

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 162651 B

(21) Patentansøgning nr.: 5132/82

(51) Int.Cl.⁵

C 08 F 220/54

(22) Indleveringsdag: 18 nov 1982

B 01 J 39/20

(41) Alm. tilgængelig: 20 maj 1983

(44) Fremlagt: 25 nov 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 19 nov 1981 GB 8134861

(71) Ansøger: SOCIETE D'EXPANSION SCIENTIFIQUE "EXPANSIA"; 264, rue du Faubourg Saint-Honore; 75008 Paris, FR

(72) Opfinder: Christian *Aspisi; FR, Bernard *Calas; FR, Jacques *Daunis; FR, Michel *Follet; FR, Robert *Jacquier; FR, Joseph *Parello; FR

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af acryl-copolymere der er anvendelige som kationbyttere

(56) Fremdragne publikationer

DE off.g.skrift nr. 1212729
FR pat. nr. 1506798

(57) Sammen drag:

5132-82

Acrylcopolymere fremstilles ved samtidig copolymerisation i blok eller i suspension af 3 forskellige monomere: (I) en N-acrylpolymethylenimin eller et N-acryldialkylamid til tilvejebringelse af matrix, (II) en N,N'-bis-acryldiaminoalkan som tværbindingens middel, og (III) N-acrylaminosyre eller -ester til tilvejebringelse af de funktionelle grupper, eksempelvis carboxylsyregrupper.

De acrylcopolymere har gode mekaniske egenskaber og lader sig anvende med mange forskellige opløsningsmidler, inklusive vand, eksempelvis ved gelkromatografi, hvor de som kationbyttere giver god adskillelse ved høje strømningshastigheder.

DK 162651 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte acrylcopolymere, der er anvendelige som kationbyttere.

- 5 De omhandlede acrylpolymere er tværbundne, statistiske acrylcopolymere, der er anvendelige i et stort udvalg af opløsningsmidler (vand, methylenchlorid, chloroform, methanol, ethanol, dimethylformamid, pyridin etc.) De er anvendelige ved kromatografering baseret på ionbytning.

- 10 Kromatografering ved ionbytning består i, at man anvender et uopløseligt bærestof (matrix), på hvilket er fæstnet ioniserbare grupper knyttet til ioner med modsat fortegn (mod-ioner).

- 15 Disse sidstnævnte kan udskiftes med andre ioner med samme fortegn, som er indeholdt i en mobil fase, som man bringer i kontakt med matrixen. Afhængig af den sure eller basiske karakter af de fastgjorte grupper taler man om en kationbytterharpiks eller en anionbytterharpiks.
- 20

- Ovenstående teknik er anvendelig ved adskillelsen af forskellige bestanddele i en blanding i opløsning; de ikke-ioniserede molekyler vil hurtigt blive elueret, de ioniserede molekyler vil i større eller mindre udstrækning blive tilbageholdt på grund af udskiftningen af ioner, som trænger ind i matrix.
- 25

- Den foreliggende opfindelse angår således fremstillingen af hidtil ukendte copolymere, der især er anvendelige som kationbytterharpikser.
- 30

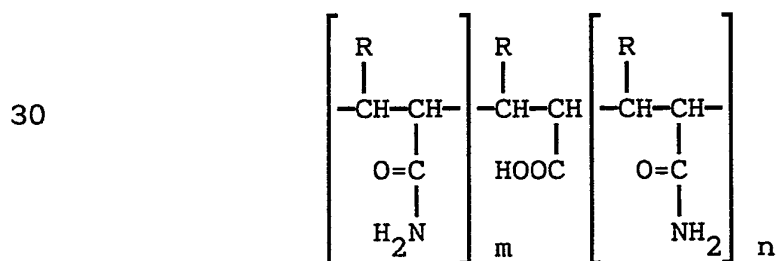
- Der foreligger op til nu et vist antal acrylharpikser eller methacrylharpikser indeholdende carboxylsyregrupper, som er anvendelige som bærestof ved kromatografering baseret på ionbytning (kationbyttere).
- 35

De opnås sædvanligvis ud fra ikke-funktionelle polymere, som fremstilles ved radikal-copolymerisation af acrylsyrederivater eller methacrylsyrederivater og et tværbindingsmiddel, som kan være enten methylen-bis-acrylamid (N,N,-diacrylyldiaminomethan, forkortet MBA), eller divinylbenzen.

Syregrupperne indføres derpå i de fleste tilfælde i matricen ved hjælp af kemiske modifikationer, som indtræder efter polymerisationen. Disse reaktioner er vanskelige at regulere, og de kan føre til en mangel på homogenitet med hensyn til funktionaliteten (hydrolyse af gitterstrukturen eller af tværbindingsmidlet).

Copolymerisatet af acrylamid og methylen-bis-acrylamid (der er kendt under handelsmærket "BIOGEL P" og fremstilles af firmaet "BIORAD Laboratories") fører således, efter delvis hydrolyse med natriumhydroxid, til det bærestof, der er kendt under handelsmærket "BIOGEL 70" (INMAN og DINTZIS, Biochemistry, 1969 8, 4074).

Det fremgår af disse harpiksers kemiske struktur (se nedenstående afbildning), at carboxylgruppen er tætliggende ved polymerkæden; som følge deraf vil steriske hindringer genere den gensidige reaktion mellem omfangsrige molekyler og syre-punktet.



R = H eller -CH₃

Den samme kritik kan formuleres over for andre harpikser, såsom dem der kendes under handelsmærket "TRISACRYL" og fremstilles af "Pharmindustrie" (fransk patentskrift nr. 2 378 808 og 2 482 112), der er opnået ved copolymerisation med en funktionsgruppebærende monomer.

Visse polyacrylamidgeler ("BIOGEL, DUOLITE") er kemisk ustabile i basisk medium på grund af hydrolysen af amidgrupper og carboxylgrupper, hvilket begrænser deres anvendelsesområde (INMAN og DINTZIS, som citeret).

Man bør ligeledes mærke sig de begrænsninger, som er indført ved den manglende mekaniske stabilitet af polyacrylamider indeholdende primære amidgrupper (SCHOUTEN, Affinity Chromatography: Bioselective Absorption on Inert Matrices, Wiley, 1981).

Man kan endelig nævne en harpiks omtalt af SHEPPARD et Coll. (J.C.S. Perkin Trans I, 1981, p. 529 og 538), som er opnået ved copolymerisation af N-acrylyldimethylamid, 1,2-N,N'-diacrylyldiaminoethan samt af methylesteren af N-acrylylsarcosin. Dette bærestof er imidlertid aldrig blevet hydrolyseret til en copolymer af N-acrylyldimethylamid, 1,2-N-diacrylyldiaminoethan og N-acrylylsarcosin for at blive anvendt som kationbytter. Dersom man gennemfører denne omdannelse og afprøver den således opnåede sure harpiks ved ionbytningskromatografi, konstaterer man meget betydelige volumenændringer som funktion af elueringsmidlets ionstyrke. Når man således arbejder med natriumchloridopløsninger med progressivt stigende koncentrationer på mellem 0 og 0,5 M, kan man bemærke en rumfangs-kontraktion større end 50% for det hydrolyserede SHEPPARD-bærestof; dette medfører et betydeligt dødt rumfang og derigennem en meget betydelig usikkerhed med hensyn til værdien for elueringsgradienten; herfra stammer den ømtålelige anvendelse af denne type bærestof ved kationbytterkromatografi.

10

15

25

30

35

Forbindelser (2): $R_1 = H$ $R_2 = -CH_3$
 RATCHFORD et Coll., J. Amer. Chem. Soc., 1947, 69, 1911.

$R_1 = H \qquad R_2 = -C_2H_5$

USA patentskrift nr. 2 683 741.

Forbindelser (3):

5

Man kender midler med formlen (3):

$n_2 = 1$ (handelsvare)

$n_2 = 2$

10 SHEPPARD et Coll., J. Chem. Soc. Perkin I, 1981, 529.

Endelig er i litteraturen omtalt funktionsgrubebærende midler med formlerne (4), (5) eller (6).

15 Forbindelser (4):

$R_1 = R_3 = H \qquad n_3 = 1, 2, 3 \text{ eller } 5.$

BROWN og Coll., C.R. Acad. Sci., 1978, 287c, 125.

20 $R_1 = CH_3, R_3 = H \qquad n_3 = 1, 2, 3 \text{ eller } 5$

BATZ og KOLDEHOFF, Makromol. Chem., 1976, 177, 683.

WINSTON og KIRCHNER Macromolécules 1978, 11, 89

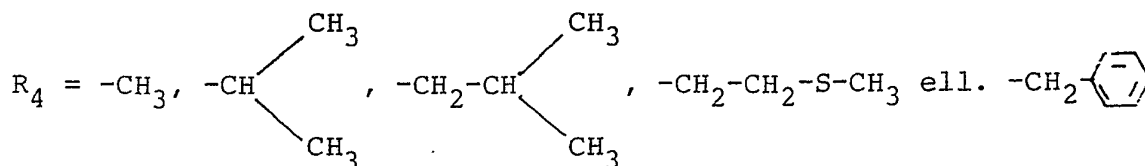
25 LOUPEK og Coll., Bioch. Biophys. Act. 1977, 481, 289.

Forbindelser (5):

$R_1 = H$

$R_3 = CH_3$

30



35

SAKOTA, KOINE NIPPON ZAGAKIN ZASHI 1967, 88 (10), 1087.

Copolymerisationen af disse to monomer-kategorier, I på den ene side og III på den anden side, der anvendes henholdsvis som matrix og som funktionelt middel, sammen med et tværbindingsmiddel af typen II, fører til opnåelsen af harpikser med fysiske egenskaber, der er velegnede i forbindelse med ionbytterkromatografi, især med hensyn til elueringshastigheden. Volumen-sammentrækningerne i afhængighed af det vandige elueringsmiddels ionstyrke er således aldrig større end 15%.

10

Eftersom polymerisationsbetingelserne er fuldstændig under kontrol, og udbytterne er høje, er det muligt at variere inden for vide rammer indholdet af funktionelle grupper. Til opnåelse heraf er det tilstrækkeligt at modificere den relative mængde N-acrylylaminosyre (eller -ester) (III) i forhold til de to andre monomere.

15

De acrylpolymere som fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er tredimensionale, tværbundne, statistiske copolymere, som i copolymeriseret form indeholder:

20

(a) 30 - 90 vægtprocent af en monomer svarende til N-acrylylpolymethylenimin med formlen (1) eller af en N-acrylyldialkylamid med formlen (2);

25

(b) 2 - 50 vægtprocent af en monomer svarende til en N,N'-diacrylyldiaminoalkan med formlen (3);

(c) 2 - 65 vægtprocent af en monomer svarende til en acrylylaminosyre eller -ester, som kan være racemisk med formlen (4) eller optisk aktiv med formlen (5) eller (6).

30

De omhandlede forbindelser indeholder fortrinsvis:

35

- 70 - 90% monomer I (som definerer matrix) svarende til formlerne (1) og (2);

- 3 - 10% af en monomer II (tværbindingsmiddel) svarende til formlen (3);
- 10 - 20% af en monomer III (middel til indføring af funktionelle grupper) svarende til formlerne (4), (5) og (6).

Man har ifølge opfindelsen været i stand til at fremstille bærestoffer indeholdende 0,2 - 10 milliækvivalenter carboxylsyregruppe pr. gram tørt bærestof (direkte eller efter forsåbning). Man har på den anden side bemærket, at der ikke forekommer nogen hydrolyse af estergruppen under polymerisationen.

De copolymere på syreform er kemisk stabile i klart sure eller basiske medier. Behandling igennem adskillige dage med saltsyreopløsninger eller med natriumhydroxidopløsninger på 0,5 og 1 M ved omgivelsernes temperatur har vist, at der ikke forekommer nogen hydrolyse, heller ikke en partiel hydrolyse.

Dette er knyttet til tilstedeværelsen på den monomere som danner matrix, af et forholdsvis pakket sekundært amid, som er meget mere stabilt end de primære aminer, der sædvanligvis anvendes. Dette tillader anvendelsen af de pågældende bærestoffer i et meget udvidet pH-område (1 til 14). De således opnåede harpikser udviser pH-værdier varierende fra 4,5 til 5,0.

Disse copolymere er termisk stabile; man har ved opvarmning til 90 °C igennem 12 timer og et vakuum på 0,1 mm kviksløv ikke konstateret nogen ændringer.

Endelig udviser disse bærestoffer en fremragende mekanisk stabilitet. Efter mekanisk omrøring gennem adskillige dage konstaterer man ikke dannelsen af smuld (ingen uklarhed i supernatantvæsken).

De tværbundne copolymere fremstilles ifølge opfindelsen ved gennem radikal-polymerisation af de monomere I, II og III.

- 5 Copolymerisationen kan især gennemføres enten som blok-polymerisation (i masse), i en blanding af ethylalkohol og vand eller dimethylformamid og vand i bufret medium (pH = 6,0), eller i suspension i systemer bestående af vand og petroleum eller af polyvinylalkohol og vand.
10 Igangsætningen gennemføres under anvendelse af:

- Koblingsforbindelser, såsom N,N,N',N'-tetramethylendi-amin (TMEDA) + alkalimetalsulfat,
- 15 - ammoniumpersulfat,
- eller azoisobutyronitril.

- Man anvender 3 til 10% af vægten af tværbindingsmiddel
20 samt en mængde funktionel gruppe-bærende middel, der er beregnet således, at man opnår 0,2 - 5 milliækvivalenter carboxylsyregruppe pr. gram tør harpiks (direkte eller efter forsæbning); resten op til 100 vægtprocent består af den monomere, der er beregnet til at udgøre matrix.

- 25 Når det drejer sig om blokpolymerisation, underkaster man den vandige opløsning indeholdende de forskellige monomere og initiatoren en polymerisation i homogen fase. Den transparente gel, der dannes, formales hurtigt, vaskes og
30 sigtes; denne fremgangsmåde giver et kvantitativt udbytte især af copolymere med homogen størrelse.

- Suspensionspolymerisation fører direkte til en harpiks i form af kugleformede partikler; disse vaskes omhyggeligt
35 og tørres. Deres størrelse er ligeledes meget homogen, idet deres diameter er på mellem 0,1 og 0,25 mm (mikroskopisk bestemmelse).

I dette tilfælde sætter man til den homogene opløsning indeholdende de forskellige monomere et polymerisations-initieringsmiddel og en emulgator.

5 Det hele hældes derpå ud i en organisk væskefase, der ikke er blandbar med vand, og som holdes under omrøring. Omrøringshastigheden reguleres således, at man opnår en emulsion med den ønskede dråbestørrelse. Polymerisationen startes derpå enten ved tilsætning af TMBA eller ved en
10 let opvarmning.

Blandingen omrøres derpå, indtil omsætningen er tilendebragt. De opnåede harpiksperler vaskes med et carbonhydrid-opløsningsmiddel, derpå med vand, med ethanol og
15 med ethylether. Harpiksen tørres til sidst ved omgivelsernes temperatur under et kraftigt vakuum.

Som anvendelig organisk væskefase kan man eksempelvis nævne vegetabiliske olier (sojaolie, jordnøddolie, solsikkeolie etc.) eller uorganiske olier (paraffinolie, siliconeolie).
20

Emulgatoren kan være et af de produkter, der er kendt under de kommercielle betegnelser "SPAN", "ARLACEL" eller
25 "TWEEN", anvendt i en koncentration på 0,1 til 4 volumenprocent.

De efterfølgende eksempler belyser de forskellige polymerisations-fremgangsmåder, såvel som de forskellige harpikser ifølge opfindelsen.
30

A. Blokcopolymerisation

EKSEMPEL 1

35

Copolymerisation af acrylylpyrrolidin (forkortet AP), ethylen-bis-acrylamid, der også kaldes 1,2-N,N'-di-

acrylyldiaminoethan (forkortet EBA) samt methylesteren af N-acrylylglycin (forkortelse A Gly O CH₃).

5 Man opløser 0,12 mol (15 g) AP, $7,8 \times 10^{-3}$ mol (1,31 g) EBA og $1,631 \times 10^{-2}$ mol (2,33 g) methylester af N-acrylylglycin i 34,2 ml vandfri ethanol. Den farveløse opløsning afgasses i 2 minutter med et ultralydapparat. Ved tilsætning af 18 ml vand bliver opløsningen opak. Man
10 afgasser yderligere 2 minutter og tilsætter 21,6 ml phosphatbuffer (pH 6,0). Afgasningen fortsættes, indtil man genvinder en klar opløsning.

Derpå tilsættes 3,16 g ammoniumpersulfat, og man lader det opløse under afgasning. Derpå tilsættes 0,53 ml TMEDA
15 (N,N,N',N'-tetramethyl-1,2-diaminoethan). Der fremkommer hurtigt en temperaturforhøjelse, og opløsningen sætter sig til en transparent gel. Man lader henstå en halv time. Efter formaling på en såkaldt "THOMAS"-mølle lader man dekantere i vand for at fjerne det ovenpå flydende
20 smuld. Man gentager denne behandling endnu en gang. Efter filtrering vaskes harpiksen successivt med vand, med en blanding i forholdet 50:50 vand og acetone, med acetone og til sidst med ether. Det således opnåede hvide pulver tørres i 12 timer ved 80 °C under 2 mm. På denne måde
25 isoleres 13,86 g af den hvide harpiks.

Udbytte 74,4%

For at omdanne ester-harpiks til en syre-harpiks anbringer man de ovenfor opnåede 13,86 g i 1300 ml molær
30 natriumhydroxid og omrører ved 25 °C i 2 timer. Efter filtrering vaskes harpiksen successivt med vand, med saltsyre (10%), med vand indtil neutralitet, med molær natriumhydroxid (500 ml), med vand indtil neutralitet,
35 med saltsyre (10%), og til sidst med vand indtil neutralitet. Man tørrer som ovenfor ved 80 °C under 2 mm kvik-sølv. Efter sigtning for at fjerne de partikler, hvis

diameter er større end 0,25 mm, opnår man 8,8 g hvidt pulver. pKa-værdien af OH-formen er 4,4.

EKSEMPEL 2

5

Copolymerisation af AP, EBA, methylester af N-acrylyl- β -alanin (forkortet A β Ala O CH₃).

10 Man anvender identiske polymerisationsbetingelser: Ud fra 15 g (0,12 mol) AP, 1,31 g ($7,8 \times 10^{-3}$ mol) EBA og 2,55 g (1,631 $\times 10^{-2}$ mol) methylester af N-acrylyl- β -alanin i 34,2 ml ethanol og med de samme mængder vand (18 ml), phosphatbuffer (pH 6,0) (21,6 ml), ammoniumpersulfat (3,16 g) og TMEDA (0,53 ml) isolerer man efter forsøbning
15 under identiske betingelser til dem, der er omtalt i det foregående afsnit, samt efter sigtning 9,43 g tør og hvid harpiks. pKa-værdien for OH-formen er 4,8.

EKSEMPEL 3

20

Copolymerisation af AP, EBA, methylester af N-acrylyl- ϵ -aminocaprønsyre (forkortelse A ϵ Cap. O CH₃).

25 Man anvender de samme polymerisationsbetingelser som i de forudgående eksempler, og man går ud fra følgende monomere: N-acrylyl-pyrrolidin (0,12 mol, 15 g), EBA (0,0078 mol, 1,31 g) og methylesteren af N-acrylyl- ϵ -aminocaprønsyre ($16,31 \times 10^{-3}$ mol, 3 g). På denne måde isolerer man efter fjernelse af smuldet 13 g (68%) hvid og tør har-
30 piks.

Hydrolyse under samme betingelser som ovenfor beskrevet fører efter sigtning til 10,6 g tør og hvid syre-harpiks. pKa-værdien af OH-formen er 5,1.

35

EKSEMPEL 4

Copolymerisation af AP, EBA, methylester af N-acrylyl- γ -aminosmørsyre (forkortelse A γ But O CH₃).

5 Ud fra 15 g (0,12 mol) AP, 1,31 g ($7,8 \times 10^{-3}$ mol) EBA og 2,76 g (0,01631 mol) methylester af N-acrylyl- γ -aminosmørsyre isolerer man 12 g tør ester-harpiks. Efter hydrolyse i 300 ml molær natriumhydroxid opnår man ved
10 sigtning 10,8 g af den tørre syre-harpiks. pKa-værdien af OH-formen er 5,0.

EKSEMPEL 5

15 Copolymerisation af AP, EBA, methylester af N-acrylyl-L-leucin (forkortelse A(L)Leu O CH₃).

De anvendte monomer-mængder er: 15 g N-acrylylpyrrolidin, 1,31 g EBA, 3,24 g methylester af N-acrylyl-L-leucin.

20 Den tørre ester-harpiks (10,05 g) hydrolyseres med 300 ml molær natriumhydroxid. Efter behandling som ovenfor anført og sigtning isolerer man 8,45 g syre-harpiks. pKa-værdien af OH-formen er 4,8.

25

EKSEMPEL 6

Copolymerisation af AP, EBA, methylester af N-acrylyl-L-valin (forkortelse A (L) Val O CH₃).

30

Man anvender 15 g N-acrylylpyrrolidin, 1,31 g EBA og 3 g methylester af N-acrylyl-L-valin. Polymerisationen og de sædvanlige behandlinger fører til 9,96 g tør ester-harpiks. Hydrolyse med 300 ml molær natriumhydroxid fører
35 under de samme betingelser som ovenfor anført til 7,64 g tør og hvid syre-harpiks. pKa-værdien af OH-formen er 5,0.

EKSEMPEL 7

Copolymerisation af AP, EBA, methylester af N-acrylyl-L-prolin (forkortelse A (L) Pro O CH₃).

- 5 Ud fra 15 g (0,12 mol) N-acrylylpyrrolidin, 1,31 g (0,0078 mol) EBA og 2,98 g methylester af N-acrylyl-L-prolin ($16,31 \times 10^{-3}$ mol) isolerer man 15,03 g (77,7%) tør harpiks. Hydrolyse i 300 ml molær natriumhydroxid fører efter sigtning til 11 g tør syre-harpiks. pKa-værdien af OH-formen er 4,7.
- 10

EKSEMPEL 8

- 15 Copolymerisation af acrylylmorpholin (forkortelse AM), EBA, methylester af N-acrylyl- ϵ -aminocaprønsyre).

- 5 g (0,0355 mol) N-acrylylmorpholin, 0,38 g (0,0023 mol) EBA og 0,995 g ($5,38 \times 10^{-3}$ mol) methylester af N-acrylyl- ϵ -aminocaprønsyre opløses i 10,4 ml ethanol. Efter afgasning med ultralydapparat tilsætter man successivt under de i første eksempel beskrevne betingelser 6 ml vand, 7,2 ml dinatriumphosphatbuffer med styrken 0,1 M, 1,05 g ammoniumpersulfat og 0,176 ml TMEDA.
- 20

- 25 Polymerisationen fører til 4,93 g (77,4%) hvid og tør harpiks. Hydrolyse fører efter sigtning til 2,35 g tør syre-harpiks. pKa-værdien for OH-formen er 5,1.

- 30 EKSEMPEL 9

Copolymerisation af AM, EBA, methylester af N-acrylyl- β -alanin.

- 35 Polymerisationen gennemføres under de i foregående afsnit beskrevne betingelser under anvendelse af som monomere 5 g (0,0355 mol) N-acrylylmorpholin, 0,38 g (0,0023 mol)

EBA og 0,844 g ($5,38 \times 10^{-3}$ mol) methylester af N-acrylyl- β -alanin. På denne måde isolerer man 4,24 g (68,2%) tør ester-harpiks, som efter hydrolyse og sigtning fører til 2,18 g tør syre-harpiks. pKa-værdien for OH-formen er 4,8.

EKSEMPEL 10

Copolymerisation af N,N-dimethylacrylamid (forkortelse ADM), EBA, methylester af N-acrylyl- ϵ -aminocaprønsyre.

4,653 g (0,047 mol) N,N-dimethylacrylamid, 0,51 g (0,003 mol) EBA og 0,955 g ($5,16 \times 10^{-3}$ mol) methylester af N-acrylyl- ϵ -aminocaprønsyreester opløses i 13,4 ml ethylalkohol. Efter afgangning ved hjælp af ultralydapparat tilsætter man successivt under de ovenfor anførte reaktionsbetingelser 7,05 ml vand, 8,46 ml dinatriumphosphatbufferopløsning med styrken 0,1 M, 1,237 g ammoniumper-sulfat og 0,2 ml TMEDA. Man opnår 4,64 g (73%) hvid ester-harpiks, som efter hydrolyse og sigtning fører til 2,44 g syre-harpiks. pKa-værdien af OH-formen er 5,0.

EKSEMPEL 11

Copolymerisation af ADM, EBA, methylester af N-acrylyl- β -alanin.

Under samme reaktionsbetingelser som i foregående afsnit gennemfører man polymerisationen ud fra 4,653 g (0,047 mol) N-dimethylacrylamid, 0,51 g (0,003 mol) EBA og 0,81 g ($5,16 \times 10^{-3}$ mol) methylester af N-acrylyl- β -alanin.

Der forekommer dannelse af 4,51 g (75,75%) af den tørre ester-harpiks, som efter hydrolyse og sigtning fører til 2,36 g af syre-harpiksen. pKa-værdien af OH-formen er 4,7.

EKSEMPEL 12

Copolymerisation af N,N-diethylacrylamid (forkortelse ADE), EBA, methylester af N-acrylyl- β -alanin.

5

Polymerisationen gennemføres ud fra 2 g N-diethylacrylamid, 0,17 g EBA og 0,32 g methylester af N-acrylyl- β -alanin i 4,5 ml ethanol, ved successive tilsætninger af 2,35 ml vand, 2,82 ml dinatriumphosphatbuffer med styrken 0,1 M, 0,42 g ammoniumpersulfat og 0,067 mol TMEDA. Efter hydrolyse og sigtning isolerer man 1,31 g tør syre-harpiks. pKa-værdien for OH-formen er 5,5.

10

EKSEMPEL 13

15

Copolymerisation af ADE, EBA, methylester af N-acrylyl- ϵ -aminocaprønsyre.

Man opnår ud fra 6 g N-diethylacrylamid, 0,5 g EBA og 1,12 g methylester af N-acrylyl- ϵ -aminocaprønsyre i 18,4 ml alkohol og ved successive tilsætninger af 7,05 ml vand, 8,46 ml dinatriumphosphatbuffer med styrken 0,1 M, 1,24 g ammoniumpersulfat og 0,2 ml TMEDA efter hydrolyse og sigtning 4,77 g tør harpiks. pKa-værdien af OH-formen er 5,42.

20

25

EKSEMPEL 14

Copolymerisation af N-acrylyl-hexamethylenimin, EBA, methylester af N-acrylyl- β -alanin.

30

Ud fra 6 g N-acrylyl-hexamethylenimin, 0,33 g EBA, 0,65 g methylester af N-acrylyl- β -alanin i 8,4 ml alkohol tilsætter man successivt under de sædvanlige reaktionsbetingelser 5,6 ml vand, 6,9 ml bufferopløsning, 1,0 g ammoniumpersulfat og 0,18 ml TMEDA.

35

EKSEMPEL 15

Copolymerisation af N-acrylyl-N'-methylnpiperazin, EBA, methylester af N-acrylyl- β -alanin.

5

Man behandler 3,0 g hydrogenchloridsalt af N-acrylyl-N'-methylnpiperazin, 0,16 g EBA og 0,3 g methylester af N-acrylyl- β -alanin i 4,2 ml ethanol successivt med 2,8 ml vand, 3,5 ml bufferopløsning, 0,5 g ammoniumpersulfat og 0,09 ml TMEDA.

10

I samtlige disse eksempler har man verificeret, at de opnåede estere ikke hydrolyseres under polymerisationens forløb, idet harpikserne ikke indeholder frie carboxylsyregrupper.

15

EKSEMPEL 16

Copolymerisation af AP, methylen-bis-acrylamid (MEBA), N-acrylyl- β -alanin.

20

Man opløser i 57 ml absolut ethanol 25 g (0,2 mol) AP, 2,15 g ($1,3 \times 10^{-2}$ mol) methylen-bis-acrylamid og 3,5 g ($2,4 \times 10^{-2}$ mol) N-acrylyl- β -alanin. Man tilsætter 30 ml vand og derpå 36 ml phosphatbuffer (pH 6,0). Den klare opløsning afgasses med ultralyd-apparat i 2 minutter. Derpå tilsætter man 5,27 g ammoniumpersulfat og derpå 0,88 ml TMEDA, man lader polymerisere i 30 minutter. Den transparente gel formales i et såkaldt "THOMAS"-apparat, vaskes med vand, med ethanol og derpå med ether. Harpiksen tørres under vakuum.

25

30

Udbytte 27,6 g.

Man sigter derpå harpiksen. Derved opnår man følgende størrelsesfordeling:

35

d > 0,25 mm ...	4,08 g
0,2 > d > 0,18	15,18 g
0,18 > d > 0,16	5,37 g
0,16 > d > 0,125	0,72 g

5

B) SuspensionscopolymerisationEKSEMPEL 17

10 Copolymerisation af N-methacrylmorpholin, EBA, methylester af N-acrylyl- β -alanin.

Man tilsætter under nitrogen en blanding af 18,6 g (0,12 mol) N-methacrylmorpholin, 1,31 g EBA ($7,8 \times 10^{-3}$ mol),
 15 2,55 g ($1,63 \times 10^{-2}$ mol) methylester af N-acrylyl- β -alanin og 100 mg azoisobutyronitril til en under omrøring
 værende opløsning af polyvinylalkohol (3 g) og vand (250 ml). Blandingen opvarmes 3 timer ved 70 °C. Den polymere
 20 vaskes med varmt vand, med ethanol, med acetone, med ethanol og med ether. Efter tørring under vakuum (2 mm kviksølv) ved 80 °C isolerer man 14,8 g kugler, hvis diameter er på mellem 0,1 og 0,2 mm.

EKSEMPEL 18

25

Copolymerisation af N-methacrylmorpholin, EBA, methylester af N-acrylyl- ϵ -aminocaprønsyre.

Ud fra en blanding af 18,6 g (0,12 mol) N-methacrylmorpholin, 1,31 g ($7,8 \times 10^{-3}$ mol) EBA, 3,24 g ($1,631 \times 10^{-2}$ mol) methylester af N-acrylyl- ϵ -aminocaprønsyre og 100 mg
 30 azoisobutyronitril, som er behandlet under de samme betingelser som ovenfor anført, isolerer man 12,6 g polymer.

35

EKSEMPEL 19

Copolymerisation af AP, EBA, methylester af N-acrylyl- β -alanin.

5
4 g ($3,2 \times 10^{-2}$ mol) AP, 8 g (5×10^{-2}) N-acrylyl- β -alanin-methylester og 1,2 g ($7,14 \times 10^{-3}$ mol) EBA opløses i 50 ml phosphatbuffer (KH_2PO_4 0,1 M, som er bragt til pH 6,0 med 1 N natriumhydroxid) og 50 ml ethanol. Til den
10 således opnåede klare opløsning sætter man 0,6 g ammoniumpersulfat og 0,3 ml "SPAN 85". Blandingen anbringes i 400 ml paraffinolie, hvorpå den omrøres, indtil man opnår dråber af den ønskede dimension. Under stadig omrøring fjernes oxygen fra mediet ved gennembobling med
15 nitrogen i løbet af 20 minutter. Derpå tilsætter man 0,92 ml TMEDA. Efter 30 minutters omrøring fortynder man med petroleumsether, filtrerer, vasker med petroleumsether, med vand, med en blanding (50-50) vand og acetone, med acetone og derpå med ether.

20 På denne måde opnår man polymerkugler, der er fuldstændig runde, og hvor man kan variere deres størrelse mellem 0,05 og 0,5 mm ved at regulere omdrejningshastigheden. Udbyttet er i nærheden af 90%.

25 Reaktionen kan ligeledes gennemføres i vand i stedet for phosphatbuffer.

30 Man opnår let natriumsaltene af syre-harpikserne ved at vaske de polymere med 0,5 molære natriumhydroxidopløsninger. Man anvender 30 ml natriumhydroxidopløsning pr. ml opkvaldet syre-harpiks. Overskud af natriumhydroxid fjernes ved vask med vand indtil neutralitet.

35 De polymeres opsvulmningsgrad måles i vand og i forskellige organiske opløsningsmidler. Disse målinger blev gennemført på formalede harpikser. (Tabellerne 1 og 2).

Rumfang af 1 g harpiks i ml

Tabel 1

Harpiks	AP + EBA	AP + EBA	AP + EBA	AP + EBA	AP + EBA	AP + EBA	AP + EBA	AP + EBA	AP + EBA
Medium	A.Gly.OH:AClyONa	A.Gly.OH:AClyONa	A.Gly.OH:AClyONa	A.Gly.OH:AClyONa	A.Gly.OH:AClyONa	A.Gly.OH:AClyONa	A.Gly.OH:AClyONa	A.Gly.OH:AClyONa	A.Gly.OH:AClyONa
Tørt	1,9 : 2,2	2,2 : 2,1	2,2 : 1,6	1,8 : 1,5	1,9 : 2,8	3,0 : 2,4	2,8 : 2,0		
Vand	11,7 : 22 (x 6) : (x 10)	11,0 : 26,2 (x 5) : (x 12,5)	8,8 : 10,5 (x 4) : (x 10,5)	9,2 : 12,0 (x 5) : (x 2)	7,8 : 23,8 (x 4) : (x 2,5)	15,0 : 21,4 (x 6) : (x 9)	28 : 26 (x 10) : (x 13)		
CH ₃ OH	10,3 : 19,8 (x 5,4) : (x 9)	12,1 : 20,0 (x 5,5) : (x 9,5)	8,8 : 10,5 (x 4) : (x 10,5)	9,1 : 12,0 (x 5,2) : (x 8)	11,6 : 22,4 (x 6) : (x 8)	15,0 : 16,8 (x 5) : (x 7)	22,4 : 16 (x 8) : (x 8)		
C ₂ H ₅ OH	12,0 : 12,1 (x 6,3) : (x 5,5)	14,3 : 18,4 (x 6,5) : (x 9)	12,1 : 9,5 (x 5,5) : (x 9,5)	13,0 : 13,5 (x 7,2) : (x 9)	10,7 : 22,4 (x 5,5) : (x 8)	18,0 : 19,2 (x 6) : (x 8)	22,4 : 14 (x 8) : (x 7)		
CH ₂ Cl ₂	13,3 : (x 7,0)	11,0 : (x 5)	11 : 9,0 (x 5) : (x 9)	13,5 : (x 7,5)	11,6 : (x 6)	15,0 : (x 5)	22,4 : (x 8)		
CHCl ₃	14,2 : (x 7,5)	12,1 : (x 5,5)	12,1 : 6,0 (x 5,5) : (x 6)	11,7 : (x 6,5)	11,6 : (x 6)	12,0 : (x 4)	19,6 : (x 7)		
C ₅ H ₅ N	15,2 : (x 8,0)	18,7 : (x 8,5)	11 : (x 5)	19,8 : (x 11)	19,1 : (x 10)	30,0 : (x 10)	16,8 : (x 6)		
DMS	10,8 : (x 5,7)	9,9 : (x 4,5)	8,8 : (x 4)	8,5 : (x 4,7)	7,8 : (x 4)	12,0 : (x 4)	14 : (x 5)		

* Forkortelsen A Gly OH svarer til N-acrylylglycin. Den er på samme måde for alle de andre aminosyrer, hvis forkortelse indeholder bestanddelen "OH".

** Forkortelsen A Gly ONa svarer til et natriumsalt af N-acrylylglycin. Den er tilsvarende for alle de andre aminosyre-derivater, hvis forkortelse indeholder bestanddelen "ONa".

*** Det tal, med hvilket den tørre harpiks' specifikke volumen multipliceres.

Tabel 2 Rumfang af 1 g harpiks i ml

Harpiks	ADM + EBA	ADM + EBA A.βAla.OH	AM + EBA A.εcap.OH	AM + EBA A.βAla.OH	AM + EBA A.βAla.DNa	ADE + EBA A.εcap.OH	ADE + EBA A.βAla.OH	ADE + EBA A.βAla.DNa
Medium	A.εcap.OH	A.βAla.OH	A.βAla.DNa	A.εcap.OH	A.βAla.OH	A.βAla.DNa	A.εcap.OH	A.βAla.OH
Tørt	3,1 (x 5)	3,5 (x 16)	2,9 (x 7)	4,5 (x 4)	7,1 (x 11)	3,2 (x 16)	4,2 (x 4)	4,2 (x 13)
Vand	15,5 (x 5)	56 (x 16)	20,3 (x 7)	16 (x 4)	76 (x 11)	51,2 (x 16)	46,2 (x 7)	54,6 (x 13)
CH ₃ OH	24,6 (x 3)	26,25 (x 7,5)	23,2 (x 8)	13,5 (x 3)	56,8 (x 8)	17,6 (x 5,5)	26,4 (x 4)	42 (x 10)
C ₂ H ₅ OH	21,7 (x 7)	21 (x 6)	26,1 (x 9)	13,5 (x 3)	35,5 (x 5)	8,0 (x 2,5)	11,2 (x 3)	25,2 (x 6)
CH ₂ Cl ₂	27,9 (x 9)		29 (x 10)	27 (x 6)		20,8 (x 8)	50,4 (x 12)	33 (x 11)
CHCl ₃	24,8 (x 8)		26,1 (x 9)	27 (x 6)		26 (x 10)	46,2 (x 11)	30 (x 10)
C ₅ H ₅ N	31, (x 10)		26,1 (x 9)	27 (x 6)		28,6 (x 11)	16,8 (x 4)	30 (x 10)
DME	27,9 (x 9)		14,5 (x 5)	40,5 (x 9)		31,2 (x 12)	25,2 (x 6)	15 (x 5)

De således fremstillede polyacrylamider afprøves som kationbyttere ved kationbytnings-kromatografi på 3 substrater:

- 5 - to peptidblandinger,
 - en blanding af basiske proteiner (histoner stammende fra kalvens thymus).

10 Peptidblandingerne er sammensat af 2 peptider med samme sekvens, som udelukkende adskiller sig ved ladningen:

Ac Gly Lys Ala Leu Arg Val O Me	2 ladninger > 0
Ac Gly Lys Ala Leu Arg Val OH	1 ladning > 0

15 Ac Gly Lys Leu Arg Val O Me	2 ladninger > 0
Ac Gly Lys Leu Arg Val OH	1 ladning > 0

20 Adskillelserne blev gennemført med en natriumchlorid-gradient ved pH på konstant værdi (pH 5,0, 10^{-2} M natriumacetat), idet man anvendte sigtede harpikser svarende til følgende copolymere:

- 25 - AP + MEBA + A β Ala O Na
 - AP + EBA + A ϵ Cap O Na
 - AP + EBA + A (L) Pro O Na
 - AP + EBA + A Gly O Na

30 Partikelstørrelsen er på mellem 0,1 og 0,25 mm. Carboxylsyregruppeladningen er i nærheden af 0,8 milliækvivalenter/g på den tørre harpiks. De efterfølgende kromatogrammer på figurerne 1 og 2 viser en meget god adskillelse mellem komponenterne i de analyserede blandinger.

35 Histonerne fra kalvens thymus blev ligeledes kromatograferet på en natriumchloridgradient (0 - 2 M) (fig. 3). Man iagttager en opløsning i de forskellige komponenter med en meget kort analysetid (5 timer), en hurtig strøm-

ningshastighed (80 ml/time) og en buffer (NaCl), der er bedre egnet til analyse ved ultraviolet lys.

5 For en tilsvarende opløsning gennemfører man kromatograferinger ved ionbytning af histoner på gradienter af omhyggeligt udarbejdede former for guanidiniumchlorid med meget langsomme strømningshastigheder og med analysetider, som kan variere mellem 12 timer og adskillige dage. (J. BONNER et Coll., "Method in Enzymology", bind 126, 10 GROSSMAN L. og MALDAVE K. redaktører, Academic Press, New York, 1968).

Harpikserne ifølge opfindelsen er således forenelige med proteiner og tillader en let gennemførelse af gode adskillelser. Det skal yderligere bemærkes, at de her beskrevne bærestoffer tillader meget høje strømningshastigheder. Det er muligt at bearbejde op til 300 ml/time med en søjle på 1 x 25 cm.

20

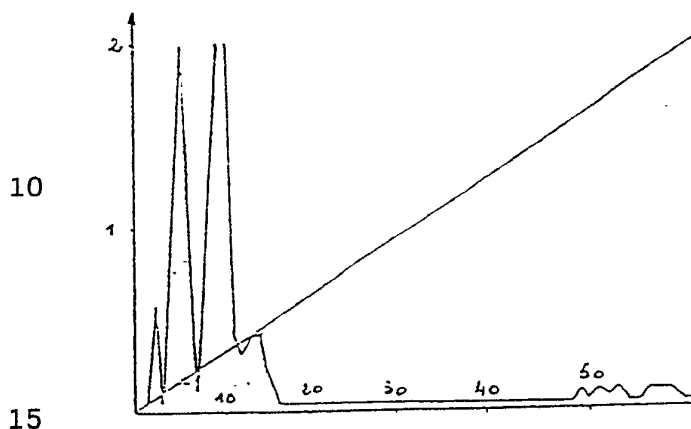
25

30

35

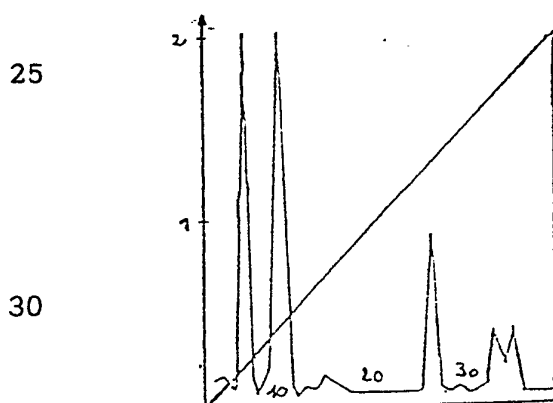
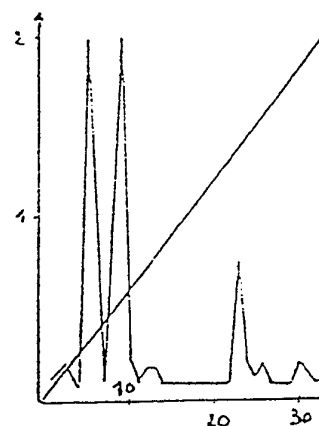
På disse fire delfigurer $\lambda = 210$ nm, er elueringsopløsningen 0,2 M med hensyn til NaCl, tallene, der er vist på abscissen, angiver numrene på opsamlede fraktioner, og cifrene på ordinaten angiver den optiske tæthed i fuld skala.

5 inds. s. 22 øv.



kromatografering af:
Ac Gly Lys Ala Leu
Arg Val OMI + Ac Gly
Lys Ala Leu Arg Val
OH på en kolonne af
acrylylpyrrolidin,
methylen-bis-acryl-
amid, acrylyl- β -ala-
nin. Strømningshas-
tighed 89 ml/h. Frak-
tioner 15 min.

20 kromatografering af:
Ac Gly Lys Leu Arg Val OMI
+ Ac Gly Lys Leu Arg Val
OH på en kolonne af acryl-
ylpyrrolidin, ethylen-bis-
acrylamid og acrylyl-b-
alanin. Strømningshastighed
80 ml/h. Fraktioner 15 min.

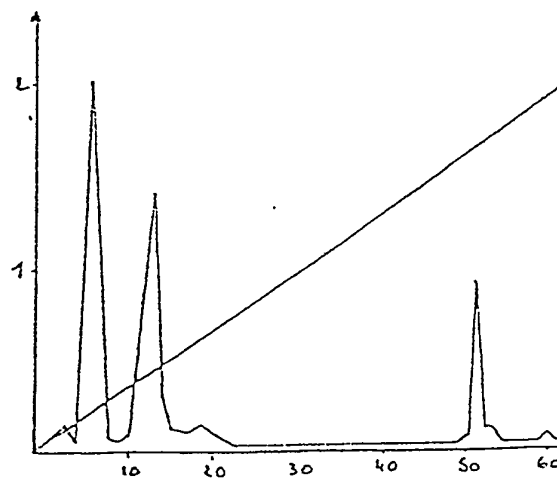


Kromatografering af:
Ac Gly Lys Leu Arg
Val OMI + Ac Gly Lys
Leu Arg Val OH på en
kolonne af acrylyl-
pyrrolidin, methylen-
bis-acrylamid og
acrylyl- ϵ -aminoca-
pronsyre. Strømnings-
hastighed 80 ml/h.
Fraktioner 15 min.

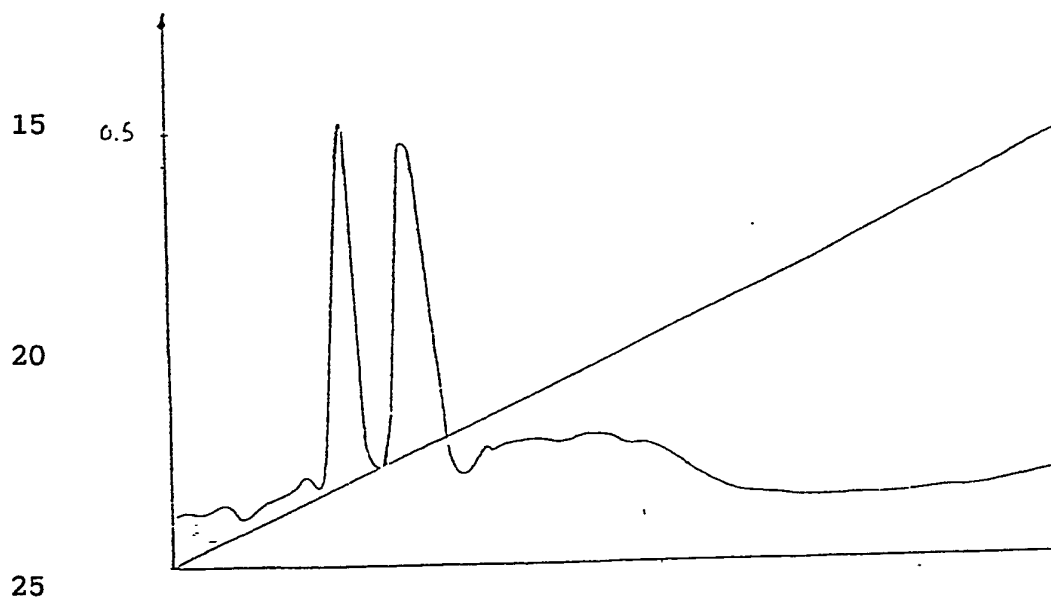
35

5 kromatografering af:
 Ac Gly Lys Leu Arg Val OMe
 + Ac Gly Lys Leu Arg Val OH
 på en kolonne af acrylyl-
 pyrrolidin, ethylen-bis-
 acrylamid og acrylylprolin.
 Strømningshastighed 50 ml/h.
 Fraktioner 15 min.

FIGUR 1



10



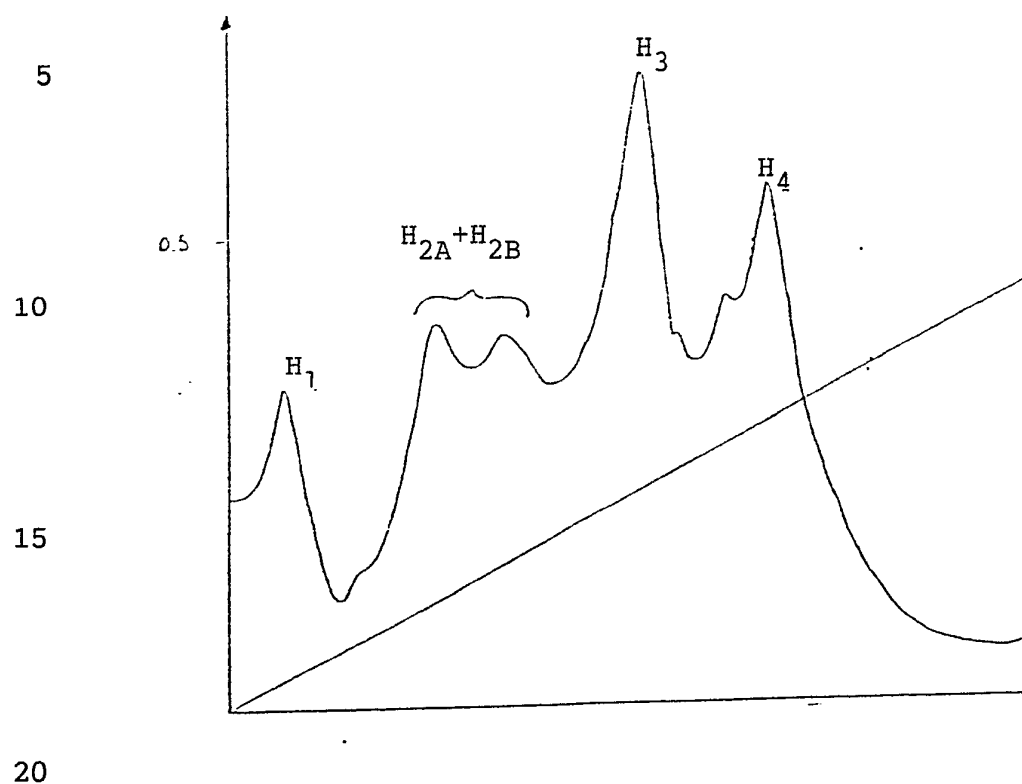
25

FIGUR 2

30 Kromatografering af: Ac Gly Lys Leu Arg Val OMe + Ac Gly
 Lys Leu Arg Val OH på en kolonne af acrylylpyrrolidin,
 ethylen-bis-acrylamid og acrylylglycin. Strømningshastig-
 hed 80 ml/h. - Varighed 8 timer. $\lambda = 220$ nm.

Som abscisse er anført fraktionerne og som ordinat den
 optiske tæthed i fuld målestok. Elueringsopløsningen er
 0,2 M med hensyn til NaCl.

35



FIGUR 3

Kromatografering af en blanding af histoner på en kolonne af acrylylpyrrolidin, ethylen-bis-acrylamid og acrylyl- β -alanin. Strømningshastighed 80 ml/h. - Varighed 5 timer. $\lambda = 210$ nm.

Som abscisse er anført fraktioner og som ordinat den optiske tæthed i fuld målestok. Elueringsopløsningen er 0,2 M med hensyn til NaCl.

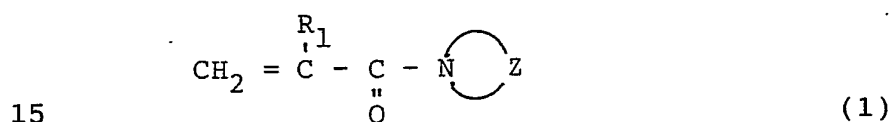
30

35

P a t e n t k r a v :

5 Fremgangsmåde til fremstilling af acryl-copolymere som
 kan anvendes som kationbyttere, k e n d e t e g n e t
 ved, at polymeriseringen gennemføres med følgende monome-
 re:

10 I) 30 - 90 vægtprocent af en første monomer (I) som
 understøttelsesgitter, hvilken monomer består af en N-
 acrylpolymethylenimin med formlen:

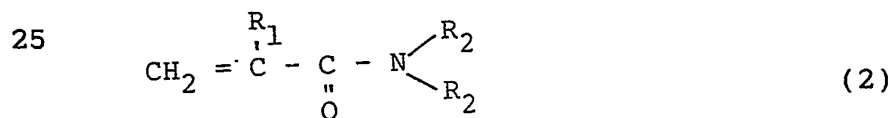


hvor $\text{R}_1 = \text{H}$ eller $-\text{CH}_3$

20 $\text{Z} = -(\text{CH}_2)_{n_1}-$ med $n_1 = 4, 5$ eller 6 , eller

$-(\text{CH}_2)_2 - \text{X} - (\text{CH}_2)_2-$ med $\text{X} = \text{O}$ eller $\text{N}-\text{CH}_3$

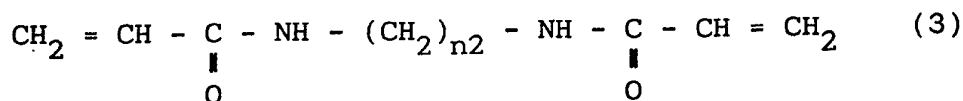
eller et N-acryldialkylamid med formlen:



30 hvor $\text{R}_1 = -\text{CH}_3$ eller $-\text{C}_2\text{H}_5$, og
 $\text{R}_2 = -\text{CH}_3$ eller $-\text{C}_2\text{H}_5$;

II) 2 - 50 vægtprocent af en anden monomer (II) som tvær-
 bindingsmiddel, hvilken monomer består af en N,N'-bis-
 acryl-diaminoalkan med formlen:

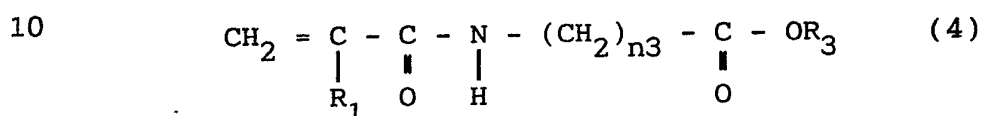
35



hvor $n_2 = 1$ eller 2 ;

5

III) 2 - 65 vægtprocent af en tredje monomer (III) som funktionsbærende middel, hvilken monomer svarer til racemisk N-acrylaminosyre eller -ester med formlen:



hvor $\text{R}_1 = \text{H}$ eller $-\text{CH}_3$

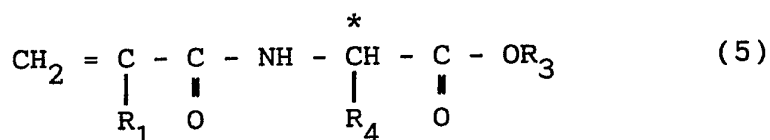
15

$\text{R}_3 = \text{H}$ eller $-\text{CH}_3$

$n_3 = 1, 2, 3$ eller 5 ,

eller en asymmetrisk N-acrylaminosyre eller -ester tilhørende L-serien med formlen:

20



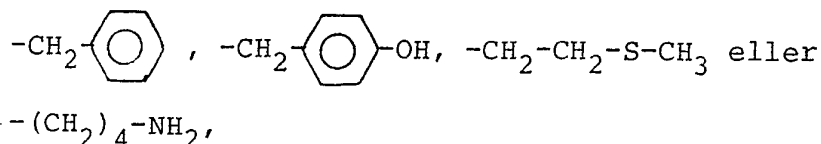
25

hvor $\text{R}_1 = \text{H}$ eller $-\text{CH}_3$

R_3 har den ovenfor anførte betydning

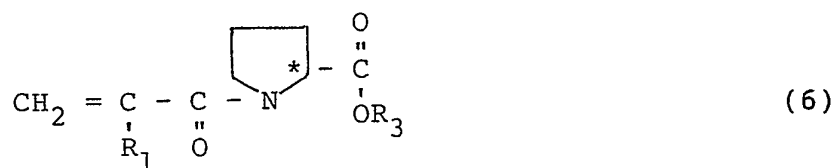
$\text{R}_4 = -\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=(\text{CH}_3)_2$,

30



eller N-acrylyl(L)prolin eller dennes methylester med formlen:

35



5 hvori $\text{R}_1 = \text{H}$ eller $-\text{CH}_3$, idet R_3 har den ovenfor anførte
betydning, som blandes i nærvær af en radikalpolymerisa-
tionsinitiator, idet man som initiator anvender
 N,N,N',N' -tetramethylendiamin (TMEDA) plus alkalisk per-
sulfat, ammoniumpersulfat eller azoisobutyronitril, idet
10 polymerisationen gennemføres i vandig opløsning ved en
temperatur på $0-50^\circ\text{C}$, fortrinsvis i masse eller i emul-
sion i en organisk væskefase, som ikke er blandbar med
vand.

15

20

25

30

35