

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 20002149 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 20002149

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C13D 3/14 (2006.01)

C13J 1/06 (2006.01)

C13K 11/00 (2006.01)

C13K 13/00 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 29.09.2000

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 29.09.2000

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 30.03.2002

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 14.06.2019

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Xyrofin Oy, Helsinki, Keilaranta 9, 02150 Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Kärki, Ari, Kotka, SUOMI - FINLAND, (FI)

2 • Heikkilä, Heikki, ESPOO, SUOMI - FINLAND, (FI)

3 • Jumppanen, Juho, Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)

4 • Tiihonen, Jari, Lappeenranta, SUOMI - FINLAND, (FI)

5 • Tervala, Tiina, Kirkkonummi, SUOMI - FINLAND, (FI)

6 • Mäyrä, Nina, Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

7 • Ravanko, Vili, Kirkkonummi, SUOMI - FINLAND, (FI)

8 • Paananen, Hannu, Kantvik, SUOMI - FINLAND, (FI)

9 • Paatero, Erkki, Kauniainen, SUOMI - FINLAND, (FI)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Sakkaridien puhdistaminen kromatografisella erotuksella

Rening av sackarider med kromatografisk separation

(57) Tiivistelmä - Sammandrag - Abstract

Keksintö koskee heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttöä hiilihydraattien kromatografisessa erotuksessa. Keksinnössä hyödynnetään hiilihydraattien, sokerien ja sokerialkoholien hydrofiilistä/hydrofobista vuorovaikutusta heikosti happaman kationinvaihtohartsin kanssa. Heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään erottamaan hydrofiiliset sakkaridit, kuten deoksi-, metyyli- ja anhydrosokerit ja anhydrosokerialkoholit hydrofiilisemmista sakkarideista.

Uppfinningen avser användning av ett svagt surt katjonbytarharts för kromatografisk separation av kolhydrater. I uppfinningen utnyttjas kolhydraternas, sockrens och sockeralkoholernas hydrofila/hydrofoba interaktion med det svagt sura katjonbytarhartset. Det svagt sura katjonbytarhartset används för separation av hydrofila sackarider, såsom deoxi-, metyl och vattenfria socker och vattenfria sockeralkoholer från mera hydrofila sackarider.

Sakkaridien puhdistaminen kromatografisella erotuksella

Keksinnön kohde

Esillä oleva keksintö koskee heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttöä hiilihydraattien kromatografisessa erotuksessa. Erityisesti esillä oleva keksintö koskee hiilihydraattien, sokerien ja sokerialkoholien hydrofiilisen/hydrofobisen vuorovaikutuksen hyväksikäyttöä heikosti happaman kationinvaihtohartsin kanssa. Vielä erityisemmin keksintö koskee heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttöä hydrofobisten sakkaridien, kuten deoksi-, metyyli- ja anhydrosokerien ja anhydrosokerialkoholien erottamiseksi hydrofiilisemmista sakkarideista.

Keksinnön tausta

US-patentissa 2 684 331 tuodaan esiin menetelmä kahden tai useamman ainesosan kromatografiseksi erottamiseksi toisistaan, joilla on erittäin erilaiset ionisaatiovakiot ja vähintään toinen ainesosista käy läpi huomattavan ionisoitumisen sen laimeassa vesipitoisessa liuoksessa. Menetelmää ei ole kuitenkaan käytetty hiilihydraattien erottamiseen. US-patentin 2 684 331 esimerkit kuvaavat suolojen erottamista orgaanisista liuottimista, esim. natriumkloridia formaldehydistä. Menetelmä käsittää ioninvaihtohartsin, jolla on ioni, joka on identtinen erittäin ionisoituneen liuotteen ionin kanssa. Ioninvaihtohartsin on joko kationinvaihtohartsin tai anioninvaihtohartsin. Kationinvaihtohartsin sisältää sulfonaattiryhmiä funktionaalisina ryhminä. Anioninvaihtohartsin sisältää kvaternäärisiä ammoniumryhmiä funktionaalisina ryhminä.

US-patentissa 2 911 362 kuvataan menetelmä, joka käsittää kromatografisen erotusprosessin, jossa käytetään ioninvaihtohartsia kahden tai useamman veteen liukenevan orgaanisen yhdisteen erottamiseksi toisistaan vesipitoisessa väliaineessa ioninvaihtoreaktion poissa ollessa, eli oleellisesti kemiallisen reaktion poissa ollessa, joka käsittää ionien absorption hartsin vesipitoisesta väliaineesta tai ionien siirtymisen hartsista liuokseen. Mainitun menetelmän mukaan ioninvaihtohartsin voi olla joko kationinvaihtohartsin tai anioninvaihtohartsin. Kationinvaihtohartsin voi sisältää joko sulfonaattiryhmiä funktiona-

lisina ryhminä tai karboksyylihapporyhmiä funktionaalisina ryhminä. Anioninvaihtohartsit sisältää kvaternäärisiä ammoniumryhmiä funktionaalisina ryhmiin. Kuitenkin erotusta ei ole käytetty hiilihydraattien erottamiseen.

- Kromatografista erotusta on käytetty US-patentissa 4 075 406 kuvatussa menetelmässä ksyloosin talteen ottamiseksi luonnollisten materiaalien hydrolysaateista, kuten koivupuun, maissintähkien ja puuvillan siementen kuorien. Kromatografisessa erotuksessa käytetty hartsi on vahvasti hapan kationinvaihtaja, eli sulfonoitu polystyreeni, joka on silloitettu divinyylibentseenillä. Vahvasti happaman kationinvaihtajan käyttö monosakkaridien, esim. ksyloosin erottamiseksi magnesiumsulfiittikeittoliemestä on myös tunnettua julkaisusta WO 97/49 658. Kromatografinen erotus on suoritettu käyttämällä simuloitua liikkuvaa kerrosta. Tiettyjen monosakkaridien erottaminen käyttämällä vahvasti happamia kationinvaihtohartseja on kuitenkin osoittautunut vaikeaksi. Samuelsonin mukaan (Samuelson, O., Chromatography on ion-exchange resins, J. Methods Carbohydr. Chem. 6 (1972) 65 - 75), esimerkiksi ramnoosin erottaminen muista hiilihydraateista vahvoilla kationinvaihtohartseilla on ollut mahdollista käyttämällä liuottimia, esim. alkoholia eluenttina. Rhamnoosi eluotuu ennen useimpia muita hiilihydraatteja koska sillä on lyhyempi retentioaika kuin aldooseilla ja ketooseilla, kun vesipitoista etanolia käytetään eluenttina. Vesi olisi edullinen eluentti, mutta kun sitä käytetään, ongelma on, että erilaisilla hiilihydraateilla, kuten ramnoosilla, arabinoosilla ja/tai ksyloosilla on taipumus eluotua melkein samantlaisilla retentioajoilla, jolloin fraktiot limittyvät. Erotusta ei ole ehdotettu tehtäväksi vesieluentilla.

- Hiilihydraattien, erityisesti ksyloosin erottamista vahvasti happamilla kationinvaihtajilla on harjoitettu teollisesti, mutta se on monimutkaista ja siinä on onnistuttu vain yhdellä tavalla. US-patentissa no. 5 998 607 esitettyä menetelmää on käytetty erityisesti ksyloosin erottamiseen magnesiumkeittoliemestä. Ongelma on ollut ksyloosin ja ksylonihapon riittämätön erottuminen. Heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttö ei tuonut mitään hyötyä ratkaistaessa ongelmaa. Menetelmässä erotus vaatii kaksi vaihetta. Ensimmäisessä vaiheessa kationinvaihtohartsia käytetään edullisesti maa-alkalisessa muodossa, edullisemmin Mg^{2+} -muodossa ja toisessa vaiheessa kationinvaihtohartsi on

edullisesti alkalimetallimuodossa (esim. natrium). Myös monosakkaridien erottumisen on kuitenkin todettu olevan epätydyttävää, sillä kaikki muut monosakkaridit eluoituvat melkein samalla retentioajalla ksyloosin kanssa. Menetelmän pH oli alhainen. Kaksiarvoisessa muodossa oleva hartsi näytti erottavan ksyloosia tehokkaammin kuin hartsi, joka oli yksiarvoisessa muodossa.

Julkaisussa PCT/FI00/00350 esitetään sulfonoituja polymeerihartseja, erityisesti ioninvaihtohartseja ja tällaisten hartsien valmistus. Polymeeri on styreenidivinylibentseenikopolymeeri, vahvasti hapanta kationinvaihtohartsi. Silloittaja voi myös olla isopreeni, allyylimetyyliakrylaatti, vinyylimetakrylaatti, glykolimetakrylaatti tai glykolidiakrylaatti. Julkaisun PCT/FI00/00350 mukaan sulfonoitua polymeerihartsia voidaan käyttää kromatografisena hartsina, ioninvaihtohartsina tai katalyyttihartsina.

US-patentissa 4 359 430 kuvataan prosessi betaiinin talteen ottamiseksi luonnollisista lähteistä, kuten juurikasmelasseista, jäänösmelasseista ja vinasseista. Prosessi käyttää vahvasti hapanta kationinvaihtohartsia alkalimetallimuodossa kromatografisena kolonnina, natriumin ollessa yleensä edullinen alkalimetalli. Vettä käytetään eluenttina menetelmässä. Menetelmä tuottaa kolme fraktiota. Ensimmäinen fraktio on ei-sokeripitoinen jätefraktio, toinen on sokeria sisältävä fraktio ja kolmas fraktio koostuu oleellisesti betaiinista.

Julkaisussa WO 96/10650 tuodaan esiin menetelmä juurikkaasta saadun sakkaroosia sisältävän liuoksen prosessoimiseksi sakkaroosilla rikastetun fraktion saamiseksi ja toisella orgaanisella yhdisteellä rikastetun fraktion saamiseksi, erityisesti sellaisella kuin betaiini, inositoli, raffinoosi, galaktinoli tai seriini ja muilla aminohapoilla. Vahvasti hapanta kationinvaihtajaa, edullisesti natrium- tai kaliummuodossa, käytetään fraktioiden erottamiseksi. Suomalaisesta patentista no. 960 225 on myös tunnettua menetelmä melassien fraktioimiseksi käyttämällä vahvasti hapanta kationinvaihtajaa.

Anioninvaihtohartseja on käytetty fruktoosin erottamiseen glukoosista. Y. Takasaki (Agr. Biol. Chem. 36 (1972), sivut 2575 - 77) ja B. Lindberg et al. (Carbohydr. Res. 5 (1967), sivut 286 - 291) kuvaavat bisulfiittimuodossa olevan anioninvaihtajan käyttöä sokerien erottamiseen. Vettä käytetään eluenttina. Anioninvaihtajan käyttö ei kuitenkaan johda hyvään ksyloosin erotukseen,

sillä muut sokerit limittävät ksyloosin. Ramnoosin erotusta ei ole ehdotettu. Fruktosin ja glukosin erotus bisulfiittimuodossa olevalla anioninvaihtajalla on tunnettua myös patentista FR-2 117 558.

US-patentissa no. 5 084 104 tuodaan esiin menetelmä ksyloosin
 5 erottamiseksi runsaasti pentoosia sisältävästä liuoksesta, esim. koivupuusta. Käytetään kromatografista kolonnia, joka käsittää vahvasti emäksistä anioninvaihtohartsia. Anioninvaihtohartsi on sulfaattimuodossa. Käytettäessä tätä menetelmää ksyloosi jää voimakkaimmin jälkeen, mutta muut monosakkaridit elu-
 oituvat nopeammin.

10 Menetelmä L-arabinoosin valmistamiseksi on tunnettu julkaisusta WO 99/57 326, jossa menetelmä on tunnettu siitä, että saatetaan kasvikuikut kosketuksiin hapon kanssa kuitujen hydrolysoimiseksi sellaisissa olosuhteissa, että kasvikuikutuihin sisältyneet L-arabinoosin ainekset saadaan valikoiden.
 US-patentissa no. 4 880 919 tuodaan esiin menetelmä arabinoosin erottami-
 15 seksi monosakkaridien seoksista, jotka sisältävät arabinoosia ja muita aldopentooseja ja aldoheksooseja adsorboimalla sulfonoiduilla, polystyreenidivinylibentseenillä silloitetuilla ioninvaihtohartseilla, jotka ovat Ca^{2+} - ja NH_4^+ -muodoissa ja desorptiomalla adsorbaatti vedellä. Menetelmä kiteisen L-arabinoosin tuottamiseksi on tunnettu US-patentista no. 4 816 078.

20 Arabinoosin valmistus on myös tunnettua US-patentista 4 664 718. Menetelmässä arabinoosi erotetaan monosakkaridiseoksesta, joka sisältää myös muita aldopentooseja ja aldoheksooseja. Syöttö saatetaan kosketuksiin kalsium-Y-tyypin tai kalsium-X-tyypin zeoliitin kanssa ja arabinoosi adsorboi-
 daan valikoivasti. Desorptio suoritetaan vedellä tai etanolilla.

25 Julkaisussa DE 3 545 107 kuvataan menetelmä ramnoosin valmistamiseksi arabikumista. Vahvasti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään sokerin erottamiseen ja ramnoosi puhdistetaan adsorptiolla aktiivihieillä. Myös arabinoosia erotetaan tällä menetelmällä.

30 Barker, S.A. et al. (Carbohydrate Research, 26 (1973) 55 - 64) ovat kuvanneet poly(4-vinylibentseeniboorihappo)-hartsien käyttöä hiilihydraattien fraktioinnissa ja keskinäisessä muuntamisessa. Menetelmässä vettä käytetään eluenttina. Fruktosin paras saanto saatiin, kun pH oli korkea. Hartseja on käy-

tetty syrjäyttämään näennäinen tasapaino, joka on syntynyt vesipitoisessa alkalissa D-glukoosin, D-fruktoosin ja D-mannoosin välille, D-fruktoosin saamiseksi.

Yllättäen on havaittu, että käytettäessä heikosti happamia kationinvaihtohartseja päästään käsiksi parannettuun hiilihydraattien kromatografiseen erotukseen. Muiden ominaispiirteiden lisäksi erotusjärjestykseen näyttää vaikuttavan hiilihydraattien hydrofobiset/hydrofiiliset vuorovaikutukset hartsin kanssa ja tulokseksi saadaan parannettu hiilihydraattien erottuminen. Muut yleisesti tunnetut ioninvaihtohartsilla tapahtuvan hiilihydraattien kromatografisen erottamisen ominaispiirteet sisältävät esim. ioniekskluusion ja kokoekskluusion. Jos hartsi on hydrofiilisessä muodossa, hydrofobisimmat monosakkaridit näyttävät eluoituvan ensin ja hydrofiilisimmät viimeiseksi. Tämä johtaa erilaiseen eluoitusjärjestykseen kuin aikaisemmin on todettu.

15 **Keksinnön yhteenveto**

Yllä mainitut tarkoitukset ja muut saadaan aikaan esillä olevalla keksinnöllä, jossa heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään erottamaan monosakkarideja, disakkarideja tai oligosakkarideja kromatografisesti. Edullisesti käytettävä ioninvaihtohartsi on akryylinen heikosti hapan kationinvaihtaja, jossa on karboksyylinen funktionaalinen ryhmä, silloitettu noin 1 - noin 20 %:lla. edullisesti noin 3 - noin 8 %:lla divinyylibentseeniä. Hartsi on H^+ -, K^+ -, Na^+ -, Mg^{2+} - tai Ca^{2+} -muodossa ja myös muita ionimuotoja voidaan käyttää. Tällainen hartsi osoittautui tehokkaammaksi kuin aikaisemmin testatut, esim. polystyreenimatriisihartsit. Tähän näyttää vaikuttavan myös se tosiasia, että

20 aromaattipohjaiset hartsit ovat hydrofobisempia kuin akryylipohjaiset hartsit.

Heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään hiilihydraattien, erityisesti hydrofobisten sakkaridien erottamiseen. Edullisesti heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään erottamaan hydrofobisia monosakkarideja, kuten deoksi-, metyyli- ja anhydrosokereita ja sokerialkoholeja hydrofiilisemmistä sakkarideista. Edullisimmin heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään erottamaan sakkarideja, jotka koostuvat ryhmästä heksooseja, kuten ketoheksooseja, aldoheksooseja, pentooseja, kuten ketopentooseja, aldopentooseja,

30

vastaavia sokereita ja sokerialkoholeja ja niiden seoksia, esim. glukoosia, fruktoosia, ramnoosia, anhydrosorbitolia, sorbitolia, erytritolia, inositolia, aradinoosia, ksyloosia ja ksylitolia. Sakkaroosia, betaiinia ja aminohappoja sisältäviä liuoksia voidaan myös erottaa suotuisasti. Heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään myös erottamaan anhydrosokereita vastaavista sokereista, erottamaan anhydrosokerialkoholeja vastaavista sokerialkoholeista, erottamaan sokereita, sokerialkoholeja ja niiden anhydromuotoja suoloista ja erottamaan erytritoli inositolista. Kun hartsi on hydrofiilisessä muodossa hydrofobisin monosakkaridi näyttää eluoituvan ensin ja hydrofiilisin monosakkaridi näyttää eluoituvan viimeisenä. Tähän näyttää vaikuttavan hartsin ja komponenttien hydrofiiliset/hydrofobiset vuorovaikutukset.

Raaka-aineet, jotka sisältävät yllä mainittuja hiilihydraatteja, hydrolysaatit ja kasviuutteet tai, niistä muunnetut raaka-aineet, jotka sisältävät edellä mainittuja hiilihydraatteja, joihin heikosti hapanta kationinvaihtajaa käytetään ovat esim. ksyloosiprosessivirrat, sakkaroosiprosessivirrat, tärkkelys- tai sakkaroosipohjaiset virrat, esim. maltoosi-, glukoosi- tai fruktoosiprosessivirrat tai niiden prosessisivirrat.

Yllä kuvattua heikosti hapanta kationinvaihtohartsia käytetään kromatografisessa kolonnissa. Hartsia käytetään kromatografisessa kolonnissa lämpötiloissa 10 - 95 °C, edullisesti 40 - 95 °C, edullisemmin 60 - 95 °C. On tunnettua, että korkeampi erotuslämpötila alentaa viskositeettia ja parantaa sokereiden erotushyötysuhdetta.

Kromatografisessa erotuksessa käytetty eluentti on vesi, esimerkiksi demineralisoitu vesi tai lauhdevesi tai jokin muu vesipitoinen liuos, alkoholi tai niiden seos. Edullisesti eluentti on vesi.

Esillä olevassa keksinnössä monosakkaridien eluoitusjärjestys on erilainen kuin aikaisemmin saatu eluoitusjärjestys käyttämällä vahvasti emäksisiä hartseja bisulfiitti- tai sulfaattimuodossa tai käyttämällä vahvasti happamia kationinvaihtohartseja. Yhtenä keksinnön edullisena esimerkkinä ramnoosi voidaan erottaa ennen hydrofiilisempiä monosakkarideja. Tämä mahdollistaa ramnoosin talteenoton hyvällä saannolla erittäin puhdistettuna fraktion. Erotettaessa betaiinia, erytritolia ja inositolia hiilihydraatit erotetaan

mainitussa järjestyksessä betaiinin jälkeen. Jos ramnoosia erotetaan muista monosakkarideista on suotuisaa, että ramnoosi eluoituu ensin. Jos erytritolia ja inositolia erotetaan betaiinia sisältävästä liuoksesta on suotuisaa, että erytritoli erotetaan ennen inositolia.

5

Kuvioiden lyhyt kuvaus

Seuraavat kuviot havainnollistavat keksinnön suoritusmuotoja eikä niitä ole tarkoitettu rajoittamaan keksinnön piiriä.

10 Kuvio 1 on graafinen esitys esimerkistä 1 saaduista eluutioprofiileista ja pH:sta.

Kuvio 2 on graafinen esitys esimerkistä 2 saaduista eluutioprofiileista ja pH:sta.

Kuvio 3 on graafinen esitys esimerkistä 3 saaduista eluutioprofiileista ja pH:sta.

15 Kuvio 4 on graafinen esitys esimerkistä 4 saaduista eluutioprofiileista ja pH:sta.

Kuvio 5 on graafinen esitys esimerkistä 5 saaduista eluutioprofiileista ja pH:sta.

20 Kuvio 6 on graafinen esitys esimerkistä 6 saaduista eluutioprofiileista ja pH:sta.

Kuvio 7 on graafinen esitys esimerkistä 7 saaduista eluutioprofiileista ja pH:sta.

Yksityiskohtainen kuvaus

25 Hiilihydraatteja sisältävälle liuokselle suoritetaan kromatografinen erottaminen. Erottaminen suoritetaan kromatografisessa erotuskolonnissa. Kromatografinen kolonni täytetään heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla.

Kromatografisessa kolonnissa käytetty hartsi on tarkoituksen mukaisesti heikosti hapan akryylinen kationinvaihtaja, jossa on karboksyyllisiä funktionaalisia ryhmiä. Heikosti hapan akryylinen kationinvaihtohartsi on peräisin ryhmästä, joka koostuu akrylaattiestereistä, kuten metyyliakrylaatista, etyyliakrylaatista, butyyliakrylaatista ja metyylietakrylaatista tai akrylonitriilistä tai

30

akryylihapoista tai niiden seoksista. Hartsin runko voi olla myös jokin muu kuin akryylinen. Aktiivinen funktionaalinen ryhmä voi myös olla jokin muu kuin karboksyyli-ryhmä, esim. se voidaan valita muista heikoista hapoista. Akryylinen kationinvaihtohartsi silloitetaan yhdisteellä ryhmästä, joka koostuu aromaattisesta silloittajasta, kuten divinyylibentseenistä tai alifaattisesta silloittajasta, kuten isopreenista, 1,7-oktadieenista, trivinyyliisikloheksaanista, dietyyliglykolidivinyylietteristä. Hartsin silloitusaste on noin 1 - noin 20 %, edullisesti noin 3 - noin 8 % divinyylibentseeniä. Heikosti happaman kationinvaihtohartsin keskimääräinen partikkelikoko on 10 - 2000 mikrometriä, edullisesti 100 - 400 mikrometriä. Hartsi voidaan regeneroida pääasiassa H^+ -, K^+ -, Na^+ -, Mg^{2+} - tai Ca^{2+} -muotoon. Myös muita ionimuotoja voidaan käyttää.

Fraktioitava hiilihydraattiliuos mahdollisesti esikäsitellään ensin suodattamalla, joka voidaan tehdä käyttämällä painesuodatinta ja piimaata suodatuksen apuaineena. Syöttöliuoksen pH mahdollisesti säädetään arvoon 1 - 11, edullisesti 2 - 10, edullisemmin 2 - 4 ja 5 - 10 esimerkiksi natriumhydroksidiliuoksella. Tämän jälkeen liuos voidaan mahdollisesti suodattaa ennen kromatografista erotusta.

Myös syöttöliuoksen kuiva-ainepitoisuus säädetään sopivalle tasolle ennen kromatografista erotusta.

Syöttölaitetta voidaan käyttää liuoksen syöttämiseksi hartsikerroksen pinnalle. Liuoksen virtaus voi olla alapäin tai ylöspäin, alaspäin on edullinen. Kolonnin, syöttöliuoksen ja eluentin lämpötila on 10 - 95 °C, edullisesti 40 - 95 °C, edullisimmin noin 60 - 95 °C. Tämä saavutetaan esilämmittämällä liuos. Käytetty eluentti on joko vesi tai liuotin. Vesi voi olla esimerkiksi demineralisoitua vettä tai lauhdevettä. Liuotin voi olla vesipitoinen liuos tai alkoholi tai niiden seos. Edullisesti eluentti on vesi tehokkaalle erotukselle.

Syöttöliuos eluoidaan kolonniin syöttämällä esilämmitettyä vettä, esimerkiksi demineralisoitua vettä tai lauhdevettä tai jotakin muuta vesipitoista liuosta tai alkoholia tai niiden seosta, kolonniin. Virtausnopeus kolonnissa säädetään sopivalle tasolle.

Ulostulevan liuoksen fraktiot kerätään sopivin väliajoin ja mahdollisesti fraktioiden koostumus analysoidaan. Ulostulevia virtoja voidaan seurata laitteistoon kytketyillä mittareilla.

Seuraavat esimerkit havainnollistavat esillä olevaa keksintöä. Niitä
5 ei ole tarkoitettu rajoittamaan vaatimuksia millään tavoin.

Esimerkki 1

Ksyloosin kiteytysryönän kromatografinen erottaminen H⁺/Mg²⁺-muodossa olevalla hartsilla

10

Pyökkipohjaiselle ksyloosin kiteytysryönälle, joka oli alunperin Mg-pohjaisesta si-keittoliuoksesta suoritettiin kromatografinen erottaminen. Erottaminen tehtiin kromatografisessa laboratorioerotuskolonnissa panosprosessina. Kolonni, jonka halkaisija oli 0,045 m täytettiin akryylisellä heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (Finex™ CA 12 GC) valmistajana Finex Oy, Suomi.
15 Hartsin silloitustasaste oli 6,0 % DVB:ä ja hartsin keskimääräinen partikkelikoko oli 0,26 mm. Hartsin regeneroitiin pääasiassa H⁺-muotoon (94 %) ja osittain Mg²⁺-muotoon (6 %) ja syöttölaite asetettiin hartsikerroksen päälle. Kolonnin ja
20 syöttöliuoksen ja eluenttiveden lämpötila oli noin 65 °C. Virtausnopeus kolonniin säädettiin arvoon 4 ml/min.

Kromatografinen erotus toteutettiin seuraavasti:

Vaihe 1: Syöttöliuoksen kuiva-aine säädettiin 25 g:aan kuiva-ainetta
100 g:ssa liuosta liuoksen taitekertoimen (RI) mukaan. Syöttöliuoksen pH oli
25 3,5.

Vaihe 2: 100 ml esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikerroksen päälle.

Vaihe 3: Syöttöliuos eluoiitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä esilämmitettyä ionivaihdettua vettä kolonnin huipulle.

30 Vaihe 4: Ulostulevasta liuoksesta kerättiin 10 ml:n näytteitä 3 minuutin väliajoin. Näytteiden koostumus analysoitiin Dionex HPLC-laitteella, jossa

oli elektrokemiallinen impulssidetektori ja CarboPac PA1™ anioninvaihtokolonni (vesi ja 0,2 M NaOH eluentteina).

Hartsi antaa hyvän ramnoosin erotuksen muista monosakkarideista. Arabinoosi ja ramnoosi eluoituvat erotusprofiiliin lopussa. Ulos virtaavan nesteen pH oli välillä 3 - 4. Tulokset on esitetty graafisesti kuviossa 1.

Esimerkki 2

Anhydrosorbitolin (1,4-anhydro-D-glusitoli) ja sorbitolin kromatografinen erotus Na⁺-muotoisella hartsilla

10

Anhydrosorbitolia (1,4-anhydro-D-glusitoli) ja sorbitolia sisältävälle liuokselle suoritettiin kromatografinen erottaminen. Liuos valmistettiin liuottamalla puhdasta anhydrosorbitolia ja sorbitolia ionivaihdettuun veteen. Erotus suoritettiin kromatografisessa laboratorioerotuskolonnissa panosprosessina.

15 Kolonni, jonka halkaisija oli 0,045 m täytettiin akryylisellä heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (Finex™ CA 12 GC), jonka oli valmistanut Finex Oy, Suomi. Hartsi oli etyyliakrylaattipohjainen hartsi. Hartsikerroksen korkeus oli noin 0,70 m. Hartsin silloitusaste oli 6,0 % DVB:ä ja hartsin keskimääräinen partikkelikoko oli 0,26 mm. Hartsi oli Na⁺-muodossa. Hartsin pH oli korkea

20 valmistusprosessin jälkeen. Syöttölaite asetettiin hartsikerroksen päälle. Kolonnin ja syöttöliuoksen ja eluenttiveden lämpötila oli noin 65 °C. Virtausnopeus kolonniin säädettiin arvoon 4 ml/min.

Kromatografinen erotus toteutettiin seuraavasti:

Vaihe 1: Syöttöliuoksen kuiva-aine säädettiin 25 g:aan kuiva-ainetta

25 100 g:ssa liuosta liuoksen taitekertoimen (RI) mukaan. Syöttöliuos koostui seuraavasti: 50% kuiva-aineesta (DS) anhydrosorbitolia ja 50 % kuiva-aineesta sorbitolia.

Vaihe 2: 100 ml esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikerroksen päälle.

30 Vaihe 3: Syöttöliuos eluoitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä esilämmitettyä ionivaihdettua vettä kolonnin huipulle.

Vaihe 4: Ulostulevasta liuoksesta kerättiin 10 ml:n näytteitä 3 minuutin väliajoin. Näytteiden koostumus analysoitiin HPLC:llä (Pb^{2+} -muotoinen harts, 0,6 ml/min, 85 °C vesieluentti).

Komponentit eluoutuivat kolonnista seuraavassa järjestyksessä: an-
 5 hydrosorbitoli ja sorbitoli. Eluotumisjärjestys näyttää olevan yhdenmukainen komponenttien hydrofobisen/hydrofiilisen luonteen kanssa. Ulostulevan virran pH oli välillä 7,5 - 11. Harts erotti komponentit toisistaan hyvin. Tulokset on esitetty graafisesti kuviossa 2.

10

Esimerkki 3

Sakkaroosin, glukoosin ja fruktoosin kromatografinen erottaminen Na^+ -muotoisella hartsilla

Sakkaroosia, glukoosia ja fruktoosia sisältävälle liuokselle suoritettiin kromatografinen erottaminen. Liuos valmistettiin liuottamalla puhdasta sakkaroosia, glukoosia ja fruktoosia ionivaihdettuun veteen. Erotus suoritettiin kromatografisessa laboratorioerotuskolonnissa panosprosessina. Kolonni, jonka halkaisija oli 0,045 m täytettiin akryylisellä heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (Finex™ CA 12 GC), jonka oli valmistanut Finex Oy, Suomi. Harts oli
 20 etyyliakrylaattipohjainen harts. Hartsikerroksen korkeus oli noin 0,70 m. Hartsin silloitusaste oli 6,0 % DVB:ä ja hartsin keskimääräinen partikkelikoko oli 0,26 mm. Harts oli Na^+ -muodossa. Hartsin pH oli korkea valmistusprosessin jälkeen. Syöttölaite asetettiin hartsikerroksen päälle. Kolonnin ja syöttöliuoksen ja eluenttiveden lämpötila oli noin 65 °C. Virtausnopeus kolonnissa säädettiin
 25 arvoon 4 ml/min.

Kromatografinen erotus toteutettiin seuraavasti:

Vaihe 1: Syöttöliuoksen kuiva-aine säädettiin 25 g:aan kuiva-ainetta 100 g:ssa liuosta liuoksen taitekertoimen (RI) mukaan. Syöttöliuos koostui seuraavasti: 33 % kuiva-aineesta (DS) sakkaroosia, 33 % DS:stä glukoosia ja
 30 33 % DS:stä fruktoosia.

Vaihe 2: 100 ml esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikerroksen päälle.

Vaihe 3: Syöttöliuos eluoitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä esilämmitettyä ionivaihdettua vettä kolonnin huipulle.

Vaihe 4: Ulostulevasta liuksesta kerättiin 10 ml:n näytteitä 3 minuutin väliajoin. Näytteiden koostumus analysoitiin HPLC:llä (Na^+ -muotoinen harts
5 si, 0,8 ml/min, 0,003 M Na_2SO_4 , 85 °C)

Ensin sakkaroosi eluoitui kolonnista erillisenä piikkinä. Glukoosi ja fruktoosi eluoituivat yhdessä toisena piikkinä sakkaroosin jälkeen. Harts antaa hyvän erotuksen sakkaroosin ja monosakkaridien välillä. Ulostulevan virran pH oli välillä 9 - 11. Tulokset on esitetty graafisesti kuviossa 3.

10

Esimerkki 4

Natriumkloridin, betaiinin, erytritolin ja inositolin kromatografisen erottaminen Na^+ -muotoisella hartsilla

15 Betaiinia, erytritolia, inositolia ja natriumkloridia (NaCl) sisältävälle liuokselle suoritettiin kromatografinen erottaminen. Liuos valmistettiin liuottamalla puhdasta betaiinia, erytritolia, inositolia ja natriumkloridia ionivaihdettuun veteen. Erotus suoritettiin kromatografisessa laboratorioerotuskolonnissa panosprosessina. Kolonni, jonka halkaisija oli 0,045 m täytettiin akryylisellä heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (Finex™ CA 12 GC), jonka oli valmista-
20 nut Finex Oy, Suomi. Harts oli etyyliakrylaattipohjainen harts. Hartsikerroksen korkeus oli noin 0,70 m. Hartsin silloitusaste oli 6,0 % DVB:ä ja hartsin keskimääräinen partikkelikoko oli 0,26 mm. Harts oli Na^+ -muodossa. Hartsin pH oli korkea valmistusprosessin jälkeen. Syöttölaite asetettiin hartsikerroksen päälle.
25 le. Kolonnin ja syöttöliuoksen ja eluenttiveden lämpötila oli noin 80 °C. Virtausnopeus kolonnissa säädettiin arvoon 4 ml/min.

Kromatografinen erotus toteutettiin seuraavasti:

Vaihe 1: Syöttöliuoksen kuiva-aine säädettiin 25 g:aan kuiva-ainetta 100 g:ssa liuosta liuoksen taitekertoimen (RI) mukaan. Syöttöliuos koostui seuraavasti: 30 % kuiva-aineesta (DS) betaiinia, 30 % DS:stä inositolia ja 30 %
30 DS:stä erytritolia ja 10 % DS:stä natriumkloridia.

Vaihe 2: 100 ml esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikerroksen päälle.

Vaihe 3: Syöttöliuos eluoiitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä esilämmitettyä ionivaihdettua vettä kolonnin huipulle.

- 5 Vaihe 4: Ulostulevasta liuksesta kerättiin 10 ml:n näytteitä 3 minuutin väliajoin. Näytteiden koostumus analysoitiin HPLC:llä (Ca^{2+} -muotoinen harts, 0,8 ml/min, 0,001 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 85 °C)

Komponentit eluoituivat kolonnista seuraavassa järjestyksessä: natriumkloridi, betaiini, erytritoli ja inositoli. Betaiinin ja hiilihydraattien eluoitumis-
10 järjestys näyttää olevan yhdenmukainen komponenttien hydrofobisuuden/hydrofiilisen luonteen kanssa. Harts erotti komponentit toisistaan hyvin. Ulostulevan virran pH oli välillä 6 - 9. Tulokset on esitetty graafisesti kuviossa 4.

15 **Esimerkki 5**

Natriumkloridin, betaiinin, sakkaroosin ja mannitolin kromatografinen erottaminen Na^+ -muotoisella hartsilla

Betaiinia, sakkaroosia, mannitolia ja natriumkloridia (NaCl) sisältä-
20 väle liukselle suoritettiin kromatografinen erottaminen. Liuos valmistettiin liuottamalla puhdasta betaiinia, sakkaroosia, mannitolia ja natriumkloridia ionivaihdettuun veteen. Erotus suoritettiin kromatografisessa laboratorioerotuskolonnissa panosprosessina. Kolonni, jonka halkaisija oli 0,045 m täytettiin akryylisellä heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (Finex™ CA 12 GC), jonka oli
25 valmistanut Finex Oy, Suomi. Harts oli etyyliakrylaattipohjainen harts. Hartsikerroksen korkeus oli noin 0,65 m. Hartsin silloitusaste oli 6,0 % DVB:ä ja hartsin keskimääräinen partikkelikoko oli 0,26 mm. Harts oli Na^+ -muodossa. Hartsin pH oli korkea valmistusprosessin jälkeen. Syöttölaite asetettiin hartsikerroksen päälle. Kolonnin ja syöttöliuoksen ja eluenttiveden lämpötila oli noin 80
30 °C. Virtausnopeus kolonnissa säädettiin arvoon 4 ml/min.

Kromatografinen erotus toteutettiin seuraavasti:

Vaihe 1: Syöttöliuoksen kuiva-aine säädettiin 25 g:aan kuiva-ainetta 100 g:ssa liuosta liuoksen taitekertoimen (RI) mukaan. Syöttöliuos koostui seuraavasti: 30 % kuiva-aineesta (DS) betaiinia, 30 % DS:stä sakkaroosia ja 30 % DS:stä mannitolia ja 10 % DS:stä natriumkloridia.

5 Vaihe 2: 100 ml esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikerroksen päälle.

Vaihe 3: Syöttöliuos eluoiitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä esilämmitettyä ionivaihdettua vettä kolonnin huipulle.

10 Vaihe 4: Ulostulevasta liuksesta kerättiin 10 ml:n näytteitä 3 minuutin väliajoin. Näytteiden koostumus analysoitiin HPLC:llä (Na^+ -muotoinen harts, 0,8 ml/min, 0,003 M Na_2SO_4 , 85 °C).

Natriumkloridi eluoiutui ensin kolonnista. Sakkaroosi ja betaiini eluoiutuvat kolonnista yhdessä yhtenä piikkinä limittyen jossain määrin suolojen kanssa. Mannitoli eluoiutui kolonnista erillisenä piikkinä sakkaroosin ja betaiinin 15 jälkeen. Harts erotti mannitolia ja sakkaroosia betaiinista hyvin. Ulostulevan virran pH oli välillä 7 - 11. Tulokset on esitetty graafisesti kuviossa 5.

Esimerkki 6

20 **Juurikasmelassin kromatografinen erottaminen heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla**

Juurikasmelassille suoritettiin kromatografinen erottaminen. Erottaminen suoritettiin laboratoriomittakaavaisessa kromatografisessa erotuskolonnissa panosprosessina. Kolonni, jonka halkaisija oli 0,045 m täytettiin akryy- 25 sellä heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (Finex™ CA 16 GC, jonka oli valmistanut Finex Oy, Suomi). Harts oli metyyliakrylaattipohjainen. Hartsin siloitusaste oli 8 % DVB:ä ja keskimääräinen partikkelikoko oli noin 0,23 mm. Harts oli Na^+ -muodossa ennen erotusta.

30 Hartsikerroksen korkeus oli noin 0,70 m. Hartsin pH oli melko korkea valmistusprosessin jälkeen (pH noin 9 - 10). Syöttölaite asetettiin hartsikerroksen päälle. Kolonnin, syöttöliuoksen ja eluenttiveden lämpötila oli noin

80 °C. Virtausnopeus kolonnissa säädettiin arvoon 4 ml/min. Syöttöliuos suodatettiin suodattimen läpi ennen erotusta. Syöttöliuoksen pH oli noin 8,2.

Kromatografinen erotus toteutettiin seuraavasti:

Vaihe 1: Syöttöliuoksen kuiva-aine säädettiin 25 g:aan kuiva-ainetta
5 100 g:ssa liuosta liuoksen taitekertoimen (RI) mukaan.

Vaihe 2: 100 ml esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikeroksen päälle.

Vaihe 3: Syöttöliuos eluoiitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä esilämmitettyä ionivaihdettua vettä kolonnin huipulle.

10 Vaihe 4: Ulostulevasta liuksesta kerättiin 10 ml:n näytteitä 3 minuutin väliajoin. Näytteiden koostumus analysoitiin HPLC:llä (Na^+ -muotoinen kolonni, 0,8 ml/min, 0,003 M Na_2SO_4 , 85 °C).

Suolat eluoutuivat kolonnista ensin ulos. Sakkaroosi ja betaiini eluoutuvat samalla retentioajalla ja limittyvät suolojen kanssa jossain määrin. Amino-
15 nohapot eluoutuivat pääasiassa profiilin takaliuskassa. Ulostulevan liuoksen pH oli välillä 7,5 - 10. Tulokset on esitetty graafisesti kuviossa 6. Taulukko 1 osoittaa aminohappokonsentraatiot näytteissä 21 - 39.

Taulukko 1. Aminohappokonsentraatio

Näyttenumero	RDS g/100g	Aminohapot % DS:sta	Aminohapot g/100g
21	20,54	1,8	0,370
23	16,36	3,1	0,507
25	5,09	8,5	0,433
26	3,58	13,0	0,465
27	2,47	16,5	0,408
29	1,28	4,9	0,063

20

Esimerkki 7

Fruktoosin kiteytysryönän kromatografinen erottaminen Na^+ -muotoisella hartsilla

Konsentroidulle ja lämpökäsitellylle fruktoosin kiteytysryönälle suoritettiin kromatografinen erottaminen. Erottaminen suoritettiin kromatografisessa laboratorioerotuskolonnissa panosprosessina. Kolonni, jonka halkaisija oli 0,045 m täytettiin akryylisellä heikosti happamalla kationinvaihtohartsilla (FinexTM CA 12 GC), jonka oli valmistanut Finex Oy, Suomi. Hartsin silloitusaste oli 6 % DVB:ä ja keskimääräinen partikkelikoko oli noin 0,26 mm. Hartsin regeneroitiin Na⁺-muotoon ja syöttölaite asetettiin hartsikerroksen päälle. Kolonnin ja syöttöliuoksen ja eluenttiveden lämpötila oli noin 60 °C. Virtausnopeus kolonnissa säädettiin arvoon 4 ml/min. Syöttöliuoksen pH säädettiin arvoon 7 natriumhydroksidilla.

Kromatografinen erotus toteutettiin seuraavasti:

Vaihe 1: Syöttöliuoksen kuiva-aine säädettiin 25 g:aan kuiva-ainetta 100 g:ssa liuosta liuoksen taitekertoimen (RI) mukaan.

Vaihe 2: 100 ml esilämmitettyä syöttöliuosta pumpattiin hartsikerroksen päälle.

Vaihe 3: Syöttöliuos eluoiitiin alaspäin kolonnissa syöttämällä esilämmitettyä ionivaihdettua vettä kolonnin huipulle.

Vaihe 4: Ulostulevasta liuksesta kerättiin 10 ml:n näytteitä 3 minuutin väliajoin. Näytteiden koostumus analysoitiin HPLC:llä (Na⁺-muotoinen hartsin, 85 °C, vesi eluentti, 0,8 ml/min).

Hartsin erottaa hyvin fruktoosia ja fruktoosin termisessä happohajoamisessa muodostuneita oligosakkarideja. Oligosakkaridit eluoiutuvat kolonnista nopeammin kuin fruktoosi. Ulostulevan virran pH oli välillä 6 - 11. Tulokset on esitetty graafisesti kuviossa 7.

Esimerkki 8

Akryylipohjaisten hartsien käyttö nestekromatografiassa, kun käytetään deionisoitua vettä ja noin 30 painoprosenttista vesi-etanoli liuosta eluentteina

Nestekromatografiakokeessa käytettiin stationaarifaaseina DVB:llä (divinyylibentseenillä) silloitettuja akryylipohjaisia hartseja, jotka on valmistanut Finex Oy (Suomi). Hartsien silloitusasteet olivat 4 % DVB:ä (CA08GC) ja 6 % DVB:ä (CA12GC). Hartsien keskimääräinen partikkelikoko oli 375 µm. Vahvas-
 5 ti hapanta styreenipohjaista sulfonoitua kationinvaihtohartsia (CS08G) samalta valmistajalta, jonka hartsin keskimääräinen partikkelikoko oli 395 µm, käytettiin vertailuhartsina.

Pharmacia Biotech FPLC™ nestekromatografialaitetta käytettiin kolonnikokeissa, laite käsittää pumpun, vaipallisen lasikolonnin, jossa on lämpötilan säätö, RI-detektorin (Refractive Index, taitekerroin) ja tietokoneen, jota käytettiin mittaustietojen keräämiseen. Ulostulevan virran laitteistoon kytketyssä analyysissä käytettiin RI-98 SCOPE taitekerroindetektoria. Testikolonne oli Pharmacia Biotech XK16, jonka halkaisija oli 1,6 cm. Na⁺-muodossa olevia hartseja käytettiin testeissä ja noin 60 ml hartsia (vedessä turvonnutta hartsia)
 15 pakattiin kolonniin. Kerrokorkeus vedessä oli noin 30 cm.

Kolonnikokeissa käytettiin eluentteina deionisoitua vettä ja noin 30 painoprosenttista vesi-etanoliliuosta, joista ilma oli poistettu tyhjöimulla. Eluentin virtausnopeus oli 1 ml/min kaikissa kokeissa ja kokeet suoritettiin lämpötilassa 25 °C:ta. Kolonne tasattiin ennen mittauksia pumppaamalla mainittua eluenttia sen läpi, kunnes hartsi oli tasattu ja RI-detektorin pohjan taso pysyi vakiona.
 20

Mittauksissa käytetyt näytteet valmistettiin operaatiossa käytetyllä eluentilla. Ksyloosin (C₅H₁₀O₅) ja ramnoosimonohydraatin (C₆H₁₂O₅*1 H₂O) pitoisuus näyteliuoksissa oli 70 g/l ja Blue Dextrania 1,5 g/l käytettiin hidastumatonana komponenttina. Näytetilavuus oli 0,5 ml. Hartsikerroksen huokoisuus määritettiin Blue Dextran-ajojen pulssivasteista.
 25

Kromatografiset parametrit laskettiin momenttimenetelmällä. Ennen parametrien laskemista kaikki kromatogrammit prosessoitiin Jandel Scientific Peak Fit v4 -ohjelmalla, jonka avulla käyrien pohjataso korjattiin ja etanolin aiheuttama negatiivinen piikki poistettiin. Jakautumisvakiot ja ksyloosin ja ramnoosin erotuskertoimet laskettiin pulssivasteista seuraavasti:
 30

$$K_i = \frac{V_i - V_{BD}}{V_s} = \frac{\left(\frac{V_i}{v_n} - \frac{z\varepsilon}{v_n / (\pi r^2)} - \frac{V_l}{2v_n} \right)}{\frac{z(1-\varepsilon)}{v_n / (\pi r^2)}} \quad (1)$$

jossa

K_i = alalaji i:n jakautumiskerroin

V_i = alalaji i:n retentiotilavuus

V_{BD} = hidastumattoman alalajin retentiotilavuus
(Blue Dextran)

V_s = stationaarifaasin tilavuus

v_n = eluentin virtausnopeus

z = stationaarifaasin korkeus

ε = huokoisuus

r = kolonnin säde

V_l = syötetyn näytteen tilavuus

$$\alpha_{ij} = \frac{V_i - V_{BD}}{V_j - V_{BD}}$$

jossa α_{ij} = alalajin i erotuskerroin suhteessa alalajiin j

V_j = alalaji j:n retentiotilavuus

Taulukko 2

Harts	Eluentti	z cm	ε -	K_{rham} -	K_{xyl} -	$\alpha_{rham/xyl}$ -
CA08GC	Vesi	29.2	0.34	0.39	0.56	1.44
	EtOH 29.3 w-%	18.4	0.35	0.60	1.14	1.89
CA12GC	Vesi	30.0	0.34	0.25	0.42	1.66
	EtOH 29,4 w-%	23.3	0.34	0.53	1.03	1.95
CS08G	Vesi	29.9	0.37	0.47	0.53	1.13
	EtOH 29,3 w-%	26.5	0.36	0.70	0.85	1.21

Tulokset osoittavat, että etanolin lisääminen eluenttiin parantaa ksyloosin ja ramnoosin erotusta. Tulokset osoittavat, että heikosti hapan kationinvaihtoharts on parempi ksyloosin ja ramnoosi kromatografiseen erotukseen kuin vahvasti hapan kationinvaihtoharts.

5

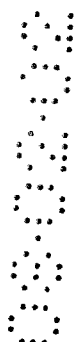
10

15

20

25

30



Patenttivaatimukset

1. Heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttö hiilihydraattien kromatografisessa erotuksessa t u n n e t t u siitä, että hartsia käytetään

- 5 - monosakkaridien erottamiseen toisistaan, disakkarideista ja/tai oligosakkari-
deista;
- sokeri- ja anhydrosokerialkoholien erottamiseen toisistaan;
- deoksi-, metyyli- ja anhydrosokereiden ja -sokerialkoholien erottamiseen hyd-
rofiilisemmista sakkarideista ja/tai
- 10 - heksoosi- ja pentoosisokereiden ja sokerialkoholien erottamiseen toisistaan.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen heikosti happaman kationinvaih-
tohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että hartsi on akryylinen heikosti hapan ka-
tioninvaihtohartsi.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen heikosti happaman ka-
15 tioninvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että akryylinen hartsi johdetaan
ryhmästä, joka koostuu akrylaattiesteristä tai akrylonitrilistä tai akryylihapoista
tai niiden seoksista.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen heikosti happaman kationinvaih-
tohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että akrylaattiesteri valitaan ryhmästä, joka
20 koostuu metyylimetakrylaatista, metyyliakrylaatista, etyyliakrylaatista ja butyy-
liakrylaatista.

5. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen heikosti hap-
paman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että hartsi on H^+ -, Na^+ -,
25 K^+ -, Ca^{2+} - tai Mg^{2+} -muodossa.

6. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen heikosti hap-
paman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että hartsi on silloitettu
divinyylibentseenillä (DVB).

7. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 6 mukainen heikosti happa-
man kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että hartsin silloitusaste
30 on noin 1 - noin 20 paino-% DVB:ä.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen heikosti happaman kationinvaih-
tohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että hartsin silloitusaste on noin 3 - noin 8
paino-% DVB:ä.

9. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen heikosti hap-
35 paman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että hartsin keskimää-
räinen partikkelikoko on 10 - 2000 mikrometriä.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että hartsin keskimääräinen partikkeli-
koko on 100 - 400 mikrometriä.

11. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 10 mukainen heikosti
5 happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että syöttöliuoksen
pH on 1 - 11.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen heikosti happaman kationin-
vaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että syöttöliuoksen pH on 2 - 10.

13. Patenttivaatimuksen 11 mukainen heikosti happaman kationin-
10 vaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että syöttöliuoksen pH on 2 - 4 tai
5 - 10.

14. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 13 mukainen heikosti
happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että kolonnin, syöt-
töliuoksen ja eluentin lämpötila on 10 - 95 °C.

15. 15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen heikosti happaman kationin-
vaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että kolonnin, syöttöliuoksen ja eluen-
tin lämpötila on 40 - 95 °C.

16. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 15 mukainen heikosti hap-
paman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että kolonnin, syöttöliu-
20 oksen ja eluentin lämpötila on 60 - 95 °C.

17. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 16 mukainen heikosti
happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että eluentti vali-
taan ryhmästä, joka koostuu vedestä, alkoholista ja niiden seoksesta.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen heikosti happaman kationin-
25 vaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että eluentti on vesi.

19. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti
happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että erotettavat hii-
lihydraatit ovat sokereita ja sokerialkoholeja.

20. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti
30 happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että hydrofiiliset hii-
lihydraatit erotetaan hydrofobisemmista hiilihydraateista.

21. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti
happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että anhydrosokerit
erotetaan vastaavista sokereista.

22. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että anhydrosokeri-alkoholit erotetaan vastaavista sokerialkoholeista.

23. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti
5 happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että erotettavat hii-
lihydraatit ovat monosakkarideja.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen heikosti happaman kationin-
vaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että monosakkaridi on L-ramnoosi.

25. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti
10 happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että erotettavat hii-
lihydraatit ovat disakkarideja ja oligosakkarideja.

26. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti
happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että erotettavat hii-
lihydraatit valitaan ryhmästä, joka koostuu heksooseista, kuten ketohek-
15 sooseista, aldoheksooseista, pentooseista, kuten ketopentooseista, aldopen-
tooseista, vastaavista sokereista ja sokerialkoholeista ja niiden seoksista,
esim. gukoosista, fruktoosista, ramnoosista, anhydrosorbitolista, sorbitolista,
erytritolista, inositolista, arabinoosista, ksyloosista ja ksylitolista.

27. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti
20 happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että sokerit, sokeri-
alkoholit ja niiden vastaavat anhydromuodot erotetaan suoloista.

28. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti
happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että sokerit, sokeri-
alkoholit ja niiden vastaavat anhydromuodot erotetaan ionisista aineksista.

29. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 27 tai 28 mukainen heikosti
25 happaman kationinvaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että sakkaroosi ja
ei-sokeripitoiset komponentit otetaan talteen juurikasmelassierotuksessa.

30. Patenttivaatimuksen 29 mukainen heikosti happaman kationin-
vaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että kun melassille suoritetaan erotta-
30 minen, sokeri- ja ei-sokeripitoiset komponentit otetaan talteen.

31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen heikosti happaman kationin-
vaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että aminohapot erotetaan sakka-
roosijakeesta.

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen heikosti happaman kationin-
35 vaihtohartsin käyttö, t u n n e t t u siitä, että mannitoli erotetaan betaiinista,
sakkaroosista ja suoloista.

33. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttö, tunnettu siitä, että fruktoosi erotetaan disakkarideista ja oligosakkarideista.

5 34. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttö, tunnettu siitä, että monosakkaridit erotetaan oligosakkarideista.

35. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttö, tunnettu siitä, että monosakkaridit erotetaan disakkarideista.

10 36. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttö, tunnettu siitä, että sakkaroosi erotetaan fruktoosista ja glukoosista.

37. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttö, tunnettu siitä, että erytritoli, 15 inositoli ja mannitoli erotetaan betaiinista.

38. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 18 mukainen heikosti happaman kationinvaihtohartsin käyttö, tunnettu siitä, että erytritoli erotetaan inositolista.



Ksyyloosin kiteytysryönän kromatografinen erotus

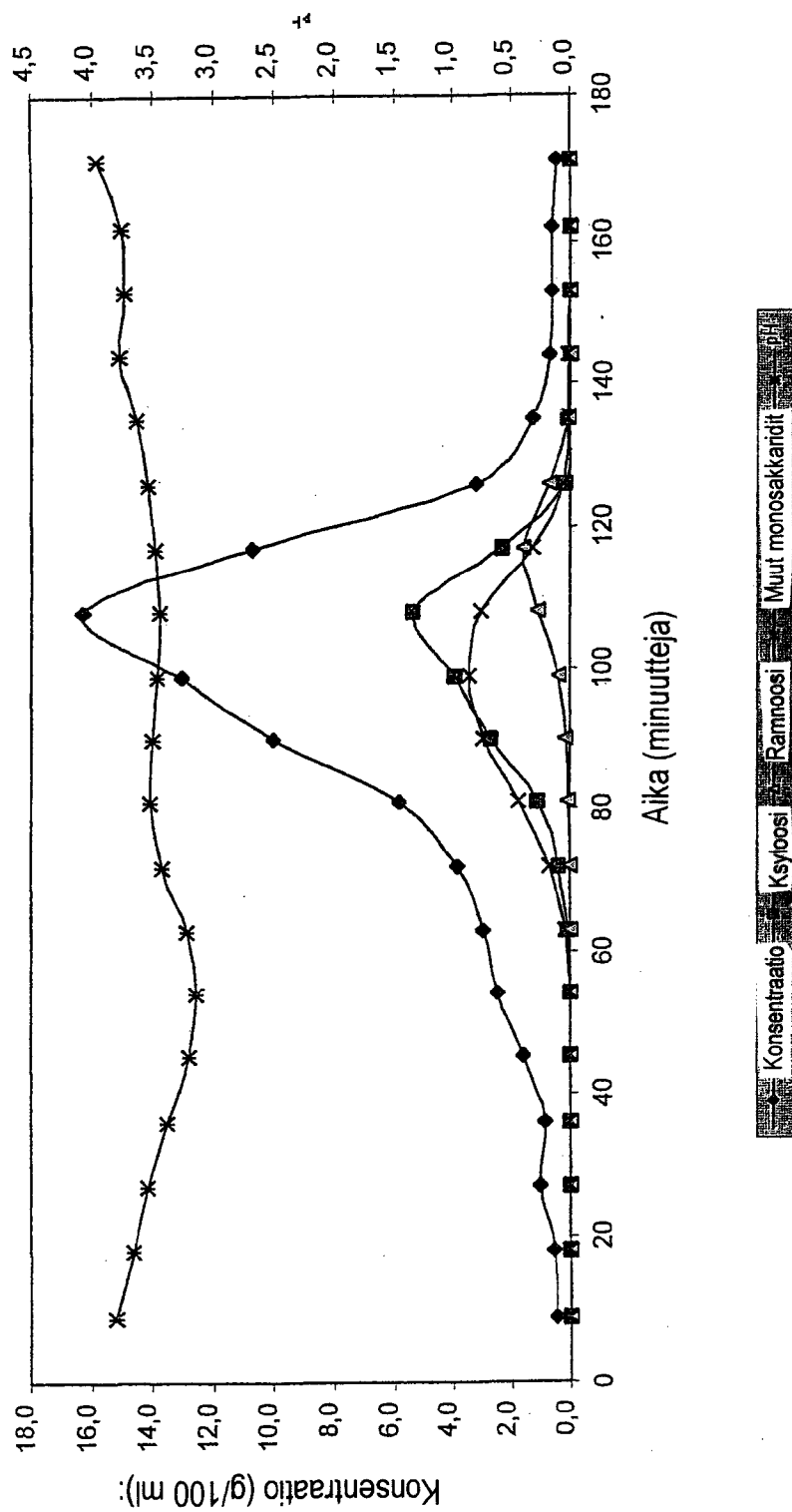


FIG. 1

000002 000143

Anhydrosorbitolin ja sorbitolin kromatografinen erotus

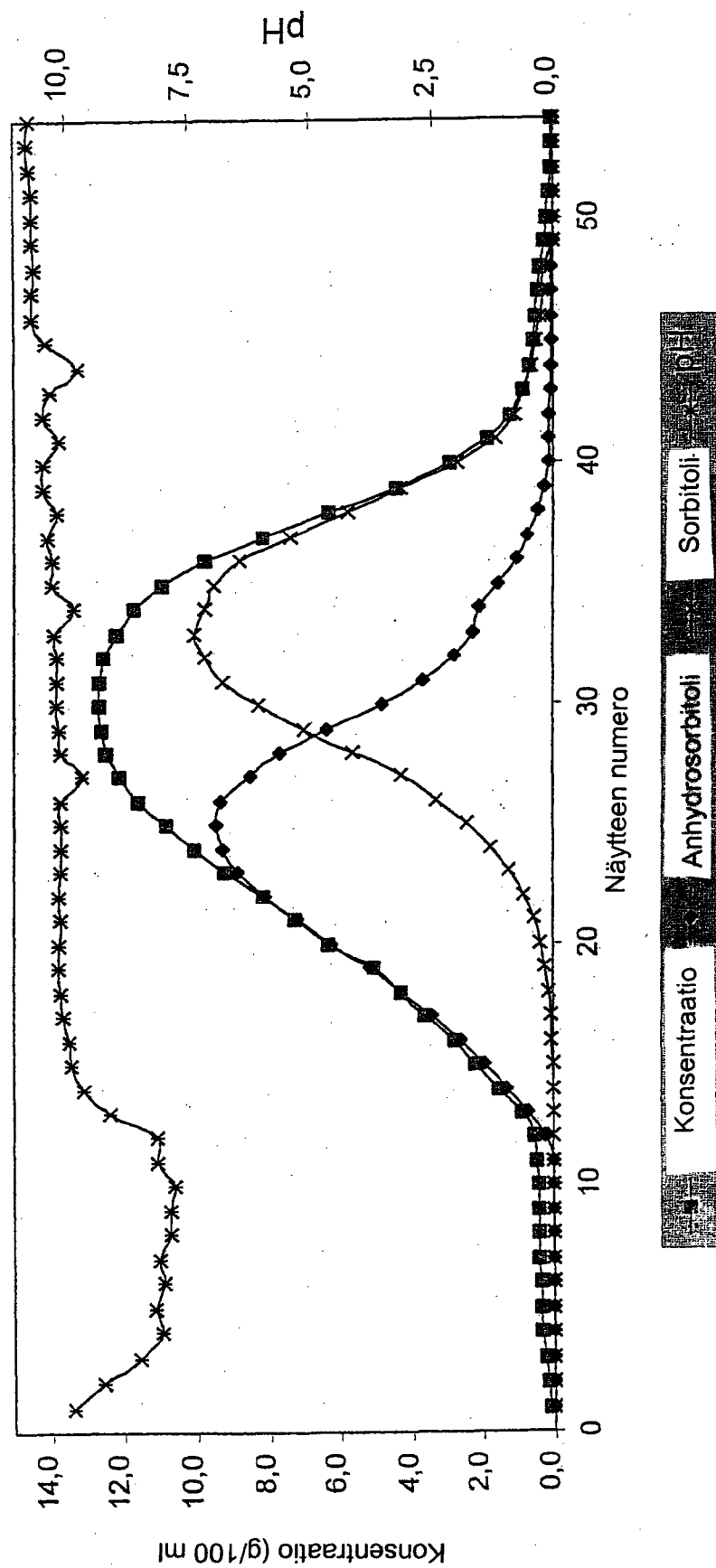


FIG. 2

Sakkaroosin, glukoosin ja fruktoosin kromatografinen erotus

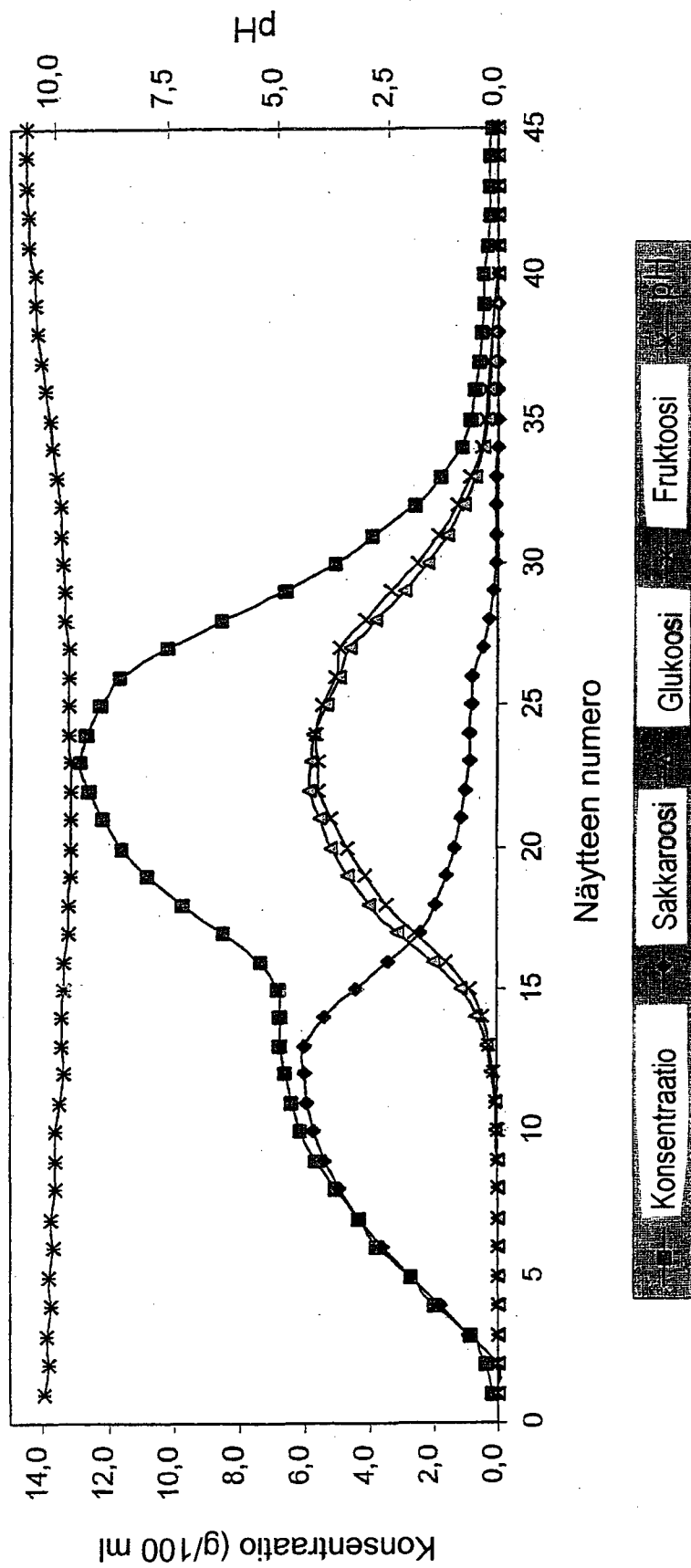


FIG. 3

00:00:00 00:00:00

Betaiinin, erytritolin ja inositolin kromatografinen erotus

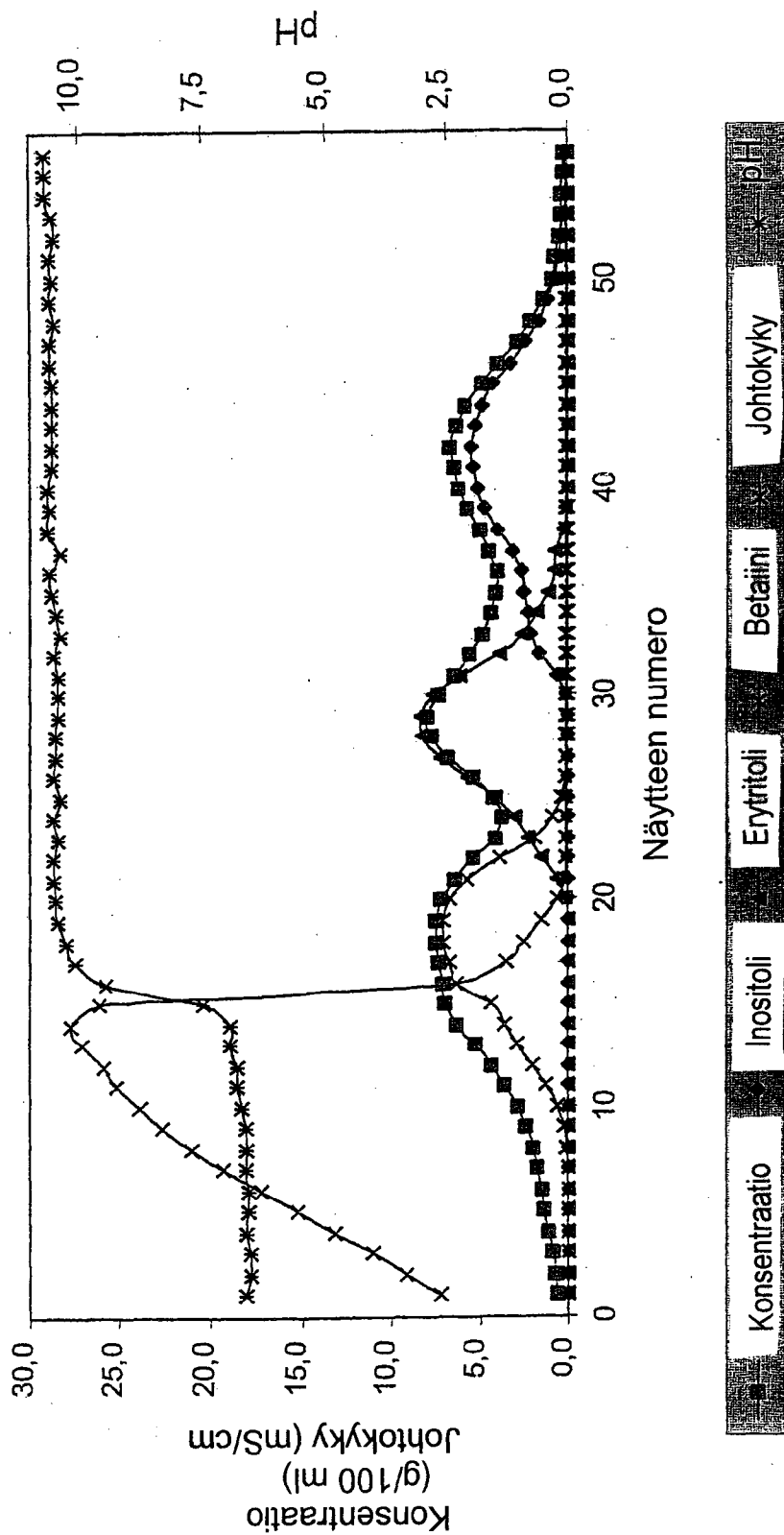


FIG. 4

000000 000000

Betaiinin, sakkaroosin ja mannitolin kromatografinen erotus

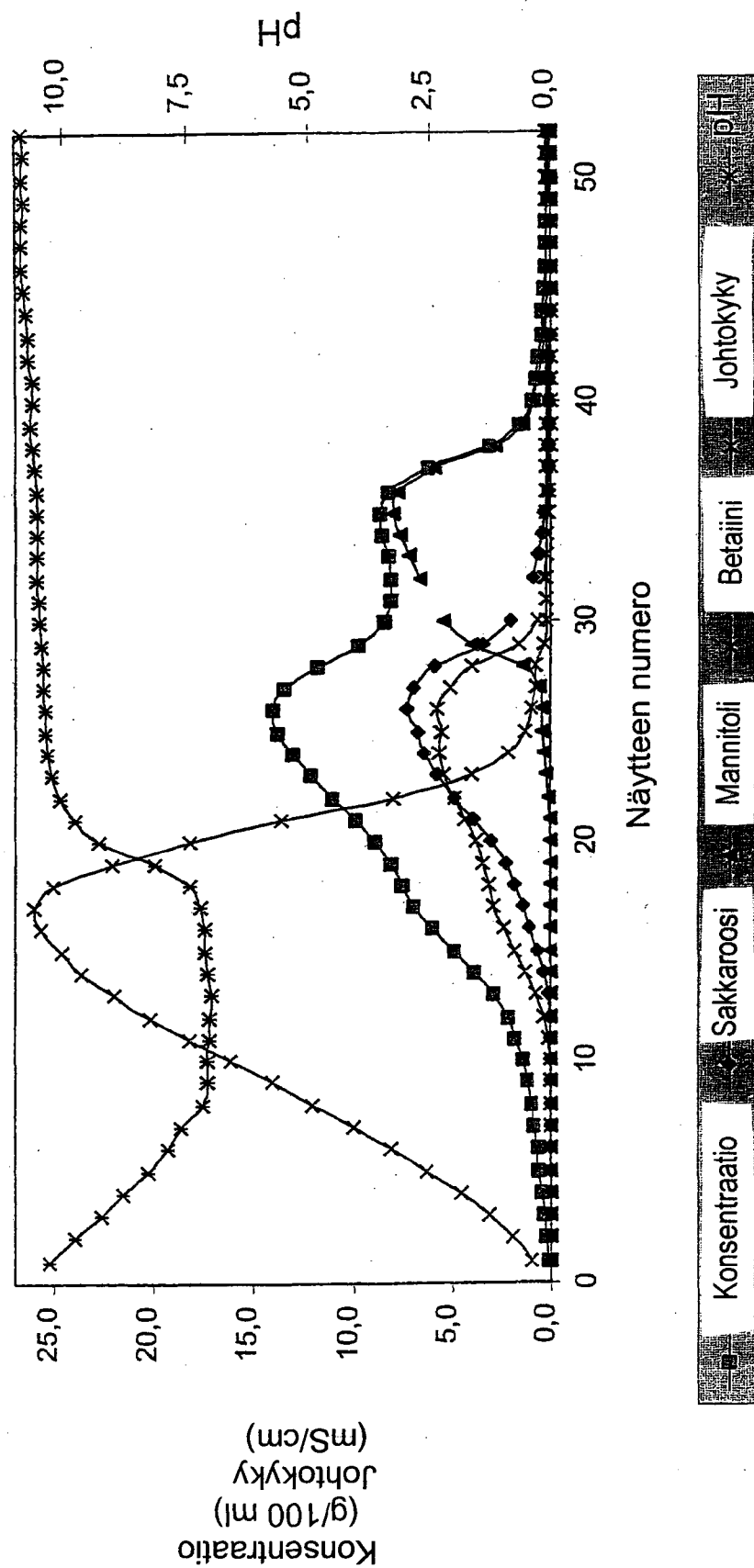


FIG. 5

00:00:00 00:00:00

Juurikasmelassin kromatografinen erotus

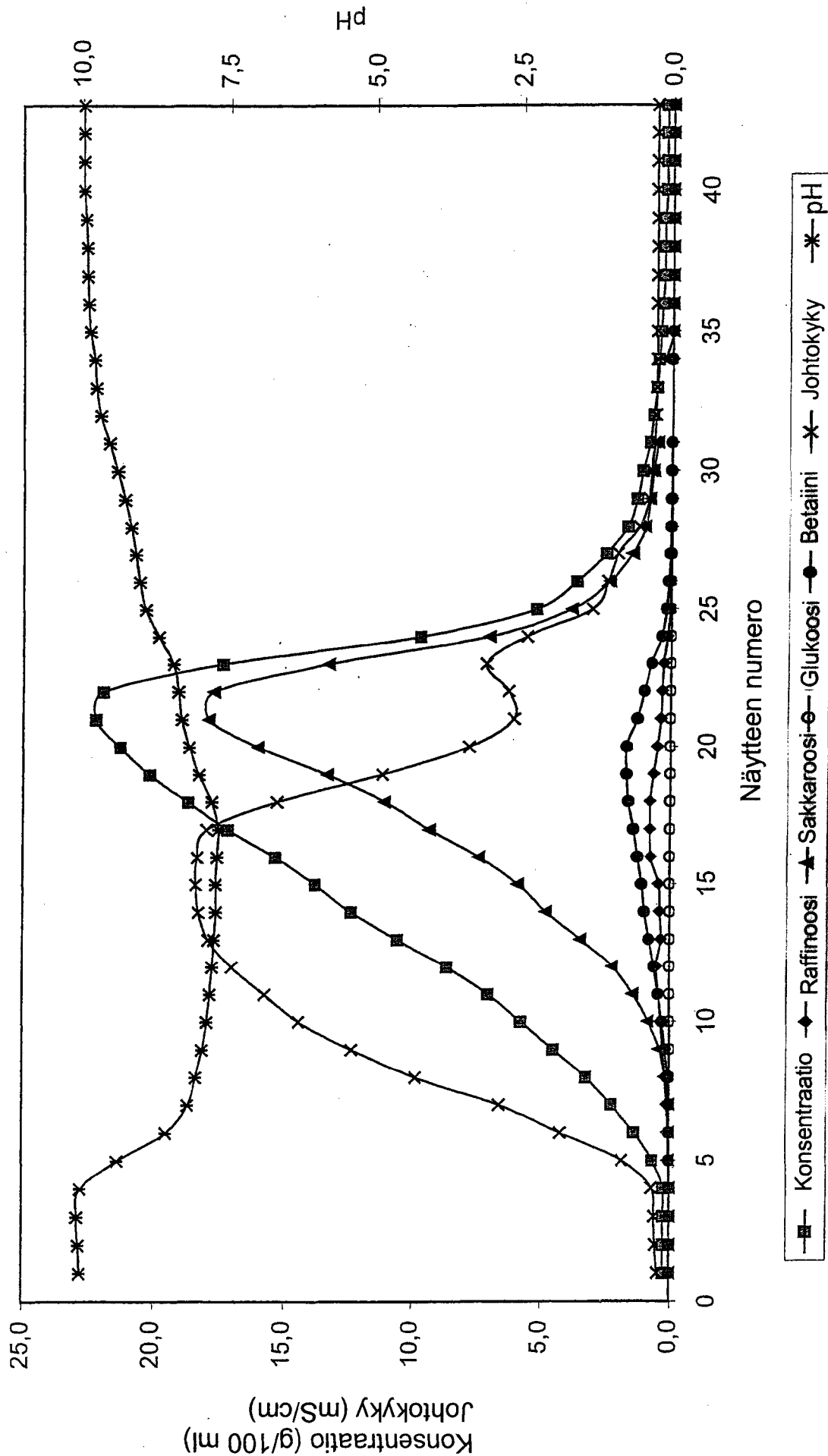


FIG. 6

00:00:00 00:00:00

Fruktoosin kiteytysryönän kromatografinen erotus

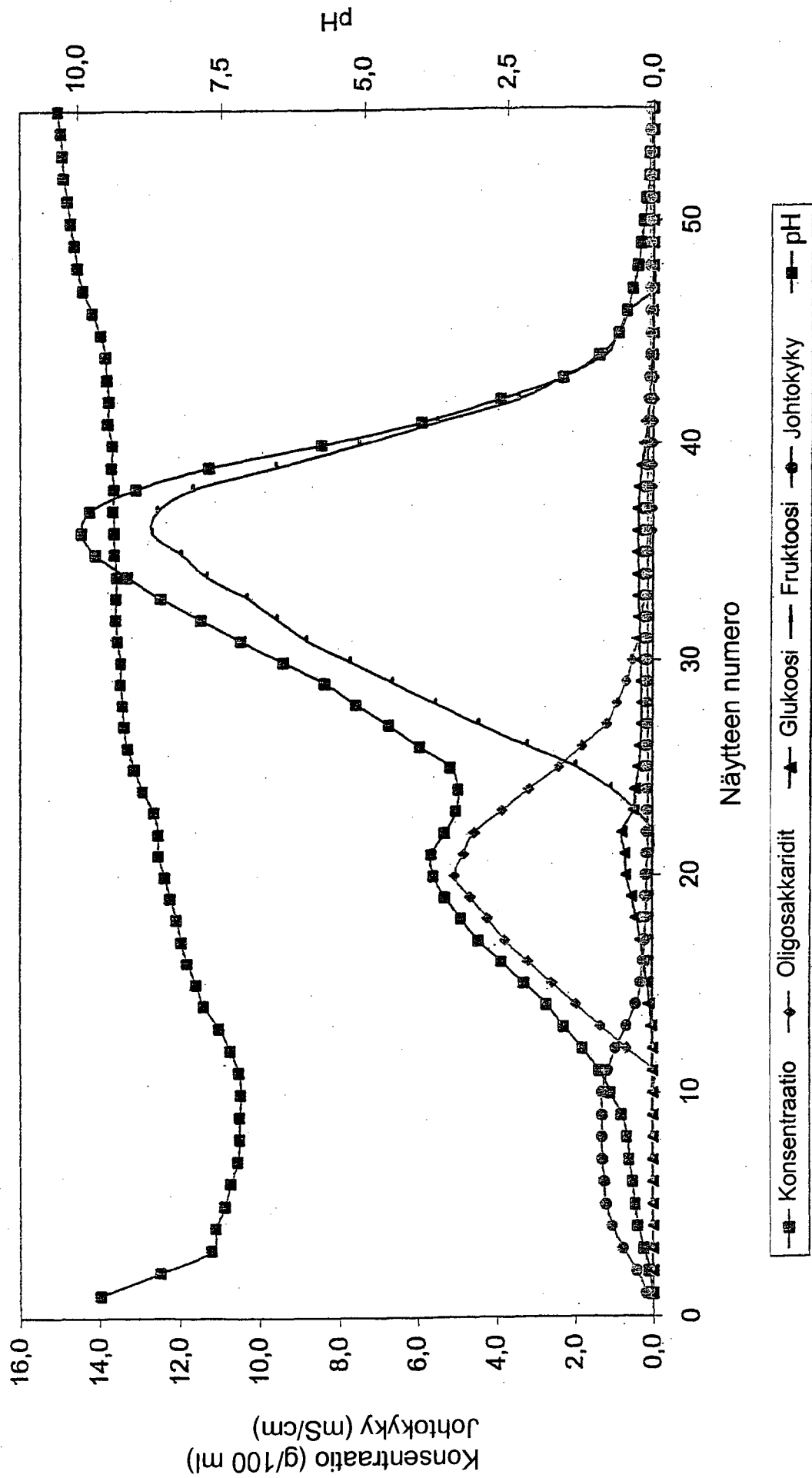


FIG. 7

PATENTTIHAKEMUS NRO	LUOKITUS
20002149	C 13 D 3/14, C 13 J 1/06, C 13 K 11/00 ja 13/00

TUTKITTU AINEISTO
Patenttijulkaisukokoelma (FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US), tutkitut luokat C 13
Tiedonhaut ja muu aineisto Tiedonhakuja Epodoc, WPI- ja PAJ-patenttitietokannoista sekä CA-plus-tietokannasta

VIITEJULKAISUT		
Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
X	FI-B 102962 (C 07 C 31/18, esim. 10 ja 11, vastaa US-A 5998607)	1-
X	JP-A 9127090 (G 01 N 30/48), CA-abstr. 127:47442	1-
X	x) US-A 4904769 (C 07 H 3/08), palsta 1, rivi 38 - palsta 2, rivi 21.	1 -
X	x) WPI AN: 2000-376948, tiivistelmä julkaisusta CN 1234404 (C 07 H 1/06).	1 -
x) lisäys tutkimusraporttiin 24.06.2003.		
*) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este		
Päiväys	Tutkija	
19.4.2001	Terttu Piepponen	