

(19)



(10) LT 3061 B

(12) PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: 3061

(51) Int.Cl.⁵: C08F 216/08,
B01D 15/08

(21) Paraiškos numeris: IP101

(22) Paraiškos padavimo data: 1992 07 16

(41) Paraiškos paskelbimo data: 1994 03 25

(45) Patent paskelbimo data: 1994 10 25

(72) Išradėjas:

Jonas-Henrikas Pesliakas, LT
Linas Stepšys, LT
Vilius Žutautas, LT
Vida Timinskienė, LT
Vilma Rožėnaitė, LT

(73) Patent savininkas:

Biotechnologijos institutas FERMENTAS, Graičiūno g. 8, 2028 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Polimerinių gelių, skirtų sorbentų sintezei, gavimo būdas

(57) Referatas:

Išradimas siejasi su stambiamolekulinių junginių chemija ir skirtas polimerinių gelių gavimui, kurie gali būti panaudoti biotechnologijoje sintetinant jų pagrindu sorbentus biomolekulių chromatografijai.

Būdo tikslas - sukurti didelio poringumo polimerinius gelius, kurie būtų tinkami sintetinant jų pagrindu sorbentus biomolekulių chromatografijai, eliminuojant baltymų nespecifinę sorbciją. Būdas realizuojamas vykdant suspenzinę radikalinę alilo alkoholio arba jo gicidilo eterio kopolimerizaciją su etilenglikoldimetakrilatu santykiu (65,34 - 87,41) : (34,66 - 12,59) mol. % neutralaus organinio tirpiklio - etilacetato arba jo mišinių su n-alkanais (1-3):1 tirpale. Kopolimerizacija vykdoma esant viršutinės organinės fazės, turinčios komonomerus ir radikalinių iniciatorių, ir apatinės disperguojančios fazės, turinčios suspensijos stabilizatorius, santykiui 1:(2-3). N-Alkanai yra tokie: heksanas, heptanas, oktanas, dekanas ir dodekanas. Disperguojančia faze naudojamas vandeninis koncentruoto kalcio chlorido (30±2 %) tirpalas su polivinilo alkoholiu arba pastarojo ir želatinos (0,5±0,1 %) tirpalas.

Išradimas priskiriamas stambiamolekulinių . junginių chemijai, ir būtent polimerinių gelių gavimo būdai. pastarieji gali būti panaudoti biotechnologijoje kaip bazinės matricos sintetinant jų pagrindu sorbentus
5 biomolekulių chromatografijai.

Yra žinomi didelio efektyvumo sorbentų, skirtų biologiškai aktyvių medžiagų gryninimui, gavimo būdai, naudojant agarozės arba celiuliozės matricas. Sorbentai
10 šių matricų pagrindu nepasižymi baltymų nespecifinės sorbcijos efektais. Tačiau pačios matricos linkusios dėl žemo mechaninio patvarumo kolapsuoti esant dideliems eliuentų tekėjimo greičiams. Tai riboja jų panaudojimą biomolekulių preparatyvinės chromatogra-
15 fijos procesuose /S. Kato, E. Sada, Rates of mass transfer in affinity chromatography. J. Eng. Japan, 13, 151-154 (1980). Pakankamu mechaniniu stabilumu pasižymi sintetiniai polimerų geliai, tokie kaip Asahi-geliai /EP 0066165, C 08 F 8/12, G 01 N 31/06, B 01 J 20/26.
20 1982 m., SU 1311631, Biul. No 18, 1987 m. -/ arba TSK tipo geliai /Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki, T. Hashimoto, Separation range and separation efficiency in high-speed gel filtration on TSK-gel SW columns. J. Chromator., 190 (1980) 297-303/. Minėti geliai yra
25 gaminami radikalinės suspensinės kopolimerizacijos metodu naudojant vinilacetatą kaip monovinilini komonomerą ir triallilizocianuratą (Asahi- geliai) arba (meta) akrilinės rūgšties ir pentaeritrito esterius (TSK-geliai) kaip susiuvimo agentus. Tačiau minėtų
30 gelių gavimo būdai pasižymi eile trūkumų: - reikalingos papildomos darbo sąnaudos jų apmuilninimui pervedant į neutralius OH-grupes turinčius gelius, ir būdingas sintetiniams geliams nespecifinės (pagrindė hidrofobinio pobūdžio) baltymų sorbcijos lygis. Tam
35 tikro dydžio liekamos nespecifinės baltymų sorbcijos buvimas išeiginiuose geliuose neigiamai atsiliepia

gaunamų jų pagrindų sorbentų monofunkcionalumui ir selektyvumui biomolekulių atžvilgiu.

Siūlomam išradimui techninio sprendimo esmė labiausiai artimas yra polimerinių gelių - Sferonų HEMA - gavimo būdas. Šio tipo geliai yra gaminami vykdant suspensinę radialinę 2-hidroksietilmetakrilato ir etilendimetakrilato arba etilendiakrilato kopolimerizacija inertinių organinių tirpiklių - cikloheksanolio arba cikloheksilamino mišiniuose su oktilo arba dodecilo alkoholiais. Disperguojančia faze yra naudojamas vandeninis polovinilpirolidono arba polivinilo alkoholio tirpalas, ir krakmolai kaip suspensijos stabilizatoriai. Kopolimerizacijos reakcija vykdoma 12 valandų 70°C temperatūroje /JAV pat. 1370477, CO8F 1/11, 1974 m./.

Šio tipo gelių gavimo būdo trūkumas - aukštas baltymų nespecifinės sorbcijos lygis ant išėiginių gelių. Nespecifinė baltymų sorbcija žymiu mastu sumažinama tolimesne išėiginių gelių modifikacija, pvz., aminorinio agentais, įvedant didelę jonogeninių grupių koncentraciją. Tačiau pilnai eliminuoti nespecifinę baltymų sorbciją nepavyksta /O. Mikes, Z. Hostomska et al., Ion - exchange derivatives of Spheron, J. Chromatogr. 440 (1988) 287-304/. Liekamos baltymų nespecifinės sorbcijos buvimas geliuose labai neigiamai pasireiškia naudojant pastaruosius kaip bazinę matricą specifinių sorbentų sintezei, ir baltymų gel - filtracijos procesams. Sintetinant biospecifinius sorbentus įvedamo į matricą ligando koncentracija, kaip taisyklė, nėra aukšta. Todėl nespecifinės baltymų sorbcijos buvimas gali iškreipti biomolekulės sąveikos su imobilizuotu specifiniu ligandu specifiškumą ir sumažinti sorbento efektyvumą. Biomolekulių gel - filtracijoje nespecifinės sorbcijos reiškiniai gali būti eliminuojami įvedant į eliuventus chaotropinius

agentus arba organinių tirpiklių priedus. Tačiau pastarųjų naudojimas gali iššaukti biomolekulių konformacijos pasikeitimus ir denatūraciją. Tai riboja savo ruožtu platesnį išeiginių gelių panaudojimą biomolekulių chromatografijai išsaugant jų natyvią struktūrą.

Išradimo tikslas - sukurti didelio poringumo polimerinius gelius, kurie būtų tinkami sorbento sintezei, o pastarieji neturėtų nespecifinės sorbcijos ir būtų tinkami biomolekulių chromatografijai.

Keliamas tikslas yra pasiekiamas vykdant suspensinę radikalinę alilo alkoholio arba aliloglicidilo eterio kopolimerizaciją su etilenglikoldimetakrilatu esant jų moliniam santykiui (65, 34- 87, 41) : (34, 66-12, 59) moliniai procentai. Komonomerų mišinio polimerizacija vykdoma inertiniuose organiniuose tirpikliuose - etilacetate arba jo mišiniuose su n-alkanais santykiu (1-3):1, ir reakcija vykdoma 6 valandas 80°C temperatūroje esant viršutinės fazės, turinčios komonomerus ir radikalinių iniciatorių, ir apatinės disperguojančios fazės, turinčios suspensijos stabilizatorių, santykiu 1:(2-3).

Alilo alkoholio arba aliloglicidilo eterio, kaip pagrindinio komonomero, panaudojimas įgalina įvesti į polimerinio gelio grandinę hidrofilinį komponentą, turintį erdvinių požiūriu palankiai atitolintą nuo pagrindinės makromolekulinės grandinės neutralią OH-grupę arba dar labiau atitolintą reakcingą epoksi-grupę, tinkamą įvairių funkcinių grupių bei specifinių ligandų prijungimui. Pastaruoju atveju susidaranti po ligandų prijungimo oksipropilinė grupuotė atlieka intarpo tarp polimero grandinės ir ligando vaidmenį, skatindama pilnesnį ligando specifinės sąveikos su biomolekule vyksmą.

- 5 Inertinių tirpiklių - etilacetato arba jo įvairios sudėties mišinių su n-alkanais panaudojimas, bei komonomerų molinio santykio keitimas įgalina kryptingai reguliuoti polimerinių gelių poringumą t. y. porų dydį ir tūrį, jų vidinio paviršiaus plotą, porų pasisikirstymą pagal jų dydį bei liekamos nespecifinės baltymų sorbcijos ant gelių lygį.
- 10 Viršutinės organinės fazės, turinčios komonomerus bei polimerizacijos iniciatorių, ir apatinės disperguojančios fazės, turinčios suspensijos stabilizatorių, tūrinio santykio keitimas nuo 1:2 iki 1:3 įgalina reguliuoti gelio dalelių geometrinę formą bei dydį.
- 15 Koncentruoto kalcio chlorido vandeninio tirpalo su polivinilo alkoholiu arba pastarojo ir želatinos tirpalo panaudojimas yra pakankamas suspensijos stabilizavimui, siekiant gauti sferinės formos daleles, ir apsaugoti hidrofilinio komonomero perėjimą į apatinę vandeninę fazę.
- 20 Išradimo esmė yra atskleidžiama žemiau pateiktais pavyzdžiais.
- 25 1. Polimeriniai geliai - alilo alkoholio kopolimerai su etilenglikoldimetakrilatu (sąlyginis pavadinimas FSL-S-geliai).
- 30 Pavyzdys 1. Monomerinis mišinys, turintis 50 ml. (0,736 molio) alilo alkoholio (AA) IR 20 ML. (0,106 molio) etilenglikoldimetakrilato (EGDMA) (AA:EGDMA = 87,41:12,59 mol.%) ištirpinamas 75 ml. etilacetato. Jame ištirpinama 0.64 g (1% nuo bendros monomerų masės)
- 35 iniciatoriaus - azoizosviesto rūgšties dinitrilo (ADN) ir gautas mišinys prapučiamas 10 min. laikotarpyje dujiniu azotu deguonies pašalinimui. Gautas mišinys

disperguojamas maišant (250 aps/min) 1%-iame polivinilo alkoholio (mol. masė 100000) vandeniniame tirpale, turinčiame 200 g. ištirpinto kalcio chlorido heksahidrato (viršutinės organinės ir apatinės vandėninės fazių tūrinis santykis = 1:2). Reakcijos mišinys maišomas 6 valandas 90°C temperatūroje. Reakcijai pasibaigus, mišinys ataušinamas iki kambario temperatūros, iškraunamas ant filtro, ir gautas gelis plaunamas ant filtro vandeniu, vandens-izopropanolio mišiniais su didėjančia pastarojo tūrine koncentracija nuo 30 iki 100%, izopropanolio ir vandens-izopropanolio mišiniais su mažėjančia pastarojo tūrine koncentracija nuo 100 iki 30%, ir vandeniu. Gautas kopolimeras frakcionuojamas šlapio sijojimo būdu, atrenkant gelio frakcijas 63 - 125 ir 125 - 500 mikronų dydžio. Gaunama 140 ml. gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm, ir 70 ml - 63 - 125 mkm.

Gautam polimeriniam geliui nustatomos šios pagrindinės savybės: vandens užlaikymas, lyginamasis vandenyje išbrinkusio gelio tūris, baltymo nespecifinės sorbcijos lygis bei poringumo parametrai.

H₂O - užlaikymas (W_R, ml/g) nustatomas sekančiai. Nupusiausvyrintas vandenyje gelis centrifuguojamas vandens pašalinimui, ir pasveriamas (W₁). Po to gelis išdžiovinamas ir pasveriamas (W₂). H₂O užlaikymas išskaičiuojamas pagal formulę:

$$W_R = \frac{W_1 - W_2}{W_2}$$

Lyginamasis vandenyje išbrinkusio gelio tūris (V_R, cm³/g) nustatomas išmatavus 1 g šlapio, nusėdusio gelio užimamą tūrį.

Baltymo nespecifinės sorbcijos lygis (N_m , mg/ml) nustatomas pagal sorbuoto žmogaus serumo albumino kiekį, statinės sorbcijos būdu. Tam tikslui polimerinis gelis inkubuojamas 2 valandų bėgyje kambario temperatūroje baltymo tirpale (40 - 50 mg baltymo 1,0 ml gelio) natrio fosfatiniame buferyje, turinčiame 3,0 M NaCl.

Polimerinio gelio poringumas - porų užimamas tūris, lyginamasis paviršiaus plotas, vidutinis porų diametras ir jų polidispersiškumas nustatomi atvirkštinės gel-chromatografijos metodu /A.A. Gorbunov, L. Ya. Solovyova, V. A. Pasechnik, Fundamentals of the theory and practice of polymer gel-permeation chromatography as a method of chromatographic porosimetry. J. Chromatogr., 448, (1988) 307-332./

Polimerinių gelių, gautų pagal pvz. 1 ir žemiau pateiktų pavyzdžių aprašymus, savybės pateikiamos lentelėse 1-2.

Pavyzdys 2. AA ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 1, išskyrus tai, kad organiniu tirpikliu naudojamas 75 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-heksano mišinys. Gaunama 160 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 30 ml - 63-125 mkm.

Pavyzdys 3. AA ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 1, išskyrus tai, kad organiniu tirpikliu naudojamas 75 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-heptano mišinys. Gaunama 110 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 65 ml - 63-125 mkm.

Pavyzdys 4. AA ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 1, išskyrus tai, kad organiniu tirpikliu naudojamas 75 ml vienodų tūrių etilacetato ir

n-oktano mišinys. Gaunama 140 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 65ml - 63-125 mkm.

5 Pavyzdys 5. AA ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 1, išskyrus tai, kad organiniu tirpikliu naudojamas 75 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-dekano mišinys. Gaunama 135 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 35 ml - 63-125 mkm.

10 Pavyzdys 6. AA ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 1, išskyrus tai, kad organiniu tirpikliu naudojamas 75 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-dodekano mišinys. Gaunama 85 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 75 ml - 63-125 mkm.

15

Pavyzdys 7. AA ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 1, išskyrus tai, kad monomerinio mišinio fazė susideda iš 50 ml (0,736 molio) alio alkoholio, 35 ml (0,185) etilenglikoldimetakrilato (santykis AA:EGDMA = 79,88:20,12 mol.%), 75 ml etilacetato ir 0,8 g azoizosviesto rūgšties dinitrilo. Gaunama 220 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 90 ml - 63-125 mkm.

20

25 Pavyzdys 8. AA ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 1, išskyrus tai, kad naudojamas monomerinis mišinys tokios pat sudėties kaip pvz. 7, o organiniu tirpikliu naudojama 75 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-heksano mišinį. Gaunama 250 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 50 ml - 63-125 mkm.

30

Pavyzdys 9. AA ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analodiškai kaip pvz. 1, išskyrus tai, kad naudojamas monomerinis mišinys tokios pat sudėties kaip pvz. 7, o organiniu tirpikliu naudojama 75 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-oktano mišinį. Gaunama 180 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 60ml - 63-125 mkm.

35

5 Pavyzdys 10. AA ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 1, išskyrus tai, kad naudojamas monomerinis mišinys tokios pat sudėties kaip pvz. 7, o organinių tirpikliu naudojama 75 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-dekano mišinį. Gaunama 190 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 40 ml - 63-125 mkm.

10 Pavyzdys 11. AA ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 1, išskyrus tai, kad naudojamas monomerinis mišinys tokios pat sudėties kaip pvz. 7, o organinių tirpikliu naudojama 75 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-dodekano mišinį. Gaunama 180 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 45 ml - 63-125 mkm.

15 Lentelė 1

Vandens užlaikymas (W_R), lyginamasis vandenyje išbrinkusio gelio tūris (V_R) ir albumino nespecifinės sorbcijos lygis (N_m)

20

Pavyzdžio Nr	W_R ml/g	V_R cm ³ /g	N_m mg/ml
1.	-	-	18,5
2.	4,07	8,90	5,9
3.	4,14	-	6,1
4.	3,80	7,25	0,8
5.	2,18	7,50	2,3
6.	2,95	7,40	2,3
7.	-	-	20,4
8.	2,59	5,76	23,4
9.	2,61	5,65	13,5
10	2,49	5,10	17,8
11.	2,48	5,40	11,4
Prototipas Spheron 100000			27,1

Lentelė 2

Alilo alkoholio ir etilenglikoldimetakrilato pagrindu gautų gelių poringumo parametrai

5

Pavyzdžio Nr	Porų užimamo tūrio dalis V_P/V_{P+V_0}	Lyg.paviršius m^2/ml porų tūrio	Vidutinis porų diametras (nm)	Polidispersiškumas	Frakcionavimo interv. pagal molekul. diam. (nm)	Optimali dekstranų molek. masė
1.	0,43	82	24	2,0	3,1-59	103000
2.	0,43	120	16,5	19	2,3-300	330000
3.	0,45	15	140	6,1	17-1000	8123000
4.	0,40	23	87	165	17-9000	27024000
5.	0,29	62	32	48	5-1200	3152000
6.	0,23	100	20	2,1	2,5-50	76000
7.	0,39	93	21,5	1,8	2,8-45	81000
8.	0,44	130	15	30	2,2-390	431000
9.	0,44	88	23	55	4-1000	187300
10.	0,44	36	56	90	10-3500	11415000
11.	0,44	92	21,5	81	4-1250	1674000
Prototipas Spheron 100000 Ekskliuzijos riba dekstranui 10^6						

Duomenys, pateikti lentelėse 1-2, rodo, kad polimeriniai geliai gauti alilo alkoholio ir etilenglikoldimetakrilato pagrindu disponuoja labai didelio diametro poromis, į kurias gali skverbti ne tik stambios baltymų makromolekulės, bet ir virusai. Pateiktas šio tipo gelių sintezės būdas įgalina kryptingai keisti jų poringumą ir atitinkamai baltymų nespecifinės sorbcijos lygį. Šio tipo geliai gali būti panaudoti sintetinant jų pagrindu sorbentus visiems biopolimerų chromatografijos tipams, išskyrus gel-chromatografiją. Žmogaus serumo albumino nespecifinės sorbcijos ant Sferono 100000 (27,1 mg/ml) ir analogiško

jam dekstrano ekskliuzijos ribą gelio, gauto pagal pvz. 4 aprašymą (0,8 mg/ml), palyginimas (lent. 1) rodo, kad bendras nespecifinės baltymų sorbcijos lygis ant polimerinių gelių, gautų pagal siūlomą būdą, yra žymiai mažesnis ir gali būti kryptingai reguliuojamas keičiant monomerinio mišinio sudėtį, tirpiklius ir jų mišinių sudėtį.

2. Polimeriniai geliai - aliloglicidilo eterio ir etilenglikoldimetakrilato kopolimerai (sąlyginis pavadinimas FSL-SE-geliai).

Pavyzdys 12. Į 2-jų litrų talpos trigurklę kolbą su mechaniniu maišikliu, termometru ir grįžtamu šaldytuvu supilamas monomerinis mišinys, susidedantis iš 100 ml (0,694 mol) aliloglicidilo eterio (AGE) ir 40 ml (0,212 mol) etilenglikoldimetakrilato (santykis AGE:EGDMA = 76,61:23,39 mol.%). Po to į mišinį įpilama 150 ml etilacetato ir 1,40 g iniciatorius - azoizosviesto rūgšties dinitrilo. Mišinys prapučiamas 20 min. laikotarpyje dujiniu azotu ir disperguojamas maišant (250-300 aps/min) 870-yje ml 2% vandeniniame polivinilo alkoholio (mol. masė 100000) tirpale, turinčiame 4,35 g želatinos (organinės ir vandinės fazių santykis = 1:3). Reakcijos mišinys maišomas 6 valandas 80°C temperatūroje. Po to reakcijos mišinys atšaldomas iki kambario temperatūros ir filtruojamas. Polimerinis gelis plaunamas ant filtro vandeniu, vandens-izopropanolio mišiniais su didėjančia tūrine pastarojo koncentracija nuo 25 iki 100%, izopropanoliu, vandens-izopropanolio mišiniais su mažėjančia pastarojo tūrine koncentracija nuo 100 iki 25% ir vandeniu. Gautas gelis frakcionuojamas šlapio sijojimo būdu, atrenkant frakcijas su dalelių dydžiu 63-125 ir 125-500 mkm.

35

Gautam polimeriniam geliui nustatoma epoksi-grupių kondentracija (C_E , mkmol/ml) ir poringumo parametrai.

Epoksi-grupės nustatomos inkubuojant gelio pavyzdį, natrio tiosulfato tirpale, titruojant išsiskiriančius reakcijos metu hidroksilo jonus standartiniu HCl tirpalu /J. Turkova, Afininė chromatografija, p. 241-242, 1980 m. /.

$C_E = 24-25$ mkmol/ml.

Polimerinių gelių, gautų pagal pvz. 12 ir žemiau pateiktų pavyzdžių aprašymus, savybės pateikiamos lentelėje 3.

Pavyzdys 13. AGE ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 12, išskyrus tai, kad organiniu tirpikliu naudojama 150 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-oktano mišinio. Gaunama 200 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 50 ml - 63-125 mkm. $C_E = 6-15$ mkmol/ml.

Pavyzdys 14. AGE ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 12, išskyrus tai, kad naudojama 150 ml organinių tirpiklių mišinio kaip pvz. 13, esant jų tūriniam santykiui 3:1. Gaunama 400 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 150 ml - 63-125 mkm. $C_E = 20$ mkmol/ml.

Pavyzdys 15. AGE ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 12, išskyrus tai, kad naudojama 150 ml organinių tirpiklių mišinio, susidedančio iš 112,5 ml etilacetato ir 37,5 ml n-heksano. Gaunama 400 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm. ir 150 ml - 63-125 mkm. $C_E = 30$ mkmol/ml.

Pavyzdys 16. AGE ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 12, išskyrus tai, kad organiniu tirpikliu naudojama 150 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-dekano mišinį. Gaunama 260 ml gelio su dalelių dydžiu

125-500 mkm. ir 120 ml. - 63-125 mkm. $C_E=8-12,5$ mkmol/ml.

5 Pavyzdys 17. AGE ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 12, išskyrus tai, kad organiniu tirpikliu naudojama 150 ml mišinio, susidedančio iš 112,5 ml etilacetato ir 37,5 ml n-dekano. Gaunama 500 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm. ir 15 ml - 63-125 mkm. $C_E=mkmol/ml$.

10

Pavyzdys 18. AGE ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 12, išskyrus tai, kad organiniu tirpikliu naudojama 150 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-dodekano mišinį. Gaunama 200 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm. ir 30 ml - 63-125 mkm. $C_E=5,5-6,0$ mkmol/ml.

15

Pavyzdys 19. AGE ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 12, išskyrus tai, kad monomerinio mišinio fazė susideda iš 100 ml (0,694 molio) aliloglicidilo eterio, 70 ml (0,370 molio) etilenglikoldimetakrilato (santykis AGE:EGDMA = 65,34:34,66 mol.%) 150 ml etilacetato ir 1,86 g azoizosviesto rūgšties dinitrilo, o vandeninės fazės, 25 turinčios polivinilo alkoholį ir želatiną turis lygus 960 ml. Gaunama 280 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 60 ml - 63-125 mkm. $C_E=30-38$ mkmol/ml.

25

Pavyzdys 20. AEG ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 12, išskyrus tai, kad naudojamas monomerinis mišinys tokios pat sudėties kaip pvz. 19, o organiniu tirpikliu naudojama 150 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-heksano mišinį. Gaunama 200 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 50 ml - 63 - 125 mkm. 35 $C_E=20 - 24$ mkmol/ml.

35

Pavyzdys 21. AGE ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 12, išskyrus tai, kad naudojamas monomerinis mišinys tokios pat sudėties kaip pvz. 19, o organiniu tirpikliu naudojama 150 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-oktano mišinį. Gaunama 220 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 50 ml - 63-125 mkm. $C_E=14-20$ mkmol/ml.

Pavyzdys 22. AGE ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 12, išskyrus tai, kad naudojamas monomerinis mišinys tokios pat sudėties kaip pvz. 19, o organiniu tirpikliu naudojama 150 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-dodekano mišinį. Gaunama 150 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm ir 30 ml - 63-125 mkm. $C_E=11-13$ mkmol/ml.

Pavyzdys 23. AGE ir EGDMA kopolimerizacija vykdoma analogiškai kaip pvz. 12, išskyrus tai, kad naudojamas monomerinis mišinys tokios pat sudėties kaip pvz. 19, o organiniu tirpikliu naudojama 150 ml vienodų tūrių etilacetato ir n-dekano mišinį. Gaunama 600 ml gelio su dalelių dydžiu 125-500 mkm. $C_E=18-19$ mkmol/ml.

25

30

35

Lentelė 3

Aliloglicidilo eterio ir etilenglikoldimetakrilato pagrindu gautų gelių poringumo parametrai

5

Pavyzdžio Nr	Porų užimamo tūrio dalis $V_p/V_p + V_0$	Lyg. paviršius m^2/ml porų tūrio	Vidutinis porų diametras (nm)	Polidispersiškumas	Frakcionavimo interv. pagal molek. diam. (nm)	Optimali dekstrano molekul. masė
1	2	3	4	5	6	7
12.	0,39	67	30	1,44	4,2-50	138000
13.	0,47	30	67	4,30	8-330	1439000
14.	0,46	33	61	1,18	10-81	499000
15.	0,41	50	40	1,50	5,5-71	245000
16.	0,38	57	35	7,80	4,3-300	662000
17.	0,32	34	60	3,30	7,2-230	906000
18.	0,40	360	5,5	1,20	0,9-7	5000
19.	0,39	115	17,4	1,03	3,3-19	47000
20.	0,37	180	11,1	1,12	1,9-14	19000
21.	0,43	43	47	27	6,8-1150	4103000
22.	0,45	148	13,5	1,00	2,7-14	28000
23.	0,37	58	35	15,5	4,6-530	797000

10 Duomenys pateikti lentelėje 3 rodo, kad polimeriniai geliai aliloglicido eterio ir etilenglikoldimetakrilato pagrindu taip pat pasižymi dideliu poringumu, pakankamu stambių biomolekulių prasiskverbimui į juos. Šio tipo geliai yra labiau monofunkciniai porų dydžio atžvilgiu ir tinkami biomolekulių gel-filtraciniais procesams.

15 Gautų polimerinių gelių tinkamumą sorbentų sintezei ir pastarųjų tinkamumą biomolekulių chromatografijai iliustruoja žemiau pateikiami pavyzdžiai.

Pavyzdys 24. Gelio FSL-S-42 karboksimetilinio darinio sintezė.

- 5 I 100 ml šlapia nusėdusi gelį, gautą pagal pvz. 8. aprašymą, supilama maišant nedidelėmis dalimis 55 ml 46% natrio šarmo tirpalo, ir gauta suspensija paliekama 1 valandai inkubuotis. Po to suspensija pernešama į trigurklę 250 ml talpos kolbą, turinčią grįžtamą šaldytuvą, termometrą ir mechaninį maišiklį, ir maišant
- 10 supilamas 27 g (0,145 mol.) monojodacto rūgšties tirpalas 50 ml vandens. Reakcijos mišinys maišomas 30 min. kambario ir 6 valandas 80°C temperatūroje. Gautas sorbentas nufiltruojamas ir plaunamas vandeniu, 2 N HCl tirpalu ir vandeniu iki neutralios plovimo vandenų pH
- 15 reikšmės.

Katijonito joninė talpa pagal Na⁺ jonus lygi 50 mkg-ekv/ml.

- 20 Sorbento tinkamumas baltymų chromatografijai įvertinamas pagal Citochromo c (0,02 M Na fosfatinis buferis pH 8,0), žmogaus serumo albumino (0,02 M Na acetatinis buferis pH 4,0) ir Tripsino (0,02 M Na fosfatinis buferis pH 7,1) statinę sorbciją,
- 25 inkubuojant sorbento pavyzdžius baltymo tirpale 2 val. kambario temperatūroje, ir desorbuojant baltymus su 1,4 M NaCl tirpalu. Sorbento sorbcinis imlumas baltymui ir pastarojo desorbcijos išeiga pateiktos lentelėje 4.

30

35

Lentelė 4

Sorbento sorbcinis imlumas baltymams

Baltymas ir jo koncentracija	mg/ml	Baltymo tirpalo tūris 1ml sorbento	Sorbcinis imlumas, mg baltymo 1 ml sorbento	Baltymo desorbcijos išeiga, %
Citochromas c	4,7	1,0 ml	4,7	98
Albuminas	50,0	1,0 ml	37,2	95
Tripsinas	22,5	1,0 ml	13,0	95

5. Pavyzdys 25. Gelio FSL-SE-81 sulfopropilinto darinio sintezė.

10. Į 100 ml talpos trigurklę kolbą supilama 50 ml gelio, gauto pagal pvz. 22 aprašymą, 11,1 g (0,09 mol.) bevandenio Na_2SO_4 , ir 27,25 ml distiliuoto vandens. Reakcijos mišinys paliekamas 1 val., kambario temperatūroje, ir reakcija tęsiama maišant suspensiją 4 val 95°C temperatūroje. Reakcijos mišinys ataušinamas iki kambario temperatūros, sorbentas nufiltruojamas ir

15. plaunamas ant filtro vandeniu. Po to sorbentas pernešamas į stiklinę ir baigiamas plauti vandeniu dekantuojant. Sorbento imlumas pagal Na^+ jonus nustatomas titruojant H^+ formos pavyzdį standartiniu 5 mH Na OH tirpalu, ir yra lygus 12 mkmol/ml.

20. Sorbento tinkamumas biomolekulių chromatografijai įvertinamas pagal jaučio Tripsino statinę sorbciją 0,02 M Na acetatiniame buferyje pH 5,0. Tam tikslui sorbento pavyzdys atplautas nurodytu buferiu, inkubuojamas 2 val

25. kambario temperatūroje baltymo tirpale (pradinė koncentracija 20 mg/ml, 1,5 ml tirpalo 1 ml sorbento) ir sorbuotas baltymas eliuuojamas 1M NaCl tirpalu buferyje pH 5,0. Sorbento imlumas tripsinui lygus 16 mg/ml, baltymo desorbcijos išeiga siekia 86-90%.

Tuo būdu pateikiamas polimerinių gelių būdas, naudojant momentinius mišinius, susidedančius iš alilo alkoholio arba alilo-glicidilo eterio ir etilenglikoldimetakrilato, ir organinių tirpiklių mišinius, sudarytus iš etilacetato ir n-alkanų, įgalina kyptingai reguluoti gelių poringumą bei baltymų nespecifinės sorbcijos lygį. Tai įgalina savo ruožtu gelius panaudoti sintetinant sorbentus, kurie yra monofunkciniai prijungto ligando atžvilgiu. Duomenys pateikti lentelėje 4 ir pvz. 25 rodo, kad gaunami gelių pagrindu sorbentai yra tinkami biomolekulių chromatografijai, užtikrinant praktiškai kiekybinę pastarųjų desorbcijos išėigą.

15

20

25

30

35

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Būdas gauti polimeriniams geliams, skirtiems
sorbentų sintezei, vykdant suspensinę radikalinę
5 komonomerų mišinio, turinčio monomerą su viena dviguba
jungtimi ir susiuvimo agentą su dviem dvigubomis
jungtimis polimerizaciją inertiniame organiniame
tirpiklyje, dalyvaujant iniciatoriui ir vykdant procesą
vandeninėje disperguojančioje fazėje, turinčioje
10 suspensijos stabilizatorių, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad pagrindiniu monomeru, turinčiu vieną dvigubą
jungtį, naudoja alilo alkoholį arba aliloglicidilo
eterį, o susiuvimo agentu - etilenglikoldimetakrilatą
esant jų moliniam santykiui $(65,34 - 87,41) : (34,66 -$
15 $12,59)$ mol.%; organiniu tirpikliu naudoja etilacetatą
arba jo mišinius su n-alkanais, tūriniu santykiu $(1-3):1$, ir kopolimerizaciją vykdo esant viršutinės
organinės fazės, turinčios komonomerus ir iniciatorių,
ir apatinės disperguojančios fazės, turinčios sus-
20 pensijos stabilizatorių, tūriniam santykiui $1 : (2 - 3)$.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad n-alkanais naudoja heksaną, heptaną, oktaną,
dekana ir dodekana.

25 3. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad disperguojančia faze naudoja vandeninį
koncentruotą kalcio chlorido ir polivinilo alkoholio
tirpalą, arba vandeninį polivinilo alkoholio ir
30 želatinos tirpalą.

4. Būdas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad kalcio chlorido koncentracija, yra $30 \pm 2\%$,
polivinilo alkoholio - $1-2\%$, želatinos - $0,5 \pm 0,1\%$.