



**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 szennyező anyagok elválasztása.

Jellemez m veletek:  
az összes eddigi  
KROMATOGRÁFIA



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---


---

---

---

**(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.



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

---

---

---

---

---

---

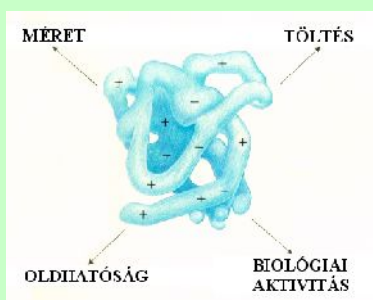
---

---

---

---

### Kromatográfia



**MÉRET** szerint: géelpermeációs kromatográfia  
**TÖLTÉS** szerint: ioncsere kromatográfia  
**OLDHATÓSÁG** szerint: megoszlási, adszorpció, HIC  
**AKTIVITÁS** szerint: affinkromatográfia



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

---

---

---

---

---

---

---

---

---

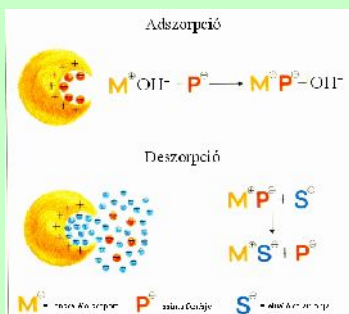
---

### Ioncsere mechanizmusa

A leggyengébben kötődő ionok: H<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup>, ezeket minden mintában leszorítja.

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

Regenerálás: savval vagy lúggal



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Ioncsere kromatográfia

Formula	Name	Abbreviation
<b>Strong cation</b>		
$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Trimethylaminoethyl	TAM-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	Triethylaminoethyl	TEAE-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{C}_2\text{H}_4\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	Diethyl-2-hydroxypropylaminoethyl	QAE-
<b>Weak cation</b>		
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_2$	Aminoethyl	AE-
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Diethylaminoethyl	DEAE-
<b>Strong anion</b>		
$-\text{SO}_3^-$	Sulphin	S-
$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Sulphomethyl	SM-
$-\text{C}_3\text{H}_7\text{SO}_3^-$	Sulphopropyl	SP-
<b>Weak anion</b>		
$-\text{COO}^-$	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, erős savak és bázisok visszaszorítják 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 megkötődhet kation- és anioncsere resin 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 kromatográfias elválasztások el re tervezhetők.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

### Titrlási görbék felvétele

A titrlási görbéket elektrofókusáló elektroforézissel lehet felvenni.

Marha izomfehérjék titrlási görbéi.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

### A pH gradiens hatása

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

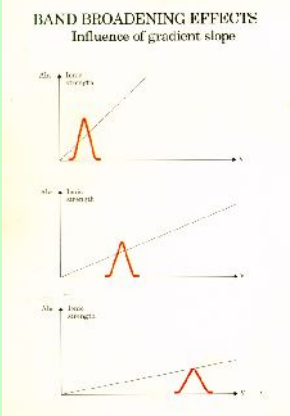
---

---

### 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

---

---

---

---

---

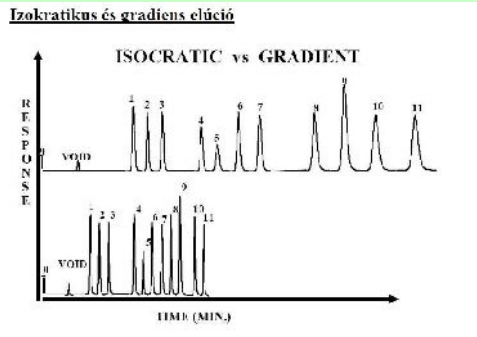
---

---

---

### A gradiens hatása

Izokratikus és gradiens elűző



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

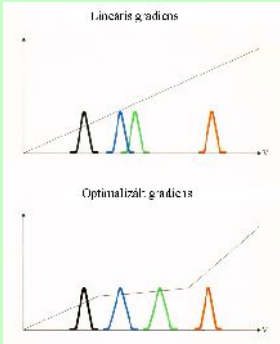
---

---

### A gradiens hatása

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

Az optimális gradiens profil állhat több, eltér meredekség szakaszból is.



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 szénatom-száma szerint jelölik:

Az ilyen hidrofób töltet alkalmas:

- Megoszlásos
- Adszorpciós
- 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 els sorban 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!



19

---

---

---

---

---

---

---

---

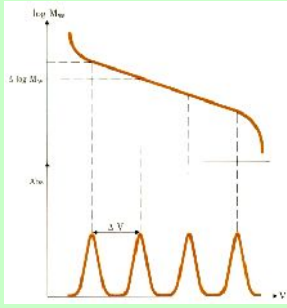
---

---

### 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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

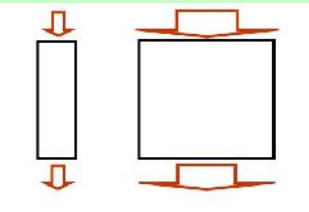
### Oszlopok léptéknövelése

Léptéknövelésnél azonos anyagú és szemcseméretű 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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Oszlopok léptéknövelése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Ipari méret ioncserél oszlopok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

---

---

---

---

---

---

---


---

---

---

### Folytonos kromatográfia

A kromatográfia szakaszos (ciklikus) m ködés . De ha több oszlopot fázisetolással 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 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 körfordulás alatt a henger minden alkotója végigmegy a kromatográfia teljes ciklusán.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

---

---

---

---

---

---

---

---

---

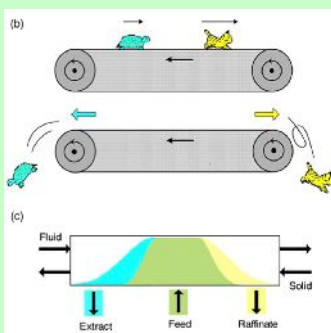
---

### Mozgó töltet és szimulált mozgó töltet

(moving bed és simulated moving bed = SMB)

Nemcsak a mozgó fázis mozog, hanem a töltet is – ellenkez irányban. A nagy retenciójú komponensek ett l visszafelé mozdulnak el.

A kialakuló koncentráció-profilok:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

---

---

---

---

---

---

---

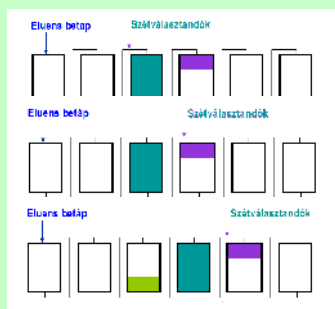
---

---

---

### 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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



### Glükóz-fruktóz elválasztás SMB-vel

Az iparban sok 1-2 m<sup>3</sup>-es kolonnát alkalmaznak, a kimeneteknél optikai szenzorokkal mérik az összetételt, és a léptetéseket processzorral irányítják.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

### Centrifugálásos megoszlásos kromatográfia (CPC)

Helye a kromatográfián 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 egyensúly beállása után a felső fázist tovább visszük.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

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

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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 küls detektort is csatlakoztatni.
- Frakciók szedése (id program vagy a detektor jele alapján)
- Frakciók vizsgálata megfelelő analitikai technikákkal (TLC, HPLC-UV)
- pH-monitorozás (ionos jelleg molekulák elválasztásánál).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---



---



---



---



---



---



---