



УКРАЇНА

(19) UA (11) 10481 (13) C1
(51) C 12 N 11/00, 11/02ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ІММОБІЛІЗАЦІЇ НА ВУГЛЕЦЕВІСНИЙ НОСІЙ АМІНОВІСНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК

1

2

(21) 93101013

(22) 16.04 93

(24) 12.11.99

(31) 5033447

(32) 20 03.92

(33) RU

(46) 12.11.99. Бюл. № 7

(56) Патент GB № 1193918,
кл. C 12 N 11/08, 1969.(72) Коваль Нінель Михайлівна, Бакалінська
Ольга Миколаївна, Картель Микола Тимо-
фійович, Стрелко Володимир Васильович
(73) Інститут сорбції та проблем
ендоекології Національної академії наук
України(57) 1. Способ иммобилизации на угле-
родсодержащий носитель аминсодержа-
щих биологически активных веществ
(БАВ), включающий последовательную об-

работку носителя хлористым тионилем и
раствором аминсодержащего БАВ, от-
личающийся тем, что в качестве
углеродсодержащего носителя используют
окисленный углеродный материал, а по-
лученный после обработки хлористым тио-
нилом продукт обрабатывают раствором
аминсодержащего БАВ при
мольном соотношении количества карбо-
кислых групп углеродного материала,
хлористого тионила и амина или аминсо-
держащего БАВ 1:(1,5-2,5):(1-2) соот-
ветственно, при этом pH реакционной сре-
ды 7,5-8,5 поддерживают с помощью бло-
ка автоматического титрования.

2. Способ по п. 1, отличающийся
тем, что обработку хлористым тио-
нилом осуществляют в течение 3-5 ч при
температуре 60-80°C.

Изобретение относится к биотехнологи-
и, в частности к способам получения
иммобилизованных углеродных носителей,
которые могут быть использованы в хими-
ко-фармацевтической промышленности и
к способам получения иммобилизованных
биологически активных соединений, ис-
пользуемых в медицине, аффинной хро-
матографии

Наиболее близким по достигаемому
результату и техническому решению к
заявляемому является способ получения
углеродного носителя для иммобилизации
БАВ. Способ заключается в том, что окис-
ленный углеродный носитель последова-

тельно обрабатывают: парами хлористого
тионила, горячим раствором азидна
натрия, раствором БАВ. Процесс многоста-
дийный и вследствие этого - низкий выход
иммобилизованного БАВ. Кроме того, про-
ведение газофазных реакций всегда бо-
лее трудоемкий и аппаратно сложный
процесс, чем обработка твердого носите-
ля в жидкой фазе при том же выходе
конечного продукта

Задачей, на решение которой направ-
лено изобретение, является разработка
эффективного способа иммобилизации на
углеродный носитель аминов или аминсо-
держащих биологически активных веществ

(19) UA (11) 10481 (13) C1

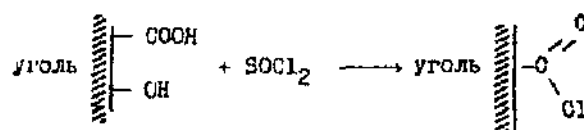
Заявляемый способ, включающий последовательную жидкофазную обработку окисленного углеродного материала хлористым тионилем и амином или аминсодержащим БАВ, позволяет получить требуемый технический результат, заключающийся в повышении эффективности способа за счет увеличения количества иммобилизованного БАВ при одновременном его упрощении.

Сущность этого способа заключается в следующем. В качестве исходного углеродного материала для получения носителя используют окисленные углеродные носители (типа СКН_0 , СКС_0 , КАУ_0 и др.). К окисленным углеродным адсорбентам прибавляют хлористый тионил с бензолом в качестве разбавителя реакционной массы. Мольное соотношение количества карбоксильных групп на угле и хлористого тионила 1:(1,5–2,5). Смесь нагревают до 60–80°C в течение 3–5 ч до прекращения выделения двуокиси серы и хлористого водорода. По окончании реакции сорбент отфильтровывают и промывают бензолом до полного удаления остатков непрореагировавшего хлористого тионила. Далее, к раствору амина или аминсодержащего БАВ (pH 7,5–8,5) при постоянном контроле и поддержании pH среды при помощи блока автоматического титрования, порционно, при постоянном перемешивании прибавляют активированный хлористым тионилем углеродный носитель при мольном соотношении количества карбоксильных групп к амину или аминсодержащему БАВ 1:(1–2).

Существенными отличительными признаками заявляемого изобретения от прототипа являются: обработка углеродного носителя хлористым тионилем в абсолютном бензоле и взаимодействие активированного хлористым тионилем углеродного носителя с раствором амина или аминсодержащего БАВ при pH среды 7,5–8,5. Эти признаки достаточны во всех случаях для достижения требуемого технического результата. Отличием способа является также то, что обработку раствором хлористого тионила осуществляют в течение 3–5 ч при температуре 60–80°C и мольном соотношении карбоксильных окисленного углеродного носителя и хлористого тионила 1:(1,5–2,5), а также то, что обработку амином или аминсодержащим БАВ проводят при мольном соотношении количества карбоксильных групп угля к количеству амина или аминсодержащего БАВ 1:(1–2).

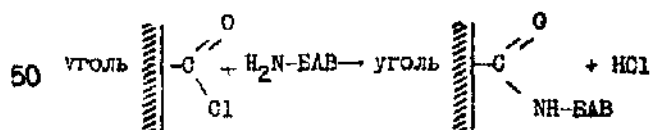
Необходимость и оптимальность вышеприведенных конкретных условий получения иммобилизованного углеродного носителя обусловлена следующими факторами.

Необходимость проведения реакции взаимодействия карбоксильных групп углеродного сорбента с хлористым тионилем в абсолютном бензоле обусловлена тем, что проведение этой реакции в газовой фазе более трудоемко и аппаратно сложно при том же выходе конечного продукта. Проводя реакцию в абсолютном бензоле, нам необходимо меньшее, чем в случае обработки в газовой фазе, количество хлористого тионила. Кроме того, удаление непрореагировавшего хлористого тионила с угля раствором бензола более эффективно, чем удаление продувкой сухим воздухом. При обработке окисленного носителя раствором хлористого тионила в бензоле происходит превращение карбоксильных групп



в хлорангидридные (хлорацильные) с высоким выходом (до 85%) последних.

В дальнейшем, при получении иммобилизованных БАВ на углеродном носителе поверхностные хлорацильные группы на углеродном носителе реагируют при pH 7,5–8,5 с аминогруппами БАВ (амины, диамины, аминокислоты, белки), образуя прочные пептидные связи. Поддержание pH реакции на величине 7,5–8,5 необходимо вследствие того, что при этом равновесие реакции смещено в сторону образования пептидной связи, в отличие от реакции при pH среды больше или меньше заявляемого интервала.



Для проведения реакции не требуются дополнительные реагенты, кроме как для поддержания постоянного pH среды (раствор щелочи). После получения хлорацильных групп на поверхности угля реакция иммобилизации БАВ одностадийна, следовательно, проходит с большим вы-

ходом, чем многостадийный процесс иммобилизации (по прототипу).

При обработке окисленного углеродного носителя раствором хлористого тионила менее 3 ч, при мольном соотношении количества хлористого тионила к количеству карбоксильных групп на носителе менее 1,5 и температуре ниже 60°C превращение карбоксильных групп в хлорацильные происходит медленно и с низким выходом.

Обработка углеродного носителя раствором хлористого тионила в течение более 5 ч при мольном соотношении количества хлористого тионила к количеству карбоксильных групп на носителе более 2,5 и температуре выше 80°C не приводит к увеличению выхода хлорангидридных групп на угле по сравнению с оптимальным, составляющим 75–85%, и сопряжена с затратами времени и реактивов, не приводящими к улучшению свойств целевого материала.

Обработка хлорангидридсодержащего угля при мольном соотношении количества амина или аминсодержащего БАВ к карбоксильным группам носителя менее 1,0 не обеспечивает высокого выхода иммобилизации вследствие недостаточности количества иммобилизуемого амина или аминсодержащего БАВ.

Обработка хлорангидридсодержащего углеродного носителя при мольном соотношении амина или аминсодержащего БАВ к количеству карбоксильных групп носителя более 2,0 не дает увеличения выхода иммобилизованных БАВ по сравнению с оптимальными условиями, составляя 40–50% от количества хлорацильных групп на угле, и сопряжена с затратами реактивов, не приводящими к улучшению свойств целевого материала.

Эффективность способа иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Навеску 6 г окисленного углеродного сорбента с СОЕ 2,0 мэкв/г помещают в круглодонный реактор с обратным холодильником. Прибавляют 30 мл бензола. В реактор, помещенный на водяную баню, находящуюся на электрической плитке, прибавляют 1,74 мл хлористого тионила (мольное соотношение количества карбоксильных групп угля и хлористого тионила 1:2). После перемешивания греют 4 ч при температуре 70°C. После этого углеродный материал отфильтровывают и промывают бензолом для удаления остатков непрореагировавшего хлористого тионила. Промытый активированный хлористым тионилем уголь переносят в бюкс. Концентрацию хлорациль-

ных групп на угле определяют титрованием и аргентометрией. Навеску 0,4 г полученного угля с содержанием хлорацильных групп 1,7 мэкв/г углеродного носителя постепенно вносят в раствор с содержанием амина или аминсодержащего БАВ 1,2 ммоль (соотношение -COOH групп угля к амину или аминсодержащему БАВ 1:1,5). pH среды постоянно контролируют в процессе добавления активированного носителя и поддерживают при помощи блока автоматического титрования. После добавления последней порции угля к раствору pH контролируют еще в течение 2–3 ч. Процесс иммобилизации ведут в течение 20–24 ч. Количество иммобилизованного амина определяли титрованием аминогрупп на угле, количество иммобилизованного белка определяли по разности содержания белка в растворе до и после иммобилизации. Варьируя pH реакционной среды иммобилизации, получают образцы целевых сорбентов, приведенных в табл. 1.

Таким образом, из приведенных в табл. 1 данных видно, что предлагаемый способ иммобилизации аминов (этилендиамин, фенилаланин) и аминсодержащих БАВ (бычий сывороточный альбумин, БСА) эффективен только в предлагаемом интервале pH иммобилизации 7,5–8,5. При выходе pH за указанные пределы эффективность способа существенно снижается и требуемого технического решения не удается достичь.

Пример 2. Навеску окисленного углеродного сорбента с СОЕ 2,0 мэкв/г обрабатывают как приведено в примере 1, т.е. помещают в круглодонный реактор с обратным холодильником. Заливают бензолом. В реактор, помещенный на водяную баню, находящуюся на электрической плитке, прибавляют хлористый тионил. После перемешивания греют необходимое время при нужной температуре. После этого углеродный материал отфильтровывают и промывают бензолом до удаления остатков непрореагировавшего хлористого тионила. Промытый активированный хлористым тионилем уголь переносят в бюкс. Навеску полученного сорбента постепенно переносят в раствор амина или аминсодержащего БАВ. pH среды постоянно контролируют и поддерживают его величину равную 8,0 при помощи блока автоматического титрования. Режимы обработки (мольное соотношение количества карбоксильных групп угля к хлористому тионилу, время и темпера-

туру обработки хлористым тионилем, мольное соотношение количества карбоксильных групп к количеству амина или аминсодержащего БАВ) изменяют, как описано в табл. 2. В ней же приведены данные по результатам иммобилизации амина или аминсодержащего БАВ на полученных образцах целевого сорбента.

Как видно из табл. 2, обработка угля хлористым тионилем в заявляемых интервалах: мольного соотношения карбоксиллов к хлористому тионилу 1:(1,5–2,5), времени обработки 3–5 ч, температуре обработки 60–80°C приводит к достижению обеспечиваемого изобретением технического результата (повышение эффективности иммобилизации): этилендиамина (образцы № 4–12) по сравнению с прототипом (образец № 35), фенилаланина (образцы № 21, 24) по сравнению с прототипом (образец № 36), БСА (образцы № 31, 33) по сравнению с прототипом (образец № 37). Уменьшение мольного соотношения количества хлористого тионила к карбоксильным группам носителя до 1:1 (меньше заявляемого интервала) приводит к значительному снижению количества иммобилизованного амина (образцы № 13–15) даже при том, что остальные параметры обработки находятся в заявляемых интервалах.

Увеличение мольного соотношения количества хлористого тионила к карбоксильным группам носителя до 1:3 (больше заявляемого интервала) не приводит к улучшению уже достигнутого результата даже при том, что остальные параметры обработки угля находятся в заявляемых интервалах (образцы № 16–18).

Обработка носителя хлористым тионилем в течение времени меньшего, чем заявляемый интервал (2 ч) при том, что остальные параметры обработки находятся в заявляемом интервале, не приводит к достижению требуемого результата (образцы № 30, 32). Увеличение времени обработки больше заявляемого интервала (6 ч) не приводит к улучшению достигнутого (образцы № 22, 25).

При уменьшении температуры обработки носителя хлористым тионилем меньше, чем заявляемый интервал (50°C, при

том, что остальные параметры обработки находятся в заявляемых интервалах, не достигается требуемая эффективность иммобилизации (образцы № 23, 29). Увеличение температуры обработки выше заявляемого интервала (90°C) не приводит к улучшению уже достигнутого результата (образцы № 26, 34).

При выходе соотношения карбоксиллов угля к амину или аминсодержащему БАВ за пределы заявляемого интервала не удается достичь обеспечиваемого изобретением технического результата (образцы № 1–3, 19, 20, 27, 28).

Таким образом, проведение иммобилизации аминов или аминсодержащих БАВ на углеродном носителе при обработке угля хлористым тионилем в абсолютном бензоле с мольным соотношением карбоксильных групп носителя к хлористому тионилу 1:(1,5–2,5) в течение 3–5 ч при 60–80°C с последующей обработкой раствором амина или аминсодержащего БАВ при pH реакционной среды 7,5–8,5 и мольном соотношении карбоксиллов угля к амину или аминсодержащему БАВ 1:(1–2) позволяет достичь обеспечиваемого изобретением технического результата – повышения эффективности способа за счет увеличения количества иммобилизованного амина или аминсодержащего БАВ при одновременном его упрощении. Действительно, согласно заявляемому способу удается иммобилизовать в 3,7 раза больше этилендиамина, в 2,9 раза больше фенилаланина и в 1,7 раза больше БСА по сравнению с прототипом. Этого удается достичь при одновременном упрощении способа: обработке углеродного носителя хлористым тионилем в абсолютном бензоле, т.е. в жидкой среде, а не в газовой фазе, минуя стадии обработки активированного хлористым тионилем угля раствором азиды натрия и термической перегруппировки в изоцианатные группы.

Перечисленные выше достоинства способа иммобилизации позволяют получить высокоэффективные биоспецифические углеродные носители для нужд биотехнологии, аффинной хроматографии и медицины с большей эффективностью и меньшими затратами реактивов и ресурсов.

Т а б л и ц а 1

№ образца	pH среды	Этилендиамин, мг/г	Фениланин, мг/г	БСА, мг/г
1	7,0	6,0	11,1	40
2	7,5	30,6	55,1	70
3	8,0	40,8	75,9	75
4	8,5	32,4	59,4	65
5	9,0	7,2	13,2	45

Т а б л и ц а 2

№ образца	Мольное соотношение - COOH: - Cl	Вре- мя, ч	Темпе- ратура, °C	Иммоби- лизован- ное вещество	Мольное соотношение - COOH: - NH ₂	Кол-во иммобили- зованного вещества, мг/г
1	1:2,0	3	80	Этилендиамин	0,8:2,5	28,6
2	"	4	"	"	"	29,1
3	"	5	"	"	"	29,5
4	1:1,5	3	"	"	1:1,0	31,6
5	"	4	"	"	"	33,7
6	"	5	"	"	"	35,7
7	1:2,0	3	"	"	"	35,7
8	"	4	"	"	"	37,7
9	"	5	"	"	"	39,8
10	1:2,5	3	"	"	"	39,8
11	"	4	"	"	"	41,8
12	"	5	"	"	"	43,9
13	1:1,0	3	"	"	"	19,4
14	"	4	"	"	"	20,4
15	"	5	"	"	"	24,4
16	1:3,0	3	"	"	"	39,8
17	"	4	"	"	"	40,8
18	"	5	"	"	"	38,8
19	1:1,6	4	60	Фенилаланин	0,8:2,5	57,2
20	"	6	"	"	"	58,4
21	"	4	"	"	1:2	62,7
22	"	6	"	"	"	66,0
23	1:2,0	5	50	"	"	30,2
24	1:2,5	4	60	"	"	69,3
25	"	6	"	"	"	72,6
26	1:2,0	3	90	"	"	65,2
27	1:2,5	5	50	БСА	0,8:2,5	43
28	"	"	70	"	"	45
29	"	"	50	"	1:1,5	42
30	1:1,5	2	70	"	"	40
31	"	4	70	"	"	65
32	1:2,5	2	70	"	"	50
33	"	4	70	"	"	75
34	"	3	90	"	"	70
35	1:10	1,5	100	Этилендиамин	"	12,0
(прототип) 36	1:10	"	100	Фенилаланин	"	24,8
(прототип) 37	1:10	"	100	БСА	"	45

Упорядник

Техред М. Келемеш

Коректор Л.Пчолинська

Замовлення 522

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

