

С. Туманов^{1,2}, И. Л. Лысенко², О. Л. Шарко², Ю. Зубенко³, В. В. Шманай²

¹Институт исследования рака им. Дж. Битсона, Глазго, Великобритания

²Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

³Независимая нефтехимическая лаборатория, Нортленд, Новая Зеландия

СИНТЕЗ ДЕЙТЕРИРОВАННОГО МЕТИЛХЛОРФОРМИАТА

Большинство аналитических методов метаболомики позволяют определить относительное содержание метаболитов в биологических образцах, либо требуют использования нескольких внутренних стандартов. Для количественного определения метаболитов необходимо определение абсолютных концентраций. Для этих целей применяются газохроматографические методы разделения продуктов взаимодействия метаболитов с метилхлорформиатом и их масс-детекция с использованием дейтерированных аналогов в качестве внутренних стандартов. Нами синтезирован дейтерированный метилхлорформиат – реагент для абсолютного количественного метаболомического анализа на основе газовой хроматографии с масс-детекцией. Предложенный метод позволяет получать дейтерометилхлорформиат в индивидуальном состоянии с высокими выходами.

Ключевые слова: метаболомика, метилхлорформиат, масс-спектрометрия.

S. Tumanov^{1,2}, I. L. Lysenko², O. L. Sharko², Yu. Zubenko³, V. V. Shmanai²

¹Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, UK

²Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

³Independent Petroleum Laboratory Ltd, Northland, New Zealand

SYNTHESIS OF DEUTERIUM LABELLED METHYL CHLOROFORMATE

Most analytical methods in metabolomics allow determination of relative intensities or require several internal standards of metabolites. For quantitative analysis, determination of absolute concentrations is required. For this purpose, the gas chromatography/tandem mass spectrometry methods are used, based on methyl chloroformate derivatization and quantification by spiking samples with metabolite standards separately derivatized with deuterated derivatization reagents. Described herein is the synthesis of deuterated methyl chloroformate – the reagent for absolute quantitative metabolite analysis by gas chromatography-mass spectrometry. The method allows preparation and isolation of deuteromethylchloroformate with high yields.

Keywords: metabolomics, methyl chloroformate, mass-spectrometry.

Введение. Метаболомика как инструмент постгеномной эры является молодой и динамично развивающейся областью науки в ее экспоненциальной фазе роста. Сегодня подходы к изучению метаболома и аналитические методы представляют огромный интерес в области медицины (диагностика и терапия раковых заболеваний, токсикология, трансплантация органов), производства продуктов питания, а также сельского хозяйства.

Для исследований в области метаболомики требуется анализ биологических образцов, которые представляют собой сложные смеси большого числа метаболитов на фоне высоких концентраций солей, белков и других биомолекул. Поэтому эффективные хроматографические методы являются неотъемлемой частью любого метаболомического метода.

Газохроматографические методы анализа с масс детекцией (ГХ-МС) нашли широкое применение в метаболомике [1–4] благодаря сочетанию относительно невысокой стоимости оборудования и высокого качества разделения аналитов. Наиболее популярным методом химической модификации аналитов с их последующим ГХ-МС анализом является метод силилирования, приводящий к значительному снижению температур кипения модифицированных биомолекул, что делает этот метод удобным в анализе широкого спектра метаболитов. Однако стабильность таких производных относительно невысока, что сильно сказывается на времени хранения образцов перед непосредственным их анализом [5]. Альтернативный метод карбометоксилирования метилхлорформиатом зарекомендовал себя как надежный метод в метаболомическом анализе и получил широкое распространение в анализе метаболитов [6]. Подход с применением метилхлорформиата используется в анализе популярных метаболитов, таких как аминокислоты, органические кислоты, включая жирные кислоты, органические амины, а также некоторые фенольные производные.

Как и любой аналитический метод, ГХ-МС преследует цель абсолютного количественного определения концентраций аналитов. Однако данный подход требует наличия внутреннего стандарта для каждого метаболита. Как правило, внутренними стандартами являются изотопно-меченные аналоги аналитов, которые прибавляются к анализируемой смеси в известном количестве. В случае анализа метаболитов, когда количество аналитов может достигать сотен, применение внутренних стандартов сильно ограничено стоимостью или чаще всего их малой доступностью. Поэтому для многих анализов в метаболомике используются так называемые относительные концентрации метаболитов, когда интенсивности хроматографических пиков метаболитов нормализуют к предварительно выбранному веществу, используемому в качестве внутреннего стандарта.

В 2010 году описан метод [7], в котором использовали дейтерированный метилхлорформиат (DMCF) в анализе метаболитов с помощью ГХ-МС с последующим расчетом абсолютных значений концентраций. Дейтерированный метилхлорформиат, использованный в данном методе, синтезирован из коммерчески доступного реагента 20%-ного раствора фосгена в толуоле. Общий выход продукта реакции составил менее 7%. При этом была получена азеотропная смесь метилхлорформиата и толуола, а чистое вещество не выделено. Получение дейтерированного метилхлорформиата в чистом виде до сих пор не было описано.

Дейтерированный метилхлорформиат – ценный продукт, который способен модифицировать метаболиты с одновременным введением изотопной метки в состав биомолекулы по схеме, представленной на рис. 1.

Дополнительный интерес к данной реакции вызывает тот факт, что количество введенных атомов дейтерия, а также селективность введения метки в гидроксильные, карбоксильные и аминогруппы можно контролировать, используя частично дейтерированный метилхлорформиат. Данный подход может стать мощным вспомогательным инструментом в установлении структур неизвестных метаболитов с помощью масс-спектрометрии.

По этой причине нашей задачей стала разработка и оптимизация методики синтеза дейтерированного метилхлорформиата с последующим его применением в абсолютном количественном определении метаболитов с использованием ГХ-МС.

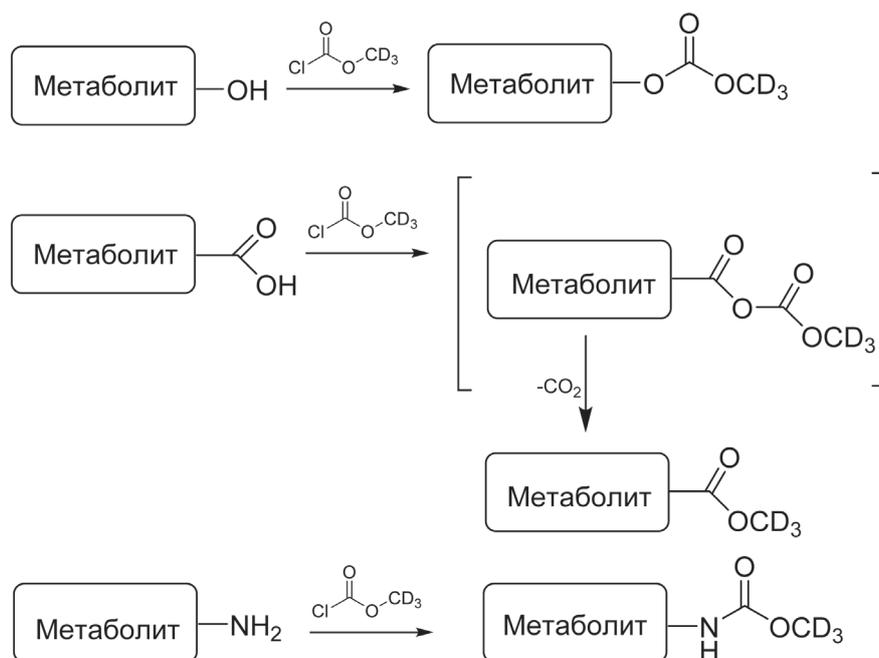


Рис. 1. Модификация гидроксильных, карбоксильных и аминогрупп биомолекул и метаболитов с помощью DMCF

Fig. 1. Modification of hydroxy, carboxy and amino groups of biomolecules and metabolites with DMCF

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и оборудование. В работе использовали толуол, тетрабутиламмония хлорид (Sigma-Aldrich), трифосген (GL Biochem (Shanghai) Ltd., Китай), дейтерометанол-d4 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., США). Спектры ЯМР регистрировали на мультиядерном Фурье-ЯМР-спектрометре высокого разрешения Bruker-Biospin AVANCE-500.

Синтез дейтерированного метилхлорформиата. В круглодонной колбе-реакторе 5,1 г (17 ммоль) трифосгена смешивали с 10 мл крезола и 40 мг (0,14 ммоль) тетрабутиламмония хлорида. Колбу-реактор соединяли с колбой-приемником поливинилхлоридным шлангом и погружали в баню с ацетоном и сухим льдом (-60 °С) для конденсации фосгена. Систему соединяли с атмосферой через хлоркальциевую трубку. Смесь тетрабутиламмония хлорида и трифосгена в ксилоле периодически нагревали до 40 °С в течение 10–15 мин. Спустя 15 мин начиналось плавное разложение трифосгена, и газообразный фосген конденсировался в колбе-приемнике. При сильном нагревании колбы разложение трифосгена протекает бурно, и часть фосгена может быть потеряна. К жидкому фосгену на бане с ацетоном и сухим льдом прикапывали 550 мкл (13 ммоль) дейтерометанола в течение 10 мин. Реакционную смесь оставляли для отогревания до комнатной температуры при постоянном перемешивании в течение часа. Колбу с полученной реакционной смесью снабжали обратным холодильником и кипятили в течение 15 мин до полного удаления газообразных продуктов. Далее дейтерированный метилхлорформиат перегоняли; собрали фракцию с температурой кипения 71–73 °С. Масса полученного продукта составила 2,3 г.

¹³C ЯМР(CDCl₃): δ 150,36 (s), 56,71 (sep, J=22,9 Гц).

Результаты и их обсуждение. В то время как метилхлорформиат является коммерческим продуктом, его дейтерированный аналог малодоступен, а описанные в литературе методики его синтеза нерациональны и малоэффективны. Нами был осуществлен синтез дейтерированного метилхлорформиата по двустадийной схеме, представленной на рис. 2.

На первой стадии происходит каталитическое разложение трифосгена четвертичной аммонийной солью до газообразного фосгена, который затем собирается при пониженной температуре. Жидкий фосген вступает в реакцию с дейтерометанолом с образованием дейтерированного метилхлорформиата.

Разработанная нами методика позволила получить чистый продукт с общим выходом 70 %, что на порядок превышает выход продукта по сравнению с описанной ранее методикой. Несомненным преимуществом нашего подхода является получение продукта в индивидуальном состоянии, а не в виде раствора, что позволяет его охарактеризовать и делает его использование гораздо более удобным. Нескольких грамм DMCF достаточно для анализа сотен образцов по методике Smart et al. [6]. Более того, при необходимости методика синтеза DMCF может быть легко масштабирована. Хотя химический синтез и связан с получением промежуточных высокотоксичных веществ, в условиях проведения реакции без выделения промежуточные продукты не оказывают вредного воздействия на здоровье человека, а ценность полученного продукта оправдывает затраты на материалы и тщательную подготовку эксперимента с учетом соблюдения всех правил техники безопасности. Применение данного продукта позволяет значительно увеличить ценность и значимость метаболомических данных, получаемых в экспериментах с использованием метилхлорформиата в качестве модифицирующего реагента.

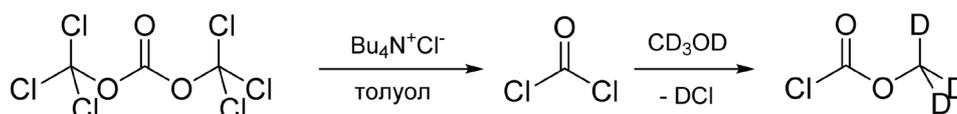


Рис. 2. Схема синтеза DMCF

Fig. 2. Scheme of DMCF synthesis

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Evaluation of sampling and extraction methodologies for the global metabolic profiling of *Saccharophagus degradans* / M. N. Shin [et al.] // *Anal. Chem.* – 2010. – Vol. 82, N 15. – P. 6660–6666.
2. Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics / A. B. Canelas [et al.] // *Anal. Chem.* 2009. – Vol. 81, N 17. – P. 7379–7389.
3. Kanani, H. Standardizing GC-MS metabolomics / H. Kanani, P. K. Chrysanthopoulos, M. I. Klapa // *J. of Chromatography B.* – 2008. – Vol. 871, N 2. – P. 191–201.
4. Villas-Bôas, S. G. Cold glycerol-saline: the promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells / S. G. Villas-Bôas, P. Bruheim // *Anal. Biochem.* – 2007. – Vol. 370, N 1. – P. 87–97.
5. Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS? / S. G. Villas-Bôas [et al.] // *Metabolites.* – 2011. – № 1. P. C. 3–20.
6. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry / K. F. Smart [et al.] // *Nature Protocols.* – 2010. – Vol. 5, N 10. – P. 1709–1729.
7. Highly sensitive GC/MS/MS method for quantitation of amino and nonamino organic acids / H. F. N. Kvitvang [et al.] // *Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 83, N 7. – P. 2705–2711.

References

1. Shin, M., Lee, D., Liu, K., Fiehn, O. and Kim, K. (2010) «Evaluation of sampling and extraction methodologies for the global metabolic profiling of *Saccharophagus degradans*», *Analytical Chemistry*, vol. 82, no. 15, pp. 6660–6666.
2. Canelas, A. B., ten Pierick, A., Ras, C., Seifar, R. M., van Dam, J. C., van Gulik, W. M. and Heijnen, J. J. (2009) «Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics», *Analytical Chemistry*, vol. 81, no. 17, pp. 7379–7389.
3. Kanani, H., Chrysanthopoulos, P. K. and Klapa, M. I. (2008) «Standardizing GC-MS metabolomics», *Journal of Chromatography B*, vol. 871, no. 2, pp. 191–201.
4. Villas-Bôas, S. G. and Bruheim, P. (2007) «Cold glycerol-saline: the promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells», *Analytical Biochemistry*, vol. 370, no. 1, pp. 87–97.
5. Villas-Boas, S. G., Smart, K. F., Sivakumaran, S. and Lane, G. A. (2011) «Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS?», *Metabolites*, vol. 1, no. 1, pp. 3–20.
6. Smart, K. F., Aggio, R. B., Van Houtte, J. R. and Villas-Bôas, S. G. (2010) «Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry», *Nature Protocols*, vol. 5, no. 10, pp. 1709–1729.
7. Kvitvang, H. F. N., Andreassen, T., Adam, T., Villas-Boas, S. G. and Bruheim, P. (2011) «Highly sensitive GC/MS/MS method for quantitation of amino and nonamino organic acids», *Analytical Chemistry*, vol. 83, no. 7, pp. 2705–2711.

Информация об авторах

Туманов Сергей Николаевич – исследователь. Институт исследования рака им. Дж. Битсона, Глазго, Великобритания; науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь).

Зубенко Юрий Сергеевич – канд. хим. наук, исследователь. Независимая нефтехимическая лаборатория, Нортленд, Новая Зеландия.

Лысенко Иван Леонидович – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lysenkoi@tut.by.

Шарко Ольга Леонидовна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sharko@ifoch.bas-net.by.

Шманай Вадим Владимирович – канд. хим. наук, зав. лаб. химии биокоъюгатов. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by.

Для цитирования

Синтез дейтерированного метилхлорформиата / С. Туманов [и др.] // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук.* – 2016. – № 4. – С. 47–50.

Information about the authors

Tumanov Sergey Nikolaevich – Postdoctoral Research Assistant, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, UK; Senior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus.

Zubenko Yury Sergeevich – Ph. D. (Chemistry), Research Assistant, Independent Petroleum Laboratory Ltd, Northland, New Zealand.

Lysenko Ivan Leonidovich – Ph. D. (Chemistry), Senior Scientific Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (Surganova str., 13, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lysenkoi@tut.by.

Sharko Olga Leonidovna – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus (Surganova str., 13, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sharko@ifoch.bas-net.by.

Shmanai Vadim Vladimirovich – Ph. D. (Chemistry), Head of Laboratory of Bioconjugate Chemistry. Institute of Physical Organic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus (Surganova str., 13, 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by.

For citation

Tumanov S., Lysenko I. L., Sharko O. L., Zubenko Yu., Shmanai V. V. Synthesis of deuterium labelled methyl chloroformate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series*, 2016, no. 4, pp. 47–50.