

**Universitatea “Babeş-Bolyai”
Facultatea de Fizică**

**STUDIUL UNOR BIOMOLECULE PRIN METODE
SPECTROSCOPICE. APLICAȚII BIOMEDICALE**

Rezumat

**Conducător științific:
Prof. Univ. Dr. Culea Monica**

**Doctorand:
Horj Elena**

**Cluj-Napoca
2012**

Cuprins

PREFATĂ.....	3
INTRODUCERE.....	4
CAP.I. CROMATOGRAFIA DE GAZE.....	8
1.1. Principiul de bază al cromatografiei de gaze. Coloane cromatografice.....	8
1.2. Parametrii coloanelor cromatografice. Elementele caracteristice cromatogramei.....	12
1.3. Tipuri de detectori utilizați în cromatografia de gaze.....	16
1.3.1. Detectorul cu ionizare în flacără.....	17
1.3.2. Detectorul termoionic.....	18
1.3.3. Detectorul cu captură de electroni.....	19
CAP.II. SPECTROMETRIA DE MASĂ.....	21
2.1. Istoric.....	21
2.2. Cuplajul GC-MS : spectrometrul de masă ca detector pentru cromatograful de gaze.....	23
2.3. Tipuri de spectrometre de masă utilizate în cuplajul GC-MS.....	25
2.3.1. Noțiuni generale.....	25
2.3.2. Spectrometrul de masă cu analizor cuadrupolar.....	26
2.3.3. Spectrometrul de masă cu analizor cu trapă de ioni.....	28
2.4. Moduri de ionizare utilizate în cuplajul GC-MS.....	30
2.4.1. Ionizarea prin impact electronic.....	30
2.4.2. Ionizarea chimică.....	32
2.5. Tipuri de detectori și performanțele spectrometrelor de masă.....	32
2.5.1. Multiplicatoare de electroni cu dinode separate.....	33
2.5.2. Multiplicatoare de electroni cu dinode continue (engl. <i>Channeltron</i>).....	34
2.5.3. Detectorii cu microcanale.....	34
2.6. Aplicații ale spectrometriei de masă în metabolomică.....	35
2.6.1. Aplicații medicale ale spectrometriei de masă.....	38
2.6.1.1. Spectrometria de masă și descoperirea de noi biomarkeri.....	38
2.6.1.2. Spectrometria de masă și screeningul neonatal.....	40
CAP. III. VALIDAREA METODELOR DE ANALIZĂ.....	44

3.1. Criterii de validare.....	44
CAP. IV. ANALIZA PRIN GC-MS ȘI DILUȚIE IZOTOPICĂ A AMINOACIZILOR ȘI ACIZILOR GRAȘI DIN PLASMĂ DE CRAPI (CYPRINUS CARPIO) HRĂNIȚI CU SELENIU.....	50
4.1. Aminoacizii.....	50
4.2. Acizii grași omega-3: importanță și mecanism de acțiune la nivelul organismului uman.....	52
4.3. Seleniul și efectele sale benefice asupra organismelor vii.....	54
4.4. Obiectivul studiului.....	55
4.5. Materiale și metode	56
4.5.1. Reactivi și probe biologice.....	56
4.5.2. Extracția simultană a aminoacizilor și a acizilor grași din plasmă de crap.....	57
4.5.3. Reacții de derivatizare.....	57
4.5.3.1. Derivatizarea aminoacizilor.....	57
4.5.3.2. Derivatizarea acizilor grași.....	58
4.5.4. Aparatura experimentală.....	59
4.5.5. Calculul cantitativ al aminoacizilor.....	60
4.5.6. Calculul cantitativ al acizilor grași.....	63
4.6. Rezultate și discuții.....	63
4.7. Concluzii.....	70
CAP. V. ANALIZA PRIN GC-MS ȘI DILUȚIE IZOTOPICĂ A AMINOACIZILOR ȘI A ACIZILOR GRAȘI DIN PLASMĂ ȘI CARNE DE PĂSTRĂV DE CRESCĂTORIE (ONCORHYNCHUS MYKISS). VARIAȚIA ÎN FUNCȚIE DE ANOTIMP.....	71
5.1. Obiectivul studiului.....	71
5.2. Materiale și metode.....	71
5.2.1. Reactivi și probe biologice.....	71
5.2.2. Procedeele de extracție și derivatizare.....	72
5.2.3. Rezultate și discuții.....	72
5.2.4. Concluzii.....	76
5.3. Analiza prin GC-MS a acizilor grași din carne de păstrăv de crescătorie (Oncorhynchus Mykiss).....	77
5.3.1. Procedeele de extracție și derivatizare.....	78

5.3.2. Rezultate și discuții.....	78
5.3.3. Concluzii.....	81
CAP. VI. ANALIZA PRIN GC-MS ȘI DILUȚIE IZOTOPICĂ A AMINOACIZILOR ȘI A ACIZILOR GRAȘI DIN SALAM FERMENTAT LA RECE.....	83
6.1. Introducere.....	83
6.2. Materiale și metode.....	84
6.2.1. Recativi și probe biologice.....	84
6.2.2. Extracția simultană a aminoacizilor și a acizilor grași din probe de salam.....	85
6.2.3. Derivatizare.....	85
6.2.4. Aparatura experimentală.....	86
6.3. Rezultate.....	86
6.3.1. Variația conținutului de aminoacizi în funcție de durata procesării.....	86
6.3.2. Variația conținutului de acizi grași în funcție de durata procesării.....	94
6.4. Concluzii.....	97
CAP. VII. ELABORAREA ȘI OPTIMIZAREA UNOR METODE DE DIAGNOSTICARE.....	98
7.1. Erori înăscute de metabolism al aminoacizilor.....	98
7.2. Studiu de caz: monitorizarea tratamentului unor pacienți diagnosticați cu fenilcetonurie (PKU) prin spectrometrie de masă cuplată cu cromatografie de gaze (GC-MS).....	102
7.2.1. Introducere.....	102
7.2.2. Materiale și metode.....	105
7.2.3. Validarea metodei.....	109
7.2.4. Rezultate și discuții.....	113
7.3. Concluzii.....	122
BIBLIOGRAFIE.....	123
PUBLICAȚII ȘI PREZENTĂRI LA CONFERINȚE.....	132
PUBLICAȚII.....	132
PREZENTĂRI LA CONFERINȚE.....	134

Cuvinte cheie:

Spectrometrie de masă, cromatografie de gaze, GC-MS, aminoacizi, acizi grași, metabolomică, extracție simultană, derivatizare, diluție izotopică, validare, fenilcetonurie.

Cuplajul cromatografie de gaze-spectrometrie de masă (GC-MS) a fost ales de către majoritatea laboratoarelor implicate în studii de metabolomică. Această tehnică presupune separarea componentelor unui amestec pe coloana capilară a unui cromatograf de gaze (tehnica ideală de separare) și identificarea folosind un spectrometru de masă (detectorul ideal).

În această teză, tehnica GC-MS a fost utilizată pentru a determina, atât calitativ cât și cantitativ, două clase de compuși cu o importanță biologică deosebită: aminoacizii și acizii grași.

Pe lângă faptul că sunt unitățile structurale de bază ale proteinelor, aminoacizii sunt surse de energie și precursori în biosinteza neurotransmițătorilor, a porfirinelor, poliaminelor și a oxidului nitric.

Acizii grași sunt constituenții majori ai lipidelor. Principalele funcții biologice ale lipidelor sunt: componente structurale ale membranelor celulare, combustibili metabolici și transportori ai substanțelor liposolubile. Acizii grași polinesaturați, omega-3 și omega-6, joacă un rol foarte important în ceea ce privește sănătatea iar acțiunea acestora este similară cu cea a hormonilor.

Cuplajul GC-MS este o metodă robustă, cu o reproductibilitate excelentă a timpilor de retenție, care poate fi automatizată cu ușurință. Aceasta a fost prima tehnică folosită pe scară largă în analiza metaboliților și în diagnosticare.

Această teză cuprinde șapte capitole. Primele trei capitole prezintă aspecte teoretice. În următoarele patru capitole sunt prezentate rezultatele analizei prin GC-MS a unor sistemelor biologice complexe.

IV. Analiza prin GC-MS și diluție izotopică a aminoacizilor și a acizilor grași din plasmă de crap (*Cyprinus carpio*) hrăniți cu seleniu

Scopul acestui studiu a fost acela de a dezvolta o metodă de analiză calitativă și cantitativă a aminoacizilor și acizilor grași din plasmă sangvină de crap. Loturile experimentale au fost hrănite cu un furaj special care a conținut seleniu organic (Sel-Plex), în timp ce loturile martor au fost hrănite cu furaj obișnuit. Concentrația de aminoacizi din plasmă reflectă calitatea nutritivă a furajului

Perioada experimentală a durat 159 de zile, în 2008 (9.06-15.11) și 200 de zile, în 2009 (17.04-3.11), între cele două perioade având loc somnul de iarnă al crapului.

Zece crapi din fiecare lot, martor și experimental, câte 5 din varietatea Lausitz și 5 din varietatea Galițian (sau Oglindă), au fost capturați și li s-a colectat sânge în fiole cu heparină.

Etape experimentale

Aminoacizii și acizii grași au fost extrași din 0.5 mL de plasmă, pe o rășină schimbătoare de ioni, Dowex 50W-W8. 10 μL ^{15}N -Met s-au adăugat fiecărei probe, ca standard intern, înainte de trecerea peste rășină. 2 mL de apă au "spălat" rășina și au fost colectați împreună cu plasma în flacoane de sticlă. Aminoacizii reținuți pe rășină au fost apoi eluați cu 2 mL NH_4OH 4M. Acizii grași au fost extrași din amestecul de apă și plasma folosind 0.5 mL cloroform:metanol 2:1 (v:v), agitând timp de 30 s flaconul, la temperatura camerei.

Probele au fost derivatizate pentru a se obține acizi grași metil esteri (FAME) și aminoacizi n-butil N-trifluoroacetil esteri.

Aminoacizii au fost derivatizați folosind 200 μL 3M HCl în butanol, la 100°C, timp de 1h. După răcire și evaporare, a avut loc o reacție de trifluoroacetilare, folosind 100 μL de anhidridă trifluoroacetică, la 60°C, timp de 20 min.

Acizii grași au fost derivatizați cu 200 μL 3M HCl în metanol, la 80°C, timp de 20 min.

S-a utilizat un cromatograf de gaze cuplat cu un spectrometru de masă Trace DSQ (Thermo Finnigan). Coloana capilară Rtx-5MS a cromatografului a avut următoarele caracteristici: 30m x 0.25mm D.I. și o grosime a filmului de 0.25 μm .

Temperatura cuptorului, pentru separarea aminoacizilor n-trifluoroacetil N-butil esteri a fost: 50°C timp de 1 min, 6°C/min la 100°C, 4°C/min la 200°C, 20°C/min la 310°C, și menținere aici timp de 5 min.

Temperatura cuptorului pentru separarea acizilor grași metil esteri a început de la 50°C, 2 min, 8°C/min la 310°C, și a fost menținută aici 8 min.

Gazul purtător a fost heliul 5.5, cu o viteză de curgere de 1 mL/min. Spectrometrul de masă a funcționat în modul EI (impact de electroni), 70 eV. Curentul de emisie a fost de 100 μA .

Analiza cantitativă a avut loc în modul SCAN: domeniul 30-520 u.a.m., pentru aminoacizi, și 34-500 u.a.m., pentru acizii grași. Următoarele condiții de funcționare au fost asigurate pentru spectrometrul de masă: temperatura liniei de transfer, 250°C, temperatura injectorului, 200°C, pentru aminoacizi și 250°C, pentru acizii grași, iar temperatura sursei de ioni, 250°C.

1 μL din fiecare probă a fost injectat în GC-MS, în modul split (10:1), folosind un autosampler TriPlus.

Rezultate și discuții

17 aminoacizi au fost determinați cantitativ iar metoda a fost validată folosind etaloane. Precizia a fost de 20% DSR, excepție făcând arginina, cisteina și tirozina, iar limita de detecție (LOD) a fost de 1 $\mu\text{g/mL}$, pentru fiecare aminoacid (1 ng injectat).

Ordinea de eluție a aminoacizilor într-o probă de plasmă a fost: alanină (Ala), glicină (Gly), acid γ -aminobutiric (GABA), treonină (Thr), serină (ser), valină (Val), leucină (Leu), izoleucină (Ile), cisteină (Cys), prolină (Pro), metionină (Met), acid aspartic (Asp), fenilalanină (Phe), ornitină (Orn), acid glutamic (Glu), lizină (Lys), tirozină (Tyr) și histidină (His) (Fig. 1).

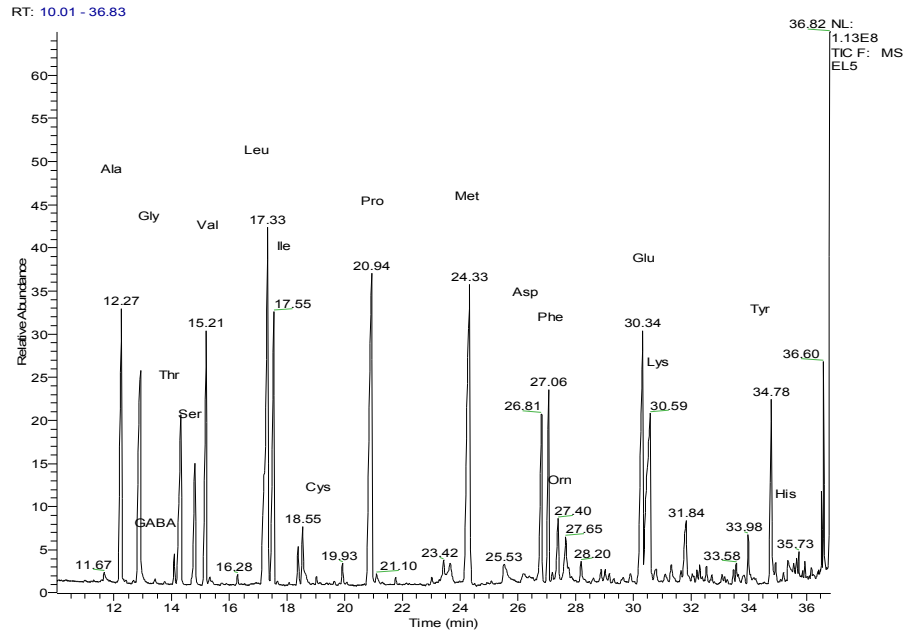


Fig.1. Cromatograma reprezentativă a aminoacizilor din plasma de crap.

Concentrațiile de aminoacizi au fost calculate cu ajutorul formulelor (1) și (2).

$$F_i = \frac{A_i/A_j}{m_i/m_j} \quad (1)$$

unde F_i sunt factorii de răspuns, m_i este cantitatea corespunzătoare compusului i , m_j este cantitatea corespunzătoare compusului j (reprezentând standardul intern) iar A_i și A_j sunt ariile compușilor i și j .

$$m_i(\mu\text{g}) = m_j(\mu\text{g}) \frac{A_i}{F_i \cdot A_j} \quad (2)$$

unde F_i sunt factorii de răspuns calculați cu ajutorul standardelor, m_i este cantitatea de corespunzătoare compusului i , m_j este cantitatea corespunzătoare compusului j (reprezentând standardul intern) iar A_i și A_j sunt ariile compușilor i și j .

Hrănirea crapilor cu Se organic a influențat concentrația aminoacizilor din plasma lor sangvină. S-a remarcat o creștere a concentrațiilor de aminoacizi în cazul ambelor varietăți, Lausitz și Galițian, grupurile martor și experimentale (Fig. 2 și 3).

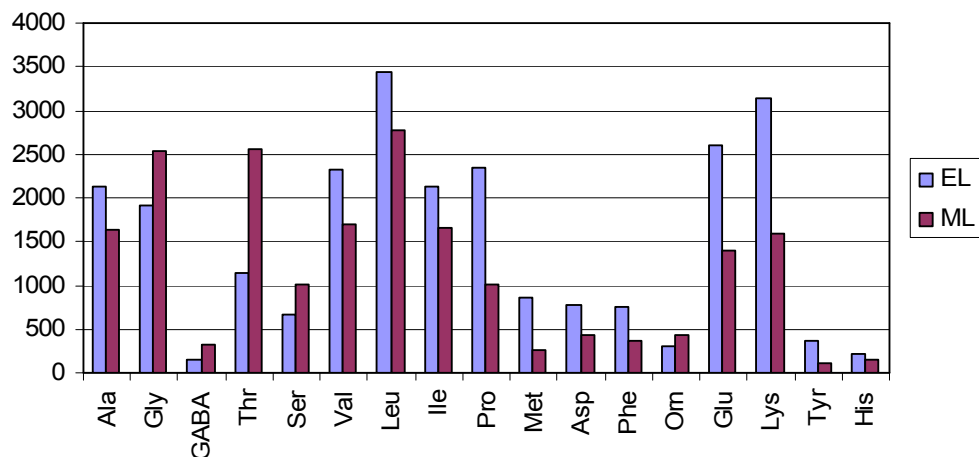


Fig.2. Aminoacizii (μM) din plasma crapilor Lausitz, grupul experimental (EL) și martor (ML).

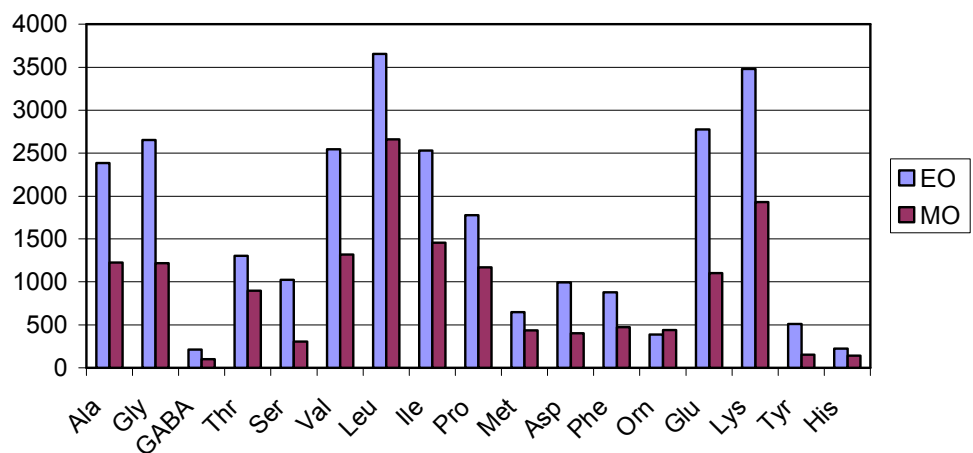


Fig.3. Aminoacizii (μM) din plasma crapilor Galițian, grupul experimental (EO) și martor (MO).

Influența pozitivă a Se organic s-a manifestat și asupra concentrației de acizi grași din plasmă. Fig. 4 prezintă cromatograma reprezentativă a acizilor grași din plasma de crap.

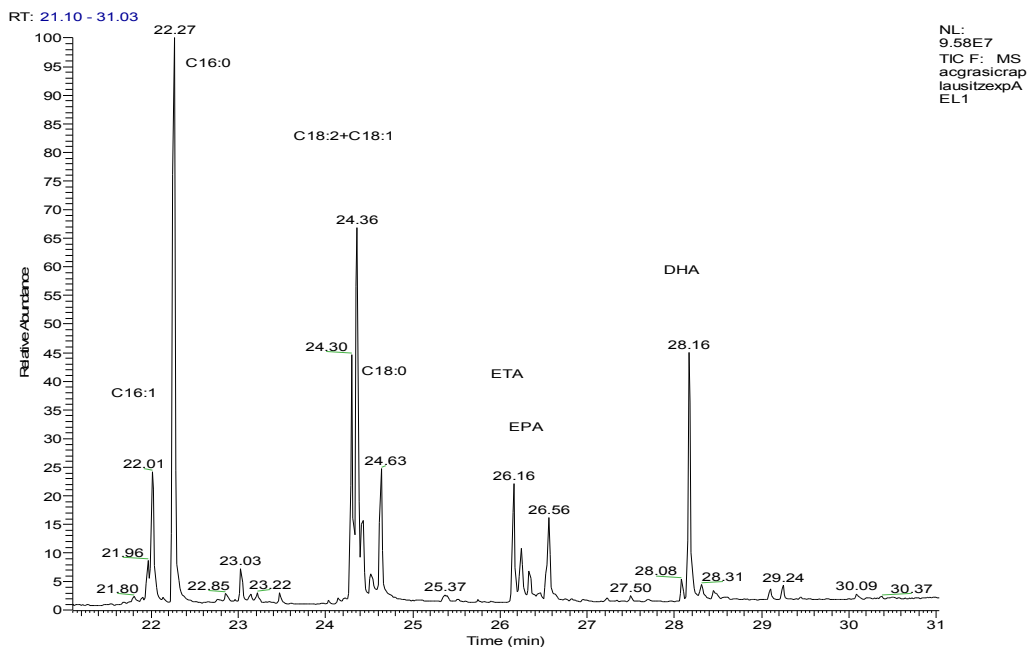


Fig.4. Cromatograma reprezentivă a acizilor grași (FAME) dintr-o probă de plasmă de crap.

Cu ajutorul bibliotecii de spectre NIST, au fost identificați următorii acizi grași: acidul palmitoleic (C16:1), acidul palmitic (C16:0), acidul linoleic (C18:2), acidul oleic (C18:1), acidul stearic (C18:0), cei doi izomeri ai acidului arahidonic C20:4 (acidul 5,8,11,14 eicosatetraenoic, ETA ω -6 și acidul 8,11,14,17 eicosatetraenoic, ETA ω -3), acidul eicosapentaenoic (EPA, C20:5 ω -3) și acidul docosahexaenoic (DHA, C22:6 ω -3).

Câte 10 μ g C11:1 s-au adăugat fiecărei probe, înainte de injectare, ca standard intern. Concentrațiile de acizi grași au fost calculate cu ajutorul formulei:

$$C_i(\%) = \frac{\frac{m_j \times A_i}{F_i \times A_j}}{\sum_{i=1}^n \left(\frac{A_i}{F_i} \right)} \times 100 \quad (3)$$

unde C_i este cantitatea de compus i , F_i sunt factorii de răspuns calculați cu ajutorul standardelor de acizi grași, m_j este cantitatea de standard intern, A_i și A_j sunt ariile picurilor i și j , F_i este factorul de răspuns corespunzător compusului i .

Raportul DHA/EPA a avut valoarea cea mai mare în cazul crapilor Lausitz din grupul experimental:5.63, iar acest raport a fost de 5.53, în cazul crapilor Galițian din grupul experimental. În grupurile martor, acest raport a fost mai scăzut: 4.39, pentru crapii din varietatea Lausitz, respectiv 3.76, pentru cei din varietatea Galițian (Fig. 5).

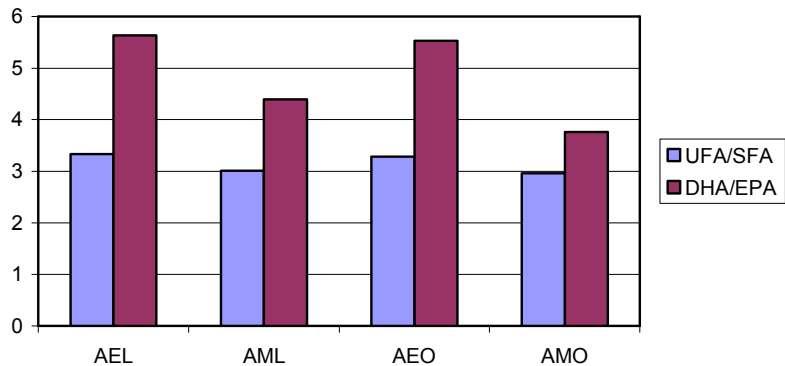


Fig.5. Comparația rapoartelor de acizi grași nesaturați/acizi grași saturați (UFA/SFA) și acid docosahexaenoic/acid eicosapentaenoic (DHA/EPA) pentru AEL: varietatea Lausitz experimental, AML: Lausitz martor, AEO: Galițian experimental, AMO: Galițian martor.

Concluzii

- Metoda de analiză dezvoltată aici a prezentat parametri de validare buni. Precizia a fost de 20%(DSR), iar limita de detecție (LOD) a fost de 10 $\mu\text{g/mL}$, (10 ng injectate).
- Folosirea unui standard intern marcat izotopic permite determinarea cu o precizie înaltă a metaboliților.
- Au existat diferențe semnificative între concentrațiile de aminoacizi, în cazul ambelor varietăți, Lausitz și Galițian.
- Loturile hrănite cu Se organic au prezentat concentrații mai mari de aminoacizi în plasmă.
- Hrănirea cu Se organic a determinat creșterea raportului de acizi grași nesaturați/acizi grași saturați, pentru ambele varietăți.
- Creșterea concentrației de DHA din plasma crapilor din loturile experimentale se datorează proprietăților antioxidante ale Se.

V. Analiza prin GC-MS și diluție izotopică a aminoacizilor și a acizilor grași din plasmă și carne de păstrăv de crescătorie (*Onchorhynchus mykiss*). Variația în funcție de anotimp

Scopul acestui studiu a fost acela de a dezvolta o metodă GC-MS simplă și de încredere pentru determinarea aminoacizilor și a acizilor grași din plasmă și carne de păstrăv.

Carnea de pește este bogată în proteine de înaltă calitate și conține toți aminoacizii esențiali. Pe lângă aceasta, peștele este considerat cea mai importantă sursă dietetică de acizi grași polinesaturați, în special, de acizi grași omega-3: eicosapentaenoic (EPA) și docosahexaenoic (DHA). EPA și DHA sunt precursori ai eicosanoizilor – molecule implicate în semnalizarea inter- și intracelulară care influențează sistemele vascular, neuronal și imunitar.

Metaboliții de interes au fost determinați din plasmă sangvină și din carne de păstrăv. Păstrăvii au provenit din două sisteme de creștere diferite: clasic (M - lotul martor) și recirculant (E - lotul experimental). A fost studiată influența anotimpurilor și a sistemelor de creștere asupra concentrațiilor de aminoacizi și de acizi grași.

Etape experimentale

Probele de plasmă au fost analizate primăvara și vara, pentru determinarea aminoacizilor, și în cele patru anotimpuri ale anului, pentru determinarea acizilor grași. Pentru plasmă, etapele experimentale s-au desfășurat în același mod ca și în Capitolul IV. Separarea și identificarea compușilor s-a realizat cu ajutorul unui cromatograf de gaze Trace GC, cuplat cu un spectrometru de masă (Trace DSQ, Thermo Finnigan).

Dacă în cazul extracției aminoacizilor și acizilor grași din plasmă s-a procedat ca și în capitolul anterior, pentru carne, metoda de extracție a fost diferită.

1 g de carne decongelată și 1 g de nisip au fost mojarate împreună cu 5 mL de apă distilată. Amestecul omogen a fost centrifugat la 5800 rpm, timp de 5 min.

0.5 mL de supernatant și 10 μg ¹⁵N-Met (standard intern) au fost trecute încet peste o rășină schimbătoare de ioni, de la Dowex 50W-8W, într-o coloană 2 x 40 mm. Soluția a fost colectată în flacoane de 4 mL și folosită la extracția acizilor grași. Acizii grași au fost extrași adăugând cloroform:metanol 2:1, v:v, și agitând puternic timp de 30 s, la temperatura camerei.

Aminoacizii purificați pe rășină au fost extrași trecând 2 mL de NH₄OH 4M. Soluția obținută a fost colectată în flacoane de sticlă și uscată în flux de azot, la 60°C.

Etapele de derivatizare sunt aceleași cu cele descrise în capitolul IV, pentru analiza GC, obținându-se aminoacizi butil trifluoroacetil esterii și acizi grași metil esterii.

Rezultate și discuții

S-au identificat și calculat 16 aminoacizi: alanina (Ala), glicina (Gly), treonina (Thr), serina (Ser), valina (Val), leucina (Leu), izoleucina (Ile), prolina (Pro), hidroxiprolina (Hy-Pro), metionina (Met), acidul aspartic (Asp), fenilalanina (Phe), ornitina (Orn), tirozina (Tyr), acidul glutamic (Glu) și lizina (Lys) (Fig. 6 și Tabelul 1).

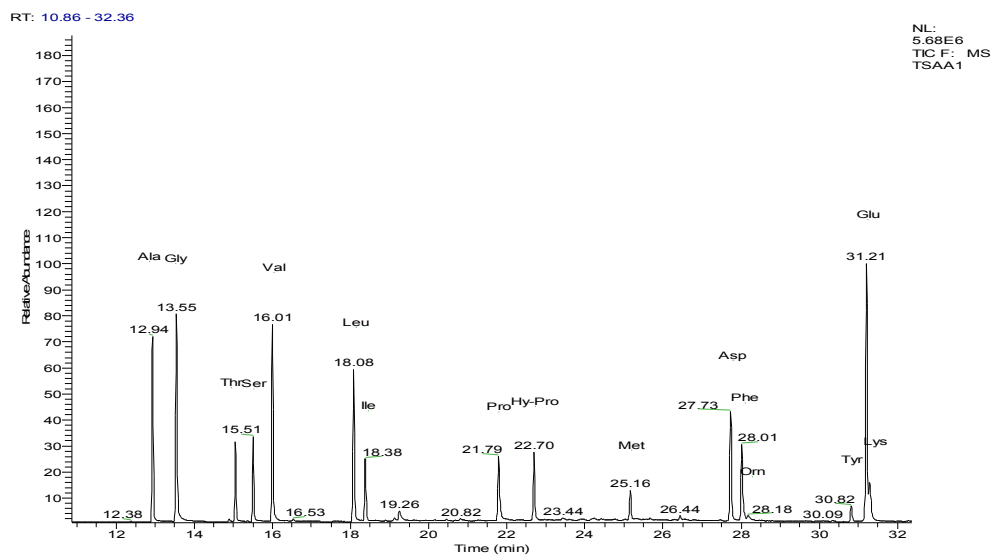


Fig.6. Cromatograma aminoacizilor dintr-o probă de plasmă de păstrăv.

Tabelul 1. Rezultatele analizei prin GC-MS a aminoacizilor din probe de plasmă de păstrăv în cele două sezoane: primăvara și vara.

Aminoacid	Masa moleculară	Timp de retenție (min)	Concentrație ($\mu\text{M}/\text{mL}$) Media \pm DS (n=10)	
			Primăvara	Vara
Ala	89	12.94	551.23 \pm 80.06	486.32 \pm 61.11
Gly	75	13.55	806.14 \pm 115.60	505.18 \pm 19.72
Thr*	119	15.06	265.10 \pm 27.16	208.38 \pm 16.17
Ser	105	15.51	391.32 \pm 60.41	150.70 \pm 28.74
Val*	117	16.01	854.50 \pm 74.98	750.49 \pm 30.48
Leu*	131	18.08	701.13 \pm 57.61	460.93 \pm 23.40
Ile*	131	18.37	375.14 \pm 32.02	279.62 \pm 17.06
Pro	115	21.78	393.68 \pm 21.11	460.54 \pm 25.24
Hy-Pro	131	22.68	190.10 \pm 19.62	53.47 \pm 4.92
Met*	149	25.15	242.83 \pm 13.74	182.71 \pm 5.40
Asp	133	27.72	743.95 \pm 60.65	447.63 \pm 33.02
Phe*	165	28.01	318.76 \pm 22.01	320.02 \pm 14.60
Orn	132	28.13	103.87 \pm 11.00	82.91 \pm 6.11
Tyr	181	30.82	55.54 \pm 10.17	69.17 \pm 4.03
Glu	147	31.21	1692.56 \pm 117.75	1218.23 \pm 67.53
Lys*	146	31.24	572.87 \pm 50.74	699.97 \pm 49.09

* aminoacizi esențiali, DS- deviația standard.

Primăvara, concentrațiile de aminoacizi esențiali au fost mai mari decât vara, cu excepția fenilalaninei și a lizinei.

După derivatizare, acizii grași au devenit metil esteri și câte 20μg de C11:1 s-au adăugat în fiecare probă, ca standard intern, înainte de injectarea în GC.

Acizii grași, care au fost identificați și calculați, sunt: acidul palmitoleic (C16:1), acidul palmitic (C16:0), acidul linoleic (C18:2), acidul oleic (C18:1), acidul stearic (C18:0), acidul eicosapentaenoic (EPA, C20:5 ω-3) și acidul docosahexaenoic (DHA, C22:6 ω-3) (Fig. 7).

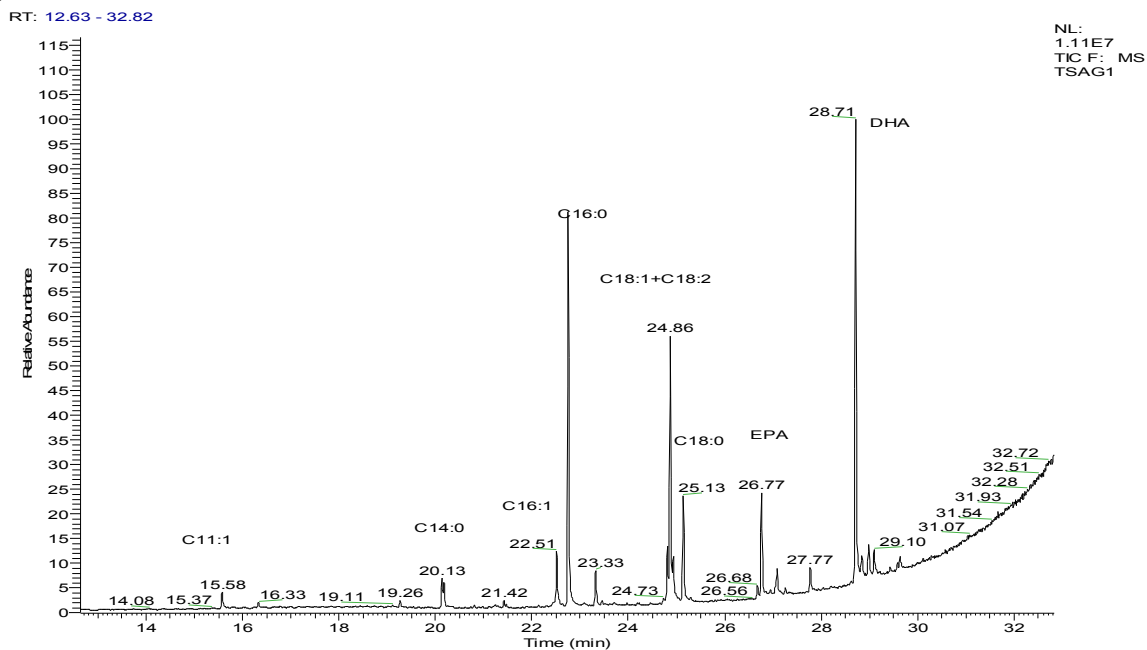


Fig.7. Cromatograma acizilor grași dintr-o probă de plasmă de păstrăv.

Tabelul 2. Concentrațiile de acizi grași identificați în plasma de păstrăv curcubeu.

Acid gras	Timp de retenție (min)	Concentrație (% din totalul de acizi grași) Medie (n=10)			
		Primăvara	Vara	Toamna	Iarna
Acid palmitoleic C16:1	22,51	5,322	3,666	3,039	1,789
Acid palmitic C16:0	22,75	21,841	20,350	21,906	32,861
Acid linoleic C18:2	24,81	3,864	4,387	12,256	8,405
Acid oleic C18:1	24,86	19,855	22,592	29,455	32,578
Acid stearic C18:0	25,13	4,997	4,881	5,143	4,819
Acid eicosapentaenoic C20:5 EPA	26,77	9,830	10,036	6,029	6,281
Acid docosahexaenoic C22:6 DHA	28,71	34,324	34,088	22,174	13,267
PUFA		48,02	48,51	40,46	27,95
SFA		26,84	25,23	27,05	37,68
UFA		73,20	74,77	72,95	62,32
UFA/SFA		2,73	2,96	2,70	1,65
ω-3/ω-6		11,43	10,06	2,30	2,33

Dintre speciile de apă dulce, carnea de păstrăv conține cea mai mare concentrație de acizi grași nesaturați.

S-au determinat acizii grași din carnea păstrăvilor curcubeu, proveniți din două sisteme de creștere diferite: clasic și recirculant, în sezonul de toamnă. Lotul M (martor) este crescut în sistem clasic (complexul salmonicol Fiad-Telcișor) iar lotul E (experimental), în sistem recirculant, amplasat în Cluj-Napoca. Furajul utilizat și frecvența administrării acestuia au fost identice în cazul ambelor loturi. Un număr de 10 exemplare a fost sacrificat din fiecare lot.

Limita de detecție (LOD) a fost de 10 $\mu\text{g/mL}$ (10 ng injectate) iar precizia și acuratețea sub 20%. Randamentul extracției a fost de 21%.

Figura 8 prezintă cantitatea de acizi grași din probele de carne obținute de la păstrăvi martor și experiment.

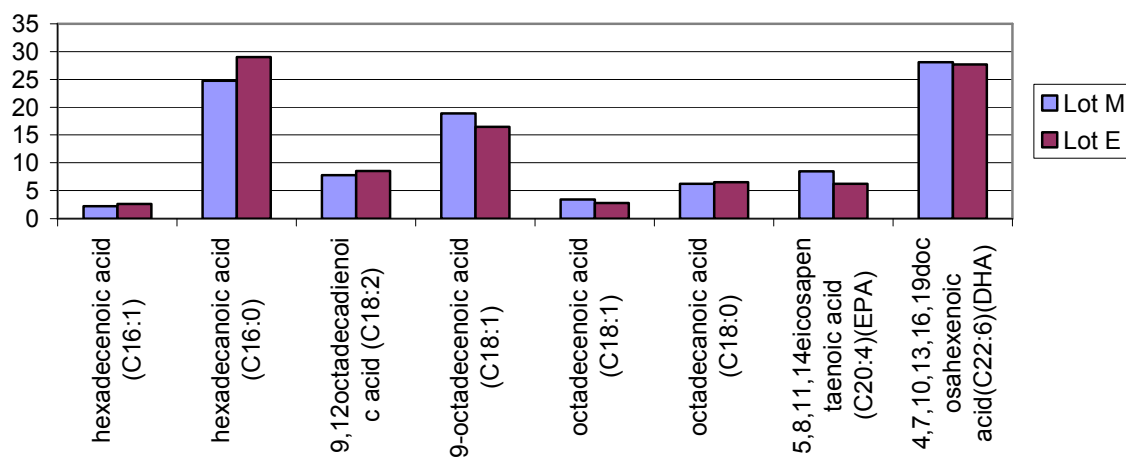


Fig.8. Concentrațiile de acizi grași (%din totalul de acizi grași) din carnea de păstrăv, loturile M-martor și E-experimental.

Carnea păstrăvilor din lotul martor este mai bogată în acizi grași nesaturați (68.95%), comparativ cu lotul experimental (64.44%). De asemenea, carnea păstrăvilor din lotul martor conține o concentrație mai mică de acizi grași saturați (31.04%) față de cea a păstrăvilor din lotul experimental (35.56%) și o valoare mai mare a raportului de acizi grași ω -3/ ω -6 (4.69), față de cea a păstrăvilor din lotul experimental (ω -3/ ω -6 de 3.97).

Concluzii

- Metoda dezvoltată aici prezintă parametri de validare buni: precizia și acuratețea fiind < 20% DSR iar limita de detecție (LOD), 10 $\mu\text{g/mL}$ (10 ng injectate).
- Concentrațiile de aminoacizi și acizi grași au prezentat variații în funcție de anotimp.
- Concentrații mai mari ale acestor metaboliți s-au remarcat primăvara.
- Vara, concentrațiile de acizi grași din probe de plasmă au scăzut. Acest lucru se poate datora creșterii temperaturii apei și schimbării modului de hrănire.

- Carnea obținută de la lotul martor, crescut în sistem clasic, a fost mai bogată în acizi grași nesaturați decât carnea păștrăvilor din lotul experimental, crescuți în sistem recirculant.

VI. Analiza prin GC-MS și diluție izotopică a aminoacizilor și a acizilor grași din salam fermentat la rece

Scopul acestui studiu a fost acela de a stabili un protocol experimental rapid și precis pentru analiza prin GC-MS a aminoacizilor liberi și a acizilor grași din probe de salam obținut prin fermentare, folosind ^{15}N -Met, ca standard intern. S-au preparat probe conținând 0.3% glucono delta-lactonă (GDL) și 0.05% ascorbat de sodiu (ASC), și probe conținând 0.1% ascorbat de sodiu. Conținutul de aminoacizi a fost determinat la diferite intervale de timp, pe parcursul a 45 de zile de procesare. A fost stabilită o procedură de extracție simultană a aminoacizilor și a acizilor grași, urmată de o reacție de derivatizare în doi pași a aminoacizilor, pentru analiza prin GC.

Etape experimentale

Extracția și derivatizarea s-au desfășurat întocmai ca în Capitolul V, când au fost analizate probe de carne de păștrăv.

S-a folosit un cromatograf de gaze (Trace GC) cuplat cu un spectrometru de masă (Trace DSQ, ThermoFinnigan). Coloana capilară Rtx-5MS a fost de 30m x 0.25 mm D.I., cu o grosime a filmului de 0.25 μm . Programul de temperatură al cuptorului cromatografului de gaze, pentru separarea aminoacizilor derivatizați (butil trifluoroacetil ester) a fost: 50°C timp de 1 min, 6°C/min la 100°C, 4°C/min la 200°C, 20°C/min la 300°C, și menținere 3 min. Programul de temperatură pentru separarea acizilor grași derivatizați (FAME) a fost: 50°C timp de 1 min, 8°C/min la 300°C.

Gazul purtător a fost He 5.5, cu un debit de 1mL/min.

Spectrometrul de masă a funcționat în modul de ionizare prin impact electronic (70 eV). Curentul de emisie a fost 100 μA . Analiza calitativă s-a desfășurat în domeniul 50-500 u.a.m. Următoarele condiții au avut loc: temperatura liniei de transfer a fost setată la 250°C, temperatura injectorului, la 200°C și temperatura sursei de ioni, la 250°C. S-a injectat câte un microlitru din fiecare probă în modul split (10:1) și folosind un autosampler TriPlus.

Rezultate și discuții

Aminoacizii identificați în probele de salam au fost: Ala, Gly, Thr, Ser, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Asp, Orn, Phe, Lys, Glu, His, Tyr.

În funcție de ordinea de eluție și de aria relativă a picului, cei mai abundenți aminoacizi liberi au fost: alanina (Ala), histidina (His), valina (Val) și acidul glutamic (Glu).

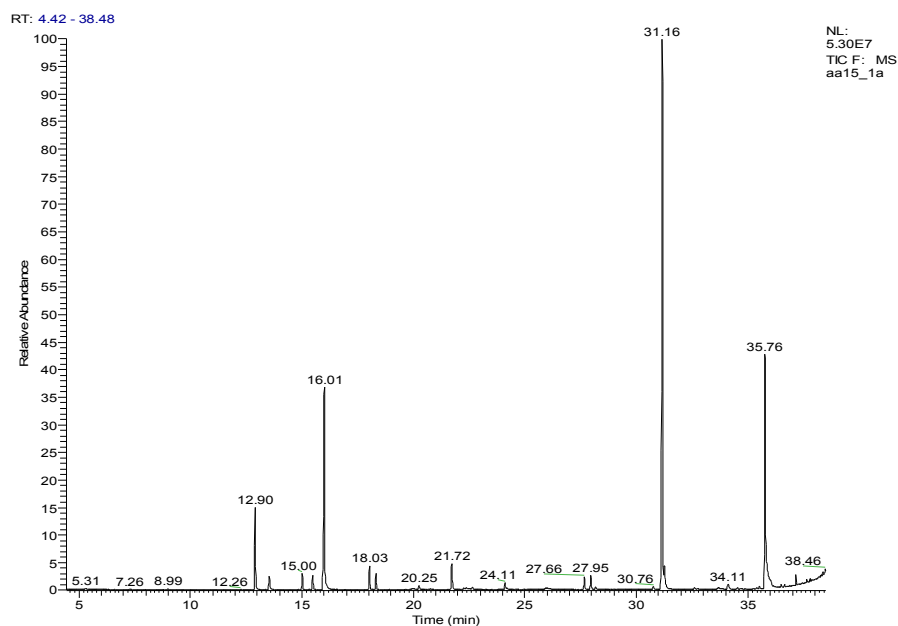


Fig.9. Cromatograma de separare a aminoacizilor extrași dintr-o probă de salam: Ala (Rt:12.90), Gly (Rt:13.50), Thr (Rt:15.00), Val (Rt:16.01), Pro (Rt:21.72), Asp (Rt:27.66), Glu (Rt:31.16), His (Rt:35.76).

Concentrațiile de aminoacizi s-au calculat cu ajutorul formulei (2) și a dreptelor de regresie (Tabelul 3). $10\mu\text{g } ^{15}\text{N-Met}$ s-au adăugat ca standard intern.

Tabelul 3. Ecuțiile dreptelor de regresie și coeficienții de corelație.

Aminoacid	Ecuția curbei de regresie	r
Alanină (Ala)	$y = 1.017x + 12.567$	0.991
Glicină (Gly)	$y = 1.0682x + 13.166$	0.996
Treonină (Thr)	$y = 1.1285x + 15.058$	0.992
Serină (Ser)	$y = 1.1041x + 12.72$	0.995
Leucină (Leu)	$y = 1.0044x + 16.09$	0.995
Izoleucină (Ile)	$y = 0.8507x + 12.37$	0.994
Valină (Val)	$y = 1.5124x - 13.434$	0.980
Cisteină (Cys)	$y = 0.1667x - 6.512$	0.940
Acid gamma-aminobutiric (GABA)	$y = 2.207x - 8.8747$	0.980
Prolină (Pro)	$y = 1.0331x + 20.49$	0.991
Hidroxi-prolină (Hy-Pro)	$y = 1.3504x - 4.257$	0.993
Metionină (Met)	$y = 0.0355x + 0.1319$	0.9995
Ornitină (Orn)	$y = 0.7645x + 8.7581$	0.997
Fenilalanină (Phe)	$y = 0.6542x + 26.844$	0.978
Tirozină (Tyr)	$y = 0.3209x - 5.2564$	0.973
Lizină (Lys)	$y = 1.2868x - 10.384$	0.978
Histidină (Hys)	$y = 0.6916x - 10.196$	0.957

Alimentele aflate în proces de fermentare conțin o abundență de aminoacizi. Procesul de fermentare este cel care dă gustul unic și savoarea alimentelor.

Figurile 10 și 11 arată concentrațiile de aminoacizi (mg/g) din probele de salam preparate cu și fără GDL.

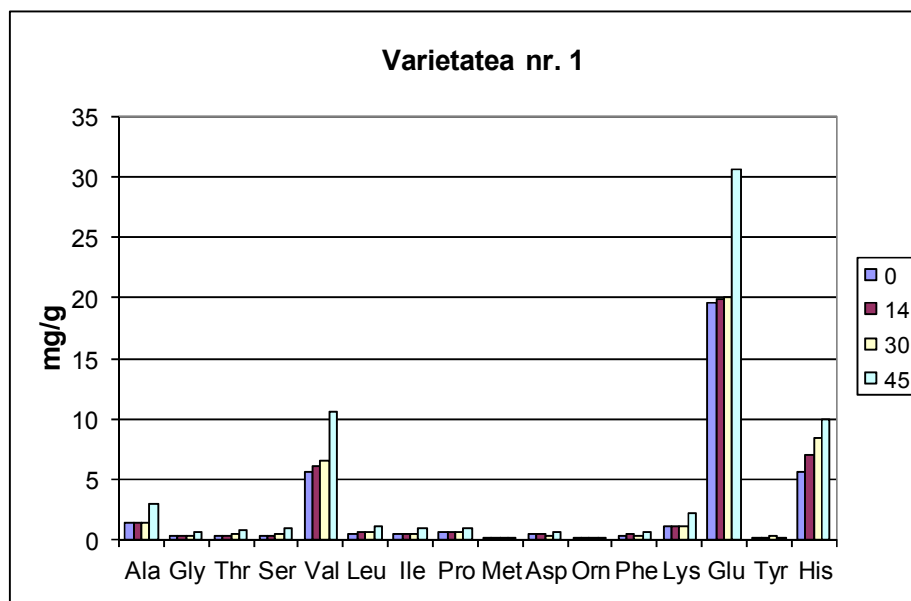


Fig.10. Variația concentrațiilor de aminoacizi liberi din salam – varietatea I, preparată cu GDL, în funcție de durata de procesare: 0, 14, 30 și 45 de zile.

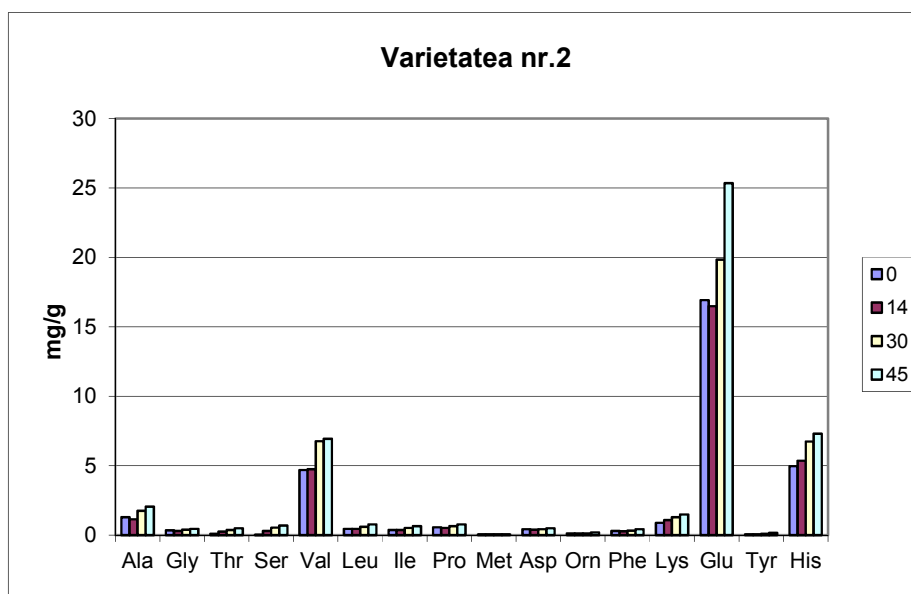


Fig.11. Variația concentrațiilor de aminoacizi liberi din salam – varietatea II (fără GDL), în funcție de durata de procesare: 0, 14, 30 și 45 de zile.

Acizii grași identificați în probele de salam sunt: acidul miristic (C14:0), acidul palmitoleic (C16:1), acidul palmitic (C16:0), acidul linoleic (C18:2, ω -6), doi dintre izomerii acidului oleic (9-C18:1, 12-C18:1), acidul stearic (C18:0) și acidul arahidonic (C20:4, ω -6).

10 μ g C11:1 s-au adăugat în fiecare probă, înainte de injectare, ca standard intern. Concentrațiile de acizi grași s-au calculat cu ajutorul formulei (3) (Tabelele 4 și 5).

Tabelul 4. Conținutul în acizi grași al probelor de salam – Varianta I (0.3% GDL, 0.05% ASC).

Acid gras (%)	Durata de procesare (zile)			
	0	14	30	45
Acid miristic (C14:0)	0.60	0.67	0.70	0.67
Acid palmitoleic (C16:1)	1.15	1.06	1.28	1.27
Acid palmitic (C16:0)	23.01	22.11	22.22	22.41
Acid linoleic (C18:2)	12.93	12.88	13.03	13.04
Acid oleic (9-C18:1)	36.47	36.28	39.24	40.36
Acid oleic (12-C18:1)	3.64	4.59	4.33	3.42
Acid stearic (C18:0)	18.98	19.38	16.49	16.32
Acid arahidonic (C20:4)	2.85	2.62	2.18	2.15
SFA¹	42.59	42.16	39.41	39.40
UFA²	57.05	57.43	60.06	60.24
MUFA³	41.26	41.93	44.85	45.05
EFA⁴	15.78	15.50	15.21	15.19
UFA/SFA	1.34	1.36	1.52	1.53

¹SFA: acizi grași saturați (C14:0, C16:0, C18:0); ²UFA: acizi grași nesaturați (C16:1, 9- și 12-C18:1, C18:2, C20:4); ³MUFA: acizi grași mononesaturați (C16:1, 9- și 12-C18:1); ⁴EFA: acizi grași esențiali (linoleic, arahidonic).

Tabelul 5. Conținutul în acizi grași al probelor de salam – Varianta II (fără GDL, 0.1% ASC).

Acid gras (%)	Durata de procesare (zile)			
	0	14	30	45
Acid miristic (C14:0)	0.57	0.54	0.69	0.72
Acid palmitoleic (C16:1)	0.95	1.02	1.20	1.30
Acid palmitic (C16:0)	22.31	22.31	22.81	22.84
Acid linoleic (C18:2)	13.21	14.34	14.08	13.08
Acid oleic (9-C18:1)	34.49	35.49	37.43	38.85
Acid oleic (12-C18:1)	4.68	3.92	3.35	3.49
Acid stearic (C18:0)	20.03	18.64	17.18	16.90
Acid arahidonic (C20:4)	3.50	3.46	2.96	2.42
SFA¹	42.91	41.49	40.68	40.46
UFA²	56.83	58.23	59.02	59.14
MUFA³	40.12	40.43	41.98	43.64
EFA⁴	16.71	17.80	17.04	15.50
UFA/SFA	1.32	1.40	1.45	1.46

¹SFA: acizi grași saturați (C14:0, C16:0, C18:0); ²UFA: acizi grași nesaturați (C16:1, 9- și 12-C18:1, C18:2, C20:4); ³MUFA: acizi grași mononesaturați (C16:1, 9- și 12-C18:1); ⁴EFA: acizi grași esențiali (linoleic, arahidonic).

Pe parcursul perioadei de procesare, raportul UFA/SFA a crescut, în cazul ambelor tipuri de salam. Dintre acizii grași, acidul oleic este cel care a crescut cel mai mult, în procente de masă.

Concluzii

- Metoda este potrivită pentru analize de rutină, cu aplicații în controlul calității alimentelor, studii de metabolism, studii de control al proceselor biotehnologice, de control al dietei și etichetarea produselor alimentare.
- În probele de salam, conținutul total de aminoacizi crește pe timpul procesului tehnologic de la 31,66 la 48,44 mg/g, în cazul variantei fără adaos de GDL, și de la 36,67 la 63,06 mg/g, la varianta cu adaos de GDL.
- Se constată valori mai ridicate ale acidului glutamic, histidinei, valinei și alaninei pe durata desfășurării proceselor biotehnologice.
- Pe parcursul procesului tehnologic, varianta cu adaos de GDL a prezentat o creștere mai mare a raportului UFA/SFA față de varianta fără GDL.

VII. Elaborarea și optimizarea unor metode de diagnosticare

Scopul acestui studiu a fost acela de a dezvolta o metodă de analiză cantitativă rapidă, minim invazivă, a aminoacizilor din spoturi de sânge uscat (20 μl), folosind diluția izotopică și tehnica GC-MS. Metoda a fost aplicată în analiza probelor de sânge obținute de la patru pacienți cu fenilcetonurie (PKU).

În multe dintre cazurile în care există o perturbare a metabolismului aminoacizilor, diagnosticarea promptă și intervenția rapidă pot aduce beneficii enorme nou-născuților iar uneori le poate salva viața.

Fenilcetonuria (PKU) a fost una dintre primele boli genetice pentru care s-a stabilit un screening neonatal. Inițial, testul Guthrie presupunea diagnosticarea PKU prin restaurarea creșterii unei colonii de bacterii atunci când fenilalanina era prezentă într-o probă de urină sau sânge, care este o metodă semicantitativă. În zilele noastre, testul Guthrie a fost înlocuit cu diagnosticarea prin GC-MS și spectrometrie de masă tandem.

Etape experimentale

Probele de sânge au fost absorbite pe hârtie de filtru. După ce acestea s-au uscat la temperatura camerei, s-a decupat 8 mm din fiecare spot și probele s-au depus în fiole de sticlă cu volumul de 5 mL. 200μL metanol/HCl 0.1% s-au adăugat în fiecare fiolă iar probele au fost apoi ținute la 4°C, timp de o oră, pentru a se extrage aminoacizii.

La fiecare 100μL de extract, s-au adăugat 0.5 μL ¹⁵N-Met, ca standard intern, iar excesul de solvent a fost apoi îndepărtat cu flux de azot.

Aminoacizii au fost derivatizați printr-o reacție desfășurată în doi pași: esterificare cu 100 μL butanol/clorură de acetyl 4:1 (v/v), 100°C, 30 min, și acetilare cu 50 μL anhidridă trifluoroacetică, 100°C, 30 min. Excesul de reactiv a fost complet înlăturat după fiecare pas. După reacția de acetilare, probele au fost uscate la 4°C, cu ajutorul unui flux de azot. La final, s-au adăugat 200 μL de acetat de etil și câte 2μL din fiecare probă s-au injectat în GC/MS.

Metoda a fost validată în domeniul 1-20 μg/mL. Tabelul 6 prezintă ecuațiile dreptelor de regresie și coeficienții de corelație ai aminoacizilor de interes.

Tabelul 6. Parametrii dreptelor de regresie.

Aminoacid	Ecuația dreptei de regresie	Coeficient de corelație
Val	$y = 0.2505x - 0.2092$	0.990
Leu	$y = 0.0752x - 0.0771$	0.978
Pro	$y = 0.2023x - 0.0514$	0.992
Phe	$y = 0.1978x - 0.0987$	0.992
Tyr	$y = 0.1763x - 0.0957$	0.967

Precizia a fost sub 5.5% (DSR), iar acuratețea, sub 6% (DSR) (Tabelul 7). Limita de detecție (LOD) a fost de 0.01μg/mL (0.01ng analizate) iar limita de determinare cantitativă (LOQ) de 1 μg/mL (1ng injectat).

Tabelul 7. Valorile (DSR%) pentru precizie și acuratețe.

Etalon	Precizie DSR%	Acuratețe DSR%
20μg (n=7)	5.48	10.94
30μg (n=5)	3.85	6.76

Precizia s-a calculat, ca *deviație standard relativă* (RSD%), cu ajutorul formulei:

$$RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4)$$

unde SD este deviația standard iar \bar{x} este valoarea medie.

Acuratețea s-a calculat de asemenea tot ca *deviație standard relativă* (RSD%), utilizând formula de mai jos:

$$RSD(\%) = \frac{|V_1 - V_2|}{V_2} \cdot 100 \quad (5)$$

unde V_1 este valoarea măsurată iar V_2 este valoarea adevărată.

Analiza s-a realizat cu ajutorul unui cromatograf de gaze (Trace GC), cuplat cu un spectrometru de masă cuadrupolar (Trace DSQ, Thermo Finnigan). Ionizarea a avut loc prin impact electronic (energia electronilor: 70 eV, curentul de emisie: 100μA); temperatura liniei de transfer a fost de 250°C, temperatura injectorului, 200°C, temperatura sursei de ioni, 250°C și modul de injectare split 10:1. Coloana capilară Rtx-5MS a avut dimensiunile: 30 m x 0.25 mm, 0.25 μm grosimea filmului. He 5.5. a fost gazul purtător.

Programul de temperatură al cromatografului de gaze a început de la 50°C (1 min), apoi a crescut la 260°C, cu 20°C/min, iar apoi la 300°C, cu 100°C/min (0.3 min). Spectrometrul de masă a funcționat în modul SIM (monitorizarea ionilor selectați).

Tabelul 8. Aminoacizii utilizați ca biomarkeri și ionii selectați.

Aminoacizi	Ioni selectați (m/z)
Val	168
Leu	182
Pro	166
Phe	91, 148
Tyr	203, 260, 316

Pentru metionina nemarcată, respectiv marcată cu ¹⁵N, s-au selectat ionii 171 și 172.

Rezultate și discuții

Figura 12 prezintă cromatograma de separare a aminoacizilor extrași din 20μL de sânge și apoi derivatizați.

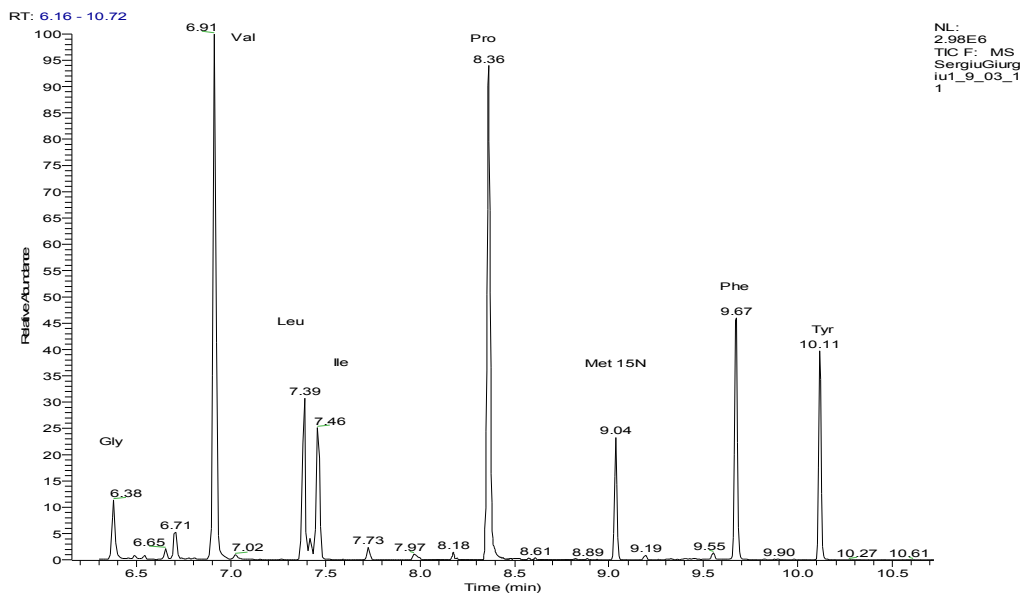


Fig.12. Cromatograma SIM GC-MS a unei probe de sânge: Val ($t_R = 6.91$ min), Leu ($t_R = 7.39$ min), Pro ($t_R = 8.36$ min), ^{15}N -Met SI ($t_R = 9.04$ min), Phe ($t_R = 9.67$ min), Tyr ($t_R = 10.11$ min).

În cazul pacientului AS, în vârstă de 9 luni la momentul începerii analizei, s-au remarcat diferențe semnificative. Pe parcursul celor două luni de monitorizare a tratamentului, concentrația de fenilalanină a scăzut de 37 de ori (Fig. 13) iar raportul Phe/Tyr a scăzut de la 11.9 la 2.01 (Fig. 17 a).

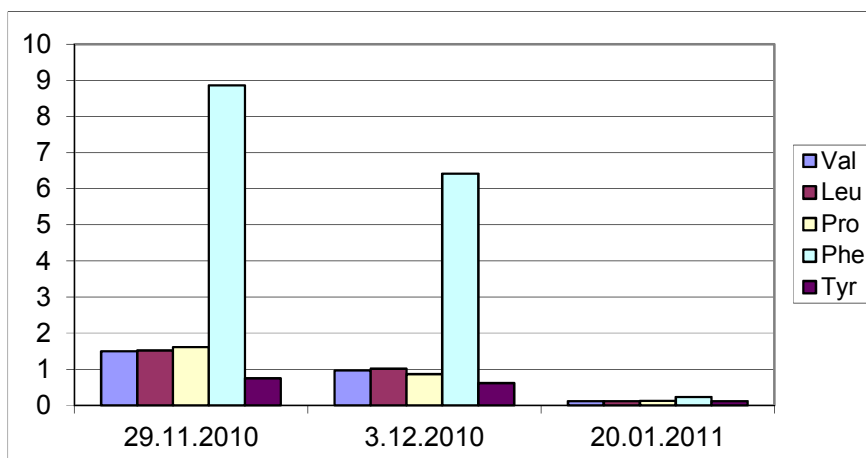


Fig.13. Variația concentrațiilor de aminoacizi pe parcursul perioadei de monitorizare a pacientului AS.

În cazul pacientului SG (Fig.14.), dieta specială și medicația corespunzătoare au determinat o menținere a concentrațiilor de Phe și Tyr în limite normale. Valorile normale

pentru Phe sunt cuprinse între 0.61-1.45 mg/100mL, iar pentru Tyr, între 0.39-1.58 mg/100mL (adulți), conform Dickinson et al. (1965)¹.

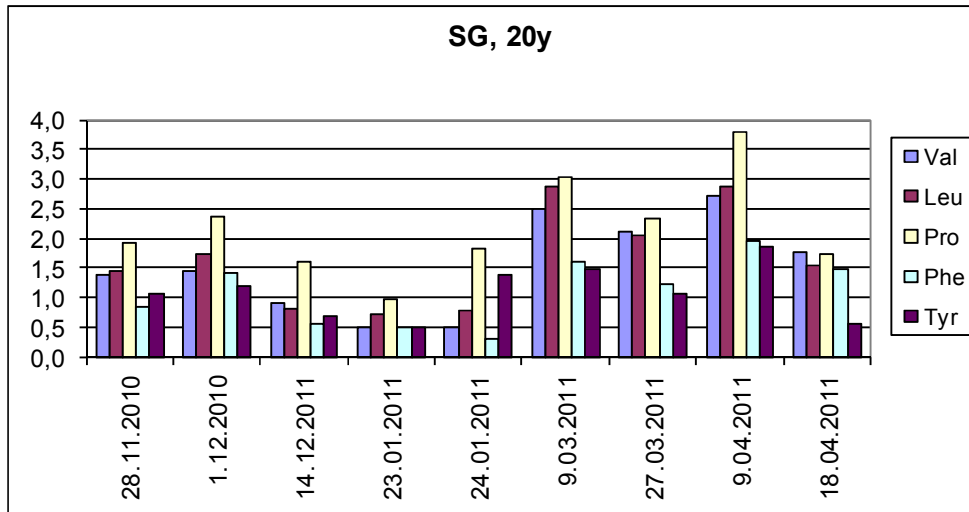


Fig.14. Variația concentrațiilor de aminoacizi pe parcursul perioadei de monitorizare a pacientului SG în vârstă de 20 ani.

În cazul pacientei DA, concentrația de Phe este mai mare în cea de-a doua lună de monitorizare (Fig. 15), de aprox. 5.5 ori mai mare decât valoarea medie de 0.88mg/100mL, considerată normală (adult). În lunile următoare, tratamentul corespunzător a determinat descreșterea acestei valori, precum și a raportului Phe/Tyr, care a devenit subunitar (Fig. 17 c).

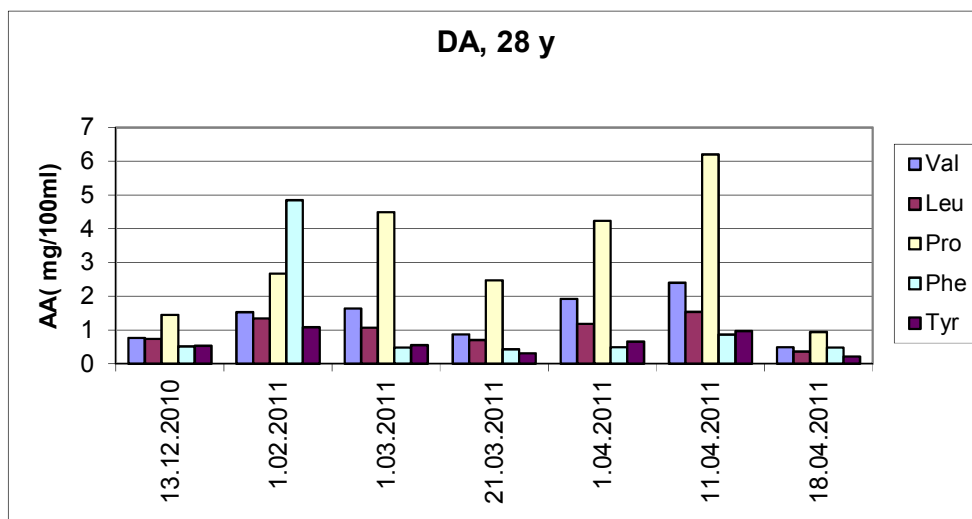


Fig.15. Variația concentrațiilor de aminoacizi pentru pacienta DA, în vârstă de 28 ani.

¹ J. C. Dickinson, H. Rosenblum, P. B. Hamilton, *The free amino acids in the plasma of the newborn infant by ion exchange chromatography*, Pediatrics, **36**, (1965), pp. 2-13.

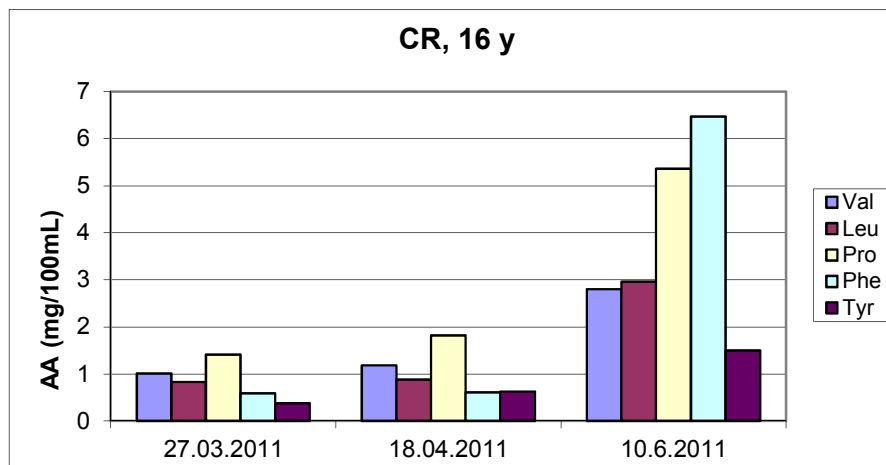
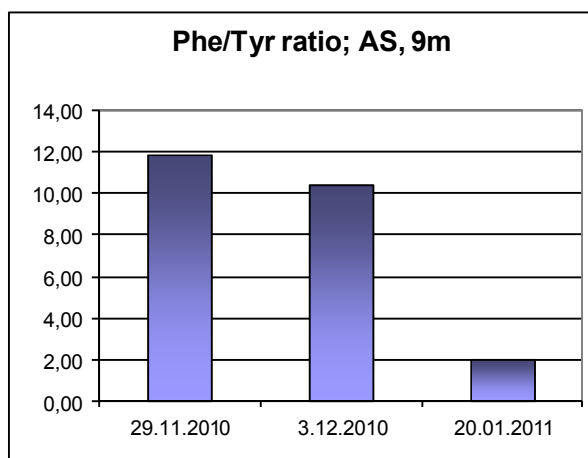
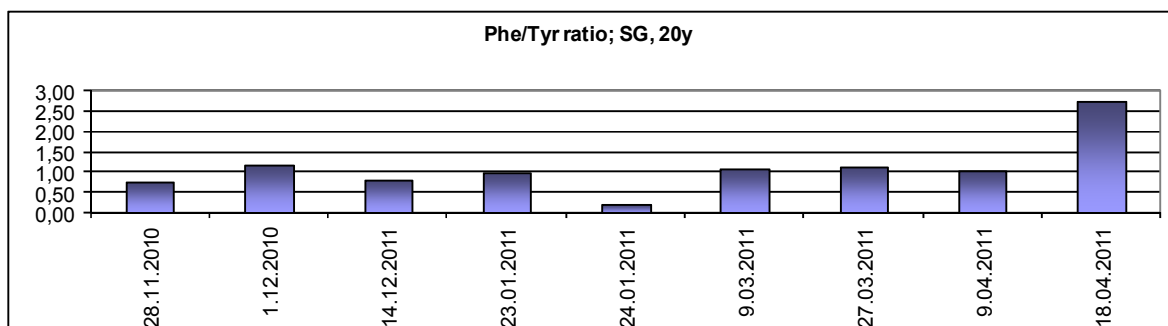


Fig.16. Variația concentrațiilor de aminoacizi pe parcursul perioadei de monitorizare, pentru pacienta CR, în vârstă de 16 ani.

Eficiența tratamentului poate fi controlată urmărind valorile raportului Phe/Tyr. Scăderea cea mai pronunțată a acestui raport, ca răspuns la tratamentul indicat pentru PKU, se remarcă în cazul pacientului AS. În cazul pacienților SG și DA, raportul Phe/Tyr este menținut sub 3, în majoritatea datelor de analiză, cu o singură excepție, de 4.5, la data de 1.02.2011, pentru DA. În ultima lună în care i s-a prelevat sânge pentru monitorizare, pacienta CR a prezentat un raport Phe/Tyr mai mare decât 4.



a)



b)

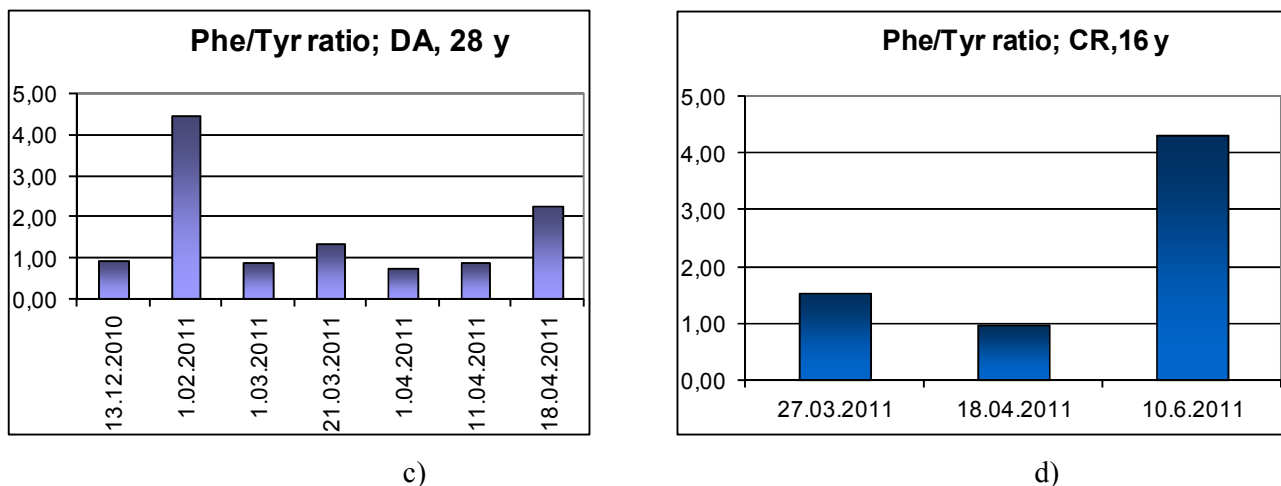


Fig. 17. Valorile raportului Phe/Tyr pentru fiecare pacient implicat în acest studiu.

Studiile au arătat că expunerea timpurie la un nivel ridicat de Phe, pe o perioadă lungă de timp, este extrem de nocivă pentru funcțiile executive ale creierului. Un raport ridicat de Phe/Tyr afectează sinteza dopaminei deoarece tirozina este un precursor al neurotransmițătorilor din grupul catecolaminelor (dopamina, norepinefrina și epinefrina).

Concluzii

- GC-MS este o metodă sensibilă, precisă și rapidă, și reprezintă o alternativă ieftină pentru diagnosticarea și monitorizarea bolilor de eroare de metabolism.
- Metoda propusă aici a fost validată în domeniul: 1-20 $\mu\text{g/mL}$ și prezintă o bună liniaritate pentru fiecare dintre aminoacizii de interes.
- Metoda este simplă, rapidă și reproductibilă. Utilizarea diluției izotopice conduce la creșterea preciziei și acurateții metodei.
- Metoda propusă permite monitorizarea tratamentului și determinarea raportului Phe/Tyr, ca indicator rapid al PKU.
- Metoda propusă poate fi folosită și în diagnosticarea și monitorizarea altor boli de eroare de metabolism, precum: boala urinei cu miros de arțar (MSUD), prolinemia, metioninemia, tirozinemia.

Bibliografie selectivă

1. M. Culea, *Spectrometrie de masă. Principii și aplicații*, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, (2008), p.15-21, 41-45, 48-51, 27-28, 256-260.
2. J. H. Gross, *Mass spectrometry – A textbook*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2004), p. 154-157, 146-148, 475-480.
3. R. P. W. Scott, *Principles and practice of chromatography*, Chrom-Ed Book Series, Vol. 2, (2003), p.1, 46-54, <http://www.library4science.com/>
4. S. Gocan, *Cromatografia de înaltă performanță. Partea I: Cromatografia de gaze*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, (1998), p. 9, 10, 11, 53-55, 12-17, 29, 34, 75, 115-117, 120-128.

5. R. J. Mishur, S. L. Rea, *Applications of mass spectrometry to metabolomics and metabonomics: detection of biomarkers of aging and of age-related diseases*, Mass Spectrometry Reviews, 31, (2012), p. 70-95.
6. A. R. Ani, *Influence of organic selenium on carp (Cyprinus Carpio) and grass carp (Ctenopharyngodon Idella) production rates and health*, PhD Thesis, (2011), Cluj-Napoca, p. 70-74.
7. D. I. Cocan, *Morpho-physiological peculiarities of rainbow trout of different growth and operating systems*, PhD Thesis, (2011), Cluj-Napoca, p. 232-281.
8. S. L. Andrew, *Factorul Ω -3 – Dieta revoluționară omega-3 pentru sănătatea creierului și împotriva depresiei*, Ed. Elena Francisc Publishing, (2005), p. 35-60.
9. M. P. Rayman, *The importance of selenium to human health*, Lancet, 356, (2000), p. 233-241.
10. S. K. Jin, I. S. Kim, D. H. Kim, Y. J. Choi, S. J. Hur, *The Development of Sausage Including Meat from Spent Laying Hen Surimi*, Poultry Science, 86(12), (2007), p. 2676–2684.
11. F. Toldrá, *Biochemistry of Fermented Meat*, Food Biochemistry & Food Processing, editori: Y. H. Hui, W.-K. Nip, L. M. L. Nollet, G. Paliyath, B. K. Simpson, Oxford, Ed. Blackwell Publishing Ltd, (2006), p. 641–658.
12. M. Yudkoff, Cap.13. *Disorders of Amino Acid Metabolism*, Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Amino Acids and Peptides in the Nervous System, Editori: S. S. Oja, P. Saransaari, & A. Schousboe, p. 279–287, Berlin: Springer-Verlag, 2007.
13. C. Deng, C. Shang, Y. Hu, X. J. Zhang, *Rapid diagnosis of phenylketonuria and other aminoacidemias by quantitative analysis of amino acids in neonatal blood spots by gas chromatography–mass spectrometry*, Chromatogr. B, 775, p. 115-120, 2002.
14. C. Mesaros, A. Iordache, O. Cozar, C. Cosma, M. Culea, *Diagnosis by Mass Spectrometry*, Romanian J. Biophys., 20, No. 1, p. 71–82, 2010.
15. C. Mesaroș, M. Culea, A. M. Iordache, Cap. 3, *Aplicații ale gaz cromatografiei și spectrometriei de masă în studii de biologie și medicale, Diagnosticare prin GC-MS*, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 2012, pp. 67-82.
16. A. M. Iordache, M. Culea, C. Mesaroș, I. Ștefănescu, Cap.2, *Validarea metodelor de analiză cantitativă, Aplicații biomedicale și ecologice prin spectrometrie de masă*, Ed. Risoprint, pp. 40-43, 46-47, Cluj-Napoca, 2012.
17. M. Culea, M. Chiriac, E. Culea, C. Lehene, A. Iordache, *ID-GC-MS diagnosis of metabolic diseases*, Romanian Journal of Biophysics, 17(3), (2007), pp. 169–175.
18. U. Ceglarek, P. Müller, B. Stach, P. Bührdel, J. Thiery, W. Kiess, *Validation of the Phenylalanine/Tyrosine Ratio Determined by Tandem Mass Spectrometry: Sensitive Newborn Screening for Phenylketonuria*, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 40(7), (2002), pp. 693-697, D.O.I.10.1515/CCLM.2002.119.
19. C. Deng, B. Wang, L. Liu, *Fast diagnosis of neonatal phenylketonuria by gas chromatography–mass spectrometry following microwave-assisted silylation*, Journal of Chromatography B, 62, (2005), pp. 617-621.
20. S. Kawana, K. Nakagawa, Y. Hasegawa, S. Yamaguchi, *Simple and rapid analytical method for detection of amino acids in blood using blood spot on filter paper, fast-GC/MS and isotope dilution technique*, J. Chromatogr. B (2010), doi:10.1016/j.jchromb.2010.09.015.

Lista de publicații

Publicații ISI

1. Andreea Iordache, **Elena Horj**, Alina Rodica Ani, Cornelia Mesaros, Simina Morar, O. Cozar, Monica Culea, *Amino Acids Profiles In Biological Media*, AIP Conference Proceedings, vol. 1262, p.192-197, 2010, ISSN 0094-243X, ISBN 978-0-7354-0810-4.
2. Andreea Iordache, Monica Culea, **Elena Horj**, Onuc Cozar, *Determination of amino acids and selenium in fish plasma*, Romanian Journal of Physics, vol. 56(7-8), p. 963-970, 2011.
3. Andreea Iordache, **Elena Horj**, Alina Toma, Onuc Cozar, Monica Culea, *Amino acid determination of two carp species by GC-MS*, Asian Journal of Chemistry, 23(11), p. 4757-4760, 2011.
4. **Elena Horj**, Andreea Iordache, Alina Toma, Onuc Cozar, Monica Culea, *Fatty acid composition of two carp species by GC-MS*, Asian Journal of Chemistry, 23(11), p. 4768-4770, 2011.
5. Monica Culea, **Elena Horj**, Andreea Iordache, Onuc Cozar, *Determination of glycine in biological fluids by isotopic dilution mass spectrometry*, Asian Journal of Chemistry, 23(11), p. 4279-4281, 2011.
6. **Elena Horj**, Andreea Iordache, Monica Culea, *Isotopic Dilution GC/MS Method for Methionine Determination in Biological Media*, AIP-Conference Proceedings 1387, p. 241-246, doi:10.1063/1.3647081, 2011, ISSN 0094-243X, ISBN 978-0-7354-0951-4.
7. **Elena Horj**, Diana Florescu, Andreea Iordache, Silvia Neamțu, Monica Culea, *Leucine transmembranar transport study in the human red cell*, Chem. Listy 105, s1048 - s1049, 2011.
8. **Elena Horj**, Diana Florescu, Andreea Iordache, Cornelia Mesaros, Romana Vulturar, Monica Culea, *Diagnosis and monitoring by GC-MS*, Chem. Listy 105, s1047 - s1048, 2011.
9. Andreea Iordache, Diana Florescu, **Elena Horj**, Monica Culea, *Fatty acids determination in biological samples by GC-MS*, Chem. Listy 105, s1015, 2011.
10. Monica Culea, **Elena Horj**, Diana Florescu, Andreea Iordache, Levente Bara, Codrean Pop, *Amino acids determination in dry fermented salami*, Chem. Listy 105, s996, 2011.
11. Diana Florescu, Roxana Elena Ionete, Andreea Iordache, **Elena Horj**, Ioan Ștefănescu, Monica Culea, *Optimal Measurements of Surface Water Pollution-Case Study on Southern Part of Romania*, Asian Journal of Chemistry, 23(12), p. 5209-5212, 2011.
12. Diana Florescu, Andreea Iordache, **Elena Horj**, Roxana Ionete, Ioan Ștefănescu, Monica Culea, *SIM-GC/MS determination of BTEX in ambient air*, Chem. Listy 105, s984, 2011.
13. Diana Florescu, Andreea Iordache, **Elena Horj**, Roxana Ionete, Claudia Șandru, Monica Culea, *Trace of heavy metals in fish tissues, sediment and water from Danube river in Romania*, Chem. Listy 105, s984, 2011.
14. Diana Florescu, Andreea Iordache, Diana Costinel, **Elena Horj**, Roxana Ionete, Monica Culea, *Validation procedure for assessing the total organic carbon in water samples*, articol acceptat spre publicare în *Romanian Journal of Physics*.

Publicații BDI

1. Daniel Cocan, **Elena Horj**, Monica Culea, Vioara Mireșan, Adela Pinteș, *Amino Acids Levels of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Plasma During Spring – Summer Seasons*, Bulletin of UASVM, Agriculture, vol.67(1-2)132-136, 2010, ISSN 1843-5262, Electronic ISSN 1843-536X.
2. Daniel Cocan, **Elena Horj**, Monica Culea, Vioara Mireșan, Adela Pinteș, *Variation of Free Fatty Acid in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Plasma During Spring – Summer Seasons*, Bulletin of UASVM, Agriculture, vol.67(1-2)137-141, 2010, ISSN 1843-5262, Electronic ISSN 1843-536X.
3. Codrean Pop, Levente Bara, **Elena Horj**, Andreea Iordache, Cornel Laslo, Monica Culea, *Determination of free fatty acids in sausage meat*, Bulletin of UASVM, Agriculture, vol.67(2)373-377, 2010, ISSN 1843-5246, Electronic ISSN 1843-5386.
4. Levente Bara, Codrean Pop, **Elena Horj**, Andreea Iordache, Cornel Laslo, Monica Culea, *Amino acids determination in meat by GC-MS*, Bulletin of UASVM, Cluj-Napoca, Agriculture, vol.67(2)162-167, 2010, ISSN 1843-5246, Electronic ISSN 1843-5386.
5. Andreea Iordache, **Elena Horj**, Alina Rodica Ani, Cornelia Mesaros, Simina Morar, Monica Culea, *Fatty Acids Profile in Fish Plasma*, Analele Universității de Vest, Timișoara, seria FIZICA, LIV, p. 55-61, 2010.
6. **Elena Horj**, Andreea-Maria Iordache, Monica Culea, *Method validation for free amino acids determination in biological samples*, STUDIA UNIVERSITATIS BABES BOLYAI. PHYSICA, LV, 2, p. 61 – 68, 2010.
7. Diana Florescu, Andreea Iordache, Claudia Șandru, **Elena Horj**, Roxana Ionete, Monica Culea, *Heavy Metals Concentration in Contaminated Soils from Southern Part of Romania*, Bulletin UASVM Agriculture, 68(2) 160, 2011, ISSN 1843-5246; Electronic ISSN 1843-5386.