

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 szennyez anyagok elválasztása.

Jellemz m veletek:

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 folyadékkromatográfia, ezen belül az oszlopkromatográfia használatos. Ezen belül bármilyen álló- és mozgófázison bármilyen szorpció(különbség) elválasztást eredményez.

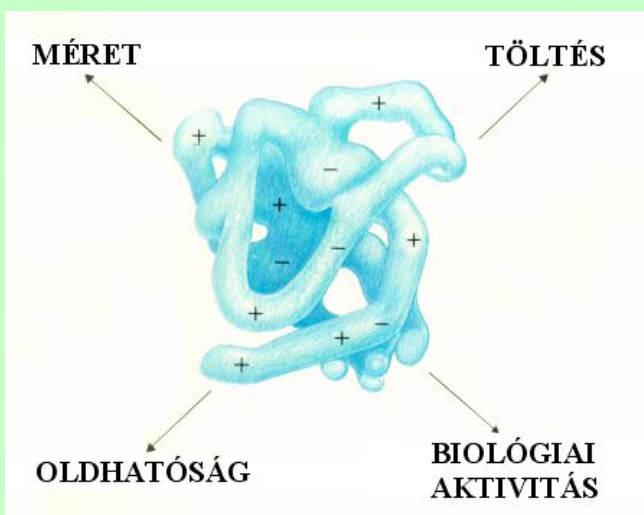


Mi a különbség az oszlopkromatográfia és az oszlopban végrehajtott adszorpció között?

	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 megvégezték 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

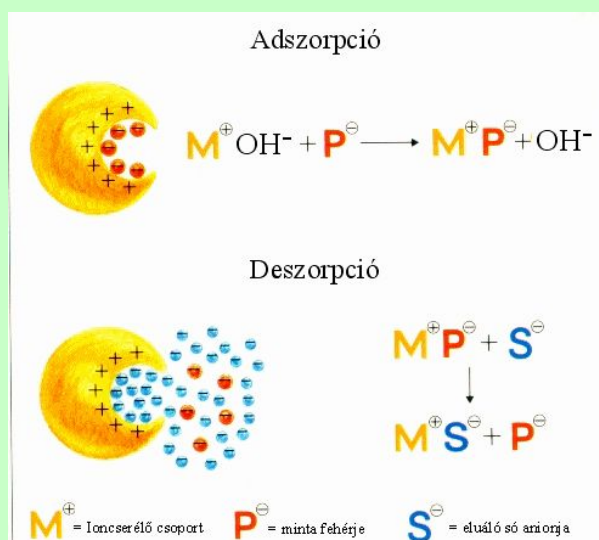
5

Ioncsere mechanizmusa

A leggyengébben
köt d ionok: H^+ ,
 OH^- , ezeket minden
mintaion leszorítja.

Deszorpció:
er sebben köt d
ionokkal (pl. kétérté-
k), vagy nagyobb
koncentrációval

Regenerálás:
savval vagy lúggal



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

Ioncsere 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		
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_3$	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-



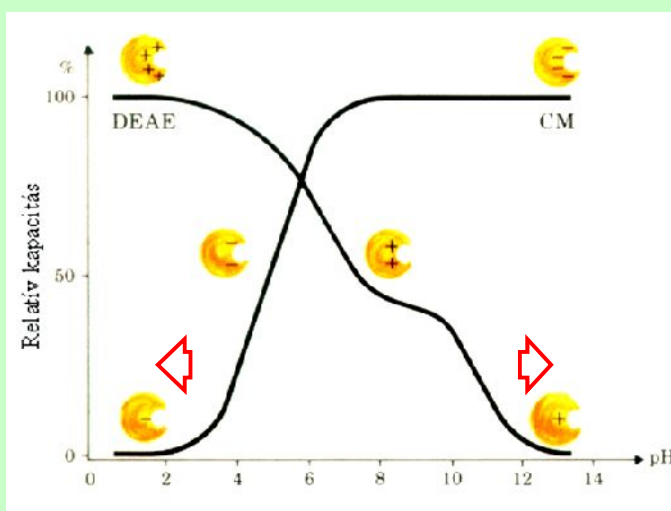
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

Ioncsere gyanták kapacitása

A kapacitás függ a pH-tól, er s savak és bázisok visszazorítják a disszociációt

Regenerálás: savval vagy lúggal



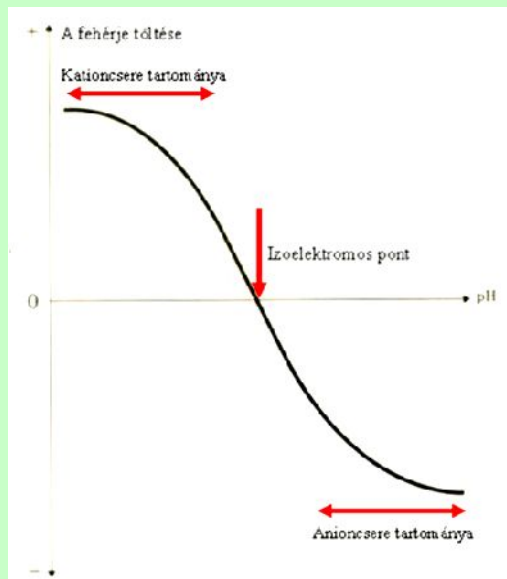
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

A fehérje töltése

A fehérjék töltése függ a pH-tól:

Bármelyik fehérje megköthet kation- és anioncserélő 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.

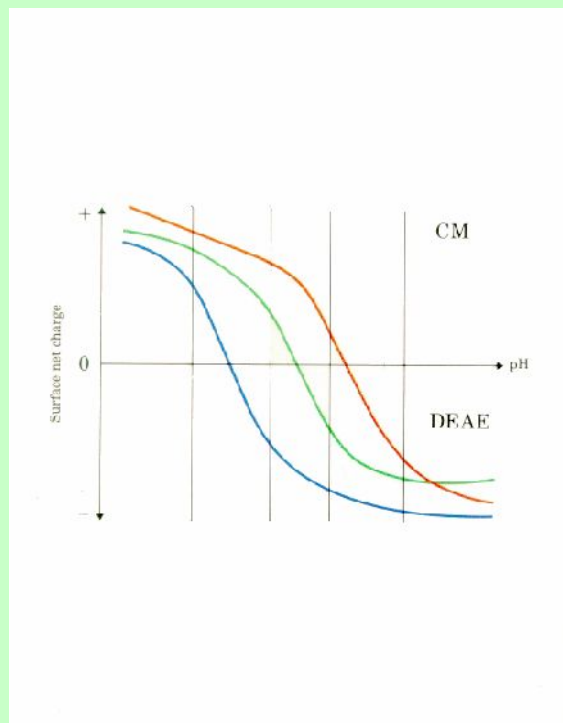


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Elválasztás tervezése

A titrálási görbék ismeretében a kromatográfiai elválasztások elre tervezhetők.



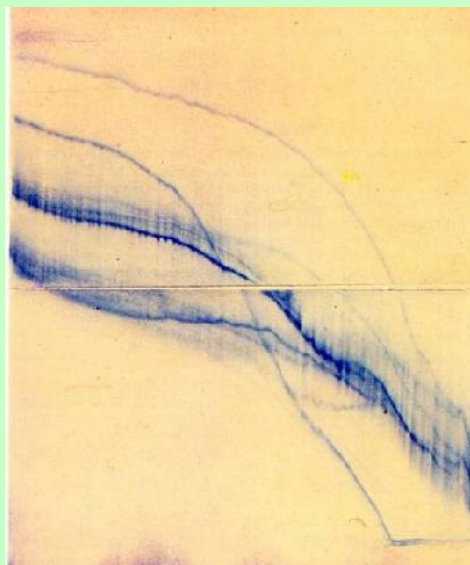
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

Titrálási görbék felvétele

A titrálási görbéket elektrofókusáló elektroforézissel lehet felvenni.

Marha izomfehérjék titrálási görbéi.

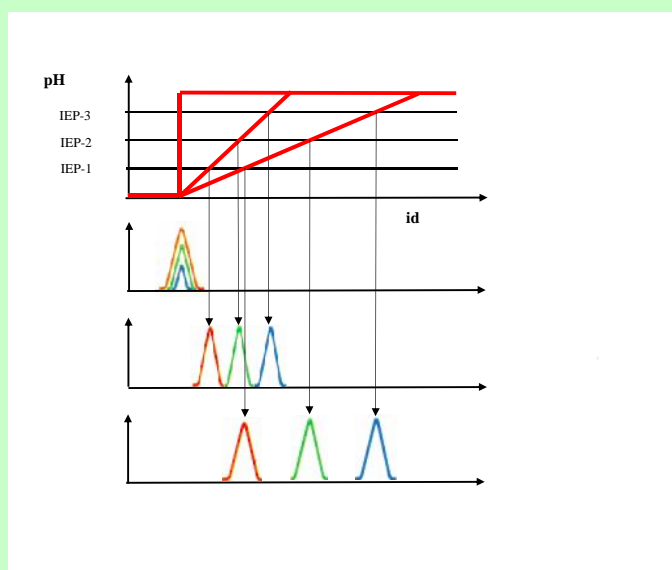


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

A pH gradiens hatása

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

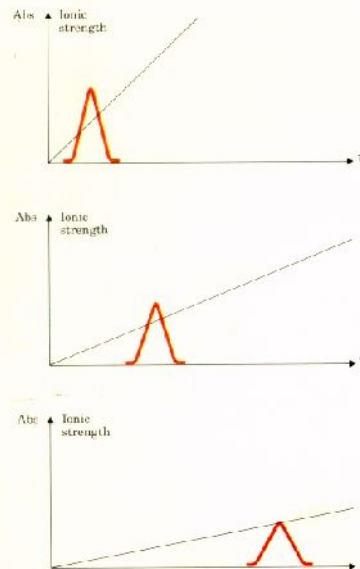
12

A gradiens hatása

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

(Van Deemter egyenlet)

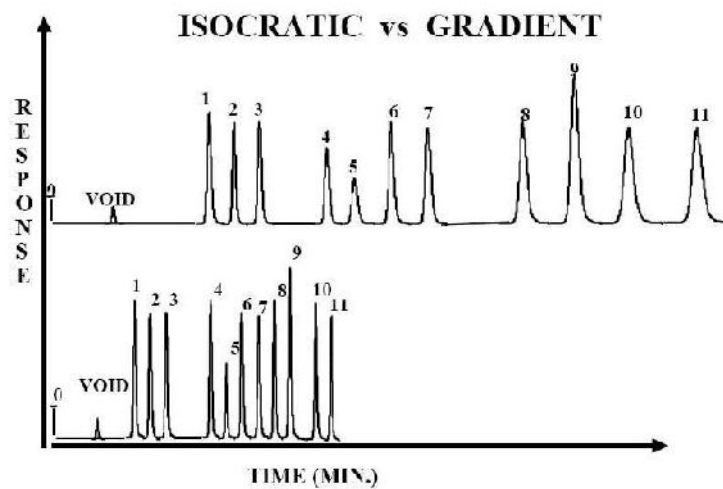
BAND BROADENING EFFECTS Influence of gradient slope



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A gradiens hatása

Izokratikus és gradiens elűző

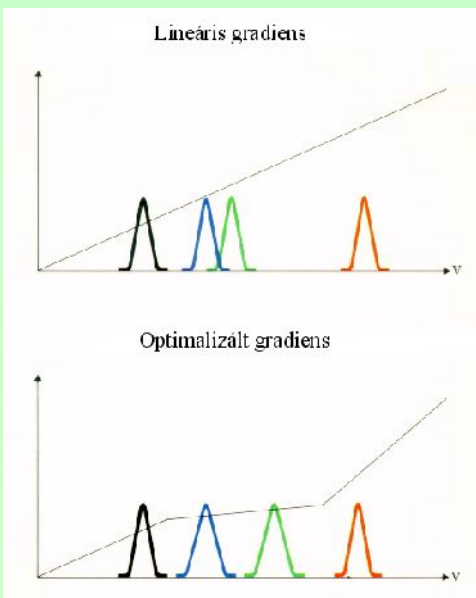


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.



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
- Adszorpció
- Hidrofób kölcsönhatás (HIC) kromatográfiára



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

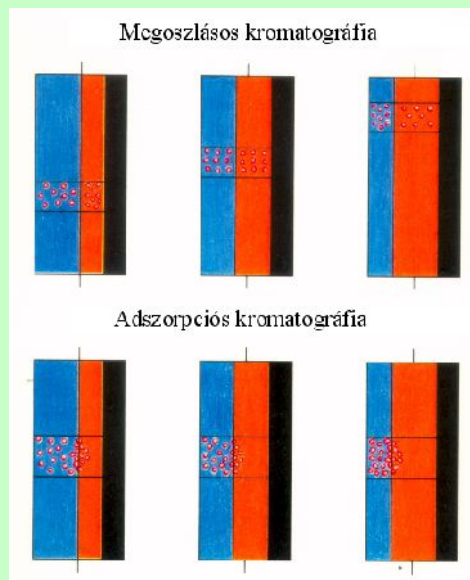
16

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



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 elsősorban 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!



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

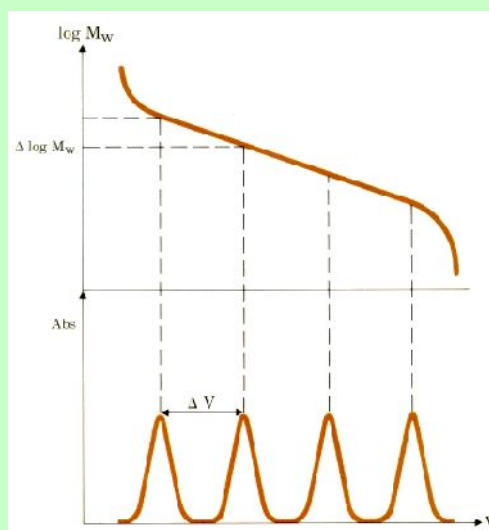
19

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

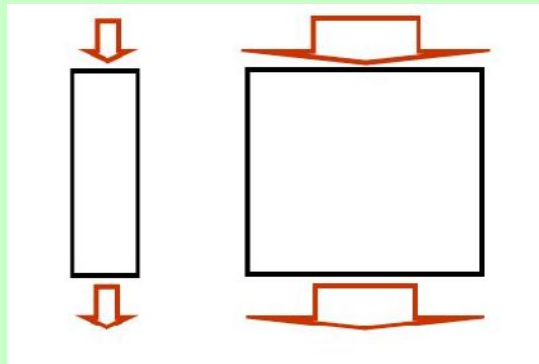


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Oszlopok léptéknövelése

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

Azonos hatékonyságú elválasztáshoz azonos lineáris sebesség kell:



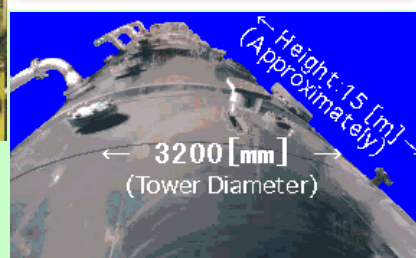
$v = \text{térfogatáram} / \text{keresztmetszet}$
a keresztmetszetet kell arányosan növelni, a hossz változatlan.



Oszlopok léptéknövelése



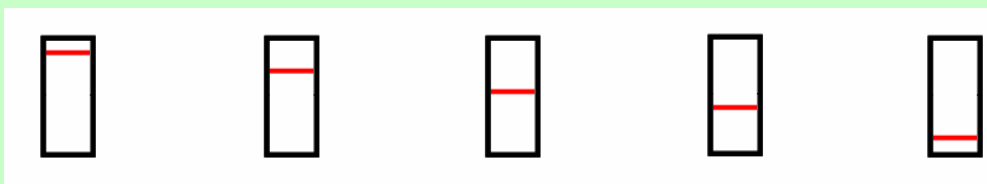
Ipari méret ioncserél oszlopok



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 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

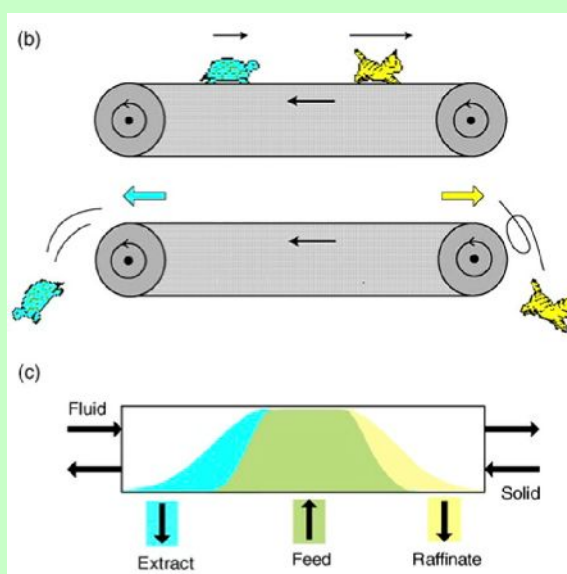
25

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 mozognak el.

A kialakuló koncentrácioprofilok:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

Szimulált mozgó töltet

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



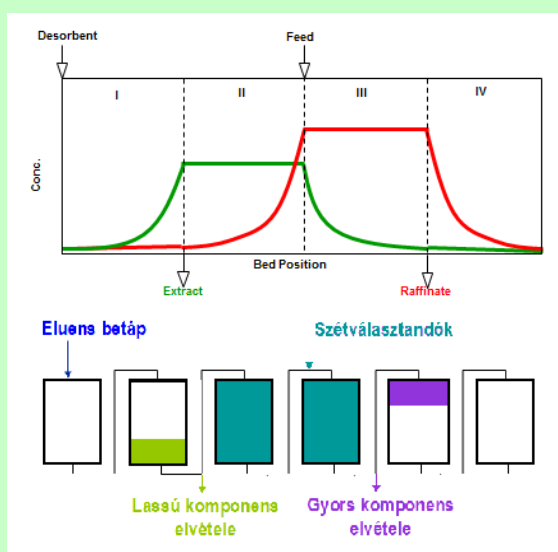
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

Szimulált mozgó töltet

A kialakuló koncentráció profil alakja:

Ennek megfelelően a két komponens tiszta formában elvezethető:

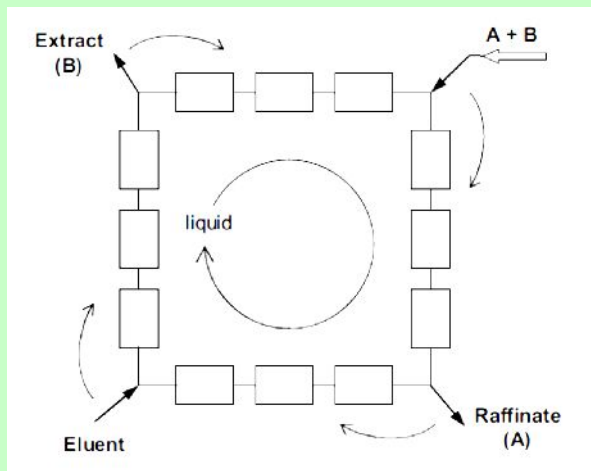


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

Szimulált mozgó töltet

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

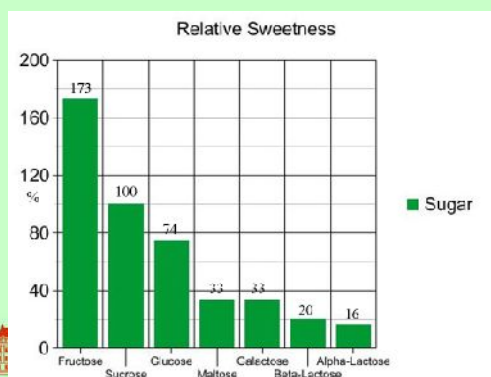


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 s kationcserélő gyantán SMB kromatográfiával választják el, a fruktóz aránya 90%-ig növelhető (HFCS = high fructose corn syrup, sokkal édesebb).



nány 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

31

Centrifugálásos megoszlásos kromatográfia (CPC)

Helye a kromatográfian belül:

Folyadék-folyadék kromatográfia

Mind az állófázis, mind a mozgófázis folyadék halmazállapotú

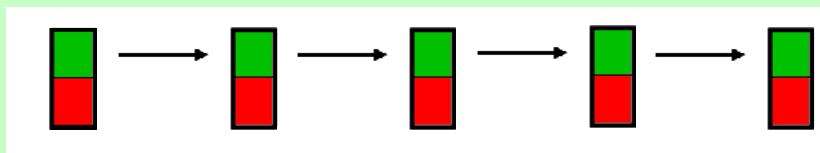
Elválasztás alapja a különböző komponensek eltér megoszlási hányadosa a két folyadék fázis között



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A megoszlásos kromatográfia elve

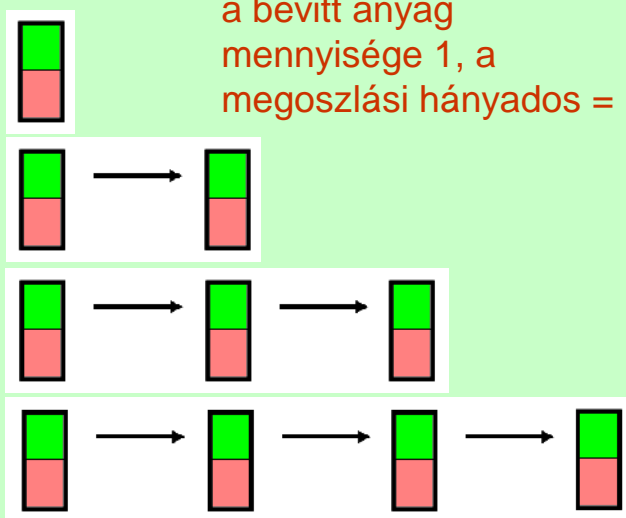
Vezessük ezt le a megoszlás jelenségére (gondolatkísérlet)
Kémcsövekben „könny” és „nehéz” oldószer az egyen-
súly beállása után a fels fázist tovább visszük.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

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



		1			
			1	1	
				1	
		1	2	1	
		1	2	2	1

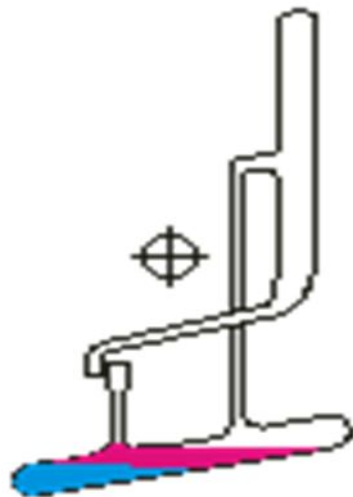


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

A technika se: Craig-extraktor

START OF CYCLE



ismételt lépé-

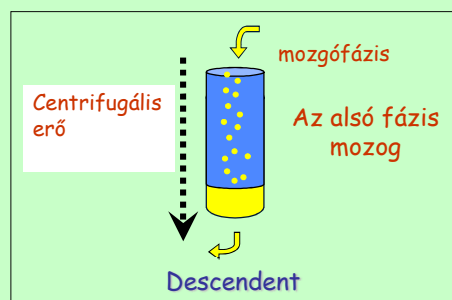
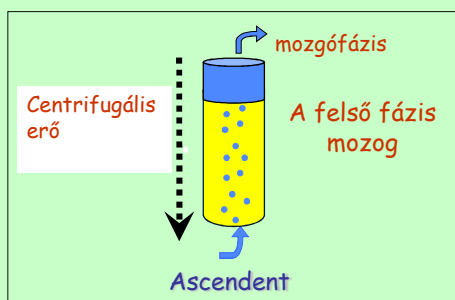


Centrifugában:

Mindkét fázis lehet álló és mozgó:

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

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



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 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) 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)



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).

