

Títol del treball: DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE ANALÍTIC PER LA DETERMINACIÓ DE NEUROTÒXICS EN SÈRUM DE RATOLÍ PER HPLC-DAD

Estudiant: Eva Casado Ramón

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: u1906633@campus.udg.edu

Tutor: Victòria Salvadó

Cotutor*:

Empresa / institució: Facultat de Ciències, Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Victòria Salvadó

Nom del cotutor*: Facultat de Ciències,

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s) victoria.salvado@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE ANALÍTIC PER LA
DETERMINACIÓ DE NEUROTÒXICS EN SÈRUM DE RATOLÍ
PER HPLC-DAD

Eva Casado Ramón

Grau en Biotecnologia
Facultat de Ciències
Universitat de Girona



RESUM

El 3,3'-Iminodipropionitril (IDPN) és un neurotòxic que pot metabolitzar-se formant 3-Aminopropionitril (BAPN) i β -alanina, entre altres metabòlits. En el present treball s'ha desenvolupat un mètode cromatogràfic per a la determinació de l'IDPN i dos dels seus possibles metabòlits, el BAPN i la β -alanina en mostres biològiques emprant un sistema de cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) amb detector de díodes en línia (DAD). El mètode desenvolupat s'ha avaluat en mostres de sèrum de ratolí fortificades amb l'objectiu d'estudiar la recuperació dels compostos i l'efecte matriu.

Per determinar els tres compostos d'interès ha estat necessària la derivatització del grup amino per facilitar la seva detecció per UV-Vis, utilitzant com agent derivatitzant el clorur de dansil. S'han estudiat les condicions de derivatització dels compostos i, especialment, les de l'IDPN a partir de modificar la temperatura, el pH i les concentracions de l'agent derivatitzant. No és va poder derivatitzar l'IDPN malgrat que es van assajar condicions més extremes que per la resta de compostos estudiats, i per tant, només s'ha pogut derivatitzar i determinar el BAPN i la β -alanina. Per aquests compostos també es varen estudiar les condicions cromatogràfiques de separació i detecció per HPLC-DAD.

Un cop establertes les condicions més òptimes de derivatització i de separació cromatogràfica, s'han realitzat les rectes de calibratge del BAPN i la β -alanina, establint l'interval de linealitat i els límits de detecció i de quantificació del mètode. Per l'estudi de la recuperació dels compostos en mostres de sèrum de ratolí s'han provat diferents procediments per tractar les mostres, prèviament fortificades amb BAPN i β -alanina.

Els resultats mostren un interval de linealitat de 0,67-2 ppm en el cas de la β -alanina amb un límit de detecció de 0,2 ppm tot i no haver aconseguit suficient sensibilitat amb el mètode per determinar concentracions més baixes del LOD. Pel BAPN aquesta sensibilitat és encara menor i la recta patró té un interval de linealitat de 0,61-2 ppm amb un límit de detecció de 0,18 ppm.

En l'estudi de recuperació en les mostres de sèrum s'han provat diferents tractaments per eliminar les proteïnes de la mostra: tractament amb HClO_4 , amb acetona-MeOH, filtres de centrífuga AMICON 3 KDa i combinacions dels filtres amb els altres dos tractaments. Els resultats no han estat positius en cap dels procediments provats per tractar les mostres i evitar que els pics cromatogràfics dels components del sèrum no interferissin en la dels compostos d'interès. L'efecte matriu és molt gran en aquest cas, i per tant, no s'ha pogut calcular el percentatge de recuperació de la β -alanina i BAPN en les mostres de sèrum.

RESUMEN

El 3,3'-Iminodipropionitrilo (IDPN) es un neurotóxico que puede metabolizarse formando 3-Aminopropionitril (BAPN) y β -alanina, entre otros metabolitos. En el presente trabajo se ha desarrollado un método cromatográfico para la determinación de IDPN y dos de sus posibles metabolitos, el BAPN y la β -alanina en muestras biológicas empleando un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detector de diodos en línea (DAD). El método desarrollado se ha evaluado en muestras de suero de ratón fortificadas con el objetivo de estudiar la recuperación de los compuestos y el efecto matriz.

Para determinar los tres compuestos de interés ha sido necesaria la derivatización del grupo amino para facilitar su detección para UV-Vis, usando como agente derivatizante el cloruro de dansilo. Se han estudiado las condiciones de derivatización de los compuestos y, especialmente, las del IDPN a partir de modificar la temperatura, el pH y las concentraciones del agente derivatizante. No se pudo derivatizar el IDPN a pesar que se ensayaron condiciones más extremas que para el resto de compuestos estudiados, y por lo tanto, solo se ha podido derivatizar y determinar el BAPN y la β -alanina. Para estos dos compuestos también se estudiaron las condiciones cromatográficas de separación y detección por HPLC-DAD.

Una vez establecidas las condiciones más óptimas de derivatización y de separación cromatográfica, se han realizado las rectas de calibrado del BAPN i β -alanina, estableciendo el intervalo de linealidad y los límites de detección y cuantificación del método. Para el estudio de la recuperación de los compuestos en muestras de suero de ratón se han probado diferentes procedimientos para tratar las muestras, previamente fortificadas con BAPN y β -alanina.

Los resultados muestran un intervalo de linealidad de 0,67-2 ppm para la β -alanina, con un límite de detección (LOD) de 0,2 ppm a pesar de no haber conseguido suficiente sensibilidad con el método para determinar concentraciones más bajas del LOD. Para el BAPN esta sensibilidad aún es menor y la recta de calibrado tiene un intervalo de linealidad de 0,61-2 ppm, con un límite de detección de 0,18 ppm.

En el estudio de recuperación en muestras de suero se ha probado diferentes tratamientos para eliminar las proteínas de la muestra: tratamiento con HClO_4 , con acetona-MeOH, filtros de centrifuga AMICON 3 kDa y combinaciones de los filtros con los otros dos tratamientos. Los resultados no han estado positivos para ninguno de los procedimientos probados para tratar las muestras y evitar que los picos cromatográficos de los componentes del suero no interfirieran en los picos de los compuestos de interés. El efecto matriz es muy grande en este caso, y por lo tanto, no se ha podido calcular el porcentaje de recuperación de la β -alanina i BAPN en las muestras de suero.

ABSTRACT

3,3'-iminodipropionitrile (IDPN) is a neurotoxin that can metabolize in 3-Aminopropionitrile (BAPN) and β -alanine, among other metabolites. In this study we developed a chromatographic method for the determination of IDPN and two of its possible metabolites, BAPN and β -alanine in biological samples using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system equipped with diode array detector (DAD). The developed method has been evaluated by analyzing spiked mouse serum samples. The aim of this study is to study the matrix effects and to calculate the recoveries of these compounds in this type of samples.

Derivatization of the amino group is required to facilitate UV-Vis detection of the three compounds of interest. In this study, dansyl chloride was selected as the derivatization agent. The conditions of the derivatization reaction such as temperature, time, pH and concentration of the derivatizing agent were studied and especially those required for obtaining IDPN derivatives. Finally, despite the extreme conditions tested, IDPN was not derivatized. Therefore, this compound was not determined and only BAPN and β -alanine were included in the method. The chromatographic separation and detection conditions by HPLC-DAD for these compounds were then studied.

Once established the optimum conditions of derivatization and chromatographic separation, we calculated calibration curve for BAPN and β -alanine, setting the range of linearity and limits of detection and quantification of this method for the determination of these compounds. To study the recovery of compounds in mouse serum samples we tested different procedures of sample treatment after spiking the samples with BAPN and β -alanine.

The results show a linearity interval of 0,67-2 ppm for β -alanine and a detection limit of 0,2 ppm despite we could not achieved enough sensitivity with this method to determine lower concentrations. For BAPN, the sensitivity is even lower than for β -alanine and the calibration curve has linearity interval of 0,61-2 ppm with a detection limit of 0,18 ppm.

In order to determine the recoveries of these compounds from the serum samples, we tested several sample treatments to remove serum proteins: HClO_4 , acetone-methanol, centrifugal filters AMICON 3 KDa and combinations of centrifugal filters with the other two treatments. The results were not positive in any of the procedures tested to treat samples and we could not prevent chromatographic peaks of serum components did not interfere in the peaks of the compounds of interest. The matrix effect is strong in this case and therefore we could not calculate the recovery percentage of β -alanine and BAPN in serum samples.

Índex de continguts

1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1. Estructura química i determinació de l'IDPN, BAPN i β -alanina.....	1
1.2. Reacció de derivatització i clorur de dansil.....	1
1.3. Anàlisi Cromatogràfica.....	4
2. OBJECTIVES.....	5
3. METODOLOGIA.....	6
3.1. Reactius i equipament.....	6
3.2. Proves de derivatització de l'IDPN.....	6
3.3. Condicions de derivatització i optimització.....	8
3.4. Cromatografia per HPLC.....	9
3.5. Rectes de calibratge β -alanina i BAPN.....	10
3.6. Anàlisi estadístic de les dades: LOD i LOQ.....	10
3.7. Tractament i estudi de recuperació en mostres de sèrum de ratolí.....	11
4. RESULTATS.....	13
4.1. Condicions de derivatització.....	13
4.2. Cromatografia.....	13
4.3. Rectes de calibratge β -alanina i BAPN.....	14
4.4. Anàlisi estadístic: LOD i LOQ.....	15
4.5. Estudi de l'efecte matriu en mostres de sèrum de ratolí.....	16
5. DISCUSSIÓ.....	20
6. CONCLUSIONS.....	22
7. BIBLIOGRAFIA.....	23

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Estructura química i determinació de l'IDPN, BAPN i β -alanina

El 3,3'-iminodipropionitril (IDPN) és un nitril que pot causar diferents efectes de neurotoxicitat. En la seva estructura presenta una amina secundària i dos grups ciano (**Figura 1**). Es coneix que dos dels seus metabòlits comuns són el 3-aminopropionitril (BAPN), i la β -alanina, entre altres compostos (Llorens, 2011). El BAPN es tracta també d'un nitril amb un grup ciano i un grup amino en la seva estructura química. La β -alanina per altra banda, és un aminoàcid i d'estructura senzilla i que per tant, conté un grup amina i un grup carboxil (**Figura 1**). Tan el grup amino de la β -alanina com el del BAPN es tracten d'amines primàries.

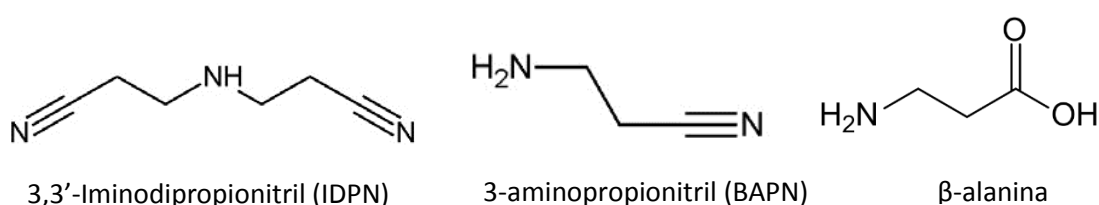


Figura 1. Estructura química de l'IDPN, BAPN i β -alanina.

Donat la semblança estructural dels tres compostos, es pot plantejar la seva determinació de manera conjunta. Per la determinació d'amines i aminoàcids, com és el cas d'aquests compostos, en mostres biològiques, es descriuen nombrosos mètodes d'anàlisi per a la seva detecció per diferents tècniques com poden ser la cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) o per espectrofotometria de masses (MS) o la combinació de les dues (Machon 2013, Paseiro 2011, Minocha 2004). També s'indiquen altres mètodes com la fluorescència, ELISA, radioimmunoassaig (RIA), cromatografia de capa fina (TLC) cromatografia d'intercanvi iònic, cromatografia de gasos (GC) (Mao 2009, Innocente 2007), tot i que l'HPLC en fase reversa s'indica com a tècnica més adequada (Innocente, 2007). En la majoria de casos es descriu la necessitat prèvia de la derivatització dels compostos abans de passar a la seva determinació i separació cromatogràfica.

1.2. Reacció de derivatització i clorur de dansil

La derivatització és una reacció de procediment senzill que permet assegurar una bona sensibilitat per la determinació dels compostos ja que moltes vegades les amines o aminoàcids que es volen determinar manquen d'un grup cromòfor que faciliti la seva detecció (Saarinen, 2002). Així, al derivatitzar-los es millora la seva sensibilitat i detecció per Uv-VIS i fluorescència. (Kang, 2006). A més, la utilització del mateix agent derivatitzant per reaccionar amb compostos que es volen determinar, permet que es puguin tractar simultàniament i detectar pel mateix mètode i condicions a una mateixa longitud.

Els aminoàcids i les amines poden ser detectats directament a l'ultraviolat, ja que absorbeixen a una longitud d'ona entre 190-210 nm. No obstant això, en aquesta regió de l'espectre també absorbeixen la majoria dels solvents i altres components de les mostres, pel que normalment es recorre a la formació de derivats detectables a altres longituds d'ona o fluorescents (Cáceres, 1986).

Alguns dels agents derivatitzants que s'utilitzen de manera més comuna per a la determinació d'aminoàcids i amines són: la Ninhidrina, el clorur de dabsil, el clorur de dansil (Dns-Cl), l'ortoftaldehid (OPA), fenilisotiocianat (FITC), el 9-fluorenilmetil cloroformat (FMOC) o el 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat (AQC) (Kaspar 2008, Callejón R).

En aquest treball s'ha fet servir el clorur de dansil com a agent derivatitzant. Entre les avantatges que presenta respecte altres agents derivatitzants es troba el fet que pot reaccionar tant amb amines primàries com secundàries, així com una major estabilitat dels derivats dansilats resultants de la reacció. També permet la detecció dels derivats tan per UV-Vis (254 nm), com per fluorescència (λ_{ex} 360 nm; λ_{em} 470 nm) (Callejón R, Paseiro 2011). Els nivells de detecció estan en l'ordre de picomols o femtomols depenent de la sensibilitat del detector (White i Hart, 1992). Aquest agent derivatitzant també té l'avantatge que ha estat utilitzat en la detecció per espectrometria de masses ja que permet augmentar la massa dels compostos més petits, com la β -alanina, al unir-se a ells durant la derivatització

La reacció de DNS-Cl amb amines genera sulfonamides aromàtiques (Fournier et al., 2008). L'estructura de la molècula de DNS-Cl conté dos anells aromàtics, que són altament fluorescents i poden ser fàcilment detectats amb un detector d'UV. També conté un grup reactiu (clorur de sulfonil), que reacciona amb els analits en una reacció de substitució nucleòfila (**Figura 2**) (Silva 2005).

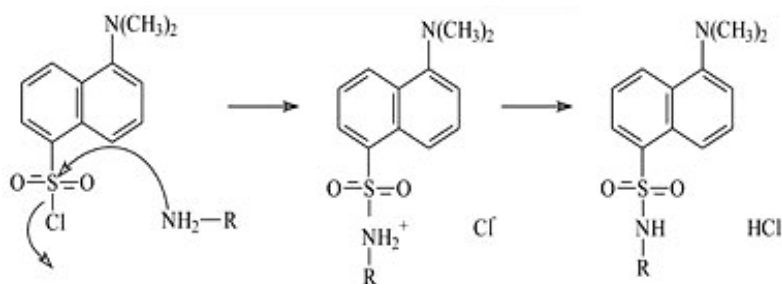


Figura 2. Reacció de derivatització d'una amina amb el clorur de dansil.

Perquè la reacció de derivatització es produeixi es necessiten unes condicions de pH bàsic, un temps i temperatura adequats perquè els compostos tinguin temps a reaccionar i una concentració de clorur de dansil adequada. També cal que es produeixi en absència de llum, ja que els derivats dansilats són fotosensibles i es poden degradar. Totes aquestes condicions poden afectar el rendiment de la derivatització (Kang, 2006), de manera que és necessari el seu estudi per tal d'establir aquelles condicions que donen un resultat més òptim de la reacció.

Així doncs, a la bibliografia no es troben descrites unes condicions estàndard per a la derivatització amb clorur de dansil, i tot i estar treballant amb compostos similars, s'apliquen condicions molt variables entre diferents estudis. Normalment abans de passar a la determinació dels compostos s'optimitzen les condicions de la reacció de derivatització, estudiant diferents temps de reacció i temperatura (de reacció a temperatura ambient fins a 90°C, i de 10 min fins a 2-3 h), diferents pH (de pH 8 a 11) i diferents concentracions de clorur de dansil (de 2 a 20 mg/ml) (Paseiro 2011, Cai 2010, Kang 2006, Mao 2009, Minocha 2004, Innocente 2007, Machon 2013).

És molt important controlar sobretot el pH a la que es produeix la reacció, ja que té un paper clau en la seva eficiència (Paseiro, 2007). Perquè es produeixi la completa derivatització dels compostos es necessiten condicions bàsiques. Però en algun cas s'ha vist que si s'aplica un tampó de pH massa bàsic, la reacció de les amines amb el clorur de dansil competeix també amb la hidròlisi del clorur de dansil per part dels grups hidroxils (Minocha 2004). Mentre que tampoc pot ser a 9,5 atès que es requereix una concentració relativament gran d'ions hidròxid per que es produeixi la substitució del H del grup amina per a formar una dansil amida. Per tant cal ajustar el pH més òptim que permeti que la reacció es produeixi i es mantingui l'estabilitat dels derivats formats.

L'estabilitat dels derivats dansilats depèn de las condicions utilitzades en la reacció de derivatització. L'estabilitat és menor si la reacció de derivatització es produeix a temperatures altes, de més de 90°C, i a temps superior a 1 hora. Ara bé, aquestes condicions més extremes són a vegades necessàries per a derivatitzar amines secundàries. Les altes temperatures fan que la reacció vagi més ràpid i el temps de reacció disminueixi. No obstant això, les altes temperatures disminueixen l'estabilitat dels dansilo-derivats i, per tant, el rendiment final és més baix (Silva, 2005).

Un dels inconvenients que té la derivatització amb clorur de dansil és que cal fer servir un excés d'aquest reactiu per a obtenir una bona eficiència i per tant, en l'anàlisi cromatogràfica de la mostra també apareix en el cromatograma un gran pic corresponent a l'excés de dansil (Callejón R). Per tal d'evitar que el pic del dansil interfereixi en el correcte anàlisi dels pics d'interès s'han d'aplicar les condicions de separació cromatogràfica i gradient adients per separar els diferents compostos sense que el pic del dansil interfereixi o es solapi amb els pics dels compostos a determinar. També s'apliquen diferents mètodes per eliminar l'excés de dansil i que el seu pic no interfereixi en la lectura dels altres pics, com l'ús d'amoniac o altres aminoàcids com la L-alanina o la prolina (Saarinen 2002, Minocha 2004, Innocente 2007).

1.3. Anàlisi cromatogràfica

Pel que fa a l'anàlisi cromatogràfic dels compostos derivatitzats, a la bibliografia també es descriuen diferents condicions, com la fase mòbil utilitzada, el gradient o columnes de diferents mides i mida de partícula. A la majoria d'articles consultats s'aplica una fase mòbil d'aigua i acetonitril o metanol, encara que en algun estudi també s'apliquen fases mòbils amb sals com acetat de sodi o amoni (Minocha 2004, Cai 2010). Per aquest treball s'han seleccionat una composició de fase mòbil aigua i acetonitril que sigui compatible amb l'espectrometria de masses perquè es pugui transferir el mètode al sistema HPLC-MS/MS quan les concentracions en les mostres biològiques siguin molt petites (Meyer, 2011).

Amb l'objectiu de determinar la concentració de IDPN i de dos dels seus metabòlits, BAPN i B-alanina, en sèrum de ratolí, s'ha procedit a determinar les condicions de derivatització i de separació cromatogràfica per cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) amb detector DAD. Partint de les condicions establertes prèviament (Eroles, 2015) s'han derivatitzat els compostos i separat per HPLC-DAD.

2. OBJECTIVES

The main objective of this project is to develop an analysis method for determination of IDPN and its metabolites, BAPN and β -alanine in biological samples by HPLC-DAD. This method will be validated for the determination of these compounds in mouse serum samples. The specific objectives of this study are:

- To establish the optimum derivatization conditions of IDPN, BAPN and β -alanine with dansyl chloride in order to determine them by HPLC-DAD.
- To study and optimize the chromatographic separation conditions of these compounds.
- To calculate the recoveries of these compounds (IDPN, BAPN and β -alanine) from spiked mouse serum samples and set out the most appropriate sample treatment to reduce the matrix effect.

3. METODOLOGIA

3.1. Reactius i equipament

Els principals reactius que s'han utilitzat per l'elaboració d'aquest treball són: Clorur de dansil (Sigma-Aldrich), Clorur de dansil (bioreactiu, Sigma-Aldrich), IDPN (TCI), BAPN (Sigma-Aldrich), β -alanina (Sigma-Aldrich), Carbonat sòdic (Panreac), Bicarbonat sòdic (Merk), Àcid fòrmic (Fluka), Àcid acètic (Sigma-Aldrich), Hidròxid de sodi (Panreac), Àcid perclòric al 60% (Panreac). Tots ells de qualitat reactiu per anàlisi (RA).

Per les fases mòbils i neteja del sistema cromatogràfic s'ha fet servir aigua miliQ, Acetonitril (Fisher Scientific), Metanol (Fisher Scientific) i Isopropanol (Carlo Erba). Qualitat solvents per a HPLC.

Les primeres proves es van realitzar amb el cromatògraf Thermo Scientific SpectraSystem equipat amb un detector Finnigan Surveyor PDA Plus Detector, i la columna Phenomenex C8 100 Å, LC Column 150 x 4,60 mm, 5 μ m.

Després es va passar a treballar amb el cromatògraf Agilent Technologies 1200 Series amb el detector DAD Agilent 1290 Infinity, i columna Phenomenex C18 100 Å, LC Column de 50 x 2 mm, 2,5 μ m. Els cromatogrames i dades obtingudes es tractaven amb el software de l'HPLC ChemStation for LC 3D Systems (Agilent Technologies).

Altres instruments i aparells utilitzats: Balança (Denver Instrument SI-234), pH metre (Crison Basic 20), Bany d'ultrasons (Selecta), Espectrofotòmetre (VWR UV-1600PC), Termobloc (Stuart SBH130D), Centrífuga (Hettich Mikro 120).

Per el tractament de les mostres de sèrum també s'han fet servir filtres de centrifuga Amicon Ultra 0,5 ml - 3 kDa (Sigma-Aldrich), i filtres de xeringa (Filter-Lab, 0,22 μ m) per a filtrar la mostra abans d'analitzar-la al cromatògraf.

3.2. Proves de derivatització de l'IDPN

Es va partir de les condicions de derivatització (Kang, 2005) i cromatogràfiques (Meyes, 2011) que s'havien establert en un estudi previ (Eroles, 2015), en les que s'utilitzava una concentració de clorur de dansil de 2 mg/ml, tampó $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$ a pH 10,1, reacció durant 30 minuts a 80°C, i s'aturava la reacció amb 80 μ l d'àcid acètic concentrat. Per la separació cromatogràfica s'establia un flux de 0,065 ml/min amb un programa de 15 minuts amb gradient lineal d'aigua i acetonitril acidificats amb un 0,1% d'àcid fòrmic, incrementant l'acetonitril de 5% fins a 60% al final del programa. En aquestes condicions es va intentar derivatitzar l'IDPN que no s'havia aconseguit derivatitzar anteriorment. Per fer-ho es van incrementar i extremer les condicions inicials com augmentar el temps de reacció a 1 i 2 hores, i la temperatura a 90°. També es va provar a incrementar la concentració de clorur de dansil a 5 i 20 mg/ml, i el tampó a un pH d'11. Per comprovar si la reacció de derivatització s'estava produint, les primeres proves es van fer amb solucions de IDPN de 0,1 i 0,5 ppm mesurant per espectrofotometria l'absorbància de la

solució resultant a una longitud d'ona de 254 nm. En una de les proves finalment es va obtenir indicis positius de la detecció de l'IDPN derivatitzat, així que es va passar a estudiar la separació cromatogràfica dels tres compostos.

Per les proves cromatogràfiques es van preparar solucions patró de la barreja dels tres compostos a diferents concentracions, d'un rang de 2 ppb a 100 ppb. Aquestes proves es varen realitzar amb l'instrument d'HPLC (Thermo Scientific SpectraSystem) equipat amb un detector DAD (Finnigan Surveyor PDA Plus Detector) i amb una columna de 150 x 4,60 mm i 5 µm (C18 Phenomenex). Les dimensions de la columna i els fluxos de treball d'aquest sistema cromatogràfic no ens van permetre aplicar les condicions inicials (Eroles, 2015) donat que el sistema cromatogràfic i la columna, que era més llarga i de mida de partícula més gran, no ens permetien assolir fluxos tant baixos. Després de varies proves variant fluxos i gradients de fase mòbil, no es van obtenir resultats positius, ni en les barreges dels tres compostos ni amb els compostos derivatitzats per separat, en cap cas es va poder identificar els pics corresponents als compostos en els cromatogrames, sent el pic de l'excés de clorur de dansil l'únic visible i identificable malgrat que en algun cromatograma es podien apreciar alguns pics molt més petits.

Aquest resultat negatiu ens va portar a per una banda, introduir en el procediment un pas per eliminar l'excés d'agent derivatitzant i també a intentar millorar l'eficiència de la reacció de derivatització. Es van tornar a fer proves per espectrofotometria i cromatografia simultàniament amb l'objectiu d'eliminar l'excés de clorur de dansil per si pogués estar interferint en la visualització dels pics dels compostos d'interès. Es van provar diferents condicions per aturar la reacció de derivatització i eliminar l'excés de clorur de dansil de les mostres, substituint l'àcid acètic per amoníac (Saarinen, 2002), o l'extracció líquid-líquid amb hexà per tal de separar la fase polar que conté els derivats dansilats, de la fase aquosa on es troba l'excés de clorur de dansil que no ha reaccionat (Chang, 2010). Es van tornar a obtenir resultats negatius en tots els casos.

Quan es va poder fer servir el cromatògraf del grup de Química Analítica (Agilent Technologies 1200 Series) i un detector que era més sensible (DAD 1290 Infinity), que permetia l'ús d'una columna més adient (Phenomenex LC column 50x2 mm, 2,5 µm) sí es van poder aplicar les condicions ja establertes, un flux de 0,1 ml/min i gradient lineal de 5%-60% amb acetonitril i aigua acidificats amb àcid fòrmic. Però tot i així tampoc es van obtenir els resultats esperats i no es va poder identificar cap pic dels compostos.

Es va arribar a la conclusió de que no s'estava aconseguint derivatitzar cap dels tres compostos, de manera que es va decidir deixar de costat la derivatització de l'IDPN per centrar els experiments en el BAPN i β-alanina, que sí s'havien pogut derivatitzar anteriorment.

3.3. Condicions de derivatització i optimització

Tot revisant les condicions de derivatització, es va veure que l'àcid acètic que s'estava utilitzant per aturar la reacció de derivatització era àcid acètic glacial, que és molt més concentrat, i que per tant al afegir-lo a la mostra podria estar hidrolitzant els compostos ja derivatitzats. A més, també es va notar que el clorur de dansil que s'havia estat fent servir (Sigma-Aldrich, BioReagent) s'havia de conservar a -20°C i en canvi, s'havia estat guardant a la nevera i per tant, podia estar alterat i no reaccionar correctament.

Un cop adquirit el clorur de dansil adient (Sigma-Aldrich), les proves per derivatitzar els compostos es van focalitzar en l'optimització del pH de la reacció de derivatització, paràmetre crític de la reacció i el que més està relacionat amb l'èxit de la derivatització. Es van provar diferents pH, d'entre 9,5 i 11, ajustant-lo a partir d'una solució tampó $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$. També es va provar a aturar la reacció amb àcid acètic concentrat i amb àcid fòrmic 0,2 M, donant aquest últim millors resultats, ja que quan s'afegia àcid acètic es veien diferents pics corresponents al dansil dispersos i cap altre pic que pogués correspondre als compostos, potser, com s'ha comentat abans, per la seva alta concentració que podria estar acidificant massa la mostra i per tant, hidrolitzant els compostos derivatitzats. En canvi, afegint àcid fòrmic menys concentrat n'hi ha prou per aturar la reacció de derivatització i neutralitzar el pH de la mostra sense arribar a pH àcids massa extrems.

Després de tota aquesta sèrie de proves es va aconseguir visualitzar els pics de la β -alanina i el BAPN a una concentració d'1 ppm. S'utilitzava aquesta concentració d'1 ppm més elevada del les utilitzades en l'anterior treball per tal d'assegurar la visualització en el cromatograma dels pics d'interès, atès que si es derivatitzaven concentracions massa baixes possiblement no es podrien veure els pics amb el detector de l'HPLC-DAD. Es va comprovar que els pics es veien tan en la barreja dels dos compostos com en les mostres amb els compostos per separat, malgrat no s'obtenien pics grans tot i tractar-se de solucions d'1 ppm i que el pic del BAPN era molt ample en comparació amb el de la β -alanina.

Un cop es van tenir identificats els pics a partir dels temps de retenció del BAPN i la B-alanina, es va intentar millorar la sensibilitat del mètode per tal d'augmentar l'àrea dels pics i millorar la seva forma. Es va fer alguna prova més de pH i es va acabar d'ajustar la quantitat d'àcid fòrmic que s'afegia per aturar la reacció per tal que la mostra no només es neutralitzés, si no que arribés a un pH semblant a la fase mòbil utilitzada (de pH 3 aproximadament).

Finalment es van establir les condicions de derivatització que donaven un millor resultat, sense obtenir millores en la sensibilitat del mètode, a una **concentració de clorur de dansil de 2 mg/ml, tampó de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ a pH 10,1, un temps de reacció de 80°C durant 30 minuts, i àcid fòrmic 0,2 M per aturar la reacció.**

El protocol que es va seguir en la derivatització de totes les proves posteriors, és el següent:

1. S'afegeixen 100 µl de mostra, 100 µl de clorur de dansil i 100 µl de tampó NaHCO₃/Na₂CO₃ a pH 10,1 en un eppendorf prèviament cobert amb paper d'alumini per evitar que li arribi la llum a la mostra.
2. Es mescla lleugerament i es deixa al termobloc a una temperatura de 80°C durant 30 minuts perquè es produeixi la derivatització dels compostos.
3. S'afegeixen 90 µl d'àcid fòrmic 0,2 M per aturar la reacció.
4. Es deixa reposar la mostra a temperatura ambient uns minuts perquè es refredi.
5. Es centrifuga a 10000 rpm durant 5 minuts.
6. El contingut de l'eppendorf s'addiciona a un vial de cromatografia per a procedir a la seva anàlisi cromatogràfica.

És important sobretot mantenir la mostra totalment a les fosques, ja que la llum pot afectar els derivats, degradant-los. També cal punxar la mostra al cromatògraf el més aviat possible després de la derivatització ja que l'estabilitat dels derivats és força baixa (entre 60-90 minuts) i amb el pas de les hores els compostos s'hidrolitzen i generen derivats que tenen temps de retenció diferents als dels compostos derivatitzats, com es va poder comprovar en algunes de les mostres que en van injectar a diferents temps on es va observar com el cromatograma i forma dels pics anava canviant a mesura que augmentava el temps transcorregut des de la derivatització.

3.4. Cromatografia per HPLC

Les mostres es van injectar a l'HPLC amb un programa de gradient lineal a un flux de 0,1 ml/min que passava de 95%-5% d'aigua-acetonitril a 40%-60% en 15 minuts, mantenint fins al minut 2 la composició inicial de fase mòbil per tal que eluís primer tot l'excés de dansil que no havia reaccionat amb els compostos durant la reacció de derivatització.

Es va partir de les condicions descrites anteriorment (Apartat 3.1), tot i que com s'ha comentat les condicions es van haver d'adaptar segons la columna i cromatògraf de que es disposaven.

Com a fase mòbil es va fer servir aigua i acetonitril acidificats al 0,1% d'àcid fòrmic. Per preparar la fase mòbil es van filtrar els dos components per separat en un equip de filtració utilitzant filtres de nylon de 0,2 µm, i després es van deixar en un bany d'ultrasons durant uns 10 minuts per desgasificar-los.

Un volum de 10 µl de les mostres s'injectava al sistema cromatogràfic mitjançant un mostrejador automàtic, prèviament s'havia provat a injectar un volum menor, de 5 µl, però l'àrea del pic del BAPN no es diferenciava prou de la línia base i el pic de la β-alanina també era més petit. El programa cromatogràfic consisteix en una elució en gradient durant 16 minuts. Durant els 2 primers minuts la composició inicial de la fase mòbil, 95% d'aigua i 5% d'acetonitril, es manté constant per tal que s'elueixi l'excés de clorur de dansil de la mostra que és més polar. A partir del minut 2 la composició d'acetonitril va augmentant linealment fins a arribar al 60% al minut

15, de manera que els compostos més hidrofílics elueixen abans i els més hidrofòbics més tard a mesura que es va augmentant la proporció d'acetonitril. Durant l'últim minut del programa es torna a la composició inicial de fase mòbil.

En aquestes condicions, el mètode era poc sensible i les àrees dels pics petites. Es van fer diferents proves canviant el flux i el gradient per tal d'intentar fer més estret el pic del BAPN, i en general intentar millorar la forma i àrea dels pics. No es van obtenir millors resultats dels que ja es tenien, inclús en alguna prova on s'intentava reduir el temps del cromatograma donat que després de que sortís el pic del BAPN a partir del minut 6 ja no sortia cap més pic en els 10 minuts restants que quedaven de programa, desapareixien els pics. De manera que es va concloure que el millor gradient i temps de programa era el que ja s'estava fent des del principi. També es van aplicar programes de neteja del sistema cromatogràfic i de la columna per millorar la sensibilitat del sistema i la seva reproductibilitat.

3.5. Rectes de calibratge β -alanina i BAPN

Per obtenir les rectes de calibratge es van preparar dissolucions patró de diferents concentracions a partir de solucions stock de BAPN i β -alanina de 100 ppm, passant per una dissolució intermèdia de 10 ppm. Es van preparar 6 solucions patró en un rang que anava des de 0,5 ppm a 2 ppm: 0,5 ppm – 0,8 ppm – 1 ppm – 1,2 ppm – 1,5 ppm – 2 ppm.

Les mostres patró es van derivatitzar amb el procediment ja exposat (Apartat 3.3) i es van injectar a l'HPLC. Les àrees dels pics de cada compost es van representar en front de les concentracions dels patrons per obtenir les rectes de calibratge per cada compost. Els pics dels compostos s'identificaven pel seu temps de retenció en les mateixes condicions cromatogràfiques, que era de 4,6 minuts per la β -alanina i de 6,6 minuts pel BAPN aproximadament.

3.6. Anàlisi estadístic de les dades: LOD i LOQ

Per fer l'anàlisi estadístic es van eliminar aquelles mostres que presentaven uns pics amb àrees irregulars o un temps de retenció de més de 0.5 minuts de marge amunt o avall respecte les altres mostres que sí mostraven un temps regular. Donat que alguns dies es van tenir problemes amb el sistema cromatogràfic que provocaven que s'obtinguessin cromatogrames i temps de retenció variables entre rèpliques o mostres d'un mateix calibrat i també entre els diversos calibrats que es van fer en diferents dies, s'han hagut de descartar alguns resultats i només s'han utilitzat per a construir les rectes de calibratge aquells resultats que presentaven una bona reproductibilitat. La manca de reproductibilitat i les variacions en els temps de retenció considerem que es deuen al fet d'injectar mostres que contenien un gran excés de clorur de dansil que canviava les propietats de la fase estacionària. Aplicant programes de neteja del sistema es va aconseguir millorar el comportament del sistema puntualment però després d'injectar més patrons i d'injectar les mostres de sèrum no es va aconseguir tornar a obtenir cromatogrames similars als obtinguts a l'inici de l'estudi.

Els límits de detecció i quantificació s'han calculat a partir de la desviació estàndard de l'ordenada a l'origen de la recta de calibratge. Pel límit de detecció (LOD) s'ha considerat que és 3 vegades la desviació estàndard i el límit de quantificació (LOQ) és 10 vegades la desviació estàndard (Jurado, 2008). L'interval de linealitat s'ha establert entre el límit de quantificació (LOQ) i el valor del patró més alt analitzat que no és desvia de la linealitat.

3.7. Tractament i estudi de recuperació en mostres de sèrum de ratolí

Es va realitzar un estudi de recuperació del BAPN i la β -alanina en mostres de sèrum de ratolí, que s'havien extret prèviament i s'havien conservat congelades fins el moment de dur a terme l'estudi. Als ratolins utilitzats no se'ls hi havia administrat IDPN doncs eren del grup de control. Per fer l'estudi de recuperació les mostres de sèrum es fortificaven a diferents concentracions de BAPN i β -alanina, es van triar concentracions elevades a partir d'1 ppm donada la baixa sensibilitat del mètode. Es van realitzar diferents proves i tractaments per tal d'aconseguir eliminar satisfactòriament les proteïnes i altres components del sèrum que poguessin interferir en la detecció i visualització dels pics dels compostos.

En primer lloc, es va provar a centrifugar directament la mostra de sèrum utilitzant filtres de centrífuga (Amicon Ultra-0,5 ml) d'una mida de 3 kDa (**Figura 3**) que retenen tota molècula superior a aquesta mida, com la majoria de proteïnes, i a la vegada permet que passin el BAPN i la β -alanina donat la seva mida més petita. Aquests filtres normalment s'apliquen per a la separació i purificació de proteïnes en mostres biològiques, descartant el sobrenedant i recuperant després les proteïnes del filtre, però en aquest cas es van utilitzar amb l'objectiu d'eliminar les proteïnes retingudes al filtre i guardar el sobrenedant resultant. La mostra es centrifugava durant 20 minuts a 14000 rpm i seguidament es procedia a la derivatització i injecció a l'HPLC en les condicions ja establertes.

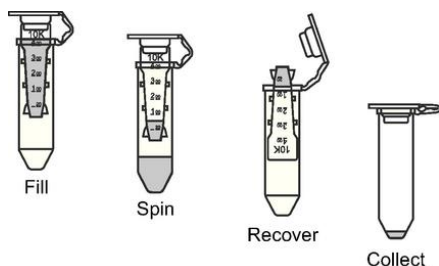


Figura 3. Filtre de centrífuga Amicon i procediment per a la separació i purificació de proteïnes.

Després es va tractar les mostres amb àcid perclòric (Cheng, 2009) Es va preparar una solució de d'àcid perclòric 0,5 M a partir d'àcid perclòric concentrat al 60%. Als 0,5 ml de sèrum ja fortificats se li afegeix la mateixa quantitat de perclòric i es centrifuga a 14000 rpm durant 7 minuts. Es descarta el pellet on ha quedat el precipitat de proteïnes i es separa el sobrenedant, que es neutralitza amb 250 μ l de NaOH 1 M. A partir d'aquí i donat que ens quedava un gran volum de mostra, es va dividir en dos i es van provar dos procediments per a cada meitat:

- Derivatització directa amb les condicions establertes seguint el procediment estàndard del tractament amb perclòric (Cheng, 2009).
- Segona centrifugació a 14000 rpm durant 20 minuts, utilitzant els filtres de centrífuga de 3 kDa, amb l'objectiu d'afegir un pas més de purificació en cas de que haguessin pogut quedar alguns components que no s'han eliminat prèviament amb el tractament estàndard. I posterior derivatització.

Per últim, es va provar un procediment en el que s'utilitza acetona i metanol com a medi per precipitar les proteïnes del sèrum (Tallarico, 1998), amb l'avantatge que no hi ha problemes de pH perquè l'acetona i metanol tenen un pH neutre de manera que el pH de la mostra no es modifica i tampoc cal després neutralitzar-la. Es prepara una barreja d'acetona-metanol en una relació de 3:1. S'afegeix la barreja d'acetona-metanol al sèrum (0,5 ml) prèviament descongelat i fortificat amb BAPN i β -alanina. Es centrifuga a 14000 rpm durant 15 minuts. El pellet del resultat de la centrifugació es descarta i el sobrenedant es posa en el filtre de centrífuga de Amicon 3 kDa per a una segona centrifugació a 14000 rpm durant 20 minuts. Es derivatitza amb les condicions establertes.

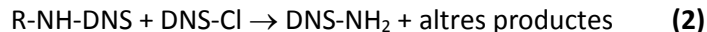
Després de derivatitzar les mostres de sèrum se les va tornar a centrifugar a 10000 rpm durant 5 minuts (procediment estàndard de derivatització). Però a diferència de les mostres patró que s'havien derivatitzat fins ara, les mostres de sèrum sí deixen un petit pellet en aquesta última centrifugació, de manera que abans de punxar-les al cromatògraf també es filtrava el sobrenedant amb filtres de xeringa d'una mida de 0,22 μ m per evitar qualsevol brutícia que pogués perjudicar el sistema HPLC i la columna.

4. RESULTATS

4.1. Condicions de derivatització

Es van provar diferents condicions per tal de derivatitzar l'IDPN, la β -alanina i el BAPN. Un cop es va descartar l'IDPN per no haver obtingut cap resultat positiu referent a la seva derivatització, les proves es van centrar en tractar d'optimitzar la derivatització de la β -alanina i el BAPN per tal de millorar la forma dels pics. Finalment les condicions de derivatització amb les que es van obtenir millors resultats van ser: concentració de clorur de dansil de 2 mg/ml, tampó $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ a pH 10,1, 30 minuts de reacció a 80°C, i la reacció s'aturava amb 90 μl d'àcid fòrmic 0,2 M.

Segons Silva, 2005 la reacció de derivatització es realitza fàcilment en el cas de les amines primàries com la β -alanina i el BAPN. En el cas de les amines secundàries, els impediments estèrics fan que la reacció sigui més difícil de dur a terme i siguin necessàries condicions més extremes. A més, l'impediment estèric afavoreix la descomposició dels derivats formats, que poden conduir a reaccions secundàries no desitjades, especialment si les condicions de pH i de temperatura no són òptimes (**equacions 1 i 2**). La velocitat de reacció es pot augmentar mitjançant l'augment del pH, però aquest increment pot afavorir l'augment de la taxa d'hidròlisi de DNS-Cl (**equació 1**).



4.2. Cromatografia

Els cromatogrames obtinguts de les condicions cromatogràfiques aplicades (Apartat 3.4) mostren com el pic del clorur de dansil és sempre el primer en aparèixer (**Figura 4**), ja que és molt polar i elueix quan la fase aquosa és més elevada. Després elueixen els compostos, la β -alanina abans que el BAPN per la seva polaritat. Entre els dos pics sempre es manté un temps de retenció de 2 minuts (aproximat en alguns casos). La β -alanina elueix al minut 4,6, mentre que el BAPN ho fa al minut 6,6, però degut als problemes amb el sistema d' HPLC i la columna, que podria tenir algun problema amb la fase estacionària, els temps de retenció variaven entre diferents mostres patró d'un mateix dia, i entre diferents dies, desplaçant-se fins a 0,5 o més minuts.

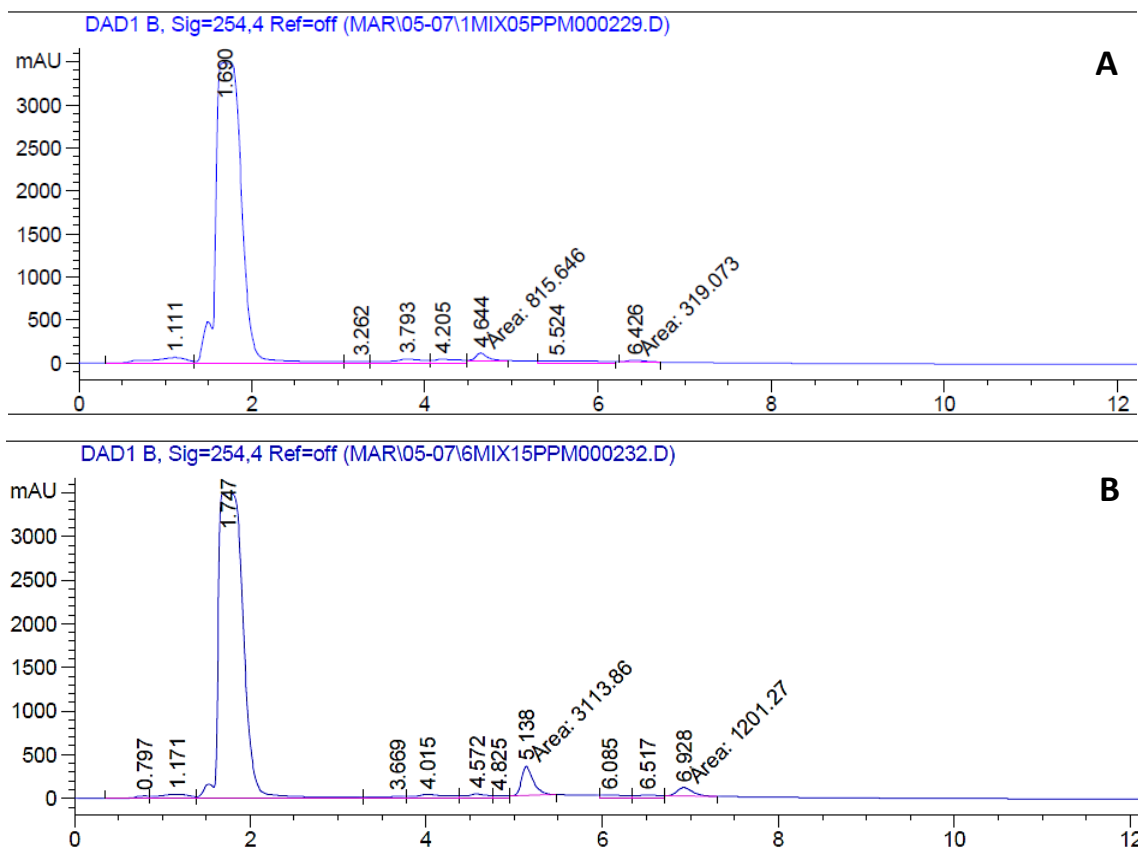


Figura 4. Cromatogrames de mostres de patró de concentració 0,5 ppm (A) i 2 ppm (B), derivatitzades amb les condicions establertes.

Com s'observa en els cromatogrames, les àrees dels pics dels derivats dansilats obtingudes amb el mètode és molt baixa, donant com a resultat uns pics de molt poca àrea, i a mesura que es redueix la concentració de B-alanina i BAPN (**Figura 4B**), és més difícil visualitzar els pics, sobretot el pic del BAPN, que presenta una àrea molt petita comparat amb la B-alanina i no té una forma ben definida. El pic de la B-alanina sí té una forma més definida i poca amplada de pic, tot i que també tendeix a deixar una mica de cua quan el senyal torna a la línia base. En general, en els cromatogrames també s'observa com la línia base no es recupera del tot quan s'acaba el pic. Per això ha calgut integrar els pics manualment i establir una línia base que permeti integrar l'àrea dels pics correctament.

4.3. Rectes de calibratge β -alanina i BAPN

Les rectes de calibratge de la β -alanina i del BAPN s'han elaborat a partir de les àrees de pic obtingudes a l'anàlisi cromatogràfic de les dissolucions patró, preparades en un rang de concentració de 0,5 a 2 ppm.

Tan la recta de la β -alanina como la del BAPN (**Figura 5**) mostren una bona linealitat tal i com indica el coeficient de determinació, R^2 , de més de 0,98. Però tot i la linealitat, el pendent de la recta del BAPN és molt petit, cosa que fa que hi hagi molt poca sensibilitat en l'àrea del pic entre les diferents concentracions, que es fa més notòria quan més properes es troben.

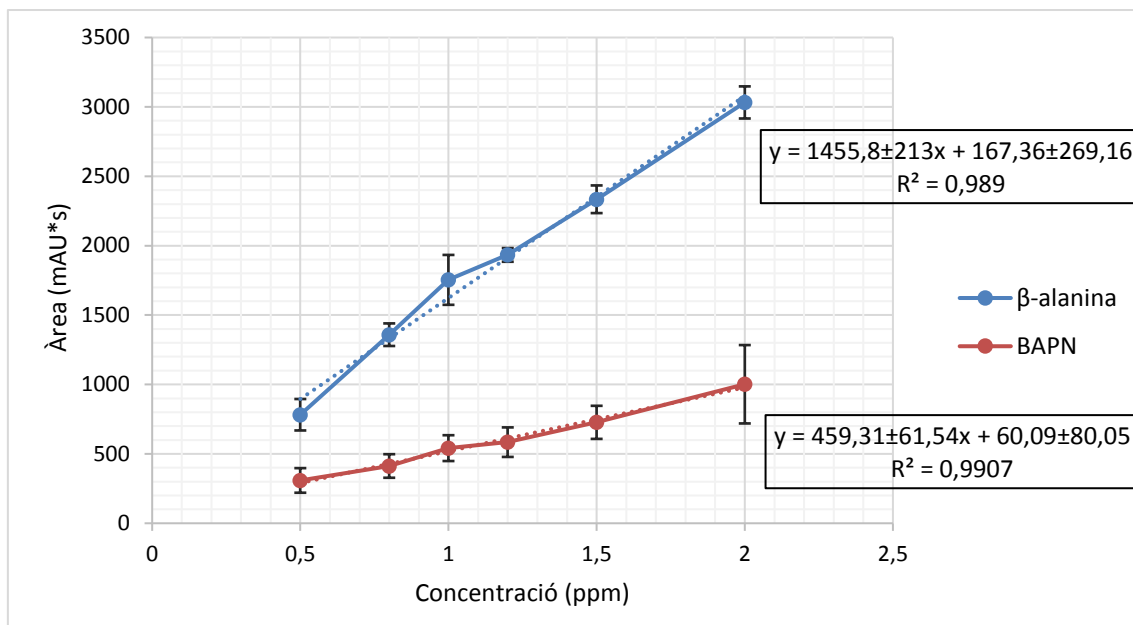


Figura 5. Mitjana de quatre rectes de calibratge de la β -alanina i el BAPN, amb les desviacions estàndard representades, i les equacions de les rectes amb els corresponents intervals de confiança, que relacionen l'àrea dels pics amb la concentració de les mostres, en un rang de 0,5 a 2 ppm.

En canvi, per la β -alanina el pendent de la recta de calibratge és més gran i això permet distingir amb més claredat una concentració d'una altra més propera, tot i que les concentracions de 1 i 1,2 ppm sempre mostraven àrees semblants per la seva proximitat, cosa es reflecteix en la forma de la recta, com s'observa, on la concentració d'1 ppm sobresurt una mica.

La recta s'ha calculat a partir de la mitjana de quatre rectes de calibratge elaborades en diferents dies. Degut als problemes de separació cromatogràfica que s'han tingut, pels quals els temps de retenció dels compostos variaven d'una mostra a una altra i entre diferents calibrats, s'han seleccionat aquelles rectes en les que no es trobessin mostres que variessin el seu temps de retenció en més de 0,5 minuts, tot i tractar-se d'una diferència important, no s'ha aconseguit millor fiabilitat dels resultats. I entre les rectes seleccionades també s'ha eliminat alguna dada atípica o amb temps de retenció fora del rang.

4.4. Anàlisi estadístic: LOD i LOQ

El límit de detecció (LOD) es defineix com la concentració mínima d'analit que pot ser detectada amb fiabilitat pel mètode i que proporciona una senyal significativament diferent a la senyal d'un blanc. S'ha calculat a partir de la recta de calibratge amb el complement d'anàlisi de dades d'Excel (Microsoft® Excel® 2013), calculant el LOD com 3 vegades la desviació estàndard de l'ordenada a l'origen (S_a), dividit pel pendent de la recta de calibratge (b) (Jurado, 2008).

D'igual manera s'ha calculat el límit de quantificació (LOQ), que és la mínima concentració d'analit que es pot quantificar amb un nivell d'exactitud acceptable. En aquest cas, el LOQ correspon a 10 vegades la desviació estàndard a l'ordenada dividit pel pendent de la recta (b).

A l'Excel la desviació estàndard és equivalent a l'error típic (SE) de l'ordenada a l'origen que resulta de l'anàlisi de dades realitzat, de manera que els límits s'han calculat a partir d'aquest valor (**Taula 1**). També s'ha calculat l'interval de linealitat, on el límit inferior és el LOQ, i el límit superior la concentració més alta analitzada que no es desvia de la linealitat, en aquest cas 2 ppm, i el coeficient de variació (CV) de les concentracions de 0,5 i 1,5 ppm entre diferents dies, que en el cas del BAPN és més elevat.

Taula 1. Límit de detecció (LOD) i l'interval de linealitat, i coeficient de variació (CV) entre les concentracions de 0,5 i 1,5 ppm en diferents dies, de la β -alanina i el BAPN.

	LOD (ppm)	Interval de linealitat (ppm)	CV (%) 0,5 i 1,5 ppm
β-alanina	0,20	0,67 – 2	14,5 i 4,3
BAPN	0,18	0,61 – 2	28,7 i 16,4

Els dos compostos presenten uns límits de detecció i quantificació semblants. Donat els resultats de les dues rectes de calibratge (Apartat 4.3) s'esperaria obtenir uns límits més baixos per la β -alanina perquè el BAPN té un pendent molt petit, però l'error en la recta de la β -alanina és més gran i els valors es troben dispersats irregularment. En canvi, els valors de la recta del BAPN estan dispersats de manera més regular, fet que disminueix l'error i malgrat el seu pendent, fa que els límits dels dos compostos s'igualin.

L'interval de linealitat no es molt ampli ja que tampoc ens interessa treballar a concentracions més elevades de 2 ppm i el mètode no permet quantificar concentracions més petites de 0,67 i 0,61 per la β -alanina i el BAPN, respectivament.

4.5. Estudi de l'efecte matriu en mostres de sèrum de ratolí

S'han aplicat diferents procediments i reactius per tractar les mostres de sèrum de ratolí (Apartat 3.7) i veure com afecta la matriu de les mostres a la determinació de la β -alanina i el BAPN.

El tractament amb el filtre de centrífuga Amicon Ultra 0,5 ml 3 kDa que es va provar primer va donar com a resultat uns cromatogrames força bruts (**Figura 6**), en el que es troben pics corresponents a components del sèrum de concentració molt elevada i d'altura similar al clorur de dansil. La forma i mida dels pics impedeix identificar els pics de la β -alanina i BAPN, que s'havien afegit a la mostra de sèrum a una concentració de 1,5 ppm. A més, els pics es troben solapats, fet que no permet distingir la forma completa dels pics i fa que la línia base del cromatograma es desplaci.

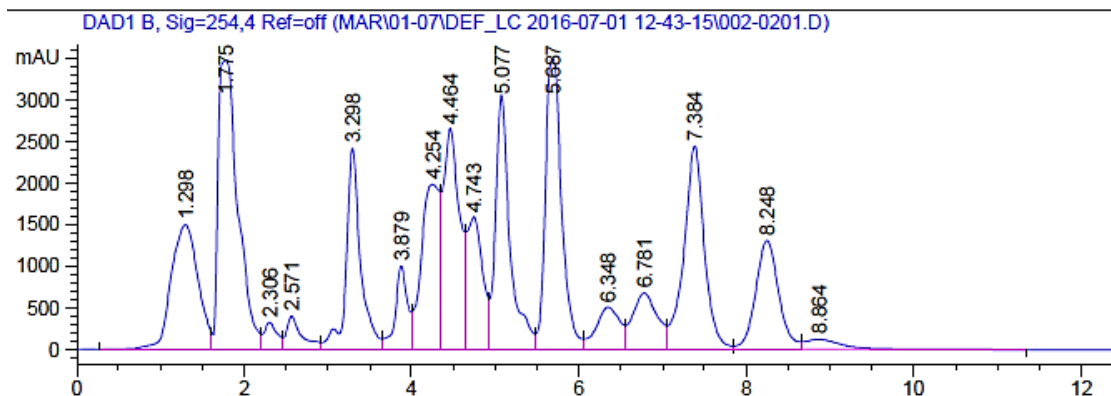


Figura 6. Cromatograma d'una mostra de sèrum fortificada amb 1,5 ppm de β -alanina i BAPN. La mostra es va tractar amb el filtre de centrífuga Amicon 3 kDa.

El tractament amb perclòric dóna uns cromatogrames amb menys pics, de menys altura i més definits, que facilita la identificació dels pics (**Figura 7**). En aquest cas les mostres de sèrum s'havien fortificat amb 1 ppm de β -alanina i BAPN. Tot i l'aspecte més net del cromatograma tampoc és possible identificar els pics de la β -alanina i el BAPN (**Figura 7A**). Per tractar d'identificar els pics mitjançant l'augment de la seva altura, es va afegir una mica de solució patró 1 ppm que s'havia derivatitzat prèviament. En el cromatograma després d'afegir més patró (**Figura 7B**), s'observa un pic al minut 4,8 que al primer cromatograma no apareix (**Figura 7A**), cosa que podria indicar que l'efecte matriu de la mostra és molt gran i que hi ha hagut un desplaçament del pic degut a l'efecte matriu, o que el tractament amb àcid perclòric no ha acabat de funcionar correctament.

S'ha presentat només els resultats del tractament amb àcid perclòric, amb una segona centrifugació utilitzant els filtres de centrífuga Amicon 3 kDa perquè les mostres derivatitzades directament després d'afegir àcid perclòric es van degradar degut al temps que havia passat des de la seva derivatització fins que s'havien pogut obtenir uns cromatogrames que mostressin correctament els pics. Tot i així, en altres mostres tractades amb el mateix procediment no es van observar diferències significatives entre el tractament amb només perclòric, i l'addició d'un segon pas de purificació amb els filtres de centrífuga Amicon 3 kDa, i en cap cas es va poder identificar els pics de la β -alanina i el BAPN que s'havien afegit inicialment a les mostres.

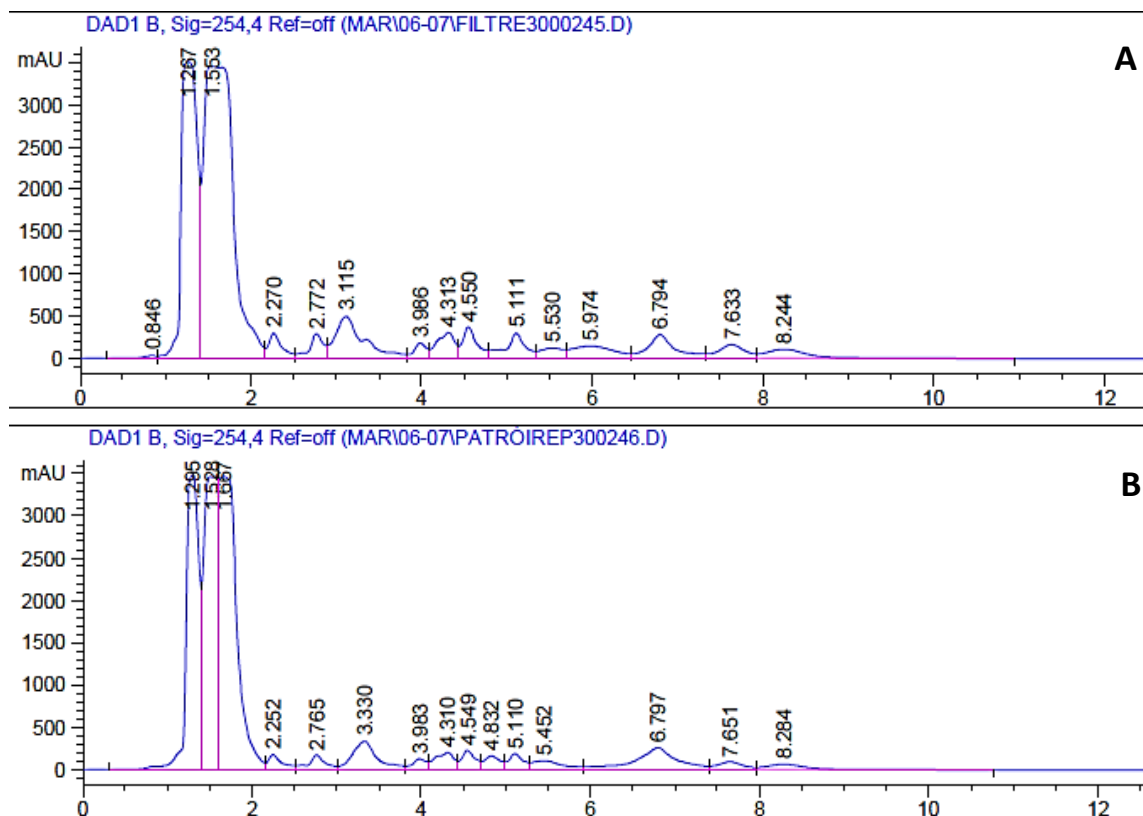


Figura 7. Cromatogrames de mostres de sèrum fortificades amb 1 ppm de β -alanina i BAPN, sense (A) i amb (B) l'addició de solució patró 1 ppm. Tractades amb àcid perclòric i filtre de centrífuga Amicon 3 kDa.

També es va intentar comprovar si realment el tractament amb perclòric estava funcionant i si els pics canviaven el seu temps de retenció degut a la reacció. Per fer-ho es van derivatitzar mostres patró tractades amb perclòric amb el mateix procediment amb que es tractava les mostres de sèrum. Però donat els problemes amb el cromatògraf i la columna, no es va poder obtenir cap cromatograma perquè només es veia el pic de l'excés del clorur de dansil, i els pics de la mostra començaven a sortir un cop acabat el programa de 16 minuts.

Amb l'últim tractament que es va provar, la barreja acetona-MeOH, donat el mateix problema amb el cromatògraf comentat, tampoc es va poder obtenir cap cromatograma de cap mostra. Finalment es va provar a augmentar molt el flux, de 0,1 a 0,5 ml/min perquè, amb ajuda també de l'augment de pressió, els diferents compostos poguessin eluir dins del temps del programa establert. A causa d'aquest canvi de flux els cromatogrames obtinguts (**Figura 8**) mostren uns temps de retenció i forma dels pics que no poden ser comparables amb els cromatogrames obtinguts fins llavors.

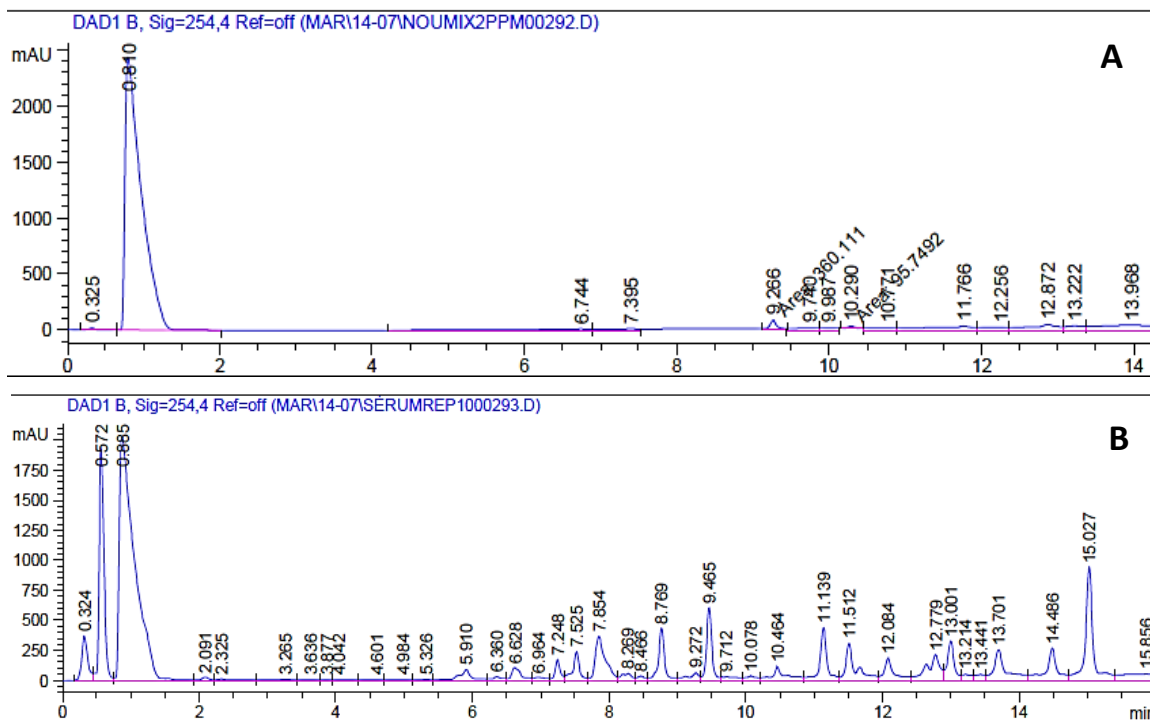


Figura 8. Mostra patró de 2 ppm (A) i mostra de sèrum fortificada amb 2 ppm, tractada amb acetona-MeOH i posteriorment centrifugada amb el filtre de centrifuga Amicon 3 kDa (B). Derivatitzades amb les condicions establertes i punxades a l'HPLC amb un flux de 0,5 ml/min.

Per establir els temps de retenció del pic de la β -alanina i el BAPN amb aquest flux, també es va derivatitzar una solució patró de 2 ppm (**Figura 8A**), que és la concentració a la que s'havien fortificat les mostres de sèrum. Al cromatograma de la mostra de sèrum (**Figura 8B**) s'observen una gran quantitat de pics, que fan pràcticament impossible la identificació dels pics de la β -alanina i el BAPN. Encara ho dificulta més el fet que a la mostra patró de 2 ppm s'obtinguin uns pics tan petits respecte al flux i mostres amb les que s'havien treballat fins ara (**Figura 4B**). Es va provar a afegir mostra patró derivatitzada de 2 ppm a la mostra de sèrum, però no es van observar diferències significatives entre la mostra amb i sense patró.

5. DISCUSSIÓ

Les condicions cromatogràfiques i de derivatització utilitzades en aquest treball s'han establert després de nombroses proves i variacions de les condicions inicials, ja que com s'ha reportat, no existeix un protocol i condicions estàndards per a la reacció de derivatització, de manera que cada estudi necessita provar i establir les seves pròpies condicions fins a obtenir la màxima optimització segons el tipus de compostos amb els que es treballa. Tot i necessitar realitzar nombrosos experiments perquè no s'aconseguia derivatitzar cap dels tres compostos d'interès d'aquest treball, l'IDPN, la β -alanina i el BAPN, finalment s'ha aconseguit derivatitzar la β -alanina i el BAPN, malgrat que amb el mètode desenvolupat no s'ha obtingut una bona sensibilitat.

Durant les proves de separació cromatogràfica han sorgit una sèrie de complicacions que han dificultat poder identificar correctament i amb total fiabilitat els pics de la β -alanina i BAPN, ja que els temps de retenció no es mantenen constants entre diferents concentracions d'un mateix calibrat, ni en les mateixes concentracions en calibrats realitzat diferents dies, amb un desplaçament dels pics que podia arribar a més de 0,5 minuts de diferència. S'ha intentat efectuar processos de neteja del sistema i regeneració de la fase estacionària de la columna per si pogués estar malmesa però no s'han aconseguit obtenir temps de retenció estables. Amb això el temps entre els dos compostos sí es manté sempre, fet que facilita la seva identificació (**Figura 4**). El pic de la β -alanina apareix primer, sobre el minut 4,6, degut a la seva polaritat. El BAPN apareix més tard, al minut 6,6 aproximadament, quan augmenta la concentració d'acetonitril degut a que el grup ciano que té la seva estructura el fa menys polar que la β -alanina.

Les àrees dels pics obtinguts pel mètode no han permès determinar concentracions més petites dels compostos, sent la concentració més baixa que s'ha analitzat de 0,5 ppm, on els pics dels compostos ja presenten una àrea molt reduïda, i el pic del BAPN a vegades costa identificar-lo i distingir-lo de la línia base del cromatograma. Encara que segons el límit de detecció calculat (**Taula 1**) sí es podrien detectar concentracions una mica més baixes, en el cas del límit de quantificació, de 0,6 ppm en el cas dels dos compostos, la concentració de 0,5 ppm es troba per sota d'aquest límit, fent que els resultats obtinguts per a aquesta concentració no siguin del tot fiables.

Pel que fa a l'estudi de l'efecte matriu de les mostres de sèrum de ratolí i els diferents tractaments provats, els cromatogrames obtinguts mostren un efecte matriu important, que no ha permès identificar els pics de la β -alanina i el BAPN tot i els tractaments de mostra assajats. En el cas del tractament amb àcid perclòric, s'observa al cromatograma (**Figura 7**) un conjunt de pics entre el minut 4 i 5, que és el temps en el que hauria de trobar-se el pic de la β -alanina i que podrien estar dificultant la seva identificació i quantificació. La β -alanina es tracta d'un aminoàcid d'estructura senzilla i per tant és fàcil trobar altres aminoàcids d'estructura similar al sèrum, que no han estat eliminats amb el tractament i que també contenen un grup amina en la seva estructura que reacciona d'igual manera amb el clorur de dansil. L'aparició del pic al minut 4,8 després d'afegir patró a la mostra de sèrum (**Figura 7B**) podria ser degut a que el

tractament amb perclòric no ha funcionat i s'han destruït els compostos o l'efecte matriu de la mostra és massa gran. L'absència dels pics dels compostos també es podria explicar per l'elevada acidesa del perclòric que podria estar oxidant el grup ciano del BAPN, convertint-lo en un grup carboxílic. Aquesta reacció podria canviar l'estructura original del compost, canviant per tant, la seva polaritat i temps de retenció. Com que a partir del tractament amb perclòric no es va poder obtenir cap més cromatograma en el que sortissin els pics dins del programa degut als problemes amb el sistema, no es va poder comprovar si realment l'àcid perclòric estava alterant l'estructura dels compostos i el seu temps de retenció.

El tractament de les mostres de sèrum utilitzant només el filtre de centrifuga Amicon 3 kDa sembla ser el procediment que menys funciona, ja que tot i eliminar bona part de les proteïnes del sèrum que queden retingudes al filtre, segueixen quedant molts altres components i en grans concentracions (**Figura 6**) que dificulten la identificació dels pics dels compostos que es troben en concentracions més petites.

Encara que no es pugui treure cap conclusió ni resultat fiable del tractament de les mostres de sèrum amb acetona/metanol, sí que s'observa en els cromatogrames (**Figura 8**), com hi ha molts més pics que amb el tractament amb perclòric. Possiblement l'augment del nombre de pics sigui perquè l'acetona no és tant forta com l'àcid perclòric i no elimina tant eficaçment les proteïnes i altres components del sèrum, ja que els cromatogrames amb el tractament d'àcid perclòric (**Figura 7**) eren molt més nets, sense tants pics i més ben definits. Però com que pel tractament amb acetona s'han canviat les condicions cromatogràfiques que s'han utilitzat amb la resta de mostres, no s'ha pogut obtenir un resultat concloent amb el què es pugui avaluar l'eficàcia real d'aquest tractament.

El fet de no obtenir cromatogrames amb el temps de retenció estable en totes les mostres patró ha dificultat encara més la identificació dels pics de la β -alanina i el BAPN en les mostres de sèrum, ja que en les mostres es troben altres components del sèrum a prop dels temps de retenció dels compostos, per tant si no es té la fiabilitat de que els temps no varien entre diferents cromatogrames, no és possible la identificació dels pics. A més, el gran efecte matriu que s'observa en les mostres de sèrum encara dificulta més la seva identificació. S'haurien de desenvolupar nous tractaments pel sèrum que permetin reduir l'efecte matriu de la mostra i elimini els components del sèrum de manera més eficaç, per tal que no interfereixin en la lectura i identificació dels pics d'interès.

Tot i que finalment s'ha pogut derivatitzar la β -alanina i el BAPN amb aquestes condicions, la seva determinació només s'ha pogut aconseguir a concentracions més altes de les que es pretenia en un principi, que serien les que podríem trobar en una mostra real de sèrum de ratolí que se li hagués administrat IDPN. Per tant aquest mètode no seria adient per determinar aquestes concentracions tan baixes presents en la sang, i caldria, ens estudis futurs, establir unes noves condicions, tan de derivatització com de separació cromatogràfica, que optimitzin aquest mètode i permetin una millor identificació dels pics dels compostos a concentracions més

petites, així com la millora de la forma i temps de retenció dels pics. Així mateix, també s'hauria de desenvolupar un nou mètode amb el que s'aconsegueixi determinar l'IDPN, i que sigui aplicable als diferents compostos a la vegada, ja que els tres compostos tenen una estructura química similar que hauria de facilitar la seva derivatització i determinació conjunta.

6. CONCLUSIONS

- With this method we achieved the derivatization and good chromatographic separation of β -alanine and BAPN, although it has low sensitivity. β -alanine has better peak shape and area, while sensitivity for BAPN is lower and his determination should be improve in future studies.
- The IDPN could not be determined and detected with the set conditions of derivatization and chromatographic conditions tested.
- The recovery study of these compounds in mouse serum samples indicates a significant matrix effect of the serum components that impides the peak identification of β -alanine and BAPN.
- The serum sample treatment procedure using perchloric acid seems to be more efficient than other treatments studied although in any sample treatment could not be possible to identify β -alanine and BAPN peaks.

7. BIBLIOGRAFIA

Cai, H-L., Zhu, R-H., Li, H-D. (2010). Determination of dansylated monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 396, 103-111.

Cálculo de incertidumbre, límite de detección y de cuantificación de los métodos de medidas mediante FRX (2010). Laboratorio de rayos X, Universidad de Sevilla, Sevilla.

Callejón, R. *Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales* (Treball d'investigació). Universidad de Sevilla.

Cheng, J., Feng, F., Zhuang, B. (2009). Development of a New Pre-Derivatization LC Method for Analysis of Branched-Chain and Aromatic Amino Acids in Rat Plasma and to Monitor their Dynamic Variation as a Result of Acute Hepatic Injury. *Chromatographia*, 70, 57-65.

Eroles, M. (2015). *Desenvolupament de metodologia analítica per la determinació de neurotòxics i els seus metabòlits en sang de ratolí per cromatografia* (Treball fi de grau). Universitat de Girona, Girona.

Innocente, N., Biasutti, M., Padovese, M., Moret, S. (2007). Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry* 101, 1285–1289.

Jurado, J. M. (2008). Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos (Arxiu PDF).

Kang, X., Xiao, J., Huang, X., Gu, Z. (2006). Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. *Clinica Chimica Acta* 366, 352 – 356.

Kaspar, H., Dettmer, K., Gronwald, W., Oefner, P.J. (2008). Advances in amino acid analysis. *Anal Bioanal Chem*, 393, 445–452.

Llorens, J., Soler-Martín, C., Saldaña-Ruiz, S., Cutillas, B., Ambrosio, S., Boades-Vaello, P. (2011). A new unifying hypothesis for lathyrism, konzo and tropical atàxic neuropathy: Nitriles are the causative agents. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 563-570.

Machon (2013). Quantification of β -aminopropionitrile, an inhibitor of lysyl oxidase activity, in plasma and tumor of mice by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 28, 1017–1023.

Majors, R. E. (2003). The Cleaning and Regeneration of Reversed-Phase HPLC Columns. *Column Watch*. LCGC.

Mao, H., Chen, B., Qian, X., Liu, Z. (2009). Simultaneous determination of twelve amines in serum by high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal* 91, 176-180.

Meyer, T. E., Fox, S. D., Issaq, H. J., Xu, X., Chu, L. W., Veenstra, T. D., Hsing, A. W. (2011). A 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.

Minocha (2004) Simultaneous separation and quantitation of amino acids and polyamines of forest tree tissues and cell cultures within a single high-performance liquid chromatography run using dansyl derivatization. *Journal of Chromatography A* 1035, 63–73.

Moein, B., et al. (2014). Determination of Biologically Active Polyamines in Turkey Breast Meat by HPLC and Derivatization with Dansyl Chloride. *Nutrition and Food Sciences Research*, Vol 1, 49-53.

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.

Roy-Lachapelle, A., Sollicec, M., Sauvé, S. (2015). Determination of BMAA and three alkaloid cyanotoxins in lake water using dansyl chloride derivatization and high-resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 407, 5487–5501.

Saarinen, M. T. (2002). Determination of Biogenic Amines as Dansyl Derivatives in Intestinal Digesta and Feces by Reversed Phase HPLC. *Chromatographia*, 55, 297-300.

Silva, M. (2005). Quantitation by HPLC of Amines as Dansyl Derivatives. In Molnár-Perl, I.(ed.) vol. 70. *Quantitation of amino acids and amines by chromatography – methods and protocols*, pp. 445-470. *Journal of Chromatography Library*.

Tallarico, C., Pace, S., Longo, A. (1998). Quantitation of L-Carnitine, Acetyl-L-carnitine, Propionyl-L-carnitine and Their Deuterated Analogues by High-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 12, 403-409.

White, J. A., Hart, R. J. (1992a). Derivatization methods for liquid chromatographic separation of amino acids. *Analysis by HPLC*. Nollet, L.M.L. Ed. pp. 53-74. Marcel Dekker, Inc. New York.

Yang, Y.-X., Mu, C.-L., Zhang, J.-F., Zhu, W.-Y. (2014). Determination of Biogenic Amines in Digesta by High Performance Liquid Chromatography with Precolumn Dansylation. *Analytical Letters* 47, 1290–1298.