

УДК 678.555

П. ТООМИК, Рийна МАХЛАПУУ, Т. ПЮССА, А. КОЛЛИСТ

## ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ АГАРОНОСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

### 8. ПРОБЛЕМЫ СИНТЕЗА ИОНИТОВ НА ОСНОВЕ ГЕЛЯ АГАРОЗЫ

P. TOOMIK, Riina MAHLAPUU, T. PUSSA, A. KOLLIST. AGARIVETIKATEST ERALDATUD POLY-SAHHARIIDIDE UURIMINE JA KASUTAMINE. 8. AGAROOSI GEELIL BASEERUVATE IONIITIDE SONTES

P. TOOMIK, Riina MAHLAPUU, T. PUSSA, A. KOLLIST. CHARACTERIZATION AND UTILIZATION OF POLYSACCHARIDES ISOLATED FROM AGAR-CONTAINING ALGAE. 8. SYNTHESIS OF AGAROSE-BASED ION EXCHANGERS

(Представил Ю. Лилле)

Диэтиламиноэтил (ДЭАЭ)- и карбоксиметил (КМ)-агарозы широко используются для очистки белков, однако методы получения этих сорбентов освещены в литературе недостаточно. В [1, 2] почти без изменений копируются методы, применяемые для синтеза соответствующих производных целлюлозы [3]. Эти методы заключаются в обработке целлюлозы 2-хлорэтилдиетиламиноом или монохлоруксусной кислотой в сильнощелочной среде (5 М NaOH) при повышенных температурах. Безуспешно кончились попытки лабораторного синтеза ДЭАЭ-агарозы [4] по методике, принятой для Сферона [5] и мало отличающейся от методики синтеза ДЭАЭ-целлюлозы [3]. Однако известно, что в случае целлюлозы высокая концентрация щелочи необходима для набухания матрицы. В случае же агарозы, концентрация которой в реакционной смеси низкая, данная функция щелочи не нужна.

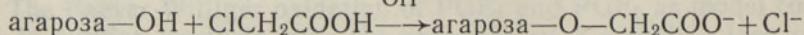
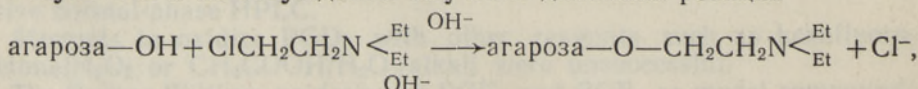
Цель настоящей работы — выявить оптимальные условия получения ДЭАЭ- и КМ-агароз для ионообменной хроматографии.

**Экспериментальная часть.** Все опыты проводили на шитом эпихлоргидрином 4%-ном геле агарозы из отечественных водорослей *Ahnfeltia tobuchiensis* (производство колхоза им. М. Хярма); гидрохлорид 2-хлорэтилдиетиламина синтезировали сами из 2-диэтиламиноэтанола и тионилхлорида по методике [6].

Суспензию агарозы (~6 г) смешивали при 0°С с различными количествами NaOH, прибавляли раствор 2-хлорэтилдиетиламина или раствор хлоруксусной кислоты и смесь нагревали до 60—100°С со скоростью примерно 4°С/мин. После реакции гель агарозы промывали на стеклянном фильтре большим количеством дистиллированной воды.

Для определения обменной емкости ДЭАЭ-агарозу переводили в форму свободного основания раствором 1 М NaOH, промывали водой до нейтральной реакции и титровали 0,01 М HCl по метилоранжу в присутствии 0,5 М KCl; КМ-агарозу переводили в H<sup>+</sup>-форму 10—15%-ной уксусной кислотой, промывали водой до нейтральной реакции и титровали 0,01 М NaOH по фенолфталейну тоже в присутствии 0,5 М KCl.

**Результаты и их обсуждение.** Изучение динамики реакций



показало, что при синтезе ДЭАЭ-агарозы оптимальная конечная тем-



пература составляет  $85^{\circ}\text{C}$ , а при синтезе КМ-агарозы —  $70^{\circ}\text{C}$ , хотя в случае последней дополнительно требуется 10–20 мин нагревания. Попытки исследовать кинетические закономерности реакций оказались безуспешными, так как ни скорость возникновения  $\text{Cl}^-$ -ионов, ни расход щелочи не поддавались измерению. Оказалось, что рН-электроды и хлоридселективные электроды не работоспособны в присутствии как 2-хлорэтилдиэтиламина в случае синтеза ДЭАЭ-агарозы, так и применяемых концентраций щелочи (см. ниже) в случае синтеза КМ-агарозы. Поскольку возможность проведения этих реакций при постоянной концентрации щелочи отпадала, исследовали зависимость выхода продуктов по галогенпроизводным от концентрации щелочи в конце реакций (рис. 1 и 2, обратите внимание на обозначение осей!), а также варьировали количество соответствующих галогенпроизводных при оптимальной конечной концентрации щелочи (рис. 3 и 4).

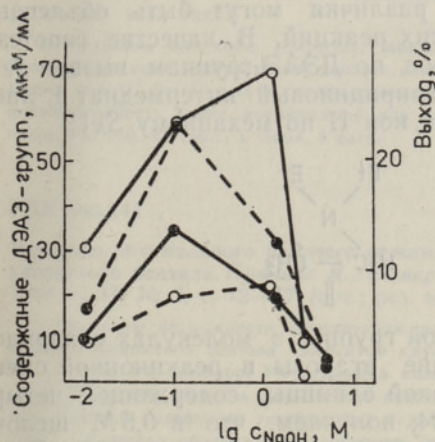


Рис. 1. Зависимость выхода продукта (пунктир) и содержания в нем ионных групп (сплошная линия) от конечной концентрации щелочи в реакционной среде при синтезе ДЭАЭ-агарозы. Количество 2-хлорэтилдиэтиламина 145 (●) и 775 (○) мкМ/мл геля.

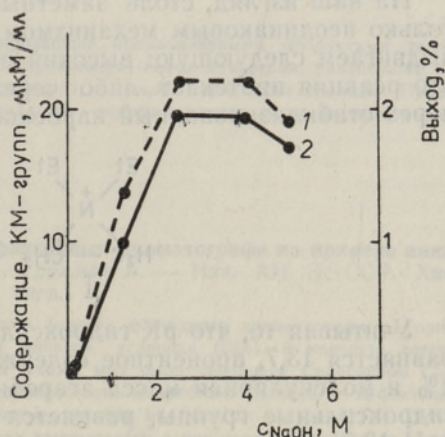


Рис. 2. Зависимость выхода продукта (1) и содержания в нем ионных групп (2) от конечной концентрации щелочи в реакционной среде при синтезе КМ-агарозы. Количество  $\text{ClCH}_2\text{COOH}$  885 мкМ/мл геля.

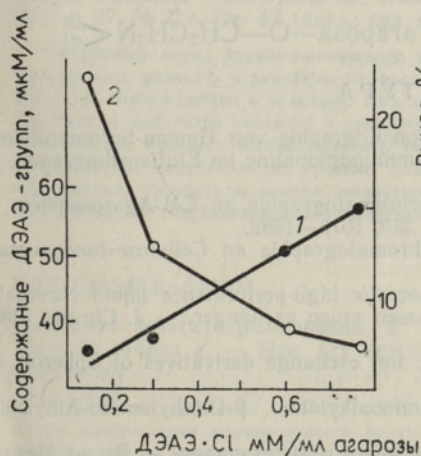


Рис. 3. Зависимость концентрации ДЭАЭ-групп в продукте (1) и выхода продукта (2) от количества 2-хлорэтилдиэтиламина в реакционной смеси при конечной концентрации щелочи 0,1 М.

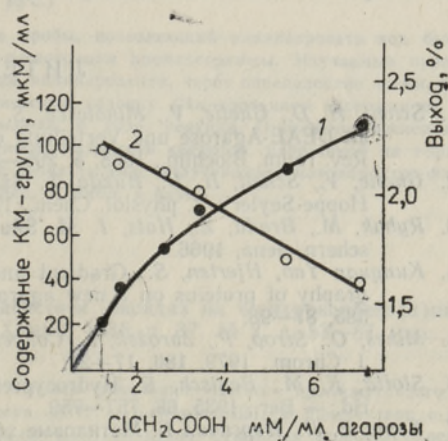


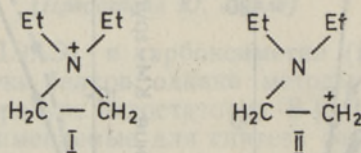
Рис. 4. Зависимость концентрации КМ-групп в продукте (1) и выхода продукта (2) от количества  $\text{ClCH}_2\text{COOH}$  в реакционной смеси при конечной концентрации щелочи 3,3 М.



Результаты показали, что оптимальная концентрация щелочи при синтезе КМ-агарозы (рис. 2) близка к концентрации щелочи по методике синтеза КМ-целлюлозы [2], но выход продукта очень низкий (2—3%). В то же время известно, что реакция алкилирования углеводов с незамещенными алкилгалогенидами проводится при высоких концентрациях щелочи (30% NaOH) [7]. На уменьшение выхода продукта при синтезе КМ-агарозы могут дополнительно влиять электростатические силы отталкивания ионизированных гидроксильных групп агарозы от отрицательно заряженных карбоксилатных ионов. Очевидно, что методы синтеза этого ионита еще не совершенны и нуждаются в дальнейших исследованиях.

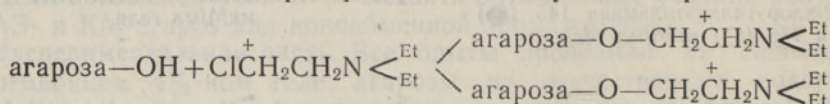
В случае ДЭАЭ-агарозы оптимальная концентрация щелочи примерно на порядок ниже, а выход продукта более или менее удовлетворительный.

На наш взгляд, столь заметные различия могут быть объяснены только неодинаковым механизмом этих реакций. В качестве гипотезы выдвигаем следующую: высокий выход по ДЭАЭ-группам вызван тем, что реакция протекает либо через азиридиновый интермедиат I, либо через стабилизированный карбеновый ион II по механизму  $S_N1$ :



Учитывая то, что рК гидроксильной группы в молекулах сахаридов равняется 13,7, процентное содержание агарозы в реакционной смеси 2% и молекулярная масса агаробиозной единицы, содержащей четыре гидроксильные группы, равняется 324, получаем, что в 0,5 М щелочи (рН 13,7) реакция должна протекать с выходом примерно 20%. Это и наблюдается при низких степенях замещения.

Вариант I можно проверить введением спиновой метки в один из углеродных атомов 2-хлорэтильной цепи — в случае подтверждения гипотезы метка должна распределиться следующим образом:



## ЛИТЕРАТУРА

1. Schell, H. D., Ghetie, V., Mihăiescu, S. Chromatographie von Human-Serumproteinen an DEAE-Agarose und Verteilung der Immunglobuline im Elutionsdiagramm. — Rev. roum. Biochim., 1968, 5, 295—305.
2. Ghetie, V., Schell, H. D., Buzila, L. Säulenchromatographie an CM-Agarosegelen. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1969, 350, 1675—1682.
3. Rybak, M., Brada, Z., Hais, I. M. Säulenchromatographie an Cellulose-Ionenaustauschern. Jena, 1966.
4. Kunquan Yao, Hjerten, S. Gradient and isocratic high-performance liquid chromatography of proteins on a new agarose-based anion exchanger. — J. Chrom., 1987, 385, 87—98.
5. Mikeš, O., Strop, P., Zbrožek, J., Coupek, J. Ion exchange derivatives of Spheron. — J. Chrom., 1979, 180, 17—21.
6. Slotta, K. M., Benisch, R. Hydrocyprein-Aminoalkyläther.  $\beta$ -Diäthylamino-Äthylchlorid. — Ber., 1935, 68, 757—759.
7. Херст Е. Л., Персивал Е. Метилловые эфиры моно- и дисахаридов. — В кн.: Методы химии углеводов. Под ред. Н. К. Кочеткова. М., 1967, 85—89.

Тартуский государственный университет

Поступила в редакцию  
14/I 1988

Институт химии  
Академии наук Эстонской ССР