



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 260 701 A1

 4(51) C 08 B 5/00
 C 08 B 3/22
 C 07 C 69/96

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 08 B / 304 306 0	(22)	30.06.87	(44)	05.10.88
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD				
(72)	Boeden, Hans-Friedrich, Dr. rer. nat.; Büttner, Werner, Dr. rer. nat.; Büttner, Dorothea; Courault, Barbara; Rupprich, Christian, Dipl.-Ing.; Becker, Manfred, Dr. rer. nat., DD				
(54)	Verfahren zur Umesterung von aktiven unsymmetrischen Kohlensäurediester-Gruppen an hydroxylgruppenhaltigen Polymeren				

(55) Hydroxylgruppenhaltige Polymere, unsymmetrische Kohlensäurediester, Umesterung, supernucleophile Amine, Pericellulose, Sepharose, Kopplung von Alkoholen, Biotechnologie

(57) Verfahren zur Umesterung von aktiven unsymmetrischen Kohlensäurediester-Gruppen an hydroxylgruppenhaltigen Polymeren. Erfindungsgemäß werden an hydroxylgruppenhaltigen Polymeren gebundene unsymmetrische Kohlensäurediester mit elektronenanziehenden Gruppen in Gegenwart von Basen, insbesondere von supernucleophilen Aminen, in wasserfreien organischen Lösungsmitteln bei Temperaturen von 0–100° mit Alkoholen, Phenolen oder N,N-disubstituierten Hydroxylaminen umgeestert. Anwendungsgebiete sind Verfahrensentwicklungen in der chemischen und pharmazeutischen Industrie und die Biotechnologie.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Umesterung an aktiven unsymmetrischen Kohlensäurediester-Gruppen an hydroxylgruppenhaltigen Polymeren, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Polymere mit aktiven Kohlensäurediester-Gruppen der allgemeinen Formel $\text{J}-\text{O}-\text{CO}-\text{OR}$, wobei der Rest R eine elektronenanziehende Gruppe darstellt, in Gegenwart von supernucleophilen Aminen und/oder stark basischen tertiären Aminen in wasserfreien organischen Lösungsmitteln bei Temperaturen von 0–100°C mit Alkoholen, Phenolen oder mit N,N-disubstituierten Hydroxylaminen bzw. deren Salzen umsetzt und gegebenenfalls eine Behandlung mit wäßrigen Lösungen anschließt.
2. Verfahren nach Anspruch 1., d. g., daß die elektronenanziehende Gruppe R substituierte Phenylreste, wie p-Nitrophenyl- oder 2,4,5-Trichlorphenyl- oder ein Succinimidyl-, Phthalimidyl- oder 5-Norbornen-2,3-dicarboximidyl-Rest sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1., d. g., daß man als supernucleophile Amine 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), 4-Pyrrolidinopyridin, 4-Morpholinopyridin, N-Methylimidazol, Diazabicyclo [5,4,0] undecen, Diazabicyclo [2,2,2] octan einsetzt.
4. Verfahren nach Anspruch 1., d. g., daß man als stark basische tertiäre Amine Triethylamin, N-Methylmorpholin, N,N-Dimethylanilin oder heterocyclische Amine wie Pyridin, Picoline, N-Methylpiperidin einsetzt.
5. Verfahren nach Anspruch 1., d. g., daß als Alkohole sowohl unsubstituierte als auch substituierte primäre, sekundäre und tertiäre Verbindungen, sowie Phenol, substituierte Phenole wie p-Nitrophenol, Dichlor- oder Trichlorphenole, Kresole und N,N-disubstituierte Hydroxylamine wie N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxyphthalimid, N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid (HONB) eingesetzt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1. und 3., d. g., daß pro Mol unsymmetrische Kohlensäurediester-Gruppen am Polymeren > 0,01 bis 5 Mol supernucleophiles Amin, vorzugsweise 0,05–2 Mol, verwendet werden.
7. Verfahren nach Anspruch 1. und 4., d. g., daß die Menge des eingesetzten stark basischen Amins von 1–100 Mol pro Mol unsymmetrische Kohlensäurediester-Gruppen beträgt.
8. Verfahren nach Anspruch 1. und 5., d. g., daß pro Mol unsymmetrische Kohlensäurediester-Gruppen 1–100 Mol Alkohole, Phenole oder N,N-disubstituierte Hydroxylamine, gelöst in wasserfreien organischen Lösungsmitteln, oder gegebenenfalls diese Verbindungen als Lösungsmittel eingesetzt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 1., d. g., daß als wasserfreie Lösungsmittel polare organische Verbindungen wie Acetonitril, Dimethylformamid, Dioxan, Aceton u. a. oder aliphatische Kohlenwasserstoffe wie Hexan, Heptan oder aromatische Kohlenwasserstoffe wie Benzen, Toluol oder halogenierte Kohlenwasserstoffe wie Methylenchlorid, Chloroform u. a. eingesetzt werden.
10. Verfahren nach Anspruch 1., d. g., daß die Behandlung mit wäßrigen Lösungen im pH-Bereich von 2–9 bei Raumtemperatur durchgeführt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Umesterung von aktiven unsymmetrischen Kohlensäurediester-Gruppen an hydroxylgruppenhaltigen Polymeren mit Alkoholen, Phenolen oder N,N-disubstituierten Hydroxylaminen in Gegenwart tertiärer Amine. Die dadurch erhaltenen Polymere reagieren mit nucleophilen Reaktionspartnern und können zur Kopplung von Aminen, Aminosäuren, Peptiden, Proteinen und Nucleinsäuren genutzt werden.

Anwendungsgebiete sind wissenschaftliche Grundlagenuntersuchungen und Verfahrensentwicklungen in der chemischen und pharmazeutischen Industrie, die Biowissenschaften, die Biotechnologie und die Medizin.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Herstellung von unsymmetrischen Kohlensäurediester-Gruppen tragenden hydroxylgruppenhaltigen Polymeren erfolgt überwiegend durch Aktivierung von Polymeren mit Chlorameisensäureestern (Chlorkohlensäureester). So wurden hydroxylgruppenhaltige Polymere mit Chlorameisensäureestern ($\text{Cl}-\text{CO}-\text{OR}$) umgesetzt, in denen z. B. R = Ethyl-, Isobutyl-, p-Nitrophenyl-, 2,4,5-Trichlorphenyl-, Succinimidyl-, Phthalimidyl-, 5-Norbornen-2,3-dicarboximidyl- ist. (S. A. Barker et al. Carbohydrate Res. **17** [1971] 471; P. D. G. Dean, W. S. Johnson, F. A. Middle, Affinity Chromatography, IRL Press, Oxford 1985, S. 44; M. Wilchek et al., Biochem. Internat. **4** [1982] 629, Meth. Enzymol. **104** [1984] 3, Biochem. Biotechn. **11** [1985] 445; J. Drobnik et al., Biotechnol. Bioeng. **24** (1982) 487, GB 2015553; EP 0134041).

Eine Aktivierung (Veresterung) von Hydroxylgruppen an Polymeren kann auch durch deren Umsetzung mit symmetrischen Kohlensäurediestern (RO-CO-OR), wobei R eine elektronenanziehende Gruppe ist, in Gegenwart von supernucleophilen Aminen durchgeführt werden (M. Wilchek et al. Appl. Biochem. Biotechnol. **11** [1985] 141). die in den aktivierten Polymeren befindlichen f-O-CO-OR -Gruppen enthalten im Rest die dem entsprechenden Alkohol, Phenol oder N,N-disubstituierten Hydroxylamin entstammende Gruppe. Die Kopplungsfähigkeit dieser Polymere gegenüber nucleophilen, aminogruppenhaltigen Verbindungen wurde in allen Fällen nachgewiesen.

Für die Kopplung hydroxylgruppenhaltiger Verbindungen werden nach anderen Methoden aktivierte Polymere, wie z. B. Divinylsulfon-, Epoxid- oder Halogentriazin-aktivierte, empfohlen (W. H. Scouten, Affinity Chromatography, John Wiley & Sons, New York 1981). Ein Nachteil, der die Anwendung von Divinylsulfon-aktivierten Polymeren erschwert, ist die Kopplung von Alkoholen oder aminogruppenhaltigen Verbindungen bei hohen pH-Werten (> 10) und die Tatsache, daß die Kopplungsprodukte von Alkoholen $> \text{pH} 9$ und die der Amine $> \text{pH} 8$ instabil sind.

Die Epoxid-aktivierten Polymere koppeln Hydroxyverbindungen erst bei höheren Temperaturen und pH-Werten zwischen 11 und 13. Die Beseitigung der nicht umgesetzten Epoxidgruppen ist äußerst schwierig. Nachteile der Halogentriazin-aktivierten Polymeren sind die vor dem Aktivieren notwendige Vorbehandlung der Polymeren mit 3N NaOH, die Veränderung der Polymerstruktur bei der Aktivierung durch Quervernetzung und die Kopplung von Alkoholen bei pH-Werten > 10 , wobei nur stärker nucleophile OH-Gruppen reagieren.

S. Yolles et al. (J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed. **17** (1979) 4111) beschreiben die Kopplung von Steroiden über deren Hydroxylgruppen, wobei aber das hydroxylgruppenhaltige Polymere (z. B. Hydroxypropylcellulose) durch Umsetzung mit Phosgen in einen Chlorkohlensäureester-Gruppen (-O-CO-Cl) enthaltenden Träger umgewandelt wurde. Nachteilig wirkt sich hierbei der Einsatz großer Mengen flüssigen Phosgens aus und der Fakt, daß das aktivierte Polymere äußerst hydrolyseempfindlich ist.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zu entwickeln, um Kohlensäurediester-Gruppen enthaltende Polymere unter milden Reaktionsbedingungen und unter Erhalt der kovalenten Bindung am Polymeren umzuestern.

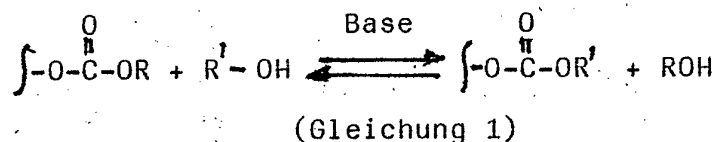
Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, aktivierte hydroxylgruppenhaltige Polymere des Typs f-O-CO-OR in einem technisch gut durchführbaren Verfahren mit guten Ausbeuten umzuestern.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß aktive unsymmetrische Kohlensäurediester-Gruppen enthaltende Polymere der allgemeinen Formel f-O-CO-OR , wobei der Rest R eine elektronenanziehende Gruppe darstellt, in Gegenwart von supernucleophilen Aminen und/oder einem der Gruppe starker Basen zugehörigen tertiären Amin in wasserfreien organischen Lösungsmitteln bei Temperaturen von $0-100^\circ\text{C}$ mit Alkoholen, Phenolen oder mit N,N-disubstituierten Hydroxylaminen oder deren Salzen umgesetzt werden.

Gegebenenfalls wird noch eine Behandlung mit wäßrigen Lösungen durchgeführt.

Die Umesterung ist eine Gleichgewichtsreaktion, die durch folgende allgemeine Gleichung beschrieben werden kann:



Als aktivierte hydroxylgruppenhaltige Polymere sind sowohl wasserlösliche als auch unlösliche natürliche Polysaccharide und deren Derivate oder Hydrolyseprodukte wie Cellulose, Agarose, Dextran, Stärke, Mannan, Sepharose, Stärkehydrolyseprodukte (SHP) u. a. oder synthetische Polymere wie Fractogel, Toyopearl, Spheron, Trisacryl, Polyvinylalkohol, Polyethylenglykol usw. einsetzbar. Als elektronenanziehende Gruppe R werden substituierte Phenylreste, wie z. B. p-Nitrophenyl- oder 2,4,5-Trichlorphenyl oder ein Succinimidyl-, Phthalimidyl- oder 5-Norbornen-2,3-dicarboximidyl-Rest verwendet. Durch diese guten Abgangsgruppen wird die Umesterung erleichtert und kann z. B. bei niedrigen Temperaturen ($0-20^\circ\text{C}$) erfolgen. Entscheidend für den Ablauf der Umesterung ist der Zusatz von Basen, insbesondere von tertiären Aminen. Die erforderliche Menge ist von der Natur der Amine abhängig. Als supernucleophile Amine werden z. B. 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), 4-Pyrrolidino- oder 4-Morpholinopyridin, N-Methylimidazol, Diazabicyclo [5.4.0] undecen, Diazabicyclo [2.2.2] octan eingesetzt. Dabei findet die Umesterung schon in Gegenwart von katalytischen Mengen statt. Erfindungsgemäß werden pro Mol unsymmetrische Kohlensäurediester-Gruppen am Polymeren $> 0,01$ bis 5 Mol supernucleophiles Amin, vorzugsweise 0,05 bis 2 Mol, verwendet.

Eine Erhöhung der Menge beschleunigt die Reaktion, z. B. kann beim Einsatz äquimolarer oder größerer Mengen DMAP, bezogen auf die vorhandenen aktiven unsymmetrischen Kohlensäurediester-Gruppen, die Reaktionszeit erheblich verkürzt werden (1-4 Stunden bei Raumtemperatur). Als stark basische tertiäre Amine verwendet man Triethylamin, N-Methylmorpholin, N,N-Dimethylanilin oder heterocyclische Basen wie Pyridin, Picoline, N-Methylpiperidin u. a.. Werden diese eingesetzt, sind in der Regel größere Mengen notwendig, mindestens äquimolar zu den aktiven Gruppen, wobei die Umesterung langsamer und der Umsetzungsgrad deutlich geringer ist als bei Einsatz supernucleophiler Amine.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, besonders bei der Umesterung mit OH-Verbindungen sehr geringer Acidität der OH-Gruppe, neben dem supernucleophilen Amin das stark basische Amin äquimolar zur Menge der OH-Verbindung ($\text{R}'\text{OH}$) (z. B. 1-100 Mol pro Mol unsymmetrische Kohlensäurediester-Gruppen) einzusetzen. Auf die zusätzliche Verwendung stark basischer Amine kann zweckmäßigerweise dann verzichtet werden, wenn Ammonium-, Alkali- oder Erdalkalisalze der OH-Verbindungen zur Reaktion gebracht werden. Dabei sind wegen der besseren Löslichkeit dieser Salze in stark polaren Lösungsmitteln Acetonitril oder Dimethylformamid zu verwenden.

Als Hydroxylgruppenhaltige Verbindungen (s. Gleichung 1, R'OH) können unsubstituierte und substituierte primäre, sekundäre und tertiäre Alkohole, Phenol, substituierte Phenole wie p-Nitrophenol, Di- oder Trichlorphenole, Kresole und N,N-disubstituierte Hydroxylamine wie N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxyphthalimid, N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid (HONB) verwendet werden. Es dürfen jedoch keine stark nucleophilen Gruppen (-NH₂, -SH, -COOH usw.) enthaltende Substituenten vorliegen, weil sonst eine Kopplung am Polymeren über diese Gruppen erfolgt. Die OH-Verbindungen sind sowohl im Gemisch mit wasserfreien organischen Lösungsmitteln als auch selbst als Lösungsmittel einzusetzen. Bevorzugt werden sie im größeren Überschuß (pro Mol unsymmetrische Kohlensäurediester-Gruppen 1–100 Mol Alkohole, Phenole oder N,N-disubstituierte Hydroxylamine) eingesetzt.

Wichtig ist, daß wasserfreie organische Lösungsmittel verwendet werden, um die relativ schnell verlaufende Hydrolyse der unsymmetrischen aktiven Kohlensäurediester-Gruppen in Gegenwart von Basen zu vermeiden. Von den möglichen organischen Lösungsmitteln werden Aceton oder Dioxan bevorzugt. Es sind jedoch auch andere Lösungsmittel wie Diethylether, Tetrahydrofuran, Pyridin, Acetonitril, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder aliphatische Kohlenwasserstoffe wie Hexan, Heptan oder aromatische Verbindungen wie Benzen und Toluol oder halogenierte Kohlenwasserstoffe wie Methylenchlorid, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff u. a. mit Erfolg für die Umesterung einsetzbar.

Bei der Überführung der Polymeren vom wäßrigen Medium in ein organisches Lösungsmittel wird eine Behandlung mit Wasser-Lösungsmittel-Gemischen steigenden Lösungsmittelgehalts durchgeführt, um Strukturveränderungen des Polymeren zu vermeiden. In analoger Weise wird bei der Überführung der Polymeren vom organischen Lösungsmittel ins wäßrige Medium verfahren.

Der Umesterungsgrad der aktiven unsymmetrischen Kohlensäurediester-Gruppen ist von der Natur des Polymeren, der Art der OH-Verbindung (R'OH) und den Reaktionsbedingungen (Menge an Base und OH-Verbindung, Temperatur, Reaktionszeit) abhängig. Für die Umesterung sind 2 unterschiedliche Verfahrensvarianten anwendbar. Entweder wird das umzuesternde Polymere in einem wasserfreien organischen Lösungsmittel mit tertiärem Amin und der OH-Verbindung (R'OH) unter leichtem Schütteln oder Rühren umgesetzt, oder das Polymere wird in einer Chromatographiesäule mit der Lösung von tertiärem Amin und OH-Verbindung (R'OH) in einem wasserfreien organischen Lösungsmittel im Durchflußverfahren behandelt.

Im ersten Fall ist der Einsatz eines großen Überschusses der OH-Verbindung (R'OH) empfehlenswert, um das Gleichgewicht der Umesterung (siehe Gleichung 1) zugunsten des gewünschten Umesterungsproduktes (f-O-CO-OR') zu verschieben. Das kann gegebenenfalls auch durch die Verwendung von wenig polaren oder unpolaren Lösungsmitteln, wie z. B. Benzen oder Toluol erreicht werden, weil die frei werdende Verbindung ROH eine relativ stark saure Hydroxylgruppe enthält und mit tertiären Aminen Salze bilden kann, die weitestgehend unlöslich in diesen Lösungsmitteln sind.

Wird die Umesterung im Durchflußverfahren durchgeführt, sind nicht so große Überschüsse an OH-Verbindung (R'OH) notwendig, weil die vom aktivierten Polymeren abgespaltene OH-Verbindung (ROH) kontinuierlich aus der Säule ausgetragen und somit auch aus dem Umesterungsgleichgewicht entfernt wird.

Zweckmäßig ist für beide Varianten eine anschließende gründliche Wäsche des Polymeren mit stark polaren Lösungsmitteln, wie z. B. Acetonitril oder die kurzzeitige Überführung in ein wäßriges Medium von pH 2–9, vorzugsweise 2–3, um eventuell anhaftendes tertiäres Ammoniumsalz zu entfernen.

Der Verlauf der Umesterung kann durch Hydrolyse der Kohlensäurediester-Gruppen des Polymeren mit 0,1 M NH₄OH und spektralphotometrische Bestimmung der abgespaltenen OH-Verbindung (ROH) und gegebenenfalls auch von R'OH sowie durch Titration der vorhandenen unsymmetrischen Kohlensäurediester-Gruppen verfolgt werden. Die Titration wird nach Kopplung von Allylamin und Addition überschüssigen Iodmonobromids an die Doppelbindung des gekoppelten Allylamins durch Zusatz von Kaliumjodid mit 1/20 Thiosulfat (Bestimmung des nicht addierten IBr) durchgeführt (H. P. Kaufmann, Analyse der Fette und Fettprodukte, Bd. 1, Springer-Verlag, Berlin–Göttingen–Heidelberg 1958). Außerdem können die umgeesterten Polymeren durch ihre IR-Spektren, insbesondere im Bereich der C=O-Valenzschwingung (1700–1800 cm⁻¹) charakterisiert werden.

Bei einer nicht vollständigen Umesterung der -O-CO-OR-Gruppen kann man z. B. im Falle der Reaktion mit OH-Verbindungen (R'OH), die keine elektronenziehenden Gruppen tragen, wie aliphatische Alkohole oder Phenole, die noch am Polymeren befindlichen nicht umgeesterten Kohlensäurediester-Gruppen aufgrund ihrer größeren Hydrolyseempfindlichkeit durch eine Nachbehandlung mit wäßrigen Lösungen unter Rückbildung der Hydroxylgruppen des Polymeren quantitativ abgespalten werden. Vorteilhaft ist dabei die Verwendung schwach saurer Lösungen (z. B. pH 5). In schwach alkalischen pH-Bereichen (z. B. pH 8) erfolgt die Hydrolyse schneller, aber es können auch schon in gewissem Maße die neugebildeten, weniger aktiven Kohlensäurediester-Gruppen wieder abgespalten werden. Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß durch die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen eine vollständige Abspaltung der -O-CO-OR-Gruppen gelingt. Die Ausbeute an Umesterungsprodukt (f-O-CO-OR') beträgt bis ca. 75%. In Abhängigkeit von der Art des Polymeren und der Menge der aktiven unsymmetrischen Kohlensäurediester-Gruppen (-O-CO-OR) können umgeesterte Polymere erhalten werden, die ca. 50–300 µmol Kohlensäurediester-Gruppen (-O-CO-OR') pro Gramm trockenes Polymere enthalten. Beim Einsatz hoch aktivierter Polymere, wie z. B. mit Chlorameisensäureestern aktivierte Sepharose oder Perlc ellulose (600–1000 µmol -O-CO-OR-Gruppen/g trockenes Trägermaterial) kann man durch Umesterung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren bis ca. 500 µmol -O-CO-OR'-Gruppen/g (z. B. mit R'OH = Phenol oder p-Nitrophenol) einführen. Das entspricht im Falle des p-Nitrophenols einer gekoppelten Phenolmenge von ca. 6 mg/ml sedimentierte Perlc ellulose. Die umgeesterten Polymere können in Abhängigkeit von der Hydrolyseempfindlichkeit der -O-CO-OR'-Gruppen entweder in wasserfreien organischen Lösungsmitteln oder auch in wäßrigen Lösungen mit schwach saurem pH-Wert (z. B. pH 6) aufbewahrt werden.

Die Kopplungsfähigkeit der umgeesterten Polymeren wurde am Beispiel der Kopplung von Aminen, Aminosäuren und Proteinen nachgewiesen.

Die Erfindung wird anhand folgender Beispiele erläutert:

Beispiel 1

3 ml in wasserfreiem Dioxan sedimentierte aktivierte Perlc ellulose, hergestellt durch Umsetzung von Perlc ellulose mit N-Chlor-carbonyloxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid (Cl-CO-ONB) nach EP 0134041, mit 52 µmol aktiven Kohlensäurediester-Gruppen des Typs -O-CO-ONB/ml sedimentierte Cellulose (± 800 µmol/g trockene Cellulose) werden mit einer Lösung von 204 mg p-Nitrophenol (1,5 mmol) in 6 ml wasserfreiem Dioxan versetzt und 4 Stunden unter leichtem Schütteln in einem verschlossenen Kolben auf 65°C erwärmt. Der so behandelte Träger enthält noch sämtliche aktiven -O-CO-ONB-Gruppen; p-Nitrophenol wurde nicht gekoppelt. Anschließend wird zum Reaktionsgemisch eine Menge von 20 mg 4-Dimethylaminopyridin (164 µmol DMAP)

zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden 26,4 μMol p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen/ml Cellulose (410 $\mu\text{Mol/g}$) bestimmt. Das entspricht einem Umesterungsgrad von ca. 50% und einer gekoppelten p-Nitrophenolmenge von 3,7 mg/ml Cellulose.

Nach Absaugen der Cellulose und waschen mit wasserfreiem Dioxan über eine Glasfritte wird die Umesterung unter erneuter Zugabe von p-Nitrophenol und DMAP unter analogen Bedingungen 1 Stunde fortgesetzt. Danach enthält der Träger 26,9 μMol p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen neben ca. 13 μMol -O-CO-ONB-Gruppen.

Bei nochmaliger Weiterführung der Umesterung wie zuvor beschrieben wird ein Träger mit 22,6 μMol p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen/ml erhalten. Der Anteil der -O-CO-ONB-Gruppen sinkt auf ca. 6 $\mu\text{Mol/ml}$. Für die Bestimmung der aktiven Gruppen werden ca. 100–200 μl sedimentierte aktivierte Cellulose entnommen und auf einer Glasfritte mit wasserfreiem Dioxan gewaschen und anschließend durch Behandlung mit Wasser-Dioxan-Gemischen steigenden Wassergehaltes in destilliertes Wasser überführt. Nach scharfem Absaugen des Wassers erfolgt die Bestimmung der Kopplungskapazität (Menge der aktiven unsymmetrischen Kohlensäurediester-Gruppen/ml sedimentierte bzw. /g trockene Cellulose) durch Hydrolyse mit 0,1 M NH_4OH und spektralphotometrische Bestimmung des abgespaltenen N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximids (HONB) bei 270 nm ($\epsilon = 6,4 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bzw. des abgespaltenen p-Nitrophenols bei 400 nm ($\epsilon = 1,7 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Liegen gemischt aktivierte Träger vor, die neben ONB- auch p-Nitrophenol-Gruppen enthalten, kann der Anteil der entsprechenden aktiven Gruppen an der Gesamtkopplungskapazität mit Hilfe einer HONB-p-Nitrophenol-Eichkurve und der Ermittlung des Verhältnisses der Extinktionen bei 400 und 260 nm bestimmt werden.

Beispiel 2

Zu 1 ml in wasserfreiem Dioxan sedimentierter Cl-CO-ONB-aktivierter Perlcellulose mit 46 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose wird eine Lösung von 40 mg p-Nitrophenol (290 μMol) und 100 μl Triethylamin (720 μMol) in 2 ml wasserfreiem Dioxan gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Gehalt an p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen beträgt danach 8,6 $\mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte bzw. 133 $\mu\text{Mol/g}$ trockene Cellulose, die gekoppelte p-Nitrophenolmenge 1,2 mg/ml Cellulose. Daneben enthält der Träger noch ca. 37 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose.

Beispiel 3

Zu 4 ml in wasserfreiem Tetrahydrofuran sedimentierter Cl-CO-ONB-aktivierter Perlcellulose mit 51 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose wird eine Lösung von 28 mg p-Nitrophenol (200 μMol), 28 μl Triethylamin (200 μMol) und 16 mg DMAP (130 μMol) in 8 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran hinzugefügt und das Gemisch 1 Stunde bei Raumtemperatur in einem verschlossenen Gefäß geschüttelt. Der Träger enthält dann 9,8 μMol p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen/ml sedimentierte bzw. 150 $\mu\text{Mol/g}$ trockene Cellulose. Der Gehalt an -O-CO-ONB-Gruppen beträgt 40 $\mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte Cellulose.

Beispiel 4

1 ml in wasserfreiem Aceton sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Perlcellulose mit 51 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose wird gemäß Beispiel 3 mit 8 mg p-Nitrophenol (57 μMol), 20 μl Triethylamin (145 μMol) und 3,3 mg N-Methylimidazol (40 μMol) in 2 ml wasserfreiem Aceton umgeestert.

Nach einstündiger Reaktionszeit enthält der Träger 9,5 μMol und nach 4 Stunden 11,9 μMol p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen/ml sedimentierte Cellulose.

Die gekoppelte p-Nitrophenolmenge beträgt nach 4 Stunden 1,7 mg/ml und die Menge an noch vorhandenen -O-CO-ONB-Gruppen 36 $\mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte Cellulose.

Beispiel 5

3 ml in wasserfreiem Dioxan sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Perlcellulose mit 52 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose werden analog Beispiel 3 mit 204 mg p-Nitrophenol (1,5 mMol), 12 μl Triethylamin (90 μMol) und 7,3 mg DMAP (60 μMol) umgeestert. Nach einer Reaktionszeit von 6 Stunden enthält der Träger 28 μMol p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen/ml sedimentierte bzw. 420 $\mu\text{Mol/g}$ trockene Cellulose. Der Anteil der -O-CO-ONB-Gruppen beträgt 20 $\mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte Cellulose. Der so erhaltene Träger wird in eine Chromatographie-Säule luftblasenfrei eingefüllt und im Durchflußverfahren mit einer Lösung von 600 mg p-Nitrophenol (4,3 mMol), 50 μl Triethylamin (360 μMol) und 22 mg DMAP (180 μMol) in 20 ml wasserfreiem Dioxan bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 2,5 ml/Stunde behandelt. Nach 8 Stunden wird mit 40 ml wasserfreiem Dioxan (10 ml/Stunde) gewaschen. Der so umgeesterte Träger enthält 16,4 μMol p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen/ml sedimentierte bzw. 252 $\mu\text{Mol/g}$ trockene Cellulose. Der Anteil der -O-CO-ONB-Gruppen beträgt ca. 0,3 $\mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte Cellulose.

Beispiel 6

1 ml in wasserfreiem Dioxan sedimentierte Perlcellulose mit 16,4 μMol p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen wird in einer Chromatographie-Säule mit einer Lösung von 60 mg HONB (335 μMol), 50 μl Triethylamin (360 μMol) und 2 mg DMAP (16,4 μMol) in 4 ml wasserfreiem Dioxan bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/Stunde behandelt. Danach enthält der Träger 12,8 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml sedimentierte bzw. 198 $\mu\text{Mol/g}$ trockene Cellulose. Das entspricht einem Umesterungsgrad von ca. 75% und einer gekoppelten HONB-Menge von 2,3 mg/ml sedimentierte Cellulose. Der Anteil an p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen beträgt 3,2 $\mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte Cellulose.

Der so erhaltene Träger wird in einen 10-ml-Schliffkolben überführt und mit einer Lösung von 12 mg HONB (67 μMol), 10 μl Triethylamin (62 μMol) und 1 mg DMAP (8,2 μMol) in 2 ml wasserfreiem Dioxan versetzt und 20 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach enthält der Träger 6,6 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml sedimentierte bzw. 102 $\mu\text{Mol/g}$ trockene Cellulose. Der Gehalt an p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen ist $< 0,05 \mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte Cellulose.

Beispiel 7

1 ml in wasserfreiem Acetonitril sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Perlcellulose mit 65 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose wird mit einer Lösung von 10,4 mg Natrium-p-nitrophenolat (65 μMol) und 2 mg DMAP (16,4 μMol) in 2 ml wasserfreiem

Acetonitril versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach enthält der Träger 27 μMol p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen/ml sedimentierte bzw. 420 $\mu\text{Mol/g}$ trockene Cellulose. Der Anteil der -O-CO-ONB-Gruppen beträgt 37 $\mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte Cellulose.

Beispiel 8

1 ml des nach Beispiel 7 erhaltenen Trägers wird in wasserfreies Dioxan überführt, mit einer Lösung von 18 mg HONB (100 μMol), 15 μl Triethylamin (110 μMol) und 2 mg DMAP (16,4 μMol) in 2 ml wasserfreiem Dioxan versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach enthält der Träger 57 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml sedimentierte bzw. 883 $\mu\text{Mol/g}$ trockene Cellulose. Der Anteil an p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen beträgt ca. 7 $\mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte Cellulose.

Beispiel 9

5 ml in wasserfreiem Aceton sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Perlcellulose mit 78,4 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose wird mit einer Lösung von 1 g p-Nitrophenol in 10 ml wasserfreiem Aceton in einem geschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur 30 Minuten geschüttelt. Dann wird dekantiert und die Cellulose mit einer Lösung von 2,8 g p-Nitrophenol (20 mMol), 2,7 ml Triethylamin (20 mMol) und 100 mg DMAP (ca. 0,8 mMol) in 50 ml trockenem Aceton 4 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach enthält der Träger 27,3 μMol p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen/ml sedimentierte bzw. 304 $\mu\text{Mol/g}$ trockene Cellulose. Der Anteil an -O-CO-ONB-Gruppen beträgt ca. 7 $\mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte Cellulose.

Beispiel 10

2 ml in wasserfreiem Aceton sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Perlcellulose mit 78,4 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose werden in einer Chromatographie-Säule mit einer Lösung von 1,09 g p-Nitrophenol (7,8 mMol), 1,1 ml Triethylamin (7,8 mMol) und 3,8 mg DMAP (0,03 mMol) in 50 ml wasserfreiem Aceton im Durchflußverfahren (Durchflußgeschwindigkeit: 12,5 ml/Stunde) behandelt.

Danach enthält der Träger noch 5,4 μMol -O-CO-ONB-Gruppen und 33,4 μMol p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen/ml Cellulose. Das entspricht einer gekoppelten p-Nitrophenolmenge von 4,6 mg/ml sedimentierte Cellulose.

Beispiel 11

3 ml in wasserfreiem Dioxan sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Perlcellulose mit 52 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose werden gemäß Beispiel 3 mit 420 mg Triphenylmethanol (1,6 mMol), 120 μl Triethylamin (0,9 mMol) und 6 mg DMAP (0,05 mMol) in 6 ml wasserfreiem Dioxan umgeestert.

Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden enthält der Träger noch 24,5 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml sedimentierte Cellulose. Im Anschluß an die Umesterung wird der Träger mit ca. 15 ml wasserfreiem Dioxan auf einer Glasfritte gewaschen und ins wäßrige Medium überführt. Durch Behandlung mit 6 ml 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,3 bei Raumtemperatur (3 Tage) können die restlichen -O-CO-ONB-Gruppen quantitativ abhydrolysiert werden. Die am Träger verbliebene Menge an Triphenylmethylcarbonat-Gruppen beträgt 6,5 $\mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte bzw. 100 $\mu\text{Mol/g}$ trockene Cellulose. Das entspricht einer gekoppelten Triphenylmethanolmenge von 1,6 mg/ml sedimentierte Cellulose.

Die Bestimmung der Carbonatgruppen nach Hydrolyse erfolgte durch Kopplung von Allylamin (im Überschuß eingesetzt) bei pH 10 in Natriumtetraborat-Puffer (ca. 20 Stunden bei Raumtemperatur) und anschließende Addition von Iodmonobromid an die Doppelbindung des gekoppelten Allylamins und Rücktitration des unumgesetzten IBr nach Zugabe von überschüssigem Kaliumjodid mit Thiosulfatlösung.

Beispiel 12

3 ml in wasserfreiem Dioxan sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Perlcellulose mit 52 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose werden analog Beispiel 3 mit 240 μl Isopropanol (3,2 mMol), 150 μl Pyridin (1,8 mMol) und 6 mg DMAP (0,05 mMol) umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden enthält der Träger noch 19,7 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml sedimentierte Cellulose. Die weitere Behandlung des Trägers und die Bestimmung der Carbonatgruppen nach Hydrolyse erfolgte wie in Beispiel 11 beschrieben.

Der Träger enthält 7,5 μMol Isopropylcarbonat-Gruppen/ml sedimentierte bzw. 120 $\mu\text{Mol/g}$ trockene Cellulose. Das entspricht einer gekoppelten Isopropanolmenge von ca. 0,5 mg/ml sedimentierte Cellulose.

Beispiel 13

3 ml in wasserfreiem Aceton sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Perlcellulose mit 78,4 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose werden in 5 ml wasserfreies Isopropanol überführt. Dazu werden 20 mg DMAP (164 μMol) gegeben und das Gemisch 4 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach enthält der Träger noch 22,3 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml sedimentierte Cellulose. Durch Nachbehandlung mit 3 N Natriumchlorid-Lösung, pH 5,6 bei Raumtemperatur (4 Tage) und anschließende Allylaminkopplung gemäß Beispiel 10 wurden 17,5 μMol Isopropylcarbonat-Gruppen/ml sedimentierte bzw. 194 $\mu\text{Mol/g}$ trockene Cellulose bestimmt. Das entspricht einer gekoppelten Isopropanolmenge von 1,0 mg/ml sedimentierte Cellulose. Der Gehalt an -O-CO-ONB-Gruppen ist < 0,8 $\mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte Cellulose.

Beispiel 14

Die Umesterung wird analog Beispiel 13 unter Einsatz von 2 mg DMAP durchgeführt. Nach 24stündiger Reaktionszeit enthält der Träger noch 52,3 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml sedimentierte Cellulose. Nach Hydrolyse bei pH 5,6 (10 Tage bei Raumtemperatur) beträgt die Menge an -O-CO-ONB-Gruppen < 0,1 $\mu\text{Mol/ml}$ und die der Isopropylcarbonat-Gruppen 12,5 $\mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte Cellulose.

Beispiel 15

5 ml in wasserfreiem Aceton sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Perlcellulose mit 78,4 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose werden im Durchflußverfahren mit einer Lösung von 10 Vol.-% Isopropanol in trockenem Aceton gewaschen und anschließend mit einer Lösung von 2 ml Isopropanol (26 mMol), 2 ml Triethylamin (14,5 mMol) und 100 mg DMAP (0,8 mMol) in 50 ml wasserfreiem Aceton innerhalb von 4 Stunden behandelt.

Der Träger enthält danach noch 1,7 μMol -O-CO-ONB-Gruppen und 25,2 μMol Isopropylcarbonat-Gruppen/ml Cellulose. Durch Nachbehandlung des Trägers mit 3N Natriumchloridlösung (pH 5,6) können die restlichen -O-CO-ONB-Gruppen entfernt werden. Die Menge an Isopropylcarbonat-Gruppen beträgt dann 21,1 μMol /ml Cellulose.

Das entspricht einer gekoppelten Isopropanolmenge von 1,3 mg/ml. Mit Hilfe der IR-Spektroskopie (KBr-Preßling) wird die Isopropylcarbonat-Gruppe durch ihre C=O-Valenzschwingung bei 1730 cm^{-1} nachgewiesen.

1 ml der Isopropylcarbonat-Cellulose wird mit einer Lösung von 10 mg Concanavalin A in 1 ml Natriumtetraborat-Puffer pH 9,3 16 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln behandelt. Die Bestimmung der gekoppelten Proteinmenge ergibt 3,5 mg Concanavalin A.

Beispiel 16

1 ml in wasserfreiem Dioxan sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Pericellulose mit 52 μMol -O-CO-ONB-Gruppen wird in einer Chromatographie-Säule mit einer Lösung von 400 μl Isopropanol (5,3 mMol), 400 μl Triethylamin (2,9 mMol) und 20 mg DMAP (0,164 mMol) in 20 ml wasserfreiem Dioxan bei Raumtemperatur mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 2,5 ml/Stunde behandelt.

Danach enthält der Träger noch 7,9 μMol -O-CO-ONB-Gruppen. Der so umgeesterte Träger wird stufenweise in destilliertes Wasser überführt, abgesaugt und 8 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit 5 ml einer 0,1 M Natriumtetraborat-Lösung (pH 8,3) behandelt.

Der Träger enthält dann keine nachweisbaren Mengen an -O-CO-ONB-Gruppen mehr. Die Bestimmung der Isopropylcarbonat-Gruppen am Träger wird, wie unter Beispiel 11 beschrieben, durch Kopplung von Allylamin durchgeführt. Die Menge an Isopropylcarbonat-Gruppen beträgt 11 μMol /ml sedimentierte bzw. 165 μMol /g trockene Cellulose. Das entspricht einer gekoppelten Isopropanolmenge von ca. 0,7 mg/ml Cellulose.

Beispiel 17

3 ml in wasserfreiem Dioxan sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Pericellulose mit 78,4 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose werden im Durchflußverfahren mit einer Lösung von 1,1 g Phenol (11,8 mMol), 1,65 ml Triethylamin (11,8 mMol) und 5,7 mg DMAP (0,047 mMol) in 50 ml wasserfreiem Dioxan umgeestert (Durchflußgeschwindigkeit: 12,5 ml/Stunde). Der Träger enthält dann noch 3,8 μMol -O-CO-ONB-Gruppen und 47,3 μMol Phenylcarbonat-Gruppen/ml Cellulose. Das entspricht einer gekoppelten Phenolmenge von 4,4 mg Phenol/ml Cellulose. Nach Abspaltung der restlichen -O-CO-ONB-Gruppen durch eine Hydrolyse in 3N Natriumchlorid-Lösung pH 5,6 (4 Tage, Raumtemperatur) werden 42,8 μMol Phenylcarbonat-Gruppen/ml Cellulose nachgewiesen (Bestimmung durch Kopplung von Allylamin gemäß Beispiel 11).

Im IR-Spektrum kann die Phenylcarbonat-Gruppe durch ihre C=O-Valenzschwingung bei 1760 cm^{-1} nachgewiesen werden.

Beispiel 18

5 ml in wasserfreiem Aceton sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Pericellulose mit 78,4 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose werden im Durchflußverfahren mit einer Lösung von 1,2 ml Ethanol (20 mMol), 2,8 ml Triethylamin (20 mMol) und 9,6 mg DMAP (0,08 mMol) in 50 ml wasserfreiem Aceton behandelt (Durchflußgeschwindigkeit: 12,5 ml/Stunde). Der umgeesterte Träger enthält 1,8 μMol -O-CO-ONB-Gruppen und 30,9 μMol Ethylcarbonat-Gruppen/ml Cellulose. Das entspricht einer gekoppelten Ethanolmenge von 1,4 mg/ml Cellulose. 3 ml des umgeesterten Trägers werden mit einer Lösung von 400 mg Glycin in 3 ml Natriumbicarbonat-Puffer, pH 11, 16 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln umgesetzt. Die gekoppelte Glycinmenge (Bestimmung durch Titration der am Träger vorhandenen Carboxylgruppen) beträgt 6,9 mg bzw. 90 μMol .

Beispiel 19

3 ml in wasserfreiem Aceton sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Sepharose CL-4B mit 52,4 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Sepharose werden mit einer Lösung von 1,1 g p-Nitrophenol (7,9 mMol), 1,1 ml Triethylamin (7,9 mMol) und 1,9 mg DMAP (0,016 mMol) in 5 ml wasserfreiem Aceton gemäß Beispiel 3 umgesetzt. Nach 30minütiger Reaktionszeit enthält der Träger 5,1 μMol p-Nitrophenylcarbonat- und noch 17,4 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml sedimentierte Sepharose.

Beispiel 20

5 ml in wasserfreiem Aceton sedimentiertes Cl-CO-ONB-aktiviertes Fractogel TSK HW 75 (990 μMol /g trockenes Gel) werden mit einer Lösung von 3,5 g p-Nitrophenol (25 mMol), 3,5 ml Triethylamin (25 mMol) und 12,2 mg DMAP (0,1 mMol) in 12 ml trockenem Aceton analog Beispiel 3 umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten enthält der Träger 64,3 μMol p-Nitrophenylcarbonat-Gruppen, nach 2 Stunden 99,3 μMol /g trockenes Fractogel. Die Menge der noch vorhandenen -O-CO-ONB-Gruppen beträgt 150 bzw. 61,5 μMol /g trockenes Gel.

Beispiel 21

1 g in wasserfreiem Aceton sedimentierter Cl-CO-ONB-aktivierter Polyvinylalkohol (21,3 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/g) wird mit einer Lösung von 156 mg p-Nitrophenol (1,12 mMol), 155 μl Triethylamin (1,12 mMol) und 0,5 mg Diazabicyclo [2,2,2] octan (0,005 mMol) in 3 ml trockenem Aceton gemäß Beispiel 3 behandelt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten enthält das Polymere 2,1 μMol p-Nitrophenylcarbonat- und 4,5 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/g.

Beispiel 22

5 ml in wasserfreiem Aceton sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Pericellulose mit 78,4 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose werden gemäß Beispiel 18 mit 2,8 g p-Nitrophenol (20 mMol), 2,8 ml Triethylamin (20 mMol) und 16,5 mg N-Methylimidazol (0,2 mMol) in 50 ml wasserfreiem Aceton umgesetzt. Danach enthält der Träger 28,8 μMol p-Nitrophenylcarbonat- und 3,9 μMol -O-CO-ONB-Gruppen/ml sedimentierte Cellulose.

Beispiel 23

2 ml in wasserfreiem Aceton sedimentierte Cl-CO-ONB-aktivierte Perlcellulose mit $78,4 \mu\text{Mol}$ -O-CO-ONB-Gruppen/ml Cellulose werden analog Beispiel 3 mit einer Lösung von 0,9 g N-Hydroxysuccinimid ($7,8 \text{ mMol}$), 1,08 ml Triethylamin ($7,8 \text{ mMol}$) und 6,4 mg N-Methylimidazol ($0,078 \text{ mMol}$) behandelt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten beträgt die Menge an -O-CO-ONB-Gruppen $11,9 \mu\text{Mol}$ und die der N-Succinimidylcarbonat-Gruppen $17,1 \mu\text{Mol/ml}$ sedimentierte Cellulose. Die Bestimmung der aktiven Carbonatgruppen erfolgte spektralphotometrisch mit Hilfe einer HONB-N-Hydroxysuccinimid-Eichkurve und der Ermittlung des Verhältnisses der Extinktionen bei 270 nm (HONB) und 261 nm (N-Hydroxysuccinimid, $\epsilon = 8,0 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).
