

**Przygotowanie próbek biologicznych do analizy.
Badanie preparatów farmaceutycznych oraz tkanek i płynów fizjologicznych,
laboratorium**

Derywatywacja tioli

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Reakcja derywatywacji

Derywatywacja polega na przeprowadzeniu analitów, w wyniku reakcji chemicznej, w odpowiednie pochodne o właściwościach umożliwiających ich oznaczenie. W wyniku reakcji derywatywacji substancje, które są przedmiotem analizy uzyskują właściwości odpowiednie dla danej metody analitycznej. Ponieważ większość tioli, w tym biologicznie ważnych związków nie posiada strukturalnych własności, które umożliwiałyby ich oznaczenie przy użyciu najbardziej rozpowszechnionych w laboratoriach detektorów, koniecznym staje się przeprowadzenie zabiegu derywatywacji chemicznej.

Grupa tiolowa jest szeroko rozpowszechniona w związkach obecnych w materiale biologicznym. Są to zarówno związki małocząsteczkowe, takie jak: cysteina, homocysteina, glutation, kwas liponowy czy koenzym A, jak również związki wielkocząsteczkowe, takie jak: peptydy, enzymy i błony półprzepuszczalne. Wiele ważnych biologicznie reakcji, a mianowicie reakcje redox, przenoszenia grupy metylowej, wiązania dwutlenku węgla oraz reakcje z udziałem koenzymu A, jest determinowanych obecnością grupy sulfhydrylowej (-SH). Część związków tiolowych, jak np. homocysteina, stanowi doskonałe narzędzie podczas diagnozowania chorób związanych z zaburzeniami metabolizmu.

Odczynniki stosowane w derywatywacji tioli można podzielić na kilka grup. Pierwszą z nich stanowią związki, które w wyniku reakcji z funkcją tiolową, tworzą pochodne, które mogą być oznaczane z wykorzystaniem detekcji UV-Vis (np. kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) i N-etylomaleimid, halogenosulfonylobenzofurazany oraz monobromobimany), natomiast drugą odczynniki, które tworzą pochodne fluoryzujące (np. N-podstawione maleimidy, bimany, halogenosulfonylobenzofurazany, aldehyd o-ftalowy).

W niektórych przypadkach, w celu polepszenia właściwości analitów, wystarczy zastosować prostą reakcję fotochemiczną, termiczną, czy też reakcję kwas-zasada. Istnieje grupa związków, których modyfikacja wymaga jednak bardziej złożonych reakcji chemicznych, efektem czego może być zmiana układu wiązań atomów w cząsteczce, jak również przyłączenie dodatkowego fragmentu do cząsteczki związku. W przypadku takiej reakcji mamy do czynienia z derywatyzacją chemiczną. W końcowym etapie uzyskujemy zmodyfikowany analit, którego właściwości fizyko-chemiczne czynią go kompatybilnym z aktualnie stosowaną techniką analityczną. W przypadku niektórych procesów derywatywacji chemicznej uzyskuje się nie jeden, a kilka produktów przeprowadzanych przemian. Uzyskanie większej liczby pochodnych jednego analitu pozwala niejednokrotnie na wykorzystanie kilku z nich, w celu identyfikacji związku. Dodatkowo, ich właściwości umożliwiają osiągnięcie dużo niższych granic wykrywalności i oznaczalności w przypadku analizy ilościowej. Ciekawym przypadkiem derywatywacji chemicznej jest sytuacja, kiedy odczynnik derywatyzujący, podobnie zresztą jak analit, nie jest kompatybilny z wykorzystywanym podczas analizy detektorem. Dopiero produkt reakcji derywatywacji posiada właściwości fizyko-chemiczne, które umożliwiają jego detekcję. Przykładem tego typu związku może być aldehyd o-ftalowy (OPA), używany do derywatywacji aminokwasów.

Możliwości modyfikacji cząsteczek związków chemicznych

a) $A \rightarrow B$

Reakcja przebiegająca pod wpływem światła, temperatury, katalizatora, fal radiowych dająca jeden produkt;

b) $A \rightarrow B + C + D \dots$

Reakcja zachodząca pod wpływem światła, temperatury, katalizatora, fal radiowych. W tym samym czasie powstaje kilka pochodnych. W przemianach nie biorą udziału dodatkowe substancje.

c) $A + B \rightarrow C$

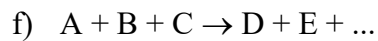
Pojedyncza reakcja chemiczna pomiędzy analitem i odczynnikiem chemicznym, w wyniku czego powstaje addukt.

d) $A + B \rightarrow C + D$

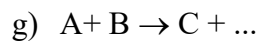
Pojedyncza reakcja chemiczna pomiędzy analitem i dodatkowym odczynnikiem chemicznym dająca dwie pochodne.

e) $A + B \rightarrow C + D \rightarrow E \dots$

Kilkuetapowa reakcja analitów z dodatkowym odczynnikiem dająca produkt (C), który reaguje następnie z innym odczynnikiem (D), w wyniku czego powstaje produkt (E). Istnieje możliwość tworzenie dodatkowych pochodnych.



Reakcja analitu (A) w której biorą udział równocześnie dwa odczynniki (B) i (C), w wyniku czego tworzy się kilka pochodnych (D) i (E) oraz inne.



Reakcja analitu (A) z odczynnikiem (B) dająca pochodną (C) zawierającą fragment cząsteczki odczynnika (B).

h) Wszystkie reakcje prezentowane powyżej (z wyjątkiem g), których produkty są następnie poddane reakcji przyłączenia fragmentu odczynnika derywatyzującego do analitu (reakcja g).

Celem wszystkich przedstawionych powyżej technik modyfikacji analitu jest poddanie związku chemicznego reakcji prowadzącej do otrzymania pochodnych o właściwościach ułatwiających, bądź w ogóle umożliwiających jego identyfikację, separację i oznaczanie. Właśnie taka modyfikacja cząsteczki analitu jest nazywana derywatyzacją. Derywatywacja jest więc modyfikacją chemiczną związku w celu otrzymania nowego związku posiadającego właściwości bardziej odpowiednie dla specyficznej metody analitycznej.

Specyfika stosowanych technik analitycznych określa charakter otrzymanych w wyniku derywatywacji zmodyfikowanych związków chemicznych. Głównym zadaniem derywatywacji w przypadku dostosowywania analitów do wymagań chromatografii gazowej będzie najczęściej zwiększenie lotności i polepszenie stabilności termicznej oznaczanej substancji, w chromatografii ciekowej polepszenie rozdzielczości oraz parametrów detekcji podczas procesu rozdzielania chromatograficznego. W przypadku elektroforezy kapilarnej głównym ograniczeniem jest detekcja, dlatego też modyfikacja analitu ma najczęściej na celu przystosowanie analitu do wymagań stosowanego detektora. Derywatywacja chemiczna analitu polepsza czułość i wykrywalność, może również zwiększyć selektywność metody, jeśli odczynnik derywatyzujący reaguje w matrycy wyłącznie z interesującym nas analitem. Dodatkowo, w wyniku derywatywacji dla potrzeb elektroforezy kapilarnej otrzymuje się związki, które wykazują większą stabilność, lepsze właściwości elektroforetyczne, niejednokrotnie lepszą rozpuszczalność w aktualnie stosowanym buforze. Zdarza się też, że celem derywatywacji chemicznej jest przeprowadzenie substancji gazowej w inny stan skupienia, kompatybilny ze stosowaną techniką analityczną.

Główne przyczyny modyfikacji analitów

Dostosowanie analitów do aktualnych wymagań techniki analitycznej może być spowodowane wieloma względami. Poniżej przedstawiono główne przyczyny modyfikacji analitów:

- a) analit niekompatybilny ze stosowanym detektorem może być przekształcony w pochodną o zmienionych właściwościach w porównaniu ze związkiem wyjściowym, poddanym procesowi derywatywacji;
- b) substancja, która nie może być rozdzielana w swej pierwotnej postaci, może uzyskać wymagane właściwości separacyjne na skutek zmian w strukturze cząsteczkowej, bądź po przyłączeniu fragmentu odczynnika derywatywującego;
- c) związek trudny do separowania od innych składników próbki (np. matrycy) może zostać rozdzielony, po przekształceniu w wyniku procesu derywatywacji;
- d) związki, które dają sygnał analityczny w niewielkim zakresie liniowości, pozwalający na osiągnięcie stosunkowo wysokich granic wykrywalności są przekształcane w pochodne, które pozwalają uzyskać znacznie lepsze parametry detekcji.

Cel ćwiczenia

Przeprowadzenie reakcji derywatywacji analitów z wykorzystaniem dwóch różnych odczynników derywatywujących oraz określenie czynników powodujących przesunięcie batochromowe.

Odczynniki i roztwory

- Roztwory:
 - tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego (CMQT) o stężeniu 10 $\mu\text{mol/ml}$,
 - bromku 1-benzyl-2-chloropirydyniowego (BBCP) o stężeniu 10 $\mu\text{mol/ml}$,
 - cysteiny (CSH) o stężeniu 10 $\mu\text{mol/ml}$,
 - homocysteiny (HCSH) o stężeniu 10 $\mu\text{mol/ml}$.
- 3 M kwas solny
- bufor fosforanowy o pH 7,9, 0,2 M
- woda dejonizowana

Sprzęt laboratoryjny

- Spektrofotometr HP8453
- Kuweta kwarcowa 1 cm
- Pipety automatyczne
- Kolby miarowe o pojemności 5 i 10 ml
- tryskawka

Wymagane środki ostrożności

- ✓ W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- ✓ Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- ✓ Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE):

Kwas solny - C Produkt żrący R34, Xi Produkt drażniący R37

- ✓ Pierwsza pomoc:
 - w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody z mydłem.
 - w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece.
 - w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem.
 - W przypadku połknięcia NIE prowokować wymiotów. Nieprzytomnej osobie nigdy nie podawać nic doustnie. Wypłukać usta wodą. Zasięgnąć porady medycznej.

Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.

Wykonanie ćwiczenia

1. Obliczyć, jakie objętość roztworów wzorcowych CMQT, BCBP, CSH i HCSH będą potrzebne do przygotowania roztworów roboczych w kolbach miarowych o objętości 10 ml.

Stężenia roztworów roboczych:

- a) CMQT o stężeniu 50 nmol/ml,
- b) BCBP o stężeniu 50 nmol/ml,
- c) CSH o stężeniu 50 nmol/ml,
- d) HCSH o stężeniu 50 nmol/ml.

2. Przygotować kolbki z odpowiednimi podpisami

3. Przygotować roztwory robocze w kolbach miarowych o pojemności 10 ml.

4. Przeprowadzić reakcję derywatyzacji HCSH i CSH z CMQT.

- Do dwóch kolb miarowych o pojemności 5 ml wprowadzić po 500 μ l buforu fosforanowego o stężeniu 0,2 M i pH 7.9.
- Do pierwszej kolby dodać 25 μ l HCSH o stężeniu 10 μ mol/ml.
- Do drugiej kolby dodać 25 μ l CSH o stężeniu 10 μ mol/ml.
- Do obu kolb dodać po 25 μ l CMQT o stężeniu 10 μ mol/ml.
- Zawartość obu kolb wymieszać i pozostawić na 5 minut.
- Do obu kolb wprowadzić po 100 μ l 3 M HCl.
- Obie kolby uzupełnić wodą do objętości 5 ml.

3. Przeprowadzić reakcję derywatywacji HCSH i CSH z BCBP.

- Do dwóch kolb miarowych o pojemności 5 ml wprowadzić po 500 μl buforu fosforanowego o stężeniu 0,2 M i pH 7.9.
- Do pierwszej kolby dodać 25 μl HCSH o stężeniu 10 $\mu\text{mol/ml}$.
- Do drugiej kolby dodać 25 μl CSH o stężeniu 10 $\mu\text{mol/ml}$.
- Do obu kolb dodać po 25 μl BCBP o stężeniu 10 $\mu\text{mol/ml}$.
- Zawartość obu kolb wymieszać i pozostawić na 15 minut.
- Do obu kolb wprowadzić po 100 μl 3 M HCl.
- Obie kolby uzupełnić wodą do objętości 5 ml.

4. Zarejestrować widmo UV-Vis roztworów w następującej kolejności:

Pomiar A

- 0,2 M buforu fosforanowego, pH 7,9,
- HCSH o stężeniu 50 nmol/ml
- CSH o stężeniu 50 nmol/ml
- CMQT o stężeniu 50 nmol/ml,

Omówić różnice w widmach, wykonać zdjęcia widoku widm, usunąć widma buforu, HCSH i CSH. Zostawić widmo CMQT.

Pomiar B - do widma CMQT dograć:

- HCSH - CMQT
- CSH - CMQT

Omówić różnice w widmach i przesunięcie batochromowe, wykonać zdjęcia widoku widm, usunąć widma HCSH -CMQT i CSH-CMQT. Zostawić widmo CMQT.

Pomiar C - do widma CMQT dograć:

- BCBP o stężeniu 50 nmol/ml,

Omówić różnice w widmach, usunąć widmo CMQT. Zostawić widmo BCBP.

Pomiar D - do widma BCBP dograć:

- HCSH - BCBP
- CSH - BCBP

Omówić różnice w widmach i przesunięcie batochromowe, wykonać zdjęcia widoku widm, usunąć wszystkie widma.

Wykonanie sprawozdania

1. Przygotować wstęp teoretyczny, wskazać cel ćwiczenia.
2. Opisać przebieg wykonania ćwiczenia, wskazać, czy były jakieś trudności z jego wykonaniem.
3. Przygotować rysunek (skan, zdjęcie) kolejno rejestrowanych widm.
4. Opisać obserwacje dotyczące porównania widm UV-Vis otrzymanych dla poszczególnych roztworów.
5. Podać maksima absorpcji dla poszczególnych widm.
6. Określić wartości batochromowych przesunięć maksimów absorpcji dla pochodnych CSH i HCSH względem CMQT oraz BCBP.
7. Wskazać, który z badanych odczynników derywatyzujących wykazuje lepsze właściwości spektrofotometryczne i dlaczego.
8. Zweryfikować poprawność zapisu jednostek.

Literatura

1. R. Głowacki, Wykorzystanie derywatywacji w analizie próbek biologicznych na zawartość aminotiosioli techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV-Vis, Wiad. Chem. 63 (2009) 11-12.
2. S.H. Mudd, H.L. Levy and F. Skovby, in C.G. Scriver, A.L. Beudet, W.S. Sly and D. Valle (Eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease, 6th ed. McGraw Hill, NY, 1989.
3. S.T. Colgan, I.S. Krull, C. Dorschel and B. Bidlingmeyer, J. Chromatogr. Sci. 26 (1988) 501.
4. S.T. Colgan, I.S. Krull, C. Dorschel and B. Bidlingmeyer, Anal. Chem. 58 (1986) 2366.
5. I.S. Krull, Z. Deyl and H. Lingeman, J. Chromatogr. B, 659 (1994) 1.