

# Chemické derivatizace s alkyl- chlorformiáty a jejich využití v hygieně

K. Černá, Š. Dušková, J. Mráz,  
L. Řimnáčová\*, P. Šimek\*

Státní zdravotní ústav Praha

\*Biologické centrum AV ČR České Budějovice

# Možnosti chemické analýzy

## GC či HPLC

- Vzduch – obvykle látky těkavé, někdy příliš reaktivní
- Metabolity – látky polární, ve vodném prostředí (krev, moč),  
=> nutná předúprava vzorku

? Jak analyt z matrice dostat ?

Extrakce, zakoncentrování, derivatizace

# Chemická derivatizace - 1

- Cílená přeměna analytu ( $A-X$ ) chemickou reakcí jeho funkční skupiny s vhodným derivatizačním činidlem ( $D-Y$ )  
-> na produkt (derivát,  $A-Y$ ) s požadovanými fyzikálně-chemickými vlastnostmi



- Využití: GC, GC-MS, HPLC, HPLC-MS
- Proč: umožnění separace, detekce, změna (snížení) polarity, změna rozpustnosti ve vodné/org. fázi, těkavosti, změna náboje analytu, rychlost reakce, spojení s extrakcí, automatizace

Jak naložit s polárními analyty?

# Chemická derivatizace - 2

## DERIVATIZACE V HYGIENĚ

### 1- Silylace

univerzální, prozkoumané

vyžaduje zahřívání desítky minut

aplikace: cukry, mastné/organické kys., steroidy, amk, OH-kys.

### 2- Esterifikace

snižuje aciditu, stabilní deriváty

aplikace: analýza lipidů – stanovení m.k., identifikace a určování dvojných vazeb, butylace karnitinů, stanovení organických kys. – metabolitů průmyslových rozpouštědel

### 3- Acylace

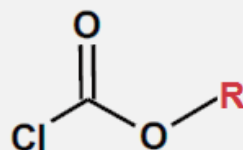
zlepšení těkavosti

aplikace: chirální analýzy amk, derivatizace aromatických aminů

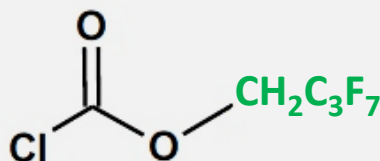
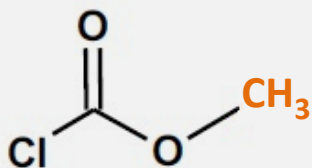
**Nevýhoda: jen v bezvodém prostředí**

# Derivatizace s alkyl-chlorformiáty (RCF) - 1

**RCF** - jednoduchá činidla schopná reagovat s funkčními skupinami ve vodném prostředí (moč, plasma) v sekundách. Navíc v jediném kroku provedena též extrakce.



**Příklady:** **MCF**, ECF, PCF, BCF, IBCF, PentCF, HCF + fluorované: TFECF, PFPCF, **HFBCF**



## Vlastnosti:

- Vysoká reaktivita s funkčními skupinami (-COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH)
- Možnost reagovat i ve vodném prostředí (např. fyz.roztok, pufr, plasma, moč)
- Spojení derivatizace a extrakce do jednoho kroku (extrakce do org. rozpouštědla)

# Derivatizace s alkyl-chlorformiáty (RCF) - 2

Reakční produkty s  
alkyl chlorformiáty

-COOH

Alkyl ester

-OH

Alkyl karbonát

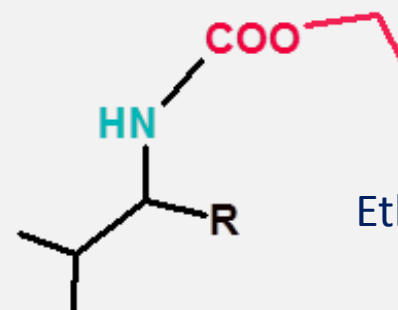
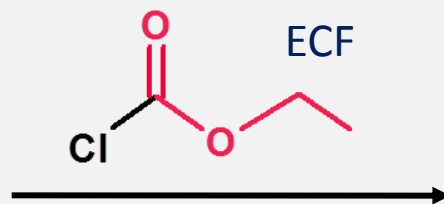
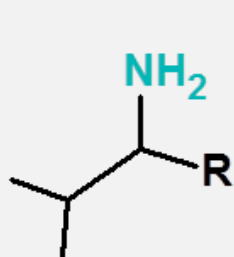
-NH<sub>2</sub>

Alkyl karbamát

-SH

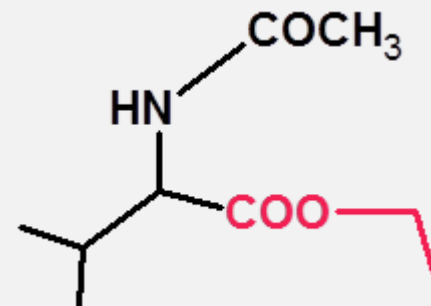
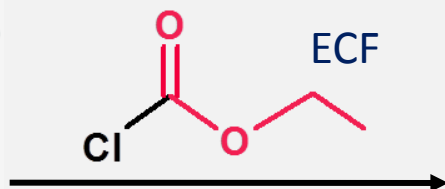
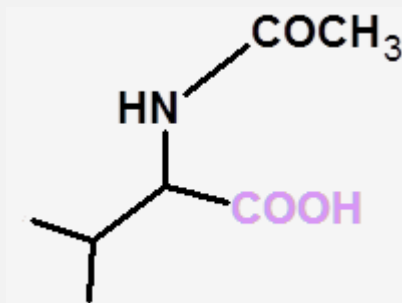
Alkyl thiokarbonát

## A. AMINO skupina



Ethyl karbamát

## B. KARBOXY skupina



Ethyl ester

# Derivatizace s alkyl-chlorformiáty (RCF) - 3

## OPTIMALIZACE DERIVATIZACE S RCF

**Analyt** (v moči, plasmě, fyz.r.)

- **alkohol:organické r.** – katalyzátor + disperzant, vhodná kombinace, např. EtOH:pyridin (jaký poměr, objem?)
- **derivatizační činidlo** – zvolit s identickou strukturou k alkoholu, najít vhodný poměr, objem k předchozímu, např. ECF
- **extrakční rozpouštědlo** – co nejmíň rozpustné ve vodě, vliv na množství vyextrahovaného analytu, např. isooktan, chloroform
- **čas** – vliv nebyl prokázán
- **pH** – může ovlivnit derivatizaci a extrakci (není pravidlem), volba vhodné úpravy, např. HCl, NaOH

# Detekce 16 biomarkerů v moči - 1

Validace metody na identifikaci a detekci 14 metabolitů – biomarkerů expozice v lidské moči:

Compound	Indicator	Compound	Indicator
Benzene	t,t-Muconic acid (MA)	Styrene	Mandelic acid
	S-Phenylmercapturic acid		Phenylglyoxylic acid
Toluene	Hippuric acid	Alkoxyethanols	Methoxyacetic acid
	S-Tolylmercapturic acid		Ethoxyacetic acid
	S-Benzylmercapturic acid		Butoxyacetic acid
o-, m-, p-Xylenes	o-, m, p-Methylhippuric acid	Carbon disulfide	2-Thiothiazolidine carboxylic acid
Fural	Furancarboxylic acid	Dimethylformamide	S-(N-Methylcarbamoyl) mercapturic acid

Jednokroková derivatizace-extrakce:

Moč + vnitřní standard + ethylchlorformiát + ethanol + pyridin + chloroformové médium

→ GC-MS analýza

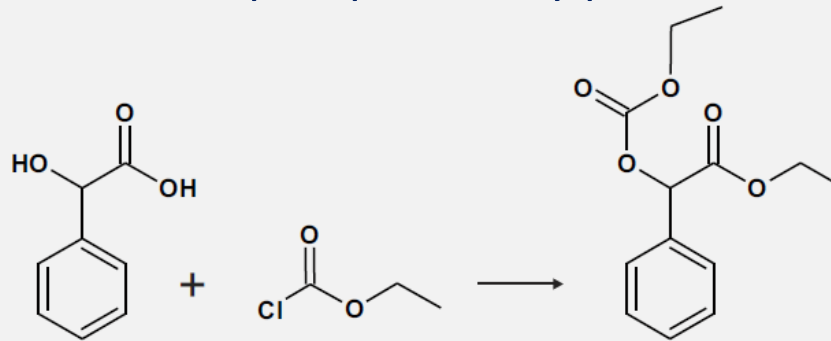


# Detekce 16 biomarkerů v moči - 2

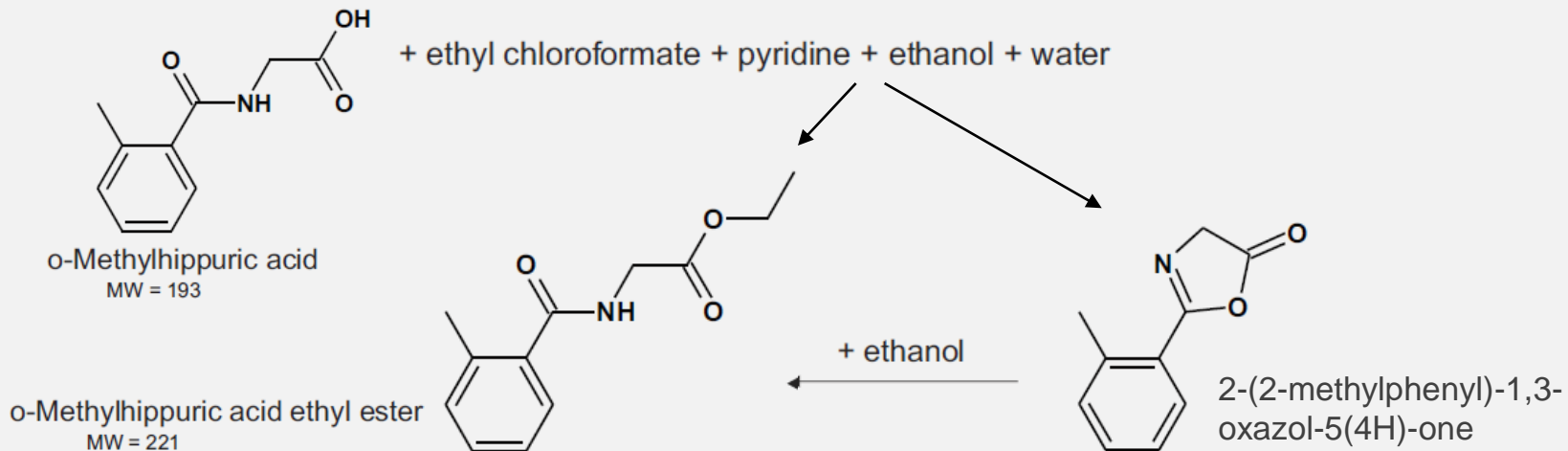
Většina metabolitů poskytla předpokládané produkty,

kromě kys. hippurové, kys. methylhippurových, kys. S-(N-methylcarbamoyl)merk.

- Reakce kys. mukonové s ECF -> předpokládaný produkt

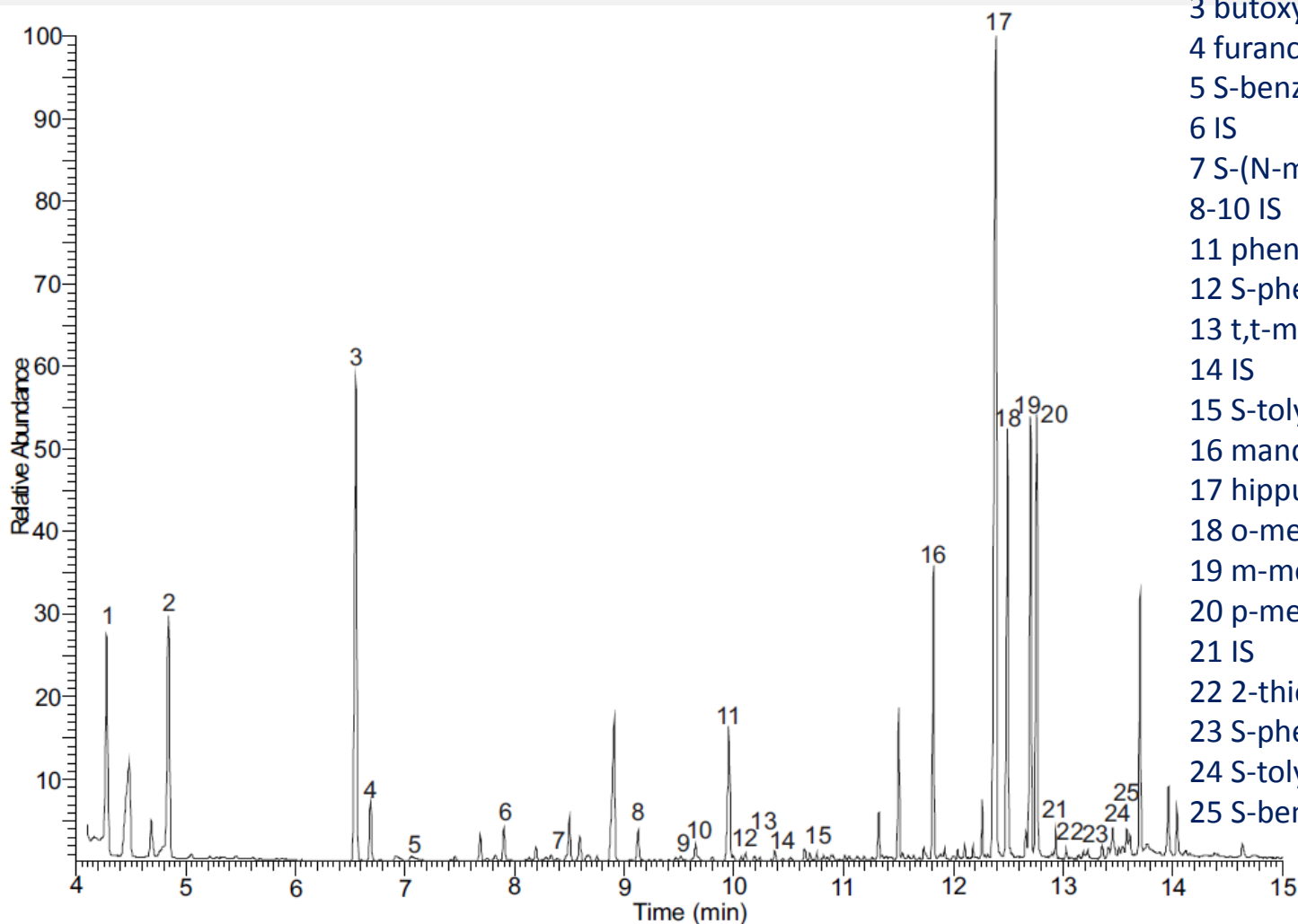


- Pozorována nová cyklizace u kys. hippurové a kys. o-, m-, p-methylhippurových



# Detekce 16 biomarkerů v moči - 3

GC-EI-MS chromatogram vzorku moči (spikováno)



- 1 methoxyacetic acid
- 2 ethoxyacetic acid
- 3 butoxyacetic acid
- 4 furancarboxylic acid
- 5 S-benzylmercapturic acid
- 6 IS
- 7 S-(N-methylcarbamoylmerc. a
- 8-10 IS
- 11 phenylglyoxylic acid
- 12 S-phenylmercapturic acid
- 13 t,t-muconic acid
- 14 IS
- 15 S-tolylmercapturic acid
- 16 mandelic acid
- 17 hippuric acid
- 18 o-methylhippuric acid
- 19 m-methylhippuric acid
- 20 p-methylhippuric acid
- 21 IS
- 22 2-thiothiayolidine carboxylic
- 23 S-phenylmercapturic acid
- 24 S-tolylmercapturic acid
- 25 S-benzylmercapturic acid

# Projekt IGA – degradační produkty proteinových aduktů v moči - 1

**Hypotéza:** po ukončení životnosti erythrocytu je globin s navázanými adukty odbourán proteolytickou degradací, při níž se uvolní:

- volné aminokyseliny, které (znovu) vstoupí do fyziologických metabolických cyklů
- volné aminokyselinové adukty, které se vyloučí močí

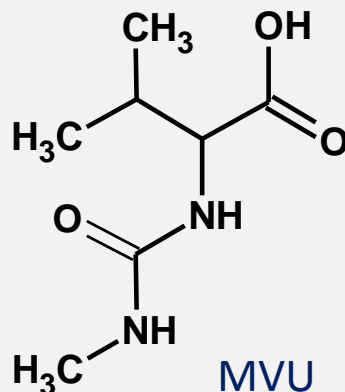
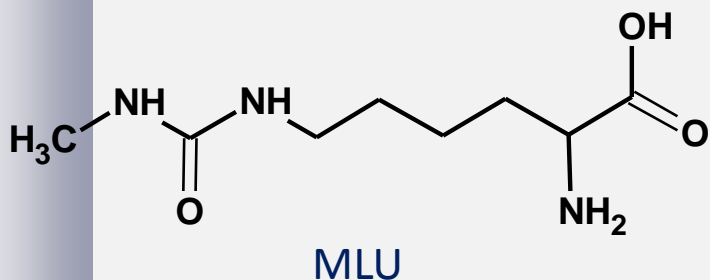
## Zkoumané látky:

### A. adukty s methylisokyanátem

N-methylkarbamoylvalin (MVU)

N-methylkarbamoyllysin (MLU)

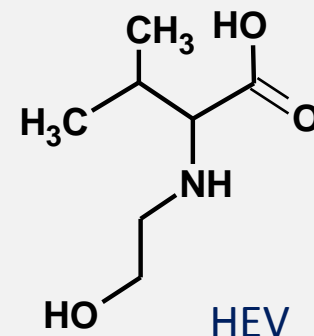
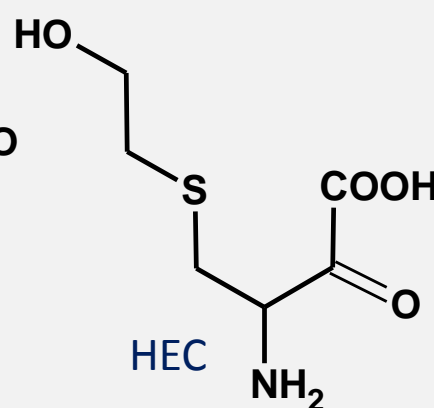
N-acetyl-MLU (MLU-Ac)



### B. adukty s ethylenoxidem

S-(2-hydroxyethyl)cystein (HEC)

N-(2-hydroxyethyl)valin (HEV)



# Projekt IGA – degradační produkty proteinových aduktů v moči - 2

HEC, HEV, MVU, MLU, MLU-Ac – polární

Možný postup - derivatizace s RCF

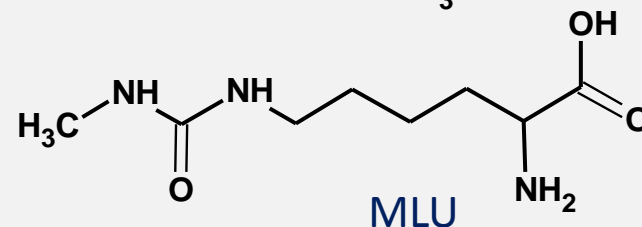
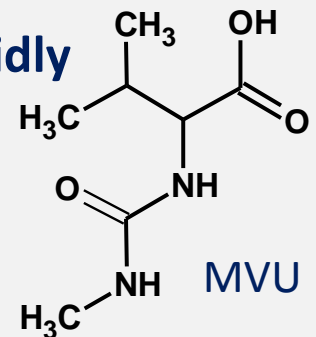
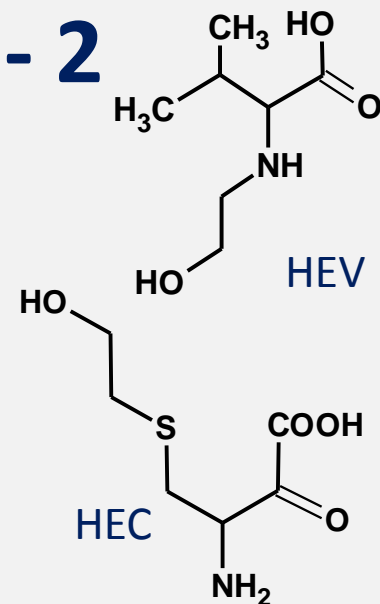
- Doposud vyzkoušeny ethyl-, propyl-, isobutyl- a heptafluorbutyl-chlorformiát (ECF, PCF, IBCF, HFBCF)
- Metody: GC-MS (EI), HPLC-MS (ES), HPLC-UV

HEC, HEV – stanoveny GC-MS, s činidly ECF, HFBCF

HEC, HEV, MVU, MLU, MLU-Ac – stanoveny HPLC-MS, se všemi činidly

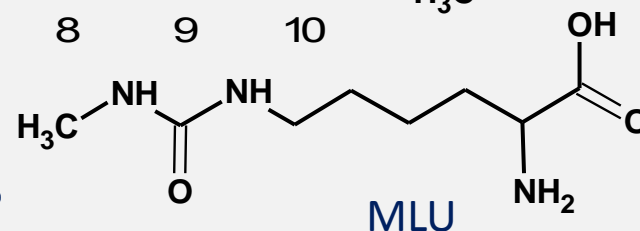
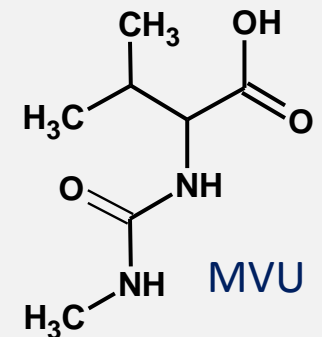
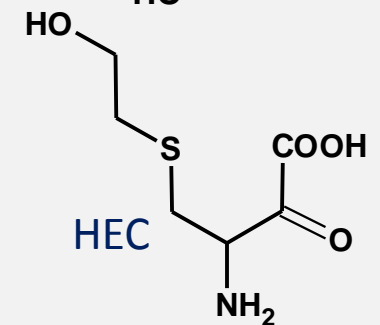
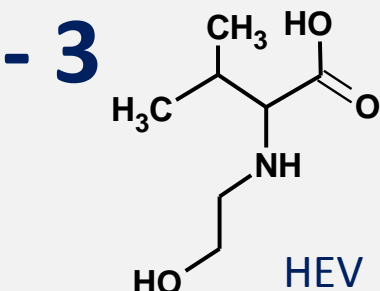
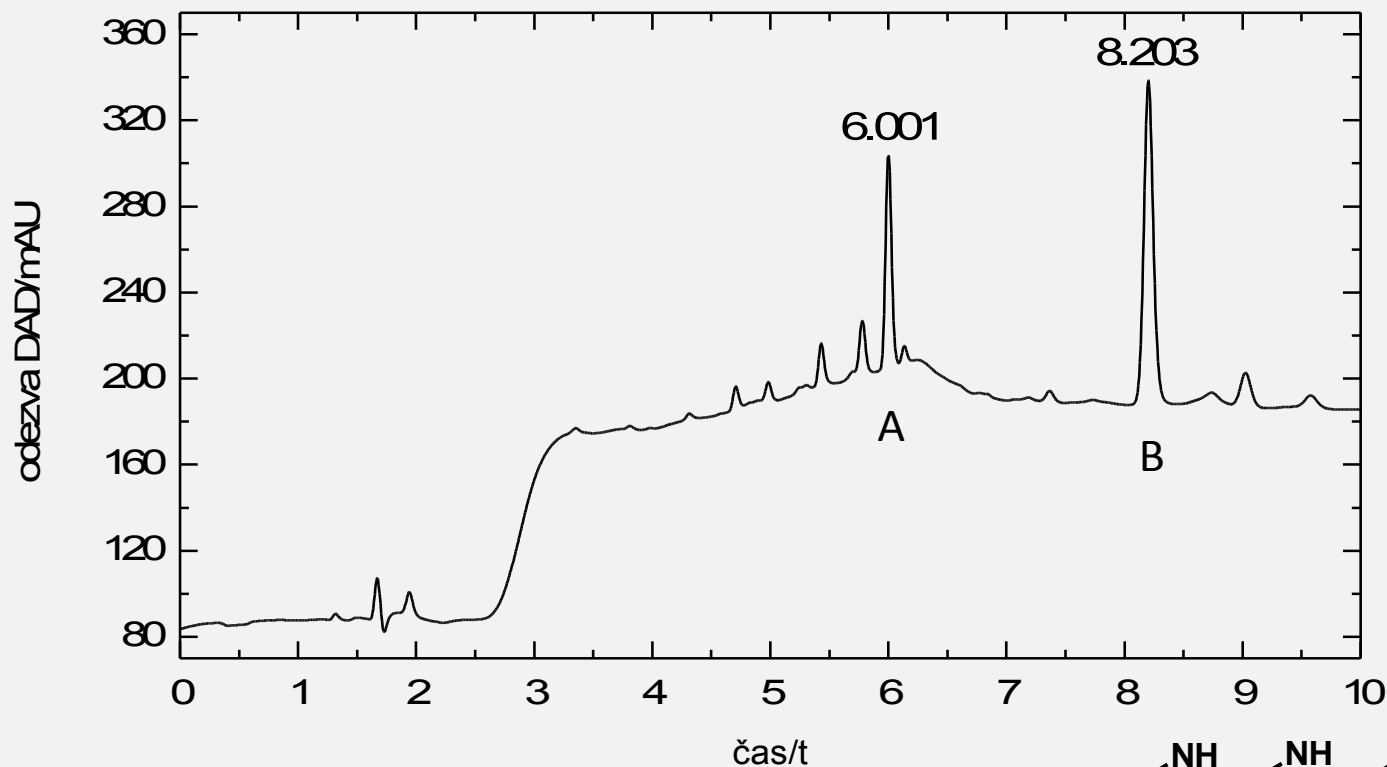
MVU – zkoumáno HPLC-UV, s činidly ECF, PCF, IBCF

HPLC-MS odhalilo vznik artefaktů



# Projekt IGA – degradační produkty proteinových aduktů v moči - 3

HPLC-UV chromatogram MVU ve fyziologickém roztoku  
derivatizace ECF, 200 nm,  $c_m = 0,1$  mg/ml MVU



- Pík A i B mají stejnou m/z - který je ten správný?

**DĚKUJI ZA POZORNOST**