

# PRACOWNIA BIOFIZYKI DLA ZAAWANSOWANYCH

Dr hab. Janusz Stępiński

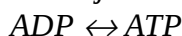
## Ćwiczenie 17

Zastosowanie jonowymiennej chromatografii kolumnowej oraz wysokociśnieniowej chromatografii w odwróconych fazach w chemicznej syntezie

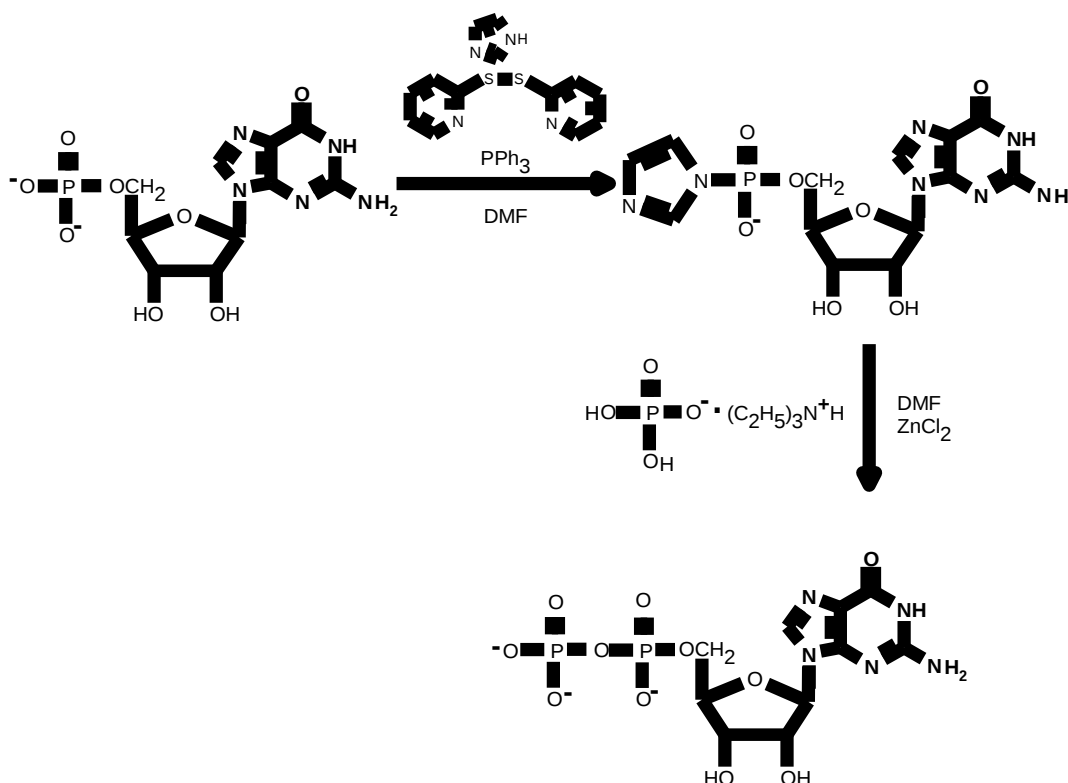
### 5'-difosforanów nukleozydów

#### Podstawy chemiczne ćwiczenia

Tworzenie wiązania pirofosforanowego w żywej komórce to jeden z podstawowych procesów biochemicznych, od którego uzależniona jest gospodarka energetyczna organizmów. Znamionym przykładem jest reakcja:



Wiązanie pirofosforanowe łączące dwie reszty fosforanowe przez mostek tlenowy ma charakter wiązania bezwodnikowego. Synteza nukleotydu 5'-di- i trifosforanowych możliwa jest też w sposób „sztuczny”, czyli na drodze chemicznej (bez udziału enzymów).



Rys. 1. Schemat chemicznej syntezy GDP.

Chemia nukleotydu narzuca jednak konieczność stosowania łagodnych warunków syntezy, ponieważ drastyczne metody jak np. wysoka temperatura reakcji doprowadziłyby do rozkładu

1



KAPITAŁ LUDZKI  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



substratów. Opierając się na fakcie, że kationy manganu  $Mn^{2+}$  stanowią katalizator reakcji enzymatycznych powstawania wiązania pirofosforanowego (mangan, podobnie jak i kilka innych pierwiastków metali przejściowych występuje w ilościach śladowych w organizmach żywych), opracowano chemiczną syntezę z udziałem tych jonów. Reakcję wykonuje się w wodzie, a jeden z substratów musi być aktywowany np. imidazolem. Stopień konwersji substratu do pochodnej pirofosforanowej w tej reakcji jest jednak nieduży i wynosi 20 – 30%. Próby usprawnienia syntezy doprowadziły do stwierdzenia, że katalizatorem reakcji mogą być też inne kationy, spośród których najlepsze rezultaty dają jony cynku  $Zn^{2+}$ . Jony cynkowe wymagają środowiska bezwodnego, ponieważ w obecności wody ulegają one hydratacji i tracą właściwości katalityczne.

Chemiczna synteza nukleotydów 5'-di- i trifosforanowych modyfikowanych w części nukleozydowej wydaje się być jedyną drogą otrzymywania takich związków, jako że często nie są one dostępne w handlu, a metody enzymatyczne mogą zawodzić ze względu na nienaturalną budowę substratów. Również w odniesieniu do związków handlowych synteza di- i tri-fosforanów może być opłacalna, gdyż takie związki mają bardzo wysokie ceny. Na przykład 5'-difosforan guanozyny (w skrócie GDP) jest około trzydziestokrotnie droższy, według cen katalogowych, od 5'-monofosforanu guanozyny (GMP). Synteza GDP z GMP w laboratorium, oprócz watorów poznawczych, ma więc również sens ekonomiczny.

## Metody badawcze i przepisy wykonawcze:

### 1. Wymiana jonowa na jonitach.

#### Otrzymywanie 5'-GMP w postaci soli trietyloamoniowej.

GMP przechowuje się najczęściej w postaci soli sodowej. Jeżeli jakkolwiek reakcję z GMP wykonuje się w rozpuszczalniku organicznym, należy przedtem sól sodową przeprowadzić w sól organiczną w celu zapewnienia jak największej rozpuszczalności tego substratu. Dogodną postacią jest sól trietyloamoniowa.

Wymiany jonowej dokonuje się na tzw. kationicie. Kationit to najczęściej polimer organiczny zmodyfikowany chemicznie tak, aby zawierał grupy o charakterze kwasowym, np. polimer-COOH, polimer-SO<sub>3</sub>H. W obecności jakichkolwiek jonów dodatnich (kationów) polimer wiąże siłami elektrostatycznego oddziaływania te kationy i uwalnia do roztworu jony wodorowe (następuje np. reakcja: polimer-SO<sub>3</sub>H + Na<sup>+</sup> → polimer-SO<sub>3</sub>Na + H<sup>+</sup>). Na kationicie może następować oczywiście jakkolwiek inna wymiana jonowa, np. reakcja odwrotna do opisanej, w obecności odpowiednio dużego stężenia jonów wodorowych.

Aby wykonać podaną w tytule operację należy dysponować kationitem w formie trietyloamoniowej, np. polimer-SO<sub>3</sub>N<sup>+</sup>H(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>. Poniżej podany jest przepis na przeprowadzenie 5 g soli sodowej GMP w sól trietyloamoniową. W kolumnie o objętości ok. 100 ml umieszcza się kationit (dół kolumny, o ile nie posiada ona dna ze szkła porowatego, zaopatruje się w zwitek waty i kolumnę napełnia zawiesziną kationitu w wodzie do wysokości 5 - 7 cm od górnej krawędzi) i przemywa 500 ml 10% kwasu solnego. W tej fazie regeneracji kationitu uzyskuje się go w formie wodorowej. Następnie kolumnę przemywa się wodą zdemineralizowaną (np. destylowaną) aż wyciek będzie obojętny. Po spuszczeniu ostatniej warstwy wody do zrównania jej poziomu z górnym poziomem kationitu nalewa się 20 ml trietyloaminy i kontynuuje zbieranie wycieku (operację wykonuje się koniecznie pod wyciągiem). Po "wsiąknięciu" trietyloaminy w warstwę kationitu, kolumnę przemywa się ponownie wodą aż wyciek będzie miał pH ok. 7. Kolumnę należy przepakować, tzn. zawiesziną kationitu w wodzie wylewa się do innego naczynia, a następnie napełnia ponownie kolumnę. W tym etapie kolumna gotowa jest do wykonania tytułowej operacji. GMP (sól disodowa) rozpuszcza się w ok. 50 ml wody i otrzymany roztwór nanosi się na kolumnę, potem przemywa się wodą do uzyskania ok. 0,5 l roztworu (w razie potrzeby można badać absorbancję UV wycieku w 260 nm, aby stwierdzić, że w wycieku nie ma już GMP). Wyciek



zateęza się na wyparce, a następnie pozostałość suszy się w eksykatorze próżniowym nad  $P_4O_{10}$  do uzyskania soli monotrietyloamoniowej GMP w postaci sypkiego proszku.

## 2. Jonowymienna chromatografia cieczowa

### 2a) Otrzymywanie $P^{5'}$ -imidazolidu GMP.

W kolbie poj. 500 ml zaopatrzonej w magnetyczny element mieszający umieszcza się 0,9 – 1,0 g GMP (ok. 2 mmoli) w postaci dobrze wysuszonej soli TEA (**pkt. 1**), 0,68 g imidazolu, 0,88 g 2,2'-ditiopirydyny i dodaje 10 ml bezwodnego DMF (N,N-dimetyloformamid) oraz 0,3 ml TEA (trietyloaminy). Kolbę ustawia się na mieszadle magnetycznym i dodaje jeszcze 1,1 g  $Ph_3P$  (trifenylfosfiny). Mieszanie kontynuuje się aż do całkowitego zaniku GMP (ok. 6 godz.). Reakcję kończy się dodając do kolby roztwór 1,0 g  $NaClO_4$  (nadchloran sodu bezwodny) w 100 ml bezwodnego acetonu. Dodatkowo mieszaninę rozcieńcza się dodając 20 ml acetonu. Kolbę chłodzi się w lodówce ok. 2 godz. i otrzymany osad soli sodowej imidazolowej pochodnej GMP odsącza się na lejku Schotta pod zmniejszonym ciśnieniem. Osad przemywa się na lejku 3 – 4 razy bezwodnym acetonem, za każdym razem rozcierając osad dokładnie z rozpuszczalnikiem, aż wyciek z lejka nie będzie już zabarwiony na żółto. Po przeniesieniu osadu do krystalizatora, suszy się go przez noc w eksykatorze próżniowym nad  $P_4O_{10}$ .

### 2b) Synteza 5'-GDP (tworzenie wiązania pirofosforanowego).

W kolbie zaopatrzonej w magnetyczny element mieszający umieszcza się otrzymaną poprzednio (**pkt. 2a**) imidazolową pochodną GMP, ok. 1,6 g soli trietyloamoniowej kwasu fosforowego\*, 12 ml DMF i rozpocząwszy mieszanie na mieszadle magnetycznym dodaje się 0,9 g bezwodnego  $ZnCl_2$ . Po 4 godz. zawartość kolby wlewa się do zlewki zawierającej roztwór 2 g wersenianu disodu (EDTA) w 200 ml wody, mieszając bagietką. Roztwór doprowadza się do pH ok. 6 dodając małymi porcjami  $NaHCO_3$ . Jeżeli mieszanina stanie się mętna należy dodać więcej EDTA.

*Nadmiar stechiometryczny donora reszty fosforanowej (soli kwasu fosforowego) jest korzystny, albowiem zapobiega (zmniejsza prawdopodobieństwo przebiegu ze względów statystycznych) reakcji ubocznej tworzenia się 5',5'-difosforanu diguanozyny ( $Gp_2G$ ).  $Gp_2G$  może powstawać, gdy imidazolowa pochodna GMP przereaguje z cząsteczką GMP uwolnioną uprzednio z imidazolowej pochodnej w wyniku ubocznej reakcji hydrolizy w obecności śladów wody. Obecności śladów wody nie można uniknąć, ponieważ sól trietyloamoniową kwasu fosforowego bardzo trudno jest uzyskać w formie bezwodnej. Zawartość  $Gp_2G$  w produktach reakcji rzutuje na czystość pożądanego produktu czyli GDP, ponieważ tego produktu ubocznego nie można oddzielić od GDP opisaną poniżej metodą oczyszczania.*

### 2c) Izolowanie 5'-GDP metodą chromatografii kolumnowej jonowymiennej.

Nukleotydy i inne związki zawierające reszty kwasu fosforowego dość trudno jest wydzielić z mieszanin poreakcyjnych prostymi metodami chemicznymi (np. w wyniku krystalizacji). Zauważmy, że roztwór otrzymany w pkt. 2b) zawiera obok pożądanego GDP, również wspomniany  $Gp_2G$ , inny produkt uboczny -  $Gp_3G$ , ślady GMP i ewentualnie innych fosforanów guanozyny, tudzież wiele soli nieorganicznych i organicznych (np. wersenian cynku, chlorek sodu, fosforan trietyloamoniowy użyty w nadmiarze, uwolniony imidazol itd.). Często stosowaną metodą oczyszczania tych związków jest podana w tytule chromatografia jonowymienna. Nośnikiem chromatograficznym (fazą stacjonarną, złożem chromatograficznym) jest odpowiednio spreparowany polimer sztuczny lub pochodzenia naturalnego zawierający grupy charakteryzujące się zdolnością koordynowania anionów (jonów ujemnych). Są to tzw. anionity (porównaj pkt. 1, w którym była mowa o kationitach; zarówno kationity jak i anionity mogą w określonych warunkach być wykorzystywane jako nośniki chromatograficzne). Do subtelnych rozdziałów chromatograficznych, jakim niewątpliwie jest opisywany tu przykład izolowania 5'-GDP, trzeba stosować nośniki specyficznie nadające się do określonego przypadku.



Używamy kolumny (o rozmiarach  $\Phi \cong 4$  cm i długości ok. 1,5 m) napełnionej anionitem (DEAE-Sephadex-A25) w formie wodorowęglanowej, czyli że w odpowiednich grupach funkcyjnych nośnika przykoordynowane są jony  $\text{HCO}_3^-$ . Na górę kolumny наносimy uzyskany w **pkt. 2b** roztwór wodny, uprzednio przesączony przez gęsty sączek, i przemywamy kolumnę obficie wodą korzystając z pompy perystaltycznej. Podczas przemywania wodą pozbywamy się soli, podczas gdy nukleotydy przykoordynowują się w miejscach aktywnych kolumny (wypierając jony wodorowęglanowe). Następnie przemywamy kolumnę roztworem wodorowęglanu trietyloamoniowego (tzw. TEAB\*) o wzrastającym liniowo stężeniu od 0 – 1 M. Zużywa się ok. 4,6 l fazy ruchomej, zbierając wyciek do probówek w automatycznym kolektorze frakcji. W celu detekcji substancji zawartych w poszczególnych probówkach mierzy się w spektrometrze UV (przy 260 nm) absorpcję roztworu w co piątej probówce, a następnie sporządza się wykres absorbancji w funkcji kolejności probówek. Otrzymuje się profil kilku pasm chromatograficznych, z których ten o największym polu powinien odpowiadać GDP. Dodatkowo zawartość wybranych probówek z pasma GDP analizuje się metodą HPLC (patrz **pkt. 3**). Probówki z pasma GDP o stopniu czystości powyżej 95% (można w razie gorszych rezultatów rozdziału obniżyć kryterium czystości) zbiera się razem jako frakcję GDP do kolby poj. 1 l i zateża na wyparce. W trakcie odparowywania trzeba dodawać alkohol etylowy, aby ułatwić rozkład TEAB. Pozostałość po destylacji nie powinna zawierać śladów trietyloaminy. Po wysuszeniu w eksykatorze próżniowym nad  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  substancję (czyli GDP w postaci soli bistrietyloamoniowej) należy zważyć i obliczyć wydajność (w % molowych) względem użytego GMP (**pkt. 2a**).

\* odczynniki otrzymywane według odrębnych procedur; w ćwiczeniu będą dostarczone przez prowadzącego.

### 3. Wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa w odwróconych fazach.

Stopień czystości otrzymanego produktu pośredniego ( $\text{P}^5$ -imidazolidu GMP, **pkt. 2a**), wybranych frakcji po chromatografii kolumnowej jonowymiennej oraz uzyskanego GDP (**pkt. 2c**) sprawdza się metodą HPLC (wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa). Wykorzystuje się kolumnę RP (z odwróconymi fazami, od ang. *reverse phase*) i roztwór wodny octanu amonu o stężeniu 0,05 M (pH 5,9) jako fazę ruchomą. Analizę wykonuje się w gradiencie wzrastającego liniowo stężenia metanolu w tym buforze od 0 – 25 % (v/v) w ciągu 15 min., przy przepływie 1,0 ml/min. Zawartość wycieku sprawdza się detektorem mierzącym absorpcję UV przy 260 nm.

#### Literatura:

1. Walenty Szczepaniak "Metody instrumentalne w analizie chemicznej", PWN, Warszawa 2002 (Rozdz. 14, 16-18)
2. Zygfryd Witkiewicz "Podstawy chromatografii", WNT, Warszawa 2000 (Rozdz. 1 i 3).  
lub  
inne opracowania omawiające podstawy chromatografii.

#### Wymagania:

1. Znajomość podstaw teoretycznych procesów chromatograficznych.
2. Chromatografia cieczowa ze szczególnym uwzględnieniem budowy blokowej aparatu HPLC.

Przykładowe pytania:

- podać podstawowe mechanizmy rozdziału chromatograficznego (zjawiska fizykochemiczne na granicy faz decydujące o procesie rozdziału chromatograficznego);
- podać schemat blokowy aparatury do chromatografii cieczowej;



- jakiego rodzaju detektory można używać w technice HPLC i jakie są główne zalety wymienionych detektorów;
- czym różni się chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (*reverse phase* HPLC) od rozdzielania w normalnym układzie faz; podać też ogólnie zakresy ich stosowania.

### Opracowanie wyników i wskazówki do opisu:

Opis powinien zawierać

1. Skrótowe przedstawienie wykonanych czynności;
2. Obliczenie wydajności całkowitej według wzoru:

$$\frac{\text{liczba moli otrzymanego GDP (M}_{\text{GDP}})}{\text{liczba moli wyjściowego GMP (M}_{\text{GMP}})} \cdot 100 \% =$$

gdzie:

$$M_{\text{GDP}} = \frac{\text{liczba gramów otrzymanego w pkt. 2c GDP}}{\text{masa molowa GDP} \cdot 2\text{TEA [g/mol]}}$$

$$M_{\text{GMP}} = \frac{\text{liczba gramów użytego w pkt. 2b GMP}}{\text{masa molowa GMP} \cdot \text{TEA [g/mol]}}$$

3. Wykres (profil chromatograficzny) absorbancji (UV przy  $\lambda=260$  nm) poszczególnych frakcji w funkcji kolejności próbek (dot. **pkt. 2c**). Wykres może być sporządzony odręcznie albo za pomocą odpowiedniego programu komputerowego (np. Excel).
4. Wydruki wyników HPLC z badania czystości wybranych frakcji w **pkt. 2c**.
5. Wydruki HPLC substratu (GMP, **pkt. 1**), imidazolowej pochodnej GMP (**pkt. 2a**), mieszaniny po reakcji w **pkt. 2b** oraz końcowego produktu (GDP, **pkt. 2c**).
6. Opisową analizę chromatogramu HPLC zsyntetyzowanego GDP (omówienie stopnia czystości uzyskanego preparatu).

