(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103415535 B
(45)授权公告日 2017.07.04

(21)申请号 201280012114.7
(22)申请日 2012.03.06
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103415535 A
(43)申请公布日 2013.11.27
(30)优先权数据
2011-050714 2011.03.08 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.09.06
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2012/055710 2012.03.06
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/121258 JA 2012.09.13
(73)专利权人 株式会社钟化
地址 日本大阪
(72)发明人 河井义和 铃木康之 森尾健一郎 平野优
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 金世煜 赵曦
(51)Int.Cl.
C08B 1/08(2006.01)
B01J 2/06(2006.01)
B01J 20/24(2006.01)
B01J 20/30(2006.01)
C08B 15/10(2006.01)
G01N 30/88(2006.01)
审查员 刘璐

权利要求书1页 说明书15页 附图1页

(54)发明名称

多孔纤维素珠的制造方法

(57)摘要

本发明旨在提供不使用毒性、腐蚀性高的辅料，不经过工业上不利的繁杂工序就可简便地制造机械强度高的多孔纤维素珠的方法。本发明的多孔纤维素珠的制造方法的特征在于，使通过混合低温的碱性水溶液和纤维素而制成的纤维素分散液与凝固溶剂接触。

CN 103415535 B

1.多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，以0.1kW/m^3以上、12kW/m^3以下的搅拌动力使将－20℃以上、20℃以下的碱水溶液与纤维素混合而制成的纤维素分散液分散在分散介质中、制成乳液后，使该乳液与凝固溶剂接触。

2.根据权利要求1所述的多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，所述碱水溶液的碱浓度为5～15重量％。

3.根据权利要求1或2所述的多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，使用中位粒径在10μm以上、500μm以下的纤维素。

4.根据权利要求1所述的多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，所述纤维素分散液中的纤维素浓度为1～10重量％。

5.根据权利要求1所述的多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，所述凝固溶剂含有醇。

6.根据权利要求1所述的多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，所述凝固溶剂为酸性。

7.根据权利要求1所述的多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，制作、储藏所述纤维素分散液的温度在－20℃以上、10℃以下。

8.根据权利要求1所述的多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，所述凝固溶剂的体积为乳液的0.01倍～1倍。

9.根据权利要求1所述的多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，所述乳液与凝固溶剂接触时的Pv值即单位体积功率在0.1kW/m^3以上。

10.根据权利要求1或8所述的多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，向所述乳液中添加凝固溶剂所需的时间在150秒以内。

11.根据权利要求1所述的多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，所述纤维素分散液是通过将由水和纤维素构成的预分散液与碱水溶液混合而调制的。

12.根据权利要求1所述的多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，至少一个以上工序中的搅拌操作通过使用涡轮桨而进行。

13.交联多孔纤维素珠的制造方法，其特征在于，再将用权利要求1～12中任一项所述的制造方法而得到的多孔纤维素珠交联。

多孔纤维素珠的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于制造多孔纤维素珠的方法。

背景技术

[0002] 多孔纤维素珠与使用其他合成系高分子时相比，由于安全性高，非特异性吸附少，虽为多糖类但机械强度大，而且含有大量能用于导入与要吸附的目标物质发生相互作用的配体的羟基等优点，因而被用作各种吸附剂。例如，可以列举出各种色谱用吸附剂和亲和吸附剂。其中，亲和吸附剂由于能有效地精制目标物或者能降低不需要的物质的浓度，因而被用作医疗用吸附剂或抗体药品精制用吸附剂。尤其是，作为风湿病、血友病、扩张型心肌病的治疗用(医疗用)吸附剂，将蛋白A作为亲和配体固定在多孔载体上的吸附体正受到关注(例如非专利文献1、非专利文献2)。另一方面，作为能特异性地吸附、溶出免疫球蛋白(IgG)的吸附剂，将蛋白A作为亲和配体固定在多孔载体上的吸附剂(抗体药品精制用吸附剂)正受到关注。

[0003] 这种多孔纤维素珠的制造由于纤维素被认为不易溶解，因而，与通常的合成聚合物相比，多包括繁杂的工序。作为其中的一个，已公开有一种溶解在硫氰酸钙水溶液等腐蚀性、毒性高、会增加设备化难度的溶剂中进行凝固的方法(例如专利文献1)。已经知道，该方法中使用的纤维素溶液会显示特异的性状，而且，由该方法所得的多孔纤维素珠具有相当大的细孔(例如非专利文献3)。因此，在将该方法所得的多孔纤维素珠用作抗体等的吸附剂时，比表面积小，由此，不能期待其会显示高的吸附性能。另一方面，已经示例出一种为了提高纤维素的溶解性，对纤维素的羟基赋予取代基，溶解到常用的溶剂中进行制粒，制粒后脱去取代基而得到多孔纤维素系载体的方法(例如专利文献2)，但该方法存在工序繁杂，在置入或脱去取代基的过程中会出现分子量降低，不易得到近年来一直在追求的高速处理和大规模使用所需的适当强度的倾向。

[0004] 此外，作为能容易地溶解纤维素的溶剂，离子液体受到关注，非专利文献4公开了一种将纤维素溶解到离子液体中而得到纤维素珠的方法。然而，离子液体相当贵，在工业水平上不适合作为辅料使用，而且，关于虽为微量但仍可能会残留的离子液体的安全性，毒性数据等少，预计在作为医疗用或药品精制用的吸附剂制造用而使用时，需要进行相当严格的安全性确认的研究。

[0005] 此外，还公开有一种能使纤维素仅溶解在低温的氢氧化钠水溶液中的方法(例如专利文献3、4)。然而，在专利文献3记载的方法中，将纤维素和氢键切断剂(ahydrogen bond-cleaving solution)的混合物在加压下、经过在100～350℃加热的工序后溶解在碱水溶液中。这种工序对工业化不利。此外，在专利文献4记载的方法中，需要将纤维素分散到强碱溶液中、先使该分散液冷冻后再溶解的工序。

[0006] 此外，专利文献5还公开了一种在碱性溶液中显示溶解性的纤维素，但该纤维素是微纤丝的纤维直径被微细化至1μm以下，乃至500nm以下的纤维素。这种微细化处理不适合工业制造。

[0007] 就在最近，如专利文献6所示，公开有一种用专利文献4中记载的方法溶解微生物纤维素，制成溶液，通过使该溶液冷冻的工序得到纤维素珠的方法，但工序繁杂，不适合工业制造。

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1：日本特表2009－242770号公报

[0010] 专利文献2：国际公开WO2006/025371

[0011] 专利文献3：美国专利第4634470号公报

[0012] 专利文献4：美国专利第5410034号公报

[0013] 专利文献5：日本特开平9－124702号公报

[0014] 专利文献6：日本特开平2010－236975号公报

[0015] 非专利文献

[0016] 非专利文献1：Annals of the New York Academy of Sciences,2005,Vol.1051,P.635-646

[0017] 非专利文献2：American Heart Journal,Vol.152,Number4,2006

[0018] 非专利文献3：Journal of Chromatography,195(1980)221-230

[0019] 非专利文献4：Journal of Chromatography A,1217(2010)1298-1304

发明内容

[0020] 本发明旨在提供不使用毒性、腐蚀性高的辅料，不经过在工业上不利的繁杂的工序就可简便地制造机械强度高的多孔纤维素珠的方法。

[0021] 为了解决上述课题，本发明者进行了深入研究。具体而言，以往，在多孔纤维素珠的制造中，首先，如何使不易溶解在毒性低的廉价溶剂中的纤维素溶解就成为问题。本发明者当初也对将纤维素简便地溶解在上述那样的溶剂中的条件进行了研究。然而，本发明者发现，可以不使用纤维素溶液，而由纤维素的分散液良好地制造多孔纤维素珠，从而完成了本发明。

[0022] 本发明的多孔纤维素珠的制造方法的特征在于，使通过混合低温的碱水溶液和纤维素而制成的纤维素分散液接触凝固溶剂。

[0023] 作为上述碱水溶液的碱浓度，优选为5～15重量％。在该范围内，纤维素对碱水溶液的分散性和膨润性高。

[0024] 作为本发明的方法，原料纤维素优选使用中位粒径在10μm以上、500μm以下的纤维素。将纤维素粉碎至中位粒径小于10μm可能会有在工业上不利、整体制造成本上升之虞。另一方面，若使用该中位粒径过大的纤维素，则可能会有得不到稳定的分散液，甚至不能良好地制造多孔纤维素珠的情况，因此，作为该中位粒径，优选在500μm以下。

[0025] 上述纤维素分散液中的纤维素浓度，以1～10重量％为宜。若该浓度小于1重量％，则要除去的溶液的量多，可能有工业上不利之虞。另一方面，若该浓度过高，则为了制造均一的分散液，搅拌时间可能过长，因此，该浓度优选在10重量％以下。

[0026] 作为上述凝固溶剂，优选为含醇的溶剂。醇不仅廉价，而且，如果是含醇的凝固溶剂，就可良好地制造本发明的多孔纤维素珠。

[0027] 作为上述凝固溶剂，优选为酸性溶剂。如果凝固溶剂为酸性，就能与含碱水溶液的

纤维素分散液中和。此外，本发明者发现，如果使用酸性溶剂作为凝固溶剂，则所得的多孔纤维素珠的细孔径分布窄。在期待有这种细孔径特性的情况下，优选使凝固溶剂为酸性。

[0028] 作为制作、储藏上述纤维素分散液时的温度，优选在－20℃以上、10℃以下。如果该温度在－20℃以上，就能抑制碱水溶液的冷冻。另一方面，如果该温度在10℃以下，就能高效调制纤维素分散液，而且能抑制纤维素分散液着色。

[0029] 将上述纤维素分散液分散到分散介质中制成乳液后、使该乳液接触凝固溶剂的方式也是适宜的。通过调制乳液，能更简便地得到球形度更高的多孔纤维素珠。

[0030] 作为上述凝固溶剂的体积，优选为上述乳液的0.01倍～1倍。如果在该范围内，就能容易地得到具有良好的细孔和表面孔的多孔纤维素珠。

[0031] 作为制作乳液时的Pv值(单位体积的功率)，以0.1kW/m^3以上为宜。如果该搅拌功率在0.1kW/m^3以上，就能容易地得到良好的球形度和细孔特性。

[0032] 此外，作为上述纤维素分散液与凝固溶剂接触时的Pv值(单位体积的功率)，以0.1kW/m^3以上为宜。如果该Pv值在0.1kW/m^3以上，就能容易地得到具有良好球形度和细孔特性的多孔纤维素珠。

[0033] 作为向乳液中添加凝固溶剂所需的时间，优选在150秒以内。虽然其理由尚不清楚，但令人惊讶的是，如果该时间在150秒以内，则所得多孔纤维素珠的强度提高。

[0034] 上述纤维素分散体优选通过混合由水和纤维素构成的预分散液与碱水溶液而调制。由此，能抑制纤维素团块的发生，缩短制作纤维素分散液所需的时间。

[0035] 在至少一个以上工序中的搅拌操作中，优选使用涡轮桨。作为搅拌桨，若使用剪切力大的涡轮桨，则虽然其理由尚不清楚，但令人惊讶的是，能容易地得到具有良好球形度和细孔特性的多孔纤维素珠。

[0036] 本发明的交联多孔纤维素珠的制造方法的特征在于，进一步对上述说明过的通过本发明的制造方法所得的多孔纤维素珠进行交联。

[0037] 根据本发明，能在不使用毒性、腐蚀性高的辅料，不经过工业上不利的繁杂的工序的情况下简便地制造机械强度高的多孔纤维素珠。

附图说明

[0038] 图1：图1(1)是本发明的纤维素分散液，图1(2)是以往方法中的纤维素溶液。

具体实施方式

[0039] 本发明的多孔纤维素珠的制造方法的特征在于，包括通过混合低温的碱水溶液和纤维素而调制纤维素分散液的工序及通过使该纤维素分散液接触凝固溶剂而得到多孔纤维素珠的工序。

[0040] 本发明者发现，若使将纤维素分散在低温的碱水溶液中而得到的纤维素分散液在该纤维素分散液不会冷冻的温度下接触凝固溶剂，则能在实质上不使用毒性、腐蚀性高的溶剂或溶解助剂的情况下廉价、简便地制造多孔纤维素珠。此外，令人惊讶的是，若向低温的碱水溶液中投入通常大小的纤维素粉末，则如众所周知的那样，在许多情况下会制得很难说是透明的溶解状态的分散液，但是，本发明者经过深入研究，结果发现，用这种纤维素分散液也能更简便、廉价地制造多孔纤维素珠。其原因可能是由于即使纤维素不溶解在碱

水溶液中，纤维素也会被配位在由水与碱成分在低温下形成的特殊的团簇上而膨润，该团簇被凝固溶剂吸收并置换，纤维素边凝固边多孔化。

[0041] 下面，按各工序对本发明进行说明。

[0042] (1)纤维素分散液的调制工序

[0043] 本发明中，混合低温的碱水溶液和纤维素。纤维素被低温的碱水溶液溶剂化的反应为发热反应，因此，即使向高温的碱水溶液中加入纤维素，也得不到均匀的、无着色的分散液。所以，在混合纤维素与碱水溶液时保持低温。

[0044] 这里，低温是指比常温低的温度。只要比常温低就不会有大问题，但如果在－20℃以上，则温度调控设备简便，运行成本也低，因而优选。此外，如果在10℃以下，则纤维素分散液的着色少，并且纤维素的分散性、膨润性高，因而优选。作为该温度，优选在－10℃以上、20℃以下。如果在－10℃以上，则能抑制碱水溶液的冷冻。另一方面，如果在20℃以下，则能高效调制纤维素分散液，并且能抑制纤维素分散液着色。作为该温度，更优选在－5℃以上，进而优选在－2℃以上，尤其优选在－1℃以下，并且，更优选在15℃以下，进而优选在9℃以下，尤其优选在5℃以下，特别优选在4℃以下，尤以在1℃以下为佳。此外，如果该温度在9℃以下，则所得的多孔纤维素珠的球形度高，因而优选。

[0045] 作为碱，只要是形成水溶液时会显示碱性的物质就能使用，无特殊限制。从容易获得的角度考虑，优选为氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾，从产品安全性和价格方面，最优选为氢氧化钠。

[0046] 对上述碱水溶液的碱浓度无特殊限制，优选为3～20重量％。如果碱浓度在该范围，则纤维素对碱水溶液的分散性、膨润性高，因而优选。更优选碱浓度为5～15重量％，进而优选为7～10重量％，最优选为8～10重量％。

[0047] 对上述纤维素的种类无特殊限制。例如，在本发明方法中，由于可以不使纤维素溶解，因此，无需使用为了提高溶解性而导入了取代基的纤维素等取代纤维素，能使用通常的无取代纤维素作为原料。

[0048] 对纤维素的分子量无特殊限制，但聚合度优选在1000以下。如果聚合度在1000以下，则对碱水溶液的分散性、膨润性高，因而优选。此外，若聚合度在10以上，则所得的多孔纤维素珠的机械强度大，因而优选。更优选的聚合度的范围为50以上、500以下，进而优选为100以上、400以下，尤其优选在200以上、350以下，最优选为250以上、350以下。

[0049] 作为本发明方法中使用的纤维素，优选使用其中位粒径在10μm以上、500μm以下的纤维素。由于在本发明方法中可以不溶解纤维素，因而无需为了提高溶解性而通过特殊的方法粉碎纤维素。而且，若过度地粉碎纤维素，则整体的制造效率降低。即，以往，为了将纤维素溶解到低温的碱水溶液中，通过爆碎处理或湿式粉碎等对纤维素进行极端微细化，但这些处理成为升高制造成本的原因。因此，原料纤维素的中位粒径优选在10μm以上。此外，如果中位粒径在10μm以上，则还具有纤维素分散液中不易出现团块的效果。另一方面，若使用该中位粒径过大的纤维素，则会出现得不到稳定的分散液，甚至不能良好地制造多孔纤维素珠的情况，因此，作为该中位粒径，优选在500μm以下。作为该中位粒径，更优选在15μm以上，特别优选在20μm以上，尤其优选在45μm以上，并且，更优选在200μm以下。

[0050] 另外，作为溶解性提高了的纤维素的例子，可以列举出溶解浆。不可否认，溶解浆是适合用于制作本发明的纤维素分散液的原料，但如以往已知的那样，为了得到溶解浆，多

采用环境负荷大的制法，而且现在，可能是由于纤维素相关产业的结构上的问题，其作为用于制造多孔纤维素珠的原料，非常难以获得，本发明者已经认识到这个情况。在本发明方法中，即使不使用溶解浆，也能良好地制造多孔纤维素珠。即，在本发明中，从整体的制造成本和制造效率的角度考虑，优选使用一般情况下容易获得的纤维素。

[0051] 对于碱水溶液和纤维素的混合条件无特殊限制。例如可以向碱水溶液中加入纤维素，也可以向纤维素中加入碱水溶液。优选预先将碱水溶液调节至低温后投入纤维素。

[0052] 纤维素也可在与碱水溶液混合之前悬浮在水中。由此，能抑制纤维素团块的发生，缩短制作纤维素分散液所需的时间，而且能容易地得到更均匀的纤维素分散液。该悬浮液中的纤维素的比例只要做适当调整即可，例如可以使其在1重量％以上、40重量％以下。

[0053] 还优选在与碱水溶液混合之前，将纤维素或纤维素悬浮液的温度与碱水溶液同样，调节至低温。此时，碱水溶液与纤维素或纤维素悬浮液的温度可以不是相同的温度。

[0054] 要加入纤维素或纤维素悬浮液的碱水溶液以及加入碱水溶液的纤维素悬浮液优选先搅拌好。作为此时的搅拌功率Pv值，优选在0.01kW/m^3以上、100kW/m^3以下。如果该搅拌功率在0.01kW/m^3以上，则可以高效地混合两者。此外，若该搅拌功率过高，则可能存在反而不易混合之虞，因此，该搅拌功率优选在100kW/m^3以下。

[0055] 此外，令人惊讶的是，本发明者发现，若在将纤维素悬浮在水中并调节至低温后，搅拌下添加碱水溶液，则能在瞬间调制出均匀的纤维素分散液，因而尤其可以优选使用该方法。此时，更优选添加的碱水溶液为低温。优选在纤维素分散液的制作中及储藏中也保持在低温。可以使该温度与在碱水溶液部分中说明的温度相同。

[0056] 此外，纤维素分散液中的纤维素的浓度优选为1～10重量％。如果在1重量％以上，则所得多孔珠的机械强度大，因而优选，如果在10重量％以下，则纤维素分散液的粘度低，且不能分散/膨润的部分少，因而优选。更优选为3～10重量％，特别优选为4～8重量％，尤其优选为5～7重量％，最优选为5～6重量％。另外，该纤维素分散液中的纤维素浓度不包含没有分散/膨润完全、没变均匀的部分。

[0057] (2)乳液的调制工序

[0058] 也可将纤维素分散液分散到分散介质中制成乳液后，使该乳液接触凝固溶剂。该乳液的调制是任意的，但借由该工序，能容易地由纤维素含量较多的纤维素分散液得到多孔纤维素珠，而且，能容易地得到机械强度高的多孔纤维素珠。

[0059] 对分散介质无特殊限制，只要是与纤维素分散液相容性低的介质就能良好地使用。例如，可以使用：中链脂肪酸甘油三酯(MCT)等食用油；棕榈油、椰油、角鲨烷等天然油；异硬脂醇、油醇等高级醇；2－辛基十二醇等的高级酯；二氯苯等亲油性有机溶剂等。此外，分散介质中也可适量添加山梨醇酐月桂酸酯、山梨醇酐硬脂酸酯、山梨醇酐油酸酯、山梨醇酐三油酸酯等山梨醇酐脂肪酸酯等表面活性剂。

[0060] 作为分散介质的使用量，只要使其为能充分分散纤维素分散液的液滴的量即可。例如，可以使分散介质的量为纤维素分散液的1质量倍以上。另一方面，若分散介质的量过多，则可能有废液量过量增加之虞，因此，作为该比例，优选在10质量倍以下。作为该比例，更优选在2质量倍以上，尤其优选在4质量倍以上，而且，更优选在8质量倍以下，特别优选在7质量倍以下，尤其优选在6质量倍以下。

[0061] 分散时的温度优选事先调节为与纤维素分散液相等。即，分散介质的温度、分散介

质与纤维素分散液混合时的温度、使纤维素分散液分散到分散介质中时的温度优选与碱水溶液一样调成低温。

[0062] 调制乳液时，通常，优选将纤维素分散介质加到搅拌过的分散介质中。作为此时的搅拌功率Pv值，优选在0.1kW/m^3以上、12kW/m^3以下。如果该搅拌功率在0.1kW/m^3以上，则能容易地得到良好的球形度和细孔特性。此外，若该搅拌功率过高，则可能有乳液的流动状态不易稳定之虞，因此，作为该搅拌功率，优选在12kW/m^3以下。作为该搅拌功率，更优选在1.1kW/m^3以上，特别优选在3.1kW/m^3以上，尤其优选在5.5kW/m^3以上。

[0063] (3)凝固工序

[0064] 接着，通过使纤维素分散液接触凝固溶剂而使纤维素多孔化。

[0065] 对本发明的凝固溶剂无特殊限制，只要是能通过与纤维素分散液接触而得到纤维素珠的溶剂就可良好地使用。其中，水和醇与作为纤维素分散液的良溶剂的碱水溶液的亲和性高，能良好地使用。尤其是使用醇时，与使用水时相比，能使纤维素珠的孔小，因而优选。此外，使用醇时，球形度提高，因而优选。此外，使用水与醇的混合溶剂时，通过混合比能任意地调整纤维素珠的孔的大小，因而更优选。对可在本发明中使用的醇无特殊限制，但碳数在6以下的醇与碱水溶液的亲和性高，因而优选，更优选碳数在4以下的醇，最优选甲醇。此外，凝固溶剂也可以是醇水溶液。

[0066] 此外，本发明的凝固溶剂还优选为酸性。如果凝固溶剂为酸性，则能中和碱水溶液，因而优选。若该中和能迅速进行，则对所得纤维素珠的化学损伤减轻，因而优选。此外，令人惊讶的是，本发明者发现，通过将凝固溶剂调成酸性，所得多孔珠的细孔径分布变窄，在期望有这种细孔径特性的情况下，优选事先将凝固溶剂调成酸性。对用于调成酸性的试剂无特殊限制，能广泛地使用硫酸、盐酸等无机酸、醋酸、枸橼酸、酒石酸等有机酸、磷酸、碳酸等具有缓冲效果的酸等。另外，凝固溶剂为酸性是指凝固溶剂的pH小于7.0。该pH优选在5.0以下，更优选在4.0以下，特别优选在3.0以下，尤其优选在2.0以下。另外，对该pH的下限无特殊限制，但优选在0.0以上。

[0067] 对凝固溶剂的使用量无特殊限制，只要适当调整即可。例如，可以调整为相对于纤维素分散液在0.001倍体积以上、100倍体积以下的程度。此外，可以调整为相对于乳液在0.01倍体积以上、10倍体积以下的程度。如果在这些范围内，则能容易地得到多孔纤维素珠。此外，能容易地得到良好的细孔和表面孔。作为凝固溶剂的使用量，更优选为相对于乳液在0.025倍体积以上，特别优选在0.05倍以上，尤其优选在0.07倍以上，此外，更优选在0.4倍体积以下，特别优选在0.2倍体积以下，尤其优选在0.15倍体积以下。与通常认为的凝固溶剂量相比，上述使用量相当少，但令人惊讶的是，本发明者发现，根据本发明，即使减少凝固溶剂的使用量，仍能良好地得到多孔纤维素珠。

[0068] 对上述凝固溶剂的温度无特殊限制，但当凝固溶剂中纤维素分散液冷冻、然后融化时，纤维素珠会变形或纤维素会容易破碎，因此，优选上述纤维素分散液不发生冷冻的温度。此外，凝固溶剂的温度优选在上述纤维素分散液的温度以上。通常，从加快凝固速度等效果的角度考虑，凝固溶剂比纤维素分散液温度低，但本发明者发现，令人惊讶的是，将凝固溶剂的温度设在纤维素分散液的温度以上时，凝固快速进行。对具体的温度无特殊限制，但凝固溶剂的温度优选在0℃以上、150℃以下，更优选在25℃以上、100℃以下，特别优选在45℃以上、80℃以下，但优选参考凝固溶剂的沸点等而适当调整。另外，纤维素分散液的温

度在使用乳液的情况下是指乳液的温度。

[0069] 对上述纤维素分散液或乳液与凝固溶剂的接触方法无特殊限制，可以使用气相法等以往公知的制粒方法。例如，只要先搅拌纤维素分散液或乳液，再添加凝固溶剂即可。作为气相法，例如可以列举出作为专利文献2的实施例1而记载的振动法。

[0070] 使纤维素分散液或乳液与凝固溶剂接触时，从所得珠的球形度的角度考虑，优选搅拌下使其接触。对搅拌条件无特殊限制，但从能容易地得到良好的球形度和细孔特性的角度考虑，优选接触时的Pv值(单位体积的功率)在0.1kW/m^3以上。更优选在1.1kW/m^3以上，尤其优选在3.1kW/m^3以上，最优选在5.5kW/m^3以上、12kW/m^3以下。若超过12kW/m^3，则会有接触时的流动状态不易稳定的情况。这些Pv值包含对于使用较软材质的纤维素的多孔珠的制造方法而言难以想象地大的范围，本来会非常担忧珠的破碎等问题，但令人惊讶的是，本发明者发现，反而使Pv值在这些范围内，有时会得到具有良好球形度和细孔特性的多孔纤维素珠，在本发明中能适宜地使用。

[0071] 对向纤维素分散液或乳液中添加凝固溶剂所需的时间无特殊限制，只要适当调整即可，但优选在150秒以内。虽然其理由尚不清楚，但令人惊讶的是，如果该时间在150秒以内，则所得多孔纤维素珠的强度提高。其结果，在将多孔纤维素珠充填到柱子中进行通液时，即使在高线速下也不易发生压密化。作为该时间，更优选在60秒以内，特别优选在40秒以内，尤其优选在2秒以内。另一方面，若该时间过短，则有纤维素的多孔化在局部发生之虞，因此，作为该时间，优选在0.1秒以上。另外，向纤维素分散液或乳液中添加凝固溶剂所需的时间是指从开始添加凝固溶剂到添加结束所需的时间。

[0072] (4)交联工序

[0073] 为了进一步提高采用上述方法所得的多孔纤维素珠的强度，可以使用交联剂进一步提高强度。被交联的多孔纤维素珠由于强度尤其优异，因此，还能耐受在高线速下或高压力下的使用。本工序是任意的。

[0074] 作为交联方法，无特殊限制，可以使用以往公知的方法。对交联剂、交联反应条件无特殊限制，可以使用公知的技术进行。例如，作为交联剂，可以列举出表氯醇、表溴醇、二氯丙醇等卤代醇；2官能性双环氧化物(双环氧乙烷)；多官能性聚环氧化物(聚环氧乙烷)。其中，尤其可良好地使用日本特开2008－279366号公报中所示的方法。本发明者进一步发展了日本特开2008－279366号公报中所示的方法，结果发现，通过分次添加促进交联反应的碱水溶液，强度进一步提高，可以作为本发明中最适合的交联方法使用。这些公报作为参考文献引入本申请中。

[0075] 优选在上述纤维素分散液的调制工序、乳液的调制工序以及凝固工序中使用搅拌操作。其中，优选至少一个以上工序中的搅拌操作使用叶片式桨、涡轮桨之类的剪切力大的搅拌桨进行。更优选使用这些搅拌桨的工序为乳液的调制工序和凝固工序，最优选为凝固工序。从常识上考虑，在凝固工序中，若使用剪切力大的搅拌桨，则采用较软材质的纤维素的多孔珠有破碎等之虞，因此，通常不会考虑使用这样的搅拌桨，但本发明者发现，反而使用这些剪切力大的搅拌桨，虽然其理由尚不清楚，但令人惊讶的是，在许多情况下能得到具有良好球形度和细孔特性的多孔纤维素珠。此外还发现，与上述超出常识的Pv值组合，令人惊讶的是，也能得到良好的多孔纤维素珠。作为可在本发明中使用的剪切力大的搅拌桨，无特殊限制，但可以列举出叶片式桨、涡轮桨。其中，可以良好地使用倾斜叶片式桨、倾斜叶片

式桨、圆盘涡轮桨等。此外，组合使用多个、多种桨叶也是优选的。此外，使用倾斜桨叶时，例如在容器的下侧向上搅拌、在上侧向下搅拌这样的区别使用也是优选的。此外，在乳液的调制工序中，常识上认为，使用大型桨叶在分散的均匀性、粒度分布的锐度等方面是适宜的，但令人惊讶的是，本发明者发现，使用小型桨叶(例如叶片式桨、涡轮桨)时，所得的多孔纤维素珠的粒度分布锐利(窄)，而且球形度高，因而优选。

[0076] 通过本发明方法制成的多孔纤维素珠，其着色受到抑制，并且机械强度高。因此，能使特定的蛋白等结合，作为血液接触材料等使用。

[0077] 此外，根据本发明，能在不使用毒性、腐蚀性高的辅料，不经过工业上不利的繁杂的工序的情况下制造上述那样的高品质的多孔纤维素珠。此外，根据条件，还可提高多孔纤维素珠的球形度，调整细孔。

[0078] 本申请要求基于2011年3月8日提交的日本专利申请第2011－050714号的优先权。将2011年3月8日提交的日本专利申请第2011－050714号的说明书的全部内容引人本申请中以供参考。

[0079] 实施例

[0080] 下面对本发明的实施例进行说明，但本发明不局限于这些实施例。

[0081] 首先，对制得的多孔纤维素珠的物性的试验方法进行说明。

[0082] 试验例1 表面孔径的测定

[0083] 用5倍体积量的30％乙醇清洗由各实施例得到的多孔纤维素珠，用30％乙醇置换多孔纤维素珠中所含的液体部分。接着，依次使用50％乙醇、70％乙醇、90％乙醇、特级乙醇、特级乙醇、特级乙醇对多孔纤维素珠进行同样处理，从而用乙醇置换液体部分。进而使用叔丁醇/乙醇为3/7的混合液对多孔纤维素珠进行同样处理。接着，使用叔丁醇/乙醇＝5/5、7/7、9/1、10/0、10/0、10/0的混合液对多孔纤维素珠进行处理，用叔丁醇置换液体部分，然后，冷冻干燥。对冷冻干燥了的多孔纤维素珠实施蒸镀处理，拍摄2万5千倍的SEM图像。使用美国国立卫生研究所生产的软件ImageJ，由所得的SEM图像测得表面孔径。

[0084] 试验例2 最大细孔径的测定

[0085] (1)柱充填

[0086] 将多孔纤维素珠分散到RO水中，脱气1小时。以105cm/h的线速度将脱气后的多孔粒子充填到柱子(GE Healthcare日本公司生产的Tricorn10/300)中。然后，用pH7.5的溶出液(129mL)以26cm/h的线速度对柱子进行通液。

[0087] (2)添加标记物

[0088] 使用以下物质作为标记物。

[0089] • 蓝色葡聚糖2000(Pharmacia Fine Chemicals公司产品)

[0090] • 低密度脂蛋白(SIGMA公司产品)，MW3,000,000

[0091] • 甲状腺球蛋白(SIGMA公司产品)，MW660,000

[0092] • 铁蛋白(SIGMA公司产品)，MW440,000

[0093] • 醛缩酶(SIGMA公司产品)，MW158,000

[0094] • 人来源IgG(SIGMA公司产品)，MW115,000(参考例1中不使用)

[0095] • 牛血清白蛋白(和光公司产品)，MW6,700

[0096] • 细胞色素C(和光公司产品)，MW12,400

[0097] • 杆菌肽(和光公司产品),MW1,400

[0098] 边用上述溶出液以26cm/h的线速度对柱子进行通液,边注入用pH7.5的缓冲液将上述标记物稀释至5mg/mL的稀释液各12μL。另外,标记物的浓度随时进行微调。

[0099] (3)测定

[0100] 作为测定器,使用了DGU－20A3、SCL－10A、SPD－10A、LC－10AD、SIL－20AC、CTO－10AC(分别为岛津公司产品),作为测定软件,使用了LCSolution。在液量测定中使用了50mL量筒。

[0101] 在注入标记物的同时开始UV监测及液量的测定,

[0102] 1)将与蓝色葡聚糖的最初的峰相对应的液量作为V_0(mL)。

[0103] 2)将与各标记物的峰对应的液量作为V_R(mL)。

[0104] 3)将柱内的多孔粒子的总体积作为V_t(mL)。

[0105] (4)计算

[0106] 用下式计算出各标记物的分配系数(K_{av})。

[0107] $K_{av}=(V_R-V_0)/(V_t-V_0)$

[0108] (5)最大细孔径的计算

[0109] 将各标记物的Kav和分子量的对数绘图,由显示直线性的部分求出下式的斜率和截距。

[0110] $K_{av}=k\times L_n$(分子量)$+b$

[0111] 接着,由求到的斜率和截距算出k_{av}为0时的分子量,也就是排阻极限分子量。接着,将排阻极限分子量代入中性缓冲液中的球状蛋白质的直径与分子量的下述相关式,将求出的值作为试样粒子的细孔的最大直径。

[0112] 球状蛋白质在中性缓冲液中的直径(Å)$=2.523\times$分子量$^{0.3267}$

[0113] 试验例3 平均细孔径的计算

[0114] 在上述试验例2(5)中,将与显示直线性的部分的最大$K_{av}/2$相当的分子量代入上述中性缓冲液中的球状蛋白质的直径与分子量的相关式中,将求出的值作为多孔纤维素珠的细孔的平均径。

[0115] 另外,在试验例2及试验例3中,测定吸附体对目标吸附物质的K_{av}时,有目标吸附物质被吸附而不能准确测定之虞。因此,吸附体对目标吸附物质的K_{av}通过测定具有与目标吸附物质相近的分子量的2种以上的蛋白质的K_{av},对这些数据进行计算而求出。例如,目标吸附物质为IgG时,由铁蛋白和白蛋白的数据求出K_{av}。

[0116] 试验例4 中位粒径的测定

[0117] 使用激光衍射/散射式粒径分布测定装置(崛场公司产品LA－950)测定多孔纤维素珠的体积基准的粒径分布,求出中位粒径。

[0118] 试验例5 强度评价

[0119] 使用AKTAexplorer10S(GE HealthcareBioscience公司产品),将22μm的筛安装到直径为0.5cm、高度为15cm的柱子上,分别装入多孔纤维素珠3mL,在450cm/h的线速度下用20％乙醇水溶液(用和光纯药工业公司生产的乙醇和蒸馏水调制)通液1小时进行充填。接着,用pH7.4的磷酸缓冲液(SIGMA公司产品)以任意线速度进行通液,求出发生压密化的线速度,作为强度评价。

[0120] 实施例1

[0121] (1)碱水溶液A的制作

[0122] 使用和光纯药公司生产的氢氧化钠和蒸馏水制作9重量%的氢氧化钠水溶液，将其温度调整至4℃。

[0123] (2)纤维素分散液A的制作

[0124] 将调整至4℃的上述碱水溶液保持在4℃进行搅拌，接着，投入在4℃的环境下静置了2小时的庄信万丰公司生产的微晶纤维素(中位粒径:71μm)，一点点地添加，使纤维素为5重量%。从添加结束起，保持在4℃下继续搅拌2小时，制作纤维素均匀分散、膨胀的纤维素分散液，在4℃下储藏。所得纤维素分散液的照片示于图1(1)。

[0125] (3)多孔纤维素珠的制作

[0126] 在4℃、300rpm下搅拌中链脂肪酸甘油三酯(理研维他命公司生产的Actor M-2)85mL，向其中加入纤维素分散液A15mL，在4℃、300rpm下搅拌15分钟。将所得的分散液添加到调整至50℃、300rpm的90%甲醇水溶液中，在50℃、300rpm下搅拌10分钟。抽滤后，用75mL乙醇清洗，接着，用150mL的水清洗，得到多孔纤维素珠。所得多孔纤维素珠的表面孔径的中位径为747Å。这样，即使是纤维素不溶解、以往被认为不能被用于多孔纤维素珠的制造的纤维素分散液，也能用来制造具有良好物性的多孔纤维素珠。

[0127] 实施例2

[0128] 除了在凝固溶剂中使用1.2M枸橼酸水溶液(用和光纯药公司生产的枸橼酸一水合物和蒸馏水制作)，使凝固溶剂的温度为75℃以外，按与实施例1相同的方法得到多孔纤维素珠。所得的多孔纤维素珠的表面孔径的中位径为1057 Å。

[0129] 实施例3

[0130] 除了在凝固溶剂中使用以9:1混合甲醇和1.2M枸橼酸水溶液而成的溶液以外，按与实施例1相同的方法得到多孔纤维素珠。所得的多孔纤维素珠的表面孔径的中位径为932 Å。

[0131] 实施例4

[0132] 除了在凝固溶剂中使用以8:2混合甲醇和和光纯药公司生产的硫酸而成的溶液以外，按与实施例1相同的方法得到多孔纤维素珠。所得的多孔纤维素珠的表面孔径的中位径为1298 Å。

[0133] 实施例5

[0134] (1)纤维素分散液B的制作

[0135] 除了使纤维素为6重量%以外，按与实施例1(2)的纤维素分散液A相同的方法制得。

[0136] (2)多孔纤维素珠的制作

[0137] 向和光纯药公司生产的邻二氯苯82mL中加入和光纯药公司生产的山梨醇酐单油酸酯(与span80相当的产品)1.15g，在4℃、330rpm下进行搅拌，向其中加入纤维素分散液B18mL，在4℃、330rpm下搅拌15分钟。将所得的乳液添加到调整至55℃、300rpm的300mL甲醇中，在55℃、300rpm下搅拌10分钟，使其凝固。抽滤后，用75mL甲醇清洗，接着用150mL水清洗，得到多孔纤维素珠。所得的多孔纤维素珠的表面孔径的中位径为667 Å。

[0138] 实施例6

[0139] 除了将凝固溶剂改为乙醇以外，按与实施例5相同的方法制得纤维素珠。所得的纤维素珠的表面孔径的中位径为453 Å。

[0140] 比较例1

[0141] (1)纤维素溶液的制作

[0142] 将调整至4℃的实施例1(1)的碱水溶液A保持在4℃进行搅拌，接着，投入在4℃的环境下静置了2小时的庄信万丰公司生产的微晶纤维素(中位粒径：71μm)，一点点地添加，使纤维素为9重量%。从添加结束起，保持在4℃下继续搅拌2小时，使纤维素均匀地分散、膨胀，在－20℃下使其完全冷冻。接着，在4℃进行融化，用蒸馏水稀释至使体积为1.5倍，搅拌，在均匀化后，于4℃下储藏。所得的纤维素溶液的照片示于图1(2)。

[0143] (2)多孔纤维素珠的制作

[0144] 除了使用上述纤维素溶液代替纤维素分散液B以外，按与实施例6相同的方法得到多孔纤维素珠。所得的多孔纤维素珠的表面孔径的中位径为502 Å。

[0145] 比较例2

[0146] 除了使用比较例1(1)的纤维素溶液，将凝固溶剂由55℃的甲醇改为4℃的60％的甲醇，凝固溶剂的温度调成4℃以外，按与实施例5相同的方法得到多孔纤维素珠。所得的多孔纤维素珠的表面孔径的中位径为451 Å。

[0147] 比较例3

[0148] 除了使凝固溶剂量为5.4mL，使凝固溶剂为甲醇以外，按与比较例2相同的方法得到多孔纤维素珠。所得的多孔纤维素珠的表面孔径的中位径为531 Å。

[0149] 如比较例1～3所示，将纤维素分散液冷冻后使其融化，由此调制纤维素溶液，再使该溶液与凝固溶剂接触，也能得到多孔纤维素珠。但是，分散液的冷冻和融化需要能量和时间，不适合工业上的大量生产。另一方面，根据本发明，即使不经过冷冻工序和融化工序，也能制造同样的多孔纤维素珠。

[0150] 实施例7

[0151] 除了使调制乳液时的温度为55℃、凝固溶剂量为7.2mL以外，按与实施例5相同的方法制成多孔纤维素珠。

[0152] 实施例8

[0153] 除了使凝固溶剂为60％甲醇以外，按与实施例7相同的方法得到多孔纤维素珠。

[0154] 实施例9

[0155] 除了使凝固溶剂为蒸馏水以外，按与实施例7相同的方法得到多孔纤维素珠。

[0156] 实施例10

[0157] 除了使凝固溶剂为甲醇以外，按与实施例7相同的方法得到多孔纤维素珠。

[0158] 实施例11

[0159] (1)碱水溶液B的制作

[0160] 使用和光纯药公司生产的氢氧化钠和蒸馏水制作33重量％的氢氧化钠水溶液，调整至4℃。

[0161] (2)纤维素分散液C的制作

[0162] 混合旭化成化学公司生产的日本药典纤维素PH－F20JP(中位粒径：21μm)9.2重量份和蒸馏水104重量份，搅拌下调整至4℃。接着，投入40重量份在搅拌下调整至4℃的碱水

溶液B，在4℃下搅拌了30分钟。

[0163] (3)多孔纤维素珠的制作

[0164] 混合154重量份调整至4℃的纤维素分散液C、776重量份调整至4℃的邻二氯苯和7.8重量份调整至4℃的山梨醇酐单油酸酯(与span80相当的产品)，在安装有2片盘式涡轮桨的分液瓶内以300rpm(Pv值：0.2kW/m^3)在4℃下搅拌30分钟，制成乳液。在维持温度和搅拌下加入调整至4℃的甲醇57重量份作为凝固溶剂。此时的凝固溶剂的体积相对于乳液为0.1倍。此外，添加凝固溶剂所需的时间为2秒。之后，在维持搅拌数和温度的情况下搅拌20分钟。抽滤后，使用乙醇240重量份作为清洗液进行清洗，接着，用500重量份的水进行清洗，得到多孔纤维素珠。使用38μm和90μm的筛对所得的多孔纤维素珠进行了湿式分级。

[0165] (4)交联－方法A(参考日本特开2008－279366的方法)

[0166] 向上述多孔纤维素珠11体积份中加入蒸馏水，使其为16.5体积份，移到反应容器中。向其中加入4N NaOH水溶液(用Nacalai Tesque公司产品和蒸馏水调制)3.86体积份，升温至40℃。向其中投入含有丙三醇缩水甘油醚的Denacol EX－314(Nagase chemteX公司产品)1.77重量份作为交联剂，在40℃搅拌了4小时。反应结束后，边抽滤边用珠的20倍体积量以上的蒸馏水清洗，得到一次交联珠。

[0167] 将所得的一次交联珠移至容器中，加入蒸馏水，使总量为交联多孔珠的10倍体积量，使用高压釜在120℃下加温1小时。放冷至室温后，用珠的5倍体积量以上的RO水清洗，得到环氧基变成甘油基的高压釜加温过的一次交联珠。

[0168] 接着，向该高压釜加温过的一次交联珠11体积份中加入蒸馏水，使其为16.5体积份，移至反应容器中。向其中加入4N NaOH水溶液(用Nacalai Tesque公司产品和蒸馏水调制)3.86体积份，升温至40℃。向其中投入Denacol EX－314(Nagase chemteX公司产品)1.77重量份，在40℃搅拌4小时。反应结束后，边抽滤边用珠的20倍体积量以上的蒸馏水清洗，得到二次交联珠。

[0169] 将所得的二次交联珠移至容器中，加入蒸馏水，使总量为交联多孔珠的10倍体积量，使用高压釜在120℃加温60分钟。放冷至室温后，用珠的5倍体积量以上的蒸馏水进行清洗，得到高压釜加温过的二次交联珠。

[0170] (5)物性试验

[0171] 上述交联珠的中位粒径为75μm。此外，平均细孔径为215 Å，最大细孔径为1756Å，排阻极限分子量为5.0×10^8。

[0172] 实施例12

[0173] 除了使凝固溶剂为15重量％的枸橼酸一水合物甲醇溶液以外，按与实施例11相同的方法得到交联多孔纤维素珠。中位粒径为75μm，平均细孔径为190 Å，最大细孔径为718 Å，排阻极限分子量为3.2×10^7。

[0174] 实施例13

[0175] (1)多孔纤维素珠的制作

[0176] 除了使搅拌速度为500rpm(Pv值：1.1kW/m^3)，将90μm的筛改为63μm的筛以外，按与实施例11相同的方法制成多孔纤维素珠。

[0177] (2)交联－方法B

[0178] 向上述多孔纤维素珠20体积份中加入蒸馏水使其为30体积份，移至反应容器中。

向其中投入含有丙三醇缩水甘油醚的Denacol EX－314(Nagase chemteX公司产品)2.3重量份作为交联剂，边调整至40℃边继续搅拌。到达40℃后，搅拌30分钟。接着，准备2N NaOH水溶液(用Nacalai Tesque公司产品和蒸馏水调制)7.1体积份，每1小时加1/4。在此期间，维持温度在40℃，搅拌也继续进行。添加最后的1/4量后，在同一温度下搅拌1小时。反应结束后，边抽滤边用珠的20倍体积量以上的蒸馏水清洗，得到一次交联珠。

[0179] 将所得的一次交联珠移至容器中，加入蒸馏水，使总量为交联多孔粒子的10倍体积量，使用高压釜在120℃下加温1小时。放冷至室温后，用珠的5倍体积量以上的RO水清洗，得到环氧基变成甘油基的高压釜加温过的一次交联珠。

[0180] 接着，向该高压釜加温过的一次交联珠20体积份中加入蒸馏水，使其为30体积份，移至反应容器中。向其中投入含有丙三醇缩水甘油醚的Denacol EX－314(Nagase chemteX公司产品)2.3重量份作为交联剂，边调整至40℃边继续搅拌。到达40℃后，搅拌30分钟。接着，准备2N NaOH水溶液(用Nacalai Tesque公司产品和蒸馏水调制)7.1体积份，每1小时加1/4。在此期间，维持温度在40℃，搅拌也继续进行。添加最后的1/4量后，在同一温度下搅拌1小时。反应结束后，边抽滤边用珠的20倍体积量以上的蒸馏水清洗，得到二次交联珠。

[0181] 将所得的二次交联珠移至容器中，加入蒸馏水，使总量为交联多孔珠的10倍体积量，使用高压釜在120℃加温60分钟。放冷至室温后，用珠的5倍体积量以上的蒸馏水清洗，得到高压釜加温过的二次交联珠。

[0182] (3)物性试验

[0183] 上述交联珠的中位粒径为56μm。此外，平均细孔径为336 Å，最大细孔径为3400 Å，排阻极限分子量为3.8×10^{9}。该珠在线速度为3057cm/h的条件下也没有压密化。

[0184] 实施例14

[0185] 除了使凝固溶剂为15重量％的枸橼酸一水合物乙醇溶液以外，按与实施例11相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。中位粒径为75μm，平均细孔径为163 Å，最大细孔径为1040 Å，排阻极限分子量为1.0×10^{8}。

[0186] 实施例15

[0187] 除了使凝固溶剂为28重量份以外，按与实施例11相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。中位粒径为75μm，平均细孔径为232 Å，最大细孔径为1419 Å，排阻极限分子量为2.6×10^{8}。

[0188] 实施例16

[0189] 除了将63μm的筛改为90μm的筛以外，按与实施例13相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。中位粒径为75μm。该珠在装置的可通液的最大线速度即3057cm/h下也没有压密化。

[0190] 实施例17

[0191] 除了使搅拌速度为700rpm(Pv值：3.1kW/m^3)以外，按与实施例16相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。中位粒径为75μm。该珠在线速度为3057cm/h的条件下也没有压密化。

[0192] 实施例18

[0193] 除了使搅拌速度为250rpm(Pv值：0.1kW/m^3)以外，按与实施例16相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。中位粒径为75μm，平均细孔径为130Å，最大细孔径为562Å，排阻极限分子量为1.5×10^{7}。

[0194] 实施例19

[0195] 除了将搅拌桨改为1片WH型大型桨，使搅拌速度为350rpm(Pv值：1.1kW/m^3)以外，按与实施例16相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。刚制粒后的粒度分布比实施例16宽。

[0196] 实施例20

[0197] 除了使添加凝固溶剂所需的时间为60秒以外，按与实施例16相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。中位粒径为75μm。

[0198] 实施例21

[0199] 除了使添加溶剂所需的时间为160秒以外，按与实施例16相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。中位粒径为75μm。该珠在线速度为1987cm/h的条件下发生压密化。此外，所得的交联的多孔纤维素珠对柱的充填性略有降低，蛋白质较快流出。

[0200] 实施例22

[0201] 除了使搅拌桨为2片倾斜叶片式桨以外，按与实施例17相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。

[0202] 实施例23

[0203] 除了使温度调整为9℃以外，按与实施例22相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。

[0204] 实施例24

[0205] 除了使温度调整为0℃以外，按与实施例22相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。

[0206] 实施例25

[0207] 除了使添加凝固溶剂所需的时间为10秒以外，按与实施例16相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。

[0208] 实施例26

[0209] 除了使添加凝固溶剂所需的时间为30秒以外，按与实施例16相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。

[0210] 实施例27

[0211] 除了使搅拌速度为1180rpm(Pv值：12kW/m^3)以外，按与实施例16相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。

[0212] 实施例28

[0213] 除了使搅拌速度为800rpm(Pv值：5.5kW/m^3)以外，按与实施例16相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。

[0214] 实施例29

[0215] 除了将用于制作分散液的搅拌时间由30分钟变为120分钟以外，按与实施例16相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。

[0216] 实施例30

[0217] (1)纤维素分散液D的制作

[0218] 除了使用旭化成化学公司生产的日本药典纤维素KG－1000(中位粒径：54μm)，按与实施例11(2)的纤维素分散液C相同的方法制作。

[0219] (2)多孔纤维素珠的制作

[0220] 除了使用上述纤维素分散液D以外，按与实施例27相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。

[0221] 实施例31

[0222] 除了使用纤维素分散液D以外，按与实施例27相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。

[0223] 实施例31

[0224] 除了使凝固溶剂量为228重量份以外，按与实施例30相同的方法得到交联的多孔纤维素珠。

[0225] 比较例4

[0226] 使用和光纯药公司生产的氢氧化钠和蒸馏水制作9重量％的氢氧化钠水溶液，调整至25℃。将调整至25℃的上述氢氧化钠水溶液保持在25℃下进行搅拌，接着，投入在25℃的环境中静置了2小时的庄信万丰公司生产的微晶纤维素，一点点地添加，使纤维素为5重量％。从添加结束起，保持在25℃下继续搅拌2小时，在25℃储藏，其结果，纤维素粒子沉降，没能得到纤维素分散液。而且着了黄色。

[0227] 比较例5

[0228] (1)纤维素溶液的制作

[0229] 向100g硫氰酸钙的60重量％水溶液中加入6.4g的结晶纤维素(旭化成化学公司生产的CEOLUS PH101，中位粒径：73μm)，加热至120℃进行溶解。由于在该温度下难以储藏，因而在使用时进行调配。

[0230] (2)交联多孔纤维素珠的制作

[0231] 参考WO2010/095573的实施例，按如下方法制作使用硫氰酸钙制作的多孔纤维素珠。具体地，向上述纤维素溶液中添加山梨醇酐单油酸酯6g作为表面活性剂，滴加到预先加热到140℃的邻二氯苯480mL中，在300rpm下搅拌。接着，将上述分散液冷却至40℃，注入到甲醇190mL中使其凝固。抽滤后，用甲醇190mL清洗。进行数次这种甲醇清洗。再用大量的蒸馏水清洗，然后，抽滤，得到多孔纤维素珠。将过滤后的多孔纤维素珠100g加入到在121g的蒸馏水中溶解60g的硫酸钠而成的溶液中，在50℃搅拌2小时。接着，加入45重量％的氢氧化钠水溶液3.3g和硼氢化钠0.5g进行搅拌。在50℃下继续搅拌，每隔15分钟添加将45重量％的氢氧化钠水溶液48g和表氯醇50g分别进行了25等分的量。添加结束后，在50℃使其反应16小时。反应后，冷却至40℃，加入醋酸2.6g进行中和，抽滤，用蒸馏水清洗。使用53μm和90μm的筛进行湿式分级，得到平均粒径为78μm的交联的多孔纤维素珠。

[0232] (3)物性试验

[0233] 上述交联多孔纤维素的表面孔径为1649 Å，平均细孔径为793 Å，最大细孔径为14100 Å，排阻极限分子量为2.9×10^{11}。这种珠在线速度为3057cm/h下也没有压密化。

[0234] 如上所示，比较例5中所得的交联多孔纤维素具有相当过大的细孔。此外，含有毒性高的硫氰酸钙的溶液作为废液残留下来。

[0235] 参考例1

[0236] 作为单克隆抗体的吸附量较大的类型而在销售的导入有蛋白A的多孔琼脂糖珠MabSelect SuRe LX(GE Healthcare公司产品)的平均细孔径为425 Å，最大细孔径为2970 Å，排阻极限分子量为2.5×10^{9}。



图1