

**Přírodovědecká fakulta University Karlovy
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie**

Syntéza polymerních nosičů obsahujících aktivní formy chelátů a studium jejich využití v chromatografii na imobilizovaných kovových iontech

Disertační práce

**Mgr. Kateřina Kráčalíková,
rozená Mészárosová**

Praha 2007

**Vědní obor: Makromolekulární chemie
Školitel: Ing. Miroslav Bleha, CSc.**

Práce byla vypracována v Oddělení polymerních membrán Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v období od října 1999 do března 2006.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vykonala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Prohlašuji, že jsem tuto práci ani její část nepředložila k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 27. 3. 2007

Alexandra Kocová
.....

„Experiment je nejmocnější a nejspolehlivější
pákou, jíž můžeme na přírodě vynutit její tajemství.“

Wilhelm Conrad Röntgen

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Ing. Miroslavu Blehovi, CSc. za vedení mé disertační práce a své konzultantce Ing. Galině Tishchenko, CSc. za cenné rady a pomoc při testování připravených sorbentů.

Poděkování patří také pracovníkům Oddělení analytické chemie ÚMCH AV ČR pod vedením Ing. Petra Hollera, CSc. za změření AAS, IČ spekter a elementárních analýz, pracovníkům Oddělení polymerních částic, jmenovitě Ing. Jiřímu Hradilovi, CSc. a Ing. Danielu Horákovi, CSc., za změření a pomoc při interpretaci porézních charakteristik částic a dále Ing. Jiřímu Dybalovi, CSc. za sestavení geometrických modelů chelatujících skupin. Pracovníkům Oddělení strukturní analýzy pod vedením Ing. Jaroslava Kříže, CSc. děkuji za změření NMR spekter v roztoku a pracovníkům skupiny Ing. Jiřího Bruse, Ph.D. děkuji za změření a pomoc při interpretaci NMR spekter pevné fáze. Pracovní skupině Ing. Jiřího Horského, CSc. děkuji za změření hmotnostních MALDI-TOF spekter a pracovní skupině Ing. Miroslava Šloufa, Ph.D. za pořízení a interpretaci mikrofotografií.

RNDr. Adamovi Strachotovi, Ph.D. děkuji za pomoc při sestavení experimentální chromatografické aparatury spojené s digitálním přenosem dat na PC a za vytvoření počítačového programu pro výpočet ploch za čelem frontálních křivek.

Ing. Janu Lokajovi, CSc. a Ing. Jaroslavu Kahovcovi, CSc. děkuji za provedení korektur anglického jazyka při sepisování publikací. Vedoucí mé pracovní skupiny, Ing. Zdeňce Sedlákové, CSc. a všem ostatním kolegům děkuji za cenné rady a připomínky a za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

In memoriam děkuji Ing. Karlu Bouchalovi, CSc. za cenné rady týkající se organické syntézy.

Závěrem bych chtěla poděkovat svému manželovi Milanovi, který mi byl nablízku vždy, když jsem to potřebovala.

Tato práce byla podpořena grantovými projekty A 4050910 (GA AV ČR) a K 4055109 (GA ČR).

Seznam nejčastěji používaných zkratk a symbolů

A	absorbance
Ac	acetyl
AcOH	kyselina octová
aq.	vodný (roztok)
AAS	atomová absorpční spektrometrie
AIBN	2,2-azobis(isobutyronitril)
BSA	hovězí sérový albumin
CP	<i>N</i> -(2-pyridylmethyl)glycin
CHCl ₃	chloroform
d	dublet (v NMR spektrech)
dd	dublet dubletu (v NMR spektrech)
DEGMA	2-(2-hydroxyethoxy)-ethylester 2-methyl-2-propenové kyseliny
DE-IDA	diethylester kyseliny iminodioctové
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EDMA	1,2-ethandiylester 2-methyl-2-propenové kyseliny
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ECH	epichlorhydrin
ekv.	ekvivalent
ELISA	metoda pro detekci protilátek
EtOH	etanol
GMA	2,3-epoxypropylester 2-methyl-2-propenové kyseliny
HEMA	2-hydroxyethylester 2-methyl-2-propenové kyseliny
HEWL	lysozym (z vaječného bílku)
HCH	lidský choriogonadotropní hormon
HMYO	lidský myoglobin
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
HPMA	2-hydroxypropylester 2-methyl-2-propenové kyseliny
8-HQ	chinolin-8-ol

HRP	křenová peroxidáza
HSA	lidský sérový albumin
IBA	2-methylpropyl-acetát
IČ	infračervená (spektroskopie)
IDA	kyselina iminodioctová
IgG ₁	imunoglobulin třídy G, podtřídy IgG ₁
IMA nosič/sorbent	nosič/sorbent pro afinitní chromatografii na imobilizovaných kovových iontech
IMAC	afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech
IMAM	membrána pro afinitní chromatografii na imobilizovaných kovových iontech
<i>J</i>	spin - spinová interakční konstanta (v NMR spektrech)
LEC	chromatografie s výměnou ligandu
MAC	<i>N</i> -metakryloyl-L-cystein methyl ester
MAH	<i>N</i> -methakryloyl-L-histidin methyl ester
Me	methyl
MeOH	metanol
MMA	methylester 2-methyl-2-propenové kyseliny
NTA	kyselina nitrilotrioctová
OPS	L-fosfoserin
OVA	ovalbumin
ProP	kyselina 3,18-divinyl-2,7,13,17-tetramethylporphin-8,12-dipropanová
q	kvadruplet (v NMR spektrech)
t	triplet (v NMR spektrech)
Tacn	1,4,7-triazocyklononan
THCC	cytochrom c (tuna heart)
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
UV	ultrafialový
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
λ	vlnová délka (v UV spektrech)

Obsah

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. Chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC), princip metody	8
2.2. Separace a purifikace bílkovin, vliv kovového iontu.....	8
2.3. Chelatující skupiny používané v IMAC.....	11
2.4. Polymerní nosiče používané v IMAC.....	18
2.4.1. Přírodní částicové nosiče.....	19
2.4.1.1. Agarózové gely.....	19
2.4.1.2. Jiné přírodní nosiče.....	21
2.4.2. Synthetické částicové nosiče.....	24
2.4.2.1. Nosiče na bázi 2-hydroxyethyl-methakrylátu (HEMA).....	26
2.4.2.2. Jiné syntetické nosiče.....	30
2.4.2.3. Komerční syntetické nosiče	32
2.4.3. Membránové nosiče.....	32
2.4.3.1. Formy a moduly membránových nosičů	33
2.4.3.2. Matrice membránových IMA nosičů.....	34
2.4.3.3. Modifikace membránových IMA nosičů.....	36
2.4.3.4. Komerční membránové IMA sorbenty.....	37
2.4.3.5. Příklady srovnání separačních vlastností sorbentů s imobilizovanými kovovými ionty v membránovém a kolonovém uspořádání.....	38
2.4.4. Vliv vnitřní struktury nosiče a koncentrace imobilizovaného kovového iontu chelatujícího sorbentu na efektivitu ligandové výměny.....	41
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	47
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
4.1. Použité chemikálie.....	49
4.2. Příprava polymerních nosičů.....	49
4.2.1. Příprava monomerů.....	49
4.2.2. Obecný předpis pro přípravu polymerních částic suspenzí radikálovou polymerizací.....	51

4.2.2.1. Kopolymerace binárního systému, příprava částic poly(DEGMA- <i>co</i> -EDMA).....	52
4.2.2.2. Ternární kopolymerace, příprava částic poly(GMA- <i>co</i> -DEGMA- <i>co</i> -EDMA).....	52
4.2.2.3. Zpracování polymerní směsi.....	52
4.2.3. Příprava membrán poly(DEGMA- <i>co</i> -EDMA).....	53
4.2.4. Hodnocení a vlastnosti polymerních nosičů.....	53
4.2.4.1. Hodnocení vzhledu částic. Kontrola distribuce částic.....	53
4.2.4.2. Hodnocení vnitřní struktury částic.....	53
4.2.4.3. Kontrola porozity ve zbotnalém stavu, botnací zkoušky.....	54
4.2.4.4. Stanovení hustoty polymerů.....	55
4.2.4.5. Stanovení obsahu oxiranových skupin v polymerních nosičích.....	56
4.3. Modifikace polymerních nosičů.....	56
4.3.1. Modifikace kopolymerních částic poly(DEGMA- <i>co</i> -EDMA).....	56
4.3.1.1. Příprava sorbentu s chelatujícími skupinami N-(2-pyridylmetyl)glycinu	56
4.3.1.2. Příprava sorbentu s chelatujícími skupinami kyseliny iminodioxové obsahujícího spojovací řetězec s 24 atomy.....	57
4.3.1.3. Příprava sorbentů s chelatujícími skupinami kyseliny etylendiamintriocové a chinolin-8-olu.....	57
4.3.2. Modifikace terpolymerních částic.....	59
4.3.2.1. Příprava chelatujících sorbentů založených na poly(GMA- <i>co</i> - DEGMA- <i>co</i> -EDMA) nosičích s různou koncentrací imobilizované kyseliny iminodioxové.....	59
4.3.2.2. Příprava chelatujících sorbentů s poly(GMA- <i>co</i> -HPMA- <i>co</i> -EDMA) nosiči.....	60
4.3.3. Modifikace plochých listů poly(DEGMA- <i>co</i> -EDMA) membrán.....	61
4.3.3.1. Příprava membrán s různou koncentrací tosyloxyskupin.....	61
4.3.3.2. Příprava chelatujících membrán.....	62
4.3.4. Příprava a charakterizace některých nekomerčních nízkomolekulárních látek použitých při modifikaci polymerních nosičů.....	62
4.4. Sorpce kovových iontů.....	64

4.4.1.	Obecný popis pro stanovení obsahu chelatujících skupin sorpcí kovových iontů.....	64
4.4.2.	Regenerace chelatujících sorbentů po sorpci kovových iontů.....	65
4.5.	Ligandově-výměnná chromatografie na připravených chelatujících sorbentech	65
4.5.1.	Zařízení pro IMAC, plnění kolon.....	65
4.5.2.	Obecný předpis provedení IMAC proteinů v koloně.....	66
4.5.3.	Ligandová výměna model. látek s využitím frontální chromatografie.....	66
4.5.4.	Eluce specificky navázaných proteinů z kolony.....	67
4.5.5.	Adsorpce proteinů šaržovitými experimenty.....	68
4.5.6.	Vyhodnocení bílkovinných roztoků.....	68
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	69
5.1.	Volba monomerů pro přípravu IMA nosičů.....	71
5.2.	Sorbenty založené na binárních kopolymerních částicových nosičích.....	72
5.2.1.	Příprava a charakteristika částic poly[diethylenglykol-methakrylát- <i>co</i> -ethylen-dimethakrylátu] [poly(DEGMA- <i>co</i> -EDMA)]	72
5.2.2.	Modifikace částic poly(DEGMA- <i>co</i> -EDMA) chelatujícími skupinami... 74	74
5.2.3.	Stanovení obsahu chelatujících skupin výsledných sorbentů sorpcí kovů 82	82
5.2.4.	Studium interakce připravených sorbentů s proteiny.....	84
5.2.5.	Souhrn výsledků kapitoly 5.2.....	89
5.3.	Sorbenty založené na terpolymerních částicových nosičích.....	90
5.3.1.	Částice poly[glycidyl-methakrylát- <i>co</i> -diethylenglykol-methakrylát- <i>co</i> -ethylen-dimethakrylátu] [poly(GMA- <i>co</i> -DEGMA- <i>co</i> EDMA)].....	90
5.3.1.1.	Příprava a charakteristika částic poly(GMA- <i>co</i> -DEGMA- <i>co</i> -EDMA) 90	90
5.3.1.2.	Příprava modifikovaných poly(GMA- <i>co</i> -DEGMA- <i>co</i> -EDMA) částic s různou koncentrací chelatujících skupin.....	98
5.3.1.3.	Sorpční vlastnosti Ni ²⁺ -IDA komplexů poly(GMA- <i>co</i> -DEGMA- <i>co</i> -EDMA) v závislosti na vnitřní struktuře nosiče.....	103
5.3.1.4.	Studium chování vybraných sorbentů k model. imunoglobulinu.....	108
5.3.2.	Částice poly[glycidyl-methakrylát - <i>co</i> -2-hydroxypropyl-methakrylát- <i>co</i> -ethylen-dimethakrylátu] [poly(GMA- <i>co</i> -HPMA- <i>co</i> -EDMA)].....	115
5.3.2.1.	Charakteristika částic poly(GMA- <i>co</i> -HPMA- <i>co</i> -EDMA).....	115
5.3.2.2.	Modifikace částic poly(GMA- <i>co</i> -HPMA- <i>co</i> -EDMA).....	116

5.3.2.3. Použití chelatujících poly(GMA- <i>co</i> -HPMA- <i>co</i> -EDMA) v IMAC imunoglobulinů, srovnání separačních vlastností s komerčním sorbentem.....	120
5.3.3. Souhrn výsledků kapitoly 5.3.....	122
5.4. Membránové polymerní nosiče.....	123
5.4.1. Příprava plochých listů poly(DEGMA- <i>co</i> -EDMA) membrán a jejich vlastnosti.....	123
5.4.2. Modifikace plochých listů poly(DEGMA- <i>co</i> -EDMA) membrán chelatajícími skupinami.....	124
5.4.3. Studium komplexačních vlastností chelatujících poly(DEGMA- <i>co</i> -EDMA) membrán, srovnání s částicovými sorbenty.....	126
5.4.4. Modelové studie sorpce imunoglobulinu G na Ni(II)-IDA-DEGMA- <i>co</i> - EDMA membránách v IMA metodě, modely izotherm.....	127
5.4.5. Souhrn výsledků kapitoly 5.4.....	131
6. ZÁVĚR.....	132
7. DODATEK.....	134
7.1. Seznam publikovaných prací autorky disertační práce.....	134
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	135

Z důvodu přehlednosti jsem v textu této práce použila vžitou triviální nomenklaturu, v experimentální části je použito názvosloví IUPAC.

Pro číslování modifikovaných polymerů je použito římských číslic. Číslování tabulek, schémat a obrázků je v celé práci jednotné.

1. ÚVOD

První zmínka o imobilizovaných kovových iontech na pevném nosiči pochází z roku 1855, kdy byla v knize Friedlieba Ferdinanda Rungeho „Der Bildungstrieb der Stoffe“ [1] popsána impregnace roztoků kovových solí v pergamenu. V roce 1939 využili Erlenmayer a Dahn [2] navázanou chelatující skupinu (chinolin-8-ol) na pevném nosiči (silikagelu) k zachycení kovových iontů. Princip komplexace kovového iontu s vhodným ligandem či multiligandovým uskupením, tzv. chelatující skupinou, která je připojena na nerozpustném nosiči, je široce využíván pro separaci kovových iontů od 50. let 20. století dodnes.

V roce 1975 však Porath a jeho spolupracovníci [3] ukázali, že imobilizovaných kovových iontů je možno využít pro separaci proteinů. Chelatující skupiny - kyselina iminodioctová a *N,N,N*-tris(karboxymethyl)ethylendiamin byly kovalentně navázány na agarózový gel a po vytvoření komplexů s ionty Cu^{2+} , příp. Zn^{2+} , byly úspěšně rozděleny proteiny lidského séra. Tato práce znamenala vznik nové metody, dnes nazývané chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC – „immobilized metal affinity chromatography“). Ačkoli díky rozvoji této metody byla vyčištěna, separována a prozkoumána celá řada přírodních i transgenních proteinů, autoři zůstávali většinou věrni systému zavedenému Porathem, tj. kyselině iminodioctové navázané na agarózovém gelu. Jen zřídka byl jako pevný nosič použit jiný polysacharid či anorganický silikagel. V posledním desetiletí jsou však přírodní polysacharidové nosiče stále více nahrazovány nosiči syntetickými, polymerními, které jsou založené zpravidla na esterech kyseliny methakrylové. Mají několik výhod proti svým přírodním protějškům. Kromě snadné skladovatelnosti a odolnosti proti mikrobům je jejich velkou předností definované chemické složení a strukturní parametry nastavitelné volbou experimentálních podmínek při jejich přípravě. Proces hledání nových polymerních nosičů s vhodnými parametry je stále ve stadiu vývoje. Ačkoli je zřejmé, že struktura nosiče jakož i typ a koncentrace chelatující skupiny mají velký vliv na chromatografickou separaci, neexistuje systematická studie ani obecný model, podle něhož by se na základě znalosti parametrů nosiče, kvality a koncentrace chelatující skupiny dalo usuzovat na efektivitu IMA procesu.

Príspevek k řešení těchto problémů je obsahem předkládané disertační práce.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC), princip metody

Kovové ionty hrají v přírodě důležitou úlohu. Některé jsou obsaženy v živé buňce a jsou pro život nezbytné, jiné jsou naopak toxické. Z širokého využití kovových iontů tato práce pojednává o jejich úloze v ligandově výměnné chromatografii a především pak v její specifické součásti, v chromatografii na imobilizovaných kovových iontech (dále jen IMAC). Speciálně se pak zaměříme na gely s imobilizovanými kovovými ionty, které jsou pro ligandovou výměnu na kovovém iontu používány.

Ligandová výměna na imobilizovaném kovu je výsledkem schopnosti přístupujícího ligandu substituovat slabě vázaný ligand, většinou vodu, v komplexech kovů. Kovy mohou dát nebo přijmout elektrony z atomů ligandu. Podle definice [4] je ligandově výměnná chromatografie či chromatografie s výměnnou ligandu (LEC-, „ligand exchange chromatography“) proces, kdy se interakce mezi stacionární fází a separovanou molekulou vyskytuje během tvorby koordinační vazby uvnitř koordinační sféry iontu tvořícího komplex; vedoucím principem je interakce mezi elektron donorovou skupinou a akceptorem elektronů. Ligandová výměna na imobilizovaném kovovém iontu je pak využívána pro kvantitativní rozbor toxických aniontů [5,6], separace karbohydrátů [7], substituovaných fenolů [8,9], imidazolu a jeho derivátů [10] a biopolymerů (IMAC).

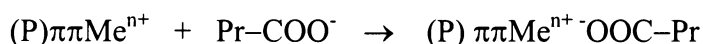
2.2. Separace a purifikace bílkovin, vliv kovového iontu

Efektivita ligandové výměny na imobilizovaném kovovém iontu je ovlivněna povahou kovu. Základem pro pochopení vlivu kovového iontu v LEC a IMAC je Pearsonovo pojetí měkkých a tvrdých kyselin a bází [11]; kovové ionty můžeme je rozdělit podle míry jejich polarizovatelnosti na tvrdé a měkké. Nepolarizovatelné nebo též „tvrdé“ kovové ionty, jako například Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} , se silně asociují s kyslíkem, zatímco „měkké“ kovové ionty, Pd^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Hg^{2+} nebo Tl^{3+} jsou ty, které se nejsnadněji polarizují v elektrickém poli a které upřednostňují „měkké“ atomy jako je síra. Koordinační vazby vytvořené s měkkými kovy jsou kovalentní, s tvrdými kovy iontové. Ionty středního typu, kterými jsou např. Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+} se preferenčně koordinují s amino-nebo imino-

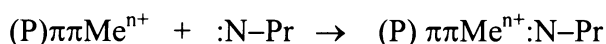
dusíkem, ale interagují také s kyslíkem a sírou. Proto jsou nazývány střední (intermediární) nebo častěji „hraniční“ (borderline).

V IMAC, která patří do skupiny pseudobiospecifických metod, slouží jako donory nebo akceptory elektronů funkční skupiny na povrchu proteinu, zpravidla přístupné postranní řetězce aminokyselin. Tyto aminokyseliny jsou vystaveny vlivu kovu, vázaného přes chelatační gel, který má volnou kapacitu pro tvorbu dalších koordinačních vazeb. Bílkovina může být tedy ke kovu reversibilně vázána několika typy sil [12]:

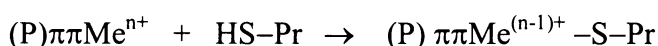
1. iontová adsorpce kontrolovaná nábojem



2. koordinační vazba



3. silná kovalentní vazba



Který z uvedených typů interakce bude převažovat závisí na použitém kovovém iontu. Je pravděpodobné, že asparagová a glutamová kyselina obsahující „tvrdé“ kyslíkové atomy budou zahrnuty ve vazbě proteinů s tvrdými kovovými ionty [13]. Lidský β -interferon obsahující thiolové skupiny se zase váže specificky k chelátům měkkých, případně též hraničních kovů [14]. Z toho vyplývá selektivita jistých proteinů k jistým kovovým iontům. Toho je využíváno například pro separaci fosfoproteinů, které se selektivně váží na cheláty tvrdých kovových iontů, z nichž nejčastěji je používán kation železitý. Selektivitu lze demonstrovat též např. pro některé sérové proteiny, které byly na komplexech „měkkého“ Tl^{3+} při optimálním pH (7,6) silně adsorbovány, zatímco na komplexech „tvrdých“ Al^{3+} , Ga^{3+} a In^{3+} nikoli [15]. Pokud má kovový komplex silný záporný efektivní náboj, mohou v interakci aminokyselinových postranních řetězců s kovovými ionty figurovat též např. aminoskupina lysinu nebo guanidinový kruh argininu.

V IMAC jsou však nejpoužívanějšími kovové ionty hraniční, přičemž jejich komplexy váží proteiny bohaté především na histidin. Je to proto, že za fyziologických podmínek funkci primární donorové skupiny plní imidazolový kruh histidinu. V menší míře k interakci přispívají také ostatní aminokyselinové zbytky, zejména cysteinové, ale také aromatické postranní řetězce tryptofanu, tyrosinu a fenylalaninu. Velmi slabě interagují též aminokyseliny arginin, methionin a glycin. Dominantní příspěvek dusíkových atomů

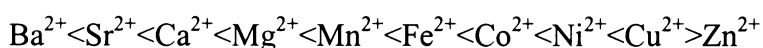
imidazolového kruhu histidinu v interakci proteinů s hraničními kovovými ionty byl prokázán experimentálně i teoreticky; z experimentálních prací uvedme například často citovanou práci Sulkowskiho [16], který zkoumal vztah mezi retenčním chováním proteinů s různým obsahem histidinových a tryptofanových zbytků na kolonách s chelatovaným měďnatým iontem (ve formě imobilizovaného komplexu s kyselinou iminodioctovou-IDA). Zjistil, že ribonukleázy (RNasy) s jedním, dvěma a třemi povrchovými histidinovými zbytky byly zadrženy v pořadí stoupajícího množství histidinových zbytků za stejných podmínek. Stejný princip předvedl Sulkowski ještě na případě dvou lysozymů; ten, který obsahoval povrchově přístupný histidinový zbytek (HEWL) byl zadržen na Cu^{2+} -IDA sorbentu, zatímco lysozym neobsahující histidin na témže sorbentu zadržen nebyl.

Z teoretických studií si zmínku zaslouží práce Ruliška a Havlase [17], která je nejjobecnějším dostupným zdrojem zabývajícím se výpočty interakčních energií postranních řetězců aminokyselin s vybranými přechodnými kovovými ionty. Autoři pro každý z dané série kovů (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} a Hg^{2+}) prováděli výpočty interakčních energií ve čtyřech nejběžnějších koordinačních geometriích (lineární, tetraedrické, čtvercově planární a oktaedrické) za účelem kvantitativního vyhodnocení selektivity příslušných aminokyselinových zbytků k vybraným kovům, přičemž interakční energie byla definována jako energie záměny jedné vody v příslušném aquakomplexu $[\text{Me}(\text{H}_2\text{O})_n]^{2+}$ (n je přirozené číslo) za funkční skupinu reprezentující postranní řetězec aminokyseliny. Matematické výpočty prokázaly, že histidin má nejpříznivější interakční energii mezi neutrálními ligandy, přičemž koordinace s kovem probíhá preferenčně prostřednictvím volného elektronového páru na imidazolovém dusíku Ne (dvakrát častěji než pro N δ). Mezi záporně nabitými ligandy vychází nejpříznivější interakční energie pro Cys^- (cystein), následovaném Glu^- , Asp^- , Tyr^- (glutamin, asparagin, tyrosin). Dále ukázali, že histidin (na rozdíl od jiných aminokyselin, např. cysteinu) není selektivní ke studovaným hraničním kovovým iontům Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} a ve všech případech vykazuje velkou afinitu.

Tyto a další studie ukazují v první aproximaci, že proteiny tvoří s hraničními kovovými ionty koordinační vazby v závislosti na množství přístupných histidinových zbytků. Toho je využíváno nejen pro rozdělení proteinů v závislosti na množství histidinových zbytků, ale též např. pro topografii histidinů v proteinech [18,19]. S rozvojem molekulární biologie získala IMA metoda popularitu také při separaci proteinů získaných rekombinantními technikami, tj. technikami, při nichž se překombinováním sekvence DNA vyexprimuje transkripčně-

translačními pochody v bakteriálních buňkách *Escherichia coli* protein obohacený o hexahistidinovou sekvenci, tzv. „fusion part“ (Hexa-His tag), kterou lze odštěpit chemicky nebo specifickými proteázami. Tím je zefektivněna purifikace cílového proteinu [20].

Irwing-Williamsova řada [21], která řadí kovové ionty podle stability jejich komplexů na základě iontových poloměrů kovů a orbitalových energií, je dalším parametrem ovlivňujícím výběr kovového iontu v IMA chromatografii:



Pro stability komplexů první řady přechodných kovů lze uvést pořadí $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$, Zn^{2+} . Nejvíce používanými kovovými ionty v IMA metodě jsou proto právě ionty Cu^{2+} a Ni^{2+} , které tvoří stabilní komplexy.

Měďnaté komplexy jsou nejstabilnější a i afinita měďnatého iontu k přístupujícímu ligandu (bílkovině) je nejvyšší. Je však nutné si uvědomit, že vyšší afinita nevede nutně k lepší separaci, protože selektivita se liší s individualitou proteinu. Vyšší afinita rovněž ztěžuje zpětnou eluci reverzibilně navázaného proteinu ze sorbentu.

2.3. Chelatující skupiny používané v IMAC

Jak již bylo uvedeno, ionty přechodných kovů jsou imobilizovány k neutrální a rigidní vazebné fázi, tzv. nosiči („support, carrier“). Imobilizace se provádí koordinací kovového iontu s vhodným ligandem či častěji chelatující skupinou (několik rigidně spojených ligandů), kovalentně připojenou na pevném nosiči.

Chelatující skupina v IMAC pak musí splňovat dva kritické aspekty: musí vázat kovové ionty dostatečně pevně, aby nedocházelo k jejich uvolňování a zároveň musí ponechat některé z koordinačních míst kovu volné pro tvorbu vazeb s přístupujícím ligandem. Stabilitu kovového komplexu určuje množství atomů tvořících chelátový kruh. Jako „tridentate“ se označují chelatující skupiny tvořící s komplexovaným kovem tři koordinační vazby. Analogicky „tetradentate“ chelátory tvoří čtyři vazby, „pentadentate“ pět, „bidentate“ dvě atd. Důsledkem je, že komplexy např. „pentadentate“ chelát -kovový ion jsou sice pevnější a stabilnější než komplexy např. „tridentate“ chelátoru, ale mají také slabší afinitu k proteinům,

nebot' zanechávají méně koordinačních míst na kovu pro vazbu proteinu. Pokud ion vyčerpá všechny vazby pro koordinaci s chelatující skupinou a nezanechá žádné volné koordinační místo na kovu pro vazbu další látky, neinteraguje s přístupujícím ligandem vůbec a vykazuje tudíž nulovou adsorpční kapacitu. Povaha chelatující skupiny tedy určuje jak stabilitu kovového komplexu, tak i sílu afinity mezi imobilizovaným kovovým iontem a přístupujícím ligandem. Zpravidla platí, že čím silnější je imobilizace kovu, tím slabší je interakce s přístupujícím ligandem [12]. Kovové komplexy by proto měly být střední síly [22]. Komplex by neměl být velmi pevný, aby měl kov dostatek vazebné kapacity pro proteiny. Nepříliš stabilní komplexy dávají zase prostor úniku kovu a tvorbě kov-protein komplexů v mobilní fázi. Navíc vždy existuje požadavek regenerovatelnosti sorbentu, tj. odstranění imobilizovaného kovového iontu po provedení experimentu roztokem silnějšího chelatujícího činidla (soli kyseliny ethylendiamin-tetraoctové (EDTA)) tak, aby byl nosič s imobilizovanou chelatující skupinou získán zpět v původní formě připravený k opětovnému použití či k vytvoření komplexu s jiným kovovým iontem.

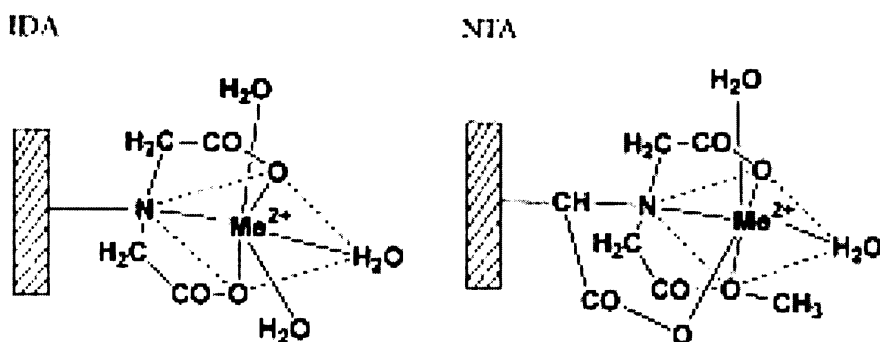
Z chelatujících skupin splňujících výše popsaná kritéria je zdaleka nejpopulárnější kyselina iminodiectová (IDA), částečně také kvůli své přítomnosti na komerčních sorbentech. Hlavními důvody její oblíbenosti jsou však snadná dostupnost, nízká cena a především pak vhodná pevnost jejích komplexů, zejména s „hraničními“ kovovými ionty. Střední síla těchto komplexů (průměrná vazebná konstanta $K = 10^{7,3} \text{ M}^{-1}$ [22]) je řadí mezi dostatečně stabilní pro použití v IMAC a zároveň dovoluje snadné odstranění chelatovaného kovu ze sorbentu promytím silnějším chelatačním činidlem. Tím je zajištěn minimální únik kovových iontů z komplexů při procesu ligandové výměny a současně je umožněna snadná regenerace sorbentu po provedení experimentu. Díky střední síle kovových komplexů IDA zůstane více než jedno koordinační místo na imobilizovaném kovu dostupné pro interakci s proteiny nebo jinými látkami. IDA vytváří s imobilizovaným kovovým iontem tři koordinační vazby a patří proto mezi „tridentate“ cheláty.

Méně častěji se v IMAC používají jiné chelatující skupiny. Často se jedná o sloučeniny strukturně podobné kyselině iminodiectové, které stejně jako IDA patří do skupiny karboxymethylovaných aminů, tzv. „chelonů“. Vyšší chelony však tvoří příliš stabilní komplexy s kovy, a proto nejsou pro chromatografii IMA vhodné [12,23].

Jedním z chelonů použitých v IMAC je již v úvodu zmíněný *N,N,N*-tris(karboxymethyl)ethylendiamin (TED), kterého použili Porath a spolupracovníci ve své

stěžejní práci [3]. Tíž autoři ho později použili pro imobilizaci různých kovových iontů (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} , Tl^{3+}) [15]. TED byl použit též pro chelataci Eu^{3+} a dalších tvrdých iontů pro čištění kalmmodulinu [24], proteinu vážícího vápník, metodou IMAC. TED však patří mezi „pentadentate“ cheláty tvořící zbytečně pevné komplexy s kovovými ionty, čímž je oslabena vazba s vázajícími se ligandy.

Jinou známou chelatující skupinou je kyselina nitrilotrioctová (NTA). Od kyseliny iminodioctové se odlišuje přítomností další karboxymethylové skupiny, která vytváří s přechodným kovem čtvrtou koordinační vazbu. NTA je proto řazena mezi „tetradentate“ chelátory a tvoří tedy v porovnání s IDA pevnější komplexy ($K_{\text{NTA}} \sim 10^{10,4} \text{ M}^{-1}$) a ponechává o jedno volné vazebné místo na kovovém iontu méně. To jsou zřejmě hlavní důvody, proč NTA nedosáhla takové popularity jako IDA, nicméně i přesto byla úspěšně použita pro separaci různých peptidů a proteinů [25]. Obě chelatující skupiny, IDA i NTA, vytvářejí s imobilizovaným kovovým iontem čtvercově planární bipyramidální koordinační strukturu. Koordinační sféru obou adsorbentů ukazuje Obr. 1. V obou případech je protein koordinován k chelátovanému kovovému iontu prostřednictvím dvou histidinových zbytků. V případě Me^{2+} -IDA však protein může interagovat s kterýmikoli dvěma ze tří dosažitelných koordinačních míst.



Obr. 1. Domnělé koordinační struktury „dentate“ chelátorů {kyselin iminodioctové (IDA) a nitrilotrioctové (NTA)} v komplexu s imobilizovaným kovovým iontem v afinitní metodě na imobilizovaných kovových iontech [26].

Další chelatující skupina z množiny karboxymethylovaných aminů, která však v IMAC nenalezla velké popularity, je ethylen- N,N -dioctová kyselina (EDDA) použitá ve formě komplexů s tvrdými i měkkými kationty kovů pro separaci proteinů a glykoproteinů [27].

Z chelatujících skupin, které nacházejí využití v IMAC a které nejsou strukturně příbuzné kyselině iminodioctové, si pozornost zaslouží chinolin-8-ol (8-HQ), nazývaný též oxin. O něm je už dávno známo, že tvoří komplexy s různými kovovými ionty. Je úspěšně používán v iontové výměnné chromatografii pro separaci kovových iontů [28] a v ligandově výměnné chromatografii pro odstraňování organických polutantů z odpadních vodných roztoků [8,9]. V IMAC byl prozatím používán spíše zřídka a většinou ve formě komplexů s tvrdými kovovými ionty, pro IMAC méně častými, přestože velmi dobře komplexuje též měkké a střední kovové ionty v širokém rozmezí pH [28,29,30]. Poprvé v IMAC byl 8-HQ použit v práci Zachariou a Hearn [13], kteří studovali množství zachyceného cytochromu THCC na komplexech 8-HQ s několika „tvrdými“ kovovými ionty. Zachycení THCC bylo úspěšné zejména na sorbentu s imobilizovanými komplexy 8-HQ-Fe³⁺, jichž bylo proto později využito pro separaci a charakterizaci fosforylovaných biomolekul [31]. Zde je interakce zprostředkována především tvorbou iontových vazeb mezi nabitým kovovým komplexem a „tvrdými“ postranními řetězci kyseliny glutamové a asparagové.

Diez a spol. [32] však ukázali, že i „měkký“ kov, Pd²⁺, imobilizovaný ve formě komplexu 8-HQ-Pd²⁺ může sloužit k separaci aminokyselin i proteinů, jež je založena na afinitních chromatografických principech na imobilizovaném měkkém kovu. Zachariou a Hearn [33] používali ve své pozdější práci též měďnatých komplexů 8-HQ-Cu²⁺ pro srovnávací studie sorpčních vlastností několika bílkovin (HMYO, THCC a HEWL). Všechny studované bílkoviny se dobře zachycovaly na 8-HQ-Cu²⁺ sorbentu. Hrubý a spol. [9] pak při separaci substituovaných fenolů na imobilizovaném „hraničním“ (Cu²⁺) i „tvrdém“ (Fe³⁺) iontu ve formě komplexů s 8-HQ ukázali, že ligandová výměna na komplexech s chinolin-8-olem je úspěšná pro oba typy iontů a je částečně kovalentní a částečně coulombické povahy. Nedávno publikovaná práce zabývající se IMAC na komplexech Ga³⁺-quinolin-8-ol [34] odhalila zajímavý fakt, že se 8-HQ může chovat též jako bioligand, neboť fosfoprotein pepsin A se vázal kvantitativně nejen na Ga³⁺-8-HQ sorbent, ale i samotný nosič obsahující jen volný chinolin-8-ol bez imobilizovaného kovu vázal uvedený fosfoprotein. Uvedený jev je zřejmě způsoben bioafinitní interakcí enzym-substrát, resp. enzym-inhibitor, kde 8-HQ zastává funkci inhibitoru.

Jelikož je interakce přistupujícího ligandu s komplexy chinolinol-8-olu částečně coulombické povahy, je chinolin-8-ol často používán ve spojení s tvrdými kationty majícími vysoký náboj (většinou n=3, např. Fe³⁺, Yb³⁺, Al³⁺), avšak nevýhodou těchto komplexů bývá

vytvoření velmi pevných vazeb s některými přístupivějšími ligandy (např. aromatickými o-hydroxyfenoly [9]), kdy se interakce stává ireversibilní a navázanou látku již není možné získat zpět elucí. 8-HQ patří mezi „bidentate“ chelátory a tvoří neutrální komplexy pouze s univalentními ionty [29].

Mezi další chelatující skupiny, které nejsou příliš obvyklé, nicméně v IMAC byly použity, lze zařadit Protoporphyrin IX (ProP; 3,18-divinyl-2,7,13,17-tetramethylporphin-8,12-dipropanová kyselina) [35] otestovaný pro sorpci několika peptidů a proteinů na měkkých i tvrdých kovových iontech (Fe^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) nebo 1,4,7-Triazocyklononan (tanc) [36] použitý ve formě komplexů s hraničními kov. ionty (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) pro sorpci modelových proteinů lysozymu HEWL, cytochromu THCC a myoglobinu HMYO, případně β -diketoamin použitý ve formě Cu^{2+} komplexů pro izolaci α -laktoalbuminu ze syrovátky [37]. Zmíněné chelátory si však popularitu v IMAC nezískaly pravděpodobně proto, že tvoří velmi pevné komplexy (vazebné konstanty dosahují hodnot až $K=10^{29} \text{ M}^{-1}$) v porovnání s jinými chelatujícími skupinami, pro IMAC běžnějšími. V případě ProP a tanc hraje negativní roli nejen pevnost komplexů (způsobená též π - π interakcí mezi chelatující skupinou a aromatickými zbytky aminokyselin), která znemožňuje nebo ztěžuje zpětnou eluci navázané bílkoviny, ale též sterické vlivy, neboť kovový ion je imobilizován uprostřed makrocyclu, čímž je přístup cílové látky ztížen. Autoři uvedených prací srovnávali výsledky získané IMA separací na tanc a ProP komplexech s odpovídajícími IDA-sorbenty za stejných podmínek a potvrdili, že typ chelatující skupiny ovlivňuje selektivitu ke kovu a tím též schopnost zadržet bílkovinu.

Jako vhodné IMA chelátory pro imobilizaci kovového iontu však mohou sloužit též aminokyseliny nebo jejich deriváty. Ty byly buď kovalentně připojeny na nosič s využitím organicko-chemických postupů nebo byly zabudovány do pevného nosiče přímo při jeho přípravě. Mezi aminokyselinové chelátory kovalentně připojené modifikačními postupy polymerního nosiče patří deriváty proteinogenních aminokyselin jako např. L-fosfoserin (OPS) [38], *N*-(karboxymethyl)-4-amino-L-prolin (*cis* nebo *trans*) [39], *N*-(2-pyridylmethyl)glycin (CP) [40], kyselina karboxymethyl L-asparagová (CM-ASP) [41] nebo glycinhydroxamová kyselina (GH) [42]. L-fosfoserin má vyšší afinitu spíše k tvrdým iontům, hlavně Fe^{3+} a Al^{3+} , v porovnání s měkkým měďnatým iontem pravděpodobně kvůli přítomnosti několika kyslíkových atomů preferujících interakci s „tvrdými“ kovy. Jeho komplexy vykazují pro sérii modelových proteinů (THCC, HMYO, HEWL) různou

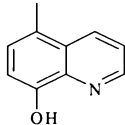
selektivitu [38]; HEWL se neváže na žádný z komplexů Me^{n+} -OPS, zbylé dva proteiny ano, avšak vykazují různou afinitu v závislosti na pH a typu kov. iontu. Nejlepší výsledky byly získány pro Fe^{3+} -OPS. V jiné práci [39] byla studována interakce mezi týmiž modelovými proteiny (HMYO, HEWL a THCC) a „měkkým“ (Cu^{2+}) i „tvrdými“ ionty (Al^{3+} , Fe^{3+} , Yb^{3+} a Ca^{2+}) komplexovanými ve formě chelátů s chelatujícími skupinami IDA, 8-HQ a OPS za různých podmínek (pH, iontové síly). Bylo zjištěno, že kovové komplexy chelatujících skupin lze seřadit podle síly jejich vazby k modelovým proteinům takto: 8-HQ > OPS \geq IDA.

N-(2-pyridylmethyl)glycin (CP) byl ve formě měďnatého komplexu otestován pro vazbu modelového proteinu HMYO a byly též vyhodnoceny jeho vazebné schopnosti pro proteiny lidského séra při různých hodnotách pH, mezi jinými též pro lidský IgG (M_w 165 000) [40]. Výsledky ukázaly, že všechny studované proteiny lidského séra se specificky váží na CP- Cu^{2+} při pH 7 a 9, ale ne při pH 5, neboť při tomto pH jsou již v protonizované formě a jejich elektrondonorové skupiny tedy již neinteragují s imobilizovaným kov. iontem. Autoři dále ukázali, že Cu^{2+} -CP komplexy se chovají ke studovaným proteinům velmi podobně jako komplexy Cu^{2+} -IDA, přestože byly nalezeny některé nevýznamné odlišnosti (např. pH optimum pro lidský albumin (HSA) nebo HMYO). Na základě Lewisovy teorie kyselin a zásad je totiž CP stejně jako IDA ligand vhodný pro komplexaci spíše „měkkých“ či „hraničních“ kovových iontů a předpokládá se pro oba chelátory čtvercově planární bipyramidální koordinační struktura. Volný elektronový pár pyridinového dusíku pravděpodobně participuje v koordinaci „hraničních“ kovových iontů a vytváří tak N_2O donor-akceptorový systém podobný s NO_2 systémem komplexů IDA.

Kobaltnaté komplexy kyseliny karboxymethyl L-asparagové (CM-ASP) imobilizované na agarózovém gelu byly použity pro separaci proteinů lidského séra [41]. V porovnání s Co^{2+} komplexy kyseliny iminodioxové je však afinita bílkovin ke komplexům CM-ASP nižší (klesá v řadě IDA > CM-ASP > TED [12]). Tato chelatující skupina proto nenabyla většího praktického významu.

Některé z diskutovaných chelatujících skupin použitých v IMAC zřehledňuje Tabulka 1.

Tabulka 1: Chelatující skupiny použité v chromatografii na imobilizovaných kovových iontech.

Název	zkratka	struktura	lit.
Iminodioctová kyselina	IDA	$-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$	3
Nitrilotrioctová kyselina	NTA	$-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_3$	25
Tris(karboxymethyl)-ethylendiamin	TED	$\begin{array}{c} -\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$	24
Ethylendiamin- <i>N,N</i> -dioctová kyselina	EDDA	$\begin{array}{c} -\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2\text{COOH} \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_2\text{COOH} \quad \text{H} \end{array}$	27
Chinolin-8-ol	8-HQ		13
Karboxymethyl L-asparagová kyselina	CM-ASP	$\begin{array}{c} -\text{N}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{CH}_2\text{COOH} \\ \searrow \text{COOH} \end{array} \\ \qquad \\ \text{H} \qquad \text{H} \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$	41
Glycinhydroxamová kyselina	GH	$-\text{NHCH}_2\text{CONHOH}$	42
L-fosfoserin	OPS	$\begin{array}{c} -\text{N}-\text{CHCOOH} \\ \qquad \\ \text{H} \qquad \text{CH}_2\text{OPO}_3^- \end{array}$	38
<i>N</i> -(2-pyridylmethyl)glycin	CP	$\begin{array}{c} -\text{N}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{C}_5\text{H}_4\text{N} \\ \searrow \text{CH}_2\text{COOH} \end{array} \\ \\ \text{H}_2 \end{array}$	40

Denizli a jeho pracovní tým zavedli komplexující aminokyseliny na IMA nosič přímo při jeho přípravě [43-46]. Tento způsob se však používá spíše vyjíměčně. Lze ho totiž použít pouze v případě syntetických nosičů, pokud si je chemik sám připravuje. V převážné většině prací týkajících se IMA metody je však použito buď přímo komerčních IMA sorbentů nebo je jednoduchým postupem chelatující skupina na komerční nosič kovalentně připojena. Hlavním omezením je zde však skutečnost, že chelatující funkce musí být součástí monomeru, který má vysoký stupeň čistoty, je termicky stabilní (tj. je možné ho přečistit destilací) a lze jej snadno polymerizovat, v případě přípravy IMA částicových nosičů suspenzně.

Takovými monomery byly *N*-methakryloyl-*L*-histidin methyl ester (MAH) [43-45] a *N*-metakryloyl-*L*-cystein methyl ester (MAC) [46]. Byly připraveny z methakrylchloridu reakcí s *L*-histidin nebo *L*-cystein methylesterem. Autoři zde využili afinity histidinových a cysteinových zbytků k „hraničním“ kovovým iontům též pro přípravu IMA sorbentů. Jejich měďnaté komplexy byly použity pro modelové adsorpce albuminu HSA a cytochromu THCC [43,44,46], železité komplexy pak pro studium sorpční kapacity k jinému modelovému proteinu- kataláze [45]. Při sorpci imunoglobulinu IgG se MAH neočekávaně choval jako bioligand, tj. vázal specificky imunoglobulin i bez přítomnosti kovového iontu [47]. Příčina takového chování však v citované práci není vysvětlena.

Denizli a spol. často využívají i dalšího způsobu imobilizace přechodných kovových iontů. Jako chelátory zde fungují imobilizovaná barviva, která mají jednak schopnost komplexovat kovový ion, ale i sama o sobě se používají pro izolace proteinů (tzv. „Dye-ligand affinity chromatography“). Takovými azobarvivy je např. Congo-Red [48,49,50], Cibacron Blue F3GA [51-53] nebo Procion Brown MX-5BR [54]. V těchto pracích bývají na „dye-ligand“ chelátorech prováděny srovnávací studie afinity a selektivity různých modelových proteinů (např. HEWL, THCC atd.) bez přítomnosti kovu (pouze na barvivech) a na komplexech barviva s kovovým iontem. V přítomnosti kovu jsou zpravidla získávány vyšší kapacity navázaného modelového proteinu. Podrobnější diskuse však přesahuje rámec této disertační práce.

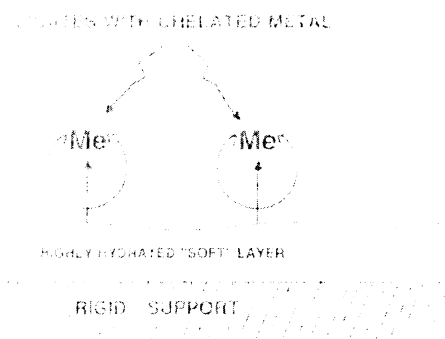
2.4. Polymerní nosiče používané v IMAC

V metodě IMA hraje důležitou úlohu také nosič kovového iontu. Jeho charakter určuje fyzikální vlastnosti jako je mechanická pevnost nebo hydrodynamický odpor v chromatografické koloně, ovlivňuje chování k biologickým substancím i kapacitu sorbentu, tj. množství navázaného proteinu. Přestože jsou tyto fakty zřejmé, vlivu nosiče na IMAC separaci bylo věnováno relativně málo pozornosti. Existují však jistá kritéria, která by měla být pro volbu nosiče splněna. Jsou to především:

- mechanická a chemická stabilita
- hydrofilita povrchové vrstvy
- dostupnost imobilizovaného kovového iontu pro interakci s biopolymerním roztokem

Mechanická stabilita nosiče je důležitá především pro práci za vysokých tlaků. Některé často používané měkké polysacharidové gely jsou proto pro vysokotlaké HPLC separace nevhodné. Chemicky musí být matrice nosiče odolná zejména vůči elučním činidlům a vodným roztokům v širokém rozmezí pH.

Hydrofilita nosiče je klíčová vlastnost pro práci s vodnými roztoky. Jelikož interakce biopolymerů s imobilizovanými kovovými ionty probíhá přednostně na povrchu nosiče, celý nosič obecně nemusí být vždy hydrofilní, ale musí alespoň obsahovat vysoce hydrofilní povrchovou vrstvu (viz Obr.2), která neinteraguje s biopolymerem určenými k separaci [22].



Obr. 2. Povrch nosiče pro IMAC proteinů [22]

Matrice chromatografických nosičů mohou být založeny na polysacharidech, syntetických polymerech a vzácně též na anorganických sloučeninách (většinou silikagelu).

V následujících odstavcích se budeme jednotlivým typům nosičů věnovat podrobněji.

2.4.1. Přírodní částicové nosiče

2.4.1.1. Agarózové gely

Všechny přírodní polymery používané jako nosiče v IMAC jsou polysacharidy, z nichž největší oblíbenosti se těší agarózové gely připravované tzv. gelací agarózy. Ve svém přírodním stavu se agaróza vyskytuje jako část komplexní směsi nabitých a neutrálních polysacharidů nazývaných agar, jež jsou obsaženy v mořských řasách rodu *Gelidium* nebo *Gracilaria*. Čistícím postupem se pak odstraní nabitě polysacharidy s cílem získat materiál

s minimálním množstvím ionizovatelných skupin, které by mohly způsobovat nežádoucí nespecifické elektrostatické sorpce.

Po chemické stránce je agaróza lineární polysacharid skládající se z opakující se disacharidové monomerní jednotky zvané agarobiosa, tj. (1-3)- β -D-galaktosa-(1-4) [3,6 anhydro]- α -L-galaktosa. Díky přítomnosti neobvyklého monosacharidu 3,6-anhydro-L-galaktózy je omezen růst bakterií a tím též biologická degradace agarózy. Agaróza má za nižších teplot podobu gelu, který se tvoří spontánně ochlazením horkého roztoku agarózy. Působením vyšší teploty pak ve vodném roztoku taje. Bod tání závisí na koncentraci a typu agarózy. Pro přípravu běžných agarózových gelů se používají agarózy tající při teplotách 85-100°C a gelující při poklesu teploty pod 45-50°C. Při procesu gelace tvoří volná vlákna agarózy postupně dvě formy prostorového šroubovicového uspořádání, které se poté agregují a několik vláken pak tvoří pevné svazky tak, že vytvoří trojrozměrnou prostorovou síť (Obr.3). Gelace tak vede ke vzniku želatinové hmoty, kde jsou mezery v síti vláken vyplněny vodou (resp. pufrem), v níž byla předtím agaróza rozpuštěna. Výsledkem seskupování dvojitých helixů do svazků je vznik makroporézní struktury. Velikost pórů v gelu závisí na koncentraci agarózy, která se typicky pohybuje mezi 0,7 - 2,5 %, což odpovídá velikosti pórů 100 až 300 nm (prospekty Pharmacia). Gel s vyšší koncentrací agarózy obsahuje menší póry, naopak gel s nižší koncentrací agarózy póry větší.

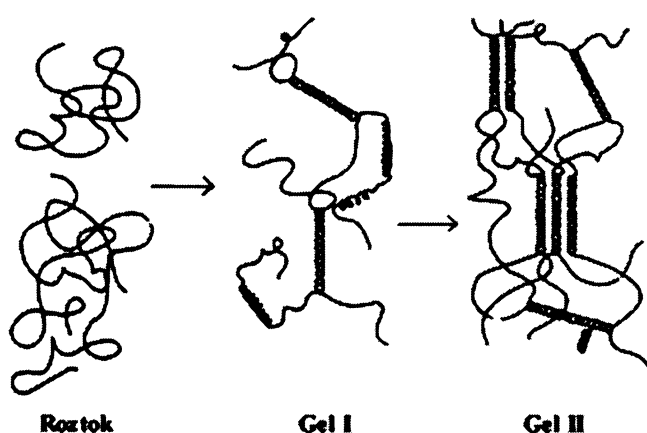
V IMA metodě se používá zesíťovaný agarózový gel ve formě kulovitých částic zvaný Sefaróza CL (CL = crosslinked). Před síťovacím procesem je struktura agarózového gelu stabilizována pouze vodíkovými vazbami. Síťování se provádí většinou reakcí s 2,3-dibrompropanolem za silně alkalických podmínek. Síťovací proces poskytuje zesíťovaný agarózový gel v zásadě se shodnou porozitou jako měl mateřský gel, ale s mnohem vyšší tepelnou, chemickou a fyzikální stabilitou a minimální bobtnavostí. Gel není citlivý ke změnám iontové síly ani pH a má dobré průtokové vlastnosti zabraňující fluktuacím objemu náplně v chromatografickém sloupci.

Komerčně dostupné Sefarózy 2B, 4B a 6B se liší koncentrací agarózy (2,4 a 6 %) a tím i mechanickou pevností (Sefaróza 6B je nejpevnější). Velikost částic zmiňovaných komerčních Sefaróz se pohybuje v rozmezí 45-200 μ m v průměru.

Sefarózu CL je možné modifikovat zavedením funkčních skupin k monosacharidovým jednotkám za vzniku etherových vazeb. Aktivovat Sefarózu lze též reakcí s epichlorhydrinem nebo bifunkčními oxirany, které se mohou chovat nejen jako modifikátory, ale také jako

sítovací činidlo, čímž lze získat zesíťovanou aktivovanou Sefarózu přímo z mateřské Sefarózy 2B, 4B nebo 6B. Reakcí epoxyskupin s primárním nebo sekundárním aminem za alkalických podmínek mohou pak být v dalším kroku zavedeny funkční skupiny pro požadovaný typ chromatografie, v případě IMAC chelatuující skupiny.

Existuje též komerční zesíťovaný 4 nebo 6%-ní agarózový gel Sepharose Fast Flow (Pharmacia) s velikostí částic o průměru 45-165 μm již obsahující navázanou chelatuující kyselinu iminodioctovou (IDA), případně i komplexovaný kovový ion určený přímo pro využití v IMAC.



Obr. 3. Průběh gelace agarózy.

2.4.1.2. Jiné přírodní nosiče

Méně častěji jsou jako IMA nosiče používány též jiné přírodní materiály. Mezi ně lze zařadit např. algináty, což jsou lineární nerozvětvené polysacharidy získávané z mořských chaluž rodu *Phaeophyceae* a *Laminaria* obsahující β -(1 \rightarrow 4)-vázané zbytky kyseliny D-mannuronové (M) a α -(1 \rightarrow 4)-vázané zbytky kyseliny L-guluronové (G). Uvedené monomerní jednotky jsou epimery a lze je enzymaticky navzájem konvertovat. V alginátech se nevyskytují nahodile, nýbrž vytvářejí buď bloky jedné monomerní jednotky nebo jsou striktně alternující (tj. MMMMMM, GGGGGG nebo GMGMGMGM) v závislosti na druhu chaluhy, ze které jsou izolovány. To určuje jejich konformační preference a tím i jejich vlastnosti. Algináty tvoří gely již při nízkých koncentracích. Pro tvorbu gelové struktury je však důležitá přítomnost kovového iontu, většinou je to kation vápenatý, který je silně vázán

guluronátovými jednotkami a vytváří s nimi strukturu podobnou vejci; v této struktuře je vápenatý ion obklopen šesti kyslíkovými ligandy, kterými jsou 2-OH a 3-OH hydroxylové skupiny jedné G jednotky a karboxylový kyslík jiné G jednotky. M jednotky kovové ionty nekomplexují. Vysoký obsah G jednotky pak produkuje křehké gely s dobrou tepelnou stabilitou, vyšší obsah M jednotky zase poskytuje více elastické gely. Rozhodující však není jen poměr M/G, ale též průměrná délka G bloků (pro tvorbu gelů je optimální 12 G jednotek v bloku). Gupta a spol. [55,56] využili vlastností alginátů pro přímou přípravu IMA sorbentů, kdy namísto vápenatého iontu použili pro přípravu gelové struktury ionty zinečnatý nebo měďnatý. Z 2 %-ního roztoku nízkoviskózního alginátu sodného (Sigma) přímo připravili postupným přikapáváním roztoku $ZnCl_2$ částice (kapacita Zn^{2+} 80 $\mu\text{mol/ml}$ částic), na nichž byl pak úspěšně izolován sójový inhibitor trypsinu ze surového extraktu, přičemž bylo zachováno 90 % jeho enzymové aktivity. Podobně byly alginátové Cu^{2+} -částice [56], tentokrát zesítované epichlorhydrinem, použity v IMA chromatografii pro izolaci β -amylázy, chymotrypsinu a kozího imunoglobulinu IgG. Autoři předpokládají, že za koordinaci zinečnatých i měďnatých iontů jsou v těchto případech zodpovědné pouze karboxylové kyslíky prostorově blízkých guluronátových jednotek.

Alginátové nosiče mají výhodu především v tom, že nepotřebují chelatující skupinu pro komplexaci kovového iontu a že v přítomnosti roztoku kovových solí samovolně tvoří částice obsahující imobilizovaný kovový ion pro přímé použití v IMAC. Navíc bylo ukázáno, že mohou vázat mnohem větší množství modelového proteinu než komerční agarózový gel Sepharose Fast Flow (až 4x pro inhibitor trypsinu na Zn^{2+}) [55]. Tvar částic však není kulovitý; jedná se o částice nepravidelné, deformované s širokou distribucí velikosti, což zhoršuje hydrodynamické vlastnosti při separaci v koloně. Vazba IgG na Cu^{2+} -alginátových částicích je navíc částečně ireversibilní (zpět lze vytěsnit přibližně pouze polovinu) a pro enzym β -amylázu je jeho biologická aktivita elucí dramaticky snížena. U chymotrypsinu závisela jeho enzymová aktivita na koncentraci měďnatého iontu, kdy do cca 100 μmol Cu^{2+}/ml částic zůstávala zachována, ale při zvyšování koncentrace Cu^{2+} rapidně klesala. Separace na alginátových IMAC nosičích je též časově náročná, neboť pro dosažení uspokojivé čistoty je nutné experiment mnohonásobně (8-18 krát) opakovat.

Z dalších přírodních polymerů použitých jako IMA nosiče lze jmenovat celulózu a její deriváty nebo chitin, případně chitosan. Uvedené materiály však podobně jako algináty

nedosáhly v IMAC zdaleka takové popularity jako agarózové gely, přesto se však u nich krátce zastavme.

Karboxymethylovaná celulóza (cellulose CM) je semisyntetický vodorozpustný derivát celulózy (komerčně dostupný ve formě sodné soli), který obsahuje CH_2COOH skupiny vázané přes etherové vazby na glukosové jednotky. Komerční celulóza CM obsahuje různý stupeň substituce, pro IMAC byla použita celulóza CM se stupněm substituce 0,7 [57]; pevný IMA nosič byl připraven zesíťováním vodného roztoku sodné soli celulózy CM epichlorhydrinem, jehož epoxidové skupiny dále sloužily pro navázání IDA. Výsledný chelatující sorbent byl opět získán ve formě částic a byl použit pro studium afinity k papainu i pro jeho izolaci z papayového latexu. Pro všechny studované kovové ionty (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) imobilizované na chelatující celulóze CM byly získány téměř shodné výsledky týkající se množství navázaného a eluovaného proteinu i jeho biologické aktivity, které se navíc shodovaly s daty získanými na srovnávacích komerčních agarózových sorbentech (Sephacrose Fast Flow a STREAMLINE Chelating, což je Cu^{2+} -IDA makroporézní zesíťovaná 6% agaróza ve formě částic 100-300 μm v průměru obsahující krystalické jádro (fa. GE Healthcare Life Sciences, Indiana, USA)). Avšak karboxymethylcelulóza je elektrolyt, a proto lze u nosičů z ní vyrobených předpokládat silné nežádoucí nescifické (především elektrostatické) sorpce.

V souvislosti s celulózovými nosiči lze zmínit též Chelat-Granocel- Cu^{2+} , celulózový IMA sorbent s velikostí částic 100-200 μm v průměru, který byl připraven patentovanou technologií [58]. V jiné práci [59] ho též autoři použili pro čištění hormonu somatotropinu ze surového extraktu, který byl získán v 80% čistotě jednorázovým experimentem. Úspěšnost izolace však závisela na koncentraci imobilizovaného komplexu Cu^{2+} -IDA, což je podrobněji diskutováno v kapitole 2.4.4.

Chitin je lineární nerozvětvený polysacharidový polymer strukturně podobný celulóze složený z opakujících se jednotek *N*-acetyl-D-glukosaminu. Je přítomen v planktonu, členovcích a především pak ve schránkách mořských bezobratlých (krabů, raků, sépií), z nichž se také získává. Deacetylací chitinu v horkém roztoku NaOH se získává aminopolysacharid chitosan s monometní jednotkou D-glukosaminem. Chitin i chitosan bývají obvykle velmi dlouhé polysacharidy skládající se z více než 5 000 monomerních jednotek ($> 10^3$ Daltonů). Jejich použití v IMAC je však spíše vyjimečné, zřejmě kvůli své elektrostatické povaze způsobující silné nescifické sorpce. Samotné chitosanové kulovité

částičky mají též špatné mechanické vlastnosti, při sušení se deformují, jsou stlačitelné a v kyselém prostředí se rozpouští, gelovatí ve vodném roztoku až při pH > 12 (v přítomnosti primárních aminů již při pH > 9). Proto se chitosan používá většinou ve spojení s jinými materiály. Jeho výhodou je kromě hydrofility též dostatečná přítomnost aktivních aminoskupin v aminoglukosanovém řetězci, které mohou přímo sloužit k navázání kovových iontů. Autoři Xi a Wu [60] připravili IMA sorbent, v němž pevné jádro tvořily neporézní silikagelové kulovité částičky (75-100 μm v průměru) obalené vrstvou chitosanu tvořícího makroporézní povrch. Porozita byla dosažena použitím porogenu polyethylenglykolu (PEG) pomocí „molecular imprinting“, kdy byl PEG nanesen spolu s chitosanem na povrch silikagelu a poté odstraněn s cílem vytvořit makropóry na povrchu částic. Chitosanová vrstva byla poté zesíťována epichlorhydrinem s tím, že porozita určená PEG nebyla síťovadlem porušena. Změnou koncentrace chitosanu a typem použitého PEG bylo možné měnit porézní strukturu pevného nosiče. Rovněž množství imobilizovaných měďnatých iontů bylo dáno koncentrací použitého chitosanu. S využitím modelového proteinu (hovězího sérového albuminu BSA, který má velkou afinitu k Cu^{2+} iontům) byl sledován vliv porézní struktury na množství navázaného modelového proteinu. Nejlepších kapacit navázaného BSA bylo dosaženo pro sorbent připravený s použitím 2% roztoku chitosanu a PEG 20000. V jiné práci [61] byl použit chitin obsahující imobilizované ionty Fe^{3+} znovu v kombinaci se silikagelem jako nosič v kolonové LEC a nízkovrstevné chromatografii pro dělení modelových fenolických sloučenin katecholu a pyrogalolu. Bylo též zkoumáno potenciální využití tohoto nosiče v IMAC. Použit byl chitin obsahující 15 % deacetylovaných aminoskupin, které jsou zodpovědné za navázání iontů Fe^{3+} . Mössbauerova spektroskopie však prokázala, že komplexovaný není ion železitý, nýbrž železnatý, komplexovaný se dvěma prostorově blízkými aminoskupinami polymerního řetězce; autoři předpokládají, že chitin má pravděpodobně schopnost ion železa redukovat. Díky tomu je pak možné imobilizovaný ion železa využít k specifickému navázání fenolických sloučenin a v IMAC fenolických sloučenin jako jsou flavonoidy a biflavonoidy.

2.4.2. Syntetické částicové nosiče

Z předchozí kapitoly zabývající se přírodními polymerními IMA nosiči vyplývá, že jsou jimi většinou kulovité částice s relativně širokou polydisperzitou. Průměr částic se pohybuje

v rozmezí cca 40-300 μm . Kulovitost, respektive sférický tvar částic, je důležitý především pro zajištění dobrých hydrodynamických vlastností rovnoměrnou distribucí mobilní fáze v chromatografické koloně, aby byl její průchod plynulý. Výhodou částicových sorbentů je též možnost provedení experimentu ve větším měřítku („scale up“).

Též v případě syntetických IMA sorbentů jsou zdaleka nejčastěji používanými nosiči sférické částice s průměrem v řádu desítek až stovek mikrometrů. Metodou, která se pro jejich přípravu používá, je suspenzní radikálová polymerizace. V této metodě je monomer nebo směs monomerů s rozpuštěným iniciátorem rovnoměrně dispergována ve vhodném rozpouštědle, většinou vodě. Výsledný polymer ve tvaru perličky pak vzniká jako aglomerát mikrosfér (50-100 nm), přičemž každá mikrosféra se skládá z menších jader (10-20 nm), které jsou spojovány dohromady. Aby však bylo zabráněno koagulaci viskózní hmoty v průběhu polymerizace, je nutné přidat ochranný koloid. Již při malé koncentraci ochranného koloidu (stabilizátoru suspenze) (<0,1%) se na fázovém rozhraní vytvoří tenký film, což má za následek, že se vysoce viskózní kuličky nespojují, nýbrž se od sebe odrážejí jako pružné koule. Po ukončení polymerizace jsou získány tvrdé, sklovité perličky ve formě polydisperzní sypké hmoty. Pečlivým určením režimu míchání (počet otáček, tvar míchadla, tvar kotle) lze v určitém rozmezí ovlivnit velikost perliček a jejich polydisperzitu. Při pomalém míchání jsou získány větší, při vysokootáčkovém menší perličky.

Pro účely IMA metody se často připravují zesíťované porézní částice. Jako síťovadlo působí jeden z monomerů a pro generaci pórů se používá rozpouštědlo (porogen) nerozpustné v disperzní fázi. Objem a velikost pórů se pak zvyšuje s objemem porogenu. Mikrosféry tvořící agregáty jsou pak separovány póry. Malé póry (<4 nm) jsou přítomny uvnitř mikrosfér, mezi jádry; vznikají pouze při vysokém obsahu síťovadla. Střední póry (4-50 nm) jsou uvnitř agregátů, mezi mikrosférami. Velké póry vznikají mezi agregáty mikrosfér a jejich velikost se pohybuje mezi 50 nm až několika μm v průměru, v závislosti na množství porogenu. Střední póry přítomné v inter-mikrosférovém prostoru jsou pak zodpovědné za vysoké hodnoty specifického povrchu až do 100 m^2/g , naopak větší póry lokalizované uvnitř mezi aglomeráty k hodnotě specifického povrchu přispívají v menší míře, zato však způsobují velké objemy pórů až do 3 ml/g i více.

První stádium suspenzní polymerizace (vznik „gel microspheres“) je závislé především na koncentraci síťovadla, v menší míře na porogenu. Nastává, když Flory-Hugginsův interakční parametr přesáhne hodnotu 0,5, tj. když nastane fázová separace. Se zvýšením množství

sít'ovadla se zvyšuje též velikost specifického povrchu a objemu pórů. Je však nutné zvyšovat též množství porogenu, protože jinak zvýšení objemu pórů nenastane ani když se zvyšuje množství sít'ovadla.

Technikou suspenzní radikálové polymerizace lze tedy změnou koncentrace iniciátoru, stabilizátoru suspenze nebo porogenu a dále pak změnou experimentálních podmínek (především intenzity míchání) měnit strukturu výchozích částic.

2.4.2.1. Nosiče na bázi 2-hydroxyethyl-methakrylátu (HEMA)

Jestliže ze všech přírodních nosičů používaných v IMA metodě hrají nejdůležitější úlohu agarózové gely a ze všech chelatujících skupin kyselina iminodioctová, pak v případě syntetických nosičů plní tuto úlohu 2-hydroxyethyl-methakrylát (HEMA). Tento hydrofilní monomer našel uplatnění především pro přípravu kontaktních čoček, nicméně jeho využití je mnohem širší. Jedná se o komerčně dostupný, monovinylický monomer, který lze snadno polymerizovat. Přítomná koncová hydroxylová skupina je zodpovědná za hydrofilitu, která je pro IMA nosič nezbytná, a zároveň slouží jako reaktivní skupina pro navázání chelatující funkce.

IMA nosiče připravené z HEMA bývají zesít'ované sít'ovadlem pro tento monomer typickým, tj. ethylen-dimethakrylátem (EDMA), případně tvoří terpolymery ještě s dalším monomerem. HEMA je ve všech těchto nosičích základním stavebním materiálem, který určuje vlastnosti nosiče a potažmo tedy celého výsledného IMA sorbentu.

Prvními autory, kteří použili 2-hydroxyethyl-methakrylátové polymery pro přípravu IMA sorbentů byly Alvarez, Bertorello a Strumia [62], kteří připravili polybutadien-co-2-hydroxyethyl-methakrylátový (PB-HEMA) nosič tentokrát ještě ne ve formě kulovitých částíček, ale pouze ve formě prášku, který byl získán radikálovou kopolymerizací butadienu s 2-hydroxyethylmethakrylátem v poměru 1:2 v benzenu s použitím benzoylperoxidu jako iniciátoru. Získaný polymer pak aktivovali epichlorhydrinem (ECH) nebo 1,4-butandiol diglycidyletherem (BDGE) s cílem zavést reaktivní epoxyskupiny do polymerní matrice a následně je převést reakcí s kyselinou iminodioctovou do chelatující formy. Po komplexaci iontů Zn^{2+} nebo Cu^{2+} byla pak na připravených sorbentech testována šaržovitými („batch“) experimenty retence lidského IgG. Zatímco na zinečnatých sorbentech se imunoglobulin nezachycoval, na měďnatých komplexech byla při jejich optimální koncentraci (pro tento

system je to 16,9 mg Cu²⁺/g sorbentu) pozorována silná retence imunoglobulinu, která však závisela nejen na koncentraci imobilizovaného měďnatého komplexu, ale též na délce řetězce („spacer“) spojujícího pevný nosič s kovovým komplexem, který je zde určený epoxy-aktivním činidlem. BDGE přispívající alifatickým řetězcem s 12 atomy zajišťuje zřejmě lepší prostorovou dostupnost po objemnou molekulu IgG v porovnání s kratším řetězcem vznikajícím při aktivaci epichlorhydrinem. Důležité však je uvědomit si, že pro jiné proteiny a jiné nosiče toto platit nemusí a může být naopak pozorováno s prodlužujícím se řetězcem zhoršení retenčních vlastností. Nicméně, autoři výše zmiňované práce, kteří se problematice přípravy IMA nosičů z 2-hydroxyethyl-methakrylátu doposud věnují, používají dodnes jako aktivátor nosiče pro zavedení epoxyskupin výhradně 1,4-butandiol diglycidylether. V dalších studiích se však již zaměřili na přípravu částicových kopolymerních nosičů poly(HEMA-co-EDMA) připravovaných metodou suspenzní radikálové polymerizace. Na získaných částicích s imobilizovanými komplexy Fe³⁺-IDA testovali šaržovitými experimenty afinitu různých fosfoproteinů (ovalbuminu [63]) a fosforylovaných aminokyselin (L-fosfothreoninu [64], L-fosfoserinu a L-fosfotyrosinu [64,65]) majících velkou afinitu k iontům Fe³⁺ s cílem vyhodnotit vliv vnitřní struktury poly(HEMA-co-EDMA) nosičů na množství specificky sorbované látky (podrobná diskuse viz kap. 2.4.4.). Kapacity dosahovaly až 6,98 mg/g specificky sorbovaného (a poté zpětně desorbovaného) modelového fosfoproteinu v závislosti na vnitřní struktuře nosiče. Sorbenty s poly(HEMA-co-EDMA) nosiči v malé míře vykazovaly nespécifické elektrostatické sorpce, pokud byla iontová síla použitých pufrů <0.4 mol/l.

Jiní autoři [50,53] připravili poly(HEMA-co-EDMA) částicové nosiče velikosti 150-200 μm v průměru a stupněm botnavosti ve vodě 55 %, které byly po imobilizaci kovového komplexu Cu²⁺ [50] nebo Zn²⁺ [53] použity pro modelové studie sorpce hovězího sérového albuminu (BSA). Adsorpční kapacity dosahovaly hodnot až 128 mg BSA/g sorbentu, přičemž nežádoucí nespécifické sorpce proteinu s nosičem (hydrofobní nebo elektrostatické interakce) byly zanedbatelné. Díky těmto poznatkům byl pak sorbent obsahující zinečnaté komplexy dále použit též pro izolaci BSA z lidské plazmy, kde bylo dosaženo ještě vyšších kapacit požadovaného navázaného proteinu (asi 1,7 krát) v porovnání s předchozími modelovými studiemi. Autoři tento jev vysvětlují lepší konformační strukturou BSA pro navázání na kovový komplex ve svém přirozeném prostředí krevní plasmy.

Pro přípravu všech dosud diskutovaných kopolymerních poly(HEMA-*co*-EDMA) nosičů byl používaným iniciátorem benzoyl peroxid a stabilizátorem suspenze polyvinylpyrrolidon nebo poly(vinyl alkohol) (M_r 100 000). Používanými porogeny pro vznik porézních struktur byla organická rozpouštědla toluen [50,53] nebo cyklohexan [63-65]. Rychlost otáček (450-600 rpm) zajišťovala vznik částic s průměrem okolo 100-200 μm v hlavní frakci.

O IMA sorbentech založených na terpolymerním 2-hydroxyethyl-methakrylátovém nosiči padla zmínka již v souvislosti s chelatujícími skupinami. Vedle síťovadla zde figuruje ještě třetí monomer obsahující zbytek proteinogenní aminokyseliny L-histidinu [43,44] nebo L-cysteinu [46] sloužící pro imobilizaci kovového iontu. Množství „třetího“ monomeru (MAH nebo MAC) v polymerizační směsi bylo přibližně 4 krát nižší než základního stavebního monomeru HEMA. Hodnota specifického povrchu činila pro oba terpolymery přibližně 18 m^2/g , podobné byly též hodnoty botnavostí ve vodě (65 % pro MAH a 72 % pro MAC) a distribuce velikosti částic (150-200 μm pro MAH a 140-180 μm pro MAC). Jednalo se o částice s porézní vnitřní strukturou. Přesná velikost pórů či distribuce velikostí však nebyla uvedena. Na měďnatých komplexech těchto částic byla testována specifická adsorpce HSA (lidský sérový albumin). Ukázalo se, že sorbent obsahující MAC vykazuje velké nespecifické sorpce; přítomnost imobilizovaného Cu^{2+} pak jeho navázané množství pouze zdvojnásobila. Sorbent obsahující MAH vykazoval nespecifickou adsorpci pro HSA asi 2,5 krát nižší v porovnání s MAC za stejných podmínek. Proto byl tento sorbent použit pro izolaci HSA z lidského séra [43], kdy se jeho specificky navázané množství oproti modelovému pokusu ve vodném roztoku opět asi 1,7 krát zvýšilo (na 56,3 mg/g) nepočítaje minoritní příměsi fibrinogenu a γ -globulinu. Pozorované chování lze pravděpodobně opět připsat jeho vhodné konformaci v přirozeném prostředí podobně jak tomu bylo v případě albuminu BSA [53]. Sorbent HEMA-*co*-EDMA-*co*-MAH- Cu^{2+} s frakcí poněkud menších částic (75-125 μm) byl též testován pro sorpci jiného modelového proteinu, cytochromu c (THCC) [44]. Pro tento protein byly nespecifické sorpce poly(MAH-*co*-HEMA-*co*-EDMA) nosiče (0,2 mg/g) ve srovnání s HSA (8,8 mg/g) téměř zanedbatelné. V pracích zabývajících se sorbenty s matricí MAH-*co*-HEMA-*co*-EDMA byla též testována jejich regenerační schopnost. Bylo ukázáno, že pro tyto terpolymerní sorbenty po každém následném experimentu množství specificky navázaných proteinů mírně klesá (cca o 3-5 %).

Jako IMA nosičů bylo též využito kopolymerů HEMA s methyl-methakrylátem (poly(MMA-*co*-HEMA)) [48,49]. Jednalo se o neporézní částice o průměru cca 4 μm , které

byly připraveny opět suspenzní radikálovou polymerizací ve vodně-ethanolickém disperzním prostředí. Částice byly připraveny bez přítomnosti porogenu v polymerizační směsi s použitím iniciátoru polymerizace 2,2-azobis(isobutyronitril)u a stabilizátoru suspenze polyvinylpyrrolidonu. Zde je zvolena strategie zajištění přístupu kovových komplexů pro ligandovou výměnu nikoli prostřednictvím difuze do pórů, nýbrž zvětšením specifického povrchu použitím částic menšího průměru. Nevýhodou malých částic je však nepohodlná manipulace při jejich čištění a dále pak nutnost použití vyššího tlaku za dynamických podmínek v koloně. Autoři zde však prováděli pouze modelové studie šaržovitými experimenty na zinečnatých [49] nebo železitých [48] komplexech s albuminem BSA jako modelovým proteinem. Na železitých komplexech byly dále prováděny studie s dalšími modelovými látkami, enzymy glukosou-oxidázou a katalázou, které jsou známé svou afinitou k železitým iontům díky přítomnosti fosfátové skupiny v FAD kofaktoru (glukosa-oxidáza) a protoporfyrinové skupině (kataláza). Při hodnotě pH odpovídající izoelektrickému bodu daného proteinu byly prováděny specifické sorpce na železitých iontech. Bylo ukázáno, že množství specificky navázaného proteinu stoupá v pořadí stoupající molekulové hmotnosti proteinu a že všechny sorpce lze popsat Langmuirovým modelem. Ten předpokládá, že molekuly jsou adsorbované ve fixním množství dobře definovaných míst, z nichž každé může obsahovat pouze jednu molekulu. Tato adsorpční místa jsou také energeticky ekvivalentní a vzdálenosti mezi jednotlivými místy musí zaručovat nulovou interakci mezi adsorbovanými molekulami na jednotlivých místech. To je důkazem, že specifická vazebná místa pro protein jsou na poly(MMA-*co*-HEMA) neporézních částicových nosičích vhodně distribuována, neinteragují spolu a jsou energeticky ekvivalentní. Díky tomu lze z jednoduché analýzy Langmuirovy adsorpce vypočítat hodnoty maximální vazebné kapacity proteinu na sorbent (q_m) a disociační konstanty komplexu protein-kov (K_d).

2-hydroxyethyl-methakrylátu (HEMA) bylo použito též pro přípravu magnetických částic (mPHEMA-*co*-EDMA) [66], které byly po modifikaci kyselinou iminodioxovou a komplexací ionty Cu^{2+} použity v modelové studii sorpce lidského sérového albuminu (HSA) IMA metodou. Jejich použití nemění chemickou podstatu IMA metody, mění pouze fyzikální parametry separačního systému a usnadňuje mechanickou manipulaci s částicemi. Magnetické částice jsou připravovány stejným způsobem jako jiné IMA nosiče suspenzní radikálovou polymerizací s tím rozdílem, že do polymerizační směsi jsou přidány částičky magnetitu (Fe_3O_4 , průměr $< 5 \mu\text{m}$), které jsou před přidáním do vodného disperzního media smíseny

s monomerní směsí a rozpuštěným iniciátorem, většinou 2,2-azobis(isobutyronitril)em. Přítomnost magnetitových částic v polymerní struktuře je pak sledována elektronovou spinovou resonancí (ESR). Magnetické (mPHEMA-*co*-EDMA) částice velikosti 80-250 μm s blíže nespécifikovanou vnitřní porézní strukturou a s hrubým povrchem, který byl způsobený oděrkami krystalů magnetitu, vykazovaly po imobilizaci Cu^{2+} -IDA komplexů chování k modelovému proteinu HSA (provedené šaržovitými experimenty), které bylo možné popsat Langmuirovým modelem adsorpční izothermy [66].

2.4.2.2. Jiné syntetické nosiče

Zcela vyjíměčně se v literatuře vyskytují též jiné kopolymery použité jako IMA nosiče. Jedná se o zesíťované hydrogely připravené suspenzní polymerizací s použitím opět ethylen-dimethakrylátu (EDMA) jako síťovadla. Příkladem je např. kopolymer poly(ethylen-dimethakrylát-*n*-vinyl imidazol) poly(EDMA-VIM) [67], jehož částice velikosti 150-200 μm v průměru, stupněm botnavosti ve vodě 78 % a relativně velkým specifickým povrchem (59,8 m^2/g), který je způsoben přítomností malých pórů (jejich přesná velikost není uvedena), byly přímo použity pro komplexaci měďnatých iontů prostřednictvím imidazolových dusíků přítomných v polymerním nosiči. Na takto připraveném sorbentu byla pak opět šaržovitými experimenty studována sorpce modelového enzymu α -amylázy (*Aspergillus Oryzae* α -amylase), který má velkou afinitu k měďnatým iontům. Bylo ukázáno, že samotný polymerní nosič způsoboval nezanedbatelné nespécifické sorpce modelového enzymu (2,4 mg/g), specifická vazba na měďnaté ionty však byla přibližně 10 krát vyšší. Výhodou enzymu navázaného na (poly(EDMA-VIM)- Cu^{2+}) sorbent bylo zachování jeho aktivity, která klesala mnohem pomaleji než v případě volného enzymu v roztoku, přičemž reversibilně navázaný enzym bylo pak možné kvantitativně desorbovat zpět do volné formy aniž by byla elučním procesem narušena jeho biologická aktivita. Desorbovaný enzymový roztok byl však kontaminován kovem, neboť použité eluční činidlo EDTA vytěsnilo celý komplex enzym-kov. Bylo též ukázáno, že opakované používání poly(EDMA-VIM)- Cu^{2+} sorbentu způsobovalo snižování kapacity sorbentu pro navázání enzymu.

Jako IMA nosičů bylo použito též kopolymerů glycidyl-methakrylátu a ethylen-dimethakrylátu {poly(GMA-*co*-EDMA)}. Ve tvaru kulovitých částic o velikosti 5-9 μm v průměru byl tento kopolymer po imobilizaci galitých komplexů chinolin-8-olu využit pro

studium afinity fosfoproteinů (vepřového pepsinu A) s použitím HPLC [34]. Částicové kopolymery poly(GMA-*co*-EDMA) však nacházejí široké využití spíše v jiných typech chromatografických metod [68-71]. Jejich příprava a vlastnosti byly podrobně studovány v ÚMCH AV ČR v sedmdesátých až devadesátých letech 20. století [68-70, 72-75].

Pro IMAC byl kopolymer poly(GMA-*co*-EDMA) použit též ve formě monolitu, jehož výhodou je jednak odstranění procesu plnění kolon (monolit je připravován přímo v nádobě, která později slouží jako chromatografická kolona) a jednak zrychlení přenosu hmoty v koloně odstraněním mezičásticových prostor, neboť veškerá mobilní fáze musí nutně protékat póry monolitu. Při přípravě monolitu radikálovou polymerizací je nicméně nutné vzít v úvahu fakt, že je potřeba zajistit odvod velkého množství tepla, které je v průběhu polymerizace uvolňováno [76,77]. Proto jsou monolity často připravovány v kapilárních kolonách. Příkladem využití v IMAC je poly(GMA-*co*-EDMA) monolit použitý v práci Zhanga a Zhanga [78] připravený v kapilární elektroforetické koloně s použitím směsi cyklohexanolu a dodekanolu (11:1) jako porogenu, kde monolit tvořil 1/50 délky kolony. Výsledkem byl porézní materiál s velkým objemem pórů (1,65 cm³/g) i specifickým povrchem (64 m²/g) a relativně úzkou distribucí velikosti pórů (88 % pórů v rozmezí velikosti 100-2400 nm). Po navázání chelatuující skupiny kyseliny iminodioctové a komplexací s měďnatým iontem byl připravený Cu²⁺-IMAC sorbent použit v kapilární elektroforéze pro dělení čtyř modelových polypeptidů. Uvedený systém a jemu podobné, kde je využito afinity peptidů k přechodným kovovým iontům v kombinaci s elektroosmózou a elektroforézou, se využívají pro rozdělení směsi peptidů vyskytujících se v přírodě v nepatrných koncentracích (např. v leukemických buňkách).

Jiným příkladem je poly(GMA-*co*-EDMA) monolit s imobilizovanými Me²⁺-IDA komplexy využitý pro dělení směsi modelových proteinů BSA, trypsinu, cytochromu c a lysozymu (HEWL) [79] na komplexech měďnatých, nikelnatých a zinečnatých s použitím HPLC s UV detekcí. Monolit byl připraven podobným způsobem jako v předchozím případě v koloně s rozměry 50 x 4 mm. Obsahoval opět póry s relativně úzkou distribucí (769 nm v průměru) a velkým specifickým povrchem (89,1 m²/g) i celkovým objemem pórů (3,3 ml/g odpovídající porozitě 75%).

2.4.2.3. Komerční syntetické nosiče

Fraktogel EMD Chelát (fa. Merck, Německo) je nejznámější komerční IMA sorbent založený na zesíťovaném, blíže nespecifikovaném polymethakrylátovém nosiči, jež je připravený patentovanou technologií pro přímé použití v IMAC. Fraktogelové kulovité částičky (20-40 μm v průměru) mají vysokou mechanickou a chemickou stabilitu a funkční skupiny navázané na lineární polymerní řetězce. Výrobci dále uvádějí, že v případě Fraktogel-EMD-Chelátu jsou funkční skupiny navázány flexibilně přes polymerní řetězce, čímž má imobilizovaný kov možnost zaujmout lepší pozici vzhledem k vazebným místům na povrchu proteinu. Výsledkem by potom mělo být pevnější navázání proteinů na tento typ nosiče ve srovnání s přírodními gely. Nevýhodou proti přírodním agarózovým nosičům jsou naopak vyšší nespecifické sorpce především elektrostatické povahy, které však lze potlačit zvýšením iontové síly použitých pufrů v rozmezí koncentrací od 0,2 do 1 mol/l. Fraktogel-EMD-Chelátu se používá ve spojení s „hraničními“ (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) i „tvrdými“ (Fe^{3+}) ionty.

2.4.3. Membránové nosiče

Pro separaci a čištění proteinů je využíváno též afinitních membrán. Ze všech ligandů (mohou jimi být koenzymy, lektiny, aminokyseliny, protilátky, Protein A a G, barviva, imobilizované kovové ionty atd.), které jsou kovalentně imobilizovány na membránových nosičích a které specificky a reversibilně váží cílový protein, bude další text opět zaměřen pouze na ty afinitní membrány, jejichž specifickým ligandem pro vazbu proteinu je imobilizovaný kovový komplex a jež jsou v literatuře označovány zkratkou IMAMs („immobilized metal affinity membranes“).

IMAMs se začali používat v devadesátých letech 20. století [80,81] a doposud nalézají své místo v pseudoafinitních chromatografických procesech. Jejich hlavními přednostmi oproti částicemi plněným kolonám je překonání pomalé vnitročástečkové difuze a vysokého odporu při přenosu hmoty vedoucímu k poklesu tlaku ve sloupci. Z uvedených důvodů musí být ve všech chromatografických systémech s plněnými kolonami používána malá průtoková rychlost. V případě membrán jsou umožněny operace s velkou rychlostí toku vedoucí k urychlení separačního procesu. Díky spojitému proudění rozpuštěné látky přes membránu a díky malé tloušťce membrány se pak vyskytuje jen nepatrná tlaková ztráta. Zkrácením

procesního času zůstane zachována většina biologické aktivity cílové látky, což je důležité zejména při izolaci enzymů, jejichž aktivita obvykle dosahuje po vyčištění na IMAM vysoké enzymové aktivity. Podobně jako pro částicové sorbenty, i zde je možné zvětšování rozsahu membránové operace zvýšením počtu použitých membrán („scale-up“). Membrány mohou být navíc aplikovány též v prvních stupních čistícího procesu, pokud jsou uspořádány v tzv. „cross-flow“ modulu (vysvětleno níže) [26,82].

Nicméně praktické využití IMAMs zdaleka nedosáhlo takového rozsahu jako sorbentů založených na částicových nosičích. Mezi nejdůležitější problémy spojené s použitím IMAMs patří totiž velké volné objemy existující ve většině membránových modulů. Následkem je pak mimomembránové míšení [83] vedoucí k rozšiřování pásů a ke zhoršení separační efektivity. Dalšími problémy, které se však vyskytují i u částicových sorbentů, jsou nespecifické vazby [84], únik kovu nebo kompetitivní adsorpce nečistot [85]. Problémem je zde též dostupnost membránových maticí.

2.4.3.1. Formy a moduly membránových nosičů

Jako membránové nosiče pro IMAC se často používají běžně dostupné materiály tvaru rovinného disku, často s homogenní vnitroporézní strukturou. Tyto materiály bývají v literatuře označovány jako „ploché listy“ (flat-sheets). Další, též často používanou formou IMA membrán, jsou „dutá vlákna“ (hollow fibres), která jsou oblíbená především díky svému velkému specifickému povrchu, který by měl zajišťovat vysoké adsorpční kapacity pro specificky adsorbovanou látku [86]. Několik dutých vláken spojením do svazku vytvoří membránu.

Obě formy membrán lze pak uspořádat v různých modulech. Nejjednodušší a také nejčastěji používané upevnění plochého listu membrány je v diskovém držáku. Toto uspořádání je často používáno pro šaržovité experimenty modelové sorpce proteinu. Pokud je membrán použito pro přímé čištění surových roztoků nebo suspenzí, je použit některý z tzv. „cross-flow“ modulů uspořádání membrán, kdy dojde nejprve k odfiltrování velkých částic nebo usazenin a poté dochází k adsorpci rozpuštěných cílových látek. Proud tekutiny je na membránu distribuován v podélném (v modulu „deska a rám“) nebo v radiálním směru (v modulu „spirálově navinutého plochého listu“ a v případě dutých vláken). Bližší diskuse však přesahuje rámec této disertační práce.

2.4.3.2. Matrice membránových IMA nosičů

Materiály tvořící matici plochého listu membrány nebo dutého vlákna jsou přírodního i syntetického charakteru. Jako plochý list mohou sloužit např. mikrofiltrační, ultrafiltrační a dialyzační membrány či dokonce obyčejný filtrační papír [87]. Vyjímkou nejsou ani bi-komponentní matrice, kde jedna složka může být přírodní a druhá syntetická či obě syntetické (např. celulósové membrány roubované glycidyl-metakrylátem [80], epoxydizované polysulfonové membrány [88], nylonem potažené hydroxyethylcelulósové membrány [89] či HEMA-chitosanové membrány [54]). Jedna ze složek těchto bi-komponentních maticí zajišťuje mechanické vlastnosti, zatímco druhá slouží jako nosič funkčních skupin sloužících pro navázání chelatujiící skupiny a případně též pro zvýšení hydrofility.

Čistě syntetickými membránovými IMA nosiči jsou opět například poly(HEMA)-ploché listy [51,52] použité pro modelové sorpce lysozymu (HEWL), albuminu BSA nebo enzymů glukózy-oxidázy a katalázy na komplexech Cu^{2+} nebo Fe^{3+} . Použité membránové nosiče měly relativně vysoký stupeň poréznosti (58 %) a porézní, blíže nespecifikovanou strukturu. K přípravě membrán bylo použito UV iniciace (iniciátorem byl AIBN) a vodného roztoku 0,1 M SnCl_4 pro dosažení porézní struktury. Polymerizací vzniklý monolit plochého listu membrány s tloušťkou cca 0,06 cm byl mechanicky rozřezán na kruhové disky požadovaného průměru a poté chemicky modifikován jedнокrokovou reakcí hydroxymethylenových skupin polymerního nosiče s chelatujiícím ligandem. Testované membrány vykazovaly pro všechny studované látky zanedbatelné nespecifické sorpce (množství navázaného látky na nemodifikovanou membránu bylo vždy $\leq 0,9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), zatímco specifické adsorpce prováděné šaržovitými experimenty na kovových iontech dosahovaly vysokých hodnot ($q_m = 165,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pro lysozym); adsorpční chování bylo ve všech případech možné popsat Langmuirovým modelem adsorpční izotermy předpokládající navzájem neinteragující a energeticky ekvivalentní vazebná místa. Hodnoty q_m vypočítané z Langmuirových izoterem navíc zůstaly nezměněny po pětinasobném opakování experimentu, což naznačuje vysokou regenerační schopnost poly(HEMA) membrán. Autoři dále uvádějí, že při zpětné desorpci reversibilně navázaného lysozymu (zbylé látky nejsou diskutovány) roztokem KSCN bylo 95% lysozymu získáno zpět aniž by byl zaznamenán únik kovu. Svůj výsledek sorpční kapacity pro lysozym na poly(HEMA)- Cu^{2+} membránách srovnávají autoři s již publikovanými kapacitami pro lysozym dosaženými na jiných systémech a zjišťují, že

dosažená sorpční kapacita byla překonána pouze na poly(glycidyl methakrylát-co-ethylenedimethakrylát) bioafinitní membráně za použití vysokotlaké membránové chromatografie (HPMC) [90].

Pro doplnění ještě uvedme, že byly syntetizovány též ploché listy chelatuující poly(HEMA) membrány „vylepšené“ přidavkem malého množství (1/50 w %) chitosanu ve smyslu zvýšení botnavosti membrány a hydrofility povrchu [54] (při přípravě této bi-komponentní membrány byl k polymerizační směsi přidán roztok chitosanu ve zředěné kyselině octové).

Jiná syntetická IMA membrána byla připravena z komerčně dostupných poly(ethylen-vinyl alkohol)ových (PEVA) dutých vláken (Kuraray) (vnitřní průměr 200 μm , tloušťka stěn 20 μm a propustnost pro molekuly do velikosti 600 kD). Po epoxy-aktivaci reakcí s epichlorhydrinem byla membrána modifikována chelatuující kyselinou iminodioctovou (IDA) (cca 38 μmol IDA/ml membrány) následovaná komplexací s ionty Zn^{2+} . Úspěšně byl izolován imunoglobulin IgG_1 z buněčného supernatantu [91].

Zcela polymerní membránový nosič byl použit též v práci Iwata a spol. [81]. Jednalo se o membránu připravenou z polyethylenových dutých vláken radiačně indukovaným naroubováním glycidyl-methakrylátu (GMA). Základní polyethylenová vlákna měla průměr pórů 0,18 μm , porozitu 75% a specifický povrch 23 m^2/g , jehož hodnota se však roubováním snížila na 11 m^2/g . Na IDA- Cu^{2+} modifikované membráně byly poté provedeny modelové sorpce dipeptidu L-histidin-L-leucinu a sérového albuminu BSA šaržovitými experimenty, které ukázaly Langmuirův typ adsorpčního chování studovaných látek. Z dynamických experimentů adsorpcí téhož dipeptidu na téže membráně vyplynulo zjištění, že hodnota maximální vazebné kapacity pro zmiňovaný dipeptid (50 g /kg suché Cu^{2+} -IDA membrány) je nezávislá na používaném vstupním tlaku a navíc se shoduje s hodnotou maximální vazebné kapacity získanou šaržovitými experimenty (což dokazuje fakt, že v membránovém uspořádání je významně redukován odpor přenosu hmoty).

Vyjímkou nejsou ani kombinace IMA membrán s jinými čistícími technikami. Jako příklad lze uvést izolaci urokinázy (enzym štěpící plasminogen na plasmin) z lidské moči [80]. Byla použita kombinace iontovýměnné a IMA membrány, přičemž jako membránová matrice sloužila v obou případech kompozitní celulósová vlákna roubovaná glycidyl-methakrylátem - modifikovaná jednak sulfopropylovými skupinami (iontovýměnná membrána) a jednak kyselinou iminodioctovou komplexovanou s kationty Zn^{2+} (IMAM). Po

přečištění na iontovýmenné membráně se zvýšila specifická aktivita urokinázy více než šestkrát a po následném přečištění na Zn^{2+} -IDA membráně dále více než 18krát.

Kopolymer poly(GMA-co-EDMA), podobně jako pro částicové nosiče, i ve formě membrán nachází své uplatnění zatím spíše v jiných typech chromatografie, zejména imunoafinitní [92,93], kdy je membrána modifikována imobilizací protilátky.

2.4.3.3. Modifikace membránových IMA nosičů

Pro připojení kyseliny iminodioctové, která je i v případě IMA membrán nejčastěji používanou chelatující skupinou, je opět využíváno zejména oxiranových skupin. Na rozdíl od částicových nosičů jsou však v případě membrán způsoby zavedení oxiranových skupin mnohem rozmanitější; častým způsobem je podobně jako pro částice reakce funkčních skupin nosiče s epichlorhydrinem [84,87,91,94] nebo bisoxirany [89]. Novinkou je zde reakce s již polymerovaným glycidyl-metakrylátem [80], čímž se navíc zvýší hustota reaktivních skupin na membráně. Těchto způsobů je využíváno, pokud matrice membránového nosiče obsahuje funkční skupiny hydroxylové (např. v celulósově [80], poly(ethylen vinyl)alkoholové [91] nebo poly(2-hydroxyethyl methyl)metakrylátové matrici [51,52]), případně aminoskupiny (v polyamidech [89] nebo chitosan obsahujících matricích [54]). Problém s epoxy-aktivací nastává v případě, kdy v původní matrici membránového nosiče nejsou přítomny žádné reaktivní skupiny. To je případ např. polyethylenu. Zde se používá radiačně indukované roubování (grafting) glycidyl-metakrylátu (GMA) [81,95]. Polyethylenová dutá vlákna jsou ozářena proudem elektronů z urychlovače (dávkou 200kGy) za normální teploty v dusíkové atmosféře a za zvýšené teploty jsou ponořena do metanolického roztoku GMA. Množství GMA naroubovaného na duté vlákno je pak vyjádřeno stupněm roubování d_g :

$$d_g = 100[(M_1 - M_0)/M_0] \quad (1)$$

kde M_0 a M_1 jsou hmotnosti původních a GMA-roubovaných vláken. Stupeň roubování d_g lze tedy nastavit množstvím přítomného GMA (např. dvojnásobná hmotnost GMA oproti dutým vláknům znamená stupeň roubování 200%) a tím libovolně regulovat množství navázaných epoxyskupin. Rouby jsou přítomny především na povrchu pórů porézních polyethylenových dutých vláken. Metody radiačně indukovaného roubování glycidylmetakrylátu bylo použito

těž pro modifikaci dutých vláken založených na alifatických polymerech obsahujících polární skupiny [82,96]. Pokud jsou dutými vlákny aromatické polysulfony, lze epoxyskupiny zavádět elektrofilní substituací do ortho- polohy aromatického jádra (např. reakce polysulfonových aromatických jader aktivovaných butyllithiem s glycidyl-4-oxoethyletherem [88]).

Pro zajímavost doplňme, že byla použita též chelatující skleněná dutá vlákna [97], do nichž byly epoxidové skupiny zavedeny silanizací 3-(glycidoxypropyl)trimethoxysilanem.

Imobilizované epoxidové skupiny zmiňovaných membránových nosičů jsou v následném reakčním kroku převedeny na chelatující skupiny, většinou kyseliny iminodioctové (IDA).

2.4.3.4. Komerční membránové IMA sorbenty

Výběr komerčních IMAMs je velice úzký. Komerčně dostupnými IMAMs jsou např. Sartobind IDA membrane (stabilizovaná vystužená celulóza modifikovaná kyselinou iminodioctovou) (Sartorius), Ni-NTA HisSorb Strips (transparentní proužky z blíže neuvedeného materiálu pokryté komplexy Ni^{2+} - kys. nitrilotriactová) (Qiagen), SwellGell Nickel (nebo Cobalt) Chelated Discs (Pierce)-disky s imobilizovaným niklem nebo kobaltem z blíže neuvedeného materiálu atd. Kromě produktu Sartobind IDA je však většina komerčních produktů uzpůsobena pouze pro cíle izolace malého množství proteinu (většinou detekci transgenních His_6 proteinů) nebo analýzu stopového množství kovu, ne však pro izolaci většího množství proteinu. Hydrofilní kopolymerní membrány Sartobind IDA firmy Sartorius (tloušťka 170-190 μm , průměrná velikost pórů 0,45 μm) umístěné v diskovém držáku byly testovány v práci Reifa a spol. [98], kdy byly po imobilizaci iontů Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} nebo Co^{2+} úspěšně separovány proteiny β -laktoglobulin, lysozym (HEWL), myoglobin a cytochrom c (THCC), což je skupina proteinů s různým počtem povrchových histidinů, ale srovnatelnou hydrofobicitou a podobným isoelektrickým bodem.

2.4.3.5. Příklady srovnání separačních vlastností sorbentů s imobilizovanými kovovými ionty v membránovém a kolonovém uspořádání

Tato kapitola je věnována několika příkladům úspěšného použití IMA membrán, jejichž separační efektivita byla srovnávána s oblíbenými komerčními agarózovými IMA sorbenty ve formě kulovitých částic.

Jako první lze uvést příklad rozdělení pektinových enzymů na komplexech Cu^{2+} -IDA imobilizovaných jednak na membráně z polysulfonových dutých vláken [82,96] a na koloně plněné částicovou Chelatující Sepharosou CL-6B [99]. Na obou nosičích bylo dosaženo oddělení pektin lyázy (PL) od pektin esterázy (PE), přičemž první z enzymů se na IMA sorbent nezachycuje, zatímco druhý je kvantitativně specificky adsorbován. Zachycený enzym PE byl poté z obou nosičů kvantitativně eluován a enzymová aktivita po eluci dosahovala vždy 99% své původní enzymové aktivity. Některé rozdíly v chování obou sorbentů jsou shrnuty v Tab. 2.

Tabulka 2: Porovnání membrány a gelového částicového sorbentu pro izolaci pektinesterázy (PE) na Cu^{2+} -IDA komplexech. Data převzata z [82 a 99].

Pozn.: Pro oba systémy, membránový i částicový, bylo použito stejných experimentálních podmínek (kromě iontové síly pufrů-viz text).

Parametr	Membrána	Chel. Sefaróza CL 6B
Maximální kapacita (U/ml) ^{a,b}	8000	3000
Dynamická kapacita (U/ml) ^b	7500	2600
Vnější rychlost (min^{-1})	5	0,2
Celkový čas (min)	10	50
Produktivita (U/ml per min)	750	81

^a stanoveno z rovnovážných adsorpčních izotherem

^b Jednotka U/ml je enzymová aktivita vztažená na ml pevného nosiče. Jedna jednotka (U) je množství enzymu PE potřebného k uvolnění 1 μeq . karboxylových skupin za minutu.

Tabulka 2 zdůrazňuje výhody membránového nosiče. Kratší doba frakcionace zvýšením rychlosti průtoku při použití membrán (doba je snížena na 10 min) a vyšší produktivita za minutu separace dovoluje za kratší čas použitím malé membrány dosažení stejného

separačního efektu jako při použití větší, gelovými částicemi plněné kolony. Membránový sorbent však vykazoval vyšší nespecifické sorpce. Ty byly částečně odstraněny zvýšením iontové síly používaných roztoků (pro frakcionaci pektinových enzymů byla zvýšena z 0,1 M pro částicový gel na 0,25 M NaCl pro membránu). Další nevýhodou membrány byla nesnadná eluce reverzibilně navázaného enzymu PE. Zatímco z kolonového systému byl zachycený enzym (PE) kvantitativně eluován snížením pH promývacího pufru z pH 7 na pH 3, z membrány byl navázaný enzym tímto pufrům odstraněn jen částečně, zcela teprve promytím roztokem EDTA, který vytěsňuje celý komplex Cu^{2+} -enzym a enzymový eluát je tudíž kontaminován kovem. Autoři předpokládají existenci dvou skupin ligandů IDA- Cu^{2+} imobilizovaných na membráně s různou dostupností pro enzym, kdy z lépe dostupné skupiny je navázaný enzym odstraněn elucí klesajícím pH gradientem, zatímco pro hůře dostupnou skupinu ligandů je navázaný enzym potřeba odstranit elučním činidlem obsahujícím EDTA. Existenci dvou skupin ligandů potvrzuje též adsorpce enzymů provedená šaržovitými experimenty, která neodpovídá Lagmuirově izotermě. Dvě skupiny ligandů vznikly zřejmě při epoxy-aktivaci dutých vláken radiačně indukovaným roubováním glycidylmethakrylátu [82]. Navázání chelatujících skupin kyseliny iminodioctové na rozvětvené rouby s různou prostorovou dostupností zřejmě způsobí rozdělení ligandů na dvě skupiny.

Dalším příkladem srovnání IMA provedení na membráně a v koloně je izolace Penicilin G acylázy (PGA), což je enzym hydrolyzující penicilin G na 6-aminopenicilanovou kyselinu produkující semisyntetické peniciliny, ze surového extraktu-supernatantu z lýze buněk ve fermentačním růstu kultivace bakterie *Escherichia coli*. Jako plnivo do kolony byl použit komerční agarósový gel Chelating Sepharose Fast Flow s imobilizovanými ionty Cu^{2+} [100], membránovým nosičem bylo 10 plochých listů 47-mm v průměru afinitní membrány (160 μm silné) připravené z regenerované celulósy a následně modifikované IDA- Cu^{2+} [94]. Oba sorbenty poskytly srovnatelné výsledky čistoty a specifické aktivity enzymu PGA. Bylo získáno 90,25 % původního množství enzymu po přečištění na membráně a 97 % po přečištění na Cu^{2+} -Chelatující Sepharose Fast Flow. Čistící faktory specifické aktivity byly 9,11 pro membránu a 12,36 pro Sefarózu (čistící faktor specifické aktivity je číslo udávající kolikrát se zvětšila specifická aktivita cílového enzymu v přečištěném roztoku oproti výchozímu roztoku).

V nedávno publikované práci [91] byla připravena membrána z komerčních poly(ethylen-vinyl alkohol) (PEVA) dutých vláken jejich následnou modifikací kyselinou iminodioctovou

a komplexací s ionty Zn^{2+} a využita pro izolaci monoklonálního imunoglobulinu IgG_1 z buněčného supernatantu. Stejný čistící postup byl proveden též na částicovém agarózovém gelu (Chelating Sepharose Fast Flow) v koloně. Ačkoli celková kapacita Zn^{2+} -IDA-PEVA membrány pro adsorpci proteinů je nižší (přibližně poloviční) v porovnání s Zn^{2+} -IDA-agarózovým gelem, pro membránu byla pozorována vyšší selektivita k imunoglobulinu IgG_1 . V posledních elučních frakcích při izolaci IgG_1 na membráně bylo totiž získáno 90.3 % přítomného imunoglobulinu IgG_1 ve vysoké čistotě. Navíc bylo ukázáno, že množství zachycených proteinů z buněčného supernatantu na Zn^{2+} -IDA-PEVA membráně na rozdíl od kolonového systému nezávisí na rychlosti průtoku mobilní fáze.

Iwata a spol. v již zmiňované práci [81] porovnávali sorpční chování modelového proteinu, albuminu BSA ($M_w = 66700$, 17 histidinových zbytků), na Cu^{2+} -IDA membráně z polyethylenových dutých vláken roubovaných glycidyl-metakrylátem a na komerčním částicovém Cu^{2+} -IDA agarózovém gelu za stejných experimentálních podmínek. Množství modelového proteinu adsorbovaná na obou sorbentech byla srovnatelná a sorpční chování bylo možné popsat Langmuirovou izotermou, z níž byly též vyhodnoceny hodnoty saturačních vazebných kapacit q_m (autoři udávají přesnou hodnotu q_m pouze pro membránu 0,26 mmol/l, přičemž množství imobilizovaných iontů Cu^{2+} na membráně je 0,18 mol/l). Pro oba studované sorbenty byl zaznamenán jen nepatrný vliv nespecifických sorpcí.

Podobně jako u většiny částicových nosičů, též pro IMAMs byla pozorována vysoká regenerační schopnost a použitelnost pro několikeré opakování experimentu. Například v práci Wei a spol. [87] byla testována regenerační schopnost celulosové membrány. Její adsorpční kapacita zůstala stejná po 10-ti násobném opakování experimentu na téže membráně, po použití 30 x však klesla o 10 %. Po použití polysulfonových dutých vláken 60 x zůstala adsorpční kapacita pro lysozym nezměněna [96]. Na syntetických 2-hydroxyethyl-metakrylátových či glycidyl-metakrylátem roubovaných polyethylenových maticích [81,51,52] zůstaly maximální sorpční kapacity nezměněny po pětinasobném opakování experimentu.

2.4.4. Vliv vnitřní struktury nosiče a koncentrace imobilizovaného kovového iontu chelatujícího sorbentu na efektivitu ligandové výměny

Parametry sorbentu, kterými jsou především struktura a hydrofilita nosiče, koncentrace imobilizovaných kovových iontů a délka řetězce oddělujícího imobilizovaný kov od povrchu nosiče, ovlivňují přístupnost pro cílovou látku v ligandově výměnné chromatografii na imobilizovaných kovových iontech. Všechny tyto charakteristiky působí jako komplexní celek, nelze na základě znalostí jen jedné z nich usuzovat na efektivitu procesu ligandové výměny. V IMA metodě se však používají výhradně hydrofilní matrice a délka řetězce spojujícího kovový komplex s povrchem nosiče činí zpravidla 3-12 atomů [22,101]. Důležitými parametry určujícími efektivitu ligandové výměny pak zůstávají především struktura pevného nosiče a koncentrace imobilizovaných kovových iontů.

Je zřejmé, že přístupnost proteinů k imobilizovaným kovovým iontům a tím i výsledná retence a vazebná kapacita sorbentu jsou v prvním přiblížení závislé na celkovém povrchu nosiče. V případě proteinů se dále často uplatňuje tzv. multiligandová interakce, kdy jedna objemná proteinová molekula obsazuje několik imobilizovaných kov. iontů najednou. Přístupnost imobilizovaných kovových iontů pro interakci s bílkovinou a pevnost vzniklé reversibilní vazby pak závisí na prostorovém rozložení kov.iontů uvnitř hmoty nosiče, zejména uvnitř pórů, potažmo tedy na průměru pórů a koncentraci imobilizovaných kovových komplexů. Bohužel však autorům mnoha prací týkajících se IMA metody lze vyčíst nepřesnou nebo nedostačující charakterizaci porézní struktury nosičů používaných sorbentů. Vnitřní struktura bývá často ukázána pouze na mikrofotografii nebo bývá uvedena jen hodnota specifického povrchu nosiče. Systematická studie v této oblasti nebyla provedena. Zde předkládám pouze parciální závěry, které lze provést z dostupné literatury.

Již v jedné ze starších studií průkopníků metody IMA [102], v níž byly srovnávány dva Cu^{2+} -IMA nosiče s rozdílnou porozitou {TSK gel chelate-5PW (Bromma, Švédsko) a Sepharosa Fast Flow (Pharmacia)}, bylo ukázáno, že TSK gel s menším průměrem částic (10 μm) obsahující menší póry (podrobnější data nejsou uvedena) vykazuje sice menší kapacitu (1,9-2,4 krát) pro studované modelové proteiny (BSA, lysozym a ovalbumin) v porovnání s více porézním agarózovým nosičem (průměr částic 45-165 μm), avšak poskytuje téměř

ideální podmínky pro studium adsorpční rovnováhy v kolonovém chromatografickém uspořádání (ostré frontální eluční píky).

V práci Berkela a spol. [103], kteří testovali sorbenty získané kovalentní imobilizací chelatující skupiny 3,5-dimethylpyrazolu na kopolymerní částice glycidylmetakrylátu s 1,1,1-tris(hydroxymethyl)propan trimethakrylátem připravených podle [104], bylo ukázáno, že při tvorbě měďnatých komplexů ve vodném prostředí množství chelatujících skupin využitých pro koordinaci iontů Cu^{2+} je dvakrát vyšší v případě polymerního nosiče s nízkými hodnotami objemu pórů a specifického povrchu ($0,16 \text{ cm}^3/\text{g}$ a $0,2 \text{ m}^2/\text{g}$) než pro podstatně poréznější nosič s vyšším objemem pórů a o tři řády vyšším specifickým povrchem ($1,12 \text{ cm}^3/\text{g}$ a $128 \text{ m}^2/\text{g}$, hlavní póry 37 nm v průměru), byť koncentrace imobilizovaných chelatujících skupin byla na obou nosičích srovnatelná ($\sim 1,3 \text{ mmol/g}$). Autoři vysvětlují tento jev předpokladem, že ve druhém polymeru s došlo k zablokování vstupu do pórů formujícími se měďnatými komplexy, takže zbylé chelatující skupiny ke komplexaci Cu^{2+} nebyly využity a tudíž by nemohly sloužit ani v ligandově výměnné chromatografii na kovových iontech. Tato studie tedy naopak demonstruje případ, kdy větší objem pórů pevného nosiče snižuje využitelnost imobilizovaných chelatujících skupin.

Při přípravě IMA sorbentů s IDA skupinami však porézní struktura bývá výhodou již při samotné modifikaci polymerního nosiče. V homogenně zesíťovaném polymeru (neporézním) jsou totiž reaktivní skupiny přístupné teprve až po dostatečném nabotnutí polymerní sítě, tj. když jsou polymerní řetězce dostatečně vzájemně separovány působením osmotického tlaku. Tato skutečnost však omezuje výběr rozpouštědel aplikovatelných pro reakci s funkčními skupinami nosiče, neboť pokud polymerní síť nebotná v jistém rozpouštědle, reakce proběhne pouze na povrchu. Další nevýhodou homogenně zesíťovaných polymerů je rovněž pomalá difuze činidla do zbotnalé polymerní sítě a naopak reakčních produktů ven ze sítě. Tyto nevýhody mohou být odstraněny v heterogenně zesíťovaných polymerech, které jsou charakterizovány vysokou porozitou i v suchém stavu. Reakce jejich funkčních skupin probíhá kromě vnějšího povrchu také na rozsáhlém vnitřním povrchu, obvykle nezávisle na termodynamické kvalitě rozpouštědla.

Alvarez a Gomez [63-65] studovali schopnosti komplexů Fe^{3+} -IDA imobilizovaných v síťovaných poly(HEMA) částicových sorbentech sorbovat fosfoprotein ovalbumin a některé fosforylované aminokyseliny v závislosti na porézní struktuře pevného nosiče. Použitím cyklohexanu jako porogenu, jehož koncentrace zůstávala konstantní pro přípravu všech

studovaných nosičů, byly získávány vysoce porézní materiály s vnitřní strukturou připomínající květák, které měly celkový objem pórů v rozmezí 3,1-3,7 ml/g sorbentu. Rozdílů v distribuci pórů jednotlivých nosičů, které byly sledovány rtuťovou porozimetrií, bylo dosaženo změnou teploty polymerizace nebo koncentrace iniciátoru. Všechny studované syntetické nosiče obsahovaly mezopóry a makropóry s průměry 4-50 nm a 50 - 400 nm, lišily se však jejich poměrným zastoupením. Bylo ukázáno, že nosič obsahující vysoký obsah makropórů (95% celkového objemu pórů), nízký obsah mezopórů (5%) a tím též (téměř o třetinu) nižší celkový specifický povrch (91,6 m²/g) než nosiče ostatních sorbentů (~ 130 m²/g) vykazoval výrazně vyšší (až dvakrát) sorpční kapacity pro studované aminokyseliny (až 12,1 mg/g - pro fosfothreonin). Při sorpci ovalbuminu byly získány podobné výsledky, kdy nejvyššího množství tohoto fosfoproteinu (7 mg/g) bylo navázáno na sorbentu s nejnižší použitou koncentrací Fe³⁺-IDA skupin (17,4 μmol/g), avšak vysokým obsahem makropórů nosiče (78 % celkového objemu pórů) a nízkou hodnotou jeho specifického povrchu (1,6 m²/g). Z uvedených poznatků vyplývá, že nejen celkový objem pórů a hodnota specifického povrchu nosiče, ale zejména poměr obsahu makro-, meso- a mikropórů hraje podstatnou roli v množství látky zadržené na imobilizovaném kovovém iontu. V uvedených studiích zvyšuje celkovou kapacitu IMA sorbentu především proporcionalní obsah makropórů s průměry v rozmezí 50 - 400 nm.

V již zmiňovaných pracích [43,44] bylo zase dosahováno vysokých sorpčních kapacit pro modelové proteiny- lidský sérový albumin a cytochrom c (až 193 mg/g pro HSA a 31,7 mg/g pro THCC) na měďnatých komplexech částicových sorbentů založených opět na sesítovaných poly(HEMA) nosičích (průměr částic 75-250 μm), přičemž nespecifické adsorpce mezi proteinem a nosičem byly oproti specifickým sorpcím na měďnatém iontu nízké. Autoři připisují dosažené vysoké hodnoty specifických sorpčních kapacit velkému vnitřnímu povrchu částicových nosičů, avšak bližší údaje o vnitřních strukturách nosičů nejsou uvedeny; pouze hodnoty specifických povrchů nosičů se pohybují v rozmezí 17,6-18,3 m²/g. Podobné studie byly provedeny též na podobných sorbentech i s dalšími proteiny (katalázou) atd. [45,46], avšak ani zde nebyla struktura nosiče detailněji studována, přestože na základě holých dat specifického povrchu nosiče nelze předpovědět příliš o efektivitě IMA procesu.

Poněkud lepší přehled lze získat z dostupné literatury pro vliv koncentrace kovového iontu v IMAC. V mnoha případech bylo zjištěno, že se sorpční kapacita pro cílový protein

kontinuálně zvyšuje se zvyšující se koncentrací imobilizovaných kovových komplexů [44,49,50,62]. Pokud se jedná o separaci směsi proteinů, může se se zvyšující se koncentrací imobilizovaného kovového iontu zlepšit i separační efektivita. To ukázal např. Kagedal [105] na separaci směsi pěti proteinů (cytochromu c, lysozymu, β -laktoglobulinu, lektinu z čočky a α -laktalbuminu) na IDA-Cu²⁺ komplexech imobilizovaných na agarózovém nosiči. Při postupném zvyšování koncentrace imobilizovaných IDA-Cu²⁺ komplexů z 18 na 32 $\mu\text{mol/ml}$ byl pozorován zmenšující se překryv elučních píků jako důsledek lepšího oddělení jednotlivých proteinů. Při dalším zvýšení koncentrace IDA-Cu²⁺ komplexů z 26 na 43 $\mu\text{mol/ml}$ se však separační efektivita opět zhoršila. Stinnou stránkou vysoké koncentrace imobilizovaného kovového iontu je především zvýšení afinity vázajícího se proteinu k imobilizovanému kovu. Pro jeho zpětnou eluci ze sorbentu je pak potřeba použít silnější eluční činidla, jak ukázali Liesiene a spol. [59], kteří používali různé koncentrace IDA-Cu²⁺ komplexů imobilizovaných na celulósovém nosiči Granocel-500 s velikostí částic 100-200 μm pro navázání hormonu somatotropinu (STH). Z frontálních elučních křivek zjistili, že afinita STH se pro imobilizované měďnaté ionty zvyšuje s jejich zvyšující se koncentrací. Navázaný enzym byl získán zpět nejjednodušším způsobem (klesajícím pH gradientem) pouze pokud koncentrace IDA-Cu²⁺ komplexů nepřevyšovala hodnotu 20 $\mu\text{mol/ml}$. S rostoucí koncentrací IDA-Cu²⁺ komplexů z 3,5 na 20 $\mu\text{mol/ml}$ se navíc snižovalo pH elučního píku (až k pH 4,5) a docházelo k jeho rozšiřování. Při koncentraci IDA-Cu²⁺ komplexů 26-34 $\mu\text{mol/ml}$ již bylo nutné pro vytěsnění reversibilně navázaného STH použít kompetitivní eluční činidlo (imidazol).

Dalšími komplikacemi, které mohou nastat při vysoké koncentraci imobilizovaných kovových iontů, je zesílení vlivu některých nežádoucích jevů jako jsou nespecifické sorpce za současného snížení specifické adsorpce cílového proteinu [106] či snížení difusivity molekuly proteinu v roztoku k imobilizovanému reakčnímu partnerovi [107].

Velmi přínosná je práce Wirtha a spol. [108], v níž byl studován vliv koncentrace imobilizovaných komplexů IDA-Cu²⁺ na vazebnou kapacitu modelových proteinů- lysozymu nebo konkavalinu A- v kombinaci se strukturálními parametry nosiče současně. Bylo ukázáno, že zvyšování koncentrace imobilizovaných IDA-Cu²⁺ komplexů na neporézních silikagelových sorbentech způsobuje kontinuální zvyšování množství navázaného proteinu, ať již se jedná o lysozym či konkavalin A. Na porézním silikagelovém sorbentu (průměr pórů 1000 Å) byl pozorován zajímavý jev, kdy se s postupným zvyšováním IDA-Cu²⁺ koncentrace

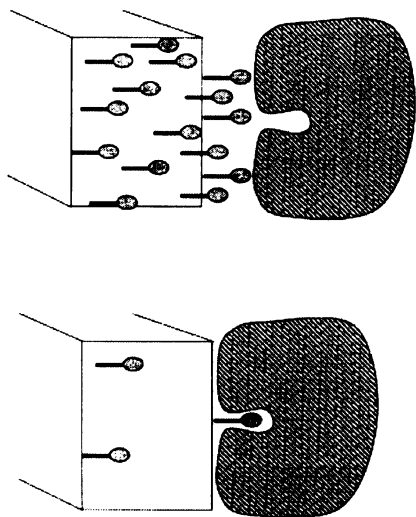
(z 0,9-104 $\mu\text{mol/g}$) množství navázaného proteinu nejprve zvyšovalo, ale po dosažení maxima opět klesalo.

Vliv koncentrace imobilizovaného kovu na efektivitu v IMAC byl studován také pro IMA membrány (IMAMs). Na Cu^{2+} -IDA komplexech imobilizovaných na mikrofiltrační membráně (polysulfonovaná dutá vlákna) byla studována kapacita pro lysozym (14 kD). Bylo zjištěno, že pro tři studované koncentrace Cu^{2+} -IDA komplexů (69, 134, 203 $\mu\text{mol/ml}$) byla kapacita pro lysozym vždy blízká hodnotě 4 $\mu\text{mol/ml}$ [82]. Na komplexech Cu^{2+} -IDA imobilizovaných na membráně z hydrofilizovaných polyethylenových dutých vláken byla provedena sorpce L-histidinu, lysozymu (14 kD) a hemoglobinu (68 kD) [95]. Bylo zjištěno, že zvyšující se koncentrace imobilizovaných komplexů Cu^{2+} -IDA zvyšuje množství navázané aminokyseliny L-histidinu, avšak nezlepšuje či dokonce snižuje (při koncentracích nad 1300 $\mu\text{mol/ml}$) množství navázaného proteinu (lysozymu nebo hemoglobinu). Při koordinaci L-histidinu byla při všech studovaných koncentracích komplexů Cu^{2+} -IDA vždy přibližně polovina z nich využita pro navázání této aminokyseliny. Celková množství navázaného lysozymu však byla vždy o dva a hemoglobinu o tři řády nižší v porovnání s L-histidinem, což je důsledek stoupající velikosti molekuly. Tyto výsledky jsou v jistém souladu se závěry zmiňované práce Wirtha a spol. [108], kteří při vysoké koncentraci imobilizovaných komplexů Cu^{2+} -IDA na porézním silikagelovém nosiči pozorovali pokles v množství navázaného proteinu (lysozymu nebo konkavalinu A).

Důvodem, proč se při určité koncentraci imobilizovaného kovového iontu množství navázaného proteinu již nezvyšuje, je zřejmě multibodové připojení proteinu. Objemná molekula bílkoviny obsahuje několik aminokyselinových zbytků schopných interagovat s imobilizovaným kovovým iontem na několika místech, zatímco nízkomolekulární molekula (např. imidazol) se připojuje jen na jedno vazebné místo imobilizovaného kovového iontu [109]. Optimální koncentraci imobilizovaného kovového iontu však lze jen těžko stanovit, vždy záleží kromě jiného též na struktuře pevného nosiče, na nějž je kov imobilizován, a na interagujícím partnerovi, především jeho velikosti a množství interaktivních skupin.

V některých uváděných případech [95,108] byl pozorován dokonce pokles množství navázaného proteinu při vysokých koncentracích imobilizovaného kovového iontu v porovnání s nižšími koncentracemi na témže sorbentu. Možným vysvětlením tohoto jevu je zablokování přístupného místa v bílkovinné molekule. Vysoká hustota ligandu imobilizovaného na pevném nosiči způsobí vazebné místo proteinu nedostupným. Toto bylo

již pozorováno v bioafinitní chromatografii enzymů [106] (Obr.4). Je velmi pravděpodobné, že podobný princip platí i pro pseudoafinitní chromatografii na imobilizovaných kovových iontech (IMAC).



Obr.4. Možné vysvětlení efektu ligandové hustoty na vazbu proteinové molekuly [106].

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Hlavním cílem této disertační práce je příprava a studium polymerních nosičů ve formě kulovitých částic, případně membrán, jejich modifikace chelatujícími skupinami s následnou komplexací iontem přechodného kovu a jejich potenciální využití v IMA („immobilized metal affinity“) metodě pro studium afinity modelového imunoglobulinu IgG₁. Získané výsledky přispívají k návrhu a optimalizaci struktur sorbentů používaných pro studium nebo izolaci imunoglobulinů na imobilizovaných kovových iontech.

Dosažení cílů disertace předpokládá vyřešení následujících okruhů otázek:

1. Příprava a studium vhodných typů syntetických makromolekul tvaru kulovitých částic umožňujících kovalentní připojení chelatující skupiny
 - a) Příprava hydrofilních kopolymerů poly(DEGMA-*co*-EDMA) vhodných k modifikaci chelatující skupinou s využitím koncových hydroxylových skupin přítomných v polymerní matici (DEGMA = 2-(2-hydroxyethoxy)ethyl-methakrylát; EDMA = ethylen-dimethakrylát)
 - b) Příprava terpolymerů poly(GMA-*co*-DEGMA-*co*-EDMA) vhodných k modifikaci chelatující skupinou s využitím oxiranových skupin přítomných v polymerní matici (GMA = 2,3-epoxypropyl-methakrylát).
 - c) Využití terpolymerů poly(GMA-*co*-HPMA-*co*-EDMA) k modifikaci chelatující skupinou s využitím oxiranových skupin přítomných v polymerní matici (HPMA = 2-hydroxypropyl-methakrylát)
2. Výběr a příprava chelatujících skupin, syntetické postupy jejich připojení k polymernímu nosiči
 - a) Syntéza nízkomolekulárních látek obsahujících chelatující skupinu ve své molekulární struktuře
 - b) Kovalentní připojení připravených nebo komerčně dostupných nízkomolekulárních látek na polymerní nosič s využitím hydroxylových nebo epoxidových skupin přítomných v polymerní matici; využití běžných syntetických postupů zahrnujících nukleofilní substituce epoxidových skupin, alkylace aminoskupin, oxidace a tosylace hydroxyskupin, acylace, halogenace, přípravu Schiffovy báze a další

3. Komplexace částicových chelatujících sorbentů s iontem přechodného kovu; využití v IMA metodě pro studium afinity modelového proteinu-monoklonálního imunoglobulinu IgG₁
- a) Příprava sorbentů založených na homogenním poly(DEGMA-co-EDMA) nosiči s imobilizovanými ionty nikelnatými, měďnatými a železitými. Porovnání vlivu nikelnatých komplexů s různými chelatujícími skupinami imobilizovanými na poly(DEGMA-co-EDMA) nosiči pro specifickou sorpci monoklonálního IgG₁ specifického proti křenové peroxidáze
 - b) Příprava sorbentů založených na homogenních a heterogenních poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) nosičích s imobilizovanými ionty nikelnatými a měďnatými. Porovnání vlivu porézní struktury poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) nosičů pro sorpci modelových látek - imidazolu a monoklonálního IgG₁ specifického proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu - na imobilizovaných komplexech Ni(II)-kyselina iminodioxetová s různou koncentrací imobilizovaného komplexu; porovnání získaných výsledků s oběma modelovými látkami
 - c) Příprava sorbentů založených na heterogenních poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA) nosičích s imobilizovanými ionty nikelnatými a studium jejich využití pro izolaci monoklonálního IgG₁ specifického proti křenové peroxidáze v závislosti na porézní struktuře nosiče
4. Příprava a studium polymerních membrán, syntetické postupy jejich modifikace chelatující skupinou s cílem zachování mechanických vlastností membrán; posouzení jejich využitelnosti v praxi
- a) Příprava homogenních kopolymerních poly(DEGMA-co-EDMA) membrán s různými stupněmi sesítění; stanovení stupně botnavosti a porovnání mechanických vlastností
 - b) Kovalentní připojení chelatující skupiny-kyseliny iminodioxetové-na membrány s vhodnými mechanickými vlastnostmi dvoukrokovou modifikací za různých experimentálních podmínek; posouzení vlivu reakčních podmínek na výsledný chelatující materiál a posouzení jeho využití v praxi

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chemikálie

Všechna činidla a výchozí látky použité v této práci byly od firem Sigma, Aldrich nebo Fluka. Ve všech experimentech byla používána vysoce kvalitní voda (Millipore Q).

Pyridin byl sušen pevným KOH a destilován (t.v. 115 °C), dimethylformamid (DMF) byl sušen bezvodým P₂O₅ a destilován (t.v. 76°C při 5,2 kPa), dimethylsulfoxid (DMSO) byl sušen bezvodým MgSO₄ a CaH₂ a destilován (t.v. 75,6°C při 1,6 kPa). Ostatní rozpouštědla byla sušena bezvodým síranem sodným a destilována, není-li uvedeno jinak.

2,2-azobis(isobutyronitril) (AIBN), b. t. 103 °C (rozklad) byl překrystalován z methanolu. Teplota při rozpouštění nepřekročila 40°C, aby se zaručilo, že nedojde k částečnému rozpadu iniciátoru. Překrystalovaný AIBN byl uchováván při teplotě +1°C.

Biologické materiály byly získány od firmy Seva-Imuno (Praha, Česká republika).

4.2. Příprava polymerních nosičů

4.2.1. Příprava monomerů

2-(2-hydroxyethoxy)ethylester 2-methyl-2-propenové kyseliny (DEGMA)

Reakční směs získaná smísením 195 g (1,84 mol) diethylenglykolu, 113 g (1,13 mol) methylmethakrylátu ($\rho = 0,943$), 2,1 g (0,011 mol) teramethylamoniumhydroxid pentahydrátu a 0,5 g 4-*terc*-oktylpyrokatecholu byla zahřívána za míchání pod zpětným chladičem s chlorkalciovým uzávěrem po dobu 1 hod. při teplotě 60-70°C. Následně byla ponechána stát při laboratorní teplotě 16 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 350 ml vody a pro lepší oddělení vodné a organické vrstvy byly přidány 2 ml roztoku HCl (0,01M). Vodná vrstva byla oddělena od vrstvy organické a vytřepána 4 x 150 ml hexanu. Poté byla vodná vrstva nasycena NaCl (250 g), přebytečný NaCl byl odfiltrován a nasycený roztok byl vytřepán 3 x chloroformem (200 ml). Chloroformové vrstvy byly spojeny a po přidavku 4-*terc*-oktylpyrokatecholu (inhibitor polymerizace) byly vysušeny bezvodým Na₂SO₄ při 5°C 16 hodin.

Po vysušení byl Na_2SO_4 odfiltrován a rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační odparce při 40°C . Odparek byl po přidavku 4-*terc*-oktylpyrokatecholu a 3 ml práškové mědi destilován přes límcovou baňku naplněnou měděnými spirálkami za sníženého tlaku (b.v. $75^\circ\text{C}/6,67\text{ Pa}$, $n_D = 1,453$). Monomer byl skladován při teplotě $+1^\circ\text{C}$ v přítomnosti inhibitoru (4-*terc*-oktylpyrokatechol) (0,01%). Bylo získáno 51,64 g produktu (25 % teoretického množství).

Před použitím v polymerizační směsi byl monomer znovu čerstvě predestilován.

Čistota připraveného monomeru byla kontrolována na plynovém chromatografu (nosný plyn: N_2 (průtok 20 ml/min), teplota nástřiku: 230°C , teplota detektoru: 220°C , počáteční teplota kolony: 170°C , nástřik: 0,3 μl , náplň kolony: 10 % OV 17 na Chromosorbu) a pohybovala se v rozmezí 96,0-99,4 %; hlavní příměsi tvořily blíže nespecifikovaná aduktivní sloučenina (0,5-3,5 %) a ethylen-dimethakrylát (0,07-0,48 %), používaný ve všech uvedených polymerizačních zásadách jako síťovadlo. Jeho přítomnost v připraveném monomeru byla zahrnuta ve výpočtu hmotnostních poměrů monomerních směsí.

2,3-epoxypropylester 2-methyl-2-propenové kyseliny (GMA) a 1,2-ethandiylester 2-methyl-2-propenové kyseliny (EDMA)

Monomery GMA ($d_{25} = 1,042\text{ g/ml}$, $n_{D20} = 1,449$, b.v. 189°C) a EDMA (síťovadlo) ($d_{25} = 1,051\text{ g/ml}$, $n_{D25} = 1,452$, $97 - 100^\circ\text{C}/0,6\text{ kPa}$) byly stabilizovány hydrochinonem, který byl před vlastní destilací odstraněn protřepáním s 10 % roztokem hydroxidu sodného (8-10x). Aby docházelo při protřepávání k rychlejšímu oddělení vodné a organické fáze, byla hustota surového monomeru upravena hexanem (1:1 obj.). Směs byla poté protřepána destilovanou vodou do neutrální reakce. Po oddělení fází byl monomer sušen 48 hod. nad bezvodým $\text{Mg}(\text{SO})_4$. Po odfiltrování $\text{Mg}(\text{SO})_4$ byl hexan oddestilován na vakuové rotační odparce. V posledním stupni čištění byly monomery destilovány. Při odpařování hexanu i destilaci byl přidán inhibitor (4-*terc*-oktylpyrokatechol). Množství inhibitoru se pohybovalo mezi 0,075 – 0,1 hm.% na destilační zásadu. V případě vzniku polymeru během čistící operace byl polymer vysrážen etherem a odfiltrován. Ether byl odpařen za vakua a zbylý monomer znovu predestilován.

Kromě 4-*terc*-oktylpyrokatecholu byl použit i Cu_2Cl_2 , jehož stabilizační účinek je však nižší.

4.2.2. Obecný předpis pro přípravu polymerních částic suspenzí radikálovou polymerizací

Před zahájením polymerizace byly disperzní a monomerní fáze připravovány odděleně. Jako disperzního prostředí bylo používáno vody s rozpuštěnou solí (NaCl nebo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) pro vysolení vodorozpuštěného monomeru, jako stabilizátoru suspenze koloidního $\text{Mg}(\text{OH})_2$ nebo $\text{Al}(\text{OH})_3$.

$\text{Mg}(\text{OH})_2$ byl precipitován „in situ“ přímo v polymerizační směsi rozpuštěním $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ při 40°C pod dusíkovou atmosférou a postupným přikapáváním ekvivalentního množství nasyceného roztoku NaOH injekční stříkačkou za stálého míchání (300 ot./min). Organická fáze (směs monomerů, iniciátoru a porogenu) byla vzhledem k náchylnosti monomerů k polymerizaci připravována těsně před začátkem polymerizace. Byly používány vždy čerstvě předestilované monomery. Množství iniciátoru (2,2-azobis(isobutyronitril), AIBN) bylo ve všech případech 0,5 hm.% na směs monomerů. Obě fáze byly smíchány v polymerizačním reaktoru vždy až po dokonalém rozpuštění iniciátoru v organické fázi. Pro všechny provedené experimenty byl dodržen běžně užívaný objemový poměr monomerní směsi ku disperznímu prostředí přibližně 1:3.

Skleněný reaktor (250 ml) opatřený kotvovým míchadlem typu GA 14 (firma Jacob Brinzer KG, Maschinenfabrik, Lipsko) byl ze silnostěnného skla (Rasotherm, 0 – 10 atm, 0 – 100°C). Víko polymerační nádoby bylo nerezové, opatřené teploměrem, přívodem inertního plynu, plnicím otvorem a nerezovým míchadlem. Na vlastní reaktor byl upevněn skleněný plášť, vyhřívaný vodou z termostatu. Teplota byla regulována s přesností $\pm 1^\circ\text{C}$. Nerezové míchadlo (tvaru kotvy) bylo poháněné elektromotorem (výkon 500 W), regulace otáček míchadla byla zaručena variátorem (0 – 2200 otáček/min).

Polymerizační směs v reaktoru byla pod dusíkovou atmosférou míchána (700 ot./min) po dobu asi 10 min. za laboratorní teploty do ustálení hydrodynamických poměrů. Poté byla teplota zvýšena na 60°C a po dvou hodinách na 75°C . Při této teplotě při stejné intenzitě míchání (700 ot./min) probíhala polymerizace dalších 10-16 hod. Potom bylo zahřívání přerušeno a polymerační směs byla míchána při snížených otáčkách (300 ot./min) do úplného vychladnutí.

4.2.2.1. Kopolymerace binárního systému, příprava částic poly(DEGMA-co-EDMA)

V případě přípravy kopolymerických částic poly(DEGMA-co-EDMA) bylo ve vodě (50 ml) rozpuštěno 15g NaCl a 3,49g MgCl₂.6H₂O a přikapáváno 1,6 g NaOH v 10 ml vody. Množství dalších použitých komponent činila 17,8 g (DEGMA), 1,8 g (EDMA) a 0,1 g (AIBN).

Výsledný kopolymer byl izolován přidáním etanolu (500 ml) a koncentrované HCl (10 ml) a opakovaně promyt vodným etanolem (50 %). Hmotnost přečištěných částic byla 14,1-15,2 g (72 -78 % hmotnosti monomerní směsi).

4.2.2.2. Ternární kopolymerace, příprava částic poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA)

Při přípravě částic poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) zůstávala množství použitých monomerů při všech násadách konstantní (30 g (GMA), 12,5 g (DEGMA), 7,5 g (EDMA)), v jejichž směsi byl rozpuštěn iniciátor 2,2-azobis(isobutyronitril) (0,25 g). Koncentrace soli i stabilizátoru však byly pro různé polymerní násady obměňovány (viz Výsledky a diskuse Tab.4-6, str. 91). Porogen 2-methylpropyl acetát byl použit v koncentracích 0 - 300 hm.% (vzhledem k hmotnosti monomerů).

Výsledné terpolymerní částice byly několikrát promyty roztokem disodné soli EDTA (6 g v 3 l 50 % etanolu), vodou a metanolem. Po přečištění a vysušení bylo získáno 38 – 42 g (79 – 85 % hmotnosti použitých monomerů).

4.2.2.3. Zpracování polymerní směsi

Po promytí byly polymerní částice sušeny nejprve 24 hod na vzduchu, poté stejnou dobu ve vakuové sušárně při 40 °C. Vysušené částice byly zbotnány v destilované vodě a několikrát dekantovány, aby se odstranil polymerní prach.

4.2.3. Příprava membrán poly(DEGMA-co-EDMA)

Směs DEGMA a odpovídajícího množství síťovadla EDMA (hm. % 5,5; 3; 2,5; 2; 1,5; 1 nebo 0,5) (celkově 10 g monomerní směsi) s rozpuštěným iniciátorem benzoin ethyl etherem (0,5 hm % na monomerní směs) byla pod inertní atmosférou (N₂) polymerována při laboratorní teplotě s využitím UV iniciace pod rtuťovou výbojkou zn. Tesla RVK 125 W vzdálené 15 cm po dobu 20 min.

Vzniklé polymerní membrány byly po vyjmutí z formy (pro přípravu dvou plochých listů) promyty vodným etanolem (1:1) a vodou.

4.2.4. Hodnocení a vlastnosti polymerních nosičů

4.2.4.1. Hodnocení vzhledu částic. Kontrola distribuce částic

Hodnocení vzhledu částic a distribuce jejich velikosti byla stanovována na optickém mikroskopu Nikon SMZ-2T. Pro hodnocení byl vybírán průměrný vzorek z celé várky, který byl nanesen na podložní sklíčko mikroskopu tak, aby bylo možno odlišit jednotlivé částičky od sebe.

Mikrofotografie jednotlivých částic a jejich řezy byly pořízeny na rastrovacím elektronovém mikroskopu Vega Tescan a snímány kamerou Nikon DXM 1200.

4.2.4.2. Hodnocení vnitřní struktury částic

Vnitřní struktura materiálů byla určována jak v suchém, tak ve zbotnalém stavu. V suchém stavu byla měřena porozita rtuťovou porozimetrií a metodou tepelné desorpce. Porozita ve zbotnalém stavu byla stanovena botnacími zkouškami.

Měření specifického povrchu polymerů (B.E.T. izotherma)

Stanovení specifického povrchu byla prováděna na sorptometru Quantasorb (Quantachrome,CA,USA) pracujícím na principu metody tepelné desorpce. Specifický povrch byl určován z množství adsorbátu (směs vodík – dusík, 9:1), potřebného k tvorbě

monomolekulární vrstvy na měřeném povrchu. Při dostatečně nízké teplotě (teplota kapalného dusíku) sorboval vzorek dusík. Zvýšením teploty se dusík k povrchu sorbentu desorboval, došlo tedy k přechodnému zvýšení obsahu dusíku v plynné směsi. Specifický povrch zkoumaného vzorku byl vypočítán z plochy desorpční křivky, která je přímo úměrná množství desorbovaného dusíku a toto množství je přímo úměrné velikosti měrného povrchu.

U každého vzorku byly změřeny dvě různé navážky a pro každou navážku bylo odměřeno 3 – 5 desorpčních křivek. Za výsledek byl pokládán aritmetický průměr ze všech měření.

Rtuťová porozimetrie

Objemy pórů porézních částic, distribuce velikosti pórů a hodnoty porozit byly zjišťovány měřením na rtuťovém porozimetru-225 (Carlo Erba Strumentazione, Miláno, Itálie). Tato metoda je založena na zaplňování pórů porézního materiálu rtuťí. Při vlastním měření se stanovuje objem vtlačené rtuti v závislosti na tlaku, který lze měnit od několika setin do několika tisíc atmosfér. Oproti adsorpčním metodám je porozimetrie univerzálnější, je však pracnější a interpretace výsledků složitější.

4.2.4.3. Kontrola porozity ve zbotnalém stavu, botnací zkoušky

Vzorky částicových gelů byly předem vysušeny ve vakuové sušárně při 40°C po dobu 24 hod., ploché listy membrán byly sušeny při 50°C 3 dny.

Přesně odvážené množství vzorku suchého gelu (m_d) bylo botnáno v odměrné uzavřené nádobce ve čtyřnásobném přebytku botnacího činidla. Makroporézní gely bylo třeba předem odplynit ve vakuu vodní vývěvy. Po 48 hodinách působení v příslušném rozpouštědle byl přebytek rozpouštědla zfiltrován a vzorky zbotnalých gelů byly několikrát zváženy v časových odstupech 30-60 s. Hmotnost vzorku ve zbotnalém stavu (m_{sw}) byla získána extrapolací časové závislosti hmotnosti zbotnalého vzorku na nulový čas.

Vzorky zbotnalých plochých listů membrán byly na povrchu osušeny a váženy v uzavřených skleněných nádobách.

Stupeň zbotnění d_{sw} (%) byl vypočten ze vztahu

$$d_{sw} = \left[\frac{(m_{sw} - m_d) \times \rho_p}{m_d \times \rho_0} \right] \times 100, \quad (2)$$

kde ρ_0 a ρ_p jsou hustoty botnacího činidla a polymerního gelu.

Poměrné změny objemu q_v , případně hmotnosti q_w (pro vyhodnocení parametru H porézních gelů-viz kapitola 5.3.1.1., str. 96-97) byly vyjádřeny jako podíl objemů nebo hmotností ve zbotnalém a suchém stavu.

4.2.4.4. Stanovení hustoty polymerů

Hustota polymerů byla stanovována pyknometricky. Byl používán prokalibrovaný pyknometr užívaný pro měření hustoty polymerů, který byl zvážen a bylo do něj vloženo přesně odvážené množství 0,5 – 1 g vzorku. Vzorek v pyknometru byl pak zalit pyknometrickou kapalinou (*n*-dekan) a zbaven ulpívajících plynů za vakua v exikátoru. Pyknometr byl poté dolit po rysku touž kapalinou a 30 min. temperován v termostatu při požadované teplotě ($20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ nebo $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$). Po vytemperování byla pomocí kapiláry úroveň kapaliny upravena do přesného souhlasu s rýskou a naplněný pyknometr byl vážen do konstantní hmotnosti. Nezávislými váženími byla stejným způsobem zjištěna hmotnost vytemperovaného pyknometru naplněného samotnou pyknometrickou kapalinou (bez vzorku). Všechna vážení byla prováděna do konstantní hmotnosti.

Hustota hmoty d suchého vzorku byla spočítána z rovnice

$$d = \frac{md_0}{m + m_1 - m_2}, \quad (3)$$

kde m je hmotnost vzorku (g), d_0 je hustota pyknometrické kapaliny (*n*-dekan $d_{20^\circ\text{C}} = 0,730 \text{ g/cm}^3$, $d_{25^\circ\text{C}} = 0,734 \text{ g/cm}^3$), m_1 hmotnost pyknometru zaplněného pyknometrickou kapalinou (g) a m_2 hmotnost pyknometru s kapalinou i vzorkem (g).

4.2.4.5. Stanovení obsahu oxiranových skupin v polymerních nosičích

Kvantitativní vyhodnocení obsahu epoxidových skupin v polymerech bylo provedeno pomocí IČ spekter, která byla měřena na spektrometru Perkin Elmer FT-IR Paragon 1000 PC v KBr tabletách. Z píku při 907 cm^{-1} byly pomocí PC programu odečteny hodnoty maxima a minima transmitance (T,%), z nichž byl potom při známé navážce vzorku a KBr tablety spočítán obsah epoxidových skupin přítomných v polymeru podle [110].

4.3. Modifikace polymerních nosičů

Mísení složek reakční směsi při modifikacích polymerních nosičů bylo prováděno buď třepáním (třepačka IKA-VIBRAX-VXR) nebo častěji mícháním míchadlem ponořeným do reakční směsi, které bylo uchyceno v horní části reakční nádoby a bylo poháněno buď elektromotorem nebo magnetem. Nikdy nebylo používáno teflonové magnetické míchadlo užívané při syntézách nízkomolekulárních látek z důvodu zamezení mechanického poškození polymerů.

Byla-li reakční směs refluxována, byl k reakční směsi přidán varný kamínek pro zabránění možnosti vzniku utajeného varu.

4.3.1. Modifikace binárních kopolymerních částic poly(DEGMA-*co*-EDMA)

4.3.1.1. Příprava sorbentu s chelatujícími skupinami *N*-(2-pyridylmethyl)glycinu

Nejprve byly polymerní hydroxylové skupiny tosylovány za vzniku modifikovaného polymeru I následovně: Ve 20 ml suchého pyridinu byl rozpuštěn tosylchlorid (9,9 g, 57,1 mmol). K tomuto roztoku byly přidány částice poly(DEGMA-*co*-EDMA) (2 g, teoretické množství OH skupin 10,3 mmol) a 0,02 g katalyzátoru {4-(*N,N*-dimethylamino)pyridin (DMAP)}. Směs byla míchána 3 dny za laboratorní teploty. Poté byla reakční směs vlita do acetonu s ledem, produkt byl promyt metanolem a vysušen. Konverze hydroxylových skupin polymeru na tosyloxyskupiny (TsO-, $540\text{ }\mu\text{mol/g}$) byla 10,5 mol.% (1,73 %S).

Tento polymer (I) (2g, 1,08 mmol TsO-) byl poté rozmíchán v metanolicím roztoku *N*-(2-pyridylmethyl)glycinu (5,5 mmol, 30 ml). Směs byla refluxována 2 dny. Polymer byl pak důkladně promyt vodou, 0,5 M HCl, 0,5 M NaOH a znovu vodou, zfiltrován, promyt

metanolem, ponechán na vzduchu a vysušen. Výsledný chelatující polymer obsahoval 144 $\mu\text{mol/g}$ navázných skupin *N*-(2-pyridinmetyl)glycinu (zjištěno acidobasickou titrací a sorpcí kovů) odpovídající průměrné konverzi TsO- skupin 27 mol. %.

4.3.1.2. Příprava sorbentu s chelatujícími skupinami kyseliny iminodioctové obsahujícího spojovací řetězec s 24 atomy

Vysušené polymerní částice poly(DEGMA-*co*-EDMA) (0,5 g, teoret. 2,1 mmol –OH skupin) byly rozmíchány v 15 ml dichlormethanu (sušen P_2O_7 a destilován). Za nepřístupu vzdušné vlhkosti pod dusíkovou atmosférou k nim byl přidán hexan-1,6-diyldiisokyanát (2 ml, 12,9 mmol, 5 ekv.) a 0,25 ml dibutylbis(dodekanoyloxy)stannanu a směs byla míchána 3 dny při 60°C pod dusíkovou atmosférou. Roztok nezreagovaného diisokyanátu v dichlormetanu byl poté zfiltrován za nepřístupu vzduchu s použitím speciální aparatury, částice byly (opět za nepřístupu vzdušné vlhkosti) promyty dichlormethanem a dále podrobeny reakci s roztokem diethylesteru *N*-(2-hydroxyethoxy)ethyliminodioctové kyseliny (2 g, 25,9 mmol, 5 ekv. vzhledem k teoret. množství –OH skupin polymeru) v dichlormetanu (10 ml) v inertní atmosféře při 60°C 3 dny. Částice byly poté zfiltrovány, několikrát promyty chloroformem, metanolem a vysušeny.

Koncové esterové skupiny byly hydrolyzovány 0,5 M NaOH při 60°C 24 hodin. Připravený chelatující polymer byl promyt vodou, 0,5 M HCl, vodou, metanolem a vysušen. Kvalitativní rozbor přítomných funkčních skupin byl proveden pomocí spekter NMR pevné fáze a obsah chelatotvorných skupin byl zjištěn sorpcí kovových iontů (viz Výsledky a diskuse, kapitola 5.2.2., Tab.3 na str. 83).

4.3.1.3. Příprava sorbentů s chelatujícími skupinami kyseliny etylendiamintriocetové a chinolin-8-olu

Následující čtyřkroková modifikace byla zahájena přípravou modifikovaného polymeru obsahujícího aldehydové skupiny (V) následovně: Poly(DEGMA-*co*-EDMA) částice (3,7 g, teoretický obsah CH_2OH skupin 19,13 mmol) byly suspendovány v dimethylsulfoxidu (DMSO) (37 ml) a po kapkách byl přidáván anhydrid trifluoroctové kyseliny (2,8 ml, 0,02

mol). Směs byla míchána za laboratorní teploty za nepřístupu vzdušné vlhkosti 6 dní. Částice byly zfiltrovány, promyty absolutním metanolem a použity pro další modifikace. Obsah aldehydových skupin (0,431 mmol/g, 8,3 mol % teoretického množství CH_2OH skupin) byl stanoven potenciometrickou titrací založenou na reakci aldehydových skupin s roztokem hydrogensířičitanu sodného připraveného in situ [111].

V následném modifikačním kroku byly částice modifikovaného polymeru V (3 g, 1,293 mmol/g CHO skupin) zahřívány ve směsi etanolu (15 ml), benzenu (15 ml) a etylendiaminu (4,5 ml, 67,3 mmol) 2 dny při 105-110°C. Vznikající voda byla odstraňována azeotropicky. Výsledný polymer VI obsahující Schiffovu bázi byl promyt absolutním metanolem a bez další analýzy použit v následujícím modifikačním kroku (redukci) probíhající 2 dny za refluxu (při 80°C) v bis(2-methoxyethyl)etheru (diglym) (25 ml) v přítomnosti NaBH_4 (0,06 g, 1,59 mmol) a 18-crown-6 (0,01 g, 0,038 mmol). Vzniklý polymer (VII) byl promyt postupně vodou, 0,5 M HCl, 0,5 NaOH a znovu vodou, zfiltrován, promyt methanolem a vysušen. Obsah přítomných aminoskupin v polymeru byl stanovován titrací sorbentu kyselinou chloristou v ledové kyselině octové [112] (stanoveno $151 \pm 7 \mu\text{mol/g}$) a elementárním stanovením obsahu dusíku v polymeru (stanoveno $143 \pm 10 \mu\text{mol/g}$). Oběma metodami byl zjištěn celkový obsah primárních i sekundárních aminoskupin v modifikovaném polymeru. Obsah koncových primárních aminoskupin odpovídal jedné polovině, tj. průměrné hodnotě $75 \mu\text{mol/g}$ odpovídající konverzi aldehydových skupin polymeru V na NH_2 skupiny polymeru VII 17 mol %.

Připravený polymer VII byl dále modifikován jedním ze dvou následujících postupů s cílem připravit sorbent obsahující chelatující skupiny (a) kyseliny etylendiamintriocetové nebo (b) chinolin-8-olu:

(a)

Polymer VII obsahující aminoskupiny (2 g, 0,294 mmol NH_2 skupin) byl spolu s práškovým bezvodým uhličitanem draselným (0,6 g, 4,34 mmol) dispergován v 12,5 ml dimetylsulfoxidu. K suspenzi byl přidán bromoctan ethylnatý (1,25 ml, 11,27 mmol) a 18-crown-6 (0,03 g). Směs byla refluxována za míchání 2 dny. Polymer byl poté promyt etanolem a vodou a zahříván s 25 ml 0,5 M NaOH při 60°C 2 dny. Poté byl promyt vodou a třepán s 25 ml 0,5 M HCl přes noc. Výsledný polymer VIII byl důkladně promyt vodou, etanolem a vysušen. Po vysušení byl stanoven obsah chelatujících skupin titračně přímou i nepřímou acidobazickou titrací a sorpcí kovových iontů. Obě titrační metody poskytly

srovnatelné výsledky (73,3 a 79,6 mmol/g suchého sorbentu) odpovídající průměrné konverzi aminoskupin polymeru VII v chelatující skupiny kyseliny etylendiamintriocetové polymeru VIII 50 mol %.

(Pozn. Při přímé titraci byly titrovány polymerní karboxylové skupiny 0,1 M NaOH v 0,1 M NaCl, při nepřímé titraci byl stanovován (titrací 0,1 M HCl) obsah přebytečného NaOH, kterým byly karboxylové skupiny sorbentu převáděny v iontovou formu. Titr odměrného roztoku byl stanoven pomocí standardu hydrogenftalátu draselného (pH 4,008), který byl před rozpuštěním sušen 2 hodiny při 110°C).

(b)

Ke směsi 0,125 g (0,64 mmol) hydrochloridu 5-(chlormethyl)chinolin-8-olu a suchého uhličitanu sodného (0,1 g, 0,9 mmol) v 95 % etanolu (20 ml) byl přidán polymer VII (2,8 g, 0,412 mmol NH₂ skupin) a 18-crown-6 (0,03 g). Směs byla míchána za laboratorní teploty 12 hodin. Produkt byl po třepání s 10 ml 0,5 M HCl 12 hodin a promytí vodou a metanolem vysušen. Po vysušení byl stanoven obsah chelatujících skupin sorpcí kovových iontů odpovídající hodnotě 82 mmol/g suchého sorbentu. Průměrná konverze aminoskupin polymeru VII v chelatující skupiny chinolin-8-olu sorbentu IX činila 56 mol%.

4.3.2. Modifikace terpolymerních částic

4.3.2.1. Příprava chelatujících sorbentů založených na poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) nosičích s různou koncentrací imobilizované kyseliny iminodioctové

Částice poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) byly modifikovány chelatující kyselinou iminodioctovou jedním ze tří následujících postupů:

(a) Metoda A

Částice (1 g suchých), předem zbotnalé v 1M Na₂CO₃/NaHCO₃ (pH 11) 24 h., byly vloženy do roztoku kyseliny iminodioctové (IDA) (2,81 g, tj. 5 teor. ekv.) ve 25 ml téhož roztoku (1 M Na₂CO₃/NaHCO₃). Vzniklá suspenze byla třepána 24 hod. při 60°C.

(b) Metoda B

Terpolymerní částice (1 g) byly vloženy do čerstvě předestilovaného DMF (14 ml) a ponechány v něm 24 hodin botnat. K této suspenzi byl poté přidán roztok vzniklý

rozpuštěním IDA (1,4 g, tj. 2,5 ekv.) v 1,6 M NaOH (7 ml). Vzniklá směs byla třepána 8,5 hod. při 55°C.

V případě obou způsobů modifikace byly částice po skončení reakce řádně promyty vodou. Zbylé přístupné nezreagované epoxyskupiny byly zhydrolyzovány (za vzniku vicinálních hydroxylových skupin) v kyselém prostředí (0,25 M HCl, 60°C, 10 h) podle Hrudkové a spol. [73]. Částice byly poté opět promyty vodou do neutrální reakce, metanolem a vysušeny.

Kyselina iminodioxiová (Aldrich) byla před použitím překrystalována z vody a vysušena při 13 Pa nad P₂O₅.

(c) Metoda C

Terpolymerní částice (1 g) byly vloženy do roztoku čerstvě předestilovaného diethylesteru kyseliny iminodioxiové (DE-IDA) (2 g, tj. 2,5 ekv.) v propan-1-olu (6 ml) a refluxovány 25 hod. DE-IDA byl připraven reakcí krystalické kyseliny iminodioxiové s thionylchloridem a ethanolem podle [113]. Modifikované částice byly poté důkladně promyty metanolem a vysušeny. Poté byly ponořeny do roztoku 0,5 M NaOH (15 ml) a třepány při 80°C 8 hod. V průběhu reakce byl v pravidelných časových intervalech odebírán vzorek částic pro monitorování vlivu vedlejší nežádoucí reakce elementárním stanovením obsahu dusíku.

Po skončení hydrolýzy byl výsledný chelatující sorbent důkladně promyt vodou, metanolem a vysušen. Přítomnost epoxyskupin chelatujícího sorbentu po provedení modifikace tímto způsobem nebyla zaznamenána (prokázáno pomocí IČ spekter absencí charakteristického epoxidového pásu při 907 cm⁻¹).

Množství navázaných chelatujících skupin bylo stanovováno sorpcí kovových iontů a acidobasickou titrací karboxylových skupin (kap.5.3.1.2.).

4.3.2.2. Příprava chelatujících sorbentů s poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA) nosiči (HPMA = 2-hydroxypropyl methakrylát)

Částice poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA) byly modifikovány kyselinou iminodioxiovou stejně jako v případě poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) částic způsobem označeným jako „metoda A“.

4.3.3. Modifikace plochých listů poly(DEGMA-*co*-EDMA) membrán

4.3.3.1. Příprava membrán s různou koncentrací tosyloxyskupin

Hydroxyskupiny (-OH) plochých listů poly(DEGMA-*co*-EDMA) membrány byly tosylovány jedním z popsaných postupů:

(a)

Plochý list membrány s obsahem síťovadla 0,5 % (odpovídající ≈ 5 g suché hmoty polymeru) byl postupně vkládán v časových intervalech 24 h do směsi voda-pyridin v poměrech (v/v) 80/20, 60/40, 40/60, 20/80 a 0/100 (čistý pyridin). Tosylchlorid (TsCl) (5 nebo 10 g, tj. 0,92 nebo 1,83 ekv. vzhledem k vypočtenému množství hydroxyskupin membrány (5,72 mmol/g)) a katalyzátor 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridin (DMAP) (0,02 g) byly rozpuštěny v čerstvě predestilovaném pyridinu (100 ml). Roztok byl ochlazen ponořením do vodní lázně s ledem. Do roztoku byla poté vložena membrána a reakční směs byla třepána při 25°C ve vodní lázni 48 h. Modifikované membrány byly propláchnuty pyridinem a znovu kondicionovány opačným postupem, tj. z vody do pyridinu ve stejných poměrech se zvyšujícím se podílem vodné složky.

Množství vzniklých tosyloxyskupin odpovídalo 1,02 nebo 1,36 mmol /g suché membrány (3,26 nebo 4,35 hm % S) v závislosti na obsahu TsCl v reakční směsi.

(b)

Tosylchlorid (15 g, tj. 13,75 ekv. vzhledem k množství -OH skupin membrány) byl suspendován ve vodě (40 ml). Do suspenze byla ponořena ve vodě zbotnalá membrána (odpovídající ≈ 1 g suché hmoty polymeru). Po přidání katalyzátoru DMAP (0,02 g) a roztoku methylčerveni v acetonu (0,01 ml) byla reakční směs třepána při 25°C ve vodní lázni. K reakční směsi bylo průběžně přikapáváno ekvivalentní množství 5 M NaOH vždy při poklesu pH (změna barvy indikátoru). K poklesu pH docházelo zpočátku přibližně po ½-1 hodinových intervalech, které se postupně prodlužovaly až na několik hodin až nakonec ke změně pH nedocházelo. Membrána byla po skončení modifikace (7 dní) promyta vodou.

Nalezená hodnota 1,54 hm % S odpovídá 0,48 mmol tosyloxyskupin/g suché membrány.

4.3.3.2. Příprava chelatujících membrán

Membrána modifikovaná tosyloxyskupinami jedním ze dvou posaných způsobů byla ponořena do roztoku kyseliny iminodioctové (IDA) (1,5 g nebo 3 g, tj. 0,8-2,0 ekv. vzhledem k množství TsO- skupin po modifikaci v pyridinu) v 1 M Na₂CO₃/1 M NaHCO₃ (50 ml). Reakce probíhala za třepání 5 dní při 45 °C ve vodní lázni. Vzniklá chelatující membrána byla poté promyta vodou a třepána s 25 ml 0,5 M HCl za laboratorní teploty 12 h. Poté byla znovu důkladně promyta vodou a ponechána ve vodě ve zbotnalém stavu.

Získaná množství navázaných IDA skupin byla stanovována elementární analýzou obsahu dusíku (viz kap.5.4.2., Tab. 15 na str. 126).

4.3.4. **Příprava a charakterizace některých nekomerčních nízkomolekulárních látek použitých při modifikaci polymerních nosičů**

N-(2-pyridylmethyl)glycin

byl připravena jedním ze dvou následujících postupů:

a)

Neselektivní způsob přípravy této látky byl převzat z literatury [40]. Požadovaný produkt byl získán ve formě směsi obsahující 90 % požadovaného produktu a 10 % dialkylovaného produktu {kyselina *N*-(2-pyridylmethyl)iminodioctová}.

b)

Kyselina glyoxalová (2,95 g, 32 mmol, 1,1 ekv.) byla rozmíchána v benzenu (20 ml), byl přidán 2-(aminomethyl)pyridin (2-pikoly lamin) (3 ml, 29 mmol) a 0,2 ml ledové kyseliny octové. Vzniklá suspenze byla refluxována pod azeotropickým nástavcem 2 dny. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno a k destilováno toluenem (4x). Surová reakční směs byla rozmíchána v suchém metanolu (sušen MgSO₄ a destilován) a postupně byl přidáván NaBH₄ (11,01g, 0,291 mol, 10 ekv. vzhledem k 2-pikoly laminu). Směs byla 5 hodin refluxována a poté ponechána stát přes noc za laboratorní teploty. Přebytný tetrahydroboritan sodný byl rozložen ledovou kyselinou octovou, dokud se uvolňoval vodík. Směs byla doneutralizována do neutrálního pH a ponechána 24 hodin při -18°C. Vypadlá sraženina byla zfiltrována, filtrát byl odpařen, k destilován 3x s benzenem (azeotropické odstranění zbytků vody) a toluenem

(azeotropické odstranění zbytků kys octové) a poté při sníženém tlaku (5 torr) odpařen do sucha. Produkt byl získán (0,5 g, 10 %) čištěním na sloupci silikagelu v soustavě CHCl₃-MeOH.

¹H - NMR (300MHz, D₂O): 3,25 s (2H, -NH-CH₂(CO₂H)), 3,91 s (2H, py-CH₂-NH-), 7,33-7,88 m (py); Pro C₈H₁₀N₂O₂ (166,2) vypočteno: C 57,82 %; H 6,07 %; N 16,86 %, nalezeno C 58,50 %; H 6,29 %; N 16,16 %.

5-chlorometyl-chinolin-8-ol. hydrochlorid

Alkylační činidlo 5-chlorometyl-chinolin-8-ol ve formě hydrochloridu bylo připraveno podle literatury [114], která však neuvádí úplnou charakteristiku látky (chybí NMR). Proto doplňuji: ¹H NMR (300MHz, D₂O): 5,03 s (2H, Cl-CH₂); 7,27 d (1H, *J* = 8,1 Hz, H-C6); 7,65 d (1H, *J* = 7,8 Hz, H-C7); 8,086 dd (1H, *J* = 8,7 Hz, *J* = 5,4 Hz, H-C3); 8,98 d (1H, *J* = 4,8 Hz, H-C4); 9,18 d (1H, *J* = 8,7 Hz, H-C2).

N-(2-hydroxyethoxy)ethyl iminodioctová kyselina

2-(2-aminoetoxy)etanol (5 ml, 50,1 mmol) byl rozpuštěn ve 40 ml vody, byla přidána kyselina chloroctová (10,378 g, 0,11 mol, 2,2 ekv.) a 0,45 ml 0,5 M NaOH (4,4 ekv.). Vzniklý roztok (pH 10-11) byl zahříván 10 h na 110°C a poté 3h na 135°C (viskózní směs zřídne). Po ochlazení bylo pH reakční směsi upraveno na 2,5 přidávkem HCl_{konc.}, vypadlá sraženina odpovídající požadovanému produktu byla zfiltrována, propláchnuta etherem a vysušena. Bylo získáno 3,9 g (35 %) produktu. ¹H NMR (300MHz, D₂O): 3,62 t (2H, *J* = 4,5 Hz, HOCH₂-CH₂O-), 3,64 t (2H, *J* = 3,9 Hz, -OCH₂-CH₂N-), 3,72 t (2H, *J* = 4,5 Hz, -OCH₂-CH₂N-), 3,88 t (2H, *J* = 5,1 Hz, HOCH₂-CH₂O-), 4,08 s (4H, -N(CH₂COOH)₂). Pro C₈H₁₅NO₆ (221,2) vypočteno: C 43,44 %; H 6,83 %; 6,33 % N, nalezeno: C 43,05 %; H 6,82 %; N 5,88 %.

diethylester N-(2-hydroxyethoxy)ethyl iminodioctové kyseliny

Ve vodě (10 ml) byl rozpuštěn K₂CO₃ (4 g, 34 mmol, 1,2 ekv.), k roztoku byl přikapán 2-(2-aminoetoxy)etanol (2,5 ml, 25,1 mmol) a bromoctan etylnatý (6,4 ml, 57,7 mmol, 2,3 ekv.). Vzniklý zákal zmizel přidáním 10 ml etanolu. Reakční směs byla míchána 3 dny za

laboratorní teploty. Během této doby vypadávala bílá sraženina, která byla odstraněna filtrací. Filtrát byl zahuštěn a dělen chromatografií na koloně silikagelu v soustavě CHCl_3 -MeOH. Bylo získáno 5 g (72 %) viskózní olejovité látky odpovídající požadovanému produktu. ^1H NMR (300MHz, CDCl_3): 1,21 t (6H, $J = 8,3$ Hz, CH_3 - CH_2CO_2 -), 2,92 t (2H, $J = 5,3$ Hz, - OCH_2 - CH_2 N-), 3,48 t (2H, $J = 4,5$ Hz, HOCH_2 - CH_2 O-), 3,56 s (4H, -N($\text{CH}_2\text{COOCH}_2$) $_2$ -), 3,58 t (2H, $J = 5,1$ Hz, - OCH_2 - CH_2 N-), 3,63 t (2H, $J = 4,5$ Hz, HOCH_2 - CH_2 O-), 4,10 q (4H, $J = 6,9$ Hz, CH_3 - CH_2CO_2 -). Pro $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ (277,3) vypočteno: C 51,97 %; H 8,36 %; N 5,05%, nalezeno C 51,53%; H 8,22 %; N 4,80 %.

Nízkomolekulární látky byly sušeny při 13 Pa nad oxidem fosforečným.

4.4. Sorpce kovových iontů

4.4.1. Obecný popis pro stanovení obsahu chelatujících skupin sorpcí kovových iontů

Přesně odvážené množství (cca 0,3 g) suchého chelatujícího sorbentu bylo třepáno 24-48 hodin v acetátovém pufru o pH 4,5 (0,1M AcOH/AcONa v 0,5 M NaCl). Přebytečný pufr byl poté odfiltrován a zbytečný sorbent byl třepán s 0,1 M-0,2 M roztokem NiCl_2 nebo CuSO_4 v téže pufru (3,5 ml) 12 hod. Koncentrace soli kovu byla volena vzhledem k předpokládanému množství chelatujících skupin. Sorpce FeCl_3 byla prováděna v 0,1 M acetátovém pufru (pH 2,7) stejným způsobem. Potom byl sorbent zfiltrován a promyt acetátovým pufrům (pH 4,5, případně 2,7 pro FeCl_3). Obsah kovu byl v rovnovážném a v původním roztoku stanovován metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS) s použitím spektrometru Perkin Elmer 3110. Množství sorbovaného kovu bylo pak vypočítáno z rozdílu v obsahu kovu v obou roztocích.

Sorbent s komplexovanými kovovými ionty byl poté třepán 8 h s fosfátovým pufrům (0,05 M K_3PO_4 obsahující 0,5 M NaCl, pH 8) (3,5 ml), přičemž rovnovážný roztok nad sorbentem byl průběžně obnovován čerstvou dávkou pufru o pH 8. Filtráty byly spojeny a metodou AAS byl stanovován rozdíl v obsahu kovu imobilizovaného na sorbentu v závislosti na změně pH prostředí (4,5, resp. 2,7 \rightarrow 8).

Před měřením AAS byly studované roztoky naředěny roztokem 0,1 M kyseliny octové na přibližnou koncentraci v rozmezí 5-20 mg kovu/l. Orientační stanovení koncentrace

rovnovážného roztoku kovové soli bylo provedeno spektrofotometricky pomocí kalibrační křivky.

Roztoky solí kovů byly připraveny rozpuštěním požadovaného množství kovové soli v 0,1M acetátovém pufru o pH 4,5 (FeCl_3 byl rozpuštěn v 0,1M kyselině octové) a přefiltrovány přes sterilní filtr Millipor 0,22 μl .

4.4.2. Regenerace chelatujících sorbentů po sorpci kovových iontů

Princip regenerace chelatujícího sorbentu spočívá v odstranění kovového iontu z imobilizovaných komplexů na sorbentu použitím silného komplexačního činidla. Sorbent určený k regeneraci byl ponořen do regeneračního pufru (roztok EDTA v Tris pufru) (3,5 ml) a třepán několik hodin až dní v závislosti na struktuře polymerního nosiče (v případě porézních sorbentů probíhala regenerace rychleji). V průběhu procesu uvolňování kovového iontu byl rovnovážný roztok několikrát zfiltrován a sorbent byl uveden v rovnováhu vždy s čerstvou dávkou regeneračního pufru. Filtráty byly poté spojeny a naředěny roztokem 0,1 M kyseliny octové na výslednou koncentraci 5-20 mg kovu/l. Přesné množství uvolněného kovu bylo zjištěno měřením AAS (referenčním roztokem byl zde regenerační pufr). Postup byl opakován tak dlouho, dokud celkový obsah kovového iontu ve filtrátech neodpovídal původně stanovenému obsahu imobilizovaného kovu v sorbentu. Během uvolňování kovových iontů ze sorbentů do roztoku docházelo ke ztrátě zabarvení sorbentu.

Regenerovaný sorbent byl promyt vodou, roztokem 0,5 M HCl (20-25 ml), vodou, zfiltrován a poté promýván vodou ve skleněné koloně s fritou při průtoku cca 0,25 ml/min nejméně 2 hodiny. Nakonec byl sorbent propláchnut čistým etanolem a vysušen.

Všechny experimenty byly prováděny s čerstvě připravenými pufrů, které byly před použitím přefiltrovány přes sterilní filtr Millipor 0,22 μl .

4.5. Ligandově-výměnná chromatografie na připravených chelatujících sorbentech

4.5.1. Zařízení pro IMAC, plnění kolon

Před provedením dynamického experimentu v koloně byl vzorek i všechny pufrované roztoky zbaveny v odplyňovači přítomných plynů. Čerpací zařízení měla dostatečný výkon,

aby byla zajištěna plynulá a spolehlivá dodávka elučního činidla. Bylo použito skleněných nebo plastových kolon, které byly dole uzavřeny porézní fritou. Zařízení doplňovaly pružné spoje (teflonové hadičky, nerezové kapiláry) a spojky těchto pružných spojů. Použité spojovací hadičky byly polyethylenové nebo teflonové.

Kolony byly plněny přímým vlitím suspenze zbotnalého gelového sorbentu.

4.5.2. Obecný předpis provedení IMAC proteinů v koloně

Chromatografie IMA nanášecí metodou byla provedena s použitím kolon HR-5 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko) naplněných zbotnalým testovaným chelatujícím sorbentem, který byl nejprve uveden do rovnováhy s acetátovým pufrem (0,1 M AcOH/AcNa v 0,5 M NaCl, pH 4,5) (objem proteklého pufru odpovídal cca 10 objemům lóže). Poté byl sorbentem v koloně propuštěn roztok 0,1 M NiCl₂ v rovnovážném pufru při průtokové rychlosti 0,25 ml/min (5-15 objemů lóže). Během koordinace Ni²⁺ iontu s chelatujícími skupinami byla sledována absorbance filtrátu při 405 nm s použitím Uvicord SD napojeného na kolonu. Absorbance roztoku vytékajícího z kolony po nasycení sorbentu kovem musela být stejná jako v původním roztoku NiCl₂. Nenavázané kovové ionty byly pak z volného objemu kolony promyty rovnovážným pufrem (cca 10 objemů lóže). Poté byl sorbent uveden do rovnováhy s nanášecím pufrem (0,05 M K₃PO₄ v 0,5 M NaCl, pH 8, 10 objemů lóže). Proteinový roztok v nanášecím pufru (2 ml, konc. 590 μg-1 mg/ml) byl nanesen na sorbent a kolona byla promyta nanášecím pufrem (přibližně 5-6 objemů lóže) (odstranění nenavázaných proteinů z mezičásticového prostoru). Roztok vytékal z kolony konstantní průtokovou rychlostí 0,25 ml/min. Poté byla provedena eluce specificky navázaných proteinů z kolony (viz 4.5.4.).

Před nanesením na kolonu byl proteinový roztok přefiltrován přes filtrační papír (Whatman) a zbaven přítomného Na₃N dialýzou proti destilované vodě přes dializační membránu Cupraphone.

4.5.3. Ligandová výměna modelových látek s využitím frontální chromatografie

Ligandová výměna čisté modelové látky byla studována frontální chromatografií s použitím polypropylénových kolon Tatren PD 140 (0,9 x 1,0-4,0 cm; Labio, Praha, Česká

republika) naplněných zbotnalými Ni^{2+} -IDA polymerními částicemi, případně nemodifikovanými částicemi pro referenční měření (pro srovnávací měření byly používány stejné navážky v suchém stavu). Částice byly uvedeny v rovnováhu s ekvilibračním pufrem (0,05 M K_3PO_4 v 0,5 M NaCl, pH 8) (10 objemů lóže). Poté prošlo 5 – 15 objemů lóže roztoku modelové látky {0,15 M imidazolu nebo spec. IgG₁ (1 mg/ml) v ekvilibračním pufru} kolonou při konstantní průtokové rychlosti 0,2 ml/min. Absorbance filtrátu ($\lambda = 280$ nm) na konci každého experimentu byla stejná jako pro počáteční roztok. Ve všech experimentech byla přítoková koncentrace roztoku C_0 konstantní. Pokus byl zastaven, když koncentrace roztoku vytékajícího z kolony dosáhla hodnoty koncentrace roztoku vstupujícího na kolonu. Během průtoku mobilní fáze kolonou byly odebírány frakce vytékajícího roztoku pro sledování analytického množství kovového iontu uvolněného do roztoku (vyhodnoceno AAS). Reversibilně navázaný modelový imunoglobulin byl poté vytěsněn z kolony elucí (viz 4.5.4.).

Hodnoty absorpčních modelových látek (imidazolu nebo IgG₁) v roztocích při $\lambda = 280$ nm byly v průběhu měření zaznamenávány v intervalech 10 s pomocí detektoru 2510 Uvicord SD (LKB, Švédsko) připojeného k digitálnímu PC Osciloskopu K7103 (Velleman, Německo) a počítači. Pomocí vytvořeného počítačového programu byl proveden přesný výpočet ploch za čelem frontální křivky. Koncentrace studovaných modelových roztoků byly vypočítány s použitím jejich absorpčních koeficientů v 0,05 M fosfátovém pufru o pH 8 ($\epsilon_{\text{imidazol}} = 1,12$, $\epsilon_{\text{IgG1}} = 1,38 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.5.4. Eluce specificky navázaných proteinů z kolony

Eluce specificky sorbovaných proteinů byla provedena po vymytí nenavázaných proteinů z mezičásticového prostoru kolony nanášecím pufrem o pH 8 (0,05 M K_3PO_4 v 0,5 M NaCl) (5-6 objemů lóže).

Proteiny reverzibilně navázané na Ni^{2+} komplexech byly eluovány nejprve klesajícím pH gradientem s použitím acetátových pufrů o pH 6; 5,5; 5 a 4,5 a poté imidazolovým koncentračním gradientem (10-150 mM roztoky v 0,5 M NaCl), případně též 0,05 M EDTA v 0,5 NaCl. Při eluci byla používána stejná průtoková rychlost jako při promývání (0,20 nebo 0,25 ml/min), která byla po celou dobu procesu udržována konstantní.

4.5.5. Adsorpce proteinů šaržovitými experimenty

Adsorpce čistého modelového proteinu (např. myšního sérového imunoglobulinu G na plochých listech Ni²⁺-IDA membrán) byly provedeny též s využitím šaržovitých („batch“) experimentů: Roztoky proteinů byly připraveny v 0,05 M fosfátovém pufru (pH 8, 0,5 M NaCl). K sérii nádobek, z nichž každá obsahovala stejnou navážku Ni(II)-IDA sorbentu uvedeného do rovnováhy s týmž fosfátovým pufrem, byly přidány stejné objemy pufrovaných proteinových roztoků o různých koncentracích. Nádobky byly inkubovány 12 hod. při 20°C za třepání ve vodní lázni. Koncentrace proteinu v supernatantu byla stanovena spektrofotometricky [115] a množství navázaného proteinu bylo vypočítáno z bilance hmoty.

4.5.6. Vyhodnocení bílkovinných roztoků

Celková koncentrace proteinů v eluátech byla stanovována spektrofotometricky metodou Warburga a Christiana [115] z hodnot absorbcí při $\lambda = 260, 280$ a 302 nm s použitím spektrofotometru Hewlett Packard 8451 A diode array.

Koncentrace specifického imunoglobulinu v elučních frakcích byla vyhodnocena titrací ELISA („enzyme-linked immuno sorbent analysis“) (prováděla fa. Seva-Imuno Praha).

Analýza komponent v elučních frakcích čistého modelového imunoglobulinu byla provedena s využitím hmotnostních spekter MALDI TOF získaných měřením na spektrometru MALDI TOF-MS, BiFlex III. Proteinové roztoky byly před měřením přefiltrovány přes ultrafiltrační polysulfonovou membránu Milipore cut-off 5 kD s cílem snížit iontovou sílu roztoků a zvýšit koncentraci rozpuštěných komponent.

Pro vyhodnocení čistoty proteinu izolovaného ze směsi byla použita zónová nízkonapěťová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s přidavkem dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) s použitím vysokomolekulárního proteinového standardu firmy Pharmacia Biotech, která byla provedena v Mini-Hoefler SE 200 aparatuře za neredukujících podmínek [116]. Gely byly barveny, fixovány a sušeny podle instrukcí výrobce.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Jak vyplývá z diskuse v kapitole 2.4., v IMA chromatografii bylo relativně málo pozornosti věnováno vlivu pevného nosiče jakož i typu chelatující skupiny a její koncentrace na interakci s proteinem či obecněji jakoukoli cílovou látkou, ačkoli je zřejmé, že struktura pevného nosiče ovlivňuje množství navázané cílové látky, neboť určuje nejen koncentraci navázaných chelatujících skupin, ale především pak prostorovou přístupnost komplexů kovových iontů s chelatujícími skupinami pro navázání cílové látky.

V této disertační práci jsme se proto pokusili jednak připravit nové, dosud neprozkoumané nosiče pro chromatografii na imobilizovaných kovových iontech a zároveň jsme se soustředili na vyhodnocení vlivu struktury pevného nosiče, typu a koncentrace chelatující skupiny na modelových studiích specifické sorpce nebo izolace imunoglobulinu na kovových komplexech imobilizovaných na připravených pevných nosičích. K připojení chelatujících skupin na pevný nosič bylo využito různých organicko-chemických postupů s cílem buď získat sorbenty s proměnlivými koncentracemi chelatujících skupin na pevném nosiči a/nebo připojit kvalitativně odlišné chelatující skupiny.

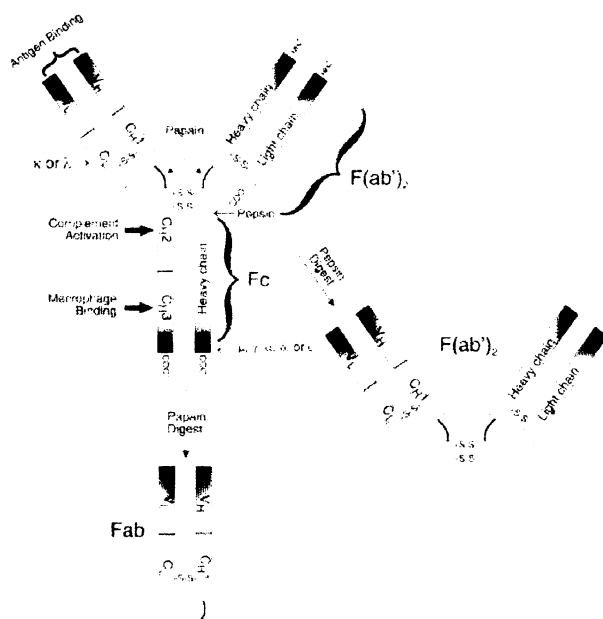
Při výběru vhodného kovového iontu a modelového proteinu pro naše studie jsme vycházeli z práce Haleho a Beidlera [117], v níž bylo dokázáno, že C_{H3} doména imunoglobulinové molekuly (Obr.5) obsahuje aminokyselinovou sekvenci bohatou na histidin, která je zodpovědná za vazbu na imobilizovaný kovový ion. Tato vlastnost byla prokázána pro imunoglobuliny třídy IgG, podtřídy IgG₁, lidské, myší a králičí. Autoři dále prováděli porovnávací studie uvedených přírodních imunoglobulinů a jejich analogů, jež byly obohaceny o hexa-histidinovou peptidovou sekvenci („Hexa-his tag“), která měla zajišťovat lepší navázání na imobilizované kovové ionty. Bylo však ukázáno, že obě dvě formy imunoglobulinu, přírodní i obohacená histidinem, se stejně dobře váží na IMA gel. Autoři dále ukázali, že velkou afinitu k imunoglobulinům mají především nikelnaté ionty, což bylo již předtím pozorováno v jedné z prvotních studií průkopníků IMA metody Poratha a Olina [118]. Proto i v našich experimentech byly při práci s imunoglobuliny používány imobilizované nikelnaté ionty.

Pro zajímavost lze doplnit, že IMA sorbentu lze na rozdíl od jiných biospecifických imunoabsorbentů (protein A, anti-Ig-specifické imunoabsorbenty atd.) využít též pro oddělení jednotlivých fragmentů imunoglobulinů [119] neboť Fc fragment (Obr. 5) obsahující C_{H3}

doménu se váže pevně na IMA sorbent, zatímco Fab fragment se nezachycuje. Díky tomu lze takto oddělit lehký řetězec (light chain-Obr.5), který vzniká při expresi imunoglobulinů v savčích buněčných kulturách až v padesátinásobném přebytku.

Tím, že IMA sorbenty neváží ani lehký řetězec imunoglobulinů ani některé další sérové proteiny, které vznikají při expresi v buněčných kulturách v přebytku, dovolují získat imunoglobuliny v relativně vysoké čistotě a kapacita sorbentu není omezena vazbou těchto nežádoucích proteinů. Z dalších výhod IMA oproti biospecifickým sorbentům lze uvést např. použití mírnějšího elučního prostředí pro zpětné vytěsnění reversibilně navázaného proteinu (pH gradient, imidazolový koncentrační gradient). Pro vytěsnění imunoglobulinu z bioadsorbentů je často potřeba použít roztoky s nízkým pH, případně detergenty či chaotropní soli, které mohou způsobovat denaturaci izolovaného proteinu.

Pro experimenty této disertační práce byly použity imobilizované komplexy iontu Ni(II) a tyto imunoglobuliny: myší sérový imunoglobulin, myší monoklonální IgG₁ specifický proti křenové peroxidáze a myší monoklonální IgG₁ specifický proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu.



Obr.5. Základní struktura molekuly imunoglobulinu a její proteolytické fragmenty Fab, F(ab)₁ a Fc. C_{H3} doména (vazebné místo pro Ni(II) ion; pseudobiospecifická interakce) označena červeně, vazebná místa pro antigen (biospecifická interakce) označena modře.

5.1. Volba monomerů pro přípravu IMA nosičů

Jako hydrofilního monomeru pro přípravu pevného nosiče IMA sorbentu lze teoreticky použít jakékoliv dvou nebo vícefunkční vinylické sloučeniny, která obsahuje polární skupiny a je tudíž částečně nebo úplně mísitelná s vodou (např. hydroxyalkylmethakryláty, aminoalkylmethakryláty, n-vinylpyrrolidon, akrylonitril, methakrylonitril, kyselina akrylová, methakrylová atp.). Jako síťovadlo se uplatní každý vícefunkční monomer, který kopolymeruje se základním hydrofilním monomerem (např: bismethakryláty, bisakryláty, bisakrylamidy, bismethakrylamidy).

Z možných kandidátů byly vybrány monomery glycidyl-methakrylát (GMA) a diethylenglykol-methakrylát (DEGMA). Použité monomery totiž vykazují z chemického hlediska výborné vlastnosti. Žádný z nich neobsahuje skupinu, která má schopnost vyměňovat ionty, což ruší vlastní chromatografické dělení. Monomery naopak obsahují funkční skupiny (oxiranové nebo hydroxylové), jež je možno chemicky modifikovat v chelatující skupiny schopné komplexace s kovovými ionty. Monomer DEGMA, který byl připraven reesterifikací methylmetakrylátu s diethylenglykolem, má navíc oproti 2-hydroxyethyl-methakrylátu (HEMA), nejčastěji používanému monomeru pro přípravu syntetických IMA nosičů (viz kapitola 2.4.2.1.), díky přítomnosti další ethoxy- skupiny vyšší hydrofilitu. Předností monomeru GMA je pak především vysoká reaktivita jeho oxiranových skupin. Další velkou předností je chemická stálost výsledného polymerního nosiče, který připomíná svou strukturou estery kyseliny pivalové, patřící díky terciálnímu α uhlíku k nejstabilnějším esterům organických kyselin vůči kyselé i alkalické hydrolyze.

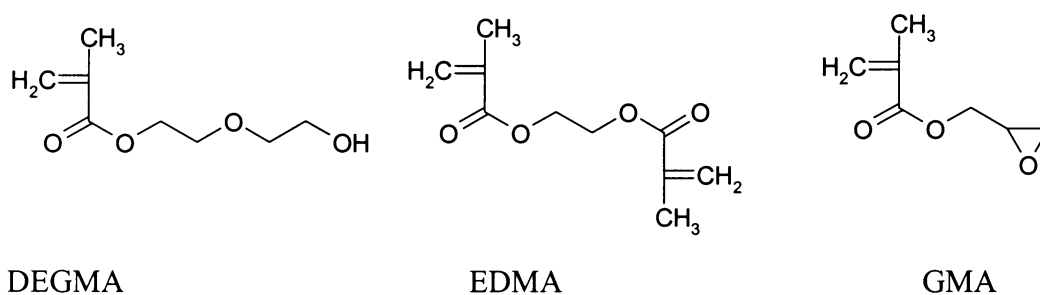
Jako síťovadlo byl použit bifunkční ethylen-dimethakrylát (EDMA), běžně užívaný pro přípravu zesíťovaných methakrylátových polymerů. Chemickou strukturu používaných monomerů znázorňuje Schema 1.

Jak bylo uvedeno v teoretické části, IMA nosiče mívají nejčastěji tvar kulovitých částic s průměrem desítek až stovek μm . I v této práci byla pozornost soustředěna na přípravu takových nosičů, k čemuž byla využívána technika suspenzní radikálové polymerizace ve vodném prostředí; voda bývá volena jako disperzní prostředí především z ekonomických důvodů. V našem případě byla sice částečně překážkou rozpustnost DEGMA ve vodě, ta však byla do značné míry odstraněna vysolením tohoto monomeru z vodného disperzního prostředí. Tím se ale omezil výběr stabilizátoru suspenze, jehož úkolem je zabraňovat

slepování částecek v lepidelném stadiu polymerace (20 – 30 % konverze). Organické rozpustné stabilizátory (polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon) nebylo možné vzhledem k iontové síle vysolujícího roztoku (koncentrovaný roztok anorganických solí) použít, proto bylo nutné provádět stabilizaci anorganickými práškovými stabilizátory.

Jednotlivým typům částicových nosičů včetně jejich aplikací v IMA metodě jsou samostatně věnovány následující kapitoly.

Kopolymery poly(DEGMA-*co*-EDMA) byly připraveny též ve formě membrán a po modifikaci chelataujícími skupinami bylo zkoumáno jejich možné praktické využití.



Schema 1. Chemická struktura monomerů používaných pro přípravu IMA nosičů: diethylenglykol-methakrylát (DEGMA), ethylen-dimethakrylát (EDMA), glycidyl-methakrylát (GMA).

[Nomenklatura IUPAC: 2-(2-hydroxyethoxy)ethylester 2-methyl-2-propenové kyseliny (DEGMA), 1,2-ethandiylester 2-methyl-2-propenové kyseliny (EDMA), 2,3-epoxypropylester 2-methyl-2-propenové kyseliny (GMA)].

5.2. Sorbenty založené na binárních kopolymerních částicových nosičích

5.2.1. Příprava a charakteristika částic poly[diethylenglykol-methakrylát-*co*-ethylen-dimethakrylátu] [poly(DEGMA-*co*-EDMA)]

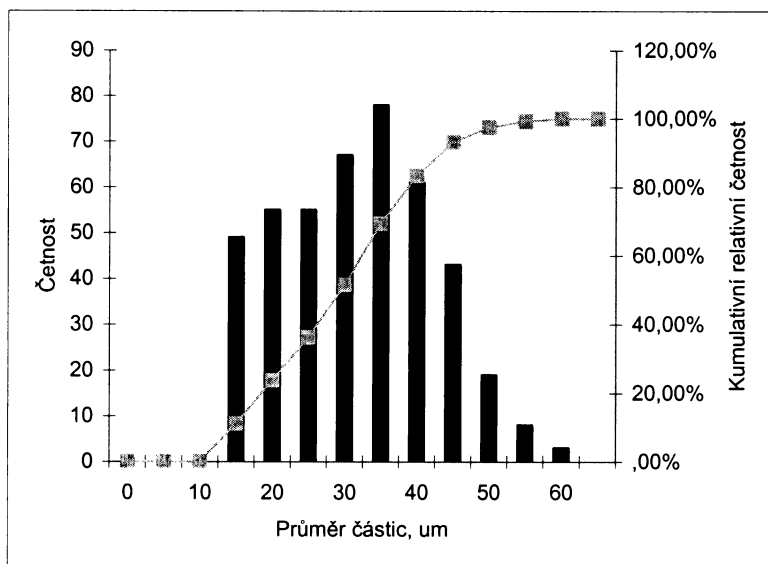
Prvním seznámením s výzkumem týkajícím se metody IMA byla příprava polymerních částic poly(DEGMA-*co*-EDMA), které byly posléze upraveny na funkční IMA nosič.

Jako stabilizátor suspenze při přípravě částic sloužil koloidní roztok hydroxidu hořečnatého připravený „in situ“ přímo v polymerní směsi srážením chloridu hořečnatého

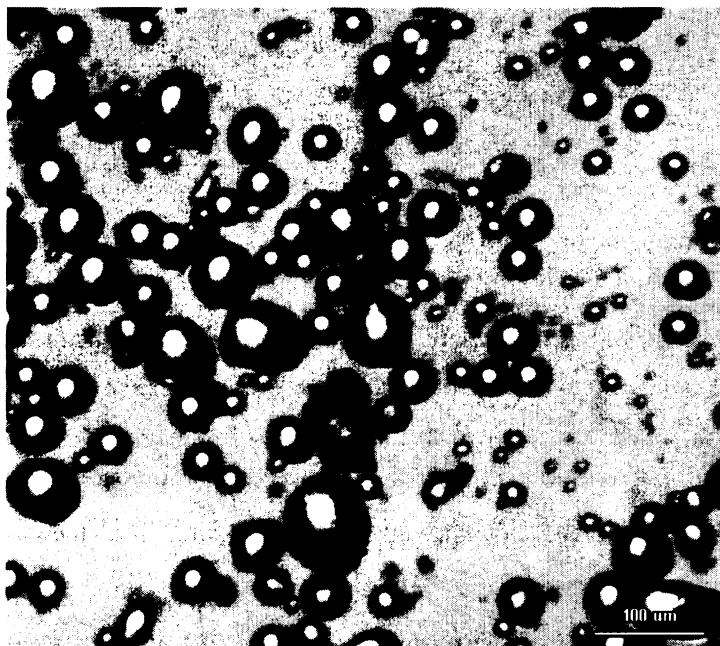
hydroxidem sodným. Jeho příprava byla převzata z patentu pro přípravu sesít'ovaných 2-hydroxyethyl methakrylátových (HEMA) částic [120].

Vzniklý kopolymer byl pak charakterizován botnavými vlastnostmi (botnavost ve vodě 69 %), stanovením specifického povrchu částic B.E.T. experimentem ($0,008 \text{ m}^2/\text{g}$) a distribucí velikosti částic (Obr.6), které byly vyhodnocovány statisticky z mikrofotografií (Obr.7). Průměr vzniklých sférických částeček $15\text{-}60 \text{ }\mu\text{m}$ je vhodný pro použití v IMAC. Můžeme též předpokládat, že složení polymeru je identické s poměrem komponent v monomerní směsi, neboť kopolymerizační parametry obou monomerů jsou blízké jedné [121] a lze tedy předpokládat ideální průběh kopolymerizace. Konverze (72%) byla stanovena gravimetricky.

Homogenní charakter částic a nízká hodnota jejich specifického povrchu potvrzují nízkou porozitu připraveného polymeru. Při pokusu o přípravu porézních poly(DEGMA-*co*-EDMA) částic však vznikaly hybridní částice nebo slepence. Takové formy polymeru jsou pro použití v IMAC nežádoucí, neboť pro udržení dobrých hydrodynamických vlastností v chromatografické koloně je vhodné použít částice v kulovité formě. Nicméně, připravený homogenní polymer je vysoce hydrofilní, což je důležité jednak pro zamezení případné denaturace bílkovin a jednak pro potlačení nežádoucích hydrofóbních i jiných nekovalentních interakcí pevného IMA nosiče se studovaným proteinem, a proto byl připravený částicový polymer studován i pro další využití.



Obr. 6. Statistické vyhodnocení distribuce velikostí mikročástic poly(DEGMA-*co*-EDMA) a množství defektních částic z mikrofotografií pořízených na mikroskopu Nikon SMZ-2T. Vyhodnoceno 481 částic, střední průměr částic $29 \text{ }\mu\text{m}$, směrodatná odchylka $10 \text{ }\mu\text{m}$, podíl defektních částic (tj. částice s cirkularitou $< 0,8$) 9%.



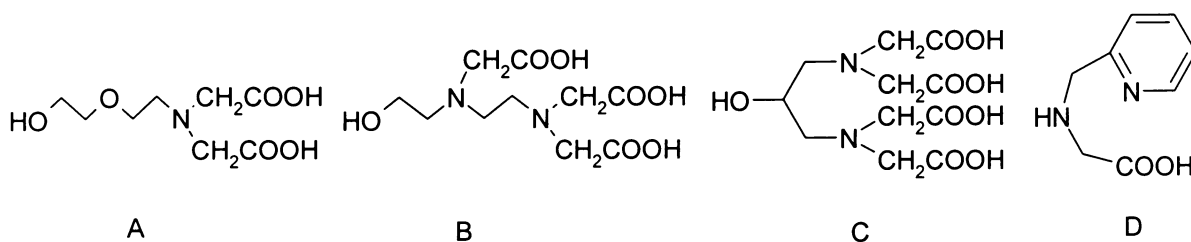
Obr.7. Mikroskopický snímek homogenních kopolymerních částic poly(DEGMA-*co*-EDMA).

5.2.2. Modifikace částic poly(DEGMA-*co*-EDMA) chelatujícími skupinami

Hydroxylové skupiny přítomné v polymerním prekursoru byly využity k jeho následné modifikaci. Cílem bylo kovalentně připojit různé chelatující skupiny schopné komplexovat kovové ionty a vzniklé komplexy následně využít v chromatografii na imobilizovaných kovových iontech IMAC.

K navázání chelatujících skupin bylo využito dvou přístupů: 1) Byla připravena nebo použita nízkomolekulární látka, jež ve své molekule obsahovala funkční skupiny schopné komplexovat kovové ionty a kterou lze jednoduše navázat na polymerní prekursor. 2) Chelatující skupiny byly připojeny na polymerní prekursor jeho postupnou modifikací.

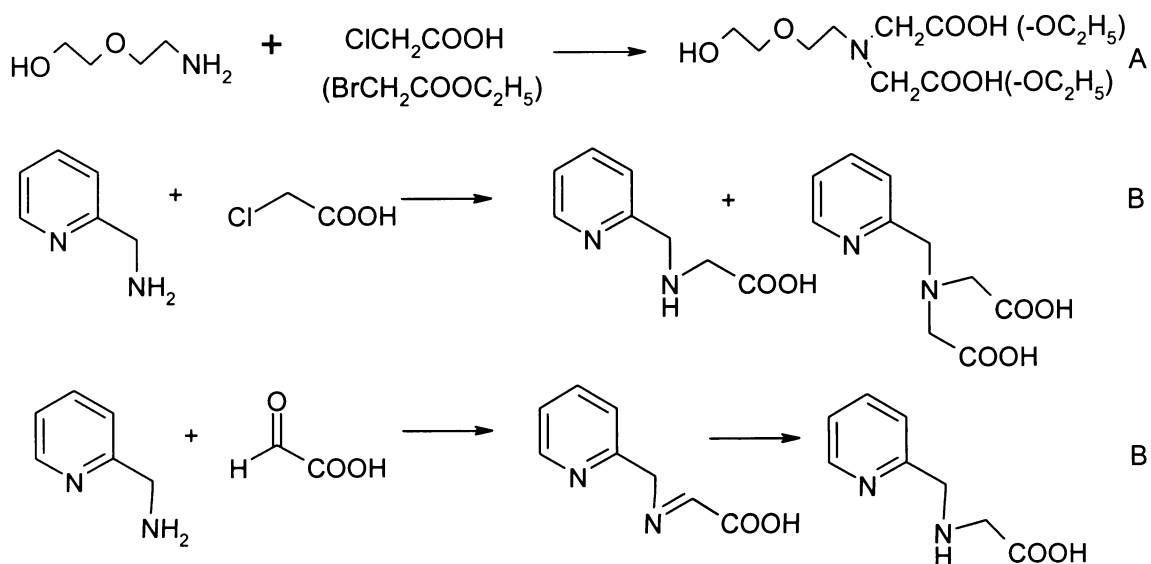
Pro realizaci prvního přístupu byly navrženy tyto nízkomolekulární sloučeniny: *N*-(2-hydroxyethoxy)ethyliminodioctová kyselina, 2-propanol-1,3 bis-iminodioctová kyselina, *N*-(2-hydroxyethyl)ethylendiamin, *N,N,N*-trioctová kyselina (HEDTA) a *N*-(2-pyridylmethyl)glycin. Jejich chemické struktury znázorňuje Schema 2.



Schema 2. Chemické struktury nízkomolekulárních látek určených k připojení na polymerní prekursor. A) *N*-(2-hydroxyethoxy)ethyliminodiacetová kyselina, B) *N*-(2-hydroxyethyl)ethylendiamin *N,N,N*-trioctová kyselina (HEDTA), C) 2-propanol-1,3 bis-iminodiacetová kyselina, D) *N*-(2-pyridylmethyl)glycin.

Jedná se o látky strukturně odvozené od kyseliny iminodiacetové s dobrými komplexačními charakteristikami pro kovové ionty. *N*-(2-hydroxyethoxy)ethyliminodiacetová kyselina (A) byla připravena z 2-(2-aminoethoxy)ethanolu buď ve formě kyseliny (reakcí s kyselinou chloroactovou) nebo jejího diethylesteru (reakcí s bromoactanem ethylnatým). Látka označená jako HEDTA (B) je komerčně dostupná. Pokus o syntézu další navržené sloučeniny, 2-propanol-1,3 bis-iminodiacetové kyseliny (C), která by obsahovala dvě chelatující skupiny na jednom řetězci spojujícím polymerní prekursor s chelatující funkcí, však selhal. Produkt měl být získán reakcí 1,3-dichlor-2-propanolu s kyselinou iminodiacetovou, případně jejím diethylesterem, v alkoholickém či vodně-alkoholickém prostředí. Průběh reakce byl sledován při různých teplotách, avšak reakční směs vždy obsahovala směs několika látek (detekce TLC) a jako majoritní byla vyizolována výchozí látka. Důvodem neúspěchu jsou pravděpodobně sterické efekty. Naopak *N*-(pyridylmethyl)glycin (D) patří mezi chelatující skupiny, které již byly pro modelové studie několika bílkovin metodou IMAC použity, mimo jiné též pro imunoglobuliny třídy IgG [40] (viz kapitola 2.3.). Autoři citované práce použili pro přípravu *N*-(2-pyridylmethyl)glycinu reakci 2-pikolylaminu (2-(aminomethyl)pyridin) s kyselinou chloroactovou, při níž však vzniká kromě požadované sloučeniny též dialkylovaný vedlejší produkt (kyselina *N*-(2-pyridylmethyl)iminodiacetová, cca 10 %). Navrhli jsme proto jiný, elegantnější způsob selektivní přípravy *N*-(2-pyridylmethyl)glycinu s využitím Schiffovy báze jako reaktivního intermediátu, která vzniká reakcí 2-pikolylaminu s kyselinou glyoxalovou, následovanou redukcí dvojnásobné vazby natriumborohydridem (Schema 3 B'). Celkový výtěžek této dvoukrokové syntézy byl však dosti nízký (10 %). Nicméně, v tomto případě lze použít i prvního zmiňovaného způsobu přípravy a modifikovat polymerní prekursor směsí *N*-(2-pyridylmethyl)glycinu s přidavkem *N*-(2-pyridylmethyl)iminodiacetové

kyseliny. Ta sice může reagovat s aktivovaným polymerním prekursorem za vzniku kvartérní soli, avšak ta je odstranitelná působením zásaditého prostředí (NaOH).

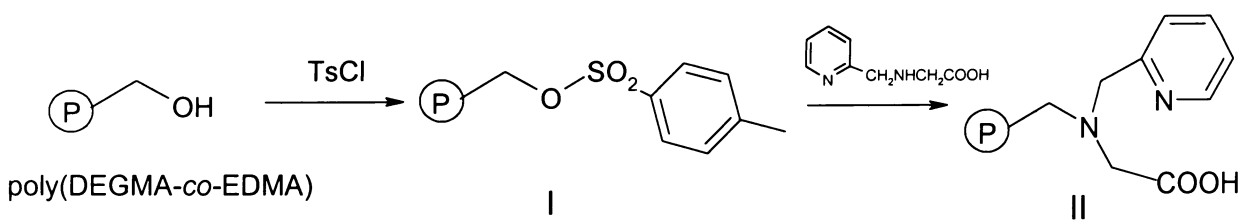


Schema 3. Příprava *N*-(2-hydroxyethoxy)ethyliminodiacetové kyseliny (a jejího diethylesteru) (A); *N*-(2-pyridylmethyl)glycinu: neselektivně (B), selektivně (B'). Reakční podmínky: (A) ve formě kyseliny: 1) pH 10-11, 135°C, 13 h, 2) pH 2,5, 25°C; ve formě diethylesteru: K₂CO₃, 25°C, 72 h, aq.-EtOH; (B) K₂CO₃, 60°C, 10 h, aq. (B') 1) benzen, reflux, 48 h, 2) NaBH₄, MeOH, 5 h, reflux.

Úspěšné byly tedy přípravy látek (A) a (D), látka (B) je komerčně dostupná.

Dalším krokem je připojení připravených nízkomolekulárních látek k polymernímu prekursoru. Možností je tosylování hydroxylových skupin buď polymerního prekursoru nebo nízkomolekulární látky na tosyloxyskupiny reakcí s tosylchloridem nebo jejich substituce na halogenderivát, případně převedení na alkoholáty v silně basickém prostředí.

K imobilizaci *N*-(2-pyridylmethyl)glycinu byla využita aktivace hydroxylových skupin polymerního prekursoru na snadno odstupující tosyloxyskupiny (Schema 4). Nejprve byla tedy hydroxyskupina kopolymeru poly(DEGMA-*co*-EDMA) tosylována za vzniku modifikovaného polymeru I. V dalším reakčním kroku byla navázána chelatující skupina za vzniku sorbentu II. Obsah navázaných chelatujících skupin byl zjišťován titrací přítomných acidobasických skupin (137±15 μmol/g nosiče), elementárním stanovením obsahu dusíku (150±10 μmol/g) a sorpcí kovových iontů (viz následující kapitola).

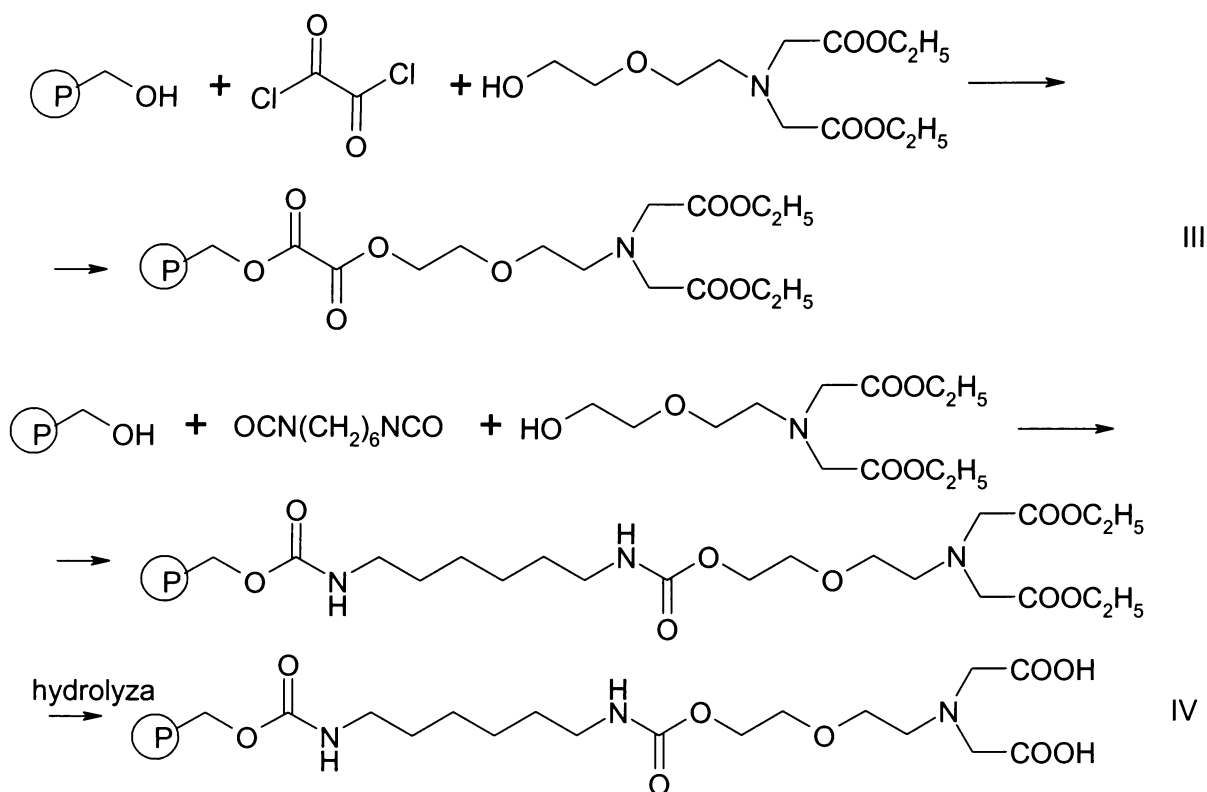


Schema 4. Dvoukroková imobilizace chelatující skupiny *N*-(pyridylmethyl)glycinu na kopolymerní poly(DEGMA-*co*-EDMA) částice. Reakční podmínky: krok 1: pyridin, DMAP, 25°C, 72h, krok 2: MeOH, 48h, reflux.

Pro připojení zbylých nízkomolekulárních látek (A a B) obsahujících hydroxylové skupiny na polymerní prekursor bylo použito spojovacího můstku. Aktivace hydroxylových skupin halogenací nebo přeměnou na alkoholát (ať již polymerního prekursoru či nízkomolekulární látky) zde totiž nebyly úspěšné; při přeměně na alkoholát v silně bazickém prostředí docházelo k poškození polymerního prekursoru (hydrolyze jeho vnitřních esterových skupin), při přeměně látek (A) a (B) (příp. jejich esterů) na halogenderiváty docházelo ke vzniku směsi produktů. K připojení byl proto použit nejprve reaktivní diacylchlorid-oxalylchlorid (Schema 5), ačkoli z hlediska reaktivity by byl nevhodnější fosgen. Ten byl však zavržen vzhledem ke své vysoké toxicitě. Jelikož je oxalylchlorid látka uvolňující chlorovodík při styku se vzdušnou vlhkostí, bylo potřeba používat zcela bezvodého prostředí. Připojení proto probíhalo za nepřístupu vzdušné vlhkosti v inertní atmosféře v jedné nádobě, kdy byly polymerní částice nejprve zreagovány s oxalylchloridem a poté s nízkomolekulární látkou. Vhodné reakční prostředí vytvářel dichlormethan. Tímto způsobem byl však úspěšně připojen pouze diethylester *N*-(2-hydroxyethoxy)ethyl iminodioxtové kyseliny (látka A ve formě diethylesteru) za vzniku modifikovaného polymeru III, který obsahoval 721 ± 10 μmol chelatujících skupin/g polymeru (zjištěno stanovením elementárního obsahu dusíku). V případě látek obsahujících volné karboxylové skupiny (A a B ve formě kyseliny) bylo problémem nalezení vhodného rozpouštědla a připojení s využitím oxalylchloridu jako spojovadla nebylo úspěšně provedeno.

Připravený modifikovaný polymer III sice obsahoval chelatující skupiny diethylesteru kyseliny iminodioxtové, které také patří mezi slabě chelatující činidla [122], avšak pro použití v IMAC bylo potřeba provést hydrolyzu koncových esterových skupin na formu kyseliny. Při hydrolytické reakci v alkalickém prostředí však docházelo též k narušení diacylového uskupení ve spojovacím řetězci mezi polymerním nosičem a chelatující skupinou, čímž se

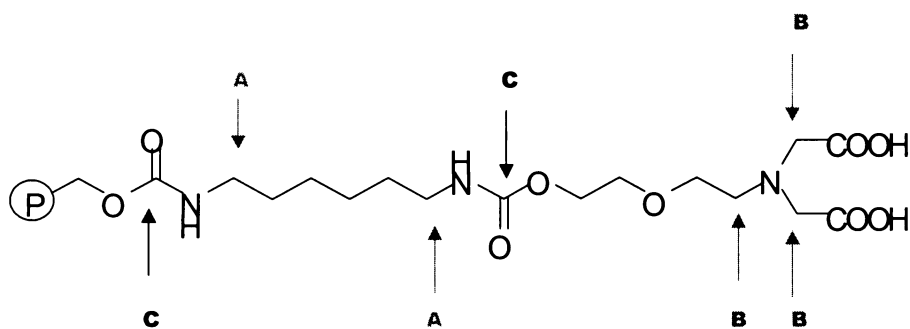
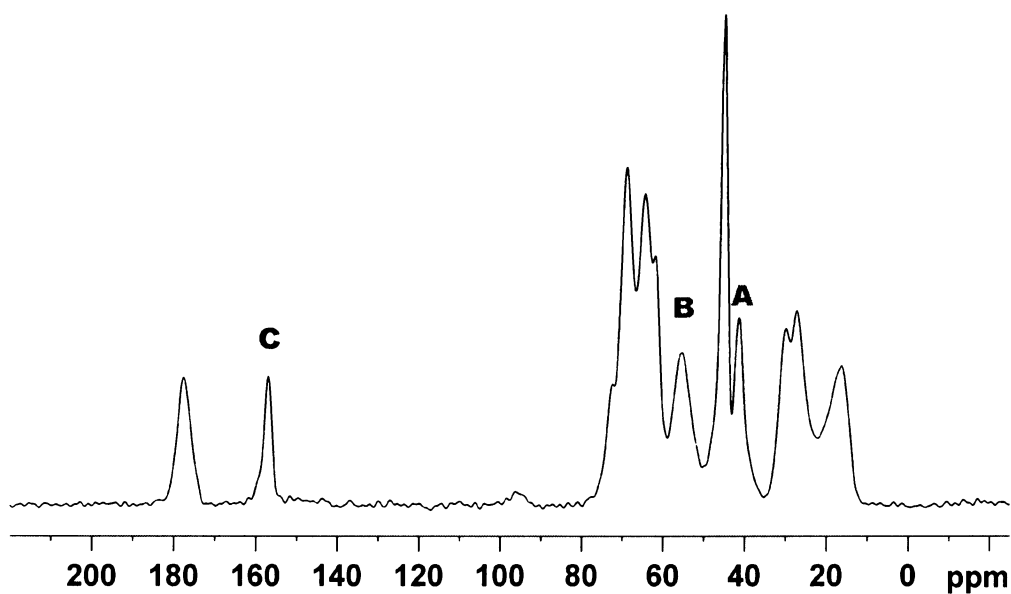
značná část chelatujících skupin odpojila z polymerního nosiče (hydrolyzou v 0,5 M NaOH při 60°C 8 hodin bylo množství chelatujících skupin sníženo na $\leq 20 \mu\text{mol/g}$).



Schema 5. Navázání diethylesteru *N*-(2-hydroxyethoxy)ethyliminodiacetové kyseliny na částice kopolymeru poly(DEGMA-*co*-EDMA) (ozn. P-CH₂-OH) s využitím buď oxalylchloridu za vzniku modifikovaného polymeru III nebo hexametylendiizokyanátu za vzniku modifikovaného polymeru IV. Reakční podmínky: příprava III: dichlormethan, reflux, 96 h; příprava IV: 1) dichlormethan, 60°C, 72 h, 2) (hydrolyza) 0,5 M NaOH, 60°C, 24 h, 3) 0,5 M HCl, 25°C, 2 h.

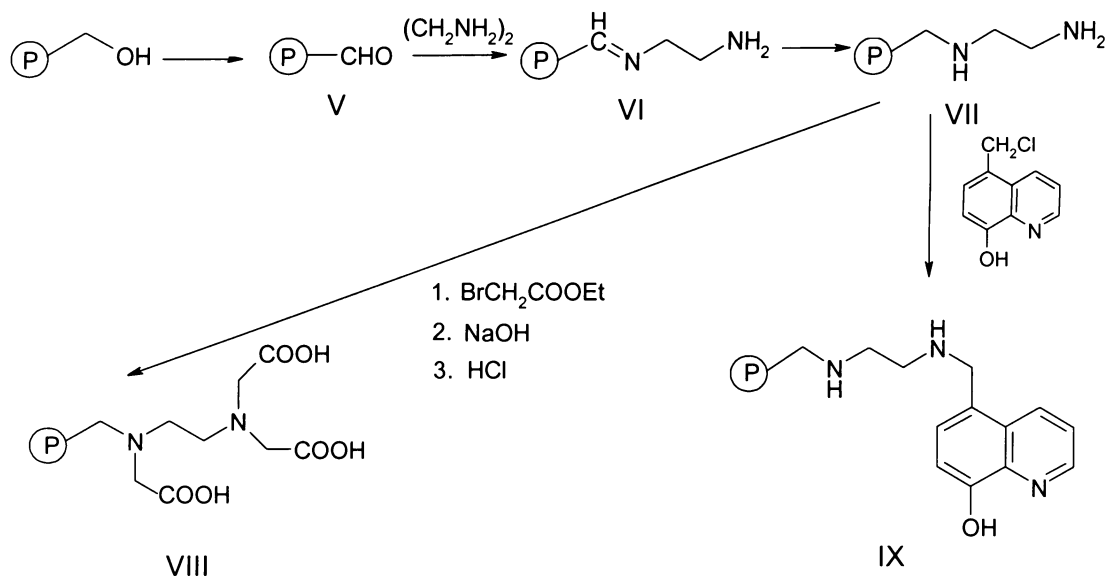
Funkci spojovacího můstku tedy zastal hexametylendiizokyanát poskytující vznik stabilních urethanových vazeb ve spojovacím řetězci (Schema 5). Po připojení diethylesteru *N*-(2-hydroxyethoxy)ethyliminodiacetové kyseliny na polymerní prekursor tímto způsobem byl připraven sorbent, jehož koncové esterové skupiny byly zhydrolyzovány v alkalickém prostředí tentokrát bez poškození spojovacího řetězce, čímž byl získán výsledný chelatující sorbent s chelatujícími skupinami kyseliny iminodiacetové označený jako IV. Obsah navázaných chelatujících skupin tohoto sorbentu byl stanoven sorpcí kovových iontů (viz následující kapitola). Titrační stanovení zde nebylo provedeno z důvodu přítomnosti dalších

acidobazických skupin ve spojovacím řetězci. Informaci o vzniku předpokládané struktury sorbentu IV zde poskytla též ^{13}C NMR spektra pevné fáze (Obr.8), v nichž je patrný charakteristický urethanový signál při 158 ppm a dále signály dvou typů $-\text{CH}_2-\text{N}-$ skupin.



Obr.8. ^{13}C CP/MAS NMR (10 kHz) sorbentu IV. Neoznačené signály přísluší $-\text{CH}_2-\text{O}-$ (60-78 ppm) a $-(\text{CH}_2)_6-$ (20-35 ppm) skupinám spojovacího řetězce a zbylým funkčním skupinám polymerního prekursoru $\{\text{CH}_3-$ (10-20 ppm), $\text{C}_{\text{kvar.}}$ (45 ppm) $-\text{CO}_2-$ (178 ppm) $\}$.

V další práci jsme se zabývali možnostmi kovalentního připojení chelatujících funkcí postupnou několikakrokovou modifikací hydroxylových skupin polymerního nosiče (Schema 6).



Schema 6. Postup imobilizace chelatujících skupin ethylendiamintriocetové kyseliny (VIII) a chinolin-8-olu (IX) na kopolymerní částice poly(DEGMA-*co*-EDMA) (ozn. P-CH₂-OH). Reakční podmínky: příprava V: DMSO, trifluoracetanhydrid, 25°C, 144 h; příprava VI: EtOH-benzen (1:1), 48 h, 110°C; příprava VII: NaBH₄, diglym, 18-crown-6, 48 h, reflux; příprava VIII: 1) K₂CO₃, 18-crown-6, DMSO, 48 h, reflux, 2) 0,5 M NaOH, 60°C, 48h; příprava IX: 1) Na₂CO₃, 18-crown-6, aq-EtOH (5:95), 12 h, 25°C, 2) 0,5 M HCl, 12 h, 25°C.

Nejdříve byla provedena oxidace hydroxylových skupin polymerního nosiče na aldehydové za vzniku modifikovaného polymeru (V), který byl v zápětí převeden reakcí s ethylendiaminem na modifikovaný polymer (VI) obsahující Schiffovu bázi. Vzniklá labilní dvojná vazba byla bezprostředně redukována natriumborohydridem za vzniku modifikovaného polymeru (VII) obsahujícího stabilní koncovou primární aminoskupinu. Alkylací modifikovaného polymeru (VII) bylo pak možné zavést různé chelatující skupiny, což bylo provedeno volbou těchto alkylačních činidel: bromoctanu ethylnatého a 5-(chlormethyl)chinolin-8-olu. Alkylací bromoctanem ethylnatým s následnou hydrolýzou jeho koncových esterových skupin byl získán sorbent s chelatující skupinou ethylendiamintriocetovou kyselinou (VIII), alkylací 5-(chlormethyl)chinolin-8-olem byla do

polymerního prekursoru zavedena chelatující skupina chinolin-8-ol (IX), která již byla v IMAC používána (viz Teoretická část, kapitola 2.3.).

Po každém modifikačním kroku kopolymerních částic poly(DEGMA-*co*-EDMA) byly v IČ spektrech patrné skeletální změny polymerního prekursoru, v nichž docházelo ke zřetelnému posunu valenční vibrace C-O skupiny od 1100 cm^{-1} směrem k nižším vlnočtům.

Po jednotlivých modifikačních krocích bylo provedeno stanovení stupně konverze. Kvantitativní stanovení množství aldehydových skupin na nosiči V po prvním modifikačním kroku bylo provedeno titrační metodou [111] založenou na reakci aldehydových skupin s roztokem hydrogensířičitanu sodného připraveného „in situ“ ($431\text{ }\mu\text{mol/g}$, konverze hydroxyskupin 8,3 %). Dosažená konverze polymerních hydroxyskupin v aldehydové na polymerech byla v souladu s literaturou [123].

Důkaz průběhu redukce Schiffovy báze modifikovaného polymeru VI za vzniku VII poskytla Ramanova spektra, která mohou spolehlivě vyloučit přítomnost dvojně vazby C=N; pás způsobený „stretching“ vibrací C=N skupiny v oblasti $1690\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ má totiž v Ramanových spektrech velkou intenzitu na rozdíl od infračervených spekter, kde intenzita této vibrace bývá slabá. Nepřítomnost pásu v uvedené oblasti Ramanových spekter polymeru VII naznačuje kvantitativní průběh redukce.

Obsah přítomných aminoskupin polymeru VII po redukci Schiffovy báze byl pak stanovován titrací sorbentu kys. chloristou v ledové kyselině octové podle Blumricha a Bandela [112] ($151\pm 7\text{ }\mu\text{mol/g}$) a elementárním stanovením obsahu dusíku ($143\pm 10\text{ }\mu\text{mol/g}$). Oba výsledky jsou ve velmi dobré shodě. Obě metody však poskytují informaci o celkovém obsahu aminoskupin v modifikovaném polymeru; množství koncových primárních aminoskupin nosiče VII tedy odpovídá poloviční hodnotě, $75\pm 8\text{ }\mu\text{mol/g}$ (17 %). Důkaz přítomnosti primárních aminoskupin v polymeru VII poskytují rovněž IČ spektra prokazující přítomnost „stretching“ vibrace vazeb N-H (pás při 3500 cm^{-1}).

Pro zjištění obsahu chelatujících skupin ethylendiamintriocetové kyseliny ve výsledném sorbentu VIII bylo využito acidobazické titrace přítomných karboxylových skupin. Hodnoty množství COOH skupin zjištěné přímou ($220\pm 20\text{ }\mu\text{mol/g}$) či nepřímou titrací ($239\pm 5\text{ }\mu\text{mol/g}$) jsou v dobré shodě. (Při nepřímé titraci je stanovováno množství hydroxidu sodného potřebného na přeměnu karboxylových skupin v disociovanou formu).

Množství navázaného chinolin-8-olu výsledného chelatujícího sorbentu IX bylo stanovováno pouze sorpcí kovových iontů (viz následující kapitola). Acidobazické titrace zde nelze využít jednak z důvodu rychlé hydrolyzy obou forem chinolin-8-olu [kyselé (hydrochlorid chinolin-8-olu) i bazické (sodná sůl chinolin-8-olu)] na chinolin-8-ol a jednak z důvodu přítomnosti dalších acidobazických skupin ve spojovacím řetězci (sekundární aminoskupiny).

5.2.3. Stanovení obsahu chelatujících skupin výsledných sorbentů sorpcí kovů

Jak vyplývá z předchozí kapitoly, v případě modifikovaných polymerů je situace oproti nízkomolekulárním látkám ztížena tím, že nelze používat metody charakterizace v roztoku, neboť zesíťovaný polymerní nosič je zcela nerozpustný. V případě výsledných chelatujících sorbentů však lze kromě spektrálních či analytických metod využít též jejich schopnosti komplexovat kovové ionty a množství chelatujících skupin tak stanovit množstvím komplexovaných kovových iontů. V této studii byly používány ionty Ni(II), Cu(II) a Fe(III), které patří mezi nejběžněji používané v IMAC. Obsah kovových komplexů daného kovu imobilizovaných v daném sorbentu byl zjišťován atomovou absorpční spektrometrií (AAS).

Studovány byly všechny dosud připravené výsledné chelatující sorbenty s označeními II, IV, VIII a IX (viz schemata 4-6 v předchozí kapitole 5.2.2.), tj. obsahující chelatující skupiny *N*-(2-pyridylmethyl)glycinu (II), kyseliny iminodioctové (IV), kyseliny ethylendiamintriocetové (VIII) a chinolin-8-olu (IX), všechny imobilizované na částicích poly(DEGMA-*co*-EDMA). Zjištěné hodnoty koncentrací komplexů iontů Ni(II), Cu(II) a Fe(III) s chelatujícími skupinami sorbentů byly porovnávány s hodnotami obsahu chelatujících skupin zjištěnými titračně (Tabulka 3).

Pro sorpci kovových iontů bylo zvoleno kyselé prostředí (pH 4.5). Pokud by totiž byla sorpce kovových iontů prováděna v prostředí neutrálním nebo mírně alkalickém, mohlo by při následném snížení pH dojít k částečnému uvolnění kovových iontů do roztoku. Při opačném postupu, tj. při změně pH z kyselého do zásaditého prostředí, se však koncentrace kovových komplexů téměř nemění, neboť bylo zjištěno, že nejméně 96 % kovových iontů při přechodu do alkalického prostředí stále zůstává ve formě komplexu imobilizovaného na polymerním nosiči (Tabulka 3). Je proto namístě se domnívat, že při dalším použití připravených sorbentů pro reverzibilní navázání bílkoviny metodou IMA a její zpětné vytěsnění ze sorbentu

klesajícím pH gradientem (8 → 4.5) nedochází (případně pouze nepatrně) k úniku kovového iontu ze sorbentu do roztoku.

(Pozn.: V případě FeCl₃ bylo pH pro sorpci sníženo na 2.7, čímž se lze vyvarovat hydrolyzy chloridu železitého.)

Tabulka 3. Charakteristika chelatujících sorbentů s nosičem poly(DEGMA-co-EDMA) ve formě kulovitých částic.

Sor-bent	Chelatující skupina		Množství koordinovaných iontů (μmol/g) ^b			Množství zbylých iontů v komplexu (%) při změně pH na 8 ^b		
	typ	koncentrace (μmol/g) ^a	Ni(II) pH 4,5	Fe(III) pH 2,7	Cu(II) pH 4,5	Ni(II)	Fe(III)	Cu(II)
II	<i>N</i> -(2-pyridylmethyl)glycin	137	144	29	145	95,7	99,6	99,7
IV	kys.iminodioctová	-	266	186	254	98,4	97,8	99,1
VIII	kys. ethylendiamin-trioctová	76	107	74	74	96,1	95,6	95,6
IX	chinolin-8-ol	-	109	66	82	98,7	95,4	99,7

^astanoveno acidobazickou titrací (±10 μmol/g)

^bstanoveno AAS (±5 μmol/g)

Jak je vidět ze získaných dat, pro různé ionty byly získány různé hodnoty koncentrací jejich imobilizovaných komplexů v polymerním sorbentu.

Chování sorbentu II s imobilizovanými chelatujícími skupinami *N*-(2-pyridylmethyl)glycinu (CP) lze vysvětlit na základě Pearsonova rozdělení kovů [11], které je diskutováno v Teoretické části práce (kapitola 2.2.); dusíkové atomy obsažené v *N*-(2-pyridylmethyl)glycinu předpovídají lepší afinitu k „hraničním“ kovovým kationtům, tj. Cu²⁺ a Ni²⁺ v porovnání s „tvrdým“ Fe³⁺, což souhlasí s experimentálně zjištěnými daty uvedenými v tabulce. Hodnotu 144 μmol/g lze tedy považovat za množství navázané CP chelatující skupiny. Získaný výsledek je v jisté shodě s hodnotou zjištěnou titračně (137±15 μmol/g) a hodnotou získanou elementárním stanovením obsahu dusíku (150±10 μmol/g).

Sorbent IV obsahuje chelatující skupinu kyselinu iminodioctovou tvořící s kovovými ionty středně silné komplexy a vykazující dobré komplexační charakteristiky pro všechny

studované ionty, především pak „hraniční“ Ni(II) a Cu(II), což je v souladu s experimentálně zjištěnými daty.

Pro imobilizované chelatující skupiny kyseliny ethylendiamintriocetové (sorbenť VIII) byl získán stejný výsledek po sorpci Fe^{3+} i Cu^{2+} ($74 \mu\text{mol/g}$), který je navíc v dobré shodě s výsledkem získaným titrací ($76 \pm 5 \mu\text{mol/g}$). Uvedená hodnota tedy odpovídá skutečnému množství chelatujících skupin na nosiči VIII. Vyšší hodnota získaná sorpcí Ni^{2+} ($107 \mu\text{mol/g}$) je zřejmě důsledkem faktu, že dochází k dodatečné tvorbě nikelnatých komplexů s ligandem $\text{R}_1\text{R}_2\text{-N-CH}_2\text{-COOH}$, tj. „substituovaným glycinem“, který je součástí molekuly chelatující ethylendiamintriocetové kyseliny a který rovněž tvoří komplexy s Ni^{2+} , nikoliv však s Fe^{3+} a Cu^{2+} . Lze tedy předpokládat nezávislou chelataci Ni^{2+} glycinovým a iminodioctovým seskupením v ethylendiamintriocetovém ligandu.

V případě sorbentu IX obsahujícího imobilizovaný chinolin-8-ol (8-HQ) jako chelatující skupinu je třeba vzít v úvahu, že jeho spojovací řetězec s pevným nosičem obsahuje chelatotvorný ethylendiamin. Celková hodnota imobilizovaného Ni^{2+} je tedy součtem chelatačních příspěvků chinolin-8-olu a ethylendiaminu. S Cu^{2+} však ethylendiamin tvoří komplexy pouze v zásaditém prostředí, zatímco chinolin-8-ol též v prostředí kyselém. Hodnota $82 \mu\text{mol/g}$ komplexovaného Cu^{2+} při pH 4.5 odpovídá tedy selektivní chelataci chinolin-8-olu vedle ethylendiaminu. Tato hodnota je navíc ve shodě se zjištěným množstvím alkylovatelných aminoskupin polymeru VII před alkylací ($75 \pm 8 \mu\text{mol/g}$), což naznačuje průběh alkylace aminoskupin sorbentu VII 5-(chlormethyl)chinolin-8-olem za vzniku sorbentu IX do prvního stupně (viz Schema 6). Kation Fe^{3+} tvoří rovněž selektivně komplex s chinolin-8-olem vedle ethylendiaminu, poněkud nižší hodnota jeho komplexovaného množství v porovnání s Cu^{2+} je zde však opět způsobena neúplnou sorpcí železa v souladu s Pearsonovou komplexační teorií měkkých a tvrdých iontů kovů.

5.2.4. Studium interakce připravených sorbentů s proteiny

Nikelnaté komplexy dané chelatující skupiny imobilizované na částicovém poly(DEGMA-co-EDMA) nosiči byly využity pro studium jejich afinity k imunoglobulinům s využitím principů metody IMAC v kolonovém uspořádání.

Výchozí surovinou pro aplikační studie byla tekutina hromadící se v dutině břišní (ascites) jako důsledek přítomnosti patogenu. V tomto případě byla použita myšičí tekutina obsahující

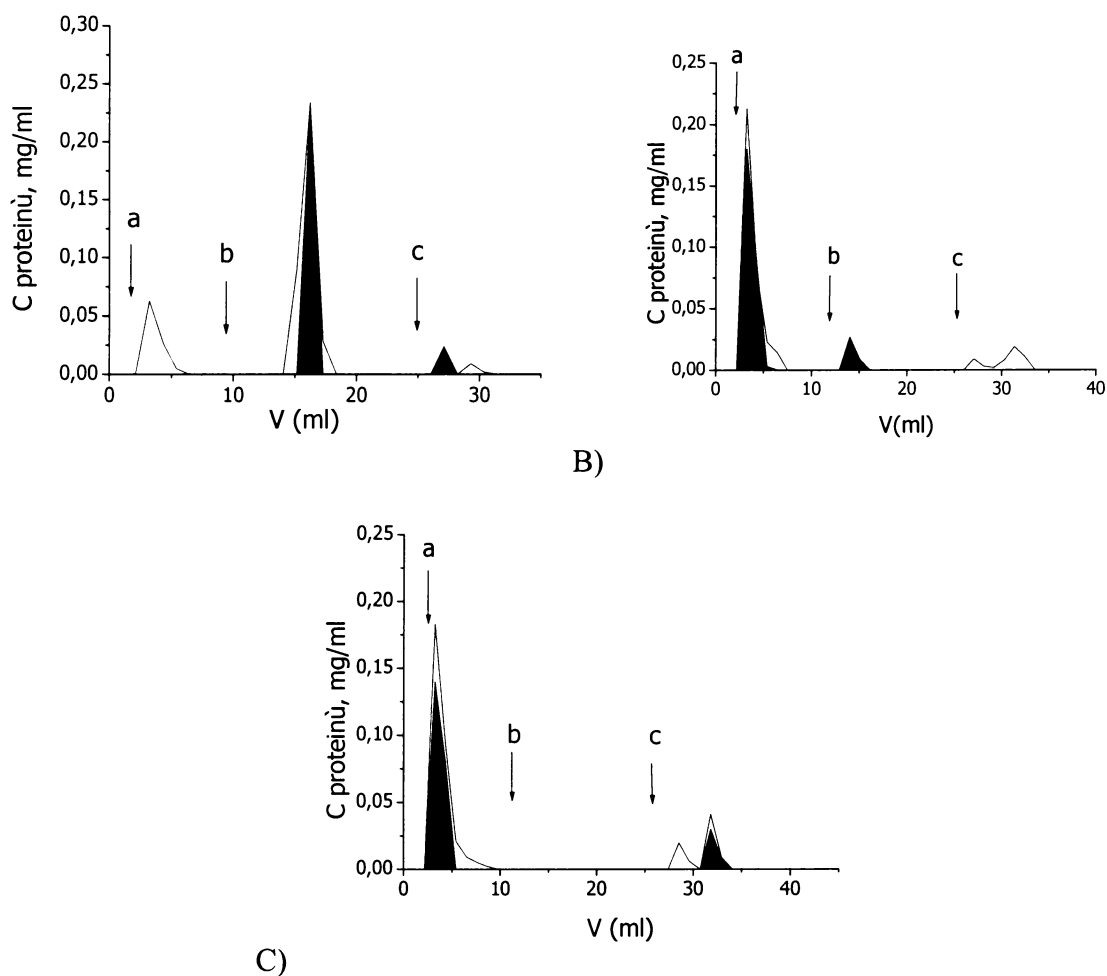
monoklonální imunoglobulin izotypu IgG₁, který byl specifický proti křenové peroxidáze (v dalším textu bude označen jako HRP-spec. IgG₁).

Sorpce bílkovinného roztoku na IMA sloupci pak probíhala v mírně zásaditém prostředí (pH 8), přičemž nezachycené proteiny byly pufrům o stejném pH odstraněny z mezičásticového prostoru kolony. Specificky navázané proteiny (zachycené na základě ligandové výměny v koordinační sféře kovu) byly vytěsněny ze sorbentu zpětnou elucí, kdy došlo k rozrušení reversibilní vazby kovový ion- IgG₁ buď klesajícím pH gradientem či použitím kompetitivního elučního činidla (imidazol).

Z předběžných pokusů provedených s ascitickou tekutinou, která byla před použitím v IMAC na připravených sorbentech předčištěna na DEAE celulóze podle [124], vyplynulo, že sorbent IV nezachycuje specificky žádnou ze složek bílkovinného roztoku a byl proto zhodnocen jako nevhodný pro použití v chromatografii IMA. Důvodem je pravděpodobně příliš dlouhý řetězec s 24 atomy spojující polymerní nosič s chelatující skupinou, který navíc obsahuje hydrofobní hexamethylenové uskupení, a který nejspíše zamezuje imobilizovanému komplexu v přístupu k vazebnému místu bílkoviny.

U zbylých sorbentů byl vyhodnocován vliv typu chelatujícího ligandu na jeho proteinovou sorpční selektivitu. Vzhledem k jejich nízké kapacitě pro vazbu proteinů byl pro další experimenty použit bílkovinný roztok obsahující 80 % HRP-spec. IgG₁ a 20 % příměsných proteinů (sérové proteiny a transferrin), který připravila firma Seva-Imuno (Praha) z téže, již zmiňované, myší ascitické tekutiny bioafinitní chromatografií podle [125].

Výsledky IMA chromatografie uvedeného bílkovinného roztoku znázorňují grafy závislosti množství eluovaných proteinů na objemu roztoku vyteklého z chromatografického sloupce (Obr.9). Pro kvantitativní zjištění obsahu HRP-spec IgG₁ v jednotlivých elučních pících bylo využito imunologického testu ELISA (enzyme-linked immunosorbent analysis) (provedla fa. Seva-Imuno), který dává pozitivní reakci pouze se specifickým HRP-spec.IgG₁, nikoli s doprovodnými proteiny.



Obr. 9. Interakce HRP-specifického IgG₁ (čistota 80%) v IMA chromatografii na sorbentech s imobilizovanými nikelnatými komplexy chinolin-8-olu (A), ethylendiamintriocetové kyseliny (B) a *N*-(2-pyridylmethyl) glycinu (C) (2 ml zbotn. sorbentu). Šipky označují změnu elučního činidla při daném objemu; (a) Vytěsnění nezachycených proteinů promývacím pufrem (0,05 M fosforečnan draselný v 0,5 M NaCl, pH 8) z mezičásticového prostoru. (b) a (c) Eluce navázaných proteinů pH gradientem (6→4,5) (b) a imidazolovým koncentračním gradientem (0,05-0,1 M) (c). Prázdné plochy odpovídají celkovému obsahu proteinů vytěsněných z kolony (zjištěno spektrofotometricky), vyplněné plochy odpovídají obsahu HRP-spec.IgG₁ v elučních frakcích (zjištěno ELISA titrací).

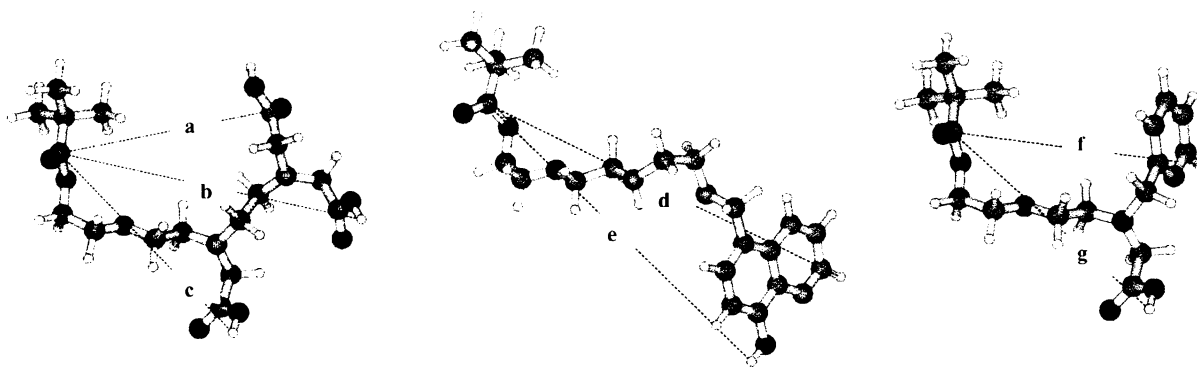
Největší sorpční kapacita i selektivita pro studovaný HRP-spec IgG₁ byla zaznamenána pro sorbent IX s chinolin-8-olem jako chelatující skupinou (Obr.9A). První pík v chromatogramu tvoří doprovodné proteiny, neboť test ELISA byl negativní. Tyto proteiny neinteragují s uvedeným sorbentem a byly vytěsněny již promývacím pufrem (pH 8). HRP-spec IgG₁ byl kvantitativně navázán a specifické interakce se sorbentem byly pak rozrušeny klesajícím pH gradientem. Pouze malá část HRP-spec IgG₁ (~ 10 %) byla vytěsněna imidazolovým koncentračním gradientem. Můžeme předpokládat, že tato část specifického

IgG₁ (může se jednat buď o fragmenty s menší molekulovou hmotností, případně o deaminovanou formu IgG₁ vlivem deamináz při určitém pH) pronikla hlouběji do povrchových vrstev sorbentu nebo byla pevněji vázána na Ni²⁺ komplexy.

Zbylé dva sorbenty mají pro cílový protein mnohem menší afinitu (Obr. 9 B,C), neboť pouze jeho malá část (v obou případech cca 12 %) byla na tyto sorbenty navázána, většina byla vytěsněna již promývacím pufrem. Navázaný HRP-spec.IgG₁ byl pak ze sorbentu s imobilizovanými komplexy Ni²⁺-ethylendiamintriocetová kyselina vytěsněn při pH 5,5 a ze sorbentu s imobilizovanými komplexy Ni²⁺-*N*-(2-pyridylmethyl)glycin imidazolovým koncentračním gradientem.

Pozorované chování HRP-spec.IgG₁ ke studovaným sorbentům je v souladu se skutečností, že chinolin-8-ol tvoří pevné komplexy s kovovými ionty, které dále ovlivňují též sílu interakce v ligandové výměně [9]. V našem případě se tato vlastnost projeví větší afinitou i selektivitou komplexů Ni²⁺-chinolin-8-ol k cílovému HRP-spec. IgG₁ v porovnání s Ni²⁺ komplexy zbylých dvou chelatujících skupin. Je však třeba vzít v úvahu, že pro jiné proteiny může silná interakce s kovovými komplexy chinolin-8-olu mít za následek požadavek použití silnějšího eluční činidla způsobujícího případnou denaturaci proteinu. Afinitu i kapacitu reversibilně navázaného proteinu na kovovém komplexu dále ovlivňuje též biologické prostředí či jeho koncentrace v roztoku (viz příklady v kapitole 2.4.2.1., str. 26). Bez povšimnutí nemůže zůstat ani nedávno odhalený fakt [34], že chinolin-8-ol může projevovat vlastnosti bioligandu (podrobněji viz kapitola 2.3., str.13). Z uvedených skutečností vyplývá, že v souvislosti s IMAC nepříliš prozkoumaná chelatující skupina chinolin-8-ol může skrývat další možnosti využití.

V našem případě může roli v selektivitě i v kapacitě daného sorbentu pro studovaný protein hrát též geometrie chelatujících skupin ovlivňující dostupnost pro vazbu s proteinem, která byla vyhodnocena s využitím kvantově mechanických výpočtů provedených v MNDO formátu s použitím programové sady Gaussian 98 (Obr. 10). Vzdálenost kovového komplexu od polymerního prekursoru je přibližně 15 Å pro chinolin-8-ol, zatímco pro zbylé dvě chelatující skupiny je tato vzdálenost asi o třetinu menší (cca 10 Å). Pro molekulu HRP-spec.IgG₁ ($M_w \sim 162\ 000$) o délce 12 nm může být vzdálenost 15 Å a lepší flexibilita spojovacího řetězce spojujícího 8-HQ s nosičem „šikovnější“ pro její imobilizaci na sorbent.



Obr.10. Geometrické modely získané počítačovou simulací v programu Gaussian 98 udávající prostorovou orientaci chelatujících skupin ethylendiamintriocetové kyseliny, chinolin-8-olu a *N*-(pyridylmethyl) glycinu (zleva doprava). Meziatomové vzdálenostmi (uvedeny v angstretech) mezi karboxylovým uhlíkem polymerního nosiče a koncovými atomy chelatujících skupin odpovídají: a =9,001, b =12,159, c =9,805, d =15,551, e =14,618, f = 8,865 a g = 9,973.

Ze získaných elučních křivek na Obr.9 je dále zjevné, že proteiny jsou ze všech sorbentů eluovány ve vysoké koncentraci v úzkém rozmezí objemů a pH, což je patrné ze strmých píků. Předností sorbentů je tedy dobrá kinetika, což je jedna z výhod použitého polymerního nosiče. Zde totiž nedochází k difuzi do pórů jako je tomu u porézních sorbentů, v jejímž důsledku dochází k rozšiřování elučních píků.

Další výhodou použitého polymerního nosiče je jeho vysoká hydrofilita, díky níž nedochází k nescifickým sorpcím na chelatující sorbenty, neboť ze všech sorbentů II, VIII i IX byly proteiny kvantitativně získány zpět elucí.

Nevýhodou sorbentů je, jak již bylo zmíněno, nízká kapacita pro navázání proteinů, což omezuje jejich použití pouze pro analytické účely. Sorbenty II, VIII a IX sice využívají svých imobilizovaných nikelnatých komplexů pro ligandovou výměnu molekul vody ve své koordinační sféře za proteiny, nicméně jen jejich malá část je pro ligandovou výměnu přístupná. Zjištěné kapacity chelatujících sorbentů II, VIII a IX pro specifické navázání proteinů jsou totiž o několik řádů nižší (cca 10^{-3} $\mu\text{mol}/\text{ml}$ zbotnalého sorbentu), než bychom mohli očekávat vzhledem k objemovým koncentracím komplexů Ni(II)-chel. skupina (řádově 10^1 - 10^2 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ zbotnalého sorbentu). Důvodem špatné dostupnosti kovových komplexů pro ligandovou výměnu je zřejmě homogenní charakter polymerního nosiče, v němž jsou pro navázání objemných bílkovinných molekul pravděpodobně přístupné pouze Ni^{2+} -IDA komplexy imobilizované na povrchu polymeru a v dostupných místech pod povrchem.

5.2.5. Souhrn výsledků kapitoly 5.2.

Lze konstatovat, že hydrofilní polymer poly(DEGMA-*co*-EDMA) ve tvaru kulovitých částic o průměru 11-60 μm lze po modifikaci použít jako nosiče v IMAC pouze pro analytické účely. Sorbentu s imobilizovaným nikelnatým komplexem chinolin-8-olu [poly(DEGMA-*co*-EDMA)-HQ-Ni²⁺] lze použít pro dočištění analytického množství specifického IgG₁ proti křenové peroxidáze od příměsi degradačních produktů a kontaminantů. Na tomto sorbentu byl zmíněný imunoglobulin specificky zachycen a vytěsněn klesajícím pH. Kvůli neporéznímu charakteru polymerního nosiče vykazují všechny sorbenty sice malou kapacitu pro specifickou imobilizaci proteinů, ale zároveň vysokou separační účinnost díky jeho dobrým kinetickým vlastnostem, což se odrazí ve tvaru elučních píků, které jsou úzké a ostré.

Chelatující skupiny jsou na polymer zaváděny chemickými modifikacemi, jejichž meziprodukty i konečné produkty jsou spolehlivě charakterizovatelné. Jelikož modifikační reakce probíhají na polymerech obecně vždy pomaleji a s nižšími výtěžky než na nízkomolekulární úrovni, lze množství navázaných skupin po jednotlivých stupních považovat za uspokojivé. Pokud bylo množství skupin stanovováno různými způsoby, jsou získané hodnoty ve velmi dobré shodě. Stabilita kovových komplexů chelatujících skupin při změně pH z kyselé (pH 4.5, resp. 2.7 pro Fe³⁺ komplexy) do alkalické (pH 8) oblasti je vysoká.

Výsledky práce popsané v této kapitole byly publikovány v *React. Funct. Polym.* 56, 27–35 (2003).

5.3. Sorbenty založené na terpolymerních částicových nosičích

5.3.1. Částice poly[glycidyl-methakrylát-*co*-diethylenglykol-methakrylát-*co*-ethylen-dimethakrylátu] [poly(GMA-*co*-DEGMA-*co*-EDMA)]

5.3.1.1. Příprava a charakteristika částic poly(GMA-*co*-DEGMA-*co*-EDMA)

V případě terpolymerních poly(GMA-*co*-DEGMA-*co*-EDMA) částic byla pozornost zaměřena na vyhodnocení vlivu jejich porézní struktury, především pak objemu pórů a velikosti specifického povrchu v ligandově výměnné chromatografii na imobilizovaných kovových iontech. Za tímto účelem byla připravena série terpolymerních částic, které měly velice podobné složení hmoty, avšak lišily se typem porézní struktury.

Ternární kopolymerace a zpracování výsledného kopolymeru byla provedena způsobem analogickým jako u binárního systému. Přídavkem třetí komponenty do polymerační směsi však dochází ke změně podmínek separace fází v polymerující částěčce a tím může dojít ke změně struktury gelu. Velikost této změny je dána rozdílem solvatační schopnosti základního systému monomerů a systému s třetím monomerem.

Vhodným stabilizátorem suspenze byl opět hydroxid hořečnatý [120]. Pro srovnání byl použit též hydroxid hlinitý, jehož stabilizací však vznikaly částice příliš velkého průměru (v řádu mm) (Tab. 4); hydroxid hořečnatý zajistil za určitých podmínek (Tab. 5 a 6) vznik kulovitých částic s průměrem vhodným pro použití v ligandově výměnné chromatografii. Pro vysolení vodorozpustného monomeru DEGMA byl použit chlorid sodný nebo síran amonný.

Tabulka 4. Příprava částic poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) s použitím Al(OH)₃ jako stabilizátoru suspenze a (NH₄)₂SO₄ pro vysolení DEGMA. Porogen: 2-methylpropyl-acetát.

Množství stabilizátoru (hm %)	Množství soli (hm %)	Porogen/monomery (v/v)	Charakteristika terpolymeru		
			epoxy sk. (mmol/g)	tvar částic homogenita/heterogenita	přibližná velikost částic
1,8	25	1 : 1	4,19	elipsoidy/heterogenní	0,1-0,3 mm
1,8	12,5	1 : 1	3,74	elipsoidní a nepravidelné heterogenní	1 mm
1,8	25	1 : 1	2,47	kulovité/heterogenní	1,5-2 mm
3,3	50	0 : 1	3,48	tvrdá krusta	
1,8	25	1 : 1	3,24	nepravidelné částice heterogenní	0.5-1 mm

Tabulka 5. Příprava částic poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) s použitím Mg(OH)₂ jako stabilizátoru suspenze a (NH₄)₂SO₄ pro vysolení DEGMA. Porogen: 2-methylpropyl-acetát.

Množství stabilizátoru (hm %)	Množství soli (hm %)	Porogen/monomery (v/v)	Charakteristika terpolymeru		
			epoxy sk. (mmol/g)	tvar částic homogenita/heterogenita	velikost částic (μm)
1,8	12,5	0 : 1	3,02	Homogenní vlákna, žádné kuličky	-
1,8	25	1 : 1	2,88	heterogenní, kulovité až elipsoidní	100-350
1,4	25	1 : 1	2,85	heterogenní, kulovité	100-400
1,4	50	1 : 1	-	Nepravidelné shluky	-

Tabulka 6. Příprava terpolymerů poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) s použitím Mg(OH)₂ jako stabilizátoru suspenze a NaCl pro vysolení DEGMA. Porogen: 2-methylpropyl-acetát.

Množství stabilizátoru (hm %)	Množství soli (hm %)	Porogen/monomery (v/v)	Charakteristika terpolymeru		
			epoxy sk. (mmol/g)	tvar částic homogenita/heterogenita	velikost částic (μm)
1,8	25	0 : 1	2,88	homogenní, kulovité	100-350
1,4	25	0 : 1	3,08	homogenní, kulovité	100-350
1,8	25	1 : 1	3,02	heterogenní, kulovité	100-350
1,4	25	1 : 1	3,04	heterogenní, kulovité	100-325
1,8	25	1,5 : 1	2,94	heterogenní, kulovité	100-350
1,4	25	2 : 1	3,15	heterogenní, kulovité	100-350
1,4	25	3 : 1	3,08	heterogenní, nepravidelné	100-350

Nejlepších výsledných polymerů bylo dosaženo s použitím kombinace koloidního hydroxidu hořečnatého jako stabilizátoru, chloridu sodného jako vysolovacího činidla a izobutyl-acetátu jako porogenu. Tyto terpolymery byly prostudovány podrobněji a budou v dalším textu označeny podle stoupající porozity symboly P-1 až P-6. V Tabulce 5 jsou pak zřehledněny jejich vlastnosti (distribuce velikosti částic, hustota, specifický povrch, objem pórů, distribuce velikosti pórů a procentuální porozita udávající poměrný objem zaujímaný póry). Je však nutné zdůraznit, že vysoce porézní terpolymerní částice P-6 již zcela postrádaly pravidelný kulovitý tvar a vzhledem ke svým nevhodným hydrodynamickým parametrům při použití jako náplně v chromatografické koloně nebyly pro aplikační studie používány. (Pozn. Částice P-1 a P-1' se lišily koncentrací stabilizátoru při jejich přípravě-1,4 hm. % a 1,8 hm. % pro P-1 a P-1').

Tabulka 7

Charakteristika terpolymerních částic poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) připravených s použitím Mg(OH)₂ jako stabilizátoru suspenze a 2-methylpropyl-acetátu jako porogenu.

Polymer	Průměr částic	Obsah epoxy-skupin ^a	hustota částic ^b	Celkový		Objem			Porozita ^d
				specifický povrch ^c	objem pórů ^d	mesoporů ^d	makropórů ^d	voidů ^d	
				μm	mmol/g	g/cm ³	m ² /g	cm ³ /g	
P-1'	100-350	2,88	1,33	0,03	0	0	0	0	0
P-1	100-350	3,08	1,33	0,03	0	0	0	0	0
P-2	100-350	3,02	1,32	0,26	0,035	0	0	0	2,5
P-3	100-325	3,04	1,29	0,20	0,059	0	0	0	4,3
P-4	100-350	2,94	1,27	9,78	0,085	0,037	0	0	6,1
P-5	100-350	3,15	1,18	3,49	0,690	0,222	0,314	0,090	44,8
P-6	-	3,08	1,17	1,30	1,39	0,05	1,08	0	76,1

^a stanoveno z IČ spekter (± 0,3)

^b stanoveno pyknometricky (± 0,07 g/cm³)

^c stanoveno B.E.T. experimentem

^d stanoveno rtuťovou porosimetrií – celkový objem pórů zahrnuje objemy mikropórů s průměrem 5-20 nm, mezopórů s průměrem 20-300 nm, makropórů s průměry 300-2500 nm a "voidů" s průměrem 2,5-20 μm.

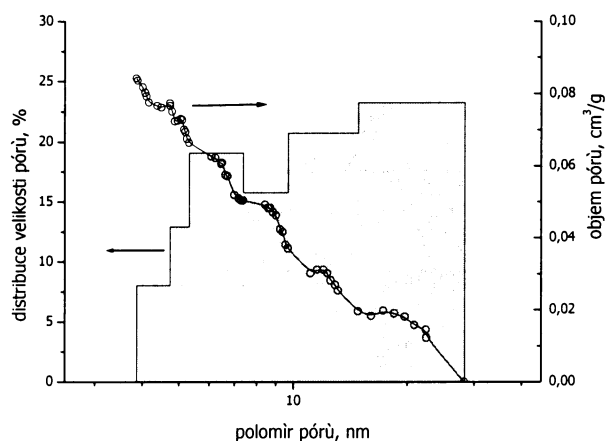
Podobné hodnoty hustoty hmoty částic pro všechny terpolymerní částice (stanoveno pyknometricky), které se pohybovaly v rozmezí 1,18-1,33 g/cm³, svědčí o tom, že ve všech případech byly získány částice s velmi podobným chemickým složením hmoty. Dále lze předpokládat, že složení hmoty polymeru se proporcionálně shoduje s poměrem složek v monomerní směsi, neboť se jedná o monomery strukturně podobné (všechny jsou deriváty kyseliny methakrylové) a kompozice polymerní struktury je tedy tvořena náhodným zabudováváním monomerních jednotek do polymeru, tj. předpokládáme v souladu s literaturou [72,121], že kopolymerizace ternárního systému probíhá podobně jako pro binární systém ideálně. Velmi podobné chemické složení terpolymerů bylo potvrzeno též pomocí IČ spekter vyhodnocením kvantitativního množství epoxidových skupin z píku při 907 cm⁻¹ [110], které odpovídá množství zakomponovaných glycidylmethakrylátových jednotek do polymerní matrice. Pro všechny studované terpolymery se množství epoxyskupin pohybovalo kolem hodnoty 3 mmol/g, což dokazuje, že přibližně ¾ monomeru GMA přítomného v monomerní směsi se podílela na vzniku polymerní struktury.

Pokud je do polymerní směsi přidáno rozpouštědlo generující póry (porogen), získané částice mají heterogenní strukturu způsobenou přítomností těchto pórů. Ačkoli je velikost pórů primárně určena koncentrací porogenu v monomerní směsi, výslednou porézní strukturu ovlivňují též další parametry, kterými jsou například množství síťovadla nebo iniciátoru polymerizace [64]. V případě přípravy poly(GMA-*co*-DEGMA-*co*-EDMA) však poslední dva zniňované parametry měněny nebyly. Kromě množství porogenu byla případně měněna pouze koncentrace stabilizátoru suspenze (např. polymer P-1'). Poměry ostatních reakčních komponent zůstaly zachovány. V nepřítomnosti porogenu v polymerizační směsi byly získány neporézní transparentní gely (terpolymery P-1 a P-1'), přítomnost porogenu pak vedla ke vzniku nízkoporézních (terpolymery P-2 a P-3), v případě vyššího obsahu porogenu porézních částic (terpolymery P-4, P-5 a P-6). Vhodným porogenem pro přípravu porézních poly(GMA-*co*-DEGMA-*co*-EDMA) částic byl izobutyl-acetát, který byl již použit jako porogen pro podobné systémy [126]. Použití směsi cyklohexanolu a dodekan-1-olu (9:1), běžně užívaného porogenu pro přípravu porézních kopolymerních poly(GMA-*co*-EDMA) částic [72,127,128], nevedlo v případě přípravy poly(GMA-*co*-DEGMA-*co*-EDMA) k lepším výsledkům (Tabulka 8).

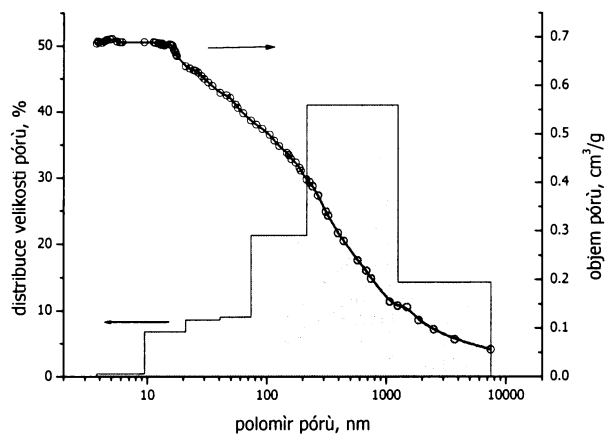
Tabulka 8. Příprava a charakteristika terpolymerů poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) s použitím směsi cyklohexanol- dodekan-1-olu (9 : 1) jako porogenu.

Množství stabilizátoru (hm.%) Mg(OH) ₂	Množství soli (hm.%) NaCl	Poměr (v/v) porogen/ monomery	Charakteristika terpolymeru			
			Množství epoxy sk. (mmol/g)	Tvar částic	Spec. povrch (m ² /g)	Přibližná velikost částic (μm)
1,8	25	1 : 1	3,09	kulovitý až elipsoidní	0,71	většina 200-400; asi ¼ 20-100
1,8	25	1,5 : 1	2,58	kulovitý a nepravidelný	2,98	150-350
1,4	25	2 : 1	3,23	nepravidelný	1,20	100-400

Jak již bylo zmíněno, celkový objem pórů terpolymerů určující hodnotu procentuální porozity a distribuce velikostí pórů byly zjišťovány rtuťovou porozimetrií. Získaná data pro dále studované porézní terpolymery P-4 a P-5 jsou zobrazena na Obr. 11, z nichž je patrné, že terpolymer P-5 s celkovou porozitou 45 % obsahuje velké póry; hlavními póry v polymerní matrici jsou makropóry s průměrem 300-2500 nm a mezopóry s průměry 20-300 nm, které dohromady tvoří 91 % celkového objemu pórů. Z grafu je dále zřejmé, že jsou přítomny též velmi objemné póry až do 20 μm v průměru (tvořící cca 14 % celkového objemu pórů), označované někdy v literatuře jako tzv. “voidy” (voids). Pro přítomnost takovýchto objemných pórů není měření rtuťovým porozimetrem jednoznačným důkazem jejich přítomnosti v polymeru, neboť již mohou splývat s mezičásticovým prostorem. Rastrovací elektronová mikroskopie (Obr.12) však potvrdila, že póry s velikostí 20 μm v průměru jsou v částicích P-5 opravdu přítomny. V porovnání s porézním terpolymerem P-4 má však tento polymer relativně malý specifický povrch (3,5 m²/g). Naopak polymer P-4, který obsahuje póry spíše menší velikosti, má specifický povrch ve srovnání s P-5 téměř třikrát větší (9,78 m²/g). Jeho porézní strukturu vytvářejí mezopóry s průměrem 20-58 nm tvořícím 43 % celkového objemu pórů a mikropóry s průměrem menším než 20 nm (Obr. 11a).

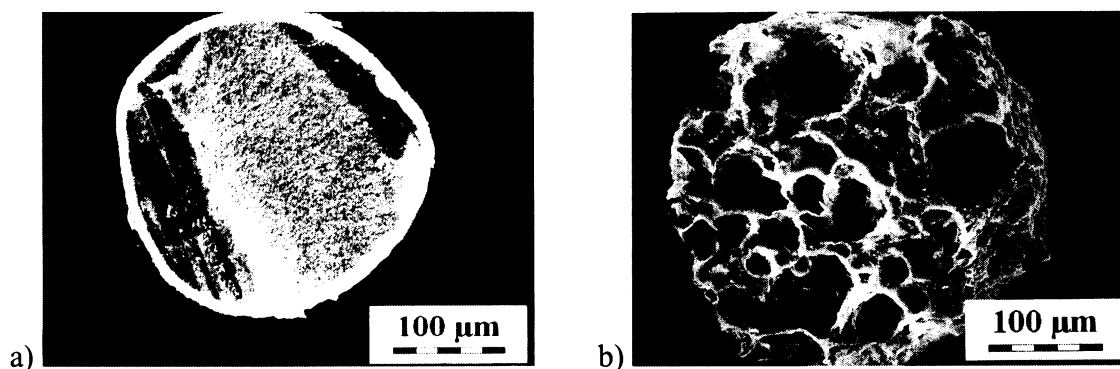


a)



b)

Obr. 11. Závislosti distribuce velikosti pórů a objemu pórů na poloměru pórů terpolymerů P-4 (a) a P-5 (b) (měřeno na rtuťovém porozimetru-225 Carlo Erba Strumentazione).



Obr. 12. Příčné řezy porézními terpolymerními poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) částicemi P-4 (a) a P-5 (b). Smínky byly získány na rastrovacím elektronovém mikroskopu Vega Tescan.

Další charakteristikou terpolymerních částic je botnavost v rozpouštědlech (Tabulka 9). Roztažnost polymerní sítě ovlivňuje přístupnost epoxidových skupin přítomných v polymerním nosiči při reakci s modifikačním činidlem. Na základě botnavosti lze potom volit vhodné rozpouštědlo pro modifikaci terpolymerních částic s cílem zavést požadované množství funkčních skupin do polymeru. V souladu s literaturou [64,65] byla botnavost vyjádřena jako poměrná změna objemu (q_v) nebo hmotnosti (q_w) ve zbotnalém a v suchém stavu s použitím rovnice 4:

$$q_w = W_{sw}/W_{dry}; q_v = V_{sw}/V_{dry} , \quad (4)$$

kde W_{sw} , W_{dry} a V_{sw} , V_{dry} jsou hmotnosti a objemy terpolymerních částic uvedené v rovnováhu s rozpouštědlem a v suchém stavu.

Na základě zjištěných hodnot q_v , které jsou pro většinu studovaných rozpouštědel blízké jedné, lze usoudit, že v polymerní síti v důsledku relativně vysokého stupně zesítnění (15%) téměř nedochází k napínání sítě a částice tudíž nemění příliš svůj objem. Jedná se tedy o spíše rigidní, málo stlačitelné částice, které jsou vhodné pro použití jako náplně pro kolonové chromatografie i za vyšších tlaků. Pouze v případě dimethylformidu (DMF) byla zaznamenána výraznější změna objemu po nabotnání. Toho bylo využito při zavádění chelatajících skupin do polymeru, kdy přítomnost DMF zajistila lepší přístupnost modifikačního činidla dostatečným roztažením polymerní sítě (viz následující kapitola).

Tabulka 9. Hodnoty relativních změn objemu (q_v) a hmotnosti (q_w) po zbotnání polymerní sítě neporézních poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) částic.

rozpouštědlo	voda	metanol	etanol	propan-1-ol	DMF	aceton	ethylacetát
q_v	1,1	1,1	1,1	1,1	1,4	1,2	1,2
q_w	1,1	1,3	1,4	1,1	1,4	1,3	1,3

V případě porézních terpolymerů je množství pohlceného rozpouštědla dáno také zádrží rozpouštědla v pórech. Proto byla pro terpolymerní částice s porézní strukturou zvolena (opět v souladu s literaturou [63-65]) další veličina označovaná jako „sorption-expansion balance“, $H = q_w / q_v$, která vyjadřuje podíl relativní změny hmotnosti ku relativní změně objemu po a

před zadržím rozpouštědla. Její hodnota vyjadřuje schopnost daného terpolymeru zadržovat dané rozpouštědlo v pórech.

Tabulka 10. Vyhodnocení zadržím rozpouštědla v závislosti na porozitě poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) částic s použitím parametru $H = q_w / q_v$ vyjadřujícího poměr relativních změn objemu (q_v) a hmotnosti (q_w) po a před uvedením do rovnováhy s rozpouštědlem.

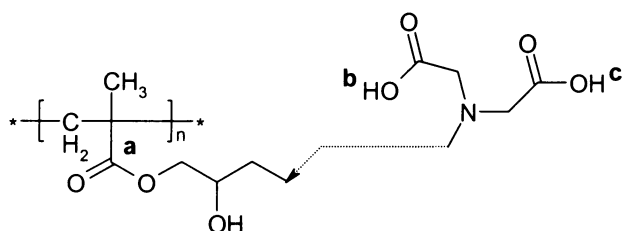
vzorek		P-1	P-3	P-5	P-6
Porozita, %		0	4	45	76
Specifický povrch, m ² /g		0,03	0,20	3,49	1,3
<i>H</i>	voda	1,0	1,1	1,9	3,1
	metanol	1,2	1,1	1,8	3,7
	etanol	1,3	1,2	1,7	3,2
	propan-1-ol	1,0	1,2	1,8	3,3
	DMF	1,0	1,1	2,0	3,9
	aceton	1,1	1,1	1,5	2,8
	etylacetát	1,1	1,2	1,3	2,9

Jak je uvedeno v Tabulce 10, hodnota *H* se podle předpokladu pro všechna studovaná rozpouštědla se zvyšující se porozitou zvyšuje. Stoupající porozita tedy znamená větší množství zadrženého rozpouštědla, což zvyšuje pravděpodobnost styku s interaktivní látkou, která je v rozpouštědle rozpuštěna. V našem případě je nejdůležitějším rozpouštědlem voda, neboť vodné roztoky budou používány v aplikační části, tj. při použití terpolymerů v LEC a IMAC. Některá z dalších rozpouštědel (DMF, propan-1-ol) sloužila při organicko-chemické modifikaci terpolymerů (viz následující kapitola).

5.3.1.2. Příprava modifikovaných poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) částic s různou koncentrací chelatujících skupin

Oxiranové skupiny terpolymerního nosiče byly využity k navázání chelatujících skupin kyseliny iminodioctové (IDA).

Výsledná koncentrace připojených chelatujících skupin je závislá na struktuře polymeru, která určuje distribuci postranních řetězců nesoucích oxiranové skupiny a tím i jejich přístupnost pro modifikaci. Z výpočtu meziatomových vzdáleností (Obr. 13) mezi karboxylovým uhlíkem polymerního prekursoru a nejvzdálenějším atomem chelatující skupiny nepřesahující hodnotu 10 Å vyplývá, že rozměry všech pórů v porézních terpolymerech podstatně přesahují tuto hodnotu a měly by proto být pro modifikaci přístupné.

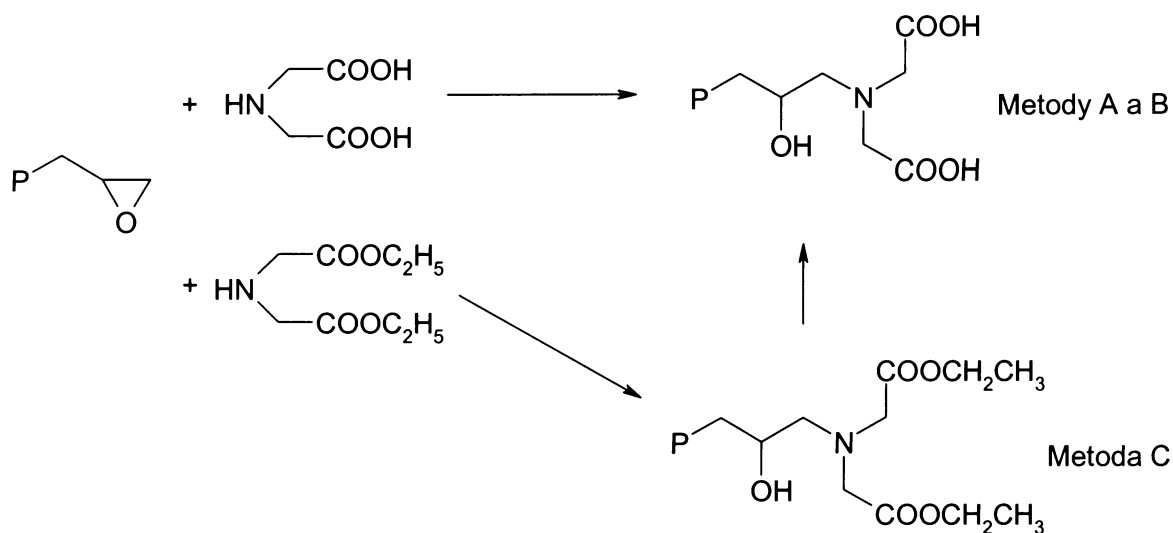


Obr.13. Meziatomové vzdálenosti modifikovaných polymerů: a-b 7,861 Å, a-c 9,878 Å.

Pro připojení IDA skupin byly použity tři nezávislé metody označené jako metoda A, B nebo C s cílem získat různou koncentraci navázaných chelatujících skupin (Schema7).

Nejjednodušší a často užívané [129,130] přímé navázání kyseliny iminodioctové (přesněji řečeno její disodné soli) ve vodném pufru je označeno jako metoda A. Tímto způsobem však bylo pro všechny terpolymery zavedeno velmi malé množství chelatujících IDA skupin. Jejich koncentrace, která byla vzhledem ke svým nízkým hodnotám stanovena pouze koordinací Ni²⁺ a Cu²⁺ iontů, se pro neporézní terpolymery P-1 a P-1' pohybovala mezi 20-30 μmol/g; pro jejich nízkoporézní a porézní protějšky (P-2 až P-5) byla koncentrace IDA skupin mírně vyšší (Tabulka 11, str. 102). Stupeň modifikace, který vyjadřuje množství oxiranových skupin přeměněných na skupiny kyseliny iminodioctové, dosahuje maximálně 1,2 % pro neporézní a 2,0–4,5 % pro nízkoporézní a porézní terpolymery. Pro zvýšení koncentrace navázaných skupin kyseliny iminodioctové na terpolymery bylo tedy využito rozpouštědla *N,N*-dimethylformamidu (DMF), který je dobrým rozpouštědlem terpolymerní sítě, je mísitelný s vodou a vodnými roztoky a má dipolární aprotický charakter zvyšující nukleofilitu reagentu. Tento způsob připojení kyseliny iminodioctové na terpolymery (v přebytku DMF)

je označen jako metoda B, která skutečně v případě všech terpolymerů poskytla přibližně dvojnásobné množství navázaných skupin kyseliny iminodioctové v porovnání s metodou A (Tabulka 11). Zvýšení koncentrace navázaných funkčních skupin za přítomnosti DMF v reakční směsi bylo již pozorováno pro jiné epoxy-reaktivní matrice [131].

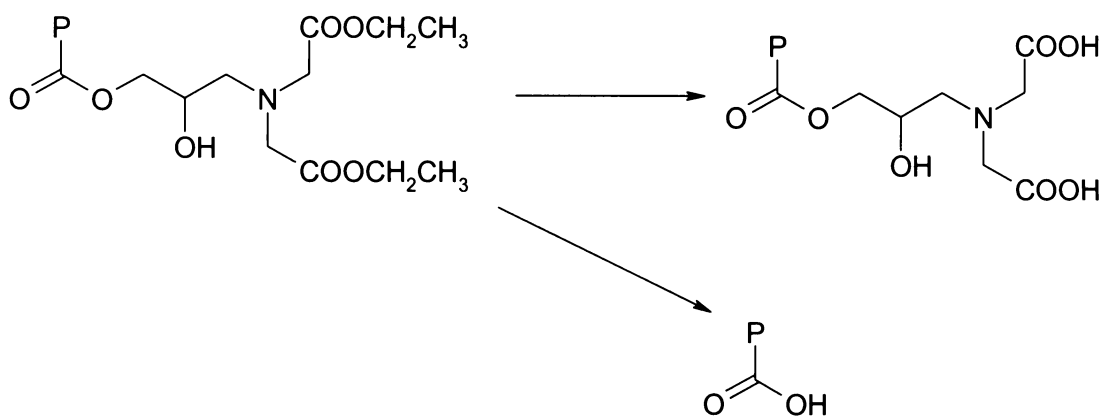


Schema 7. Transformace epoxyskupin terpolymerních poly(GMA-*co*-DEGMA-*co*-EDMA) částic na chelatující skupiny kyseliny iminodioctové. Reakční podmínky: Metoda A: 1 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 11; Metoda B: 1,6 M NaOH, DMF (0,75 v %); C) 1) reflux, propan-1-ol, 2) 0,5 M NaOH, 80°C.

Mnohem vyšší stupeň modifikace epoxyskupin terpolymerů v chelatující skupiny byl však dosažen při použití nepřímého dvoukrokového modifikačního postupu, který je označen jako metoda C. Na terpolymer byl nejprve připojen diethylester kyseliny iminodioctové (DE-IDA), který byl připraven reakcí krystalické kyseliny iminodioctové s thionylchloridem a etanolem [113]. DE-IDA je na rozdíl od krystalické kyseliny iminodioctové kapalina, kterou bylo možno přečistit destilací a která se dobře rozpouštěla v alkoholech. Z nich nejvhodnějším byl propan-1-ol jednak vzhledem ke zjištěné hodnotě veličiny *H* a jednak vzhledem ke svému vhodnému bodu varu (97°C) zajišťujícímu dostatečnou teplotu pro průběh reakce a zároveň zabraňujícímu degradaci terpolymerů, k níž docházelo při teplotách nad 120°C.

Reakci s diethylesterem kyseliny iminodioctové pak podlehla více než polovina oxiranových skupin přítomných v terpolymerech. Na rozdíl od předchozích způsobů modifikace (metody A a B), kde byla koncentrace navázaných chelatujících skupin závislá na

porozitě terpolymerního nosiče, zde byla koncentrace navázaných DE-IDA skupin srovnatelná pro všechny terpolymery ($\sim 1,7$ mmol/g) nezávisle na jejich porézní struktuře. To je pravděpodobně důsledek dostatečné nukleofility DE-IDA ve srovnání s IDA, která je vyšší díky elektrondonorovému charakteru přítomných ethoxy-skupin. Navázané DE-IDA skupiny byly převedeny zpět na chelatující skupiny kyseliny iminodioctové alkalickou hydrolyzou koncových esterových skupin. Samotné DE-IDA skupiny patří sice také, jak již bylo zmíněno, mezi slabě chelatující činidla [122], avšak pro použití v LEC a IMAC jsou jejich chelatační schopnosti nedostačující. Je však nutno mít na paměti, že při alkalické hydrolyze koncových esterových skupin dochází též k nežádoucí reakci, hydrolyze řetězce spojujícího terpolymerní nosič a chelatující skupinu („spaceru“), který rovněž obsahuje esterové skupiny (Schema 8). Na základě literatury pro podobné systémy [127] však esterové skupiny přítomné ve spojovacím řetězci podléhají hydrolytické reakci v daleko menší míře v porovnání s koncovými skupinami DE-IDA, pokud je použito mírných experimentálních podmínek při hydrolyze ($\leq 0,5$ M NaOH), neboť (jak již bylo zmíněno) se jedná o stabilní, stericky chráněné sloučeniny strukturně odvozené od kyseliny pivalové.



Schema 8. Průběh hydrolyzy imobilizovaného diethylesteru kyseliny iminodioctové na kyselinu iminodioctovou (0,5 M NaOH, 80°C, 8 h). Při reakci dochází v malé míře též k vedlejší nežádoucí reakci hydrolyze spojovacího řetězce („spaceru“) (9–11%). (Polymerní nosič zde označen P-CO-O-).

Vliv nežádoucí vedlejší reakce byl však přesto monitorován průběžným vyhodnocováním obsahu dusíku, který byl přítomen pouze v navázané chelatující skupině, nikoli v terpolymerním nosiči. K nežádoucí reakci v malé míře docházelo (9–11 %) v případě všech terpolymerů P-1 až P-5 zejména během prvních dvou až 4 hodin. Případný slabý nárůst

obsahu dusíku pozorovaný zejména ke konci hydrolyzy byl způsoben poklesem hmoty chelatačního terpolymeru po hydrolyze (vztaženo na gram hmoty).

Množství skupin kyseliny iminodioxové vzniklých hydrolyzou jejího diethylesteru navázaného na polymerní nosič bylo stanovováno acidobazickou titrací karboxylových skupin. Získané výsledky shrnuté opět v Tabulce 11 byly porovnávány s množstvím koordinovaných kovových iontů. Bylo ukázáno, že 92–96 % skupin kyseliny iminodioxové participuje v tvorbě kovových komplexů v neporézních a nízkoporézních chelatačních terpolymerech. V případě porézních chelatačních terpolymerů byla naopak zjištěna sorpční kapacita pro kovové ionty o 8–14 % vyšší než bylo množství IDA skupin stanovených acidobazickou titrací. To je zřejmě způsobeno přítomností malého množství zbylých diethyl- a monoethyl-esterů kyseliny iminodioxové, které vydržely hydrolyzu a které, jak již bylo zmíněno, mají rovněž komplexační schopnosti. Jejich přístupnost je u porézních sloučenin zřejmě usnadněna difusí do pórů a pak je tedy všech přítomných chelatačních funkcí využito pro koordinaci kovových iontů. Tyto výsledky jsou v souladu s literaturou vyjádřeny jako “obsazení ligandu” (L) [63], která vyjadřuje celkový podíl chelatačních skupin v komplexaci kovových iontů:

$$L = [\text{chelatační kapacita pro kovový ion (mmol/g)/konc. chelatačních skupin (mmol/g)}] \quad (5)$$

Byla též sledována stabilita imobilizovaných kovových komplexů při změně prostředí z kyselého na zásadité, tj. únik kovu z komplexu v závislosti na změně pH. Jelikož zvýšení pH ze 4.5, v němž byla komplexace prováděna, na 8 způsobilo pouze mírný pokles koncentrace Ni^{2+} a Cu^{2+} komplexů v případě všech chelatačních terpolymerů (ne více než 2 %), lze konstatovat, že stabilita kovových komplexů navázaných na terpolymerní nosiče při změně pH je vysoká.

Tabulka 11

Stanovení koncentrace chelatujících skupin kyseliny iminodioctové (IDA) sorpcí kovových iontů a acidobasicou titrací karboxylových skupin.

Počáteční terpolymer	Modifikační metoda	Stanovení navázaných IDA skupin (mmol/g)			Obsazení ligandu ^c	
		Koordinací kov. iontu ^a		Titrací COOH skupin ^b	L_{Ni}	L_{Cu}
		Ni ²⁺	Cu ²⁺			
P-1	A	0,03	0,02	-	-	-
	B	0,06	0,03	-	-	-
	C	1,33	1,35	1,45±0,03	0,92	0,92
P-1'	A	0,03	0,02	-	-	-
	B	0,05	0,03	-	-	-
	C	1,33	1,34	1,41±0,06	0,94	0,96
P-2	A	0,06	0,07	-	-	-
	B	0,12	0,06	-	-	-
	C	1,47	1,43	1,56±0,07	0,94	0,92
P-3	A	0,08	0,08	-	-	-
	B	0,17	0,15	-	-	-
	C	1,50	1,47	1,60±0,10	0,94	0,92
P-4	A	0,08	0,06	-	-	-
	B	0,18	0,15	-	-	-
	C	1,50	1,52	1,38±0,04	1,09	1,10
P-5	A	0,13	0,10	-	-	-
	B	0,35	0,26	-	-	-
	C	1,58	1,55	1,39±0,05	1,14	1,12

^a ± 5 %

^b Možství karboxylových skupin (COOH) v chelatujících sorbentech zjištěné titračně je dvojnásobné nežli koncentrace chelatujících skupin IDA uvedená v tabulce.

^c $L = [\text{chelatační kapacita pro kovový ion (mmol/g)}] / [\text{koncentrace IDA skupin stanovená titračně (mmol/g)}]$

5.3.1.3. Sorpční vlastnosti Ni²⁺-IDA komplexů poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) v závislosti na vnitřní struktuře nosiče

Na imobilizovaných Ni²⁺-IDA komplexech v koordinační sféře kovu docházelo k výměně molekul vody za jiné ligandy, kterými byly v tomto případě dvě látky zcela rozdílné molekulové hmotnosti: imidazol a imunoglobulin IgG₁ specifický proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu ($M_w \sim 155\,000$) (v dalším textu bude označen jako GTH-IgG₁).

Imidazol je v IMAC obvykle používán jako kompetitivní eluční činidlo pro vytěsnění proteinů pevně navázaných na chelatujícím sorbentu. Pomocí sorpčních charakteristik imidazolu byla vyhodnocena přístupnost komplexů Ni²⁺-IDA jednotlivých chelatujících terpolymerů pro využití v ligandové výměně. U těch sorbentů, které měly komplexy Ni²⁺-IDA dobře přístupné pro koordinaci imidazolu, bylo testováno též jejich využití v IMAC pro sorpci uvedeného modelového proteinu.

Sorpční chování imidazolu i GTH-IgG₁ ke studovaným sorbentům bylo studováno frontální chromatografií [79,132-135], která umožňuje vypočítat množství zadržené látky (q) na koloně naplněné daným sorbentem ze závislosti koncentrace látky rozpuštěné v mobilní fázi na objemu mobilní fáze vytékající z kolony $C = f(V)$ po dosažení rovnováhy podle vztahu

$$q = \frac{V_{eq} - V_o}{V_a} \times C_o, \quad (6)$$

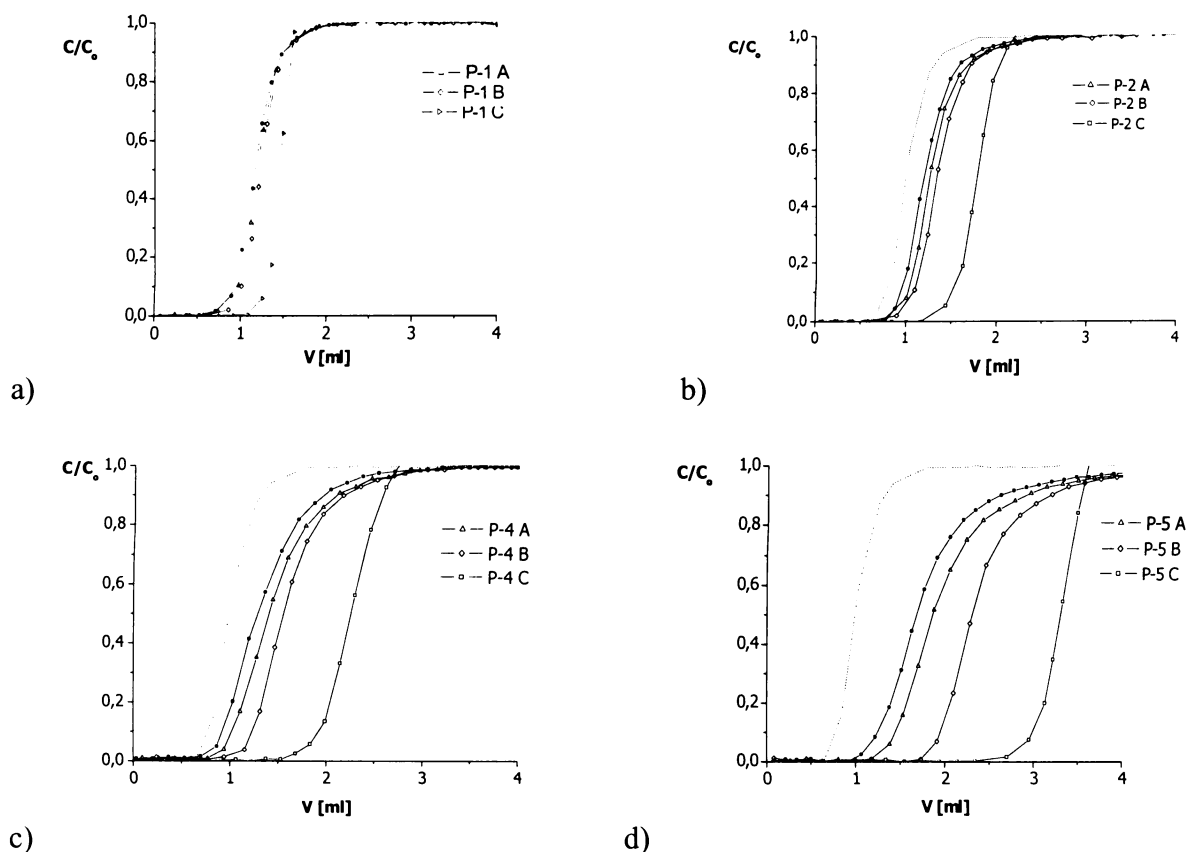
kde C_o je počáteční koncentrace roztoku vstupujícího na kolonu, V_{eq} je eluční objem, kdy koncentrace odtékajícího roztoku dosáhne poloviny počáteční koncentrace, V_o je objem způsobený zádrží roztoku v systému zahrnující též volný objem kolony a V_a je objem náplně kolony. Uvedenou závislost (6) lze transformovat do tvaru, v němž se pro výpočet množství zadržené látky používá plocha za frontální křivkou:

$$q = \frac{A_{eq} - A_o}{V_a}, \quad (7)$$

kde A_{eq} je integrovaná plocha za frontou (čelem) chromatografické křivky a $A_o = V_o \times C_o$ je plocha, která odpovídá objemu zadržnému systémem, v něm je zahrnut i volný objem kolony.

V případě zádrže imidazolu na terpolymerních sorbentech Ni²⁺-IDA-GMA-co-DEGMA-co-EDMA byly křivky $C = f(V)$ (Obr. 14) získány měřením aktuální absorbance mobilní fáze

při $\lambda = 280$ nm spojené s digitálním přenosem dat, z nichž je patrné, že se liší se strukturou polymerního nosiče i s koncentrací Ni^{2+} -IDA komplexů. Pro každý nosič bylo provedeno referenční měření na nemodifikovaném terpolymeru, k němuž byl výpočet vztažen.



Obr. 14. Frontální křivky sorpce imidazolu na terpolymerních sorbentech s nosiči P-1 (a), P-2 (b), P-4 (c), P-5 (d). objem mobilní fáze zadržený systémem bez kolony, —●— distribuce kapaliny uvnitř kolony naplněné nemodifikovaným terpolymerním nosičem, —△—, —◇—, —□— sorpce imidazolu (0,15 M imidazolu v 0,5 M NaCl) na terpolymerech s různou koncentrací Ni^{2+} -IDA komplexů (koncentrace A,B,C viz Tab.12).

Distribuce kapaliny v koloně stejně jako zadrž způsobená případnými dalšími interakcemi nekovalentní povahy jsou již pro výpočet eliminovány tím, že jsou zahrnuty v hodnotě A_0 , neboť q je přímo úměrné rozdílu $A_{eq}-A_0$. Hodnota q tedy odpovídá pouze specifické adsorpci zadržované látky na IDA-nikelnatých komplexech, tj. tvorbě komplexu IDA- Ni^{2+} -imidazol. Předpokládáme však zanedbatelný vliv nežádoucích nekovalentních interakcí vzhledem k hydrofilitě polymerního nosiče a iontové síle použitých pufrů.

Hodnoty sorpčních kapacit pro imidazol (q) vyhodnocené z frontálních chromatografických křivek pro jednotlivé sorbenty jsou shrnuty v Tabulce 12.

Tabulka 12

Vyhodnocení kapacity Ni²⁺-IDA-GMA-co-DEGMA-co-EDMA terpolymerních sorbentů pro koordinaci imidazolu. Hodnoty jsou vypočítány z dynamických sorpčních experimentů.

nosič	Koncentrace Ni ²⁺ -IDA ^a			Sorpční kapacita (<i>q</i>)		Přístupnost Ni ²⁺ -IDA komplexů ^c %
	Modif. metoda	mmol/ml ^b	mmol/g sorbent	mmol/ml ^b	mmol/g sorbent	
P-1, P-1'	A	0,023	0,029	0,010±0,002	0,012±0,003	41±9
	B	0,044	0,054	0,023±0,002	0,028±0,003	52±5
	C	1,073	1,330	0,097±0,007	0,120±0,009	9±1
P-2	A	0,041	0,055	0,022±0,002	0,029±0,003	53±5
	B	0,092	0,123	0,051±0,004	0,068±0,005	55±4
	C	1,107	1,472	0,189±0,008	0,251±0,010	17±1
P-3	A	0,058	0,082	0,036±0,001	0,052±0,001	63±2
	B	0,122	0,173	0,068±0,004	0,096±0,006	55±4
	C	1,056	1,500	0,233±0,005	0,331±0,007	22±1
P-4	A	0,056	0,085	0,033±0,003	0,050±0,004	60±4
	B	0,120	0,180	0,076±0,003	0,114±0,005	63±3
	C	1,003	1,500	0,275±0,006	0,411±0,009	27±1
P-5	A	0,047	0,130	0,047±0,001	0,129±0,003	99±3
	B	0,126	0,349	0,125±0,003	0,342±0,007	98±2
	C	0,572	1,580	0,288±0,003	0,796±0,009	50±1

^a hodnoty převzaty z Tab. 11

^b objem lože

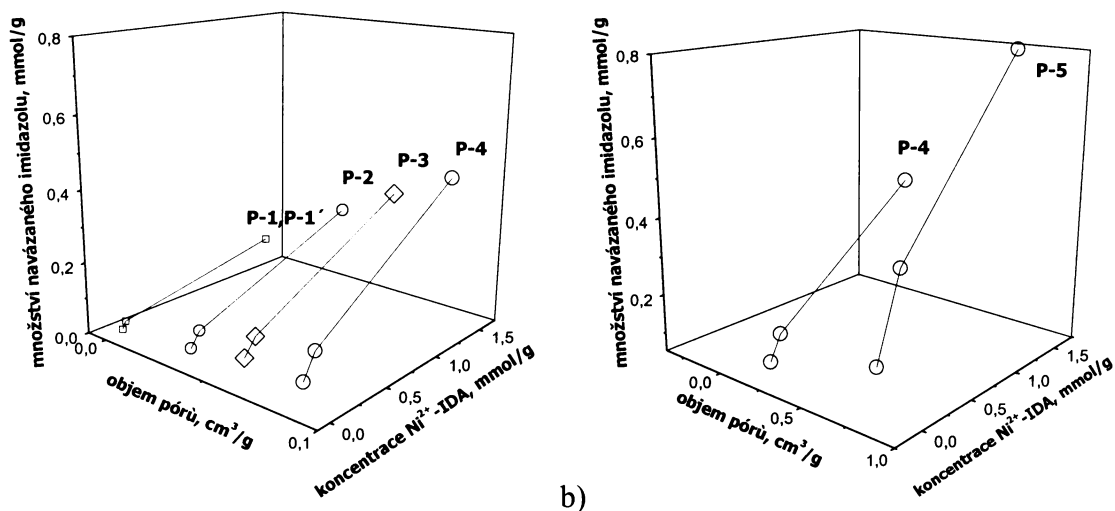
^c poměrné zastoupení Ni²⁺-IDA komplexů účastnících se specifické vazby imidazolu

Z tabulky je patrné, že pro všechny studované sorbenty absolutní množství specificky navázaného imidazolu *q* stoupá s rostoucí koncentrací imobilizovaných Ni²⁺-IDA komplexů. Nicméně jejich podíl využitý pro komplexaci imidazolu (vyjádřený v %) vzhledem k jejich celkovému množství s jejich stoupající koncentrací klesá. Předpokládáme-li tvorbu komplexů s poměrem imidazol/Ni²⁺ 1:1, pak pro nízké koncentrace Ni²⁺-IDA komplexů (0,029-0,130

mmo/g) (hodnoty A v Tab. 12) je jejich využitelnost pro navázání imidazolu relativně vysoká 41–99 %. Pokud je koncentrace imobilizovaných Ni^{2+} -IDA komplexů studovaných sorbentů přibližně dvojnásobná (hodnoty B), jejich přístupnost pro navázání imidazolu zůstává přibližně stejná anebo slabě vzroste. Při vysokých koncentracích imobilizovaných Ni^{2+} -IDA komplexů (kolem 1,5 mmol/g) (hodnoty C) je však jejich proporcionální využití pro komplexaci imidazolu nízká (9–50 %) a silně závisí na porozitě polymerního nosiče. Pro neporézní a nízkoporézní sorbenty (P-1, P-1', P-2) je v intervalu koncentrací imobilizovaných Ni^{2+} -IDA komplexů 0,05-0,08 mmol/g jejich využitelnost pro navázání imidazolu kolem 50 %, pro sorbenty s malými póry v nosiči (P-3, P-4) pak přibližně 60 %. Sorbenty s nosičem P-5, který obsahuje velké póry, vykazují v porovnání s ostatními sorbenty mnohem lepší přístupnost imobilizovaných Ni^{2+} -IDA komplexů k imidazolu. To platí pro všechny studované koncentrace imobilizovaných Ni^{2+} -IDA komplexů. Prakticky všechny přítomné Ni^{2+} -IDA komplexy v P-5 nosiči jsou zúčastněny ve vazbě imidazolu, pokud je jejich koncentrace 0,13 mmol/g. Tuto hodnotu srovnáme např. s nízkoporézním sorbentem P-2, který obsahuje srovnatelné množství Ni^{2+} -IDA komplexů (0,123 mmol/g), avšak zde je pro navázání imidazolu využito pouze o něco málo více než polovina z nich (55%). Při vyšší koncentraci Ni^{2+} -IDA komplexů v nosiči P-5 0,35 mmol/g se stále ještě všechny podílejí v navázání imidazolu. Je-li však jejich koncentrace podstatně vyšší (1,58 mmol/g), pak váže imidazol specificky přibližně pouze polovina z nich.

Pro lepší interpretaci získaných výsledků byly z hodnot uvedených v Tabulce 12 sestrojeny grafy (Obr.15), které dobře demonstrují závislost množství specificky navázaného imidazolu na obou proměnných veličinách, tj. na objemu pórů polymerního nosiče a na koncentraci Ni^{2+} -IDA komplexů, jež jsou na terpolymerním nosiči kovalentně imobilizovány.

Je vidět, že pro neporézní nosiče (P-1, P-1') podstatný vzrůst koncentrace Ni^{2+} -IDA komplexů způsobil pouze mírné zvýšení množství specificky sorbovaného imidazolu. Pokud však zvyšujeme objem pórů polymerního nosiče, potažmo jeho porozitu, pak se již malé zvýšení porozity (z 0 na 2,5 %, P-1→P-2) projeví ve zlepšení přístupnosti imobilizovaných Ni^{2+} -IDA komplexů k vazbě imidazolu. Především při vysoké koncentraci imobilizovaných Ni^{2+} -IDA komplexů, která se pohybuje kolem hodnoty 1.5 mmol/g, se vliv struktury nosiče na sorpci imidazolu významně projeví.



a) Obr. 15. Vazebné kapacity Ni^{2+} -IDA chelatujících terpolymerů pro imidazol.
 (a) sorbenty s nosiči P-1 – P-4.
 (b) porovnání sorbentů založených na porézních nosičích P-4 a P-5.

Porovnání schopnosti specificky vázat imidazol sorbentů s porézními nosiči P-4 a P-5 ukazuje Obr.15 b; podstatně větší množství imidazolu se specificky navázalo na sorbenty s nosičem P-5. Přístupnost Ni^{2+} -IDA komplexů zde činí 50–99 % v závislosti na jejich koncentraci, na P-4 pak pouze 27–63 %. Nosič P-4 obsahuje malé póry (hlavní póry s průměrem 10–60 nm), které přispívají především k celkové hodnotě specifického povrchu ($S_p = 9,8 \text{ m}^2/\text{g}$), P-5 má naopak hodnotu specifického povrchu poměrně nízkou ($S_p = 3,5 \text{ m}^2/\text{g}$), avšak obsahuje velké póry až do 20 μm v průměru, které jsou zodpovědné za vysokou hodnotu porozity (45%) a celkového objemu porů ($V_p = 0,7 \text{ cm}^3/\text{g}$) (uvedené hodnoty převzaty z Tab.7, str. 92). Tedy nikoli hodnota specifického povrchu terpolymerního nosiče, ale spíše celkový objem a především distribuce velikosti jeho porů hrají, jak se zdá, dominantní úlohu v ligandové výměně imidazolu na sorbentech GMA-co-DEGMA-co-EDMA-IDA- Ni^{2+} , přesněji řečeno v jejich přístupnosti pro ligandovou výměnu.

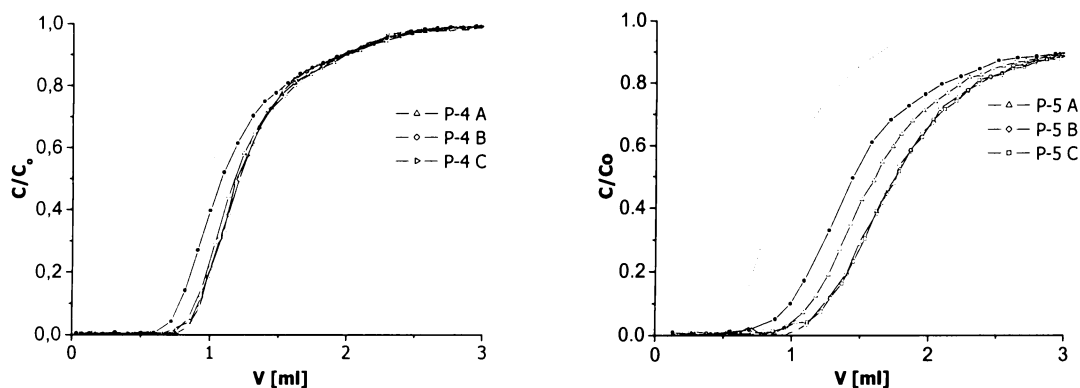
Z analýz přístupnosti Ni^{2+} -IDA komplexů pro navázání imidazolu na různých strukturách terpolymerních poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) nosičů lze dále předpokládat, že pro každou strukturu existuje optimální koncentrace imobilizovaných Ni^{2+} -IDA komplexů, kdy je nejvyšší procento těchto komplexů využito pro ligandovou výměnu nízkomolekulárního imidazolu. Dále lze předpokládat, že hodnota této optimální koncentrace pravděpodobně stoupá se zvyšujícím se obsahem komunikativních makroporů. Využitelnost imobilizovaných

Ni²⁺-IDA komplexů pro ligandovou výměnu, v tomto případě modelové látky imidazolu, pak může dosáhnout až téměř sta procent.

Během sorpčního procesu byl pozorován mírný únik nikelnatých iontů (0.2–0.8 % - stanoveno AAS) v případě sorbentů s vysokými koncentracemi Ni²⁺-IDA komplexů (kolem 1,5 mmol/g). Zvýšení absorbance roztoku vytékajícího z kolony způsobené přítomností těchto uvolněných iontů bylo respektováno při výpočtu množství specificky sorbovaného imidazolu. Únik kovových iontů je zřejmě důsledek přítomnosti mono- a diethyl esterů kyseliny iminodioctové, které zbyly na sorbentu po dvoukrokové modifikaci terpolymerů DE-IDA s následnou hydrolýzou koncových esterových skupin a které patří, jak již bylo uvedeno, mezi slabě chelatuující skupiny.

5.3.1.4. Studium chování vybraných sorbentů k modelovému imunoglobulinu

Na základě dosavadních výsledků získaných sorpcí imidazolu na poly(GMA-*co*-DEGMA-*co*-EDMA) částicových terpolymerních Ni²⁺-IDA sorbentech byly pro funkci IMA nosičů studovány ty, u nichž byla pozorována dobrá využitelnost imobilizovaných Ni²⁺-IDA komplexů pro ligandovou výměnu, tj. P-4 a P-5. Jak již bylo uvedeno, tyto nosiče jsou pro porovnávací studie vhodné také proto, že se liší typem porézní struktury. Průměry pórů obou nosičů však přesahují 12 nm, což je délka molekuly další studované modelové látky, myšího monoklonálního imunoglobulinu specifického proti lidskému choriogonadotropnímu hormonu (GTH-spec IgG₁) ($M_w \sim 155\ 000$). Měla by tedy být zajištěna teoretická možnost vstupu molekuly studovaného imunoglobulinu dovnitř všech přítomných pórů.



a)

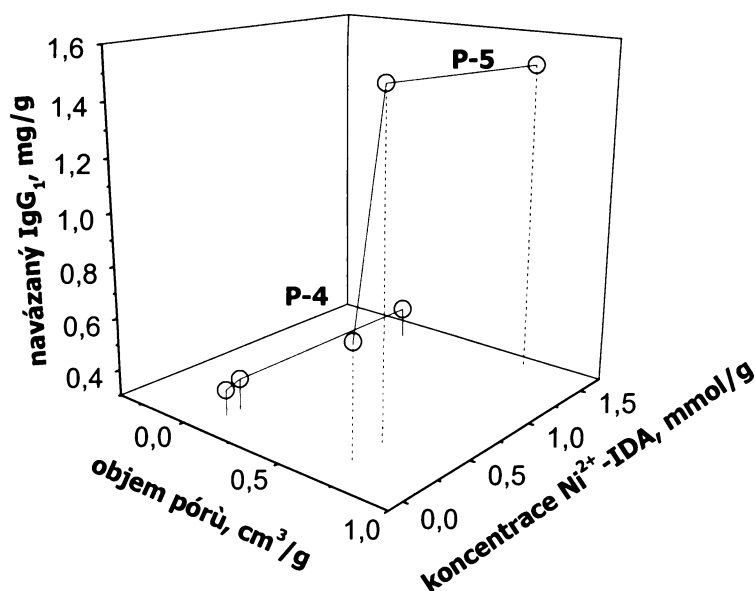
b)

Obr. 16. Koncentrační závislosti roztoku modelového proteinu (GTH-spec. IgG₁, $C_0=1$ mg/ml, pH 8) na objemu mobilní fáze při sorpci na Ni²⁺-IDA-GMA-co-DEGMA-co-EDMA; P-4 (a) a P-5 (b). objem mobilní fáze zadržovaný systémem bez kolony, —●— distribuce kapaliny uvnitř kolony s nemodifikovaným nosičem, —△—, —◇—, —□— sorpce na Ni²⁺-IDA-GMA-co-DEGMA-co-EDMA (koncentrace Ni²⁺-IDA komplexů P-4 A;B;C; 0,09; 0,18; 1,50 mmol/g; P-5 A;B;C; 0,13; 0,35; 1,58 mmol/g).

Sorpce imunoglobulinu na Ni²⁺-IDA-GMA-co-DEGMA-co-EDMA (Obr.16) probíhá v porovnání s imidazolem (Obr.14) pomaleji, což je způsobeno nižší rychlostí difuze velké molekuly imunoglobulinu do pórů nosiče. Stejně jako v případě imidazolu, i zde je specifická sorpční kapacita pro GTH-spec IgG₁ funkcí struktury nosiče. Na rozdíl od imidazolu, zde však vzrůst množství specificky zachyceného IgG₁ není úměrný zvýšení koncentrace Ni²⁺-IDA komplexů. Jak vyplývá z Obr.17, který byl sestaven z hodnot q vypočítaných z ploch za čelem frontální křivky, výrazný vzrůst sorpční kapacity pro GTH-specifický IgG₁ nastal pouze při změně koncentrace Ni²⁺-IDA komplexů imobilizovaných na nosiči P-5 z 0,13 mmol/g na 0,35 mmol/g, kdy se množství Ni²⁺-IDA-koordinovaného imunoglobulinu zvýšilo z 0,72 na 1,53 mg/g. Avšak pro výrazně vyšší koncentraci Ni²⁺-IDA komplexů na témže nosiči bylo množství navázaného IgG₁ srovnatelné (1,49 mg/g). Tento výsledek může být v souladu s prací Wirtha a spol. [108], kteří pozorovali, že množství specificky navázaných modelových proteinů (konkavalinu A a lysozymu [HEWL]) na Cu²⁺-IDA komplexech imobilizovaných na porézním silikagelovém nosiči prochází maximem při zvyšování koncentrace imobilizovaných kovových komplexů (podrobněji viz kapitola 2.4.4., str. 42).

Co se týče nosiče P-4, pro všechny studované koncentrace Ni²⁺-IDA komplexů bylo stanoveno téměř shodné množství specificky sorbovaného GTH-specifického IgG₁ (cca 0,4 mg/g), které je ovšem mnohem nižší ve srovnání se všemi sorbenty nosiče P-5. I zde tedy

platí, že větší rozměry pórů a větší objem přístupných pórů porézních chelatujících terpolymerů zajišťují lepší sorpční kapacitu pro specifickou vazbu modelového proteinu.



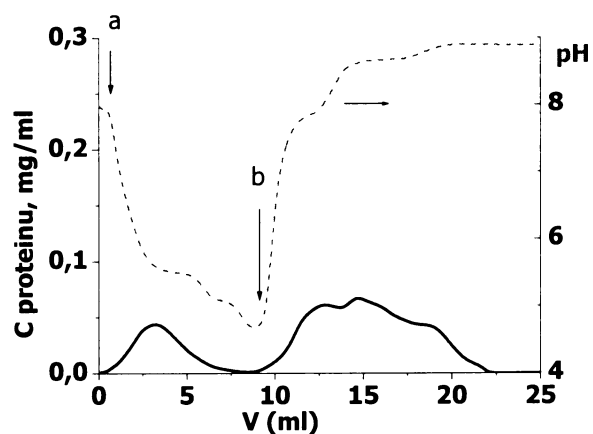
Obr. 17. Vazebné kapacity Ni²⁺-IDA chelatujících terpolymerů poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) založených na nosičích P-4 a P-5 pro myši GTH-spec. IgG₁.

Morfologické vlastnosti terpolymerních poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) nosičů hrají roli rovněž při eluci reversibilně navázaného GTH-spec. IgG₁. Před zahájením eluce byl protein přítomný v roztoku zaplňujícím mezičásticový prostor v koloně zcela odstraněn promývacím pufr (0,05 M fosfátový pufr obsahující 0,5 M NaCl, pH 8). Eluce navázaného imunoglobulinu byla pak provedena stejně jako v případě kopolymerních částic poly(DEGMA-co-EDMA) nejprve klesajícím pH gradientem následovaná kompetitivní elucí imidazolovým koncentračním gradientem. Jak ukazují eluční grafy (Obr.18), navázaný protein byl ze sorbentů s nosičem P-5 eluován částečně pH gradientem a částečně imidazolovým koncentračním gradientem, zatímco v případě sorbentů s nosičem P-4 (Obr.19) byla eluce pH gradientem neúspěšná a navázaný imunoglobulin byl kvantitativně eluován až použitím kompetitivní eluce. Nabízejí se tedy hned dvě otázky: 1) proč byl studovaný protein navázaný na Ni²⁺-IDA komplexech nosiče P-5 vytěsněn dvěma typy elucí a 2) proč byla eluce pH gradientem u sorbentů s P-4 nosičem neúspěšná. Možnou odpovědí na první otázku může být částečné rozštěpení molekuly IgG₁ na své F_c a F_{ab} fragmenty v průběhu IMAC procesu.

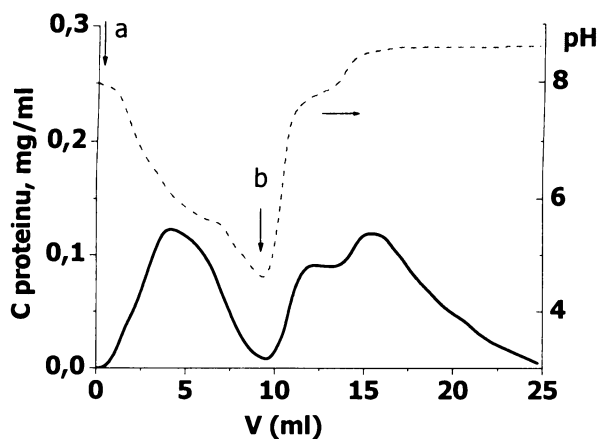
Sorbenty by pak specificky vázaly F_c fragmenty a nerozštěpené molekuly IgG_1 , které by se eluovaly zvlášť, F_{ab} fragmenty by se na sorbent zachycovat neměly. Tato hypotéza však byla vyvrácena využitím metody MALDI TOF-MS (Obr.20), která potvrdila, že všechny eluáty obsahují pouze jedinou látku s molekulovou hmotností $\approx 155\ 000$, kterou je původní molekula GTH-spec. IgG_1 . Odpověď lze tedy hledat opět ve struktuře terpolymerního poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) nosiče. Nejpravděpodobnějšími příčinami pozorovaného chování studovaného proteinu při eluci je menší omezení difuze do objemných pórů nosiče P-5 a především rovnoměrné rozprostření imobilizovaných kovových komplexů v pórech. Navázaný imunoglobulin lze proto z pórů zřejmě vytěsnit již klesajícím pH gradientem. Pro imunoglobulin navázaný uvnitř polymerní sítě nebo v malých pórech nosiče P-4 předpokládáme silné uplatnění multimístného navázání proteinu na imobilizované kovové komplexy umístěné prostorově blízko sebe. Důsledkem je potom menší celková kapacita pro navázání proteinu a pevná vazba proteinu s kovovými komplexy, pro jejíž rozrušení je potřeba použít kompetitivní eluční činidlo.

Další zajímavost byla odhalena integrací ploch jednotlivých elučních píků odpovídajících množství proteinu eluovaného daným typem eluce (Obr.21). Ze sorbentu s nosičem P-5 a koncentrací Ni^{2+} -IDA komplexů 0,35 mmol/g (P-5 B) bylo pH gradientem eluováno poněkud vyšší (0,58 mmol/g) množství GTH-spec. IgG_1 než pro koncentraci Ni^{2+} -IDA komplexů 1,58 mmol/g na témže nosiči (P-5 C) (0,45 mmol/g), ačkoli celkové množství eluovaného proteinu z obou sorbentů bylo téměř totožné. Některé molekuly IgG_1 jsou tedy navázány méně pevně, pokud je koncentrace Ni^{2+} -IDA komplexů nižší a reversibilní vazby lze rozrušit již pouhým snížením pH. To je v souladu s výše navrženou hypotézou, že uvnitř velkých pórů se multiligandová interakce s proteinem uplatňuje v menší míře a je závislá na koncentraci kovových komplexů. Podobné chování již pozorovali Liesiene a spol. [59], kteří pro reversibilně navázaný somatotropin na Cu^{2+} -IDA komplexech imobilizovaných na celulósovém nosiči museli při zvyšování koncentrace Cu^{2+} -IDA na sorbentu používat silnější eluční činidla, jak již bylo zmiňováno v kapitole 2.4.4.

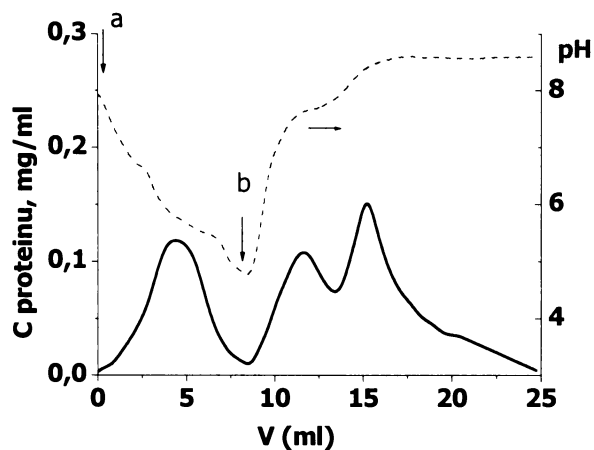
Výpočtem pak bylo potvrzeno, že celkové množství specificky sorbovaného modelového proteinu (GTH-specifického IgG_1) bylo kvantitativně eluováno zpět v neporušeném stavu.



A)

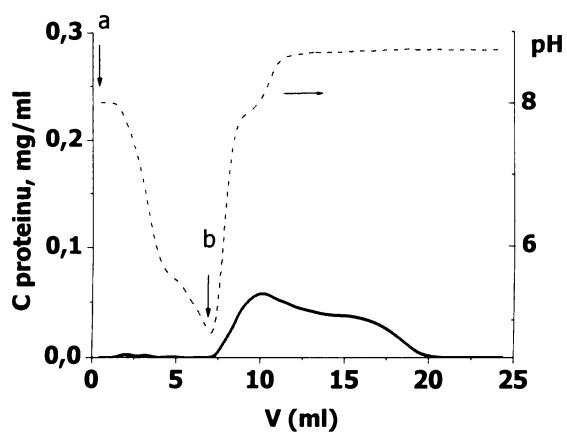


B)

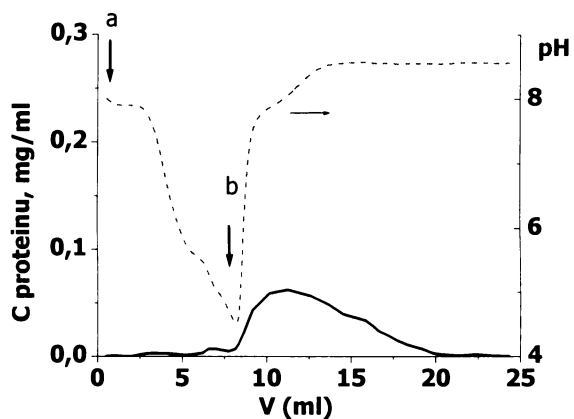


C)

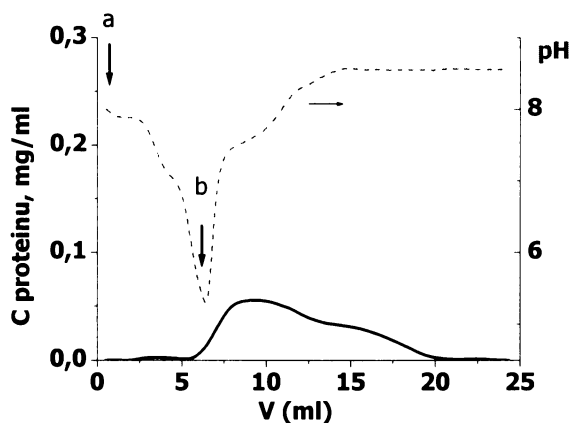
Obr.18. Eluce specificky navázaného imunoglobulinu GTH-spec. IgG₁ ze sorbentů s polymerním nosičem P-5 a koncentrací komplexů Ni(II)-IDA A) 0,13 B) 0,35 C) 1,58 mmol/g (1,0 g polymerní hmoty). Eluce (a) pH gradientem (6→ 4,5 v 0,1M AcOH/AcONa, 0,5 M NaCl), (b) imidazolovým gradientem (5 mM→ 150 mM v 0,5 M NaCl).



A)

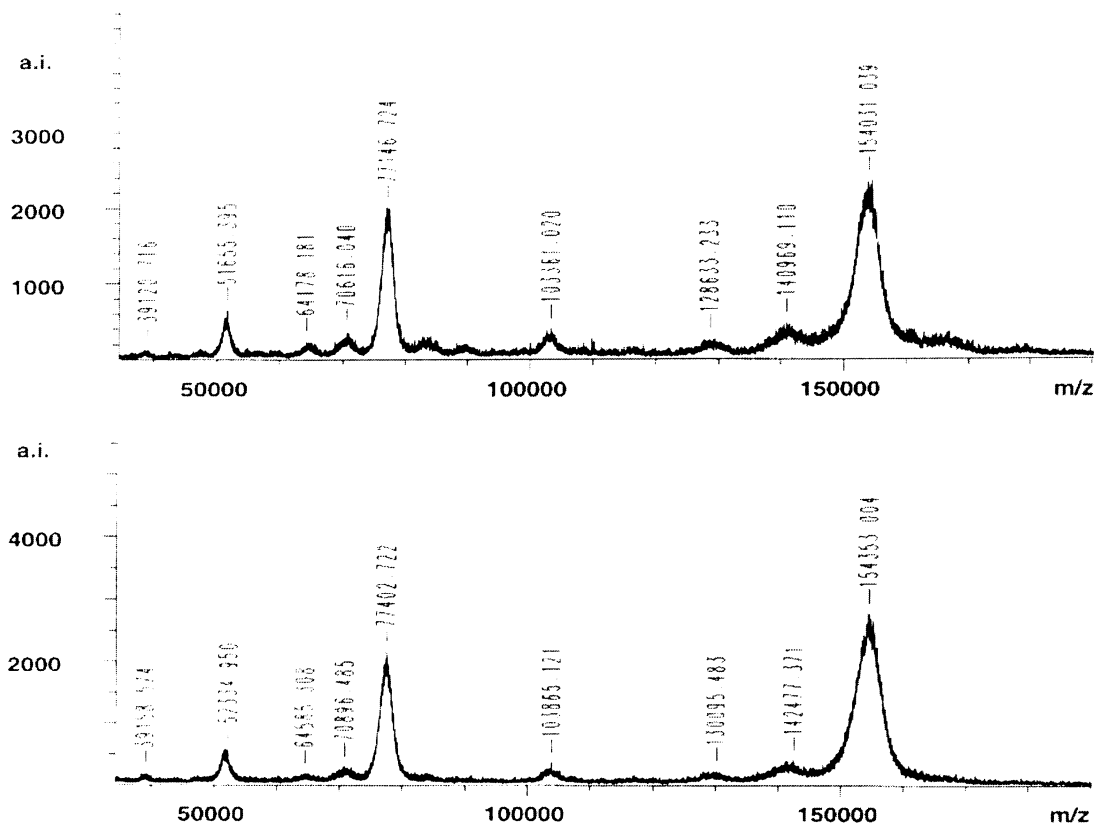


B)

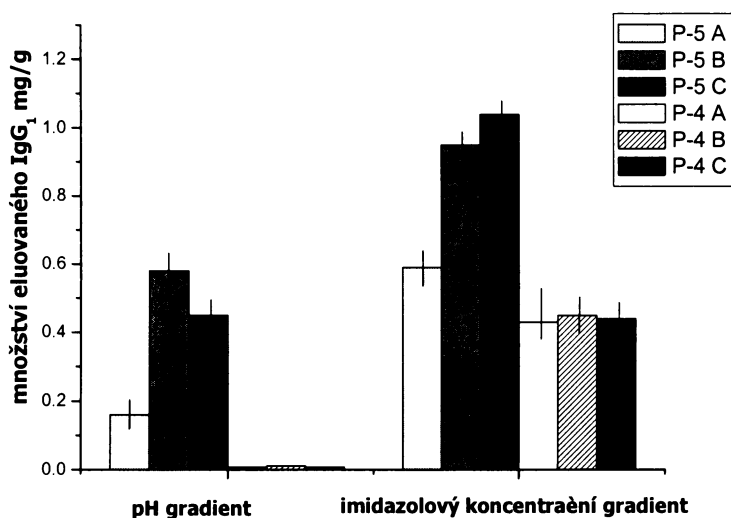


C)

Obr.19. Eluce specificky navázaného imunoglobulinu GTH-spec. IgG₁ ze sorbentů s polymerním nosičem P-4 a koncentrací komplexů Ni(II)-IDA A) 0,09 B) 0,18 C) 1,50 mmol/g (1,0 g polymerní hmoty) (a) pH gradientem (6→ 4,5 v 0,1M AcOH/AcONa, 0,5 M NaCl), (b) imidazolovým gradientem (5 mM→ 150 mM v 0,5 M NaCl).



Obr. 20. MALDI TOF MS elučních frakcí GTH-spec. IgG₁ ze sorbentu P-5, konc. Ni²⁺-IDA 0,35 mmol/g. Nahoře: frakce získaná elucí pH gradientem 6→4,5, dole: imidazolovým gradientem 5→150Mm. Signály při *m/z*: ≈55 000, 103 000, 77 000 a 52 000 odpovídají přítomnosti iontů [MH]⁺, [M₂H₃]³⁺, [MH₂]²⁺ a [MH₃]³⁺, kde M je molekula GTH-spec.IgG₁.



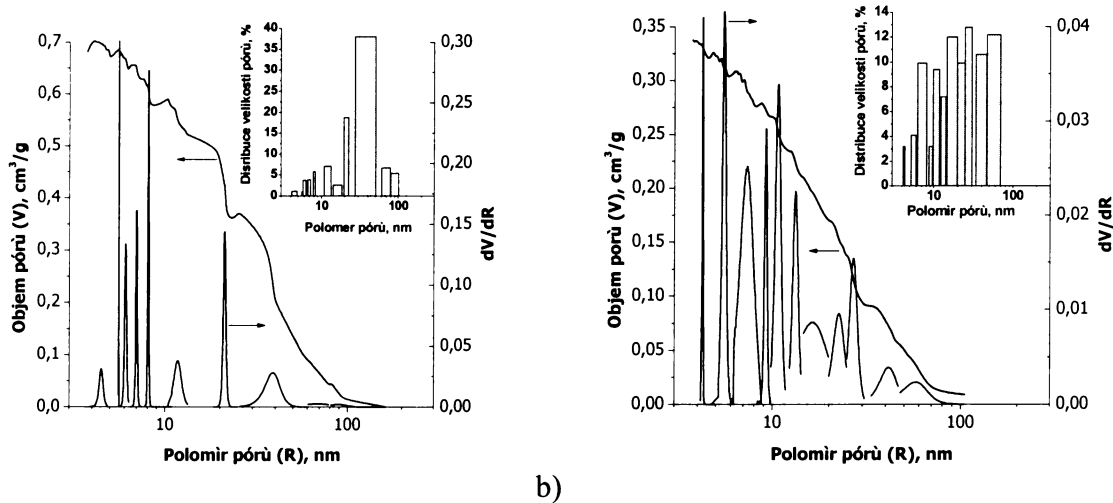
Obr.21. Množství eluovaného myššího GTH-spec. IgG₁ z porézních Ni²⁺-IDA-GMA-co-DEGMA-co-EDMA chelatujících sorbentů pH gradientem (pH 6→4,5) a imidazolovým koncentračním gradientem (5→150 mM).

5.3.2. Částice poly[glycidyl-methakrylát-co-2-hydroxypropyl-methakrylát-co-ethylen-dimethakrylátu] [poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA)]

5.3.2.1. Charakteristika částic poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA)

Terpolymery poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA) (HPMA = 2-hydroxypropyl-methakrylát) tvaru kulovitých částic nám laskavě poskytli pracovníci Oddělení polymerních částic ÚMCH AV ČR. Jednalo se o heterogenní částice s dobře vyvinutou porézní strukturou, které bylo dosaženo vlivem porogenu (směsi cyklohexanolu a dodekan-1-olu 9:1) použitého při jejich přípravě [72,127,128].

Pro účely použití v IMAC byly dále studovány dva typy těchto částic, které měly podobné chemické složení, avšak lišily se velikostí částic a typem porézní struktury (v dalším textu budou označeny jako T-1 a T-2). Částice T-1 o průměru 7-13 μm a složení [GMA]:[HPMA]:[EDMA] = 5:3:4 měly hodnoty procentuální porozity (51 %) i celkového objemu pórů (0,7 cm^3/g) srovnatelné s porézními částicemi poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) označenými jako P-5 z předchozí kapitoly 5.3.1. Distribuce velikostí pórů však byly odlišné, neboť pro T-1 dominovaly póry o velikosti 55-102 nm, které tvořily 38 % celkového objemu pórů. Nicméně póry větší velikosti (120 –200 nm) byly v terpolymeru T-1 též přítomny (12% celkového objemu pórů) (Obr.22 a). Naproti tomu druhé studované částice, T-2, o složení [GMA]:[HPMA]:[EDMA] = 2:6:4 se odlišovaly od T-1 velikostí částic (průměr 60-100 μm) i porézní strukturou, kterou v částicích T-2 tvořila množina pórů plynule zvětšujícího se průměru od 10 do 200 nm. Na rozdíl od T-1 zde však značnou část (cca 1/3) tvořily malé póry s průměrem ≤ 30 nm (Obr.22 b). Hodnota celkové procentuální porozity T-2 byla 27 % a celkového objemu pórů 0,34 cm^3/g .



Obr. 22. Strukturální charakteristiky poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA) částic T-1 (a) a T-2 (b) (měřeno na rtuťovém porozimetru-225 Carlo Erba Strumentazione).

5.3.2.2. Modifikace částic poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA)

Pro kovalentní připojení chelatujících skupin bylo podobně jako v případě terpolymerů poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) využito reaktivních oxiranových skupin GMA jednotek polymerního prekursoru. Jako chelatující skupina zde opět sloužila kyselina iminodioctová (IDA), která byla navázána přímou jedнокrokovou modifikací ve vodném pufru způsobem označeným jako metoda A na Schematu 7 (viz str. 99). Stupeň modifikace, tj. množství přeměněných epoxyskupin v chelatující skupiny kyseliny iminodioctové, byl zde však v porovnání s částicemi poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) poněkud vyšší. Důvodem bylo zřejmě lepší prostorové rozptřeni GMA jednotek v polymerní částici; větší vzdálenost mezi dvěma sousedními GMA jednotkami v poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA) částicích může snižovat vliv elektrostatické repulze mezi navázanými IDA skupinami v důsledku čehož je dosaženo vyššího modifikačního stupně epoxyskupin, který činil pro částice T-1 21 % a pro T-2 24 % (původní obsah epoxyskupin v částicích T-1 a T-2 \cong 2,6 a 1,1 mmol/g).

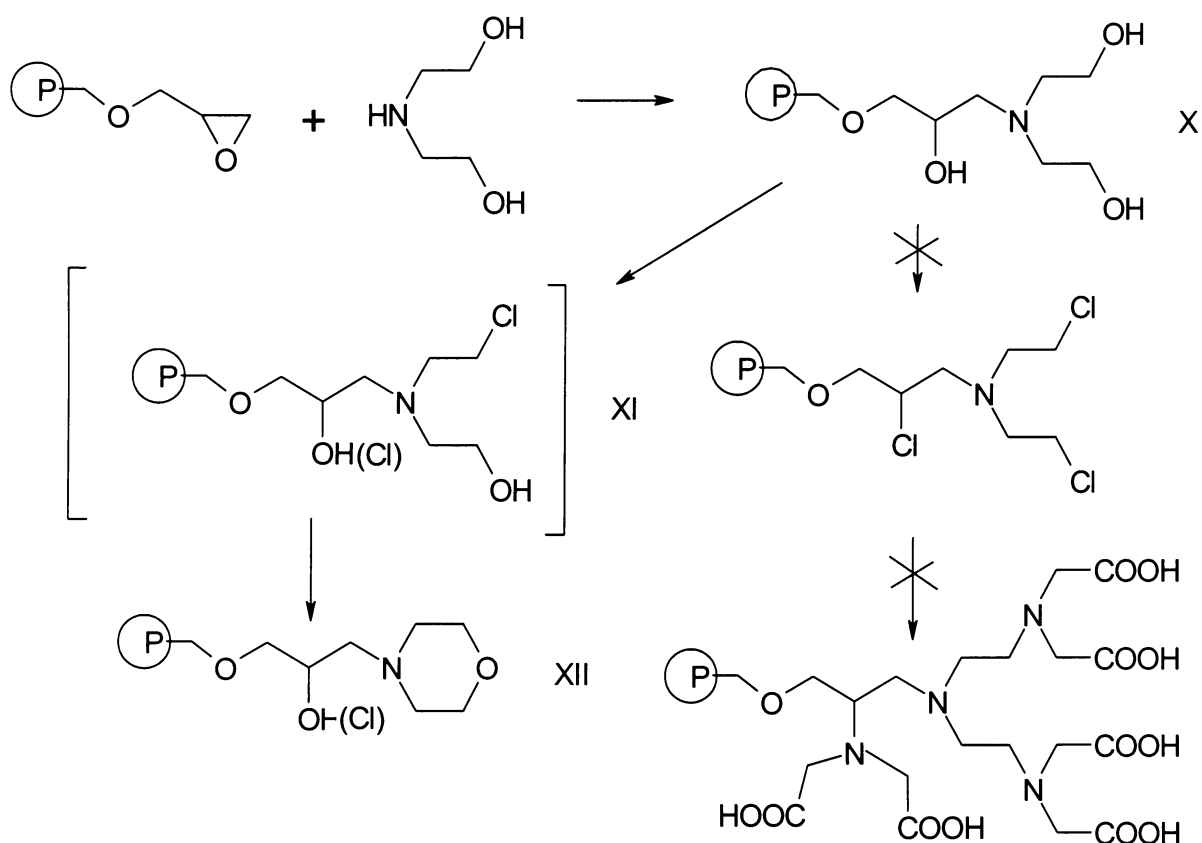
Konečná množství navázaných chelatujících skupin kyseliny iminodioctové v částicích poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA) zjištěná elementárním stanovením obsahu dusíku, acidobasicou titrací karboxylových skupin a sorpcí kovových iontů shrnuje Tabulka 13. Z uvedených dat je zřejmé, že množství IDA skupin zjištěná různými typy stanovení se shodují a že prakticky všechny chelatující skupiny byly využity pro tvorbu komplexů Ni²⁺-IDA.

Tabulka 13. Charakteristika modifikovaných poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA) částic.

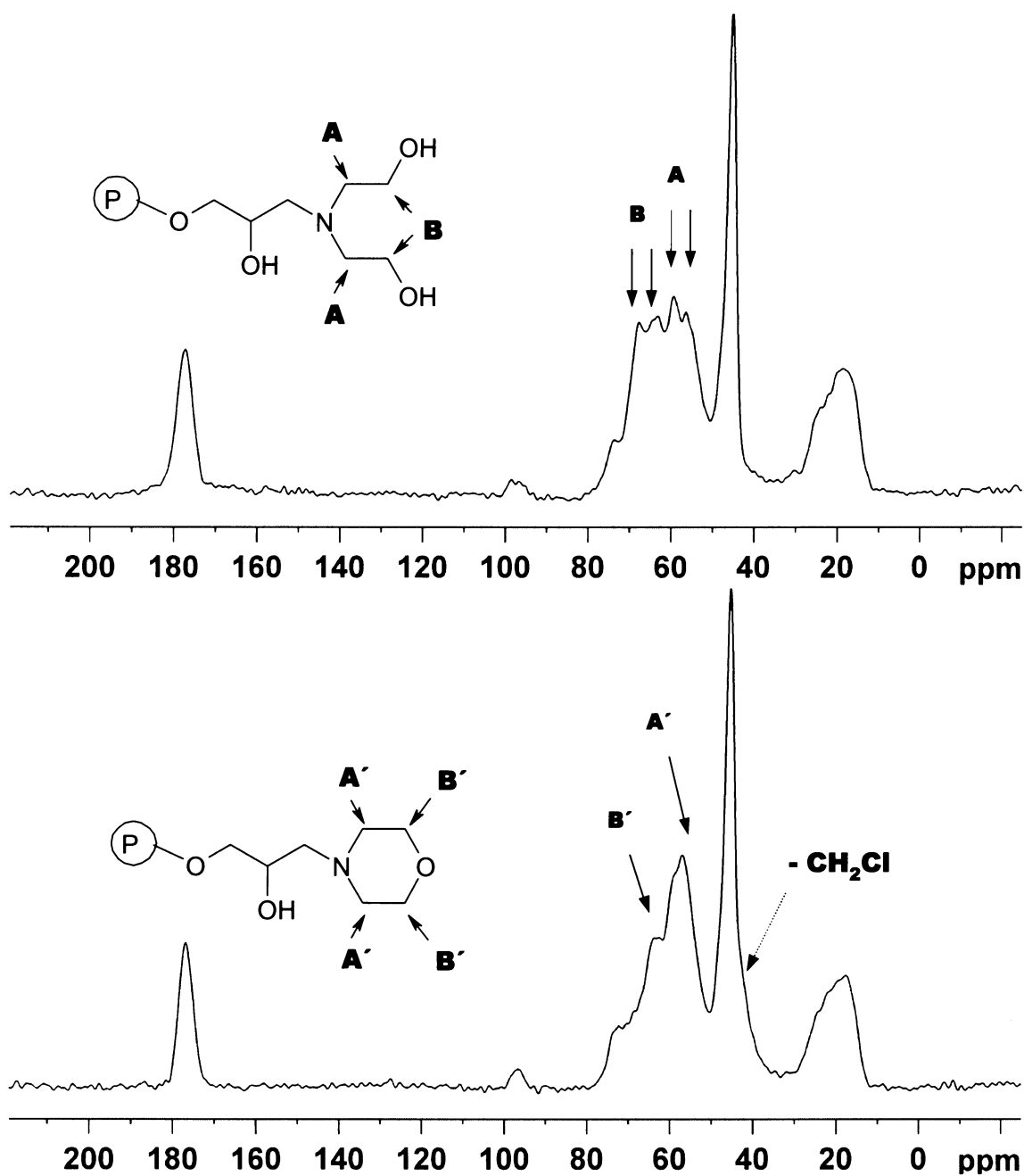
Polymerní nosič	Koncentrace imobilizovaných IDA skupin (mmol/ml)			Množství zbylých Ni ²⁺ -IDA (%) při změně pH 4,5→8
	Analýzou dusíku	Titrací COOH skupin	Sorpcí Ni ²⁺ pH 4,5	
T-1	0,11	0,12	0,11	98,1
T-2	0,07	0,09	0,07	94,1

I v tomto případě byl proveden pokus zvýšit koncentraci imobilizovaných chelatujících skupin polymerního nosiče. Namísto zvyšování stupně konverze polymerních oxiranových skupin použitím nukleofilnějšího činidla zde však byla použita strategie přípravy takového sorbentu, kdy postranní polymerní řetězce nosiče nesou více chelatujících skupin, čímž by měla být teoreticky zajištěna kromě vyšší kapacity sorbentu též např. lepší přizpůsobivost přistupující proteinové struktuře a vyšší selektivita.

Návrh modifikačního postupu ukazuje Schema 9. Epoxyskupiny polymerního prekursoru byly nejprve modifikovány diethanolaminem za vzniku modifikovaného polymeru X. I zde, stejně jako v případě modifikace kyselinou iminodioxovou, podlehla této reakci přibližně pětina všech přítomných terpolymerních poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA) oxiranových skupin (zjištěno elementárním stanovením obsahu dusíku). Koncové hydroxylové skupiny polymeru X byly poté substituovány halogenem použitím Bösshardtova činidla (směsi SOCl₂ a DMF v CHCl₃), případně tosylovány, avšak k navázání chelatující kyseliny iminodioxové v dalším reakčním kroku téměř vůbec nedošlo (zanedbatelná koncentrace imobilizovaných karboxylových skupin zjištěná titračně (0,04 mmol/g)), přestože analogické nízkomolekulární látky jsou v literatuře popsány. Předpokládáme proto, že pravděpodobnou příčinou neúspěchu není v tomto případě sterická nepřístupnost funkčních skupin pro navázání chelatujícího ligandu, ale spíše cyklizace reaktivního intermediátu XI (obsahuje halogen ve vicinální poloze k dusíku) za vzniku stabilního morfolinového kruhu (XII). Uvedená domněnka je v souladu se spektry NMR pevné fáze (Obr.23), v nichž jsou patrné charakteristické signály –CH₂-OH a –CH₂-N- skupin flexibilních řetězců modifikovaného polymeru X, které spolu splývají po uzavření v rigidní hexacyklické uskupení polymeru XII za současného posunu k nižším ppm. Jiné spektrální metody nebyly pro potvrzení uvedeného předpokladu dostatečně průkazné (např. pás vibrace etherové skupiny –O– při 1000-1100 cm⁻¹ v IČ spektrech byl překryt silnějšími pásy polymerního nosiče).



Schema 9. Návrh přípravy sorbentu s více funkčními skupinami na jednom řetězci. P představuje sesítovanou polymerní strukturu. Reakční podmínky: Příprava X: EtOH-diethanolamin (1:1), reflux, 24 h. Příprava XII: CHCl_3 , SOCl_2 , DMF, reflux, 16 h.



Obr.23. ^{13}C CP/MAS NMR (10 kHz) sorbentů X (nahore) a XII (dole).

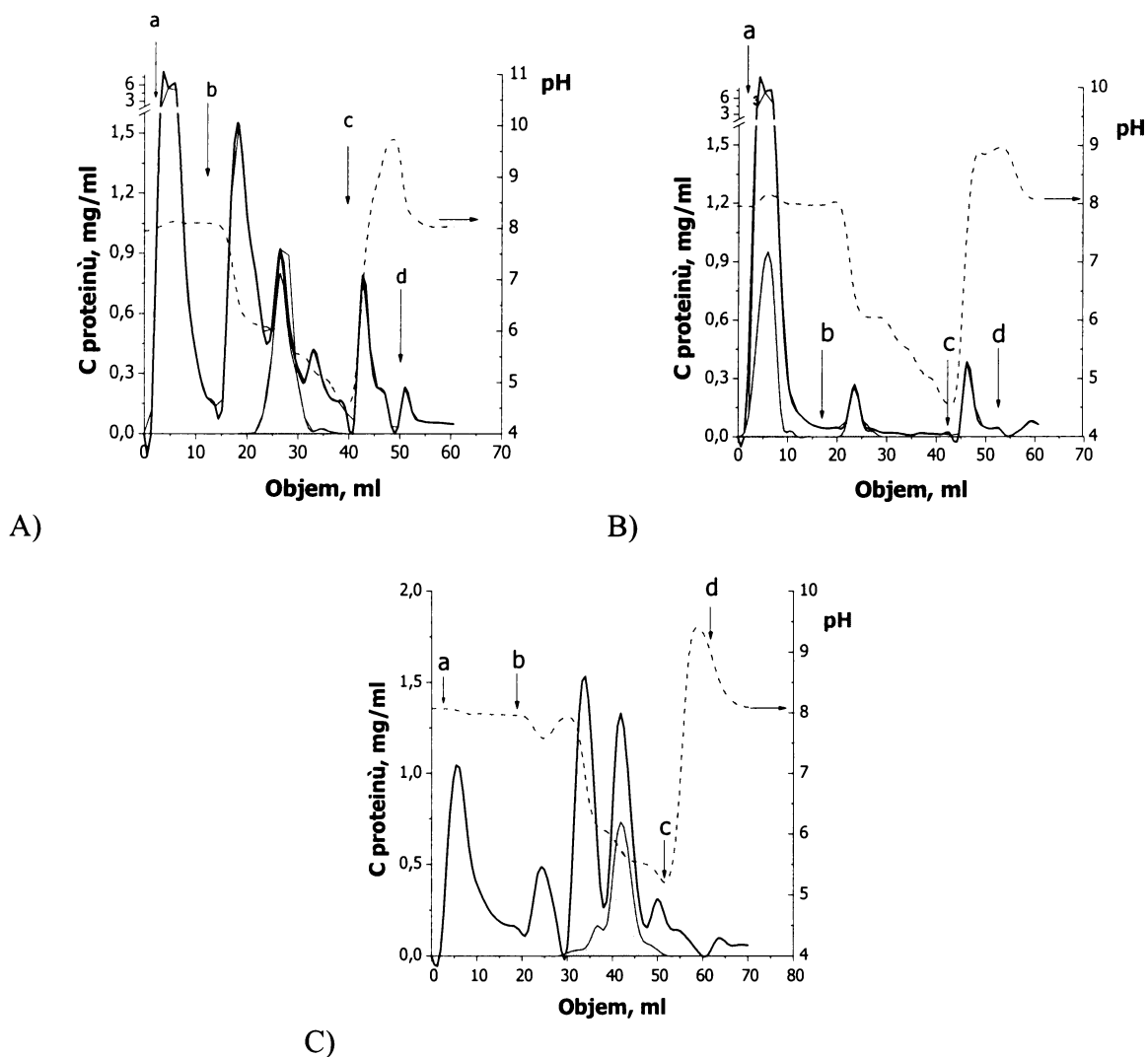
Při přeměně X na XII dochází k posunutům $-\text{CH}_2\text{N}-$ ($A \rightarrow A'$) 57-60 \rightarrow 54 ppm a $-\text{CH}_2\text{O}-$ ($B \rightarrow B'$) 62-68 \rightarrow 67 ppm. Neoznačené signály přísluší $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{OH}$ skupinám spojovacího řetězce (70-75 ppm) a zbylým funkčním skupinám polymerního prekursoru $\{\text{CH}_3-$ (10-25 ppm), $\text{C}_{\text{kvar.}}$ (45 ppm) $-\text{CO}_2-$ (178 ppm) $\}$. Signál při 40-42 ppm (dole) přísluší zbytku chlormethylenových skupin.

5.3.2.3. Použití chelatujících poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA) v IMAC imunoglobulinů, srovnání separačních vlastností s komerčním sorbentem

Podobně jako pro kopolymery poly(DEGMA-co-EDMA), i zde bylo testováno potenciální využití připravených chelatujících sorbentů T-1 a T-2 pro izolaci monoklonálního imunoglobulinu, specifického proti křenové peroxidáze (HRP-spec. IgG₁) chromatografií IMA z myší ascitické tekutiny. Na rozdíl od homogenních kopolymerních poly(DEGMA-co-EDMA) částic (kap.5.2.), u nichž bylo kvůli jejich malé kapacitě nutné provést izolaci požadovaného proteinu v kombinaci s dalšími chromatografickými technikami, zde již při přímém použití surové ascitické tekutiny bylo jedнокrokovou separací na imobilizovaných komplexech Ni²⁺-IDA získáno 92 % celkového množství cílového imunoglobulinu na částicích T-1 v relativně vysoké čistotě (73 %) (Obr.24 A). Na tomto sorbentu došlo k úplnému navázání požadovaného imunoglobulinu, přičemž vzniklé reverzibilní vazby byly rozrušeny již klesajícím pH. V případě sorbentu s nosičem T-2 se však specifický imunoglobulin zachytil jen částečně; jeho větší část (84 %) protékla kolonou bez navázání na sorbent a byla vytěsněna již promývacím pufrem spolu s některými dalšími doprovodnými proteiny přítomnými v proteinové směsi (Obr.24 B). Na rozdíl od sorbentů založených na poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) částicích diskutovaných v předchozí kapitole, zde byl cílový protein z obou sorbentů vytěsněn již klesajícím pH; kompetitivní eluce (imidazolový koncentrační gradient, případně roztok EDTA) byla použita pouze pro vytěsnění některých zbylých doprovodných proteinů. Z toho lze usoudit, že se multimístné navázání proteinu v tomto případě uplatňuje zřejmě v menší míře než pro sorbenty s poly(GMA-co-DEGMA-co-EDMA) nosiči, což je zřejmě opět důsledek lepší distribuce imobilizovaných kovových komplexů v sorbentu.

Separací vlastnosti částicového sorbentu Ni²⁺-IDA-T-1 pro izolaci tohoto typu imunoglobulinu v jistém smyslu dokonce předčily separačními schopnostmi komerčního agarózového IMA nosiče Ni²⁺-IDA-Sepharose Fast Flow, který byl pro srovnání rovněž otestován (Obr.24 C); cílový protein se sice na oba sorbenty kvantitativně navázal, avšak jeho čistota v hlavních elučních frakcích dosahovala pouze 65 % pro Ni²⁺-IDA-Sepharose Fast Flow na rozdíl od Ni²⁺-IDA-T-1 (73%); hlavním proteinem doprovázejícím eluovaný HRP-spec. IgG₁ byl transferrin, což bylo zjištěno nízkonapětovou zónovou elektroforézou na

polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Celkové kapacity obou sorbentů pro specifické navázání imunoglobulinu však byly srovnatelné (~2 mg IgG₁/ ml zbotn. sorbentu).



Obr. 24. IMAC ascitické tekutiny obsahující HRP-spec.IgG₁ na částicích Ni²⁺-IDA- GMA-*co*-HPMA-*co*-EDMA T-1 (A) a T-2 (B) a na Ni²⁺-IDA Sepahrose Fast Flow (C) (2 ml zbotn. sorbentu): (a) vytěsnění nenavázaných proteinů z mezičásticového prostoru rovnovážným pufrem (0,05 M K₃PO₄, 0,5 M NaCl, pH 8), eluce reverzibilně navázaných proteinů (b) pH gradientem (6 → 4,5), (c) imidazolovým koncentračním gradientem (0,1 → 0,5 M), (d) 0,05 M EDTA v 0,5 NaCl. Prázdné plochy odpovídají celkovému obsahu proteinů vytěsněných z kolony (zjištěno spektrofotometricky), vyplněné plochy odpovídají obsahu HRP-spec.IgG₁ v elučních frakcích (zjištěno ELISA titrací).

5.3.3. Souhrn výsledků kapitoly 5.3.

Terpolymerní kulovité částice poly(GMA-*co*-DEGMA-*co*-EDMA) (průměr částic 100-350 μm) byly připraveny s různou porozitou. Distribuce velikostí pórů byly zjišťovány z rtuťové porozimetrie. Navázání chelatujících skupin kyseliny iminodioctové probíhalo s využitím reaktivních oxiranových skupin polymeru, kdy byly použity tři modifikační postupy s cílem získat různou koncentraci imobilizovaných chelatujících skupin.

Využitelnost nikelnatých komplexů imobilizované kyseliny iminodioctové v ligandové výměně byla testována pro dvě modelové látky -imidazol nebo monoklonální GTH-spec. IgG₁ s použitím série připravených sorbentů se stoupající porozitou polymerního nosiče a stoupající koncentrací imobilizovaných kovových komplexů. Získané výsledky lze shrnout do těchto hlavních bodů:

- 1) Výrazné zvýšení koncentrace imobilizovaných Ni²⁺-IDA komplexů mělo pouze mírný vliv na množství specificky sorbovaného imidazolu při použití neporézního polymerního nosiče
- 2) Zvýšení koncentrace imobilizovaných Ni²⁺-IDA komplexů podstatně zvýšilo množství specificky sorbovaného imidazolu, avšak nikoli specifického imunoglobulinu, pokud byl použit sorbent s porézní strukturou polymerního nosiče
- 3) Přítomnost pórů velkých průměrů v matrici polymerního nosiče (0,1-20 μm) měla rozhodující vliv v množství specificky navázané modelové látky, ať již se jednalo o imidazol či monoklonální imunoglobulin
- 4) Hodnota specifického povrchu polymerního nosiče neměla rozhodující vliv na množství navázané modelové látky (imidazolu nebo monoklonálního imunoglobulinu IgG₁)

Uvedené výsledky byly publikovány v *J. Biochem. Biophys. Methods* 67, 7–25 (2006).

Podobné závěry byly získány i pro Ni²⁺-IDA sorbenty založené na poly(GMA-*co*-HPMA-*co*-EDMA) částicích (HPMA = 2-hydroxypropyl-methakrylát), kdy na sorbentu obsahujícím významný podíl makropórů (120-200 nm) v nosiči byla úspěšně provedena izolace monoklonálního imunoglobulinu HRP-spec. IgG₁ z proteinové směsi. Jeho separační schopnosti byly srovnatelné se separačními vlastnostmi komerčního chelatujícího agarózového gelu. Sorbent s převahou malých pórů v nosiči byl pro tento účel mnohem méně vhodný, byť průměry většiny jeho pórů přesahovaly rozměry cílového imunoglobulinu. Tyto výsledky byly publikovány v *J. Chromatogr. A* 954, 115–126 (2002).

5.4. Membránové polymerní nosiče

5.4.1. Příprava plochých listů poly(DEGMA-*co*-EDMA) membrán a jejich vlastnosti

Homogenní ploché listy poly[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl-methakrylát-*co*-ethylen-dimethakrylátu] {poly(DEGMA-*co*-EDMA)} membrán s tloušťkou 73 μm silné byly připraveny radikálovou polymerizací iniciovanou fotochemicky s iniciátorem benzoin ethyl etherem. Rovnovážný stupeň botnavosti membrán ve vodě a v pyridinu byl sledován v závislosti na stupni sesítění. Jelikož kopolymerizační parametry obou monomerů, jak již bylo uvedeno v kapitole 5.2., jsou blízké jedné [121], předpokládáme, že kopolymerizace probíhala ideálně a stupeň sesítění byl určen obsahem síťovadla v monomerní směsi.* S klesajícím stupněm sesítění podle očekávání stupeň botnavosti v rozpouštědle stoupal (Tabulka 14) a zároveň byl lépe zachován tvar připraveného hydrogelu; při vyšším stupni sesítění často docházelo k poškození membrány vlivem botnacích tlaků.

Získané hodnoty stupně botnavosti ve vodě dobře korelují s vlastnostmi biokompatibilních mírně sesíťovaných hydrogelů obsahujících monomer DEGMA, které byly podrobně studovány v pracích Gatenholma, Michálka a Vacíka [136,137], a které nacházejí široké využití v mnoha biochemických aplikacích.

Vzhledem k vysokému obsahu vody za současného zachování tvaru plochého listu byly zbotnalé homogenní polymerní membrány se stupněm sesítění 0,5 % vybrány pro další zkoumání. Byly modifikovány chelatujícími skupinami kyseliny iminodioxové a byly zjišťovány možnosti jejich praktického využití. Vlastnosti získaných chelatujících membránových sorbentů s různou koncentrací chelatujících skupin byly srovnávány s vlastnostmi částicových poly(DEGMA-*co*-EDMA) sorbentů, kterým byla věnována kapitola 5.2.

* Pozn.: Přítomnost síťovadla v připraveném monomeru DEGMA (zjištěno GC/MS) byla zahrnuta ve výpočtu hmotnostních poměrů monomerních směsí.

Tabulka 14. Botnavost poly(DEGMA-*co*-EDMA) membrán v závislosti na stupni sesítnění.

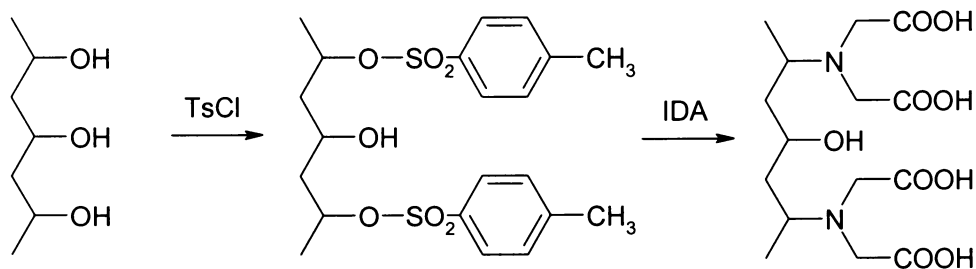
Stupeň sesítnění (%)	Stupeň botnavosti (%)	
	ve vodě	v pyridinu ^a
5.5	69	-
3	77	-
2.5	85	-
2	96	-
1.5	102	-
1	146	320
0.5	240	380

^a Z důvodu destrukce membrány nelze stupeň botnavosti spolehlivě stanovit.

5.4.2. Modifikace plochých listů poly(DEGMA-*co*-EDMA) membrán chelatujícími skupinami

Dvoukroková modifikace kyselinou iminodioctovou zahrnovala přeměnu hydroxyskupin membrány na dobře odstupující tosyloxyskupiny reakcí s tosylchloridem (katalyzátor 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridin, DMAP) následová substitucí vzniklých tosyloxyskupin kyselinou iminodioctovou (Schema 10). První modifikační krok -tosylace- byl prováděn opět jako v případě poly(DEGMA-*co*-EDMA) částic v pyridinu. Zde bylo však potřeba zabránit mechanickému poškození membrány vzhledem k vysokému stupni botnavosti v pyridinu (Tabulka 14), proto byla změna rozpouštědla prováděna kondicionováním, kdy byl plochý list membrány přemísťován z vody do pyridinu postupně přes směsi voda-pyridin s postupným zvyšováním obsahu pyridinu.

Druhý reakční krok, připojení kyseliny iminodioctové, byl prováděn ve vodném pufru. Opět bylo prováděno nejprve kondicionování membrány z pyridinu do vody.



Schema 10. Postup zavedení chelatujících skupin kyseliny iminodipropionové (IDA) na poly(DEGMA-*co*-EDMA) membránu. Modifikační proces zahrnuje přeměnu hydroxylových skupin membrány na tosyloxyskupiny následovanou jejich substitucí kyselinou iminodipropionovou. Reakční podmínky: Krok 1: pyridin, DMAP, 20°C, 48 h nebo aq., 25°C, 168 h; krok 2: 1 M Na₂CO₃/1 M NaHCO₃, 45 °C, 120 h.

Tímto modifikačním postupem byla až třetina všech přítomných polymerních hydroxyskupin přeměněna v tosyloxyskupiny díky dostatečné přístupnosti reakčního partnera ve vysoce zbotnalé polymerní síti. Vysoká reaktivita tosyloxyskupin pak zajistila i vysoký stupeň přeměny v cílové chelatující skupiny kyseliny iminodipropionové ve druhém modifikačním kroku. Množství vzniklých tosyloxyskupin stejně jako skupin kyseliny iminodipropionové bylo regulováno poměrem komponent v reakční směsi. Jejich výsledné koncentrace po připojení na ploché listy membrán shrnuje Tabulka 15.

Nicméně tento pracný postup, kdy navíc často docházelo k poškození (natržení) plochého listu při modifikacích v pyridinu, byl nahrazen alternativním postupem, kdy bylo použito pouze vodného prostředí při veškerých manipulacích s membránou. Tím bylo ve velké míře zamezeno mechanickému poškození plochého listu membrány. Tosylace hydroxyskupin v heterogenním prostředí, kdy byl posun rovnováhy ve prospěch vzniku produktu zajišťován průběžným přísunem NaOH s cílem neutralizovat kyselinu vznikající při reakci, je obdobou Schottenovy-Baumannovy metody, kdy reakce alkoholů nebo aminů s chloridy organických kyselin na odpovídající estery probíhá ve vodném prostředí v přítomnosti nejméně stechiometrického množství vodného roztoku alkalického hydroxidu, který je k reakční směsi postupně přidáván.

Ačkoli tosylace ve vodném prostředí probíhala delší dobu než tosylace v pyridinu (cca 3,5 krát), konečné množství vzniklých tosyloxyskupin (0,48 mmol/g) bylo přibližně třikrát nižší (Tabulka 15). K porušení plochého listu membrány však nedocházelo. Stejným způsobem jako v předchozím případě (ve vodném pufru) byly poté na membránu zavedeny chelatující skupiny kyseliny iminodipropionové.

Tabulka 15. Charakteristika modifikovaných poly(DEGMA-*co*-EDMA) membrán. (Hodnoty jsou vztaženy na g suché polymerní hmoty.)

-OH skupiny (mmol/g)	-OTs ^a skupiny (mmol/g)	IDA ^b skupiny (mmol/g)	Komplexované ionty (μmol/g) ^c			Zbylé komplexy (%) při změně pH na 8 ^c		
			Ni ²⁺ pH 4.5	Cu ²⁺ pH 4.5	Fe ³⁺ pH 2.7	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Fe ³⁺

modifikace v pyridinu

5,72	1,02	0,79	785	652	150	95,7	99,2	100,0
		0,96	951	944	259	98,9	96,1	99,8
	1,36	1,09	1092	1069	793	96,3	99,1	97,1
		1,35	1258	1196	805	98,8	96,8	95,6

modifikace ve vodném prostředí

5,72	0,48	0,38	369	318	-	97,7	99,1	-
		0,44	421	398	-	98,1	96,2	-

^a ± 2 % stanoveno analýzou obsahu síry

^b ± 8 % stanoveno analýzou obsahu dusíku

^c ± 5 % stanoveno AAS

5.4.3. Studium komplexačních vlastností chelatujících poly(DEGMA-*co*-EDMA) membrán, srovnání s částicovými sorbenty

U získaných chelatujících sorbentů byla testována jejich schopnost tvořit komplexy s kovovými ionty (viz opět Tabulka 15). Získaná data potvrzují, že se jedná o sorbenty velmi dobře koordinující všechny studované kovové ionty (Ni²⁺, Cu²⁺ a Fe³⁺). Vyšší kapacita pro Ni(II) a Cu(II) v porovnání s „tvrdým“ Fe(III) je opět v souladu s již zmiňovanou Pearsonovou komplexační teorií [11]. Ve srovnání s chelatujícími sorbenty založenými na částicových poly(DEGMA-*co*-EDMA) nosičích se stupněm sesítění 10 % (kapitola 5.2.3., Tab.3, str.83), byla v tomto případě sorpční kapacita pro komplexaci těchto kovových iontů přibližně 5-10 krát vyšší. Důvodem je především lepší roztažnost polymerní sítě jako důsledek nižšího stupně sesítění, který dovoluje navázat větší množství chelatujících skupin. Tvar polymerního nosiče a typ chelatujících skupin však rovněž ovlivňují výsledné množství koordinovaných kovových iontů.

Získané hodnoty sorpčních kapacit pro kovové ionty jsou srovnatelné s hodnotami jiných adsorbentů, které používají mechanismus iontové výměny pro odstranění kovových iontů z vodných roztoků [138-140], což předurčuje potenciální využití připravených chelatujících poly(DEGMA-*co*-EDMA) membrán pro odstraňování toxických kovových iontů z odpadních vodných roztoků. Sorbenty jsou navíc snadno regenerovatelné aniž by docházelo ke snižování jejich chelatačních schopností, neboť ani po trojnásobném opakování sorpce kovů na regenerovaných sorbentech se jejich kapacita nezměnila. Kovové ionty lze ze sorbentu kvantitativně odstranit pouhým ponořením do roztoku disodné soli EDTA na 12-24 hodin. Po promytí jsou opět připraveny k opakovanému použití.

Sorpce kovů byla prováděna stejně jako pro částicové sorbenty v kyselém prostředí (pH 4,5) (v případě FeCl₃ bylo pH opět sníženo na 2,7). Zvýšení pH na 8 ani zde nezpůsobilo významný pokles v koncentraci imobilizovaných kovových iontů, neboť nejméně 96 % jich zůstalo ve formě komplexu.

5.4.4. Modelové studie sorpce imunoglobulinu G na Ni(II)-IDA-DEGMA-*co*-EDMA membránách v IMA metodě, modely izotherm

Chelatující Ni²⁺-IDA-DEGMA-*co*-EDMA membrány byly testovány též v metodě IMA pro modelovou studii sorpce myšího sérového imunoglobulinu G šaržovitými („batch“) experimenty.

Interakce mezi molekulou proteinu a sorbentem s imobilizovaným kovovým iontem byla vysvětlena na základě různých modelů izotherm, které popisují rovnovážný vztah mezi volnou a adsorbovanou látkou. Nejjednodušší Langmuirova izoterma předpokládá, že všechna vazebná místa mají stejnou energii, jsou na sobě nezávislá (neinteragují spolu) a že se adsorbovaná látka naváže v rovnováze na jedno vazebné místo. Ačkoli byla Langmuirova teorie původně vyvinuta pro popis adsorpce plynů na pevné povrchy, byla úspěšně aplikována též v případě adsorpce proteinů na IMA sorbenty. Příklady využití modelu Langmuirovy izothermy v metodě IMA jsou diskutovány v Teoretické části. V případě mnoha IMA adsorpcí však tento model nedokáže uspokojivě popsat interakci mezi imobilizovaným kovem a proteinem. Důvodem odchylek od Langmuirova modelu je nejen rozdíl ve velikosti mezi molekulami proteinů a malými molekulami plynů, ale též heterogenní podstata většiny

pevných povrchů, dále vzájemná kooperativní interakce mezi adsorbovanými molekulami a nespecifické (iontové nebo hydrofóbní) sorpce proteinu s pevným nosičem.

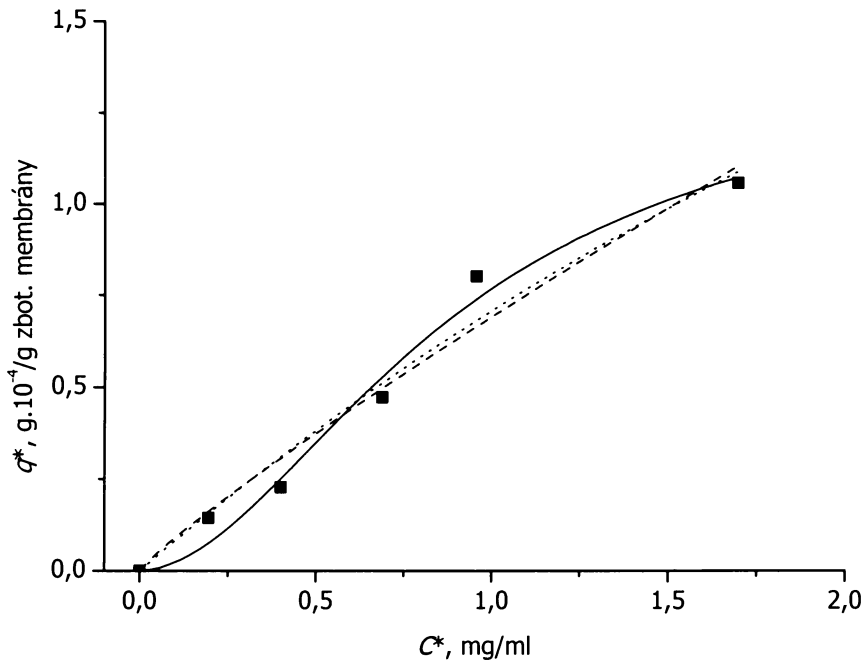
Pro popis adsorpce myšního imunoglobulinu G na Ni²⁺-IDA komplexy poly(DEGMA-co-EDMA) membrán je Langmuirův model rovněž nevyhovující. Adsorpční chování v tomto případě nejlépe vystihuje tříparametrový Langmuirův-Freundlichův model (Obr.25), kterým bylo již popsáno adsorpční chování myšního monoklonálního imunoglobulinu IgG₁ na Zn²⁺-IDA komplexech imobilizovaných na membráně poly(ethylen-graft-vinyl alkohol) [91] nebo adsorpce lysozymu, konalbuminu či BSA (hovězí sérový albumin) na IDA-Ni²⁺ a IDA-Cu²⁺ agaróze [141].

Langmuirův-Freundlichův model je popsán rovnicí

$$q^* = \frac{q_{m(LF)} (C^*)^n}{K_d^* + (C^*)^n}, \quad (8)$$

kde q^* je množství adsorbovaného proteinu, C^* je rovnovážná koncentrace proteinu v kapalně fázi, K_d^* je zdánlivá disociační konstanta, $q_{m(LF)}$ maximální vazebná kapacita chelatujícího sorbentu a n Langmuirův-Freundlichův koeficient. Tento model vysvětluje kooperativní chování vazebných míst při interakci kovového iontu s proteinem, což znamená, že vazebné místo na povrchu sorbentu obsazené proteinem ovlivňuje pozitivně ($n > 1$) nebo negativně ($0 < n < 1$) přilehlé vazebné místo k navázání proteinu a jedná se pak o pozitivní či negativní kooperativitu při vazebném procesu. Pro čistě nezávislá a neinteragující místa je hodnota empirického koeficientu $n = 1$. Zdánlivá disociační konstanta K_d^* pak zahrnuje příspěvky z vazby kovového iontu nejen k jedné molekule proteinu, ale i jeho asociovaným formám.

Tříparametrová Langmuirova-Freundlichova funkce se redukuje na dvouparametrové funkce za zjednodušujících podmínek. Při nízkých koncentracích na Freundlichův model ($q = FC^n$, kde F je Freundlichova konstanta) a pro homogenní povrchy na Langmuirův model $q = q_m C / (K_d + C)$, kde q_m je maximální vazebná kapacita a K_d disociační konstanta. Zmíněné dvouparametrové modely však bohužel nevystihují uspokojivě adsorpční chování imunoglobulinu G na plochých listech Ni²⁺-IDA-DEGMA-co-EDMA membrány.



Obr.25. Adsorpce myšního imunoglobulinu G na Ni^{2+} -IDA-DEGMA-co-EDMA membráně v 0,05 M fosfátovém pufru (pH 8, 0.5 M NaCl) při 20°C. Koncentrace Ni^{2+} -IDA komplexů: 1,1 mmol/g. Křivky vznikly proložení experimentálních bodů Langmuirovým-Freundlichovým (plná čára), Langmuirovým (tečkovaná čára) a Freundlichovým (přerušovaná čára) modelem adsorpční izotermy.

Pomocí Langmuirova-Freundlichova modelu byl studován vliv koncentrace Ni^{2+} -IDA komplexů imobilizovaných na poly(DEGMA-co-EDMA) membráně na sorpci myšního imunoglobulinu G. Z tohoto modelu pak byly vypočítány hodnoty termodynamických parametrů $q_{m(LF)}$, n a K_d^* (Tabulka 16). U všech studovaných koncentrací Ni^{2+} -IDA komplexů byl patrný pozitivní kooperativní efekt vazebných míst membrány ($n > 1$), který je pravděpodobně způsoben již v předchozích kapitolách diskutovanou „protein-multiple ligand“ interakcí, kdy molekula proteinu interaguje s několika vazebnými místy na sorbentu najednou. Vliv kooperativity vazebných míst se snižující se koncentrací Ni^{2+} -IDA komplexů, jak se zdá, poněkud slábl, neboť hodnoty parametru n mírně klesaly. Hodnoty K_d^* v řádu 10^{-6} odpovídají afinitě pseudobiospecifických nosičů. Avšak hodnoty maximálních vazebných kapacit $q_{m(LF)}$ membrány pro navázání imunoglobulinu G jsou pro všechny studované koncentrace Ni^{2+} -IDA komplexů dosti nízké; pro jiné IMA membrány jsou tyto hodnoty podstatně vyšší pro stejný typ modelového proteinu (IgG₁) [91]. To je zřejmě důsledkem

špatné dostupnosti těch imobilizovaných Ni(II) pro interakci s proteinem, které jsou umístěny uvnitř polymerní sítě homogenní poly(DEGMA-*co*-EDMA) membrány. Použitelnost připravených chelatuujících membrán v IMA metodě je z tohoto důvodu podobně jako pro homogenní částice poly(DEGMA-*co*-EDMA) (kap.5.2.) omezena pouze pro sorpce analytického množství proteinu.

Vliv nežádoucích nescifických (elektrostatických nebo hydrofóbních) interakcí mezi proteinem a pevným membránovým nosičem nebyl pozorován, neboť studovaný protein se na nemodifikované poly(DEGMA-*co*-EDMA) membrány nesorboval.

Tabulka 16. Adsorpční parametry zjištěné z modelu Langmuirovy-Freundlichovy izotermy pro adsorpci myšího imunoglobulinu G na Ni²⁺-IDA komplexech imobilizovaných na plochých listech poly(DEGMA-*co*-EDMA) membrán při 20°C.

Koncentrace Ni ²⁺ -IDA (mmol/g) ^a	$q_{m(LF)}$ (μg/g) ^b	n	K_d^* (μmol.l ⁻¹)
1,35	139±33	1,90±0,22	2,97±0,16
1,09	125±28	1,85±0,40	5,75±0,36
0,44	122±36	1,68±0,40	7,58±0,55

^ahodnoty převzaty z Tabulky 15

^bvztaženo na g zbotnalé membrány

5.4.5. Souhrn výsledků kapitoly 5.4.

Ploché listy zesíťované hydrofilní polymerní membrány poly(DEGMA-*co*-EDMA) připravené radikálovou kopolymerizací 2-(2-hydroxyethoxy)ethyl-methakrylátu (DEGMA) a ethylen-dimethakrylátu (EDMA) vykazují po modifikaci chelatující skupinou (kyselinou iminodioctovou) vysokou kapacitu pro sorpci kovových iontů (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+}). Lze je proto potenciálně využít pro odstraňování toxických kovových iontů z odpadních vodných roztoků.

Při studiu sorpce modelového proteinu (myšního sérového imunoglobulinu G) na imobilizované Ni(II)-IDA komplexy šaržovitými experimenty bylo pozorováno chování, které bylo možné popsat tříparametrovou Langmuirovou-Freundlichovou izothermou. Maximální vazebné kapacity sorbovaného proteinu však byly nízké.

Výsledky této kapitoly jsou předloženy k publikování.

6. ZÁVĚR

Tato disertační práce se zabývá možnostmi využití syntetických polymerů pro přípravu chelatotvorných sorbentů a po vytvoření komplexů s kovovými ionty jejich použitím v ligandově výměnné chromatografii, zejména v její specifické součásti, chromatografii na imobilizovaných kovových iontech (IMAC), pro studium afinity k imunoglobulinům, případně jejich izolaci ze směsi. Zvláštní důraz je kladen na posouzení vlivu struktury těchto polymerů na fyzikálně-chemické a biochemické vlastnosti výsledných sorbentů.

Používány byly polymery založené na esterech kyseliny methakrylové tvaru sférických částic s průměry pohybujícími se v rozmezí jednotek až stovek mikrometrů, jež byly připravovány suspenzní radikálovou polymerizací ve vodném disperzním prostředí. Z důvodu následného využití pro biochemické aplikace bylo vždy snahou získat polymer s co nejvyšší hydrofilitou, která byla zajišťována přítomností hydrofilního monomeru. Byly připravovány částice s pokud možno porézní strukturou v rámci vytvoření dostatečné kapacity pro navázání cílové látky. Dalším požadavkem částic byl co nejvyšší objem zadržené vody a vodných roztoků pro zajištění možnosti styku s interaktivní látkou v ligandové výměně za současné malé změny jejich objemu pro zachování vhodných hydrodynamických parametrů v chromatografické koloně. Polymer dále musel obsahovat funkční skupiny, které bylo možné využít pro kovalentní připojení chelatujících skupin.

K navázání používaných chelatujících skupin (kyselin iminodictové a ethylendiamintriocetové, *N*-(2-pyridylmethyl)glycinu a chinolin-8-olu) sloužících k imobilizaci kovového iontu bylo využíváno polymerních hydroxylových nebo oxiranových skupin. Transformace hydroxyskupin zahrnovaly jejich tosylyaci, oxidaci, acylaci či přípravu urethanů reakcí s izokyanáty následované dalšími modifikačními kroky běžnými v organické syntéze. K polymeru obsahujícímu oxiranové skupiny byly chelatující skupiny navázány přímo substituční reakcí vedoucí k otevření tříčlenného cyklu. Změna koncentrace navázaných chelatujících skupin byla dosažena použitím rozpouštědla dobře botnajícího polymerní síť či zvýšením nukleofility reagentu.

Studovány byly sesítované částice 2-(2-hydroxyethoxy)ethyl-methakrylátu, 2,3-epoxypropyl-methakrylátu, případně 2-hydroxypropyl-methakrylátu sesítované ethylen-dimethakrylátem.

V případě síťovaných 2-(2-hydroxyethoxy)ethyl-methakrylátových částic (11-60 μm v průměru), kdy byla kulovitá forma zachována pouze pro homogenní polymerní strukturu, byla umožněna příprava sorbentů s příznivými kinetickými vlastnostmi vhodnými k dočištění bílkovin typu IgG₁ v analytickém měřítku.

Přídavkem třetího monomeru, 2,3-epoxypropyl-methakrylátu (glycidylmethakrylátu), k polymerační směsi bylo již možné připravit sérii sférických částic (s průměry cca 100-350 μm) lišících se porézní strukturou, na které bylo možné zavést různé koncentrace imobilizovaných kovových komplexů. Rozboru vnitřních struktur těchto částic byla věnována značná pozornost. Stejně tak byl vliv porézní struktury polymerního nosiče v IMAC studován též pro sesíťované částice glycidyl-methakrylátu s 2-hydroxypropyl-methakrylátem. Proporcionální zvýšení obsahu makropórů s průměry nad 100 nm mělo vždy pozitivní vliv v ligandové výměně v koordinační sféře kovu na množství reversibilně navázané cílové látky. Velikost pórů měla též vliv na sílu interakce mezi sorbentem a reversibilně navázaným proteinem pravděpodobně v důsledku menšího uplatnění multiligandové interakce uvnitř velkých pórů. Obsah meso- a mikro- pórů polymerního nosiče, celková hodnota jeho specifického povrchu a celková koncentrace imobilizovaných kovových komplexů měly v porovnání s proporcionálním obsahem makropórů mnohem menší vliv na množství navázané cílové látky, ať již se jednalo o modelové studie či izolaci cílového imunoglobulinu z proteinové směsi.

Sesíťovaný 2-(2-hydroxyethoxy)ethyl-methakrylát s nízkým stupněm sesíťování (0,5 %) byl připraven též ve formě plochých listů homogenních membrán. Díky schopnosti tohoto hydrogelu zadržovat velké množství polárního rozpouštědla byla zajištěna možnost vysokého stupně přeměny polymerních hydroxyskupin v chelatující skupiny (kyseliny iminodiacetové), čímž byl získán sorbent s vysokou kapacitou pro imobilizaci kovových iontů (o řád vyšší než pro jeho částicový protějšek), která byla srovnatelná s kapacitou sorbentů používaných pro odstraňování kovových iontů z odpadních vodných roztoků. Tento sorbent však nebyl vhodný pro použití v ligandové výměně modelového imunoglobulinu.

Konstrukce ideálního sorbentu pro ligandově výměnnou chromatografii, potažmo pro úspěšnou izolaci cílového proteinu ze směsi, vyžaduje řešení ještě dalších otázek. Presentované výsledky však mohou posloužit k lepší orientaci v nepřeberném množství možností pro přípravu takových sorbentů.

7. DODATEK

7.1. Seznam publikovaných prací autorky disertační práce

- 1) **Kateřina Mészárosová**, Antonín Holý and Milena Masojídková: Synthesis of acyclic adenine 8,N-anhydronucleosides, *Collect Czech Chem Commun* 65, 1109-25 (2000).
- 2) Galina Tishchenko, Jiří Dybal, **Kateřina Mészárosová**, Zdeňka Sedláková and Miroslav Bleha: Purification of the specific immunoglobulin G₁ by immobilized metal ion affinity chromatography using nickel complexes of chelating porous and nonporous polymeric sorbents based on poly(methacrylic esters). Effect of polymer structure. *J Chromatogr A* 954, 115-26 (2002).
- 3) **Kateřina Mészárosová**, Galina Tishchenko, Miroslav Bleha: Příprava nových chelatujících nosičů pro separaci specifického imunoglobulinu IgG₁ z myší ascitické tekutiny afinitní chromatografií na imobilizovaných kationtech kovů (IMAC). konference Sigma-Aldrich, sborník, *Chem Listy* 96, 228 (2002).
- 4) **Kateřina Mészárosová**, Galina Tishchenko, Karel Bouchal, Miroslav Bleha: Immobilized-metal affinity sorbents based on hydrophilic methacrylate polymers and their interaction with immunoglobulins. *React Funct Polym* 56, 27-35 (2003).
- 5) **Kateřina Mészárosová**, Galina Tishchenko, Miroslav Bleha: Vliv typu matrice a množství chelatujících skupin v pseudoafinitní chromatografii na imobilizovaných kationtech kovů (IMAC). konference Sigma-Aldrich, sborník, *Chem Listy* 97, 281 (2003).
- 6) **Kateřina Kráčalíková**, Galina Tishchenko, Miroslav Bleha: Effect of the matrix structure and concentration of polymer-immobilized Ni²⁺-iminodiacetic acid complexes on retention of IgG₁. *J Biochem Biophys Methods* 67, 7-25 (2006).
- 7) **Kateřina Kráčalíková** and Miroslav Bleha: Chelating polymer-based membranes. Preparation and their potential use for metal ion removal and sorption of the murine immunoglobulin G by immobilized Ni(II) ions. *Polym Bull*, předloženo k publikování.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Runge F.F.: Der Bildungstrieb der Stoffe, veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bildern. *Oranienburg* (1855).
2. Erlenmeyer H., Dahn H.: Beitrag zur chromatographischen Methode in der anorganischen Chemie. *Helv. Chim. Acta*, 22, 1369 (1939).
3. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.: Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-9 (1975).
4. Hutchens T.W., Yip T.T., Porath J.: Protein interaction with immobilized ligands: Quantitative analyses of equilibrium partition data and comparison with analytical chromatographic approaches using immobilized metal affinity adsorbents. *Anal. Biochem.* 170, 168-182 (1988).
5. Kney A.D, Zhao D.: A pilot study on phosphate and nitrate removal from secondary wastewater effluent using a selective ion exchange process. *Environ. Technol.* 25, 533-542 (2004).
6. Dambies L.: Existing and prospective sorption technologies for the removal of arsenic in water. *Sep. Sci. Technol.* 39, 603-627 (2004).
7. Catalogue Supelco Chromatography products for analysis and purification, pp. 143-144 (2000).
8. Shahwan G.J., Jezorek J.R.: Liquid chromatography of phenols on an 8-quinolinol silica gel-iron (III) stationary phase, *J. Chromatogr.* 256, 39-48 (1983).
9. Hrubý M., Hradil J., Beneš M.J.: Interactions of phenols with silver(I), copper(II) and iron (III) complexes of chelating methacrylate-based polymeric sorbent containing quinolin-8-ol groups, *React. Funct. Polym.* 59, 105-118 (2004).
10. Liu C.Y., Hu C.C., Yeh K.Y., Chen M.J.: Synthesis of chelating resins and its application in ligand-exchange chromatography. *Fresenius J. Anal. Chem.* 339, 877-881 (1991).
11. Pearson R.G.: Hard and soft acids and bases, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3533-3539 (1963).
12. Kučerová Z.: Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech, *Chem. Listy* 85, 526-534 (1991).
13. Zachariou M., Hearn M.T.V.: High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. CXXI. 8-Hydroxyquinoline-metal chelate chromatographic support: an additional mode of selectivity in immobilized-metal affinity chromatography. *J. Chromatogr. A* 599, 171-177 (1992).
14. Sulkowski E., Vastola K., Oleszek D., Muenchhausen W.Von: Surface topography of interferons: A probe by metal chelate chromatography, (C.J. Gribnau, J. Visser, Nivard R.J.F., eds.), *Affinity chromatography and related techniques* 313-322 (1982).
15. Porath J., Olin B., Granstrand B.: Immobilized-Metal Affinity Chromatography of Serum Proteins on Gel-immobilized Group III A Metal ions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 225, 543-547 (1983).
16. Sulkowski E.: Purification of proteins by IMAC.: *Trends Biotechnol.*, 3, 1-7 (1985).
17. Rulíšek L., Havlas Z.: Theoretical studies of Metal ion selectivity. 1. DFT calculations of interaction energies of amino acid side chains with selected transition metal ions (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺). *J. Am. Chem. Soc.* 122, 10428-10439 (2000).
18. Sulkowski E.: The Saga of IMAC and MIT. *BioEssays* 10, 170-175 (1989).

19. Hemdan E.S., Zhao Y.-J., Sulkowski E., Porath J.: Surface topography of histidine residues: A facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 1811-1815 (1989).
20. Sawadogo M., Van Dyke M.W.: Indirect use of immobilized metal affinity chromatography for isolation and characterization of protein partners. *Genet. Eng.*, 17, 53-65 (1995).
21. Cotton F.A., Wilkinson G: *Advanced Inorganic Chemistry*, Second Edition, John Wiley & Sons (1966).
22. Gooding K.M., Rassi Z.E., Horváth Cs.: Metal Interaction Chromatography, *HPLC of biological macromolecules*, Marcel Dekker, New York (2002).
23. Porath J.: IMAC-Immobilized metal ion affinity based chromatography. *Trends Anal. Chem.* 7, 254-259 (1988).
24. Chaga G.S., Ersson H., Porath J.O.: Isolation of calcium binding proteins on selective adsorbents application to purification of bovine calmodulin. *J. Chromatogr. A*, 732, 261-269 (1996).
25. Hochuli E., Dobeli H., Schacher S.: New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr. A*, 411, 177-184 (1987).
26. Suen S.-Y., Liu Y.-C., Chang C.-S.: Exploiting immobilized metal affinity membranes for the isolation or purification of therapeutically relevant species. *J. Chromatogr. B*, 797, 305-319 (2003).
27. Bacolod M.D., El Rassi Z.: High-performance metal chelate interaction chromatography of proteins with silica-bound ethylenediamine-N,N'-diacetic acid. *J. Chromatogr. A*, 512, 237-247 (1990).
28. Parrish J.R.: Selective ion-exchangers from polystyrene. *Chem. Ind.* 137-137 (1956).
29. Seubert A., Petzold G., McLaren J.W.: Synthesis and application of an inert type of 8-hydroxyquinoline-based chelating ion exchanger for sea-water analysis using on-line inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 10, 371-379 (1995).
30. Martins A.O., da Silva E.L., Carasek E., Goncalves N.S., Laranjeira M.C.M., de Favere V.T.: Chelating resin from functionalization of chitosan with complexing agent 8-hydroxyquinoline: application for metal ions on line preconcentration system. *Anal. Chim. Acta* 521, 157-162 (2004).
31. Holmes L.D., Schiller M.R.: Immobilized iron (III) metal affinity chromatography for the separation of phosphorylated macromolecules: Ligands and applications. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 20, 123-42 (1997).
32. Diez S., Zhou P., Daunert S., Valiente M.: Immobilized soft-metal affinity system for amino-acids based on an 8-hydroxyquinoline-Pd(II) complex-characterization using glycine as a model. *Anal. Chim. Acta* 315, 339-345 (1995).
33. Zachariou M., Hearn M.T.W.: Application of immobilized metal ion chelate complexes as pseudocation exchange adsorbents for protein separation. *Biochemistry* 35, 202-211 (1996).
34. Novotná L., Hrubý M., Beneš M.J., Kučerová Z.: Affinity chromatography of porcine pepsin A using quinolin-8-ol as ligand. *J. Chromatogr. A*, 1084, 108-112 (2005).
35. Xiao J., Meyerhoff M.E.: Retention behaviour of amino acids and peptides on protoporphyrin-silica stationary phases with varying metal ion centres. *Anal. Chem.* 68, 2818-2825 (1996).

36. Jiang W., Graham B., Spiccia L., Hearn M.T.: Protein selectivity with immobilized metal ion-tacn sorbents: Chromatographic studies with human serum proteins and several other globular proteins. *Anal. Biochem.* 255, 47-58 (1998).
37. Gambero A., Kubota L.T., Gushikem Y., Airolidi C., Granjeiro J.M., Taga E.M., Alcantara E.F.C.: Use of chemically modified silica with β -diketoamine groups for separation of α -lactoalbumin from bovine milk whey by affinity chromatography *J. Colloid Interface Sci.*, 185, 313-316 (1997).
38. Zachariou M., Traverso I., Hearn M.T.W.: High-performance liquid chromatography of amino acid, peptides and proteins. CXXXI. O-Phosphoserine as a new chelating ligand for use with hard Lewis metal ions in the immobilized-metal affinity chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A* 646, 107-120 (1993).
39. Chaouk H., Middleton S., Jackson W.R., Hearn M.T.W.: Constrained immobilized metal ion chelate affinity adsorbents for protein purification. *J. Biol.Chem.* 2, 153-190 (1997).
40. Chaouk H., Hearn M. T. W.: New ligand, *N*-(2-pyridylmethyl)aminoacetate, for use in the immobilized metal affinity chromatographic separation of proteins. *J. Chromatogr. A* 852, 105-115 (1999).
41. Mantovaara T., Pertoft H., Porath J.: Further characterization of carboxymethylated aspartic acid agarose-purification of human α_2 -macroglobulin and hemopexin. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13, 371-379 (1991).
42. Hansson H., Kagedal L.: Adsorption and desorption of proteins in metal chelate affinity chromatography. Purification of albumin. *J. Chromatogr.* 215, 333-339 (1981).
43. Odabasi M., Garipcan B., Denizli A.: Preparation of a novel metal-chelate affinity beads for albumin isolation from human plasma. *J. Appl. Polym. Sci.* 90, 2840-2847 (2003).
44. Emir S., Say R., Yavuz H., Denizli A.: A new metal chelate affinity adsorbent for cytochrome c. *Biotechnol. Prog.* 20, 223-228 (2004).
45. Akgöl S., Denizli A.: Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in catalase adsorption. *J. Mol. Catal.B: Enzymatic* 28, 7-14 (2004).
46. Garipcan B., Andac M., Uzun L., Denizli A.: Methacryloylamidocysteine functionalized poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads and its design as a metal-chelate affinity support for human serum albumin adsorption. *React. Funct. Polym.* 59, 119-128 (2004).
47. Garipcan B., Denizli A.: A novel affinity support material for the separation of immunoglobulin G from human plasma. *Macromol. Biosci.* 2, 135-144 (2002).
48. Denizli A., Yavuz H., Arica Y.: Monosize and non-porous p(HEMA-co-MMA) microparticles designed as dye- and metal-chelate affinity sorbents. *Colloids & Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 174, 307-317 (2000).
49. Denizli, A., Köktürk, G., Salih, B., Kozluca, A. and Piskin, E.: Congo Red- and Zn(II)-Derivatized Monosize Poly(MMA-HEMA) Microspheres as Specific Sorbent in Metal Chelate Affinity of Albumin, *J. Appl. Polym. Sci.*, 63, 27-33 (1997).
50. Denizli, A., Salih, B. and Piskin, E.: Congo Red and Cu(II) carrying poly(ethylene glycol dimethacrylate-hydroxyethyl methacrylate) microbeads as specific sorbents Albumin adsorption/desorption, *J. Chromatogr. A*, 731, 57-63 (1996).
51. Denizli A., Senel S., Arica M.Y.: Cibacron Blue F3GA and Cu (II) derived poly (2-hydroxyethylmethacrylate) membranes for lysozyme adsorption. *Colloids & Surfaces B* 11, 113-122 (1998).

52. Arica M.Y., Testereci H.N., Denizli A.: Dye-ligand and metal chelate poly(2-hydroxyethylmethacrylate) membranes for affinity separation of proteins. *J. Chromatogr. A* 799, 83-91 (1998).
53. Denizli A, Köktürk G., Yavuz H., Piskin E.: Albumin adsorption from aqueous solutions and human plasma in a packed-bed column with Cibacron Blue F3GA-Zn(II) attached poly(EGDMA-HEMA) microbeads. *React. Funct. Polym.*, 40, 195-203 (1999).
54. Bayramoglu G., Kaya B., Arica M.Y.: Procion Brown MX-5BR attached and Lewis metals ion-immobilized poly(hydroxyethyl methacrylate)/chitosan IPNs membranes: Their lysozyme adsorption equilibria and kinetics characterization. *Chem. Eng. Sci.* 57, 2323-2334 (2002).
55. Gupta M.N., Jain S., Roy I.: Immobilized metal affinity chromatography without chelating ligands: Purification of soybean trypsin inhibitor on zinc alginate beads. *Biotechnol. Prog.* 18, 78-81 (2002).
56. Jain S., Gupta M.N.: Purification of goat immunoglobulin G by immobilized metal-ion affinity using cross-linked alginate beads. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 39, 319-322 (2004).
57. D'Souza F., Lali A.: Purification of papain by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) on chelating carboxymethyl cellulose. *Biotechnol. Tech.* 13, 59-63 (1999).
58. Maruska A., Liesiene J., Serys A.: The method for preparing granulated cellulose. *Lithuanian Patent*, Nr. 2299 (1993).
59. Liesiene J, Račaityte K., Morkevičiene M., Valančius P., Bumelis V.: Immobilized metal affinity chromatography of human growth hormone Effect of ligand density. *J. Chromatogr. A* 764, 27-33 (1997).
60. Xi F., Wu J.: Macroporous chitosan layer coated on non-porous silica gel as a support for metal chelate affinity chromatographic adsorbent. *J. Chromatogr. A*, 1057, 41-47 (2004).
61. Rodrigues C.A., Reynaud F., Stadler E., Drago V.: Preparation, characterization, and chromatography properties of chitin modified with FeCl₃. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 22, 761-769 (1999).
62. Alvarez, C., Strumia, M. and Bertorello, H.: Preparation of adsorbents applicable to pseudobiospecific ligand affinity chromatography using different spacers and ligands. *React. Funct. Polym.* 34, 103-111 (1997).
63. Gomez C.G., Alvarez Igarzabal C.I., Strumia M.C.: Surface modification on poly(EGDMA-co-HEMA) synthetic matrices to be used as specific adsorbents. *Polymer* 46, 6300-6307 (2005).
64. Gomez C.G., Alvarez C.I., Strumia M.C.: Influence of the morphology of poly(EGDMA-co-HEMA) on the chemical modifications and retention of O-phosphothreonine. *J. Biochem. Biophys. Methods* 55, 23-36 (2003).
65. Alvarez C.I., Gomez C.G., Strumia M.C.: Influence of the polymeric morphology of sorbents on their properties in affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods* 49, 141-151 (2001).
66. Odabasi M., Uzun L., Denizli A.: Porous magnetic chelator support for albumin adsorption by immobilized metal affinity separation. *J. Appl. Polym. Sci.*, 93, 2501-2510 (2004).

67. Kara A., Osman B., Yavuz H., Besirli N., Denizli A.: Immobilization of α -amylase on Cu^{2+} chelated poly(ethylene glycol dimethacrylate-*n*-vinyl imidazole) matrix via adsorption. *React. Funct. Polym.*, 62, 61-68 (2005).
68. Hradil J., Švec F.: Reactive polymers. 61. Synthesis of strongly basic anion exchange methacrylate resins. *React. Polym.* 13, 43-53 (1990).
69. Hradil J., Králová E., Beneš M.J.: Methacrylate anion exchangers with enhanced affinity for nitrates. *React. Funct. Polym.* 33, 263-273 (1997).
70. Tennikova T.B., Náhůnek M., Švec F.: Modified macroporous copolymers of glycidylmethacrylate with ethylene dimethacrylate as sorbents for ion-exchange and hydrophobic interaction chromatography. *J.Liquid.Chromatogr.* 14, 2621-2632 (1991).
71. Gong B., Zhu J., Li L., Qiang K., Ren L.: Synthesis of non-porous poly(glycidylmethacrylate-co-ethylenedimethacrylate)beads and their application in separation of biopolymers. *Talanta* 68, 666-672 (2006).
72. Švec F., Hradil J., Čoupek J., Kálal J.: Reactive polymers I. Macroporous methacrylate copolymers containing epoxy groups. *Angew. Makromol. Chem.* 48, 135-143 (1975).
73. Hrudková H., Švec F., Kálal J.: Reactive polymers XIV. Hydrolysis of the epoxide groups of the copolymer glycidylmethacrylate-ethylenedimethacrylate. *Brit. Polym. J.* 9, 238-240 (1977).
74. Horák D., Pelzbauer Z., Bleha M., Ilavský M., Švec F., Kálal J.: Reactive polymers. XXXII. Effect of composition of polymerization feed on morphology and some physical properties of macroporous suspension copolymers glycidyl methacrylate-ethylene dimethacrylate. *J. Appl. Polym. Sci.* 26, 411-421 (1981).
75. Horák D., Labský J., Pilař J., Bleha M., Pelzbauer Z., Švec F.: The effect of polymeric porogen on the properties of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate). *Polymer* 34, 3481-3489 (1993).
76. Švec F.: Monolitické stacionární fáze pro HPLC. *Chem. Listy* 98, 232-238 (2004).
77. Švec F., Frechet J.M.: Modified poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) continuous rod columns for preparative-scale ion-exchange chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A*, 702, 89-95 (1995).
78. Zhang L., Zhang L., Zhang W., Zhang Y.: On-line concentration of peptides and proteins with the hyphenation of polymer monolithic immobilized metal affinity chromatography and capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 26, 2172-2178 (2005).
79. Luo Q., Zou H., Xiao X., Guo Z., Kong L., Mao X.: Chromatographic separation of proteins on metal immobilized iminodiacetic acid-bound molded monolithic rods of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate). *J. Chromatogr. A*, 926, 255-264 (2001).
80. Hou K.C., Zaniwski R.: Purification of urokinase by combined cation exchanger and affinity chromatographic cartridges. *J. Chromatogr.* 525, 297-306 (1990).
81. Iwata H., Saito K., Furusaki S., Sugo T., Okamoto J.: Adsorption characteristics of an immobilized metal affinity membrane. *Biotechnol. Prog.* 7, 412-418 (1991).
82. Camperi S.A., Grasselli M., Smolko E.E., Cascone O.: Preparation and characterisation of immobilised metal ion hollow-fibre polysulphone membranes. Their application in high-speed pectic enzyme fractionation. *Process Biochem.* 39, 1017-1024 (2004).
83. Klein E.: Affinity membranes: a 10-year review. *J. Membrane Sci.* 179, 1-27 (2000).

84. Wu C.-Y., Suen S.-Y., Chen S.-C., Tzeng J.-H.: Analysis of protein adsorption on regenerated cellulose-based immobilized copper ion affinity membranes. *J. Chromatogr. A* 996, 53-70 (2003).
85. Gaberc-Porekar V, Menart V.: Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods* 49, 335-360 (2001).
86. Ghosh R.: Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. *J. Chromatogr. A* 952, 13-27 (2002).
87. Wei Q., Yao R., Bao S.: Preparation of Immobilized Metal-chelated Affinity Chromatographic Membranes and Their Properties Study. *J. South China Univ. Technol.* 28, 82-87 (2000).
88. Rodemann K., Staude E.: Synthesis and characterization of affinity membranes made from polysulfone. *J. Membrane Sci.* 88, 271-278 (1994).
89. Beeskow T.C., Kusharyoto W., Anspach F.B., Kroner K.H., Deckwer W.-D.: Surface modification of microporous polyamide membranes with hydroxyethyl cellulose and their application as affinity membranes. *J. Chromatogr. A* 715, 49-65 (1995).
90. Tennikova T.B., Bleha M., Švec F., Almazova T.V., Belenkii B.G.: High-performance membrane chromatography of proteins, a novel method of protein separation. *J. Chromatogr. A* 555, 97-107 (1991).
91. Serpa G., Augusto E.F.P., Tamashiro W.M.S.C., Ribeiro M.B., Miranda E.A., Bueno S.M.A.: Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G₁ monoclonal antibody. *J. Chromatogr. B* 816, 259-268 (2005).
92. Kasper C., Meringova L., Freitag R., Tennikova T.: Fast isolation of protein receptors from streptococci G by means of macroporous affinity discs. *J. Chromatogr. A*, 798, 65-72 (1998).
93. Hagedorn J., Kasper C., Freitag R., Tennikova T.: High performance flow injection analysis of recombinant Protein G. *J. Biotechnol.* 69, 1-7 (1999).
94. Liu Y.-C., ChangChien C.-C., Suen S.-Y.: Purification of penicillin G acylase using immobilized metal affinity membranes. *J. Chromatogr. B*, 794, 67-76 (2003).
95. Camperi, S.A., Grasselli M., Navarro del Cañizo A.A., Smolko E.E., Cascone O.: Chromatographic characterization of immobilized metal ion hollow-fiber affinity membranes obtained by direct drafting. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 21, 1283-1294 (1998).
96. Camperi SA, Grasselli M, Cascone O.: High-speed pectic enzyme fractionation by immobilised metal ion affinity membranes. *Bioseparation* 9, 173-177 (2000).
97. Serafica G.C., Pimbley J., Belfort G.: Protein Fractionation Using Fast Flow Immobilized Metal Chelate Affinity Membranes. *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 21-36 (1994).
98. Reif O.-W., Nier V., Bahr U., Freitag R.: Immobilized metal affinity membrane adsorbers as stationary phases for metal interaction protein separation. *J. Chromatogr. A* 664, 13-25 (1994).
99. Camperi S.A., Auday R. M., Navarro del Cañizo A., Cascone O.: Study of Variables Involved in Fungal Pectic Enzyme Fractionation by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Process Biochem.* 31, 81-87 (1996).
100. Fitton V., Santarelli X.: Evaluation of immobilized metal affinity chromatography for purification of penicillin acylase. *J. Chromatogr. B*, 754, 135-140 (2001).
101. Zou H., Luo Q., Zhou D.: Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* 49, 199-240 (2001).

102. Belew M., Yip T.T., Andersson L., Porath J.: Interaction of proteins with immobilized Cu^{2+} . Quantitation of adsorption capacity, adsorption isotherms and equilibrium constants by frontal analysis. *J. Chromatogr.*, 403, 197-206 (1987).
103. Berkel P.M.V., Slot S.C.V.D., Driessen W.L., Reedijk J., Sherrington C.: Influence of the polymer matrix on the metal-ion uptake characteristics of ligand-modified poly(glycidyl methacrylate-co-trimethylolpropane trimethacrylate) polymers. *Eur. Polym. J.* 33, 303–310 (1997).
104. Verweij, P.D. and Sherrington, D.C.: High-surface-area Resins derived from 2,3-Epoxypropyl Methacrylate cross-linked with Trimethylolpropane Trimethacrylate, *J. Mater. Chem.*, 1, 371–374 (1991).
105. Kagedal, L.: Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (Chapter 8), *Protein purification*: Wiley-VCH, New York (Janson J.C., Rydén L. eds.), p. 311-342 (1998).
106. Murza A, Fernández-Lafuente R, Guisán J M.: Essential role of the concentration of immobilized ligands in affinity chromatography: Purification of guanidinobenzoate on an ionized ligand. *J. Chromatogr. B* 740, 211–218 (2000).
107. Zhang, S. and Sun, Y.: Study on protein adsorption kinetics to a dye–ligand adsorbent by the pore diffusion model. *J. Chromatogr. A*, 964, 35–46 (2002).
108. Wirth H.J., Unger K.K., Hearn M.T.W.: Influence of ligand density on the properties of metal-chelate affinity supports. *Anal. Biochem.* 208, 16–25 (1993).
109. Johnson R.D., Todd R.J., Arnold F.H.: Multipoint binding in metal-affinity chromatography II. Effect of pH and imidazole on chromatographic retention of engineered histidine-containing cytochromes c. *J. Chromatogr. A* 725, 225–235 (1996).
110. Houska M.: Disertační práce. Reaktivní polymery nesoucí aldehydové a epoxidové skupiny. VŠCHT Praha (1974).
111. Siggia, S., Maxcy, W.: Improved procedure for determination of aldehydes. *Anal. Chem.* 19, 1023-1025 (1947).
112. Blumrich, K.; Bandel, G.: Titrationen von schwachen Basen und starken Säuren in Eisessiglösung. *Angew. Chem.* 54, 374-375 (1941).
113. Mukkala V.-M., Kwiatkowski M., Kankare J., Takalo H.: Influence of Chelating groups on the luminiscence properties of europium (III) and terbium (III) chelates in the 2,2'-bipyridine series. *Helv. Chim. Acta* 76, 893-9 (1993).
114. Burckhalter J.H., Leib R.I.: Amino- and chloromethylation of 8-quinolinol. Mechanism of preponderant ortho substitution in phenols under Mannich conditions. *J. Org. Chem.* 26, 4078-4083 (1961).
115. Warburg O, Christian W.: Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.* 310, 384–421 (1941).
116. Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
117. Hale J.E., Beidler D.E.: Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 222, 29-33 (1994).
118. Porath J., Olin B.: Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry* 22, 1621-1630 (1983).

119. Todorova-Balvay D., Pitiot O., Bourhim M., Srikrishnan T., Vijayalakshmi: Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. *J. Chromatogr. B* 808, 57-62 (2004).
120. Mueller K. F., Heiber S. J., Plankl W. L.: Process for preparing hydrogels as spherical beads of large size. *US Patent 4,224,427* (1980).
121. Kopeček J., Lím D.: Mechanism of three-dimensional polymerization of glycol methacrylates. III. Contribution to the polymerization kinetics of the system diglycol monomethacrylate-glycol dimethacrylates-water. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 36, 2703-7 (1971).
122. Guevara-García J, Barba-Behrens N, Tapia-Benavides A, Rosales-Hoz M, Contreras R.: Coordination chemistry of iminodiacetic esters. Structural and spectroscopic characterization of copper (II) and zinc (II) monoethyliminodiacetato complexes. *Inorg. Chim. Acta* 239, 93-97 (1995).
123. Smrž, M., Slováková, S., Vermousek, I., Kiss F., Víška J.: Trojrozměrné makroporézní polymerní gelové materiály a způsob jejich přípravy. *Czechoslovak Patent 169, 326* (1977).
124. Tishchenko, G. A.; Bleha, M.; Škvor, J.; Boštík, T.: Effect of salt concentration gradient on separation of different types of specific immunoglobulins by ion-exchange chromatography on DEAE cellulose. *J. Chromatogr. B* 706, 157-166 (1998).
125. Godfrey, M.A., Kwasowski P., Clift R., Marks V.: Assessment of the suitability of commercially available SpA affinity solid phases for the purification of murine monoclonal antibodies at process scale.: *J. Immunol. Meth.* 160, 97-105 (1993).
126. Jyo A, Sassa M, Egawa H.: Properties of chelating resins prepared by addition of 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-5,7-dione to epoxy groups of poly(glycidyl methacrylate)s crosslinked with oligoethylene glycol dimethacrylates. *J. Appl. Polym. Sci.* 59, 1049-1057 (1996).
127. Švec F, Horák D, Kálal J.: Reactive polymers. IX. Preparation of macroporous chelate-forming resins from the copolymer glycidyl methacrylate-ethylenedimethacrylate containing iminodiacetic groups. *Angew. Makromol. Chem.* 63, 37-45 (1977).
128. Švec F., Hrudková H., Horák D., Kálal J.: Reactive polymers. VIII. Reaction of the epoxide groups of the copolymer glycidyl methacrylate-ethylenedimethacrylate with aliphatic amino compounds. *Angew. Makromol. Chem.* 63, 23-36 (1977).
129. Hemdan E S, Porath J.: Development of immobilized metal affinity chromatography I. Comparison of two iminodiacetate gels. *J. Chromatogr.* 323, 247-254 (1985).
130. Horák D., Beneš M.J., Gumargalieva K., Zaikov G.: A novel highly copper(II)-selective chelating ion exchanger based on poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) beads modified with aspartic acid derivative. *J. Appl. Polym. Sci.*, 80, 913-916 (2001).
131. Alvarez C, Bertorello H, Strumia M.: Preparation of new synthetic hydrogels containing galactose, applicable in affinity chromatography. *J. Appl. Polym. Sci.* 54, 1887-1891 (1994).
132. Patwardhan AV, Ataa MM.: Site accessibility and the pH dependence of the saturation capacity of a highly cross-linked matrix. Immobilized metal affinity chromatography of bovine serum albumin on chelating superose. *J. Chromatogr. A* 767, 11-23 (1997).

133. Zhang M, Sun Y.: Cooperation of solid granule and solvent as porogenic agents. Novel porogenic mode of biporous media for protein chromatography. *J. Chromatogr. A* 922 (77–86) 2001.
134. Gritti F, Piatkowski W, Guiochon G.: Comparison of the adsorption equilibrium of a few low-molecular mass compounds on a monolithic and a packed column in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 978, 81–107 (2002).
135. Tejeda-Mansir A, Montesinos R M, Gurmán R.: Mathematical analysis of frontal affinity chromatography in particle and membrane configurations. *J. Biochem. Biophys. Methods* 49, 1–28 (2001).
136. Gatenholm P, Michálek J, Vacík J: Synthesis and characterization of highly wettable hydrogel coatings for immobilization of marine bacteria. *Macromol. Symp.* 109, 127-133 (1996).
137. Karlsson J.O., Gatenholm P.: Solid-supported wettable hydrogels prepared by ozone induced grafting. *Polymer* 37, 4251-4256 (1996).
138. Denizli A., Garipcan B., Emir S., Patir S., Say R: Heavy metal ion adsorption properties of methacrylamidocysteine-containing porous poly(hydroxyethyl methacrylate) chelating beads. *Adsorpt. Sci. Technol.* 20, 607-617 (2002).
139. Shukla S.R., Pai R.S., Shendarkar A.D.: Adsorption of Ni(II), Zn(II) and Fe(II) on modified coir fibres. *Sep. Purif. Technol.* 47, 141-147 (2006).
140. Beauvais R.A., Alexandros S.D.: Polymer-supported reagents for the selective complexation of metal ions: an overview. *React. Funct. Polym.* 36, 113-123 (1998).
141. Sharma S., Agarwal G.P.: Interactions of proteins with immobilized metal ions: A comparative analysis using various isotherm models. *Anal. Biochem.* 288, 126-140 (2001).