

制备性配位交换树脂的合成

曹宁军 伦世仪

(发酵工程系)

摘要 为满足中性氨基酸制备性层析的要求,本研究合成出三种具有不同配位基团的含铜配位交换层析树脂,其担体材料分别为 Sephadex G-25,多孔玻璃和聚苯乙烯磺酸树脂。由于在合成过程中采用了新的合成路线和添加适量的有机溶剂,促进了有机反应物在水中的溶解度,提高单位柱载量达 33%,并且有良好的稳定性和机械强度,满足了制备性层析要求。

关键词 配位交换层析;树脂合成;氨基酸分离

0 引言

“配位”在化学上是分子或离子通过配位键与金属离子相结合形成络合物的过程。如果配位键既容易形成又便于打开,配位体之间的交换便成为可能。配位交换层析正是运用了这一特点,通过溶质与金属离子之间亚稳态络合物的建立达到相似混合物分离的目的。

配位交换层析创立于 1961 年,它使离子交换层析与配位化学相结合,产生普通层析方法无法达到的选择性,并且由于金属离子的可配位数大于所带有的电荷数,从而输入了更高的配位容量^[1]。目前它主要应用于氨基酸分析及其随后发展的光学异构体拆分分离等方面^[2]在这个系统中金属离子通过离子键、共价键或配位键固定于载体上,因而金属离子的种类、固定相功能基团的性质、基质结构和流动相组成等不同程度地影响层析结果。其中前三项均同树脂的选择与合成紧密相联,尽管已合成出多种配位树脂,并在 HPLC 系统中得到广泛的应用;它们虽有不同的优缺点,但层析容量低、金属离子稳定性差却是所有材料的通病,达不到制备性应用的要求^[3,4]。

根据理论分析,为了有效地运用配位交换层析技术于中性氨基酸的制备过程,树脂的高亲和性与大容量是必须加以考虑的两个重要因素^[5]。作者通过方法的改进合成出不同种配位树脂,与原方法比较交换容量明显提高,伴随层析参数的修正,在稳定性方面达到制备性层析的要求。

收稿日期: 1991-09-09

1 材料与方法

1.1 材料

氯代环氧丙烷 A.R 级

α -碘乙酸 A.R 级

Sephadex G-25 Pharmacia 公司(或国产)

层析硅胶 100-200 目, 多孔玻璃球

γ -环氧丙氧基丙基三甲氧基硅烷, 3-氨基丙基三甲氧基硅烷 东京化成公司

1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 Sigma 公司

1.2 合成

1.2.1 树脂 1 的合成 参考 E. S. Hemdan 的方法^[6]。取 15g 充分溶胀并抽滤去水的 Sephadex G-25 凝胶, 悬浮于含 30% 二甲亚砜或乙腈的水溶液中, 与适量 2mol/L NaOH 和氯代环氧丙烷相混合, 终浓度分别为 0.6mol/L NaOH 和 10%(v/v) 的氯代环氧丙烷; 40℃ 水浴保温磁力搅拌反应, 并不断滴入适量氯代环氧丙烷以保持适量环氧丙基浓度; 2h 后停止反应, 于布氏漏斗中充分洗涤至流出液无环氧基为止。

活化的 Sephadex G-25 凝胶于 65℃ 水浴中与等量稀释二倍的氨水相混合, 在不断搅拌下继续滴加适量的氨水溶液, 连续反应 24h, 于布氏漏斗中用水和 10% 乙酸溶液交替洗涤, 直至洗出液中无铵离子存在为止。氨化胶低温保存。

低温条件下, 2.0g 碘乙酸溶于 80ml 碳酸钠水溶液中, 用 2mol/L NaOH 调至所希望的 pH 值, 加入氨化的 G-25 凝胶, 重新调节 pH 值。于 15℃ 水浴中旋转搅拌反应 24h, 反应产物在布氏漏斗中交替用水和 10% 乙酸溶液充分洗涤, 收集洗涤液, 测定游离碘离子的含量, 同时采用酸碱滴定法测定胶内羧基含量, 达 1060 μ mol/gGel, 用铜离子溶液充分浸泡转化为配位交换树脂。

1.2.2 树脂 2 的合成 可通过两种不同的方法进行合成, 分别得到树脂 2A 和 2B。树脂 2A 的合成参照 H. H. Weetall 等人的方法进行^[7]。称取 50g 100—200 目的多孔玻璃加入 50% 硝酸溶液 500ml, 煮沸 45min, 于布氏漏斗中水洗至中性, 175℃ 干燥。取 25g 干燥的多孔玻璃并加入含 10%(v/v) 3-氨基丙基三甲氧基硅烷 100ml, 在 pH 滴定仪监视下, 控制 pH 为 3.5, 75℃ 水浴连续反应 4h 后, 于布氏漏斗中充分水洗至中性, 测定氨基含量为 430 μ mol/gGel。

硅烷基化的多孔玻璃悬浮于 100ml pH5.0 的水中, 加入适量脯氨酸溶液, 室温下分次缓慢加入过量的固体水溶性碳二亚胺, 并不断搅拌, 控制 pH 不小于 4.5。室温反应 4h 后, 将反应系统移至 5℃ 下, 反应物于布氏漏斗中用水充分洗涤, 测定脯氨酸含量达 364 μ mol/gGel, 结合率为 85%。

树脂 2B 的合成是在多孔玻璃表面引入环氧丙基代替氨基。取 25g 硝酸处理后的多孔玻璃悬浮于 150ml 无水甲苯中, 并加入 180 μ l 三乙基胺无水溶液和 30ml γ -环氧丙氧基丙基三甲氧基硅烷, 在通入氮气的条件下, 回流搅拌反应 6h, 产物在布氏漏斗中过滤并依次用无水甲苯、丙酮、乙醚洗涤, 干燥备用。环氧基含量为 462 μ mol/gGel。

取活化的多孔玻璃悬浮于 pH9.0 的磷酸缓冲液中, 加入过量的脯氨酸, 75℃ 反应 12h, 脯氨酸的结合率达 60% 左右, 一般为 265 μ mol/gGel。2A 和 2B 与 0.1mol CuSO₄ 水溶液充

分混合,水洗得到相应的配位树脂。

1.2.3 树脂 3 的合成 将最常用的 732 阳离子交换树脂经酸碱处理后转化为氢型,然后与 0.1mol/L 硝酸铜水溶液充分混合,至铜离子交换饱和为止,用水充分洗涤即可。此树脂易于合成,容量大,但铜离子稳定性较差,只有与改进的流动相相配合才能克服其不足。

1.3 方法

1.3.1 环氧丙基的测定 按照 L.Sundberg 方法^[8]。取 0.5g 树脂,加入 1.5ml 含 1.3mol/L 硫代硫酸钠 pH7.0 的水溶液,搅拌反应 10min 后用标准盐酸溶液滴定,所消耗的盐酸量便为环氧丙基含量。

1.3.2 铜离子浓度的测定 采用碘量法测定。此方法在铜离子过量的条件下可定量测定游离碘离子含量。

1.3.3 游离氨的甲醛滴定 取 0.5g 树脂与 10ml 20% 甲醛溶液充分混合后,以酚酞为指示剂,采用标定的 0.1mol/L NaOH 溶液进行滴定,计算碱的消耗量。

1.3.4 游离氨基酸的浓度测定 采用茚三酮标准曲线法进行氨基酸浓度测定^[9]。

2 结 果

不同种固相载体因表面结构及功能基团组成的不同,需要采用不同种偶联方法进行化学修饰,同时在同一种载体表面因反应剂浓度的差别,pH、离子强度等因素的影响决定了固定配基结合量,而结合量的高低直接决定树脂的容量。

多糖基载体因邻二羟基的存在可通过环氧丙基进行活化,其活化量和碘乙酸的化学修饰受 NaOH 浓度和 pH 等的控制。为提高配基结合量,于 G-25 活化过程中加入 30% 的乙腈或二甲亚砜有机溶液,促进氯代环氧丙烷的水中溶解度;同时改变它的加入方式,通过不断滴加以维持较高浓度。比原方法的活化率提高 33% (图 1)。

由图可见,在不存在有机溶剂的条件下,最适 NaOH 浓度为

0.4mol/L,随着有机溶剂的加入,导致最适浓度的提高,达到 0.6mol/L,同时也促进氯代环氧丙烷最适反应浓度上升至 10% (V/V) (图 2),活化率明显改善。其根本原因是 NaOH 在整个反应过程中起到某种促进和中和的效果,修饰量的提高必然要求 NaOH 加入量的增加,有机溶液促进了氯代环氧丙烷的溶解。

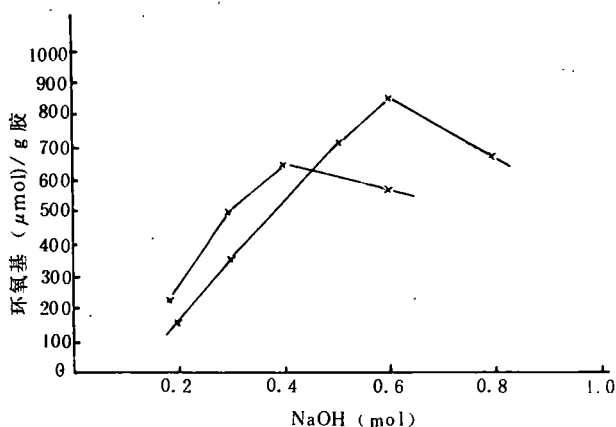


图 1 有机溶剂存在条件下 NaOH 浓度与修饰量的关系

++ 不含有有机溶剂 * * 含有有机溶剂

条件: $T = 40^{\circ}\text{C}$

适量 Sephadex G-25 凝胶悬浮于 30% 的有机水溶液中

2mol/L NaOH 调节碱的终浓度

滴加氯代环氧丙烷至不同百分浓度

轻度搅拌反应 2h 后终止反应

继浓氨水加合反应之后,碘乙酸取代反应在 pH7.0—12.0 范围内都可进行,最佳值在 9.0—9.5 之间。由于采用碘乙酸代替溴乙酸,因而反应性大大提高,反应温度降至 15℃ 左右,按一个环氧基最终结合二个羧甲基计,修饰率达 65% 左右(图 3)。

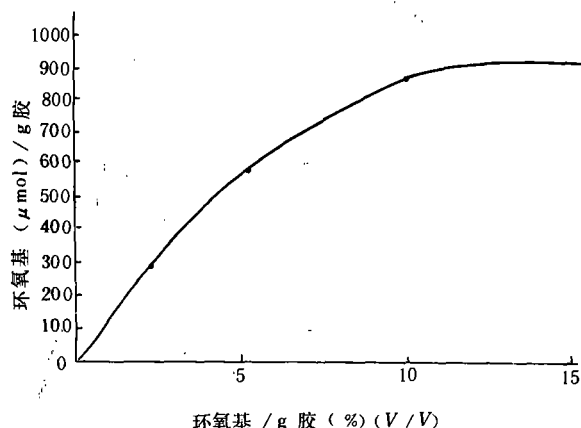


图 2 有机溶剂存在条件下环氧基化条件的改变
条件与图 1 相同

硅烷化多孔玻璃的脯氨酸化由于碳二亚胺和脯氨酸的双重大过量,并且用水溶性碳二亚胺代替传统方法中脂溶性偶联剂,在低温条件下反应,从而保证了较高的脯氨酸偶联率,2A 与 2B 相比较提高 25% 左右。各种合成树脂铜离子载量如表 1 所示,树脂 1 明显高于树脂 2。由于铜离子载量的差别及其表面性质和空间结构的不同,造成 4 种树脂不同的层析特性和

应用价值。

表 1 不同树脂载铜离子量(μmol/g)

类型	1	2A	2B	3
载量	510	180	130	1650

3 讨 论

为满足制备性层析的要求,提高交换容量及其稳定性是合成新树脂的重要指标。实验中通过几种不同的改进方法合成树脂 1 和树脂 2。在树脂 1 的合成过程中,G-25 凝胶的环氧丙基活化是整个反应的关键,它决定了合成材料的单位载量。在以往的实验方法中,主要是通过碱的催化在水溶液中将环氧基偶联到担体表面。由于水溶液中氯代环氧丙烷的溶解度较低,体系形成固-水和水-有机相两个界面层,阻碍了固体表面取代反应的顺利进行。众所周知,同相中的化学反应速度将优于相界面处的反应,界面越多,有效反应浓度将越低,反应速度和强度都会相应减小。加入适量有机溶剂,促使氯代环氧丙烷在水中溶解,因一个界面的去除,大大增强反应物的接触几率,使反应强度提高。因为氯代环氧丙烷浓度的增加,相应地 NaOH 的需要量也有所提高,证明有机溶剂的加入是结合率上升的根本原因,从合成的第一步起便决定了单位载样量将有明显的改观。

环氧丙烷的三元环自身是一个非常活泼的反应基团,受酸或碱的催化而水解,它的稳定性也决定了最终结果。为此,控制氯取代过程的温度是该反应的关键。反应过程中必然发生

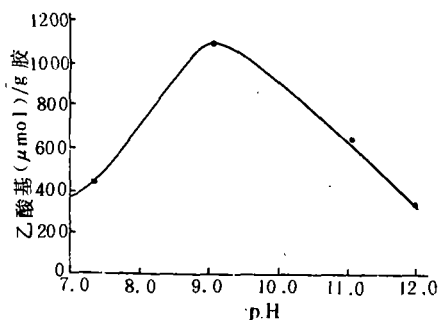
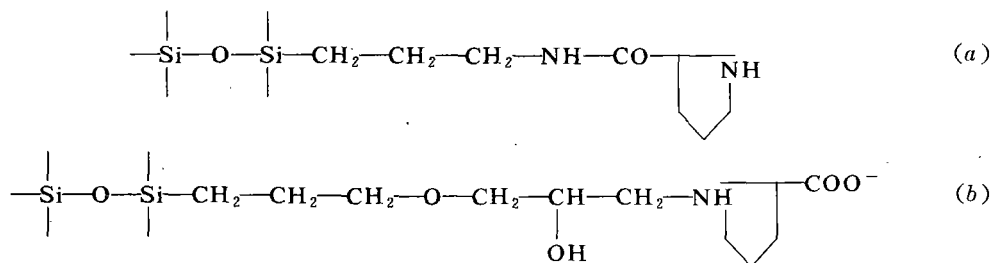


图 3 pH 对碘乙酸取代反应的影响

条件: $T=15\text{ }^{\circ}\text{C}$
旋转搅拌反应 24h
以 2mol/L NaOH 控制反应 pH

环氧基的水解,为减少水解的影响,运用高浓度氨水以阻止水的竞争,提高取代的几率。另一方面应尽可能提高凝胶中环氧丙基的含量,实验中发现活化过程中不断滴入反应剂环氧丙烷,使其保持较高的反应浓度,其结果提高 10% 左右。因为碘代乙酸的反应性远高于溴代乙酸,在碱性条件下反应完全,不会有碘分子产生,并且需要较低的反应温度。由此可以认为环氧丙基 65% 的再修饰率主要产生于它的水解。水解产物为多羧基化合物,对载体主体性质无影响,另由于 G-25 凝胶的相对柔性和羧基对铜离子的高结合性,树脂 1 不但容量提高,稳定性好,并且不引入额外的载体影响。

多孔玻璃球在机械强度和化学稳定性方面有着明显的优势,用作制备性层析担体是很理想的,但柱容量过低。树脂 2 的合成可通过两种相似的方法来完成,脯氨酸残基的羧基和亚氨基是两个非常敏感的结合点。经过碳二亚氨或碱的催化而与载体相连,形成如下两种产物



由结构式可以看出,分子式(b)具有游离羧基,对铜离子应有较强的约束力,但为了双氨基酸配位体配位,要求空间结构有微小的改变,对于刚性担体而言在多数情况下是不易完成的,可导致实际铜离子控制能力的减弱和不均一。分子式(a)具有游离胺基,与铜离子结合后,载体表面明显具有正电性,有利于碱性条件下氨基酸的结合。由于与 Cu^{2+} 结合较弱,铜离子易于脱落是明显的不足。对比两种方法,玻璃的活化依然是提高载量的关键,只有进一步改进方法才能使树脂 2 适合于制备性应用。

通过比较可以看出,树脂 3 合成最简便,铜载量高,但是由于磺酸根对铜离子的约束较弱,易发生离子交换反应,它的应用因而受到限制。树脂 2B 具有游离羧基,表面电性与树脂 1 相似,是树脂 2 的主要代表,在容量方面还需不断提高。树脂 1 因具有明显提高的单位容量和稳定性,所以能满足于制备性层析要求。

参 考 文 献

- 1 Helferich F G. Nature, 1961;189,1001
- 2 Hemmasi B et al. J Chromatogr, 1975;104,367
- 3 Hernandez C M et al. Anal chem, 1972;44,890
- 4 Pehlivan E et al. Analytical Letters, 1988;21,197
- 5 曹宁军. 混合氨基酸的分离和纯化. 博士论文, 1989
- 6 Hemdan E S et al. J Chromatogr, 1985;323,247
- 7 Woatali H H et al. Methods in Enzymology, 1980;59,19
- 8 Sundbery L et al. J Chromatogr, 1974;90,87
- 9 Needleman S B. Protein Sequence Determination, Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York: 1975

Synthesis of Ligand-Exchange Chromatography Resins

Cao Ningjun Lun Shiyi

(Dept. of Fermen. Eng.)

Abstract In order to suffice the needs of the preparative ligand-exchange chromatography of neutral amino acids, three types of ligand-exchange resins loading copper ion with different function groups were synthesized by using Sephadex G-25, porous glass and polystyrenesulfonic acid resin respectively. Because of the adaption of the new synthesis technologies, and the addition of adequate amount of organic solvent, the condition of reactions was improved and the solubility of organic reagents was increased in the aqueous solution, so that the unit column load was increased by 33%. The resins took more better stability and mechanical strength, and so met the demands of preparative chromatography.

key words Ligand-exchange chromatography; Synthesis of resin; Separation of amino acid