



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

230908

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 22 10 82
(21) (PV 7520-82)

(51) Int. Cl.³
B 01 J 20/10
G 01 N 31/08

(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) Sorbent na bázi silikagelu pro dělení oligosacharidů

Sorbent určený pro dělení pomocí kapalinové chromatografie se podle vynálezu vyznačuje tím, že sestává z celkově porézního silikagelu s měrným objemem pórů 1,0 až 2,0 ml/g, měrným povrchem 350 až 500 m²/g a středním průměrem pórů 10 až 20 nm, který obsahuje kovalentně vázanou alkanickou stacionární fázi s alkylem obsahujícím 12 až 24 atomů uhlíku, s obsahem uhlíku alespoň 20 % hmotnostních, u něhož jsou zbytkové silanolové skupiny metylovány.

Sorbentu podle vynálezu lze využít pro analýzu a preparaci oligosacharidů v biochemických, zemědělských a potravinářských produktech.

Vynález se týká sorbentu na bázi alkylovaného silikagelu pro dělení oligosacharidů kapalinovou chromatografií.

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

Zrychlení eluce a zvýšení účinnosti dělení proti současnému stavu u gelové chromatografie je velmi obtížné s ohledem na malou tlakovou odolnost používaných homogenně síťovaných bobtnajících gelů například polysacharidových nebo polyakrylamidových materiálů.

Aplikace rigidních gelové chromatografických materiálů, jako je silikagel, porézní sklo nebo makroporézní kopolymerní sorbenty se při dělení sacharidů gelovou chromatografií omezuje pouze na vysloveně makromolekulární sloučeniny.

Velmi běžná je metoda dělení sacharidů na měničích aniontů. Obecnou nevýhodou použití anexů v borátových puffech je však dlouhé trvání analýzy, protože rychlejšímu ustavování rovnováh brání snížený přenos hmoty v gelové matici bobtnajících iontově výměnných pryskyřic; totéž ještě ve zvýšené míře platí i pro rozdělovací chromatografii sacharidů na anexech ve směsi vody s organickým rozpouštědlem. Při pokusu odstranit tuto nevýhodu se ukazuje, že na makroporézních semirigidních nebo rigidních nosičích k dělení oligomerů podle molekulové hmotnosti nedochází. Je tedy zřejmé, že se na separačním mechanismu určitou měrou podílí molekulárně síťový efekt.

Dělení sacharidů na katexech v Ca^{++} nebo Ag^+ formě dovoluje také používat jako mobilní fáze vody, na závadu je však opět vysoká bobtnavost iontoměničů a nízká tlaková a mechanická odolnost sloupce. I zde se výrazně podílí na mechanismu dělení molekulárně síťový efekt. Rozdělovací chromatografie na katexech může být omezena rozpustností dělených látek v mobilní fázi a úroveň separace je obdobná anexům.

Při chromatografických procesech založených na interakcích se silikagelem (impregnace kolony aminy přidávanými do mobilní fáze), případně s aminoalkylovým derivátem silikagelu, je nutno pracovat se směsnou mobilní fází (nejčastěji acetonitril-voda).

Dělení oligodextrinů s vyšší molekulovou hmotností je komplikováno sníženou rozpustností v mobilní fázi. Užití gradientové techniky je s ohledem na refraktometrickou detekci omezeno nebo zcela vyloučeno.

V poslední době bylo dosaženo dělení oligomerů na speciální koloně v módu obrácené fáze. Nevýhodou této metody je však rozlišení alfa a beta anomerů, které nemá technologický význam a chromatogramy zbytečně komplikuje. Pokusy s posunem rovnováhy mezi anomery s použitím chemických činidel byly neúspěšné s výjimkou redukce. Citlivost postupu je příliš nízká pro stanovení oligomerů glukózy v maltóзовé sérii s DP vyšším než 6, při dělení cello-dextrinů je metoda poměrně časově náročná (asi 30 až 40 minut pro DP 4).

Předmětem předloženého vynálezu je sorbent na bázi silikagelu pro dělení oligosacharidů podle molekulové hmotnosti pomocí kapalinové chromatografie, který spočívá v tom, že sestává z celkově porézního silikagelu s měrným objemem pórů 1,0 až 2,0 ml/g, měrným povrchem 350 až 500 m²/g a středním průměrem pórů 10 až 20 nm, který obsahuje kovalentně vázanou alkanickou stacionární fázi s alkylem obsahujícím 12 až 24 atomů uhlíku, s obsahem uhlíku alespoň 20 % hmotnostních, u něhož jsou zbytkové silanolové skupiny metylovány.

S výhodou lze zejména pro vysokou účinnou kapalinovou chromatografii používat sorbentu ve sférické nebo mikrosférické formě.

Výhodou sorbentu podle předloženého vynálezu je ve srovnání s obvyklými iontově výměnnými pryskyřicemi jeho vynikající mechanická stálost, která dovoluje práci za vysokých průtokových rychlostí mobilní fáze a za vysokých tlaků. Tato skutečnost podstatně přispívá k urychlení analýzy. Sorbenty je možno připravovat ve sférické a v mikrosférické (3 až 5 μm) formě. Dosahuje se tak nižších tlakových spádů na koloně než u sorbentů s nepravidelným tvarem částic a vysokých účinností dělení. Kovalentně vázaná stacionární fáze má oproti sorbentům, připraveným saturací nosiče nízkomolekulárními sloučeninami nebo kationty značnou přednost ve vysoké reprodukovatelnosti a stálosti vlastností a v podstatně delší životnosti.

Značný průměr i specifický objem trvalých pórů sorbentu má ve srovnání s gelovou strukturou sorbentů na bázi homogenních síťovaných pryskyřic četné výhody při ustalování rovnováh mezi mobilní a stacionární fází, při transportu hmoty mezi fázemi.

Důsledkem je vysoká účinnost kolon plněných sorbentem podle předmětu vynálezu, menší závislost účinnosti na průtokové rychlosti eluentu, velmi dobrá selektivita při prakticky zanedbatelné asymetrii chromatografických pík. Výhodou je i možnost použití vody jako mobilní fáze.

V následující části je předmět vynálezu vysvětlen a doložen příklady. Tyto příklady však rozsah vynálezu v žádném případě neomezuji.

P ř í k l a d 1

100 g makroporézního silikagelu s měrným objemem pórů 1,8 ml/g a měrným povrchem 450 m²/g o velikosti částic 5 μm $\pm$ 2 μm se rozmíchá v 3 000 ml destilované vody, do které se přidá 300 ml 36% (% hmotnostní) chlorovodíkové kyseliny. Suspenze se povaří 30 minut a po vychladnutí se přefiltruje a sorbent se promyje na filtru 2 000 ml destilované vody, suspenduje ve 3 litrech destilované vody a povaří se po dobu 30 minut. Po vychladnutí se suspenze odsaje na skleněném filtru a promyje se 2 litry destilované vody až do pH 5. Silikagel se ponechá na skleněném filtru a prosává se vzduchem po dobu 4 minut, pak se suší 4 hodiny při 60 °C a dále 16 hodin při teplotě 110 °C.

Takto aktivovaný silikagel se smísí s 500 ml sušeného toluenu, směs se řádně protřepe a přidá se 80 ml oktaedecyltrichlorsilanu, zamíchá se a potom se přidá 80 ml hexametyldisilazanu. Nádoba se opatří uzávěrem obsahujícím chlorid vápenatý a směs se ponechá reagovat po dobu 120 hodin. Pak se suspenze odsaje, promyje se 2,4 litru toluenu, 1 400 ml nesusušeného toluenu, 1 700 ml acetonu, 1 400 ml metanolu, směsí metanolu a vody (2:1), acetonem a volně se vysuší. Poslední sušení se provádí během 3 hodin při teplotě 80 °C. Elementární analýzou byl zjištěn obsah uhlíku 25 % hmotnostních.

P ř í k l a d 2

Sorbent se silikagelovou maticí středního průměru pórů 12 nm, měrným objemem pórů 1,8 ml/g a o měrném povrchu 440 m²/g obsahující oktaedecylovou chemicky vázanou fázi (obsah uhlíku 25 % hmotnostních) se střední velikostí částic 10 μm sférického tvaru (podle příkladu 1) se naplní suspenzní technikou do nerezové kolony dlouhé 250 mm s vnitřním průměrem 6 mm.

Chromatografická kolona je opatřena nastřikovacím ventilem s přerušením toku (stop-flow) a refraktometrickým detektorem. Mobilní fáze (voda) se čerpá vysokotlakým lineárním čerpadlem. Do kolony se nastříkne směs maltodextrinů a při teplotě 25 °C se kolonou čerpá voda s průtokovou rychlostí 50 ml/h při přetlaku 1,6 MPa. Za uvedených podmínek dojde během 12 minut k úplné separaci sedmi maltodextrinů podle molekulové hmotnosti.

P ř í k l a d 3

Sorbent na bázi silikagelové matrice o středním průměru pórů 14 nm, měrným objemem pórů 2,0 ml/g a měrným povrchem 400 m²/g obsahující oktaedecylovou chemicky vázanou fázi (obsah uhlíku 27,5 % hmotnostního) se střední velikostí sférických částic 5 μm byl suspenzní technikou naplněn do skleněné vysokotlaké kolony délky 150 mm s vnitřním průměrem 3,2 mm. Čerpadlo, nastříkovací ventil a detektor jsou shodné se zařízením popsaným v příkladu 2. Eluce směsi oligomerních cello-dextrinů se provádí při teplotě 70 °C, průtokové rychlosti 3 l ml/h a při přetlaku 4,0 MPa. Dělení oligomerů po DP 6 proběhne během 8 minut.

P ř í k l a d 4

Kolona a přístrojové uspořádání je shodné jako v příkladu 3, sorbent má stejnou matici a liší se obsahem C₂₄ alkanické stacionární fáze (30 % hmotnostních). Dělení malto-dextrinů (do DP 10) při teplotě 70 °C ve vodné mobilní fázi proběhne během 10 minut.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Sorbent na bázi silikagelu pro dělení oligosacharidů podle molekulové hmotnosti pomocí kapalinové chromatografie, vyznačující se tím, že sestává z celkově porézního silikagelu s měrným objemem pórů 1,0 až 2,0 ml/g, měrným povrchem 350 až 500 m²/g a středním průměrem pórů 10 až 20 nm, který obsahuje kovalentně vázanou alkanickou stacionární fázi s alkylem obsahujícím 12 až 24 atomů uhlíku, s obsahem uhlíku alespoň 20 % hmotnostních, u něhož jsou zbytkové silanolové skupiny metylovány.

2. Sorbent podle bodu 1, vyznačující se tím, že částice silikagelu mají sférický tvar.