

金属离子与氨基酸螯合配体的键合特性研究

陈斌 王石慧 李蓉* 樊安

(西北大学化工学院, 西安 710069)

摘要 利用前沿色谱法,通过 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Co^{2+} 与螯合配体 IDA 键合的准确度 ($R^2 > 0.98$) 与精密度 ($\text{RSD} < 5\%$) 实验,研究了前沿色谱法同时测定络合稳定常数 K_{ML} 与总键合位点数 Λ_0 值的可行性。为了进一步证明前沿色谱法的普适性,以 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Co^{2+} 为代表,在 3 种键合缓冲体系 (NaAc-HAc 、 Na-PB 、 Tris-HCl) 中,考察了金属离子在 3 种氨基酸螯合配体 (IDA、Asp、Glu) 上络合稳定常数 K_{ML} 的变化规律。结果表明,螯合配体对金属离子键合强度遵循 $\text{IDA} > \text{Asp} > \text{Glu}$; 金属离子对螯合配体键合强度遵循 $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$; 3 种键合缓冲体系中, NaAc-HAc 键合效果最好。按照 M06/6-311++G (d, p) 方法对螯合配体与金属离子的结合能 (ΔE) 与吉布斯自由能 (ΔG) 进行相关的量子计算。根据 ΔE 与 ΔG 的大小,从理论上推测出螯合配体与金属离子的键合规律,此规律与上述实验结果基本相符。本研究为金属离子与螯合配体间键合参数的求取提供了有效的方法和手段,从而为今后提高 IMAC 柱的稳定性,解决固定金属亲和柱在应用过程中尤其是竞争洗脱过程中金属离子的流失问题奠定了良好的基础。

关键词 前沿色谱法; 量子计算; 氨基酸螯合配体; 络合稳定常数; 总键合位点数

1 引言

自 1975 年 Porath 等^[1] 提出固定金属离子亲和色谱 (Immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 的概念以来,该技术在蛋白质的分离纯化中得到了广泛应用^[2,3]。该方法利用螯合物中固定化的金属离子与蛋白质间的亲和作用,实现目标的分离和纯化^[4]。相对于传统的蛋白质分离技术,IMAC 对目标蛋白具有高度的选择性。此外,与其它亲和色谱相比,蛋白质负载量高,更容易实现工业化^[5]。然而,金属离子的泄漏是 IMAC 柱在实际应用过程中的致命缺陷^[6,7]。该泄漏一方面与外部洗脱条件有关,另一方面与 IMAC 柱自身即金属离子与螯合配体的键合强度有关,后者起主导作用。键合强度越高,键合稳定常数 K_{ML} 越大,则 IMAC 柱越稳定,在蛋白质竞争洗脱时金属离子越不容易泄漏。因此,建立一种快速准确测定键合强度的方法尤为重要。根据测得的键合参数可有效制备出高强度 IMAC 柱,从而缓解甚至解决 IMAC 柱上金属离子的流失问题。

键合稳定常数 K_{ML} 和总键合位点数 Λ_0 直接体现金属离子在螯合配体上的键合特性。 K_{ML} 和 Λ_0 的传统检测方法存在诸多不足^[8~13]。前沿色谱法 (Frontal chromatography, FC) 能够在动态条件下同时测定溶质分子在配体上的 K_{ML} 和 Λ_0 值,广泛应用于分子生物、药物机理和药物先导化合物的筛选研究^[14~16]。在本课题组前期工作中,提出用 FC 法进行 IMAC 柱上 K_{ML} 和 Λ_0 值的测定,结合均匀设计实验,制备出高稳定性能的 Glu-Cu(II) 柱^[17]。

IMAC 柱的稳定性主要同金属离子与螯合配体的键合强弱有关,而键合强弱又与金属离子、络合配基及键合溶液相关。因此,采用 FC 法测定 IMAC 柱上键合参数是否具有普适性,是本研究的工作重点。根据 IMAC 固定金属离子的选择原则 (金属离子既要具有适宜的空轨道数目与螯合剂结合,还要有剩余的轨道亲合待分离的蛋白质),本研究以常见的过渡金属离子 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Co^{2+} 为代表,分别考察了在 NaAc-HAc 、 Na-PB 、 Tris-HCl 的键合溶液体系下,金属离子与 IDA、Glu、Asp 的键合参数 K_{ML} 和 Λ_0 。通过分析不同条件下键合参数的变化规律,以及与量子计算结果的比较,论证了方法的可行性。

2017-03-15 收稿; 2017-06-22 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 21376191)、陕西省自然科学基金 (No. 2011JM2013)、陕西省教育厅服务地方专项 (No. 14JF027) 和陕西省产业化项目 (No. 2013jc23) 资助

* Email: lirong@nwnu.edu.cn

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

AKTA purifier10 生物色谱制备仪(Amersham Biosciences 公司);124PP 装填机(日本 Chemico 公司);纯水仪(西安优普仪器设备公司)。硅胶(粒径 7 μm , 孔径 30 nm, 兰州物理化学研究所); γ -缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷(γ -GLDP, 分析纯, 辽宁盖县化工研究所);亚氨基二乙酸(IDA, 分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司);谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)均为分析纯;实验用水为超纯水(18.25 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

2.2 固定相的制备

按照文献[6]分别制得 IDA-硅胶填料、Asp-硅胶填料和 Glu-硅胶填料。采用匀浆法,将上述不同整合配体-硅胶填料分别装填至规格为 50 mm $\times$ 4.6 mm 的不锈钢柱内,在 40 MPa 的压力下装填 12 min,依次得到 IDA-硅胶柱、Asp-硅胶柱和 Glu-硅胶柱。

2.3 K_{ML} 和 A_0 的测定

2.3.1 空白突破曲线的测定 用 5.00 mmol/L NaNO_2 -25 mmol/L NaAc-HAc 缓冲溶液(pH 4.0)以 0.5 mL/min 的流速依次通过未键合金属离子的不同整合配体-硅胶柱,直至在 356 nm 处的紫外可见吸收值达到一个平台,即得到空白突破曲线。

2.3.2 金属离子突破曲线的测定 用 0.30 mmol/L CuSO_4 -25 mmol/L NaAc-HAc 缓冲溶液(pH 4.0)以 0.5 mL/min 的流速通过 IDA-硅胶柱,直至在 700 nm 处的紫外可见吸收值达到一个平台,即得到一条金属离子突破曲线,该突破曲线为金属离子在螯合柱上达到饱和吸附量时所对应的平台曲线。依次用 0.50, 0.60, 0.80 和 1.00 mmol/L 等一系列浓度的 CuSO_4 -25 mmol/L NaAc-HAc (pH=4.0) 重复上述步骤,得到一系列不同浓度 Cu^{2+} 在 IDA-硅胶柱上的突破曲线。每测完一条突破曲线,用 0.05 mmol/L EDTA-Na_2 溶液将键合在色谱柱上的金属 Cu^{2+} 洗脱。

不同浓度金属 Cu^{2+} 的其它键合缓冲溶液(Na-PB 、 Tris-HCl)分别在 Asp-硅胶和 Glu-硅胶柱,以及不同浓度金属 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 的 3 种键合缓冲溶液(NaAc-HAc 、 Na-PB 、 Tris-HCl)分别在 IDA-硅胶柱, Asp-硅胶柱和 Glu-硅胶柱上的突破曲线均按上述步骤获得。

2.3.3 表观摩尔吸附量的计算 用 Peakfit (V4.12) 软件分别对空白突破曲线和金属离子突破曲线进行一阶微分处理,得到曲线拐点处所对应的时间,即为空白突破时间 t_0 和金属离子突破时间 t_m 。由式(1)计算达到突破时间时的表观摩尔吸附量^[18]。

$$Q_e = \frac{V \times (t_m - t_0) \times [M]}{60 \times 1000} \quad (1)$$

其中, Q_e 为达到平衡时的表观摩尔吸附量(mol); v 为流速(0.5 mL/min); t_m 为不同浓度金属离子的突破时间(min); t_0 为 NaNO_2 的空白突破时间(min); $[M]$ 为金属离子的浓度(mol/L)。

2.3.4 K_{ML} 值与 A_0 值的求取 金属离子在螯合色谱柱上的吸附符合单位点的 Langmuir 吸附等温模型^[19]:

$$Q_e = \frac{K_{\text{ML}} A_0 [M]}{1 + K_{\text{ML}} [M]} \quad (2)$$

将(2)式取倒数可得:

$$\frac{1}{Q_e} = \frac{1}{K_{\text{ML}} A_0 [M]} + \frac{1}{A_0} \quad (3)$$

其中, K_{ML} 为金属离子在络合配基上的络合稳定常数(L/mol); A_0 为金属离子在络合配基上的总键合位点数(mol)。由公式(3)可知 $1/Q_e$ 和 $1/[M]$ 呈线性关系,根据斜率和截距可求出 K_{ML} 和 A_0 。

3 结果与讨论

3.1 K_{ML} 和 A_0 的测定

以金属 Cu^{2+} 为例,在 25 mmol/L NaAc-HAc 键合缓冲溶液(pH=4.0)体系下,按照 2.3.2 节的方法

测得不同浓度 Cu^{2+} 在 IDA 螯合配体上的前沿突破曲线,得到图 1 的结果。

根据 2.3.3 节的方法得到不同浓度 Cu^{2+} 的 t_m 和 Q_e 。由图 1 和表 1 可知,随着 Cu^{2+} 浓度的升高, t_m 减小, Q_e 增大。表明当 Cu^{2+} 浓度升高时,有利于 Cu^{2+} 在 IDA-硅胶柱上的吸附,短时间内金属 Cu^{2+} 在 IDA-硅胶柱上迅速达到吸附平衡,且吸附量逐渐增大。

根据公式(3)将 $1/Q_e$ 和 $1/[M]$ 进行线性拟合,结果如图 2 所示。 Cu^{2+} 浓度在 0.30 ~ 1.00 mmol/L 的范围内, $1/Q_e$ 与 $1/[M]$ 呈良好的线性相关性,线性相关系数 $R^2=0.985$ 。这充分说明了在 NaAc-HAc 的键合缓冲体系中,金属 Cu^{2+} 在 IDA 螯合配体上的吸附特性符合单位点的 Langmuir 吸附等温模型。根据 $1/Q_e$ 与 $1/[M]$ 的线性方程可以得到在 25 mmol/L NaAc-HAc 键合缓冲体系 (pH=4.0) 的条件下,金属 Cu^{2+} 在 IDA 螯合柱上的络合稳定常数 $K_{\text{ML}}=1.12\times10^4\text{ L/mol}$, 键合位点数 $\Lambda_0=9.31\times10^{-6}$ 。

表 1 不同浓度 Cu^{2+} 的 t_m 和 Q_e

Cu ²⁺ 浓度 Cu ²⁺ concentration [M] (mmol/L)		空白突破时间 Blank breakthrough time <i>t</i> ₀ (min)	突破时间 Breakthrough time <i>t</i> _m (min)	表观摩尔吸附量 Apparent molar adsorption capacity <i>Q</i> _e (×10 ⁻⁶ , mol)
0.30		12.26	60.33	7.21
0.50		12.26	43.54	7.82
0.60		12.26	39.15	8.06
0.80		12.26	33.11	8.34
1.00		12.26	29.56	8.65

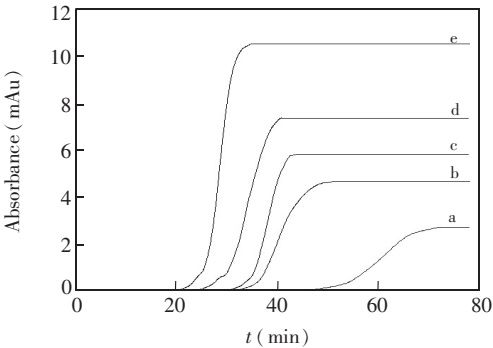


图 1 不同浓度 Cu^{2+} 的突破曲线
Fig.1 Breakthrough curves of different concentrations of Cu^{2+}

a. 0.30 mmol/L; b. 0.50 mmol/L; c. 0.60 mmol/L;
d. 0.80 mmol/L; e. 1.00 mmol/L.

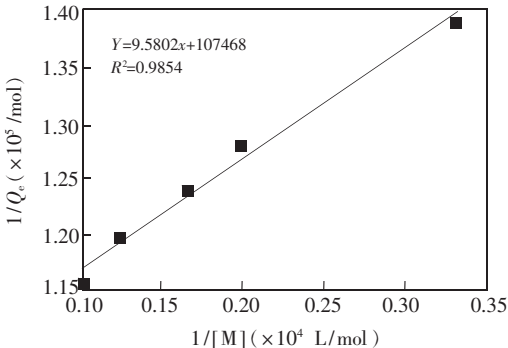


图 2 $1/[M]$ 和 $1/Q_e$ 的线性关系图
Fig.2 Linear diagram of $1/[M]$ and $1/Q_e$

3.2 FC 方法的准确度与精密度实验

为了考察本法的准确性与可靠性,在 25 mmol/L NaAc-HAc (pH=4.0) 键合缓冲溶液的体系下,对不同的金属离子,在 IDA 螯合柱上进行吸附特性的研究,结果如表 2 所示。

由表 2 可知,3 种金属离子 (Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Co^{2+}) 浓度在 0.30 ~ 1.00 mmol/L 范围内, $1/Q_e$ 和 $1/[M]$ 的线性关系良好,线性相关系数 $R^2>0.98$; 吸附特性参数 K_{ML} 和 Λ_0 的 RSD 分别低于 2.7% 和 3.9%。说明方法的准确度高,重现性好。这是因为 IDA 是一种含有 3 个配位原子的氨羧类络合剂,可以与 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Co^{2+} 以 1:1 的络合比进行络合,金属离子在其上的吸附符合单位点的 Langmuir 吸附等温模型。此外, Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Co^{2+} 与 IDA 的络合稳定常数遵循如下顺序 $K_{\text{ML}(\text{Cu(II)-IDA})} > K_{\text{ML}(\text{Ni(II)-IDA})} > K_{\text{ML}(\text{Co(II)-IDA})}$, 此结果与理论推测相一致^[20~22]。

由此可见,利用 FC 法可准确有效地求得表征金属离子在氨羧类螯合剂上键和特性的参数 K_{ML} 和 Λ_0 , 并且通过评价参数 K_{ML} 直观地反映出不同的金属离子与螯合剂结合能力的强弱,这也为分析金属

离子与螯合剂的键合强度以及间接地判断 IMAC 柱的稳定性提供了依据。

表 2 FC 方法的准确度与精密度实验 ($n=3$)
Table 2 Accuracy and precision tests of frontal chromatogrpahy (FC) method for different metal ions ($n=3$)

	Cu ²⁺		Ni ²⁺		Co ²⁺	
	平均值 Average	RSD (% , $n=3$)	平均值 Average	RSD (% , $n=3$)	平均值 Average	RSD (% , $n=3$)
$K_{ML}(\times 10^4)$	1.15	2.18	0.64	2.36	0.57	2.66
$\Lambda_0(\times 10^{-5})$	0.97	2.06	1.19	1.28	1.13	3.86
R^2	0.99	0.82	0.99	0.82	0.99	0.82

3.3 金属离子在氨羧类螯合配体上的键合特性

为了进一步论证 FC 法的通用性,将研究范围扩大到 Glu,Asp 螯合配体以及 Na-PB 和 Tris-HCl 键合缓冲体系中,依次考察了 Cu²⁺、Ni²⁺和 Co²⁺的键合特性,结果如表 3 所示。

表 3 金属 Cu²⁺、Ni²⁺和 Co²⁺在不同氨羧类螯合柱上的键合参数
Table 3 Binding parameters of Cu²⁺, Ni²⁺ and Co²⁺on different aminocarboxyl chelating columns

金属离子 Metal ion	缓冲溶液 Buffer	IDA			Asp			Glu		
		K_{ML} ($\times 10^4$)	Λ_0 ($\times 10^{-5}$)	R^2	K_{ML} ($\times 10^4$)	Λ_0 ($\times 10^{-5}$)	R^2	K_{ML} ($\times 10^4$)	Λ_0 ($\times 10^{-5}$)	R^2
Cu ²⁺	NaAc-HAcI	1.14	0.98	0.99	0.76	0.49	0.99	0.36	1.09	0.98
	Na-PB	0.77	1.12	0.98	0.45	0.96	0.98	0.24	0.81	0.98
	Tris-HCl	1.06	0.94	0.99	0.52	0.60	0.99	0.28	0.65	0.97
Ni ²⁺	NaAc-HAc	0.64	1.17	0.98	0.54	0.55	0.99	0.33	0.55	0.99
	Na-PB	0.38	1.47	0.99	0.35	0.35	0.98	0.20	0.47	0.99
	Tris-HCl	0.49	1.20	0.98	0.37	1.07	0.99	0.28	0.34	0.98
Co ²⁺	NaAc-HAc	0.58	1.11	0.99	0.52	0.39	0.99	0.32	0.25	0.97
	Na-PB	0.26	1.62	0.98	0.19	0.39	0.99	0.15	0.53	0.99
	Tris-HCl	0.40	1.39	0.99	0.34	0.22	0.99	0.25	0.36	0.98

IDA, iminodiacetic acid; Asp, aspartic acid; Glu, glutamic acid.

从表 3 可知,在相同的键合缓冲体系下:(1)3 种金属离子对不同螯合配体柱的络合稳定常数遵循: $K_{ML(Cu(II)-IDA)} > K_{ML(Cu(II)-Asp)} > K_{ML(Cu(II)-Glu)}$; $K_{ML(Ni(II)-IDA)} > K_{ML(Ni(II)-Asp)} > K_{ML(Ni(II)-Glu)}$; $K_{ML(Co(II)-IDA)} > K_{ML(Co(II)-Asp)} > K_{ML(Co(II)-Glu)}$,均表现为螯合配体对金属离子键合强度:IDA>Asp>Glu。这一规律与本课题组先前用 AAS 法测得的结果相符^[23,24]; (2)3 种金属离子对相同螯合配体柱的络合稳定常数遵循: $K_{ML(Cu(II)-IDA)} > K_{ML(Ni(II)-IDA)} > K_{ML(Co(II)-IDA)}$; $K_{ML(Cu(II)-Asp)} > K_{ML(Ni(II)-Asp)} > K_{ML(Co(II)-Asp)}$; $K_{ML(Cu(II)-Glu)} > K_{ML(Ni(II)-Glu)} > K_{ML(Co(II)-Glu)}$,均表现为金属离子对螯合配体键合强度:Cu²⁺>Ni²⁺>Co²⁺。这是因为 Cu²⁺、Ni²⁺和 Co²⁺的半径分别为 69、72 和 74 pm,当金属离子的电荷数相等时,随着金属离子半径的依次增大高,金属离子与络合剂间的配位作用会逐步减弱^[25]。此外,3 种键合缓冲体系中,NaAc-HAc 的键合效果最好,这与文献[25]的研究结论一致。

为了进一步论证实验结果的可靠性,用 Gaussian 09 软件对上述金属离子与螯合配体进行量子模拟计算:采用 B3LYP 和 6-31G(d) 基组进行几何构型优化,在 M06/6-311++G(d, p)水平计算螯合配体与金属离子的结合能(ΔE)与吉普斯自由能(ΔG),结果见表 4。 ΔE 在一定程度上体现了金属离子与螯合配体构型的稳定性; ΔE 越高,说明这种构型在配位过程中越容易产生且能稳定存在; ΔG 反映了反应正向进行的趋势,其为负值说明反应能自发进行,且数值的绝对值越大,螯合物构型越稳定,说明金属离子与螯合配体的键合力越大。

由表 4 可知, $\Delta E>0$, $\Delta G<0$,说明这 9 种螯合物都能稳定存在。对于同一种螯合配体而言,金属离子与其的键合能力均表现为 Cu²⁺>Ni²⁺>Co²⁺。这是因为当金属离子所带电荷相同时,螯合物的稳定性与金属离子的半径有关^[24~26]:金属离子的半径越小,螯合物的 ΔE 和 ΔG (绝对值)越大,则结构更加稳定。因此量子计算的结果与实验结果一致。

金属离子与螯合配体是按照 1:1 的络合比形成稳定的螯合物^[27],因此不同配体的空间构型将对金属离子与其螯合的稳定性产生一定的影响。由螯合配体的结构可知,对于提供同样配位原子的螯合体,

表 4 IDA, Asp, Glu 与不同金属离子的 ΔE 和 ΔG
Table 4 ΔE and ΔG of IDA, Asp and Glu with different metal ions

	IDA			Asp			Glu		
	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Co ²⁺
ΔE (Kcal/mol)	108.84	33.63	25.16	98.19	33.57	25.76	98.87	34.00	26.66
ΔG (Kcal/mol)	-97.12	-21.88	-12.74	-88.11	-21.72	-14.33	-87.85	-21.73	-12.17

主链上含有配位原子的螯合体能够与金属离子形成更加稳定的结构;此外,螯合配体的链长也会影响其与金属离子的键合能力。计算结果表明,对于同一种金属 Cu²⁺而言,IDA 与其的键合能力最强;与 Asp 与 Glu 相比,由于 IDA 主链上含有提供配位的 N 原子,使得金属 Cu²⁺ 与其配位后形成的络合物更加稳定^[27]。而 Asp 与 Glu 结构相似,主链上含有更多的 —CH₂ ,使得这两种螯合配体与金属离子相结合时,空间位阻较大,导致形成的螯合物的稳定性较弱^[28,29]。而对于 Ni²⁺ 和 Co²⁺ 而言,计算结果与实验结果有偏差,这可能是因为理论的计算是在水溶液进行的,忽略了键合缓冲溶液的影响。

4 结 论

本研究在 FC 法的基础上,利用 Langmuir 单位点的等温吸附模型,考察了在不同缓冲体系条件下,不同金属离子与不同螯合配体间的键合稳定参数之间的关系。通过数据分析与比较,论证了 FC 法在 IMAC 制备过程中金属离子对螯合配体键合参数测定的普适性。本研究为金属离子与螯合配体间键合参数方便快速的求取提供了有效的方法和手段,从而为今后制备高强度 IMAC 柱,解决 IMAC 柱在使用过程中金属离子的流失问题奠定了良好的基础。

References

1 Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. *Nature*, **1975**, 258(5536): 598–599

2 WANG Yong. *J. Graduates. Sun YAT-SEN. Univ: Nat. Sci. Med. Ed.*, **2012**, 33(2): 15–21
王 勇. 中山大学研究生学刊: 自然科学与医学版, **2012**, 33(2): 15–21

3 Lyu Y, Bao X L, Liu H, Ren J H, Guo S T. *Food Chem.*, **2013**, 141(3): 1645–1650

4 YU Shi-Lin. *Affinity Chromatography and Application*. Beijing: Chemical Industry Press, **2008**: 235–241
于世林. 亲和色谱方法及应用. 北京: 化学工业出版社, **2008**: 235–241

5 Papaneophytou C P, Kontopidis G. *Protein Expr. Purif.*, **2014**, 94(2): 22–32

6 Li R, Wang Y, Chen G L, Shi M, Wang X G, Chen B, Zheng J B. *Sep. Sci. Technol.*, **2010**, 46(2): 309–314

7 Gaberc-Porekar V, Menart V. *Chem. Eng. Technol.*, **2005**, 28(11): 1306–1314

8 WANG Yan, LI Rong, CHEN Guo-Liang, WANG Xiao-Gang. *Chemistry*, **2008**, 11: 838–845
王 燕, 李 蓉, 陈国亮, 王小刚. 化学通报, **2008**, 11: 838–845

9 Harrington J M, Jones S B, Hancock R D. *Inorg. Chim. Acta*, **2005**, 358(15): 4473–4480

10 CHEN Ying, ZHANG Man-Li, ZHANG Wei, HE Hong-Bo, GUAN Lian-Zhu, YAN Li. *Journal of Liaoning Technical University (Natura Science Edition)*, **2008**, 27(3): 478–480
陈 盈, 张满利, 张 威, 何洪波, 关连珠, 颜 丽. 辽宁工程技术大学学报(自然科学版), **2008**, 27(3): 478–480

11 Byrne L A, Hynes M J, Connolly C D, Murphy R A. *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, 105(12): 1656–1661

12 Liu X, Wang H, Liang A, Li Y, Gai H, Lin B. *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1270(24): 340–343

13 LIU Ying-Hong, SHA Ou, WANG Gui-Fen. *J. Huaihai. Inst. Technol(Nat. Sci. Ed)*, **2005**, 14: 56–58
刘英红, 沙 鸥, 王桂芬. 淮海工学院学报(自然科学版), **2005**, 14: 56–58

14 Hage D S, Schiel J E. *Encyclopedia Chromatogr.*, **2009**: 184–191

15 Bian L J, Qian L, Xu J. *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1401: 42–51

16 Calleri E, Temporini C, Massolini G. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **2011**, 54(5): 911–925

17 Chen B, Li R, Li S H, Chen X L, Yang K D, Chen G L, Ma X X. *J. Sep. Sci.*, **2016**, 39(3): 518–524

18 Bian L J, Geng X D. *Chin. J. Chrom.*, **1994**, 12(5): 317–320

19 Iwata H, Saito K, Furusaki S, Sugo T, Okamoto J. *Biotechnol. Prog.*, **1991**, 7(5): 412–418

20 Sengupta S, Sengupta A K. *Environ. Sci. Technol.*, **1993**, 27(10): 2133–2140

- 21 Foresti M L, Nyholm L. *J. Electroanal. Chem.*, **1989**, 269(1): 2144–2140
- 22 LIN Xiu-Li, ZHU Chen-Fu, ZOU Shi-Fu. *Chinese J. Anal. Chem.*, **1996**, 24(2): 175–179
林秀丽, 主沉浮, 邹时复. *分析化学*, **1996**, 24(2): 175–179
- 23 Li R, Wang Y, Chen G L, Wang X G, Zheng J B. *Chromatographia*, **2009**, 70(5-6): 731–737
- 24 Li R, Ju M Y, Chen B, Sun Q Y, Chen G L, Shi M, Wang X G, Zheng J B. *Korean Chem. Soc.*, **2011**, 32(2): 590–594
- 25 Sharma S, Agarwal G P. *Sep. Sci. Technol.*, **2002**, 37(15): 3491–3511
- 26 ZHANG Ji-Xin, SU Ke-Man, WANG Yan, HU Ping. *Analytical Chemistry* (6th ed). Beijing: Higher Education Press, **2009**: 102–126
张济新, 苏克曼, 王燕, 胡坪. *分析化学* (第六版). 北京: 高等教育出版社, **2009**: 102–126
- 27 Shircliff A D, Wilson K R, Cannon-Smith D J, Jones D G, Zhang Z, Chen Z Q, Yin G C, Prior T J, Hubin T J. *Inorg. Chem. Commun.*, **2015**, 59: 71–75
- 28 Sharma R P, Saini A, Venugopalan P, Jezierska J, Ferretti V. *Inorg. Chem. Commun.*, **2012**, 20(6): 209–213
- 29 S6v6g6, V6rnagy K. *Met. Ions Life Sci.*, **2013**, 11(11): 275–302

Study on Binding Characteristics of Aminocarboxyl Chelating Ligands for Metal Ions

CHEN Bin, WANG Shi-Hui, LI Rong*, FAN An

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

Abstract The feasibility of frontal chromatography for determining the complexation stability constant K_{ML} and total mole of binding site A_0 was demonstrated by the accuracy and precision binding experiments between metal ions (Cu^{2+} , Ni^{2+} and Co^{2+}) and chelating ligand (IDA), in which $R^2 > 0.98$ and $RSD < 5\%$. To further prove the universality of the frontal chromatography, the changing rules of K_{ML} values between Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} and IDA, Asp, L-Glu were examined under NaAc-HAc, Na-PB and Tris-HCl buffer systems. The results showed that the binding strength of chelating ligands for metal ions followed $IDA > Asp > Glu$; binding strength of metal ions for chelate ligands followed $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+}$; and the binding effect with NaAc-HAc buffer was the best. In aqueous solution, quantum computing of binding energy (ΔE) and gibbs free energy (ΔG) between chelating ligand and metal ion was performed at the M06/6-311++G (d, p) level. According to ΔE and ΔG , the binding rules between chelating ligand and metal ion were predicted theoretically. These rules were basically in agreement with above experimental results. The present work provided effective method for studying on binding characteristics of metal ions for aminocarboxyl chelating ligands, thus exhibited a good foundation for improving the stability of immobilized metal affinity chromatographic column and solving the leakage of metal ions from the column in the process of competitive elution.

Keywords Frontal chromatography; Quantum computing; Aminocarboxyl chelating ligand; Complexation stability constant; Total mole of binding site

(Received 15 March 2017; accepted 22 June 2017)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21376191) and the Natural Science Foundation of Shaanxi Province, China (No. 2011JM2013), the Service Local Special Project of Shaanxi Province Education Department (No. 14JF027) and the Industrialization Cultivation Item of Shaanxi Province Educational Department (No. 2013jc23)