

#### 四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本；2003.12.02；2003-402725
2. 日本；2004.11.30；2004-345739

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於含有磷酸膽鹼基之新穎化合物、及由該化合物所構成之表面改質劑、藉由該表面改質劑改質之改質粉體、利用該改質粉體作為載體之色層分析用填充劑、藉由該表面改質劑改質之過濾材及玻璃製實驗器具。

本發明之化合物所構成之表面改質劑可對物體賦予活體適合性、保濕性、及其他各種有用的機能。

### 【先前技術】

以往曾探討將具有磷酸膽鹼基之聚合物當作活體適合性高分子，且將此聚合物被覆於各種基劑所成之活體適合性材料也已開發出。

例如，於專利文獻 1 中揭示出一種化妝品，其係以 2-甲基丙烯醯基羥乙基磷酸膽鹼之均聚物及共聚物被覆之粉末，利用為化妝品用粉末，而改善保濕性與皮膚密合性。

又，於專利文獻 2 及專利文獻 3 中揭示出，被覆具有磷酸膽鹼基之聚合物所成之醫療用材料與分離劑。

上述之材料之製備，係使主要具有羥基之丙烯酸系單體與 2-氯-1,3,2-雙氧磷烷(dioxaphosphorane)-2-氧化物反應，再藉由三甲胺作為 4 級銨，藉此合成得具有磷酸膽鹼構造之單體，再以此進行聚合而得到聚合物，並將該聚合物被覆於表面而構成。(有關聚合物之製造方法，可參照專利文獻 4 及 5)。

於專利文獻 4 中，係製造 2-甲基丙烯醯基羥乙基磷酸

膽鹼與甲基丙烯酸酯之共聚物，而專利文獻 5 中，則製造 2-甲基丙烯酸鹽基羥乙基磷酸膽鹼之均聚物。

另一方面，將蛋白質或較蛋白質分子量小之聚肽等活體樣品依分子大小而進行分離之 GFC 用填充劑，有多種之市售品存在。此 GFC 用填充劑中，有以交聯之親水性高分子作為載體之填充劑、與以矽膠作為載體之填充劑。

以交聯之親水性高分子作為載體之填充劑，其移動相可適用之 pH 範圍廣，泛用性高。然而，以高分子作為載體之填充劑與以矽膠作為載體之填充劑相較，(1)由於細孔徑之控制困難，故難以得到高理論段數；又，(2)由於對使用於高效液相色層分析(HPLC)時之高壓條件其強度差、且因移動相溶劑而使粒子膨潤，故常難以得到再現性良好之層析圖。

以矽膠作為載體之填充劑，則會有蛋白質或聚肽吸附於矽膠載體表面之問題。因此，為了抑制分析樣品中之蛋白質與聚肽吸附於矽膠，而有市售品係使用以非解離性之親水性基進行表面改質之矽膠的填充劑。

例如，作為矽膠系 GFC 用管柱，有昭和電工(股)公司之市售品 Shodex PROTEIN KW-083(製品名)。根據型錄之說明，此矽膠系管柱適合分子量數千至 100 萬左右之蛋白質分析之矽膠系之 GFC 模式管柱。

又 YMC 公司之市售品 YMC-Pack Diol(製品名)。根據說明，此亦為矽膠系之 GFC 用管柱，由於係使具有二醇構造之官能基化學性地鍵結於矽膠載體上，故可適用於分子量

一萬至數十萬的蛋白質之分離。

於非專利文獻 1 中記載：藉由在載體上以經化學性接枝之磷酸膽鹼基來減少蛋白質之吸附。

又，於專利文獻 6 及 7 中揭示一種有機矽烷系表面改質劑(矽烷耦合劑)，其具有周知之顯示優異親水性之肽構造。於專利文獻 6 中揭示出，使二甲基胺烷基矽烷於有機溶劑中與 1,3-丙烷磺內酯反應，可得到由具有 4 級銨之正電荷與磺酸之負電荷所構成之磺基甜菜鹼之矽烷耦合劑。專利文獻 7 中記載著，由具有 4 級銨與羧基所構成之羧基甜菜鹼之矽烷耦合劑之製造方法。此等矽烷耦合劑，可塗佈於玻璃等、使其乾燥以進行物質表面之改質。然而，以此等構造之甜菜鹼雖可賦予物質表面優異的親水性，但由於甜菜鹼中之正電荷與負電荷的強度不同，故無法成為電中性。例如，磺基甜菜鹼，因磺酸之強酸性而帶負電荷，而羧基甜菜鹼，則因 4 級銨而呈現正電荷的性質。於如此之甜菜鹼構造中，蛋白質間會產生過強的離子交互作用而導致蛋白質之非可逆性的吸附。

另一方面，以活體適合性與蛋白質吸附之抑制為目的之此等矽烷耦合劑，從未使用於色層分析用填充劑與過濾器類及實驗器具類。

專利文獻 1：日本專利特開平 7-118123 號公報

專利文獻 2：日本專利特開 2000-279512 號公報

專利文獻 3：日本專利特開 2002-98676 號公報

專利文獻 4：日本專利特開平 9-3132 號公報

專利文獻 5：日本專利特開平 10-298240 號公報

專利文獻 6：日本專利特開平 5-222064 號公報

專利文獻 7：日本專利特開昭 63-295593 號公報

非專利文獻 1：Jian R. Lu 等、Langmuir 2001、17、  
3382-3389

### 【發明內容】

然而，藉由具有磷酸膽鹼基之聚合物被覆於物體的表面以改質之方法，欲將全部表面有效地被覆有其困難。又，由於被覆之聚合物會自物體表面剝離，故於耐久性亦會產生問題。再者，由於物體的表面係以聚合物被覆，可能會偏離藉由磷酸膽鹼基之活體適合性等之機能性賦予目的，反而喪失物體本身所要求之細孔等之微細構造之基本性質。

又，即使於將磷酸膽鹼基之衍生物作為低分子導入物體中的場合，於先導入可與磷酸膽鹼基之衍生物反應的官能基於物體，再使磷酸膽鹼基之衍生物反應的方法中，由於物體表面會有未反應的官能基殘留而導致活體適合性降低。

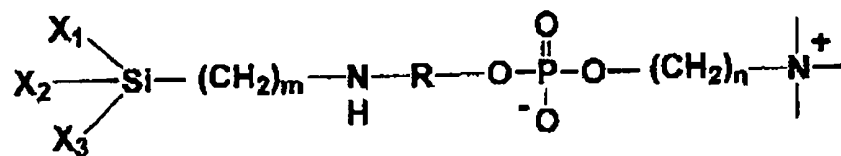
例如，先導入胺基於物體表面，然後再使磷酸膽鹼之醛衍生物與物體表面的胺基反應時，會有多數的未反應的胺基殘存。此等殘存的胺基，藉由與其他低分子化合物鍵結雖可某種程度地封鎖，惟，欲維持物體表面之親水性有困難，且亦無法完全地封鎖。於有胺基殘存在物質表面的場合，由於胺基具強鹼性，故顯現與主要為酸性蛋白質之

強離子交換性的交互作用，而會將蛋白質幾乎完全吸附。於作為色層分析用填充劑使用之場合，會成為該蛋白質回收率差、與波峰脫尾(tailing)顯著的原因。再者，蛋白質之吸附會導致其變性，於作為活體適合性材料使用的場合，會成為發炎等之原因，故非良好。

本發明發現，使含有磷酸膽鹼基之化合物、與具有可和此化合物反應的官能基且具有可與物體表面發生鍵結的官能基之物體進行直接反應，則可以簡便且高泛用性的方式，將所需之任意量之磷酸膽鹼基直接賦予至物體表面。

且亦發現，藉由以該化合物所構成之表面改質劑，可容易地製造：改質粉體、利用該改質粉體作為載體之色層分析用填充劑、及以該表面改質劑改質之過濾器及玻璃製實驗器具。本發明於焉得以完成。

亦即，本發明係提供一種以下述式(1)表示之含磷酸膽鹼基化合物。



(1)

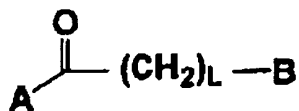
式中，m為2~6，n為1~4。

X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>分別單獨地為甲氧基、乙氧基或鹵素；惟，X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>中之1至2個可為甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基之任一者。

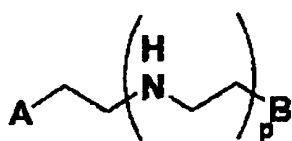
R為下述式(2)~(4)中之構造之任一者(惟，於下述(2)~(4)構造中，式(1)之化合物係以A-R-B表示)。



(2)



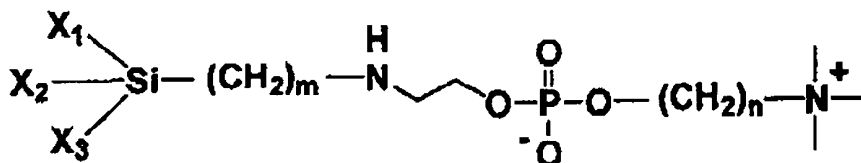
(3)



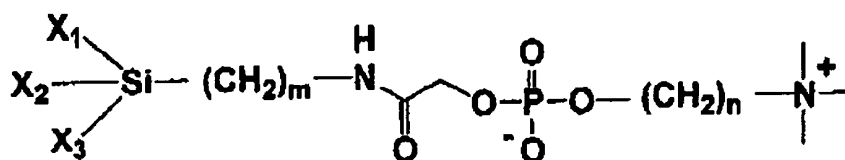
(4)

於式(2)~(4)中，L表示1~6，P表示1~3。

又，本發明亦提供以下述式(5)或(6)表示之含磷酸膽鹼基化合物。



(5)



(6)

式中，m為2~6，n為1~4；X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>分別單獨地為甲氧基、乙氧基或鹵素；惟，X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>中之1至2個可為甲

基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基之任一者。

又，本發明亦提供由上述含磷酸膽鹼基化合物所構成的表面改質劑。

又，本發明提供一種用以製造前述式(6)化合物之製造方法；其特徵在於，藉由甘油磷酸膽鹼之過碘酸鈉與三氯化鈦之氧化反應，合成具有磷酸膽鹼基及羧基之化合物，再將具有胺基之有機矽烷化合物與具有磷酸膽鹼基及羧基之化合物，使用縮合劑進行反應來合成出。

再者，本發明亦提供一種以上述表面改質劑處理之改質粉體。

又，本發明亦提供一種由以上述表面改質劑處理之改質載體所構成之色層分析用填充劑。

再者，本發明亦提供一種以上述表面改質劑處理之過濾器。

又，本發明提供一種以上述表面改質劑進行表面處理之玻璃製實驗器具。

只要使用本發明之化合物、由該化合物所構成之表面改質劑，可使各種物體的表面，以單一步驟之極為簡便的反應賦予所希望之任意量的磷酸膽鹼基。其結果，可容易地製造：藉由磷酸膽鹼基而具有所需機能之改質粉體、利用該改質粉體作為載體之色層分析用填充劑、以該表面改質劑改質之過濾器、以該表面改質劑處理之玻璃製實驗器具。

更詳而言之，依據本發明，可在不損及物體表面的微

細構造之下，簡便且定量地導入對蛋白質與聚肽之吸附極少的磷酸膽鹼基。又，由於不會導入磷酸膽鹼基以外的未反應官能基，故可提供活體適合性極高的材料。

於使用於矽膠等之色層分析用載體之場合，可成為極優異的 GFC 用填充劑。使用本發明之表面改質劑所合成之色層分析用填充劑的特徵在於，當然可依 GFC 模式而藉由分子量差異進行分離，更可因應蛋白質與聚肽所具有之等電點與疏水性之差異而有優異的分離能力。

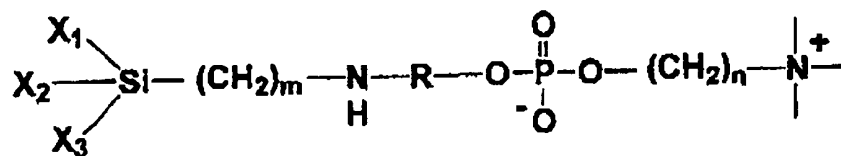
再者，由於離子交換性與疏水性可依移動相之鹽濃度與 pH 而調節，故可進行因應蛋白質之獨特的分離。再者，由於蛋白質於粉體表面不會發生非可逆性的吸附，故可在蛋白質不會發生變性、不失活下，進行分離、萃取、分析。

使用本發明之表面改質劑處理過濾器及玻璃製實驗器具的場合，可得到蛋白質吸附極少之過濾器及玻璃製實驗器具。

### 【實施方式】

又，本發明之化合物，不論精製、非精製與否，皆可進行表面改質，而可得到蛋白質吸附抑制等之效果。

以下述式(1)、或(5)或(6)表示之含磷酸膽鹼基化合物，係新穎化合物。



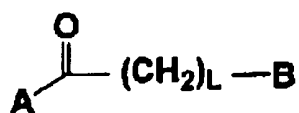
式中， $m$  為 2~6， $n$  為 1~4。

$X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  分別單獨地為甲氧基、乙氧基或鹵素；惟， $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  中之 1 至 2 個可為甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基之任一者。

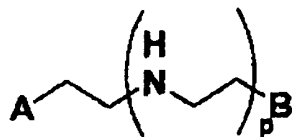
$R$  為下述式(2)~(4)中之構造之任一者(惟，於下述(2)~(4)構造中，式(1)之化合物係以  $A-R-B$  表示)。



(2)

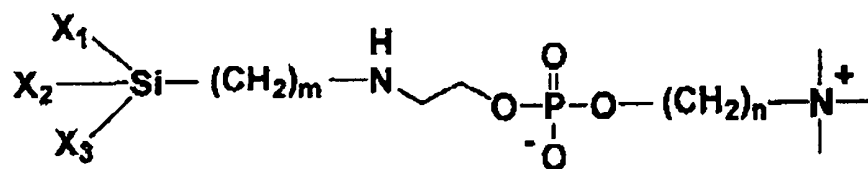


(3)

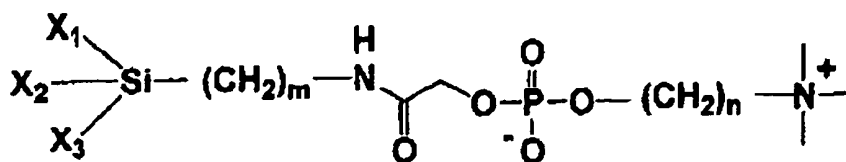


(4)

於式(2)~(4)中， $L$  表示 1~6， $P$  表示 1~3。



(5)

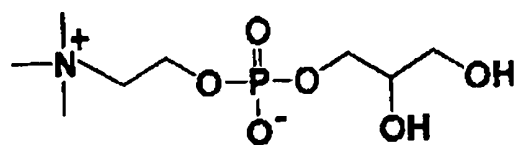


(6)

式中， $m$  為 2~6， $n$  為 1~4； $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  分別單獨地為甲氧基、乙氧基或鹵素；惟， $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  中之 1 至 2 個可為甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基之任一者。

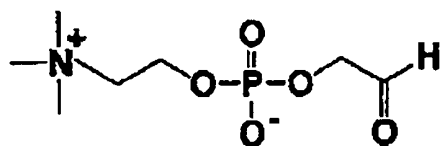
式(1)、或(5)或(6)之含磷酸膽鹼基化合物之製造方法

將以下述式(7)表示之磷酸膽鹼衍生物溶解於蒸餾水中。下述式(7)之磷酸膽鹼衍生物為周知之化合物，可由市售品取得。



(7)

使式(7)的化合物之水溶液於冰浴中冷卻，添加過碘酸鈉，攪拌 5 小時。將反應液減壓濃縮、減壓乾燥，藉由甲醇萃取以下述式(8)表示之具醛基之磷酸膽鹼衍生物。構造式及 NMR 光譜示於圖 1，質譜示於圖 18。



(8)

然後，將 3-氨基丙基三甲氧基矽烷 0.5 當量添加於式

(8)之甲醇溶液中。將此混合溶液於室溫下攪拌既定得時間之後，以冰冷卻之，並適量添加氰基氫硼化鈉，回復到室溫後攪拌 16 小時。此期間，亦持續流通乾燥氮氣於反應容器中。將沈澱過濾後，得到式(5)及/或式(6)之甲醇溶液。

其次，就本發明之化合物之精製方法加以說明。惟，本發明之化合物之精製方法並不限定於下述者。

將得到之甲醇溶液減壓濃縮，使殘留物溶解於蒸餾水中。以此水溶液作為樣品。將具有疏水性作用與陽離子交換能力之高效液相色層分析用管柱之膠囊包 SCX UG80S-5(尺寸：4.6mm i.d. × 250mm)(資生堂公司製)連接至 HPLC 裝置，將 0.2mmol/L 之磷酸緩衝液(pH3.5)以 1mL/分的流速流通使其平衡化之後，注入樣品 10  $\mu$ L。使用差示折射計作為檢測器得到層析圖，可將作為目標物之化合物分離出。

惟，由本發明之化合物所構成之表面改質劑，可以精製前之甲醇溶液階段直接使用。

上述之順序，於以式(5)或(6)表示之化合物中之 m、n 即使改變，亦可同樣地施行。此處所示之順序為 m=3、n=2 的場合。再者，作為具有胺基之化合物，藉由使用 3-(2-胺基乙基胺基丙基)三甲氧基矽烷等亦可於矽烷部位與磷酸膽鹼基之間插入 2 級胺，此亦可用與上述相同的順序進行。反應溶劑並無特別限定，除上述甲醇以外，亦可使用水、乙醇、丙醇、丁醇等之醇類；N,N-二甲基甲醯胺與二甲亞砷等非質子溶劑。惟，為防止反應中有機矽烷化合物

之聚合，以脫水溶劑為佳。

又，於式(5)或(6)中之甲氧基( $\text{OCH}_3$ )為乙氧基( $\text{OC}_2\text{H}_5$ )的場合，係將甲醇改為乙醇進行反應，於Cl的場合則改為二甲基甲醯胺或二甲亞砜。

再者，於與Si鍵結之甲氧基或乙氧基或Cl中之2個或1個以甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基之任一者取代的場合，亦可使用上述方法同樣地製造。

#### 表面改質劑

上述式(5)及(6)之化合物作為物質之表面改質劑係有用。亦即，係可對物質表面容易地將所希望量之磷酸膽鹼基導入而進行改質者。具體而言，於表面具有羥基物質之場合，藉由其物質表面的羥基與式(5)及(6)化合物之 $\text{Si-OCH}_3$ 之脫水反應，可形成化學鍵。此化學反應可在幾乎全部的有機溶劑中，於 $10^\circ\text{C}$ 至 $250^\circ\text{C}$ 的溫度範圍中極容易地定量地進行。藉由此脫水反應，可在化學上、物理上極為安定地施行藉由磷酸膽鹼基之表面改質。

又，當物質表面不存在羥基的場合，使式(5)及(6)之化合物溶解於揮發性溶劑中，將該溶液塗佈於物質表面，再使溶劑乾燥的方法是有效的。作為具體例，可使式(5)及(6)之化合物溶解於甲醇中，將其塗佈於物質表面。然後，以 $10^\circ\text{C}$ 至 $250^\circ\text{C}$ 的溫度範圍使甲醇氣化。視需要可更進一步施以加熱處理。此時，式(5)及(6)之化合物 $\text{Si-OCH}_3$ 彼此間會發生脫水反應，生成 $\text{Si-O-Si}$ 鍵，而可將物質表面被覆。 $\text{Si-OCH}_3$ 彼此間發生脫水反應而生成 $\text{Si-O-Si}$ 鍵之反應

為周知者。當甲醇揮發時，如此生成的膜，由於可與於絕大部分的物質表面微量存在的各羥基發生鍵結，故為安定性良好的表面改質法。本法，不只對於不具有羥基的物質有效，亦為對具有羥基的物質極為有效之表面改質法。

藉由本發明之表面改質劑改質之物質(或材料)，為活體適合性及親水性優異的材料及成形品。作為在材料表面直接有具活體適合性之磷酸膽鹼基的材料，可應用於化妝品、醫用材料(人工內臟、手術用器具等)、色層分析用填充劑、塗料等之廣泛用途中。

又，本發明之表面改質劑，於作為分離或分析裝置用配管、配管連接零件、取樣用針、樣品瓶、檢測器單元等與試驗液接觸之材料的改質方法甚為有用，尤其是對HPLC、MS、NMR等之連接配管與電泳裝置之毛細管配管等材料，係較佳之改質劑。其等係鐵氟龍(註冊商標)管、鐵氟傑龍(Tefzel)管、聚醚醚酮(PEEK)管、熔凝矽管等材料。

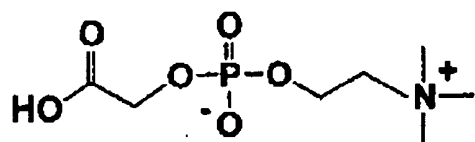
#### 使用具有羧基之磷酸膽鹼衍生物製造式(6)化合物之製造方法

磷酸膽鹼衍生物有極高之親水性，而對有機溶劑之溶解度極低。磷酸膽鹼之衍生物的合成可大致區分為：以雙氧磷烷類作為開始物質之全合成法；及以甘油基磷酸膽鹼作為開始物質之合成法，該甘油基磷酸膽鹼係藉由大豆等中所含之磷脂質之磷酯醯膽鹼水解而得。由於可溶解磷酸膽鹼之衍生物之有機溶劑有限，故合成之途徑較為複雜，

製造成本較高而成為實用化之障礙。此合成之複雜度與成本的問題在全合成法中尤其顯著，而依據本發明之製造方法，可在磷酸膽鹼衍生物之良好溶劑中極簡便且高產率製造磷酸膽鹼衍生物，並且可由廉價且可大量取得之源自磷酯醯膽鹼之甘油基磷酸膽鹼製造，於成本面上甚為優異。最後，可簡便且高產率地製得式(6)之化合物。

將甘油基磷酸膽鹼、過碘酸鈉、三氯化鈎(水合物)加入乙腈水溶液中。於室溫下攪拌後，過濾，自濾液將溶劑除去。自得到之固形物以甲醇萃取出目標物，接著餾除甲醇，藉此得到以下述式(9)表示之具有羧基之磷酸膽鹼衍生物。構造式及 NMR 光譜示於圖 16，質譜示於圖 17。

又，反應溶劑用水亦可，且，除過碘酸鈉之外，亦可使用其他的過碘酸鹽或過碘酸等；除三氯化鈎之外，亦可使用其他的二價及/或三價之鈎化合物或該等之水合物等。



(9)

然後，於式(9)所示之化合物的甲醇溶液中加入 3-胺基丙基三甲氧基矽烷 0.5 當量、及 N-羥基丁二酸醯亞胺(NHS)與 N-乙基-N'-3-二胺基丙基羧基二醯亞胺(EDC)各 1 當量。將此混合溶液於室溫下攪拌 3 小時，藉此製得式(6)之化合物。

又，反應溶劑除甲醇之外，亦可為 N,N-二甲基甲醯胺、

二甲亞砒、氯仿等，又，除 NHS、EDC 外，亦可用使雙環碳二亞胺(dicyclocarbodiimide) (DCC)、羧基二咪唑(CDI) 等。

上述順序，即使式(6)所示化合物中之  $m$ 、 $n$  改變，亦可完全同樣地施行。此處所示之順序為  $m=3$ 、 $n=2$  的場合。惟，為防止反應中有機矽烷化合物聚合，以脫水溶劑為佳。

又，當式(6)中之甲氧基( $\text{OCH}_3$ )為乙氧基( $\text{OC}_2\text{H}_5$ )的場合，係將甲醇改為乙醇進行反應，為 Cl 的場合則改為二甲基甲醯胺或二甲亞砒。

再者，當與 Si 鍵結之甲氧基或乙氧基或 Cl 中之 2 個或 1 個，用甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基之任一者取代的場合，亦可用上述方法同樣地製造。

#### 改質粉體

本發明之表面改質劑為較佳之可使用於對具羥基之粉體進行改質者。

本發明之改質粉體可由下述的方法製造。藉由此方法，可容易地製造在粉體表面直接具有磷酸膽鹼基之改質粉體，亦即，使磷酸膽鹼基以化學鍵結導入粉體表面之改質粉體。

此改質粉體，與藉由以具磷酸膽鹼基之聚合物被覆而導入磷酸膽鹼基之粉體比較，其優點為不會有因聚合物的剝離而失去磷酸膽鹼基的情形。又，由於未以聚合物被覆，故有不會損及粉體本身微細構造之優點。具體而言，藉由使用本發明之表面改質劑，可在不使粉體表面所具有的微

細構造(微細孔等)(立體, 數 nm 程度)被遮蔽下, 將表面以磷酸膽鹼基被覆。

又, 即使於使磷酸膽鹼基之衍生物以低分子形態導入物體中的場合, 在對物體先導入可與磷酸膽鹼基之衍生物反應的官能基, 再使磷酸膽鹼基之衍生物產生反應的方法中, 由於在物體表面會殘存有未反應的官能基, 故會導致活體適合性降低。例如, 當先將胺基導入至物體表面, 然後使磷酸膽鹼的醛衍生物與物體表面之胺基反應的場合, 會殘存多量的未反應胺基。此等殘存胺基, 藉由使其與其他低分子化合物鍵結, 雖可達到某程度的封鎖作用, 惟, 欲維持物體表面的親水性有困難, 而且無法完全封鎖。當物質表面殘存有多量胺基之場合, 由於胺基顯示強鹼性, 故對主要為酸性的蛋白質會顯示強的電氣性交互作用, 而幾乎完全地吸附。於作為色層分析用填充劑的場合, 會成為該蛋白質之回收率差或波峰發生顯著托尾之原因。再者, 蛋白質之吸附會導致其變性, 於作為活體適合性材料的場合, 會成為發炎等之原因, 而非良好。

本發明之表面改質劑, 於合成時, 須對具有胺基之有機矽烷化合物過剩地添加磷酸膽鹼之醛衍生物, 使雙方在液相中反應。由於胺基與醛基之反應性非常高, 故於過剩添加醛的場合, 幾達 100%的胺基會與醛反應係周知者。因此, 本發明之表面改質劑無法檢測出未反應的胺基。故本發明之表面改質劑, 可在物體表面無未反應胺基混在下只將磷酸膽鹼基導入。藉此, 與固相上進行 2 階段反應的方

法相較，此方法可得到活體適合性極優異、且蛋白質吸附少的粉體。

#### 改質粉體之製造方法

對式(5)或(6)化合物之 0.3mmol/L 濃度之甲醇溶液 20mL，加入蒸餾水 20mL，再添加入用以施行表面改質之粉體。粉體之質量須依其比表面積加以調整。例如，於 100m<sup>2</sup>/g 之粉體的場合，其添加量以 10g 的程度為適當。使此粉體分散液在油浴中於 80℃ 下回流，於 5 小時後將粉體過濾，以甲醇洗淨，在 80℃ 下進行減壓乾燥 3 小時，製得改質粉體。

使用之粉體並無特別限制。依用途而異，通常為平均粒徑 0.01~10 μm 或 0.01~1000 μm 左右之任意物體。作為粉體之具體例，可列舉如：無機粉末(例如，滑石粉、高嶺土、雲母、絹雲母、白雲母、金雲母、合成雲母、紅雲母、黑雲母、蛭石、碳酸鎂、碳酸鈣、矽酸鋁、矽酸鋇、矽酸鈣、矽酸鎂、矽酸鋇、鎢酸金屬鹽、鎂、氧化矽、沸石、硫酸鋇、燒成硫酸鈣(燒石膏)、磷酸鈣、氟磷灰石、羥基磷灰石、陶瓷粉、金屬皂(例如，肉豆蔻酸鋅、棕櫚酸鈣、硬脂酸鋁)、氮化硼、氧化硒等)；有機粉末(例如，聚醯胺樹脂粉末(尼龍粉末)、聚乙烯粉末、聚甲基丙烯酸甲酯粉末、苯并鳥糞胺樹脂粉末、聚四氟化乙烯粉末、聚甲基倍半矽烷粉末、矽酮彈性體粉末、纖維素粉末等)；無機白色顏料(例如，二氧化鈦、氧化鋅等)；無機紅色系顏料(例如，氧化鐵(氧化鐵紅)、鈦酸鐵等)；無機褐色系顏料(例如，

$\gamma$ -氧化鐵等)；無機黃色系顏料(例如，黃氧化鐵、黃土等)；無機黑色系顏料(例如，黑氧化鐵、低次氧化鈦等)；無機紫色顏料(例如，錳紫、鈷紫)；無機綠色系顏料(例如，氧化鉻、氫氧化鉻、鈦酸鈷等)；無機藍色系顏料(例如，群青、普魯士藍等)；珠光顏料(例如，氧化鈦被覆雲母、氧化鈦被覆氧基氯化鈹、氧化鈦被覆滑石粉、著色氧化鈦被覆之雲母、氧氯化鈹、魚鱗箔等)；金屬粉末顏料(例如，鋁粉、銅粉等)；鋇、鋇或鋁色澱等之有機顏料(例如，紅色 201 號、紅色 202 號、紅色 204 號、紅色 205 號、紅色 220 號、紅色 226 號、紅色 228 號、紅色 405 號、橙色 203 號、橙色 204 號、黃色 205 號、黃色 401 號、及藍色 404 號等之有機顏料、紅色 3 號、紅色 104 號、紅色 106 號、紅色 227 號、紅色 230 號、紅色 401 號、紅色 505 號、橙色 205 號、黃色 4 號、黃色 5 號、黃色 202 號、黃色 203 號、綠色 3 號及藍色 1 號等)；天然色素(例如，葉綠素、 $\beta$ -胡蘿蔔素等)等。

藉由上述之製造方法，可簡單地製得含有任意量之親水性磷酸膽鹼基的粉體。又，於粉體為合成聚合物的場合，作為其親水部，可含有羧酸基、羥基、1 級~3 級胺基、磺酸基、磷酸基、聚氧乙烯基、銨基、醯胺、羧基甜菜鹼、糖類等，根據此等之種類與含有量可作粉體機能之設計。再者，作為其疏水部，可含有碳原子數 2~22 之直鏈狀或分枝烷基、膽固醇等環狀烷基、含有油烯基等不飽和鍵之烷基、苯環、萘環、以嵌二萘為代表之烴系芳香族、吡啶環、

咪唑、噻唑、吡啶等雜環系芳香族、全氟烷基、聚烷基矽氧烷等疏水基，可依粉體之用途選擇、設計。合成聚合物粉體之疏水基之鍵結形態，亦可藉由酯、醚、醯胺、氨基甲酸酯、尿素鍵等直接與聚合物主鏈鍵結，亦可透過間隔物(spacer)與主鏈鍵結。作為間隔物之種類，可列舉如：親水性之聚環氧乙烷、疏水性之聚環氧丙烷、直鏈狀烷基(碳原子數 2~22)等。

本發明之改質粉體，為親水性及保濕性優異之粉體。可作為具有活體適合性之粉體而應用於化妝品、醫用材料、色層分析用填充劑、塗料等廣泛的用途。

由以表面改質劑處理之改質載體所構成之色層分析用填充劑

藉由本發明之表面改質劑，可對載體表面加以改質而容易地製造具有所需量之磷酸膽鹼基之色層分析用填充劑。

具體而言，係藉由存在於載體表面之羥基與式(5)及(6)化合物之  $\text{Si-OCH}_3$  的脫水反應，將磷酸膽鹼基導入載體表面。

於式(5)及(6)的化合物之甲醇溶液(0.3mmol/mL)20mL，加入蒸餾水 20mL，再添加平均粒徑  $5\mu\text{m}$ 、平均細孔徑  $300\text{\AA}$ 、比表面積  $100\text{m}^2/\text{g}$  之球狀高純度矽膠 4g。使此粉體分散液於油浴中以  $80^\circ\text{C}$  回流，於 5 小時後將粉體過濾，以甲醇洗淨，於  $80^\circ\text{C}$  下減壓乾燥 3 小時，藉此，可容易地得到在表面直接具有磷酸膽鹼基之粉體。

反應溶劑，除水-甲醇混合溶劑之外，亦可使用水、乙醇、2-丙醇等之質子溶劑，或二甲亞砜、二甲基甲醯胺、甲苯、二乙醚等之非質子溶劑，此等可單獨使用，亦可混合使用。

又，於載體表面未存在有羥基的場合，使式(5)及(6)的化合物溶解於揮發性溶劑中，將該溶液塗佈於物質表面，然後再使溶劑乾燥的方法，係有效。具體而言，係將式(5)及(6)化合物之甲醇溶液(0.3mmol/mL)依物體的比表面積適量地直接塗佈於物質上。然後，於 10°C 至 250°C 的溫度範圍下使甲醇氣化。此時，式(5)及(6)化合物之 Si-OCH<sub>3</sub> 彼此間會發生脫水反應，生成 Si-O-Si 鍵，而可將物體表面被覆。此脫水反應係習知者。於甲醇揮發時，如此般生成的膜，由於會與於絕大部分的物質表面微量存在的各羥基產生鍵結，故可施行安定性良好的表面改質。本法不只對未具羥基的物質有效，對有羥基的物質亦為極有效的表面改質方法。

藉由先將胺基導入載體表面，再將含有醛體之化合物（藉甘油基磷酸膽鹼之氧化裂解反應而得）導入的方法，其與用本發明之表面改質劑的方法之最大的差異點在於，於物體表面之未反應胺基之有無。

亦即，使用本發明之表面改質劑之場合，於物質表面可不使未反應的胺基混在而只導入磷酸膽鹼基。於先將胺基導入粉體表面之場合，由於液相中之甘油基磷酸膽鹼之醛體須與固相表面之胺基反應，故由於擴散速率與因固相

表面之立體構造所致之空間位阻、磷酸膽鹼基本身的立體性等，會使得反應率低。只能對約 30%的胺基導入磷酸膽鹼基。殘存的胺基藉由與其他的低分子化合物鍵結，雖可某程度地封鎖，惟，欲維持物體表面的親水性有困難且無法完全封鎖。

又，於物質表面殘存有甚多的胺基之場合，由於胺基具有強鹼性，故顯現與主要為酸性蛋白質之強離子交換性的交互作用，而會將蛋白質幾乎完全吸附。於使用為色層分析用填充劑之場合，會成為使該蛋白質回收率差與波峰托尾顯著的原因。再者，蛋白質之吸附會導致其變性，於用作活體適合性材料的場合，會成為導致發炎等之原因，故非良好。

相對於此，本發明之表面改質劑，合成時，對具有胺基之有機矽烷化合物過剩地添加磷酸膽鹼之醛衍生物，使雙方在液相中反應。胺基與醛基之反應性非常高，於過剩地添加醛的場合，幾乎 100%的胺基會與醛反應是周知者。

因而，於本發明之表面改質劑中，無法檢測出未反應的胺基。因此，使用本發明之表面改質劑，可在物體表面不使未反應之胺基混在而只將磷酸膽鹼基導入。藉此，相較於固相上進行 2 階段反應的方法，此方法可得到活體適合性極優異、且蛋白質吸附少的粉體。

又，藉由將球狀粉體分散於液相中來進行表面改質的場合，強度弱的粉體在攪拌中粉體會崩壞的現象是周知者。使用本法，可於一個步驟且短時間內直接將磷酸膽鹼

基導入粉體中，故較在固相上進行二步驟之反應的方法，粉體攪拌時間僅需其之 4 分之 1 以下即可，可適於更廣泛之構造、材料的粉體。具體而言，即使對於細孔徑超過 1000Å 之機械強度弱的粉體，亦可在不損及粉體形狀之下進行表面改質。

本發明中使用之載體有：氧化矽、矽膠、活性碳、沸石、氧化鋁、黏土礦物等無機多孔質體、多孔質之有機高分子樹脂。載體以粉體為佳。較佳者為球形或破碎型多孔質矽膠。球狀多孔質矽膠之平均粒徑宜為 1~200  $\mu\text{m}$ ，而以 1~10  $\mu\text{m}$  為佳，球狀多孔質矽膠之細孔平均粒徑宜為 10~2000Å，而以 80~1000Å 為佳，而比表面積宜為 0.01~800  $\text{m}^2/\text{g}$ ，而以 80~600  $\text{m}^2/\text{g}$  為佳。

若以本發明之色層分析用填充劑作為 GFC 用管柱使用，則蛋白質或聚肽的吸附極少，可發揮高分離能力。

亦即，為於蛋白質與聚肽之吸附抑制上優異之管柱填充劑。因而，可適於藉由蛋白質與聚肽的分子量差異而進行分離之模式(GFC 模式)。

再者，本發明之色層分析用填充劑，不只因磷酸膽鹼基所具有之雙電荷而可依樣品之分子量不同進行分離，且因樣品所帶有之微弱的電荷之差異而為具更高的分離能力之管柱填充劑。迄今未曾有如此般為抑制蛋白質之吸附的目的而導入具有雙電荷的官能基的先例，藉由本發明之表面處理劑所製造之色層分析用填充劑是一種嶄新的 GFC 用管柱填充劑。藉由此種具有電荷之特徵，其顯示出不只可

依蛋白質與聚肽分子量的差異且可依其等所具有的電荷而分離，亦可藉由改變移動相之 pH 與鹽濃度而抑制填充劑表面與蛋白質或聚肽之交互作用的強度。因此，藉由使移動相之 pH 與鹽濃度最適化，可自由地保持目標物之蛋白質與聚肽。

由於 GFC 模式可在不使蛋白質與酵素失去活性下將此等分離、精製，故在未知樣品的離析與醫療用途方面，本發明之管柱填充劑亦可期待發揮高的分離能力。

本發明之色層分析用填充劑，具體而言，係作為蛋白質與聚肽吸附極少之具高分離能力的管柱填充劑，於例如人體血清中之蛋白質的分離、或蛋白質進行胰蛋白酶消化所得樣品中所含有之聚肽的分離、或根據活體中所含未知蛋白質的活性評價之分離、取樣諸方面皆優異。

#### 以表面改質劑處理之過濾器

於分析活體樣品中所含蛋白質等之場合，須進行將源自活體之夾雜物除去之前處理。具體而言，於測定血液中蛋白質濃度的場合，為得到溶解有蛋白質之血清，須將血球、血小板等過濾，或用離心分離等先行除去。於血液等之過濾，由於蛋白質會吸附於使用的過濾器上而造成蛋白質的定量性降低，是其問題點。此外，用離心力使其通過有細孔的膜之 2 層構造之容器，於蛋白質樣品之濃縮與脫鹽、溶劑取代等目的上被廣泛地使用。可舉例如 Ultrafree-MC 離心式過濾機（商品名，日本米力波阿股份有限公司製）。將濃縮前的樣品裝入此過濾機之上部，使下部朝向離

心分離器之外側而設置，藉由施加約 5000G 的離心力而達成過濾。此等機具之過濾膜，其蛋白質之回收率亦有下降至 50%附近之情形，而有非良好之課題。

藉由式(5)及(6)的化合物對過濾器表面進行改質，可得到蛋白質吸附極少之過濾器。藉由式(5)及(6)中之  $\text{Si-OCH}_3$  與過濾器表面之羥基產生脫水反應而鍵結，可簡便地導入蛋白質吸附抑制能力優異的磷酸膽鹼基。由於使用之金屬製、玻璃製、玻璃纖維製等過濾器之表面幾乎都有來自氧化物的羥基，故對廣泛之材料皆有效用。

又，於不具有羥基之材料的場合，有效的方法為：使式(5)及(6)的化合物溶解至揮發性溶劑中，將過濾器或其材料浸漬到該溶液中，然後使溶劑乾燥，再加以洗淨。具體而言，以式(5)及(6)的化合物之甲醇溶液(0.3mmol/mL)依物質的比表面積適量地直接將物質浸漬。然後，於  $10^\circ\text{C}$  至  $250^\circ\text{C}$  的溫度範圍使甲醇氣化。此時，式(5)及(6)中之  $\text{Si-OCH}_3$  彼此會發生脫水反應，生成  $\text{Si-O-Si}$  鍵，而可覆蓋物質表面。此脫水反應係公知者。於甲醇揮發時如此生成之膜，由於會與於絕大部分的物質表面微量存在的各羥基產生鍵結，故可施行比較強韌的表面改質。本法不只對沒有羥基的物質有效，對有羥基的物質亦為極有效的表面改質方法。

對過濾器般的具有微細孔之物體以磷酸膽鹼基進行表面處理之場合，欲以已公知化之具有磷酸膽鹼基的聚合物進行被覆有其困難。主要原因為聚合物會塞住微細孔使作

為過濾器之能力降低。藉由使用式(5)及(6)般的低分子，可在不損及微細孔之載體的構造特性下進行載體表面改質。再者，由於與載體表面並非物理吸附，而可生成化學鍵，故於耐久性方面亦甚優異。

#### 以表面改質劑處理之玻璃製實驗器具

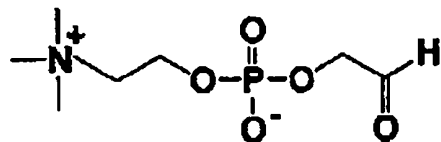
所謂玻璃製實驗器具乃保存容器、計量用器具、玻璃單元(cell)、取樣用尖嘴管(tip)、取樣品用注射針筒等。當使用本發明之表面改質劑處理之場合，可得到蛋白質吸附極少之實驗器具。

#### 實施例

接著依據實施例詳細說明本發明。又，本發明並非限定於此等實施例中。

#### 合成例 1 含有磷酸膽鹼基之醛化合物

將 L- $\alpha$ -甘油基磷酸膽鹼(450mg)溶解於蒸餾水 15ml 中，於冰水浴中冷卻。添加過碘酸鈉(750mg)(和光純藥工業股份有限公司製)，攪拌 5 小時。將反應液減壓濃縮、減壓乾燥，以甲醇萃取出目標物。其構造示如下述化合物(8)。式(8)化合物之  $^1\text{H-NMR}$  光譜示如圖 1，質譜示如圖 18。

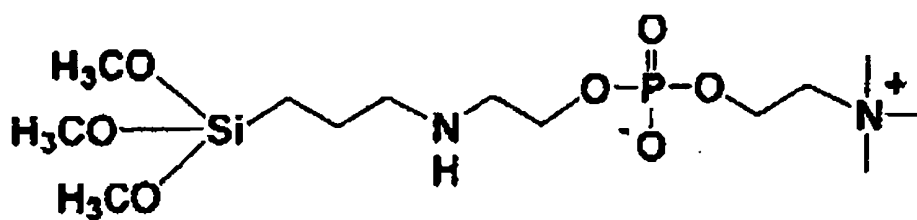


(8)

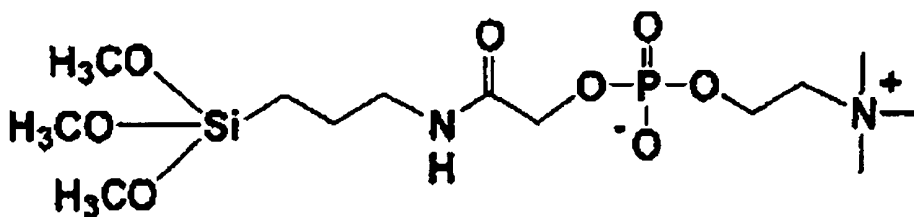
#### 實施例 1 式(5)及(6)化合物之製造

使合成例 1 之化合物 7.5g 溶解於脫水之甲醇 30mL，將

容器內以乾燥氮氣置換。然後，添加 3-胺基丙基三甲氧基矽烷(信越化學工業股份有限公司製)3.6g 於化合物 1 之甲醇溶液中。將此混合液於室溫下攪拌 5 小時之後，進行冰冷，添加 氰基氫硼化鈉(和光純藥工業股份有限公司製)2.5g，回復至室溫再攪拌 16 小時。此期間，亦繼續以乾燥氮氣流通反應容器。沈澱過濾後，得到目標物質之下述式(10)及(11)化合物之甲醇溶液。



(10)



(11)

#### 實施例 2 改質粉體之製造

對含有實施例 1 中所製造之式(10)及(11)化合物之甲醇溶液加入蒸餾水 35mL，再添加平均粒徑  $5\mu\text{m}$ 、平均細孔徑 30nm、比表面積為  $140\text{m}^2/\text{g}$  之矽膠 14g。使此粉體分散液於  $80^\circ\text{C}$  下回流 5 小時。回流後以甲醇 100mL 過濾洗淨，得到目標物質。

以上述之順序，將使用實施例 1 之表面改質劑處理之改質粉體的元素分析值示於表 1。表中之 C%或 N%，係表示

粉體中所含碳元素或氮元素之質量%。由此值可知，以實施例 1 的表面改質劑處理後之粉體，其碳與氮之原子數比(C/N)為 5.08。由於式(10)及(11)的表面改質劑之甲氧基部位全部鍵結後之 C/N 為 5，故顯示係未破壞表面改質劑而導入粉體中。

表 1

|             | 元素分析值 |      |
|-------------|-------|------|
|             | C%    | N%   |
| 表面改質劑處理前之粉體 | 0.06  | 0.03 |
| 表面改質劑處理後之粉體 | 3.95  | 0.91 |

又，此矽膠之  $^{13}\text{C}$ -CPMAS 光譜及  $^{13}\text{C}$ -PSTMAS 光譜示如圖 2。所謂 PSTMAS 光譜係選擇性地得到進行著自由運動的分子鏈之光譜的方法，為廣泛地用於粉體表面的修飾鏈之解析方法。圖 2 中，於 54.2ppm 處可觀測得起因於膽鹼基之碳之光譜。

另一方面，於圖 3 所示之該矽膠之  $^{31}\text{P}$ -CPMAS 光譜中，由於在與測定對象  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  大致相同的化學位移值處偵測出波峰，故可確認磷酸基之存在。由於由圖 2 可確認膽鹼基之存在，並由圖 3 可確認出磷酸基之存在，故可推斷已將磷酸膽鹼基導入矽膠表面。

再者，由圖 2，於 9ppm、23ppm 附近可觀測到起因於存在於矽原子與磷酸膽鹼基間丙基之碳的光譜，於 60ppm、69ppm 附近可觀測到來自磷酸膽鹼內之乙基的光譜。由上述

者可知：可於未破壞式(5)及(6)的化合物構造下將矽膠導入。又，磷酸膽鹼基與丙基三甲氧基矽烷之鍵結部分混在有式(5)所示之2級胺者與式(6)所示之醯胺鍵者。

圖4顯示本實施例中所合成之改質粉體的FT-IR光譜。於 $1650\text{cm}^{-1}$ 附近可觀測到醯胺鍵所特有的吸收。

### 實施例3 色層分析用填充劑

以實施例2所製造之改質粉體作為載體，藉由通常的漿料法，填充到內徑4.6mm，長250mm之空管柱中。層析圖之取得條件如下述：

移動相：50mmol/L 磷酸緩衝液+500mmol/L NaCl pH6.8

流速：100  $\mu\text{L}$ /分

溫度：25 $^{\circ}\text{C}$

檢測：UV 280nm

於以本條件使用實施例3之管柱的場合之校正曲線示如圖5。圖5所示之校正曲線於測定範圍有極佳的直線性。可知：由於蛋白質吸附少，故填充劑表面與蛋白質之交互作用極小，其結果，可以分子量大的分子先溶出之GFC模式進行分離。其次，以上述條件分離人體血清蛋白質之結果示如圖6。

將作為樣品用之孔西拉N(製品名)以蒸餾水稀釋2倍後注入2  $\mu\text{L}$ 。即使人體血清般的實驗樣品亦可施行依分子量順序的GFC模式分離，可知實用性甚高。

### 比較例1

其次，將市售品之色層分析用管柱(Shodex PROTEIN

KW803，昭和電工股份有限公司製)以市售之狀態直接使用，試行人體血清樣品(將孔西拉 N(製品名)以蒸餾水稀釋成二倍)中的蛋白質之分離。比較例中所舉出之本管柱，與實施例 3 所述之管柱為相同內徑與長度者。

根據說明，此填充劑，係於多孔性矽膠之表面化學鍵結著親水性基之分子排阻模式用的填充劑。平均細孔徑為 300Å、粒徑為 5 μm，為適於與實施例 1 中所述之填充劑作比較者。根據說明，係適於分子量 1 萬至數十萬的蛋白質之分離。

Shodex PROTEIN KW803，由於係使用非解離性之親水性基，故異於用本發明之表面改質劑調製之填充劑，並沒有帶有電荷之官能基。因而認為其幾乎沒有與蛋白質之間的離子性交互作用。

與實施例 3 同樣地，用對 50mmol/L 磷酸緩衝液(由  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  及  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  所調製)加入 500mmol/L 之氯化鈉所成之移動相，以流速 0.1ml/分、於管柱恆溫箱溫度 25°C 之條件，試行人體血清樣品(將孔西拉 N(製品名)以純水稀釋成二倍)之蛋白質的分離。檢測係以 280nm 進行。結果示如圖 7(b)。

又，為了比較，圖 7 中，係顯示用實施例 3 中製得之本發明表面改質劑所調製成之填充劑，以相同條件、相同樣品下之層析圖。

再者，圖 8(a)係表示將使用本發明之表面改質劑調製成之填充劑，於鹽濃度 150mM 下使用之層析圖，圖 8(b)係表示以 Shodex PROTEIN KW803 於鹽濃度 150mM 下使用之層

析圖。於圖 8，鹽濃度以外之條件係與圖 7 相同。

於用使用本發明之表面改質劑調製之填充劑的層析圖(圖 7(a))中，除了可確認出人體血清中主要蛋白質之  $\gamma$ -球蛋白與白蛋白之外，亦可確認出呈肩狀之運鐵蛋白之波峰，是重要的特徵。波峰之判別係使用單離之各蛋白質之市售品進行。

相對於此，於使用以往之 GFC 用填充劑的場合(圖 7(b))，則完全無法將白蛋白與運鐵蛋白分離。其理由經確認係因單離之市售品之各蛋白質的溶出時間為相同之故。

白蛋白與運鐵蛋白之分子量分別為 69,000 與 75,000，非常接近。使用以往之 GFC 用填充劑無法分離白蛋白與運鐵蛋白般分子量相近的樣品。使用本發明之表面改質劑所調製之填充劑，不只蛋白質的吸附極少，並具有藉由磷酸膽鹼基所具之雙電荷與蛋白質間之微弱交互作用，故即使對分子量相近的蛋白質，亦可基於等電點與疏水性之不同而加以分離。

亦即，可知：本發明之色層分析用填充劑於 GFC 模式中，不只可依分子量之不同而進行分離，亦可根據蛋白質所具等電點與疏水性之不同來進行樣品之分離。

使用本發明之表面改質劑所調製之填充劑，其具有微弱的離子交換相互作用，可藉由降低移動相之鹽濃度而得到確認。

於移動相之鹽濃度為 500mM 之圖 7(a)中，即使用本發明之表面改質劑所調製之填充劑，係呈現運鐵蛋白為白蛋

白的波峰之肩部之程度，惟，於使移動相之鹽濃度下降至 150mM 之圖 8(a)中，運鐵蛋白與白蛋白的波峰則達成了於基線(base line)之分離。

再者，於圖 8(a)中，可確認出甚多蛋白質之波峰。通常，在填充劑表面與移動相內之物質間作用之離子交互作用，係隨著移動相之鹽濃度愈小而愈強是周知者。此乃意味著藉由移動相之鹽濃度變小，受到離子交換相互作用之物質可強固地維持著。使用本發明之表面改質劑所調製之填充劑，藉由使移動相之鹽濃度減小，特別對白蛋白產生強固地維持，而可達成運鐵蛋白之完全分離。

於圖 7、圖 8 般的中性 pH 下，由於係使帶負電之白蛋白於低鹽濃度下維持著，故推測使用本發明之表面改質劑所調製之填充劑具有陰離子交換模式。

接著，再用乳酸、乙酸、琥珀酸、丙二酸、檸檬酸之 5 種酸，對使用本發明之表面改質劑所調製之填充劑所具有的陰離子交換能進行評價。評價條件如下述。結果示如圖 9。

管柱：4.6 × 150mm

移動相：50mmol/L 磷酸緩衝液(pH6.8)

流速：1000mL/分

偵測：UV 210nm

依據圖 9，可知：使用本申請案發明之表面改質劑所調製之填充劑，可根據羧酸之數目而將各種有機酸分離。

具體而言，就來自 5 種羧酸之各波峰加以判別，可得知具有 1 個羧酸之 2 種有機酸最快溶離，其次會溶離出具

有 2 個羧酸之 2 種有機酸，最後則溶離出具有 3 個羧酸之檸檬酸。隨著羧酸數目之增加，維持力有增大的傾向可得到確認，故此填充劑具有陰離子交換能力是明確的。因而，藉由本發明之表面改質劑處理之粉體，於作為陰離子交換用填充劑亦可說是非常有效。以上所示之離子交換性非為可使蛋白質吸附、變性程度的強度，而適於回收率良好之專一分離。

另一方面，一般 GFC 用管柱之 Shodex PROTEIN KW803，如圖 8(b)所示般，即使於 150mM 之鹽濃度亦無法分離運鐵蛋白與白蛋白。

用本發明之表面改質劑所調製之填充劑，除具有抑制蛋白質吸附之優異機能之 GFC 模式(分子排阻模式)之外，亦存在有離子交換模式之極獨特之填充劑。由於蛋白質之吸附極少，故可在不使蛋白質變性之下，於保持著酵素活性狀態下進行蛋白質之分離、精製。而且，不只有 GFC 模式，亦混在著交換模式，故為可調整移動相之鹽濃度與 pH 來抑制分離之劃時代之填充劑。

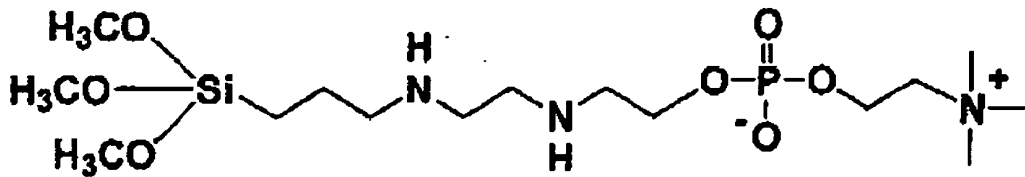
#### 實施例 4 色層分析用填充劑

〈使用在矽原子與磷酸膽鹼基之間有二個氮原子之式(1)中 R 為以式(4)p=1 表示之化合物的表面改質〉

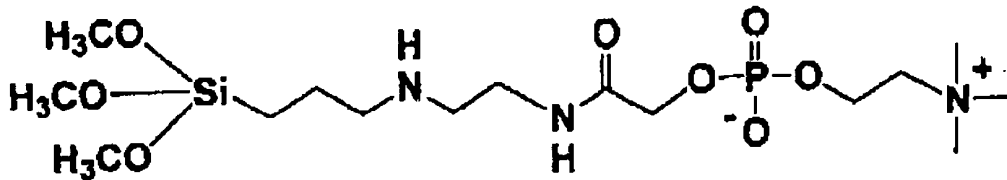
使合成例 1 之化合物 7.5g 溶解於脫水甲醇 30ml 中，將容器內置換成乾燥氮氣。然後，添加 3.6g 之 3-(2-胺基乙基胺基丙基)三甲氧基矽烷(信越化學工業股份有限公司製)至化合物 1 之甲醇溶液中。

將此混合溶液於室溫下攪拌 5 小時後，進行冰冷，添加氰基氫硼化鈉 2.5g，回復至室溫再攪拌 16 小時。此期間，亦繼續以乾燥氮氣流通反應容器。

將沈澱過濾後，得到目標物質之下述式(12)及(13)化合物之甲醇溶液。



(12)



(13)

對含有式(12)及(13)化合物之甲醇溶液加入蒸餾水 35mL，再添加平均粒徑  $5\mu\text{m}$ 、平均細孔徑 30nm、比表面積為  $140\text{m}^2/\text{g}$  之矽膠 14g。使此粉體分散液於  $80^\circ\text{C}$  下回流 5 小時。回流後以甲醇 100mL 過濾洗經，得到目標物質。

圖 10(b)表示對導入式(12)及(13)之矽膠藉由通常之漿料法填充，注入人體血清樣品(將孔西拉 N(製品名)以蒸餾水稀釋成二倍)時之層析圖。

圖 10(a)為使用實施例 3 中所調整之粉體之場合之層析圖。

實施例 3 與本實施例之差異在於表面改質劑之間隔物部分之 2 級胺之數目不同。又，圖 10(a)與(b)中所使用之

矽膠為相同者。

於矽原子與磷酸膽鹼基間有較圖 10(a)多一個 2 級胺之圖 10(b)中，可知運鐵蛋白與白蛋白之分離更得到改善。其理由在於藉由在矽原子與磷酸膽鹼基間插入 2 級胺使修飾基的鹼性增大，而使酸性蛋白質之白蛋白更強固地被保持之故。

如此般，本發明之表面改質劑，除藉由磷酸膽鹼基之蛋白質吸附抑制效果之外，藉由改變在矽原子與磷酸膽鹼基之間的間隔物之性質，可賦予離子交換性、疏水性、親水性、氫鍵結性等之交互作用。

#### 實施例 5 硼矽酸玻璃纖維過濾器材料

<磷酸膽鹼基鍵結之硼矽酸玻璃纖維過濾器材料之調製>

將蒸餾水 20g、實施例 1 中製造之含有式(10)及(11)化合物(約 0.4mmol)之甲醇溶液 1.0mL 置入 100mL 三角燒瓶中加以振盪混合。對其添加日本瓦特曼(股)公司製之硼矽酸玻璃纖維過濾器(玻璃纖維濾紙級 GF/F，直徑 25mm $\phi$ ，一片約 0.070g)8 片後，加熱至 100 $^{\circ}$ C 回流煮沸 5 小時。冷卻至室溫後，以過濾器過濾，洗淨，在 80 $^{\circ}$ C 下減壓乾燥 3 小時，得到在表面直接具有磷酸膽鹼基之硼矽酸玻璃纖維過濾器。

<過濾器材料之蛋白質吸附抑制效果之測定>

將牛血清白蛋白(BSA)10mg 溶解於於磷酸緩衝液 100mL(塔卡拉生化公司製 PBS 錠 1 錠溶解於蒸餾水中，使

全量作成為 100mL。PH7.4~7.5)中作成為 BSA 溶液。取調製之 BSA 溶液 2.0g 置入 3 支丙烯製 30mL 試樣管中，於其中之一支試樣管中置入實施例 6 中所調製之硼矽酸玻璃纖維過濾器，於另一支試樣管中則置入未處理之硼矽酸玻璃纖維過濾器，使之浸漬於 BSA 溶液中。於室溫(25°C)下放置 24 小時，以 Lowry 法分別使 3 支試樣管中之 BSA 溶液發色，並進行吸光光度分析，對每 1 片過濾器之 BSA 吸附量進行定量分析(表 2)。

得知本發明之硼矽酸玻璃纖維過濾器係與未處理品比較，其 BSA 吸附量較低。

表 2

| 試樣                 | BSA 吸附量( $\mu\text{g}/\text{片}$ ) |
|--------------------|-----------------------------------|
| 未處理之硼矽酸玻璃纖維過濾器     | 37.8                              |
| 磷酸膽鹼基處理之硼矽酸玻璃纖維過濾器 | 7.8                               |

由上述結果可知本發明可提供蛋白質與聚肽之吸附極少之過濾器材料。

本發明之過濾器材料，於抗體、酵素等分離、濃縮或血液透析、血液過濾等血液淨化、分析等之廣範圍的活體物質之過濾甚有用。

#### 實施例 6 玻璃製試樣瓶

<磷酸膽鹼基鍵結之試樣瓶之調製>

將蒸餾水 20g、實施例 1 中製造之含有式(10)及(11)化合物(約 0.4mmol)之甲醇溶液 1.0mL 置入 100mL 三角燒瓶中加以振盪混合。置入日本渥特氏股份有限公司製試樣瓶(vial)之 12 × 32mm 玻璃試樣瓶螺旋式 10 個後，加熱至

100°C 回流煮沸 5 小時。冷卻至室溫後。將試樣瓶以甲醇洗淨，於 80°C 下減壓乾燥 3 小時，得到在表面直接具有磷酸膽鹼基之玻璃試樣瓶。

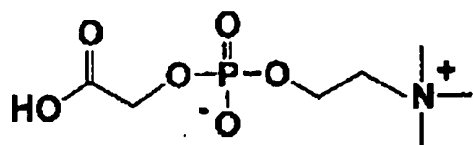
如此般，藉由本發明之表面改質劑，可得到蛋白質吸附極少之玻璃製實驗器具。於無法抑制蛋白質吸附之一般試樣瓶，於實驗操作中蛋白質之樣品濃度會經時減少是周知者。具體而言，於自保存容器將樣品注入至高效液相色層分析儀中之場合，儘管每次注入同量的體積，其經時後波峰面積會減少是周知者。本實施例中所製造之玻璃製試樣瓶，由於對蛋白質之吸附抑制優異，故可避免此現象。

又，於使高分子吸附於容器內面以抑制蛋白質吸附的場合，若於樣品中含有有機溶劑，會發生高分子之脫附，於耐久性方面有問題，是周知者。藉由高分子之表面被覆，係藉由高分子與丙烯容器等之基材間的疏水性相互作用而達成。若於樣品溶劑中含有有機溶劑，則高分子與基材之間的疏水性相互作用會減弱，致高分子會剝離。另一方面，本發明之表面改質劑(矽烷耦合劑)，由於係藉由化學鍵結行表面改質，故實質上不會受到樣品中溶劑之影響，效果可持續。

#### 實施例 7 具有羧基之磷酸膽鹼衍生物之製造

將甘油基磷酸膽鹼 5g(19.4mmol)、過碘酸鈉 17g(79.7mmol、4.1eq)(和光純藥工業股份有限公司製)、三氯化鈦(水合物)81mg(0.39mmol、0.02moleq)(和光純藥工業股份有限公司製)、及離子交換水 70g、乙腈 30g 加入 200mL

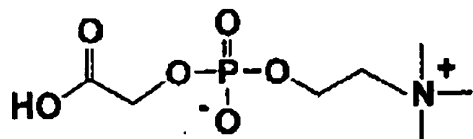
燒瓶中。於室溫下攪拌 2 小時後，過濾，將溶劑自濾液除去。自得到之固體成分以甲醇萃取出目標物，再將甲醇除去，藉此得到以式(9)表示之具有羧基之磷酸膽鹼衍生物。式(9)化合物之  $^1\text{H-NMR}$  光譜示如圖 16，質譜示如圖 17。



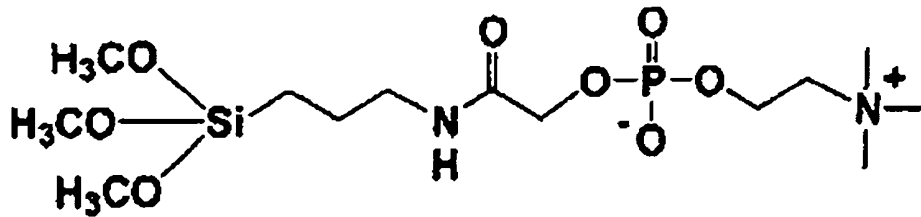
(9)

實施例 8 矽原子與磷酸膽鹼基之間有醯胺鍵之式(1)中 R 以式(3)L=2 表示之有機矽烷化合物(矽烷耦合劑)

將上述(9)化合物 3g(12.4mmol)溶解脫水之甲醇 100ml 中，以乾燥氮氣對容器內進行置換。然後，添加 3-胺基丙基三甲氧基矽烷 1.1g(6.2mmol)、N-羥基琥珀醯亞胺 1.4g(12.4mmol)與 N-乙基-N'-3-二甲基胺基丙基羧基二醯亞胺 2.4g(12.4mmol)，於 -10°C 下使其反應 16 小時，得到於間隔物具有下述式(11)表示之醯胺鍵、於末端具有磷酸膽鹼基之有機矽烷化合物的溶液。



(9)



(11)

又，上述以式(9)表示之化合物，可用在磷酸膽鹼基與羧基間有碳數 5 之飽和烷基鏈的 O-磷酸膽鹼羧基己酸代替，藉由同樣的順序可得到式(1)中 R 以式(3)L=6 表示之化合物。

本發明之表面改質劑，即使不施行精製，磷酸膽鹼基亦可固定於基材上。然而，例如，亦可用下述的方法進行精製。

#### <精製方法>

對得到之溶液進行減壓濃縮，使其溶解於蒸餾水中。以此水溶液作為樣品。將具有疏水性相互作用與陽離子交換能力之高速液體色層分析用管柱之膠囊包 SCX UG80S-5(尺寸：4.6mm i.d. × 250mm)(資生堂公司製)連接到 HPLC 裝置上，使 0.2mmol/L 之磷酸緩衝液(pH3.5)以 1mL/分的流速流通使其平衡化之後，注入樣品 10 μL。用差示折光計作為檢測器而得到層析圖，可將作為目標物之化合物單離出。

實施例 9 藉由於間隔物具有醯胺鍵、於末端有磷酸膽鹼基之有機矽烷化合物進行處理之改質粉體

對含有實施例 8 中所製造之式(11)化合物之溶液 30mL(0.25mmol/mL)加入蒸餾水 35mL，再添加平均粒徑 5 μ

m、平均細孔徑 30nm、比表面積為  $140\text{m}^2/\text{g}$  之矽膠 14g。使此粉體分散溶液於  $80^\circ\text{C}$  下回流 5 小時。回流後以甲醇 100mL 過濾洗淨，得到目標物質。以上述順序得到之以實施例 8 之表面改質劑處理之改質粉體(處理前的碳含有量為 0.15%)的碳含有量為 2.49%。

以磷定量確認 PC 基之導入

對實施例 9 所製造之於表面有磷酸膽鹼基之改質粉體的磷元素進行定量。本發明之製造方法中磷元素為磷酸膽鹼基之固有元素，藉由對存在粉體表面的磷元素定量，可確認磷酸膽鹼基之確實導入。

磷元素之定量係藉由鉬酸發色法進行。定量方法說明如下：

(1) 將既定量之粉體以充分洗淨之試驗管計量。

(2) 對 1 之粉體添加 60% 過氯酸水溶液(和光純藥工業股份有限公司製) 3mL。

(3) 為避免液體之蒸散，於 2 的試驗管上部安裝上冷卻管，而以  $120^\circ\text{C}$  加熱 1 小時，再以  $180^\circ\text{C}$  加熱 2 小時。藉由本操作使粉體表面之修飾鏈完全氧化，尤其使磷元素游離成為磷酸。

(4) 將 3 之溶液以離心分離機進行離心分離(3000rpm、5 分)，取上部澄清液 1mL 移往樣品管中。

(5) 對 4 之溶液添加蒸餾水 1mL 與 0.5M 之鉬酸鈉(和光純藥工業股份有限公司製)  $500\ \mu\text{L}$ 、及 0.5M 之抗壞血酸  $500\ \mu\text{L}$ 。

(6)對 5 之溶液以 95°C 之熱水浴間接加熱 5 分鐘，然後，以冷卻水冷卻。

(7)使 6 之發色完成之溶液 200  $\mu$ L 滴下至 96 孔板上，以孔板判讀器 (Plate reader) 測定於 710nm 之發色強度。

(8)以由已知濃度之磷酸溶液的發色強度所得之檢量線為基準，對樣品中所含之磷元素的量進行定量。磷酸標準溶液可由和光純藥工業股份有限公司取得。

其結果，實施例 9 所製造之於表面有磷酸膽鹼基之改質粉體的磷元素為 0.13mmol/g<sub>gel</sub>。亦即，得知有 0.13mmol/g<sub>gel</sub> 之磷酸膽鹼基固定化於粉體表面。

圖 11 表示本實施例合成之改質粉體的 FT-IR 光譜。

可於 1650cm<sup>-1</sup> 附近觀測到醯胺鍵所特有之吸收。

實施例 10 使用於間隔物具有醯胺鍵、於末端有磷酸膽鹼基之表面改質劑(矽烷耦合劑)進行處理所成之液相色層分析用填充劑

以實施例 9 所合成之改質粉體作為載體，藉由通常的漿料法，填充到內徑 4.6mm，長 250mm 之空管柱中。層析圖之取得條件如下述：

移動相：50mmol/L 磷酸緩衝液+500mmol/L NaCl pH6.9

流速：200  $\mu$ L/分

溫度：25°C

檢測：UV 280nm

首先，由  $\alpha$  2 巨球蛋白 0.67mg/mL(分子量約 800000，簡稱  $\alpha$  2M)、 $\gamma$ -球蛋白 1.3mg/mL(分子量約 160000，簡稱

$\gamma$  G)、人體血清白蛋白 1.7mg/mL(分子量約 70000, 簡稱 HSA)、溶菌酶 0.3mg/mL(分子量約 14000, 簡稱 LYZ)、尿嘧啶 0.017mg/mL(分子量 112, 簡稱 U)所混合成之水溶液樣品 2  $\mu$  L 注入時的層析圖如圖 12 所示。 $\alpha$  2M、 $\gamma$  G、HAS、LYZ 係由西格瑪阿爾得立奇(日本)股份有限公司取得, 尿嘧啶則由那卡萊特斯克股份有限公司取得。可明確地確認出 5 支波峰, 對此等依據市售單品樣品之溶出時間進行鑑定之下, 溶出順序之先後順序依序為  $\alpha$  2M、 $\gamma$  -G、HAS、LYZ、U。於 5 支波峰以外之觀測得之小波峰係市售標準樣品中所含有之雜質。可知: 由於因磷酸膽鹼基透過醯胺鍵而固定於矽膠上而使蛋白質之吸附少, 故填充劑表面與蛋白質之交互作用極小, 其結果, 使得能以分子量大的分子先溶出的 GFC 模式進行分離。

醯胺鍵之親水性良好, 就蛋白質吸附之抑制考量, 以使物質表面用親水性且非離子性的官能基被覆為佳。磷酸膽鹼基, 由於其雙離子性所固有之極優異的親水性、與雙離子性電荷的平衡均衡, 故其實質之離子性非常微弱, 可說是蛋白質吸附抑制優異的官能基。然而, 為使磷酸膽鹼基固定於物質表面所用的間隔物的疏水性若高, 則會引起蛋白質之非專一性的不可逆吸附。因而, 於間隔物中醯胺鍵之存在是極重要的, 為可達成更親水性的表面改質者。此間隔物所含有之親水性於蛋白質之吸附抑制係極為有效。

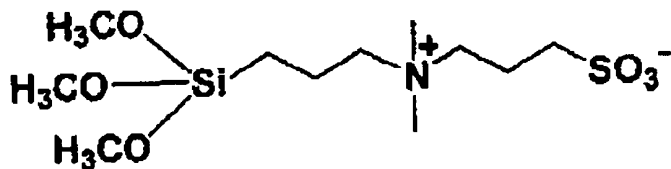
<與甜菜鹼構造之表面改質劑比較之比較例(與習知技

術之比較)>

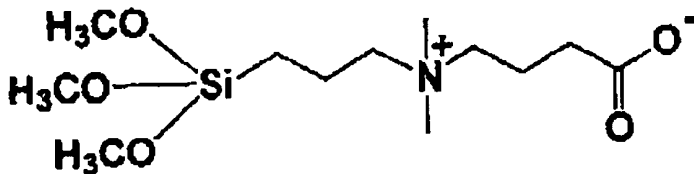
比較例 2

有關具有不同於磷酸膽鹼基之甜菜鹼構造之有機矽烷系表面改質劑，於日本專利特開平 5-222064 號公報中揭示有式(14)所示之具有磺基甜菜鹼之矽烷化合物。又，於日本專利特開昭 63-295593 號公報中揭示有式(15)所示之具有羧基甜菜鹼之矽烷化合物。

進行式(14)及(15)之矽烷化合物、與實施例 1 之式(10)及(11)的化合物之比較。



(14)



(15)

式(14)及(15)的化合物之製造方法係依循該相關之公知文獻。

對式(14)的化合物 2.0g 加入甲醇 20mL 與蒸餾水 20mL，再添加平均粒徑  $5\mu\text{m}$ 、平均細孔徑 30nm、比表面積為  $140\text{m}^2/\text{g}$  之矽膠 5.0g。使此粉體分散溶液於  $80^\circ\text{C}$  下回流 5 小時、再將式(14)所示之化合物固定化於矽膠上。回流後以甲醇 100mL 過濾洗淨，得到以式(14)所示化合物進行表

面改質之矽膠。

接著，將得到之經表面改質的矽膠分別藉由通常之漿料法，填充到內徑 4.6mm，長 250mm 之空管柱中。層析圖之取得條件如下述：

移動相：50mmol/L 磷酸緩衝液+500mmol/L NaCl pH6.9

流速：200  $\mu$  L/分

溫度：25°C

檢測：UV 280nm

首先，以實施例 3 之表面具有磷酸膽鹼基之填充劑所填充之管柱，將由  $\alpha 2$  巨球蛋白 0.67mg/mL(分子量約 800000，簡稱  $\alpha 2M$ )、 $\gamma$ -球蛋白 1.3mg/mL(分子量約 160000，簡稱  $\gamma G$ )、人體血清白蛋白 1.7mg/mL(分子量約 70000，簡稱 HSA)、溶菌酶 0.3mg/mL(分子量約 14000，簡稱 LYZ)、尿嘧啶 0.017mg/mL(分子量 112，簡稱 U)所混合成之水溶液樣品 2  $\mu$  L 注入時的層析圖如圖 13 所示。 $\alpha 2M$ 、 $\gamma G$ 、HAS、LYZ 係由西格瑪阿爾得立奇(日本)股份有限公司取得，尿嘧啶則由那卡萊特斯克股份有限公司取得。

可明確地確認出 5 支波峰，對此等依據市售單品樣品之溶出時間進行鑑定之下，溶出順序之先後順序依序為  $\alpha 2M$ 、 $\gamma -G$ 、HAS、LYZ、U。於 5 支波峰以外之觀測得之小波峰係市售標準樣品中所含有之雜質。

另一方面，對使用以式(14)所示之磺基甜菜鹼固定化之填充劑所填充之管柱，以相同樣品注入時之層析圖示如圖 14。5 種物質中只能觀測到血清白蛋白與尿嘧啶的波峰，

尤其是溶菌酶，於此樣品濃度下無法確認其溶出。理由在於：構成磺基甜菜鹼之 4 級銨與磺酸間之電中性無法達成，而存在前端之強酸之磺酸所引起之陽離子交換能力顯現之結果，於中性而具有正電荷之溶菌酶之間產生極強的離子交換相互作用之故。

對使用以式(15)所示之羧基甜菜鹼固定化之填充劑所填充之管柱，以相同樣品注入時之層析圖示如圖 15。5 種波峰與以磺基甜菜鹼固定化之管柱的場合相比顯示有良好的溶出，係依  $\alpha$  2M、 $\gamma$ -球蛋白、溶菌酶、尿嘧啶、人體血清白蛋白之順序溶出。值得注意者為，於中性移動相下帶負電之人體血清白蛋白仍被專一地保持著，比低分子之尿嘧啶更後溶出。其理由在於：構成羧基甜菜鹼之 4 級銨與羧基間之電中性無法達成，而呈現出離子性相對強的 4 級銨所致之強陰離子交換性，故與中性並具有負電荷之人體血清白蛋白之間產生極強的離子交換相互作用之故。

如此般，通常所熟知之甜菜鹼於離子性上非完全地為中性。前述舉例之磺基甜菜鹼與羧基甜菜鹼般的構造雖有優異的親水性，惟，因於過強的離子交換性會引發蛋白質之吸附。可知：其中之磷酸膽鹼基其磷酸與 4 級銨的電荷平衡為適當者，於甜菜鹼構造之固有的極優異親水性、與非離子性之蛋白質吸附抑制機能皆甚優異。

由上述可知，具有磷酸膽鹼基之有機矽烷系表面改質劑(矽烷耦合劑)，於以蛋白質不吸附為目的之物質表面改質可說是極為有效，此點迄今尚未有報告例指出。藉由使

用本發明之表面改質劑，可施行蛋白質吸附少且活體適合性優異之表面改質。

本發明之含有磷酸膽鹼基之嶄新化合物，作為表面改質劑甚為有用。本發明之表面改質劑，可對物體賦予活體適合性、保濕性及其他各種有用的機能。藉由本發明之表面改質劑，可容易地製造以磷酸膽鹼基改質之改質粉體、利用該改質粉體作為載體之色層分析用填充劑、以該表面改質劑改質之過濾器、以該表面改質劑改質之玻璃器具。

#### 【圖式簡單說明】

圖 1 為以合成例 1 製造之化合物的構造式及  $^1\text{H-NMR}$  光譜。

圖 2 為以實施例 2 製造之改質粉體之  $^{13}\text{C-CPMAS}$  光譜。

圖 3 為實施例 2 所製造之改質粉體之  $^{31}\text{P-CPMAS}$  光譜。

圖 4 為實施例所製造之改質粉體之 FT-IR 光譜。

圖 5 為以實施例 3 所製造之液體色層分析用填充劑使用於 GFC 模式之場合的校正曲線。

圖 6 為使用實施例 3 中所製造之液體色層分析用填充劑進行血清蛋白質分離時的層析圖。

圖 7 為以移動相濃度 500mM 進行人體血清蛋白質之分離時的層析圖。(a)為使用本發明之表面改質劑所合成之填充劑。(b)Shodex PROTEIN KW803。

圖 8 為以移動相濃度 150mM 進行人體血清蛋白質之分離時的層析圖。(a)為使用本發明之表面改質劑所合成之填充劑。(b)Shodex PROTEIN KW803。

圖 9 為使用本發明之表面改質劑所合成之填充劑，對 5 種有機酸進行分離時之層析圖。

圖 10 為對本發明之表面改質劑之間隔物部分插入 2 級胺的場合，而進行人體血清蛋白質之分離時的層析圖。

圖 11 為實施例 9 所合成之改質粉體之 FT-IR 光譜。

圖 12 為使用實施例 10 所製造之液體色層分析用填充劑之層析圖。

圖 13 為使用實施例 3 所製造之液體色層分析用填充劑之層析圖。

圖 14 為以比較例 2 所製造之以式(14)表示之化合物進行表面改質之液體色層分析用填充劑之層析圖。

圖 15 為以比較例 2 所製造之以式(15)表示之化合物進行表面改質之液體色層分析用填充劑之層析圖。

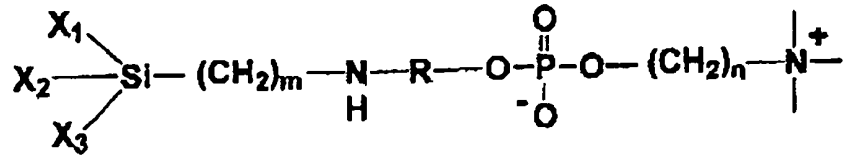
圖 16 為實施例 7 製造之化合物之  $^1\text{H-NMR}$  光譜。

圖 17 為實施例 7 製造之化合物的質譜。

圖 18 為合成例 1 製造之化合物的質譜。

### 五、中文發明摘要：

本發明係以下述式(1)表示之含磷酸膽鹼基化合物。

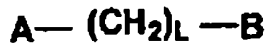


(1)

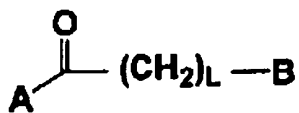
式中，m 為 2~6，n 為 1~4。

X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 分別單獨地為甲氧基、乙氧基或鹵素；惟，X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 中之 1 至 2 個可為甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基之任一者。

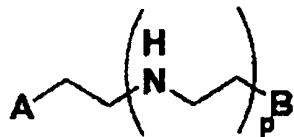
R 為下述式(2)~(4)中之構造之任一者(惟，於下述(2)~(4)構造中，式(1)之化合物係以 A-R-B 表示)。



(2)



(3)



(4)

於式(2)~(4)中，L 表示 1~6，P 表示 1~3。

又，本發明亦為由上述含磷酸膽鹼基化合物所構成之

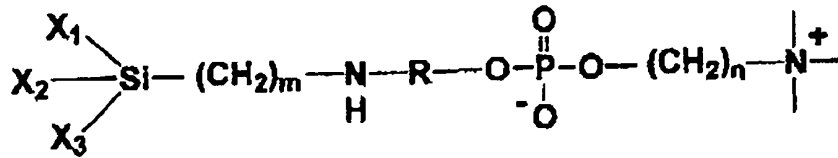
表面改質劑、以該表面改質劑處理之改質粉體、由以該表面改質劑處理之改質載體所構成之色層分析用填充劑、以該表面改質劑處理之過濾材、以該表面改質劑處理之玻璃器具。

**六、英文發明摘要：**

|     |
|-----|
| 公告本 |
|-----|

### 十、申請專利範圍：

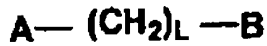
1. 一種含磷酸膽鹼基化合物，其特徵在於，係由下述式(1)所表示者；



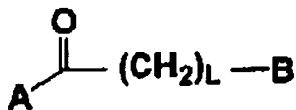
式中，m 為 2~6，n 為 1~4；

X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 分別單獨地為甲氧基、乙氧基或鹵素；惟，X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 中之 1 至 2 個可為甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基之任一者；

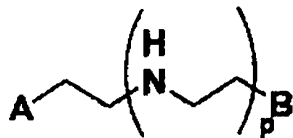
R 為下述式(2)~(4)中之構造之任一者(惟，於下述(2)~(4)構造中，式(1)之化合物係以 A-R-B 表示)；



(2)



(3)



(4)

於式(2)~(4)中，L 表示 1~6，P 表示 1~3。

2. 一種含磷酸膽鹼基化合物，其特徵在於，係以下述式(5)或(6)表示者；



物，使用縮合劑進行反應來合成出。

5. 一種改質粉體，其特徵在於，係經申請專利範圍第 3 項之表面改質劑處理者。

6. 一種色層分析用填充劑，其特徵在於，係由以申請專利範圍第 3 項之表面改質劑處理之改質載體所構成。

7. 一種過濾器，其特徵在於，係經申請專利範圍第 3 項之表面改質劑處理者。

8. 一種玻璃製實驗器具，其特徵在於，係經申請專利範圍第 3 項之表面改質劑處理者。

## 十一、圖式：

如次頁

公告本

圖1

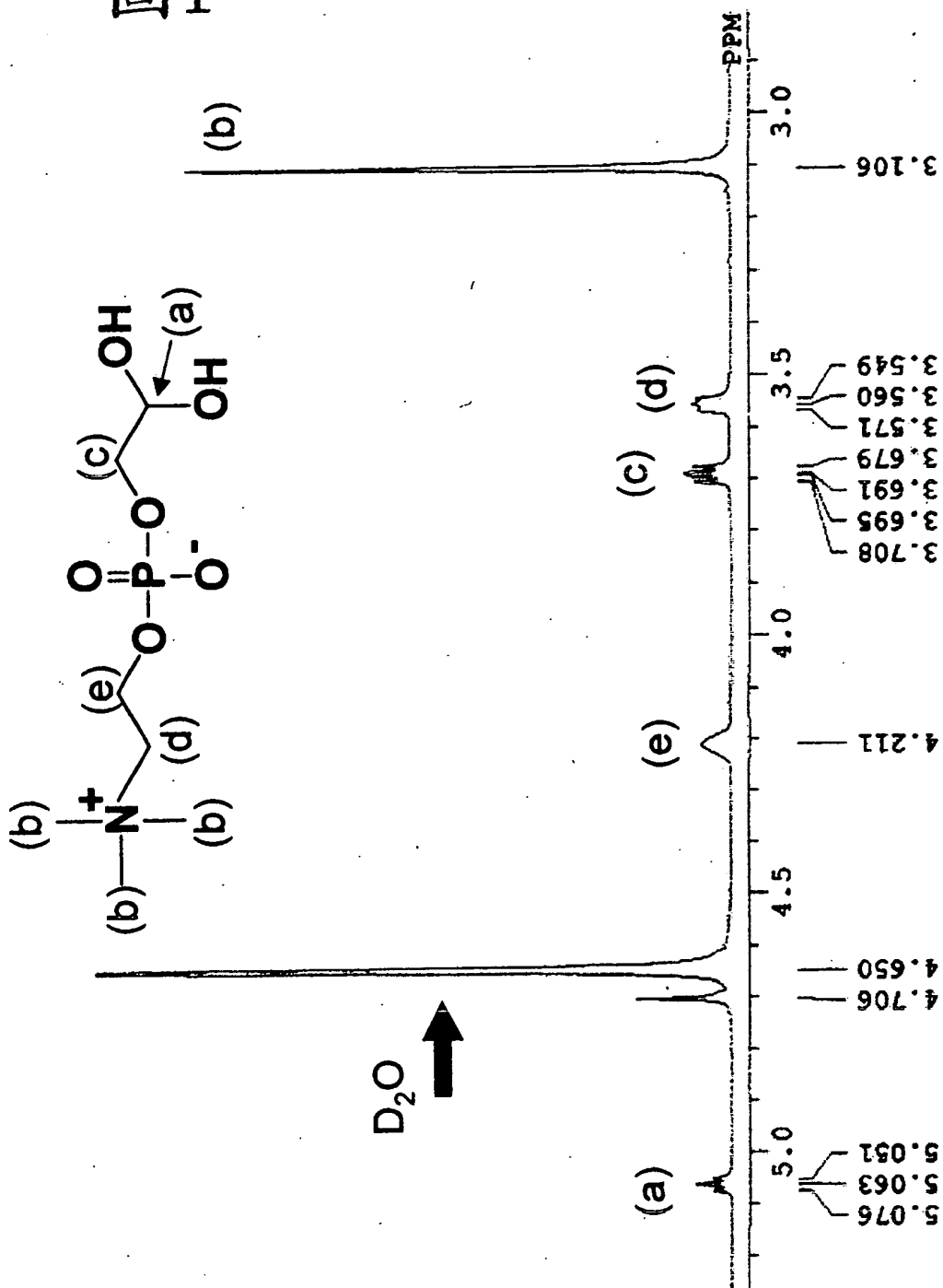


圖 2

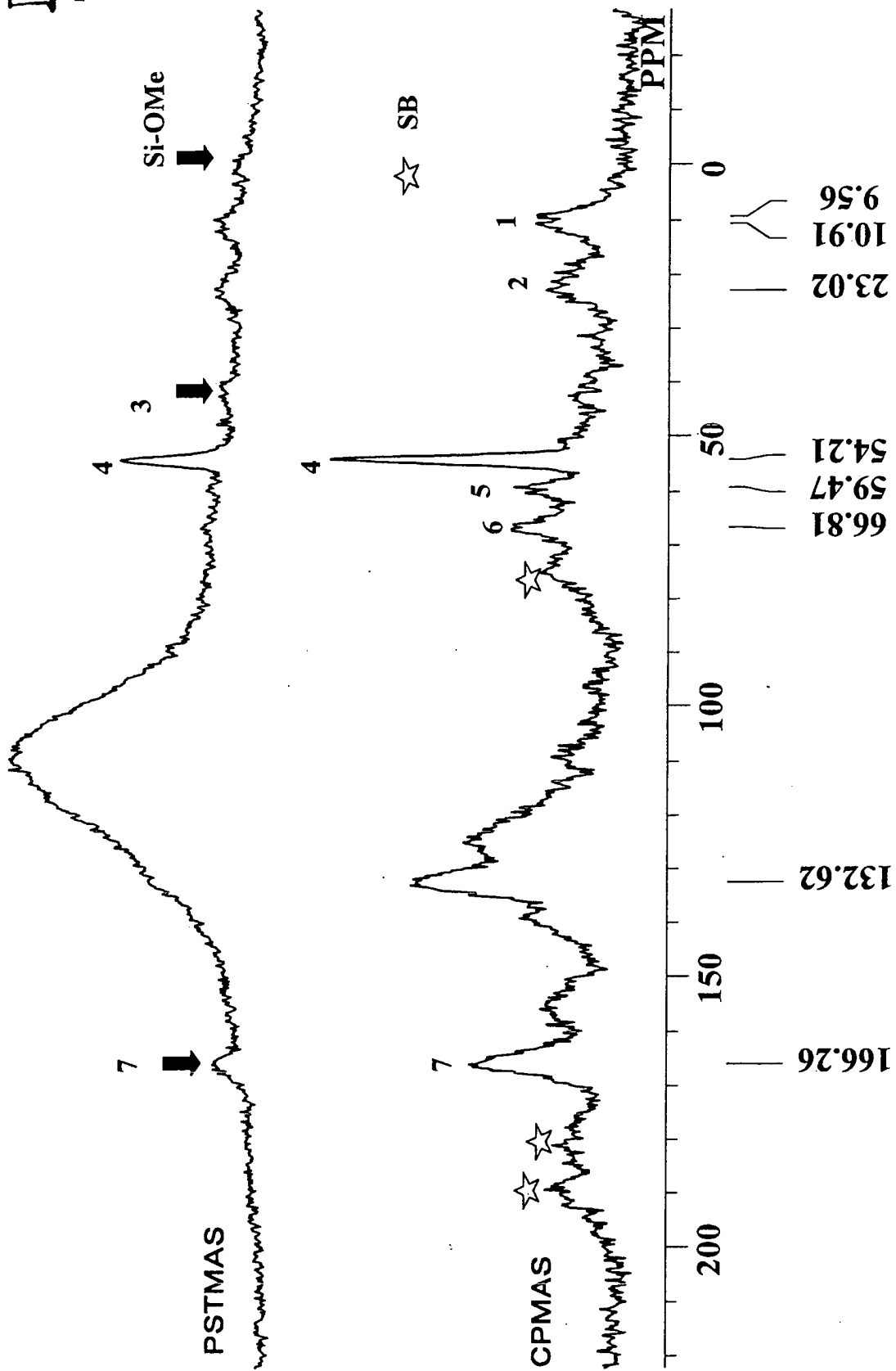


圖 3

\* 旁頻帶 (side band)

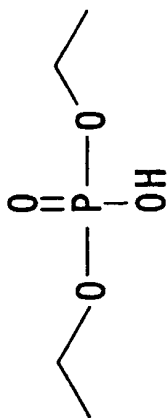
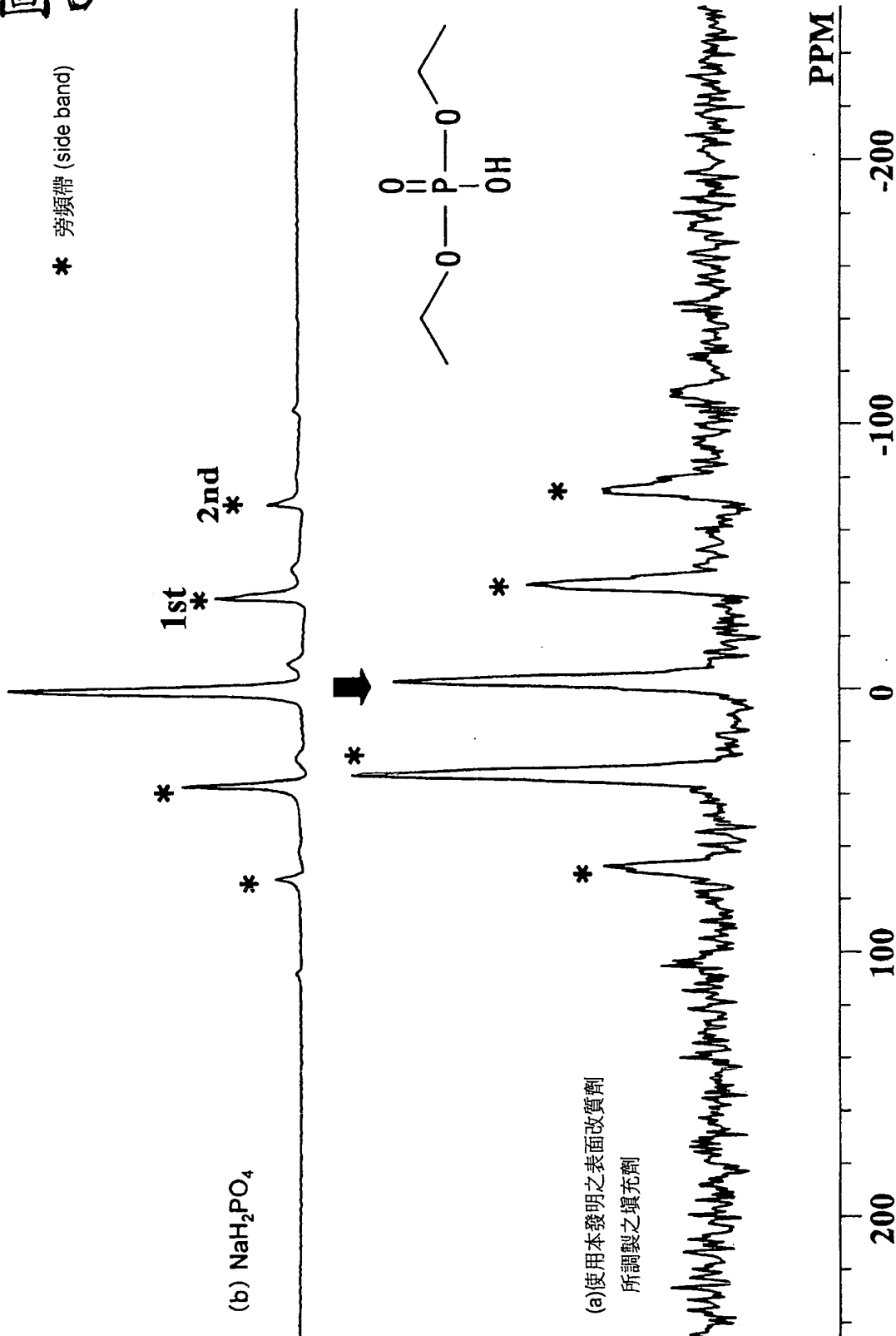


圖 4

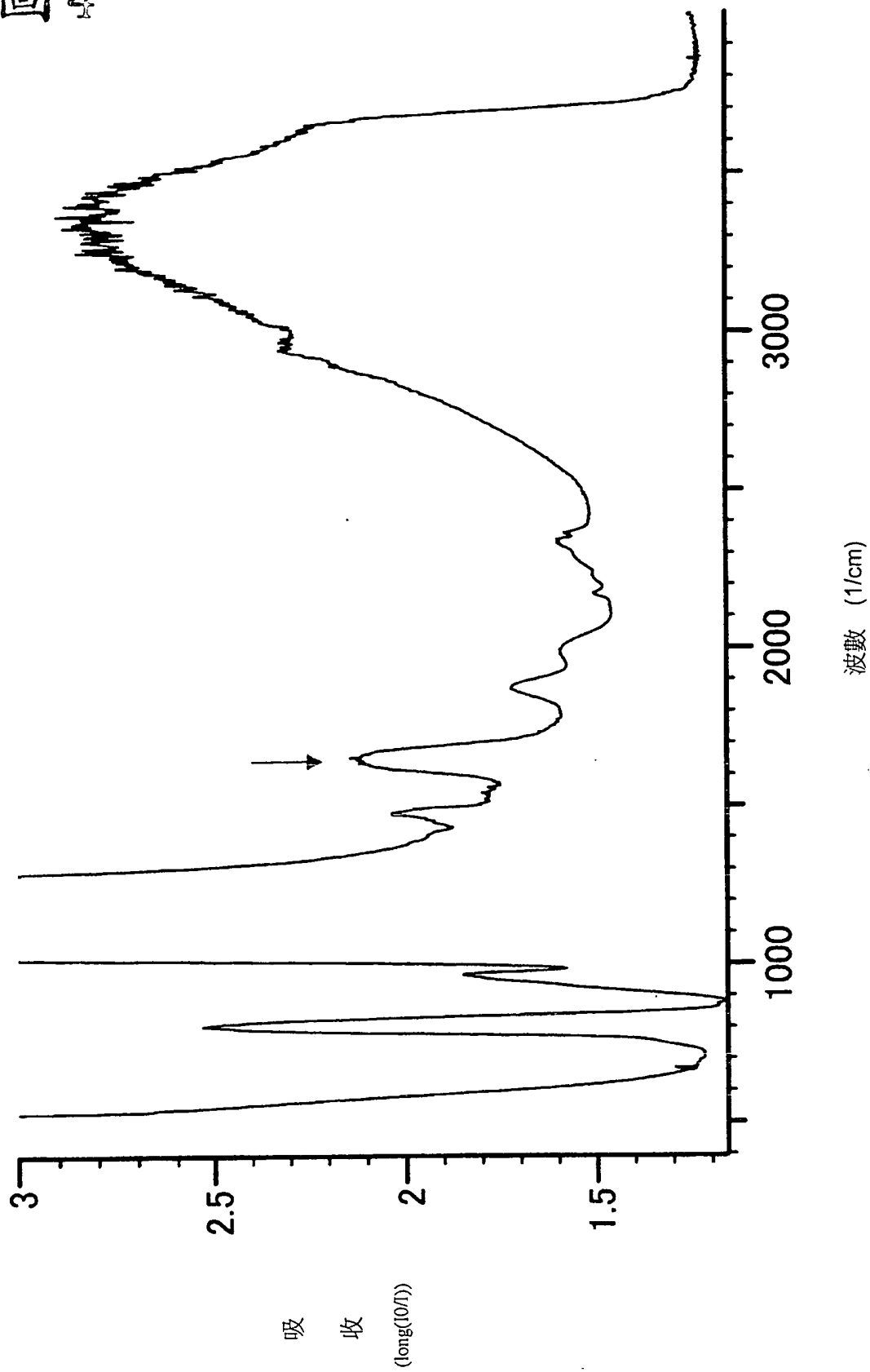


圖 5

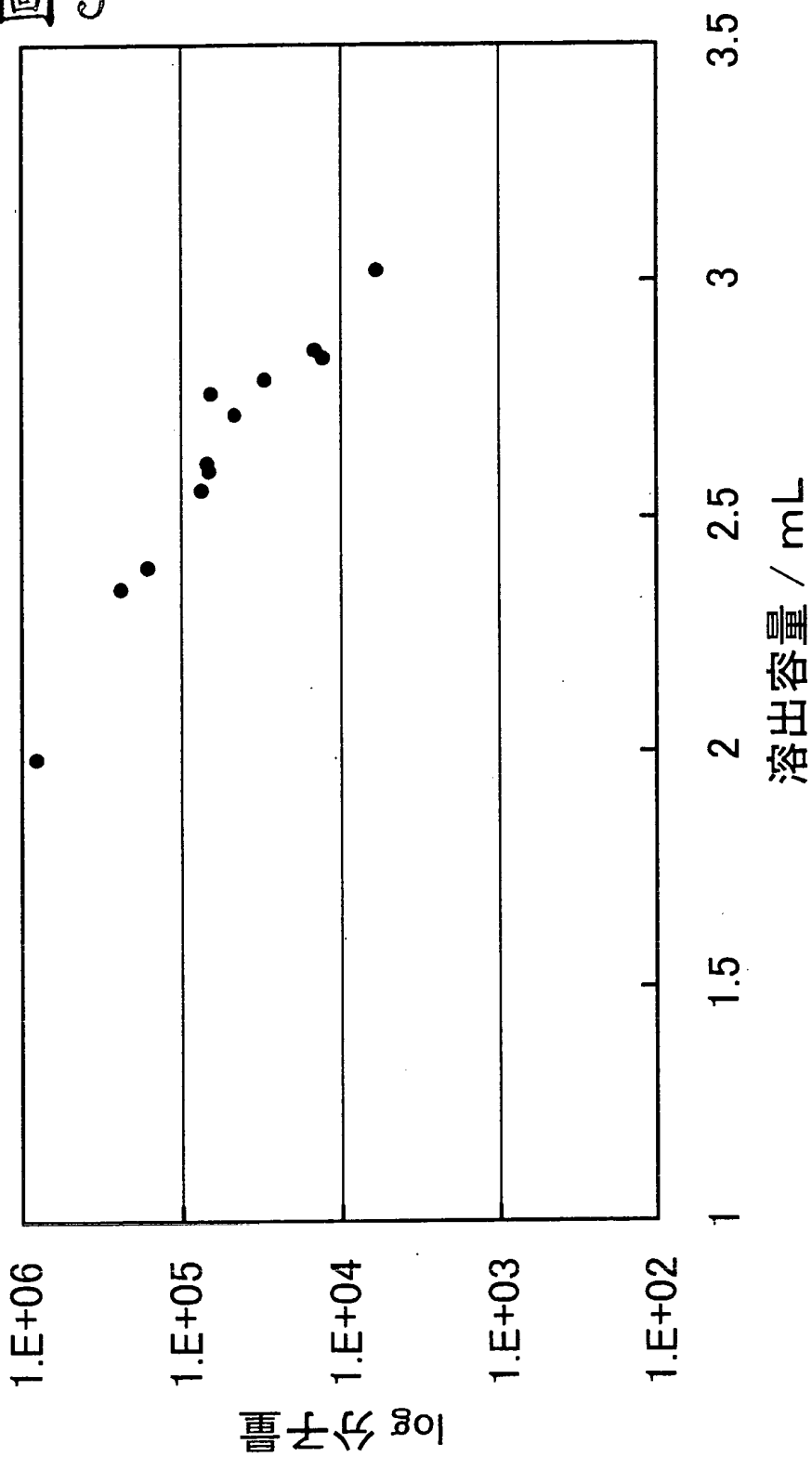


圖 6

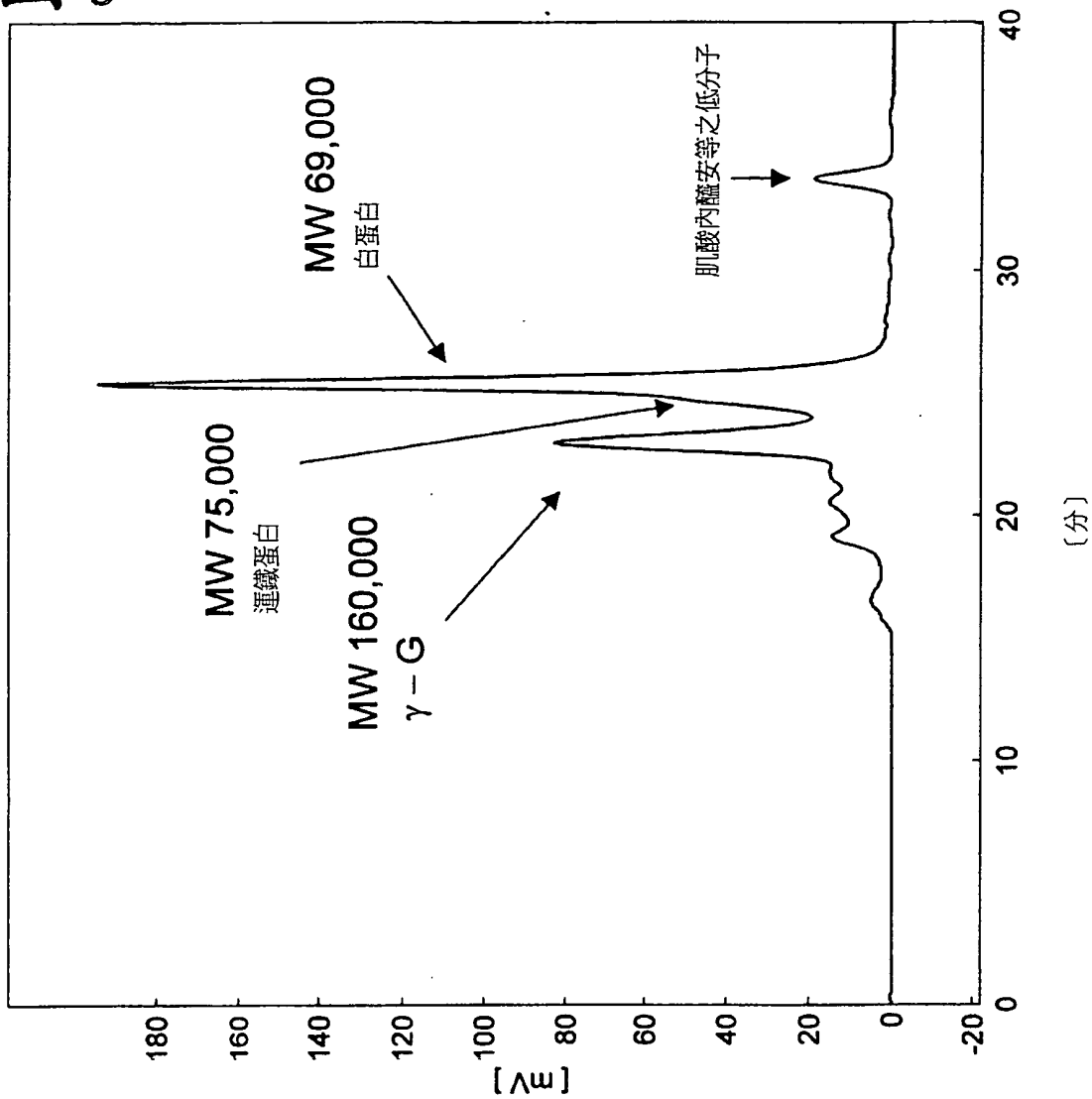
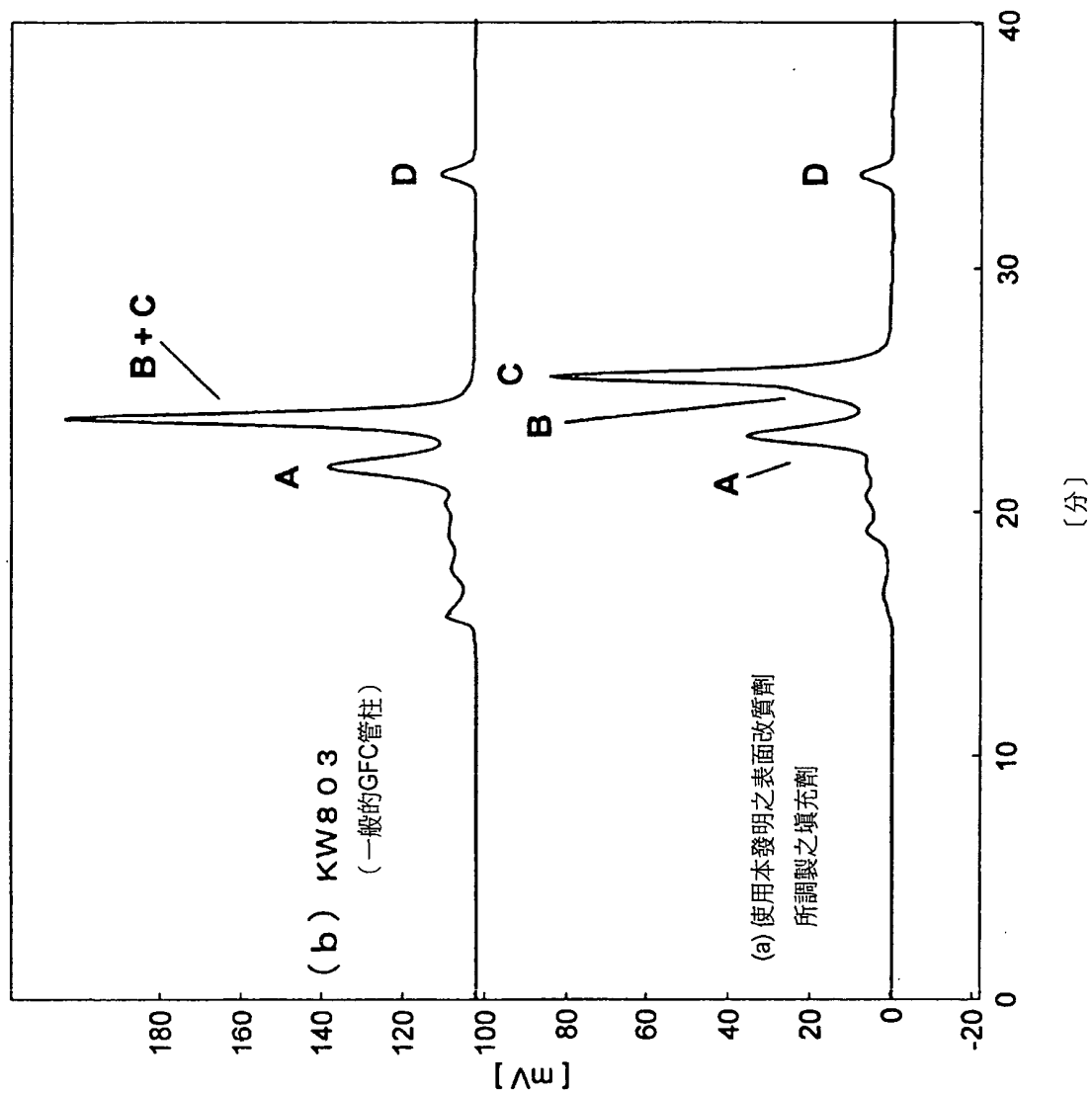


圖 7



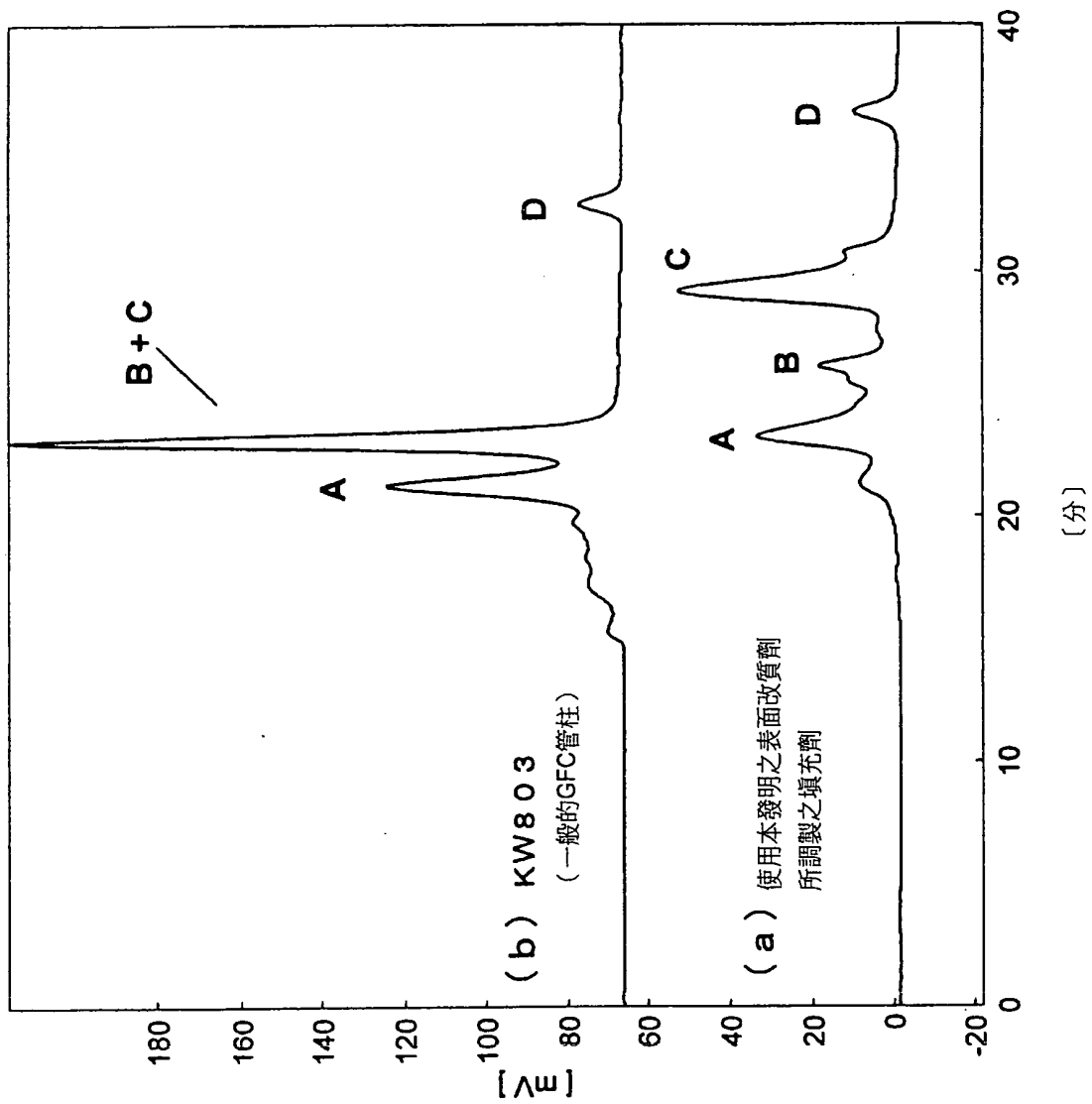
A: MW 160,000  
γ-G

B: MW 75,000  
運鐵蛋白

C: MW 69,000  
白蛋白

D: 肌醇內鹽等之低分子

圖 8



A: MW 160,000  $\gamma$ -G

B: MW 75,000 運鐵蛋白

C: MW 69,000 白蛋白

D: 肌醇內醴等之低分子

(b) KW803 (一般的GFC管柱)

(a) 使用本發明之表面改質劑 所調製之填充劑

[分]

[E]

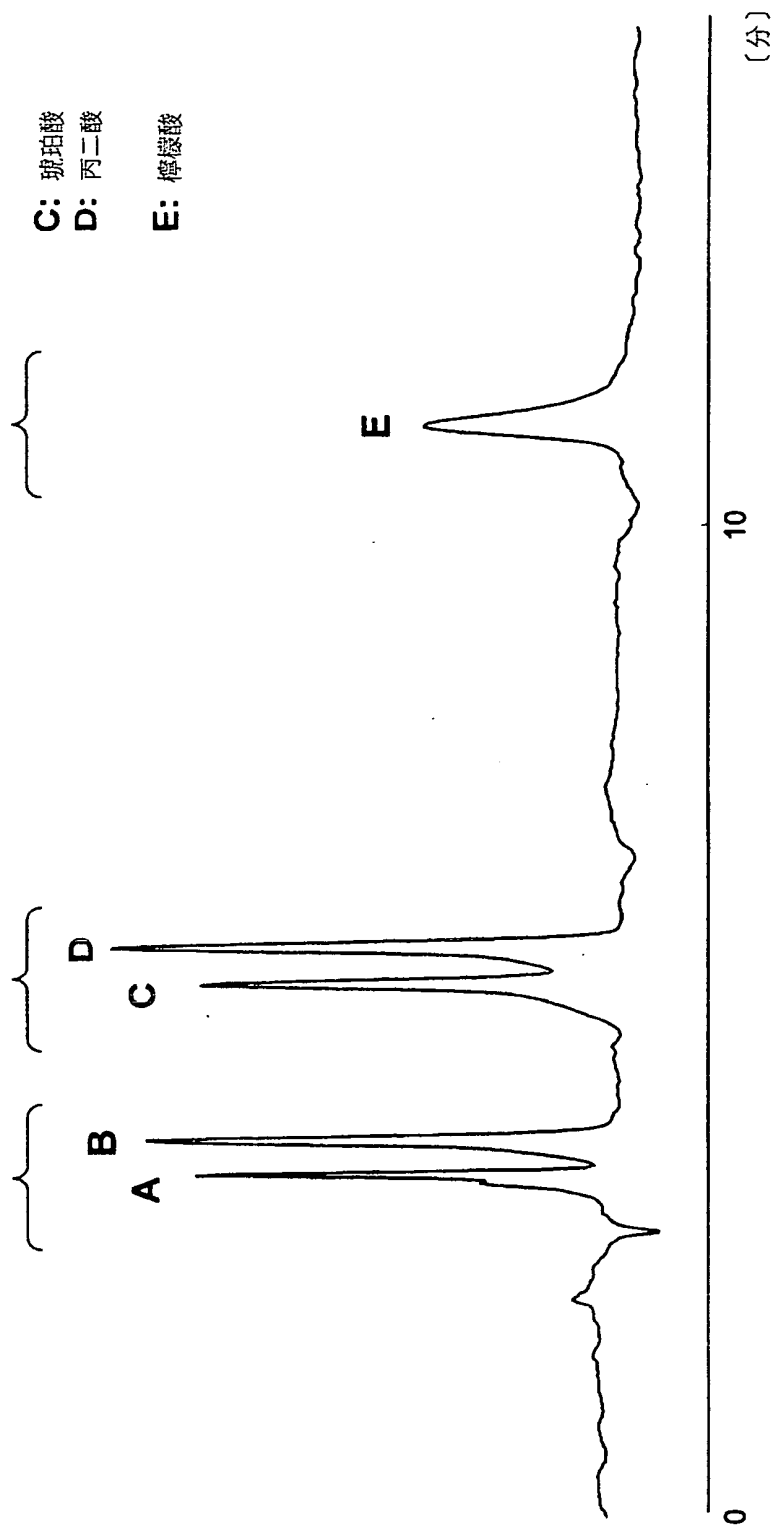
# 圖 9

- A: 乳酸
- B: 乙酸
- C: 琥珀酸
- D: 丙二酸
- E: 檸檬酸

分子內之  
羧酸數 = 3

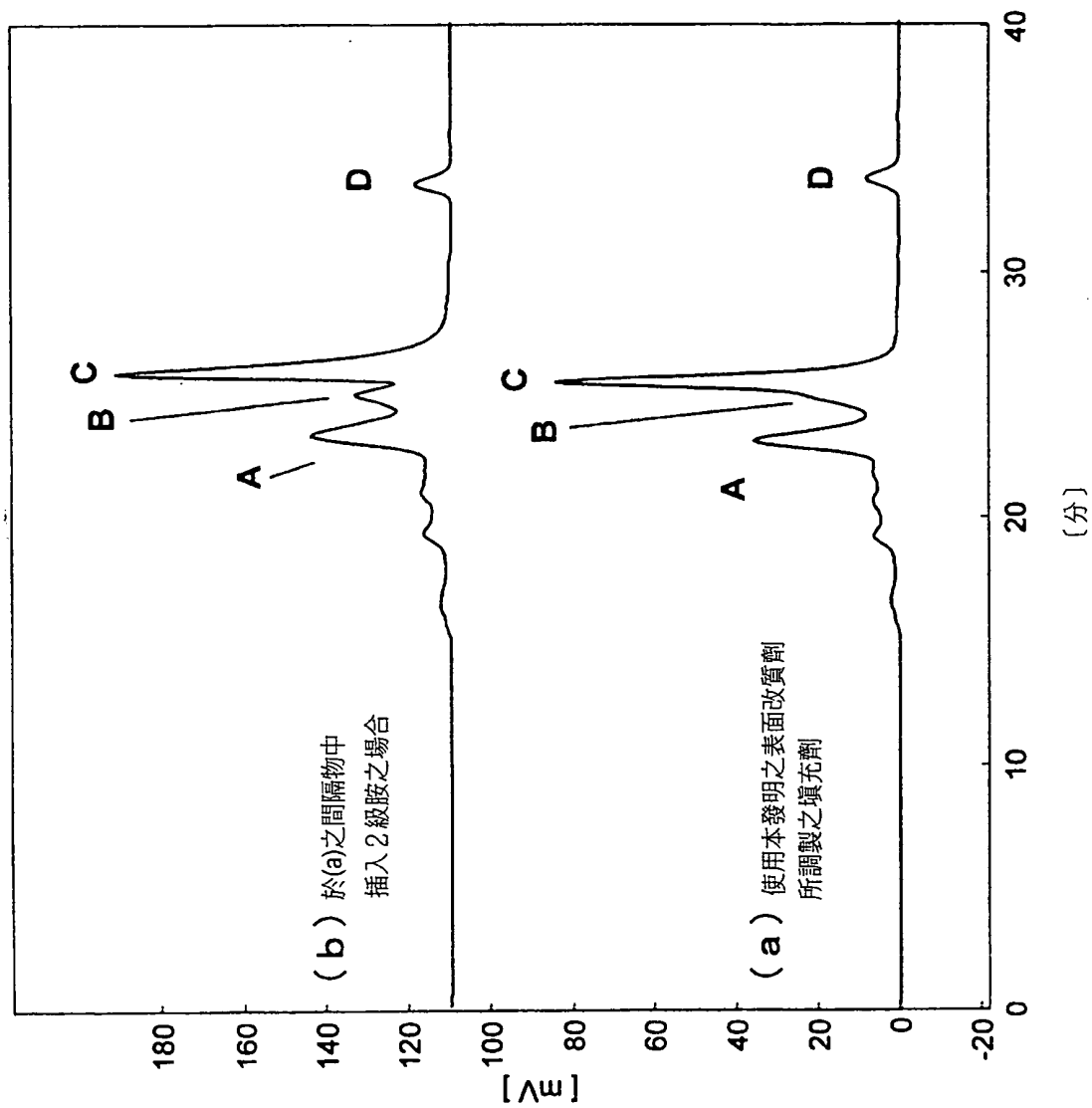
分子內之  
羧酸數 = 2

分子內之  
羧酸數 = 1



[分]

# 圖10



A: MW 160,000  
γ-G

B: MW 75,000  
運鐵蛋白

C: MW 69,000  
白蛋白

D: 肌醇內鹽胺等之低分子

圖 11

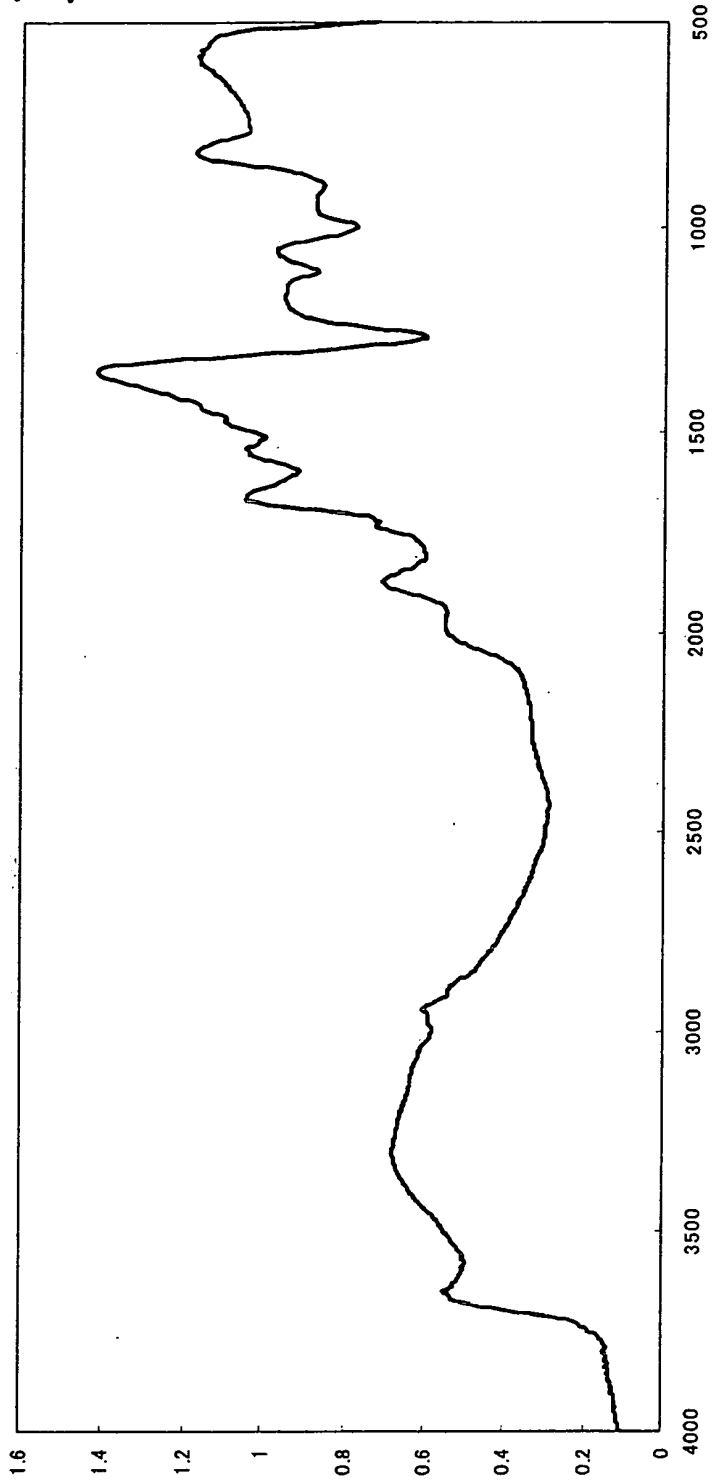


圖 12

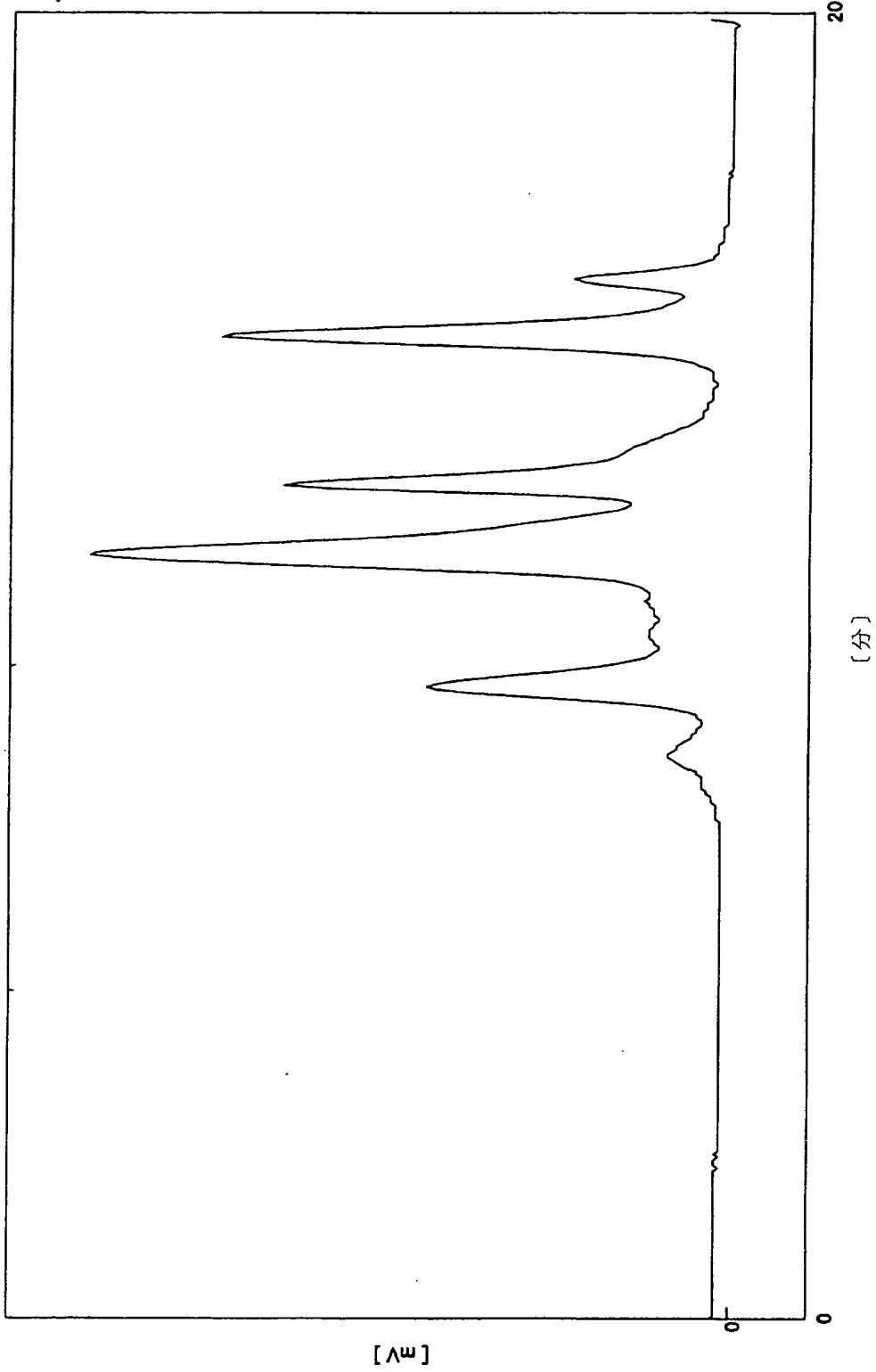


圖 13

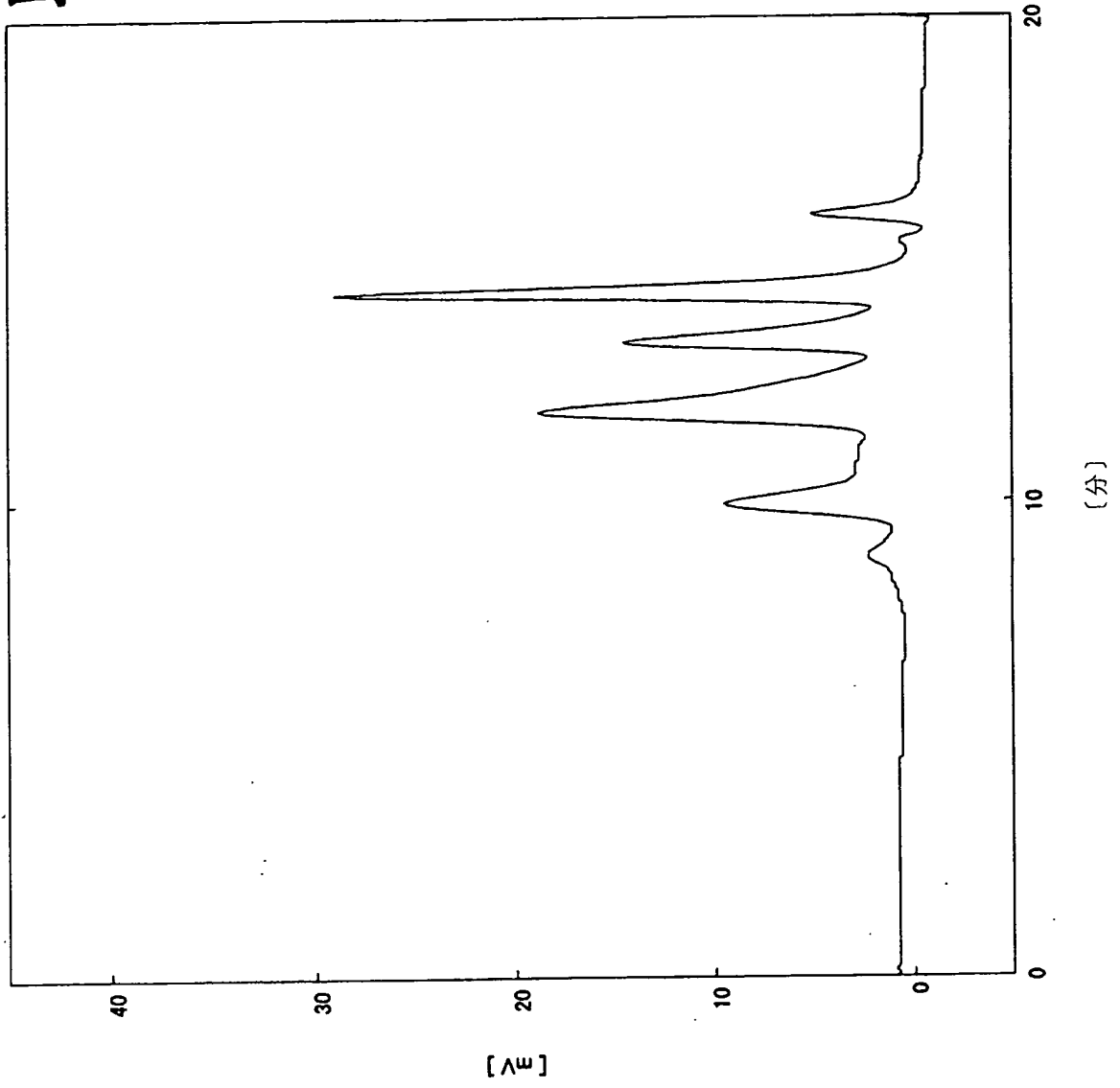


圖 14

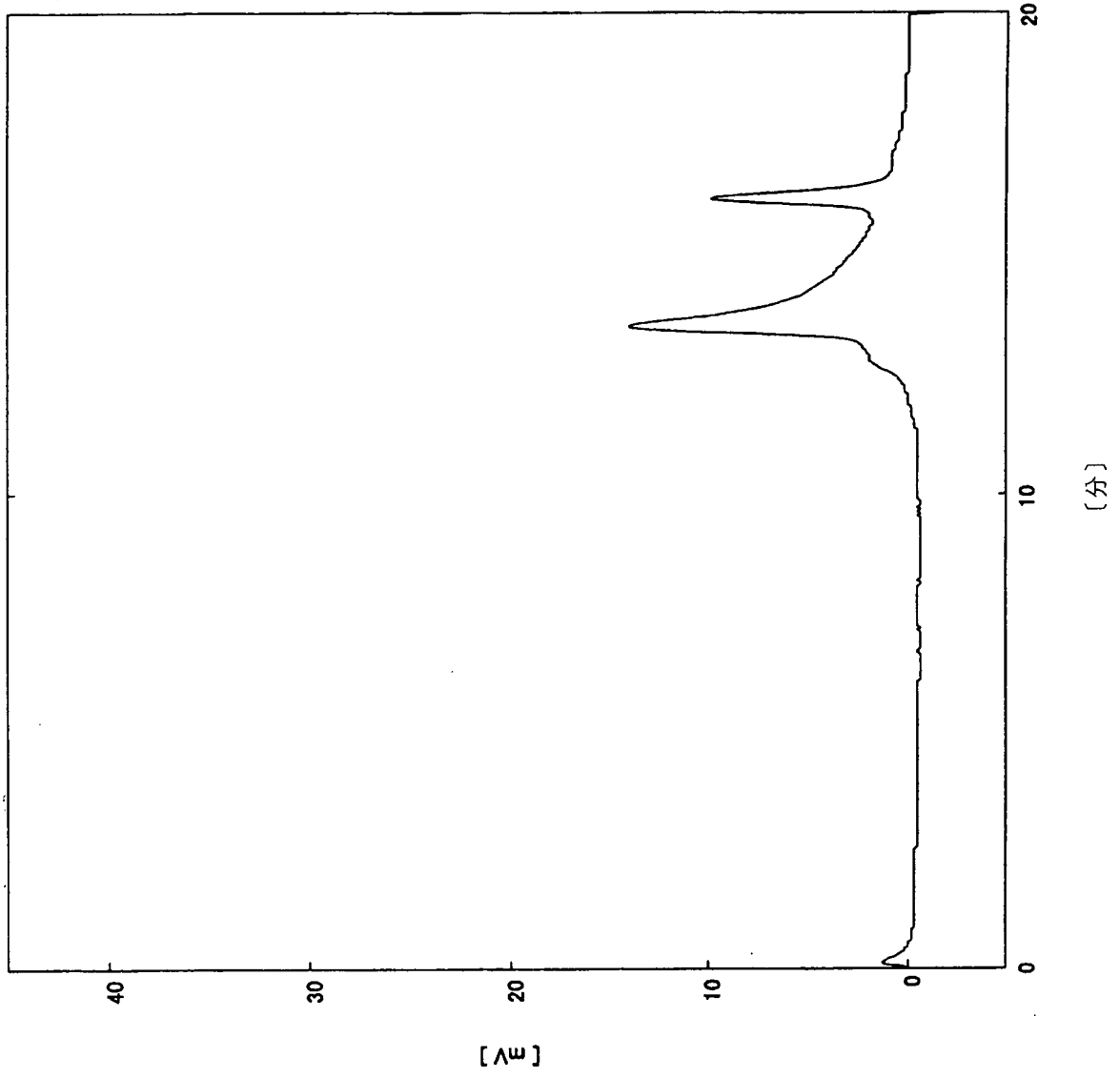


圖 15

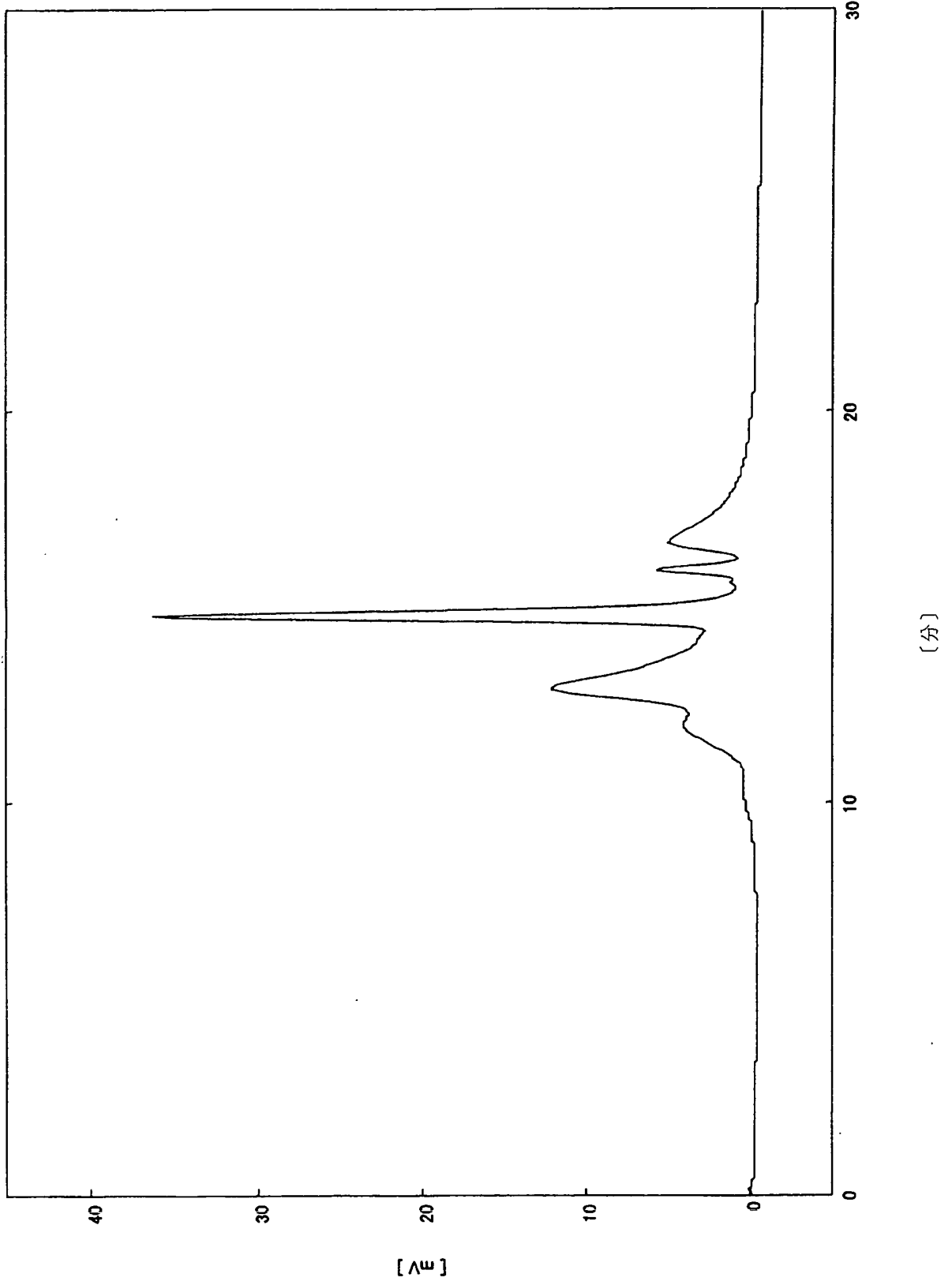


圖 16

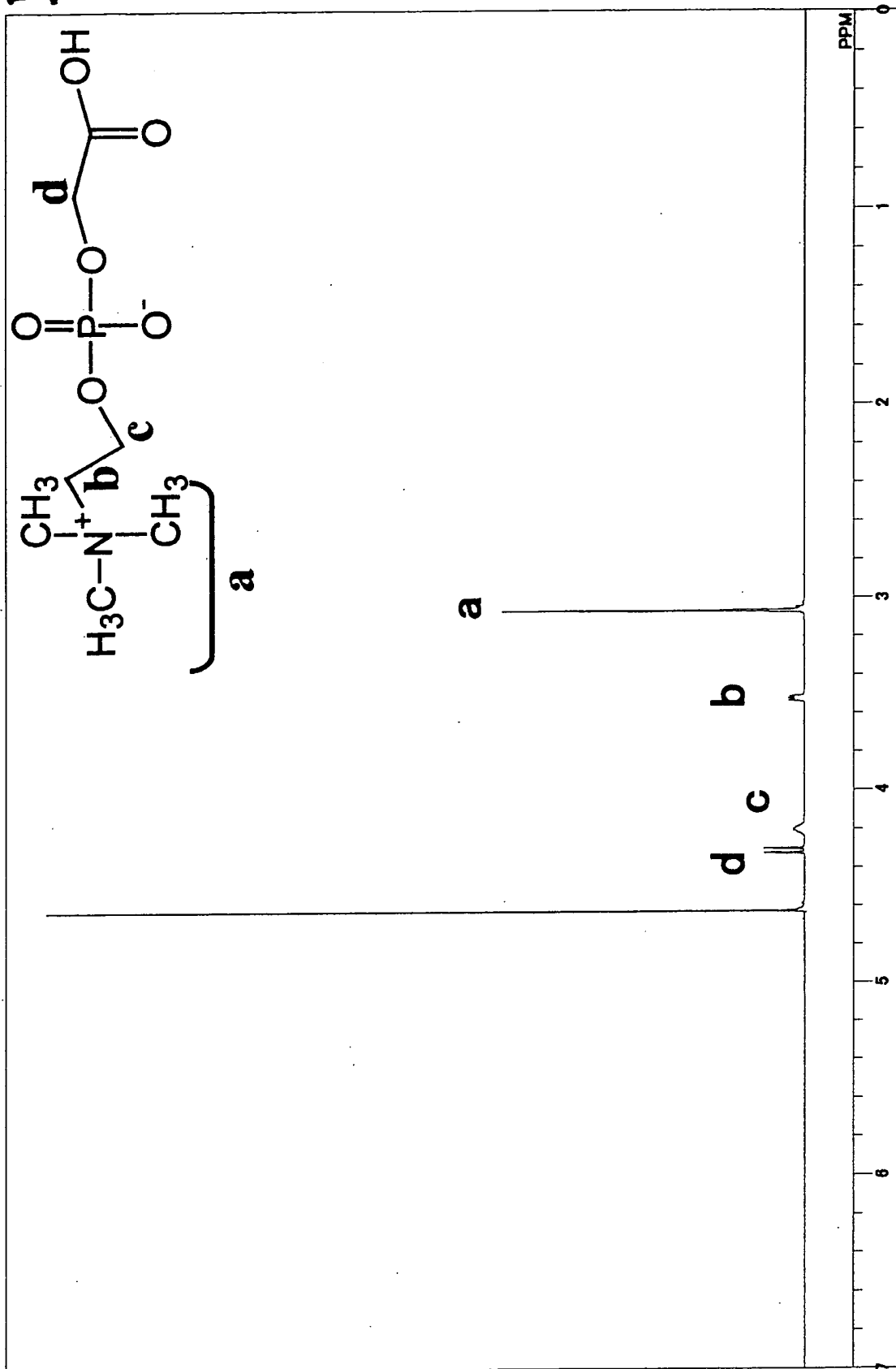


圖 17

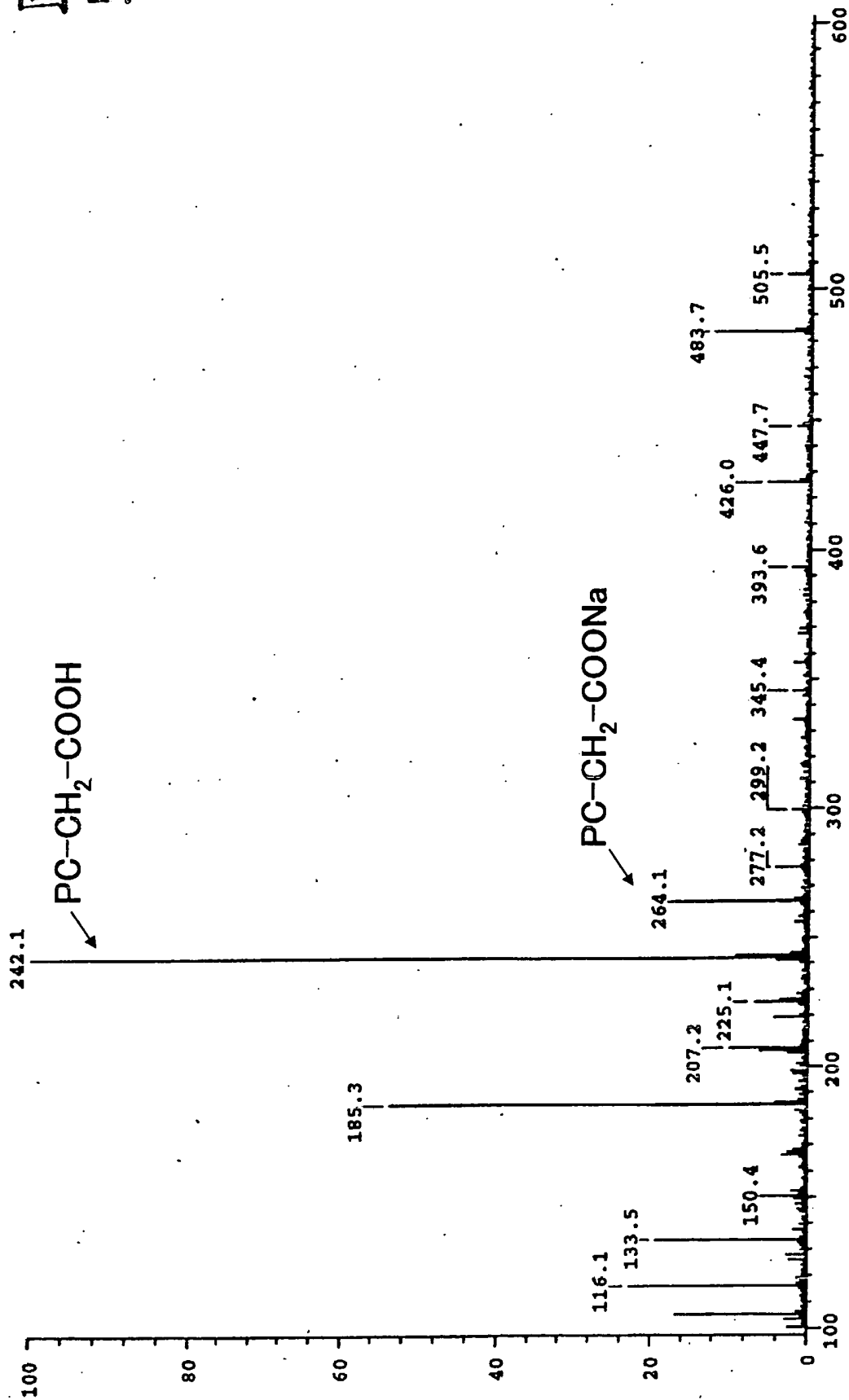
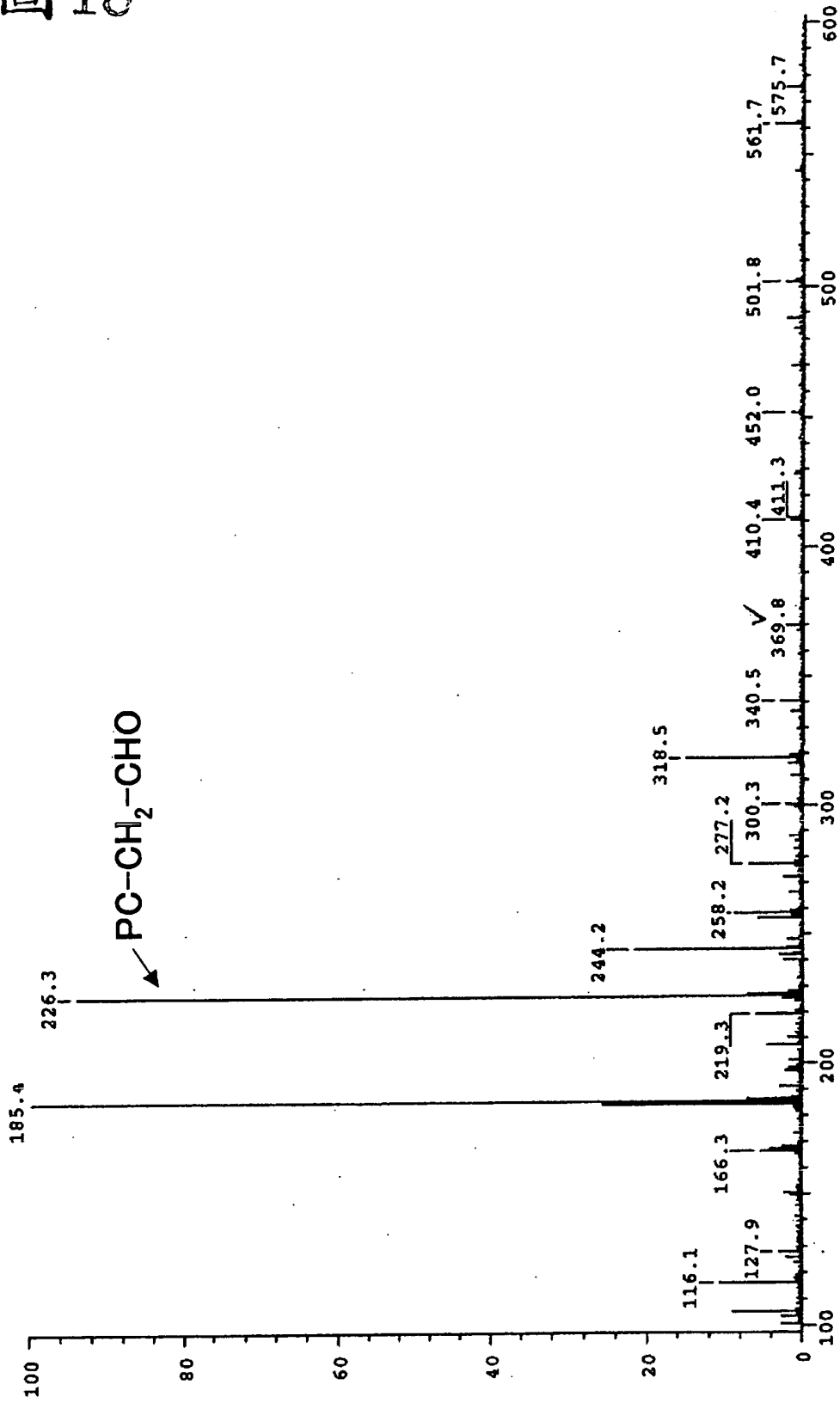


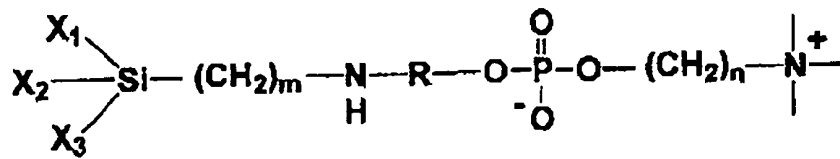
圖 18



**七、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

**八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

(1)

公告本

修正  
年 月 日  
96 7 13 補充

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：

93127018

C07H9/09

※ 申請日期：

93.12-1

※IPC 分類：

C07H7/08

C03C25/66

G01N30/00

## 一、發明名稱：(中文/英文)

含磷酸膽鹼基化合物及由該化合物構成之表面改質劑

## 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

資生堂股份有限公司

代表人：(中文/英文)

前田 新造

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本東京都中央區銀座 7-5-5

國 籍：(中文/英文)

日本

## 三、發明人：(共 7 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 東條 洋介

2. 宮澤 和之

3. 神田 武利

4. 沓名 裕

5. 佐久間 健一

6. 和田 正良

7. 隅田 如光

國 籍：(中文/英文)

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 日本