



УДК 547.466 : 543.544 + 541.632

ЛИГАНДООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
ЭНАНТИОМЕРОВ АМИНОКИСЛОТ НА ПОЛИСТИРОЛЬНОМ
ДИССИММЕТРИЧЕСКОМ СОРБЕНТЕ С ГРУППИРОВКАМИ
R-1,2-БИС(2'-КАРБОКСИЭТИЛАМИНО)ПРОПАНА

*Ямсков И. А., Березин Б. Б., Тихонов В. Е.,
Даванков В. А.*

*Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР, Москва*

Синтезирован диссимметрический сорбент с тетрафункциональными стационарными лигандами (СЛ) — остатками *R*-1,2-бис(2'-карбоксиэтиламино)пропана на шитом полистирольном каркасе. На сорбенте, заряженном ионами Cu (II) и Ni (II), методом лигандообменной хроматографии изучали энантиоселективные эффекты для энантиомеров аминокислот. Наибольшую энантиоселективность наблюдали в случае никелевых комплексов СЛ для гистидина и фенилаланина, а в случае медных комплексов СЛ — для фенилаланина и пролина. Значения ВЭТТ, в которых оценивали эффективность процесса хроматографии, получили в пределах 10—50 мм.

Лигандообменная хроматография — процесс, в котором взаимодействие разделяемых соединений со стационарной фазой осуществляется путем образования координационных связей с присутствующим в системе ионом металла [1]. Использование диссимметрических комплексообразующих сорбентов позволило методом лигандообменной хроматографии расщепить рацематы ряда amino- и оксикислот [1, 2], а также обнаружить и изучить стереоселективные эффекты в большом числе лабильных смешанных (разнолигандных) комплексов Cu(II) и Ni(II) с энантиомерами аминокислот [1, 3, 4].

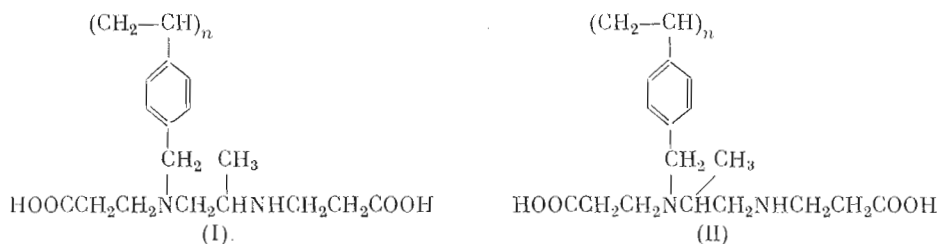
Продолжая работы по исследованию стереоселективных эффектов в смешанных комплексах Cu(II) и Ni(II) с оптически активными полидентатными лигандами и энантиомерами аминокислот, мы синтезировали сорбент с тетрафункциональными группировками — остатками *R*-1,2-бис(2'-карбоксиэтиламино)пропана — и изучили его поведение в процессе лигандообменной хроматографии аминокислот.

Сорбент получали взаимодействием макросетчатого хлорметилированного полистирола с *R*-4-метил-1,8-дициано-3,6-диазооктаном с последующим гидролизом нитрильных групп в HCl. Полноту гидролиза контролировали по исчезновению в ИК-спектре полимера полосы поглощения нитрильной группы при 2250 см⁻¹ и по отсутствию полосы поглощения амидных групп при 1650 см⁻¹. Полученный сорбент имел 5,0% азота, что соответствовало содержанию 1,8 ммоль группировок СЛ на 1 г сорбента. Величины весовой набухаемости синтезированного сорбента

Сокращения: СЛ — стационарный лиганд; ВЭТТ — высота, эквивалентная теоретической тарелке; АК — аминокислота; Мт — ион двухвалентного металла.

(вода — 55%, 0,5 н. HCl — 104%, 0,5 н. NaOH — 100%, метанол — 71%, диоксан — 83%) показали применимость его для хроматографических целей.

Хлорметильные группы сополимера алкилируют *R*-4-метил-1,8-дициано-3,6-диазооктан по одному из атомов азота, имеющих в его молекуле, что приводит к структурам (I) и (II) конечного полимера. Преимущественно образуется, вероятно, продукт алкилирования по стерически менее затрудненной аминогруппе — полимер (I). Известно, что *N,N'*-бис-(β-карбокситил)этилендиамин, координируясь с ионами переходных металлов, с высокой степенью специфичности образует комплексы *сим-цис*-структуры [5]. Это позволило предположить, что при образовании смешанных комплексов хирального лиганда с аминокислотами будут проявляться и энантиоселективные эффекты. Рассмотрение молекулярных моделей показало одинаковый характер координации структур (I) и (II) с ионами Cu(II) и Ni(II), поэтому можно было ожидать их аналогичного поведения в процессах лигандного обмена.



На полученном сорбенте, заряженном Cu(II) и Ni(II), мы изучили стереоселективные эффекты в смешанных комплексах [(*R*-СЛ)Mt (*L*- или *D*-АК)]. Стереоселективный эффект характеризовали разницей в энергиях образования диастереомерных комплексов [(*R*-СЛ)Mt(*L*-АК)] и [(*R*-СЛ)-Mt(*D*-АК)]: $\Delta G = -RT \ln \alpha$, рассчитываемой из отношений объемов удерживания *L*- и *D*-изомеров АК — α , которые пропорциональны термодинамическим константам K_L и K_D образования в фазе смолы соответствующих диастереомерных сорбционных комплексов: $\alpha = K_L/K_D = V_L/V_D$.

Экспериментальные данные, приведенные в таблице, показывают, что стереоселективные эффекты в разнолигандных медных комплексах *R*-СЛ с лейцином, валином и аланином падают с уменьшением объема удерживания АК, который коррелирует в данном ряду с размером алкильного заместителя у α-углеродного атома: ΔG 190, 120, 80 кал/моль соответственно. Необходимо также отметить, что для валина и аланина большую прочность имеют комплексы [(*R*-СЛ)Cu(*L*-АК)], тогда как в случае лейцина прочнее комплекс [(*R*-СЛ)Cu(*D*-Leu)]. Для энантиомеров треонина, имеющих малый удерживаемый объем, в медных комплексах величина ΔG незначительна и составляет 50 кал/моль, а для комплексов [(*R*-СЛ)-Cu(Met)] стереоселективность составляет 110 кал/моль. Гетероциклическая аминокислота — пролин в медных комплексах с СЛ показывает значительно больший стереоселективный эффект (210 кал/моль), причем более прочен комплекс [(*R*-СЛ)Cu(*L*-PrO)]; *L*-гистидин также дает более прочный комплекс при величине ΔG 130 кал/моль. Наибольший стереоселективный эффект для сорбционных медных комплексов мы наблюдали в случае энантиомеров фенилаланина — 350 кал/моль. Следует отметить, что *L*- и *D*-фенилаланины характеризуются значительными удерживаемыми объемами.

В октаэдрических комплексах Ni(II) стереоселективные эффекты для смешанных комплексов *R*-СЛ и аминокислот, имеющих α-алкильные заместители, меньше, чем для соответствующих медных комплексов.

Результаты лигандообменной хроматографии *L*- и *D*-энантимеров аминокислот

АК	Мг	V_L	V_D	α	ΔG_{298} , кал/моль	Элюент	ВЭТТ, мм	
							<i>L</i> -АК	<i>D</i> -АК
Пролин	Cu ²⁺	18,1	12,6	1,4	210	0,1 н. NH ₃	9,8	9,3
	Ni ²⁺	11,5	9,3	1,25	130	0,05 н. NH ₃	32,7	32,2
Валин	Cu ²⁺	14,9	12,2	1,22	120	0,1 н. NH ₃	15,5	15,1
	Ni ²⁺	12,8	14,2	0,89	70	0,05 н. NH ₃	15,2	15,6
Аланин	Cu ²⁺	10,6	9,2	1,15	80	0,1 н. NH ₃	13,5	10,9
	Ni ²⁺	13,1	11,7	1,11	60	0,05 н. NH ₃	14,6	14,8
Лейцин	Cu ²⁺	26,4	36,8	0,72	190	0,1 н. NH ₃	18,1	18,3
	Ni ²⁺	21,9	28,9	0,76	160	0,05 н. NH ₃	19,0	23,8
Треонин	Cu ²⁺	5,3	5,8	0,92	70	0,1 н. NH ₃	17,9	18,1
	Ni ²⁺	12,5	17,3	0,73	180	H ₂ O	15,4	16,0
Фенилаланин	Cu ²⁺	28,8	52,5	0,55	350	0,1 н. NH ₃	11,3	12,2
	Ni ²⁺	40,0	25,1	1,59	270	0,05 н. NH ₃	15,4	14,5
Гистидин	Cu ²⁺	9,2	7,4	1,25	130	0,1 н. NH ₃	39,6	39,3
	Ni ²⁺	4,9	12,2	0,39	560	H ₂ O	42,1	51,3
Метионин	Cu ²⁺	9,6	11,6	0,83	160	0,1 н. NH ₃	14,9	15,1
	Ni ²⁺	16,8	19,2	0,88	70	0,05 н. NH ₃	14,1	14,8

Примечание. V_L и V_D — безразмерные отношения V_L/V_0 и V_D/V_0 , где V_0 — свободный объем колонки.

В ряду лейцина, валина и аланина энантиоселективный эффект по абсолютной величине также падает (ΔG 160, 70 и 60 кал/моль соответственно), причем по знаку эффекты для валина и лейцина оказываются противоположными энантиоселективному эффекту аланина. В то же время для треонина и гистидина характерна значительно большая энантиоселективность в никелевых смешанных комплексах с СЛ по сравнению с соответствующими медными комплексами (ΔG 180 и 560 кал/моль соответственно). Для фенилаланина энантиоселективный эффект в никелевых комплексах сопоставим с эффектом в медных комплексах (ΔG 270 кал/моль). Интересно, что при переходе от медных комплексов к никелевым знак энантиоселективного эффекта в случае валина, фенилаланина и гистидина меняется на противоположный.

Эффективность процесса хроматографии аминокислот оценивали по величинам ВЭТТ. Число тарелок N рассчитывали по формуле

$$N = 8 (V/\delta V)^2,$$

где V — объем удерживания, δV — ширина пика на высоте h/e [6].

Для большинства изученных аминокислот ВЭТТ составляют величины 1—2 см, что свидетельствует о низкой эффективности хроматографического процесса. По-видимому, это можно объяснить небольшой величиной набухания сорбента, заряженного ионами металла (в случае Cu²⁺ набухаемость в 0,05 н. NH₃ — 52 вес.%, в случае Ni²⁺ — 60 вес.%). Незначительность набухания сорбента существенно уменьшает скорость массопередачи и приводит к размыванию хроматографических зон.

Хроматографический лигандообменный процесс протекает в общем с одинаковой эффективностью при использовании как медной, так и никелевой формы сорбента. Исключением является низкая эффективность процесса хроматографии пролина на сорбенте, заряженном ионами Ni²⁺ (ВЭТТ больше 3 см). Для гистидина высокая селективность хроматографического процесса сочетается с низкой эффективностью (ВЭТТ порядка 4—5 см).

Экспериментальная часть

R-1,2-пропилендиамин получали по методике [7]. Выход 50%. Оптическая чистота 95,0%.

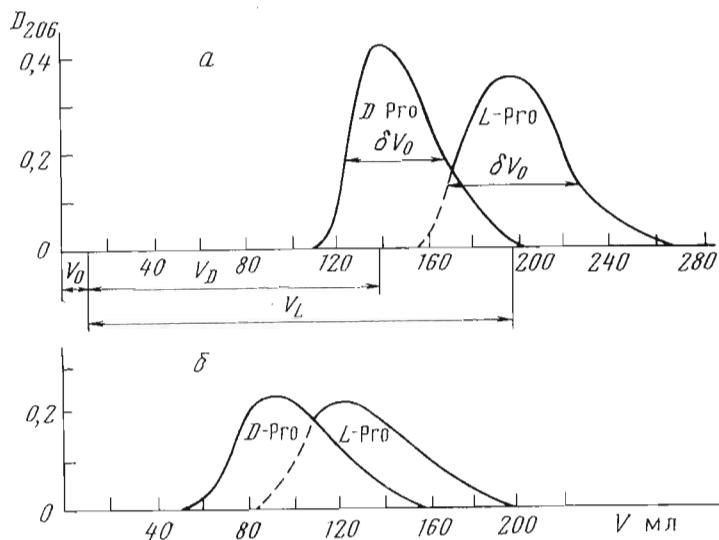
R-4-метил-1,8-дициано-3,6-диазооктан получали по методике [8]. Выход 54%, т. кип. 195—198°/4 мм.

Синтез сорбента. Смесь 11 г хлорметилированного сополимера (содержание хлора 22%, 7 мол.% сшивающего агента — *n,n'*-ксилилендихлорида), 20 г (0,11 моль) *R-4-метил-1,8-дициано-3,6-диазооктана*, 3,2 г (0,019 моль) KI и 13 г (0,15 моль) NaHCO_3 суспендировали в смеси диоксана (120 мл) и метанола (20 мл) и нагревали 50 ч при 60°. Полимер промывали водой и метанолом. Содержание азота в продукте 9,97%. Для гидролиза нитрильных групп полимер кипятили 20 ч в 75 мл 6 н. HCl. Содержание азота после гидролиза — 5,0%, аналитическая емкость сорбента — 1,8 ммоль СЛ/г.

Набухаемость сорбента определяли весовым методом [9].

Лигандообменную хроматографию проводили на колонках размером 1×20 см; объем колонки, заполненной сорбентом, 17 см³, что соответствует 6—7 г сухого сорбента. Объемная скорость элюирования 10 мл/ч. Сорбент заряжали ионами Cu^{2+} , выдерживая его 3 ч в 0,02 М растворе $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 0,5 н. NH_3 . Ионами Ni^{2+} сорбент заряжали 3 ч из 0,015 М раствора $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 0,5 н. NH_3 . Количество металла, связанного с ионитом, определяли комплексометрическим титрованием с комплексоном III в присутствии мурексида по методу [10]; отношение стационарный лиганд : металл для Cu^{2+} составило 2 : 1, для Ni^{2+} — 1,5 : 1. Хроматографию проводили, вводя в колонку поочередно растворы *L*- и *D*-изомеров аминокислот (~2 мг). В качестве элюента использовали 0,1 н. NH_3 , содержащий $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ для компенсации вымываемой меди, 0,05 н. NH_3 , содержащий $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ или H_2O . Оптическую плотность фракций измеряли при 206 нм на спектрофотометре «Спектропом-204» (ВНР). При хроматографии метионина, гистидина и треонина на сорбенте в медной форме и гистидина на сорбенте в Ni^{2+} -форме отбор фракций проводили через 15 мин, во всех остальных случаях — через 50 мин.

Типичные кривые элюирования приведены на рисунке.



Кривые элюирования энантимеров пролина: *a* — на сорбенте в медной форме; элюент 0,1 н. NH_3 ; *б* — на сорбенте в никелевой форме; элюент 0,05 н. NH_3

Отсутствие синего окрашивания фракций при хроматографии алифатических аминокислот свидетельствует о достаточно большой прочности связывания Cu(II) и Ni(II) с СЛ, существенное снятие металла наблюдали только в случае гистидина и треонина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Даванков В. А., Рогожин С. В., Семечкин А. В. (1973) Итоги науки и техники, серия «Химия и технология высокомолекулярных соединений» (Сладков А. М., ред.), т. 4, с. 5—44, М.
2. Davankov V. A., Rogozhin S. V., Semetchkin A. V., Baranov V. A., Sannikova G. S. (1974) *J. Chromatogr.*, **93**, 363—367.
3. Davankov V. A., Rogozhin S. V. (1974) *J. Chromatogr.*, **60**, 280—283.
4. Ямсков И. А., Рогожин С. В., Даванков В. А. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 200—205.
5. Murakami T., Hirako I., Hatanomi I. (1971) *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **50**, 164—168.
6. Тремийон Б. (1967) Хроматография на ионообменных смолах, с. 251, «Мир», М.
7. Dwyer F., Garvan E., Shulman A. (1959) *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 290—294.
8. DeHayes J., Busch D. (1973) *Inorg. Chem.*, **12**, 2010—2015.
9. Рогожин С. В., Даванков В. А., Вырбанов С. Г., Коршак В. В. (1968) *Высокомоле. соед.*, **10A**, 1277—1282.
10. Шварценбах Г. (1968) *Комплексометрия*, с. 107, Госхимиздат, М.

Поступила в редакцию
25.V.1977

LIGAND-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY OF AMINO ACID ENANTIOMERS ON POLYSTERENE ASYMMETRIC SORBENT WITH *R*-1,2-BIS(2'-CARBOXYETHYLAMINO)PROPANE GROUPINGS

YAMSKOV I. A., BEREZIN B. B., TIKHONOV V. E., DAVANKOV V. A.

*Institute of Organo-Element Compounds,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The asymmetric sorbent has been prepared which bears *R*-1,2-bis(2'-carboxyethylamino)propane tetrafunctional groupings in the cross-linked polystyrene matrix. It has been used in ligand-exchange chromatography of amino acid enantiomers in the presence of Cu(II) and Ni(II) ions. The highest enantioselectivity was observed for the complexes of Ni(II) ions of the fixed ligand with His and Phe, and for the complexes of Cu(II) ions of the fixed ligand with Phe and Pro. The efficiency of the ligand-exchange chromatography of amino acid enantiomers was characterized by values of the height of equivalent theoretical plate, which ranged from 10 to 50 mm.