

Спектрофотометрическое определение фенилаланина в водных растворах различной кислотности

*В. И. Васильева, А. М. Сауд

Воронежский государственный университет,
Российская Федерация, 394018, г. Воронеж, Университетская площадь, 1

*Адрес для переписки: Васильева Вера Ивановна, E-mail: viv155@mail.ru

Поступила в редакцию 8 июля 2021 г., после доработки 10 октября 2022 г.

Разработан способ определения фенилаланина в водных растворах различной кислотности спектрофотометрическим методом без предварительной коррекции pH растворов и применения вспомогательных химических реагентов. Проведен сравнительный анализ результатов спектрофотометрического определения фенилаланина при варьировании кислотности среды, проанализированы погрешности и возможность их минимизации. Показано, что аналитический сигнал и результаты определения аминокислоты в растворах с различным pH значительно различаются вследствие нахождения фенилаланина в разных ионных формах, отличающихся величиной молярного коэффициента поглощения. Установлено, что максимальная величина молярного коэффициента поглощения падает в ряду $\epsilon(\text{Phe}^-) > \epsilon(\text{Phe}^+) > \epsilon(\text{Phe}^0)$ на 20 %. Максимальная погрешность определения фенилаланина без учёта зависимости оптической плотности раствора от кислотности среды найдена в сильнощелочных растворах. Экспериментально получены корреляционные зависимости аналитической длины волны и молярного коэффициента поглощения фенилаланина от показателя pH среды. Установлен длинноволновый (батохромный) сдвиг максимума полосы поглощения при переходе от положительного к отрицательному заряду фенилаланина с ростом величины pH раствора. Выявлены два диапазона величин pH, в которых изменение кислотности растворов не вызывает спектральных изменений. Это область преимущественного нахождения аминокислоты в катионной Phe^+ и биполярной Phe^0 формах (pH < 8) и область анионной Phe^- (pH > 10) формы. Приведены регрессионные уравнения, позволяющие сделать выбор аналитической длины волны при любой произвольной величине pH раствора. Преимуществом разработанного способа определения аминокислоты без коррекции величины pH в растворах являются возможность повышения чувствительности и обеспечение относительной погрешности определения менее 0.5 % при коэффициенте вариации не более 0.3 %. Предел обнаружения аминокислоты, рассчитанный по 3s-критерию, составляет $(1.4-1.6) \cdot 10^{-5}$ М. Диапазон определяемых содержаний фенилаланина находится в интервале $(0.5-5.3) \cdot 10^{-3}$ М. Показана эффективность предложенного способа для определения фенилаланина в образце препарата «L-Фенилаланин» (Protein Company, Россия) методом добавок. Доказана возможность минимизации погрешности определения аминокислоты при применении разработанного способа для контроля содержания компонентов в процессе деминерализации водно-солевых растворов фенилаланина методом электродиализа с экспериментальными мембранами.

Ключевые слова: спектрофотометрия; фенилаланин; кислотность среды; спектры поглощения.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2022, vol. 26, no. 3, pp. 222-234

DOI: 10.15826/analitika.2022.26.3.003

Spectrophotometric determination of phenylalanine in aqueous solutions with different acidity

*V.I. Vasil'eva, A.M. Saud

Voronezh State University,
Universitetskaya pl., ul. 1, Voronezh, 394018, Russian Federation

*Address for correspondence: Vasil'eva Vera Ivanovna, E-mail: viv155@mail.ru

Submitted 8 July 2022, received in revised form 10 October 2022

A method for the determination of phenylalanine using the spectrophotometric method without preliminary correction of the solutions pH and the use of auxiliary chemical reagents has been developed. A comparative analysis of the spectrophotometric determination of phenylalanine by varying acidity of the medium was carried out. The errors and the possibility of their minimization were analyzed. It was shown that the analytical signal and the results of amino acid determination in the solutions with different pH differ significantly due to the presence of phenylalanine in various ionic forms that vary in the magnitude of the molar absorption coefficient. It was found that the maximum value of the molar absorption coefficient decreases in the series $\epsilon(\text{Phe}^-) > \epsilon(\text{Phe}^+) > \epsilon(\text{Phe}^{\pm})$ by 20%. The maximum error in determining the phenylalanine concentration without taking into account the dependence of the optical density of the solution on the acidity of the medium was found in strongly alkaline solutions. The correlation dependences of the analytical wavelength and molar absorption coefficient of phenylalanine on the pH of the medium were obtained experimentally. A long-wavelength (bathochromic) shift of the absorption band maximum was established upon the transition from positive to negative charge of the phenylalanine molecule with increasing pH of the solution. Two ranges of pH values have been identified, in which a change in the acidity of the solutions did not cause spectral changes. These were the regions where the amino acid was predominantly found in cationic Phe^+ and bipolar Phe^{\pm} forms (pH < 8) and in the region of anionic Phe^- (pH > 10) form. The regression equations that allow choosing the analytical wavelength at any arbitrary pH of the solution were presented. The advantage of the developed approach is the possibility of increasing the detection sensitivity and ensuring that the error in the amino acid determination in the solutions of arbitrary acidity is less than 0.5% with the variation of no more than 0.3%. The detection limit of amino acid, calculated by 3σ – test, is $(1.4 - 1.6) \times 10^{-5}$ M. The range of the determined phenylalanine contents is $(0.5 - 5.3) \times 10^{-3}$ M. The efficiency of the proposed approach for determining the content of phenylalanine in a sample of the “L-Phenylalanine” (Protein Company, Russia) drug by the method of standard addition was shown. The possibility of minimizing the error in determining the amino acid when applying the technique to control the content of components in the process of demineralization of water-salt solutions of phenylalanine by electrodialysis with experimental membranes has been proven.

Keywords: spectrophotometry; phenylalanine; medium acidity; absorption spectra.

ВВЕДЕНИЕ

Ароматические аминокислоты обладают ценными биологическими свойствами, входят в состав фармацевтических препаратов, пищевых добавок и продуктов питания [1]. В литературе известны методы титриметрического [2], хроматографического [3], спектроскопического [4, 5] и электрохимического [6–8] определения аминокислот. Фармакопейное определение ароматических аминокислот основано на измерении флуоресценции [9]. Флуориметрия считается одним из наиболее чувствительных методов определения аминокислот, который более чем в десять раз чувствительнее абсорбционной спектрофотометрии [10]. Этот метод применяют для определения аминокислот в биологических жидкостях [11, 12], плазме человеческой крови [13], в фармацевтических препаратах [14] и пищевых продуктах [15]. Однако, с целью повышения чувствительности определения необходимо проводить дериватизацию аминокислот для получения сильно флуоресцирующих производных, например, замещённых изоиндолов [16]. В работе [17] предложен иммуноферментный метод для количественного определения L-фенилаланина. Преимуществами этого метода являются большая точность и свойство моноклональных антител связывать целевые молекулы с высоким сродством и специфичностью. Существенным недостатком определения фенилаланина этим методом является длительность процесса, требующего использования предварительно дериватизированного образца. Кроме того, для определения массовой доли аминокислот используют метод капиллярного электрофореза [18].

Стандарт [19] позволяет определить этим методом общее содержание (свободные и связанные формы в сумме) аминокислот в диапазоне от 0.25 до 10 %. Процедура пробоподготовки является достаточно трудоёмкой и заключается в переводе аминокислот в форму фенилизотиокарбамильных производных. Экспрессный метод капиллярного электрофореза аминокислот [20] основан на разделении ионных форм аминокислот под действием электрического поля и измерении поглощения в УФ-области.

Недостатками известных методов определения аминокислот являются длительность приготовления рабочих растворов (титриметрия), токсичность (потенциометрическое титрование в неводной среде), дорогостоящее оборудование (хроматография), необходимость предварительного продолжительного процесса дериватизации (иммуноферментный метод) и перевода аминокислоты в определяемые флуоресцирующие или окрашенные производные (фотометрия и флуориметрия).

Наиболее предпочтительным методом исследования и количественного определения ароматических и гетероциклических аминокислот является спектрофотометрический метод по характеристическим длинам волн индивидуальных аминокислот [21–27]. К структурным особенностям таких аминокислот, как фенилаланин, тирозин и триптофан относится наличие бензольного кольца. Для спектра поглощения бензола характерно наличие трёх полос поглощения при 180, 203 и 256 нм [28]. Для ароматических аминокислот эти полосы в спектрах не очень значительно изменяют положение и интенсивность. В работе [29] показано, что максимальное поглощение для водного раствора фенилаланина характерно

при 191, 205 и 257 нм, а для тирозина установлено наличие полос поглощения при 193, 222 и 274 нм. В спектрах поглощения водных растворов триптофана присутствуют слабые полосы поглощения при 196 и 279 нм и интенсивная полоса поглощения с максимумом 219 нм. Достоинствами спектрофотометрического метода определения аминокислот являются высокая чувствительность, экспрессность, незначительное количество исследуемого вещества и его сохранение в процессе анализа. Чувствительный спектрофотометрический метод целесообразно применять при анализе аминокислот, когда содержание определяемого компонента не превышает 1 %.

Особая структура сольватированной аминокислоты очень чувствительна к показателю pH среды, влияющему на биологическую активность [1]. Поэтому важнейшими характеристиками, влияющими на спектрофотометрическое определение аминокислот в водном растворе, являются pH раствора, концентрация и время установления равновесия при растворении амфолита [29–32]. Диапазон величин $6 < \text{pH} < 11$ оптимален для разделения и выделения ароматических и гетероциклических аминокислот сорбционными и мембранными методами [33]. Поэтому большой интерес представляет разработка и применение методик спектрофотометрического определения аминокислот в нейтральных и щелочных растворах [21, 22]. Однако, в большинстве методик спектрофотометрического определения ароматических аминокислот [24, 29] содержатся упоминания и приводятся не систематизированные экспериментальные данные о влиянии кислотности растворов на результаты определения. Общим недостатком является отсутствие конкретных рекомендаций по выбору рабочей длины волны и анализа погрешностей, возникающих при варьировании pH анализируемых растворов, не указаны возможности минимизации погрешностей определений. В различных вариантах метода спектрофотометрии в ультрафиолетовой области для построения градуировочных зависимостей обычно применяют модельные водные растворы аминокислот при нейтральных значениях pH, что требует предварительной пробоподготовки анализируемых объектов.

Таким образом, исследование и выявление оптимальных условий спектрофотометрического определения ароматических аминокислот в различных объектах в широком интервале величин pH растворов является актуальной практической задачей. В данной работе представлены результаты разработанного способа спектрофотометрического определения фенилаланина в водных растворах различной кислотности, в том числе в фармацевтических препаратах и технологических растворах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты, растворы, аппаратура

В качестве объектов исследования были выбраны модельные водные растворы фенилаланина в диапазоне pH от 0.2 до 13.5. Растворы готовили растворением в дистиллированной воде точной навески препарата аминокислоты производства фирмы Sigma-Aldrich, (США) с содержанием фенилаланина 99.77 %. Серия растворов в широком диапазоне pH была получена с использованием смеси растворов соляной кислоты и гидроксида натрия. Все дополнительные реактивы имели квалификацию х.ч. или ч.д.а. и применялись без дополнительной очистки.

Спектр поглощения и оптическую плотность (A) растворов фенилаланина измеряли с помощью спектрофотометра СФ–2000 (Россия). Измерения проводили в интервале длин волн 200–400 нм в кварцевой кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см. Согласно основным техническим данным и характеристикам спектрофотометра СФ–2000 в диапазоне длин волн 190–390 нм пределы допускаемого значения абсолютной погрешности установки длины волны составляют ± 0.4 нм. Практически доступное минимальное числовое значение шага сканирования составляет 0.1 нм.

При изучении влияния pH на спектр поглощения фенилаланина использован модельный раствор аминокислоты с концентрацией $2.0 \cdot 10^{-3}$ М. Для контроля за кислотностью растворов использовали стеклянный электрод ЭСП-63-07 в паре с хлоридсеребряным электродом сравнения ЭВЛ-1МЗ. Измерения проводили на лабораторном иономере И-160МИ (Россия) с точностью ± 0.05 ед. pH, откалиброванным по стандартным буферным растворам. Стабильность во времени свежеприготовленных растворов аминокислоты контролировали изменением через определённые промежутки времени при температуре 20 ± 1 °C величины оптической плотности растворов концентрации $3.0 \cdot 10^{-3}$ М для разных pH и длин волн.

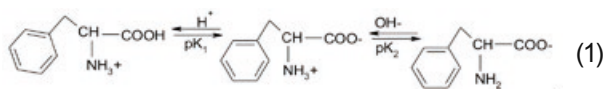
Для построения градуировочных зависимостей использовали растворы в диапазоне концентраций $(0.05–5.0) \cdot 10^{-3}$ М, приготовленные растворением точной навески аминокислоты в дистиллированной воде. Оценку линейности градуировочных графиков или функциональных зависимостей типа $y = a + bx$ для других измеряемых величин проводили на основе вычисления коэффициентов корреляции r и их значимости [34]. Расчёт коэффициентов регрессионных уравнений с одновременной оценкой их доверительного интервала проводили с использованием алгоритма Гаусса [34, 35]. Доверительные интервалы для величин коэффициентов a и b вычисляли по формулам $\Delta a = \pm t(P, f = n - 2) \cdot S_a$ и $\Delta b = \pm t(P, f = n - 2) \cdot S_b$ при доверительной вероятности $P = 0.95$ и числе точек n , взятых для построения соответствующей зависимости. Дисперсии S_a^2 и S_b^2 , характеризующие погрешность определения величин

a и *b*, находили с учётом остаточной дисперсии S_0^2 , определяющей рассеяние экспериментальных величин относительно прямой. Статистическую оценку значимости различия характеристик градуировочных графиков для растворов фенилаланина различной кислотности проводили по *t*-тесту (распределение Стьюдента) при $P = 0.95$ [35]. Значения предела обнаружения C_{min} рассчитали согласно ИЮПАК по 3s-критерию [34].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние pH на спектр поглощения водных растворов фенилаланина

Фенилаланин (α -амино- β -фенилпропионовая кислота) представляет собой монозамещенное производное бензола. Наличие основной и кислотной ионогенных групп в составе молекулы аминокислоты позволяет рассматривать фенилаланин с точки зрения электролитических свойств, как амфотерное соединение. В зависимости от pH раствора фенилаланин существует в различных ионных формах [29, 36]. Существует значение pH (изоэлектрическая точка $pI = 5.9$), при котором фенилаланин существует в максимальном количестве в виде биполярных ионов. В кислой среде аминокислота ведет себя как основание с константой диссоциации сопряженной кислоты $K_2(\alpha-NH_2) = 8.13 \cdot 10^{-10}$ и заряжается положительно, а в щелочной – как кислота с константой диссоциации $K_1(\alpha-COOH) = 2.63 \cdot 10^{-3}$ и заряжается отрицательно:



Спектр поглощения фенилаланина в ультрафиолетовой области обусловлен системой делокализованных π -электронов хромофора бензольного кольца. Система полос поглощения в ближней ультрафиолетовой области возникает вследствие одного $\pi \rightarrow \pi^*$ перехода с хорошо разрешенной колебательной структуры [27]. Максимальное значение оптической плотности и более широкая полоса поглощения в нейтральных растворах фенилаланина соответствует длине волны $\lambda_{max} = 259$ нм (рис. 1).

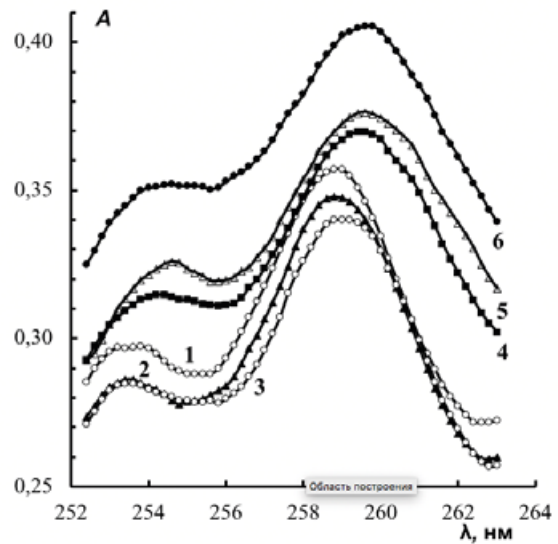


Рис. 1. Зависимость положения и интенсивности полос поглощения от pH раствора фенилаланина концентрации $2.0 \cdot 10^{-3}$ М. Значения pH: 0.5 (1), 2.0 (2), 6.8 (3), 10.0 (4), 11.3 (5), 13.0 (6).

Fig. 1. Dependence of the position and the intensity of absorption bands on the pH of the phenylalanine solution at the concentration $2.0 \cdot 10^{-3}$ M. pH: 0.5 (1), 2.0 (2), 6.8 (3), 10.0 (4), 11.3 (5), 13.0 (6).

Установлено, что перераспределение содержания ионных форм фенилаланина согласно (1) при изменении величины pH водного раствора проявляется в спектральных характеристиках (табл. 1). Концентрации различных ионных форм фенилаланина в водном растворе с различными pH рассчитывали с использованием уравнений материального баланса и соответствующих констант диссоциации. Спектры поглощения при различной кислотности растворов представляют собой серию кривых, отличающихся как высотой, так и положением максимумов поглощения (рис. 1). Сравнительный анализ распределения содержания ионных форм фенилаланина и зависимости максимума полосы поглощения λ_{max} от значений величины pH в водном растворе представлен на рис. 2. Установлен длинноволновый сдвиг максимума полосы поглощения при переходе от положительного к отрицательному заряду фенилаланина с ростом величины pH рас-

Таблица 1

Влияние pH на характеристики спектров поглощения водных растворов фенилаланина в УФ-области

Table 1

Influence of pH on the characteristics of the absorption spectra of phenylalanine aqueous solutions in the UV region

pH раствора	Доля различных ионных форм, α			λ_{max} , нм	$\Delta\lambda_{max}$, нм	ϵ_{max} , $M^{-1} cm^{-1}$	$\Delta\epsilon_{max}$, $M^{-1} cm^{-1}$
	Phe ⁺	Phe [±]	Phe ⁻				
0.5	0.992	0.008	0	258.8	0.2	178.0	8.0
6.8	0	0.995	0.005	259.0	0	170.0	0
13.5	0	0.0001	0.9999	259.6	0.6	202.1	32.1

Примечания: λ_{max} – положение максимума, $\Delta\lambda_{max}$ – спектральный сдвиг, ϵ_{max} – молярный коэффициент поглощения при λ_{max} , $\Delta\epsilon_{max}$ – изменение молярного коэффициента поглощения.

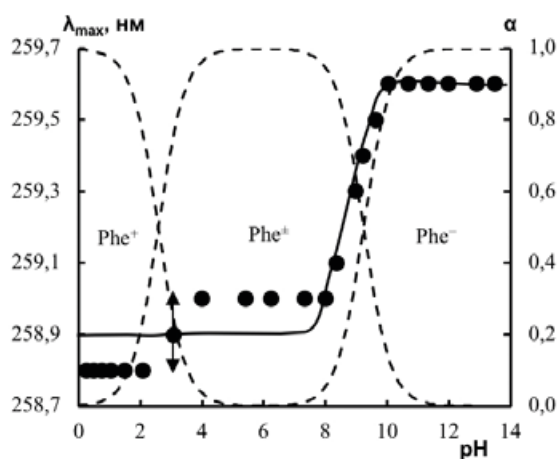


Рис. 2. Зависимость максимума полосы поглощения λ_{\max} и распределения ионных форм фенилаланина (штриховая линия) от значения pH раствора при концентрации аминокислоты $C(\text{Phe}) = 2.0 \cdot 10^{-3}$ М.

Fig. 2. Dependence of the absorption band maximum λ_{\max} and the distribution of ionic forms of phenylalanine (dashed line) on the pH of the solution at the amino acid concentration $C(\text{Phe}) = 2.0 \cdot 10^{-3}$ M.

твора. В работах [21, 22] отмечено, что в диапазоне $7 < \text{pH} < 11$ максимум поглощения фенилаланина соответствует 257 нм и при изменении pH смещения максимума не происходит. Нами первоначально выявлены три диапазона pH, в которых изменение кислотности растворов не вызывает спектральных изменений. Это области преимущественного нахождения аминокислоты в катионной Phe^+ ($\text{pH} < 2$), биполярной Phe^\pm ($4 < \text{pH} < 8$) и анионной Phe^- ($\text{pH} > 10$) формах. Однако, депротонизация карбоксильной группы при переходе от катионной к биполярной форме нахождения фенилаланина в растворе вызывает сдвиг $\Delta\lambda_{\max}(\text{COOH})$ всего лишь на 0.2 нм. В соответствии с техническими характеристиками спектрофотометра данная величина является статистически незначимой. Более значительное изменение в спектре поглощения фенилаланина установлено при депротонизации аминогруппы и образовании анионной формы аминокислоты. Диссоциация аминогруппы приводит к уширению максимума поглощения со сдвигом в длинноволновую область $\Delta\lambda_{\max}(\text{NH}_3^+)$ на 0.6 нм по сравнению с длиной волны максимального поглощения биполярной формы фенилаланина.

Известно, что спектральные изменения вследствие внутримолекулярных взаимодействий при ионизации amino- и карбоксильной групп аминокислот не являются результатом прямого влияния заряда на дипольный момент перехода [27]. Так как электронные спектры молекулы характеризует изменение электронного распределения, то влияние на спектральные характеристики фенилаланина определяется индуктивным эффектом и эффектом сопряжения. Вероятной причиной является индуктивный эффект, заключающийся в

смещении электронной плотности на бензольном кольце вследствие внутримолекулярных взаимодействий при ионизации amino- и карбоксильной групп фенилаланина. Катионной форме фенилаланина соответствует минимальная электронная плотность на бензольном кольце, а анионной форме – максимальная электронная плотность.

Спектральные изменения являются также следствием универсальных (ван-дер-ваальсовых) и специфических (донорно-акцепторных) межмолекулярных взаимодействий в растворах аминокислоты. В работах [37, 38] доказано образование в растворах фенилаланина ассоциатов за счет водородных и дисперсионных связей, а также межплоскостного взаимодействия (стэкинг-эффект) ароматических колец. В результате этих взаимодействий изменяются реологические и, соответственно, спектральные свойства растворов органических веществ [38, 39]. Процессы межчастичных взаимодействий, обусловленные особенностями строения ароматической аминокислоты, более интенсивно протекают в кислых и щелочных средах [40]. По мнению авторов [41], объяснение длинноволнового сдвига следует также искать в увеличении степени самоассоциации воды под воздействием неполярных групп аминокислот.

Кислотность среды определяет не только спектральный сдвиг, но и изменение интенсивности спектра поглощения в растворах аминокислоты. На рис. 3 представлена зависимость молярного коэффициента поглощения от показателя pH водного раствора фенилаланина при длине волны 259 нм,

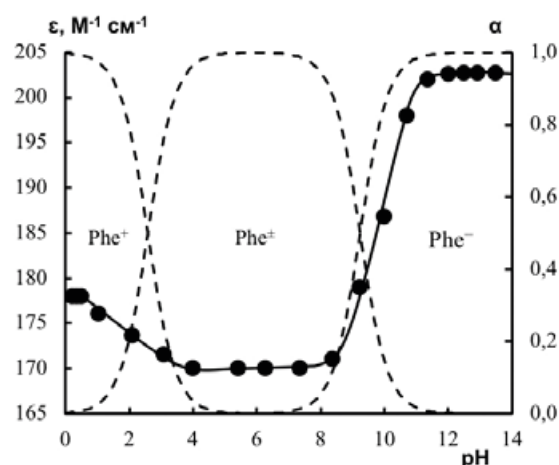


Рис. 3. Влияние кислотности раствора на молярный коэффициент поглощения и распределение ионных форм фенилаланина (штриховая линия) при концентрации $C(\text{Phe}) = 2.0 \cdot 10^{-3}$ М и длине волны $\lambda_{\max} = 259$ нм, отвечающей максимуму полосы поглощения биполярной формы аминокислоты.

Fig. 3. Effect of the solution acidity on the molar absorption coefficient and the distribution of the ionic forms of phenylalanine (dashed line) at the concentration $C(\text{Phe}) = 2.0 \cdot 10^{-3}$ M and the wavelength $\lambda_{\max} = 259$ nm, which corresponds to the absorption band maximum of the bipolar form of the amino acid.

соответствующей максимальному поглощению его биполярной формы.

В сильнокислых растворах при $\text{pH} < 0.5$ фенилаланин практически полностью находится в форме катиона Phe^+ и характеризуется постоянным значением величины молярного коэффициента поглощения $\epsilon(\text{Phe}^+) = 178.0 \pm 1.7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Непостоянство величины ϵ по мере дальнейшего роста pH свидетельствует о том, что в условиях варьирования кислотности среды $2.0 < \text{pH} < 4.0$ основной закон светопоглощения в растворах аминокислоты не соблюдается. Причина связана со смещением химического равновесия по реакции (1). Увеличивается степень ионизации карбоксильной группы и в растворе нарастает содержание биполярного иона Phe^\pm . Раствор в своем составе содержит в равновесии смесь катионной и биполярной форм фенилаланина, поэтому характеризуется различными величинами ϵ_{pH} в зависимости от их соотношения. Речь идет об условной величине молярного коэффициента поглощения, т.е. ϵ рассматривается как усредненная величина для всех форм фенилаланина в равновесном состоянии при различных pH водных растворов. С ростом pH вклад в суммарное поглощение аминокислоты молярного коэффициента поглощения катионов $\epsilon(\text{Phe}^+)$ уменьшается и достигает минимума при полном переходе фенилаланина в биполярную форму. При дальнейшем возрастании pH значению молярного коэффициента поглощения (рис. 3) соответствует горизонтальный прямолинейный участок постоянной величины $\epsilon(\text{Phe}^\pm) = 170.0 \pm 0.8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ вследствие постоянства концентрации биполярной формы аминокислоты. Участок крутого подъема кривой зависимости ϵ_{pH} в диапазоне $8 < \text{pH} < 11$ отвечает области возрастания содержания в растворе анионной формы фенилаланина Phe^- . В области высоких pH горизонтальный участок $\epsilon(\text{Phe}^-) = 202.1 \pm 1.3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ соответствует практически полному нахождению аминокислоты в анионной форме. Анализ представленных на рис. 3 результатов показал, что максимальная величина молярного коэффициента поглощения падает в ряду $\epsilon(\text{Phe}^-) > \epsilon(\text{Phe}^\pm) > \epsilon(\text{Phe}^+)$. При этом величина эффекта депротонизации аминогруппы на величину молярного коэффициента поглощения в четыре раза больше по сравнению с депротонизацией карбоксильной группы. Полученный результат согласуется с величинами, установленными экспериментально в работе [42] для ароматических аминокислот.

Определение времени установления равновесия после растворения фенилаланина при разных pH показано на рис. 4. В области нейтральных значений pH равновесие устанавливается в течение 4 ч с момента приготовления раствора. В сильнокислых и сильнощелочных средах установление равновесия во времени наблюдается спустя 9–10 часов. Следует отметить, что увеличение молярного коэффициента поглощения свежеприготовленных растворов фенилаланина не превышает удвоен-

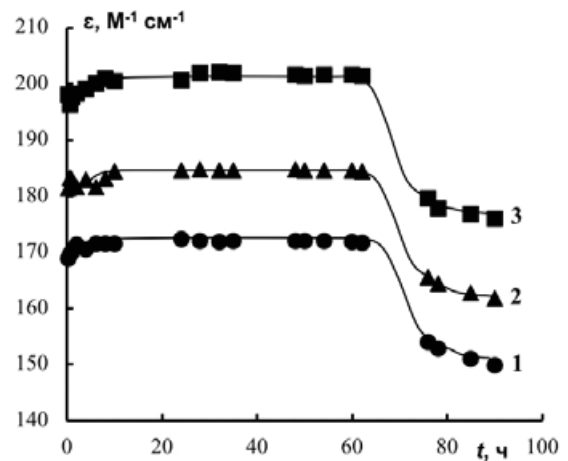


Рис. 4. Кинетические зависимости молярного коэффициента поглощения свежеприготовленных растворов фенилаланина концентрации $C(\text{Phe}) = 3.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ при pH 6.8 (1), 0.5 (2), 13.0 (3) и длинах волн 259.0 (1), 258.8 (2), 259.6 (3) нм.

Fig. 4. Kinetic dependences of the molar absorption coefficient of freshly prepared solutions of phenylalanine with concentration $C(\text{Phe}) = 3.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ at pH 6.8 (1), 0.5 (2), 13.0 (3) and wavelengths 259.0 (1), 258.8 (2), 259.6 (3) nm.

ную минимальную величину 1.76 % относительной погрешности спектрофотометрических измерений оптической плотности [43]. Хранение раствора более пяти суток вызывает значительное уменьшение молярного коэффициента поглощения. Поэтому наиболее целесообразно измерения оптической плотности проводить не позднее установленного времени.

Выбор аналитической длины волны

Если молекулярная и ионизированная формы вещества имеют различные спектральные характеристики, то определение его аналитической концентрации в растворах с различной или неизвестной кислотностью обычно проводят при длине волны изобестической точки $\lambda_{\text{ит}}$ [43]. Установление величины $\lambda_{\text{ит}}$ представляет трудоёмкую задачу, так как требует постоянства величин температуры и ионной силы растворов. Согласно протолитическому равновесию (1) растворы фенилаланина с разным pH характеризуются двумя изобестическими точками в кислой и щелочной среде соответственно. Нахождение их положения затруднено тем, что наблюдаемые в эксперименте эффекты в спектрах поглощения малы по абсолютной величине (рис. 1).

Экспериментальные данные по исследованию влияния кислотности растворов на максимум полосы поглощения фенилаланина представлены на рис. 2. Установлена общая тенденция роста величины λ_{max} с увеличением pH растворов аминокислоты. Выявлена область значимой чувствительности спектров поглощения фенилаланина к изменению

Таблица 2

Параметры линейной регрессии $\lambda_{\max} = a + b \cdot \text{pH}$ в растворах фенилаланина при различных значениях pH

Table 2

Linear regression parameters $\lambda_{\max} = a + b \cdot \text{pH}$ in phenylalanine solutions at various pH values

Значение pH раствора	$a \pm \Delta a$, нм	$b \pm \Delta b$, нм	$r < r_{\text{табл.}} (P, f=n-2)$
0.2 – 8.0	258.9 ± 0.1	0	–
8.0 – 10.0	256.6 ± 0.3	0.30 ± 0.03	$0.996 < 0.811 (0.95, 4)$
10.0 – 13.5	259.6 ± 0.1	0	–

pH в щелочной ($8.0 < \text{pH} < 10.0$) области, что связано с ионизацией аминогруппы. Установлена линейная корреляция между длиной волны максимума поглощения λ_{\max} и величиной pH для растворов, содержащих различные соотношения биполярной и ионизированных форм фенилаланина (табл. 2). Вычисление значения коэффициента корреляции r и сравнение его с табличной величиной $r_{\text{табл.}} (P, f = n - 2)$ позволяют сделать вывод, что зависимость λ_{\max} от величин pH является высокорелированной линейной функцией для интервала $8.0 < \text{pH} < 10.0$.

Полученные уравнения регрессии позволяют определить аналитическую длину волны λ_{\max} , соответствующую максимуму спектра поглощения фенилаланина, при любой произвольной величине pH раствора. Это дает возможность повышения правильности и чувствительности проведения прямых спектрофотометрических определений фенилаланина в водных растворах.

Выбор уравнения градуировочной зависимости

Установлено, что зависимость оптической плотности от концентрации фенилаланина согласуется с линейным характером закона светопоглощения в растворах с показателями pH, соответствующими преимущественному содержанию одной из форм Phe^+ , Phe^{\pm} , Phe^- аминокислоты. Метрологические характеристики градуировочных зависимостей при длинах волн, отвечающих максимуму полосы поглощения, представлены в табл. 3. Показано, что при определении аминокислоты в растворах, содержащих ионизированные формы Phe^+ и Phe^- компонента, чувствительность определения больше, чем в нейтральных растворах, соответствующих её нахождению в биполярной форме Phe^{\pm} . Результаты оценки значимости различия тангенсов углов наклона градуировочных кривых, определяющих чувствительность метода при соблюдении основного закона светопоглощения, выявили их статистически значимый характер (табл. 4). Установлено значитель-

Таблица 3

Влияние кислотности среды на параметры градуировочной зависимости спектрофотометрического определения фенилаланина ($P = 0.95, n = 6$)

Table 3

Influence of the acidity of the medium on the calibration dependence parameters of the spectrophotometric determination of phenylalanine ($P = 0.95, n = 6$)

pH раствора	λ_{\max} , нм	Уравнение градуировочной зависимости	r	ДОС, 10^{-3} М	C_{\min} , 10^{-5} М
0.2 – 0.5	258.9	$A = (178.0 \pm 1.7) C(\text{Phe}^+)$	0.999	0.56 – 5.10	1.5
4.0 – 8.0	258.9	$A = (170.0 \pm 0.8) C(\text{Phe}^{\pm})$	0.999	0.59 – 5.30	1.6
11.0 – 13.5	259.6	$A = (202.1 \pm 1.3) C(\text{Phe}^-)$	0.999	0.49 – 4.50	1.4

Примечания: здесь и далее r – коэффициент корреляции градуировочной зависимости; ДОС – диапазон определяемых содержаний; C_{\min} – предел обнаружения, рассчитанный по $3s$ – критерию.

Таблица 4

Результаты статистической оценки значимости различия молярных коэффициентов поглощения в растворах различной кислотности ($P = 0.95, n = 14$)

Table 4

Statistical evaluation results of difference significance in the molar absorption coefficients in solutions of various acidity ($P = 0.95, n = 14$)

pH раствора	ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$S_g^2, 10^{-5}$	S_d^2, M^{-2}	$t_{\text{экс}}$
0.2 – 0.5	178.0 ± 1.7	2.89	1.64	7.11
11.0 – 13.5	202.1 ± 1.3	1.28	0.72	31.80

Примечание: Результаты получены по сравнению с $\epsilon = 170.0 \pm 0.8 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ при $\text{pH} = 4.0 - 8.0$. S_g^2 – общая дисперсия; S_d^2 – дисперсия разности молярных коэффициентов поглощения. Теоретическое значение $t_{\text{табл.}} = 2.18 (P = 0.95, n = 14)$

Таблица 5

Оценка линейной корреляции $\varepsilon = a + b \cdot \text{pH}$ между молярным коэффициентом поглощения ε и pH водных растворов фенилаланина ($P = 0.95, n = 5$)

Table 5

Estimation of the linear correlation $\varepsilon = a + b \cdot \text{pH}$ between the molar absorption coefficient ε and pH of aqueous phenylalanine solutions ($P = 0.95, n = 5$)

pH	Параметры		
	$a \pm \Delta a, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$b \pm \Delta b, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	r
0.2 – 0.5	178.0 ± 1.7	0	–
0.5 – 4.0	178.6 ± 1.5	-2.2 ± 0.6	0.996
4.0 – 8.0	170.0 ± 0.8	0	–
8.0 – 11.0	83.3 ± 1.4	10.4 ± 0.2	0.997
11.0 – 13.5	202.1 ± 1.3	0	–

ное превышение рассчитанной по экспериментальным данным величины коэффициента Стьюдента $t_{\text{экс}}(P, f = n - 2)$ над табличным значением $t_{\text{табл}}(P, f = n - 2)$ в сильнокислой и сильнощелочной средах по сравнению с нейтральной. Наименьший предел обнаружения $C_{\text{мин}}$ установлен при проведении анализа в щелочной среде. Установлено, что зависимость оптической плотности от концентрации фенилаланина имела линейный характер во всем исследованном диапазоне концентраций градуировочных растворов. Линейность зависимости оптической плотности от концентрации нарушается при концентрации фенилаланина выше 0.01 M. Оптимальный диапазон определяемых содержаний указан для интервала оптической плотности $0.12 \leq A \leq 0.9$, как соответствующего минимальной систематической ошибке спектрофотометрического анализа [43].

В диапазонах $0.5 < \text{pH} < 4.0$ и $8.0 < \text{pH} < 11.0$ доказана линейная корреляция между значением pH раствора и величиной молярного коэффициента поглощения аминокислоты (рис. 3). Коэффициенты соответствующих уравнений регрессии в широком диапазоне pH приведены в табл. 5.

На основании проведенных исследований предложен способ спектрофотометрического определения аминокислоты в водных растворах различной кислотности, применение которого возможно для анализа растворов ароматических (фенилаланин, тирозин) и гетероциклических (триптофан, пролин, гистидин) аминокислот, обладающих УФ-спектром поглощения. Разработанный способ включает следующие предварительные этапы:

1. получение регрессионных уравнений зависимости аналитической длины волны λ_{max} от величины pH раствора на основе анализа экспериментально измеренных спектров поглощения растворов анализируемой аминокислоты в широком диапазоне кислотности;
2. нахождение функциональных зависимостей молярного коэффициента поглощения ε от величины pH раствора аминокислоты на основе спектрофотометрических измерений серии градуировочных растворов, содержащих различные соотношения биполярной и ионизированных форм аминокислоты.

Определение интервала линейности для зависимости аналитического сигнала от концентрации аминокислоты.

Для определения содержания аминокислоты в анализируемом растворе осуществляют выбор аналитической длины волны и вида градуировочного графика на основании pH-метрических измерений. Концентрацию аминокислоты находят методом градуировочного графика или методом молярного коэффициента поглощения по результатам спектрофотометрического измерения в диапазоне линейной концентрационной зависимости аналитического сигнала для выбранных условий анализа.

Результаты определения фенилаланина в порошке лекарственного препарата «L-Фенилаланин» (Protein Company, Россия) в условиях внутрилабораторной прецизионности с помощью разработанного способа и традиционной методики без учёта влияния кислотности среды [21] представлены в табл. 6. Для оценки случайной и систематической составляющих погрешности результатов анализа использован алгоритм, рекомендованный в [34]. На первом этапе метрологических исследований была проведена оценка случайной составляющей погрешности по большому числу измерений, так как обычно рекомендуемое число степеней свободы для дисперсии внутрилабораторной прецизионности результатов анализа должно быть не менее 30. Оценка внутрилабораторной прецизионности определена с помощью $M = 16$ групп рабочих проб анализируемого раствора, отражающих ширину диапазона варьирования величины pH. Для каждой пробы получено по $L = 4$ независимых результатов анализа с числом единичных измерений каждого $N = 2$. Все пробы первоначально разбили на четыре подгруппы и провели оценку наличия выбросов в результатах анализа, проверку однородности дисперсий $S^2_{\text{вп}}$, относящихся к входящим в каждую подгруппу пробам, с помощью критерия Кохрена и однородности средних дисперсий внутрилабораторной прецизионности $\bar{S}^2_{\text{вп}}$ соседних подгрупп с помощью критерия Фишера [34].

При определении фенилаланина по традиционной методике по постоянству абсолютных значений дисперсий внутрилабораторной прецизионности

Таблица 6

Проверка правильности спектрофотометрического анализа лекарственного препарата на содержание фенилаланина методом добавок ($P = 0.95$, $n_1 = n_2 = 8$) при введении 0.1652 г аминокислоты

Table 6

Validation of the spectrophotometric analysis correctness of the drug for phenylalanine content using the method of standard additions ($P = 0.95$, $n_1 = n_2 = 8$) with the introduction of 0.1652 g of amino acid

рН	Традиционная методика		Разработанный способ	
	Найдено, г	δ %	Найдено, г	δ %
0.2	0.1735 ± 0.0024	5.0	0.1650 ± 0.0002	0.1
0.5	0.1735 ± 0.0024	5.0	0.1648 ± 0.0002	0.3
1.0	0.1718 ± 0.0024	4.0	0.1654 ± 0.0002	0.1
2.0	0.1685 ± 0.0014	2.0	0.1645 ± 0.0002	0.4
3.0	0.1654 ± 0.0014	0.12	0.1654 ± 0.0002	0.1
4.0	0.1653 ± 0.0014	0.06	0.1658 ± 0.0002	0.4
5.5	0.1652 ± 0.0014	0.06	0.1658 ± 0.0002	0.4
7.5	0.1653 ± 0.0014	0.06	0.1660 ± 0.0002	0.5
8.5	0.1669 ± 0.0014	1.0	0.1654 ± 0.0002	0.1
9.0	0.1735 ± 0.0105	5.0	0.1660 ± 0.0002	0.5
9.5	0.1800 ± 0.0105	8.9	0.1656 ± 0.0002	0.2
10.0	0.1801 ± 0.0105	9.0	0.1654 ± 0.0002	0.1
11.5	0.1900 ± 0.0105	15.0	0.1654 ± 0.0002	0.1
12.0	0.1966 ± 0.0105	19.0	0.1657 ± 0.0002	0.3
13.0	0.1970 ± 0.0105	19.3	0.1657 ± 0.0002	0.3
13.5	0.1966 ± 0.0105	19.0	0.1659 ± 0.0002	0.4

результатов анализа были выделены три диапазона величин рН: 1) $0.2 < \text{pH} < 1.0$, $\overline{S}_{\text{вп1}}^2 = 9 \cdot 10^{-7} \text{ M}^2$, $f_1 = 9$; 2) $2.0 < \text{pH} < 8.5$, $\overline{S}_{\text{вп2}}^2 = 1.8 \cdot 10^{-6} \text{ M}^2$, $f_2 = 18$; 3) $9.0 < \text{pH} < 13.5$, $\overline{S}_{\text{вп3}}^2 = 9.9 \cdot 10^{-5} \text{ M}^2$, $f_3 = 18$. Число степеней свободы для средних дисперсий в каждой объединенной подгруппе равно $f = M_k \cdot (L - 1)$, где M_k – число проб в подгруппе. Коэффициенты вариации V , рассчитанные с использованием абсолютных отклонений, составили $V_{\text{вп1}} = 0.6 \%$, $V_{\text{вп2}} = 0.8 \%$ и $V_{\text{вп3}} = 5.3 \%$, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что требуется совершенствование используемой традиционной методики анализа, так как установленная неоднородность дисперсий выделенных подгрупп не связана с содержанием аминокислоты в пробе. Аналогичное оценивание внутрилабораторной прецизионности результатов определения фенилаланина с помощью разработанного способа выявило, что средние дисперсии всех четырех подгрупп являются однородными. Величины средней дисперсии и коэффициента вариации для объединенных подгрупп составили соответственно $\overline{S}_{\text{вп}}^2 = 2 \cdot 10^{-7} \text{ M}^2$ и $V_{\text{вп}} = 0.3 \%$ при числе степеней свободы $f = M \cdot (L - 1) = 48$. Полученные величины прецизионности характеризуют случайную погрешность результатов анализа в широком диапазоне рН растворов от 0.2 до 13.5. Систематическую составляющую погрешности результатов анализа оценивали методом добавок проведением по $n_1 = n_2 = 8$ независимых анализов исходной пробы n_1 и пробы с добавкой n_2 . В табл. 6 величина (δ) представляет собой выраженное в процентах отношение разности между найденным (среднее значение) и введённым содержанием до-

бавки к величине введённого значения. Выявлено, что величина добавки не попадает в установленные доверительные границы найденных традиционным методом величин в сильноокислых ($\text{pH} < 3$) и сильнощелочных ($\text{pH} > 8.5$) растворах, что свидетельствует о наличии значимых систематических погрешностей. Представленные в табл. 6 результаты свидетельствуют о правильности и повторяемости результатов, полученных с использованием предлагаемого способа определения фенилаланина в широком диапазоне рН водных растворов. На основании проведенных испытаний установлено, что содержание фенилаланина в порошке фармацевтического препарата составляет $(99.1 \pm 0.3)\%$. Полученный результат практически совпадает с указанной производителем величиной 99 %.

Разработанный способ также был апробирован при анализе проб в процессе электродиализной обработки водно-солевых растворов фенилаланина, имитирующих состав производственных вод в технологии микробиологического синтеза аминокислоты. Рис. 5 демонстрирует результаты определения фенилаланина в процессе электродиализной деминерализации его смешанных с хлоридом натрия растворов. Величина рН модельного смешанного раствора, содержащего аминокислоту (0.05 M) и хлорид натрия (0.01 M), составляла 6.15. Однако, использование экспериментальных мембран с массовой долей анионообменной смолы 65 % с ростом плотности тока вызывает значительное защелачивание раствора в секции концентрирования (кривая 1, рис. 5). Сравнение концентраций фенилаланина, определённых с учётом изменения кислотности

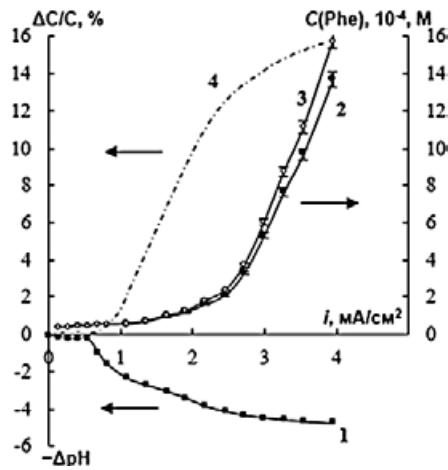


Рис. 5. Зависимости изменения pH (1), концентрации (2, 3) и относительной погрешности определения (4) фенилаланина в пробах секций концентрирования при электродиализе смешанного NaCl + Phe (0.01 + 0.05 M) раствора от плотности тока. Концентрации определены: 2 - по разработанному способу; 3 - по традиционной методике без учёта влияния pH.

Fig. 5. Dependences of the change in pH (1), concentration (2, 3), and the relative error in determining phenylalanine (4) in the samples of concentration sections during electro dialysis of NaCl + Phe (0.01 + 0.05 M) mixed solution on the current density. The concentration of solutions: 2 - according to the developed method; 3 - according to the standard method without taking into account the influence of pH.

растворов (кривая 2, рис. 5) и без учёта влияния pH (кривая 3, рис. 5) выявило с ростом плотности тока увеличение относительной погрешности определения аминокислоты до 16 % (кривая 4, рис. 5). Следует отметить, что процесс защелачивания деминерализуемых водно-солевых растворов нейтральных аминокислот в процессе электродиализа при использовании экспериментальных ионообменных мембран способствует увеличению точности спектрофотометрического определения аминокислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан способ спектрофотометрического определения фенилаланина, заключающийся в учете влияния фактора кислотности среды на положение аналитической длины волны и величину молярного коэффициента поглощения, позволяющий без предварительной коррекции pH анализируемого раствора повысить чувствительность и уменьшить систематическую составляющую погрешности результатов анализа. Обоснован выбор аналитической формы аминокислоты в виде аниона для проведения спектрофотометрического анализа с максимальной чувствительностью и точностью. Установлены незначительные изменения молярного коэффициента поглощения в свежеприготовленных растворах фенилаланина, не превышающие удвоенную ми-

нимальную величину относительной погрешности спектрофотометрических измерений.

По сравнению с известными методиками абсорбционной молекулярной спектроскопии, обычно использующих градуировочные растворы при нейтральных величинах pH и требующих предварительную пробоподготовку анализируемых объектов, предложенный способ позволяет достоверно определять фенилаланин в широком диапазоне величин pH водных растворов при относительной погрешности определения менее 0.5 % и коэффициенте вариации не более 0.3 %. Методика применима в лабораторных и производственных условиях, выполняется с использованием стандартного спектрофотометрического оборудования, менее трудоёмка и более экспрессна, так как не предусматривает предварительной коррекции pH растворов и применения вспомогательных реактивов. Предложенный способ апробирован на содержащем фенилаланин фармацевтическом препарате и при контроле аминокислоты в процессе деминерализации водно-солевых растворов фенилаланина методом электродиализа с экспериментальными мембранами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-19-00397, <https://rscf.ru/project/21-19-00397/>.

ACKNOWLEDGEMENT

The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 21-19-00397, <https://rscf.ru/en/project/21-19-00397/>.

ЛИТЕРАТУРА

1. Damian J.H. Biophysical characterization of proteins in developing biopharmaceuticals (2-ed.). USA: Elsevier, 2020. P. 586.
2. Монахова Ю.Б., Чернова Р.К., Варыгина О.В. Хемо-метрический метод ПЛС в обработке титриметрических данных при определении лизина и аргинина в смешанных растворах // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, № 3. С. 280–285.
3. Количественный анализ α-аминокислот в моче нейроригургических больных методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Армсорб» / В.Н. Майстренко [и др.] // Вестник Башкирского университета. 2008. Т. 13, № 2. С. 265–269.
4. Спектрофотометрическое определение концентрации L-лизина в водно-органических растворах / Ю.А. Нащекина [и др.] // Журн. технической физики. 2018. Т. 88, № 9. С. 1384–1386.
5. Antosiewicz J.M., Shugar D. UV-Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure // Biophys. Rev. 2016. V. 8. P. 163–177.
6. Abbaspour A., Ghaffarnejad A., Safaei E. Determination of l-histidine by modified carbon paste electrode using tetra-3,4 pyridinoporphyrazinatocopper(II) // Talanta. 2004. V. 64. P. 1036–1040.

7. Amini M.K., Shahrokhian S., Tangestaninejad S. PVC-based Mn (III) porphyrin membrane-coated graphite electrode for determination of histidine // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 2502–2505.
8. Определение глицина, аланина и лейцина при различных pH раствора с помощью ПД-сенсоров на основе гибридных мембран / А.В. Паршина [и др.] // *Журн. аналит. химии.* 2016. Т. 71, № 3. С. 272–281.
9. Флуориметрия // Фармакопея Российской Федерации. [Электронный ресурс]: <http://pharmacosropeia.ru/ofs-1-2-1-1-0006-15-fluorimetriya> (дата обращения: 01.09.2021).
10. Бекетов В.И., Воронина Р.Д., Зоров Н.Б. Флуориметрическое определение аминокислот и фотохимическая устойчивость продуктов их реакции с орто-фталевым альдегидом под воздействием мощного импульсного лазерного излучения // *Вестн. моск. ун-та. сер. 2. химия.* 2012. Т. 53, № 4. С. 228–233.
11. On-column derivatization with o-phthalaldehyde for fast determination of homocysteine in human urine / R. Głowacki [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 396. № 6. P. 2363–2366.
12. Determination of branched chain amino acids, methionine, phenylalanine, tyrosine and α -keto acids in plasma and dried blood samples using HPLC with fluorescence detection / R. Kand'ár [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009. V. 47. № 5. P. 565–572.
13. Поздеев В.К., Поздеев Н.В. Определение общих аминокислот и нейроактивных аминокислот в плазме крови при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием // *Биомедицинская химия.* 2010. Т. 56., №. 6. С. 726–738.
14. Rapid hydrophilic interaction chromatography determination of lysine in pharmaceutical preparations with fluorescence detection after postcolumn derivatization with o-phthalaldehyde / M. Douša [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 54, № 5. P. 972–978.
15. Kőrös Á., Varga Z.S., Molnár-Perl I. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 47, № 5. P. 146–152.
16. Zuman P. Reactions of orthophthalaldehyde with nucleophiles // *Chemical reviews.* 2004. V. 104, №. 7. P. 3217–3238.
17. Kubota K., Mizukoshi T., Miyano H. A new approach for quantitative analysis of L-phenylalanine using a novel semi-sandwich immunometric assay // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405, №. 25. P. 8093–8103.
18. Soga T., Heiger D. N. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2000. V. 72, №. 6. P. 1236–1241.
19. ГОСТ Р 55569–2013. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза. М.: Стандартинформ, 2013. 25 с.
20. ГОСТ Р 52347–2005. Комбикорма, комбикормовое сырье. Определение содержания аминокислот (лизина, метионина, треонина, цистина и триптофана) методом капиллярного электрофореза. М.: Стандартинформ, 2005. 25 с.
21. Спектрофотометрическое определение фенилаланина и тирозина / В.Ф. Селеменев [и др.] // *Журн. аналит. химии.* 1994. Т. 49, № 4. С. 446–447.
22. Spectrophotometric determination of aromatic and heterocyclic amino acids in mixtures / A.V. Kaznacheev [et al.] // *J. Anal. Chem.* 2000. V. 55, № 4. P. 335–337.
23. Спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты и аминокислот при совместном присутствии / Н.Я. Мокшина [и др.] // *Аналитика и контроль.* 2004. Т. 8, № 4. С. 346–348.
24. Spectrophotometric determination of proline in aqueous solutions / E.G. Davydova [et al.] // *J. Anal. Chem.* 2005. V. 60. № 8. P. 710–713.
25. Раздельное определение ароматических α -аминокислот и витаминов после экстракции из водных сред / Н.Я. Мокшина [и др.] // *Аналитика и контроль.* 2009. Т. 13, № 4. С. 169–173.
26. Lindon J.C. Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry (3-ed). United Kingdom: Elsevier, 2017. 502 p.
27. Demchenko A.P. Ultraviolet spectroscopy of proteins. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1986. 312 p.
28. Казицына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК-, ЯМР-и масс-спектрологии в органической химии. М.: МГУ, 1979. 240 с.
29. Котова Д.Л., Крысанова Т.А., Елисеева Т.В. Спектрофотометрическое определение аминокислот в водных растворах. Воронеж: ВГУ, 2004. 55 с.
30. Fitz J., Mammana A. Spectroscopic study of the pH dependent interaction of an achiral molecular photo-switch with poly-Glutamic acid // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2020. V. 338. P. 112146.
31. Спектрофотометрическое определение натриевой соли цефотаксима в водном растворе / Т.А. Крысанова [и др.] // *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация.* 2015. Т. 18, № 2. С. 13–16.
32. Second derivative analysis of synthesized spectra for resolution and identification of overlapped absorption bands of amino acid residues in proteins: Bromelain and ficin spectra in the 240–320 nm range / I.A. Lavrinenko [et al.] // *Spectrochim. Acta, Part A.* 2020. V. 227. P. 117722.
33. Физико-химические основы сорбционных и мембранных методов выделения и разделения аминокислот / В.Ф. Селеменев [и др.]. Воронеж: ВГУ, 2001. 300 с.
34. Смагунова А.Н., Карпукова О.М. Методы математической статистики в аналитической химии. Ростов н/Д: Феникс, 2012. 346 с.
35. Дюерфель К. Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1994. 267 с.
36. Griffith E.C., Vaida V. Ionization state of l-phenylalanine at the air-water interface // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135, № 2. P. 710–716.
37. Хохлова О.Н. Некоторые особенности термодинамики необменной сорбции фенилаланина анионообменниками различной природы // *Журн. физ. хим.* 2010. Т. 84, № 5. С. 753–759.
38. Реологические и спектральные свойства водных растворов фенилаланина / Е.А. Голева [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2018. Т. 18, № 2. С. 190–196.
39. Васильева В.И., Голева Е.А., Селеменев В.Ф. Особенности сорбции фенилаланина профилированными ионообменными мембранами // *Журн. физ. хим.* 2016. Т. 90, № 10. С. 1548–1557.
40. Необменная сорбция фенилаланина низкоосновными анионообменниками из солянокислых растворов / Т.С. Карлашова [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2014. Т. 14, № 4. С. 648–653.
41. Воробьев М.М., Баранов А.А., Беликов В.М. Исследование гидратации α -аминокислот методом абсорбционной миллиметровой спектроскопии // *Изв. АН. Сер. Хим.* 1996. №3. С. 618–623.
42. Near UV-Visible electronic absorption originating from charged amino acids in a monomeric protein / S. Prasad [et al.] // *Chem. Sci.* 2017. V. 8, № 8. P. 5416–5436.

43. Основы аналитической химии. Практическое руководство / В.И. Фадеева [и др.]. М.: Высшая школа, 2001. 464 с.

REFERENCES

- Damian J.H. *Biophysical characterization of proteins in developing biopharmaceuticals* (2-ed.). USA, Elsevier, 2020. 586 p.
- Monahova Yu.B., Chernova R.K., Varygina O.V. [Chemometric Method of PLS in the Treatment of Titrimetric Data when Opredeleeniye of Arginine and Lysine in Mixed Solutions]. *Izv. Sarat. un-ta. Nov. ser. Ser. Khimii. Biologiya. Ekologiya [Izvestiya of Saratov University. New Ser. Ser. Chemistry. Biology. Ecology]*, 2017, vol. 17, no. 3, pp. 280–285. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-280-285 (in Russian).
- Majstrenko V.N., Il'jasova R.R., Kudasheva F.H., Sadretdinov M.A., Majstrenko T.V. [Quantitative analysis of α -amino acids in the urine of nervous surgical patients by thin layer chromatography on ArmSorb plates]. *Vestnik Bashkirskogo universiteta [Bulletin of Bashkir University]*, 2008, vol. 13, no. 2, pp. 265–269 (in Russian).
- Nashhekina Yu.A., Kurdyukova K.E., Zorin I.M., Mikhailova N.A., Bilibin A.Yu. Spectrophotometric evaluation of L-Lysine concentrations in water–organic solutions. *Technical Physics*, 2018, vol. 88, no. 9, pp. 1384–1386. DOI: 10.21883/JTF.2018.09.46425.31-18.
- Antosiewicz J.M., Shugar D. UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. *Biophys. Rev.*, 2016, vol. 8, pp. 163–177. DOI: 10.1007/s12551-016-0197-7
- Abbaspour A., Ghaffarnejad A., Safaei E. Determination of l-histidine by modified carbon paste electrode using tetra-3,4 pyridinoporphyrinazinatocopper(II). *Talanta*, 2004, vol. 64, no. 4, pp. 1036–1040. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.05.013
- Amini M. K., Shahrokhian S., Tangestaninejad S. PVC-based Mn (III) porphyrin membrane-coated graphite electrode for determination of histidine. *Anal. Chem.*, 1999, vol. 71, pp. 2502–2505. DOI: 10.1021/ac9812633
- Parshina A.V., Titova T.S., Bobreshova O.V., Safronova E.Y., Yaroslavtsev A.B. Determination of glycine, alanine, and leucine at different solution pH with the aid of donnan potential sensors based on hybrid membranes. *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, vol. 71, no. 3, pp. 259–268. DOI: 10.1134/S1061934816030102.
- Fluorimetry. Pharmacopoeia of the Russian Federation. [Fluorimetriya. Farmakopeia Rossiiskoi Federatsii]*. Available at: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-1-0006-15-fluorimetriya> (accessed 1 September 2021) (in Russian).
- Beketov V.I., Voronina R.D., Zorov N.B. Fluorimetric determination of amino acids and photochemical stability of their reaction products with ortho-phthalic aldehyde under irradiation by high-power pulsed laser. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2012, vol. 67, no. 4, pp. 149–153. DOI: 10.3103/S0027131412040013.
- Głowacki R., Borowczyk K., Bald E., Jakubowski H. On-column derivatization with o-phthalaldehyde for fast determination of homocysteine in human urine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, vol. 396, no. 6, pp. 2363–2366. DOI: 10.1007/s00216-010-3456-7
- Kand'ar R., Žáková P., Jirošová J., Sládká M. Determination of branched chain amino acids, methionine, phenylalanine, tyrosine and α -keto acids in plasma and dried blood samples using HPLC with fluorescence detection. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2009, vol. 47, no. 5, pp. 565–572. DOI: 10.1515/CCLM.2009.123
- Pozdeev V.K., Pozdeev N.V. [Determination of total amino thiols and neuroactive amino acids in plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection]. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2010, vol. 4, no. 3, pp. 288–295. DOI: 10.1134/S199075081003011X.
- Douša M., Břicháč J., Gibala P., Lehnert P. Rapid hydrophilic interaction chromatography determination of lysine in pharmaceutical preparations with fluorescence detection after postcolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, vol. 54, no. 5, pp. 972–978. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.11.026
- Kőrös Á., Varga Z.S., Molnár-Perl I. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1999, vol. 47, no. 5, pp. 146–152. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.07.035
- Zuman P. Reactions of orthophthalaldehyde with nucleophiles. *Chemical reviews*, 2004, vol. 104, no. 7, pp. 3217–3238. DOI: 10.1021/cr0304424
- Kubota K., Mizukoshi T., Miyano H. A new approach for quantitative analysis of L-phenylalanine using a novel semi-sandwich immunometric assay. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, vol. 405, no. 25, pp. 8093–8103. DOI: 10.1007/s00216-013-7081-0
- Soga T., Heiger D. N. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2000, vol. 72, № 6, pp. 1236–1241. DOI: 10.1021/ac990976y
- GOST R 55569–2013. Korma, kombikorma, kombikormovoe syr'e. Opredeleeniye proteinogenykh aminokislot metodom kapilljarnogo jelektroforeza [State Standard R 55569–2013. Feed, compound feed, compound feed raw materials. Determination of proteinogenic amino acids by capillary electrophoresis]*. Moscow, Standartinform Publ., 2013. 25 p. (in Russian).
- GOST R 52347–2005. Kombikorma, kombikormovoe syr'e. Opredeleeniye sodержaniya aminokislot (lizina, metionina, treonina, cistina i triptofana) metodom kapilljarnogo jelektroforeza [State Standard R 52347–2005. Compound feed, compound feed raw materials. Determination of amino acid content (lysine, methionine, threonine, cystine and tryptophan) by capillary electrophoresis]*. Moscow, Standartinform Publ., 2005. 25 p. (in Russian).
- Selemenev V.F., Hohlov V.Ju., Korenman N.Ja., Lovchinskaja E.V. [Spectrophotometric determination of phenylalanine and tyrosine]. *Journal of Analytical Chemistry*, 1994, vol. 49, no. 4, pp. 446–447 (in Russian).
- Kaznacheev A.V., Khokhlova O.N., Selemenev V.F., Khokhlov V.Yu., Mokshina N.Ya. Spectrophotometric determination of aromatic and heterocyclic amino acids in mixtures. *Journal of Analytical Chemistry*, 2000, vol. 55, no. 4, pp. 335–337. DOI: 10.1007/BF02757767
- Mokshina N.Ya., Savushkin R.V., Selemenev V.F., Hohlov V.Ju. [Determination of ascorbic acid and amino acids by method of UV-spectroscopy]. *Analitika i Kontrol [Analytical and control]*, 2004, vol. 8, no. 4, pp. 346–348.
- Davydova E.G., Kotova D.L., Krysanova T.A. Selemenev V.F. Spectrophotometric determination of proline in aqueous solutions. *Journal of Analytical Chemistry*, 2005, vol. 60, no. 8, pp. 710–713. DOI: 10.1007/s10809-005-0167-x
- Mokshina N.Ya., Korenman Ya.I., Pahomova O.A., Zykov A.V. [Separate determination of the aromatic α -amino acids and vitamins after extraction from water environments]. *Analitika i Kontrol [Analytical and control]*, 2009, vol. 13, no. 4, pp. 169–173 (in Russian).
- Lindon J.C. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry* (3-ed). United Kingdom, Elsevier, 2017. 502 p.
- Demchenko A.P. *Ultraviolet spectroscopy of proteins*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 1986. 312 p.

28. Kazicyna L.A., Kupletskaja N.B. *Primenenie UF-, IK-, JaMR i mass-spektroskopii v organicheskoj himii [Application of UV, IR, NMR and mass spectroscopy in organic chemistry]*. Moscow, Moscow State University Publ., 1979. 240 p. (in Russian).
29. Kotova D.L., Krysanova T.A., Eliseeva T.V. *Spektrofotometricheskoe opredelenie aminokislot v vodnyh rastvorah [Spectrophotometric determination of amino acids in aqueous solutions]*. Voronezh, Voronezh State University Publ., 2004. 55 p. (in Russian).
30. Fitz J., Mammanna A. Spectroscopic study of the pH dependent interaction of an achiral molecular photo-switch with poly-Glutamic acid. *J. Photochem. Photobiol. A.*, 2020. vol. 338. pp. 112146. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2019.112146
31. Krysanova T.A., Kotova D.L., Vasil'eva S.Yu., Slashheva E.A., Rjazhskih Yu.Yu., Erina O.V. [Spectrophotometric determination sodium salt of Cefotaxime in aqueous solution]. *Vestnik VGU. Serija: Khimija. Biologija. Farmacija [Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy]*, 2015, vol. 18, no. 2, pp. 13–16. (in Russian).
32. Lavrinenko I.A., Holyavka M.G., Chernov V.E., Artyukhov V.G. Second derivative analysis of synthesized spectra for resolution and identification of overlapped absorption bands of amino acid residues in proteins: Bromelain and ficin spectra in the 240–320 nm range. *Spectrochim. Acta, Part A*, 2020, vol. 227, pp. 117722. DOI: 10.1016/j.saa.2019.117722
33. Selemenev V.F., Hohlov, V.Ju., Bobreshova O.V., Aristov I.V., Kotova D.L. *Fiziko-himicheskie osnovy sorbcionnyh i membrannyh metodov vydelenija i razdelenija aminokislot [Physicochemical foundations of sorption and membrane methods for the isolation and separation of amino acids]*. Voronezh, Voronezh State University Publ., 2001. 300 p. (in Russian).
34. Smagunova A.N., Karpukova O.M. *Metody matematicheskoj statistiki v analiticheskoj khimii [Methods of mathematical statistics in analytical chemistry]*. Rostov n/D, Feniks Publ., 2012. 346 p. (in Russian).
35. Doerfel' K. *Statistika v analiticheskoj khimii [Statistics in analytical chemistry]*. Moscow, Mir Publ., 1994. 267 p. (in Russian).
36. Griffith E.C., Vaida V. Ionization state of l-phenylalanine at the air–water interface, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013. vol. 135, no. 2, pp. 710–716. DOI: 10.1021/ja308089n
37. Khokhlova O.N. [Some features of the thermodynamics of non-exchange sorption of phenylalanine by anion exchangers of various nature]. *Zhurnal fizicheskoj khimii [Russian Journal of Physical Chemistry]*, 2010, vol. 84, no. 5, pp. 753–759 (in Russian).
38. Goleva E.A., Vasil'eva V.I., Abramova E.O., Saud Ali Munir, Kostylev D.V., Smagin M.A. [Rheological and spectral properties of aqueous solutions of phenylalanine]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy [Sorption and chromatographic processes]*, 2018, vol. 18, no. 2, pp. 190–196. DOI: 10.17308/sorpchrom.2018.18/499 (in Russian).
39. Vasil'eva V.I., Goleva E.A., Selemenev V.F. Features of the sorption of phenylalanine by profiled ion-exchange membranes, *J. Phys. Chem. A*, 2013. vol. 90, no. 10, pp. 2035–2043. DOI: 10.1134/S0036024416100277
40. Karlashova T.S., Trunaeva E.S., Khokhlova O.N., Khokhlov V.Yu. [Non-exchange sorption of phenylalanine by low-basic anion exchangers from hydrochloric acid solutions]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy [Sorption and chromatographic processes]*, 2014, vol. 14, no. 4, pp. 648–653 (in Russian).
41. Vorob'ev M.M., Baranov A.A., Belikov V.M. Investigation of hydration of α -amino acids by absorption millimeter spectroscopy. *Izvestija Akademii Nauk - Serija Khimicheskaja [Russian Chemical Bulletin]*, 1996, no. 3, pp. 618–623.
42. Prasad S., Mandal I., Singh S., Paul A., Mandal B., Venkatramani R., Swaminathan R. Near UV-Visible electronic absorption originating from charged amino acids in a monomeric protein, *Chem. Sci.*, 2017. vol. 8, no. 8, pp. 5416–5436. DOI: 10.1039/C7SC00880E
43. Fadeeva V. I., Barbalat Ju.A., Shehovcova T.N., Ivanov V.M. *Osnovy analiticheskoj khimii. Prakticheskoe rukovodstvo [Fundamentals of analytical chemistry. Practical Guide]*. Moscow, Vysshaja shkola Publ., 2001. 464 p. (in Russian).