

Мембранные методы разделения и их реализация на приборах НТО АН СССР. Г о м о л и ц к и й В. Н., К а л и н и н а И. К., Р е й ф м а н Л. С., С у д а р е в а Н. Н. — В кн.: Приборы для научных исследований и автоматизации эксперимента. Л., «Наука», 1982, с. 140—147.

Рассмотрено влияние на основные параметры процесса мембранного разделения — селективность и проницаемость — таких факторов, как размер пор мембран, концентрация и молекулярная масса растворенных веществ, рН и ионная сила раствора, давление и скорость перемешивания. Показан его комплексный характер и необходимость создания оптимальных методик и соответствующих приборов для мембранного разделения. Рассмотрены основные типы разработанных в НТО АН СССР мембранных приборов, их работы при решении различных задач разделения биологических объектов — очистки, фракционирования, концентрирования, обессоливания. Лит. — 6 назв., ил. — 9, табл. — 4.

МЕМБРАННЫЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ИХ РЕАЛИЗАЦИЯ НА ПРИБОРАХ НТО АН СССР

В течение 1973—1979 гг. в НТО АН СССР были разработаны мембранные приборы и созданы методические основы их использования для разделения разнообразного круга веществ различной химической природы. Были также исследованы и оценены препаративные и аналитические возможности мембранного метода как в самостоятельном качестве, так и в комплексе с другими развиваемыми методами.

При исследовании структурных свойств биологических веществ аналитическими методами одной из важнейших задач является выделение и очистка изучаемых объектов. Обычно эта задача разрешается с помощью известных методов разделения веществ, таких как хроматография, центрифугирование, электрофорез, экстракция и т. д. Перечисленные методы являются достаточно сложными технически и весьма длительными во времени.

Более эффективным представляется использование для этих же целей высокоселективных полупроницаемых мембран при разделении, очистке, концентрировании веществ методами ультрафильтрации.

Основными параметрами, характеризующими процесс разделения с помощью мембранных методов, являются структурные и функциональные характеристики мембран. Методы определения структурных характеристик — распределения пор по размерам, среднего радиуса пор — изложены в работе [1].

Для практической методической работы на мембранных приборах более удобны функциональные характеристики — проницаемость мембраны по растворителю и задерживающая способность, позволяющие непосредственно оценивать скорость и эффективность процесса. Функциональные характеристики тесно, но не однозначно связаны со структурой мембран.

Даже исчерпывающая информация о структурных характеристиках не позволяет определить селективные возможности мембран, так как они зависят также от структуры и состояния фильтруемых растворов. Задерживающая способность мембран связана в основном с соотношением размеров и формы молекул разделяемых веществ с размером и формой пор мембраны.

Обычно в большинстве работ по ультрафильтрации полагают, что размер молекулы пропорционален молекулярной массе (что справедливо далеко не для всех биополимеров), и строят калибровочные кривые — зависимости задерживающей способности от логарифма молекулярной массы [2]. Представляется более правильным по аналогии с гель-хроматографией введение зависимости задерживающей способности от логарифма произведения характеристической вязкости на молекулярную массу $[\eta]M$, т. е. величины, пропорциональной гидродинамическому размеру макромолекул. Совершенно естественно, что чем однороднее пористая структура используемой мембраны, тем круче подъем калибровочной кривой.

В работе [3] была предпринята попытка количественно сопоставить размеры макромолекул биополимеров и радиуса пор задерживающих их ультрафильтрационных мембран из ацетата целлюлозы типа УАМ.

В табл. 1 сопоставлены результаты определения среднего радиуса пор (по Пуазейлю) и результаты так называемой дифференциальной калибровки $\Delta r/\Delta D = f(D)$, где D — диаметр макромолекулы, и приведены значения радиуса, соответствующего максимуму калибровочной кривой. Существен-

Таблица 1

Сравнение характеристик структуры мембран «Владипор»

Марка мембраны	r_{cp}	
	по Пуазейлю	по дифференциальной калибровке
УАМ-100	75 ± 25	10
УАМ-150	125 ± 25	30
УАМ-200	175 ± 25	45
УАМ-300	250 ± 50	50

Примечание. $r_{cp} = \sqrt{\frac{8\eta t_m J}{W}}$, где η — вязкость растворителя, t_m — толщина мембраны, J — проницаемость мембраны, W — пористость мембраны.

ное несовпадение результатов может быть объяснено погрешностью метода Пуазейля, а также отсутствием учета стерических препятствий для входа макромолекулы в пору. Не принималась во внимание и толщина гидратных оболочек молекул.

Для мембраны УАМ-200 ($r_{cp} = 180 \text{ \AA}$), кроме калибровочной кривой, была построена кривая порометрического распределения, полученная при помощи гидродинамического метода (Московский химико-технологический институт). Максимум этой кривой соответствует размеру пор 85 \AA . Здесь также наблюдались расхождения результатов.

Все растворы биологически активных веществ, содержащие различные соли, обладают определенным значением водородного показателя рН и ионной силы для поддержания структуры и, следовательно, биологической ак-

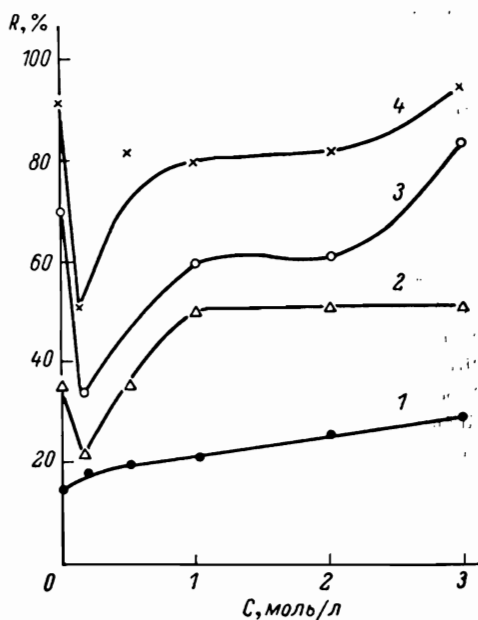


Рис. 1. Зависимость задерживающей способности мембран «Рипор» по отношению к рибонуклеазе от концентрации CaCl_2 .
1 — «Рипор 1»; 2 — «Рипор 2»; 3 — «Рипор 3»; 4 — «Рипор 4».

тивности макромолекул. Вследствие этого мембраны должны обладать переменной проницаемостью в присутствии неорганических солей. Фирмы — производители мембран сообщают скорости фильтрации дистиллированной воды через мембрану. Однако этой информации недостаточно, так как скорость фильтрации для мембран зависит не только от концентрации, но и от вида солей, присутствующих в растворе [4].

Изменение ионного окружения и рН может приводить к изменению конформации, растворимости биополимеров, толщины и плотности их гидратных оболочек, а в некоторых случаях и к изменению взаимного влияния растворителя, растворенных веществ и мембраны.

На рис. 1 приведены зависимости задерживающей способности мембран по отношению к рибонуклеазе от концентрации хлористого кальция

при $pH=6.5$. Аналогичные результаты получены для сульфата аммония $(NH_4)_2SO_4$ и хлористого натрия $NaCl$. Все кривые имеют экстремальный характер.

Кроме состава фильтруемой среды, на характеристики мембран влияют рабочие условия — температура, режим перемешивания, а в особенности избыточное давление и концентрация раствора биополимеров. Поток растворителя через мембрану равен

$$J_1 = \frac{\bar{P}}{t_m} \Delta p,$$

где \bar{P} — специфическая проницаемость мембраны для растворителя; Δp — избыточное гидростатическое давление; t_m — толщина мембраны.

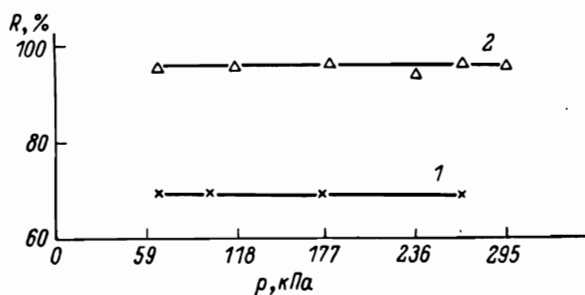


Рис. 2. Зависимость задерживающей способности мембран «Рипор» от давления.

1 — «Рипор 2»; $C=0,1$ мг/мл, преальбумин; 2 — «Рипор 3», $C=0,8$ мг/мл, ОНК-аза.

Поток растворенного вещества можно выразить через величину задерживающей способности мембраны R :

$$J_2 = C_0(1 - R) J_1,$$

где $R = 1 - \frac{C_f}{C_0}$; C_f — концентрация вещества в фильтрате; C_0 — концентрация вещества в растворе над мембраной [5]. В ходе ультрафильтрации задержка мембраной растворенного вещества приводит к увеличению концентрации на поверхности мембраны: $C_w > C_0$; это явление называется концентрационной поляризацией. Образование слоя белкового раствора повышенной концентрации на поверхности мембраны приводит к увеличению суммарного сопротивления мембраны и, следовательно, к уменьшению потока J_2 .

Образование слоя концентрационной поляризации может приводить в ряде случаев к изменению задерживающей способности мембраны. Кривые, представленные на рис. 2 и 3, показывают, что задерживающая способность мембран «Рипор» по отношению к глобулярным белкам не изменяется в диапазоне давлений 0—294 кПа и концентраций 0.1—2 мг/мл.

При больших концентрациях растворов белков (более 10 мг/мл) задержка может расти с увеличением концентрации. Этот эффект, объясняемый увеличением вязкости, наблюдается у мембран, частично задерживающих исследуемое вещество. Для биополимеров, полностью задерживаемых или пропускаемых мембраной, такой эффект отсутствует.

Для линейных полимеров — декстранов задержка падает с ростом давления и концентрации (рис. 3 и 4). Аналогичные результаты были получены на мембранах фирмы «Amicon» [5]. Данные, приведенные в табл. 2, иллюстрируют зависимость задерживающей способности от природы выделяемого вещества. Условия калибровки мембран белками и декстранами были одинаковыми. Использовались ячейки с перемешиванием ФМ при избыточном давлении 98 кПа, концентрации 1 мг/мл и растворы белков в буфере 0.05 М *трис*-HCl, pH 7.4. Эти результаты под-

Таблица 2

**Задерживающая способность мембран «Рипор»
по отношению к глобулярным белкам и декстранам**

Вещество	М, а. е. м.	«Рипор 1»	«Рипор 2»	«Рипор 3»
Рибонуклеаза	13700	10	18	35
Декстран 10Т	10000	0	0	19
Химотрипсин	25400	61	71	75
Декстран 20Т	20000	0	4	54
Овальбумин	45000	90	92	95
Декстран 40Т	40000	4	15	60
Гемоглобин	66000	98	99	1000
Декстран 70Т	70000	16	30	68

тверждают предположение Михаэлиса [6] о том, что длинные гибкоцепные молекулы декстранов могут проходить через те же мембраны, на которых задерживаются меньшие глобулярные белки.

В 1978 г. на НПО «Биохимреактив» (г. Олайне) начат промышленный выпуск ультрафильтрационных мембран типа «Рипор». В НТО АН СССР были экспериментально исследованы их характеристики. Калибровка

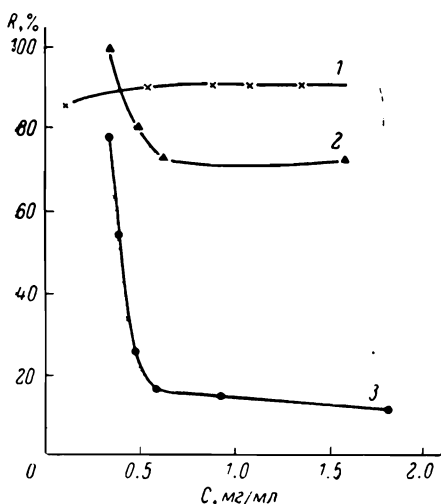


Рис. 3. Зависимость задерживающей способности мембран «Рипор 3» по отношению к белкам и декстранам от концентрации исходного раствора.

1 — РНК-аза, $p=198$ кПа (2 атм); 2 — Dex 70, $p=118$ кПа (1.2 атм); 3 — Dex 70, $p=196$ кПа.

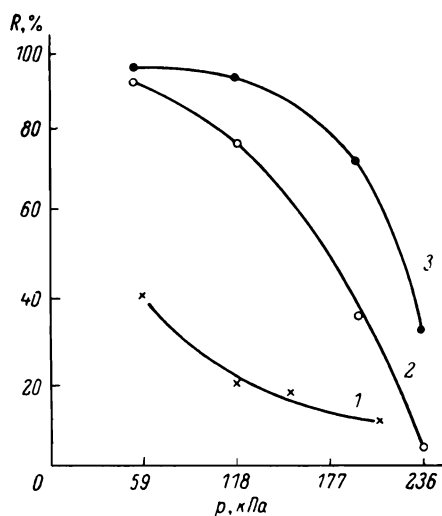


Рис. 4. Зависимость задерживающей способности мембран «Рипор» по отношению к декстранам от величины давления. $C=0.15$ мг/мл.

1 — «Рипор 2», Dex 70; 2 — «Рипор 3», Dex 40; 3 — «Рипор 3», Dex 70.

мембран «Рипор» по молекулярным массам белков, находящихся в буфере *tris*-HCl, pH 7.4, представлена на рис. 5.

Таким образом, задерживающая способность и скорость фильтрации через полупроницаемые мембраны определяются структурными характеристиками мембраны, характеристиками раствора и условиями реализации процесса. Влияние указанных факторов на механизм и параметры мембранного разделения носило комплексный характер. В связи с этим возникает необходимость создания оптимальных схем реализации мембранных методов, как на основе серийно выпускаемых мембранных приборов, так и на основе специально разработанных приборов и устройств.

Рассмотрим основные схемы реализации мембранных методов на приборах, разработанных в НТО АН СССР, для решения ряда конкретных задач разделения и концентрирования.

На рис. 6 представлена условная схема концентрирования раствора. Схема иллюстрирует применение метода ультрафильтрации, при котором

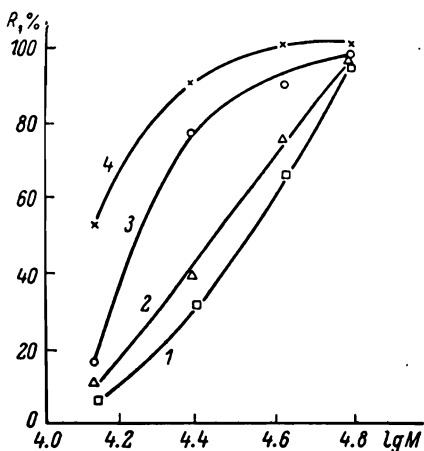


Рис. 5. Зависимость задерживающей способности мембран «Рипор» от логарифма молекулярной массы глобулярных белков. $C=0.8$ мг/мл, $p=196$ кПа.

1 — «Рипор 1»; 2 — «Рипор 2»; 3 — «Рипор 3»; 4 — «Рипор 4».

вого комплекта фильтров мембранных комбинированных ФК01 (табл. 4). По этой схеме нами осуществлялось сравнительно быстрое и мягкое концентрирование практически без потерь растворов различных белков, внутриклеточных структур и вирусов. Например, при концентрировании

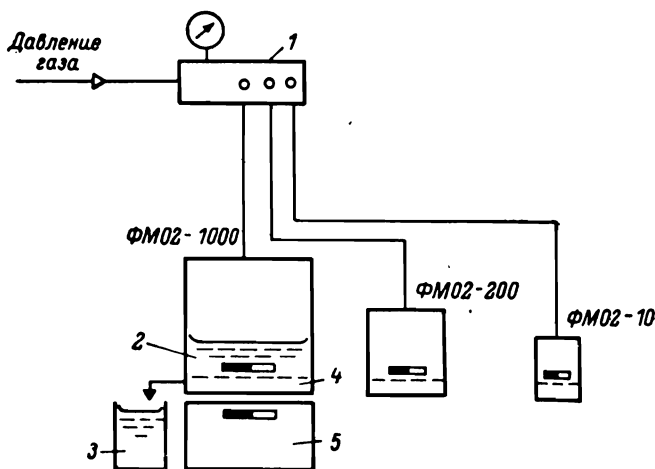


Рис. 6. Схема работы комплекта мембранных фильтров ФМ02 в режиме ультрафильтрации.

1 — распределитель; 2 — концентрат; 3 — фильтр; 4 — мембрана; 5 — магнитная мешалка.

вируса гриппа (штамм «А-2-Ленинград», диаметр молекул 1200 \AA) удалось достичь 20-кратного увеличения концентрации практически без потерь на сорбцию за 2 ч. При этом активность вируса не изменялась. Приведенная схема позволяет также проводить анализ межмолекулярных связей, изучать комплексообразование и ассоциирование.

Фильтры ФМ02 и ФК01 позволяют осуществить схему фракционирования растворов на две фракции методом диафильтрации — ультрафильтрации низкомолекулярных компонентов через мембрану в условиях сохранения исходного объема раствора. Схема также может быть использована для проведения очистки, обессоливания, замены буфера, для ана-

Таблица 3

Краткая техническая характеристика комплектов мембранных фильтров ФМ01 и ФМ02

Характеристика	Тип фильтра		
	ФМ01-10, ФМ02-10	ФМ01-200, ФМ02-200	ФМ01-1000, ФМ02-1000
Внутренний объем, мл	10	200	1000
Минимальный перемешиваемый объем, мл	1	5	50
Диаметр мембраны, применяемой в фильтре, мм	25	64	120
Максимальное рабочее давление, кгс/см ²	5	5	5
Давление срабатывания предохранительного клапана, кгс/см ²	6	6	6
Скорость перемешивания, об/мин	0—1000	0—1000	0—1000

Таблица 4

Краткая техническая характеристика комплектов мембранных комбинированных фильтров ФК01

Характеристика	Тип фильтра	
	ФК01-200	ФК01-1000
Внутренний объем, мл	200	1000
Минимальный перемешиваемый объем (1000 об/мин), мл	20	100
Диаметр мембраны, применяемой в фильтре, мм	64	120
Максимальное рабочее давление, кгс/см ²	5	5
Максимальное рабочее давление при фильтрации, кгс/см ²	2	2

лиза связей между макромолекулами и ионами, частицами и ассоциатами — выявления кинетики связывания, комплексобразования и ассоциирования.

Наличие нескольких комплектов ФМ02 или ФК01 позволяет осуществлять мягкое фракционирование сложной смеси с широким диапазоном молекулярных масс.

Фракционирование сложной смеси с помощью диафильтрации позволяет значительно облегчить дальнейший анализ смеси другими методами разделения — хроматографией, электрофорезом и пр.

Указанные схемы оправдывают себя при работе с растворами сравнительно низких исходных концентраций (до 0.5%). При работе с растворами повышенных исходных концентраций (до 10%) используются иные схемы, которые реализуются с помощью ФК01 (исходный объем раствора до 1 л) или мембранного тонкоканального фильтра ФТ01 (исходный объем раствора более 1 л).

Остановимся на схемах, реализуемых с помощью фильтра ФТ01, также разработанного в НТО АН СССР. Его характеристика:

Объем резервуара, л	5
Объем камеры, л	1
Диаметр мембран, мм	150
Максимальное число мембран, шт.	20
Максимальное рабочее давление, кгс/см ²	5
Максимальное рабочее давление при работе насоса, кгс/см ²	2
Максимальная производительность каждого канала насоса (при $p = 1$ кгс/см ²), л/мин	1
Максимальное число каналов, шт.	10
Максимальная производительность насоса (при $p = 1$ кгс/см ²), л/мин	5

Фильтр ФТ01 состоит из дисков мембранодержателей, снабженных спиральными каналами щелевидной формы. Мембраны укладываются таким образом, что поток рабочего раствора (в случае ультрафильтрации и

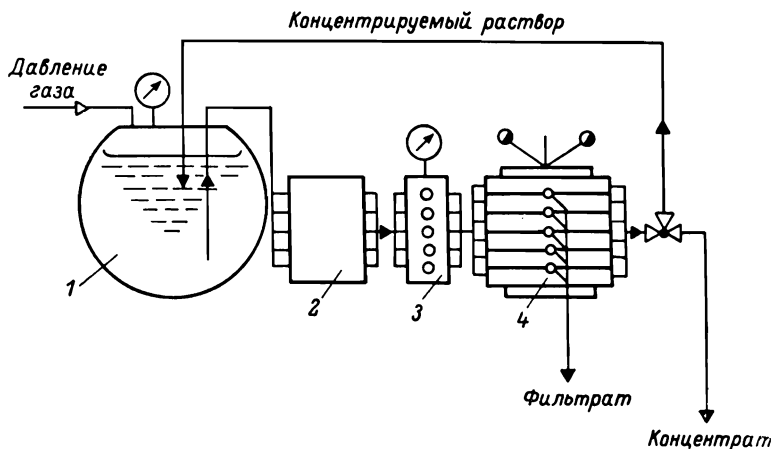


Рис. 7. Схема работы мембранного тонкоканального фильтра ФТ01 в режиме ультрафильтрации (большие концентрации исходного раствора).

1 — резервуар с концентрируемым раствором; 2 — насос; 3 — указатель давления; 4 — тонкоканальный фильтр.

диафильтрации находящийся под давлением) циркулирует по каналам, интенсивно и равномерно омывая поверхность мембраны. Это существенным образом снижает эффект концентрационной поляризации, тем самым повышая скорость фильтрации и задерживающую способность.

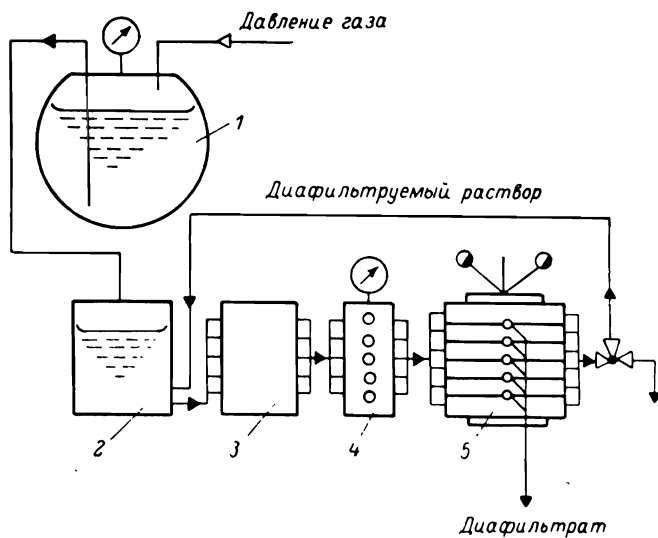


Рис. 8. Схема работы ФТ01 в режиме диафильтрации.

1 — резервуар с диафильтрующим раствором; 2 — резервуар с диафильтруемым раствором; 3 — насос; 4 — указатель давления; 5 — тонкоканальный фильтр.

Конструкция фильтра и его элементов позволяет использовать его для решения самых разнообразных задач разделения. Остановимся на его основных методических схемах.

На рис. 7 представлена условная схема концентрирования растворов макромолекул повышенных концентраций, суспензий и эмульсий методом

ультрафильтрации. Здесь прибор включен в находящийся под давлением газа замкнутый контур, в котором рабочий раствор циркулирует при помощи насоса. При данной схеме включения удается достичь сохранения скорости фильтрации в течение почти всего опыта, несмотря на сильное увеличение концентрации в процессе концентрирования.

Например, при концентрировании содержащегося в клеточном гомогенате С-вируса картофеля скорость фильтрации в процессе двадцатикратного концентрирования оставалась практически постоянной и равной 20 мл/мин; при концентрировании содержащейся в оксидате горючих сланцев высокомолекулярной составляющей скорость фильтрации в процессе десятикратного концентрирования падала незначительно и была в пределах 20—25 мл/мин.

На рис. 8 показана схема фракционирования на две фракции методом диафильтрации. По этой схеме нами была осуществлена отмывка высокомолекулярной составляющей оксидата горючих сланцев от низкомолекулярной.

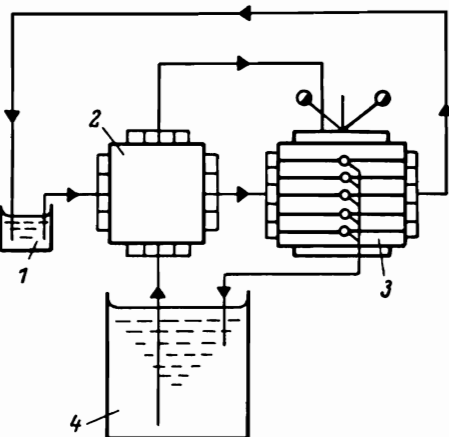


Рис. 9. Схема работы ФТО1 в режиме диализа.

1 — резервуар с диализуемым раствором;
2 — насос; 3 — тонкоканальный фильтр; 4 — резервуар с диализующим раствором.

Схема также может быть использована для очистки, обессоливания и смены буфера.

С помощью ФТО1 можно осуществить фракционирование смеси самого широкого молекулярно-массового распределения методом диафильтрации на отдельные фракции. В принципе при наличии мембран с требуемыми характеристиками фильтры позволяют получить и сконцентрировать до десяти отдельных фракций.

На рис. 9 приведена условная схема для обессоливания растворов, а также для задач, требующих создания динамического режима с обеих сторон мембраны. Схема иллюстрирует метод диализа, при котором разделение происходит за счет градиента концентраций, и может быть широко использована для оценки мембран, предназначенных для гемодиализа.

Полученные в работе результаты будут полезны при разделении, очистке и концентрировании различных макромолекулярных растворов с учетом основных методических особенностей осуществления процесса и тем самым будут способствовать повышению уровня дальнейших аналитических исследований структуры веществ в широком диапазоне молекулярных масс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hampl V., Spurný K., Coll. Czechosl. Chem. Comm., 1967, v. 31, p. 4181.
2. Meares. Membrane separation processes. Amsterdam—Oxford—New York, 1976.
3. Рожанская Т. И., Марголина Н. А., Подсужина Г. А., Селезнева А. А., Дубяга В. П., Е. Е. Каталевский, Прикладн. биохимия и микробиология, 1976, т. 12, № 2, с. 287.
4. Хасимото К., Хагивара Б., Chem. Eng., 1972, v. 17, N 16, p. 36.
5. Blatt W. F., David A., Michaels A. S., Nelson L., in: Membrane science and technology. New York, 1970, p. 73.
6. Michaels A. S., Chem. Eng. Progress, 1968, v. 64, p. 31.