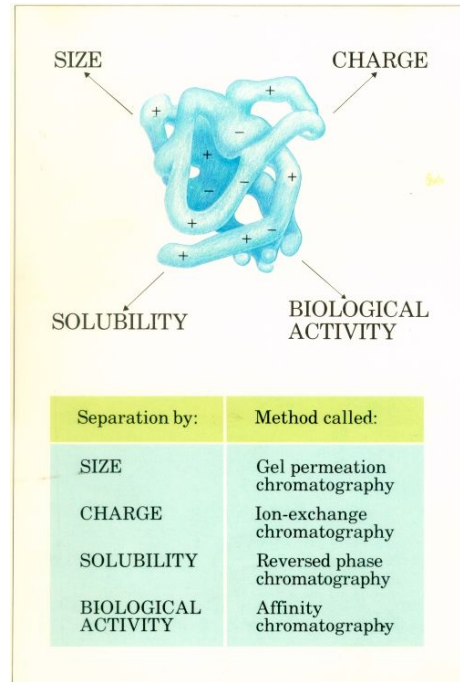


A kromatográfiás módszerek csoportosítása

A kromatográfiás módszereket a céltermék molekula anyagi tulajdonságai alapján csoportosíthatjuk. Az elválasztások alapja, hogy a két szétválasztani kívánt anyagokat a fizikai(-kémiai) tulajdonságaik különbözőségén alapuló fizikai műveletekkel különítjük el egymástól. A kromatográfiát, mint műveletet a sokféle lehetséges szorpciós, megkötődési mechanizmus miatt többféleképpen is meg lehet valósítani. A kötődés változatos lehetőségeit legjobban a fehérje molekulák kromatográfiás elválasztásain lehet bemutatni.

A molekula mérete/tömege szerinti elválasztás a gélpermeációs (kizárásos) kromatográfia, a töltés szerinti az ioncsere kromatográfia, oldhatóság szerinti a megoszlási, adszorpciós kromatográfia és a hidrofób kölcsönhatás (HIC), biokémiai aktivitás szerinti pedig az affinkromatográfia. Fehérjék esetén a fehérje töltöttsége, bizonyos csoportok hidrophil vagy hidrophób jellege, a mérete vagy a biológiai aktivitása (specifikus ligandkötő tulajdonság) lehet az elválasztás alapja. A módszer kiválasztásánál figyelembe kell venni a fehérje stabilitását, a környezet, tehát az oldószer, a pH, az ionerősség és a hőmérséklet viszonyait.



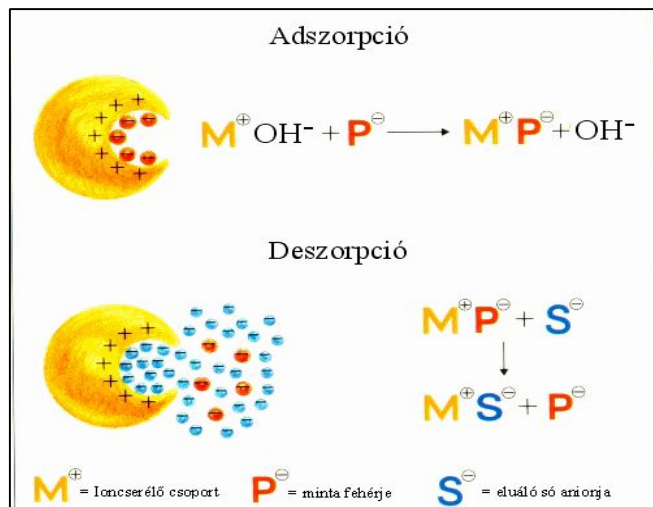
Mielőtt belevágnánk a változatok tárgyalásába, tekintsük át, hogy miben különbözik a most tárgyalt kromatográfia az adszorpciótól. Hiszen mind a kettő szorpción alapul, mindkettőt meg lehet valósítani töltött oszlopban.

Az összehasonlításban elsőként megállpítható, hogy más a két művelet célja. A kromatográfia több hasonló komponens elválasztására szolgál, addig az adszorpciót egy komponens megkötésére, az oldószertől való elválasztására használjuk. Míg a kromatográfiánál az oszlop terhelése a töltet kapacitásának 1-2%-a, az adszorpciónál viszont minél teljesebb kihasználásra, a 100% közelébe törekszünk. Kromatográfia esetén adszorpció és deszorpció dinamikusan, időben egyszerre van jelen, hiszen a komponensek haladnak az oszlopon. A csúcs elején az adszorpció, a végén a deszorpció jellemző. Adszorpciónál nincs értelme retenciós időről vagy térfogatról beszélni, a telítés befejezése után egy eltérő összetételű eluenssel tetszőlegesen időben deszorbeáljuk az anyagot a töltetről.

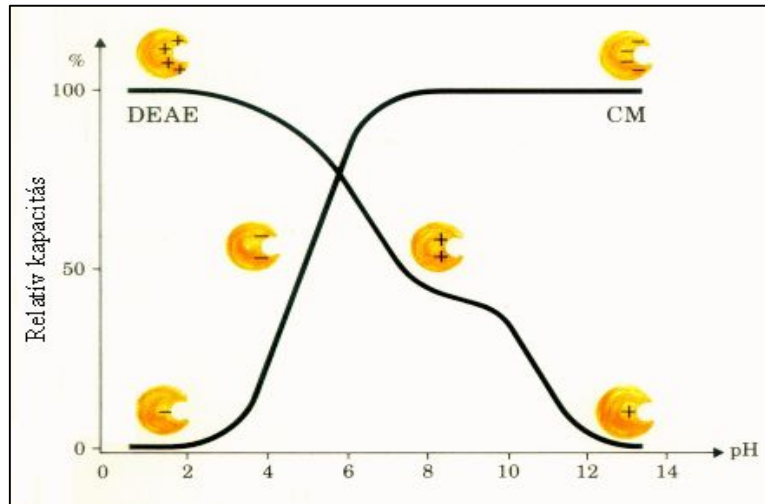
	Kromatográfia	Adszorpció
Cél:	több hasonló komponens elválasztása	egy komponens elválasztása az oldószertől (víztől)
Az oszlop terhelése:	kicsi, a kapacitás max. 1-2 %-a	nagy (→ 100%)
Deszorpció:	egyidejűleg megy végbe, a csúcs „hátsó” oldalán	a telítés befejezése után, eltérő összetételű eluenssel

Ioncsere kromatográfia

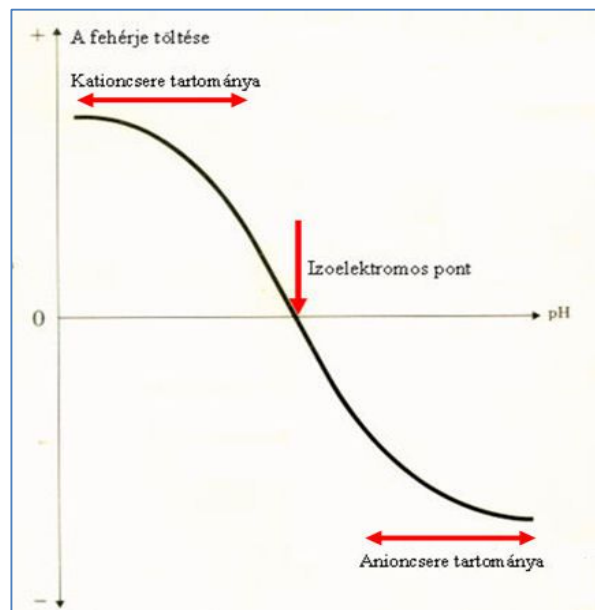
Az ioncsere kromatográfia igen sokféle töltött molekula elválasztására alkalmazható a nagyméretű fehérjéktől nukleotidokig és aminosavakig. Leggyakrabban fehérjék és peptidok elválasztására használják. Alapja, hogy a töltött, elválasztandó terméket az oszlop ellentétesen töltött ioncsereelő csoportja reverzibilisen képes megkötni. A deszorpció történhet állandó összetételű mozgó fázis hatására (izokratikusan) vagy a pH és/vagy a sókoncentráció változtatásának hatására (gradiens elúció). A mozgó fázis ionjai leszorítják a megkötődött komponenseket. Az ionok között versengés lép fel, az oszlophoz erősebben kötődő (pl. kétértékű) ionok leszorítják az elválasztandó anyagot. Ez a gyengébben kötődő ionokkal (H^+ , OH^-) is lehetséges, de ehhez nagy ionkoncentráció szükséges → az oszlop regenerálása tömény savval (kationcsereelő) illetve lúggal (anioncsereelő) történik. A regenerálást értelmezhetjük más oldalról is. A gyantán lévő ionizálható csoportok disszociációja függ a pH-tól. Szélsőséges pH értékeknél az ionizálható csoportok disszociációja visszaszorul, elvesztik a töltésüket, így nem képesek elleniont megkötni. Emiatt az eladdig megkötött komponenseket elengedik, azok a mozgófázissal távoznak. Kvantitatívan ezt a folyamatot a pH-oszlopkapacitás diagramon mutathatjuk be, ami lényegében a töltet titrálási görbéje. A regenerált gyantának nincs töltése, csoportjait a H^+ , illetve OH^- ionok semlegesítik.



A gyantán lévő ionizálható csoportok disszociációja függ a pH-tól. Szélsőséges pH értékeknél az ionizálható csoportok disszociációja visszaszorul, elvesztik a töltésüket, így nem képesek elleniont megkötni. Emiatt az eladdig megkötött komponenseket elengedik, azok a mozgófázissal távoznak. Kvantitatívan ezt a folyamatot a pH-oszlopkapacitás diagramon mutathatjuk be, ami lényegében a töltet titrálási görbéje. A regenerált gyantának nincs töltése, csoportjait a H^+ , illetve OH^- ionok semlegesítik.



Ioncsereelőket csoportosíthatjuk aszerint is, hogy erős vagy gyenge savas illetve bázikus csoportokat tartalmaznak. Az anioncsereelőknél az aminoetil- (AE) és dietilaminoetil- (DEAE) csoport a gyengék (részlegesen protonálódók) közé tartozik. Erős anioncsereelőknél a trietilaminometil- (TAM), trietilaminoetil- (TEAE), dietil-2-hidroxipropilaminoetil- (QAE) csoport szerepel, ezek protonálódása gyakorlatilag teljes. Gyenge kationcsereelő csoportok a karboxil- (C) és a karboximetil (CM), erős kationcsereelő csoport a szulfo- (S), szulfometil (SM) és a szulfopropil (SP) csoport.



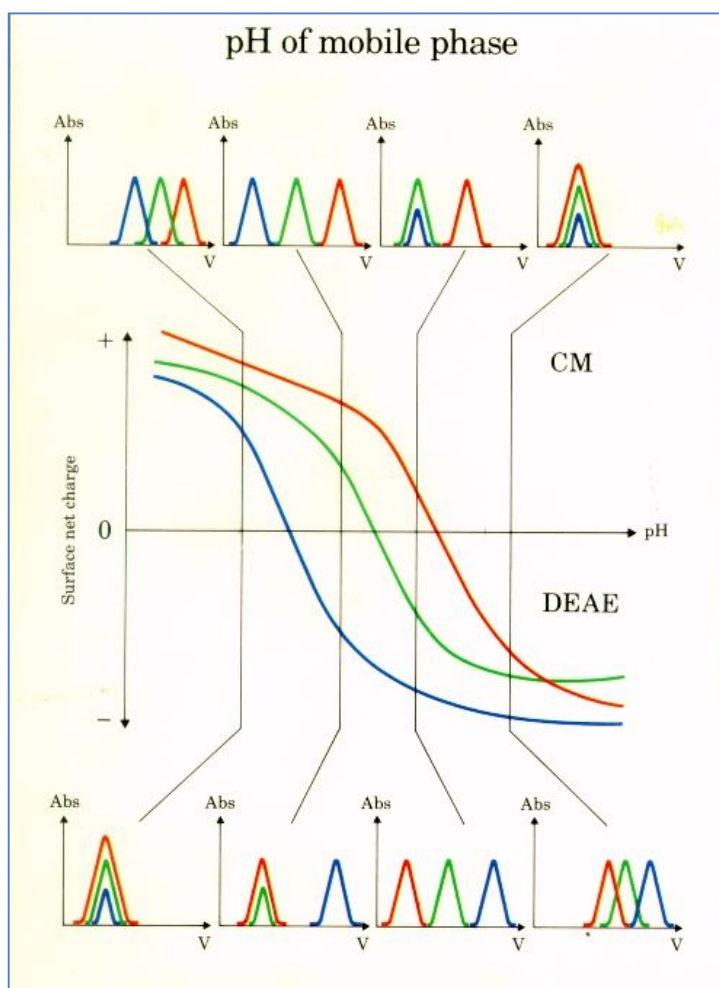
A fehérjék töltése függ a pH-tól. Az aminosav oldalláncok és láncvégek mind savas, mind bázikus ionizálható csoportokat tartalmaznak. Savas közegben ezek protonálódnak, a fehérje ettől pozitív töltésűvé válik. Lúgos közegben éppen ellenkezőleg, a csoportok deprotonálódnak, a karbonsav csoportok negatív töltése válik dominálóvá. Ez azt jelenti, hogy a fehérjék a közeg aciditásától függően kation- és anioncserélő gyantán is megkötődnek. A fehérje titrálási görbéjének nullátmenetén, az izoelektromos ponton a molekula eredő töltése nulla, ekkor egyik ioncserélőn sem köthető meg. Tehát az oszlopon kötött fehérje a töltetről leválasztható, ha a pH-t az izoelektromos pontra állítjuk.

Elválasztás tervezése

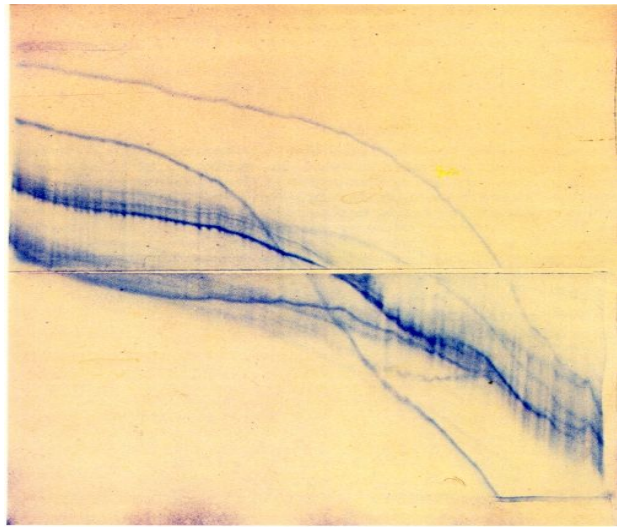
Az alábbi ábrán 3 különböző fehérje titrálási görbéje látható. Gondolatkísérletben megvizsgáljuk az elválasztásokat az állandó pH értéken, izokratikusan végrehatott elválasztások esetén. Felül a kationcserélőn, alul az anioncserélőn kapott elvi kromatogramok sorakoznak.

Nagyon alacsony pH-nál mindegyik fehérje pozitívan töltött, és csak a kationcserélő oszlopon (CM) képes megkötődni. A fehérjéket a nettó töltésük szerinti sorrendben lehet eluálni az oszlopról, mivel a kötődés erőssége a töltés nagyságával jellemezhető. Tehát elúció során az oszlophoz leggyengébben kötődő fehérje jelenik meg először. Ugyanezen pH tartományban egyik fehérje sem képes kötődni anioncserélőn, ezért mindegyik retenció nélkül, együtt halad át (laborszlangban: „átesik az oszlopon”), ezt mutatja az alsó kis kromatogram. Nagyobb pH értéknél

(balról a második függőleges vonal) jobb elválasztást kapunk. Az egyik (itt kézzel jelölt) fehérje töltése már negatív, átléptünk az izoelektromos pontján, tehát kationcserélőn nem fog megkötődni, nem lesz retenciója. A másik két komponens a kationcserélőn jól elválasztható, mert nagy a különbség a töltésük között (felső kis kromatogram). Még nagyobb pH értéket választva (harmadik függőleges vonal) már két fehérje vált át az anionos tartományba. Itt anioncserélő oszlopon kapunk jó elválasztást, az egy kationos fehérje nulla retencióval „átesik az oszlopon”, a két anionos pedig jól elválik egymástól, mert nagy a töltéskülönbség. A legnagyobb pH értéknél valamennyi fehérje anionos jellegű, egységesen az anioncserélőn kötődnek meg, de ez elválasztás nem elég jó, mert kicsi a töltések különbsége, így majdnem egyforma retencióval, átfedő csúcsokkal jelennek meg. Megfigyelhető, hogy a kromatogramok jellege az ábrán centrális szimmetriát mutat. Az átlósan egymással szemben található elválasztások eredménye hasonló, csak a csúcsok sorrendje fordul meg.



Összességében jól látható, hogy a titrálási görbék ismeretében az elválasztás tervezhető, kiválaszthatjuk az optimális pH értéket. Ezeket a titrálási görbéket elektrofókuszáló elektroforézissel lehet felvenni. Az ábrán marha izomfehérjék titrálási görbéi láthatók. Minden egyes kék vonal egy-egy fehérjekomponens titrálási görbéjét rajzolja ki.

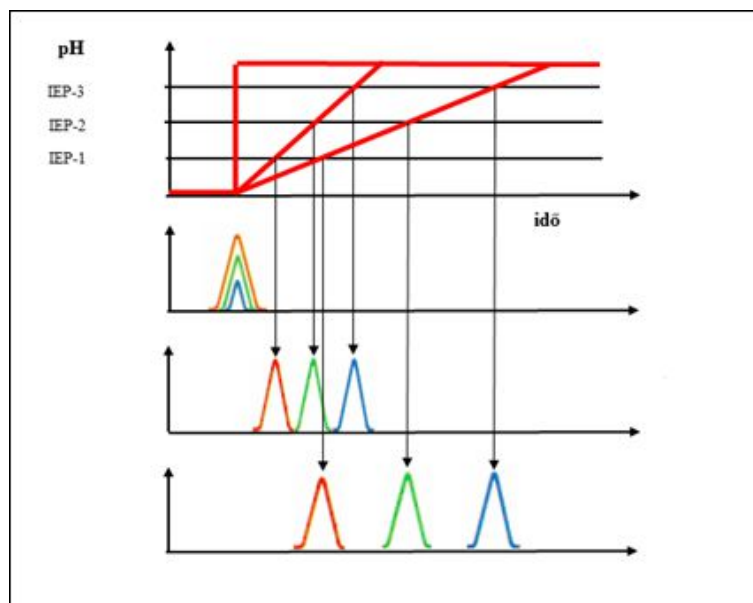


Titration curve of bovine muscle proteins produced by electrofocusing – electrophoresis

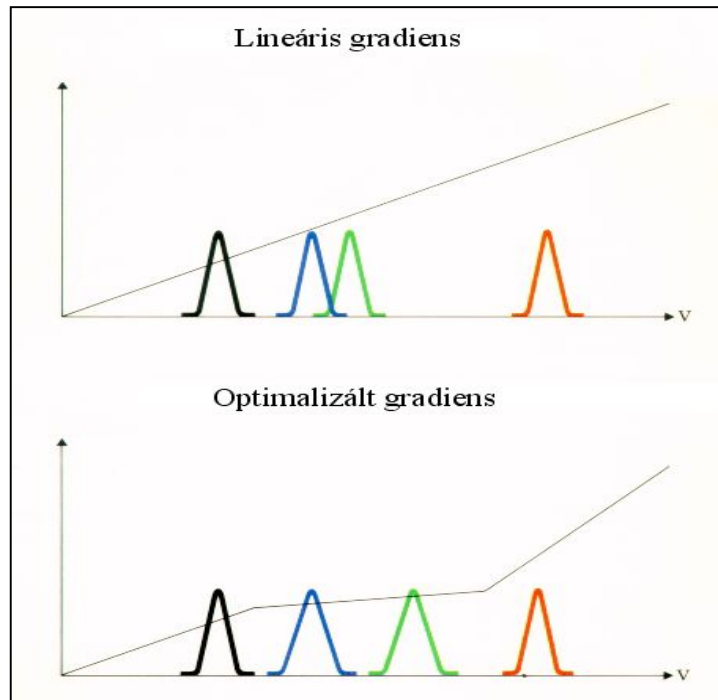
A pH gradiens hatása

Izokratikusnak nevezzük azt az elválasztást, ahol az eluens összetétele (pH-ja és ionerőssége) időben állandó. Eltérő technika a gradiens elúció: a pH és/vagy az ionerősség időben változik.

Ha a pH változtatás során áthaladunk egy fehérje izoelektromos pontján, az elveszti a töltését, és leválik az oszlopról. Így a különböző IEP-jű fehérjéket szelektíven, egyenként tudjuk leválasztani a töltetről. Kérdés, hogy milyen gyors legyen a pH változás sebessége. Vizsgáljuk meg ezt három eltérő IEP-jű fehérje esetén (ábra). Ha a pH változás ugrásszerű, lépcsős, a fehérjék egyszerre válnak le a töltetről, nincs elválasztás. Lassabb változtatás beállításával a pH egymás után, időben elkülönülve éri el az egyes IEP-eket, így a csúcsok is eltérő időben jelennek meg. Ezt a mechanizmust követve arra jutunk, hogy minél lassabb a változás, minél „laposabb” a gradiens, annál jobb az elválasztás, mert annál nagyobb lesz az időkülönbség az egyes csúcsok megjelenése között. Eszerint a „leglaposabb” gradiens a leghatékonyabb, határértékben az izokratikus elúció. Ez a gondolatmenet azonban nem veszi figyelembe csúcsok kiszélesedését, pontosabban az axiális diffúzió hatását. Minél hosszabb időt tölt az anyag az oszlopban, annál szélesebb csúcsot kapunk (ld. az Analitika tárgyban). A későn jövő, lemaradó csúcsok jobban kiszélesednek, mint kis retenciós időnél. A gradiens meredekségének megválasztásánál két ellentétes hatás között kell megtalálnunk az optimumot. A meredekség csökkentése javítja a szétválasztást, ugyanakkor fokozza a sávok kiszélesedését.

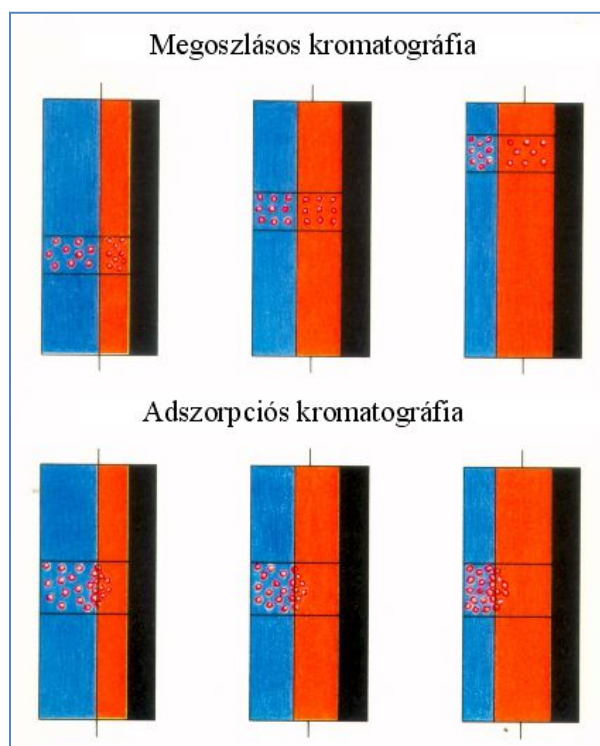


A gradiens profilját nem feltétlenül szükséges egyetlen lineáris szakaszként definiálni. Ha szükséges, összeállíthatjuk több szakaszból is. Ahol növelni szükséges a szelektivitást, ott laposabb szakaszt iktathatunk be, illetve a végén meredekebb változtatással akadályozhatjuk meg a csúcsok szétkenődését.



Fordított fázisú (reverz phase, RP) kromatográfia

A fordított fázisú kromatográfia a mintakomponensek hidrofób tulajdonságán alapul. Az RP kromatográfias oszlopban a töltet apoláris és a mozgó fázis poláris jellegű. (Ezt a párosítást nevezzük fordított fázisúnak. Régen, a kromatográfia hőskorában a töltet volt poláris jellegű, pl. szilikagél, és az eluens egy apoláris oldószer, pl. benzol, hexán, stb. Ez a direkt fázisú kromatográfia, később a polaritás megcserélésével jött létre a fordított, reverz fázisú kromatográfia.) A töltet apoláris jellegét alkil láncokkal való borítással érik el, a különböző töltetek nevüket az alkil lánc hosszáról kapták (pl. RP-2, RP-8, RP-18 = etil-, oktil-, oktadecil csoportok). Az ilyen hidrofób töltet alkalmas megoszlásos, adszorpciós, és hidrofób kölesönhatás (HIC) kromatográfiára. A megoszlásos kromatográfia esetén a hidrofil fázis teljes térfogatában kötődik az anyag, minél hosszabb az alkil lánc, annál nagyobb a rendelkezésre álló oldószertérfogat, ezzel a retenció. Adszorpciós kromatográfia esetén csak a felületen képes kötni az anyag, az alkil lánc hosszától független a kötődés.



A mozgó fázis polaritásának csökkentése csökkentheti a hidrofób kölcsönhatások erősségét/ kialakulásának lehetőségét is. A fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezete nagymértékben függ a hidrofób kölcsönhatásoktól, mint a szerkezetet stabilizáló erőktől. A fordított fázisú eluenseket így a hidrofób kölcsönhatások gyengítésére alkalmazzák, tehát a potenciális denaturálószerkezetek közé tartoznak. Ezért a fehérjék RP-kromatográfiája precíz egyensúlyozást kíván a deszorpció és a denaturálás között, az optimum beállításánál ügyelni kell arra, hogy a fehérjék irreverzibilisen ne változzanak meg.

Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia (Hydrophob interaction chromatography, HIC)

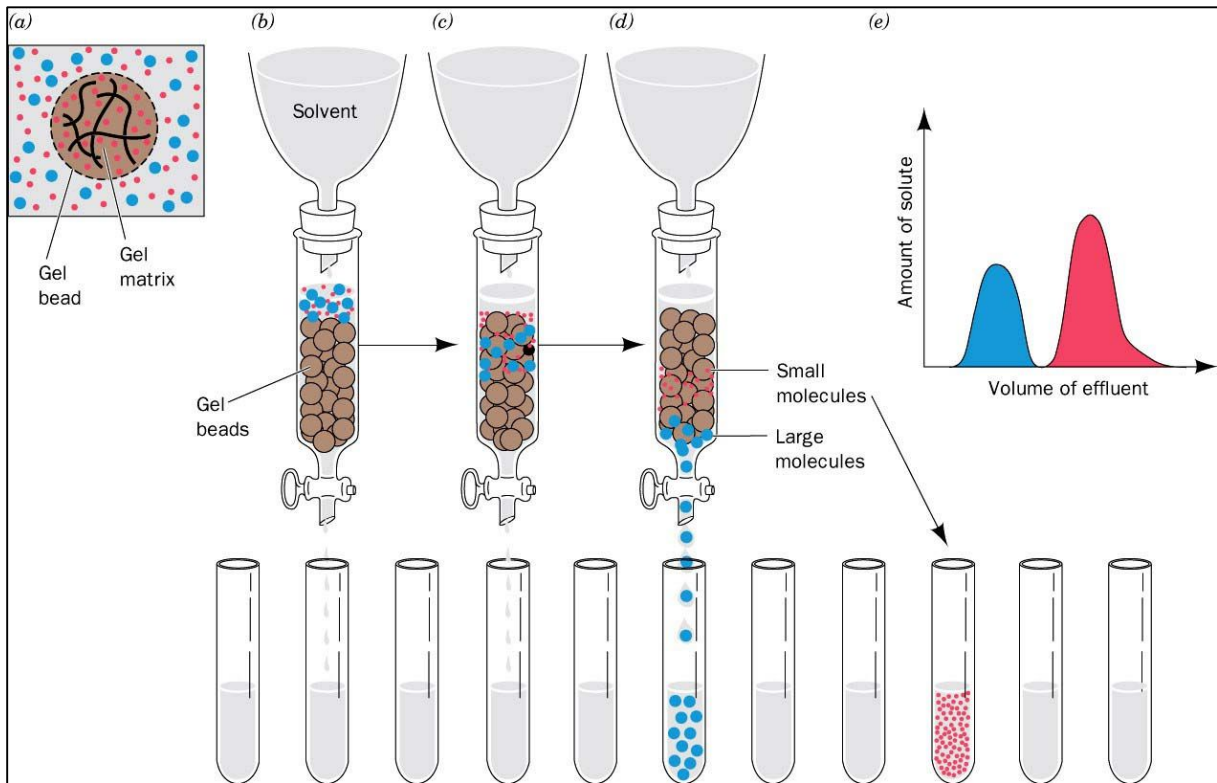
A HIC az adszorpciós RP kromatográfia speciális esete. Lényegében a fehérjéket tesztjük hidrofóbbá a következő elv alapján: A tömény sóoldatok (1-2 mólos KCl) polaritása nagyobb, mint a híg oldatoké. Ezekben a csak a legpolárosabb fehérjék oldódnak jól, a kevésbé polárosak oldhatósága romlik. Ezt a jelenséget értelmezhetjük úgy is, hogy a só hatására a fehérjék hidratburka gyengül, ettől hajlamossá válnak az apoláris töltet felületén megkötődni. A deszorpciót csökkenő sókoncentrációjú gradiens elúcióval hajtjuk végre: a mozgó fázis polaritásának csökkentésével a fehérjék a polaritásuknak megfelelő sorrendben fognak deszorbeálódni.

Gélpermeációs/méretkizárásos kromatográfia (gél-szűrés)

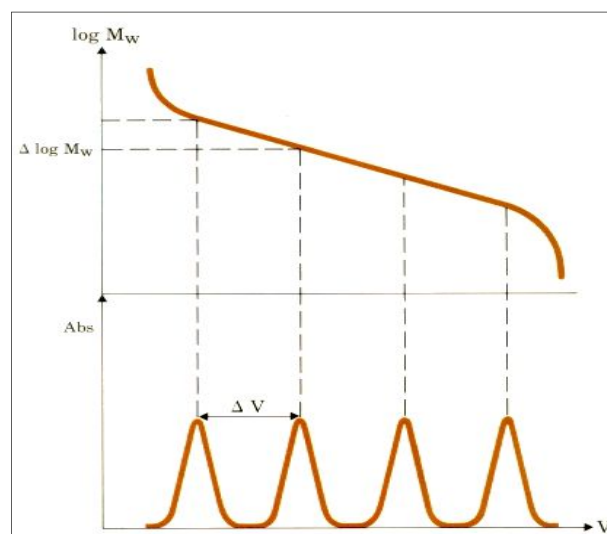
(Ld. BIM labor kromatográfiai gyakorlatát) A gélkromatográfiánál az elválasztás a molekulák közötti méretkülönbségen alapul. Az oszloptöltet gyöngyei különböző átmérőjű pórusokat tartalmaznak. A nagyméretű fehérjék csak a töltet köz-



ti hézagterfogóban tudnak mozogni, míg a kisebb méretű molekulák minden pórusba behatolnak, így a töltet belsejében is haladva összességében több időt vesz igénybe az oszlopon való áthaladás. Így a nagyobb molekulák jelennek meg először az oszlop végén.

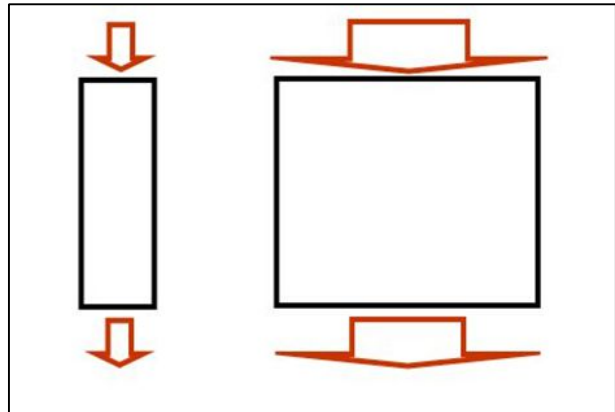


A gélkromatográfia esetében a retenció mértéke nem-lineáris kapcsolatban van a molekula mérettel. Féllogaritmikus ábrázolásban a kapcsolat jellemzően egy S-görbét ad, amelynek inflexiós szakasza közel lineárisnak tekinthető, itt lehet a móltömeget kvantitatívan meghatározni.



A kromatográfias oszlopok lépték-növelése

Ha kis léptékben sikeresen kialakítottunk egy kromatográfias elválasztást, kérdéses, hogy ugyanazt nagyobb, ipari méretekben hogyan lehet reprodukálni. Azonos álló és mozgó fázis esetén hogyan kell az oszlop geometriáját megváltoztatni, hogy ugyanolyan elválasztást kapjunk? A hasonlóságot mikroméretekben kell fenntartani, azaz egy töltésemecse környezetében szükséges ugyanolyan áramlási viszonyokat biztosítani. Ezt pedig azonos lineáris sebesség beállításával érhetjük el. Az áramlási sebességet a térfogatáram és az áramlási keresztmetszet hányadosával fejezhetjük ki. A nagyobb feldolgozandó oldatmennyiséggel arányosan kell megnövelni az oszlop keresztmetszetét. Az oszlop hosszát ugyanakkor a lépték nem befolyásolja. Ha egy bizonyos oszlophosszon sikerült megfelelő elválasztást létrehozni, akkor a nagyobb mennyiségeknél is ugyanakkora hossz szükséges. Így alakul ki az ipari kolonnák jellegzetes „kövér” alakja, a magas, karcsú oszlopok helyett az l/d viszony 1 körülire, vagy ez alá csökken.



Az ilyen nagy átmérőjű kolonnánál külön problémát jelent az egyenletes áramlás biztosítása az egész keresztmetszetben. A töltet tetején a mozgó fázis eloszlását, illetve alján a kilépő folyadék összegyűjtését bonyolult csatornahálózat biztosítja.

Folytonos kromatográfia

Bár a kromatográfia szakaszos működésű művelet, több kromatográfias oszlop körbe kapcsolása során az elválasztás kvázifolytonossá tehető. Az egyes oszlopok ciklikusan működnek, de közöttük fáziseltolódás van. Az oszlopok számát, és a fáziseltolódást úgy kell megválasztani, hogy a ciklus záródjon, a legutolsó lépést végrehajtó, és a legelső lépést végző oszlop között is ez az állandó fáziseltolás legyen. Az elválasztandó anyag betáplálása folyamatosan történik, de körforgásban mindig más és más oszlop tetejére kerül. A többi oszlopra egyenletesen az eluent táplálják be. Az oszlopon alján állandóan távozik a mozgó fázis. Állandósult retenció esetén a minta beadásához képest állandó késéssel, azaz állandó szögelfordulással lépnek ki az egyes elválasztott frakciók, ezek elvétele is folyamatosan végezhető.



E megoldás továbbfejlesztése egy olyan berendezés, amelyben a körben található oszlopokat egy hengerpalást alakú, lassan forgó töltetággal helyettesítjük. A henger minden alkotója megfelel egy-egy oszlopnak, a köztük lévő válaszfalak hiánya nem okoz elvi problémát. Az anyagfelvitel egy ponton, folyamatosan történik, alul több fix ponton lehet elvenni az elválasztott komponenseket. Egy körfordulás alatt a henger minden alkotója végigmegy egy teljes cikluson.



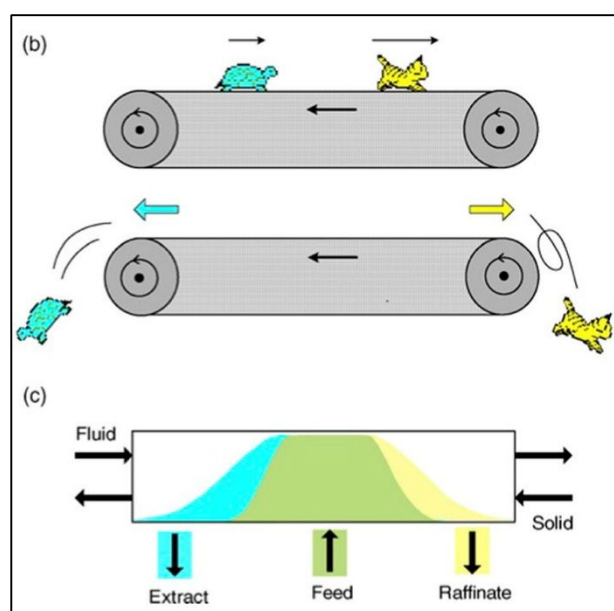
A mozgóágyas kromatográfia

Az eljárás lényege egy olyan kromatográfias művelet kifejlesztése, amelyben a szilárd- és a folyadékfázis egymással ellenáramban mozog folyamatosan.

A műveletet egy kétkomponensű, „A” és „B” komponenseket tartalmazó folyadék-elegyre vonatkozóan mutatjuk be. Az „A” komponens legyen az adszorbensen az erősebben, a „B” pedig a gyengébben kötődő komponens.

A valódi mozgóágyas kromatográfia során az adszorbens folyamatosan mozog felülről lefelé az eluens pedig vele ellenáramban halad a berendezésben. Az „A” + „B” elegyet az oszlop adott pontján (F; Feed) folyamatosan adagolják be a rendszerbe. Az adszorpciós megoszlási jellemzők és a szilárd-folyadék fázisok áramlási sebességének arányában az „A” komponens erősebben kötődik meg az adszorbensen, és emiatt azzal együtt az oszlop alja felé halad, míg a „B”, mivel kevésbé jól adszorbeálódik, az eluenssel az oszlop teteje felé vándorol. Az oszlop két elvételi pontján, az extraktum és a raffinátum áramokban az „A” és a „B” komponens a betáplálástól eltérő koncentrációban fog megjelenni. Az extraktum az „A” komponensben lesz gazdag, a raffinátum pedig a „B”-ben.

A betáplálási és elvételi pontok négy részre osztják az oszlopot, ezek alapján mutatható be a művelet elmélete. Az oszlop I. szegmensében, amely a kolonna aljától az extraktum elvételi pontjáig tart, tisztítjuk meg az adszorbent a megkötődött komponensektől az eluens segítségével. Az oszlop-rész feladata tehát a szilárd fázis teljes rege-

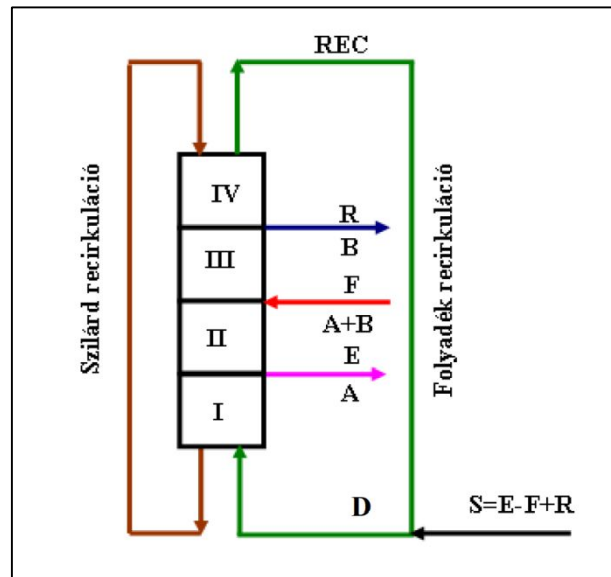


nerálása, mert ha a regenerálás nem tökéletes, akkor a felső ponton visszavezetett adszorbens „A” és „B” tartalma le fogja rontani a művelet hatékonyságát.

A II. szegmens az extraktum kilépési pontjától a betáplálási pontig tart. Ebben a részben a lefelé haladó adszorbensről az összes „B” komponens deszorbeáltatni kell az adszorbensről, azon csak „A” komponens maradhat, különben az extraktum-áram „B” komponenssel lesz szennyezett.

A III. szegmens, amely a betáplálási pont és a raffinátum elvételi pont között helyezkedik el, feladata a betáplált elegy megtisztítása az „A” komponestől. Mivel a raffinátumban csak tiszta „B” komponens szeretnénk kapni, ezért a szegmensben adszorbeáltatni kell a teljes „A” mennyiséget.

A IV. szegmensben, amely a raffinátum elvételtől az oszlop tetejéig tart, mindkét komponensnek tökéletesen meg kell kötődni az adszorbensen. A recirkulálandó eluens nem tartalmazhat „A” és „B” komponenseket, mert azok az oszlop alján megjelenve szintén lerontják az elválasztás hatékonyságát.



Adalék: Először a művelet megvalósításánál a szilárd fázis mozgatására fluidizációs műveletet alkalmaztak, azonban az alkalmazás során derült fény a módszer nagy hibájára, ami a fluidizáció jellegéből következik. A fluidizált szilárd fázis a mozgatás során számottevő mennyiségben visszakeveredik, és ez nagymértékben rontja az elválasztás hatékonyságát.

A probléma megoldására dolgozta ki 1964-ben Higgins a pulzáló ágyas műveletet, melynek során a szilárd réteget pulzáló, egyenként fluidizált szakaszokra bontják, így akadályozva meg a visszakeveredést.

A legújabb TMB eljárások során mágnesesen stabilizált fluid ágyat alkalmaznak. Előnye az, hogy a mágneses térben a megfelelően előkezelt adszorbens visszakeveredése minimális lesz, és kicsi a művelet során fellépő nyomásvesztés, azonban hátránya a módszernek, hogy speciális mágneses tulajdonságú adszorbenst igényel. Az ilyen adszorbensek gyártása a mai korlátja a művelet elterjedésének.

A TMB technikában az I-IV. szegmensek egyetlen oszlopon belül helyezkednek el, ezért a töltet visszakeveredése a rendszer egyik legnagyobb problémája. Ennek a problémának a kiküszöbölése olyan rendszer megvalósításával érhető el a legegyszerűbben, ahol a fenti szegmenseket térben elválasztjuk egymástól és az elválasztott részek megfelelő kapcsolásával valósul meg a művelet. Az ilyen berendezéseket nevezzük szimulált mozgóágyas folyadék-kromatográfias műveleteknek (SMB).

A szimulált mozgóágyas (SMB) kromatográfias műveletek

Az SMB technika megvalósítása során két alapvető eljárás terjedt el:

1. Az oszlopok mozgatása úgy valósul meg, hogy az oszlopok tetején található összekötési pontokat fizikailag mozgatják az oszlopok között. Ennek a módszernek hátránya, hogy a működésük során nyomás alatt levő oszlopokat fizikailag meg kell bontani és újrazárni, ami műveleti és gépészeti problémát jelent.
2. Az oszlopok mozgatása fizikailag nem történik meg, a kapcsolási sorrendet precíziós, nagynyomású, többállású szelepek segítségével valósítják meg. A gyakorlatban inkább ez a technológia terjedt el.

A berendezésben az adszorbens mozgása az oszlopkaszkád betáplálási és elvételi helyeinek bizonyos időközönkénti megváltoztatásával jön létre. Az oszlopok váltási idejét nevezzük léptetési időnek, taktus időnek vagy kapcsolási időnek.

A többállású szelepek megfelelő működtetése és a ciklusok közti váltás könnyen automatizálható, így az ipari gyakorlat könnyen adaptálhatja az eljárást.

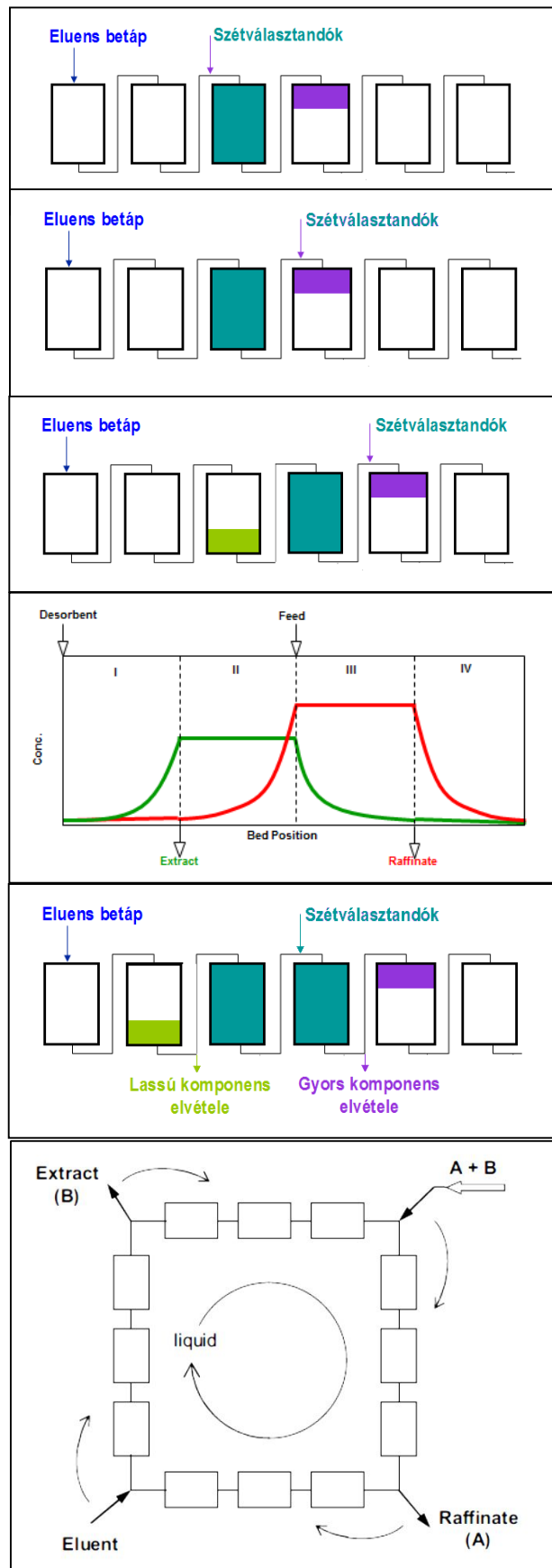
Az egyes szegmenseket nyugvóágyas adszorbenssel töltött oszlopok sorozata adja.

A legegyszerűbb SMB berendezés négy, egyenlő hosszúságú oszlop sorbakötésével valósítható meg. Az oszlopokon állandó alakú, de vándorló koncentráció profil alakul ki, amelynek megfelelő pontjairól a (közel) tiszta komponensek elvezethetők.

A gyakorlatban a négy szakaszt körben kapcsolják össze, így mindkét fázis ciklikus mozgása egyszerűen kivitelezhető. A négy szakaszt nem szükséges négy megszakítási ponttal (négy oszloppal) megoldani, sokszor előnyös ennek többszöröseit beépíteni.

Félüzemi elválasztásokhoz 12-20 oszlopot, 30-100 cm oszlophosszt és 1-5 cm oszlopátmérőt ajánlanak. A nagyméretű, ipari berendezésekben $D = 1-2$ m, $L = 1-3$ m oszlopokat is tartalmaznak, az oszlopok száma a szétválasztási feladattól függően 4-20.

Adalék: A szimulált mozgóágyas kromatográfiát az 1960-as évek elején szabadalmaztatták. Elsőként Broughton alkalmazta a petrokémiai iparban para-xilol C8-as szénhidrogén elegyből történő elválasztására. Az



olajiparban még ma is eredményesen használják a módszert millió tonna/éves volumenű gyártásra, melynek során főként zeolitokat alkalmaznak állófázisként.

Néhány évvel később a berendezést sikeresen alkalmazták monoszacharidok szeparációjára is. A cukoriparban ma is sikeresen használják az SMB-t többféle mono- és oligoszacharid előállítására. Ehhez kapcsolódik a következő esettanulmány.

Glükóz és fruktóz elválasztása SMB-vel

Az izocukor gyártás glükóz izomerizációs lépésénél a kilépő glükóz/fruktóz elegy százalékos összetétele jellemzően 53:42, a többi melléktermék. A lé további feldolgozása során adszorpciós lépésekkel megtisztítják, majd egy speciális kromatográfiás művelettel részlegesen elválasztják a glükózt és a fruktózt.

Az elválasztásra kalcium ionokkal telített erős kationcserélő gyantát, pl.: DOWEX MONOSPHERE 99-et használnak. Az elválasztás mechanizmusa összetett. Egyrészt az oldott állapotban levő cukrok -OH csoportjai kölcsönhatásba lépnek a gyantán levő kalcium ionokkal (kelátképzés). A fruktóz és glükóz elválasztása azon alapul, hogy a fruktóz/kalcium ion komplexben erősebb kölcsönhatás jön létre, mint a glükóz/kalcium ion komplexben. Az elválasztás mechanizmusát ligandcserés kromatográfiának is nevezik. Másrészt méretkizárásos kromatográfia is megvalósul, mivel a nagyobb molekulák, mint a tri-, tetra- és nagyobb méretű oligoszacharidok, fizikailag nem férnek be a gyantában található polisztirol láncok közötti legkisebb nyílásokba. Fruktóz tisztítás esetén a méretkizárásos kromatográfia a ligandcserés kromatográfiával együtt, párhuzamosan játszódik le. A szirupban levő oligoszacharidok a gyanta gyöngyökön kívül maradnak, így elsőként érnek az oszlop aljára.

Az elválasztáshoz igen nagy oszlophosszra van szükség (~10 m), ezért nem egy kolonával, hanem több, rövidebb oszlop összekapcsolásával, az ún. szimulált mozgó ágyas (simulated moving bed = SMB) technikával hajtják végre. A kapott frakciók így sem tiszták, mindkettő tartalmaz mintegy 10%-ot a másik cukorból is. A glükóz áramot visszavezetik az izomerizációra, a fruktóz áramot pedig többféleképpen is fel lehet használni. Lehet tovább tisztítani a fruktózt, tetszőleges tisztaságig, lehet ebben a 90%-os formában értékesíteni, de a legnagyobb részét az izomerizációból kapott 43%-os elegyhez keverik úgy, hogy a fruktóz arány 55%-ra növekedjen. Ez az összetétel felel meg legjobban a szacharóz tulajdonságainak, ezt használja föl az óriási mennyiségben az élelmiszeripar izocukor/izoszörp néven. Ezt az elegyet nem kristályosítják ki, hanem 70% szárazanyag tartalomig bepárolva oldatban forgalmazzák.

