

10. (IPARI) KROMATOGRÁFIA

Dr. Pécs Miklós
Dr. Fehér Csaba



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány
Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

MŰVELETI SORREND

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

Jellemző műveletek:

az összes eddigi
KROMATOGRÁFIA



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

(Ipari) kromatográfia

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

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

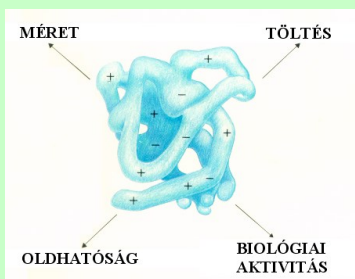
	Kromatográfia	Adszorpció
Cél:	több hasonló komponens elválasztása	egy komponens elválasztása az oldószer-től (viztől)
Az oszlop terhelése:	kicsi, a kapacitás max. 1-2 %-a	nagy (→ 100%)
Deszorpció:	egyidejűleg megy végbe, a csúcs „hátsó” oldalán	a telítés befejezése után, eltérő összetételű eluenssel



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Kromatográfiák



MÉRET szerint: gélpermeációs kromatográfia
TÖLTÉS szerint: ioncsere kromatográfia
OLDHATÓSÁG szerint: megoszlási, adszorpciós, HIC
AKTIVITÁS szerint: affinkromatográfia

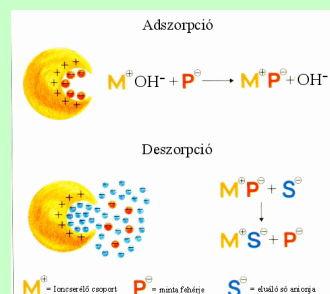


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Ioncsere mechanizmusa

A leggyengébben kötődő ionok: H⁺, OH⁻, ezeket minden mintaion leszorítja.
Deszorpció: erősebben kötődő ionokkal (pl. kétértékű), vagy nagyobb koncentrációval
Regenerálás: savval vagy lúggal



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

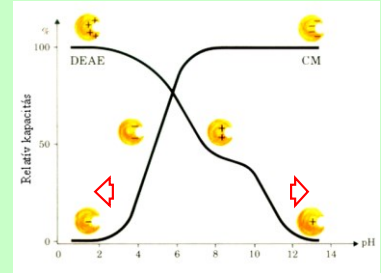
6

loncsere kromatográfia

Formula	Name	Abbreviation
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		
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_2$	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-

loncsere gyanták kapacitása

A kapacitás függ a pH-tól, erős savak és bázisok visszaszorítják a disszociációt
 Regenerálás: savval vagy lúggal



A fehérje töltése

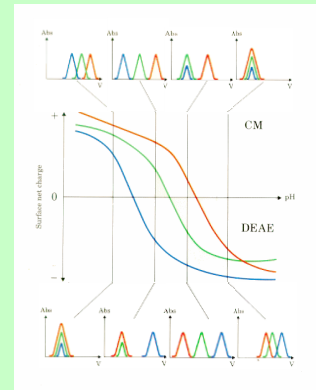
A fehérjék töltése függ a pH-tól:

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.



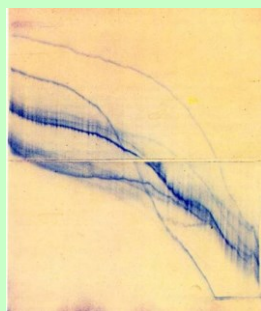
Elválasztás tervezése

A titrálási görbék ismeretében a kromatográfiai elválasztások előre tervezhetők.



Titrlási görbék felvétele

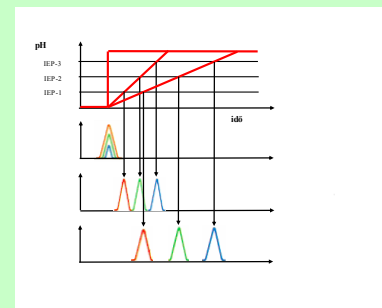
A titrlási görbéket elektrofókusáló elektroforézissel lehet felvenni.



Marha izomfehérjék titrlási görbéi.

A pH gradiens hatása

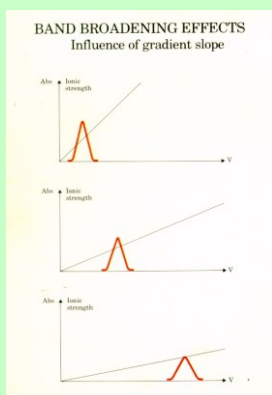
Minél laposabb a gradiens, annál jobb a szétválás → akkor minek a gradiens?



A gradiens hatása

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

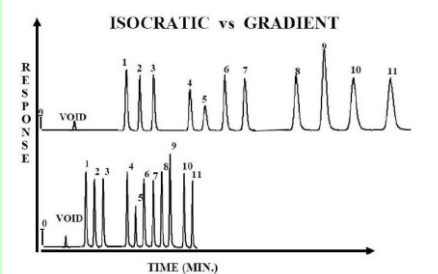
(Van Deemter egyenlet)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A gradiens hatása

Izokratikus és gradiens elúció

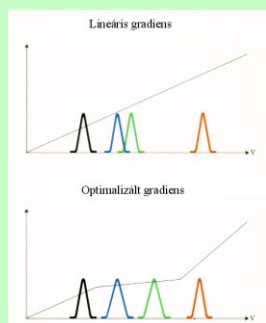


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A gradiens hatása

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

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



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:



Az ilyen hidrofób töltet alkalmas:

- Megoszlásos
- Adsorpciós
- Hidrofób kölcsönhatás (HIC) kromatográfiára



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

Fordított fázisú (RP) kromatográfia

A megoszlásos és az adsorpciós kromatográfia közti elvi különbség:

Megoszlásos: a hidofil fázis teljes térfogatában kötődik az anyag.

Adsorpciós: csak a felületen → nem számít az alkilánc hossza



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Hidrofób kölcsönhatás (HIC)

Az adsorpciós kromatográfia egy speciális esete.

Tömény sóoldatokban az apolárisabb fehérjék oldhatósága romlik (ld. kiszáras), 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.



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 eltérő méretű molekulák eltérő úthosszából adódik.

Lassú, akár 10-20 óra.
Mindig hígít!



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

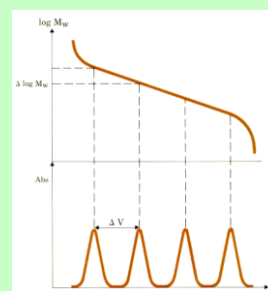
19

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.



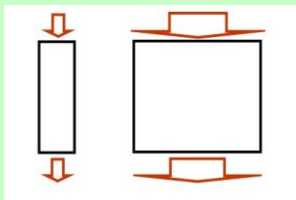
20



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:

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

→ a keresztmetszetet kell arányosan növelni, a hossz változatlan.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

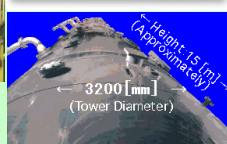
Oszlopok léptéknövelése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

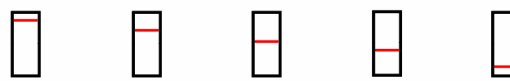
Ipari méretű ioncserélő oszlopok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

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.



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 felvétele, a töltet további felületére az eluens folyik. Alul az elfolyó pontoknál fix helyeken lehet elvenni az egyes komponenseket.

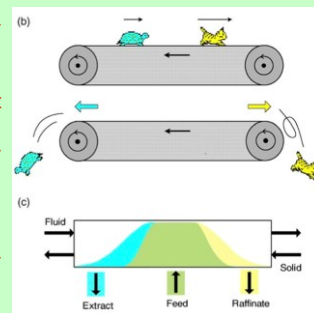
Egy körülfordulás alatt a henger minden alkotója végigmegy a kromatográfia teljes ciklusán.



25

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.

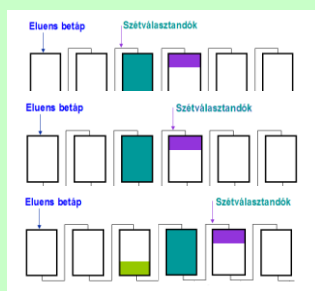


A kialakuló koncentrációprofilok:

26

Szimulált mozgó töltet

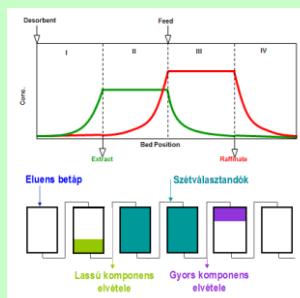
Valójában nem a töltet mozog, hanem a betáplálási és elvételi pontokat léptetik a töltet (= sorba kötött oszlopok) mentén.



27

Szimulált mozgó töltet

A kialakuló koncentrációprofil alakja:

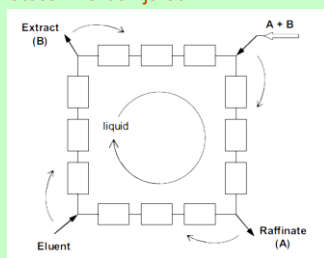


Ennek megfelelően a két komponens tiszta formában elvezethető:

28

Szimulált mozgó töltet

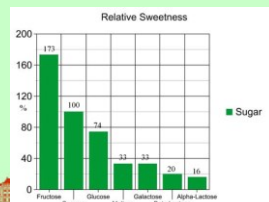
Az oszlopokat célszerű zárt ciklusban üzemeltetni, mindkét fázist folyamatosan körben járatni.



29

Ipari példa: glükóz-fruktóz elválasztás

A glükóz enzim 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).



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

01

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

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

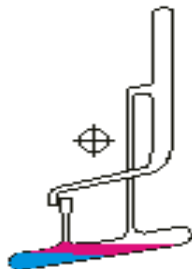


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

A technika őse: Craig-extraktor

START OF CYCLE



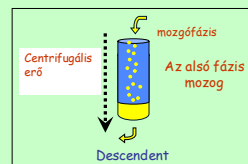
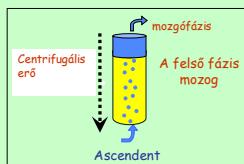
ismételt lépé-



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)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Mi történik rotorban?



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



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 (időprogram 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