

Fordelingschromatografi: fra skilletragt til Fast Centrifugal Partition Chromatography

Allerede i 1930'erne kunne man med monstrøse skilletragtsanlæg separere komplekse stoffblandinger i løbet af nogle dage. I dag kan man inden for en time udføre samme arbejde med Fast Centrifugal Partition Chromatography

Af cand.pharm. Petur Dalsgaard, Københavns Universitet og Danmarks Tekniske Universitet og cand.pharm. Johan H. Faber, Universität Würzburg, Tyskland

Fordelingschromatografi i den mest simple form bør enhver dansker med en obligatorisk skolegang have stiftet bekendtskab med. To-fasesystemet i en skilletragt – der er et obligatorisk instrument i 8-9. klassens kemiøvelser – er nemlig principet fordelingschromatografi er baseret på. Skilletragten er et instrument, der kan spores tilbage til middelalderen, altså længe inden russeren Tswett i 1906 introducerede begrebet chromatografi i kemiens verden.

For at effektivisere skilletragtsmetoden blev der tidligt i chromatografiens historie udviklet apparater, der kunne skille stofmængder ud fra deres polaritet. De første anlæg til kontinuerlig separation var allerede tilgængelige før 1930. Der var tale om monstrøse anlæg med flere meter lange rør og litervis af eluenter. Et eksempel er Craig-anlægget, der var sammensat af skilletragtslignende glasvarer (figur 1). Det blev bl.a. brugt til at adskille A-, D- og E-vitaminer, men den enorme mængde af eluenter samt den lange chromatograferingstid medførte høje omkostninger og gjorde, at udviklingen af mindre og mere anvendelige anlæg fortsatte.

I 1970'erne fremstillede Dr. Yoichiro Ito fra National Institute of Health, Maryland, USA, det første kontinuerlige væske-væske-fordelingssystem der udnyttede centrifugalkraften. Man valgte navnet modstrømschromatografi (Countercurrent Chromatography (CCC)) til denne teknik.

Fordelene ved Dr. Ito's nyudvikling var mindre mængder eluenter, hurtig chromatografering og bedre adskillelse af en stoffblanding.

Der blev hurtigt udviklet to typer apparater. Den ene type, hvor High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) er den mest udbredte, videreudviklede Dr. Ito selv i USA; mens den anden type, Centrifugal Partition Chromatography (CPC) senere blev udviklet i Japan af Sanki Engineering Ltd. I 1982 førte det til markedsføring af et apparat med samme navn.

I slutningen af 80'erne begyndte nogle af disse apparater i mindre skala at slå igennem, fordi de udgjorde et økonomisk meget fordelagtigt alternativ til præparativ HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Teknologien bag Countercurrent Chromatography (modstrømschromatografi)

I CCC er der absolut ingen væsker, der »strømmer« imod hinanden. Teknikkens navn er forvirrende, idet det indikerer, at den ene væske løber en vej, mens den anden væske løber modsat. Det er forkert. CCC er en klassisk væskechromatograferingsteknik (Liquid Chromatography - LC), hvor den stationære fase er en væske i stedet for fast materiale.

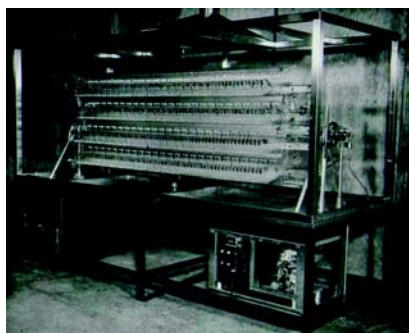
I CCC er den mobile fase ikke blandbar med den flydende stationære fase. Brugen af dette to-fasesystem giver teknikken alle dens fordele.

I andre LC-teknikker tilbageholder to fritter den stationære fase i en kolonne. I en CCC-kolonne er det mere kompliceret at tilbageholde den stationære fase, imens en anden væskefase (den mobile fase) filtreres igennem. Alle moderne CCC-apparater, som i virkeligheden kun er »kolonner«, bruger centrifugalkraften til dette formål. En CCC-kolonnes chromatografiske egenskaber eksisterer kun så længe, den er under centrifugal påvirkning. Inden for CCC-teknikken findes to typer apparater, de hydrostatiske (HS) og de hydrodynamiske (HD).

De før omtalte HSCCC-apparater er hydrodynamiske og CPC-apparaterne er hydrostatiske.

Fælles for de to typer er, at den stationære fase fastholdes på kolonnen vha. centrifugalkraft. Påfyldning af den stationære fase på kolonnen foregår i stillestående tilstand, først når kolonnen er under centrifugal påvirkning, kan den mobile fase pumpes igennem. Alt efter hvilken vej væsken pumpes igennem, kan øvre eller nedre fase vælges, som hhv. stationær eller mobil fase. De to faser indtræder i ligevægt, hvorefter kun den mobile fase pumpes igennem systemet. Retentionsgraden af den stationære fase ligger typisk over 60%.

Analysen vandrer gennem den stationære fase afhængig af stoffernes polaritet, og vandringshastigheden for det enkelte stof afhænger af fordelingskoefficienten mellem de to faser, og derved adskilles stofferne (figur 2).



Figur 1. Udviklingen af apparater til modstrømschromatografi (Countercurrent Chromatography (CCC)).

Til venstre: Craig-apparatet fra ca. 1955 er et godt eksempel på de monstrøse skilletragtsanlæg, der blev brugt til at oprense naturstoffer. En oprensning tog normalt flere dage (copyright Marcel Dekker AG).

Til højre: Den nyeste type af moderne apparater inden for modstrømschromatografi. FPCP-apparatet fra Kromaton i Frankrig blev lanceret i 2000.

Figur 2. Princippet i modstrømschromatografi.

Eluent-sammensætningen kan f.eks. være:

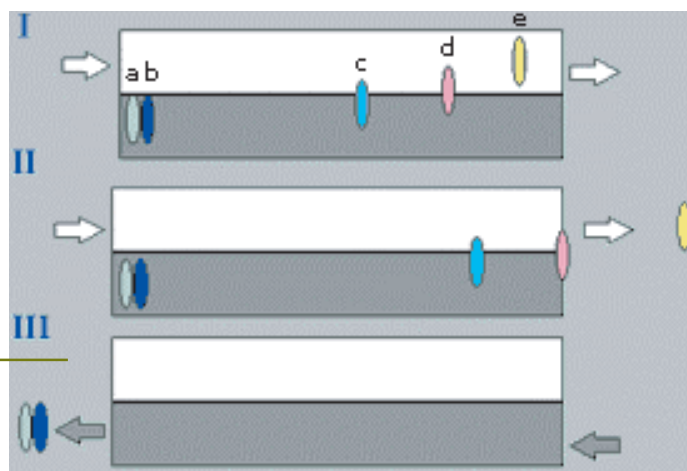
Øvre fase: heptan og ethylacetat

Nedre fase: methanol og vand

I: a, b, c, d og e er stoffer fra en blanding. Deres affinitet til den mobile fase øges fra a til e. Ifølge fordelingskoefficienten vil hvert enkelt stof vandre med sin egen hastighed mod enden af kolonnen.

II: Stof a og b har stærkere affinitet til den nedre fase. De bliver tilbageholdt i kolonnen i længere tid. Deres vandring er meget langsommere end c, d og e.

III: Det tager lang tid for stof a og b at vandre igennem hele kolonnen. Da begge faser er væsker, er det muligt at vende faserne. Den stationære fase bliver den mobile og omvendt. Stofferne a og b elueres i modsat rækkefølge.



Centrifugal Partition Chromatography (CPC)

I CPC-apparater, som hører til de hydrostatiske apparater, gør man brug af kamre, der er sammenkoblede i serie med små kanaler. Kamrene er indgraverede på flere diske, som roteres med en høj hastighed i en centrifuge. Denne roterende bevægelse genererer et konstant centrifugalt felt omkring væskekerne i kamrene. Den stationære væskefase holdes derved tilbage på kolonnen, mens den mobile fase pumpes igennem i form af små bobler.

High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

De hydrodynamiske apparater har en rotorvinge, hvortil der er

fastgjort en eller flere spoler omviklet med teflonslanger. Et tandhjulsarrangement producerer en bevægelse af rotorvingen med spolerne omkring den centrale akse. Bevægelsen danner et meget variabelt centrifugalt felt omkring de to ikke-blandbare væsker, hvorved den stationære fase tilbageholdes på kolonnen. I teflonslangerne opstår der under chromatograferingen en række blandingszoner af den stationære fase med den mobile fase i.

Selv om ligheden mellem HS- og HD-teknikkerne er stor, er de komplementære til hinanden. HS-apparaterne kan næsten tilbageholde alle to-fasesystemer. De er meget pålidelige, støjfri og nemme at betjene. HD-apparaterne har svært ved at tilba-

FLOW KOMPONENTER

- CSF – Pumper
- Flowtech – Lobe rotor pumper
- Dockweiler – Pharmarør og fittings
- Bardiani – Ventiler
- ITT – Membranventiler
- AFLEX – Flexible PTFE slanger
- AdvantaPure – Silicone slanger
- MBS – Varmevekslere
- Staitech – Rendamp udstyr



Mød os på
Foodtech
Scandinavia

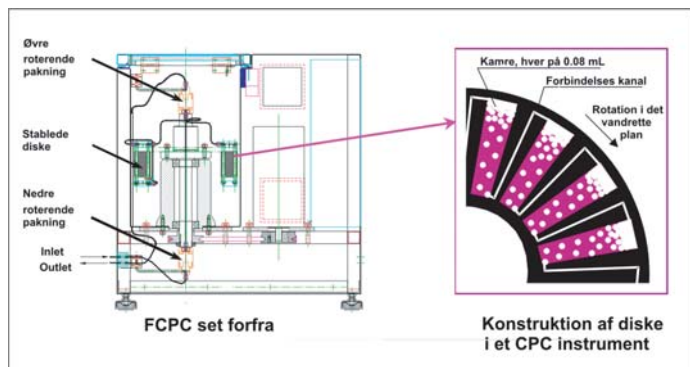
- Stand J1 7120

alflow®

- for en mere komplet løsning...

Alflow · P.O. Box 105 · Park Allé 14 · DK-6600 Vejen · Tel. +45 7696 2130 · Fax +45 7536 1473

alflow.dk



Figur 3. Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC).

geholde visse væskesystemer som f.eks. de meget polære (blandinger med butanol, ethanol, acetonitril og vand). Dertil kommer, at de er meget støjende pga. deres tandhjulssammenstilling.

Fremtiden for Countercurrent Chromatography

Interessante nyskabelser inden for CCC:

- CCC-MS, der i princippet er et CCC-apparat forbundet med et massespektrometer. Denne opstilling er et alternativ til en opstilling, hvor CCC er forbundet med et spektrofotometer.
- pH-zone-refining CCC minder om ionbytningschromatografi. Ved at kontrollere pH kan man adskille stoffer efter deres pK_a-værdi og fordelingskoefficient. Metoden er bl.a. blevet brugt til at separere sure og basiske aminosyredrivere, chirale stoffer og alkaloider.
- Multi Dimensional CCC, hvor to eller flere CCC-apparater forbindes i serie, så et eksperiment kan adskille en kompleks blanding

Den nye generation: Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC)

I 2000 introduceredes en ny generation modstrømschromatografiapparat: Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC), (figur 1). De hører til HS-typen og bygger på samme princip, men er mere elegante og nemme at betjene. De er lydsvage og kan køre med langt højere tryk og flow (5-20 ml/min for en 200 ml kolonne) end HSCCC-apparaterne, og ekvilibreringsstiden er bare et par minutter.

Nyudviklingen ligger i geometrien af de laserindbrændte kamre, og de mange kamre pr. ml eluent (figur 3). Det giver en langt mere effektiv blanding af mobil og stationær fase og kompenserer let det forøgede tab af stationær fase pga. det høje flow. Et separationsforsøg er blevet udført for at sammenligne HSCCC-metoden med det nyudviklede FCPC-apparat. Separationstiden for adskillelsen af de fedtopløselige vitaminer A, D og E var typisk for HSCCC-metoden ca. 150 min, mens FCPC-apparatet klarer en bedre separation på under 30 min.

Dvs. at udviklingen de sidste hundrede år er gået fra en næsten umulig separation vha. skilletrugten, over dages chromatografering med Craig-anlægget, til et par timers oprensning vha. HSCCC-metoden og endelig til en separation af fedtopløselige vitaminer på under en halv time med FCPC-apparatet. Ved opskaleringen af separationerne er FCPC uforlignelig. Kolonner kan fås med volumen fra 100 ml – egnet til milligram oprensning – til 10 l – egnet til oprensning i 100 gram skala. Erfaringen taler for, at opskaleringen forløber problemfrit.

De mange fordele ved den nye generation af modstrømschromatografiapparat (FCPC) vil uden tvivl bevirke en stærkt øget udbredelse.

I Danmark bruges HSCCC bl.a. af mykologigruppen på DTU til oprensning af sekundære metabolitter fra skimmelsvampe. For få år siden blev HSCCC også brugt til separation af chirale stoffer på Novo Nordisk.

Prof. Dr. Bringmanns gruppe i Würzburg var nogle af de første i Tyskland til at anskaffe sig et FCPC-apparat. I denne gruppe indgår apparatet med stor succes i oprensning af synteseblandinger, sekundære plantemetabolitter og sekundære metabolitter fra skimmelsvampe. Apparatet har vist sig egnet til oprensning fra milligram- til gram-skala.

Fordele ved modstrømschromatografi (CCC):

- Intet tab af prøvemateriale, 100% gengivning
- Skånsom oprensning, ingen reaktive overflader på kolonnemateriale
- Økonomisk oprensning (op til 10 gange mindre brug af eluenter, ingen fast fase)
- Ingen afhængighed af kvaliteten af eluenter
- Anvendelsesmulighederne af metoden er store. Oprensning af naturstoffer, synteseblandinger, metaller, proteiner og DNA, sågar adskillelse af enantiomerer, er blot nogle eksempler
- Udvalget af stationære og mobile faser er enormt, forudsætningen er blot, at de to væskefaser ikke er blandbare
- Direkte opskalering fra analytisk til præparativ skala

E-mail-adresser

Petur Dalsgaard: pda@biocentrum.dtu.dk

Johan Faber: faber@chemie.uni-wuerzburg.de

Kilder

Countercurrent Chromatography – the support-free liquid stationary phase. Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 37. Elsevier 2002.

Y. Ito, W.D. Conway (Eds.), High-Speed Counter-current Chromatography. Chemical Analysis, vol. 132. Wiley, New York, 1996.

W.D. Conway, Counter-current Chromatography-Apparatus, Theory and Applications, VCH, New York, 1990

www.kromaton.com

Nyt om...

... lakrids

Japanske forskere har fundet ud af, at ekstrakt af lakridsrod kan bruges til at forhindre bakterievækst i fødevarer. Nu er man jo ikke altid interesseret i, at fødevarerne kommer til at smage af lakrids, man har derfor søgt efter det aktive bakteriedræbende stof, som har vist sig at være *licochalcon A*, som

