



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2009128851/05, 27.07.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.07.2009

(45) Опубликовано: 10.12.2010 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2209665 C1, 10.08.2003. RU 2349377 C1,
20.03.2009. RU 2104924 C1, 20.02.1998. SU
1503875 A1, 30.08.1989. WO 8000247 A1,
21.02.1980. US 5073357 A, 17.12.1991. US
4874511 A, 17.10.1989. US 6972090 A,
06.12.2005.

Адрес для переписки:

167982, Республика Коми, г.Сыктывкар, ул.
Коммунистическая, 28, Институт биологии
Коми НЦ УрО РАН, инновационная группа

(72) Автор(ы):

Донцов Андрей Геннадиевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Коми научного центра
Уральского отделения РАН (RU)(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АДСОРБЕНТА ДЛЯ ПРЕПАРАТИВНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
БЕЛКОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области хроматографии белков. Предложенный способ получения адсорбента включает взаимодействие твердого фосфата кальция с раствором ортофосфорной кислотой, получение нейтрализованной суспензии брусита, введение в суспензию, содержащую брусит, раствора щелочи и выдержку полученной суспензии до образования

суспензии гидроксипатита, при этом на взаимодействие фосфата кальция с ортофосфорной кислотой подают 3М ортофосфорную кислоту в эквимолярном количестве при гидромодуле, равном 1:1,2, обработку брусита раствором щелочи проводят при гидромодуле, равном 1:3. Изобретение позволяет упростить процесс получения гидроксипатита и увеличить сорбционную емкость целевого продукта.

RU 2 405 623 C1

RU 2 405 623 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
B01J 20/04 (2006.01)
B01J 20/281 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2009128851/05, 27.07.2009**

(24) Effective date for property rights:
27.07.2009

(45) Date of publication: **10.12.2010 Bull. 34**

Mail address:

**167982, Respublika Komi, g.Syktyvkar, ul.
Kommunisticheskaja, 28, Institut biologii Komi
NTs UrO RAN, innovatsionnaja gruppa**

(72) Inventor(s):

Dontsov Andrej Gennadievich (RU)

(73) Proprietor(s):

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

(54) METHOD OF PREPARING ADSORBENT FOR PROTEIN PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to chromatography of proteins. Disclosed method of preparing an adsorbent involves reaction of solid calcium phosphate with a solution of orthophosphoric acid, obtaining a neutral suspension of brushite, adding an alkali solution to the said suspension and holding the obtained suspension until formation a

suspension of hydroxyapatite. Calcium phosphate reacts with 3M orthophosphoric acid taken in equimolar amount with hydromodulus equal to 1:1.2. The brushite is treated with the alkali solution with hydromodulus equal to 1:3.

EFFECT: invention simplifies the process of producing hydroxyapatite and increases sorption capacity of the desired product.

2 ex

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

Известен способ получения гидроксипатита (RU 2349377, МПК В01У 20/04, опубл. 20.03.2009), включающий стадию получения брушита (CaHPO_4) из карбоната кальция путем обработки эквимольным количеством ортофосфорной кислоты при рН 1.0, комнатной температуре и при самопроизвольном перемешивании суспензии в результате выделения углекислого газа. Далее суспензию нейтрализуют, брушит отфильтровывают, промывают и обрабатывают щелочью при комнатной температуре.

Недостатком способа является разрушение частиц брушита в результате выделения углекислого газа, что снижает сорбционную емкость сорбента. Это ограничивает его использование для очистки белков методом твердофазной экстракции на концентрирующих патронах и для препаративной хроматографии.

Известен способ получения гидроксипатита (RU 2209665, МПК В01J 20/04, опубл. 10.08.2003), выбранный за прототип, включающий стадию получения брушита из фосфата кальция путем его обработки 1 М ортофосфорной кислотой при кипячении и гидромодуле реакции 1:3.5. Далее суспензию нейтрализуют, брушит отфильтровывают, промывают и обрабатывают щелочью при 100°C и гидромодуле 1:6.

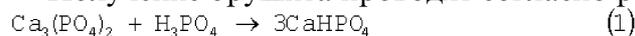
Недостатком способа является низкая сорбционная емкость, обусловленная образованием микропористой структуры сорбента в результате жестких (100°C) условий обработки. Это затрудняет его использование для препаративной хроматографии и для очистки белков методом твердофазной экстракции на концентрирующих патронах.

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

Технический результат достигается тем, что брушит получают из фосфата кальция путем обработки 3 М раствором ортофосфорной кислоты при комнатной температуре и гидромодуле реакции 1:1.2, а получение гидроксипатита осуществляют посредством обработки брушита щелочью при комнатной температуре и гидромодуле 1:3.

Способ осуществляют следующим образом.

Получение брушита проводят согласно реакции 1:



Фосфат кальция с размерами частиц 50-250 мкм добавляют при перемешивании к раствору, содержащему эквимольное количество ортофосфорной кислоты. При этом используют гидромодуль реакции 1:1.2 (вес $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ /объем H_3PO_4). После этого суспензию оставляют на несколько часов при комнатной температуре 20-25°C для завершения реакции. Образование брушита происходит на поверхности твердых частиц фосфата кальция, что способствует получению более крупных фракций брушита. В ходе реакции происходит увеличение объема твердой фазы на 40-50% от исходного, в результате чего брушит занимает весь объем реакционной смеси. При этом получение брушита в указанных условиях не требует перемешивания и способствует образованию более пористого материала. После установления рН суспензии в диапазоне от 3.0 до 4.0 ее нейтрализуют до рН 6.8-7.2 добавлением раствора щелочи. Для получения гидроксипатита брушит отфильтровывают, промывают на фильтре 2 литрами воды и обрабатывают гидроксидом натрия при

комнатной температуре 20-25°C и гидромодуле 1:3.

Сорбционную емкость целевого продукта (мг/г) определяют по связыванию бычьего сывороточного альбумина (БСА) в растворе с рН 6.0 при комнатной температуре. Концентрацию БСА определяют по поглощению (оптической

плотности) раствора при $\lambda=280$ нм.

Пример 1 (прототип). К 100 г $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ приливают 350 мл 1 М раствора H_3PO_4 (гидромодуль 1:3.5), помещают суспензию в кипящую водяную баню и выдерживают при периодическом перемешивании, пока не установится рН среды в пределах 2.5-3.5.

Суспензию нейтрализуют до рН 6.8-7.2 добавлением 50%-ного NaOH и дают медленно остыть до комнатной температуры. Брушит отфильтровывают, промывают на фильтре 2 л воды и суспендируют в 500 мл воды, после чего добавляют 100 мл 50%-ного NaOH (гидромодуль 1:6) помещают в кипящую водяную баню, периодически перемешивая суспензию. По истечении 2-х часов гидроксиапатит отфильтровывают и промывают на фильтре водой до нейтральной реакции фильтрата.

Сорбционная емкость гидроксиапатита составляет 25-29 мг БСА/г сорбента.

Пример 2. К 120 мл 3 М раствора ортофосфорной кислоты добавляют при перемешивании 100 г $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (гидромодуль 1:1.2). После этого суспензию оставляют на несколько часов при комнатной температуре 22.5°C для завершения реакции и установления рН суспензии в диапазоне от 3.5 до 4.0. Далее суспензию нейтрализуют до рН 6.8-7.2 добавлением 50%-ного NaOH. Брушит отфильтровывают, промывают на фильтре 2 л воды и суспендируют в 200 мл воды, после чего добавляют 100 мл 50%-ного NaOH (гидромодуль 1:3) 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 68-72 мг БСА/г сорбента.

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

Способ получения адсорбента для препаративной хроматографии белков, включающий взаимодействие твердого фосфата кальция с раствором ортофосфорной кислоты, получение нейтрализованной суспензии брушита, введение в суспензию, содержащую брушит, раствора щелочи и выдержку полученной суспензии до образования суспензии гидроксиапатита, отличающийся тем, что на взаимодействие фосфата кальция с ортофосфорной кислотой подают 3М ортофосфорную кислоту в эквимолярном количестве при гидромодуле, равном 1:1,2, обработку брушита раствором щелочи проводят при гидромодуле, равном 1:3, и процесс осуществляют при комнатной температуре.