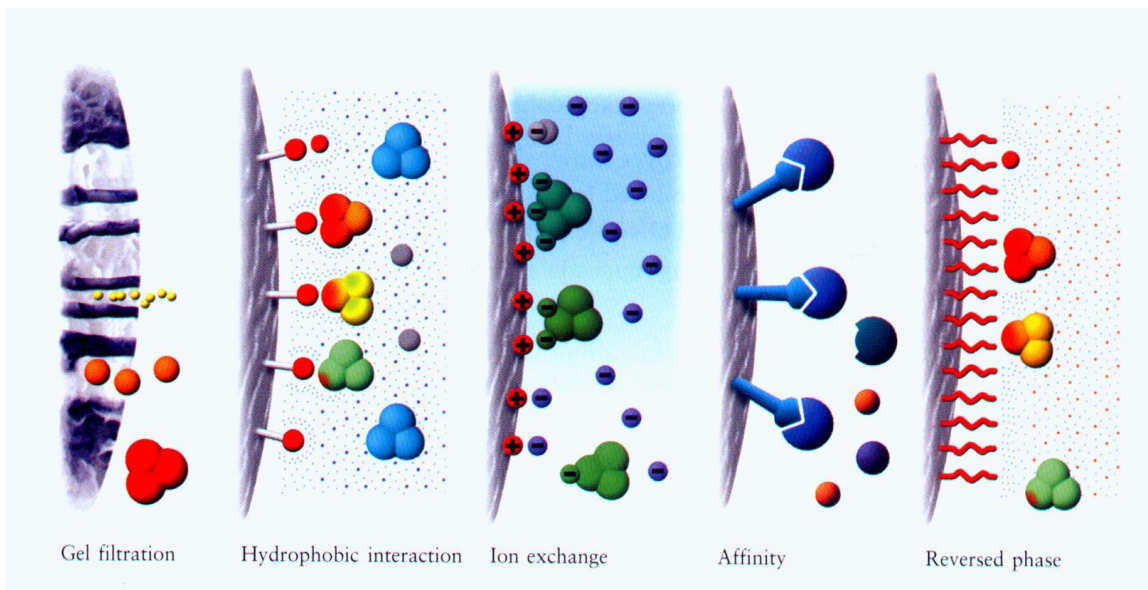


Chromatografie

Auteur: Michel Eppink (Wageningen Universiteit)



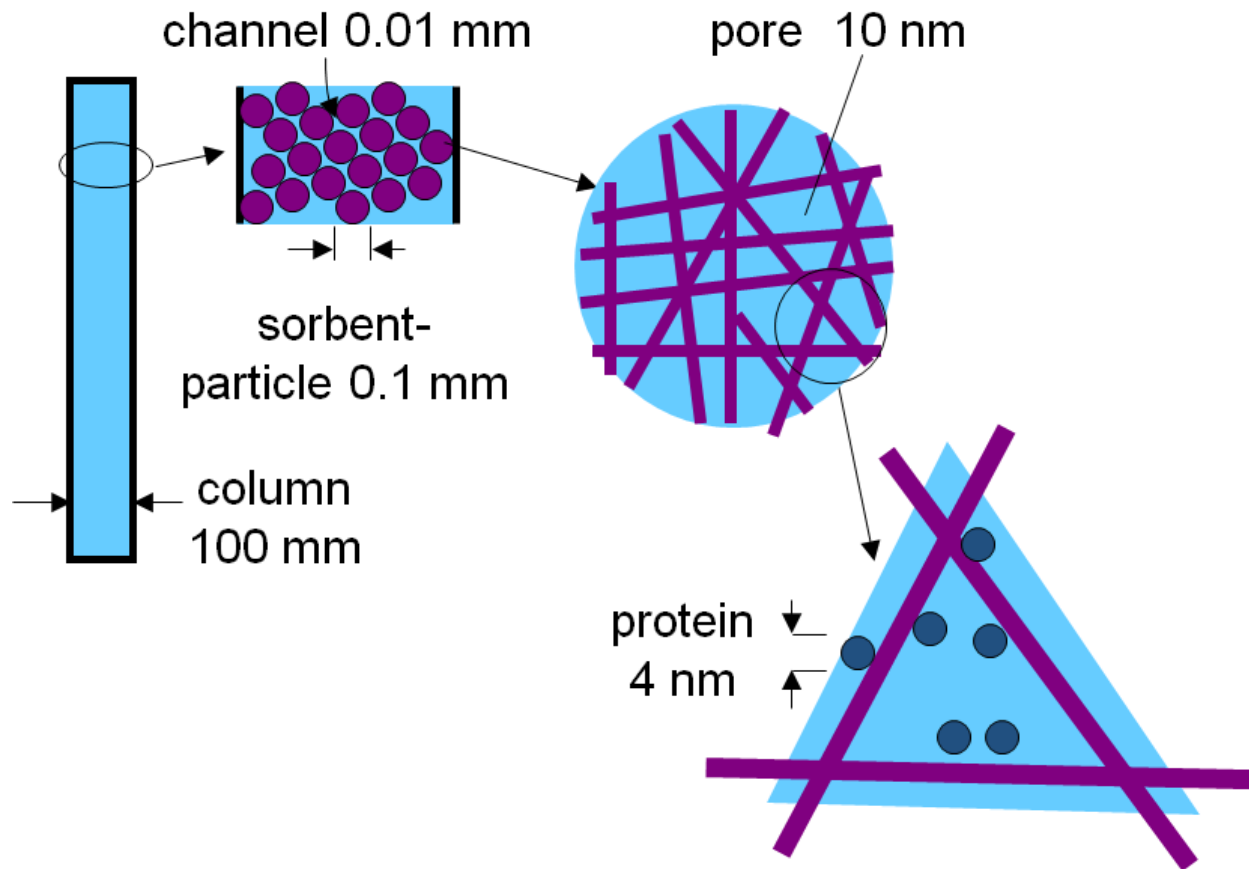
Basisprincipe van chromatografische scheidingen

Scheidingen van componenten (b.v. eiwitten) kan gebeuren via twee verschillende fasen zoals weergegeven in Tabel 1 hieronder waarbij onderscheid gemaakt kan worden in een stationaire fase en mobiele fase. De focus in dit verhaal zal liggen op Vloeistof-Vast Chromatografie (LSC) waarbij de mobiele fase een vloeistof is en de stationaire fase een vaste stof (bolletjes of beads wat vaak “resin” genoemd wordt) en op de scheiding van eiwitten die in de vloeistof zijn opgelost.

Tabel 1: Classificatie van Chromatografie

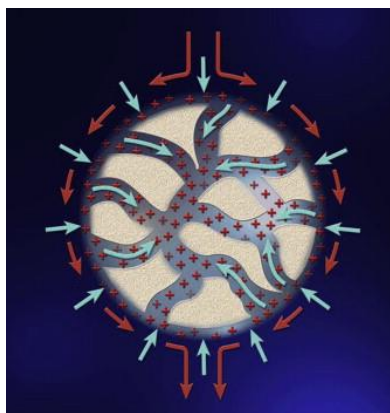
Mobiele fase	Stationaire fase
Gas Chromatografie (GC)	Gas-Vloeistof Chromatografie (GLC)
	Gas-Vast Chromatografie (GSC)
Vloeistof Chromatografie (LC)	Vloeistof-Vloeistof Chromatografie (LLC)
	Vloeistof-Vast Chromatografie (LSC)

Vloeistof-Vast Chromatografie (LSC) gebeurt in een kolom. De stationaire ofwel de vaste fase in een kolom bestaat uit bolletjes die poreus zijn zoals weergegeven in figuur 1. De kolom is gevuld met bolletjes (ongeveer 100 μm), eiwitten (ongeveer 4 nm) zijn in staat om te binden niet alleen aan de buitenkant van het bolletje maar ook in de poriën (diameter ongeveer 10 nm) van deze bolletjes.



Figuur 1a: Stationaire fase in kolom chromatografie

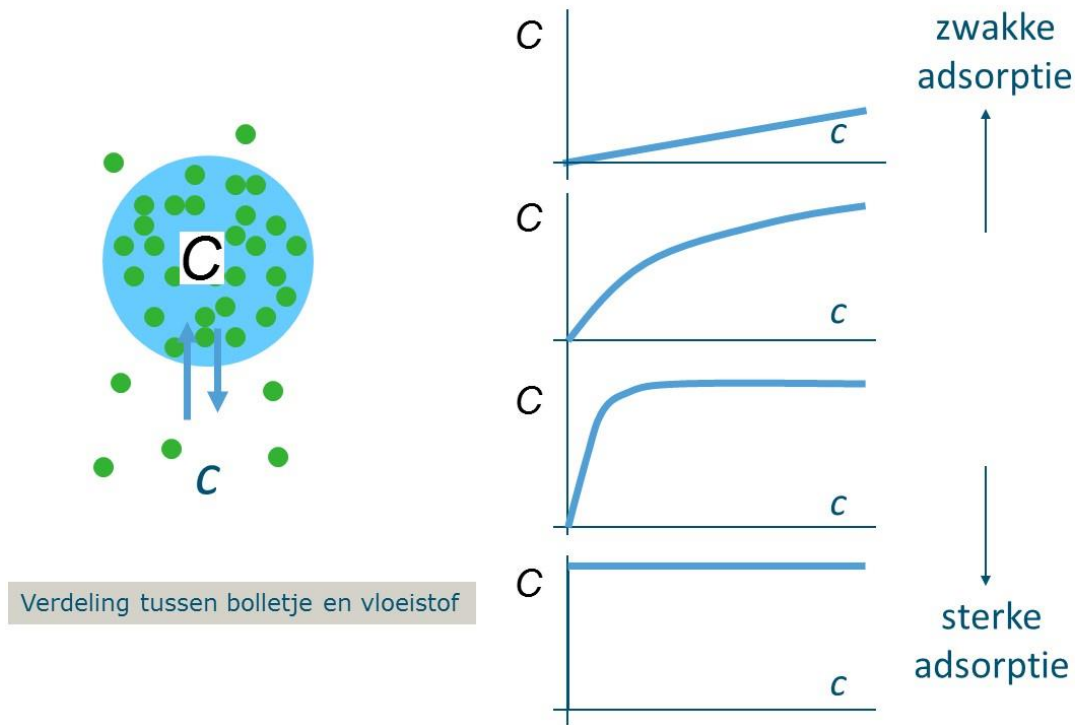
Hieronder in figuur 1b is een bolletje weergegeven met diverse poriën om aan te geven dat eiwitten-niet alleen aan het oppervlak kunnen binden maar ook in de poriën. Door de poriën wordt het oppervlak flink vergroot voor binding van eiwitten.



Figuur 1b: Schematische weergave van een bolletje met poriën

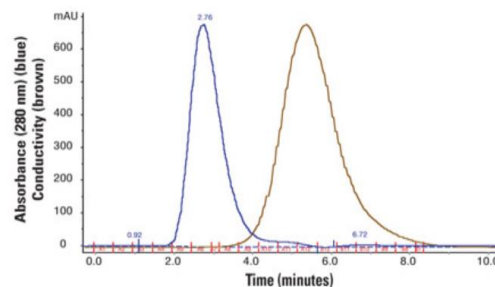
De adsorptie van eiwitten aan bolletjes (C) t.o.v. vloeistof (c) is afhankelijk van de sterkte van de interacties, deze kunnen zowel zwakke als sterke adsorptie vertonen (Figuur 2). Dit heeft te maken met de verdeling tussen de vaste en vloeibare fase. De bindingscapaciteit van eiwitten kan laag zijn bij zwakke

adsorptie of heel sterk bij zeer sterke adsorptie, meestal is de gulden middenweg een goede binding maar niet te sterk anders zijn eiwitten niet van de bolletjes te elueren.



Figuur 2: Verdeling van eiwitten tussen bolletje (C) en vloeistof (c)

Biomoleculen (bijv. eiwitten) zullen zich verdelen over twee niet mengbare fasen en daarbij zal een scheiding ontstaan als de verdeling verschillend is over de twee fasen. Op deze manier kunnen twee opgeloste biomoleculen gescheiden worden als de ene zich beter hecht aan de vaste fase (het bolletje) dan de mobiele fase (de vloeistof) waarbij pH of de zoutsterkte in de mobiele fase hiervoor wordt aangepast. Als voorbeeld hieronder in Figuur 3 is een chromatogram weergegeven waarbij het ene biomolecuul (eiwit 1) minder goed of niet hecht aan het bolletje en eerder door de kolom heen is dan het andere biomolecuul (eiwit 2) waardoor eiwit 1 dat sneller door de kolom loopt een kortere retentietijd heeft dan eiwit 2 zodat na detectie m.b.v. UV_{280nm} aan het einde van de kolom twee pieken worden gemeten en weergegeven in Figuur 3.



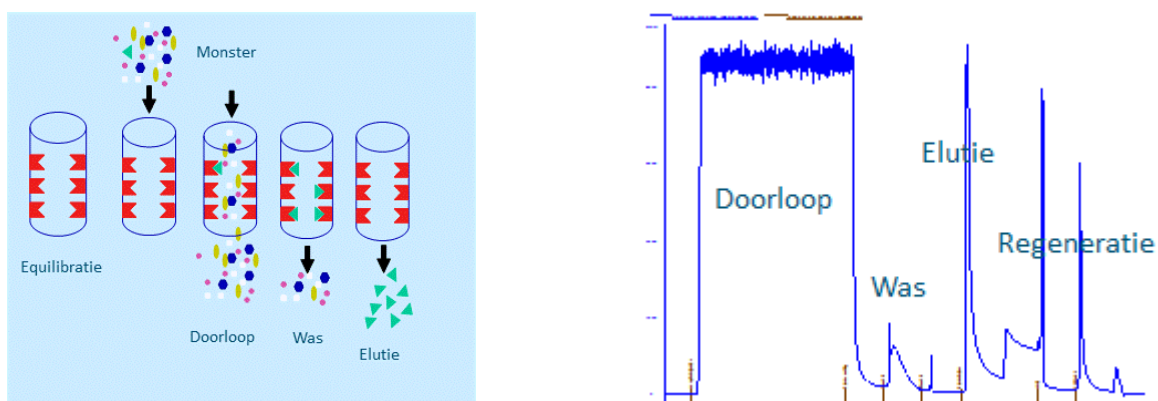
Figuur 3: Scheiding van twee eiwitten m.b.v. LSC (blauw= eiwit 1; bruin=eiwit 2)

Daarnaast zijn er adsorptieve en niet-adsorptieve krachten die een rol spelen bij de scheiding van eiwitten (Tabel 2). Bij adsorptieve scheiding spelen electrostatische-, hydrofobe-, van der Waals- krachten of combinaties hiervan zoals bij ionenwisseling-, hydrofobe interactie-, reverse phase- of affiniteit chromatografie een rol. Terwijl bij niet-adsorptieve krachten de scheiding plaatsvindt op basis van grootte waarbij kleine moleculen een langere weglengte in een kolom met bolletjes moeten afleggen dan grotere moleculen zoals bij gelfiltratie chromatografie.

Tabel 2: Eigenschappen (niet) adsorptie

Eigenschap	Techniek	Adsorptie
Lading	Ionenwisseling (IEC)	Ja
Grootte	Gelfiltratie (GPC)	Nee
Hydrofobiciteit	Hydrofobe interactie (HIC)	Ja
Hydrofobiciteit	Reverse fase (RPC)	Ja
Biorecognition	Affiniteit (AC)	Ja

Hieronder in figuur 4 (linker figuur) staat een schematische weergave van de scheiding van een eiwit met kolomchromatografie van de andere eiwitten. In de rechter figuur is het chromatogram weergegeven waarbij een waaijer aan verbindingen met verschillende retentietijden uit de kolom komen. In de Doorloop blijven de eiwitten in de vloeistof die niet binden aan de kolom. Het is de bedoeling dat de eiwitten, die wij wel willen hebben aan de bolletjes in de kolom hechten. Bij het Wassen worden de achtergebleven resten van de niet of zwak gebonden eiwitten uit de kolom gespoeld, waarna de eiwitten die wij willen hebben in de Elutie worden gedesorbeerd uit de bolletjes in een hogere concentratie voor verder verwerking wat meestal met veranderingen van pH of zoutconcentratie bewerkstelligd kan worden. De bolletjes worden vervolgens weer in de adsorptiemodus gebracht middels doorspoelen met een bufferoplossing van de juiste pH, ofwel Regeneratie. In feite verlopen de processen op kleine schaal gelijk aan die bij de grote procesindustrie wat verderop in de opschaling besproken zal worden.



Figuur 4: Schematische scheiding van een eiwit van andere eiwitten m.b.v. kolomchromatografie

Processen in de chromatografiekolom

Bij kolomchromatografie (zie figuur 5 voor een kleine en een industriële kolom) zijn diverse parameters van belang voor het goed functioneren van een chromatografierun:

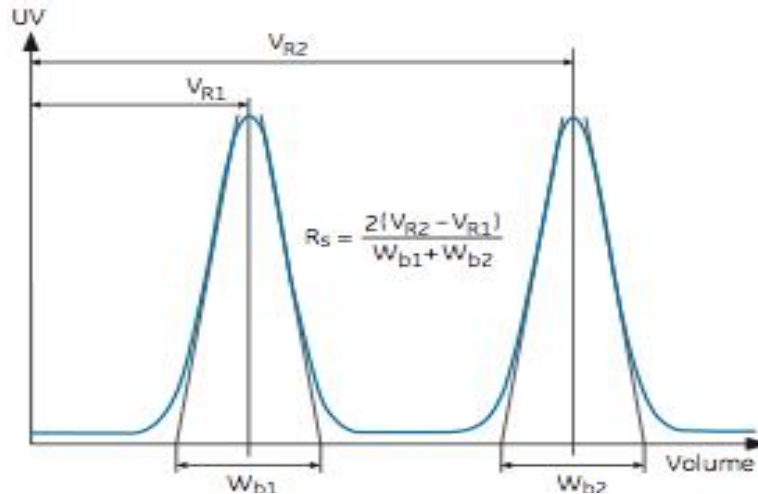
- Mobiele fase (b.v. buffer samenstelling)
- Stationaire fase (b.v. welk geactiveerd bolletje)
- Monster of voedingsstroom (samenstelling van de vloeistof)
- Injectievolume (het te behandelen volume)
- Retentie (elutie van het eiwit of eiwitten)
- Retentietijd (tijd van elutie van het eiwit)
- Retentievolume (volume nodig bij elutie van het eiwit)
- Retentiefactor (hoe sterk is de vertraging op de kolom)
- Kolomlengte (hoogte van de kolom)
- Verdelingscoëfficiënt (verdeling van het eiwit over vaste/vloeibare fase)



Figuur 5: Chromatografie kolom: Labschaal (links) en Productieschaal (rechts)

Voor een goede scheiding tussen eiwitcomponenten is de resolutie van de kolom zeer belangrijk, in Figuur 6 is een chromatogram weergegeven met twee verschillende eiwitcomponenten die compleet gescheiden zijn van elkaar. Met andere woorden, de kolom heeft voor deze eiwitten een goede resolutie.

M.b.v. de resolutiefactor R_s kun je de scheidingsfactor ofwel de mate van scheiding bepalen. V_{R1} = retentietijd component 1; V_{R2} = retentietijd component 2; W_{b1} = breedte van component 1; W_{b2} = breedte van component 2. Gebruikmakend van de formule in figuur 6 kan je resolutiefactor R_s berekenen.



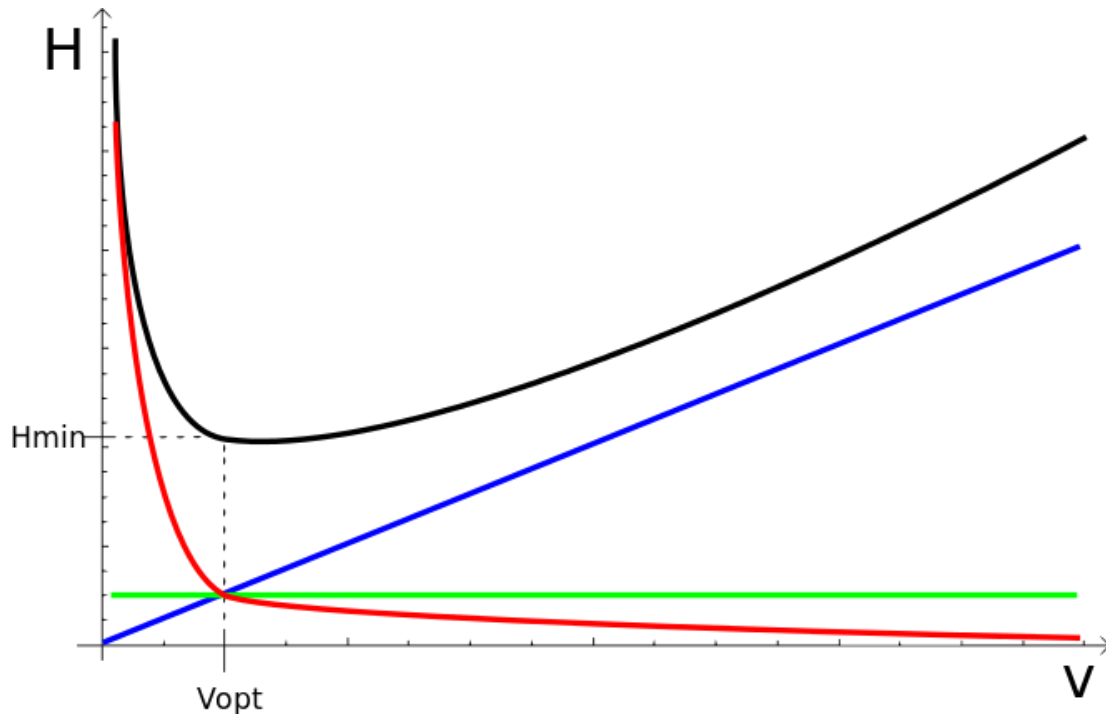
Figuur 6: Bepaling resolutie factor (R_s) van twee eiwitpieken

Belangrijk voor de kolomresolutie is de “Van Deemter” vergelijking, hieronder weergegeven:

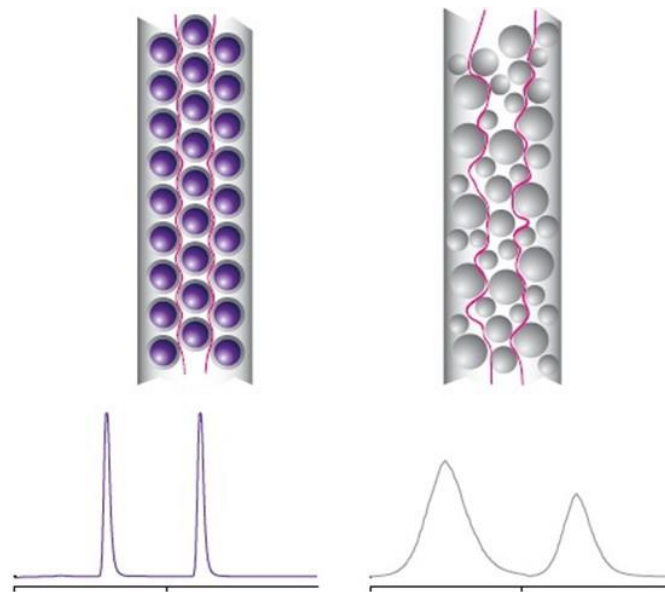
$$H_{ETP} = A + (B/u) + C.u$$

- De van Deemter vergelijking relateert de resolutie (H_{ETP} : Height Equivalent to a Theoretical Plate) van een chromatografie kolom aan de vloeistofstroom en kinetische parameters die piek verbreding veroorzaken zoals hieronder weergegeven:
- H_{ETP} = Height Equivalent to a Theoretical Plate (schotelgetal) is een maat voor de kolomresolutie [m], het geeft de verhouding weer tussen wat in de praktijk wordt gevonden en de theoretische waarde
- A = Eddy-diffusie (Figuur 8a) parameter is gerelateerd aan de kanaalvorming voor een niet ideaal gepakte kolom [m] dus weer de verhouding tussen praktijk en theorie
- B = Diffusiecoëfficiënt van de te elueren moleculen in longitudinale (= de lengte) richting, hetgeen resulteert in dispersie [$m^2 s^{-1}$]
- C = Resistentie tot massatransport coëfficiënt (Figuur 8b) van de component tussen de mobiele en stationaire fase [s]. De weglengte voor een kleine bead is veel kleiner dan voor een grote bead waardoor je piekverbreding kunt krijgen
- u = Lineaire Snelheid [$m s^{-1}$] van de vloeistof door de kolom

In figuur 7 is te zien wat de verschillende termen voor invloed op de scheiding hebben waarbij vloeistofsnelheid (V) is uitgezet tegen de H_{ETP} (schotelgetal). Het laagste punt van de zwarte resultante lijn geeft de laagste kolomhoogte weer, die voldoet aan de ontwerpeisen, dus de meest economische.

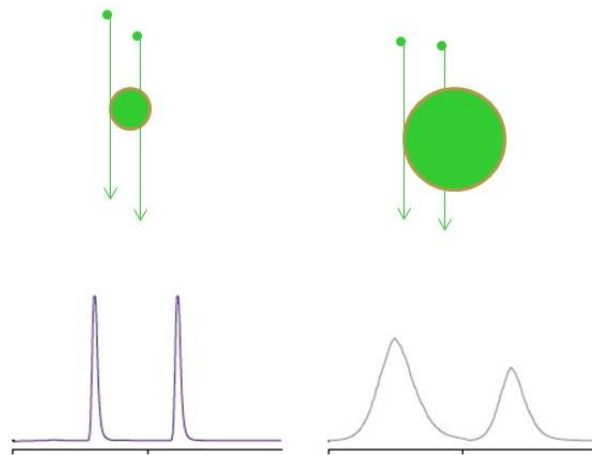


Figuur 7: Invloed van de verschillende termen op de scheiding van biomoleculen in de “van Deemter”. Groen is A-Term (kanaalvorming), Rood is B-Term (dispersie), Blauw is C-Term (weglengte) en Zwart is de som van de verschillende termen.



Figuur 8a: Eddy diffusie in een kolom

De A-term in de “van Deemter” vergelijking beschrijft de grootte van de bolletjes zoals in figuur 8a te zien is, ofwel Eddy diffusie. Een kleiner bolletje (kleine A-Term) in een kolom geeft een veel betere piekscheiding dan een kolom waarbij de bolletjes een verschillende en grotere omvang hebben.

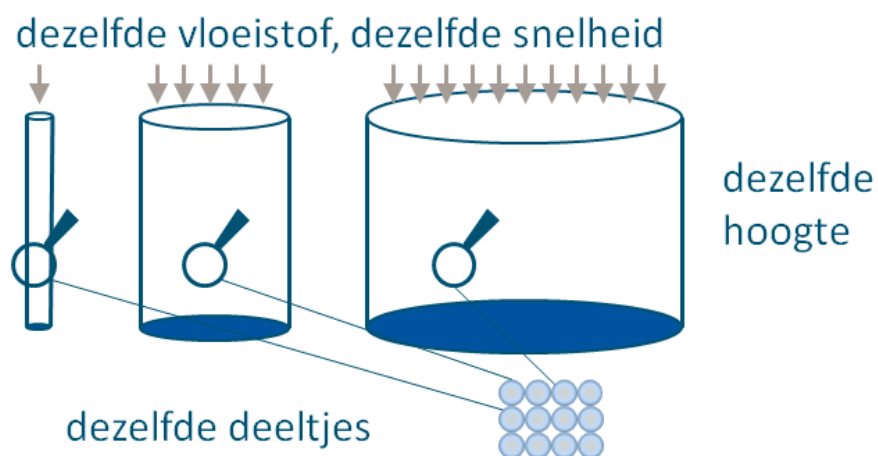


Figuur 8b: Massatransport in een bolletje

Voor de C-term in de “van Deemter” vergelijking speelt massatransport een belangrijke rol zoals weergegeven in figuur 8b waarbij voor kleine bolletjes de transport afstand in het bolletje veel korter is met dus een betere uitwisseling/evenwicht dan in grote bolletjes die een veel grotere weglengte hebben. Bij grote bolletjes zal het langer duren voor het evenwicht is ingesteld en dus zal de resolutie ook duidelijk minder zijn. Dus een klein bolletje leidt tot een kleine C-Term en een groot bolletje tot een grote C-Term.

Opschaling

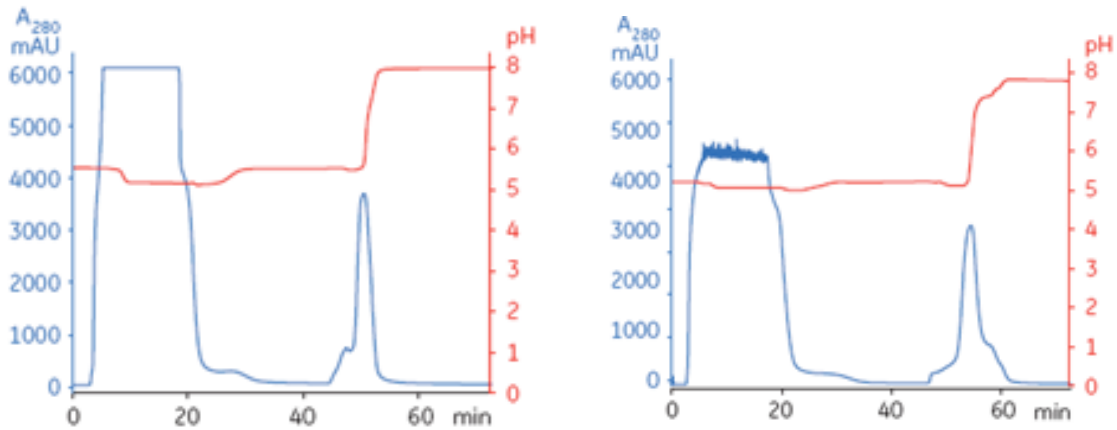
Het opschalen van een chromatografie stap van kleine schaal kolom naar een grote schaal kolom zoals weergegeven in figuur 5 gebeurt normaal gesproken alleen met verbreding van de diameter van de kolom waarbij een kolom met een diameter van 1 cm opgeschaald kan worden naar een kolom met een diameter van wel 200 cm. In Figuur 9 is dit illustratief weergegeven. Het belangrijkste is dat het chromatogram van de 1 cm kolom hetzelfde moet zijn als het chromatogram van de 200 cm kolom (Figuur 9c), dan is de opschaling goed gelukt.



Figuur 9a: Opschaling in diameter



Figuur 9b: Opschaling in diameter: labschaal (1 cm diameter) naar productieschaal (200 cm diameter)

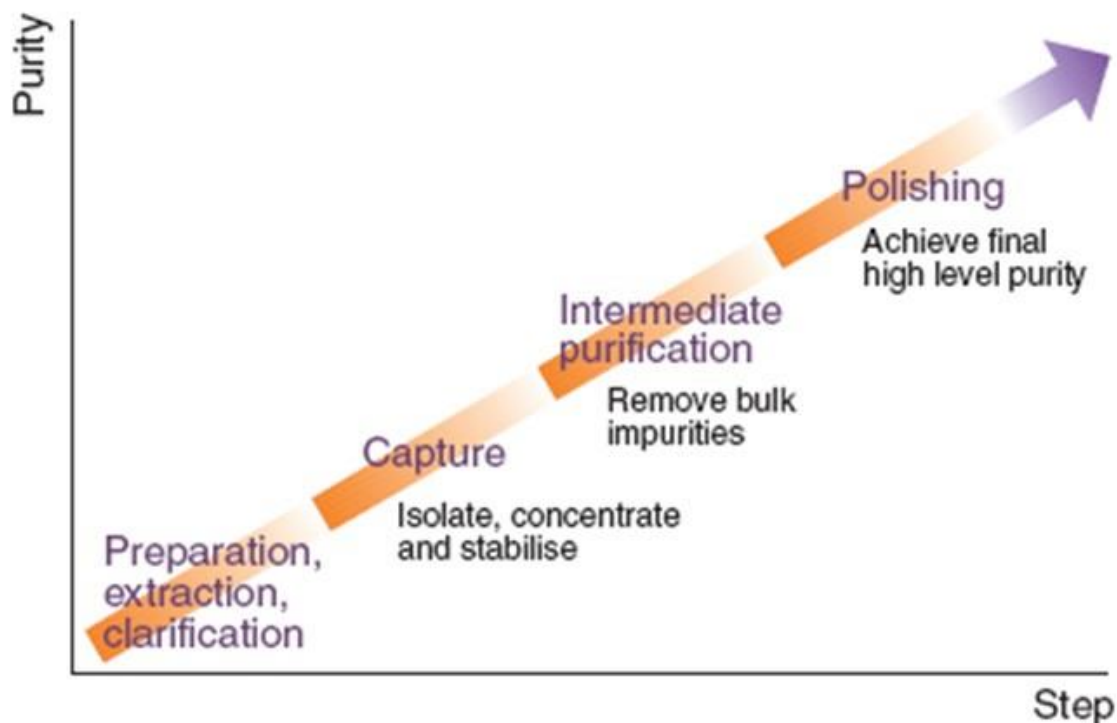


Figuur 9c: Chromatogram: labschaal (links) naar productieschaal (rechts)

Ontwikkelen van het complete chromatografieproces

De volgende fase in het ontwerp is het ontwikkelen van een compleet proces om de eiwitten te zuiveren met een aantal chromatografie stappen achter elkaar waarbij diverse (niet) adsorptietechnieken gebruikt worden. Figuur 10 geeft schematisch het aantal stappen weer, waaruit een zuiveringsproces meestal bestaat. Eerst wordt van het extract een heldere vloeistof gemaakt middels centrifugeren of filtratie en vervolgens worden de diverse kolomstappen uitgevoerd. Als eerste de “Capture step”, waarin je ervoor zorgt om alle eiwitten te vangen die je wilt hebben (en dat de ongewenste stoffen door de kolom heen gaan) en om zo na de cyclus een reductie in het volume te bewerkstelligen. Hierbij zijn snelheid en capaciteit het belangrijkste omdat je zo snel mogelijk alle eiwitten wilt vangen die je verder wilt zuiveren; vervolgens “Intermediate Purification” waarin de te isoleren stof een eerste echte zuivering ondergaat door het verwijderen van de meeste onzuiverheden (bijv. eiwitten, suikers, DNA) Hierbij zijn zowel capaciteit alsook resolutie van belang; en als laatste een “Polishing step” waarbij resolutie en opbrengst ervoor zorgen dat uiteindelijk een zuiver eiwitproduct wordt opgeleverd. Door het koppelen van verschillende zuiveringsstappen is het belangrijk dat je ervoor zorgt dat de kolomstappen en dus ook de

buffercondities (b.v. pH, geleidbaarheid) goed op elkaar aansluiten. Een vuistregel is dat als eerste een ionenwisselingsstap wordt uitgevoerd waar het product in hoog zout elueert en vervolgens kun je deze eiwitfractie weer binden op een Hydrofobe Interactie kolom en elueer je het eiwit in laag zout van de kolom en vervolgens kun je nog een ionenwisseling stap of Gelfiltratie stap als laatste stap implementeren en zorgen dat je eiwit in de juiste buffer componenten kan elueren zodat het direct gebruikt kan worden voor allerlei toepassingen (voedingsextract, medicijn, etc.).



Figuur 10: Schematische weergave van een zuiveringsproces (GE Healthcare)

De zuiverheid van een product is afhankelijk van een aantal factoren:

- Waar wordt het product voor gebruikt (voeding, farma, diagnostiek)
- Regelgeving (veiligheid, aseptisch, immunogeen)
- Functionele zuiverheid (halfwaarde tijd, stabiliteit)
- Chemische zuiverheid (homogeen, onzuiverheden, additieven)

Een mooi voorbeeld voor het opzetten van een zuiveringsproces met verschillende stappen is te zien in het bijgevoegde YouTube filmpje van GE Healthcare:

<https://www.youtube.com/watch?v=KAKZGpdmWio>

Soorten chromatografiekolommen in de procesindustrie

Hieronder zijn in Tabel 3 en figuur 11 de verschillende chromatografiekolommen weergegeven en waar die veel toegepast worden in de praktijk.

Tabel 3: Voorbeeld toepasbaarheid chromatografie in de industrie

Techniek	Industrie	Proces stromen	Oppervlak
Axiale kolom	Voeding, Farma, Chemie	Medium, Groot	Groot
Radiale kolom	Voeding, Farma	Groot	Klein
Simulated Moving Bed (SMB)	Voeding, Farma, Chemie	Groot	Groot, Medium
Expanded Bed Adsorptie (EBA)	Voeding, Farma	Klein, Medium	Medium
True Moving Bed Adsorptie (TMB)	Voeding, Farma	Medium	Medium

In de kleinschalige preparatieve bewerkingen zijn de uitvoeringen van de chromatografiekolommen niet doorslaggevend. Echter bij grotere processtromen kan de keuze van groot belang zijn voor zuiverheid, procestijd, proces- en installatievolume, chemicaliën-, water- en energieverbruik.



Figuur 11: A) Axiale kolom; B) Radiale kolom; C) SMB; D) EBA; E) TMB

Duurzaamheid en energieverbruik

Het kiezen van de procescondities, de selectie van oplosmiddelen en buffers en het bepalen van het aantal opeenvolgende stappen zijn beslissend voor de mate waarin het proces duurzaam kan worden bedreven en voor het totale energieverbruik per kg product. Hierbij wordt ook de specifieke energiewaarde van de gebruikte chemicaliën en oplosmiddelen meegenomen.

Een goede richtlijn voor het beperken van het specifieke energieverbruik en het verbeteren van de duurzaamheid van chromatografie is:

- 1) Klein oppervlak (kosten voor cleanroom laag houden)
- 2) Hoge vloeistofdoorstroming (korte procestijden)
- 3) Continue processing (downscalen, minder kolommateriaal, minder batch chemicaliën, minder manueel gebruik, etc.)
- 4) Minimaal aantal zuiveringsstappen (koppelen van stappen zonder dat aanpassingen in buffer condities nodig zijn, dus lager chemicaliënverbruik en minder zoutlozingen)
- 5) Multipurpose (geen dedicated systemen maar wisselende producten kunnen worden gezuiverd)
- 6) Downscalen verlaagt lozing van organische verbindingen, CIP en zouten; vermindert het verbruik van bufferchemicaliën e.d.)

Snel assessment

Door beantwoording van onderstaande zes vragen kunt u snel vaststellen, of deze technologie relevant voor u kan zijn:

- 1) Voert u scheidingen uit met eiwitten?
- 2) Doet u scheidingen op preparatieve schaal en op lage druk?
- 3) Moet een specifiek eiwit uit een mengsel van andere eiwitten worden gehaald?
- 4) Worden waterige buffers gebruikt in pH bereik van 3 – 9?
- 5) Heeft het eiwit adsorptieve mogelijkheden, is het wel of niet geladen aan het oppervlak?
- 6) Is het eiwit makkelijk te scheiden op basis van grootte

Wanneer u een of meer van deze vragen met ja beantwoord hebt, kan deze technologie voor u relevant zijn.

Op de NL GUTS website staan

- Experts reports over deze technologie
- Presentaties over deze technologie
- Objectieve commentaren over toepassing van deze techniek

Zie: www.processinnovation.nl. Dit geeft u een beter idee over de vraag of de technologie in uw proces een toepassing kan vinden.

Commerciële informatie kunt u vinden op diverse websites

- Asahi Kasei
- Biorad
- GE Healthcare
- JSR Lifescience
- Kaneka
- Merck/Millipore
- Pall
- Proxcys
- Purolite
- TOSOH Bioscience

Voorbeelden van toepassingen

Chemie

- Concentreren van intermediates
- Zuiveren van functionele chemicaliën

Farmaceutische industrie

- Zuivering van enzymen

- Zuivering van bio-therapeutische eiwitten
- Zuivering van DNA

Voedingsmiddelen

- Zuivering van enzymen
- Zuivering van eiwitten
-

Bio-raffinage

- Winnen hydrofobe bio-based componenten (zoals vetten)
- Winnen hydrofiele bio-based componenten (zoals eiwitten, suikers)

Procesenvelop

Selectief scheiden of concentreren van eiwitproducten

Temperatuurgebied tussen circa 15 en 25 °C (meestal omgevingstemperatuur)

Eiwit concentratie in de voeding tussen 100 mg/l en 40 g/l

Eiwit concentraat < 40 g/l

Eiwit concentratie in het eluaat > 100 mg/l

Verskil in concentratie tussen concentraat en eluaat max 400 g/l.

Voordelen

Toepassing van zeer lage druk, dus geen speciale hogedruk regulerende apparatuur nodig

Energieverbruik is laag daar omgevingstemperatuur vaak voldoende is voor de chromatografie

Brede pH range mogelijk (pH 3 – 10)

Goede selectiviteit in te stellen bij variaties in buffer/pH/zout gebruik

Voorkomen vervuiling door goede regeneratie, waardoor hergebruik van resins (> 200 keer) mogelijk is

Zuiveringen met chromatografie kan vaak gesloten toegepast worden wat besmettingen kan voorkomen

Risico's

Achteruitgang van actieve liganden op de bolletjes

Overmatig buffergebruik bij niet goed instellen van een zuiveringsstap

Fouling door aspecifieke binding van hydrofobe stoffen (o.a. vetten) aan de harsbolletjes waardoor een meer agressieve regeneratie nodig is en dus zal het aantal actieve ligandin op de bolletjes afnemen

Commerciële status

Commercieel TRL 9

Specifieke toepassingen vereisen test op TRL 7

Doelgroepen

Chemische industrie

Voedingsmiddelenindustrie en zuivelindustrie

Waterzuiveringsinstallaties

Biotechnologische/Biochemische industrie

Plasma industrie

Vaccin industrie

Literatuur:

- 1) J.A. Wesselingh, J. Krijgsman: Biotechnology, Downstream, Delft Academic Press, 2016
- 2) L. Hagel, G. Jagschies, G. Sofer: Handbook of Process Chromatography, Second Edition, Elsevier, 2008.