



10. (IPARI) KROMATOGRÁFIA

Dr. Pécs Miklós



Budapesti M szaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány
Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

M VELETI SORREND

3. Tisztítás a termék és a szennyező anyagok elválasztása.

Jellemző m veletek:
az összes eddigi
KROMATOGRÁFIA

2




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

(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.

3



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

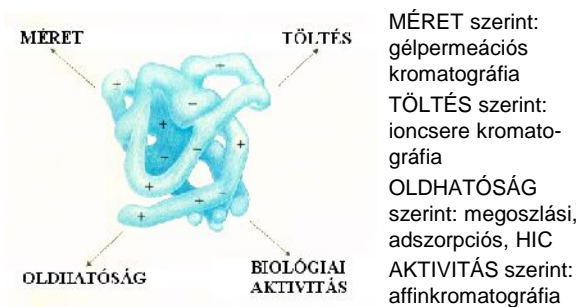
	Kromatográfia	Adszorpció
Cél:	több hasonló komponens elválasztása	egy komponens elválasztása az oldószerrel (vízzel)
Az oszlop terhelése:	kicsi, a kapacitás max. 1-2 %-a	nagy (100%)
Deszorpció:	egyidej leg megvége, a csúcs „hátsó” oldalán	a telítés befejezése után, eltér összetétel eluenssel



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Kromatográfia



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

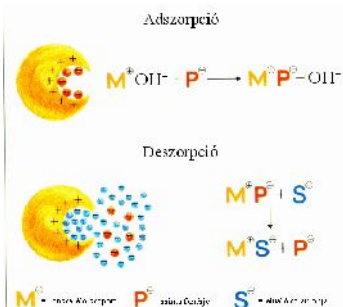
5

Ioncsere mechanizmusa

A leggyengébben kötődő ionok: H⁺, OH⁻, ezeket minden mintaion leszorítja.

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

Regenerálás: savval vagy lúggal



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Ioncsere kromatográfia

Formula	Name	Abbreviation
Strong cation		
$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Trisethylaminoethyl	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 cation		
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}$	Aminoethyl	AE-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Diethylaminoethyl	DEAE-
Strong anion		
$-\text{SO}_3^-$	Sulphin	S-
$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Sulphomethyl	SM-
$-\text{C}_3\text{H}_7\text{SO}_3^-$	Sulphopropyl	SP-
Weak anion		
$-\text{COO}^-$	Carboxy	C-
$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	Carboxymethyl	CM-

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Ioncsere gyanták kapacitása

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

Regenerálás: savval vagy lúggal

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A fehérje töltése

A fehérjék töltése függ a pH-tól:

Bármelyik fehérje megkötődhet kation- és anioncsere resin is, ha a pH megfelel. Az izoelektromos pont közelében nincs kötődés, ha a pH-t az izoelektromos pont felé mozdítom el, a fehérje leválik az oszlopról.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Elválasztás tervezése

A titrálási görbék ismeretében a kromatográfias elválasztások el re tervezhet k.

10

Titrálási görbék felvétele

A titrálási görbéket elektrofókusáló elektroforézissel lehet felvenni.

Marha izomfehérjék titrálási görbéi.

11

A pH gradiens hatása

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

12

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

High slope
Medium slope
Low slope

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A gradiens hatása

Izokratikus és gradiens elűző

RESPONSE

TIME (MIN.)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A gradiens hatása

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

Az optimális gradiens profil állhat több, eltér meredekség szakaszból is.

Linear gradient
Optimized gradient


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15


Fordított fázisú (RP) kromatográfia

RP – a töltet apoláris, a mozgó fázis poláris.
 A töltet felületét alkil láncokkal borítják, ennek szénatom-száma szerint jelölik:


RP-2



RP-8




RP-18



Az ilyen hidrofób töltet alkalmas:

- Megoszlásos
- Adszorpciós
- Hidrofób kölcsönhatás (HIC) kromatográfiára



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

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

Megoszlásos kromatográfia



Adszorpciós kromatográfia






BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

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 (csökken sógradiens) hidrofóbításuknak megfelelő sorrendben deszorbeálódnak.

Az RP technikák els sorban analitikai léptékek, nem ipariak, ezért nem tárgyaljuk ennél részletesebben.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

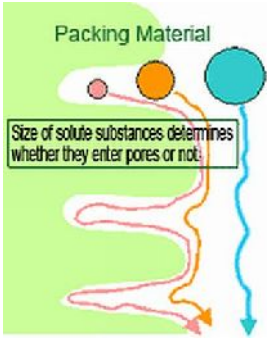
18

Gélpermeációs kromatográfia

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

A retenció az eltér méret molekulák eltér úthosszából adódik.

Lassú, akár 10-20 óra.
Mindig hígít!



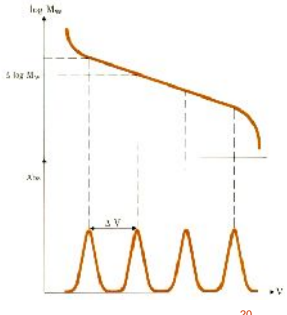
19

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Gélpermeációs kromatográfia

A retenció nem lineáris, de egy tartományban a log(moltömeg)-gel arányos.

Ez sem ipari lépték elválasztás, nem foglalkozunk vele.
Ld. BIM gyakorlat.



20

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Oszlopok léptéknövelése

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

Azonos hatékonyságú elválasztáshoz azonos lineáris sebesség kell:

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

a keresztmetszetet kell arányosan növelni, a hossz változatlan.



21

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

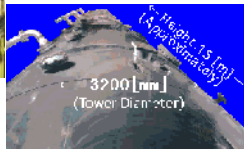
Oszlopok léptéknövelése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

Ipari méret ioncserél oszlopok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

Folytonos kromatográfia



A kromatográfia szakaszos (ciklikus) m ködés . De ha több oszlopot fáziseltolással állítunk egymás mellé, akkor kvázifolytonossá tehet (mint a vákuum dobsz r). Abban is hasonlít, hogy az elemeket körben helyezik el.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

Folytonos kromatográfia

A körberakott oszlopokat helyettesíthetjük egy hengerpalást alakú töltetágygal, 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.



25

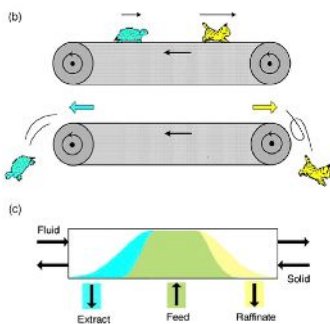


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Mozgó töltet és szimulált mozgó töltet

(moving bed és simulated moving bed = SMB)

Nemcsak a mozgó fázis mozog, hanem a töltet is – ellenkez irányban. A nagy retenciójú komponensek ett l visszafelé mozdulnak el.



A kialakuló koncentráció-profilok:

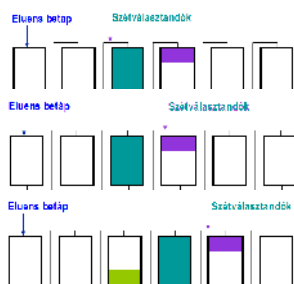
26



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Szimulált mozgó töltet

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



27



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Szimulált mozgó töltet

A kialakuló koncentráció profil alakja:

Ennek megfelelően a két komponens tiszta formában elvezethető:

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

Szimulált mozgó töltet

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

Ipari példa: glükóz-fruktóz elválasztás

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

Sugar	Relative Sweetness
Fructose	171
Sucrose	100
Glucose	72
Galactose	33
Aszpartám	20

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

Glükóz-fruktóz elválasztás SMB-vel


Az iparban sok 1-2 m³-es kolonnát alkalmaznak, a kimeneteknél optikai szenzorokkal mérik az összetételt, és a léptetéseket processzorral irányítják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Centrifugálásos megoszlásos kromatográfia (CPC)

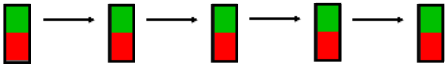
Helye a kromatográfián belül:
 Folyadék-folyadék kromatográfia
 Mind az állófázis, mind a mozgófázis folyadék halmazállapotú
 Elválasztás alapja a különböző komponensek eltér megoszlási hányadosa a két folyadék fázis között



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A megoszlásos kromatográfia elve

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

1
1 1
1 2 1
1 2 2 1

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 34

A technika se: 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)

Ascendent


Descendent

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Mi történik rotorban?




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





BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Modern CPC készülék



Nagy forgási sebesség (max. 3000 rpm)
 Gyors elválasztás (<1 óra)
 Nagy tányérszám (1-2 ezer)





BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A rotor feltöltése

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A kilépésnél

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
