

A centrifugális megoszlási kromatográfia, mint skálázható és fenntartható technológia természetes és szintetikus vegyületek ipari tisztítására

Vass Máté^{a,b,*}, Crul-Tóth Noémi^a, Kiss Anita^b, Hunyadi Attila^{a,c,d}

^aFarmakognózia Intézet, Szegedi Tudományegyetem, Szeged, Magyarország;

^bRotachrom Technológiai Zrt.

^cHUN-REN–SZTE Biológiaiilag Aktív Természetes Vegyületek Kutatócsoport, Szeged, Magyarország;

^dTermészetes Vegyületek Interdiszciplináris Központ, University of Szeged, Szeged, Hungary

Absztrakt

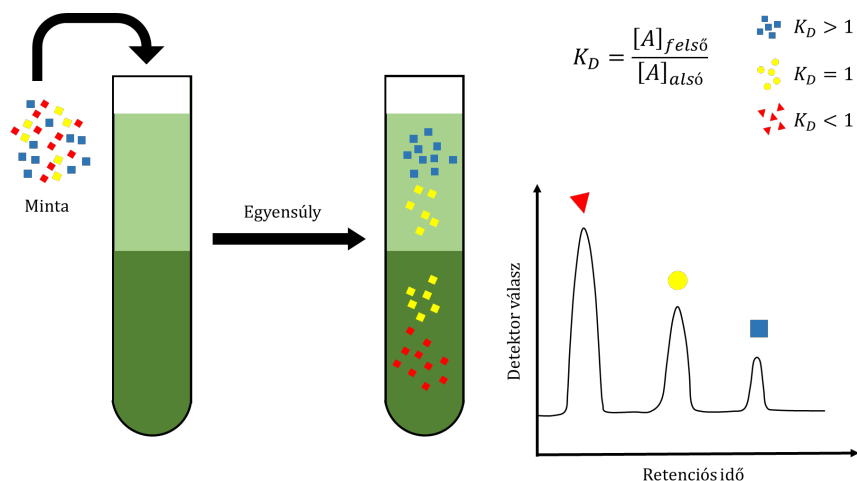
A centrifugális megoszlási kromatográfia (CPC) egy speciális, folyadék–folyadék fázisú kromatográfias technika, amelyben a két egymással nem elegyedő folyadék fázis hidrosztatikus egyensúlyban van egymással, és hatékony alternatívát kínál a szilárd fázisú kromatográfiákkal szemben a természetes vagy szintetikus vegyületek elválasztása és izolálása során. A széles körben elterjedt oszlopkromatográfiával ellentétben, ezen technika kivitelezéséhez ugyanakkor egy forgó rotorra van szükség. A módszer elméleti alapját az képezi, hogy a különböző anyagi minőségű komponensek a két nem elegyedő fázis között eltérő módon és mértékben oszlanak meg, amelyhez a forgásból adódóan kialakuló állandó centrifugális erőter hatására az egyik folyadékfázis immobilizálódik a rotortérben, kialakítva ezzel az elválasztáshoz szükséges állófázist. Így a CPC technológia előnyei közé tartozik, hogy nincsen szükség szilárd állófázisra, amely sok esetben a tisztítás költségeinek nagy részét teszi ki. A technika további jellegzetes előnye a skálázhatóság, illetve a fajlagosan alacsony oldószerigény. A tanulmány bemutatja a CPC technológia működési elvét, a használt oldószerrendszerek tulajdonságait, valamint az ipari alkalmazások szempontjából fontos elválasztási módokat. Tárgyaljuk a technika folyamatos elválasztásra való alkalmasságát is. Kiemelt figyelmet kapnak a CPC műszeres paraméterei, a módszertervezési szempontok, valamint az elválasztási hatékonyságot meghatározó tényezők. A RotaChrom Technológiai Zrt. által fejlesztett CPC-platformok (rCPC, iCPC) példáján keresztül áttekinthetjük az ipari szintű gyártási lehetőségeket, különös tekintettel a gyógyszeripari és biotechnológiai alkalmazásokra. Olyan példákon keresztül, mint oligonukleotidok, szteroidok, ciklikus peptidek vagy természetes alkaloidok tisztítása, a tanulmány rávilágít a CPC technológia sokoldalúságára és hatékonyságára. A módszer különösen értékes az olyan területeken, ahol a tisztaság, a hozam, és az oldószer visszanyerhetősége kulcsfontosságú tényezők, valamint ahol környezetbarát, költséghatékony megoldásokra van szükség. A CPC a folyadék–folyadék kromatográfias technikák új generációját képviseli, amely a folyamatos gyártás és a fenntartható elválasztástechnika irányába mutat.

1. Bevezetés

A CPC a folyadék–folyadék alapú kromatográfias technikák csoportjába tartozik, és az ellenáramú kromatográfia (CCC – *counter-current chromatography*) továbbfejlesztett formájaként ismert. Az első CCC-eljárást Ito dolgozta ki az 1960-as évek végén, amely azóta többféle technológiai változatban fejlődött tovább. A CCC működésének alapját egy egyensúlyban levő kétfázisú oldószerrendszer közötti megoszlási egyensúly képezi^{1,2}. A folyadék–folyadék kromatográfias módszerek esetében a centrifugális erőter alkalmazása teszi lehetővé, hogy a folyékony állófázis az oszlopon belül maradjon, miközben a mozgófázist azon ke-

resztül pumpálják. A CPC – akárcsak más CCC-eljárások, mint a csepp-ellenáramú kromatográfia (DCCC – *droplet counter-current chromatography*) és a toroidális tekercs-ellenáramú kromatográfia (TCCC – *toroidal coil counter-current chromatography*) – hidrosztatikus típusnak tekinthető. Ezekben a rendszerekben az állófázis megtartását hidrosztatikus erő biztosítja. Míg a DCCC-ben ez kizárólag a gravitáció hatására valósul meg³, a TCCC-ben és CPC-ben a centrifugális tér hozza létre ezt az erőt, jelentősen növelve a stabilitást és hatékonyságot. A centrifugális gyorsulás mértéke akár több száz „g” is lehet, ami sokkal intenzívebb megtartást tesz lehetővé, mint a gravitációs rendszerek.

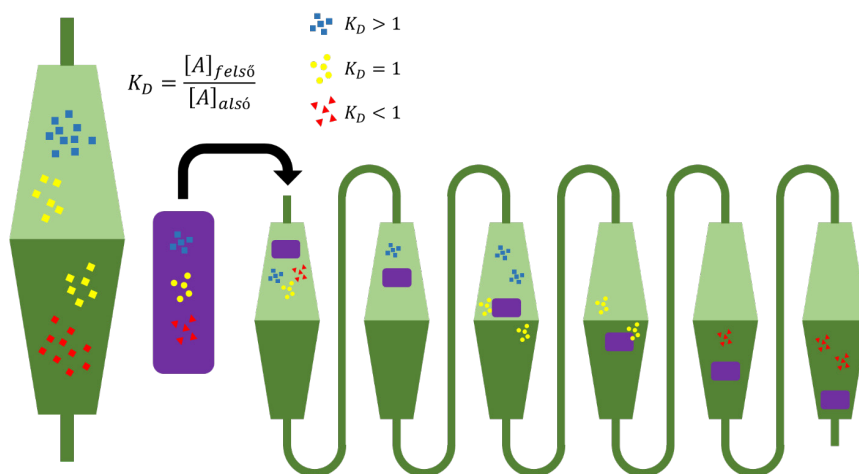
* Tel.: +36 62 545 558; e-mail: vass.mate.viktor@gmail.com



1. Ábra. Az ábra egy kétfázisú oldószerrendszerben bekövetkező komponensmegoszlást szemlélteti. A vizsgált mintában három komponens fordul elő, amelyek az alsó (sötétzöld) és felső (világoszöld) fázis között a megoszlási hányadosuknak megfelelően oszlanak el. A Sematikus kromatogramon az látható, hogyha az egyik komponens, melynek megoszlási hányadosa 1, akkor a komponens egyenlő mértékben oszlik meg a két fázis között. Amennyiben a megoszlási hányadosok kisebb, mint 1, a komponens az alsó fázisban dúsul fel, illetve ha nagyobb, mint 1 akkor az az adott komponens felső fázisban történő feldúsulását jelzi

A centrifugális erőteret alkalmazó módszerek is két nagyobb csoportot alkotnak, léteznek hidrosztatikus, és a hidrosztatikus és hidrodinamikus egyensúlyon alapuló rendszerek. A hidrosztatikus rendszerek közé sorolható a CPC, ahol az oszlopok egymásra helyezett szegmensekből állnak, amelyek egymásra helyezéssel, alakul ki a cellatér, melyek csatornákon keresztül sorosan kapcsolódnak egymáshoz. Előfordul, hogy esetleg hengeres cellákból állnak, amelyeket csövek kötnek össze^{4,5}. Ezeket az oszlopokat egy olyan centrifuga rotorjára helyezik, amely egyetlen tengely körül forog, így ez a rendszer egy állandó centrifugális tér hatásának van kitéve⁴. Ezzel szemben a hidrodinamikus CCC-rendszerek esetében – például a nagysebességű ellenáramú kromatográfia (HSCCC - *high-speed counter-current chromatography*) és annak továbbfejlesztett változata, a nagy teljesítményű ellenáramú kromatográfia (HPCCC - *high-performance counter-current chromatography*) – az oszlopok csövekből állnak, amelyek egy orsóra vannak feltekerve, és egyszerre forognak saját tengelyük körül, valamint keringenek a centrifuga központi tengelye körül bolygó-mozgást végezve. A két forgási tengely külön centrifugális erőt fejt ki, amelynek eredményeként egy összetett centrifugális erőter alakul ki, amely a csövezeték mentén változik irányban és erősségekben⁶. Ebben az esetben a kapilláris tekercsek dőlésszöge mechanikai erőt generál, amely egy Arkhimédész-csavar működéséhez hasonló módon tartja vissza az állófázist⁷. Jelenleg a kereskedelmi forgalomban két fő típus érhető el: a hidrosztatikus CPC és a hidrodinamikus HSCCC/HPCCC rendszerek. Egyéb konstrukciók inkább történeti érdekességként vagy tudományos prototípusként maradtak fenn, kereskedelmi alkalmazásuk nem jellemző⁸.

A CPC és a CCC technikák működésének alapját egyaránt a folyadék–folyadék megoszlási kromatográfia elve képezi. A módszer lényege, hogy két, egymással nem elegyedő folyadékfázist – amelyek dinamikus egyensúlyi állapotban vannak – folyamatosan érintkezésbe hoznak, ezáltal sok-sok pillanatnyi egyensúly alakul ki a cellatérben. Ezek az egyensúlyi lépések határozzák meg a rendszer elválasztási hatékonyságát, amelyet az elméleti tényérszámmal tudjuk jellemezni: minél több ilyen tényér van jelen, annál jobb a kromatográfiai felbontás⁹. A folyadék–folyadék rendszerben az egyik fázist – jellemzően az állófázist – a rotor belsejében immobilizálják, míg a másik fázist – a mozgófázist – ezen keresztül pumpálják át. A két fázis közötti nyíróerők hatására a mozgófázis finoman diszpergálódik az állófázisban, így alakul ki egy kiterjedt interfázisos felület apró cseppek formájában, ahol az anyagátadás megtörténik^{10,11}. Az elválasztás a komponensek megoszlási hányadosa (K_D) alapján történik, amely megmutatja, hogy az adott molekula hogyan oszlik meg az álló- és mozgófázis között. Azok a vegyületek, amelyek nagyobb affinitással rendelkeznek a mozgófázis iránt, gyorsabban eluálódnak, míg az állófázishoz erősebben kötődő komponensek később jelennek meg az eluátumban (1–2. ábra)^{12,13}. Ez az elválasztási elv jelentős előnyt biztosít a folyadék–szilárd kromatográfiai technikákkal szemben, ahol a komponensek csak a szilárd állófázis felületéhez férnek hozzá. A folyadék–folyadék rendszerekben ezzel szemben a komponensek az állófázis teljes térfogatát elérhetik, ami hatékonyabb anyagátadást és nagyobb elválasztási kapacitást tesz lehetővé⁴.



2. Ábra. Az ábra a CPC technológiára jellemző egyensúlyi folyamatokat szemlélteti. A sorba kapcsolt cellákban a minta (lila színnel jelölve) komponensei a két fázis – az alsó (sötétzöld) és a felső (világoszöld) – között a megoszlási hányadosuknak megfelelően oszlanak el. Ha az egyik fázist mozgásra kényszerítjük, elsőként az abban legnagyobb oldhatóságú komponens jelenik meg, majd idővel az egyensúly kialakulásával a többi komponens is eluálódik.

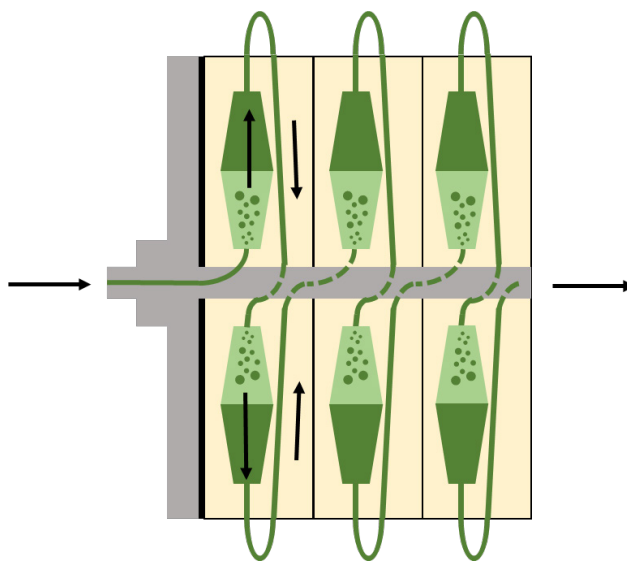
2. Centrifugális megoszlási kromatográfiás berendezés

Az állófázis oszlopon belüli megtartása érdekében az oszlopot egy a rotorban kialakuló centrifugális tér hozza létre. A CPC-oszlop (ami a CCC hidrosztatikus típusú oszlopaiknak egy változata) több, szinte teljesen azonos lemezekből áll, amelyeket egymás fölé helyeznek. Minden lemez sorozatosan metszett cellákat (kamrákat vagy csatornákat) tartalmaz, amelyeket keskeny csatornák kötnek össze, lásd 3. Ábra. A lemezeket egy tömítőlapp választja el egymástól, amelyet többnyire PTFE-ből (teflon) készítenek. E tömítőlapp egy kis furatán keresztül az egyik lemez utolsó cellája össze van kötve a következő lemez első cellájával. Ez a szerkezet hozza létre azt a térfogatot a rotoron belül, ahol az elméleti oszlop kialakul. (4. Ábra)

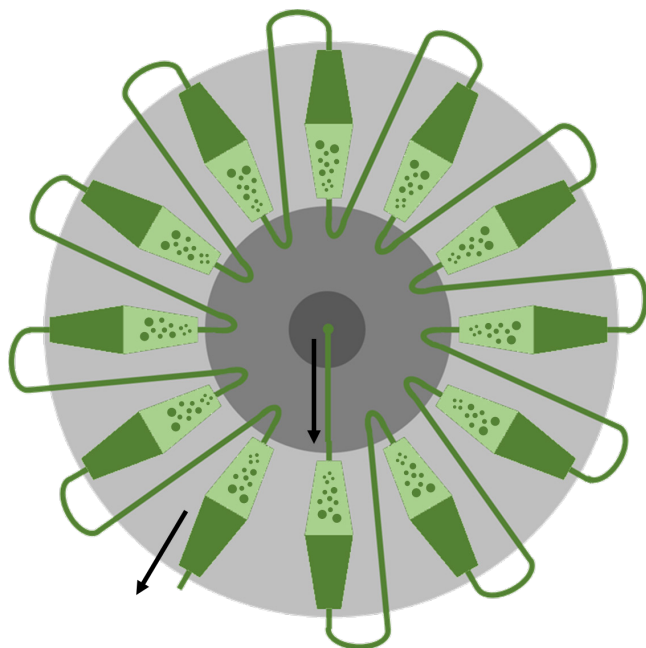
A kereskedelmi forgalomban elérhető rotorok több száz (sőt, néha több mint 2000) cellát tartalmaznak. Amikor a két fázist bejuttatják a rotorba, a centrifugális tér hatására az oszlop a rotor celláiban és csatornáiban alakul ki. Az oszlop térfogata megegyezik a rotor belső térfogatával, ami a csatornák és cellák össztérfogatától függ. Erőteljes centrifugális térben bizonyos hidrodinamikai paraméterek megváltoznak a centrifugális gyorsulás függvényében. Ez azt jelenti, hogy nagyobb centrifugális erőter lehetősé teszi diffúziós zónák kialakulását, ami növeli az elméleti tányérok számát. A Rotachrom által gyártott és jelenleg forgalomban lévő berendezések cellájának kialakítása szabadalmi oltalom alatt áll, továbbá in silico módszerekkel új, hatékonyságot növelő cellakialakítás és belső geometria alkalmazása is folyamatban van.

Az áramlási sebességet és a rotor forgási sebességét korlátozza a berendezés maximális üzemi nyomása. A kromatográfiás rendszer más elemeiből (pl. pumpa, detektor) érkező kapilláris csövek a rotorhoz (oszlophoz) forgó tömí-

téseken keresztül csatlakoznak, amelyek szintén meghatározott működési korlátokkal bírnak^{10,14,15,16}.



3. Ábra. A CPC rotor hosszszelvényi ábrája. Az ábrán látható a centrifugális erőter által rögzített állófázison (világoszöld) keresztülhaladó mozgófázis (sötétzöld) iránya. A forgótengelyre tányérszerűen rögzített lemezen található a CPC technológia alapegységei, a cellák. Ezeket egy belső csőrendszer kapcsolja össze. A cellák sugárirányban helyezkednek el a lemezen, míg egy tengelyirányú furat köti össze az egyik lemez utolsó celláját a következő lemez első cellájával. A csatornarendszer és a cellák a lemez anyagából kerülnek kialakításra, így azok gyakorlatilag a lemez belső üregeit alkotják.



4. Ábra. Az ábrán egy CPC rotor keresztmetszeti képét láthatjuk. Láthatók a cellák és a bennük kialakuló kétfázisú egyensúlyi rendszer. A mozgó fázis (sötét zöld) apró szemcsékre diszpergálva vándorol a centrifugális erőter által rögzített álló fázison (világos zöld). Abban az esetben, ha normál gravitációs erőterben kialakuló alsó fázis egyben a mozgófázis akkor felszálló, vagyis aszcendens módról beszélünk, fordított esetben pedig leszálló, vagyis deszcendens módról beszélünk. A friss mozgó fázist a rotor tengelyén keresztül vezetik be, illetve el.

3. A CPC-ben használt oldószerrendszerek tulajdonságai

A CPC-ben alapvetően használt oldószerrendszerek legalább két, nem elegyedő oldószerből állnak (biner rendszer), azonban a gyakorlatban gyakrabban alkalmaznak három- (terner) vagy négykomponensű (kvaterner) rendszereket. A klasszikus Arizona¹⁷ rendszer (*n*-heptán/etil-acetát/metanol/víz) és más négykomponensű HEMWat rendszerek a laboratóriumi elválasztásokban széles körben elterjedtek, mivel jó termelékenységet és terhelhetőséget biztosítanak. Ennek ellenére kevés példa van arra, hogy ezeket az oldószereket újrahasonosították volna CPC-bemenetre történő visszavezetéssel kismolekulák tisztítása során. Ennek egyik oka, hogy az észter típusú oldószerek alkoholokkal vagy vízzel kombinálva a minta hidrolíziséhez vagy átésztereződéséhez vezethetnek az újrahasonosítás során, amely hosszú távon ronthatja a kromatográfiai teljesítményt^{18,19}. Ennek ellenére a gyakorlat azt mutatja, hogy a kvaterner rendszerek elterjedtebbek a CPC-vel végzett laboratóriumi körülmények között kivitelezett természetes vagy szintetikus vegyületek izolálásában. Egy 1984 és 2014 között készült elemzés alapján a vizsgált 2322 rendszer 57%-a kvaterner, míg összesen 35%-a volt terner rendszer²⁰. A kvaterner rendszerek 79%-a volt az Arizona típusba sorolható, amely – bár nem minden elválasztási feladathoz nyújt kellő szelektivitást – mégis népszerű a széles körű szakirodalmi háttér és a könnyű fejleszthetőség miatt^{21,22,23,24}. Ugyanakkor a három vagy négykomponensű rendszerek

rugalmasabb lehetőséget kínálnak az oldószer–molekula kölcsönhatások finomhangolására, mivel lehetőség van tet-szőleges három vagy négy oldószer kombinációjának kipróbálására – ez gyakran hatékonyabb megoldást eredményez. [24] Pozitív jelenség, hogy a jelenleg egyre elterjedtebben preferált fenntartható oldószerhasználati irányzatok hatására számos környezetbarát, jól bevált oldószer áll rendelkezésre a fejlesztésekhez^{25,26,27}. Emellett új típusú oldószerek – például fluorozott oldószerek, mély eutektikus oldószerek (DES-ek)^{28,29} és ionfolyadékok^{30,30,32} – új távlatokat nyitnak a kétfázisú rendszerek összeállításában is.

4. Az ellenáramú kromatográfia alapvető üzemmódjai és eluálási módszerei

Az alkalmazott fázisok sűrűsége alapján a CCC-technikában két alapvető üzemmód különíthető el: az emelkedő (ascending) és a leszálló (descending) üzemmód. Az előbbi esetben a könnyebb, míg az utóbbiban a nehezebb fázis tölti be a mozgófázis szerepét. A két mód tehát attól függően kerül alkalmazásra, hogy a két nem elegyedő fázis közül melyik a mozgó- és melyik az állófázis. Jellemzően a könnyebb fázis kevésbé poláris, ezért az emelkedő módot gyakran „normálfázisú”, míg a leszálló módot „fordított fázisú” elválasztásként is említik. Fontos azonban megjegyezni, hogy ez nem minden esetben igaz: például a kloroform és a diklórmétán sűrűsége nagyobb, mint a vízé, így ezeknél a kivételeknél eltérhet a fázisok szokásos szerepe^{33,34,35,36}.

Mivel a két fázis ellenáramként van jelen, a folyadékok pumpálási iránya kiemelten fontos, mely megfelelő szeleprendszer, például egy kétsatornás, négyportos (ASC/DSC) szelep alkalmazásával bármikor megfordítható. Ennek következtében az állófázis és a mozgófázis felcserélődik. Ezt a technikát „kettős üzemmódnak” (dual-mode) nevezzük. Amennyiben a fáziscsere többször is megtörténik egyazon futtatás során, az eljárást „többszörös kettős módnak” (multiple-mode) hívjuk. Bár a dual-mode és multiple-mode módszerek viszonylag ritkán alkalmazottak, bizonyos célokra kifejezetten előnyösek lehetnek, például a kromatográfiai felbontás növelésére (az elméleti tényérok számának emelésevel), vagy az elválasztási idő lerövidítésére. Fontos megjegyezni, hogy ez a két cél gyakran egymással ellentétes: ha a módszert nehezen elválasztható csúcsok szétválasztására használják, az elválasztási idő általában megnő^{8,37,38}.

A legtöbb CPC- és CCC-elválasztás izokratikus módon történik, vagyis az oldószerösszetétel állandó marad a futtatás során. Különösen CCC esetén kritikus az izokratikus eluálás előnye, mivel így minimalizálható az állófázis-vesztés. Ez természetesen függ a minta (pl. amfipatikus vegyületek jelenléte) és az oldószerrendszer tulajdonságaitól, azonban megfelelő oldószer-választás, áramlási sebesség és centrifugális erőter mellett a CPC esetében az állófázis-vesztés kevesebb mint 2%/óra is lehet a rendszer egyensúlyának beállta után. Gradiens elúció esetén viszont az állófázis jóval nagyobb mértékben elveszhet, ami rontja a folyamat stabilitását. Emiatt a gradienselúció alkalmazá-

sa összetettebb, noha különösen hasznos lehet nyers, természetes eredetű kivonatok esetében, ahol a komponensek megoszlási hányadosai jelentősen eltérnek egymástól⁸.

Az oldószerek in-line újrahasonosíthatósága – különösen a folyamatos üzemű elválasztási folyamatokban – kiemelten fontos gazdaságossági szempont. A RotaChrom Technológiai Zrt. egy hatékony, sűrűség alapú összetétel-korrekciós algoritmust fejlesztett ki, mely képes ipari méretben a CPC által elvárt térfogatáramban és valós időben, az elválasztáshoz szükséges 2 fázisú oldószerszert előállítani. Az egység kivitelezésével precíz, ipari méretű oldószerszert előállítása mellett a Társaság kifejezett hangsúlyt fektetett a folyamat gazdaságosságának maximalizálására és egyúttal a környezeti hatás minimalizálására. Az ipari CPC berendezés mellett integrált oldószert visszaforgató rendszer is kifejlesztésre került, melynek elemei folyamatszimulációs eszközökkel kerülnek kiválasztásra és optimalizálásra. Az így definiált ipari léptékű, zárt oldószervezelési megoldással kiegészített elválasztástechnika alkalmazhatóságát, az elmúlt években több iparágban is sikeresen bizonyította a Társaság¹⁹.

5. Elválasztási hatékonyság a CPC-ben

A CPC-ben az elválasztás hatékonyságát számos tényező befolyásolja, amelyek négy fő csoportba sorolhatók:

1. A minta oldhatósága,
2. Az oldószerszert sűrűsége,
3. A műszer korlátai,
4. A módszerből adódó korlátok.

Az első csoportba azok a paraméterek tartoznak, amelyek a minta fizikai és kémiai tulajdonságaitól függenek az oldószerszertben: a célmolekulák megoszlási hányadosa, a minta mátrixa, a komponensek (célmolekulák és háttérmátrix) koncentrációjának korlátai, valamint a befecskendezett mennyiség (ez utóbbit néha a 4. csoporthoz is sorolják). A második csoport az oldószerszert fizikai tulajdonságaira vonatkozik, mint például a felületi feszültség, a sűrűség és a viszkozitás. A harmadik csoportba tartoznak a műszer paraméterei, például a cellák alakja, mérete, térfogata, valamint a csatornák és cellák anyaga. A negyedik csoport pedig a módszerfüggő tényezőket tartalmazza: az üzemmód (pl. a felső vagy alsó fázist használják mozgó-, illetve állófázisként), a mozgófázis áramlási sebessége, a rotor fordulatszáma, a mintamennyiség és koncentráció. Valószínűsíthető, hogy a harmadik csoport (a műszer korlátai) meghatározza a második és negyedik csoportból eredő nehézségek mértékét, mivel egy jól megtervezett berendezés lehetővé teszi a jobb módszertervezést, csökkentve a kevésbé stabil oldószerszertekből adódó problémákat^{16,39}.

Az oszlopterhelés növelése a megfelelő elválasztási hatékonyság megtartásával kétféleképpen valósítható meg: vagy a minta térfogatának növelésével (térfogatterhelés), vagy annak koncentrációjának emelésével (tömegterhelés).

Emellett magasabb terhelés elérhető fejlett elválasztási módokkal is, mint például a zárt hurkos recirkuláció, a szekvenciális CPC, vagy a trapping multiple dual mode technika^{40,41,42,43}. Ugyanakkor a koncentráció növelése jelentősen módosíthatja a fázisok összetételét, ami hatással van a rendszer termodinamikai, fizikai és hidrodinamikai tulajdonságaira (pl. fázisösszetétel, viszkozitás, csúcsformák, oszlophatékonyság). Berthod és munkatársai⁴⁴ korán rámutattak, hogy az állófázis-veszteség nem csupán a minta mennyiségétől, hanem az oszlop kialakításától és az üzemeltetési paramétereitől is függ. Más vizsgálatok az injektált térfogat és koncentráció elválasztásra gyakorolt hatását elemezték, de sok esetben a kromatogramok még az izotermák lineáris tartományán belül maradtak, vagy a detektor telítettsége miatt a csúcsformák nem voltak jól értékelhetők^{45,46,47}. A szakirodalomban számos megoldási javaslat született az oszlop túlterhelésének elkerülésére a maximálisan alkalmazható mintakonzentráció meghatározásával. Ezek közé sorolható az ál-terner diagrammok^{48,49}, illetve shake-flask kísérletekkel meghatározott egyensúlyi és fizikai paraméterekkel megbecsült maximális koncentráció^{50,51}.

6. A centrifugális megoszlási kromatográfia alkalmazásai

Számos tudományos cikk foglalkozik természetes vegyületek elválasztásával CPC segítségével. Az ilyen típusú alkalmazások nagy száma – különösen gazdag természetes mátrixokból izolált (és tisztított) vegyületek esetén – több előnynek köszönhető, amelyeket a CPC (és általában a CCC) kínál. A sikeres CCC-eljárás három alapfeltétele közül az utolsó (de nem kevésbé fontos) az, hogy az elválasztás két, egyensúlyban lévő fázis között történjen. Ez a feltétel különösen jellemző az ellenáramú folyadékkromatográfiára: míg a hagyományos, szilárd hordozó alapú kromatográfiánál a megoszlási hányados (K_D) akár több ezres értéket is elérhetnek, a CCC esetén a legideálisabb K_D értékek közel esnek az 1-hez (természetesen vegyületenként eltérően). A hagyományos, egyirányú üzemmódokban (ASC vagy DSC) a K_D érték ideális esetben 0,5 és 3,0 közé esik. Ilyen körülmények között gyakran már 0,2 értékű megoszlási hányadosbeli különbség is elegendő a csúcsok elválasztásához. A (multi-)dual módok alkalmazása során a megfelelő K_D értékek tartománya jóval szélesebb lehet. Az eloszlási követelmény általános szabályt alkot: az oldószerszert mindig a célvegyületek tulajdonságaihoz kell igazítani. Ennek ellenére klasszikus alkalmazásoknál igaz, hogy minél polárosabbak a célvegyületek, annál polárosabb oldószerszert kell használni a megfelelő eloszlás eléréséhez⁸.

7. Ipari léptékű gyártás – magyar fejlesztés

A RotaChrom Technológiai Zrt. egy magyar, ipari méretű CPC-s technológiai platform fejlesztő, amely tisztítási megoldásokat kínál a gyógyszeripar, az étrendkiegészítők és a növényi kivonatok területén⁵². A cég által fejlesztett modellek között szerepelnek a laboratóriumi CPC Modeler,

a GMP-kompatibilis ipari rCPC, valamint a nagyteljesítményű pCPC, amelyek egymásra épülő, skálázható technológiai láncot alkotnak, amely a laboratóriumi módszerfejlesztéstől az ipari, szabályozott gyártásig biztosít folytonos átjárhatóságot, és a lineáris skálázhatóságot⁵³.

A fejlesztési folyamat kiindulópontját a CPC Modeler jelenti, amely egy laboratóriumi méretű, moduláris platform. A rendszer ötvözi a digitális prediktív módszerfejlesztést és a félpreparatív validáció lehetőségét. A szoftveres modell alapját egy kiterjedt, tudományos irodalomból és kísérleti adatokból felépített adatbázis képezi, amely kémiai hasonlóság alapján javaslatot tesz az adott vegyületre leginkább alkalmazható oldószerrendszerre, elválasztási paraméterekre és frakciógyűjtési stratégiára. A felhasználónak mindössze a célmolekula megoszlási hányadosát (K_D -értékét) és a minta pontos szennyezőprofilját kell megadnia. Az alkalmazás ezután prediktív módon modellezi a tisztítási teljesítményt, vizualizálja a várható frakcióprofil, és kiszámítja a hozam, tisztaság és szelektivitás becsült értékeit. A gyakorlati kivitelezés a Benchtop CPC egységgel történik, amely milligrammos mennyiségektől több gramm mennyiségű minta frakcionálására alkalmas, és teljes funkcionalitásában tükrözi az ipari méretű rendszerek működését – beleértve a rotorcellát, az UV-detektálást, a frakciógyűjtést, valamint a folyadék szállító és vezérlő egységeket. A laboratóriumi mérések célja, hogy pontos képet adjanak az elválasztási teljesítményről és a rendszerparaméterek érzékenységről, így biztosítva a későbbi skálázás pontosságát⁵⁴.

Az rCPC egy fejlett centrifugális megoszlási kromatográfia platform, amely laboratóriumi és ipari léptékű felhasználásra is alkalmas. Pilot jellegű kutatásokban, kampányszerű munkákban és folyamatos-szakaszos gyártásban egyaránt hatékonyan alkalmazható. A rendszer kiváló tisztaságot, hozamot és áteresztőképességet biztosít, miközben megőrzi költséghatékonyságát. A GMP-kompatibilis változat megfelel az EudraLex Volume 4., az FDA 21 CFR Part 11 és a GAMP 5 előírásainak, így alkalmas a szabályozott környezetben történő alkalmazásra. A platform különösen hasznos aktív gyógyszerhatóanyagok, biotechnológiai termékek, természetes eredetű kivonatok és finomkémiai intermedierek nagy tisztaságú előállításában⁵³.

A termelés további felskálázására a pCPC platform áll rendelkezésre, amely ipari méretű, folyamatos üzemre tervezett tisztítórendszer. Központi eleme az iCPC egység – a világ legnagyobb CPC berendezése –, amely akár évi több tonnányi CoI (compound of interest) termelésére szolgál. Az iCPC működését egy moduláris SKID-rendszer egészíti ki, amely biztosítja az oldószer elállítását, tárolását, frakciógyűjtését, hulladékkezelését és visszanyerését. A mixer-settler egység automatikusan generálja a szükséges fázisegyensúlyt, a buffer egység hőmérséklet-szabályozott tárolást biztosít, míg a frakciógyűjtő mobil és nagy kapacitású tárolókat alkalmaz. A hulladék oldószer gyűjtő egység és a bepárló külön kezeli a nem kívánt frakciókat, az utóbbi kapartfalú bepárló oldja meg az oldószer visszanyerését és

recirkulációját. A folyamat vezérlését egy robusztus, ipari környezetre tervezett PLC-alapú rendszer végzi, amely valós idejű követését és automatizált szabályozást tesz lehetővé⁵⁵.

Az így megalkotott pCPC rendszer lehetővé teszi az elválasztási módszerek lineáris skálázását és szabályozott gyártási környezetbe történő átültetését, így ipari megoldásokként is alkalmazhatóak lehetnek a gyógyszeripar, biotechnológia, növényi kivonatok feldolgozása és más speciális finomkémiai területek számára^{53,54,55}.

A RotaChrom az általuk fejlesztett CPC-k hatékonyságát különösen a gyógyszeripar és a biotechnológia területén igazolta, ahol a komplex molekulák izolálása és tisztítása kiemelkedő jelentőséggel bír. Az eljárás alkalmazhatóságát több gyakorlati példa is alátámasztja, eltérő molekulatípusok és oldószerrendszerek esetén. Oligonukleotidok izolálása során egy húsz bázispár hosszúságú, módosítatlan egyszálú oligonukleotid tisztítását végezték etil-acetát/n-butanol/nukleázmentes víz alapú kétfázisú rendszerben. A tisztaság 88%-ról 96%-ra emelkedett, miközben a visszanyerési arány elérte a 94%-ot. A tisztítás után az oldószer eltávolítása liofilizációval, a maradék szennyeződések eliminálása alkoholos kicsapással történt^{56,57}. A természetes eredetű alkaloidok közül a *Mitragyna speciosa* (kratom) kivonatából történő mitraginin izolálása szintén sikeresen valósult meg CPC alkalmazásával. A célmolekula mellett a potenciálisan veszélyes 7-hidroxi-mitraginin származékot is egyetlen lépésben sikerült elkülöníteni. A kiválasztott etil-acetát alapú oldószerrendszerrel 99%-os tisztaságot és 81%-os visszanyerést értek el, miközben a termelékenység elérte a 15 g/óra értéket⁵⁸. Fehérjealapú hatóanyagok esetén a rekombináns humán albumin (rHA) tisztítása során egy vizes kétfázisú oldószerrendszert fejlesztettek ki, amely több mint 95%-os tisztaságot és 96%-os hozamot biztosított. A folyamat során óránként 2,5 gramm tiszta rHA kinyerése vált lehetővé, amely már ipari léptékű termeléshez is megfelelő alapot nyújt⁵⁷. A szteroid alapú aktív gyógyszerhatóanyagok esetében a fermentációs termékekben előforduló sztereoizomer szennyeződések eltávolítására alkalmazták a CPC-t, a hagyományos többlépcsős eljárások helyett. A metil-izobutil-keton/aceton/víz rendszerrel végzett tisztítás eredményeként 320 g/óra áteresztőképességet, 98,7%-os tisztaságot és 76%-os visszanyerést értek el, amely jelentős hatékonyságnövekedést jelentett az ipari gyártás szempontjából⁵⁷. Hasonlóan sikeres eredményeket mutatott a digoxin izolálása is, amelyet a *Digitalis lanata* fermentált leveleiből nyert kivonatokból állítottak elő. Halogénezett oldószerrendszer alkalmazásával a nyers kivonatból közvetlenül 98%-nál nagyobb tisztaságú digoxin volt nyerhető, 98%-os visszanyerési arány és 1 g/óra termelékenység mellett. Nem-szteroid hatóanyagok esetében az anasztrozol, egy aromataz-inhibitor, tisztítására etilalapú oldószerrendszert alkalmaztak. A CPC-módszerrel 99% feletti tisztaságot sikerült elérni egyetlen lépésben, amelyet további kristályosítás követett, így a végső tisztaság 99,9% fölé emelkedett. A módszer 1 g/óra áteresztőképességgel és

75%-os hozammal működött⁵⁷. A daganatellenes hatóanyagok előállításában kulcsszerepet játszó 10-dezacetilbak-katin III (10-DAB III), a docetaxel szintézis egyik fontos intermediere, szintén sikeresen izolálható volt CPC-vel. Aceton alapú oldószerrendszer alkalmazásával 2 g/óra termelékenységet 99%-os tisztaságot és 95%-os visszanyerést ért el⁵⁹. A ciklosporin A, egy ciklikus oligopeptid antibiotikum izolálása terén is jelentős előnyt biztosított a CPC technológia. A hagyományosan időigényes kristályosítási és preparatív HPLC-eljárásokat felváltva, egy alkánalapú oldószerrendszerrel mindössze 15 perc alatt sikerült 99%-os tisztaságot elérni ipari léptékben. A folyamat 22,4 g/óra áteresztőképességgel és 70–90%-os visszanyeréssel zajlott^{57,60}. Végezetül a Szegedi Tudományegyetemmel együttműködésben természetes eredetű ekdiszteroidok izolálását valósították meg CPC segítségével kilogrammos nagyságrendben. Az így előállított kaloniszteron állatkísérletben képes volt megelőzni a nagy zsír- és cukortartalmú étrend következtében kialakuló elhízást és jelentősen javítani a metabolikus szindróma számos paraméterét⁶¹.

8. A centrifugális megoszlási kromatográfia előnyei és hátrányai a természetes vegyületek izolálásában

Más modern kromatográfiai technikákkal összehasonlítva a CPC különösen alkalmas nagyobb léptékű elválasztásokra a jelentősen alacsonyabb fajlagos költségek miatt. A folyékony állapotú állófázis és a szilárd hordozó hiánya számos előnyt biztosít a hagyományos folyadékkromatográfiával szemben. Ide tartozik a nagyfokú szelektivitás a sokféle alkalmazható kétfázisú oldószerrendszer révén, a molekulák irreverzibilis adszorpciójának elkerülése, a nagy terhelhetőség, a teljes minta-visszanyerhetőség, az alacsony mintakárosodás kockázata és a skálázható méretnövelés. Ezen felül a szilárd hordozót nem igénylő technológiák nem használnak drága töltőanyagokat, és jobban tolerálják a szilárd részecskéket is. A hagyományos eljárásokhoz képest kisebb oldószerfogyasztás, illetve a zöld oldószerek használatára

való törekvés környezetbaráttá teszi a CPC-t. A folyékony állófázis miatt egyszerűbb a berendezés tisztítása is, mivel nincs adszorpciós jelenség. A méretnövelés során ugyanakkor nem kell számolni a felbontás csökkenésével, sem kompenzálni azt, hiszen a lineáris skálázhatóságból adódóan a rendszer a szelektivitását megtartja. A legnagyobb hátrány azonban az, hogy minden egyes új mintához elkerülhetetlen az elválasztási feltételek, és a megfelelő oldószerrendszer kiválasztása. Lásd 1. Táblázat

9. Összegzés

A CPC korszerű és sokoldalú technológia, amely hatékony alternatívát kínál a hagyományos szilárd fázisú kromatográfiai módszerekkel szemben, különösen a természetes vegyületek elválasztásában és tisztításában. A CPC egyik legfőbb előnye, hogy szilárd hordozó nélkül működik, ezáltal minimalizálva az irreverzibilis adszorpciót és lehetővé téve a teljes mintavisszanyerést. A széles oldószerválaszték, a skálázhatóság, valamint a nagyfokú felbontás, szelektivitás és tisztaság mind hozzájárulnak a technika ipari szintű alkalmazhatóságához. Bár a módszer bevezetése és optimalizálása kezdetben összetett lehet különös tekintettel az oldószerrendszer kiválasztására és a berendezés paramétereinek finomhangolására – a hosszú távú előnyök, beleértve a költséghatékonyságot és a fenntarthatóságot, jól indokolják alkalmazását. A RotaChrom által fejlesztett rendszerek példája is alátámasztja, hogy a CPC képes betölteni azt a piaci igényt, amely a hatékony, gyors és környezetbarát elválasztási megoldásokat részesíti előnyben a gyógyszeripar és más kapcsolódó iparágak területén.

Köszönetnyilvánítás

Vass Máté munkáját a kooperatív doktori program (EKÖP-KDP-24-SZTE-3), a természetes anyag származékokon végzett vonatkozó kutatásokat az NKFIH (K146359) támogatta.

1. Táblázat. CPC előnyei és hátrányai

Előnyök	Hátrányok
Nincs szükség drága preparatív oszlopra	Kevésbé ismert technika – kevesebb publikáció, tapasztalat
Nincs szükség mintaelőkészítésre, abból a szempontból, hogy esetleg a szilárd állófázis károsodhat bizonyos típusú (pl. savas, lúgos) minták esetén	Az oldószerrendszer kiválasztása időigényes lehet, fejlett analitikai hátteret és tudást igényel
Nincs irreverzibilis adszorpció, nagyobb a mintavisszanyerés	Elúciós mód optimalizálása is sok időt vehet igénybe, a tökéletes oldószerrendszer megtalálása után is
Nagy terhelhetőség, lehetőség van nagy koncentrációjú minták injektálására az oszlop túlterhelése nélkül	Az oldószerrendszer instabilitása rontja a felbontást, az állófázis kimosódása („vérzése”) gyakran nagyobb mértékű az előzetesen vártnál (A megfelelő oldószerrendszer kiválasztásával ez elkerülhető, minimálisra redukálható)
A széles oldószerválaszték miatt alacsony a célvegyület károsodásának (denaturáció, degradáció) kockázata	A minta mátrixa (pl. szaponin-tartalom) befolyásolhatja a stabilitást, amely szintén az állófázis kimosódásával járhat
Olcsebb, analitikai tisztaságú oldószerek is elegendőek	Túlkonzentrált minta esetén emulzió képződhet, mely fokozza az állófázis kimosódásának esélyét
Az 1 grammra jutó oldószerfogyasztás alacsony, ezért kiérdemli a „Zöld kromatográfia” címet	Kis léptékű tisztításnál gyengébb felbontás, mint néhány hasonló léptékű HPLC-s módszer esetében
Veszteség nélkül méretnövelhető – nagyobb eszközzel elérhető az ugyanolyan (vagy jobb) felbontás	
Egyszerűbb tisztítás – nincs adszorpciós szennyeződés	
Széles oldószerválaszték – a célvegyülethez igazítható	

Hivatkozások

1. Y. Ito, I. Aoki, E. Kimura, N. Nunogaki, X. Nunogaki, New micro liquid-liquid partition techniques with the coil planet centrifuge, *Anal. Chem.* 1969; 41:1579–1584. <https://doi.org/10.1021/ac60281a004>
2. Y. Ito, R. L. Bowman, Countercurrent chromatography: liquid-liquid partition chromatography without solid support. *Science* 1970; 167:281-283. <https://doi.org/10.1126/science.167.3916.281>
3. T. Tanimura, J. J. Pisano, Y. Ito, R. L. Bowman, Droplet countercurrent chromatography. *Science* 1970; 169: 54-56. <https://doi.org/10.1126/science.169.3940.54>
4. A. P. Foucault, *Centrifugal Partition Chromatography*, Dekker, New York, N.Y., 1995.
5. L. Lorantfy, L. Nemeth, Extraction cell for a centrifugal partition chromatograph, a centrifugal partition chromatograph containing such a cell, and a method for producing such an extraction cell, WO 2017/037489 A1.
6. A. Berthod, *Countercurrent chromatography: The support-free liquid phase*, Elsevier Science, Amsterdam, 2002. <https://doi.org/10.1080/10826070701277067>
7. Y. Ito, R. L. Bowman, Countercurrent chromatography with flow-through coil planet centrifuge. *Science* 1971; 173: 420-422. <https://doi.org/10.1126/science.173.3995.420>
8. M. Bojczuk, D. Żyzelewicz, P. Hodurek, Centrifugal partition chromatography - A review of recent applications and some classic references. *J. Sep. Sci.* 2017; 40(7):1597-1609. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601221>
9. G. D. Christian, P. K. Dasgupta, K.A. Schug, *Analytical Chemistry*, seventh ed., Wiley, USA, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7884-7>
10. W. Murayama, T. Kobayashi, Y. Kosuge, H. Yano, Y. Nunogaki, K. Nunogaki, A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. *J. Chromatogr.* 1982; 239:643-649. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)82022-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)82022-1)
11. A. P. Foucault, Enantioseparations in counter-current chromatography and centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 2001; 906:365-378. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00499-4)
12. C. Schwienheer, J. Merz, G. Schembecker, Investigation, comparison and design of chambers used in centrifugal partition chromatography on the basis of flow pattern and separation experiments. *J. Chromatogr. A.* 2015; 1390:39-49. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.085>
13. F. Bezold, J. Goll, M. Minceva, Study of the applicability of non-conventional aqueous two-phase systems in counter-current and centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2015; 1388:126-132. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.021>
14. M. J. van Buel, L. A. M. van der Wielen, K. C. A. M. Luyben, Pressure drop in centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 1997; 773:1-12. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00248-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00248-3)
15. M. Bourdat-Deschamps, C. Herrenknecht, B. Akendengue, A. Laurens, R. Hocquemiller, Separation of protoberberine quaternary alkaloids from a crude extract of *Enantia chlorantha* by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 2004; 1041:1431-52. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.035>
16. S. Adelman, G. Schembecker, Influence of physical properties and operating parameters on hydrodynamics in Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A* 2011; 1218:5401-5413. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.064>
17. A. Berthod, M. Hassoun, M. J. Ruiz-Angel, Alkane Effect in the Arizona Liquid Systems Used in Countercurrent Chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005; 383:327–340. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0016-7>
18. J. Krause, T. Oeldorf, G. Schembecker, J. Merz, Enzymatic Hydrolysis in an Aqueous Organic Two-Phase System Using Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2015; 1391:72–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.071>
19. L. Lorántfy, D. Rutterschmid, R. Örkenyi, D. Bakonyi, J. Faragó, G. Dargo, A. Könczöl, Continuous Industrial-Scale Centrifugal Partition Chromatography with Automatic Solvent System Handling: Concept and Instrumentation. *Org. Process Res. Dev.* 2020; 24:2676–2688. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00338>
20. K. Kalicka-Woźniak, I. Garrard. A Comprehensive Classification of Solvent Systems Used for Natural Product Purifications in Countercurrent and Centrifugal Partition Chromatography. *Nat. Prod. Rep.* 2015; 32:1556–1561. <https://doi.org/10.1039/C5NP00061K>
21. N. Fumat, A. Berthod, K. Faure, Effect of Operating Parameters on a Centrifugal Partition Chromatography Separation. *J. Chromatogr. A* 2016; 1474:47–58. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.014>
22. G.F. Pauli, S. M. Pro, J. B. Friesen, Countercurrent Separation of Natural Products. *J. Nat. Prod.* 2008; 71:1489–1508. <https://doi.org/10.1021/np800144q>
23. J. B. Friesen, G.F. Pauli, Rational Development of Solvent System Families in Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2007; 1151:51–59. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.126>
24. J. B. Friesen, J. B. McAlpine, S. N. Chen, G. F. Pauli, Countercurrent Separation of Natural Products: An Update. *J. Nat. Prod.* 2015; 78:1765–1796. 24. <https://doi.org/10.1021/np501065h>
25. D. Prat, O. Pardigon, H. W. Flemming, S. Letestu, V. Ducandas, P. Isnard, E. Guntrum, T. Senac, S. Ruisseau, P. Cruciani, P. Hosek, Sanofi's Solvent Selection Guide: A Step Toward More Sustainable Processes. *Org. Process Res. Dev.* 2013; 17:1517–1525. 25. <https://doi.org/10.1021/op4002565>
26. D. J. C. Constable, C. Jimenez-Gonzalez, R. K. Henderson, Perspective on Solvent Use in the Pharmaceutical Industry. *Org. Process Res. Dev.* 2007; 11:133–137. 26. <https://doi.org/10.1021/op060170h>
27. P. G. Jessop, Searching for Green Solvents. *Green Chem.* 2011; 13:1391–1398. <https://doi.org/10.1039/c0gc00797h>
28. F. Bezold, M. Minceva, A Water-Free Solvent System Containing an L-Menthol-Based Deep Eutectic Solvent for Centrifugal Partition Chromatography Applications. *J. Chromatogr. A.* 2019; 1587:166–171. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.083>
29. F. Bezold, M. E. Weinberger, M. Minceva, Assessing Solute Partitioning in Deep Eutectic Solvent-Based Biphasic Systems Using the Predictive Thermodynamic Model COSMO-RS. *Fluid Phase Equilib.* 2017; 437:23–33. 29. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.01.001>
30. A. Berthod, M. J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, Recent Advances on Ionic Liquid Uses in Separation Techniques. *J. Chromatogr. A* 2018; 1559:2–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.044>
31. F. Bezold, S. Roehrer, M. Minceva, Ionic Liquids as Modifying Agents for Protein Separation in Centrifugal Partition Chromatography. *Chem. Eng. Technol.* 2019; 42:474–482. <https://doi.org/10.1002/ceat.201800369>

32. J. H. P. M. Santos, M. R. Almeida, C. I. R. Martins, A. C. R. V. Dias, M. G. Freire, J. A. P. Coutinho, S. P. M. Ventura, Separation of Phenolic Compounds by Centrifugal Partition Chromatography. *Green Chem.* 2018; 20:1906–1916. <https://doi.org/10.1039/C8GC00179K>
33. M. J. van Buel, L. A. M. van der Wielen, K. C. A. M. Luyben, Modelling gradient elution in centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 1997; 773:13-22. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00245-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00245-8)
34. A. Berthod, T. Maryutina, B. Spivakov, O. Shipugin, I. A. Sutherland, Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2009; 81(2):355-387. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00245-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00245-8)
35. E. Delannay, A. Toribio, L. Boudesocque, J. M. Nuzillard, M. Zèches-Hanrot, E. Dardennes, G. Le Dour, J. Sapi, J. H. Renault, Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratoryscale purifications. *J. Chromatogr. A* 2006; 1127:45-51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.069>
36. J. Krause, T. Oeldorf, G. Schembecker, J. Merz, Enzymatic hydrolysis in an aqueous organic two-phase system using centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 2015; 1391:72-79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.071>
37. A. E. Kostanyan, A. A. Erastov, O. N. Shishilov, Multiple Dual Mode Counter-Current Chromatography with Variable Duration of Alternating Phase Elution Steps. *J. Chromatogr. A* 2014; 1347:87–95. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.064>
38. R. Morley, M. Minceva, M. Minceva, Trapping Multiple Dual Mode Centrifugal Partition Chromatography for the Separation of Intermediately-Eluting Components: Throughput Maximization Strategy. *J. Chromatogr. A* 2017; 1501:26–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.033>
39. C. Schwienheer, J. Merz, G. Schembecker, Investigation, comparison and design of chambers used in centrifugal partition chromatography on the basis of flow pattern and separation experiments. *J. Chromatogr. A* 2015; 1390, 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.085>
40. A. E. Kostanyan, M. Martynova, Modeling of two semi-continuous methods in liquid-liquid chromatography: Comparing conventional and closed-loop recycling modes. *J. Chromatogr. A* 2020; 1614:460735. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460735>
41. J. Völkl, W. Arlt, M. Minceva, Theoretical study of sequential centrifugal partition chromatography. *AIChE J.* 2013; 59(1):241–249. <https://doi.org/10.1002/aic.13812>
42. J. Goll, R. Morley, M. Minceva, Trapping multiple dual mode centrifugal partition chromatography for the separation of intermediately-eluting components: Operating parameter selection. *J. Chromatogr. A* 2017; 1496:68–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.039>
43. Y. Ito, Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 2005; 1065:145–168. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.044>
44. A. Berthod, B. Billardello, S. Geoffroy, Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation. *Analisis* 1999; 27(9):750–757. <https://doi.org/10.1051/analisis:1999140>
45. C. -. X. Zhao, C. -. H. He, Sample capacity in preparative high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A* 2007; 1146(2):186–192. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.105>
46. Y. Yuan, B. Wang, L. Chen, H. Luo, D. Fisher, I. A. Sutherland, Y. Wei, How to realize the linear scale-up process for rapid purification using high-performance counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 2008; 1194(2):192–198. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.049>
47. N. A. Edwards, G. Fisher, G. H. Harris, N. Kellichan, A general method for the separation of triphenylphosphine oxide and reaction products using high performance countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A* 2014; 1323:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.089>
48. L. Marchal, O. Intes, A. Foucault, J. Legrand, J. -. M. Nuzillard, J. -. H. Renault, Rational improvement of centrifugal partition chromatographic settings for the production of 5-n-alkylresorcinols from wheat bran lipid extract. *J. Chromatogr. A* 2003; 1005(1-2):51–62. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00879-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00879-3)
49. N. Amarouche, L. Boudesocque, C. Sayagh, M. Giraud, J. McGarrity, A. Butte, L. Marchal, A. Foucault, J. -. H. Renault, Purification of a modified cyclosporine A by co-current centrifugal partition chromatography: process development and intensification. *J. Chromatogr. A* 2013; 1311:72–78. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.053>
50. J. Goll, A. Frey, M. Minceva, Study of the separation limits of continuous solid support free liquid-liquid chromatography: separation of capsaicin and dihydrocapsaicin by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 2013; 1284:59–68. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.116>
51. R. Morley, M. Minceva, Trapping multiple dual mode centrifugal partition chromatography for the separation of intermediately-eluting components: Throughput maximization strategy. *J. Chromatogr. A* 2017; 1501:26–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.033>
52. RotaChrom, <https://rotachrom.com/about-us/> (Letöltve: 2025. május 15.).
53. RotaChrom, <https://rotachrom.com/products/> (Letöltve: 2025. május 15.).
54. RotaChrom, https://hub.rotachrom.com/modeler?_gl=1*1tq68wf*_ga*OTQ0MTU0NDUwLjE3MjAyNjQ3MzQ*_ga_CCM426V9GM*czE3NDcyOTQwMzkkbzM5JGcxJHqXNzQ3Mjk0Mjg0JGowJGwwJGww (Letöltve: 2025. május 15.).
55. RotaChrom, <https://rotachrom.com/product-prices/pcpc/> (Letöltve: 2025. május 15.).
56. RotaChrom, https://hub.rotachrom.com/app-nucleotide-purification?_gl=1*Iu05y7i*_ga*OTQ0MTU0NDUwLjE3MjAyNjQ3MzQ*_ga_CCM426V9GM*czE3NDcyOTQwMzkkbzM5JGcxJHqXNzQ3Mjk4MTAxJGowJGwwJGww (Letöltve: 2025. május 15.).
57. RotaChrom, <https://rotachrom.com/applications-pharma-biotech/> (Letöltve: 2025. május 15.).
58. A. Dohárszky, E. Mária Vági, Á. Könczöl, A. Simon, E. Várnagy, M. Muratov, K. I. Steiger, B. Várnai, Sz. Béni, E. Riethmüller, I. Fejős, Kratom Alkaloids: A Blood–Brain Barrier Specific Membrane Permeability Assay-Guided Isolation and Cyclodextrin Complexation Study. *Molecules* 2024; 29(22):5302. <https://doi.org/10.3390/molecules29225302>
59. D. Rutterschmidt, Z. Kovács, L. Lórántfy, Z. Misek, G. Rajsch, Taxol purification with Centrifugal Partition Chromatography. *Planta Med.* 2015; 81: PW 152 <https://doi.org/10.1055/s-0035-1565776>

60. L. Lórántfy, L. Németh, Method for the purification of Cyclosporine A, PCT/HU2016/050049
61. Osman A. A., Laczkó D., Vágvölgyi M., Seres-Bokor A., Sztojkov-Ivanov A., Kemény K. K., Hunyadi A., Ducza E., Investigation of calonysterone and 20-hydroxyecdysone effects in high-fat, high-sugar diet-induced obesity rat model, *Heliyon* 2025; 11:e42435
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e42435>

Centrifugal Partition Chromatography: A Scalable and Sustainable Platform for Industrial Purification of Natural and Synthetic Compounds

Centrifugal Partition Chromatography (CPC) is a special liquid–liquid phase chromatographic technique in which two immiscible liquid phases are held in a hydrostatic equilibrium. It offers an efficient alternative to solid-phase chromatography for the separation and isolation of natural or synthetic compounds. Unlike the widely used column chromatography, this technique requires a rotating rotor for implementation. The theoretical basis of the method lies in the different partition behavior of components with varying physicochemical properties between the two immiscible phases. Due to the constant centrifugal force generated by rotation, one of the liquid phases becomes immobilized within the rotor chamber, thereby forming the stationary phase required for separation. One of the key advantages of CPC technology is that it eliminates the need for a solid stationary phase, which often represents a significant portion of purification costs. Moreover, the technique is characterized by its scalability and relatively low solvent consumption.

Here we review the operating principle of CPC, the properties of the solvent systems used, and the separation modes that are important from an industrial application standpoint, as well as the technique's suitability for continuous separation processes. Particular attention is given to CPC instrumentation parameters, method development considerations, and the key factors influencing separation efficiency. Using the platforms (rCPC, iCPC) developed by RotaChrom Technologies LLC as examples, we discuss industrial-scale production capabilities of CPC with a focus on pharmaceutical and biotechnological applications.

Through case studies including the purification of oligonucleotides, steroids, cyclic peptides, and natural alkaloids, we present the versatility and efficiency of CPC technology. The method proves especially valuable in fields where purity, yield, and solvent recovery are critical factors, and where environmentally friendly, cost-effective solutions are needed. CPC represents a new generation of liquid chromatography techniques, pointing towards continuous production and sustainable separation technologies.