



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

209268

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 03 08 79

(21) (PV 5365-79)

(40) Zveřejněno 27 02 81

(45) Vydáno 01 05 83

(51) Int. Cl.³

C 08 F 20/18

C 08 F 20/36

C 08 F 20/30

B 01 J 41/14

(75)

Autor vynálezu

ROSENBERG IVAN Ing. a HOLÝ ANTONÍN RNDr. CSc., PRAHA

(54) Polymerní ionex pro kapalinovou chromatografii a způsob jeho přípravy

Polymerní ionex pro kapalinovou chromatografii a způsob jeho přípravy

Vynález popisuje vlastnosti, způsob přípravy a způsob použití nového polymeru ionexového typu, který je založen na kopolymeru ethylmetakrylátu a ethylenglykoldimetakrylátu (vyráběného jako Separon H nebo Spheron).

Polymerní ionex se připraví jednoduchou reakcí z meziprojektu, který je předmětem samostatné přihlášky. Reakce probíhá s vysokou konverzí a bez mimořádných nároků na chemikálie a zařízení a poskytuje materiál s vhodnými parametry pro vysoko účinnou kapalinovou chromatografii.

Použití je dokumentováno vysokou účinností směsí přirozených látek ze skupiny složek nukleových kyselin a slibuje praktickou aplikaci v oboru biochemie a klinických analýz.

Vynález se týká polymerního ionexu pro kapalinovou chromatografii a způsobu jeho přípravy.

Polymerní materiály ionexového charakteru se používají pro analytické a preparativní dělení směsí anorganických a organických sloučenin. Zvláštní význam mají v poslední době ionexy pro tzv. vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), která umožňuje ve spojení s vhodnými citlivými detektory rychlou a účinnou analýzu směsí. Použitý polymerní materiál musí pro tento účel splňovat ještě další podmínky, např. homogenní zrnění, malou stlačitelnost při vysokých provozních tlacích, malou objemovou změnu při změně iontové síly, polaritu a pH eluentu a konečně musí být chemicky stabilní v extrémních podmínkách. Tyto parametry závisí jednak na vlastnostech základní polymerní matrice, jednak na vlastnostech a způsobu vazby skupin na této matici vázaných.

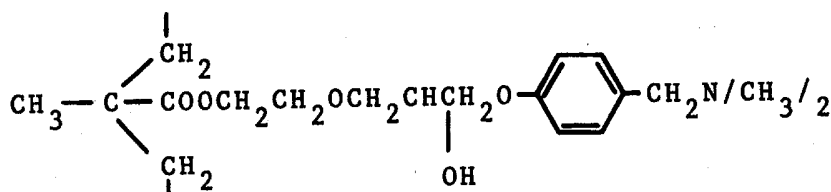
Vhodným polymerem pro přípravu takových ionexů je makroporesní glykol-metakrylátový gel, tj. kopolymer 2-hydroxyethylmethakrylátu a ethyl-

lenglykoldimethakrylátu (Separon H nebo též Spheron) viz dále jen Separon H, jehož matrice obsahuje chemicky stabilní jednotky typu 2-hydroxyethylsterů karboxylových kyselin (čs. autorské osvědčení 150 819).

Dosavadní práce uváděly přípravu některých ionexů na bázi Separonu H (karboxymethyl sulfonfyl fosforyl dimethylaminoethylderivát) (O. Mikeš, J. Zbrožek, J. Čoupek: J. Chromatogr. 119, 339 (1976); O. Mikeš, P. Štrob, J. Čoupek: J. Chromatogr. 153, 23 (1978)). K dosažení dostatečně vysokého stupně modifikace základního polymeru bylo však nutno reakci provádět opakovaně a s použitím méně snadno dostupných nebo nákladných činidel. Tyto nevýhody odstraňuje předmětný vynález nového polymerního ionexu, který dosahuje maximální substituce polymerního materiálu a to v jedné reakci a za mírných podmínek.

Podstatou vynálezu je nový polymerní ionex pro kapalinovou chromatografii, jehož strukturní jednotka má obecný vzorec I

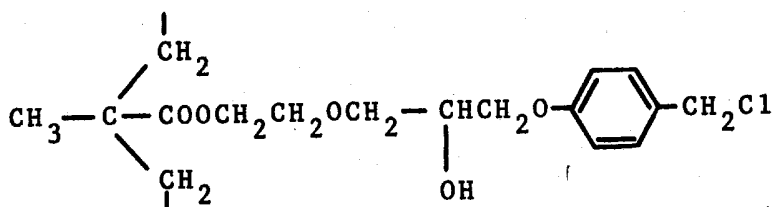
(I)



Podstatou přípravy tohoto ionexu je, že se 1-(4-chlormethylfenyloxy)-2-hydroxy-3-propylether kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu a ethyl-

lenglykoldimethakrylátu, jehož strukturní jednotka má obecný vzorec II

(II)



nechá reagovat s dimethylaminem bez rozpouštědla nebo v prostředí dioxanu, methanolu, ethanolu, chloroformu, dimethylformamidu nebo vody a při teplotách 20 °C až 100 °C, načež se výsledný produkt odfiltruje a promyje, případně suší.

Výchozí polymerní sloučenina vzorce II je snadno dostupná ze Separonu H postupně reakcí s fenylglycidyletherem a chlormethyletherem (čs. autorské osvědčení č. 209267) a obsahuje prakticky všechny substituovatelné funkční skupiny etherifikované ligandem s chlormethylskupinou, která je dostatečně stálá v nepřítomnosti silných nukleofilních činidel, je však dostatečně reaktivní vůči amoniaku a aminům. Proto probíhá reakce látky obecného vzorce II s dimethylaminem za poměrně mírných podmínek. Dimethylamin může být pro reakci použit v běžně dostupném koncentrovaném vodném roztoku, případně přímo jako rozpouštědlo se snadnou možností regenerace nebo může být

konečně ředěn dalšími, vůči němu inertními rozpouštědly (methanol, ethanol, chloroform, dioxan, dimethylformamid a další). Reakce probíhá s výhodou při mírně zvýšené teplotě, čímž se reakční doba zkracuje. Vzhledem k těkavosti dimethylaminu je také vhodné reakci provádět v uzavřené nádobě, případně v tlakové nádobě.

Po skončení reakce se polymerní materiál promyje k odstranění rozpouštědel a solí zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, vodou a vodu odnímajícími rozpouštědly. Získaný polymerní ionex na bázi Separonu H vzorce I je v chloridovém cyklu. Obsah dusíku, který určuje přítomnost dimethylaminoskupiny, odpovídá úplné konverzi chlormethylskupin v látce vzorce II na dimethylaminomethylskupiny.

Charakter takto připraveného polymerního ionexu vzorce I je určen přítomností kovalentně (etherově) vázaných skupin nesoucích terciární

aminoskupinu typu benzyldimethylaminu: látka vzorce I je středně basický anex s hodnotou pK v oblasti 7.7 (titrační křivka je uvedena na obr. 1). Proto může být s výhodou použit pro vzájemné dělení látek zásaditých, neutrálních a středně kyselých. Protože tento materiál dále obsahuje aromatické skupiny fenyletherové, mohou být pro dělení využity i neiontové interakce se složkami dělených směsí. Konečně, vzhledem k markoporesnímu charakteru nosiče může být využita i kapacita ionexu vzorce I k dělení látek na základě jejich molekulových hmotností.

Při reakci látky vzorce II s dimethylaminem se nemění významně fyzikální parametry pro použití při chromatografii a zvláště HPCL (velikost částic, relativní rychlost průtoku apod.) ve srovnání se základním (nesubstituovaným) Separonem H. Ionex je stálý ve vodných roztocích pufrů, ve zředěných anorganických a organických kyselinách a v roztocích zásad, dále v organických rozpouštědlech (např. ethanol, methanol, aceton, 2-propanol, dioxan, dimethylformamid, ether). Při změně tlaku, iontové síly, pH roztoku nedochází na kolonách s nosičem vzorce I k podstatným objemovým změnám. Jeho regeneraci lze provádět 2N kyselinou chlorovodíkovou a 2N hydroxidem sodným nebo draselným.

Použitelnost polymerního ionexu vzorce I pro dělení směsí organických látek je dokumentována analysami směsí složek nukleových kyselin (heterocyklických basí, ribonukleosidů, 2'-deoxyribonukleosidů a jejich nukleotidových derivátů), jakož i některých jejich derivátů (viz obr. 2). Tento příklad analyzy má význam v oblasti chemie a biochemie nukleových kyselin, molekulární genetiky a v klinické biochemii. Uvedené hodnoty elučních časů (tabulka 1) a diagramy dělení některých směsí (obr. 2) dokazují vysokou dělicí schopnost připraveného ionexu vzorce I, zvláště při použití borátového elučního roztoku, v němž se uplatňuje jako další faktor tvorba kyselých komplexů s látkami obsahujícími cis-diolové seskupení. Tyto údaje dokumentují vhodnost ionexu vzorce I pro účely mikroanalýzy směsí z přirozeného materiálu i pro účely enzymové kinetiky.

V dalším je předmět vynálezu osvětlen na příkladech provedení přípravy a použití, aniž se tím jakkoliv omezuje.

Příklad 1

Směs 20 g látky obecného vzorce II (připravené ze Separonu H-40) (10–15 μ), 100 ml dioxanu a 40 g bezvodého dimethylaminu se zahřívá v tlakové nádobě 6 hodin na 70 °C, pak se ponechá stát přes noc při teplotě místnosti, vzniklá suspence se odsaje a produkt na filtru promyje postupně (2 $\times$ 100 ml) dioxanem, směsí vody a dioxanu (1 : 3), vodou a ponechá stát 2 hodiny v 2 N kyselině chlorovodíkové. Pak se znovu odsaje, promyje vodou do neutrální reakce filtrátu a ponechá stát 1 hodinu s 2 N hydroxidem sodným. Po promytí vodou do neutrální reakce se postup s 2 N

kyselinou chlorovodíkovou opakuje, nakonec se promyje vodou do neutrální reakce, acetonem, etherem a suší se nad kyslíčným fosforečným ve vakuu. Získá se 20 g látky I v chloridovém cyklu. Obsah dimethylaminoskupin 1,9 mekv/g suché hmotnosti.

Příklad 2

Směs 2 g látky obecného vzorce II (připravené ze Separonu H-1000) (25–63 μ) a 20 ml 2 M roztoku dimethylaminu v methanolu se zpracuje stejně jako je uvedeno v Příkladu 1. Získá se 2,0 g látky vzorce I v chloridovém cyklu, obsah dimethylaminoskupin 1,95 mekv/g suché hmotnosti.

Příklad 3

Směs 2 g látky obecného vzorce II (připravená ze Separonu H-1000) (25–63 μ) a 20 ml bezvodého dimethylaminu se ponechá stát v uzavřené nádobě 48 hod. při teplotě místnosti. Pak se dimethylamin oddestiluje a zbytek se zpracuje stejně jako je uvedeno v Příkladu 1. Získá se 2 g látky vzorce I v chloridovém cyklu, obsah 1,87 mekv. dimethylaminoskupin/g suché hmotnosti.

Příklad 4

Směs 2 g látky obecného vzorce II (připraveného ze Separonu H-40) (10–15 μ), 20 ml chloroformu a 5 g dimethylaminu se zahřívá v tlakové nádobě 8 hodin na 50 °C a zpracuje stejně jako je uvedeno v Příkladu 1. Získá se 2 g látky vzorce I s obsahem 1,92 mekv. dimethylaminoskupin/g suché hmotnosti.

Dále je uveden příklad využití polymerních ionexů podle vynálezu pro dělení látek na koloně, která je naplněná látkou vzorce I. Kolona 0,8 $\times$ 10,5 cm byla plněna suspensí metodou z 15% suspence nosiče připraveného podle Příkladu 1 v 1 M pufru kyselina boritá-hydroxid sodný pH 8,60 a eluce provedena tímtež pufrém (koncentrace uvedena v tab. 1 a obr. 2) (průtok 124 ml/hod). Pracovní tlak 1 MPa (proporcionální programové mikročerpadlo PPM 68005, Výv. dílny ČSAV), teplota 20 °C $\pm$ 0,1 °C, nástřik 10 až 20 μ l. Detekce byla prováděna na přístroji UV III Monitor 1203 (LDC, USA) při 257 nm; citlivost 0,256 a 0,512 absorbačních jednotek na rozsah stupnice, s použitím zapisovače TZ 21 S (rychlost posunu 12 cm/hod). Údaje elučních časů jsou uvedeny v tabulce 1, diagramy některých dělených směsí na obrázku 2.

Obrázek 2 (obr. 2) obsahuje Grafy ABCD, na kterých je znázorněno dělení směsí látek na sloupci polymerního ionexu vzorce I.

Graf A, eluent 0,0025 M pufr; Graf B, eluent 0,01 M pufr, v 8,5 min lineární gradient 0,01 až 0,1 M pufr během 30 min. Graf C, eluent 0,001 M pufr, v 10 min lineární gradient 0,01 až 0,05 M pufr během 30 min, Graf D, eluent 0,15 M pufr.

DHPA znamená 9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin. Ostatní zkratky uvedené v Grafech jsou vysvětleny v tabulce 1.

Tabulka 1

Eluční časy některých sloučenin. (Čas t v minutách.)

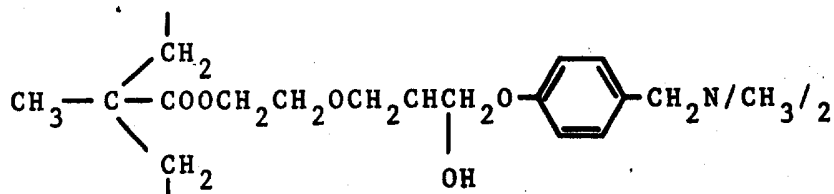
Podmínky viz příklad využití.

Látka	Koncentrace eluentu ($\times 10^{-3}$ M)							
	1	2,5	5	10	50	100	150	200
Cytosin (Cyt)	2,25	2,25		2,25				
Uracil (Ura)	6,0	5,50		4,0				
Thymin	5,25			4,0				
Adenin (Ade)	11,50	10,50	10,50	9,5	7,25			
Guanin (Gua)	8,0	7,0		6,0				
Hypoxanthin (Hx)	17,50	13,50	11,75	9,5	6,75			
Xanthin (Xan)		23,75		15,0	9,50			
Cytidin (Cyd)	5,50			4,50				
Uridin (Urd)		13,75		9,50	3,75			
3-Methyluridin		10,0						
Adenosin (Ado)	8,0	9,0	8,50	7,25	4,00			
Guanosin (Guo)								
Xanthosin (Xao)					18,00			
Inosin (Ino)					7,5			
2'-Deoxycytidin	2,0							
2'-Deoxyuridin	5,25							
2'-Deoxythymidin	4,5							
2'-Deoxyadenosin	4,5							
2'-Deoxyguanosin	8,0							
1-(α -L-Lyxofuranosyl) uracil					4,25			
1-(β -D-Lyxofuranosyl) uracil					3,50			
1-(β -D-Ribopyranosyl) uracil					3,25			
1-(β -D-Xylofuranosyl) uracil					3,75			
1-(β -D-Arabinofuranosyl) uracil					3,25			
5-Brom-2'-deoxyuridin					9,0			
Cytidin-5'-fosfát (CMP)						15,50	7,50	6,50
Adenosin-5'-fosfát (AMP)						25,0	10,5	8,50
Guanosin-5'-fosfát (GMP)							21,50	17,0
Uridin-5'-fosfát (UMP)						33,0	16,25	13,50
Uridin-2',3'-cyklofosfát						7,0		
Methylester uridin-3'-fosfátu						5,5		

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Polymerní ionex pro kapalinovou chromatografii, jehož strukturní jednotka má vzorec I

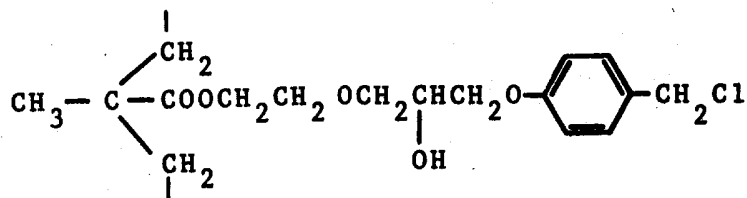
(I)



2. Způsob přípravy polymerních ionexů podle bodu 1, vyznačený tím, že se 1-(4-chlormethylfenyloxy)-2-hydroxy-3-propylether kopolymeru 2-

hydroxyethylmetakrylátu a ethylenglykoldimetakrylátu, jehož strukturní jednotka má obecný vzorec II

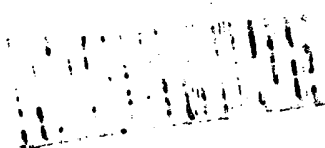
(II)

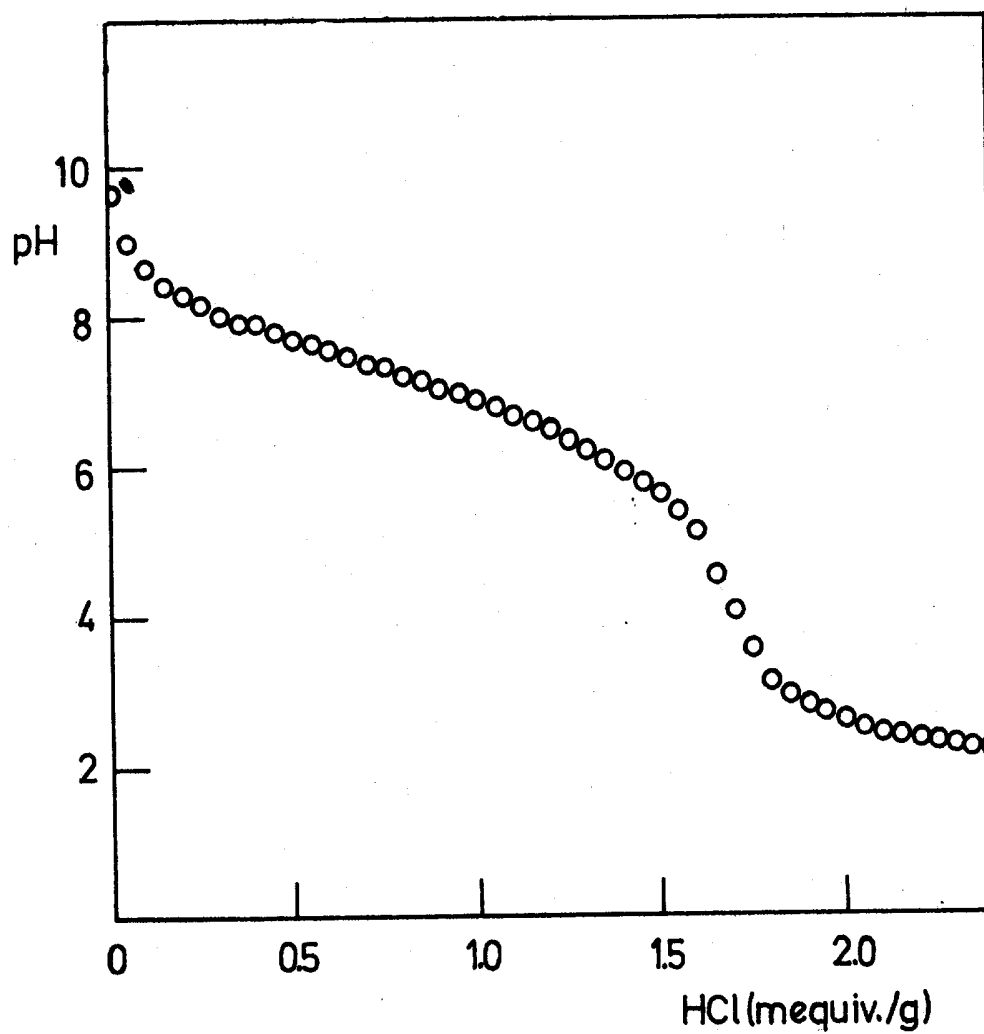


nechá reagovat s dimethylaminem bez rozpouštědla nebo v prostředí dioxanu, methanolu, ethanolu, chloroformu, dimethylformamidu nebo vody a při

teplotách 20 °C až 100 °C, načež se výsledný produkt odfiltruje a promyje, případně suší.

2 výkresy





Obr. 1

