



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

253567

(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 30/60

(22) Přihlášeno 11 02 82
(21) PV 942-82
(32) (31) (33) Právo přednosti od 12 02 81
(56-17985) Japonsko

(40) Zveřejněno 16 04 87

(45) Vydáno 15 09 88

(72) Autor vynálezu NOGUCHI KOHJI ing., KASAI MASAO ing., YOKOHAMA (Japonsko)

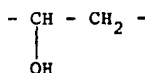
(73) Majitel patentu ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA, OSAKA (Japonsko)

(54) Kolona pro kapalinovou chromatografii a způsob její přípravy

Kolona pro kapalinovou chromatografii s gelovým ložem z pórovitých gelů obsahujících vinylalkoholové jednotky se vyznačuje tím, že gely mají hmotnostní střední průměr zrn 4 až 20 μm , přičemž gelové lože má hodnotu plnicího poměru v rozmezí 0,66 až 0,78 a stupeň rovnoměrnosti v rozmezí 2,0 až 4,0. Tato kolona se připravuje postupem, při němž je při plnění kolony nutno se vystříhat náhlé změny průtokové rychlosti nebo tlaku na gelové lože během plnění kolony, což umožňuje současně zlepšit eluování a prodloužit životnost kolony. Kolona má vynikající rozdělovací účinnosti a umožňuje přímou analýzu krevního séra.

Vynález se týká kolony pro kapalinovou chromatografii, s gelovým ložem z pórovitých obsahujících vinylalkoholové jednotky. V užším symyslu se vynález týká kolony s vysokou dělící schopností pro vysokorychlostní kapalinovou chromatografii, kterážto kolona zahrnuje rovnoměrné gelové lože s vysokým poměrem plnění pórovitých gelů obsahujících vinylalkoholové jednotky a majících vysokou hydrofilnost a zlepšenou mechanickou pevnost, již se má dosáhnout gelové permeační chromatografické separace při použití vodného elučního činidla; dále se vynález týká způsobu přípravy této kolony a metody jejího použití pro frakcionaci.

Výraz "pórovitý", jak se jej zde používá, znamená, že jemné póry jsou rozptýleny v celé hmotě zrn gelu. Výrazem "vinylalkoholové jednotky" se rozumí skupiny vzorce



Kapalinová chromatografie umožňuje rozdělení kapalné směsi v její jednotlivé kapalné složky, přičemž se zachovává kapalný stav. Není nutné přeměnit zpracovávané vzorky v páry, jako je tomu u plynové chromatografie, a požadované látky se od sebe mohou oddělit, aniž by doznaly jakoukoliv změnu nebo degradaci. Proto se kapalinové chromatografie používá v různých oborech, jako je chemie, biochemie a farmacie. Podle mechanismu dělení složek se kapalinová chromatografie dělí na gelovou permeační chromatografii (GPC), rozdělovací chromatografii, adsorpční chromatografii, chromatografii na bázi výměny iontů a jiné.

V souladu s nedávnými výraznými pokroky v oblasti vysokorychlostní chromatografie a rozšířeného používání v různých oborech existuje značný požadavek na zlepšení, pokud jde o účinnost, kolony pro gelovou permeační chromatografii používající vodného rozpouštědla, které se používá k vzájemnému oddělování vodorozpustných látek na základě různé velikosti jejich molekul použitím vody nebo vodného roztoku jakožto elučního činidla.

Největšího rozšíření z gelových permeačních kolon, používajících vodného rozpouštědla, doznaly kolony plněné dextranovým nebo agarózovým gelem. Tyto gely obsažené v takovýchto kolonách jsou měkké, a je tudíž vysokorychlostní analýza nemožná.

Měkké gely jsou popsány v britské zveřejněné patentové přihlášce č. 2 061 954A. Ze zlepšených kolon ve srovnání s výše uvedenými lze uvést kolony plněné polyetylenglykoldimetakrylátovým gelem, které však stále ještě dostatečně nevyhovují, pokud jde o dělící schopnost a průtokovou rychlost elučního činidla.

V Japonské zveřejněné patentové přihlášce č. 138 077/1977 se navrhuje použít vodného gelu, získaného zmydelněním zrnitého kopolymeru dietylen glykoldimetakrylátu nebo pod. s vinylacetátem a příčným zesílením zmydelného kopolymeru pomocí epichlorhydrinu. V uvedené přihlášce však není zmínka o dostatečně účinném oddělování při vysoké průtokové rychlosti. Nedostatečné oddělení je zčásti zaviněno velikostí zrn gelu v rozmezí 46 μm až 37 μm .

Jako kolony, zajišťující poměrně velmi rychlou analýzu a zlepšené oddělování, byly navrženy kolony plněné pórovitým silikagelem, jehož povrch byl podroben chemické úpravě, k zabránění adsorpce rozpuštěných látek. Používání kolon tohoto typu je vskutku velmi rozšířené. Avšak struktura těchto gelů je anorganická a proto je obtížné reprodukovatelně kontrolovat průměr pórů gelu, což je důležitým parametrem gelů pro gelovou permeační chromatografii, čímž se rozmezí optimální průměru pórů zmenšuje.

Rovněž je obtížné dosáhnout vysokého plnicího poměru gelového lože, což způsobuje, že životnost kolony je nízká. Další nevýhodou je, že při použití kolony z gelu kysličníku křemičitého musí být hodnota pH použitého elučního činidla v rozmezí 3 až 9. A i když je pH v tomto rozmezí, přecházejí stopová množství kysličníku křemičitého do vytékající kapaliny, což nepříznivě ovlivňuje výsledky chromatografické analýzy.

Pro získání plněné kolony o vysoké účinnosti je rozhodujícím činitelem, v jakém stavu se vytvoří gelové lože. To znamená, že je podstatné, aby se vytvořil rovnoměrný vysoký plnicí poměr gelového lože. V souladu s tímto cílem se ve zveřejněné japonské patentové přihlášce č. 60 290/1978 navrhuje rovnoměrně mísit gely o velkých zrnech s gely o malých zrnech k dosažení vysokého plnicího poměru gelového lože.

Nevýhodou tohoto postupu je, že je nevyhnutelně doprovázen zvýšením "výškového ekvivalentu teoretického patra" (v dalším "VETP"), plynoucím z přimíšení gelů o velké velikosti zrn. "Výškový ekvivalent teoretického patra" je definován jako taková délka kolony, která skýtá vytékající kapalinu, jež je v rovnováze s průměrnou koncentrací po uvedené délce ve stacionární fázi. Nevýhody výše uvedených běžných kolon souvisejí s povahou gelů a se stavem vytvořeného gelového lože. Je proto důležité zjistit optimální hodnoty těchto parametrů, aby se získala vysokorychlostní kolona vysoké oddělovací schopnosti a dlouhodobé životnosti.

Byly proto podniknuty rozsáhlé podrobné studie jednotlivých výše zmíněných parametrů, které přispívají k účinnosti plněných gelových permeačních chromatografických kolon; výsledkem těchto prací bylo zjištění optimální kombinace těchto parametrů a podmínek, které je zapotřebí k vytvoření vysokorychlostní kapalinové chromatografické kolony s vysokou dělící schopností a dlouhou životností. Tento vynález se právě opírá o výsledky těchto výzkumných prací.

Je proto účelem vynálezu poskytnout zlepšenou kolonu pro kapalinovou chromatografii s vysokým plnicím poměrem, zahrnující rovnoměrné lože jakožto nosič z takových gelů, které neadsorbují rozpuštěné látky, což by vedlo k nedostatečnému dělení složek (jinými slovy, které mají neiontovou, avšak vysoce hydrfilní chemickou strukturu), mají regulovanou velikost pórů a pórovitost v optimálním rozmezí a jsou v podobě jemných zrn k zajištění vysokého stupně dělení, přičemž se zároveň vyznačují dobrou mechanickou pevností, umožňující vysokorychlostní chromatografickou analýzu.

Dalším účelem vynálezu je poskytnout způsob přípravy takovéto zlepšené kolony pro kapalinovou chromatografii.

Jiným účelem vynálezu je poskytnout analytickou metodu, při níž se používá této zlepšené kolony pro kapalinovou chromatografii.

Výše uvedené a další účely, znaky a výhody vynálezu budou zřejmé z dalšího podrobného popisu a připojené definice předmětu vynálezu s přihlédnutím k přiloženým vykresům, kde

- na obr. 1 je znázorněn diagram, v němž jsou na ose X vyneseny hodnoty elučního objemu píku a na ose Y je vynesena koncentrace, kterýžto diagram ukazuje, jak stanovit eluční objem píku V_e (jak bude definován později) a šířku píku W (jak bude definován později), na jejichž základě se vypočte výškový ekvivalent teoretického patra,

- na obr. 2 je znázorněn chromatogram, kde na ose X je vynesena retenční doba a na ose Y absorbance ultrafialového záření, kterýžto chromatogram se vztahuje na směs komerčního thyroglobulinu, albuminu, myoglobinu a fenylalaninu (detekce absorpcí ultrafialového záření při 254 nm); byl získán použitím kolony pro kapalinovou rozdělovací chromatografii, jak popsáno v dále uvedeném příkladu 1,

- na obr. 3 (a) a (b) jsou znázorněny chromatogramy, kde na ose X je vynesena retenční doba a na ose Y absorbance ultrafialového záření; byly získány rozdělením lidského séra (detekce absorpcí ultrafialového záření při 254 nm), jak popsáno v příkladu 3. Obr. 3 (a) se týká normálního lidského séra, obr. 3 (b) se týká séra při selhání ledvin,

- na obr. 4 je znázorněn chromatogram, kde na ose X je vynesena retenční doba a na ose Y absorbance ultrafialového záření; byl získán rozdělením séra při selhání ledvin (detekce absorpcí ultrafialového záření 254 nm), jak je popsáno ve srovnávacím příkladu 1,

- na obr. 5 (a) a (b) jsou znázorněny chromatogramy, kde na ose X je vynesena retenční doba a na ose Y absorbance ultrafialového záření; byly získány rozdělením séra při selhání ledvin (detekce absorpcí ultrafialového záření při 254 nm) v koloně pro kapalinovou rozdělovací chromatografii, jak je popsáno v příkladu 4. Chromatogramem na obr. 5 (a) byl získán při průtokové rychlosti $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, chromatogram na obr. 5 (b) při průtokové rychlosti $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, a

- na obr. 6 je znázorněn chromatogram, kde na ose X je vynesena retenční doba a na ose Y absorbance ultrafialového záření; týká se směsi (detekce absorpcí ultrafialového záření při 254 nm) vzniklé v průběhu výroby chemikálie, určené pro použití v zemědělství, kterýžto chromatogram byl získán pomocí kolony pro kapalinovou rozdělovací chromatografii, jak je popsáno v příkladu 5.

Předmětem vynálezu je tedy kolona pro kapalinovou chromatografii s gelovým ložem z pórovitých gelů obsahujících vinylalkoholové jednotky, jejíž podstata spočívá v tom, že gely mají hmotnostní střední průměr zrn 4 až $20 \mu\text{m}$, přičemž gelové lože má hodnotu plnicího poměru v rozmezí 0,66 až 0,78 a stupeň rovnoměrnosti v rozmezí 2,0 až 4,0 definovaný poměrem

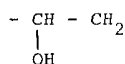
ve kterém

HETP znamená výškový ekvivalent teoretického patra kolony a

D_p znamená hmotnostní střední průměr zrn gelů.

Gely, obsažené jako nosič v kolonách pro kapalinovou rozdělovací chromatografii podle vynálezu, jsou zesítené, pórovité polymerní gely a mají dostatečnou hydrofilnost vyplývající z přítomnosti patřičného množství vinylalkoholových skupin. Jak již bylo uvedeno, rozumí se výrazem "pórovitý" taková struktura gelu, při níž jsou jemné póry rozptýleny v celé hmotě zrna polymerního gelu. Pevné gely takovéto struktury mají v suchém stavu velký specifický povrch, zpravidla v rozmezí 5 až $1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, a při přechodu gelů ze suchého do vlhkého stavu se struktura pórů téměř nemění. Tyto tuhé gely jsou popsány ve zveřejněné britské patentové přihlášce č. 2 061 954A.

Přítomnost vinylalkoholových skupin vzorce



je možno dokázat spektroskopicky z absorpce infračerveného záření. Žádoucí obsah vinylalkoholových skupin v polymeru může kolísat podle druhu rozpuštěné látky, která se má podrobit chromatografické analýze. Například může kolísat mezi hodnotou vhodnou pro sacharidy, které jsou méně adsorbovatelné na gelech, a hodnotou, vhodnou pro proteiny, aminokyseliny apod., které jsou vysoce adsorbovatelné na gelech.

Žádoucí obsah vinylalkoholových skupin, vyjádřený koncentrací hydroxylových skupin, je zpravidla v rozmezí od 3 do 15 mekv./g, s výhodou od 4 do 10 mekv./g. V polymeru mohou být přítomny i jiné iontové hydrofilní skupiny, jako jsou karboxylové skupiny, pokud jen jsou přítomny v takovém množství, které nevyvolá adsorpci rozpuštěných látek nebo které nebude mít jiný nepříznivý účinek. Koncentraci hydroxylových skupin je možno stanovit, tak, že se gel obsahující hydroxylové skupiny nechá reagovat s anhydridem kyseliny octové v pyridinu, načež se zjistí množství anhydridu kyseliny octové, které se spotřebovalo reakcí s hydroxylovými skupinami. Vyjadřuje se hmotnostním množstvím ekvivalentu na 1 g suchého gelu.

Gely, tvořící nosič v koloně podle vynálezu, by měly být zesíťeny v dostatečné míře, aby se udržela jemná pórovitá struktura a aby gely měly dostatečnou pevnost umožňující chromatografii při vysoké průtokové rychlosti elučního činidla. Zesíťující část má mít strukturu odolávající hydrolýze. Výhodné gely podle vynálezu obsahují v zesíťující části éterové vazby, isokyanurátový kruh nebo kyanurátový kruh.

Pokud jde o vlastnosti gelů podle vynálezu, je též důležité regulovat pórovitost nebo zádrž vody (označované v dalším symbolem W_R). Zvýšení hodnoty W_R může být vhodné s hlediska rozdělovací schopnosti, avšak může být doprovázeno snížením mechanické pevnosti a/nebo tvorbou nerovnoměrného gelového lože. Hodnota W_R gelů podle vynálezu by měla být zpravidla v rozmezí od 0,6 do 2,8 ml.g⁻¹, s výhodou od 0,8 do 2,0 ml.g⁻¹, zejména od 1,0 do 1,8 ml.g⁻¹. Použití gelů o takovéto hodnotě W_R usnadňuje vytvoření rovnoměrného gelového lože o vysokém plnicím poměru a zajišťuje pórovitost nutnou pro rozdělování, což přispívá k přípravě vysokorychlostní kolony pro kapalinovou chromatografii, která se vyznačuje vysokou rozdělovací schopností. Hodnotu W_R (viz. Tsuguo a Sadao Mori "Gelová chromatografie" vyd. Kodansha K. K., Japonsko, 1972) je možno určit tak, že se suchý gel o hmotnosti W_1 ponechá v destilované vodě po dostatečně dlouhou dobu k dosažení rovnováhy, načež se odstřeďuje 60 minut při teplotě 10 °C rychlostí 3 000 ot.min.⁻¹ k odstranění vody lnoucí k povrchu gelu. Pak se určí hmotnost W_2 gelu a hodnota W_R gelu se vypočte podle vztahu

$$W_R = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \quad (\text{ml/g}).$$

Zvýšením průměru zrn gelů v koloně pro kapalinovou chromatografii se příznivě zvýší průtoková rychlost elučního činidla, avšak nepříznivě sníží rozdělovací schopnost. Naopak, snížením velikosti zrn gelů příznivě vzroste rozdělovací schopnost avšak nepříznivě poklesne průtoková rychlost elučního činidla. Žádoucí hmotnostní střední průměr zrn gelů, kterých se používá v kolonách podle vynálezu, je v rozmezí od 4 do 20 μm, s výhodou od 6 do 20 μm, zejména od 8 do 15 μm. Podle vynálezu se kolona plní zrny gelů o poměrně malém průměru, aby se dosáhlo co největší rozdělovací schopnosti. Nadto se podle vynálezu dosahuje zvýšení průtokové rychlosti elučního činidla vytvořením vysokého plnicího poměru gelového lože. Z toho vyplývá, že kolona podle vynálezu splňuje oba výše uvedené požadavky, tj. vysokou rozdělovací schopnost a vysokou průtokovou rychlost elučního činidla.

Hmotnostní střední průměr zrn gelů (v dalším označovaný symbolem "Dp") se měří pomocí přístroje "Coulter Counter" (výrobce Coulter Electronics Inc., USA). Hodnota Dp se vypočte podle vztahu

$$D_p = \frac{\sum n d^4}{\sum n d^3},$$

kde

$\underline{d}$ znamená průměr zrna a

$\underline{n}$ znamená četnost výskytu tohoto průměru zrna.

Kromě výše uvedené hodnoty Dp je nutno brát v úvahu distribuci průměrů zrn jakožto parametr ovlivňující přípustnou průtokovou rychlost elučního činidla. Doporučená distribuce průměru zrn, definovaná hmotnostním středním průměrem zrna (Dp) děleným číselným středním průměrem zrna (Dn), má u kolony podle vynálezu mít hodnotu nanejvýš 1,5, s výhodou nanejvýš 1,2. Číselný střední průměr zrna (Dn) se vypočte podle vztahu

$$D_n = \frac{\sum n d}{\sum n},$$

kde

$\underline{n}$ a $\underline{d}$ mají výše uvedený význam.

Relativním kritériem stupně rovnoměrnosti gelového lože je "redukovaný výškový ekvivalent teoretického gelového lože je "redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra", definovaný vztahem $HETP/D_p$. $HETP$ se určí tak, že se chromatografuje za předem stanovených podmínek chromatografování v každé z gelových permeačních chromatografických kolon různých typů, poněvadž hodnoty $HETP$ se liší, když se mění podmínky chromatografování, jakými jsou například rychlost průtoku elučního činidla nebo druh rozpuštěné látky. Výsledkem těchto pokusů bylo zjištění, že použitím běžné plnicí metody za konstantního tlaku vzniká velmi nerovnoměrné gelové lože; při této metodě se suspenze gelu najednou načerpá do kolony pomocí vysokotlakého čerpadla.

V koloně, plněné použitím této běžné plnicí metody, se ta část gelového lože, která se nachází na výtokové straně kapaliny použité pro plnění, vyznačuje velmi vysokou hodnotou redukovaného výškového ekvivalentu teoretického patra ($HETP/D_p$) ve srovnání s jinými částmi gelového lože. Dokud plnicí poměr gelového lože, jak je v dalším definován, nedosáhne hodnoty přibližně 0,6, je možno pomocí běžné plnicí metody, za konstantního tlaku vytvořit poměrně rovnoměrné gelové lože. Když však plnicí poměr gelového lože se dále zvyšuje, stupeň nerovnoměrnosti gelového lože výrazně stoupá.

Pro řešení tohoto problému se zkoumání zaměřilo na studium vlivu jak vlastností gelu, tak techniky přípravy kolony; výsledkem tohoto úsilí bylo vytvoření rovnoměrného gelového lože o vysokém plnicím poměru podle vynálezu. Hodnota redukovaného výškového ekvivalentu teoretického patra ($HETP/D_p$) kolony podle vynálezu je v rozmezí od 2,0 do 4,0, s výhodou od 2,5 do 3,5. Je-li hodnota $HETP/D_p$ větší než 4,0, dělicí schopnost kolony se výrazně snižuje. Je-li hodnota $HETP/D_p$ nižší než 2,0, bude se kolona vyznačovat vysokou dělicí schopností, bude však velmi obtížné ji reprodukovatelně připravit.

Výškový ekvivalent teoretického patra dosahuje různých hodnot podle podmínek při chromatografii, jako jsou například typ použitého elučního činidla a druh rozpuštěné látky. Výškový ekvivalent teoretického patra, jak se toho pojmu zde používá, se stanoví tak, že se chromatografuje vodný roztok etylenglykolu o hmotnostní koncentraci 1 % za použití destilované vody jakožto elučního činidla při teplotě 25 °C a při průtokové rychlosti elučního činidla 1,5 m.h⁻¹ (povrchová rychlost v koloně), ze získaného chromatogramu, znázorněného na obr. 1 (refraktometrická detekce) se odečte eluční objem píku (V_e) a šířka píku (W) (viz Tsuguo Takeuchi a Sadao Mori "Gelová chromatografie", vyd. Kodansha K. K., Japonsko 1972), a hodnota $HETP$ se vypočte podle vztahu:

$$HETP = L (W/4 V_e)^2$$

kde

L znamená délku řetězce a

W a V_e mají výše uvedený význam.

Plnicí poměr gelového lože v koloně podle vynálezu se má regulovat s ohledem na zádrž vody (W_R). Tím je umožněno dosáhnout vysokého plnicího poměru, aniž by to ovlivnilo redukovaný výškový ekvivalent teoretického patra ($HETP/D_p$). Pro kolonu plněnou gelovým nosičem platí, jak známo, vztah

$$V_t = V_o + (V_i + V_g) ,$$

kde

V_t znamená celkový objem kolony,

V_g znamená objem gelového substrátu,

V_i znamená vnitřní objem gelových zrn a

V_o znamená objem mezer mezi gelovými zrny.

Plnicí poměr (v dalším označovaný symbolem P_d) kolony podle vynálezu je vyjádřen vztahem

$$P_d = 1 - (V_o/V_t) ,$$

kde

V_o a V_t mají výše uvedený význam.

Pro výpočet V_o se vynásobením hmotnosti gelu (a) v suchém stavu hodnotou W_R získá V_i , a hodnota V_g se vypočte ze vztahu

$$V_g = a/d ,$$

kde

V_g a a má výše uvedený význam a

d znamená hustotu gelu.

V_t (celkový objem kolony) se určí přímo z konstrukce kolony. U kolony podle vynálezu je žádoucí, aby hodnota poměru (V_i/V_o) byla v rozmezí od 1,0 do 2,0, s výhodou od 1,2 do 1,8, aby se tím dosáhlo harmonické kombinace zádrže vody W_R a plnicího poměru P_d . U kolony podle vynálezu je důležité pro dosažení výrazného zlepšení rychlosti chromatografování, dělicí účinnosti a životnosti, aby hodnota plnicího poměru (P_d) byla v rozmezí od 0,66 do 0,78, s výhodou od 0,68 do 0,74, když hodnota poměru V_i/V_o je v rozmezí od 1,2 do 1,8. Pro stanovení velikosti objemu prázdného prostoru mezi gelovými zrny (V_o) je známa metoda, při níž se v plněné koloně vyvíjí polymer, mající větší molekulovou hmotnost, než je vylučovací mez molekulové hmotnosti a V_o se získá jako objem píku eluátu, zaznamenaný na chromatogramu. Tato známá metoda však nevyhovuje, protože při ní dochází k významným chybám při měření vlivem distribuce molekulových hmotností vyvinutého polymeru a vlivem struktury gelového lože.

Kolona podle vynálezu bude nyní podrobně popsána. Gely, použité jako nosič v koloně podle vynálezu, se mohou odvozovat od vinylkarboxylátového polymeru nebo kopolymeru. Například se tyto gely získají tím, že se podrobí přeesterifikování nebo zmydlovací reakci v rozpouštědle, které nerozpouští polyvinylalkohol, pórovitý polymer nebo kopolymer z jediného nebo několika monomerů obsahujících alespoň dvě vinylkarboxylátové skupiny nebo pórovitý kopolymer získaný kopolymerací uvedeného monomeru s monomerem obsahujícím jedinou vinylkarboxylátovou skupinu, načež se takto získaná, pórovitá polyvinylalkoholová zrna, která si v podstatě zachovávají původní jemně pórovitou strukturu, nechají reagovat s příčně zesíťujícím činidlem.

Například se divynyladipát polymeruje ve vodné suspenzi v přítomnosti radikálového iniciátoru spolu s butylacetátem, vytvářejícím pórovitost vzniklého polymeru. Vzniklý polymer se přemění v polyvinylalkoholová zrna pomocí reakce v metanolu, čímž se vytvoří hydroxylové skupiny. Pak se zrna polymeru podrobí zesíťující reakci s epichlorhydridem ve směsi acetonu s dimetylsulfoxidem za vzniku požadovaných gelů. Podrobnosti o gelech, získaných výše popsanými postupy, jsou popsány ve zveřejněné japonské patentové přihlášce č. 64 657/1981.

Alternativně je možno požadované gely, které jsou určeny k použití v kolonách podle vynálezu, získat kopolymerováním vinylkarboxylátového monomeru se zesítitelným monomerem a následným přeesterifikováním apod. Popřípadě je možno získaný polymer dodatečně nechat reagovat s epichlorhydrinem nebo jiným síťujícím činidlem pro získání požadovaných gelů. Jako příklady zesítitelného monomeru, obsahujícího alespoň dvě etylenicky nenasyčené skupiny, je možno uvést monomer mající isokyanurátový kruh, jako je triallylisokyanurát, nebo monomer mající kyanurátový kruh, jako je triallylkyanurát, nebo divinyléter, jako je dietylen-glykoldivinyléter. Z výše uvedených monomerů je nejvýhodnější triallylisokyanurát, poněvadž snadno kopolymeruje s vinylkarboxylátem a vzniklý gel má vynikající mechanickou pevnost.

U gelu z triallylisokyanurátu lze snadno regulovat průměr pórů a pórovitost. Podrobnosti o takovýchto gelech způsobech k jejich přípravě jsou uvedeny v japonských patentech č.

(japonské patentové přihlášky č. 85 243/1980 a 183 703/1980). Požadované gely je možno například získat suspenzním kopolymerováním triallylisokyanurátu s vinylacetátem v příslušném molárním poměru, takže stupeň zesítení může mít předem určenou hodnotu v rozmezí od 0,20 do 0,40, v přítomnosti butylacetátu, který způsobí, že vzniklý polymer je pórovitý, a radikálového iniciátoru, načež se takto získaný pórovitý kopolymer podrobí přeesterifikační nebo zmýdelňovací reakci v metanolovém roztoku hydroxidu sodného. Jakýkoliv požadovaný obsah vinylalkoholových skupin v polymeru je možno snadno docílit řízením přeměny při přeesterifikační nebo zmýdelňovací reakci. Výše uvedený zmíněný stupeň zesítení (X) je možno vypočítat podle vztahu

$$X = \frac{\left(\frac{W_2}{M_2} \times 3\right)}{\left(\frac{W_1}{M_1} + \frac{W_2}{M_2} \times 3\right)}$$

kde

- M_1 znamená molekulovou hmotnost vinylkarboxylátu,
 M_2 znamená molekulovou hmotnost triallylisokyanurátu,
 W_1 znamená hmotnostní množství vinylkarboxylátu použitého pro polymeraci, a
 W_2 znamená hmotnostní množství triallylisokyanurátu použitého pro polymeraci.

Dalším předmětem vynálezu je způsob přípravy kolony pro kapalinovou chromatografii s gelovým ložem z pórovitých gelů obsahujících vinylalkoholové jednotky, při němž se do plnicího zařízení, odpojitelně spojeného s kolonou, která má na svém dolním konci první koncovku opatřenou filtrem, vnese suspenze pórovitých gelů obsahujících vinylalkoholové jednotky, načež se plnicí zařízení neprodyšně uzavře s výjimkou výstupu pro suspenzi a vstupu pro plnicí kapalinu, pak se plnicí kapalinou, vedenou plnicím zařízením a kolonou, převede do kolony suspenze gelů za současného odvádění kapaliny ze suspenze jakož i plnicí kapaliny přes filtr, upravený v první koncovce na dolním konci kolony, čímž se v koloně vytvoří gelové lože, poté se stupňovitě nebo spojitě zvyšuje průtoková rychlost plnicí kapaliny, načež se kolona odpojí od plnicího zařízení a ke koloně se na jejím horním konci připojí druhá koncovka opatřena filtrem, čímž v koloně zadrží vytvořené gelové lože, přičež podstata způsobu spočívá v tom, že plnicí kapalina, použitá k převedení suspenze gelů do kolony, se v objemovém množství rovnajícím se jednonásobnému až třistanásobku vnitřního objemu kolony vede kolonou průtokovou rychlostí 0,2 až 1,5 m.h⁻¹ od začátku přivádění plnicí kapaliny, přičemž při stupňovitě nebo spojitě zvyšování průtokové rychlosti plnicí kapaliny činí maximální zvýšení tlaku a průměrné zvýšení tlaku na 1 metr gelového lože, vyvozované proudící plnicí kapalinou na vstupu plnicího zařízení, nanejvýš 6 MPa.min⁻¹ u maximálního zvýšení tlaku a 0,2 až 3 MPa.h⁻¹ u průměrného zvýšení tlaku na 1 metr gelového lože.

Plnění suspenze gelu do kolony se může provádět pomocí čerpadla obecně známým postupem pro mokré plnění (viz. Hiroyuki Hatamo, a kol., "Experimentální vysokorychlostní kapalinová chromatografie" ("Experimental High-Speed Liquid Chromatography"), vyd. Kagaku Doin, Japonsko, 1977). Při způsobu podle vynálezu je nanejvýš důležité, aby nedošlo k náhlé změně průtokové rychlosti nebo tlaku na gelové lože během plnicího postupu. Při způsobu podle vynálezu je možno použít jakéhokoli, pro tento účel běžně používaného plnicího zařízení.

Při praktickém provádění způsobu podle vynálezu, se plnicí zařízení pro plnění suspenze gelu do kolony zpravidla napojí na jeden konec kolony. Na plnicí zařízení je rovněž napojena trubka pro přepravu kapaliny z odděleně instalovaného čerpadla. Horní část plnicího zařízení je opatřena uzavíratelným zařízením, které je schopno vydržet tlakové zatížení během doby plnění po nalití suspenze gelu do plnicího zařízení. Na tom konci kolony, z něhož kapalina odchází, je nasazena první koncovka opatřená filtrem, který propouští kapalinu, avšak zabraňuje průchodu zrn gelu.

Podle potřeby je možno nasadit na hlavu a/nebo spodek hlavní kolony pomocnou kolonu (obvykle označovanou jako "předběžná kolona"), mající stejný vnitřní průměr jako hlavní kolona. Účelem použití této pomocné kolony nebo kolon je, zlepšit rovnoměrnost gelového lože odstraněním zřetelně nerovnoměrných částí gelového lože. Nerovnoměrné části gelového lože mají sklon vznikat na obou koncích kolony, takže je snadno možno tyto nerovnoměrné části gelového lože přemístit do pomocné kolony. Proto, když se pomocná kolona obsahující přemístěné nerovnoměrné části gelového lože, odstraní, odstraní se tím snadno a dokonale nerovnoměrné části gelového lože společně s pomocnou kolonou.

Suspenze gelu, kterou se naplní kolona podle vynálezu, se s výhodou může připravit smísením gelů v množství, odpovídajícím 1,1 až 4,0 násobku onoho množství gelů, které se má naplnit do kolony, s disperzním prostředím, kterým je totéž rozpouštědlo jako plnicí kapaliny, k vytvoření sloupce gelů. Objemová koncentrace suspenze je vhodně v rozmezí 3 až asi 30 %. Těsně před vlitím gelové suspenze do plnicího zařízení je výhodné gely dokonale rozptýlit v disperzním prostředí pomocí ultrazvukových vln nebo jiným vhodným způsobem. Po převedení gelové suspenze do plnicího zařízení se celé plnicí zařízení uvede do stavu, aby bylo schopné snést tlakové zatížení během doby plnění.

Ona část způsobu přípravy kolony pro kapalinovou chromatografii, která spočívá v převedení suspenze gelů do kolony plnicí kapalinou, vedenou plnicím zařízením a kolonou za současného odvádění kapaliny ze suspenze jakož i plnicí kapaliny přes filtr upravený v první koncovce na dolním konci kolony, slouží pro přeměnu gelů v podobě suspenze na gelové lože. Tento postup představuje zlepšení oproti dosavadnímu stavu techniky.

Jak již bylo výše uvedeno, spočívá v tom, že se plnicí kapalina o objemu, rovnajícímu se jednonásobku až třistanásobku vnitřního objemu kolony, vede kolonou průtokovou rychlostí 0,2 až 1,5 m.h⁻¹ od začátku přivádění plnicí kapaliny, aby se zabránilo vytvoření nerovnoměrného gelového lože v počátečním stádiu plnicího postupu. Jestliže průtoková rychlost plnicí kapaliny je nižší než 0,2 m/h, nejen že se snižuje účinnost plnicí operace, avšak vznikne gelové lože o příliš nízkém plnicím poměru, což má nepříznivý vliv na stabilitu jakosti, potřebnou pro další postup.

Jestliže průtoková rychlost plnicí kapaliny přesahuje 1,5 m/h, vzniká nerovnoměrné gelové lože, jak bylo výše uvedeno. Jestliže celkový objem prošlé plnicí kapaliny je menší než vnitřní objem kolony, vzniká gelové lože nedostatečné délky a tudíž v následujícím stupni 3) dochází k nežádoucímu rychlému pohybu zbývajících suspenze gelu do kolony, což má za následek, že tvořící se gelové lože je nerovnoměrné. Jestliže celkový objem prošlé plnicí kapaliny přesahuje třistanásobek vnitřního objemu kolony, stává se účinnost plnicí operace nežádoucně nízkou.

Hlavním účelem té části způsobu přípravy kolony podle vynálezu, v níž se stupňovitě nebo spojitě zvyšuje průtoková rychlost plnicí kapaliny, je vytvořit vysoce účinnou kolonu zvýšením plnicího poměru za současného zachování rovnoměrnosti gelového lože. V této části způsobu se průtoková rychlost plnicí kapaliny zvyšuje stupňovitě nebo plynule. K dosažení zmíněného účelu činí, jak již bylo výše uvedeno, maximální zvýšení tlaku a průměrné zvýšení tlaku na 1 metr gelového lože, vyvozovaného proudící plnicí kapalinou na vstupu plnicího zařízení, nanejvýš 6 MPa.min⁻¹ u maximálního zvýšení tlaku a 0,2 až 8 MPa.h⁻¹ u průměrného zvýšení tlaku na 1 metr gelového lože.

Jestliže maximální zvýšení tlaku na 1 m délky gelového lože přesáhne 6 MPa.min⁻¹, je pravděpodobné, že bude narušena rovnoměrnost gelového lože. Jestliže průměrný vzrůst tlaku na 1 m délky gelového lože je nižší než 0,2 MPa, snižuje se účinnost plnicí operace. Jestliže průměrné zvýšení tlaku přesáhne 8 MPa, je nevýhodné vytvoření nerovnoměrného gelového lože pravděpodobné. Operace zvyšování tlaku se přeruší, jakmile plnicí poměr gelového lože dosáhne požadované hodnoty.

Podle potřeby se pak nechá po několik hodin kolonou procházet plnicí kapalina průtokovou rychlostí, která není vyšší než maximální průtoková rychlost, které bylo dosaženo během doby, kdy plnicí kapalina procházela kolonou k dosažení požadovaného plnicího poměru, a při níž nedochází k vracení části gelového lože z kolony zpět do plnicího zařízení (obvykle je tato průtoková rychlost nanejvýš poloviční oproti maximální průtokové rychlosti), aby se vytvořené gelové lože stabilizovalo. Pak se hlavní kolona odpojí od plnicího zařízení a otevřený konec kolony se uzavře druhou koncovkou mající filtr s póry o průměru v rozmezí 2 až 10 μm .

Okamžik, kdy se má postup zvyšování tlaku ukončit, se snadno zjistí vzhledem k výše uvedenému předem získanému vztahu mezi maximálním tlakem nebo průtokovou rychlostí a plnicím poměrem. Vztah mezi maximálním tlakem nebo průtokovou rychlostí a plnicím poměrem je možno zjistit metodou, při níž se nejprve připraví řada plněných kolon tím, že se kolony plní při různém maximálním tlaku nebo při různé maximální průtokové rychlosti a pak se výše popsanou metodou měří plnicí poměry těchto kolon. Nastavení plnicího poměru kolony podle vynálezu je možno snadno dosáhnout tím, že se plnění kolony provede za maximálního tlaku nebo průtokové rychlosti, jež odpovídají předem určenému plnicímu poměru podle výše získaného vztahu.

Jako plnicí kapaliny je možno použít vody nebo různých vodných roztoků. Doporučuje se však používat roztoků pufrů nebo vodných roztoků organických a anorganických solí v koncentraci nepřesahující 1 mol.litr⁻¹, poněvadž je nutno se vyhnout podmínkám, které by mohly vyvolat nadměrné vzdutí gelů ve srovnání se vzdouváním gelů obvyklým při chromatografii.

Výhodnými rozměry kolony podle vynálezu jsou: vnitřní průměr v rozmezí 4 až 50 mm a délka 100 až 600 mm. Je možno použít trubíc z nerezavějící oceli, skla, polyetylenu nebo jiného materiálu, avšak při volbě materiálu trubky je třeba přihlídnout ke druhu elučního činidla a k tlaku, použitému během doby plnění gelu a při chromatografování.

Při používání kolony podle vynálezu pro praktické provádění chromatografování je jako elučního činidla možno použít vody, různých roztoků pufrů a různých vodných roztoků a/nebo anorganických solí. Přesto však je kolony možno výhodně použít nejen pro provádění běžné rozdělovací chromatografie, při níž se používá polárního rozpouštědla, ale i pro kombinaci gelové permeační chromatografie s rozdělovací chromatografií, při níž se používá výše uvedených vodných roztoků s přísadkou vhodného množství organického rozpouštědla.

Dále se vynález týká ještě metody analyzování složek krve, kterážto metoda spočívá v tom, že se vyvine chromatogram krevního séra na koloně pro kapalinovou chromatografii zahrnující gelové lože z pórovitých gelů obsahujících vinylalkoholové jednotky, přičemž gely mají hmotnostní střední průměr zrn v rozmezí 4 až 20 μm a gelové lože má plnicí poměr 0,66 až 0,78 a stupeň rovnoměrnosti v rozmezí 2,0 až 4,0, který je definován výrazem

$$\text{HETP/Dp},$$

kde

HETP znamená výškový ekvivalent teoretického patra kolony a

Dp znamená hmotnostní střední průměr zrn gelu.

Kolona podle vynálezu je vysoce účinnou kolonou pro kapalinovou chromatografii, schopnou účinně rozdělovat různé iontové a neiontové látky přítomné ve vodě nebo vodný roztok organických a/nebo anorganických solí. Kolona podle vynálezu pro kapalinovou chromatografii je obzvláště vhodná pro rozdělování nebo pro rozdělování a identifikaci složek krve, kterýžto účel již delší dobu vyžadoval řešení. Když se provádí rozdělování složek krve nebo rozdělování a identifikace složek krve způsobem podle vynálezu, je výhodné, jestliže se pro rozdělení rozpuštěných látek majících molekulovou hmotnost, odpovídající molekulové

hmotnosti albuminu, nebo molekulovou hmotnost vyšší než je molekulová hmotnost albuminu, použije kolony obsahující gely o exkluzní mezní hodnotě molekulové hmotnosti (vztaheno na dextran) alespoň 100 000, pro rozdělení rozpuštěných látek o molekulové hmotnosti, odpovídající molekulové hmotnosti albuminu, nebo o molekulové hmotnosti 100 až molekulová hmotnost albuminu se použije kolony obsahující gely o exkluzní mezní hodnotě molekulové hmotnosti (vztaheno na dextran) 100 000 nebo méně, jakožto elučního činidla se použije různých vodných roztoků organických a/nebo anorganických solí nebo jejich směsí v koncentraci od 0,05 do 0,5 molu.litr⁻¹ a jakožto detektoru se použije ultrafialového spektrofotometru.

Jak již bylo výše uvedeno, podařilo se kolonou podle vynálezu a způsobem podle vynálezu pro její přípravu společně vyřešit stávající problémy v této oblasti. To má pro praktické použití velké výhody. Charakteristickým význakem vynálezu je, že gely, používané jako náplň do kolony podle vynálezu, obsahují neiontové vinylalkoholové skupiny v kostře polymeru, takže adsorptivnost rozpuštěných látek ve vodném roztoku na gely je nízká.

Z toho plyne, že bylo umožněno provádět přímou analýzu krevního séra apod., která byla až dosud obtížná pomocí rozdělovací chromatografie nebo adsorpční chromatografie, takže je možno získat údaje týkající se jednotlivých složek krve, často zahrnujících údaje, umožňující stanovit jejich molekulovou hmotnost. Podle vynálezu je možno připravit kolonu obsahující rovnoměrné gelové lože o vysokém plnicím poměru způsobem, při němž je při vytváření kolony nutno se vyhnout náhlé změně průtokové rychlosti nebo tlaku na gelové lože během plnicího postupu, čímž se umožní zároveň zlepšit rychlost eluce a prodloužit životnost kolony, čehož nebylo možno dosáhnout pomocí obvyklých gelových permeačních kolon s vodným rozpouštědlem. Dalším charakteristickým znakem je, že u kolon podle vynálezu se používá gelů o malém průměru zrn, které se proto vyznačují kromě výše uvedených výhod zvýšenou rozdělovací účinností.

Vynález je blíže objasněn dále uvedenými příklady, které však jeho rozsah nikterak neomezuji.

P ř í k l a d 1

Směs 80 g divinyladipátu (o čistotě vyšší než 99 %), 200 g n-butylnacetátu, 6,4 g polyvinylacetátu (o polymeračním stupni 500) a 1 g 2,2'-azobisisobutyronitrilu se při teplotě 70 °C polymeruje v suspenzi 20 hodin v 1,2 l vody obsahující polyvinylalkohol v hmotnostním množství 1 % jakožto stabilizátor suspenze, čímž se získá poly(divinyladipát). Po skončení polymerace se vzniklá zrna izolují odfiltrováním, promyjí nejprve vodou, pak metanolem, načež se vysuší.

Suchá zrna se pak nasypou do baňky s kulovým dnem o objemu 2 litrů spolu s 1 litrem metanolu, obsahujícím 32 g hydroxidu sodného, a vzniklá směs se zahřívá 24 hodiny za míchání při teplotě 40 °C. Po skončení reakce se vzniklá zrna odfiltrují a promyjí metanolem, pak acetonem.

Takto získaná polyvinylalkoholová zrna se vnesou do baňky s kulovým dnem spolu s kapalnou směsí, sestávající z 350 ml dimetylsulfoxidu, 350 ml acetonu, 37 g opichlorhydrinu a 16 g hydroxidu sodného, a vzniklá směs se zahřívá 24 hodiny za míchání při teplotě 50 °C. Po skončení reakce se vzniklá zrna odfiltrují a důkladně promyjí nejprve horkou vodou, pak acetonem. Tento reakční, filtrační a promývací postup se ještě jednou opakuje způsobem, jak výše popsáno.

Získaná zrna se pak 24 hodiny za míchání zahřívají při teplotě 80 °C spolu s vodným 1 N roztokem hydroxidu sodného, načež se pak zrna důkladně promyjí vodou. Střední průměr takto získaných zrn se stanoví pomocí přístroje "Coulter Counter Model ZB" (výrobce Coulter Electronics Inc.; činí 12,3 μm.

Výše v popisu popsanou metodou se určí hodnota W_R jako $1,75 \text{ ml.g}^{-1}$. Část získaných gelů se nechá reagovat v pyridinovém rozpouštědle při teplotě 90°C s anhydridem kyseliny octové a z množství zreagovaného anhydridu kyseliny octové se vypočte koncentrace (q_{OH}) skupin, která činí $9,1 \text{ mekv.g}^{-1}$.

10 g takto získaných vysušených zrn se ponoří přes noc do 100 ml destilované vody a nechá nabobtnat. K jednomu konci kolony o vnitřním průměru 7,5 mm a o délce 500 mm se připojí první koncovka opatřená filtrem s póry o průměru $5 \mu\text{m}$ a druhý otevřený konec kolony se spojí s plnicím zařízením o vnitřním objemu 100 ml. Plnicí zařízením je ve své horní části opatřeno vstupem pro suspenzi gelu, vstupem pro plnicí kapalinu, který je spojen s plnicím čerpadlem trubkou z nerezavějící oceli, a manometrem. Po nalití suspenze gelu do plnicího zařízení je toto možno uzavřít. Výše uvedená suspenze nabobtnalých zrn gelu se podrobí po dobu 10 minut dispergování pomocí ultrazvukového čistícího zařízení "Branson B-12" (výrobce Branson Cleaning Equipment Company, USA) a vlije do plnicího zařízení vstupem pro suspenzi gelu.

Pak se plnicí zařízením uzavře. Poté se plnicím zařízením a kolonou nechá procházet po dobu 60 minut destilovaná voda (plnicí kapalina) průtokovou rychlostí $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$. [LV (lineární rychlost): $1,36 \text{ m.h}^{-1}$]. Nato se průtoková rychlost destilované vody zvyšuje při průměrném růstu tlaku 2 MPa.h^{-1} na 1 metr gelového lože a při maximálním růstu tlaku 2 MPa.min^{-1} na 1 metr gelového lože tak dlouho, až manometr ukáže přetlak $8,5 \text{ MPa}$. Po další 3 hodiny se nechá protékat destilovaná voda, přičemž přetlak se udržuje na $8,5 \text{ MPa}$ regulováním množství destilované vody dodávané čerpadlem.

Po zastavení průtoku destilované vody se kolona odpojí od plnicího zařízení a na otevřený konec kolony se nasadí druhá koncovka, mající stejnou strukturu jako první koncovka. Tím je plnění kolony skončeno. Vyrobená kolona má hodnotu HETP/Dp 3,3, hodnotu V_i/V_o 1,54 a exkluzivní mezní hodnotu molekulové hmotnosti (vztaženo na dextran) přibližně 2 000 000.

Na koloně, připravené jak výše popsáno, se chromatografuje vodný roztok komerčního thyroglobulinu, albuminu, myoglobulinu a fenylalaninu, získaný chromatogram se vyvine a eluuje pufrovým roztokem kyseliny fosforečné o molární koncentraci $0,05 \text{ mol.litr}^{-1}$ a o pH 6,7, který obsahuje síran sodný v koncentraci $0,2 \text{ mol.litr}^{-1}$ při průtokové rychlosti $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$. Jak je patrné z chromatogramu na obr. 2, je jednotlivé složky možno rozdělit velmi účinně, přičemž se získají postupně v pořadí svých molekulových hmotností. Doba potřebná pro analýzu je pouze 20 minut.

(T - thyroglobulin, A - albumin, M - myoglobin, P - fenylalanin)

P ř í k l a d 2

Do válcové nádoby o objemu 2 litrů se vnese kapalná směs, sestávající ze 100 g vinylacetátu, 32,2 g triallylisokyanurátu (číslo X: 0,25), 100 g n-butylacetátu a 3,3 g 2,2'-azobisisobutyronitrilu spolu s 0,8 litru vody, obsahující polyvinylalkohol v hmotnostní koncentraci 1 % jakožto stabilizátor suspenze. Výsledná směs se míchá, čímž se získá stabilní suspenze. Pak se tato suspenze zahřívá 18 hodin při teplotě 65°C ; v zahřívání se pak pokračuje za míchání při teplotě 75°C po dobu 5 hodin, přičemž proběhne polymerace v suspenzi. Po skončení polymerace se vzniklá zrna odfiltrují, promyjí nejprve vodou, pak metanolem, načež se vysuší.

Vysušená zrna se vnesou do baňky s kulovitým dnem o objemu 3 litrů spolu se 2 litry metanolu, obsahujícího 47 g hydroxidu sodného, a vzniklá směs se zahřívá za míchání při teplotě 15°C po dobu 20 hodin, čímž proběhne přeesterifikační reakce. Sedimentací ve vodě se získají gely (D_p : $9,8 \mu\text{m}$, D_p/D_n : 1,28). Tyto gely mají koncentraci hydroxylových skupin $7,3 \text{ mekv.g}^{-1}$ a hodnotu W_R $1,58 \text{ ml.g}^{-1}$.

Pak se ze získaných gelů naváží tři dávky po 7 g (v suchém stavu). Každá z těchto tří dávek gelů se ponoří do 100 ml vodného roztoku síranu sodného o molární koncentraci $0,2 \text{ mol.litr}^{-1}$, kde se ponechá přes noc, načež se 5 minut disperguje pomocí ultrazvukového homogenizátoru typu US-300 (výrobce Nippon Seiki Seisakusho KK, Japonsko). Každá z výsledných tří gelových suspenzí se pak vlije do plnicího zařízení, napojeného na předběžnou kolonu o délce 100 mm a o vnitřním průměru 7,5 mm, která je nasazena na jeden konec hlavní kolony z nerezavějící oceli o vnitřním průměru 7,5 mm a o délce 250 mm; hlavní kolona je na svém druhém konci opatřena první koncovkou s filtrem, tak jako v příkladu 1.

Jak předběžná kolona, tak hlavní kolona byly předem naplněny vodným roztokem síranu sodného o molární koncentraci $0,2 \text{ mol.litr}^{-1}$. Po uzavření plnicího zařízení se tímto zařízením, předběžnou kolonou a hlavní kolonou nechá po dobu 60 minut procházet vodný roztok síranu sodného (plnicí kapalina) o molární koncentraci $0,2 \text{ mol.litr}^{-1}$, dodávaný čerpadlem. Během těchto 60 minut vstupuje suspenze gelu do hlavní kolony, přičemž z ní první koncovkou nasazenou na dolním konci hlavní kolony vytéká vodný roztok síranu sodného o molární koncentraci $0,2 \text{ mol.litr}^{-1}$, obsažený jednak v suspenzi gelu, jednak použitý jako plnicí kapalina; tím se v hlavní koloně vytváří gelové lože.

Pak se průtoková rychlost vodného roztoku síranu sodného o molární koncentraci $0,2 \text{ mol.litr}^{-1}$ postupně zvyšuje při průměrném růstu tlaku $0,5 \text{ MPa.h}^{-1}$ na 1 metr gelového lože a při maximálním růstu tlaku $0,5 \text{ MPa.min}^{-1}$ na 1 metr gelového lože tak dlouho, až přetlak, indikovaný manometrem jako v příkladu 1, dosáhne 2,6, 4,6 resp. 5,7 MPa. Plnicí kapalina se nechá procházet kolonami po další 2 hodiny, přičemž se udržuje uvedený přetlak. Pak se plnicí zařízení a předběžná kolona odpojí a na každou z hlavních kolon se nasadí druhá koncovka k zadržení vzniklého gelového lože.

Tyto kolony se podrobí zkouškám ke zjištění jejich charakteristických vlastností a praktické použitelnosti. Výsledky těchto zkoušek jsou příznivé. Charakteristické vlastnosti těchto kolon podle vynálezu jsou uvedeny v tabulce I.

T a b u l k a I

Kolona č.	HETP/Dp	V_i/V_o	Pd
1	2,95	1,34	0,67
2	2,30	1,61	0,71
3	3,34	1,90	0,74

Všechny tyto kolony mají vylučovací mez molekulové hmotnosti (vztaženo na dextran) přibližně 30 000.

Na koloně č. 1 se vyvine směs komerčního gama-globulinu, albuminu z krevního séra hovězího skotu, albumin z vaječného bílku a myoglobulinu, a eluce se provede za použití vodného roztoku chloridu sodného o molární koncentraci $0,3 \text{ mol.litr}^{-1}$ fosforečnanu sodného o molární koncentraci $0,1 \text{ mol.litr}^{-1}$ o pH 7,0 jakožto elučního činidla. Každá z uvedených složek se získá téměř ve 100% množství. Všechny tyto bílkoviny se získají v pořadí svých molekulových hmotností.

Na koloně č. 2 se vyvine 100 mikrolitrů (1 mg) vodného roztoku etylenglykolu o hmotnostní koncentraci 1 % a eluce se provádí při teplotě 15°C destilovanou vodou při průtokové rychlosti $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$. Ze získaného chromatogramu se určí hodnota HETP. Tento postup se 800krát opakuje. Stanovené hodnoty HETP jsou v rozmezí 24,5 až $25,6 \mu\text{m}$. Neměnnost hodnot HETP může být považována za důkaz prodloužené životnosti kolony a za důkaz, že při dlouhodobém používání kolony nedochází k nijakému snížení účinnosti kolony.

Kolonou č. 3 se nepřetržitě provádí vodný roztok síranu sodného o molární koncentraci $0,2 \text{ mol.litr}^{-1}$ při průtokové rychlosti $1,2 \text{ ml.min}^{-1}$ po dobu 240 hodin; po uplynutí této doby se zjistí příznivá hodnota HETP $32,9 \mu\text{m}$ ($\text{HETP}/D_p = 3,36$), přičemž nelze zjistit žádné snížení účinnosti kolony.

P ř í k l a d 3

Na spojených kolonách č. 1 a č. 2, připravených postupem podle příkladu 2, se vyvíjí lidské krevní sérum, a eluuje při pH 7,0 vodným roztokem chloridu sodného o molární koncentraci $0,3 \text{ mol.litr}^{-1}$ a fosforečnanu sodného o molární koncentraci $0,1 \text{ mol.litr}^{-1}$ při průtokové rychlosti $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ za použití ultrafialového spektrofotometru jakožto detektoru při vlnové délce 250 nm. Na obr. 3(a) je znázorněn chromatogram normálního lidského krevního séra, získaný výše popsáním postupem, a na obr. 3(b) je znázorněn chromatogram séra po selhání ledvin.

Na tomtéž výkresu jsou uvedeny dva chromatogramy, získané při různé sensitivitě detektoru, na nichž jsou společně naznačeny větší a menší složky séra. Z těchto chromatogramů je patrné, že kolona podle vynálezu pro kapalinovou chromatografii se vyznačuje vynikající rozdělovací účinností a že je obzvláště vhodná pro rozdělování směsí, obsahujících mnoho druhů rozpuštěných látek, jako je například krev.

S r o v n á v a c í p ř í k l a d 1

Z gelů, získaných podle příkladu 2, se naváží 10 g gelů, které se nechají botnat, a dispergovat postupy, popsanými v příkladu 2, načež se vnesou do plnicího zařízení spojeného s kolonou o vnitřním průměru 7,5 mm a o délce 500 mm. Suspenze gelu se z plnicího zařízení přenesou do kolony, přičemž se tlak na vstupu do kolony udržuje na 7,0 MPa. Plnicí kapalina se provádí kolonou po dobu 4 hodiny, přičemž se udržuje uvedený přetlak. Pak se na naplněnou kolonu nasadí druhá koncovka k zadržení vytvořeného gelového lože. Získaná kolona má hodnotu HETP/D_p 7,1. Na této koloně se chromatografuje též vzorek séra (pacienta, trpícího selháním ledvin) jako v příkladu 3 a za týchž podmínek, jakých bylo použito v příkladu 3. Získaný chromatogram je znázorněn na obr. 4. Z porovnání chromatogramů na obr. 4 a obr. 3(b) je patrné, že plněná kolona podle vynálezu se vyznačuje mnohem vyšší rozdělovací účinností než kolona, získaná v tomto srovnávacím příkladu 1.

P ř í k l a d 4

Do baňky se vnese směs, sestávající ze 100 g vinylacetátu, 41,4 g triallylisokyanurátu, 70 g n-butylacetátu a 3,3 g 2,2'-azobisisobutyronitrilu. Polymerace v suspenzi, přeeretifikování a sedimentace produktu se provedou prakticky stejně jako v příkladu 2, čímž se získají gely, mající hodnotu D_p $9,4 \mu\text{m}$. Tyto gely se vyznačují koncentrací hydroxylových skupin $7,1 \text{ mekv.g}^{-1}$ a hodnotou W_R $1,20 \text{ ml.g}^{-1}$. Z těchto gelů se odváží 13 g; tato dávka se vnese do kolony z nerezavějící oceli o vnitřním průměru 7,5 mm a o délce 500 mm též postupem jako v příkladu 1, čímž se získá plněná kolona, vyznačující se hodnotou HETP/D_p 2,75 a hodnotou V_i/V_o 1,55.

Za použití této kolony se chromatografuje sérum pacienta, trpícího selháním ledvin prakticky, též postupem jako v příkladu 2, jen se analýza provádí při větší průtokové rychlosti elučního činidla. Obr. 5(a) znázorňuje chromatogram, získaný při průtokové rychlosti elučního činidla $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ zatímco obr. 5(b) znázorňuje chromatogram, získaný při průtokové rychlosti elučního činidla $2,0 \text{ ml.min}^{-1}$. Z chromatogramu na obr. 5(b), získaného při tak vysoké průtokové rychlosti elučního činidla jako je $2,0 \text{ ml.min}^{-1}$, což odpovídá lineární rychlosti $2,72 \text{ m.h}^{-1}$, vyplývá téměř stejné vysoké rozdělení jako na chromatogramu obr. 5(a), získanému při průtokové rychlosti elučního činidla $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$.

Z toho je patrné, že plněná kolona podle vynálezu umožňuje vysokorychlostní chromatografii s vysokou rozdělovací účinností. Kromě toho si kolona i po chromatografování 150 vzorků krevního séra při průtokové rychlosti $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, podržuje původní rozdělovací schopnost a účinnost, kterou se vyznačuje ihned po své přípravě. Toto dokládá prodlouženou životnost plněné kolony podle vynálezu.

P ř í k l a d 5

Směs, sestávající ze 100 g vinylacetátu, 32,2 g triallylisokyanátu (stupeň příčného zesíťení: 0,25), 40 g n-butylnacetátu a 3,3 g 2,2'-azobisisobutyronitrilu, se polymeruje v suspenzi, sfiltruje, produkt se extrahuje, přeesterifikuje a sedimentuje v podstatě tímž způsobem jako v příkladu 2, čímž se získají gely, mající hodnotu D_p $13 \mu\text{m}$, hodnotu D_p/D_n 1,32, koncentraci hydroxylových skupin $8,2 \text{ mekv} \cdot \text{g}^{-1}$ a hodnotu w_R $1,05 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$.

Takto získanými gely se plní kolona o vnitřním průměru 7,5 mm a o délce 500 mm v podstatě stejným způsobem jako v příkladu 1, čímž se získá plněná kolona o hodnotě HETP/ D_p 3,4 a hodnotě V_i/V_o 1,20. Na této plněné koloně se chromatografuje vodná směs N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridyliumchloridu (NQ), N-methyl-4-(4-pyridyl)pyridiniumchloridu (MQ) a N-methylpyridiniumchloridu (MS), která se získá při výrobě chemické sloučeniny, určené pro zemědělské použití, přičemž eluce vzniklého chromatogramu se provádí vodným roztokem chloridu sodného o molární koncentraci $0,3 \text{ mol} \cdot \text{litr}^{-1}$ při průtokové rychlosti $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Získaný chromatogram je znázorněn na obr. 6. Na chromatogramu jsou zřetelně patrné jednotlivé složky směsi. Tento příklad dokládá, že plněné kolony podle vynálezu je možno účinně použít též pro frakcionaci a identifikaci elektrolytů o nízké molekulové hmotnosti.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Kolona pro kapalinovou chromatografii, s gelovým ložem z pórovitých gelů obsahujících vinylalkoholové jednotky, vyznačující se tím, že gely mají hmotnostní střední průměr zrn 4 až $20 \mu\text{m}$, přičemž gelové lože má hodnotu plnicího poměru v rozmezí 0,66 až 0,78 a stupeň rovnoměrnosti v rozmezí 2,0 až 4,0 definovaný poměrem

$$\text{HETP}/D_p,$$

ve kterém

HETP znamená výškový ekvivalent teoretického patra a

D_p znamená hmotnostní střední průměr zrn gelů.

2. Kolona podle bodu 1, vyznačující se tím, že gely mají hmotnostní střední průměr zrn v rozmezí 6 až $15 \mu\text{m}$.

3. Kolona podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se gely odvozují od homopolymeru nebo kopolymeru vinylkarboxylátu.

4. Kolona podle bodu 3, vyznačující se tím, že kopolymérem je kopolymer vinylkarboxylátu se sířujícím monomermem obsahujícím isokyanurátový kruh.

5. Kolona podle bodu 3, vyznačující se tím, že kopolymérem je kopolymer vinylkarboxylátu se sířujícím monomermem obsahujícím kyanurátový kruh.

6. Kolona podle bodu 4, vyznačující se tím, že sířujícím monomermem obsahujícím isokyanurátový kruh je triallylisokyanurát.

7. Kolona podle bodu 3, vyznačující se tím, že vinylkarboxylátový kopolymer je odvozen od monomeru obsahujícího alespoň dvě esterové skupiny vinylkarboxylátu.

8. Kolona podle bodu 7, vyznačující se tím, že monomermem obsahujícím alespoň dvě esterové skupiny vinylkarboxylátu je divinylacetát.

9. Kolona podle bodů 1 až 8, vyznačující se tím, že gely mají zádrž vody v rozmezí 0,6 až 2,0 ml.g⁻¹ a gelové lože má hodnotu poměru V_i/V_o , ve kterém V_i znamená vnitřní objem uvnitř zrna gelu a V_o znamená prázdný objem mezi zrny gelu, v rozmezí 1,0 až 2,0."

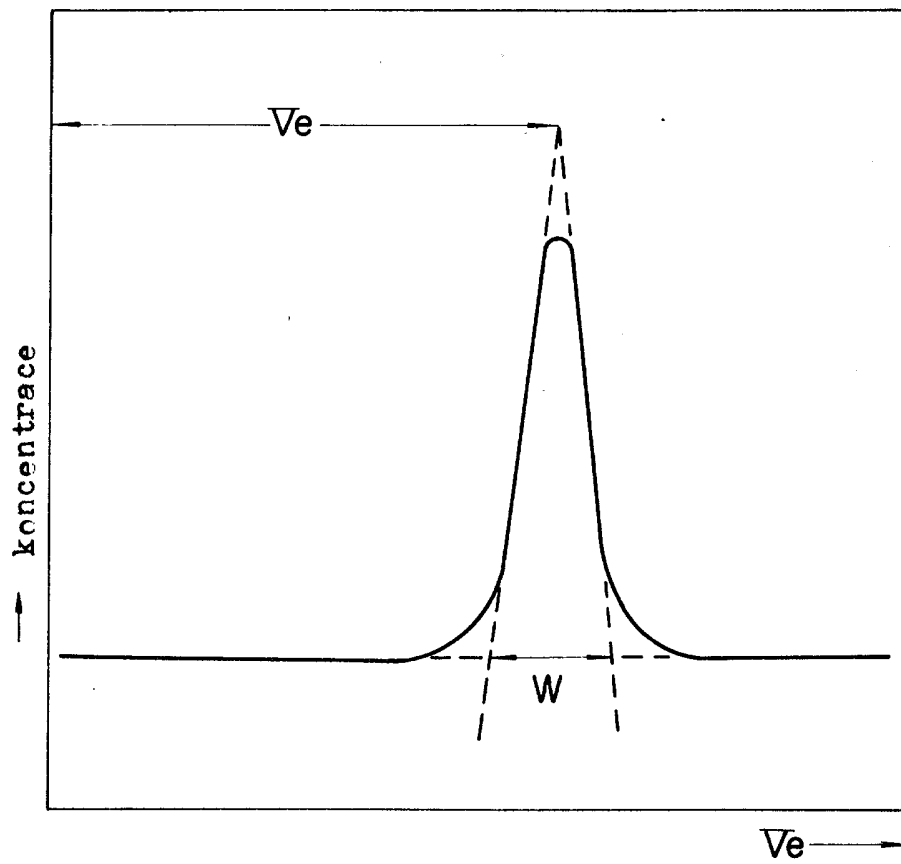
10. Kolona podle bodů 1 až 9, vyznačující se tím, že gely mají koncentraci hydroxylových skupin v rozmezí 3 až 15 mekv.g⁻¹.

11. Kolona podle bodů 1 až 10, vyznačující se tím, že gelové lože má hodnotu plnicího poměru v rozmezí 0,68 až 0,74.

12. Způsob přípravy kolony pro kapalinovou chromatografii podle bodu 1, při němž se do plnicího zařízení, odpojitelně spojeného s kolonou, která má na svém dolním konci první koncovku opatřenou filtrem, vnese suspenze pórovitých gelů obsahujících vinylalkoholové jednotky, načež se plnicí zařízení neprodyšně uzavře s výjimkou výstupu pro suspenzi a vstupu pro plnicí kapalinu, pak se plnicí kapalinou, vedenou plnicím zařízením a kolonou, převede do kolony suspenze gelů za současného odvádění kapaliny ze suspenze jako i plnicí kapaliny přes filtr, upravený v první koncovce na dolním konci kolony, čímž se v koloně vytvoří gelové lože, poté se stupňovitě nebo spojitě zvyšuje průtoková rychlost plnicí kapaliny, načež se kolona odpojí od plnicího zařízení a ke koloně se na jejím horním konci připojí druhá koncovka opatřená filtrem, čímž se v koloně zadrží vytvořené gelové lože, vyznačující se tím, že plnicí kapalina použitá k převedení suspenze gelů do kolony se v objemovém množství, rovnajícím se jednonásobku vnitřního objemu kolony, vede kolonou průtokovou rychlostí 0,2 až 1,5 m.h⁻¹ od začátku přivádění plnicí kapaliny, přičemž při stupňovitě nebo spojitě zvyšování průtokové rychlosti plnicí kapaliny činí maximální zvýšení tlaku a průměrné zvýšení tlaku na 1 metr gelového lože, vyvozované proudící plnicí kapalinou na vstupu plnicího zařízení, nanejvýš 6 MPa.min⁻¹ u maximálního zvýšení tlaku a 0,2 až 8 MPa.h⁻¹ u průměrného zvýšení tlaku na 1 metr gelového lože.

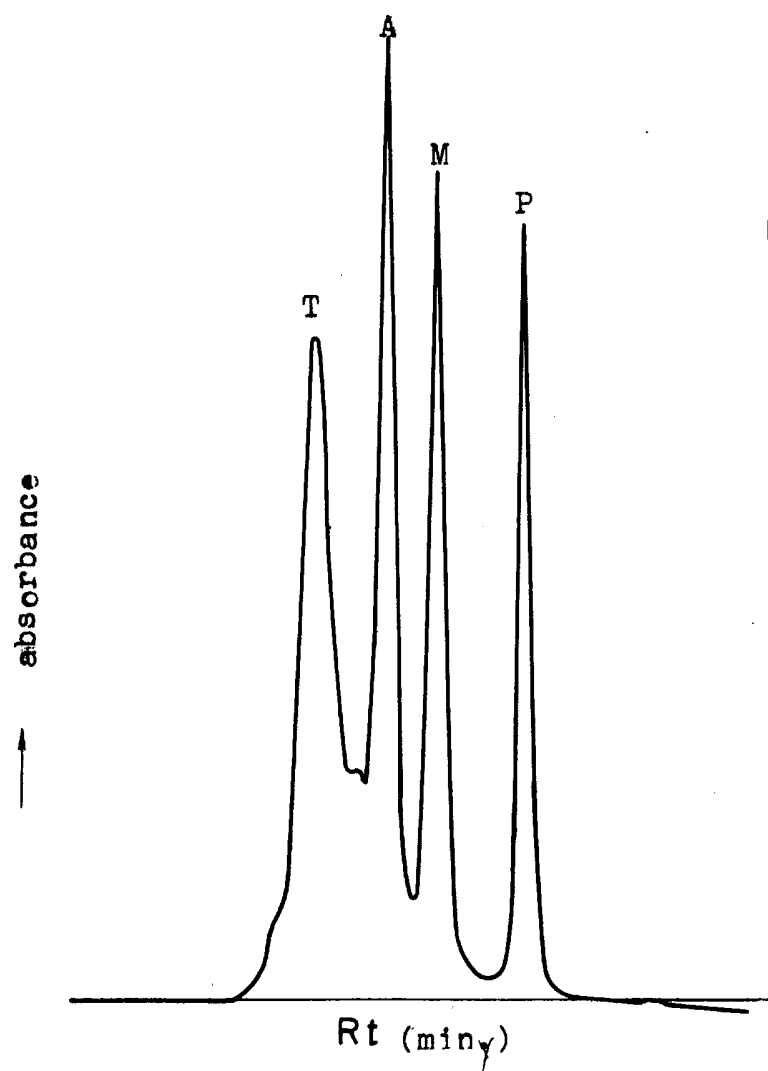
253567

Obr. 1



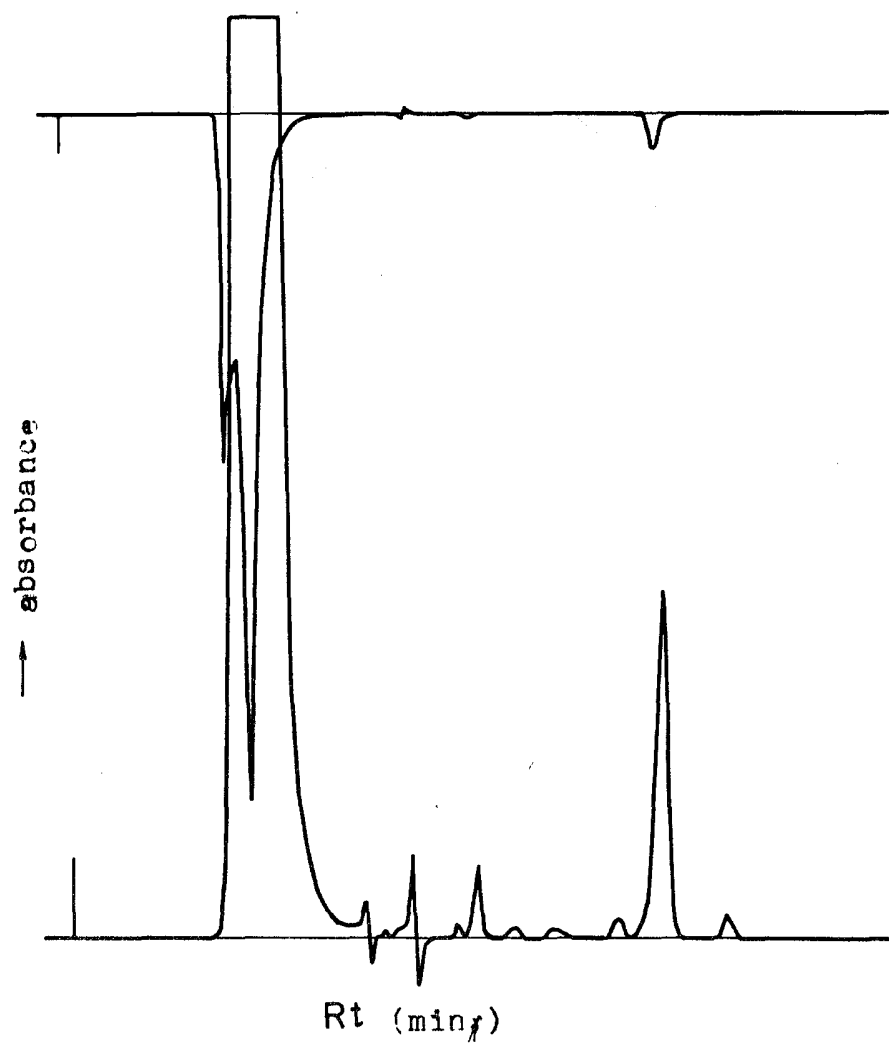
253567

Obv. 2



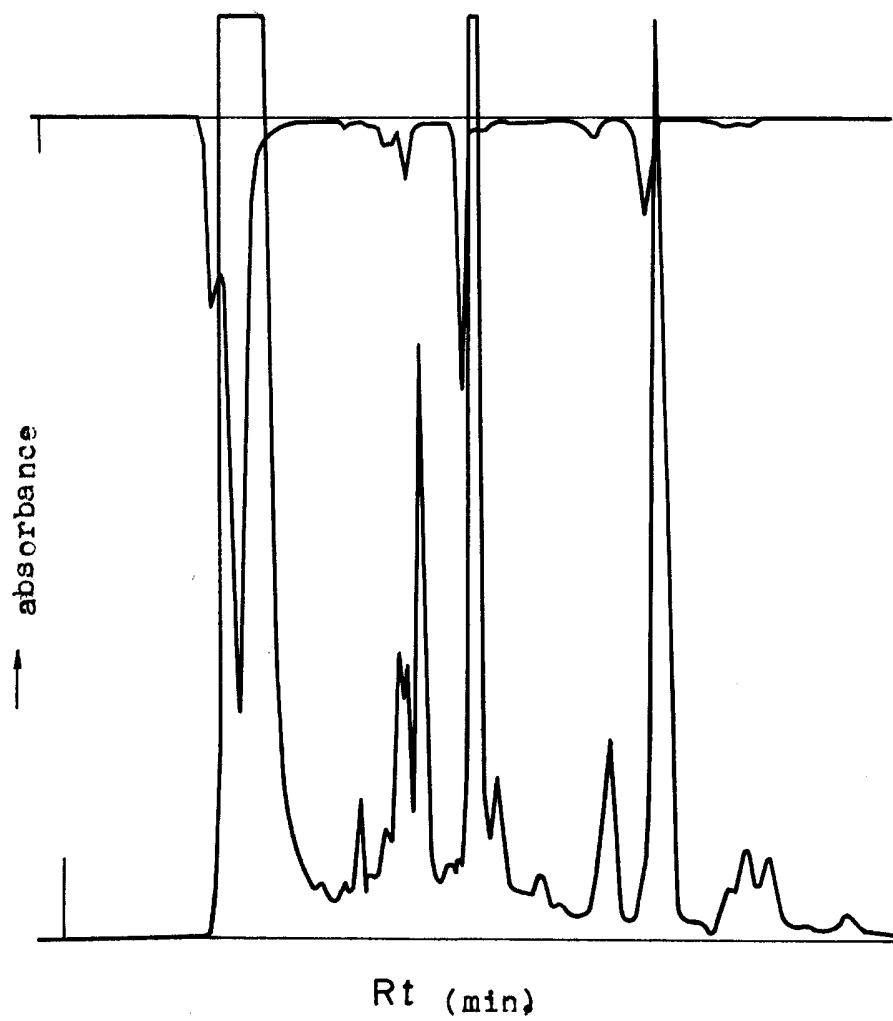
253567

obr. 3(a)



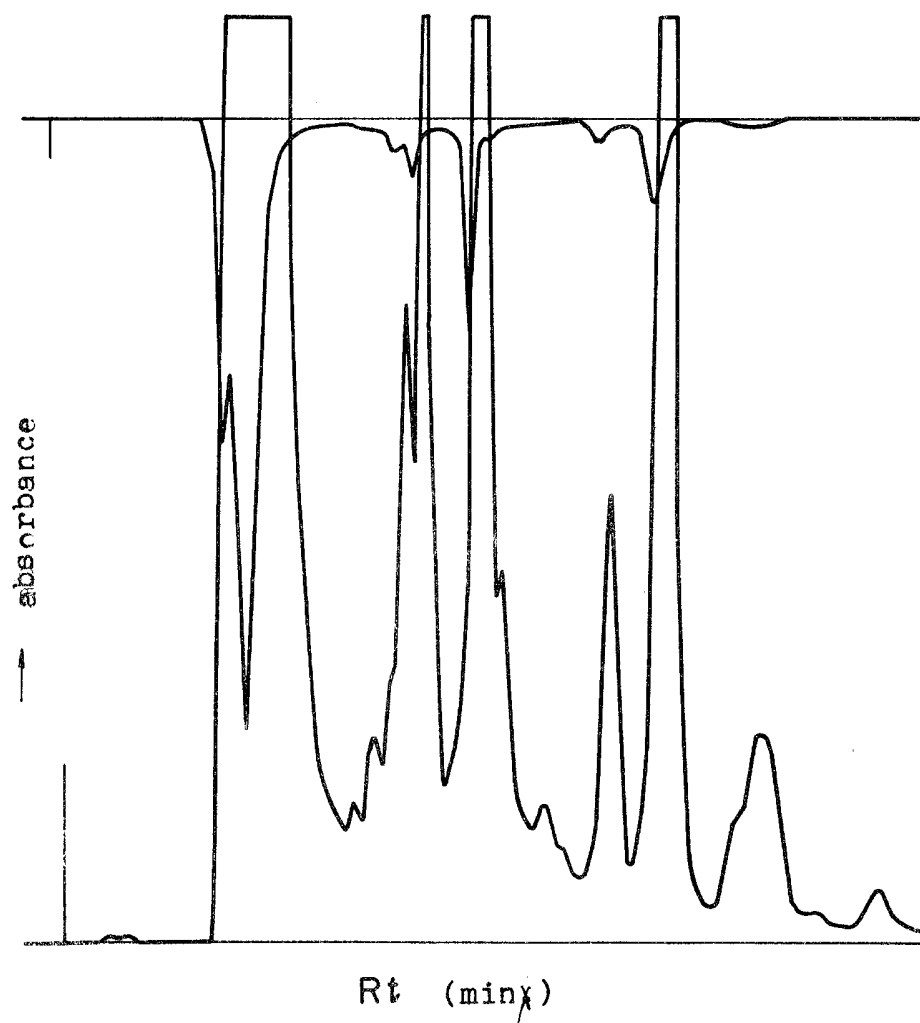
253567

abr. 3(b)



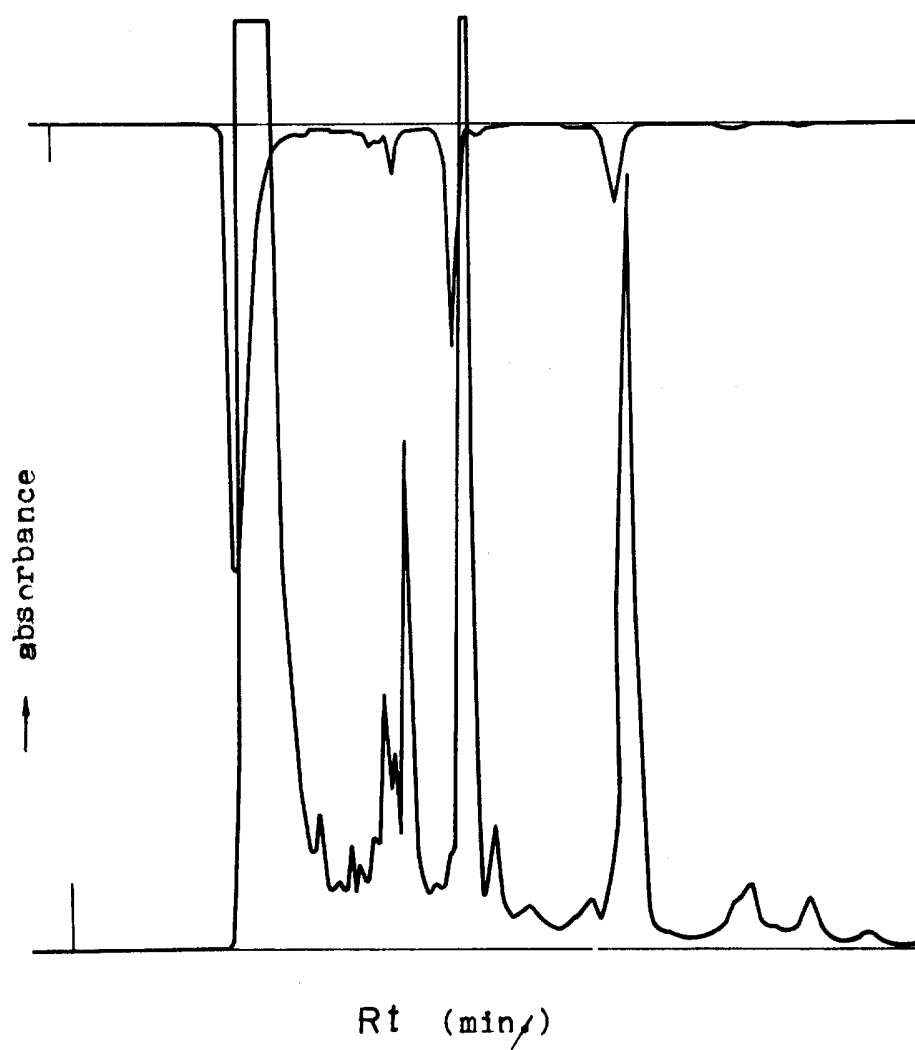
253567

obr. 4



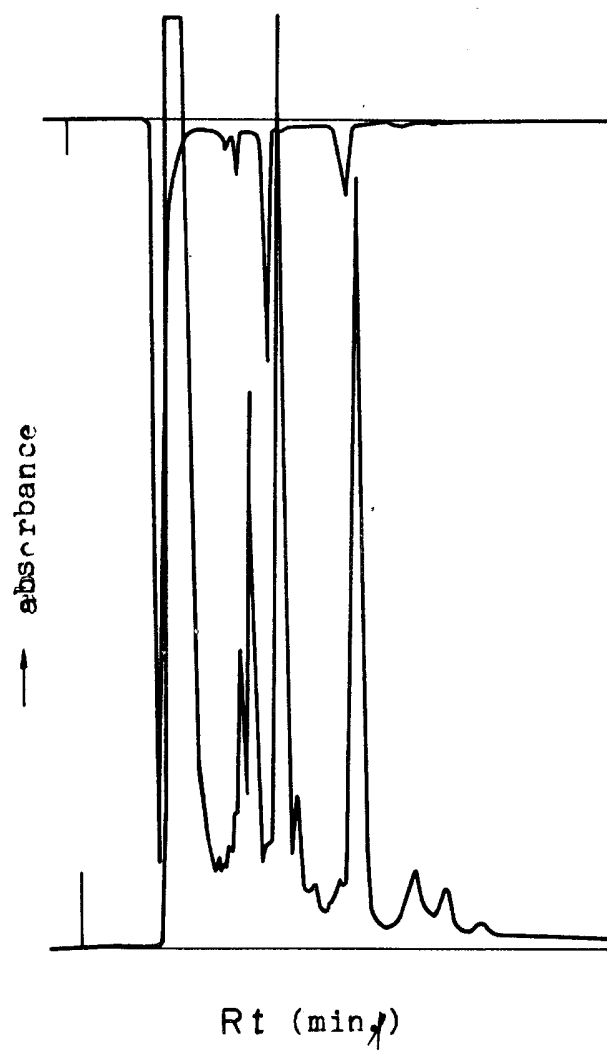
253567

Obv. 5(a)



253567

obr. 5(b)



253567

Obr. 6

