(19) **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

PATENTSCHRIFT

(12) **Ausschließungspatent**

(11) **DD 291 019 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) **B 01 J 13/02**
C 12 N 11/12

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD B 01 J / 331 587 1	(22)	08.08.89	(44)	20.06.91

(71) siehe (73)
(72) Ehwald, Rudolf, Dr. sc. nat.; Klein, Ulrich, Dr. rer. nat.; Jäschke, Andreas, Dipl.-Chem.; Cech, Dieter, Dr. sc. nat., DE
(73) Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 6, Postfach 1297, O - 1086 Berlin, DE

(54) Verfahren zum Einschluß von Makromolekülen in Hohlträger

(55) Immobilisierung; Makromoleküle; Mikrokapseln; Membran; dispersionsmittelabhängige Molekülgröße

(57) Das Verfahren betrifft den Einschluß von Makromolekülen mit dispersionsmittelabhängiger Molekülgröße in präformierte Mikrokapseln oder partikuläre Hohlmembransysteme (vesikuläre Träger). Die Einführung der Makromoleküle in die Hohlträger erfolgt durch Verwendung eines permeabilitätsvermittelnden Dispersionsmittels. Als permeabilitätsvermittelndes Dispersionsmittel wird unter Ausnutzung bekannter Gesetzmäßigkeiten ein solches eingesetzt, in dem die Molekülgröße der einzuschließenden Makromoleküle deutlich unter ihrem Maximum sowie unter der Permeabilitätsgrenze der Hohlträgermembran liegt. Anschließend wird das Dispersionsmittel unter Anwendung bekannter Gesetzmäßigkeiten der Dispersionsmittelabhängigkeit der Molekülgröße verändert oder ausgetauscht. Danach liegt die Molekülgröße der einzuschließenden Makromoleküle über der Permeabilitätsgrenze der Hohlträger-Membran. Es werden Varianten dieses Prinzips für die Immobilisierung von Polysacchariden und Nucleinsäuren oder deren Derivaten beschrieben.

ISSN 0433-6461

5 Seiten

Patentanspruch:

1. Verfahren zum Einschluß von makromolekularen polymeren Stoffen in Hohlträger, **dadurch gekennzeichnet,** daß Hohlträger, begrenzt von einer präformierten, geschlossenen, semipermeablen Ultrafiltermembran mit scharfer Permeabilitätsgrenze, und anschließende hochmolekulare polymere Stoffe mit dispersionsmittelabhängigem effektivem Moleküldurchmesser, der in Abhängigkeit vom eingesetzten Dispersionsmittel unter- oder oberhalb der der Permeabilitätsgrenze liegt, in einem permeationsvermittelnden flüssigen Dispersionsmittel, das einen effektiven Moleküldurchmesser der einzuschließenden Stoffe unter der Permeabilitätsgrenze bedingt, in Verbindung gebracht werden, und danach das Dispersionsmittel ausgetauscht oder in seiner Zusammensetzung unter Ausnutzung bekannter Gesetzmäßigkeiten der Dispersionsmittelabhängigkeit der Molekülgröße der einzuschließenden Stoffe so geändert wird, daß sich der effektive Moleküldurchmesser der einzuschließenden Stoffe vergrößert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß nach der Dispersion der einzuschließenden Makromoleküle und der Hohlträger in dem permeationsvermittelnden flüssigen Dispersionsmittel die einzuschließenden Makromoleküle mit einem bekannten flüchtigen Fällungsmittel koaguliert und die flüchtigen Bestandteile der Dispersion anschließend verdampft werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß ein feuchtes oder trockenes chromatographisches Bett aus den Hohlträgern mit einer Dispersion der einzuschließenden makromolekularen Stoffe im permeationsvermittelnden flüssigen Dispersionsmittel vollständig oder teilweise gesättigt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß als permeationsvermittelndes Dispersionsmittel für einzuschließende hydrophile makromolekulare polymere Stoffe mit stark hydratationsabhängiger Molekülgröße wie Dextrane und weitere wasserlösliche neutrale oder saure Kohlenhydrate, Nucleinsäuren, Polyethylenglycole, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid, Polyacrylsäure oder Verbindungen anderer Stoffe mit diesen polymeren Stoffen eine wäßrige Lösung, die als permeationsvermittelnde Komponente eine wasserlösliche organische Flüssigkeit zu einem unterhalb der Fällungskonzentration für die Makromoleküle liegenden Mengenanteil enthält, eingesetzt wird, und danach eine Verringerung des Mengenanteils der permeabilitätsvermittelnden organischen Komponente im Dispersionsmittel auf dem Wege der Verdünnung, der Dialyse oder des Verdampfens durchgeführt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß als permeationsvermittelndes Dispersionsmittel für einzuschließende Dextrane oder Verbindungen von Dextranen mit anderen Stoffen eine salzfreie oder salzarme wäßrige Lösung von Aceton oder Ethanol mit einem Ethanol- oder Acetongehalt wenig unterhalb der Fällungskonzentration für die Dextrane oder Dextranverbindungen eingesetzt wird und danach eine Erhöhung der Salzkonzentration und/oder Verringerung der Ethanol- bzw. Acetonkonzentration im Dispersionsmittel vorgenommen wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß als permeationsvermittelndes Dispersionsmittel für einzuschließende hydrophile Polyelektrolyte mit stark ionenstärkeabhängiger Molekülgröße wie Nucleinsäuren, Pektin, Polygalacturonsäure, Polyacrylsäure oder Verbindungen derartiger Polyelektrolyte mit anderen Stoffen eine wäßrige Salzlösung mit einer Salzkonzentration unter der Fällungskonzentration für die einzuschließenden Polyelektrolyte eingesetzt wird und danach eine Herabsetzung der Ionenstärke im wäßrigen Dispersionsmittel auf dem Wege der Verdünnung, der Dialyse oder der Elektrodialyse vorgenommen wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß als permeationsvermittelndes Dispersionsmittel für einzuschließende Polyelektrolyte mit stark *p*H-abhängiger Molekülgröße wie Polyacrylsäure, Polygalacturonsäure, Pektin, Nucleinsäure, Chitosan oder Verbindungen anderer Stoffe mit derartigen Polyelektrolyten eine wäßrige gepufferte Salzlösung, in der die Dissoziation der ionischen Gruppen auf Grund des *p*H-Wertes stark herabgesetzt ist, eingesetzt und anschließend der *p*H-Wert im Fall einzuschließender Polyanionen erhöht, im Fall einzuschließender Polykationen erniedrigt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß als Hohlträger bekannte vesikuläre Trägermaterialien, begrenzt von aus Zellwänden bestehenden Ultrafiltermembranen, eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung ist in der Polymerenchemie und Biotechnologie anwendbar.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Umhüllung mit Membranen bei der Bildung von Mikrokapseln oder die Verwendung von Hohlfasern unterscheiden sich von anderen Prinziplösungen zur Immobilisierung von Makromolekülen (kovalente oder adsorptive Trägerbindung) vorteilhaft dadurch, daß die immobilisierten Kolloide diffusionsfähig und chemisch unverändert bleiben können (Hartmeier, W., Immobilisierte Biokatalysatoren. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1986). Der Einschluß in Hohlträger hat auch den Vorteil der Unabhängigkeit der Konzentration des immobilisierten Makromoleküls von den Eigenschaften der Festphase. Trotz dieser Vorteile wird die Immobilisierung von Rezeptoren für die Affinitätschromatographie und für strukturgesteuerte chemische Synthesen ebenso wie die Immobilisierung von Enzymen in der Praxis meist durch kovalente Trägerbindung realisiert, weil die Enkapsulation wegen der meist geringen Ausbeute an eingeschlossenen Makromolekülen oftmals nicht ökonomisch ist bzw. zu Produkten mit technischen Nachteilen (u. a. ungenügende Zugänglichkeit der immobilisierten Makromoleküle für die Diffusion von Substraten oder Liganden, ungenügende hydrodynamische Flußrate im Festbett) führt. Eine Begrenzung des Enkapsulationssprinzips besteht auch darin, das biotechnologisch relevante Makromoleküle wie Nucleinsäuren, Kohlenhydrate und Proteine mit den für die Kapselbildung eingesetzten Reaktionskomponenten chemische Verbindungen eingehen können. Der Einschluß von Makromolekülen in vorgefertigte Hohlträger mit geschlossener Hüllmembran ist bekanntlich (US 4257884) durch eine irreversible chemische Veränderung der Hüllmembran (Vernetzung, Beschichtung mit gleichzeitiger Erniedrigung der Permeabilitätsgrenze) möglich. Hinsichtlich der Reaktionsmöglichkeiten der einzuschließenden Makromoleküle mit den zur Beschichtung bzw. Veränderung der Membran benutzten Reagenzien bestehen ähnliche Einschränkungen wie bei Einschluß durch Kapselneubildung. Hohlfasern und andere offene Hohlmembranmodule haben den Vorteil, daß der innere Hohlraum verlustfrei mit den einzuschließenden Makromolekülen gefüllt werden kann. In den bekannten Hohlmembranmodulen ist allerdings die Geschwindigkeit der Substratpermeation begrenzt. Wegen der genannten Probleme besteht ein begründetes technisches Interesse an einem ökonomischen Verfahren zum Einschluß von Makromolekülen in preiswerte Hohlträger mit geschlossenen semipermeablen Hüllmembranen, die durch eine hohe Stoffaustauschrate für alle permeablen Stoffe ausgezeichnet sind. Sehr hohe spezifische Austauschraten besitzen Mikrokapseln mit sehr dünnen Hüllmembranen, z. B. vesikulären Trägern gemäß DD 247570 A3. Verfahren für einen stabilen Einschluß von Makromolekülen in derartige Hohlträger ohne chemische Veränderung der Makromoleküle und der Hohlträgermembran sind bisher nicht bekannt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist ein schonendes, ökonomisches und effektives Immobilisierungsverfahren für Makromoleküle, das zu diffusionsfähigen, in einer partikulären stationären Phase immobilisierten Makromolekülen und einer hohen Geschwindigkeit des Stoffaustausches zwischen der stationären und der mobilen flüssigen Phase führt.

Darstellung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Makromoleküle durch die Hüllmembran eines präformierten geschlossenen semipermeablen Hohlmembransystems, z. B. von vesikulären Trägern, in die stationäre flüssige Phase des Trägerhohlraumes einzuführen und dort einzuschließen, ohne die Makromoleküle oder die Hüllmembran irreversibel zu verändern.
Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß präformierte Hohlträger, umhüllt von einer präformierten, geschlossenen, semipermeablen, durch eine scharfe Permeabilitätsgrenze ausgezeichneten Ultrafiltermembran, mit einer Dispersion einzuschließender hochmolekularer Stoffe, deren effektiver Moleküldurchmesser in Abhängigkeit vom Dispersionsmittel unter oder über der Permeabilitätsgrenze der Hohlträgermembran liegt, versetzt werden und das Dispersionsmittel verändert wird. Hierbei wird zuerst unter Ausnutzung bekannter Gesetzmäßigkeiten der Dispersionsmittelabhängigkeit der effektiven Molekülgröße polymerer Stoffe ein permeabilitätsverhinderndes Dispersionsmittel gewählt, in dem die einzuschließenden makromolekularen Stoffe durch die Hohlträgermembran permeieren können. Danach werden die effektiven Moleküldurchmesser der einzuschließenden Stoffe über den Wert der Permeabilitätsgrenze der Hohlträgermembran vergrößert. Dies geschieht durch Veränderung der Zusammensetzung des flüssigen Dispersionsmittels, grundsätzlich durch Zusatz von Stoffen, die die effektiven Moleküldurchmesser vergrößern oder durch Herabsetzung der Konzentration solcher Stoffe, die die effektiven Moleküldurchmesser verringern, oder aber durch vollständigen Austausch des Dispersionsmittels. Dabei werden in der Polymerenchemie bekannte Gesetzmäßigkeiten der Abhängigkeit der Molekülgröße und -gestalt vom Dispersionsmittel ausgenutzt. Es wurde überraschend festgestellt, daß das Ausmaß der dispersionsmittelabhängigen Variabilität der effektiven Moleküldurchmesser im Vergleich zum Größenbereich der Permeabilitätsgrenze sehr dünner Ultrafiltermembranen für hydrophile Makromoleküle, u. a. lösliche Polysaccharide und Nucleinsäuren, unerwartet hoch ist und für einen stabilen und effektiven Einschluß in Hohlträger mit geschlossener Hüllmembran ausreicht. Die Erfindung ist nicht auf die Verwendung von zellstrukturierten bzw. vesikulären Trägern, in denen eine Zellwandstruktur trennwirksam ist, beschränkt, da sich gezeigt hat, daß der Einfluß verschiedener Komponenten des Dispersionsmittels auf die Permeabilität dünner Ultrafiltermembranen für bestimmte polymere Stoffe, z. B. der Einfluß hoher Ionenstärken auf die maximale Molmasse für die Permeabilität der Polyelektrolyte und der Einfluß hoher Alkoholkonzentrationen auf die maximale Molmasse für die Permeabilität der Dextranmoleküle, unabhängig von der Art der Membran auftritt. Besonders geeignet für den erfindungsgemäßen Einschluß in präformierte geschlossene Hohlträger sind Dextrane und ähnlich strukturierte hydrophile Stoffe wie lösliche Stärke, Pektinstoffe, Nucleinsäuren, Polyethylenglykol, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid oder Polyacrylsäure, deren hydrodynamisch wirksame Molekülgröße bekanntlich in starkem Maße solvatationsabhängig ist, und die mit Ethanol oder anderen hydrophilen

organischen Flüssigkeiten aus der wäßrigen Dispersion gefällt werden können. Anstelle von einfachen polymeren Stoffen können auch deren Derivate oder zusammengesetzte polymere Stoffe, z.B. mit Periodat oxydiertes Dextran oder Verbindungen von Dextran mit Cibacronblau F3 GA (Blue Dextran), erfindungsgemäß eingeschlossen werden.
Der Zusatz von Ethanol, Aceton oder ähnlichen wasserlöslichen organischen Stoffen zum Dispersionsmittel bis zu einer Konzentration wenig unterhalb des für die Fällung erforderlichen Wertes führt unabhängig von der Art der verwendeten Trennmembran zu einer beträchtlichen Vergrößerung der Molmassenobergrenze für den Membrandurchtritt hydrophiler Makromoleküle mit flexibler solvatationsabhängier Molekülgröße. Dieser Effekt wurde bereits in der Chromatographie mit vesikulären Trägern genutzt (DD 269744 A3). Unerwartet stark ist die Vergrößerung der Molmassenobergrenze für den Membrandurchtritt der Dextranmoleküle, wenn der Zusatz von Ethanol bei geringer Ionenstärke erfolgt. In 35%igem ionenfreiem Ethanol vergrößert sich beispielsweise die Molmassenobergrenze von Dextran für die Permeation in vesikuläre Träger gemäß DD 247570 von einer Molmasse von etwa 12kD auf eine Molmasse über 70kD. Ähnlich verhalten sich dünne Celluloseacetatmembranen. Hierdurch wird es möglich, auch solche Dextranmoleküle in den Innenraum der Hohlträger einzuführen, deren effektiver Moleküldurchmesser in Wasser oder Pufferlösungen weit über den Wert ihrer Permeabilitätsgrenze für die Hohlträgermembran liegt.
Die Molmassenobergrenze einzuschließender hydrophiler Polyelektrolyte mit flexibler Molekülkonfiguration wie Nucleinsäuren, Polygalacturonsäure, Polyacrylsäure und Pektin für den Durchtritt durch dünne Ultrafiltermembranen ist in unerwartetem Ausmaß von der Ionenstärke abhängig, so daß solche Stoffe mit normalerweise weit über der Permeabilitätsgrenze liegender effektiver Molekülgröße durch Erhöhung der Ionenstärke für die Hohlträgermembran permeabel gemacht und durch anschließende Verringerung der Ionenstärke eingeschlossen werden können. Hierzu lassen sich Methoden der Verdünnung, Dialyse oder Elektrodialyse einsetzen. In ähnlicher Weise ist es möglich, *p*H-Veränderungen auszunutzen, da sich mit zunehmender Dissoziation der ionischen Gruppen die hydrodynamische Teilchengröße eines Polyelektrolyts bekanntlich (vergl. Autorenkollektiv, Strukturuntersuchungen an Biopolymeren mit spektroskopischen und hydrodynamischen Methoden, Akademie-Verlag, Berlin, 1976) außerordentlich vergrößert.
Als permeabilitätsvermittelnde Dispersionsmittelkomponenten können also für den Einschluß von Hydrokolloiden, wie oben dargestellt, sowohl wasserlösliche, in hoher Konzentration desolvatisierend auf die einzuschließenden hydrophilen Makromoleküle wirkende organische Flüssigkeiten, als auch desolvatisierend wirkende Ionen eingesetzt werden.
Die für den Einschluß der Makromoleküle notwendige Herabsetzung der Konzentration permeabilitätsvermittelnder Dispersionsmittelkomponenten kann ohne chemische Umsetzung grundsätzlich durch Verdünnen, Dialyse oder Verdunsten erfolgen, wobei der Vorteil der letztgenannten beiden Möglichkeiten darin besteht, daß sie ohne Verdünnung der Makromoleküle im Hohlträgerinnenraum durchgeführt werden können. Eine andere Möglichkeit zur Herabsetzung der Konzentration permeabilitätsvermittelnder Dispersionsmittelkomponenten besteht in ihrer chemischen Umsetzung. Beispielsweise können die für die Permeation von Polyanionen vermittelnd wirkenden Protonen aus der wäßrigen Lösung durch Reaktion mit basisch wirkenden Stoffen entfernt werden.
Eine vorteilhafte Variante der Erfindung besteht darin, die einzuschließenden hydrophilen Makromoleküle nach der Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes im Hohlträgerinnenraum aus der permeationsvermittelnden Flüssigkeit auszufällen. In vielen Fällen sind bekanntlich als Fällungsmittel für hydrophile Makromoleküle Ethanol, Aceton oder ähnliche leicht verdunstende wasserlösliche und in chemischer Hinsicht stabile organische Flüssigkeiten geeignet. Die genannten Flüssigkeiten sind als Fällungsmittel auch deswegen vorteilhaft, weil sie, wie oben dargestellt, unterhalb der Fällungskonzentration zur Vergrößerung der Molmassenobergrenze zahlreicher hydrophiler Polymere für die Membranpermeation eingesetzt werden können.
Anschließend an die Fällung der Makromoleküle kann das außerhalb der Hohlträger gebildete Koagulat auf einem Filtertuch abgewaschen und eine Lösungsmitteltrocknung oder Gefriertrocknung der Hohlträger durchgeführt werden, überführt man das Trockenprodukt in einer permeationsverhindernde Flüssigkeit, normalerweise Wasser oder eine wäßrige Salzlösung, kommt es zur Membrantrennung und zum gewünschten Einschluß der Makromoleküle im Hohlträger.
Es ist ratsam, die Hohlträger für den erfindungsgemäßen Einschluß von Makromolekülen in der Form eines chromatographischen Bettes anzuordnen. Dabei werden sie vor oder bei der Auftragung einzuschließender Makromoleküle vollständig oder teilweise mit einer permeabilitätsvermittelnden Lösung gesättigt. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß wegen des verhältnismäßig geringen äußeren Flüssigkeitsvolumens ein hoher Prozentsatz der eingesetzten Makromoleküle eingeschlossen werden kann. Anstelle eines feuchten Festbettes kann ein trockenes chromatographisches Bett gemäß DD-Aktenz. G 01 N/3170428 eingesetzt werden. Sättigt man das trockene Festbett mit der Dispersion der einzuschließenden Makromoleküle im permeabilitätsvermittelnden Dispersionsmittel, gelingt die Einführung der Makromoleküle in den Hohlträgerinnenraum ohne Verdünnung.
Die Vielzahl der Böden eines Festbettes kann genutzt werden, um den Anteil der nicht eingeschlossenen Makromoleküle zu verringern. Dies erfordert ein Festbettvolumen, das ein Mehrfaches des Volumens der zugesetzten Dispersion einzuschließender Makromoleküle beträgt und ist daher stets mit starker Verdünnung der einzuschließenden Makromoleküle verbunden. Ein besonders hoher Prozentsatz der einzuschließenden Makromoleküle läßt sich erreichen, wenn ein trockenes chromatographisches Bett gemäß DD-Aktenz. G 01 N/3170428 genutzt wird. Zunächst wird ein Teil des Trockenbettes mit einer permeabilitätsvermittelnden Flüssigkeit gesättigt. Gleichzeitig oder danach wird die flüssige Probe mit zu immobilisierenden Makromolekülen aufgetragen.
Anschließend wird eine Flüssigkeit aufgetragen, in der die Makromoleküle nicht durch die Hohlträgermembran permeieren. Beim Durchlauf durch das chromatographische Festbett vergrößert sich der effektive Moleküldurchmesser der einzuschließenden Makromoleküle über den Wert der Membranpermeabilitätsgrenze. Die zu dieem Zeitpunkt außerhalb der Hohlträger (im Totvolumen) liegenden ausgeschlossenen Moleküle wandern solange schneller als die Befeuchtungsfront bzw. das Dispersionsmittel, bis sie einen Bereich des Festbettes erreichen, in dem sie wieder in das Innere der Hohlträger eindringen können. Die Aufteilung des chromatographischen Bettes in mehrere Böden, in denen Diffusion und Einschluß erfolgen, ermöglicht den Einschluß von nahezu der gesamten Menge ausgetragener Makromoleküle. Die Erfindung wird nachstehend durch Ausführungsbeispiele erläutert.

Ausführungsbeispiele

1. Einschluß eines neutralen hydrophilen Polymers durch Veränderung der Ethanolkonzentration beim Durchlaufen eines chromatographischen Bettes aus vesikulären Trägern.
Ein zylindrisches chromatographisches Bett aus salzfreien, getrockneten veskulären Trägern gemäß DD-Aktenz. G 01 N/317 042 8 von 3 cm Länge und 1,5 cm Durchmesser wurde mit Filterpapier bedeckt und mit 1 ml einer salzfreien wäßrigen Lösung von Ethanol (30 Vol.-%) und Dextran M 70 (Hersteller VEB Serumwerk Dessau, DDR) in einer Konzentration von 20 mg/ml einseitig befeuchtet. Nach dem Einsaugen der ethanolhaltigen Dextranlösung wurde eine 100 mM Phosphatpufferlösung nach Soerensen bis zur vollständigen Sättigung des Festbettes in das selbstsaugende chromatographische Bett eingeführt. Nach einer Diffusionszeit von 12 h wurde die feuchte Masse der vesikulären Träger mit 20 ml der Phosphatpufferlösung, anschließend mit 20 ml 30%igen Ethanols gewaschen. Die Menge des abgewaschenen Dextrans wurde mit einem Polarimeter 141 M, Firma Perkin & Elmer, erfaßt. In allen Versuchen betrug der eingeschlossene (mit Ethanol-Lösung auswaschbare) Teil des Dextrans mehr als 60 %.
2. Einschluß eines neutralen hydrophilen Polymers durch Fällung und Trocknung aus Ethanol mit anschließender Quellung in ethanolfreier wäßriger Lösung 5 ml einer 2%igen ethanolhaltigen Dextranlösung (30 Vol.-% Ethanol, 20 mg/ml Dextran M 70) wurden auf ein mit salzfreier Lösung von Ethanol in Wasser (30 Vol.-%) gesättigtes, gut verdichtetes chromatographisches Bett aus vesikulärem Trägermaterial (Bettvolumen 6 ml) aufgetragen. Das Einsaugen der Probe erfolgt mit einer Flußrate von 0,1 $ml/cm^2\ min^{-1}$. Nach dem Eindringen der Probe wird die feuchte Trägermasse aus dem Chromatographierohr entnommen und mit 20 mg NaCl (ohne Wasser) verrührt. Nach 30 min wird die Masse in kleinen Portionen unter starkem Rühren in ein Becherglas mit 30 ml 96%igen Ethanols übertragen. Die Träger werden auf einem runden Filtertuch aus Polyamidseide mit 0,1 mm Porendurchmesser und 3 cm Durchmesser abgefiltert, zur Entfernung des Restwassers mit 10 ml Ethanol in gepackter Form gewaschen, scharf abgesaugt und im Rotationsverdampfer unter Zusatz von 0,3 ml n-Butanol getrocknet. Das getrocknete Pulver wird mit 10 ml dest. Wasser gequollen und im Chromatographierohr mit Aqua dest bis zu einer Gesamtmenge des Eluats (Eluat 1) von 20 ml gewaschen. Der Dextrangehalt des so erhaltenen Eluats 1 wird am Polarimeter 141 M gemessen. Anschließend wird nochmals mit 10 ml Aqua dest gewaschen, wobei das Eluat (Eluat 2) zur polarimetrischen Untersuchung aufgefangen wird. Zuletzt wird die Packung mit 20 ml salzfreier wäßriger Ethanol-Lösung (30 Vol.-%) eluiert, das Eluat (Eluat 3) wird aufgefangen. In allen Versuchen beträgt der Anteil des eingeschlossenen Dextrans (Eluat 3) an der gesamten im Trockenprodukt vorhandenen Menge mehr als 80 % und mehr als 30 % der insgesamt eingesetzten Menge. Eluat 2 enthielt keine nachweisbare Dextranmenge. Zu einem entsprechenden Ergebnis kommt man, wenn anstelle von Dextran M 70 eine aus diesem Stoff und einem niedermolekularen Stoff zusammengesetzte Verbindung (beispielsweise blue Dextran) oder ein durch Periodatoxidation aktiviertes Dextran eingesetzt wird.
3. Einschluß von Polyelektrolyten durch Veränderung der Ionenstärke beim Durchlauf der Makromoleküle durch ein chromatographisches Bett aus vesikulären Trägern.
Gemäß DD 24 570 hergestellte und getrocknete vesikuläre Träger werden in einem 200 mM $MgCl_2$ enthaltenden Puffer (10 mM Tris-HCl, *p*H 7,5) suspendiert. Eine Packung dieser Träger in einer Chromatographie-Säule (Bettvolumen 5 ml, Innendurchmesser 16 mm) wird mit Filterpapier bedeckt. Die Säule wird mit einem registrierenden UV-Detektor mit Durchflußküvette (Wellenlänge 254 nm), einer Durchfluß-Leitfähigkeitsmeßzelle und einem Fraktionssammler verbunden. Das Bett wird solange mit dem 200 mM $MgCl_2$ enthaltenden Puffer gespült, bis das Eluat von UV absorbierenden Stoffen frei ist. Anschließend erfolgt der Wechsel zu einem Elutionspuffer, der 20 mM $MgCl_2$ enthält. Mit diesem wird gewaschen, bis die Leitfähigkeit des Eluats gleich der des reinen Puffers ist. 50 µl einer Lösung von degradierter Ribonucleinsäure (RNA aus Hefe, Boehringer Mannheim, 1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, *p*H 7,5) werden auf die Säule aufgebracht und nach Einsaugen der Probe in kleinen Portionen mit magnesiumchloridfreiem Puffer gespült. Infolge des Pufferwechsels bleibt ein Teil der Nucleinsäuremoleküle (20 bis 30 %) im Innenraum der Träger eingeschlossen und kann diesen vorerst nicht verlassen. Die nicht eingeschlossenen Moleküle werden eluiert.