

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

ДИСЕРТАЦИЯ

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

За присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР”

Валентин Стойчев Лозанов

Научен ръководител:

Чл. кор. проф. д-р Ваньо Митев дм дбн

София, 2014 г

Съдържание

	стр
Въведение	1
Използвани съкращения	2
1. Литературен обзор	3
1.1 Аминокиселини. Структура, класификация, метаболизъм и по-важни биологични функции	3
1.2 Полиамини. Структура, класификация, метаболизъм и по-важни биологични функции	6
1.3. Методи за анализ на аминокиселини и полиамини	12
1.3.1. Методи за едновременен анализ на АК и ПА чрез ВЕТХ	13
1.3.1.1. Едновременен анализ на АК и ПА като о-фталдиалдехид деривати	14
1.3.1.2. Едновременен анализ на АК и ПА като 9-флуоренилметилоксикарбонилни деривати	15
1.3.1.3. Едновременен анализ на АК и ПА като дабзил деривати	16
1.3.1.4. Едновременен анализ на АК и ПА като флуоресцеин- и фенилтиокарбамилни деривати	17
1.3.1.5. Едновременен анализ на АК и ПА без използване на дериватизация	17
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА	18
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	19
3.1. Химикали и материали	19
3.1.1. Дериватизационни буфери	19
3.1.2. Приготвяне на разтвор на дериватизиращ реагент	20
3.2. Експериментални процедури	20
3.2.1. Приготвяне на стандартни разтвори	20
3.2.2. Предварителна обработка на проби	20
3.2.2.1. Обработка на плазма и урина	20
3.2.2.2. Обработка на напитки (вино и бира)	20
3.2.2.3. Обработка на клетъчни култури и тъкани	20
3.3. Обща процедура на дериватизация	21

3.4	Хроматографски анализи	21
3.4.1.	Оборудване	21
3.4.2.	Хроматографски колони	21
3.4.3.	Приготвяне на елуиращи буфери	22
3.4.4.	Градиентни профили	22
3.4.5.	Снемане на флуоресцентни спектри на Fmoc-деривати на аминокиселини и полиамини	22
3.5.	Процедюри по валидиране на методите	23
3.5.1.	Определяне стабилност на дериватите	23
3.5.2.	Калибрационни криви	23
3.5.3.	Възпроизводимост	23
3.5.4.	Повтаряемост	23
4.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	24
4.1	Разработване на метод за едновременен анализ на аминокиселини и полиамини чрез ВЕТХ след предколонна деривазация с Fmoc група	25
4.1.1.	Избор на химичен реагент за въвеждане на Fmoc група	25
4.1.2.	Избор на буфер за провеждане на дериватизацията	28
4.1.3.	Определяне оптималното време за дериватизация	29
4.1.4.	Определяне на хроматографските условия за едновременен количествен анализ на АА и ПА.	31
4.1.5.	Избор на въртешен стандарт за количествен анализ	39
4.1.6.	Валидиране на аналитичния метод	40
4.2.	Разработване на хроматографски метод за анализ на АК и ПА при използване на едновременен градиент на рН и органичен разтворител по време на анализа	46
4.2.1	Валидиране на метода за анализ при едновременен градиент на рН и ацетонитрил	55
4.3.	Практическо приложение на разработените аналитични методи	59
4.3.1.	Анализ на АК и ПА в слабо алкохолни напитки – бира и вино	59
4.3.2.	Определяне на динамиката на ПА синтез при нормални и третиранни клетъчни линии	63
4.3.3.	Определяне на профила на АК и ПА в междуочна течност	63
4.3.4.	Определяне на нивата на АК и ПА при пациенти с урологични	65

заболявания	
4.3.5.Изследване нивата на ПА при пациенти с псориазис	67
5. Научно приложни приноси	69
6. Публикации във връзка с дисертационния труд	71
7. Използвана литература	72

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АК	аминикиселини
ПА	полиамини
ВЕТХ	високо ефективна течна хроматография
ДБА	дибутиламин
Fmoc	9-флуоренилметоксикарбонилна група
Fmoc-Cl	9-флуоренилметоксикарбонил хлорид
Fmoc-OSu	(9-флуоренилметоксикарбонилокси) сукцинимид
Fmoc-OBt	(9-флуоренилметоксикарбонилокси)-1-хидроксибензотриазол
Fmoc-DMT	(9-флуоренилметоксикарбонилокси) диметокситриазин

В работата са използвани три буквени съкращения на аминокиселини и полиамини на латиница съгласно IUPAC.

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. Нарушения 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 явно, 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 един 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.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1 Аминокиселини. Структура, класификация, метаболизъм и по-важни биологични функции

Аминокиселините (АК) представляват органични съединения, съдържащи едновременно amino и карбоксилна групи. С изключение на глицина, всички α -аминокиселини притежават асиметричен въглероден атом и поради това проявяват оптична активност. Относителната конфигурация на аминокиселините (L- или D-изомери) се определя с помощта на рентгеноструктурен анализ. С изключение на пролина, всички протеиногенни аминокиселини имат първична аминогрупа. При β -АК (напр. таурин и β -аланин), аминогрупата е свързана към β -въглеродния атом. В структурата на някои белтъци се откриват и аминокиселини, които са претърпели посттранслационни модификации [1]. Поради вариациите в страничните вериги на АК, те проявяват различни биохимични свойства и изпълняват различни функции [2, 3, 4]. Аминокиселините обикновено са стабилни във воден разтвор при физиологично рН, с изключение на глутамина, който бавно циклизира в пироглутамат и цистеина, който се окислява до цистин.

С изключение на глицина, всички останали аминокиселини съществуват като L- и D-енантиомери. В структурата на белтъците при животните участва L-изоформата на аминокиселините, докато при някои микроорганизми се срещат и D-аминокиселини. Повечето D-АК, с изключение на D-аргинина, D-цистина, D-хистидина, D-лизина и D-треонина, могат да бъдат превърнати в L-АК при животните посредством ширококоразпространените D-АК оксидази и трансминази [5, 6].

Сред установените над 300 АК в природата, само 21 (α -АК) (схема 1) участват в изграждането на протеиновите молекули. Обаче, непротеиногенни α -АК (напр. орнитин, цитрулин и хомоцистеин), както и не- α -АК (напр. таурин и β -аланин) също играят важни роли в клетъчния метаболизъм [7, 8, 9, 10]. Поради голямата си маса (40-45% от телесното тегло) скелетната мускулатура е най-големия резервоар както на пептид-свързани, така и на свободни аминокиселини в тялото [11]. Резултатите от няколко скорошни проучвания показват, че тънките черва са основното място на интензивен катаболизъм на АК както при хората, така и при животните, като по този начин се модулира навлизането на аминокиселини от диетата в порталната циркулация и характера на АК в плазмата [12, 13, 14]. Усилва се и интереса към регулаторните

функции на L- и D-аминокиселините за храненето и физиологията [15, 16, 17], както и към подлежащите клетъчни и молекулни механизми [18, 19, 20, 21, 22].

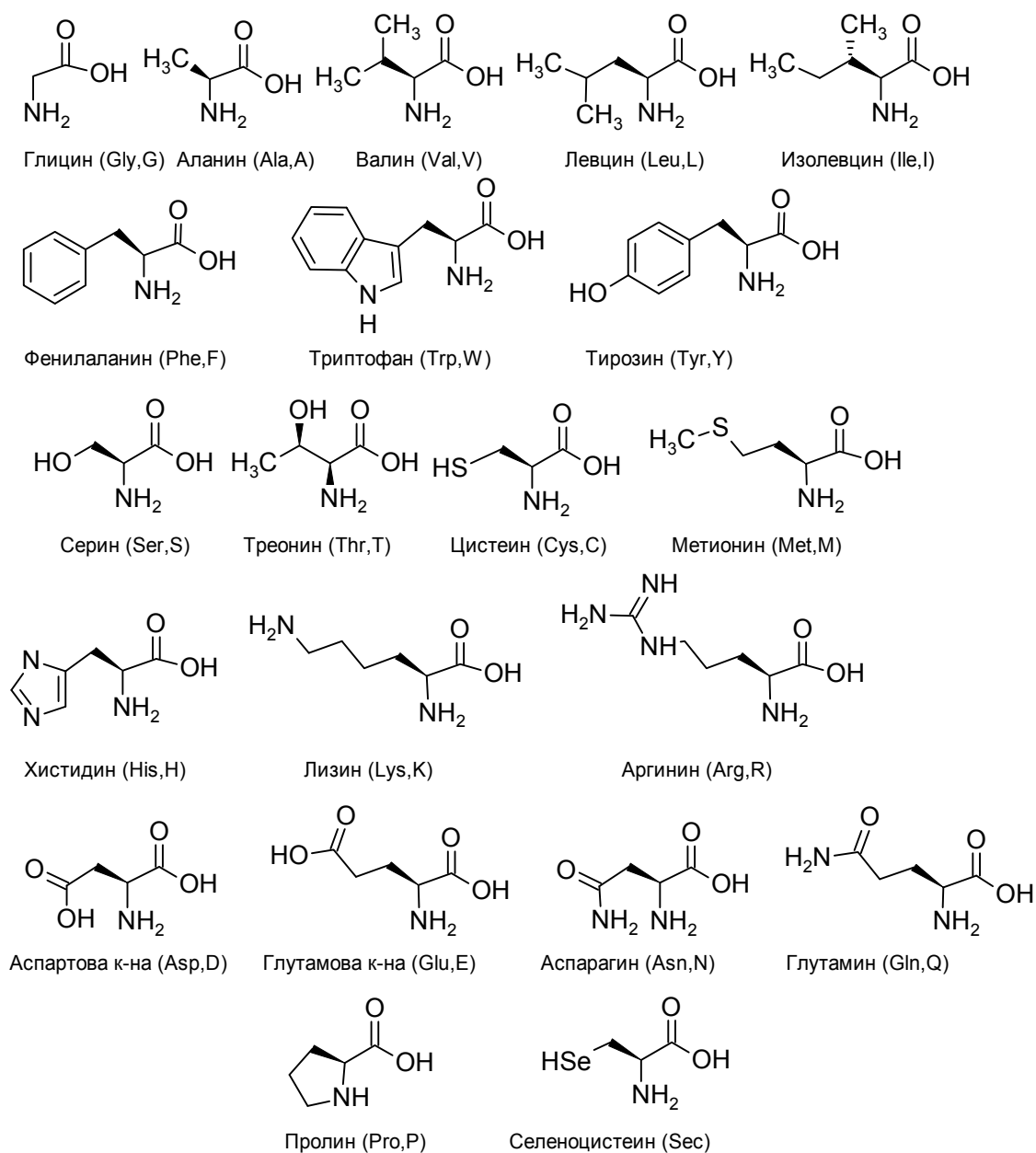


Схема 1: Структури на протеиногенните АК

Съществуват различни критерии за класифицирането на аминокиселините. В зависимост от типа на страничните вериги те се подразделят на алифатни АК (глицин, аланин, валин, левцин и изолевцин); АК с хидроксилни или сяра-съдържащи групи в страничните си вериги (серин, цистеин, треонин и метионин); циклични АК (пролин); ароматни АК (фенилаланин, тирозин и триптофан); основни АК (хистидин, лизин и аргинин); киселинни АК и техни амиди (аспартова, глутамова, аспарагин и глутамин).

Спрямо полярността си аминокиселините се подразделят на хидрофобни или неполярни АК (аланин, валин, левцин, изолевцин, метионин, фенилаланин, триптофан, пролин); полярни, незаредени АК (глицин, серин, треонин, тирозин, цистеин, аспарагин и глутамин); полярни, отрицателно заредени АК (аспартова и глутамова киселина) и полярни, положително заредени АК (лизин, аргинин и хистидин).

На база на степента на набавяне на съответните аминокиселини от храната и способността на организмите сами да синтезират определени аминокиселини, те се подразделят на незаменими (есенциални) и заменими (неесенциални). (таблица 1) Незаменимите аминокиселини се определят като тези АК, които не могат да бъдат синтезирани от организма или не се синтезират в адекватни количества *de novo*, за да се удовлетворят нуждите на организма. Заменимите аминокиселини са тези АК, които могат да се синтезират *de novo* в адекватни количества, за да се удовлетворят оптималните нужди на организма. Съществува и групата на т.нар. условно незаменими АК, които нормално могат да се синтезират в достатъчни количества от организма, но при определени условия, при които скоростта на тяхното използване от организма е по-висока от скоростта на тяхната синтеза, те трябва да се набавят от хранителния режим.

Незаменими АК	Заменими АК
Аргинин	Аланин
Хистидин	Аспарагин
Изолевцин	Аспартат
Левцин	Цистеин *
Лизин	Глутамат
Метионин	Глутамин *
Фенилаланин	Глицин
Треонин	Пролин
Триптофан	Серин
Валин	Таурин
	Тирозин

* - условно незаменими АК

Таблица 1 – Незаменими и заменими аминокиселини при бозайниците.

Трябва да се отбележи, че всичките 21 протеиногенни АК и техните метаболити са необходими за нормалната клетъчна физиология и функция [23, 24, 25, 26].

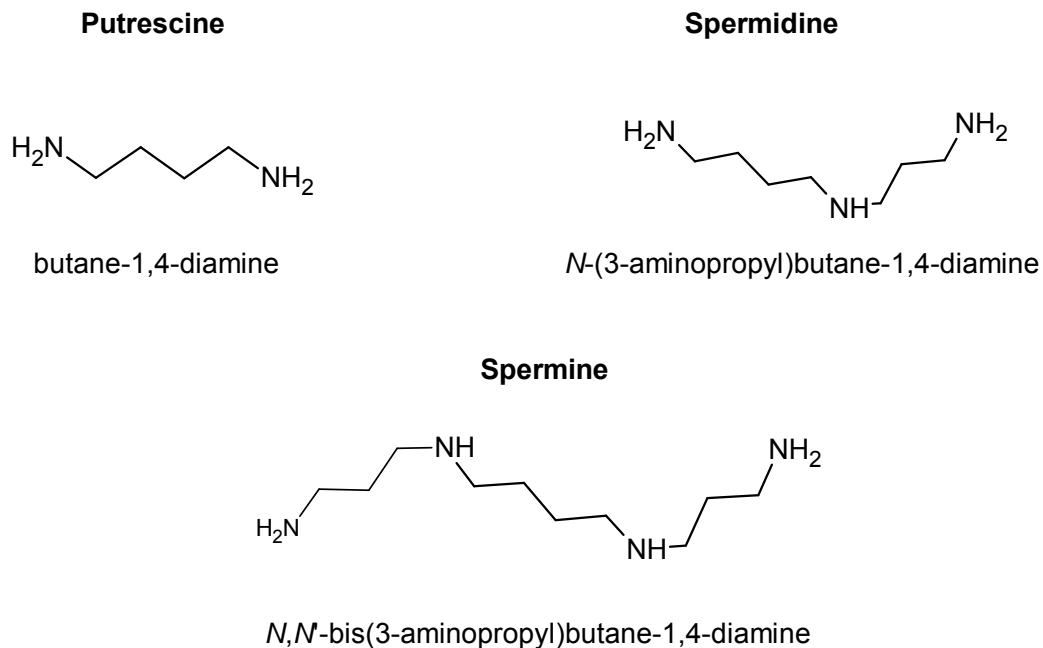
Ненормалният метаболизъм на една аминокиселина нарушава цялостната хомеостаза, нарушава растежа и развитието и дори може да предизвика смърт [27, 28, 29]. Все повече резултати показват, че освен ролята им като структурни единици на белтъците и полипептидите, някои АК са важни регулатори на ключови метаболитни пътища, които са необходими за поддържането, растежа, размножаването и имунитета на организмите, по този начин максимизирайки ефикасността на използването на храните, повишават натрупването на белтъци, намаляват адипозността и подобряват здравето [3, 4, 30, 31]. Тези аминокиселини са наречени функционални и включват аргинина, цистеина, глутамин, левцина, пролина и триптофана.

Въпреки, че всяка аминокиселина има уникален катаболитен път (пътища), катаболизма на множество АК се характеризира с набор от общи за различните организми реакции. Важните метаболити на аминокиселините включват амоняк, CO_2 , дълговерижни и късоверижни мастни киселини, глюкоза, H_2S , кетонни телца, азотен оксид (NO), уреа, пикочна киселина, полиамини и други азотогенни вещества, които имат изключително голямо биологично значение [32, 33, 34, 35, 36]. Пълното окисление на въглеродите на АК настъпва само, ако техните въглероди се превръщат в ацетил-КоА, който се окислява до CO_2 и H_2O посредством цикъла на Кребс и митохондриалната електрон-транспортна система. На моларно ниво, окислението на аминокиселините е по-малко ефективно при продукцията на АТФ, в сравнение с това на мазнините и глюкозата. По този начин, ефективността на енергийния трансфер от L-АК към АТФ варира от 29% при метионина до 59% при изолевцина. Обаче, глутамин е предпочитаното основно гориво за бързо делящите се клетки, включително ентоцити, лимфоцити, макрофаги и туморни клетки [37, 38].

1.2 Полиамини. Структура, класификация, метаболизъм и по-важни биологични функции

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. Тази група включва съединения като хистамина, тирамина, триптамина, серотонина и други, които имат важни физиологични функции [39]. Тези съединения имат много проста химична

структура (фигура 1) и представляват алифатни поликатиони, които са напълно протонирани при физиологични условия.



Фигура 1: Химична структура на полиамините

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 явно, че те повлияват клетъчните процеси на всички нива от генната транскрипция до белтъчната синтеза [40]. Полиамините трябва да бъдат смятани за ключови регулатори на клетъчния растеж, диференциация и клетъчната смърт [41]. За полиамините е известно, че са незаменими за живота, тъй като инхибиторите на полиаминовата биосинтеза блокират клетъчния растеж. Клетките с недостиг на полиамини се стимулират към растеж в присъствието на екзогенни полиамини [42]. Полиамините изпълняват специфични функции и в клетъчния цикъл [43], ембрионалното развитие [44], рака [45], неврохимията [46], функциите на дихателната [47] и имунната системи [48].

Наименованията путресцин, спермидин и спермин отразяват първоначалното им откриване. Путресцинът е изолиран за първи път от *Vibrio cholerae*, но неговото тривиално име произлиза от факта, че се съдържа в големи количества в разлагащата се плът [49]. Първоначалното откриване на спермина датира от 1678, когато Антон ван Льовенхук наблюдава някакви „тристранни” кристали в човешка семенна течност [50].

Сперминът е преоткрит няколко пъти през следващите 200 години, до 1924 когато е изведена емпиричната формула на тези кристали [51], и е отнело още две години преди продуктите да бъдат синтезирани химично [52].

При еукариотните клетки, трите полиамина се синтезират от L-орнитин и L-метионин посредством серии от шест взаимосвързани ензимни реакции (фигура 2). Първата стъпка е формирането на путресцина посредством декарбоксилиране на орнитина от ензима орнитин декарбоксилаза (ODC), който е скорост-определящия ензим за полиаминовата биосинтеза. Този ензим е силно индуцируем, цитозолен ензим, изграден от няколко субединици и се активира в отговор на разнообразни трофични стимули [53]. Има кратък полуживот (10 мин – 1 ч). ODC има нужда от пиридоксал фосфат като кофактор, и агенти, редуциращи тиоловите група, са необходими за ензимната активност.

При някои растения и бактерии първоначалния етап представлява двустъпална стъпка на трансформация на аргинина до путресцин, осъществявана чрез ензимите аргинин декарбоксилаза и агматин урохидролаза.

След това от путресцина, заедно с декарбоксилирания S-аденозилметионин (dcSAM), получен от метионина чрез S-аденозилметионин декарбоксилаза (AdoMetDC), се продуцира спермидин чрез спермидин синтаза, и спермин посредством втора аминокпропилтрансферазна реакция, включваща ензима спермин синтаза. S-аденозилметионин декарбоксилазата е втория ключов ензим в полиаминовата биосинтеза и в резултат на неговата активност образуването на декарбоксилирания продукт нарушава метаболитния път на метионина. S-аденозилметоинина може да бъде използван единствено от спермидин/спермин синтазите.

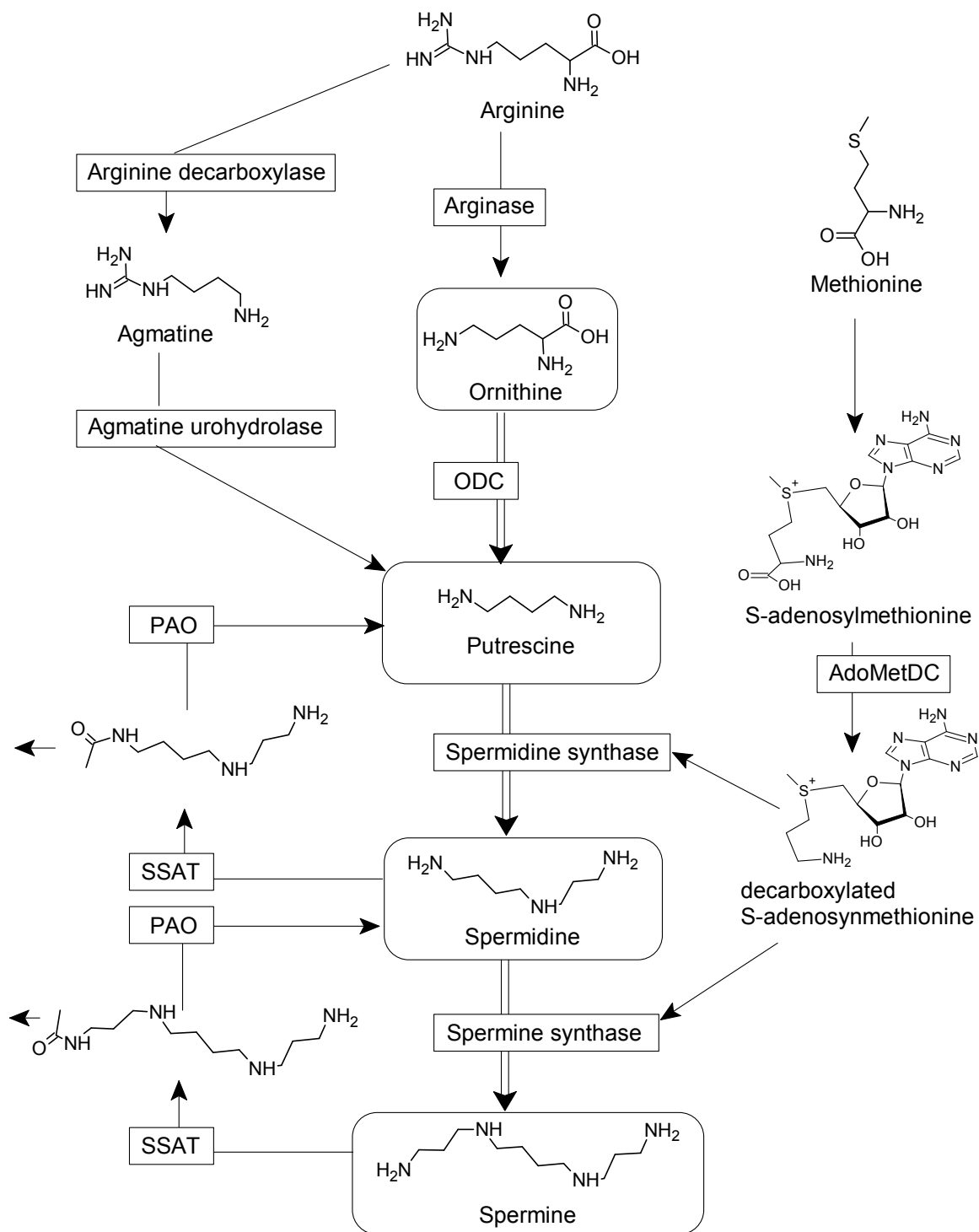
Синтазите са стабилни ензими с конститутивна експресия и за които има малко данни за индукция [54]. За разлика от декарбоксилазите, двата ензима се регулират посредством достъпността до съответните субстрати.

Реакциите, водещи до формирането на полиамини, доскоро бяха смятани за необратими, с отделен път за ретроконверсия на спермина и спермидина съответно до спермидин и путресцин.

Wang et al. (2001) [55] описат оксидаза, която конвертира спермина обратно до спермидин без стъпка на ацетилиране.

Спермидин/спермин N1-ацетилтрансферазата (SSAT) е първия ензим от пътя на ретроконверсия, който използва ацетил-КоА, за да се образуват N1-ацетилспермидин и N1-ацетилспермин. Тези производни са предпочитаните субстрати за полиамин

оксидазата (PAO), посредством която се получават съответно спермидин и спермин [56].



Фигура 2: Биосинтеза на полиамините

Междинните продукти от катаболизма на полиамините, N1-ацетилспермидина и N1-ацетилспермина, рядко се откриват в нормални клетки, основно поради факта, че са основните полиамини, изнасяни от клетката [57].

Окислението на ацетилираните полиамини води до получаването на γ -аминобутирова киселина (GABA), 3-ацетамидопропанал, водороден пероксид (H_2O_2) и амоняк. H_2O_2 и аминокалдехидите, получавани при разграждането на полиамините, също имат важно биологично значение, тъй като задвижват механизмите на програмирана клетъчна смърт или апоптоза при определени клетъчни типове [58].

Пътищата на синтез и катаболизъм на полиамините представляват добре организирана машина, допълнена от фино регулираните механизми на прием и изнасяне на вещества от клетката [59]. Тези процеси са уникални за отделните системи от органи. По този начин организмите са изградили множество регулаторни пътища за контрол на вътреклетъчните нива на полиамините, и когато тези пътища бъдат нарушени, вероятно се задействат болестните процеси [60].

Основният път за получаване на полиамини в клетките на бозайниците е *de novo* синтезата, но транспорта в и извън клетката също допринася за хомеостазата на полиамините [61]. Предварително формираните полиамини произлизат или от храната [62] или от чревната микрофлора [63].

Понеже полиамините подпомагат клетъчния растеж, е логично интензивно растящите клетки да се нуждаят от повече полиамини. Такъв е случая с раковите клетки, които са ненаситни консуматори на полиамини [64]. На този факт се базира и стратегия за „лишаване от полиамини“ при лечението на рака, която показва потенциал при случаи като рака на простатата и на гърдата. Много нови противоракови лекарства са създадени така, че да блокират способността на раковите клетки да извличат полза от полиамините [65].

Освен че стимулират клетъчния растеж, високите нива на полиамини инхибират противораковия отговор на тялото посредством специализирани антитуморни клетки, наречени „естествени убийци“ или НК клетки. Намалването или лишаването от полиамини посредством блокиране на техния синтез или прием повишава активността на НК клетките. По този начин контрола на нивата на полиамините при ракови заболявания може да доведе до намаляване на туморния растеж и стимулиране на имунната активност.

Полиамините са от съществено значение за поддържането на високата метаболитна активност на нормално функциониращия и здрав организъм. Всички

органи в тялото имат нужда от полиамини за своя растеж, възстановяване и метаболизъм. Затова едно от първите неща, които е необходимо да се вземе под внимание по отношение на ролята им за организма е, че те са широко разпространени, повсеместни и незаменими в правилните количества за здравето на организма.

Дълго време е смятано, че полиамините, необходими за растежа, се синтезират на място. Много изследвания, проведени през последните десетилетия, предполагат, че приети орално полиамините ускоряват пролиферацията и диференциацията на клетките от мукозата на храносмилателния тракт [66, 67, 68, 69].

При тези изследвания са проучвани физиологичните ефекти на спермидина и спермина и е станало ясно, че спермина по-силно ускорява узряването на храносмилателния тракт, отколкото спермидина. Освен това е установено, че приетите орално полиамини бързо се абсорбират в тялото и се поемат и използват от тъканите. Също така е открито, че спермидина и спермина се абсорбират по-бързо от путресцина [75].

Данните за съдържанието на полиамини в различни храни [70, 71, 72, 73, 74] и за дневния им прием са ограничени [75, 76].

Основните източници на путресцина са плодовете, сиренето и не-зелените зеленчуци. Всички храни допринасят към диетата със съизмерими количества спермидин, въпреки че нивата му са по-високи при зелените зеленчуци. Месото от своя страна е богат източник на спермин.

1.3. Методи за анализ на аминокиселини и полиамини

Важните биологични свойства на АК и ПА са основната причина за нуждата от надежни и прецизни методи за техния анализ. В литературата са описани стотици методи за анализ на тези вещества [77-84]. Най-разнообразни техники са използвани за целта: йоннообменна хроматография, ВЕТХ с колориметрична, UV, флуоресцентна, лазерно-индуцирана флуоресценция и електрохимична детекция; газова хроматография, капилярна електрофореза, мас спектроскопия.

Предпочитаният метод е ВЕТХ, 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. Кратък исторически поглед върху публикуваните през годините статии, отнасящи се до анализ на АК и/или биогенни амини в това число ПА показва драстично нарастване след широкото навлизане в практиката на ВЕТХ (схема 2).

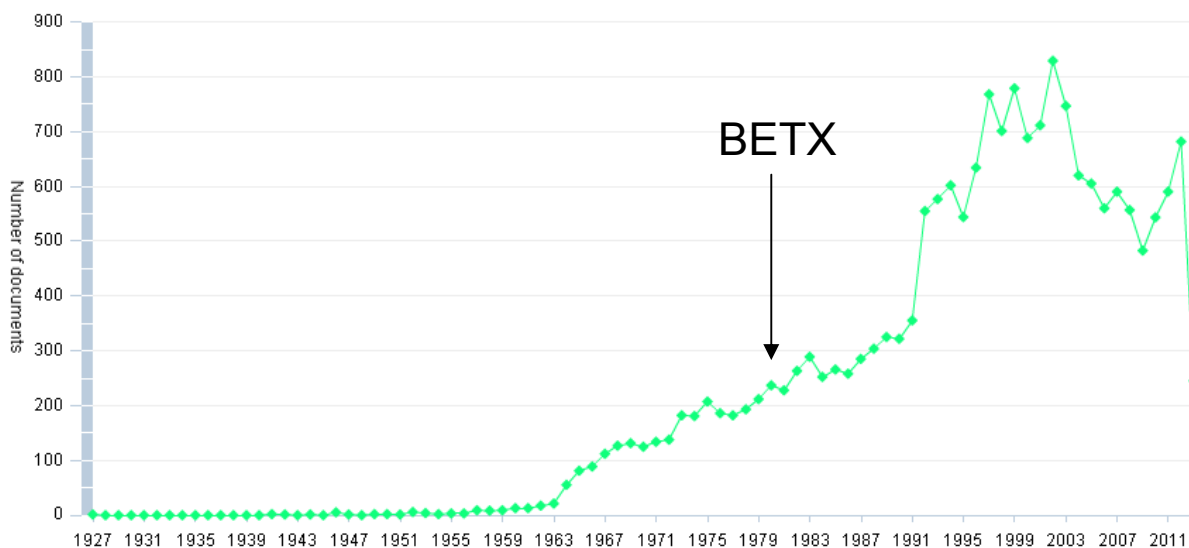


Схема 2: Брой публикации по години отнасящи се до методи за анализ на АК и/или ПА, според данни от scopus.com

В този кратък обзор ще се концентрираме само върху методите на основа ВЕТХ.

АК и ПА присъстват винаги едновременно в изследваните матрици (биологични течности, сирена, вина, храни и т.н.), но обикновено в съвършено различни

концентрации. ПА са продукти от метаболизма на конкретни аминокиселинни прекурсори. Тези факти предполагат, че едновременния им анализ би бил от особен интерес. Но предварителните литературни справки, озадачаващо показаха, че методите за едновременен анализ на АК и ПА са сравнително малко. Преобладават подходите за използване на отделни методи за анализ на тези групи вещества в една и съща матрица. Това е така поради сложността на реализация на метод за едновременен анализ. От една страна са драстичните разлики в концентрациите, а от друга особеностите във физико-химичните свойства на тези две групи вещества, което налага използване на различни подходи за предварителна обработка на пробите. По-долу ще се концентрираме само върху методите за едновременен анализ, тъй като те имат отношение към разработваната дисертационна работа.

1.3.1. Методи за едновременен анализ на АК и ПА чрез ВЕТХ

Предложени са разнообразни методи за едновременен анализ на АК и ПА в единична матрица. Сред тях преобладават методите, при които се използва флуоресцентна детекция. Флуоресценцията е високочувствителен метод, който позволява детекция в много ниски концентрации, а в реални проби ПА обикновено са именно в такива концентрации. Методи за едновременен анализ на АК и ПА след предварителна дериватизация с дабзил [85, 86], 9-флуоренилметоксикарбонил [87, 88], о-фталалдехид (ОРА) – 2-меркаптоетанол (2МЕ) - 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc) [95], ОРА – 2-меркаптопропионова киселина (МРА) [89-94], фенилтиокарбамил [97], флуоресцеинтиокарбамил [96-98] са предложени в литературата. Има направени и предложения за анализ без използване на дериватизация [103-106]. В повечето случаи метода за разделяне е ВЕТХ [85-88, 91-95, 101, 102], но са използвани също капиларна електрофореза [96-98, 100, 103], йонна хроматография [104], а също и класическа йоннообменна хроматография [89, 90, 106]. При тези методи са използвани различни подходи за предварителна обработка на пробите. Различните методи естествено се отличават съществено и в своите валидационни характеристики, като чувствителност, линеен обхват, прецизност, повтаряемост и т.н..

1.3.1.1. Едновременен анализ на АК и ПА като о-фталалдехид деривати

Използването на о-фталалдехид едновременен анализ на АК и ПА е най-старият метод описан в литературата. Първият метод за анализ е предложен през далечната 1978 г [89]. Метода е базиран на класическа йоннообменна хроматография с използване на три елуиращи буфера и продължителност от 115 минути, като между отделните анализи е било необходимо еквилибриране на колоната за цели 45 минути.

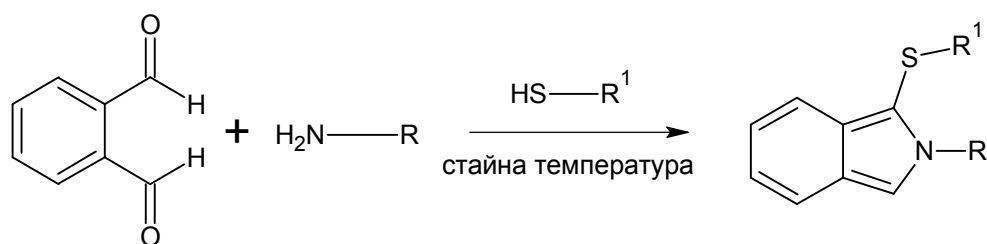


Схема 3: Примерна реакция на дериватизация на АК и ПА с OPA-SHR

Сред всички предложени методи за едновременен анализ на АК и ПА използването на OPA в комбинация с различни тиолни вещества е най-широко и често използваният в практиката [89-94]. Неговата популярност се основава на това, че при много меки условия (стайна температура) OPA в присъствие на тиоли реагира с първични аминогрупи, като формира интензивно флуоресциращи деривати. Друга важна особеност, е че изходните вещества (OPA, тиоли, АК и/или ПА) не флуоресцират. По този начин на хроматограмите не присъстват пикове за изходните вещества и разпадни продукти, за разлика от Fmoc например.

Първият ВЕТХ метод за едновременен анализ АК и ПА е разработен при използване на троен градиент за количествено определяне на 24 компонента в урина и тъканни екстракти като OPA-ME деривати [90].

Метод за анализ на триптофан и осем биогенни амина във вино е описан в [91] при използване на предколонна дериватизация с OPA-ME. Хроматографският анализ е от 35 минути.

Реакцията на аминогрупи с OPA е използвана и за постколонна дериватизация, при анализ на вина [92] и проследяване на процесите на ферментация на гроздова мъст [93]. В първия случай 24 компоненти са разделени за 50 минути на йоннообменна колона при използване на OPA-ME. Във втората работа е използван като

дериватизиращ реагент ОРА-МРА. За разделянето на 32 компонента са били необходими 138 минути. Метод за анализ на 37 аминокомпонента в бира, вино и грозде след дериватизация с ОРА-МРА също е публикуван [96].

1.3.1.2. Едновременен анализ на АК и ПА като 9-флуоренилметоксикарбонилни деривати

Използването на 9-флуоренилметоксикарбонилхлорид (Fmoc-Cl) за дериватизация на аминокиселини е въведен за първи път от Einarsson [107]. Понастоящем този метод е сравнително често използван в практиката [108, 109, 110]. Условието на дериватизация, както и хроматографските условия са интензивно изследвани и оптимизирани [110-112]. Основния проблем при използването на Fmoc-Cl е получаването на разпадния продукт флуоренилметанол, който и в много ниски концентрации има високо интензивна флуоресценция и много често маскира част от анализираните компоненти [107, 110]. Правени са редица опити за неговата екстракция от реакционната смес или използването на така наречените „стоп” реагенти с помощта на които да се отстрани излишъка му [108]. Използването на горните техники е неприложимо за едновременен анализ на АК и ПА, защото при използване на екстракция с неполярна разтворител се елиминират дериватите на ПА, които са неполярни, или обратно могат да бъдат отстранени дериватите на АК.

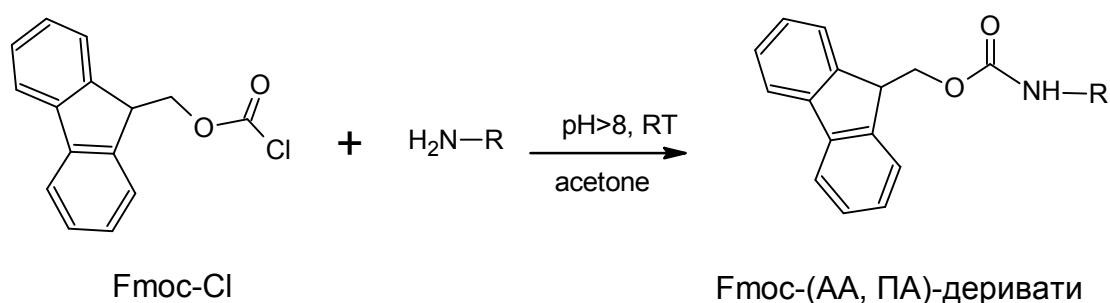


Схема 4: Примерна реакция на дериватизация на АК и ПА с Fmoc – Cl.

В литературата има описани два метода за едновременен анализ на АК и ПА [87, 88]. При първият 5 АК и 8 биогенни амина, сред тях и 3 ПА са успешно анализирани в

15 проби от бяло вино и 15 проби от розе. Въпреки относително дългото време за анализ от 120 минути, авторите не успяват да разделят ефективно повечето АК. Другият описан метод е за едновременен анализ на АК и ПА в сирена. Основният акцент в тази работа е върху условията на дериватизация – концентрация на реагент, продължителност на реакцията, разтворители и буфери. При този метод също е приложена техника на елиминиране на излишъка от Fmoc-Cl чрез стоп реакция с хептиламин и последваща екстракция. Хроматографският анализ е значително по кратък – 70 минути, а количеството на анализирани компоненти е значително по голямо – 24 броя.

1.3.1.3. Едновременен анализ на АК и ПА като дабзил деривати

Дабзил хлорид (4-N,N-диетиламиноазобензен-4'-сулфонил хлорид) е вещество, което реагира при повишена температура с първични и вторични amino-, а също тиолни и хидроксилни групи, като образува стабилни цветни съединения които обикновено се анализират при 420-440 nm. Дериватите обикновено могат да се определят количествено в наномолни концентрации.

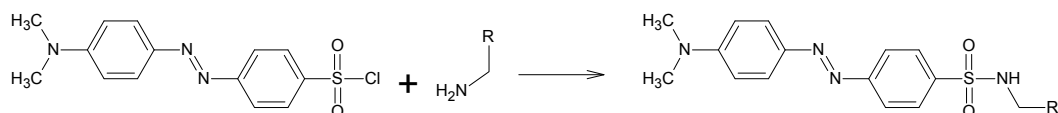


Схема 5: Примерна реакция на дериватизация на АК и ПА с дабзилхлорид

Този метод е използван за анализ на физиологични АК и ПА в сложни хранителни матрици като сирене [85] и е показал добри валидационни характеристики – чувствителност (1-1250 pM), репродуктивност (1.3-3.1 %) и нисък праг на детекция (0.12-0.52 pM). Практическо приложение метода е получил за изследване на промените в концентрациите на АК и ПА по време на зреенето на сиренето в различни условия [86]. И при двата описани метода дериватизацията е направена след депротеинизация на пробите при 70°C.

1.3.1.4. Едновременен анализ на АК и ПА като флуоресцеин- и фенилтиокарбамилни деривати

В литературата има описани методи с използване на флуоресцеин- и фенилтиокарбамилни деривати за едновременен анализ на АК и биогенни амини. Хистамина заедно с 24 АК е анализиран във вино след дериватизация с фенилтиокарбамоил хлорид [97] Петдесет вещества (21 количествено и 19 качествено) са били анализирани в цереброспинална течност [98], а също 28 АК и биогенни амини във френски вина са били анализирани като флуоресцеинтиокарбамилни производни. И при двата метода е използвана капилярна електрофореза за разделяне и лазерно-индуцирана флуоресценция за детекция.

1.3.1.5. Едновременен анализ на АК и ПА без използване на дериватизация

В литературата се откриват няколко описани метода, при които е направен опит АК и ПА да бъдат разделяни и детектирани без процедури на модификация. Шест съединения (путресцин, His, спермин, спермидин, Lys и Arg), извлечени от туморните клетки на мозъчни проби са били анализирани използвайки нанолитърно инжектиране във високоефективна капилярна електрофореза (HPCE). Като фонов електролит е използван хинин сулфат, а детекцията е чрез индиректен фотометричен метод [103]. Биогенните полиамини и техните АК предшественици (His, Tug) са били анализирани едновременно, в тяхната недериватизирана форма, в проби от храни (зеленчуци, сирене, риба) върху катион-обменна колона, интегрирана с импулсно амперометрично детектиране (IPAD) [104]. Анализите са били извлечени от хранителните проби с перхлорна киселина и екстрактите са били пречиствани чрез течно-течна екстракция при използване на хексан. Добри параметри на рековери (85.5-97.4%) и повтаряемост (RSD = 3,4-8.8%) са докладвани.

В заключение, независимо от огромното количество методи за анализ на аминокиселини и биогенни амини 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 лесни за изпълнение методи за анализ.

ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА:

Да се разработят по-ефективни от използваните в практиката методи за едновременен анализ на аминокиселини и полиамини чрез ВЕТХ 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.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. 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].

3.1.1. Дериватизационни буфери

Карбонатен буфер

Към 0.5 М разтвор на натриев хидрогенкарбонат се добавят 0.5 М натриев карбонат и 5 mM EDTA. рН на буфера се нагласява до 10.20 ± 0.05 с 5 М NaOH на рН-метър CG 842 pH-meter (Schott, Mainz, Germany) оборудван с BlueLine pH 14 рН-електрод (Schott, Mainz, Germany). Буферът 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 рН на буфера.

Боратен буфер

Към 0.2 М Натриев борат се добавят 10 mM EDTA и рН на буфера се нагласява до 9.4 ± 0.05 с 5 М NaOH на рН-метър CG 842 pH-meter (Schott, Mainz, Germany) оборудван с BlueLine pH 14 рН-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 рН на буфера.

3.1.2. Приготвяне на разтвор на дериватиращ 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.

3.2. Експериментални процедури

3.2.1. Приготвяне на стандартни разтвори

Исходни 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.

3.2.2. Предварителна обработка на проби

3.2.2.1. Обработка на плазма и урина

Аликвота от 100 µl от пробата (плазма, урина или стандартен разтвор) се смесва с 30 µl 2.0 M HClO₄, добавя се вътрешен стандарт (IS) (обикновено използвахме 2.5 µl от 2.0 mM 2-аминохептанова киселина) в 500 µl 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 50µl, беше използвана за дериватизация.

3.2.2.2. 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.

3.2.2.3. 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 µm мембрана част супернататата бе използвана за дериватизация. Получената утайка се разтваря в 0.1 M NaOH и разтвора се използва за определяне на протеиново съдържание по Брадфорд.

3.3. Обща процедура на дериватизация

В центрофужна епруветка се смесват 50µl от супернататата и 80µl от използвания дериватизационен буфер. Към сместа се добавят 150 µl 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 µl conc. HCl. Подкислените проби се съхраняват в хладилник на 4°C преди да бъдат използвани за хроматографски анализ.

3.4. Хроматографски анализи

3.4.1. 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 1046A 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).

3.4.2. 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 (5µm, 125x4 mm).

3.4.3. Приготвяне на елуиращи буфери

Фосфатни буфери

Приготвяне на буфер А: 5 mM дибутиламин се добавят към смес от 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 pH-meter окомплектован с BlueLine pH 14 рН-електрод (Schott, Mainz, Germany)). Буфер Б се приготвя като се смесят 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 pH-meter (Schott, Mainz, Germany)). Буфер Б се приготвя като се смесят 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 филтрат на 0.45 µm найлонова мембрана (HewlettPackard, Germany) и обезвъздушават на ултразвукова вана под вакуум.

3.4.4. 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.

3.4.5. 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.

3.5. Процедури по валидиране на методите

3.5.1. Определяне стабилност на дериватите

Стабилността на подкислените Fмос-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.

3.5.2. Калибрационни криви

За всяко от анализирани 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.

3.5.3. 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.

3.5.4. 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 интрепетирани като стандартно и относително стандартно отклонение на база площта на получените пикове или използвайки калибрационни криви.

4. 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 йоннообменни. 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.

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

4.1.1. 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 дериватизацията 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 схема 6.

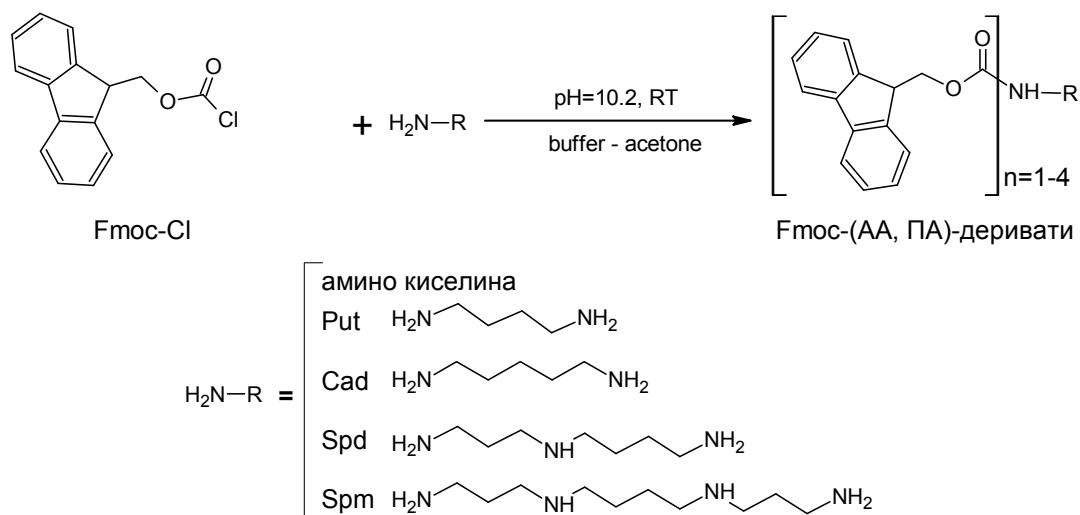
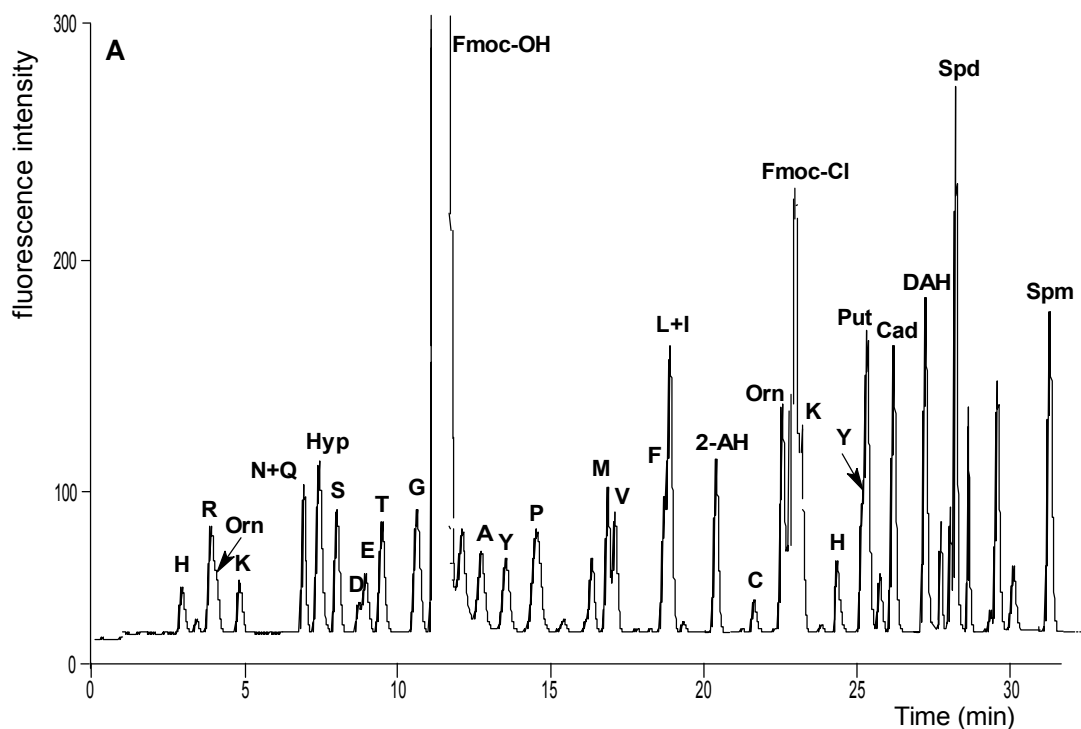


Схема 6: Принципна реакция на провеждане на реакцията на дериватизация

Постигнатите първоначални резултати показаха, че Fmoc-Cl реагира количествено и сравнително бързо с аминогрупите на AA 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

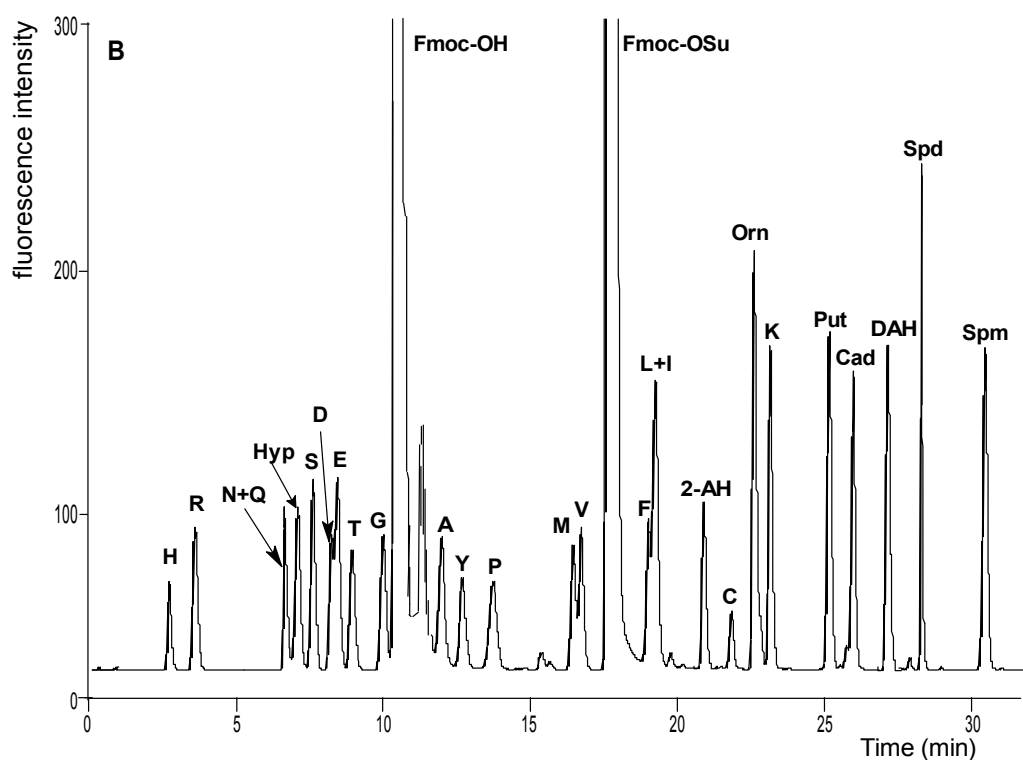
рамките на няколко седмици търпи висока степен на разпад и окисление. Бяха проведени серия от насочени експерименти за оптимизиране на условията за дериватизация и анализ, които не дадоха задоволителен резултат. Направените експерименти с различни разтворители за провеждане на реакцията, рН на средата, 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 анализирания компоненти (фигура 3). Друг недостатък бе ниската репродуктивност на методиката, като за някои от АК относителните стандартни отклонения (СО) в площите на пиковете бяха над 15 %.



Фигура 3: 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 4).



Фигура 4: 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 изпозването 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 подобри 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 amino групи. Получават се и множество странични и разпадни продукти в това число и дипептиди. При Fmoc-ODMT реакцията на дериватизация е селективна по отношение на аминокрупи. 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.

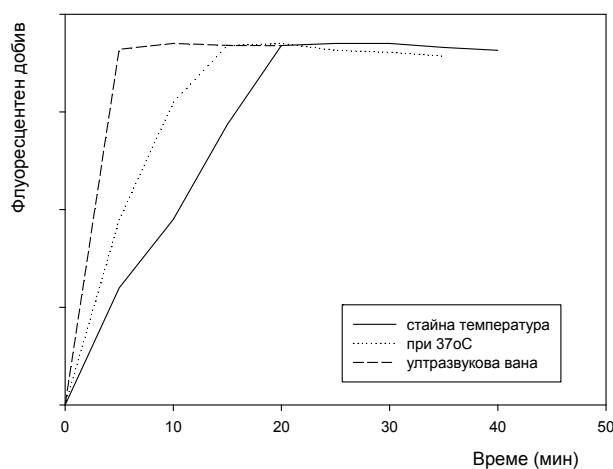
4.1.2. Избор на буфер за провеждане на дериватизацията.

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 аминокрупи, 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 оптималния 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.

4.1.3. Определяне оптималното време за дериватизация.

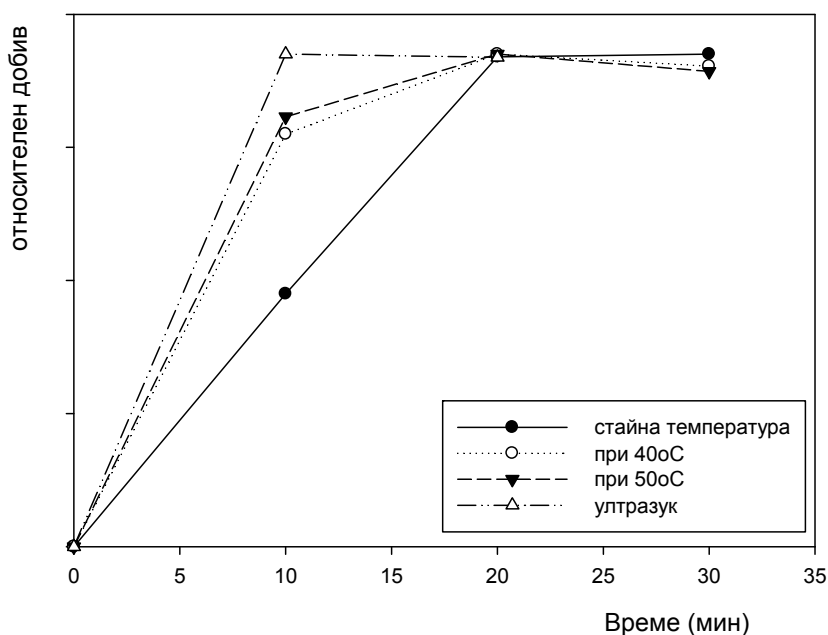
Третият елемент, след избора на дериватизиращ реагент и дериватизационен буфер бе определяне на оптималното време за провеждане на процеса. Реакцията на дериватизация бе изследвана за двата реагента Fmoc-Cl и Fmoc-OSu в независими експерименти, тъй като те имат своите индивидуални особености. Тъй като 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. На долната фигура е представен хода на дериватизацията за спермин, в относителни единици на база площта на получаващия се хроматографски пик. По аналогичен начин изглеждат кривите за останалите АК и ПА.



Фигура 5: Ход на дериватизационната реакция за спермин при използване на 5 mM Fmoc-Cl при различни условия

По отношение на дериватизация с Fмос-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 Fмос-Cl, ние приехме да провеждаме процеса за 30 мин на тест ротатор при стайна температура.

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



Фигура 6: Ход на дериватизационната реакция за спермин при използване на 5 mM Fмос-OSu при различни условия.

Както се и очакваше дериватизацията с Fмос-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.

4.1.4. 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:

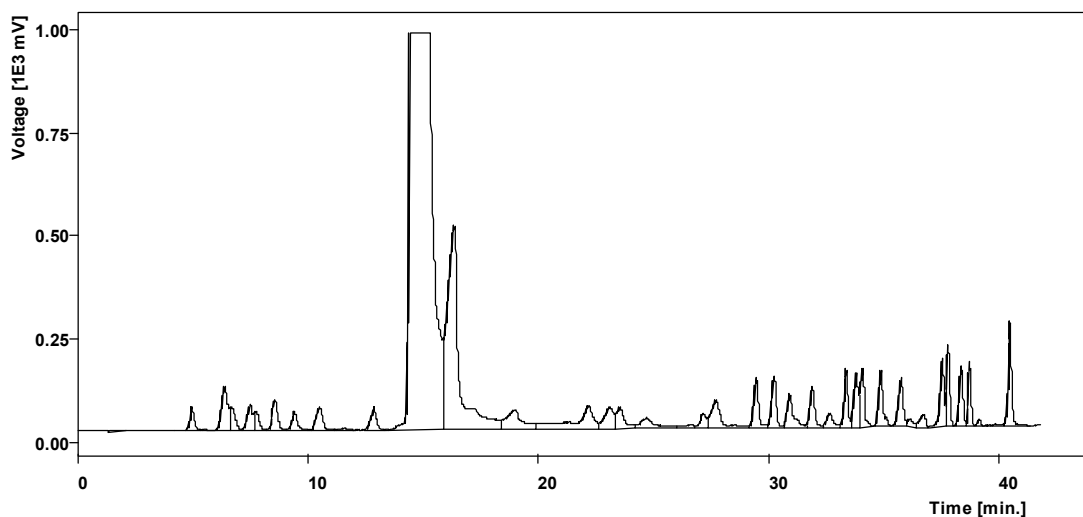
- Избор на подвижна фаза (елуиращ буфер);
- Избор на хроматографска колона;
- Определяне на оптималните условията на елуиране за всяка колона и подвижна фаза (градиент, състав на градиента, скорост на потока, параметри на детектора).

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 анализ 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 във фаза Б да използваме минимално количество вода, това от своя страна се отрази негативно на елуирането на производните на ПА. (фигура 7). 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.

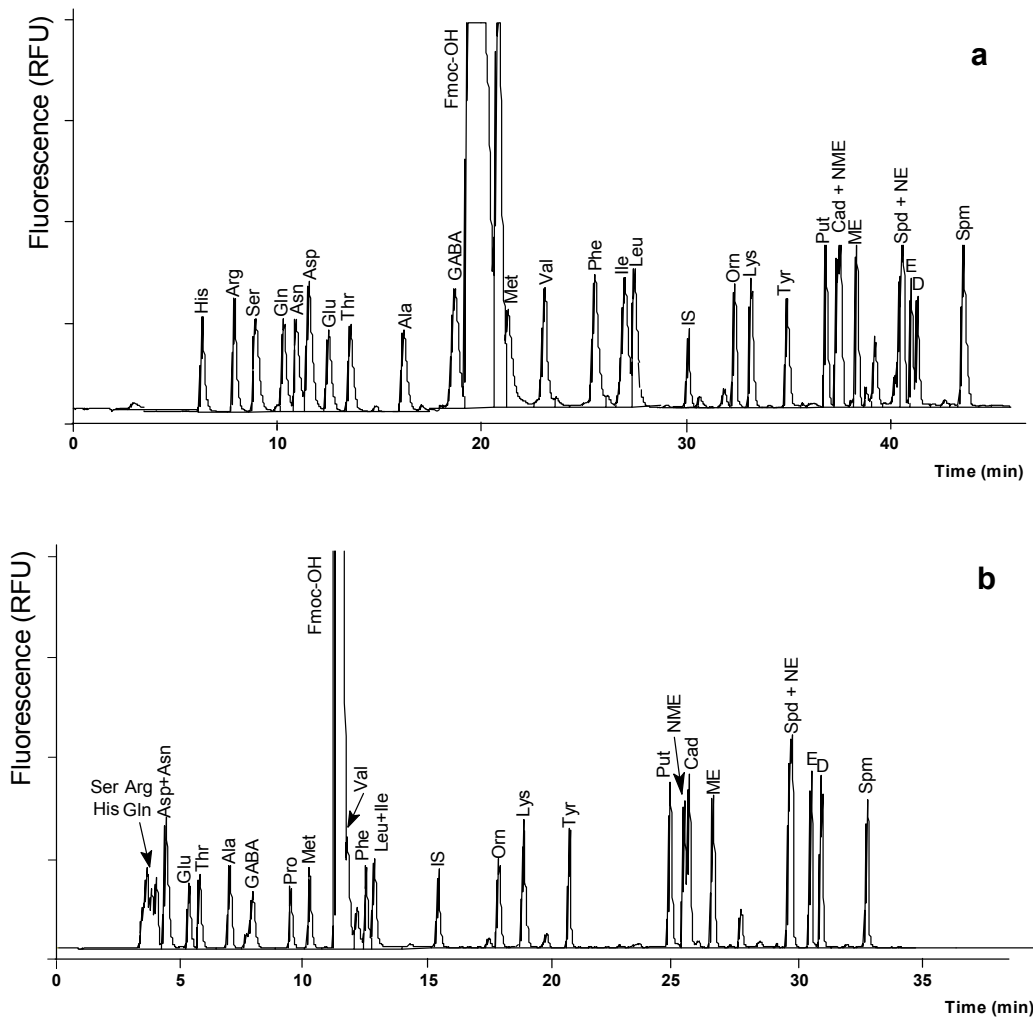
Основният извод, който бе направен от експериментите с триетиламинофосфатните буфери бе, че те не са подходящи за едновременен анализ на АК и ПА в условията на ВЕТХ.



Фигура 7: 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 дибуламинофосфат. При тези опити бяха варирани концентрацията на дибутиламина (от 1 до 10 mM) и рН (2.1 до 4.6) на буфера. На фигура 8 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

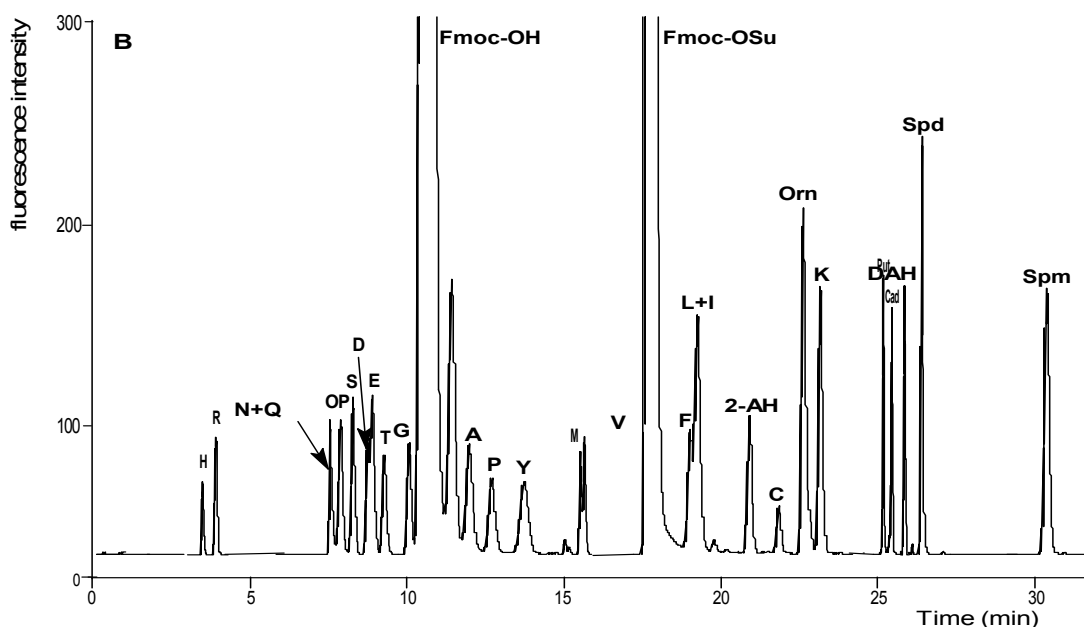
свива времето на елуиране на пиковите за ПА, като позволява значително да се снижи времето за анализ. От друга страна, при високи концентрации на дибутиламин пиковите за полярните АК се припокриват и практически не се разделят. Като компромисен вариант ние се спряхме на 5 mM концентрация на дибутиламинофосфата. 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 пиковите бе по-висока, за това като подходящо рН на буфера бе селектирано рН=2.20.



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

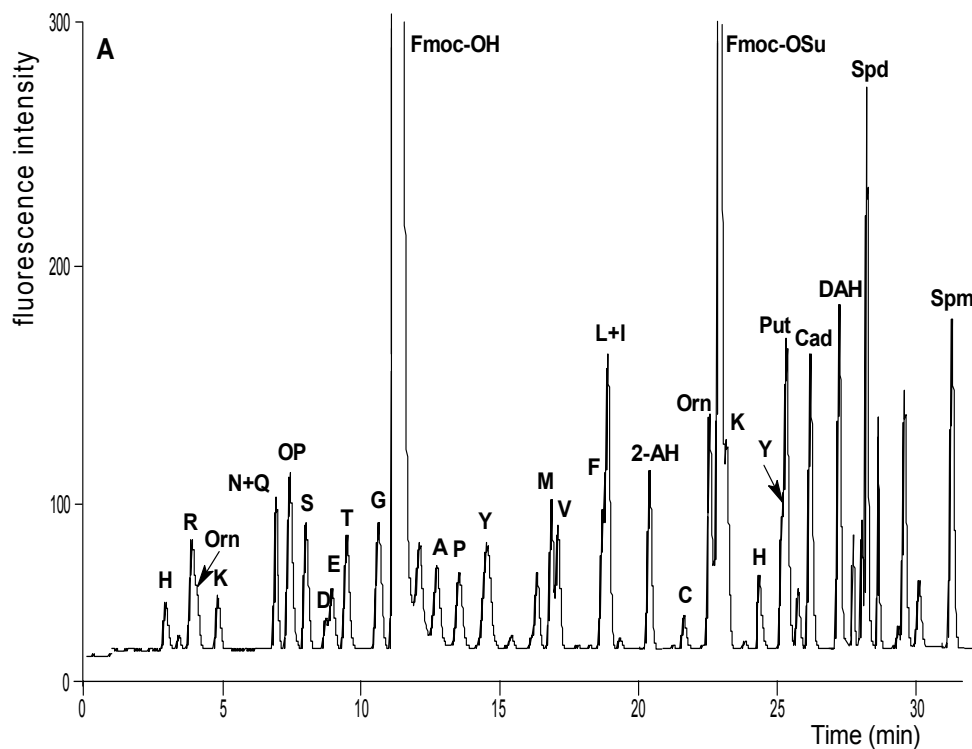
Последващите експерименти бяха насочени към оптимизиране условията на анализ при използване на вече селектираните параметри. След системен анализ на данните получени при вариране на концентрацията и рН на буфера, като оптимални бяха селектирани 5 mM дибутиламониев фосфат с рН=2.20. Тъй като дибутиламинофосфата 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, 5µm (HewlettPackard, Germany) и Adsorbosphere C₁₈, 150 x 4.6 mm, 3µm (Alltech, USA). И при двата случая резултатите от разделянето на АК и ПА бяха неудовлетворителни. На Hypesil колоната пиковете на повечето АК и част от ПА се припокриваха (фигура 9) и бяха с лоша симетрия. Пиковете за Leu, Ile и Phe практически не се разделяха. Пика за глицина при ниски концентрации на практика се припокриваше от този на флуоренилметанола.



Фигура 9: Хроматограма от анализ на стандартна смес от АК и ПА на колона Hypesil ODS 150 x 4.6 mm, 5µm

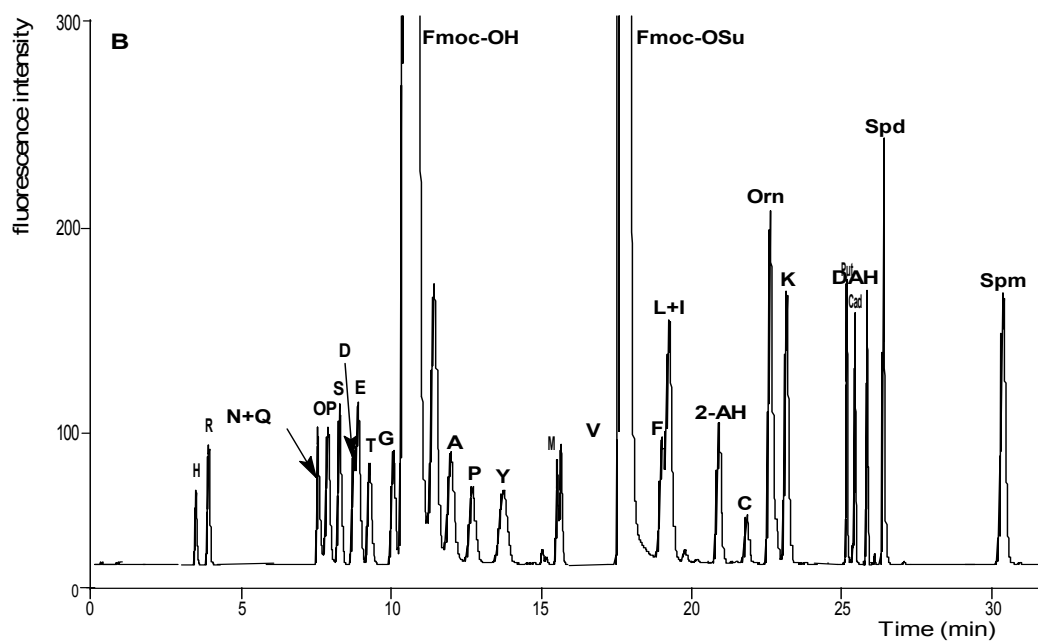
При използване на колона с по-фини частици на пълнежа, Adsorbosphere C₁₈, 150 x 4.6 mm, 3µm, резултатите бяха дори по-лоши (фигура 10), обратно на очакванията. Пиковите на ПА се припокриваха, отново нямаше разделяне на пиковите за Leu, Pe и Phe. Друг недостатък на тази колона бе, че анализите бяха с много лоша повторемост 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.



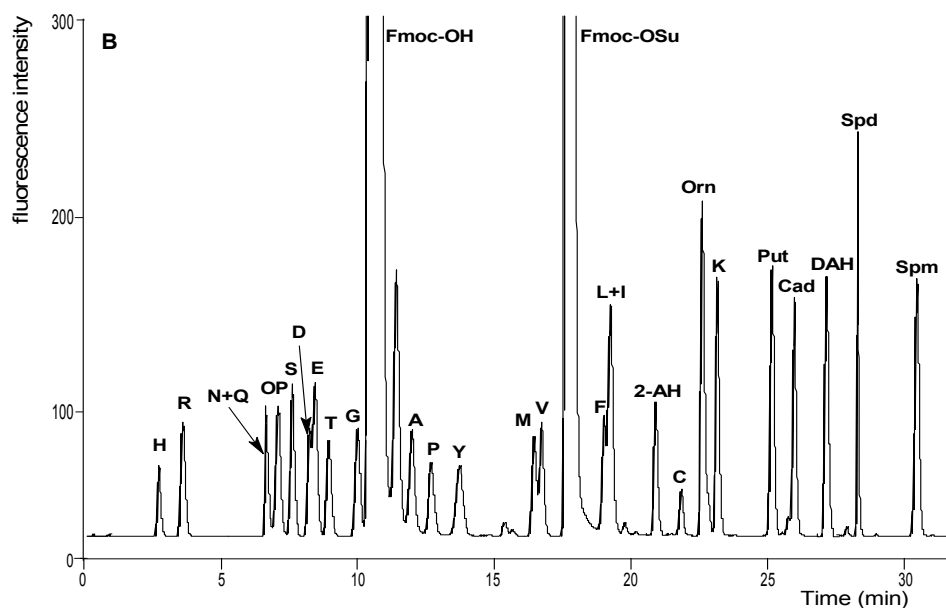
Фигура 10: Хроматограма от анализ на стандартна смес от АК и ПА на колона Adsorbosphere C₁₈, 150 x 4.6 mm, 3µm, употребявана за 20 последователни анализа

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 11). 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 Ile. Всички опити за тяхното разделяне чрез модифициране на градиентния профил, водеха до значително влошаване на разделянето на останалите АК и ПА.



Фигура 11: 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 12: 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 12). 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 единична колона със същите параметри:

- По-добро разделяне на хроматографските пикове;
- Значително опростяване на процедурите по 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 пикувете 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 по почистване колоните бяха съединявана 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 2.

Таблица 2: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

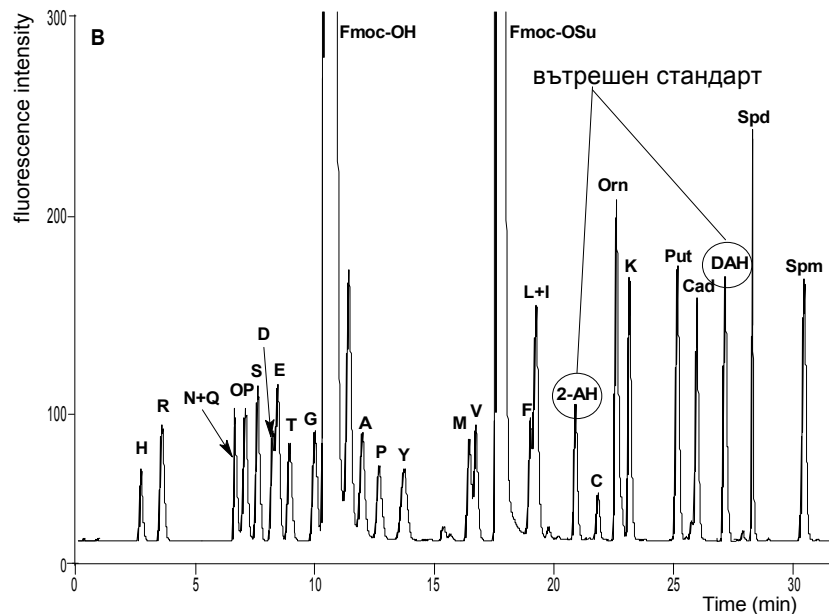
Трябва да отбележим, че независимо от усилията ни не бяха намерени условия за ефективно разделяне на две двойки от аминокиселини – левцин/изолевцин и аспарагин/глутамин. Всяко подобрене в тяхното разделяне водеше до значително влошаване на разделянето на останалите АК.

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 12). 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.

4.1.5. Избор на въртешен стандарт за количествен анализ.

Количествения 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.



Фигура 13: Място на елуиране на веществата - потенциалните кандидати за вътрешен стандарт

Ние тествахме като потенциални вътрешни стандарти: 1,6-диаминохексан; 1,7-диаминохептан и 2-аминохептанова киселина. 1,6-Диаминохексан се оказва неподходящ, защото неговия пик на хроматограмите се припокриваше с пиковите на някои от анализирани компоненти. Другите две тествани 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).

4.1.6. Валидиране на аналитичния метод

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

Първият 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 се 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 3.

Таблица 3: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		10.6 4	
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	<i>2.61</i>	2.54	2.98	2.75	$\frac{10.1}{8}$	2.71	2.85	3.92
	2.15	<i>2.40</i>	2.36	<i>2.12</i>	2.86	<i>9.48</i>	2.92	3.49	5.48
Thr	1.21	<i>1.63</i>	1.36	<i>1.86</i>	1.42	<i>1.95</i>	1.40	1.52	2.18
	1.65	<i>1.61</i>	1.98	<i>1.75</i>	1.45	<i>1.86</i>	2.06	1.75	2.86
Gly	2.32	<i>1.95</i>	2.35	<i>2.21</i>	2.49	<i>2.25</i>	2.39	2.68	2.56
	2.12	<i>1.75</i>	2.65	<i>2.32</i>	2.58	<i>2.46</i>	2.76	2.65	3.68
Ala	1.58	<i>1.69</i>	1.62	<i>1.72</i>	1.41	<i>1.75</i>	1.65	1.75	2.32
	1.72	<i>1.68</i>	1.63	<i>1.64</i>	1.86	<i>1.84</i>	1.93	2.02	2.23
Pro	1.78	<i>1.96</i>	1.76	<i>2.32</i>	1.78	<i>2.80</i>	1.82	1.86	2.65
	1.93	<i>2.25</i>	1.98	<i>2.68</i>	2.18	<i>3.05</i>	2.25	2.21	2.85
Tyr	2.12	<i>1.36</i>	2.21	<i>2.73</i>	2.52	<i>2.98</i>	2.50	2.68	2.87
	2.65	<i>1.64</i>	2.54	<i>2.18</i>	2.60	<i>2.92</i>	2.78	2.82	3.12
Met	1.68	<i>1.63</i>	2.65	<i>2.80</i>	2.70	<i>5.56</i>	2.85	3.15	4.85
	1.86	<i>1.86</i>	2.46	<i>3.11</i>	2.85	<i>6.23</i>	2.90	3.21	4.25
Val	1.56	<i>1.65</i>	2.36	<i>1.89</i>	2.31	<i>2.15</i>	2.30	2.58	2.63
	1.98	<i>1.44</i>	2.68	<i>1.78</i>	2.46	<i>1.96</i>	2.67	2.78	2.78
Phe	2.36	<i>1.83</i>	2.38	<i>1.80</i>	2.42	<i>2.23</i>	2.56	2.68	2.66
	2.59	<i>2.14</i>	2.65	<i>2.53</i>	2.70	<i>2.69</i>	2.86	3.11	3.02
Leu/	1.46	<i>1.35</i>	2.26	<i>1.40</i>	2.31	<i>1.56</i>	2.30	2.58	2.63
Ile	1.98	<i>1.65</i>	2.08	<i>2.45</i>	2.46	<i>2.26</i>	2.77	2.78	2.78
2-AH	1.26	<i>1.55</i>	1.31	<i>1.60</i>	1.31	<i>1.66</i>	1.59	1.58	1.63
	1.48	<i>1.75</i>	1.58	<i>1.79</i>	1.56	<i>2.06</i>	1.77	1.78	1.78
Orn	2.56	<i>2.80</i>	2.46	<i>3.14</i>	2.81	<i>3.89</i>	2.80	2.98	3.63
	2.98	<i>2.74</i>	3.08	<i>3.54</i>	2.96	<i>4.05</i>	3.07	3.78	3.78
Lys	2.46	<i>2.65</i>	2.46	<i>3.63</i>	3.61	<i>4.84</i>	3.80	3.98	4.13
	2.18	<i>2.87</i>	2.38	<i>3.90-</i>	3.36	<i>4.54</i>	3.57	3.78	4.32
Put	2.35	<i>2.43</i>	2.46	<i>2.65</i>	2.81	<i>3.57</i>	3.80	3.98	4.63
	1.98	<i>2.78</i>	2.08	<i>2.80</i>	2.96	<i>4.12</i>	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	14.7 8

^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 4, като относителни стандартни отклонения в проценти.

Таблица 4: 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. Линейни 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 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 въртешен 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*.

4.2. 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:

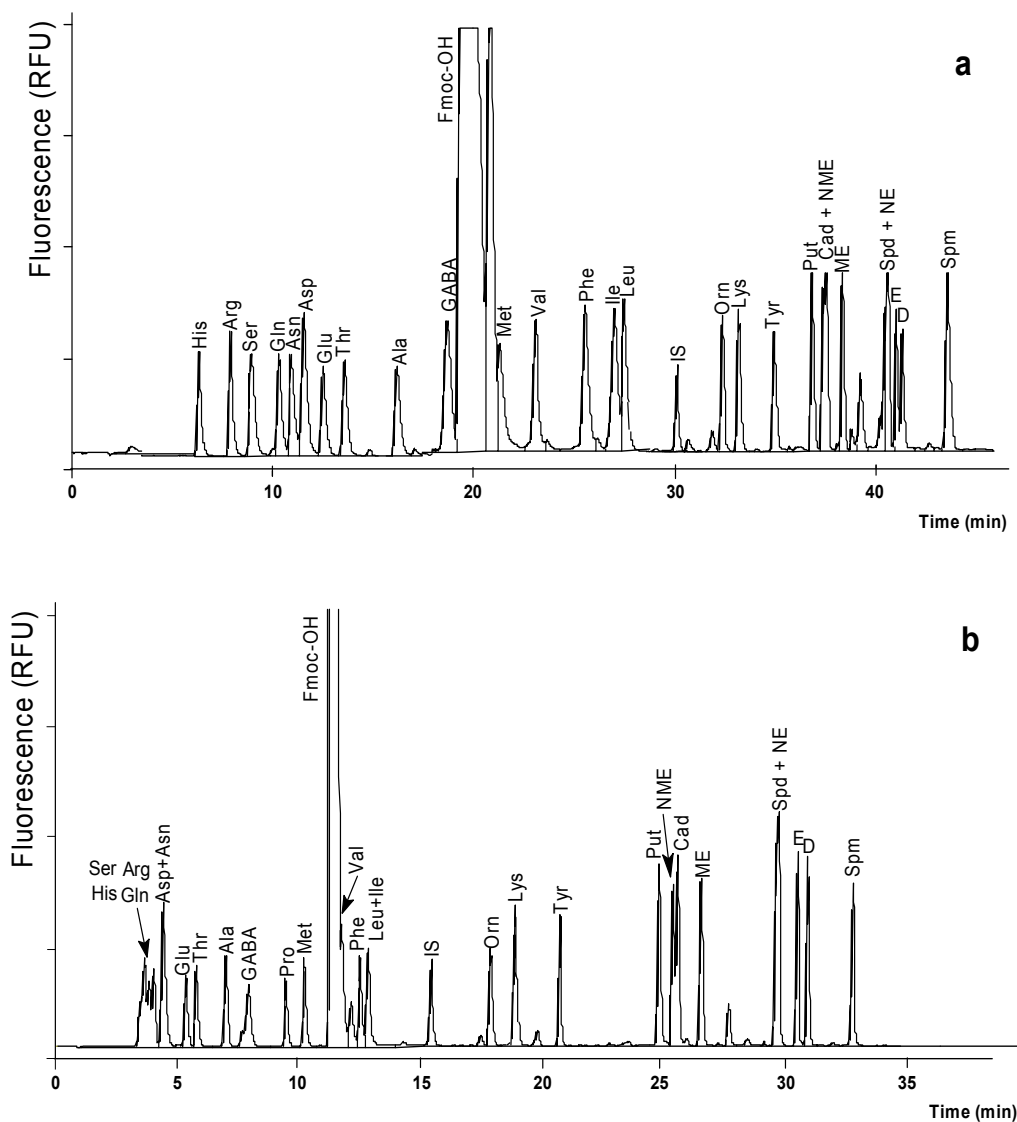
- стабилни са на стайна температура в кисели условия;
- не са чувствителни към странични реакции;
- инертни са към реакции с анализирани матрици;
- могат да се анализират в много ниски концентрации.

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, Tyr; 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 $pH = 4.5$. 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 $pH = 5.6$.

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. Беше 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 14).



Фигура 14: 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 на лице силно припокриване на пиковите за АК, пиковите за глицина и аланина практически се губеха в пика за флуоренилметанола. Промените 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 крайния 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 оказа 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 имахме и в интервала 1.8-2.6 на рН. В останалите интервали, за съжаление, фосфорната киселина се оказа 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.

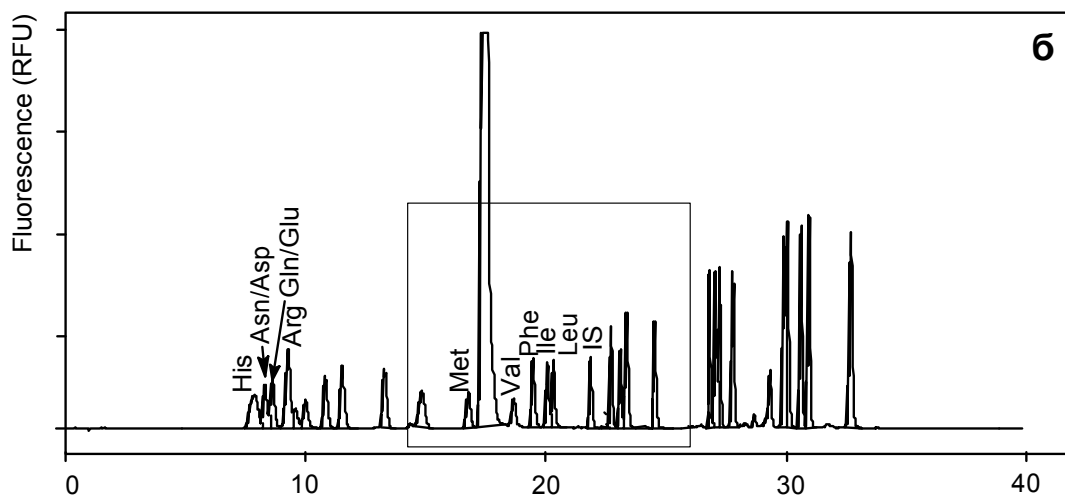
Следващата киселина, която тествахме, бе перхлорната. Първоначалните експерименти направихме с концентрирана киселина – 70%. Опитът бе успешен. С перхлорна киселина буфера (20 mM амониев ацетат, съдържащ 3mM дибутиламин) можеше да се коригира успешно в интервала 2 - 8 на рН плавно, без наличие на резки

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.

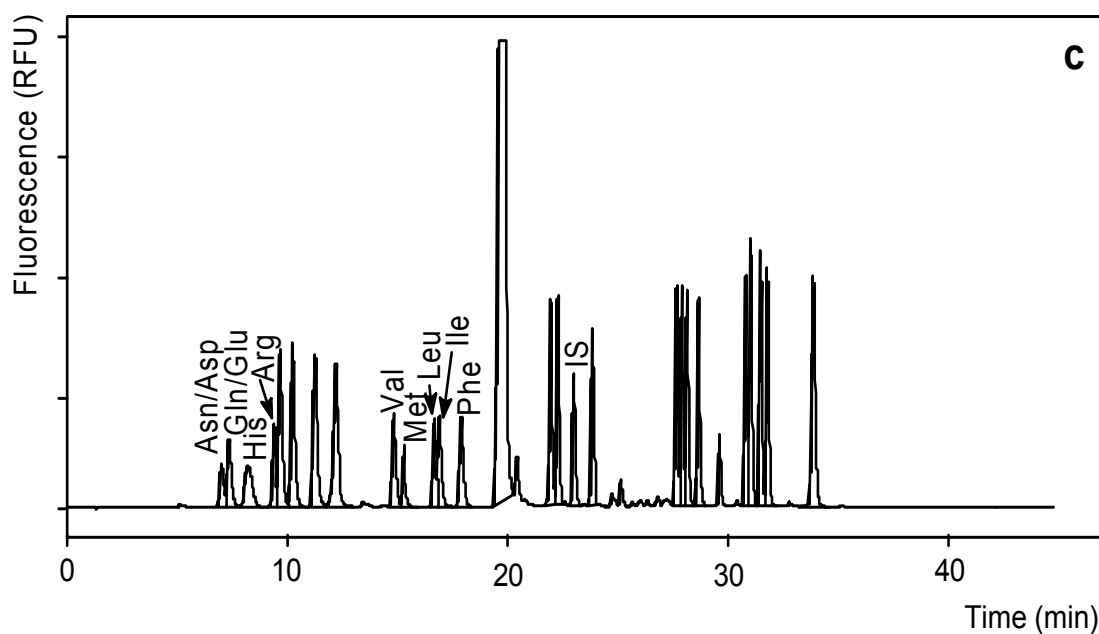
Изследвахме ефекта на рН върху разделянето в интервала от 2.1 до 8.4 със стъпка от 0.5 рН единици. Както се и очакваше добро разделяне на слабо заредените малки молекули на АК деривати се получаваше при рН около 4 (фигура 15).



Фигура 15: Представителна хроматограма получена при рН=4.2 на елуирация буфер (20 mM аминиев ацетат съдържащ 5% ацетонитрил и 3mM 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.

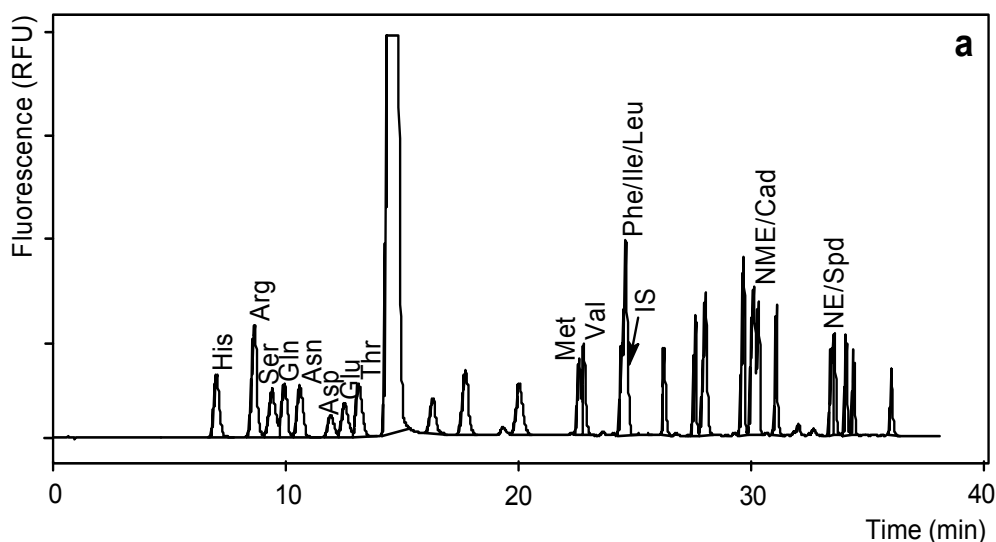
При използване на базично или неутрално рН на елуирания буфер не се наблюдаваше по-добро разделянето на ПА от това получено при рН 4. Но за всички останали АК деривати се получаваха значително по-лоши резултати (фигура 16).



Фигура 16: Представителна хроматограма получен апри рН=7.4 на елуирания буфер (20 mM аминиев 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 елуирания буфер (фигура 17). 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 17: Представителна хроматограма получена при рН=7.4 на елуирания 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. Основния извод, бе че ако искаме ефективно да разделим всички анализирани компоненти е необходимо да проведем анализа в условия, които позволяват промяна на рН на елуирания 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 микроелектрод на рН-

метър измервахме рН на входа и изхода на аналитичната колона. Крайните резултати са показани на таблица 5.

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 5: Хроматографски градиент

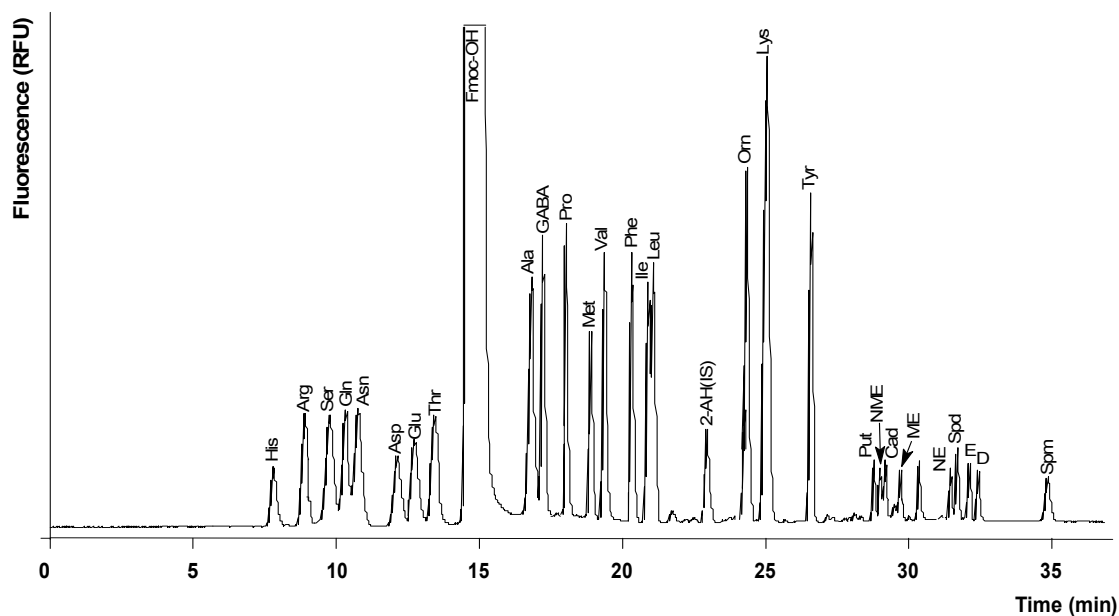
Време (min)	Буфер А (%)	Буфер Б (%)	рН ^a
0	74	26	2.4
5	69	31	2.5
15	63	37	3.6
16	52	48	4.3
21	44	56	4.8
25	32	68	5.4
27	14	86	5.8
30	0	100	6.2
36	0	100	8.4
38	74	26	2.4
43	74	26	2.4

^a Показаните рН стойности бяха измерени на изхода на колоната в 100 μ l 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 18 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 18 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 не ефективно разделяне. Вероятно това се дължи на формиране на градиентни условия във всяка от отделните колони; проблемът не бе изследван допълнително.



Фигура 18: 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.

4.2.1 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 6 и са на база на пет повторения.

Таблица 6: Повтаряемост и възпроизводимост на хроматографския метод

	Повтаряемост				
	Време на задържане			Площ на пика	
	time	SD	RSD	стандарт ^c	плазма
	[min]	[min]	[%]	RSD [%]	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 7.

Таблица 7: 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 8.

Таблица 8: Репродуктивност на метода по отношение на ПА

	Концентрация на пробата ($n=5$)	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

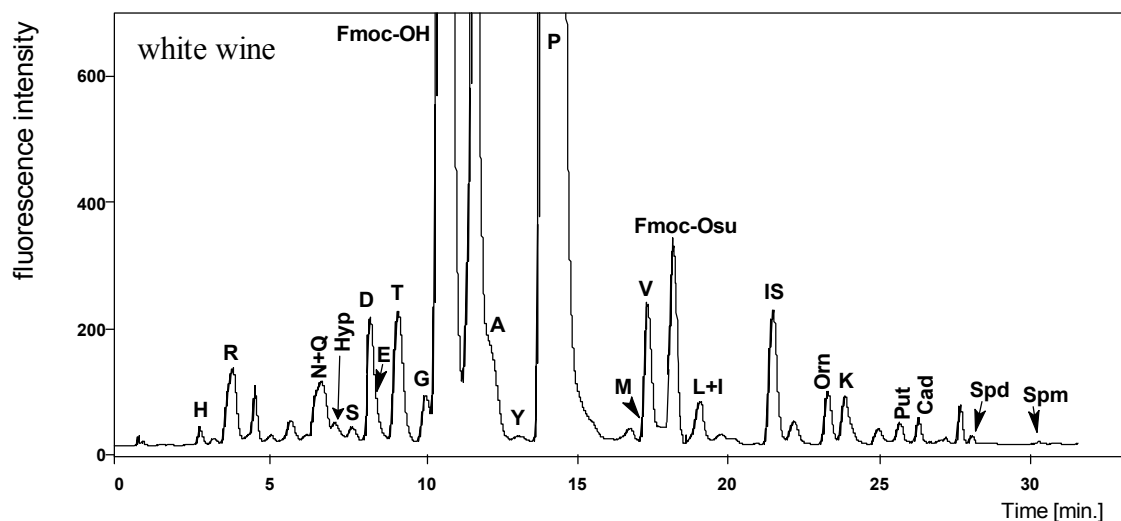
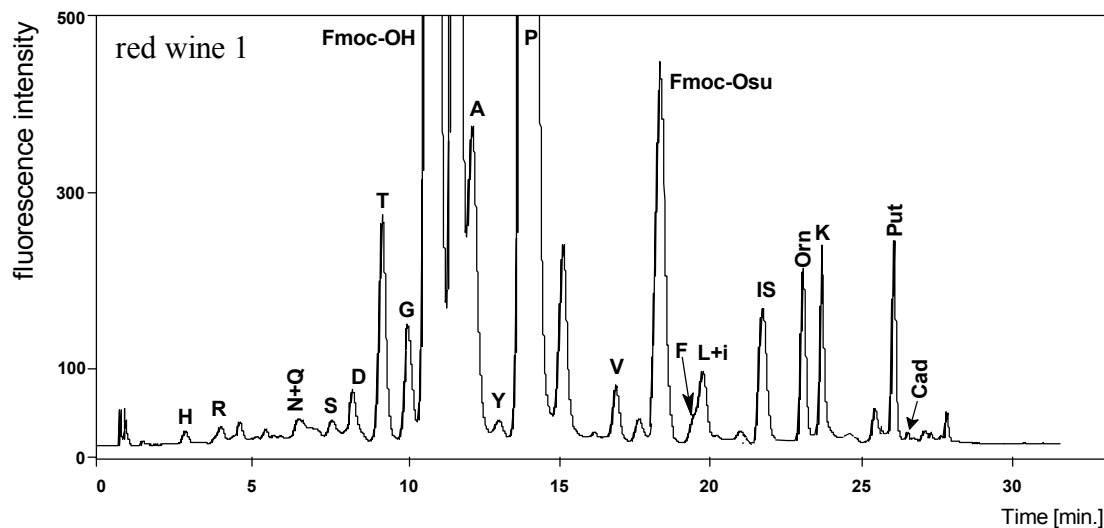
ацетонитрил по време на хроматографския анализ. Получените резултати бяха систематизирани и публикувани в реномираното научно списание Journal of Chromatography B.

4.3. 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.

4.3.1. 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. С цел избягване на съмнения за рекламни внушения те са представени само с индекси.

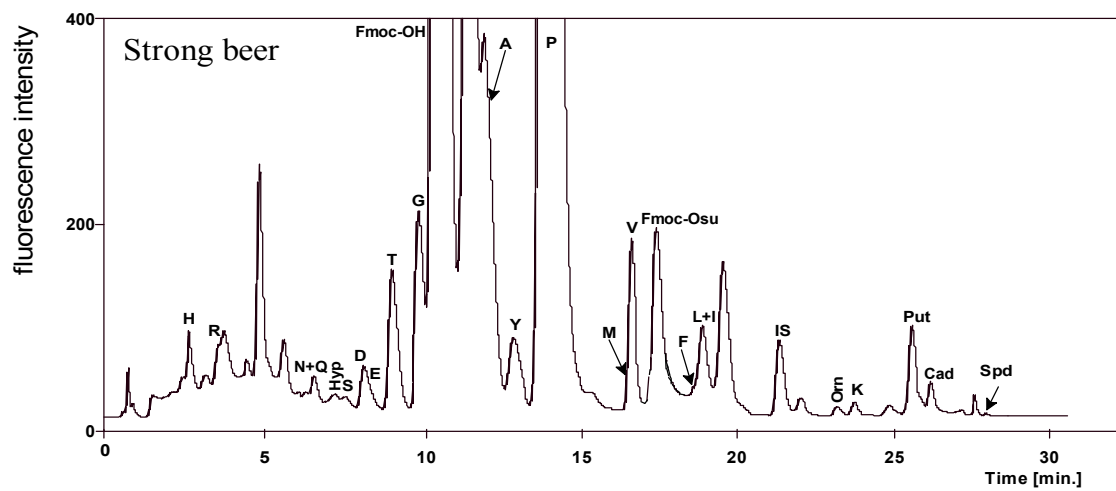
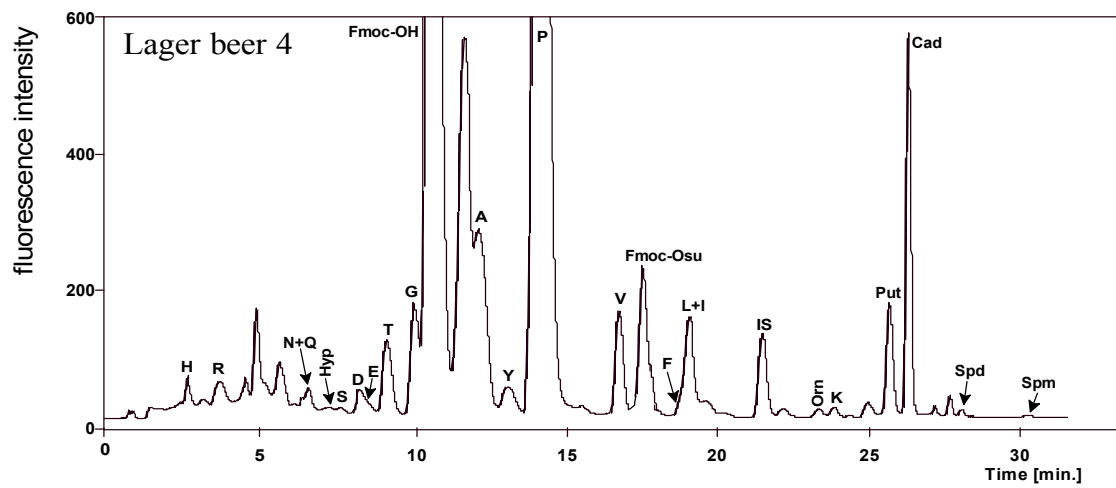
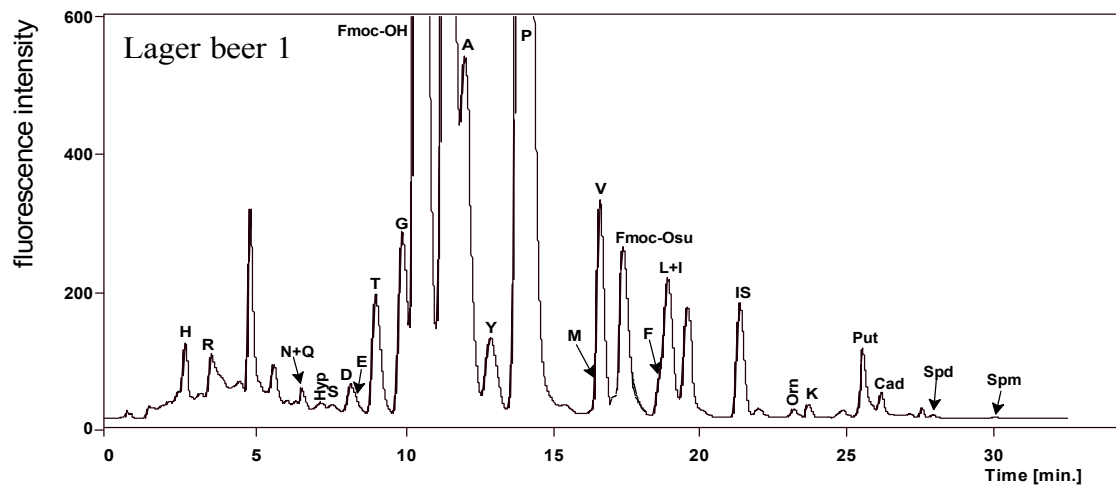


Фигура 19: Типични хроматограми получени при анализ на бяло и червено вино. Използваните хроматографски условия са описани по-горе в текста.

При анализите бяха използвани само проби с български произход. Получените резултати са показани в таблица 9, и те са в границите на стойности, публикувани от други автори, за продукти с различен произход.

Таблица 9: Съдържание на АК и ПА в бира и вина (мг/л)

Проба	Бира					Вино		
	1	2	3	4	5	Red 1	Red 2	White
His	7.89	5.98	2.41	6.80	9.92	2.35	2.25	2.18
Arg	9.11	5.62	2.23	6.88	10.95	3.22	4.59	10.19
Asn +Gln	3.49	3.94	1.20	3.15	1.98	1.35	0.97	7.78
Нур	0.75	0.68	0.36	0.85	0.56	-	-	1.04
Ser	0.91	1.50	0.44	0.74	0.70	2.46	0.56	1.92
Asp	4.13	7.53	2.62	5.32	4.34	6.08	5.58	25.36
Glu	1.21	3.67	-	2.23	1.24	1.15	0.65	3.21
Thr	33.01	31.64	22.35	31.16	36.56	57.66	37.90	33.90
Gly	7.37	7.00	3.16	7.72	9.12	4.72	4.71	2.22
Ala	23.68	28.15	11.36	13.40	20.04	5.24	5.28	2.35
Pro	141.60	149.50	131.16	90.69	80.05	147.90	149.88	76.82
Tyr	4.06	2.24	2.63	3.63	8.27	1.26	1.56	0.79
Met	0.35	0.63	-	-	0.23	-	-	0.18
Val	9.12	8.55	10.01	6.36	14.74	1.19	1.28	4.56
Phe	0.61	0.34	0.53	0.75	0.85	1.05	1.62	-
Leu + Ile	5.90	5.34	3.21	4.82	3.78	5.06	5.62	0.30
Orn	0.79	0.63	0.25	0.54	0.43	0.69	0.12	2.14
Lys	1.28	0.84	0.18	0.41	0.46	0.77	0.29	1.90
Put	3.02	2.83	1.01	2.57	1.50	1.15	0.29	0.32
Cad	0.19	0.74	0.39	6.23	0.40	0.03	0.01	0.01
Spd	0.35	0.05	0.02	0.14	0.05	-	-	0.03
Spm	0.06	0.02	0.03	0.08	0.02	-	-	0.03
AA in total	255.26	256.73	195.10	192.45	204.22	241.91	222.86	174.62
PA in total	3.62	3.64	1.45	9.02	1.97	1.18	0.30	0.39

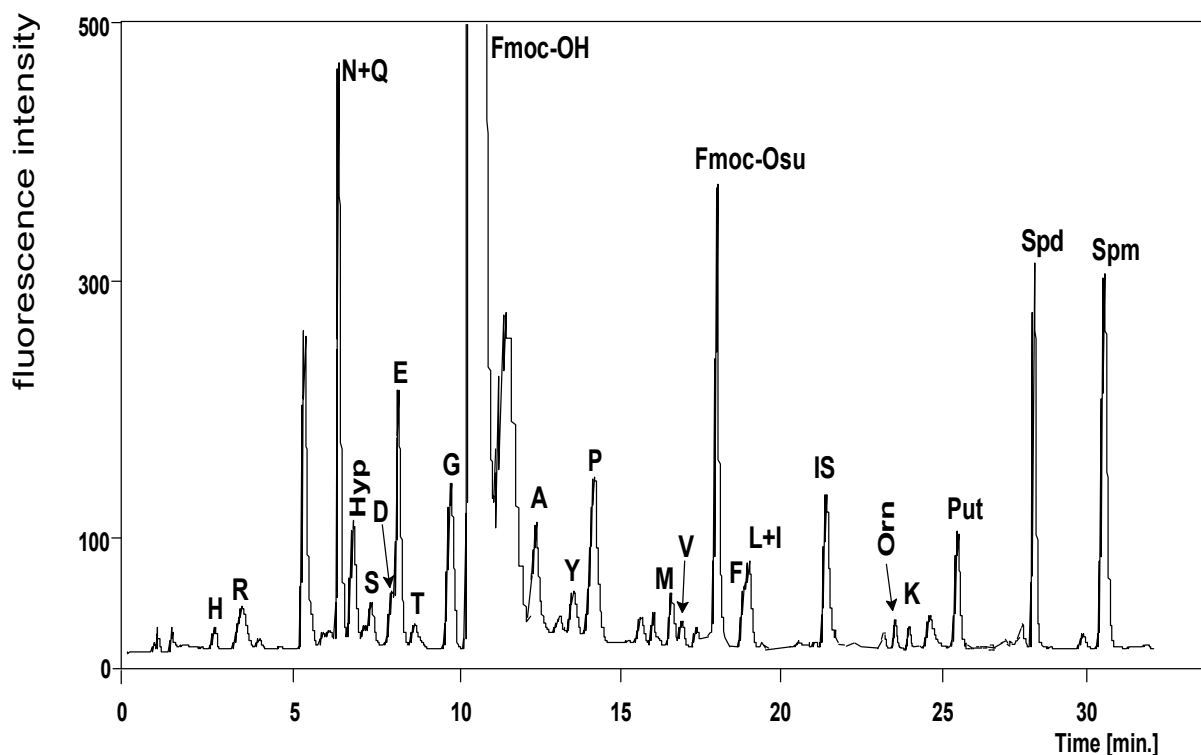


Фигура 20: Типични хроматограми, получени при анализ на различни типове бира.

Използваните хроматографски условия са описани по-горе в текста.

4.3.2. Определяне на динамиката на ПА синтез при нормални и третирани клетъчни линии

Методът бе използван в текущата работа на лабораторията по Клетъчна сигнализация за изследване промените в нивата на ПА при различни типове третиране 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 (фигура 21) и др.



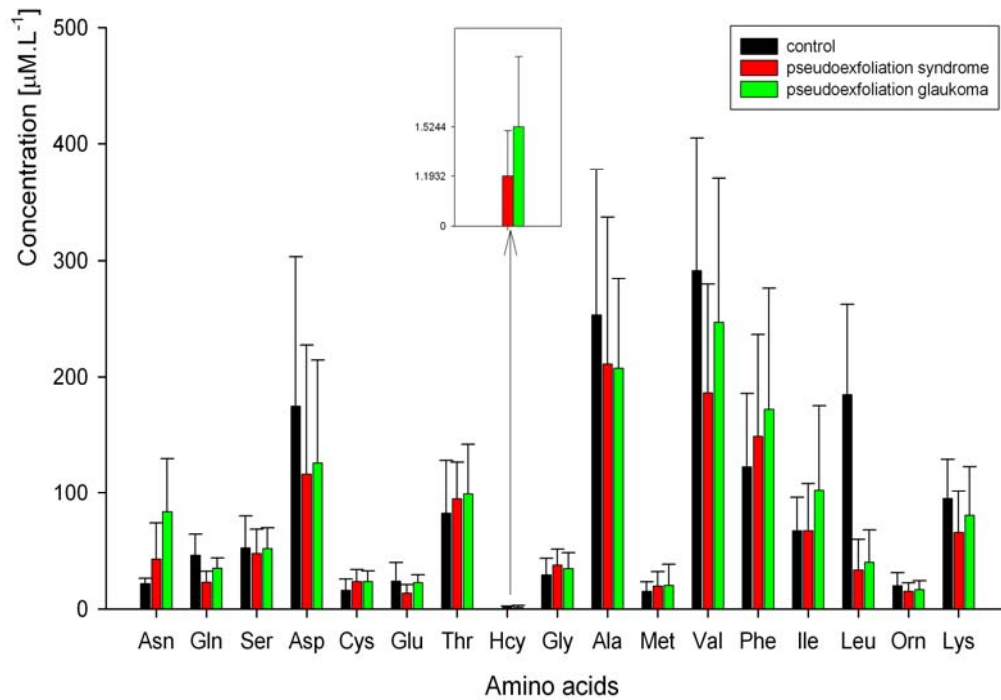
Фигура 21: Типични хроматограми получени при анализ на клетъчни лизати.

Използваните хроматографски условия са описани по-горе в текста.

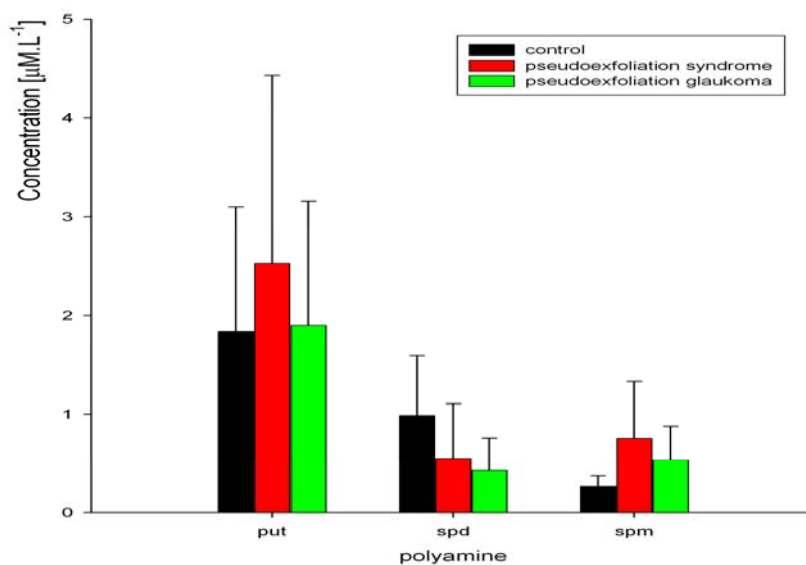
4.3.3. Определяне на профила на АК и ПА в междуочна течност при пациенти с псевдоексфолиатен синдром и псевдоексфолиатна глаукома.

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. На долната фигура са показани в систематизиран вид получените резултати, представени на международен конгрес по офталмология.



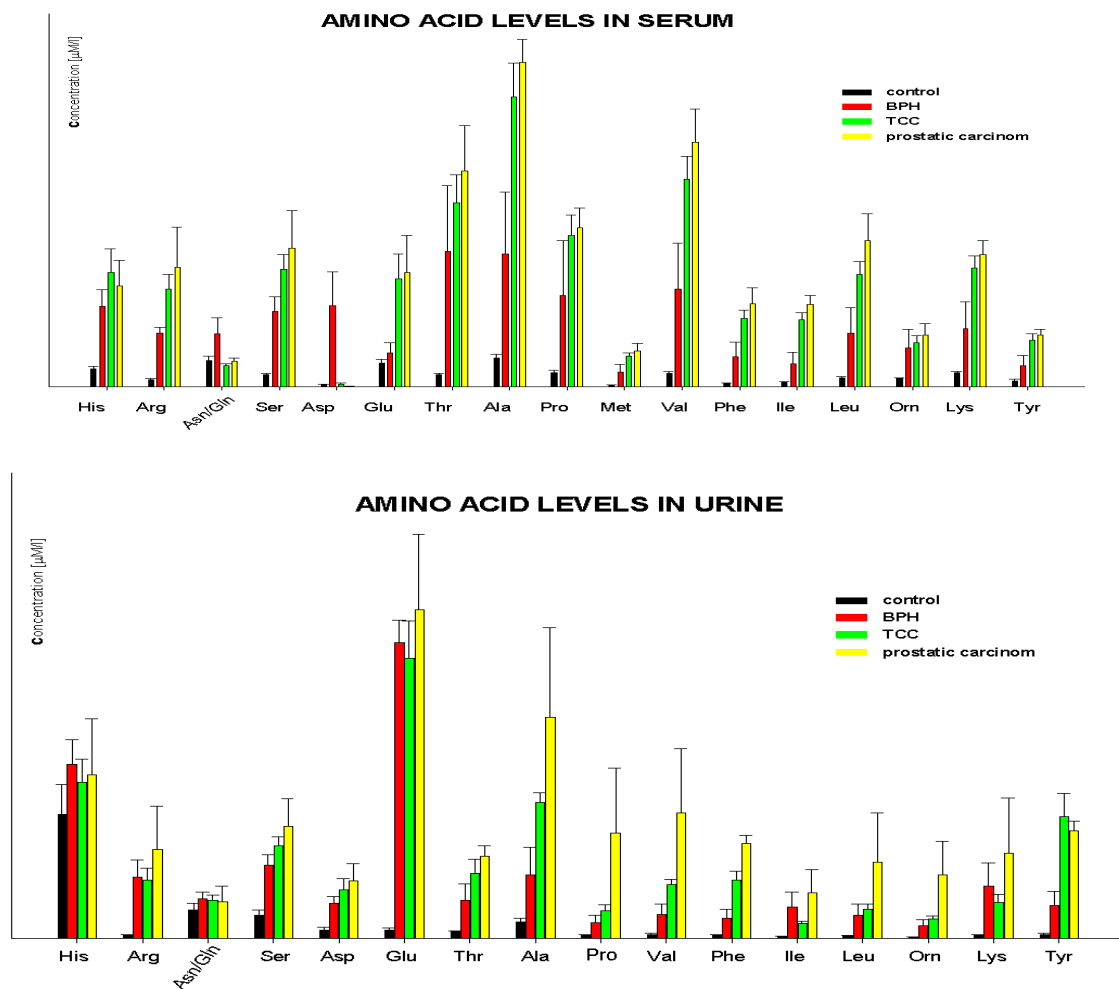
Фигура 22: Нива на АК при пациенти с очни заболявания.



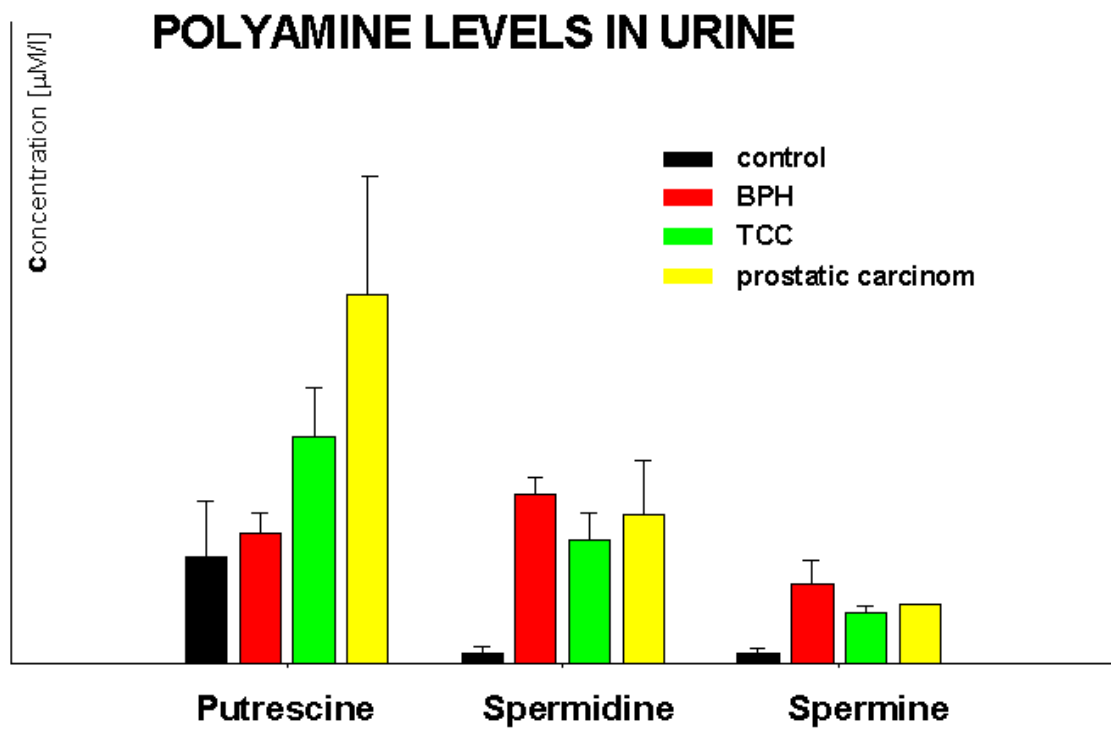
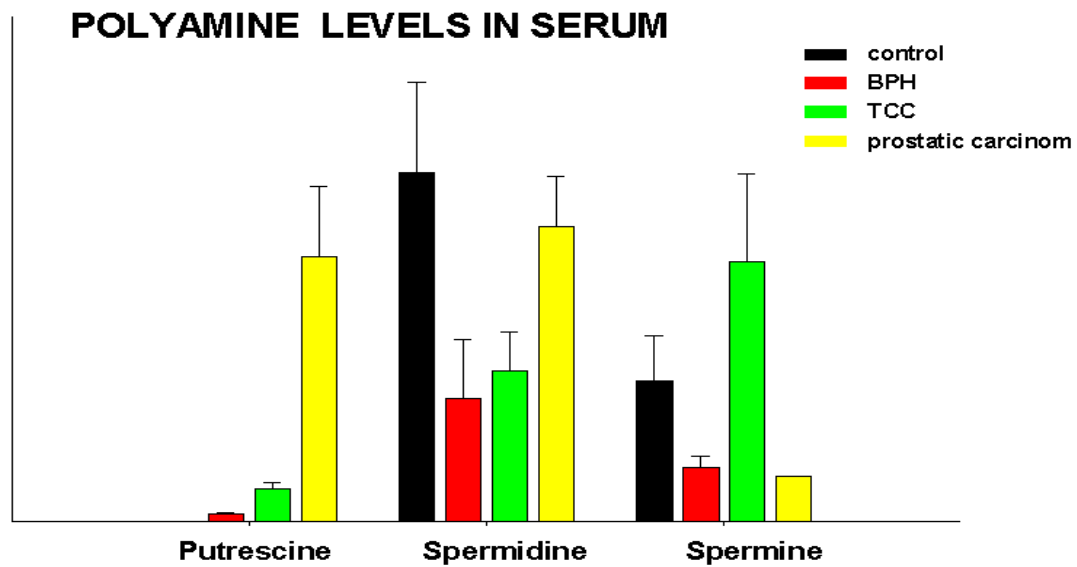
Фигура 23: Нива на ПА при пациенти с очни заболявания

4.3.4. 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” Получените резултата са показани в систематизиран вид на долните фигури.

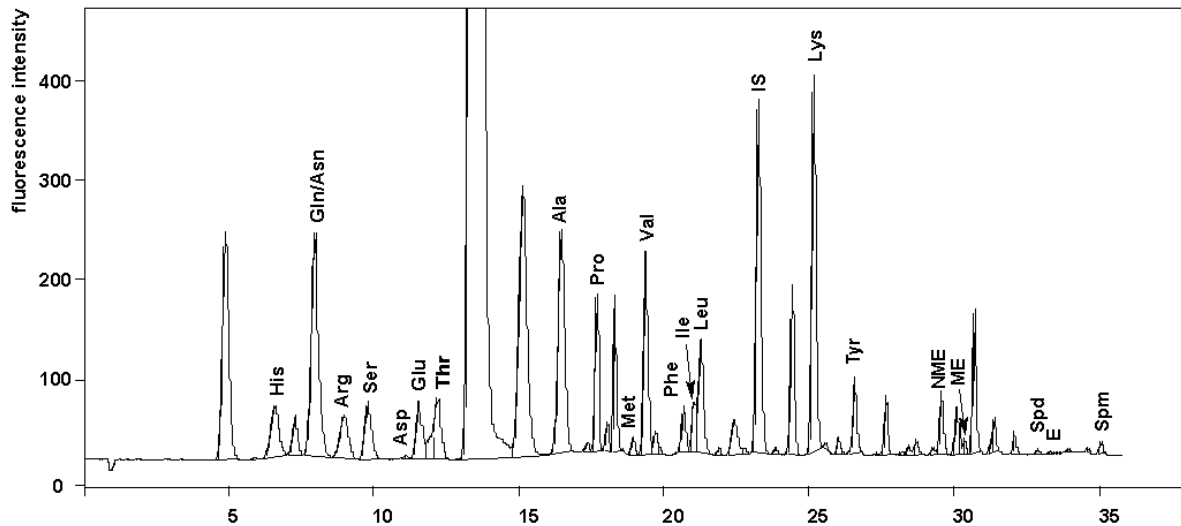


Фигура 24: Нива на аминокиселини в серум и урина при пациенти с урологични заболявания.



Фигура 25: Нива на полиамини в серум и урина при пациенти с урологични заболявания.

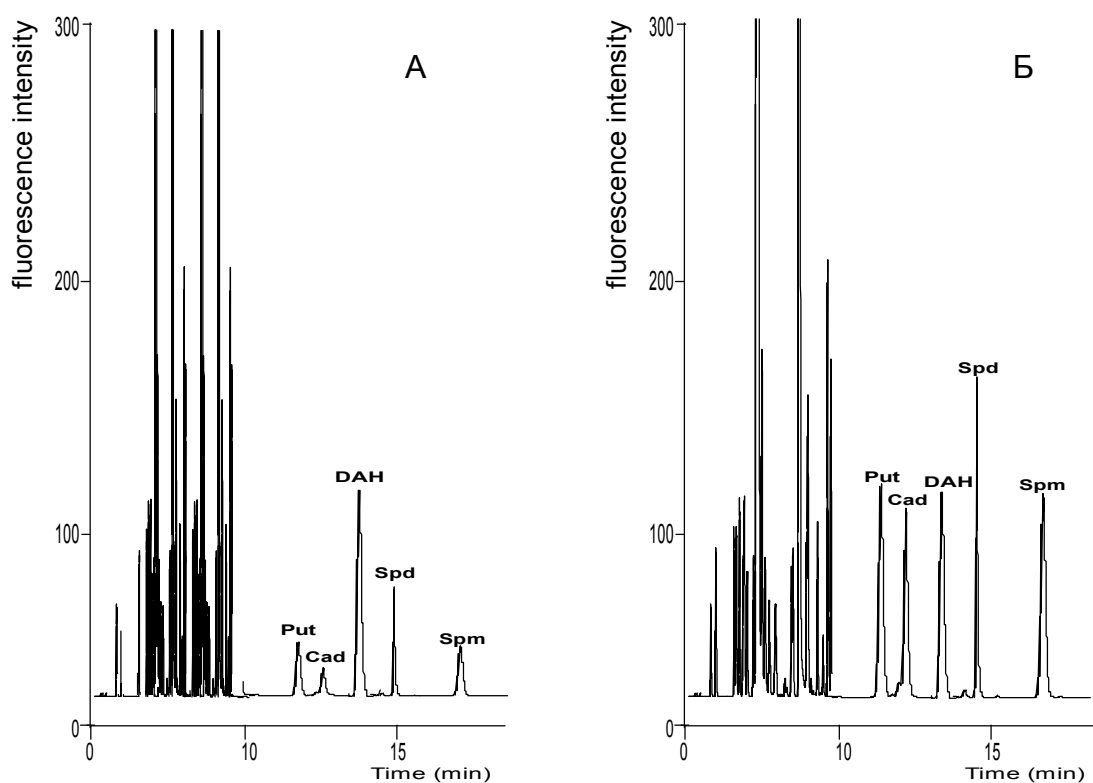
Резултатите бяха представени на международен конгрес по урология [120].
 Подолу е показана типична хроматограма, получавана при анализ на серум.



Фигура 26: Типичен профил на АК и ПА в серум при пациенти с карцином на пикочния мехур. Хроматографските условия са описани в текста.

4.3.5. 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 плаки на псориазис вулгарис и 27 с немеланомни кожни тумори. Бяха проследявани нивата на путресцин, кадаверин, спермидин и спермин в увредени и неувредени кожни проби.



Фигура 27: Типични хроматограми получени при анализ на нормална (А) и туморна (Б) кожна лезия.

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].

5. 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.

6. 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.

7. Използвана литература

1. Galli F (2007) Amino acid and protein modification by oxygen and nitrogen species. *Amino Acids* 32, 497–499
2. Brosnan JT (2001) Amino acids, then and now—a reflection on Sir Hans Krebs's contribution to nitrogen metabolism. *IUBMB Life* 52, 265–270
3. Suenaga R, Tomonaga S, Yamane H et al (2008) Intracerebroventricular injection of L-arginine induces sedative and hypnotic effects under an acute stress in neonatal chicks. *Amino Acids* 35, 139–146
4. Wu G, Bazer FW, Davis TA et al (2007) Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. *Livest Sci* 112, 8–22
5. Baker DH (2009) Advances in protein-amino acid nutrition of poultry. *Amino Acids* 37, 29–41
6. Fang ZF, Luo J, Qi ZL et al (2009) Effects of 2-hydroxy-4-methylthiobutyrate on portal plasma flow and net portal appearance of amino acids in piglets. *Amino Acids* 36, 501–509
7. Curis E, Crenn P, Cynober L (2007) Citrulline and the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10, 620–626
8. Hu CA, Khalil S, Zhaorigetu S et al (2008) Human D1-pyrroline-5-carboxylate synthase: function and regulation. *Amino Acids* 35, 665–672
9. Manna P, Sinha M, Sil PC (2009) Taurine plays a beneficial role against cadmium-induced oxidative renal dysfunction. *Amino Acids* 36, 417–428
10. Perta-Kajan J, Twardowski T, Jakubowski H (2007) Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 32, 561–572
11. Davis TA, Fiorotto ML (2009) Regulation of muscle growth in neonates. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12, 78–85
12. Riedijk MA, Stoll B, Chacko S et al (2007) Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 3408–3413
13. Stoll B, Henry J, Reeds PJ et al (1998) Catabolism dominates the firstpass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J Nutr* 128, 606–614
14. Wu G, Morris SM Jr (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336, 1–17
15. Kim SW, Wu G (2009) Regulatory role for amino acids in mammary gland growth and milk synthesis. *Amino Acids* 37, 89–95
16. Tujioka K, Okuyama S, Yokogoshi H et al (2007) Dietary caminobutyric acid affects the brain protein synthesis rate in young rats. *Amino Acids* 32, 255–26
17. Wang WW, Qiao SY, Li DF (2009) Amino acids and gut function. *Amino Acids* 37, 105–110
18. Grillo MA, Colombatto S (2007) S-Adenosylmethionine and radicalbased catalysis. *Amino Acids* 32, 197–202
19. Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ et al (2006) Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem* 17, 571–588
20. Katane M, Hanai T, Furuchi T et al (2008) Hyperactive mutants of mouse D-aspartate oxidase: mutagenesis of the active site residue serine. *Amino Acids* 35, 75–82
21. Scolari MJ, Acosta GB (2007) D-Serine: a new world in the glutamatergic neuroglial language. *Amino Acids* 33, 563–574

22. Wang JJ, Wu G, Zhou HJ, Wang FL (2008c) Emerging technologies for amino acid nutrition research in the post-genome era. *Amino Acids* 37, 177-186
23. El Idrissi A (2008) Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection. *Amino Acids* 34, 321–328
24. Lupi A, Tenni R, Rossi A et al (2008) Human prolidase and prolidase deficiency. *Amino Acids* 35, 739–752
25. Novelli A, Tasker RAR (2008) Excitatory amino acids in epilepsy: from the clinics to the laboratory. *Amino Acids* 32, 295–297
26. Phang JM, Donald SP, Pandhare J, Liu Y (2008) The metabolism of proline, as a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino Acids* 35, 681–690
27. Orlando GF, Wolf G, Engelmann M (2008) Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: insights from mutant mice. *Amino Acids* 35, 17–27
28. Willis A, Beander HU, Steel G, Valle D (2008) PRODH variants and risk for schizophrenia. *Amino Acids* 35, 673–679
29. Wu G, Knabe DA, Kim SW (2004) Arginine nutrition in neonatal pigs. *J Nutr* 134, 2783S–2790S
30. Wu G, Bazer FW, Cudd TA et al (2007) Pharmacokinetics and safety of arginine supplementation in animals. *J Nutr* 137, 1673S–1680S
31. Wu G, Collins JK, Perkins-Veazie P et al (2007) Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats. *J Nutr* 137, 2680–2685
32. Blachier F, Mariotti F, Huneau JF, Tome´ D (2007) Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids* 33, 547–562
33. Montanez R, Rodriguez-Caso C, Sanchez-Jimenez F, Medina MA (2008) In silico analysis of arginine catabolism as a source of nitric oxide or polyamines in endothelial cells. *Amino Acids* 34, 223–229
34. Morris SM Jr (2007) Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J Nutr* 137, 1602S–1609S
35. Rider JE, Hacker A, Mackintosh CA et al (2007) Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids* 33, 231–240
36. Sugita Y, Takao K, Toyama Y, Shirahata A (2007) Enhancement of intestinal absorption of macromolecules by spermine in rats. *Amino Acids* 33, 253–260
37. Curthoys NP, Watford M (1995) Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr* 15:133–159
38. Rhoads JM, Argenzio RA, Chen WN et al (1997) L-Glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogenactivated protein kinases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 272, G943–G953
39. Tabor, C. W. and Tabor, H. (1984) Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 749–790
40. Morgan, D. M. L. (1999) Polyamines. *Mol. Biotechnol.* 11, 229–250
41. Thomas, T and Thomas T. J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 244–258
42. McCann, P. P., Pegg, A. E. and Sjoerdsma, A. P. (eds) (1987) In “Inhibition of Polyamine Metabolism: Biological Significance and Basis of New Therapies”, Academic Press, Orlando, FL
43. Alm, K., Berntsson, P. S., Kramer, D. L., Porter, C. W. and Oredsson, S. M. (2000) Treatment of cells with the polyamine analog N¹,N¹¹-diethylnorspermine retards S phase progression within one cell cycle. *Eur. J. Biochem.* 267, 4157–4164

44. Seiler, N., Delcros, J. G. and Moulinox, J. P. (1996) Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 843–861
45. Pegg, A. E. (1988) Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.* 48, 759–774
46. Seiler, N. (2000) Oxidation of polyamines and brain injury. *Neurochem. Res.* 25, 471–490
47. Hoet, P. H. M. and Nemery, B. (2000) Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 278, L417–L433
48. Thomas, T. J., Gunnia, U. B. and Thomas, T. (1992) Reversal of the abnormal development of T cell subpopulations in the thymus of autoimmune MRL-*lpr/lpr* mice by a polyamine biosynthesis inhibitor. *Autoimmunity* 13, 275–283
49. Stadthagen, M. and Brieger, L. (1889) *Über Cystinurie nebst Bemerkungen über einen Fall von Morbus maculosus Werlhofii.* *Berl. Klin. Wochenschr.* 26, 344–346 (in german)
50. van Leeuwenhoek, A. (1678) *Observationes D. Anthonii Lewenhoeck, De Natis E Semine Genitali Animalculis.* *Philos. Trans. R. Soc. London* 12, 1040–1043
51. Dudley, H. W., Rosenheim, M. C. and Rosenheim, O. (1924) The Chemical Constitution of Spermine. I. The Isolation of Spermine from Animal Tissues, and the Preparation of its Salts. *Biochem. J.* 18, 1263–1272
52. Dudley, H. W., Rosenheim, O. and Starling, W. W. (1926) The Chemical Constitution of Spermine. *Biochem. J.* 20, 1082–1094
53. Heby, O. and Persson, L. (1990) Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 15, 153–158
54. Pegg, A. E. (1986) Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234, 249–262
55. Wang, Y., Devereux, W., Woster, P. M., Stewart, T. M., Hacker, A. and Casero, Jr, R. A. (2001) Cloning and Characterization of a Human Polyamine Oxidase That Is Inducible by Polyamine Analogue Exposure. *Cancer Res.* 61, 5370–5373
56. Bolkenius, F. N. and Seiler, N. (1981) Acetyl derivatives as intermediates in polyamine catabolism. *Int. J. Biochem.* 13, 287–292
57. Wallace, H. M. (1987) Polyamine catabolism in mammalian cells: excretion and acetylation. *Med. Sci. Res.* 15, 1437–1440
58. Wallace, H. M., Fraser, A. V., and Hughes, A. (2003) A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* 376, 1–14
59. Morris, D.R. (1991) A new perspective on ornithine decarboxylase regulation: Prevention of polyamine toxicity is the overriding theme. *J. Cell Biochem.* 46: 102–105
60. Kingsnorth, A. N. and Wallace, H. M. (1985) Elevation of monoacetylated polyamines in human breast cancers. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 21, 1057–1062
61. Wallace, H. M. (1996) Polyamines in human health. *Proc. Nutr. Soc.* 55, 419–431
62. Bardócz, S. (1993) The role of dietary polyamines. *Eur. J. Clin. Nutr.* 47, 683–690
63. Hessels, J., Kingma, A. W., Ferwerda, H., Keij, J., van den Berg, G. A. and Muskiet, F. A. (1989) Microbial flora in the gastrointestinal tract abolishes cytostatic effects of α -difluoromethylornithine *in vivo*. *Int. J. Cancer.* 43, 1155–1164
64. Khuhawara, M.Y, and. Qureshib, G.A. (2001) Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *J. Chromatogr B* 764, 385–407

65. Casero, R. A. Jr. and M. Woster, P. M. (2001) Terminally Alkylated Polyamine Analogues as Chemotherapeutic Agents. *J. Med. Chem.* 44, 1-26
66. Peulen, O., Pirlet, C., Klimek, M., Goffinet G. and Dandrifosse G. (1998) Comparison Between the Natural Postnatal Maturation and the Spermine-Induced Maturation of the Rat Intestine. *Arch Physiol Biochem.* 106, 46–55.
67. Peulen, O., Deloyer, P. and Dandrifosse G. (2004) Short-term effects of spermine ingestion on the small intestine: a comparison of suckling and weaned rats. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 353–364
68. Milovic, V. (2001) Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 13, 1021–1025
69. Harada, E, Hashimoto, Y. and Syuto, B., (1994) Orally administered spermine induces precocious intestinal maturation of macromolecular transport and disaccharidase development in suckling rats. *Comp Biochem Physiol A Physiol.*, 109(3), 667-673
70. Hernandez-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Noguers M, T., Mariner-Font, A., and Vidal-Carou, M. C. (1997) Biogenic Amine and Polyamine Contents in Meat and Meat Products. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2098–2102
71. Kalač, P. and Krausová, P., (2005) A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry* 90, 219–230
72. Kalač, P., Křížek, M., Pelikánová, T., Langová, M. and Veskrna, O. (2005) Contents of polyamines in selected foods. *Food Chemistry* 90, 561–564
73. Okamoto, A., Sugi, E., Kozumi, Y., Yanagida, F., and Udaka, S. (1997) Polyamine Content of Ordinary Foodstuffs and Various Fermented Foods. *Biosci. Biotech. and Biochem.* 61, 1582–1584
74. Nishibori, N., Fujihara, S. and Akatuki, T. (2007) Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese. *Food Chemistry* 100, 491–497
75. Bardócz, S., White, A., Grant, G., Brown, D.S., Duguid, T.G., and Pusztai ,A. (1996) Uptake and bioavailability of dietary polyamines. *Biochem Soc Trans.* 24, 226S
76. Ralph, A., Englyst, K. and Bardocz, S. (1999). In “Polyamines in health and nutrition“, (pp. 123–137), Massachusetts: Kluwer Academic Publishers.
77. Molnár-Perl, in: Z. Deyl, F. Tagliaro, E. Terasová (Eds.), *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences, Journal of Chromatography Library*, Vol. 60, Elsevier, Amsterdam, 1998, p. 415, Chapter 11.
78. Molnár-Perl, in: *Amino Acids, Encyclopedia of Separation Science*, Vol. III, Academic Press, 2000, p. 1999.
79. Vasanits, I. Molnár-Perl (1999) Temperature, eluent flow-rate and column effects on the retention and quantitation properties of phenylthiocarbamyl derivatives of amino acids in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 832, 109-122
80. Molnár-Perl, A. Vasanits (1999) Stability and characteristics of the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/N-acetyl-l-cysteine reagents and their amino acid derivatives measured by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr A* 835, 73-91
81. Vasanits, D. Kutlan, P. Sass, I. Molnár-Perl (2000) Retention/quantitation properties of the o-phthaldialdehyde–3-mercaptopropionic acid and the o-phthaldialdehyde–N-acetyl-l-cysteine amino acid derivatives in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 870, 271-287
82. Molnár-Perl (2001) Derivatization and chromatographic behavior of the o-phthaldialdehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group-containing additives. *J. Chromatogr. A* 913, 283-302

83. Y. Mengerink, D. Kutlan, F. Tóth, A. Csámpai, I. Molnár-Perl (2002) Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents: High-performance liquid chromatography–mass spectrometry study. *J. Chromatogr. A* 949, 99-124
84. D. Kutlán, P. Presits, I. Molnár-Perl (2002) Behavior and characteristics of amine derivatives obtained with o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and with o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents. *J. Chromatogr. A* 949, 235-248
85. Krause, A. Bockhardt, H. Neckemann, T. Henle, H. Klostermeyer (1995) Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. *J. Chromatogr. A* 715, 67-79
86. O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira, E. Mendes, B.M. Oliveira, M. Ferreira (2001) Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitão cheese. *Food Chem.* 75, 287-291
87. T. Bausa, A. Blaise, F. Daumas, J.C. Cabanis (1995) Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallée du Rhône by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A* 707, 373-379
88. J. Kirschbaum, B. Luckas, W.D. Beinert (1994) Pre-column derivatization of biogenic amines and amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and heptylamine. *J. Chromatogr. A* 661, 193-199
89. V.R. Villanueva, R.C. Adlakha (1978) Automated analysis of common basic amino acids, mono-, di-, and polyamines, phenolicamines, and indoleamines in crude biological samples. *Anal. Biochem.* 91, 264-275
90. N. Seiler, B. Knodgen (1985) Determination of polyamines and related compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Improved separation systems. *J. Chromatogr. B* 339, 45-57
91. G. Achilli, G.P. Cellerino, G.M. d'Eril (1994) Determination of amines in wines by high-performance liquid chromatography with electrochemical coulometric detection after precolumn derivatization. *J. Chromatogr.* 661, 201-205
92. Y.Yokojama, O. Ozaki, H. Sato (1996) Separation and determination of amino acids, creatinine, bioactive amines and nucleic acid bases by dual-mode gradient ion-pair chromatography. *J. Chromatogr. A* 739, 333-342
93. I.M. Mackie, L. Pine, A.H. Ritchie, H. Yamanaka (1997) The formation of non-volatile amines in relation to concentrations of free basic amino acids during postmortem storage of the muscle of scallop (*Pecten maximus*), herring (*Clupea harengus*) and mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Chem.* 60, 291-295
94. M.R. Alberto, M.E. Arena, M.C. Manca de Nadra (2002) A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines. *Food Control* 13, 125-129
95. P. Herbert, L. Santos, A. Alves (2001) Simultaneous Quantification of Primary, Secondary Amino Acids, and Biogenic Amines in Musts and Wines Using OPA/3-MPA/FMOC-CI Fluorescent Derivatives. *J. Food Sci.* 66, 1319
96. D. Kutlan, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr.*, in press.
97. M. Callul, R.M. Marcé, J. Fabregas, F. Borrull (1991) A method for the determination of histamine in wine by HPLC with precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Chromatographia* 31, 133-166

98. G. Nouadje, H. Rubie, E. Chatelut, P. Canal, M. Nertz, Ph. Puig, F. Couderc (1995) Child cerebrospinal fluid analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 717, 293-298
99. G. Nouadje, N. Simeon, F. Dedieu, M. Nertz, Ph. Puig, F. Couderc (1997) Determination of twenty eight biogenic amines and amino acids during wine aging by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 765, 337-345
100. Z. Chen, J. Wu, G.B. Baker, M. Parent, N.J. Dovichi (2001) Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to the determination of biogenic amines and amino acids in brain microdialysate and homogenate samples. *J. Chromatogr. A* 914, 293-298
101. J. You, H. Sun, W. Lao, Q. Ou (1999) Fluorescence properties of carbazole-9-yl-acetyl chloride and its application for the simultaneous determination of amino acids and biogenic amines via liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 382, 51-65
102. J. You, J. You, W. Lao, G. Wang, X. Jia (1999) Fluorescence properties of carbazole-9-yl-propionic acid and its application to the determination of amines *via* HPLC with fluorescence detection. *Analyst* 124, 281-288
103. Y. Ma, R. Zhang, C.L. Cooper (1992) Indirect photometric detection of polyamines in biological samples separated by high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 608, 93-96
104. J.R. Draisci, L. Gianetti, P. Boria, L. Lucentini, L. Palleschi, S. Cavalli (1998) Improved ion chromatography-integrated pulsed amperometric detection method for the evaluation of biogenic amines in food of vegetable or animal origin and in fermented foods. *J. Chromatogr. A* 798, 109-116
105. F. Antolini, S. Franciosini, A. Floridi, A.L. Floridi (1999). *Ital. J. Food Sci.* 11, 335-346
106. S.K. Sadain, J.A. Koropchak (1999) Condensation nucleation light scattering detection for biogenic amines separated by ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* 844, 111-118
107. S. Einarsson, B. Josefsson, S. Lagerkvist, *J. Chromatogr.* 282 (1983) 609.
108. E.C.Y. Chan, P.Y. Wee, P.Y. Ho, P.C. Ho, *J. Chromatogr. B* 749 (2000) 179.
109. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 291.
110. R.A. Bank, E.J. Jansen, B. Beekman, J.M. te Koppele, *Anal. Biochem.* 240 (1996) 167.
111. K. Ou, M.R. Wilkins, J.X. Yan, A.A. Gooley, Y. Fung, D. Sheumack, K.L. Williams, *J. Chromatogr. A* 723 (1996) 219.
112. Bauza, A. Blaise, F. Daumas, J.C. Cabanis, *J. Chromatogr. A* 707 (1995) 373.
113. Hioki, K; Kinugasa, M, Kishimoto, M; Fujiwara, M; Tani, S; Kunishima, M, Useful reagents for introduction of Boc and Fmoc protective groups to amines: Boc-DMT and Fmoc-DMT, (2006) *SYNTHESIS-STUTTGART* (12)1931-1933
114. Carpino, Louis A.; Han, Grace Y. (1972). "9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group". *The Journal of Organic Chemistry* **37** (22): 3404.
115. R. Gill, S.P. Alexander, A.C. Moffat, *J. Chromatogr.* 247 (1982) 39.
116. S.J. Kiel, S.L. Morgan, *J. Chromatogr.* 320 (1984) 313.
117. Koros, R. Hanczko, A. Jambor, Y. Qian, A. Perl, I. Molnar-Perl, *J. Chromatogr. A* 1149 (2007) 46. 381
118. M. Shibue, C.T. Mant, R.S. Hodges, *J. Chromatogr. A* 1080 (2005) 382-389.
119. By: Neychev, V. K.; Nikolova, E.; Zhelev, N.; Mitev V. (2007) Saponins from *Tribulus terrestris* L. are less toxic for normal human fibroblasts than for many cancer

- lines: Influence on apoptosis and proliferation, *EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE*, 232(1), 126-133.
120. C Slavov, V Mitev, L Mateva, B Benkova, V Lozanov, E Popov, UP-03.46: Assessment of levels of amino acids, polyamines, metanephrines and catecholamines in serum and urine samples in patients with carcinoma of the bladder, adenocarcinoma of the prostate and BPH, *Urology* 68, 299
 121. Broshtilova, V., Lozanov, V., Miteva, L. Polyamine metabolism changes in psoriasis (2013) *Indian Journal of Dermatology*, 58 (4), pp. 306-309.
 122. 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.