

## ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ

УДК 577.112.37:543.42/.544

МЕЛЬНИЧУК С.Д., ГРИНЧУК Д.В., ЦВІЛХОВСЬКИЙ В.І.

### **ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ НЕПРЯМИХ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ АМІНОКИСЛОТ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЮ РІДИННОЮ ХРОМАТОГРАФІЄЮ І ЗАГАЛЬНІ МЕТОДИЧНІ ТЕНДЕНЦІЇ ТА ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ АМІНОКИСЛОТНОГО АНАЛІЗУ**

*В огляді проведено аналіз досягнень і можливостей застосування непрямих (дериватизаційних) методів кількісного амінокислотного аналізу кормів, харчових продуктів та інших об'єктів із використанням дериватизаційних реагентів, поширених видів рідинної хроматографії та детекторів. Наведено приклади практичного використання дериватизаційних методів в аналітичних дослідженнях зразків зі складними матрицями та вимоги до них у нормативних документах. Зроблено систематизований огляд особливостей цих методів та їх застосування. Показані сучасні тенденції та зроблено прогноз щодо перспектив методичного розвитку хіральних і ахіральних хроматографічних і спектральних методів амінокислотного аналізу.*

**Ключові слова:** амінокислоти, методи амінокислотного аналізу, методи дериватизації амінокислот, дериватизаційні реагенти, вискооефективна рідинна хроматографія, хіральна хроматографія, корми, продукти харчування

*В обзоре проведен анализ достижений и возможностей применения непрямых (дериватизационных) методов количественного аминокислотного анализа кормов, пищевых продуктов и других объектов с использованием различных дериватизационных реагентов, распространенных видов жидкостной хроматографии и детекторов. Приведены примеры практического использования дериватизационных методов в аналитических исследованиях проб со сложными матрицами и требования к ним в нормативных документах. Сделан систематизированный обзор особенностей методов и их применения. Показаны современные тенденции и сделан прогноз перспектив методического развития хиральных и ахиральных хроматографических и спектральных методов аминокислотного анализа.*

**Ключевые слова:** аминокислоты, методы аминокислотной анализа, методы дериватизации аминокислот, дериватизационные реагенты, высокоэффективная жидкостная хроматография, хиральных хроматография, корма, продукты питания

*The review analyzed the achievements and possibilities of application of indirect (derivatizing) methods of quantitative amino acid analysis of feed, food and other objects using different derivatizing reagents, and various kinds of liquid chromatography, and detectors. Examples of practical application of derivatizing methods in analytical studies of samples with complex matrices and requirements for these regulations are cited. Systematized review of characteristics of methods and its applications was made. It was shown the current trends and made a forecast for the possible prospects of methodological development of chiral and achiral chromatographic and spectral methods for amino acid analysis.*

**Key words:** amino acids methods amino acid analysis, methods of derivatization of amino acids, deryvatyzatsiyni reagents, high performance liquid chromatography, chiral chromatography, feed, food

## **Вступ**

Забезпечення потенціалу і перспектив розвитку переробної галузі сільського господарства, виробництва кормів і харчової промисловості України вимагає розбудови мережі аналітичних лабораторій з контролю якості і безпеки продукції з різноманітними методичними можливостями. Важливе місце серед показників якості та безпеки сировини і продукції займає аналіз амінокислот і біогенних амінів. Використання застарілих (азотних) стандартних методів аналізу на вітчизняному ринку амінокислотних кормових і харчових добавок і продуктів харчування не усуває загрози фальсифікацій і санітарно-гігієнічної небезпеки цієї продукції, гальмує розвиток конкурентоспроможності вітчизняного тваринництва.

На ринку аналітичного обладнання і хімічних реагентів наявний широкий вибір методик та устаткування для аналізу, однак, в деяких з цих методик за зовнішніми, розрекламованими перевагами іноді приховуються реальні методичні та експлуатаційні проблеми.

Мета даного огляду – провести порівняльний аналіз досягнень при використанні непрямих (дериватизаційних) методів амінокислотного аналізу (АКА) за останні 20 років, систематизувати їх особливості, переваги, як і обмеження при науковому і практичному застосуванні, а також дослідити сучасні тенденції та загальні перспективи розвитку методів АКА.

### **Дериватизаційні реагенти в акхіральній хроматографії амінокислот**

Методи хроматографічного аналізу вільних або загальних (після гідролізу білкових сполук) амінокислот умовно можна поділити на дві групи: «прямого» аналізу – без хімічної дериватизації і «непрямого» аналізу – з дериватизацією амінокислот перед хроматографією або після неї. Обидві групи мають свою специфіку, технічні і методичні особливості, які визначаються метою та умовами проведення досліджень: матрицею проби, складом і кількістю амінокислот, процесами підготування проб і забезпеченням лабораторій, тощо.

В наукових публікаціях часто наявний модельний або пошуковий підхід, коли створюються штучні умови для дослідження впливів окремих компонентів матриці, умов гідролізу, детекції, обмеження кількості аналізованих амінокислот, використання чистих стандартів пептидів та інш. Це вирішує окремі методичні завдання, але не завжди відповідає потребам реального життя. В нашому огляді ми акцентуватимемо увагу, головним чином, на практичному застосуванні непрямих методів АКА в контролі якості продуктів харчування і кормів.

Дериватизація амінокислот бере початок з застосування реагенту Сенгера (Sanger Reagent, SR) у 1945 р. і широко використовується з 1970-х років, зберігаючи своє значення в АКА, в основному у методах газової хроматографії (ГХ, в латинській транскрипції - GC), вискоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ, в латинській транскрипції - НРТLC), вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ, в латинській транскрипції - НPLC), рідинної хроматографії надвисокого тиску (НЕРХ, в латинській транскрипції - UPLC), капілярному електрофорезі (КЕ, в латинській транскрипції - CE), капілярному зональному електрофорезі (КЗЕ, в латинській транскрипції - CZE) [1-6].

Проведення дериватизації має на меті підвищення чутливості методу та поліпшення якості хроматографічного розділення амінокислот через утворення нових сполук – дериватів амінокислот зі зміненими фізико-хімічними властивостями. Застосування методів дериватизації амінокислот у ГХ і ВЕРХ є загальноновизнаним і рівнозначним, але з практичної точки зору перевагу надають ВЕРХ.

Висока полярність амінокислот, їх низька летючість та відсутність сильних хромофорних груп ускладнює їх поділ і детекцію. Через різноманітність фізико-хімічних властивостей амінокислот за останні 60 років досліджень, не було розроблено універсального досконалого аналітичного методу АКА, який перевершив би всі інші і не

мав обмежень або недоліків. Вважається, що одним з найважчих етапів амінокислотного аналізу є не розділення амінокислот, а їх детекція. Для вирішення цієї проблеми були розроблені дериватизаційні методи підвищення летючості аналітів іонізацією в полум'ї при ГХ або мас-спектрометрії (МС) та утворення амінокислот з сильними хромофорними / флуорофорними групами – для аналізу методами рідинної хроматографії і КЕ [7].

На початку 2000-х років найбільш широко уживаними реагентами амінокислотної дериватизації були: 2,2-дигідрокси-1,3-індантіону (нінгідрин), 6-амінохіноліл-N-гідроксисукцинімідилкарбамат (AQC) [8,9], флуоренілметилхлорформіат (FMOC) [3, 4, 10], ортофталевий альдегід (ОФА, в латинській транскрипції - ОРА) [11], фенілізотіоціанат (PITC) – реагент Едмана [3,6,12], дабсилхлорид (DABS-Cl), дансилхлорид (DANS-Cl), бутилізотіоціанат (BITC), [3, 4, 7]. Всі існуючі методи дериватизації мають один або кілька недоліків: залежність стабільності дериватів від часу і температури, взаємодія реагентів, тривалий час підготовки, нездатність до дериватизації вторинних аміногруп, збільшення мертвого об'єму системи при пост-колонковому методі дериватизації, висока трудомісткість дериватизації, що іноді перешкоджає автоматизації методу, довготривале хроматографічне розділення деяких дериватів амінокислот, а також проблеми з дериватизацією окремих видів амінокислот [13-19].

Вважається, що пост-колонкова дериватизація нінгідрином або ортофталевим ангідридом в автоматизованій іонообмінній високоефективній рідинній хроматографії (ІО-ВЕРХ), дає більш високоточні результати ніж перед-колонкова. Винятком є методика «Pico-Tag»<sup>®</sup> – фенілізотіоціанат-дериватизаційний аналіз, виконаний на відповідному обладнанні [20-22].

Час реакції з ортофталевим ангідридом дуже короткий (1 хв. при кімнатній температурі). Межа визначення, як правило, в діапазоні 1-5 пмоль. Через нестійкість ортофталевих похідних їх краще використовувати в пост-колонковій дериватизації амінокислот при обернено-фазовій високоефективній рідинній хроматографії (ОФ-ВЕРХ). Ортофталевий ангідрид реагує тільки з первинними амінами, тому пролін може бути виявлено, якщо він перетвориться в первинний амін окислювальними реагентами (хлорамін Т або гіпохлорит натрію). Проблема супутніх реакцій з фталевим ангідридом усувається після реакції з флуоренілметилхлорформіатом [23-25].

Реакція ортофталевого ангідриду з амінокислотами вимагає кофактору, меркаптоетанолу, який входить як складова частина до остаточного продукту дериватизації. Проте його застосування може вплинути на стабільність та хроматографічну селективність деривату [26]. Меркаптоетанол найбільш часто використовується в якості кореагента. Але треба мати на увазі, що при цьому цистеїн детектується ненадійно, оскільки ця амінокислота може реагувати з  $\alpha$ -аміногрупою або реагувати за допомогою тіольної групи бічного ланцюга. Тому цистеїн визначається тільки після окислення або алкілування меркаптогруп. Деякі інші SH-вмісні добавки також утворюють дериватизаційні реагенти аналогічні ОРА: ОФА -меркаптоетанол (ОРА-МЕ) [27], ОФА-3-меркаптопропіонової кислоти (ОРА-МРА) [28], ОФА -N-ацетил-L-цистеїн (ОРА-НАС) [28], ОФА -3-меркаптопропіонової кислоти - 9-флуоренілметилхлорформіат (ОРА-МРА-FMOC) [29]. ОРА-НАС і ОРА-N-алкіл-L/-D цистеїн дозволяють проводити хіральне і ахіральне розділення амінокислот [30-32]. Додаткові посилання [33-46].

Дериватизація нінгідрином є найбільш поширеним методом АКА. Використання пост-колонкової нінгідринової дериватизації, літєвих буферів і градієнтного елюювання ІО-ВЕРХ\УФ-ВС дозволяє розділити 99 аміновмісних сполук [47]. Первинні амінокислот утворюють хромофорні сполуки з максимумом поглинання 570 нм, а вторинні – пролін і гідроксипролін – на 440 нм, тому детекцію бажано проводити одночасно на цих піках, якщо це можливо. Межі визначення дериватів амінокислот за пост-колонкової реакції з нінгідрином, як правило, перевищують 100 пмоль. Така чутливість достатня для аналізу переважної більшості харчових продуктів [48].

Нінгідрин є високонадійним дериватизаційним реагентом, але його розчин зазнає впливу фотодеградації і окислення повітрям, що поступово погіршує відтворюваність результатів. Через це виникає питання: коли міняти старий розчин на новий [49,50]. Наведені вище приклади широкого застосування дериватизаційних реагентів – ОФА і нінгідрину свідчать про існування специфічних обмежень різних дериватизаційних реакцій, особливості яких необхідно приймати до уваги [51-61].

ОФ-ВЕРХ амінокислотний аналіз з перед-колонковою дериватизацією фенілізотіоціанатом та УФ- детекцією користується популярністю через більшу чутливість і швидкість аналізу в порівнянні зі спеціалізованими іонообмінними амінокислотними аналізаторами [62-67]. Фенілізотіоціанат добре реагує з первинними і вторинними амінокислотами і утворює фенілтіокарбаміл - амінокислотні похідні (РТС) ( $\lambda_{\text{abs}}=254$  нм), які є помірно стабільними при кімнатній температурі (1 день). На відміну від деяких інших реагентів, за допомогою фенілізотіоціанату досить добре кількісно визначаються тирозин і гістидин [20-22]. Перед дериватизацією гідролізованих зразків необхідно повністю видалити соляну кислоту. Час реакції становить приблизно 5 хв. при кімнатній температурі. Надлишок реагенту згодом видаляють у вакуумі. Внаслідок цих операцій загальний час пробопідготовки зтягується до 2 годин, який потім компенсується швидким хроматографічним розподіленням – до 12 хв. Детекція здійснюється тільки в діапазоні УФ-поглинання. Цей метод дає відмінні результати при отриманні похідних вторинних амінокислот, проліну і гідроксипроліну [20,64,68]. Межі виявлення, як правило, в межах 50 пмоль. Термін експлуатації хроматографічної колонки скорочується при потраплянні у неї непрореагованого фенілізотіоціанату. Недоліками цього методу є те, що потрібна ефективна вакуумна система і багато часу витрачається для видалення побічних продуктів дериватизації і надлишку реагенту [67, 69-83].

При реакції з нітрофенілізотіоціанатом (NPITC), утворюються стабільні нітрофенілтіокарбаміл-деривати (NPTC), які є придатними для аналізу за допомогою ОФ-ВЕРХ з УФ-детектором при 254 нм і 340 нм [83]. Недоліком є тривале видалення надлишку реагенту, що вимагає ефективної вакуумної системи. Однак при екстракції з толуолом його видалення полегшується [64].

У порівнянні з іншими реагентами бутилізотіоціанат – більш легка аліфатична сполука, яка успішно використана для перед-колонкової дериватизації 22 стандартних білкових амінокислот з утворенням бутилтіокарбаміл-дериватів (BTC). Ці похідні амінокислот були успішно проаналізовані за допомогою  $C_{18}$  ОФ-ВЕРХ і УФ-детектора при  $\lambda_{\text{abs}}=250$  нм [84]. Бутилізотіоціанат був успішно адаптований для аналізу амінокислот в харчових продуктах [85]. Іншими перевагами цього реагенту є можливість дериватизації цистеїну і цистину, чого не досягалося при реакції з фенілфзотіоціанатом. Висока летючість даного реагенту істотно скорочує час аналізу через легке видалення надлишків реагентів і утворених побічних продуктів. BTC-деривати вторинних амінокислот, таких як пролін і гідроксипролін виявлялися з високою чутливістю. Але піки аспарагіну і серину перекривалися повністю. Стабільність BTC-дериватів при кімнатній температурі становить близько 8 годин. [67].

Аналіз результатів дериватизації з бутилізотіоціанатом, отриманих з пробами бичого сировоткового альбуміну (BSA) та харчових продуктів, показав хороше узгодження з дериватизацією за допомогою фенілізотіоціанату, а також з визначеннями за допомогою іонно обмінної хроматографії, за винятком декількох амінокислот. Особливо близькими були значення порівняно з іонно обмінною хроматографією (за винятком гістидину). Перевага ВІТС над РІТС полягала в його більшій летючості. Надлишок реагенту і побічних продуктів вилучався приблизно протягом 10 хв., порівняно з РІТС-реагентом (1 год.). BTC-деривати цистину і цистеїну виявлялися окремо, тоді як в РІТС-дериватах вони виходили єдиним піком. [85].

Бензилізотіоціанат (BzITC), аналог РІТС (за винятком NPITC), як і ВІТС був успішно використаний як реагент для дериватизації з утворенням бензилтіокарбамільних

похідних (VzTC) з усіма 22 білковими амінокислотами. Деривати були повністю розділені на колонці з оберненою фазою C<sub>18</sub> [86]. VzTC менш леткий реагент ніж VITC, і в цьому відношенні подібний до фенілізотіоціанату. За однакових експериментальних умов розділення і відтворюваність за допомогою ОФ-ВЕРХ VzTC-дериватів показали кращі результати, ніж PTC-деривати [87].

6-Амінохінол-N-гідроксисукцінімідилкарбамат (AQC, флуоресценція:  $\lambda_{ex}=250\text{nm}$ ,  $\lambda_{em}=395\text{ nm}$ , УФ:  $\lambda_{abs}=248\text{ nm}$ ,  $\lambda_{abs}=254$ ) при кімнатній температурі утворює стабільні похідні (декілька днів), як з первинними, так і вторинними амінокислотами. Основною перевагою реагенту є те, що його реакція з амінокислотами не є високочутливою до впливу матриці. Наявність солей, миючих засобів, ліпідів і багатьох інших компонентів зразка не заважають реакції, що значно спрощує підготовку проб. Флуориметричні межі виявлення при застосуванні флуоресцентного детектора лежать, як правило, в діапазоні 1-5 пмоль. Непрореагований AQC не флуоресціює, а продукт гідролізу надлишку реагенту – 6-амінохінолін, флуоресціює слабо, тому надлишок реагенту видаляти не потрібно. Час реакції – 1 хв. Спочатку утворюються моно- і ди- похідні тирозину. При нагріванні реакційної суміші протягом 10 хв при 50 °C всі деривати тирозину перетворюються в монодеривати. Флуоресценція деривату триптофану дуже слабка [8,88-90]. AQC – має хороші перспективи для застосування у аналітичному контролі біотехнологічного виробництва і генетичного конструювання штамів продуцентів L-амінокислот для ідентифікації амінокислот, поліамінів і супутніх амінованих метаболітів, які утворюються при біосинтезі цільового продукту [91], а також як чутливий комплементарний метод для МС-протеоміки [92].

Для визначення вільних амінокислот м'яса при різних способах його переробки було запропоновано метод ОФ-ВЕРХ з перед-колонковою AQC-дериватизацією (УФ  $\lambda_{abs}=248\text{ nm}$ ). Межа виявлення для 17 амінокислот знаходилася в діапазоні від 0,29 до 0,96 мкмоль/л з лінійністю у діапазоні 1 - 100 мкмоль/л, за винятком цистину (Cys2), де лінійний ний діапазоні знаходився в межах: 0,5 - 50 мкмоль/л [93-96].

Дабсилхлорид (4-диметил-аміноазобензола-4-сульфонілхлорид, DABS-Cl) утворює з первинними і вторинними амінокислотами досить стабільні похідні (протягом декількох днів), які виявляються за поглинанням,  $\lambda_{abs}=420\text{ nm}$ . Межі виявлення дериватів знаходяться в діапазоні 50 пмоль. Час реакції зазвичай становить близько 10 хв при 70 °C. Ступінь повноти реакції може залежати від впливу високих концентрацій різних солей. Через високу залежність ефективності реакції дериватизації від матриці і її варіабельності для різних амінокислот, для точного калібрування стандартного амінокислотного розчину потрібно за аналогічних умов проводити калібрування на матриці з додаванням до матриці стандартів (matrix-matched calibration standards) [97]. Для цього методу існують комерційні набори [98-105]. (5-(диметиламіно)нафтален-1-сульфонілхлорид,

Дансилхлорид, (5-(диметиламіно)-нафталін-1-сульфонілхлорид, DANS-Cl,  $\lambda_{ex} = 350/360\text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 510/470\text{ nm}$ ). реагує з первинними та вторинними амінокислотами з утворенням стабільних похідних (декілька днів, якщо захищені від світла). Виявлення дериватів переважно флуориметричне. Однак спостерігається сильна абсорбція при  $\lambda_{abs1}=250\text{ nm}$ ,  $\lambda_{abs2}=286$ . Умови флуориметричного і спектрометричного (УФ) визначення DANS-Cl-дериватів можуть відрізнятися для різних методик і класів амінокислот. Для УФ ( $\lambda_{abs}=286$ ) межі виявлення складають 40-300 пмоль [106]. Продукти гідролізу надлишку реагенту мають високу флуоресценцію і можуть впливати на розділення. Час реакції повільний: 1 год. при 60°C. Це сприяє формуванню множинних артефактних піків при взаємодії з гістидином. При певних рН, дансилхлорид може вступати в реакцію з фенольними групами тирозину [107-112].

9-флуоренілметілхлорформіат (FМОС,  $\lambda_{ex}=265\text{nm}$ ,  $\lambda_{em}=315\text{ nm}$ .) взаємодіє з первинними і вторинними амінокислотами дуже швидко: приблизно 90 сек. при кімнатній температурі, з утворенням стабільних протягом декількох днів похідних. Межі виявлення дериватів, при використанні флуорисцентного детектора, лежать в діапазоні

фмоль (<1 пмоль). Адукти триптофану не флуоресціюють в зв'язку з гасінням індольним кільцем. Адукти гістидину і цистеїну флуоресціюють слабо. Нативна форма і гідролізат реагенту (FMOH) має високу флуоресценцію. Надлишковий реагент перетворюється в адукт з сильними гідрофобними амінами – 1-аміно-адамантан (ADAM), що призводить до уповільнення елюювання. Тому перед інжекцією надлишок реагенту має бути екстрагований або перетворений в недетектований адукт. На розділення піків аналітів це не впливає [113-122].

4-Фтор-7-нітробензо-2-оксо-1,3-діазол (NBD-F,  $\lambda_{ex}=470$  нм,  $\lambda_{em} = 530$  нм) дає деривати з первинними та вторинними амінокислотами і є стабільними протягом декількох днів. Нижня межа при визначенні флуориметричним детектором може сягати кількох пмоль. Адукти триптофану не флуоресціюють. NBD-F реагує з іншими фенолами і тіолами з утворенням нефлуоресцентних адуктів. Час реакції порівняно короткий - 1 хв. при 60 °С. Реакційна здатність NBD-F в 100 разів вища ніж відповідного хлориду (NBD-Cl). Цей реагент використовується набагато частіше для визначення біогенних амінів у харчових продуктах, ніж в АКА [4, 123-129]. У Табл. 1 наведено перелік розподілу посилок непрямих методів АКА у кормах, продуктах харчування, напоях та інших біомедичних або методичних дослідженнях.

Порівняльний огляд характеристик поширених нехіральних дериватизаційних реагентів і хроматографічних методів, що застосовуються в АКА кормів і харчових продуктів, їх особливості, переваги і недоліки наведені в Табл. 2.

**Таблиця 1.**

**Перелік розподілу посилок за групами дериватизаційних реагентів і об'єктів аналізу.**

Дериватизаційні реагенти	Корми	Продукти харчування	Продукти харчування
OPA	23,39	23,27,32,38,40-42	11,24-26,28-31,33-38, 40, 43-45
Нінгідрин	48,51,54,156	48,53,55-58,60	47-52,54,59,61,85,86
PIIC, NPIIC	64,72-75	62-64,66,67,73,75-80,82,86	64,65,68-71,73,77-81, 83, 85-87
BITC, VzITC	85	85	84 - 87
AQC		93,96	88-92,94,94,95
DABS-CL		99,100	88-92,94,94,95
DANS-CL		108,109	106,107,110-112
FMOС	23,29,115	23,116,119	29,113,114,117,118,120-122
NBD-F	124	123,125-129	123

Таблиця 2.

## Порівняння характеристик непрямих хроматографічних методів аналізу амінокислот

Метод	ІО з після-колонковою дериватизацією		ОФ-ВЕРХ з передколонковою дериватизацією					
	Нінгідрин	Нінгідрин	РІТС	ОРА	FMOC	AQC	DABS-Cl	DANS-Cl
Довжина хвилі $\lambda$ (нм)	$\lambda_{\text{abs}} = 570$ $\lambda_{\text{abs}} = 440$ (Pro)	$\lambda_{\text{ex/em}} = 340/455$ $\lambda_{\text{ex/em}} = 348/450$	$\lambda_{\text{abs}} = 254$	$\lambda_{\text{ex/em}} = 340/455$ $\lambda_{\text{ex/em}} = 356/450$ $\lambda_{\text{ex/em}} = 340/425$ $\lambda_{\text{ex/em}} = 230/445$ та інші.	$\lambda_{\text{ex/em}} = 265/315$	$\lambda_{\text{abs}} = 248$ $\lambda_{\text{ex}} = 250$ $\lambda_{\text{em}} = 395$	$\lambda_{\text{abs}} = 420$ ; 436	$\lambda_{\text{ex/em}} = 360/470$ $\lambda_{\text{ex/em}} = 350/510$ $\lambda_{\text{abs1}} = 250$ $\lambda_{\text{abs2}} = 286$
Час дериватизації (хв.)	2	1-2	20	1	2	1	10	60
Видалення реагентів	Ні		Випарювання	Ні	Екстракція	Ні	Так	Так
Стабільність дериватів	Утворення кольорового розчину		Так	Ні	Так	Так	Так	Так
Виявлення амінокислот	Так		Так	Ні	Так	Так	Так	Так
Чутливість до матриці	Ні		Так	Так	Так	Низька	Висока	Так
Детектор	BC	ФЛ	УФ	ФЛ	ФЛ	УФ\ ФЛ	BC	УФ\ ФЛ
Чутливість – межа визначення (пмоль)	10, 50 (Pro)	<1	50	1-5	<1	0.5-1.0 \ 0.01-0.05	50	50 \ <1
Переваги	Тривалий термін служби колонки і можливість її регенерації, стабільне розділення, нечутливість до матриці		ОФ-ВЕРХ використовується за різними призначеннями, висока чутливість дозволяє аналізувати дуже малі об'єми проб, скорочується час розділення АК					
Недоліки	Тривалий час аналізу, комплексний буфер і температурне програмування колонки.		Деякі складні або нестабільні деривати, складна очистка та екстракція, перешкоди від солей і ліпідів, коротке життя колонки, погане розділення деяких амінокислот.					
Застосування	Стандартна процедура для аналізу кормів, продуктів харчування, хімусу і крові		Індивідуальні амінокислоти, гідролізати білків харчових продуктів, вільні амінокислоти напоїв, фізіологічних рідин					
<p>EC - іонообмінна хроматографія; ОФ-ВЕРХ - високоефективна рідинна хроматографія на колонках з оберненою фазою; <sup>b</sup>РІТС - фенілізотіоціанат; ОРА – ортофталевий альдегід; FMOC - 9-флуоренілметілхлорформіат; AQC - 6-амінохінол-N-гідроксисукцинімідилкарбамат; DABS-Cl – дабсил-хлорид, 4-диметиламинобензол-4-сульфохлорид, РІТС - бутілізотіоціанат, DANS-Cl - дансилхлорид.- N-діметіламінафталін-5-сульфохлорид. [1] ФЛ – довжини хвиль можуть залежати від варіантів методики</p>								



### Реагент Мерфі та хіральна хроматографія амінокислот

Багатоклітинні організми, як правило, складаються з L-амінокислот, але навіть в метаболічно стабільних білках живих ссавців в розведеному кислотному, лужному або нейтральному середовищі може мати місце рацемізація окремих амінокислот, внаслідок чого відбуваються структурно-молекулярні і функціональні зміни в організмі.

Підготовка енантімерно чистих заміщених аналогів амінокислот є складним завданням енантіоселективного (хірального) синтезу пептидів, який вимагає точного аналітичного методу для визначення енантімерного надлишку. Зазвичай технології поліпшення синтетичних і аналітичних процедур забезпечують потрібну послідовність і чистоту продуктів, але, як правило, майже не стосуються їхньої стереоізомерної чистоти. Часто безпідставно вважається, що рацемізації може не відбутися або її не потрібно розглядати [130].

Добре відомо про існування вільних і пептидоглікан-зв'язаних D-амінокислот бактерій, але їх наявність в рослинах, тваринах і людині було виявлено порівняно недавно [130,131]. Методична складність досліджень наднизьких концентрацій D-амінокислот в клітинах еукаріотів і їх рацемізація довго ускладнювали і гальмували наукові дослідження оптичних ізомерів. Розвиток цього напрямку тривалий час відбувався переважно завдяки дослідженням на мікробіологічних об'єктах завдяки використанню дериватизаційного реагенту Мерфі (Marfey Reagent, MR), який виявив переваги при порівнянні з іншими дериватизаційними реагентами (OPA, DNFB і деякі інші) [130].

Реагент Мерфі – 1-фтор-2,4-дінитрофеніл-5-L-аланін амід (FDAA) або (S)-2-[(5-фтор-2,4-дінитрофеніл)-аміно]пропанамід є удосконаленим хіральним варіантом реагенту Сенгера (SR) – 1,5-дифтор-2,4-динітробензолу (2,4-DNFB), який використовується для ідентифікації і хроматографічного встановлення послідовності амінокислот у пептидах. Реагент Мерфі також можна розглядати як модифікований варіант реагенту Сенгера з більш вираженими хіральними властивостями.

Реагент Сенгера утворює хіральні 2,4-дінитрофеніл деривати (DNP) відповідних амінокислот. На початку досліджень увага науковців була зосереджена на визначенні послідовностей амінокислот у пептидах без урахування їх оптичної ізомерії. Створений у 1984 р. реагент Мерфі [132] виявляв переваги порівняно з іншими дериватизаційними реагентами того періоду, які спрощували умови аналізу і покращували можливості хроматографічного розділення і детекції енантімерів амінокислот, стимулюючи інтерес до їх дослідження [130]. MR реагує стехіометрично з аміногрупами енантімерів амінокислот з утворенням стабільних діастереомерних дериватів, які можуть бути легко розділені за допомогою ОФ-ВЕРХ. Дінитрофеніл-аланінамідна частина сильно поглинає при 340 нм ( $\epsilon=30000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), що дозволяє виявляти деривати амінокислот в суб-наномольному діапазоні. Основними перевагами MR у порівнянні з іншими перед-колонковими дериватизаційними реагентами є 1) можливість проведення хроматографії на будь-яких багатофункціональних ВЕРХ приладах без нагрівання колонки; 2) детекція при довжині хвилі  $\lambda=340 \text{ нм}$ , що нечутлива до більшості домішок розчинників; 3) одночасне визначення проліну за одне хроматографічне розділення, 4) стабільність дериватів амінокислот. Деякий час вважалось, що для звичайних користувачів ця проста методика забезпечує привабливу і недорогу альтернативу спеціалізованим амінокислотним аналізаторам [133] і використовувалася для кількісного визначення 19 основних L-амінокислот [134].

Перед-колонкова дериватизація з MR і його модифікаціями знайшла застосування в різних біохімічних дослідженнях і фармакології [130,135,136] в тому числі для вивчення рацемізації і ферментативних реакцій амінокислот [137-148].

MR широко використовується для структурного аналізу пептидів, підтвердження рацемізації при пептидному синтезі, а також для виявлення малих кількостей D-амінокислот. Багато інших реагентів, що використовуються для попередньої дериватизації вільних амінокислот мають такі вади, як нездатність реагувати з усіма протеїногенними



амінокислотами, нестабільність дериватів, погану детекцію деяких похідних амінокислот або відсутність кількісного виходу реакції.

Опис застосування MR є прикладом використання надійного, перевіреного практикою методу АКА для нагальних сучасних проблем, а його чутливість іноді перевершує можливості методу мас-спектрометрії з матрикс-активованою лазерною десорбцією / іонізацією (MALDI-MS) [130].

MR має численні переваги перед багатьма іншими сучасними хіральними дериватизаційними реагентами (ХДР) в амінокислотному аналізі і значну оглядову бібліографію досліджень [149-153], але, не зважаючи на це, він і досі не набув поширення для аналізу хіральних пептидів або кормів [3,4,154-158]. Поясненням цьому можуть бути: відносно недавні (початок 2000-х рр.) наукові відкриття про значення D- і непротеїногенних енантіомерів амінокислот для розуміння метаболізму амінокислот, білків і пептидів в живих організмах [159-161]; надмірне ускладнення рутинних досліджень амінокислот через подвоєння кількості аналітів; відсутність обґрунтованих вимог до АКА енантіомерів у нормативних документах з аналізу безпечності та якості продукції [154-158]. Детальний аналіз переваг, обмежень, недоліків і перспектив застосування MR та його аналогів для наукових досліджень і практики наведено в огляді [136].

Сучасні дослідження D-енантіомерів спрямовані на вивчення їх ролі у біохімії, застосування в біології і медицині (діагностиці, фармакології, терапії ензимними і пептидними препаратами, ензимології, токсикології). Перспективними також є дослідження процесів рацемізації DL- енантіомерів амінокислот в біотехнології, у живих організмах і при переробці харчових продуктів.

Методичні можливості амінокислотного аналізу на сучасному етапі завдяки досягненням останніх 10 років відкривають нові перспективи у наукових дослідженнях рацемізації та їх практичному медико-біологічному і господарському застосуванні [131,159-163].

### **Загальні проблеми і тенденції розвитку методів амінокислотного аналізу**

З наведених даних видно, що, незважаючи на зручність і удосконалення прямих методів амінокислотного аналізу та розвиток відповідного аналітичного обладнання (детекторів, колонок, тощо), непрямі методи зберігають свої провідні позиції в наукових і прикладних дослідженнях.

Існують дуже широкі можливості вибору методів АКА, варіантів обладнання і витратних матеріалів, реалізація яких залежить від кола завдань і можливостей забезпечення лабораторій, зокрема типів зразків, пропускну здатності обладнання і методик, кількості і видів досліджуваних амінокислотних аналітів, напрямку діяльності лабораторії (науково-дослідна робота, діагностика, контроль якості і безпеки продукції тощо). Деякі лабораторії орієнтуються на АКА харчових продуктів або кормів, які є складними матрицями, а кількість матеріалу не потребує надвисокої чутливості детекторів, інші – на біологічні рідини, екстракти рослин, ферментаційні суспензії, культуральні середовища, проміжні метаболіти, пептидні фармпрепарати, що потребують більш високої чутливості. Оснащення аналітичної лабораторії має визначати вибір її орієнтації на вузьку спеціалізацію або універсальність, що вимагатиме відповідного методичного забезпечення та організації праці.

В процесі розвитку непрямих методів АКА відбувається удосконалення і заміна дериватизаційних реагентів. Деякі реагенти, наприклад, DANS-Cl, DABS-Cl, FMOC, BITC, VzTC поступово морально застарівають через появу кращих, простіших методик, обмеження тривалості зберігання робочих розчинів реагентів або нестійкість амінокислотних дериватів, низьку чутливість, зайві операції підготовки: необхідність видалення надлишків реагентів і побічних продуктів перед хроматографічним аналізом, застосування реакцій захисту від окислення, або, навпаки, - окислення окремих амінокислот, екстракцію, випарювання, чутливість до впливу матриці тощо. Інші, наприклад, нінгідрин, OPA, MR,

AQC, PITS – тривалий час зберігають свою актуальність і удосконалюються [48, 91, 92, 120, 121, 130, 150, 153].

Поява нових промислових продуктів, що містять одну або кілька амінокислот, іноді, вимагає удосконалення методів аналізу таких речовин. Прикладом такого спрощеного удосконалення може бути розробка швидкого методу ОФ-ВЕРХ аналізу таурину в енергетичних напоях з пост-колонковою дериватизацією NBD-F [128].

Незважаючи на всі недоліки дериватизації [7], вона не тільки не втратила своєї актуальності в АКА [10,164,165], але продовжує розвиватися та удосконалюватися. Метод ВЕРХ з пост-колонковою дериватизацією нінгідрином і досі має категорію офіційного (референсного) для кількісного аналізу вільних і загальних амінокислот у кормах і є необхідним для валідації методів АКА і сертифікації лабораторій [3,166,167].

Вимоги FAO до методів АКА визначаються документами, які мають відмінності щодо використання методів аналізу кормів і продуктів харчування. До широкого використання амінокислотних добавок у кормах якість і вимоги до них контролювалися спрощеними методами, що наведені у публікації FAO 160 [155]. Після появи і широкого впровадження амінокислотних кормових добавок у тваринництво контроль мав відповідати нормативним документам – ISO 13903 (ДСТУ ISO 13903:2009) і директиві Європейської Комісії 98/64/ЕС [124,126,166,168]. Вимоги FAO до методів АКА харчових продуктів на відміну від методів для кормів, мають рекомендаційний характер, що дозволяє урізноманітнювати методи аналізу [4,5,148,160,161]. У Російській федерації для визначення 5 незамінних амінокислот у кормах і сировині діє ГОСТ Р 52347-2005, в якому застосовують метод електрокапілярного електрофорезу з вимогами до відтворюваності результатів (їх статистичних показників) меншими ніж в ISO 13903 [162].

При виборі методу, обладнання і реагентів необхідно мати на увазі, що надмірно висока чутливість ( $10^{-13}$  –  $10^{-15}$  моль) вимагає додаткових заходів захисту від зовнішніх чинників (стерильних боксів, атмосфери азоту, тощо) [92], які покращують статистичні показники методики, але зменшують її продуктивність.

Останні 5-10 років спостерігається інтенсифікація досліджень про значення енантіомерів амінокислот і їх рацемізації для здоров'я людини, що дозволяє передбачати можливість появи нових вимог до показників АКА. Можливо, незважаючи на відсутність нормативних вимог до хіральної чистоти амінокислот харчових продуктів і кормів, про методичну готовність до використання хіральної хроматографії варто думати наперед, особливо, при плануванні наукової діяльності.

Лише кілька, з наведених у даному огляді добре відомих дериватизаційних реагентів, можуть застосовуватися для кількісного аналізу енантіомерів амінокислот: аналоги ОРА і Dans-Cl, SR і MR. Порівняння результатів вимірювань при застосуванні дериватів амінокислот з ОРА і Dans-Cl з амінокислотними дериватами MR не проводилося, але, зважаючи на кількість публікацій, MR і його аналоги мають кращі перспективи розвитку [130,133,135,136,150,152]. Також є підстави вважати, що MR є найбільш використовуваним хіральним дериватизаційним реагентом [171].

Сучасні тенденції загального розвитку амінокислотного аналізу пов'язані з успіхами ВЕРХ-МС [164,165,172,173], прямих і непрямих методів хіральної хроматографії амінокислот [149-152], розробкою і удосконаленням детекторів і методів прямого АКА [174], автоматизації пробопідготування та управління хроматографічним процесом [175,176], зменшення залежності результатів від впливу матриці [163], появою нових різновидів хроматографічних методів – рідинної хроматографії гідрофільної взаємодії (hydrophilic interaction chromatography (HILIC)) [177,178] і удосконаленням обладнання для ВЕРХ-МС – нано- і двовимірної хроматографії [179,180], зростанням можливостей застосування недеструктивних спектральних методів аналізу (інфрачервоної спектрометрії близького діапазону – NIRS) [181-183]

З'являються публікації про прикладне використання АКА для виявлення фальсифікованих харчових продуктів і сировини (якість, географічне походження, бренди)

[169,184-189]. Розробляються загальні критерії і методи оцінки автентичності продуктів здорового харчування [188]. Методичні підходи до оцінки автентичності продуктів здорового харчування наведені в публікації [189]. З цією метою була створена спільна програма ФАО /МАГАТЕ / (FAO/IAEA): «Programme - Nuclear Techniques in Food and Agriculture» з застосування гібридних хроматографічних і ізотопних методів дослідження в продовольчому та сільськогосподарському виробництві [190].

Біотехнологічне виробництво і застосування амінокислотних добавок у тваринництві і продуктах здорового харчування мають широке застосування в світі, чого не можна сказати про Україну. Тому для вітчизняної науки і систем контролю якості і безпечності продуктів та сировини АКА залишається важливим, актуальним завданням. Шлях до вирішення проблем якості і безпеки продуктів та їх конкурентоспроможності лежить через розвиток мережі контрольних лабораторій і забезпечення їх належного функціонування.

## ЛІТЕРАТУРА

1. **Williams A. P.** Amino Acids: Determination // Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition: [4-vol. set] / Ed. Caballero B. et al. – New-York: Academic Press, 2005. – Vol.1. – P. 192-197.
2. **Lunte S.M.** Amino Acids // Encyclopedia of Analytical Science. (2-nd Ed.): [10-vol. set] /Ed.: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole – Elsevier, 2005. – Vol.1. – P. 61– 69.
3. **Fontaine J.** Amino Acid Analysis of Feeds // Amino acids in animal nutrition. / Ed.: I. D’Mello, J.P. Felix. – Wallingford: CABI Publishing, 2003. – P. 15-40.
4. **Kivi J. T.** Amino Acids // Food analysis by HPLC. / Ed.: L.M.L. Nollet. – New York: Marcel Dekker, 2002. – P.55-97.
5. **Aristoy M. C. and Toldrá F.** Amino Acids in Dairy Foods // Handbook of Dairy Foods Analysis / Ed. L.M.L. Nollet. – Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010. – P. 9-32
6. Amino Acids, Peptides and Proteins // Ed. J.S.Davies – Cambridge: RCS Publishing, 2007. – Vol. 36. – 345 p.
7. **Petritis K., Elfakir C., Dreux M.** A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids // J. Chromatogr. A. – 2002. –v. 961. – Is. 1. – P. 9–21.
8. **Cohen S.A., Michaud D.P.** Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. // Anal. Biochem. – 1993. – v. 211. – № 2 – P. 279-87.
9. **Cohen S. A., De Antonis K. M.** Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. // J. Chromatogr. A. – 1994. – v. 661. - № (1-2) - P. 25-34.
10. **Jámbor A., Molnár-Perl I.** Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. Literature overview and further study. // J. Chromatogr. A. – 2009. – v.1216. – №15. – P. 3064-3077.
11. **Simons S. S. Jr., Johnson D. F.** The structure of the fluorescent adduct formed in the reaction of o-phthalaldehyde and thiols with amines. // J. Am. Chem. Soc. – 1976. – v. 98. – P. 7098–7099
12. **Edman P., Henschen A.** // Protein Sequence Determination. (2-nd Ed.) / Ed. Needleman S. B. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1975. – P. 232-279.
13. **Ogden G., Földi P.** Amino acid analysis: An overview of current methods. // LC-GC. – 1987. – № 5. – P. 28-38.
14. **Sarwar G., Botting H.G.** Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. // J. Chromatogr. – 1993. – v. 615. – №1. – P. 1-22.

15. **Fekkes D.** State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples. // *J. Chromatogr. B. / Biomed. Appl.* – 1996. – Vol. 682. – № 1. – P. 3-22.
16. **Smith J.T.** Developments in amino acid analysis using CE. // *Electrophoresis* . – 1997. – Vol. 18. – P. 2377-2392.
17. **Oguri S.** Electromigration methods for amino acids, biogenic amines and aromatic amines. // *J. Chromatogr. B. / Biomed. Sci. Appl.* – 2000. – Vol. 747.– № (1-2). – P. 1-19.
18. **Molnár-Perl I.** Role of chromatography in the analysis of sugars, carboxylic acids and amino acids in food. // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – Vol. 891. – № 1. – P. 1-32.
19. **Hušek P., Šimek P.** Advances in Amino Acid Analysis. // *LC-GC.* – 2001. – № 19. –P. 986-999.
20. **Heinrikson, R. L. and Meredith, S. C.** Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography; precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. // *Anal. Biochem.* – 1984. – Vol. 136. – P. 65–74.
21. **White J.A., Hart R.J., Fry J.C.** An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. // *J. Auto. Chem.* – 1986. – № 8. – P. 170-177.
22. **Fernández-Fígares I., Rodríguez L. C., González-Casado A.** Effect of different matrices on physiological amino acids analysis by liquid chromatography: evaluation and correction of the matrix effect. // *J. Chromatogr. B / Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2004. – Vol. 799. – № 1. – P. 73-79.
23. **Schuster R.** Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr.* – 1988. – Vol. 431. – P. 271-284.
24. **Blankenship D.T., Krivanek M.A., Ackerman B.L., Cardin A.D.** High-sensitivity amino acid analysis by derivatization with o-phthalaldehyde and 9-fluorenylmethyl chloroformate using fluorescence detection: applications in protein structure determination. // *Anal. Biochem.* – 1989. – Vol. 178. – P. 227-232.
25. **Godel H., Seitz P., Verhoef M.** Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOCCl precolumn derivatization. // *LC-GC Intl.* – 1992. – № 5. – P. 44-49.
26. **Euerby M.R.** Effect of differing thiols on the reversed-phase high-performance liquid chromatographic behaviour of o-phthalaldehyde-thiol-amino acids. // *J. Chromatogr.* – 1988. – v.454. – P. 398-405.
27. **Chaytor J.P.** The analysis of amino acids in fruit juices by high-performance liquid chromatography // *J. Sci. Food Agric.* – 1986. – v. 37. – № 10. – P. 1019–1026.
28. **Vasanits A., Kutlán D., Sass P., Molnár-Perl I.** Retention/quantitation properties of the o-phthaldialdehyde-3-mercaptopropionic acid and the o-phthaldialdehyde-N-acetyl-L-cysteine amino acid derivatives in reversed-phase high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – v.870. – № (1-2). – P. 271-87.
29. **Bartóák T., Szalaib G., Lőrincza Z.S et al.** High-Speed RP-HPLC/FL Analysis of amino acids after automated two-step derivatization with o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and 9-fluorenylmethyl chloroformate. // *J. Liq. Chromatogr.* – 1994. – Vol. 17. – № 20. – P. 4391-4403.
30. **Brückner H, Wittner R, Godel H.** Automated enantioseparation of amino acids by derivatization with o-phthaldialdehyde and n-acylated cysteines. // *J. Chromatogr.* – 1989. – Vol.476. – P.73-82.
31. **Brückner H, Haasmann S., Langer M., et al.** Liquid chromatographic determination of D- and L-amino acids by derivatization with o-phthaldialdehyde and chiral thiols / Applications with reference to biosciences. // *J. Chromatogr. A.* – 1994. – Vol. 666. – № 1-2. – P. 259-273.
32. **Langer M., Westhauser T., Godel H.** Liquid chromatographic determination of amino acid enantiomers by derivatization with o-phthaldialdehyde and chiral thiols Applications with reference to food science. // *J. Chromatogr. A.* – 1995. – Vol. 697. – № 1. – P. 229-245.
33. **Roth M.** Fluorescence reaction for amino acids. // *Anal. Chem.* – 1971. –Vol. 43. – P.880-882.

34. **Lindroth P., Mopper K.** High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. // *Anal. Chem.* 1979. – Vol. 51. – P.1667-1674.
35. **Kucera P., Umagat H.** Design of a post-column fluorescence derivatization system for use with microbore columns. // *J. Chromatogr.* – 1983. – Vol. 255. – P. 563-579.
36. **Dorresteijn R.C., Berwald L.G., Zomer G. et al.** Determination of amino acids using o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization; effect of reaction conditions. // *J. Chromatogr. A.* – 1996. – Vol.724. – P.159-167.
37. **Bartolomeo M. P. and Maisano F.** Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Quantitative Amino Acid Analysis. // *J. Biomol. Tech.* – 2006. – Vol.17. – №2. – P. 131–137.
38. **Krishnamurti C. R., Heindze A. M., Galzy G.** Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with o-phthalaldehyde for the quantitative analysis of amino acids in adult and fetal sheep plasma, animal feeds and tissues. // *J. Chromatogr.* – 1984. – Vol. 315. – P. 321-331.
39. **Elkin R. G.** Quantitative amino acid analysis of feed stuff hydrolysates by reverse phase liquid chromatography and conventional ion-exchange chromatography. // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* – 1984. Vol. 67. – P. – 1024-1026.
40. **Georgi G., Pietsch C., Sawatzki G.** High-performance liquid chromatographic determination of amino acids in protein hydrolysates and in plasma using automated precolumn derivatization with o-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol. // *J. Chromatogr. Biomed. App.* 1993. – Vol. 613. – № 1. – P.35-42.
41. **Lupke M.** Determination of amino acid enantiomers in fruit juices and in (dessert) wines by the OPA/IBC method. // *GIT Labor-Fachz.* – 1997. – № 41. – P. 444-446.
42. **Massom L. R.** Amino Acid Analysis // *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals (2-nd Ed.)*/ Ed.: W. J. Hurst. – NY: Taylor & Francis Group, 2008. – P. 433-464.
43. **Hušek P. and Šimek P.** Advances in Amino Acid Analysis. // *LC-GC.* – 2001. – Vol. 19. – № 9. – P. 986-999.
44. **Pantelis G. Rigas** Review: Liquid chromatography—post-column derivatization for amino acid analysis: strategies, instrumentation, and applications. // *Instrum. Sci. Technol.* – 2012. – Vol. 40. – № 2-3. – P. 161-193.
45. **Hanczkó R., Molnár-Perl I.** Derivatization, stability and chromatographic behavior of o-phthalaldehyde amino acid and amine derivatives: o-phthalaldehyde/ 2-mercaptoethanol reagent. // *Chromatographia.* – 2003. – Vol. 57. – № S1. – P. S103-S113.
46. **Liu H.** Measurement of blood plasma amino acids in ultrafiltrates by high-performance liquid chromatography with automatic precolumn o-phthalaldehyde derivatization/ Amino Acid Analysis Protocols // *Methods in Molecular Biology.* – N.J.: Humana Press Inc., 2002. – Vol. 159. – P.123-140.
47. **Grunau J.A, Swiader J.M.** Chromatography of 99 amino acids and other ninhydrin-reactive compounds in the Pickering lithium gradient system. // *J. Chromatogr.* – 1992. – Vol. 594. – P. 165-171.
48. **Csapo J., Albert Cs., Loki K., Csapo-Kiss Zs.** Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization. // *Acta Univ. Sapientiae Alimentaria.* – 2008.– № 1. – P. 5-29.
49. **Cunico R.L., Schlabach T.** Comparison of ninhydrin and o-phthalaldehyde post-column detection techniques for high-performance liquid chromatography of free amino acids. // *J. Chromatogr. A.* – 1983. – Vol. 266. – P. 461-470.
50. **Harduf Z.** Detection wavelength and integration strategy for amino acid analysis. // *J. Chromatogr. A.* – 1986. – Vol. 363. – P. 261-266.
51. **Rowan A. M., Moughan P. J., Wilson M. N.** Effect of hydrolysis time on the determination of the amino acid composition of diet, ileal digesta, and feces samples and on the determination of dietary amino acid digestibility coefficients. // *J. Agric. Food Chem.* – 1992. – Vol. 40. – P. 981-985.

52. **Zumwalt R.W., Absheer J. S., Kaiser F. E., Gehrke C. W.** Acid hydrolysis of proteins for chromatographic analysis of amino acids. // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* – 1987. – Vol. 70. – № 1. – P.147-151.
53. **Sarwar G.** Inter- and intra-laboratory variation in amino acid analysis of food proteins. // *J. Food Science.* – 1983. – Vol. 48. – P. 526-531.
54. **Gowda G. D., Liner I. E.** Determination of methionine in some feedstuffs using performic acid oxidation and standard hydrolysis. // *Indian J. Poult. Sci.* – 1986. – Vol. 21. – P. 120-123.
55. **Meredith F. I., McCarthy M. A., Leffler R.** Amino acid concentrations and comparisons of different hydrolysis procedures for American and foreign chestnuts. // *J. Agric. Food Chem.* – 1988. – Vol. 36. – P.1172-1175.
56. **Dale C. J., Young T. W., Brewer S.** Amino acid analysis of beer polypeptides. // *1 Inst. Brew.* – 1989. – Vol. 95. – P.89-97.
57. **Marshall H. F., Shaffer G. P., Conkerton E. J.** Free amino acid determination in whole peanut seeds. // *Anal. Biochem.* – 1989. – Vol. 180. – P. 264-268.
58. **Rouseff R. L.** Post-column derivatization in liquid chromatographic analysis of citrus products. // *Food. Technol.* – 1985. – Vol. 39. – P. 87-90.
59. **Csapo J., Csapo-Kiss Z., Folestad S., Tivesten A.** Mercaptoethanesulphonic acid as a protecting and hydrolysing agent for the determination of the amino acid composition of proteins using an elevated temperature for protein hydrolysis. // *Anal. Chim. Acta.* – 1994. – Vol. 289. – P. 105-111.
60. **Губанов Д. Г.** Аминокислотный состав мяса различных поставщиков // *Вестник Воронежского гос. агр. унив.* – 2011. – Т.3. – № 30. – С. 71-73.
61. **Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.** Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. // *Anal. Chem.* – 1958. – Vol. 30. – P. 1190-1206.
62. **Beaver R. W., Wilson D. M., Johes H. M., Haydon K. D.** Amino acid analysis in foods and feedstuffs using precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography – precolumn study. // *J. Ass. Off. Anal. Chem.* – 1987. – Vol. 70. – P. 425– 428.
63. **Bidlingmeyer B. A., Cohen S. A., Tarvin T. L., Frost B.** A new, rapid, high-sensitivity analysis of amino acids in food type samples. // *J. Ass. Off. Anal. Chem.* – 1987. – Vol. 70. – P. 241– 247.
64. **Cohen S. A., Strydom D. J.** Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives. // *Anal. Biochem.* – 1988. – Vol. 174. – P.1–16.
65. **Koop D. R., Morgan E. T., Tarr G. E., and Coon M. J.** Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome p-450 from live microsomes of ethanol-treated rabbits. // *J. Biol. Chem.* – 1982. – Vol. 257. – P. 8472–8480.
66. **White J. A., Hart R. T.** Derivatization methods for liquid chromatographic separation of amino acid. // in *Food Analysis by HPLC*. Ed. Nolle, L. M. L. – New York: Marcel Dekker, Inc., 1992. – P. 53–74.
67. **Woo K.-L.** Determination of amino acids in foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with new precolumn derivatives, butylthiocarbamyl, and benzylthiocarbamyl derivatives compared to the phenylthiocarbamyl derivative and ion exchange chromatography. // *Methods in Mol. Biology*, Vol. 159: Amino Acid Analysis Protocols. Ed. Cooper C., Packer N., and Williams K. – Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2002 – P.141-167.
68. **Bidlingmeyer B. A., Cohen S. A., Tarvin T. L.** Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. // *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* – 1984. – Vol. 336. – P. 93-104.
69. **Fierabracci V., Masiello P., Novelli M., Bergamini E.** Application of amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with phenyl isothiocyanate derivatization to the rapid determination of free amino acids in biological samples. // *J. Chromatogr.* – 1991. – Vol. 570. – P. 285-291.
70. **Furst P., Pollack, L. , Graser, T. A. , et al.** Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. // *J. Chromatogr.* – 1990. – Vol. 499. – P. 557-569.

71. **Sherwood R. A.** Amino acid measurement in body fluids using pitc derivatives // *Methods in Mol. Biology*, Vol. 159: Amino Acid Analysis Protocols. Ed. Cooper C., Packer N., and Williams K. – Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2002 – P. 169-175.
72. Adeola O., Buchanan-Smith J. G., Early R. J. Gas and high-performance liquid chromatographic analyses of amino acids in soybean meal, corn and triticale. // *J. Food. Biochem.* – 1988. – № 12. – P.171-181.
73. **Руденко А. О., Карцова Л. А., Снарский С. И.** Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращённо-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидантоинов аминокислот. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* – 2010. – Т. 10. – Вып. 2. – С.223-230.
74. **Elkin R. G., Wasynczuk A. M.** Amino acid analysis of feedstuff hydrolysates by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. // *Cereal Chem.* – 1987. – Vol.64. – P. 226-229.
75. **Gonzalez-Castro M.J., Lopez-Hernandez J., Simal-Lozano J., Oruna-Concha M.J.** Determination of amino acids in green beans by derivatization with phenylisothiocyanate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. // *J. Chromatogr Sci.* – 1997. – Vol.35. – P. 181-185.
76. **Hagen S. R., Frost B., Augustin J.** Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* – 1989. – Vol. 72. – P. 912-916.
77. **Sarwar G., Botting H. B., Peace R. W.** Complete amino acid analysis in hydrolysates of foods and feces by liquid chromatography of precolumn phenylisothiocyanate derivatives. // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* – 1988. – Vol. 71. – P.1172-1175.
78. **Sarwar G.** Amino acid ratings of different forms of infant formulas based on varying degrees of processing. // *Adv. Exp. Med. Biol.* –1991.– Vol. 289. – P. 389-402.
79. Toran A. A., Barberá R., Farré R. et al. HPLC Method for cyst(e)ine and methionine in infant formulas. // *J. Food. Sci.* – 1996. – Vol. 61. – P. 1132-1135
80. **Algeria A., Barberá R., Farré R. et al.** Isocratic high-performance liquid chromatographic determination of tryptophan in infant formulas. // *J. Chromatogr. A.* – 1996. – Vol. 721. – P. 83-88.
81. **Calull M., Fabregas J., Marce R. M., Borrull F.** Determination of free amino acids by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. Application to wine samples. // *Chromatographia.* – 1991. – Vol. 31. – P. 272-276.
82. **Ayestaran B., Ancin C., Corroza M., Garrido J.** Changes in free amino acid concentration during stabilization and aging of wines derived from gamacha and viura musts clarified by static sedimentation. // *Food Control.* – 1996. – Vol. 7. – P. 157-163.
83. **Cohen S. A.** Analysis of amino acids by liquid chromatography after precolumn derivatization with 4-nitrophenylisothiocyanate. // *J. Chromatogr.* – 1990. – Vol. 512. – P.283–290.
84. **Woo K. L., Lee S. H.** Determination of protein amino acids as butylthiocarbamyl derivatives by reversed-phase high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and UV detection. // *J. Chromatogr. A.* –1994. – Vol.667. – P.105–111.
85. **Woo K. L., Hwang Q. C., Kim H. S.** Determination of amino acids in the foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with a new precolumn derivative, butylthiocarbamyl amino acid, compared to the conventional phenylthiocarbamyl derivatives and ion-exchange chromatography. // *J. Chromatogr A.* – 1996. – Vol. 740. – №1. – P.31- 40.
86. **Woo K. L.** Determination of amino acids in foods by reversed-phase HPLC with new precolumn derivatives, butylthiocarbamyl, and benzylthiocarbamyl derivatives compared to the phenylthiocarbamyl derivative and ion exchange chromatography. // *Mol. Biotechnol.* – 2003 . – Vol. 24. – № 1. – P.69-88.
87. **Woo K. L., Ahan Y. K.** Determination of protein amino acid as benzylthiocarbamyl derivatives compared with phenylthiocarbamyl derivatives by reversed-phase high-performance liquid



- chromatography, ultraviolet detection and precolumn derivatization. // J. Chromatogr. A. – 1996. – Vol. 740. – P. 41–50.
88. **Liu H. J.** Determination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. // J. Chromatogr. A. – 1994. – Vol. 670. – P. 59-66.
  89. **Reverter M., Lundh T., Lindberg J. E.** Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. // J. Chromatogr. B. – 1997. – Vol. 696. – P. 1-8.
  90. **Diaz J., Lliberia JL, Comellas L.** F Broto-Puig. Amino acid and amino sugar determination by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate followed by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. // J. Chromatogr. A. – 1996. – Vol. 719. – P. 171-179.
  91. **Новикова А. Е.** Хроматографические методы идентификации и анализа аминированных метаболитов в микробиологических процессах. Автореф. дис. канд. хим. наук.: спец. 05.11.11 – «Хроматография и хроматографические приборы» – М., 2008. – 24 с.
  92. **Masuda A., Dohmae N.** Amino acid analysis of sub-picomolar amounts of proteins by precolumn fluorescence derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. // Biosci. Trends. – 2011. – № 6. – P.231-8.
  93. **Gu W., Zhang J, Xin M, et al.** Determination of free amino acids in the pork and its broth cooked by different methods using reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with pre-column derivatization. // Se Pu. – 2011. – №10. – P.1041-5.
  94. **Hong J.L., Bi Y.C., Hui W.Y., et al.** Determination of amino acids in food and feed by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and reversed-phase liquid chromatographic separation. // J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. – 1995. – Vol. 78. – P.736-744.
  95. **Van Wandelen C., Cohen S. A.** Using quaternary high-performance liquid chromatography eluent systems for separating 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate-derivatized amino acid mixtures. // J. Chromatogr. A. – 1997. – Vol. 763. – P.11-22.
  96. **Bosch L., Alegria A., Farré R.** Application of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods. // J. Chromatogr. B / Analyt Technol Biomed Life Sci. – 2006. – Vol. 831. – № (1-2). – P.176-83.
  97. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed [Electronic resource]: // Document No. SANCO/12495/2011 – Mode of access: <http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl/article.asp?CntID=727&LabID=100&Lang=EN> – Title from the screen.
  98. **Vicki Y.** HPLC Derivatization Reagents: Dabsyl Chloride [Electronic resource]: AnalytiX Volume 4 Article 3 – Mode of access: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/hplc-derivatization.html>. Title from the screen.
  99. **Fish W.W.** A reliable methodology for quantitative extraction of fruit and vegetable physiological amino acids and their subsequent analysis with commonly available HPLC systems. // Food and Nutrition Sciences. – 2012. – № 3.– P. 863-871.
  100. **Mazzucco E., Gosetti F., Bobba M., et al.** High-Performance liquid chromatography – ultraviolet detection method for the simultaneous determination of typical biogenic amines and precursor amino acids. Applications in food chemistry. // J. Agric. Food Chem. – 2010. – Vol.58. – № 1. – P.127–134.
  101. **Chang J.Y.** Analysis of phospho-amino acids and amino acid amides at the picomole level using 4-dimethylaminoazobenzene-4-sulphonyl chloride. // J. Chromatogr. – 1984. – Vol. 295. – P.193-200.
  102. **Knecht R., Chang J.Y.** Liquid chromatographic determination of amino acids after gas-phase hydrolysis and derivatization with (dimethylamino)azobenzenesulfonyl chloride. // Anal. Chem. – 1986. – Vol. 58. – P. 2375-2379.
  103. **Vendrell J., Aviles F.X.** Complete amino acid analysis of proteins by dabsyl derivatization and reversed-phase liquid chromatography. // J. Chromatogr. – 1986. – Vol. 358. – P. 401-413.

104. **Jansen E.H.J.M., Van den Berg R.H., Both-Miedema R., Doom L.** Advantages and limitations of pre-column derivatization of amino acids with dansyl chloride. // *J. Chromatogr.* – 1991. – Vol. 553. – P. 123-133.
105. **Krause I., Bockhardt A., Neckermann H. et al.** Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dansyl derivatives. // *J. Chromatogr. A.* – 1995. – Vol. 715. – P. 67-79.
106. **Kang X., Xiao J., Huang X., Gu Z.** Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. // *Clinica Chimica Acta.* – 2006. – Vol. 366. – P. 352-356.
107. **De Jong C., Hughes G.J., Van Wieringen E., Wilson K.J.** Amino acid analyses by high-performance liquid chromatography: an evaluation of the usefulness of pre-column DNS derivatization. // *J. Chromatogr.* – 1982. – Vol. 241. – P.345-359.
108. **Khayat A., Redenz P.K., Gorman L.A.** Quantitative determination of amino acids in food by high-pressure liquid chromatography. // *Food Technol.* – 1982. – Vol. 36. – P.46-50.
109. **Martin P., Polo C., Cabezudo M.D., Dabrio M.V.** Dansyl amino acids behavior on a Radial-Pak C18 column. Derivatization of grape wine musts, wines, and wine vinegars. // *J. Liq. Chromatogr.* – 1984. – Vol. 7. – P. 539-558.
110. **Reitsma B.H., Yeung E.S.** Optical activity and ultraviolet absorbance detection of dansyl L-amino acids separated by gradient liquid chromatography. // *Anal. Chem.* – 1987. – Vol. 59. – P. 1059-1061.
111. **Takeuchi T, Miwa T.** Signal enhancement by on-column fluorimetric detection in gradient elution of dansyl amino acids in liquid chromatography. // *Chromatographia.* – 1995. – Vol. 41. – P. 148-152.
112. **Martins A.R., Afonso A.P.** A practical approach to improve the resolution of dansyl-amino acids by high-performance liquid chromatography. // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* – 1996. – Vol. 19. – P.467-476.
113. **Betner I., Földi P.** New automated amino acid analysis by HPLC precolumns derivatization with fluorenylmethoxycarbonylchloride. // *Chromatographia.* – 1986. – Vol. 22. – P. 381-387.
114. **Gustavsson B., Betner I.** Fully automated amino acid analysis for protein and peptide hydrolysates by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate and 1-aminoadamantane. // *J. Chromatogr.* . 1990. – Vol. 507. – P. 67-77.
115. **Fernandez-Trapiella A.C.** Quantitative analysis of methionine, cysteine, and lysine in feeds by reverse-phase liquid chromatography using precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate: preliminary study. // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* – 1990. – Vol. 73. – P. 935-939.
116. **Butikofer U., Fuchs D., Bosset J.O., Gmur W.** Automated HPLC-amino acid determination of protein hydrolysates by precolumn derivatization with OPA and FMOC and comparison with classical ion exchange chromatography. // *Chromatographia.* – 1991. – Vol. 31. – P. 441-447.
117. **Anson-Moye H., Boning A.J.** A versatile fluorogenic labelling reagent for primary and secondary amines: 9-fluorenylmethylchloroformate. // *Anal. Lett.* – 1979. – Vol. 12. – P.25-35.
118. **Einarsson S., Josefsson B., Lagerkvist S.** Determination of amino acids with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. // *J. Chromatogr.* – 1983. – Vol. 282. – P. 609- 618.
119. **Kirschbaum J., Luckas B., Beinert W.D.** Pre-column derivatization of biogenic amines and amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and heptylamine. // *J. Chromatogr. A.* – 1994. – Vol. 661. – P.193-199.
120. **Bank R.A., Jansen E.J., Beekman B., Te Koppele J.M.** Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: improved derivatization and detection conditions with 9-fluorenylmethyl chloroformate. // *Anal Biochem.* – 1996. – Vol. 240. – P.167-176.



140. **Kochhar S., Christen P.** The enantiomeric error frequency of aspartateaminotransferase. // Eur. J. Biochem. – 1988. – Vol. 175. – P. 433-438.
141. **Martínez del Pozo A., Merola M., Ueno H. et al.** Stereospecificity of reactions catalyzed by bacterial D-amino acid transaminase. // J. Biol. Chem. – 1989. – Vol. 264. – P. 17784-17789.
142. **Goodnough D. B., Lutz M. P., Wood, P. L.** Separation and quantification of D- and L-phosphoserine in rat brain using N-alpha-(2, 4-dinitro-5-fluorophenyl)-L-alaninamide (Marfey's reagent) by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. // J. Chromatog. B. (Biomed. Appl.) . – 1995. – Vol. 672. – P. 290-294.
143. **Tran A. D., Blanc T., Leopold E. J.** Free solution capillary electrophoresis and micellar electrokinetic resolution of amino acid enantiomers and peptide isomers with L- and D-Marfey's reagents. // J. Chromatog. – 1990. – Vol. 516. – P.241-249.
144. **Goodlett D. R., Abuaf P. A., Savage, P. A. et al.** Peptide chiral purity determination: hydrolysis in deuterated acid, derivatization with Marfey's reagent and analysis using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. // J. Chromatog. A. –1995. – Vol. 707. – P. 233–244.
145. **Szókán, G., Mezö, G., and Hudecz, F.** Application of Marfey's reagent in racemization studies of amino acids and peptides. // J. Chromatog. – 1988. – Vol. 444. – P.115-122.
146. **Yoshino K., Takao T., Suhara M., et al.** Identification of a novel amino acid, o-bromo-L-phenylalanine, in egg-associated peptides that activate spermatozoa. // Biochemistry. – 1991. – Vol. 30. – P. 6203–6209.
147. **Vacca R.A., Giannattasio S., Graber R., et al.** Active-site Arg→Lys substitutions alter reaction and substrate specificity of aspartate aminotransferase. // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272. – P. 21932–21937.
148. **Graber R., Kasper P., Malashkevich V.N., et al.** Changing the reaction specificity of a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme. // Eur. J. Biochem. – 1995. – Vol.232. – P. 686-690.
149. **Bhushan R., Martens J.** Amino Acids: Chromatographic separation and enantioresolution. / New York: HNB Publishing, 2010. – P. 67–234.
150. **Ilisz I., Berkecz R., Péter A.,** Application of chiral derivatizing agents in the highperformance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: a review. // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2008. – Vol. 47. – № 900. – P. 1–15.
151. **Stalcup AM.** Chiral separations. // Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif.). – 2010. – Vol. 3. – P. 341-363.
152. **Bertrand M, Chabin A, Brack A, Westall F.** Separation of amino acid enantiomers via chiral derivatization and non-chiral gas chromatography. // J. Chromatogr. A. – 2008. – Vol.1180. – № 1-2. – P.131-137.
153. **Ilisz I, Aranyi A, Pataj Z, Péter A.** Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: a review. // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2012. – Vol. 69. – P. 28-41.
154. Food energy – methods of analysis and conversion factors / Fao food and nutrition paper 77 // Report of a technical workshop Rome, 3–6 December 2002. – 93 p.
155. Assessing quality and safety of animal feeds / FAO 160. – Rome: Food and agriculture Organization of the United Nations, 2004. – 47 p.
156. AOAC Official Method 994.12 Amino acids in feeds // Official Methods of Analysis of AOAC International 18th Edition, 2005, Ch. 4. P. 8-24.
157. RECOMMENDED METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING CODEX STAN 234-1999 / 34th Session of the Codex Alimentarius Commission in 2011. – 59 p.
158. Assessing quality and safety of animal feeds // FAO. – Rome. – 2004. – 47 p.
159. **Brückner H., Fujii N. (Eds.),** D-amino acids in chemistry, life sciences, and biotechnology, Zürich: Verlag Helvetica Chemica Acta, 2010. – Part 1. – P. 3–79.
160. **Konno R., Brückner H., A. D'Aniello, et al. (Eds.),** D-Amino acids –a new frontier in D-amino acids and protein research// Practical Methods and Protocols, Section 2, – NY: Nova Science Publishers Inc., 2007. – P. 17–148.

161. **Brückner H., Fujii N.** Free and peptide-bound D-amino acids in chemistry and life sciences. *Chemistry & Biodiversity* – Vol. 7 (2010) 1333 – 1336.
162. **Lolia A., Bee S., Jomah G.** Improved amino acid analysis of feedstuffs / Application Note: Bi30.1, Biochrom Ltd, Cambridge, UK – 1 p.
163. [Electronic resource]: Matrix independent analysis of free amino acids method abstract for post-column liquid chromatography 360. – Mode of access: [http://www.pickeringlabs.com/distribut or-catalog/M\\_360.asp](http://www.pickeringlabs.com/distribut%20or-catalog/M_360.asp) – Title from the screen.
164. **Molnár-Perl I.** Quantitation of amino acids and amines in the same matrix by high-performance liquid chromatography, either simultaneously or separately. // *J. Chromatogr. A.* – 2003.– Vol. 987. – P. 291–309.
165. **Molnár-Perl I.** Quantitation of amino acids and amines by chromatography// *Methods and protocols (Journal of chromatography library).* – Elsevier Science, 2005. – Vol.70 – 668 p.
166. **Relandeau C., Eudaimon M.** Measuring and predicting amino acid contents in feedingstuffs- Ajinomoto Eurolysine S.A.S. Special issue –Information N 32, Nov. 2008 – 37 p.
167. Метод с послеклоночной дериватизацией [Electronic resource]: Абакус Аналитические Системы ГМБХ / Abacus Analytical Systems GMBH – Mode of access: <http://www.abacus-lab.ru/analytical-chemistry/chromatography/amino-acid-analysers/method-with-post-column-derivatization.aspx> – Title from the screen.
167. <http://www.abacus-lab.ru/analytical-chemistry/chromatography/amino-acid-analysers/method-with-post-column-derivatization.aspx>
168. ISO/IEC 17025: 1999. – 12 p.
169. Chromatographic Methods for the detection of foreign proteins in processed meats/ Handbook of processed meats and poultry analysis // Editors, L.M.L. Nollet, F. Toldra. –Taylor & Francis Group, 2009 – P.587-589.
170. ГОСТ Р 52347-2005 Комбикорма, Комбикормовое сырье. Определение содержания аминокислот (лизина, метионина, треонина, цистина и триптофана) методом электрокапиллярного электрофореза. – М. Стандартинформ 2005 – 15 с.
171. **Hess S.** A universal HPLC-MS method to determine the stereochemistry of common and unusual amino acids / *Amino Acid Analysis: Methods and Protocols* // Meth. in Mol. Biology – © Springer Science+Business Media LLC, 2012. – Vol. 828. – P.63-75.
172. **Mirgorodskaya O. A., Körner R., Kozmin Y. P., and Roepstorff P.** Absolute quantitation of proteins by acid hydrolysis combined with amino acid detection by mass spectrometry / *Amino Acid Analysis: Methods and Protocols* // Meth. in Mol. Biology, M. A. Alterman and P. Hunziker (eds.), – © Springer Science+Business Media LLC, 2012. – Vol. 828.– P.115-120
173. **M. A. Alterman and P. Hunziker (eds.),** *Amino Acid Analysis: Methods and Protocols* // Meth. in Mol. Biology – Humana Press Inc. 2011. – Vol. 828. – 377 pp.
174. **Pappa-Louisi A.; Agrafiotou P.; Sotiropoulos S.** Advances in liquid chromatographic and voltammetric analysis of underivatized amino acids. // *Cur. Org. Chemistry.* – 2010. – Vol. 14. – P. 2235-2246.
175. **Wheat T. E., Hong P., Hillary B., et al.** [Electronic resource]: Wheat T. E., Hong P., Hillary B., et al. Automating amino acid analysis using robotic sample preparation instrumentation.pdf Posters Waters Corporation 2009, (Tecan US) – Mode of access: <http://www.waters.com/waters/library.htm?lid=10095562&cid=511436>.
176. [Electronic resource]: An automated approach to increase LC/MS sensitivity in multi-dimensional methods (poster) – Mode of access: <http://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134734911> – Title from the screen.
177. **Gika H, Theodoridis G, Mattivi F, et al.** Retention prediction of a set of amino acids under gradient elution conditions in hydrophilic interaction liquid chromatography. // *J. Sep. Sci.* – 2012. – Vol. 35. – P. 376–383.
178. **Kato M. Takatsu A.** Amino acid analysis by hydrophilic interaction (HILIC) chromatography coupled with isotope dilution mass spectrometry / *Amino Acid Analysis: Methods and Protocols*

- // Meth. in Mol. Biology – © Springer Science+Business Media LLC, 2012 – Vol. 828. – P. 55-62.
179. [Electronic resource]: Agilent nano HPLC – Mode of access: <http://www.ncbs.res.in/node/102>  
Title from the screen.
180. [Electronic resource]:– Mode of access: [http://www.google.com.ua/search?q=nano-lc&oe=utf-8&rls=com.frontmotion:uk:unofficial&client=firefox-a&hl=uk&sa=X&oi=image\\_result\\_group&ei=12gvUamCNM\\_LtAaa\\_IGoBQ&ved=0CCEQsAQ&biw=1258&bih=753&tbn=isch](http://www.google.com.ua/search?q=nano-lc&oe=utf-8&rls=com.frontmotion:uk:unofficial&client=firefox-a&hl=uk&sa=X&oi=image_result_group&ei=12gvUamCNM_LtAaa_IGoBQ&ved=0CCEQsAQ&biw=1258&bih=753&tbn=isch) – Title from the screen.
181. **Rosales A., Galicia L., Oviedo E., et al.** Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for protein, tryptophan, and lysine evaluation in quality protein maize (QPM) breeding programs. // J. Agric. Food Chem. – 2011. – Vol. 59. – № 20. – P. 10781–10786.
182. **De la Haba M.J., Garrido-Varo A., Guerrero-Ginel J.E., Pérez-Marín D.C.** Near-infrared reflectance spectroscopy for predicting amino acids content in intact processed animal proteins. // J. Agric. Food Chem. – 2006. – Vol. 54. – № 20. – P. 7703-7709.
183. **Fontaine J, Schirmer B, Hörr J.** Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) enables the fast and accurate prediction of essential amino acid contents. 2. Results for wheat, barley, corn, triticale, wheat bran/middlings, rice bran, and sorghum. // J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol. 50. – №14. – P. 3902-3911.
184. **Riin Rebanel, Koit Herodes.** Evaluation of the origin of Estonian honeys by amino acid content. // 4th International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS, November 4–6, 2009. - / Prague. Czech Republic. – P. 463.
185. **Koreňovská M., Bednáriková A.** Discrimination of slovakian organic and conventional wines according to elemental and amino acid profiles. // 5th International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS, November 1–4, 2011. – / Prague. Czech Republic. – P.152
186. **Andrić F.** Characterization of serbian monofloral honey according to their amino acids composition. // 5th International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS, November 1–4, 2011. – / Prague. Czech Republic. – P. 157
187. Modern techniques for food authentication / Ed. Da-Wen Sun. – New York: Academic Press, 2008. – 689 p.
188. Food science and security / Ed.: Amsel L. And Hirsch L. – New York: Nova Science Publishers Inc., 2009 – 330 p.
189. Food and NHP Authenticity / Wellness west technology watch. – 2009. – Vol.6. – P.1-11
190. FAO/IAEA Programme - Nuclear Techniques in Food and Agriculture <http://www-naweb.iaea.org/nafa/index.html>

*Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК, м. Київ*

*Надійшло до редакції  
27.11.2013*