



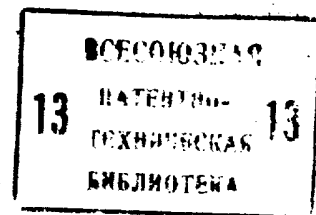
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1082338 A**

3 (51) G 01 N 33/48

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ



- (21) 2640948/28-13
(22) 24.07.78
(31) 818918
(32) 25.07.77
(33) США
(46) 23.03.84. Бюл. № 11
(72) Джозеф Эдвард Фильдс и Роберт
Джэксен Слокомб (США)
(71) Монсанто Компани (США)
(53) 612.115.3 (088.8)
(56) 1. Патент США № 3682881,
кл. 260-112, опублик. 1972.
2. Патент США № 3555001,
кл. 260-112, опублик. 1971.

(54) (57) 1. СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ФАКТОРА VIII из сыворотки или плазмы крови путем контактирования исходной жидкости с нерастворимым в воде поперечно-сшитым полиэлектролитом - сополимером малеиновой кислоты или ее ангидрида и ненасыщенного мономера, выбранного из группы, состоящей из этилена, стирола и изобутилена, со степенью замещения карбоксильных или ангидридных групп аминокимидами, выбранными из группы, состоящей из динизшего алкиламино-низ-

шего-алкилимида и низшего алкилиминоди-(низшего-алкилимида), где алкил содержит 1-5 атомов углерода, равной 2-10% от общего количества указанных карбоксильных или ангидридных групп в сополимере, с последующим элюированием, отличающийся тем, что, с целью устранения предварительной активации фактора VIII в процессе выделения, используют указанный сополимер, подвергнутый взаимодействию с алкоксиалкиламином, в котором алкоксигруппа и алкил содержат 1-5 атомов углерода, взятым в количестве 50-85 мол. %.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют указанный полимер, подвергнутый взаимодействию с метоксипропиламином.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют указанный полимер, подвергнутый взаимодействию с метоксизетиламином.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что взаимодействие исходной жидкости с полиэлектролитом осуществляют при pH 5,5-9,5.

(19) **SU** (11) **1082338 A**

Изобретение относится к фракционированию крови, в частности к способам выделения специфического фактора УШ.

Процесс свертывания крови является сложным физиологическим явлением, включающим взаимодействие многих веществ, содержащихся в обыкновенной цельной крови. Известно, что в некоторых организмах отсутствуют или же содержатся в слишком малом количестве определенные факторы, связанные с механизмом свертывания крови. У пациентов, страдающих классической формой гемофилии, в недостаточном количестве содержится антигемофильный фактор А (АГФ, фактор УШ). В организме пациентов, страдающих гемофилией В, отсутствует в крови плазменно-тромбопластиновый компонент (ПТК, фактор IХ). У небольшого числа страдающих гемофилией также не хватает так называемого фактора фон Виллебранда, родственного фактору УШ. Известен целый ряд иных факторов, играющих важную роль в механизме свертывания крови, отсутствие которых также может привести к нарушениям кровотока, это, например, факторы II, VII и X. Последние три фактора совместно с фактором IХ зачастую называют факторами протромбинового комплекса.

В системе развития современных программ хранения крови, включающих сбор и складирование больших количеств крови и ее компонентов, отработка надлежащих систем консервирования стоит очень остро. Начиная с периода второй мировой войны вошло в практику хранение крови в растворе лимонной кислоты, цитрата натрия и декстрозы, известного как ACD-blood.

Проблема консервирования крови сильно упрощается, если она сводится к консервированию отдельных компонентов крови, поскольку легче достичь условий, необходимых для данного компонента, чем для цельной крови. Более того, совершенно излишне и даже вредно вводить в организм пациента большее число компонентов крови, чем требуется. Так, страдающим гемофилией и требующим определенных факторов свертывания крови, лучше всего вводить только эти факторы или, по меньшей мере, очищенный концентрат этих факторов.

Известно фракционирование факторов свертывания крови, в частности фактора УШ и факторов, родственных протромбиновому комплексу. К ряду различных соединений, находящихся применение при таком фракционировании, относятся, например,

сульфат бария, гидроокись алюминия, полиэтиленгликоль, риванол-(6,9-диамино-2-этоксинакридинлактат), глицин, ДЭАЭ-целлюлоза и ДЭАЭ-сефадекс [1].

Однако данный способ является многостадийным и поэтому трудоемким.

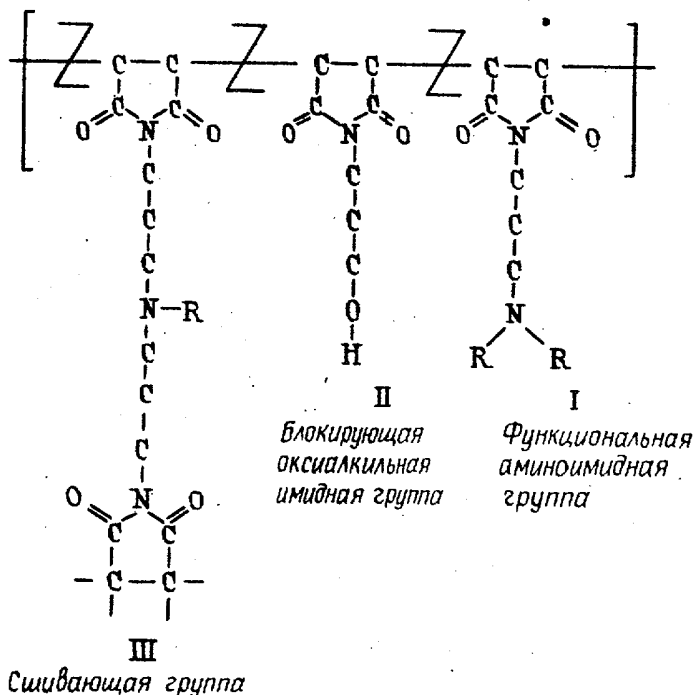
Наиболее близким по технической сущности к предлагаемому является способ выделения различных компонентов крови, в том числе и фактора свертывания УШ, из сыворотки или плазмы крови с помощью не растворяющегося в воде поперечно-связанного полиэлектrolита. Способ предусматривает контактирование исходной жидкости с нерастворимым в воде поперечно-сшитым полиэлектrolитом - сополимером малеиновой кислоты или ее ангидрида и ненасыщенного мономера, выбранного из группы, состоящей из этилена, стирола и изобутилена, со степенью замещения карбоксильных или ангидридных групп аминокимидами, выбранными из группы, состоящей из динизшего алкиламино-нижнего-алкилимида и низшего алкилимино-ди-(нижнего-алкилимида), где алкил содержит 1-5 атомов углерода, равной 2-100% общего количества указанных карбоксильных или ангидридных групп в сополимере, с последующим элюированием. Процесс выделения основан на адсорбционном взаимодействии выделяемого белкового продукта и используемого полиэлектrolита, имеющего в своей структуре электростатически заряженные группы [2].

Однако при фракционировании фактора УШ определенными полиэлектrolитами, известным способом обнаружено, что применение выделенных факторов крови в стандартных опытах определения времени сгусткообразования вызывает значительное сокращение времени сгусткообразования. Эта предварительная активация выделенного компонента - фактора УШ - представляет собой серьезный недостаток при использовании этого материала в клинической практике. Такую преждевременную активацию наблюдают и на собаках при внутривенном введении этого фактора в организм собаки. Реакции состоят в следующих симптомах: изменение поведения - собака крутится в клетке в течение 24 ч.; реакция гемолиза, что проявляется в выделении гемоглобина с мочой; заметное сокращение количества тромбоцитов при одновременном повышении давления крови.

Обнаружено, что эта преждевременная активация связана со структурой и составом адсорбирующего полиэлектrolита, в котором могут содержаться свободные гидроксиль-

ные группы, способные к образованию водородных связей. Так, поли-

электролит может содержать следующие структурные полимерные звенья:



где R - алкил с числом атомов углерода 1-5;

Z - двухвалентный углеводородный остаток с числом атомов углерода 2-18.

Согласно известному способу полиэлектролит может содержать 2-100% аминоимидных связей, причем остающиеся карбоксильные группы - в ангидридной форме. Остаточные немодифицированные полимерные ангидридные звенья превращают в нейтральные группы или звенья путем взаимодействия непрореагировавших ангидридных звеньев с такими соединениями, как алкиламины, аминокислоты и спирты. В приведенной структурной формуле - функциональные аминоимидные связи показаны при I, поперечно-сшивающие связи при III, а остающиеся карбоксильные группы в ангидридной форме показаны в состоянии превращения в нейтральные группы блокированием или взаимодействием с аминовым спиртом при II, вызывая образование оксиалкилимидных звеньев.

Несмотря на указанное блокирование остаточных ангидридных групп аминовым спиртом при II, обнаружено, что свободные гидроксильные группы, введенные таким образом в полимерный каркас в виде оксиалкилимидных групп при II (см. формулу), содействуют упомянутой преждевременной активации фактора УШ, фракционированного этим типом полиэлектролита.

Предполагается, что активация фактора УШ может быть частично связана с присутствием плазменных зимогенов или ферментов от активации зимогена в выделенной фракции фактора УШ. Эти зимогены, как

известно, активируются отрицательно заряженными поверхностями или гидроксильными поверхностями, могущими образовывать водородные связи, такие как коллаген. Указанные полимеры, содержащие свободные гидроксилы, способны образовывать внутри- и межцепочную связь с белками через образующиеся отрицательно заряженные ионы.

Целью изобретения является устранение предварительной активации фактора УШ в процессе выделения.

Указанная цель достигается способом выделения специфического фактора УШ из сыворотки или плазмы крови путем контактирования исходной жидкости с нерастворимым в воде поперечно-сшитым полиэлектролитом - сополимером малеиновой кислоты или ее ангидрида и ненасыщенного мономера, выбранного из группы, состоящей из этилена, стирола и изобутилена, со степенью замещения карбоксильных или ангидридных групп аминоимидами, выбранными из группы, состоящей из динизшего алкиламино-низшего-алкилимида и низшего алкилиминоди-(низшего-алкилимида), где алкил содержит 1-5 атомов углерода, равной 2-10% от общего количества указанных карбоксильных или

ангидридных групп в сополимере с последующим элюированием, причем используют указанный сополимер, подвергнутый взаимодействию с алкоксиалкиламином, в котором алкокси-группа и алкил содержат 1-5 атомов углерода, взятым в количестве 50-85 мол. %.

Обычно используют указанный полимер, подвергнутый взаимодействию с метоксипропиламином, или метоксиэтиламином.

Взаимодействие исходной жидкости с полиэлектrolитом осуществляют при pH 5,5-9,5.

Таким образом, весьма предпочтительным является перевод непрореагировавших ангидридных звеньев во время получения алкоксиалкилимидных единиц с применением алкоксиалкиламина, например метоксипропиламина. Это ангидридное блокирование может вестись в любой последовательности синтеза полиэлектrolита.

Полимеры типа ЗАМК (этиленангидрид малеиновой кислоты или сама кислота) на основе карбоновых кислот или их ангидридов, в частности олефиновые полимеры на основе малеиновой кислоты или ее ангидрида указанного типа. Сополимеры получают путем взаимодействия этилена или иного ненасыщенного мономера или их смесей с ангидридом кислоты в присутствии перекисного катализатора в растворителе на основе алифатического или ароматического углеводорода, растворяющего мономеры, но не растворяющего полученный промежуточный полимер. К соответствующим растворителям следует отнести бензол, толуол, ксилол, хлорированный бензол и т.п. Перекись бензоила обычно является предпочтительным катализатором. Другие перекиси: ацетила, бутирила, дитретичного бутила, лаурила и т.п. или же любой из множества азо-катализаторов также удовлетворительны вследствие их растворимости в органических растворителях. Сополимер содержит, в основном, эквимольные количества олефинового и ангидридного остатка. Он обладает степенью полимеризации примерно 8-10000, предпочтительно примерно 100-5000 при мол. массе около 1000-1000000, предпочтительно примерно 10000-500000. Свойства полимера, как, например, молекулярная масса, регулируют выбором катализатора и регулировкой одной или нескольких переменных, таких, как соотношение реактивов, температура, концентрация катализатора или же добавлением регулирующих перенос цели средств, таких как диизопропилбензол, про-

пионовая кислота, алкилальдегиды и т.п.

После образования исходного полимера ЗАМК его агрегатируют путем нагрева в инертном органическом растворителе при температуре примерно 155-160°C, но ниже точки размягчения полимера, в течение приблизительно 15 мин. Вследствие этой агрегации улучшаются фильтруемость, качества при сушке и физические свойства полимера, используемого при получении полиэлектrolита без существенного уменьшения способности его поглощать белок.

Однако для предлагаемого способа эта агрегация не играет существенной роли.

Упомянутый первоначально полученный полимер, агрегатированный или не агрегатированный, представляет собой поперечно-сшитый продукт, замещенный аминимидами группами в последовательности, оптимизирующей свойства продукта, что осуществляется надлежащим распределением специфических групп внутри самих частиц.

Эти группы в общем основные и могут быть алифатическими или ароматическими. Предпочтительными алифатическими неразветвленными группами являются динизшие алкиламино-нижние алкилимидные или низшиеалкилиминоди- (нижние-алкилимидные).

Исходные сополимеры ангидридов и другого мономера можно перевести в карбоксилсодержащие сополимеры путем взаимодействия с водой и их соли аммония, щелочных и щелочно-земельных металлов и алкиламино-вые соли - путем взаимодействия с соединениями щелочных и щелочно-земельных металлов, аминами или аммонием. К прочим пригодным производным приведенных полимеров относятся алкил или другие сложные эфиры, алкиламиды, диалкиламиды, фенилалкиламиды или фениламиды, полученные путем взаимодействия карбоксильных групп на полимерной цепи с выбранными аминами или алкилом, или фенилалкиловым спиртом, а также сложные аминокислоты, оксиды и сложные оксикислоты, где функциональные группы отделяют алкиленом, фенилом, фенилалкилом, фенилалкилфенилом или алкилфенилалкилом или иными арильными группами. Звенья, содержащие амины или аминокислоты, включая группы четвертичных солей, обычно получают взаимодействием карбоксильных групп их ангидридных предшественников, где это возможно, с полифункциональными аминами, такими как ди-

метиламинопропиламино, при повышенных температурах с образованием имидной связи с вицинальными карбоксильными группами. Такие дополнительные свободные аминогруппы тогда могут переводиться в их простые или же четвертичные соли.

Частичные имиды исходного полимера, например типа ЭАМК, содержащего карбоновую кислоту или ее ангидрид, получают нагревом ограниченного количества вторичного или третичного amino-нижнего-алкиламина с ангидрид- или карбоксилсодержащей формой полимера в соответствующем растворителе (например, ксилоле) при температуре примерно 140-150°C до тех пор, пока больше не будет отниматься вода. Такая реакция одновременно дает имидные группы в соответствии с количеством добавленного амина; при этом снова образуются ангидридные группы для остатка полимерных звеньев. Таким образом образуются имид-полимерные продукты, для которых характерно содержание 2-100%-ных имидных связей, причем если образуются остаточные карбоксильные группы, то в виде ангидридов.

Альтернативно частичный амидный полимерный продукт можно перевести в частичный имидный продукт путем нагрева частичного амидного полимерного продукта в вакууме при 140-150°C до прекращения отдачи воды. Такой имидный полимерный продукт также содержит сравнимые количества имидных и ангидридных групп в зависимости от числа амидных групп, первоначально содержащихся в исходном амидном полимерном продукте.

Частичные вторичные или третичные amino-нижние-алкиламиды исходного полимера, например типа ЭАМК, содержащего карбоксильную кислоту или ее ангидрид, получают взаимодействием полимера с ограниченным количеством выбранного амина, взвешенного в таком растворителе, как бензол или гексан, с образованием производного полимера, содержащего частичный амид и ангидрид кислоты, или же его соответствующего амид-карбоксилатного производного. Число амидных групп зависит от количества применяемого амина в сравнении с количеством используемого полимера. Такие амидполимерные продукты обычно содержат 2-100% групп, причем остающиеся карбоксильные группы содержатся в виде кислотных или ангидридных групп.

При необходимости может проводиться блокирование и деблокирование аминового звена реактива, применяемого при получении аминов

или иминов. Остаточные немодифицированные полимерные звенья можно перевести в нейтральные группы или звенья путем взаимодействия с определенными нефункциональными группами, такими как алкиламины, аминоспирты и спирты.

Альтернативно в полимере можно достичь дополнительно катионного характера путем введения мономеров, придающих основной или катионный характер, таких как С-винилпиридин, виниламин, различные amino-замещенные винилбензолы (или толуолы и т.п.), аминоксодержащие акрилаты (или метакрилаты и т.п.), винилимидазол и сходные мономеры того же рода.

Таким образом, в любом случае полимерный продукт будет содержать остаточные активные или реакционноспособные группы, которые могут принадлежать к различным типам, включая смеси, при этом однако эти активные или реакционноспособные группы или остаточные "реакционноспособные места" внутри полимера тем или иным образом содержат определенное процентное количество групп основного характера в целях придания полимеру необходимой основности.

В частности, предпочтительные полимеры, соответствующие приведенным требованиям и свойствам, выбраны из группы, включающей сополимеры, содержащие этиленмалеиновую кислоту или ее ангидрид, стирол-малеиновую кислоту или ее ангидрид, метилпентенмалеиновую кислоту или ее ангидрид и изобутиленмалеиновую кислоту или ее ангидрид.

Как видно из сказанного, основные группы поликатионного или полиамфолитического электролита (ПЭ) обладают имидным характером, включая динизшие-алкиламино-нижние алкилимидные группы, полученные путем взаимодействия динизшего алкиламино-нижнего-алкилимида с карбоксильными группами предварительно полученного полимера или же полимеризацией ненасыщенного олефина с ненасыщенными кислотой или ее ангидридом, содержащими также предварительно полученные имидные группы в количестве не менее части ненасыщенного реактива - поликарбоновой кислоты.

Имидные группы можно образовать поперечным сшиванием полимера с помощью низшей алкилимино-бис- (нижнего-алкиламина), который в процессе поперечного сшивания путем взаимодействия между конечными аминогруппами сшивающего агента и карбоксильными группами в полимерной цепи образует имидогруппы на обоих

концах сшивающей цепи с образованием желаемых низших-алкилимино-бис (низших-алкилимидных) связей. Другие группы, такие как динизшие-алкиламино-низшие алкиламидные, из которых путем нагрева при повышенных температурах могут быть получены требующиеся имидные группы, также могут присутствовать. Могут присутствовать и динизшие-алкиламино-низшие алкильные сложноэфирные группы, так же как и другие группы, если только в полиэлектролитной молекуле содержатся требуемые процентные количества имидных групп необходимого типа, равно как и остаточные кислотные группы исходной ненасыщенной кислоты или ее ангидрида в случае, если полиэлектролит представляет собой полиамфолит. Кислотные и имидные группы не обязательно должны присутствовать в полиэлектролите, они могут присутствовать в виде своих простых производных, например солей.

К алициклическим или ароматическим группам, которые могут быть замещены на агрегатированных полимерах типа ЭАМК, например, относятся амино-низший алкилпиридин, пиперидин, пиперазин, пиколлин, пирролидин, морфолин и имидазол.

Эти группы могут быть замещены на агрегатированном полимере способом, аналогичным аминам с алифатической цепью, но с применением вместо циклических аминов, например, следующих соединений:

- 2-Аминопиридин;
- 2-Амино-4-метилпиридин;
- 2-Амино-6-метилпиридин;
- 2-(2-Аминоэтил)-пиридин;
- 4-(Аминоэтил)-пиперидин;
- 3-Амино-N-этилпиперидин;
- N-(2-Аминоэтил)-пиперидин;
- N-(2-Аминоэтил)-1-этилпирролидин;
- 3-Пиколиламин;
- 4-Пиколиламин;
- 2-(Аминоэтил)-1-этилпирролидин;
- N-(3-Аминопропил)-2-пирролидин;
- N-(2-Аминоэтил)-морфолин;
- N-(3-Аминопропил)-морфолин;
- 4-Имидазол.

Ангидридные блокирующие группы можно ввести в любой желаемой последовательности во время получения приведенных полиэлектролитов. Предпочтительно их вводить после образования поперечных связей и замещения желаемой функциональной аминоимидной группой. Таким образом можно блокировать любую свободную ангидридную группу путем применения избытка блокирующего агента.

Наиболее предпочтительными блокирующими агентами являются метокси-

пропиламин и метоксиэтиламин. Блокирующие ангидрид-агенты, такие как оксипропиламин и оксиэтиламин, являются недейственными для предотвращения предварительной активации факторов свертывания крови, фракционированных полиэлектролитами. Вместо них могут найти применение другие агенты, характерные для блокирования гидроксильной группы: алкилирующие (например, диазометан), ацилирующие (например, ацетилхлорид) и этерифицирующие в сложный эфир (например, уксусная кислота) средства.

- Пример 1. В 5-литровую колбу, оснащенную обратным холодильником, ловушкой Дина-Старка, мешалкой, емкостью для добавления реагента, термометром и оборудованием для очистки азотом, загружают 193,05 г сополимера типа ЭАМК, содержащего этилен и ангидрид малеиновой кислоты, (1,5 моль, ангидридная основа) и 2700 мл ксилола.
- Смесь перемешивают со скоростью 200 об/мин с помощью мешалки, оснащенной лопастями в 6,5 дюйма, и нагревают до температуры дефлегмации, которая колеблется в пределах 135-139°C в зависимости от содержания воды в ЭАМК и азеотропного удаления воды в течение периода дефлегмации. Шлам обрабатывают с обратным холодильником 60 мин при полном возрасте флегмы при 135°C.
- После одного часа реактор охлаждают до 125°C в атмосфере азота, добавляя 7,66 г (0,075 моль) диметиламинопропиламина (ДМАПА). Перемешивание продолжают в течение 1 ч при 125°C без обратного холодильника, после чего добавляют 10,89 г (0,075 моль) метилимино-бис-пропиламина (МИБПА), после чего всю смесь перемешивают еще 1 ч при 125°C.
- Смесь затем нагревают с обратным холодильником (134°C) и выдерживают при этой температуре 7 ч, удаляя воду непрерывно азеотропной дистилляцией. Конечная температура составляет 138°C. В общей сложности собирают 5,3 мл воды. Температуру шлама снижают до 115°C, добавляя затем 127,02 г (1,42 моль) метоксипропиламина (МОПА). Смесь перемешивают 1 ч без обратного холодильника при 115-118°C, после чего температуру повышают до 120°C в момент начала азеотропной дефлегмации ксилол-вода. Дефлегмацию выдерживают 6 ч, удаляя воду непрерывно азеотропной дистилляцией при конечной температуре 138°C и выходе 23,6 мл воды.

Продукт выделяют в виде свободного амина по следующему способу. Указанный целевой шлам фильтруют в

горячем виде (100°C), жмых еще раз растворяют в 2700 мл смеси (3:1) ксилола с этанолом, перемешивают с обратным холодильником 1 ч и фильтруют. Эту ступень повторяют второй раз, применяя экстракционную смесь 3:1 ксилола со спиртом. Затем снова фильтруют, жмых повторно растворяют в ксилоле (2700 мл) и перемешивают 1 ч при температуре дефлегмации с последующей фильтрацией. Экстрагирование ксилолом повторяют еще раз, целевой жмых снова растворяют в 2700 мл гексана в течение 1 ч при комнатной температуре и фильтруют. Экстрагирование гексаном повторяют еще 3 раза, после чего целевой жмых сушат на воздухе в вальцовой мельнице с вращающимся перфорированным дном в течение 1 ч, пропускают через сито с отверстиями 100 меш без дробления и сушат под вакуумом в течение ночи при 50°C. Получают 165 г тонкого продукта, проходящего через 100 меш-отверстия, и 14 г более грубого продукта, не проходящего через эти отверстия. Тонкий продукт испытывают, определяя присутствие в нем 8,09% азота и немедленно без трудностей диспергируют в 0,04-молярном рассоле. pH такой дисперсии (0,2 г продукта в 20 мл 0,04-молярного рассола) составляет 8,10.

Пример 2. В целях переработки в виде гидрохлоридной соли целевой реакционный шлам примера 1 фильтруют в горячем виде, после чего жмых снова растворяют с обратным холодильником в смеси 3:1 ксилола со спиртом два раза, снова растворяют с обратным холодильником два раза в ксилоле аналогично примеру 1 и затем дважды экстрагируют при комнатной температуре в течение 1 ч каждый раз порциями по

2700 мл ацетона. Фильтрованный продукт превращают в гидрохлорид повторным растворением в 2700 мл ацетона с последующим постепенным добавлением при перемешивании в течение

5 10 мин 14 мл концентрированной 12 н. хлористоводородной кислоты. Домешивают затем еще 2 ч при комнатной температуре. Фильтрованный продукт затем сразу же промывают (в случае шлама - с перемешиванием) трижды подряд 10 л деионизованной воды в течение 2 ч каждый раз и наконец фильтруют. Оставшуюся на фильтре соль 4 раза растворяют повторно в 2700 мл ацетона (каждый раз в течение 1 ч) в целях удаления воды, фильтруют, сушат на воздухе 30 мин и затем в вакуумной печи при 55°C.

Всушенный целевой продукт пропускают через сито без дробления, причем 95% продукта проходит через отверстия в 100 меш; затем разливают по бутылкам. Анализ: 7,79% азота и 2,62% хлора - ионистый хлорид. Получают 186 г продукта в виде соли, проходящей через отверстия 100 меш. Ее растворяют в 0,04-молярном рассоле (5 г на 120 мл); pH дисперсии составляет 3,85.

Пример 3. Повторяют пример 1, изменяя состав продукта добавлением разных количеств аминов примера 1. Работают по той же методике, что и в примере 1, но ни в одном случае к аминам не добавляют воды для облегчения хода процесса. Все продукты обрабатывают в виде свободных аминов, как в примере 1. Первый 1-часовой период дефлегмации ЭАМК в ксилоловом шламе осуществляют с полным обратным холодильником аналогично примеру 1 (без удаления воды) или же согласно таблице (с азеотропной дефлегмацией всей воды).

Результаты синтеза по примерам 1-3 приведены в табл.1.

Т а б л и ц а 1

Прогон	Наличие воды во время агрегации	ДМАПА		МИБПА		Блокирующий агент МОПА		Общий выход продукта, г	Молярность, %
		г	мол. %	г	мол. %	г	мол. %		
1	Нет	7,66	5,0	10,89	5,0	127,02	85	166	8,24
2	"	7,66	5,0	10,89	5,0	127,02	86	210	7,89
3	"	7,66	5,0	10,89	5,0	127,02	85	208	7,60
4	"	7,66	5,0	10,89	5,0	127,02	85	211	7,81

Продолжение табл. 1

Прогон	Наличие воды во время агрегации	ДМАПА		МИБПА		Блокирующий агент МОПА		Общий выход продукта, г	Молярность, %
		г	мол. %	г	мол. %	г	мол. %		
5	---	7,66	5,00	21,79	10,0	113,60	75	214	8,00
6	---	7,66	5,0	21,79	10,0	113,60	75	239	8,22
7	Есть	7,66	5,0	21,79	10,0	113,60	75	228	8,27
8*	---	7,66	5,0	10,89	5,0				
				+10,89	5,0	113,60	75	237	8,05
9	Нет	7,66	5,0	43,57	20,0	86,9	55	254	8,79
10	Есть	7,66	5,0	43,57	20,0	86,9	55	250	8,94
11	---	7,66	5,0	43,57	20,0	86,9	55	262	8,74

* Во время прогона 8 МИБПА добавляют в виде двух последовательных порций, каждую в течение 1-часового периода дефлегмации, в виде двухступенчатого сшивающего варианта перед удалением воды от реакции конденсации из ДМАПА и МИБПА.

Пример 4. Если первоначальный 1-часовой период дефлегмации ЭАМК в этилене проводить в условиях азеотропной дистилляции, т.е. удаляя всю воду от этих реактивов перед последующими аминными реакциями, то последние протекают с замедлением. В результате общее время завершения реакций процесса увеличивается. Путем добавления небольших количеств воды с различными аминами эту проблему

можно решить. С применением способа по примеру 1 проводят несколько прогонов, но в прогонах 7, 8, 10 и 11 удаляют воду от дефлегмации ЭАМК в ксилоле в течение первого часа, как в примере 3, (табл.1). В этих прогонах воду добавляют дополнительно с 3-аминами. Все прогоны обрабатывают как свободный амин примера 1. Результаты синтеза по примеру 4 даны в табл.2.

Т а б л и ц а 2

Прогон	ДМАПА		МИБПА*		МОПА		Общий выход продукта, г	Нормальность, %
	мол. %	вода	мол. %	вода	мол. %	вода		
1	5	0	5	1,5	85		200	7,79
2	5	0	10	1,5	75		226	8,34
3	5	0	10	3,0	75	4,5	242	8,25
4	5	1,5	10		75	4,5	240	7,63

Продолжение табл. 2

Прогон	ДМАПА		МИБПА*		МОПА		Общий выход продукта, г	Нормальность, %
	мол. %	вода	мол. %	вода	мол. %	вода		
5	5	0	10	3,0	75		225	8,45
6	5	0	10	1,5	75		210	8,56
7	10	0	20	1,5	50	1,5	267	9,59
8	5		10**	1,5	75		268	7,49
9	5		20	1,5	55		261	7,69

* МИБПА добавлен перед ДМАПА, во всех других случаях - наоборот;

** ГМДА - гексаметилендиамин, используемый в качестве сливающего агента вместо МИБПА.

Пример 5. Оборудование примера 1. Загружают 193,05 г (1,5 моль) ЭАМК и 2700 мл ксилола, нагревая все с обратным холодильником (137°C) с перемешиванием при 200 об/мин, после чего дефлегмацию выдерживают 1 ч. За это время непрерывно всю воду удаляют из смеси азеотропной дистилляцией. В ловушке Дина-Старка собирают общее количество воды (1,6 мл) 30
Через час шлам охлаждают до 125°C, добавляя 7,66 г (0,075 моль) ДМАПА и выдерживая эту смесь 1 ч при 125°C, после чего добавляют смесь 21,70 г (0,15 моль) МИБПА и 1,5 мл воды. Смесь выдерживают еще 1 ч при 125°C, затем нагревают с обратным холодильником (136°C) и выдерживают при этой температуре, непрерывно удаляя воду ловушкой Дина-Старка, 35
40
45

в течение 15 ч, собирая в общей сложности 6,3 мл воды при конечной температуре 138°C. Шлам охлаждают до 125°C, затем добавляют 113,65 г (1,25 моль) МОПА, выдерживая полученный шлам еще 1 ч при 120°C. Температуру затем повышают до 136°C, продолжая удалять воду азеотропной дефлегмацией в течение 6 ч с получением ее 21,5 мл. Продукт переводят в гидроклоридную соль по способу примера 2. Осуществляют 4 прогона с применением разных количеств концентрированной 12 н. хлористоводородной кислоты для определения действия избыточного и недостаточного количеств хлористоводородной кислоты на свойства продукта.

Результаты синтеза по примеру 5 даны в табл.3.

Таблица 3

Прогон	Добавка конц. HCl, мл	% от теории	Выход, г	pH шлама	N, %	Cl, %	Количество Cl в виде ионного хлорида, %
1	8,0	0,5	206	6,95	8,24	1,77	1,70
2	15,0	1,0	207	5,55	8,10	3,00	2,76
3	30,0	2,0	214	4,40	8,22	3,32	-
4	60,0	4,0	219	4,10	8,21	3,40	3,37

Пример 6. Повторяют способ примера 5 за исключением того, что после взаимодействия ДМАПА и МИБПА вместо метоксипропиламина (МОПА) добавляют 85,77 г (1,27 моль) МОЭА (метоксиэтиламина). Получают

2 продукта, один в виде свободного амина путем обработки способами примера 1, другой - в виде соли хлористоводородной кислоты обработкой способами примера 2. Результаты синтеза по примеру 6 даны в табл. 4.

Т а б л и ц а 4

Прогон	Добавка МОЭА, мл	Выход продукта, г	N, %	Cl, %
1	-	206	8,61	-
2	15,0	205	8,15	3,18

Пример 7. Применяют способ примера 1, получая продукты, в которых избыточные ангидридные группы, остающиеся после взаимодействия ДМАПА и МИБПА, подвергают полному взаимодействию либо с оксиэтиламином, либо с 3-оксипропиламином, либо с 2-оксипропиламином (табл. 5). Продукты получают и как свободные амины (с применением

способов примера 1), и как соль хлористоводородной кислоты (с применением способов примера 2). Первый час периода агрегации ЭАМК в ксилоле с обратным холодильником осуществляют с азеотропным удалением воды, причем в каждом случае МИБПА добавляют в виде смеси с 1,5 мл воды.

Результаты приведены в табл. 5.

Т а б л и ц а 5

Прогон	ДМАПА, мол. %	МИБПА, мол. %	Амин, мол. %	Соединение для взаимодействия	Форма продукта	N, %	Cl, %
1	5 (7,66 г)	5 (10,89 г)	85 (87,05 г)	Этаноламин	Свободный амин	8,57	-
2	5	5	85 (87,05 г)	-''-	НСl	8,41	1,81
3	5	5	85 (107 г)	3-Оксипропиламин	Свободный амин	8,02	-
4	5	5	85 (107 г)	-''-	НСl	7,65	1,82
5	5	5	85 (113 г)	2-Оксипропиламин	Свободный амин	7,83	-
6	5	5	85 (113 г)	-''-	НСl	7,75	1,85
7	5	7 (15,25 г)	81 (85,2 г)	Этаноламин	Свободный амин	8,63	-
8	5	7	81 (85,2 г)	-''-	НСl	8,49	2,57

Примечание: Все молярные соотношения составов в этом и остальных примерах - в пересчете на амин; поскольку сшивающий агент взаимодействует на обоих концах, его молярные количества вдвое больше рассчитанных на ангидридную основу.

Пример 8. Получают целый ряд полиэлектролитов, в которых содержание сшивающего агента (МИБПА) выдерживают при 5 мол.%, а блокирующим амином, взаимодействующим с избытком ангидридных групп, в каждом случае является этанол-амин в концентрации 85 мол.%. Функциональное звено, выполняющее потенциальную катионную функцию, выдерживают в количестве 5 моль-0, но природу и структуру функционального звена варьируют с помощью применения 16 различных реакционноспособных аминов.

Во всех случаях применяют оборудование, ЭАМК и ксилол согласно примеру 1. Шлам нагревают до 90-95°C, добавляя 10,89 г (0,075 моль) МИБПА с перемешиванием 1 ч при

95°C. Затем добавляют 0,075 моль функционального амина и перемешивают 1 ч при 95°C. Шлам затем нагревают с обратным холодильником (134°C), удаляя полностью воду азеотропной дистилляцией при конечной температуре 139°C. Затем шлам охлаждают до 95°C, добавляя 87,05 г оксиэтиламина и перемешивая шлам 1 ч при 95°C. Затем температуру шлама повышают до 134°C, полностью удаляя воду от реакции азеотропной дистилляцией до конечной температуры 139-140°C. Целевой шлам фильтруют в горячем виде и перерабатывают в виде свободного амина по способу примера 1, сушат, дробят на шаровой мельнице и пропускают через отверстия 100 меш. Результаты синтеза даны в табл.6.

Т а б л и ц а 6

Прогон	Используемый функциональный амин	Используемый амин, г	Выход продукта, г	Молярность, %
1	Диметиламиноэтиламин	6,60	240	8,86
2	Диэтиламиноэтиламин	8,71	255	8,68
3	Диметиламинопропиламин	7,66	252	8,71
4	Диэтиламинопропиламин	9,84	228	8,61
5	Диоксиэтиламинопропиламин	12,20	256	8,56
6	Дибутиламинопропиламин	13,98	255	8,58
7	2-Амино-5-диэтиламинопентан	11,86	240	8,63
8	2-Аминометил-1-этилпирролидин	9,61	237	7,50
9	3-Амино-N-этилпиперидин	9,61	232	8,67
10	N-2-Аминоэтилпиперидин	9,61	219	8,73
11	3-Аминопропил-2-пирролидон	10,66	221	8,35
12	N-2-Аминоэтилморфолин	10,06	250	8,75
13	N-3-Аминопропилморфолин	10,81	252	8,78
14	N-2-Аминоэтилпиперазин	9,69	240	9,13
15	2(2-Аминоэтил) пиридин	9,64	240	8,97
16	N-Фенилэтилендиамин	10,27	249	8,91

Амины прогонов 1-7 являются примерами диалкиламиноимидного замещения в полиэлектrolите, в то время как амины прогонов 8-15 представляют собой примеры петероциклического аминоалкилимидного замещения. Для оценки 3 из них обрабатывают как соль хлористоводородной кислоты. Применяют метод примера 1, а при переводе в соль работают по способу примера 2. Диметиламинопропиламин (прогон 3 выше) выбирают в качестве примера диалкиламино-

алкилимидного замещения, а 3-амино-N-этилпиперидин и N-3-аминопропилморфолин (прогоны 9 и 13 выше) в качестве примера гетероциклического аминоалкилимидного замещения. Во всех трех случаях полиэлектrolиты в виде соли получают с применением оксиэтиламина и метоксипропиламина в качестве третичного амина, взаимодействующего со всеми избыточными ангидридными группами. Эти продукты приведены в табл. 7.

Т а б л и ц а 7

Прогон	Состав, мол. %			Выход продукта, г	N, %	Cl, %
	МИБПА	Функциональный амин	Третичный амин			
1	5	5-Диметиламинопропиламин	85-Оксиэтиламин	236	8,41	1,81
2	5	То же	85-Метоксипропиламин	186	7,79	2,62
3	5	5-3-Амино-N-этилпиперидин	85-Оксиэтиламин	238	7,37	1,54
4	5	То же	85-Метоксипропил-244 амин		8,19	1,20
5	5	5-3-Аминопропилморфолин	85-Оксиэтиламин	250	8,55	1,68
6	5	То же	85-Метоксипропиламин	234	7,58	1,59

Пример 9. При получении гидрохлоридных солей полиэлектrolитов общего состава (5 мол. % сшивающего агента МИБПА, 5 мол. % трех различных функциональных аминоалкилимидных звеньев и 85 мол. % нефункциональных имидных звеньев) работают по методике примеров 1 и 2 (см. табл. 7).

Пример 10. Получают метоксипропилимидные производные сополимера, содержащего стирол и ангидрид малеиновой кислоты, как в примере 5. Оборудование то же, что и в примере 1. Первоначальную смесь 101,1 г (0,5 моль) стирола - ангидрида малеиновой кислоты и 2,7 л ксилола нагревают с обратным холодильником при 135°C, азеотропно дистиллируя воду 1 ч и затем охлаждая до 125°C; затем добавляют 2,55 г (0,025 моль) ДМПА, нагревая смесь без обратного холодильника 1 ч.

Затем добавляют смесь 2,91 г (0,025 моль) гексаметилендиамин (ГМДА) и 1,0 мл воды, продолжая нагревать с обратным холодильником 1 ч. Через час снова добавляют 2,55 г ДМАПА (0,025 моль) и 1 ч нагревают при 125°C. Шлам затем нагревают до 135°C с обратным холодильником в течение 4 ч с азеотропной дистилляцией воды (собрано 1,25 мл). По охлаждении до 125°C добавляют 40,56 г метоксипропиламина, нагревая затем шлам 1 ч до 125°C. Затем шлам нагревают с обратным холодильником (136°C) с азеотропной дистилляцией в течение 6 ч, удаляя тем самым 8,2 мл воды с помощью ловушки Дина-Старка. Продукт получают в виде гидрохлоридной соли с применением способа примера 2 и 5,0 мл концентрированной 12 н. хлористоводородной кислоты. Целевой промытый продукт составляет 113,0 г

и по анализу содержит 5,27% азота и 1,00% хлора.

П р и м е р 11. Получают метилоксипропилимидные производные сополимера, содержащего изобутилангидрид малеиновой кислоты, как в примере 5, применяя оборудование примера 1. Исходная смесь 154,16 г (1,0 моль) изобутилена-ангидрида малеиновой кислоты и 2,7 л ксилола обрабатывают с обратным холодильником при 135°C при азеотропном удалении воды в течение 1 ч, после чего охлаждают до 125°C. После этого добавляют 5,11 г (0,05 моль) ДМАПА, нагревая шлам 1 ч при 120-125°C без обратного холодильника. К этому шламу добавляют 7,26 г (0,05 моль) МИБПА и 1,0 мл воды, после чего смесь снова нагревают 1 ч при 120-125°C без обратного холодильника. После этого шлам нагревают с обратным холодильником (135°C), удаляя воду азеотропной дистилляцией в течение 4 ч. Конечная температура 137°C, количество отобранной воды 1,20 мл. После снижения температуры шлама до 120°C добавляют 84,7 г метоксипропиламина, нагревая смесь потом без обратного холодильника при 120-125°C 1 ч. После этого температуру шлама повышают для дефлегмации (135°C) и 6 ч удаляют воду от реакции азеотропной дистилляцией. Конечная температура 137°C, количество собранной воды 16,3 мл. Продукт получают в виде гидрохлоридной соли с применением способа примера 2 с помощью 10,0 мл концентрированной 12 н. хлористоводородной кислоты. Целевой промытый и высушенный продукт составляет 186 г и содержит 6,44% азота и 1,25% хлора.

П р и м е р 12. В колбу емкостью 5 л, оснащенную обратным холодильником, ловушкой Дина-Старка, мешалкой, емкостью для добавления реактива, термометром и оборудованием для очистки азотным газом, загружают 193,05 г сополимера типа ЭАМК, содержащего этиленангидрид малеиновой кислоты (1,5 моль в пересчете на ангидрид) и 2700 мл ксилола. Смесь перемешивают при 200 об/мин с помощью лопастной мешалки (6,5-дюймовой) с нагревом до температуры дефлегмации. При этой температуре шлам выдерживают 60 мин с полным возвратом флегмы при 135°C. По истечении 1 ч реактор охлаждают до 125°C под азотом, добавляя затем смесь 10,89 г МИБПА (0,075 моль) и 1,5 мл воды. Смесь затем нагревают с обратным холодильником (134°C) и выдерживают 1 ч при этой температуре, непрерывно удаляя воду азеотропно до конеч-

ной температуры 137°C. Температуру реакционной смеси снова понижают до 125°C в атмосфере азота, добавляя затем смесь 153,3 г

5 (1,5 моль) ДМАПА и 4,5 мл воды. Затем нагревают до 133°C, выдерживая при этой температуре 1-10 мин до начала дефлегмации. В результате реакции образуется вода. Перемешивание и нагревание с обратным

10 холодильником продолжают до завершения азеотропной дистилляции воды. Конечная температура 139°C.

Для получения гидрохлоридной соли приведенный шлам фильтруют в

15 горячем виде, повторно растворяя жмых в 2700 мл смеси 3:1 ксилола со спиртом, перемешивая затем 1 ч с обратным холодильником и фильтруя в горячем виде. Этот при-

20 ем повторяют при дефлегмации еще раз в течение 2 ч и третий раз в течение 3 ч, причем после каждого прогона фильтруют в горячем виде. Полученный экстрагированный про-

25 дукт снова растворяют в 2700 мл ацетона в течение 1 ч при комнатной температуре и фильтруют, после чего жмых снова растворяют в

30 2700 мл ацетона в течение 1 ч при комнатной температуре и фильтруют. Этот экстрагированный жмых растворяют в 2700 мл спирта при

35 комнатной температуре и переводят в гидрохлоридную соль путем добавления в течение 10 мин 112 мл концентрированной 12 н. хлористоводородной соли с перемешиванием

при комнатной температуре в течение 2 ч. Фильтрованный продукт после этого промывают (при наличии

40 шлама - с перемешиванием) три раза подряд 10 л деионизированной воды (каждый раз по 2 ч) и фильтруют. Солевидный жмых снова растворяют

45 4 раза в 2700 мл ацетона, каждый раз по одному часу в целях удаления воды, фильтруют, сушат на воздухе 30 мин и в вакуумной печи при 55°C в течение ночи. Целевой продукт состоит из 333 г проходящего через отверстия 100 меш про-

50 дукта (не дробленого), содержащего 10,65% азота и 13,03% хлора в виде хлоридного иона.

П р и м е р 13. Применяя оборудование и способ примера 1 полу-

55 чают пробу-образец полиэлектролита с содержанием только звеньев сшивающих агентов МИБПА и МОПА, т.е. без ДМАПА или других функциональных аминов.

60 Смесь 193,05 г ЭАМК и 2700 мл ксилола нагревают с обратным холодильником 1 ч с удалением воды при 135°C в количестве 1,2 мл. Этот шлам охлаждают до 125°C, добавляя

65 затем 13,37 г (0,150 моль) МОПА

с перемешиванием при 125°C в течение 1 ч. После этого за два приема добавляют МИБПА - сначала в количестве 21,79 г (0,150 моль) и 1,5 мл воды с перемешиванием 1 ч без обратного холодильника при 125°C с последующим повышением температуры до 135°C и удалением воды азеотропно с обратным холодильником в течение 4 ч. Удаляют 7,4 мл воды. По охлаждению до 125°C добавляют вторую порцию МИБПА в количестве 21,79 г (0,150 моль) и 1,5 мл воды с нагревом шлама при 125°C в течение 1 ч без обратного холодильника. При 183°C осуществляют второй процесс удаления воды азеотропной дефлегмацией, удаляя 5,7 мл в течение 7 ч. Шлам снова охлаждают до 125°C, добавляя 80,23 г МИБПА, перемешивая при 125°C 1 ч и азеотропно удаляя воду с обратным холодильником (135-138°C) в течение 8 ч в количестве 16,2 мл. Цельевой шлам фильтруют в горячем виде и перерабатывают в виде свободного амина с применением способа примера 1. Продукт состоит из 260 г вещества, содержащего 8,57% азота.

Пример 14. Проводят адсорбцию фактора УШ сгусткообразования из плазмы крови человека различными полиэлектролитами по примерам 1-13 с элюированием и выделением фактора УШ из полимерного комплекса.

Плазма крови человека, используемая для исследования фракционирования, представляет собой свежезамороженную плазму из цельной крови доноров. Общее содержание белков такой плазмы колеблется в пределах 60-80 г на литр, причем более высокие концентрации наблюдаются летом, а не зимой.

Полученные звенья представляют собой либо О-положительные либо А-положительные по типу.

Фактор 1Х сгусткообразования может быть удален из плазмы первым до адсорбирующего фактора УШ. При этом процесс будет включать следующие стадии:

1. Оттаивают 5 звеньев свежезамороженной плазмы в водяной бане при 37°C.

2. Помещают оттаянную плазму в полиэтиленовый или полипропиленовый химический стакан. Отмеривают 1 л в полиэтиленовый мерный цилиндр и выливают в 2-литровый полиэтиленовый химический стакан.

3. Добавляют 0,35-0,50 г полиэлектролита примера 12 и доводят pH до 8,0 с помощью 1,0-молярной гидроокиси натрия магнитной мешалкой. Мешают 20 мин, выдерживая pH 8,0.

4. Отфильтровывают на воронке Бюхнера (12,5 см) с применением бумаги ватман № 54 в полиэтиленовую бутылку, содержащую 4-литровую бездонную колбу на стеклянной пластине. Фильтрат сохраняют.

5. Сцарапывают отфильтрованный полимер с бумажного фильтра в полиэтиленовый химический стакан емкостью 100 мл, промывают бумажный фильтр 20 мл дистиллированной воды и добавляют полимер в стакан. 5 мин перемешивают магнитной мешалкой. Фильтруют через бумагу ватман № 1 в воронку Бюхнера (4,25 см) так же, как в полиэтиленовый стакан.

6. Соединяют фильтраты ступеней 4 и 5 в качестве плазмы без фактора 1Х, из которой фактор УШ может быть удален на следующих стадиях.

Для пропускания через сито применяют 10 мл аликвоты этой плазмы без фактора 1Х в ходе последующего фракционирования фактора УШ. При соответствующих модификациях оборудования этот же общий способ применяют при удалении фактора УШ из 1-литровых порций неразбавленной плазмы, не содержащей фактора 1Х.

7. Диспергируют 0,50 г применяемого полиэлектролита в 10 мл 154-молярного рассола, доводят pH до 4,0 или 1,0 н., или 1,0-молярной лимонной кислотой. Лимонная кислота предпочтительнее вследствие стабилизирующего действия на фактор УШ. В случае применения аминной формы полиэлектролита pH следует регулировать хлористоводородной или лимонной кислотой. Если же применять предварительно полученную форму соли хлористоводородной кислоты, pH будет приближаться к 4,0. Все последующие приемы с применением 10-миллилитровой аликвоты осуществляют в полипропиленовых или поликарбонатных центрифугах емкостью 50 мл. Перемешивают очень маленькими магнитными стержнями.

8. Центрифугируют дисперсию ступени 7 в течение 5 мин при 2000 об/мин и выбрасывают всплывший продукт.

9. Добавляют 10 мл 0,154-молярного рассола и осторожно доводят pH до 5,8 0,1- или 1,0-молярной гидроокиси натрия.

10. Центрифугируют дисперсию ступени 8 пять мин при 2000 об/мин и выбрасывают всплывший продукт.

11. Осторожно доводят pH плазмы без фактора 1Х ступени 6 до 5,8 с помощью 1,0-молярной лимонной кислоты.

12. Добавляют 10 мл аликвоты плазмы ступени 11 к выпавшему полиэлектrolиту ступени 10. Перемешивают 20 мин, выдерживая pH при 5,8.

13. Центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин.

14. Отбирают соответствующую пробу всплывшего продукта ступени 13 для биоопытов по неадсорбированному фактору УШ (см. методику примера 15). Выбрасывают всплывший продукт.

15. Добавляют 10 мл 0,154-молярного раствора полимерного комплекса на основе фактора УШ ступени 13, перемешивают 5 мин, центрифугируют и выбрасывают всплывший продукт.

16. Добавляют 10 мл 1,7 молярного раствора к полимерному комплексу на основе фактора УШ (от ступени 15), доводят pH до 6,0 0,10-молярной лимонной кислотой с целью элюирования фактора УШ.

17. Размешивают 20 мин, выдерживая pH при 6,0.

18. Центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин и отбирают соответствующий образец-пробу от всплывшего продукта для проведения биоопытов на определение выделенного фактора УШ. Выбрасывают всплывший продукт.

С применением надлежащих модифицированных приборов и оборудования для фильтрации и незначительных отклонений от процессов промывки и элюирования фракционируют фактор УШ в объеме 1 л (от ступени 6), используя 60 г полиэлектrolита на 1 л плазмы. Снова на фильтрате ступени 14 проводится биоиспытание по определению фактора УШ (не адсорбированного), а на фильтрате ступени 18 - по выделению фактора УШ.

Пример 15. Для сопоставления выходов описанных смол относительно выделения фактора УШ из неразбавленной плазмы крови человека методикой примера 14 и оценкой уровня активации полученного таким образом фактора УШ проводят два опыта.

Выделение или выход фактора УШ.

В качестве модификации опыта получения тромбопластина (ТСТ) проводится двухступенчатый биоопыт измерения фактора УШ. В основном, в этом опыте измеряют время, необходимое для образования сгустков стандартной плазмы-субстрата (свежей, обедненной тромбоцитами) после выделения из продукта среднего уровня сгусткообразования, посредством контролируемого по времени добавления факторов сгусткообразования из других источников. Факторы, необходимые для обычного

времени сгусткообразования в опыте ТСТ в пробирке (12-20 с), это факторы XII, XI, IX, X, V, фосфолипид и хлористый кальций. Эти факторы получают из исходных смесей хлористого кальция, сыворотки крови человека для факторов XII, XI и IX, сыворотки крови крупного рогатого скота для фактора V и хлороформный экстракт человеческого мозга для фосфолипида с применением шкалы времени, после чего добавляют обедненную тромбоцитами плазму. Время образования сгустков целевой плазмы-субстрата замеряют автоматически. Перед последним добавлением плазменного субстрата добавляют свежий плазменный контроль (та же плазма, что и фракционирования фактора УШ) или целевые элюенты фактора УШ в соответствующем разбавлении в качестве измеряемого источника фактора УШ.

Составляют стандартные кривые с применением стандартизированной плазмы известного содержания фактора УШ с содержанием 1 единицы фактора УШ на мл. Стандартные кривые наносят на миллиметровую бумагу в координатах: время образования сгустков в секундах против единиц активности фактора УШ на мл (разбавления указанного плазменного контроля). По этим стандартным кривым получают содержание фактора УШ в единицах/мл для испытуемых проб-образцов.

Стандартные кривые составляют для каждодневных прогонов при определении фактора УШ.

Весь опыт заключается в определении времени и температуры с применением фиброметра BBL Fibrometer "Fibro System TM", поставляемого BBL Division of Becton, Dickinson and Co., Cockeysville, Maryland и оснащенного двумя обогревательными блоками Thermal Prep Block и автоматической пипеткой контроля времени.

Био-испытание на активацию фактора УШ.

Опыт предназначается для замера относительного времени активации фактора УШ вне плазменных условий в качестве модификации описанного опыта на частичное тромбопластиновое время. В этом тесте добавляют только фосфолипид и хлористый кальций к субстрату, обедненному тромбоцитами. Время сгусткообразования замеряют на указанном фиброметре путем добавления соответствующих разбавленных растворов фактора УШ в плазменный субстрат. Не активированный контроль (плазма) в этом тесте дает сроки сгусткообразования в 190 с. Более

быстрое стусткообразование (<150 с) говорит об активации или же о присутствии активирующих ферментов. В каждом прогоне определения активации применяют два контроля препаратов быстрого стусткообразования, а также плазменный контроль и буфер.

Био-испытания на выделение проводят с остающимся от ступеней 14 и 18 (пример 14) продуктом, в то время, как опыты на активацию проводят с остающимся от ступени 18 продуктом. Все остающиеся продукты соответствующим образом разбавляются в имидазоловом буфере с получением целевого рассола с молярностью ниже 0,08.

Пример 16. Выход фактора УШ и активации продуктов, полученных в примерах, с применением 10 мл продукта фракционирования плазмы примера 14.

Широкий спектр получения в примерах 1-13 продуктов испытывают на фракционирование фактора УШ и активацию способом примера 14, подвергая био-испытаниям на эти два па-

раметра по способу примера 15. Приведенные дальше результаты действительны для фракционирования с применением 10 мл плазмы и 0,1-0,8 г ПЭ на 10 мл плазмы. Предварительной настройкой значения pH для полиэлектролитов, полученных и применяемых в виде аминов (ступень 7, пример 14), во время процесса фракционирования получают *in situ* соль, применяя для этого хлористоводородную или лимонную кислоту указанным образом.

Как указано в примере 14, плазма меняется от смеси к смеси, а также зимой или летом относительно общего содержания белков. Аналогично изменяются и различные звенья плазмы, применяемые для этих исследований, а именно по содержанию фактора УШ: от 0,8 до 1,3 звена на мл (пример 15, опыт 1). Время стусткообразования плазмы по опыту на активацию (пример 15, опыт 2) колеблется между 185 и 240 с.

Результаты испытаний приведены в табл.8.

Т а б л и ц а 8

Полиэлект- ролитный состав по приме- ру	Применяемая форма	г ПЭ на 10 мл плазмы	Предварительно отрегулирован- ное значение pH	Выделено фактора УШ, зве- ньев / мл	Время стуст- кообра- зования факто- ра УШ, с	Наличие актива- ции факто- ра УШ
1	2	3	4	5	6	7
1	Свободный амин	0,6	Лимонной кислотой	0,72	299	Нет
1	---	0,4	HCl	0,56	270	---
1	---	0,4	Без регулирования	0,62	273	---
	pH доведен до	5,8	лимонной кислотой	Без предварительного доведения pH до 4,0		
2	HCl	0,8		0,49	259	Нет
2	---	0,5		0,42	272	Есть
7 прогон 2	---	0,4		0,43	104	---
---	---	0,5		0,66	113	---
---	---	0,4		0,53	98	---

Продолжение табл.8

1	2	3	4	5	6	7
3 прогон 1	Свободный амин	0,5	Лимонной кислотой	0,49	198	Нет
11-11-11-2	11-11	0,4	НС ₂	0,56	270	11-11
11-11-11-3	11-11	0,6	Лимонной кислотой	0,65	308	11-11
11-11-11-4	11-11	0,6	11-11	0,50	324	11-11
11-11-11-5	11-11	0,6	11-11	0,90	317	11-11
11-11-11-6	11-11		Без испытания	-	-	-
11-11-11-7	11-11	0,6	Лимонной кислотой	0,60	340	Нет
11-11-11-8	11-11	0,5	11-11	0,78	269	11-11
11-11-11-9	11-11	0,6	11-11	0,80	317	11-11
11-11-11-10	11-11		Без испытания	-	-	-
11-11-11-11	11-11		11-11	-	-	-
4 прогон 1	Свободный амин		Без испытания	-	-	-
11-11-11-2	11-11	0,5	НС ₂	0,56	269	Нет
11-11-11-3	11-11	0,5	Лимонной кислотой	0,67	283	-
11-11-11-4	11-11	0,5	11-11	0,57	305	11-11
11-11-11-5	Свободный амин	0,5	11-11	0,72	303	11-11
11-11-11-6	11-11	0,5	11-11	0,61	315	11-11
11-11-11-7	11-11	0,4	НС ₂	0,49	296	11-11
11-11-11-8	11-11	0,5	Лимонной кислотой	0,57	277	11-11
11-11-11-9	11-11	0,5	11-11	0,64	314	11-11
5 прогон 1	НС ₂	0,5	Без регулирования	0,76	258	Нет
11-11-11-2	11-11	0,5	11-11	0,72	254	11-11
11-11-11-3	11-11	0,5	11-11	0,80	261	11-11
11-11-11-4	11-11	0,5	11-11	0,80	338	11-11
7 прогон 2	11-11	0,5	11-11	0,62	111	Есть

Продолжение табл.8

1	2	3	4	5	6	7
6 прогон 1	Свободный амин	0,5	Лимонной кислотой	0,61	252	Нет
-''-''- 2	НСℓ	0,5	Без регулирования	0,58	240	-''-
7 прогон 1	Свободный амин	0,5	Лимонной кислотой	0,43	198	Нет
-''-''- 2	НСℓ	0,5	Без регулирования	0,57	107	Есть
-''-''- 3	Свободный амин	0,5	Лимонной кислотой	0,55	225	Нет
-''-''- 4	НСℓ	0,5	Без регулирования	0,60	91	Есть
-''-''- 5	Свободный амин	0,5	Лимонной кислотой	0,49	248	Нет
-''-''- 6	НСℓ	0,5	Без регулирования	0,57	94	Есть
-''-''- 7	Свободный амин	0,5	НСℓ	0,45	231	Нет
-''-''- 8	НСℓ	0,5	Без регулирования	0,51	117	Есть
8 прогон 1	Свободный амин	0,5	Лимонной кислотой	0,45	299	Нет
-''-''- 2	-''-		Без испытания	-	-	-
-''-''- 3	-''-	0,5	Лимонной кислотой	0,54	272	Нет
-''-''- 4	-''-	0,5	-''-	0,64	279	-''-
8 прогон 5	Свободный амин	0,5	Лимонной кислотой	0,59	244	Нет
-''-''- 6	-''-		Без испытания	-	-	-
-''-''- 7	-''-	-''-	-''- -''-	-	-	-
-''-''- 8	-''-	-''-	-''- -''-	-	-	-
-''-''- 9	-''-	0,5	НСℓ	0,43	252	Нет
-''-''- 10	-''-	0,5	Лимонной кислотой	0,66	314	-''-
-''-''- 11	-''-	0,5	-''-	0,42	257	-''-
-''-''- 12	-''-	0,5	-''-	0,62	246	-''-
-''-''- 13	-''-	0,5	-''-	0,52	279	-''-
-''-''- 14	-''-	0,5	-''-	0,42	257	-''-
-''-''- 15	-''-	0,5	-''-	0,57	253	-''-
-''-''- 16	-''-	0,5	-''-	0,48	288	-''-

Продолжение табл.8

1	2	3	4	5	6	7
9 прогон 1	НСЭ	0,5	Без регулирования	0,66	113	Есть
--- 2	---	0,5	---	0,42	272	Нет
--- 3	---	0,5	---	0,58	90	Есть
--- 4	---	0,5	---	0,54	225	Нет
--- 5	---	0,5	---	0,55	146	Есть
--- 6	---	0,5	---	0,50	218	Нет
10	НСЭ	0,5	Без регулирования	0,39	172	Нет
11	---	0,5	---	0,33	210	---
12	---	0,4	---	0,30	253	---
	---	0,1	---	0,54	205	---
13	Свободный амин	0,5	НСЭ	0,52	263	---
12	НСЭ	10	Без регулирования	223	210	Нет
1	Свободный амин	60	Лимонной кисло- той	600	287	Нет
3 прогон 3	---	60	---	406	301	---
4 --- 1	---	60	---	737	300	---
3 --- 5	---	60	---	650	265	---
3 --- 7	---	60	---	510	364	---
4 --- 2	---	60	---	770	336	---
3 --- 9	---	60	---	480	239	---

Пример 17. 2 образца фактора УШ, полученных с применением полиэлектrolита примеров 1 и 7 (прогон 2), сравнивают относительно токсичного действия путем внутривенного вливания гончим собакам.

55

Опыты проводят на животных весом 8-9 кг; фактор УШ получают в стерилизованной воде (10 единиц на мл). Единичные дозы по 100 единиц (100 мл) вводятся каждой собаке. Получены результаты, приведенные в табл.9.

Т а б л и ц а 9

Продолжение табл. 9

Показатели	Поведение собаки после введения полиэлектролита по примеру	
	1	7 (погон 2)

Поведение собаки после введения

Нормальное	Крутится в клетке (расстройство ЦНС)
------------	--------------------------------------

Давление крови *	Нормальное (1-24 ч).	Значительно пониженное
------------------	----------------------	------------------------

Число тромбоцитов **	Без изменений (1-24 ч)	На 60% ниже
----------------------	------------------------	-------------

Пульс *	Нормальный	-
---------	------------	---

Белые ша- рики ***	Без изменений (1-24 ч)	-
-----------------------	------------------------	---

Красные ша- рики ***	То же	-
-------------------------	-------	---

5

10

15

20

25

30

Показатели	Поведение собаки после введения полиэлектролита по примеру	
	1	7 (погон 2)

Гемоглобин	Без изменений	-
------------	---------------	---

Химизм крови ***	Нормальный (1-24 ч)	-
------------------	---------------------	---

* По бедренному катетеру, подключенному к записывающему физиографу для замера пульса и кровяного давления.

** По гемоцитометру.

*** По счетчику Coulter.

**** Прогон по системе Technicon SMAC (18 биоопытов).

Технико-экономическая эффективность способа заключается в получении специфического фактора УШ без предварительной активации. Время сгусткообразования при использовании выделенного данным способом специфического фактора УШ значительно увеличивается, что обеспечивает возможность эффективного использования данного компонента крови.

Составитель О.Скородумова

Редактор Н.Егорова

Техред М.Тепер

Корректор А. Ильин

Заказ 1589/55

Тираж 823

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий

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

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4