

10. (IPARI) KROMATOGRÁFIA

Dr. Pécs Miklós



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



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 meg végbe, a csúcs „hátsó” oldalán	a telítés befejezése után, eltér összetétel eluenssel



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

M VELETI SORREND

3. Tisztítás a termék és a szennyező anyagok elválasztása.

Jellemző m veletek:

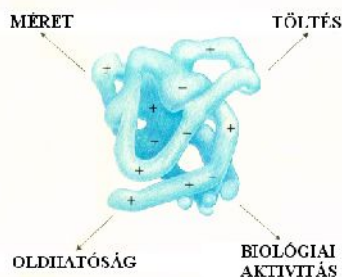
az összes eddigi
KROMATOGRÁFIA



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Kromatográfiai



MÉRET szerint:
gélpermeációs kromatográfia
TÖLTÉS szerint:
ioncsere kromatográfia
OLDILATÓSÁG szerint:
megoszlási, adszorpció, HIC
AKTIVITÁS szerint:
affinkromatográfia



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

(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 adszorpció(különbség) elválasztást eredményez.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

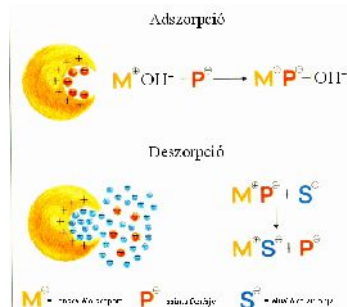
3

Ioncsere mechanizmusa

A leggyengébben kötődő ionok: H⁺, OH⁻, ezeket minden mintában lezörítjük.

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

Regenerálás: sával vagy lúggal



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Ioncsere kromatográfia

Formula	Name	Abbreviation
Strong anion		
-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	Tridethylaminoethyl	TAM-
-C ₂ H ₅ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₃	Triethylaminoethyl	TEAE-
-C ₂ H ₄ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH(OH)CH ₃	Diethyl-2-hydroxypropylaminoethyl	QAE-
Weak anion		
-C ₂ H ₄ N ⁺ H ₂	Aminoethyl	AE-
-C ₂ H ₄ NH(C ₂ H ₅) ₂	Diethylaminoethyl	DEAE-
Strong cation		
-SO ₃ ⁻	Sulphin	S-
-CH ₂ SO ₃ ⁻	Sulphomethyl	SM-
-C ₃ H ₇ SO ₃ ⁻	Sulphopropyl	SP-
Weak cation		
-COO	Carboxy	C-
-CH ₂ COO	Carboxymethyl	CM-

7

Elválasztás tervezése

A titrálási görbék ismeretében a kromatográfias elválasztások el tervezhetők.

10

Ioncsere gyanták kapacitása

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

Regenerálás: savval vagy lúggal

8

Titrálási görbék felvétele

A titrálási görbék elektroforézissel lehet felvenni.

Marha izomfehérjék titrálási görbéi.

11

A fehérje töltése

A fehérjék töltése függ a pH-tól:

Bármelyik fehérje megkötődhet kation- és anioncsere resinre 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.

9

A pH gradiens hatása

Minél laposabb a gradiens, annál jobb a szétválás akkor minél 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 gradient
Medium gradient
Low gradient

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Fordított fázisú (RP) kromatográfia

RP – a töltet apoláris, a mozgó fázis poláris.
A töltet felületét alkil láncokkal borítják, ennek szénatomszáma 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

A gradiens hatása

Izokratikus és gradiens elűző

RESPONSE

TIME (MIN.)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Fordított fázisú (RP) kromatográfia

A megoszlásos és az adszorpciós kromatográfia közti elvi különbség:

Megoszlásos kromatográfia

Adszorpciós kromatográfia

Adszorpciós: csak a felületen nem számít az alkilánc hossza

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.

Linearis gradiens
Optimalizált gradiens

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Hidrofób kölcsönhatás (HIC)

Az adszorpciós kromatográfia egy speciális esete.
Tömény sóoldatokban az apolárisabb fehérjék oldhatósága romlik (ld. kicsúszás), ezért hajlamosak megkötődni az apoláris töltet felületén.
A polaritás csökkenésével (csökken a sógradiens) hidrofóbításuknak megfelelő sorrendben deszorbeálódnak.

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

Oszlopok léptéknövelése

22

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

Ipari méret ioncserél oszlopok

23

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Oszlopok léptéknövelése

Léptéknövelésnél azonos anyagú és szemcseméret 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

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.

24

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.

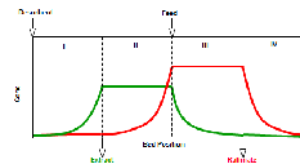
Egy körfordulás alatt a henger minden alkotója végigmegegy a kromatográfia teljes ciklusán.



25

Szimulált mozgó töltet

A kialakuló koncentráció profil alakja:



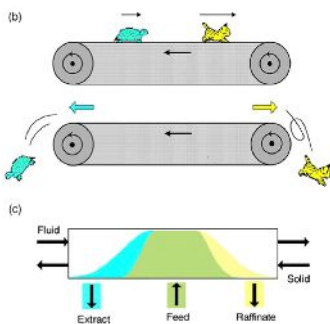
Ennek megfelelően a két komponens tiszta formában elvezethető:



28

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 itt visszafelé mozognak el.

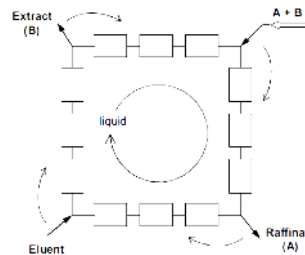


A kialakuló koncentrációprofilok:

26

Szimulált mozgó töltet

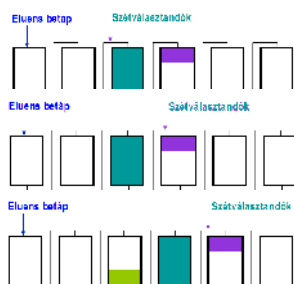
Az oszlopokat célszerű zárt ciklusban üzemeltetni, mindkét fázist folyamatosan körben járatni.



29

Szimulált mozgó töltet

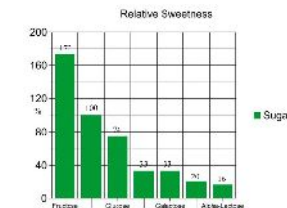
Valójában nem a töltet mozog, hanem a betáplálási és elvételi pontokat léptetik a töltet (= sorba kötött oszlopok) mentén.



27

Ipari példa: glükóz-fruktóz elválasztás

A glükóz enzimés 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).



30

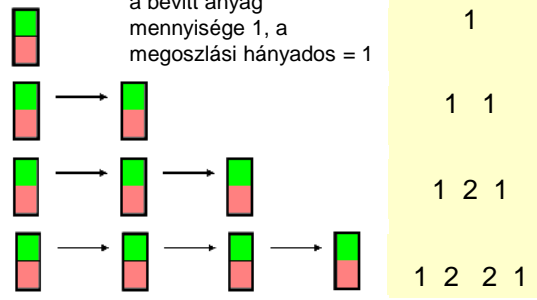
Glükóz-fruktóz elválasztás SMB-vel

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 31


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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 34

Centrifugálásos megoszlásos kromatográfia (CPC)

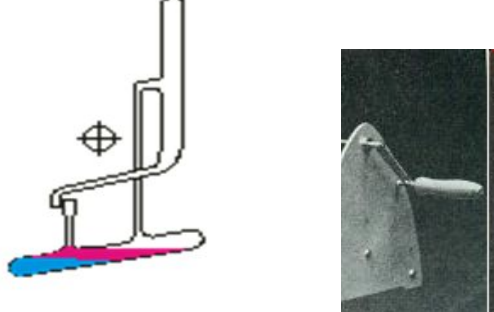
Helye a kromatográfián belül:
Folyadék-folyadék kromatográfia
Mind az állófázis, mind a mozgófázis folyadék halmazállapotú
Elválasztás alapja a különböző komponensek eltérő megoszlási hányadosa a két folyadék fázis között



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

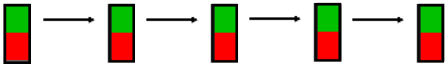
A technika se: Craig-extraktor

START OF CYCLE ismételt lépés



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 33

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?



- 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

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

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 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

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