



УДК 547.466 : 543.544 + 541.632

ЛИГАНДОБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ РАЦЕМАТОВ

VIII *. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ РАЦЕМАТОВ АМИНОКИСЛОТ
НА ПОЛИСТИРОЛЬНОЙ СМОЛЕ С ГРУППИРОВКАМИ *L*-ОКСИПРОЛИНА
С ЦЕЛЬЮ АНАЛИЗА ЭНАНТИОМЕРНОГО СОСТАВА АМИНОКИСЛОТ*Даванков В. А., Золотарев Ю. А., Тевлин А. В.**Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР, Москва*

Для разделения энантиомеров аминокислот была использована полистирольная макросетчатая смола с фиксированными *L*-оксипролиновыми лигандами, заряженная ионами меди (II). Метод лигандообменной хроматографии позволяет полностью разделять энантиомеры большинства аминокислот за время, соизмеримое с длительностью энантиомерного анализа аминокислот методом ГЖХ, но в отличие от последнего не требует предварительной химической модификации аминокислот.

Лигандообменная хроматография (ЛЮХ), как следует из недавно появившегося обзора [2], — эффективный метод разделения веществ, имеющих чрезвычайно близкую молекулярную структуру, включая геометрические и оптические изомеры. Сорбенты, содержащие остатки *L*-пролина, *L*-оксипролина, *L*-аллооксипролина и *L*-азетидинкарбоновой кислоты, обладают энантиоселективностью $\delta\Delta G$ (различие в энергии сорбции) порядка 250—1000 кал/моль по отношению к оптическим изомерам многих аминокислот [1, 3, 4]. При оценке этих величин следует иметь в виду, что современная хроматография позволяет достигать успеха в разделении компонентов, различие в энергиях сорбции которых ($\delta\Delta G$) составляет всего ~ 10 кал/моль. Для разделений в препаративном масштабе желательнее, чтобы эта величина была не ниже 250 кал/моль.

Как было отмечено в ранних публикациях [5, 6], чрезвычайно высокая энантиоселективность сорбции рацематов диссимметрическими сорбентами, к сожалению, сочеталась с невысокой эффективностью хроматографического лигандообменного процесса. При проведении хроматографии в течение десятков часов наблюдалось лишь частичное расщепление большинства рацематов. Так, при хроматографии *L*, *D*-тирозина на *L*-пролиновой смоле в Cu(II) -форме при энантиоселективности 440 кал/моль достигалось лишь 8—10%-ное разделение энантиомеров [7]. В работах [5, 6] обсуждались возможные причины снижения скорости установления межфазных равновесий в лигандообменных процессах на сорбентах со стационарными лигандами аминокислотного типа.

Из проведенных нами кинетических исследований лигандообменной сорбции аминокислот на диссимметрических сорбентах следует, что про-

* Сообщение VII см. [1].

Свойства сорбентов, содержащих фиксированные группировки *L*-оксипролина

Сорбент	Степень сшивки, %	Емкость, мг-экв/г	Набухаемость, %	Размер частиц, мкм	ВЭЭТ, мм	
					<i>L</i> -Val	<i>L</i> -Pro
1	11	1,48	80	100	15	20
2	6	3,86	250	50	1	1,4

цесс контролируется внутридиффузной кинетикой. Такой вывод означает, что эффективность ЛОХ может быть повышена улучшением условий массопередачи.

Для выяснения влияния свойств сорбента на кинетику сорбции и эффективность хроматографии рацематов аминокислот синтезирован ряд полистирольных сорбентов с фиксированными группировками *L*-оксипроли-

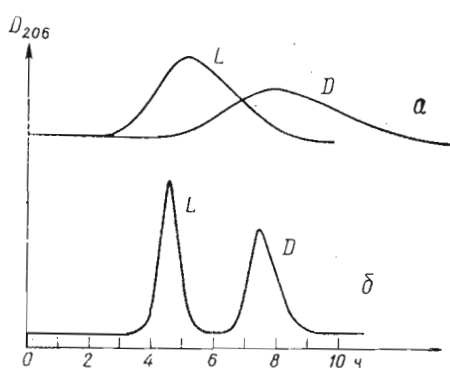


Рис. 1. Хроматография энантиомеров валина на диссимметрических сорбентах 1 (а) и 2 (б), содержащих фиксированные группировки *L*-оксипролина. Колонка (здесь и далее) $7,8 \times 140$ мм, 0,1 М NH_4OH , 10 мл/ч

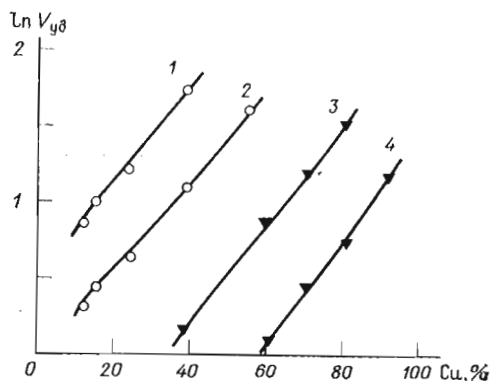


Рис. 2. Зависимость удерживания энантиомеров триптофана и пролина при элюировании от степени зарядки оксипролинового сорбента 2 ионами Cu(II) : 1 — *D*-Trp, 2 — *L*-Trp, 3 — *D*-Pro, 4 — *L*-Pro

на, различающихся степенью сшивки, набухаемостью, обменной емкостью, размером и формой частиц. Свойства двух сорбентов, имеющих частицы неправильной формы и сильно различающихся по эффективности ЛОХ, приведены в таблице. Увеличение дисперсности, емкости и набухаемости сорбента более чем на порядок уменьшает величины ВЭЭТ* в процессе хроматографии *L*-Val и *L*-Pro. Влияние эффективности процесса ЛОХ на результаты разделения энантиомеров видно из сравнения хроматографии *L*, *D*-Val на тех же сорбентах 1 и 2 (рис. 1).

Целью данной работы было добиться полного разделения рацематов аминокислот, по отношению к которым оксипролиновый сорбент обладает высокой энантиоселективностью ($\delta\Delta G > 200$ кал/моль), за время ~ 1 ч, что позволило бы создать быстрый метод анализа энантиомерного состава этих аминокислот. При этом данные по термодинамике сорбции аминокислот на сорбенте с фиксированными лигандами *L*-оксипролина взяты из опубликованной ранее работы [3].

Для сокращения времени хроматографии наряду с повышением эффективности процесса необходимо решить вопрос об оптимальной степени зарядки сорбента ионами металла. Степень зарядки диссимметрического сорбента ионами меди(II) значительно влияет на параметры удерживания аминокислот. Уменьшение степени зарядки смолы, как показано на примере хроматографии рацематов Trp и Pro (рис. 2), вызывает резкое сниже-

* Высота, эквивалентная эффективной тарелке [8].

ние средства сорбентов к аминокислоте и уменьшение удерживаемых объемов.

Рядом авторов отмечалось, что сорбция металла хелатирующими сорбентами протекает послойно [9, 10]. Поэтому для достижения равномерной зарядки по всему объему гранулы сорбента ограниченным количеством ионов металла мы использовали то обстоятельство, что с ростом ионной силы внешнего раствора наблюдается снижение комплексообразующих свойств сорбентов аминокислотного типа [11]. На рис. 3 приведена зависимость количества сорбируемых *L*-оксипролиновой смолой 2 (таблица) ионов Cu(II) от ионной силы равновесного аммиачного раствора (см. «Экс-

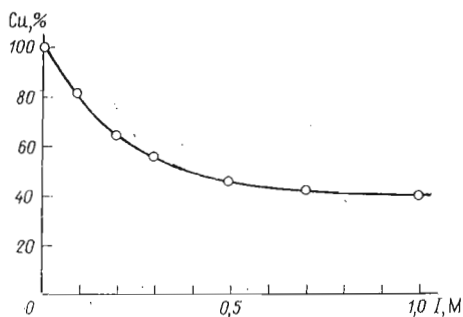


Рис. 3. Зависимость поглощения ионов Cu(II) сорбентом 2 с *L*-оксипролиновыми группировками от ионной силы равновесного 2 н. NH_4OH , содержащего KCl (см. «Эксперим. часть»)

перим. часть»). Приведенная зависимость удобна при подборе ионной силы аммиачного раствора, требуемой для достижения желаемой степени зарядки.

Для решения задачи хроматографического энантиомерного анализа аминокислот использовали *L*-оксипролиновую смолу 2 (таблица), позволяющую достичь высокой эффективности процесса. С целью сокращения времени проведения хроматографии использовали сорбент, заряженный ионами меди (II) до такой степени, чтобы удерживаемый объем первого энантиомера был близок к 1,5—2 свободным объемам колонки.

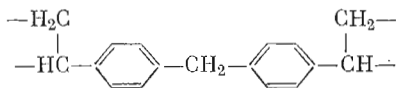
Хроматография рацематов алифатических, гетероциклических и ароматических аминокислот показана на рис. 4. Для Val, Nva, Leu, Nle, Ile, Thr, Pro, Нур, аНур, Phgl, Phe, Тур, Ser(Ph), Trp, His полное деление изомеров на данном сорбенте достигается за 1—2 ч. При дальнейшем повышении эффективности ЛОХ, по-видимому, удастся достичь полного деления ряда других аминокислот, обладающих меньшими величинами $\delta\Delta G$ на данном сорбенте, а также значительно сократить время анализа. Для разделения рацематов аминокислот, по отношению к которым оксипролиновая смола имеет недостаточную энантиоселективность [3], вероятно, могут быть использованы другие асимметрические сорбенты, проявляющие к ним большую энантиоселективность [1, 4].

При количественной оценке разделения двух энантиомеров точность энантиомерного анализа аминокислот определяется точностью измерения площадей двух пиков. Оценка точности анализа может быть проведена измерением соотношения площадей пиков двух энантиомеров в рацемате.

Экспериментальная часть

Асимметрические сорбенты, содержащие фиксированные лиганды *L*-оксипролина, получали аминированием хлорметилированных макросетчатых полистирольных каркасов солянокислым метил-*L*-оксипролинатом по методике [12], описанной для солянокислого метил-*L*-пролината.

Для синтеза сорбента 1 использовался каркас [12], содержащий 11 мол. % шшивок следующей структуры:



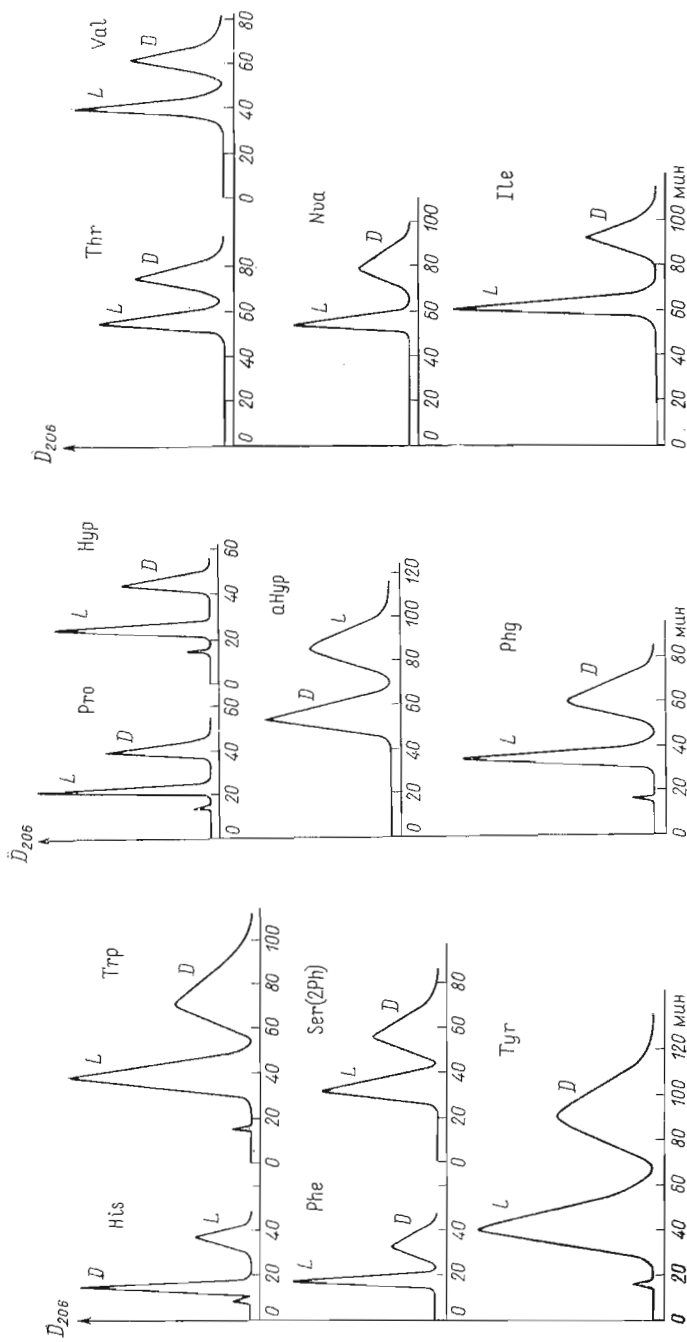


Рис. 4. Хроматография рацематов аминокислот на *L*-оксипропиновой смоле 2 в *Cu(II)*-форме. Для каждого опыта в скобках приведены степень зарядки, NH_4OH , M ; скорость элюции, мл/ч : His (30; 0,5; 25), Trp (30; 0,4; 20), Phe (45; 0,1; 20), Ser(2Ph) (45; 0,5; 14), Tyr (65; 0,1; 16), Pro (65; 1; 20), Hyp (65; 0,5; 20), αHyp (55; 0,05; 20), Png (65; 0,1; 13), Thr (30; 0,05; 20), Val (65; 0,1; 13), Nva (65; 0,1; 13). [Ser(2Ph) и Png — соответственно фенилсерин и фенилглицин]

Для синтеза сорбента 2 использовался полистирольный каркас, содержащий 0,5% дивинилбензола и 5% дополнительных сшивок того же типа, что для сорбента 1. Сорбенты подвергнуты дроблению и фракционированию на ситах.

Определение зависимости комплексобразующих свойств сорбента от ионной силы раствора проводили в статических условиях. Воздушно-сухой сорбент (0,300 г) помещали в специальные сосуды с пористым фильтром объемом 15 мл [12], промывали 2—3-кратным избытком раствора тетрааммиаката меди (II) и 20—30 мл 0,1 н. раствора NH_4OH . Степень зарядки смолы ионами меди достигала 100% и соответствовала образованию комплексов состава 2 : 1 между фиксированными лигандами и ионами Cu(II) . После удаления избытка водной фазы сорбент приводился в равновесие с 10 мл 2 н. NH_4OH , содержащего различное количество KCl . Время установления межфазного равновесия 10 мин, по истечении которых фазы разделяли центрифугированием. Медь (II) затем десорбировалась для количественного определения промывкой смолы в том же сосуде-колонке 25 мл 5 н. HCl . Медь определяли в обеих фазах спектроколориметрически с N,N -диэтил-дитиокарбаминатом натрия на спектроколориметре «Spesol» при λ 440 нм [12].

Для зарядки сорбента, используемого для проведения хроматографического процесса, до желаемого содержания меди 3 г воздушно-сухого сорбента приводили сначала во взаимодействие с избытком тетрааммиаката меди (II), а потом со 100 мл 2 н. раствора NH_4OH , содержащего определенное из рис. 3 количество KCl . После разделения фаз сорбент промывали на фильтре 0,1 н. NH_4OH .

Методика хроматографического эксперимента. Смолу, содержащую Cu(II) , суспендировали в 0,1 н. NH_4OH и переносили в колонку (7,8 × × 140 мм), которую промывали 1 ч 0,1 н. NH_4OH со скоростью 100 мл/ч. Пробы аминокислот в количестве 0,1—1 мг вводили микрошприцем в слой сорбента и элюировали 0,1—1,0 н. NH_4OH со скоростью 10—25 мл/ч. Детектор «Uvicord III» со светофильтром 206 нм регистрирует аминокислоты в элюате. Так же может быть использован «Uvicord I» или РЭПС-1 (с удаленным светофильтром), которые регистрируют элюируемый медный комплекс аминокислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davankov V. A., Zolotarev Yu. A. (1978) J. Chromatogr., in press.
2. Davankov V. A., Semechkin A. V. (1977) J. Chromatogr., 141, 313—353.
3. Davankov V. A., Zolotarev Yu. A. (1978) J. Chromatogr., in press.
4. Davankov V. A., Zolotarev Yu. A. (1978) J. Chromatogr., in press.
5. Davankov V. A., Rogozhin S. V., Semechkin A. V., Baranov V. A., Sannikova G. S. (1974) J. Chromatogr., 93, 363—367.
6. Semechkin A. V., Rogozhin S. V., Davankov V. A. (1977) J. Chromatogr., 131, 65—72.
7. Семечкин А. В. (1975) канд. дис. «Некоторые закономерности лигандообменной хроматографии рацематов», М.
8. Третьяков Б. (1967) Разделение на ионообменных смолах, с. 251, «Мир», М.
9. Чувелева Э. А., Назаров П. П., Чмутов К. В. (1972) Ж. физ. химии, 46, 2865—2869.
10. Махазель М. Ю., Мелешко Л. П. (1976) Теория и практика сорбционных процессов, вып. 11, с. 10, Воронеж.
11. Zolotarev Yu. A., Kurganov A. A., Semechkin A. V., Davankov V. A. (1978) Talanta, in press.
12. Zolotarev Yu. A., Kurganov A. A., Davankov V. A. (1978) Talanta, in press.

Поступила в редакцию
10.1.1978

LIGAND-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY OF RACEMATES.
VIII. QUANTITATIVE RESOLUTION OF RACEMIC AMINO ACIDS ON A
L-HYDROXYPROLINE CONTAINING POLYSTYRENE RESIN FOR
ANALYSIS OF AMINO ACID ENANTIOMERIC COMPOSITION

DAVANKOV V. A., ZOLOTAREV Yu. A., TEVLIN A. B.

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

For chromatographic separation of the amino acid enantiomers, use was made of a polystyrene macronet-type resin containing as fixed ligands *L*-hydroxyproline groupings in the form of their Cu(II) complexes. The ligand-exchange chromatography permits the complete resolution of many racemic amino acids in 1-2 hours and as compared with the GLC analysis of the enantiomeric composition, has an advantage of requiring no preliminary modification of the amino acids.
