



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 153406 B

- (21) Patentansøgning nr.: 2826/81
(22) Indleveringsdag: 26 jun 1981
(41) Alm. tilgængelig: 28 dec 1981
(44) Fremlagt: 11 jul 1988
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 27 jun 1980 NL 8003727

(51) Int.Cl.⁴ C 08 F 292/00
B 01 J 20/26

- (71) Ansøger: *AKZO N.V.; IJssellaan 82; Arnhem, NL
(72) Opfinder: Jan Andre Jozef *Schutijser; NL

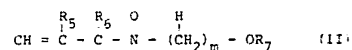
(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Porøst, uorganisk støttemateriale, der er belagt med en organisk, stationær fase, til anvendelse i kromatografi og fremgangsmåde til dets fremstilling

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

R_1, R_2 og R_3 er i stand til at danne en -O-Si-binding mellem silanet og det uorganiske materiale via dets overfladefrøoxylgrupper; og R_4 er amino, substitueret amino, såsom α -aminoalkyl (1-3 C)-amino, mercapto, en estergruppe eller glycidoxy, og idet den organiske, stationære fase er en tværbundet (co)polymer, der er opnået ved additionspolymerisation og opbygget af 0,1-140 μ mol vinylmonomere pr. m^2 uorganisk overflade af støttematerialet, idet nævnte (co)polymer indeholder mindst 0,1 μ mol amidgrupper pr. m^2 uorganisk overflade af støttematerialet, idet nævnte vinylmonomere består helt eller delvis af bifunktionelle vinylmonomere, der indeholder amidgrupper og har formen:

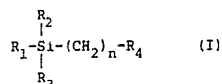


hvor R_5 og R_6 hvert er hydrogen eller en organisk gruppe med indtil 18 carbonatomer; R_7 er hydrogen eller en organisk gruppe med indtil 20 carbonatomer; og m er et helt tal fra 1-20.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer et hydrolytisk meget stabilt støttemateriale, som er fremragende velegnet til anvendelse til det ovennævnte formål, hvor støttematerialet skal anvendes mange gange efter hinanden.

Det hidtil ukendte støttemateriale kan med fordel anvendes i industriel målestok. Det har meget hensigtsmæssige hydrofile egenskaber, har høj mekanisk stabilitet og er i stand til at tåle store strømningshastigheder. Det går ikke i opløsning i vandige opløsninger og giver ikke anledning til uspecifikke reaktioner med biomakromolekyler. Materialet kan let regenereres og er modstandsdygtigt over for nedbrydning på grund af mikrober og enzymer.

Støttemateriale, der som sådant er anvendeligt i kromatografi eller som udgangsmateriale, der ved binding hertil af forbindelser indeholdende ioniske grupper, ligander eller bio-makromolekyler kan anvendes som ionbytter, som et medium i affinitetskromatografi eller i enzymatiske reaktioner og består af porøse, organiske silaniserede partikler, hvorpå der covalent er bundet en organisk, stationær fase opbygget af (co)polymeriserede vinylmonomere, der indeholder amidgrupper, idet nævnte uorganiske partikler er blevet silaniseret med en organosilan af formelen I



hvorin er 1-5; R_1 er halogen eller alkoxy (1-10 C); R_2 og R_3 hvert er halogen, alkoxy (1-10 C), alkyl (1-3 C) eller aryl (6-10 C), idet halogenet og alkoxygruppen i

DK 153406 B

2826-81

Opfindelsen angår et støttemateriale, der er velegnet som sådant i kromatografi eller som et udgangsmateriale, der ved binding hertil af forbindelser, der indeholder ioniske grupper, ligander eller biomakromolekyler, kan anvendes som ionbytter, som et medium i affinitetskromatografi eller i enzymatiske reaktioner, hvilket støttemateriale består af porøse, uorganiske silaniserede partikler, hvorpå der kovalent er bundet en organisk stationær fase opbygget af (co)polymeriserede vinylmonomerer, der indeholder amidgrupper.

Støttemateriale af den ovenfor anførte type er beskrevet blandt andet i US patentskrift nr. 3.983.299. Den så anvendte organiske stationære fase er et tyndt lag af et carbohydronat, såsom dextran eller saccharider med en molekylvægt mindre end 6000. En stor ulempe ved støttematerialer af denne type er, at carbohydrat er et naturligt materiale, som ikke blot undergår oxidativ nedbrydning, men også er genstand for biologisk angreb. En yderligere ulempe er, at antallet af funktionelle grupper, der skal bindes dertil til sidst, forbliver temmeligt begrænset.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en hidtil ukendt type støttemateriale, som ikke udviser den ovennævnte ulempe.

Det skal bemærkes, at støttematerialer til anvendelse i kromatografien, mere specielt affinitetskromatografi og baseret på et porøst uorganisk materiale og en organisk, stationær fase af en syntetisk polymer, kendes fra DE patentskrift nr. 2.750.595. I dette tilfælde gøres der imidlertid ikke brug af silaniseret materiale, og der opnås en mindre kraftig binding mellem den organiske, stationære fase og det uorganiske materiale.

I det nævnte DE patentskrift nævnes desuden ikke anvendelsen af en tværbundet polymer. Delvis på grund af anvendelsen af et ikke-silaniseret materiale og specielt vinylmonomerer kan det under visse omstændigheder ske, at hverken den hydrolytiske stabilitet eller adsorptionsegenskaberne af dette støttemateriale er tilfredsstillende.

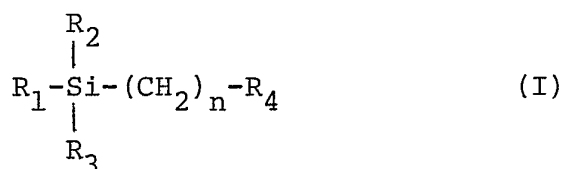
Den foreliggende opfindelse tilvejebringer et hydrolytisk meget stabilt støttemateriale, som er fremragende velegnet til anvendelse til det ovennævnte formål, hvor støttematerialet skal anvendes mange gange efter hinanden.

- 5 Det hidtil ukendte støttemateriale ifølge opfindelsen består af porøse, uorganiske silaniserede partikler, hvorpå der covalent er bundet en organisk, stationær fase, der er opbygget af (co)polymeriserede vinylmonomerer og indeholder amidgrupper og er ejendommeligt ved, at

10

(A) det uorganiske materiale er blevet silaniseret med en organisk silan med formlen I

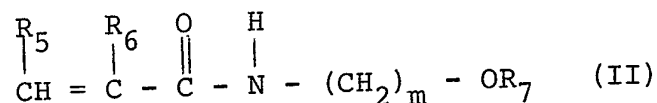
15



- hvor $n = 1-5$, fortrinsvis 3, R_1 er halogen eller alkoxy (1-10 C); R_2 og R_3 hver er halogen, alkoxy (1-10 C), alkyl (1-3 C) eller aryl (6-10 C), idet halogenet og alkoxygruppen i R_1 , R_2 og R_3 er i stand til at danne en -O-Si-binding mellem silanet og det uorganiske materiale via dets overfladehydroxylgrupper; og R_4 er amino, substitueret amino, såsom ω -amino-alkyl (1-3 C)-amino, mercapto, en estergruppe eller glycidoxy og fortrinsvis er glycidoxy, og

- (B) den organiske, stationære fase er en tværbundet (co)polymer, der er opnået ved additionspolymerisation og opbygget af 0,1 -140 μmol , fortrinsvis 5-25 μmol vinylmonomerer pr. m^2 uorganisk overflade af støttematerialet, idet nævnte (co)polymer indeholder mindst 0,1 μmol amidgrupper pr. m^2 uorganisk overflade af støttematerialet, idet nævnte vinylmonomerer består helt eller delvis af bifunktionelle vinylmonomerer indeholdende amidgrupper og med formlen (II)

35



5 hvori R₅ og R₆ hver er hydrogen, en alkyl- eller cykloalkyl-
gruppe med indtil 6 carbonatomer eller en arylgruppe med ind-
til 10 carbonatomer; R₇ er hydrogen eller en organisk gruppe

med indtil 20 carbonatomer; og m er et helt tal fra 1-10, hvor
amidgrupperne er blevet opnået delvis ved at omsætte

10 (a) et afstandsmolekyle, en ligand, et bio-makromolekyle eller
en forbindelse, der indeholder en ionisk gruppe, idet hver
har en reaktiv gruppe og en eller flere amidgrupper, med
en reaktiv gruppe af en vinylmonomer eller den tværbundne
15 (co)polymer, eller

(b) et afstandsmolekyle, en ligand, et bio-makromolekyle eller
en forbindelse, der indeholder en ionisk gruppe, hver med
en eller flere amino- og/eller carboxylgrupper, med en
20 eller flere carboxyl- og/eller aminogruupper i den tvær-
bundne (co)polymer.

Det hidtil ukendte støttemateriale kan med fordel anvendes
i industriel målestok. Det har meget hensigtsmæssige hydro-
file egenskaber, har høj mekanisk stabilitet og er i stand
25 til at tåle store strømningshastigheder. Det går ikke i
opløsning i vandige opløsninger og giver ikke anledning
til uspecifikke reaktioner med biomakromolekyler. Materi-
alet kan let regenereres og er modstandsdygtigt over for
nedbrydning på grund af mikrober og enzymer.

30 Udtrykket "bifunktionel vinylmonomer" anvendes i den fore-
liggende tekst til at beskrive en monomer, som foruden den
vinyliske funktion har mindst én hydrofil funktionel gruppe,
der er i stand til at danne covalente bindinger, dvs. i
35 formlen II gruppen -OR₇. "Delvis" er fortrinsvis > 5 mol%.

Silaniseret, uorganisk materiale omfattende glycidoxygrupper hydrolyseres til opnåelse af glycerylgrupper før (co)polymerisation.

- 5 Britisk patentskrift nr. 1.456.865 omhandler et kiselholdigt, partikelformet støttemateriale til anvendelse i kromatografi, specielt i ionbytterkromatografi, med en stationær, organisk fase, som er en copolymer, der er bundet til støttematerialets overflade. Det kiselholdige materiale
- 10 er silaniseret med en vinylsilan, og det silaniserede materiale er copolymeriseret med en vinylmonomer indeholdende en eller flere olefiniske grupper. Vinylmonomeren kan indeholde funktionelle grupper, såsom halogen, hydroxyl, methoxy, amid, trichlorsilinyll, carboxylsyre
- 15 og en estergruppe, men disse funktionelle grupper synes ikke at være af afgørende betydning, når henses til eksemplerne, som angår vinylmonomerer, såsom propylen, isobutylen, styren og butadien, idet undtagelsen er eksempel 4, hvori vinylmonomeren er maleinsyreanhydrid.
- 20 Den bundne podecopolymer, som afhængigt af valget af vinylmonomeren ikke er tværbundet eller svagt tværbundet, kan yderligere tværbindes under anvendelse af tværbindende midler, såsom divinylbenzen eller dichlorpropan. Det dannede produkt med overvejende hydrofobe egenskaber
- 25 omdannes så fortrinsvis til en syre- eller en base-ionbytterpodecopolymer ved sulfonering, fosfoneri, carboxylering, hydroxylering eller aminering.
- 30 Den bundne copolymer kan alternativt blive funktionaliseret ved omsætning med et chelateringsmiddel til indføring af et chelateringsmiddel i den bundne podecopolymer, eller nitrilgrupper kan indføres ved omsætning af et alkyl-nitril med halogenatomer, der er indeholdt i den bundne
- 35 copolymer.

5 Dette kendte vinyl-silaniserede støttemateriale med copoly=mer covalent bundet derpå har ikke de særlige hydrofile egenskaber og ikke den store alsidighed i kromatografiske anvendelser som materialet ifølge opfindelsen. Det kendte materiale er ikke velegnet til affinitetskromatografi og har ringe egenskaber i størrelsesudelukkelseskromatografi.

10 US patentskrift nr. 3.984.349 omhandler et porøst, findelt eller kolloidt, uorganisk støttemateriale til anvendelse i kromatografi indeholdende overfladehydroxylgrupper, som er modificeret ved, at der til overfladen er podet en organisk gruppe for at etablere en -O-Si-binding, hvori den organiske gruppe har en gennemsnitlig molekylvægt på over 150 og indeholder mindst én hydrofil funktionel gruppe.

15 Den organiske gruppe er en silan, der er dannet ved tilføjelsen af en forbindelse, som omfatter en vinyl- eller allylafslutning og mindst ét hydrofilt radikal og en simpel silan, eller ved copolymerisation af en vinylmonomer, som indeholder mindst ét hydrofilt radikal og en

20 umættet silan, dvs. en organisk silan, hvori den organiske gruppe indeholder ethylenisk umætning. Det således dannede silan omsættes med det uorganiske støttemateriale, f.eks. silica. På denne måde forsynes støttematerialets overflade med lange kæder ("haler") af (co)polymer uden nogen

25 tværbinding, og i tilfældet af en copolymer indeholdende adskillige silangrupper pr. molekyle vil ikke alle disse silangrupper reagere med det uorganiske støttemateriales overfladehydroxylgrupper, således at for dette kendte materiale vil de forstyrrende, ikke-specifikke adsorptionsegenskaber af støttematerialet selv eller af silanernes silanolgrupper stadigt eksistere i en vis udstrækning.

30 Til forskellige kromatografiske anvendelser (f.eks. størrelseseksklusionskromatografi, affinitetskromatografi) er dette adsorptionsfænomen meget forstyrrende. Belægning af

35 det uorganiske støttemateriale ifølge den foreliggende opfindelse fører til kromatografisk støttemateriale med fuldstandig eller næsten fuldstandig deaktiveret uorganisk overflade og med fremragende hydrofile egenskaber. For-

skellige porøse, uorganiske materialer er velegnede til anvendelse i støttematerialet ifølge den foreliggende opfindelse. Eksempler herpå omfatter oxider af aluminium, titan, nikkel, zirkonium og jern, forskellige silikater, såsom ler, diatomejord, kaolin, bentonit, magnesiumsilikat (talkum), asbest og glas. Porøst silica (SiO_2) foretrækkes. Særligt fordelagtige resultater opnås med silicaperler. Egnede perler markedsføres af Rhone-Poulenc under handelsnavnet Spherosil. I forhold til kontrolleret poreglas har dette materiale den fordel, at det er i alt væsentligt kugleformet. Prisen er desuden væsentligt lavere.

De uorganiske materialers porediameter vil sædvanligvis ligge fra 50-10.000 Å. Den valgte diameter afhænger af den påtænkte anvendelse. I affinitetschromatografi vil der f.eks. sædvanligvis blive anvendt perler med en porediameter af størrelsesordenen fra 250-3000 Å.

Perlernes porevolumen vil sædvanligvis ligge i intervallet fra 0,01-3 ml/g, idet et volumen på ca. 1 ml/g foretrækkes. Perlernes specifikke overfladeareal vil sædvanligvis ligge i intervallet fra 0,5-1000 m^2/g , idet den bedste værdi er fra 5-500 m^2/g .

Ved fremstillingen af støttematerialet til affinitetschromatografi foretrækkes det at anvende perler med et specifikt overfladeareal i intervallet fra 25-100 m^2/g , hvilket svarer til perler med en porediameter i intervallet fra henholdsvis 1000-250 Å. Afhængig af den påtænkte anvendelse af støttematerialet vil gennemsnitsdiametere af det uorganiske materiale, der skal anvendes til fremstilling deraf, sædvanligvis ligge fra 2-3000 μ .

Ved fremstillingen af støttematerialet til affinitetschromatografi kan der gøres brug af perler med en gennemsnitsdiameter i intervallet fra 50 μ til 3000 μ , idet perler med en gennemsnitsdiameter i intervallet fra 100-800 μ

foretrækkes. Ved fremstillingen af støttemateriale til højtryksvæskrokromatografi (HPLC) foretrækkes anvendelsen af perler med en gennemsnitspartikelstørrelse i intervallet fra 2-50 μ .

5 Før en organisk, stationær fase covalent bindes derpå, skal det porøse, uorganiske materiale silaniseres. Dette kan ske på en måde, der er i og for sig kendt i den kemiske teknologi. Formålet med silaniseringen er at give det uorganiske
10 materiale reaktive grupper for at tillade, at den tværbundne polymer får en covalent binding. Eksempler på silaneringsreaktioner, som er velegnede til brug ved fremstillingen af de foreliggende støttematerialer, er beskrevet i det førnævnte US patentskrift nr. 3.983.299 og i en artikel
15 af Pryde i Journal of Chromatographic Science, bind 12 (1974), side 486-498. Som tidligere anført silaniseres det uorganiske materiale med et organosilan af formelen I. I forbindelse med den foreliggende opfindelse foretrækkes et støttemateriale, hvor det uorganiske materiale er underkastet silanisering med γ -aminopropylsiloxylgrupper,
20 γ -mercaptopropylsiloxylgrupper eller hydrolyserede γ -glycidoxylpropylsiloxylgrupper, idet sidstnævnte grupper særligt foretrækkes.

Det har vist sig, at der til størstedelen af de førnævnte anvendelser opnås de gunstigste resultater med et støttemateriale, hvori den tværbundne polymer er opbygget af 5-25 μ mol vinylmonomerer pr. m^2 af det silaniserede materiales uorganiske overfladeareal. Specielt i det tilfælde, hvor de foreliggende støttematerialer anvendes til affinitetskromatografi,
25 er det ønskeligt, at de har optimale hydrofile egenskaber. Dette krav tilfredsstilles ved hjælp af den foreliggende opfindelse, der giver et støttemateriale, der indeholder mindst 0,1 μ mol amidgrupper pr. m^2 uorganisk overfladeareal af det silaniserede materiale. Amidgrupper er ikke blot modstandsdygtige over for hydrolytisk dekomponering i vandige opløsninger
35 under kraftigt varierende betingelser, men de er også stabile over for mikrobielt og/eller enzymatisk angreb. I praksis vil støttematerialet indeholde 5-25 μ mol amidgrupper pr. m^2 uorganisk overfladeareal af det silaniserede materiale.

Som tidligere angivet påvirkes indføringen af amidgrupper i den organiske, stationære fase ved, at der i (co)polymerisationen anvendes en bifunktionel vinylmonomer af

5 formlen II. Nævnte bifunktionelle vinylmonomer kan være den eneste kilde for amidgrupperne. Det er imidlertid også muligt inden for den foreliggende opfindelses omfang fordelagtigt at opnå amidgrupperne delvis ved at bringe en forbindelse, der indeholder et afstandsmolekyle, en ligand, et bio-makromolekyle eller en ionisk gruppe
10 med en reaktiv gruppe og en eller flere amidgrupper, til reaktion med en reaktiv gruppe af vinylmonomeren eller den tværbundne polymer.

15 Støttematerialets egenskaber kan også påvirkes i gunstig retning, hvis amidgrupperne opnås delvis ved at bringe en eller flere amino og/eller carboxylgrupper i den tværbundne polymer til reaktion med en forbindelse, der indeholder et afstandsmolekyle, en ligand, et bio-makromolekyle eller en ionisk gruppe
20 med carboxylgrupper og/eller aminogrupeer.

Inden for den foreliggende opfindelses omfang har det vist sig, at belagte materialer, hvori de amidgruppeholdige vinylmonomerer af formlen II er inkorporeret, er særdeles velegnede til anvendelse i væskefaseeksklusionskromatografi, gel-filtrering eller størrelseseksklusionskromatografi (SEC).
25 Det porøse, uorganiske materiale består fordelagtigt af silicaperler, der fortrinsvis har en diameter i intervallet fra 100-200 μ og markedsføres af Rhone-Polenc under handelsnavnet Spherosil. Det er en stor fordel ved de belagte perler, at der i de sædvanlige vandige opløsninger ikke
30 sker nogen adsorption eller biospecifik reaktion mellem perlenes overflade og bio-makromolekylerne.

Amidgrupper, der indeholder vinylmonomerer, som er særligt
35 velegnede til anvendelse ved fremstillingen af en polymer-

belægning, er N-(hydroxyethyl)acrylamid og N-methylol(meth)=acrylamid, fortrinsvis sidstnævnte.

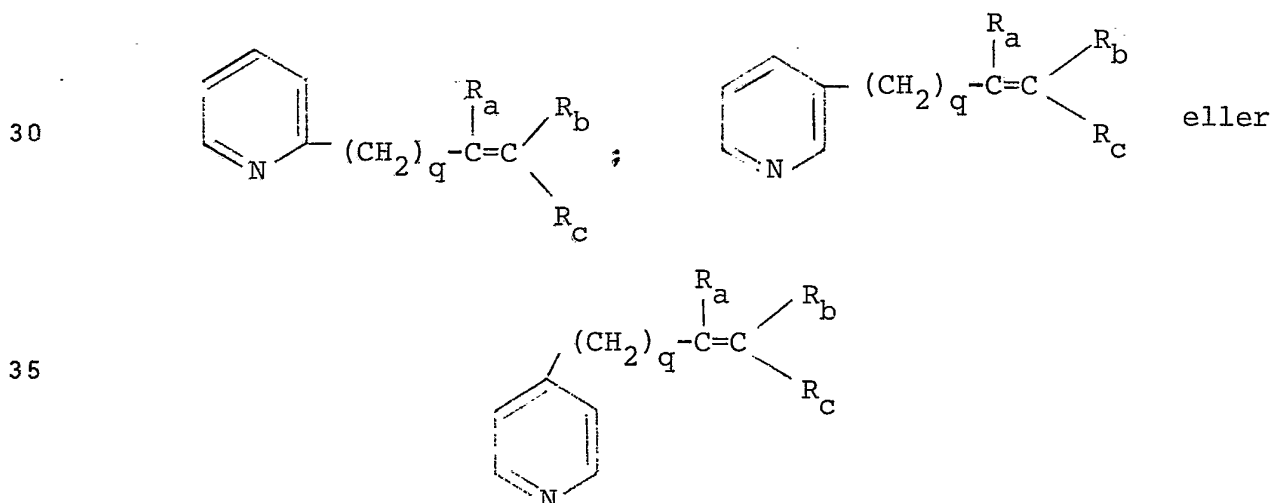
Ved anvendelsen af den biofunktionelle vinylmonomer af formelen II sker tværbinding under additionspolymerisation. I det tilfælde, hvor der findes γ -aminopropylsiloxylgrupper på det silaniserede materiale, vil den covalente binding almindeligvis
5 være en amidbinding, der er opnået ved omsætning af en amino-gruppe af silanet med en carboxylgruppe af additionspolymeren. I det tilfælde, hvor der indgår N-methylolamidgrupper i en eller flere af additionspolymerens vinylmonomerer, foretrækkes
10 det at tilføre γ -glycerylpropylsiloxylgrupper til det uorganiske materiale. N-methylolamidgrupperne er med opvarmning og eventuelt i nærværelse af et syrespor i stand til at reagere med sig selv og med en γ -glycerylpropylsiloxylforbindelses glycerylgruppe, hvilket resulterer i, at additionspolymeren tvær-
15 bindes samt bindes covalent til det silaniserede materiale.

Ikke blot valget af silanen til opnåelse af det silaniserede, uorganiske materiale og den bifunktionelle vinylmonomer, som anvendes ved (co)polymerisationen, men også fremgangsmåden til
20 fremstilling af støttematerialet ifølge opfindelsen bidrager til opnåelse af optimale produkter. Det silaniserede, uorganiske materiale opnås ifølge i teknikken kendte metoder som tidligere angivet heri. Den tværbundne polymerbelægning opnås ved hjælp af følgende fremgangsmåde. Først opløses monomererne
25 og, alt efter det foreliggende tilfælde, di- og/eller oligomerer i et flygtigt, organisk opløsningsmiddel eller organiske opløsningsmidler og/eller vand og sættes til det silaniserede, uorganiske materiale. Det flygtige opløsningsmiddel fjernes derpå fortrinsvis i et roterende vakuumfordampningsapparat under
30 omrøring og reduceret tryk og lav temperatur (under 40°C). Efter tilsætning af et opløsningsmiddel til radikalinitiatoren, i hvilket opløsningsmiddel monomererne slet ikke eller kun i ringe omfang opløses, opvarmes blandingen i en oxygenfri atmosfære, hvilket resulterer i, at monomererne polymeriseres, og
35 der sker en covalent binding til det silaniserede materiale. Radikalinitiatoren kan eventuelt allerede være sat til opløsningen af monomererne.

Foruden den bifunktionelle vinylmonomer af formlen II kan der anvendes andre vinylmonomerer i copolymerisationen til opnåelse af den tværbundne polymer. Afhængig af det påtænkte anvendelsesområde kan de yderligere vinylmonomerer have højst varierende struktur.

5 Anvendelige eksempler derpå omfatter epoxyforbindelserne med en ethylenisk, umættet gruppe som nævnt i ovennævnte DE patentskrift nr. 2.750.595. Der kan også anvendes vinylmonomerer uden nogen reaktiv gruppe, såsom ethylen, propylen, vinylchlorid, vinylfluorid og/eller vinylacetat, selvom deres anvendelse er begrænset inden for den foreliggende opfindelses omfang. En forudsætning er imidlertid, at monomererne let kan polymeriseres til en additionspolymer med de krævede egenskaber til den påtænkte anvendelse. Hvis materialet f.eks. skal anvendes som ionbytter, kan der overvejes copolymerisation, hvor der gøres brug af en vinylmonomer med en kationisk eller 15 anionisk gruppe. Eksempler på forbindelser, der indeholder en anionisk gruppe, er vinylmonomerer med en carboxylgruppe, en sulfonsyregruppe, såsom ethylensulfonsyre, allylsulfonsyre, styrensulfonsyre, 2-sulfoethylmethacrylat, 2-acrylamid-2-methylpropylsulfonsyre, 2-methacryloxy-2-hydroxypropylsulfonsyre, (meth)acryloylesteren af ω -hydroxyalkylensulfonsyre med 20 1-20 carbonatomer i alkylengruppen, N-acryloyltaurin, vinyl-oxybenzensulfonsyre og acryl- eller methacrylsyre. Eksempler på vinylmonomerer med en kationisk gruppe er:

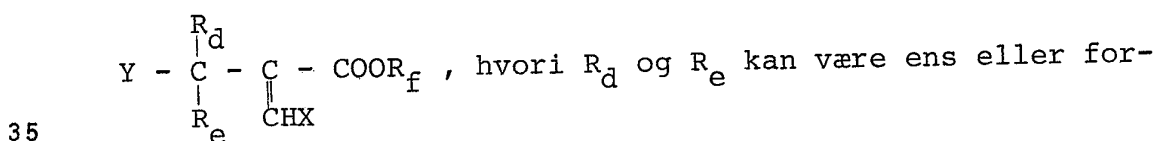
Alkenylpyridiner af formlen:



hvor $q = 0$ eller et helt tal fra 1-20, og R_a , R_b og R_c kan være ens eller forskellige og betegner et hydrogenatom eller en alkylgruppe med 1-20 carbonatomer; aminoalkylacrylater og methacrylater såsom t-butylaminoethylmethacrylat, diethyl-
 5 aminoethylacrylat, dimethylaminopropylmethacrylamid og methacrylamidpropyltrimethylammoniumchlorid.

Til anvendelse som udgangsmateriale til affinitetskromatografi foretrækkes vinylmonomerer med reaktive grupper, som let kan
 10 kobles til forbindelser, som på den ene side har en reaktiv gruppe og på den anden side en ligand, som er velegnet til anvendelse i et specielt område af affinitetskromatografi. Affinitetskromatografi har samme mening her som defineret af Turková i "Affinity Chromatography", Elsevier, 1978, side 1 og 2.
 15 Således dækkes ikke blot affinitetsmetoder i betydningen biospecifik adsorption heraf, men også hydrofob kromatografi, covalent kromatografi, affinitetseluering såvel som undersøgelsen af reaktioner på støttematerialer, hvortil oligonucleotider er bundet. Ved affinitetskromatografi skal også forstås
 20 isoleringen af bio-makromolekyler ved simpel sorption på en specifik sorbent. Det er naturligvis også muligt at anvende vinylmonomerer, hvori den funktionelle gruppe er bundet uden mellemlæddet af to reaktive grupper.

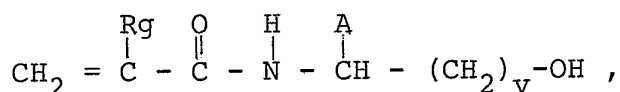
Foruden de førnævnte vinylmonomerer med en anionisk eller kationisk gruppe omfatter eksempler på vinylmonomerer med reaktive grupper; Halogenerede monomerer, såsom halogenerede alkylacrylater og methacrylater. Som eksempler herpå kan nævnes:
 25 2-chlorethylacrylat og 2-chlorethylmethacrylat; halogeneret alkylacrylsyre og deraf afledte forbindelser med formlen:
 30



skellige og betegner et hydrogenatom, en methylgruppe eller en ethylgruppe, og R_f betegner et hydrogenatom, en lavere alkylgruppe eller en arylgruppe, X betegner et hydrogenatom, halogen, CN, en arylgruppe, OH, COOH eller O-aryl, og Y betegner et chlor- eller bromatom; og halogenmethyleret styren såsom p-chlormethylstyren.

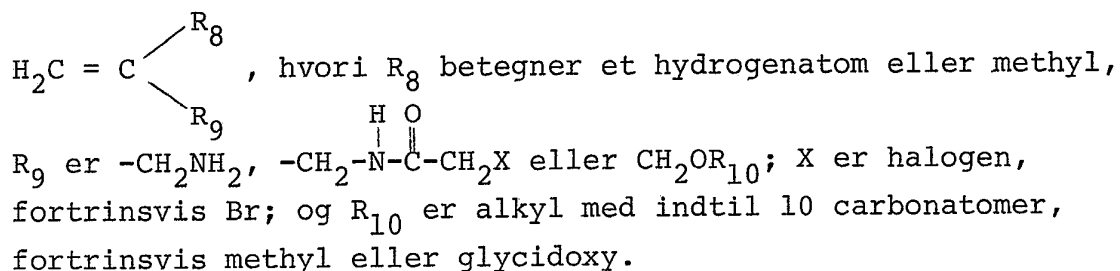
Yderligere eksempler omfatter: Reaktive heterocykliske vinylmonomerer såsom 2-(1-aziridiny)ethylmethacrylat, allylglycidylether, glycidylmethacrylat, thioglycidylacrylat, N-vinyl-2-pyrrolidon og maleinsyreanhydrid; vinylmonomerer med en aldehydendegruppe såsom acrolein og crotonaldehyd; vinylmonomerer med en aminogruppe såsom allylamin, vinylamin og p-aminostyren; syremonomerer såsom maleinsyre, fumarsyre, itakonsyre og syrer af formlen:

$$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_t\overset{\text{H}}{\underset{|}{\text{C}}}=\overset{\text{H}}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{COOH}$$
, hvori t = 0 eller et helt tal fra 1-20; acrylsyre og deraf afledte forbindelser såsom Cl₂C=CH COOH; vinylalkylencarboxylsyre med 2-20 carbonatomer i alkylengruppen; p-vinylbenzoesyre, alkylvinylether med 1-18 carbonatomer i alkylgruppen; vinylphenylether; hydroxyalkylvinylether med 2-20 carbonatomer i alkylengruppen; vinyl-etheren af en polyalkylenoxidglycol med 2-20 alkylenoxidenheder og 2-5 carbonatomer pr. alkylenoxidenhed; forbindelser af formlen:

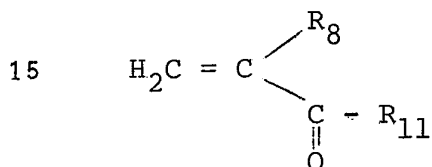


hvori Rg betegner et hydrogenatom eller en alkylgruppe med 1-18 carbonatomer, og A betegner et hydrogenatom eller en alkylgruppe med 1-20 carbonatomer, og v betegner et helt tal fra 1-20.

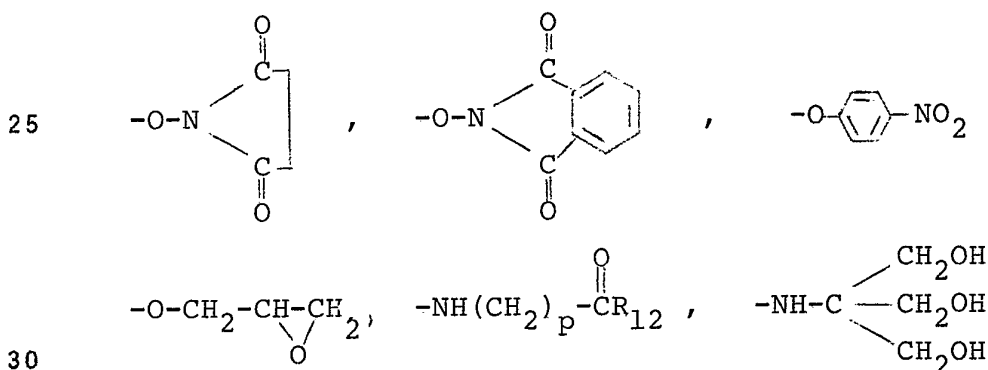
Særligt egnede er forbindelser med formlen

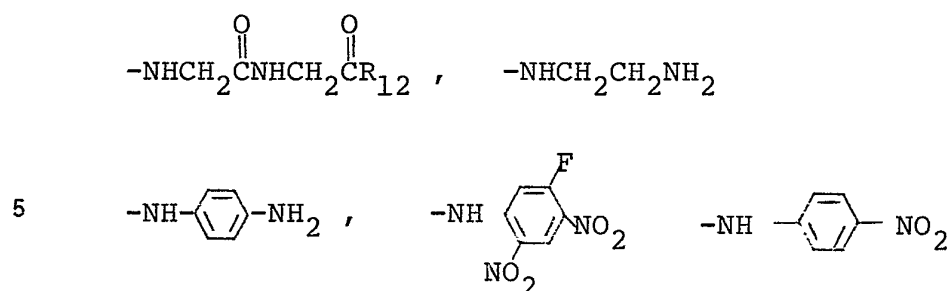


10 Som udgangsmaterialer, der er gjort velegnede til anvendelse i affinitetskromatografi ved, at der dertil er bundet ligander anvendes der imidlertid fortrinsvis en tværbundet (co)-polymer af en eller flere vinylmonomerer med en funktionel gruppe af formlen:



20 hvori $\text{R}_8 = \text{H}$ eller CH_3 , og R_{11} betegner en funktionel gruppe, der kan være bundet eller ej via en afstandsgruppe, og hvori R_{11} betegner en hydroxylgruppe eller en eller flere af følgende grupper:





hvor R_{12} kan have samme betydning som R_{11} , og p betegner et helt talt fra 2-10.

10

Ifølge den foreliggende opfindelse er det en fordel, hvis molekylvægten af vinylmonomeren med en funktionel gruppe og eventuelt også en afstandsgruppe højst er 1000 og fortrinsvis fra 70-400. Eksempler på ligander, der er velegnede til anvendelse i affinitetskromatografi, omfatter aminosyrer, mononucleotider, oligonucleotider og polynucleotider, forskellige organiske farvende stoffer, enzyminhibitorer, polyaminosyrer, lectiner, polysaccharider, lipider, antigener, enzymer.

20

Opfindelsen vil blive beskrevet yderligere i de efterfølgende eksempler. Det er klart, at disse eksempler blot tjener til at belyse den foreliggende opfindelse og på ingen måde udgør en begrænsning af opfindelsens omfang.

25

Eksempel I

30

Fremstilling af γ -glycerylpropylsiloxysilica-perler. 110 g silicaperler (gennemsnitlig porediameter: 600 Å, specifikt overfladeareal 50 m²/g, diameterinterval: 100-200 μ) blev behandlet i 2 timer med 400 ml destilleret vand i et ultrasonisk bad ved 80°C. Efter vask af perlerne med vand indtil opnåelse af

35

en klar opløsning blev de aktiveret ved behandling af suspensionen med 40 ml 4H HNO₃. Efter vask med vand og tørring blev der tilsat 460 ml toluen til 100 g silicaperler anbragt i en kolbe. Derpå blev der til kolben sat 40 ml γ -glycidoxypropyltrimethoxysilan. Efter at kolben var blevet forbundet til et
5 roterende vakuuminddamponingsapparat, blev den opvarmet i 5 timer på et oliebad af 90°C .

Efter afkøling blev suspensionen filtreret fra og vasket
10 med 500 ml toluen og 1 liter acetone. Efter fjernelse af acetonen under reduceret tryk blev perlerne tørret i 2 timer ved 50°C og under reduceret tryk. Efter tørring natten over ved 120°C og under reduceret tryk af ca. 200 mg perler blev carbonindholdet bestemt ved hjælp af elementaranalyse. Det viste sig at være ca. 2%, hvilket svarer til
15 ca. 280 μ mol γ -glycidoxypropylsiloxylgrupper pr. g perler. I en roterende vakuuminddampningsapparat indeholdende 300 ml vand syrnede til pH-værdi 2 med 10% HCl, blev 105 g af disse perler afgasset ved tryk på 12 ml Hg.

Derpå blev materialet omrørt i 1 time ved^{et} tryk på 1 atmosfære på et oliebad af 90°C. Efter afkøling af materialet blev perlerne filtreret fra og vasket med vand indtil neutral reaktion. Derpå blev perlerne tørret i 3 timer ved
20 70°C og henstillet natten over under reduceret tryk ved
25 120°C. Ved elementaranalyse viste det sig, at mængden af γ -glycerylpropylsiloxylgrupper var ca. 280 μ mol pr. g perler.

Eksempel II

30 Under anvendelse af samme fremgangsmåde som beskrevet i eksempel I blev silicaperler (porediameter: 260 Å, partikelstørrelse: 100-200 μ , specifikt overfladeareal: 102 m²/g) behandlet med γ -glycidoxypropyltrimethoxysilan indeholdende indtil 500 μ mol γ -glycidoxypropylsiloxyl-

35

grupper pr. g silica. Efter hydrolyse med dannelse af γ -glycerylpropylsiloxysilica blev 25 g af disse perler suspenderet i 100 ml dioxan. Til denne suspension blev der sat 7,5 ml af en 60 vægt% vandig opløsning af N-methylolacrylamid. I et roterende vakuuminddampnings-

5 apparat blev dioxanen afdampet, indtil perlerne trillede i kolben. Der blev derpå tilsat en opløsning af 150 mg dibenzoylperoxid (20% vand) i 100 ml n-hexan. Efter at suspensionen var blevet udsat for en nitrogenatmosfære, blev

10 blandingen polymeriseret i 1,5 time ved 70°C. Suspensionen blev overført til et glasfilter og vasket med acetone og methanol, hvorefter perlerne blev tørret under reduceret tryk ved 120°C. Ved elementaranalyse viste det sig, at carbonindholdet var 8,73% og nitrogenindholdet 1,78%. Pr.

15 g støttemateriale indgik der 1270 μmol N-methylolacrylamid i en grundmasse i form af polymeren Dette svarer til 14,8 μmol N-methylolacrylamider pr. m^2 .

Eksempel III

20 Idet der anvendes samme fremgangsmåde som beskrevet i eksempel I, blev silicaperler forsynet med 300 μmol γ -glycerylpropylsiloxysiloxysilica pr. g perler (porediameter: 500 Å, perlediameter: 100-200 μ , specifikt overfladeareal: 63 m^2/g). 100 g af disse perler blev blandet med 7,5 ml af en vandig opløsning indeholdende 60 vægt% N-methylolacrylamid. I 400 ml vandfri ethylacetat blev der lidt efter lidt indført: 2,882 g (40 mmol) acrylsyre: 5,524 g N-hydroxysuccinimid (48 mmol) og 9,078 g (44 mmol) N,N-dicyklohexylcarbodiimid efterfulgt af filtrering af opløsningen efter en nats omrøring. Filtratet blev sat til suspensionen af silicaperler, hvorefter ethylacetatet blev fjernet under reduceret tryk ved 40°C i et roterende vakuuminddampningsapparat. Til perlerne blev der derpå

30 tilsat en opløsning af 400 mg dibenzoylperoxid i 400 ml isooctan. Suspensionen blev opvarmet i en nitrogenatmosfære i 1,5 time ved 70°C, hvilket forårsagede, at filmen

35

på perlerne polymeriserede. Efter filtrering blev perlerne vasket med acetone og methanol og derpå tørret i vakuum ved 120°C. Ved elementaranalyse viste det sig, at der var opnået følgende resultater:

5

C 6,54%

N 0,99%

10

Ved mikrotitrering (tilsætning af overskud af ethanolamin og tilbagetitrering med HCl) bestemtes mængden af med N-hydroxysuccinimid aktiverede carboxylgrupper til 241 µmol pr. g eller 4,4 µmol pr. m². N-methylolacrylamidmængden viste sig at være 460 µmol pr. g.

15

Eksempel IV

20

Under anvendelse af samme fremgangsmåde som beskrevet i eksempel III blev silicaperler forsynet med 257 µmol γ-glycerylpropylsiloxylgrupper pr. g perler (porediameter: 500 Å, perlediameter: 100-200 µ, specifikt overfladeareal: 63 m²/g).

25

100 g af disse perler blev blandet med 6,0 ml af en vandig opløsning indeholdende 60 vægt% N-methylolacrylamid (40 mmol).

30

Til 400 ml vandfri dioxan blev der successivt sat 7,4 g 6-acrylamidpentancarboxylsyre (40 mmol fremstillet ifølge en artikel af E. Brown et al., i J. of Chromatography 150 (1978) side 101-110, 5,524 g N-hydroxysuccinimid (48 mmol) og 9,078 g (44 mmol) N,N'-dicyklohexylcarbodiimid efterfulgt af filtrering af opløsningen efter en nats omrøring. Ethylacetatet blev fjernet fuldstændigt ved inddampning under omrøring under reduceret tryk ved 40°C. Til perlerne blev derpå sat en opløsning af 400 mg dibenzoylperoxid i 400 ml n-hexan. Suspensionen blev opvarmet i en nitrogen=

35

atmosfære i 1,5 time ved 70°C, hvilket bevirkede polymeri-

sation af filmen på perlerne. Efter filtrering blev perlerne vasket med acetone og methanol og derpå tørret i vakuum ved 120°C . Elementaranalyse af støttematerialet viste følgende resultater:

5

C 6,49%

N 1,05%

10

Ved mikrotitrering viste det sig, at den med N-hydroxy-succinimidaktiverede mængde carboxylgrupper var 200 μmol pr. g eller 3,7 μmol pr. m^2 . Den indbyggede mængde af N-methylolacrylamid viste sig at være 360 μmol pr. g.

Eksempel V

15

Under anvendelse af den samme fremgangsmåde som beskrevet i eksempel 1 blev aluminiumoxidperler (Alumina Woelm N₁₈, kraftigt spaltning, høj hastighed, fin mesh aluminiumoxid, W200 neutral, specifikt overfladeareal: 200 m^2/g , partikelstørrelse: 18-30 μ) forsynet med 422 μmol γ -glycerylpropylsiloxylgrupper pr. g perler.

20

25

10 g af de silaniserede perler blev suspenderet i 50 ml ethylacetat. Til denne suspension blev der sat 3,80 ml af en vandig opløsning indeholdende 60 vægt% N-methylolacrylamid. Efter fordampning af ethylacetat blev der tilsat en opløsning af 100 mg dibenzoylperoxid (20% vand) i 60 ml isoocten. Efter at suspensionen var blevet udsat for en nitrogenatmosfære, blev blandingen polymeriseret i 1,5 time ved 70°C .

30

35

Efter vaskning og tørring viste elementaranalyse af produktet et carbonindhold på 7,89% og et nitrogenindhold på 1,58%. Pr. g af støttematerialet forefandtes der 1130 μmol N-methylolacrylamid i form af den polymere. Dette svarer til 6,78 μmol N-methylolacrylamid pr. m^2 .

Eksempel VI

Under anvendelse af den samme fremgangsmåde som beskrevet i eksemplerne I og II blev silicaperler (porediameter: 700 Å, perlediameter: 100-200 µ, specifikt overfladeareal: 42 m²/g) silaniseret og belagt med γ-glycerylpropylsiloxo- og polymeriseret N-methylolacrylamid. Elementaranalyse viste, at produktets carbonindhold var 3,15% og nitrogen-

indholdet 0,57%. Mængden af amidgrupper var 10,3 µmol/m².

Eksempel VII

Under anvendelse af den samme fremgangsmåde som beskrevet i eksempel I blev silicaperler forsynet med 250 µmol γ-glycerylpropylsiloxogrupeer pr. g perler (porediameter: 700 Å, perlediameter: 100-200 µ, specifikt overfladeareal: 42 m²/g).

5 g af disse perler blev blandet med 20 ml dioxan, hvorefter der til den resulterende suspension blev sat 0,375 ml (2,5 mmol) af en 60 vægt% vandig opløsning af N-methylolacrylamid, 0,360 g (2,53 mmol) glycidylmethacrylat og 10 mg azobisisobutyronitril (AIBN). Dioxanet blev fjernet under reduceret tryk ved 40°C i et roterende vakuuminddampningsapparat.

Derpå blev perlerne opvarmet i 4 timer i en kolbe på et oliebad af 80°C, hvorefter perlerne blev tørret i vakuum i 2 timer ved 100°C. Efter at perlerne havde fået lov til at afkøle, blev de omhyggeligt vasket med acetone og tørret igen. Ved elementaranalyse viste det sig, at carbonindholdet var 5,91% og nitrogenindholdet 0,51%. Ved mikrotitrering blev det påvist, at mængden af epoxygrupper var 105 µmol pr. g eller 2,9 µmol pr. m². Ud fra det fundne N-indhold kan det beregnes, at der i polymerbelægningen var inkorporeret ca. 310 µmol N-methylolacrylamid pr. g.

Eksempel VIII

Under anvendelse af den samme fremgangsmåde, som blev anvendt i eksempel 1, blev silicaperler forsynet med 390 μmol γ -glycerylpropylsiloxylgrupper pr. g perler (porediameter: 650 Å, perlediameter: 100-200 μ , specifikt overfladeareal: 50 m^2/g).

10 g af disse perler blev suspenderet i 30 ml dioxan, hvorefter der til den resulterende suspension blev sat 0,75 ml (5,00 mmol) af en 60 vægt% vandig opløsning af N-methylolacrylamid. Efter afdampning af opløsningsmidlet blev der tilsat 50 ml N-hexan, hvori der var blevet opløst 25 mg dibenzoylperoxid (20% vand). Efter polymerisation blev perlerne vasket med acetone og methanol og derpå tørret. Ved elementaranalyse fandtes et carbonindhold på 4,45% og et nitrogenindhold på 0,54%. Dette støttemateriale blev derpå overtrukket med et andet lag af polymer.

20 Hertil blev 0,370 g 6-acrylamidpentancarboxylsyre, 0,276 g N-hydroxysuccinimid og 0,454 g N,N'-dicyklohexylcarbodiimid omsat med hinanden i 20 ml dioxan. Efter filtrering af reaktionsblandingen blev opløsningen blandet med 20 ml dioxan, 0,150 ml af en 60 vægt% vandig opløsning af N-methylolacrylamid og 10 g af silicamaterialet forsynet med et første overtræk af polymer.

Efter afdampning af dioxanet blev der tilsat 60 ml n-hexan indeholdende 30 mg opløst dibenzoylperoxid. Ved elementaranalyse viste carbonindholdet sig at være 6,48% og nitrogenindholdet 0,96%. Ved mikrotitrering viste det sig, at mængden af carboxylgrupper, der blev aktiveret med N-hydroxysuccinimid var 100 μmol pr. g eller 2,33 μmol pr. m^2 .

35

Eksempel IX

10 g af perlerne, der var overtrukket i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge eksempel IV, blev behandlet med
5 en opløsning af 4,5 g heparin (175 USP enheder/mg) i 60 ml af en 0,1 molar boratpuffer af pH-værdi 7,7.

Efter afgangning af suspensionen blev den holdt ved pH-værdi 8 ved tilsætning af 1 M natriumhydroxidopløsning
10 og omrørt i 22 timer. Derpå blev suspensionen filtreret og successivt vasket med 400 ml vand, 600 ml 3 M NaCl og 400 ml vand. Efter at overskuddet af carboxylgrupper, der var aktiveret med N-hydroxysuccinimid, var blevet blokeret ved titrering med 1 M ethanolamin, blev perlerne vasket
15 med 400 ml vand, 300 ml 3 M NaCl og 500 ml 0,01 M tris-puffer (pH-værdi 7,4).

Af de 112,5 μ mol aminogrupper af heparinet var 86,5 μ mol efter reaktion tilbage i opløsningen og vaskevæskærne
20 bestemt ved fluorescensspektroskopi. Det således med heparin forsynede støttemateriale blev pakket i en 50 x 16 mm søjle med et lejevolumen på 10 ml. Søjlen blev først behandlet med 0,01 M tris-puffer (pH-værdi 7,4). Derpå blev 60 ml bovinplasma ledt gennem søjlen med en strømnings-
25 hastighed på 22 ml pr. time. Plasmaet viste en anti-thrombin-III-aktivitet på 0,92 E/ml. Efter vask med 0,01 M tris-puffer blev den adsorberede aktivitet elueret med 0,01 M tris-puffer og 3 M NaCl. Det samlede udvundne udbytte var 75%. Renheden var 2,2 E pr. mg
30 protein, hvilket betyder en renhedsfaktor på 167.

Eksempel X

5 g af de i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge eksempel VIII belagte perler blev behandlet med en afkølet
35 opløsning af bovin-antithrombin-III og 140 mg heparin (med

en minimal mængde af frie aminogrupeer) i 20 ml af en 0,1 M phosphatopløsning (pH-værdi 7,4). Opløsningen indeholdt 11 mg anti-thrombin-III/ml med en aktivitet på 5,7 E/mg.

- 5 Efter afgangning af perlerne blev opløsningen omrørt i 24 timer ved 4°C på et roterende vakuuminddampningsapparat. Derpå blev perlerne vasket på et glasfilter med 200 ml 0,1 M phosphatpuffer (pH-værdi 7). De resterende aktive-
- 10 rede carboxylgrupper blev blokeret ved titrering med 1 M ethanolamin, hvorefter perlerne successivt blev vasket med en 3 M NaCl-holdig 0,1 M phosphatpuffer (pH-værdi 7,4) og en 0,15 M NaCl-holdig 0,1 M phosphatpuffer (pH-værdi 7,4). Mængden af adsorberet anti-thrombin-III/g
- 15 støttemateriale blev bestemt ved hjælp af Folin-testmetoden og viste sig at være 8 mg pr. g støttemateriale. Dette materiale blev pakket i en søjle, hvorefter heparinadsorptionskapaciteten blev bestemt. Hertil blev efter ligevægt med en 0,15 M NaCl-holdig 0,02 M phosphatpuffer (pH-værdi 7,4) et stort overskud af heparin ledt gennem søjlen.
- 20 Derpå blev det adsorberede heparin elueret med en 3 M NaCl-holdig 0,02 M phosphatpuffer (pH-værdi 7,4). Det viste sig, at søjlen havde adsorberet 140 µg heparin pr. ml af lejevolumen.

25 Eksempel XI

- Under anvendelse af samme fremgangsmåde som anført i eksempel 3 blev silicaperler forsynet med 300 µmol γ-glycerylpropylsiloxylgrupper pr. g perler (porediameter: 500 Å,
- 30 perlediameter: 100-200 µ, specifikt overfladeareal: 63 m²/g).

- Overfladen blev overtrukket på den i eksempel 3 beskrevne måde med 407 µmol N-methylolacrylamid og 104 µmol carboxylgrupper/g aktiveret med N-hydroxysuccinimid. Af det således aktiverede materiale blev 100 g portioner omsat med
- 35 hver af de følgende primære aminer:

- 1) p-aminobenzamidindihydrochlorid
- 2) ethanolamin
- 3) N,N-diethylethylen-diamin
- 4) taurin
- 5 5) hexylamin
- 6) ethylenamin og derpå succinsyreanhydrid.

1. 10 g af støttematerialet blev suspenderet i en opløsning af 2,4 g (11,5 mmol) p-aminobenzamidindihydrochlorid i 40 ml 0,1 M fosfatpuffer (pH-værdi 8). Efter afgangning af suspensionen blev pH-værdien indstillet på 8 med 2 N natriumhydroxidopløsning og omrørt i 16 timer.

Suspensionen blev derpå filtreret og vekslende vasket med 0,1 M acetatpuffer indeholdende 1 M NaCl (pH-værdi 4) og 0,1 M fosfat indeholdende 1 M NaCl (pH-værdi 8) og til slut med vand.

Ved mikrotitrering (tilsætning af overskud af ethanolamin og tilbagetitrering med HCl) blev det konstateret, at støttematerialet ikke længere indeholdt aktiverede carboxyl-grupper. Slutproduktets nitrogenindhold var 0,76%, hvoraf det kan beregnes, at der var inkorporeret 45 μ mol/g støttemateriale. Dette støttemateriale er meget velegnet til anvendelse ved isolering af proteaser, såsom trypsin, i overensstemmelse med en fremgangsmåde, der er beskrevet af Hixson et al. i Arch. Biochem. Biophys. 154 (1973) 501 og Methods Enzymol. 34 (1974) 440.

2. 10 g af støttematerialet blev suspenderet i 30 ml af en 0,01 M ethanolaminopløsning. Suspensionen blev i rækkefølge afgasset, omrørt i 30 min., filtreret, vasket med vand, 1 M NaCl og igen med vand. Det målte nitrogenindhold var 0,71%, hvilket svarer til i alt væsentligt kvantitativ omdannelse af de aktiverede carboxylgrupper.

3. 10 g af støttematerialet blev suspenderet i en opløsning af 0,32 ml (2,2 mmol) N,N-diethylendiamin i 25 ml dimethylformamid. Efter afgangning af opløsningen blev den omrørt i 16 timer. Suspensionen blev derpå filtreret og successivt vasket med 200 ml dimethylformamid, 200 ml vand, 300 ml 1 M NaCl og 300 ml vand. Ved elementaranalyse viste nitrogenindholdet sig at være 0,85%. Antallet af tertiære aminogrupper/g produkt blev bestemt ved titrering i eddikesyre med perchlorsyre og viste sig at være 100 $\mu\text{mol/g}$.
4. 10 g af støttematerialet blev suspenderet i en opløsning af 2,5 g (20 mmol) taurin i 25 ml vand og 3,1 ml (21 mmol) triethylamin. Efter afgangning blev suspensionen omrørt i 24 timer. Efter filtrering blev suspensionen vasket successivt med vand, 2 M NaCl, 5% saltsyre og vand. Ved elementaranalyse viste svovlindholdet sig at være 0,30 vægt% hvilket svarer til en inkorporering af 93 μmol sulfoethylgrupper pr. g. Støttematerialet var velegnet til anvendelse som en kraftig, sur ionbytter.
5. 10 g af støttematerialet blev suspenderet i en opløsning af 0,222 g (2,2 mmol) hexylamin i 25 ml dimethylformamid. Efter afgangning af opløsningen blev den omrørt i 16 timer. Efter filtrering blev støttematerialet vasket successivt med 200 ml dimethylformamid, 200 ml vand, 300 ml 1 M NaCl og 300 ml vand. Ved elementaranalyse viste nitrogenindholdet sig at være 0,70%, hvilket svarer til en i alt væsentligt kvantitativ ombytelse. Det på denne måde fremstillede støttemateriale var velegnet til anvendelse i hydrofob (affinitet) kromatografi som vist ved hjælp af det følgende forsøg.

En opløsning af 5 mg mikrobiel lipase (stammer fra Chromobacterium Viscosum) i 10 ml 0,05 M tris, 0,05 M maleinsyreanhydrid-puffer indeholdende 1 M NaCl (pH-værdi 7,0) blev bragt i kontakt med 0,5 g af støttematerialet. Affi-

niteten, bestemt ifølge en metode, der er beskrevet af A. Louwers og R. Ruysen i Pharmeaceutical Enzymes (1978), Story Scientia, Gent (Belgien), var 200 enheder (U) pr. mg lipase. Efter afgasning blev suspensionen inkuberet natten over. Efter inkuberingen fandtes der 105 U (10,5%) lipaseaktivitet i den overliggende væske. Adsorptionen udgjorde 90%. Efter fraseparering af den overliggende væske på et glassugningsfilter blev perlerne bragt i kontakt to gange med 5 ml vand i 45 min. Vandet viste sig at indeholde 23 U lipaseaktivitet. Efter fjernelse af vandet ved sugning blev perlerne inkuberet i 10 ml 50% ethanol i 2 timer. Den overliggende væske viste sig at indeholde 867 U lipaseaktivitet, dvs. 87% af den oprindelige lipaseaktivitet fandtes i eluatet.

6. 10 g af støttematerialet blev sat til en opløsning af 0,132 g (2,2 mmol) ethylendiamin i 25 ml dimethylformamid.

Efter afgasning blev opløsningen udsat for en nats omrøring. Suspensionen blev filtreret og vasket successivt med 200 ml dimethylformamid, 200 ml vand, 300 ml 1 M NaCl og 300 ml vand. Ved analyse af en prøve af dette støttemateriale efterfulgt af tørring og titrering i iseddikesyre med perchlorsyre viste det sig, at den indeholdt 100 μ mol primære aminogrupper pr. g.

5 g af det således med primære aminogrupper forsynede støttemateriale blev suspenderet i 15 ml 0,1 M NaCl og afgasset. Til denne suspension blev der under omrøring og i løbet af 30 min. tilsat små mængder af pulverformet ravsyreanhydrid. Der blev ialt tilsat 2 g (20 mmol). Under denne periode blev suspensions pH-værdi holdt på 6 ved tilsætning af 20% natriumhydroxidopløsning. Efter filtrering blev perlerne vasket successivt med vand, 0,1 M NaCl og vand. Ved pletpladeundersøgelse blev det påvist, hvorvidt alle aminogrupper var blevet omdannet. Ved denne undersøgelse blev en perle af ninhydrid bragt i kontakt med 10 mg af prøven i 0,1 ml vand. Når perlerne blev blå, blev reak-

tionen med ravsyreanhydrid gentaget, indtil perlerne i
ninhydrintesten ikke længere blev blå. På denne måde
blev der opnået en svagt sur ionbytter. Dette støttemate-
riale viste sig også at være velegnet til anvendelse som
et forstadium for en affinitetssøjle.

Eksempel XII

I dette eksempel påvises det, at den hydrolytiske stabili-
tet af støttematerialerne ifølge opfindelsen er langt bedre
end af det udelukkende silaniserede støttemateriale eller
af usilaniseret støttemateriale, der er overtrukket med en
tværbundet polymer opnået ved additionspolymerisation og
med 0,1-140 μmol vinylmonomerer / m^2 uorganisk materiale.

I alle tilfælde blev der gjort brug af silicaperler (pore-
diameter: 650 Å, perlediameter: 100-200 μ , specifikt over-
fladeareal: 50 m^2/g).

Der blev fremstillet tre typer af støttemateriale.

Type A blev fremstillet i overensstemmelse med fremgangs-
måden ifølge eksempel 1 ved at behandle silicaperlerne med
 γ -glycidoxypropyltrimethoxysilan. Ved elementaranalyse
viste carbonindholdet sig at være 1,91%. Efter hydrolyse
af γ -glycidoxygrupperne blev støttematerialet dannet ved
covalent binding af en belægning af en tværbundet polymer
af 308 μmol N-methylolacrylamid og 196 μmol N-hydroxysuccin-
imid-aktiveret 6-acrylamidpentancarboxylsyre pr. g til
 γ -glycerylpropylsiloxysilicaets overflade. De med N-hydroxy-
succinimid-aktiverede carboxylgrupper blev omdannet ved
titrering med en 1 molær ethanolaminopløsning. Ved ele-
mentaranalyse viste det sig, at det resulterende materi-
ale indeholdt 5,68% carbon og 0,93 vægt% nitrogen.

Type B blev fremstillet ved at overtrække usilaniseret
silicaperler direkte med en tværbundet copolymer af 360
 μmol N-methylolacrylamid og 210 μmol 6-acrylamidpentan-
carboxylsyre/g aktiveret med N-succinimid. De med N-

hydroxysuccinimid-aktiverede carboxylgrupper blev omdannet ved titrering med en ethanolaminopløsning. Ved elementaranalyse viste det sig, at det opnåede materiales carbonindhold og nitrogenindhold var henholdsvis 4,38 og 1,05 vægt%.

Type C blev fremstillet i overensstemmelse med fremgangsmåden, der blev anvendt i eksempel I, men ved overtrækning af silicaperlerne med γ -glycidoxypropyltrimethoxysilan. Ved elementaranalyse blev carbonindholdet bestemt til at være 3,28 vægt%. Dette svarer til 455 μmol γ -glycerylsiloxygrupper pr. g.

De således fremstillede støttematerialer (typerne A, B og C) blev underkastet følgende hydrolyseundersøgelser:

2 g støttemateriale blev i en uge eller en dag omrørt ved en temperatur på 70°C i tre forskellige puffer med en pH-værdi på henholdsvis 8,8, 9,5 og 4,0. Resultaterne er sammenfattet i den efterfølgende tabel.

TABEL

Støttemateriale	Type A		Type B		Type C
	C%	N%	C%	N%	C%
Før hydrolyse	5,68	0,93	4,38	1,05	3,28
efter hydrolyse					
i 0,1 M tris-puffer af pH-værdi 8					
1 dag	-	-	4,03	0,96	-
1 uge	5,37	0,91	3,37	0,82	3,05*
i 0,2 M boratpuffer af pH-værdi 9,5					
1 uge	5,26	0,89	-	-	-
i 0,2 M acetatpuffer af pH-værdi 4,0					
1 dag	-	-	3,89	0,94	-
1 uge	5,37	0,90	-	-	3,16

* Efter forsøgets afslutning blev suspensionen mælkehvid, hvilket viser nærværelsen af silicapartikler som et resultat af hydrolytisk dekomponering af type C.

- 5 Af de i den ovennævnte tabel nævnte resultater fremgår det, at støttematerialet af type A (ifølge opfindelsen) er meget stabilt over for hydrolyse. Støttematerialet af type B var mere modstandsdygtigt over for en puffer med en høj pH-værdi end over for en med en lav pH-værdi. Støttematerialet af type C er
10 mindre velegnet til de fleste anvendelser på grund af reaktion med bio-makromolekyler.

Eksempel XIII

- 15 På tilsvarende måde som beskrevet i eksempel I blev silica-perler (porediameter: 500 Å, specifikt areal: $63 \text{ m}^2/\text{g}$, perlediameter: 100-200 μ) forsynet med 210 μmol γ -glycerylpropylsiloxylgrupper pr. g perler.

- 20 Til 10 g af det silaniserede silica blev der sat en vandig opløsning af 1,045 g (5,06 mmol) 3-dimethylaminopropylmethacrylamidhydrochlorid, 0,91 ml (6,0 mmol) af en vandig opløsning (60 vægt%) af N-methylolacrylamid og 30 ml methanol. Efter afdampning af methanol blev der tilsat 45,5 mg azobisisobutyronitril (AIBN) i 35 ml isooctan, og der skete
25 polymerisation.

- Elementaranalyse af det polymeriserede produkt gav et carbonindhold på 7,65% og et nitrogenindhold på 1,75%. Ved mikrotitrering blev mængden af svagt basiske dimethylaminogru-
30 af det ionbytende produkt bestemt til at være 335 μmol pr. g eller 6,1 μmol pr. m^2 .

Eksempel XIV

- 35 På tilsvarende måde som beskrevet i eksempel I blev silica-perler (porediameter: 500 Å, specifikt overfladeareal: $63 \text{ m}^2/\text{g}$, perlediameter: 100-200 μ) forsynet med 172 μmol γ -glycerylpropylsiloxylgrupper pr. g perler.

Til 40 g af de silaniserede perler blev der sat 7,6 ml af en vandig opløsning (40 vægt%) af methacrylamidpropyl=trimethylammoniumchlorid (18,1 mmol), 3,64 ml af en vandig opløsning (60 vægt%) af N-methylolacrylamid (24 mmol) og 140 ml methanol. Efter afdampning af methanol blev der tilsat 150 mg AIBN, der er opløst i 140 ml isooctan. Efter polymerisation blev perlerne vasket successivt med acetone, methanol, vand og en 3 M NaCl-opløsning. Elementaranalyse af det tørrede produkt gav et carbon=indhold på 7,32% og et nitrogenindhold på 1,59%. Ved

mikrotitrering blev mængden af kraftigt basiske trimethylammoniumgrupper af ionbytteren bestemt til at være 255 μmol pr. g eller 4,7 μmol pr. m^2 .

Eksempel XV

a) På tilsvarende måde som beskrevet i eksempel I blev silicaperler (porediameter: 700 Å, specifikt overfladeareal: 42 m^2/g , perlediamter: 100-200 μ) forsynet med 143 μmol γ -glycerylpropylsiloxylgrupper pr. g perler.

Til 50 g af de silaniserede perler blev der sat en blanding af 5,18 g (25,0 mmol) 2-acrylamid-2-methylpropansulfonsyre, 3,5 ml (25,0 mmol) triethylamin, 4,55 ml (6,0 mmol) af en vandig opløsning (60 vægt%) af N-methylolacrylamid og 150 ml methanol. Efter afdampning af methanol blev der tilsat 250 mg AIBN, 50 mg p-toluensulfonsyre og 200 ml isooctan.

Det efter polymerisation opnåede produkt blev successivt vasket med acetone, methanol, vand og 5% saltsyre.

Elementaranalyse: Carbon 5,99%, nitrogen 1,16%, svovl 1,25%.

Produktet indeholdt 438 μmol N-methylolacrylamid og 390 μmol 2-acrylamid-2-methylpropansulfonsyre pr. g. Ved mikrotitrering blev mængden af sulfonsyregrupper bestemt til at være 285 μmol pr. g.

b) 10 ml af det således fremstillede støttemateriale blev bragt i ligevægt i en søjle med 0,05 M Sørensen-puffer ved pH-værdi 5,5. 30 ml af en opløsning af hæmoglobin (indeholdende 20 mg hæmoglobin pr. ml) blev perkoleret gennem søjlen. Efter vask af søjlen med ligevægtspuffer blev hæmoglobinet elueret med 0,05 M Sørensen-puffer (pH-værdi 7,5) indeholdende henholdsvis intet, 0,5 M og 2 M NaCl. Der kunne ialt elueres 104 mg hæmoglobin, hvilket indikerer en søjlekapacitet på 10 mg hæmoglobin pr. ml støttemateriale i søjlen.

Eksempel XVI

På tilsvarende måde som beskrevet i eksempel I blev silica-perler (porediameter: 500 Å, specifikt overfladeareal: 63 m²/g, perlediameter: 100-200 µ) forsynet med 210 µmol γ-glycerylpropylsiloxylgrupper pr. g perler.

Til 10 g af de silaniserede perler blev der sat en blanding af 0,476 g (6,50 mmol) acrylsyre, 0,66 g (6,50 mmol) triethylamin, 0,91 ml (6,0 mmol) af en vandig opløsning (60 vægt%) af N-methylolacrylamid og 30 ml methanol. Efter afdampning af methanol blev der tilsat 60 mg AIBN og 20 mg p-toluensulfonsyre i 30 ml isooctan. Efter polymerisation blev produktet vasket successivt med acetone, methanol, 5% saltsyre og vand.

Elementaranalyse: Carbon 5,03%, nitrogen 0,67%.

Produktet indeholdt 480 µmol N-methylolacrylamid og ca. 170 µmol acrylsyregrupper pr. g.

Kapaciteten for hæmoglobin bestemt som i eksempel XVb) var 11,6 mg/ml.

Eksempel XVII

10 g af de i eksempel II fremstillede perler blev pyrolyseret ved 650°C i 2 timer. Efter afkøling blev der opnået hvide silicaperler med et carbon- og nitrogenindhold på under

0,05%. Perlerne blev behandlet igen og overtrukket igen på den i eksemplerne 1 og 2 beskrevne måde. Det opnåede produkt havde et carbonindhold på 8,63% og et nitrogenindhold på 1,73%.

5

Sammenligning af gelpermeationskalibreringskurverne opnået ved eluering af polystyrenstandarder i tetrahydrofuran

10

viste, at porediameterområdet af materialet efter overtrækning igen var det samme som for det oprindeligt overtrukne produkt.

Eksempel XVIII

15

De i eksempel VI fremstillede perler blev undersøgt med hensyn til deres gelpermeationsegenskaber (størrelses-eksklusion) for forskellige proteiner ved pH-værdi 7 og 9 i 0,02 M fosfatpuffer indeholdende 0,15 M NaCl.

20

En søjle (diameter 1 cm, højde 34,1 cm) blev fyldt med perlerne. Injektionsvolumen: 0,1 ml indeholdende 1 ml protein pr. ml. Strømningen var 2,5 ml pr. min. pr. cm².

Resultater:

25

30

35

Protein	Molekylvægt	pK _I	Kd	
			pH = 7	pH = 9
katalase	221600	5,58	0,18	0,17
γ-globulin	153000	7,0	0,15	0,15
serumalbumin	68500	4,90	0,25	0,31
hæmoglobin	64450	6,8	0,41	0,35
ovalbumin	45000	4,6	0,36	0,33
pepsin	36000	1,0	0,37	0,49
β-lactoglobulin	35400	5,0	0,39	0,48
trypsinogen	23560	9,3	0,47	0,32
myoglobin	18500	7,0	0,46	0,44
lysozym	14000	10,7	0,71	-
cytochrom-C	13000	10,65	0,49	*
insulin	5750	5,50	0,62	0,55

* eluering umulig.

$$\text{Fordelingskoefficient } K_d = \frac{V_r - V_o}{V_t - V_o}$$

5

V_r = retentionsvolumen af proteinet.

V_o = retentionsvolumen af en fuldstændigt ekskluderet komponent

V_t = retentionsvolumen af en fuldstændig permeabel komponent.

10

Eksempel XIX

Støttematerialet fra eksempel VI 1. indeholdende p-amino=benzamidingrupper blev anvendt til trypsin- og chymotrypsinisolering. En søjle blev fyldt med perlerne. Den anvendte ligevægtspuffer var 0,1 M natriumacetat (pH-værdi 5,5) indeholdende 0,1 M NaCl og 0,001 M CaCl_2 . Strømningshastigheden var 15,6 ml/time. Søjlen blev elueret med 0,1 M glycine-HCl-puffer (pH-værdi 2,0) indeholdende 0,1 M NaCl og 0,001 M CaCl_2 .

Aktiveret pancreas-pulver (30 g) blev ekstraheret med ligevægtspuffer (100 ml) ved 5°C. 60 ml af den filtrerede ekstrakt blev overført til søjlen. Søjlen blev vasket med ligevægtspuffer og derpå elueret med glycine-HCl-puffer.

Det viste sig, at det således i eluatet opnåede trypsin blev rensat syv gange og **chymotrypsinet** ca. tre gange (trypsinaktiviteten blev målt under anvendelse af det chromogeniske substrat S-2160, chymotrypsinaktiviteten blev målt potentiometrisk under anvendelse af ATEE som substrat).

Begge enzymer viste sig at være ca. 30% rene efter et enkelt kromatografitrin.

Eksempel XX

5 På tilsvarende måde som beskrevet i eksempel III blev silicaperler (porediameter: 3200 Å, perlediameter: 100-200 µ, specifikt overfladeareal: 12 m²/g) silaniseret med 28,8 µmol γ-glycerylpropylsiloxylgrupper pr. g og overtrukket

10 med en copolymer af N-methylolacrylamid (150 µmol) og N-hydroxysuccinimidylacrylsyreester (91 µmol/g). Perlerne (10 g) blev derpå behandlet med en opløsning af 1790 µmol γ-glutamylcysteinyglycin (glutathio) i 30 ml bicarbonatpuffer 0,1 M, pH-værdi 8,5 i 22 timer.

15 Perlerne blev vasket successivt med 200 ml 0,1 M NaHCO₃-puffer (pH-værdi 8,0), 100 ml 0,1 M NaHCO₃-puffer (pH-værdi 9,5) indeholdende 1 M NaCl og 0,001 M EDTA, 100 ml 0,1 M NaHCO₃-puffer (pH-værdi 4,3) indeholdende 1 M NaCl og 0,001 M EDTA og endelig med 100 ml 0,001 M EDTA.

20 Sulfhydrylgrupperne blev aktiveret med 2,2'-dipyridyldisulfid i Tris-HCl-puffer, 0,1 M, pH-værdi 8, indeholdende 0,3 M NaCl og 0,001 M EDTA.

25 Det resulterende materiale indeholdt 10 µmol aktiverede disulfidgrupper pr. g (bestemt spektrofotometrisk ved 343 nm efter reaktion med β-mercaptoethanol).

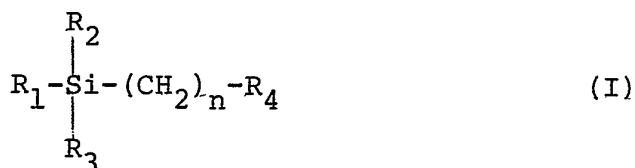
30 Det således fremstillede materiale var velegnet til isolering af proteiner indeholdende thiolgrupper, f.eks. enzymer, såsom urease.

35 Med dette materiale kan også enzymer, såsom urease, immobiliseres uden aktivitetstab. Søjlen forsynet med urease kan fordelagtigt anvendes til bestemmelse af ureumindhold af vandige opløsninger, f.eks. urin, ved perkolering af ureumopløsningen gennem søjlen og bestemmelse af NH₃ i eluatet med en NH₃-elektrode.

P a t e n t k r a v.

1. Støttemateriale, der er anvendeligt som sådant i kromato-
 5 grafi eller som udgangsmateriale, der efter binding hertil af
 forbindelser, der indeholder ioniske grupper, ligander eller
 bio-makromolekyler, kan anvendes som ionbytter, som et medium
 i affinitetskromatografi eller i enzymatiske reaktioner,
 10 hvilket støttemateriale består af porøse, uorganiske, silani-
 serede partikler, hvorpå der covalent er bundet en organisk,
 stationær fase opbygget af (co)polymeriserede vinylmonomerer
 og indeholdende amidgrupper, k e n d e t e g n e t ved,
 at

15 (A) det uorganiske materiale er blevet silaniseret med
 en organosilan med formlen I



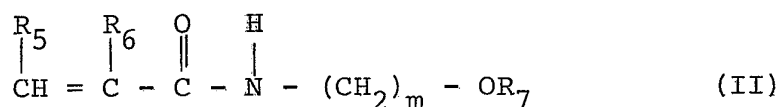
20

hyori n er 1-5, fortrinsvis 3; R_1 er halogen eller alkoxy
 (1-10 C); R_2 og R_3 hver er halogen, alkoxy (1-10 C), alkyl
 (1-3 C) eller aryl (6-10 C), idet halogenet og alkoxygrup-
 25 pen i R_1 , R_2 og R_3 er i stand til at danne en -O-Si-binding
 mellem silanet og det uorganiske materiale via dets over-
 fladehydroxylgrupper; og R_4 er amino, substitueret amino,
 såsom ω -aminoalkyl (1-3 C) amino, mercapto, en estergruppe
 eller glycidoxy og fortrinsvis er glycidoxy; og

30

(B) den organiske, stationære fase er en tværbundet (co)poly-
 mer, der er opnået ved additionspolymerisation og opbygget
 af 0,1-140 μ mol, fortrinsvis 5-25 μ mol vinylmonomerer pr.
 35 m^2 uorganisk overflade af støttematerialet, idet nævnte
 (co)polymer indeholder mindst 0,1 μ mol amidgrupper pr. m^2
 uorganisk overflade af støttematerialet, idet nævnte vinyl=
 monomerer består helt eller delvis af bifunktionelle vinyl=

monomerer indeholdende amidgrupper og med formlen III



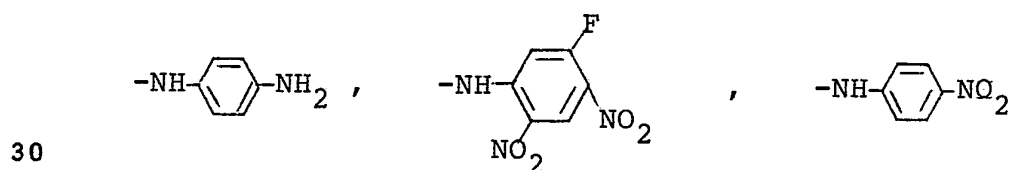
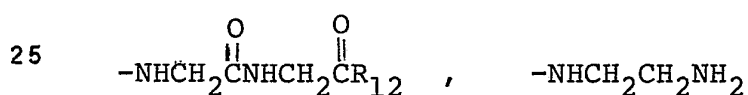
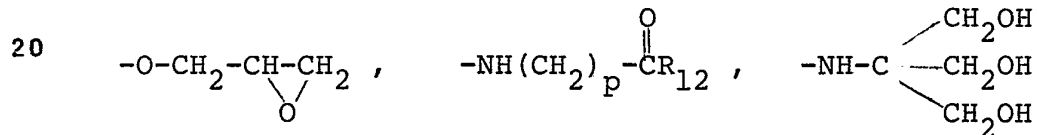
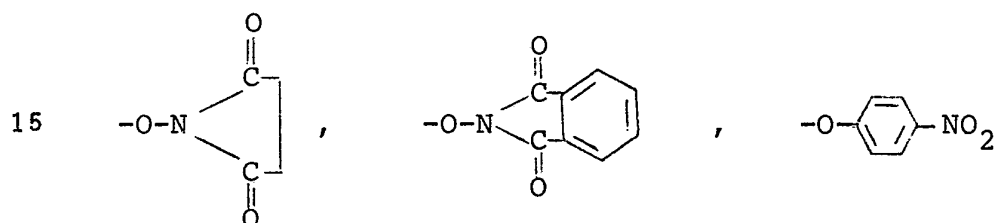
- 5 hvori R_5 og R_6 hver er hydrogen, en alkyl- eller cykloalkyl-
gruppe med indtil 6 carbonatomer eller en arylgruppe med ind-
til 10 carbonatomer; R_7 er hydrogen eller en organisk gruppe
med indtil 20 carbonatomer; og m er et helt tal fra 1-10, hvor
amidgrupperne er blevet opnået delvis ved at omsætte
- 10 (a) et afstandsmolekyle, en ligand, et bio-makromolekyle eller
en forbindelse, der indeholder en ionisk gruppe, idet hver
har en reaktiv gruppe og en eller flere amidgrupper, med
en reaktiv gruppe af en vinylmonomer eller den tværbundne
15 (co)polymer, eller
- (b) et afstandsmolekyle, en ligand, et bio-makromolekyle eller
en forbindelse, der indeholder en ionisk gruppe, hver med
en eller flere amino- og/eller carboxylgrupper, med en
20 eller flere carboxyl- og/eller aminogrupeer i den tvær-
bundne (co)polymer.
2. Støttemateriale ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at R_5 er hydrogen; R_6 er hydrogen eller methyl; R_7 er hy-
25 drogen; og m er lig 1.
3. Støttemateriale ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g -
n e t ved, at vinylmonomererne består af mindst 5 mol% bi-
funktionelle vinylmonomerer med formlen II.
- 30 4. Støttemateriale ifølge ethvert af de foregående krav,
k e n d e t e g n e t ved, at (co)polymeren indeholder 5-25
 μmol amidgrupper pr. m^2 uorganisk overflade af støttemateri-
alet.
- 35 5. Støttemateriale ifølge ethvert af de foregående krav,
k e n d e t e g n e t ved, at comonomeren til opnåelse af
den tværbundne copolymer er valgt blandt en eller flere vinyl-
monomerer med en funktionel gruppe og med formlen III

36



hvor R_8 er H eller CH_3 ; R_9 er $-\text{CH}_2\text{NH}_2$,

- 5 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{X}$, $-\text{CH}_2\text{OR}_{10}$ eller $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_{11}$ og fortrinsvis er $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_{11}$; X er halogen, fortrinsvis Br; R_{10} er alkyl med indtil 10 carbonatomer, fortrinsvis methyl, eller glycidoxy; R_{11} betegner en funktionel gruppe, der kan være bundet
- 10 eller ikke bundet til carbonylgruppen via en afstandsgruppe og betegner en hydroxylgruppe eller en af følgende grupper



hvor R_{12} kan have samme betydning som R_{11} ; og p betegner et helt tal fra 1-10, og molekylvægten af vinylcomonomeren med en

- 35 funktionel gruppe og eventuelt også en afstandsgruppe ikke er over 1000 og fortrinsvis er i intervallet fra 70 til 400.

6. Fremgangsmåde til fremstilling af støttematerialet ifølge ethvert af kravene 1-5, k e n d e t e g n e t ved, at

5 (A) det uorganiske materiale silaniseres ifølge i teknikken kendte fremgangsmåder med en organosilan med formlen I som angivet i krav 1,

10 (B) det silaniserede, uorganiske materiale bringes i kontakt med en opløsning af vinylmonomererne i et flygtigt, organisk opløsningsmiddel eller organiske opløsningsmidler og/eller vand, idet det flygtige opløsningsmiddel derpå fjernes under omrøring under reduceret tryk ved en temperatur under 40°C i et afdampningsapparat for at dække det uorganiske materiale med en tynd film af monomerblanding, hvorpå polymerisation af
15 filmovertrækket og samtidigt en covalent binding af den resulterende (co)polymer til det silaniserede materiale frembringes ved opvarmning i en oxygenfri atmosfære, og

20 (C) om nødvendigt kobles det opnåede materiale yderligere med forbindelser med reaktive grupper ifølge i teknikken kendte fremgangsmåder.

25

30

35