



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1268105** **A3**

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

(51) 4 C 08 L 1/26, 3/00, 5/12,
C 08 K 13/02//C 08 J 5/20
(C 08 K 13/02, 3:36, 5:04, 5:06,
5:16)

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

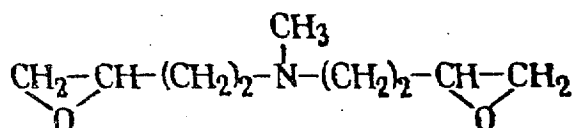
ВСТУП	13	13
ТИ		
ВНЕШ.		

- (21) 2712252/23-05
(62) 2384451/23-26
(22) 15.01.79
(23) 29.07.76
(31) 73094
(32) 29.07.75
(33) LU
(46) 30.10.86. Бюл. № 40
(71) Энститю Мерье (FR)
(72) Жан-Луи Тэйо и Мишель Тарди (FR)
(53) 661.183.12(088.8)
(56) Патент Великобритании
№ 1043616, кл. С 1 А, опублик. 1966.

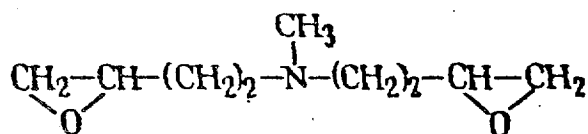
(54) КОМПОЗИЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ
АНИОНООБМЕННИКА И СПОСОБ ЕГО ПОЛУ-
ЧЕНИЯ

(57) Изобретение относится к области
химической технологии, конкретно к
композиционному материалу для анионо-
обменника и способу его получения.
Изобретение позволяет придать анио-
нообменнику высокую активность к бел-
кам за счет того, что композиционный
материал для анионообменника содержит
в качестве носителя пористую двуокись
кремния с удельной поверхностью 10-
50 м²/г, пропитанную полимерным свя-
зующим, выбранным из группы: диэтил-

аминоэтилпроизводное крахмала, декст-
рана, агарозы или целлюлозы, при
следующем соотношении компонентов,
мас. %: полимерное связующее 3-20;
носитель остальное и дополнительно
0,5-4 мас. % материала 1,4-бутандиол-
глицидилового простого эфира, эпи-
хлорбромгидрина или диэпоксисоедине-
ния формулы



Получают композиционный материал про-
питкой минерального носителя 1,5 -
10%-ным раствором полимерного связу-
ющего при pH 8,5-11,5 с последующей
сушкой до постоянного веса при 50 -
120°C и обработкой 1,4-бутандиолгли-
цидиловым простым эфиром, эпихлор
(бром)гидрином или диэтоксисоедине-
нием формулы



в количестве 0,5-4 мас. % материала.

(19) **SU** (11) **1268105** **A3**

Изобретение относится к химической технологии, а именно к композиционному материалу для анионообменника и способу его получения, и может быть использовано при разделении и очистке белков.

Целью изобретения является придание материалу высокой активности к белкам.

Пример 1. К 10 г пористой двуокиси кремния с удельной поверхностью 50 м²/г — сферозила ХОВ 030, пропитанного раствором диэтиламиноэтилдекстрана (ДЭАЭдекстрана) при pH 11,5, в соотношении, мас. %: ДЭАЭдекстран 15 (30 мл 5%-ного раствора), минеральная окись — остальное, а затем высушенного в печи с получением гомогенного порошка, прибавляют 20 мл 5%-ного раствора 1,4-бутандиолглицеридов простого эфира в диэтиловом эфире, смесь перемешивают при 40°C до полного испарения диэтилового эфира и достижения равномерной пропитки диэпоксидным соединением (0,5% от массы материала).

Для получения анионообменника смесь доводят до 80°C и выдерживают при этой температуре 15 ч. После окончательного просеивания сорбент вводят сухим в колонку, промывают 1 л 0,1 н. раствора гидрата окиси натрия, затем 1 л 1 М раствора хлористого натрия, и приводят в состояние равновесия при помощи применяемого при хроматографии буферного раствора.

Емкость сорбента при фиксации белков составляет 40–200 мг на 1 г сорбента в зависимости от условий проведения хроматографии. При начальной пористости сорбента 10–80 м²/г эта емкость является постоянной.

Пример 2. 10 г сферозила ХОВ 015 пропитывают при 65°C 20 мл 65%-ного раствора ДЭАЭ крахмала с pH 10 до получения следующего соотношения, мас. %: ДЭАЭкрахмал 13; минеральная окись остальное.

Смесь сушат в сушильной камере при 50°C в течение около 15 ч до получения постоянного веса. Полученный порошок гомогенизируют, если необходимо, просеивают для удаления возможных агломератов.

К пропитанному таким образом сферозилу добавляют 20 мл 0,4%-ного раствора 1,4-бутандиолглицеридэфи-

ра в этиловом эфире (0,8% от массы материала). Смесь непрерывно перемешивают при 40°C до полного испарения этилового эфира и получения равномерной пропитки, затем доводят до 80°C в течение 15 ч. После просеивания носитель в сухом виде помещают в колонку, промывают 1 л 0,1 н. раствора щелочи натрия, затем 1 л 1 М раствора NaCl и уравнивают буферным раствором, применяемым для требуемого типа хроматографии.

Емкость фиксации протеинов составляет 40–200 мг на 1 г носителя в зависимости от условий хроматографии.

Пример 3. 10 г сферозила ХОВ 005 (пористой двуокиси кремния с удельной поверхностью 10 м²/г) пропитывают при 100°C 20 мл водного раствора ДЭАЭагарозы при pH 9 в следующем соотношении, мас. %: ДЭАЭагароза 12; минеральная окись остальное.

Смесь сушат в сушильной камере при 80°C в течение примерно 15 ч. Полученный порошок гомогенизируют и просеивают для удаления возможных агломератов. После пропитки к носителю добавляют 20 мл раствора эпихлоргидрина или эпибромгидрина в этиловом эфире (0,6% от массы материала). Смесь непрерывно перемешивают при 40°C до полного испарения этилового эфира и получения равномерного пропитывания этим сшивающим агентом, затем доводят до 40–120°C в течение около 15 ч. Если необходимо, носитель просеивают, помещают в сухом виде в колонку, промывают 1 л 0,1 н. соды, затем 1 л 1 М раствора NaCl и уравнивают буферным раствором, применяемым для данной хроматографии.

Емкость фиксации протеинов составляет 40–200 мг на 1 г носителя в зависимости от условий хроматографии.

Пример 4. К 10 г сферозила ХОВ 030 (пористая двуокись кремния с удельной поверхностью 50 м²/г) добавляют 30 мл кетонового раствора ацетата целлюлозы с концентрацией 3% при комнатной температуре. Пропитанный носитель просушивают в потоке горячего воздуха, полученный порошок диспергируют в 1 л раствора щелочи натрия при температуре окружающей среды в течение 15 ч, что приводит к гидролизу сложного эфира целлюлозы и к регенерации исходной целлюлозы.

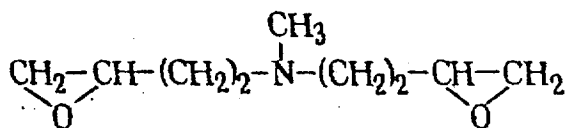
Во второй стадии носитель, пропитанный таким образом целлюлозой, обрабатывают хлоргидратом хлортриэтиламина в щелочной среде с pH 10 при 80°C. Состав материала, мас. %: ДЭАЭцеллюлоза 9; двуокись кремния остальное.

После сушки в сушильной камере для получения однородного порошка добавляют 20 мл 0,4%-ного раствора бутандиолдиглицеридэфира в этиловом эфире (0,8% от массы материала). Смесь непрерывно перемешивают при 40°C до полного испарения этилового эфира, затем доводят до 120°C в течение около 15 ч. После просеивания носитель в сухом виде помещают в колонку, промывают 1 л 0,1 н. раствора щелочи натрия, затем 1 л 1 М раствора NaCl и уравнивают буферным раствором для хроматографии.

Пример 5. Отвешивают 10 г сферозила ХОВ 015 и пропитывают его при 55°C 20 мл раствора ДЭАЭагарозы концентрацией 1,5% с pH 9. Смесь высушивают в сушильной печи при 50-55°C в течение примерно 12 ч для достижения постоянства веса.

После просеивания пропитанный материал имеет следующий состав, мас. %: ДЭАЭагароза 3, двуокись кремния остальное.

К 10 г пропитанного таким образом сферозила добавляют 20 мл раствора (концентрацией 0,5%) диэпоксидного соединения формулы



в этиловом эфире, что соответствует концентрации этого соединения 1% по отношению к пропитанному материалу.

Реакционную смесь перемешивают при 40°C до полного испарения этилового эфира. Затем температуру повышают примерно до 80°C в течение примерно 10 ч.

После просеивания носитель набивают в сухом виде в колонку, промывают 1 л 0,1 н. гидрата окиси натрия, а затем 1 л 1 М NaCl и уравнивают соответствующим буферным раствором, подходящим для хроматографии.

Пример 6. Отвешивают 10 г сферозила ХОС 005 и пропитывают его

20 мл 10%-ного водного раствора ДЭАЭкрахмала, нагретого до 75°C, pH 8,5. Затем смесь высушивают в сушильной печи при 80°C в течение 15 ч.

5 Полученный порошкообразный продукт гомогенизируют и просеивают для удаления агломератов.

Пропитанный материал имеет следующий состав, мас. %: ДЭАЭкрахмал 20, 10 двуокись кремния остальное.

К 10 г пропитанного таким образом сферозила добавляют 20 мл раствора эпибромгидрина концентрацией 2% в этиловом эфире, pH 8,5, что соответствует концентрации эпибромгидрина 4% по отношению к пропитанному сферозилу. Смесь непрерывно перемешивают при 40°C до полного испарения этилового эфира. Затем в течение 20 примерно 15 ч доводят температуру до 100°C.

После просеивания сухим носителем наполняют колонку, промывают 1 л 0,1 н. гидрата окиси натрия, затем 25 1 л 1 М NaCl и уравнивают буферным раствором, подходящим для хроматографии.

Пример 7. Прямая очистка гамма-глобулинов из сыворотки или 30 плазмы людей и животных.

Схема цикла для 50 г сорбента, приготовленного в соответствии с примерами, приведенными выше:

35 Приведение колонки в состояние равновесия буферным раствором с pH между 6,3 и 8, например 6,8 (буферный раствор PO_4 0,01-0,02 М или буферный раствор трис-НС1 0,05 М, или раствор хлористого натрия с концентрацией 40 1-3 г/л) со скоростью 200 мл/см²·ч.

Введение 50 мл плазмы или сыворотки, предварительно диализованной против буферного раствора, применяемого при хроматографировании, и профильтрованной для устранения возможности 45 колыматажа (средняя скорость подачи 50-100 мл/см² ч). В случае сорбента, приготовление которого описано в примере 1, количество плазмы или сыворотки на один цикл должно быть снижено до 25 мл. 50

Промывание колонки буферным раствором, применяемым при хроматографировании.

55 Собираение выходного пика, состоящего из чистых гамма-глобулинов, чистота которых проверяется иммуноэлектрофорезом, с выходом 50-100%

в зависимости от применяемых буферных растворов. Выход более высок при pH ниже 6,8 или при более высоких ионных силах, при этом возникает опасность, что продукт будет недостаточно чистым. Такое получение гамма-глобулинов освобождает их от пирогенных веществ и антигена, ассоциирующегося с гепатитом В (AgHBs), которые могут присутствовать в сыром исходном материале.

Элюирование других белков, удерживаемых в колонке, каким-либо буферным раствором с pH 4 или буферным раствором, применяемым при хроматографировании, с добавкой 10-60 г/л хлористого натрия, или же цитратным буферным раствором 0,05 М с pH 4-8. Продолжительность цикла примерно 2 ч (при применении простой автоматики в один день можно провести десяток циклов, т.е. выход при обработке близок к 10 л сыворотки или плазмы на 1 кг пористой неорганической окиси в день).

Пример 8. Удаление гемоглобина при очистке альбумина из плацентарной крови и концентрирование других белков.

Фракционирование плацентарной крови спиртом по методу Коха проходит через стадию осаждения массы глобулинов при pH 6,8 в среде 20-25%-ного этанола. В этих условиях альбумин, некоторые альфа-1, альфа-2 глобулины и гемоглобин, по существу, остаются в верхнем слое раствора. Их собирают путем центрифугирования на холоде, разбавляют равным объемом дистиллированной воды (для снижения концентрации спирта), pH устанавливают на уровне между 6 и 7 и жидкость осветляют путем фильтрования через мембраны из сложных эфиров целлюлозы.

Схема цикла очистки на 50 г сорбента:

Приведение колонки в равновесное состояние при помощи буферного фосфатного раствора 0,01 М или трис-HCl 0,05 М с pH 6-7 (предпочтительно 6,5) при скорости подачи 200 мл/см² ч.

Введение при средней скорости подачи 100 мл/см² ч 1000 мл описанного выше и подлежащего очистке раствора.

Промывание колонки буферным раствором, применяемым при хроматографии, при той же скорости подачи. Очищен-

ный гемоглобин удаляется из колонки при незначительной степени разбавления, в то время как другие белки, такие как альбумин, остаются фиксированными на колонке.

Элюирование белков, фиксированных на колонке, в условиях, идентичных приведенным в примере 2, причем пик содержит концентрированные белки и практически лишенные гемоглобина. Продолжительность цикла 4 ч.

Пример 9. Концентрирование раствора протеинов, разбавленных в спиртовой среде, и удаление спирта.

Фракционирование протеинов согласно методу Коха неизбежно приводит к повторному растворению спиртовых осадков во время осуществления различных стадий. Для этого предпочтительно сильно разбавить осадок, чтобы снизить остаточную концентрацию образующегося спирта. После этого необходимо, с одной стороны, удалить спирт, с другой стороны, концентрировать присутствующие белки. Это, как правило, осуществляется путем концентрирования в вакууме, лиофилизации или диализа, но два последних способа либо весьма сложны, либо являются источником депирогенов. Поэтому предпочтительно использовать следующий простой, быстрый и экономичный способ.

Примером служит раствор альбумина с концентрацией 2%, содержащий 10% спирта.

Схема цикла очистки и концентрирования на 1 кг сорбента:

Приведение в состояние равновесия при помощи 0,01 М фосфатного буферного раствора с pH 7, скорость подачи 200 мл/см² ч.

Введение спиртового раствора альбумина с pH 7 путем прибавления соляной кислоты или гидрата окиси натрия в зависимости от начальной величины pH, средняя скорость подачи 100 мл/см² ч. Таким образом, на этой колонке можно фиксировать 200 г альбумина (либо 10 л раствора за цикл); если альбумин плохо фиксируется на колонке, следует лишь достаточно разбавить исходный раствор дистиллированной водой, чтобы снизить ионную силу среды.

Промывание дистиллированной водой, скорость подачи 200 мл/см² ч и определение момента, когда альбумин не

выделяется и заканчивается удалением спирта.

Элюирование альбумина одним из следующих буферных растворов: 0,1 М раствор хлористого натрия или 0,05 М раствор цитрата с pH 6,8; при этом, как правило, конечная концентрация альбумина составляет примерно 10–12%, удаление спирта является полным, выход при таком методе равен примерно 100%. Этот способ применим для всех белков, изоэлектрическая точка которых ниже 6,5. Если изоэлектрическая точка белков превышает эту величину, метод применим при условии, что pH буферного раствора, используемого при хроматографировании, будет повышена.

Все примеси, присутствующие в этих белковых растворах, также могут быть удалены при условии, что они являются электрически нейтральными (глюциды и полисахариды) или имеют положительный заряд того же типа, что и сорбент (катионы). Если примеси имеют отрицательный заряд, может произойти на сорбенте "конкуренция" с отрицательно заряженными белками, которые желателно фиксировать. В этом случае, если степень сродства примеси к сорбенту меньше, чем степень сродства белка, и если раствор может быть разбавлен в достаточной мере водой для достижения ионной силы, совместимой с фиксацией белков на сорбенте, можно произвести удаление даже анионов. Приведенный ниже пример иллюстрирует такое разделение.

Пример 10. Концентрирование и очистка альбумина в растворе каприлата натрия.

В методах фракционирования используют каприлат натрия для коагуляции всех белков, за исключением альбумина, который в присутствии каприлата остается в растворе. Примером служит раствор, содержащий 15 г/л альбумина и 3 г/л каприлата.

Схема цикла для 1 кг сорбента, приготовленного в соответствии с примерами 2 и 3 (при использовании сорбента, приготовление которого описано в примере 1, следует удвоить количество сорбента):

Приведение в равновесное состояние с фосфатным буферным раствором 0,01 М, pH 6, скорость подачи 200 мл/см², ч.

Введение раствора альбумина и каприлата с pH 6 (в случае чрезмерно высокой ионной силы разбавление водой); средняя скорость подачи 100 мл/см², ч. В колонку можно ввести примерно 8 л раствора.

Промывание колонки буферным раствором, используемым при хроматографировании, до тех пор, пока не прекратится выход каких-либо веществ из колонки.

Элюирование альбумина в соответствии с методом, изложенным в предыдущих примерах. При этом получают раствор, содержащий 10–20% альбумина, который после доведения его концентрации до 20% содержит меньше 2,5 г/л каприлата натрия. Общая продолжительность цикла составляет примерно 4 ч.

Из этого примера видно, что метод может быть распространен на очистку и концентрирование различных биологических молекул, имеющих отрицательные заряды при определенных величинах pH (нуклеиновые кислоты, белки, анионные поверхности, анионные гликолипиды).

Возможность широкого применения метода и то, что колонка такого типа выдерживает без каких-либо последствий прохождение жидкостей самой различной полярности, показано в следующем примере.

Пример 11. Концентрирование и очистка ганглиозидов из водных экстрактов мозга животных.

Ганглиозиды представляют собой гликолипиды, играющие важную роль в физиологии и патологии на уровне клеточных перегородок в качестве рецепторов и эффекторов. Они содержат большее или меньшее количество сиалиновой кислоты и поэтому при pH выше 3 заряжены отрицательно.

Из 1 кг бычьего мозга можно получить около 7 л водного экстракта.

Водные экстракты пропускают непосредственно через колонку из 50 г сорбента, изготовленного по примеру 3, предварительно приведенного в равновесное состояние при помощи буферного раствора трис-HCl 0,05 М, pH 6,8. Скорость подачи 200 мл/см², ч. Все ганглиозиды в этих условиях фиксируются на колонке. Производится предварительное промывание следующими материалами в указанной последо-

вательности: трис-НСІ 0,05 М, рН 6,8, 0,1 н. раствор гидрата окиси натрия; вода; хлороформ-метанол-вода в объемных соотношениях 30:60:25, что позволяет удалить многочисленные примеси.

После этого производится элюирование ганглиозидов в концентрированной и очищенной форме при той же скорости подачи при помощи смеси хлороформ-метанол - 0,1 н. соляная кислота в объемных соотношениях 30:60:25.

После проведения элюирования сорбанный пик нейтрализуют путем прибавления 0,1 н. раствора гидрата окиси натрия, выпаривают и растворяют в какой-либо хроматографической системе для анализа. Выход 100%. Колонка может переходить от органического растворителя к водному раствору и наоборот. Это может быть использовано для того, чтобы исключить необходимость в очистке колонки, или для того, чтобы поддерживать в колонке стерильные условия.

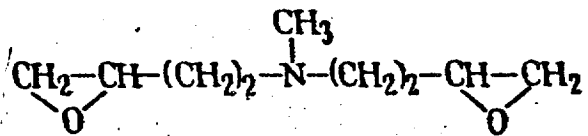
Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

1. Композиционный материал для анионообменника на основе пористого минерального носителя и полимерного связующего, отличающийся тем, что, с целью придания материалу высокой активности к белкам, он содержит в качестве минерального носителя пористую двуокись кремния с удельной поверхностью 10-50 м²/г, а в качестве полимерного связующего - диэтиламиноэтиловое производное крахмала, декстрана, агарозы или целлюлозы при следующем соотношении компонентов, мас. %:

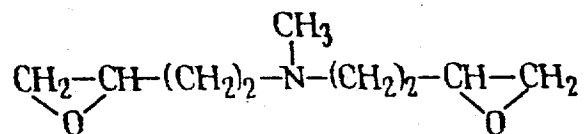
Диэтиламиноэтиловое производное крахмала, декстрана, агарозы или целлюлозы 3-20
Пористая двуокись кремния

Остальное

и дополнительно 0,5-4 мас. % материала 1,4-бутандиолглицидилового простого эфира, эпихлор(бром)гидрина или диэпоксисоединения формулы



2. Способ получения композиционного материала для анионообменника обработкой минерального носителя полимерным связующим, отличающийся тем, что, с целью придания материалу высокой активности к белкам, в качестве минерального носителя используют двуокись кремния с удельной поверхностью 10-50 м²/г, в качестве связующего - диэтиламиноэтиловое производное декстрана, крахмала, агарозы или целлюлозы, а обработку проводят пропиткой 1,5-10%-ным раствором связующего при рН 8,5-11,5 с последующей сушкой до постоянной массы при 50-120 °С и дополнительной обработкой 1,4-бутандиолглицидиловым простым эфиром, эпихлор(бром)гидрином или диэпоксисоединением формулы



в количестве 0,5-4 мас. % материала.

Редактор И.Рыбченко

Составитель Т.Мартинская

Техред А.Кравчук

Корректор Г.Решетник

Заказ 5836/60

Тираж 470

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г.Ужгород, ул.Проектная, 4