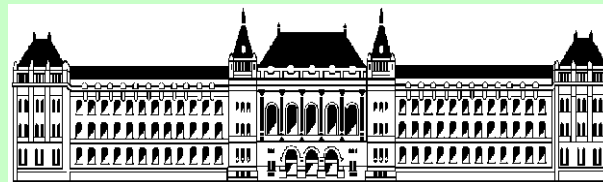


# 10. (IPARI) KROMATOGRÁFIA

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.

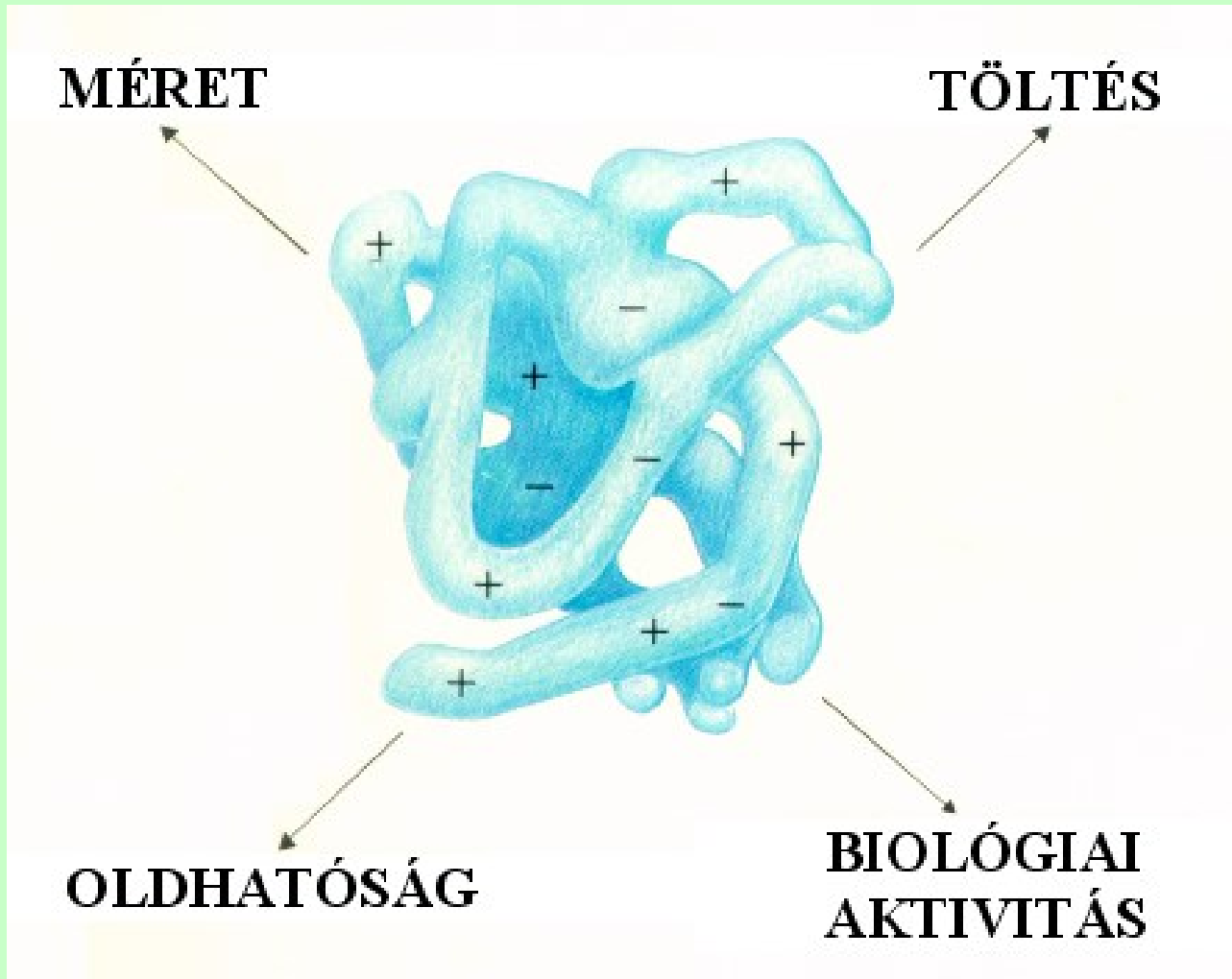


# Mi a különbség az oszlopkromatográfia és az oszlopban végrehajtott adszorpció között?

	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

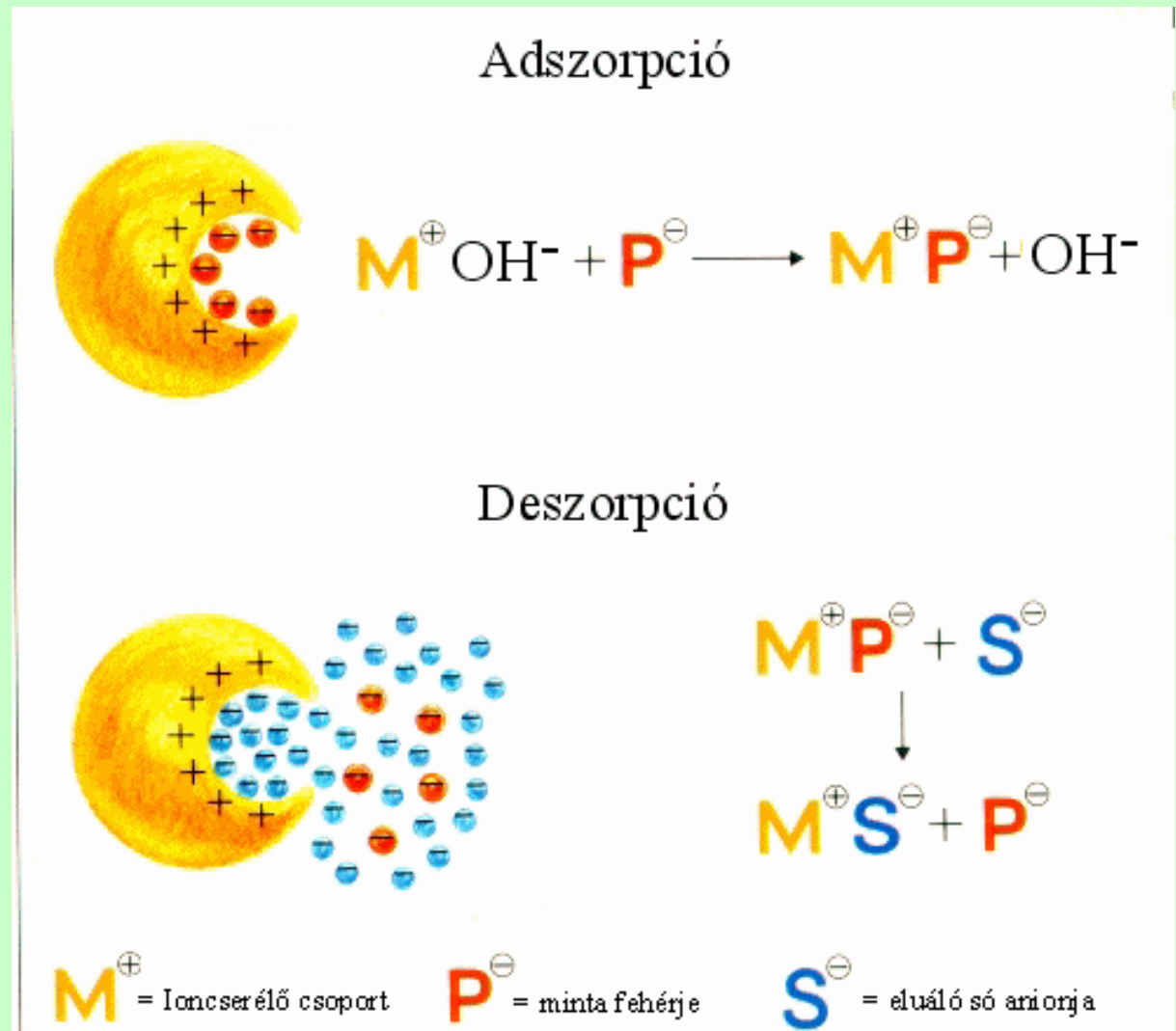


# Ioncsere mechanizmusa

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>
<b>Strong anion</b>		
$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	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-
<b>Weak anion</b>		
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_3$	Aminoethyl	AE-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Diethylaminoethyl	DEAE-
<b>Strong cation</b>		
$-\text{SO}_3^-$	Sulpho	S-
$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Sulphomethyl	SM-
$-\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$	Sulphopropyl	SP-
<b>Weak cation</b>		
$-\text{COO}^-$	Carboxy	C-
$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	Carboxymethyl	CM-

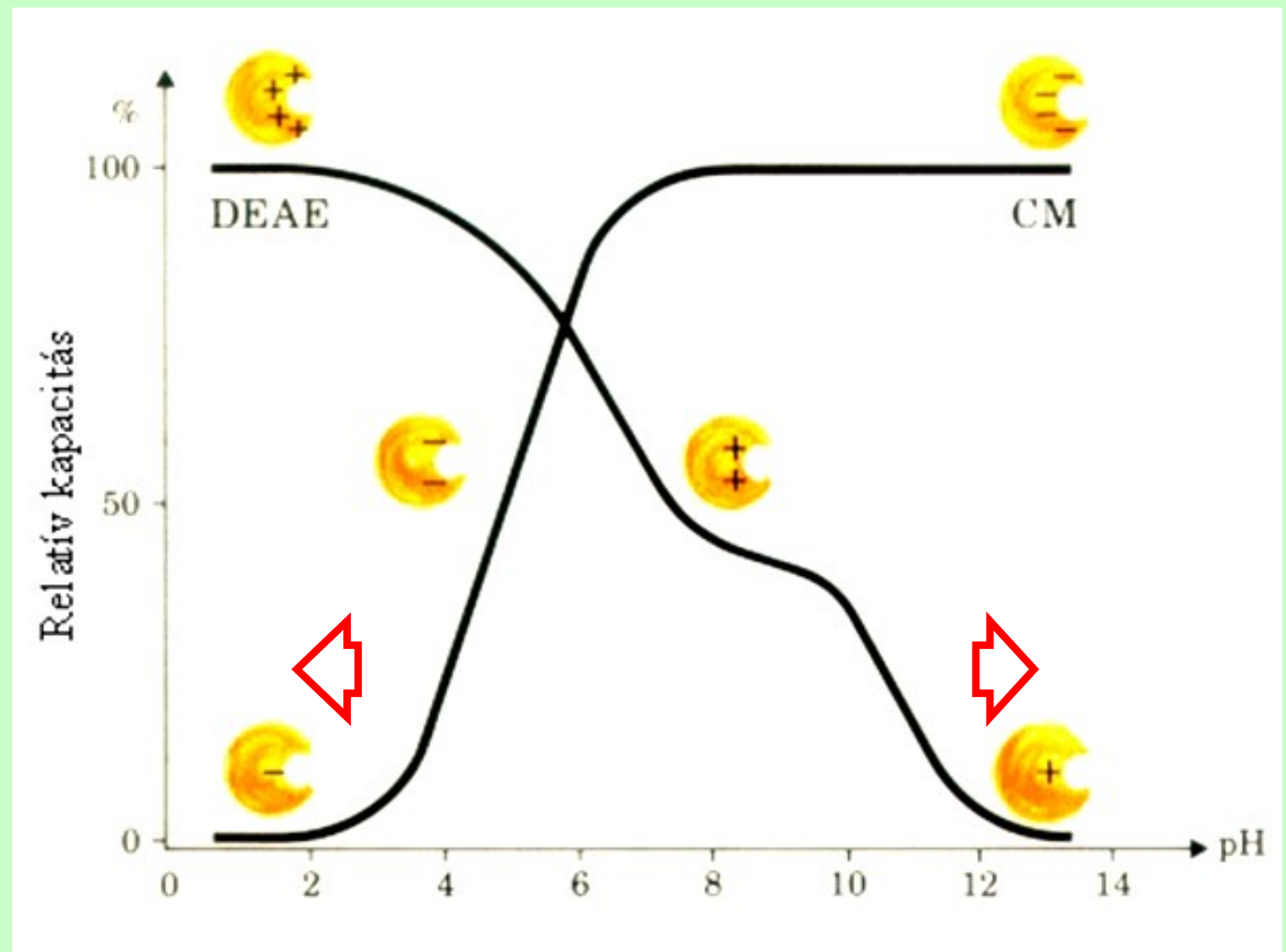




# Ioncserélő gyanták kapacitása

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

Regenerálás: savval vagy lúggal

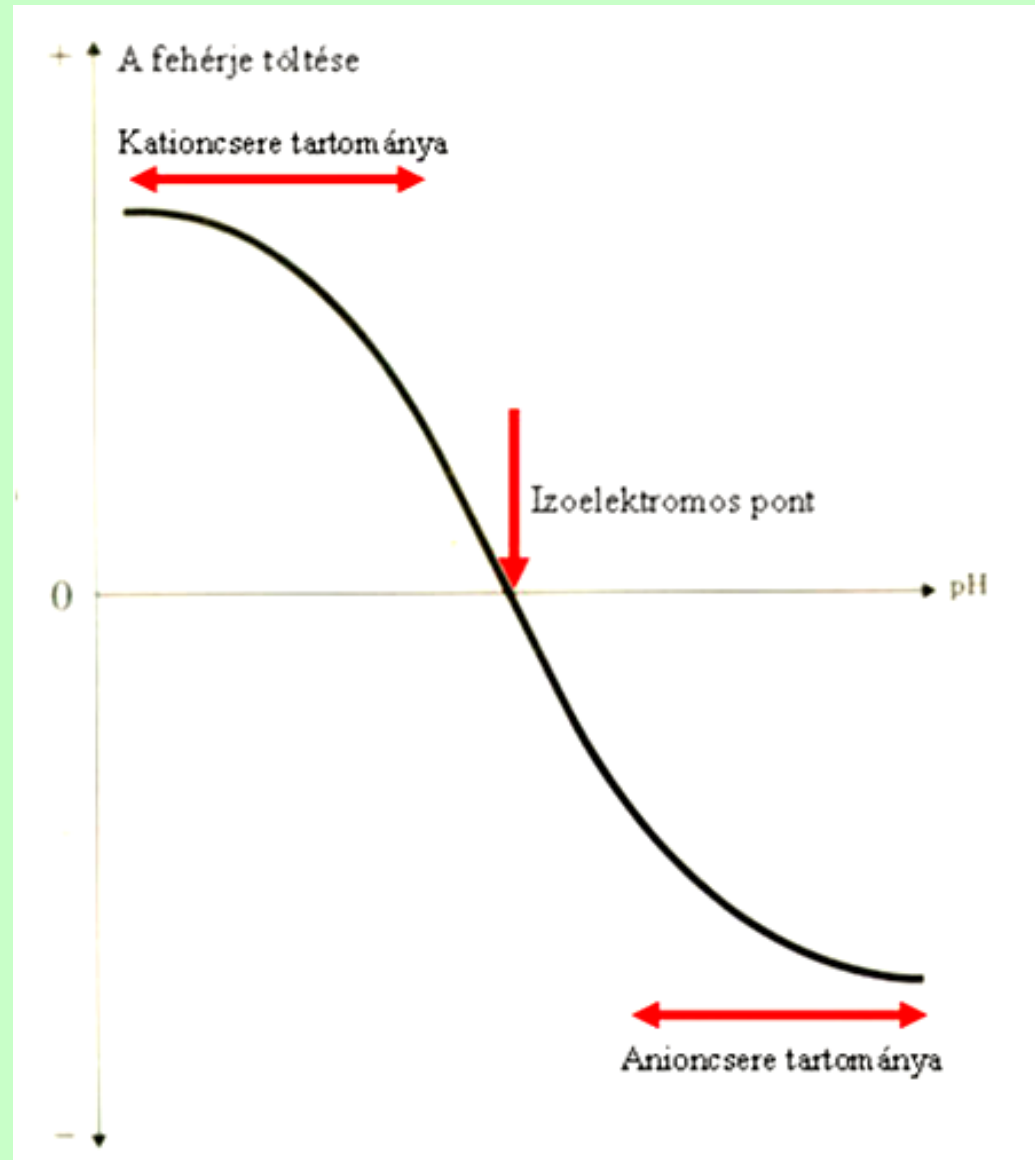




# A fehérje töltése

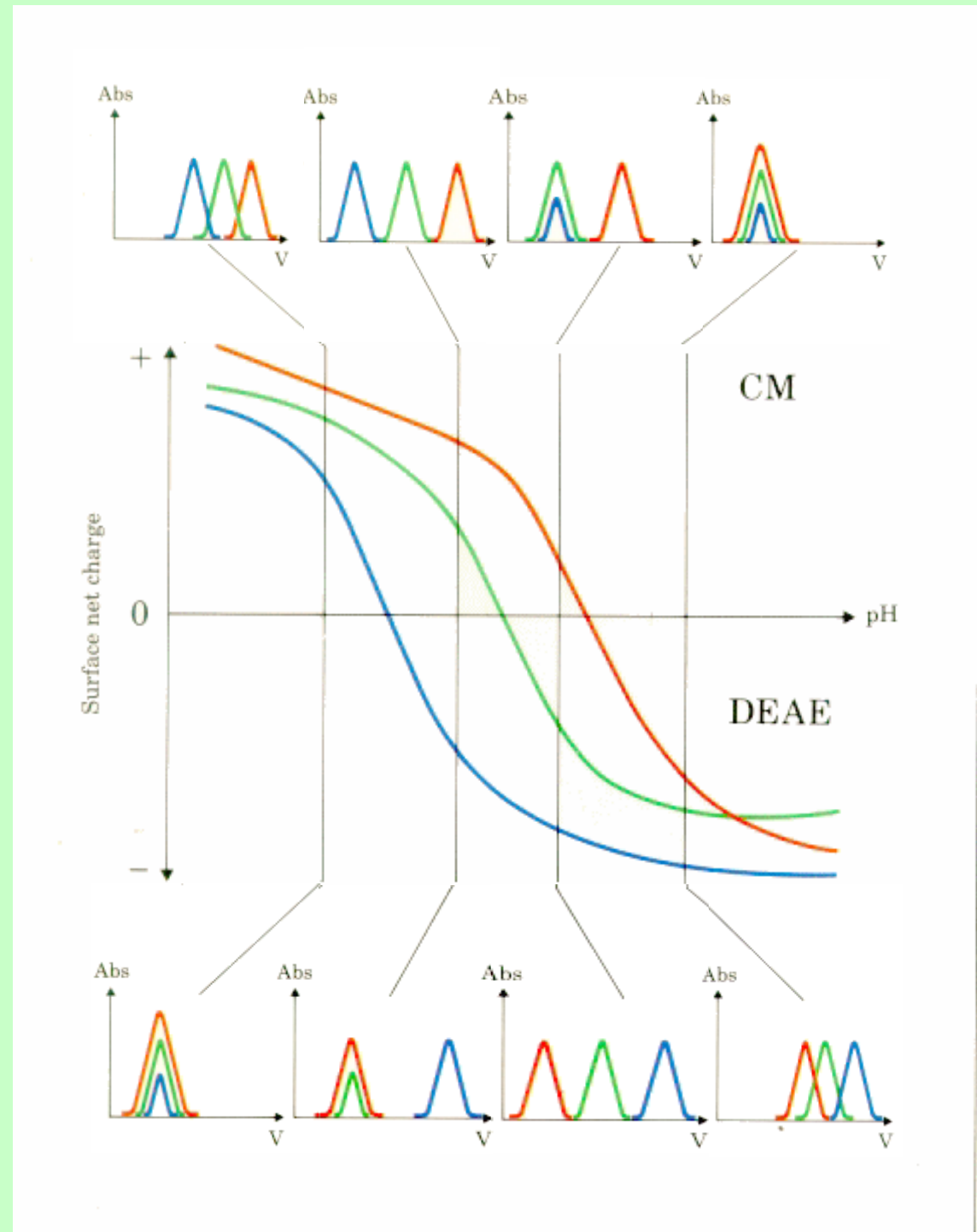
A fehérjék töltése függ a pH-tól:

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

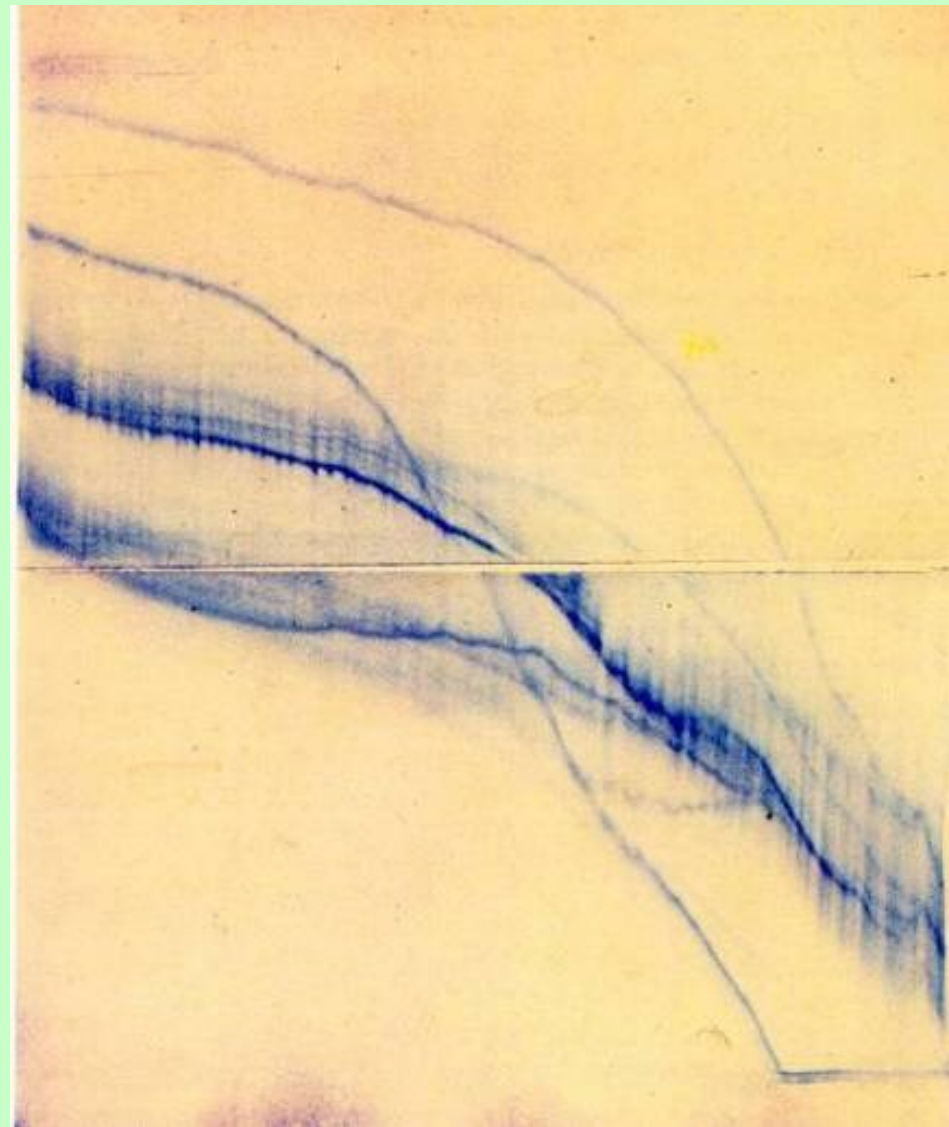
A titrálási görbék ismeretében a kromatográfiás elválasztások előre tervezhetőek.



# Titrálási görbék felvétele

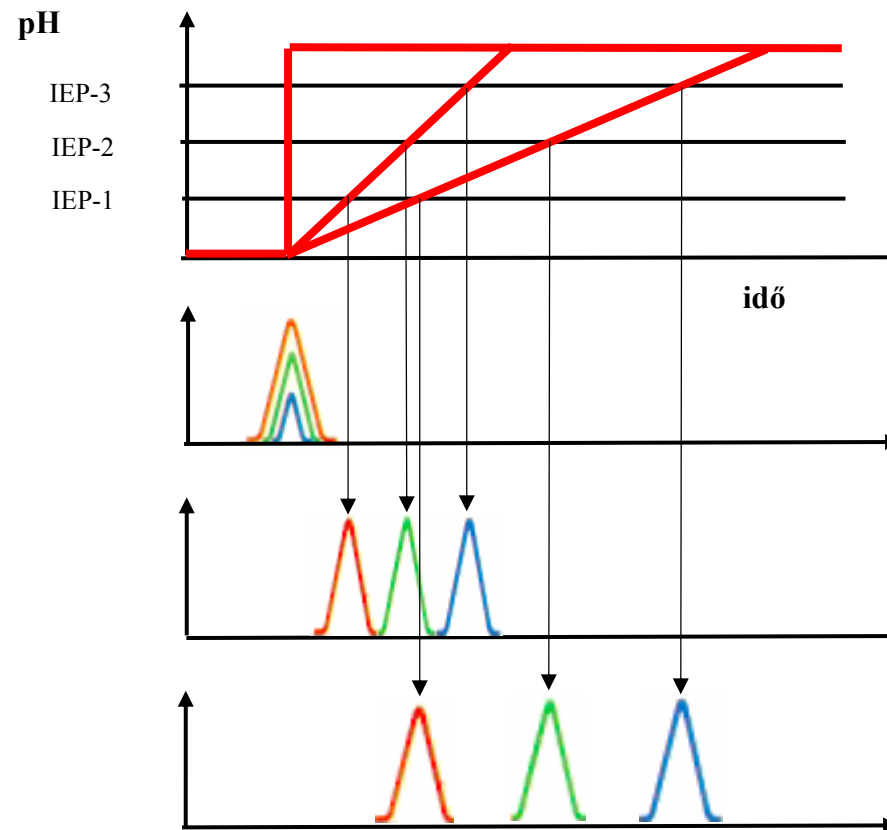
A titrálási görbét elektrofókusztáló elektroforézissel lehet felvenni.

Marha izomfehérjék titrálási görbéi.



# A pH gradiens hatása

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

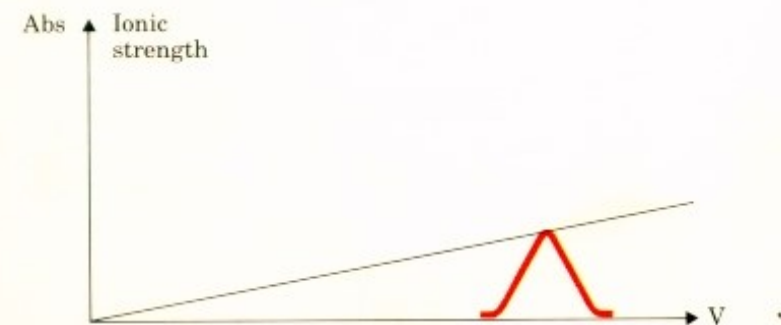
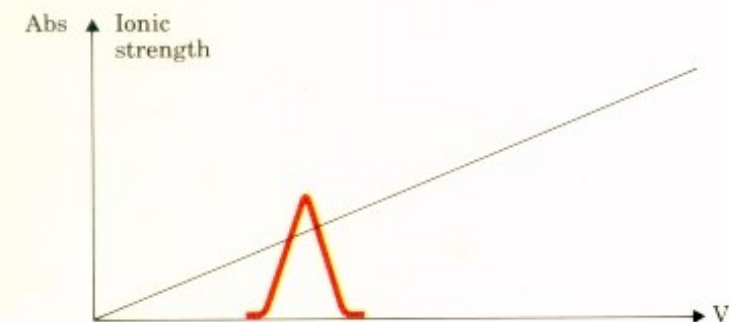
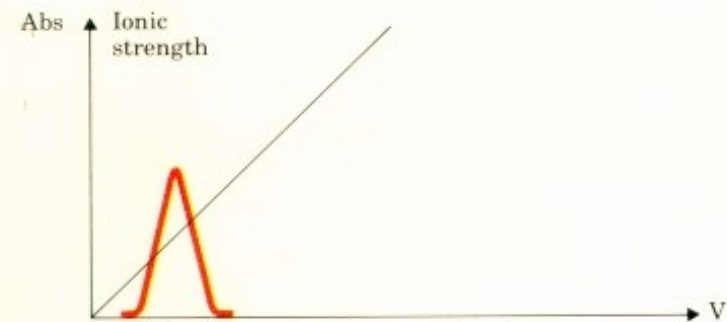


# A gradiens hatása

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

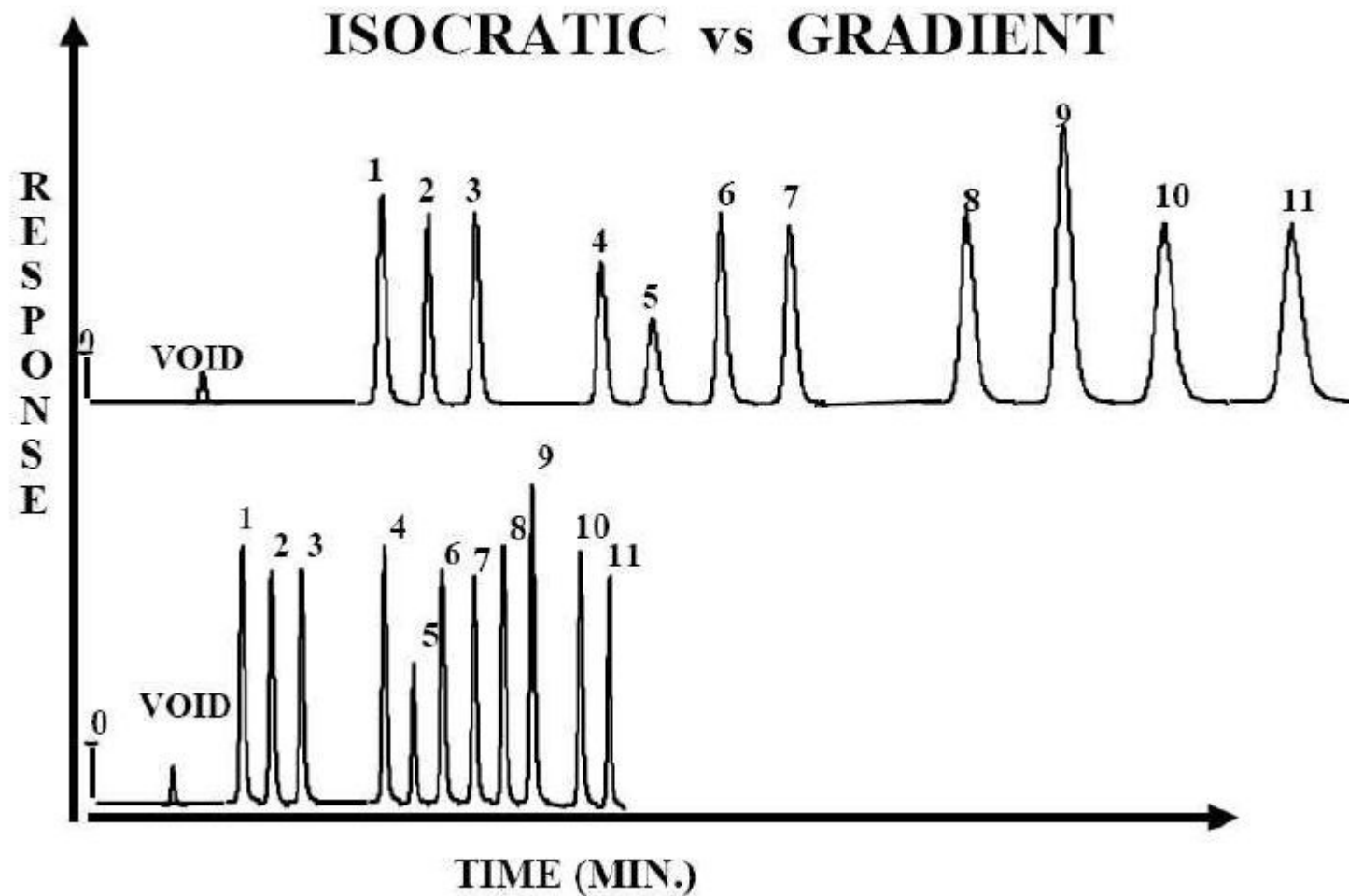
(Van Deemter egyenlet)

## BAND BROADENING EFFECTS Influence of gradient slope



# A gradiens hatása

## Izokratikus és gradiens elúció

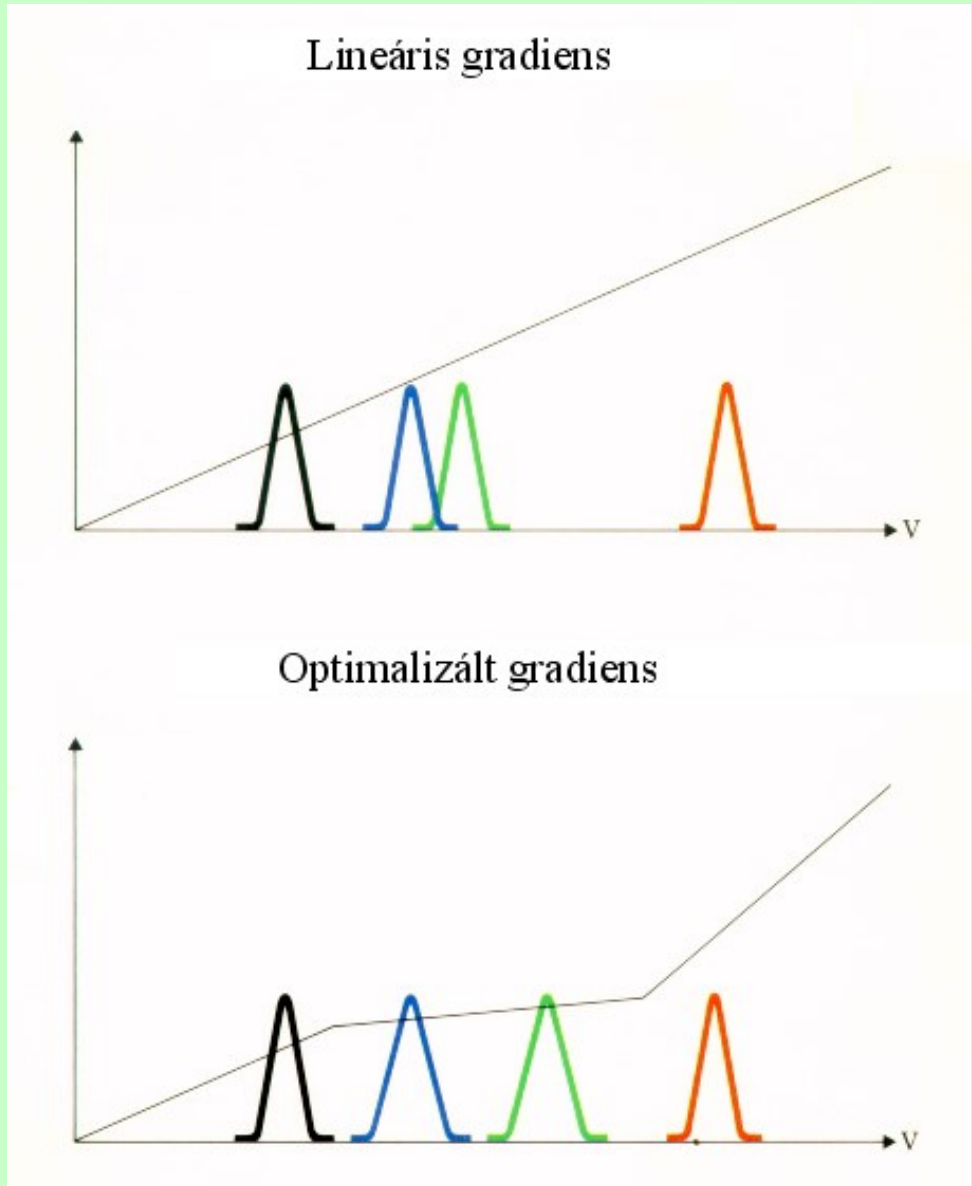




# A gradiens hatása

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

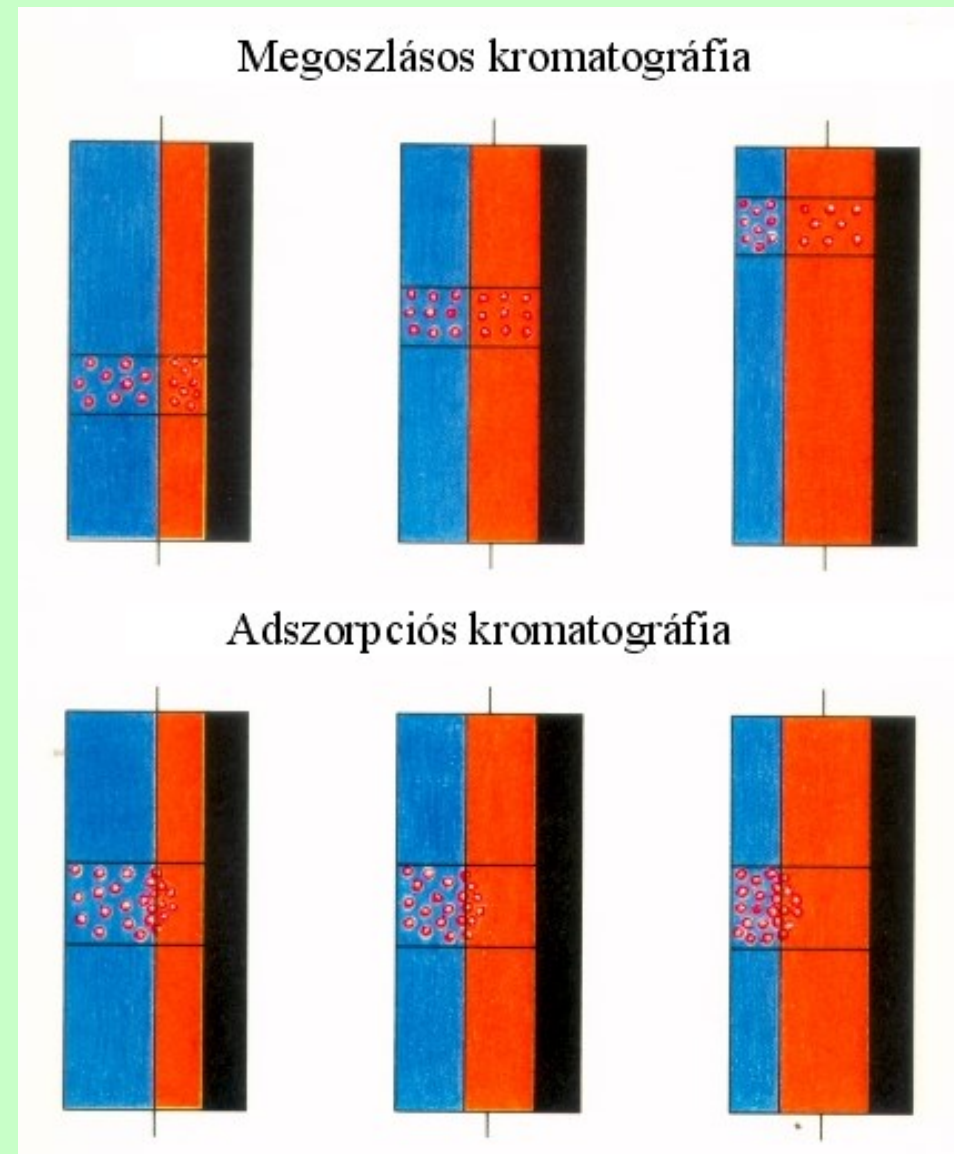


# Fordított fázisú (RP) kromatográfia

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!

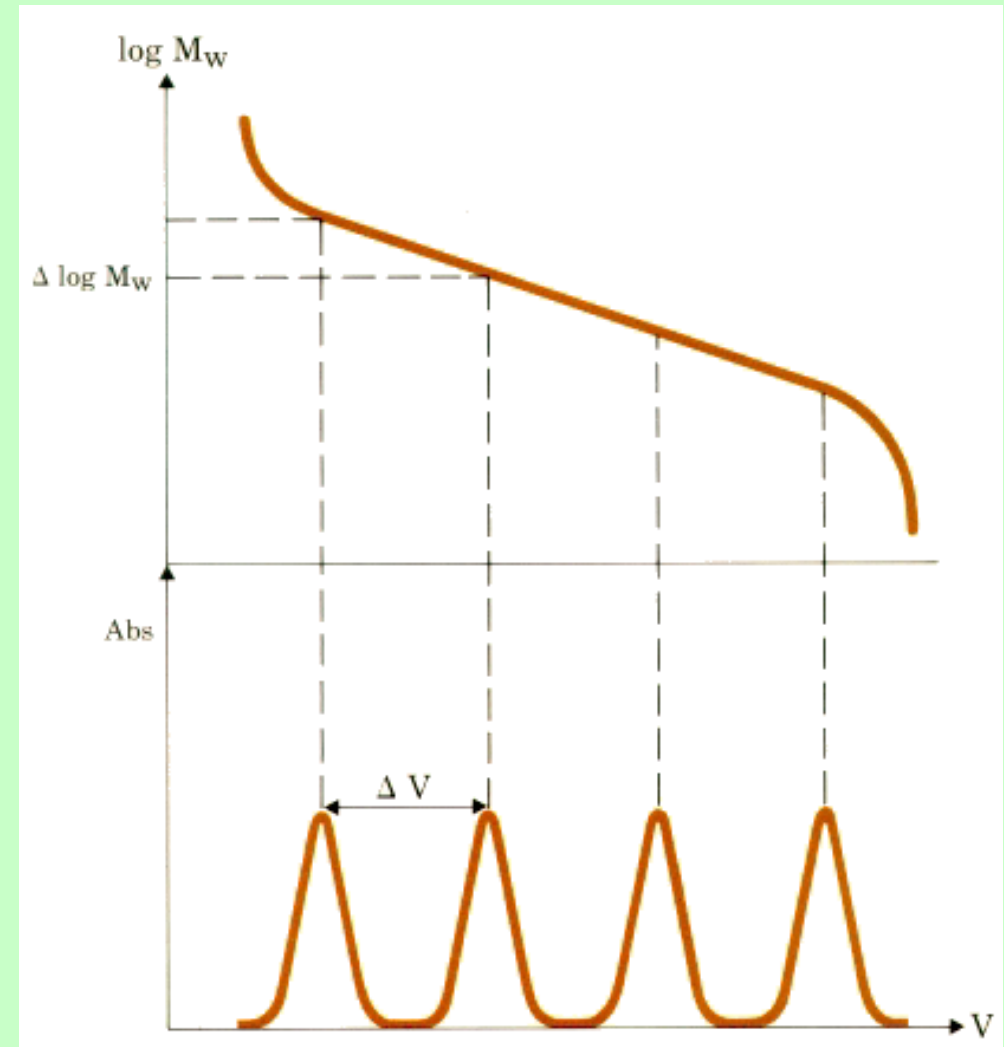


# Gélpermeációs kromatográfia

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

Ez sem ipari léptékű elválasztás, nem foglalkozunk vele.

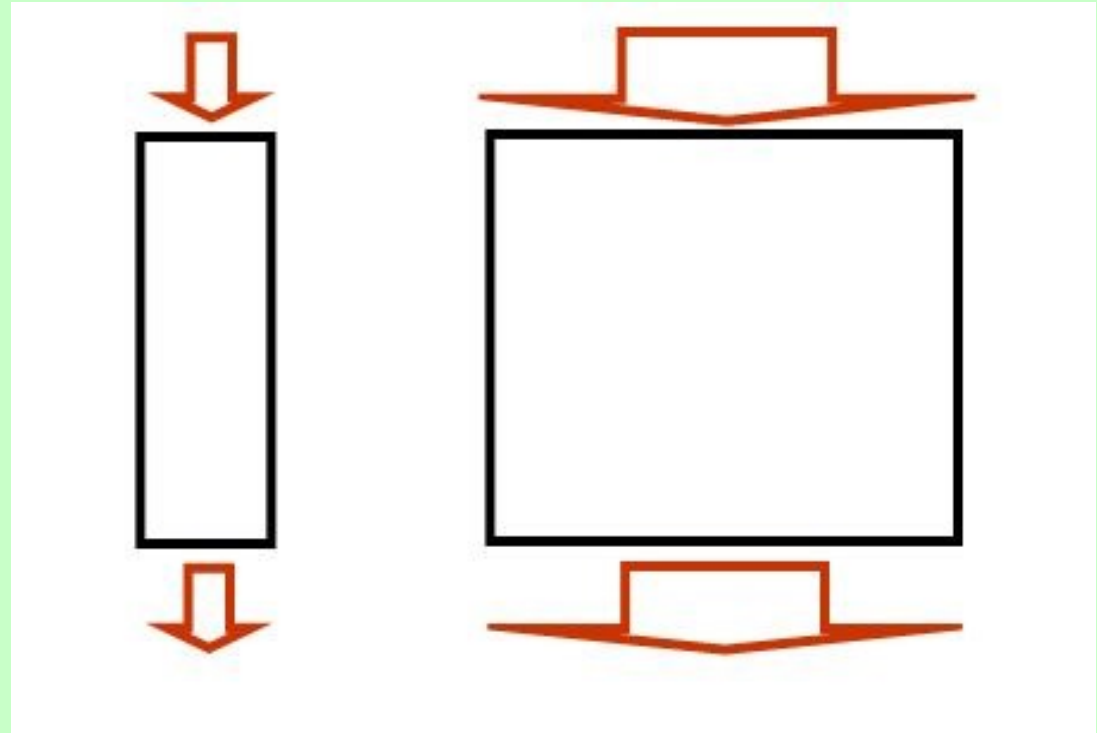
Ld. BIM gyakorlat.



# 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

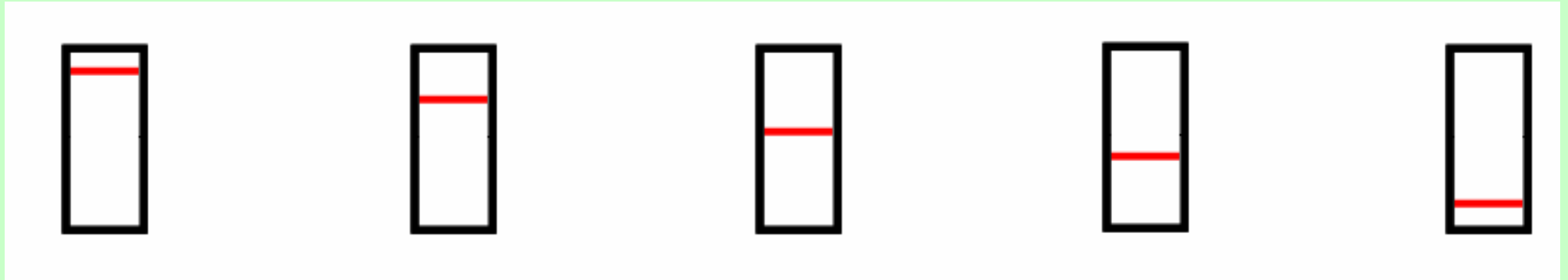




# Ipari méretű ioncserélő oszlopok



# 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.

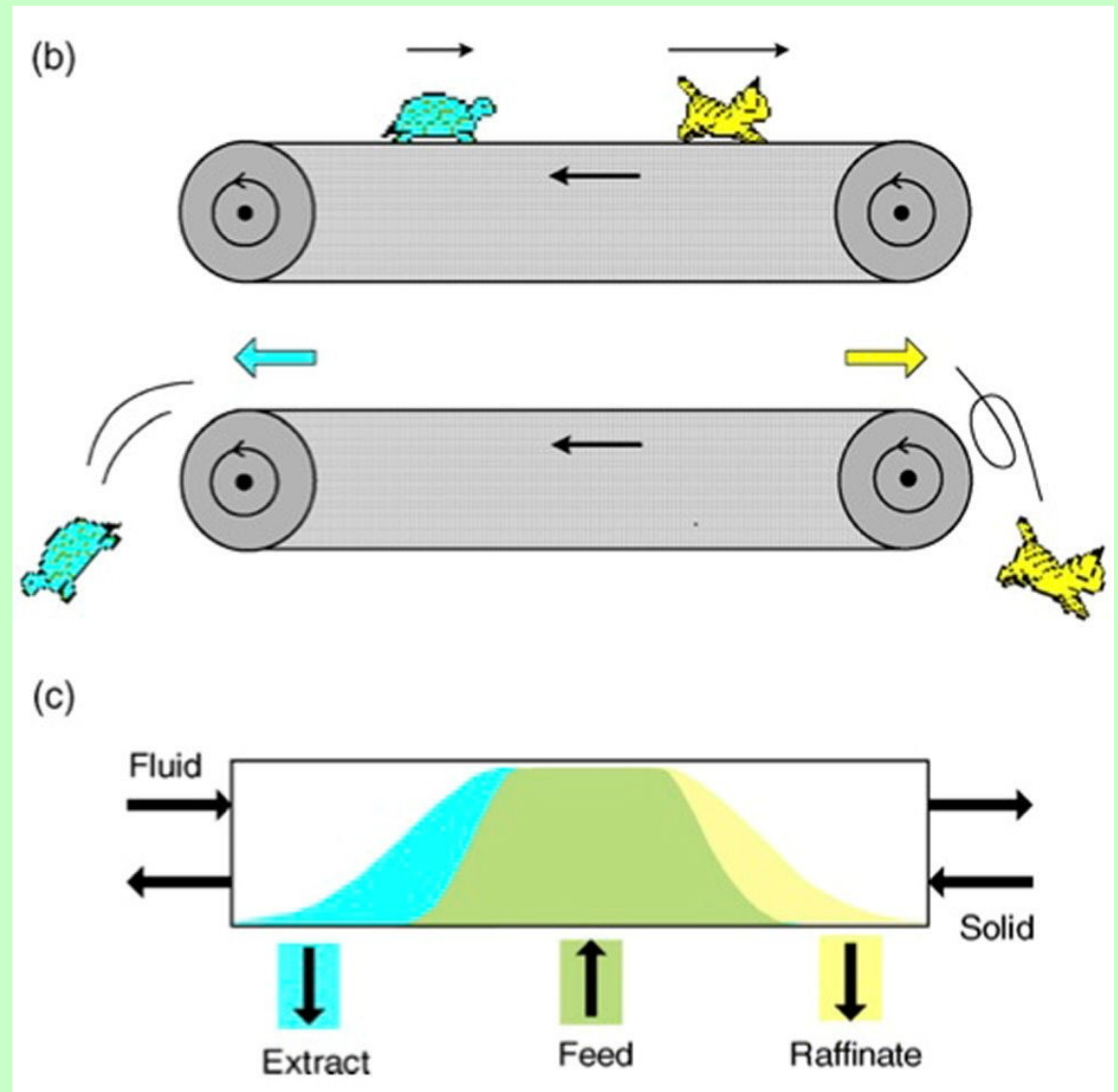
Egy körülfordulás alatt a henger minden alkotója végigmegy a kromatográfia teljes ciklusán.



# Mozgó töltet és szimulált mozgó töltet

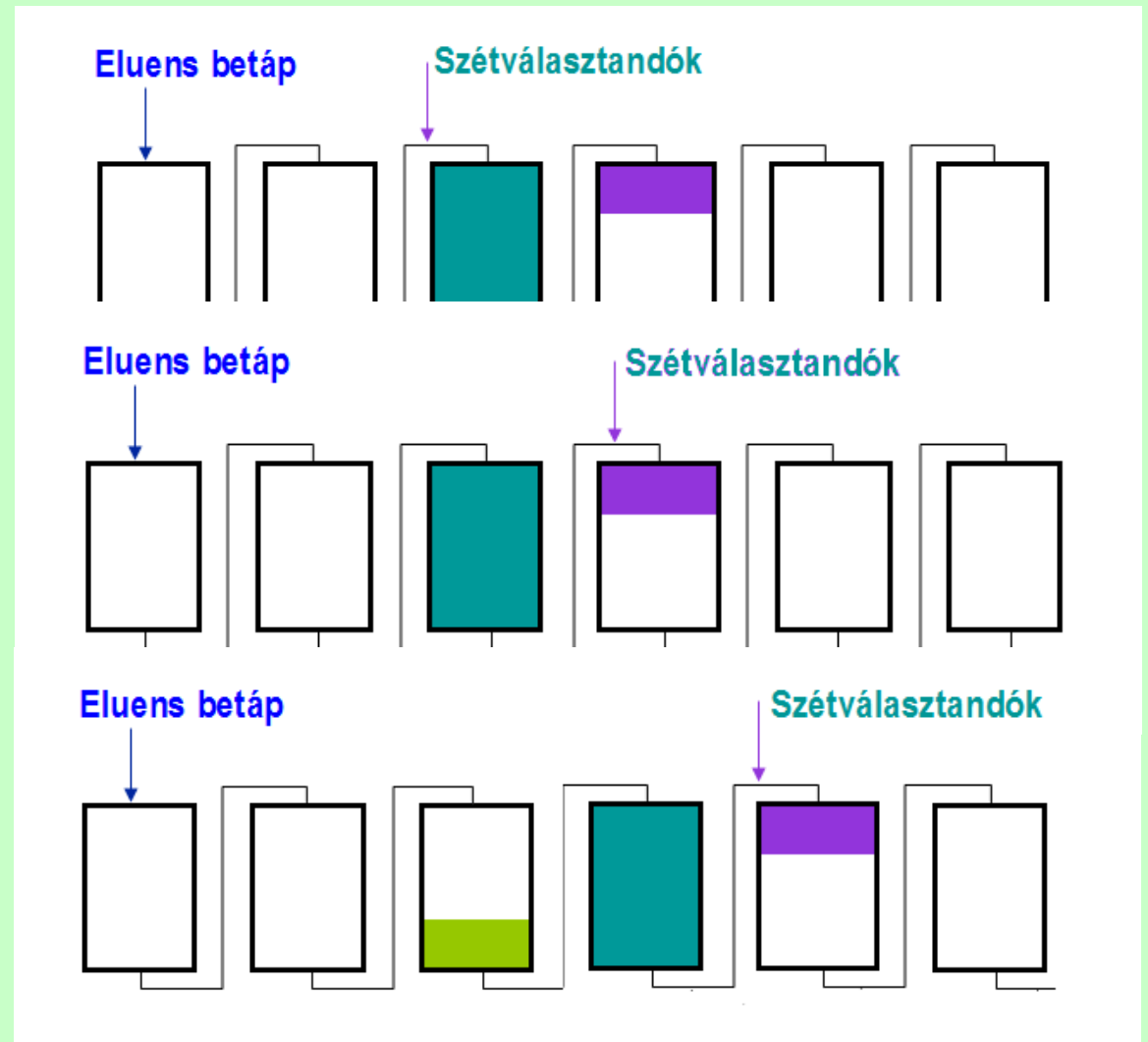
(moving bed és simulated moving bed = SMB)  
Nemcsak a mozgó fázis mozog, hanem a töltet is – ellenkező irányban. A nagy retenciójú komponensek ettől visszafelé mozdulnak el.

A kialakuló koncentrációsprofilok:



# Szimulált mozgó töltet

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

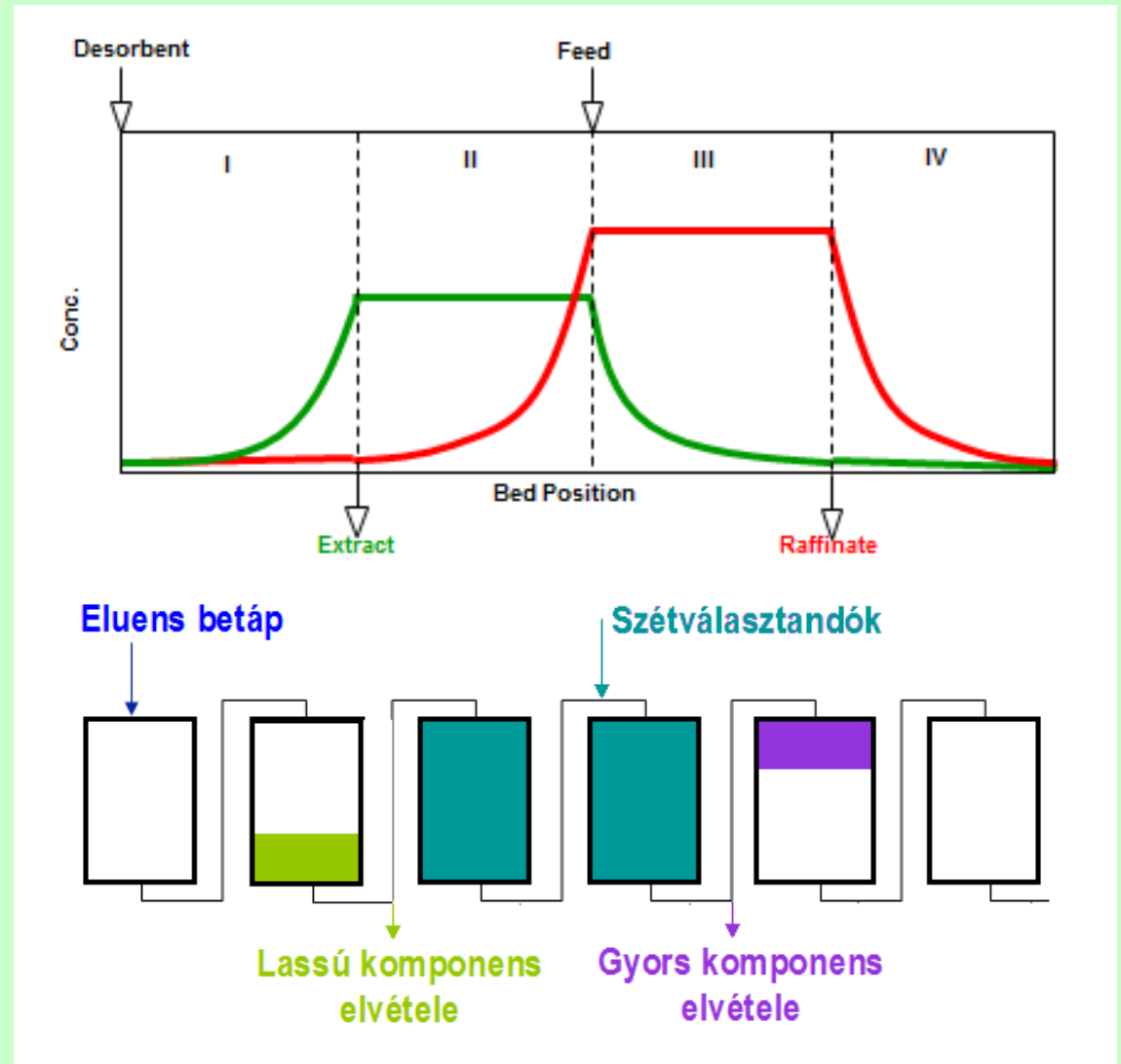




# Szimulált mozgó töltet

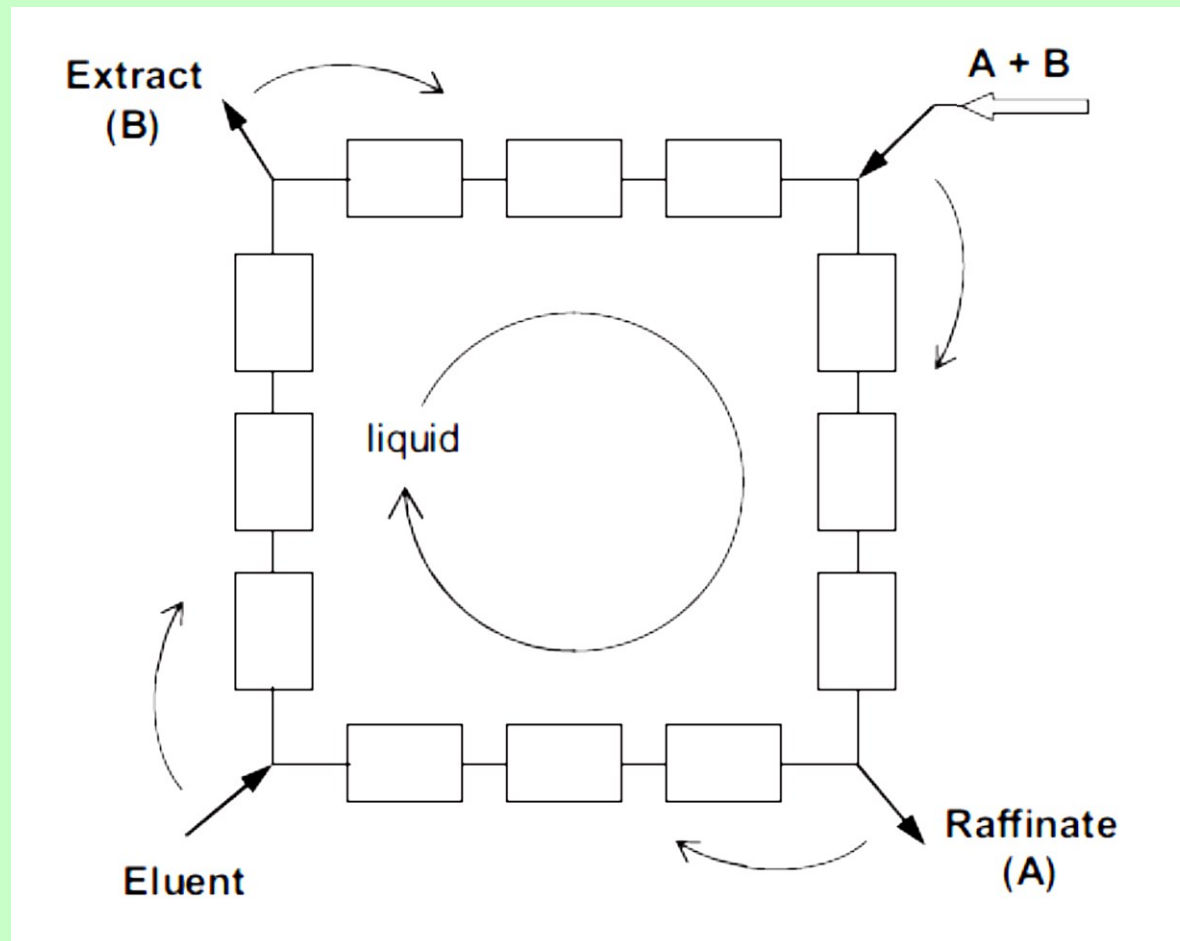
A kialakuló koncentráció profil alakja:

Ennek megfelelően a két komponens tiszta formában elvezethető:



# Szimulált mozgó töltet

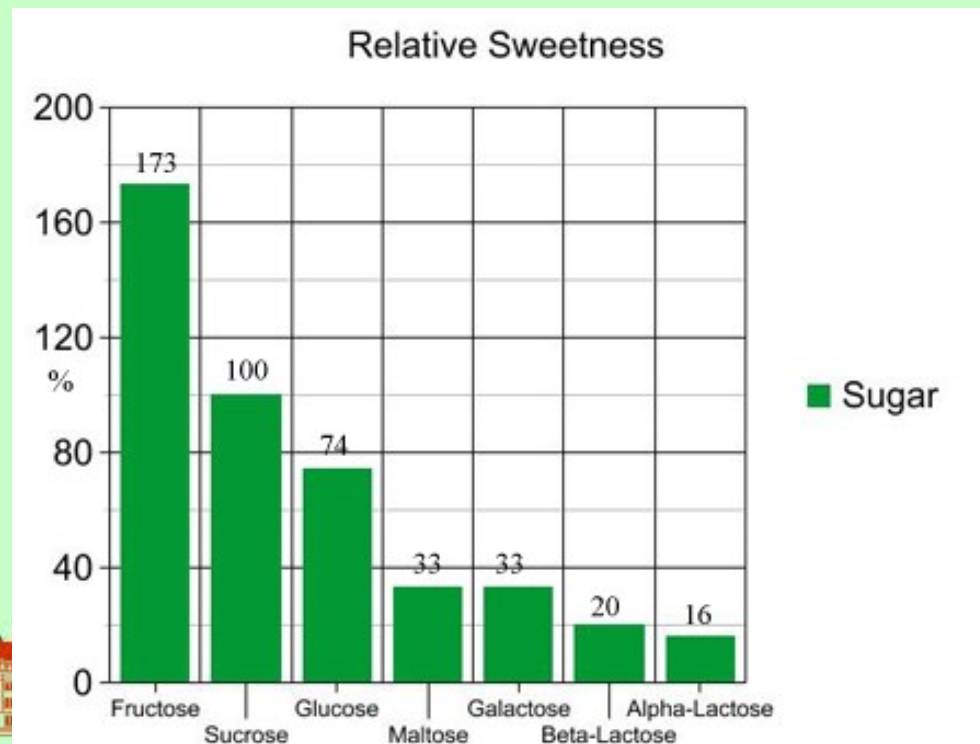
Az oszlopokat célszerű zárt ciklusban üzemeltetni, mindkét fázist folyamatosan körben járatni.





# 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 m<sup>3</sup>-  
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

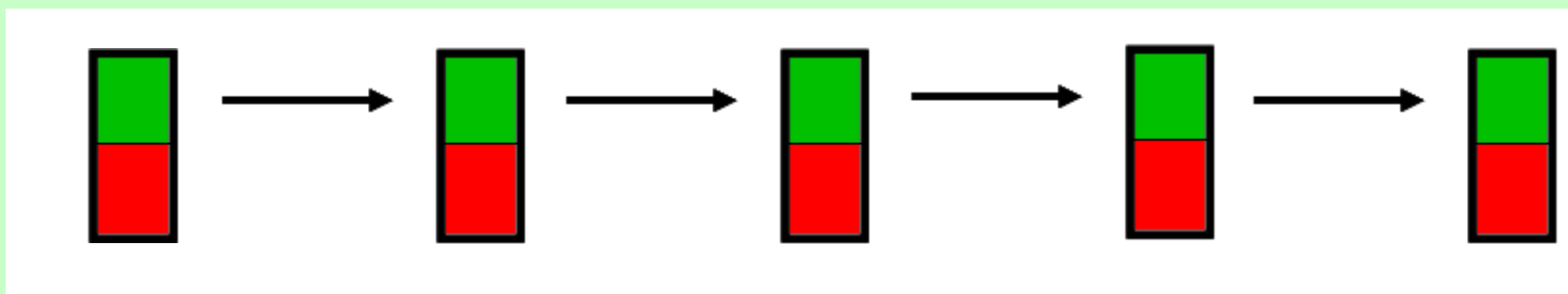
Mind az állófázis, mind a mozgófázis folyadék halmazállapotú

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

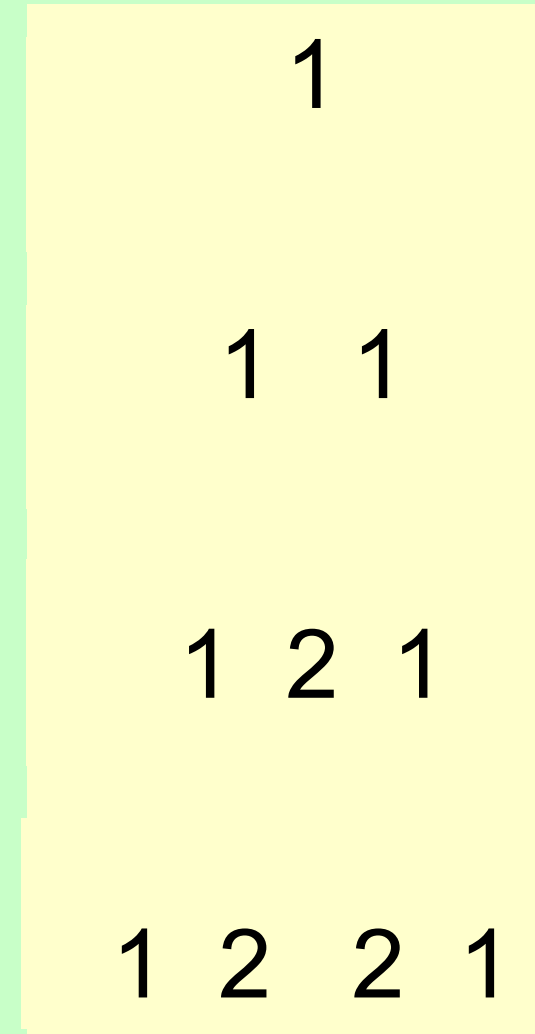
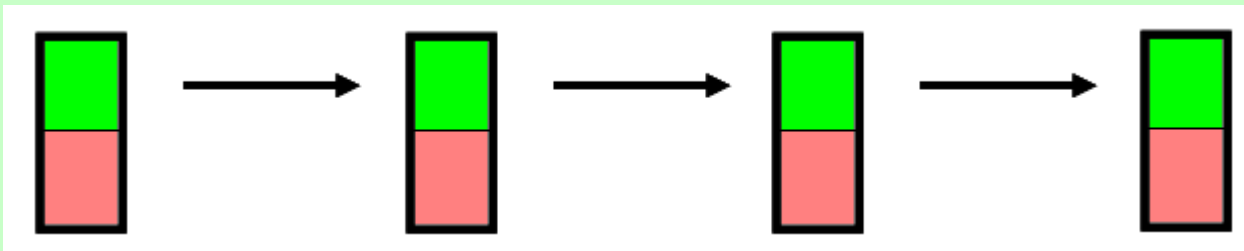
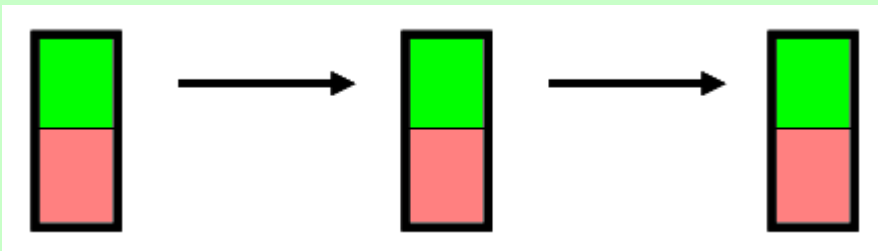
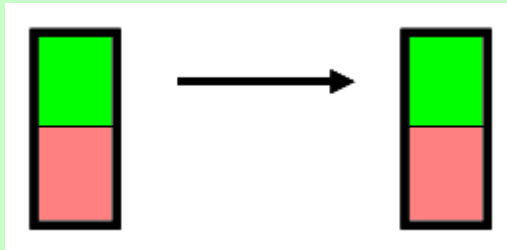
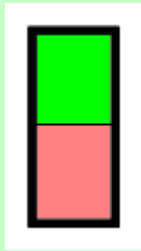


# A megoszlásos kromatográfia elve

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

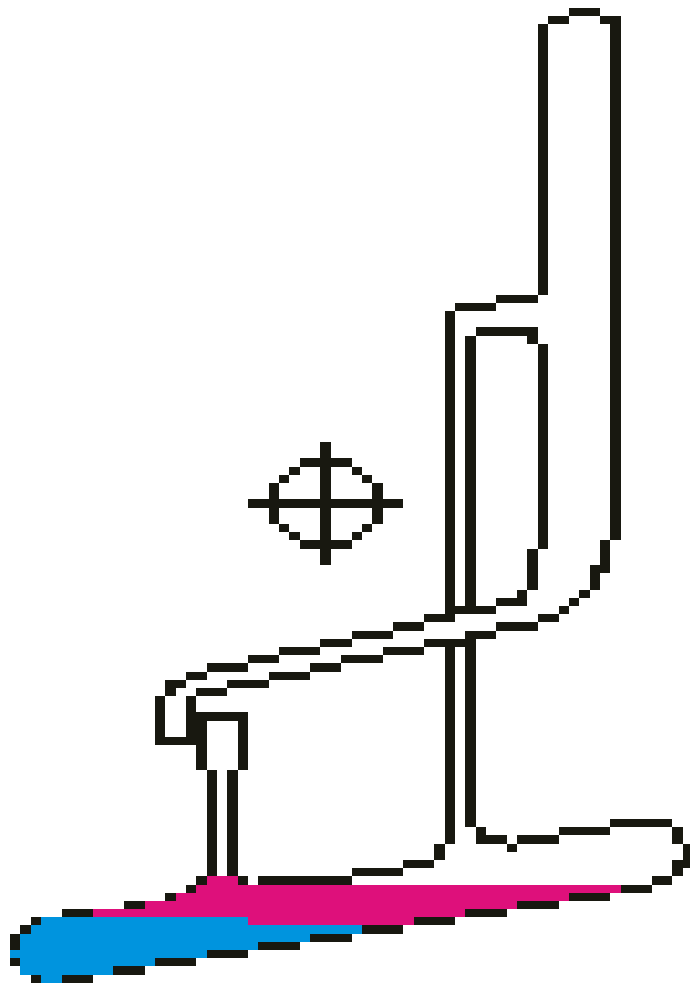


A térfogatok aránya 1:1,  
a bevitt anyag  
mennyisége 1, a  
megoszlási hányados = 1



# A technika őse: Craig-extraktor

START OF CYCLE



ismételt lépé-

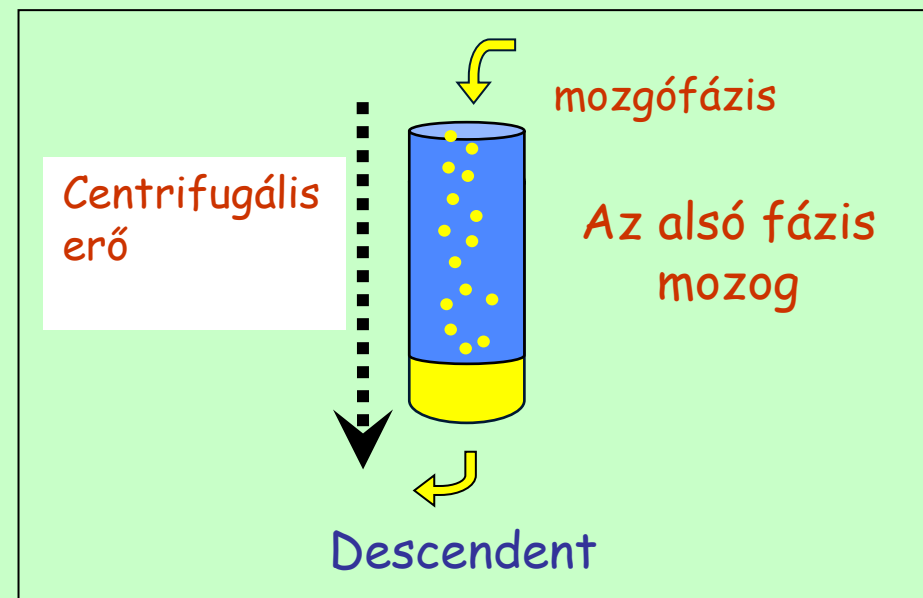
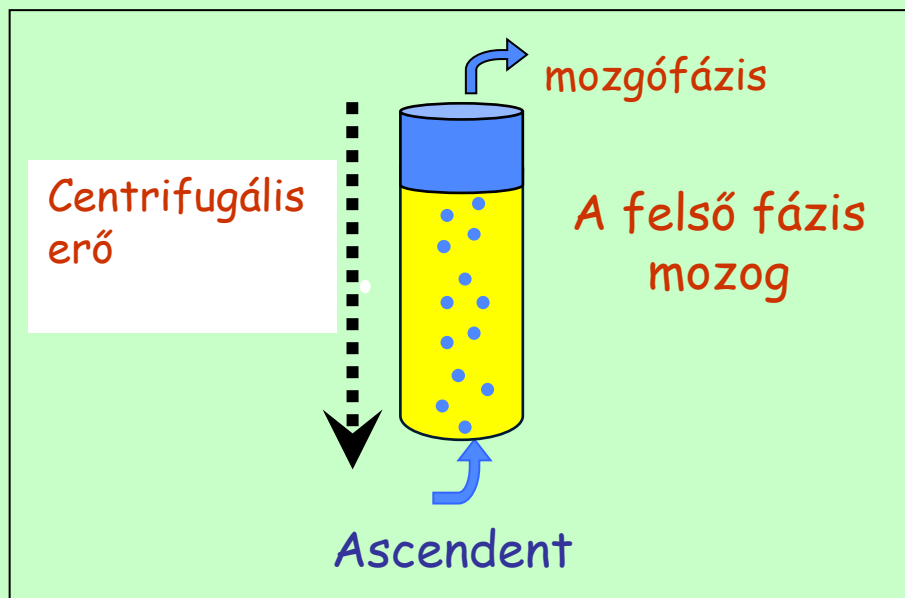


# Centrifugában:

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 csatornáknban csak mozgófázis halad)



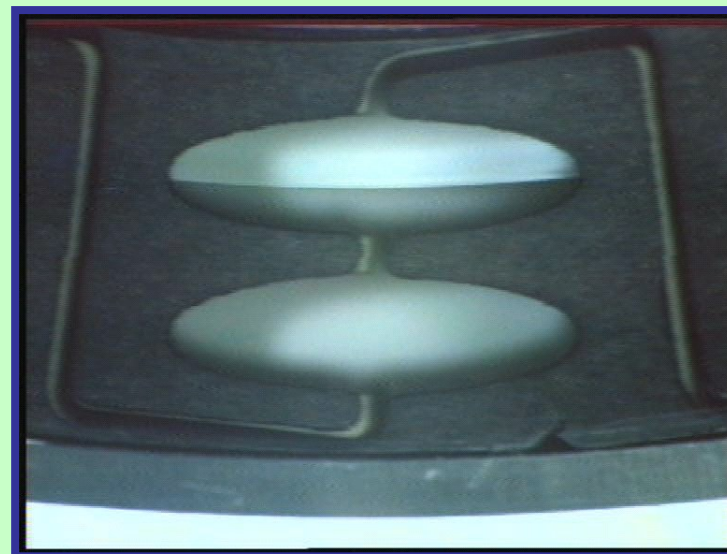
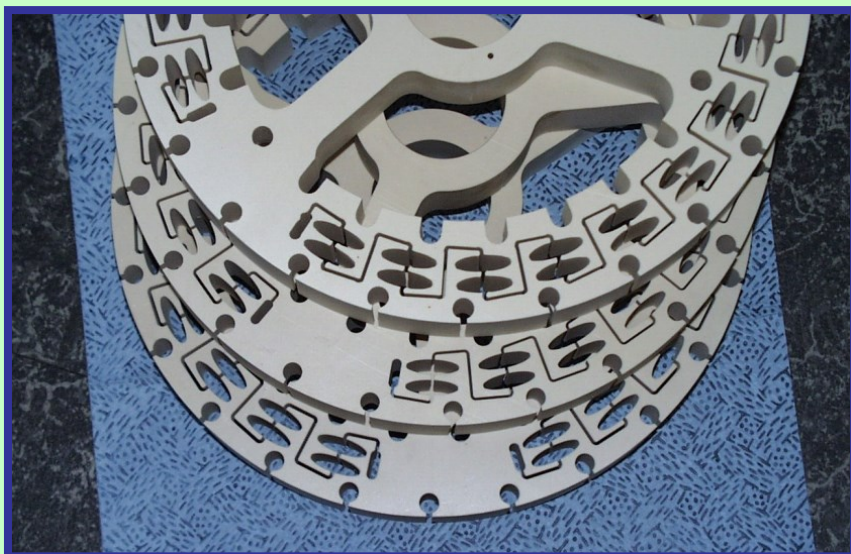
# Modern CPC készülék



Nagy forgási sebesség  
(max. 3000 rpm)

Gyors elválasztás (<1 óra)

Nagy tányérszám (1-2 ezer)



# A rotor feltöltése

- A rotor lassú 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 (holtterfogat)



# 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).

