



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

230943

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³

G 01 N 31/08,
C 07 H 3/06

(22) Přihlášeno 22 10 82
(21) (PV 2629-83)

(40) Zveřejněno 13 01 84

(45) Vydáno 15 06 86

(75)
Autor vynálezu

VRÁTNÝ PETR ing. CSc., ČOUPEK JIŘÍ ing. CSc.,
VOZKA STANISLAV RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob dělení oligosacharidů kapalinovou chromatografií

Způsob dělení oligosacharidů kapalinovou chromatografií, vyznačující se tím, že se směs oligosacharidů, která je určena k dělení, zavádí na vrchol sloupce silikagelu s měrným objemem porů 1,0 až 2,0 ml/g, měrným povrchem 350 až 500 m²/g, středním objemem porů 10 až 20 nm, který obsahuje kovalentně vázanou alkenickou stacionární fázi s obsahem uhlíku alespoň 20 % hmotnostních s alkylem obsahujícím 12 až 24 atomů uhlíku s methylovými zbytkovými silanolovými skupinami, přičemž se sloupec eluuje vodou při teplotě 20 až 80 °C.

Způsobu podle vynálezu se používá k dělení oligosacharidů v analytickém i preparativním měřítku s upletněním v biotechnologii, zemědělství a v potravinářství.

Vynález se týká způsobu dělení oligosacharidů kapalinovou chromatografií podle molekulové hmotnosti isokratickou elucí ve vodě.

Dělení oligosacharidů podle jejich molekulové hmotnosti (stupně polymerizace monosacharidových jednotek) v enzymatických nebo kyselých hydrolyzátech přírodních polysacharidů je velmi důležité v biotechnologii, v zemědělství a v potravinářském průmyslu.

Teoreticky se zdá být nejvhodnější pro dělení oligomerů sacharidů metoda gelové permeační chromatografie. Dělení se provádí zásadně za zvýšené teploty, jako elučního činidla se používá voda, avšak metoda je poněkud zdlouhavá a k úplnému rozdělení je zapotřebí několika hodin. Zrychlení eluce a zvýšení účinnosti dělení je velmi obtížné s ohledem na malou tlakovou odolnost používaných homogenně síťovaných botnajících gelů jako jsou trojrozměrné polysacharidové nebo skrylamidové kopolymery.

Rigidní celkově porézní materiály nacházejí v gelové chromatografii uplatnění jen pro dělení vysloveně vysokomolekulárních sloučenin. Určitou nevýhodou metody pro preparativní účely je i poměrně nízká zátěžová kapacita používaných gelové chromatografických materiálů.

Velmi běžná je metoda dělení sacharidů na iontoměničích. Způsob je velmi selektivní a hodí se zvláště pro rozlišení sacharidů podle rozdílů ve struktuře a v konfiguraci. Při použití kationtů v Ca^{++} a Ag^{+} formě s vodnou mobilní fází je na závadu vysoká botnavost iontoměničů, nízká tlaková a mechanická odolnost nosičů a v neposlední míře i vymývání iontů ze struktury gelu projevující se v úbytku kapacity s časem.

Při chromatografických procesech založených na interakcích se silikagelem (aminofáze) je možno pracovat se směsnou mobilní fází (nejčastěji acetonitril-voda), v níž může být dělení oligosacharidů s vyšší molekulovou hmotností komplikováno sníženou rozpustností složek. V poslední době bylo dosaženo dělení oligosacharidů na speciální koloně v módu obrácené fáze; nevýhodou této metody je však rozlišení alfa- a beta- anomerů, které separaci zbytečně komplikuje.

Pokusy s posunem rovnováhy mezi anomery pomocí chemických činidel byly s výjimkou redukce neúspěšné. Citlivost známého postupu je příliš nízká pro stanovení oligomerů glukózy v maltosové sérii s DP vyšším než 6, při dělení celloextrinů je metoda poměrně časově náročná (pro DP 4 ca 30 až 40 minut).

Předmětem vynálezu je způsob dělení oligosacharidů na silikagelovém sorbentu, který má měrný objem pórů 1,0 až 2,0 ml/g, měrný povrch 350 až 500 m²/g, střední objem pórů 10 až 20 nm a který obsahuje chemicky vázanou alkalickou stacionární fázi s obsahem uhlíku aspoň 20 % hmot., u něhož jsou zbytkové silanolové skupiny metylovány. K dělení určená směs oligosacharidů se zavede na povrch sloupce a eluuje se vodou při teplotě 20 až 80 °C,

Hlavní předností způsobu dělení oligosacharidů podle vynálezu je isokratická eluce při použití vody jako mobilní fáze. Tento způsob je zvláště výhodný přihlídneme-li se k rozpustnosti dělených systémů, která je ve směsných vodně-organických rozpouštědlech omezená, k jednoduchosti obsluhy a konečně i k ceně mobilní fáze.

Použití vody má svoje výhody i při refraktometrické detekci oligosacharidů. Sorpční interakce podle tohoto způsobu dělení je silně teplotně závislá, takže při vhodné zvolené teplotě mezi 20 až 80 °C lze dosáhnout podstatného urychlení separace vedle úplného potlačení tvorby alfa a beta anomerů, které mohou při dělení rušit.

V následujícím je předmět vynálezu vysvětlen a doložen příklady, aniž by však byl těmito příklady jeho rozsah jakkoli omezen.

Příklad 1

Sorbent se silikagelovou maticí o středním průměru pórů 14 nm, měrným objemem pórů 1,9 ml/g a měrném povrchu 400 m²/g obsahující chemicky vázanou oktaedecylovou fázi (obsah C 23,5 % hmot.) se střední velikostí částic 10 μm sférického tvaru byl suspenzní technikou naplněn do nerezové kolony 25P x 6 mm. Chromatografická kolona byla opatřena nastříkavacím ventilem s přerušením toku (stop-flow) a refraktometrickým detektorem.

Mobilní fáze (voda) byla čerpána vysokotlakým lineárním čerpadlem. Do kolony byla zavedena směs maltodextrinů a při teplotě 25 °C byla kolonou čerpána voda s průtokovou rychlostí 50 ml/h při přetlaku 1,6 MPa. Za uvedených podmínek došlo k úplnému rozdělení sedmi maltodextrinů podle molekulové hmotnosti.

Příklad 2

Sorbent i uspořádání zařízení pro dělení oligosacharidů je stejné jako v příkladu 1. Dělení směsi oligomerických cellodextrinů probíhá při teplotě kolony 80 °C, při průtoku vody jako mobilní fáze 60 ml/h a při přetlaku na koloně 0,8 MPa během 10 minut. Cello-dextriny do DP 6 se na koloně zcela oddělí a prokazují se refraktometricky.

Příklad 3

Sorbent i zařízení je stejné jako v příkladu 1. Rozdělení směsi maltodextrinů probíhá při teplotě 60 °C, při průtokové rychlosti vodné mobilní fáze 60 ml/h a při přetlaku 1,0 MPa. Během 7 minut se oligomery rozdělí až po maltodekaosu. Prokazují se detekcí na diferenciálním refraktometru.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob dělení oligosacharidů kapalinovou chromatografií, vyznačující se tím, že se směs oligosacharidů, která je určena k dělení, zavede na vrchol sloupce silikagelu s měrným objemem pórů 1,0 až 2,0 ml/g, měrným povrchem 350 až 500 m²/g, středním objemem pórů 10 až 20 nm, který obsahuje kovalentně vázanou alkanickou stacionární fázi s obsahem uhlíku alespoň 20 % hmotnostních s alkylem obsahujícím 12 až 24 atomů uhlíku a s metylovanými zbytkovými silenolovými skupinami, přičemž se sloupec eluuje vodou při teplotě 20 až 80 °C.