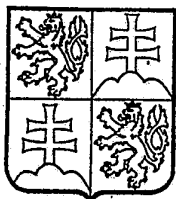


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

273 487

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
B 01 D 71/40

(21) PV 6987-88.Q

(22) Přihlášeno 21 10 88

(40) Zveřejněno 12 07 90

(45) Vydáno 10 02 92

(75) Autor vynálezu

ŠVEC FRANTIŠEK ing. DrSc., HŘEBEČ (CS)
TENNIKOVA TATIANA B. CSc., BELENKII BORIS G. DrSc.,
LENINGRAD (SU)

(54)

Makroporézní polymerní membrány pro chroma-
tografické dělení biopolymerů

(57) Řešení se týká makroporézních polymer-
ních membrán pro chromatografické dělení
biopolymerů.

Podle řešení sestávají z makroporézní-
ho kopolymeru mono- a divinylického monome-
ru, přičemž monovinylický monomer je gly-
cidylmethakrylát v množství 5 až 80 % obj.
a divinylický monomer je ethylendimetha-
krylát, jehož podíl na celkovém množství
zpolymerizovaných monomerů je 20 až 95 %
obj. a na vnitřním povrchu, který i v su-
chém stavu dosahuje velikosti 1 až 400 m²/g,
nesou chemické funkční skupiny původního
monomeru a/nebo jejich deriváty, vybrané ze
skupiny sestávající ze skupiny epoxidové,
allylové, hydroxylové, aminové, sulfonové,
hydrogensulfátové, sulfhydrylové, alkylové
s řetězcem obsahujícím až 18 C atomů.

Tyto makroporézní polymerní membrány
umožňují chromatografické dělení biopoly-
merů v průmyslovém měřítku a podle předem
zadaného programu.

Vynález se týká makroporézních polymerních membrán pro chromatografické dělení biopolymerů.

Jakkoliv je problematika separace makromolekul z jejich směsí s nízko- nebo vysokomolekulárními látkami v současné době velmi frekventovaná v literatuře i praxi, a bylo dosaženo značných úspěchů, není ji dosud možné považovat za vyřešenou. S rozvojem moderních vědních a technických disciplín, jako je například biotechnologie, se problém účinné separace vyráběného produktu z reakčního média stává rozhodujícím kritériem úspěchu řešení. Není zpravidla příliš velkým problémem nalézt způsob analytické identifikace hledané látky ani stanovit její koncentraci. Potíže však přináší dosud ne zcela vyřešená otázka preparativní, průmyslové separace s vysokou účinností při rozumném vynakládání práce, energie a nákladů jak kapitálových, tak i materiálových, a při minimálním zatěžování životního prostředí.

Z hlediska použití je nejdůležitější dělení a izolace biopolymerů. Do této skupiny makromolekulárních látek patří oligo- a poly-peptidy, bílkoviny, enzymy, lektiny, protilátky, antigeny, nukleové kyseliny, polysacharidy. Separace biopolymerů z přírodních zdrojů je obecně známým problémem již od minulého století.

Původní způsoby čištění spočívaly zejména ve srážení například bílkovin, respektive jejich vysolování neutrálními solemi, které lze provádět i za současné změny pH a dosahovat tak i několikanásobné frakcionace v jednom stupni. I tak však k získání čisté bílkoviny vedla dlouhá cesta korunovaná úspěchem až v roce 1926, kdy Sumner izoloval krystalickou ureázu. Nicméně i nyní, jak bude později ukázáno, se vlivu iontové síly nebo pH při dělení bílkovin opět používá.

Paralelně se vyvíjela i metoda nazvaná svým objevitelem M. Cvettem chromatografií (Ber. Deut. Botan. Ges. 24, 316, 1906). Významným mezníkem se však stala až práce A. J. P. Martina a R. L. M. Synge (Biochem. J. 35, 1358, 1941), která zavedla pojem teoretického patra v kapalinové chromatografii. Také bylo uvedeno, že kolony naplněné mikročásticemi jsou zejména výhodné pro dělení makromolekul, jejichž difúzní koeficienty jsou velmi malé. Protože v té době mikročástice nebyly ještě objeveny, realizoval se proces vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) až o dvacet let později.

Chromatografie polymerů se rozvinula až na základě poznatků Petersona a Sobera (J. Amer. Chem. Soc. 76, 1711, 1954), že se bílkoviny mohou adsorbovat na diethylaminoethylderivátu celulózy a potom postupně eluovat roztokem s rostoucí iontovou silou. Později byly ke stejnému účelu použity i jiné deriváty celulózy, například karboxymethylový. Koncem padesátých let firma Pharmacia Uppsala ve Švédsku zavedla sesíťené dextranové gely pro vylučovací chromatografii (SEC) bílkovin a nukleových kyselin (Ger. pat. 1292883, Brit. pat. 974 054), při které dochází k dělení na základě dostupnosti různého podílu porézní struktury gelu pro species s různou velikostí makromolekuly. Malá mechanická pevnost gelových médií však neumožnila plně realizovat princip HPLC.

Ke zlomu došlo při frakcionaci bacitracinu na mikročásticích silikagelu derivatizovaného alkylsilany (K. Tsuji, J. H. Robinson, J. Chromatogr. 112, 663, 1976). S použitím kyselé mobilní fáze obsahující organické rozpouštědlo bylo rozděleno několik strukturálních forem uvedeného peptidu metodou tzv. chromatografie s obrácenou fází (RPLC) na koloně dlouhé 30 cm. Záhy nato se objevily i práce popisující použití silikagelu i pro vysoce účinnou vylučovací chromatografii (SEC) a iontovýměnnou chromatografii (IELC) bílkovin při téměř kvantitativním výtěžku a zachování aktivity. Oproti gelovým materiálům je v uvedených případech možné použít až téměř o dva řády vyšších průtokových rychlostí mobilní fáze, což podstatně zkracuje doby analýzy.

Makromolekuly obecně interagují se stacionární fází v chromatografické koloně různými způsoby. To vede k tomu, že kapacitní faktor definovaný při isokratické eluci, tedy eluci, využívající stále stejné rozpouštědlo, jako

$$k' = (t_R - t_0)/t_0$$

kde t_R je retenční doba hledané látky a t_0 mrtvý objem kolony, se prudce mění při nepatrné změně složení eluentu. Při jistém složení je k' tak vysoké, že se makromolekula v koloně prakticky nepohybuje. Malá změna rozpouštědla však způsobí pokles k' k hodnotě blízké nule a makromolekula prochází kolonou, aniž by s její náplní jakkoliv interagovala. Běžně vynášená a publikovaná závislost $\log k'$ na složení eluentu je tedy velice strmá, mnohdy téměř vertikální. Z toho ovšem také vyplývá, že délka chromatografické kolony nemá v tomto případě rozhodující vliv na kvalitu dělení. Lze tedy použít velmi krátkých kolon, obsahujících jenom nezbytně nutné množství sorbentu, které je potřebné pro sorpci dělených makromolekul v takovém množství, aby se rozdělené látky daly detegovat.

Ukázalo se, že při chromatografii makromolekul například metodou RPLC je rozlišovací funkce úměrná

$$D_m^{1/2} \quad d_p^{-1} \quad t_G^{1/2}$$

kde D_m je difúzní koeficient solutu, d_p průměr částic naplněných v koloně a t_G doba, po níž se mění složení rozpouštědlové směsi (gradient). Protože první veličina je charakteristickou konstantou dělené látky, je možné kvalitu dělení zlepšovat pomalou změnou složení rozpouštědla nebo zmenšováním rozměru částic náplně kolony. V prvním případě se prodlužuje i doba potřebná k rozdělení směsi, ve druhém potom roste tlaková ztráta na koloně a je nutné přivádět eluent při velmi vysokém tlaku, který může dosahovat několik jednotek až desítek MPa.

Uvedené okolnosti ukazují, že zvětšení měřítka chromatografické separace z analytického nebo laboratorního může představovat značný problém. Je zřejmé, že použití objemných kolon s relativně velkým průměrem může i při použití nestlačitelných náplní znamenat obtíže projevující se ve výsledcích, které nejsou srovnatelné s předchozími. Často se projevuje tzv. chvostování chromatografických pík, popřípadě jejich překryv. Důvodem může být například rozdílná rychlost toku eluentu na různých místech příčného průřezu kolony. Aby se tomu zamezilo, je třeba dosáhnout uniformní rychlosti horizontální fronty kolonou směrem od přítoku eluentu k výtoku z kolony. Tento problém je diskutován v US pat. 3250058 a k jeho řešení se používají rozrážecí zamontované uvnitř kolony. Způsob ovlivňování toku kapaliny v koloně je předmětem i dalších patentů (US 3539505, DOS 2036525, DOS 2224794, Jap. 73-68752) a umožňuje zvětšit měřítko dělení, avšak na úkor původní jednoduchosti. Aby se složitost konstrukce kolony obešla, používají někteří autoři zásahy do samotné náplně (US 3856681) nebo zvláštních způsobů plnění kolony (US 4211656). Později se ukázalo, že dobrého efektu může být dosaženo, jestliže jsou drobné částice sorbentu, na kterém dochází k dělení, inkorporovány do porézní inertní matrice, mající tvar vláken. Tato vláknitá hmota je potom naplněna do kolony zvláštní konstrukce, ve které potom dochází k daleko menším tlakovým ztrátám a rozmývání zón (US 4384957, US 4512897, US 4496461, US 4604198).

Jak bylo již naznačeno, je převážná většina náplní chromatografických kolon pro dělení biopolymerů porézní, ať se jedná o anorganické (silikagel, sklo) nebo organické polymery (styrendivinybenzenové, akrylátové nebo methakrylátové kopolymery atd.), zpravidla ve formě sferických částic (F. E. Regnier, Chromatographia 24, 241, 1987). Tyto částice se vyrábějí převážně suspenzní technikou, v poslední době se objevují i víceúrovňové disperzní metody (seeded polymerization). Po skončení polymerizace se až na výjimky musí ze surového produktu získat úzká velikostní frakce sorbentu, protože kvalita naplněné kolony, a tedy i její účinnost silně závisí na rozptylu rozměru částic. Frakcionace částic je velmi obtížná a podíl pro HPLC použitelných částic představuje jenom malou část celého surového produktu.

S ohledem na používání částic malého průměru (5 až 10 μm), musejí i organické sorbenty být mechanicky dostatečně pevné, což předpokládá relativně vysokou koncentraci síťovadla v polymerizační násadě. Přitom současně existující požadavek porozity se řeší syntézou makroporézních částic, tedy částic vyznačujících se porozitou i v suchém stavu i popřípadě v termodynamicky špatných rozpouštědlech (autorské osvědčení č. ČS 168268, Brit 1512462, Canada 1049194). Z morfologického hlediska jsou makroporézní polymery charakterizované tzv. globulární strukturou, tedy částice sestávají ze vzájemně spojených submikroskopických sférických útvarů zvaných globule. Měrný povrch makroporézních polymerů je potom vlastně povrchem těchto globulí a intersticiální prostory mezi nimi jsou pory (viz například Z. Pelzbauer a kol., J. Chromatogr. 171, 101, 1979). Globulární struktura porézní částice do jisté míry připomíná sférické těleso naplněné drobnými také sférickými globulemi. Tato představa není již příliš vzdálená poměrům panujícím uvnitř naplněné chromatografické kolony, která má však tvar válce. Pokud by byla kolona naplněna částicemi s globulárním rozměrem (0,1 až 0,4 μm), šance realizovat chromatografické dělení by byla nepatrná, protože tlak, který by bylo třeba vyvinout, by byl nereálně vysoký. Proto byly podle čs. autorského osvědčení č. 268443 vynalezeny polymerní fólie mající tloušťku 0,2 až 15 mm charakterizované v celkovém objemu stejnou makroporézní strukturou, jakou mají částice běžně používané v různých typech HPLC.

Membrány pro elektrodialýzu mající pouze povrchovou vrstvu tvořenou makroporézním polymerem jsou předmětem US pat. 3926864. Po modifikaci ionogenními skupinami má takový povrch výrazné "antifouling" vlastnosti. Protože však je třeba dosáhnout i dobrých vlastností elektrodialyzačních, polymerizace je vedena tak, aby vnitřní část membrán byla mikroporézní (gelová). Pro dělení polymerů nelze proto tyto membrány použít, vhodné jsou pro odsolování vod, odstraňování iontů a podobně.

Membrány podle tohoto vynálezu (fólie, desky) mají tvar blízký deskám pro chromatografii v tenké vrstvě, kdy však je sorbent deponován ve vrstvě nanesené na pevném neporézním podkladě (sklo, kov). K vlastnímu dělicímu procesu, který zahrnuje prvky chromatografické separace, se však využívá vrstva ve směru tangenciálním, tj. v délce, která mnohokrát převyšuje rozměr částic sorbentu. Nevýhodou tenkých vrstev, které jsou sypané nebo sklížené, je i malá odolnost proti mechanickému poškození. Pro preparativní práci lze chromatografii v tenké vrstvě použít jenom obtížně.

Uvedený přehled o současném stavu techniky jasně dokumentuje, že zatím neexistuje spolehlivá a jednoduchá metoda pro dělení polymerů ve větším měřítku. Bylo proto nutné nalézt principiálně nové řešení, které je předmětem tohoto vynálezu. Ten v sobě spojuje jednak samotné membrány, charakterizované způsobem přípravy, spočívajícím v polymerizaci a modifikaci, jednak jejich použití pro dělení biopolymerů.

Předmětem předloženého vynálezu jsou makroporézní polymerní membrány pro chromatografické dělení biopolymerů, jejichž podstata spočívá v tom, že sestávají z makroporézního kopolymeru mono- a divinylického monomeru, přičemž monovinylický monomer je glycidylmethakrylát v množství 5 až 80 % obj. a divinylický monomer je ethylendimethakrylát, jehož podíl na celkovém množství zpolymerizovaných monomerů je 20 až 95 % obj. a na vnitřním povrchu, který i v suchém stavu dosahuje velikosti 1 až 400 m^2/g , nesou chemické funkční skupiny původního monomeru a/nebo jejich deriváty, vybrané ze skupiny sestávající ze skupiny epoxidové, allylové, hydroxylové, aminové, sulfonové, hydrogensulfátové, sulphydrilové, alkylové s řetězem obsahujícím až 18 C atomů.

Tyto membrány lze připravit polymerizací směsi mono- a divinylického monomeru v přítomnosti inertního porogenního rozpouštědla, nebo směsi rozpouštědel iniciovanou radikálovým iniciátorem, která probíhá ve vyhrávané formě, mající jeden rozměr (zpravidla tloušťku) shodný s požadovaným rozměrem finální membrány. Lze použít libovolnou směs obou typů monomerů a tímto způsobem variovat porézní vlastnosti vznikající membrány. I výběr monomerů může být širší.

Pro iniciaci radikálové polymerizace se používá azobisisobutyronitril, ale lze použít libovolného radikálového iniciátoru vybraného ze skupiny azolátek, peroxidů, hydroperoxidů, redoxních soustav a podobně.

Důležitou součástí polymerizujícího systému je porogenní rozpouštědlo. S výhodou se používá cyklohexanol nebo jeho směs s dodekanolem. Samozřejmě lze použít i jiných porogenních činidel, například alifatické nebo aromatické alkoholy, estery, ethery, ketony, uhlovodíky, silikonový olej, nízkomolekulární polymery a další.

Membrána obsahující epoxidové skupiny v bočních řetězcích není zpravidla finálním produktem a je modifikována chemicky tak, aby se upravil charakter vnitřního povrchu.

Chemickou modifikací se na povrch membrány naváží skupiny například allylové, aminové, sulfonované, hydrogensulfátové, hydroxylové, sulfhydrilové, alkylové s délkou řetězce až 16 uhlíkových atomů.

Při chromatografickém dělení biopolymerů za použití membrán podle vynálezu se postupuje například tak, že výseč libovolného rozměru a tvaru získaná z makroporézní polymerní membrány se umístí na podložce zaručující stálost polohy na kterékoliv stěně tvořící část komory a umožňující shromažďování kapaliny prošlé membránou. Komora se naplní roztokem polymeru nebo směsí polymerů, který se pod tlakem nižším než 1 MPa nechá procházet membránou, ve které se polymer (polymery) nasorbují. Do komory se přivede čerpadlem rozpouštědlo, ve kterém byl polymer (polymery) rozpuštěn, a potom se podle určeného programu mění vlastnosti rozpouštědla tak, aby se jednotlivé složky nasorbovaného polymeru postupně znovu rozpouštěly a eluovaly z membrány, čímž dojde k vlastnímu dělení. Průběh dělení se buď pouze deteguje vhodným zařízením a složení polymeru, nebo směsi polymerů se vyhodnocuje kvalitativně nebo kvantitativně, nebo se jednotlivé frakce jímají a produktem jsou jednotlivé složky dělené směsi jako individua (preparativní separace).

Programová změna vlastností rozpouštědla způsobující postupné rozpouštění jednotlivých součástí směsí (gradient) se může týkat pH, iontové síly, obsahu organického rozpouštědla, teploty a dalších proměnných.

Makroporézní polymerní membrány pro dělení polymerů, zejména potom biopolymerů, a způsob tohoto dělení mají řadu výhod oproti známému stavu techniky. Především jejich příprava je velmi jednoduchá a není omezena ani co do rozměru. Membrány se vyznačují dostatečnou mechanickou stálostí a odolností proti fyzikálním i chemickým vlivům. Přitom lze mechanickou pevnost v případě potřeby ještě zvýšit zapolymerizováním armovací složky do membrány v procese její přípravy. Protože membrány obsahují reaktivní skupiny, lze je snadno chemicky modifikovat a na jejich vnitřní povrch zavést funkční skupiny měnící jeho vlastností, a tím významně rozšiřující možnosti použití. Samotné dělení například biopolymerů potom probíhá oproti známým řešením velmi rychle při značně vyšším zatížení hmotnostní jednotky dělicího elementu oproti zatížení, které je možné na chromatografických kolonách. Přitom tlak, který je nutno vyvinout, aby se dosáhlo požadovaného průtoku, je o jeden až dva řády nižší, než u kolonových metod srovnatelné účinnosti. Zásadní předností membrán a způsobu jejich použití podle tohoto vynálezu však je možnost vytvářet teoreticky neomezeně velké plochy, na kterých se realizuje dělení polymerů, a tím i realizovat až průmyslový proces získávání individuálních látek. Přitom potřebnou plochu není nezbytně nutné získat zvyšováním rozměru jedné membrány a komory, ale je možné i kombinovat potřebný počet menších membrán a komor do bloků splňujících stejný účel.

Příklad 1

Forma tvořená dvěma kovovými deskami, ve kterých jsou vyvrtány komunikující kanálky, a distanční vložkou o síle 1 mm čtvercového tvaru ze silikonového kaučuku, ve které je vyříznut otvor ve tvaru čtverce o délce strany 8 cm a otvor umožňující plnění prostoru formy zvnějšku, se naplní polymerizační směsí, sestávající z 6 ml glycidylmethakrylátu,

6 ml ethylendimethakrylátu, 0,12 g azobisisobutyronitrilu, 16,2 ml cyklohexanolu a 1,8 ml dodekanolu. Do kanálků formy se přivádí po dobu 8 hodin voda teplá 70 °C. Po skončení polymerizace se nechá forma vychladnout a rozebere se. Deska makroporézní membrány se důkladně promyje alkoholem, vodou a opět alkoholem a nechá uschnout. Razídkem se z čtvercové desky vyrazí kruhový terč o průměru 10 mm (plocha povrchu cca 300 mm²). Měrný povrch membrány v suchém stavu činí 62 m²/g.

Příklady 2 až 8

Do formy popsané v příkladu 1 se naplní směs, jejíž složení je uvedeno v tabulce 1, obsah se shodným způsobem zpolymerizuje a zpracuje.

TABULKA 1

Složení polymerizační směsi použité pro přípravu makroporézních polymerních membrán a jejich měrný povrch

Příklad	GMA ml	EDMA ml	AIBN g	CyOH ml	DoOH ml	S _g m ² /g
2	4,8	7,2	0,12	18	0	80
3	7,2	4,8	0,12	16,2	1,8	45
4	9,6	2,4	0,12	17,1	0,9	160
5	0,6	11,4	0,12	17,1	0,9	260
6	7,2	4,8	0,12	18	0	53
7	0,6	11,4	0,06	18	0	250
8	7,2	4,8	0,24	14,4	3,6	35

V záhlaví tabulky značí GMA glycidylmethakrylát, EDMA ethylendimethakrylát, AIBN azobisisobutyronitril, CyOH cyklohexanol, DoOH dodekanol a S_g velikost měrného povrchu v suchém stavu změřený z tepelné desorpce dusíku dynamickou metodou.

Příklad 9

Kruhové terče z makroporézní membrány připravené podle příkladu 3 byly po dobu 24 hodin ponechány v 0,01 mol/l roztoku NaOH v butanolu. Po skončení reakce se terče promyje ethanolem, vodou a ve vlhkém stavu uchovávají pro další použití. Na jejich povrchu jsou etherovou vazbou navázány alkylové skupiny se 4 C-uhlíky jak lze doložit infračervenými spektry.

Příklad 10 a 11

Stejným způsobem jako v předešlém příkladě 9 byla provedena modifikace epoxidových skupin membrány oktánolem nebo oktaďekanolem. Ve druhém případě byla modifikace provedena při teplotě 65 °C. Produkt podle IČ analýzy obsahuje až 0,2 mmol/g navázaných alkylů s 8, respektive 18 C-atomy.

Příklad 12

Kruhové terče o průměru 10 mm vyražené z membrány definované v příkladu 6 byly ponořeny na dobu 6 hodin do komerčního 25 % roztoku amoniaku ve vodě a zahřívány pod zpětným chladičem na teplotu 80 °C. Potom byly terče promyty vodou do vymizení reakce na amoniak. Elementární analýza prokázala přítomnost 1,8 mmol/g aminoskupin v modifikovaném polymeru.

Příklady 13 až 20

Příklady 13 až 20

Shodným postupem jako v příkladu 12 byly reakcí s čistým aminem probíhající v baňce nebo zatavené ampuli modifikovány terče z membrány, připravené způsobem popsaným v příkladu 1. Reakční podmínky a obsah skupin navázaných na polymerní membránu shrnuje tabulka 2.

TABULKA 2

Reakční podmínky modifikace makroporézní membrány a obsah navázaných skupin v produktu					
Příklad	Amin	Koncentrace roztoku v H ₂ O % hmot.	Reakční doba h	Teplota °C	Obsah skupin mmol/g
13	dimethyl-	100	3	60	2,0
14	2-hydroxyethyl-	100	6	70	2,2
15	bis-2-hydroxyethyl-	100	6	70	2,1
16	oktyl-	100	12	70	0,4
17	ethyl-	50	6	80	1,6
18	ethylendi-	50	10	80	1,7
19	trimethyl-HCl	50	24	80	2,2
20	tributyl	100	24	80	0,1

Příklad 21

Kruhové terče vyražené z polymerní makroporézní membrány připravené podle příkladu 2 byly ponořeny po dobu 6 hodin do 0,01 mol/l kyseliny sírové a zahřívány na 80 °C. Tím dojde k hydrolýze epoxidové skupiny na dvě vicinální hydroxylové. Produkt může být popřípadě separován a různě použit. Po promytí vodou do vymizení kyselé reakce byly terče ponořeny do roztoku 10,2 g Na OH ve 36 ml vody a směs ochlazená na 0 °C. Za míchání kapaliny nad membránami bylo po kapkách přidáno 24 g propansultonů. Po třiceti minutách byla směs zvolna zahřívána na 35 °C a reakce pokračovala další 3 hodiny. Po skončení zahřívání byla směs ponechána při teplotě místnosti 12 hodin. Terče byly promyty vodou, 0,5 mol/l HCl a opět vodou do vymizení kyselé reakce. Na povrchu polymerní membrány bylo takto získáno 0,85 mmol/g sulfonovaných skupin.

Příklad 22

Obdélník o rozměru 10 x 5 cm z desky připravené obdobně jako v příkladu 2, jehož epoxidové skupiny byly zhydrolyzovány roztokem kyseliny sírové na vicinální dihydroxyderivát stejně jako v příkladu 21 byl promyt vodou a vysušen. Suchá deska byla ponořena na dobu 5 hodin do směsi allylglycidylether-dioxan (1 : 1 objemově), obsahující 0,3 % obj. eterátu fluoridu boritého a zahřívána na 50 °C. Produkt s naroubovanými allylovými skupinami byl potom modifikován 30% roztokem thiosíranu draselného ve vodě při teplotě místnosti po dobu 24 hodin, přičemž směs byl každých 10 minut po dobu 10 minut proháněn kyslíkem ze zásobní nádrže (bomby). Po promytí vodou, 0,4 mol/l HCl a opět vodou bylo acidobazickou titrací zjištěno, že membrána obsahuje 0,37 mmol/g sulfonovaných skupin.

Příklad 23

Kruhový terč o průměru 20 cm, vyříznutý z čtvercové desky o rozměru strany 25 cm a tloušťce 3 mm byl ponořen do skleněné mísy obsahující 100 ml 1,2-dichlorethanu a ponechán 20 hodin. Potom při laboratorní teplotě bylo za míchání skláněním mísy pozvolna přidáno 45 ml monohydrátu oxidu sírového. Po jedné hodině reakce byla membrána vyjmuta a promyta ethanolom a vodou. Acidobazickou titrací vzorku bylo stanoveno, že membrána obsahuje 1,59 mmol/g hydrogensulfátových skupin.

Příklad 24

Kruhové terče o průměru 30 mm, vyražené z desky připravené podle příkladu 4 byly smíseny s 10% roztokem sirníku sodného ve vodě. Při teplotě 25 °C bylo směsí mírně třepáno po dobu 12 hodin. Terče byly promývány vodou až do vymizení zápachu sirovodíku. Modifikovaný polymer obsahuje 0,52 mmol/g sulfhydrilových skupin.

Příklad 25

Na dně nádoby kruhového průřezu o objemu cca 1 ml je umístěn terč o průměru ca 1 cm z membrány o tloušťce 1 mm, připravené podle příkladu 1 a modifikované podle příkladu 9 tak, aby se při zaplnění nádoby kapalinou veškerý průtok realizoval výlučně přes membránu. Obsah nádoby se míchá vrtulovým míchadlem. Pumpou se do nádoby přivádí eluent podle určeného gradientu. Pod membránou umístěnou na ploše opatřené systémem sběrných kanálků, zaručujících dokonalý a rovnoměrný odvod eluentu z každého místa membrány, je i centrální odvodní kapilární otvor, ze kterého je protékající eluent (nebo jeho část) veden k detektoru a potom popřípadě shromažďován k získání separovaných látek. Do nádoby byl předložen roztok obsahující 0,1 mg ribonukleázy, 0,1 mg ovalbuminu a 0,1 mg chymotrypsinogenu v 0,02 mol/l fosfátovém pufru o pH 6,8, ve kterém byl rozpuštěn síran amonný, jehož koncentrace činila 2 mol/l. Za míchání byl do nádoby pod tlakem 0,1 MPa veden stejný pufr, který obsahoval síran amonný ve snižujícím se množství rychlostí 0,5 ml/min., přičemž do stavu, kdy eluent obsahoval 1 % původního množství síranu amonného se dojde za 35 minut. Eluent vytékající z nádoby byl veden do UV detektoru Gilson a záznam odezvy detektoru (chromatogram) ukazující dělení je na obrázku 1. Z membrány bylo přitom eluováno 100 % veškerých původně nesorbovaných bílkovin.

Příklad 26

Shodným postupem a na stejném zařízení jako v příkladě 25, avšak s terčem modifikovaným podle příkladu 16, bylo provedeno rozdělení stejné směsi bílkovin. Chromatogram ukazuje obrázek 2.

Příklad 27

Na stejném zařízení a za shodných podmínek jako v příkladu 25 byly separovány stejné bílkoviny, avšak množství každé z nich v roztoku předloženém do nádoby bylo 5 mg, tedy 50 x vyšší. Bylo dosaženo zcela stejného rozdělení, které ukazuje obrázek 1.

Příklad 28

Za podmínek shodných s příkladem 25 a na stejném zařízení, ale s membránou vyrobenou podle příkladu 21 bylo provedeno rozdělení směsi, sestávající z 0,1 mg ribonukleázy a 0,1 mg lysozymu rozpuštěných v 0,02 mol/l fosfátovém pufru pH 6,8. Eluce byla prováděna při průtoku 1 ml/min. a tlaku 0,1 MPa s využitím gradientu iontové síly stejným pufrům, ve kterém rostl obsah chloridu sodného tak, že po 15 minutách byl obsah soli 0,5 mol/l. Výsledek dělení ukazuje obrázek 3.

Příklad 29

Za podmínek shodných s příkladem 28 byla na membráně připravené podle příkladu 26 rozdělena stejná směs ribonukleázy a lysozymu. Chromatogram ukazuje obrázek 4.

Příklad 30

Na zařízení ve tvaru hranolu, ve kterém je komora o objemu 10 ml a jehož stěna je tvořena membránou s obdélníkovým tvarem o ploše 6 x 8 cm a tloušťce 1,5 mm připravené podle příkladu 1 a 9, bylo provedeno rozdělení směsi obsahující 150 mg ribonukleázy, 100 mg ovalbuminu a 150 mg chymotrypsinogenu. Průtok eluentu činil 5 ml/min. při tlaku 0,8 MPa. S použitím stejného gradientu iontové síly jako v příkladě 1 byla provedena

eluze a eluent jímán do zkumavek po 10 ml. V páté zkumavce bylo obsaženo 5 %, v šesté 85 % a v sedmé 10 % ribonukleázy, v osmé zkumavce 15 %, v deváté 75 % a v desáté 10 % ovalbuminu a konečně ve dvanácté 3 %, ve třinácté 28 %, ve čtrnácté 16 %, v patnácté 32 % a v šestnácté 20 % chymotripsinogenu.

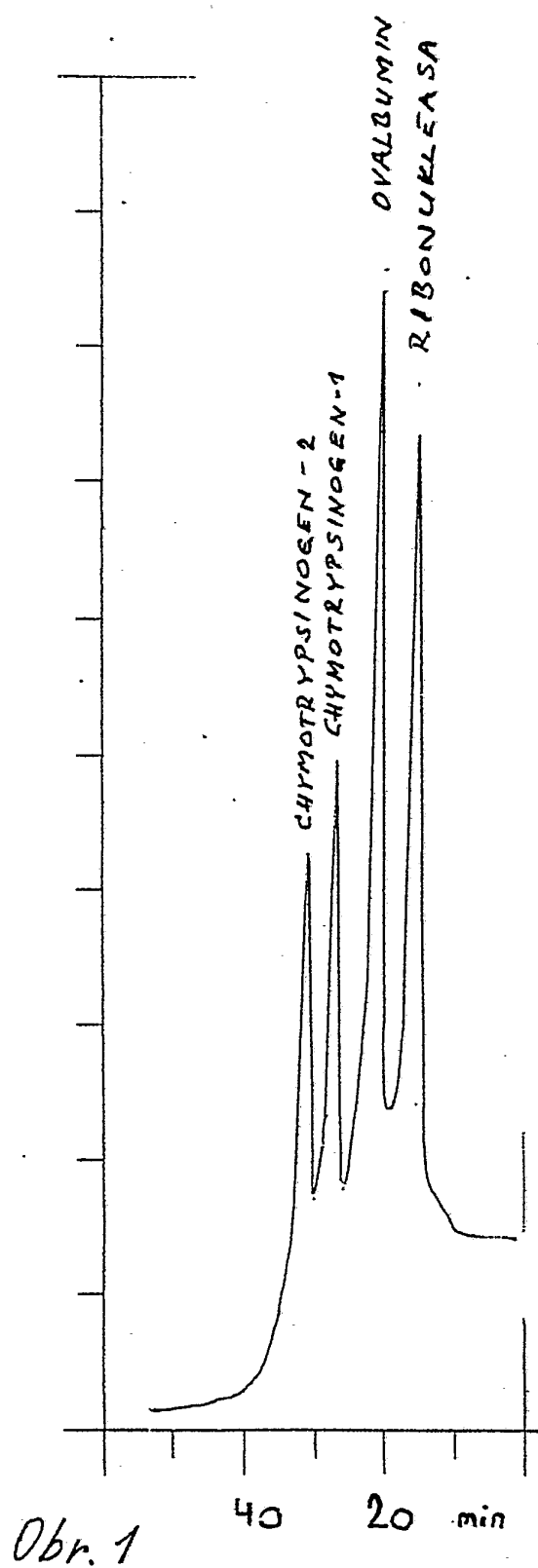
Příklad 31

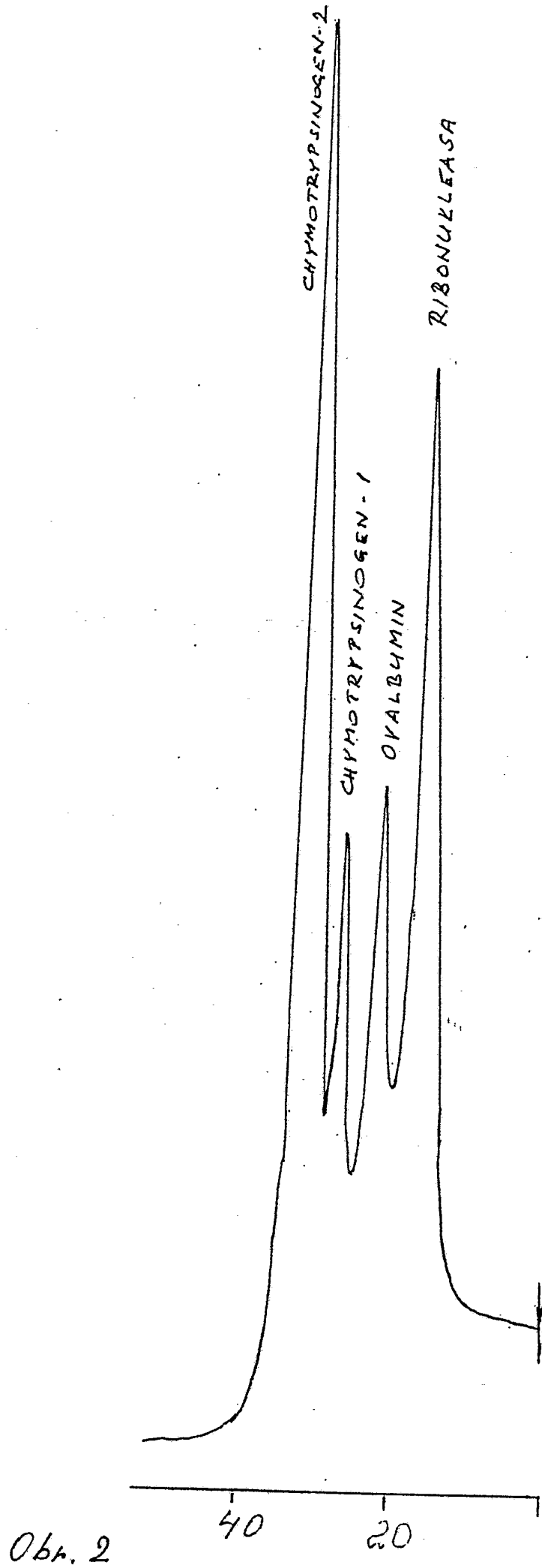
Na membráně a zařízení podle příkladu 25 bylo provedeno rozdělení směsi 0,15 mg mioglobinu a 0,3 mg ovalbuminu s tím rozdílem, že do pufru s klesající iontovou silou byl přidáván acetonitril v takovém množství, aby jeho koncentrace za 20 minut byla 12 % obj. přitlaku 0,25 MPa. Rozdělení ukazuje obrázek 5.

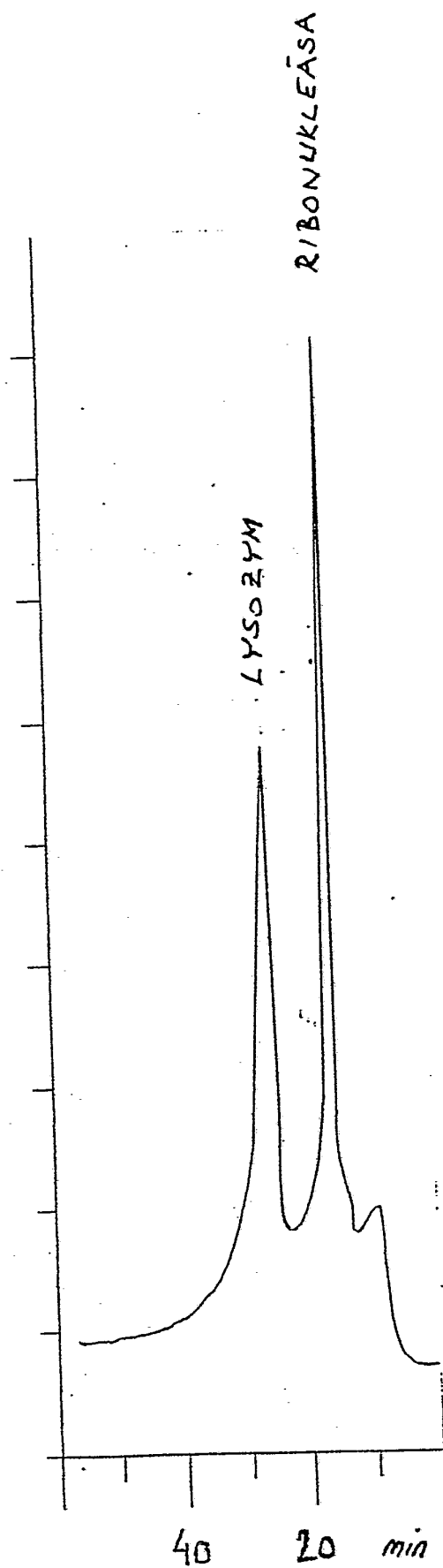
P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Makroporézní polymerní membrány pro chromatografické dělení biopolymerů, vyznačující se tím, že sestávají z makroporézního kopolymeru mono- a divinylického monomeru, přičemž monovinylický monomer je glycidylmethakrylát v množství 5 až 80 % obj. a divinylický monomer je ethylendimethakrylát, jehož podíl na celkovém množství zpolymerizovaných monomerů je 20 až 95 % obj. a na vnitřním povrchu, který i v suchém stavu dosahuje velikosti 1 až 400 m²/g, nesou chemické funkční skupiny původního monomeru a/nebo jejich deriváty, vybrané ze skupiny sestávající ze skupiny epoxidové, allylové, hydroxylové, aminové, sulfonové, hydrogensulfátové, sulfhydrylové, alkylové s řetězcem obsahujícím až 18 C atomů.

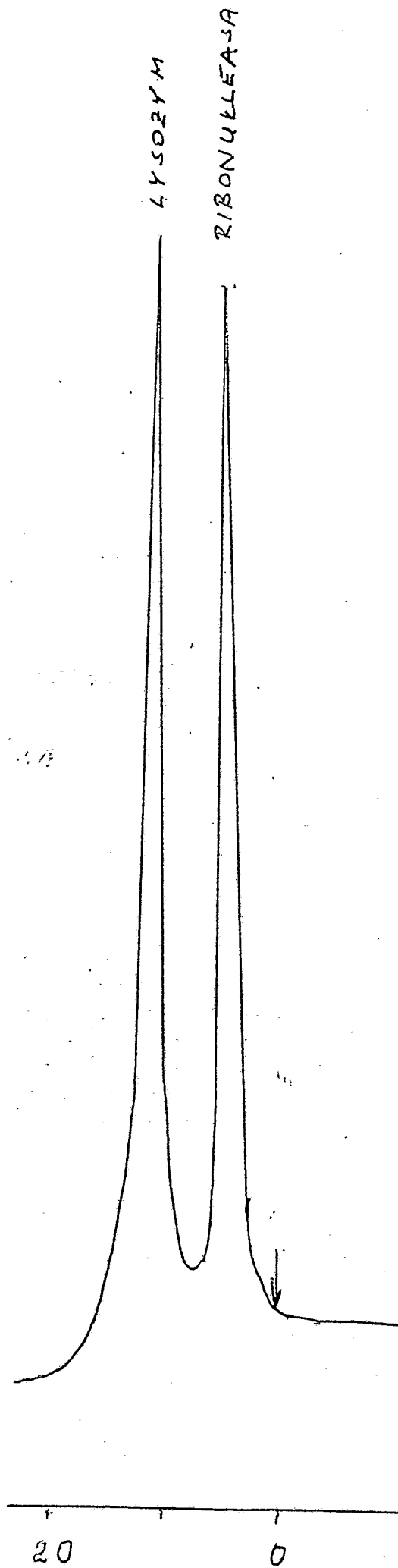
5 výkresů



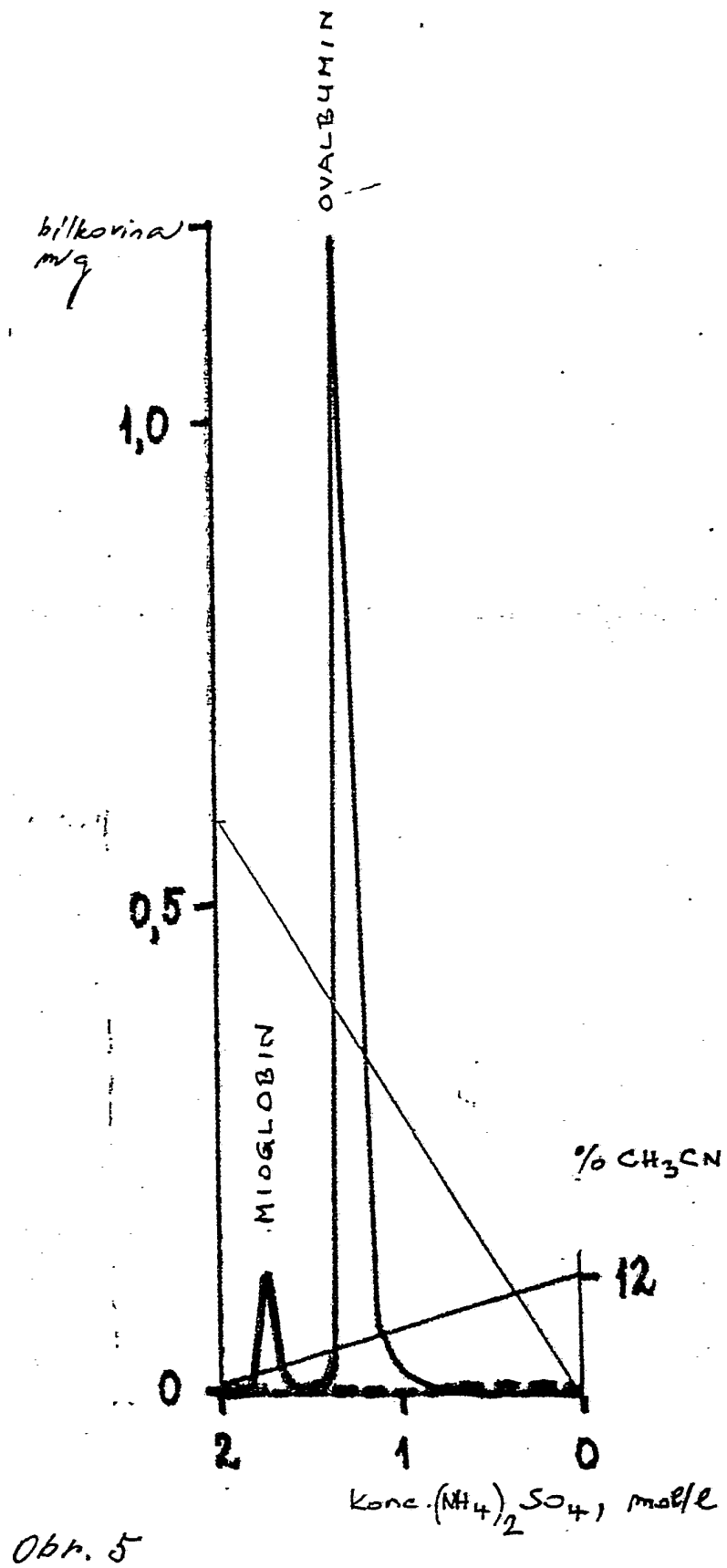




Obr. 3



Obs. 4



Obh. 5