

### ***Wstęp i cel projektu***

W analizie ilościowej powszechnie stosowaną procedurą jest stosowanie standardów wewnętrznych. Takim standardem dla wielu związków może być znakowany izotopowo analog oznaczanego analitu, w którym niektóre atomy zostały zastąpione ich cięższymi, stabilnymi izotopami, np.  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  oraz  $^{18}\text{O}$ . Związki znakowane deuterem nie są jednak uważane za dobre standardy wewnętrzne ze względu na możliwość zaburzenia koelucji podczas analizy metodą LC-MS związaną z występowaniem efektu izotopowego. Dodatkowo, otrzymywanie deuterowanych wzorców leków i ich metabolitów wymaga skomplikowanej i czasochłonnej syntezy *de novo* z zastosowaniem drogich substratów znakowanych izotopowo. Z tych względów istnieje potrzeba opracowania tanich metod otrzymywania znakowanych izotopowo standardów do analizy ilościowej metodą LC-MS.

W ostatnich latach w Zespole Chemii i Stereochemii Peptydów i Białek na Wydziale Chemii UWr została opracowana nowatorska metoda wymiany izotopowej wodór-deuter przebiegająca na atomie węgla  $\alpha$  reszty *N*-metyloglicyny (sarkozyny) w zasadowym środowisku w wodzie ciężkiej ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Głównym celem niniejszego projektu jest praktyczne zastosowanie tej metody do opracowania jakościowej i ilościowej metody analizy techniką LC-MS leków i ich metabolitów zawierających fragment sarkozyny w cząsteczce, takich jak racetamy czy tadalafil w próbkach krwi i moczu a także rozszerzenie badanej grupy związków o pochodne sulfinylnacetamidowe takie jak armodafinil. Planujemy także określić kwasowość wymienianych atomów wodoru przy użyciu teoretyczno-obliczeniowej metody „proton affinity”. Projekt będzie realizowany przy współpracy z naukowcami z Akademickiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu.

### ***Metodologia badań***

Niniejszy projekt zakłada otrzymanie deuterowanych standardów leków i ich metabolitów na drodze wymiany izotopowej w środowisku zasadowym, wspomnianej powyżej, określenie kinetyki wymiany izotopowej, efektu izotopowego oraz zastosowanie uzyskanych standardów w analizie jakościowej i ilościowej techniką LC-MS. W ramach projektu reakcja znakowania izotopowego zostanie zoptymalizowana pod kątem czasu trwania procesu i jego wydajności. Określony zostanie wpływ zastosowanej aminy, pH, skład rozpuszczalnika oraz promieniowania mikrofalowego na przebieg opisywanej reakcji. Kinetyka przebiegającego procesu zostanie określona za pomocą spektrometrii mas i spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego. Dodatkowo w ramach realizacji projektu planujemy opracować metodę bezpośredniej wymiany izotopowej przebiegającej na atomie węgla  $\alpha$  reszty sarkozyny i w grupie sulfinylnacetamidowej obecnych w związkach zawartych w próbkach moczu i krwi, umożliwiającą ich ilościową i jakościową ocenę techniką LC-MS. W tym celu przeprowadzimy optymalizację warunków przebiegającego procesu (pH, zastosowana zasada, czas reakcji, temperatura). Każda z uzyskanych próbek zostanie poddana analizie metodą LC-MS i LC-MS/MS. Przeprowadzenie takiej analizy pozwoli nam uzyskać informacje dotyczące stopnia deuterowania, możliwych produktów ubocznych i ich natury chemicznej oraz stabilności badanych związków. Aby osiągnąć ten cel, próbka moczu/krwii zawierająca związki posiadające w swojej strukturze wymienione ugrupowania zostanie podzielona na dwie porcje. Jedna z nich zostanie poddana inkubacji w mieszaninie  $\text{D}_2\text{O}$ /zasada/rozwpuszczalnik organiczny, w celu przeprowadzenia wymiany izotopowej, podczas gdy druga porcja zostanie potraktowana mieszaniną  $\text{H}_2\text{O}$ /zasada/rozwpuszczalnik organiczny. Po inkubacji, liofilizacji próbek i usunięciu zasady, próbki zostaną poddane analizie metodą LC-MS. Dodatkowo w niniejszym projekcie planujemy opracowanie metody otrzymywania deuterowanych standardów takich związków jak armodafinil, racetamy czy tadalafil oraz potwierdzić ich zastosowanie w analizie ilościowej LC-MS. Projekt obejmie także zastosowanie metody obliczeniowej „proton affinity” do określenia kwasowości wymienialnych atomów wodoru.

### ***Wpływ spodziewanych rezultatów***

Oczekujemy, że wyniki uzyskane w ramach realizacji projektu rzucą nowe spojrzenie na możliwość wymiany izotopowej wodór/deuter na atomach węgla, jakościową i ilościową analizę związków zawierających w swojej strukturze fragment sarkozyny lub fragment sulfinylnacetamidowy, tworząc narzędzie badawcze dla naukowców, diagnostów laboratoryjnych oraz kryminologów pracujących nad poprawą dokładności diagnostycznej, oceną skuteczności leczenia, wczesną diagnozą choroby i badaniem kryminalistycznym niektórych niezatwierdzonych leków, do wszelkich zastosowań medycznych lub dietetycznych. **Wierzimy, że zaproponowane przez nas deuterowane standardy związków zawierających sarkozynę lub fragment sulfinylnacetamidowy, w tym leków, znacznie zredukują koszty ich analizy metodą LC-MS i sprawią, że staną się one bardziej powszechne, natomiast określenie kwasowości poszczególnych atomów wodoru pozwoli na późniejsze przewidywanie możliwości zastosowania opisanej metody wymiany izotopowej do szerszej grupy związków o potencjale do stosowania jako standardy wewnętrzne.** Mamy nadzieję, że podjęte przez nas badania doprowadzą do rozwinięcia nowej gałęzi metabolomiki, która może zostać nazwana sarkozynomiką, co może umożliwić odkrycie nieznanych dotąd związków endogennych zawierających sarkozynę.