



УДК 547.466.05 + 543.51.8

ЛИГАНДОБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
ЭНАНТИОМЕРОВ АМИНОКИСЛОТ
НА ДИССИММЕТРИЧЕСКИХ СОРБЕНТАХ С ГРУППИРОВКАМИ
ФЕНИЛАЛАНИНА

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

*Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР, Москва*

Синтезированы два типа диссимметрических сорбентов с группировками фенилаланина в сшитой полистирольной матрице. Сорбенты, заряженные ионами Cu(II) и Ni(II) , использовались для лигандообменной хроматографии энантиомеров аминокислот. Наибольшие энантиоселективные эффекты (ΔG 300—350 кал/моль) найдены в медных комплексах стационарных лигандов с фенилаланином и в никелевых комплексах с гистидином. Эффективность процесса хроматографии энантиомеров аминокислот, охарактеризованная значениями высоты эквивалентной эффективной тарелки, изменялась в пределах 4—50 мм.

Лигандообменная хроматография (см. обзор [1]) на диссимметрических сорбентах позволяет добиваться разделения оптических изомеров различных соединений, и в первую очередь α -аминокислот (АК) [1—4].

Предыдущие работы по хроматографии энантиомеров аминокислот на сорбентах с хиральными стационарными лигандами различного строения [3, 4] показали наличие значительных энантиоселективных эффектов в образовании сорбционных медных и никелевых комплексов с энантиомерами фенилаланина. Поэтому нам казалось интересным синтезировать и исследовать диссимметрический сорбент, содержащий в качестве стационарных лигандов хиральные группировки фенилаланина.

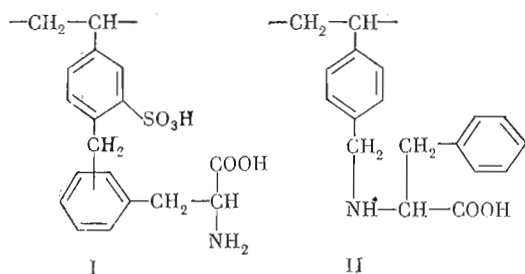
В данной работе описывается синтез таких сорбентов и лигандообменная хроматография энантиомеров аминокислот на этих сорбентах, заряженных ионами меди и никеля.

Было синтезировано два сорбента. В одном из них *D*-фенилаланин связан с полистирольной матрицей через ароматическое ядро аминокислоты, во втором *L*-энантиомер связан с полимером через α -аминогруппу.

Сорбент I получали хлорметилированием *D*-фенилаланина с помощью монохлордиметилового эфира в среде нитробензола в присутствии катализатора SnCl_4 , после чего к системе добавляли сшитый сополимер стирола, который взаимодействовал по реакции Фриделя — Крафтса с хлорметильными группами аминокислоты. Полученный сорбент содержал 1,1 ммоль остатков *D*-Phe на 1 г сухого полимера. Для подтверждения структуры сорбента I была использована реакция аминогрупп сорбента с азотистой кислотой с последующим гидролитическим разложением полученного продукта. Отсутствие в конечном полимере азота (по данным элементного ана-

лиза) подтверждало, что сорбент содержит только первичные аминогруппы. Низкая набухаемость сорбента в водных средах ($\sim 16\%$ в воде) не позволила непосредственно использовать его для лигандообменной хроматографии. Набухаемость была повышена введением некоторого количества сульфатных групп (1,3 ммоль на 1 г) в ароматические ядра полимера. Сульфатирование проводили хлорсульфоновой кислотой в дихлорэтаноле. Величины весовой набухаемости полученного ионита I составляют (%): в воде — 95; 0,5 н. HCl — 100; 0,5 н. NaOH — 110; метаноле — 50; диоксане — 70.

Сорбент II получали взаимодействием аминогрупп метилового эфира *L*-фенилаланина с хлорметилированным сшитым сополимером стирола. Следующий за реакцией аминирования щелочной гидролиз эфирных групп привел к сорбенту аналитической емкости 2,1 ммоль остатков *L*-Phe на 1 г сухого продукта. Величины весовой набухаемости ионита II (%): в воде — 51; 0,5 н. HCl — 53; 0,5 н. NaOH — 59; метаноле — 30; диоксане — 35.



На сорбентах, заряженных ионами Cu(II) и Ni(II), методом лигандообменной хроматографии изучали энантиоселективные эффекты в сорбционных комплексах, образуемых фиксированными остатками фенилаланина с энантиомерами различных аминокислот. Параметры удерживания энантиомеров аминокислот на колонках с сорбентами I и II приведены в таблице. Величины энантиоселективности оценивались из отношения объемов удерживания каждой пары энантиомеров $-\delta\Delta G^\circ$ [4]. Эффективность процесса хроматографии характеризовали высотой эквивалентной эффективной тарелки (ВЭЭТ) [5]. Хроматография энантиомеров α -алкилзамещенных аминокислот показала, что энантиоселективные эффекты падают в ряду «лейцин, валин, аланин», причем они выше по абсолютной величине для сорбента структуры I. Как правило, большую прочность имеют комплексы с противоположной конфигурацией лигандов [(*D*-Phe)Mt(*L*-Alk)] и [(*L*-Phe)Mt(*D*-Alk)]. Однако для лейцина и пролина соотношение стабильности сорбционных комплексов на сорбенте I оказывается обращенным: большей прочностью обладают комплексы [(*D*-Phe)Mt(*D*-Leu)] и [(*D*-Phe)Mt(*D*-Pro)].

Для оксиаминокислот треонина и серина энантиоселективные эффекты достигают величины 160—220 кал/моль, и большей прочностью обладают комплексы [(*D*-Phe)Cu(*D*-Thr)], [(*D*-Phe)Cu(*L*-Ser)] для ионита I и [(*L*-Phe)Cu(*D*-Thr)] и [(*L*-Phe)Cu(*L*-Ser)] для ионита II.

Брукс и Петтит [6], изучая смешанные комплексы [(*L*-Phe)Mt(*L*- или *D*-His)] в растворе методом потенциометрического титрования, обнаружили значительный энантиоселективный эффект в медных комплексах, причем большей прочностью ($\delta\Delta G$ 270 кал/моль) обладал комплекс с противоположными конфигурациями лигандов [(*L*-Phe)Cu(*D*-His)]; в никелевых комплексах энантиоселективность не была найдена. Лигандообменная хроматография энантиомеров гистидина на исследуемых сорбентах показала энантиоселективность и в медных, и в никелевых комплексах, причем в последнем случае энантиоселективный эффект оказался более высоким ($\delta\Delta G$ 190 и 290 кал/моль для никелевых комплексов и 140 и 240 кал/моль для медных комплексов сорбентов I и II соответственно). Эти результаты отличаются от данных Брукса и Петтита еще и тем, что, за исключением

Параметры удерживания энантиомеров аминокислот при хроматографии на сорбентах I (*D*-Phe) и II (*L*-Phe)

Аминокислота	Сорбент	Металл	V_L^*	V_D^*	$\alpha_{L/D}^{**}$	ВЭЭТ, мм		ΔG° , кал/моль	Элюент [NH ₃], М
						L	D		
Pro	I	Cu	9,77	12,9	0,76	6,3	6,5	160	0,05
		Ni	4,94	5,94	0,83	9,5	9,7	110	0,05
	II	Cu	4,46	7,71	0,58	12	16	320	0,1
		Ni	6,15	7,56	0,81	22	24	120	0,05
Ala	I	Cu	3,55	3,05	1,16	8,8	8,7	90	0,05
	II	Cu	1,87	2,09	0,89	23	24	70	0,1
Val	I	Cu	12,7	9,09	1,40	3,6	3,6	200	0,05
		Ni	5,91	5,29	1,12	11	10	50	0,05
	II	Cu	4,56	5,43	0,84	25	25	100	0,1
		Ni	4,91	5,21	0,94	35	36	50	0,05
Leu	I	Cu	22,9	34,6	0,66	9,6	9,6	240	0,05
		Ni	13,9	15,4	0,90	11	12	60	0,05
	II	Cu	12,7	16,7	0,76	24	25	160	0,1
		Ni	17,3	19,2	0,90	41	44	60	0,05
His	I	Cu	5,20	6,60	0,79	10	10	140	0,05
		Ni	16,2	22,4	0,72	16	17	190	0,05
	II	Cu	27,6	18,4	1,50	30	34	240	0,1
		Ni	1,18	1,93	0,61	33	37	290	pH 6 ***
Phe	I	Cu	22,1	31,4	0,70	12	13	200	0,05
		Ni	20,2	25,4	0,80	17	18	130	0,05
	II	Cu	16,5	30,1	0,55	36	37	350	0,1
		Ni	4,57	7,05	0,65	51	53	250	pH 6 ***
Met	I	Cu	13,5	22,7	0,59	12	13	310	0,05
	II	Cu	10,0	8,88	1,13	25	24	70	0,1
Thr	I	Cu	2,66	3,47	0,77	15	15	160	0,05
	II	Cu	1,77	2,39	0,74	38	39	180	0,1
Ser	I	Cu	3,22	2,20	1,46	15	15	220	0,05
	II	Cu	1,59	1,17	1,36	25	24	180	0,1

* V_L и V_D приведены в относительных единицах объема V_L/V_0 и V_D/V_0 , где V_0 — свободный объем колонки.

** $\alpha_{L/D} = V_L/V_D$ [4].

*** 1 М ацетатный буфер.

структуры [(*L*-Phe)Ni (*D*-His)], более прочными оказываются комплексы с двумя лигандами, относящимися к одному и тому же конфигурационному ряду. Вполне вероятно, что причиной такого различия в энантиоселективности являются заместители бензильного типа по аминогруппе или в ароматическом ядре фиксированной молекулы фенилаланина в изученных нами комплексах.

Для энантиомеров фенилаланина селективность сорбции выше для сорбента II. Различие в энергии сорбции достигает 350 кал/моль для медных и 250 кал/моль для никелевых комплексов; соответственно более стабильны комплексы [(*L*-Phe)Mt (*D*-Phe)]. Величины энантиоселективности в случае сорбента I для медных и никелевых комплексов составляют 200 и 130 кал/моль соответственно; более стабильны комплексы [(*D*-Phe)Mt(*D*-Phe)].

ΔG° , полученные при хроматографии энантиомеров различных аминокислот на сорбентах I и II в медной и никелевой формах, достигают значительных величин. Для энантиомеров α -алкилзамещенных аминокислот, метионина и серина большие энантиоселективные эффекты обнаружены при хроматографии на сорбенте I, тогда как для пролина, треонина, гистидина и фенилаланина большие различия в поведении энантиомеров найдены при хроматографии на сорбенте II.

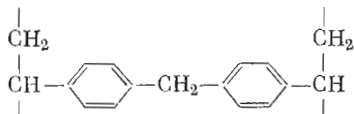
Однако, несмотря на значительность различий во временах удерживания энантиомеров, добиться их полного разделения на использованных в данной работе хроматографических колонках высотой 15 см не удается из-за размытости и перекрытия хроматографических зон. Как видно из данных таблицы, значения ВЭЭТ, в особенности для сорбента II, слишком велики, что связано с недостаточной набухаемостью сорбентов и низкими скоростями установления межфазных равновесий. Характерно, что во всех случаях замена ионов Cu(II) в фазе сорбента на ионы Ni(II) приводит к существенному возрастанию величины ВЭЭТ, а также к снижению энантиоселективности (за исключением сорбции гистидина — типично триденатного аминокислотного лиганда). По-видимому, эффективность сорбентов со стационарными лигандами типа фенилаланина в Cu(II) -форме в процессах лигандообменного разделения энантиомеров аминокислот может быть повышена применением гидрофильных полимерных каркасов.

Экспериментальная часть

Оптическая чистота исходного *D*- и *L*-фенилаланина 98%.

Хлоргидрат метилового эфира *L*-фенилаланина получали по методике [17]. Выход 85%. $[\alpha]_D^{25} = -3,9^\circ$ (*c* 2, вода).

Для получения сорбента I 4 г (24 ммоль) *D*-Phe растворяли в 10 мл нитробензола, добавляли 13 г (50 ммоль) SnCl_4 , образовавшийся осадок растворили в 25 мл нитробензола. При перемешивании к раствору приливали 2 мл (25 ммоль) монохлордиметилового эфира и реакционную смесь выдерживали 8 ч при 50° , затем к раствору добавляли 5 г макросетчатого сополимера стирола, содержащего 10 мол. % сшивающих мостиков структуры:



и перемешивание продолжали еще 20 ч. Полимер отделяли на фильтре, промывали бензолом, ацетоном, 0,5 н. HCl и водой. Содержание азота в сухом полимере 1,5%. Сульфатирование проводили при 15° хлорсульфоновой кислотой (соотношение полимер — хлорсульфоновая кислота 1 : 1) в среде дихлорэтана в течение 1,5 ч; затем полимер отфильтровывали, промывали последовательно 20, 10% H_2SO_4 , водой, 0,5 н. NaOH и водой до нейтральной реакции. Содержание азота в полимере 1,5%, серы 4,1%, что соответствует содержанию 1,1 ммоль остатков *D*-Phe и 1,3 ммоль сульфогрупп в 1 г сухого полимера.

Сорбент II получали взаимодействием 9,4 г хлорметилированного сополимера стирола (содержание хлора 21%; 10 мол. % сшивающих мостиков) и 20 г хлоргидрата метилового эфира *L*-Phe в смеси диоксиана (60 мл) с метанолом (10 мл) в присутствии избытка NaHCO_3 (15,5 г) и 1,8 г катализатора NaI при 60° в течение 30 ч. После щелочного гидролиза эфирных групп 0,5 н. NaOH в смеси диоксан — вода (1 : 1) в течение 4 сут; содержание азота в полимере 2,95%, что соответствует аналитической емкости 2,1 ммоль остатков *L*-Phe на 1 г сухого полимера.

Набухаемость сорбентов определяли весовым методом [8]. Зарядку сорбентов ионами металлов проводили из растворов их солей в 0,5 н. NH_3 . Для лигандообменной хроматографии использовали колонки размером $0,8 \times 15$ см; объем колонки, заполненной сорбентом, $7,5 \text{ см}^3$, что соответствует ~ 2 г сухого сорбента.

Объемная скорость элюирования 10 мл/ч. Поглощение элюата регистрировали на приборе Uvicord III (Швеция) при 206 нм. Для компенсации вымываемого из колонки металла и сохранения постоянной степени зарядки сорбента ионами металла в элюент добавляли соль соответствующего металла в концентрациях 200—300 мкмоль/л.

Количество металла, связанного с сорбентами, определяли комплексометрическим титрованием с комплексомом III в присутствии мурексида [9].

Отношение стационарный лиганд (Phe): металл определено в случае сорбента I для меди 1,67 : 1,0, для никеля 2,17 : 1,0, в случае сорбента II для меди 4,2 : 1,0, для никеля 4,8 : 1,0. Очевидно, часть ионов меди связана в сорбенте I с сульфогруппами, часть — с остатками фенилаланина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davankov V. A., Semechkin A. V. (1977) *J. Chromatogr.*, **141**, 313—353.
2. Tsubida E., Nishikawa H., Terada E. (1976) *Eur. Polymer J.*, **12**, 611—614.
3. Davankov V. A., Zolotarev Ju. A. (1978) *J. Chromatogr.*, in press.
4. Ямсков И. А., Березин Б. Б., Тихонов В. Е., Даванков В. А. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 149—153.
5. Трёмийон Б. (1967) *Хроматография на ионообменных смолах*, с. 251, «Мир», М.
6. Brookes G., Pettit L. (1974) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 813—814.
7. Erlanger V. F., Sachs H., Brand E. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 1806—1810.
8. Рогожин С. В., Даванков В. А., Вырбанов С. Г., Коршак В. В. (1968) *Высокомолекулярное соед.*, **10A**, 1277—1282.
9. Шварценбах Г. (1958) *Комплексометрия*, с. 107, Госхимиздат, М.

Поступила в редакцию
24.I.1978

После доработки
7.IV.1978

LIGAND-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY OF AMINO ACID ENANTIOMERS ON ASYMMETRIC SORBENTS CONTAINING PHENYLALANINE GROUPINGS

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

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

Two types of asymmetric sorbents containing phenylalanine groupings in a cross-linked polysterene matrix were prepared, which were utilized for ligand-exchange chromatography of amino acid enantiomers in the presence of Cu(II) and Ni(II) ions. The highest enantioselectivity ($\delta\Delta G^\circ = 300\text{--}350$ cal/mole) was found for the copper (II) mixed complexes with phenylalanine and the nickel (II) complexes with histidine. Efficiency of the ligand-exchange chromatography of amino acid enantiomers, as characterized by the effective plate heights, ranged from 4 to 50 mm.