



[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT

68636

C (45) Patentti myönnetty 10 10 1985
Patent meddelat

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

SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansöknng	812002
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	25.06.81
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag	25.06.81
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	28.12.81
(44) Nähtäväksi panon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	28.06.85
(86) Kv. hakemus — Int. ansökan	
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	27.06.80
Hollanti-Holland(NL) 8003727 Toteennäytetty- Styrkt	

(71) Akzo N.V., IJssellaan 82, Arnhem, Hollanti-Holland(NL)

(72) Jan André Jozef Schutijser, Dieren, Hollanti-Holland(NL)

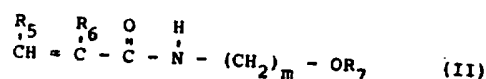
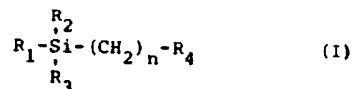
(74) Oy Kolster Ab

(54) Kromatografiassa käytettävä amidiryhmiä sisältävällä polymeerillä päällystetty huokoinen epäorgaaninen kantaja-aine ja menetelmä sen valmistamiseksi - Poröst, oorganiskt bärarmaterial med en organisk stationär fas för användning vid kromatografi och förfarande för framställning av detta

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee kantaja-ainetta, joka on sellaisenaan käyttökelpoinen kromatografiassa tai lähtöaineena, jota, kun siihen liitetään yhdisteitä, jotka sisältävät ioniryhmiä, ligandeja tai biomakromolekyylejä, voidaan käyttää ioninvaihtajana, väliaineena affiniteettikromatografiassa tai entsyymaattisissa reaktioissa, ja se käsittää huokoisia, epäorgaanisia, silanoituja partikkeleita, joiden pinnalle on kovalenttisesti sidottu orgaaninen stationäärifaaasi, joka on muodostettu (ko)polymeroiduista vinyylimonomeereista, jotka sisältävät amidiryhmiä, mainittujen epäorgaanisten hiukkasten ollessa silanoituja kaavan I mukaisella silaaniorgaanisella yhdisteellä

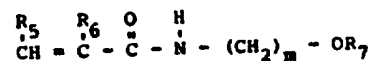
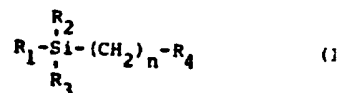
jossa $n = 1-5$; R_1 on halogeeni tai alkoksi (1-10 C); R_2 ja R_3 ovat kumpikin halogeeneja, alkoksiryhmiä (1-10 C), alkyylejä (1-3 C) tai aryyylejä (6-10 C), jolloin halogeeni ja alkoksiryhmä R_1 :ssä, R_2 :ssa ja R_3 :ssa voivat muodostaa -O-Si-sidoksen silaanin ja epäorgaanisen aineen välille sen pinnan hydroksyyli-ryhmien välityksellä; ja R_4 on amino, substituoitu amino, kuten esim. ω -aminoalkyyli (1-3 C)-amino, merkaptto, esteriryhmä tai glysidoksi; ja orgaaninen stationäärifaaasi on ristikyttykopolymeeri, joka on saatua additiopolymeroinnin avulla ja muodostuu 0,1 - 140 μ moolista vinyylimonomeerejä kantaja-aineen epäorgaanisen pinnan m^2 kohti, jolloin mainitut vinyylimonomeerit koostuvat kokonaan tai osittain bifunktionaalisista vinyylimonomeereista, joissa on amidiryhmiä, ja joilla on kaava II



jossa R_5 ja R_6 ovat kumpikin vetyjä tai orgaanisia ryhmiä, joissa on hiiliatomeita 18 saakka; R_7 on vety tai orgaaninen ryhmä, jossa on hiiliatomeita 20 saakka; ja m on kokonaislu 1-20.

(57) Sammandrag

Uppfinningen hänför sig till ett bärarmaterial, vilket som sådant kan användas i kromatografi eller som utgångsmaterial, vilket, efter att till detsamma bundits föreningar som innehåller jongrupper, ligander eller biomakromolekyler, kan användas som jonbytare, som ett medium i affinitetskromatografi eller i enzymatiska reaktioner och består av porösa, oorganiska silaniserade partiklar, till vilka kovalent bundits en organisk, stationär fas, vilken uppbyggts av (sam)polymeriserade vinylmonomerer som innehåller amidgrupper, varvid nämnda oorganiska partiklar silaniserats med ett organosilan med formeln I, vari $n = 1-5$; R_1 är halogen eller alkoxi (1-10 C); R_2 och R_3 är vardera halogen, alkoxi (1-10 C), alkyl (1-3 C) eller aryl (6-10 C), varvid halogen- och alkoxigruppen i R_1 , R_2 och R_3 förmår bilda en -O-Si-bindning mellan silanet och det oorganiska materialet vid dess på ytan belägna hydroxylgrupper; och R_4 är amino, substituerad amino, substituerad amino, såsom ω -aminoalkyl (1-3 C)-amino, merkapt, en estergrupp eller glycidylloxi; och den organiska stationära fasen är en tvärbunden (sam)polymer, vilken erhållits genom additionspolymerisation och uppbyggts av 0,1 - 140 μ mol av vinylmonomerer per m^2 oorganisk yta av bärarmaterialet, varvid nämnda vinylmonomerer helt eller delvis består av bifunktionella vinylmonomerer, vilka innehåller amidgrupper, och har formeln II, vari R_5 och R_6 vardera är väte eller en organisk grupp med upp till 18 kolatomer; R_7 är väte eller en organisk grupp med upp till 20 kolatomer; och m är ett heltal från 1 till 20.



Kromatografiassa käytettävä amidiryhmiä sisältävällä polymerilla päällystetty huokoinen epäorgaaninen kantaja-aine ja menetelmä sen valmistamiseksi

5 Keksintö koskee kantaja-ainetta, joka on käyttökelpoinen sellaisenaan kromatografiassa tai lähtömateriaalina, johon voidaan sitoa ionisia ryhmiä, ligandeja tai biomakromolekyylejä sisältäviä yhdisteitä, jolloin sitä voidaan käyttää ioninvaihtajana, väliaineena affiniteettikromatografias-
10 sa tai entsyymaattisissa reaktioissa. Kantaja-aine koostuu huokoisista, epäorgaanisista, silanoiduista hiukkasista, joihin on kovalenttisesti sidottu stationäärifaasi, joka muodostuu amidiryhmiä sisältävistä (ko)polymeroiduista vinyyli-
nylimonomeereista.

15 Edellä esitetyn kaltaista kantaja-ainetta on kuvattu mm. US-patenttijulkaisussa 3 983 299. Tällöin käytetty orgaaninen stationäärifaasi on ohut hiilihydraattikerros, kuten esim. dekstraania tai sakkarideja, joiden molekyylipaino on <6 000. Tällaisen kantaja-aineen suurena haittana on,
20 että hiilihydraatti on luonnon aine, joka ei ole ainoastaan oksidatiivisen, vaan myös biologisen hajoamisen kohde. Toinen haitta on, että siihen lopullisesti sidottujen funktionaalisten ryhmien lukumäärä jää melko rajoitetuksi.

 Keksintö tarjoaa uuden kantaja-ainetyypin, jolla ei
25 ole yllä mainittuja haittoja.

 DE-patenttijulkaisusta 2 750 595 tunnetaan kantaja-
aine, joka on tarkoitettu käytettäväksi kromatografiassa
ja erityisesti affiniteettikromatografiassa ja joka perus-
tuu huokoiseen, epäorgaaniseen aineeseen sekä orgaaniseen
30 stationäärifaasiin, joka on synteettistä polymeeria, siinä ei kuitenkaan ole käytetty silanoitua ainetta ja orgaanisen
stationäärifaasin ja epäorgaanisen aineen välillä on heikko sidos.
Lisäksi mainitussa saksalaisessa patenttijulkaisussa ei mainita
mitään silloitetun polymerin käytöstä. Johtuen osittain siitä,
35 että käytetään ei-silanoitua ainetta ja tiettyjen vinyyli-
monomeereja, voi joissakin

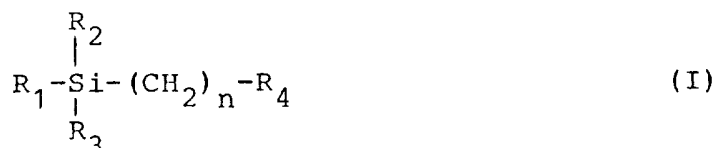
olosuhteissa sekä hydrolyyttinen stabiliteetti eikä kantaja-
aineen absorptiotoiminta voi olla epätyydyttävä.

Keksintö tarjoaa hydrolyyttisesti hyvin kestävän kan-
taja-aineen, joka soveltuu erittäin hyvin käytettäväksi
5 edellä mainittuun tarkoitukseen, jossa kantaja-ainetta on
käytettävä monia kertoja peräkkäin.

Keksintö koskee uutta kantaja-ainetta, joka koostuu
huokoisista, epäorgaanisista silanoiduista hiukkasista, joi-
hin on kovalenttisesti sidottu orgaaninen stationäärifaasi,
10 joka muodostuu (ko)polymeroiduista vinyylimonomeereistä ja
sisältää amidiryhmiä. Kantaja-aineelle on tunnusomaista,
että

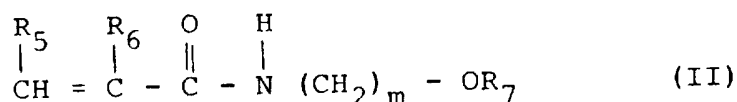
(A) epäorgaaninen aine on silanoitu orgaanisella si-
laanilla, jonka kaava on

15



jossa $n = 1-5$, edullisesti 3, R_1 on halogeeni tai alkoksi
20 (1-10 C), R_2 ja R_3 tarkoittavat halogeenia, alkoksia (1-10
C), alkyylia (1-3 C) tai aryyliä (6-10 C), jolloin halogeeni-
ja alkoksiryhmät R_1 , R_2 ja R_3 pysyvät muodostamaan
-O-Si-sidoksen silaanin ja epäorgaanisen aineen välille
viimemainitun pintahydroksyyli-ryhmien välityksellä, ja R_4
25 on amino, substituoitu amino, kuten esim. ω -amino-alkyyli-
(1-3 C)-amino, merkapto, esteriryhmä tai glysidoksi ja on
edullisesti glysidoksi; ja

(B) orgaaninen stationäärifaasi on silloitettu (ko)-
polymeeri, joka on saatu additiopolymeroinnilla ja muodos-
30 tuu 0,1 - 140 μ moolista, edullisesti 5-25 μ moolista vinyylimonomeerejä
kantaja-aineen epäorgaanisen pinnan m^2 kohti,
jolloin (ko)polymeeri sisältää vähintään 0,1 μ moolia amidi-
ryhmiä kantaja-aineen epäorgaanisen pinnan m^2 kohti ja vi-
nyylimonomeerit koostuvat kokonaan tai osittain bifunktio-
35 naalisista vinyylimonomeereistä, jotka sisältävät amidiryhmiä
ja joiden kaava on



jossa R_5 ja R_6 tarkoittavat vetyä, alkyyli- tai sykloalkyyli-
 5 liryhmää, jossa on enintään 6 hiiliatomia tai enintään 10 hiiliatomia sisältävä aryyli-
 liryhmä, R_7 on vety tai enintään 20 hiiliatomia sisältävä orgaaninen ryhmä, ja m on kokonaisluku
 1-10, jolloin amidiryhmät on saatu osittain saattamalla

(a) välimolekyyli, ligandi, biomakromolekyyli tai yh-
 10 diste, joka sisältää ionisen ryhmän, jolloin kussakin näis-
 tä on reaktiokykyinen ryhmä ja yksi tai useampi amidiryhmä,
 reagoimaan vinyylimonomeerin tai silloitetun (ko)polymeerin
 reaktiokykyisen ryhmän kanssa, tai

(b) välimolekyyli, ligandi, biomakromolekyyli tai yh-
 15 diste, joka sisältää ionisen ryhmän, jolloin kussakin näis-
 tä on yksi tai useampi amino- ja/tai karboksyyli-ryhmä, rea-
 goimaan yhden tai useamman silloitetussa (ko)polymeerissa
 olevan karboksyyli- ja/tai aminoryhmän kanssa.

Keksintö koskee myös menetelmää edellä kuvatun kanta-
 20 ja-aineen valmistamiseksi. Menetelmälle on tunnusomaista,
 että

(A) epäorgaaninen aine silanoidaan sinänsä tunnetulla
 tavalla kaavan I mukaiselle orgaanisella silaanilla;

(B) silanoitu epäorgaaninen aine saatetaan kosketuk-
 25 seen liuoksen kanssa, jossa vinyylimonomeerit on liuotettu
 haihtuvaan orgaaniseen liuottimeen tai orgaanisiin liuotti-
 miin ja/tai veteen, ja sitten haihtuva liuotin poistetaan
 sekoittamalla alennetussa paineessa ja alle 40°C :n lämpöti-
 lassa haihduttimessa niin että epäorgaaninen aine peittyy
 30 monomeeriseoksen muodostamalla ohuella kalvolla, minkä jäl-
 keen kalvopäällysteen polymerointi ja samanaikaisesti muo-
 dostuneen (ko)polymeerin kovalenttinen sitominen silanoi-
 tuun aineeseen suoritetaan kuumentamalla hapettomassa at-
 mosfäärissä, ja

(C) tarvittaessa saatu aine liitetään edelleen sinän-
 35 sä tunnetulla tavalla yhdisteisiin, joissa on reaktiokykyi-
 siä ryhmiä.

Uusi kantaja-aine sopii erittäin hyvin käytettäväksi teollisessa mittakaavassa. Sillä on erittäin edullisia, hydrofiilisiä ominaisuuksia, suuri mekaaninen kestävyys ja se kestää suuria virtausnopeuksia. Se ei liukene vesiliuoksiin eikä siinä ilmene epäspesifisiä vuorovaikutuksia biomakromolekyylien kanssa. Aine voidaan helposti regeneroida ja se kestää mikrobien ja entsyymien hajotustoimintaa.

Termiä "bifunktionaalinen vinyylimonomeeri" käytetään tarkoittamaan monomeeria, jolla on vinyyliryhmän ohella ainakin yksi hydrofiilinen, funktionaalinen ryhmä, joka voi muodostaa kovalenttisia sidoksia, esim. kaavassa II ryhmä -OR₇. "Osittain" on edullisesti >5 mooli-%.

Silanoitu epäorgaaninen aine, jossa on glysidoksiryhmiä, hydrolysoidaan, jolloin saadaan glyseryyli-ryhmiä ennen (ko)polymerointia.

GB-patenttijulkaisusta 1 456 865 tunnetaan kvartsi-pitoinen, hiukkasmainen kantaja-aine kromatografiaa, erityisesti ioninvaihtokromatografiaa varten, jolloin orgaaninen stationäärifaasi on kantaja-aineen pintaan sidottu kopolymeeri. Kvartsipitoinen aine on silanoitu vinyylisilaanilla ja silanoitu aine kopolymeroitu vinyylimonomeerin kanssa, jossa on yksi tai useampia olefiiniryhmää. Vinyylimonomeeri voi sisältää funktionaalisia ryhmiä, kuten halogeenin, hydroksyylin, metoksin, amidin, trikloorisilanyylin, karboksyylihappon- ja esteriryhmän, mutta nämä ryhmät eivät näytä olevan välttämättömiä esimerkkien perusteella, jotka koskevat vinyylimonomeereja, kuten propyleenia, isobutyleenia, styreeniä sekä butadieenia, lukuunottamatta esimerkkiä 4, jossa vinyylimonomeeri on maleiininhydridi. Sidottu oksaskopolymeeri, joka vinyylimonomeerin valinnasta riippuen ei ole silloitettu tai on vähän silloitettu, voidaan edelleen silloittaa käyttämällä silloitusaineita, kuten divinylibentseeniä tai diklooripropaania. Saatua tuotetta, jolla on pääosaltaan hydrofobisia ominaisuuksia, muutetaan sitten edullisesti happo- tai emäs-ioninvaihto-oksaskopolymeeriksi

sulfonoinnilla, fosfonoinnilla, karboksyloinnilla, hydrok-
syloinnilla tai amminoinnilla.

Vaihtoehtoisesti sidottu kopolymeeri saatetaan tehdä
toiminnallisesti siten, että se saatetaan reagoimaan kela-
5 tointi aineen kanssa, kelatointi aineen liittämiseksi si-
dottuun oksaskopolymeeriin, tai nitriiliryhmiä voidaan liit-
tää siten, että alkyylinitriili saatetaan reagoimaan sido-
tussa kopolymeerissa olevien halogeeniatomien kanssa.

Tällä tunnetulla vinyylisilanoidulla kantaja-aineella,
10 johon kopolymeeri on kovalenttisesti sidottu, ei ole samoja
erityisiä hydrofyylisiä ominaisuuksia eikä sitä suurta moni-
puolisuutta kromatografisissa sovellutuksissa kuin keksin-
nön mukaisella aineella. Tunnettu aine ei sovellu affini-
teettikromatografiaan ja sillä on huonot ominaisuudet kokoon
15 perustuvassa ekskluusiokromatografiassa.

US-patenttijulkaisusta 3 984 349 tunnetaan kromatogra-
fiassa käytettävä huokoinen hienojakoinen tai kolloidinen,
epäorgaaninen kantaja-aine, joka sisältää pinnallaan hydrok-
syyliryhmiä, jotka on muunnettu oksastamalla pintaan orgaa-
20 ninen ryhmä -O-Si-sidoksen aikaansaamiseksi, jolloin orgaa-
nisen ryhmän keskimääräinen molekyylipaino on yli 150 ja
se sisältää ainakin yhden hydrofiilisen funktionaalisen ryh-
män. Orgaaninen ryhmä on silaani, joka on valmistettu addi-
tioimalla yhdiste, jossa on vinyyli- tai allyylipääte ja
25 ainakin yksi hydrofiilinen ryhmä sekä yksinkertainen silaa-
ni, tai kopolymeroimalla vinyylimonomeeri, joka sisältää
ainakin yhden hydrofiilisen radikaalin, ja tyydyttämätön
silaani, esim. orgaaninen silaani, jossa orgaaninen ryhmä
sisältää tyydyttymättömän eteeniryhmän. Täten tuotettu si-
30 laani reagoi epäorgaanisen kantaja-aineen, esim. piihapon,
kanssa. Tässä tapauksessa kantaja-aineen pinnalle muodostuu
pitkiä (ko)polymeeriketjuja ("häntiä") ilman ristisidoksia
tai jos on kysymyksessä kopolymeeri, joka sisältää molekyy-
liä kohti useita silaaniryhmiä, kaikki näistä silaaniryh-
35 mistä eivät reagoi epäorgaanisen kantaja-aineen pinnan hyd-
roksoyliryhmien kanssa, niin että tietyssä määrin tässä
tunnetussa aineessa on vielä kantaja-aineesta itsestään joh-

tuvia, häiritseviä, ei-spesifisiä adsorptio-ominaisuuksia tai sitten silaanien silanoliryhmästä johtuvia, häiritseviä, ei-spesifisiä adsorptio-ominaisuuksia. Erilaisia kromatografisia sovellutuksia (esim. kokoon perustuva ekskluusiokromatografia, affiniteettikromatografia) tämä adsorptio-
5 ilmiö häiritsee hyvin voimakkaasti. Kun esillä olevan keksinnön mukainen epäorgaaninen kantaja-aine päällystetään, saadaan kromatografinen kantaja-aine, jossa on täysin tai lähes täysin deaktivoitu epäorgaaninen pinta ja jolla on
10 erinomaiset hydrofiiliset ominaisuudet. Erilaiset huokoiset, epäorgaaniset aineet soveltuvat käytettäväksi keksinnön mukaisena alustana. Esimerkkejä niistä ovat alumiini-, titaanini-, nikkeli-, sirkonium- sekä rautaoksidit, erilaiset silikaatit, kuten esim. savi, piimaa, kaoliini, bentoniitti,
15 magnesiumsilikaatti (talkki), asbesti ja lasi. Etusiija annetaan huokoiselle piidioksidille. Erityisen hyviä tuloksia saadaan piidioksidihelmillä. Rhone-Poluenc myy sopivia helmiä kauppanimellä Spherosil. Tarkastetun, huokoisen lasin suhteen tämän materiaalin etuna on, että se on käytännöllisesti katsoen pallomaista. Ennen kaikkea sen hinta on jokseenkin alhainen.

Epäorgaanisten aineiden huokosten läpimitta on yleensä 50 - 10 000 Å. Valittu läpimitta riippuu suunnitellusta käytöstä. Affiniteettikromatografiassa esim. käytetään
25 yleensä pallosia, joiden läpimitta on 250 - 3 000 Å:n alueella.

Pallosten huokostilavuus on yleensä 0,01 - 3 ml/g:n alueella, mieluummin tilavuus on noin 1 ml/g. Pallosten ominaispinta-ala on 0,5 - 1 000 m²/g:n alueella, useimmiten
30 käytössä oleva alue on 5-500 m²/g.

Valmistettaessa kantaja-ainetta affiniteettikromatografiaa varten, pidetään parempana käyttää pallosia, joiden ominaispinta-ala on 25-100 m²/g:n alueella, mikä vastaa pallosia, joiden huokosten läpimitta on vastaavasti
35 1 000 - 250 Å:n alueella. Riippuen kantaja-aineen ajattelusta käytöstä, sen valmistuksessa käytettävän epäorgaanisen aineen keskimääräinen läpimitta on yleensä 2 - 300 µm.

Valmistettaessa kantaja-ainetta affiniteettikromatografiaa varten, voidaan käyttää pallosia, joiden keskimääräinen läpimitta on $50 - 3\,000\ \mu\text{m}$:n alueella, etusija annetaan pallosille, joiden keskimääräinen läpimitta on $100 - 800\ \mu\text{m}$:n alueella. Kun kantaja-ainetta valmistetaan suurpaineliuoskromatografiaa (HPCL) varten, pidetään parempana käyttää pallosia, joiden keskimääräinen hiukkaskoko on $2 - 50\ \mu\text{m}$:n alueella.

Epäorgaaninen aine täytyy silanoida ennen kuin orgaaninen stationäärinen faasi sidotaan siihen kovalenttisesti. Tämä voi tehdä sinänsä tunnetulla tavalla. Silanoinnin tarkoituksena on tuoda epäorgaaniseen aineeseen reaktiokykyisiä ryhmiä kovalenttisen sidoksen muodostamiseksi silloitettuun polymeeriin. Esimerkkejä silanointireaktioista, jotka soveltuvat käytettäväksi kyseessä olevien kantaja-aineiden valmistukseen, kuvataan edellä mainitussa US-patenttijulkaisussa 3 983 299 sekä julkaisussa Journal of Chromatographic Sciences, 12, (1974), s. 486-498. Kuten edellä on esitetty, epäorgaaninen aine silanoidaan kaavan I mukaisella orgaanisella silaanilla. Edullisia kantaja-aineita ovat sellaiset, joissa epäorgaaninen aine silanoidaan γ -aminopropyyilisiloksiryhmillä, γ -merkaptopropyyilisiloksiryhmillä tai hydrolysoidulla γ -glysidoksi-*prop*yyilisiloksiryhmillä, jolloin viimeksi mainittu ryhmä on edullisin.

On havaittu, että edellä mainittuihin käyttötarkoituksiin sopii parhaiten kantaja-aine, jossa silloitettu polymeeri koostuu $5-25\ \mu\text{m}$ oolista vinyylimonomerejä m^2 kohti silanoidun epäorgaanisen aineen pinta-alaa. Erityisesti siinä tapauksessa, jossa kyseessä olevia kantaja-aineita käytetään affiniteettikromatografiaan, on toivottavaa, että niillä on optimaaliset hydrofiiliset ominaisuudet. Tämän vaatimuksen täyttää esillä oleva keksintö, jonka mukaisesti saadaan kantaja-aine, jossa on ainakin $0,1\ \mu\text{m}$ oolia amidiryhmiä silanoidun epäorgaanisen aineen pinta-alan m^2 kohti. Amidiryhmät eivät ole ainoastaan vastustuskykyisiä vesiliuoksissa tapahtuvaa hydrolyyttistä hajoamista vastaan laa-

jalti vaihtelevissa olosuhteissa, vaan ne kestävät myös mikrobi- ja/tai entsyymitoimintaa. Varsinaisessa käytännössä kantaja-aine sisältää 5-25 μ moolia amidiryhmiä silanoidun epäorgaanisen aineen pinta-alan m^2 kohti.

5 Kuten edellä on todettu amidiryhmien liittäminen orgaaniseen stationäärifaasiin saadaan aikaan käyttämällä kopolymeroinnissa kaavan II mukaista bifunktionaalista vinyylimonomeeria. Mainittu bifunktionaalinen vinyylimonomeeri voi olla amidiryhmien ainoa lähde. Kuitenkin on myös mahdollista saada edullisesti amidiryhmiä osittain saattamalla
10 välimolekyyli, ligandi, biomakromolekyyli tai yhdiste, joka sisältää ionisen ryhmän, jolloin kussakin näistä on reaktiivinen ryhmä ja yksi tai useampi amidiryhmä, reagoimaan vinyylimonomeerin tai silloitetun polymeerin reaktiokykyisen ryhmän kanssa. Kantaja-aineen ominaisuuksiin saatetaan
15 myös suotuisasti vaikuttaa, jos amidiryhmät on saatu osittain saattamalla silloitetun polymeerin yksi tai useampi amino- ja/tai karboksyyli-ryhmä reagoimaan yhdisteen kanssa, joka sisältää välimolekyylin, ligandin tai biomakromolekyylin tai ioniryhmän ja jossa on yksi tai useampi karboksyyli-
20 ja/tai aminoryhmä.

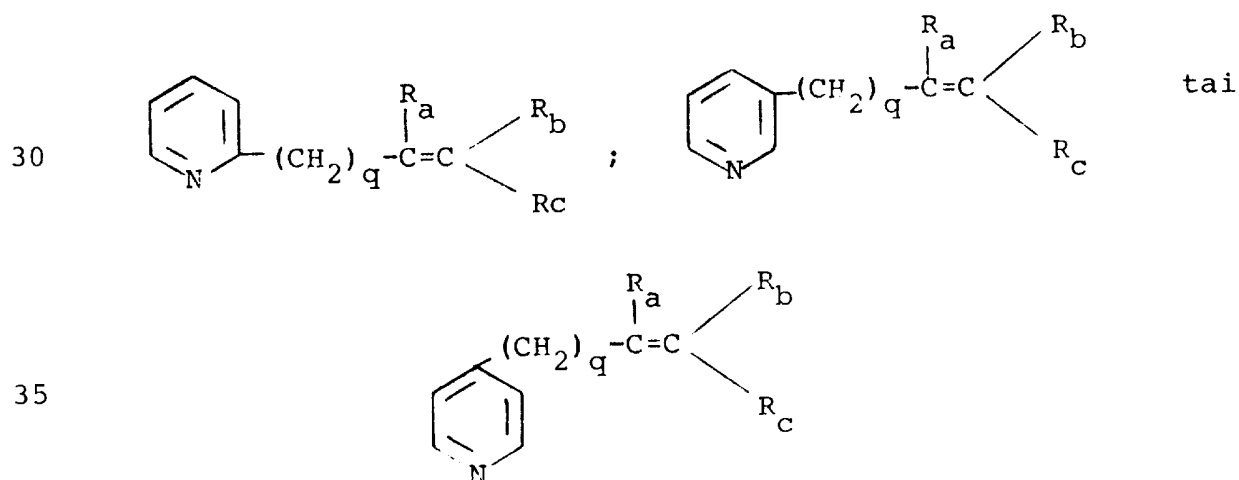
On havaittu, että päällystetyt aineet, joihin on lisätty kaavan II mukaisia amidiryhmiä sisältäviä vinyylimonomeereja, ovat erityisen sopivia käytettäväksi nestefaasi-
25 ekskluusiokromatografiassa, geelisuodatuksessa tai kokoonperustuvassa ekskluusiokromatografiassa (SEC). Huokoinen, epäorgaaninen aine käsittää edullisesti kavartsipalloja, joiden läpimitta on edullisesti 100-200 μ m:n ja joita Rhone-Poulenc myy kauppanimellä Spherosil. Päällystettyjen pallojen suhteen on erittäin edullista, että tavallisissa vesiliuoksissa ei tapahtu mitään adsorptiota tai esiinny biospesifistä vuorovaikutusta pallojen pinnan ja biomakromolekyylien välillä.
30

N-(hydroksietyyli)akryyliamidi sekä N-metyloli(met)-
35 akryyliamidi, edullisesti viimeksi mainittu, ovat amidiryhmiä sisältäviä vinyylimonomeereja, jotka erityisesti soveltuvat polymeeripäällysteiden valmistukseen.

- Kaavan II mukaista bifunktionaalista vinyylimonomeeria käytettäessä silloitus suoritetaan additiopolymeroinnin aikana. Siinä tapauksessa, että silanoidun aineen pinnalla on γ -aminopropyyilisiloksiryhmiä, kovalenttinen sidos on yleensä amidisidos, joka on saatu silaanin aminoryhmän reaktion avulla additiopolymerin karboksyyli-ryhmän kanssa. N-metyloliamidiryhmien sisältyessä yhteen tai useampaan additiopolymerin vinyylimonomeeriin, on epäorgaanista ainetta edullista käyttää γ -glyseryyli-
propyyilisiloksiryhmiä. N-metyloliamidiryhmät voivat kuumennettaessa tai vaihtoehtoisesti hapon vähäisen määrän läsnäollessa reagoida toistensa kanssa tai γ -glyseryyli-
propyyli-
silyldisteen glyseryyli-ryhmän kanssa, jonka seurauksena additiopolymeri silloittuu ja sitoutuu kovalenttisesti silanoituun aineeseen.
- Paitsi silaanin valinta silanoidun epäorgaanisen aineen saamiseksi ja (ko)polymeroinnissa käytetyn bifunktionaalisen vinyylimonomeerin valinta, myös keksinnön mukaisen kantaja-
aineen valmistusmenetelmä edistää mahdollisimman hyvien tuotteiden saamista. Silanoitua, epäorgaanista ainetta saadaan tunnetuin menetelmin, kuten aiemmin on todettu. Silloitettu polymeeripäällyste saadaan seuraavan menetelmän avulla. Ensin monomeerit sekä mahdolliset di- ja/tai oligomeerit liuotetaan haihtuvaan, orgaaniseen liuottimeen tai orgaanisiin liuottimiin ja/tai veteen ja lisätään silanoituun, epäorgaaniseen aineeseen. Haihtuva liuos poistetaan tämän jälkeen edullisesti kiertohaihduttimessa sekoittaen, alennetussa paineessa sekä alhaisessa lämpötilassa ($<40^{\circ}\text{C}$). Kun on lisätty liuotinta radikaali-initiaattoria varten, johon liuottimeen monomeerit eivät liukene tai tuskin liukenevat, seosta kuumennetaan hapettomassa atmosfäärissä, jonka tuloksena monomeerit polymeroituvat ja muodostuu kovalenttinen sidos silanoituun aineeseen. Valinnaisesti radikaali-initiaattoria voidaan jo lisätä monomeerin liuokseen.
- Kaavan II mukaisten bifunktionaalisten vinyylimonomeerien lisäksi voidaan kopolymeroinnissa käyttää myös mui-

ta vinyylimonomeereja silloitetun polymeerin muodostamiseksi. Suunnitellusta käyttöalueesta riippuen lisävinyylimonomeerit voivat olla rakenteensa suhteen hyvin vaihtelevia.

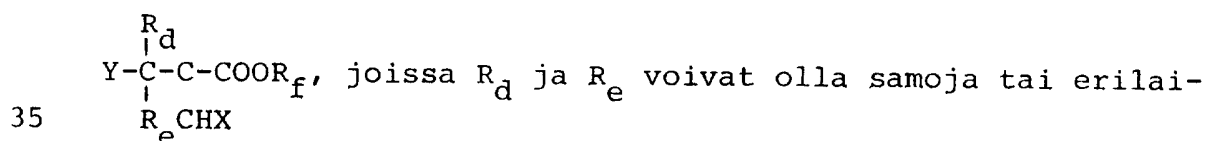
Esimerkkeinä tällaisista monomeereista mainittakoon
 5 epoksiyhdisteet, joissa on etyleenisesti tyydyttymätön ryhmä ja joita on kuvattu edellä mainitussa DE-patenttijulkaisussa 2 750 595. Myös vinyylimonomeerejä, joilla ei ole mitään reaktiokykyistä ryhmää, kuten eteeniä, propeenä, vinyylidikloridia, vinyylifluoridia ja/tai vinyyliasetaattia,
 10 voidaan käyttää, vaikka niiden käyttö e.o. keksinnössä on rajoitettu. Edellytyksenä on kuitenkin, että monomeerit voidaan helposti polymeroida additiopolymeeriksi, jolla on ajateltuun käyttöön tarvittavat ominaisuudet. Esim. jos ainetta on käytettävä ioninvaihtajana, voidaan harkita kopolymerointia, jossa käytetään vinyylimonomeeria, jossa on kationi- tai anioniryhmä. Esimerkkejä yhdisteistä, joissa on
 15 anioniryhmä, ovat vinyylimonomeerit, joissa on karboksyyli-ryhmä tai sulfonihapporyhmä, kuten eteenisulfonihappo, allyylisulfonihappo, styreenisulfonihappo, 2-sulfoetyylimetakrylaatti, 2-akryyliamido-2-metyylipropyylisulfonihappo,
 20 3-metakryloyylioksi-2-hydroksi-propyyylisulfonihappo, ω -hydroksialkyleenisulfonihapon (met)akryloyyliesteri, jonka alkyleeniryhmässä on 1-20 hiiliatomia, N-akryylitaauriini, vinyylioksibentseenisulfonihappo sekä akryyli- tai metakryyli-
 25 lihappo. Esimerkkejä vinyylimonomeereista, joissa on kationiryhmä, ovat seuraavat kaavan mukaiset alkenyyliipyridiinit:



jossa $q = 0$ tai kokonaisluku 1-20 ja R_a , R_b ja R_c voivat olla samoja tai erilaisia ja merkitsevät vetyatomia tai alkyyli-ryhmää, jossa on 1-20 hiiliatomia; aminoalkyyliakrylaatit ja metakrylaatit, kuten t-butyyliminoetyylimetakrylaatti, dietyyliminoetyyliakrylaatti, dimetyyliaminopropyylimetakryyliamidi sekä metakryyliamidopropyylitrimetyyliamoniumkloridi.

Lähtöaineiksi affiniteettikromatografiaa varten sopivat edullisesti vinyylimonomeerit, joissa on reagoivia ryhmiä, jotka voidaan liittää yhdisteisiin, joissa toisaalta on reaktiokykyinen ryhmä ja toisaalta ligandi, joka soveltuu käytettäväksi tietyllä affiniteettikromatografian alueella. Termiä "affiniteettikromatografia" määritellään siten, kuten on tehty kirjassa "Affinity Chromatography" Elsevier, 1978, s. 1 ja 2. Se ei käsitä vain affiniteettimenetelmiä biospesifisen adsorption mielessä, vaan myös hydrofobista kromatografiaa, kovalenttista kromatografiaa, affiniteetti-eluutiota sekä kantaja-aineiden, joihin oligonukleotidit ovat sidotut, vuorovaikutusten tutkimista. Affiniteettikromatografialla ymmärretään myös biomakromolekyylien yksinkertaista eristämistä spesifisen sorbentin pinnalle. On myös tietenkin mahdollista käyttää vinyylimonomeerejä, joissa funktionaalinen ryhmä on sidottu ilman välittäjänä toimivaa kahta reagoivaa ryhmää.

Edellä mainittujen vinyylimonomeerien lisäksi, joissa on ainoninen tai kationinen ryhmä, voidaan esimerkkeinä reaktiokykyisiä ryhmiä sisältävistä vinyylimonomeereista mainita halogenoidut monomeerit, kuten halogenoidut alkyyliakrylaatit tai metakrylaatit. Tällaisia ovat esim. 2-kloorietyyliakrylaatti ja 2-kloorietyylimetakrylaatti; halogenoitu alkyyliakryylihappo ja niistä johdetut yhdisteet, joilla on seuraava kaava:



sia ja merkitsevät vetyatomia, metyyliiryhmää tai etyyliiryhmää ja R_f merkitsee vetyatomia, alempaa alkyyliryhmää tai aryyliiryhmää, X merkitsee vetyatomia, halogeenia, CN:a, aryyliiryhmää, OH:a, COOH:a tai O-aryyliä ja Y merkitsee

5 kloori- tai bromiatomia; sekä halogeenimetyloitu styreeni, kuten esim. p-kloorimetyylistyreeni.

Esimerkkejä ovat edelleen: reaktiokykyiset heterosykliset vinyylimonomeerit, kuten esim. 2-(1-atsiridinyyli)-etyylimetakrylaatti, allyylyglysidyylietteri, glysidyyli-

10 metakrylaatti, tioglysidyyliakrylaatti, N-vinyyli-2-pyrrolidoni sekä maliinihapon anhydridi; vinyylimonomeerit, joissa on aldehydi-pääteryhmä, kuten esim. akroleiini sekä krotonaldehydi; vinyylimonomeerit, joissa on aminoryhmä, kuten esim. allyyliamiini, vinyyliamiini sekä p-aminostyreeni;

15 happamet monomeerit, kuten esim. maleiinihappo, fumaarihappo, itakonihappo sekä seuraavan kaavan mukaiset hapot:

$$\text{CH}_3(\text{CH}_3)_t \overset{\text{H}}{\underset{|}{\text{C}}}=\overset{\text{H}}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{COOH},$$
 jossa $t = 0$ tai kokonaisluku 1-20; akryylihappo sekä siitä johdetut yhdisteet, kuten esim.

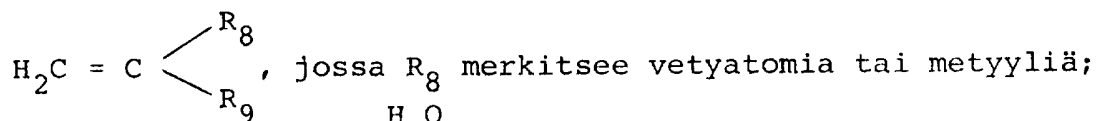
20 $\text{Cl}_2\text{C}=\text{CHCOOH}$; vinyylialkyleenikarboksyylihappo, jossa on 2 - 20 hiiliatomia alkyleeniryhmässä; p-vinyylibentsoehappo; alkyylivinyylieetteri, jossa on 1-18 hiiliatomia alkyyliryhmässä; vinyylifenyylietteri; hydroksialkyleenivinyylieetteri, jossa on 2-20 hiiliatomia alkyleeniryhmässä; polyalkyleenioksidiglykolin vinyylieetteri, jossa on 2-20 alkyleeni-

25 oksiyksikköä ja 2-5 hiiliatomia alkyleenioksidiyksikköä kohti; seuraavan kaavan mukaiset yhdisteet:

$$\text{CH}_2-\overset{\text{R}}{\underset{|}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\underset{||}{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{|}{\text{N}}}-\overset{\text{A}}{\underset{|}{\text{CH}}}-(\text{CH}_2)_v-\text{OH},$$
 jossa R_g tarkoittaa vetyatomia tai alkyyliryhmää, jossa on 1-8 hiiliatomia ja A merkitsee vety-

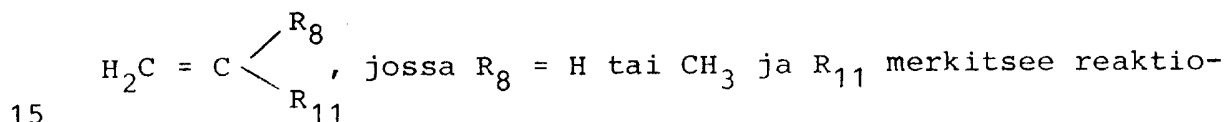
30 atomia tai alkyyliryhmää, jossa on 1-20 hiiliatomia ja v on kokonaisluku 1-20.

Eriyisen edullisia ovat yhdisteet, joiden kaava on

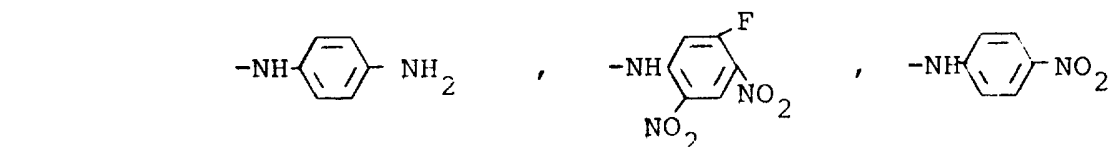
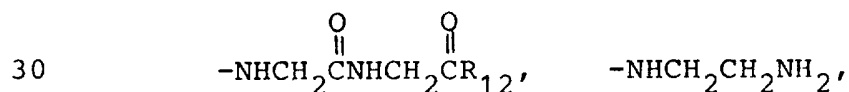
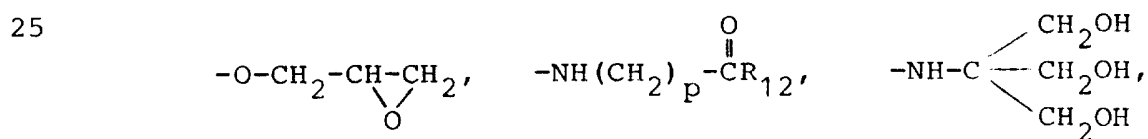
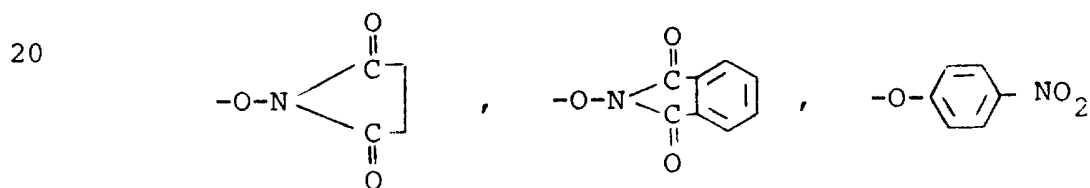


- 5 R_9 on $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2\text{X}$ tai $\text{CH}_2\text{OR}_{10}$; X on halogeeni, edullisesti Br; ja R_{10} on alkyyli, jossa on enintään 10 hiiliatomia, edullisesti metyyli, tai glysidioksi.

Käytettäessä kantaja-ainetta lähtöaineena, joka tehdään affiniteettikromatografiaan soveltuvaksi sitomalla siihen ligandeja, käytetään kuitenkin edullisesti silloitettua (ko)polymeeria, jossa on yksi tai useampi vinyylimonomeeri, jossa on seuraavan kaavan mukainen reaktiokykyinen ryhmä:



15 kykyistä ryhmää, joka voi olla liittynyt väliryhmän välityksellä tai ilman sitä, ja jossa R_{11} merkitsee hydroksyyli-ryhmää tai yhtä tai useampaa seuraavista ryhmistä:



jolloin R_{12} voi tarkoittaa samaa kuin R_{11} ja p merkitsee kokonaislukua 2-10.

On edullista, että sellaisen vinyylimonomeerin molekyyllipaino, jossa on reaktiokykyinen ryhmä ja mahdollisesti myös väliryhmä, on enintään 1 000 ja edullisesti se on 70-400. Affiniteettikromatografiaa varten käytettäviä liigandeja ovat esimerkiksi aminohapot, mononukleotidit, oligonukleotidit ja polynukleotidit, erilaiset orgaaniset väriaineet, entsyymi-inhibiittorit, polyaminohapot, lektiinit, polysakkaridit, lipidit, antigeenit ja entsyymit.

Keksintöä kuvataan edelleen seuraavissa esimerkeissä.

Esimerkki I

γ -glyseryylipropyylisiloksiidioksidipallojen valmistus. 110 g kvartsipalloja (keskimääräinen huokosen läpimitta 600 Å; ominaispinta-ala 50 m²/g; lämpmitta-alue 100-200 µm) käsiteltiin kahden tunnin ajan 400 ml:lla tislattua vettä ultraäänihauteessa 80°C:ssa. Sen jälkeen, kun pallo oli pesty vedellä, kunnes saatiin kirkas liuos, niitä aktivoitiin käsittelemällä suspensiota 40 ml:lla 4N HNO₃:a. Vedellä suoritettun pesun sekä kuivauksen jälkeen 460 ml tolueenia lisättiin pulloon, joka sisäli 100 g kvartsipalloja. Sen jälkeen pulloon pantiin γ -glysidoksi-propyyli-trimetoksisilaania 40 ml. Sen jälkeen, kun pullo oli kiinnitetty kiertohaihduttajaan, sitä kuumennettiin viiden tunnin ajan öljyhauteella 90°C:ssa.

Jäähdytyksen jälkeen suspensio suodatettiin, pestiin 500 ml:lla tolueenia sekä yhdellä litralla setonia. Kun asetoni oli poistettu vähennetyssä paineessa, palloja kuivattiin kahden tunnin ajan 50°C:ssa sekä vähennetyssä paineessa suoritettun kuivauksen jälkeen hiilisisältö määritettiin noin 200 mg:sta palloja alkuaineanalyysin avulla.

Sen todettiin olevan noin 2 %, mikä vastaa noin 280 μ moolia γ -glysididioksipropyyilisiloksiryhmiä grammaa kohti helmiä. Tyhjökiertohaihduttimessa, joka sisälsi 300 ml vettä, jonka pH oli säädetty 2:ksi 10 % HCl:lla, 105 g:sta näitä helmiä
5 kaasua poistettiin 1599,864 Pa:n (12 mmHg) paineessa.

Sen jälkeen ainetta sekoitettiin tunnin ajan yhden ilmakehän paineessa 90°C:n öljyhauteella. Sen jälkeen, kun aine oli jäähdytetty, helmet suodatettiin ja pestiin vedellä neutraaleiksi. Seuraavaksi helmiä kuivattiin kolmen tunnin ajan 70°C:ssa ja ne jätettiin yöksi vähennettyyn paineeseen 120°C:seen. Alkuaineanalyysin perusteella saatiin γ -glyseryylipropyyilisiloksiryhmien määräksi noin 280 μ moolia grammaa kohti helmiä.
10

Esimerkki II

Esimerkin I mukaista menetelmää käyttäen piidiokspalloja (huokoisen läpimitta 260 Å, osaten koko 100-200 μ , ominaispinta-ala 108 m²/g) käsiteltiin γ -glysididioksipropyylitrimetoksisilaanilla, joka sisälsi 500 μ moolia γ -glysididioksipropyyilisiloksiryhmiä grammaa kohti piihappoa. Hydrolyysin jälkeen, jossa muodostui γ -glyseryylipropyyli-
20 loksipiihappoa, 25 g näitä palloja suspendoitiin 100 ml:aan dioksaania. Tähän suspensioon lisättiin 7,5 ml 60 paino-%:ista N-metyloliakryyliamidin vesiliuosta. Dioksaani haihdutettiin pois tyhjökiertohaihduttimessa, kunnes pallot vierivät pullossa. Sen jälkeen lisättiin liuos, jossa oli
25 150 mg dientsoyyliperoksidia (20 % vettä) 100 ml:ssa npheksaania. Sen jälkeen, kun suspensio oli pantu typpikehän alle, seosta polymeroitiin 1 1/2 tunnin ajan 70°C:ssa. Suspensio siirrettiin lasisuodattimeen ja pestiin asetonilla
30 ja metanolilla, jonka jälkeen helmet kuivattiin vähennetyssä paineessa 120°C:ssa. Alkuaineanalyysin perusteella hiilen määräksi saatiin 8,73 % ja typen määräksi 1,78 %. Kantaja-aineen grammaa kohti matriisissa oli 1 270 μ moolia N-metyloliakryyliamidia, joka oli polymeerin muodossa.

Tämä vastaa 14,8 μ moolia N-metyloliakryyliamidia m^2 :ä kohti.

Esimerkki III

- Käyttämällä esimerkin I mukaista menetelmää, kvartsi-
- 5 palloja kuormitettiin 300 μ moolilla γ -glyseryylipropyyli-
- siloksiryhmiä grammaa kohti palloja (huokosen läpimitta
- 500 Å, pallon läpimitta 100-200 μ , ominaispinta-ala
- 63 m^2/g). 100 g näitä palloja sekoitettiin 7,5 ml:n kanssa
- vesiliuosta, joka sisälsi 60 paino-% N-metyloliakryyliami-
- 10 dia. 400 ml:aan vedetöntä etyyliasetaattia pantiin peräk-
- käin 2,882 g (40 mmol), akryylihappoa 5,524 g N-hydroksisuk-
- kinimidiä (48 mmol) sekä 9,078 g (44 mmol) N,N'-disyklo-
- heksyylikarbodi-imidiä, jonka jälkeen liuos suodatettiin
- yhden yön pituisen sekoituksen jälkeen. Suodos lisättiin
- 15 piihappopallojen muodostamaan suspensioon, jonka jälkeen
- etyyliasetaatti poistettiin vähennetyssä paineessa 40°C:ssa
- tyhjökiertohaihduttimessa. Pallojen päälle lisättiin sen
- jälkeen liuos, jossa oli 400 mg dibentsoyyliperoksidia
- 400 ml:ssa iso-oktaania. Suspensiota kuumennettiin typpi-
- 20 kehässä 1 1/2 tunnin ajan 70°C:ssa, mikä sai aikaan kalvon
- polymeroitumisen pallojen pinnalle. Suodatuksen jälkeen
- pallot pestiin asetonilla ja metanolilla sekä kuivattiin
- sen jälkeen tyhjössä 120°C:ssa. Alkuaineanalyysin perus-
- teella saatiin seuraavat tulokset:
- 25 C 6,54 %
- N 0,99 %

- Mikrotitrauksen perusteella (lisäämällä etanoliamiinia
- sekä titraamalla takaisin HCl:lla) N-hydroksisukkinamidin
- aktivoimien karboksyyli-ryhmien määräksi saatiin 241 μ moo-
- 30 lia grammaa kohti tai 4,4 μ moolia m^2 :ä kohti. N-metyloli-
- akryyliamidin määräksi saatiin 460 μ moolia grammaa kohti.

Esimerkki IV

- Käyttämällä esimerkissä III kuvattua menetelmää,
- kvartsipalloja kuormitettiin 257 μ moolilla γ -glyseryyli-
- 35 propyyli-siloksiryhmiä grammaa kohti palloja (huokosen läpi-
- mitta 500 Å, pallon läpimitta 100-200 μ , ominaispinta-ala
- 63 m^2/g).

100 g näitä palloja sekoitettiin 6,0 ml:n kanssa vesiliuosta, joka sisälsi 60 paino-% N-metyloliakryyliamidia (40 mmol).

400 ml:aan vedetöntä dioksaania lisättiin peräkkäin
 5 7,4 g 6-akryyliamidopentaanikarboksyylihappoa [40 mmol oli valmistettu artikkelin mukaan, jonka ovat julkaisseet E. Brown et al. julkaisussa J. of Chromatography 150 (1978) s. 101-110], 5,524 g N-hydroksisukkinimidiä (48 mmol) sekä 9,078 g (44 mmol) N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidiä, jonka jälkeen liuos suodatettiin yhden yön sekoittamisen jälkeen. Etyyliasetatti poistettiin täysin haihduttamalla samalla sekoittaen vähennetyssä paineessa 40°C:ssa. Pallojen päälle lisättiin tämän jälkeen liuos, jossa oli 400 mg dibentsoyyliperoksidia 400 ml:ssa n-heksaania. Suspensiota
 15 kuumennettiin typpikehässä 1 1/2 tunnin ajan 70°C:ssa, mikä sai aikaan kalvon polymeroitumisen pallojen pinnalle. Suodattamisen jälkeen pallot pestiin asetonilla ja metanolilla sekä kuivattiin tämän jälkeen tyhjössä 120°C:ssa. Kantaja-aineen alkuaineanalyysi antoi seuraavat tulokset:
 20 C 6,49 %
 N 1,05 %

Mikrotitrauksen avulla N-hydroksisukkinimidillä aktivoitujen karboksyyliryhmien määräksi saatiin 200 μ moolia grammaa kohti tai 3,7 μ moolia m²:ä kohti. Muodostuneen N-metyloliakryyliamidin määräksi saatiin 360 μ moolia grammaa kohti.
 25

Esimerkki V

Käyttämällä esimerkissä I kuvattua menetelmää, alumiinipalloja (alumiini Woelm N₁₈, suuri resoluutio, suuri
 30 nopeus, alumiinioksidi, jolla on hieno seulamitta, W 200 neutraali, ominaispinta-ala 200 m²/g, osasten koko 18-30 μ) kuormitettiin 422 μ moolilla γ -glyseryylipropyylisiloksi-ryhmiä pallojen grammaa kohti.

10 g silanoituja palloja lietettiin 50 ml:aan etyyliasetattia. Tähän lietteeseen lisättiin 3,80 ml vesiliuosta, joka sisälsi 60 paino-% N-metyloliakryyliamidia. Etyyliasetatin haihduttamisen jälkeen lisättiin liuos,
 35

jossa oli 150 mg dibentsoyyli-percksidia (20 % vettä) 60 ml:ssa iso-okteenia. Sen jälkeen, kun suspensio saatettiin tyypikehän alle, seosta polymeroitiin 1,5 tunnin ajan 70°C:ssa.

5 Pesun ja kuivauksen jälkeen tuotteen alkuaineanalyysi antoi hiilen määräksi 7,89 % ja typen määräksi 1,58 %. Alusaineen grammaa kohti siinä oli 1 130 μ moolia N-metyloliakryyliamidia polymeerin muodossa. Tämä vastaa 6,78 μ moolia N-metyloliakryyliamidia m^2 :ä kohti.

10 Esimerkki VI

Käyttämällä esimerkeissä I ja II kuvattua menetelmää, kvartsipalloja (huokosläpimitta 700 Å, pallon läpimittaa 100-200 μ , ominaispinta-ala 42 m^2/g) silanoitiin ja päällystettiin γ -glyseryyli-propyyli-siloksilla sekä polymeroitettiin N-metyloliakryyliamidilla. Alkuaineanalyysi antoi tuotteen hiilisisällöksi 3,15 % sekä typen määräksi 0,57 %. Amidiryhmien määrä oli 10,3 μ mol/ m^2 .

Esimerkki VII

Käyttäen esimerkin I mukaista menetelmää, kvartsipalloja kuormitettiin 250 μ moolilla γ -glyseryyli-propyyli-siloksiryhmiä pallojen grammaa kohti (huokosläpimitta 700 Å, pallon läpimitta 100-200 μ , ominaispinta-ala 42 m^2/g).

5 g näitä palloja sekoitettiin 20 ml:n kanssa dioksaania, jonka jälkeen muodostuvaan suspensioon lisättiin 25 0,375 ml (2,5 mol) 60 paino-%:ista N-metyloliakryyliamidin vesiliuosta, 0,360 g (2,53 mmol) glysidyylimetakrylaattia sekä 10 mg atsobisisobutyronitriiliä (AIBN). Dioksaani poistettiin vähennetyssä paineessa 40°C:ssa tyhjökiertohaihdutuksessa.

30 Tämän jälkeen palloja kuumennettiin neljän tunnin ajan pullossa öljyhauteessa 80°C:ssa, minkä jälkeen palloja kuivattiin tyhjössä 100°C:ssa. Sen jälkeen, kun pallojen oli annettu jäähtyä, ne pestiin perusteellisesti asetonilla ja kuivattiin jälleen. Alkuaineanalyysin perusteella 35 saatiin hiilen määräksi 5,91 % ja typen määräksi 0,51 %. Mikrotitrauksen perusteella epoksiryhmien määräksi saatiin 105 μ moolia grammaa kohti tai μ moleja/ m^2 . N-sisällön

perusteella voitiin laskea, että polymeerikalvoon oli liittynyt noin 310 μ moolia N-metyloliakryyliamidia/g.

Esimerkki VIII

- Käyttämällä esimerkissä I käytettyä menetelmää, kvart-
- 5 sipalloja kuormitettiin 390 μ moolilla γ -glyseryylipropyy-
- lisiloksiryhmiä pallojen grammaa kohti (huokosläpimitta
- 650 Å, pallon läpimitta 100-200 μ , ominaispinta-ala
- 50 m²/g).
- 10 g näitä palloja lietettiin 300 ml:aan dioksa-
- 10 nia, jonka jälkeen muodostuvaan suspensioon lisättiin
- 0,75 ml (5,00 mmol) 60 paino-%:ista N-metyloliakryyliami-
- din vesiliuosta. Sen jälkeen, kun liuotin oli haihdutettu,
- lisättiin 50 ml n-heksaania, johon oli liuotettu 25 mg di-
- bentsyyliperoksidia (20 % vettä). Polymeroinnin jälkeen
- 15 pallot pestiin asetonilla sekä metanolilla sekä kuivattiin
- sen jälkeen. Alkuaineanalyysin perusteella hiilen määräksi
- saatiin 4,45 % ja typen määräksi 0,54 %. Tämän jälkeen tä-
- mä kantaja-aine päällystettiin toisella polymeerikerroksel-
- la.
- 20 Lopuksi 0,370 g 6-akryyliamidopentaanikarboksyyli-
- happoa, 0,276 g N-hydroksisukkinimidiä sekä 0,454 g N,N'-
- disykloheksyylikarbodi-imidiä saatettiin reagoimaan keske-
- nään 20 ml:ssa dioksaania.
- Reaktioseoksen suodattamisen jälkeen liuos sekoitet-
- 25 tiin 20 ml:n kanssa dioksaania, 0,150 ml:n kanssa 69 paino-
- %:ista N-metyloliakryyliamidin vesiliuosta sekä 10 g:n
- kanssa piihappoainetta, jossa oli ensimmäinen kalvon muodos-
- tava polymeeri.
- Dioksaanin haihduttamisen jälkeen lisättiin 60 ml
- 30 n-heksaania, joka sisälsi 30 mg liuotettua dibentsyyliper-
- oksidia. Alkuaineanalyysin perusteella hiilen määräksi saa-
- tiin 6,48 % ja typpisisällöksi 0,96 %. Mikrotitrauksen pe-
- rusteella N-hydroksisukkinimidillä aktivoitujen karboksyy-
- liryhmien määräksi saatiin 100 μ moolia grammaa kohti eli
- 35 2,33 μ moolia m²:ä kohti.

Esimerkki IX

10 g palloja, jotka oli käsitelty esimerkin IV menetelmän mukaisesti, käsiteltiin liuoksella, jossa oli 4,5 g hepariinia (175 USP-yksikköä/mg) 60 ml:ssa 0,1 molaarista boraattipuskuria, pH 7,7.

Sen jälkeen, kun suspensiosta oli kaasua poistettu, sen pH pidettiin 8:ssa lisäämällä 1M natriumhydroksidiliuosta ja sitä sekoitettiin 22 tunnin ajan. Seuraavaksi suspensio suodatettiin ja pestiin peräkkäin 400 ml:lla vettä, 600 ml:lla 3M NaCl:a sekä 400 ml:lla vettä. Sen jälkeen, kun N-hydroksisukkinimidillä aktivoitujen karboksyyli-ryhmien ylimäärä oli suljettu titraamalla 1M etanoliamiinilla, palloja pestiin 400 ml:lla vettä, 300 ml:lla 3M NaCl:a sekä 500 ml 0,01M trispuskuria (pH 7,4).

112,5 μ moolista hepariinin aminoryhmiä 86,5 μ moolia löydettiin fluoresenssispektroskopian avulla reaktion jälkeen liuoksesta sekä pesuaineista. Tällä tavalla hepariinilla kuormitettu kantaja-aine pakattiin 50 x 16 mm:n suuruiseen pylvääseen, jolloin pakatun kolonnin tilavuus oli 10 ml. Pylväs käsiteltiin ensin 0,01 M trispuskurilla (pH 7,4). Seuraavaksi 60 ml härän plasmaa laskettiin pylvään läpi virtausnopeudella 22 ml tunnissa. Plasmassa oli antitrombiini-III-aktiivisuutta 0,92 E/ml. 0,01M trispuskurilla suoritettua pesun jälkeen adsorboitunut aktiivisuus elu- oitiin 0,01M trispuskurilla sekä 3M NaCl:lla. Kokonaistakaisinsaanto oli 75 %. Puhtaus oli 2,2 E mg kohti proteiinia, joka merkitsee puhdistuskertoimen arvoa 167.

Esimerkki X

5 g palloja, jotka oli päällystetty esimerkin VIII menetelmän mukaisesti, käsiteltiin härän antitrombiini-III:n jäähdytetyllä liuoksella sekä 140 mg:lla hepariinia (jolla on vähimmäismäärä aminoryhmiä) 20 ml:ssa 0,1 molaarista fosfaattiliuosta (pH 7,4). Liuos sisälsi 11 mg antitrombiini-III/ml ja antitrombiiniaktiivisuus oli 5,7 E/mg.

Sen jälkeen, kun palloista oli poistettu kaasua, liuosta sekoitettiin 24 tunnin ajan kiertotyhjöhaiduttimessa. Seuraavaksi palloja pestiin lasisuodattimessa

200 ml:lla 0,1M fosfaattipuskuria (pH 7). Jäljelle jääneet aktivoidut karboksyyli-ryhmät suljettiin titraamalla 1M etanoliamiinilla, jonka jälkeen palloja pestiin peräkkäin 3M NaCl:a sisältävällä 0,1M fosfaattipuskurilla (pH 7,4) sekä 0,15M NaCl:a sisältävällä 0,1M fosfaattipuskurilla (pH 7,4). Adsorboituneen antitrombiini-III:n määrä/g kantaja-ainetta määritettiin Folinin koementelmän mukaisesti ja sen todettiin olevan 8 mg/g kantaja-ainetta. Tämä aine pakattiin pylvääseen, jonka jälkeen määritettiin hepariinin adsorptiokapasiteetti. Päätteeksi 0,15 M NaCl:a sisältävällä 0,02M fosfaattipuskurilla (pH 7,4) suoritettua tasapainottamisen jälkeen suuri hepariinin ylimäärä laskettiin pylvään läpi. Seuraavaksi adsorboitunut hepariini eluoitettiin 3M natriumkloridia sisältävällä 0,02M fosfaattipuskurilla (pH 7,4). Pylvään todettiin adsorboineen 140 μ g hepariinia pakatun kolonnin ml kohti.

Esimerkki XI

Käyttämällä esimerkissä III esitettyä menetelmää, piihappopalloja kuormitettiin 300 μ moolilla γ -glyseryyli-propyyli-siloksiryhmiä grammaa kohti palloja (huokosläpimittia 500 Å, pallon läpimitta 100-200 μ , ominaispinta-ala 63 m²/g).

Pinta päällystettiin esimerkissä III kuvatulla tavalla 407 μ moolilla N-metylooliakryyliamidilla sekä 104 μ moolilla N-hydroksisukkinimidillä aktivoituja karboksyyli-ryhmiä/g. Täten aktivoidusta aineesta 10 g erät reagoivat kunkin kanssa seuraavista primäärisistä amiineista:

- 1) p-aminobentsamidiini-hydrokloridi
- 2) etanoliamiini
- 30 3) N,N-dietyleenidiamiini
- 4) tauriini
- 5) heksyyliamiini
- 6) etyleenidiamiini sekä seuraavaksi meripihkahapon anhydridi.

35 1. 10 g kantaja-ainetta suspendoitiin liuokseen, jossa oli 2,4 g (11,5 mmol) p-aminobentsamidiinihydrokloridia 40 ml:ssa 0,1M fosfaattipuskuria (pH 8). Sen jälkeen,

kun suspensiosta kaasu oli poistettu, sen pH säädettiin 8:aan 2N natriumhydroksidiliuoksella ja sitä sekoitettiin 16 tunnin ajan.

Sen jälkeen suspensio suodatettiin ja vaihtoehtoi-
5 sesti sitä pestiin 0,1M asetaattipuskurilla, joka sisälsi 1N NaCl:a (pH 4) sekä 0,1M fosfaatilla, joka sisälsi 1M NaCl:a (pH 8) ja lopuksi vedellä.

Mikrotitrauksen avulla (lisäämällä ylimäärin etano-
liamiinia ja titraamalla takaisin NaCl:lla) todettiin, et-
10 tei kantaja-aine, jota ei käsitelty pitempään, sisältänyt enää aktivoituja karboksyyliiryhmiä. Lopputuotteen typen määrä oli 0,76 %, josta voitiin laskea, että 45 μ moolia/g kantaja-ainetta oli yhdistynyt. Tämä alusaine soveltuu hyvin proteaasien, kuten esim. trypsiinin eristämiseen Hixson
15 et al.:n julkaisussa Arch. Biochem. Biophys. 154 (1973) 501 sekä kirjassa Methods Enzymol. 37 (1974) 440 kuvaaman menetelmän avulla.

2. 10 g kantaja-ainetta lietetttiin 30 ml:aan 0,01M etanoliamiiniliuosta. Sen jälkeen suspensiosta kaasu pois-
20 tettiin, sitä sekoitettiin 30 minuutin ajan, se suodatettiin, pestiin vedellä, 1M NaCl:lla ja jälleen vedellä. Mitatun typen määrä oli 0,71 %, joka käytännöllisesti katsoen vastaa aktivoitujen karboksyyliiryhmien kvantitatiivista muuttumista.

25 3. 10 g kantaja-ainetta lietetttiin liuokseen, jossa oli 0,32 ml (2,2 mmol) N,N-dietyylietyleenidiamiinia 25 ml:ssa dimetyyliformamidia. Sen jälkeen, kun liuoksesta oli poistettu kaasu, sitä sekoitettiin 16 tunnin ajan. Seuraavaksi liete suodatettiin ja tämän jälkeen pestiin
30 200 ml:lla dimetyyliformamidia, 200 ml:lla vettä, 300 ml:lla 1M NaCl:a sekä 300 ml:lla vettä. Alkuaineanalyysin perusteella typen määräksi saatiin 0,85 %. Tertiäärysten aminoryhmien lukumäärä/g tuotetta määritettiin titraamalla etikkahapossa perkloorihapolla ja sen arvoksi saatiin 100 μ moo-
35 lia/g.

4. 10 g kantaja-ainetta lietetttiin liuokseen, jossa oli 2,5 g (20 mmol) tauriinia 25 ml:ssa vettä sekä 3,1 ml

(21 mmol) trietyyliamiinia. Sen jälkeen, kun suspensiosta oli kaasu poistettu, sitä sekoitettiin 24 tunnin ajan. Suodatuksen jälkeen lietettä pestiin peräkkäin vedellä, 2M NaCl:lla, 5 % suolahapolla sekä vedellä. Alkuaineanalyysin perusteella rikin määräksi saatiin 0,30 paino-%, joka vastaa 93 μ moolia sulfoetyyliryhmien liittymistä grammaa kohti. Kantaja-aine sopi käytettäväksi voimakkaasti happamana ioninvaihtajana.

5. 10 g kantaja-ainetta lietettiin liuokseen, jossa oli 0,222 g (2,2 mmol) heksyyliamiinia 25 ml:ssa dimetyyliformamidia. Sen jälkeen, kun liuoksesta kaasu oli poistettu, sitä sekoitettiin 16 tunnin ajan. Suodatuksen jälkeen alusaine pestiin peräkkäin 200 ml:lla dimetyyliformamidia, 200 ml:lla vettä, 300 ml:lla 1M NaCl:a sekä 300 ml:lla vettä. Alkuaineanalyysin perusteella typen määräksi saatiin 0,70 %, joka vastaa käytännöllisesti katsoen kvantitatiivista konversiota. Täten valmistettu kantaja-aine sopi käytettäväksi hydrofobiseen (affiniteetti) kromatografiaan, kuten on esitetty seuraavan kokeen avulla:
- 0,5 g kantaja-ainetta oli kosketuksissa liuoksen kanssa, jossa oli 5 mg mikrobialkuperää olevaa lipaasia (peräisin *Chromobacterium Viscosum*ilta) 10 ml:ssa 0,05M Tris, 0,05M maleiinihapon anhydridipuskuria, joka sisälsi 1M NaCl:a (pH 7,0). Aktiivisuus, joka oli määritetty A. Louwersin sekä R. Ruyssen julkaisussa *Pharmaceutical Enzymes* (1978), Story Scientia, Gent (Belgia), kuvaaman menetelmän mukaan, oli 200 yksikköä (U) mg:aa kohti lipaasia. Kun kaasu oli poistettu, suspensiota inkuboitiin yön yli. Inkubaation jälkeen supernatantista saatiin 105 U:n (10,5 %) lipaasiaktiivisuus. Adsorptio nousi 90 %:iin. Sen jälkeen, kun supernatantti oli erotettu lasisella imusuodattimella, pallot olivat kaksi kertaa kosketuksissa 5 ml:n kanssa vettä 45 minuutin ajan. Vesi näytti sisältävän 23 U lipaasiaktiivisuutta. Kun vesi oli poistettu imemällä, palloja inkuboitiin kahden tunnin ajan 10 ml:ssa 50 %:ista etanolia. Supernatantti näytti sisältävän 867 U lipaasiaktiivisuutta, toisin sanoen eluaatissa oli 87 % alkuperäisestä lipaasiaktiivisuudesta.

6. 10 g kantaja-ainetta lisättiin liuokseen, jossa oli 0,132 g (2,2 mmol) etyleenidiamiinia 25 ml:ssa dimetyyliformamidia.

Tämän jälkeen suoritettun kaasun poistamisen jälkeen liuosta sekoitettiin yhden yön ajan. Suspensio suodatettiin ja sitä pestiin peräkkäin 200 ml:lla dimetyyliformamidia, 200 ml:lla vettä, 300 ml:lla 1M NaCl:a sekä 300 ml:lla vettä. Tämän kantaja-aineen analyysin perusteella, jossa aine kuivattiin ja titrattiin perkloorihapolla, todettiin sen sisältävän 100 μ moolia primäärisiä aminoryhmiä grammaa kohti.

5 g tällä tavalla primäärisin aminoryhmin kuormitettua kantaja-ainetta lietetettiin 15 ml:aan 0,1M NaCl:a ja kaasu poistettiin. Tähän lietteeseen lisättiin samalla sekoittaen ja 30 minuutin pituisen ajanjakson aikana pieniä määriä jauhettua meripihkahapon anhydridiä. Kaikkiaan lisättiin 2 g (20 mmol). Mainitun jakson aikana lietteen pH pidettiin 6:ssa lisäämällä 20 %:ista natriumhydroksiliuosta. Suodatuksen jälkeen pallot pestiin peräkkäin vedellä, 0,1M NaCl:lla sekä vedellä. Täplälevykokeella määritettiin, olivatko kaikki aminohapot konvertoituneet. Tässä kokeessa yksi pisara ninhydriiniä oli kosketuksissa 10 mg:n kanssa näytettä 0,1 ml:ssa vettä. Pisaroiden muutuessa siniseksi, toistettiin reaktio meripihkahapon anhydridin kanssa, kunnes ninhydriinikokeessa pisarat eivät enää muuttuneet siniseksi. Täten oli saatu heikosti hapan ioninvaihtaja. Kantaja-aineen havaittiin olevan sopivan affiniteettipylvään prekursorina.

Esimerkki XII

Tässä esimerkissä esitetään, että keksinnön mukaisen kantaja-aineiden hydrolyyttinen kestävyys on paljon parempi kuin yksinomaan silanoidun kantaja-aineen tai silanoimattoman kantaja-aineen, joka on päällystetty ristikytkypolymeerillä, joka on saatu polyaddition avulla ja jossa on 0,1 - 140 μ moolia vinyylimonomeereja/m² epäorgaanista ainetta.

Kaikissa tapauksissa käytettiin kvartsipalloja (huokosläpimitta 650 Å, pallon läpimitta 100-200 µ, ominaispinta-ala 50 m²/g).

Valmistettiin kolme kantaja-ainetyyppiä.

5 Tyyppi A valmistettiin esimerkin I menetelmän mukaan käsittelemällä kvartsipalloja γ-glysidiodiksypropyyli-trimetoksisilaanilla. Alkuaineanalyysin perusteella hiilen määräksi saatiin 1,91 %. γ-glysidiodiksyryhmien hydrolyysin jälkeen kantaja-aine syntyi sitomalla γ-glyseryylipropyyli-siloksypiihapon pintaan kovalenttisesti päällyste, jonka
10 muodosti ristikyttykopolymeeri, jossa oli 308 µmoolia N-metyloliakryyliamidia ja 196 µmoolia N-hydroksisukkinimidiaktivoitua 6-akryyliamidipentaanikarboksyylihappoa grammaa kohti. N-hydroksisukkinimidillä aktivoitunut karbok-
15 syyliryhmät konvertoitiin titraamalla 1 molaarisella etanoliamiiniliuoksella. Alkuaineanalyysin perusteella syntyvän aineen todettiin sisältävän 5,86 % hiiltä ja 0,94 paino-% typpeä.

Tyyppi B valmistettiin päällystämällä silanoimat-
20 tomat kvartsipallot suoraan ristikyttykopolymeerille, jonka muodosti 360 µmoolia N-metyloliakryyliamidia sekä 210 µmoolia N-hydroksisukkinimidillä aktivoitua 6-akryyliamidopentaanikarboksyylihappoa/g. N-hydroksisukkinimidillä aktivoitunut karboksyyliryhmät konvertoitiin titraamalla
25 etanoliamiiniliuoksella. Alkuaineanalyysin perusteella saadun aineen hiilen ja typen määrä oli vastaavasti 4,83 ja 1,05 paino-%.

Tyyppi C valmistettiin esimerkissä I esitetyn menetelmän mukaisesti päällystämällä piihappopallot γ-glysidiodiksypropyyli-trimetoksisilaanilla. Alkuaineanalyysin perusteella hiilen määräksi saatiin 3,28 paino-%. Tämä vastaa
30 455 µmoolia γ-glyseryylipropyyli-siloksyryhmää grammaa kohti.

 Täten valmistetuille kantaja-aineille (tyypit A, B
35 ja C) suoritettiin seuraavat hydrolyysikokeet:

 2 g kantaja-ainetta sekoitettiin yhden viikon tai yhden päivän ajan 70°C:n lämpötilassa kolmessa eri puskuris-

sa, joiden pH oli vastaavasti 8,8, 9,5 ja 4,0. Tuloksista on tehty yhteenveto seuraavassa taulukossa.

Taulukko

	Kantaja-aine	Tyyppi A		Tyyppi B		Tyyppi C
		C %	N %	C %	N %	C %
5	ennen hydrolyysiä	5,68	0,93	4,38	1,05	3,28
	jälkeen hydrolyysin:					
	0,1M trispuskurissa pH 8					
	1 päivä	-	-	4,03	0,96	-
10	1 viikko	5,37	0,91	3,37	0,82	3,05 ^x
	0,2M boraattipuskurissa					
	pH 9,5					
	1 viikko	5,26	0,89	-	-	-
	1,2M asetaattipuskurissa					
15	pH 4,0					
	1 päivä	-	-	3,89	0,94	-
	1 viikko	5,37	0,90	-	-	3,16

^xKokeen päättyessä suspensio oli maidonvalkoinen, mikä ilmaisee läsnäolevan piihappo-osasia, jotka ovat tyypin C hydrolyyttisen hajoamisen tuloksia.

Yllä esitetyn taulukon tulosten perusteella tyypin A mukainen kantaja-aine (keksinnön mukaan) on hydrolyysin suhteen hyvin kestävä. Tyypin B mukainen kantaja-aine oli paljon kestävämpi puskuria kohtaan, jolla oli korkea pH kuin puskuria kohtaan, jonka pH oli alhainen. C-tyyppinen kantaja-aine ei sovellu useimpiin käyttötarkoituksiin biomakromolekyylien välisen vuorovaikutuksen vuoksi.

Esimerkki XIII

30 Esimerkissä I kuvatulla tavalla kvartsipalloja (huokosläpimitta 500 Å, ominaispinta-ala 63 m²/g, pallon läpimitta 100-200 µ) kuormitettiin 210 µmoolilla γ-glyseryylipropyyilisiloksiryhmiä grammaa kohti palloja.

35 10 g:aan silanoitua kvartsia lisättiin vesiliuos, jossa oli 1,045 g (5,06 mmol) 3-dimetyyliaminopropyyylimetakryyliamidin hydrokloridia, 0,91 ml (6,0 mmol) N-metyylolimakryyliamidin vesiliuosta (60 paino-%:ista) sekä 30 ml

metanolia. Metanolin haihduttamisen jälkeen lisättiin 45,5 mg AIBN:a (atsobis-isobutyronitriiliä) 35 ml:ssa iso-oktaania ja polymerointi saatiin aikaan.

Polymeroituneen tuotteen alkuaineanalyysi antoi hiilen määräksi 7,64 % ja typen määräksi 1,75 %. Mikrotitrauksen avulla määritettiin ioninvaihtajatuotteen heikosti emäksisten dimetyyliaminoryhmien määräksi 325 μ moolia grammaa kohti tai 6,1 μ moolia/m².

Esimerkki XIV

10 Kuten esimerkissä I, kvartsipalloja (huokosläpimittata 500 Å, ominaispinta-ala 63 m²/g, pallon läpimittata 100-200 μ) kuormitettiin 172 μ moolilla γ -glyseryylipropyyli-siloksiryhmiä grammaa kohti palloja.

40 g:aan silanoituja palloja lisättiin 7,6 ml met-
15 akryyliamidopropyyli-*trimetyyliammonium*kloridin (18,1 mmol) vesiliuosta (40 paino-%), 3,64 ml N-metyloliakryyliamidin (24 mmol) vesiliuosta (60 paino-%) sekä 140 ml metanolia. Metanolin haihduttamisen jälkeen lisättiin 150 mg AIBN:a, joka oli liuotettu 140 ml:aan iso-oktaania. Polymeroinnin
20 jälkeen pallot pestiin peräkkäin asetonilla, metanolilla, vedellä sekä 3M NaCl-liuoksella.

Kuivatun tuotteen alkuaineanalyysi antoi hiilen määräksi 7,32 % ja typen määräksi 1,59 %. Mikrotitrauksen perusteella ioninvaihtajan voimakkaasti emäksisten *trimetyyliammonium*ryhmien määräksi saatiin 255 μ moolia grammaa kohti tai 4,7 μ moolia/m².

Esimerkki XV

a) Esimerkissä I kuvatulla tavalla kvartsipalloja (huokosläpimittata 700 Å, ominaispinta-ala 42 m²/g, pallon
30 läpimittata 100-200 μ) kuormitettiin 143 μ moolilla γ -glyseryylipropyyli-siloksiryhmiä grammaa kohti palloja.

50 g:aan silanoituja palloja lisättiin seos, jossa oli 5,18 g (25,0 mmol) 2-akryyliamido-2-metyylipropaanisulfonihappoa, 3,5 ml (25,0 mmol) trietyyliamiinia, 4,55 ml
35 (6,0 mmol) N-metyloliakryyliamidin vesiliuosta (60 paino-%) sekä 150 ml metanolia. Metanolin haihduttamisen jälkeen lisättiin 250 mg AIBN:a, 50 mg p-tolueenisulfonihappoa sekä 200 ml iso-oktaania.

Saatu tuote pestiin polymeroinnin jälkeen peräkkäin asetonilla, metanolilla, vedellä sekä 5 % suolahapolla.

Alkuaineanalyysi: hiili 5,99 %, typpi 1,16 %, rikki 1,25 %.

- 5 Tuote sisälsi 438 μ moolia N-metyloliakryyliamidia sekä 390 μ moolia 2-akryyliamido-2-metyylipropaanisulfonihappoa grammaa kohti. Mikrotitrauksen perusteella sulfonihapporyhmien määräksi saatiin 285 μ moolia grammaa kohti.

- b) 10 ml täten tuotettua kantaja-ainetta tavapainotettiin pylväässä 0,05M Sörensen-puskurilla pH 5,5:ssä. 10 30 ml hemoglobiinin liuosta (sisälsi 20 mg hemoglobiinia ml kohti) suodatettiin pylvään läpi. Pylvään pesun jälkeen, joka suoritettiin tasapainotuspuskurilla, hemoglobiini eluoitiin 0,05M Sörensen-puskurilla (pH 7,5), joka sisäl- 15 si vastaavasti n0, 0,5M ja 2M NaCl:a. Kaikkiaan voitiin eluoida 104 mg hemoglobiinia, mikä antoi pylvään kapasiteetiksi 10 mg hemoglobiinia ml kohti pylvään kantaja-ainetta.

Esimerkki XVI

- Esimerkissä I kuvatulla tavalla kvartsipalloja (huo- 20 kosläpimitta 500 Å, ominaispinta-ala 63 m²/g, pallon läpimitta 100-200 μ) kuormitettiin 210 μ moolilla γ -glyseryylipropyyilisiloksiryhmiä pallojen grammaa kohti.

- 10 g:aan silanoituja palloja lisättiin seos, jossa oli 0,467 g (6,50 mmol) akryylihappoa, 0,66 g (6,50 mmol) 25 trietyyliamiinia, 0,91 ml (6,0 mmol) N-metyloliakryyliamidin vesiliuosta (60 paino-%) sekä 30 ml metanolia. Metanolin haihduttamisen jälkeen lisättiin 60 mg AIBN:a sekä 20 mg p-tolueenisulfonihappoa 30 ml:ssa iso-oktaania. Polymeroinnin jälkeen tuote pestiin peräkkäin asetonilla, metanolil- 30 la, 5 % suolahapolla sekä vedellä.

Alkuaineanalyysi: hiili 5,03 %, typpi 0,67 %. Tuote sisälsi 480 μ moolia N-metyloliakryyliamidia sekä noin 170 μ moolia akryylihapporyhmiä grammaa kohti.

- Kapasiteetti hemoglobiinille, esimerkin XV b mukaan 35 määritettynä, oli 11,6 mg/ml.

Esimerkki XVII

Esimerkissä II tuotettuja palloja 10 g kuivatislattiin 650°C:ssa kahden tunnin ajan. Jäähdyttämisen jälkeen saatiin pihappopalloja, joiden hiili- ja typpisisältö
 5 olivat alle 0,05 %. Pallot käsiteltiin ja päällystettiin uudelleen esimerkeissä I ja II kuvatulla tavalla. Saadun tuotteen hiilen määrä oli 8,63 % ja typen määrä 1,73 %.

Geelipermeaation kalibrintikäyrien, jotka oli saatu eluoimalla polystyreenistandardeja tetrahydrofuraanissa,
 10 vertailu ilmaisi, että uudelleen suoritettun päällystysten jälkeen aineen huokosläpimitan alue oli sama kuin alkupe-
 räisellä päällystetyllä tuotteella.

Esimerkki XVIII

Esimerkissä VI valmistetut pallot tutkittiin geeli-
 15 permeaatio-ominaisuuksien (kokoon perustuva ekskluusio) suhteen erilaisten proteiinien avulla pH 7,0:ssa sekä 9,0:ssa käyttäen 0,02M fosfaattipuskuria, joka sisälsi 0,15M NaCl:a.

Pylväs (läpimitta 1 cm, korkeus 34,1 cm) täytettiin
 20 palloilla. Ruiskutustilavuus 0,1 ml, jossa oli 1 mg proteiinia millilitrassa. Virtaus oli 2,5 ml minuutissa cm² kohti.

Tulokset:

	Proteiini	Molekyyli- paino	pK _I	K _d	
				pH=7	pH=9
25	katalaasi	221 600	5,58	0,18	0,17
	γ-globuliini	153 000	7,0	0,15	0,15
	seerumin albumiini	68 500	4,90	0,25	0,31
	hemoglobiini	64 450	6,8	0,41	0,35
30	ovalbumiini	45 000	4,6	0,36	0,33
	pepsiini	36 000	1,0	0,37	0,49
	β-laktoglobuliini	35 400	5,0	0,39	0,48
	trypsinogeeni	23 560	9,3	0,47	0,32
	myoglobiini	18 500	7,0	0,46	0,44
35	lysotsyymi	14 000	10,7	0,71	-
	sytokromi-C	13 000	10,65	0,49	x
	insuliini	5 750	5,50	0,62	0,55

x eluutio mahdoton

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

- 5 V_r = proteiinin retentiotilavuus
 V_o = täysin ulkopuolelle jätetyn komponentin retentiotilavuus

V_t = täysin läpäisevän komponentin retentiotilavuus

Esimerkki XIX

- 10 Esimerkin VI mukaista kantaja-ainetta, joka sisälsi p-aminobentsamidiiniryhmiä, käytettiin trypsiinin ja kymotrypsiinin eristämiseen. Pylväs täytettiin palloilla. Tasapainottamispuskurina käytettiin 0,1M natriumasetaattia (pH 5,5), joka sisälsi 0,1M NaCl:a sekä 0,001M CaCl_2 :a. Vir-
- 15 tausnopeus oli 15,6 ml/h. Pylväs eluoitiin 0,1M glysiini-HCl-puskurilla (pH 2,0), joka sisälsi 0,1M NaCl:n sekä 0,001M CaCl_2 :a.

- Aktivoitua haimajauhetta (30 g) uutettiin tavapainottamispuskurilla (100 ml) 5°C:ssa. 60 ml suodatettua uutetta pantiin pylvääseen. Pylväs pestiin tasapainottamispuskurilla ja eluoitiin sitten glysiini-HCl-puskurilla.

- Todettiin, että näin eluaatissa saatu trypsiini oli puhdistettu seitsemän kertaa ja kymotrypsiini noin kolme kertaa (trypsiinin aktiivisuus oli mitattu käyttämällä väriainetta synnyttävää substraattia S-2160; kymotrypsiinin aktiivisuus mitattiin potentiometrillä käyttämällä ATEE:ä substraattina.

Molemmat entsyymit todettiin noin 30 % puhtaiksi yksinkertaisen kromatografiavaiheen jälkeen.

- 30 Esimerkki XX

- Esimerkissä III kuvatulla tavalla kvartsipallot (huokosläpimitta 3 200 Å, pallon läpimitta 100-200 µ, ominaispinta-ala 12 m² grammaa kohti) silanoitiin 28,8 µmoolilla γ-glyseerylipropyylisiloksiryhmiä grammaa kohti sekä päällystettiin N-metyloliakryyliamidin (150 µmol) ja N-hydroksisukkinimidyyliakryylihapoesterin (91 µmol/g) kopolymeerillä. Palloja käsiteltiin liuoksella, jossa oli

1 790 γ -umoolia γ -glutamyylikysteinyyliglysiiniä (glutathioni)
30 ml:ssa bikarbonaattipuskuria 0,1M, pH 8,5, 22 tunnin
ajan.

5 Palloja pestiin peräkkäin 200 ml:lla 0,1M NaHCO_3 -pus-
kuria (pH 8,5), 100 ml:lla 0,1M NaHCO_3 -puskuria (pH 9,5),
joka sisälsi 1M NaCl:a ja 0,001M EDTA:a, 100 ml 0,1M
 NaHCO_3 -puskuria (pH 4,3), joka sisälsi 1M NaCl:a sekä
0,001M EDTA:a ja lopuksi 100 ml:lla 0,001M EDTA:a.

10 Sulfhydryyliryhmät aktivoitiin 2,2'-dipyridyylidi-
sulfidilla, joka oli 0,1M TRIS-HCl-puskurissa, pH 8, ja
sisälsi 0,3M NaCl:a sekä 0,01M EDTA:a

Saatu aine sisälsi 10 γ -umoolia aktivoituja sulfidi-
ryhmiä grammaa kohti (määritetty spektrofotometrillä
343 nm:ssä β -merkaptetanolin kanssa tapahtuneen reaktion
15 jälkeen.

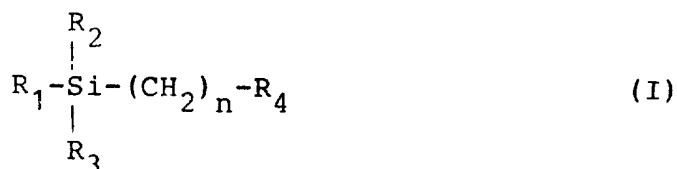
Näin saatu aine soveltui tioliryhmiä sisältävien
proteiinien, esim. entsyymien, kuten ureaasin, eristämi-
seen.

20 Tämän aineen avulla myös entsyymit, kuten esim.
ureaasi, voidaan tehdä liikkumattomiksi niiden aktiivisuu-
den häviämättä. Ureaasilla kuormitettua pylvästä voidaan
hyvin käyttää vesiliuosten virtsa-aineen määrittämiseen,
esim. virtsasta, suorittamalla urealiuoksen perkolaatio
pylvään lävitse sekä määrittämällä eluaatista NH_3 NH_3^-
25 elektrodin avulla.

Patenttivaatimukset

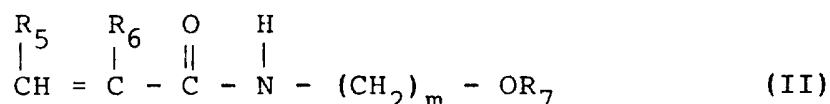
1. Kantaja-aine, joka on käyttökelpoinen sellaisenaan kromatografiassa tai lähtöaineena, johon voidaan sitoa yh-
 5 disteitä, jotka sisältävät ionisia ryhmiä, ligandeja tai bio-
 makromolekyyliä, jolloin sitä voidaan käyttää ioninvaihta-
 jana, väliaineena affiniteettikromatografiassa tai entsymaat-
 tisissa reaktioissa, joka kantaja-aine koostuu huokoisista,
 epäorgaanisista silanoiduista hiukkasista, joihin on kova-
 10 lenttisesti sidottu orgaaninen stationäärifaasi, joka muo-
 dostuu (ko)polymeroiduista vinyylimonomeereista ja sisältää
 amidiryhmiä, t u n n e t t u siitä, että

(A) epäorgaaninen aine on silanoitu orgaanisella si-
 laanilla, jonka kaava on
 15



20 jossa $n = 1-5$, edullisesti 3, R_1 on halogeeni tai alkoksi
 (1-10 C), R_2 ja R_3 tarkoittavat halogeenia, alkoksia (1-10
 C), alkyylä (1-3 C) tai aryyliä (6-10 C), jolloin halogee-
 ni- ja alkoksiryhmät R_1 , R_2 ja R_3 pysyvät muodostamaan
 -O-Si-sidoksen silaanin ja epäorgaanisen aineen välille viime-
 25 mainitun pintahydroksyyli-ryhmien välityksellä, ja R_4 on ami-
 no, substituoitu amino, kuten esim. ω -amino-alkyyli-(1-3
 C)-amino, merkapto, esteriryhmä tai glysidoksi ja on edulli-
 sesti glysidoksi; ja

(B) orgaaninen stationäärifaasi on silloitettu (ko)-
 30 polymeeri, joka on saatu additiopolymeroinnilla ja muodostuu
 0,1 - 140 μ moolista, edullisesti 5-25 μ moolista vinyylimono-
 meerejä kantaja-aineen epäorgaanisen pinnan m^2 kohti, jol-
 loin (ko)polymeeri sisältää vähintään 0,1 μ moolia amidiryh-
 miä kantaja-aineen epäorgaanisen pinnan m^2 kohti ja vinyyli-
 35 monomeerit koostuvat kokonaan tai osittain bifunktionaalisis-
 ta vinyylimonomeereistä, jotka sisältävät amidiryhmiä ja
 joiden kaava on



jossa R_5 ja R_6 tarkoittavat vetyä, alkyyli- tai sykloalkyyli-ryhmää, jossa on enintään 6 hiiliatomia tai enintään 10 hiiliatomia sisältävä aryyli-ryhmä, R_7 on vety tai enintään 20 hiiliatomia sisältävä orgaaninen ryhmä, ja m on kokonaisluku 1-10, jolloin amidiryhmät on saatu osittain saattamalla

(a) välimolekyyli, ligandi, biomakromolekyyli tai yhdiste, joka sisältää ionisen ryhmän, jolloin kussakin näistä on reaktiokykyinen ryhmä ja yksi tai useampi amidiryhmä, reagoimaan vinyylimonomeerin tai silloitetun (ko)polymeerin reaktiokykyisen ryhmän kanssa, tai

(b) välimolekyyli, ligandi, biomakromolekyyli tai yhdiste, joka sisältää ionisen ryhmän, jolloin kussakin näistä on yksi tai useampi amino- ja/tai karboksyyli-ryhmä, reagoimaan yhden tai useamman silloitetussa (ko)polymeerissa olevan karboksyyli- ja/tai aminoryhmän kanssa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kantaja-aine, tunnettu siitä, että R_5 on vety, R_6 on vety tai metyyli, R_7 on vety ja m on 1.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen kantaja-aine, tunnettu siitä, että vinyylimonomeerit käsittävät vähintään 5 mooli-% kaavan II mukaisia bifunktionaalisia vinyylimonomeereja.

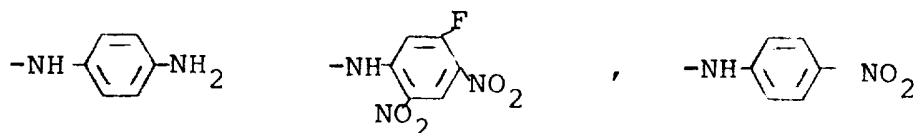
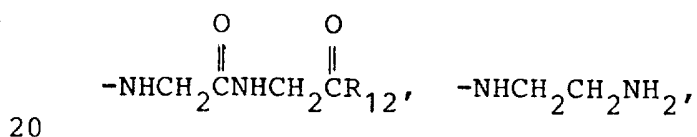
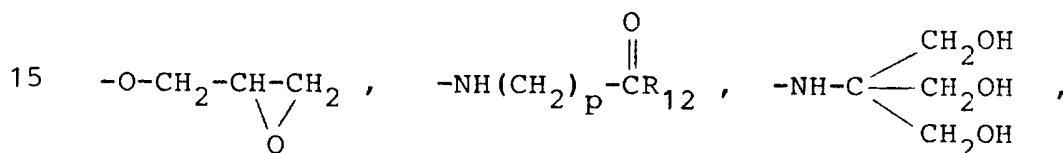
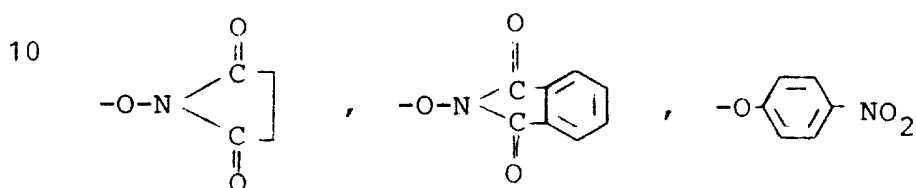
4. Jonkin edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukainen kantaja-aine, tunnettu siitä, että (ko)polymeeri sisältää 5-25 μ moolia amidiryhmiä kantaja-aineen epäorgaanisen pinnan m^2 kohti.

5. Jonkin edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukainen kantaja-aine, tunnettu siitä, että komonomeeri silloitettua kopolymeeria varten on yksi tai useampi vinyylimonomeeri, jossa on funktionaalinen ryhmä ja jonka kaava on



jossa R_8 on H tai CH_3 , R_9 on $-CH_2NH_2$,

5 $-CH_2-\overset{\text{H}}{\underset{|}{\text{N}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-CH_2X$, $-CH_2OR_{10}$ tai $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-R_{11}$ ja on edullisesti $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-R_{11}$,
X on halogeeni, edullisesti Br, R_{10} on enintään 10 hiiliato-
mia sisältävä alkyyli, edullisesti metyyli, tai glysidoksi,
 R_{11} on funktionaalinen ryhmä, joka voi olla liittynyt tai ei
ole liittynyt karbonyyliryhmään väliryhmän avulla, ja joka
on hydroksyyli tai



joissa R_{12} voi tarkoittaa samaa kuin R_{11} ja p on kokonais-
luku 1-10, jolloin funktionaalisen ryhmän ja mahdollisesti
myös väliryhmän sisältävän vinyylikomoneerin molekyylipai-
no on enintään 1 000 ja edullisesti 70-400.

6. Menetelmä jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukaisen
30 kantaja-aineen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

(A) epäorgaaninen aine silanoidaan sinänsä tunnetulla
tavalla kaavan I mukaiselle orgaanisella silaanilla;

(B) silanoitu epäorgaaninen aine saatetaan kosketuk-
seen liuoksen kanssa, jossa vinyylimonomerit on liuotettu
35 haihtuvaan orgaaniseen liuottimeen tai orgaanisiin liuotti-
miin ja/tai veteen, ja sitten haihtuva liuotin poistetaan

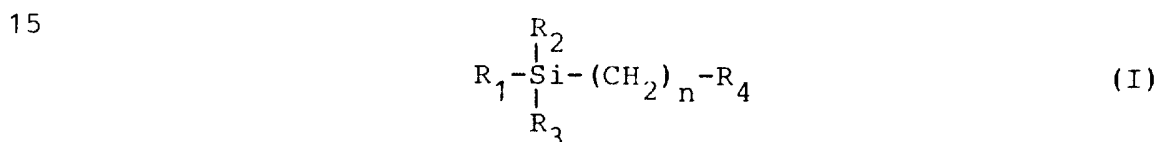
sekoittamalla alennetussa paineessa ja alle 40°C:n lämpötilassa haihduttimessa niin että epäorgaaninen aine peittyy monomeeriseoksen muodostamalla ohuella kalvolla, minkä jälkeen kalvopäällysteen polymerointi ja samanaikaisesti muodostuneen (ko)polymeerin kovalenttinen sitominen silanoituun aineeseen suoritetaan kuumentamalla hapettomassa atmosfäärissä, ja

(C) tarvittaessa saatu aine liitetään edelleen sinänsä tunnetulla tavalla yhdisteisiin, joissa on reaktiokykyisiä ryhmiä.

Patentkrav

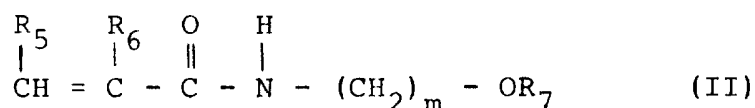
1. Bärarmaterial, som är användbart som sådant i kromatografi eller som utgångsmaterial, till vilket kan bindas
 5 föreningar, som innehåller joniska grupper, ligander eller biomakromolekyler, varvid det kan användas som jonbytare, som medium i affinitetskromatografi eller i enzymatiska reaktioner, vilket bärarmaterial består av porösa, oorganiska silanerade partiklar, till vilka kovalent bundits en organisk stationärfas, vilken utgörs av (sam)polymeriserade vinylmonomerer och innehåller amidgrupper, k ä n n e t e c k -
 10 n a t därav, att

(A) det oorganiska materialet silanerats med ett organiskt silan med formeln



vari $n = 1-5$, företrädesvis 3, R_1 är halogen eller alkoxi (1-10 C), R_2 och R_3 betecknar halogen, alkoxi (1-10 C), alkyl (1-3 C), eller aryl (6-10 C), varvid halogen- och alkoxigrupperna R_1 , R_2 och R_3 förmår bilda en -O-Si-bindning mellan silanet och det oorganiska materialet med tillhjälp av den sistnämndas ythydroxylgrupper, och R_4 är amino, substituerad
 25 amino, såsom ω -amino-alkyl-(1-3 C)-amino, merkapto, en estergrupp eller glycidoxi och är företrädesvis glycidoxi; och

(B) den organiska stationära fasen är en tvärbunden (sam)polymer, vilken erhållits genom additionspolymerisation och utgörs av 0,1 - 140 μ mol, företrädesvis 5-25 μ mol vinylmonomerer per m^2 oorganisk yta av bärarmaterialet, varvid
 30 (sam)polymeren innehåller minst 0,1 μ mol amidgrupper per m^2 oorganisk yta av bärarmaterialet och vinylmonomererna består helt eller delvis av bifunktionella vinylmonomerer, vilka innehåller amidgrupper och har formeln



5 vari R_5 och R_6 betecknar väte, en alkyl- eller cykloalkylgrupp med högst 6 kolatomer eller en arylgrupp med högst 10 kolatomer, R_7 är väte eller en organisk grupp med högst 20 kolatomer, och m är ett heltal 1-10 varvid amidgrupperna till en del erhållits genom att omsätta

10 (a) en mellanmolekyl, en ligand, en biomakromolekyl, eller en förening, som innehåller en jonisk grupp, varvid var och en av dessa har en reaktiv grupp och en eller flera amidgrupper med en reaktiv grupp i en vinylmonomer eller den tvärbundna (sam)polymeren, eller

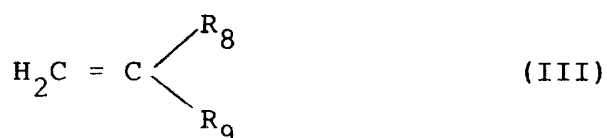
15 (b) en mellanmolekyl, en ligand, en biomakromolekyl eller en förening, som innehåller en jonisk grupp, varvid var och en av dessa har en eller flera amino- och/eller karboxylgrupper, med en eller flera karboxyl- och/eller amino-grupper i den tvärbundna (sam)polymeren.

20 2. Bärarmaterial enligt patentkravet 1, k ä n n e - t e c k n a t därav, att R_5 är väte, R_6 är väte eller metyl, R_7 är väte och m är 1.

25 3. Bärarmaterial enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda vinylmonomerer omfattar minst 5 mol-% bifunktionella vinylmonomerer med formeln II.

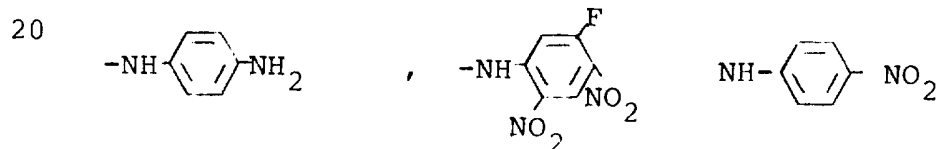
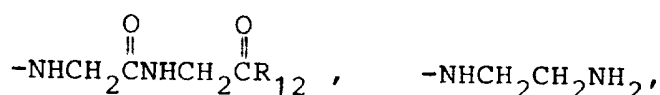
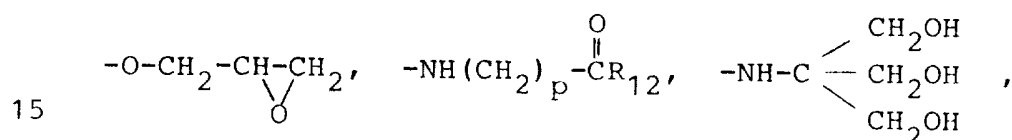
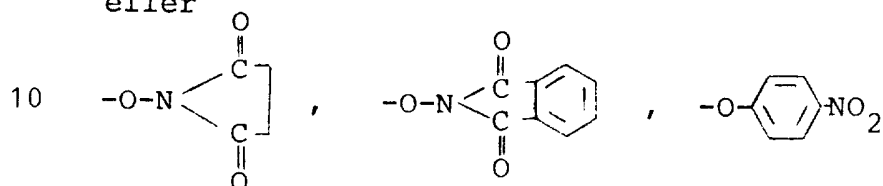
4. Bärarmaterial enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t därav, att (sam)polymeren innehåller 5-25 μmol amidgrupper per m^2 oorganisk yta av bärarmaterialet.

30 5. Bärarmaterial enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t därav, att sammonomeren för den tvärbundna sampolymeren är en eller flera vinylmonomerer, som har en funktionell grupp och som har formeln



vari R_8 är H eller CH_3 , R_9 är $-CH_2NH_2$, $-CH_2-\overset{\overset{H}{|}}{\underset{\underset{O}{||}}{N}}-C-CH_2X$,

$-CH_2OR_{10}$ eller $-\overset{\overset{O}{||}}{C}-R_{11}$ och är företrädesvis $-\overset{\overset{O}{||}}{C}-R_{11}$, X är halogen, företrädesvis Br, R_{10} är alkyl med högst 10 kolatomer, 5
företrädesvis metyl, eller glycidoxi, R_{11} är en funktionell grupp, som kan vara bunden eller ej är bunden till karbonylgruppen med tillhjälp av en mellangrupp och som är en hydroxyl eller



vari R_{12} kan beteckna samma som R_{11} och p är ett heltal 1-10, 25
varvid molekylvikten av vinylsammonomeren, vilken har en funktionell grupp och eventuellt även en mellangrupp, är högst 1 000 och företrädesvis 70-400.

6. Förfarande för framställning av ett bärarmaterial enligt något av patentkraven 1-7, k ä n n e t e c k n a t 30
därav, att

(A) det oorganiska materialet silaniseras på i och för sig känt sätt med ett organiskt silan med formeln I;

(B) det silaniserade oorganiska materialet bringas i kontakt med en lösning, där vinylmonomererna är lösta i ett 35
flyktigt, organiskt lösningsmedel eller i organiska lösnings-

medel och/eller vatten, och det flyktiga lösningsmedlet avlägsnas därefter under omröring vid reducerat tryck och en temperatur under 40°C i ett indunstningskärl så att det oorganiska materialet täcks med en tunn film av monomerblandning, 5 varefter polymerisation av filmbeläggningen och samtidigt en kovalent bindning av den bildade (sam)polymeren vid det silaniserade materialet utförs genom upphettning i en syrefri atmosfär, och

(C) vid behov, förenas det erhållna materialet ytterligare på i för sig känt sätt med föreningar innehållande 10 reaktiva grupper.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

—