

Desenvolupament de metodologia analítica per la determinació de neurotòxics i els seus metabòlits en sang de ratolí per cromatografia

**Mar Eroles Navarro
GIRONA, JULIOL 2015**

**Universitat de Girona
Facultat de Ciències
Grau en Biotecnologia**



ÍNDEX

RESUM	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1-INTRODUCTION	6
2-OBJECTIVES	9
3-EXPERIMENTAL	9
3.1 Reactius	9
3.2 Instrumentació i aparellatge	10
3.3 Cromatografia líquida amb cromatografia de masses en tàndem (HPLC-MS/MS)	11
3.4 Detecció per espectrometria de masses	11
3.5 Derivatització dels compostos amb clorur de dansil	11
3.6 Calibratge i límits de detecció mètode Separació plasma ratolí	12
3.7 Mostres	12
3.8 Tractament de les mostres de sang	13
3.9 Estudi recuperació: mostres fortificades	13
3.10 Anàlisi cromatogrames, reproductibilitat i estadística	14
4-RESULTATS	14
4.1 Detecció per espectrometria de masses	14
4.2 Condicions derivatització	15
4.3 Condicions cromatogràfiques	15
4.4 Rectes calibratge BAPN i β -alanina i límit de detecció mètode	16
4.5 Tractament de les mostres de sang	18
4.7 Estudi recuperació: mostres fortificades	18
4.8 Concentració dels metabòlits en les mostres	18
5-DISCUSSIÓ RESULTATS	21
6-CONCLUSIONS	22
7-AGRAÏMENTS	23
8-BIBLIOGRAFIA	24

Resum

El IDPN és un nitril ototòxic que provoca la mort de les cèl·lules ciliades vestibulars en animals d'experimentació. Aquestes cèl·lules estan relacionades amb habilitats motores com l'equilibri, l'estabilització visual i l'acceleració corporal com s'ha pogut observar en ratolins als que se'ls hi ha administrat aquesta substància. Es creu que l'augment de malalties neurodegeneratives i la pèrdua d'aquestes habilitats amb l'edat podria estar relacionada amb la cada vegada més freqüent presència de nitrils en el medi ambient. Actualment es desconeix la via metabòlica que segueix el IDPN a l'organisme, tot i que s'han descrit diverses hipòtesis que deriven en tres metabòlits: BAPN, àcid cianoacètic i β -alanina que s'han detectat en orina de rata. En el desenvolupament de models animals per a estudiar la relació dels nitrils amb malalties neurodegeneratives és de vital importància tenir la capacitat de detectar i quantificar aquests compostos i establir-ne una relació directa entre la seva presència a l'organisme de l'animal d'experimentació, les afeccions motores que provoquen i els efectes sobre el sistema vestibular que porta a la mort de les cèl·lules vestibulars. Per aquest motiu al treball present s'ha desenvolupat un mètode analític mitjançant cromatografia líquida per a detectar-los i quantificar-los en mostres de sang.

En aquest estudi s'han estudiat les condicions de treball de cada una de les etapes del mètode d'anàlisi: detecció i determinació de l'IDPN i els seus possible metabòlits, tractament de les mostres de sang, derivatització de les mostres, condicions cromatogràfiques, calibració i estudis de recuperació. El mètode s'ha aplicat a l'anàlisi de mostres de sang de ratolins als que se'ls havia administrat una dosi de 24mg/Kg d'IDPN. També s'ha estudiat la relació entre les concentracions dels metabòlits 3-aminopropionitril (BAPN) i β -alanina en el plasma i els estudis comportamentals i immunohistològics vestibulars. Els resultats obtinguts indiquen una relació inversa entre les concentracions dels metabòlits en sang i el dany vestibular causat per l'IDPN.

Resumen

El IDPN es un nitrilo ototoxico que provoca la muerte de las células ciliadas vestibulares en animales de experimentación. Estas células están relacionadas con habilidades motoras como el equilibrio, la estabilización visual y la aceleración corporal tal y como se ha podido observar en ratones administrados con esta sustancia. Se cree que el aumento de enfermedades neurodegenerativas y la pérdida de estas habilidades con la edad podría estar relacionada con la cada vez mayor presencia de nitrilos en el ambiente. Actualmente se desconoce la vía metabólica que sigue el IDPN en el organismo, aunque se han descrito diversas hipótesis que derivan en tres metabolitos: BAPN, ácido cianoacético y β -alanina que han sido detectados en orina de rata. En el desarrollo de modelos animales para estudiar la relación de los nitrilos con enfermedades neurodegenerativas es de vital importancia tener la capacidad para detectar y cuantificar estos compuestos y establecer una relación directa entre su presencia en el organismo del animal de experimentación, las afecciones motoras que provocan y los efectos sobre el sistema vestibular que lleva la muerte de las células ciliadas de estos. Por este motivo en el presente trabajo se ha desarrollado un método analítico mediante cromatografía líquida para detectarlos y cuantificarlos en muestras de sangre.

En este estudio se han estudiado las condiciones de trabajo de cada una de las etapas del método de análisis: detección y determinación de el IDPN y sus posibles metabolitos, tratamiento de las muestras de sangre, derivatización de las muestras, condiciones cromatografías, calibrado y estudios de recuperación. El método se ha aplicado al análisis de muestras de sangre de ratones a los que se les había administrado una dosis de 24ml/Kg de IDPN. También se ha estudiado la relación entre las concentraciones de los metabolitos 3-aminopropionitril (BAPN) y β -alanina en el plasma y los estudios comportamentales y inmunohistológicos vestibulares. Los resultados obtenidos indican una relación inversa entre las concentraciones de los metabolitos en sangre y el daño vestibular causado por el IDPN.

Abstract

The IDPN is an ototoxic nitrile that kills the vestibular cells of experimental animals. These cells are related to motor skills like balance, visual stabilization and body acceleration as has been observed in mice that were administered with this substance. It is believed that the increase in neurodegenerative diseases and the loss of these skills with aging could be related with the increasingly presence of nitriles on the environment. Currently the metabolic pathway that follows the IDPN in the body is unknown, although several hypotheses have been described which result in three metabolites: BAPN, β -alanine and cyanoacetic acid as these compounds have been detected in urine of rats. In the development of animal models to study the relationship of nitriles with neurodegenerative diseases it is essential to develop analytical methodologies for detecting and quantifying these compounds on biological samples that will be able to establish a direct relationship between their presence in the experimental animal bodies, which causes motor diseases, and their effects on the vestibular system that leads to vestibular cells death. For this reason, the objective of the present study is to develop an analytical method by liquid chromatography for detecting and quantifying them in blood samples.

In this study, we have determined the experimental conditions for each stage of the analytical method: detection and determination of IDPN and its possible metabolites, treatment of blood samples, derivatisation of the samples, chromatographic conditions, calibration and recoveries. The method has been applied to the analysis of mice's blood samples after administration of 24mg / kg dose of IDPN for several days. We have also analyzed the relationship between the concentrations of its metabolites, 3-aminopropionitril (BAPN) and β -alanine, in plasma with behavioural and vestibular immunohistologic studies of the same group of mice. The results indicate an inverse relationship between the concentrations of metabolites in blood and the vestibular damage caused by IDPN.

1. Introducció

Els nitrils són compostos químics que es caracteritzen per contenir el grup ciano ($-C\equiv N$), estant presents a la natura en diferents llavors, tubercles o llegums i són àmpliament utilitzats a la indústria. Al 1894 ja va ser observat per Lang que el consum de productes alimentaris que contenien nitrils provocava els mateixos efectes que de una intoxicació per cianur, on la unió covalent amb el Fe^{3+} obstrueix la cadena de transport electrònic i la mort es produeix per fallada respiratòria. Més endavant es va veure que aquests compostos alliberen el grup cianur al ser metabolitzats.

La neurotoxicitat associada als nitrils es va estudiar més tard, observant-se que els nitrils que alliberaven petites quantitats de cianur i que provoquen patologies que afecten als sistemes sensorials com la malaltia del Konzo i la neuropatia atàxica tropical (TAN). El nitril neurotòxic més estudiat és 3,3'-iminodipropionitril (IDPN) que conté un grup amina i dos grups ciano dins la seva estructura química (**Figura 1**).

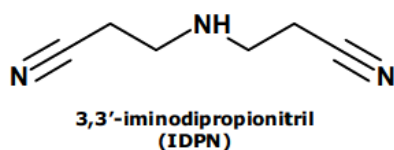


Figura 1: Estructura química del nitril IDPN

Els efectes neurotòxics d'aquest compost, que provoquen afeccions motores, ja varen ser observats a mitjans dels anys cinquanta en rates ([Delay et al., 1952](#)). A la següent dècada es va descriure la degeneració axonal que produïa l'IDPN al formar masses de neurofilaments ([Chou i Hartman, 1964](#)). Al 1993 es va relacionar l'afectació motora en rates a les que s'havia administrat IDPN amb la mort de les cèl·lules ciliars del vestíbul auditiu ([Llorens et al., 1993](#)).

Amb els resultats obtinguts en els diferents estudis es va concloure que la toxicitat del IDPN es deu a l'acció neurotòxica d'un o més dels metabòlits generats dins l'organisme de l'animal d'experimentació, sense que es pugues determinar la via de metabolització del compost ni els mecanismes de generació i actuació dels metabòlits que es puguin formar. Si que es van descriure diferents mecanismes de de metabolització del IDPN que generaven diferents seus metabòlits (**Figura 2**). Només hi ha evidències experimentals de la formació de 3-aminopropionitril (BAPN), la β -alanina i l'àcid cianoacètic que s'han detectat en orina de rata ([Boades P., 2008](#)).

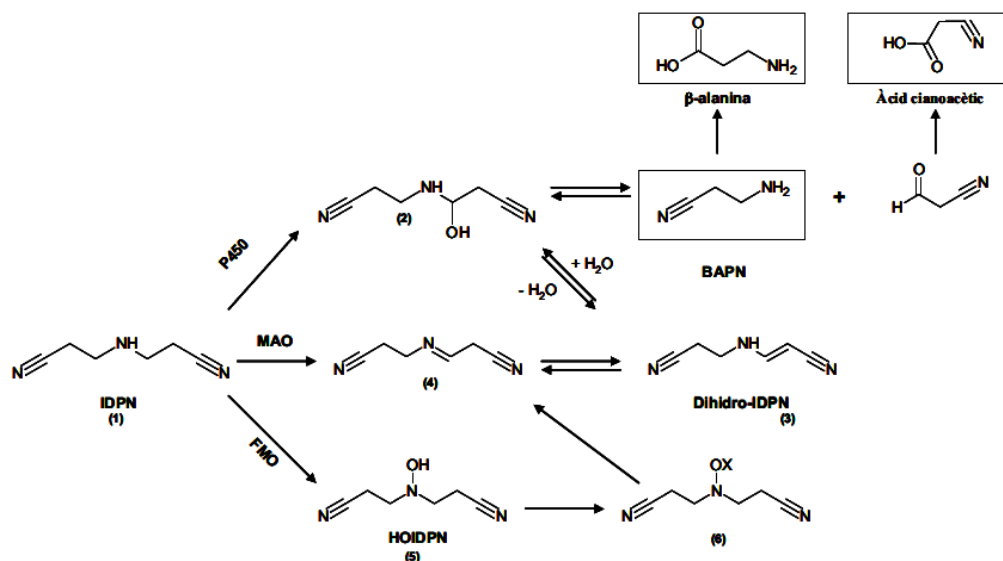


Figura 2: Esquema possibles vies metabòliques IDPN (Engelhart, 1994). Els metabòlits enquadrats han estat trobats en orina de rata.

El Dr. Pere Boades del grup de recerca NEOMA de la UdG, està desenvolupant models animals que permetin investigar els efectes de diferents substàncies neurotòxiques, com els nitrils, en el sistema sensorial d'animals d'experimentació. Als animals, ratolins Swiss femelles en aquest cas, se'ls hi administra diferents dosis d'IDPN i s'estudia el seu comportament mentre dura l'administració i una vegada sacrificats els animals es realitza un estudi immunohistològic del vestíbul auditiu. Els resultats obtinguts han permès observar que l'administració contínua en baixes dosis d'IDPN (crònica) provoca axonopatia i que l'administració puntual de dosis més grans (aguda), causa la mort de les cèl·lules vestibulars ciliades. Un altre dels efectes neurodegeneratius d'aquests compostos està relacionat amb la pèrdua de sensibilitat al dolor. L'objectiu final d'aquests estudis és arribar a descriure amb exactitud els efectes del IDPN al sistema sensorial i trobar la manera de frenar-los, atès que hi han diferents contaminants atmosfèrics amb el grup ciano a la seva estructura química i es creu que podrien ser els causants de malalties neurodegeneratives com l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA).

El grup de recerca de Química Analítica i Ambiental (QAA) col·labora en aquest estudi i, en concret, s'encarrega de desenvolupar metodologia analítica per a determinar en la sang dels animals tractats amb IDPN els compostos (metabòlits) descrits a la bibliografia que es puguin generar com a resultat de la metabolització de l'IDPN per les diferents vies proposades.

Partint de què l'objectiu era detectar IDPN i els metabòlits, BAPN, la β-alanina i àcid cianoacètic, es va fer una cerca bibliogràfica de mètodes d'anàlisi per compostos d'estructura similar (Magnes C. et al. 2013, Paseiro R. et al. 2011, Meyer T. et al. 2011, Bhandari R. et al. 2013, Garcia I. et al. 2010, Mitchell B. et al. 2010, Häkkinen M et al. 2007; 2008, Rúa F. et al. 2013, Paseiro R. et al. 2011, Magnes C. et al. 2014). Les tècniques HPLC o UHPLC acoblades a espectrometria de masses en tàndem permeten la separació i determinació de compostos que contenen grups ciano com el Sulforafan nitril (Alvarez-Jubete L. et al. 2013) i també es varen trobar referències de la determinació per HPLC-MS d'algun dels metabòlits de l'IDPN com la β-

alanina (Meyer, T. et al. 2011). En el cas, de la detecció òptica d'aquests compostos, el grup ciano presenta absorció a l'IR però no es pot utilitzar en determinacions analítiques. Per a la detecció d'aquests compostos per UV-vis cal procedir a la seva derivatització. Atès que tots els compostos que es volen determinar, excepte l'àcid cianoacètic, tenen en comú un grup amina en la seva estructura es varen avaluar diferents mètodes de derivatització d'amines. La derivatització prèvia (precolumna) de les amines es pot dur a terme emprant diferents agents derivatitzants com el clorur de dansil (DNS), el clorur de dabsil, la fluoescamina i ftalaldehids com l'OPA, entre d'altres (Kang X. et al, 2006). Una de les avantatges del clorur de dansil (DNS) és la sensibilitat en la detecció dels seus derivats a baixes concentracions de les amines però també cal tenir en compte que es poden produir solapament dels pics dels derivats amb els dels productes de les seves reaccions l'hidròlisi. No obstant, es pot evitar aquest problema controlant les condicions (pH i concentracions de DNS) de la reacció de derivatització. La principal avantatge de l'ús del DNS és que també s'ha utilitzat com agent derivatitzant d'amines per millorar la detecció per espectrometria de masses en estudis de metabolòmica (Zheng J and Li L., 2012). La tècnica de HPLC-MS/MS també s'ha aplicat a la quantificació de β -aminopropionitril en mostres tumorals i de plasma de ratolins mitjançant derivatització del compost amb clorur de dansil (Machon C. et al, 2014).

No s'ha trobat a la bibliografia cap metodologia analítica per la determinació de nitrils i els seus metabòlits en mostres biològiques per tant, per assolir l'objectiu d'aquest treball d'analitzar mostres biològiques on es puguin determinar els metabòlits de l'IDPN que es consideren responsables de la seva toxicitat i així corroborar la via metabòlica proposada en la bibliografia, era necessari, prèviament, desenvolupar la metodologia analítica adient per l'anàlisi de les mostres.

Tanmateix, també es vol correlacionar les concentracions dels metabòlits presents en les mostres amb els resultats obtinguts en els estudis de conducta i immunohistòlogics realitzats pel grup de recerca NEOMA atès que s'analitzaran els mateixos animals d'experimentació. A partir dels resultats obtinguts i una vegada conegut el mecanisme de metabolització es podria seguir investigant **com interferir en la via metabòlica que comporta la degeneració neuronal i així aturar l'avenç de la malaltia neurodegenerativa.**

2. Objectives

The main objective of this study is to develop an analytical method for the determination of IDPN and its main metabolites, BAPN, β -alanine and acid cyanoacetic, in blood samples by high performance liquid chromatography (HPLC). The method developed will be applied to the analysis of blood samples of mouses which have been previously received IDPN doses in order to cause them vestibular damage.

The specific objectives are:

- To study the detectability of IDPN and its main metabolites by mass spectrometry and UV-vis detection
- To determine the chromatographic conditions for their separation by HPLC-UV-vis
- To study the analytical performance of the determination method.
- To apply the developed method to the analysis of blood samples.
- To compare the results obtained by analysing the blood samples which those obtained by NEOMA group in the behavioural and immunohistological studies for the same group of mouses.

3. Experimental

3.1 Reactius

A la **Taula 1** es recull els reactius utilitzats en aquest estudi. Les dissolucions d'aquests compostos es van preparar en aigua ultrapura (MilliQ) a excepció del clorur de dansil, que es va preparar en acetonitril.

Taula 1: Característiques compostos utilitzats per a l'estudi.

	Companyia	Puresa (%)	Mw(g/mol)	Origen
3,3'-Iminodipropionitril (IDPN)	TCI	98.00	123.16	Japó
3-Aminopropionitril (BAPN)	Sigma-Aldrich	100	128.13	Japó
β-alanina	Fluka	98.00	89.09	Japó
Àcid cianoacètic	Sigma-Aldrich	99	85.06	Japó
Clorur de dansil	Fluka	99.00	269.75	Japó
Bicarbonat sòdic	Merk	99.7	84.01	Alemanya
Hidròxid de sodi	Panreac	98	40.00	EEUU
Àcid fòrmic	Fluka	98	46.07	Alemanya

Acetonitril	Fisher Chemical	99.99 qualitat per HPLC	41.04	Gran Bretanya
Àcid acètic	Sigma-Aldrich	49-51	60.05	Suïssa
Metanol	Fisher Chemical	99.99 Qualitat per HPLC	32.04	Gran Bretanya

3.2 Instrumentació i aparellatge

Les anàlisis cromatogràfiques es varen realitzar en un instrument de cromatografia líquida Agilent 1200 Series LC system (Agilent Technologies, CA, USA) amb un detector de díodes en línia (DAD), Agilent 1290 Infinity i amb una columna de fase reversa C18 KINETEX de 50x2.1mm. Per el control de l'instrument i l'adquisició de les dades es va utilitzar el programari LC3D ChemStation (Agilent Technologies). El sistema de cromatografia líquida amb espectrometria de masses en tàndem es compon d'un cromatògraf líquid Agilent 1200 Series LC system (Agilent Technologies, CA, USA) i un detector de triple quadrupol 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, CA, USA). El software de control de l'instrument Agilent MassHunter Workstation Software – Data Acquisition for 6410 Triple Quad LC/MS i el manual d'ús "Procediment normalitzat de treball HPLC-MS/MS (Agilent 1290-QQQ 6430)" facilitaven la posta en marxa, el funcionament i el tractament de les dades obtingudes.

Per a realitzar l'estudi es va disposar dels aparells del departament de Química Analítica i Ambiental i del departament de Química Analítica situats al Parc científic i Tecnològic de la UdG i a la Facultat de Ciències respectivament (**Taula 2**).

Taula 2: Aparells utilitzats per a l'estudi.

	Companyia	Model
Termobloc	Stuart	SBH 130D
Centrífuga	Hattich	Mikro 120
Phmetre	Crison	basic 20+
Micropipetes	Biohit	0,5-10, 10-100, 100-1000µL
Ultrasons	Selecta	
Balança	Denver	SI-234
Equip de filtració	Nahita i Afora	
Eppendorfs de centrífuga	Eppendorf	1.5mL
Columnes filtració	Amicon	Ultra-0.5 3000NMWK

3.3 Cromatografia líquida amb cromatografia de masses en tàndem (HPLC-MS/MS)

Es va partir de les condicions cromatogràfiques reportades per Meyer, T. et al. 2011 (Taula 3). A l'instrument d'HPLC-MS/MS es va crear un nou mètode introduint els paràmetres de temperatura, gradient de la fase mòbil, cabal, temps de retenció i volum d'injecció.

La fase mòbil es va filtrar amb un equip de filtració emprant filtres de nylon de 0,2µm i es va desgasificar durant 15 minuts en un bany d'ultrasons .

Taula 3: Condicions HPLC (Meyer T. 2011)

Columna	Temperatura	Fase A	Fase B	Cabal	Concentració fases mòbils	Loop
C18, 5µm 100mmX1mm	Ambient	0'1% àcid fòrmic en H ₂ O	0'1% àcid fòrmic en acetonitril	0,065mL/min	Gradient 5%faseB- 60% faseB 15 minuts	5µL

3.4 Detecció per espectrometria de masses

Amb l'objectiu d'establir les condicions d'ionització i detecció en el detector del sistema HPLC-MS/MS es van realitzar unes proves amb el instrument d'espectrometria de masses de trampa iònica (IT) MSⁿ Bruker Daltonics Esquire 6000 Ion Trap que permet dur a terme diferents fragmentacions (MS/MS), identificar-ne els fragments característics de cada compost i determinar el millor mode d'ionització. Les proves es van dur a terme amb dissolucions individuals d'IDPN, BAPN, β-alanina i àcid cianoacètic de concentració 0,1 M preparades en aigua ultrapura (MilliQ).

3.5 Derivatització dels compostos amb clorur de dansil

Partint de l'article de Machon C. Et al. 2014, es va procedir a fer les primeres proves de derivatització amb clorur de dansil amb l'objectiu d'establir les condicions químiques de la reacció de derivatització (Figura3), determinar l'estabilitat dels derivats formats i el seu espectre d'absorció molecular.

Les proves es varen fer per a cada un dels compostos. En un tub eppendorf es van barrejar 100µl de una dissolució mostra (diferents concentracions), 100µl de solució 20 mg/ml de clorur de dansil i 100 µl de tampó de pH 10,1 (1M NaOH/NaHCO₃). La reacció es va dur a terme durant 30 minuts a una temperatura de 80°C, tot mantenint la dissolució a la foscor. La reacció s'aturava afegint a la mescla en reacció 80 µl d'àcid acètic concentrat. Per tal de determinar la longitud d'ona de màxima absorbància es va enregistrar l'espectre d'absorció molecular de cada un dels compostos que es va establir en 254nm. Es van estudiar les variables de concentració de dansil (2, 10 i 20 mg/ml), temps d'incubació(30, 60, 90 i 120 minuts) i pH de la reacció (pH9,5, pH10,3 i pH11).

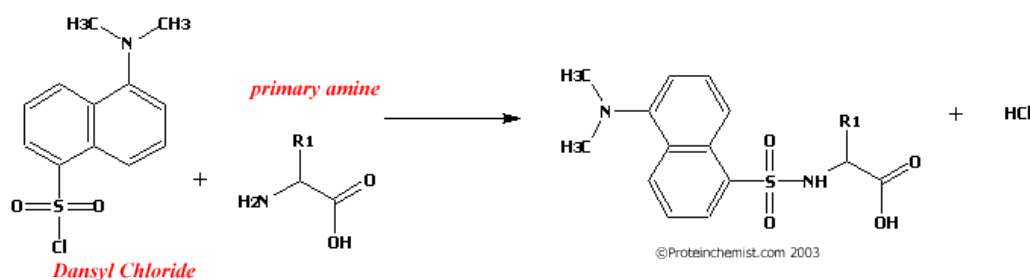


Figura 3: Reacció entre clorur de dansil i un amina primària. Per a que aquesta reacció es dongui cal aplicar energia tèrmica i estar en tot moment sense llum, a més l'enllaç format es degrada ràpidament al llarg del temps (30 minuts aprox. depenent del compost).

3.6 Calibratge i límits de detecció del mètode cromatogràfic

Es varen preparar dissolucions patró de BAPN i β -alanina en aigua ultrapura en l'interval de concentracions de 0,001 a 0,1 mg/L. Les dissolucions es varen preparar per dilució a partir de dissolucions estoc de 1 ppm. La derivatització dels dos analits es va dur a terme emprant les mateixes condicions que s'utilitzaven per les mostres. Cada una de les dissolucions patró es va punxar per triplicat. A partir dels valors de l'àrea de pic respecte les concentracions es calculaven les equacions de les rectes de calibratge.

3.7 Mostres

Les mostres estudiades pertanyien a dos grups de ratolins Swiss, un de control alimentat amb una dissolució salina (10 ml/Kg) i un al que se li va administrar un única dosi de 24 mmol/kg d'IDPN en medi salí (10 ml/Kg). L'administració es realitzava mitjançant una cànula intragàstrica per via oral (intoxicació aguda). Els animals van ser sacrificats al cap d'1, 3 i 7 dies després de l'administració. Les mostres de sang d'entre 500-800 μ L es van obtenir dels animals sacrificats per extracció amb xeringa i després d'addicionar entre 5-7 μ L d'EDTA 0,5 M, van ser congelades a -20°C i transportades en fred fins al laboratori d'anàlisi.

El stock de mostres es componia en total de: tres mostres del dia 1 amb un control, tres mostres del dia 3 amb un control, 3 mostres del dia 7 amb un control i 6 mostres blanc (Taula 4).

Taula 4: Racopilació de mostres analitzades Durant l'estudi.

	Ratolins Swiss 24mmol/Kg i control	Volum sang(μ L)	V EDTA 0,5M (μ L)
Dia1	C1	700	7
	M2	600	6
	M3	800	8
	M4	750	7
Dia3	C5	600	5
	M6	250	5
	M7	500	5

Dia7	M8	700	5
	C9	800	7
	M10	650	8
	M11	800	7
	M12	650	7

3.8 Tractament de la mostra: separació plasma ratolí

Un cop es van obtenir resultats òptims per la determinació cromatogràfica es va procedir a estudiar les condicions de tractament de les mostres biològiques. Es va treballar amb les mostres de sang de l'estudi desenvolupat per NEOMA, però en primer lloc es van fer diverses proves amb sang de ratolins control fortificades amb BAPN i β -alanina per tal de desenvolupar una metodologia de separació dels compostos a analitzar de la sang. En primer lloc es va intentar separar el plasma per centrifugació a 3000 rpm durant 10 minuts. Malauradament, les mostres que van arribar al laboratori van resultar estar hemolitzades, el contingut proteic dels eritròcits estava lliure i era totalment impossible separar el plasma per centrifugació, com és habitual en els laboratoris d'anàlisi biològiques. Per tant es va assajar el procediment descrit per [Kang, X. et al. 2005](#) on després de la centrifugació abans esmentada s'addicionen 50 μ L de HClO_4 3 M per precipitar les proteïnes i seguidament es centrifuga. Amb aquest procediment els extractes eren completament transparents. A un volum exactament conegut de l'extracte (100 μ L) se li addicionava la mateixa quantitat de tampó (pH 10,1) i de dansil (2mg/ml), però a l'analitzar les mostres fortificades no s'observava cap pic en el cromatograma.

Des del departament de biologia molecular ens van proporcionar columnes de filtració proteica (Amicon Ultra 0.5mL), on tot el contingut biològic per sobre de 3KDa es queda retinut al filtre i les molècules més petites com nitrils poden passar(**Figura4**). Es van fer diverses proves fins a trobar les revolucions òptimes per a la separació del plasma.



Figura 4: Columnes de filtració Amicon amb NMWL de 3KDa

3.9 Estudi recuperació: mostres fortificades

Per tal de conèixer de quina manera afecta el plasma a la detecció dels metabòlits es va fer un estudi de recuperació amb mostres fortificades. Es van fer dos estudis amb diferents mètodes per la separació del plasma amb 6 mostres control. En primer lloc com que es pretenia utilitzar el mètode descrit per [Kang X. Et al. 2005](#) amb àcid perclòric es van fer diverses proves a diferents concentracions de BAPN i de β -alanina sense que s'observessin pics en el cromatograma. Aquest problema es podria deure a que el pH del medi no fos l'adient per a la

reacció de derivatització malgrat el medi es tamponava amb una dissolució de tampó de pH 10,1 (2M NaOH/NaHCO₃). Es varen fer diferents proves per ajustar el pH del medi, primer neutralitzant la solució àcida inicial i després afegint el tampó però només en algun cas es va poder observar algun pic molt petit respecte al pic del patró de la mateixa concentració.

Finalment es va treballar amb columnes de filtració tal i com esta explicat a l'apartat 5.6. amb aquest mètode es van poder obtenir pics característics dels metabòlits, tot i que la recuperació va resultar ser molt baixa. Cal remarcar que l'extracte obtingut després de la centrifugació no era molt transparent atès que el filtre deixa passar biomolècules amb NWML inferiors a 3 KDa.

3.10 Anàlisi cromatogrames, reproductibilitat i estadística

Les mostres de sang es descongelaven i després es filtraven i centrifugaven tal com s'ha descrit en la sessió anterior obtenint 150 µL de plasma. Per a procedir a la derivatització, a 100 µL de plasma s'addicionaven 100 µL de dissolució 2 mg/mL de clorur de dansil i 100 µL de dissolució tampó a pH=10,1. La mescla es deixa reaccionar a 80^o C durant 30 minuts a la foscor. Per aturar la reacció se li adicionaven 80 µL d'àcid acètic concentrat. Un una part de la barreja resultant es traspassava a un vial que es col.locava en el automostrejador del cromatògraf de líquids. El volum d'injecció era de 5 µL i les mostres s'injectaven per triplicat. Les concentracions dels metabòlits han estat calculades a partir de la integració de l'àrea dels pics del cromatograma en les rectes de calibratge de cada un dels anàlits. Els patrons de calibratge s'analitzaven en una mateixa seqüència juntament amb les mostres. Com a mesura de control de qualitat, alguns dels patrons de calibratge es tornaven a analitzar al final de la seqüència.

4. Resultats

4.1 Detecció per espectrometria de masses

Els resultats obtinguts per ESI mostren que la millor opció és la ionització positiva ja que és on es van observar amb més claredat els pics esperats. El IDPN va presentar un únic pic de massa atòmica a 124, la β-alanina a 91,1 (amb ionització negativa no es va observar la presència del compost), l'àcid cianoacètic a 98 i el BAPN a 186,9. Tots amb ionització positiva. Amb aquesta informació es va crear un nou mètode de treball al software de el instrument HPLC-MS/MS.

Els resultats obtinguts no van ser concloents ja que no es van poder detectar els pics característics dels compostos, probablement per la baixa massa molecular o perquè el mètode no era el més apropiat. Es va decidir que la millor manera de millorar la detecció dels fragments moleculars era derivatitzant els compostos amb clorur de dansil, ja que se n'augmenta la massa. Atès que la derivatització amb aquest agent també permetia la detecció per UV-vis es va decidir que per estudiar les condicions de separació cromatogràfica dels compostos s'utilitzaria un sistema d'HPLC-DAD, d'ús més senzill i que una vegada establertes les condicions de separació s'estudiarien les condicions de detecció per espectrometria de masses.

4.2 Condicions de derivatització

Segons es descriu en la part experimental (3.5), es varen realitzar proves variant les condicions de la reacció de derivatització amb clorur de dansil per a obtenir els derivats dels quatre compostos objecte d'aquest estudi: IDPN, BAPNS, β -alanina i àcid cianoacètic. Després d'aquestes proves es va concloure que només el BAPN i la β -alanina podien ser derivatitzades per aquest mètode, ja que durant els experiments en cap condició es va aconseguir senyal de patrons amb IDPN o àcid cianoacètic. Es va concloure que el grup amina (amina secundària) del compost IDPN és molt estable degut als dos grups ciano terminals (veure **Figura 1**) i aquest fet, implica que la seva reactivitat encara que sigui en condicions més extremes de temperatura i pH sigui baixa. Per altra banda l'àcid cianoacètic no té grup amina, tot i que s'esperava que reaccions per el grup àcid (Batzatt R, 2003) però no es va aconseguir veure cap banda d'absorció a l'espectre UV-vis.

Es va concloure que la reacció de derivatització del BAPB i β -alanina era òptima amb una concentració de dansil de 2mg/ml, a una T^o de 80°C durant 30 minuts amb un tampó a pH 10'1 (**Taula 5**). Durant tot aquest temps la mostra havia d'estar en total absència de llum, ja que l'enllaç entre el dansil i el grup amina es degrada fàcilment i es posava en vials per a ser processats ràpidament al cromatògraf. L'estabilitat dels derivats una vegada formats era només de poques hores i per tant, calia procedir a l'anàlisi cromatogràfica de les dissolucions el més aviat possible. Per a verificar l'estabilitat de les mostres i patrons es controlava la reproduïbilitat de les àrees dels pics al final de cada seqüència.

Taula 5: Condicions de derivatització amb dansil

Temps	Temperatura	Concentració DNS	pH	Tampó	Llum
30 min	80°C	2mg/ml	10,1	NaHCO ₃ /NaOH	absència

4.3 Condicions cromatogràfiques

Un cop establertes les condicions de la reacció de derivatització es va procedir a optimitzar la separació cromatogràfica dels compostos atès que les condicions assajades en el sistema HPLC-MS/MS no eren les mateixes. Els paràmetres que es varen variar en aquest cas, eren el flux i el gradient de fase mòbil. Finalment, amb un flux de 0,1ml/min i modificant el gradient es va obtenir una bona separació dels dos compostos entre si i respecte al front del cromatograma on s'elueix l'excés de clorur de dansil que s'utilitza en la reacció de derivatització. El temps total del cromatograma és de 15 minuts amb un minut d'estabilització de la columna entre mostra i mostra. Al cromatograma de la **Figura5** Es pot observar el pic característic de la β alanina amb un temps de retenció de 3.9 min i el del BAPN a 5.2 min, durant el treball vam tenir un problema de pressió a la bomba que feia fluctuar lleugerament el cabal i els temps de retenció podien estar lleugerament desplaçats.

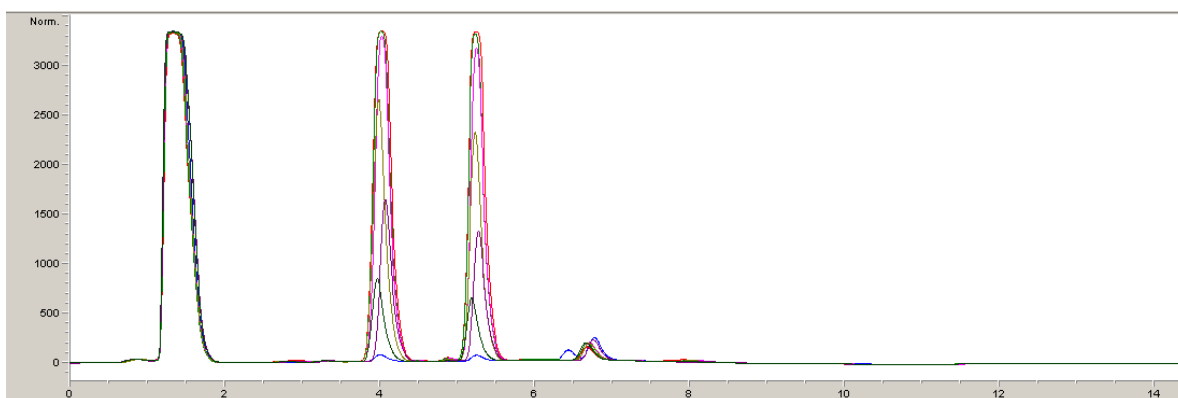


Figura 5: Solapament dels cromatgrams dels patrons de β -alanina i BAPN (0,1ppm, 0,08ppm, 0,06ppm, 0,04ppm, 0,02ppm, 0,01ppm, 0,001ppm). A l'eix de les abscises del cromatograma s'hi representa el temps de retenció en minuts i a l'eix d'ordenades l'àrea dels pics (A/A'). El primer pic del cromatograma correspon al clorur de dansil sobrant de la derivatització, seguit del pic característic de β -alanina i BAPN. S'observa un petit pic al final que probablement correspon a algun fragment de dansil creat durant la derivatització.

4.4 Rectes de calibratge i límits de detecció mètode

Les rectes de calibratge per cada un dels compostos es varen obtenir a partir de mesurar les àrees dels pics de les dissolucions patró que contenien tots dos compostos després de la seva derivatització. Els patrons es varen preparar en un interval ampli de concentracions que anaven de 1 a 100 ppb. Com es pot veure en la **Figura 6**, a les concentracions més altes hi ha una desviació important de la linealitat, de fet, es poden distingir clarament dos intervals, un a concentracions baixes i un altre a concentracions més altes:

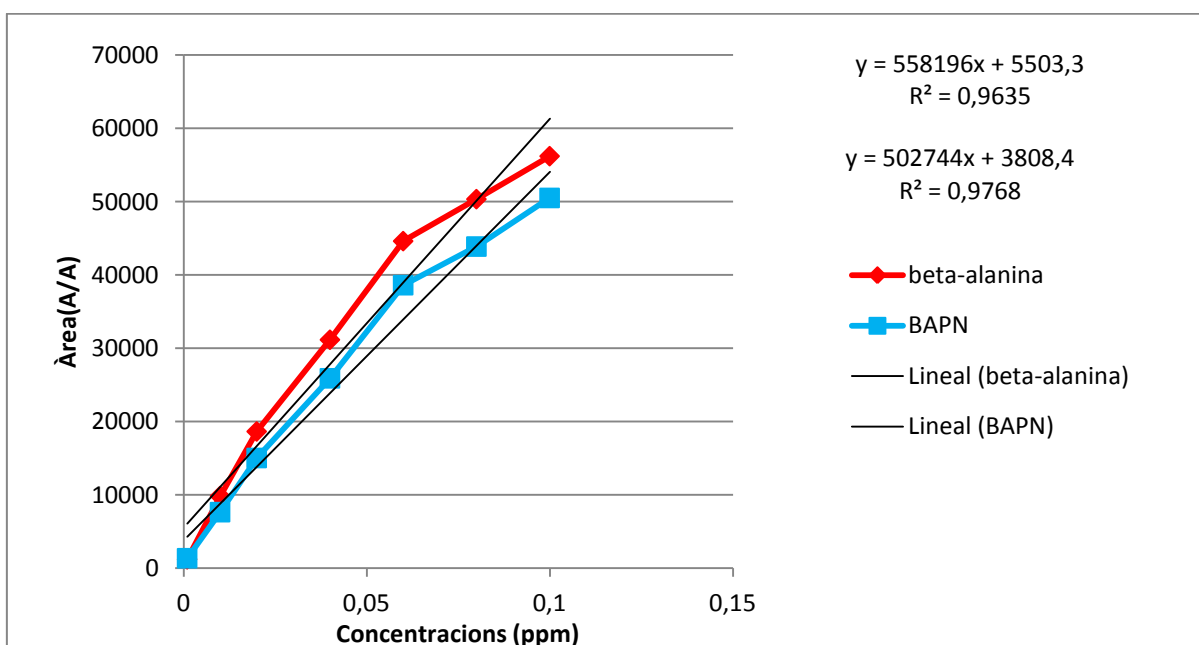


Figura 6: Rectes de calibratge per la β -alanina i del BAPN a concentracions de 0,1ppm, 0,08ppm, 0,06ppm, 0,04ppm, 0,02ppm, 0,01ppm i 0,001ppm.

Per aquest motiu, es varen seleccionar para la calibració els patrons amb concentracions de 0,06, 0,04, 0,02, 0,01 i 0,001 ppm. A la **Figura 7** es mostren les rectes obtingudes a partir de les mitjanes de les àrees dels pics característics de la β -alanina i del BAPN. Es pot observar com els punts tenen un bon ajust a la recta de regressió amb una $r^2=0.99$ pels dos compostos.

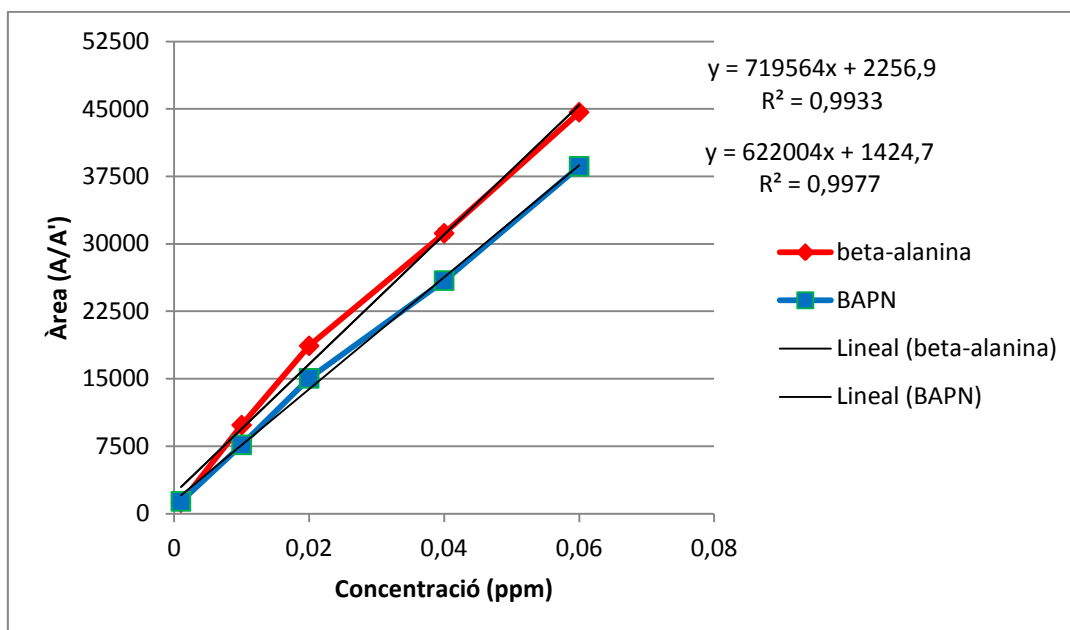


Figura 7: Rectes de calibratge per la β -alanina i del BAPN a concentracions de 0,06ppm, 0,04ppm, 0,02ppm, 0,01ppm i 0,001ppm.

Per calcular el límit de detecció es va utilitzar el mètode de Hubaux and Vos i el programari on line de Chemisoft (www.chemiasoft.com), que calcula el límit de detecció a partir del senyal que es pot diferenciar estadísticament del blanc (amb un nivell de confiança del 95%) en una zona on la relació senyal/soroll és de 5. Generalment, es defineix el límit de detecció (LD) com la concentració que proporciona un senyal que correspon a $3 \times SD$ (desviació estàndard) del blanc. El límit de quantificació es calcula com $10 \times SD$ del blanc i és el límit inferior de l'interval de linealitat. A la **Taula 6** podem trobar els valors corresponents a l'interval de linealitat, al límit de detecció i a la precisió.

Taula 6: Límits de detecció, intervals de linealitat, de BAPN i β -alanina

Compost	Interval linealitat	LD	Repetibilitat 0.01(SD)	Repetibilitat 0.06(SD)
BAPN	2,2-60 ppb	0,7 ppb	3,24 %	0,18%
β -alanina	4,4-60 ppb	1,2 ppb	2 %	0,1 %

En el cas de la β -alanina el patró de 1 ppb donava un error molt gran i no es va tenir en compte en els càlculs, malgrat el pic es distingeix fàcilment de la línia base en el cromatograma. Per aquest motiu, els LD i LQ per aquest compost són més alts que pel BAPN.

4.5 Tractament de les mostres de sang

Les diferents proves realitzades per separar el plasma de la sang per centrifugació i precipitació de les proteïnes amb àcid perclòric no varen donar bons resultats atès que les mostres estaven hemolitzades i que l'acidesa del medi o bé degradava els compostos o dificultava la reacció de derivatització. Finalment, es va optar per utilitzar columnes de filtració proteica. Per a la separació del plasma amb aquestes columnes es varen agafar 250 µL de sang en un dels tubs i es varen centrifugar a 10.000 rpm durant 20 minuts, obtenint uns 150µL de plasma.

4.7 Estudi recuperació

Després de varies proves sense resultats positius es va concloure que l'àcid HClO₄ 3 M podria haver degradat els compostos, malgrat en altres estudis estava reportat el seu us (Kang X. Et al. 2005).

Finalment, quan es va poder separar el plasma amb columnes de retenció proteica però només quedaven dos controls per a fer l'estudi de recuperació i per tant només es podia provar dues concentracions, es va realitzar la comparació entre un patró i plasma fortificat a dos nivells, un alt de 0,1ppm i un altre de 0,02 de BAPN i β-alanina. Tal i com es pot observar a la **Taula 7**, les recuperacions són baixes, especialment per la β-alanina i depenen de les concentracions presents a la mostra, es a dir que hi ha un efecte matriu important. Atès que les columnes de separació utilitzades no eliminen completament les proteïnes de la mostra (fins a 3KDa), aquestes dificulten la derivatització dels metabòlits i per tant, la seva determinació.

Taula 7: Comparació patró i mostra fortificada a 0,1ppm

	ÀreaBAPN 0,1ppm	Àrea β-alanina 0,1ppm	ÀreaBAPN 0,02ppm	Àrea β-alanina 0,02ppm
Patró (A/A')	47974.4	52468.8	17208.7	13043.8
Mostra fortificada(A/A')	32542.8	14734.9	4558.4	2500.4
% recuperació	67.8	28.1	26.4	19.1

4.8 Concentració dels metabòlits en les mostres

Com es pot observar en la **Figura 8** en els cromatogrames de la mostra hi tenim més pics corresponents als aminoàcids de les mostres que reaccionen amb l'agent derivatitzant i que també són detectats a 254 nm. També podem observar als temps de retenció de la β-alanina a 3,959min i el del BAPN a 5,217min al patró(A). Si observem el cromatograma de la mostra 4 (B) hi ha un clar pic a t=5,257min corresponent al BAPN i un a 4,16min que podria ser la β-alanina. A la imatge C podem veure el perfil del cromatograma control per el dia 1. És molt evident la reducció de pics quan la rata no ha estat intoxicada.

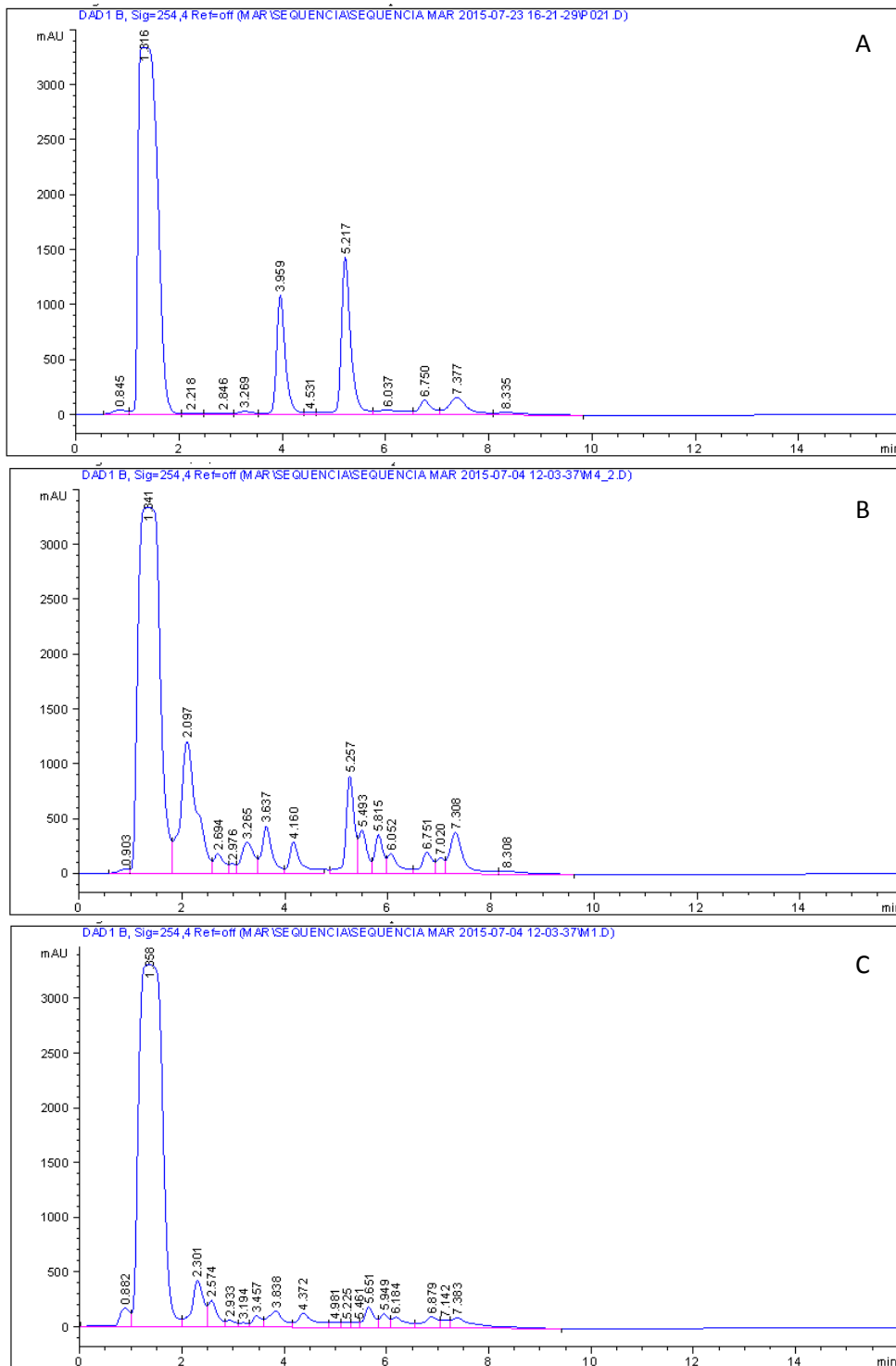


Figura 8: Cromatogrames obtinguts amb el mètode d'estudi. Cromatograma amb patró de BAPN i β -alanina a 0,02ppm(A). Cromatograma mostra M4 corresponent a un ratolí del grup 24mmol/Kg IDPN sacrificat el dia 1 (B). Cromatograma mostra control sacrificada a dia 1 (C).

En la **Taula 8** es donen les concentracions, que s'han obtingut per interpolació en les rectes de calibratge, dels dos metabòlits en les mostres de plasma. Les mostres es varen punxar a l'igual que els patrons tres vegades i el grau de repetibilitat és gran amb desviacions estàndard inferiors al 10%, encara que en algun cas s'ha rebutjat algun punt.

Taula 8: Concentracions de les mostres analitzades en ppb. Concentracions de BAPN i β -alanina calculades a partir de les rectes de calibrat calculades a partir del programa Chemiasoft. En vermell s'hi representen aquelles mostres per sota del límit de quantificació i que per tant s'han hagut de descartar.

Mostres	Concentració β -alanina (ppb)	Concentració BAPN (ppb)
C1	2.32	2.25
M2	1.37	4.75
M3	4.07	2.22
M4	4.42	5.37
C5	7.03	12.44
M6	1.77	0.96
M7	1.33	0.54
M8	6.42	6.11
C9	1.98	2.56
M10	0.91	1.39
M11	4.28	7.9
M12	1.34	4.91

Els resultats per a les concentracions de l'estudi finalment queden representades a la **Figura 9** segons els límits de quantificació establerts. Les dades mostren com no hi ha diferències significatives entre les rates estudiades i els controls en els dies 1, 3 i 7 a excepció del BAPN el dia 1.

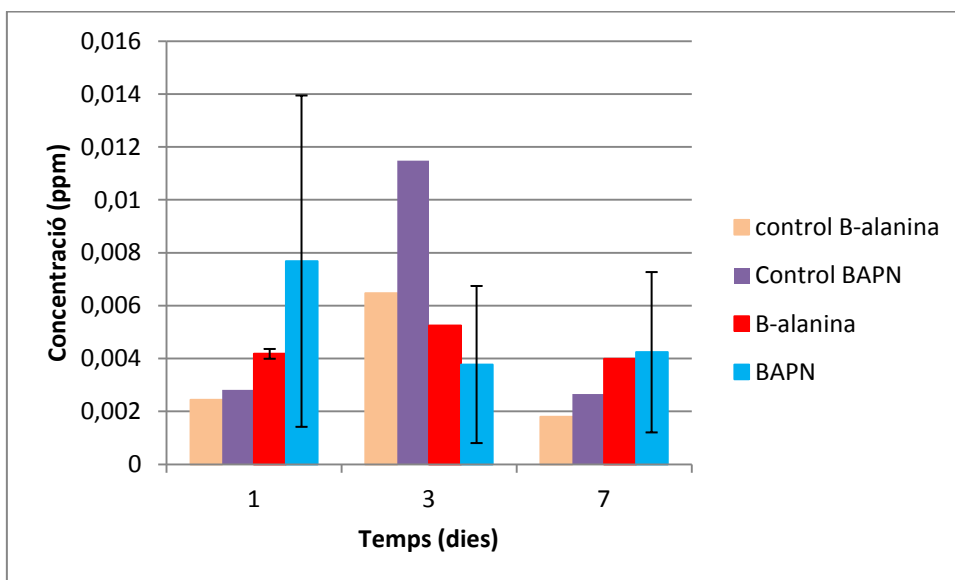


Figura 9: Concentracions de les mostres vàlides obtingudes per els dies 1, 3 i 7. Al gràfic es representen les mitjanes i les desviacions estàndard de les concentracions trobades per la β -alanina i el BAPN amb els seus respectius controls. Només s'han detectat diferències significatives entre el BAPN i el control del dia 1.

5. Discussió resultats

Comparació concentracions, comportament animal i estudi immunohistològic

El mètode desenvolupat només permet la quantificació de dos dels compostos d'interès: el BAPN i la β -alanina i presenta una bona sensibilitat quan es treballa amb patrons. En el cas de les mostres hi ha problemes d'exactitud atès que s'ha observat un fort efecte matriu que fa que les recuperacions siguin molt baixes i molt dependents del nivell de concentració. Això es degut a que les columnes de filtració utilitzades no eliminen completament totes les proteïnes presents a les mostres. La separació del plasma de la sang després de l'extracció mitjançant centrifugació evitaria el trencament dels eritròcits quan es congela la mostra i facilitaria la manipulació de les mostres de plasma que es poden conservar congelats. Després caldria estudiar els possibles efectes matrius del plasma, assajant diferents reactius per a precipitar les proteïnes o bé emprant pel calibratge el mètode de l'addició estàndard. També caldria trobar la forma de poder determinar IDPN i l'àcid cianoacètic en el mateix protocol assajant altres condicions de derivatització amb clorur de dansil. Ebn aquest cas encara que el rendiment de la reacció de derivatització fos baix, si s'utilitza un sistema de HPLC-MS/MS, aquest al tenir més sensibilitat i més resolució permetria determinar concentracions més baixes dels analits d'interès. Una vegada trobades les condicions òptimes per l'anàlisi s'hauria de procedir a la validació del mètode que inclouria l'anàlisi de mostres fortificades per a verificar-ne l'exactitud.

Els resultats finalment obtinguts per a les concentracions de les mostres no han sigut estadísticament rellevants segons els paràmetres establerts, a excepció del BAPN el dia 1. Tot i així es pot observar una tendència a baixar la concentració de metabòlits en sang al llarg dels dies, sembla que a dia 1 les rates presenten les concentracions més altes de BAPN i β -alanina, però al dia 3 trobem dues rates que han eliminat pràcticament tots aquests metabòlits i a dia 7 les tres rates tenien concentracions molt baixes, dues per sota del límit de quantificació. Cal destacar que moltes mostres van haver de ser descartades per estar per sota del límit de quantificació, i que la desviació estàndard és molt gran degut a la variabilitat d'individus ja que la capacitat de metabolització difereix dins la n.

Si comparem aquests resultats amb l'estudi realitzat des de NEOMA trobem una relació comportament-concentració metabòlits. Coincideix el fet de que quan en sang les concentracions són més elevades, durant el dia 1, els ratolins encara no experimenten canvis significatius en el seu comportament (test de funció vestibular, prova de camp obert i patró de marxa), però a partir del dia 3 i el dia 7 sobretot s'observa una disfuncionalitat cada vegada més greu. Nosaltres interpretem a partir d'aquests fets que durant les primeres hores des de l'administració del neurotòxic l'organisme metabolitza aquest fins a arribar a tenir els seus metabòlits en sang a unes concentracions elevades, però encara no han tingut temps de danyar els teixits diana. Al llarg dels dies aquests metabòlits poden arribar als epitelis del sistema vestibular provocant la mort de les cèl·lules ciliades d'aquest.

Per altra banda NEOMA també va realitzar un estudi amb microscopia d'epifluorescència i confocal de les preparacions immunohistoquímiques dels epitelis vestibulars per cèl·lules ciliades i neurofilaments. Per al grup de rates amb administració de 24mmol/Kg es va observar

una mort abundant d'aquestes cèl·lules però no de neurofilaments. En el dia de màxima degeneració cel·lular els metabòlits en sang són mínims, així que s'explicaria un cop més com els tòxics han interactuat amb les cèl·lules causant la mort d'aquestes.

Cal destacar que el procés de metabolització semblaria a ser que es produeix en les primeres 48h, així que de cara a estudis posteriors es podria fer un estudi en un termini més centrat en aquestes hores crítiques. L'estudi fet des de NEOMA tenia mostres a dia 0, 1, 3, 7 i 19 però només es van analitzar cromatogràficament els dies 1, 3 i 7. Caldria en un futur fer un estudi més detallat en el temps per a seguir la via metabòlica. Un altre problema amb el que ens vam trobar era la enorme variabilitat entre individus, ja que la capacitat d'afectació d'un tòxic pot variar molt entre els ratolins. Una possible solució de cara al futur podria ser treballar amb rates enlloc de ratolins i extreure diàriament una gota de sang per a analitzar, així es podria veure com evoluciona cada individu al llarg del temps.

6. Conclusions

After all this work, we can conclude that:

-Only BAPN and β -alanine are detectable by the developed method. IDPN and cyanoacetic acid are not able to react with dansyl chloride because of their molecular structure. Only primary amines like aminoacids could be visualized in our chromatograms. The best way to detect these molecules is to develop a mass-spectrometry method that could confirm our hypothesis.

-The big variability between individual animals cannot be correctly overcome due to the small number of samples analyzed. I propose for a future studies, to monitor the same animal during the experiment by extracting little volumes of blood. Mouses little blood extraction. Another method would be developed to analyze this little amount of sample. Another possibility is to substitute mouses by rats, if it is the case.

-Metabolites concentration seems to be indirectly connected with the vestibular degeneration. We observed how a degenerated behaviour and cellular epithelium are related with the decrease of metabolites concentration in blood.

7. Agraïments

L'autora vol agrair al departament de Química Analítica i Ambiental l'oportunitat de prendre paper en el que espero que sigui una llarga i fructífera col·laboració amb NEOMA en l'estudi de les malalties neurodegeneratives. Ha estat un any ple d'enriquiment acadèmic i personal que he tingut la sort de gaudir.

Sento especial agraïment i admiració cap a la meva tutora en aquesta odissea, la Dra. Victòria Salvadó, per la gran dedicació, la implicació i la capacitat de compaginar tot aquest treball amb les obligacions del Deganat de Ciències.

Gràcies al Dr. Pere Boades per l'adquisició de les mostres i depositar-les a les meves mans per a l'estudi, basat en la seva tesi doctoral. També li estic agraïda per la visita a l'estabulari de la Universitat de Barcelona on vaig poder veure les instal·lacions on es tractarien les mostres que hauria d'analitzar.

Finalment també vull agrair a la Dra. Nela Hidalgo l'ajuda durant la posada a punt del cromatògraf, als Serveis Tècnics del Parc Científic i Tecnològic per les facilitats a l'hora d'accedir i treballar amb el espectròmetre de masses i als membres del departament de Química Analítica de la Facultat de Ciències per l'ajuda proporcionada.

8. Bibliografia

- Bhandari R. et al. (2013). Simultaneous high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS) analysis of cyanide and thiocyanate from swine plasma. *Anal. Bioanal. Chem.*, 406, 727-734.
- Boades i Vaello P. Neurotoxicitat i metabolisme denitrils a la rata i ratolí. Barcelona: universitat de Barcelona. Departament de ciències fisiològiques II, 2008. http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1155/PBV_TESI.pdf?sequence=1 (consultat el 30 de juny de 2014)
- Chemiasoft <http://www.chemiasoft.com/chemd/node/60> (calculator) consultat el 23/7/2015
- Chou S.M. i Hartman H.A.(1964). Axonal lesions and waltzing syndrome after IDPN administration in rats. With a concept "Axostasis". *Acta Neuropathol*, 3, 428-450.
- Delay J. et al. (1952). Action de l'amino-dipropionitrile sur le comportement moteur de la souris blanche C.R. *Soc. Biol.*, 146, 533-534.
- Denlinger R. et al (1993). Methabolism of 3,3'-iminopropilnitrile and deuterium -substituted analogs: potential mechanisms of detoxification and activation. *Toxicology and applied pharmacology*, 124, 59-66.
- Engelhart D.A. (1994). Methabolic activation of cyclic tertiary amines, Neurotoxic activation of β,β' -iminopropilnitrile (IDPN). Tesi doctoral. *Departament of chemistry*. Case Western Reserve university.
- Garcia I. et al. (2010). Mitochondrial b-cyanoalanine synthase is essential for root hair formation in arabidopsis thaliana. *The plant cell*, 22, 3268-3279.
- Häkkinen M et al. (2008). Quantitative determination of underivatized polyamines by using isotope dilution RP-LC-ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 48, 414- 421.
- Häkkinen M et al. (2007). Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 45, 625-634.
- Jiamin Zheng, Liang Li (2012). Fragmentation of protonated dansyl-labeled amines for structural analysis of amine-containing metabolites *International Journal of Mass Spectrometry* 316- 318, 292- 299.
- Kang X. (2005). Optimitzation of dansyl derivatitzation and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. *Clinica Chimica Acta*, 3666, 352-356.

Llorens J. Et al (1993). Olfactory toxicity of β,β' -iminopropilnitrile (IDPN) in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 263, 1432-1439.

Machon C. (2014). Quantification of β -iminopropilnitrile, an inhibitor of lysyl oxidase activity, in plasma and tumor of mice by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical chromatography*, 28, 1017-1023.

Magnes C. Et al. (2014). Polyamines in biological samples: rapid and robust quantification by solid-phase extraction online-coupled to liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1331, 44-51.

Meyer T. (2011).reproducible and high-throughput hplc/ms method to separate sarcosine from α - and β -alanine and to quantify sarcosine in human serum and urine. *Analytical chemistry*, 83, 5735-5740.

Mitchell B. et al (2010). Quantification of α -ketoglutarate cyanohydrin in swine plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 934, 60-65.

Moore M. Et al. (2010). Infrared spectra and optical constants of nitrile ices relevant to titan's atmosphere. *The Astrophysical Journal Supplement Series*, 190, 1–17.

Morandi A. et al (1987). Mechanism of neurotoxic action of β,β' -iminopropilnitrile (IDPN): N-hydroxylation enhances neurotoxic potency. *Brain research*, 437, 69-76.

Paseiro R. Et al. (2011). Analytical method for the simultaneous determination of polyfunctional amines used as monomers in the manufacture of food packaging materials. *Journal of chromatography A*, 1218, 7105- 7109.

Rúa F. et al (2013). Vestibulotoxic properties of potential metabolites of allylnitrile. *Toxicological sciences*, 135, 182-192.

Williams S. et al. (1970). Studies on the metabolism of β,β' -iminopropilnitrile in the rat. *Biochemical pharmacology*, 19, 2277-2287.