



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 90110310.1

[51]Int.Cl⁶

B01D 15/08

[45]授权公告日 1996 年 1 月 10 日

[24]颁证日 95.9.24

[21]申请号 90110310.1

[22]申请日 90.12.7

[30]优先权

[32]89.12.7 [33]JP[31]320141/89

[73]专利权人 黛丝化学工业株式会社

地址 日本大阪

共同专利权人 田辺制药株式会社

[72]发明人 永松信二 田中芳和 柴田敬

B01J 20/22

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

C02F 1/28 C07K 1/16

代理人 黄革生

权利要求书 2 页 说明书 39 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 分离方法和分离剂

[57]摘要

一种分离方法，包括用多孔吸附剂与含有二氧磷基多羟基经合物（例如，热原质）的溶液接触，其特征在于上述吸附剂具有带脂肪族含氮碱性官能团，链长 2-50 的官能链，并键合到基材上。上述吸附剂孔径从 1nm 到 20 μ m。还分开了上述分离方法上使用的分离剂。根据本发明，含在高离子强度的药物溶液中的二氧磷基多羟基化合物，容易以高去除率分离，因而药物可有效地回收。

权 利 要 求 书

1. 一种分离二氧磷基多羟基化合物的方法, 包括用多孔吸附剂与含有二氧磷基多羟基化合物的溶液接触, 其中所说的吸附剂含有链长为 2—50 的脂肪族伯胺和仲胺型官能团并键合到基材上, 上述吸附剂的孔径从 1nm — $20\mu\text{m}$, 上述溶液的离子强度为 0.03—0.5。

2. 按权利要求 1 的分离方法, 其特征就在于上述多孔吸附剂是具有孔径从 10nm 到 $5\mu\text{m}$ 的硬凝胶颗粒的形式。

3. 按权利要求 1 的分离方法, 其特征就在于多孔吸附剂是微滤膜或超滤膜形式。

4. 按权利要求 1 的分离方法, 其特征就在于上述基材是具有孔径从 50nm 到 $1\mu\text{m}$ 的多羟基聚合物。

5. 一种以多孔吸附分离剂形式存在的吸附二氧磷基多羟基化合物的分离剂, 该分离剂包括一种基材和一种与基材键合的官能链, 孔径从 1nm 到 $20\mu\text{m}$, 其中官能链带有脂肪族伯或仲胺型官能链。

6. 按照权利要求 5 的分离剂, 其特征就在于官能链含有 1—12 碳原子的二氨基亚烷基部分。

7. 按照权利要求 5 的分离剂, 其特征就在于上述基材是多糖类

或聚乙烯醇聚合物,羟基取代的丙烯中间链直接键合到基材的氧原子上。

8. 按照权利要求 5 的分离剂,其特征在于上述的官能链有一个键合到二氨基亚烷基部分上的氨基酸残基。

说 明 书

分离方法和分离剂

本发明涉及一种从液体中分离二氧磷基多羟基化合物(*PPS*),如有毒的热原质(*Pyrogen*)的方法,其中所述液体如注射液、渗析液和灌输液以及用于现场的稀释水和洗涤水直接导入生物体内。本发明的方法可用于同样用途的有机溶液,也可吸附基因技术领域的 *DNA* 和 *RNA*,也可用来吸附细菌和动物细胞中的 *PPS*。

PPS 定义为一种由磷酸部分和多羟基化合物部分组成的化合物,如 *LPS*(脂多糖),类脂 *A*,核酸和甘油磷酸酯化合物。多数的此类多羟基化合物具有生理活性。即使数量很少,它们也可用本发明的方法除去。

本发明还进一步涉及一种从液体中分离 *PPS* 的试剂。

吸附剂可用于分离包含在液体中的物质。在工业上所需的分离技术的难易程度取决于各种因素,如系统中含有的物质种类,分离能力和生产量。去除热原质是分离技术的一个实例,它要求的难度特别高。类似的分离技术还包括去除核酸和其它的 *PPS*。

从中去除热原质的液体实例包括那些直接进入生物体而不用通过消化道的液体,如注射、营养物灌输液和渗析用的液体药物,以

及这些药物的稀释水，用来处理上述液体的设备以及用于上述液体容器的洗涤水。

热原质为一种即使其量很少也可使恒温生物的体温发生不正常升高的物质。当热原质作为一种静脉注射污染物进入血液中时，将引起与药物作用无关的严重高烧。据信，当上述作用严重时，将引起发烧并伴有恶寒战栗，甚至会休克死亡。细菌物质、炎性物质、植物多糖、血型物等是已知的热原质。在它们当中，细菌物质大多引起发烧，被称为细菌毒素，它广义地分为外毒素和内毒素。在上述的毒素中，内毒素如所谓的 O 抗原体主要由革兰氏阴性细菌的细胞壁脂多糖(LSP)构成，具有强烈的发热特性，即使通过热处理也不会失活。万一内毒素偶然进入一种液体中，要除去它就非常困难。因此，热原质通常等同于内毒素或 LPS。

化学分解，膜分离，凝胶过滤，吸附等是已知的除去热原质的方法。由于待处理物质对分解器的抵抗以及由分解器和分解产品等的污染而引起的问题，化学分解的可应用性受到限制。

膜分离和凝胶过滤均被看作是利用热原质和待处理物质之间尺寸大小的差异的分离方法。关于热原质的大小，还要考虑其种类，LPS 之间的联系以及类脂 A 的存在。特别是，即使当物质被限制为在各种热原质中最重要物质 LPS 时，根据作为 LPS 来源的细菌种类的不同，发热作用中所涉及的脂肪链部分(即类脂 A)以及与其链合的多糖的种类也各不相同。具有分子量约 5000 的

LPS 联合形成大胶束的结构,分子量可高达几百万,而具有分子量约 2000 的类脂 A 本身是热原质。

用膜分离的方法来脱除热原质采用超滤膜(**UF** 膜)和反渗透膜(**RO** 膜)。还有人提出了一种包括一组膜的设备作为使用膜的热原质除去技术,而使热原质含量降低。日本专利公开 No. 207517/1982 和美国专利 4261834(*de Winter*)揭示了包括上述设备的实例。当待处理物质是仅由水和低分子量药物组成的水溶液时,可以选用待处理物质可透过而热原质和含热原质的细胞不能透过的分离膜。然而,当待处理物质的分子量大时,则不容易选取这样的膜,以使待处理物以好的回收率透过同时阻止热原质(尤其是分子量较低的热原质)透过,从而达到希望的低的热原质浓度。

例如,当以 10Eu/ng 的标准液,5Eu(内毒素单位)/Kg 的热值,10ml/kg 的剂量对兔子给药时,预定浓度是 0.5Eu/ml 或 50pg/ml 或更低。

成功地选择一种能从含有高分子量物质(如蛋白质)的液体中去除热原质的膜是比较困难的,这就使得在保持高的药物回收率的同时去除热原质使之达到令人满意的低含量成为不可能。通常,分子量相近的物质的分离不可能通过膜过滤来实现,其膜也不适于除去如热原质等具有宽的分子量分布的物质。

人们知道,活性碳和离子交换树脂具有吸附和除去热原质的能力。此外,一种多孔分离膜的材料如聚烯烃通过疏水结合力也具

有吸附热原质的能力。然而，上述材料不能从含药物的液体中选择性地吸附热原质而使含量降至非常低，从而不能作为能令人满意的吸附剂以用于获得热原质已充分除去的药物溶液。

业已知道一些其它的具有吸附热原质能力的材料。例如，日本专利公开 No. 112888/1984 揭示了依靠含有氨基的纤维除去革兰氏阴性细菌和其细胞壁成分的方法。可以知道，在上述公开的说明书中描述的实例可达到的最低热原质含量是 0.014mg/ml ，即 14000ng （毫微克），在处理含 0.1mg/ml 的脂多糖的水溶液时的去除率为 86%。

在美国专利 4,639,513(Houe 等)中可用来除去大分子蛋白质的离子色谱法被用来作为提纯 IgG(一种血浆成分)的方法，而亲合色谱法被用来除去酶。该专利进一步描述热原质的去除并暗示 LPS 可用正电荷离子交换基质(Matrix)除去。虽然该专利没有关于热原质的去除的描述中对正电荷离子交换基质的结构给出说明，但是在上述关于离子交换色谱法的描述中暗示它可为一种接枝共聚物，如纤维素—GMA—DEAEMA(异丁烯酸二乙氨乙酯)。进而公开了一种通过用 1,2—乙二胺胺化纤维素—GMA 基质(参见上专利图 9)得到的材料作为用于色谱的固定床，该床具有的结构不是类似于在关于热原质的去除的描述中的结构，而是类似于在关于亲合色谱法的描述中的结构。

美国专利 4,663,163(Houe 等)描述了一种物质，该物质由一

种合成聚合物与多糖类经共价键键合得到，而上述聚合物是通过一种带有环氧基和乙烯基的单体与不饱和酸的氮烷基酯进行自由基共聚得到的。使用这些物质在色谱法中作载体，这与美国专利 4639513 中所述的纤维素—GMA—DEAEMA 接枝共聚物基本一样。

在美国专利 4,491,660 (Gendrich 等) 中记载了通过异脲，酰胺键与不溶性聚合物，烷基，苯系环式化合物相连接的基质，它显示与内毒素相结合的能力。可认为此种基质对于热原质的疏水结合性相当好，在此结构中含有由氨基，脒基等含氮官能团取代的苯系环式化合物。

近年来，能特定地吸附一种热原质且可用于除去混合在含药物液体中的热原质的亲合吸附剂已具有商业可用性。这种类型吸附剂的代表例包括在日本专利公开号 183712/1982 中公开的带有与其键合的含氮的环状化合物的多糖凝胶。该凝胶在技术上评价很高，因为它们具有选择吸附和从含有高分子量药物如蛋白质的水溶液中除去各种大范围分子量的热原质的能力。在上述专利公开说明书中给出的热原质含量可达到 $0.1\text{ng}(\text{毫微克})/\text{ml}(0.5\text{Eu}/\text{ml})$ 或更低。

热原质吸附剂进一步要求能处理高离子强度的溶液。在离子交换色谱法中，随着洗脱剂离子强度的增加而提高洗脱能力。在离子键参与吸附的吸附中，从上述的事实中可以明显看出，随着溶液

离子强度升高，通常吸附力趋向于降低。因此，上述与含氮环状化合物键合的热原质吸附剂去除热原质的能力随着药液离子强度提高而降低(参见 *Biotech. Appl. biochem.* , 10, 147)。相应地，从高离子强度溶液中充分地除去各种热原质将给对高深度药物溶液的处理带来新的可能。

众所周知，抗菌素、多粘菌素均使热原质减活。然而，这些物质将会产生严重的副作用(肾中毒)，从而限制了它们在生物体中的应用。为了解决这个问题，日本专利公开 No. 16389/1989 提出了一种热原质吸附剂，其中多粘菌素被固定在不溶性载体上。

本发明的目的是提供一种非常安全的吸附分离剂，它具有极好的从高离子强度的溶液中去除二氧磷基多羟基化合物如热原质的能力且能承受高流速下的压力。

【解决问题的方法】

按照下列方法可实现上述目的。即，本发明提出一种分离方法，该方法包括用多孔吸附剂与含二氧磷基多羟基化合物的溶液进行接触，其中，所说的吸附剂具有链长 2—50 的脂肪族胺型的官能链，并与基材相键合。上述吸附剂孔径范围从 1nm ~ $20\mu\text{m}$ 。最好使用官能团是只键合在饱和碳原子上的伯或仲氨基的吸附剂。

本发明还提供一种分离剂，该分离剂用来以多孔吸附分离剂的形式吸附二氧磷基多羟基化合物。上述分离剂包括基材和与其键合的官能链。其孔径从 1nm ~ $20\mu\text{m}$ ，其中所说的官能链为脂肪族

伯或仲胺官能链。

本发明采用的典型的二氧磷基多羟基化合物溶液的实例是含热原质的药物水溶液，其离子强度 $0.03 \sim 0.5$ ，特别是离子强度类似于生理盐水的溶液。然而，本发明可适用于离子强度范围更宽，如从 $0 \sim 5$ 的溶液。进而，本发明可适用于低的离子强度范围（如没有离子的药物溶液），普通的含有含氮环状化合物的吸附剂也是非常适用的。

本发明吸附剂由链长 $2-50$ 的脂肪族胺型官能链与多孔基材结合而成。脂肪族胺型官能链可与杂环官能链、芳香族胺型官能链、肽型官能链等不同。而多孔基材并不是孔径意义上的多孔质，并可与通常的纤维或有孔颗粒区别开来。这种官能链，不是高聚物，而是具有限定的链长，其中含有的碱性含氮官能团仅与脂肪族碳原子结合。官能链实质上为链式化合物，含氮杂环化合物或芳香族胺等，但本质上由官能氮起作用的部分具有环状结构的化合物除外。

多孔基材的优选例是多羟基聚合物。活性部分如羟基基团将官能链键合到基材上是有用的。例如，具有羟基取代的丙烯中间链的官能链直接键合到基材的氧原子上，并且通过表氯醇与基材的羟基基团反应进而再与亚烷基二胺反应得到二氨基亚烷基部分。官能链的脂肪族氮原子可进而结合到氨基酸的残基上。

本发明的典型特征在于二氧磷基多羟基化合物可从离子强度

类似于生理盐水(如 $\mu=0.07\sim0.3$)的溶液中选择性地吸附。这里使用的术语“选择性地”意思是指在含有酸性基材如蛋白质的药物中可基本除去热原质,而药物可以很高的回收率回收。本发明的分离剂可在很宽的 pH 值范围内显示其选择吸附作用,例如,在离子强度 0.1 时,适用的 pH 范围从 3~11。

在本发明中要除去的二氧磷基多羟基化合物的典型实例是热原质,这将在下文详细叙述。

本发明的分离剂常被用作吸附/保留(*retention*)分离剂,它与所引用的参考文献中的现有技术所涉及的色谱技术是不同的。

多孔吸附剂的典型实例是坚硬的凝胶颗粒,它具有孔径从 $10nm\sim5\mu m$,优选 $50nm\sim1\mu m$,这种硬凝胶的柱子具有较高耐压能力(如 $1kg/cm^2\cdot G$ 或更高),它允许待处理液在高流量下渗透。另外,多孔吸附剂也可是微过滤膜(MF)或超滤膜(UF)的形式。

【物理形状和基材】

多孔吸附剂为具有一定孔数的网状结构,由于具有高耐压性,当流体流过时不会破裂,它的适当实例包括硬凝胶和微滤膜。

本发明分离剂包括一种物质,在该物质中,含只与脂肪族碳原子键合的碱性氮官能团并由 3—50 个原子构成的官能链键合到多孔基材上形成基体骨架。因而,吸附剂的物理形状常常与在实际中的基材的形状相一致。

多孔基材是具有一定孔数,接触溶液中的热原质后,并尽可

能加以吸附的材料。它的具体实例包括装填在柱中的凝胶颗粒的具有足够厚度以与所通过的液体完全接触的膜，凝胶颗粒粒径一般是 $50\sim 200\mu\text{m}$ 。

另一适当的实例包括非均质的超滤膜，它包括一薄而致密的且微孔的表面层部分和厚且具有大孔径的粗糙的中心部分。上述膜的结构在分离膜的现有技术中是已知的。膜的厚度通常是 $10\sim 1000\mu\text{m}$ ，特殊地是 $50\sim 300\mu\text{m}$ ，如果需要，也可使用更厚的膜，和一组一层压一层的膜。

亲水性凝胶的孔径可用如下方法测定。即将充填了凝胶的柱子中流过已知斯托克斯半径和分子量的蛋白质，多糖类的标准样品溶液，作出表示分子量和保持容量关系的校正曲线，从两端求出分区分子量。孔径使用对应于分子量的斯托克斯半径。可以采用市售的测定凝胶过滤分子量用的标准样品。样品与吸附剂的官能团反应时，可用基材的测定值代替。此外，对于疏水性基材，也可用在氨法和水银法等的干燥状态下测定的孔径代替。

多孔质膜状吸附体的孔径通常在膜分离技术中被叫做超滤或微滤所用的范围内，如 $1\text{nm}\sim 20\mu\text{m}$ ，优选 $10\text{nm}\sim 5\mu\text{m}$ ，最常用膜孔径为 $50\text{nm}\sim 1\mu\text{m}$ 。当从含大分子量如蛋白质或多糖类药物溶液中除去热原质时，当然需根据分子直径合理选择膜的孔径以便药物的渗透不被阻碍。膜的孔径一般表达为从未被吸附到膜上的颗粒直径和阻滞率之间关系曲线上确定出的阻滞率达 90% 时的颗粒

直径。有孔颗粒状凝胶的孔径也与膜状分离剂一样，从 1nm ~ $20\mu\text{m}$ ，较好的是 10nm ~ $5\mu\text{m}$ ，特别是约 50nm ~ $1\mu\text{m}$ 。

多孔硬凝胶基材的实例包括亲水性合成聚合物颗粒如纤维素，葡聚糖，聚丙烯酰胺和聚乙烯醇以及多孔硅凝胶。琼脂糖及其衍生物如琼脂糖（凝胶）通常为软凝胶，因此，不适宜用于高流量液体的处理，因为这些物质的孔隙在液流压力下会破裂。当本发明的实例中描述的 A—1 型硬凝胶被装填在柱内，（直径： 1cm ，高： 50cm ）测量在液体通道上的压力损失时，例如，压力损失是线性的，直到流量 ($\text{ml}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ ，在下文中相同，以柱的空塔速度为基准) 超过 1500。流量为 200 时，压力损失应不超过 $0.12\text{Kg}/\text{cm}^2$ ，并近似于表面压力损失的 $1/3$ 。另一方面，当含琼脂糖作为基材的软凝胶被装在柱内且使液体通过时，在非常低流量下，也会观察到压力损失很快增加。在流量为 200 时，压力损失为 $0.8\text{Kg}/\text{cm}^2$ 。 G 。为了有效地进行吸附/保留，在一定流量如 200 时的压力损失应为 $0.5\text{Kg}/\text{cm}^2\cdot G$ 或更低，优选 $0.25\text{Kg}/\text{cm}^2\cdot G$ 或更低。

多孔微滤膜基材实例包括由各种材料制成的膜，如纤维素膜，聚乙烯醇膜，聚砷膜。

膜的形状不特别限制，平板膜，中空纤维膜，管式膜都可使用。上述各种膜均可用相应膜组件形式。如，膜组件的实例包括螺旋形的，Preat，板框式，管式和中空纤维组件。

通常，基材是不溶解的，即不溶解于待处理的液体，溶剂常常

是水，在特殊情况下，也可能使用非水溶剂如乙醇，丙酮，乙腈，DMSO(二甲亚砜)和氯仿或它们的水溶液。基材在吸附剂的形成过程中溶解与否并不重要，只要它不溶解于最终的吸附剂中即可，该吸附剂带有键合于其上的脂肪族含氮官能链。许多水不溶多糖类基材同样也不溶于有机溶剂中。

一般，基材是高分子量物质，而且在许多情况下是由于分子间力而处于聚集状态的直链有机聚合物。基材的结构使脂肪族含氮官能链可直接地或间接地被固定于其上。例如，它有一活性位置(如活性氢)，该活性位置可与如羟基或氨基等官能团或其它物质反应。

基材的特殊实例包括多糖类(包括它们的衍生物如氮烷基化多糖类，羧烷基化多糖类，如纤维素和其衍生物；琼脂糖和其衍生物，交联的葡聚糖和其衍生物和脱乙酰壳多糖，这些均在日本专利公开号 183712/1982 中论述)，合成有机聚合物(如聚丙烯腈，聚砜，聚酰胺，聚乙烯醇，聚苯乙烯和聚丙烯酸树脂，羟烷基化、氮烷基化和卤代烷基化的聚苯乙烯树脂，和聚丙烯酰胺树脂，均在上述同一公开说明书中提到)，以及无机聚合物(如硅胶，玻璃如氮丙基化的(*amino propylated*) 多孔玻璃以及各种陶瓷)。进而，同样可选择日本专利公开号 183712/1982 中描述的水不溶性载体为基材。用于同配合物形成键合的官能团如羟基或氨基，可通过多种方法如羟甲基化或还原作用将其引入到上述的基材中。

上述基材构成一种粒子或膜，因而具有三维结构，可直接地或通过间隔基(*Spacer*)键合到含氮环状化合物上。基材，配位体和间隔基的分子结构加上较高级的结构，如分子的缔合和孔的形成，对液体与吸附剂的接触具有重要作用。

实际上，选择适合的基材对于本发明的实施是非常重要的。

【键合官能团到基材上】

例如，将官能链直接或间接地定位到包含组成膜的基材的载体上的键合方法包括：共价键合，离子键合，疏水键合，配位键合等。在它们当中，希望通过共价键定位，因为它对消除含氮环化合物敏感性很差。共价键的实例包括酰胺，酯，醚，氨基，亚氨基，硫醚，二硫醚，和砷键。

一个官能团或间隔基可通过下列方法键合到基材上。基材用下述材料活化：卤化氰（如溴化氰），环氧化合物（如表氯醇或双环氧乙烷），卤代有机酰卤（如氯乙酰氯或 *tresyl* 氯），二醛（如戊二醛），苯醌等。然后将带有氨基、羟基、硫羟基或羧基基团的含氮环状化合物或间隔基键合于基材上。

用于键合或定位且使用间隔基载体的间接方法包括环氧化作用（表氯醇，双环氧乙烷），脱水缩合作用（*WSC*，*EEDO*），还原胺化作用（*NaCN* + 甲硼烷，二甲胺 + 甲硼烷）和硫羟活化作用（*PySSPy*）。在这些方法中，载体间隔基衍生物具有一个基团如环氧基，羧基，氨基，胍基，甲酰基，硫羟基，该衍生物通过使用缩

合剂，活化剂(在每种方法说明之后附带给出实例)转化成为活性中间体，然后与具有如氨基，羧基，醛或硫羟基团的配位体键合。

通过环氧化作用制备的吸附剂在下一点上比现有技术中最普通的溴化氰方法要好得多，即依靠较稳定的配位体的定位非特殊的吸附作用是很低的。这使在本发明中环氧化作用更为优越。

除了共价键合以外的其它定位方法的实例包括依靠离子键合把带有强碱取代基的脂肪族含氮官能链定位到表面键合有强酸性基团的载体上(用于阴离子色谱的市售填料)。及具有由十八烷基，辛基，苯基等制得的疏水性表面的基材与键合有长链烷基或苯基的配位体通过疏水键合(动态涂渍)而键合。

基材，间隔基和脂肪族含氮官能链相互键合的定位过程，也在上述同一公开的说明书已详细描述。在本发明中，配位体的定位可通过应用这些已公开的技术进行。

上述配位体定位技术可用到例3描述的膜形的材料的操作和在例1中迄今没有膜形的材料的操作中。

【官能链】

在多孔吸附剂中，键合到基材上的官能链具有仅与脂肪族的碳原子相结合的碱性含氮官能团并由3—50个原子构成的链。官能链的链构成原子数(链长)指的是在最长原子链中构成连续链的原子数。例如，在官能链 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ 中，如链构成原子数是11，即中间链的3个原子(取代丙烯)和二氨基烯

的 8 个原子。

碱性氮官能团只与脂肪族碳原子相键合，脂肪族碳原子的代表例为亚甲基的碳原子，支链烷基的仲碳原子，叔碳原子也可以，原则上应为饱和碳原子。作为碱性氮官能团有伯胺、仲胺、叔胺、季胺、亚胺($=NH$)等。脒基，胍基，只限于键合在脂肪族碳原子上，可以整体地认为是非环式氮官能团，可是像异脲那样结合在氧原子上的应排除在外。在氮官能团中，最好是伯氨基($-NH_2$)，仲氨基($-NH-$)，因为这些基团具有相应的碱性且能承受空间位阻现象引起的小干扰。含有非常弱碱性氮原子的吸附剂，如胺或脒，一般在吸附性能上是较差的。

现有吸附剂中常见的肽结构，不包含在本发明的碱性官能团中，把只是与脂肪族的碳原子结合的碱性氮官能团中的氮原子称为脂肪族氮原子。

氮原子可是端部组成原子或中间原子。另外，它可为侧式(*Pendant-type*)氮原子，这种侧式氮原子可直接地或是经由另外的脂肪族原子键合到中间原子上。

最好，官能链包括伯或仲氨基脂肪族氮原子和一个具有 3 个或更多碳原子与氮原子相邻的链。在上述的官能链中己烯基(和羟基取代的丙烯基)邻接到二个氮原子上。

如上所述，实质上官能链是链长较短的链式化合物，而对于含氮杂环化合物，芳香族胺等，在本质上由官能氮起作用的部分

具有环式结构的官能链除外。可是，与氮官能团非相邻部分可允许存在环式结构(如苄基胺型结构)。

官能链的代表例包括直接键合到基材上的中间链和含氮原子部分。含脂肪族氮原子部分的代表例包括亚烷基二胺或开链碱性氨基酸的衍生物，尽管单个氨基酸也可使用。中间链与脂肪族含氮原子部分的摩尔比不一定等于 1:1。

含中间链的吸附剂的化学结构可大致分类如下：

基材—中间链

—含氮部分；

基材—中间链

—含氮部分

—中间链—基材；

基材—中间链

—含氮部分 A

—含氮部分 B；和

基材—中间链

—含氮部分

—含氮部分。

例如，当六亚甲基二胺同环氧甲基化基材反应时，第一类吸附剂(1:1 反应产品)伯氨基和仲氨基的摩尔比为 1:2，而第二类(1:2 反应产品)仅仅有仲氨基。在实际中有时会观察到这二种反

应会同时进行，因而获得的这些反应产品是以混合物形式存在的。这些反应产品混合物成分可由分析氨基基团来测定。在某种情况下，这些吸附剂在性能上相互之间没有多大区别。然而有时会观测到含有更多量第二类产品的混合物在性能上比另一种要好得多。

中间链长通常范围是 2~10，如果需要，可通过引入如间隔基而延长。当使用表氯醇时，所形成的链长为 3 的中间体为主要产品。然而，也会观察到带有多个表氯醇分子的加合物作为付产物或目的产物。

现在借助实例来说明把官能链键合到基材上的方法，用多羟基聚合物作为基材。基材可选自那些本来含大量羟基基团的物质（如多糖类，聚乙烯醇聚合物，或硅胶）和通过引入大量羟基基团进入其它聚合物得到的物质。脂肪族含氮原子部分可直接键合到基材上。例如，氮烷基纤维素可由纤维素和氮烷基氯化物反应而获得。然而在许多情况下，含氮原子部分可用接合剂键合到基材上。接合剂可为表氯醇，戊二醛或溴化氮，如上所述它们可分别产生具有 3, 5 或 1 个碳原子链的中间体。

为了形成含氮原子部分，可采用含有多个氨基的化合物如碱性链氨基酸或含有单个氨基的化合物如氮烷基氯化物。最简单的是用氮来实现该目的。

这些反应的结果使含有氨基和与它邻接的碳链的官能链键合到基材上。碳链可位于氮原子的基材之间或在相反的一侧。如上所

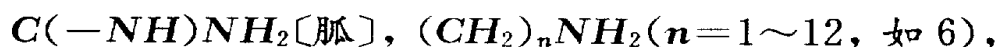
述，可按使基材交联的方式设置官能链。

现在给出官能链的实例：

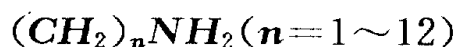
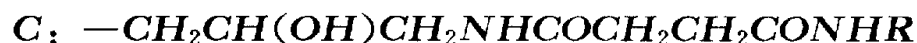
下列脂肪族链 $A \sim D$ 具体表示如下：



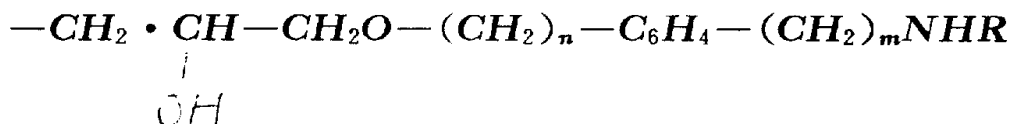
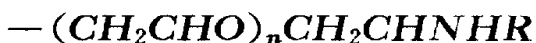
R 为氢原子和以下的基团(在括号中是与 R 一致的化合物 RNH_2 或 ROH 名称)。



[亚烷基二胺]， $COCH(NH_2)(CH_2)_4NH_2$ [赖氨酸] $COCH(NH_2)(CH_2)_3NH_2$ (鸟氨酸)， $COCH(NH_2)(CH_2)_3NHC(-NH)NH_2$ (精氨酸)，[含 2 个或多个伯和仲氨基的天然多胺，如亚精胺，精胺]



进而可用以下形式的胺型官能链作实例。



R 为氢, 烷基, 烷氨基或脒基, A 为氢或甲基。

【典型分离剂】

典型的分离剂包括作为基材的纤维素和上述 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NHR}$ 一型脂肪链, R 是氢的分离剂可通过表氯醇与基材缩合, 进而用氨开环而获得。实例中示为 $B-1$ 型的分离剂是以纤维素作为基材的一类。它是凝胶颗粒的形式, 粒径为 $50 \sim 200 \mu\text{m}$, 孔径约 $100 \sim 500 \text{nm}$ 。

所给的各类型的分离剂(除了那些 R 是 H 之外)可通过 $B-1$ 型分离剂或在基制备过程中获得的中间产品与上述括号中给出的各种化合物反应得到。 $A-1$ 型分离剂是具有脂肪链 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ 的纤维素衍生物, 该分离剂是六亚甲基二胺与纤维素/表氯醇的缩合物的开环反应获得的。 $A-1$ 型分离剂可以同赖氨酸, 邻-甲基异脲或精氨酸反应, 分别得到 $A-2$, $A-3$ 或 $A-4$ 型。进而, $B-1$ 型分离剂可与赖氨酸, 邻-甲基异脲或精氨酸反应, 分别得到 $B-2$, $B-3$ 或 $B-4$ 型。

此外，琼脂糖代替纤维素用作基材的分离剂也可以使用，但因这些分离剂是软凝胶，不适宜在高流量时使用。

用合成树脂作基材的分离剂的实例如下：

聚苯乙烯：

苯乙烯/*DVB* 共聚物的苯环在对位氯甲基化并与三乙基胺反应。反应产物进一步与六亚甲基二胺反应得到分离剂，该分离剂中的官能链 $\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ 键合到聚苯乙烯树脂的基材上。亲水乙烯基聚合物：

上述 A-1 型分离剂制备过程中，使用 *Epoxy Toyo Pearl 650M* (*Toyo Soda Mfg Co. Ltd.* 产品) 代替纤维素/表氯醇缩合物作为基础凝胶。把获得的产品(颗粒粒径 44—88 μm)装填入柱中(内径 16mm，高 150mm)，可在压力为 0.2Kg/cm².G，流量为 0.51/hr(*SV*=17)下处理液体。

PVA：

例 3 给出了膜形式的 *PVA* 分离剂。分离剂可以是粒状。

聚砒：

官能链可很容易键合到如聚砒 *MF* 膜上，该膜具有氨基基团，市售作为载体用来固定酶。在被戊二醛活化后，该膜同含脂肪族氮原子的化合物反应。通过用六亚甲基二胺可形成在邻氮原子处有 5—和 6—碳链的官能链。

【处理方法】

现在将本发明待应用的液体分为 4 种类型，分别描述它们的处理方法和分离性能。

第 1 种：含酸性聚合物的试样

该类型的代表例是一种酸性蛋白质溶液（如 HSA）。虽然热原质和药物都带负电荷，但是热原质对分离剂的结合力较强，因此热原质可被选择性吸附。为了实现选择性吸附，最好控制离子强度稍高一些（ $\mu=0.02\sim0.2$ ）。当去除热原质的效果不好时，应调整离子强度到 $0.02\sim0.07$ ，如果需要，处理要靠近药物的等电点进行。当药物的回收率很低时，所采用的吸附剂的量应在可接受的范围内减至最小，并且要在药物的等电点以下进行处理。

第 2 种：含碱性聚合物的试样

这是最困难的一种，因为药物或杂质是带正电荷的，因而对热原质有亲合力。最好在离子强度 0.1 或以下进行热原质吸附。然而，当碱性物质对热原质的亲合力高时，则要提高离子强度。当除去率不好时，处理应在 pH8 到试样的等电点的范围内进行。然而在此情况下应当小心，因为在靠近等电点处试样的溶解度会降低。

第 3 种： γ -球蛋白制剂等

最好，在靠近 pH7 和离子强度 0.1 或以上处理中性高分子量蛋白质。当 pH 降低至接近 5 时，热原质由球蛋白吸附，去除率会下降。

第 4 种：渗析液，糖类，氨基酸输液等

pH 值最好为 3~10, 离子强度将不会影响除去热原质的效率。然而, 当碱性的低分子量的有机物污染时, 最好调整离子强度到 0.02 或以上。

【分离功能】

本发明的多孔吸附剂能从生理活性物质溶液中选择吸附和分离二氧磷基多羟基化合物, 如热原质。例如, 生理物质包括氨基酸, 如组氨酸, 丙氨酸和脯氨酸等; 核酸碱如腺嘌呤和胞嘧啶等; 抗菌素如青霉素 G; 激素如胰岛素; 维生素如黄素, 腺嘌呤和二核苷酸; 血清蛋白质如清蛋白和 γ -球蛋白; 酶如尿酸酶, 天门冬酰胺酶和溶菌酶; 抗体如免疫球蛋白; 和疫苗如流感疫苗。本发明应用于注射液如葡聚糖, 果糖, 葡萄糖; 输血的柠檬酸钠溶液; 静脉滴注法和过滤型的人工肾的补充液。所应用的液体其离子强度的浓度可不同。可直接给药于生物体的液体, 其离子强度一般约为 0.15, 类似生理盐水。

待处理的热原质粘污的液体的浓度变化很宽。最好, 所述的浓度是几十个 $\mu\text{g/ml}$ 或以下。特别地, 本发明的分离剂可吸附或去除痕量(如 100ng/ml 或以下)的热原质。当在药物中的热原质浓度非常高时, 在用本发明的分离剂之间需使用 UF 膜等进行预处理。

当基材是凝胶时, 用本发明的分离剂处理可以用间歇法进行或柱型法进行。

按照本发明, 分离热原质的方法取决于热原质的浓度。热原质

含量相当低的液体，如 500EU/ml，可用一般厚度膜有效处理。用厚膜或层压(*Liminates*)膜可以处理高热原质含量的液体。在该方法中孔径使高浓度进料流有效分离，而吸附使低浓度的出料流分离。这表明一种处理，二种方式。不需要予处理。

在本发明中，热原质一般通过吸附和保留从高离子强度的溶液中分离。这种吸附/保留方法与吸附和洗脱同时进行的色谱分离法不同，在药物与吸附剂亲合力特别高时，可能观察到回收率很低。在这种情况下，用高离子强度溶液处理已吸附热原质和药物的吸附剂，从而使药剂可以选择性地被洗脱和回收。

【耐碱性和再生性能】

吸附了热原质的分离剂，常在碱性条件下处理再生。本发明的分离剂在 0.2N NaOH(20%乙醇溶液) 中，即使放置一个月，性能也不变化，对于碱性是稳定的。如在实施例 16 的测定方法中，反复进行 10 次再生后才看到性能变化。可以看出，本发明的分离剂与具有肽为主体的官能链的现有产品相比，具有优良的耐碱性和再生性能。

【发明效果】

本发明提供的分离方法，用具有特定结构的分离剂将二氧磷基多羟基化合物有效地从高离子强度的溶液中除去。此方法的去除率，最终浓度，药物回收率非常好而且很安全。在该方法中使用的一些分离剂作为物质本身都是已知的或者作为合成过程的中间

物曾提出过。而且一些分离剂作为用于不同目的的分离剂是已知的，如，作为分析色谱法的载体。然而一些典型分离剂至今还不知道可作为分离剂。因此，本发明进而提供了一种新的分离剂。

本发明分离剂的使用使得有可能从相对高离子强度溶液中去除热原质。进而，通过一次间歇处理可使从含药物如蛋白质的溶液中去除热原质的效率高达99%。也就是说，用上述分离剂处理可降低热原质的溶液中的含量，从100ng/ml和1ng/ml分别降至1ng/ml，10pg/ml。在不含药物如蛋白质的溶液的情况下，通过单个间歇处理热原质含量从100ng/ml可降至1pg/ml或更低(检测限度以下)，相应于去除率可达99.999%或更高。

另外，本发明的分离剂较之普通的热原质吸附剂可在很宽的pH范围内使用。适用的pH范围取决于离子强度，如在离子强度0.1时，所使用的pH从3~11。

本发明分离剂的作用原理至今还不十分清楚。然而，本发明者假定的分离剂作用原理如下：

也就是说，包括基材和官能脂肪族链的分离剂与通过它的孔的液体进行紧密接触，因而选择性地吸附保留了热原质。基材是由大分子组成的，从而分离剂作为整体是不溶解的。但是，基材是多孔的，因而脂肪族链在空间结构上有一些自由度。也就是说，分离剂的结构适宜于接受大分子(如热原质或核酸)，并且通过适当的控制官能链的位置提供吸附作用。一些普通吸附剂如碱性离子交换

树脂含大孔基材，氨基可键合到其上面。虽然这些吸附剂能除去水中的热原质，但是，它不能选择性地吸附含药物溶液中的热原质使去除率达到 99%。因为在它的结构中没有任意的自由度。

本发明的官能脂肪链是 3~50 原子组成的脂肪链。当应用于离子强度很高的溶液时，和普通的包含有含氮环状化合物作为官能链的热原质吸附剂比较，本发明可提供特别优良效果。因为本发明的官能链携带 3 个或更多的组成原子，所以该官能链具有在离子交换树脂中是不能达到的自由度。对于离子交换树脂，其中氨基直接地键合到基材的聚苯乙烯芳环上[链组成 (Chain — Constituting) 原子数: 0]。另一方面，本发明链组成原子数比多粘菌素(一种抗生素)小得多，并且可以采用相对简单的分子作为脂肪链。因此，即使脂肪链从基材中释放出并进入待处理的液体，几乎不会发生严重的生理副作用。

在本发明中，含短链和相对简单结构的含氮脂肪链被键合到基材上。因而，可通过改变含氮脂肪链的结构而获得具有指定吸附性能的分离剂，这取决于热原质和药物的多种组合。在一些现有技术中大分子量的交联接枝共聚物是一种复杂结构的混合物，因而包括可影响其性能的许多因素。因此，在这种情况下，研制可满足各种需要的各种系列的产品就显然很困难，这和本发明不同。

上述结构的本发明的分离剂可用于离子强度为 0.16 的人血清白蛋白溶液的间歇处理[该溶液是把 100ng/ml E. CoLi 0111;B4

(用酚萃取)和食盐加到市售的 *HSA*(浓度 5%)中制得的样品], 借此去除达 90~99%的热原质。

【实施例】

在以下说明中,“湿”(wet)表示以“湿重”为准,尽管给出的分析数据是以干重为准。

实施例 1

【分离剂】

A-1 型:

用水洗涤并且抽滤 2 分钟脱水后, 50g(湿)的颗粒状的多孔纤维素凝胶载体(a)被分散在 110ml 0.6N 苛性苏打中。加入 16ml 表氯醇, 其混合物在 60℃反应 30 分钟, 接着过滤, 用水清洗。将在 100ml 水中溶解 4 ml 65%六亚甲基二胺制得的配位体溶液加入到得到的环氧活化了的中间物(b)中。然后, 让生成的混合物在 70℃反应 1 小时。过滤并用水洗涤, 用盐酸调节 pH 值至 10.4 之后, 用水洗涤反应混合物并脱水。由此得到大约 55gA-1 型(C)湿的吸附剂。

g/湿/g 干

(a) 17.0

1.82ml/g 湿

(b) 15.8

环氧含量($\mu\text{mol/g}$ 干)174

(c) 18.2

1.45ml/g 湿

六亚甲基二胺含量($\mu\text{mol/g}$ 干)133

【元素分析】

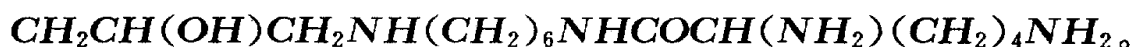
该分离剂有 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ 链(链长: 11)作为主要官能链。

类似地, 通过改变反应条件可获得六亚甲基二胺含量从 50~600 的分离剂。通过改变反应条件得到的一些分离剂可带有 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NHCH}_2\text{CG}(\text{OH})\text{CH}_2$ 链(链长: 14)和 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ 链(链长: 11)作为主要链。

A—2 型:

用赖氨酸缩合上述 A—1 型分离剂得到。

官能链:



A—3 型:

用邻—甲基异脲缩合上述 A—1 型分离剂, 从而得到脲端基。

官能链:



B—1 型:

加入表氯醇和氨到作为基材的多孔纤维素凝胶中而得到。

官能链: $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$,



颗粒粒径约 50~200 μm 和孔径约 100~500 μm 。

B—2 型:

用赖氨酸缩合上述 B—1 型分离剂而得到。

官能链： $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NHCOCH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 。

B—3 型

用邻—甲基异脲缩合上述 B—1 型分离剂得到。

官能链： $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 。

市售吸附剂：

每个都可高效地去除热原质。

IRA：

Amberlite (商标)IRA—98 弱碱性阳离子交换树脂。包括作为基材的大孔聚苯乙烯颗粒和直接键合到芳环上作配位体的二甲氨基。

TEAE 和 DEAE：

由 *Serva* 公司生产的纤维素离子交换材料，包括微纤维纤维素（不是多孔的而是微颗粒状的）。TEAE 的配位体是 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ ，它由取代纤维素 OH 基得到。而 DEAE 的配位体是 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ，它们分别显示强碱和普通的中性性质。

BCW：

脱乙酰壳多糖 (*Chitosan*) 颗粒 BCW Series 2503 (由 *Fuji Spinning Co. Ltd.* 生产) 强碱性阴离子交换树脂，经由化学键将季铵接合到脱乙酰壳多糖颗粒上而得到。

【待处理的液体】

试验溶液 1: 市售的 *HSA*(人工血清白蛋白, 浓度 5%, 离子强度 $\mu=0.02$), 含 100ng/ml 标准内毒素 *E. CoLi* 0111:B₄。

试验溶液 2: 市售的 *HSA*(浓度: 20%, 离子强度 $\mu=0.07$), 含 100ng/ml 标准内毒素 *E. CoLi* 0111:B₄。

试验溶液 3: 通过加食盐到试验溶液 1 中, 调节离子强度到 $\mu=0.16$ 而得到。

试验溶液 4: 通过加食盐到市售 *HSA*(浓度: 5%)从而调节离子强度到 0.16, 然后加入 1ng/ml *E. CoLi*: 0111:B₄ 制得。

试验溶液 5: 通过把 100ng/ml *E. CoLi*: 0111:B₄ 加到无热原质的水中制得。

【除去热原质(间歇法)】

试验方法: 将 1ml 每种试验液和 100mg(湿)分离剂在无热原质的玻璃试管内, 在室温下以 50rpm(转/分)搅拌 1 小时。接着, 使用 *Limulus* Es-test, *WaKo*(商标)和 *Toximometer*—ET—201 (均为 *Wako pure Chemical Industries Ltd.* 生产), 用比浊法确定存在于溶液中的热原质浓度, 由此计算热原质去除率。通过 *PC* 分析确定 *HSA* 回收率。

结果: 表 1 给出了用各种分离剂处理试验溶液的结果。本发明的分离方法在较高的离子强度区域内具有优良的去除热原质的性能。

表 1

		A—1	B—1	A—2	B—2
试验溶液 1	去除率%	3 6	3 4	8 1	6 9
	回收率%	7 2	9 8	6 8	9 0
试验溶液 2	去除率%	9 5	9 0	9 1	8 1
	回收率%	9 5	1 0 1	1 0 2	1 0 2
试验溶液 3	去除率%	9 3	9 9	9 8	8 6
	回收率%	8 4	1 0 0	9 6	9 6
试验溶液 4	去除率%	9 7	9 9		
	回收率%	9 2	1 0 0		
试验溶液 5	去除率%	在每种情况下 > 99.999%。			

比较实施例 1

用市售的离子交换材料按实施例 1 描述的同样方法处理试验溶液 2, 其结果, 一些离子交换材料表明去除热原质的效果可达到一定程度, 但是它们之中没有一个可达到 90% 或以上的热原质除去率。

表 2

		I R A	T E A E	D E A E	B C W
试验溶液 1	去除率%	5	0	0	
	回收率%	9 8	9 7	9 9	
试验溶液 2	去除率%	7 6	3 0	0	4 7
	回收率%	9 7	9 7	9 9	9 4

实例 2

用 0.1g(湿)A—1 型分离剂,用间歇吸附法检测在 2ml 的药物水溶液中天然热原质的去除性能。

表 3 给出所用的试样,处理条件和获得的结果。

项 目	浓 度	pH	离子强度 (μ)	热原质浓度		去除率 (%)	试样回收率 (%)
				处理后	处理前		
试样 (单位)	(%)						
牛血清清蛋白	10	0.8	0.18	7.85	0.82	90	100
溶菌酶	0.5	9.0	0.05	9.66	0.09	99	94
细胞色素 C	0.5	9.0	0.05	4.11	0.09	98	98
人 γ -球蛋白	1.0	8.5	0.22	0.87	0.08	92	100

实施例3 包含含氮脂肪链的 PVA 膜的制备

三个聚乙烯醇(PVA)中空纤维膜(Kuraray SF-401; 均匀膜, 共孔径约 $0.1\mu\text{m}$; 内径 $330\mu\text{m}$, 膜厚 $125\mu\text{m}$, 有效长度 5.5cm)用环氧树脂固定在玻璃管内, 以制备小型组件。然后用如上制备的该组件按照步骤(1)~(5), 使中空纤维膜与液体接触, 以对膜进行各种处理。这些处理包括组成膜的材料们的化学反应, 从而制得本发明 AH-PVA 膜吸附剂。在该情况下, 在中空纤维膜内和外部, 以流量 $20\sim 50\text{ml}/\text{min}$ 循环液体, 使膜与液体接触。通过浸入整个膜在水浴中来调节温度。

(1) 洗涤(1M NaCl , 纯水), (2) 环氧化作用(60°C 在 $90\text{ml } 1\text{N NaOH}$ 中; 进而加入 10ml 表氯醇, 体系在该温度下保持 2 小时), (3) 洗涤(纯水), (4) 间隔基键合($40\text{ml } 0.625\%$ 六亚甲基二胺水溶液, 60°C , 2 小时), (5) 清洗(纯水)。制得用作吸附剂的 AH-RVA 膜。

AH-PVA 与 PVA 膜的元素分析值(%)如下:

样 品	碳	氢	氮
作原料的 PVA 膜	55.14	7.92	0.02
AH-PVA 膜	54.92	8.00	0.17

实施例4: 热原质的去除

含浓度为 $3300\text{EU}/\text{ml}$ 的热原质 *E. Coli* 0111:B₄ (1ng 或 5.5Eu) 的未处理水 50ml 循环通过实施例3制得的面积为 1.7cm^2 的

AH—PVA 膜。以流量 $1.3\text{ml}/\text{min}$ 加入小型组件，用压力旋塞调节膜渗透率至 $0.2\text{ml}/\text{min}$ ($70\text{l}/\text{m}^2 \cdot \text{hr}$)。供压约 $0.2\text{Kg}/\text{cm}^2 \cdot \text{G}$ 。用 *Limulus Es—test*, *WaKo* (商标) 和 *Toxinometer ET—201* (均为 *WaKo pure Chemical Industries Ltd.* 的产品) 测定渗透液的热原质浓度。

当渗透液量为 25ml ，热原质浓度和去除率分别为 $0.33\text{Eu}/\text{ml}$ 和 99.99% 。

为了比较，使用在实施例 3 中所用的 PVA 中空纤维膜小型组件作为制备吸附剂的原料进行同样试验。用膜分离后得到的渗透水的热原质浓度和去除率分别是 $627\text{Eu}/\text{ml}$ 和 81% 。

实施例 5：生理盐水的处理

用实施例 4 的面积为 1.7cm^2 的 AH—PVA 膜，处理 0.9% 的含 $4630\text{Eu}/\text{ml}$ 热原质 ($\mu=0.15$) 的盐水，得到 $0.08\text{Eu}/\text{ml}$ 的热原质浓度和去除率为 99.998% 。用 PVA 膜比较得到的结果为 $1120\text{Eu}/\text{ml}$ 和去除率为 76% 。

实施例 6：处理分子量大约 12,500 的细胞色素 C

含 $1130\text{Eu}/\text{ml}$ 热原质的 200ml 10.0% 的细胞色素 C，在 $\text{pH}9.0$ ， $\mu=0.02$ 下，用实施例 4 所示的同样方法，使用实施例 3 的有效面积 50cm^2 的 AH—PVA 膜进行处理，循环流量 $100\text{ml}/\text{min}$ ，通量为 $4.5\text{ml}/\text{min}$ ，得到处理液中热原质含量为 $0.23\text{Eu}/\text{ml}$ ，去除率 99.98% 。d 细胞色素含量 10.0% 。

兔子试验结果为阴性，用 PVA 膜比较得到的去除率为 45%，热原质含量为 622Eu。

实施例 7：人工血清白蛋白(HSA)的处理

用实施例 6 的 AH—PVA 膜组件处理 pH6.5， $\mu=0.07$ ，含 85Eu/ml 的热原质的 100ml20% 的 HSA。得到热原质含量 0.84Eu/ml 和去除率 99%。用 PVA 膜比较得到热原质含量为 75Eu/ml，去除率 12%。

实施例 8：(离子强度的影响；pH 值在各种情况下均为 7)

将 0.1gA—1 型分离剂加入到 1ml 含 100ng/ml 的热原质的多种浓度的盐水溶液中。在 25℃ 以 25rpm 搅拌 1 小时后，按清液中热原质浓度确定每种分离剂的吸附率。离子强度和热原质的吸附率的关系如下。可以证实在宽的离子强度范围内，分离剂都具有高吸附率。

离子强度	0.1	0.2	0.35	0.7	1.2	1.7	2.0
吸附率(%)	99.98	99.3	98.2	97.8	97.5	96.5	97.9

上面应用的热原质来源于 E. CoLi 0111:B₄ 中的一种。

【比较】

当用包括含氮环状化合物作为配位体的分离剂时，在低离子强度时吸附率降低。吸附率降低的程度依所用的热原质而改变。例如，在热原质来源于 E. CoLi UTK—B 时，直到离子强度达到 0.1 时，吸附率一直保持为 100%，然后 μ 是 0.2 时降至 82%， μ 为 0.

3 则降至 5%。另一方面, 在热原质来源于 *E. CoLi* 0128:B₁₂ 时, 当 μ 是 0.1 时吸附率为 40%, 当 μ 为 0.2 时, 吸附率为 0%。

实施例 9: (pH 的影响)

按实施例 8 描述的同样方法试验 pH 值 ($\mu=0.1$) 不同的热原质水溶液 (1000ng/ml)。所使用的热原质, 其浓度和所使用的分离剂与实施例 8 描述的一样。热原质的吸附率和 pH 值的关系如下, 从而证实了在宽 pH 值范围内的吸附性能:

P H	2.9	5.4	6.8	8.1	9.2	10.7	11.7
吸 附							
率 (%)	99.8	99.96	99.9	99.96	99.7	99.3	98.8

【比较】

当用包含含氮环状化合物作为配位体的分离剂时, 吸附率在较低 pH 值时下降。在离子强度为 0.1 时, 当 pH 为 7 或以下时, 吸附率保持在 100%, pH 为 8 时, 吸附率下降到约为 90%, pH 为 9 时, 吸附率为 0%。当 $\mu=0.02$ 时, 在 pH 值 8 或以下时, 吸附率保持在 100%, 当 pH 值为 9 时, 吸附率下降到约为 65% (使用的热原质来源于 *E. CoLi* UKT-B)。

实施例 10 (渗析液)

通过加入标准热原质调整渗析液的热原质浓度到 1440pg/ml, 将得到的渗析液收集到消过毒的聚苯乙烯试管内, 加入 0.1 倍渗

析液量的吸附剂。在圆形混合器内搅拌 20 分钟后，过滤混合物，测定热原质浓度。

在用 A—1 型分离剂处理后，热原质浓度降至 1.5pg/ml 。在用 B—1 型分离剂处理后，降至 185pg/ml 。看来 A—1 型分离剂比 B—1 型分离剂在吸附率方面要好得多。

实施例 11(柱法)

在实施例 10 进行的试验中，显示了优良结果的两种吸附剂被用来用柱法确定洗脱液中热原质的浓度。

柱：内径 10mm ，填充高度 $80\text{mm}(8.3\text{ml})$ ；

试验溶液：通过加入 E. CoLi 0111:B₄ 调节透析液中热原质浓度至 1ng/ml 而制得。

流速 (cm/hr)	76	153	306	535	764	994	1300
A—1 吸附剂	2	3	6	11	18	37	57
非极性吸附剂	90	105	159	256	348	388	482

(XAD—2)

虽然 XAD—2 显示了仅次于 A—1 吸附剂的优良结果 (4pg/ml)，但在高 SV 时，XAD—2 的吸附性能大大低于 A—1 吸附剂。

实施例 12(比较实施例)

纤维素颗粒首先同表氯醇反应，然后同聚烯丙胺 (polyallylamine) 氢氯化物 (分子量：60,000) 反应，由此得到多孔吸附剂 AA—C。分别地，用同样方法处理聚乙烯亚胺

(polyethyleneimine)(分子量 40,000~50,000)得到多孔吸附剂 PEI—C。进而用市售的聚烯丙胺颗粒物作为 PAA—B。采用与例 8 相同的间歇法对这三种型号的粒状物进行吸附试验。

这些试样的每一个都很好地吸附生理盐水中的热原质,但是在 5% HSA 溶液中,热原质吸附率低于 50%。试验溶液的离子强度,试验溶液的热原质浓度 (ng/ml) 和处理液中热原质浓度 (ng/ml) 三者之间关系如下:

	μ	试验溶液	A A—C	PEI—C	PAA—B
生理盐水	0.15	192	0.015	0.012	0.11
5% HSA	0.02	2.50	4.12	2.34	2.40
5% HSA	0.09	4.06	2.02	2.50	3.14

实施例 13(柱法)

用 A—1 型吸附剂,通过柱法去除 HSA 溶液中的热原质。

试验溶液: 5% HSA + 2M NaCl + E. CoLi 0111; B₄ (DIFCO),

pH6.4, $\mu=0.15$

处理方法: 在平衡吸附柱后,流速 (SV) 变化从 30—2,测定处理液中的热原质浓度。

柱: 内径 10mm, 高: 60mm

结果:	热原质浓度 (pg/ml)	去除率 (%)
试验溶液	7300	
30	801	95.9
10	96	98.7
5	74	99.0
2	69	99.1

将 0.2g(湿)吸附剂加到 2ml 的试验溶液中,该试验溶液是将 *E. Coli* 0111: *B*₄(*DIFCO*)加入到 0.9%NaCl 溶液中制备而成的。搅拌 1 小时后,过滤混合物,再经 *Limulus ES*—试验。

用 A-1 吸附剂处理后	5	未测定出
--------------	---	------

将 0.2g(湿)A—1 型吸附剂加入到含源自多种微生物的热原质的磷酸盐缓冲溶液中($pH=7$, $\mu=0.02$), 在 25°C , 25rpm 下搅拌处理 1 小时后, 用过滤器($22\mu\text{m}$)过滤混合物, 测定热原质浓度。

进而,对用食盐调节离子强度至 0.1 得到的试样进行试验。

热原质	离子强度	所加的	被释放的
E. CoLi 0111:B ₄	0.02	5510	0.06
	0.1	4630	0.08
E. CoLi UKT —B	0.02	3900	0.28
	0.1	4070	0.62
S. 肠类	0.02	6280	0.12
(enteritidis)	0.1	9440	0.59

S. flexneri	0. 0 2	9 4 4 0	0. 0 7
	0. 1	4 8 8 0	0. 0 7
P. aeruginosa	0. 0 2	1 2 3 0	0. 0 4
	0. 1	3 8 0	0. 0 5

实施例 16

用 0.5g(湿)A-1 型吸附剂接触高浓度热原质液,从残留浓度确定其吸附能力。即使在重复再生和再使用后,表明吸附能力没有显著变化。

【试验方法】

1. 测定吸附能力

热原质溶液: 5ml E. CoLi 0111:B₄ 水溶液(100 μ g/ml)。

* 在磷酸盐缓冲液(pH=7, μ =0.02)中可溶。

PS-CA: 0.5g(湿)

处理时间: 1 小时。

2. 再生方法

(1) 在完成吸附试验后,将 PS-CA 浸入 15ml 再生液中(碱/酒精的水溶液)12 小时。

(2) 通过微过滤器(0.22 μ m)过滤。

(3) 用无热原质的水洗涤(30ml $\times$ 5)。

(4) 用 1.5M NaCl 水溶液洗涤(30ml $\times$ 5)。

(5) 用无热原质水洗涤(30ml×5)。

(结果)

	热原质浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		吸附能力 ($\mu\text{g}/\text{g湿}$)
	试验液	处理后的溶液	
第1次操作后	100	21	790
第2次操作后	100	8.8	910
第3次操作后	100	5.9	940