

聚甲基丙烯酸酰胺型配体交换色谱载体的研究*

阎虎生 程晓辉 何炳林

(南开大学高分子化学研究所,天津,邮政编码: 300071)

摘 要

通过交联聚甲基丙烯酸甲酯与过量的乙二胺或多乙烯多胺反应,然后再与氯乙酸反应得到含有 α -胺基乙酸基团的亲水性的聚甲基丙烯酸酰胺树脂。用这些树脂的 Cu^{2+} 络合物作为色谱载体对中性氨基酸进行分离。研究了色谱条件如洗脱剂组成、流速和柱温对分离的影响。

关键词 色谱、配体交换、氨基酸、聚甲基丙烯酸酰胺、分离

配体交换色谱用于含有可与过渡金属配位的基团如胺基、羟基、羧基和巯基等的化合物的浓集、分离和外消旋体的拆分等,如生理活性胺和生物碱的分离,核苷酸、核酸碱和核酸的分离,氨基酸、多肽和蛋白质的分离以及外消旋氨基酸的拆分等^[1-3]。常用的载体有以疏水性聚苯乙烯为骨架的磺酸树脂、膦酸树脂、胺基磷酸树脂、亚胺基二乙酸树脂和亲水性的聚丙烯酸树脂等。为了分离中性氨基酸,前文^[4]我们设计并合成了以亲水性聚丙烯酰胺为骨架含有 α -胺基乙酸配位基的树脂,并证明在以 Cu^{2+} 为中心离子的配体交换色谱分离中性氨基酸时,骨架亲水性愈大,则对分离愈有利。根据氨基酸与 Cu^{2+} 形成1:1和2:1络合物的稳定性^[5]判断,如果树脂上配位基团周围有较大位阻的基团,则对中性氨基酸的分离更有利。因此本文合成了位阻较大、同时具有亲水性骨架的螯合树脂,研究了这些树脂的 Cu^{2+} 络合物对中性氨基酸的分离。

实 验 部 分

1. 主要试剂

甲基丙烯酸甲酯,分析纯,天津化学试剂二厂,用前熏蒸, B.P. 46—47°C/1.33 × 10⁵Pa; 二乙烯苯(含量 56.45%),美国 Dow 公司,用前用氢氧化钠溶液洗涤而脱去阻聚剂;乙二胺,分析纯,天津化学试剂一厂;二乙烯三胺,化学纯,宜兴县化学试剂二厂;三乙烯四胺,化学纯,上海染料化工十四厂;四乙烯五胺,化学纯,宜兴县化学试剂三厂;氯乙酸,分析纯,北京化学试剂三厂。

2. 实验步骤

(1) 含胺基树脂的合成: 含 1% 二乙烯基苯和 1% 过氧化苯甲酰的甲基丙烯酸甲酯悬浮于含 20% 氯化钠和 0.5% 明胶的水相中,调整适当的搅拌速度,70°C 聚合 6 小时,然

* 1991年6月17日收到;国家自然科学基金资助课题

后升温到 80℃ 聚合 6 小时。筛分 100—200 目珠体,用丙酮提取 4 小时,干燥。取 10g 此树脂,加 80ml 多胺(乙二胺、二乙烯三胺、三乙烯四胺或四乙烯五胺),室温搅拌 2 小时,140℃ (当乙二胺为反应物时为回流温度 117℃) 反应 10 小时,得含胺基树脂,分别用 C1、C2、C3 和 C4 表示。

(2) 含胺基乙酸树脂的合成: 5g 含胺基树脂 (C2、C3 或 C4) 加入由 30g 碳酸钠、15g 氯乙酸和 70ml 水配成的溶液,室温搅拌 2 小时,然后升温到 65℃ 反应 8 小时,用酸转成 H⁺ 型后得含 α -胺基乙酸的树脂,分别用 D2、D3 和 D4 表示。

(3) 配体交换色谱: 含 α -胺基乙酸树脂用 0.5mol/l 乙酸铜溶液浸泡 24 小时,装入玻璃柱 (30 × 0.5cm, I.D.), 树脂床高为 25cm, 用洗脱剂以 16ml/h 的流速使柱充分平衡,加入待分离样品,用洗脱剂洗脱分离,流出液用 ZW-II 型紫外检测仪 (北京新技术应用研究所生产,检测波长为 254nm) 和薄层色谱 (茚三酮显色) 检测。

结果与讨论

1. 树脂的合成

聚甲基丙烯酸甲酯与过量多胺反应得到含胺基的 C 系列树脂,见表 1 (树脂编号见实验部分)。由表 1 中碱交换量和氮含量可知,在 140℃ 下,二乙烯三胺、三乙烯四胺和四乙烯五胺与聚甲基丙烯酸甲酯的反应可顺利进行。乙二胺的沸点为 117℃,在回流温度下乙二胺与聚甲基丙烯酸甲酯的反应较难进行,反应 10 小时后,所得 C1 树脂的氮含量只有 1.36%,未作进一步研究。由酸碱交换量和氮含量可计算出 C 系列树脂中每一个多胺分子中平均参加反应形成酰胺基个数(酰胺基数/多胺分子数,见表 1),说明聚甲基丙烯酸甲酯与多胺的反应发生部分后交联,C2—C4 的后交联程度逐渐增大。C2—C4 与氯乙酸在碱性条件下反应得到含 α -胺基乙酸基团的 D2—D4 树脂,见表 1。

Tab. 1 Characteristics of the Resins

Resin	Ion exchange capacity* (mmol/g)	N%	Cu ²⁺ Capacity (mmol/g)	No. Amide groups per polyamine molecule
C1		1.36		
C2	4.37	10.80		1.16
C3	5.02	11.62		1.58
C4	4.78	11.08		1.97
D2	5.78	6.49	3.84	
D3	4.98	7.52	2.73	
D4	5.56	6.06	3.34	

* Anion exchange capacity for C series resins and cation exchange capacity for D series resins

2. 配体交换色谱分离氨基酸

前文^[4] 我们研究了聚丙烯酰胺型螯合树脂的 Cu²⁺ 络合物对中性氨基酸的分离,并与聚丙烯酸和聚苯乙烯型亚胺二乙酸树脂的 Cu²⁺ 络合物作为载体作了比较。结果表明,螯合树脂亲水性愈大,对分离愈有利。以 Val、Ala、Gly 三种氨基酸为例,在亲水性

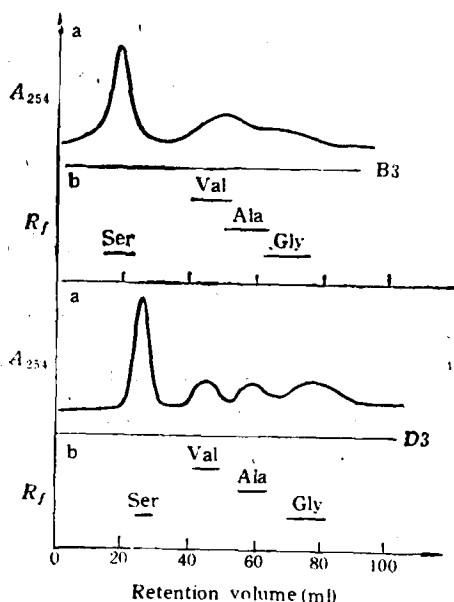


Fig. 1 Separation of amino acids on B3 and D3 loaded with Cu^{2+}

Eluent: 0.2 mol/l NH_3 , 5×10^{-4} mol/l $\text{Cu}(\text{OAc})_2$; Flow rate: 16 ml/h; a, detected with UV detector; b, detected with TLC

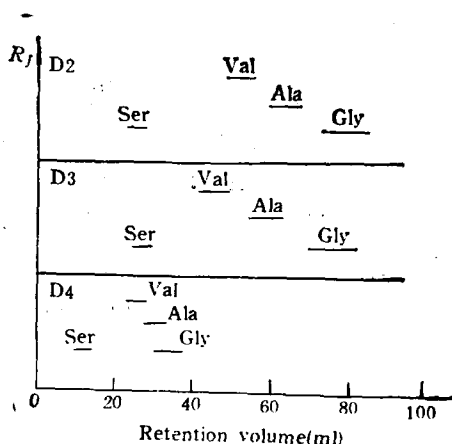


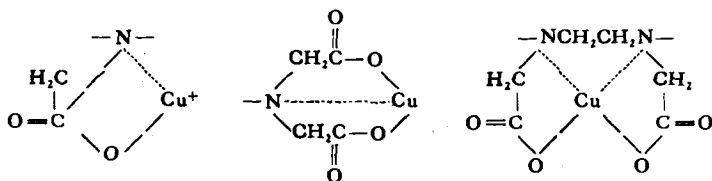
Fig. 2 Separation of amino acids on D series resins loaded with Cu^{2+}

Eluent: 0.2 mol/l NH_3 , 5×10^{-4} mol/l $\text{Cu}(\text{OAc})_2$; Flow rate: 16 ml/h; Detected with TLC

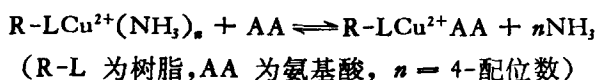
载体上的保留体积次序为 $\text{Val} < \text{Ala} < \text{Gly}$ 。

如果树脂上的配位基团周围有较大的位阻基团,则当被分离氨基酸与已配合于树脂上的金属离子配位时,由于位阻作用,侧基位阻较大的 Val 的配位能力有较大幅度的降低,而侧基位阻很小的 Gly 的配位能力变化较小,因而有利于分离。图 1 为 D3 树脂和 B3 树脂^[4](聚丙烯酰胺骨架,功能基与 D3 相同)的 Cu^{2+} 络合物作为色谱载体对中性氨基酸的分离的比较。D3 比 B3 的亲水性小,但 D3 的分离效果比 B3 好,说明 D3 中的位阻基团对氨基酸的分离是有利的。

图 2 为 D 系列树脂的 Cu^{2+} 络合物作为色谱载体对中性氨基酸分离的比较,D2—D4,氨基酸的保留体积逐渐减小。与我们在前文的分析类似,D 系列树脂与 Cu^{2+} 的络合物主要有下列三种形式:



D2 主要含 2 配位和 3 配位形式, D3 和 D4 所含 4 配位形式逐渐增多。配位数增大,则使平衡



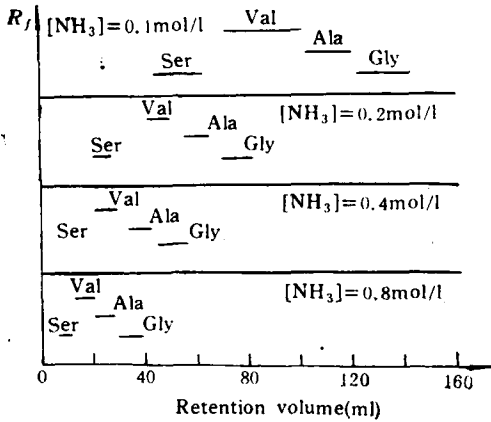


Fig. 3 Effect of concentration of NH_3 on the separation Packing: D3- Cu^{2+} ; Eluent: 5×10^{-4} mol/l $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ - NH_3 ; Flow rate: 16 ml/h; Detected with TLC

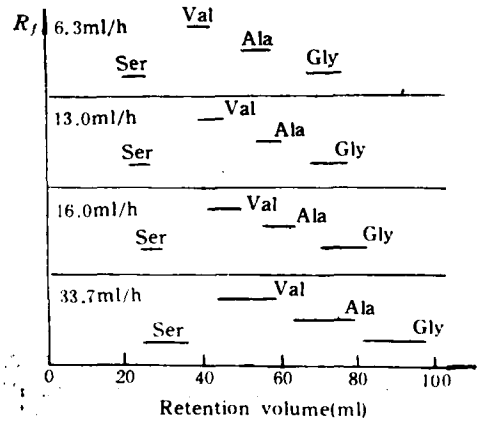


Fig. 4 Effect of flow rate on the separation Packing: D3- Cu^{2+} ; Eluent: 0.2 mol/l NH_3 , 5×10^{-4} mol/l Cu^{2+} (OAc) $_2$; The flow rate is shown in Fig. Detected with TLC

向左移动^[4], [AA]增大, 因而保留体积减小。

3. 色谱条件对分离的影响

洗脱剂组成: 分别用 NH_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 和 KH_2PO_4 溶液(含少量 Cu^{2+})作为洗脱剂分离氨基酸, 结果表明, 以 NH_3 溶液为最好, 其它二种洗脱剂的分离效果较差。 NH_3 浓度对分离的影响见图 3。随着 NH_3 浓度的增大, 氨基酸的保留体积减小, 当 NH_3 浓度为 0.2 mol/l 时, 分离效果较好。

流速: 图 4 为洗脱剂流速对分离的影响, 流速由 6.3 ml/h 增加到 16.0 ml/h 时, 氨基酸的保留体积略有增加, 峰宽稍加宽, 说明色谱过程接近于平衡过程。而当流速增加到 33.7 ml/h 时, 保留体积和峰宽都显著增大, 说明色谱过程与热力学平衡过程偏离较大。

柱温: 图 5 为柱温从 25℃ 到 55℃ 对分离的影响, 随着柱温的升高, 保留体积稍有增大。Lefebver 等^[6]和袁直等^[7]在用亲水性手性配体树脂拆分 DL-氨基酸

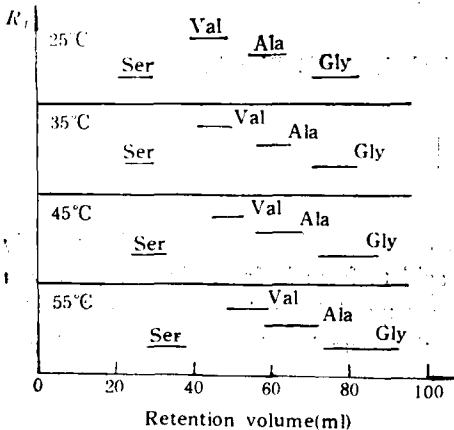


Fig. 5 Effect of temperature on the separation Packing: D3- Cu^{2+} ; Eluent: 0.2 mol/l NH_3 , 5×10^{-4} mol/l $\text{Cu}(\text{OAc})_2$; Flow rate: 16 ml/h; The temperature is shown in Fig. Detected with TLC

酸时也得到了类似的结果, 但 Davankov 等^[8]和金仁华等^[9]在用聚苯乙烯系手性配体树脂拆分氨基酸时得到了相反的结果, 即随着柱温的升高, 氨基酸的保留体积有较大幅度的下降。金仁华等^[9]曾用动力学因素解释温度的影响。但如果温度对色谱的影响是对动力学

过程的影响,则升高温度必将加快配体交换反应的速度,使保留值下降。但如上所述,在用亲水性载体分离或拆分氨基酸时,保留体积随柱温的升高而增大,这与用动力学的解释是相矛盾的。作者认为柱温对色谱过程的影响主要是对热力学平衡的影响,由流速对分离的影响的结果可知,在一般所用的流速范围内,配体交换色谱过程与热力学平衡过程偏离不大。作者在前文^[4]已证明,在用疏水性配体树脂分离氨基酸时,疏水吸附力在分离过程中起着主要作用,因此柱温升高使在疏水性载体上的氨基酸的保留值显著下降的原因是升高温度使吸附力显著下降所致。而在亲水性载体上,这种吸附力很小。

参 考 文 献

- [1] Davankov, V. A. and Semechikin, A. V., *J. Chromatogr.*, 1977, 141, 313
- [2] Doury-Berthod, M. and Poitrenaud, C., *ibid.*, 1977, 131, 73
- [3] Antonelli, M. L., Bucci, R., Carunchio, V., *J. Liq. Chromatogr.*, 1980, 3, 885
- [4] 阎虎生、程晓辉、何炳林, *高等学校化学学报*, 1992, 13, 270
- [5] Martell, A. E. and Smith, R. M., *Critical Stability Constants, V. 1: Amino Acids*, Plenum Press, New York, 1974, p. 1
- [6] Lefebver, B., Audebert, R., and Quivoron, C., *Isr. J. Chem.*, 1977, 15, 69
- [7] 袁直、金仁华、何炳林, *离子交换与吸附*, 1991, 7, 110
- [8] Davankov, V. A., Rogozhin, S. V., Semechin, A. V., Baranov, V. A., and Sannikova, G. S., *J. Chromatogr.*, 1974, 93, 363
- [9] Jin, R. and He, B., *J. Liq. Chromatogr.*, 1989, 12, 501

STUDY ON POLY (METHYL METHACRYLAMIDE)-TYPE LIGAND EXCHANGE CHROMATOGRAPHIC SUPPORTS

YAN Husheng, CHENG Xiaohui, HE Binglin

(Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin, Post code: 300071)

ABSTRACT

Crosslinked poly(methyl methacrylate) was first reacted with ethylenediamine or polyethylenepolyamine and then reacted with chloroacetic acid to form hydrophilic poly(methyl methacrylamide) resins containing α -amino acetic acid groups. The resins coordinated with Cu^{2+} were used as chromatographic supports to separate the neutral amino acids. The effect of the chromatographic conditions such as composition of the eluent, flow rate and column temperature on the separation was studied.

Key words Chromatography, Ligand exchange, Amino acids, Poly(methyl methacrylamide), Separation