

Derywatywacja tioli

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Reakcja derywatywacji 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 umożliwiłyby ich oznaczanie przy użyciu najbardziej rozpowszechnionych w laboratoriach detektorów (spektrofotometrycznych z zakresu UV-Vis), koniecznym staje się przeprowadzenie zabiegu derywatywacji chemicznej.

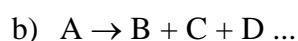
Grupa tiolowa (-SH) jest szeroko rozpowszechniona w związkach obecnych w materiale biologicznym. Są to zarówno związki małocząsteczkowe, takie jak: cysteina, homocysteina, glutation, kwas liponowy czy koenzym A, jak również związki wielkocząsteczkowe, takie jak: peptydy, enzymy i błony półprzepuszczalne. 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), sole pirydyniowe i sole chinoliniowe), natomiast drugą grupę 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 derywatywacją chemiczną. W końcowym etapie uzyskujemy zmodyfikowany analit, którego właściwości fizykochemiczne czynią go kompatybilnym z aktualnie stosowaną techniką analityczną. W przypadku

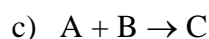
niektórych procesów derywatywacji chemicznej otrzymuje się nie jeden, a kilka produktów przeprowadzanych przemian. Uzyskanie większej liczby pochodnych jednego analitu pozwala niejednokrotnie na wykorzystanie kilku z nich, w celu identyfikacji związku. Dodatkowo, ich właściwości umożliwiają osiągnięcie dużo niższych granic wykrywalności i oznaczalności w przypadku analizy ilościowej. Ciekawym przypadkiem derywatywacji chemicznej jest sytuacja, kiedy odczynnik derywatygujący, 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. Poniżej przedstawiono możliwości modyfikacji cząsteczek związków chemicznych, poddawanych następnie analizie końcowej.



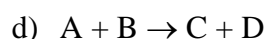
Reakcja przebiegająca pod wpływem światła, temperatury, katalizatora, fal radiowych dająca jeden produkt;



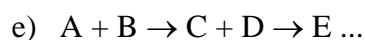
Reakcja zachodząca pod wpływem światła, temperatury, katalizatora, fal radiowych. W tym samym czasie powstaje kilka pochodnych. W przemianach nie biorą udziału dodatkowe substancje.



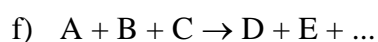
Pojedyncza reakcja chemiczna pomiędzy analitem i odczynnikiem chemicznym, w wyniku czego powstaje addukt.



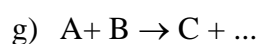
Pojedyncza reakcja chemiczna pomiędzy analitem i dodatkowym odczynnikiem chemicznym dająca dwie pochodne.



Kilkuetapowa reakcja analitu (A) z odczynnikiem (B) 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. Derywatyżacja jest więc modyfikacją związku w celu otrzymania nowego związku posiadającego właściwości bardziej odpowiednie dla specyficznej metody analitycznej.

Specyfika stosowanych technik analitycznych określa charakter otrzymanych w wyniku derywatyżacji zmodyfikowanych związków chemicznych. Głównym zadaniem derywatyżacji w przypadku dostosowywania analitów do wymagań chromatografii gazowej będzie najczęściej zwiększenie lotności i polepszenie stabilności termicznej oznaczanej substancji, w chromatografii cieczowej 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. Derywatyżacja chemiczna analitu polepsza czułość i wykrywalność, może również zwiększyć selektywność metody (nadanie ładunku cząsteczce), jeśli odczynnik derywatyżujący reaguje w matrycy wyłącznie z interesującym nas analitem. Dodatkowo, w wyniku derywatyżacji 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 derywatyżacji chemicznej jest przeprowadzenie substancji gazowej w inny stan skupienia, kompatybilny ze stosowaną techniką analityczną.

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 derywatyżacji;

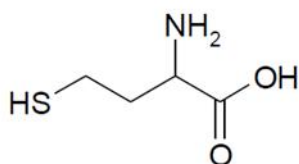
- b) substancja, która nie może być rozdzielana w swej pierwotnej postaci, może uzyskać wymagane właściwości separacyjne na skutek zmian w strukturze cząsteczkowej, bądź po przyłączeniu fragmentu odczynnika derywatyżującego;
- c) związek trudny do separowania od innych składników próbki (np. matrycy) może zostać rozdzielony, po przekształceniu w wyniku procesu derywatyżacji;
- 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.

I. Cel ćwiczenia

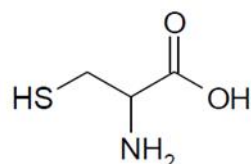
Przeprowadzenie reakcji derywatyżacji wybranych aminokwasów tiolowych, cysteiny (CSH) i homocysteiny (HCSH) za pomocą tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego (CMQT) i bromku 1-benzyl-2-chloropirydynowego (BBCP) oraz na podstawie uzyskanych wyników porównanie i omówienie zaistniałych różnic.

Wzory strukturalne stosowanych w ćwiczeniu analitów przedstawia rysunek 1.

Homocysteina (HCSH)

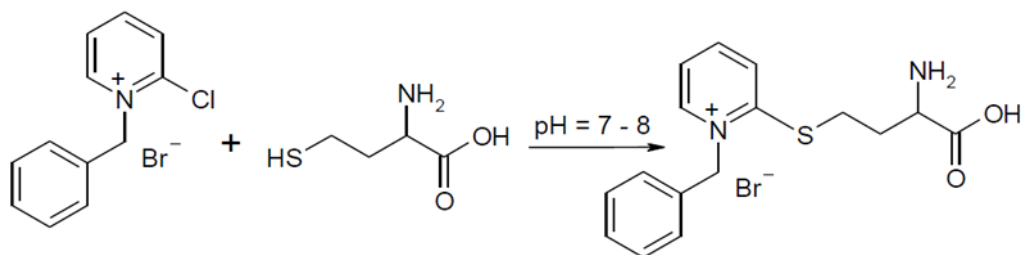


Cysteina (CSH)

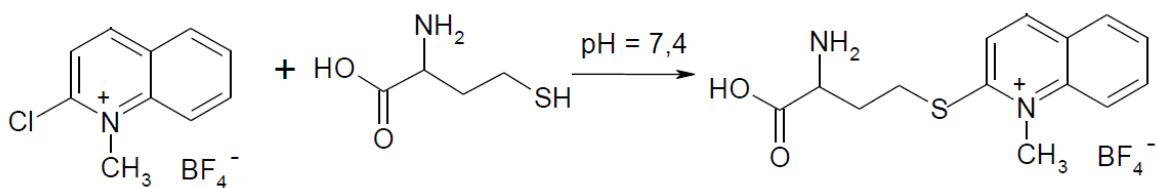


Rys. 1. Wzory analitów.

Tiole (HCSH i CSH) reagują z solami pirydynowymi (BBCP) i chinoliniowymi (CMQT) tworząc tioeterowe pochodne. Równania odpowiednich reakcji przedstawiono na rysunku 2 i 3.



Rys. 2. Schemat reakcji derywatyżacji HCSH z bromkiem 1-benzyl-2-chloropirydynowym (BBCP)



Rys. 3. Schemat reakcji derywatywacji HCSH z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylochino-
liniowym (CMQT)

I. Aparatura, odczynniki i roztwory

- Spektrofotometr HP8453
- Roztwory analitów i odczynników derywatyzujących:
 - tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego (CMQT) o stężeniu $10 \mu\text{mol/ml}$,
 - bromku 1-benzylo-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
- Kuweta kwarcowa 1 cm
- Pipety automatyczne
- Kolby miarowe o pojemności 5 i 10 ml
- Bufor fosforanowy o pH 7,9
- Woda dejonizowana

II. Wykonanie ćwiczenia

1. W kolbach miarowych o pojemności 10 ml przygotować roztwory:

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

2. Przeprowadzić reakcję derywatywacji z CMQT.

Do kolby o pojemności 5 ml wprowadzić 500 μl buforu fosforanowego o pH 7,9, 25 μl HCSH o stężeniu $10 \mu\text{mol/ml}$ oraz 25 μl CMQT o stężeniu $10 \mu\text{mol/ml}$. Zawartość kolby wymieszać i pozostawić na 5 minut. Do kolby wprowadzić 100 μl 3 M HCl i uzupełnić wodą do objętości 5 ml.

Powyższą procedurę należy zastosować do przygotowania roztworu pochodnej CSH.

3. Przeprowadzić reakcję derywatywacji z BBCP.

Do kolby o pojemności 5 ml wprowadzić 500 μ l buforu fosforanowego o pH 7.9, 25 μ l HCSH o stężeniu 10 μ mol/ml oraz 25 μ l BBCP o stężeniu 10 μ mol/ml. Zawartość kolby wymieszać i pozostawić na 15 minut. Do kolby wprowadzić 100 μ l 3 M HCl i uzupełnić wodą do objętości 5 ml.

Powyższą procedurę należy zastosować do przygotowania roztworu pochodnej CSH.

4. Zarejestrować widmo UV-Vis:

- buforu fosforanowego,
- roztworów CMQT, BBCP, CSH, HCSH o stężeniu 50 nmol/ml,
- roztworów otrzymanych po reakcji derywatywacji.

III. Opracowanie wyników

1. Porównać widma UV-Vis otrzymane dla poszczególnych roztworów.
2. Wyznaczyć maksima absorpcji.
3. Określić wartości batochromowych przesunięć maksimów absorpcji dla pochodnych CSH i HCSH względem odczynników derywatywujących.

Literatura

1. R. Głowacki, Wykorzystanie derywatywacji w analizie próbek biologicznych na zawartość aminotiosi 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.