

Desarrollo de un método de análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas combinadas para el estudio del metabolismo de la histamina

Josette-Nicole Mahy Gehenne

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA

CATEDRA DE FISIOLOGIA ANIMAL

Dr.D.ANTONIO TORRALBA RODRIGUEZ

DESARROLLO DE UN METODO DE ANALISIS POR CROMATOGRAFIA
DE GASES Y ESPECTROMETRIA DE MASAS COMBINADAS PARA EL
ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LA HISTAMINA.

Memoria presentada por Dña.
Josette Nicole MAHY GEHENNE para
aspirar al grado de Doctor en --
Farmacia por la Universidad de -
Barcelona.

Barcelona, Octubre de 1979.



LABORATORIO DE FISILOGIA ANIMAL
FACULTAD DE FARMACIA
—
UNIVERSIDAD DE BARCELONA
BARCELONA - 14
(ESPAÑA)

Ilmo. Sr.

El que suscribe, Antonio Torralba Rodriguez, Catedrático de Fisiología Animal de esta Facultad de Farmacia, como director, para juzgar la tesis de Dña. Josette-Nicole Mahy Gehenne, hace constar que según su criterio dicha tesis es apta para su presentación y lectura.

Barcelona, 6 de noviembre 1979

Ilmo. Sr. Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

a TRISTRAM SHANDY sq.

a MIQUEL

Deseo expresar mi más profundo reconocimiento a:

Dr. Emilio Gelpí por la constante labor realizada a lo largo de este trabajo y por haber ayudado a mantener, en circunstancias adversas el equipo de investigación en cuyo marco se ha realizado la labor de este manuscrito.

Todos mis compañeros del Instituto de Biología Fundamental y del Instituto de Biofísica y Neurobiología, junto a los que he compartido problemas y alegrías durante estos años de trabajo.

Mercè Pedra por su ayuda en la pesada tarea de mecanografiar este manuscrito.

ABREVIATURAS USADAS

Algunas de las abreviaturas se han usado en su versión anglosajona debido a la amplia difusión que poseen.

AcN	Acetonitrilo
AcEt	Acetato de Etilo
BSA	Bis trimetil silil acetamida
BSTFA	N-O bis trimetil silil trifluoro acetamida
CG	Cromatografía de gases
e	Carga eléctrica
EM	Espectrometría de masas
FID	Detector de ionización por llama
H	Intensidad de campo magnético
HD	Histidina
HFBA	Anhídrido heptafluorobutírico
HM	Histamina
Im AA	Acido imidazol acético
Me	Metilo
Me OH	Metanol
M	Masa
m/e	Relación masa/carga
MIT	Monitor de ionización total
n	Nano
p	Pico
PFPA	Anhídrido pentafluoropropiónico
RESI	Registro selectivo de iones
TFA	Anhídrido trifluoroacético

TMCS	Trimetil clorosilano
V	Voltaje de aceleración
u	Micro.

INDICE

	pag.
RESUMEN GENERAL	XI
<u>INTRODUCCION</u>	1
I.1. INTERES NEUROQUIMICO DE LA HISTAMINA Y SUS METABOLITOS	2
I.1.1. Biosíntesis de la histamina cerebral	3
I.1.2. Distribución cerebral de la histamina	4
I.1.2.1. Distribución regional	4
I.1.2.2. Distribución celular y subcelular	7
I.1.3. La dinámica de la histamina cerebral	8
I.2. DIFICULTADES QUE PRESENTA LA DETERMINACION ANALITICA DE LA HISTAMINA, SU PRECURSOR Y SUS CATABOLITOS.	12
I.3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA HISTAMINA Y SUS METABOLITOS	16
I.4. REVISION DE LOS METODOS DESCRITOS PARA EL ANALISIS DE LA HISTAMINA Y SUS METABOLITOS	20
I.4.1. Métodos biológicos	22
I.4.2. Métodos químicos	23
I.4.3. Métodos isotópicos	25
I.4.4. Métodos cromatográficos	26
I.5. PROPOSITO DEL TRABAJO	29
<u>CAPITULO 1</u>	
MATERIALES Y METODOS	31
1.1. METODOS GENERALES	32
1.1.1. La cromatografía de gases	32

	VII
1.1.2.La espectrometria de masas	47
1.1.3.La cromatografía de gases-espectrometria masas.	56
1.1.4.La fragmentografia de masas	62
1.1.5.El contador de centelleo líquido	63
1.2.MATERIALES	65
1.2.1.Productos	65
1.2.2.Instrumentación	67

CAPITULO 2

ESTUDIO DE LA FORMACION DE DERIVADOS A TRAVES DE LAS REACCIONES DE ESTERIFICACION Y SILILACION	68
2.1.ESTUDIO DE LA REACCION DE ESTERIFICACION	69
2.1.1.Antecedentes	69
2.1.2.Métodos	71
2.1.3.Resultados y discusión	73
2.2.ESTUDIO DE LA REACCION DE SILILACION	75
2.2.1.Antecedentes	75
2.2.2.Métodos	79
2.2.2.1.Cinética de derivatización	81
2.2.2.2.Tiempos de retención	84
2.2.2.3.Curvas de calibración	85
2.2.3.Resultados	86
2.2.3.1.Reacción de sililación	86
2.2.3.2.Estudio de la mezcla de reacción	95
2.2.3.3.Estabilidad de los derivados de las aminas y de los ácidos	97
2.2.3.4.Indices de retención	98
2.2.3.5.Límites de detección y curvas de calibración	100
2.2.3.6.Mecanismo de la reacción de sili lación	105

2.2.4. Discusión	110
------------------	-----

CAPITULO 3

ESTUDIO DE LA REACCION DE ACILACION	113
3.1. INTRODUCCION	114
3.2. ANTECEDENTES	115
3.3. METODOS	120
3.3.1. Aminoácidos	121
3.3.2. Aminas	121
3.4. RESULTADOS	122
3.4.1. Reacción de acilación con el PFPA	122
3.4.1.1. Aminoácidos	122
3.4.1.2. Aminas	133
3.4.2. Reacción de heptafluorobutiración	137
3.4.3. Estabilidad de los derivados	139
3.4.4. Indices de retención	139
3.4.5. Límites de detección y curvas de cali bración	143
3.4.6. Mecanismo de la reacción de acilación	145
3.4.6.1. Aminoácidos	147
3.4.6.2. Aminas	152
3.5. DISCUSION	152

CAPITULO 4

ESTUDIO ESPECTROMETRICO DE LOS DERIVADOS SINTETI ZADOS	156
4.1. ANTECEDENTES	157
4.2. METODOS	158
4.2.1. Cromatografía de gases-espectrometria de masas	158
4.2.2. Normalización de los espectros	159
4.3. RESULTADOS Y DISCUSION	160

4.3.1. Espectros de masas de los compuestos libres	160
4.3.2. Espectros de masas de los derivados sililados	165
4.3.3. Espectros de masas de los derivados pentafluoropropionados	171
4.3.3.1. Aminas	171
4.3.3.2. Aminoácidos	181
4.3.4. Espectros de masas de los derivados heptafluorobutirados	189
4.3.4.1. Aminas	189
4.3.4.2. Aminoácidos	194
4.3.5. Estudio de la fragmentación de los derivados acilados de la histidina y metil histidina	200
4.4. CONCLUSIONES	205

CAPITULO 5

ESTUDIO CRITICO DEL METODO CROMATOGRAFICO Y ESPECTROMETRICO DESARROLLADO PARA SU APLICACION AL ESTUDIO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PREVIA ADSORCION SOBRE RESINA XAD-2.

207

5.1. ANTECEDENTES

5.1.1. Aplicación de la fragmentografía de masas al análisis de aminas biógenas en muestras biológicas

208

5.1.2. Cromatografía de adsorción utilizando la resina XAD-2

209

5.2. METODOS

212

5.2.1. Fragmentografía de masas por detección múltiple de iones

212

5.2.2. Estudio de un método de extracción en columna cromatográfica con resina Amberlita XAD-2	215
5.3. RESULTADOS	217
5.3.1. Comparación de los tres grupos de derivados sintetizados para su detección por fragmentografía de masas	217
5.3.1.1. Iones seleccionados para el análisis de aminas	217
5.3.1.2. Iones seleccionados para el análisis de los amino-ácidos	221
5.3.2. Resultados obtenidos con el método de extracción con resina Amberlita XAD-2	223
5.3.3. Problemas analíticos encontrados	225
5.3.3.1. Sistema cromatógrafico	226
5.3.3.2. Sistemas de cromatografía de gases-espectrometría de masas	229
5.4. Discusión	237
CONCLUSIONES	240
BIBLIOGRAFIA	247

RESUMEN

Entre los posibles neurotransmisores objeto de estudio actualmente, la histamina, descubierta en tejido nervioso en 1943 por Kwiatkowsky , es uno sobre el cual falta todavía - mucha información como por ejemplo el conocer su metabolismo cerebral. Las dificultades analíticas que presentan la histamina y sus metabolitos (sobre todo la histidina y la metil histidina) así como la falta de una técnica lo suficientemente sensible y específica para poder valorar conjuntamente esta amina y sus metabolitos pueden explicar esta laguna.

Debido al creciente interes en medicina y psiquiatría - por la determinación de estas sustancias, se ha abordado el - problema de la valoración simultánea de la histamina y sus - metabolitos mediante técnicas de cromatografía de gases y -- espectrometría de masas.

Para obtener derivados cuya volatilidad sea adecuada -- para su análisis por cromatografía de gases se han estudiado tres reacciones diferentes de formación de derivados de la - histidina, metil histidina, histamina, metil histamina, ácidos imidazol acético y metil imidazol acético con tres tipos de reactivos: primero fue el reactivo de metilación BCl_3 /metanol con el cual no se obtuvieron resultados lo suficientemente positivos como para permitir su posterior utilización. La segunda clase de reactivo fue el reactivo de sililación formado - por la mezcla BSA/TMCS ya que resultó ser el más adecuado -- para sililar las 2 aminas y los 2 ácidos. No pudimos obtener resultados satisfactorios con los dos aminoácidos. En el tercer grupo se utilizaron tres reactivos diferentes con el fin de comprobar los resultados y los mecanismos de reacción que

llevaban a la acilación directa de la histidina y la metil histidina sin necesidad previa de una esterificación del grupo carboxilo por tratarse de una reacción original y ser el mecanismo muy peculiar. Los tres reactivos anhídridos pentafluoropropiónico, heptafluorobutírico y trifluoroacético, condujeron a la formación de derivados similares tanto para los aminoácidos como para las aminas.

Para todos estos derivados, se estudiaron las condiciones óptimas de reacción y de cromatografía para su obtención en forma de un perfil en el cual las diferentes sustancias se obtienen correctamente separadas, así como las cantidades mínimas cuantificables con un detector de ionización - por llama.

La elucidación de la estructura de todos estos derivados se realizó por la técnica combinada de CG-EM. A partir de esta información, se pudo explicar los mecanismos de sililación y de acilación de las diferentes sustancias y poner de relieve la importancia del carácter básico del núcleo imidazol.

La comparación de las condiciones de formación, estabilidad, análisis de estos derivados y de las abundancias de sus fragmentos observados en los espectros realizados nos - condujo a elegir los derivados heptafluorobutirados como -- más aptos para el análisis por cromatografía de gases y registro selectivo de iones de la histidina, metil histidina, histamina y metil histamina.

Por otra parte, el estudio detallado de los datos de espectrometría de masas de los compuestos estudiados y de sus derivados sintetizados ha permitido obtener mucha información sobre los mecanismos de fragmentación de la histamina y compuestos relacionados. El inicio de aplicación de este método de análisis al estudio de muestras biológicas no se pudo continuar por no haberse podido solventar de forma satisfactoria los problemas analíticos encontrados en nuestro sistema de CG-EM.

Introducción

I.1.- INTERES NEUROQUIMICO DE LA HISTAMINA Y SUS METABOLITOS

La potente actividad que la histamina ha demostrado tener sobre diversas preparaciones biológicas, ha hecho reflexionar sobre las posibles funciones que podría desempeñar en el organismo. El uso conjunto de técnicas neuroquímicas, neurohistológicas y neurofarmacológicas, ha permitido elaborar el concepto importante de que múltiples sustancias químicas desempeñan el papel de neurotransmisores cerebrales. Para la histamina, algunas observaciones preliminares como la constatación de un reparto regional heterogéneo o el registro de modificaciones electrofisiológicas inducidas por su aplicación (ver revisiones de Green (59), Boissier(18), Snyder y Taylor(159) eran esperanzadoras. De hecho, los trabajos realizados durante estos últimos años han reforzado progresivamente esta hipótesis, precisando las localizaciones y los mecanismos de los procesos que permiten su síntesis, almacenamiento, liberación y acción. También, se ha empezado a identificar un sistema neuronal histaminérgico que presenta similitudes con los sistemas monoaminérgicos.

Se ha ido elaborando una noción algo imprevista a partir de estas investigaciones; la existencia de un segundo compartimiento de la amina, extraneuronal y

probablemente localizado en los mastocitos cerebrales.

Así, la histamina presenta a la vez numerosas similitudes y caracteres originales en relación con otros posibles mediadores del sistema nervioso central. Los -- estudios sobre la histamina sólo se han multiplicado -- después de la puesta a punto de los métodos de fluorescencia(154)y enzimático - isotópico (156)ya que a partir de ello se ha podido abordar el problema de la presencia, niveles y papel de la histamina cerebral.

Los criterios que califican una determinada substancia como un neurotransmisor son múltiples y aunque la histamina cumple con muchos de ellos, quedan por elucidar aquellos aspectos que necesitan de técnicas más específicas y más sensibles, como la cromatografía de gases y - espectrometría de masas, extensibles al análisis, no -- sólo de la histamina, sino de sus metabolitos. Varios - autores han revisado recientemente los resultados obtenidos en este campo (19,147,146), presentándose a continuación los resultados más importantes.

I.1.1.- BIOSINTESIS DE LA HISTAMINA CEREBRAL

Se conoce desde hace mucho tiempo la existencia de la histamina en el sistema nervioso cerebral de los -

mamíferos(59,158). No obstante, es sólo desde estos últimos años que se ha elucidado el origen de la histamina cerebral; la puesta a punto de un método simple y relativamente sensible(144)ha permitido demostrar que esta amina se sintetiza in situ por decarboxilación de la histidina. La eliminación del grupo α -carboxilo es catalizada por el enzima L-histidina decarboxilasa (EC.4.1.1.22) cuya especificidad es alta, ya que puede aceptar únicamente dos aminoácidos, la L-histidina y la L-1,4 metil histidina(148), como sustratos. El enzima no se encuentra saturado en condiciones normales, por lo que las fluctuaciones del nivel plasmático de histidina afectaran la síntesis de histamina cerebral(146,169) . El mecanismo de decarboxilación de la histidina queda representado en la figura 1 . La distribución subcelular de la histidina decarboxilasa es similar a la de los enzimas responsables de la biosíntesis de otros posibles neurotransmisores (2).

I.1.2.- DISTRIBUCION CEREBRAL DE LA HISTAMINA

I.1.2.1.- DISTRIBUCION REGIONAL

El reparto regional de la histamina cerebral ha sido estudiado en numerosas especies animales (16) y

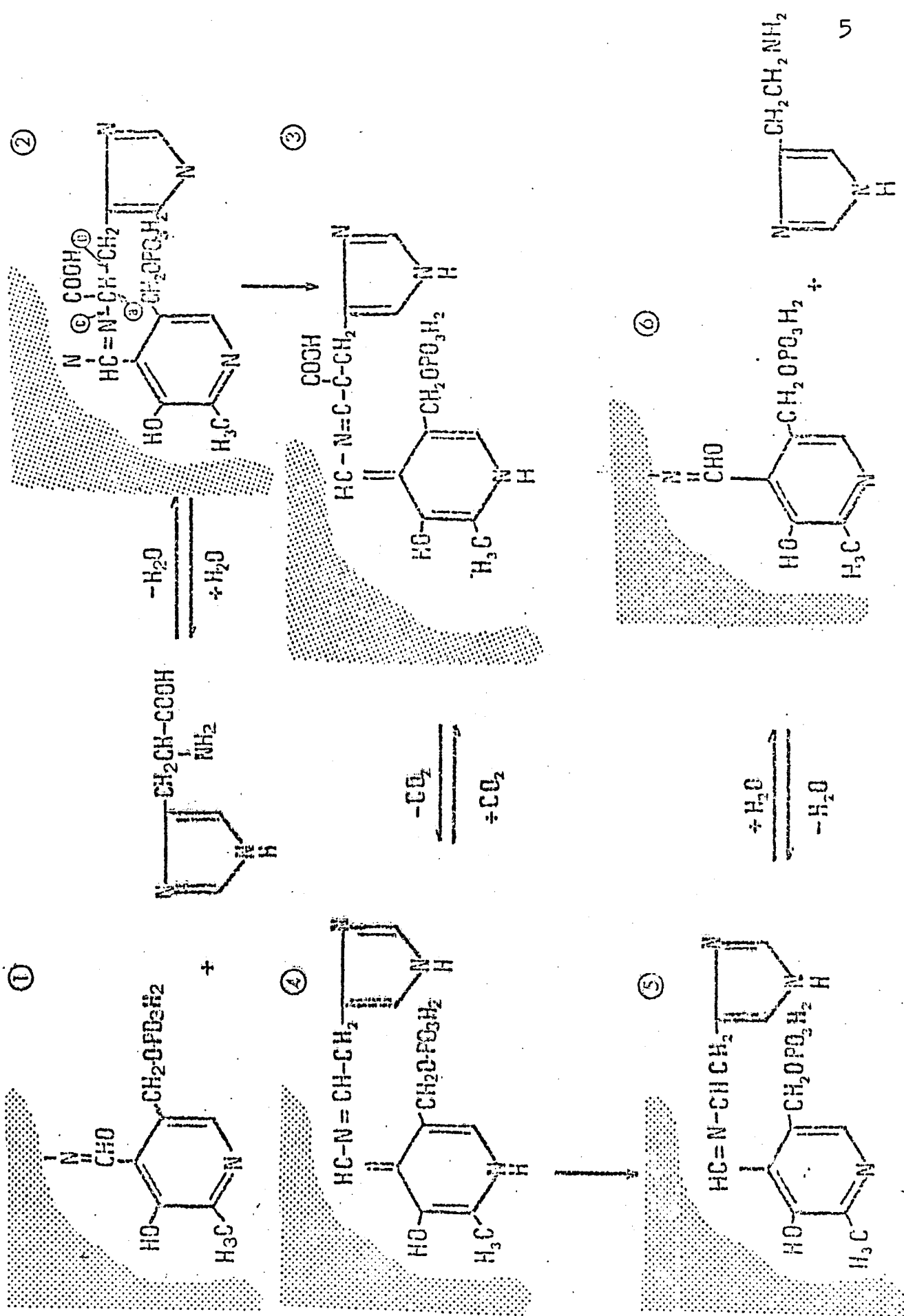


Figura 1.- Esquema del mecanismo de descarboxilación de la histidina.

TABLA I

REPARTO REGIONAL DE LA HISTAMINA EN EL CEREBRO DE RATA

REGION	HISTAMINA (ng/mg de proteínas)	
Cerebelo	0,25	0,01
Tronco cerebral	0,30	0,02
Mesencéfalo	0,53	0,04
Hipotálamo		
núcleo supraquiasmático	6,3	0,9
núcleo periventricular	3,7	0,4
núcleo supraóptico	3,0	0,6
núcleo hipotalámico anterior	3,3	0,8
haz mediano del telencéfalo	2,7	0,5
núcleo arqueado	6,2	0,7
núcleo ventromediano	3,6	0,8
núcleo dorsomediano	4,0	0,5
núcleo hipotalámico posterior	4,6	0,7
núcleo premamilar dorsal	3,9	0,5
núcleo premamilar ventral	8,1	0,8
cuerpos mamilares	4,3	0,7
eminencia media	17,8	2,2
Hipocampo	0,49	0,05
Cuerpos Estriados	0,61	0,05
Cortex	0,42	0,03
Datos de M.J. Brownstein et al (23)		

en el hombre(103). Al igual que el de otras aminas cerebrales tales como la acetilcolina, dopamina, noradrenalina o serotonina(168), el reparto de la histamina en las distintas regiones cerebrales no es uniforme (59,149).

El cerebro y el tronco cerebral son las regiones más pobres en histamina, mientras que respecto al -- hipotálamo, que es la región más rica, como se puede ver en la Tabla 1 , pg.6 , el mesencéfalo, el hipocampo, los cuerpos estriados y el cortez presentan concentraciones intermedias.

El estudio del contenido en histamina de los diferentes núcleos del hipotálamo, ha podido ser realizado (103) (168)en varias especies. Si se excluye a la eminencia -- media -debido a que la mayor parte de la histamina que contiene se localiza probablemente en mastocitos-, constatamos que el núcleo preliminar - el más rico en histamina- tiene una concentración 30 veces superior a la del cerebelo.

I.1.2.2.- DISTRIBUCION CELULAR Y SUBCELULAR

En el cerebro, una parte de la histamina endógena ha podido ser localizada en un compartimiento no -

neural, que se ha identificado como los mastocitos o células cebadas (79,96,136.) . Estas células se encuentran en zonas características del cerebro. Por el contrario, otras regiones que contienen concentraciones elevadas de histamina se hallan desprovistas de mastocitos. Todos estos resultados indican una doble distribución cerebral para la histamina.

Los estudios de localización subcelular de la amina indican que esta se encuentra en la fracción que contiene las terminaciones nerviosas, separadas de los axones en el proceso de homogenización: los denominados "sinaptosomas" (34).

También se ha caracterizado un segundo compartimiento subcelular para la histamina, relacionado con la presencia de mastocitos en el cerebro.

I.1.3.- LA DINAMICA DE LA HISTAMINA CEREBRAL

La demostración de que una sustancia puede actuar como neurotransmisor en el sistema nervioso central exige la comprobación de una serie de características, tales como:

- a) que dicha sustancia se libera de las terminaciones nerviosas cuando estas son estimuladas adecuadamente.
- b) que aplicada, mediante técnicas de microiontoforesis, a neuronas, provoca una respuesta electrofisiológica - específica.
- c) que actúa sobre receptores específicos provocando una respuesta fisiológica.
- d) que participa en las respuestas del sistema nervioso, actuando de alguna manera sobre el comportamiento, y
- e) que existen mecanismos adecuados en el sistema nervioso capaces de interrumpir la acción del neurotransmisor, tales como su recaptación o catabolismo y que el transmisor sufre un recambio o "turnover", a una velocidad adecuada a su función.

Todos estos puntos son actualmente objeto de numerosas investigaciones. No obstante, los datos que se van publicando son muchas veces contradictorios o incompletos.

Taylor y Snyder han mostrado que la liberación de histamina cerebral depende de la libre presencia de iones Ca^{2+} (170), pero no pudieron demostrar al igual que el grupo de Schwartz (125) que la liberación de histamina cerebral estimulaba su síntesis.

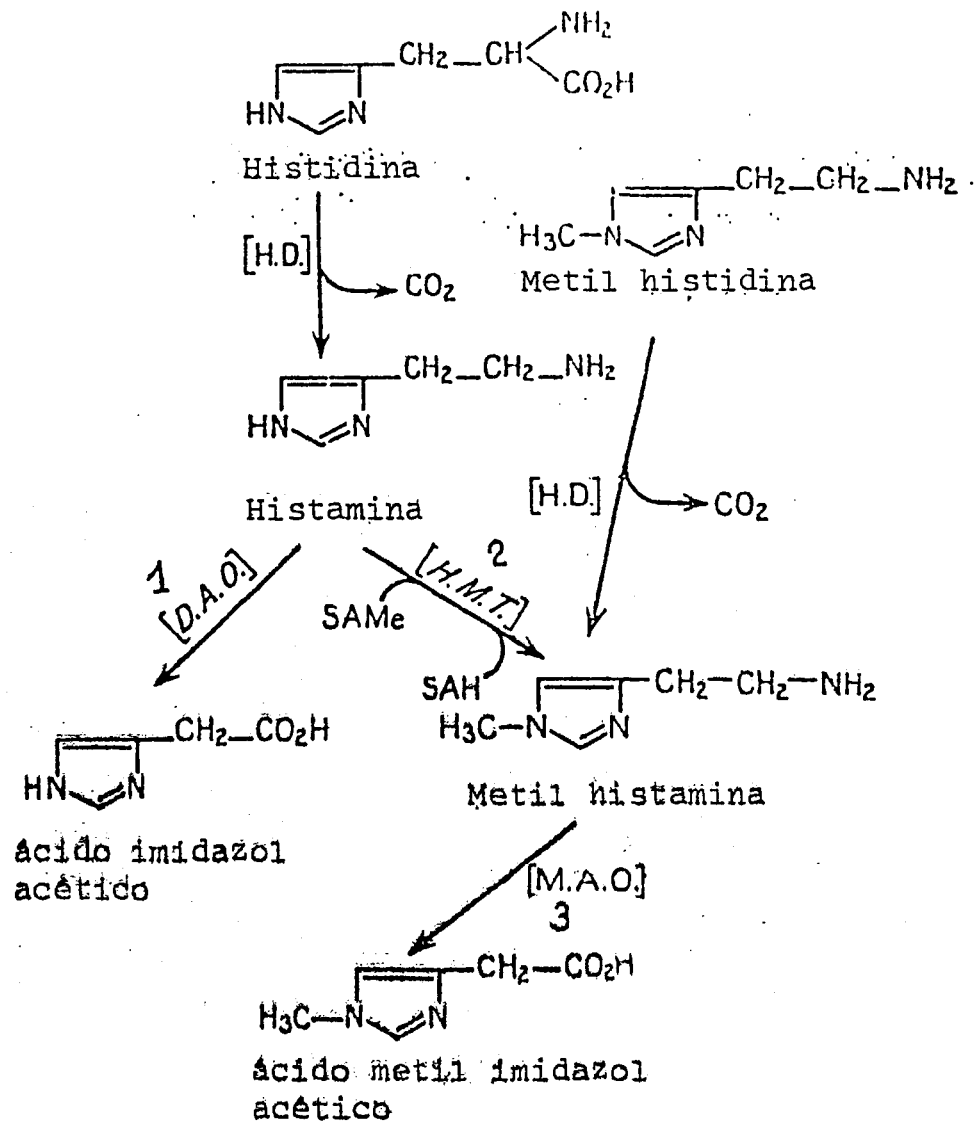


Figura 2.- Vías del metabolismo de la histamina en los tejidos periféricos.

Tampoco se ha elucidado la naturaleza de los receptores, posiblemente proteínas constituyentes de la membrana post-sináptica.

Ampliaremos más el último punto (e) ya que el trabajo aquí presentado intenta contribuir a su comprobación.

Desde los trabajos de Schayer se sabe que el catabolismo de la histamina tiene lugar en los tejidos periféricos según dos vías principales (cf. fig2). La importancia de cada una de las dos vías varía no solamente en función de la especie animal estudiada sino también en función del órgano considerado (130). Además, los datos publicados sobre la participación de cada una de estas rutas en el catabolismo de la histamina cerebral son contradictorios.

Tanto Burkard como Reilly, no encuentran ninguna actividad diaminoxidásica (DAO) en el cerebro de rata y de otros mamíferos (28,130). Por otra parte, Snyder y col.(157) describen que la mayor parte de la ^3H -histamina inyectada en el ventrículo lateral de cerebro de rata se recupera en forma de ácido imidazol acético ^3H . Schwartz y col., en un trabajo similar (145) pero disminuyendo las cantidades de ^3H -histamina inyecta

da (30 ng en lugar de 250 ng) encuentran la ^3H -metil histamina como principal metabolito y el ácido metilimidazol acético ^3H como metabolito desaminado por acción de una monoamino oxidasa (MAO). Dismukes recientemente confirma que la transmetilación es la vía mayoritaria del catabolismo en el cerebro de rata.

La importancia de la transmetilación de la histamina cerebral, su posible relación con las reacciones similares descritas para otras aminas neurotransmisoras y su implicación en la etiología de la esquizofrenia ha sido discutida recientemente por Schwartz. (147)

I.2.- DIFICULTADES QUE PRESENTA LA DETERMINACION ANALITICA DE LA HISTAMINA, SU PRECURSOR Y SUS CATABOLITOS.

La situación anteriormente descrita en relación con el estudio del metabolismo de la histamina, -- presenta varios puntos contradictorios; en el cerebro no se ha podido determinar todavía con exactitud cuál es la vía principal de catabolismo de la histamina, ni

la participación de otras vías. Por otra parte, como -- hemos señalado, Schwartz describe la formación de metil histamina a partir de metil histidina. No obstante, hasta ahora, según nuestros conocimientos, no se ha podido atribuir a este aminoácido un papel específico.

Todos estos puntos oscuros sobre el metabolismo de una amina cuya presencia en el sistema nervioso central es conocida desde el año 1943(101), vienen ligados a las dificultades existentes para el análisis tanto de la histidina y metil histidina como de los metabolitos de la histamina.

Varios hechos dificultan su determinación:

- a) Inestabilidad química de los compuestos men cionados.
- b) Similitudes estructurales y de comportamiento químico de los compuestos pertenecientes a este grupo.
- c) Bajas concentraciones de estos compuestos en tejidos y fluidos biológicos.
- d) Elevada complejidad de las muestras a anali zar.

La primera de las características generales

de estos compuestos es consecuencia de la elevada polaridad y reactividad de las mismas, lo que conduce a la existencia de adsorciones y/o degradaciones durante todo el proceso analítico.

El interés para la determinación conjunta de todas las sustancias presentes en la figura 3, de gran similitud estructural, obliga al desarrollo de un método analítico altamente específico y a la vez universal dado el número de sustancias a determinar y el distinto carácter ácido-básico de las mismas.

Sin embargo, quizás los dos factores limitantes en el análisis de estas sustancias sean los expuestos en los párrafos c) y d) respecto a las bajas concentraciones existentes en los diversos tejidos y fluidos biológicos y por otra parte la elevada complejidad de estos fluidos.

Debido a esto, cualquier intento de estudiar conjuntamente estos metabolitos supone disponer de la capacidad analítica necesaria para poder diferenciarlos entre centenares de otras sustancias afines: por ejemplo, en orina humana, procedentes de individuos sanos, se han identificado, hasta el momento, más de 700 compuestos (88) y es evidente que el problema es mucho más complejo cuando se pasa a un homogenado cerebral.

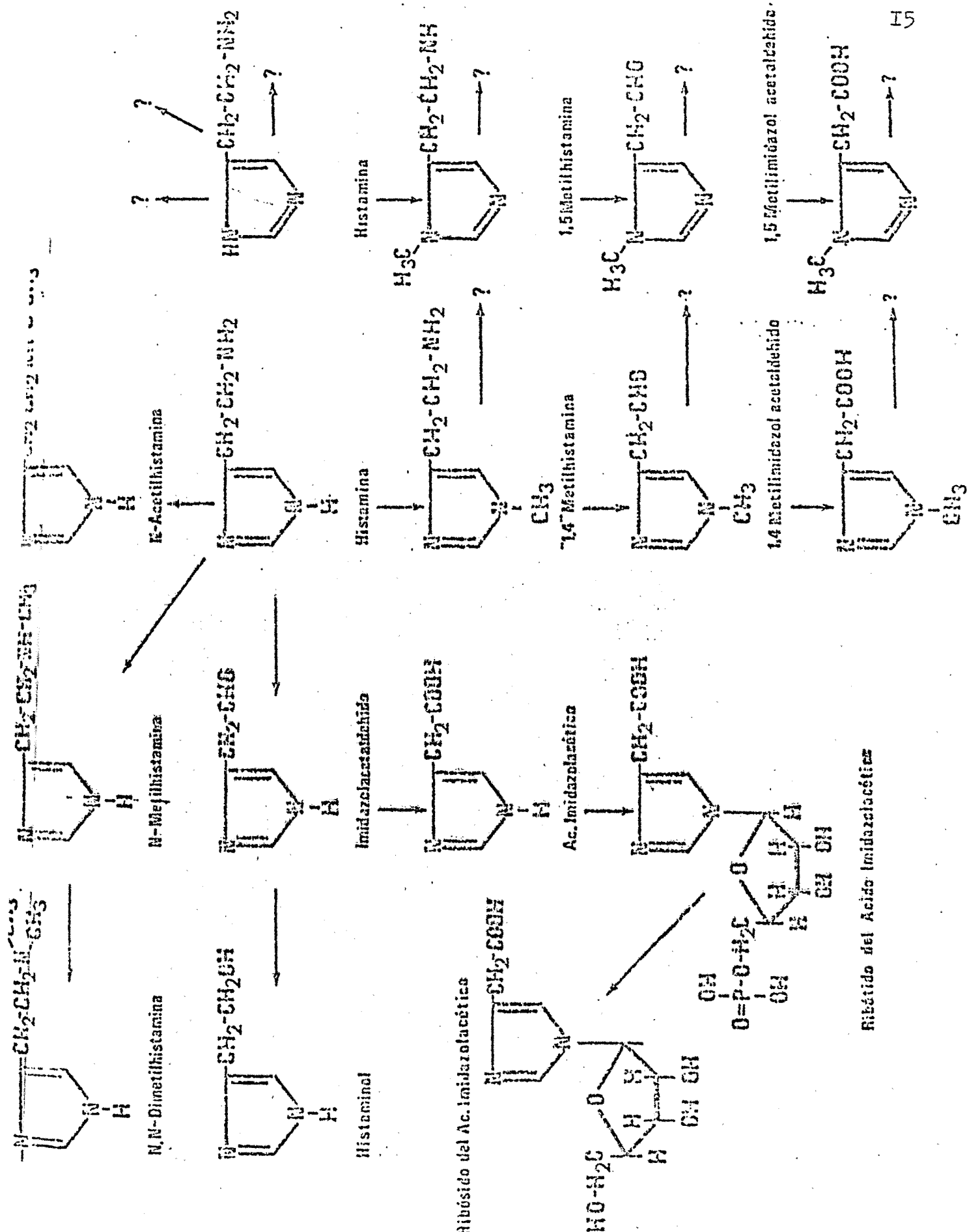


Figura 3.- Productos del catabolismo de la histamina en los mamíferos.

Otro factor importante para este tipo de análisis es el tamaño de la muestra. La mayoría de los autores evalúan el nivel de histamina para un cerebro entero de rata en unos 100 ng ($1 \cdot 10^{-7}$ g). Ante esta cantidad, es evidente que hay que emplear métodos altamente sensibles para el estudio de estas sustancias.

1.3.- PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA HISTAMINA Y SUS METABOLITOS.

El desarrollo de un método de análisis para el estudio del metabolismo de la histamina, debido a las limitaciones e inconvenientes de las técnicas descritas en la bibliografía, tal como se pone de manifiesto en la revisión que se expone seguidamente, ha necesitado previamente el estudio de las propiedades fisicoquímicas de estas sustancias, sobre todo de la histamina ya que ha sido más estudiada y presenta mayores dificultades de análisis por cromatografía de gases.

En relación con las estructuras químicas representadas en la figura 4, estas sustancias tienen dos características estructurales en común:

- la existencia de un núcleo aromático imidazol.

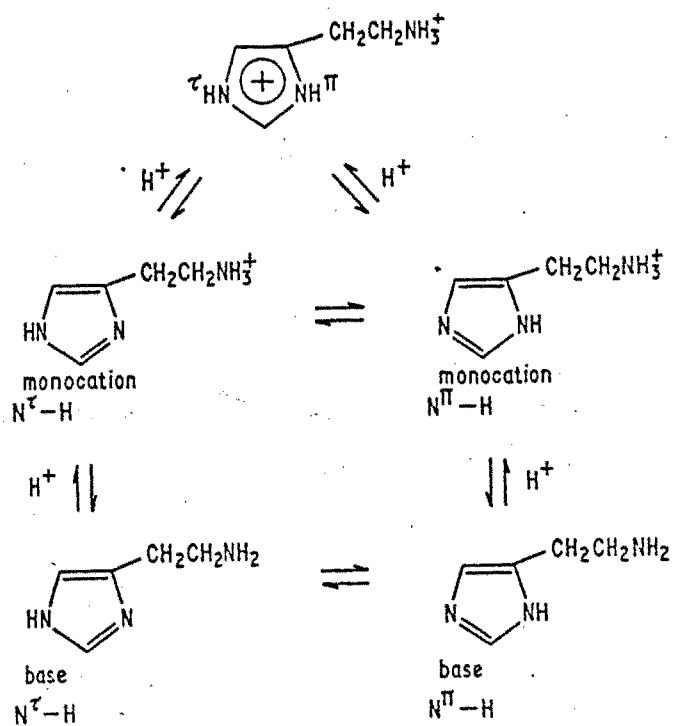


Figura 4.— Equilibrio existente entre las formas iónicas y tautomeras de la histamina.

- la presencia de una cadena alifática lineal de longitud variable polar.

El pK del grupo NH_2 primario de la histamina es de 9,7 mientras que el del grupo amino del núcleo es de 5,9. A pH fisiológico estas aminas se encuentran en forma fuertemente ionizada (96-97%) por fijación de protones a los grupos amino y, sólo a pH alcalino existen como bases libres.

Basándose en la resonancia entre los dobles enlaces del anillo imidazólico, Richards y col.(133) han estudiado las formas tautómeras de la histamina y la influencia del agua sobre ella : (cf. fig 4). Consideran que la forma ζ prevalece para la histamina ionizada, pero que no existe ninguna forma preferente para la histamina base. Esto es debido a la mayor influencia que tiene el agua sobre él monocatión en comparación con la base sin carga.

Sin embargo, las diferencias en las técnicas de estudio y cálculo aplicadas dan lugar a resultados confusos y en ocasiones contradictorios, de modo que el problema del tautomerismo de la histamina no está definitivamente resuelto.

La cadena aminoetil lateral de la histamina puede tener dos conformaciones posibles respecto al anillo: extendida y plegada, y según la conformación adoptada --

la distancia que separa los átomos de N de la cadena y del anillo es distinta con lo cual varía también la reactividad de la molécula (4). El interés por interpretar las acciones de la histamina en función de las interacciones amina-receptor a nivel molecular, ha provocado la realización de gran número de trabajos teóricos y experimentales (38,100,126), con el objeto de dilucidar cual de las dos conformaciones (extendida o plegada) es la preferida. Los resultados de estos estudios no son muy concluyentes, lo que hace necesario nuevos trabajos para conseguir la clarificación de este problema. Se ha descrito la existencia de, por lo menos, dos tipos de receptores de la histamina (H_1 y H_2) (13) que dan lugar, al ser activados por la amina, a efectos fisiológicos distintos. Como se ha indicado anteriormente, la existencia de formas tautómeras, las conformaciones que puede presentar la cadena lateral y los distintos grados de ionización, determinan que la molécula de HM pueda adoptar diversas estructuras, lo que explicaría su posibilidad de interacción con receptores distintos (3).

La HM y sus metabolitos pueden formar complejos de coordinación con varios iones metálicos (Cu, -

Zn,Co,Ag, etc.) (13,107,114,115 y 167) . La estructura y estabilidad de estos complejos varían según las condiciones de formación de los mismos. Se ha descrito también la formación de complejos de transferencia de carga con diversas moléculas de interés biológico -- (167). Aunque está bien establecida la importancia de las reacciones de complejidad en diversos sistemas -- (como ocurre por ejemplo para numerosas proteínas enzimáticas), la existencia y posible significación biológica de tales complejos en el caso de la HM es prácticamente desconocida.

I.4.- REVISION DE LOS METODOS DESCRITOS PARA EL ANALISIS DE LA HISTAMINA Y SUS METABOLITOS.

La presencia en los materiales biológicos y de modo especial en el tejido nervioso, de un elevado número de compuestos, la carencia de métodos totalmente específicos para la determinación cuantitativa de la histamina y sus metabolitos, así como las bajas concentraciones en que se encuentran en determinados tejidos, ha limitado notablemente los estudios bioquímicos y fisiológicos sobre estos compuestos.

La dificultad para valorarlos directamente en los tejidos y líquidos biológicos, a causa de la existencia de sustancias interferentes, ha determinado en general, la necesidad de efectuar una extracción y/o purificación, previas a su cuantificación.

A lo largo del tiempo, se han desarrollado numerosas técnicas conducentes a la eliminación de los -- contaminantes aumentando así la especificidad de la técnica.

Debido a la ausencia de una técnica para la valoración conjunta de la histamina y sus metabolitos, nos limitaremos a dar una revisión de las técnicas de valoración de estas sustancias. Las principales técnicas de análisis se pueden clasificar en cuatro grupos:

I.4.1.- Métodos biológicos.

I.4.2.- Métodos químicos.

I.4.3.- Métodos isotópicos.

I.4.4.- Métodos cromatográficos.

Los dos primeros métodos permiten valorar -- únicamente la histamina. El tercero permite dosificar la metil histamina formada a partir de la inyección -

de histamina marcada. Los métodos cromatográficos permiten el análisis conjunto de varias sustancias.

I.4.1.- Métodos biológicos.

Todas estas técnicas se basan en la propiedad que tiene la histamina de contraer el músculo liso. La amplitud de esta concentración es proporcional al logaritmo de la concentración de histamina presente en el medio. El ileón de cobayo proporciona los mejores resultados (28). Para ello se utilizan principalmente dos técnicas:

a) Técnica de perfusión

Es la más antigua. Se sumerge el órgano alternativamente en soluciones fisiológicas de concentración desconocida en histamina y en soluciones que contienen concentraciones variables y conocidas de la amina. La determinación de la histamina se hace por comparación de las respuestas obtenidas.

b) Técnica de superfusión

Después de una desproteínización del tejido y de una purificación de la amina, se hacen fluir los --

líquidos a valorar y las disoluciones estandard sobre el órgano dispuesto en una cámara termostatada (34). La de terminación de la histamina se hace también por compa ración de las respuestas obtenidas. El principal incon veniente de los métodos biológicos es que no son espe cíficos, por lo que pueden ser afectados, a pesar de - una purificación previa, por la presencia de otras sus tancias biológicamente activas.

A pesar de ello y de la aparición de otras - técnicas, los métodos biológicos no han sido totalmen te desplazados.

I.4.2.- METODOS QUIMICOS

Todos ellos implican la formación de derivados coloreados (diazó derivados o derivados del dinitrofluo robenceno) o de derivados fluorescentes por condensa ción con el o-ftalaldehido (OPT).

a) Métodos colorimétricos

No se emplean actualmente debido a su falta de especificidad, a la inestabilidad de los productos forma

dos y a su falta de sensibilidad.

En principio exigían la formación de productos coloreados por condensación del núcleo imidazol con la p-nitroanilina o con el dinitrofluorobenceno (51) (81).

b) Métodos espectrofluorimétricos

En 1959, Shore y al (154) propusieron una técnica espectrofluorimétrica para la valoración de la histamina. Según este método la amina se condensa en medio alcalino con el o-ftalaldehído (OPT) dando lugar a un compuesto cuya fluorescencia se estabiliza en medio -- ácido. Sin embargo, los resultados obtenidos por estos autores dan unos niveles cerebrales de histamina cinco veces más elevados que los descritos por Carlini y Green (1963) después de un análisis biológico específico, mientras que Kremzner y Pfeiffer (1966) (95) y Michaelsson y Coffman (1967)(112), demostraron que la espermidina, de una concentración cerebral igual a quinientas veces la de la histamina interfería en la valoración fluorimétrica.

Una modificación de esta técnica por introducción de una purificación previa de la histamina (111,113) permitió finalmente una medida correcta de la histamina.

I.4.3.- METODOS ISOTOPICOS

a) Métodos de Schayer (141)

Se incuban las muestras con histidina marcada. La reacción se finaliza por adición de ácido perclórico 0.6M. La histamina formada se extrae con una mezcla -- butanol/cloroformo (2:1). Después de la formación de - cristales de dibenceno sulfonil histamina, estos se di suelven en una mezcla de contaje y se leen en un contador de centelleo.

b) Método de Khalson, Rosenberg y Thunberg (86)

Este método es una variante del método descrito por Schayer. Se forma igualmente histamina marcada a partir de una incubación con histidina marcada. Después de una purificación mediante una columna Dowex 50 W-X₄, se forma el derivado de la histamina con el cloruro de pipsilo. Los cristales obtenidos se recristalizan repretidas veces hasta obtener una radioactividad constante.

c) Método isotópico enzimático de Snyder.

Desde que en 1966 Snyder describió este método

por primera vez, numerosas modificaciones han permitido rebajar los límites de detección de la histamina de 20 nanogramos hasta 0,02 nanogramos (156,158).

El método se basa en la formación de un derivado marcado de la histamina -la metil-histamina- por incubación de la histamina con S-adenosil metionina tritizada en el grupo metilo, en presencia del enzima imidazol N-metil transferada. La reacción se finaliza por adición de NaOH IN y, la metil histamina se extrae con cloroformo. La radioactividad de las muestras se mide en un contador de centelleo.

I.4.4.- METODOS CROMATOGRÁFICOS

Diferentes técnicas de cromatografía han sido puestas a punto para el estudio del metabolismo de la histamina; las primeras, basadas en la cromatografía en papel (57,70) han sido sustituidas progresivamente por los métodos de capa fina (65,143) que ofrecen las ventajas de una mayor rapidez y resolución así como una mejor sensibilidad.

Una descripción exhaustiva de todas las variantes introducidas en cuanto a soportes, fases móviles

y sistemas de detección así como Rfs descrito sobrepasa el objeto de este trabajo por lo que se remite a la bibliografía específica sobre el tema (4,143). Destacaremos únicamente el empleo generalizado de ninhidrina como reactivo de detección. Un trabajo reciente (62) aplica la cromatografía en plaza fina bidimensional al estudio del metabolismo cerebral de la histidina. La revelación de las placas se realiza en varias etapas (primero a pH ácido y luego básico) empleando una solución de aldehído ortoftálico. Con este reactivo se forma un producto fluorescente, se forma el mismo fluoróforo de la histamina para su análisis en plasma por cromatografía de alta presión (91) a pesar de que su estructura quede todavía por esclarecer.

Pero este método permite únicamente cuantificar la histamina ya que no se detectan con este método sus metabolitos. Se ha desarrollado otro método de cromatografía de alta presión que emplea derivados de la histamina y metil histamina formados por reacción con el cloruro de dansilo (CIDNS). Este reactivo se ha utilizado ampliamente en los últimos años para el análisis de aminas y aminoácidos. Los compuestos formados son en general estables e intensamente fluorescentes, lo que les hace fácilmente detectables. Pero, a pesar de su utilidad para identificar compuestos amínicos presentes en muy baja concentración, su aplicación rutinaria presenta inconvenien

tes, ya que varios derivados dausilados pueden tener idénticos o muy similares. Esto obliga o a purificar más completamente la muestra o a realizar una nueva cromatografía con nuevos solventes, lo que complica la técnica y hace más difícil su aplicación.

La aplicación de la cromatografía de gases al estudio del metabolismo de la histamina se ha intentado en varios laboratorios pero hasta ahora, los resultados obtenidos fueron mediocres debido a los problemas analíticos encontrados. Las sustancias imidazólicas son muy polares y por esto, presentan numerosos fenómenos de adsorción, lo que se intentó suprimir bloqueando los grupos polares por acción de diversos reactivos:

- Diazometano (171)
- Bis (trimetilsilil) trifluoro acetamida (BSTFA) (30)
- Anhídrido trifluoroacético (TFA) (119)
- Diclorotetrafluoroacetona (DCTFA) (90)

Los resultados no son convincentes ya que las sustancias siguen presentando problemas analíticos y por esto se separan mal en la columna cromatográfica -- (91) (62).

1.5. PROPOSITO DEL TRABAJO

En la primera parte de este capítulo, se ha puesto de relieve el posible papel neurotransmisor de la histamina en base a su estudio en tejido cerebral por métodos de fluorescencia y enzimático-isotópico. Al analizar los trabajos de la literatura que intentan calificar esta amina de neurotransmisor, se aprecian numerosas limitaciones ligadas a su metabolismo debido sobre todo a la falta de una técnica lo suficientemente sensible y específica para poder realizar el estudio.

Dada la importancia que tiene el poder analizar conjuntamente la histamina y sus metabolitos, el objetivo principal de esta tesis se ha centrado en la puesta a punto de un método de análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas de la histidina, metil histidina, histamina, metil histamina, ácido imidazol acético y metil imidazol acético.

Esto presupone en un primera etapa la síntesis de derivados adecuados de estas sustancias de modo que posean buenas propiedades cromatográficas en cuanto a volatilidad, polaridad y factores de respuesta. Para esto, se tiene que estudiar la formación de estos derivados a partir de la acción de los tres principales grupos de reactivos: reactivos de metilación, sililación y acilación. En base a los resultados obtenidos, escogeremos el tipo de reacción más adecuado a las sustancias estudiadas.

En una segunda etapa, se debe realizar un estudio espectrométrico extensivo de la estructura de los derivados sintetizados. A partir de este trabajo, será posible poner de relieve los principales mecanismos de fragmentación y seleccionar así los fragmentos más característicos y abundantes de cada sustancia para su análisis por el sistema de registro selectivo de iones.

Debido a las características de sensibilidad y especificidad de este detector, en una tercera etapa se podrá poner a punto un método de extracción simple (basado en las características de adsorción de la resina Amberlita XAD-2) con la idea de reunir y analizar simultáneamente en una sola fracción los principales compuestos implicados en la vía metabólica de la histamina.

Es de suponer que previamente a la aplicación de este método de análisis al estudio del metabolismo cerebral de la histamina será necesario resolver los problemas analíticos ya referenciados en la literatura para la histidina y la histamina.

Capítulo I

1.- MATERIALES Y METODOS

1.1.- Métodos generales

Se describen de un forma general en este capítulo los principios básicos de los métodos utilizados, y se explicitan los detalles concretos relativos a su aplicación para la realización de este trabajo en los apartados de "Métodos" de cada capítulo.

1.1.1.- La cromatografía de gases

La primera aplicación de una técnica cromatográfica se debe a Tswett (173) en 1906 que utilizó una columna de aluminio para separar los pigmentos coloreados de las hojas. Desde entonces, permaneció ignorada, hasta -- que, en 1931 fue redescubierta por Kuhn (97). Los primeros en utilizar un gas como fase móvil en una separación cromatográfica fueron James y Martin (83) en 1952 para separar ácidos grasos de cadena corta.

A partir de entonces, la cromatografía de gas-líquido o cromatografía de gases (CG) ha experimentado un desarrollo poco común como demuestran las cada vez -- más numerosas publicaciones dedicadas al tema. Existe en

la literatura multitud de monografías sobre la misma, -- sus posibilidades analíticas, su instrumentación así -- como resúmenes sobre su aplicación (46,47,53).

Esto se debe a su gran versatilidad como técnica analítica y a sus ventajas como tal en cuanto a tamaño de muestra, sensibilidad, rapidez de análisis, costo relativamente bajo, etc.

La cromatografía de gases es un método de análisis inmediato en el cual los componentes de la mezcla a separar se reparten entre dos fases, entre las que se establece una sucesión de equilibrios de disolución o de adsorción constantemente desplazados: una de las fases es inmóvil, tiene una superficie específica muy grande -- es la fase estacionaria-- la otra fase, móvil, circula a través de la fase estacionaria.

La fase móvil es un gas; la fase estacionaria es un líquido poco volátil. Así, según las características del reparto de las sustancias introducidas en la fase móvil, unas se quedarán más retenidas por la fase estacionaria que otras. De esta forma, se obtendrá una separación de los diversos componentes de la mezcla. El -- grado de separación entre dos sustancias cualesquiera,

dependerá, por lo tanto, de sus relativas constantes de reparto entre ambas fases.

Para una sustancia dada, el equilibrio de reparto existente entre las fases móvil y estacionaria -- puede quedar alterado por diversas variables tales como la temperatura, el flujo de gas portador y la naturaleza de la fase estacionaria.

ELEMENTOS CONSTITUTIVOS DE UN CROMATOGRFO

El esquema de un cromatógrafo de gases está representado en la figura 5. La parte esencial del aparato es la columna D, que es un tubo de vidrio o de metal relleno de un adsorbente sólido o de un soporte inerte impregnado de un líquido no volátil o también de una fase estacionaria depositada sobre su pared interna (columnas capilares), y por el cual, circula el gas portador. La separación se realiza en su interior.

La columna está precedida de un sistema de inyección C. Este es un dispositivo que permite la introducción

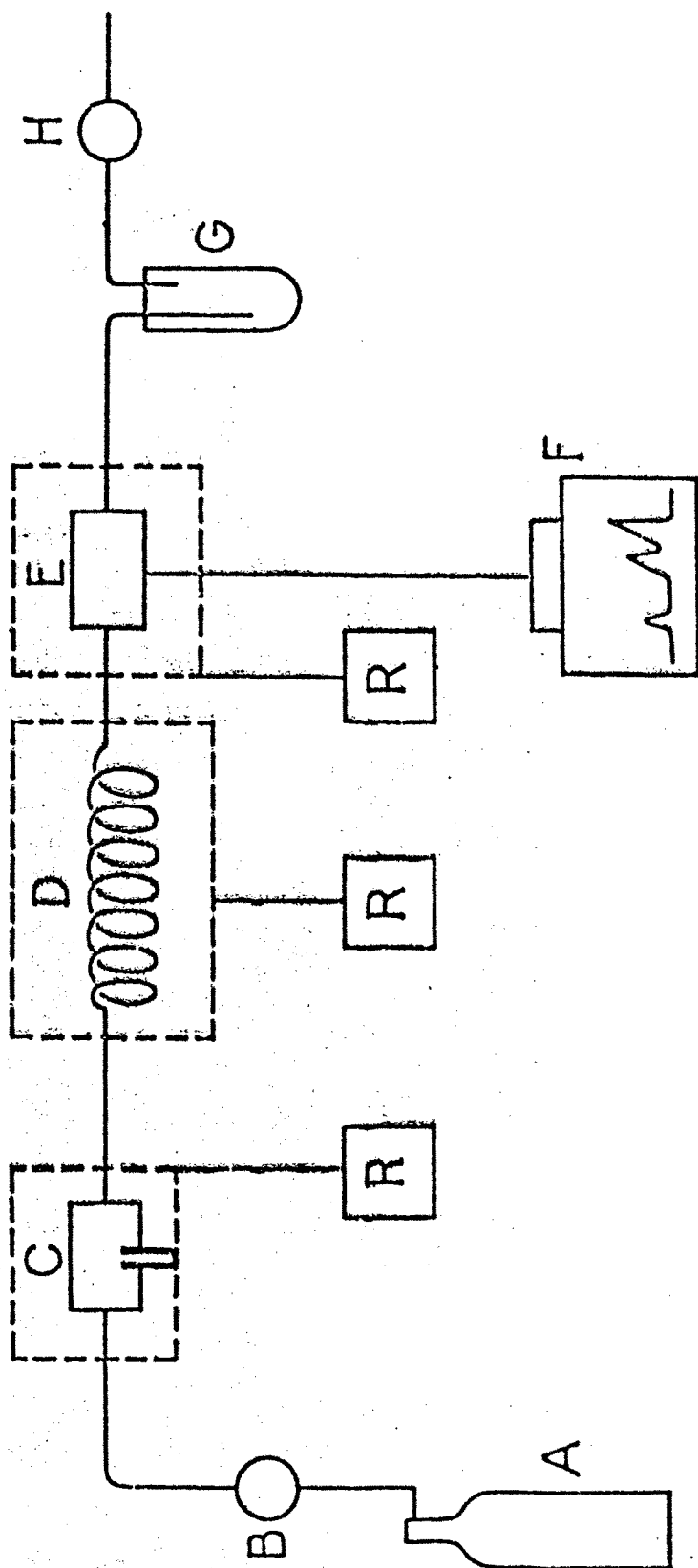


Figura 5.- Esquema del sistema de cromatografía de gases.

y la volatilización instantáneamente de la muestra en la corriente de gas portador. El extremo de salida de la columna se conecta a un detector, el cual generalmente permite medir una propiedad física del gas portador. Dicha propiedad se modifica ampliamente con la presencia de -- muy poca cantidad de la sustancia a analizar.

Todo ello está unido a un sistema electrónico que permite el control y la regulación de las temperaturas de los recintos R que contiene el inyector, la columna y el detector, así como la ampliación y el registro de la señal que suministra el detector.

1.- La fuente de gas portador A:

Proporciona la fase móvil. Los gases más utilizados son: H_2 , He, N_2 , Ar. Es necesario emplear un gas muy puro y que el flujo sea constante para que los tiempos de retención y las señales de la mayoría de los detectores sean reproducibles y significativos. Por esto se dispone de un regulador de presión o flujo del gas portador (B).

2.- El inyector C:

La muestra a analizar se introduce y vaporiza en la corriente de gas portador, lo más cerca posible de

la entrada de la columna para evitar una difusión en la fase gaseosa perjudicial para la resolución de la muestra. La temperatura de la cámara de inyección debe ser suficientemente elevada para permitir una vaporización rápida de la muestra, pero no tanto que pueda provocar la descomposición térmica de la misma. En general, se fija a una temperatura ligeramente superior a la de la columna.

Las cantidades inyectadas oscilan entre 0,1 y 2-3 μ l en el trabajo analítico normal.

3.- La columna D:

Es en la columna donde se realiza la separación de los componentes de la muestra. La elección de sus dimensiones, naturaleza y calidad de su relleno es pues, muy importante.

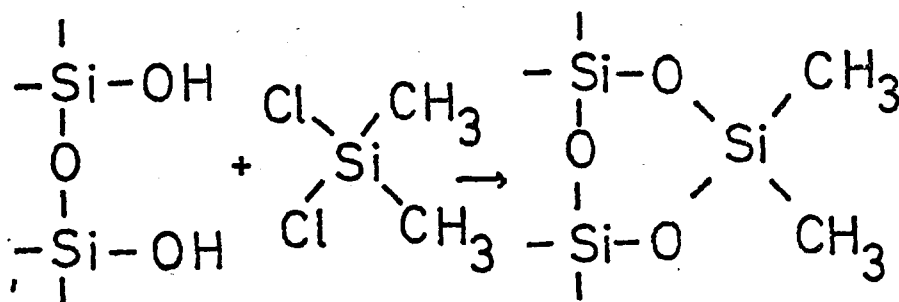
Las columnas que se emplean en CG son unos tubos de dimensiones y características muy diferentes (108). (Ver tabla 2). Las columnas analíticas clásicas son las más empleadas. Tienen un diámetro interior de 2 a 4 mm. y una longitud de 50 cm. a 4 metros. Estas columnas están rellenas con la fase estacionaria, -- fijada de una forma finamente dispersa, proveyendo así una capa de interfase de gran superficie. Para realizar trabajos analíticos con muestras biológicas, se --

TABLA 2

CARACTERISTICAS DE LAS COLUMNAS DE CROMATOGRAFIA DE GASES
(MARTIRE D.E., 1968 (108))

	COLUMNAS CAPILARES CLASICAS	COLUMNAS ANALITICAS CLASICAS	COLUMNAS PREPARA- TIVAS
Diámetro interior (mm)	0,1 a 0,5	2 a 6	6 a 500
Longitud (m)	10 a 100	0,5 a 6	1 a 6
Permeabilidad (cm ²)	10 ⁻⁴ a 10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
Altura equivalente a un plato teórico (mm)	0,2 a 1	0,5 a 2	1 a 5

utilizan columnas de vidrio, ya que químicamente inertes y sus puntos activos son fácilmente bloqueados por agentes de silanización (Dimetilclorosilano o hexametildisilazano) según la reacción:



En 1958, Golay introdujo un nuevo tipo de columna, las columnas capilares. El tubo, en este caso, está vacío y su superficie interna se recubre de una delgada capa de fase estacionaria. El interés de este tipo de columna reside en su elevada eficacia, ligada a su gran permeabilidad permitiendo la separación de muestras complejas; en contrapartida, su capacidad de carga es muy pequeña, por lo que sólo permite la inyección de cantidades reducidas de muestra.

El relleno de la columna en cromatografía Gas-Líquido (CGL), está constituido por un soporte sólido, impregnado de fase líquida poco volátil (columnas de re-

lleno), o bien, sólo de fase líquida (columnas capilares clásicas). El soporte sólido está constituido por granos porosos inertes que pueden impregnarse de una cantidad más o menos grande de fase líquida. Este soporte, debe ser esencialmente inerte frente a las sustancias inyectadas, tanto desde el punto de vista químico como del de la adsorción específica. Los soportes más utilizados son las tierras de diatomeas (39) (17), las cuales están constituidas de sílice (90%), alumina (4%) y de óxido férrico (1,5%) y se comercializan bajo el nombre de Sil-O-Cel o Chromosorb Gas Chrom. según los tratamientos que han recibido. Las fases líquidas deben satisfacer un cierto número de condiciones, en particular, - desde el punto de vista de su actividad química. Por -- ejemplo, a la temperatura de análisis, la fase debe ser líquida, estable y tener una presión de vapor baja. Así mismo, tiene que ser un buen disolvente de los compuestos que se analizan pero no deben dar con ellos ni reacciones químicas irreversibles ni asociaciones reversibles que tengan una cinética de transferencia lenta (darían lugar a una eficacia de columna muy baja).

Se han descrito varios centenares de fases - líquidas que se clasifican generalmente según su polaridad. Por orden de polaridad creciente, tenemos: los alcanos, las aceites y grasas de silicona, las amidas, las aminas, los poliesteres y los poliglicoles (17). En

la práctica, la utilización de unas pocas es suficiente para resolver la mayoría de los problemas analíticos que se presentan en el campo del análisis bioquímico. La -- elección de la fase estacionaria todavía es muy empírica pero, dada su importancia, es un punto clave en la cromatografía Gas-Líquido.

4.- El horno R:

En cuyo interior se sitúa la columna, debe poseer una buena regulación de temperatura.

5.- El detector E:

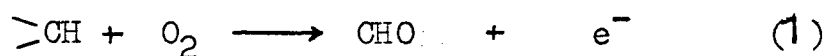
Es un elemento muy importante del cromatógrafo ya que es el que a través de un sistema de registro, permite visualizar la composición del gas a la salida de la columna cromatográfica, indicar el instante de salida de los compuestos inyectados, verificar si la separación deseada se ha obtenido con una resolución suficiente y - efectuar la dosificación de los constituyentes de la mezcla a analizar.

Algunos detectores trabajan por comparación de las propiedades del gas portador puro y del gas portador más componentes; otros trabajan por medición de las propiedades del componente en el gas portador. Todo ello,

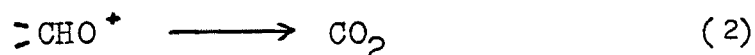
da lugar a una señal eléctrica que es adecuadamente ampli
ficada y registrada.

Los detectores de elevada sensibilidad que tien
nen ahora mayor interés son los de ionización. El más --
usado en la actualidad es el detector de ionización de
llama (FID) en el que los gases quemados en una llama ad
quieran suficiente energía como para que una pequeña pro
porción de moléculas se ionice y comunique una conducti-
vidad eléctrica al gas. Cuando entra un vapor orgánico en
la llama, aumenta la conductividad, y este aumento puede
ser medido y registrado. El mecanismo de formación de los
iones no puede ser termoiónico, siendo la temperatura de
la llama demasiado baja, por ello, se ha postulado una -
quimioionización que tendría lugar en una zona determinada
de la llama (128). El rendimiento de un detector es
aproximadamente de 2,5 iones formados por un millón de
átomos de carbono quemados, lo que explica que la reacción
responsable del proceso de ionización no haya podido estu
diarse en suficiente detalle.

La teoría más aceptada es la que postula la for
mación de los iones durante la oxidación de la sustancia
orgánica en la zona externa de la llama (zona oxidante).
El mecanismo de ionización sería el siguiente (116):



en el cual el radical CHO puede hallarse electrónicamente excitado. Una posterior reacción:



se produce sin que tenga lugar ningún fenómeno de ionización apreciable. Es el primer paso, por lo tanto, el que contribuye a la formación de la corriente de ionización.

La respuesta de este detector es lineal en un amplio margen siendo la cantidad mínima detectable del orden del nanogramo.

6.- El sistema electrónico F:

De amplificación y medida de la señal eléctrica enviada por el detector y registrador de la misma.

EFICACIA Y RESOLUCION DE LA COLUMNA CROMATOGRAFICA

Dado que la función básica de la cromatografía de gases reside en la separación de los diversos compuestos de una mezcla, se han definido los parámetros necesarios para medir y cuantificar la efectividad de la separación obtenida para dos compuestos dados. Esta efecti

vidad es función tanto de la estrechez de las bandas cromatográficas (eficacia) como de la distinta migración de dos bandas dadas (resolución).

Al inyectar una sustancia pura en una columna cromatográfica, por la que circula un gas portador con una velocidad lineal constante, la anchura de la zona es nula a la entrada en la columna y debería ser nula también al emerger a la salida. Sin embargo, en la práctica nos encontramos que el pico se ha ensanchado, adoptando la forma de un pico tipo gaussiano. Este ensanchamiento ha sido provocado por tres factores:

- 1.- Difusión ordinaria del soluto en fase móvil.
- 2.- Difusión originada por la tortuosidad del recorrido.
- 3.- Inequilibrio local en los procesos de adsorción del soluto en fase estacionaria.

El parámetro más adecuado para el cálculo del ensanchamiento de un pico cromatográfico es la "altura equivalente a un plato teórico" (HETP o H), cuyo significado físico se ha interpretado como la longitud de columna en la que se produce un equilibrio de reparto del soluto entre las dos fases. Es pues el ensanchamiento producido por unidad de longitud de la columna. De hecho, en la práctica no se utiliza H sino otro parámetro direc

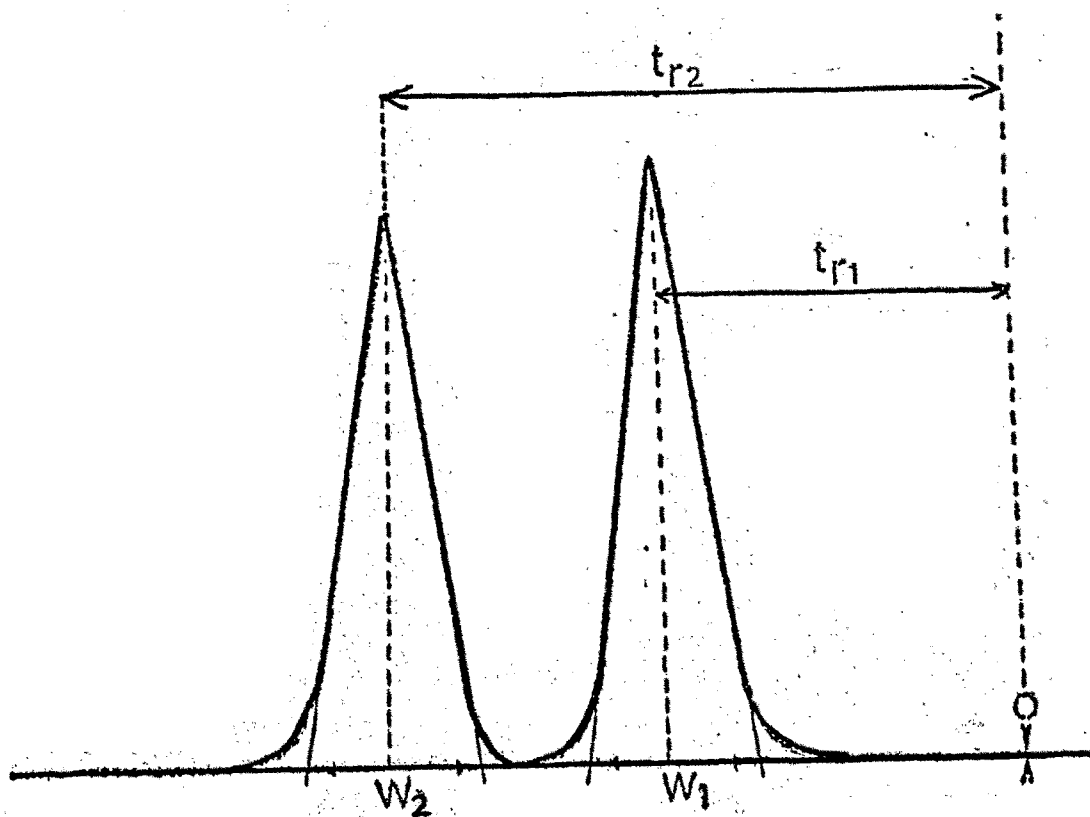


Figura 6.- Tiempo de retención (t_r) y anchura de base de pico (W), variables a partir de las cuales puede calcularse la resolución cromatográfica.

tamente relacionado con H: Este parámetro es N o número de platos teóricos, se expresa con la relación:

$$N = L/H \quad \text{siendo } L = \text{Longitud de columna.}$$

Se puede calcular fácilmente el valor de N a partir del cromatograma según la relación:

$$N = 16 (t'_r / W) \quad t'_r = \text{Tiempo de retención del pico.}$$

W = Anchura medida en la fase del pico como la distancia entre los puntos de corte por la línea base de las dos tangentes al pico trazadas por los puntos de inflexión (fig.6).

La ecuación de Van Deemter relaciona de una forma directa la eficacia de una columna con los parámetros y variables utilizados:

$$H = A + B/v + Cv$$

v = Velocidad de gas portador.

A, B y C = Parámetros que dependen de la columna utilizada.

Tanto N como H indican la eficacia del sistema cromatográfico, pero no la capacidad de separación de los

dos compuestos del sistema. Esta capacidad de separación es función de la selectividad relativa de la fase estacionaria, con respecto a ambos compuestos. Para expresar tal capacidad se emplea la llamada "resolución cromatográfica", que viene dada por:

$$R' = 2 (t_{r2} - t_{r1}) / (W_2 + W_1) \quad (\text{fig. 6})$$

Todos estos conceptos han sido desarrollados durante los últimos años por lo que actualmente se dispone de una amplia información, tanto en castellano como en inglés: Cromatografía de Gases I y II (41), Practice of Gas Chromatography (46), Ancillary Techniques on Gas -- Chromatography (47), Gas Chromatography (104) y Advances in Chromatography (121).

1.1.2.- ESPECTROMETRIA DE MASAS, FUNDAMENTOS Y TECNICA

La espectrometría de masas es, en principio, un método de separación y medida de masas con fines -- analíticos generales. Los iones obtenidos de una sustancia en general orgánica se separan, según su relación de masa a carga iónica dando lugar, una vez registrados en forma adecuada, al espectro de masas característico de la citada sustancia.

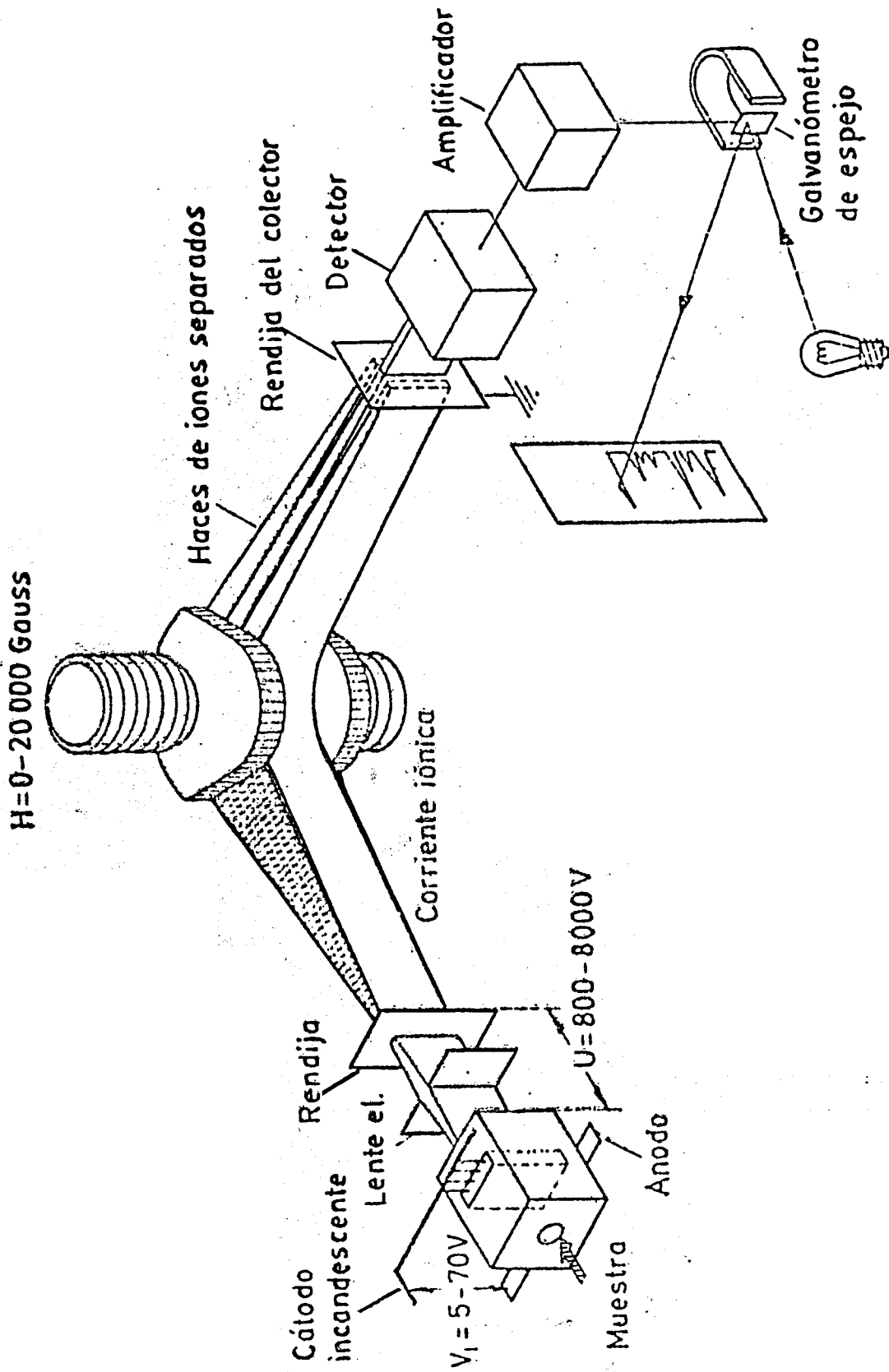


Fig.7 Esquema de un espectrometro de masas.

Todo espectrómetro de masas consta de cuatro partes esenciales: (fig. 7)

- 1.- Sistema de introducción de la muestra.
- 2.- Fuente o cámara de ionización donde son producidos y acelerados los iones.
- 3.- Tubo analizador donde los iones se separan en función de su relación masa/carga.
- 4.- Detector de los iones y sistema de amplificación y registro.

1.- Sistema de introducción

La introducción de la muestra es uno de los factores más decisivos con respecto a las limitaciones de aplicabilidad del método; en el estado actual de la técnica, las muestras orgánicas tienen que introducirse en forma de vapor para poderlas analizar.

a) Introducción indirecta: Es el método clásico de introducción de los líquidos y de las muestras gaseosas, se inroduce la sustancia en un depósito de reserva del cual fluye, a través de un pequeño orificio (fuga molecular) hacia la fuente de ionización. Este sistema de entrada se puede aplicar únicamente a compuestos bastante volátiles ya que exige una presión de vapor relativamente alta (10^{-3} torr).

b) Introducción directa: Para el análisis de sólidos se han desarrollado métodos de introducción directa, las muestras se introducen a través de esclusas de vacío, directamente en la fuente iónica. En este caso, la presión de vapor es de unos 10^{-6} torr, que alcanzan incluso los compuestos -- poco volátiles.

c) Finalmente, la muestra se puede introducir en un cromatógrafo de gases cuya salida está conectada con el espectrómetro de masas.

La cantidad de muestra que se necesita para realizar el análisis por espectrometría de masas, varía según la forma de introducción escogida: (Tabla 3)

TABLA 3

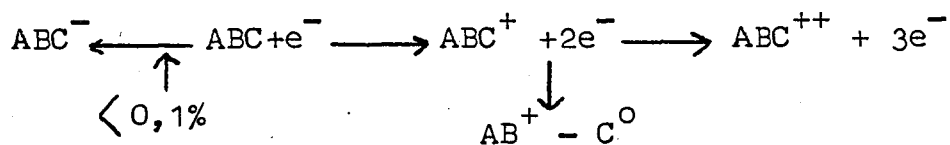
RELACION FORMA DE INTRODUCCION DE LA MUESTRA/CANTIDAD DE MUESTRA NECESARIA.

Forma de introducción	Cantidad de muestra necesaria			
I. Indirecta	0,5	a	1	mg
I. Directa	0,04	a	100	μ g
Conexión directa con un cromatógrafo	0,005	a	10	μ g

2.- La fuente o cámara de ionización

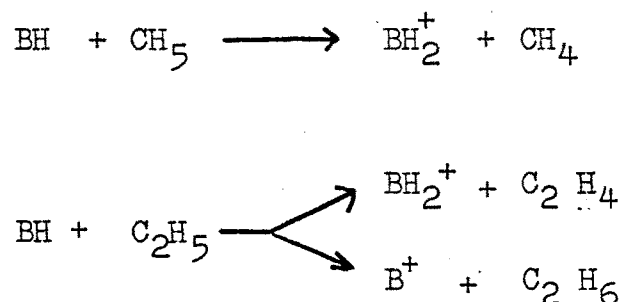
Las primeras y todavía las más usadas son las del tipo llamado de "impacto electrónico". En ellas, la muestra en estado gaseoso, es sometida al bombardeo de un haz de electrones de energía variable (0 a 100 eV generalmente) producido por un filamento incandescente. Los fragmentos así formados tienen carga positiva, debido a que la energía proporcionada por el bombardeo de electrones es lo suficientemente alta como para producir procesos de ionización y de rotura de enlaces. En condiciones especiales, llegan a producirse iones negativos, pero el número de iones negativos formados difícilmente supera el 0,1 % de iones positivos.

Los procesos de ionización y fragmentación más importantes que se producen en la fuente de iones son - del tipo (29) :



Otro tipo de fuente de iones en creciente uso en la actualidad, es la llamada "de ionización química". En ello, se aprovechan las reacciones posibles ión-molécula: por ello se introducen en la fuente de ionización un gas reactivo, generalmente CH_4 , que es ionizado se-

guidamente en las fuentes de impacto electrónico, produciéndose gran número de iones reactivos de tipo CH_5^+ , C_2H_5^+ , C_3H_8^+ , etc., que reaccionan entonces con las moléculas del compuesto analizado según reacción del tipo - (117):



Estas reacciones sólo se producen cuando la presión en la fuente de ionización es lo suficientemente alta, del orden de 1 mm de Hg. Es importante notar que, a diferencia de las fuentes de impacto electrónico, la fragmentación es mínima, lo que proporciona una inmediata determinación de la masa molecular del compuesto analizado.

Existen otros tipos de fuentes de ionización: las de ionización de campo, desorción de campo, fotoionización, ionización a presión atmosférica (14) pero las más utilizadas son las que hemos descrito.

3.- Separación de los iones:

El primer paso para la separación de los iones formados es siempre una aceleración de estos iones por campos eléctricos (aproximadamente de 800 a 8000 voltios) a cuyo efecto la energía electrostática de los mismos se transforma en energía cinética:

$$e \cdot U = \frac{1}{2} m v^2 \quad (1)$$

e = carga

U = tensión de aceleración

$$v = \sqrt{\frac{2eU}{m}} \quad (2)$$

m = masa

v = velocidad.

El orden de magnitud de las velocidades de los iones en los instrumentos analíticos es por término medio de unos 100 km/seg

Para la separación de masas puede utilizarse -- esta relación entre la velocidad y la masa solo (tiempo de vuelo y cuadrípulo) o en combinación con la deflexión de los iones en movimiento producida por un campo magnético. Al penetrar en la zona de acción del campo magnético H, la trayectoria del ión queda modificada por la acción del campo, describiendo entonces una trayectoria cuyo radio de curvatura viene determinado por la rela-

ción siguiente:

$$r = \frac{m \cdot v}{e \cdot H} \quad (3)$$

r = radio de deflexión
 m = masa
 v = velocidad
 e = carga
 H = intensidad del campo magnético.

Si se sustituye la velocidad de los iones deducida de la igualdad (2), resulta la ecuación (4):

$$r^2 = \frac{m}{e} \cdot \frac{2U}{H^2} \quad (4)$$

ecuación fundamental de los instrumentos magnéticos sectoriales.

Para un radio fijo, a partir de la ecuación (3) se demuestra fácilmente que la relación masa/carga correspondiente a una especie iónica determinada viene dada por la siguiente relación:

$$m/e = \frac{K \cdot H^2}{V} \quad (5)$$

K = constante que depende de la geometría del aparato.
 H = Intensidad del campo magnético.
 V = Voltaje de aceleración

Es la relación fundamental que regula la masa de las especies iónicas colectadas en función de los -- campos eléctrico y magnético.

4.- Detección y registro de los iones

Los iones, una vez separados, son colectados a través de una rendija de anchura variable y detectados. Los detectores más utilizados son los llamados "multiplicadores de electrones". En ellos, los iones inciden sobre una serie de dinodos cuya superficie está constituida de metales que, al ser bombardeados por los iones, producen electrones secundarios en un número que depende del voltaje a que están sometidos los dinodos. La ganancia en este tipo de detectores es muy superior a la obtenida - con otros tipos de detectores (76).

Debido a las altas velocidades de barrido del campo magnético utilizadas en la obtención de los espectros de masas, los sistemas de registro deben carecer, en lo posible, de inercia mecánica para poder seguir con suficiente estabilidad las rápidas variaciones de intensidad de la corriente iónica. Por ello los tipos de registradores son del tipo galvanométrico que utilizan papeles sensibles a la luz ultravioleta.

1.1.3.- CROMATOGRAFIA DE GASES. ESPECTROMETRIA
DE MASAS.

El método combinado, une el poder de separación de la cromatografía con el excepcional potencial de identificación que ofrece la espectrometría de masas, aún a niveles inferiores a los requeridos por otras técnicas (85). La Tabla 4 muestra una comparación de los niveles de -- identificación y de detección de diferentes técnicas analíticas.

Se puede ver que la técnica combinada cromatografía de gases-espectrometría de masas permite alcanzar unos niveles de identificación y de detección más bajos que los de cualquier otra técnica analítica; en efecto, es la única técnica que permite detectar unos 10^{-11} g - de sustancia e identifica unos 10^{-10} g. Las otras técnicas: IR, UV, RMN, llegan solamente a unas cantidades de 10^{-5} a 10^{-7} g.

TABLA 4

COMPARACION DE LOS NIVELES DE IDENTIFICACION Y DE DETECCION DE DIFERENTES TECNICAS ANALITICAS (55)

Técnica	Límite de detección (g)	Límite de Identificación (g)
CG	10^{-6} a 10^{-13}	---
IR	10^{-7}	10^{-6}
UV	10^{-7}	10^{-6}
RMN	10^{-7}	10^{-5}
EM (entrada directa)	10^{-12}	10^{-11}
CG-EM (convencional)	10^{-11}	10^{-10}

El interés del sistema combinado CG-EM reside pues en su gran capacidad para identificar y cuantificar los componentes de muestras de gran complejidad y a unos niveles muy bajos (inferiores al nanogramo).

El problema fundamental para el acoplamiento de un cromatógrafo de gases a un espectrómetro de masas reside en la diferencia de presión existente entre los dos aparatos: mientras que la salida de la columna del cromatógrafo se halla a presión cercana a la atmos....

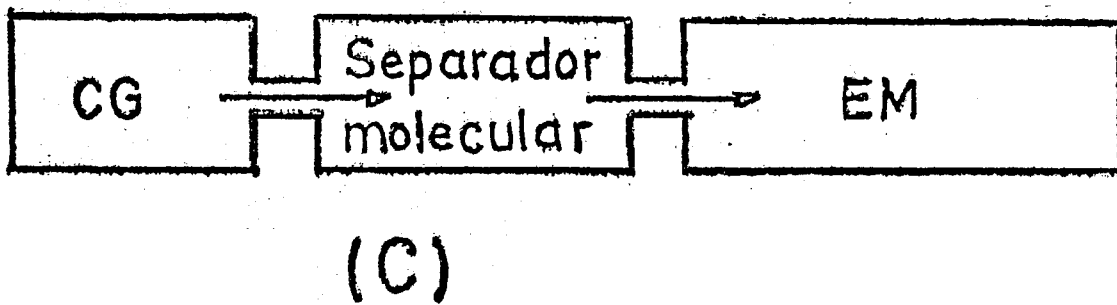
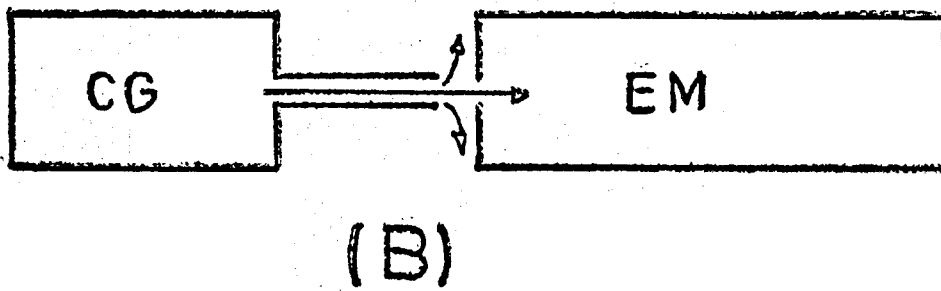
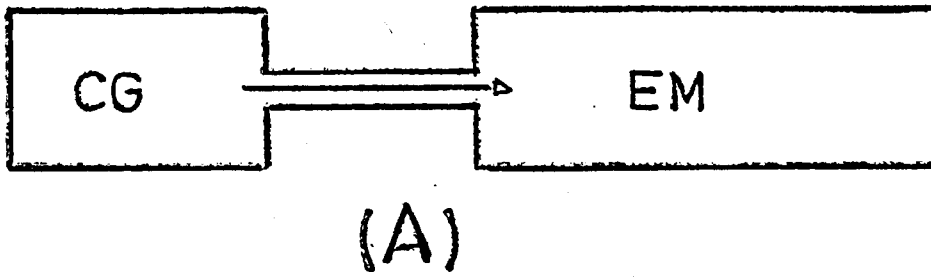


Figura 8.- Acoplamiento CG - EM.

férica, el espectrómetro debe trabajar a presiones del orden de 10^{-5} a 10^{-7} mm Hg. Debido a esto, se han puesto a punto diversos sistemas para poder conectar un cromatógrafo de gases con un espectrómetro, existiendo de hecho tres formas básicas de resolver el problema. (fig. 8).

a) Por conexión directa (open spliter) utilizando columnas capilares, que necesitan flujos de las columnas de relleno (69,72).

b) Por conexión de columnas de relleno mediante un divisor de flujo (24,25,49).

c) Por conexión a través de un separador molecular (53).

El método de acoplamiento más utilizado es el de conexión a través de un separador molecular o interfase. Tiene dos objetivos principales:

a) Proporcionar un medio físico eficaz para la conexión del cromatógrafo de gases a la fuente de iones del espectrómetro de masas y,

b) Eliminar la mayor parte del gas portador del caudal de salida del cromatógrafo antes de que este alcance la fuente de iones del espectrómetro de masas. Así, la totalidad de los compuestos que eluyen del cromatógra

fo penetran en el espectrómetro; lo único que se elimina es el disolvente y una parte del gas portador.

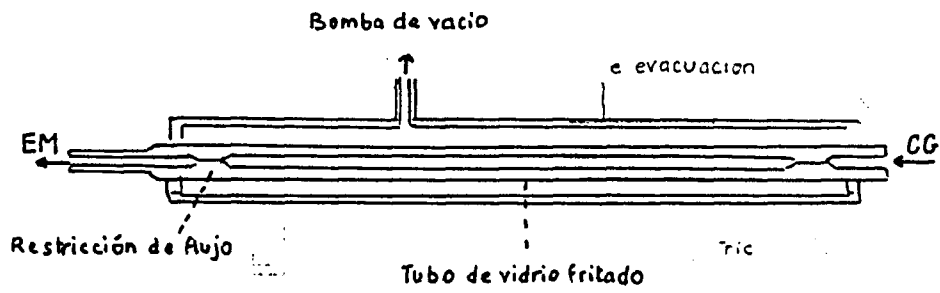
Existen varios sistemas, todos basados -excepto el separador de Ryhage- en la utilización de una barrera física para la separación. Esta separación se hace - según dos esquemas diferentes (Fig 9):

a) El gas portador pasa preferencialmente la barrera.

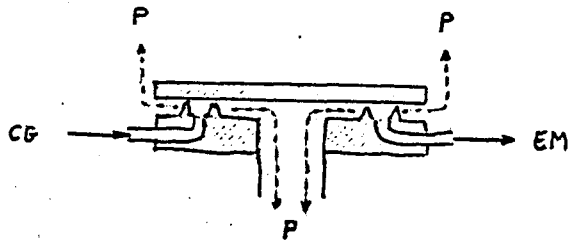
b) Los componentes que eluyen penetran preferencialmente a través de la barrera.

Entre los separadores de tipo a) los de Watson Bieman (176) (Fig 9a) y de Brunnée y Col (26) (Fig. 9b) son los más utilizados. Entre los separadores de tipo b) existen varios modelos que emplean membranas de silicona en las que se absorbe preferencialmente los compuestos eluidos, los cuales, después de atravesar dichas membranas, penetran en la fuente de iones (105)(Fig. 9c).

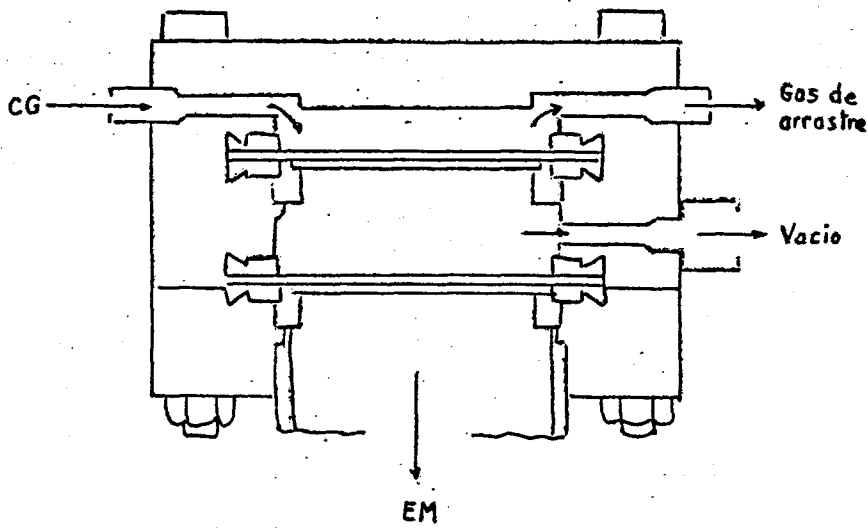
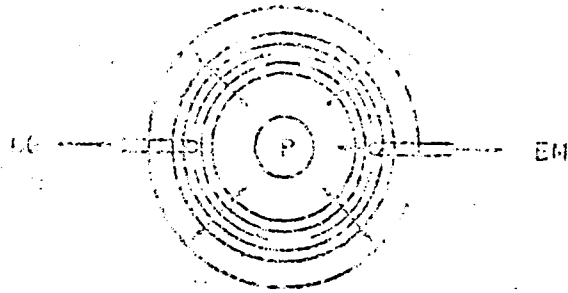
El separador de Ryhage, de tipo "jet" se clasifica aparte ya que funciona según un sistema diferente de los dos anteriores(137):Las sustancias eluidas de la columna pasan a través de un pequeño orificio (0,1 mm) alcanzando así velocidades muy elevadas. El gas portador,



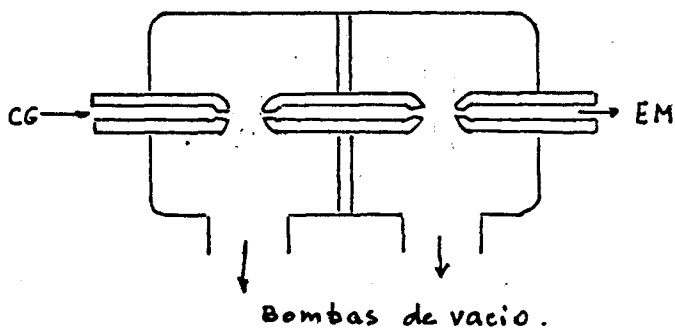
A



B



C



D

Figura 9.- Separadores moleculares.

por la menor masa de sus moléculas y por tanto por su -- mayor difusibilidad, se desvía de la trayectoria que alinea los orificios de entrada y salida de los jets y se elimina por bombeo de las bombas de vacío, conectadas con el separador, aumentando así grandemente la concentración de la muestra.

La mayoría de los resultados de CG-EM se han obtenido usando este tipo de separador.

Los dos factores de suma importancia en el uso de un separador molecular son:

a) Ausencia de superficies activas donde pueden producirse degradaciones o adsorciones irreversibles de las sustancias que lo atraviesan.

b) Ausencia de espacios muertos que disminuyan la eficacia conseguida en la columna cromatográfica.

1.1.4.- Fragmentografía de masas

El método de fragmentografía de masas implica el uso del espectrómetro de masas como detector del cromatógrafo de gases de modo que se registran continuamente

las densidades iónicas totales de determinados iones --
específicos, seleccionados de entre los que forman el --
espectro de masas del compuesto analizado. El aumento de -
sensibilidad así obtenido puede llegar a 10^7 veces el nivel
obtenido con un espectro de masas normal por CG-EM.

La especificidad estructural se logra registrando
simultáneamente las densidades iónicas de dos o más
fragmentos característicos. Este modo de operación se llama
detección múltiple de iones (MID) y proporciona una
información estructural válida ya que la relación entre -
las densidades iónicas de los dos iones es una propiedad
característica de la sustancia en estudio (15).

1.1.5.- Contador de centelleo líquido

Desde las observaciones realizadas a principio
de siglo por Rutherford relativas al centelleo producido
por la radioactividad, la técnica de contador de centelleo
líquido ha ido adquiriendo cada vez más importancia en el
campo de la investigación biológica y médica. Esta técnica
se basa en el contage de emisores de partículas beta a --
partir de la transferencia de energía desde estas partículas
al escintilador: la muestra emite un electrón, este

excita las moléculas del solvente que a su vez transfieren la mayor parte de esta energía a un escintilador primario que emite su energía de excitación en forma de fotones de luz que llegan a un escintilador secundario. Este los absorbe y los reemite a una longitud de onda más alta. La energía luminosa se transforma en energía eléctrica a nivel del fotomultiplicador.

Los isotopos que se utilizan son el tritio, el ^{14}C y el ^{32}P . Su rendimiento de detección varía debido a la diferencia existente a nivel de la producción de fotones por estos tres elementos. Las principales ventajas de esta técnica hacen que sea actualmente la más utilizada para el conteo de emisores de partículas beta. Esto, sobre todo, debido a:

1 - Alto rendimiento de detección.

2 - Comodidad y versatilidad del método: Las muestras, de preparación rápida y fácil, se pueden presentar en varias formas: líquidas, sólidas, tejidos animales o vegetales, cromatogramas sobre papel y gases.

3 - Separación de isotopos: Se pueden contar simultáneamente tres isotopos en una misma muestra a través de la selección de las energías de las diferentes radiaciones.

4.- El equipamiento automático de los aparatos actuales permite el tratamiento directo de la información.

1.2.- MATERIALES

Los materiales (productos e instrumentación) que se citan en este capítulo son los de uso general a lo largo de este trabajo ya que en cada capítulo, se explicita el material utilizado específicamente en éllo.

1.2.1.- PRODUCTOS

Las sustancias patrones empleadas en este trabajo: clorhidrato de histamina, de metil histamina y de metil histidina, histidina base, ácido imidazol y metil imidazol acético, se obtuvieron de Sigma Chem. Co. (EE.UU.), de -- Regis Chem. Co. (EE.UU.). Todos ellos se conservaron protegidos de la humedad a 4 °C. Los hidrocarburos usados para calcular los índices de retención de los derivados cromatográficos sintetizados se obtuvieron de Applied -- Science Lab. (EE.UU).

Los reactivos utilizados para la síntesis de los diferentes derivados se obtuvieron de Sigma Chem Co. (EE. UU.). Se conservaron sobre gel de sílice a 4 °C.

Los diferentes disolventes utilizados (Carlo Erba, Italia y Merck, Alemania), fueron todos de pureza -- cromatográfica y se utilizaron directamente, sin posterior purificación.

Para los estudios de cromatografía de gases, se emplearon columnas de vidrio 2m x 2,5 mm. Se silanizaron con una solución de dimetilclorosilano (DMCS) al 10% en tolueno durante 24 horas y se lavaron con abundante metanol y acetona. Después de secar, se llenaron con el relleno cromatográfico correspondiente. Las fases estacionarias que se utilizaron fueron las siliconas SE-30, OV-17 y OV-225 al 3% sobre Gas Chrom Q, malla 100/120. Todo este material cromatográfico se obtuvo de Xpectrix Int. S.A. (España).

La resina Amberlita XAD-2 (polimero de estireno y divinilbenceno) se obtuvo de Rohm and Haas (EE.UU.).

1.2.2.- INSTRUMENTACION

El trabajo de cromatografía de gases se realizó con un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer 900, equipado con dos detectores de ionización de llama. Como gas portador se utilizó el helio. Los espectros de masas de los compuestos sólidos se realizaron en un espectrómetro de masas Hitachi-Perkin-Elmer modelo RMU-6H.

Para los estudios de cromatografía de gases-espectrometría de masas, se utilizó este mismo espectrómetro acoplado a un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer 3920 a través de una interfase de vidrio fritado. Después se cambió este separador molecular por uno de otro diseño: uno de tipo "jet" como se explica en el capítulo

. El espectrómetro de masas lleva acoplado una unidad de Peak Matcher modelo MK-148 con el cual se realizaron los trabajos de fragmentografía de masas.

Las muestras marcadas con ^{14}C se leyeron en un contador de centelleo líquido Intertechnique modelo SL-32.

Capítulo 2.

2.1.- ESTUDIO DE LA REACCION DE ESTERIFICACION

2.1.1.- ANTECEDENTES

El análisis de ácidos carboxílicos libres por cromatografía de gases ha sido estudiado por W.R. Supina (162) quien obtuvo resultados prometedores. Sin embargo, la presencia del grupo funcional - COOH en la molécula exige o bien la modificación del relleno de la columna, o bien, el empleo de una técnica especial a fin de evitar la posible absorción del soluto en la columna (30). Esto se ha resuelto en general a través de la esterificación del grupo carboxílico por diferentes agentes de derivatización lo que permite disminuir la polaridad del ácido y facilitar así su cromatografía. Los agentes de esterificación utilizados son reactivos de metilación y butiración.

Los esteres metílicos se han sintetizado utilizando el diazometano (108,162), la mezcla HCL/ Me OH - (92) o el trifluoro de boro/metanol (172,175,183) y el tricloruro de boro/metanol (150). Los esteres butíricos se prepararon de una forma similar a los esteres metílicos: Unos autores (22) han utilizado butanol con 2% de ácido sulfúrico. Otros trabajos (22, 30) emplean el butanol saturado de ácido clorhídrico y/o butanol con trifluoro de boro. (162)

La reacción de esterificación de los metabolitos ácidos de la histamina ha sido descrita en la literatura principalmente por dos autores: Tham y Evans. Tham (171), describe dos métodos de metilación de los ácidos imidazol acético, 1,4 metil imidazol acético y 1,5 metil imidazol acético. El primer método hace reaccionar el diazometano durante 15 minutos con los tres ácidos. El reactivo se prepara extemporaneamente por descomposición de N-Nitroso-N-metil-p-toluensulfamida con alcali (129). La reacción de derivatización tiene lugar según el esquema:



El segundo método utiliza la mezcla de metanol/ácido clorhídrico (este último actuando de catalizador) a reflujo durante tres horas a 90 °C. El derivado metilado se obtiene según la reacción:



Las trazas de agua se eliminan con la adición de cloruro cálcico. En su artículo, Tham describe la formación de tres derivados diferentes del ácido imidazol acético: los esteres metílicos de los ácidos 1,4 metil imidazol acético 1,5 metil imidazol acético e imidazol acético. La mezcla de Me. OH/HCL provoca la formación preferente del último. Con los ácidos 1,4 y 1,5 metil imidazol ----

acético, los dos reactivos proporcionan el mismo ester metílico.

Los tiempos de retención de los tres derivados formados son respectivamente de 30, 40 y 100 minutos en una columna de 10% EGA y de 15, 20 y 45 minutos en una columna de 7% NGS. En ambos casos se consideran tiempos de retención muy largos.

Elisabeth Evans (48) describe la obtención de un derivado etil ester del ácido 1,4 metil imidazol -- acético con etanol/HCL dos horas a reflujo seguido de una extracción líquido/líquido a 40°, con dietil éter durante dos horas. Es un proceso muy lento y al igual que en el método de Tham, los picos cromatográficos --- presentan mucha cola y eluyen de la columna con un tiempo de retención largo (35 minutos con una columna del 6% EGA).

2.1.2.- METODOS

En base a estos trabajos, se estudió la reacción de esterificación por acción del tricloruro de boro/

/metanol ya que este reactivo es de uso más cómodo y su acción más rápida que el diazometano, la mezcla Me OH/HCL o EtOH/HCL debido a su alta reactividad (43).

ESTUDIO REACCION DE METILACION

La reacción de metilación se estudió con los ácidos imidazol acético y 1,4 metil imidazol acético de forma similar a la reacción de formación de esteres metílicos de otros ácidos orgánicos (22). Cantidades del orden de 300µg. provenientes de soluciones patrón en metanol, se hicieron reaccionar con 300µg de B Cl₃ en metanol al 10% peso/volumen.

Los viales se mantuvieron a distintas temperaturas (desde ambiente hasta 100 °C) durante tiempos -- también variables (0 a 3 horas).

Transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar las muestras hasta temperatura ambiente y se evaporaron bajo una corriente de helio. El residuo final seco, se disolvió en 60µl de metanol.

En dos columnas de vidrio de 2 m x 14'' (ϕ externo), rellena una con la fase 3% OV-17 sobre soporte --

gas Chrom Q de 100/120 mallas y otra con la fase 3% OV-225 sobre el mismo soporte, se inyectaron cantidades del orden de 1 a 3 μ l de la solución final. Cada columna estaba instalada en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer modelo 900. Las condiciones cromatográficas -- fueron las siguientes:

- gas portador: helio flujo 30 ml/min.
- temperatura de la columna: 140 °C con un incremento de 4 °C min. hasta alcanzar 200 °C.
- temperatura del inyector y del detector: 250 °C detector utilizado: FID.

2.1.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

A pesar de la utilidad demostrada por este reactivo para metilar los ácidos indol acético y 5 hidroxindol acético (150), no se pudo poner en evidencia la formación de derivados cromatografiables de los ácidos imidazol acético con las condiciones de derivatización y de separación estudiadas.

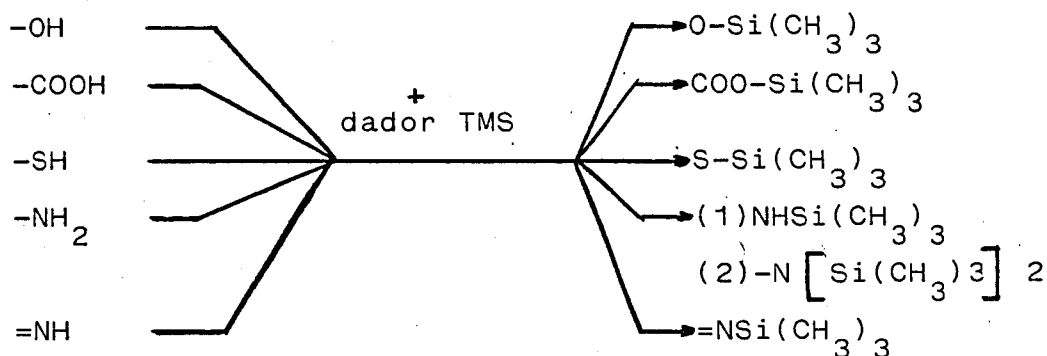
Por otra parte, los trabajos presentes en la -- literatura sobre la metilación de los catabolitos ácidos de la histamina mencionan la existencia de varios problemas, lo que hace difícil su utilización: por una parte se

describe la obtención de múltiples derivados para la --
misma sustancia y por otra parte, estos derivados cromatog
grafían con tiempos de retención bajos (de 35 a 100 minut
tos) y con niveles de análisis muy altos, de unos 50
microgramos por inyección. A la vista de todos estos data
tos, se decidió estudiar la reacción de formación de derii
vados de estas sustancias utilizando reactivos de sililaa
ción en lugar de reactivos de esterificación.

2.2.- ESTUDIO DE LA REACCION DE SILILACION

2.2.1.- ANTECEDENTES

La reacción de sililación se basó en la introducción de un grupo silil en una molécula, en general en sustitución de un hidrógeno activo. Los reactivos que se emplean a este fin son derivados del trimetilsilano $(\text{CH}_3)_3\text{SiH}$ y han sido muy utilizados para la cromatografía de gases de compuestos no volátiles ya que permiten derivatizar, en una sola etapa diversos grupos funcionales:



De hecho, las únicas desventajas de la reacción de sililación son la necesidad de trabajar en condiciones anhidras y la alta sensibilidad de algunos de los reactivos a la humedad. En efecto, cualquier traza de humedad -

provoca una descomposición del derivado trimetilsililado. Los métodos de preparación de los derivados sililados han sido descritos en detalle en el libro de Pierce (124).

Este autor cita como principales reactivos:

- El triclorometilsilano (TMCS) sólo o con un aceptor de ácido o, si es necesario con un catalizador.
- El hexadimetildisilazano (HMDS) con el TMCS u otro catalizador.
- Sililamidas como la N, O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) y la N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA).

La mezcla de HMDS y TMCS en piridina, frecuentemente utilizada, es un dador de TMS debil, los reactivos más fuertes, sobre todo el BSA y el BSTFA, se utilizan para formar derivados de los grupos de baja reactividad. La piridina que actúa de aceptor de ácido, se utiliza frecuentemente como medio de reacción pero es difícil de cromatografiar debido a la cola que se forma en los picos. Los otros disolventes que se pueden utilizar son el acetonitrilo, el dimetilformamida y el dioxano.

En la literatura, pocos trabajos describen la formación de derivados sililados de la histidina y sus

metabolitos(30,119)W.C.Butts, hace reaccionar juntos la histidina, las 1 y 3 metil histidinas, la histamina, la 1-metil histamina y el ácido 1,4 metil imidazol acético con el BSTFA/TMCS al 1% y piridina durante 16 horas a 60 °C para formar sus derivados sililados. Para la histidina, la histamina y la 1 metil histamina obtiene dos derivados diferentes que se separan en las columnas 3% OV-1 o 3% OV-17. Henri Navert estudia la cromatografía de gases de la histidina, la histamina y de las N1 y N3 metil histaminas a partir de la mezcla BSTFA/TMCS al 1% en acetonitrilo. Estos derivados se obtienen a 90 °C en la estufa en una hora. En este caso, como en el caso de Butts, le fue imposible obtener un solo derivado de cada metabolito: la histamina y la N1 monometilhistamina eluyen en forma de dos picos en todas las columnas estudiadas: 3% OV-11, 3% OV-17 y 3% OV-22.

Esta duplicidad de derivados se debe al número de grupos funcionales capaces de ser sililados como se indica en la figura 10. Para la histidina, por ejemplo, existen el grupo amino I terminal a nivel del cual pueden entrar uno o dos grupos TMS según las condiciones y un grupo amino III a nivel del cual también puede entrar o no un grupo TMS. El grupo ácido también se puede sililar.

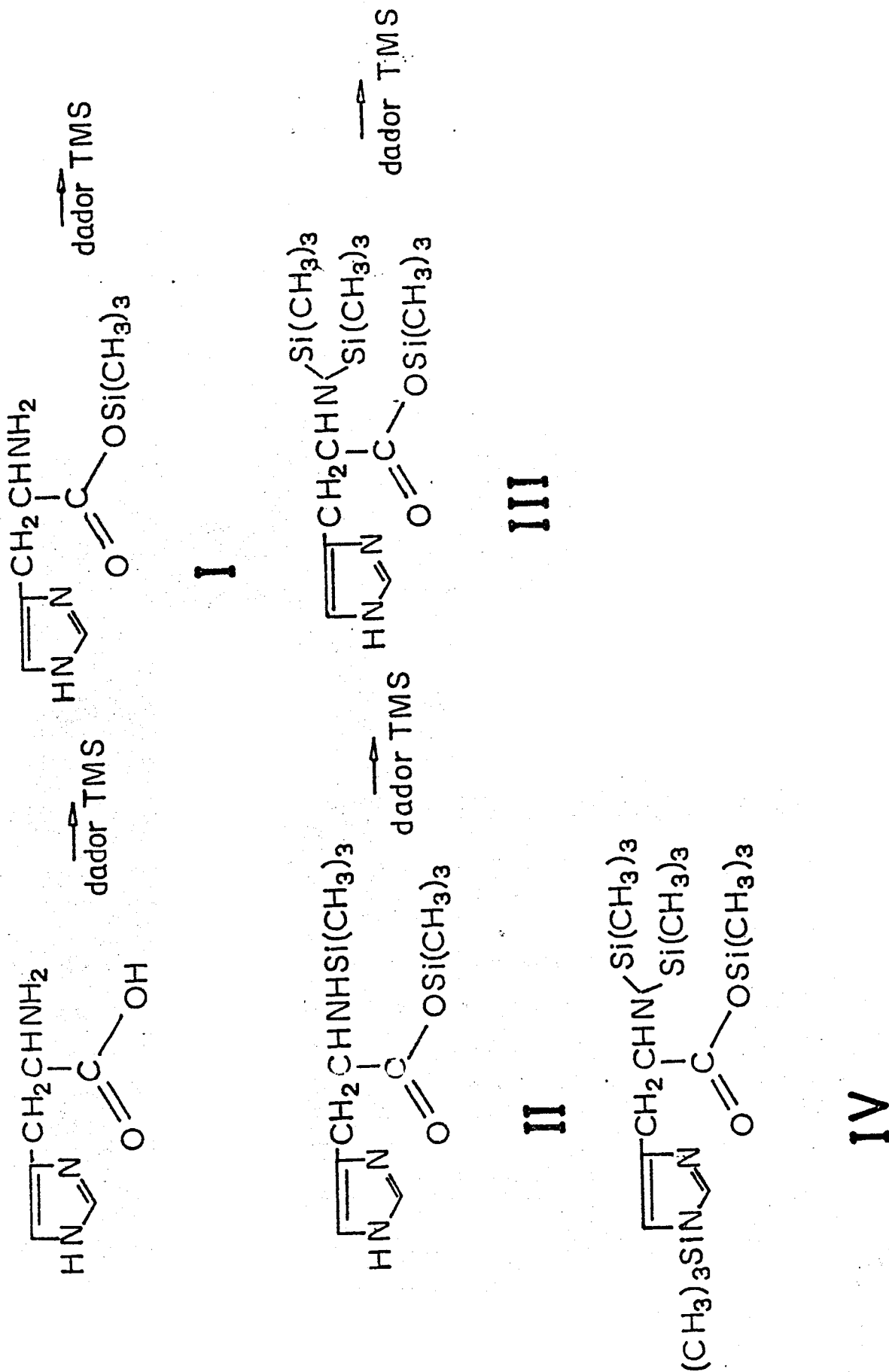


Fig.10 Ejemplo de la duplicidad de derivados de la histidina.

Por otra parte, en ninguno de los dos trabajos anteriores, se ha establecido el límite de detección para los derivados estudiados, siendo siempre las cantidades inyectadas del orden de varios μg .

Por todo ello, se decidió llevar a cabo un estudio sistemático de la reacción de sililación de los derivados del imidazol en base a la utilización de varios reactivos y varios disolventes.

2.2.2.- METODOS

En base a los datos contenidos en el libro de Pierce, se estableció el siguiente cuadro de condiciones de reacción con vistas a sililar cada grupo funcional presente en las sustancias a analizar. Por esto, las dividimos en tres grupos químicamente afines:(ver tabla 5).

TABLA 5

Reactivos de sililacion y grupos funcionales que reaccionan con cada uno.

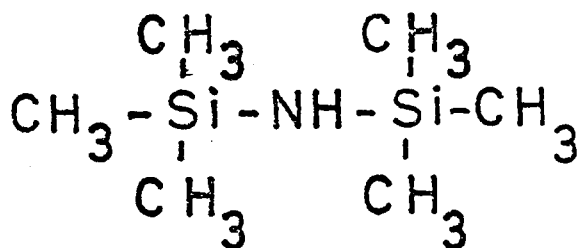
Compuestos Reactivo	Aminoacidos HD y MeHD	Aminas HM y MeHM	Acidos Im AA y Me Im AA
HMDS en piridina		+	
HMDS/TMCS			+
TMCS en piridina		+	
BSA/TMCS	+	+	
BSTFA/TMCS	+	+	

Las estructuras de los diferentes reactivos se indican en la figura II .

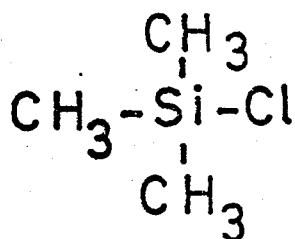
Los disolventes que se describen son el acetonitrilo, la piridina y la dimetilformamida y las temperaturas de reacción van desde temperatura ambiente a 100 °C.

2.2.2.1.- Cinética de derivatización.

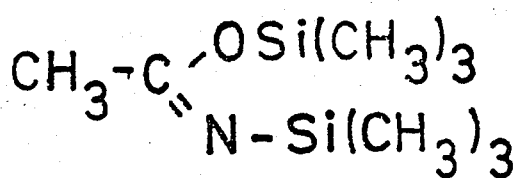
Se hizo un estudio sistemático de estas reacciones, tanto para estudiarlas para el grupo funcional indicado, como para comprobar su posible interés para otros grupos funcionales ya que se intentó obtener en una sola reacción las seis sustancias en forma cromatografíable. El proceso general de derivatización queda indicado en la figura I2 en la que se presenta la histamina a modo de ejemplo. Después de la evaporización bajo flujo de helio de la solución metanólica, se añade el reactivo y el disolvente escogido. El derivado trimetilsililado se forma en la estufa y después de su enfriamiento se inyecta con la solución reaccionante directamente en la columna cromatográfica.



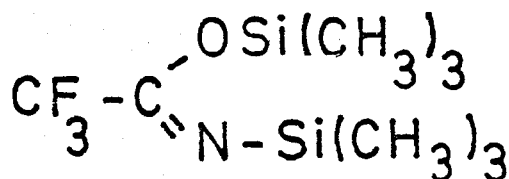
HMDS
HEXAMETILDISILAZANO



TMCS
TRIMETILCLOROSILANO



BSA
N, O BIS(TRIMETILSILIL)
ACETAMIDA



BSTFA
N, O BIS(TRIMETILSILIL)
TRIFLUOROACETAMIDA

Figura II - Estructuras de los principales reactivos de sililación.

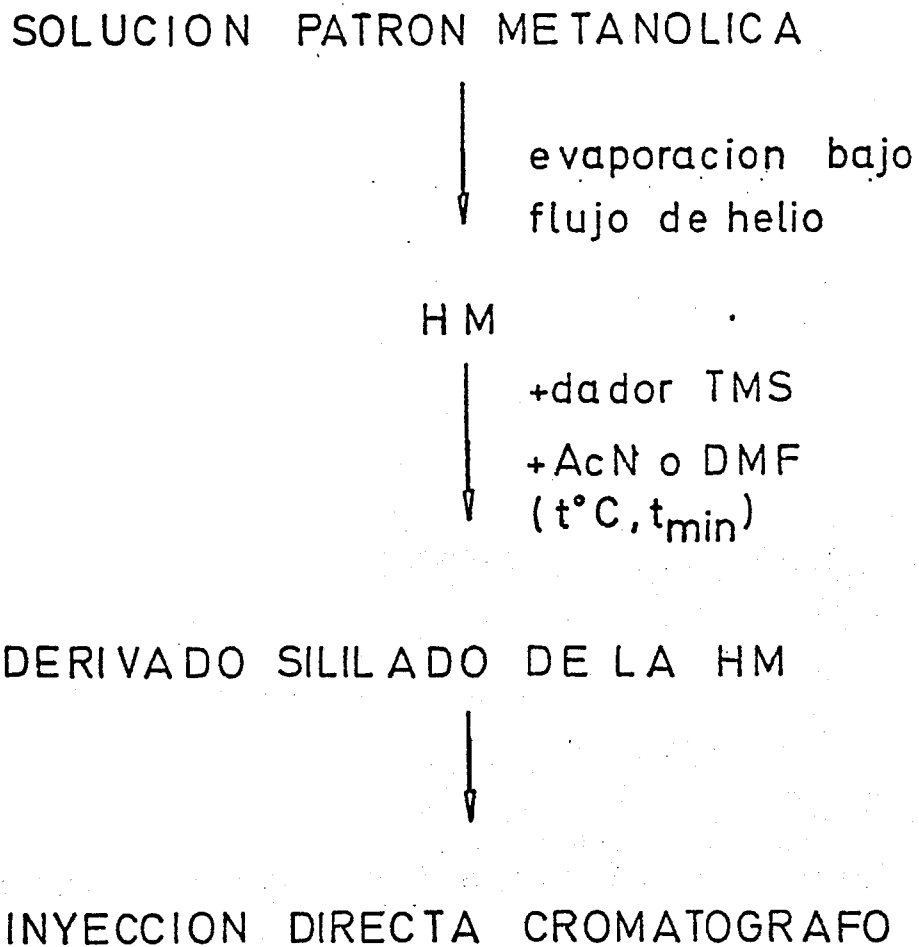


Figura I2 - Proceso general de formación de un derivado.

Para el estudio de esta reacción, en general, a una cantidad del orden de 300 μg de cada sustancia, - se adicionó una cantidad similar de n-eicosano (C_{20}). Después de su evaporación bajo flujo de helio se añadió 100 de reactivo y 0 - 100 μl del solvente adecuado. La mezcla se mantuvo a distintas temperaturas (desde ambiente a 90 $^{\circ}\text{C}$) durante tiempos variables (0-20 horas). Las condiciones cromatográficas fueron similares a las utilizadas para el estudio de los derivados metilados de los -- ácidos imidazol acético.

La identidad estructural de los derivados se ha puesto de manifiesto con los datos de CG-EM que se aportan en el capítulo 4 . Aquí se hará mención de ellos y sus fórmulas sin dar énfasis a su identificación

2.2.2.2.- Tiempos de retención de los derivados.

Los tiempos de retención de cada derivado se han calculado respecto a dos alcanos que eluyen cerca del compuesto estudiado a partir de la fórmula elaborada por Kovats(94). Así, el índice de retención I queda expresado de la siguiente forma:

$$I = 100 \left(n \frac{\log R_x - \log R_z}{\log R_{z+n} - \log R_z} + Z \right)$$

R_x = tiempo de retención de la sustancia a analizar.

R_z = tiempo de retención del alcançe normal de z átomos de carbono.

R_{z+n} = tiempo de retención del alcanço normal de $z + n$ átomos de carbono.

2.2.2.3.- Curvas de calibración

Para determinar el límite de sensibilidad del detector FID respecto a los derivados sintetizados y -- evaluar la linealidad de la respuesta, se preparó una - reacción de histamina de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y de ácido 1,4 metil imi dazol acético de $200 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Partes alicuotas de 0,1 a 1 μl de estas soluciones se inyectaron en el cromatógrafo, empezando por las de volumen más bajo.

2.2.3.- RESULTADOS

2.2.3.1.- REACCION DE SILILACION

2.2.3.1.1.- Aminoácidos

Diversas pruebas de sililación se realizaron utilizando los 4 reactivos indicados en la figura 11. La histidina y la metil histidina no dieron derivados cromatografiables en las condiciones estudiadas, lo que coincide con el vacío existente en la literatura sobre la sililación de estos compuestos.

2.2.3.1.2.- Aminas.

- Elección de la mezcla de reacción.

Los estudios de las reacciones de sililación se llevaron a cabo utilizando varios reactivos y varios disolventes. Los mejores resultados se obtuvieron con las reacciones ya señaladas en la tabla 5 es decir las mezclas BSTFA/TMCS y BSA/TMCS. Los rendimientos de reacción varían mucho si se utiliza un disolvente como la piridina acetoneitrilo o ninguno, como se puede ver en la figura 13 donde se muestra el perfil cromatográfico del derivado de la histamina en las tres variantes anteriores. La canti

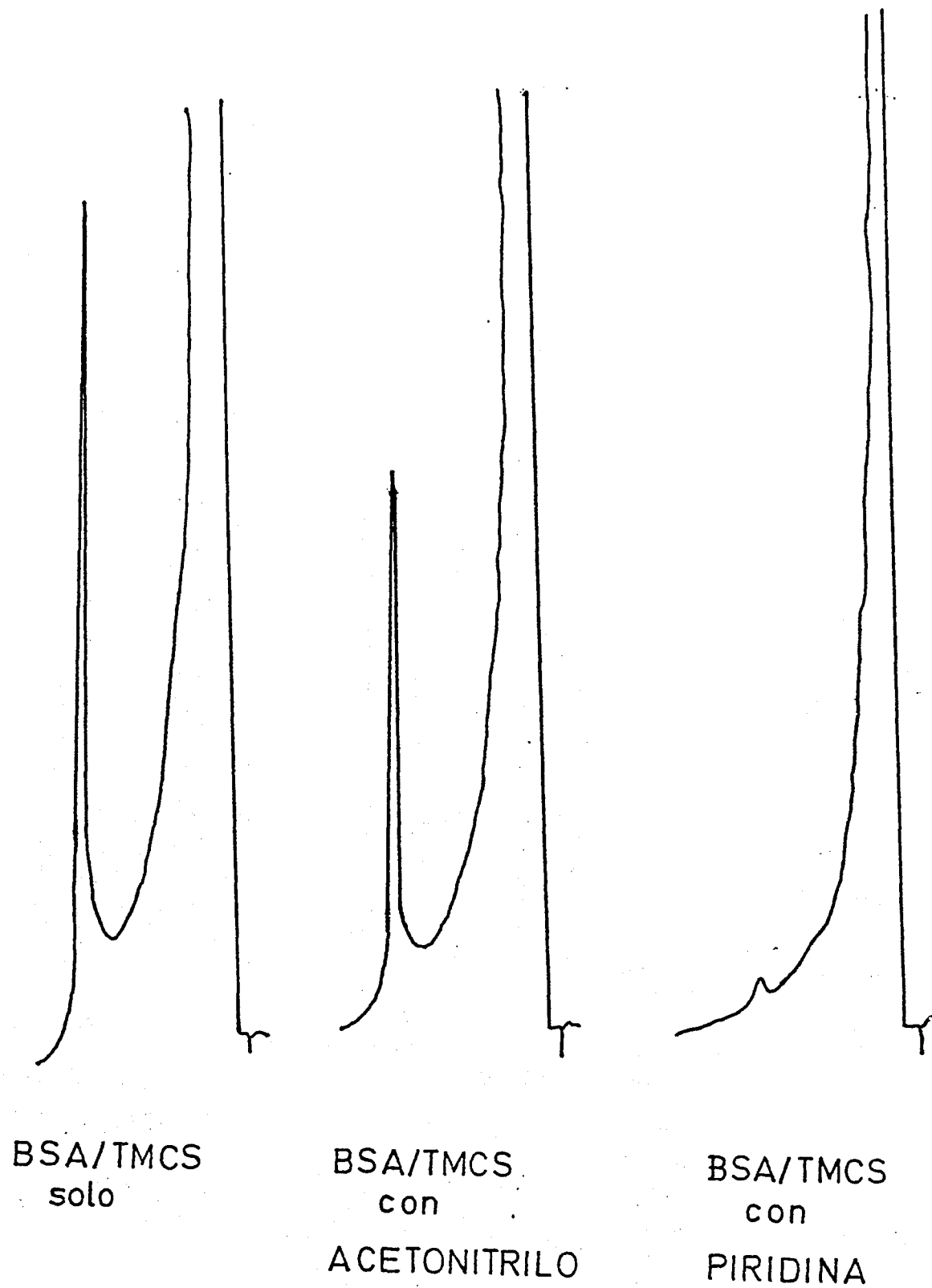


Figura 13 -

dad inyectada en cada caso es de 0,5 μg y el reactivo que se utilizó fue la mezcla BSA/TMCS.

El rendimiento más bajo se obtuvo con la piridina a pesar de haberse efectuado esta reacción 30 minutos a 60 $^{\circ}\text{C}$ y las dos otras 20 minutos a 20 $^{\circ}\text{C}$, ya que a esta temperatura no se formó ningún derivado con este disolvente. Este es el solvente más utilizado para la sililación en cromatografía de gases y muchas veces se le considera no sólo como un disolvente sino también como un catalizador (106). Pero, en ciertas reacciones, la presencia de la piridina puede provocar una disminución de la velocidad de sililación hasta anularla como en el caso de la n-octylamina o de las catecolaminas (109). En la tabla se presentan los resultados de la sililación de la histamina, actuando la piridina o el acetonitrilo de disolvente o con la mezcla BSA/TMCS sola. La mezcla BSTFA/TMCS utilizada en trabajos anteriores no se pudo emplear debido a problemas de disolución; en efecto, al añadir este reactivo al vial de reacción, se formó siempre un precipitado blanco que desaparecería únicamente después de la adición de piridina a acetonitrilo.

Este precipitado proviene probablemente de la formación de un clorhidrato de histamina por acción del triclorometilsilano. Su disolución se obtiene fácilmente cuando se crea un medio básico por adición de piridina, por ejemplo.

TABLA 6

Influencia del disolvente sobre el rendimiento de la reacción

Muestra	Volúmen de Piridina (μl)	Volúmen de Acetonitrilo (μl)	Volúmen de reactivo (μl)	Respuesta relativa HM (TMS) ₃
1	0	20	100	82
2	20	0	100	2
3	100	0	100	0
4	0	100	100	35
5	0	0	100	125

Los resultados obtenidos con los diferentes disolventes mostraron que estos provocan una disminución del rendimiento de la reacción de derivatización, lo que nos ha -- conducido a no utilizarlos y a trabajar unicamente con la - mezcla reaccionante de BSA/TMCS 4%.

Cinética de la reacción

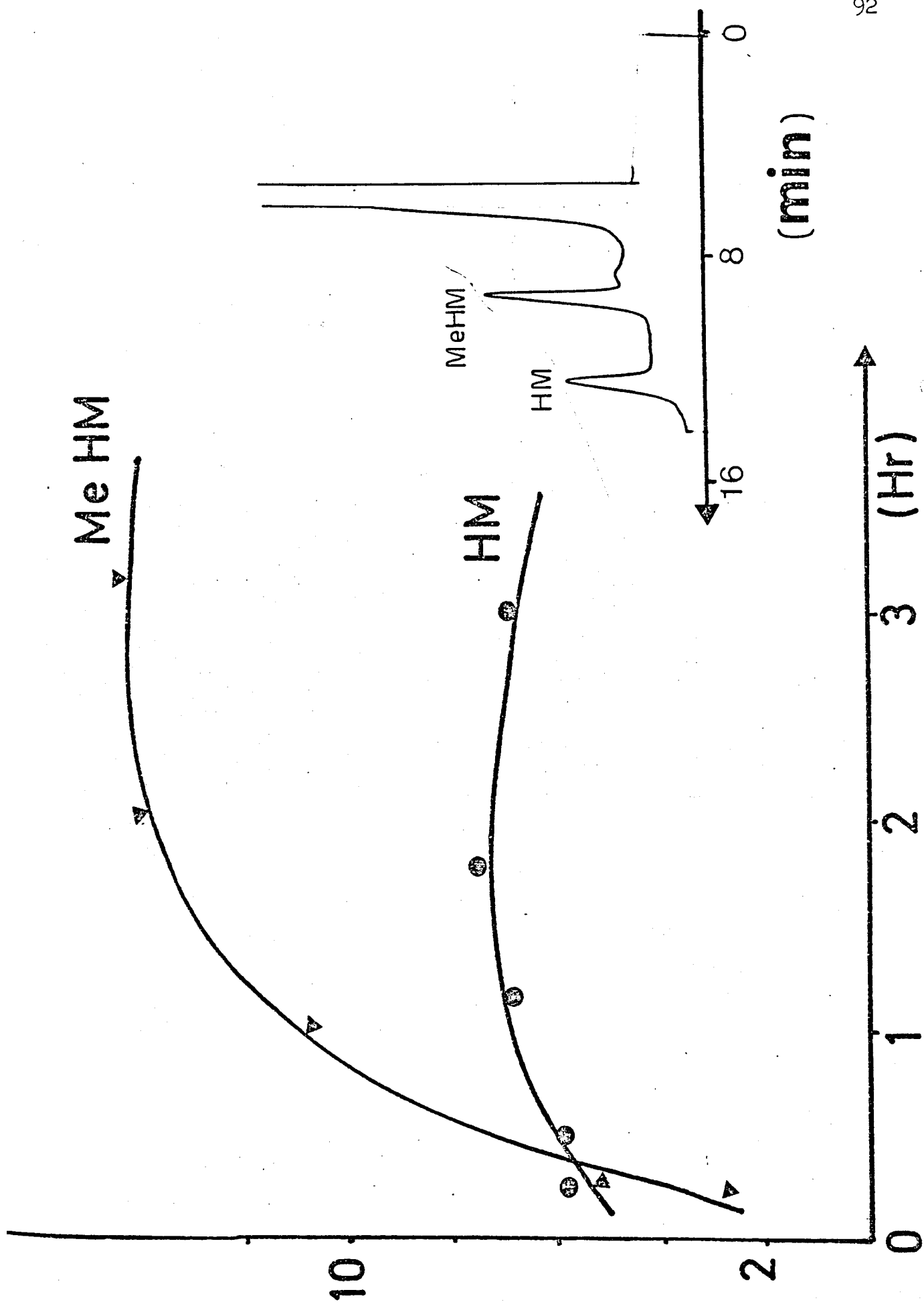
En la figura I4 se representan los resultados de la derivatización, obtenidos con la histamina y la 1,4 metil histamina. En ordenadas aparece la relación de alturas entre el pico del compuesto estudiado y el pico del patrón (C₁₈) habiéndose normalizado a una -- cantidad inicial similar para los tres compuestos. En abscisas se representa el tiempo de reacción en minutos. La reacción se llevó a cabo a 60 °C ya que a temperatura ambiente no se obtuvo ningún resultado apreciable cromatográficamente. La reacción de derivatización alcanza su máximo a 60 °C después de 60 minutos. En esta misma figura se puede ver el perfil cromatográfico de las dos aminas, obtenido con una columna 3% OV-17 y -- después de haberse efectuado la reacción en estas condiciones.

2.2.3.1.3. Acidos

Elección de la mezcla de reacción

Como para los compuestos anteriores, se hizo un estudio de la reacción de sililación de los ácidos, utilizando tres reactivos diferentes, las mezclas HMDS/ /TMCS, BSTFA/TMCS y BSA/TMCS. Se estudió especialmente

Figura I4.- Cinética de la reacción de sililación de la histamina y metilhistamina y perfil cromatográfico obtenido con una columna 3% OV-17.



la reacción de sililación con la mezcla BSA/TMCS 4% ya que era la mezcla adecuada para el análisis de las aminas. No fue posible utilizar la primera mezcla -- (HMDS/TMCS) por problemas de disolución encontrados, tanto para el ácido imidazol acético como para el ácido 1,4 metil imidazol acético; en efecto, el residuo seco dejado después de la evaporación bajo corriente de helio de la disolución patrón de cada metabolito no se disolvió al añadir el reactivo y uno de estos cuatro solventes: benceno, acetonitrilo, dioxano y dimetil formamida. El método de Sweely y al(163) que es el método más frecuentemente utilizado en la literatura para la sililación emplea el HMDS/TMCS con piridina. Pero, este disolvente, como se ha visto con las aminas provoca una disminución muy fuerte de rendimiento de reacción y por esto, no se puede utilizar.

Las sililamidas son buenos solventes y muchas veces se pueden utilizar solas. El BSA y el BSTFA se encuentran entre los dadores de grupos silil más -- fuertes y su poder se encuentra reforzado por adición de TMCS (76,77).

Los estudios de la reacción de derivatización

se llevaron a cabo con BSA/TMCS 4%, ya que este reactivo dió mejores resultados que la mezcla BSTFA/TMCS como se puede apreciar en la gráfica I5, en la cual se muestra la respuesta obtenida por inyección en la misma columna de 0,5 μ g de Me Im AA, después de reaccionar en las mismas condiciones (30' 60°C) con cada uno de los dos -- reactivos

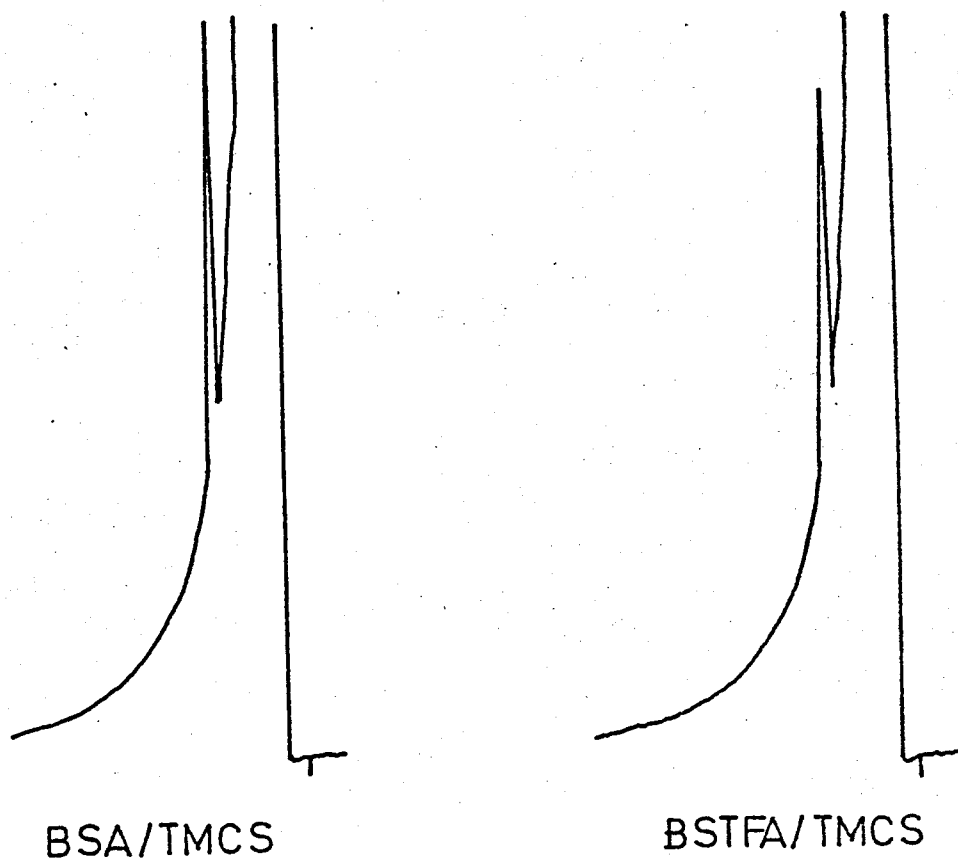


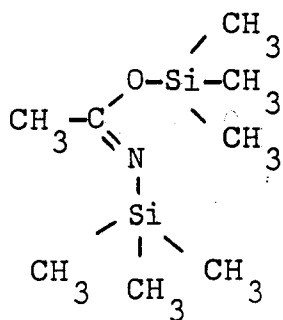
Figura I5

La respuesta obtenida con el BSTFA/TMCS representó

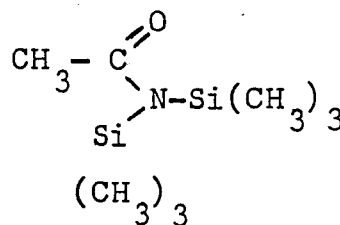
un 79,2% de la respuesta dada por los derivados formados con la mezcla BSA/TMCS.

2.2.3.2.- Estudio de la mezcla de reacción.
Estabilidad.

La mezcla de reacción escogida fue el BSA/TMCS 4%. El BSA es uno de los agentes de sililación más -- fuertes. Las estructuras propuestas para la bistrimetil sililacetamida son las representadas a continuación:



I



II

Giessler(54) estudió las dos estructuras posibles del BSA. Encontró que el momento dipolar del BSA (1,27 μ) corresponde a una estructura N, O - bis (TMS) pero el espectro de RMN a temperatura ambiente dió -- solamente una señal protonica para el grupo Si (CH₃)₃ en lugar de las dos esperadas. Esta señal se desdobra a 0°C.

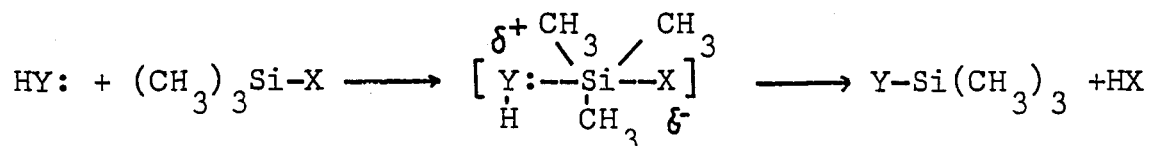
Pump y Rochow (127) después del estudio por RMN de seis otras bis (TMS) amidas, pusieron en evidencia la movi lidad del grupo trimetilsilil entre la posición N- y O:

La reactividad del BSA se puede explicar a través de las dos estructuras: la presencia del segundo grupo TMS compite siempre para fijarse con el nitrógeno o el oxígeno y así debilita el enlace del primer grupo.

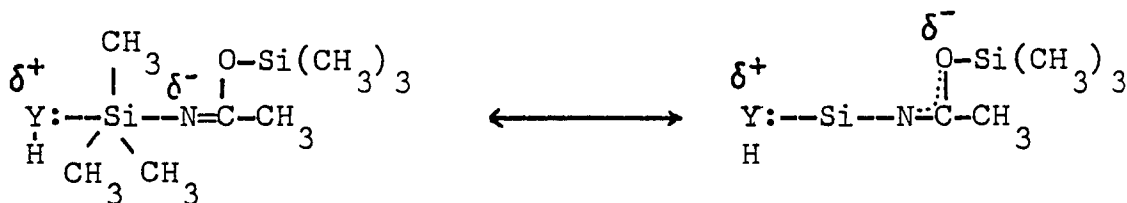
Ultimamente, no obstante, se acepta como más probable la estructura I con la posible oscilación de los grupos TMS entre las dos posiciones dentro de la molecula (75).

Otro punto que permite explicar la mayor fuer za del BSA en relación a otros reactivos de sililación es su posibilidad de formar un anión en el estado de - transición y estabilizar la carga negativa así creada (77):

En efecto, la reacción general de sililación ocurre según el esquema siguiente formándose un zwitterion como compuesto intermediario:



En el estado de transición tendremos, con el BSA:



Esto provoca una disminución de la energía libre de activación.

Por otra parte, la fuerza del BSA se incrementa debido a la presencia del trimetilclorosilano que actúa de catalizador ácido: tiene lugar una protonación del BSA debilitando así todavía más el enlace TMS (N - O-).

Por todo esto, se utilizó una mezcla de reacción BSA/TMCS al 4% (v/v) que, una vez preparada se conservó a la nevera a (+4 °C), su estabilidad mostró ser de un mes por lo que mensualmente tuvimos que prepararla.

2.2.3.3. ESTABILIDAD DE DERIVADOS DE LAS AMINAS Y DE LOS ACIDOS.

El estudio de la estabilidad de los derivados

formados muestra que estos empiezan a degradarse después de permanecer unas 8 horas en la nevera a (+4 °C) o tres horas a temperatura ambiente. Debido a esto, los derivados se analizaron siempre inmediatamente después de su forma ción para evitar cualquier posible variación en la res- puesta.

2.2.3.4.- INDICES DE RETENCION

Se intentó realizar esta separación con fases cromatográficas de diferente polaridad: para esto se utilizó una fase OV-17 de polaridad media y una fase casi apolar, la SE-30. No se obtuvo ningún resultado positi vo con esta última como se muestra en la figura 17. Los índices de retención, expresados en forma de índices de Kovats calculados a partir de una separación cromatográ fica sobre una fase OV-17 se muestran en la tabla 7.

TABLA 7

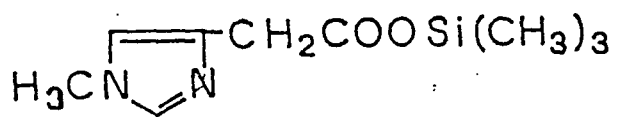
DERIVADO	FASE 3% OV-17
1,4 Me Im AA (TMS)	1.975
Im AA (TMS) ₂	2.037
1,4 Me HM (TMS) ₂	2.126
HM (TMS) ₃	2.180

Indices de retencion expresados en Indices de Kovats de los derivados trimetilsililados sintetizados en una fase OV-I7.

La estructura correspondiente a los picos cromatográficos obtenidos con los ácidos y las aminas se indica en la figura I6. En el capítulo 4 referente a -- espectrometría de masas se estudia la estructura de estos derivados.

2.2.3.5.- LIMITES DE DETECCION Y CURVAS DE CALIBRACION

Se llevó a cabo un estudio de la sensibilidad del detector de ionización de llama para distintas cantidades inyectadas de los derivados sililados. La respuesta para la mayoría de los casos fue buena, llegándose a detectar cantidades del orden de 10ng. Sin embargo, el rendimiento para la histamina no resultó tan bueno, debido seguramente a bajos rendimientos en la reacción de derivatización y a posibles pérdidas por degradación en las líneas del cromatógrafo. En la figura 16 aparece un cromatógrama de los cuatro derivados analizados conjuntamente en una columna 3% OV-17 y 3% SE-30. Se pone de manifiesto, en el primer cromatograma, en base a la cola del pico correspondiente a la histamina el proceso de - retención por adsorción. Por otra parte a partir del estudio de la reacción de derivatización, ya se constató que la respuesta dada por una cantidad de ácidos era el doble o el triple que la respuesta obtenida con

ACIDOS

MeImAA(TMS)

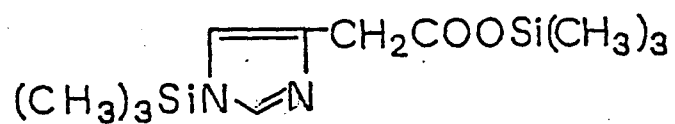
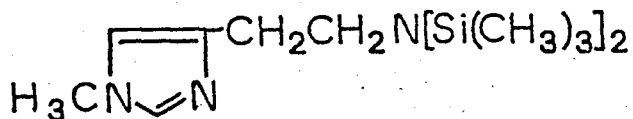
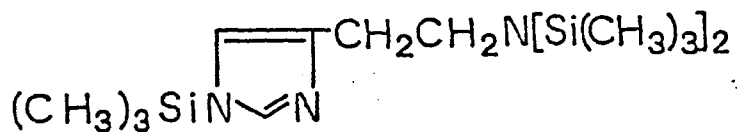
ImAA(TMS)₂AMINASMeHM(TMS)₂HM(TMS)₃

Figura 16. - Estructura de los derivados sililados sintetizados.

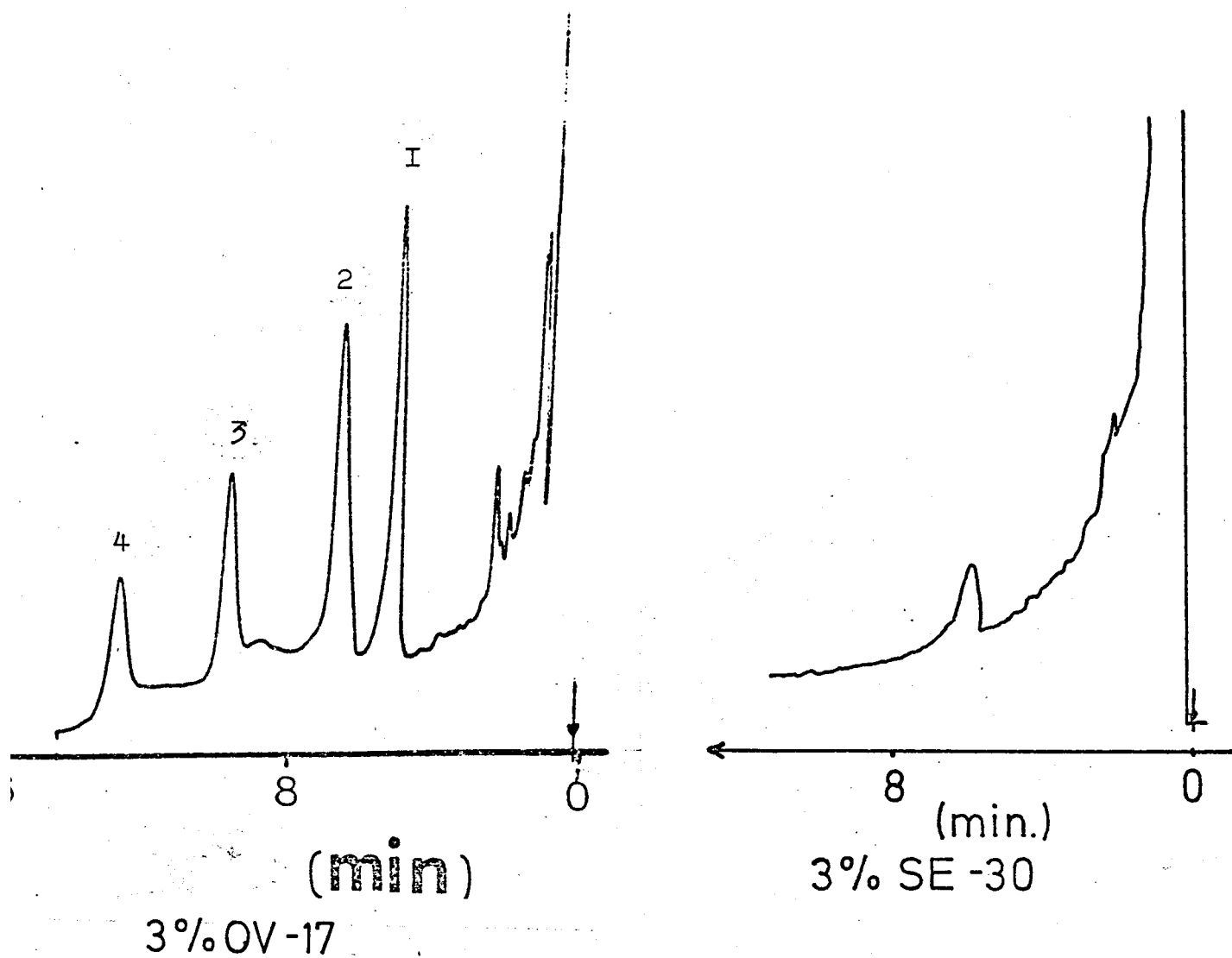
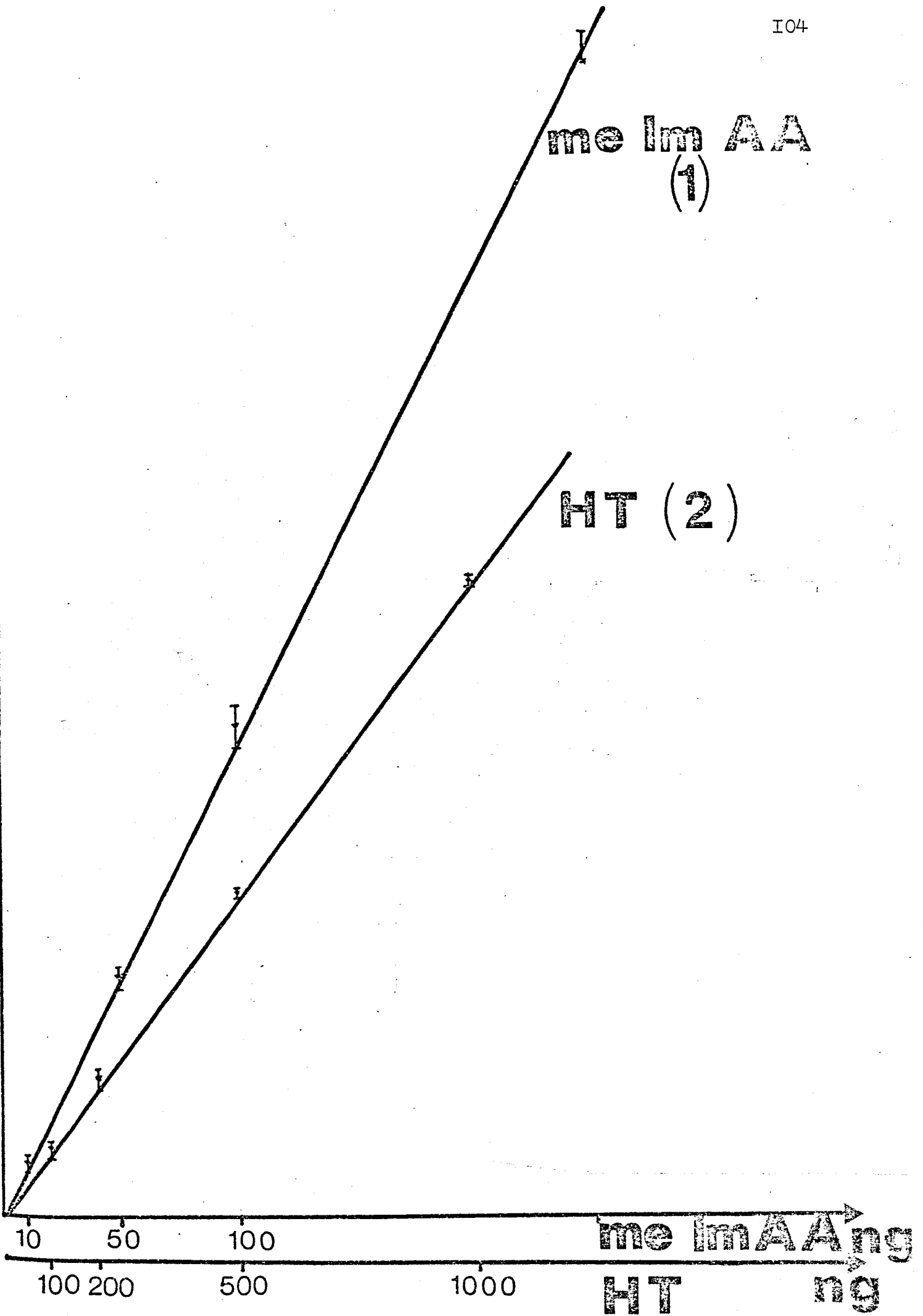


Figura I7 - Perfil cromatográfico de los 4 derivados anali-
zados en una columna 3% OV-17 y 3% SE-30.

I:MeImAA , 2:ImAA , 3:MeHM , 4:HM.

Figura 18.- Curvas de respuesta del ácido 1,4 metil imidazol acético y de la histamina en su forma sililada.



la misma cantidad de aminos.

Esto se traduce directamente en la curva de respuesta representada en la figura 18, vemos que estas curvas son lineales a nivel del nanogramo y que el nivel de detección para los ácidos es de 10ng y de 100ng para las aminos. Las dos rectas pasan por el origen y nos permiten pensar que los principales problemas de absorción o de degradación han sido resueltos satisfactoriamente. Los tratamientos aplicados para optimizar el sistema cromatográfico y el sistema espectrométrico se exponen más adelante en el capítulo 5 .

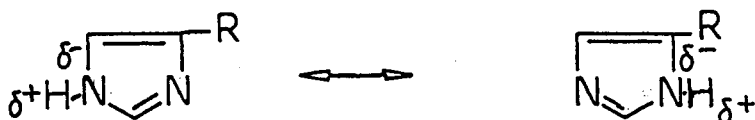
2.2.3.6.- MECANISMO DE LA REACCION DE SILILACION

2.2.3.6.1.- AMINAS

El grupo amino es uno de los grupos químicos más difíciles de sililar. Sin embargo, en el caso de la metil histamina y de la histamina, en condiciones relativamente suaves de derivatización se ha podido sustituir los dos protones de la amina primaria por dos grupos trimetil-sililo a pesar de los problemas estéricos previsibles. En el caso de la histamina, un tercer grupo trimetilsililo ha sustituido al protón de la amina secundaria del anillo imidazol. Como se ha indicado anteriormente,

no fue posible utilizar un disolvente para la reacción debido a la gran disminución de rendimiento que provocaba. Hay que resaltar la importancia de la basicidad del núcleo imidazol para explicar la fácil sililación de -- estas dos aminas.

En efecto, según su facilidad de protonación, las aminas reaccionan más o menos rápidamente. Por ejemplo, se ha demostrado que la dietilamina, con un carácter básico más pronunciado que la n-butilamina, se silila más fácilmente. Se puede considerar que el átomo de hidrógeno del núcleo imidazol es prácticamente ácido ya que los electrones del átomo de nitrógeno se encuentran deslocalizados sobre el anillo heterocíclico, ya que así aumenta la aromaticidad del anillo:



La fácil sustitución de este átomo de hidrógeno

viene forzada, también, por la existencia de formas tautómeras, como se indicó anteriormente en la introducción.

Debido a que no se ha podido aislar derivados parcialmente sililados, se puede considerar que todos los grupos silil entran prácticamente juntos en la molécula de HM o de Me HM. La menor reactividad teórica de la amina secundaria del núcleo viene aumentada por la basicidad de este mismo y por el aumento de aromaticidad que implica la pérdida del protón. El trimetilclorosilano no facilita la protonación y, la histamina, a través del núcleo imidazol actúa de propio solvente, estabilizando en parte, la carga positiva del estado de transición. El equilibrio de la reacción se desplaza en el sentido de formación de los derivados debido a la presencia de un exceso de reactivo. (120)

2.2.3.6.2.- ACIDOS

Los ácidos se sililan más fácilmente que las aminas debido a varios factores:

- Primero, los ácidos tienen más facilidad para perder un protón a nivel de la función ácida de la cadena lateral. Esto, junto con el carácter nucleofílico del ión así formado juega un papel importante en la reacción de sililación. Por otra parte, el átomo de

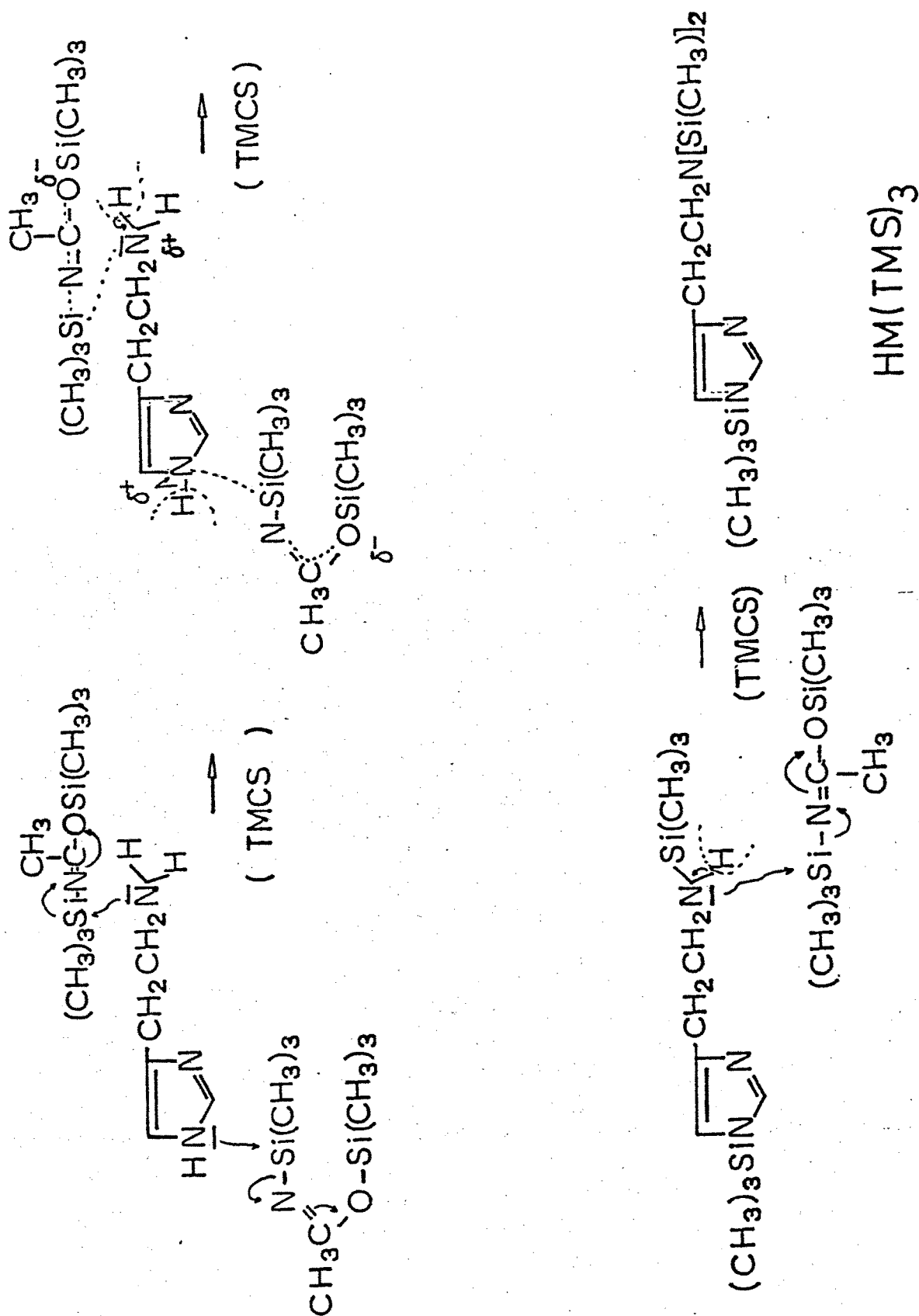


Figura 19.-Mecanismo de reacción de sililación de la histamina.

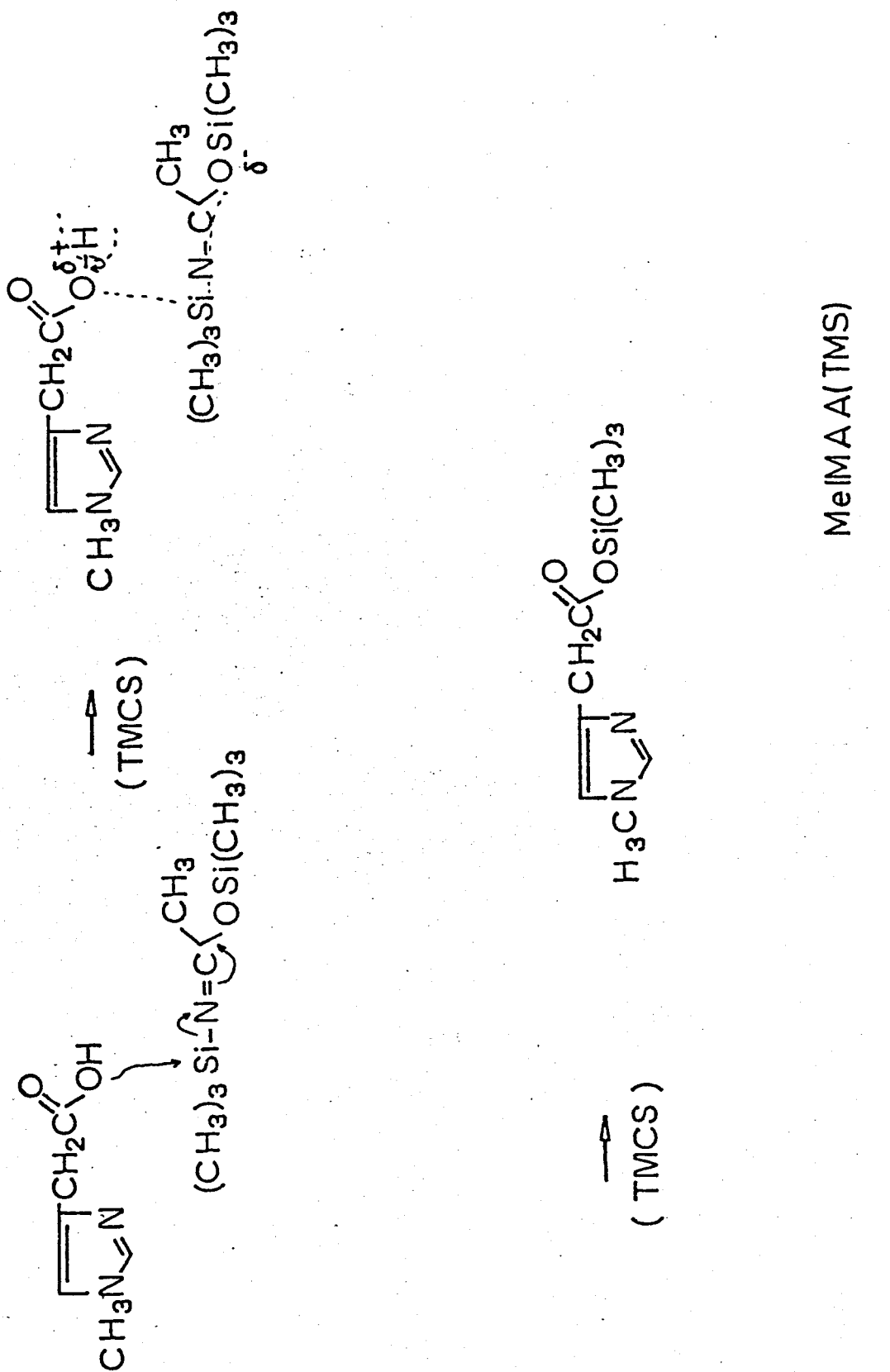
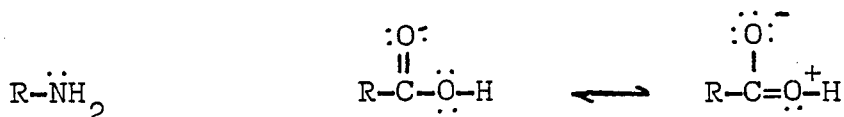


Figura 20.-Mecanismo de reaccion de sililacion del acido metilimidazol acético.

oxigeno es más efectivo que el átomo de nitrogeno para formar un enlace con el grupo trimetisilil debido a -- que tienen dos dobles de electrones libres cuando el nitrogeno sólo tiene uno:



Por todo esto, la reacción de sililación de las aminos y de los ácidos se puede representar según el esquema de la figura I9 y 20 , actuando el trimetilclorosilano de catalizador ácido para facilitar la eliminación de los diversos protones.

2.2.4. DISCUSION

El proceso de sililación de la histidina y de sus metabolitos para la obtención de derivados volátiles para su análisis por cromatografía de gases, resultó satisfacto

factorio excepto en el caso de los dos aminoácidos, histidina y metil histidina para los cuales no se consiguió formar ningún derivado volátil. La síntesis de los derivados sililados tiene lugar en un solo paso, a 60 °C durante una hora con la mezcla BSA/TMCS 4%. Para obtener un rendimiento máximo de esta reacción, se tiene que evitar el uso de cualquier tipo de disolvente (piridina, acetonitrilo,...) y asegurar la eliminación de toda traza de metanol proveniente de las disoluciones patrón. En estas condiciones, se obtiene un perfil cromatográfico completo de los cuatro derivados en unos ocho minutos.

Los trabajos relativos a la formación de derivados similares (Butts y Navert) describen la formación de dobles derivados con la histamina y la metil histamina y analizan estas sustancias a nivel de microgramo.

El método de reacción que describimos es nuevo en cuanto permite trabajar a unos niveles más relacionados con los niveles fisiológicos de estas sustancias y permite la obtención de un solo tipo de derivado para cada sustancia. Para asegurar su reactividad, la mezcla de reacción BSA/TMCS tiene que ser preparada extemporaneamente.

Por otra parte, el análisis de estos derivados se tiene que realizar lo más rápidamente posible, ya que, como lo puso de relieve F. Colin, son muy sensibles a la luz e inestables. (35)

Las consideraciones relativas al mecanismo de sililación de la histamina y del ácido imidazol acético permiten poner en evidencia la alta reactividad del -- núcleo imidazol, así como el proceso de formación de los derivados de las aminas y de los ácidos.

Capitulo 3.

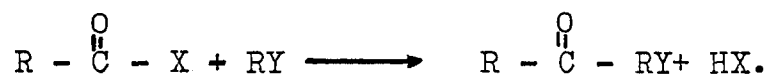
3.1.- INTRODUCCION

El estudio de la reacción de sililación de los tres grupos de compuestos a analizar puso de relieve varios problemas, entre ellos; la no obtención de derivados cromatografiables para la histidina y la metil histidina, lo que impide, a priori, el estudio del anabolismo de la histamina.

Por esto, nos propusimos el estudio de la --- reacción de formación de derivados acilados de la histidina, metil histidina, histamina y de la metil histamina ya que a través de estas cuatro sustancias se puede controlar el metabolismo de la histamina como se puso de relieve en la figura 2 . Por otra parte, a partir de la sintesis de estos derivados, se pensó alcanzar pesos moleculares más altos y por tanto de más interés para un estudio biológico. Finalmente, la reacción de acilación, representa una alternativa válida a la reacción de sililación --dando derivados más estables, sobre todo con las aminas (22).

3.2.- ANTECEDENTES

La reacción de acilación implica la introducción de un grupo acilo ($R - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} -$) en una molécula, por sustitución de uno de los átomos de hidrógeno, según la reacción



Los grupos químicos susceptibles de ser acilados son numerosos y los principales se indican en la -- tabla 8 .

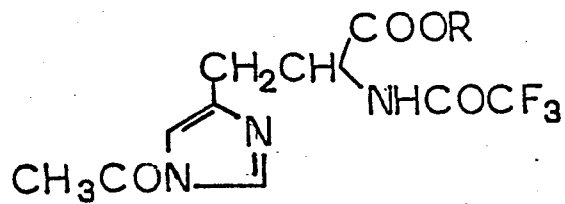
Los compuestos que nos interesan analizar con tienen grupos amino (I,II y III) y grupos ácidos. El -- grupo ácido no está contenido entre los grupos químicos de la tabla 8 por lo que se tendrá que bloquear a través de la acción de otro reactivo (reactivo de metilación o de sililación). Por esto, todos los trabajos publicados sobre la acilación de los aminoácidos realizan esta derivatización en dos etapas para formar finalmente los ésteres N-trifluoroacetil metílicos (TAM) como lo reporta Bertilsson L. (12) o los ésteres N-trifluoroacetil butíricos (TAB) como lo describen Roach y Gehrke (135)

Solamente el grupo de Gehrke presenta un deriu

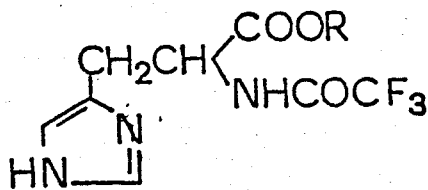
PRINCIPALES GRUPOS FUNCIONALES SUSCEPTIBLES DE SER ACILADOS

ESTRUCTURA QUIMICA	NOMBRE
$\begin{array}{ccc} -\text{NH}_2 & -\text{NH}- & \begin{array}{c} \\ -\text{N}- \end{array} \end{array}$	aminas primarias, secundarias y terciarias.
-NH-CO-R	amidas
$\begin{array}{ccc} -\text{CH}_2\text{OH} & \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ -\text{CH}- \end{array} & \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ -\text{C}- \\ \end{array} \end{array}$	alcooles primarios, secundarios y terciarios.
-SH	grupos tiol
>C=C<	compuestos insaturados,

En un trabajo de revisión sobre la cromatografía de gases de los aminoácidos, E.Evans y P.Nichols (48), describen también los problemas inherentes a la cromatografía de la histidina: obtención de varios derivados o de un rendimiento de derivatización muy bajo, lo que se atribuye a la formación de la sal imidazolil de la histidina durante la esterificación del grupo COOH , sal que se disocia en el bloque de inyección(45) o si la acilación se realiza a temperatura alta, se obtiene un derivado diacilado que se transforma fácilmente en derivado monoacilado debido a la gran sensibilidad a la hidrólisis del protón esterificado del grupo imidazol (35,43,155). Estas diversas estructuras quedan reflejadas en el esquema siguiente: (Fig. 21.).



HD diacilada



HD monoacilada

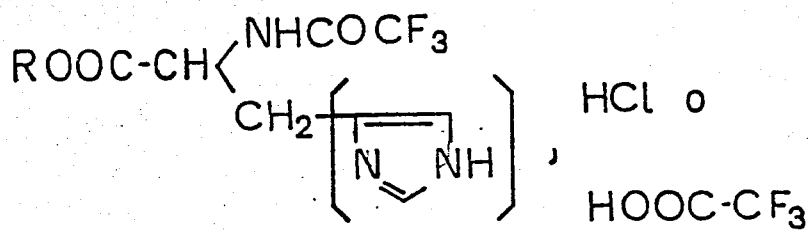
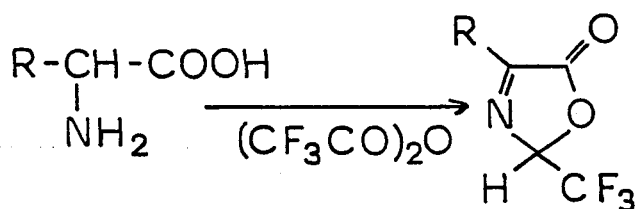
sal del alquil ester de
la N-TFA HD

Figura 2I. - El derivado diacilado de la histidina y sus productos de hidrolisis.

En uno de los últimos trabajos publicados, Pearce (123) describe la formación del ester N-heptafluorobutiril isobutilado de la histidina, derivado que se obtiene solamente si se toman ciertas precauciones: adición de un -- antioxidante y calentamiento de la muestra antes de su inyección con el anhídrido etoxifórmico a 110 °C durante cinco minutos. Por todo esto, consideramos que se tenía que estudiar una reacción de derivatización original para la histidina y su derivado metilado debido a los - problemas presentados por los derivados descritos en la literatura. En base a un trabajo de Weygand (179) en el cual describe la formación de 2 - trifluorometil - oxazo lonas sustituidas en 4 por reflujo de diferentes amino- ácidos con el anhídrido trifluoroacético según la reac- ción:



se decidió estudiar la reacción de acilación directa de la histidina y la metilhistidina.

Para la cromatografía de la histamina y de la metil histamina, la problemática es muy similar: formación de varios derivados e inestabilidad de la muestra. Para estos compuestos, debido a la diversidad de los -- grupos funcionales (aminas primarias, secundarias y terciarias, nitrógeno imino), no es posible obtener a partir de un solo reactivo un derivado único para cada metabolito con una separación y un tiempo de elución adecuados (119).

Se decidió estudiar la reacción de acilación directa de las cuatro sustancias apoyándonos en todos estos datos.

3.3.- METODOS

Debido a la gran estabilidad del núcleo imidazol y para evitar la formación de derivados fácilmente hidrolizables, se estudió la reacción de acilación en condiciones lo suficientemente drásticas como para evitar la degradación rápida de los derivados, así como la obtención de múltiples derivados.

3.3.1.- AMINOACIDOS

Debido a los resultados negativos obtenidos con la reacción de metilación se estudió la reacción de acilación directa de la histidina y de la metil histidina, intentando formar un anhídrido de ácido y una amina acilada. Para estos dos compuestos, se hicieron reaccionar cantidades del orden de 100 a 200 μg con - 100 a 200 μl de reactivo acilante (PFPA, HFBA o TFA) - evitando toda traza de humedad y estudiando la influencia de un disolvente. Los viales de reacción se mantuvieron a distintas temperaturas (desde ambiente hasta 100 $^{\circ}\text{C}$) durante tiempos variables (0 - 6 horas). Las muestras enfriadas se evaporaron bajo corriente de helio y fueron redisueltas en acetonitrilo.

3.3.2.- AMINAS

El estudio de la reacción de acilación de las aminas se llevó a cabo de un forma similar al estudio de la reacción de acilación de los aminoácidos, utilizando, también, los diferentes agentes de acilación. El estudio cromatográfico se realizó con columnas 3% OV-225, 3% OV-17 y 3% SE-30.

Los anhídridos TFA, PFP y HFB se pueden utilizar indiferentemente ya que difieren ligeramente en reactividad y volatilidad. Así, se considera el anhídrido TFA -- como el más reactivo y el más volátil. Por otra parte, para muchos compuestos, los derivados HFB tienen mayor estabilidad y mayor sensibilidad con un detector de captura de electrones, pero los derivados PFP necesitarían temperaturas de análisis más bajas. Las condiciones de trabajo con estos tres reactivos son muy similares. En general los derivados son fáciles de sintetizar y gozan de buenas propiedades cromatográficas.

3.4.- RESULTADOS

3.4.1.- REACCION DE ACILACION CON EL PFP

3.4.1.1.- AMINOACIDOS

En la literatura, los aminoácidos se esterifican antes de su acilación ya que el reactivo de acilación reacciona únicamente con el grupo amino y no con el grupo ácido. En un intento de conseguir la formación de un --

anhídrido de ácido se hizo reaccionar la histidina y la metil histidina directamente con el agente acilante -- (PFPA, HFBA o TFA) y el acetato de etilo o el acetoni-trilo de disolvente.

Las primeras pruebas de derivatización en función del tiempo (0 - 3 horas) y de la temperatura -- (20 °C - 100 °C), resultaron negativas, lo que nos indujo a estudiar esta reacción paso a paso, primero la fase de evaporación, después la reacción de derivatización -- (cantidad de reactivo y de disolvente, temperatura y tiempo de reacción) la evaporación de la mezcla de reacción y la elección de un disolvente y finalmente, las -- condiciones cromatográficas.-ver figura 22-.

Se ha expuesto anteriormente que los derivados de la histidina y de la histamina son fácilmente hidrolizables. Por esto, se estudió especialmente la etapa de evaporación para asegurar la ausencia de toda traza de humedad. Se eliminó la posible presencia de agua en el gas de evaporación utilizando helio seco, para lo cual se hizo pasar el gas a través de un tubo relleno de -- silicagel. Esta precaución no modificó los resultados obtenidos.

Seguidamente, se intentó eliminar las posibles trazas de agua contenidas en el metanol de la di

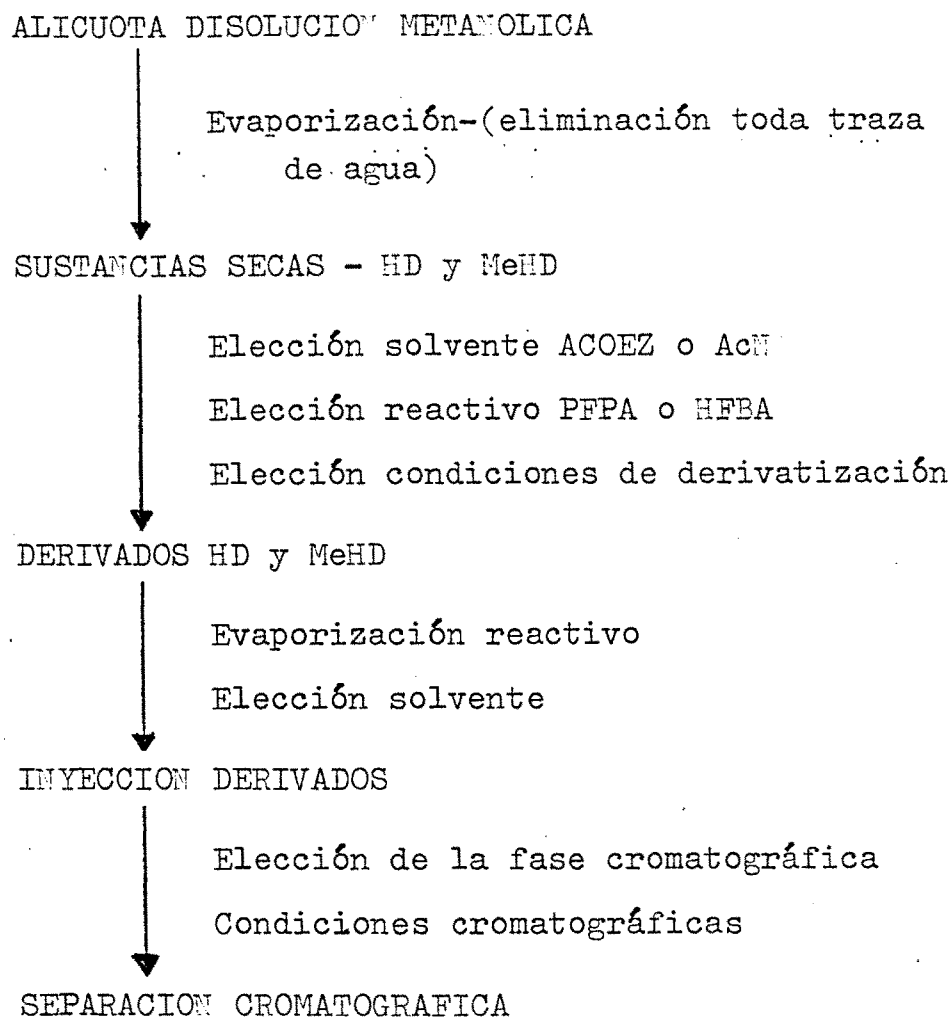
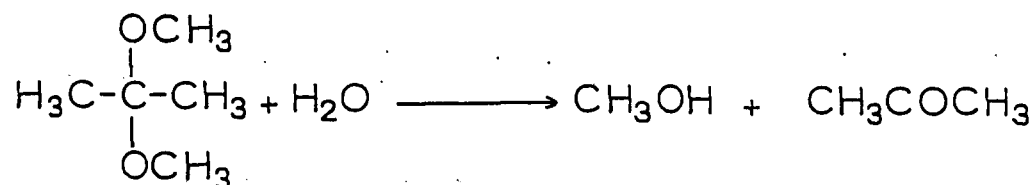


Figura 22.- Esquema del proceso de formación de derivados de la histidina y metil histidina.

solución stock utilizando el método de Brooks: se añade dimetoxipropano al vial de reacción que puede reaccionar con el agua presente y formar acetona y metanol, dos disolventes muy volátiles:



La reacción se realizó de la siguiente forma: una vez llevada a cabo la evaporación de la solución metanólica de histidina y metilhistidina, se añadió al vial 20 μl de dimetoxipropano. Después de agitar se mantuvo el vial a temperatura ambiente diez minutos. Se evaporó la acetona y el metanol formados, y se añadió el PFFA, la reacción se realizó a 70 $^{\circ}\text{C}$ en la estufa durante una hora. En estas condiciones, ningún resultado positivo tampoco se obtuvo.

El tercer tipo de pruebas que se realizaron fue en base a la utilización de una placa caliente o de un baño de arena. Debido a la alta estabilidad de la histidina y de la metil histidina que se refleja en el cuadro adjunto: (Tabla 9).

% Recuperación	Hidrolisis a 110°C en:			
	6N HCl			3N Ac. p-Tolueno sulfurico.
	24 h.	48 h.	72 h.	
Histidina	98,8	96,2	96,0	97,2
Metil histidina	98,2	97,2	96,7	98,9

TABLA 9

La recuperación de las sustancias se calculó en relación a la estabilidad de un standard interno (4-PEP) -- (Walizemski K. 1977). (175).

se decidió llevar a cabo la evaporación utilizando un baño de arena cuya temperatura se fijo a 104 °C y en el cual se pusieron los viales de reacción con la disolución metanólica. No fue necesario utilizar helio seco ni otras precauciones como enfriar el vial en un ambiente anhidro. Una vez la disolución patrón evaporada, se enfrió el vial antes de añadir la mezcla de reacción y ponerle a la estufa. Solamente utilizando el sistema de evaporación descrito fue posible formar unos derivados

acilados cromatografiables.

Se estudió la posible mejora de esta evaporación realizándola de nuevo con helio desecado o con adición de dimetoxipropano. Con ninguna de las dos modificaciones se obtuvieron mejoras. Así, las condiciones de evaporación quedaron fijadas como sigue: baño de arena a 104 °C y corriente de helio de 5 a 10 minutos según el volumen a evaporar. Se deja enfriar el vial y a continuación se realiza la reacción de acilación.

R.C. Hammond (66) indica que las aminas terciarias y las bases heterocíclicas como la piridina, catalizan las reacciones de acilación actuando, probablemente, por conversión de los anhídridos de ácido, como el anhídrido pentafluoropropionico en iones más reactivos, -- los iones de acilamonio. Por esto, la reacción de acilación se estudió en presencia y ausencia de la piridina, así como las condiciones de duración y temperatura de la reacción. Las pruebas realizadas para estudiar la influencia de la piridina sobre el rendimiento de la derivatización mostraron que este disolvente, como en el caso de los derivados silanizados, provoca una fuerte disminución del rendimiento y, por esto, los estudios cromatográficos se realizaron empleando únicamente el PFP. Los perfiles cromatográficos correspondientes a los derivados de la histidina y de la metil histidina obtenidos en presencia y ausencia de la piridina se pueden apreciar en la figura 23.

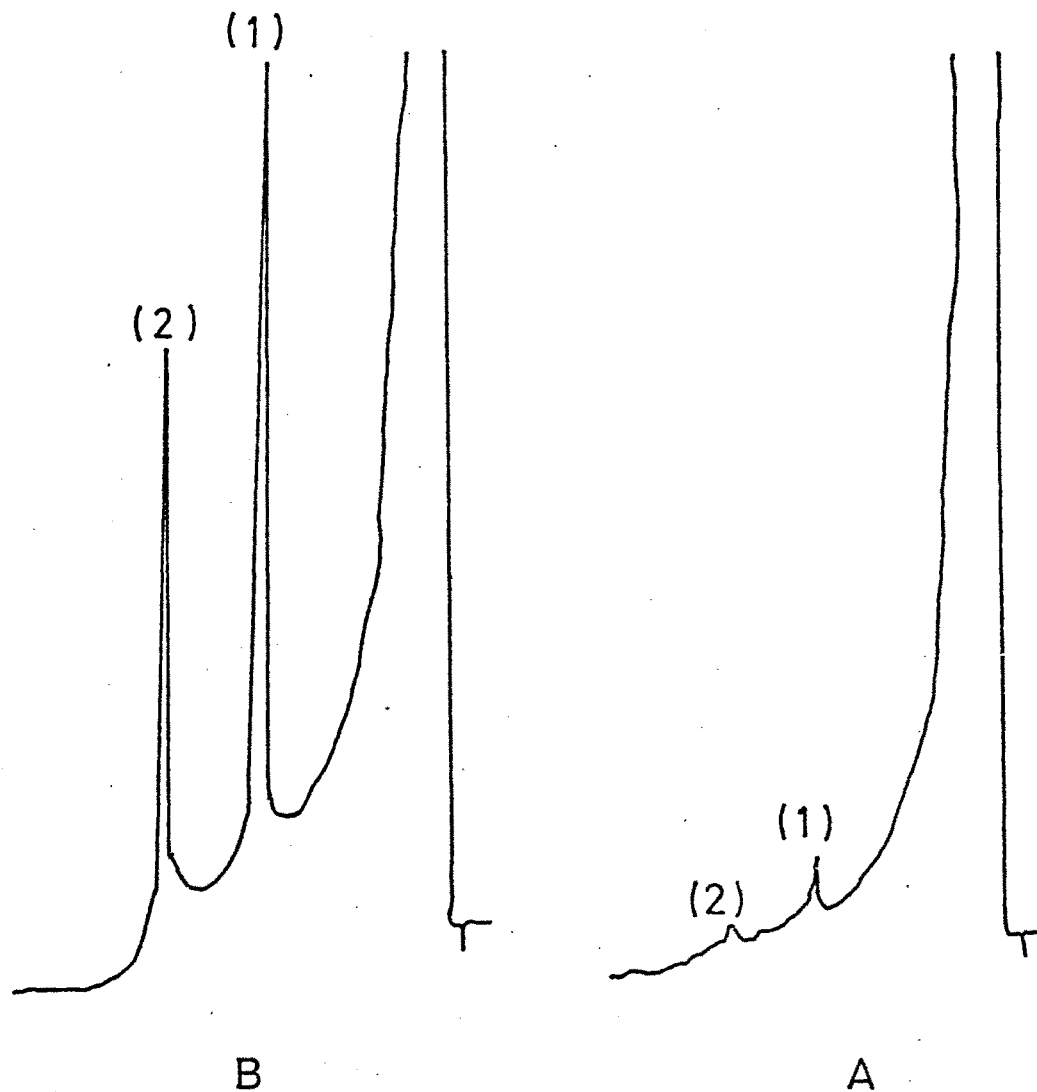
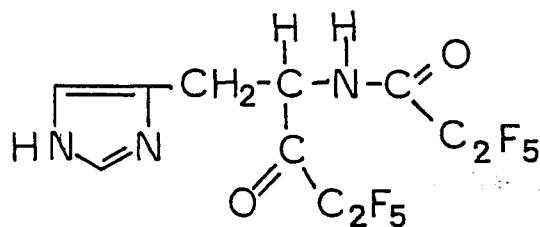
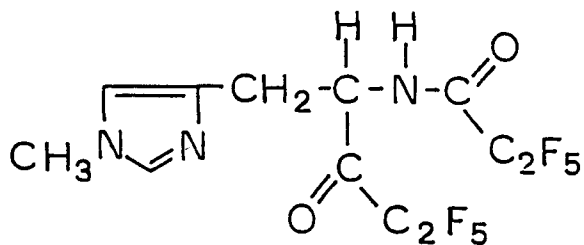


Figura 23.- Separación cromatografica de los derivados pentafluoropropionados de la (1) MeHD y (2) HD -
A) En presencia de piridina. B) En ausencia de -
piridina.

Por esto, la reacción de acilación se estudió utilizando el reactivo solo. En la figura 24 se presentan graficamente los resultados obtenidos: en ordenadas aparece la relación de alturas entre el pico del compuesto estudiado (HD o Me HD) y el pico del patrón (C₂₀). En abcisas se representa el tiempo de reacción en minutos. Los dos picos cromatográficos que se citan como HD - 2PFP y Me HD - 2PFP corresponden a los compuestos siguientes:

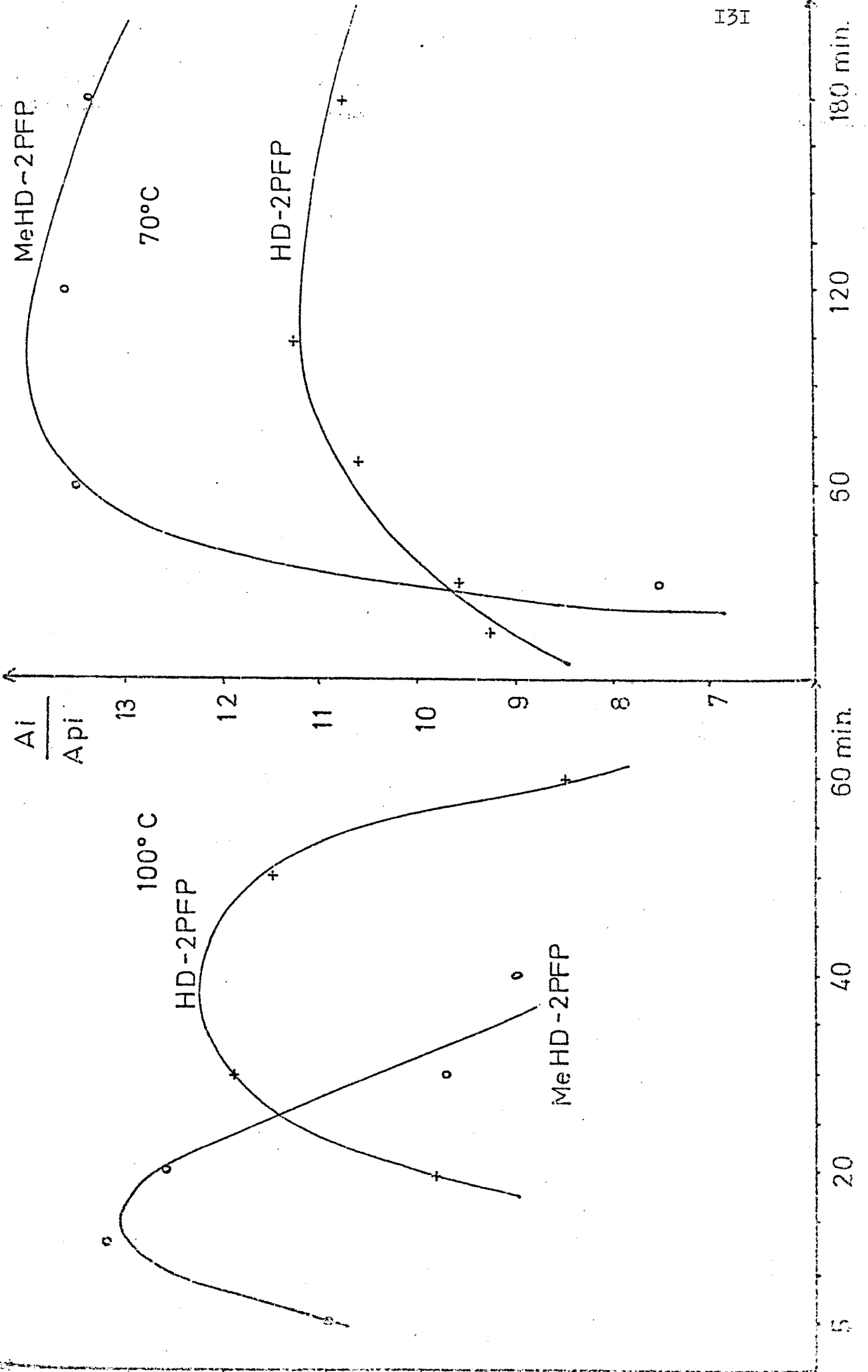


HD-2 PFP



MeHD-2PFP

Figura 24.-Representacion gráfica del rendimiento de la reacción de perfluoroacilación de la MeHD y HD con PFFPA en función del tiempo y de la temperatura.



Según los resultados de la figura 24, resultó prácticamente imposible asegurar un buen rendimiento de reacción de perfluoroacilación conjuntamente para los dos aminoácidos a 100 °C. En cambio, fue relativamente fácil obtenerlo trabajando a 70 °C y con un tiempo de reacción de 90 min.

Un estudio de la utilización de diversos solventes (benceno, acetonitrilo, acetato de etilo), en cantidades diversas mostró que los resultados más satisfactorios se obtienen empleando el reactivo solo, en gran cantidad.

Así, la reacción de derivatización de los aminoácidos se realizó de la forma siguiente:

Se llevó a sequedad bajo flujo de helio y en el baño de arena a 104 °C el alicuota de disolución metanólica durante 5 a 10 minutos, según el volumen de la muestra. Una vez el vial enfriado, se le añade 100 a 200 µl. de anhídrido pentafluoropropiónico, se agita con el rotamixer y se deja 90 minutos a la estufa a 70 °C. El reactivo se evapora después de enfriar el vial y se disuelve la muestra en acetonitrilo para su análisis.

3.4.1.2.- AMINAS

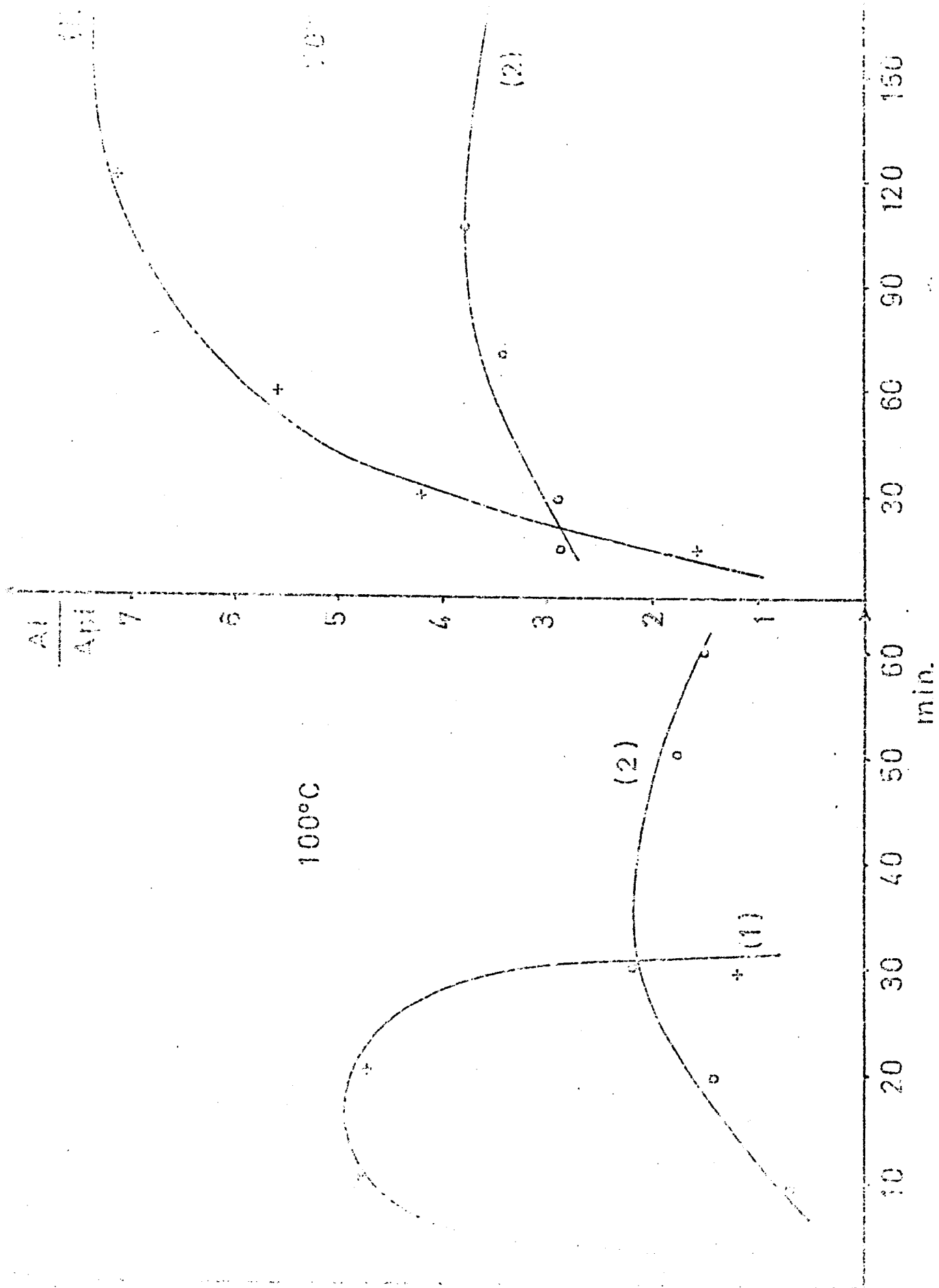
La derivatización de la histamina y de la metil histamina se realizó en una sola etapa como en el caso de los aminoácidos. El estudio de la reacción de acilación se llevó a cabo a 70 °C y a 100 °C. Los resultados se pueden apreciar en la figura 25. Aquí, también observamos una inestabilidad de los derivados formados a 100 °C. La temperatura de 70 °C permite obtener mejores rendimientos con un tiempo más largo de reacción.

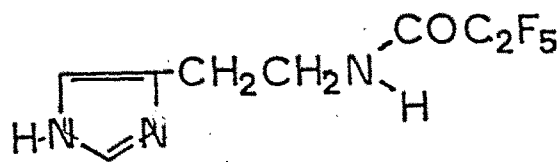
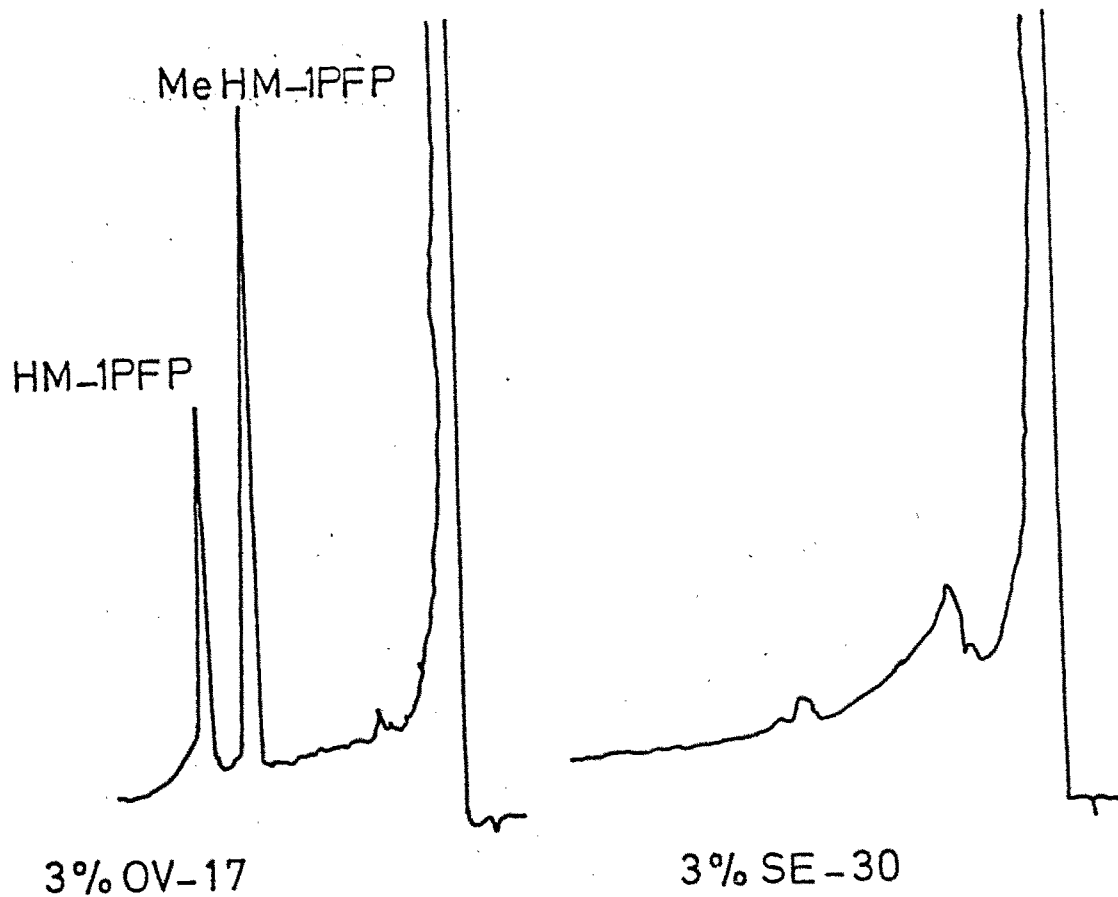
Para estas dos aminas, el rendimiento de la -- reacción fue más alto utilizando el reactivo sólo que -- empleando una mezcla reactivo/solvente (piridina, acetato de etilo, acetonitrilo, benceno) en proporciones variables.

Debido a esto, la reacción de perfluoroacilación de las aminas resulta similar a la reacción de perfluoroacilación de los aminoácidos y, por esto, las cuatro sustancias se pueden derivatizar conjuntamente en una sola etapa.

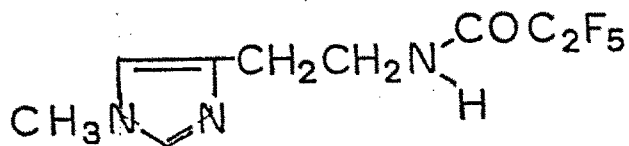
La cromatografía de las dos aminas realizada tras una reacción de acilación a 70 °C de 90 minutos -

Figura 25.-Representacion gráfica del rendimiento de la reacción de perfluoroacilación de la MeHM y HM con PFFA en funcion del tiempo y de la temperatura.





HM-1PFP



MeHM-1PFP

Figura 26..- Separación cromatografica de la histamina y de la metil histamina.

se presenta en la figura 26. En la figura puede apreciarse que la separación de ambas aminas no es posible sobre 3% SE-30, pero sí en 3% OV-17, fase mucho más polar. En esta misma figura se representan las estructuras químicas correspondientes a los picos HM - 1 PFP y Me HM - 1 PFP.

3.4.2.- REACCION DE HEPTAFLUOROBUTIRACION

Se realizó el estudio de la reacción de acilación empleando el anhídrido heptafluorobutirado. Los resultados obtenidos para los aminoácidos y las aminas, coinciden totalmente con los obtenidos con el anhídrido pentafluoropropionico; tiempo y temperatura de reacción similares (90 minutos a 70 °C); condiciones de separación por cromatografía idénticas:

- Fases 3% OV-17, 3% OV-225
- Temperaturas del detector (FID) 250 °C
- Temperaturas del inyector 250 °C
- Temperaturas de la columna 160 °C

En la figura 27 se representa el perfil cromatográfico obtenido con los aminoácidos y las aminas después de la reacción de heptafluorobutiración así como las es

estructuras de los derivados formados.

Estos son similares a los obtenidos anteriormente con el PFPA y también, se forman según el mismo mecanismo de reacción como se pone de manifiesto más adelante.

3.4.3.- ESTABILIDAD DE LOS DERIVADOS

No se realizó un estudio sistemático de la estabilidad de los derivados formados por acción del PFPA o por acción del HFBA; sin embargo, la experiencia acumulada durante todo el desarrollo de este trabajo -- mostró que estos derivados redisoluertos en acetonitrilo se conservan varios días en la nevera a +4 °C; la muestra no se conservaba en mejores condiciones si al disolvente se le añadía un 5% de reactivo (PFPA o HFBA) como se describió para otras aminas biógenas (Fri y Col 1974).

3.4.4.- INDICES DE RETENCION

La tabla 10 muestra los datos de retención,

TABLA 10INDICE DE KOVATS

Compuesto	3% OV-17	3% OV-225
Metil histidina-2-PFP	1582	2015
Metil histidina-2-HFB	1594	2030
Histidina-2-PFP	1736	2355
Histidina-2-HFB	1767	2397
Metil histamina-1-PFP	1763	2147
Metil histamina-1-HFB	1815	2212
Histamina-1-PFP	1827	2443
Histamina-1-HFB	1897	2537

expresados en forma de índices de Kovats, de los diferentes derivados acilados. Los resultados dan una idea del perfil cromatográfico que se obtendría a partir de una mezcla de todos los compuestos listados, cromatografiados en columnas de distinta polaridad (OV-225 y OV-17). Representando graficamente los índices de Kovats de estos derivados, puede ponerse en evidencia la influencia sobre dichos valores de la distinta polaridad de las fases. Si se representan los Índices de Kovats obtenidos en ambas fases estacionarias según la figura 28 puede comprobarse que los retrasos en la elución en la fase OV-225 respecto a la OV-17 (mayores índices de Kovats), son debidos principalmente a dos factores: por una parte la polaridad de las fases: la constante de McReynold (132) de la fase OV-17 es de 884 y la de la fase OV-225 1813. Esta constante a través de la medición de los índices de retención de varias sustancias en escualeno y en OV-17 o OV-225, permite clasificar las diferentes fases; así, la OV-225 tiene un valor más alto y por esto es más polar (más selectiva) que la fase OV-17. El segundo factor refleja la existencia de derivados más o menos polares según si llevan un grupo metilo a nivel del núcleo imidazol o no. Esto queda expresado en la figura 28 en función inversa de las pendientes de las rectas. En

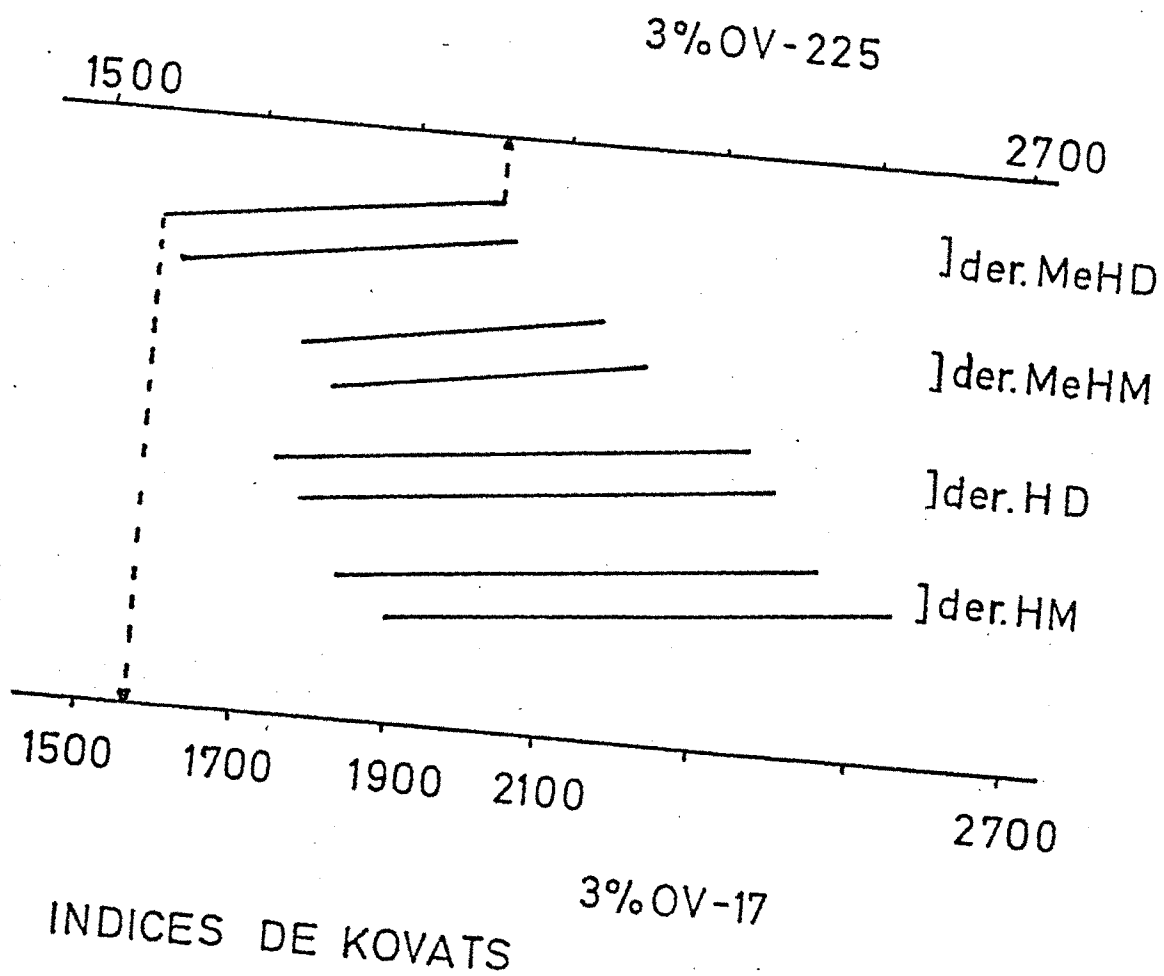


Figura 28. - Representación gráfica de los índices de Kovats en las fases 3% OV-17 y 3% OV-225 de todos los derivados acilados sintetizados.

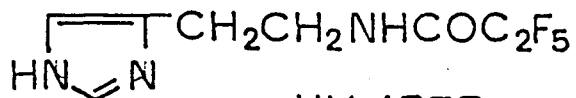
esta figura, se puede comprobar también que los derivados pentafluoropropionados y heptafluorobutirados dan resultados similares aún cuando esto implica la entrada de un grupo CF_2 suplementario a nivel de la cadena lateral.

La menor polaridad de una fase se traduce en un menor índice de Kovats para cualquiera de los compuestos estudiados en tanto que una mayor polaridad del soluto provoca una mayor diferencia de los índices de Kovats del compuesto entre las dos fases utilizadas (ΔI). Estos fenómenos se ilustran en la figura 29 en donde se ha -- tomado la histamina 1 PFP y la metil histamina 1 PFP como ejemplo.

3.4.5.- LIMITES DE DETECCION Y CURVAS DE CALIBRACION

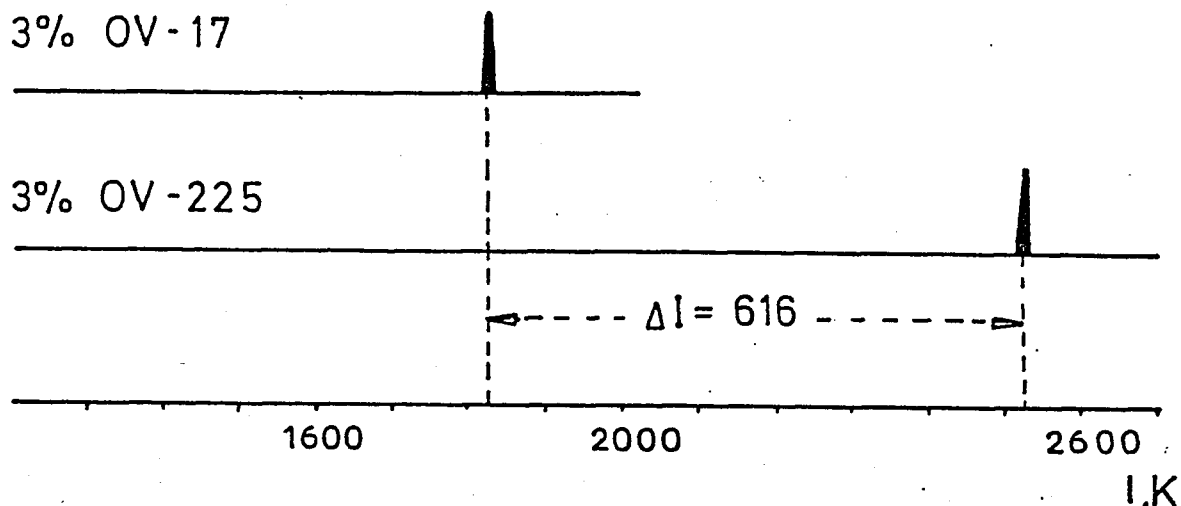
Se llevó a cabo un estudio de la sensibilidad del detector de ionización de llama para distintas cantidades inyectadas de los derivados pentafluoropropionados. La respuesta fue correcta en la mayoría de los casos, llegándose con facilidad a detectar cantidades

COMPUESTO POLAR

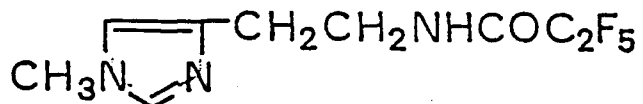


3% OV-17

3% OV-225



COMPUESTO NO POLAR



3% OV-17

3% OV-225

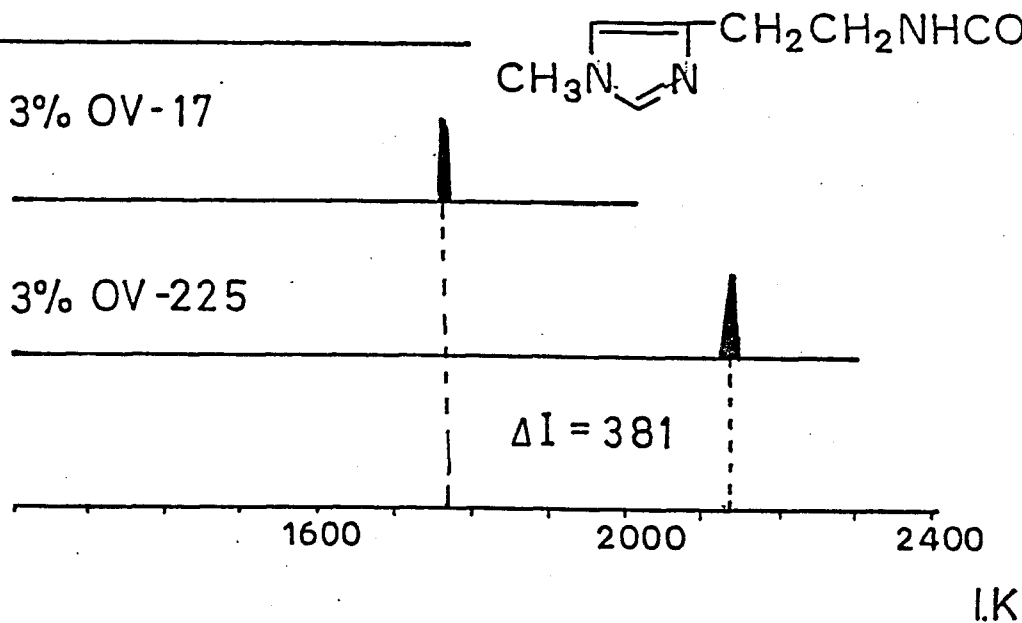


Figura 29.- Influencia de la polaridad de las fases estacionarias y de la polaridad del compuesto cromatografiado sobre el tiempo de retención expresado como índices de Kovats. Se ha tomado la histamina y la metil histamina como ejemplos.

del orden de 15 - 20ng . Sin embargo, el límite de detección para los compuestos MeHM - 1 PFP y HM - 1 PFP, es aproximadamente del doble debido seguramente a bajos rendimiento en la derivatización y/o a posibles pérdidas por degradación en las líneas del cromatógrafo. En la figura 30 aparecen las correspondientes curvas de calibración para las cuatro sustancias estudiadas. La variación en el nivel de detección no es función de la polaridad del anillo imidazol, sino función de la naturaleza de la cadena lateral, ya que la respuesta de los dos aminoácidos es del mismo orden frente a la respuesta dada por las dos aminos.

3.4.6.- MECANISMOS DE LA REACCION DE ACILACION

Las estructuras de los derivados heptafluorobutirados y pentafluoropropionados se han representado anteriormente. En el caso de las aminos, tiene lugar la entrada de un solo grupo acilo en la cadena lateral. De ninguna forma se podían obtener otros derivados (di o triacilados) El imidazol perfluoracilado o acetilado ha sido comercializado por diferentes casas como agente de acilación, su alta reactividad siendo debida a que los elec-

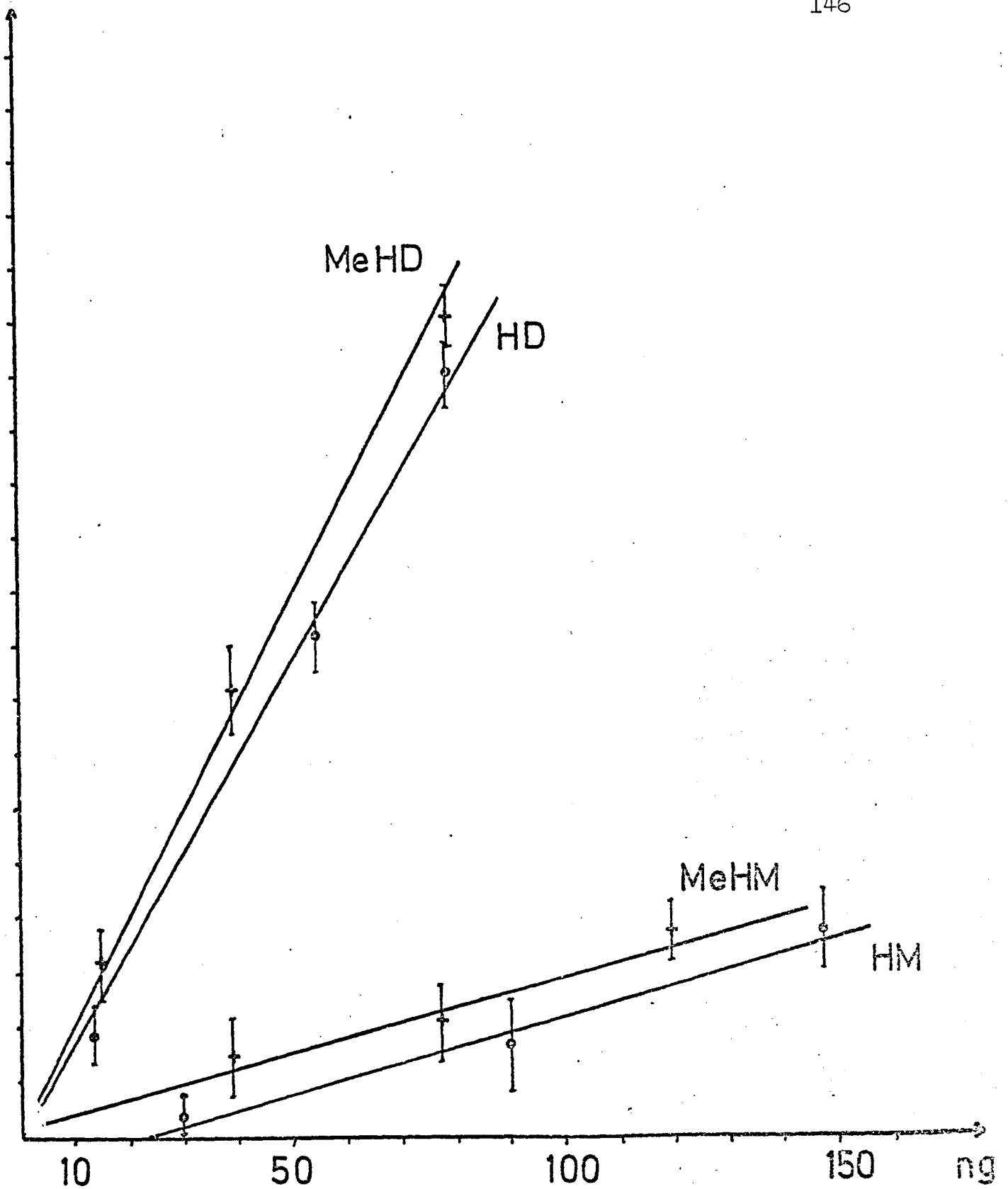
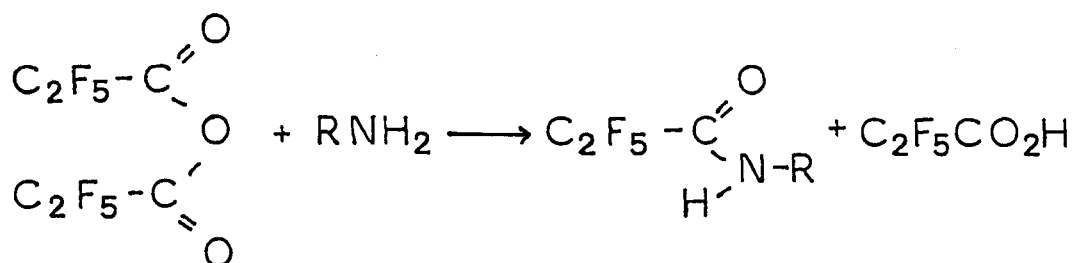
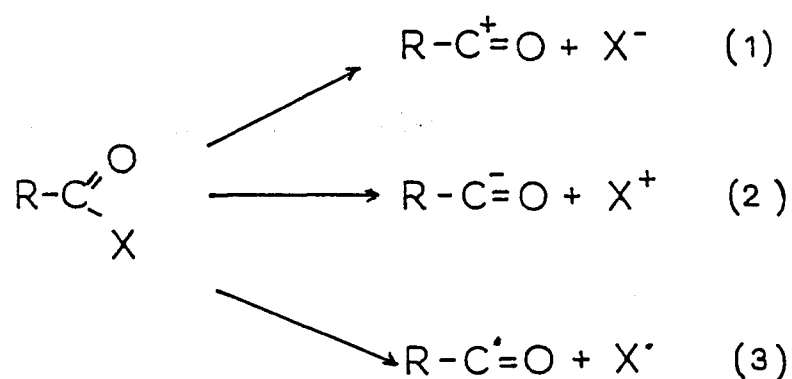


Figura 30. - Curvas de respuesta obtenidas con el detector de ionización de Llama de los derivados estudiados obtenidos con una columna 3% OV-225.

cleofílicos o de eliminación de un radical libre se han descrito también (140).

De hecho, el mecanismo de reacción reside seguramente en un equilibrio entre estas diversas posibilidades :



La acilación del grupo ácido del aminoácido no condujo a la formación de un anhídrido de ácido como se

podía preveer sinó al compuesto correspondiente pero con cuarenta y cuatro unidades de masa menos. Para el derivado pentafluoropropionato de la histidina, obtuvimos un derivado con un ión molecular de masa $M^+ = 403$ en lugar -- del esperado a $M^+ = 447$. El primer valor se comprobó en los espectros de masa obtenidos a bajas energías de ionización electrónica (20,12,10 y 7,5 eV). El realizar los espectros de masa a energías de ionización bajas, permite obtener un ión molecular más abundante ya que se producen menos fragmentaciones debido a la menor energía de ionización aplicada.

Esta pérdida de cuarenta y cuatro unidades de masa corresponde a una eliminación de CO_2 durante la reacción de derivatización. Las estructuras del derivado esperado ($M^+ = 447$) y del derivado obtenido quedan representadas en la figura 31 en la cual se ha indicado también los valores de los principales fragmentos que se deberían formar a partir de cada compuesto.

Los fragmentos del derivado $M^+ = 403$ se pudieron comprobar en su espectro de masas y no los fragmentos del derivado $M^+ = 447$ como se verá en el siguiente capítulo.

Debido a los resultados obtenidos y para comprobar si realmente se formaba esta clase de derivado de la

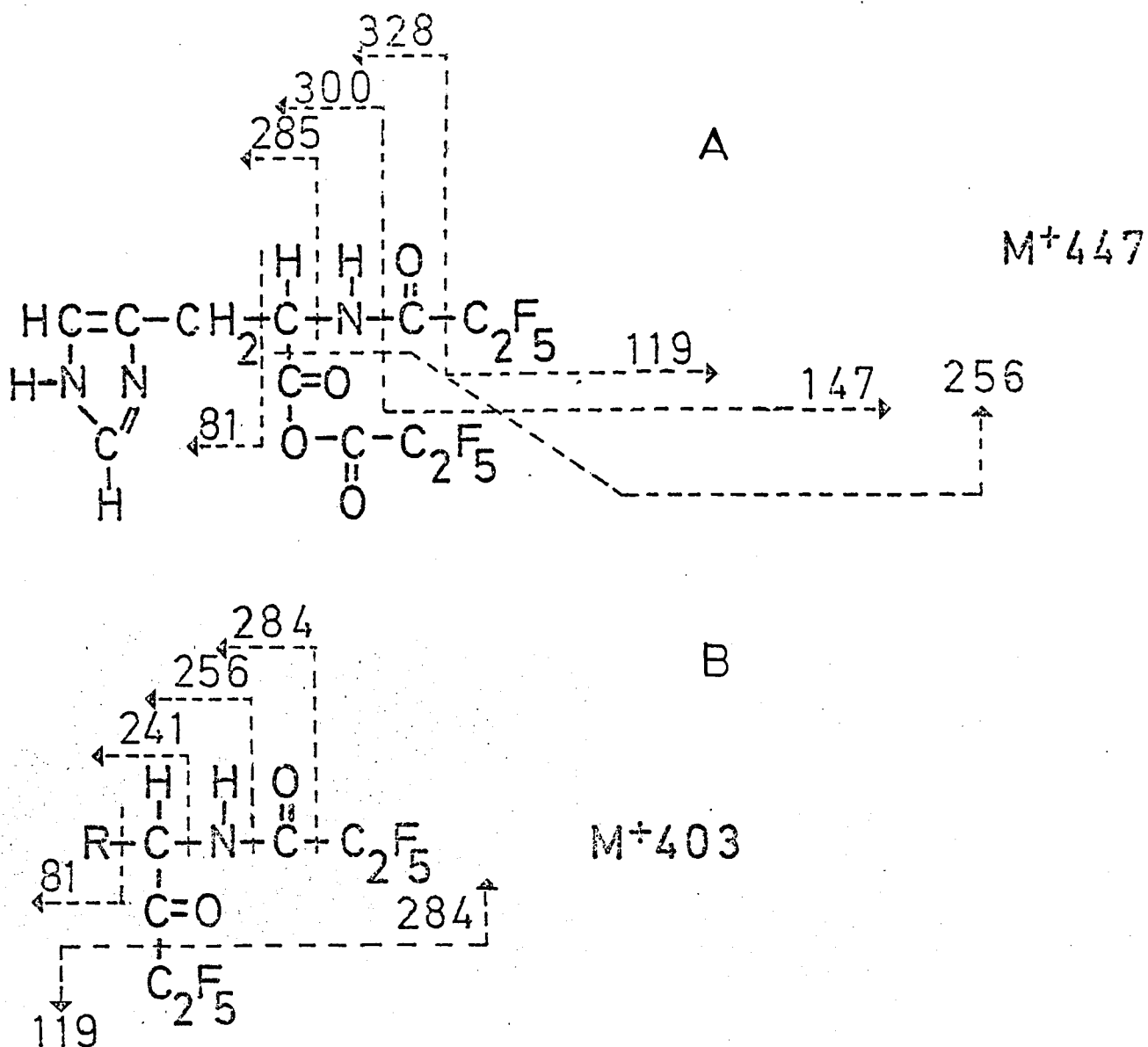


Figura 31..- Estructura de los derivados pentafluoropropionados de la histidina:

A) Derivado esperado.

B) Derivado obtenido.

histidina y de la metil histidina, con los diferentes reactivos de acilación a nuestra disposición, se sintetizaron sus derivados trifluoroacetilados. El anhídrido trifluoroacético se considera más reactivo que el HFBA o el PFPA y da derivados cuyas temperaturas de análisis están entre las de los derivados PFP y las de los derivados -- HFB (122). En nuestro caso, fue necesario llevar a cabo la reacción de derivatización a 100 °C a la estufa ya que el rendimiento obtenido a 70 °C era muy bajo. Para esto fue necesario trabajar con ampollas scelladas ya que el anhídrido trifluoroacético es muy volátil. Con este -- reactivo no obtuvimos los derivados descritos por Weygand (179) sino los derivados correspondientes a la histidina y la 4 - metil histidina cuyos pesos moleculares muestran una pérdida de 44 unidades de masa en relación al peso molecular teórico.

Así podemos decir que para todos estos derivados acilados, tiene lugar un proceso de decarboxilación durante la derivatización :inicialmente se forma el anhídrido mixto de ácido previsto, con la entrada de los grupos PFP, HFB o TFA, según el reactivo empleado, seguida de una reacción de acilación intramolecular con catalisis básica del núcleo imidazol. El mecanismo propuesto se re-

presenta en la figura 32 , actuando el anhídrido pentafluoropropionico de reactivo para formar el derivado de la -- histidina.

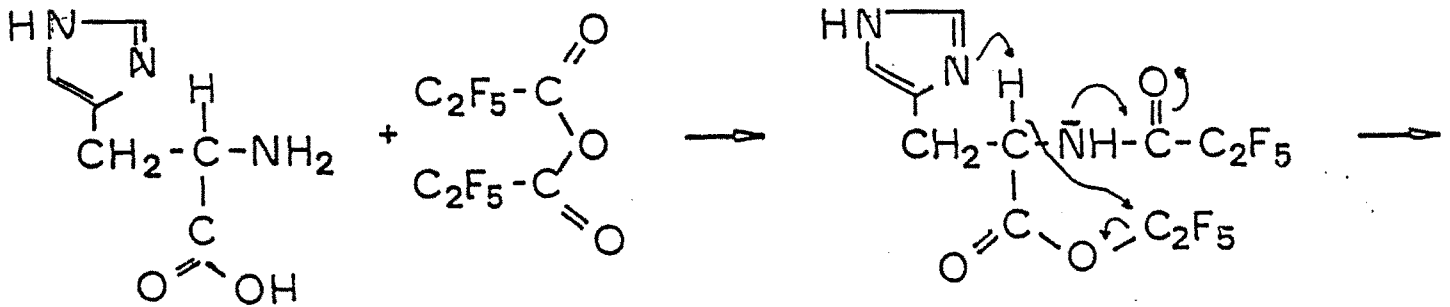
3.4.6.2.- ACILACION DE LAS AMINAS

Por acilación de las aminas con los diferentes reactivos empleados, obtuvimos los derivados correspondientes a la entrada de un grupo acilo a nivel de la amina - primaria de la cadena lateral como estaba previsto y de forma similar a la acilación del grupo amino de los aminoácidos descrita anteriormente.

3.5. DISCUSION

La reacción de acilación de los grupos --- amino y ácido con anhídrido pentafluoropropionico, heptafluorobutírico y trifluoroacetico se ha estudiado desde el punto de vista del disolvente empleado y de las condiciones de duración y temperatura de la reacción. Hasta la fecha, el empleo de estos reactivos como agentes directos de acilación para la histidina y sus derivados, no había sido objeto de ningún estudio como el aquí presentado. Por lo que respecta al empleo de un disolvente, cabe señalar

A. ENTRADA DE DOS GRUPOS PFP



B. ACILACION INTRAMOLECULAR

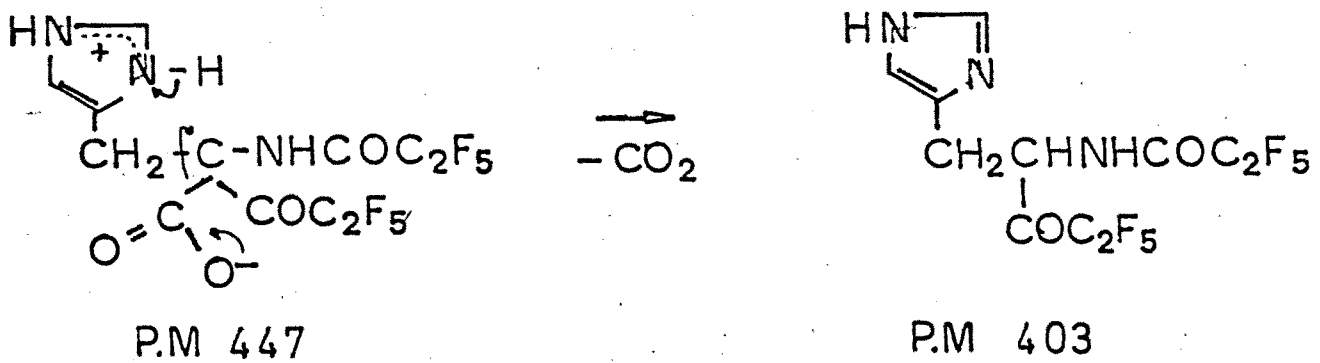


Figura 32.- Mecanismo de acilación de la histidina.

que los resultados mejoran mucho trabajando con el reactivo puro.

Las conclusiones obtenidas del estudio de los derivados se pueden resumir en los siguientes puntos:

- En el caso de las aminas y de los amino-ácidos, las condiciones de derivatización que dan lugar a un mayor rendimiento son de 90 minutos a setenta grados centígrados con el anhídrido pentafluoropropionico y -- heptafluorobutírico, de sesenta minutos a cien grados -- con el anhídrido trifluoroacetico. El uso de ampollas -- selladas para este último reactivo hace más difícil su utilización y aconseja el empleo de los dos primeros. Los diferentes derivados cromatografiaron correctamente en una fase 3% OV-17 y 3% OV-225, siendo el tiempo de -- análisis de unos 6-8 minutos.

En conjunto, los resultados anteriores permiten la selección de aquellos parámetros que conducen a: 1) máximo rendimiento de la reacción y por consiguiente -- límite de detección inferior por unidad de peso de cada compuesto y 2) mejor grado de separación empleando una fase estacionaria determinada. La elección de este último punto debe realizarse de acuerdo con los Indices de Kovats presentado en la tabla 10.

La sensibilidad del sistema CG-FID para los derivados sintetizados, es buena para todos ellos. En el caso de los derivados de la histamina y de la metil histamina, factores de degradación y/o falta de reacción son los responsables de una menor sensibilidad. Este hecho se puso de manifiesto también, con los derivados sililados de estas dos aminas y será objeto de estudio más adelante.

- Estos derivados, de concepción totalmente -- nueva, muestran un interés particular importante ya que - por una parte son sustancias muy estables lo que permite su utilización para el estudio del metabolismo de la histamina y por otra parte resuelven el importante problema analítico de la histidina en la determinación de aminoácidos por cromatografía de gases. Como se ha visto al inicio de este capítulo, la histidina es uno de los aminoácidos más difíciles de cromatografiar y muchas veces forma dobles derivados.

Finalmente, la elucidación de la estructura de los diferentes derivados de los dos aminoácidos ha permitido poner en evidencia un mecanismo de reacción original explicando la pérdida de cuarenta y cuatro unidades de - masa observada, así como el porque no utilizar un disolvente polar para la reacción ya que éste impide de alguna - forma, el efecto catalizador del núcleo imidazol.

Capitulo 4.

4.1.- ANTECEDENTES

Los espectros de masas de la histamina y de la metil histamina han sido publicados y estudiados principalmente en dos trabajos(44,131)pero, en general, los autores que han sintetizado sus derivados no han realizado el estudio espectrométrico correspondiente. Los trabajos relativos a los derivados de la histidina son más numerosos, ya que se han publicado múltiples trabajos sobre -- análisis por GC-MS de los aminoácidos(5,7). Pero, no -- existe ningún estudio sobre interpretación de los espectros realizados para comprobar la estructura de los derivados sintetizados. Por otra parte, como los derivados formados en nuestro laboratorio son originales, el estudio espectrométrico se realizó en base a trabajos más -- generales o a libros teóricos sobre fragmentografía de masas(14,26) . Se comprobó que las características espectrométricas más sobresalientes de los derivados sililados son comunes a las observadas por diversos autores -- para otras aminas biogénas (29,49).

Los derivados acilados mostraron un mecanismo de fragmentación original que no había sido descrito -- hasta ahora para otras sustancias similares.

4.2.- METODOS

4.2.1.- Cromatografía de gases-Espectrometría de masas.

La identificación de los diferentes compuestos se llevó a cabo por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). Para ello, se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer modelo 3920 acoplado a un espectrómetro de masas Hitachi Perkin Elmer RMU-6H a través de una interfase de tipo "Jet". La fase estacionaria empleada en todos los casos fue OV-17. Las cantidades inyectadas fueron del orden de 2-5 μ l. que contenían 5-20 μ g de las sustancias.

La temperatura del separador molecular se mantuvo a 200-250 $^{\circ}$ C según la temperatura de la columna cromatográfica. La temperatura de la fuente de iones del espectrómetro de masas fue de 180 $^{\circ}$ C y los espectros se registraron generalmente con una corriente de ionización de 70 eV. Se utilizaron energías de ionización del orden de 15 a 20 eV para confirmar picos moleculares e iones metastables. El voltaje de aceleración se varió entre 1200 y 2400 voltios según el intervalo de masas a cubrir.

Se realizaron también espectros de masas de los compuestos originales sin derivatizar para poder usarlos como referencia en la interpretación de los espectros de masas de sus derivados. Para ello, se introdujeron las

muestras sólidas (400 - 800 μg) a través de la entrada -- directa de sólidos. Se realizó a continuación una volatización progresiva del compuesto por medio de los calefactores de la sonda para sólidos. La introducción de los vapores en la fuente de iones y en el espectrómetro se registró a través del monitor de ionización total (TIM).

4.2.2.- NORMALIZACION DE LOS ESPECTROS

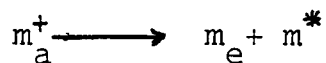
Los espectros de masas se calcularon normalmente a partir de los picos trazados en el papel registrador. Se asignó al pico base de cada espectro una abundancia de -- cien y se calcularon las abundancias de los demás iones relativas a este valor. Para ello se midió la relación entre la altura de cada ión y la del ión que dió lugar al pico base. En general no se calculó la abundancia de los iones que eran inferiores al 3-5% del pico base, excepto en -- aquellos casos en que se consideraron de importancia para la interpretación de los espectros, tal como sucede en algunos iones que aparecen a masas altas cercanas al ión molecular, o bien con los picos isotópicos de éste.

Se registraron también los iones metastables - que aparecieron como picos anchos y de baja intensidad. En la mayoría de los casos se intentó descifrar cual era la transición que daba lugar a dichos iones aceptando el suu

puesto de que los iones causantes del ión metastable eran monopositivos. Para ello se empleó la siguiente fórmula:

$$m^* = \frac{m_e^2}{m_a}$$

suponiendo una transición:



4.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

4.3.1.- ESPECTRO DE MASAS DE LOS COMPUESTOS LIBRES

Para comprobar la estructura de las sustancias patrón (HD, MeHD, HM, Me HM, ImAA, MeImAA), se realizó - sus espectros de masas introduciendo directamente la muestra sólida en la fuente de iones. En la literatura se han podido encontrar directamente la descripción de los espectros de las cuatro primeras sustancias, pero no los espectros de masas de los ácidos imidazol acético y metil imidazol acético. En cada caso, para todos los compuestos, --

el pico base corresponde a una rotura en β con reordenamiento de un átomo de hidrógeno formándose así el ión -- m/e 96 ó m/e 82, según si el compuesto se encuentra metilado o no a nivel del anillo imidazólico. La única --- excepción la constituye el ácido imidazol acético que -- tiene como pico base un ión de m/e 81 que corresponde a una rotura en β pero sin reordenamiento de un átomo de hidrógeno. Se incluyen aquí, únicamente los espectros relativos a los dos metabolitos ácidos de la histamina -- (fig. 33), ya que la descripción de los otros se puede -- encontrar en la literatura y se han resumido en la tabla 11.

A lo largo del trabajo, se verificaron estas - estructuras para comprobar la conservación del stock y - obtuvimos siempre los mismos espectros lo que nos permite afirmar que ninguna de estas sustancias se degradó a lo largo de este estudio.

./.

Figura 33.-Espectros de masas de los derivados ácidos
de la Histamina.

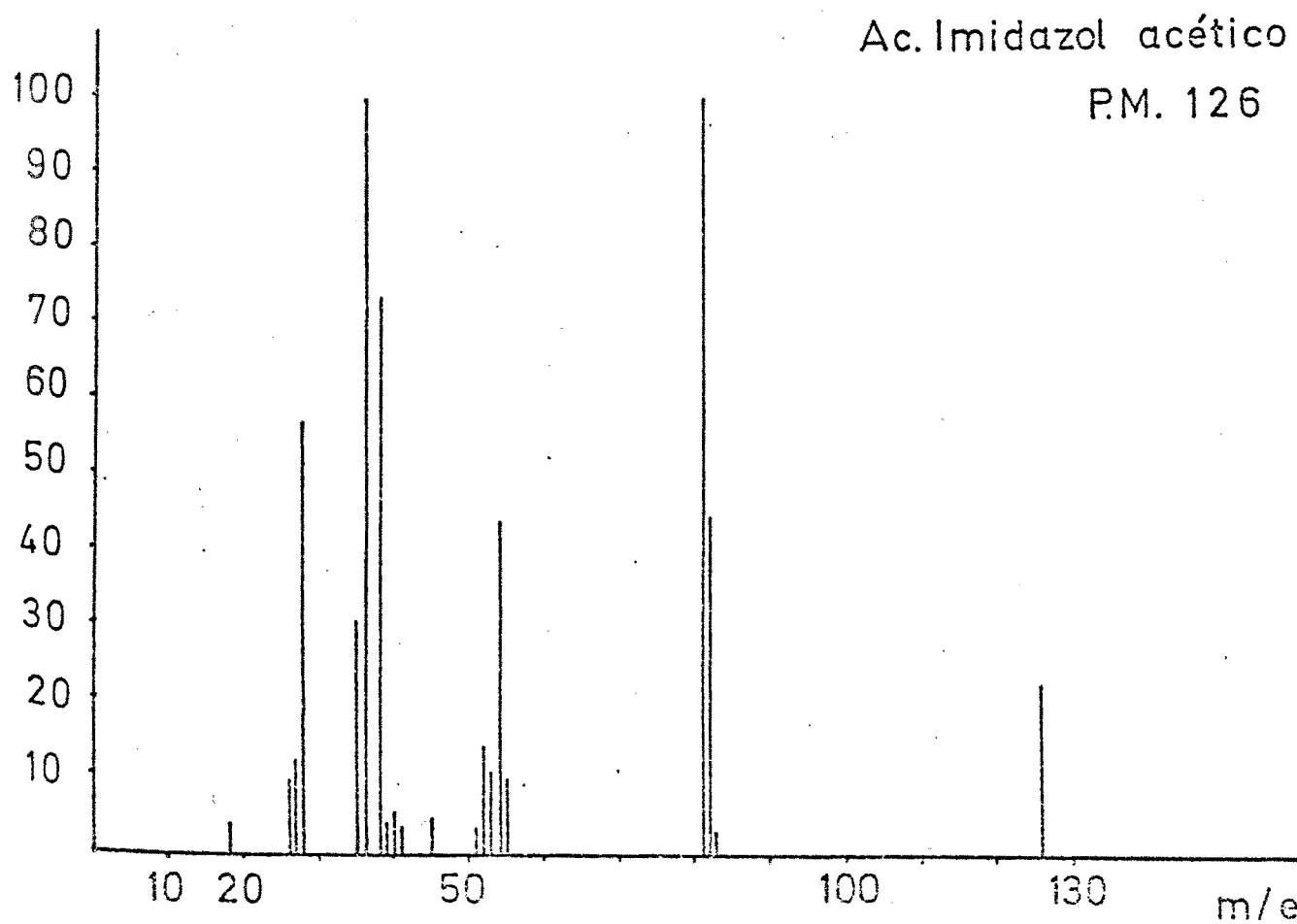
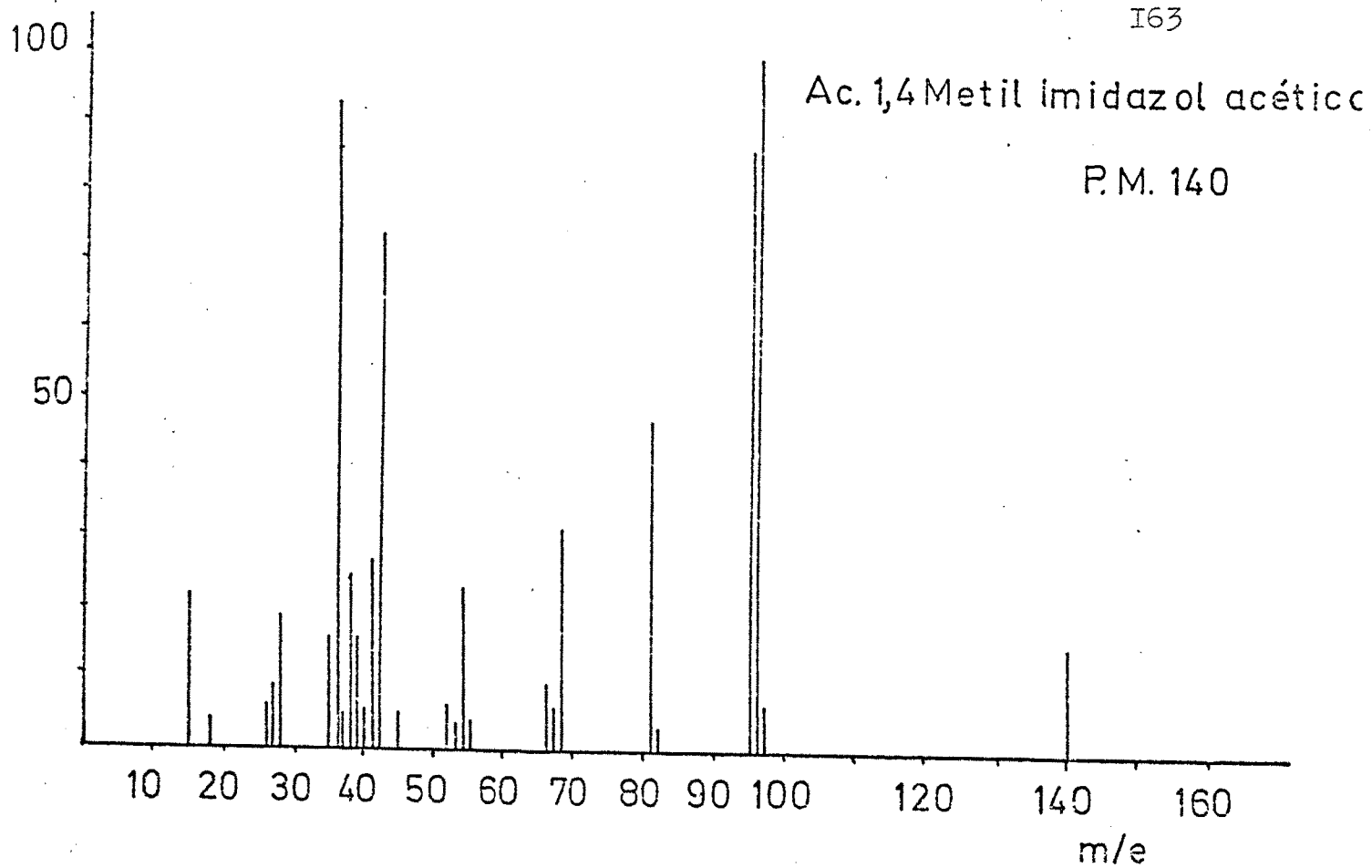


TABLA 11

FRAGMENTOS MAS ABUNDANTES OBSERVADOS EN LOS ESPECTROS DE
 MASAS DE LA MeHD, HD, MeHM y HM.

	Me HD		HD		Me HM		HM	
	m/e	%	m/e	%	m/e	%	m/e	%
M	169	23	155	8	125	5	111	39
M - H					124	8	110	16
M - NH ₃					108	6	94	8
M - CO ₂	125	44	111	14				
Rotura en $\beta + H$	96	100	82	100	96	100	82	100
Rotura en β	95	88	81	83	95	50	81	79
Rotura en $(\beta + H) - CH_2$	82	32	66	13	82	24	68	10
Rotura en $\beta - CH_2$	81	58			81	89	67	10

4.3.2.- ESPECTRO DE MASAS DE LOS DERIVADOS SILILADOS

Los espectros de masas de los derivados sililados demuestran que en la histamina entran tres grupos silil:

$\text{HM}(\text{TMS})_3$, en la metilhistamina y el ácido imidazol acético dos grupos silil cada uno: $\text{MeHM}(\text{TMS})_2$ y $\text{ImAA}(\text{TMS})_2$ - cuando en el ácido metil imidazol acético entra un solo grupo: $\text{MeImAA}(\text{TMS})$. Las aminos (HM y MeHM) se caracterizan por tener un pico base a m/e 174 que corresponde a una rotura en β con retención de la carga positiva sobre el nitrógeno de la cadena lateral formándose así el ión bis -- (trimetilsilil) amonio:

$\text{CH}_2 = \text{N}^+ [\text{Si}(\text{CH}_3)_3]_2$. Otro ión característico es el correspondiente a $M - 101$ formado por rotura en β seguida del reordenamiento de un grupo trimetilsilil sobre el resto imidazólico formándose el ión $M - [\text{CH}_2 = \text{N} - \text{Si}(\text{CH}_3)_3]$. Esta fragmentación queda representada para la metilhistamina en la figura 34. Los espectros de las -- dos aminos se representan en las figuras 35 y 36 indicándose las principales fragmentaciones.

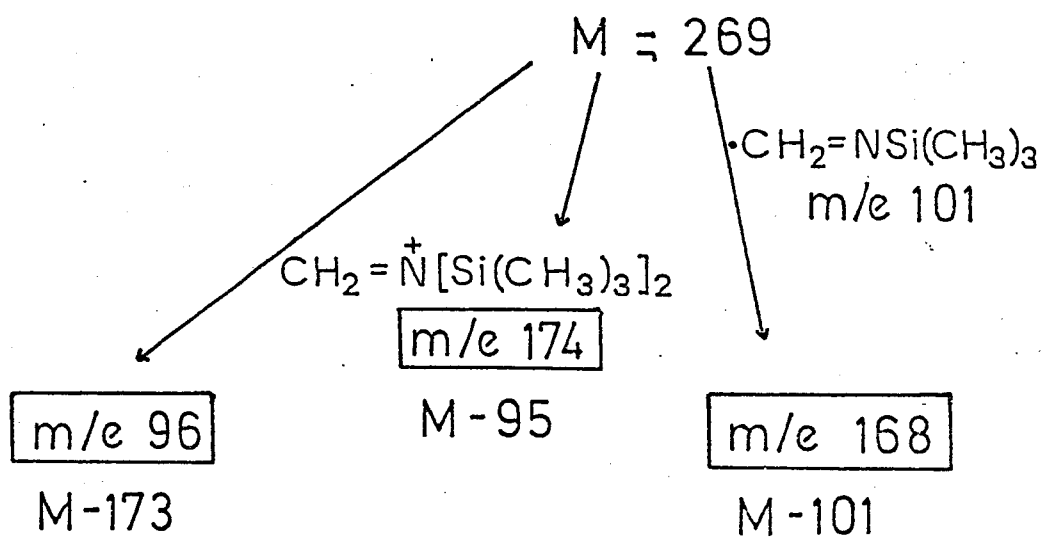
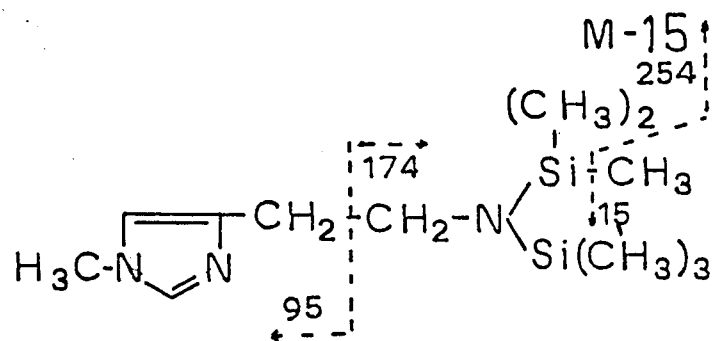
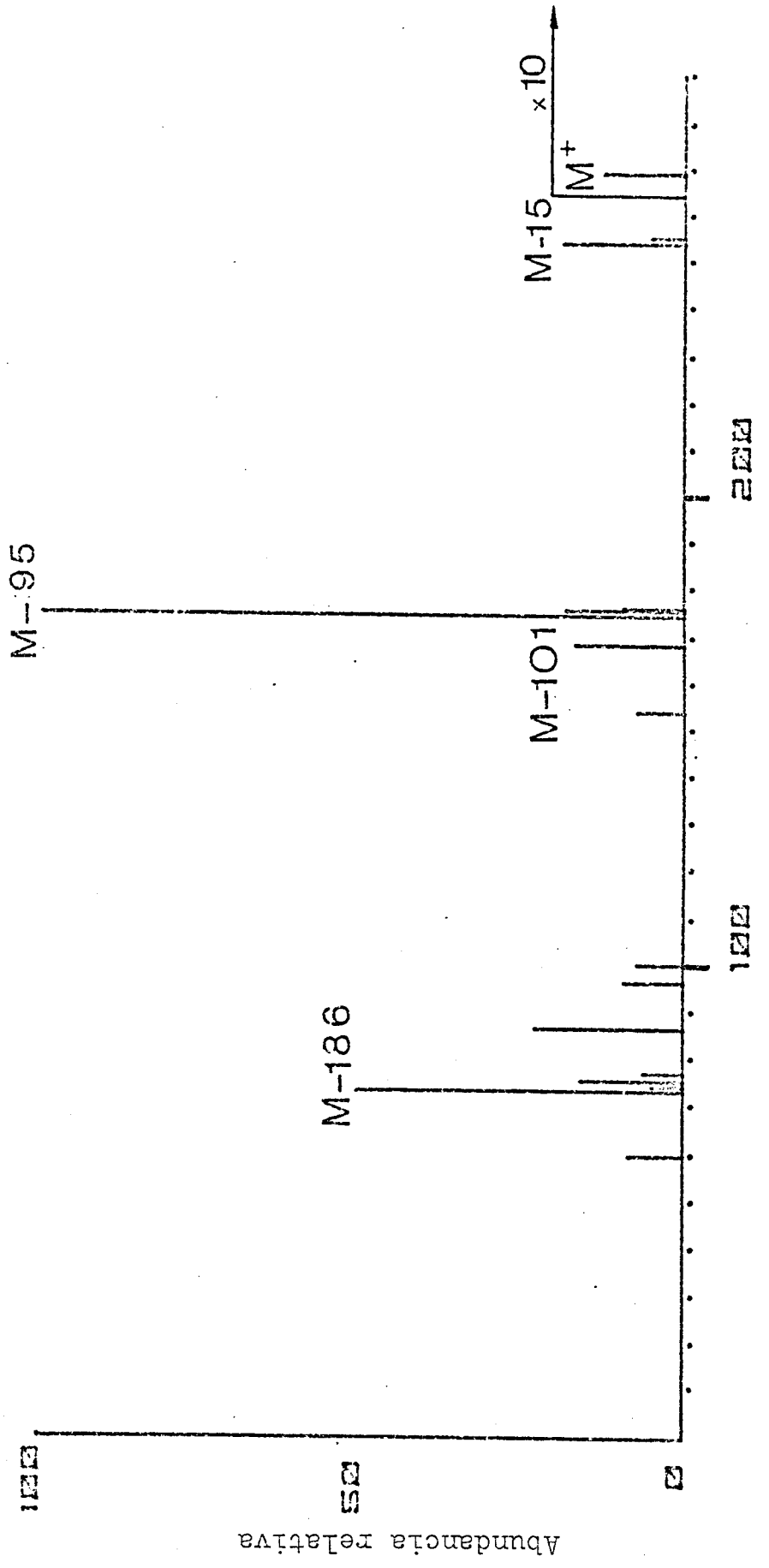
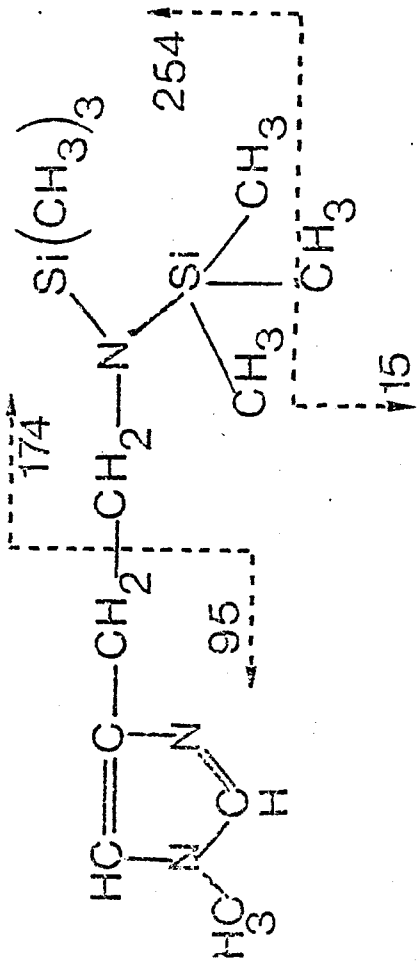


Figura 34.-Fragmentaciones principales de la metil histamina disililada.

Figura 35.-Espectro de masas de la histamina trisililada.

Figura 36.-Espectro de masas de la metil histamina disililada.



m/e

Los iones moleculares de los dos ácidos son más proeminentes que los de las aminas. Sin embargo, el pico base para los dos aparece a un m/e correspondiente a la pérdida de 44 unidades de M que corresponde a una eliminación de --CO_2 en cada caso. Otros iones abundantes corresponden a la eliminación de un grupo metilo del pico base (M-44)-15. Los espectros de los ácidos quedan representados en las figuras 37 y 38 con las principales fragmentaciones indicadas a nivel de sus estructuras y de los espectros. Un resumen de la fragmentación de estos cuatro derivados se indica en la tabla .12.

4.3.3.- ESPECTROS DE MASAS DE LOS COMPUESTOS PENTA- FLUOROPROPIONADOS.

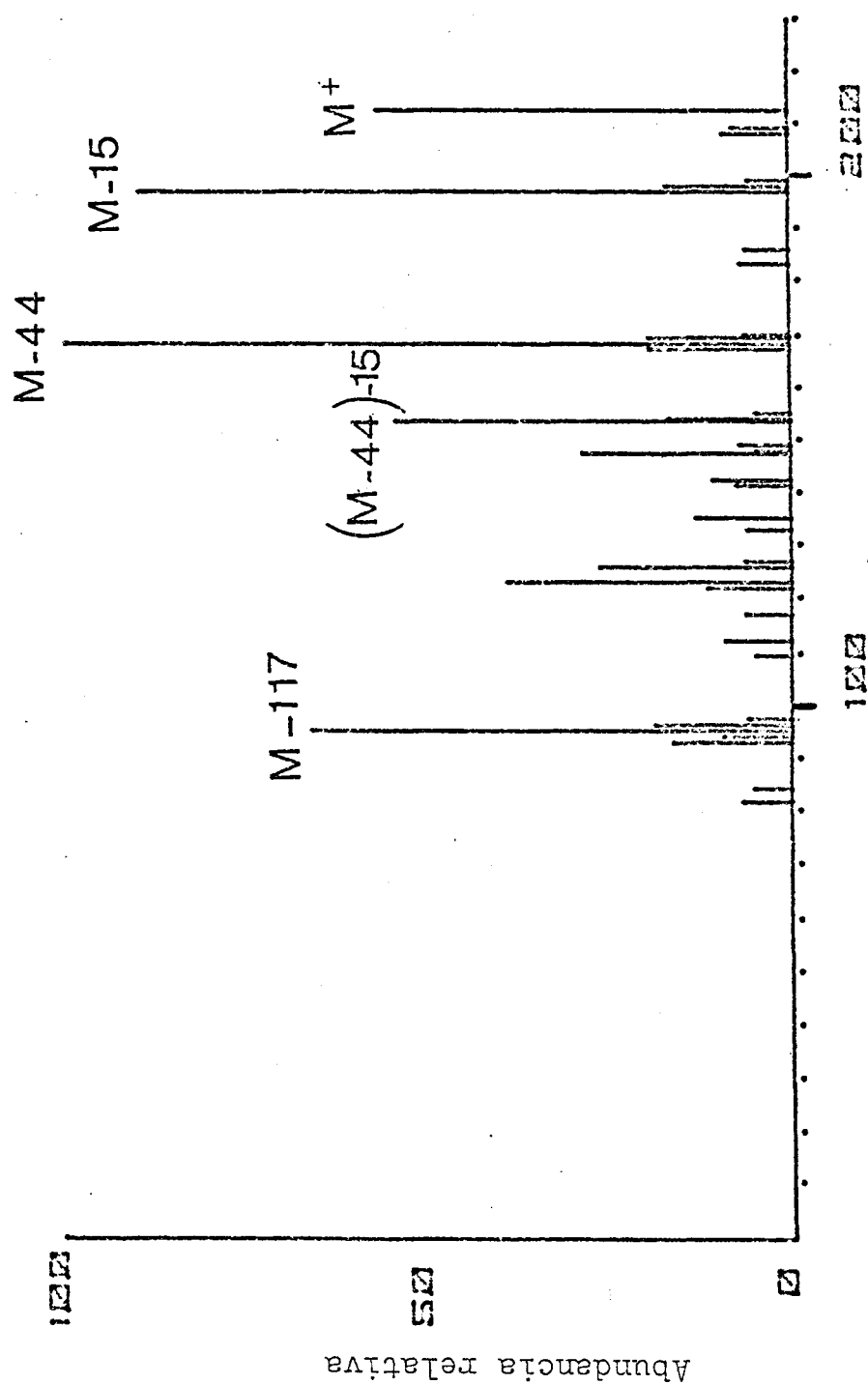
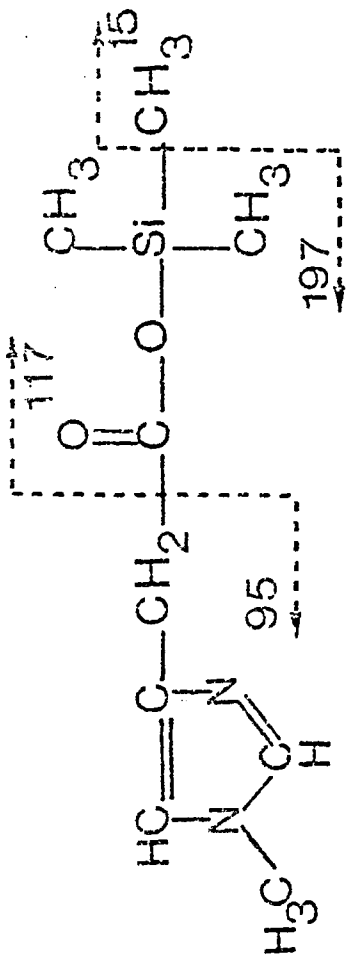
4.3.3.1.- Aminas

La acilación de las dos aminas permite en cada caso la entrada de un solo grupo $\text{-COC}_2\text{F}_5$ a nivel de la amina de la cadena lateral como muestran los espectros de masas de la histamina y de la metil histamina representados en las figuras 39 y 40. Los iones a m/e 69, 100, 119 y 147 corresponden respectivamente, a los fragmentos CF_3 , -

Figura 37.-Espectro de masas del ácido imidazol acético
disililado.

Figura 38.-Espectro de masas del ácido metil imidazol acético monosililado.

MeImA(TMS)₂



m/e

TABLA I2

Abundancias relativas de los principales fragmentos de los derivados TMS de los metabolitos de la histidina.

<u>AMINAS</u>				
	<u>HT(TMS)₃</u>		<u>Me-HT(TMS)₂</u>	
	m/e	(%)	m/e	(%)
M	327	2	269	I
M-I5	312	I7	254	20
⁺ CH ₂ =N(TMS) ₂	I74	I00	I74	I00
M-I0I	226	I7	I68	I7
Rotura en β+H	I54	22	96	9
<u>ACIDOS</u>				
	<u>ImAA(TMS)₂</u>		<u>MeImAA(TMS)</u>	
	m/e	(%)	m/e	(%)
M	270	9I	2I2	57
M-I5	255	67	I97	90
M-44	226	I00	I68	I00
M-45	225	20	I67	20
(M-44)-I5	2II	45	I53	55
Rotura en β+H	I54	59	96	I9
Rotura en β	I53	36	95	66

Figura 39.-Espectro de masas de la histamina pentafluoropropionada.

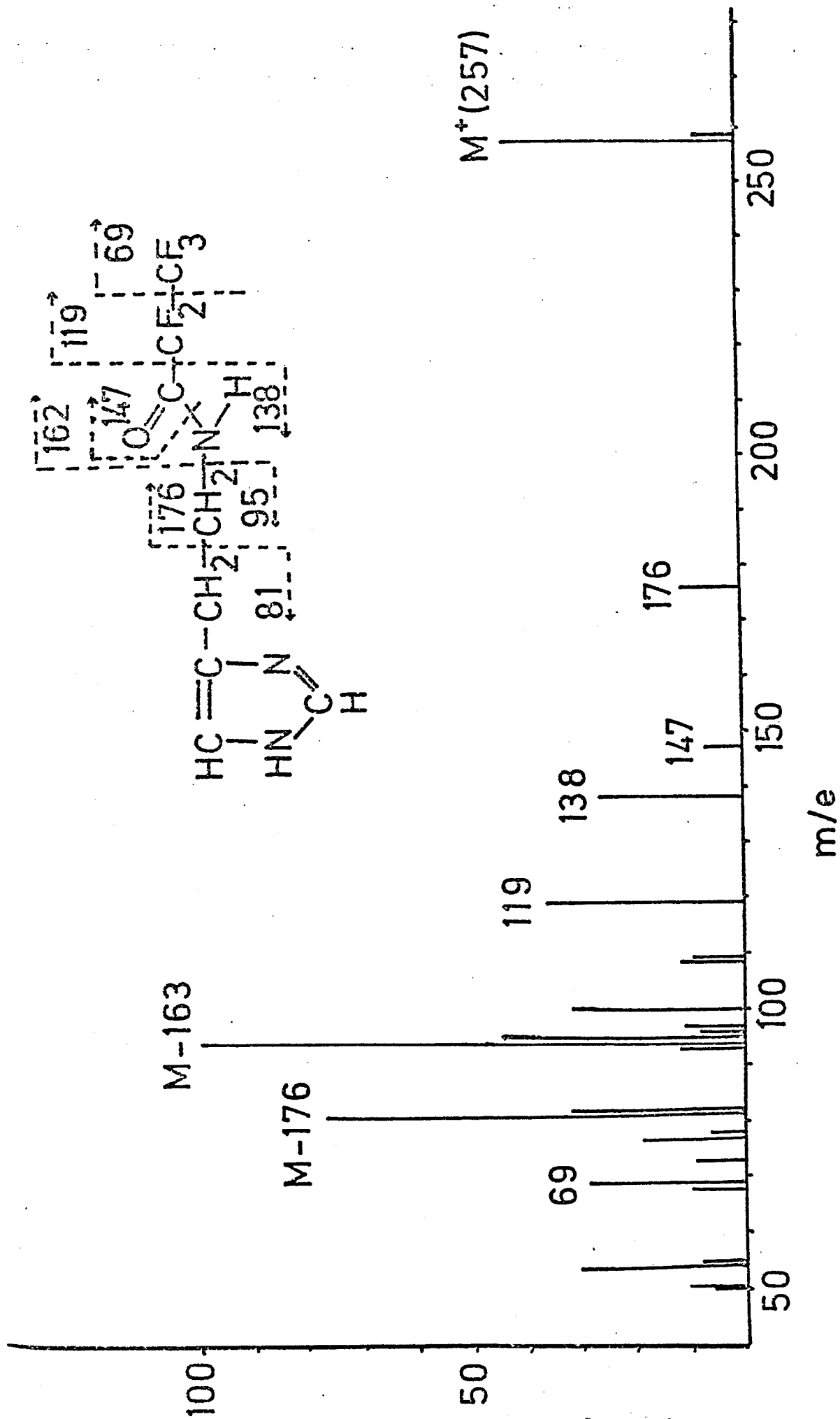
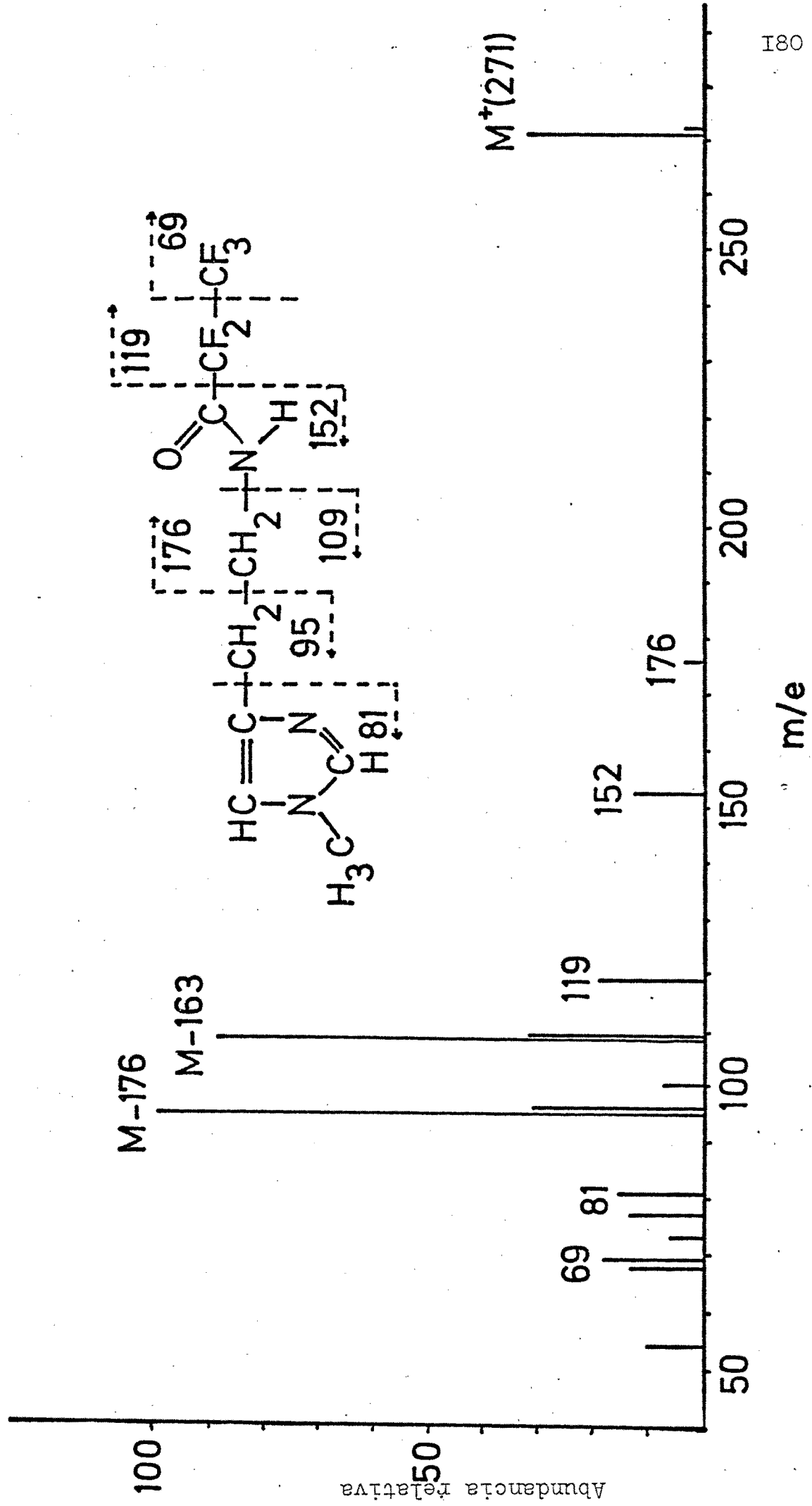


Figura 40.-Espectro de masas de la metil histamina penta-
fluoropropionada.



C_2F_4 , C_2F_5 y C_2F_5CO . Para la metil histamina monoacilada, el pico base corresponde a una rotura en β de la molécula formándose el ión m/e 95. La captación por reordenamiento de un átomo de hidrógeno para formar el ión m/e 96 es muy poco abundante. Otro ión importante es el relativo a una rotura en γ con reordenamiento de un átomo de hidrógeno - para formar el ión $[M - (NH - CO - C_2F_5) - H]^+$ m/e = 108.

El espectro de la histamina monoacilada muestra picos similares pero, la abundancia de estos dos iones se encuentra invertida: en este caso, el pico base es el ión formado por rotura en γ seguida por un reordenamiento de un átomo de hidrógeno. El ión correspondiente a la rotura en β es así menos abundante.

4.3.3.2.- Aminoácidos

La acilación de los aminoácidos, sin previa esterificación no se utiliza comunmente; pero de su perfluoración directa con el PFFA puro, se puede pensar obtener la incorporación de dos grupos PFP tanto en la histidina como en la metil histidina. Así, durante la reacción de derivatización puede acilarse el grupo $\alpha-NH_2$ de la cadena la-

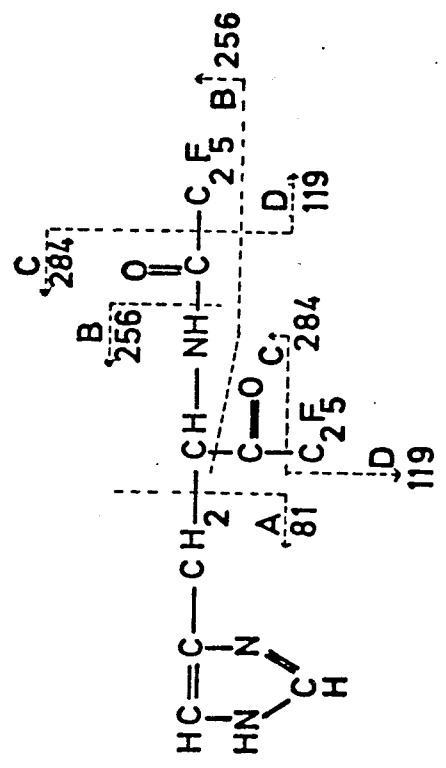
teral formando un grupo $\text{NH} - \text{CO} - \text{C}_2\text{F}_5$. El grupo α carboxilo puede formar un anhídrido mixto del tipo $\text{R}_1 - \text{CO} - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_2\text{F}_5$. En el capítulo anterior, se vió que esta molécula diacilada es inestable debido al carácter básico del anillo imidazol y sufre una descarboxilación intramolecular según el mecanismo descrito en la figura 31. Los espectros de masas de los derivados acilados de la histidina y de la metil histidina se presentan en las figuras 41 y 42.

De acuerdo con los estudios previamente realizados sobre la fragmentación de otros derivados de aminoácidos (52,102) los picos mayoritarios en estos espectros son los que provienen del llamado "fragmento de la amina" que aparece a m/e 256 y 270 así como los derivados del fragmento imidazolil - CH_2O de "expansión del anillo" a m/e 81 y m/e 95 respectivamente. En relación a los últimos fragmentos, se sabe que la introducción de un sistema aromático en el radical de un aminoácido favorece las posibilidades de rotura de otros enlaces, especialmente el $\text{C}_\alpha - \text{C}_\beta$ ya que la carga positiva puede quedar muy bien acomodada sobre el carbono en β .

De otra parte el "fragmento ester" correspondiente que se esperaría a una masa equivalente a m/e 322 en cada caso (M-81 y M-95) es sospechosamente ausente de estos espectros (ver tabla 13).

Figura 4I.-Espectro de masas de la histidina pentafluoropropionada.

HD.PFP
P.M.403



R-CH=CH⁺
m/e 94
E

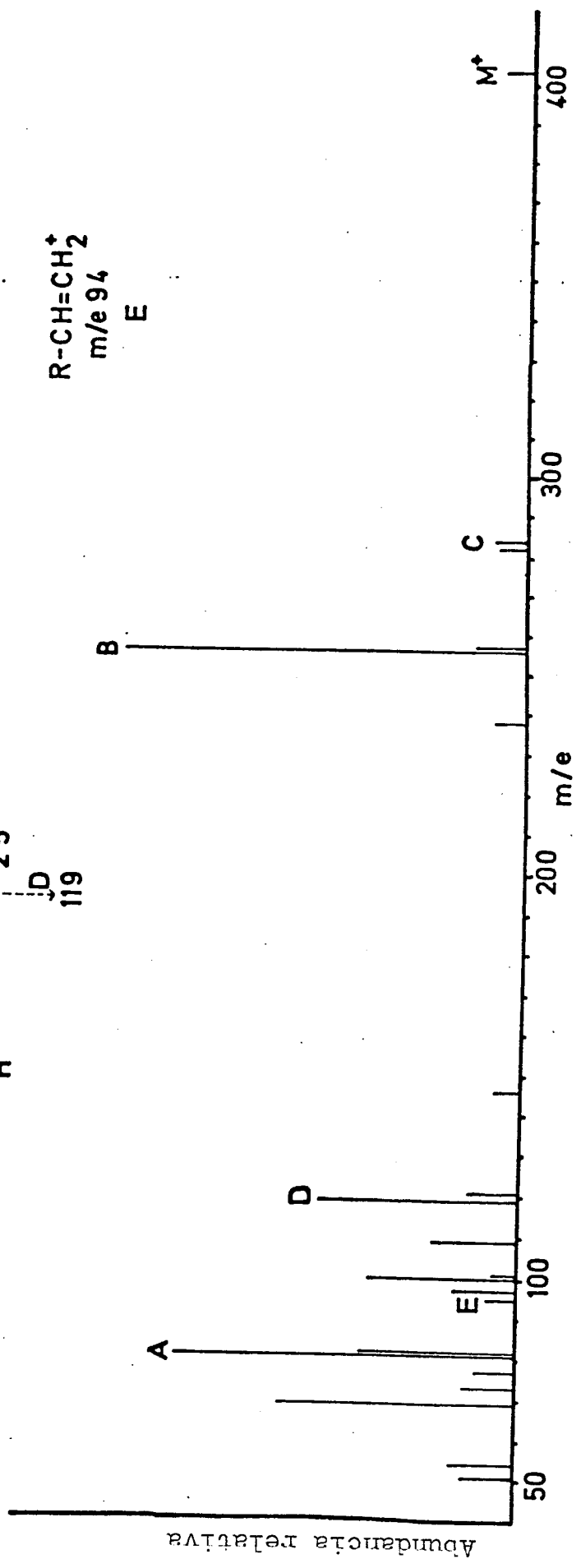
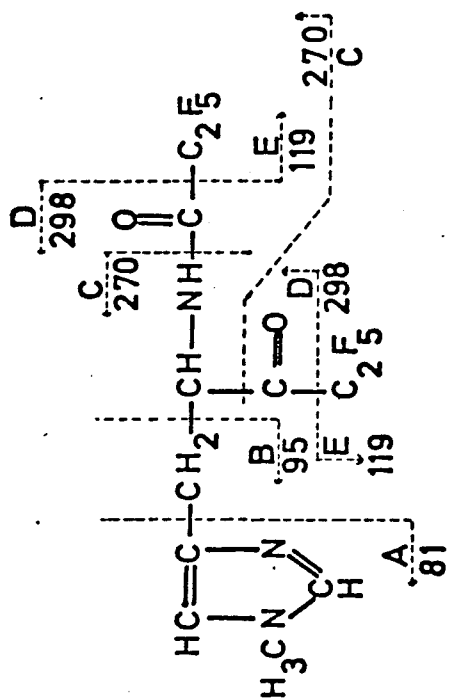


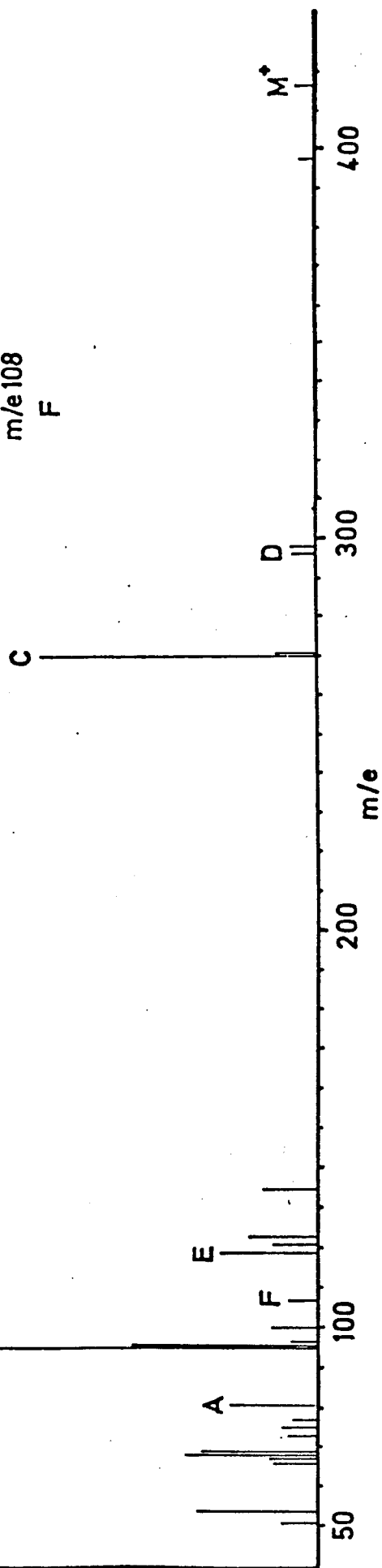
Figura 42.-Espectro de masas de la metil histidina penta-
fluoropropionada.

Me HD.PFP

P.M. 417



Abundancia relativa

R-CH=CH⁺
m/e 108
F

De todas formas, se sabe que este fragmento es poco abundante en los espectros de muchos amino ácidos - con un grupo α -NH₂ libre. Esto es debido a que la carga positiva del carbono α está estabilizada en parte por resonancia con el grupo α amino y al mismo tiempo desestabilizada parcialmente por la proximidad del grupo carboxilo.

En este caso, como ocurre también con los derivados trifluoroacetyl butirados (52) uno de los átomos de hidrógeno del grupo amino ha sido sustituido por un grupo pentafluoropropionado que desestabiliza la localización de la carga positiva sobre el nitrógeno del grupo α amino. Esto se debe sobre todo a la carga δ^+ inducida sobre el grupo carboxilo vecino, por efecto inductivo del grupo C₂F₅ electronegativo.

El resto del espectro de masas parece más simple ya que los otros iones abundantes (m/e 69, 100, 119 y 147) provienen como en los espectros de las aminas discutidos anteriormente del grupo perfluoro-acilo. Pero, exceptuando los iones [M-F], [M-FH] y [(M-F) -FH], al final de los espectros, algunos picos minoritarios son interesantes ya que permiten explicar la fragmentación de estos dos compuestos: se trata del doblete situado a m/e 282 y 284, en el espectro derivado de la histidina y a m/e 296 y 298 en el espectro del derivado de la metil histidina (ver tabla 13), y de los picos pequeños a m/e 96.

ESPECTROS DE MASA DE LOS DERIVADOS PENTAFLUOROPROPIONADOS DE LA HISTIDINA Y METIL HISTIDINA

	<u>MeHD</u>	<u>HD</u>		<u>MeHD</u>	<u>HD</u>
417	2.79 (M)	-	82	10.09	44.38(V')
403	-	6.05(M)	81	22.92	100.00
398	1.93(M-19)	-	80	2.58	-
384	-	4.71(M-19)	79	1.93	-
343	-	5.04	78	1.35	-
298	4.08(VI)	-	77	4.73	6.05
296	3.65(VII)	-	75	7.09	-
284	-	9.82(VI')	73	5.58	16.81
282	1.07	7.53(VII')	69	3.01	26.23
281	0.86	-	68	3.44	3.06
280	2.36	-	67	8.81	2.35
278	2.15	-	66	7.95	3.97
271	7.52	-	65	-	1.48
270	67.44(I)	-			
266	-	4.37			
264	-	4.84			
257	-	14.79			
256	-	85.07(I')			
252	2.36(IV)	-			
243	1.50	-			
238	-	6.39 (IV')			
224	-	4.51			
207	-	3.43			
175	0.64	-			
169	-	21.12			
168	-	16.48			
150	3.65	-			
147	2.36	-			
136	1.29	6.05			
135	10.09	-			
134	1.5	-			
124	1.5	-			
123	13.53	-			
122	3.65	-			
121	8.59	14.79			
120	2.36	-			
119	33.33	21.45			
109	1.93	32.28			
108	3.65	5.38			
107	5.37	6.72			
106	3.01	-			
101	1.93	-			
100	9.24	9.41			
97	4.94	-			
96	45.03 (V)	-			
95	100.00	4.71			
94	3.65	4.71			
93	1.93	6.05			

Los números romanos indican los iones significativos representados en las figuras 47 y 48.

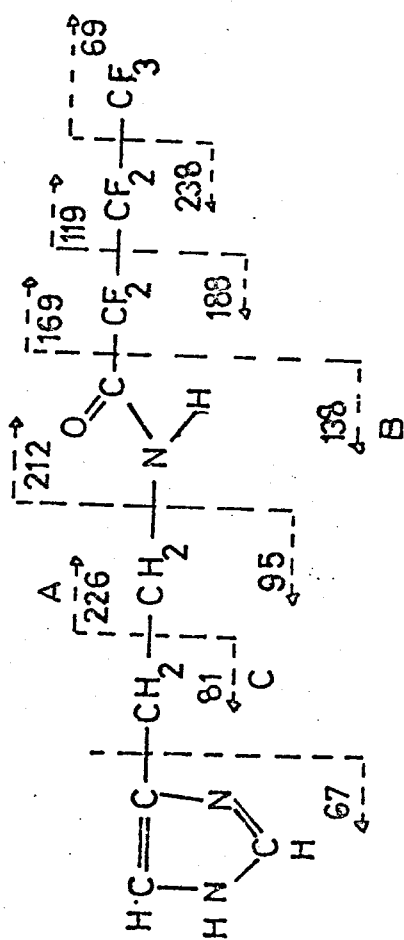
En el párrafo 4.3.5 se expondrán estos mecanismos de fragmentación ya que son comunes a los derivados heptafluorobutirados de la histidina y de la metil histidina.

4.3.4.- ESPECTROMETRIA DE MASAS DE LOS DERIVADOS HEPTA- FLUORO BUTIRADOS

4.3.4.1.- Aminas

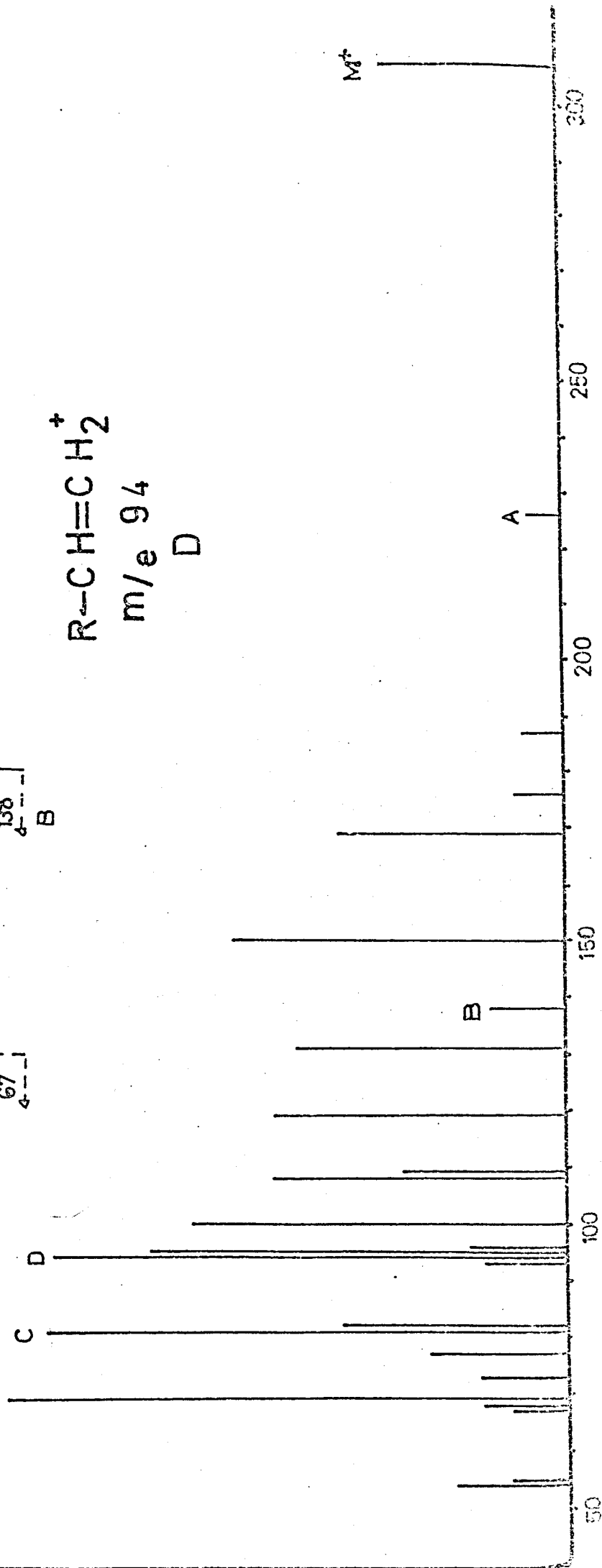
La acilación de la histamina y de la metil histamina con el anhídrido heptafluorobutirado provoca la entrada de un grupo heptafluorobutiril a nivel del grupo amino de la cadena lateral. Los espectros de masas de los derivados obtenidos se muestran en las figuras 43 y 44. El pico molecular a m/e 321 y 307 corresponde al pico molecular observado con los derivados pentafluoropropionados de las mismas sustancias con un aumento de masas de cincuenta unidades, lo que corresponde al grupo CF_2 - suplementario que contiene el radical heptafluorobutiril. Los otros picos son practicamente idénticos: los iones de mayor abundancia provienen de una rotura en β y γ de la cadena lateral con reordenamiento o no de un átomo de hidrógeno. Otros iones son los formados debido a la fragmentación del radical heptafluorobutiril (m/e 69, 100,

Figura 43.-Espectro de masas de la histamina heptafluoro-
butirada.



m/e 94

D



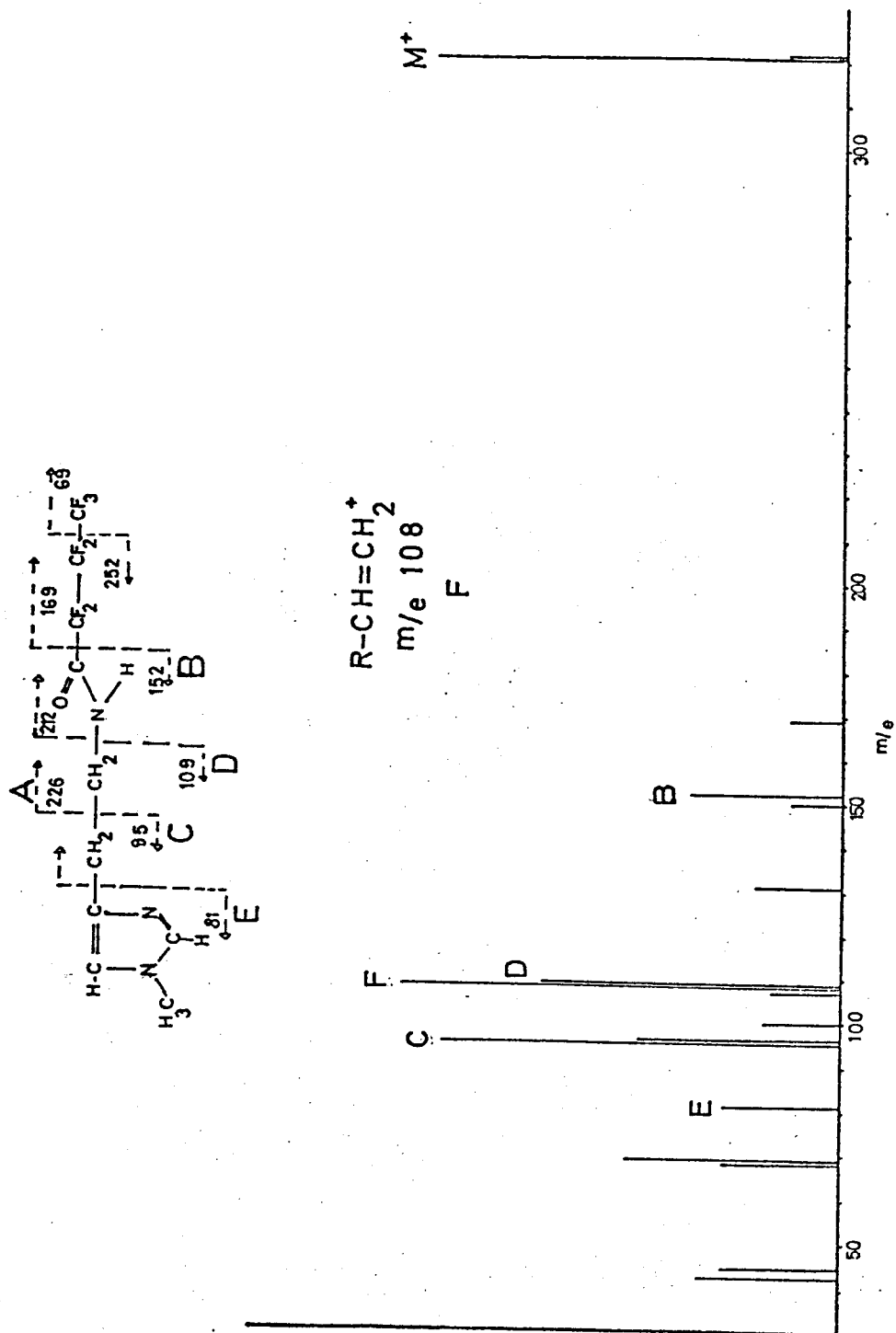


Figura 44.-Espectro de masas de la metil histamina heptafluorobutirada.

TABLA 14

	<u>HM</u>		<u>Me HM</u>	
	PF %	HFB %	PF %	HFB %
321				58
307		37		
271			33	
257	42			8
169		42		22
152			13	8
150		60		
138	26	14		
131		50		13
119	36	54	20	
109	9	29	32	42
108	11	54	87	63
100	31	69	8	11
96	8	18	32	28
95	44	77	100	57
94	12	94		
82	32	42		
81	87	95	16	18
69	29	100	18	31

119, 169). Los espectros correspondientes a las dos clases de derivados obtenidos quedan resumidos en la tabla 14-- donde se puede apreciar que, con excepción del pico molecular, prácticamente todos los otros fragmentos son comunes a los dos derivados de cada sustancia y sus abundancias son similares.

4.3.4.2.- Aminoácidos

Los espectros de masas correspondientes a los derivados heptafluorobutirados de la histidina y de la metil histidina se indican en las figuras 45 y 46 . De forma similar a lo observado con los derivados de la -- histamina y metil histamina, existe una correspondencia entre los fragmentos existentes en los espectros de los derivados pentafluoropropionados el pico molecular corresponde también a la entrada de dos grupos --aquí -- heptafluorobutirados-- con una pérdida de cuarenta y cuatro unidades de masa. De igual forma se observan los -- diferentes picos de baja abundancia que permiten la -- fragmentación de estos derivados sobre la base de un -- mismo mecanismo (ver tabla 15).

Figura 45.-Espectro de masas de la histidina heptafluoro-
butirada.

HD-HFB
P.M. 503

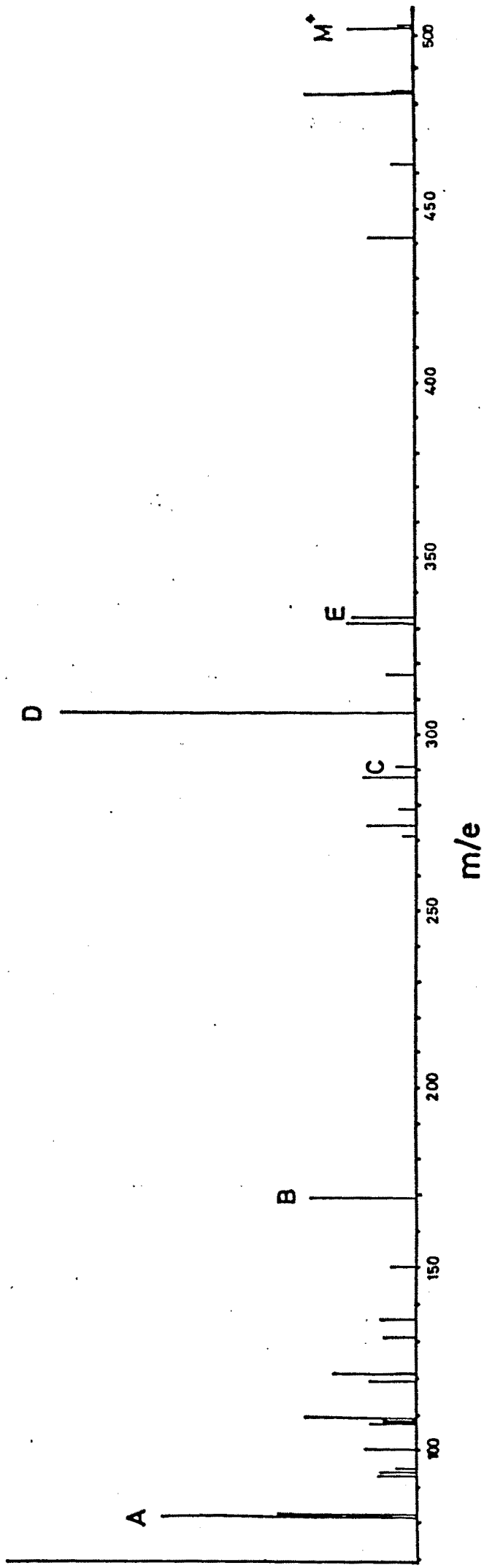
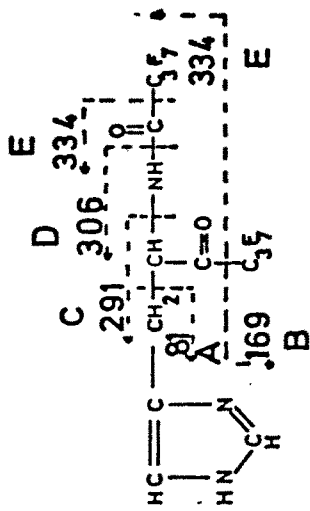
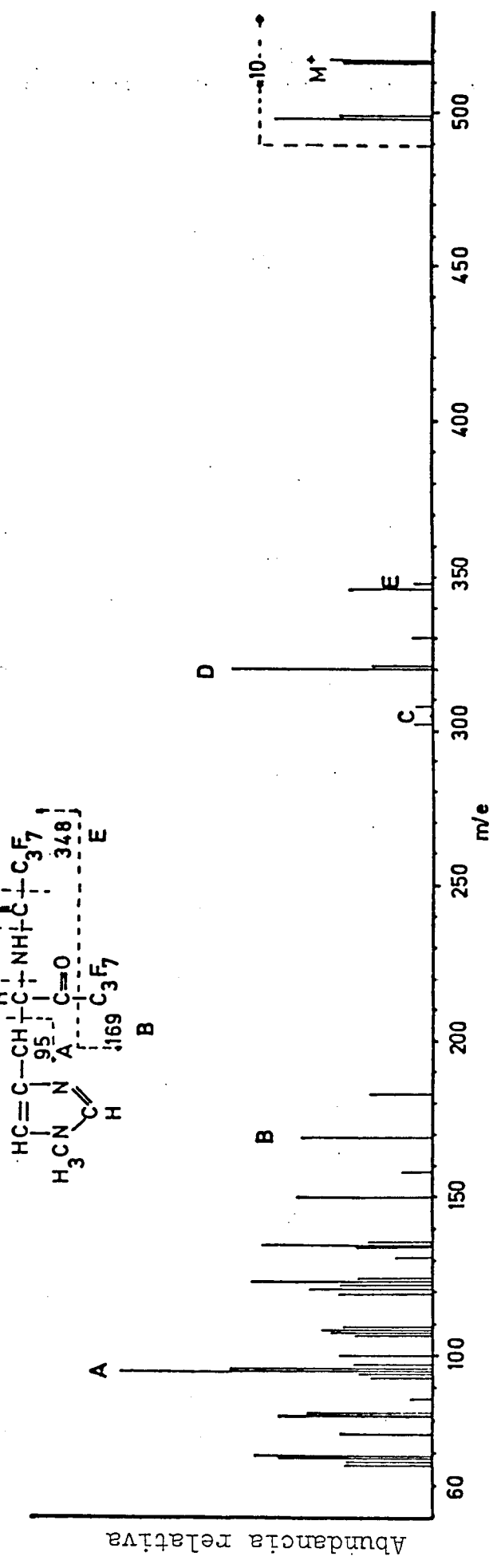


Figura 46.-Espectro de masas de la metil histidina hepta-
fluorobutirada.

MeHD.HFB
PM 517



Abundancia relativa

ESPECTROS DE MASA DE LOS DERIVADOS HEPTAFLUOROBUTIRADOS DE LA HISTIDINA Y METILHISTIDINA

	<u>MeHD</u>	<u>HD</u>		<u>MeHD</u>	<u>HD</u>
519	0.43(M 2)	-			
517	0.43 (M)	-			
503	-	3.64(M)	100	22.86	14.84
502	-	17.64(M-1)	97	4.57	-
501	0.71	-	96	51.43 (V)	-
500	0.71	-	95	100	6.06
484	-	6.3(M-19)	94	11.57	10.08
483	-	30.24(M-1)-19	93	3.29	11.43
463	-	5.46	85	3.14	-
442	-	13.3	83	2.86	-
362	2.71	-	82	17.14	39.06(V')
348	7.14(VI)	-	81	27.14	71.82
346	6.71(VII)	-	80	3.14	-
334	-	3.06(VI')	79	2.57	-
333	-	17.64	77	7.14	-
332	-	2.25(VII')	69	57.14	42.84
331	-	18.62	68	27.14	3.85
330	2.57	-	67	7.71	-
322	13.14	-			
321	17.14	-			
320	85.71(I)	-			
317	-	7.84			
307	1.43	-			
306	-	100(I')			
302	2.43(IV)	-			
291	-	5.6			
288	-	15.12(IV')			
282	2.00	-			
279	-	4.9			
274	-	14			
271	-	3.78			
226	5.57	-			
169	17.14	30.24			
153	2.86	-			
152	28.57	-			
150	20	7			
136	4.71	10.36			
131	18.57	9.24			
124	7.29	-			
123	4.71	-			
121	4.86	22.68			
119	45.71	13.16			
110	9	-			
109	74.29	31.5			
108	94.29	8.96			
107	20	13.16			
106	3.14	-			

Los números romanos indican los iones significativos cuya estructura se representa en las figuras 47 y 48.

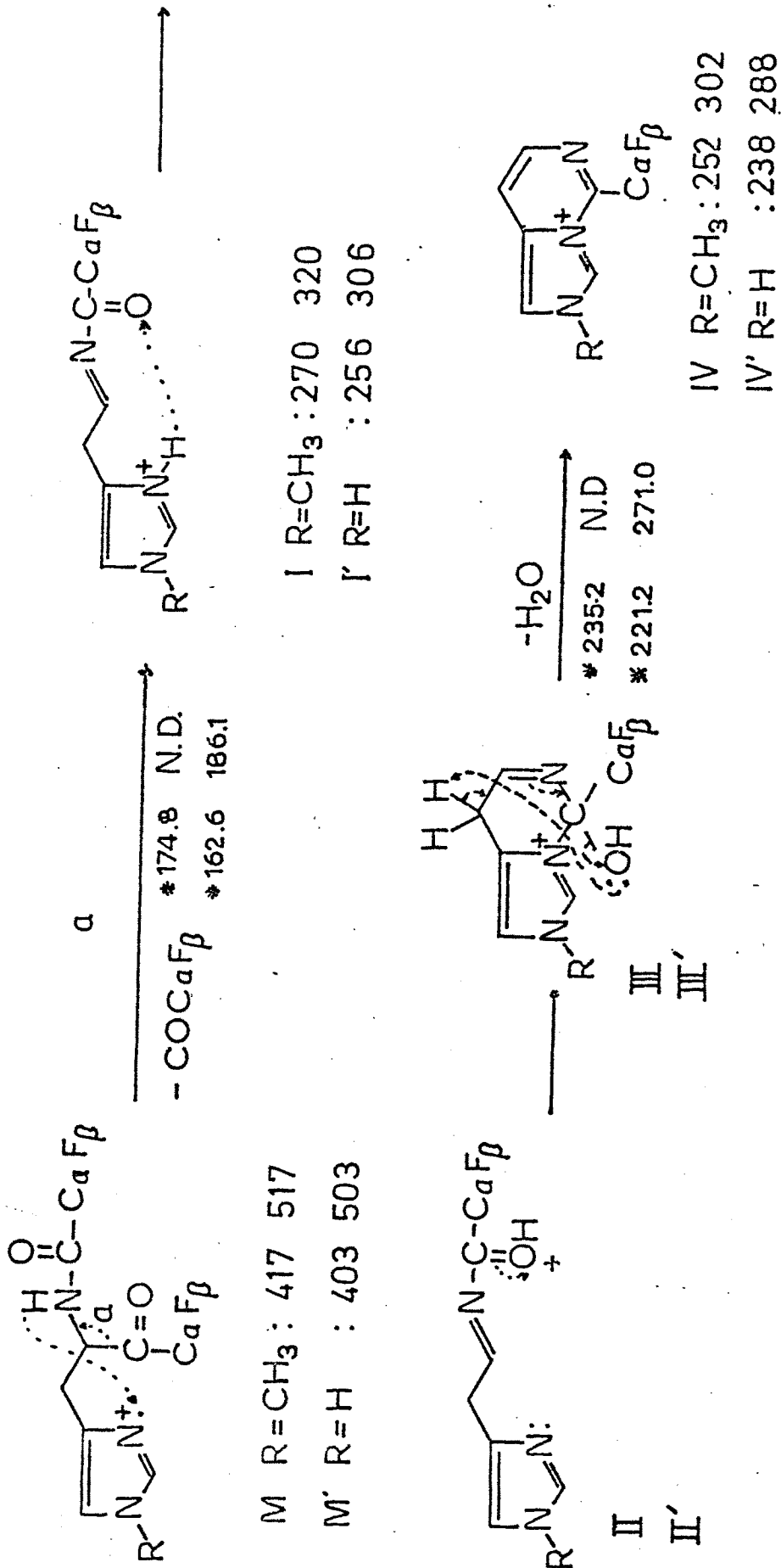
4.3.5.- ESTUDIO DE LA FRAGMENTACION DE LOS DERIVADOS ACI-
LADOS DE LA HISTIDINA Y METIL HISTIDINA.

El modelo de fragmentación aquí propuesto se aparta de los conceptos comunmente aceptados sobre la formación del "fragmento amino" en el sentido de que, en este caso, no tiene lugar una rotura directa del enlace $C_{\alpha}CO$. En su lugar la ionización de la molécula por impacto electrónico, transforma en acidica uno de los átomos de nitrógeno del núcleo imidazol inicialmente básico. Este nitrógeno, a su vez, participa en una migración 1,6 de un hidruro capturando el hidrogeno del grupo α -amino.

Esto conduce a la especie molecular representada en la figura 47 con el número I o I' en función de la naturaleza de R que puede ser o un grupo metilo o un hidrógeno, según si se trata de los derivados de la metil histidina o de la histidina respectivamente. La flexibilidad de la estructura del amino ácido unida a la reactividad del átomo de nitrógeno ionizado a nivel del núcleo imidazol favorece la interacción entre estos dos lugares alejados.

Tal proceso puede ser considerado como la fuerza desencadenante responsable de la formación de la mayoría de otras especies iónicas estructuralmente sig

Figura 47.-Fragmentación de los derivados acilados 20I de la histidina y metil histidina a partir de la ionización del núcleo imidazol.



nificativas. (134).

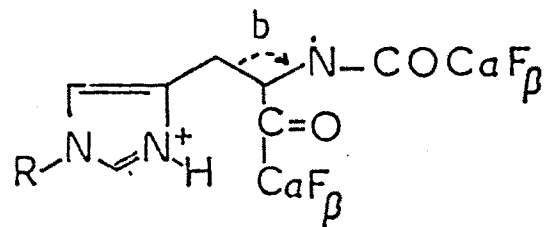
El hidrógeno puede ser seguidamente captado por el grupo carbonilo con transferencia de la carga positiva a este sitio formándose así las especies intermediarias II o II' que luego se ciclan con localización de la carga positiva de nuevo sobre el nitrógeno del núcleo imidazol (III o III'). Por deshidratación intramolecular se forman los iones aromáticos relativamente estables IV o IV'.

El grupo funcional de la parte acilada se ha representado en esta figura como $C_x F_y$ siendo $X = 2$ y $y = 5$, para los derivados PFP y $X = 3$, $y = 7$ para los derivados HFB. También, de los dos valores dados para el ión molecular M de los derivados de la metilhistidina -- ($R=CH_3$), el primero corresponde al derivado MeHD-PFP -- (m/e 417) -ver tabla 13- y el segundo corresponde al derivado HFB (m/e 517) -ver tabla 15 -. Las masas de los otros fragmentos se dan en el mismo orden en la figura 47. La pérdida del grupo perfluoroacilo del ión M o M' está comprobada por los correspondientes iones metastables indicados con un asterisco y su valor de m/e en la figura 47. De forma idéntica se indican los correspondientes a la pérdida de agua de los iones III o III' para formar los iones IV o IV'.

Por otra parte, la rotura homolítica del enlace $C_\alpha - C_\beta$ de las especies moleculares intermedias conduce

a la formación de los iones V o V' como se muestra en la figura 48. Estos pueden, luego, perder un hidrógeno formándose así los fragmentos m/e 95 o 81 de mayor abundancia. Sin embargo, como no existe una señal apreciable de la transición metastable correspondiente a esta pérdida de hidrógeno, esto se puede considerar como una indicación de que los dos fragmentos provienen de la rotura directa homolítica del enlace $C_a - C_\beta$ del ión molecular M o M', antes del reordenamiento del hidrógeno (figura 47). Se ha descrito que el ión m/e 82, que es el pico base del espectro de masas del derivado etil ester de la histidina pierde hidrógeno, formándose un ión mucho más pequeño a m/e 81. Esta reacción viene acompañada de un ión metastable a m/e 80 (44) no detectado en nuestro caso.

En relación con los dobletes que se observan - en todos estos espectros a veintiocho unidades de masa - más arriba que las masas de los iones I o I' (figura 47), su origen puede provenir, o bien, a través de la pérdida de los grupos C_2F_5 o C_3F_7 de estos iones. Se forman así los fragmentos VI o VI' (ver figura 48) que sufren luego una desaturación del enlace $C_a - C_\beta$ formándose los iones VII o VII'

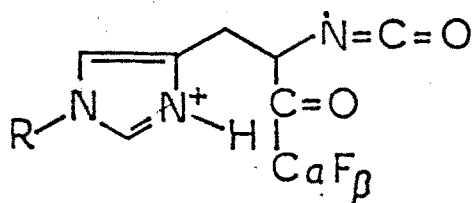
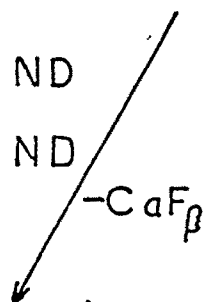


M R = CH₃ : 417 517

M' R = H : 403 503

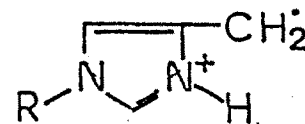
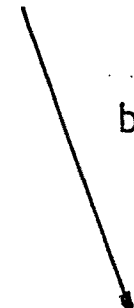
+ 212.9 ND

+ 200.1 ND



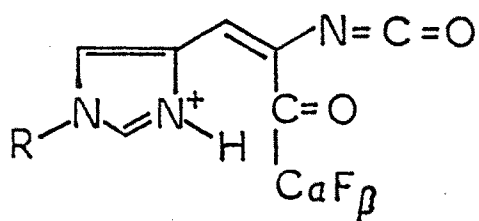
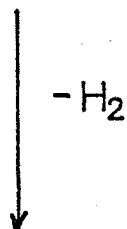
VI R = CH₃ : 298 348

VI' R = H : 284 334



V R = CH₃ : 96 96

V' R = H : 82 82



VII R = CH₃ : 296 346

VII' R = H : 282 332

Figura 48.-Fragmentación de los derivados acilados de la histidina y metil histidina a partir de la rotura homolítica del enlace C_α-C_β.

4.4. CONCLUSIONES

El estudio por espectrometría de masas de los compuestos de referencia ha podido demostrar que el núcleo imidazol se fragmenta según unos mecanismos ya descritos como son la pérdida de los grupos HCN o CH₂ CN. Al mismo tiempo se han establecido los espectros de los metabolitos ácidos de la histamina.

En cuanto a los derivados sililados sintetizados, los espectros de las aminas muestran un pico base a m/e 174 correspondiente a la rotura en β descrita y - los espectros de los ácidos tienen como pico base el ión M-44 formado por pérdida de CO₂ en cada caso.

Los derivados pentafluoropropionados y heptafluorobutirados alcanzan masas moleculares mucho más altas que los derivados sililados y, veremos en el capítulo siguiente que esto es una propiedad importante para la posible utilización de estos derivados para el análisis de estos -- compuestos en muestras biológicas. Al mismo tiempo, se ha podido atribuir una estructura química a estos nuevos derivados acilados. El estudio de la fragmentación de los derivados acilados de la histidina y metil histidina ha permitido explicar la presencia de los diferentes picos del

espectro en base para muchos al caracter básico del núcleo imidazol. Estos mecanismos son similares para los derivados pentafluoropropionados y heptafluorobutirados.

Capítulo 5

5.- ESTUDIO CRITICO DEL METODO CROMATOGRAFICO Y ESPECTRO-
METRICO DESARROLLADO PARA SU APLICACION AL ESTUDIO DE
MUESTRAS BIOLÓGICAS PREVIA ADSORCION DE LOS COMPUES-
TOS SOBRE RESINA AMBERLITA X AD-2.

5.1.- ANTECEDENTES

5.1.1.- Aplicación de la fragmentografía de --
masas al análisis de aminas biógenas en
muestras biológicas

La fragmentografía de masas se ha usado para -
determinaciones cualitativas y cuantitativas. En los años
1968-1971 se utilizó para la identificación en plasma de
metabolitos de clorpromazina y nortriptilina(63,64). Pos-
teriormente, se ha usado para la determinación de compues-
to endógenos, como prostaglandinas (20)y neurotransmis@
res (12,21,32).En la literatura existen numerosas referen-
cias relativas a las principales técnicas y aplicaciones
biológicas de las técnicas de detección e identificación
basadas en la fragmentografía de masas (36,56,74,175)-
(165). En cuanto al estudio de sustancias neurotransmiso-
ras, los principales trabajos se han realizado en el cam-
po de las catecolaminas (42, 87) de la acetilcolina en
varias partes del cerebro de rata (67,84) y de los ácidos

glutámico y γ amino-butírico (12). Otros trabajos importantes han sido realizados sobre el metabolismo de la serotonina, también en tejido cerebral (9,40,50).

Por lo que respecta al estudio de la histamina y compuestos relacionados con esta técnica, hasta el momento no se conoce ningún trabajo en este campo. En efecto, como se ha visto en los capítulos anteriores, solamente unas pocas publicaciones tratan de la cromatografía de gases de la histamina y de sus metabolitos y utilizan la espectrometría de masas únicamente para identificar los derivados formados.

5.1.2.- Cromatografía de adsorción utilizando resina Amberlita XAD-2.

La resina Amberlita XAD-2 es un polimero de estireno y divinilbenceno con una superficie de $330 \text{ m}^2/\text{gr}$ (seca). Existe en varios tamaños, desde $300\text{-}1000 \mu\text{m}$ hasta $0,5\text{-}1,5 \mu\text{m}$ (ultrafina) con la cual pueden prepararse placas de capa fina (27). Se ha postulado que la extracción de compuestos mediante esta resina presenta ventajas sobre las extracciones con disolventes orgánicos en cuanto que proporciona altos rendimientos y que permite obtener un conjunto de varias sustancias que de otra manera no

serían extraídas por los métodos convencionales (99).

Esta resina se ha utilizado para el aislamiento de distintos grupos de sustancias y dentro de ellos, en distintas aplicaciones. Así, se ha usado para cromatografía de gases (183) estudios bioquímicos (68,71), análisis de prostaglandinas en líquido amniótico o plasma (89) estudios de peptidos en homogenados de tejidos - (181) análisis de medicamentos (11,80) cromatografía líquida de alta presión.(33).

En cuanto a la utilización de este tipo de resinas en el campo de las aminas biógenas, existe referencias sobre su utilización para las catecolaminas e indolalquilaminas (9,155).

No tenemos noticias de que se haya empleado - esta resina para la extracción de ninguno de los metabolitos de la histamina ni para la extracción conjunta de todos estos compuestos.

De hecho, la utilización de esta resina para el aislamiento de los compuestos imidazolicos en material biológico sólo tiene sentido si se posee un método analítico suficientemente específico como para obviar la

inespecificidad de la adsorción en el polímero. Si se cumple este supuesto, su utilización ofrece dos grandes ventajas: En primer lugar, está el hecho de que todas las sustancias de una misma familia puedan aparecer en una sola fracción permitiendo el análisis simultáneo de todas ellas. Si las mismas están implicadas en una misma ruta metabólica, se abre la posibilidad de analizar lo que se denomina un -- perfil metabólico. Por otra parte, los procesos de manipulación de la muestra biológica se reducen al mínimo ya que en general, el uso de la resina XAD-2 implica tan -- solo un proceso de adsorción-desorción-. Como además las condiciones empleadas pueden ser relativamente drásticas (pH extremos o calentamiento de la muestra ya que la re sina puede usarse a temperaturas superiores a 150 °C), debido a la gran estabilidad de las sustancias aquí ana lizadas, tiene lugar al mismo tiempo, una eliminación de ciertos componentes de la muestra.

Otros autores(98,120) han mencionado que el proceso de adsorción en este tipo de resinas puede ser dependiente del pH de la muestra, de la cantidad de resina empleada, y del flujo de elución cuando la resina se emplea en una columna.

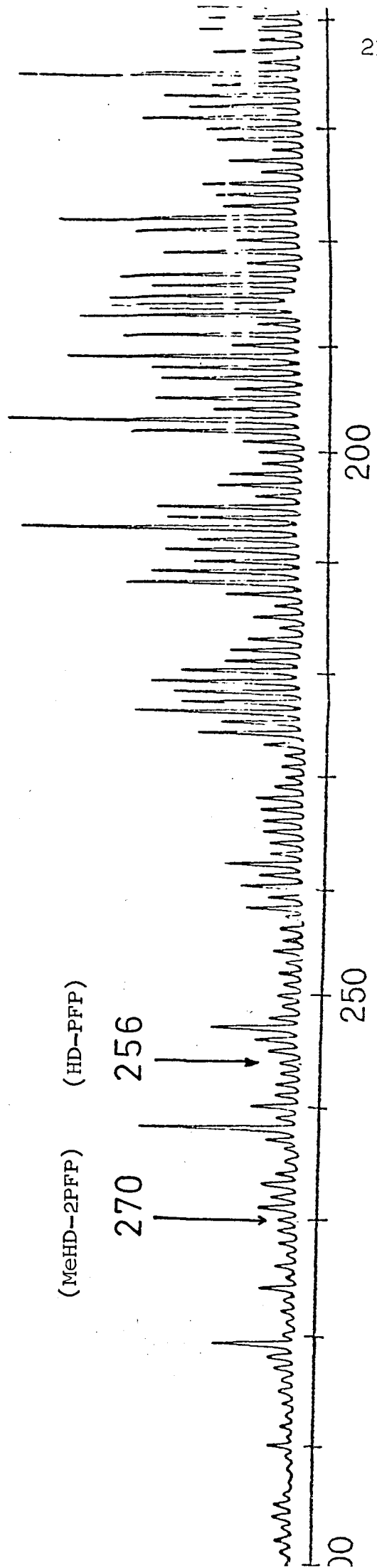
5.2.- METODOS

5.2.1.- FRAGMENTOGRAFIA DE MASAS POR DETECCION MULTIPLE DE IONES.

Los trabajos de fragmentografía de masas se han realizado empleando como fase estacionaria la silicona -- OV-17, la cual se utilizó porque los iones más importantes de la misma que aparecen en el espectrómetro de masas debido al inevitable sangrado de la columna sirven de referencia para localizar con facilidad los iones seleccionados y además no interfieren con ellos .- En la figura 49, se presenta una parte del espectro de masas del sangrado de la fase OV-17 y en ella puede verse como se utilizan ciertos de sus iones para localizar los iones que queremos detectar.

La unidad de detección múltiple de iones empleada en este trabajo fue diseñada y construida en el laboratorio (8) y actúa del siguiente modo: a cada uno de los cuatro canales, se le añade al voltaje de aceleración -- nominal (V), un incremento de voltaje determinado que varía en función del tiempo $\Delta V(t)$. Este voltaje se genera por medio de la suma de un voltaje fijo suministrado por una fuente de voltaje programable y una onda de diente de

Figura 49.-Representación parcial del espectro de masas del sangrado de la fase OV-I7.



(MeHD-2PFP)

(HD-PFP)

270 256

200

200

siena suministrada por un generador de rampa.

De esta forma, se obtiene un mini barrido alrededor de cada una de las masas deseadas. La alternancia de los cuatro diferentes valores $\Delta V(t)$ y su sincronización con el barrido horizontal de una pantalla osciloscópica se realiza por medio de un programador digital.

Las cuatro señales son recogidas y amplificadas separadamente, apareciendo simultáneamente en la pantalla del osciloscopio y en los registradores conectados al sistema. El registro osciloscópico se utiliza para la búsqueda y focalización inicial de los picos. Debido a la falta de un marcador de masas, la búsqueda se basa en picos de la fase estacionaria cuyo valor m/e es conocido y como se ha indicado en la figura 49. Al mismo tiempo, el registro osciloscópico permite obtener una imagen continua del grado de focalización dentro de cada canal, -- con lo cual se minimizan errores debidos a desfocalización.

5.2.2.- ESTUDIO DE UN METODO DE EXTRACCION EN COLUMNA CROMATOGRAFICA CON RESINA AMBERLITA XAD-2.

El proceso general de extracción en columna -

cromatográfica, utilizando la resina XAD-2, puede esquematizarse del siguiente modo: se prepararon columnas de vidrio de 7 mm. de diámetro interior rellenas con resina XAD-2 hasta una altura de 13 mm. El llenado de las columnas se realizó siempre con la resina suspendida en agua después de considerables lavados acuosos de la misma, posteriores a un primer mojado con metanol. Después de lavar la columna con agua destilada se pasó el líquido a extraer a un flujo de 0,3 ml/min. Sin dejar secar la columna, se añadió agua ajustada al mismo pH que el líquido anterior en cantidad similar a la de la primera muestra. Se recogieron fraccionadas las aguas de lavado y se eluyó con 10-15 ml. de metanol.

Se recogió el aluato en fracciones de 5 ml. Se realizó un estudio de la influencia del pH analizándose siempre las muestras con un contador en centelleo ya que se utilizaron ^{14}C Histidina y ^{14}C histamina, provenientes de Radiochemical Center Amersham, para esta parte del trabajo.

5.3.- RESULTADOS

5.3.1.- COMPARACION DE LOS TRES GRUPOS DE DERIVADOS SINTETIZADOS PARA SU DETECCION POR FRAGMENTOGRAFIA DE MASAS.

Los espectros de masas de los derivados sintetizados se han estudiado en el capítulo anterior. Estos espectros en general, presentan iones muy abundantes -- provenientes de la rotura del enlace en posición α y en posición β . Dichas escisiones dan lugar en todos los compuestos a estructuras características causantes de los iones m/e 81, 94, 95 y 108 (figura 50). Pero, por aparecer a valores bajos, esos iones no se pueden utilizar, ya que pueden facilmente ser comunes a otras y, por esto, impiden la realización de espectrometría de masas de grupo funcional ya que los otros iones abundantes de los espectros no son comunes a todos los compuestos.

5.3.1.1.- IONES SELECCIONADOS PARA EL ANALISIS DE LAS AMINAS.

Los derivados de la histamina y de la metil --

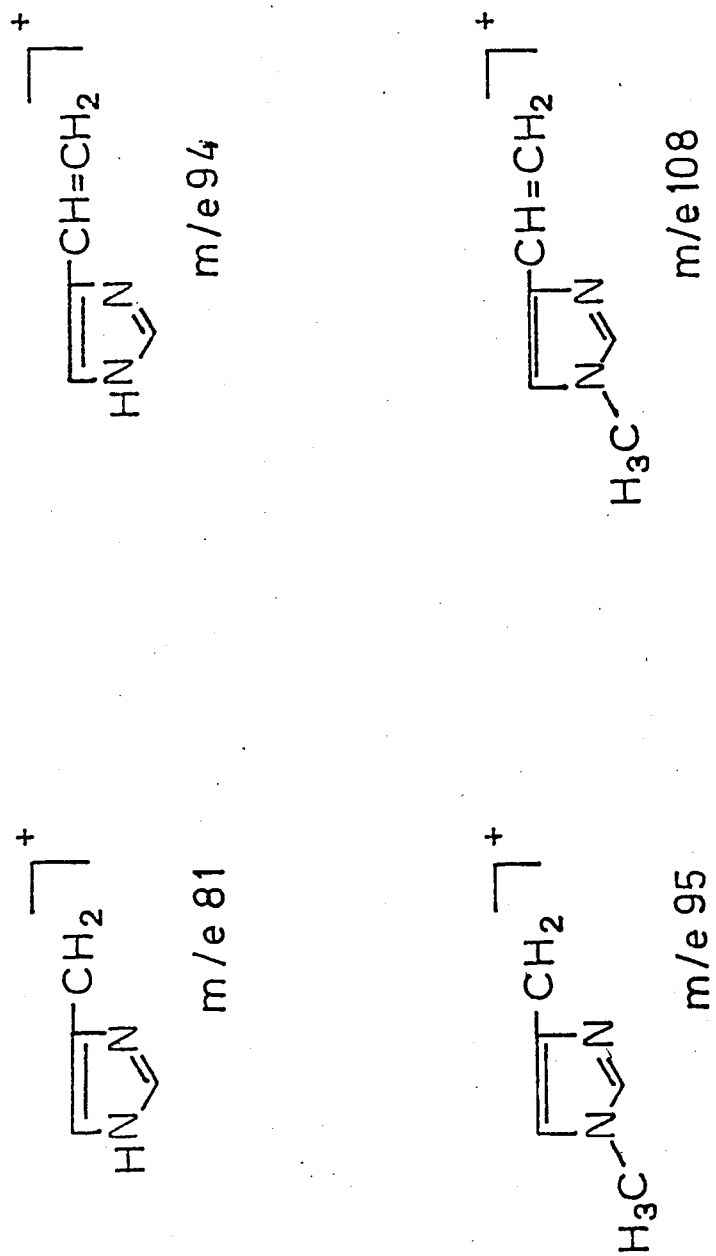


Figura 50.-Iones comunes a todos los derivados sintetizados.

histamina estudiados en este trabajo son de tres tipos: sililados, pentafluoropropionados y heptafluorobutirados. En la tabla 16 se han resumido los iones más altos y más abundantes de cada derivado, basándonos en los espectros presentados en el capítulo anterior.

TABLA 11

Derivado	Histamina		Metil Histamina	
	m/e	%	m/e	%
TMS	174	100	174	100
PFP	176	12		
(P.M.)	257	43	271	33
HFB				
(P.M.)	307	33	321	59

En base a esta tabla, se ponen de manifiesto -- varios hechos que, unidos a los datos correspondientes a

la estabilidad de los derivados demuestran que los derivados heptafluorobutirados son preferibles para el análisis por fragmentografía de masas de estas dos aminos: en efecto, los derivados acilados (PFP y HFB) presentan picos abundantes en zonas más altas del espectro que los derivados sililados. Por otra parte, estos derivados presentan picos moleculares abundantes (43% y 33% para la histamina y 33% y 59% para la metil histamina) lo que - hace aconsejable su elección ya que son específicos de la sustancia.

Los derivados heptafluorobutirados, teniendo un peso molecular más alto que los derivados pentafluoro propionados, su utilización es más aconsejable, ya que menos compuestos de la muestra pueden interferir con ellos. Es decir, que para el análisis por fragmentografía de masas de estas dos aminos los valores seleccionados - son m/e 307 y m/e 321.

5.3.1.2.- Iones seleccionados para el análisis de los ácidos.

Los derivados de los ácidos imidazol y metil imidazol acético son los derivados sililados. En la tabla 12 de capítulo anterior, se ve que poseen varios iones

importantes en la parte alta del espectro y que también para ellos el pico molecular es suficientemente abundante como para ser utilizado para el análisis por fragmentografía de masas. Por esto, los picos seleccionados para estas dos sustancias son para el ácido imidazol acético m/e 270 (91%) y para el ácido metil imidazol acético m/e 212 (57%).

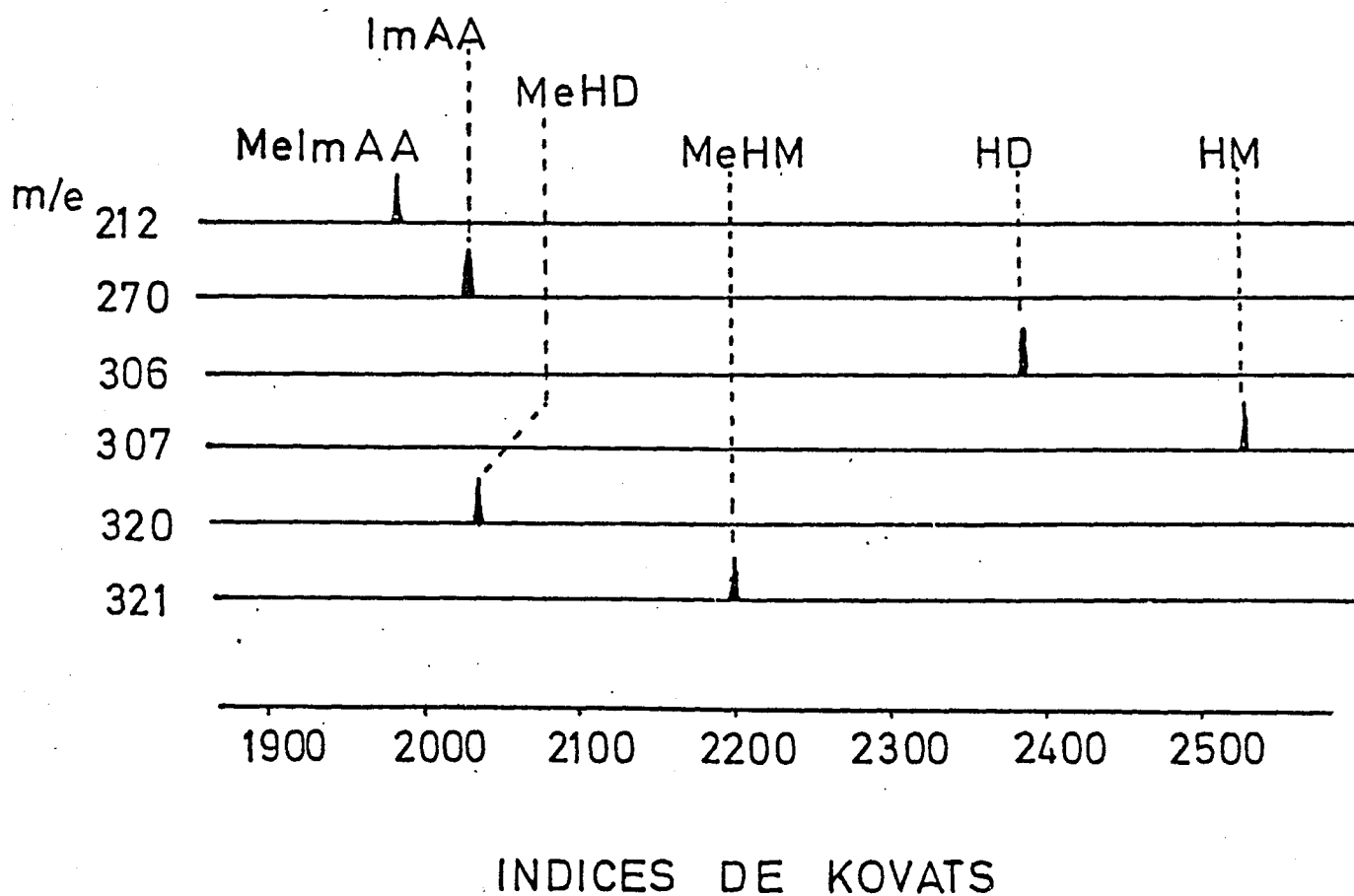
5.3.1.3.- Iones seleccionados para el análisis de los aminoácidos.

Se han estudiado en este trabajo los derivados acilados de la histidina y de la metil histidina. Como se puede ver en las tablas 13 y 15, los iones más abundantes de la parte alta del espectro son los que corresponden al fragmento I o I'.

Como para las aminas, los derivados heptafluorobutirados presentan fragmentos abundantes a valores más altos que los de los derivados pentafluoropropionados y por esto, se deben escoger para su análisis por fragmentografía de masas. Tendremos así para la histidina el -- fragmento correspondiente a m/e 306 (100%) y para la metil histidina el correspondiente a m/e 320 (86%).

Se han representado en la figura 51 los iones seleccionados para estas 6 sustancias proporcionalmente a sus abundancias, así como sus índices de Kovats en una fase estacionaria de OV-17 al 3%

FIGURA 51
Iones seleccionados para las seis sustancias en estudio.



5.3.2.- RESULTADOS OBTENIDOS CON EL METODO DE EXTRAC-
CION CON RESINA AMBERLITA XAD-2.

La resina Amberlita XAD-2 es un polimero de poliestireno y divinil benceno con una gran afinidad por los restos hidrófóbicos de las moléculas. El estudio de la extracción en columna cromatográfica se realizó en base a la adición a muestras acuosas de histidina ^{14}C y de histamina ^{14}C . Se analizó la posible influencia del pH sobre el rendimiento de extracción. Debido probablemente a la importante polaridad de los compuestos analizados, se constató que no quedaban retenidos en la columna y que se recogían en las aguas de lavado. El interés de este dato reside en que otras aminos biógenas más sensibles a procesos de degradación quedan retenidas sobre la resina. Esto nos permite recogerlas por separado y no aplicarles el tratamiento de evaporación al baño de arena a $104\text{ }^{\circ}\text{C}$ de los compuestos imidazólicos, gracias a esto, los dos grupos de compuestos se recuperan a partir de una misma muestra en dos fracciones distintas, lo que permite aplicar a cada uno un tratamiento posterior específico para su posible análisis.

Así, el proceso de extracción queda esquematizado de la siguiente forma:(fig.52)

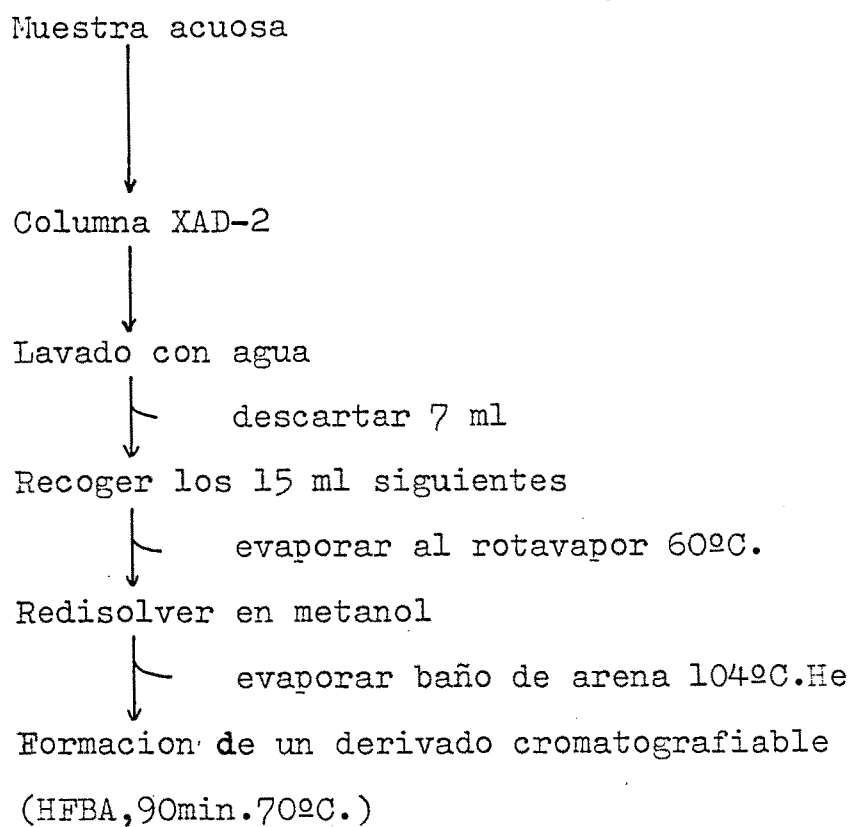


Figura 52.-Esquema del proceso de extracción de las 2 aminas y de los dos aminoácidos con la resina XAD-2.

Siguiendo este esquema de extracción, los rendimientos de recuperación para la histidina fueron de 86,23% y para la histamina de 78,91%, rendimientos que se pueden considerar aceptables y que no variaron al cambiar el pH.

5.3.3.- PROBLEMAS ANALITICOS ENCONTRADOS

Los resultados presentados en los capítulos anteriores se obtuvieron después de resolver diferentes -- problemas analíticos encontrados, en el estudio de los derivados sililados y de los derivados acilados. Estos problemas analíticos se han mencionado en repetidos trabajos para la histidina y la histamina. En nuestra experiencia, estos problemas han sido comunes a todas las sustancias estudiadas ya que están ligados principalmente a las propiedades del núcleo imidazol: En la introducción se ha mencionado el problema relativo al tautomerismo del núcleo imidazol y a la formación de complejos de coordinación con varios iones metálicos (Cu, Zn, Co, Ag, etc.) así como de complejos de transferencia de carga.

Es decir, que desde un punto de vista analítico, ciertos derivados imidazólicos existirán también en dos formas tautómeras y podrán formar complejos de coor

dinación con los iones metálicos presentes. Por otra parte, es interesante la buena estabilidad de estas sustancias ya que, de cara a una extracción biológica, se les puede aplicar tratamientos relativamente drásticos (pH extremos, temperaturas altas) para eliminar los otros componentes de las muestras.

Los problemas analíticos encontrados, aunque sea en grado distinto provienen por una parte del sistema cromatográfico y por otra parte de la interfase que conecta el cromatógrafo de gases con el espectrómetro de masas.

5.3.3.1.- Sistema cromatográfico

A.- METODOLOGIA APLICADA

Los problemas analíticos relativos al sistema cromatográfico se pusieron de relieve a través de las imágenes de adsorción en los registros cromatográficos y la discrepancia de resultados al inyectar simultáneamente una misma muestra en dos sistemas cromatográficos análogos. Por todo esto, se tuvo que realizar un estudio sistemático de este fenómeno con el fin de 1) localizar los puntos activos del sistema cromatográfico responsa-

bles de esta adsorción y 2) aplicar el tratamiento adecuado a fin de anular la actividad de estos puntos. El sistema cromatográfico está compuesto de tres partes principales (fig. 5).

- bloque de inyección
- columna cromatográfica
- detector de llama

Las modificaciones introducidas fueron comunes a los diversos elementos y tuvieron como objeto aplicar un tratamiento químico a los elementos que pudieran provocar adsorciones y eliminar así los puntos activos. Este tratamiento se basa en el bloqueo de los diferentes grupos activos presentes por agentes de silanización. Por ejemplo en el vidrio se eliminan así los grupos hidroxilo que quedan libres en la superficie interna y podrían retener las sustancias vaporizadas según la reacción con el dimetilclorosilano (DMCS).

- bloque de inyección.- Se acondicionó la cámara de vidrio del bloque de inyección mediante lavado con mezcla crómica durante veinticuatro horas seguido de una silanización durante un tiempo similar con una solución al 10% de DMCS en tolueno.

- la columna cromatográfica.- A parte de la silanización de la columna antes de su relleno con la fase cromatográfica, se cambiaron regularmente sus tapones de lana de vidrio. Esta lana de vidrio fue previamente silanizada y secada a la estufa. También a lo largo del estudio, se inyectaron repetidamente cantidades del orden de 3-5 μ l de hexametildisilazano en la columna con el mismo objeto de bloquear los puntos activos posiblemente presentes.

- el detector.- El detector de llama se limpió regularmente. Para esto, se demontó y las diferentes partes metálicas se sumergieron en ácido fluorídrico ya que cualquier suciedad a nivel del "jet" o del colector puede alterar la corriente producida en la llama.

B.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos sin aplicar estos tratamientos no fueron tan positivos como se podía preveer.

Los derivados sililados se forman con más facilidad y son menos estables (se degradan al cabo de algunas horas frente a una semana para los derivados acilados). Para trabajar con toda seguridad con estos derivados, fue necesario limpiar y silanizar cada quince días la cámara de vidrio del bloque de inyección e inyectar un total de unos diez μ l de BSTFA antes de empezar el análisis. Con esto, se consiguió bloquear los puntos activos de la columna y evitar en parte la formación de unos depósitos excesivos de silice en el colector del sistema de detección; la silice proviene de las muestras, ya que estas se inyectan disueltas en BSA/TMCS.

Por todo esto, se puede considerar que de cara a un trabajo de análisis por cromatografía de gases, los derivados acilados presentan las ventajas de ser más estables y de adsorberse menos en el sistema cromatográfico. Solamente el análisis de los metabolitos ácidos se tendrá que hacer a través de la formación de los derivados sililados ya que no se pueden acilar con las reacciones estudiadas.

5.3.3.2.- Sistema de cromatografía de gases- -espectrometría de masas.

Los problemas encontrados en el análisis cromatográfico

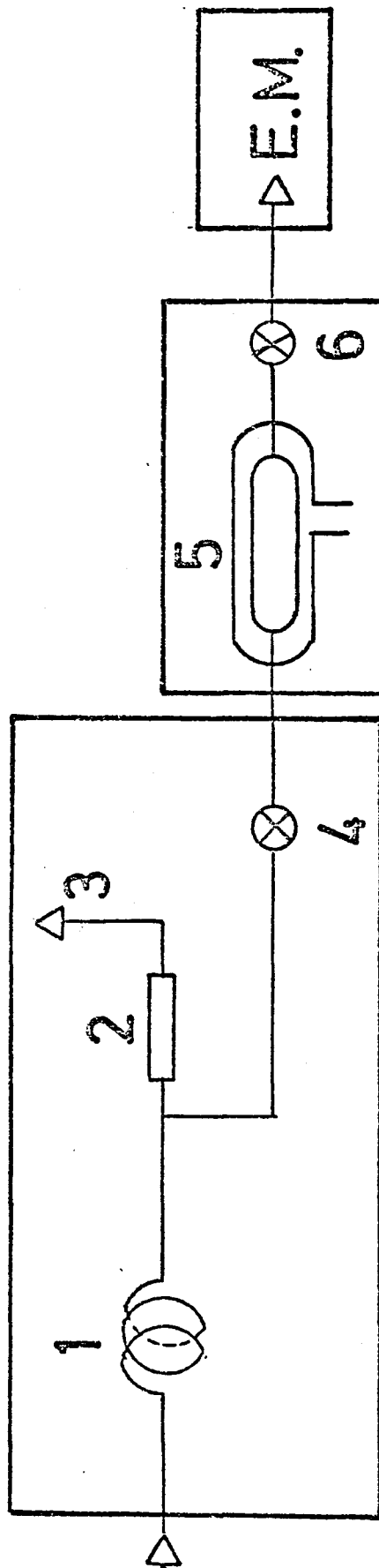
tográfico de los derivados estudiados fueron similares pero de más difícil solución en cuanto fue necesario realizar modificaciones del sistema CG-EM a parte del tratamiento químico del sistema cromatográfico.

A.- METODOLOGIA APLICADA

Los componentes del sistema de cromatografía de gases-espectrometría de masas son el cromatógrafo de gases, el espectrómetro de masas y el sistema de interfase que une ambos instrumentos (fig.7,9).

Los tratamientos aplicados al cromatógrafo fueron similares a los descritos anteriormente para el sistema cromatográfico: silanización de la camisa de vidrio del inyector y de los tapones de vidrio de la columna cromatográfica. También, regularmente, se inyectó en la columna cantidades del orden de 10 μ l de BSTFA.

- Interfase.- La conexión que une el cromatógrafo al espectrómetro de masas estaba hecha según el esquema de la figura 53: a la salida de la columna cromatográfica, un sistema de restricción permitía enviar un 5% de los compuestos al detector de llama y un 95% al



CROMATOGRAFO

INTERFASE

E.M.

Figura 53.-Esquema de la conexión que une el espectrómetro de masas al cromatógrafo de gases.

espectrómetro de masas que actúa como segundo detector. - Una válvula tipo "aguja" de acero permite cerrar la entrada del separador y, después del desparador, otra válvula mayor, y también de acero, cerraba la entrada del espectrómetro. El separador molecular era de vidrio fritado y su esquema se representó en la figura 9 del capítulo I.

Debido a la porosidad del vidrio, existe una gran superficie de contacto entre este y la muestra; en general se utiliza un tubo de vidrio fritado de unos 20 cm. de largo y 0,8 cm. de diametro contenido dentro de una camisa de vidrio a la cual se le conecta una bomba de vacío. El recorrido libre medio de las moléculas es del orden de unos $10 \mu\text{m}$ (10 x diámetro del poro).

Por la facilidad que tiene el núcleo imidazol para adsorberse sobre los puntos activos del vidrio y para formar complejos con átomos de metal, se estudió especialmente las partes de la interfase que presentan vidrio y acero. De hecho, toda la conexión estaba compuesta por estos dos elementos: unas líneas de acero permitían la unión cromatógrafo-separador-espectrómetro y -- unas válvulas de acero permitían cerrar en dos puntos esta línea. Por otra parte, el separador de vidrio fritado podía explicar también la fuerte adsorción observada.

En efecto, a pesar del tratamiento de silanización aplicado al sistema de cromatografía de gases, con esta interfase no fue posible en nuestro laboratorio utilizar el espectrómetro de masas como detector: el nivel de adsorción era tal que ni inyectando de ocho a diez microgramos de histamina en la columna fue posible obtener una respuesta en el espectrómetro.

Las modificaciones a realizar en la interfase para intentar solucionar este problema debían implicar la eliminación de las partes metálicas y del vidrio fritado.

La solución era, por una parte, ver si era posible simplificar esta conexión y por otra parte, recubrir todas las superficies de acero de un metal inerte como el oro. El separador molecular se debía sustituir por uno con las paredes interiores recubiertas de oro.

Unas pruebas preliminares se realizaron en el Instituto Químico Sarriá que dispone de un sistema CG-EM cuya interfase es un separador de difusión de chorro "jet". La principal ventaja de este separador es que la integridad de la muestra se conserva gracias al reducido número de choques con las paredes que sufren las partículas que llegan al espectrómetro.

Las pruebas que se hicieron fueron realizadas con los derivados sililados de la histamina y de la

metil histamina ya que son los que presentan mayor nivel de adsorción.

Con esta interfase, no se observó ningún problema de análisis, obteniéndose el perfil de la figura 54. El perfil de la parte A corresponde al perfil obtenido con el detector de llama y el de la parte B correspondiente al obtenido con el espectrómetro de masas. Se observa que estos picos están bien resueltos y no presentan signos de adsorción. Esta misma muestra inyectada en nuestro sistema CG-EM no dió ninguna respuesta con el espectrómetro.

En base a estos resultados y a fenómenos de degradación observados en nuestro laboratorio, se decidió - reducir al máximo los posibles puntos activos del sistema de conexión del cromatógrafo al espectrómetro. Después de un estudio de los diversos componentes, se eliminó una de las dos válvulas y la restante se cambió por una tipo -- "aguja de oro". La línea de acero que une los dos aparartos fue recubierta interiormente de un tubo de oro. Con - estas transformaciones se intentó evitar al máximo la presencia de metales que no sean inertes.

En cuanto al separador molecular, para eliminar los problemas debidos al vidrio fritado, se instaló un -

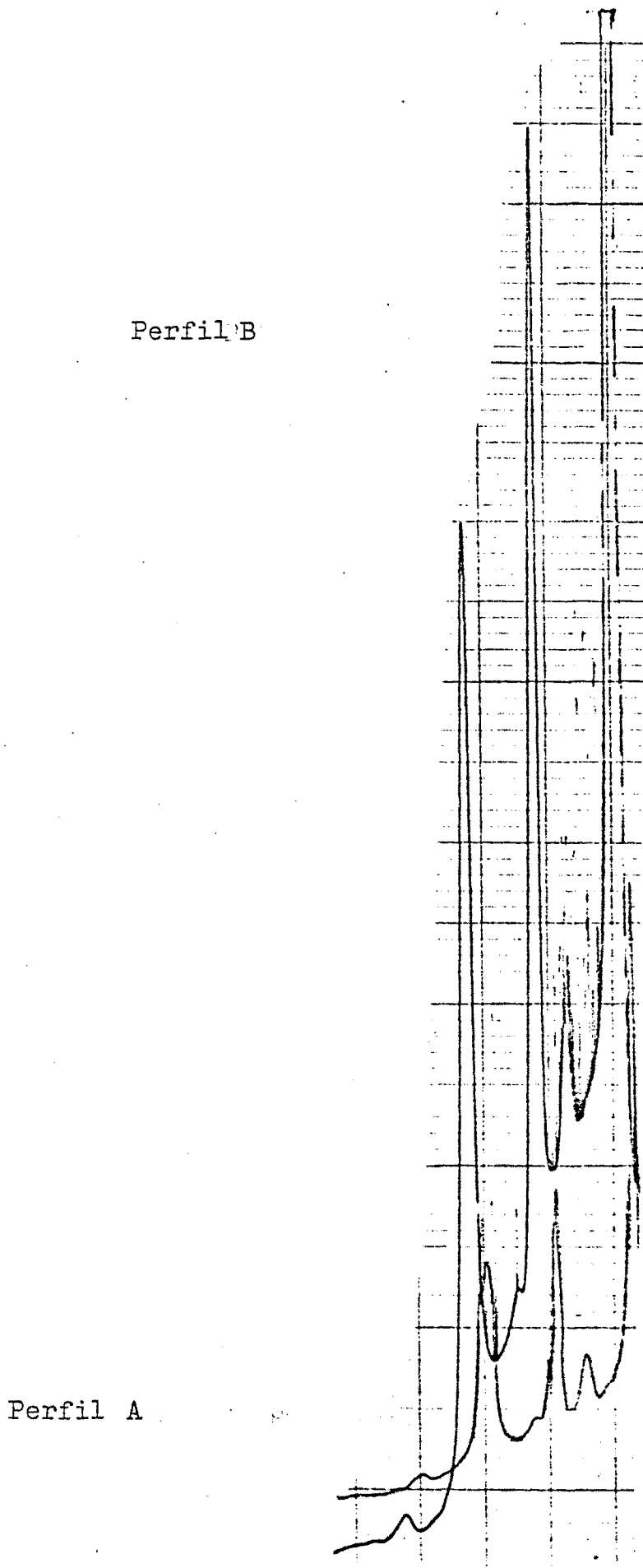


Figura 54.-Perfiles obtenidos con la histamina trisililada y la metil histamina disililada.
A:perfil cromatográfico; B:perfil obtenido porTIM.

modelo tipo "jet". Con este separador, recubierto interiormente de oro, al mismo tiempo que la eliminación de los puntos activos se mejoró el enriquecimiento de la muestra como se muestra en la tabla 17 donde se resumen los parámetros característicos de los dos separadores utilizados (138, 174).

TABLA 17

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS SEPARADORES MOLECULARES DE WATSON BIEMAN Y DE RYHAGE.

Tipo de separador	Margen de flujo(ml/min.)	Rendimiento (Y)	Enriquecimiento
<u>W.B.</u>	I-50	30-75	10-40
<u>Ryhage</u>	30	50-75	50-70

El nuevo esquema CG-EM queda representado en la figura 55. Después de estas modificaciones se realizaron nuevas pruebas para medir la sensibilidad del sistema. Para esto, se inyectaron cantidades variables de los derivados sililados y acilados y las respuestas obtenidas variaron según el tipo de derivados, siendo los niveles de detección comprendidos entre medio y dos microgramos.

Estos niveles son más bajos que los obtenidos anteriormente pero, son insuficientes para permitir el análisis de histamina de muestras biológicas. Permiten únicamente realizar los espectros de masas de los derivados sintetizados.

5.4.- DISCUSION

En este capítulo se han evaluado los diferentes derivados sintetizados, poniéndose en evidencia las ventajas de los derivados acilados y entre ellos, de los derivados heptafluorobutinados, por ser los más estables y los que presentan en su espectro de masas iones abundantes a valores de m/e más altos. Se deberán estudiar los metabolitos ácidos en su forma sililada ya que son los únicos que no se pudieron acilar.

El proceso de extracción, muy simple debido a

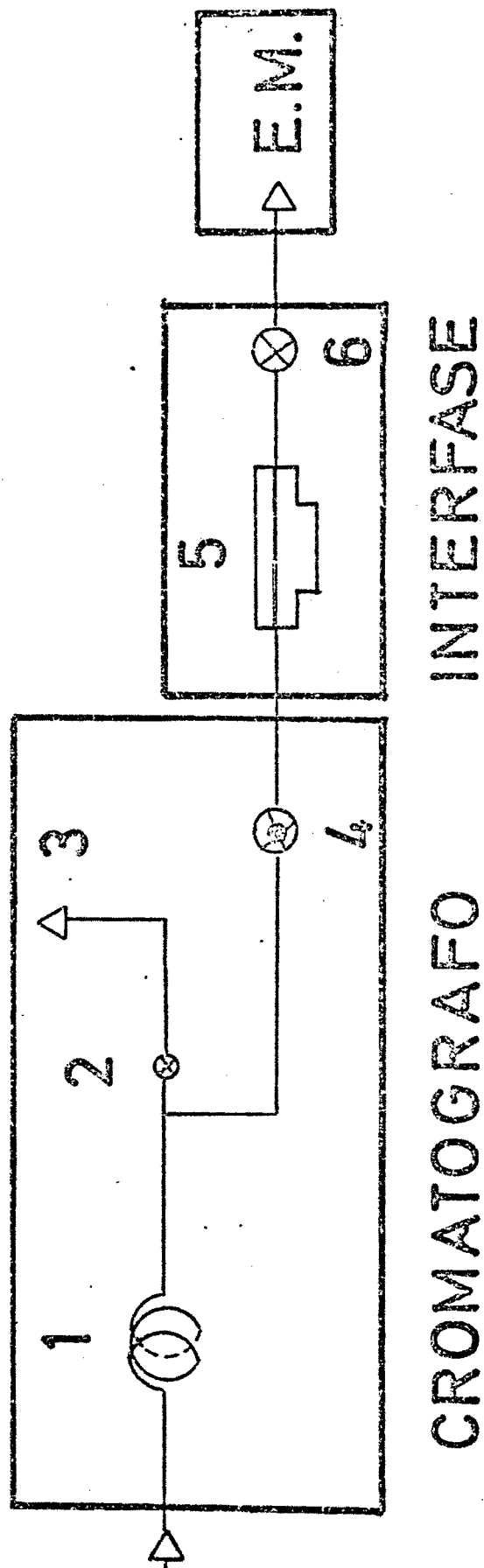


Figura 55.-Conexión modificada entre el cromatógrafo y el espectrometro de masas.

la alta especificidad del sistema analítico permite una buena recuperación de los diversos metabolitos.

Los numerosos problemas analíticos encontrados fueron similares en gran parte a los observados con las prostaglandinas que se estudian también en nuestro laboratorio: son también muy sensibles a la presencia de -- cualquier punto activo presente a nivel de la conexión cromatógrafo-espectrómetro de masas. Por lo contrario, con otra línea de trabajo, relativa al metabolismo cerebral del triptofano, no se han observado estos fenómenos tan importantes de adsorción. Los límites de detección obtenidos para estas sustancias indólicas son del orden de 30 a 100 ng y permiten aplicar las técnicas de cromatografía de gases-espectrometría de masas al análisis de tejido cerebral. Esta variación en la respuesta obtenida con compuestos derivados del imidazol o del ácido prostanoico y con otros derivados del núcleo indol pone de -- relieve la problemática inherente al análisis de muestras biológicas complejas como puede ser el tejido cerebral.

Se va afirmando cada vez más la dificultad -- analítica representada por las bajas concentraciones de las sustancias activas en el cerebro que obliga a pasar de un nivel de trabajo del microgramo o nanogramo a un nivel de picogramo lo que obliga a la utilización de un material de análisis cada vez más sofisticado.

Conclusiones.

1º.- El presente trabajo ha permitido abordar la problemática presentada por la valoración conjunta de la histamina y sus principales metabolitos, mediante técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas. El objetivo principal ha sido el desarrollo de un método de análisis sensible y específico para obtener un perfil metabólico de estas sustancias relacionadas.

2º.- La falta de volatilidad de las sustancias estudiadas implica la síntesis de derivados de las mismas para su posible análisis por cromatografía de gases, resultando necesario bloquear los grupos carboxilo y amino presentes en estas moléculas. Para esto se ha estudiado la evolución de la reacción de metilación con el tricloruro de boro metano al 10% (peso/volumen). Al mismo tiempo se ha analizado la influencia de diversos factores sobre el rendimiento de la reacción tales como: relación reactivo/solvente, uso de un antioxidante o de un agente desecante, silanización de todo el material de vidrio utilizado.

En condiciones óptimas, el rendimiento de esta reacción resulta insuficiente como para permitir el análisis por cromatografía de gases de los compuestos estudiados.

3º.- A la vista de estos resultados, se estudió la reacción de sililación utilizándose la mezcla de reacción BSA/TMCS al 4%. La reacción tiene lugar una hora a 60 °C y los derivados sintetizados se tienen que analizar inmediatamente -

debido a los efectos de degradación que aumentan con el -- tiempo. En estas condiciones; los resultados fueron satisfactorios para la histamina, metil histamina, ácidos imidazol acético y metil imidazol acético y se ha podido evitar la formación de dobles derivados, problema descrito anteriormente en la literatura.

Se han calculado los índices de Kovats de los derivados en la fase OV-17.

Las condiciones relativas al mecanismo de la reacción permiten poner de relieve el papel jugado por el núcleo -- imidazol debido a su alta reactividad.

4º.- La reacción de perfluoroacilación directa de los grupos carboxilo y amino de las seis sustancias en estudio se realizó utilizando tres reactivos diferentes: PFPA, HFBA y TFA considerándose los factores de: tiempo de reacción, temperatura y disolvente empleado. Ello fue necesario debido a la novedad de la reacción de acilación directa de un ácido carboxílico: en efecto, hasta la fecha estos grupos carboxilo se bloqueaban por acción de un agente metilante o sililante.

Los derivados acilados de los aminoácidos y aminas se obtienen después de 90 minutos a la estufa a 70 °C utilizándose preferencialmente el PFPA o HFBA.

5º.- El análisis de los derivados acilados formados mediante un sistema de cromatografía de gases y detección por ionización por llama ha permitido analizar cantidades del orden de 10 a 30 ng, para los aminoácidos y las aminas. Asimismo, se han calculado los índices de retención cromatográficos de to

dos los derivados formados en dos fases de distinta polaridad (OV-17 y OV-225). Estos derivados, totalmente nuevos presentan el interés particular de resolver el problema cromatográfico ligado a la histidina y metil histidina.

6º.- Mediante la técnica combinada de cromatografía de gases y espectrometría de masas, se ha podido elucidar la estructura de los derivados pentafluoropropionados, heptafluorobutirados y trifluoroacetilados. Esto nos ha permitido poner en evidencia un mecanismo de reacción para la acilación de la HD y MeHD, común a estos tres tipos de derivados, que --consiste en la entrada de dos grupos PFP, HFB o TFA seguida de una descarboxilación intramolecular catalizada por el -- mismo núcleo imidazol. Este proceso de catálisis explica la disminución de rendimiento de la reacción observada al añadir un disolvente polar. Para la histamina y la metil histamina, la reacción de acilación provoca en cada caso la entrada de un solo grupo sobre la función amino primaria de la cadena lateral.

7º.- Con este mismo método se han establecido las estructuras químicas de los derivados formados a partir de la reacción de sililación.

Esta reacción ha permitido el bloqueo de todos los grupos funcionales existentes en cada sustancia; así se obtiene la histamina trisililada por entrada de dos grupos sililo a nivel del grupo amino de la cadena lateral y de un tercero en el grupo amino del anillo amidazol. De forma similar se sintetizan así metil histamina disililada, ácido imidazol

acético disililado y ácido metil imidazol acético monosililado.

El estudio de los espectros de masas de estos compuestos ha permitido conocer sus principales vías de fragmentación por impacto electrónico. Para las aminas el proceso -- más destacable corresponde a un rotura en β formándose el pico base m/e 174 y para los ácidos tiene lugar una pérdida intramolecular de CO_2 siendo el pico base para cada uno --

M-44-

8.- El estudio de los espectros de masas de los derivados pentafluoropropimados y heptafluorobutirados de las aminas y de los aminoácidos ha puesto de relieve una similitud de mecanismos de fragmentación. Estos se han estudiado más en detalle para la histidina y la metil histidina debido a la novedad de la reacción. La flexibilidad de la estructura del derivado formado, unida a la reactividad del átomo de nitrógeno ionizado del núcleo imidazol se pueden considerar como la fuerza desencadenante de los principales procesos de fragmentación. Para cada tipo de derivados los iones más abundantes son los formados a) por una rotura del enlace en α (iones a m/e 81 para los derivados de la histidina y a m/e 95 para los de la metil histidina) y b) los iones del -- "fragmento amino" a m/e 256, 306, 270, 320 respectivamente.

9.- La determinación de los mecanismos de fragmentación de los compuestos originales por introducción directa a través de la sonda para sólidos ha sido necesaria al estudio previo de los procesos de fragmentación de los derivados sililados,

y acilados. Para todas estas sustancias patrón, el fragmento principal corresponde a una rotura en β de la molécula con reordenamiento de un átomo de hidrógeno, formándose así el ión m/e 96 para los compuestos metilados y el ión m/e 82 para los compuestos no metilados. La única excepción la presenta el ácido imidazol acético que no presenta este mecanismo de reordenamiento y por esto tiene un ión mayoritario a m/e 81.

10.- Para obtener una mayor especificidad y sensibilidad de respuesta, se ha realizado un estudio comparativo de los -- diferentes derivados sintetizados para su utilización con un detector múltiple de iones. Los derivados heptafluorobutirados se revelaron los más adecuados para esta clase de detector que permite analizar simultáneamente la histidina, metil histidina, histamina y metil histamina siendo los iones m/e 306, 320, 307 y 321 los valores escogidos para su valoración respectiva. Se escogieron estos fragmentos por ser característicos de las sustancias en estudio, ser abundantes y tener valores m/e relativamente altos.

11.- La extracción de estas mismas sustancias por medio de elución sobre Amberlita XAD-2 y su recuperación en fase acuosa en combinación con la reacción de acilación debería permitir aplicar el método de análisis por fragmentografía de masas por detección simultánea de cuatro iones al estudio de las cantidades presentes de estos compuestos en líquidos --

biológicos especialmente en tejido cerebral. No se ha podido realizar esta aplicación por los problemas analíticos encontrados (problemas analíticos localizados a nivel de la interfase del sistema CG-EM) a pesar de las múltiples pruebas que se realizaron. Este punto negativo, de gran importancia para nosotros, sigue todavía en estudio en nuestro laboratorio.

Bibliografía.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abraham R.J. y Birch D. ; Mol. Pharmacol., 11 (1975) 663.
- 2.- Alberts A. ; Basic Neurochemistry, Ed. Little, Brown and Co., Boston (1972).
- 3.- Allain P.; Therapie, 24 (1969) 757.
- 4.- Anton A.H. y Sayre D.F.; I. Pharmacol. Exp. Ther. 166 (1969) 285.
- 5.- Appelquist L.A. y Nair B.M.; J. Chromatog. 124 (1976) 239.
- 6.- Mc Arthur Moodie I.; J. Chromatog. 53 (1964) 215
- 7.- Mc Arthur Moodie I.; J. Chromatog. 99 (1974) 495.
- 8.- Artigas F., Gelpí E., Prudencia M., Alonso J.A., Baillart J., Anal. Chem., 49 (1977) 543.
- 9.- Artigas F. y Gelpí E.; Anal. Biochem., 92 (1979) 233.
- 10.- Aures D., Fleming R. y Hakanson R.; J. Chromatogr., 33 (1969) 285.
- 11.- Bakke O.M., Segura J.; J. Pharmacol., 22 (1976) 32.
- 12.- Bertilsson L. y Costa E.; J. Chromatog. 118 (1976) 395.
- 13.- Bertsch C.R., Fernelius W.C. y Blocke B.P.; J. Phys. Chem., 62 (1958) 444.
- 14.- Beynon J.H. Mass Spectrometry and its applications to Organic chemistry (1960) Elsevier. Amsterdam.
- 15.- Biemann K., Seibl R. y Gapp F.; I. Am. Chem. Society 83 (1961) 3795.
- 16.- Blanco I., Blanco M., Grau M., Palacios J.M., Picatoste F., y Scherk G. Experientia 29 (1973) 791.

- 17.- Blu G., Jacob L. y Guichon G., J. Chromatog. 50 (1970) 1.
- 18.- Boissier J.R., Guernet M., Tillement J.P., Blanco I y Blanco M. C.R. Academ. Sci. Paris, 269 (1969) 929.
- 19.- Boissier J.R. Actualités Pharmacol. 23 (1971) 51.
- 20.- Borga O. Palmer L. Linnarson A y Holmstedt B.; Anal. Lett., 4 (1971) 837.
- 21.- Braestrup C.; Anal. Biochem. 55 (1973) 420.
- 22.- Brian B.L., Gracy R.W. y Scholes V.E.; J. Chromatog. 66 (1972) 138.
- 23.- Brownstein M.J., Saavedra J.M., Palkovits M. y Axelrod J., Brain Res. 77 (1974) 151.
- 24.- Brunnee C., Jenckel L. y Kronenberger K., Anal. Chem. 189 (1962) 50.
- 25.- Brunnee C., Jenckel L. y Kronenberger K.; Anal. Chem. 197 (1963) 42.
- 26.- Brunnee C., Bultemann H.J. y Kaptus. ASTM meeting on Mass Spectrometry 20-5-1969. Dallas.Texas.
- 27.- Brusse F.S., Furst R. Van Bennekom W.P.; Pharmaceutisch Weekblad, 109 (1974) 921.
- 28.- Burkard W.P., Gey K.F. y Pletscher A.J. Neurochem. 10 (1963) 183.
- 29.- Burlingame A.L.; Topics in Organic Mass Spectrometry. (1970) Ed. Wiley Interscience, N.Y.
- 30.- Butts W.C. Anal. Biochem. 46 (1972) 187.
- 31.- Casey W.J.; Ph. D. Thesis, Univ. of Iowa (1971).
- 32.- Cattabeni F., Koslow S.H. y Costa E.; Science 177 (1972) 74.
- 33.- Chu C.H., Pietrzyk D.J.; Anal. Chem., 46 (1970) 330.
- 34.- Code C.F. y Mc Intire F.C.; Methods of Biochem. Anal. Vol. III (1956) 49.

- 35.- Colin F. Poole. Handbook of Derivatives for Chromatography p. 180 Ed. K. Blau y G.S. King . Londres (1978).
- 36.- Costa E., Gree A.R., Koslow, S.H., Lefreuve H.F., --
Revuelta A.M. y Wang C., Pharmacol. Rev. 24 (1972)
167.
- 37.- Costa E., Koslow S.H. y Lefevre H.F., Handbook of
Psychopharmacology p. 1. Ed. Plenum Press, N.Y. (1975).
- 38.- Coubeils J.L., Courriere P. y Pullman B.; C.R. Acad.
Sci. Ser. D., 272 (1971) 1813.
- 39.- Cruickshank A.J.B., Gainey B.W. y Young C.L.; Gas
Chromatog. (1969) Ed. Harbourn. The Institute of Petro
leum, Londres. p.76-91.
- 40.- Curtius H., CH, Wolfensberger M., Redweick V., Lein-
bacher W., Maibach R.A., Isler W.; J. Chromatogr. 112
(1975) 523.
- 41.- Dabrio M.V. Cromatografía de Gases I y II (1971)
Ed. Alhambra. Madrid.
- 42.- Dailey J.W. y Anggard E.; Biochem. Pharmacol. 22
(1973) 2591.
- 43.- Darbre A. Handbook of derivatives for chromatography
p. 39 Ed. K. Blau y G. King ().
- 44.- Dawborne J.S.; Organic Mass Spectr. 6 (1972) 211.
- 45.- Edvinsson L., Hakansson R., Ronnberg A.L. y Sundler
F.; J. Chromatogr. 67 (1972) 81.
- 46.- Ettre L.S. Zlatkis A. Practice of Gas Chromatography
(1967) Ed. J. Wiley and Sons.N.Y.
- 47.- Ettre L.S. y Mc Fadden W.H.; Ancillary Tchniques in
Gas Chromatography (1969) Ed. Wiley Interscience.
- 48.- Evans E. y Nicholls P.J.; J. Chromatog. 82 (1973) 394.
- 49.- Mc Fadden W.H. Mass Spectrometry Analysis of G.C.
eluent en Advances in Chromatography, Vol. 4 (1967)
Ed. Dekker M., Nueva York.

- 50.- Fri C.G., Wiesel F.A. y Sedvall G.; Life Sci. 14
(1974) 2469.
- 51.- Gaddum J.H., Br. J. Pharmacol. Chemother; 8 (1953)
321.
- 52.- Gelpí E., Koenig W.A., Gibert J. y Oro J; J. Chrom.
Science 7 (1969) 604.
- 53.- Gelpí E., Cromatografía de Gases II. Dabrio M.V.
pg. 122-181 (1973) Ed. Alhambra. Madrid.
- 54.- Giessler W., Tesis doctoral, Univ. Colonia.Alemania
(1963).
- 55.- Gohlke R.S., Am. Chem. Soc. Div. Petrol. Chem. Pre-
prints 2. nº 4 D-77 (1957).
- 56.- Gordon A.E. y Frigerio A. ; J. Chromatogr. 73 (1973)
401.
- 57.- Graham H.T., Scarpellino J.A.D., Hubka B.P. y Lowry
D.H., Biochem. Pharmacol; 17 (1966) 2271.
- 58.- Green H. y Erickson R.W.; Intern. J. Neuropharmacol.
3 (1964) 365.
- 59.- Green J.P., Handbook of Neurochemistry 4 (1970) 221
Ed. A. Lajtha Plenum Press.
- 60.- Green K., Graustrom E., Samuelson B. y Axen U.; Anal.
Biochem. 54 (1973) 438.
- 61.- Hakanson R., Juhlin L., Duman Ch. y Sporrang B.; J.
Histochem. Cytochem. 18 (1970) 93.
- 62.- Hall W.T. y Nagy S.; J. Chromatog. 171 (1979) 397.
- 63.- Hammar C.G., Holmsteat B., Ryhage R.; Anal. Biochem.,
25 (1968) 532.
- 64.- Hammar C.G. y Hessling R. ; Anal. Chem. 43 (1971) 298.
- 65.- Hammond J. E y Herbest E.J. ; Anal. Biochem., 22
(1968) 474.
- 66.- Hammond R.C. Elementos de Química Orgánica. Ed.
Reverte, Barcelona.

- 67.- Hanin I., Cheney D.L., Trabucchi M., Massarelli R., Wang C.T. y Costa E. I. *Pharmacol. Exptl. Ther.* 187 (1973) 68.
- 68.- Hattox V.R., Vrieze W., *Fed. of Am. Soc. for Exptl. Biol. Fed. Proc.*, 26 (1967) nº 945.
- 69.- Henneberg D., V. Henrichs G. *Schomburg ; Chromatographia* 8 (1975) 449.
- 70.- Herbst E.J., Keister D.L. y Weaver R.H.; *Arch. Biochem. Biophys.* 175 (1958) 178.
- 71.- Holloway P.W., Ppják G.; *J. Biochem.* 104 (1973) 57.
- 72.- Holmes J.C., Morell F.A., *Appl. Spectry* 11 (1957) 86.
- 73.- Holmstedt B. y Linnarson A.; *Proc. of Drugs Abuse. Int. Conf. 291. Lea and Febiger, Philadelphia* (1972).
- 74.- Holmstedt B. y Palmer L.; *Adv. in Biochem. Psychopharmacol.* 7 (1973) 1.
- 75.- Horning E.C., presentado a "The Conference on Analytical Chemistry and applied spectroscopy". Pittsburgh Pa., Marzo 1963, nº 123.
- 76.- Horning E.C., Horning M.G., Carrol D.I., Dzidic I. y Stilwell R.N.; *Anal. Chem.* 45 (1973) 936.
- 77.- Horning M.G., Boucher E.A. y Moss A.M.; *J. Chrom.* 5 (1967) 297.
- 78.- Horning M.C. Moss A.M. y Horning E.C. *Biochem. Biophys Acta.* 148 (1967) 597.
- 79.- Ibrahim M.Z., *I. Neurol. Sci.* 21 (1974) 431.
- 80.- Ibrahim G., Andryanskas S., Bastos M.L.; *Chromatogr.* 108 (1975) 107.
- 81.- Mc Intire F.C.; *J. Amer. Pharm. Ass. Sci.* ; 41 (1952) 277.
- 82.- Islani A. y Darbre A.; *J. Chromatog.* 43 (1969) 11.
- 83.- James A.T., Martin A.J.P.; *Biochem. J;* 50 (1952) 679.
- 84.- Jenden D.J. y Cho A.K.; *Ann. Rev. Pharmacol.* 13 (1973) 371.

- 85.- Junk G.A. Int. J. Mass Spectr. Ion. Physics. 8 (1972) 1.
- 86.- Kalson L., Rosengren P. y Thunberg G., J. Physiol. (London) 169 (1963) 467.
- 87.- Karoum F., Cattaberi F., Costa E., Ruthven C.R. y Sandler M.; Anal. Biochem. 47 (1972) 550.
- 88.- Katz S., en An. Annotated Bibliography of Low-Molecular 2394 ().
- 89.- Keirse M.J., Turnbull A.C.; Prostaglandins, 4 (1973) 263.
- 90.- Kelvin S.A.; J. Pharm. Pharmacol., 20 (1968) 659.
- 91.- Mc. Kenzie S.L. y Tenaschuk D. J. Chromatog. 171 (1979) 195.
- 92.- Koslow S.H., Cattaberi F. y Costa E.; Science 176 (1972) 177.
- 93.- Koslow S.H., Racagni G. y Costa E.; Neuropharmacology 13 (1974) 1123.
- 94.- Kovats E.; Helv. Chim. Acta, 41 (1958) 1915.
- 95.- Kremzner L.T. y Pfeiffer C.C. Ciochem. Pharmacol. 15 (1966) 197.
- 96.- Kruger P.G.; Experientia 30 (1974) 810.
- 97.- Kuhn H.J.; Z. Physiol. Chem. 129 (1931) 84.
- 98.- Kullberg M.P., Miller W.L., Mc Gowan F.J.; Biochem. Med. 7 (1973) 323.
- 99.- Kullberg M.P., Gorodetzky Ch. W.; Clin. Chem. 20 (1974) 177.
- 100.- Kumbar M., J. Theor. Biol., 53 (1975) 333.
- 101.- Kwiatkowski H. J. Physiol. 102 (1943) 32.
- 102.- Leimer K.R., Rice R.H. y Gehrke C.W.;, I. Chomat. 141 (1977) 121.

- 104.- Littlewood A.B. Gas Chromatography (1962) Ed. Academic Press. N.Y.
- 105.- Llewellyn P., Littejohn D.; Varian Technical Information Quaterly (1966).
- 106.- Makita M. y Wells W.W.; Anal. Biochem. 5 (1963) 523.
- 107.- Martell A.E., Calvin M., Chemistry of the metal chelate compounds, Prentice Hall Inc. Englewoods Cliffs N.J. (1952).
- 108.- Martire D.E. Progress in Gas Chromatography (1968) Ed. Purnell J.H., Interscience, Nueva York pg. 93, 120.
- 109.- Mason P.S. y Smith E.D.; J. Gas Chromatogr. 4 (1966) 398.
- 110.- Means G.E. y Feeney R.E. Chemical Modification of Proteins Holden-Day, San Francisco p. 83 (1971).
- 111.- Medina M. y Shore P.A.; Biochem. Pharmacol. 15 (1966) 1627.
- 112.- Michaelson I.A. y Coffman P.Z. Biochem. Pharmacol. 16 (1967) 2085.
- 113.- Michaelson I.A., Coffman P.Z. y Vedral D.F. Biochem Pharmacol. 17 (1968) 2435.
- 114.- Mickel B.L., Andrewa A.C.; J. Amer. Chem. Soc. 77 (1955) 323.
- 115.- Moxon G.H., Slifkin M.A.; Biochim. Biophys. Acta 286 (1972) 98.
- 116.- Muhs M.A., Weiss F.T.; J. Am. Chem. Soc. 84 (1962) 4697.
- 117.- Munson M.S.B., Field M.H.; Adv. in Chemistry (1966) Series nº 8.
- 118.- Narahara H., Nippon Jozo Kyokai Zasshi, 65 (1970) 340.
- 119.- Navert H.; J. Chromatography 106 (1975) 218.
- 120.- Niederwieser A., Giliberti P., J. Chromatography, 61 (1971) 95.

- 121.- Novak, J., Advances in Chromatography Vol. II (1974)
E.D.M. Dekker. N.Y. p 1-68
- 122.- Pailer M. y Hübsch W.J.; M. Chem. 97 (1966) 1541.
- 123.- Pearce R.J.; J. Chromatog. 136 (1977) 113.
- 124.- Pierce A.E. Silylation of organic compounds. Pierce
Chemical Co., Rockford. Illinois (1968).
- 125.- Pollard H., Bischoff S. y Schwartz J.C. Evr. J. Pharma
col. 24 (1973) 339.
- 126.- Pullman B., Port J., Mol. Pharmacol., 10 (1974) 360.
- 127.- Pump J. y Rochow E.G.; Chem. Ber. 97 (1964) 627.
- 128.- Purnell J.H. Gas Chromatog. (1966) Ed. Littlewood,
Elsevier, N.Y. p-3.
- 129.-Quinn L.D. y Hobbs M.E.; Anal. Chem. 30 (1958) 1400.
- 130.- Reilly M.A. y Schayer R.W.; Brit. J. Pharmacol. 38
(1970) 478.
- 131.- Reisch J., Pagmcco R., Alges H. Jantos N. y Möllmann H.,
J. Pharm. Pharmacol. 20 (1968) 81.
- 132.- Mc Reynolds; J. Chromatog. Science 8 (1970) 685.
- 133.- Richards W.G., Wallis J. y Ganellin C.R. Evr. J. Med.
Chem.; 14 (1979) 9.
- 134.- Richter W.J. y Liehr J.G.; Helvética Chim. Acta. 55
(1972) 2421.
- 135.- Roach D. y Gehrke C.W.; J. Chromatog. 44 (1969) 269.
- 136.- Ronnberg A.L., Edvinson L. Larson L.J. Nielsen K.C. y
Dwman C. Agents and Actions 3 (1974) 191.
- 137.- Ryhage R.; Anal. Chem. 36 (1964) 759.
- 138.- Ryhage R. y Wikström S.; Science Tools, 14 (1967) 1.
- 139.- Samuelson B., Hamberg M. y Sweeley C.C.; Anal. Biochem.
38 (1970) 301.
- 140.- Sztchell D.P.N.; Rev. Chem. Soc. 17 (1963) 160.

- 141.- Schayer R.W., Rothschild Z. y Bizony P.; Am. J. Physiol. 196 (1959) 295.
- 142.- Scheider W., Fuller J.K.; Biochem. Biophys. Acta, 221 (1970) 376.
- 143.- Schitz E., Schnackerz K.D. y Gracy R.W.; Anal. Biochem. 79 (1977) 33.
- 144.- Schwartz, J.C.; Lampart C. y Rose C. J. Neurochem. 7 (1970) 1527.
- 145.- Schwartz J.C., Pollard H., Bischoff S., Rehaut M.C. y Verdier-Sahuque C. Eur. J. Pharmacol. 16 (1971) 326.
- 146.- Schwartz J.C., Lampart C. y Rose C.; J. Neurochem. 19 (1972) 801.
- 147.- Schwartz J.C., Baudry M., Chast F., Bischoff S. y Krishnamoorthy M.S. Central Nervous System. Studies on metabolic Regulation and Function. Ed. Genazzani y Herken. Springer Verlag. (1973).
- 148.- Schwartz J.C., Rose C. y Caillens H.J.; Pharm. Exp. Ther. 184 (1973) 766.
- 149.- Schwartz J.C., Actualités Pharmacol. 28 (1976) 29.
- 150.- Segura J., y Gelpí E., Acta Vitaminológica y Enzimológica 29 (1975) 25.
- 151.- Segura J., Borja L. Bakke O.M., Arch. Int. Pharmacodyn. Therap. 223 (1976) 88.
- 152.- Shelley W.B. y Juhlin L.; J. Chromatogr. 22 (1966) 130.
- 153.- Shih-Ching Lee y Shih-Jiun Yin; J. Chromatog. 129 (1976) 482.
- 154.- Shore P.A., Burkhalter A. y Cohn V.P.; J. Pharmacol. Exptl. Ther. 127 (1959) 182.
- 155.- Sjoquist B., Lindstrom B., Anggard E., Life Sci., 13 (1973) 1655.
- 156.- Snyder S.H., Baldessarini R.J. y Axelrod J., J. Pharmacol. Exptl. Ther. 153 (1966) 544.

- 157.- Snyder S.H., Glowinski, J. y Axelrod, J. J. Pharm. Exp. Ther. 153 (1966) 8
- 158.- Snyder S.H. y Taylor K.M.; Methods in Neurochemistry (1971) Ed. R. Rodnynygt and N. Marks. Plenum Press. Vol. I.
- 159.- Snyder S.H. y Taylor K.M. Perspectives in Neuropharmacology. Ed. S.H. Snyder, Oxford University Press, N.Y. (1972) 43-73.
- 160.- Strong, J.M., Atkinson A.J.; Anal. Chem. 44 (1972) 2287.
- 161.- Sundberg, R.J., Martin, R.D.; Chem. Reviews, 74 (1974) 471.
- 162.- Supina W.R. en H.A. Szymanski (Ed) Biomedical Applications of Gas Chromatography, Plenum Press, Nueva York (1964) p 271.
- 163.- Sweeley, C.C., Bentley R., Makitam y Wells W.W.; J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 2497.
- 164.- Sweeley C.C., Alliot W.H., Ryhage R.; Anal. Chem. 38 (1966) 1549.
- 165.- Sweeley C.C., Gates S.C., Thompson R.H. Harten J., Dendramis N. y Holland J.F., Quantitative Mass Spectrometry in Life Sciences. p 29-49. Ed. de Leenher y Roncucci, Elsevier Scientific Publishing Company (1977).
- 166.- Tabor H., Biochemistry, 1 (1962) 496.
- 167.- Tabor H., Tabor C.W., Pharmacol. Rev. 16 (1964) 245.
- 168.- Taylor K.M., Gfeller E. y Snyder S.H., Brain Res. 41 (1972) 171.
- 169.- Taylor K.M. y Snyder S.H. J. Neurochem. 19 (1972) 1343.
- 170.- Taylor K.M. y Snyder S.H., J. Neurochem. 21 (1973) 1215.

- 171 .-Tham R.y Holmsted B.O.;J.Chromatog.19 (1965) 286.
- 172 .-Tham R.,J.Chromatog.23 (1966) 207.
- 173 .-Tswett M.; Ber.Dent.Botan.Ges. 24 (1906) 316.
- 174 .-Van Eanaeme C.,Bienfait J.M.,Lambot O. y Pondant A.;
J.Chromatog.Sci. 12 (1974) 404.
- 175 .-Waliszewzki K.,Jaszewski A.,Skupin J.;Bulletin de
l'Académie Polonaise des Sciences 25 (1977) 572.
- 176 .-Waller G.R.;Biochemical Applications of Mass Spectro-
metry. Ed.Wiley Science N.Y. (1972).
- 177 .-Watson J.T.,Biemann K.; Anal.Chem.36 (1964) 759.
- 178 .-Wells W.W. y Makita M.;Anal.Biochem.4 (1962) 204.
- 179 .-Weygand F.; Anal.Chem.205 (1964) 406.
- 180 .-Yamatodani A.,Seki T. y Taneda M.;J.Chromatog.144
(1977) 141.
- 181 .-Zaika L.L.,Wassermann A.E.,Monk C.A. y Salay J.; J.
Food Sci.,33 (1968) 53.
- 182 .-Zaika L.L.;J.Agr.Food Chem.17 (1969) 893.
- 183 .-Zlatkis A.,Kaufman H.R.; J.Gas Chrom.4 (1966) 240.
-