

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационна работа

**Течно-хроматографски методи за определяне на
аминокиселини и полиамини чрез дериватизация с 9-
флуоренилметоксикарбонилна група**

За присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР”

на

Валентин Стойчев Лозанов

Научен ръководител:

Чл. кор. проф. д-р Ваньо Митев дм дбн

Научно жури:

Акад. Евгени Головински

Чл. кор. проф. д-р Ваньо Митев дм дбн

Проф. д-р Радослав Гърчев

Проф. д-р Емилия Найденова

Проф. д-р Любомир Везенков

София, 2014 г

Дисертационната работа е написана на 78 страници и съдържа 27 фигури, 9 таблици и 6 схеми. В работата са използвани 122 литературни източника. Работата е изработена в Катедра „Медицинска Химия и Биохимия” където докторанта на самостоятелна подготовка Валентин Стойчев Лозанов, зачислен със заповед № РК 36-1302 от 25.06.2013 на Ректора на МУ-София, работи като специалист-химик.

Дисертационната работа е обсъдена и приета на разширен катедрен съвет състоял се на 15.01.2014 г в Катедра „Медицинска Химия и Биохимия”, Медицински Факултет на Медицински Университет – София.

Резултатите от работата са публикувани в две научни статии в списания с импакт фактор и един обзор в книга на английски език. Научните публикации са цитирани в 97 научни статии.

Публичната защита на дисертационната работа ще се състои на 25.02.2014 г от 13 часа в сградата на ПУЦ, катедра „Медицинска химия и биохимия”, ул Здраве 2, София.

Всички материали и документи отнасящи се до дисертационната работа, са на разположение на заинтересованите в в Катедра „Медицинска Химия и Биохимия”, стая 304, сградата на ПУЦ, МФ, МУ-София, ул Здраве 2, София

Съдържание

	стр
ВЪВЕДЕНИЕ	1
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА	3
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	4
Химикали и материали	4
Дериватизационни буфери	4
Приготвяне на разтвор на дериватиращ реагент	4
Експериментални процедури	5
Приготвяне на стандартни разтвори	5
Предварителна обработка на проби	5
Обработка на плазма и урина	5
Обработка на напитки (вино и бира)	5
Обработка на клетъчни култури и тъкани	5
Обща процедура на дериватизация	5
Хроматографски анализи	6
Оборудване	6
Хроматографски колони	6
Приготвяне на елуиращи буфери	6
Градиентни профили	7
Снемане на флуоресцентни спектри на Fmoc-деривати на аминокиселини и полиамини	7
Процедри по валидиране на методите	7
Определяне стабилност на дериватите	7
Калибрационни криви	7
Възпроизводимост	7
Повтаряемост	7
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	9
Разработване на метод за едновременен анализ на аминокиселини и полиамини чрез ВЕТХ след предколонна деривация с Fmoc група	10
Избор на химичен реагент за въвеждане на Fmoc група	10
Избор на буфер за провеждане на дериватизацията	13

Определяне оптималното време за дериватизация	14
Определяне на хроматографските условия за едновременен количествен анализ на АА и ПА.	14
Избор на въртешен стандарт за количествен анализ	22
Валидиране на аналитичния метод	23
Разработване на хроматографски метод за анализ на АК и ПА при използване на едновременен градиент на рН и органичен разтворител по време на анализа	27
Валидиране на метода за анализ при едновременен градиент на рН и ацетонитрил	35
Практическо приложение на разработените аналитични методи	38
Анализ на АК и ПА в слабо алкохолни напитки – бира и вино	38
Определяне на динамиката на ПА синтез при нормални и третиранни клетъчни линии	38
Определяне на профила на АК и ПА в междуочна течност	38
Определяне на нивата на АК и ПА при пациенти с урологични заболявания	38
Изследване нивата на ПА при пациенти с псориазис	39
НАУЧНО ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ	40
ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	42
ЦИТИРАНИЯ	42

ВЪВЕДЕНИЕ

Аминокиселините представляват органични съединения, съдържащи едновременно amino и карбоксилна групи в молекулата си. Известни са над 300 природни аминокиселини, но само 21 от тях участват в изграждането на протеиновите молекули. Всички протеиногенни аминокиселини, с изключение на глицина, притежават асиметричен въглероден атом и поради това проявяват оптична активност. Поради вариациите в страничните вериги на аминокиселините, те проявяват различни биохимични свойства и изпълняват различни функции

Всичките 21 протеиногенни аминокиселини и техните метаболити са необходими за нормалната клетъчна физиология и функция. Нарушеният метаболизъм на една аминокиселина нарушава цялостната хомеостаза, нарушава растежа и развитието и дори може да предизвика смърт. Все повече резултати показват, че освен ролята им като структурни единици на протеини и полипептидите, някои аминокиселини са важни регулатори на ключови метаболитни пътища, които са необходими за поддържането, растежа, размножаването и имунитета на организмите.

С термина полиамини се означават линейни алифатни въглеводороди, съдържащи две или повече аминогрупи. Названието природни или биогенни полиамини се отнася за путресцина, спермидина и спермина. Полиамините се отнасят към по-голямата група на биологично активните амини. Тези съединения имат много проста химична структура и представляват алифатни поликатиони, които са напълно протонирани при физиологични условия.

Полиамини се съдържат във всички живи клетки, прокариоти, еукариоти, растения и животни. Въпреки че пълния набор от биологични ефекти на полиамините не е напълно изяснен, днес е ясно, че те повлияват клетъчните процеси на всички нива от генната транскрипция до белтъчната синтеза. Полиамините трябва да бъдат смятани за ключови регулатори на клетъчния растеж, диференциация и клетъчната смърт. За полиамините е известно, че са незаменими за живота и изпълняват специфични функции в клетъчния цикъл, ембрионалното развитие, рака, неврохимията, функциите на дихателната и имунната системи.

В литературата са описани стотици методи за анализ на аминокиселини и полиамини. Най-разнообразни техники са използвани за целта: йонообменна хроматография, високо ефективна течна хроматография; газова хроматография, капилярна електрофореза, мас спектроскопия.

Предпочитаният метод е високо ефективна течна хроматография, защото тази технология позволява използването на разнообразни методи за разделяне (обратно-фазова, йоннообменна, йонна хроматография), използване на многообразие от елуиращи буфери и техники на детекция. Освен това методите на основа ВЕТХ са относително бързи и не без значение сравнително евтини.

Определяне на количествата на аминокиселини и полиамини в биологични проби чрез високо ефективна течна хроматография е една от най-трудните за реализация задачи. Причина за това са незначителните разлики в структурните и химико-физичните свойства на тези вещества. Повечето аминокиселини и полиамини нямат хромофорни свойства и практически имат много ниски абсорбционни свойства. Това налага за анализ на тези вещества да се използват различни процедури на модификация, които да придадат на получените деривати свойства, позволяващи определянето им.

Независимо от огромното количество методи за анализ на аминокиселини и полиамини публикувани в научната литература, едва няколко десетки позволяват едновременен анализ на тези две групи съединения. Като се имат предвид важните биологични и физиологични функции, които проявяват тези съединения, е от изключително значение разработването на съвременни ефективни и практични за изпълнение методи за едновременното им количествено определяне в биологични проби.

ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА:

Да се разработят по-ефективни от използваните в практиката методи за едновременен анализ на аминокиселини и полиамини чрез високо ефективна течна хроматография след дериватизация при използване на флуоренилметоксикарбонилна (Fmoc) група като маркерна.

ЗАДАЧИ:

- Избор на реагент за въвеждане на флуоренилметоксикарбонилна група в аминокиселини и полиамини;
- Оптимизиране условията на дериватизация;
- Намиране на условия за ефективно хроматографско разделяне на анализирани компоненти:
 - Избор и оптимизация на елуиращи буфери;
 - Избор на аналитична колона;
 - Оптимизация на градиентните профили.
- Валидиране на аналитичните методи;
- Доказване на практическата приложимост на разработените методи.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Химикали и материали

Стандартен кит съдържащ 21 протеиногенни аминокиселини, 2-аминохептанова киселина, Fmoc-Cl, Fmoc-OSu и Fmoc-OBt бяха закупени от Fluka (Buchs, Switzerland). Използваните путресцин, спермин, спермидин, перхлорна киселина и ацетонитрил от градиентен клас бяха на Sigma (Germany). Дибутиламин, фосфорна киселина, солна киселина, триетиламин и оцетна киселина бяха закупени от Merck (Germany). Всички останали химикали и реагенти бяха с максимално достъпната чистота налични в лабораторията. За приготвяне на буфери бе използвана вода с хроматографска чистота получена на система Purelab UHQ II system (ELGA, VivendiWater Systems, Netherlands).

Дериватизиращите реагенти Fmoc-Cl, Fmoc-OSu бяха използвани след трикратна прекристализация в съответни разтворители на база литературни данни. Реагента Fmoc-ODMT бе синтезиран в лабораторията използвайки публикувана процедура[113].

Дериватизационни буфери

Карбонатен буфер

Към 0.5 М разтвор на натриев хидрогенкарбонат се добавят 0.5 М натриев карбонат и 5 mM EDTA. pH на буфера се нагласява до 10.20 ± 0.05 с 5 М NaOH на pH-метър CG 842 pH-meter (Schott, Mainz, Germany) оборудван с BlueLine pH 14 pH-електрод (Schott, Mainz, Germany). Буфера се филтрува на 0.22 μm мембрана, обезвъздушава на ултразвукова вана под вакуум и съхранява при 4°C в хладилник. При използване в продължение на повече от месец не бе наблюдавано образуване на утайки и промяна на pH на буфера.

Боратен буфер

Към 0.2 М Натриев борат се добавят 10 mM EDTA и pH на буфера се нагласява до 9.4 ± 0.05 с 5 М NaOH на pH-метър CG 842 pH-meter (Schott, Mainz, Germany) оборудван с BlueLine pH 14 pH-електрод (Schott, Mainz, Germany). Буферът се филтрува на 0.45 μm мембрана, обезвъздушава на ултразвукова вана под вакуум и съхранява на стайна температура. При използване в продължение на две седмици не бе наблюдавано образуване на утайки и промяна на pH на буфера.

Приготвяне на разтвор на дериватизиращ реагент

Точно претеглено количество (до 0.0001 г) от съответния реагент се разтваря в подходящ разтворител за получаване на желаната концентрация. В хода на разработване на методите, като разтворители бяха използвани ацетон, ацетонитрил, тетраhydroфуран и диоксан.

Експериментални процедури

Приготвяне на стандартни разтвори

Изходни стандартни разтвори на аминокиселини и полиамини бяха приготвени в концентрация 10 mM в 0.1 M солна киселина. Калибрационни разтвори със съответните концентрации бяха приготвени непосредствено преди употреба чрез подходящо разреждане на стандартните разтвори със солна киселина.

Предварителна обработка на проби

Обработка на плазма и урина

Аликвота от 100 μ l от пробата (плазма, урина или стандартен разтвор) се смесва с 30 μ l 2.0 M HClO_4 , добавя се вътрешен стандарт (IS) (обикновено използвахме 2.5 μ l от 2.0 mM 2-аминохептанова киселина) в 500 μ l центрофужна епруветка. Сместа се разбърква интензивно на вортекс и се инкубира за 10 мин на стайна температура, след което се центрофугира при 13 000 rpm за 12 мин. Част от супернатантата, обикновено 50 μ l, беше използвана за дериватизация.

Обработка на напитки (вино и бира)

Проби от вина и бира бяха анализирани без специална предварителна обработка. Обикновено анализираната проба се разреждаше с 0.1 M солна киселина в съотношение 1/1 (об/об) и ако се появи утайка, пробата бе центрофугирана при 13 000 rpm за 2 мин за отстраняване на утайката.

Обработка на клетъчни култури и тъкани

Култивирани човешки кератиноцити и туморни линии (A431, Nb2 and MCF-7) бяха използвани в хода на работа. Клетките първо бяха промити двукратно с охладен фосфатен буфер и след това лизирани с 1.0 ml от 0.2 M перхлорна киселина в ултразвукова вана за 30 мин. След центрофугиране при 12 000 x g за 15 min при 4°C (Labofuge 400R, Hereus, Germany) и филтруване на 0.22 μ m мембрана, част супернатантата бе използвана за дериватизация. Получената утайка се разтваря в 0.1 M NaOH и разтвора се използва за определяне на протеиново съдържание по Брадфорд.

Обща процедура на дериватизация

В центрофужна епруветка се смесват 50 μ l от супернатантата и 80 μ l от използвания дериватизационен буфер. Към сместа се добавят 150 μ l of 5 mM дериватизиращ реагент и реакцията се провежда за съответното време при стайна температура или при 40°C. Реакцията на дериватизация се спира с добавяне на 10 μ l conc. HCl. Подкислените проби се съхраняват в хладилник на 4°C преди да бъдат използвани за хроматографски анализ.

Хроматографски анализи

Оборудване

Анализите са направени на хроматографски системи:

А.) HewlettPackard (Германия) модел 1050, състояща се от кватернерна помпа модел 1050, 50 µl Rheodyne ръчен инжектор (Rheodyne, Германия) и модел 1046А флуоресцентен детектор (HewlettPackard, Германия).

Б.) SpectraSystem (Thermo Ltd, USA) състояща се от P2000 бинарна хроматографска помпа, FL 3000 флуоресцентен детектор и ръчен инжектор модел 7125SN (Rheodyne, USA).

Събирането и обработката на данни и при двете системи се извършва с CSW 1.7 хроматографски софтуер (DataApex Ltd, Czech Republic).

Хроматографски колони

В хода на работа бяха тествани и използвани различни колони за BETX Nucleodur 100-5 C18 ec (125×4 mm); Nucleodur 100-5 C18 ec (50×4 mm); Nucleosil 100-5 C18 ec (150×4 mm); Nucleodur Pyramid C18 ec (125×4 mm); Hypesil ODS (150 x 4.6 mm, 5µm); Adsorbosphere C₁₈ (150 x 4.6 mm, 3µm); Symmetry C₁₈ (3.5 µm, 150x4.6 mm) и XTerra C18 (5 µm, 125x4 mm).

Приготвяне на елуиращи буфери

Фосфатни буфери

Приготвяне на буфер А: 5 mM дибутиламин се добавят към смес от of 950 ml вода и 50 ml ацетонитрил. рН на буфера се нагласява до 2.20 с ортофосфорна киселина при използване на рН-метър (CG 842 рН-meter окомплектован с BlueLine рН 14 рН-електрод (Schott, Mainz, Germany)). Буфер Б се приготвя като се смесят of 950 ml ацетонитрил и 50 ml от буфер А. рН на получената смес се коригира до рН 2.20 с ортофосфорна киселина. Двата разтвора се филтрат на 0.45 µm найлонова мембрана (HewlettPackard, Germany) и обезвъздушават на ултразвукова вана под вакуум.

Перхлоратни буфери

Буфер А: Приготвя се смес от 20 mM амониев ацетат и ацетонитрил в съотношение (95/5 %, об/об), към сместа се добавя 1 mM дибутиламин и рН на буфера се нагласява до 2.10 с 35 % перхлорна киселина при използване на рН електрод SenTix 41 (WTW, Germany) на рН-метър CG 842 рН-meter (Schott, Mainz, Germany)). Буфер Б се приготвя като се смесят of 900 ml ацетонитрил и 100 ml от 20 mM амониев ацетат. Към сместа се добавя 5 mM дибутиламин и рН на буфера се нагласява до 8.4 с 35 % перхлорна киселина при използване на рН електрод SenTix

41 (WTW, Germany) на рН метър CG 842 pH-meter (Schott, Mainz, Germany). Двата разтвора се филтруват на 0.45 µm найлонова мембрана (HewlettPackard, Germany) и обезвъздушават на ултразвукова вана под вакуум.

Градиентни профили

При разработване на аналитичните методи бяха използвани различни градиентни профили на елуиране. При всички тях бе използвана линейна стъпка на органичния (Б) буфер във времето.

Снемане на флуоресцентни спектри на Fmoc-деривати на аминокиселини и полиамини

Флуоресцентните спектри на отделни представители на аминокиселините и полиамините бяха снети на Varioscan (Thermo Ltd, USA) комбиниран спектрофлуориметър. На база на тези данни, за оптимални условия за детекция бяха възприети – облъчване при 262 nm, емисия при 630 или 615 nm. Във флуоресцентните спектри се наблюдава максимум на емисия в областта 300 -340 nm но, поради наличието на много интерфериращи вещества в тази област, бе прието да се работи в по-нисковълновия обхват.

Процедури по валидиране на методите

Определяне стабилност на дериватите

Стабилността на подкислените Fmoc-дериватизирани проби бе определена чрез използване на всекидневни анализи на стандарти и реални проби в продължение на 7 дни. Проби съхранявани на стайна температура и 4°C бяха използвани.

Калибрационни криви

За всяко от анализираните вещества (аминокиселини и полиамини) бяха изследвани калибрационни криви при използване на външен и вътрешен стандарт. Линейни калибрации в интервала 0.2 – 200 микромола бяха построени при използване на разтвори с точно дефинирана концентрация.

Възпроизводимост

За изследване на възпроизводимостта бе използван метода на добавката. Към проби с известна концентрация бе добавяно дефинирано количество вещества. След провеждане на цялата аналитична процедура пробите бяха анализирани и бе отчитана разликата между теоретичната и реално отчетената концентрация.

Повтаряемост

За изследване повтаряемостта на разработените методи бяха използвани стандартни разтвори и реални проби. Два подхода бяха използвани – петкратно

последователно инжектиране на една проба; приготвяне на една и съща проба пет пъти и анализ. Използван бе и подхода една проба да се приготвя в пет последователни дни. Данните бяха интерпретирани като стандартно и относително стандартно отклонение на база площта на получените пикове или използвайки калибрационни криви.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Директното определяне на количествата на аминокиселини и полиамини в проби чрез ВЕТХ е един от най-трудните за реализация анализи. Причина за това са химико-физичните свойства на самите вещества. Те са силно полярни съединения с приблизително едни и същи R_K стойности, които трудно се разделят на хроматографска колона, с изключение на йонообменни. Повечето аминокиселини и полиамини нямат хромофорни свойства и практически имат много ниски абсорбционни свойства. Това налага за анализ на тези вещества да се използват различни процедури на модификация, които да придадат на получените деривати свойства, позволяващи анализа им чрез ВЕТХ. Използват се различни подходи, които са описани детайлно в литературния обзор на дисертацията. Тук ще се спрем само на модификацията чрез въвеждане на Fmoc група, която е обект на тази работа. Fmoc групата първоначално е въведена [114] като временна защитна група за аминокрупи в пептидният синтез. За целите на пептидният синтез не са от значение нейните спектрални характеристики, а удобството за работа при многократно повтаряне на процедури на деблокиране и синтез. На основа използването на Fmoc група е разработен т.нар. ортогонален подход на твърдофазен пептиден синтез, който и понастоящем е основен метод за синтез на пептиди. Сравнително късно е открит и оценен потенциала на Fmoc групата за модифициране на аминокрупа съдържащи вещества с цел анализ. По тази причина са разработени относително малко методи за анализ на аминокиселини и най-вече полиамини чрез ВЕТХ след модификация с Fmoc група. По-долу са описани резултатите и достиженията получени в хода на разработване на настоящата работа.

Разработването на аналитичните методи мина през различни етапи:

- Избор на реагент за въвеждане на **Fmoc** група в молекулите на аминокиселините и полиамините;
- Оптимизиране на условията на дериватизация;
- Намиране на условия за хроматографско разделяне на дериватите;
- Оптимизиране на хроматографските условия;
- Валидиране на разработените методи;
- Практическо приложение на методите за анализ.

Разработване на метод за едновременен анализ на аминокиселини и полиамини чрез ВЕТХ след предколонна дериватизация с Fmoc група

Избор на химичен реагент за въвеждане на Fmoc група.

Първоначалните експерименти бяха проведени на база на наличните литературни данни. В експериментите като реагент бе използван Fmoc-Cl, който бе и единственият реагент използван до този момент за дериватизация на АК с цел анализ. В литературата няма данни за използването му при анализ на ПА. Общата схема на реакцията на дериватизация е показана на схемата.

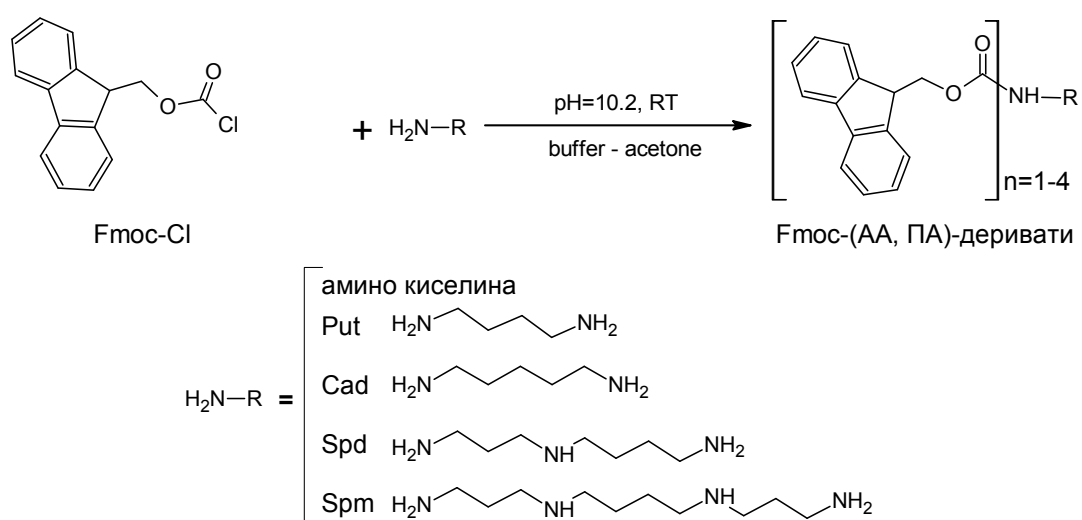
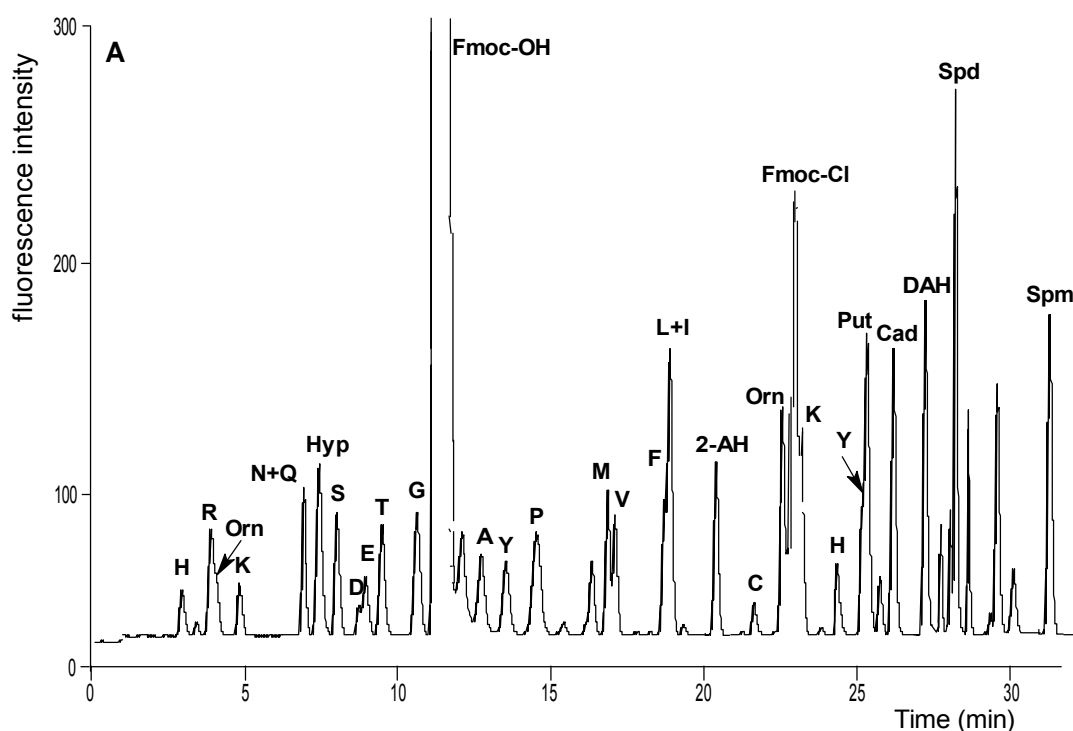


Схема: Принципна реакция на провеждане на реакцията на дериватизация.

Постигнатите първоначални резултати показаха, че Fmoc-Cl реагира количествено и сравнително бързо с аминогрупите на АК и ПА, но бяха наблюдавани редица недостатъци. Получаваха се сравнително голямо количество неидентифицирани разпадни и странични продукти, които интерферират анализа на ПА. На хроматограмите се наблюдава широк пик за хидролизен продукт. Аминокиселините His и Tug, а също и ПА се идентифицират с повече от един пик, което е неприемливо за количествен анализ. В допълнение самият реагент е относително нестабилен, като в рамките на няколко седмици търпи висока степен на разпад и окисление. Бяха проведени серия от насочени експерименти за оптимизиране на условията за дериватизация и анализ, които не дадоха задоволителен резултат. Направените експерименти с различни разтворители за провеждане на реакцията, рН на средата,

време за протичане и температура бяха полезни с това, че бе направен системен анализ на дериватизационния процес, който ни бе полезен при последващите разработки. На практика бяха оптимизирани максимално експерименталните условия, но въпреки това разпадните продукти на Fmoc-Cl маскираха част от анализирани компоненти (фигура 1). Друг недостатък бе ниската репродуктивност на методиката, като за някои от АК относителните стандартни отклонения (ОСО) в площите на пиковете бяха над 15 %.

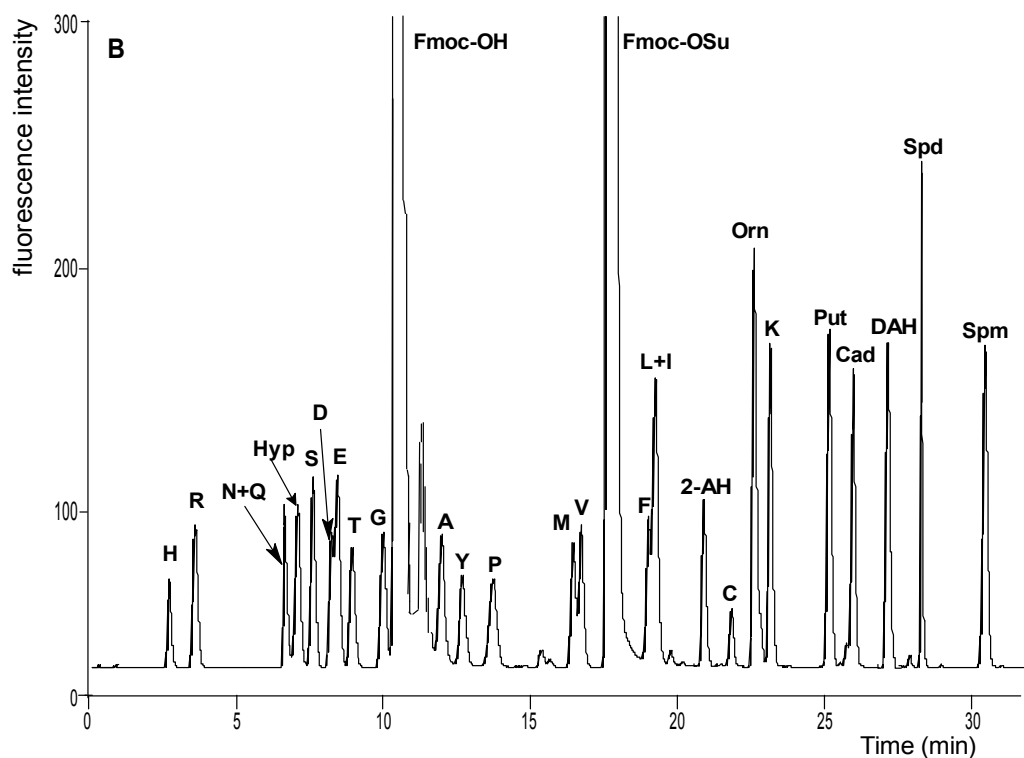


Фигура 1: Хроматограма от анализ на стандартна смес от 21 АК и 4 ПА при използване на Fmoc-Cl за дериватизиращ реагент

Тази ниска възпроизводимост, впоследствие бе установено, че се дължи на недостатъчния буферен капацитет на използвания боратен буфер.

На следващата стъпка от реализиране на работата за дериватизация на АК и ПА бе използван Fmoc-OSu. Този реагент до момента не бе използван в аналитични методи. Fmoc-OSu е използван само в синтетични реакции за получаване на Fmoc производни на АК с цел използването им в пептидният синтез. В литературата нямаше данни за синтез на ПА производни чрез Fmoc-OSu. Първоначалните опити бяха направени при използване на условията, които определихме като оптимални за Fmoc-

Cl. Реакцията на дериватизация протичаше без странични процеси. Fmoc-OSu показва относително висока стабилност на хидролиза, като в допълнение пика на излишъка от реагент не интерферираше анализирани компоненти (фигура 2).



Фигура 2: Хроматограма от анализ на стандартна смес от 21 АК и 4 ПА при използване на Fmoc-OSu за дериватизиращ реагент

Допълнително предимство на използването на Fmoc-OSu, бе че той реагира ефективно с първични и вторични аминогрупи, но за разлика от Fmoc-Cl не реагира с хидроксилни фенолни групи. Така тирозинът се определя само с един пик на хроматограмите. След установяване на наличие на предимства при използването на Fmoc-OSu за дериватизация бяха проведени експерименти за оптимизиране на реакционните условия, които са описани по-долу в работата. Методиката показва висока степен на възпроизводимост, като ОСО за всички анализируеми компоненти (21 АК и 4 ПА) бе под 5%.

Като възможни реагенти за въвеждане на Fmoc- група бяха използвани и Fmoc-OBt и Fmoc-ODMT. И при двата реагента не бяха постигнати резултати, които да са по-добри от Fmoc-OSu. Бензотриазоловият реагент по скорост и специфичност е сходен с Fmoc-Cl. За него бе наблюдавано, че реагира с по-висока скорост с хидроксилни

отколкото с аминогрупи. Получават се и множество странични и разпадни продукти в това число и дипептиди. При Fmoc-ODMT реакцията на дериватизация е селективна по отношение на аминогрупи. Наблюдава се много ниско ниво на странични продукти, практически се получават само следови количества. Основният недостатък на този реагент е ниската скорост на реакцията на дериватизация. Ако се сравни със скоростта при Fmoc-Cl, то тя е в пъти по-бавна. Ниската скорост на реакцията е и основната причина да отхвърлим използването на този реагент за аналитични цели. Твърде дълго време за дериватизация не е приемливо от гледна точка на големи набори от проби.

Избор на буфер за провеждане на дериватизацията.

В хода на проведените изследвания бе установено, че се наблюдават съществени разлики в пиковете на ПА и аминокиселините лизин и орнитин, при различни концентрации на стандарти. Всички те имат поне две аминогрупи, като втората (вторичните при ПА) имат високи рК (> 10) стойности и за да бъдат дериватизирани ефективно и пълно е необходимо високо рН на използвания буфер. Тези разлики бяха много силно изразени когато се използваха за анализ лизати на ракови клетки. При тези проби екстракцията на АК и ПА се осъществява с 2.0 или 0.2 М перхлорна киселина, поради високата устойчивост на клетъчните стени. За да проверим дали предположението ни, че причина за горните наблюдения е ниският буферен капацитет на стандартно използваните в практиката боратни буфери, реакцията бе контролирана на рН-мерър при използване на микроелектрод. Установихме, че в зависимост от природата на използваната реална проба, реалното рН в реакционната среда е в границите 6.8 – 7.6. Това рН е далеч от необходимото около 8 за нормално протичане на дериватизационната реакция. След серия от експерименти, при които бяха тествани фосфатни, ацетатни, карбонатни и органични буфери, ние установихме, че най-подходящи за процеса са карбонатните буфери. В последваща серия от експерименти бе определен и оптималният състав (бяха изследвани натриев, калиев и литиев карбонат и хидрогенкарбонати, а също и различни по състав комбинации от тях.) и рН (тестван бе интервала от 8.6 до 10.4 при стъпка от 0.2 единици) на буфера за дериватизация. Като такъв бе селектиран 0.5 М натриев хидрогенкарбонат, съдържащ 0.5 М натриев карбонат и 5 mM ЕДТА с рН=10.2.

Определяне оптималното време за дериватизация.

Третият елемент, след избора на дериватизиращ агент и дериватизационен буфер бе определяне на оптималното време за провеждане на процеса. Реакцията на дериватизация бе изследвана за двата реагента Fmoc-Cl и Fmoc-OSu в независими експерименти, тъй като те имат своите индивидуални особености. Тъй като времето за дериватизация е в пряка връзка с температурните условия на провеждане на процеса, бе реализирана серия от опити при стайна и повишена температура, а също дериватизацията бе провеждана при използване на ултразвукова вана.

По отношение на дериватизацията с Fmoc-Cl бе установено: 1) при завишена температура протича с по-висока скорост, но е съпроводена в по-голяма степен от странични процеси; 2) в ултразвукова вана процеса протича пълно за <8 мин без странични процеси, но за съжаление част от органичния разтворител се изпарява неконтролирано, което е съпроводено с промяна обема на пробата респективно промяна концентрацията на анализирани компоненти; 3) при стайна температура реакцията протича напълно за около 20 мин при използване на разбъркване. Като оптимални условия за провеждане на реакцията на дериватизация с Fmoc-Cl, ние приехме да провеждаме процеса за 30 мин на тест ротатор при стайна температура.

За изследване хода на дериватизацията с Fmoc-Cl бяха проведени аналогични опити, но бе използвана и по-висока температура 40°C и 50°C.

Както се и очакваше дериватизацията с Fmoc-OSu протича с сравнително по-ниска скорост. Използването на температура над 40°C ускорява процеса, но аналогично на случая с употребата на ултразвук, води до неконтролируема промяна в обема на пробата, поради частично изпарение на използвания ацетон. За провеждане на дериватизацията с Fmoc-OSu бяха приети за относително най-добри - използване на температура от 40°C за период 20 мин.

Така селектираните условия бяха използвани при всички последващи експерименти за оптимизация на хроматографските условия за анализ.

Определяне на хроматографските условия за едновременен количествен анализ на АА и ПА.

Производните на АК и ПА, които се получават след дериватизация с Fmoc-група, имат твърде разнообразен характер. Една част от дериватите на АК (Asp, Glu, His, Arg) са полярни и хидрофилни съединения, друга част на алифатните АК (Leu, Val, Ile, Phe) са слабо полярни и хидрофобни, а пък производните на ПА и диамино

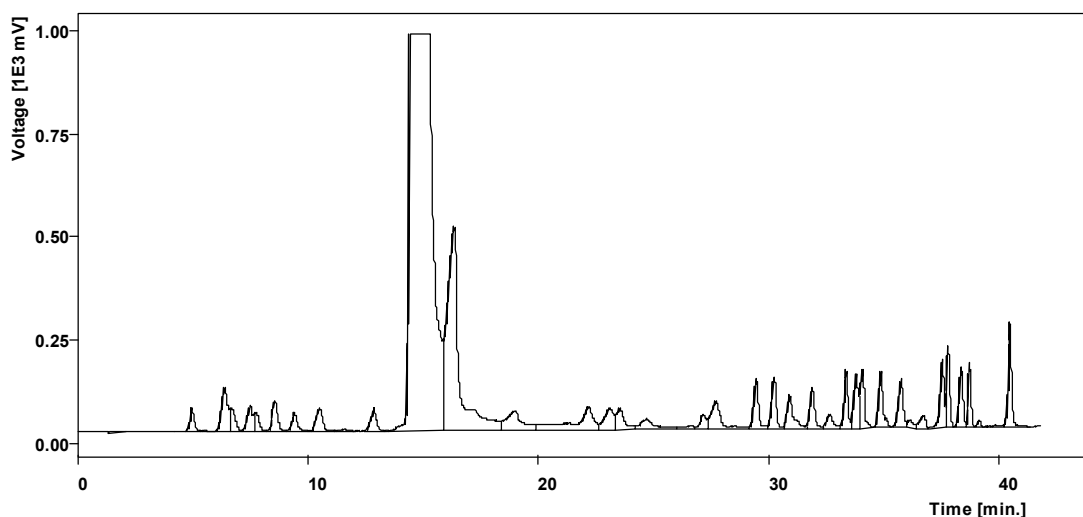
аминокиселините (Lys, Orn) са слабо полярни, хидрофобни и обемисти. Всичко това прави намирането на ефективни условия за хроматографско разделяне сравнително трудна задача. По литературни данни [107-109] това може да стане на нестандартна колона и продължително време на елуиране при използване на три или четири компонентни градиенти. Тоест за да изпълним предварително набелязаната цел на настоящата работа – разработване на ефективен метод за едновременен анализ на АК и ПА, трябваше да намерим решение на редица проблеми, като:

- Избор на подвижна фаза (елуиращ буфер);
- Избор на хроматографска колона;
- Определяне на оптималните условията на елуиране за всяка колона и подвижна фаза (градиент, състав на градиента, скорост на потока, параметри на детектора).

За целта бе използван един прост подход, който включваше вариране на всеки индивидуален параметър при запазване стационарни останалите.

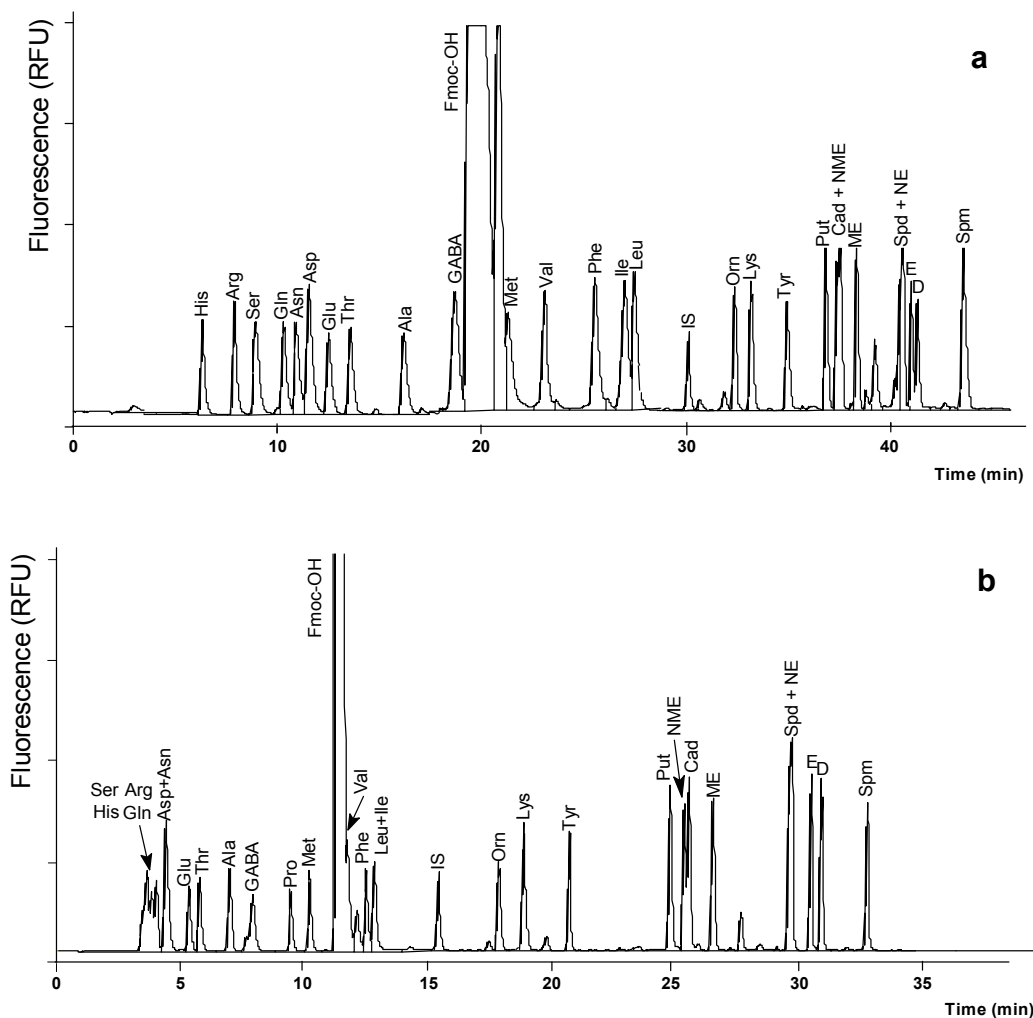
Първата задача, с която трябваше да се справим, бе избора на елуираща фаза. На базата на налични литературни данни и собствен предварителен опит в областта на анализа на пептиди, за стартови условия бяха избрани аминокиселинни буфери. Началните експерименти бяха направени с триетиламинофосфатен буфер. Този буфер е ефективен когато се използва в сравнително висока концентрация (0.125 M), а за органичен разтворител бе използван ацетонитрил. Тъй като триетиламониевия фосфат е слабо разтворим в ацетонитрил бе необходимо в фаза Б да използваме минимално количество вода, това от своя страна се отрази негативно на елуирането на производните на ПА. (фигура 3). Те се задържаха в колоната твърде дълго време, а това естествено водеше до твърде продължителен анализ. В допълнение, разделянето на част от АК не бе добро, а пиковете за част от АК и ПА бяха несиметрични и разляти.

Основния извод който бе направен от експериментите с триетиламинофосфатните буфери бе, че те не са подходящи за едновременен анализ на АК и ПА в условията на ВЕТХ.



Фигура 3: Хроматограма от анализ на стандартна смес от 21 АК и 4 ПА при използване на триетиламинофосфатен буфер.

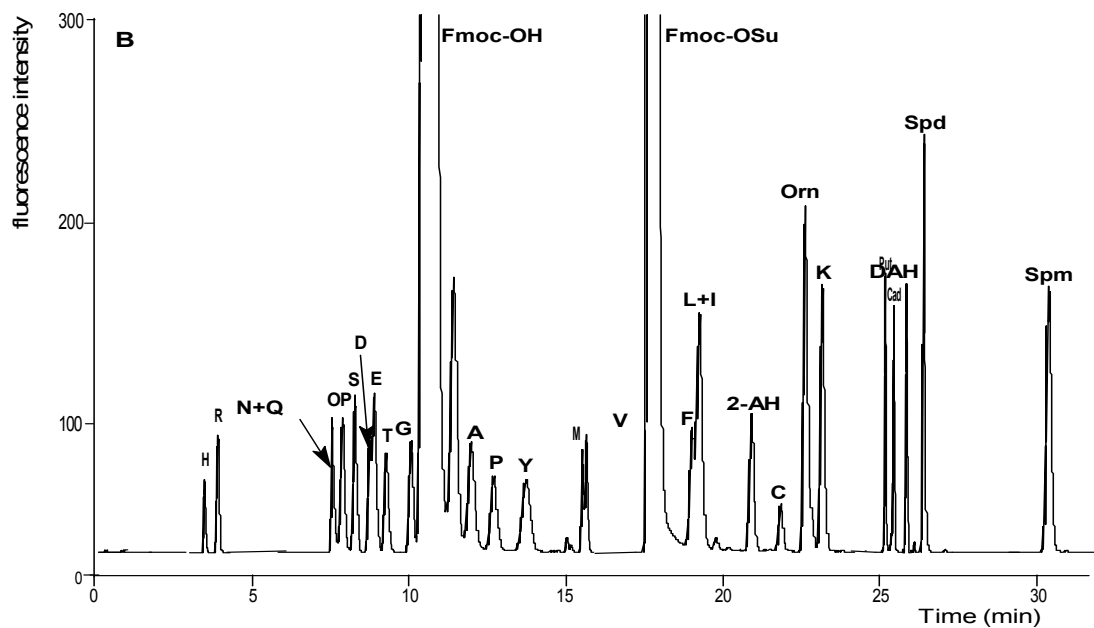
Тези начални експерименти показаха, че е необходимо да се търси вещество, което да повлиява ефективно задържането на полиамините в условията на обратно фазова хроматография. На базата на опита ни с анализ на защитени пептиди и наличните литературни данни [115, 116], като подходящ агент изглеждаше дибутиламина. Тъй като фосфатните буфери се смятат за подходящи за хроматографско разделяне на модифицирани аминокиселини, бяха проведени експерименти с използване на буфери на основа дибутиламинофосфат. При тези опити бяха варирани концентрацията на дибутиламина (от 1 до 10 mM) и рН (2.1 до 4.6) на буфера. На фигура 4 е показан ефекта на различни концентрации на дибутиламина при едно и също рН на буфера, в случая рН=2.20. Както може да се види, дибутиламина ефективно свива времето на елуиране на пиковете за ПА, като позволява значително да се снижи времето за анализ. От друга страна, при високи концентрации на дибутиламин пиковете за полярните АК се припокриват и практически не се разделят. Като компромисен вариант ние се спряхме на 5 mM концентрация на дибутиламинофосфата. При тази концентрация на буфера бе проверен ефекта на рН върху елуирането. Не се наблюдаваха съществени разлики в профилите на елуиране при различни рН на буфера в интервала 2.1 – 4.6. Единствено при по-ниските стойности на рН симетричността на пиковете бе по-висока, затова като подходящо рН на буфера бе селектирано рН=2.20.



Фигура 4: Хроматограма от анализ на стандартна смес от АК и ПА а). 1 mM дибутиламониевфосфат; б). 8 mM дибутиламониевфосфат. Всички останали параметри на анализа са идентични.

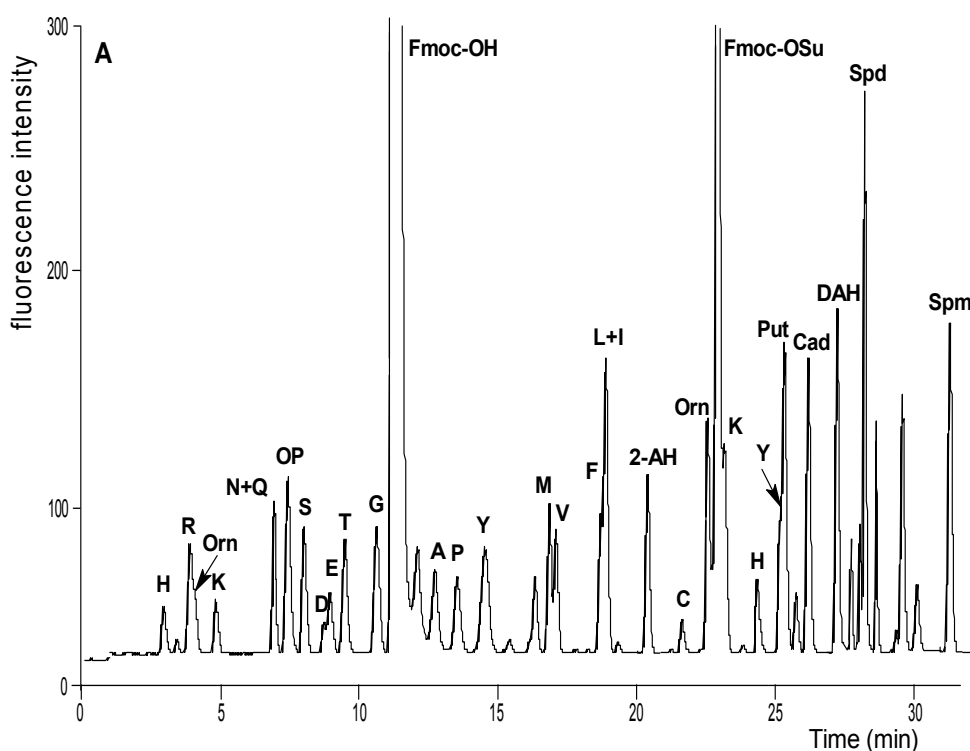
Последващите експерименти бяха насочени към оптимизиране условията на анализ при използване на вече селектираните параметри. След системен анализ на данните получени при вариране на концентрацията и рН на буфера, като оптимални бяха селектирани 5 mM дибутиламониевфосфат с рН=2.20. Тъй като дибутиламинофосфата е с ниска разтворимост във вода, във фаза А бяха използвани 5 обемни % ацетонитрил. С цел избягване на формиране на градиент на рН по време на анализа, рН на фаза Б бе коригирано до изходното рН на фаза А с ортофосфорна киселина. На следващата стъпка пристъпихме към избор на най-подходящата хроматографска колона и оптимизиране на стъпките на градиента.

Първоначално използвахме налични в лабораторията колони: Hypesil ODS 150 x 4.6 mm, 5 μ m (HewlettPackard, Germany) и Adsorbosphere C₁₈, 150 x 4.6 mm, 3 μ m (Alltech, USA). И при двата случая резултатите от разделянето на АК и ПА бяха неудовлетворителни. На Hypesil колоната пиковите на повечето АК и част от ПА се припокриваха (фигура 5) и бяха с лоша симетрия. Пиковите за Leu, Pe и Phe практически не се разделяха. Пика за глицина при ниски концентрации на практика се припокриваше от този на флуоренилметанола.



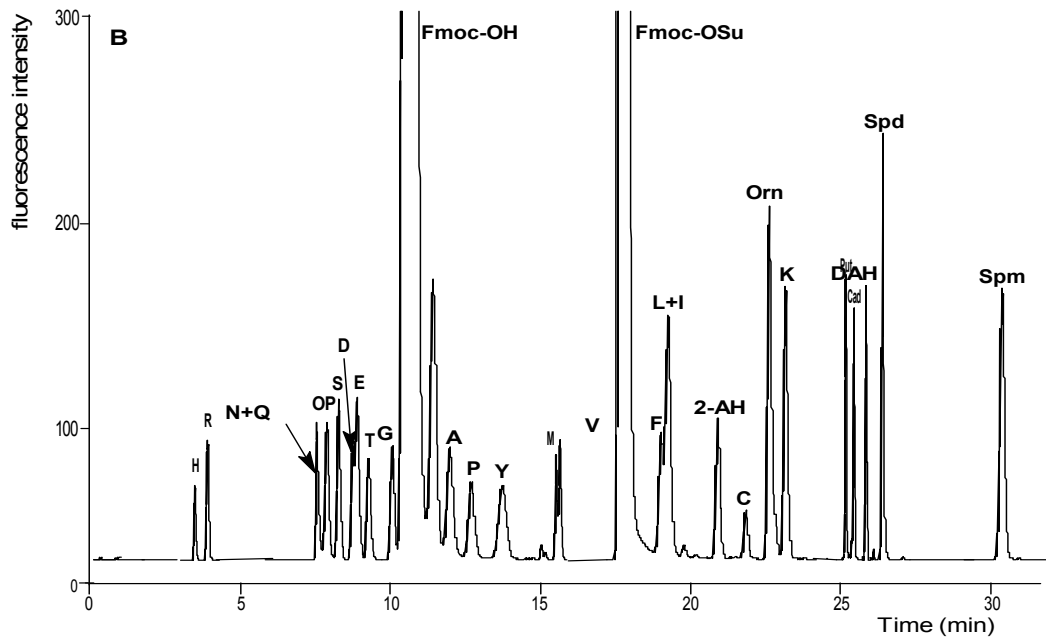
Фигура 5: Хроматограма от анализ на стандартна смес от АК и ПА на колона Hypesil ODS 150 x 4.6 mm, 5 μ m

При използване на колона с по-фини частици на пълнежа, Adsorbosphere C₁₈, 150 x 4.6 mm, 3 μ m, резултатите бяха дори по-лоши (фигура 6), обратно на очакванията. Пиковите на ПА се припокриваха, отново нямаше разделяне на пиковите за Leu, Pe и Phe. Друг недостатък на тази колона бе, че анализите бяха с много лоша повторямост и възпроизводимост. След само няколко последователни анализа се наблюдаваше значимо изместване на почти всички пикове във времето, в това число и пика за използвания вътрешен стандарт, което правеше метода неизползваем за по-големи серии от проби. В допълнение, бе наблюдаван и така наречения „мемори ефект“: след няколко анализа, при използване на празна проба на хроматограмата се появяваха пикове от АК и ПА. При последващ анализ тези пикове вече интерферираха с анализираната проба.

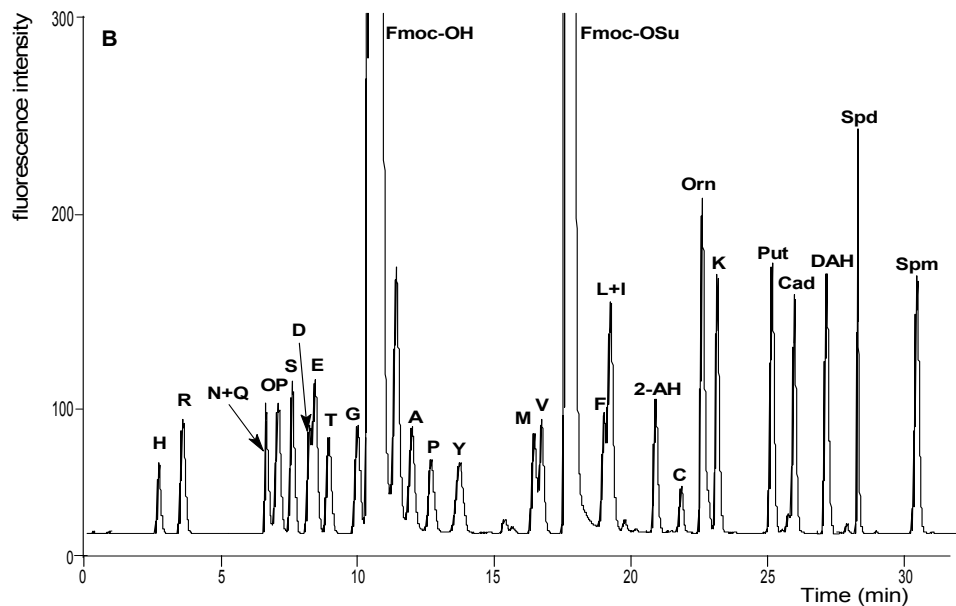


Фигура 6: Хроматограма от анализ на стандартна смес от АК и ПА на колона Adsorbosphere C₁₈, 150 x 4.6 mm, 3µm, употребявана за 20 последователни анализа

На следващия етап използвахме няколко колони от производителя MachereyNagel (Германия) от типа NUCLEODUR C₁₈, 5µm размер на частиците и 100 Å размер на порите. Първоначално бе тествана единична колона с размер 150x4.6 mm. На тази колона бяха постигнати задоволителни резултати (фигура 7). Повечето пикове за АК се разделяха на базова линия. Хроматографските пикове бяха симетрични и добре дефинирани. За съжаление се наблюдаваше сравнително лошо разделяне на ПА, които се сбиваха, а пика за спермина се задържаше относително дълго време в колоната. Както и при предишните тествани колони, не бе възможно разделяне на Leu и Pe. Всички опити за тяхното разделяне, чрез модифициране на градиентния профил, водеше до значително влошаване на разделянето на останалите АК и ПА.



Фигура 7: Хроматограма от анализ на стандартна смес от АК и ПА на колона NUCLEODUR C₁₈, 5µm размер на частиците и 100 Å размер на порите, 150x4.6 mm



Фигура 8: Хроматограма от анализ на стандартна смес от АК и ПА на три последователно свързани колони NUCLEODUR C₁₈, 5µm размер на частиците и 100 Å размер на порите, 50x4.6 mm

Аналогични анализи направихме и на по-къса колона, само 50 mm. Идеята бе да се съкрати времето за анализ. Резултатите показаха, изненадващо добро делене на

хроматографските пикове за ПА и естествено не особено добри резултати за АК. Тези данни ни наведоха на идеята да проведем анализа на три последователно свързани еднотипни къси колони. Хроматограмите, които се получиха бяха значително по-добри от тези получени на единична колона със същата дължина и абсолютно идентични останали показатели (фигура 8). Всички експерименти по оптимизиране и валидиране на аналитичния метод, разработен до този момент, бяха направени на системата от три последователно свързани колони. Тази система показва редица предимства в сравнение с единичка колона със същите параметри:

- По добро разделяне на хроматографските пикове;
- Значително опростяване на процедурите на почистване на колоните;
- По-дълъг живот на колоните;
- Сnižаване на разходите за единичен анализ.

При анализ на реални проби повечето онечиствания, идващи от матрицата, се задържаха в първата колона. На практика, след около сто анализа, колоните бяха разединявани и промивани индивидуално. Като показател за необходимостта от почистване, използвахме загубата на резолюция между пиковете за глицина и флуоренилметанола. Промиването извършвахме с 0.1 % трифлуороцетна киселина в ацетонитрил при ниска скорост на потока. Ако се налагаше в колоните се инжектираха малки количества диметилформамид или диоксан, за допълнителна очистка. След процедурата на почистване колоните бяха съединявани в различен ред от първоначалния. По този начин на един набор от три колони бяха проведени над хиляда анализа на реални проби (подробности в секция „Приложения на аналитичните методи” на дисертацията). По-горе описаните детайли по процедури на пречистване всъщност най-директно се отразяваха на икономическата страна на разработваните методи, те нямат отражение върху аналитичните достойнства на метода.

Едновременно с тестването на различни колони бе проведено и оптимизиране на градиентния профил на елуирането. Това е така, защото ефективността на разделяне на дадена колона е директно зависима от използвания градиентен профил. След избора на системата от три колони за най-подходяща за нашите цели бяха направени допълнителни оптимизационни експерименти за градиента – стъпки, продължителност на стъпките, наклон на кривите. Условиата подбраните за оптимални са представени в таблица 1.

Таблица 1: Оптимален хроматографски градиент за анализ на АК и ПА.

Време (мин)	Буфер А (%)	БуферБ (%)
0	72	28
2	72	28
5	62	38
7	62	38
13	57	43
15	49	51
18	49	51
21	37	63
25	20	80
26	0	100
31	0	100
32	72	28

Трябва да отбележим, че независимо от усилията ни не бяха намерени условия за ефективно разделяне на две двойки от аминокиселини – левцин/изолевцин и аспарагин/глутамин. Всяко подобрене в тяхното разделяне водеше до значително влошаване на разделянето на останалите АК.

Друг важен елемент на разработения градиентен профил, е че той позволява лесно да се адаптира за анализ само на АК или само на ПА, тъй като двете групи вещества се разделят на две отделни групи (фигура 8). Всеки от тези отделни анализи е значително по-кратък от цялостния, а това значително повишаваше производителността на анализите. Този подход бе използван при проби, при които бе необходимо да се получи информация само за една отделна група компоненти.

На основата на реализирания обем от изследователска работа бе разработен нов аналитичен метод за едновременно количествено определяне на 20 АК и 4 ПА чрез ВЕТХ след предколонна дериватизация с N-(9-флуоренилметоксикарбонилокси) сукцинимид.

Избор на вътрешен стандарт за количествен анализ.

Количественият анализ на реални проби може да се осъществи по два метода- използване на вътрешен стандарт или на външен стандарт. Използването на вътрешен стандарт има редица предимства, които най-общо казано, позволяват елиминиране на вариациите в параметрите на използваната апаратура и околни условия.

Ние тествахме като потенциални вътрешни стандарти: 1,6-диаминохексан; 1,7-диаминохептан и 2-аминохептанова киселина. 1,6-Диаминохексанът се оказа

неподходящ, защото неговия пик на хроматограмите се припокриваше с пиковете на някои от анализирани компоненти. Другите две тестовни вещества показаха, че са подходящи за използване като вътрешен стандарт. Ние предпочетохме да използваме 2-аминохептанова киселина от практически съображения – по-лесно приготвяне на стандартни разтвори и по-висока трайност на тези разтвори (1,7-диаминохептана е аморфно вещество, което на стайна температура е полутечно).

Валидиране на аналитичния метод

За да бъде приложен на практика разработения от нас аналитичен метод бе необходимо да бъде валидиран.

Първия параметър на метода, който трябваше да се определи, бе стабилността на Fmoc дериватите на АК и ПА. За целта бяха използвани стандартна и реална проба (клетъчен лизат), които бяха анализирани непосредствено след приготвянето. Аликвоти от тях бяха съхранявани на 4°C в хладилник и на стайна температура и ре-анализирани всеки ден в продължение на една седмица. Пробите съхранявани на 4°C показаха снижение на флуоресцентния сигнал от под 3 % за АК и около 5% за ПА след съхранение в продължение на една седмица. Тъй като на хроматограмите не са наблюдаваха допълнителни пикове, това снижение ние си обясняваме с евентуална абсорбция по стените на използваните пластмасови епруветки или с микро-преципитация, незабележима с невъоръжено око.

При пробите съхранявани на стайна температура нямаше значими промени до 48 час на съхранение. След този период на хроматограмите се наблюдаваха нови пикове и значително снижаване на пиковете за хистидин, аргинин, лизин и полиамините. Резултатите от това изследване са представени на долната таблица 2.

Таблица 2: Стандартно отклонение (%) на площта на пика при дневните ре-анализи.

АК и ПА	Стандартно отклонение на площта на пика (%)											
	1 ден ^a		2 ден		3 ден		4 ден		5 ден		8 ден	
	4°C	RT	4°C	RT	4°C	RT	4°C	RT	4°C	RT	4°C	RT
His	1.37 ^b	1.71	1.87	3.07	2.24	8.15	2.36		2.87		6.02	
	1.46 ^c	2.31	2.96	2.62	2.65	15.6 7	2.87		3.13		9.48	
Arg	2.30	0.99	1.90	2.60	2.67	7.42	2.75		3.05		5.43	
	1.51	1.24	1.59	2.95	1.93	9.10	2.54		3.20		5.66	

Asn/	1.87	1.37	2.60	3.00	2.56	6.76	2.63	2.78	9.24
Gln	2.62	1.80	2.95	2.87	2.84	8.36	2.80	3.11	10.64
Hyp	0.76	1.14	1.25	1.51	1.65	2.75	1.71	1.86	2.52
	1.25	1.10	1.59	1.83	1.79	4.01	2.32	2.34	2.70
Ser	1.21	0.88	2.01	1.46	2.32	2.42	2.48	2.53	2.73
	1.37	1.57	2.27	1.96	2.49	3.53	2.61	2.61	2.90
Asp	1.82	1.62	2.12	2.87	2.58	5.89	2.64	2.98	3.51
	2.38	2.58	2.23	2.52	2.64	8.50	2.83	3.15	5.03
Glu	2.68	2.61	2.54	2.98	2.75	10.1	2.71	2.85	3.92
	2.15	2.40	2.36	2.12	2.86	8	2.92	3.49	5.48
						9.48			
Thr	1.21	1.63	1.36	1.86	1.42	1.95	1.40	1.52	2.18
	1.65	1.61	1.98	1.75	1.45	1.86	2.06	1.75	2.86
Gly	2.32	1.95	2.35	2.21	2.49	2.25	2.39	2.68	2.56
	2.12	1.75	2.65	2.32	2.58	2.46	2.76	2.65	3.68
Ala	1.58	1.69	1.62	1.72	1.41	1.75	1.65	1.75	2.32
	1.72	1.68	1.63	1.64	1.86	1.84	1.93	2.02	2.23
Pro	1.78	1.96	1.76	2.32	1.78	2.80	1.82	1.86	2.65
	1.93	2.25	1.98	2.68	2.18	3.05	2.25	2.21	2.85
Tyr	2.12	1.36	2.21	2.73	2.52	2.98	2.50	2.68	2.87
	2.65	1.64	2.54	2.18	2.60	2.92	2.78	2.82	3.12
Met	1.68	1.63	2.65	2.80	2.70	5.56	2.85	3.15	4.85
	1.86	1.86	2.46	3.11	2.85	6.23	2.90	3.21	4.25
Val	1.56	1.65	2.36	1.89	2.31	2.15	2.30	2.58	2.63
	1.98	1.44	2.68	1.78	2.46	1.96	2.67	2.78	2.78
Phe	2.36	1.83	2.38	1.80	2.42	2.23	2.56	2.68	2.66
	2.59	2.14	2.65	2.53	2.70	2.69	2.86	3.11	3.02
Leu/	1.46	1.35	2.26	1.40	2.31	1.56	2.30	2.58	2.63
Ile	1.98	1.65	2.08	2.45	2.46	2.26	2.77	2.78	2.78
2-	1.26	1.55	1.31	1.60	1.31	1.66	1.59	1.58	1.63
AH	1.48	1.75	1.58	1.79	1.56	2.06	1.77	1.78	1.78
Orn	2.56	2.80	2.46	3.14	2.81	3.89	2.80	2.98	3.63
	2.98	2.74	3.08	3.54	2.96	4.05	3.07	3.78	3.78
Lys	2.46	2.65	2.46	3.63	3.61	4.84	3.80	3.98	4.13
	2.18	2.87	2.38	3.90-	3.36	4.54	3.57	3.78	4.32
Put	2.35	2.43	2.46	2.65	2.81	3.57	3.80	3.98	4.63
	1.98	2.78	2.08	2.80	2.96	4.12	3.07	3.78	3.82
Cad	2.65	2.54	2.95	2.65	3.54	2.70	3.52	4.65	6.84
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spd	2.56	3.01	3.46	3.10	4.81	3.58	4.80	4.88	7.63
	2.98	3.23	3.08	3.20	3.96	3.76	4.57	4.78	8.78
Spm	3.56	3.32	3.46	3.43	4.81	4.13	4.64	5.12	9.13
	2.98	3.56	4.28	4.43	4.65	5.65	5.07	5.78	14.78

^a Времето между два последователни анализа бе 19-23 часа; ^b стандартен разтвор с концентрация 10 μ M за всяка АК и ПА; ^c клетъчен лизат.

Повтаряемостта на метода бе проверена като една и съща проба бе анализирана 10 пъти независимо, използвайки цялата процедура на дериватизация и хроматографски анализ. За целта бяха използвани две стандартни проби с концентрации 1 и 10 микромола и една реална проба на клетъчен лизат. Получените резултати са показани на таблица 3, като относителни стандартни отклонения в проценти.

Таблица 3: Относителни стандартни отклонения (%) на площта на пика за дериватите на АК и ПА

АК and ПА	Стандарти и проби		
	10 μ M (n=10)	1 μ M (n=10)	Клетъчен лизат (n=10)
Histidine	1.2	1.5	1.5
Arginine	1.1	1.9	2.3
Asparagine +Glutamine	2.0	2.6	2.3
Hydroxyproline	1.1	1.4	1.5
Serine	1.5	1.7	1.6
Aspartic acid	3.4	3.8	3.9
Glutamic acid	3.6	3.5	3.3
Threonine	1.6	1.7	2.0
Glycine	2.2	2.3	2.1
Alanine	2.4	2.6	2.6
Proline	1.5	1.5	1.6
Tyrosine	1.7	1.6	2.3
Methionine	3.3	4.0	3.8
Valine	3.3	3.4	3.6
Phenylalanine	4.2	4.5	4.2
Leucine + Isoleucine	3.9	4.2	4.0
2-aminoheptanoic acid	1.2	1.4	1.4
Cysteine	3.5	3.9	-
Ornithine	1.3	1.3	2.0
Lysine	1.3	1.4	1.6
Putrescine	1.2	1.3	1.3
Cadaverine	1.1	1.3	-
Spermidine	1.6	2.0	2.1
1,7-diaminoheptane	1.4	1.8	1.7
Spermine	3.1	6.7	3.0

Относително високи отклонения (между 3.3 и 4.5 %) бяха установени за не добре разделящите се пикове. Високо вариране бе отбелязано и за спермина при ниските концентрации. Като цяло получените данни показаха изключително висока повтаряемост на разработения метод.

За един аналитичен метод от изключително значение е наличието на корелационна зависимост между количеството вещество и получавания сигнал на

хроматограмата в определен интервал от концентрации. Линеини корелационни криви бяха изследвани в интервала от 0.2 до 50 микромола, използвайки 8 различни концентрации - 0.2, 0.5, 1, 2,5, 10, 15, 25 и 50. За всяка концентрация бяха използвани 7 повторения. За всички анализирани вещества корелационните коефициенти бяха над 0.991. Изключение правеха само метионина с 0.984 и спермина с 0.979. При спермина това вероятно бе поради относително ниската репродуктивност установена за него преди това. При метионина, предполагаме, че по-ниския корелационен коефициент се дължи на частично окисление в процеса на дериватизация и/или съхранение на пробите.

Калибрационните криви бяха направени при използване на вътрешен стандарт – 2-аминохептанова киселина и 1,7-диаминохептан. За рутинна работа бе избрана 2-аминохептановата киселина тъй като:

- Имаше по-висок линеен корелационен коефициент за повечето АК и ПА;
- Нейният собствен корелационен коефициент в интервала 0.2 – 50 микромола бе по-висок в сравнение на този на 1,7-диаминохептана;
- Приготвянето на стандартен разтвор е значително по-лесно, като разтвора е стабилен за по-дълго време в сравнение на този при 1,7-диаминохептана.

Трябва да отбележим, че при полиамините беше установена превъзходна кубична корелационна зависимост ($r = 0.998$ Put, $r = 0.997$ Cad, $r = 0.998$ Spd, $r = 0.995$ Spm) при използване на 1,7-диаминохептана за вътрешен стандарт в обхвата 1 – 20 микромола (1, 2, 5, 10 и 20, пет повторения на всяка концентрация).

В заключение можем да отбележим че разработения ВЕТХ метод за едновременен анализ на АК и ПА има редица предимства пред досега известните методи [107 -112]:

- Кратко време на анализ (продължителността на единичен анализ е 35 минути в това число 3 минути за еквилибриране на колоната);
- Повечето анализирани компоненти се разделят на базова линия;
- Компонентите се елуират, като тесни, добре дефинирани пикове;
- Значимо снижаване консумацията на органичен разтворител;

- Аминокиселините се разделят много добре от полиамините, което позволява лесно преминаване на различни режими на анализ (аминокиселини или полиамини самостоятелно);
- Удъжен живот и използване на колоните;
- Ниска цена на единичен анализ.

В заключение, на базата на описаната по-горе изследователска работа, бе разработен аналитичен метод за едновременен анализ на аминокиселини и полиамини, който впоследствие в един систематизиран вид бе публикуван като научна статия в реномираното научно списание *Journal of Chromatography A*.

Разработване на хроматографски метод за анализ на АК и ПА при използване на едновременен градиент на рН и органичен разтворител по време на анализа.

На база на досегашните изследвания бяха установени няколко съществени качества на Fmoc дериватите на АК и ПА:

- стабилни са на стайна температура в кисели условия;
- не са чувствителни към странични реакции;
- инертни са към реакции с анализираните матрици;
- могат да се анализират в много ниски концентрации.

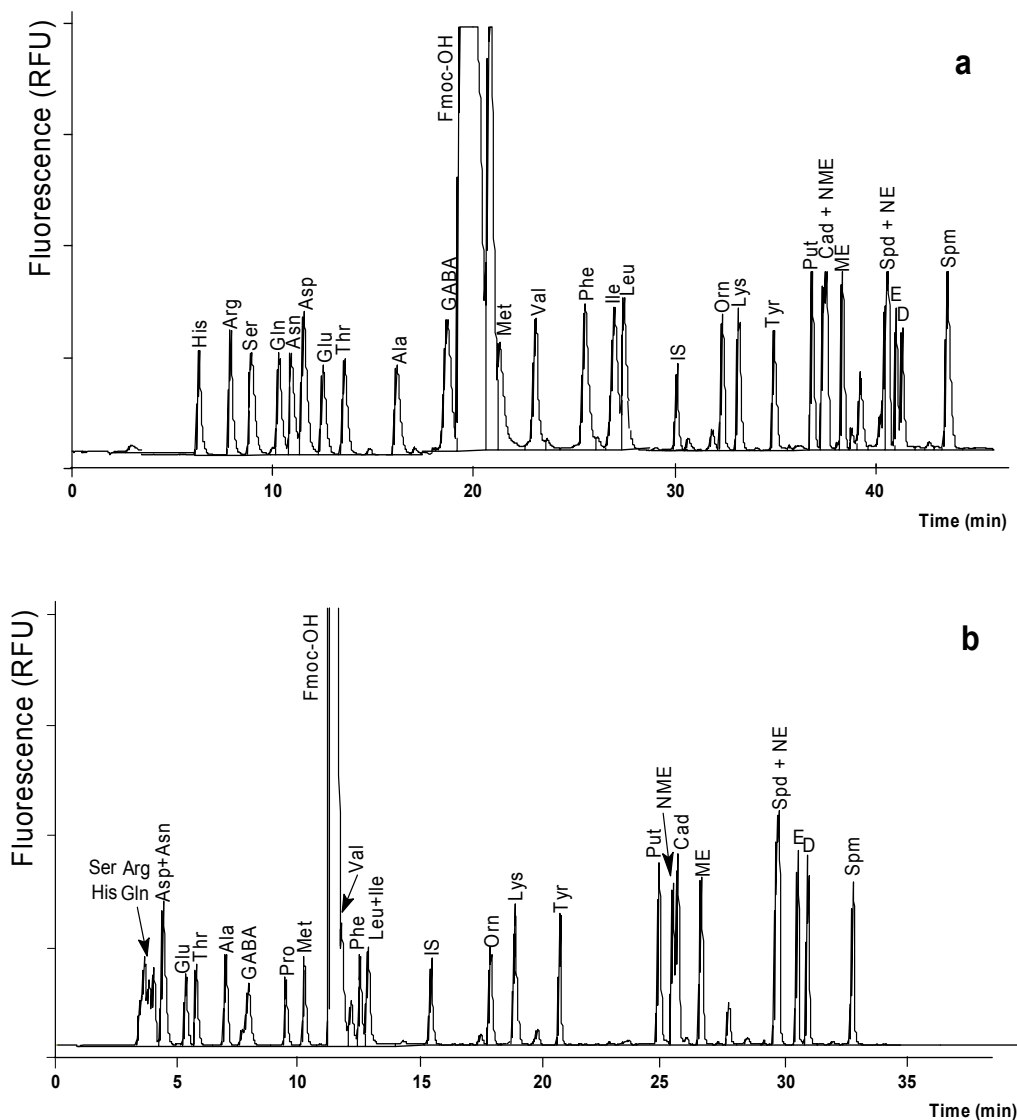
От друга страна поради съществените разлики в природата им: а.) силни йонни съединения - His, Glu, Asn, Arg, Ser, Asp и Glu; б.) незаредени аминокиселини - Ala, Val, Phe, Ile и Leu; в.) относително хидрофобни - Lys, Orn, Trp и г.) силно хидрофобни ди- и тризаместени производни на ПА, които изискват различни условия за разделяне при хроматографски анализ. Досегашните изследвания показаха, че два фактора оказват най-съществено влияние на ефективността на анализа – съдържанието на органичен разтворител в подвижната фаза и нейното рН.

По-долу са описани нашите търсения и резултати насочени към намиране на оптимални условия за съчетаване на тези условия с цел максимално ефективен анализ.

Както бе установено в предишните експерименти, силно хидрофобните производни на ПА се задържат твърде дълго в аналитичната колона и тяхното елуиране се повлиява благоприятно от добавянето на дибутиламин към елуиращата фаза. В предходните опити бе използван елуиращ буфер на основа дибутиламинофосфат, който е използваем само в кисели условия под рН = 4.5. Но за целите на разработвания метод

ни бе необходим буфер, който да модифицираме с добавка на дибутиламин. На базата на известни литературни данни, проведохме серия от експерименти с различен състав на елуиращия буфер. В хода на работа бяха тествани буфери на база: амониев ацетат; амониев формиат; лимонена киселина (дихидрогенцитрат, хидрогенцитрат и цитрат); малеинова киселина; фосфати. При всички буфери имаше разделяне на двете групи вещества – АК от ПА, но в самите групи разделянето на компонентите бе като цяло много лошо. При използване буфери на база фосфат, само силно полярните представители на АК се разделяха относително добре, при останалите анализируеми вещества се наблюдаваше припокриване на пикове, което затрудняваше коректното идентифициране на съответните вещества. Аналогични картини имахме и при цитратните буфери, но с обратен знак. В тях хидрофобните и слабо полярни компоненти се разделяха относително добре, но при силно хидрофобните практически не се наблюдаваше разделяне. От тези експерименти, като компромисен вариант за работа се очертаха буфери на база амониев ацетат или формиат. При тях имаше относително добро разделяне както на силно полярните АК, така и на силно хидрофобните производни на ПА. Проблемни като разделяне оставаха пиковете на слабо полярните алифатни АК – Val, Ala, Leu, Ile, Phe. Повечето от тези пикове се припокриваха, в допълнение бяха твърде широки и с лоша симетричност. Друг съществен проблем, който бе налице на практика при всички тествани буфери, бе твърде дългото задържане на ПА в аналитичната колона. Времето за анализ се удължаваше до над 45 минути. Най-неблагоприятно в това отношение се отразяваха цитратните буфери, при които за елуиране на спермидина от колоната бе необходимо удължаване на градиента до 1 час. На основата на тази серия от експерименти, бе избран за по-нататъшна работа буфер на база амониев ацетат с концентрация 20 милимола и некоригирано рН = 5.6.

От предишните ни изследвания знаехме, че дибутиламина е добър модификатор на фазата за снижаване на времето на елуиране. За това на следваща стъпка от реализиране на метода проведохме серия от експерименти с добавено различно количество дибутиламин към фаза на база амониев ацетат. Бе изследван интервал от 1 до 10 милимола, добавени само към водната (А) фаза или и към двата елуиращи буфера, с стъпка от 0.5 милимола. Концентрации над 5 милимола значително съкращаваха времето на елуиране за ПА-те (до 5 минути), но същия ефект се наблюдаваше и за всички останали пикове (фигура 9).



Фигура 9: Хроматограми на стандартна смес от АК и ПА, получени при използване на елуиращи фази съдържащи: а). 1 mM ДБА и б). 8 mM ДБА. Всички останали условия са идентични.

В резултат беше налице силно припокриване на пиковите за АК, пиковите за глицина и аланина практически се губеха в пика за флуоренилметанола. Промени в стъпките на градиента, бяха с противоречив резултат. Ако част от пиковите за АК се разделяха, то при друга част от АК промяната се отразяваше негативно. При концентрации на дибутиламина в интервала 1-3 милимола, ефекта върху елуирането на ПА, бе значително по-малък, но при АК се наблюдаваше относително добро разделяне. Положителен ефект върху елуирането на ПА бе налице когато и двата използвани буфера съдържаха дибутиламин, като концентрацията му не бива да надвишава 6

милимола за да бъде ефекта положителен за всички анализирани компоненти. Ако само водният буфер бе модифициран, ефекта на дибутиламина бе пренебрежително малък дори при концентрация от 10 милимола. Друг важен извод от тези опити, бе че за елуиране на полярните производни на АК е добре да имаме ниска концентрация на дибутиламин, докато за ефективното елуиране на хидрофобните АК и ПА е необходима по-висока концентрация. По тази причина решихме да използваме в двата елуиращи буфера различни концентрации на дибутиламин. В крайният вариант на условията, които селектирахме буфер А съдържаше 1 mM дибутиламин, а буфер Б - 5 mM.

Следващият проблем, който трябваше да решим бе намиране на киселина, която позволява фино коригиране на елуиращите буфери в широк интервал от рН стойности. В началото тествахме фосфорна киселина и трифлуорооцетна киселина. ТФА се оказва неподходяща за тези цели, минимални промени в концентрацията ѝ на практика „пробиваха” буфера. С други думи контролирано коригиране на рН на буфера с ТФА не можеше да се реализира. Дори разреден разтвор от 1.0% във вода не позволяваше титруване на буферите. При фосфорната киселина нещата изглеждаха по-обнадеждаващи. В началото успешно коригирахме рН на буфера в интервала 3.8-4.6 с висока прецизност. Подобен резултат имаме и в интервала 1.8-2.6 на рН. В останалите интервали, за съжаление фосфорната киселина се оказва безполезна. За рН над 5 не бе възможно контролирано коригиране, минимални промени в количеството добавена киселина водеха до големи промени в рН на буфера. Основният извод, бе че фосфорната киселина има приложение само в ограничени рН интервали.

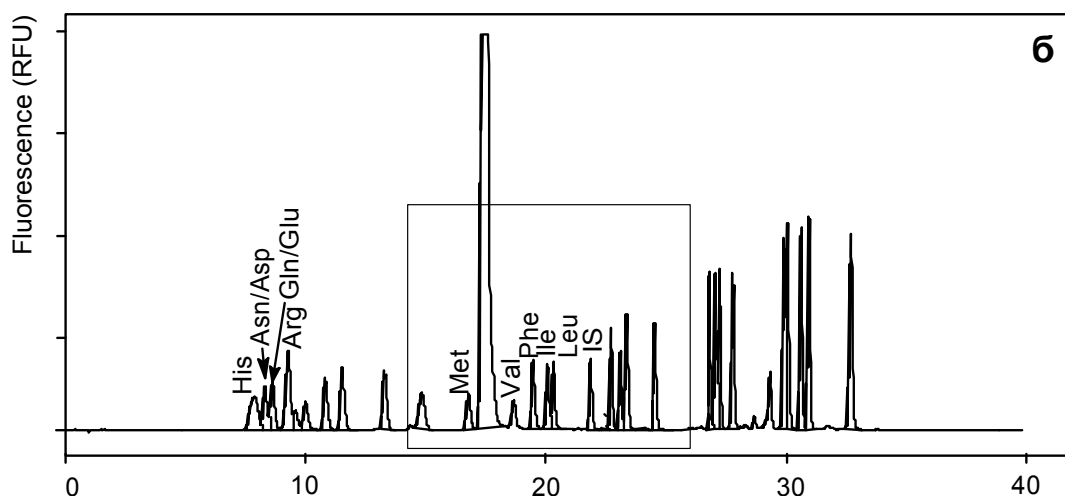
Следващата киселина, която тествахме, бе перхлорната. Първоначалните експерименти направихме с концентрирана киселина – 70%. Опитът бе успешен. С перхлорна киселина буфера (20 mM амониев ацетат съдържащ 3 mM дибутиламин) можеше да се коригира успешно в интервала 2 - 8 на рН плавно, без наличие на резки скокове в стойностите. За да може да се постигне още по-прецизно настройване на буфера в последващите експерименти използвахме 35 % концентрация на перхлорна киселина. С тази концентрация успешно можеше да се реализира разлика от 0.1 рН стойност на буфера. Допълнително предимство на перхлорната киселина, е че тя притежава отлични качества за формиране на йонни двойки [117, 118].

Обобщено, до този момент успешно определихме оптималните концентрации на дибутиламин и перхлорна киселина, които позволяват реализиране на рН градиент.

На следващата стъпка бе необходимо да определим какво е влиянието на рН върху разделянето на анализирани компоненти. За целта проведохме серия от

експерименти, при които само рН на буфера бе различно. Използвахме: буфер А= 20 mM амониев ацетат съдържащ 3 mM дибутиламин в смес от 90/10 (об%) вода към ацетонитрил; буфер Б = 90/10 (об%) ацетонитрил/вода. рН на буфер А коригирахме с 35% перхлорна киселина, тоест по време на тези опити варирахме концентрацията на киселината, респективно рН.

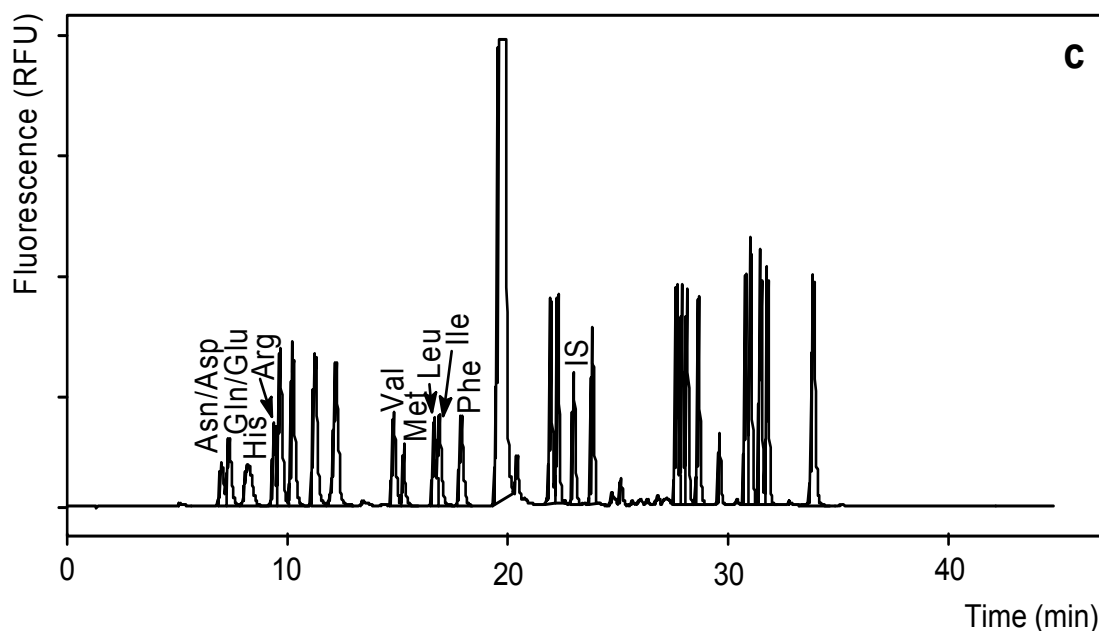
Изследвахме ефекта на рН върху разделянето в интервала от 2.1 до 8.4 със стъпка от 0.5 рН единици. Както се и очакваше добро разделяне на слабо заредените малки молекули на АК деривати се получаваше при рН около 4 (фигура 10)



Фигура 10: Представителна хроматограма получена при рН=4.2 на елуирация буфер (20 mM амониев ацетат съдържащ 5% ацетонитрил и 3 mM дибутиламин)

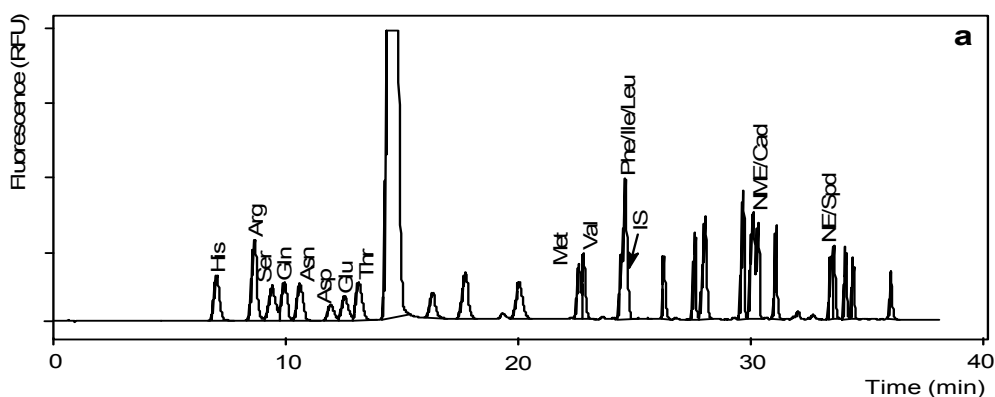
Затова проведохме допълнителни експерименти в интервала 3.8-4.5 със стъпка на вариране на рН от 0.1 единица. Резултатите показаха, че в този интервал е налице много добро разделяне за хидрофобните АК и относително добро за ПА. При тези рН обаче силно заредените АК, които се елуират първи от колоната, практически не се деляха. Повечето техни пикове се припокриваха. В този тесен интервал, на практика не се наблюдаваха значими разлики в разделянето. Хроматограмите получени при рН 3.8 и 4.5 бяха видимо идентични.

При използване на базично или неутрално рН на елуирация буфер не се наблюдаваше по-добро разделянето на ПА от това получено при рН 4. Но за всички останали АК деривати се получаваша значително по-лоши резултати (фигура 11).



Фигура 11: Представителна хроматограма получена при рН=7.4 на елуирация буфер (20 mM амониев ацетат съдържащ 5% ацетонитрил и 3 mM дибутиламин)

Разделяне на базова линия за силно полярните производни на АК, които се елуират първи от колоната, се наблюдаваше в интервала 2.1-2.6 на елуирация буфер (фигура 12). При това кисело рН обаче хидрофобните АК и особено левцин, изолевцин и фенилаланин, практически не се разделяха. Припокриване на пиковете за ПА също бе налице. В допълнение, като цяло всички пикове се елуираха по-късно, като този ефект бе най-силно изразен за ПА.



Фигура 12: Представителна хроматограма получена при рН=7.4 на елуирация буфер (20 mM амониев ацетат, съдържащ 5% ацетонитрил и 3 mM дибутиламин)

Получените данни на този етап от реализация на метода, бяха подложени на сериозен анализ. Основният извод, бе че ако искаме ефективно да разделим всички анализирани компоненти е необходимо да проведем анализа в условия, които позволяват промяна на рН на елуиращия буфер по време на анализа. Това можеше да се постигне само, ако двата елуиращи буфера имаха различно рН и ако по време на градиента, рН на резултатния поток се променяше плавно. За проверка на тази възможност направихме нов дизайн на елуиращите буфери:

А: 20 mM амониев ацетат/ацетонитрил 90/10 (об%) съдържащ 1 mM дибутиламин с рН=2.1, коригирано с 35% перхлорна киселина.

Б: 20 mM амониев ацетат/ацетонитрил 10/90 (об%), съдържащ 5 mM дибутиламин с рН=8.4, коригирано с 35% перхлорна киселина.

За да провери дали при тези буфери ще се получи плавен градиент на рН по време на анализа направихме серия от анализи, при които чрез микроелетрод на рН-метър измервахме рН на входа и изхода на аналитичната колона. Крайните резултати са показани на таблица 4.

Както може да се види, експеримента бе успешен. Променяйки състава на елуиращите фази по време на анализа се получаваше едновременен градиент на ацетонитрил (органичен разтворител) и рН по време на елуирането. Заедно с нарастване на съдържанието на ацетонитрил по време на анализа се повишаваше и рН на фазата.

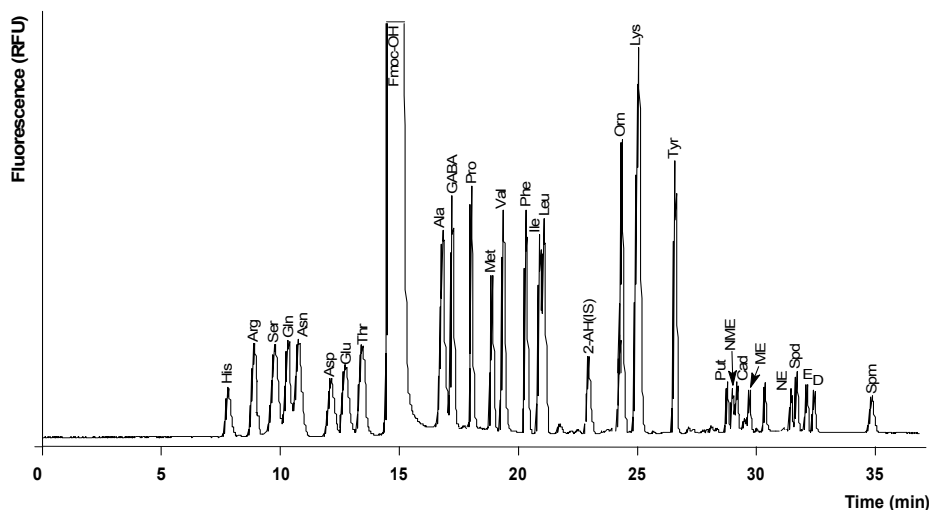
Таблица 4: Хроматографски градиент

Време (min)	Буфер А (%)	Буфер Б (%)	рН ^a
0	74	26	2.4
5	69	31	2.5
15	63	37	3.6
16	52	48	4.3
21	44	56	4.8
25	32	68	5.4
27	14	86	5.8
30	0	100	6.2
36	0	100	8.4
38	74	26	2.4
43	74	26	2.4

^a Показаните рН стойности бяха измерени на изхода на колоната в 100 µl аликвота използвайки рН-метър оборудван с микроелектрод (Blue Line 16, WTW, Germany)

Най-важният резултат от реализирането на метода за едновременен градиент на рН и ацетонитрил по време на анализа, бе че всички анализирани АК и ПА се разделяха на базова линия. По този начин в началните кисели условия се постигаше разделяне на силно хидрофилните компоненти, след това при рН около 4 се постигаше добро разделяне на слабо хидрофобните аминокиселини и накрая при базично рН и високо съдържание на дибутиламин, разделени на базова линия се елуираха пиковете за ПА.

На фигура 13 е показан резултата, който се получаваше при така селектираните условия на градиента. За проверка ефективността на разработения метод към анализиранията смес от 21 аминокиселини и 4 полиамина добавихме още 5 непротеиногенни АК (таурин, саркозин, хидроксипролин, β -аланин и GABA) и 5 катехоламина (допамин, епинефрин, норепинефрин, метаепинефрин и метанорепинефрин). Те бяха избрани, защото присъстват в повечето биологични течности (плазма, урина или лимфа) и както АК и ПА реагират в условията на дериватизация с Fmoc-Cl. Така броя на анализиранияте деривати достигна 30. Както може да се види на фигура 13 в условията на едновременен градиент на рН и ацетонитрил тези 30 компонента бяха успешно разделени на базова линия при това само за 35 минути. При всички тези експерименти бе използвана единична аналитична колона, а не по-рано предложената система от три последователно свързани колони. При система от три колони не се получаваше коректен градиент на рН, а оттам и неефективно разделяне. Вероятно това се дължи на формиране на градиентни условия във всяка от отделните колони, проблема не бе изследван допълнително.



Фигура 13: Представителна хроматограма от анализ на стандартна смес от 26 АК, 4 полиамина и 5 катехоламина в условия на едновременен анализ на рН и ацетонитрил по време на хроматографския анализ.

Валидиране на метода за анализ при едновременен градиент на рН и ацетонитрил

Хроматографските условия на разработения метод включват едновременно градиент на органичен разтворител и рН, по този начин от съществено значение бе да се установи повторемостта и възпроизводимостта на времената на задържане. За целта бяха използвани проба на стандарт и реална проба от човешка плазма. Получените резултати са показани на таблица 5 и са на база на пет повторения.

Таблица 5: Повтаряемост и възпроизводимост на хроматографския метод

	Повтаряемост				
	Време на задържане			Площ на пика	
	time [min]	SD [min]	RSD [%]	стандарт ^c RSD [%]	плазма RSD [%]
His	7.85	± 0,13	1.64	4.62	7.46
Arg	8.94	± 0,08	0.92	2.44	1.47
Ser	9.83	± 0,13	1.29	2.16	1.38
Gln	10.36	± 0,12	1.12	1.85	1.24
Asn	10.83	± 0,07	0.63	2.46	2.06
Asp	12.19	± 0,10	0.81	1.66	2.88
Glu	12.82	± 0,08	0.66	3.28	1.01
Thr	13.49	± 0,07	0.54	2.34	1.34
Ala	17.31	± 0,04	0.22	1.34	1.06
Pro	18.13	± 0,07	0.37	2.60	0.71
Met	18.95	± 0,08	0.43	1.85	1.84
Val	19.47	± 0,08	0.39	1.51	1.51
Phe	20.43	± 0,08	0.40	2.49	2.01
Ile	20.97	± 0,08	0.37	1.14	1.77
Leu	21.15	± 0,08	0.38	3.12	0.40
Orn	24.42	± 0,05	0.20	1.97	5.18
Lys	25.16	± 0,15	0.58	2.74	0.78
Tyr	26.67	± 0,17	0.62	3.58	4.62
Put	28.87	± 0,04	0.15	3.44	3.54
Cad	29.32	± 0,04	0.13	4.39	3.44
Spd	31.81	± 0,03	0.10	2.08	n.d.
Spm	34.99	± 0,02	0.06	3.48	4.04

Приложимостта на разработения метод за количествени анализи бе проверена като определихме линейността и чувствителността. Всички анализи бяха направени при използване на 2-аминохептанова киселина за вътрешен стандарт.

Линейността бе проверена в интервала 1-200 mM за АК и 0.1-20 mM за ПА. Калибрационните криви и нелинейните регресионни пресмятания бяха направени при използване съотношението на площта на съответния компонент към площта на вътрешния стандарт. Получените резултати са показани на таблица 6.

Таблица 6: Валидационни параметри на метода.

	Линейност r^2	Нива на откриваемост	
		LOD pmol	LOQ pmol
His	0.974	6.92	14.10
Arg	0.996	2.26	7.84
Ser	0.998	1.90	6.26
Gln	0.999	2.14	6.86
Asn	0.999	2.16	6.62
Asp	0.998	3.38	11.64
Glu	0.998	2.23	8.20
Thr	0.994	2.30	7.72
Ala	0.999	1.66	5.76
Pro	0.999	1.68	5.44
Met	0.988	2.98	10.18
Val	0.997	3.50	9.48
Phe	0.999	1.76	5.78
Ile	0.998	1.82	6.72
Leu	0.998	1.44	5.24
Orn	0.999	1.10	3.96
Lys	0.994	0.56	2.46
Tyr	0.998	2.40	5.10
Put	0.999	0.96	3.16
Cad	0.996	0.84	2.72
Spd	0.999	0.86	2.64
Spm	0.999	0.64	2.16

За повечето анализирани компоненти получените регресионни коефициенти бяха по-високи от 0.995, изключение правеха само метионина и хистидина с $r=0.988$ и 0.978 съответно. Това най-вероятно се дължи на чувствителността им на окисление. Праговете на откриване (детекция) и количествен анализ бяха пресметнати при използване на съотношение сигнал/шум =3 и 10 съответно и бяха в пикомолни концентрации. С други думи разработения метод притежава висока чувствителност и прецизност в широк концентрационен интервал.

Репродуктивността на метода бе изследвана само за полиамините, тъй като те в реални проби обикновени са в много ниски концентрации. Бе използван метода на определяне на добавено количество. Анализирана бе произволно избрана проба от плазма и към нея бяха добавени три различни дефинирани количества на ПА. Получените резултати са показани на таблица 7.

Таблица 7: Репродуктивност на метода по отношение на ПА

	Концентрация на пробата ($n=5$) [$\mu\text{M.L}^{-1}$]	добавено 1 μmol ($n=5$)		добавено 2 μmol ($n=5$)		добавено 4 μmol ($n=5$)	
		found [$\mu\text{M.L}^{-1}$]	recovery [%]	found [$\mu\text{M.L}^{-1}$]	recovery [%]	found [$\mu\text{M.L}^{-1}$]	recovery [%]
Put	4.03	5.06	101	6.12	104	8.01	99
Cad	1.24	1.97	88	3.02	89	4.68	86
Spd	0.25	1.19	95	2.07	91	3.68	92
Spm	0.36	1.33	98	2.23	94	4.21	96

Тези данни показват, че метода има много добра репродуктивност. Относително по-ниски стойности бяха получени за кадаверина, които по наше мнение се дължат на качеството на използвания стандарт.

В заключение, бе разработен и валидиран метод за едновременен анализ на АК и ПА в биологични проби при използване на едновременен градиент на рН и ацетонитрил по време на хроматографския анализ. Получените резултати бяха систематизирани и публикувани в реномираното научно списание *Journal of Chromatography B*.

Практическо приложение на разработените аналитични методи.

В резултат на описаната по-горе изследователска дейност бяха разработени два отделни аналитични метода за едновременен анализ на АК и ПА. Впоследствие тези методи намериха своята реализация в редица практически проекти.

Анализ на АК и ПА в слабо алкохолни напитки – бира и вино.

За да проверим приложимостта в практиката на първия разработен аналитичен метод, ние го приложихме за определяне състава на всекидневно консумирани напитки. Пробите за анализ бяха подбрани на случаен принцип и бяха закупени от търговската мрежа. При анализите бяха използвани само проби с български произход. Получените резултати бяха в границите на стойности, публикувани от други автори за продукти с различен произход.

Определяне на динамиката на ПА синтез при нормални и третиранни клетъчни линии

Метода бе използван в текущата работа на лабораторията по Клетъчна сигнализация за изследване промените в нивата на ПА при различни типове третирания на клетъчни линии. Така например, динамиката в ПА синтез бе изследвана при третиране на нормални човешки фибробласти с екстракт от *Tribulus terrestris* (бабини зъбки) [119]; при инициране чрез етопозид на апоптоза в нормални и модифицирани кератиноцити и др.

Определяне на профила на АК и ПА в междуочна течност при пациенти с псевдоексфолиатен синдром и псевдоексфолиатна глаукома.

Това изследване бе проведено съвместно с колеги от Очна клиника „Вижън”, гр. София и имаше за цел да провери възможно ли е АК и ПА профил да бъде използван за диагностични цели. Изследвани бяха проби от три групи пациенти с предварителна диагноза, поставена по класически методи. Резултатите от това изследване бяха представени на международен конгрес по офталмология

Определяне на нивата на АК и ПА при пациенти с урологични заболявания

При този проект бяха изследвани нивата на АК и ПА в серум и урина от 57 пациенти (43 мъже и 14 жени) на възраст между 47 и 84 години, разделени на три

групи – пациенти с карцином на пикочния мехур (24 броя), аденокарцином на простата (6 броя) и доброкачествена простатна хиперплазия (27 броя), а също и група от 11 контролни проби от здрави пациенти. Изследването бе реализирано съвместно с колеги от клиниката по урология на „Александровска болница“. Резултатите бяха представени на международен конгрес по урология [120].

Изследване нивата на ПА при пациенти с псориазис и немеланомни кожни тумори

Този проект бе реализиран съвместно с колеги от Катедрата по кожни и венерически болести на МУ-София. В проучването бяха включени 58 пациенти: 31 с плака на псориазис вулгарис и 27 с немеланомни кожни тумори. Бяха проследявани нивата на путресцин, кадаверин, спермидин и спермин в увредени и неувредени кожни проби.

При реализирането на този проект не се интересувахме от нивата на аминокиселините, затова дизайна на градиента бе променен, така че да има оптимално разделяне на полиамините. Това водеше до много по-кратък анализ, респективно повече проби за единица време. Получените резултати са публикувани в [121, 122].

НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

Разработен е нов хроматографски метод за едновременен анализ на аминокиселини и полиамини посредством предварителна дериватизация с N-(9-флуоренилметоксикарбонилокси) сукцинимид

Реагентът Fmoc-OSu има съществени предимства пред Fmoc-Cl:

- Fmoc-OSu е по-слабо реактивоспособен от Fmoc-Cl и реагира селективно с аминогрупите, без да взаимодейства с алкохолни и фенолни хидроксилни групи в аминокиселините, както и с имидазоловия цикъл в хистидина;
- При използване на Fmoc-OSu в условията на дериватизация не се образуват дипептиди, тъй като не се формират смесени анхидриди с аминокиселините;
- Отпада необходимостта от екстракция на пробата.

Разработеният BETX метод за едновременен анализ на АК и ПА има редица предимства пред досега известните методи:

- Кратко време на анализа (продължителността на единичен анализ е 35 минути, в това число 3 минути за еквилибриране на колоната);
- Повечето анализирани компоненти се разделят на базова линия;
- Компонентите се елуират, като в хроматограмите се наблюдават тесни, добре дефинирани пикове;
- Значимо снижаване консумацията на органичен разтворител;
- Аминокиселините се елуират отделно, преди полиамините, което позволява лесно преминаване в различни режими на анализ (аминокиселини или полиамини самостоятелно).

Реализираната комбинация от колони и мобилна фаза значително намалява цената на отделните анализи, като намалява времето за анализ, намалява разхода на органичен разтворител и повишава живота на колоната.

За първи път в практиката е успешно приложено използването на карбонатни буфери в процеса на дериватизация.

Разработен е нов хроматографски метод за едновременното определяне на аминокиселини и полиамини чрез едновременен градиент на рН и органичен разтворител по време на хроматографския анализ

Предложеният метод за контролирано образуване на едновременен градиент на органичен разтворител и рН по време на единичен хроматографски анализ е описан за първи път в литературата.

Предложен е практичен алгоритъм за формиране на рН градиент по време на анализа с използване на дибутиламин и перхлорна киселина като модификатори на елуиращите буфери.

За първи път в практиката процеса на дериватизация с Fmoc-Cl е проведен при повишена температура

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА

1. **Lozanov, V.**, Benkova, B., Mateva, L., Petrov, S., Popov, E., Slavov, C., Mitev, V. Liquid chromatography method for simultaneous analysis of amino acids and biogenic amines in biological fluids with simultaneous gradient of pH and acetonitrile (2007) Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 860 (1), pp. 92-97.
Impact Factor: 2.888, цитирания 33.
2. **Lozanov, V.**, Petrov, S., Mitev, V. Simultaneous analysis of amino acid and biogenic polyamines by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization with N-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide (2004) Journal of Chromatography A, 1025 (2), pp. 201-208.
Impact Factor: 4.531, цитирания 64.
3. **Lozanov, V.**, Biogenic Polyamines in Beer, (2009), In „Beer in Health and Disease Prevention”, Ed. Victor R. Preedy, Elsevier Inc.

ЦИТИРАНИЯ

Lozanov, V., Benkova, B., Mateva, L., Petrov, S., Popov, E., Slavov, C., Mitev, V. (2007) Journal of Chromatography B:, 860 (1), pp. 92-97.

1. Redruello, B., Ladero, V., Cuesta, I., Álvarez-Buylla, J.R., Martín, M.C., Fernández, M., Alvarez, M.A. A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent (2013) Food Chemistry, 139 (1-4), pp. 1029-1035.
2. Devez, A., Delmas, D. Selective liquid chromatographic determination of trace domoic acid in seawater and phytoplankton: Improvement using the ophthaldialdehyde/9-fluorenylmethylchloroformate derivatization (2013) Limnology and Oceanography: Methods, 11 (JUNE), pp. 327-336.
3. Masár, M., Kruk, P., Luc, M., Bodor, R., Danč, L., Troška, P. CZE study on adsorption processes of aliphatic and aromatic amines on PMMA chip (2013) Electrophoresis, 34 (3), pp. 432-440.
4. Meesters, R.J. Bioanalytical LC separation techniques for quantitative analysis of free amino acids in human plasma (2013) Bioanalysis, 5 (4), pp. 495-512.
5. Gosetti, F., Mazzucco, E., Gennaro, M.C., Marengo, E. Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS (2013) Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405 (2-3), pp. 907-916.

6. Rebane, R., Herodes, K. Comparison of three buffer solutions for amino acid derivatization and following analysis by liquid chromatography electrospray mass spectrometry (2012) *Journal of Chromatography A*, 1245, pp. 134-142.
7. Xu, Y., Yang, L., Yang, F., Xiong, Y., Wang, Z., Hu, Z. Metabolic profiling of fifteen amino acids in serum of chemical-induced liver injured rats by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (2012) *Metabolomics*, 8 (3), pp. 475-483.
8. Song, C., Zhang, C., Li, G., Zhang, X., Chen, G., You, J. Highly selective and sensitive determination of free and total amino acids in *Apocynum venetum* L. (Luobuma tea) by a developed HPLC/FLD method coupled with pre-column fluorescent labelling (2012) *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63 (2), pp. 170-177.
9. Li, W., Hou, M., Cao, Y., Song, H., Shi, T., Gao, X., Wang, D. Determination of 20 Free Amino Acids in Asparagus Tin by High-Performance Liquid Chromatographic Method after Pre-Column Derivatization (2012) *Food Analytical Methods*, 5 (1), pp. 62-68.
10. Bueno-Solano, C., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I., Campas-Baypoli, O.N. HPLC determination of histamine, Tyramine and Amino acids in shrimp by-products (2012) *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23 (1), pp. 96-102.
11. Jia, S., Kang, Y.P., Park, J.H., Lee, J., Kwon, S.W. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (2011) *Journal of Chromatography A*, 1218 (51), pp. 9174-9182.
12. Sun, J., Guo, H.-X., Semin, D., Cheetham, J. Direct separation and detection of biogenic amines by ion-pair liquid chromatography with chemiluminescent nitrogen detector (2011) *Journal of Chromatography A*, 1218 (29), pp. 4689-4697
13. Sun, Z., You, J., Li, G., Zhao, X., Suo, Y., Wang, X. Determination of amino acids in rat brain microdialysate with 1,2,5,6-dibenzocarbazole-9-ethyl chloroformate as labeling reagent by high performance liquid chromatographic fluorescence detection and mass spectrometric identification (2011) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879 (17-18), pp. 1367-1374.
14. Molnár-Perl, I. Advancement in the derivatizations of the amino groups with the o-phthaldehyde-thiol and with the 9-fluorenylmethylloxycarbonyl chloride reagents (2011) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879 (17-18), pp. 1241-1269.
15. Rosenfeld, J. Chemical Derivatizations in Analytical Extractions (2011) *Handbook of Sample Preparation*, pp. 225-245.
16. Shukla, A., Sanghi, S.K., Gowri, V.S., Baderia, V.K., Lamba, S., Singh, D.K. Determination of biogenic amines in lake water by micellar electrokinetic chromatography with fluorescence detection after derivatization with fluorescamine (2011) *Journal of Analytical Chemistry*, 66 (3), pp. 296-300.
17. Kang, L., You, J., Sun, Z., Wang, C., Ji, Z., Gao, Y., Suo, Y., Li, Y. LC determination of trace biogenic amines in foods samples with fluorescence detection and MS identification (2011) *Chromatographia*, 73 (1-2), pp. 43-50.
18. Sun, Z., You, J., Song, C. LC-fluorescence detection analysis of amino acids from *Stellera chamaejasme* L. Using 2-[2-(Dibenzocarbazole)-ethoxy] ethyl chloroformate as labeling reagent (2010) *Chromatographia*, 72 (7-8), pp. 641-649.
19. Markova, T., Lozanov, V., Alexieva, B., Dyulgerova, M., Mitev, V., Boyadjieva, N. Rolipram inhibits phorbol ester-induced histamine synthesis in murine P-815 mastocytoma cells (2010) *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 63 (7), pp. 1067-1074.
20. Önal, A. Current status of polyamine and polyamine analogs analysis in cancer research (2010) *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40 (2), pp. 60-67.
21. Massa, S., Spanò, D., Pintus, F., Medda, R., Floris, G. Oxidation of di- and polyamines: In vitro effect of amino aldehydes on the vitality of *Leishmania promastigotes* (2010) *Medicinal Chemistry Research*, 19 (1), pp. 77-83.

22. Shi, T., Tang, T., Qian, K., Wang, F., Li, J., Cao, Y. High-performance liquid chromatographic method for determination of amino acids by precolumn derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride (2009) *Analytica Chimica Acta*, 654 (2), pp. 154-161.
23. Jám bor, A., Molnár-Perl, I. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (2009) *Journal of Chromatography A*, 1216 (34), pp. 6218-6223.
24. Zhao, S., Huang, Y., Shi, M., Liu, Y.-M. Quantification of biogenic amines by microchip electrophoresis with chemiluminescence detection (2009) *Journal of Chromatography A*, 1216 (26), pp. 5155-5159.
25. Jám bor, A., Molnár-Perl, I. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride. Literature overview and further study (2009) *Journal of Chromatography A*, 1216 (15), pp. 3064-3077.
26. Tang, T., Shi, T., Qian, K., Li, P., Li, J., Cao, Y. Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography (2009) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877 (5-6), pp. 507-512.
27. Sun, Z., You, J., & Song, C. (2010). LC-Fluorescence Detection Analysis of Amino Acids from *Stellera chamaejasme* L. Using 2-[2-(Dibenzocarbazole)-ethoxy] Ethyl Chloroformate as Labeling Reagent. *Chromatographia*, 72(7-8), 641-649.
28. Rebane, R. (2012). *Advanced method development strategy for derivatization LC/ESI/MS*.
29. CUIHUA, S., ZHANG, C., GUOLIANG, L., ZHANG, X., GUANG, C., & YOU, J. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*.
30. Li, G. (2012). Isolation and Analysis of Chemical Components in Several *Swertia* Plants.
31. Elbashir, A. A., Krieger, S., & Schmitz, O. J. (2013). Simultaneous determination of polyamines and acetylpolyamines in human urine by capillary electrophoresis with fluorescence detection. *Electrophoresis*.
32. Donthuan, J., Yunchalard, S., & Srijaranai, S. (2014). Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for sensitive determination of five biogenic amines in fermented fish samples. *Analytical Methods*.
33. Sun, Z., You, J., Xia, L., & Suo, Y. (2009). Determination and Identification of Primary Aliphatic Amines Using 4-(1H-Phenanthro [9, 10-d] Imidazol-2-yl) Benzoic Acid as Novel Pre-Column Labeling Reagent by LC with Fluorescence Detection and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectroscopy. *Chromatographia*, 70(7-8), 1055-1063.

Lozanov, V., Petrov, S., Mitev, V. (2004) *Journal of Chromatography A*, 1025 (2), pp. 201-208

1. Tsutsui, H., Mochizuki, T., Inoue, K., Toyama, T., Yoshimoto, N., Endo, Y., Todoroki, K., Min, J.Z., Toyo'oka, T. High-throughput LC-MS/MS based simultaneous determination of polyamines including N-acetylated forms in human saliva and the diagnostic approach to breast cancer patients (2013) *Analytical Chemistry*, 85 (24), pp. 11835-11842.
2. Jin, D., Wang, L., Lee, Y.-I. Determination of the polyamines in human toenails as 1-(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-4-methylpiperazine derivatives using high-performance liquid chromatography (2013) *Microchemical Journal*, 110, pp. 568-574.
3. Iijima, S., Sato, Y., Bounoshita, M., Miyaji, T., Saito, M., Tognarelli, D.J. Optimization of an online post-column derivatization system for ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC) and its applications to analysis of biogenic amines (2013) *Analytical Sciences*, 29 (5), pp. 539-545. Cited 1 time.
4. Fiechter, G., Sivec, G., Mayer, H.K. Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses (2013) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 927, pp. 191-200.

5. Masár, M., Kruk, P., Luc, M., Bodor, R., Danč, L., Troška, P. CZE study on adsorption processes of aliphatic and aromatic amines on PMMA chip (2013) *Electrophoresis*, 34 (3), pp. 432-440.
6. Spizzirri, U.G., Restuccia, D., Curcio, M., Parisi, O.I., Iemma, F., Picci, N. Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with evaporative light scattering detector (2013) *Journal of Food Composition and Analysis*, 29 (1), pp. 43-51.
7. Choi, S., Lee, J.-K., Shukla, S., Kim, M. Physicochemical properties and determination of biogenic amines in korean microbrewery beer products (2012) *Journal of Food Biochemistry*, 36 (6), pp. 766-773.
8. Rebane, R., Herodes, K. Comparison of three buffer solutions for amino acid derivatization and following analysis by liquid chromatography electrospray mass spectrometry (2012) *Journal of Chromatography A*, 1245, pp. 134-142.
9. Mazzotti, F., Benabdelkamel, H., Donna, L.D., Athanassopoulos, C.M., Napoli, A., Sindona, G. Light and heavy dansyl reporter groups in food chemistry: Amino acid assay in beverages (2012) *Journal of Mass Spectrometry*, 47 (7), pp. 932-939.
10. Broshtilova, V., Lozanov, V., Miteva, L. Comparative analysis of polyamine metabolism in benign and neoplastic keratinocytic proliferations (2012) *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica*, 21 (1), pp. 3-5.
11. Bueno-Solano, C., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I., Campas-Baypoli, O.N. HPLC determination of histamine, Tyramine and Amino acids in shrimp by-products (2012) *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23 (1), pp. 96-102.
12. Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J., Ferreira, V. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Amines in Must and Wine: A Review (2012) *Food Reviews International*, 28 (1), pp. 71-96.
13. Jia, S., Kang, Y.P., Park, J.H., Lee, J., Kwon, S.W. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (2011) *Journal of Chromatography A*, 1218 (51), pp. 9174-9182.
14. Koyama, J., Taga, S., Shimizu, K., Shimizu, M., Morita, I., Takeuchi, A. Simultaneous determination of histamine and prostaglandin D 2 using an LC-ESI-MS/MS method with positive/negative ion-switching ionization modes: Application to the study of anti-allergic flavonoids on the degranulation of KU812 cells (2011) *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401 (4), pp. 1385-1392.
15. Tang, T., Qian, K., Shi, T., Wang, F., Li, J., Cao, Y., Hu, Q. Monitoring the contents of biogenic amines in sufu by HPLC with SPE and pre-column derivatization (2011) *Food Control*, 22 (8), pp. 1203-1208.
16. Hernández-Cassou, S., Saurina, J. Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques (2011) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879 (17-18), pp. 1270-1281.
17. Molnár-Perl, I. Advancement in the derivatizations of the amino groups with the o-phthaldehyde-thiol and with the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride reagents (2011) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879 (17-18), pp. 1241-1269.
18. Sun, Z., You, J., Li, G., Zhao, X., Suo, Y., Wang, X. Determination of amino acids in rat brain microdialysate with 1,2,5,6-dibenzocarbazole-9-ethyl chloroformate as labeling reagent by high performance liquid chromatographic fluorescence detection and mass spectrometric identification (2011) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879 (17-18), pp. 1367-1374.
19. Mohammad, A., Haq, N., Siddiq, A. Resolution of multicomponent mixture of amino acids using environmentally benign eluents: A green chromatographic approach (2010) *Journal of Separation Science*, 33 (23-24), pp. 3619-3626.
20. Mohammad, A., Haq, N. TLC separation of amino acids with a green mobile phase (2010) *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 23 (4), pp. 260-264.

21. Nasir, F., Batarseh, M., Abdel-Ghani, A.H., Jiries, A. Free amino acids content in some halophytes under salinity stress in arid environment, Jordan (2010) *Clean - Soil, Air, Water*, 38 (7), pp. 592-600.
22. Mohammad, A., Haq, N. Synergistic effect of cationic-nonionic surfactants on simultaneous separation of phenylalanine and tyrosine (2010) *Tenside, Surfactants, Detergents*, 47 (4), pp. 248-253.
23. Callejón, R.M., Troncoso, A.M., Morales, M.L. Determination of amino acids in grape-derived products: A review (2010) *Talanta*, 81 (4-5), pp. 1143-1152.
24. Stefan-Van Staden, R.-I. Enantioanalysis of d-histidine based on its interaction with [5,6]fullerene-C70 and diethyl (1,2-methanofullerene-C 70)-71,71-dicarboxylate (2010) *New Journal of Chemistry*, 34 (6), pp. 1141-1147.
25. Mazzucco, E., Gosetti, F., Bobba, M., Marengo, E., Robotti, E., Gennaro, M.C. High-performance liquid chromatography-ultraviolet detection method for the simultaneous determination of typical biogenic amines and precursor amino acids. applications in food chemistry (2010) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (1), pp. 127-134.
26. Rutherford, S.M., Gilani, G.S. Amino acid analysis (2009) *Current Protocols in Protein Science*, (SUPPL.58), pp. 11.9.1-11.9.37.
27. Zhao, S., Huang, Y., Shi, M., Liu, Y.-M. Quantification of biogenic amines by microchip electrophoresis with chemiluminescence detection (2009) *Journal of Chromatography A*, 1216 (26), pp. 5155-5159.
28. Domínguez-Vega, E., Martínez-Girón, A.B., García-Ruiz, C., Crego, A.L., Marina, M.L. Fast derivatization of the non-protein amino acid ornithine with FITC using an ultrasound probe prior to enantiomeric determination in food supplements by EKC (2009) *Electrophoresis*, 30 (6), pp. 1037-1045.
29. Hristozkova, M., Geneva, M., Stancheva, I. Effect of foliar feeding on nitrogen assimilation in alfalfa plants at insufficient molybdenum supply (2009) *Acta Biologica Hungarica*, 60 (2), pp. 211-219.
30. Kand'ár, R., Žáková, P., Jirošová, J., Sladká, M. Determination of branched chain amino acids, methionine, phenylalanine, tyrosine and α -keto acids in plasma and dried blood samples using HPLC with fluorescence detection (2009) *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47 (5), pp. 565-572.
31. Jámbor, A., Molnár-Perl, I. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride. Literature overview and further study (2009) *Journal of Chromatography A*, 1216 (15), pp. 3064-3077.
32. Tang, T., Shi, T., Qian, K., Li, P., Li, J., Cao, Y. Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography (2009) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877 (5-6), pp. 507-512.
33. Koyama, J., Takeuchi, A., Tode, C., Shimizu, M., Morita, I., Nobukawa, M., Nobukawa, M., Kobayashi, N. Development of an LC-ESI-MS/MS method for the determination of histamine: Application to the quantitative measurement of histamine degranulation by KU812 cells (2009) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877 (3), pp. 207-212.
34. Martínez-Girón, A.B., Domínguez-Vega, E., García-Ruiz, C., Crego, A.L., Marina, M.L. Enantiomeric separation of ornithine in complex mixtures of amino acids by EKC with off-line derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (2008) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 875 (1), pp. 254-259.
35. Sugiura, K., Min, J.Z., Toyo'oka, T., Inagaki, S. Rapid, sensitive and simultaneous determination of fluorescence-labeled polyamines in human hair by high-pressure liquid chromatography coupled with electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry (2008) *Journal of Chromatography A*, 1205 (1-2), pp. 94-102.
36. Pereira, V., Pontes, M., Câmara, J.S., Marques, J.C. Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldehyde derivatization procedure (2008) *Journal of Chromatography A*, 1189 (1-2), pp. 435-443.

37. Mateva, L.V., Petrov, S.Sv., St. Lozanov, V., Elenkova, A.P., Zacharieva, S., Mitev, V.Iv. Simultaneous determination of free polyamines, catecholamines and metanephrines in plasma and urine (2008) *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 31 (14), pp. 2128-2140.
38. Yang, C., Jiang, X., Guo, L., Zhang, H., Liu, M. Analysis of free amino acids in islets of Langerhans by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (2007) *Journal of Separation Science*, 30 (18), pp. 3154-3163.
39. Lozanov, V., Benkova, B., Mateva, L., Petrov, S., Popov, E., Slavov, C., Mitev, V. Liquid chromatography method for simultaneous analysis of amino acids and biogenic amines in biological fluids with simultaneous gradient of pH and acetonitrile (2007) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 860 (1), pp. 92-97.
40. Zarandi, M. Amino acids (2007) *Amino Acids, Peptides and Proteins*, 36, pp. 19-81.
41. García-Villar, N., Hernández-Cassou, S., Saurina, J. Characterization of wines through the biogenic amine contents using chromatographic techniques and chemometric data analysis (2007) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (18), pp. 7453-7461.
42. Hristozkova, M., Geneva, M., Stancheva, I., Georgiev, G. Nitrogen assimilatory enzymes and amino acid content in inoculated foliar fertilized pea plants grown at reduced molybdenum concentration (2007) *Journal of Plant Nutrition*, 30 (9), pp. 1409-1419.
43. Santalad, A., Teerapornchaisit, P., Burakham, R., Srijaranai, S. Pre-capillary derivatization and capillary zone electrophoresis for amino acids analysis in beverages (2007) *Annali di Chimica*, 97 (9), pp. 935-945.
44. Bauza, T., Kelly, M.T., Blaise, A. Study of polyamines and their precursor amino acids in Grenache noir and Syrah grapes and wine of the Rhone Valley (2007) *Food Chemistry*, 105 (1), pp. 405-413.
45. Mohammad, A., Zehra, A. Surfactants modified silica phase for sorption studies of essential amino acids by thin layer chromatography (2007) *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 301 (1-3), pp. 404-411.
46. Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., García-Romero, E. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples (2007) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (3), pp. 608-613.
47. Girchev, R., Markova, P. Renal nerves participation in the effects of nitric oxide and ET A/ETB receptor inhibition in spontaneously hypertensive rats (2007) *Physiological Research*, 56 (1), pp. 25-35.
48. Staden, R.-I.S.-v., Holo, L. Enantioselective, potentiometric membrane electrodes based on cyclodextrins for the determination of l-histidine (2007) *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 120 (2), pp. 399-402.
49. Hlabangana, L., Hernández-Cassou, S., Saurina, J. Determination of biogenic amines in wines by ion-pair liquid chromatography and post-column derivatization with 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate (2006) *Journal of Chromatography A*, 1130 (1 SPEC. ISS.), pp. 130-136.
50. García-Villar, N., Saurina, J., Hernández-Cassou, S. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in wines with an experimental design optimization procedure (2006) *Analytica Chimica Acta*, 575 (1), pp. 97-105.
51. Girchev, R.A., Bäcker, A., Markova, P.P., Kramer, H.J. Interaction of endothelin with renal nerves modulates kidney function in spontaneously hypertensive rats (2006) *Kidney and Blood Pressure Research*, 29 (2), pp. 126-134.
52. Girchev, R., Markova, P., Vuchidolova, V. Influence of renal denervation on renal effects of acute nitric oxide and ETA/ETB receptor inhibition in conscious normotensive rats (2006) *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57 (1), pp. 17-27.
53. Weiss, T.S. 2.2.4. HPLC of biogenic amines as 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl derivatives (2005) *Journal of Chromatography Library*, 70 (C), pp. 502-523.
54. Molnár-Perl, I. 3. Quantitation of amino acids and amines, simultaneously (2005) *Journal of Chromatography Library*, 70 (C), pp. 577-604.

55. Mengerink, Y. 4. Chromatography of polyamines (2005) *Journal of Chromatography Library*, 70 (C), pp. 606-647.
56. Gasthuys, M., Alves, S., Fenaille, F., Tabet, J.-C. Simple identification of A cross-linked hemoglobin by tandem mass spectrometry in human serum (2004) *Analytical Chemistry*, 76 (22), pp. 6628-6634.
57. Bauza, T., Kelly, M. T., & Blaise, A. (2007). Study of polyamines and their precursor amino acids in Grenache noir and Syrah grapes and wine of the Rhone Valley. *Food chemistry*, 105(1), 405-413.
58. Mazzucco, E., Gosetti, F., Bobba, M., Marengo, E., Robotti, E., & Gennaro, M. C. (2009). High-Performance Liquid Chromatography– Ultraviolet Detection Method for the Simultaneous Determination of Typical Biogenic Amines and Precursor Amino Acids. Applications in Food Chemistry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(1), 127-134.
59. Alver, Ö., Parlak, C., & Şenyel, M. (2009). NMR spectroscopic study and DFT calculations of vibrational analyses, GIAO NMR shieldings and 1 J CH, 1 J CC spin-spin coupling constants of 1, 7-diaminoheptane. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 23(1), 85-96.
60. Spizzirri, U. G., Restuccia, D., Curcio, M., Parisi, O. I., Iemma, F., & Picci, N. (2012). Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with evaporative light scattering detector. *Journal of Food Composition and Analysis*.
61. Callejón, R. Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales.
62. Şanlı, N., Şanlı, S., & Ozkan, G. Method Optimization and Separation of Aromatic Biogenic Amines and Precursor Amino Acids by High Performance Liquid Chromatography.
63. Fiechter, G., Sivec, G., & Mayer, H. K. (2012). Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses. *Journal of Chromatography B*.
64. Scotter, M., & Hutton, S. (2005). Testing for biogenic amines in shellfish DSP MBA extracts.