



УДК 543.544+661.183

КОВАЛЕНТНОЕ ПРИСОЕДИНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ К ПОЛИМЕРАМVII*. НОВЫЙ ПРОСТОЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ АДСОРБЕНТОВ
С ГИДРАЗИДНЫМИ ГРУППАМИ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ
НОСИТЕЛЕЙ*Гляцицкий В. А., Межова И. В.***, Позднев В. Ф.,
Славик Э. П.***, Швец В. И.*****Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва;****Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Разработан новый метод получения адсорбентов с гидразидными группами на основе гидроксилсодержащих носителей. Метод заключается в модификации носителя метоксикарбонилхлоридом в пиридине с образованием соответствующего адиклического карбоната и последующем гидразинолизе метоксикарбонил-носителя. Оптимальные условия процесса установлены на примере сефарозы CL-4B: проведение метоксикарбонилирования в течение 1 ч при 4°С при использовании 10 ммоль метоксикарбонилхлорида на 10 г влажного веса или 0,5 г сухого веса носителя с последующим гидразинолизом модифицированного носителя избытком гидразида в течение 2 ч при 20°С. В этих условиях была осуществлена модификация сефарозы, целлюлозы, сефадекса, сферона, тойопала и трисакрила. Подтверждена возможность получения гидразида-сферона и гидразида-трисакрила прямым гидразинолизом указанных носителей при нагревании.

В связи с интенсивным развитием исследований по научно-техническому использованию иммобилизованных биологически активных соединений и по аффинной хроматографии актуальное значение приобретает поиск простых, экономически рациональных и безопасных методов иммобилизации веществ на носителях различной химической природы [3]. Наиболее широкое применение для иммобилизации биологически активных веществ и получения биоспецифических адсорбентов нашли гидроксилсодержащие носители как природного (сефароза, сефадекс, целлюлоза и др.), так и синтетического (сферон, тойопал, трисакрил и др.) происхождения. Для их активации существуют многочисленные методы, в том числе наиболее распространенный — обработка бромцианом [4], а также органическими дианатами [5], эпоксидными соединениями [6], триазидами [7] и галогенпиримидинами [8], карбонилдимидазолом [9], сульфохлоридами [10], активированными эфирами хлормуравьиной кислоты [11], дивинилсульфоном [12] и др. Каждый из упомянутых методов имеет свои преимущества и недостатки, причем последние обусловлены высокой токсичностью, дефицитностью или лабильностью применяемых реагентов, неустойчивостью образующейся связи лиганд — носитель, введением в носитель нежелательных гидрофобных и заряженных групп или изменением его структурно-физических свойств.

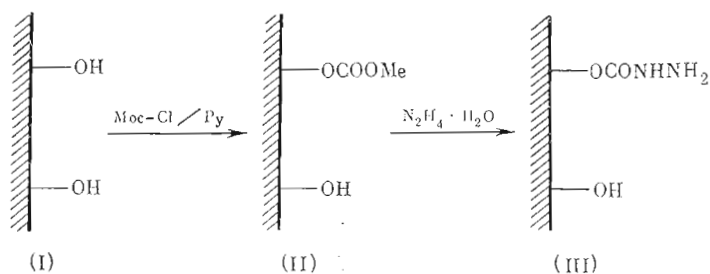
Поэтому остается актуальным поиск альтернативных методов модификации гидрофильных носителей, которые обеспечат широкий выбор методов при решении конкретных задач иммобилизации разных лигандов. В настоящей статье описан новый простой метод получения адсорбентов с гидразидными группами на основе гидроксилсодержащих носителей.

* Сообщение VI см. [1]. Предварительное сообщение см. [2]. Сокращения: Мос-Cl — метоксикарбонилхлорид; Мос-носитель — метоксикарбонилированный носитель; TNBS — 2,4,6-трипнитробензолсульфо кислота.

Сорбенты с гидразидными группами — удобные строительные блоки для конструирования биоспецифических адсорбентов, позволяющие гибко варьировать стратегию иммобилизации лигандов с различными функциональными группами [13]. Вещества с альдегидными группами могут быть непосредственно присоединены к гидразидам-сорбентам путем образования соответствующих гидразонов. С другой стороны, белки и низкомолекулярные лиганды с амино- (или гидразидами-) группами могут быть иммобилизованы на гидразидах-сорбентах после простых дополнительных модификаций последних, заключающихся в превращении гидразидных групп сорбента в азидные, обработке глутаровым альдегидом или ацилировании ангидридами двухосновных кислот [13].

Наиболее распространенным методом получения сорбентов с гидразидными группами на основе гидроксилсодержащих носителей остается присоединение дигидразидов двухосновных кислот по одной из гидразидных групп к активированному бромистым цианом носителю [14]. К недостаткам этого метода, помимо использования высокотоксичного бромциана, относится необходимость применения большого избытка дигидразидов двухосновных кислот для предотвращения поперечной сшивки носителя, а также недостаточная устойчивость образующейся связи [15]. Известен способ получения гидразида-сорбентов на основе целлюлозы или декстрана путем обработки карбоксиметилпроизводных указанных полисахаридов раствором хлористого водорода в метаноле с последующим гидразинолизом [16]. Необходимость предварительного получения карбоксиметилпроизводных и достаточно жесткие условия последующих превращений делают этот способ мало пригодным для полисахаридных носителей ввиду их возможной деградации. Следует упомянуть также метод гидразинолиза карбоксиметилсефадекса после предварительного превращения его в соответствующий лактон обработкой дидиклогексилкарбодиимидом в органическом растворителе [17]. Этот метод применим, по-видимому, только к карбоксиметилпроизводным носителей, содержащих винциальные гидроксильные группы.

Предлагаемый нами метод получения адсорбентов с гидразидными группами на основе гидроксилсодержащих носителей заключается в модификации носителя (I) метоксикарбонилхлоридом в пиридине с образованием соответствующего ациклического карбоната (II) с последующим гидразинолизом Мос-носителя (II) до гидразида-сорбента (III).



Известно, что симметричные диалкилкарбонаты легко реагируют с гидразингидратом с образованием карбазатов, которые далее превращаются в карбогидразид при длительном нагревании с гидразином при 100°С [18]. Было показано, что гидразинолиз *трет*-бутилметилкарбоната проходит значительно труднее и при этом избирательно отщепляется метоксильная группа с образованием *трет*-бутилкарбазата и небольшого количества карбогидразида [19]. Исходя из этих фактов, можно было предположить, что смешанный карбонат полимерного спирта и метилового спирта будет подвергаться гидразинолизу предпочтительно по метоксильной группе с образованием целевого гидразида-сорбента (III).

Для экспериментальной проверки этого предположения гидроксилсодержащий носитель, например сефарозу CL-4B, промывали водным и затем сухим ацетоном для удаления воды, затем суспендировали в сухом

пиридине и обрабатывали при охлаждении раствором Мос-Cl в ацетоне. Метоксикарбонилирование проводили в течение 1 ч при 4° С (за исключением отмеченных случаев), используя 10 ммоль Мос-Cl на 10 г влажного веса носителя. В ИК-спектре полученного Мос-носителя (II) обнаружена полоса поглощения при 1750 см⁻¹, характерная для группы COOCH₃, но не было полосы при 1800 см⁻¹, что указывает на отсутствие циклических карбонатов в Мос-носителе. Гидразиолиз Мос-носителя (II) осуществляли избытком гидразингидрата в изопропиловом спирте в течение нескольких часов. Гидрази́до-сорбент (III) отмывали от избытка гидразингидрата разбавленной соляной кислотой и водой; продукт окрашивался в характерный для гидразидных групп ярко-красный (сефароза) или темно-бурый (сферон, тойопал) цвет при обработке раствором TNBS в насыщенном растворе тетрабората натрия [20].

С целью выяснения оптимальных условий модифицирования была изучена зависимость количества гидразидных групп на сорбентах от времени гидразиолиза Мос-носителя, от времени модификации носителя Мос-Cl и от количества используемого Мос-Cl. В качестве носителя в этих экспериментах использована сефароза CL-4B. Количественное определение гидразидных групп проводили путем обработки гидрази́до-сорбентов избытком TNBS с последующим спектрофотометрическим определением непрореагировавшей TNBS после реакции с дигидразидом адипиновой кислоты [13].

Было установлено, что оптимальное время гидразиолиза — 2–5 ч, после чего, вероятно, увеличивалась степень гидразиолиза связи лиганд — носитель с отщеплением лиганда в виде карбогидрази́да; этот нежелательный процесс ускоряется при повышении температуры (рис. 1).

При изучении влияния времени метоксикарбонилирования на содержание гидразидных групп, образовавшихся после гидразиолиза Мос-сефарозы CL-4B (2 ч при 20° С), обнаружено (рис. 2), что обработка носителя Мос-Cl в течение 0,5–1,0 ч при 4° С обеспечивает последующее образование свыше 130 ммоль гидразидных групп на 1 г сухого сорбента. Дальнейшее увеличение времени реакции приводило лишь к незначительному повышению количества гидразидных групп.

При реакции носителя с различными количествами Мос-Cl с последующим гидразиолизом (2 ч при 20° С) установлено (рис. 3), что содержание гидразидных групп увеличивается вначале резко, а затем пропорционально увеличению количества Мос-Cl, причем при использовании больших количеств Мос-Cl (40–100 ммоль/10 г влажного веса носителя) отмечалось образование осадка, затрудняющего перемешивание, и изменение свойств носителя, в частности уменьшение его объема.

Таким образом, оптимальными условиями для модификации сефарозы CL-4B следует считать использование 10–20 ммоль Мос-Cl на 10 г влажного веса носителя при проведении стадии метоксикарбонилирования в течение 1 ч при 4° С с последующим гидразиолизом Мос-носителя избытком гидразингидрата в течение 2 ч при 20° С. В этих условиях была осуществлена модификация ряда других гидроксилсодержащих носителей, результаты которой представлены в таблице. Поскольку содержание гидразидных групп на гидрази́до-сорбентах в различных экспериментах с одним и тем же носителем и в одинаковых условиях колебалось в пределах 10–15%, в таблице приведены усредненные значения 4–5 опытов. Из данных таблицы видно, что гидрази́до-сорбенты, полученные на основе синтетических носителей, содержат большее количество гидразидных групп по сравнению с полисахаридными, в особенности декстрановыми, гелями. В случае сефадекса увеличение времени метоксикарбонилирования или количества используемого Мос-Cl не приводило к повышению содержания гидразидных групп в гидрази́до-сефадексе G-50. Можно полагать, что метоксикарбонилирование протекает в основном по первичным гидроксильным группам носителя. Сефадекс, являясь поперечно-сшитым декстраном [21], содержит ограниченное количество первичных гидроксильных групп. Возможно, поэтому степень метоксикарбонилирования этого носителя в выбранных условиях весьма незначительна, что под-

n , мкмоль/г сухого веса

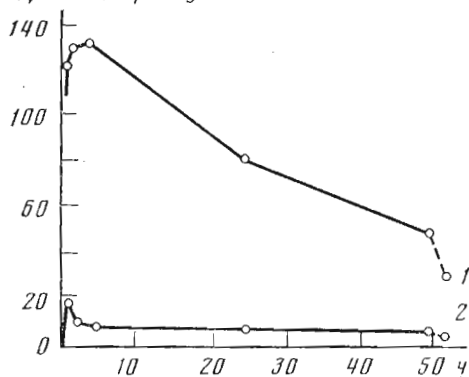


Рис. 1

n , мкмоль/г сухого веса

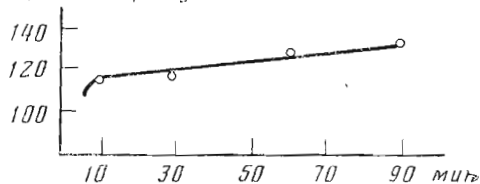


Рис. 2

n , мкмоль/г сухого веса

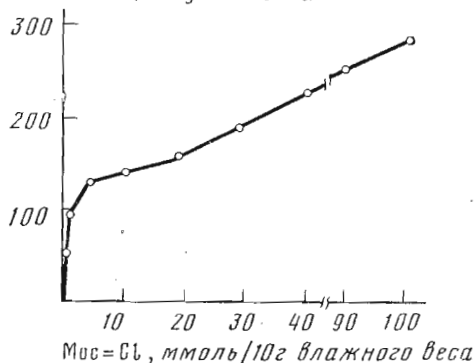


Рис. 3

Рис. 1. Зависимость количества гидразидных групп в гидразидо-сефарозе CL-4B (n) от длительности гидразинолиза Мос-сефарозы CL-4B (1) и немодифицированной сефарозы CL-4B (2). Пунктирные линии — после нагревания (3 ч при 70° С)

Рис. 2. Зависимость количества гидразидных групп в гидразидо-сефарозе CL-4B (n) от длительности метоксикарбонилирования

Рис. 3. Зависимость количества гидразидных групп в гидразидо-сефарозе CL-4B от количества Мос-Cl, используемого для модификации исходного носителя

тверждается низкой интенсивностью полосы при 1750 см^{-1} в ИК-спектре Мос-сефадекса.

Другой причиной недостаточно высокого содержания гидразидных групп на некоторых сорбентах (таблица) может быть частичный гидразинолиз полимер-карбонатной связи, что приводит к образованию карбогидразида или метилкарбазата. Действительно, после упаривания фильтратов и промывных вод, полученных на стадии гидразинолиза практически всех Мос-носителей, методом ТСХ на силуфол (MeCN—MeOH—конц. NH_4OH , 3:2:0,1) при сравнении с заведомыми образцами были идентифицированы карбогидразид (R_f 0,3) и метилкарбазат (R_f 0,57). Вероятно, указанная побочная реакция протекает в незначительной степени, на что указывает вполне удовлетворительное содержание гидразидных групп,

Характеристика гидразидо-сорбентов, полученных модификацией гидроксилсодержащих носителей

Носитель	Количество гидразидных групп в сорбенте, мкмоль/г сухого веса		
	А	Б	В
Сефароза 4В	120	—	—
Сефароза CL-4В	135	20	—
Целлюлоза	40	—	—
Сферон 300	350	30	360
Трисакрил GF-2000	275	15	80
Тойонал HW-55	220	25	—

Примечание. А — оптимальные условия, Б — гидразинолиз без предварительного метоксикарбонилирования носителя, В — непосредственный гидразинолиз носителя при нагревании (см. «Экспериментальную часть»).

достигнутое для большинства изученных носителей. Возможным путем дальнейшей оптимизации процесса может быть уменьшение количества гидразингидрата на стадии гидразинолиза Мос-носителя.

Следует отметить также относительно низкое содержание гидразидных групп на целлюлозном носителе, достигнутое при оптимальных условиях процесса (35–40 мкмоль/г сухого веса). Более низкая степень модификации целлюлозы по сравнению с сефарозой при реакции с активированными хлорформатами была отмечена ранее [22]. Нам удалось увеличением времени стадии метоксикарбонилирования целлюлозы до 10 ч при 20°С повысить содержание гидразидных групп на гидразидо-целлюлозе до 90 мкмоль/г сухого веса.

При проведении «холостых» опытов с гидроксилсодержащими носителями гидразинолиз в оптимальных условиях, но без предварительного метоксикарбонилирования не вызывал образования существенного количества гидразидных групп ни для одного носителя (таблица). Однако при проведении гидразинолиза при нагревании была подтверждена возможность прямого введения гидразидных групп в оксиэтилметакрилатный гель. Указанная возможность, подобная получению гидразидо-сорбентов на основе полиакриламидных гелей [23], упоминается в нескольких авторских свидетельствах ЧССР [24, 25]. При нагревании сферона в *n*-гексаноле с избытком гидразингидрата в течение 5 ч при 130°С мы получили гидразидо-сорбент, содержащий примерно такое же количество гидразидных групп, как и при описанном выше двухстадийном процессе (метоксикарбонилирование — гидразинолиз). Аналогичную возможность прямого гидразинолиза можно было предположить и для трисакрила. Нагревание последнего с избытком гидразингидрата в диоксане в течение 5 ч при 90°С привело к соответствующему гидразидо-сорбенту с содержанием гидразидных групп 72 мкмоль/г сухого веса. Таким образом, в случае трисакрила двухстадийный процесс, приводящий к образованию 275 мкмоль гидразидных групп на 1 г сухого веса, имеет явные преимущества по сравнению с прямым гидразинолизом этого носителя.

На заключительном этапе работы на гидразидо-сефарозе CL-4В, содержащей 25 мкмоль гидразидных групп на 1 г влажного веса, была проведена иммобилизация модельного лиганда — периодатокисленного уридина. Для сравнения тот же лиганд был иммобилизован на сорбенте, полученном традиционным методом путем присоединения дигидразида яблочной кислоты к бромциан-активированной амилопектин-сефарозе [26] (11 мкмоль гидразидных групп/г влажного веса геля). Периодатное окисление уридина и его присоединение к гидразидо-сорбентам проводили по методике, описанной в работе [27]. В реакции присоединения использовали более чем 10-кратный избыток лиганда по отношению к количеству гидразидных групп на сорбентах. После присоединения лиганда сорбенты восстанавливали избытком боргидрида натрия и определяли содержание уридина дифференциальным методом, а также по количеству отщепившегося при кислотной обработке урацила. Сорбент, полученный нашим двухстадийным методом, содержал 11,4 мкмоль уридина на 1 г влажного веса, а адсорбент на основе BrCN-активированного носителя — 1,12 мкмоль уридина/г влажного веса геля. В обоих случаях не было обнаружено отщепления лиганда в интервалах pH 4–9, т. е. в условиях, обычно используемых при аффинной хроматографии; однако при инкубации сорбентов в 1 н. NH₄OH при 37°С в течение 24 ч они теряли до 50% иммобилизованного уридина.

Описанный выше новый метод получения гидразидо-сорбентов, по-видимому, универсален для всех гидроксилсодержащих носителей. В нем используются вполне доступные реагенты — Мос-Cl и гидразингидрат; исключается применение высокотоксичных реагентов типа бромистого циана. Известно, что тип связи между лигандом и носителем в получаемых гидразидо-сорбентах характеризуется высокой гидролитической устойчивостью и отсутствием дополнительных заряженных групп в отличие от сорбентов на основе бромциан-активированных носителей [22]. В результате метоксикарбонилирования в носитель не вводятся хими-

чески активные группы, что исключает необходимость их последующего блокирования и позволяет хранить Мос-носитель в течение длительного времени.

Экспериментальная часть

В работе использованы следующие гидроксилсодержащие носители: сефароза 4В, сефароза CL-4В, сефадекс G-50 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), целлюлоза (НПО «Биохимреактив», СССР), сферон 300 (Lachema-Chemapol, ЧССР), тойопал Япония), трисакрил GF-2000 (LKB, Швеция). Остальные реагенты — коммерческие продукты («Союзреактив», СССР).

ИК-спектры снимали на приборе Pye-Unicam SP-100 в таблетках KCl. Образцы сорбентов перед снятием ИК-спектров и перед определением содержания гидразидных групп промывали водным и затем сухим диоксаном и высушивали в вакууме над P_2O_5 до постоянного веса.

Определение количества гидразидных групп на сорбентах. Образцы высушенных сорбентов (по 100 мг) обрабатывали 30 мин при $20^\circ C$ 1 мл 1% раствора TNBS в воде и 1 мл насыщенного раствора тетрабората натрия. Затем сорбент отделяли на стеклянном фильтре и промывали 0,2 М раствором NaCl, доводя объем фильтрата до 25 мл. Аликвоту фильтрата (0,1 мл) обрабатывали 0,9 мл насыщенного раствора тетрабората натрия и 1 мл 0,2 М раствора дигидразида адипиновой кислоты в воде, смесь выдерживали 15–20 мин и измеряли поглощение при 500 нм, считая молярный коэффициент поглощения TNBS-производного дигидразида адипиновой кислоты $\epsilon_{500} = 16500 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ [22]. По количеству прореагировавшей с адсорбентом TNBS рассчитывали количество гидразидных групп на сорбенте.

Общая методика получения гидразидо-сорбентов. Суспендированные носители предварительно обезвоживали промыванием водным и затем сухим ацетоном (сефароза, тойопал, трисакрил). Носители, поставляемые в сухом виде, перед реакцией промывали сухим ацетоном (целлюлоза, сефадекс, сферон). Гидроксилсодержащий носитель (10 г влажного веса или 0,5 г сухого веса) суспендировали в 10 мл сухого пиридина. К перемешиваемой суспензии при $4^\circ C$ за 2 мин добавляли раствор 10 ммоль Мос-Cl в 5 мл сухого ацетона, перемешивали 1 ч при $4^\circ C$, носитель отделяли, промывали ацетоном и затем изопропиловым спиртом (по 30 мл). Мос-носитель суспендировали в 5 мл изопропилового спирта и 20 мл гидразингидрата и суспензию перемешивали в течение 2 ч при $20^\circ C$. Сорбент отделяли, промывали большим количеством 0,1 н. HCl и дистиллированной воды до отрицательной реакции фильтрата с TNBS. Количество гидразидных групп на полученных сорбентах представлено в таблице. В «холостых» опытах проводили гидразинолиз носителя в описанных выше условиях, исключая стадию метоксикарбонилирования.

Гидразинолиз сферона 300 при нагревании. Сферон 300 (0,5 г) промывали 10 мл сухого диоксана, затем 10 мл *n*-гексанола, суспендировали в 10 мл *n*-гексанола и 20 мл гидразингидрата и нагревали в течение 5 ч при $130^\circ C$. Затем гель отделяли, промывали 10 мл изопропилового спирта, 0,1 н. HCl и водой до отрицательного теста промывных вод с TNBS.

Гидразинолиз трисакрила GF-2000 при нагревании. Трисакрил GF-2000 (10 г влажного веса) промывали смесями диоксан — вода (25 : 75, 50 : 50, 75 : 25; по 30 мл) и затем 30 мл сухого диоксана, суспендировали в 10 мл диоксана и 20 мл гидразингидрата и нагревали при $90^\circ C$ в течение 5 ч при перемешивании. Полученный сорбент отделяли, промывали 10 мл диоксана, 0,1 н. HCl и водой до отсутствия гидразингидрата в промывных водах по тесту с TNBS.

Иммобилизация уридина на гидразидо-сорбентах. К раствору 244 мг (1 ммоль) уридина (Reanal, Венгрия) в 8 мл 0,1 М натрий-ацетатного буфера (pH 5) добавляли при $4^\circ C$ в темноте раствор 214 мг (1 ммоль) периодата натрия в 2 мл воды и смесь перемешивали 2 ч при $4^\circ C$ в темноте. Затем смесь добавляли к 3 г (влажный вес) гидразидо-сефа-

розы СL-4В (25 мкмоль гидразидных групп/г влажного веса) и полученную суспензию перемешивали 3 ч при 4° С. Гель отделяли, промывали 15 мл 2 М NaCl, 15 мл 0,1 М натрий-бикарбонатного буфера (рН 8,5) и суспендировали в 10 мл того же буфера. К суспензии добавляли 60 мг боргидрида натрия и перемешивали 2 ч при 20° С. Гель отделяли и промывали 30 мл воды.

Для определения содержания уридина в полученном адсорбенте 100 мг геля (влажный вес) инкубировали в течение 2 ч при 75° С с 5 мл 0,1 н. HCl, гель отделяли и определяли поглощение фильтрата при 262 нм. Согласно полученным данным, сорбент содержал 11,4 мкмоль уридина на 1 г влажного веса геля. При инкубации аликвот сорбента в интервале рН 4–9 в течение 72 ч при 20° С не было обнаружено отщепления лиганда. После инкубации сорбента с 1 М NH₄OH при 37° С в течение 24 ч наблюдалось отщепление 52% иммобилизованного уридина.

Аналогично проводили иммобилизацию уридина на сорбенте, полученном присоединением дигидразида яблочной кислоты к BrCN-активированной амилопектин-сефарозе [26] (11 мкмоль гидразидных групп/г влажного веса геля). Полученный продукт содержал 1,12 мкмоль уридина/г влажного веса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Митина В. X., Кляцицкий Б. А. Журн. общ. химии, 1984, т. 54, № 4, с. 934–938.
2. Кляцицкий Б. А., Межова И. В., Позднеев В. Ф., Швец В. И. Докл. АН СССР, 1985, т. 282, № 6, с. 1395–1397.
3. Кляцицкий Б. А., Кузнецов П. В. Усп. химии, 1984, т. 53, № 10, с. 1740–1764.
4. Azen R., Porath J., Ernback S. Nature, 1967, v. 214, № 5095, p. 1302–1304.
5. Ahrgren L., Kägedal L., Akerström S. Acta chem. scand., 1972, v. 26, № 1, p. 285–288.
6. Sundberg L., Porath J. J. Chromatogr., 1974, v. 3, № 1, p. 87–98.
7. Smith N. L., Lenhoff H. M. Analyt. Biochem., 1974, v. 61, № 2, p. 392–415.
8. Gribnau T. C. J., Tesser G. J., Nivard R. J. F. J. Solid-Phase Biochem., 1978, v. 3, № 1, p. 1–32.
9. Hearn M. T. W., Bethell G. S., Ayers J. S., Hancock W. S. J. Chromatogr., 1979, v. 185, p. 463–470.
10. Nilsson K., Mosbach K. Eur. J. Biochem., 1980, v. 112, № 2, p. 397–402.
11. Drobník J., Labský J., Kudvasová H., Saudek V., Švec F. Biotechnol. and Bioeng., 1982, v. 24, № 2, p. 487–493.
12. Porath J., Sundberg L. Nature, New Biol., 1972, v. 238, № 85, p. 261–262.
13. Miron T., Wilchek M. J. Chromatogr., 1981, v. 215, p. 55–63.
14. Lamed R., Levin Y., Oplatka A. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 305, № 1, p. 163–171.
15. Jost R., Miron T., Wilchek M. Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 362, № 1, p. 75–82.
16. Mitz M., Summaria L. Nature, 1961, v. 189, № 4764, p. 576–577.
17. Akanuma H., Yamasaki M. J. Biochem., 1978, v. 84, № 6, p. 1357–1362.
18. Ohme R., Zubeck A. Z. Chem., 1968, B. 8, № 2, B. 41–51.
19. Позднеев В. Ф., Чаман Е. С. Журн. орган. химии, 1971, т. 7, № 2, с. 273–276.
20. Cuatrecasas P. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 12, p. 3059–3065.
21. Porath J., Flodin P. Nature, 1959, v. 183, № 4676, p. 1657–1659.
22. Wilchek M., Miron T. Biochem. Intern., 1982, v. 4, № 6, p. 629–635.
23. Inman J. K., Dintzis H. M. Biochemistry, 1969, v. 8, № 10, p. 4074–4082.
24. А. с. 167593 (СССР). Způsob přípravy nerozpustných biologicky aktivních sloučenin/Hradil J., Coupek J., Křiváková M., Stamberg J., Stoy A., Turková J. Оубл. 15.11.77.
25. А. с. 183170 (СССР). Způsob obohacování a čištění peniciliny/Vojtišek V., Vlašák J., Bárta J., Čulík K. Оубл. 15.05.80.
26. Klyashchitsky B. A., Milina V. Kh. J. Chromatogr., 1981, v. 210, p. 55–65.
27. Lamed R., Levin Y., Wilchek M. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 304, № 2, p. 231–235.

Поступила в редакцию
29.III.1985
После доработки
3.VI.1985

COVALENT COUPLING OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS TO POLYMERS.
VII. A NEW SIMPLE METHOD FOR PREPARATION OF ADSORBENTS WITH
HYDRAZIDE GROUPS BASED ON HYDROXYL-CONTAINING SUPPORTS

KLYASH, HITSKY B. A., MEZHOVA I. V. **, POZDNEV V. F.,
SLAVIK E. P. **, SHVETS V. I. **

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow;*

*** M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

A new simple method for preparation of adsorbents with hydrazide groups based on hydroxyl-containing supports is reported. It includes modification of the support by methoxycarbonylchloride in the presence of pyridine and subsequent hydrazinolysis of the methoxycarbonylated support. Optimal conditions for the first stage involved the support treatment with methoxycarbonyl chloride (10 mmoles per 10 g of wet or 0,5 g of dried support) for 1 h at 4° C. The hydrazinolysis was carried out with the excess of hydrazine hydrate for 2 h at 20° C. Sepharose, cellulose, Sephadex, Spheron, Toyoparl, and Trisacryl were modified under above conditions. Hydrazido-Spheron and hydrazido-Trisacryl can also be prepared by direct hydrazinolysis of the corresponding matrices.