



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

196077

(11)

(B1)

/22/ Přihlášeno 12 02 74
/21/ /PV 8534-77/

(10) Zveřejněno 29 06 79

(45) Vydáno 15 05 82

(51) Int. Cl.³
C 08 F 20/36
B 01 J 43/00

(75)

Autor vynálezu

MIKEŠ OTAKAR dr. ing. DrSc., ŠTROP PETR ing.
a ČOUPEK JIRÍ ing. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy hydrofilních makroporézních ionexů

1

Vynález se týká způsobu přípravy hydrofilních polymerních gelů, které ve své struktuře obsahují současně kationické i anionické funkční skupiny.

Ionexové hydrofilní polymerní gely s regulovatelnou porositou, připravené podle čs. A0 č. 171 962, 171 963 a 187 563, obsahují ve své struktuře funkční skupiny buď anionické /měniče kationtů/, nebo kationické /měniče aniontů/. Bylo prokázáno, že tyto materiály předčí svými fyzikálními i chemickými vlastnostmi dosavadní běžně užívané katexy a anexy s celulózovou nebo polydextranovou maticí při sorpci a chromatografii různých biopolymerů.

Kromě běžných katexů a anexů byly však již dříve připraveny syntetické organické polystyren-divinylbenzenové ionexy, které ve své struktuře obsahovaly současně bazické i kyselé funkční skupiny. Na polystyrenový anex se iontovou výměnou sorbovala kyselá složka /například kyselina akrylová/, která po průniku do zrnka anexu byla potom do jeho sítě zapolymerována, většinou vklíněním jejího makromolekulárního řetězce. Podobně je možno vázat bazické složky na katex. Těmito postupy byly vyrobeny komerční amfoterní ionexy, např. typu Retardion, které se uplatnily především v procesu nazývaném iontové zbrzdění. Tento separační postup se uplatňuje jak v laboratorním, tak ve výrobním měřítku.

Současný rozvoj chromatografie biopolymerů ukazuje na velký význam amfoterních ionexů, jsou-li jejich funkční skupiny vázány na matici dovolující penetraci makromolekul, jako je například polydextran

2

[/J. Porath, L. Fryklund: Nature 226 /1970/ 169; J. Porath, N. Fornstedt: J. Chromatogr. 51 /1970/ 479]. Vzhledem k výhodným chemickým i mechanickým vlastnostem hydrofilních hydroxyakrylátových a hydroxymethakrylátových gelů připravených podle čs. patentu č. 148 828 a autor. osvědčení č. 150 819, které v mnoha ohledech předčí deriváty polysacharidové, je tento syntetický polymerní gel velmi vhodným nosičem i pro amfoterní nebo dipolární ionogenní skupiny.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy hydrofilních makroporézních ionexů amfoterního charakteru, určených zvláště pro izolaci a separaci biologických materiálů, který spočívá v tom, že se makroporézní hydrofilní katex, tvořený fosforylovaným kopolymerem 2-hydroxyalkylmethakrylátu nebo -akrylátu obsahujícím 2 až 3 atomy uhlíku v alkyly a ethylenglykoldimethakrylátu nebo -akrylátu, neutralizuje bazicky reagujícími monomery ze skupiny zahrnující vinylpyridin, aminoalkylmethakryláty a aminoalkylakryláty, obsahující 1 až 3 atomy uhlíku v alkyly, a poté se reaktivní dvojné vazby produktu neutralizace radikálově kopolymerizují s dvojnými vazbami v postranních řetězcích původního katexu.

Kopolymerizaci lze s výhodou provést tak, že se nejprve připraví makroporézní katex suspenzní kopolymerizací anionogenního monomeru s větším množstvím /více než 10 % mol./ síťovadla, takže po provedené polymerizaci obsahuje polymer určitou část nezreagovaných akryloylových nebo methakryloylových dvojných vazeb. Přidá-li se nyní k takovému katexu monomer vybraný

ze skupiny vinylpyridinů, aminoalkylakrylátů, aminoalkylmethakrylátů, aminoalkylakrylamidů nebo jejich kvartérních amoniových sloučenin, mohou zbylé dvojné vazby základního katexu kopolymerizovat s dvojnými vazbami nového bazického monomeru, který je v první fázi pouze katexem sorbován. Vzniká tak roubovaný kopolymer s amfoterními vlastnostmi.

K přípravě makroporézního hydrofilního katexu se s výhodou používá síťujících monomerů akrylového nebo methakrylového typu vybraných ze skupiny sloučenin diakrylátů a dimethakrylátů, jako jsou dialkylakryláty, dialkylmethakryláty, oligoglykol a polyglykoldiakryláty, oligoglykol a polyglykolmethakryláty, bisakrylamidy, bismethakrylamidy a divinylbenzen. Síťovadla mohou obsahovat též větší počet akryloylových nebo methakryloylových kopolymerizace schopných skupin. Radikálová kopolymerizace se provádí v přítomnosti inertních organických rozpouštědel, vybraných ze skupiny organických kyselin, alkoholů, aminů nebo nitrilů ve vodné disperzní fázi.

Při syntéze amfoterního ionexu hraje často roli významný požadavek, aby opačně nabitě skupiny byly nejen ve stechiometrické ekvivalenci, nýbrž aby byly stericky tak situovány, aby dovolovaly v důsledku volné otáčivosti řetězců jejich nezávislé kroužení v roztoku a zaujímání polohy v prostoru určeném délkou jejich ramen. Přitom je žádoucí, aby se mohly v jednom místě setkat a vytvořit iontovou vazbu.

Amfoterní ionexové hydrofilní gely mají veliký význam pro rozvoj jemných frakčních metod. Dělí se na nich směsi bílkovin a nukleových kyselin již při lineární chromatografii, aniž se vylučuje možnost použití elučních gradientů. Dosaženými výsledky předčí separace na amfoterních ionexech dělení dosažená na obvyklých monofunkčních ionexových derivátech. [J. Porath: Chromatographic Methods in Fractionation of Enzymes /in Biotechnology and Bioengineering Symp. No. 3, 145-166, 1972/.] K těmto účelům dosud používané deriváty polydextranů Sephadexu nebo Sepharosu /chráněné slovní známky/ mají ve srovnání s hydrofilními deriváty hydroxyakrylátových a hydroxymethakrylátových gelů podstatně menší chemickou a mechanickou stabilitu.

Nové ionexy připravené podle tohoto vynálezu navíc jen velmi málo botnají, při vyšších průtocích nedochází k ucpání kolon naplněných těmito materiály. Gely

jsou vzdorné vůči mikrobiální infekci a v případě potřeby je lze sterilovat vařením.

Dále uvedené příklady ilustrují metodu přípravy amfoterních ionexů podle tohoto vynálezu, aniž však jimi je předmět vynálezu omezován. Monomery uvedené nahoře lze např. doplnit i dalšími známými kation-aktivními a anionaktivními monomery, jako jsou soli kyseliny ethylensulfonové, styren-sulfonové, kvarterizované aminoalkylstyreny apod.

P ř í k l a d 1

Kopolymer 2-hydroxyethylmethakrylátu a ethylendimethakrylátu s vylučovací mezí molekulové váhy 300 000 /5 g/ byl zhotoven v ethylacetátu /100 ml/, směs byla poté vychlazena na -20 °C. V trojhrdlé baňce, opatřené míchadlem, teploměrem, kapátkou s vnějším chlazením, byla při teplotě -20 °C provedena reakce. K ochlazené suspenzi gelu bylo za míchání a chlazení během 30 minut přikapáno 20 ml roztoku /3 ml POCl₃ + 17 ml suchého ethylacetátu/. Roztok byl dále míchán za této teploty ještě 10 minut. Pak byl gel odfiltrován, promyt ethylacetátem, acetonem, methanolem, vodou, methanolem a vysušen z etheru. 2 g fosforylovaného produktu s kapacitou asi 2,5 mekv/g bylo převedeno na pH formu promytím 20% HCl. Přebytek kyseliny byl vymyt vodou. Gel byl prolit 4-vinylpyridinem, přebytek monomeru byl odsát a vymyt směsí methanol-voda 2 : 1. Gel byl promíchán s minimálním objemem roztoku aceton-voda 15 : 1 s 10 hmot. % azobisisobutyronitrilu. Nádoba s gelem byla vymrazena, evakuována a propláchnuta dusíkem. Tento postup byl opakován ještě 3x, pak byla ampule zatavena a umístěna do termostatu s teplotou 70 °C. Gel byl zahříván 10 hodin. Pak byla nádoba otevřena, gel promyt methanolem, směsí aceton-voda 10 : 1, acetonem, etherem. Gel byl vysušen na vzduchu, dosušen za vakua a obsah dusíku stanoven elementární analýzou a podle Kjehldala /1,75% N/.

P ř í k l a d 2

Modifikace byla provedena stejně jako v příkladu 1, s tím rozdílem, že místo 4-vinylpyridinu byl použit N,N-diethylamino-methakrylát. Stanovený obsah dusíku podle Kjehldala činil 1,1 %.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy hydrofilních makroporézních ionexů amfoterního charakteru, určených zvláště pro izolaci a separaci biologických materiálů, vyznačený tím, že se makroporézní hydrofilní katex tvořený fosforylovaným kopolymerem 2-hydroxyalkylmethakrylátu nebo -akrylátu obsahujícím 2 až 3 atomy uhlíku v alkylu a ethylen-glykoldimethakrylátu nebo -akrylátu neutra-

lizuje bazicky reagujícími monomery ze skupiny zahrnující vinylpyridin, aminoalkylmethakryláty a aminoalkylakryláty, obsahující 1 až 3 atomy uhlíku v alkylu a poté se reaktivní dvojné vazby produktu neutralizace radikálově kopolymerizují s dvojnými vazbami v postranních řetězcích původního katexu.