

PRACOWNIA BIOFIZYKI DLA ZAAWANSOWANYCH

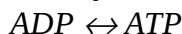
Dr hab. Janusz Stępiński

Ćwiczenie 41

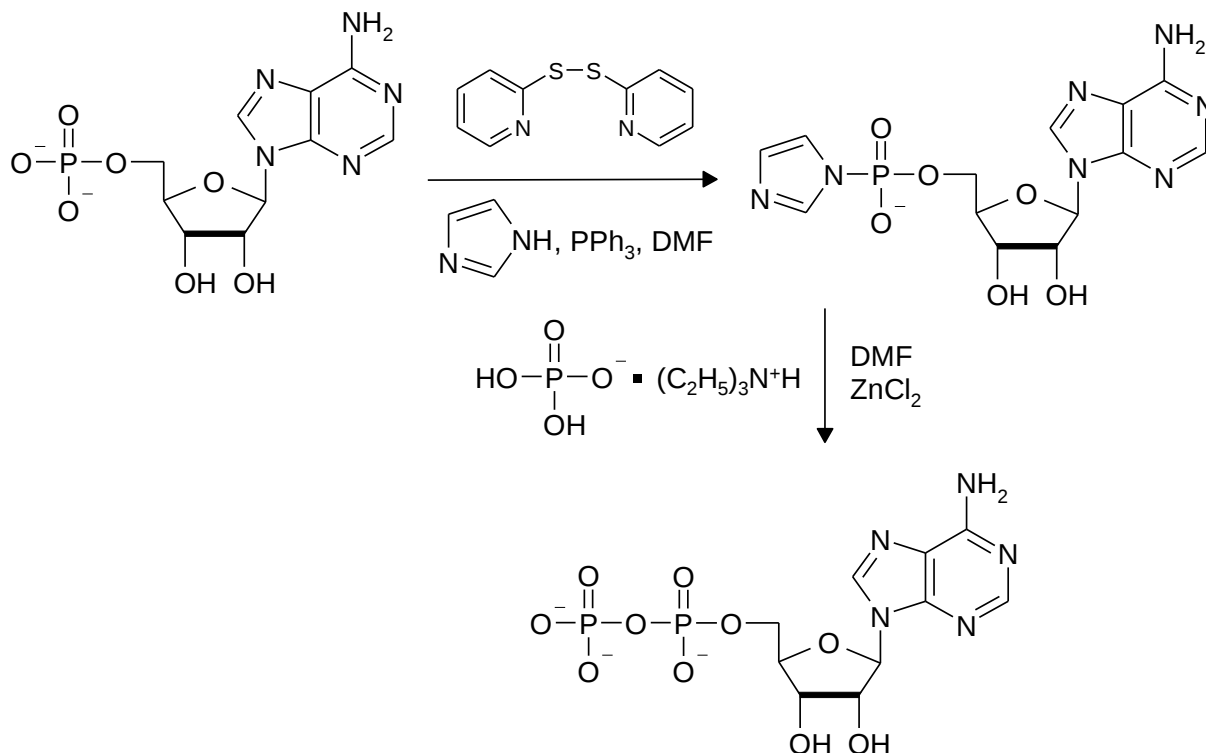
Zastosowanie jonowymiennej chromatografii kolumnowej oraz wysokociśnieniowej chromatografii w chemicznej syntezie 5'-difosforanu adenozy

Podstawy chemiczne ćwiczenia

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



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



Rys. 1. Schemat chemicznej syntezy ADP.

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

Metody badawcze i przepisy wykonawcze:

1. Wymiana jonowa na jonitach.

Otrzymywanie 5'-AMP w postaci soli trietyloamoniowej.

AMP przechowuje się najczęściej w postaci soli sodowej. Jeżeli jakkolwiek reakcję z AMP 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-SO₃H. W obecności jakichkolwiek jonów dodatnich (kationów) polimer wiąże siłami elektrostatycznego oddziaływania te kationy i uwalnia do roztworu jony wodorowe (następuje np. reakcja: polimer-SO₃H + Na⁺ → polimer-SO₃Na + H⁺). 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-SO₃N⁺H(C₂H₅)₃. Poniżej podany jest przepis na przeprowadzenie 5 g soli sodowej AMP 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. AMP (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 AMP). Wyciek zateża się na wyparce, a następnie pozostałość suszy się w eksykatorze próżniowym nad P₄O₁₀ do uzyskania soli monotrietyloamoniowej AMP w postaci sypkiego proszku.

2. Jonowymienna chromatografia cieczowa



2a) Otrzymywanie P^{5'}-imidazolidu AMP.

W kolbie poj. 500 ml zaopatrzonej w magnetyczny element mieszający umieszcza się 0,9 – 1,0 g AMP (ok. 2 mmoli) w postaci dobrze wysuszonej soli TEA (**pkt. 1**), 0,68 g imidazolu, 0,88 g 2,2'-ditiodipirydyny i dodaje 10 ml bezwodnego DMF (N,N-dimetyloformamidu) oraz 0,3 ml TEA (trietyloaminy). Kolbę ustawia się na mieszadle magnetycznym i dodaje jeszcze 1,1 g Ph₃P (trifenylfosfiny). Mieszanie kontynuuje się aż do całkowitego zaniku AMP (ok. 6 godz.). Reakcję kończy się dodając do kolby roztwór 1,0 g NaClO₄ (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 AMP 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 P₄O₁₀.

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

W kolbie zaopatrzonej w magnetyczny element mieszający umieszcza się otrzymaną poprzednio (**pkt. 2a**) imidazolową pochodną AMP, ok. 1,6 g soli trietyloamoniowej kwasu fosforowego*, 12 ml DMF i rozpoczynając mieszanie na mieszadle magnetycznym dodaje się 0,9 g bezwodnego ZnCl₂. 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 NaHCO₃. Jeżeli mieszanina stanie się mętna należy dodać więcej EDTA.

2c) Izolowanie 5'-ADP 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 ADP, również wiele innych związków. 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 rozdzielaczy chromatograficznych, jakim niewątpliwie jest opisywany tu przykład izolowania 5'-ADP, 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 przykoordinowane są jony HCO₃⁻. Na górę kolumny nanosimy uzyskany w **pkt. 2b** roztwór wodny, uprzednio przesączony przez gęsty sącdek, i przemywamy kolumnę obficie wodą korzystając z pompy perystaltycznej. Podczas przemywania wodą pozbywamy się soli, podczas gdy nukleotydy przykoordinują 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 ADP. Dodatkowo zawartość wybranych probówek z pasma ADP analizuje się metodą HPLC (patrz **pkt. 3**). Probówki z pasma ADP o



stopniu czystości powyżej 95% (można w razie gorszych rezultatów rozdziału obniżyć kryterium czystości) zbiera się razem jako frakcję ADP do kolby poj. 1 l i zatęża 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 P_4O_{10} substancję (czyli ADP w postaci soli bistrietyloamoniowej) należy zważyć i obliczyć wydajność (w % molowych) względem użytego AMP (**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 ($P^{5'}$ -imidazolidu AMP, **pkt. 2a**), wybranych frakcji po chromatografii kolumnowej jonowymiennej oraz uzyskanego ADP (**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 rozdziału 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:

$$\frac{\text{liczba moli otrzymanego ADP } (M_{ADP})}{4} \cdot 100 \% =$$



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



liczba moli wyjściowego AMP (M_{AMP})

gdzie:

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

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

3. Wykres (profil chromatograficzny) absorpcji (UV przy $\lambda=260$ nm) poszczególnych frakcji w funkcji kolejności probówek (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 (AMP, **pkt. 1**), imidazolowej pochodnej AMP (**pkt. 2a**), mieszaniny po reakcji w **pkt. 2b** oraz końcowego produktu (ADP, **pkt. 2c**).
6. Opisową analizę chromatogramu HPLC zsyntetyzowanego ADP (omówienie stopnia czystości uzyskanego preparatu).

