

# POLIMERNE MEMBRANE ZA LOČEVANJE KRVI; KEMIJSKA MODIFIKACIJA NJIHOVE POVRŠINE

## POLYMERIC MEMBRANES FOR BLOOD SEPARATION; CHEMICAL MODIFICATION OF THEIR SURFACES

Vesna Nežmah, Irena Kukovičič, Črtomir Stropnik

Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Smetanova 17, 2000 Maribor

*Prejem rokopisa – received: 1999-04-01; sprejem za objavo – accepted for publications: 1999-04-15*

V laboratoriju pripravljene membrane iz polisulfona (PSf), celuloznega acetata (CA), poliamida 4,6 (PA4,6), poliamida 6,6 (PA6,6) in kopolimera poli-(akrilonitril-ko-akrilna kislina) (KANAK) smo karakterizirali tako, da smo izmerili njihove debeline ter pretoke za deionizirano vodo in nato z njimi izvedli ločevanje krvi prašičev. Membrane iz PSf smo na površini modificirali s Friedel-Crafts-ovo elektrofilno substitucijo aromatskih delov molekule PSf, pri čemer smo vezali 1-klorodekan in propilenoksid. Izvedli smo tudi sulfoniranje z žveplovo kislino. Modificirane membrane smo prav tako karakterizirali z merjenjem debelin, pretokov za deionizirano vodo in določanjem "streaming"-potenciala ter nato z njimi izvedli ločevanje krvi prašičev. S primerjavo lastnosti nemodificiranih in na površini kemično modificiranih membran smo ugotavljali učinke kemijske modifikacije površine na separacijske lastnosti polimernih membran.

Ključne besede: polimerne membrane, kemijska modifikacija, površina, membrane, ločevanje krvi

Laboratory prepared membranes from polysulfone (PSf), cellulose acetate (CA), polyamide 4,6 (PA4,6), polyamide 6,6 (PA6,6) and from poly-acrilonitrile-co-acrylic acid (KANAK) were characterized by measuring the thicknesses, deionised water fluxes and then by porcine blood separation. The surfaces of PSf membranes were modified with the series of Friedel-Crafts electrophilic substitutions of aromatic rings in polysulfone molecules with use of 1-chlorodecane and propylene oxide. We also modified the membrane surface by sulfuric acid. All modified membranes were characterized by measuring thicknesses, deionized water fluxes, by measuring the streaming potentials and then by porcine blood separation. We examined the effects of chemical modification with comparison of properties of "native" and surface chemically modified membranes on blood separation characteristics of polymeric membranes.

Key words: polymeric membranes, chemical modification, membrane surface, blood separation

## 1 UVOD

Prehranjevanje z mesom je bil, je in z veliko verjetnostjo bo način preživljanja ljudi povsod po svetu. V klavnicah se iztekajo velike količine krvi, ki so v najslabšem primeru kot odpadke precejšnja obremenitev za okolje. V državah z razvito tehnologijo že poteka izolacija in selektivna uporaba sestavin krvi iz klavnic.

Raziskovali smo uporabo membran, pripravljenih po mokrem postopku fazne inverzije, iz različnih polimernih materialov pri ločevanju klavniške prašičje krvi.

Polimerne asimetrične porozne membrane se v veliki meri uporabljajo v različnih separacijskih procesih. Zaradi pojava onečiščenja (fouling) in koncentracijske polarizacije se občutno zmanjšajo pretoki skozi membrane. Oba pojava neugodno vplivata na procese pri ločevanju. Z modifikacijo površine membrane poskušamo zmanjšati oba navedena pojava in s tem doseči ugodnejše separacijske lastnosti posameznih membran.

## 2 TEORETIČNI DEL

Polimerne membrane pripravimo z mokro fazno inverzijo: tanko plast raztopine polimera potopimo v koagulacijsko kopel, ki je deionizirana voda. Zaradi

nastalih termodinamskih neravnotežij pride do fazne inverzije, ki vodi k nastanku polimerne membrane<sup>2</sup>.

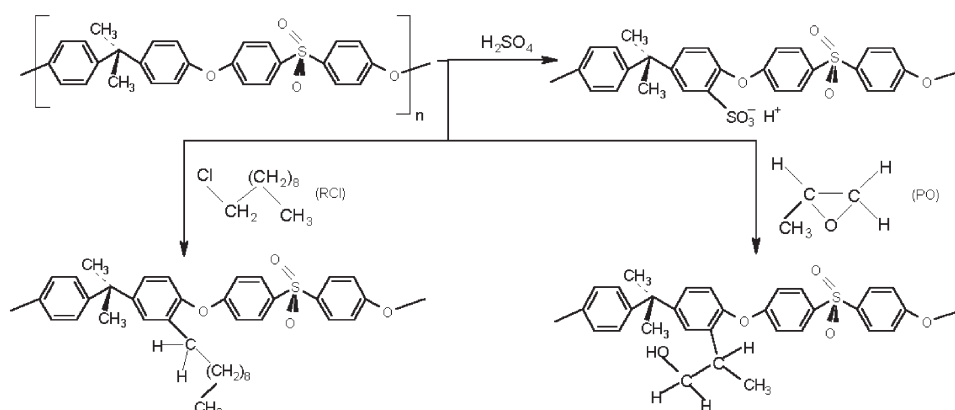
Kri sestavljajo poleg vode (okrog 82%) krvne celice (okrog 10%), beljakovine (okrog 7%) ter elektroliti, sladkorji, lipidi in podobno (pod 1%)<sup>3,4,5</sup>. Z mikro-filtracijo lahko ločujemo krvne celice, z ultra- in nanofiltracijo pa beljakovine<sup>1</sup>.

Na **shemi 1** je prikazana površinska modifikacija membran iz polisulfona s Friedel-Crafts-ovo reakcijo elektrofilne substitucije z reagentoma propilen oksidom (PO) in 1-klorodekanom (RCl) ter AlCl<sub>3</sub> kot katalizatorjem<sup>6,7,9</sup>. Površino je potrebno predhodno kondicionirati zaradi prehoda iz polarnega v manj polarno oz. nepolarno topilo, kjer je topen reagent. Površino membrane kemijsko modificiramo še z žveplovo kislino.

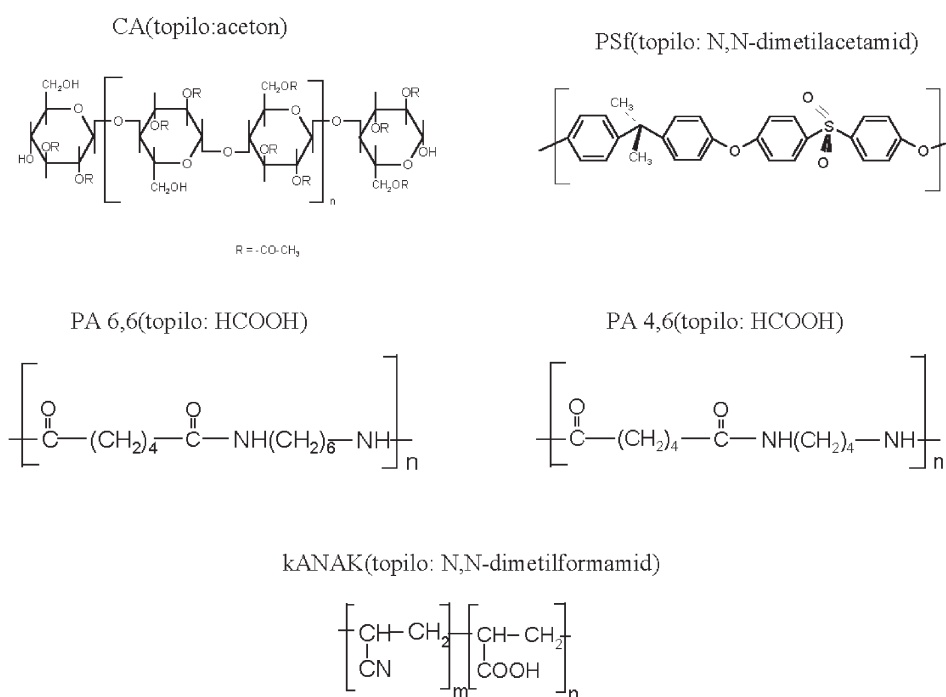
Pri polimernih membranah se pojavlja površinski naboj. Ko jo pomočimo v vodno raztopino elektrolita, se površinski naboj kompenzira z nastankom dvojne plasti ob površini membrane. Površina med tema plastema se imenuje strižna površina, od katere se glede na neskončno oddaljeno površino določa potencial zeta. Določimo ga z merjenjem "streaming"- potenciala<sup>8</sup>.

## 3 EKSPERIMENTALNI DEL

Na **shemi 2** so predstavljene strukturne formule polimerov, ki smo jih uporabili za pripravo membran.



**Shema 1:** Prikaz modifikacije površine polisulfonskih membran s tremi različnimi reagenti  
**Scheme 1:** Presentation of surface modification of polysulfone membranes with three different reagents



**Shema 2:** Strukturne formule polimerov za pripravo membran  
**Scheme 2:** Structure formula of polymers for membrane preparation

Podrobne (m,n) strukturne formule kANAK ne poznamo.

Iz pripravljenih raztopin z različnimi masnimi koncentracijami polimera smo pripravili membrane tako, da smo potopili tanko plast raztopine polimera znane debeline (300  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ ) v koagulacijsko kopel (deionizirana voda) pri sobni temperaturi. Pri membranah iz CA je bila temperatura koagulacijske kopeli okrog 5°C. Membrane smo nato prenesli in pustili izluževati 24 ur v deionizirani vodi.

Karakterizacijo membran smo izvedli z merjenjem učinkovitih debelin z magnetno sondo Minimer HD1 in z merjenjem pretokov deionizirane vode v ultrafiltracijski celici Amicon 8400 pri tlaku 2 bara.

Nemodificirane membrane smo uporabili za ločevanje prašičje krvi, ki smo ji dodali antikoagulacijsko sredstvo: 8,3% vodno raztopino natrijevega citrata. Kri smo hranili v hladilniku in jo navadno uporabljali največ dva dni, saj imajo krvne celice kratko dobo obstojnosti. 350 ml krvi smo nalili v ultrafiltracijsko celico in pri tlaku 2 bara lovili posamezne frakcije; ugotavljali smo, ali skozi membrano prehaja plazma ali celotna kri, in določali vsebnost beljakovin v osnovni krvi, posameznih frakcijah in v retentatu.

Pri modifikaciji površin polisulfonskih membran s Friedl-Crafts-ovo elektrofilno aromatsko substitucijo smo membrane predhodno kondicionirali v različnih topilih. Spirali smo jih po 10 minut v vodi, metanolu,

butanolu in heksanu. Kot reagenčno raztopino smo uporabili 300 ml raztopine 1-klordekana in propilen oksida v heksanu z volumskim razmerjem reagent : heksan = 1:5. Reakcija je potekala ob prisotnosti katalizatorja  $\text{AlCl}_3$  (2 g) in intenzivnem mešanju, v večini primerov pri 20°C. Reakcijo smo prekinili s kondicioniranjem v seriji topil v obratni smeri, saj smo shranjevali membrane v deionizirani vodi. Pri reakciji z žveplovo kislino ni bilo treba membrane predhodno kondicionirati, saj smo uporabili vodne raztopine žveplove kisline. Reakcija je v večini primerov potekala 30 minut pri 20°C.

Modificirane membrane smo uporabili za ločevanje krvi, karakterizirali pa smo jih tudi z merjenjem efektivnih debelin, pretokov deionizirane vode in "streaming"-potenciala skozi membrano in vzdolž nje (EKA 133, proizvajalca Anton Paar iz Gradca).

#### 4 REZULTATI IN DISKUSIJA

**Tabela 1** prikazuje separacijske lastnosti različnih membran. Izmerjeni so bili pretoki za deionizirano vodo in prašičjo kri. Za posamezne membrane smo ugotavljali, v kolikšni meri prepuščajo oziroma zadržujejo krvne celice in beljakovine. Pri tistih membranah, ki so prepuščale krvne celice, nismo merili vsebnosti beljakovin.

**Tabela 1:** Izmerjene karakteristike različnih membran za ločevanje krvi

**Table 1:** Measured characteristics of different membranes for blood separation

memb.	pretok vode ( $\text{l/m}^2\text{h}$ )	pretok krvi ( $\text{l/m}^2\text{h}$ )	beljakovine $\mu\text{g/ml}$					
			1.fr.	2.fr.	3.fr.	4.fr.	5.fr.	6.fr.
1	4,7	0,41	#	#	#	#	#	#
2	65,2	1,07	30,4	18,1	-	-	-	-
3	183,9	202,70	#	#	#	#	#	#
4	35,9	0,92	#	#	#	#	#	#
5	139,1	0,89	158,8	73,4	94,4	37,6	21,9	27,5
modificirane polisulfonske membrane								
PO 1	13,6	5,70	49,6	-	-	-	-	-
PO 2	17,7	3,94	75,9	73,4	90,0	-	-	-
PO 3	3,93	3,29	#	#	#	#	#	#
PO 4	5,4	0,09	153,1	-	-	-	-	-
S 1	9,8	14,9	#	#	#	#	#	#
S 2	11,5	7,31	#	#	#	#	#	#
S 3	17,7	1,07	2,0	9,0	9,8	7,8	7,3	-
S 4	16,3	2,04	0	0	0	8,5	0,5	-

- vsebnost beljakovin pri teh membranah smo merili samo v navedenih frakcijah

# skozi membrano so prehajale tudi krvne celice in vsebnosti beljakovin nismo merili

1- PSf 15%/300  $\mu\text{m}$  PO 1 - t=5 min S 1 - 45 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$

2- kANAK 15%/300  $\mu\text{m}$  PO 2 - t=15 min S 2 - 50 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$

3- PA 6,6 21%/300  $\mu\text{m}$  PO 3 - t=30 min S 3 - 55 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$

4- PA 4,6 21%/300  $\mu\text{m}$  PO 4 - t=1 h S 4 - 60 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$

5- CA 14,8%/250  $\mu\text{m}$ , 2,3 %  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ , 25%  $\text{H}_2\text{O}$

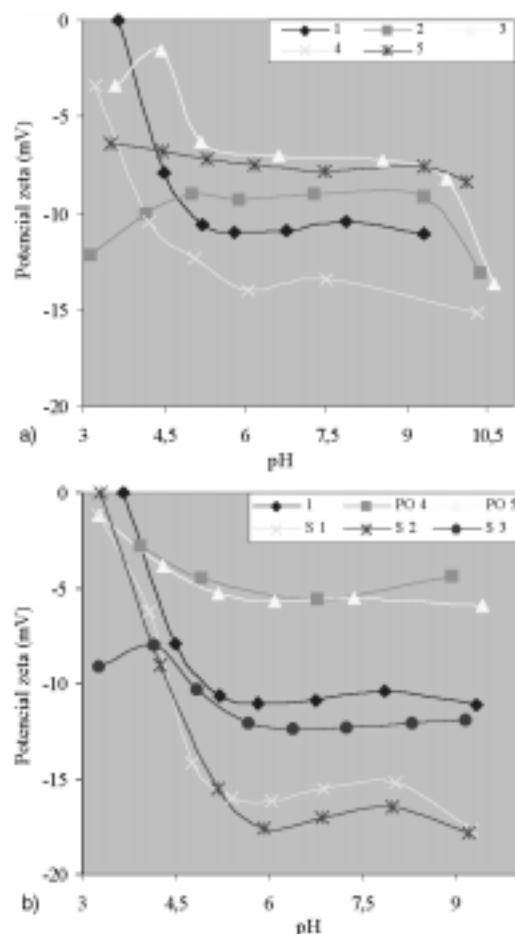
PO .. s propilen oksidom modificirane PSf-membrane;

S .. s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  modificirane PSf-membrane

Z membranami smo izvedli tudi ločevanje krvi. Nemodificirane membrane iz PSf, membrane iz PA 4,6

in PA 6,6 so prepuščale krvne celice. S temi membranami nismo ločili krvnih celic in plazme. Krvne slike osnovne krvi in posameznih frakcij so bile enake. Vsebnosti beljakovin v teh primerih nismo določali. Membrane iz kANAK so omogočale ločevanje krvnih celic in plazme. Vsebnost beljakovin v posameznih frakcijah ni bila velika. Za ločevanje beljakovin iz prašičje krvi so bile najbolj primerne membrane iz CA z dodatkom perklorata. Skozi membrane je prehajala samo plazma. Celice so ostale v retentatu. V posameznih frakcijah pa smo dobili precej beljakovin.

Podobne poskuse smo izvedli tudi z nekaterimi modificiranimi membranami (**tabela 2**). Krvne celice so prepuščale nekatere modificirane membrane iz PSf, in sicer PO 3, S 1 in S 2. Nekatero membrano iz PSf, modificirano s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (S 3 in S 4), so zadrževale krvne celice in prepuščale samo plazmo, vendar niso prepuščale dosti beljakovin. Med modificiranimi membranami je za ločevanje prašičje krvi najbolj primerna PO 4; to je membrana, modificirana s propilen oksidom.



**Slika 1:** Potencial zeta vzdolž površine membrane za različne polimerne membrane a) in modificirane polisulfonske membrane b). Označe membran so enake kot v tabelah.

**Figure 1:** Zeta potential on the surface of membrane for: a) different polymeric membranes and b) modified polysulfone membranes. Membranes are signed same as in tables.

**Tabela 2:** Spreminjaje debelin in pretokov deionizirane vode z modifikacijo površin polisulfonskih membran (15% PSf / 300 $\mu$ m); potencial zeta skozi in vzdolž membrane

**Table 2:** Change of thicknesses and deionised water fluxes with modification of polysulfone membrane surfaces (15% PSf / 300 $\mu$ m); zeta potential through and along the membrane

memb.	pretok pred reakc.	pretok po reakc.	debelina pred reakc.	debelina po reakc.	potencial zeta mV	
	l/m <sup>2</sup> h	l/m <sup>2</sup> h	$\mu$ m	$\mu$ m	skozi	vzdolž
RCl 1	48,3	10,9	118	137	-	-
RCl 2	50,9	0	130	125	-	-
PO 1	21,7	13,6	113	120	-3,2	-
PO 2	17,7	17,7	112	108	+2,2	-
PO 3	1,3	3,9	110	-	-	-
PO 4	19,0	5,4	118	122	-4,2	-5,2
PO 5	25,8	24,4	118	114	-	-5,1
PO 6	53,0	7,6	118	116	-	-
PO 7	35,3	12,2	115	120	-	-
PO 8	13,6	20,4	108	123	-	-
S 1	7,46	9,78	135	122	-	-15,8
S 2	11,50	27,23	112	107	-	-16,2
S 3	12,90	17,65	112	109	-	-12,2
S 4	15,60	16,29	111	106	-	-16,1
S 5	8,42	11,95	109	114	-	-
S 6	29,87	21,78	108	108	-	-
S 7	14,93	14,66	108	110	-	-

... ni izmerjeno

Pogoji modifikacije:

RCl 1 ... t=30 min PO 6... t=20 h S 5...60 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, t=15 min

RCl 2 ... t=3 h PO 7... t=30 min, T = -5°C S 6...60 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, t=1h

PO 5 ... t=3 h PO 8... t=3 h, T = -5°C S 7...60 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, t=3 h

Pri modifikaciji površine membrane z RCl se je permeabilnost za vodo skozi membrano zmanjševala. Triurna modifikacija je membrano popolnoma zaprla.

S PO modificirane polisulfonske membrane so se vedle različno. Sprememba permeabilnosti za vodo je odvisna od časa reakcije in temperature. Pri 30-minutni modifikacijah pri 20°C in pri 3-urni modifikaciji pri -5°C se je permeabilnost za vodo povečala. Pri drugih primerih pa se je zmanjšala oz. je ostala nespremenjena. Za primerjavo smo izmerili tudi potencial zeta nemodificiranih membran. Bil je -10,2 mV vzdolž membrane in -5 mV skozi njo. Potencial zeta vzdolž membrane se je pri modificirani membrani v primerjavi s potencialom zeta nemodificirane nekoliko zmanjšal (bil je manj negativen). Vzrok za ta pojav naj bi bila hidrofilitnost -OH skupine na površini modificirane membrane in s tem debelejša stagnantna plast vode na površini.

Pri polisulfonskih membranah, modificiranih z žveplovo kislino, se je permeabilnost za vodo v večini primerov povečala, debelina pa se je pri vseh membranah nekoliko zmanjšala. Permeabilnost za vodo se je zmanjšala samo pri membranah, ki smo jih modificirali 1 oz. 3 ure s 60% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Potencial zeta je bil nekoliko bolj negativen od tistega pri nemodificiranih membranah. To naj bi bil dokaz vezave skupine SO<sub>3</sub>H na površino polisulfonske membrane (**Slika 1**).

## 5 SKLEP

Namen našega dela je bil pripraviti membrane, ki bi omogočale uspešno ločevanje sestavin krvi. Zato smo iskali membrano, ki bi prepuščala beljakovine in zadrževala rdeče in bele krvne celice. Nemodificirane membrane so v nekaterih primerih omogočale uspešno ločevanje krvnih celic in beljakovin. Da bi dosegli čimbolj uspešno ločitev krvi, smo poskušali spreminjati lastnosti površine membrane z različnimi modifikacijami. Izmed vseh preizkušenih vzorcev sta najboljše ločitev omogočili membrana iz celuloznega acetata z dodatkom perklorata in membrana iz polisulfona, modificirana s propilen oksidom; čas modifikacije je bil 1 uro pri sobni temperaturi. V nadaljevanju raziskav bomo poskušali pri teh dveh membranah poiskati optimalne pogoje za njihovo izdelavo, da bi tako izboljšali ločitev.

## 6 LITERATURA

- <sup>1</sup> A. Cencič, S. Koren, B. Filipič, Č. Stropnik: Porcine Blood Cell Separation by Porous Cellulose Acetate Membranes, *Cytotechnology*, 26 (1998)165-171
- <sup>2</sup> M. Mulder: Basic Principles of Membrane Technology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1991
- <sup>3</sup> M. Žemva: Laboratorijska hematologija, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1968
- <sup>4</sup> J. Leikola, P. Lundsgaard-Hansen: Leukocyte-Depleted Blood Products, Basel, 1994
- <sup>5</sup> Č. Rusov: Osnovi hematologije živalinj, Naučna knjiga, Beograd, 1984
- <sup>6</sup> A. Higuci, N. Iwata, T. Nakagava: Surface-Modified Polysulfone Hollow Fibers. II. Fibers Having CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Segments and Immersed in HCl Solution, *J. Appl. Polym. Sci.*, 40 (1990) 709-717
- <sup>7</sup> A. Higuci, T. Nakagava: Surface-Modified Polysulfone Hollow Fibers. III. Fibers Having a Hydroxide Group, *J. Appl. Polym. Sci.*, 41 (1990) 1973-1979
- <sup>8</sup> M. Elimelech, W. H. Chen. J. J. Waypa: Measuring the Zeta (Electrokinetic) Potential of Reverse Osmosis Membranes by a Streaming Potential Analyzer, *Desalination*, 95 (1994) 269-286
- <sup>9</sup> L. Breithbach, H. Hinke, E. Stande: Heterogeneous Functionalizing of Polysulfone Membranes, *Angew. Macromol. Chem.*, 184 (1991) 183-196