

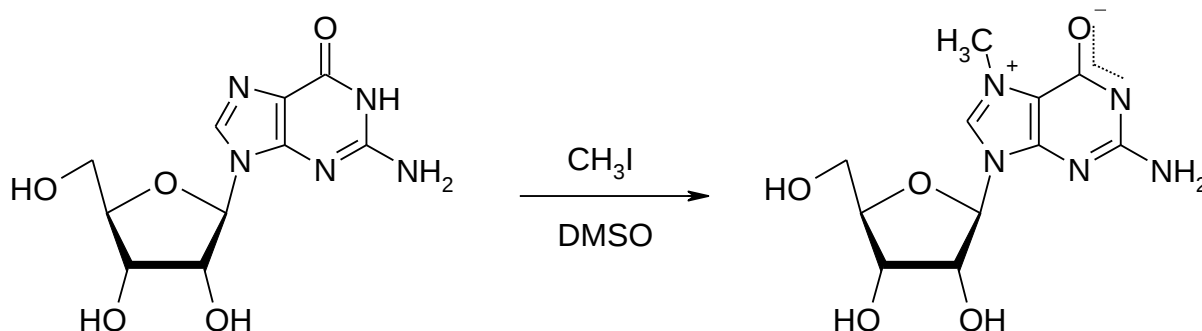
## PRACOWNIA BIOFIZYKI DLA ZAAWANSOWANYCH

### Ćwiczenie 40

#### Zastosowanie analitycznej i preparatywnej wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) w badaniach przebiegu reakcji chemicznych na przykładzie syntezy 7-metyloguanozyny

##### Wstęp

Pochodne metylowe zasad nukleinowych, nukleozydów i nukleotydów są często wykorzystywane w różnorodnych badaniach biochemicznych i biofizycznych. Ćwiczenie zapoznaje z metodą syntezy i wyodrębniania 7-metyloguanozyny po reakcji metylowania guanozyny za pomocą jodku metylu:



Rys. 1. Schemat chemicznej syntezy 7-metyloguanozyny (m<sup>7</sup>Guo).

#### Metody badawcze i przepisy wykonawcze:

##### 1. Synteza chemiczna.

W kolbce okrągłodennej (poj. 25-50 ml) umieszcza się magnetyczny element mieszający w kształcie „łezki”, dodaje 200 mg guanozyny, 3ml DMSO (dimetylosulfotlenek) oraz 200 μl jodku metylu (CH<sub>3</sub>I) i uruchamia mieszanie na mieszadle magnetycznym. Postęp reakcji bada się metodą HPLC (Sekcja 2a, patrz niżej). Po zakończeniu reakcji (na ogół po ok. 24 godz.) dodaje się 30 ml wody i zawartość kolby przenosi do rozdzielacza (poj. 50 – 100 ml). Przeprowadza się dwukrotną ekstrakcję eterem dietylowym (po 10 ml) w celu oddzielenia nadmiaru jodku metylu. Dolną warstwę zbiera się do kolby okrągłodennej i zatęcza się na wyparce obrotowej do ok. 5 ml. Pozostałość przenosi się do kolby stożkowej (erlemmajerki, poj. 100ml), popłukując wodą (1 ml), a następnie dodaje się wodę amoniakalną porcjami po 50 μl (do pH ok. 8) i na koniec 60 ml acetonu. Kolbę wstawia się do lodówki na noc. Osad odsącza się na lejku Schotta i po wysuszeniu sprawdza jednorodność metodą HPLC (Sekcja 2a).

Wydajność tak wykonanej syntezy wynosi ok. 60 %. Pozostała część produktu znajduje się w przesączu, z którego można wyodrębnić więcej 7-metyloguanozyny metodą preparatywnej HPLC. Przesącz przelewamy do kolby okrągłodennej i zatęczamy na wyparce do obj. ok. 5ml i dalej postępujemy według opisu w Sekcji 2b.

## 2. Wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa w odwróconych fazach (RP HPLC).

### a) HPLC na kolumnie analitycznej.

Postęp reakcji metylowania guanozyny oraz stopień czystości otrzymanego produktu bada się za pomocą HPLC. Wykorzystuje się kolumnę RP (z odwróconymi fazami, od ang. *reverse phase*) o wymiarach 4,6 mm x 25 cm z prekolumną 2 cm. Jako fazę ruchomą stosuje się roztwór wodny wodorofosforanu potasu o stężeniu 0,1 M i pH 6,0 (tzw. Bufor A). Przyrządza się go z 11 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  rozpuszczonych w kolbie miarowej poj. 1000 ml. Po rozpuszczeniu soli roztwór należy bezwarunkowo przesączyć na filtry bakteryjnym. Analizy są wykonywane w gradiencie liniowo wzrastającego stężenia metanolu. W tym celu przyrządza się również drugi roztwór (Bufor B) mieszając równe objętości Buforu A i metanolu (o czystości „HPLC grade”). W trakcie analizy zwiększa się udział Buforu B od 0% na początku do 40 % po 15 min, przy przepływie 1 ml/min. Detekcja spektrofotometryczna w zakresie UV (260 nm).

Najpierw wykonuje się chromatogram substratu. We fiolce Eppendorfa rozpuszcza się kilka kryształków guanozyny w 200  $\mu\text{l}$  wody i 10  $\mu\text{l}$  uzyskanego roztworu nanosi się na kolumnę. Podobnie wykonuje się analizy chromatograficzne w trakcie trwania reakcji. Co 1 godz. pobiera się z kolby reakcyjnej 5  $\mu\text{l}$  mieszaniny do próbówki Eppendorfa, rozcieńcza wodą (100  $\mu\text{l}$ ) i nanosi 10  $\mu\text{l}$  uzyskanego roztworu na kolumnę. Po zakończonych analizach drukuje się chromatogramy.

### b) HPLC na kolumnie preparatywnej.

*Kryształizacja (na przykład taka, jak opisana w Sekcji 1) czy inne klasyczne techniki wyodrębniania i oczyszczania związków mają ograniczone zastosowanie i nie zawsze dają dobre wydajności. Techniki chromatograficzne, dzięki wysokim współczynnikom podziału mogą stanowić bardzo dobrą metodę izolowania substancji, nawet ze skomplikowanych mieszanin. Zwiększając odpowiednio skalę procesu chromatograficznego można wykorzystać go do celów preparatywnych, tzn. podczas jednego przebiegu rozdzielania na kolumnie uzyskać miligramowe albo nawet gramowe ilości oczyszczonej substancji. Poniżej podany jest przykład zastosowania HPLC w skali preparatywnej do wydzielenia 7-metyloguanozyny z ługów pokryształicznych.*

Do celów preparatywnych stosujemy kolumnę o większych rozmiarach (o średnicy 21,2 mm) oraz taką fazę ruchomą, aby jej składniki można było stosunkowo łatwo usunąć w dalszym toku postępowania. Fazę ruchomą stanowi wodny roztwór octanu amonu (0,05 M) o pH 5,9, a w czasie przebiegu rozdzielania chromatograficznego stosuje się liniowy gradient metanolu od 0 % na początku do 50 % (v/v) po 30 min przy przepływie 5 ml/min. Podobnie jak wyżej, w detektorze przepływowym mierzona jest absorpcja w zakresie UV (260 nm).

Jednorazowo nanosi się (nastrzykuje) na kolumnę 200  $\mu\text{l}$  rozdzielanego roztworu. W trakcie rozdzielania, w czasie pojawienia się na monitorze piku odpowiadającego wypływowi wraz z fazą ruchomą 7-metyloguanozyny, wyciek z kolumny zbiera się do kolby okrągłodennej. Proces rozdzielania w razie potrzeby przeprowadza się wielokrotnie. Zebrane razem wycieki zatęża się do połowy objętości na wyparce i zamraża w zamrażalniku (np. do  $-80^\circ\text{C}$ ). Następnie stosuje się proces liofilizacji w celu usunięcia z kolby wody i octanu amonu. Pozostałość po jednokrotnej liofilizacji rozpuszcza się w 2-3 ml wody, zamraża się i ponownie liofilizuje (w ten sposób usuwa się resztki octanu amonu, który po jednokrotnej liofilizacji może jeszcze pozostawać w niewielkich ilościach w próbce). Drugą liofilizację wykonuje się w wytarowanym naczyniu szklanym, a po liofilizacji oznacza się masę uzyskanego produktu i oznacza jego stopień czystości (Sekcja 2a).

## 3. Wskazówki do opisu

Opis powinien zawierać:

1. Wymienione w punktach operacje chemiczne wykonywane podczas syntezy i analizy przebiegu reakcji.
2. Wykres postępu reakcji metylowania (na osi poziomej czas w godzinach; na osi pionowej procent zawartości produktu).
3. Wydrukowane wszystkie chromatogramy (substratu, z analizy postępu reakcji w czasie, z analizy czystości produktu wyodrębnionego po krystalizacji, z analizy czystości dodatkowej ilości produktu wyodrębnionego po liofilizacji).
4. Obliczenia wydajności reakcji.  
(M.cz. Guo = 283 g/mol; M.cz. m7Guo = 297 g/mol)

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