



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

199577
(11) (B2)

(22) Přihlášeno 10 02 75
(21) (PV 834-75)

(40) Zveřejněno 31 10 79

(45) Vydáno 15 07 83

(51) Int. Cl.³
A 61 K 37/26
B 01 D 15/08

(72)
Autor vynálezu

JACKSON RICHARD LEE dr. a STILZ JOHN GEORGE,
INDIANAPOLIS (Sp. st. a.)

(73)
Majitel patentu

ELI LILLY AND COMPANY, INDIANAPOLIS (Sp. st. a.)

(54) Způsob čištění insulinu

1

Vynález se týká způsobu čištění insulinu ve formě soli alkalického kovu nebo soli amonné.

Předmětem vynálezu je tedy způsob čištění insulinu ve formě soli alkalického kovu nebo amonné soli, vyznačující se tím, že se nabobtná gel, schopný přijímat v suchém stavu 4 až 98 hmotnostních % vody, mající částčky o průměru 20 až 80 mikronů, nabobtnalým gelem se naplní kolona, do níž se vpustí vodný roztok soli insulinu a alkalického kovu nebo amonné soli o čistotě nejméně 80 %, přičemž koncentrace insulinu je v rozmezí od 1 do 8 % (hmotnostní procenta/objemová procenta) a celkové množství insulinu dostačuje k zatížení kolony v rozmezí od 0,8 do 6,7 g na litr objemu náplně v koloně, přičemž hodnota pH roztoku je v rozmezí od 7,5 do 9,5, načež se vymývá insulin z adsorbentu za teploty v rozmezí od 5 do 30 °C vodným roztokem s obsahem až 0,02 M anorganické soli o stejné hodnotě pH, jakou měl původní roztok insulinu.

Výhodným gelem je zesítněný dextran, schopný přijmout 5 až 20 % hmotnostních vody.

Od doby svého objevu v r. 1921, kdy byl insulin nalezen v pankreasu, má insulin na celém světě mimořádnou důležitost při léč-

2

bě cukrovky (diabetes mellitus). Protože při postupech extrakce insulinu z pankreasové tkáně se extrahují rovněž podstatná množství jiných proteinů kromě insulinu, bylo vynaloženo mnoho úsilí na čištění insulinu, například tedy na nalezení postupů dělení insulinu od jiných proteinů. Některé z postupů čištění insulinu jsou značně používány.

Jeden z těchto výrobně důležitých postupů, a to jeden z nejstarších, využívá obecného jevu, že rozpustnost proteinu je nejnižší v isoelektrickém bodě za dodržování dalších konstantních podmínek. V US patentu číslo 1 469 994 je popisován postup, vyznačující se tím, že se z vodného extraktu z pankreasu vysrážejí proteiny neinsulinové povahy v odpovídajících isoelektrických bodech. Isoelektrické vysrážení insulinu z vodného extraktu pankreasu za hodnoty pH od asi 4 do asi 7 je popsáno v americkém patentovém spise číslo 1 520 673.

Při jednom z původních někdejších postupů se provádí srážení insulinu přidáním dostatečného množství anorganické soli. V US patentu číslo 1 547 515 je popsán první způsob vysolení insulinu z rozpouštědla, použitého při reakci, a to přidáním chloridu sodného. Diferenciální postup vysolování je popsán v US patentu číslo 2 449 076, a vyznačuje se vysolením insulinu přidáním

chloridu sodného k neutralisovanému extraktu s následující filtrací, novým rozpuštěním zbytku a opakovaným vysolením insulínu, ale za použití soli v nižší koncentraci, než jak to bylo použito v prvním stupni vysolení.

Třetí, provozně důležitý způsob čištění insulínu se týká vysrážení nebo krystalisace insulínu z roztoku komplexu insulínu se zinkem. Obecně se tento komplex vysráží z pufovaného, vodního roztoku, obsahujícího zinečnaté ionty. Byly použity četné pufrы, například podle US patentu číslo 2 626 228 se používá pufr, obsahující kyselinu citrónovou a její soli.

Současně používané provozně způsobilé postupy čištění insulínu zahrnují typicky všechny tři výše zmíněné způsoby. Protože komplex insulínu se zinkem je nejdůležitější obchodní formou insulínu, týká se obvykle poslední stupeň čištění tohoto komplexu krystalizací.

V posledních letech však bylo nalezeno, že proteiny neinsulinové povahy, mezi nimiž obvykle převažují proinsulinové a jim podobné proteiny, tvoří menší složku obchodně používaného komplexu insulínu se zinkem. Ačkoliv tyto složky obvykle představují pod asi 8 % hmotnostních obchodně používaného komplexu insulínu se zinkem, má se za to, že některé z těchto složek mají antigenní nebo imunogenní vlastnosti, viz například Chance a spol., *Science* **161**, 165 (1968); Steiner a spol., *Diabetes* **18**, 725 (1968); Bromer *BioScience* **20**, 701 (1970) a Rubenstein a spol., *Ann. Rev. Med.* **22**, 1 (1971).

Stále trvajícím problémem je tedy odstranění proteinů neinsulinové povahy z insulínu za použití provozně a obchodně způsobilého postupu.

Výraz „insulin“, jak je zde používán, zahrnuje nejen insulin jako takový, ale i proteiny, podobné insulínu, jako je desamidoinulin. Protože insulin a proteiny podobné insulínu se vyznačují podobnou hypoglykemickou účinností, není obvykle třeba dělit insulín od jiných pankreatických proteinů, a není tedy třeba obvykle připravovat homogenní insulin.

Jsou známy postupy dělení biologicky účinných látek na analytickém podkladu, jako je elektroforesa a chromatografie na iontoměničích, a dají se takto oddělit neinsulinové složky od insulinových složek v obchodních (nebo i surových) přípravcích insulínu. Těmito postupy je i možno dělit insulinové složky na insulin jako takový a desamidoinsuliny. Tyto postupy mají však pochybnou použitelnost při použití ve velkoprodukcích.

Postup, který se dá snáze přizpůsobit zpracování na velko, je gelová filtrace (což je rovnocenný pojem výrazům gelová exkluzní chromatografie a gelová permeační chromatografie). Při tomto postupu se dělí proteiny na koloně, obsahující gel, který byl

zesíten takovým způsobem, že vzniknou póry v každé částice gelu. Tyto póry se vyznačují stálým, měřitelným objemem, který je přímo úměrný stupni nabobtnání gelu a menší molekuly mají lepší přístup k těmto pórům než větší molekuly, je postup menších molekul kolonou ztížen ve srovnání s většími molekulami, majícími pouze částečný přístup, případně vůbec žádný přístup k pórům.

V uplynulé době byla již gelová filtrace použita k čištění insulínu; při izolování insulínu z pankreatů jednotlivých koček byl surový insulin získán extrakcí alkoholem za přítomnosti kyseliny s následujícím vysrážením neúčinných složek v alkalickém prostředí, dále se zahuštěním, vysrážením v isoelektrickém bodě a posléze s vysolením za použití srážení chloridem sodným. Surový insulin se potom využije k dělení na koloně s gelem zesíteného dextranu s následujícím eluováním 1,0 M roztokem kyseliny octové, viz Davoren, *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 150 (1962).

Při izolování insulínu z ryb se homogenizují žlázy ve vodě, a proteiny se vysrážejí roztokem kyseliny trichloroctové. Sraženina se extrahuje ethanolem, obsahujícím kyselinu, a z extraktů se methylenchloridem odstraní lipidní složky. Zbývající pevné podíly se izolují, a po rozpuštění v 5,0 M roztoku kyseliny octové se roztok filtruje na koloně se zesíteným dextranem za použití 5,0 M roztoku kyseliny octové jako elučního rozpouštědla, viz Humbel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**, 333 (1963). Uvádějí se výtěžky okolo 80 %. Je třeba poznamenat, že Humbel uvádí, že pro dobré dělení insulínů od dalších proteinů se mají volit podmínky při eluování, podporující disociaci molekul insulínu. Dále tvrdí Humbel, že 1,0 M roztok kyseliny octové není uspokojivým rozpouštědlem, protože podle sdělení Yphantise a Waughy, viz *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 218 (1957), není tamže insulin dostatečně disociován.

Surový extrakt z pankreasu hovězího dobytka se filtruje na gelu zesíteného dextranu, jak to popisuje Epstein a spol., *Biochemistry* **2**, 461 (1963). Jako eluční rozpouštědlo byl použit 0,2 M roztok hydrogenuhlíčitanu amonného, tedy rozpouštědlo, o kterém se již zmiňuje Humbel (citace výše). Epstein a spol. uvádějí výtěžek asi 60%.

Insulin byl izolován z pankreatu lidí; žlázy byly nejprve homogenisovány, a potom extrahovány, frakcionací síranem amonným byly odstraněny určité podíly inaktivních materiálů, insulin byl vysrážen, nejprve chloridem sodným, potom vysrážením v isoelektrickém bodě. Získaný insulin byl rozpuštěn v 0,5 N roztoku kyseliny octové, a roztok byl filtrován na gelu zesíteného dextranu. Filtrovaný insulin byl převeden na komplex insulínu se zinkem, viz Jackson a spol., *Diabetes*, **18**, 206 (1969). Výtěžek insulínu po gelové filtraci činí asi 60 %.

Posléze byl postup gelové filtrace a chromatografie na iontoměničích kombinován podle jihoafrického patentového spisu číslo 69/5280 (odpovídajícího belgickému patentu číslo 737 257). V jediném příkladu gelové filtrace (viz příklad 1) se filtruje komplex insulínu se zinkem na koloně se zesítěným dextranem, a to za dosažení výtěžku 80 %. Jako roztok při eluování se použije 1,0 M roztok kyseliny octové. Je třeba poznamenat, že Schlichtkrull a spol., zjistili, že je třeba po filtrování provádět postup vysolení za dodržení isoelektrického vysrážení a krystalizace zinečnatého komplexu při izolování komplexu insulínu se zinkem.

Při každém z předchozích postupů gelové filtrace při čištění insulínu byla zaznamenána podstatná ztráta insulínu. Dále pak podle předchozích postupů zde není spolehlivý odkaz na to, že lze získat pouze insulin (počítaje v to proteiny, podobné insulínu, jak je o nich výše řeč) v důsledku použití gelové filtrace.

Obecně řečeno, může se použít jakýkoli gel, bobtnatelný vodou, to za použití roztoků proteinů a postupu podle tohoto vynálezu. Avšak takový gel se má vyznačovat za sucha, nebo v nenabobtnalém stavu schopností poutat vodu v množství nejméně hmotnostně 4 %, přepočteno na hmotnost suchého gelu, jakož i částicemi o průměru pod asi 100 mikronů. S výhodou činí schopnost gelu poutat vodu od asi 4 do asi 98 %, a nejvýhodněji od asi 5 do asi 20 %. S výhodou mají být průměry suchých částic gelu menší než asi 80 mikronů a zvláště výhodné rozmezí průměru částic činí od asi 20 do asi 80 mikronů.

Jako příklady vhodných gelů lze uvést mezi četnými jinými (počítaje v to kukuřičný škrob) zesítěný galaktomannan, zesítěný dextran, agar nebo agarosu, polyakrylamidy, kopolymery akrylamidu a methylen-bis-akrylamidu, kopolymery methylen-bis-akrylamidu s vinylmethylkarbinolem a s vinylpyrrolidinem, a podobně. Výhodnými gely jsou zesítěné dextrany, jako je sefadex.

Typ kolony, použité při postupu podle tohoto vynálezu, nemá rozhodující význam. Volba výšky kolony, průměr kolony, nebo její tvar je vždy závislý na žádaných parametrech postupu. Je jasné, že jak se výška kolony zvyšuje, snižuje se průtoková rychlost, či jinak řečeno, zpětný tlak je přímo úměrný výšce kolony. Z těchto důvodů je sestava patrové kolony pokládána za výhodnou, například v úpravě, jako je „Pharmacia Sectional Column KS-370“. Pro účely normální produkce slouží dobře patro se šesti sekciemi.

Například lze uvést vyhovující dělení a čištění insulínu na koloně s možným zatížením asi 4,5 g soli insulínu s alkalickým kovem nebo amonné soli insulínu na litr lože kolony, což je rozmezí nejvýhodnější. Avšak zatížení kolony může obvykle kolísat od asi 0,8 do asi 6,7 g na litr lože kolony,

přičemž výhodným rozmezím je rozsah od asi 3,5 do asi 5,0 g na litr lože kolony. Pochopitelně lze stanovit optimální podmínky velmi snadno pokusně pro každou kolonu.

Gel je možno bobtnat, nebo je možno plnit kolonu nabobtnalým gelem jakýmkoli možným postupem, jak jsou známy odborníkům na tomto úseku. Obecně se gel bobtná elučním prostředím. Jinak je možno bobtnat gel 30% vodným ethanolem, přičemž se jemné podíly dekantují, a bobtnací prostředí se nahradí elučním prostředím.

Obecně se sůl insulínu a alkalického kovu, nebo amonná sůl insulínu rozpustí v destilované vodě, a hodnota pH se upraví jak je to žádoucí zředěným roztokem báze nebo zředěným roztokem organického pufru. Jako vhodné báze lze uvést hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid lithný, vodný roztok amoniaku a podobně. Jako výhodnou sloučeninu lze uvést hydroxid sodný. Co příklad vhodného organického pufru lze uvést kombinaci glycinu a hydroxidu sodného, tris-(hydroxymethyl)aminomethan, a podobně.

Obecně řečeno, může se sůl insulínu a alkalického kovu nebo amonná sůl insulínu připravovat známými postupy. Je však výhodné připravovat sůl insulínu a alkalického kovu, nebo amonnou sůl insulínu postupem podle US patentu číslo 3 719 655. Jak to zde již bylo uvedeno, má mít řečený insulin čistotu nejméně asi 80 %, což znamená, že obsah insulínu, počítaje v to proteiny, podobné insulínu, vyznačující se glykemickou aktivitou, má činit nejméně asi 80 %, přepočteno na veškeré přítomné proteiny.

Koncentrace soli insulínu a alkalického kovu, či amonné soli insulínu v roztoku, použitým na té či oné koloně, činí, jak je to uvedeno výše, od asi 1 do asi 8 %, uvedeno jako hmotnost na objem. Výhodnou koncentrací je rozsah od asi 4 do asi 6 %.

Pro uspokojivé výsledky se má sůl insulínu a alkalického kovu nebo amonná sůl insulínu rozpustit v objemu rozpouštědla, který je nižší než objem, použitý při dělení, jak je o tom výše řeč.

Při chromatografování je distribuční koeficient K_d definován jako poměr koncentrace rozpuštěné složky v pohyblivé fázi ke koncentraci rozpuštěné složky ve stacionární fázi. Při gelové filtraci je pohyblivá fáze definována jako rozpouštědlo, pohybující se ve volném prostoru mezi částicemi gelu, a stacionární fáze je rozpouštědlo, jímž jsou zaplněny částice gelu, tj. podíl rozpouštědla, uzavřeného v pórech každé z částic gelu. Takže K_d značí onu frakci zachyceného rozpouštědla, jež obsahuje rozpuštěnou složku.

Za použití elučního objemu K_d lze podíl V_e rozpuštěné složky vyjádřit rovnicí:

$$V_e = V_0 + K_d \cdot V_i$$

kde V_0 je objem kolony a V_i je objem zadr-

ženého rozpouštědla. Řešením pro K_d se dá rovnice upravit na

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i}$$

Jestliže se hustota vody pokládá za rovnou 1, pak $V_i = a \cdot W_r$, kde a je výška suchého gelu a W_r je podíl zadržené vody. Takže K_d činí -

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{a W_r}$$

což mohou odborníci na tomto úseku stanovit experimentálně.

Za předpokladu, že roztok obsahuje 2 rozpuštěné složky, lze eluční objem pro každou složku vyjádřit takto:

$$V'_e = V_0 + K_d' V_i$$

$$V''_e = V_0 + K_d'' V_i$$

Dělicí objem, V_s , je rozdíl mezi elučními objemy obou dvou rozpuštěných složek:

$$V_s = V''_e - V'_e$$

$$V_s = (K_d'' - K_d') V_i$$

Z předchozího je zjevné, že stupeň dělení dvou (či více) složek je z části závislý na zatížení kolony. Jak se množství rozpuštěných složek o nižší molekulové hmotnosti blíží limitu dostupných pórů, musí nutně dojít ke snížení dělení mezi dvěma rozpuštěnými složkami. Mezi limitními hodnotami zatížení, jak jsou specifikovány jako část tohoto vynálezu, může stupeň zatížení kolísat. V některých případech se může volit vyšší zatížení kolony k vyvážení dělení proti produktivitě.

Jak to zde již bylo uvedeno výše, může mít eluční prostředí hodnotu pH v rozmezí od asi 7,5 do asi 9,5. Obvykle se jako eluční prostředí používá vodný roztok stejné báze nebo pufru, jak byl použit při přípravě roztoku insulínu.

Je-li to žádoucí, může eluční prostředí obsahovat až do asi 0,02 molů anorganické soli na litr, tedy například chloridu sodného, draselného, amonného a podobně. Za výhodnou koncentraci lze pokládat 0,01 M, a za výhodnou sůl je třeba pokládat chlorid sodný. Použití takové soli je výhodné pro zlepšení dělení, přičemž je znemožněno navíc adsorbování bazických látek na gelu.

Eluování kolony se dá provádět za teplot v rozmezí od asi 5 do 30 °C. S výhodou se postup provádí za teploty od 20 °C níže.

Eluování se provádí jakýmkoli běžným postupem, a jako zvláště použitelný postup lze uvést měření ultrafialové absorpce při 280 nm u každé frakce. Ty frakce, které obsahují podle zjištění jako složku vyčištěný in-

sulín, se spojují a obvykle se převedou na komplex insulínu se zinkem.

Jak to zde již bylo výše uvedeno, je komplex insulínu se zinkem nejdůležitější formou insulínu. V důsledku toho se sůl insulínu s alkalickým kovem nebo amonná sůl insulínu o vysoké čistotě, jak se získá postupem podle tohoto vynálezu, převádí na komplex insulínu se zinkem. Konverse na komplex insulínu se zinkem se s výhodou provádí za hodnoty pH 6,0 za přítomnosti octanu amonného jako pufru. Není třeba isolovat sůl insulínu s alkalickým kovem nebo amonnou sůl insulínu z elučního prostředí, nebo koncentrovat roztok vyčištěného insulínu před krystalizací se zinkem. Výhodou postupu podle tohoto vynálezu je to, že roztok insulínu, jak se eluuje, je dostatečně koncentrovaný takže vysolení nebo elektrické vysrážení není nutné, ačkoli se takové postupy mohou provádět, je-li to třeba.

Zinečnatý komplex insulínu, takto získaný, se vyznačuje lepší čistotou v důsledku použití tohoto postupu. Zvýšenou čistotu lze dokázat několika způsoby. Komplex insulínu se zinkem lze analyzovat přímo se zřetelem na zjištění neinsulinových proteinových složek, jako je proinsulin a glukagon. Přítomnost proteinů o vysoké molekulové hmotnosti a tam patří jako typický příklad proteolýzy, tedy proteolytický enzym, se dá stanovit měřením stálosti protaminové suspence insulínu za zvýšených teplot. Za přítomnosti protaminasy se komplex insulínu s protaminem disociuje v důsledku degradace protaminu. Lze měřit fyzikální vlastnosti, jako je rozpustnost komplexu insulínu se zinkem za neutrálního pH a barva vzniklého roztoku. Posléze je možno měřit specifickou účinnost insulínu biologickými a imunologickými testy.

V důsledku vyšší čistoty je komplex insulínu se zinkem, získaný provedením postupu podle tohoto vynálezu, vhodným materiálem pro úpravu do různých farmaceutických přípravků insulínu, např. insulínu co takového, isofán-insulínu, protaminového komplexu insulínu se zinkem, suspence komplexu insulínu se zinkem, globin-insulínu a podobně. Dále pak dovoluje čistší forma komplexu insulínu se zinkem přípravu neutrálního insulínu, který je stálejší ve srovnání s kyselou formou insulínu; nečistoty, které přítomné v komplexu insulínu se zinkem, se často částečně vysrážejí za neutrální hodnoty pH. Takové nečistoty by často obsahovaly enzymy, odbourávající insulin, jako je trypsin a chymoprypsin, snižující účinnost insulinových přípravků. Čistší komplex insulínu se zinkem rovněž dovoluje výrobu přípravků insulínu z prasat nebo hovězího dobytka s prodlouženým účinkem, aniž by bylo třeba provádět další čištění, jak to bylo třeba v minulé době. Posléze vyžaduje příprava isofan-insulínu s čistších komplexů insulínu se zinkem méně protaminu, protože bez přítomnosti nečistot povahy kyselých

proteinů je možno použít jen takového množství protaminu, jehož je třeba k vysrážení insulinu.

Postup podle tohoto vynálezu lze kombinovat, jak je to třeba, s dalšími postupy čištění, například lze roztok insulinu s alkalickým kovem, nebo amonné soli insulinu filtrovat jednou či vícekrát před prováděním vlastní gelové filtrace. Rovněž je možno filtrovat eluovaný insulin jednou či vícekrát dříve, než se převádí na komplex insulinu se zinkem.

Příklad 1

5,53 g sodné soli insulinu z hovězího dobytka o účinnosti 26,4 jednotek na mg s obsahem 7,2 % hmotnostních proinsulinu se suspenduje v destilované vodě. Přidá se zředěný roztok hydroxidu sodného až k pH 9,0. Objem vzniklého roztoku činí 100 ml, načež se použije gel zesíťného dextranu, vyznačující se schopností přijímat 5 % vody, a velikostí částic od 20 až do 80, upravených do rovnovážného stavu ve vodném roztoku hydroxidu sodného o pH 9,0. Nabobtnalý gel

se použije jako náplň kolony rozměrů 4,0 na 43,0 cm s objemem 540 ml. Alikvotní část 40 ml roztoku insulinu se nanese na kolonu, načež se kolona eluuje vodným roztokem hydroxidu sodného o pH 9,0, přičemž se jímají frakce o objemu 6,5 ml. Eluování se provede měřením ultrafialové absorpce při 280 μ m. Frakce, odpovídající insulinové složce, se spojí, a okyslí se na pH 3,0 přidáním 6 N roztoku kyseliny chlorovodíkové. Vzniklý roztok se filtruje, přidá se chlorid zinečnatý, a komplex insulinu se zinkem se isoluje za pH 6,0 z pufru octanu amonného. Výtěžek komplexu insulinu se zinkem činí 1,83 g, což odpovídá výtěžku 82,5 %, přepočteno na výchozí složku. Insulin se vyznačuje účinností 26,8 jednotek/mg, a obsahem proinsulinu hmotnostně pod asi 0,05 %; přepočteno na jednotky činí výtěžek 83,8 %.

Podíl 37,5 ml původního roztoku insulinu se převede přímo, jak je to výše popsáno, na komplex insulinu se zinkem, a to bez stupně gelové filtrace. Výtěžek činí 1,87 g, tj. 90,1% komplexu insulinu se zinkem s obsahem proinsulinu 5,4 % hmot.

PREDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob čištění insulinu ve formě soli alkalického kovu nebo amonné soli, vyznačující se tím, že se nabobtná gel, schopný přijímat v suchém stavu 4 až 98 % hmotnostních vody mající částičky o průměru 20 až 80 mikronů, nabobtnalým gelem se naplní kolona, do níž se vpustí vodný roztok soli insulinu a alkalického kovu nebo amonné soli o čistotě nejméně 80 %, přičemž koncentrace insulinu je v rozmezí od 1 do 8 % (hmotnostní %/objemová %) a celkové množství insulinu dostačuje k zatížení kolony v rozmezí od 0,8 do 6,7 g na litr objemu náplně v koloně, přičemž hodnota pH roztoku je v rozmezí od 7,5 do 9,5, načež se vymývá insulin z adsorbentu za teploty v rozmezí od 5 do 30 °C vodným roztokem obsahem až 0,02 M anorganické soli o stejné hodnotě pH, jakou měl původní roztok insulinu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako řečený gel používá zesíťný dextran, schopný přijmout 5 až 20 % hmotnostních vody.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že zatížení kolony činí od 3,5 do 5,0 g na litr objemu vrstvy náplně v koloně, s výhodou 4,5 g na litr vrstvy v koloně.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se používá roztok anorganické soli o koncentraci 0,01 M.

5. Způsob podle bodu 4, vyznačující se tím, že se jako anorganická sůl používá chlorid sodný.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se eluování provádí za teploty místnosti.