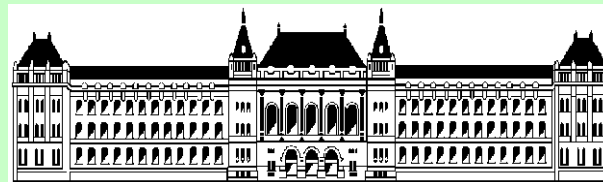


10. (IPARI) KROMATOGRÁFIA

Dr. Pécs Miklós
Dr. Fehér Csaba



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány
Tanszék



MŰVELETI SORREND

3. Tisztítás → a termék és a szennyező anyagok elválasztása.

Jellemző műveletek:

az összes eddigi
KROMATOGRÁFIA



(Ipari) kromatográfia

A kromatográfia elvét, kvantitatív leírását ld. az Analitika tárgyban. Ipari/preparatív léptékben csak a folyadékkromatográfia, ezen belül az oszlopkromatográfia használatos. Ezen belül bármilyen álló- és mozgófázison bármilyen szorpció(különbség) elválasztást eredményez.

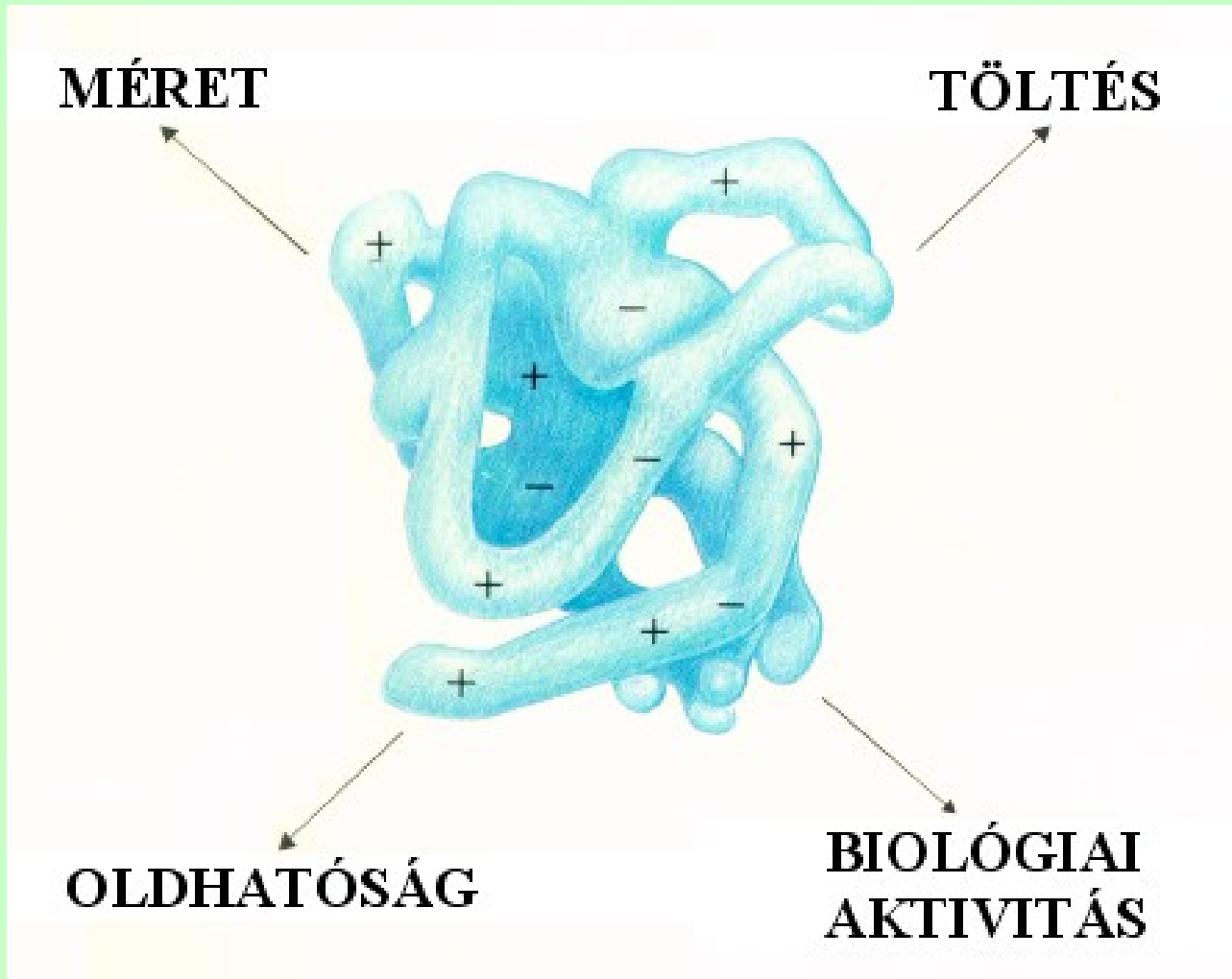


Mi a különbség az oszlopkromatográfia és az oszlopban végrehajtott adszorpció között?

| | Kromatográfia | Adszorpció |
|----------------------|---|---|
| Cél: | több hasonló komponens elválasztása | egy komponens elválasztása az oldószer-től (víztől) |
| Az oszlop terhelése: | kicsi, a kapacitás max. 1-2 %-a | nagy (→ 100%) |
| Deszorpció: | egyidejűleg megy végbe, a csúcs „hátsó” oldalán | a telítés befejezése után, eltérő összetételű eluenssel |



Kromatográfiák



MÉRET szerint:
gélpermeációs
kromatográfia

TÖLTÉS szerint:
ioncsere kromato-
gráfia

OLDHATÓSÁG
szerint: megoszlási,
adszorpciós, HIC

AKTIVITÁS szerint:
affinkromatográfia

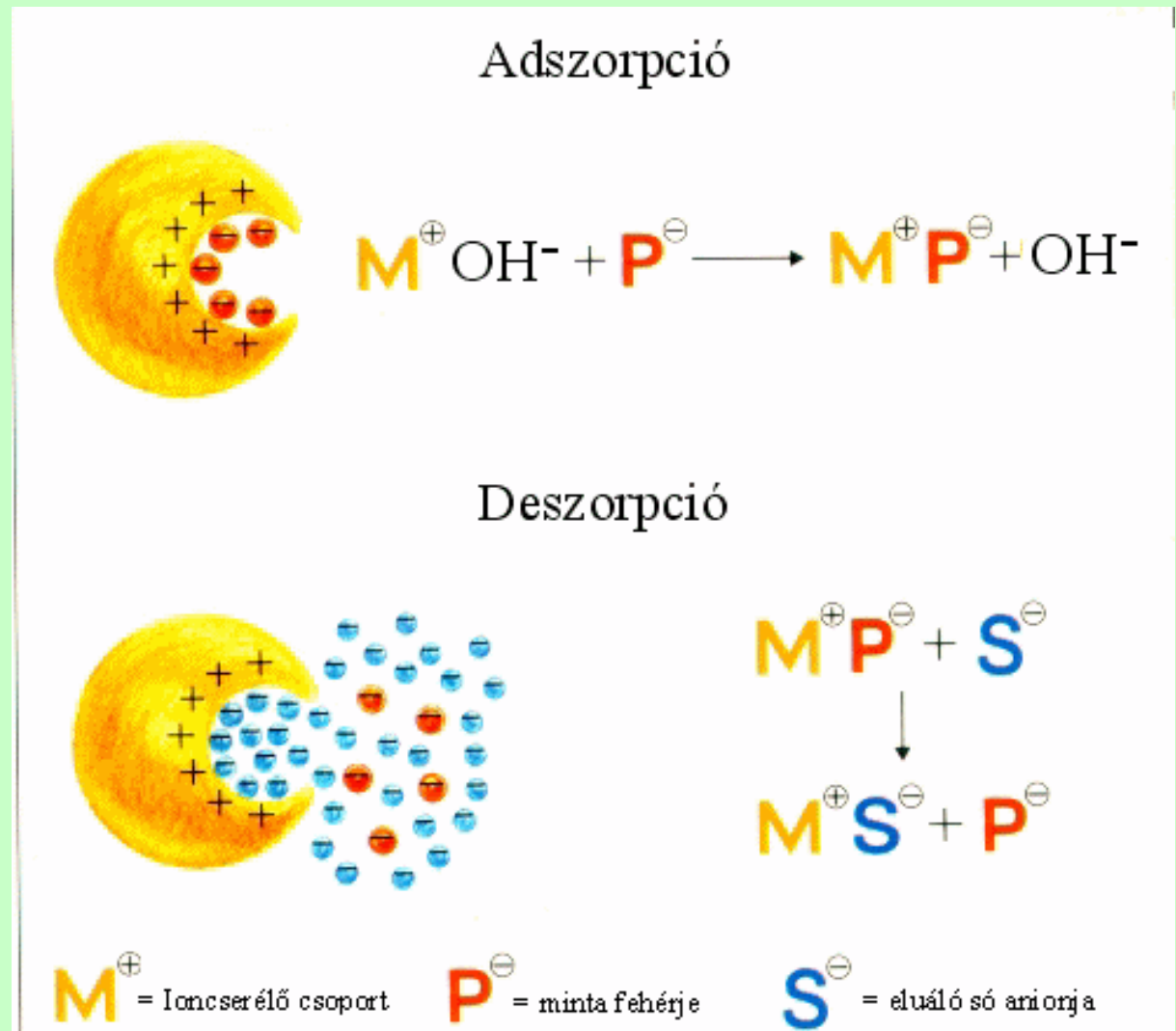


Ioncsere mechanizmusa

A leggyengébben kötődő ionok: H^+ , OH^- , ezeket minden mintai ion leszorítja.

Deszorpció: erősebben kötődő ionokkal (pl. kétértékű), vagy nagyobb koncentrációval

Regenerálás: savval vagy lúggal



Ioncsere kromatográfia

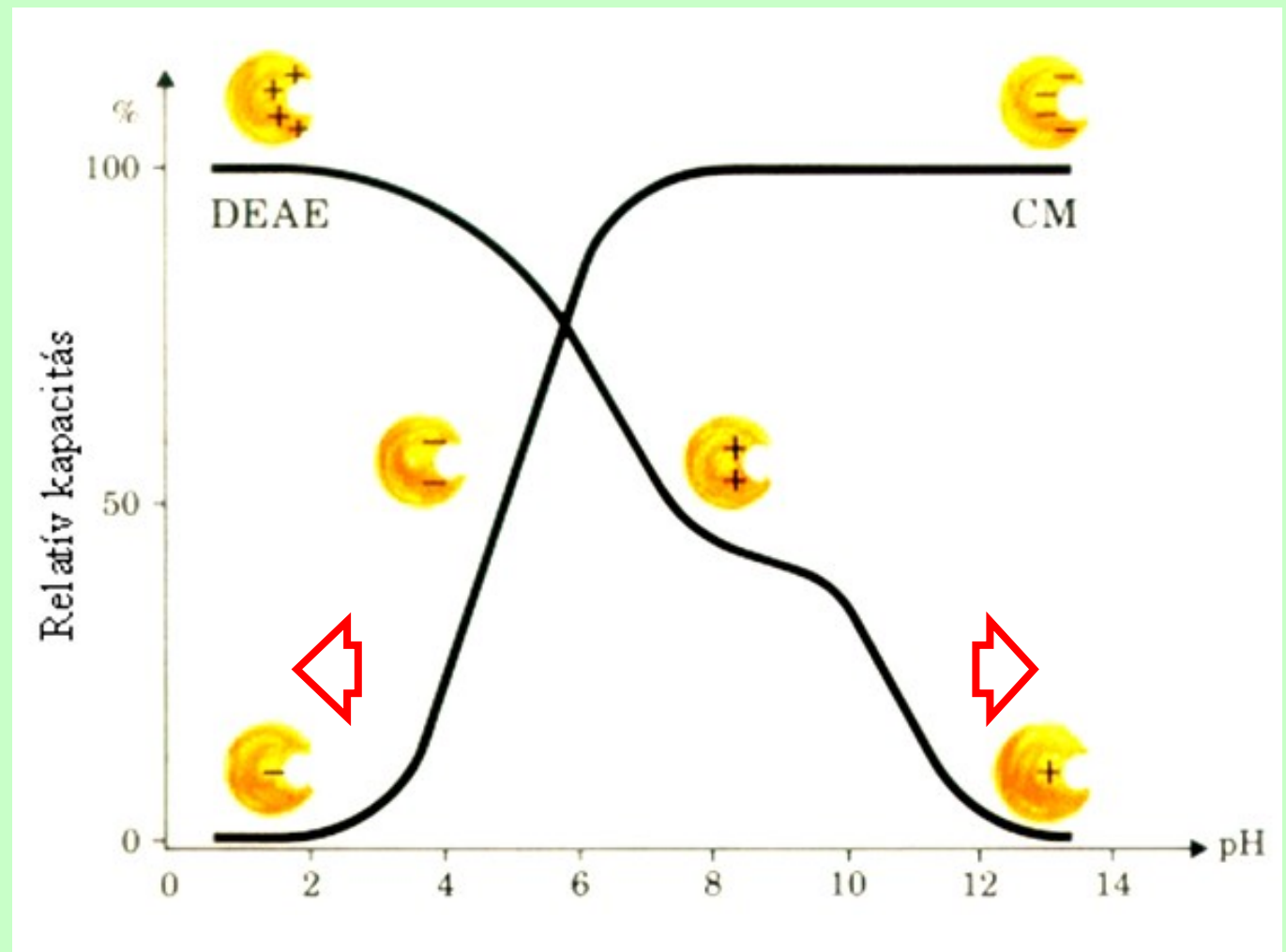
| <i>Formula</i> | <i>Name</i> | <i>Abbreviation</i> |
|---|-----------------------------------|---------------------|
| Strong anion | | |
| $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ | Triethylaminoethyl | TAM- |
| $-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ | Triethylaminoethyl | TEAE- |
| $-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ | Diethyl-2-hydroxypropylaminoethyl | QAE- |
| Weak anion | | |
| $-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_3$ | Aminoethyl | AE- |
| $-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ | Diethylaminoethyl | DEAE- |
| Strong cation | | |
| $-\text{SO}_3^-$ | Sulpho | S- |
| $-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ | Sulphomethyl | SM- |
| $-\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$ | Sulphopropyl | SP- |
| Weak cation | | |
| $-\text{COO}^-$ | Carboxy | C- |
| $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ | Carboxymethyl | CM- |



Ioncserélő gyanták kapacitása

A kapacitás függ a pH-tól, erős savak és bázisok visszahúzzák a disszociációt

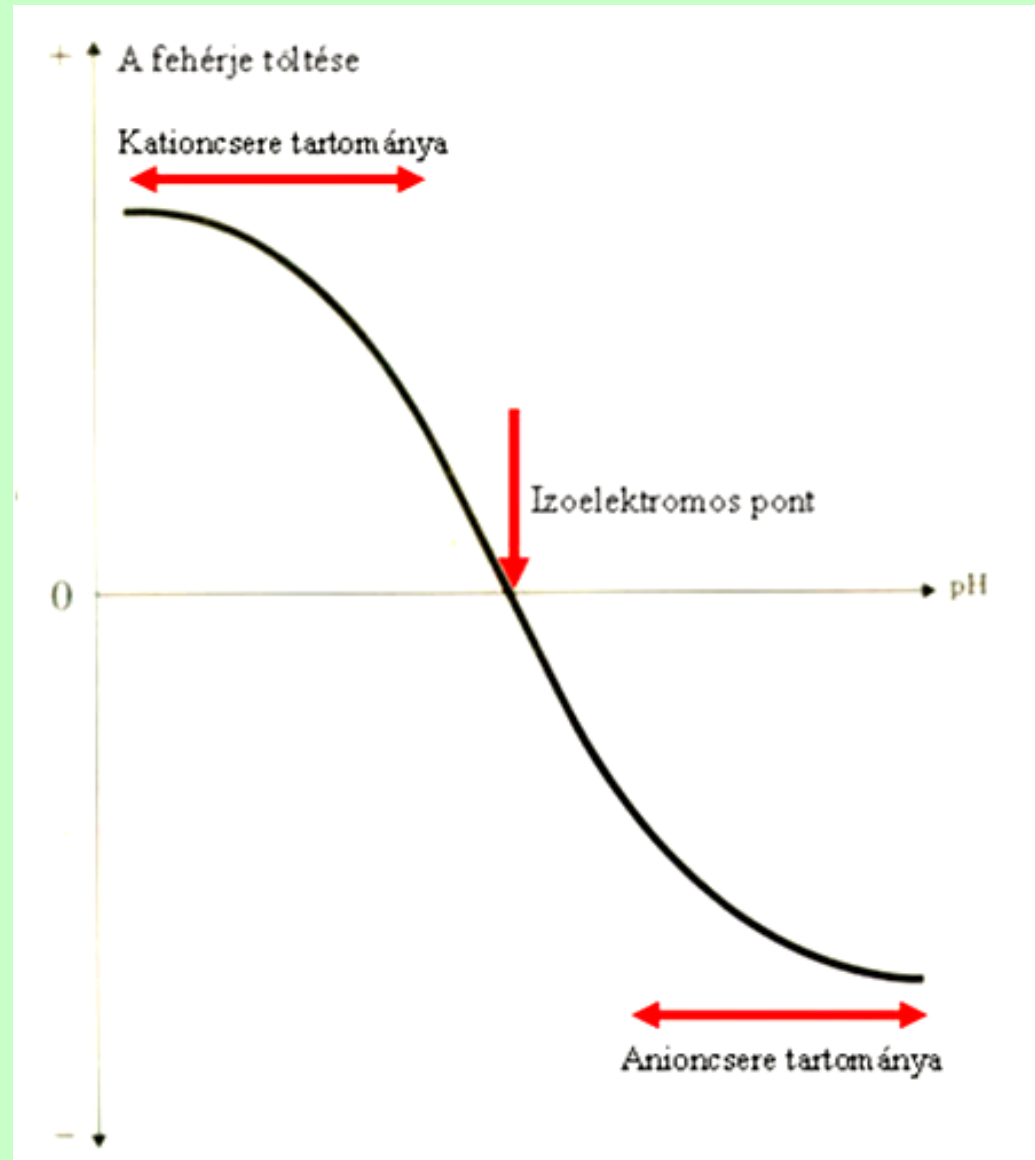
Regenerálás: savval vagy lúggal



A fehérje töltése

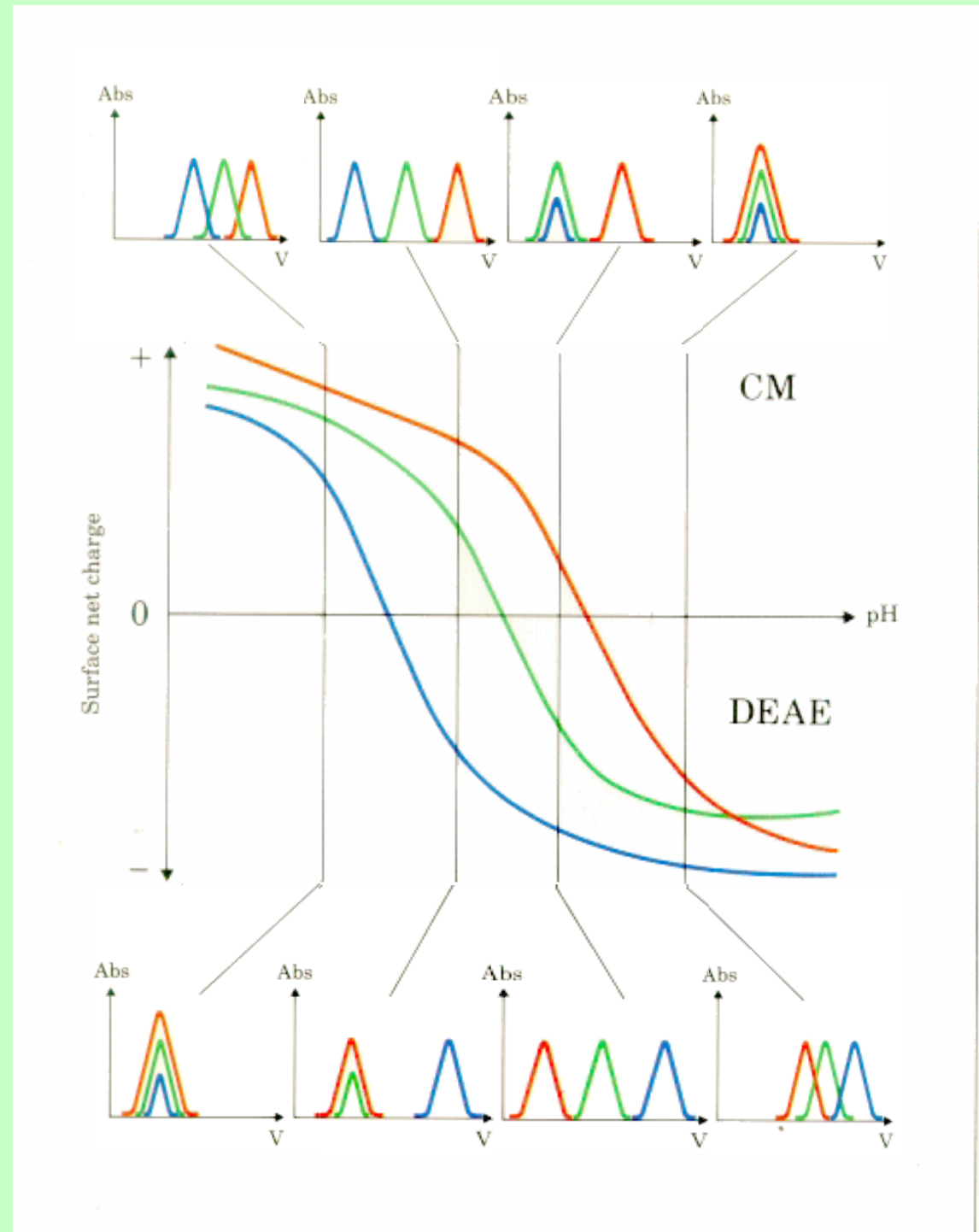
A fehérjék töltése függ a pH-tól:

Bármelyik fehérje megköthető kation- és anioncserélőn is, ha a pH megfelelő. Az izoelektromos pont közelében nincs kötődés → ha a pH-t az izoelektromos pont felé mozdítom el, a fehérje leválik az oszlopról.



Elválasztás tervezése

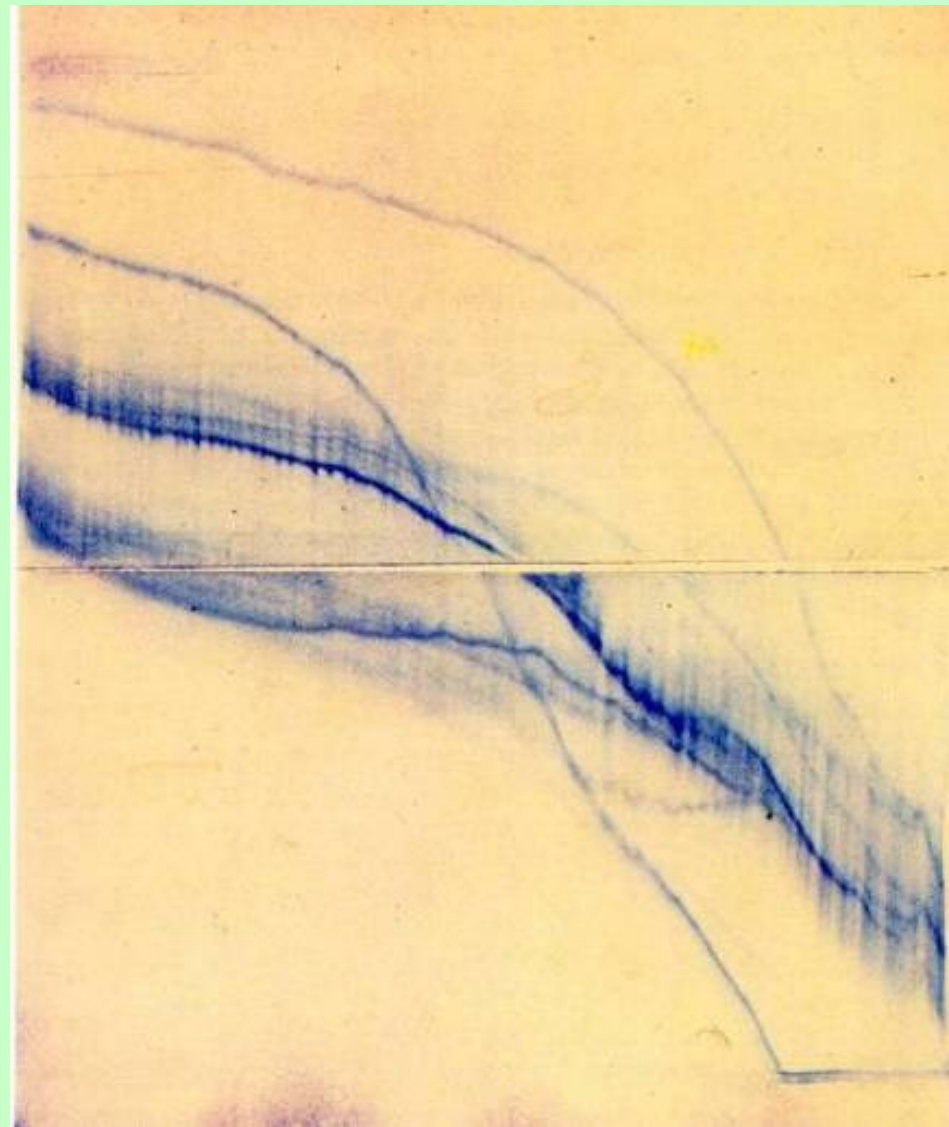
A titrálási görbék ismeretében a kromatográfiás elválasztások előre tervezhetőek.



Titrálási görbék felvétele

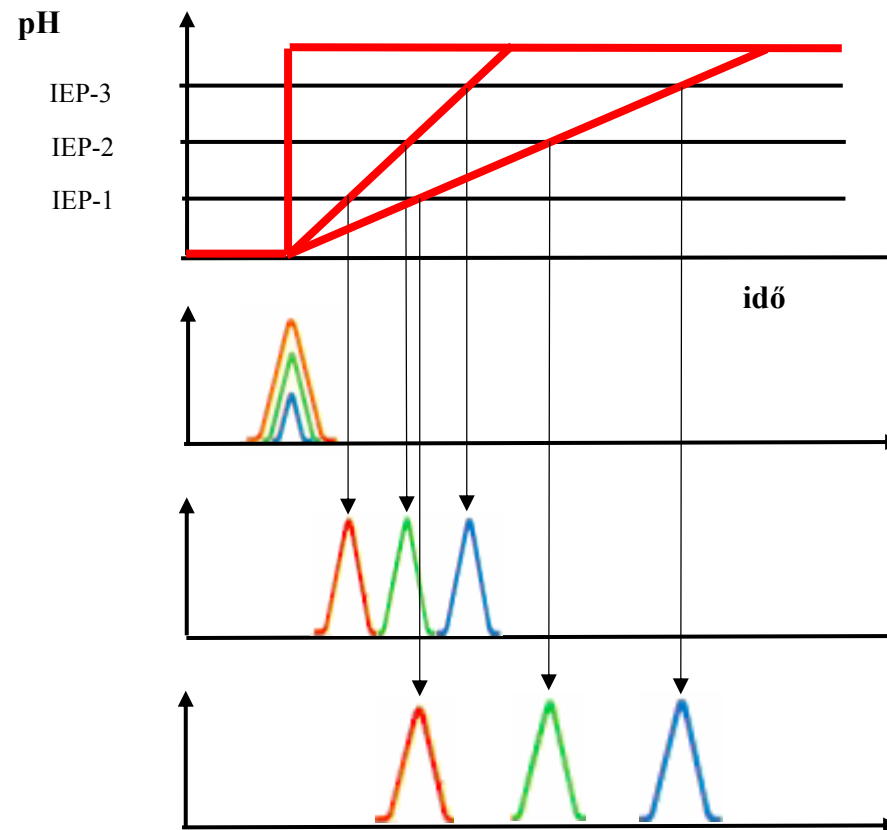
A titrálási görbét elektrofókuszázó elektroforézissel lehet felvenni.

Marha izomfehérjék titrálási görbéi.



A pH gradiens hatása

Minél laposabb a
gradiens, annál
jobb a szétválás
→ akkor minek a
gradiens?

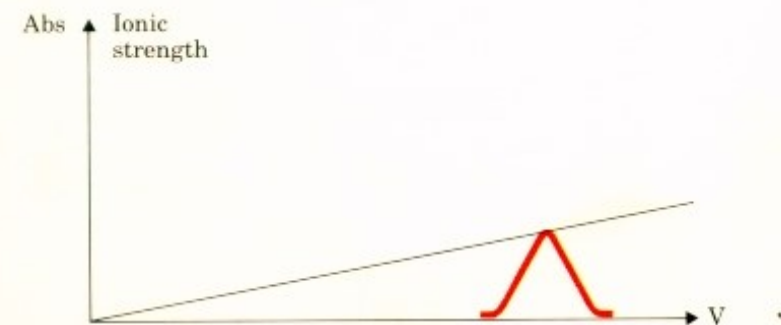
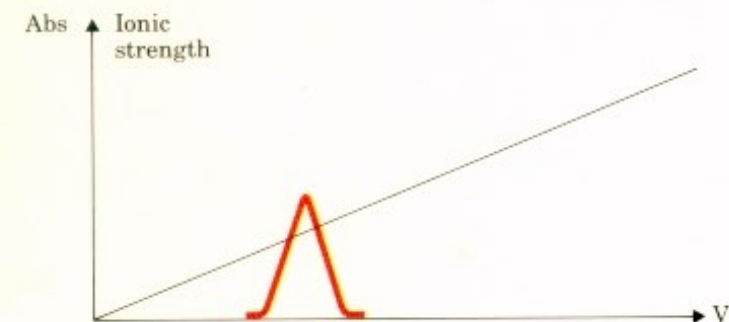
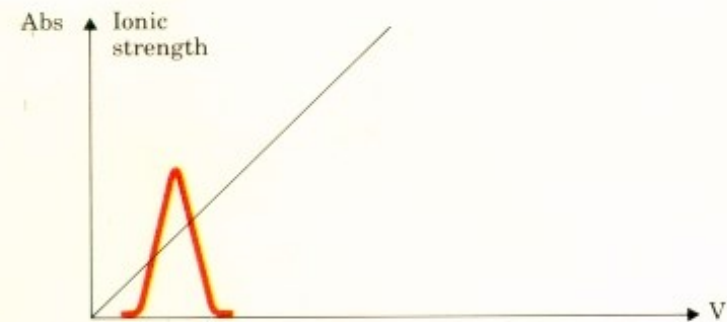


A gradiens hatása

Minél laposabb a gradiens, annál több időt tölt az oszlopban a komponens → annál inkább kiszélesedik a csúcs.

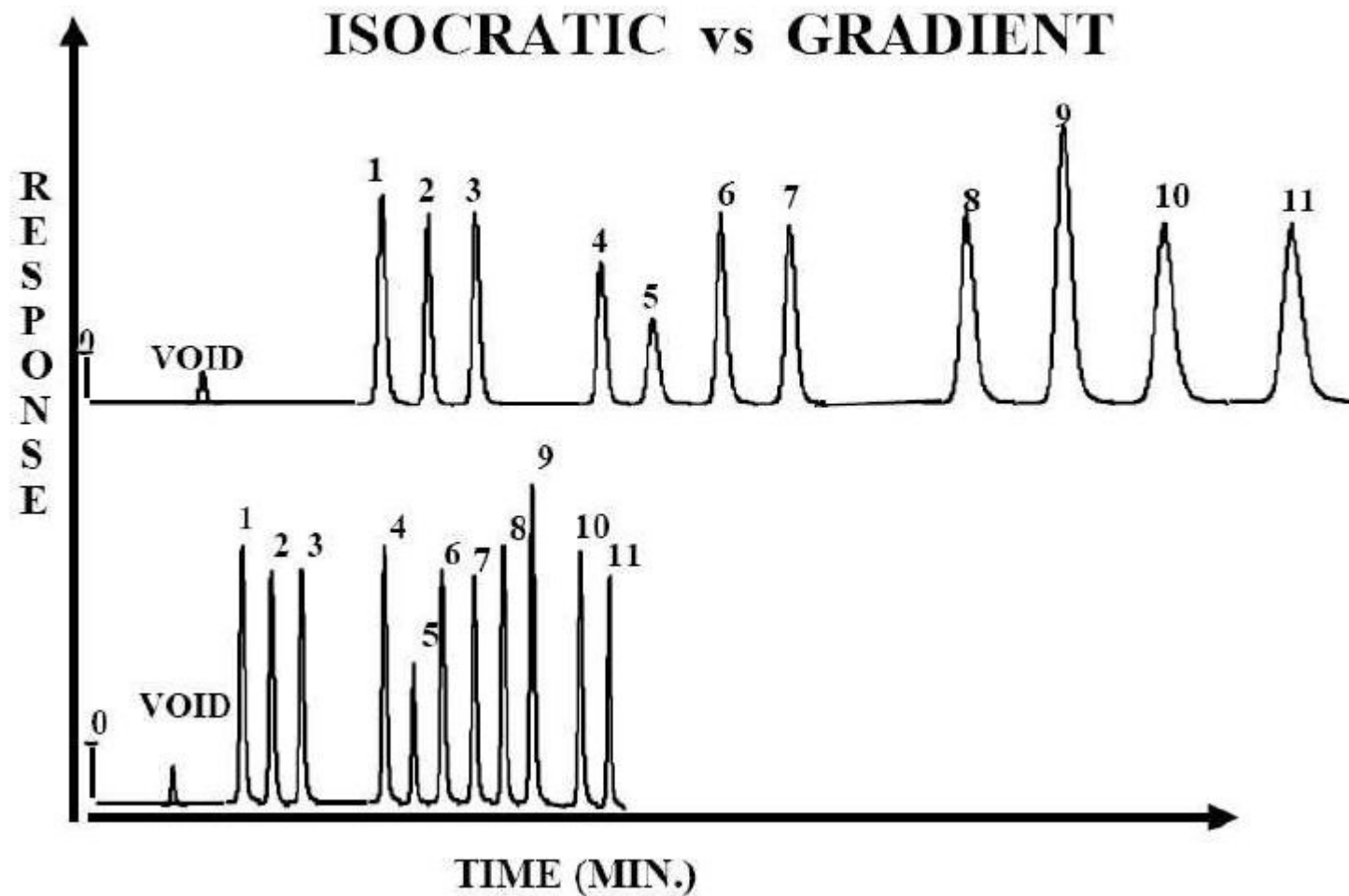
(Van Deemter egyenlet)

BAND BROADENING EFFECTS Influence of gradient slope



A gradiens hatása

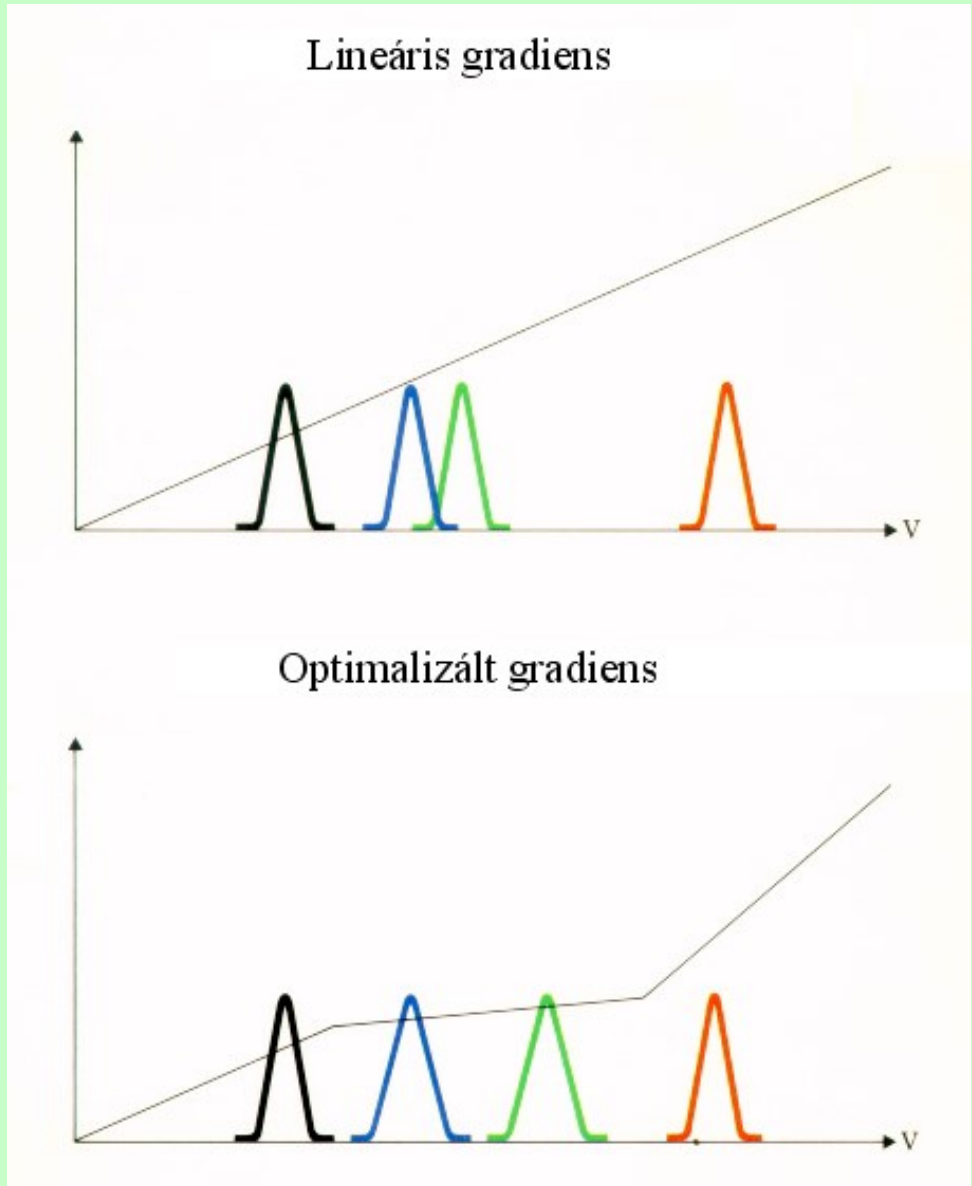
Izokratikus és gradiens elúció



A gradiens hatása

A gradiens meredekségét optimálni kell a szétválasztás és a csúcsok kiszélesedése között.

Az optimális gradiens profil állhat több, eltérő meredekségű szakaszból is.



Fordított fázisú (RP) kromatográfia

RP – a töltet apoláris, a mozgó fázis poláris.

A töltet felületét alkil láncokkal borítják, ennek szénatom-száma szerint jelölik:



Az ilyen hidrofób töltet alkalmas:

- Megoszlásos
- Adszorpciós
- Hidrofób kölcsönhatás (HIC) kromatográfiára

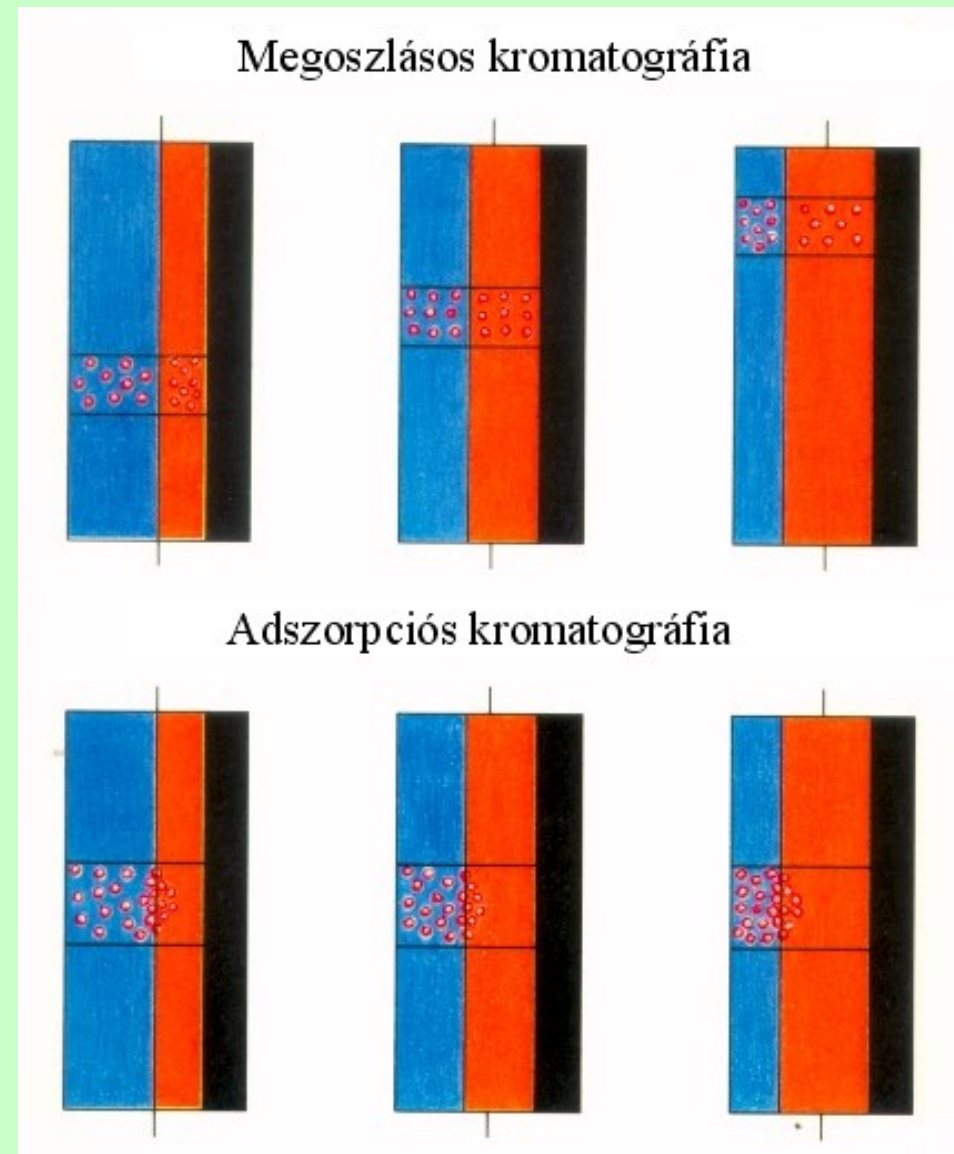


Fordított fázisú (RP) kromatográfia

A megoszlásos és az adszorpciós kromatográfia közti elvi különbség:

Megoszlásos: a hidrofil fázis teljes térfogatában kötődik az anyag.

Adszorpciós: csak a felületen → nem számít az alkilánc hossza



Hidrofób kölcsönhatás (HIC)

Az adszorpciós kromatográfia egy speciális esete.

Tömény sóoldatokban az apolárisabb fehérjék oldhatósága romlik (ld. kisózás), ezért hajlamosak megkötődni az apoláris töltet felületén.

A polaritás csökkenésével (csökkenő sógradiens) hidrofóbításuknak megfelelő sorrendben deszorbeálódnak.

Az RP technikák elsősorban analitikai léptékűek, nem ipariak, ezért nem tárgyaljuk ennél részletesebben.



Gélpermeációs kromatográfia

A töltet inert, nincs anyagi kölcsönhatás a felület és az elválasztandó anyagok között.

A retenció az eltérő méretű molekulák eltérő úthosszából adódik.

Lassú, akár 10-20 óra.
Mindig hígít!

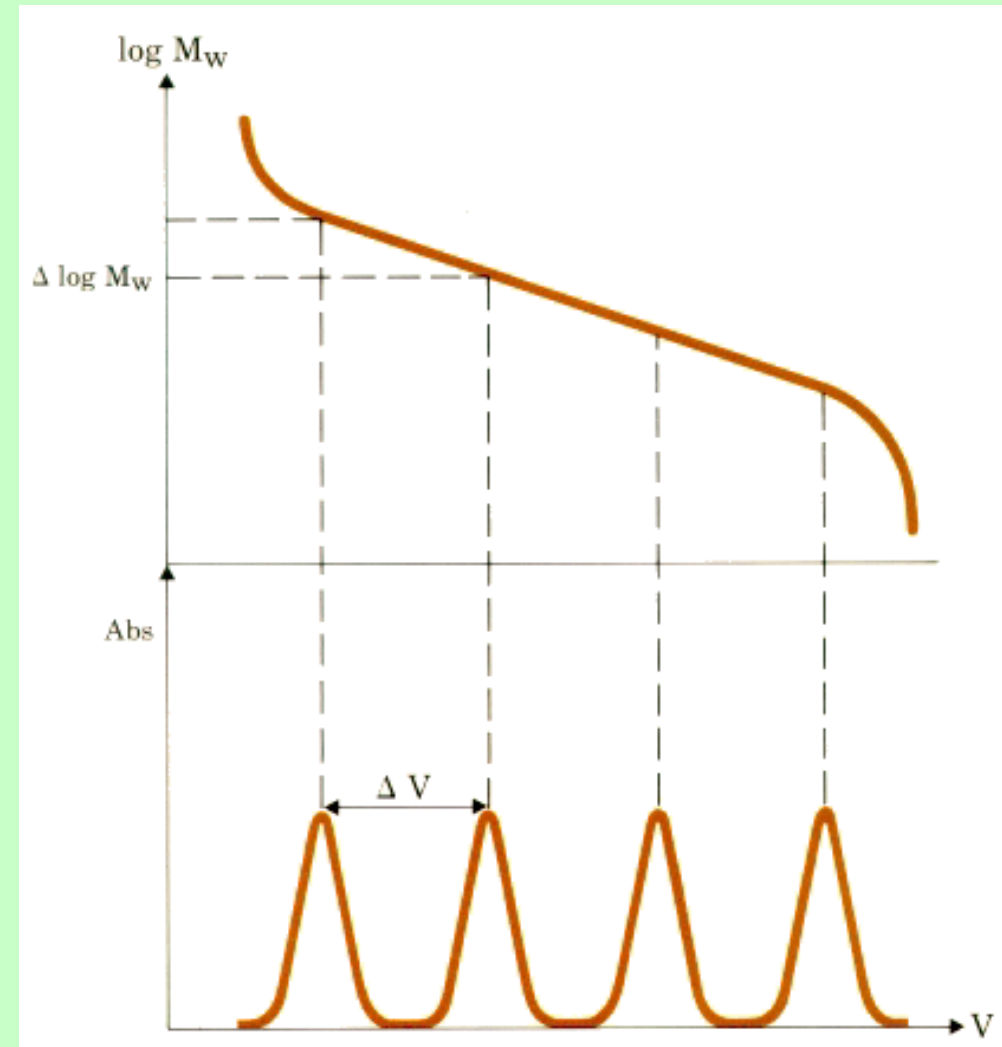


Gélpermeációs kromatográfia

A retenció nem lineáris, de egy tartományban a $\log(\text{móltömeg})$ -gel arányos.

Ez sem ipari léptékű elválasztás, nem foglalkozunk vele.

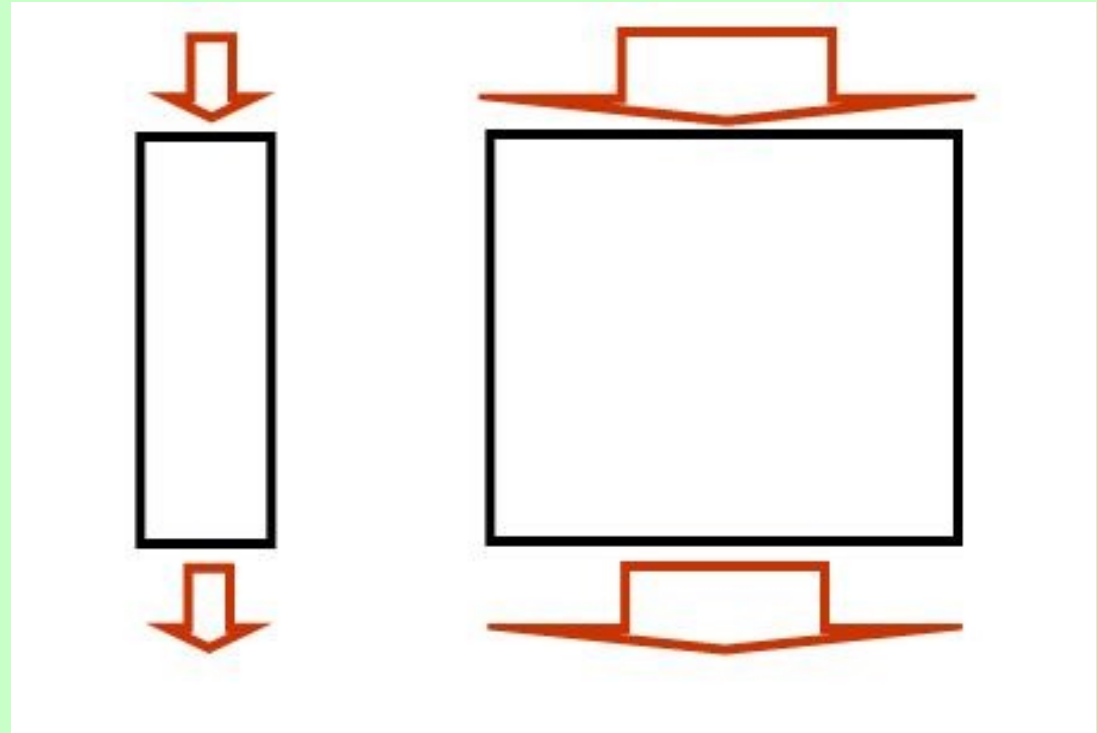
Ld. BIM gyakorlat.



Oszlopok léptéknövelése

Léptéknövelésnél azonos anyagú és szemcseméretű töltetek esetén hogyan növeljük az oszlop méretét?

Azonos hatékonyságú elválasztáshoz azonos lineáris sebesség kell:



$v = \text{térfogatáram} / \text{keresztmetszet}$

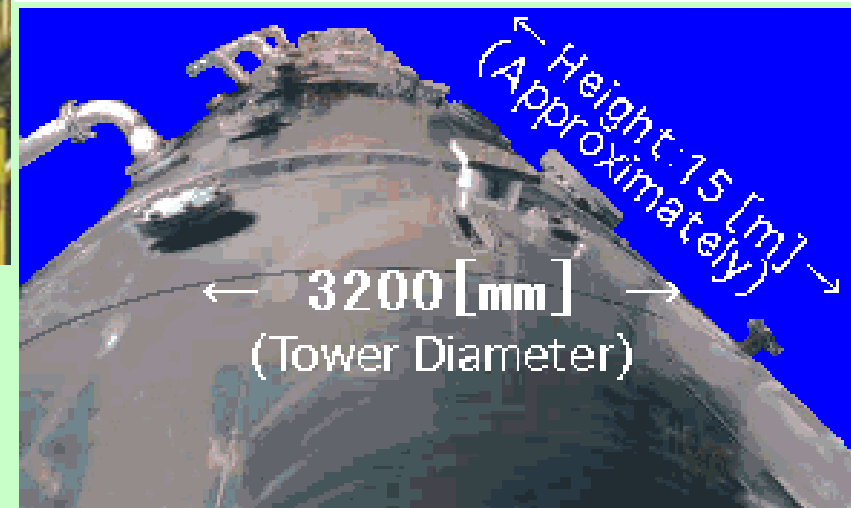
→ a keresztmetszetet kell arányosan növelni, a hossz változatlan.



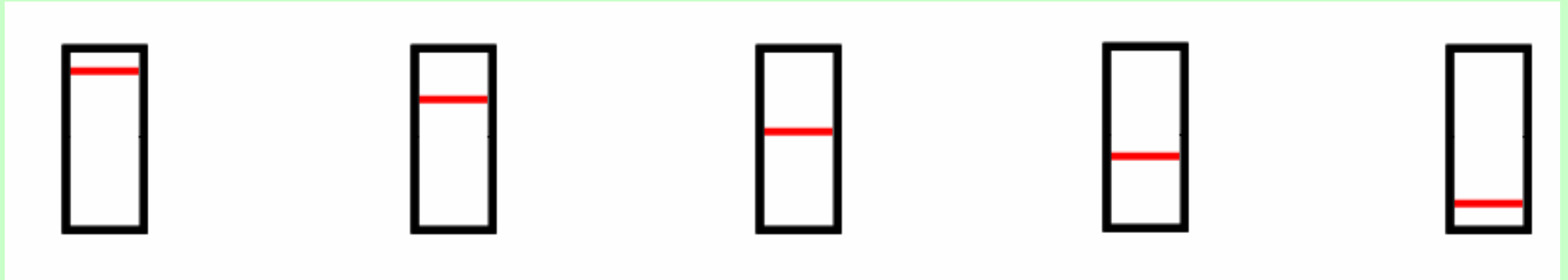
Oszlopok léptéknövelése



Ipari méretű ioncserélő oszlopok



Folytonos kromatográfia



A kromatográfia szakaszos (ciklikus) működésű. De ha több oszlopot fáziseltolással állítunk egymás mellé, akkor kvázifolytonossá tehető (mint a vákuum dobszűrő).

Abban is hasonlít, hogy az elemeket körben helyezik el.



Folytonos kromatográfia

A körberakott oszlopokat helyettesíthetjük egy hengerpalást alakú töltetággal, ami lassan forog. Felül egy ponton, folyamatosan történik az anyag felvitele, a töltet további felületére az eluens folyik. Alul az elfolyó pontoknál fix helyeken lehet elvenni az egyes komponenseket.

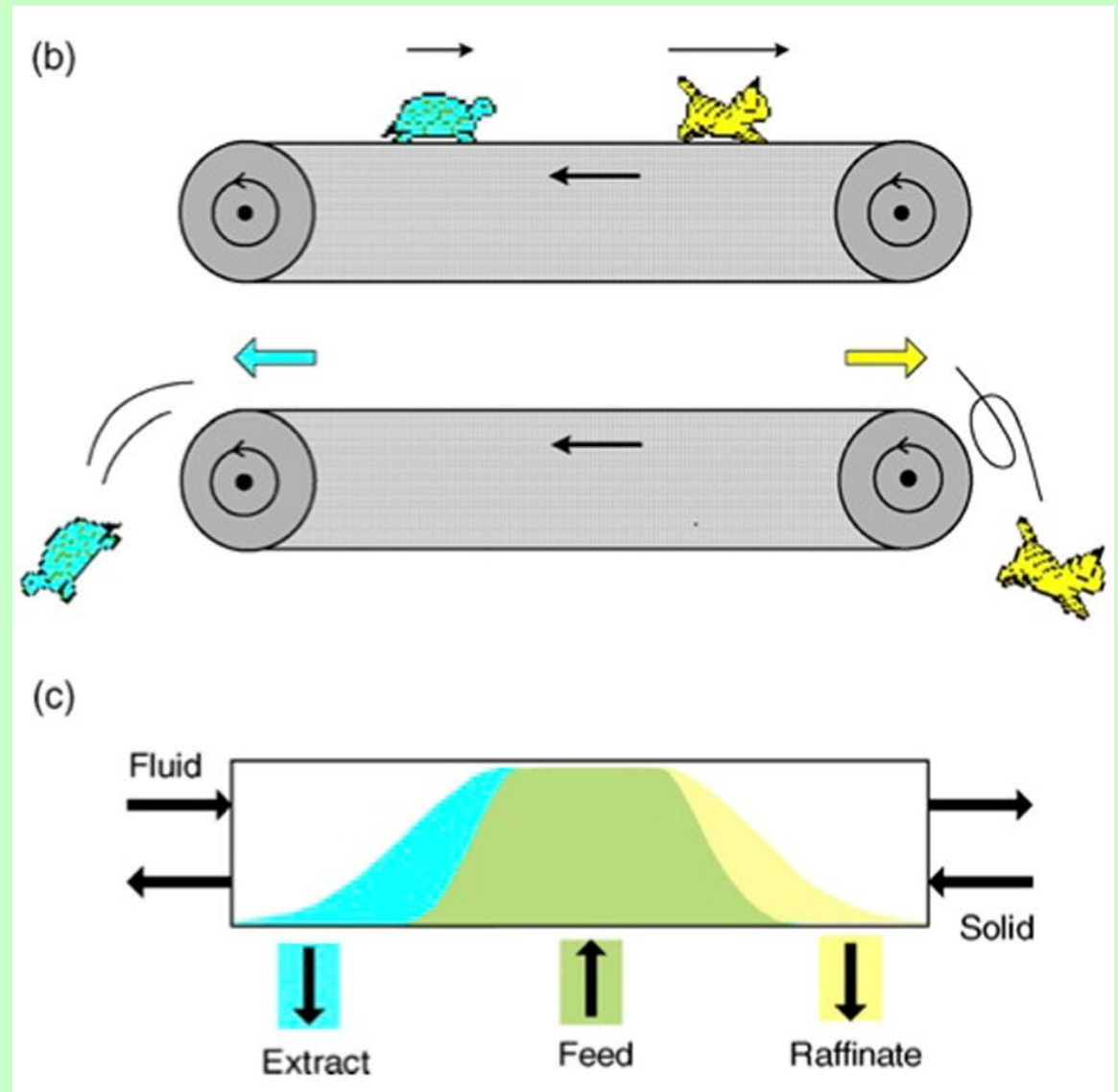
Egy körülfordulás alatt a henger minden alkotója végigmegy a kromatográfia teljes ciklusán.



Mozgó töltet és szimulált mozgó töltet

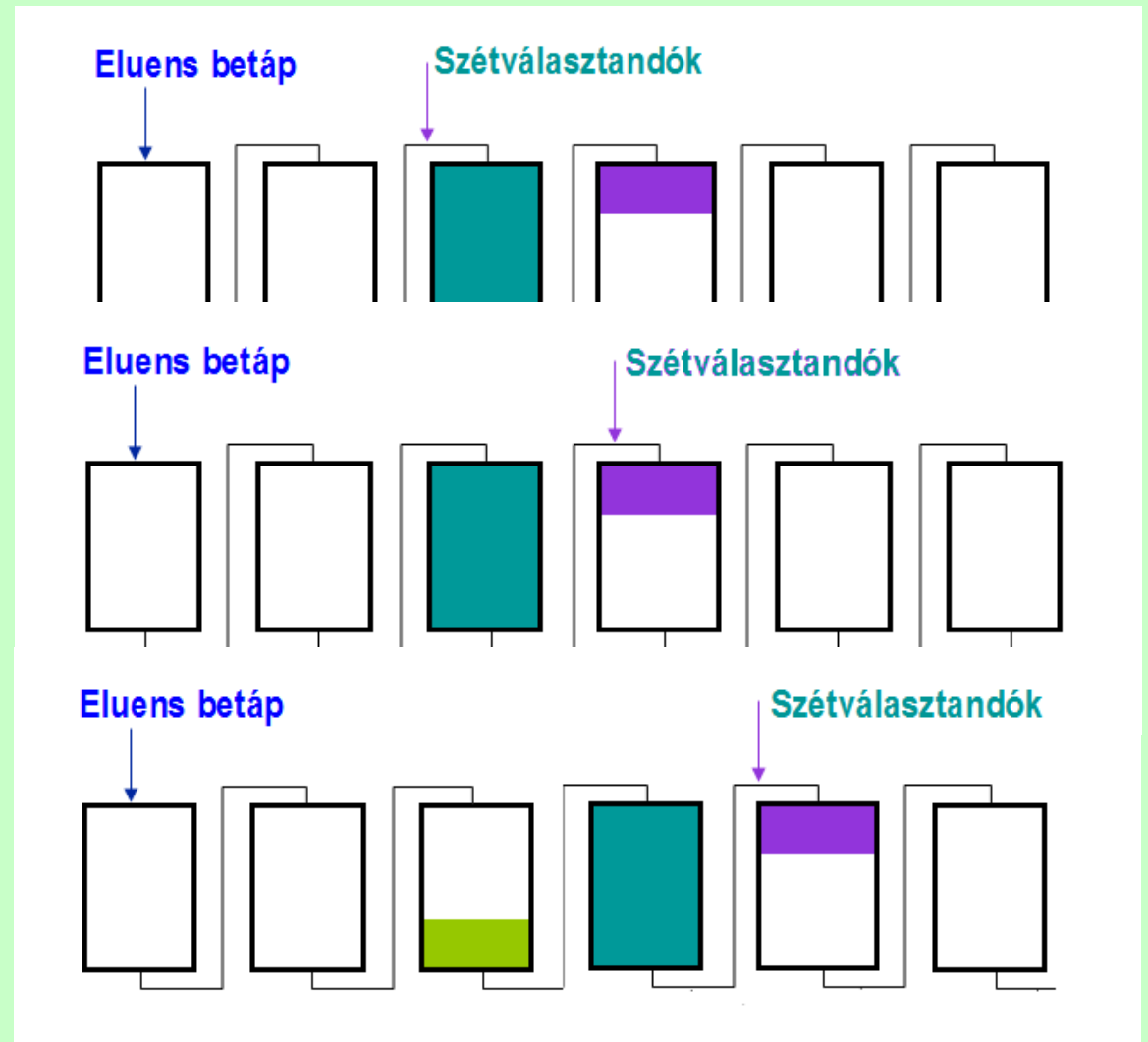
(moving bed és simulated moving bed = SMB)
Nemcsak a mozgó fázis mozog, hanem a töltet is – ellenkező irányban. A nagy retenciójú komponensek ettől visszafelé mozdulnak el.

A kialakuló koncentrációsprofilok:



Szimulált mozgó töltet

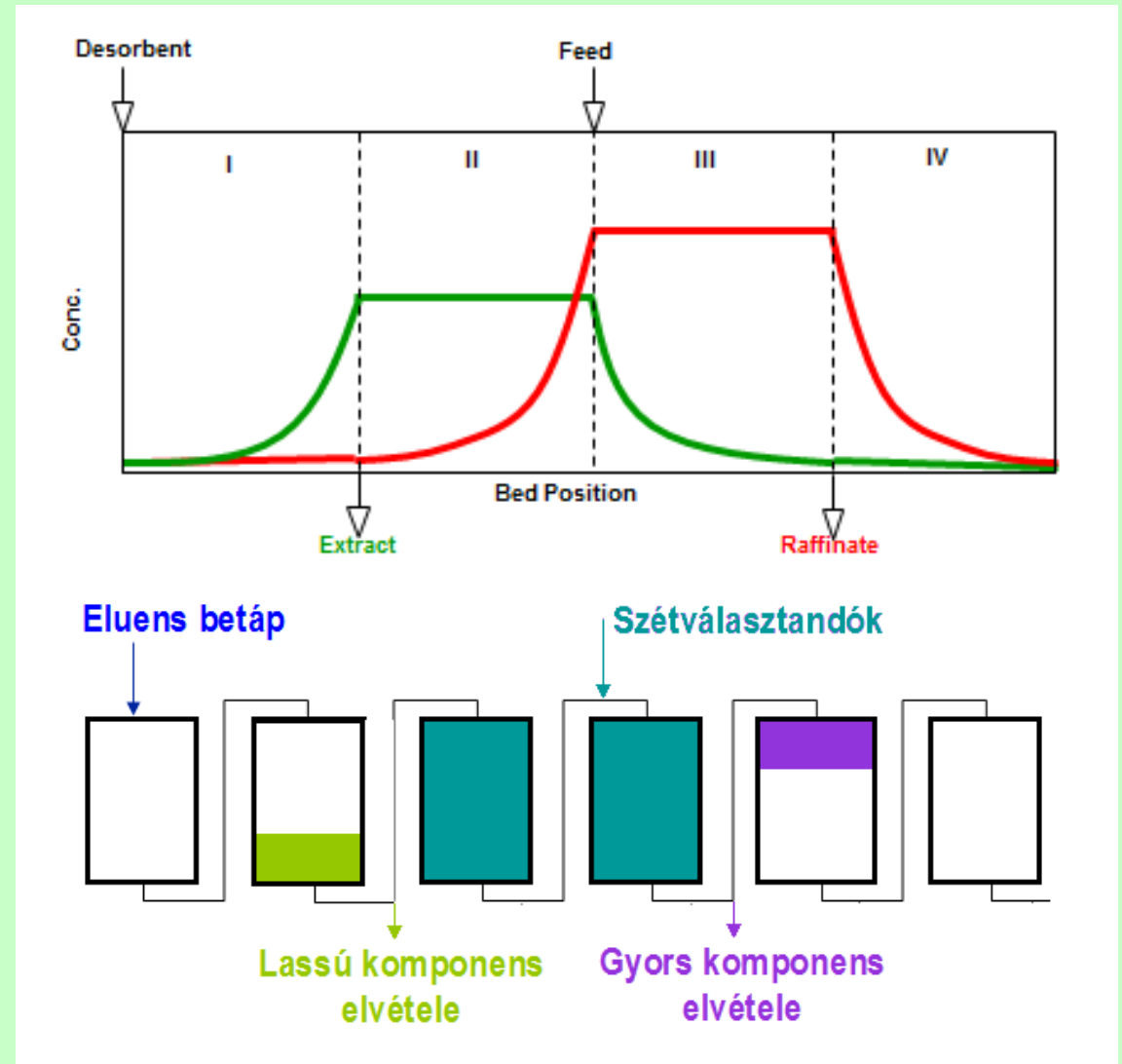
Valójában nem a töltet mozog, hanem a betáplálási és elvételi pontokat léptetik a töltet (= sorba kötött oszlopok) mentén.



Szimulált mozgó töltet

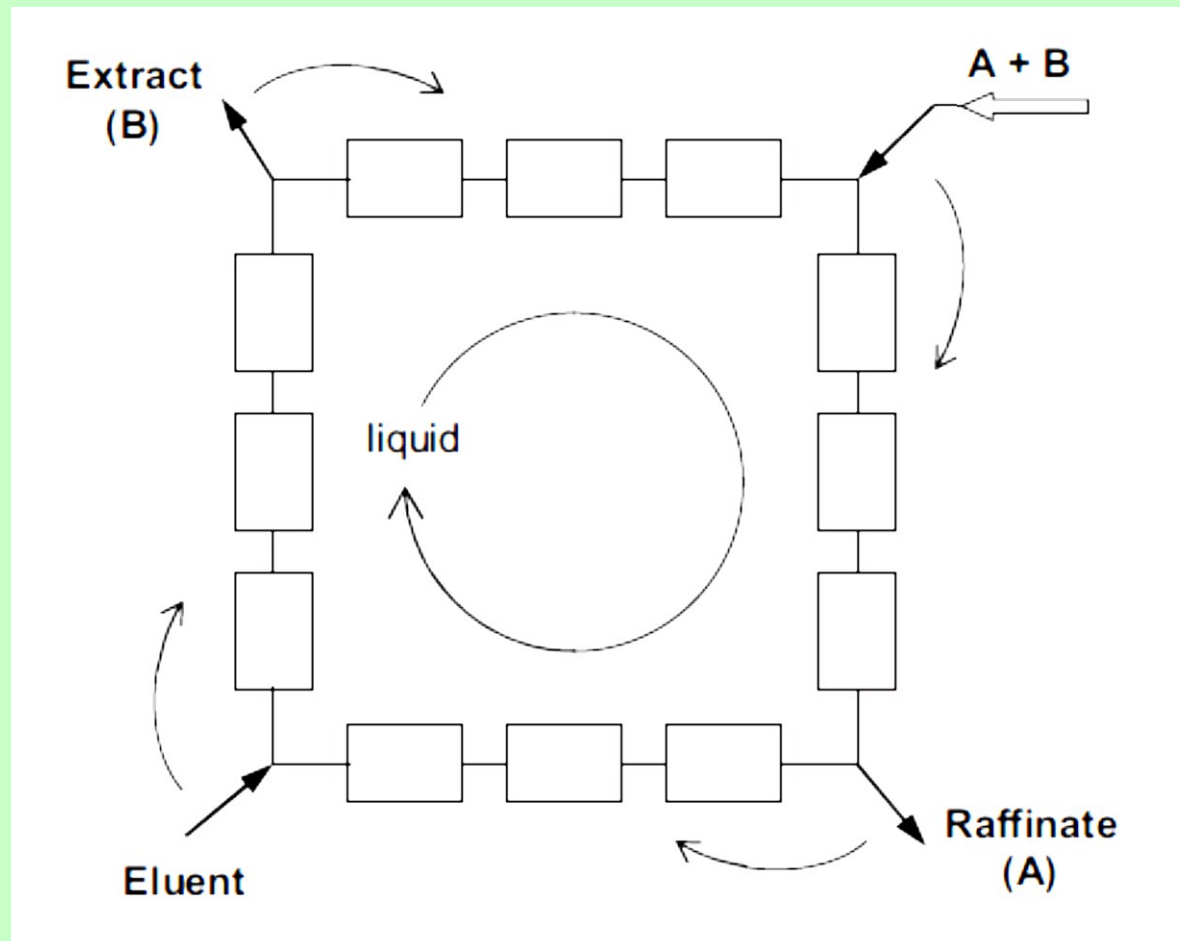
A kialakuló koncentráció profil alakja:

Ennek megfelelően a két komponens tiszta formában elvezethető:



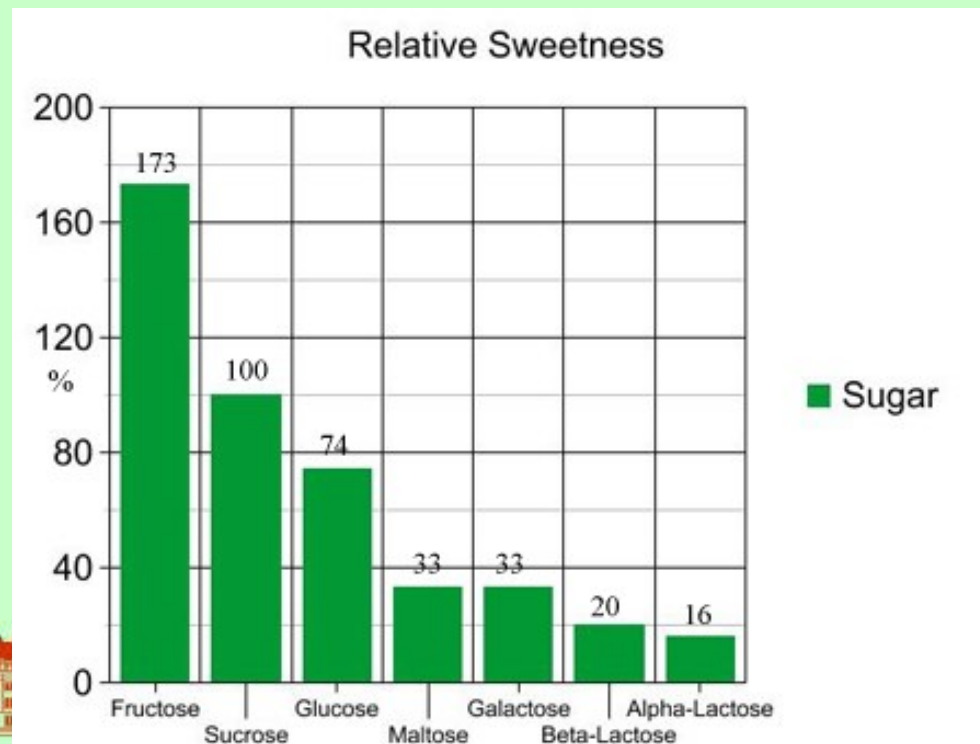
Szimulált mozgó töltet

Az oszlopokat célszerű zárt ciklusban üzemeltetni, mindkét fázist folyamatosan körben járatni.



Ipari példa: glükóz-fruktóz elválasztás

A glükóz enzimes izomerizálása során glükóz:fruktóz = 52:43 arányú keverék keletkezik. A cukrokat tonnás tételben Ca fázisban lévő erős kationcserélő gyantán SMB kromatográfiával választják el, a fruktóz aránya 90%-ig növelhető (HFCS = high fructose corn syrup, sokkal édesebb).



Glükóz-fruktóz elválasztás SMB-vel

Az iparban sok 1-2 m³-
es kolonnát alkalmaz-
nak, a kimenetekenél
optikai szenzorokkal
mérik az összetételt,
és a léptetésekét pro-
cesszorral irányítják.



Centrifugálásos megoszlásos kromatográfia (CPC)

Helye a kromatográfián belül:

Folyadék-folyadék kromatográfia

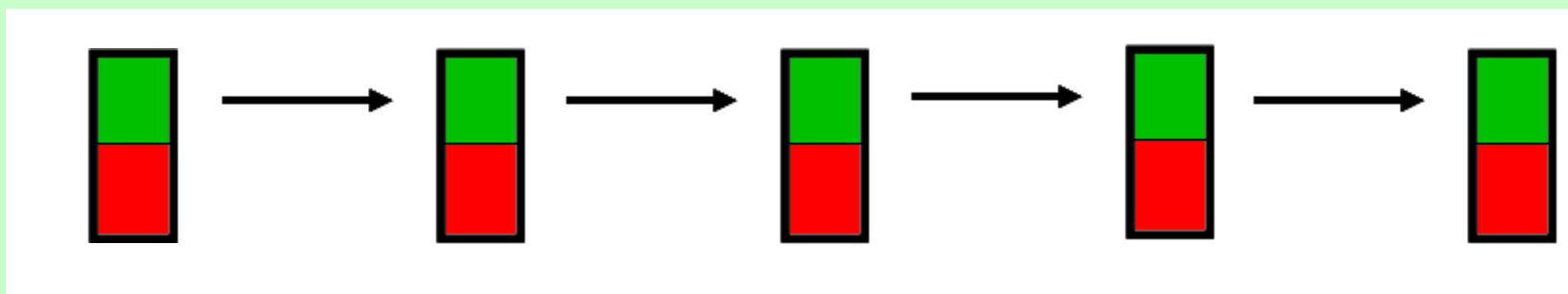
Mind az állófázis, mind a mozgófázis folyadék halmazállapotú

Elválasztás alapja a különböző komponensek eltérő megoszlási hányadosa a két folyadék fázis között

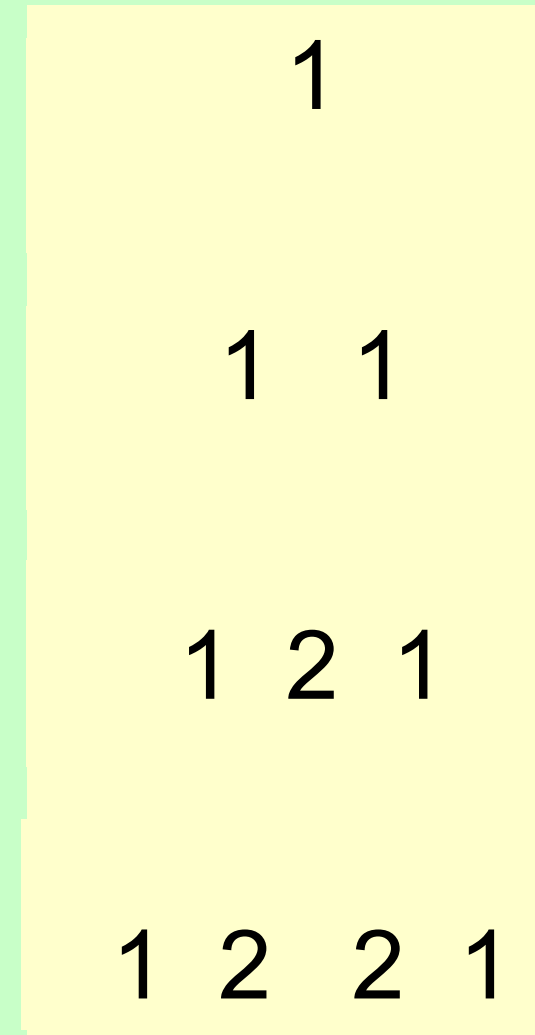
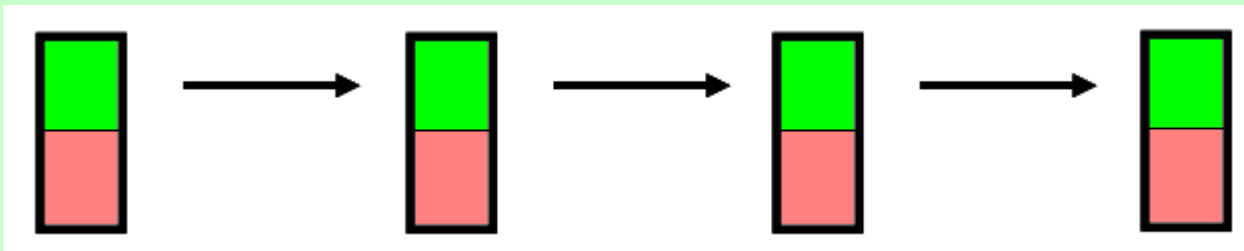
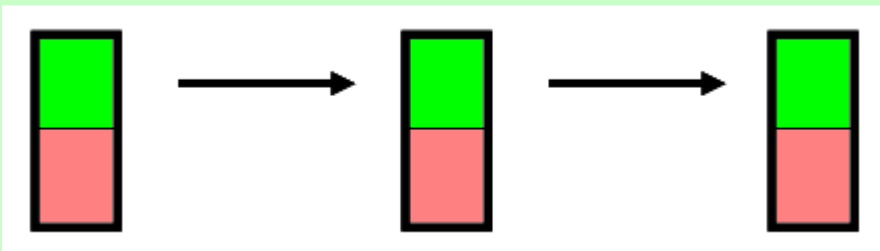
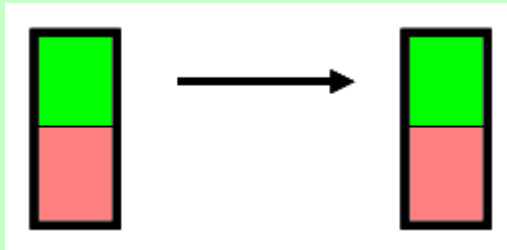
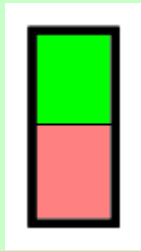


A megoszlásos kromatográfia elve

Vezessük ezt le a megoszlás jelenségére (gondolatkísérlet)
Kémcsövekben „könnyű” és „nehéz” oldószer → az egyensúly beállása után a felső fázist tovább visszük.

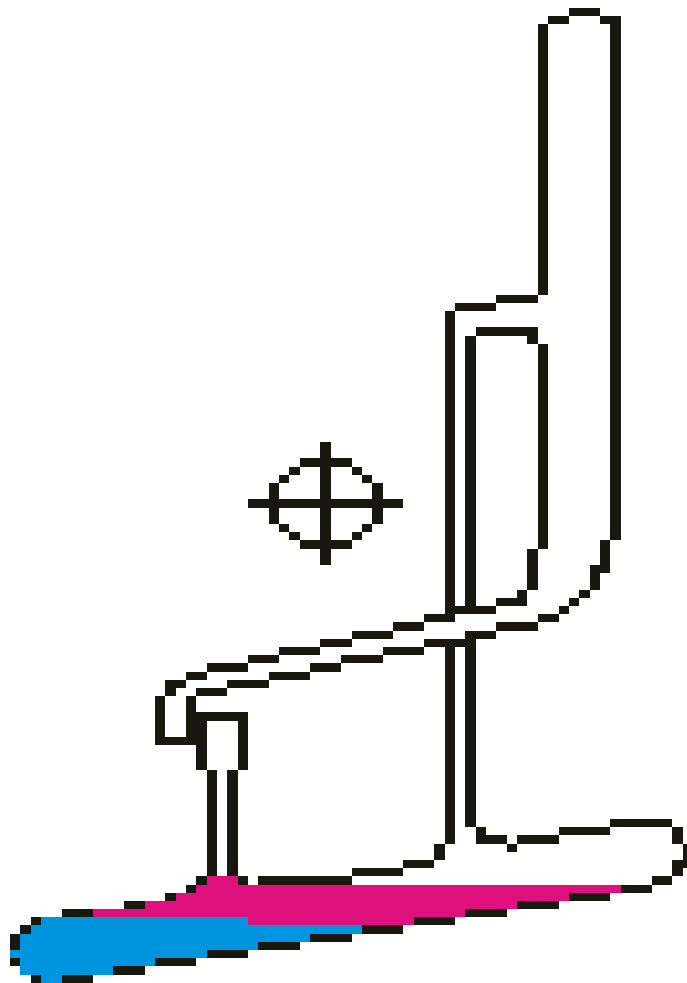


A térfogatok aránya 1:1,
a bevitt anyag
mennyisége 1, a
megoszlási hányados = 1



A technika őse: Craig-extraktor

START OF CYCLE



ismételt lépé-

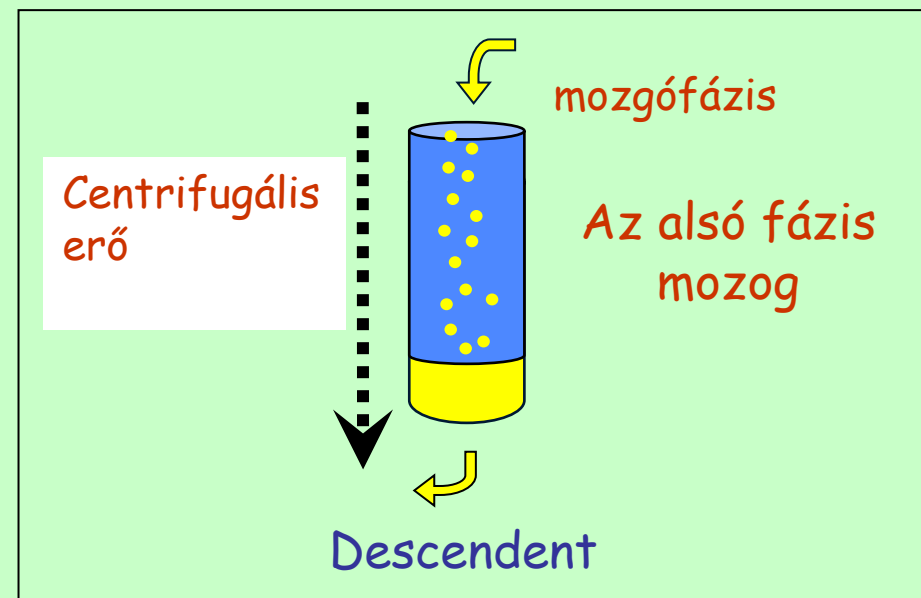
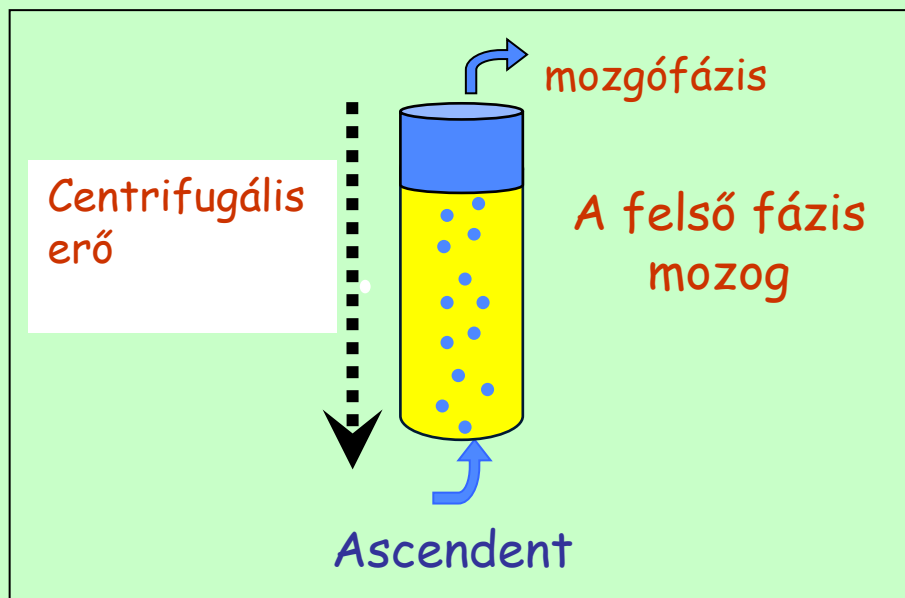


Centrifugában:

Mindkét fázis lehet álló és mozgó:

Ascendens mód: felső fázis a mozgó fázis (normál fázis)

Descendens mód: alsó fázis a mozgó fázis (reverz fázis)



Mi történik rotorban?



- Mozgó fázis sugara belép az állófázisba
- ott apró cseppekre bomlik (nagy határfelület) – Stokes-tv
- A cella végén a cseppek egyesülnek (a csatornáknál csak mozgófázis halad)



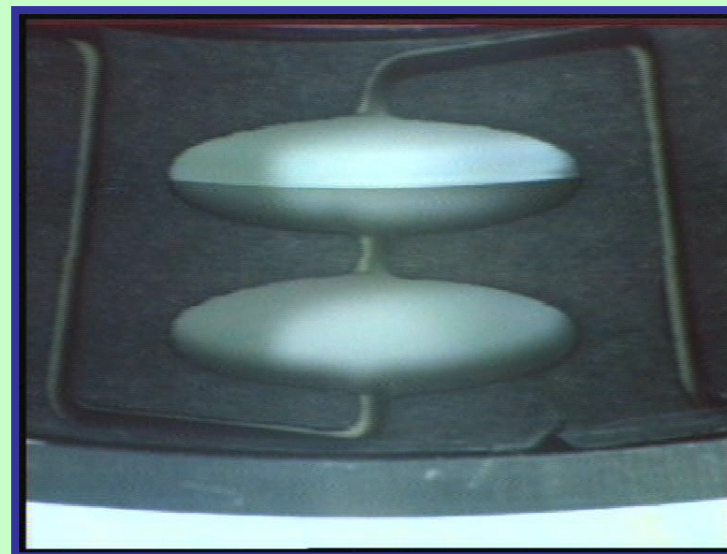
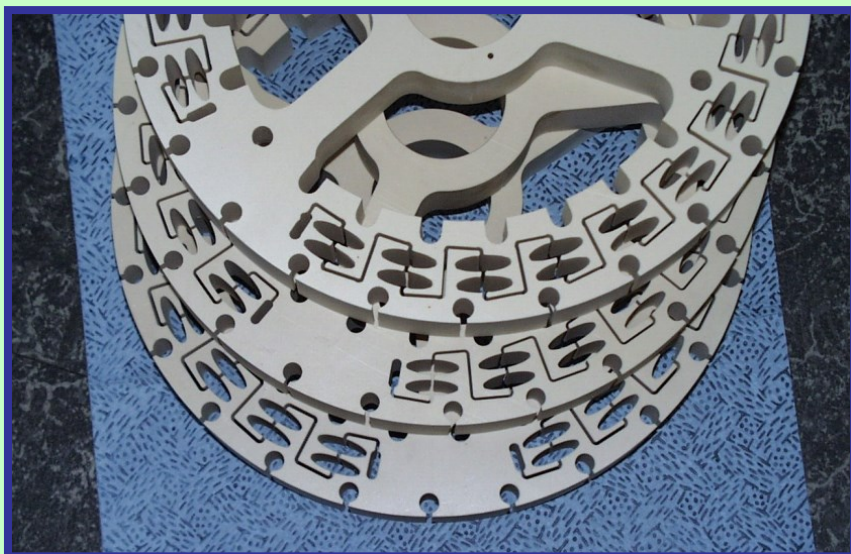
Modern CPC készülék



Nagy forgási sebesség
(max. 3000 rpm)

Gyors elválasztás (<1 óra)

Nagy tányérszám (1-2 ezer)



A rotor feltöltése

- A rotor lassú forгатása (500 rpm) mellett, a kiválasztott állófázis gyors pumpálásával (50 ml/perc) felöltjük a rendszert.
- A rotort felpörgetve (pl 2000 rpm) a mozgófázist a célzott áramlási sebességgel pumpáljuk (pl. 10 ml/perc)
- Figyeljünk a maximális nyomásra (kb. 80 bar)
- Mérjük meg a kiszorított állófázist (holttérfogat)



Minta injektálása

- Kezdetben mindig injektáljunk keveset.
- Injektálhatunk a mintahurokból (10 ml), de pumpával is (max 50 ml ajánlott).
- Inkább töményebb (akár telített) mintát kis térfogattal, mint sok hígat (csúcs kiszélesedése), de ne legyen túl tömény se.



A kilépésnél

- Detektálás: beépített két csatornás UV detektor, de lehet külső detektort is csatlakoztatni.
- Frakciók szedése (időprogram vagy a detektor jele alapján)
- Frakciók vizsgálata megfelelő analitikai technikákkal (TLC, HPLC-UV)
- pH-monitorozás (ionos jellegű molekulák elválasztásánál).

