



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007145885/15, 10.12.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
10.12.2007

(45) Опубликовано: 20.03.2009 Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2209665 C1, 10.08.2003. RU 2147290  
C1, 10.08.2000. RU 2098350 C1, 10.08.2003. RU  
2293571 C1, 20.02.2007. RU 2077475 C1,  
20.04.1997. SU 1503875 A1, 30.08.1989. RU  
2149827 C1, 27.05.2000. US 6592989 A,  
15.07.2003. US 6033780 A, 07.03.2000. US  
4335086 A, 15.06.1982.

Адрес для переписки:

167982, Республика Коми, г.Сыктывкар, ул.  
Коммунистическая, 28, Институт биологии Коми  
НЦ УрО РАН, пат. пов. Л.Б. Печерской

(72) Автор(ы):

Донцов Андрей Геннадиевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Институт биологии Коми научного центра  
Уральского отделения Российской академии  
наук (RU)

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АДСОРБЕНТА ДЛЯ ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области  
хроматографии белков, может быть использовано  
для очистки и фракционирования ферментов с  
использованием адсорбента - гидроксиапатита,  
который получают из брушита путем обработки

гидроксидом натрия при комнатной температуре с  
последующей выдержкой. Изобретение позволяет  
упростить процесс получения и увеличить  
сорбционную емкость целевого продукта. 1 з.п. ф-  
лы.

RU 2 349 377 C1

RU 2 349 377 C1

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 349 377** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.

**B01J 20/04** (2006.01)

**B01J 20/30** (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2007145885/15, 10.12.2007**

(24) Effective date for property rights: **10.12.2007**

(45) Date of publication: **20.03.2009 Bull. 8**

Mail address:

**167982, Respublika Komi, g.Syktyvkar, ul.  
Kommunisticheskaja, 28, Institut biologii  
Komi NTs UrO RAN, pat. pov. L.B. Pecherskoj**

(72) Inventor(s):

**Dontsov Andrej Gennadievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Institut biologii Komi nauchnogo tsentra  
Ural'skogo otdelenija Rossijskoj akademii  
nauk (RU)**

(54) **METHOD OF MAKING ADSORBENT FOR PURIFYING PROTEINS**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: present invention pertains to protein chromatography, and can be used for purifying and fractionating enzymes using an adsorbent - hydroxyapatite, which is obtained

from brushite through treatment with sodium hydroxide at room temperature with subsequent extraction.

EFFECT: invention simplifies the process and increases the sorption capacity of the end product.

2 ex, 2cl

R U 2 3 4 9 3 7 7 C 1

R U 2 3 4 9 3 7 7 C 1

Изобретение относится к области хроматографии белков, может быть использовано в биотехнологии для очистки и фракционирования ферментов и касается способа получения адсорбента - гидроксиапатит.

Известен способ получения гидроксиапатита (RU 2209665, МПК В01J 20/04, опубл. 5 10.08.2003), выбранный за прототип, включающий стадию получения брушита ( $\text{CaHPO}_4$ ), его фильтрование, промывку двумя литрами воды, обработку суспензии брушита в 500 мл воды 100 мл 50%-ного NaOH при кипячении в течение 2 часов. При этом для получения брушита используют карбонат кальция, который обрабатывается избытком дигидрофосфата натрия (калия) при pH 1.0-4.0 и температуре 100°C.

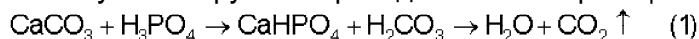
10 Недостатком данного способа является низкая сорбционная емкость гидроксиапатита, что затрудняет его использование в препаративной хроматографии и для очистки белков.

Техническим результатом настоящего изобретения является увеличение сорбционной емкости целевого продукта и упрощение способа его получения.

15 Технический результат достигается тем, что для увеличения сорбционной емкости гидроксиапатита брушит получают из карбоната кальция путем обработки раствором ортофосфорной кислоты при pH около 1,0 и комнатной температуре, получение гидроксиапатита осуществляют посредством обработки брушита щелочью при комнатной температуре.

Способ осуществляется следующим образом.

20 Получение брушита проводят согласно реакции 1:



К раствору ортофосфорной кислоты с pH около 1.0 небольшими порциями при медленном перемешивании добавляют карбонат кальция. После этого суспензию оставляют на несколько часов при комнатной температуре 20-25°C для завершения 25 реакции. Выделяющийся углекислый газ вызывает самопроизвольное перемешивание суспензии, что снижает вероятность истирания частиц в результате принудительного перемешивания. Образование брушита происходит на поверхности твердых частиц карбоната кальция, что способствует получению более крупных фракций брушита. После прекращения выделения пузырьков  $\text{CO}_2$  и достижения pH раствора примерно от 3.5 до 30 4.0 суспензию нейтрализуют до pH 6.8-7.2 добавлением раствора щелочи. Брушит отфильтровывают, промывают на фильтре 2 л воды и обрабатывают гидроксидом натрия при комнатной температуре 20-25°C для получения гидроксиапатита.

Сорбционную емкость целевого продукта (мг/г) определяют по связыванию бычьего 35 сывороточного альбумина (БСА) в растворе с pH 6.0 при комнатной температуре. Концентрацию БСА определяют по поглощению раствора при  $\lambda=280$  нм.

40 Пример 1 (прототип). К 100 г  $\text{CaCO}_3$  приливают 1 л 2 М раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , добавлением ортофосфорной кислоты устанавливают pH раствора около 1.0 и помещают суспензию в кипящую водяную баню. Для поддержания pH 1.0 в суспензию периодически добавляют 75%-ную ортофосфорную кислоту. После прекращения выделения пузырьков  $\text{CO}_2$  суспензию нейтрализуют до pH 6.8-7.2 добавлением 50%-ного NaOH и дают остыть до 45 комнатной температуры. Брушит отфильтровывают, промывают на фильтре 2 л воды и суспендируют в 500 мл воды, после чего добавляют 100 мл 50%-ного NaOH и помещают в кипящую водяную баню, периодически перемешивая суспензию. По истечении 2 часов гидроксиапатит отфильтровывают и промывают на фильтре водой до нейтральной реакции фильтрата. Сорбционная емкость гидроксиапатита составляет 22-26 мг/г.

50 Пример 2. К 1 л раствора с pH около 1.0, содержащего преимущественно 98 г ортофосфорной кислоты, добавляют небольшими порциями при медленном перемешивании 100 г  $\text{CaCO}_3$ . После этого суспензию оставляют на несколько часов при комнатной температуре 22.5°C для завершения реакции. После прекращения выделения пузырьков  $\text{CO}_2$  и достижения pH раствора примерно от 3.5 до 4.0 суспензию нейтрализуют до pH 6,8-7,2 добавлением 50%-ного NaOH. Брушит отфильтровывают, промывают на фильтре 2 л воды и суспендируют в 500 мл воды, после чего добавляют 100 мл 50%-ного NaOH и выдерживают 1 час при комнатной температуре 22.5°C. В случае кристаллизации

суспензии ее подвергают слабому нагреву (до 40°C) или добавляют равный объем воды. Гидроксиапатит отфильтровывают и промывают на фильтре водой до нейтральной реакции фильтрата. Сорбционная емкость гидроксиапатита составляет 34-37 мг/г.

5 Таким образом, предлагаемый способ позволяет увеличить сорбционную емкость целевого продукта по сравнению прототипом, а также упростить процесс получения гидроксиапатита за счет исключения операции кипячения.

#### Формула изобретения

10 1. Способ получения адсорбента для очистки белков, включающий получение брусшита, его нейтрализацию раствором щелочи, фильтрование, промывку и обработку суспензии щелочью для получения гидроксиапатита, отличающийся тем, что брусшит получают из карбоната кальция и раствора ортофосфорной кислоты при рН около 1,0 и при стехиометрическим мольном соотношении 1:1 путем последовательного добавления  
15 рассчитанного количества карбоната кальция к раствору кислоты при комнатной температуре 20-25°C и самопроизвольном перемешивании, для получения гидроксиапатита брусшит обрабатывают гидроксидом натрия при комнатной температуре 20-25°C с последующей выдержкой в течение часа.

20 2. Способ по п.1, отличающийся тем, что при кристаллизации суспензии гидроксиапатита ее нагревают до температуры не более 40°C или смешивают с равным количеством воды.

25

30

35

40

45

50