

⑤  
107-110, 114  
固定化锌螯合物亲和色谱填料的合成  
及其色谱行为

梁文忠 卫引茂 耿信笃

(西北大学现代分离科学研究所, 710069, 西安; 第一作者 26 岁, 男, 硕士生)

0657.7  
**摘要** 以大孔微球硅胶为基质, 用两种方法合成了高效锌离子螯合物亲和色谱填料。第一种是将硅胶经  $\gamma$ -缩甘油丙基三甲氧基硅烷活化后与亚氨基二乙酸键合; 第二种是先将  $\gamma$ -缩甘油丙基三甲氧基硅烷与亚氨基二乙酸反应, 再键合到硅胶上。然后与锌离子螯合, 得到锌离子螯合物亲和色谱填料。对这两种填料的性质和色谱行为进行了研究。从对标准蛋白分离的结果来看, 以第二种合成路线为佳。**关键词** 固定化金属螯合物亲和色谱; 亚氨基二乙酸; 蛋白质**分类号** O657.72

锌螯合物, 亲和填料, 色谱

近年来固定化金属螯合物亲和色谱(Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography, IMAC)在生物大分子分析中取得了广泛的应用。与其他亲和色谱填料相比, 固定化金属螯合物亲和填料具有造价低廉、配体金属离子易于更换、可供选择的洗脱条件多等优点。早期的填料合成是用琼脂糖(Sepharose 6B, Sephadex G25)作为基质, 在碱性环境中与 IDA 偶联后再与  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  等离子螯合, 制成软基质的亲和填料。但其柱效低, 分析时间长, 而且合成条件不适合硅胶基质。后来人们开始发展高效金属螯合物亲和填料。Hashimoto<sup>[1]</sup>等以苯乙烯-二乙烯基苯聚合物 TSKgel G5000PW 为基质, 制成了 TSKgel Chelate 5PW 螯合树脂, 螯合  $\text{Zn}^{2+}$  离子后用于分离蛋白质混合物。后来 Gimpel<sup>[2]</sup>, Horvath<sup>[3]</sup>等在硅胶基质上合成了以 IDA 为螯合基团的金属螯合物亲和填料。

本文以大孔微球硅胶为基质, 用两种合成路线合成了两种 IDA 型亲和填料。再将其与  $\text{Zn}^{2+}$  螯合后制成了 IMAC 固定相。在磷酸盐缓冲液中, 对几种标准蛋白进行了分离。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

本文所用色谱仪为岛津 LC-6A, SPD-6AV 紫外可见检测器, SCL-6B 系统控制器, Chemco-124A 型装柱机, KQ-250 型超声仪。

### 1.2 试剂

Vydac (7  $\mu\text{m}$ , 30 nm) 大孔硅胶(美国 Vydac 公司);

$\gamma$ -缩甘油丙基三甲氧基硅烷 (GLYMO, 河北省盖县化工厂);

溶菌酶(Lys, 鸡蛋白)、细胞色素-C(Cyt-C, 单胞菌)、 $\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -Lact)、核糖核酸酶(RNase-A), 均为美国 Sigma 公司产品。

亚氨基二乙酸(IDA)为分析纯。

### 1.3 填料合成

1.3.1 合成路线 1 硅胶的预处理及其活化: 将 8 g 大孔硅胶放入约 80 mL 1:1 HCl(V/V)溶液中,

回流 3 h, 冷却后用去离子水洗至中性, 干燥。然后将其放入 100 mL 一定 pH 值的 0.10 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中, 在不断搅拌下加入适量的  $\gamma$ -缩甘油丙基三甲氧基硅烷, 反应 3 h, 冷却后依次用水、丙酮、甲醇、水洗涤, 干燥, 备用。

将上述硅烷化的硅胶加入到 40 mL 1.0 mol/L 含有适量 IDA 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  缓冲溶液中, 在 60℃ 水浴下反应 24 h, 冷却, 依次用水、10% 乙酸、水洗涤, 烘干后即为第一种键合相 ( $\text{SiO}_2$ -IDA-1)。

1.3.2 合成路线 2 含有 IDA 基团硅烷的合成: 称取 NaOH 约 2.42 g 放入 100 mL 三颈瓶中, 加去离子水数毫升溶解, 再加入 2.82 g 亚氨基二乙酸, 搅拌至完全溶解。滴加  $\gamma$ -缩甘油丙基三甲氧基硅烷 5.0 mL, 反应 24 h。得到金黄色透明溶液即为含有 IDA 基团的硅烷 (GLYMO-IDA)。

称取预处理过的硅胶 8.0 g, 加入适量的 GLYMO-IDA, 在 80℃ 水浴条件下反应 4 h, 冷却。分别用水、丙酮、甲醇、水洗涤, 烘干后即为第二种键合相 ( $\text{SiO}_2$ -IDA-2)。

#### 1.4 $\text{SiO}_2$ -IDA 键合相锌离子螯合容量的测定

称取键合相  $\text{SiO}_2$ -IDA-1 和  $\text{SiO}_2$ -IDA-2 各 2 g 放入 100 mL 烧杯中, 分别加入已知浓度的金属  $\text{Zn}^{2+}$  溶液 (pH=5.0) 50.0 mL 反应 24 h, 吸取上清液。用标准 EDTA 溶液滴定, 计算出  $\text{SiO}_2$ -IDA-1、 $\text{SiO}_2$ -IDA-2 键合相的螯合容量分别为 46.3  $\mu\text{mol/g}$  和 86.4  $\mu\text{mol/g}$ 。

#### 1.5 $\text{SiO}_2$ -IDA 键合相羧基含量的测定<sup>[6]</sup>

称取键合相  $\text{SiO}_2$ -IDA-1 和  $\text{SiO}_2$ -IDA-2 各 2 g 于 100 mL 烧杯中, 分别加入 0.010 mol/L 盐酸 50 mL, 反应 12 h, 吸出上清液。用去离子水将键合相洗至中性。再加入 20 mL 去离子水, 得悬浊液, 然后再用 0.01 mol/L 的标准 NaOH 溶液滴定该悬浊液, 通过消耗碱液的体积计算,  $\text{SiO}_2$ -IDA-1 和  $\text{SiO}_2$ -IDA-2 羧基含量分别为 60.1  $\mu\text{mol/g}$  和 104.6  $\mu\text{mol/g}$ 。

#### 1.6 色谱柱的装填

使用 4.0 mm  $\times$  100 mm I.D. 的不锈钢柱管, 将约 2 g 填料放入适量甲醇中, 超声 5 min, 用匀浆法装柱, 充填压力为 40 MPa。色谱柱用 200 mL 的去离子水冲洗, 除去过量的 IDA, 再用约 0.020 mol/L  $\text{ZnSO}_4$  溶液流过柱子进行螯合反应。最后用去离子水将未螯合上的金属离子洗去, 制成  $\text{Zn-IDA-SiO}_2$  金属螯合物亲合色谱柱。

#### 1.7 标准蛋白混合物的分离

将标准蛋白配制成 5.0 mg/mL 的磷酸盐溶液。以磷酸盐缓冲液为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 对几种标准蛋白进行了分离。

## 2 结果与讨论

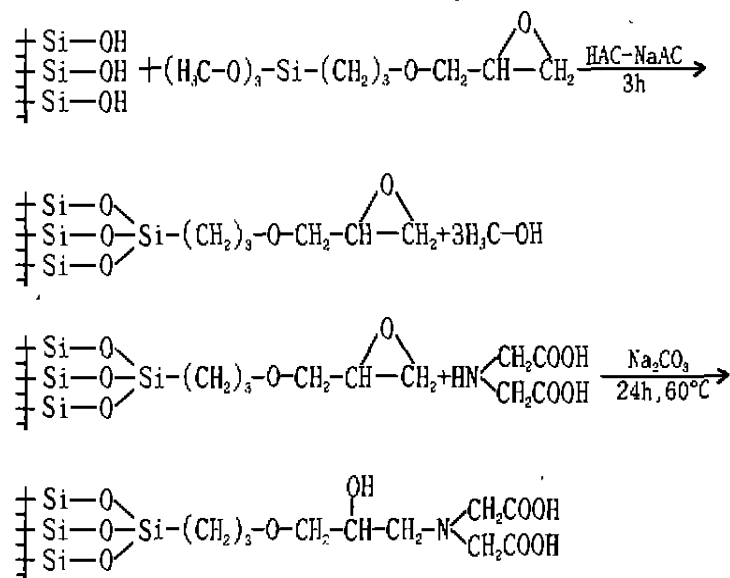
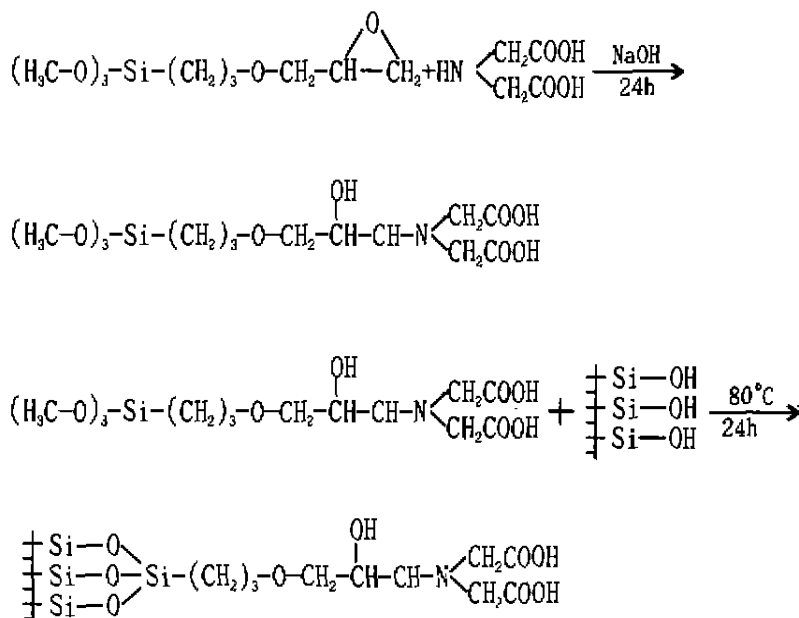
### 2.1 固定相合成路线的选择

在硅胶基质上合成以 IDA 为配体的固定化金属螯合物亲合填料, 最关键的一步是把 IDA 偶联到 GLYMO 上。

在合成路线 1 (图 1) 中, 先将硅胶环氧活化后再与 IDA 反应, 由于在 pH > 8.3 时硅胶会发生水解, 所以偶联 IDA 一步的 pH 值最高只能放在 8.3。较低的 pH 值不利于 IDA 的键合, 从而导致填料低的键合量。

为解决这一问题, 我们尝试了合成路线 2 (图 2)。即先将 IDA 和 GLYMO 在较高 pH 条件下反应, 使其充分偶联, 得到含有亚氨基二乙酸官能团的硅烷。再与硅胶反应。

填料羧基含量测定实验结果表明, 由合成路线 2 得到的填料其羧基含量较合成路线 1 所得为高。相应的其金属离子螯合量也较高。另外, 由于空间位阻的原因, 只有一部分的羧基与金属离子螯合, 这反映在两种填料的金属离子螯合量均低于其羧基含量上。

图 1 SiO<sub>2</sub>-IDA-1 合成路线Fig. 1 Synthetic Route of SiO<sub>2</sub>-IDA-1图 2 SiO<sub>2</sub>-IDA-2 合成路线Fig. 2 Synthetic Route of SiO<sub>2</sub>-IDA-2

## 2.2 标准蛋白质的分离

在金属螯合物亲合色谱中,蛋白质与固定相之间的作用力包括范德华力、疏水作用力、静电作用力以及金属螯合作用力。金属螯合作用力即固定相上的金属离子与蛋白质表面上氨基酸残基中某些给电子基团间的作用,如组氨酸的咪唑基、胱氨酸的巯醇基以及色氨酸的吲哚基等,它在金属螯合物亲合色谱中起主要作用。在 Zn-IDA-SiO<sub>2</sub> 固定相中,不同蛋白按其 与 锌 离 子 作 用 强 度 的 不 同 而 依 次 被 洗 脱 下 来,两种不同合成路线得到的固定相对不同标准蛋白的分离结果如图 3,图 4 所示。

由图 3,4 可见,一些等电点较低的蛋白,如 β-Lact,在 SiO<sub>2</sub>-IDA-1 柱上不保留,而在 SiO<sub>2</sub>-IDA-2 柱上有保留。这说明在后者中固定相与蛋白质的作用力强于前者。在 IMAC 中,蛋白质表面组氨酸等氨基酸残基的密度和固定相上金属离子的密度决定了蛋白质与固定相之间作用力的大小。实验表明,两种填料金属离子螯合量的测定结果和蛋白质在其上不同的色谱行为与该结论是一致的。

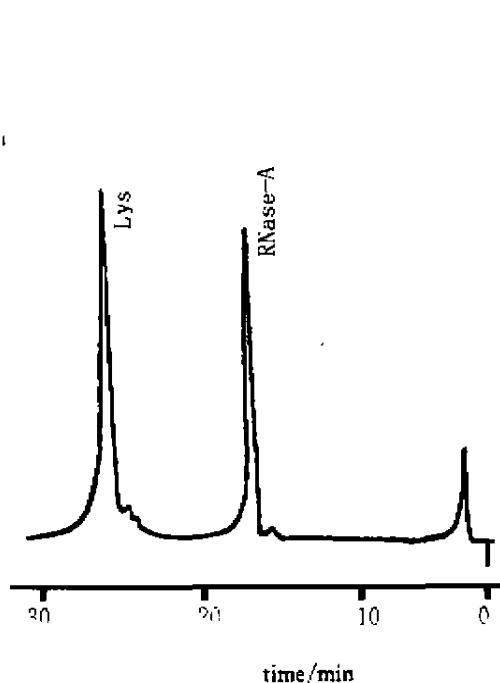
图 3 SiO<sub>2</sub>-IDA-1 填料对标准蛋白的分离

Fig. 3 Separation of Standard Proteins  
on SiO<sub>2</sub>-IDA-1 Packings

柱子 SiO<sub>2</sub>-IDA-1(4.0 mm×100 mm I. D.)

A 液 0.025 mol/L PBS pH=6.0

B 液 0.025 mol/L PBS+0.5 mol/L NaCl pH=6.0

流速 1.0 mL/min 40 min 线性梯度

注:PBS-磷酸二氢钠

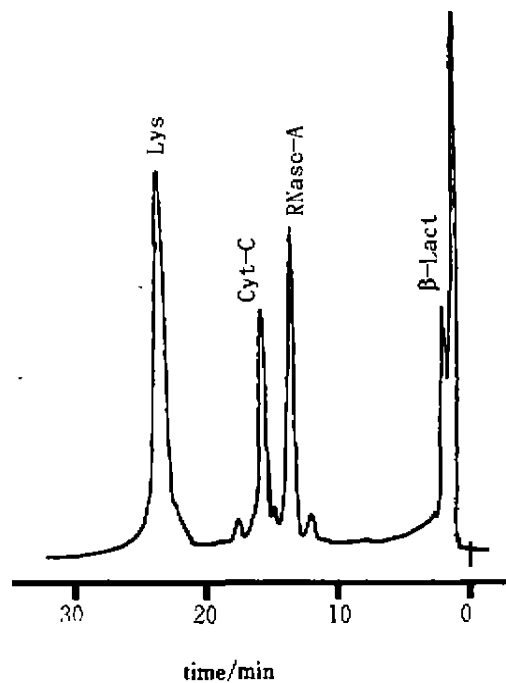
图 4 SiO<sub>2</sub>-IDA-2 填料对标准蛋白的分离

Fig. 4 Separation of Standard Proteins  
on SiO<sub>2</sub>-IDA-2 Packings

柱子 SiO<sub>2</sub>-IDA-2(4.0 mm×100 mm I. D.)

A 液 0.025 mol/L PBS pH=6.0

B 液 0.025 mol/L PBS+0.5 mol/L NaCl pH=6.0

流速 1.0 mL/min 40 min 线性梯度

实验结果表明,先将 IDA 基团键合到带有环氧基的硅烷上,再与硅胶反应的合成路线,可以有效地提高固定化金属螯合物亲合填料的羧基含量和金属离子螯合量。由此得到 Zn-IDA-SiO<sub>2</sub> 亲合色谱固定相,用磷酸盐缓冲液(pH=6.0)作为流动相,可实现对一些混合标准蛋白的有效分离。

### 参 考 文 献

- 1 Hashimoto T, Kato K, Nakamura K. High-performance metal chelate affinity chromatography of proteins. *J. Chromatogr.*, 1986, 354:511~517
- 2 Gimpel M, Unger K, Monomeric V S. Polymeric bonded iminodiacetate silica supports in high-performance ligand-exchange chromatography. *Chromatographia*, 1983, 17(4):200~205
- 3 Rassi Z El, Horvath C. Metal chelate-interaction chromatography of proteins with iminodiacetate acid-bonded stationary phases on silica support. *J. Chromatogr.*, 1986, 359:241~253
- 4 于世林,周雪萍,冯茹. 亚氨基二乙酸-硅胶键合相的合成及其在核苷酸分析中的应用. *分析化学*, 1995, 24:45~49

责任编辑 时亚丽

(下转第 114 页)

## 参 考 文 献

- 1 Ponzi P R, Kaya L A. Effect of flow maldistribution on conversion and selectivity in radial flow fixed bed reactors. *AICHE J.*, 1979, 25(1):100~108
- 2 张小里, 赵彬侠, 樊君等. 径向反应器流体流动行为研究. 西北大学学报(自然科学版), 1996, 26(3):235~239

责任编辑 时亚丽

## An Analysis of the Fluid Hydrostatic Pressure Distribution for Radial Flow Fixed-bed Reactors

Zhao Binxia Zhang Xiaoli Li Baozhang

(Department of Chemical Engineering, Northwest University, 710069, Xi'an)

**Abstract** The analysis of the hydrostatic pressure distribution is based on the momentum exchange equation of varying mass. According to the magnitude of the friction resistance function relative to the momentum exchange function, four cases in the divided flow channel are discussed. But in the combined flow channel the hydrostatic pressure always decreases.

**Key words** radial flow; reactor; hydrostatic pressure distribution

(上接第 99 页)

## Syntheses and Characterization of Schiff Bases of 3,4-Dibutyltindioxybenzaldehyde with Aromatic Amines

Ma Huairang<sup>1)</sup> Lu Jun Chen Jingyan<sup>2)</sup> Yang Bingqin<sup>1)</sup>

(1)Department of Chemistry, Northwest University, 710069, Xi'an; 2)Department of Chemistry, Xianyang Teachers College, 712000, Xianyang)

**Abstract** 3,4-Dibutyltindioxybenzaldehyde has been prepared by the reaction of 3,4-dihydroxybenzaldehyde with dibutyltin oxide and 4 Schiff bases synthesized by the condensation of the obtained aldehyde with aromatic primary amines. All products are characterized through elemental analysis, IR and <sup>1</sup>H NMR spectra.

**Key words** 3,4-dibutyltindioxybenzaldehyde; Schiff base; synthesis; characterization

(上接第 110 页)

## Synthesis of Silica-Based Packings of Immobilized Zinc-Affinity Chromatography and Its Chromatographic Behaviour

Liang Wenzhong Wei Yinmao Geng Xindu

(Institute of Modern Separation Science, Northwest University, 710069, Xi'an)

**Abstract** Using a wide-pore microspheric silica as the matrix, a packings for high performance immobilized zinc-affinity chromatography was synthesised with two ways. Silica directly reacts with  $\gamma$ -glycidoxypropyltrimethoxysilane and then links to iminodiacetic acid (IDA) (way 1) and GLYMO reacts with IDA firstly and then bonds to silica (way 2). The characters and chromatographic behaviour of the packings were tested with standard proteins. From the results it was found that the second way was better.

**Key words** immobilized metal chelate affinity chromatography; iminodiacetic acid; protein