



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 229 888** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 K 35/12, 38/55**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2002124666/15, 16.09.2002

(24) Дата начала действия патента: 16.09.2002

(46) Дата публикации: 10.06.2004

(56) Ссылки: RU 2088241 C1, 27.08.1997. RU
2067868 C1, 20.10.1996. GB 1070870 A1,
07.06.1967. SU 1823184 A1, 20.10.1996.

(98) Адрес для переписки:
630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово,
3, кв.16, С.С. Решетникову

(72) Изобретатель: Акименко З.А. (RU),
Решетников С.С. (RU), Тюнин А.С. (RU)

(73) Патентообладатель:
Решетников Сергей Степанович (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОСНОВНОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ ИЗ ОРГАНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

(57)

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к технологии получения основного ингибитора протеаз типа Кунитца из органов крупного рогатого скота, и может быть использовано в биохимии, клеточной и молекулярной биологии, а также в медицинской промышленности в качестве субстанции для получения лекарственных препаратов. Способ включает измельчение исходного сырья, экстракцию водным раствором кислоты, выделение и очистку целевого продукта, осуществляемую хроматографией с применением карбоксильных катионообменников. После стадии экстракции проводят осаждение примесей в щелочной среде при температуре от -4 до +30°C, доводя pH раствора сначала до 9,5-11,3, а после удаления выпавшего осадка доводят pH кислотой до 2-8.

Выделение осуществляют твердофазной экстракцией на сорбенте обращенно-фазового типа путем порционного накопления целевого продукта с периодической промывкой сорбента буферным раствором. Окончательную очистку целевого продукта проводят на карбоксиметил-силикагеле с последующей дополнительной промывкой спиртовым раствором, после чего осуществляют десорбцию 0,5-2 М раствором фосфатов, сульфатов, галогенидов, преимущественно хлоридов, щелочных, щелочноземельных металлов, аммония или их смесью. Технический результат: способ позволяет значительно увеличить выход целевого продукта при существенном уменьшении объемов экстракта уже на начальных стадиях и при повышении степени очистки целевого продукта. 9 з.п. ф-лы.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 229 888** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 35/12, 38/55**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2002124666/15, 16.09.2002

(24) Effective date for property rights: 16.09.2002

(46) Date of publication: 10.06.2004

(98) Mail address:
630559, Novosibirskaja obl., pos. Kol'tsovo,
3, kv.16, S.S. Reshetnikovu

(72) Inventor: Akimenko Z.A. (RU),
Reshetnikov S.S. (RU), Tjunin A.S. (RU)

(73) Proprietor:
Reshetnikov Sergej Stepanovich (RU)

(54) **METHOD FOR PREPARING PROTEASE BASIC INHIBITOR FROM CATTLE ORGA**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, biochemistry.
SUBSTANCE: invention relates to technology for preparing proteases Kunitz inhibitor from cattle organs and can be used in biochemistry, cellular and molecular biology, and medicinal industry as a substance used for preparing medicinal preparations. Method involves milling the parent raw, its extraction with acid an aqueous solution and purification of the end product by chromatography method using cation-exchange resins. After extraction stage impurities are precipitated in alkaline medium at temperature from -4°C to +30 °C bringing about pH value of solution firstly to 9.5-11.3 and after removing the precipitated deposit to pH value 2-8 with

acid. Isolation is carried out by solid-phase extraction on sorbent of reversed-phase type by portion accumulation of the end product with periodic washing a sorbent with buffer solution. The final purification of the end product is carried out on carboxymethylsilica gel followed by additional washing with alcoholic solution and the following desorption with 0.2-2 M solution of phosphates, sulfates, halides being mainly chlorides, alkaline, earth-alkaline metals, ammonium or their mixture. Method provides significant elevating the yield of the end product and significant reducing volumes of extract at initial stages and enhancing degree of purity of the end product. EFFECT: improved preparing method. 10 cl, 7 ex

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к технологии получения основного ингибитора протеаз типа Кунитца из органов крупного рогатого скота, преимущественно из легких, печени, поджелудочной железы, околоушных желез, почек, верхнечелюстных желез, селезенки, желудка, кишок и мускулов (мышц, мышечной ткани), и может быть использовано в биохимии, клеточной и молекулярной биологии, а также в медицинской промышленности в качестве субстанции для получения лекарственных препаратов, например ингибитора, ингибитора, контрикала, гордокса, трасилола апротинина и др.

Известен способ получения вещества, обладающего антипротеазным действием, из околоушных желез животных, включающий измельчение исходного сырья, гомогенизацию, экстракцию с последующей фильтрацией, и очисткой целевого продукта, при котором экстракцию осуществляют раствором уксусной кислоты при соотношении сырье : кислота 1:8-1:10 с добавлением хлористого цинка в количестве 1 г на 1 л смеси при pH 3,0-3,5 и температуре 4-8°C в течение 36-60 ч, экстракт фильтруют, фильтрат обрабатывают ацетоном в соотношении 1:5 при температуре (-5)-(+5)°C в течение 18-22 ч, полученный осадок, содержащий целевой продукт, растворяют в дистиллированной воде, фильтруют на цеолите и лиофилизируют (Авт. свид. РФ 1823184, А 61 К 35/37, 1996).

Недостатком способа является недостаточная очистка целевого продукта.

Указанный недостаток частично устранен в известном способе получения основного ингибитора протеаз из органов крупного рогатого скота, включающем измельчение сырья, экстракцию в кислой среде, удаление осадка, две хроматографии с последующей очисткой целевого продукта ацетоном и высушиванием целевого продукта, при котором первую хроматографию проводят на сульфокатионите, элюат подкисляют соляной кислотой до pH 1-3, отделяют осадок, надосадочную жидкость обрабатывают трихлоруксусной кислотой до концентрации 2,5-7%, удаляют выпавшие белки, а из надосадочной жидкости высаливают целевой продукт, очищают хроматографией на сефадексе и лиофилизируют (Патент РФ 2067868, А 61 К 35/39, 35/42, 38/55, 1996).

Описанный способ является очень сложным, многостадийным. Отдельные стадии, например хроматография на сефадексе, являются нетехнологичными и, как следствие этого, не обеспечивается достаточный выход конечного продукта.

Известен способ экстракции и извлечения в очищенном виде полипептидов с калликреин- и трипсинотормозящим эффектом из органов животных, при котором подлежащие экстрагированию органы животных измельчают и затем экстрагируют подкисленной водой, причем вода содержит такую кислоту или кислоты, которые в области pH от 4,5 до 8,0 образуют соль, растворимость которой при комнатной температуре меньше чем 10^{-4} , после чего экстракт органов обрабатывают окисью или гидроокисью металла, катион которого образует с употребленной при экстракции кислотой соль, растворимость продукта

которой при комнатной температуре меньше чем 10^{-4} , после чего экстрагированный орган и осадок соли отделяют, активные полипептиды из экстракта органов связывают на адсорбенте силикатного типа при величине pH от 5 до 7, адсорбент отделяют и промывают кислой водой, затем активные полипептиды элюируют полярным органическим растворителем, разбавленным кислой водой при величине pH ниже 3, и полученный таким образом кислый элюат известным образом очищают далее (Патент ФРГ №1492114, 30 h, 2/01, 1970).

Данный способ является многостадийным, а использование металлов, в частности стронция, остающихся в отходах, нежелательно по экологическим причинам. Выход целевого продукта при применении данного способа также невелик.

Наиболее близким по технической сущности и результату к заявляемому является способ получения основного ингибитора протеаз из органов крупного рогатого скота, включающий измельчение исходного сырья, экстракцию водным раствором кислоты, выделение и очистку целевого продукта, осуществляемую хроматографией с применением карбоксильных катионообменников (Патент РФ 2088241, А 61 К 35/39, 35/42, 38/55, 1997). В описанном способе выделение продукта осуществляют ультрафильтрацией в тангенциальном потоке сначала на полых волокнах с размером пор, отсекающим белки, с молекулярным весом 15-50 КДа, а затем на полых волокнах с размером пор, отсекающим белки, с молекулярным весом менее 5 КДа. Очистку осуществляют хроматографией на карбоксиметилцеллюлозе, причем сорбцию проводят при pH 6,2-7,2, а десорбцию - 0,45 М раствором хлорида натрия при том же pH.

Данный способ является достаточно сложным и требует периодической замены непрочных полых волокон. При использовании способа не достигается необходимая степень очистки, обессоливания и концентрации целевого продукта.

Следует также отметить, что все производители препаратов, получаемых экстракцией из животных органов, сталкиваются с проблемой больших объемов полученного экстракта, в котором исходная концентрация целевого продукта обычно очень невелика. Для уменьшения объемов и увеличения концентрации целевого продукта на ранних стадиях используют различные приемы, например осаждение ацетоном белковых компонентов, использование ультрафильтрации (тангенциальный поток), применение бентонита и др. Эти приемы усложняют и удорожают известные способы и зачастую малоэффективны.

Задачей изобретения является повышение выхода и степени очистки целевого продукта, а также упрощение и, соответственно, удешевление способа.

Поставленная задача достигается тем, что в способе получения основного ингибитора протеаз из органов крупного рогатого скота, включающем измельчение исходного сырья, экстракцию водным раствором кислоты, выделение и очистку целевого продукта, осуществляемую хроматографией с применением карбоксильных катионообменников, после стадии экстракции

проводят осаждение примесей в щелочной среде при температуре от -4 до +30°C, доводя pH раствора сначала до 9,5-11,3, а после удаления выпавшего осадка доводят кислотой pH раствора до 2-8, выделение осуществляют твердо фазной экстракцией на сорбенте обращенно-фазового типа путем порционного накопления целевого продукта с периодической промывкой сорбента буферным раствором, окончательную очистку целевого продукта проводят на карбоксиметил-силикагеле с последующей дополнительной промывкой спиртовым раствором, после чего осуществляют десорбцию 0,5-2 М раствором фосфатов, сульфатов, галогенидов, преимущественно хлоридов, щелочных, щелочноземельных металлов, аммония или их смеси.

Экстрагирование и подкисление растворов производят минеральными и/или органическими кислотами, например соляной, серной, фосфорной, щавелевой, уксусной, муравьиной.

Осаждение примесей в щелочной среде проводят в растворе гидроокиси щелочных и/или щелочноземельных металлов или их смесей.

Осаждение примесей в щелочной среде проводят водным раствором аммиака или трис-гидроксиметиламинметана.

Осаждение примесей проводят щелочью с концентрацией 0,05-1,5 М.

Осаждение примесей в щелочной среде производят в течение 1-48 часов.

Удаление выпавших в осадок примесей осуществляют центрифугированием или фильтрацией на соответствующем фильтре.

Промывку осуществляют раствором спирта или смесью растворов метилового, этилового, пропилового и изопропилового спиртов.

Карбоксиметил-силикагель с осевшим на нем целевым продуктом промывают раствором, содержащим спирт, или смесью спиртов в концентрации 20-50%.

Перед стадией десорбции хроматографическую колонну промывают буферным раствором, не содержащим спирт с pH 2-8.

Способ осуществляют следующим образом. Замороженные органы крупного рогатого скота, преимущественно легкие, печень, поджелудочную железу, окологрудные железы, почки, верхнечелюстные железы, селезенку, желудок, кишки и мышечную ткань измельчают на мясорубке. Из измельченной массы в водном растворе кислоты экстрагируют целевой продукт при pH 1-5 в течение 1,5-72 часов в зависимости от органа. Экстрагирование растворов производят минеральными и/или органическими кислотами, например соляной, серной, фосфорной, щавелевой, уксусной, муравьиной. Осадок (жмых) отделяют центрифугированием и/или фильтрованием через крупнопористый фильтр (марля, бязь, металлическая сетка).

После стадии экстракции проводят осаждение примесей, добавляя щелочь в сухом виде или в виде концентрированного раствора. При этом применяют окиси и/или гидроокиси щелочных и/или щелочно-земельных металлов, и/или раствор аммиака, и/или трис-гидроксиметиламинметан. Этот этап

проводят при температуре от -4 до +30 °C, при pH раствора 9,5-11,3 в течение 1-48 часов. Осаждение примесей проводят щелочью с концентрацией 0,05-1,5 М. Удаление выпавшего осадка производят центрифугированием или фильтрацией на бумажном или тканевом фильтре, например на бязи. Полученный частично очищенный экстракт подкисляют до pH 2-8.

Выделение целевого продукта осуществляют твердофазной экстракцией порционно на сорбенте обращенно-фазового типа, например "Диасорб С-16", "Силасорб С-8", "Нуклеосил С-18", периодически промывая сорбент буферным раствором. Допустимо присутствие в буферном растворе слабо концентрированного спирта 3-10%. Остающийся раствор декантируют или отсасывают. На этом этапе удаляются все гидрофильные примеси. К сорбенту с накопившимся на нем целевым продуктом добавляют небольшое количество буферного раствора, содержащего спирт в концентрации 20-50%. При этом используют спирты, смешивающиеся с водой в этих концентрациях, например метиловый, этиловый, пропиловый и изопропиловый, или их смеси. Затем спиртовой раствор с элюированным целевым продуктом отделяют от сорбента.

Этап твердофазной экстракции позволяет значительно уменьшить рабочий объем и увеличить концентрацию целевого продукта в растворе в 20-100 раз.

Очистку целевого продукта проводят на карбоксиметил-силикагеле в хроматографической колонне. Применение карбоксильных катионообменников не требует стадий дополнительной очистки, как при использовании, например, сульфокатионитов типа Bio-Rex или КУ-23 (см. аналог - патент РФ 2067868). Карбоксиметил-силикагель с осевшим на нем целевым продуктом промывают раствором, содержащим спирт в концентрации 20-50%. При этом используют спирты, смешивающиеся с водой в этих концентрациях, например метиловый, этиловый, пропиловый и изопропиловый, или их смеси. При спиртовой промывке удаляются гидрофобные примеси, которые присутствуют во всех конечных целевых продуктах, получаемых известными ранее способами.

Снятие целевого продукта с карбоксиметил-силикагеля осуществляют десорбцией 0,5-2 М - раствором фосфатов, сульфатов, галогенидов, преимущественно хлоридов, щелочных, щелочноземельных металлов, аммония или их смеси. Для получения еще более чистого целевого продукта перед стадией десорбции хроматографическую колонну промывают буферным раствором, не содержащим спирт с pH 2-8.

Пример 1. Один кг легких КРС измельчают на мясорубке, добавляют 3 литра воды, доводят pH до 2-2,5 соляной кислотой и выдерживают 4 часа. Осадок отделяют центрифугированием, раствор собирают, доводят 5 М раствором гидроокиси натрия до pH 10 с конечной концентрацией гидроокиси натрия 0,2 М. Затем раствор оставляют на 16 часов, осадок отделяют декантированием или центрифугированием, нейтрализуют раствор до pH 6,5 соляной кислотой. Полученный раствор подвергают твердофазной экстракции

в несколько приемов, а именно порцию сорбента обращенно-фазового типа Диасорб С-8, 50 мл встряхивают или перемешивают с 0,5 литрами полученного ранее раствора, декантируют жидкость, промывают сорбент забуференным раствором фосфата натрия и заливают новой порцией полученного ранее раствора.

На этом этапе целевой продукт переходит из раствора в сорбированное состояние на обращенно-фазовый сорбент. Сорбент, насыщенный белковыми гидрофобными полипептидами, уравнивают забуференным раствором фосфата натрия с концентрацией 0,1 М и pH 6,5.

Десорбцию проводят 25% раствором изопропилового спирта. Далее полученный раствор непосредственно сорбируют на колонну с 20 мл катионообменного силикагеля Диасорб Карбокси, уравновешенную тем же буферным раствором на основе фосфата натрия, и промывают тем же буферным раствором с добавлением 25% изопропилового спирта. Десорбцию проводят 1 М раствором хлористого натрия на основе того же фосфатного буфера. Описанные выше две стадии с использованием силикагельных сорбентов практически количественные. Полученное вещество представляет собой раствор целевого продукта в забуференном 1 М хлористом натрии, объем полученного раствора 40 мл. Обессоливание проводят на картридже с обращенно-фазовым сорбентом Диасорб С-8. Обессоленный раствор целевого продукта высушивают. Выход целевого продукта составляет 125 мг с активностью 8200 КИЕ/мг. По данным электрофореза в полиакриламидном геле препарат имеет гомогенный белковый состав. По данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) чистота целевого продукта составляет 90%.

Пример 2. Один кг легких КРС измельчают на мясорубке, экстрагируют водным 0,5 М раствором соляной кислоты, осаждают примеси подщелачиванием раствора гидроокисью кальция до конечной концентрации 0,5 М и pH 9,5. Примеси осаждают в течение 8 часов. Затем проводят твердофазную экстракцию, используя 0,1 М раствор уксусной кислоты на сорбенте обращенно-фазового типа Нуклеосил С-18. Десорбцию проводят 50% раствором этилового спирта, подкисленного уксусной кислотой до pH 3,5. Полученный раствор наносят на колонну с ионообменным силикагелем Диасорб Карбокси, уравновешенным 0,1 М уксусной кислотой. Десорбцию с колонны проводят 0,8 М раствором хлористого натрия. Обессоливание проводят по схеме твердофазной экстракции в 0,1 М уксусной кислоте. Полученный гомогенный по белковому составу препарат высушивают или осаждают 8 объемами охлажденного ацетона, а выпавший осадок центрифугируют и высушивают. Выход целевого продукта 110 мг с активностью 7900 КИЕ/мг. По данным ВЭЖХ чистота целевого продукта составляет 86%.

Пример 3. Один кг замороженной поджелудочной железы крупного рогатого скота измельчают на мясорубке, перемешивают с 3 литрами подкисленного фосфорной кислотой до pH 3 водного

раствора, перемешивают в течение 2 часов, осадок отделяют центрифугированием. Примеси отделяют подщелачиванием полученного раствора гидроокисью калия до конечной концентрации 0,1 М и pH 11. Выпавший осадок отделяют центрифугированием, полученный раствор очищают твердофазной экстракцией на сорбенте обращенно-фазового типа Нуклеосил С-18, уравновешенном буферным раствором 0,05 М ацетата натрия, pH 5,5. Сорбированный продукт десорбируют раствором 80% этилового спирта в этом же буфере.

Полученный элюат сорбируют на колонну Диасорб Карбокси, уравновешенную тем же буфером, и десорбируют с колонны 0,5 М раствором хлористого калия. Обессоливание проводят методом твердофазной экстракции на обращенно-фазовом сорбенте Диасорб С-16, после чего очищенный целевой продукт высаживают 5-кратным объемом ацетона. Выход целевого продукта 15 мг с активностью 7500 КИЕ/мг. По данным ВЭЖХ чистота целевого продукта составляет 85%.

Пример 4. Один кг замороженных околушных желез КРС измельчают на мясорубке, массу перемешивают в течение 2 часов в подкисленном уксусной кислотой водном растворе, поддерживая pH 2,5-3,0. Жмых отделяют фильтрацией на металлической сетке. Доводят pH раствора водным раствором аммиака до 9, отстаивают в течение 4 часов, надосадочную жидкость декантируют, осадок отделяют фильтрованием на бязевом фильтре. Раствор подкисляют уксусной кислотой до pH 4 и проводят очистку твердофазной экстракцией на сорбенте обращенно-фазового типа Силасорб С-18. Сорбированный продукт элюируют водным раствором смеси 20% этилового и 30% изопропилового спиртов в слабом буфере ацетата натрия, pH 4. Элюат наносят на колонну с катионообменной смолой Диасорб Карбокси. Десорбцию с колонны проводят 1,5 М раствором хлористого натрия, обессоливание на картридже с обращенно-фазовым сорбентом в растворе разбавленной уксусной кислоты и осаждают целевой продукт 10-кратным объемом ацетона. Выход целевого продукта 5 мг с активностью 7800 КИЕ/мг. По данным ВЭЖХ чистота целевого продукта составляет 85%.

Пример 5. Один кг легких КРС измельчают на мясорубке, экстрагируют водным 0,5 М раствором щавелевой кислоты с pH 3,0. Примеси из экстракта осаждают подщелачиванием раствора трис-гидроксиметиламинометаном до pH 10,0 в течение 10 часов. Затем проводят твердофазную экстракцию на сорбенте обращенно-фазового типа Силасорб С-8. Десорбцию проводят 50% раствором метилового спирта, подкисленного уксусной кислотой до pH 3,5. Полученный раствор наносят на колонну с ионно-обменным силикагелем Диасорб Карбокси, уравновешенным 0,1 М уксусной кислотой. Десорбцию с колонны проводят 0,8 М раствором хлористого натрия. Обессоливание проводят по схеме твердофазной экстракции в 0,1 М уксусной кислоте. Полученный гомогенный по белковому составу препарат высушивают или осаждают 8 объемами

охлажденного ацетона, а выпавший осадок центрифугируют и высушивают.

Выход целевого продукта 120 мг с активностью 8500 КИЕ/мг. По данным ВЭЖХ чистота целевого продукта составляет 90%.

Пример 6. Все операции проводили, как описано в примере 1, используя при десорбции с карбоксиметил-силикагеля 0,5 М сульфат аммония. Выход целевого продукта 120 мг с активностью 8300 КИЕ/мг. По данным ВЭЖХ чистота целевого продукта составляет 87%.

Пример 7. Все операции проводили, как описано в примере 1, используя при десорбции с карбоксиметил-силикагеля 0,6 М фосфат калия. Выход целевого продукта 110 мг с активностью 8000 КИЕ/мг. По данным ВЭЖХ чистота целевого продукта составляет 85%.

Предлагаемый способ получения основного ингибитора протеаз из органов крупного рогатого скота позволяет значительно увеличить выход целевого продукта при существенном уменьшении объемов экстракта уже на начальных стадиях. При этом повышается степень очистки целевого продукта.

Формула изобретения:

1. Способ получения основного ингибитора протеаз из органов крупного рогатого скота, включающий измельчение исходного сырья, экстракцию водным раствором кислоты, выделение и очистку целевого продукта, осуществляемую хроматографией с применением карбоксильных катионообменников, отличающийся тем, что после стадии экстракции проводят осаждение примесей в щелочной среде при температуре от -4 до +30 °С, доводя pH раствора сначала до 9,5-11,3, а после удаления выпавшего осадка доводят pH кислотой до 2-8, выделение осуществляют твердофазной экстракцией на сорбенте обращенно-фазового типа путем порционного накопления целевого продукта с периодической промывкой сорбента буферным раствором, окончательную очистку

целевого продукта проводят на карбоксиметил-силикагеле, с последующей дополнительной промывкой спиртовым раствором, после чего осуществляют десорбцию 0,5-2М раствором фосфатов, сульфатов, галогенидов, преимущественно хлоридов, щелочных, щелочноземельных металлов, аммония или их смесью.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что экстрагирование и подкисление растворов производят минеральными и/или органическими кислотами, например соляной, серной, фосфорной, щавелевой, уксусной, муравьиной.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что осаждение примесей в щелочной среде проводят в растворе гидроокиси щелочных и/или щелочноземельных металлов или их смесей.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что осаждение примесей в щелочной среде проводят водным раствором аммиака или трисгидроксиметиламинометана.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что осаждение примесей проводят щелочью с концентрацией 0,05-1,5М.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что осаждение примесей в щелочной среде производят в течение 1-48 ч.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что удаление выпавших в осадок примесей осуществляют центрифугированием или фильтрацией на соответствующем фильтре.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что промывку осуществляют раствором спирта или смесью растворов метилового, этилового, пропилового и изопропилового спиртов.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что карбоксиметил-силикагель с осевшим на нем целевым продуктом промывают раствором, содержащим спирт или смесь спиртов в концентрации 20-50%.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что перед стадией десорбции хроматографическую колонну промывают буферным раствором, не содержащим спирт с pH 2-8.

45

50

55

60