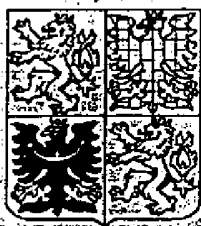


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 28.05.93

(32) 29.05.92

(31) 92/891381

(33) US

(40) 15.12.93

(21) 1023-93

(13) A3

5(51)

C 08 F 265/02

B 01 J 20/26

B 01 J 39/20

(71) ROHM AND HAAS COMPANY, Philadelphia,
Pennsylvania, US;

(72) Steffier Larry Wayne, Cherry Hill, New Jersey, US;

(54) Síťované kopolymery anhydridu kyseliny
methakrylové

(57) Síťované sferické kopolymerní částice anhydridu kyseliny
methakrylové jsou vhodnými prekursory pro slabě kyselé a
jiné ionexové pryskyřice, afinitně chromatografické materi-
ály i další materiály, jejichž příprava vyžaduje přítomnost
reaktivních funkčních skupin anhydridu v těchto sferických
polymerech. Je uveden způsob přípravy těchto kopolyme-
rů.

Sitované kopolymery anhydridu kyseliny methakrylové

Oblast techniky

Předkládaný vynález se zabývá sitovanými nerozpustnými kopolymery, konkrétně sitovanými kopolymery anhydridu kyseliny methakrylové, které jsou vhodné pro využití jako adsorbenty a prekursory ionexových pryskyřic.

Dosavadní stav techniky

Ionexové pryskyřice připravované kopolymerací akrylové a methakrylové kyseliny se síťujícími monomery jsou dobře známy. Používají se jako slabě kyselé kationtové iontoměniče. Vzhledem k tomu, že monomery těchto kyselin jsou hydrofilní a do značné míry rozpustné ve vodě, je těžší z nich připravit kopolymery suspensní polymerací než v případě pryskyřic vycházejících z esterů akrylové a methakrylové kyseliny. Estery jsou hydrofobní, ve vodě relativně nerozpustné a polymerace probíhající uvnitř kapiček organické fáze vede k relativně čistým částicím. Kyseliny však mají sklon polymerovat částečně také ve vodné suspensní fázi. Zde dochází ke vzniku nežádoucích polymerů, které zbytečně ubírají monomer a narušují tvorbu čistých kopolymerních částic.

Rozpustnost monomerů ve vodné fázi lze omeřit zavedením speciálních postupů. Jedním takovým postupem je přidávání anorganických solí do vodné fáze, "vysolení" monomeru. Rozpusťnost monomerů ve výsledném solném roztoku se sníží natolik, že je nucen setrvat v organické fázi, v níž probíhá žádaná polymerace. Nevýhodou tohoto postupu je nutnost regenerace soli pro opakované použití, nebo kvůli ekologicky přijatelné čistotě odpadních vod. Hlavní nevýhodou je však narušování kapiček organické fáze během polymerace. Tento jev vede k tvorbě nesférických kopolymerních částic, které mají nepředvídatelné hydraulické vlastnosti a jako naplně ionexových sloupců jsou nevhodné.

Porézní částice pryskyřic jsou obzvláště vhodné jako

adsorbentů nebo iontomeničů s rychlými kinetickými vlastnostmi. Polymery lze v částicích vytvářet mnoha různými způsoby. Obecným postupem je použití činidla pro separaci fází vedoucí k tvorbě makroretikulárních částic, jak například popsal Meitzner a kol. v US-A-2,221,871. Vyberem činidla pro separaci fází lze řídit celkovou porositelou, její distribuci u hotových částic a velikost porů. Díky tomu, že methakrylová kyselina zvyšuje rozpustnost vody v organické fázi, snižuje se rozpustnost rozkladu monomerů v organické fázi a dochází k oddělení fází i v nepřítomnosti

uvedeného činidla pro separaci fází. To sice usnadňuje přípravu makroretikulárních pryskyřic z methakrylové kyseliny, ale řízení parametrů porů je omezeno.

Je známo, že anhydridy kyselin jsou v přítomnosti silných kyselin nebo zásad hydrolyzovány za vzniku příslušných kyselin. Polymery anhydridů, například polymery maleinanhydridu, zavádějí do kopolymerů reaktivní skupiny, které lze využít pro další reakce. Příkladem je funkcionizace vedoucí k iontomeničům, jak popsal v US-A-2,988,541 Semon a kol., nebo v US-A-3,871,964 Hüper a kol. Anhydrid kyseliny methakrylové spolu s dalšími funkčními deriváty kyseliny methakrylové, estery, amidy a nitrily, byl využit jako monomer při přípravě kopolymerů. Jejich následná funkcionizace vedla ke slabě kyselým kationtovým iontomeničům (US-A-2,524,935 Kautter). Bever v GB-A-894,391 navrhl využití anhydridu kyseliny methakrylové jako jednoho z řady olefinických derivátů nenasycených karboxylových kyselin, esterů a anhydridů k přípravě kopolymerů "houbovité struktury", ale neuvedl žádný praktický příklad takové přípravy. Další například Kraemer a kol. v US-A-4,070,648, Lehmann a kol. v US-A-3,764,477 a Barnes v US-A-2,308,581, připravili kopolymery z anhydridu kyseliny methakrylové homogenní nebo precipitační polymerací, případně suspenzní polymerací s obrácenými fázemi, kde průběhna suspendující fází byla organická fáze místo vodní. Lehmann a kol. (US-A-3,764,477) se zmínil o precipitační polymeraci jako o možnosti, ale neuvedl žádný praktický příklad provedení.

Podstata vynálezu

Ujistili jsme, že částice síťovaného kopolymeru anhydridu kyseliny methakrylové lze vhodně využít jako adsorbenty, nosice pro afinitní chromatografii, ionexové pryskyřice a prekursory těchto materiálů. Dale jsme objevili způsob přípravy těchto kopolymerních částic, při němž lze řídit jejich velikost, velikost jejich povrchu u porézních částic i parametry porů.

Podle předkládaného vynálezu lze připravit síťované sferické kopolymerní částice o velikosti 10 μm až 2 mm, kopolymer převážně obsahuje jednotky tvořené anhydridem kyseliny methakrylové.

Předkládaný vynález také uvádí způsob polymerace, který zahrnuje suspendování směsi monomerů (ve vodném suspensním prostředí) obsahující (a) monomer anhydridu kyseliny methakrylové, (b) částice polymeru a/nebo jeden nebo více dalších monomerů a radikálovou polymeraci monomeru(ů) (zahájenou volným radikálem), která vede k tvorbě sferických kopolymerních částic.

Předkládaný vynález dále uvádí způsob polymerace, který zahrnuje:

a. suspendování kapiček směsi monomerů (ve vodném suspensním prostředí) obsahující (i) anhydrid kyseliny methakrylové v množství alespoň 50% hmotnostních vztaheno k celkovému množství monomerů, (ii) jeden nebo více síťujících monomerů a (iii) volný radikál rozpustný v monomeru, iniciátor polymerace;

b. zahřívání kapiček nad teplotu rozkladu iniciátoru polymerace po dobu polymerace směsi monomerů, která vede ke vzniku síťovaných sferických kopolymerních částic, dle předkládaného vynálezu, a

c. případně oddělení kopolymerních částic ze suspensního prostředí.

Částice výhodně vznikají polymerací směsi, která obsahuje nejméně 50% hmotnostních anhydridu kyseliny methakrylové a 0,1 až 50% hmotnostních polyethylenicky nenasyceného síťujícího monomeru. Údaje v procentech se vztahují k celkovému množství monomerů.

Kopolymerace anhydridu kyseliny methakrylové s jinými monomery vede ke vzniku kopolymerních částic dle předkládaného vynálezu, které převážně obsahují jednotky tvořené anhydridem kyseliny methakrylové a vyjádřeno převážně zde znamená, že polymer obsahuje nejméně 50% hmotnostních polymerovaných jednotek tvořených diskutovaným monomerním, v tomto případě anhydridem kyseliny methakrylové.

Monomery, které kopolymerují s anhydridem kyseliny methakrylové za vzniku kopolymerních částic dle předkládaného vynálezu, výhodně obsahují nejméně jeden polyethylenicky nenasycený sitující monomer. Tento monomer je výhodně přítomen v množství 0,1 až 50% hmotnostních vzhledem k celkovému množství monomerů. Jako sitující monomer nebo monomery lze použít alifatické, například akrylové sitující jednotky, jako ethylenglykol dimethakrylát, ethylenglykol diakrylát, tris(1,2,3-hydroxymethyl)propan di- a triakrylát, tris(1,2,3-hydroxymethyl)propan di- a trimethakrylát, divinylketon, allylakrylát, diallylmalonát, diallylfumarát, diallylsukcinát, diallylkarbonát, diallylmalonát, diallyloxalát, diallyladipát, diallylsebakát, divinylsebakát, N,N'-methylen-di(akrylamid), N,N'-methylen-di(methakrylamid) a polyvinyl nebo polyallyl étery glykolu, glycerolu, pentaerythritolu, mono- nebo dithio-derivátů glykolu nebo resorcinolu a podobně. Jako sitující jednotky lze použít též aromatické látky, například styreny, divinylbenzen, trivinylbenzen, divinyltolueny, divinylnaftalen, diallylftalat, divinylxylen, divinylethylbenzen a podobně, nebo heterocyklické sitující jednotky jako divinylpyridin. Tyto sitující monomery jsou odborníkům v této oblasti dobře známy.

Podle předkládaného vynálezu sitující monomer obsahuje jeden nebo více alifatických situjících monomerů ze skupiny ethylenglykol dimethakrylát, ethylenglykol diakrylát, tris(1,2,3-hydroxymethyl)propan di- a triakrylát, tris(1,2,3-hydroxymethyl)propan di- a trimethakrylát, divinylketon, allylakrylát, diallylmalonát, diallylfumarát, diallylsukcinát, diallylkarbonát, diallylmalonát, diallyloxalát, diallyladipát, diallylsebakát, divinylsebakát, N,N'-methylen-di(akrylamid), N,N'-methylen-di(methakrylamid).

Anhydrid kyseliny methakrylové lze kopolymerovat s jedním

i více dalšími monomery. Tyto monomery zahrnují akrylové monomery, například kyselinu akrylovou, methakrylovou a jejich estery, včetně esterů alkyl, cykloalkyl, aryl, a aralkyl, a alkaryl, alkoholů obsahujících 1 až 18 uhlíkových atomů, alifatické monomery jako akrylonitril a methakrylonitril, vinylchlorid, vinylformát, vinylalkylethery, například methylvinylether, akrylamid, methakrylamid, a aromatické monomery jako methyvinylbenzen, styren, α -methylstyren, vinyltoluen, vinylnaftalen, a podobné. Při přípravě kopolymerních částic dle předkládaného vynálezu je anhydrid kyseliny methakrylové přítomen v množství nejméně 50% hmotnostních vzhledem k celkovému množství monomerů.

Kopolymerní částice dle předkládaného vynálezu lze připravit suspensní polymerací směsi monomerů obsahující nejméně 50% hmotnostních anhydridu kyseliny methakrylové. Při suspensní polymeraci je směs monomerů suspendována ve formě kapiček ve vodném suspensním prostředí, které případně obsahuje stabilizátory a jiná aditiva podporující tvorbu stabilních kapiček o jednotné velikosti. Reakce je zahájena generováním volných radikálů ve směsi monomerů.

Kopolymeraci dle předkládaného vynálezu provedenou radikálovou polymerací monomeru(ů), iniciovanou volným radikalem, lze zahájit termálním rozkladem iniciátorů z nichž vznikají volné radikály. Vhodnými iniciátory tohoto typu jsou například peroxidy, soli peroxykyselin a aró-iniciátory, obsažené ve směsi monomerů; volné radikály též vznikají z redoxních iniciátorů jako t-butyldihydroperoxid ve směsi s formaldehydem a hydrogensulfiditátem sodným; nebo působením ultrafialového nebo jiného ionizačního záření. Výhodou pro zahájení polymerace je zavedení termicky nestabilního iniciátoru rozpustného v monomeru do reakční směsi a zahřívání suspensního prostředí, v něm suspendují kapičky monomeru, na teplotu vyšší než je bod rozkladu iniciátoru.

Příklady termicky nestabilních iniciátorů rozpustných v monomeru jsou peroxidy, hydroperoxidy a práturce iniciátory jako benzoylperoxid, t-butyldihydroperoxid, kumenperoxid, α -kumenyl-peroxyneodekanoát, tetralin peroxid, acetylperoxid, kaproylperoxid, t-butylperoxybenzoát, t-butylidiperoxyftalát.

di(4-t-butylcyklohexyl)peroxydikarbonát, methylethylketon peroxid a podobně. Vhodné jsou též azo-iniciátory jako azodiisobutyronitril, azodiisobutyramid, azo-bis-(α,α -dimethylvaleronitril), azo-bis-(α -methylbutyronitril), a dimethyl-, diethyl- nebo dibutylazo-bis-(methylvalerat). Peroxidové a hydroperoxidové iniciátory jsou výhodně užívány v množství 0,01 až 3% hmotnostních vzhledem k celkovému množství monomeru(ů), a azo-iniciátory jsou výhodně užívány v množství 0,01 až 2% hmotnostních vzhledem k celkovému množství monomeru(ů).

Výhodné iniciátory mají relativně nízkou teplotu bodu rozkladu do 60°C. Jsou to například α -kumenylperoxyneodekanoát, di(4-t-butylcyklohexyl)peroxydikarbonát, které zahajují polymeraci při poměrně nízkých teplotách. Za těchto podmínek, hydrolyza funkční skupiny anhydridu nebo jiné reakce se složkami reakční směsi, probíhají méně pravděpodobně.

Podle předkládaného vynálezu jsou kopolymerní částice gelové nebo makroporezní. Makroporezní kopolymerní částice mají výhodně póry o průměru 5 až 10 000 nm, objem pórů tvoří 5% objemových z celkového objemu částic (5% objem pórů). Důsledkem poresity je zvětšení povrchu makroporezních částic ve srovnání s částicemi gelovými (tj. těmi, které neobsahují póry). Jeden ze způsobů popisujících zavedení makroporesity je obsažen ve výše uvedeném dokumentu US-A-4.221.371 Metzner a kol. Podle tohoto způsobu je do reakční směsi zaveden porogen, též známý jako precipitační činidlo, činidlo na rozšíření fázi (phase extender) a činidlo pro separaci fázi (phase-separating agent). Porogen rozpouští dobře monomer ale špatně polymer, vhodné porogeny s monomerem ani polymerem nereagují. Podle předkládaného vynálezu zahrnují zvláště výhodné porogeny pro přípravu kopolymerních částic látky jako isooktan, methyl-isobutylketon, methyl-isobutylkarbinol, xylén, toluen, di(n-butyl)etér a podobně. Zvláště výhodné jsou silněji hydrofobní porogeny jako isooktan a xylén, protože nepodporují hydrolyzu funkční skupiny anhydridu během polymerace. Velikost pórů a povrchu makroporezních kopolymerních částic lze řídit způsoby běžně známými v tomto oboru. Tyto způsoby zahrnují změnu typu porogenu a jeho koncentrace, změnu typu sitující

jednotky a její koncentrace, změnu typu iniciátoru a jeho koncentrace, změnu reakční teploty polymerace a podobně. Lze užít i jiné další obecně známe způsoby zavedení makroporesity do kopolymerních částic.

Podle předkládaného vynálezu lze alternativně použít další způsoby tvorby kopolymerních částic, které využívají jako monomer anhydrid kyseliny methakrylové nebo výše uvedenou směs monomerů a vedou ke vzniku gelových nebo makroporezních částic. Monomer(y) lze zavést do vodné suspence ve formě předem vytvořených polymerních částic, známých jako semenné (seed) částice. Tyto částice se rozpouští v monomeru(ech), který je poté polymerován. Podle tohoto způsobu jsou polymerní částice síťovány působením anhydridu kyseliny methakrylové pokud je užit jako jediný monomer, v případě směsi monomerů není nutné dodávat další síťující monomer. Pokud nemají být polymerní částice síťovány, je výhodné použít směs monomerů obsahující síťující monomer. Monomer/směs monomerů výhodně obsahuje iniciátor polymerace. Podle tohoto způsobu přípravy lze řídit růst semenných částic a tak efektivně ovlivňovat jejich konečnou velikost. Pokud mají semenné částice jednotný průměr, což je výsledkem třídění podle velikostí částic, nebo výsledkem určitého způsobu přípravy, který vede k jednotným velikostem (například emulsní polymerace), budou mít výsledné kopolymerní částice obsahující anhydrid též jednotnou velikost, větší než semenné částice.

Podle alternativního způsobu přípravy, který též vede k tvorbě částic jednotného průměru, je směs monomerů zaváděna do suspensního prostředí vstříkáváním, při určité rychlosti a pomocí jedné nebo více trysek o jednotném průměru, do pohyblivého se proudy suspence. Takto vytvářené kapičky monomerů mají jednotný průměr. Následně polymerace, užívající jako iniciátor volný radikál, je zahájena zahřátím suspensního prostředí na teplotu vyšší než je bod rozkladu iniciátoru. Výsledkem jsou kopolymerní částice o jednotné velikosti. Tyto částice lze používat bez dalších úprav, nebo sloužit jako semenné částice pro výše popsané postupy vedoucí k tvorbě větších částic o určené velikosti.

Výrobou alternativních způsobech přípravy, eventuelně

i v dalších, které se ukáží vhodné pro přípravu kopolymerních částic, zůstává výše popsane zavedení makroporesity do kopolymerních částic významnou součástí.

Velikost částic připravených podle kteréhokoliv z výše uvedených postupů lze ovlivňovat v rozmezí 10 μm až 42 mm, výhodně v rozmezí 150 μm až 41 mm. Regulování velikosti částic při suspensi-polymeraci je odborníkům zřejmé. Zahrnuje postupy týkající se změn mezifázového napětí na rozhraní organické a vodné fáze, změn viskozit, jedné nebo obou fází, změn rychlosti míchání.

Obzvláštní výhodou v předkládaném vynálezu, která je zřejmá ze způsobu přípravy kopolymerních částic suspensi-polymerací, je vynechání nutnosti přidávat do vodného suspensiho prostředí látky, jejichž účelem bylo snížit rozpustnost monomerů ve vodě. Tyto látky zahrnovaly anorganické soli nebo jiné složky rozpustné ve vodě, například inhibitory zamezující tvorbu polymerů ve vodné fázi. Jak je výše uvedeno, rozpustnost monomeru je obzvláštním problémem v případě tvorby slabě kyselých kationtových ionexových pryskyřic z monomeru kyseliny methakrylové. Díky tomu, že monomer anhydridu kyseliny methakrylové je ve vodě poměrně nerozpustný, není nutné přidávat anorganické soli nebo jiné ve vodě rozpustné složky do reakčního prostředí. Jejich přítomnost však nevylučuje způsob přípravy podle předkládaného vynálezu jak lze předpokládat.

Na kopolymerních částicích připravených podle předkládaného vynálezu lze provádět další reakce, například zavedení iontoměnačové nebo chelatační funkční skupiny, navázání specifického afinitního ligandu, navázání mnoha různých hydrofilních nebo hydrofobních skupin a jejich kombinací. Funkcionalisace kopolymeru vede například k vytvoření funkční skupiny karboxylové kyseliny, amonné soli, či soli amínu. V kopolymeru přítomná funkční skupina anhydridu pocházející z monomeru anhydridu kyseliny methakrylové je velmi reaktivní a poskytuje výhodné reakční místo pro navázání dalších funkčních skupin. Hydrolyza anhydridu vedoucí k slabě kyselým karboxylovým skupinám také vede k tvorbě kationtových ionexových funkčních skupin na kopolymeru. Je nutné poznamenat,

že určitá část funkčních skupin anhydridu je hydrolyzována na karboxylové skupiny během polymerace. Tato frakce nepřesahuje 20% běžně 15% vzhledem k celkovému množství funkčních skupin anhydridu teoreticky přítomných v kopolymeru. Další hydrolyzu anhydridových skupin účinkem kyseliny, která vede k slabě kyselým karboxylovým skupinám, nebo účinkem hydroxydů alkalických kovů, která vede k alkalickým solím slabě kyselých karboxylových skupin, lze využít pro zlepšení slabě kyselé funkcionalisace.

Dalšími příklady funkcionalizačních reakcí a výsledných funkčních skupin jsou reakce s amoniakem vedoucí ke tvorbě amonných solí karboxylových kyselin a reakce s aminy, včetně primárních, sekundárních a terciárních aminů a polyethylenaminů, vedoucí ke tvorbě solí aminů. Vhodnými deriváty polymerů anhydridu jsou alkylestery, případně jiné estery a amidy, výhodně alkylestery a amidy obsahující 1 až 8 atomů uhlíku, alkylamidy, dialkylamidy, arylamidy, alkarylamidy. Dalšími vhodnými deriváty jsou alkylamidy se substituovanou aminoskupinou, připravené reakcí karboxylové skupiny polymeru s příslušným aminem nebo alkyl- nebo fenylalkylalkoholem, aminoestery, aminoamidy, hydroxyamidy a hydroxyestery, jejichž funkční skupiny jsou odděleny alkylenovou skupinou, fenylem, alkylenaminem, alkylenoxidem, fenylalkylem, fenylalkylfenylem nebo alkylfenylalkylem, případně jinými arylovými skupinami. Substituent nesoucí aminoskupinu, případně soli aminu včetně kvartérní amoniové soli, lze obecně připravit reakcí karboxylové skupiny polymeru s polyfunkčními aminy jako je dimethylaminoethanol, která vede ke vzniku amidické vazby. V určitých případech vede tato reakce za vyšší teploty ke vzniku imidické vazby se sousední karboxylovou skupinou. Anhydridové funkční skupiny polymeru reagují také s polyfunkčními aminy za vzniku esterových vazeb. Deriváty obsahující síru lze připravit podobným způsobem, reakcí anhydridové funkční skupiny s thioley. Způsob uvedených funkcionalisací kopolymerních částic je v této oblasti obvyklý.

Podle předkládaného vynálezu lze připravit hybridní pryskyřice plněním porů makroporezních kopolymerních částic nebo funkcionalizovaných částic pryskyřice monomery, colozným

nebo lišícím se od monomeru použitého při tvorbě makroporézních částic. Dalším krokem je polymerace tohoto monomeru a následná funkcionálníace nově vzniklého polymeru v pórech. Jejím výsledkem jsou funkční skupiny odlišné od funkčních skupin výchozích částic. Vznikají tak dualně funkcionální kopolymerní částice. Alternativně lze podle předkládaného vynálezu povrch makroporézních kopolymerních částic nebo funkcionálních částic pryskyřice potáhnout, případně naplnit pory částic monomerem anhydridu kyseliny methakrylové. Monomer polymeruje za vzniku dualně funkcionované kopolymerní částice, nebo za vzniku makroretikulární částice s povlakem polymeru anhydridu kyseliny methakrylové. Výhody jež poskytuje tato poslední uvedená struktura zahrnují ovlivňování bobtnání a kinetiky difúze výběrem výchozího makroporézního polymeru, vyšší chemickou stabilitu povlečených částic a snížení možnosti zanešení (znečištění) částic.

Předkládaný vynález dále uvádí adsorpční a iontové výměnné postupy a postupy afinitní chromatografie, které zahrnují styk kapaliny se síťovanými sferickými kopolymerními částicemi připravenými podle předkládaného vynálezu, které jsou případně dále funkcionálníovány.

Předkládaný vynález dále uvádí způsob adsorpce proteinů na kopolymer funkcionálníovaný funkčními skupinami vykazujícími afinitu k proteinům, který zahrnuje styk proteinů s funkcionálním kopolymerem připraveným podle předkládaného vynálezu.

Podle výše uvedeného způsobu adsorpce proteinů mohou být proteiny například ve vodné suspenzi.

Pokud jsou proteiny ve vodné suspenzi, proteiny adsorbované na kopolymeru lze následně z kopolymeru uvolnit do kapaliny odlišné od původní vodné suspenze. Z celkového množství proteinů adsorbovaných na kopolymeru lze následně uvolnit výhodně nejméně 80% hmotnostních, výhodněji nejméně 90% hmotnostních, nejvýhodněji nejméně 95% hmotnostních proteinů.

Príklady provedení vynálezu

Následující příklady ilustrují některé příspěvky předkládaného vynálezu. Všechny procentuální údaje a poměry jsou hmotnostní, pokud není uvedeno jinak. Všechny použité reagenty jsou komerční čistoty, pokud není uvedeno jinak.

Príklad 1

Následující příklad uvádí přípravu makroporézních částic pryskyřice z anhydridu kyseliny methakrylové podle předkládaného vynálezu.

Do kulaté banky o objemu 1 litr, se 4 hrdly, vybavené míchadlem, chladičem a topným tělesem, bylo dáno 462,45 g deionisované vody, 27,5 g 2% vodného roztoku hydroxyethylcelulózy, 9,0 g 10% vodného polyvinylalkoholu (z 98% hydrolyzovaného, o molekulové hmotnosti 11 000 až 31 000) a 0,15 g dusitanu sodného. Náplň byla míchána při 300 ot/min (rpm) po dobu 1 hodiny. Organická směs byla připravena odděleně smícháním 12,5 g o-xyleny, 4,7 g 80% divinylbenzenu (zbytek tvoří hlavně methylvinylbenzen), 32,8 g anhydridu kyseliny methakrylové (99,5% čistoty), 0,5 g 75% alkoholátového roztoku α -kumenyl-peroxyneodekanoátu a 0,375 g di(4-t-butyl-cyklohexyl)peroxydikarbonátu. Směs byla protřepávána až do úplného rozpuštění iniciátorů. Po 1 hodině míchání vodné fáze, byla organická směs pomalu přidávána do banky za pokračujícího míchání. Po přidání celé organické směsi byl obsah banky za stálého míchání zahříván rychlostí 1°C/minuta na teplotu 35°C a pak rychlostí 0,2°C/minuta na teplotu 75°C. Obsah banky byl udržován na teplotě 75°C po dobu 1 hodiny za stálého míchání a poté teplota klesla na laboratorní hodnotu. Výsledné částice byly odfiltrovány, třikrát promyty objemem acetonu srovnatelným s celkovým objemem částic a vysušeny na suchné ově nalevce pomocí vakua. Po vysušení byl odebrán vzorek (25 g) kopolymerních částic. Ten se nechal reagovat se 120 g 50% vodného roztoku hydroxydu sodného v 300 ml deionisované vody při teplotě 80 až 90°C po dobu 5 hodin, a ponechan přes noc při laboratorní teplotě za stálého třepání. Smyslem této reakce

bylo převezt anhydridové funkční skupiny na sodné soli karboxylových skupin. Po zakončení této reakce byly částice promyty deionizovanou vodou, odděleny, vyfiltrovány a vysušeny. Vlastnosti těchto částic spolu s vlastnostmi částic připravených podle příkladů 2 až 6, jsou uvedeny v tabulce 1 dále.

Příklad 2

Následující příklad uvádí přípravu makroporezních částic pryskyřice podle předkládaného vynálezu, podobnou přípravě uvedené v příkladu 1. Je zde použita stejná organická směs, ale liší se užití suspendující činidla, teplotní profil postupu je strmější a teplota závěrečné polymerace je nižší.

Postup dle příkladu 1 byl opakován kromě položek: počáteční náplň baňky tvořilo 449,15 g deionizované vody, 0,75 g karboxymethyl-methylcelulózy, 0,05 g laurylsulfátu sodného a reakční směs byla zahřívána rychlostí 1°C/minutu na teplotu 60°C. Na této teplotě byla reakční směs udržována 5 hodin, poté teplota klesla na laboratorní hodnotu.

Příklad 3

Následující příklad uvádí přípravu makroporezních částic pryskyřice podle předkládaného vynálezu, podobnou přípravě uvedené v příkladu 2, za použití akrylové síťující jednotky, tris(1,2,3-hydroxymethyl)propan-trimethakrylátu místo divinylbenzenu a odlišného organického rozpouštědla methyl-isobutylketonu místo o-xylenu.

Při použití postupu podle příkladu 1, počáteční náplň baňky a teplotního průběhu podle příkladu 2, byly polymerní částice připraveny z výchozí odělené připravené organické směsi obsahující 25,0 g methyl-isobutylketonu, 10,0 g tris(1,2,3-hydroxymethyl)propan-trimethakrylátu, 27,5 g anhydridu kyseliny methakrylové (99,5% čistoty), 0,5 g 75% alkoholátového roztoku α -kumenyl-peroxyneodekanoátu a 0,375 g di(4-t-butylcyklohexyl)peroxydikarbonátu.

Příklad 4

Tento příklad uvádí další způsob, přípravy makroporézních částic pryskyřice podle předkládaného vynálezu za využití odlišných reakčních podmínek a jiných reagensů.

Podle postupu dle příkladu 1 byla dána do reakční nádoby vodná směs obsahující 750 g deionisované vody, 1,26 g karboxymethyl-methylcelulózy a 0,09 g čistého práškového laurylsulfátu sodného. Do této směsi byla přidána organická směs obsahující 50,0 g methyl-isobutylketonu, 30,0 g tris(1,2,3-hydroxymethyl)propan-trimethakrylátu, 82,5 g anhydridu kyseliny methakrylové (92% čistoty), 1,0 g 75% alkoholátového roztoku α -kumenyl-peroxyneodekanoátu a 0,76 g di(4-t-butylcyklonexyl)peroxydikarbonátu. Reakční směs byla zahřívána rychlostí 1°C/minutu na teplotu 50°C a rychlostí 0,5°C/minutu z 50 na 58°C a udržována na teplotě 58°C po dobu 1,5 hodiny. Poté teplota klesla na laboratorní hodnotu, částice pryskyřice dle předkládaného vynálezu byly zpracovány, vysušeny a testovány podle postupu uvedeného v příkladu 1.

Část těchto částic byla funkcionalisována polyaminem za vzniku aniontové ionexové pryskyřice podle následujícího postupu. Vzorek suchých kopolymerních částic (0,677 g) byl přenesen do kulaté baňky o objemu 1 litr a suspendován v 250 g deionisované vody za stálého třepání. V kádince o objemu 500 ml byly suspendovány 300 g triethylentetraminu (TETA) v 250 ml deionisované vody a suspendovaný amin byl po kapkách přidán do baňky obsahující kopolymerní částice. Po přidání celého množství aminu byl obsah baňky zahříván na teplotu 50°C a tato teplota byla udržována po dobu 5 hodin. Poté byl obsah baňky ochlazen, polymerní částice promyty deionisovanou vodou a vysušeny. Výsledky měření velikosti částic se týkají těchto TETA-funkcionalisovaných částic.

Příklad 5

Tento příklad uvádí další způsob, přípravy makroporézních částic pryskyřice podle předkládaného vynálezu za využití odlišné organické směsi.

Částice pryskyřice byly připraveny podle postupu dle příkladu 1. při složení vodné směsi a teplotním profilu postupu dle příkladu 4. Organická směs obsahovala: 50,0 g methyl-isobutylketonu, 15,0 g tris(1,2,3-hydroxymethyl)-propan trimethakrylátu, 97,5 g anhydridu kyseliny methakrylové (92% čistoty), 1,0 g 75% alkoholátového roztoku α -kumenyl-peroxyneodekanoátu a 0,76 g di(4-t-butyl-cyklohexyl)peroxydikarbonátu. Kopolymerní částice byly zpracovány, vysušeny a testovány podle postupu uvedeného v příkladu 1. Po vysušení byl vzorek kopolymeru převeden do IETA formy postupem podle příkladu 4, výsledky měření velikosti částic se týkají těchto IETA-funkcionalizovaných částic.

Příklad 6

Tento příklad uvádí další způsob přípravy makroporezních částic pryskyřice podle předkládaného vynálezu s využitím menšího množství síťující jednotky divinylbenzenu dle příkladů 1 a 2 a porogenu methyl-isobutylketonu dle příkladů 3 až 5.

Částice pryskyřice byly připraveny postupem dle příkladu 1, užitá vodná směs měla složení dle příkladů 4 a 5 a organická směs obsahovala 30,645 g methyl-isobutylketonu, 2,563 g divinylbenzenu (80% čistoty), 47,95 g anhydridu kyseliny methakrylové (92% čistoty), 0,665 g 75% alkoholátového roztoku α -kumenyl-peroxyneodekanoátu a 0,5 g di(4-t-butyl-cyklohexyl)peroxydikarbonátu. Reakční směs byla zahřívána rychlostí 1°C/minutu na teplotu 50°C, udržována na teplotě 50°C po dobu 4 hodin a poté teplota klesla na laboratorní hodnotu. Kopolymerní částice byly zpracovány, vysušeny a testovány podle postupu uvedeného v příkladu 1.

Stanovení kapacity pro cytochrom-c a jeho regenerace.

U všech pryskyřic, připravených podle výše uvedených příkladů, byla testována jejich adsorpční kapacita a schopnost uvolnit navazaný protein cytochrom-c. Pro stanovení kapacity cytochromem-c (tj. stanovení množství cytochromu-c, který pryskyřice adsorbuje z roztoku, vztaheno na objemovou jednotku pryskyřice) byly užitý 20 ml vzorky vlhkých pryskyřic, připravené dle následujícího postupu. Každý ze vzorků

pryskyřice byl dán do skleněného chromatografického sloupce o vnitřním průměru 2,5 cm a délky nejméně 20 cm. Volná kapalina byla ze sloupce vytlačena přetlakem vzduchu $2 \times 10^5 \text{ N/m}^2$ (2 bary) působícím z vršku sloupce. Sloupec pak byl naplněn methanolem (HPLC čistoty) a promyt obdobným způsobem za využití přetlaku vzduchu při $2 \times 10^5 \text{ N/m}^2$ (2 bary). Tento postup byl opakován tak dlouho, až byl sloupec promyt celkovým množstvím 200 ml methanolu. Methanol byl poté ze sloupce vytlačen a sloupec byl obdobně promyt 200 ml deionisované vody. Po vytlačení vody byl sloupec obdobně promyt 200 ml 0.05 M roztoku acetátového pufru (3,0 g ledové kyseliny octové v 1000 ml vody, pH upraveno 50% vodným roztokem hydroxydu sodného na hodnotu 5,4).

Dále byly stanoveny přesné objemy přibližně 2 ml vzorků pryskyřic, připravených podle výše uvedeného postupu. Vzorky byly zředěny acetátovým pufrům na celkové objemy 80 ml a přeneseny do 250 ml zásobníků. Zde k nim bylo rychle přidáno 20 ml roztoku cytochromu-c (Sigma C-2506; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) v acetátovém pufru o koncentraci 20 mg/ml. Zásobníky byly uzavřeny a třepány 30 minut. Poté se nechala pryskyřice usadit (5 minut), byla změřena hodnota ultrafialové absorbance supernatantu při 550 nm a srovnána s hodnotou standardního roztoku cytochromu-c. Tímto způsobem byla stanovena koncentrace volného cytochromu-c v supernatantu. Adsorpční kapacita cytochromu-c pryskyřic byla vypočtena dle vzorce 1:

$$\text{kapacita} = (400 - (100 \times C_s)) / V_r \quad (1)$$

kde C_s znamená koncentraci cytochromu-c v mg/ml v supernatantu a V_r je objem vzorku pryskyřice v ml.

Stanovení množství regenerovaného cytochromu-c (tj. stanovení množství cytochromu-c adsorbovaného na pryskyřici, které z ní lze uvolnit): Každý z 2 ml vzorků pryskyřic použitých na stanovení kapacity byl přenesen do skleněného chromatografického sloupce o vnitřním průměru 1 cm a promyt 4 až 5 ml acetátového pufru k odstranění zbylého roztoku cytochromu-c. Každý ze vzorků byl pak promyt přesně 100,0 ml 0,5 M roztoku chloridu sodného v acetátovém pufru při rychlosti

toku 1 ml/minutu a byla změřena hodnota ultrafialové absorbance eluatů roztoků chloridu sodného při 550 nm. Koncentrace cytochromu-c v roztoku chloridu sodného byla stanovena porovnáním se standardním roztokem, jak již bylo uvedeno výše. Hodnota regenerace pro pryskyřice byla vypočtena dle vzorce 2:

$$\text{regenerace (\%)} = \frac{(100 \times C_r)}{(V_r \times \text{kapacita})} \quad (2)$$

kde C_r znamená koncentraci (mg/ml) cytochromu-c v roztoku chloridu sodného, kapacita znamená adsorpční kapacitu cytochromu-c pryskyřice, jak byla vypočtena dle vzorce 1 a V_r znamená objem vzorku pryskyřice, jak bylo uvedeno výše. Výsledky obou stanovení pro pryskyřice připravené podle příkladů 1 až 6 jsou uvedeny níže v tabulce 1.

V tabulce 1 jsou dále uvedeny výsledky stanovení kapacity za použití streptomycinu u pryskyřic připravených dle příkladů 4, 5 a 6; výsledky jsou udány v jednotkách aktivity streptomycinu vztažené k 1 ml vlhké pryskyřice. Každý mg streptomycin sulfátu je přibližně roven 767 jednotkám aktivity streptomycinu.

V tabulce 1 jsou dále uvedeny a zhodnoceny výsledky testů, srovnávající dvě různá zrnění slabě kyselé, makroporézní pryskyřice kyseliny methakrylové s divinylbenzémem, připravené podle dříve popsanych postupů. Distribuce velikosti částic u prvního vzorku (srovnávací vzorek A) je v rozmezí 150 až 300 μm , u druhého vzorku (srovnávací vzorek B) je v rozmezí 75 až 105 μm .

tabulka 1

pří- klad	velikost částic (μm)	CEC3 (meq/g)	Cyto-C4 kapacita (mg/ml)	Cyto-C4 regenerace (%)	Strep regenerace (StrepUnit)5
1	-	-	72	91	-
2	2771	6.86	144	82	-
3	2021	5.48	157	98	-
4	1602	6.95-7.72	19	85	305

5	160 ²	8,73-9,17	44	81	251
6	500	6,9	-	-	101
A	150-300	11,7	82	100	-
8	75-150	10,3	11	87	-

1 - velikost částic byla stanovena pro sodné soli

2 - velikost částic byla stanovena pro soli TEIA

3 - kapacita iontové výměny

4 - cytochrom-c

5 - kapacita adsorpce streptomycinu udaná v jednotkách aktivity streptomycinu.

Jak je patrné z příkladů 1 až 6 a z výsledků uvedených v tabulce 1, kapacita iontové výměny pryskyřic dle předkládaného vynálezu je pro mnohé účely vyhovující. Kapacitu adsorpce a regeneraci proteinů jako je cytochrom-c a streptomycin lze hodnotit jako dobré až výborné. Pryskyřice samotné lze připravit bez pracných postupů zahrnujících vysolování a podobné operace, které byly zařazovány díky problémům s rozpustností monomerů.

Příklad 7

Tento příklad uvádí postup přípravy gelové pryskyřice podle předkládaného vynálezu za využití suspensní techniky podle příkladu 2, s vynecháním porogenu.

Vodná fáze byla připravena mícháním 958,47 g deionisované vody, 1,44 g karmoxymethyl-methylcelulózy a 0,085 g laurylsulfátu sodného v kulaté baňce o objemu 2 l až do úplného rozpuštění. Organická fáze byla připravena odděleně mícháním 88,87 g komerčního divinylbenzenu (55% čistoty), 163,97 g anhydridu kyseliny methakrylové (94% čistoty), 4,8 g di(4-t-butylcyklohexyl)peroxydikarbonátu a 3,2 g α -kumenylperoxyneodekanoátu až do úplného rozpuštění iniciátorů. Organická fáze byla přidána do vodné fáze za stálého míchání, aby se ve vodné fázi vytvořila suspence organických kapídek. Smes byla ohřívána na 60°C rychlostí 0,5°C/minutu

a udržována na teplotě 60°C po dobu 4 hodin; vzhledem k exotermnímu charakteru vzrostla teplota reakce po dobu 20 minut na hodnotu 65°C . Po uplynutí reakční doby byl obsah banky ochlazen, pevné složky odfiltrovány na Buchnerově nálevce a promyty acetonem. Produktem přípravy byly neporezní gelové kopolymerní částice.

P A T E N O V É N Á R O K Y

1. Sítované sferické kopolymerní částice, vyznačující se tím, že mají velikost v rozmezí 10 μm až 2 mm a kopolymer je tvořen především jednotkami anhydridu kyseliny methakrylové.

2. Kopolymerní částice podle nároku 1, vyznačující se tím, že mají průměr v rozmezí 50 μm až 1 mm.

3. Kopolymerní částice podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že jsou makroporézní.

4. Kopolymerní částice podle nároku 3, vyznačující se tím, že průměr jejich pórů je v rozmezí 5 až 10 000 nm a objem pórů tvoří nejméně 5% z celkového objemu částic.

5. Kopolymerní částice podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že jsou gelové.

6. Kopolymerní částice podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že kopolymer byl funkcionalisován za vzniku:

- (i) karboxylových funkčních skupin
- (ii) funkčních skupin amoniových solí
- (iii) funkčních skupin solí aminů.

7. Způsob polymerace, vyznačující se tím, že zahrnuje suspendování směsi monomerů (ve vodném suspensním prostředí) obsahující (a) monomer anhydridu kyseliny methakrylové a (b) částice polymeru a/nebo jeden nebo více dalších monomerů, a radikálovou polymeraci monomeru (ii) (zahájenou volným radikálem), která vede k tvorbě sferických kopolymerních částic, podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5.

8. Způsob polymerace, vyznačující se tím, že zahrnuje

- a. suspendování kapiček směsi monomerů (ve vodném suspensním prostředí) obsahující (i) anhydrid kyseliny methakrylové v množství nejméně 50% hmotnostních vzhledem k celkovému množství monomerů.
- (ii) jednu nebo více síťujících jednotek a (iii)

volný radikál rozpustný v monomeru, iniciátor polymerace;

b. zahřívání kapiček nad teplotu rozkladu iniciátoru polymerace po dobu polymerace směsi monomerů, která vede ke vzniku síťovaných sferických kopolymerních částic podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5; a

c. případně oddělení kopolymerních částic ze suspensního prostředí.

9. Způsob polymerace podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , že pokud polymerace probíhá podle z kteréhokoliv z nároků 1 až 4, jsou kopolymerní částice makroporézní a směs monomerů obsahuje porogen.

10. Způsob polymerace podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že porogen je vybrán z látek isooktan, methyl-isobutylketon, methyl-isobutylkarbinol, xylen, toluen a di(n-butyl)ether.

11. Způsob polymerace podle kteréhokoliv z nároků 8 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že síťující monomer obsahuje jeden nebo více alifatických, polyethylenicky nenasycených monomerů.

12. Způsob polymerace podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že alifatický síťující monomer je vybrán z látek ethylenglykol dimethakrylát, etylenglykol diakrylát, tris(1,2,3-hydroxymethyl)propan diakrylát a tris(1,2,3-hydroxymethyl)propan triakrylát, tris(1,2,3-hydroxymethyl)propan dimethakrylát a tris(1,2,3-hydroxymethyl)propan trimethakrylát, divinylketon, allyl-akrylát, diallylmalonát, diallylfumarát, diallylsukcinát, diallylkarbonát, diallylmalonát, diallyloxalát, diallylacetát, diallylsebakát, divinylsebakát, N,N'-methylen-di(akrylamid), N,N'-methylen-di(methakrylamid).

13. Způsob polymerace podle kteréhokoliv z nároků 8 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že síťující monomer obsahuje jeden nebo více aromatických síťujících monomerů.

14. Způsob polymerace podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m , že síťující aromatický monomer je vybrán z látek divinylbenzen, trivinylbenzen, divinyltolueny, divinylnaftaleny, diallylftalát, divinylxylen a

divinylethylbenzen.

15. Způsob polymerace podle kteréhokoliv z nároků 8 až 14, vyznačující se tím, že iniciátor polymerace je peroxidový nebo hydroperoxidový iniciátor.

16. Způsob polymerace podle nároku 15, vyznačující se tím, že peroxidový nebo hydroperoxidový iniciátor polymerace je vybrán z látek benzoylperoxid, t-butylhydroperoxid, kumenperoxid, α -kumenyl-peroxyneodekanoát, tetralin peroxid, acetylperoxid,

kaproylperoxid, t-butylperoxybenzoát, t-butylidiperoxyftalát, di(4-t-butylcyklohexyl)peroxydikarbonát a methylethylketon peroxid.

17. Způsob polymerace podle nároku 15 nebo 16, vyznačující se tím, že peroxidový nebo hydroperoxidový iniciátor polymerace je přítomen v množství 0,01 až 3% hmotnostních vztáženému k celkovému množství monomerů.

18. Způsob polymerace podle kteréhokoliv z nároků 8 až 14, vyznačující se tím, že iniciátor polymerace je azo-iniciátor.

19. Způsob polymerace podle nároku 18, vyznačující se tím, že azo-iniciátor polymerace je vybrán z látek azodiisobutyronitril, azodiisobutyramid, azo-bis-(α , α -dimethylvaleronitril), azo-bis-(α -methylbutyronitril) a dimethylazo-bis-(methylvalerát), diethylazo-bis-(methylvalerát) a dibutylazo-bis-(methylvalerát).

20. Způsob polymerace podle nároku 18 nebo 19, vyznačující se tím, že azo-iniciátor polymerace je přítomen v množství 0,01 až 2% hmotnostních vztáženém k celkovému množství monomerů.

21. Způsob polymerace podle kteréhokoliv z nároků 8 až 20, vyznačující se tím, že iniciátor polymerace má bod teploty rozkladu do 60°C.

22. Adsorpční, iontové, výměnné nebo afinitní chromatografické postupy, vyznačující se tím, že zahrnují styk kapaliny se sitovanými sferickými kopolymerními částicemi připravenými podle kteréhokoliv

z nároků 1 až 5, nebo podle kteréhokoliv z nároků 7 až 21, které byly případně funkcionalisovány za vzniku funkčních skupin.

23. Způsob adsorpce proteinu na funkcionalisovaný kopolymer, vyznačující se tím, že zavedené funkční skupiny jsou afinitní k proteinům a způsob zahrnuje styk proteinu s funkcionalisovaným kopolymerem připraveným podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, nebo kteréhokoliv z nároků 7 až 21.

24. Způsob adsorpce podle nároku 23, vyznačující se tím, že proteiny jsou ve vodné suspensi.

25. Způsob adsorpce podle nároku 24, vyznačující se tím, že proteiny adsorbované na kopolymeru lze z kopolymeru následně uvolnit do kapaliny odlišné od vodné suspence.

26. Způsob adsorpce podle nároku 25, vyznačující se tím, že proteiny adsorbované na kopolymeru lze z kopolymeru následně uvolnit nejméně z 80% hmotnostních, do kapaliny odlišné od vodné suspence.