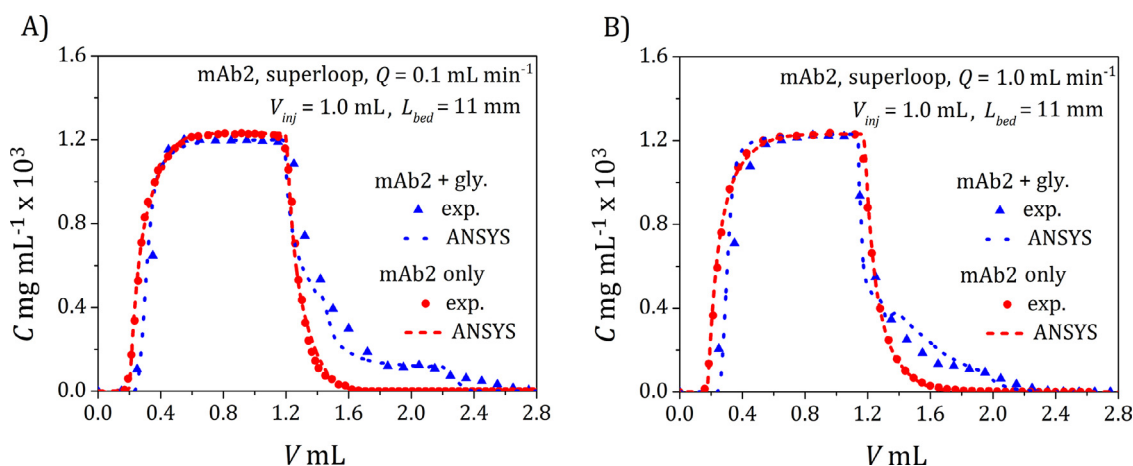


Fig. 12. Band profiles of mAb2 in the single-component solutions and in the mixture with glycerol at the outlet of the whole chromatographic system. (A) $Q = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, (B) $Q = 1 \text{ mL min}^{-1}$, $C_{inj,mAb2} = 0.7 \text{ mg mL}^{-1}$. Symbols - experimental data, lines - model simulations.

glycerol concentration and the mobile phase flowrate. The intensification of VF was demonstrated by the enhancement of tailing of the outlet band profiles, which could be observed in Fig. 6A–C.

Fig. 9A and B show snapshots of the concentration contours for the elution of samples of 60% w/w glycerol along the column at different time intervals. Fig. 10 illustrates snapshots of the velocity and concentration contours at different time intervals for the same sample eluting from a connection capillary. A long period in which the viscous sample was adhered to the wall of the connection capillary correlated with the velocity drop in the radial direction.

The presence of any curvature in the elution path additionally complicated the flow behavior. Fig. 11 shows an illustration of 3D-model predictions of the concentration and velocity contours for a sample of 60% w/w glycerol eluting through a curved part of the

system, i.e., a fragment of the injection loop capillary coil. Strong heterogeneity of the concentration and velocity profiles in radial and axial directions can be observed, which enhances with increasing the mobile phase flowrate.

4.3.2. Co-elution of samples of mAb2 and glycerol

Finally, the experiments and numerical predictions were performed to determine the elution course of the protein in the presence of glycerol. As mentioned above, the solvent environment of the protein was selected to mimic viscous solution of a post-processing protein material.

Fig. 12A and B exemplify the VF effect for mAb2 dissolved in the solutions of 60% w/w glycerol and eluted from the column at flowrates of $Q = 0.1$ and 1 mL min^{-1} . The model predictions are

overlaid on the experimental profiles obtained by the SEC-HPLC concentration analysis of the column effluent. Additionally, the profiles of the mAb2 sample without glycerol are presented. The band deformation and peak tailing of mAb2 were correlated with deformation of the elution profiles of glycerol shown Fig. 6A and B. Yet, for mAb2 the influence of flowrate on the intensity of VF was reversed compared with glycerol, i.e., increase in flowrate reduced VF to some extent. This can be explained by intensification of flow turbulence at increasing flowrate, which mitigated the effect of very low diffusivity of mAb2 ($D_{Ab2,m} = 5.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$).

In general, the VF effect can impair the effectiveness of protein separation, especially for weak-binding or nonbinding process conditions.

5. Conclusions

The CFD model has been developed for the prediction of protein band broadening in a lab-scale chromatographic system. The case study included the analysis of band broadening of a mAb in the individual elements of the elution path, including: ECV consisted of the injection system, connecting capillaries, detector cells, IEV consisted of the adaptors, frits, distributor, collector, and the packed bed. For the calculations, the commercial CFD solver ANSYS Fluent v.2022 R1 was used, where the user-defined functions were implemented to account for the concentration dependences of density, viscosity and dispersion anisotropy in packed bed.

The model accurately reproduced band shapes recorded experimentally and provided information on the contribution of different elements of the chromatographic system to band broadening under different process and system conditions, i.e., for different lengths of the packed bed (11–55 mm), the mobile phase flowrates (0.1–1 mL min⁻¹) and for different injection systems, i.e., the injection loop capillaries of different volumes (0.01–1 mL) and the superloop. The obtained results indicated that for the smallest volume injections using the 0.01 mL-loop capillary, the dispersion effect in the column hardware contributed most to protein band broadening. For the injection loop capillaries of 0.5 mL and larger ones, the flow behavior in coils of the capillary made a major contribution to band broadening. That effect was much weaker when the superloop was used in the injection system, which reduced significantly the length of the elution path. Increase in flowrate triggered increase in the band variance, yet that effect was suppressed by increasing turbulence in the curved parts of ECV, which improved protein mobility in radial direction and partly mitigated heterogeneity of radial concentration profiles. Band asymmetry enhanced for highly viscous samples of glycerol, whose solution was selected to mimic viscous solvent environment of the protein. The VF effect was observed for high concentrations of glycerol, for which the mobility ratio was about 10. For the protein injected in the glycerol solutions, the VF effect was also observed, which was mitigated by the increased flowrate. Nevertheless, the occurrence of VF caused that the flow behavior in packed bed made dominating contribution to band broadening. However, diffusivity and transport properties are specific for the protein solution to be processed. Therefore, to accurately quantify the viscosity effect, the occurrence of the VF phenomenon and its extent, the rheology of the protein solution has to be determined.

All the observed trends were found to be reproducible and predictable, thus the model can be used for predictions of band broadening in chromatographic systems for different species, including proteins, for a wide range of operating conditions. This can allow distinguishing between the contribution of hydrodynamic effects occurring in void volumes of the chromatographic system as well as thermodynamic and kinetic effects induced by protein adsorption. This is of major importance for successful scaling-up of the separation process from a small-scale, for which hydrodynamic ef-

fects are dominant in protein elution behavior, to a large-scale, for which packed-bed related effects determine the separation efficiency.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

Bartłomiej Filip: Investigation, Methodology, Conceptualization, Writing – review & editing. **Roman Bochenek:** Methodology, Conceptualization. **Wojciech K. Marek:** Investigation. **Dorota Antos:** Conceptualization, Writing – review & editing.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgment

The research was conducted using the station of the Internet of Everything and infrastructure in the Department of Complex Systems, Faculty of Electrical and Computer Engineering, Rzeszów University of Technology.

We thank Maciej Ginalski from the SYMKOM company for assistance with developing our CFD procedure.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.chroma.2023.464178](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464178).

References

- [1] E.V. Dose, G. Guiochon, Effects of extra column convolution on preparative chromatographic peak shapes, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1723–1730.
- [2] A. Shankar, A.M. Lenhoff, Dispersion in round tubes and its implications for extra column dispersion, *J. Chromatogr. A* 556 (1991) 235–248.
- [3] O. Kaltenbrunner, A. Jungbauer, S. Yamamoto, Prediction of the preparative chromatography performance with a very small column, *J. Chromatogr. A* 760 (1997) 41–53.
- [4] K.J. Fountain, U.D. Neue, E.S. Grumbach, D.M. Diehl, Effects of extra column band spreading, liquid chromatography system operating pressure, and column temperature on the performance of sub-2- μm porous particles, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5979–5988.
- [5] K. Vanderlinden, K. Broeckhoven, Y. Vanderheyden, G. Desmet, Effect of pre-and post-column band broadening on the performance of high-speed chromatography columns under isocratic and gradient conditions, *J. Chromatogr. A* 1442 (2016) 73–82.
- [6] S. Schweiger, A. Jungbauer, Scalability of pre-packed preparative chromatography columns with different diameters and lengths taking into account extra column effects, *J. Chromatogr. A* 1537 (2018) 66–74.
- [7] G. Desmet, K. Broeckhoven, Extra-column band broadening effects in contemporary liquid chromatography: causes and solutions, *TrAC Trends Anal. Chem.* 119 (2019) 115619.
- [8] K. Baran, W.K. Marek, W. Piątkowski, D. Antos, Effect of flow behavior in extra-column volumes on the retention pattern of proteins in a small column, *J. Chromatogr. A* 1598 (2019) 154–162.
- [9] B. Filip, R. Bochenek, K. Baran, D. Strzałka, D. Antos, Influence of the geometry of extra-column volumes on band broadening in a chromatographic system. Predictions by computational fluid dynamics, *J. Chromatogr. A* 1653 (2021) 462410.
- [10] A. Javidanbardan, V. Chu, J.P. Conde, A.M. Azevedo, Microchromatography integrated with impedance sensor for bioprocess optimization: experimental and numerical study of column efficiency for evaluation of scalability, *J. Chromatogr. A* 1661 (2022) 462678.
- [11] J.G. Atwood, M.J.E. Golay, Dispersion of peaks by short straight open tubes in liquid chromatography systems, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 97–122.
- [12] J.S. Vrentas, C.M. Vrentas, Dispersion in laminar tube flow at low Peclet numbers or short times, *JAIChE* 34 (1988) 1423–1430.
- [13] S. Gerontas, M.S. Shapiro, D.G. Bracewell, Chromatography modelling to describe protein adsorption at bead level, *J. Chromatogr. A* 1284 (2013) 44–52.

- [14] A. Püttmann, M. Nicolai, M. Behr, E. von Lieres, Stabilized space-time finite elements for high-definition simulation of packed bed chromatography, *Finite Elem. Anal. Des.* 86 (2014) 1–11.
- [15] C. Jungreuthmayer, P. Steppert, G. Sekot, A. Zankel, H. Reingruber, J. Zanghellini, A. Jungbauer, The 3D pore structure and fluid dynamics simulation of macroporous monoliths: high permeability due to alternating channel width, *J. Chromatogr. A* 1425 (2015) 141–149.
- [16] D. Iurashev, S. Schweiger, A. Jungbauer, J. Zanghellini, Dissecting peak broadening in chromatography columns under non-binding conditions, *J. Chromatogr. A* 1599 (2019) 55–65.
- [17] U. Umatheva, G. Chen, R. Ghosh, Computational fluid dynamic (CFD) simulation of a cuboid packed-bed chromatography device, *Chem. Eng. Res. Des.* 152 (2019) 393–401.
- [18] M. Harasek, G. Paul, C. Jordan, A. Friedl, CFD-simulation of preparative chromatographic columns: effect of the distributor and the column design on the separation performance, *Chem. Ingen. Technol.* 73 (6) (2001) 639.
- [19] A. Moussa, K. Broeckhoven, G. Desmet, Fundamental investigation of the dispersion caused by a change in diameter in nano liquid chromatography capillary tubing, *J. Chromatogr. A* 1688 (2023) 463719.
- [20] W. Smits, S. Deridder, G. Desmet, The impact of flow distribution on column performance: a computational fluid dynamics study, *J. Chromatogr. A* 1369 (2014) 125–130.
- [21] A. Moussa, S. Deridder, K. Broeckhoven, G. Desmet, Computational fluid dynamics study of potential solutions to alleviate viscous heating band broadening in 2.1 mm liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A* 1654 (2021) 462452.
- [22] A. Moussa, S. Deridder, K. Broeckhoven, G. Desmet, Detailed computational fluid dynamics study of the parameters contributing to the viscous heating band broadening in liquid chromatography at pressures up to 2500bar in 2.1mm columns, *J. Chromatogr. A* 1661 (2022) 462683.
- [23] R. Ghosh, G. Chen, U. Umatheva, P. Gatt, A flow distribution and collection feature for ensuring scalable uniform flow in a chromatography device, *J. Chromatogr. A* 1618 (2020) 460892.
- [24] S. Deridder, G. Desmet, K. Broeckhoven, Numerical investigation of band spreading generated by flow-through needle and fixed loop sample injectors, *J. Chromatogr. A* 1369 (2014) 125–130.
- [25] M. Kołodziej, D.G. Sauer, J. Beck, W.K. Marek, R. Hahn, A. Jungbauer, A. Dürauer, W. Piątkowski, D. Antos, Scale up of a chromatographic capture step for a clarified bacterial homogenate – influence of mass transport limitation and competitive adsorption of impurities, *J. Chromatogr. A* 1618 (2020) 460856.
- [26] A. Laesecke, J.L. Burger, Viscosity measurements of DNA solutions with and without condensing agents, *Biorheology* 51 (2014) 15–28.
- [27] P.G. Saffman, G.I. Taylor, The penetration of a fluid into a porous medium or Hele-Shaw cell containing a more viscous liquid, *Proc. R. Soc. Lond. A* 245 (1958) 312–329.
- [28] P. Tabeling, G. Zocchi, A. Libchaber, An experimental study of the Saffman-Taylor instability, *J. Fluid Mech.* 177 (1987) 67–82.
- [29] G.M. Homsy, Viscous fingering in porous media, *Annu. Rev. Fluid Mech.* 19 (1987) 271–311.
- [30] A.D. Wit, Y. Bertho, M. Martin, Viscous fingering of miscible slices, *Phys. Fluids* 17 (2005) 054114.
- [31] A. Pinilla, M. Asuaje, N. Ratkovich, Experimental and computational advances on the study of viscous fingering: an umbrella review, *Heliyon* 7 (2021) e07614.
- [32] S. Pramanik, A. De Wit, M. Mishra, Viscous fingering and deformation of a miscible circular blob in a rectilinear displacement in porous media, *J. Fluid Mech.* 782 (2015) R2.
- [33] R. Luo, Y. Chen, S. Lee, Particle-induced viscous fingering: review and outlook, *Phys. Rev. Fluids* 3 (2018) 110502.
- [34] C. Rana, S. Pramanik, M. Martin, A. De Wit, M. Mishra, Influence of Langmuir adsorption and viscous fingering on transport of finite size samples in porous media, *Phys. Rev. Fluids* 4 (2019) 104001.
- [35] V. Sharma, H.B. Othman, Y. Nagatsu, M. Mishra, Viscous fingering of miscible annular ring, *J. Fluid Mech.* 916 (2021) A14.
- [36] L. Vienne, S. Marié, Lattice Boltzmann study of miscible viscous fingering for binary and ternary mixtures, *Phys. Rev. Fluids* 6 (2021) 053904.
- [37] P. Jangir, R. Mohan, P. Chokshi, Experimental study on the role of polymer addition in Saffman-Taylor instability in miscible flow displacement, *Phys. Fluids* 34 (2022) 093102.
- [38] M. Ch. Kim, S. Pramanik, Miscible viscous fingering in a packed cylindrical column: theory and numerics, *Phys. Rev. Fluids* 8 (2023) 013901.
- [39] R.A. Shalliker, B.S. Broyles, G. Guiochon, Visualization of viscous fingering in high-performance liquid chromatographic columns. Influence of the header design, *J. Chromatogr. A* 865 (1999) 73.
- [40] S. Keunckarian, M. Reta, L. Romero, C. Castells, Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatographic conditions, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 20–28.
- [41] R.A. Shalliker, H.J. Catchpole, G.R. Dennis, G. Guiochon, Visualising viscous fingering in chromatography columns: high viscosity solute plug, *J. Chromatogr. A* 1142 (2006) 48–55.
- [42] G. Rousseaux, M. Martin, A. De Wit, Viscous fingering in packed chromatographic columns: non-linear dynamics, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8353–8361.
- [43] T. Suekane, J. Ono, A. Hyodo, Y. Nagatsu, Three-dimensional viscous fingering of miscible fluids in porous media, *Phys. Rev. Fluids* 2 (2017) 103902.
- [44] T.T. Norton, E.J. Fernandez, Viscous fingering in size exclusion chromatography: insights from numerical simulation, *Ind. Eng. Chem. Res.* 35 (1996) 2460–2468.
- [45] M.L. Dickson, T.T. Norton, E.J. Fernandez, Chemical imaging of multicomponent viscous fingering in chromatography, *J. AIChE* 43 (1997) 409.
- [46] G. Carta, A. Jungbauer, *Protein Chromatography: Process Development and Scale-up*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, 2010.
- [47] C. Rana, A. De Wit, M. Martin, M. Mishra, Combined influences of viscous fingering and solvent effect on the distribution of adsorbed solutes in porous media, *RSC Adv.* 4 (2014) 34369.
- [48] S.G. Subraveti, P. Nikrityuk, A. Rajendran, Computational fluid dynamics study of viscous fingering in supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1534 (2018) 150–160.
- [49] M.T. Tyn, T.W. Gusek, Prediction of diffusion coefficients of proteins, *Biotechnol. Bioeng.* 35 (1990) 327–338.
- [50] G. D'Errico, O. Ortona, F. Capuano, V. Vitagliano, Diffusion coefficients for the binary system glycerol + water at 25°C. A velocity correlation study, *Chem. Eng. Data* 49 (6) (2004) 1665–1670.
- [51] N. Cheng, Formula for the viscosity of a glycerol-water mixture, *Ind. Eng. Chem. Res.* 47 (2008) 3285–3288.
- [52] K. Takamura, H. Fischer, N.R. Morrow, Physical properties of aqueous glycerol solutions, *J. Petr. Sci. Eng.* 98–99 (2012) 50–60.
- [53] G. Guiochon, A. Felinger, D.G. Shirazi, A.M. Katti, *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*, Elsevier Academic Press, USA, 2006.
- [54] S.F. Chung, C.Y. Wen, Longitudinal dispersion of liquid flowing through fixed and fluidized beds, *J. AIChE* 14 (1968) 857–866.
- [55] G. Bognár, A. Vencl, Experimental investigation of viscosity of glycerol based nanofluids containing carbon nanotubes, *Tribol. Ind.* 41 (2019) 267–273.
- [56] V. Tirtaatmadja, D.E. Dunstan, D.V. Boger, Rheology of dextran solutions, *J. Non-Newton. Fluid Mech.* 97 (2001) 295–301.