

## СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Е.А. Сарф, Л.В. Бельская\*

Омский государственный педагогический университет,  
644099, Омск, Набережная им. Тухачевского, 14; \*e-mail: belskaya@omgpu.ru

Определение аминокислотного состава биологических жидкостей имеет важное диагностическое значение. К общепринятым методам анализа аминокислот относятся хроматографические, электрофоретические и масс-спектрометрические методы. Однако в исследовательских целях для решения частных задач зачастую возникает необходимость определения не полного аминокислотного профиля, а концентрации отдельных аминокислот. В настоящем обзоре представлен анализ литературных данных по методам определения индивидуальных аминокислот в биологических жидкостях. Показано, что определение аминокислот можно проводить спектрофотометрическими, электрохимическими методами, а также с использованием широкого набора биосенсоров, при этом предел обнаружения не уступает хроматографическим методам анализа.

**Ключевые слова:** аминокислоты; биологические жидкости; спектрофотометрический метод; капиллярный электрофорез; электрохимический метод

**DOI:** 10.18097/BMCRM00253

## ВВЕДЕНИЕ

Омиксные исследования представляют одно из перспективных направлений современной диагностики в контексте метаболома биологических жидкостей. Известно, что аминокислоты – это составная часть метаболома, вовлеченная едва ли не во все процессы организма человека [1, 2]. Помимо участия в биосинтезе белков, аминокислоты выполняют многочисленные функции; они входят в состав предшественников биоактивных соединений, нейромедиаторов, гормонов, являются индукторами пролиферативных реакций, а также, регуляторами иммунного ответа и ионного равновесия в клетках [3, 4]. Аминокислоты имеют важное значение в функционировании нервной системы, оказывая нейротрофические и нейропротекторные эффекты. Так, глутаминовая, аспарагиновая кислота, а также глицин, выступая в роли нейромедиаторов, действуют на синаптические рецепторы, вызывая возбуждение или торможение нейронов [5, 6]. Аминокислоты служат источником энергии для клеток (например, валин, лейцин, изолейцин и глутамин). Серосодержащие аминокислоты – метионин, цистеин – являются донорами серы (SH- и SO<sub>3</sub>H-групп), достаточное содержание которой в организме способствует полноценному формированию волос, кожи и ногтей. Эти аминокислоты принимают участие в формировании вторичной структуры белков за счет образования дисульфидных мостиков [7]. Аланин – это важный источник энергии для головного мозга и центральной нервной системы; эта аминокислота также участвует в метаболизме глюкозы, регулируя уровень сахара в крови. Гистидин – одна из незаменимых α-аминокислот, которая выполняет ряд важных функций в организме человека: входит в состав активных центров многих ферментов, служит субстратом для синтеза биологически активных веществ, гормонов и некоторых пигментов (меланин)

и участвует в синтезе белков. Триптофан – активный участник многих биологических процессов, метаболизм которого существенно влияет на здоровье человека [8]. Изменения концентрации триптофана в организме связаны с онкологическими заболеваниями, инфекциями, стрессом и депрессией [9, 10]. Незаменимая аминокислота фенилаланин по одному из своих основных путей метаболизма образует тирозин. В свою очередь, тирозин используется в разных тканях для синтеза катехоламинов (дофамин, норадреналин, адреналин), йодтиронинов (тироксин, трийодтиронин) и пигмента меланина [11].

Таким образом, аминокислоты наряду с другими биологически активными веществами обеспечивают жизнедеятельность на клеточном уровне; в связи с этим для нормального функционирования и гармоничного развития организма человека большое значение имеет оптимальный аминокислотный состав биологических жидкостей, который необходим для сбалансированных обменных процессов [12]. Избыточное или недостаточное содержание в тканях, органах, биологических жидкостях отдельных аминокислот или их групп может свидетельствовать о возникновении различных патологий [13, 14].

К основным методам суммарного определения аминокислот (разделения и идентификации) в биологических жидкостях относятся обращённо-фазовая жидкостная хроматография (RPLC) с разделением как в положительном (ESI+), так и в отрицательном (ESI-) режиме ионизации, катионообменная высококачественная жидкостная хроматография ВЭЖХ, газовая хроматография, электрофоретические методы, тандемная масс-спектрометрия, а также методы капиллярного электрофореза [15-24]. Однако данные методы, несмотря на их универсальность и высокую точность, требуют использования достаточно сложной аппаратуры и дорогостоящих реактивов [25]. При этом в ряде случаев



требуется селективное определение отдельных аминокислот в различных биологических жидкостях [26, 27], поскольку они характеризуют различные патофизиологические процессы и функции организма, и изучение их биологической роли и последствий сдвигов концентрации представляется перспективным направлением.

Целью настоящего обзора была систематизация существующих методов определения индивидуальных аминокислот в биологических жидкостях.

## 1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Традиционно, аминокислоты классифицируют по различным признакам: по структуре боковых цепей, полярности радикалов, химическому составу, степени гидрофильности и др. [28, 29].

Методы анализа и разделения аминокислот связаны, главным образом, с их строением. Аминокислоты алифатического ряда определяют с помощью жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии [30-32]. Один из распространённых и простых методов определения суммарного уровня  $\alpha$ -аминокислот – колориметрический анализ образцов, содержащих аминокислотные смеси, с нингидриновым реактивом (2,2-дигидроксииндан-1,3-дион); при этом образуется интенсивная синяя окраска раствора при реакции с глицином и желтая окраска с пролином, интенсивность которых измеряют спектрофотометрически [33-35]. Наиболее высокие и стабильные значения оптической плотности наблюдали во время проведения нингидриновой реакции с аминокислотами при температуре 100°C в течение 15 мин [36].

Зачастую для мониторинга состояния организма человека требуется определение индивидуальных аминокислот в различных биологических жидкостях. При этом целесообразно использовать альтернативные чувствительные и селективные методы анализа. Разработка таких методов – важная задача, как аналитической химии, так и клинической биохимии и медицины. Для решения данных вопросов применяют различные физико-химические и электрохимические методы, отвечающие требованиям, предъявляемым к современным методам мониторинга биообъектов. Основные методы представлены в таблице 1.

Существуют методы каталитического анализа, обладающие высокой чувствительностью, экспрессностью и простотой аппаратного оформления. Разработана методика определения гистамина с использованием медьсодержащих бумажных фильтров с химически закрепленными гексаметилендиаминовыми группами. Наиболее сильные помехи при определении гистамина отмечены для диэтиламина и триэтиламина. Методика использована для сорбционно-каталитического определения гистамина в слюне человека, и позволяет определять концентрации на уровне нмоль [53, 54].

### 1.1. Определение глицина, аланина, изолейцина

Разработан простой и чувствительный колориметрический метод для определения глицина, аланина и изолейцина. Аминокислоты дериватизировали дихлоном (2,3-дихлоранафталин-1,4-дион) в присутствии бикарбоната натрия. Дихлон реагирует с первичной

аминогруппой с образованием окрашенного в оранжевый цвет производного 2-замещенного амина-3-хлор-1,4-нафтохинона. Аминокислоты показали максимальное поглощение при 470 нм [37]. Метод был валидирован с точки зрения линейности (5–25 мкг/мл для глицина, аланина и изолейцина), прецизионности (колебания в течение дня 0.13–0.78%, 0.22–1.29%, 0.58–2.52% и колебания между днями 0.52–2.49%, 0.43–3.12%, 0.58–4.48% для глицина, аланина и изолейцина соответственно), точности (91.43–98.86 %, 96.26–105.99% и 95.73–104.82% для глицина, аланина и изолейцина соответственно), предела обнаружения (0.6 мкг/мл, 1.0 мкг/мл и 1.0 мкг/мл для глицина, аланина и изолейцина соответственно) и предела количественного определения (5.0 мкг/мл для глицина, аланина и изолейцина) [37, 55].

### 1.2. Определение пролина, аргинина, лизина

Для выборочного определения L-пролина предложен метод с использованием молекулярно-импринтированных наночастиц. Наночастицы на основе 2-гидроксиэтилметакрилата, синтезированные посредством мини-эмульсионной полимеризации, применяют для специфического распознавания L-пролина с помощью сканирующей электронной микроскопии [38]. В качестве нового подхода для прямого определения L-пролина в жидкостях организма использовали методы молекулярного импринтинга.

Для обнаружения L-аргинина разработан метод с использованием кондуктометрического биосенсора на основе рекомбинантной аргининдеиминазы [39]. Для разработки биосенсора рекомбинантную аргининдеиминазу иммобилизовали путем сшивания глутаровым альдегидом на чувствительной поверхности встречно-штыревых электродов кондуктометрического преобразователя, подобраны оптимальные условия иммобилизации фермента (концентрация фермента и время иммобилизации), а также изучено влияние параметров раствора (рН, ионной силы и буферной емкости) на чувствительность биосенсора. Биосенсор показал высокую селективность в присутствии нецелевых соединений. Линейный диапазон определения L-аргинина в широком спектре биологических жидкостей составил 20–750 мкМ, предел обнаружения – 2 мкМ, время отклика – 1–1.5 мин. Результаты определения аргинина в образцах, полученных биосенсорным и хроматографическим методами, имели высокую корреляцию ( $R=0.987$ ) [33].

Для определения концентрации L-лизина в водных средах применяют колориметрический и флуоресцентный датчик выключения DPT (флуоресцентный сенсор на основе куркумина [(2Z,4E,6E)-7-(4-(диметиламино)фенил)-3-гидрокси-1-фенилгепта-2,4,6-триен-1], полученный простым синтетическим методом [40]. Данным методом можно успешно определять лизин в биологических жидкостях человека (сыворотка крови и образцы мочи). Комбинация спектрофотометрического, колориметрического, флуориметрического методов дает высокую селективность, чувствительность, стабильность и воспроизводимость с пределом количественного определения от 94 нМ до 315 мкМ. Кроме того L-лизин также определяют с помощью биосенсоров. Существуют большое количество биосенсоров: электрохимические биосенсоры, оптические биосенсоры, микробные биосенсоры, сенсоры с трафаретной

Таблица 1. Методы определения индивидуальных аминокислот

АМК	Ссылка	Метод определения	Диапазон определяемых концентраций	Среда
Аланин, глицин, изолейцин	[37]	Спектрофотометрический	5–25 мкг/мл	Модельный раствор
Пролин	[38]	Электрохимический (биосенсоры)	от $1 \cdot 10^{-16}$ М до 0.01 М	Сыворотка, моча
Аргинин	[39]	Кондуктометрический биосенсор	20–750 мкМ	Любые биологические жидкости
Лизин	[40]	Колориметрический и флуоресцентный датчик выключения	от 94 нМ до 315 мкМ	Кровь, моча
	[41]	Электрохимический (биосенсоры на основе наноматериалов)	от 0.01 мкМ до 5500 мкМ	Любые биологические жидкости
	[42]	Спектрофотометрический	от 15 мкМ до 95 мкМ	Любые биологические жидкости
Гистидин	[43]	Избирательного рН-титриметрического определения	0.005-0.04 моль/л	Многочисленные объекты (в том числе и биологические жидкости)
	[42]	Спектрофотометрический	от 1.5 мкМ до 55 мкМ	Любые биологические жидкости
Метионин	[44]	Метод высокоэффективного капиллярного электрофореза	50-150 мкмоль/л	Кровь (плазма)
Цистеин	[45]	Капиллярное электрофоретическое разделение с лазерно-индуцированной флуоресценцией	50-200 мкмоль/л	Кровь (плазма), моча
Триптофан	[46]	Метод капиллярного электрофореза	от 10 мкг/л до 150 мкг/л	Слюна
	[47]	Спектрофотометрический	1–20 мкг/мл	Биологические образцы (гидролизаты белков)
	[48]	Спектрофотометрический	от 10 мг/л до 100 мг/л	Спинномозговая жидкость
	[49]	Спектрофотометрический (УФ область)	$0.25 \pm 0.06$ ммоль/л	Кровь (плазма)
Тирозин	[50]	Электрохимический метод (биосенсоры)	от $1 \cdot 10^{-7}$ М до $2 \cdot 10^{-5}$ М	Любые биологические жидкости
	[51]	Электрохимический метод (биосенсоры)	от 100 нМ до 100 мкМ	Любые биологические жидкости
Тирозин, фенилаланин	[52]	Спектрофотометрический	Тирозин: от 0.16 мг/мл до $5.5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл Фенилаланин: от 3.72 мг/мл до $9.08 \cdot 10^{-3}$ мг/мл	Модельный раствор

печатью, безферментные сенсоры, безреагентные сенсоры и электрохимические биосенсоры на основе наноматериалов [41]. В биосенсорах для определения L-лизина используют такие лизин-метаболизирующие ферменты, как лизиндекарбоксилаза, лизиндегидрогеназа и лизиноксидаза [42]. Лизиндекарбоксилаза катализирует декарбоксилирование L-лизина, что приводит к выделению углекислого газа, который, в свою очередь, обнаруживается электродом, специфическим для углекислого газа. Лизиндегидрогеназе требуется  $\text{NAD}^+$  в качестве кофермента вместе с окислительно-восстановительными медиаторами, в которых  $\text{NAD}^+$  восстанавливается до  $\text{NADH}$ , что определяется амперометрически. Лизиноксидаза – наиболее широко используемый фермент для анализа L-лизина. Методика, используемая в биосенсорах лизиноксидазы,

основана на измерении кислорода с помощью кислородного электрода Кларка или образовании пероксида водорода с последующим его измерением. В исследовании Kugimiya и соавт. описан метод определения лизина с использованием лизил-tPHK-синтетазы в качестве молекулярного элемента распознавания. Преобразование  $\text{NAD}^+$  в  $\text{NADH}$  путем нескольких ферментативных реакций измеряли спектрофотометрически путем мониторинга изменения поглощения при 340 нм [42].

### 1.3. Определение гистидина

В работе Черновой и соавт. рассмотрена возможность применения индикаторного электрода для избирательного рН-титриметрического определения гистидина [43].

В основе данного метода лежит тот факт, что гистидин – основная аминокислота с имидазольной группой; при его растворении (рН=7.61) создается щелочная среда, в то время как водные растворы других аминокислот имеют значения рН в пределах 6. Проведенные исследования показали, что в интервале концентраций 0.005-0.04 моль/л возможно прямое избирательное рН-потенциметрическое определение гистидина в различных смешанных растворах нейтральных аминокислот с погрешностью, не превышающей 7%, что может применяться в предварительных скрининговых обследованиях многочисленных объектов. Кроме того, существует метод определения гистидина с использованием гистидил-ТРНК-синтетазы в качестве элемента молекулярного распознавания: преобразование NAD<sup>+</sup> в NADH посредством нескольких ферментативных реакций измеряли спектрофотометрически путем мониторинга изменения поглощения при 340 нм с использованием микропланшетного ридера [42]. Для определения концентрации гистидина также применяют диазореакцию Паули. Метод основан на измерении спектрофотометром оптической плотности образованного окрашенного соединения [56]. Для проведения реакции к пробе добавляют свежеприготовленный диазореактив, смесь выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре и измеряют оптическую плотность при длине волны 425 нм.

#### 1.4. Определение метионина, цистеина

Серосодержащие аминокислоты (метионин, цистеин и цистин) активно участвуют в метаболических процессах организма. Так, наиболее тесная корреляция состояния различных звеньев иммунитета выявлена именно с серосодержащими аминокислотами [57]. С уровнем их содержания связаны не только клеточный и гуморальный иммунитет, но и активация лимфоцитов. Поэтому для своевременной коррекции уровня данных аминокислот необходимо их количественное определение. Для определения метионина, цистеина и гомоцистеина используют метод высокоэффективного капиллярного электрофореза, основанный на детекции лазерно-индуцированной флуоресценции [44]. Флуоресценция серосодержащих аминокислот в плазме линейна в диапазоне 50-150 мкмоль/л для L-метионина, 5-100 мкмоль/л для L-гомоцистеина и 50-200 мкмоль/л для L-цистеина. Концентрации в плазме, измеренные с помощью метода высокоэффективного капиллярного электрофореза, хорошо согласуются с концентрациями, полученными с помощью метода на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии; при этом отмечена удовлетворительная корреляция между концентрациями, полученными двумя методами ( $r = 0.9972$ ). Таким образом, данный метод измерения подходит для рутинных определений серосодержащих аминокислот в клинических исследованиях благодаря простоте, скорости, точности и чувствительности.

В методе Lochman и соавт. образцы биологической жидкости (плазма, моча) восстанавливали трис(карбоксиэтил)фосфином и метили 5-(бромметил) флуоресцеином. Капиллярное электрофоретическое разделение проводили в буфере, содержащем борат натрия, додецилсульфат натрия, 2-амино-2-метил-1-пропанола при рН 10.0 с лазерно-индуцированной флуоресценцией [45]. Чувствительность метода составляет 0.19 мкмоль/л

для всех анализируемых соединений. Результаты хорошо согласуются со стандартным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

#### 1.5. Определение триптофана

Триптофан – ароматическая гетероциклическая аминокислота, индивидуальное определение которой в биологических жидкостях достаточно распространено. Индивидуальное определение триптофана в слюне проводили с помощью метода капиллярного электрофореза, где в качестве ведущего буферного компонента использовали натрий тетраборнокислый 0.02 моль/л, анализ проводили при постоянном напряжении 25 кВ и рабочей длине волны фотометрического детектора 219 нм [46]. Известен спектрофотометрический метод определения триптофана [47], основанный на измерении интенсивности поглощения ярко окрашенного пурпурного цвета комплекса при длине волны 550 нм. Данное соединение образуется при реакции нитрита натрия с триптофаном (получается диазотированный продукт) в среде азотной кислоты с дигидрохлоридом N-(1-нафтил) этилендиамина. Линейная зависимость поглощения от концентрации триптофана позволяет проводить чувствительное количественное определение в диапазоне 1–20 мкг/мл, а предел обнаружения составляет 0.5 мкг/мл.

В работе Hosokawa и соавт. описан еще один метод спектрофотометрического определения триптофана, при котором образуется малиновое окрашивание в результате реакции окисления триптофана и глиоксиловой кислоты [48]. Окисление триптофана и глиоксиловой кислоты проводили с помощью гипохлорида натрия пентагидрата. Измерение проводили при длине волны 525 нм. Анализ показал линейный диапазон обнаружения от 10 мг/л до 100 мг/л ( $R^2 = 0.9996$ ). Этот новый спектрофотометрический метод позволяет обнаруживать триптофан в различных растворах образцов без дорогостоящих аналитических приборов или сложных манипуляций. Возможно совместное определение тирозина и триптофана спектрофотометрически в УФ области спектра при длине волны 290 нм в кварцевых кюветках. Для измерения к пробе добавляют 0.1 мл 1.8 М хлорной кислоты, затем центрифугируют и к надосадочной жидкости (0.2 мл) добавляют 1.8 мл 0.7 М NaOH, измеряют оптическую плотность при 290 нм. Авторами выведены уравнения для раздельного расчета концентраций тирозин- и триптофансодержащих пептидов [49]. Также триптофан, как некоторые другие аминокислоты, измеряют методом тонкослойной хроматографии [58], однако данный метод считается препаративным, но не измерительным.

#### 1.6. Определение фенилаланина, тирозина

К ароматическим аминокислотам также относятся фенилаланин и тирозин. Определение концентрации тирозина производят электрохимическим методом. В качестве биосенсоров часто используют материалы на основе углерода, в частности, оксид графена и гибриды его наночастиц из-за их уникальных свойств (большая площадь поверхности, улучшенная электрическая и теплопроводность, высокая механическая прочность и оптическая прозрачность) [50]. Такие биосенсоры экономически эффективны, они легко изготавливаются,

легко контролируются и демонстрируют высокую стабильность, широкий линейный диапазон обнаружения и лучшую чувствительность обнаружения. Кроме того известен метод с применением стеклоглеродного электрода, модифицированного графеном и наночастицами золота (графен/Au-наночастицы/стеклоглерод, изготовленный потенциостатическим осаждением наночастиц золота на стеклоглерод, покрытый графеном) [51]. Линейный отклик между пиковым током и концентрацией тирозина был обнаружен в диапазоне от 100 нМ до 100 мкМ, а предел обнаружения ( $S/N = 3$ ) составил 47 нМ.

Предложен метод искусственных нейронных сетей для спектрофотометрического определения данных аминокислот, основанный на моделирование различных многокомпонентных систем и сравнительном изучении их с помощью хемометрических алгоритмов [52]. Спецификой выбранных соединений являются характерные ультрафиолетовые спектры поглощения: максимумы поглощения фенилаланина – 205 нм и 257 нм, тирозина – 222 нм и 275 нм. Поскольку между фенилаланином и тирозином отсутствует химическое взаимодействие в водных растворах, соблюдается также фактор аддитивности. Все исследования проводили в водных растворах при физиологических значениях pH (6.5–7.1). В этих условиях фенилаланин и тирозин находятся в форме цвиттерионов. Обучение нейронной сети производили одним из наиболее популярных алгоритмов (хемометрическим) для обучения многослойных нейронных сетей — алгоритмом обратного распространения ошибки. Интервал определяемых концентраций фенилаланина составил 3.72 мг/мл –  $9.08 \cdot 10^{-3}$  мг/мл, интервал концентраций тирозина — от 0.16 мг/мл до  $5.5 \cdot 10^{-2}$  мг/мл. Все исследования проводили в водных растворах при физиологических значениях (модельный раствор).

## 2. ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

Одним из перспективных направлений определения аминокислот могут быть интегральные методы, которые позволяют количественно или полуколичественно определять содержание аминокислот в биологических жидкостях. К их числу относится инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия). Часто данный метод применяют в фармацевтической отрасли для аналитического контроля важнейших характеристик качества сырья и полупродуктов, а также критических параметров качества процесса изготовления с целью обеспечения качества конечного продукта. Это особенно актуально для производства аминокислот и их аналогов [59, 60]. В настоящее время данный метод активно развивается и применяется в биомедицинских исследованиях для анализа биологических жидкостей, в частности крови и ее фрагментов [61, 62]. В последнее время для диагностики и прогнозирования различных заболеваний все в возрастающей степени используют ротовую жидкость или смешанную слюну [63, 64]. Поэтому при определенных доработках экспрессный, безреагентный метод ИК-спектроскопии может быть перспективен для определения индивидуальных аминокислот в биологических жидкостях [65].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на очевидное преимущество методов хроматографии и масс-спектрометрии для анализа аминокислотного состава биологических жидкостей, для решения частных задач возникает необходимость определения аминокислот по отдельности. Перечень методов, которые могут быть использованы для данных целей, достаточно широк и включает спектрофотометрические, электрохимические, электрофоретические методы, а также различные биосенсоры. Сравнивая пределы обнаружения методов хроматографии и описанных методов определения аминокислот в биологических жидкостях, можно сделать вывод, что данные методы не уступают, а в некоторых случаях являются более чувствительными. Одним из недостатков биосенсоров принято считать их низкую селективность, однако в настоящее время при их разработке на модельных системах учтено влияние свойств растворов, а также всех мешающих примесей. Следует также отметить более простое аппаратное оформление, экспрессность и меньшую стоимость, что может быть ключевым фактором выбора метода для небольших лабораторий.

Неоспоримым фактом является, что в клинико-лабораторной практике для диагностики аминоацидурий и нарушений аминокислотного состава биологических жидкостей, могут применяться лишь стандартизованные методики с определенной клинической значимостью, чувствительностью и специфичностью, прошедшие клиническую апробацию и утвержденные в установленном порядке. Такими методами являются жидкостная хроматография (иногда в комбинации с масс-спектрометрией) и капиллярный электрофорез. Но в исследовательских целях можно использовать описанные методы определения концентрации аминокислот в разных биологических жидкостях.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда «Диагностическая и прогностическая значимость аминокислотного профиля слюны при раке молочной железы», проект 23-15-00188.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Ershov, Yu.A.* Fundamentals of molecular diagnostics. Metabolomics. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 336 p.
2. *Lomova, N.A., Chagovets, V.V., Dolgoplova, E.L., Novoselova, A.V., Petrova, U.L., Shmakov, R.G., Frankevich, V.E.* (2022) Alteration of the amino acid profile in the mother–fetus system in COVID-19. *Vestnik RGMU*, 3, 53-63. DOI: 10.24075/vrgmu.2022.025
3. *Pogorelova, T.N., Gunko, V.O., Nikashina, A.A., Mikhelson, A.A., Mikhelson, A.F., Lebedenko, E.Yu., Alliluyev, I.A.* (2018) The influence of amino acid imbalance in the mother and fetus on the formation of placental insufficiency

- and the course of the neonatal period. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, **63**(10), 610-614. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-610-614
4. Wu, G. (2010) Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Advances in Nutrition*, **1**(1), 31-7. DOI: 10.3945/an.110.1008
5. Okonenko, T.I., Kartysheva, K.Yu., Antropova, G.A., Novikova, A.P. (2022) Physiological mechanisms of replaceable proteinogenic amino acids and their importance for neurology. *Vestnik NovGU. Meditsinskiye Nauki*, **4**(129), 61–65. DOI: 10.34680/2076-8052.2022.4(129).61-65
6. Madzhidova, E.N., Rasulova, H.A., Ziyaviddinov, J.F. (2010) Features of the amino acid composition of cerebrospinal fluid and blood serum in patients with acute ischemic stroke. *Nervnyye BOLEZNI*, **4**, 23-26.
7. Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H. (2004) Sulfur containing amino acids and human disease. *Biomed. Pharmacother.*, **58**(1), 47-55. DOI: 10.1016/j.biopha.2003.11.005.
8. Friedman, M. (2018) Analysis, Nutrition, and Health Benefits of Tryptophan. *International Journal of Tryptophan Research*, **11**, 1178646918802282. DOI: 10.1177/62F1178646918802282
9. Lanser, L., Kink, P., Egger, E.M., Willenbacher, W., Fuchs, D., Weiss, G., et al. (2020) Inflammation-induced tryptophan breakdown is related with anemia, fatigue, and depression in cancer. *Front. Immunol.*, **11**, 249. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00249
10. Lee, H.O., Uzzo, R.G., Kister, D., Kruger, W.D. (2017) Combination of serum histidine and plasma tryptophan as a potential biomarker to detect clear cell renal cell carcinoma. *J Transl. Med.*, **15**(1), 72. DOI: 10.1186/s12967-017-1178-8
11. Krivova, A.V., Kozhevnikova, M.V., Korobkova, E.O., Zektser, V.Yu., Zheleznykh, E.A., Ageyev, A.A., Moskaleva, N.E., Kukharengo, A.V., Appolonova, S.A., Belenkov, Yu.N. (2022) Aromatic amino acids: phenylalanine and tyrosine in patients with arterial hypertension and ischemic heart disease. *Ratsional'naya Farmakoterapiya v Kardiologii*, **18**(3), 297-305. DOI: 10.20996/1819-6446-2022-06-05
12. Scholl-Bürgi, S., Sass, J.O., Heinz-Erian, P., Amann, E., Haberlandt, E., Albrecht, U., Ertl, C., Sigl, S.B., Lagler, F., Rostasy, K., Karall, D. (2010) Changes in plasma amino acid concentrations with increasing age in patients with propionic acidemia. *Amino Acids*, **38**(5), 1473-81. DOI: 10.1007/s00726-009-0356-2
13. Narezhnaya, E.V., Kruker, I.I., Avrutskaya, V.V., Nikashina, A.A., Serkova, S.V. (2013) Determination of the level of l-citrulline in amniotic fluid in women with physiological pregnancy by capillary electrophoresis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, **1**, 39-41.
14. Amosova, O.E., Mashina, E.V., Shanina, S.N. (2020) Amino acids as biomarkers of phase composition of choleliths. *Vestnik Instituta Geologii Komi NTS URO RAN*, **10**(310), 22-30. DOI: 10.19110/geov.2020.10.3
15. Reddy, I., Sherlin, H.J., Ramani, P., Premkumar, P., Natesan, A.; Chandrasekar, T. (2012) Amino acid profile of saliva from patients with oral squamous cell carcinoma using high performance liquid chromatography. *J Oral Sci*, **54**(3), 279-283. DOI: 10.2334/josnuds.54.279
16. de Sá Alves, M., de Sá Rodrigues, N., Bandeira, C.M. et al. (2021) Identification of possible salivary metabolic biomarkers and altered metabolic pathways in south american patients diagnosed with oral squamous cell carcinoma. *Metabolites*, **11**, 650. DOI: 10.3390/metabo11100650
17. García-Villaescusa, A., Morales-Tatay, J.M., Monleón-Salvado, D., González-Darder, J.M., Bellot-Arcis, C., Montiel-Company, J.M., Almerich-Silla, J.M. (2018) Using NMR in saliva to identify possible biomarkers of glioblastoma and chronic periodontitis. *PLoS ONE*, **13** (2), e0188710. DOI: 10.1371/journal.pone.0188710
18. Hershberger, C.E., Rodarte, A.I., Siddiqi, S., Moro, A., Acevedo-Moreno, L.A., Brown, J.M., Allende, D.S., Aucejo, F., Rotroff, D.M. (2021) Salivary Metabolites are Promising Non-Invasive Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma and Chronic Liver Disease. *Liver Cancer Int.*, **2** (2), 33-44. DOI: 10.1002/lci.225
19. Takamori, S., Ishikawa, S., Suzuki, J., Oizumi, H., Uchida, T., Ueda, S., Edamatsu, K., Iino, M., Sugimoto, M. (2022) Differential diagnosis of lung cancer and benign lung lesion using salivary metabolites: A preliminary study. *Thorac. Cancer*, **13** (3), 460-465. DOI: 10.1111/1759-7714.14282
20. Muller Bark, J., Karpe, A.V., Doecke, J.D., Leo, P., Jeffrey, R.L., Chua, B., Day, B.W., Beale, D.J., Panyadeera, C. (2023) A pilot study: Metabolic profiling of plasma and saliva samples from newly diagnosed glioblastoma patients. *Cancer Med.*, **12**(10), 11427-11437. DOI: 10.1002/cam4.5857
21. Cheng, F., Wang, Z., Huang, Y., Duan, Y., Wang, X. (2015) Investigation of salivary free amino acid profile for early diagnosis of breast cancer with ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta*, **20**(447), 23-31. DOI: 10.1016/j.cca.2015.05.008
22. Hasan, M.M., Razu, M.H., Akter, S., Mou, S.A., Islam, M., Khan, M. (2024) Development and validation of a non-invasive method for quantifying amino acids in human saliva. *RSC Adv.*, **14**(31), 22292-22303. DOI: 10.1039/d4ra01130a
23. Vorozheikin, S.B., Vorozheikina, S.S. (2008) Amino acids: main achievements of methods for their analysis and separation. *Vestnik IKIAT*, **2**(17), 163-168.
24. Kaur, J., Rangra, N.K., Chawla, P.A. (2023) A comprehensive review on recent trends in amino acids detection through analytical techniques. *Separation Science Plus*, **6**(11), 2300040. DOI: 10.1002/sscp.202300040
25. Gałęzowska, G., Ratajczyk, J., Wolska, L. (2021) Determination of amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography: critical review. *Amino Acids*, **53**(7), 993-1009. DOI: 10.1007/s00726-021-03002-x
26. Magerramova, L.M., Dzhaifarova, N.A., Suleimanova, E.I. (2023) Methods of physicochemical analysis for the determination of tryptophan. *Vestnik KNII RAN. Seriya «Yestestvennyye i Tekhnicheskkiye Nauki»*, **2**(13), 48-57. DOI: 10.34824/VKNIIRAN.2023.13.2.006
27. Hasani, M., Yaghoubi, L., Abdollahi, H. (2007) A kinetic spectrophotometric method for simultaneous determination of glycine and lysine by artificial neural networks. *Anal. Biochem.*, **365**(1), 74-81. DOI: 10.1016/j.ab.2007.02.010
28. Nikolaeva, E.A., Mamedov, I.S., Zolkina, I.V. (2011) Modern technologies for diagnosing hereditary diseases of amino acid metabolism. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii*, **4**, 20-30.
29. Danilova, L.A. *Biochemistry*. St. Petersburg: SpetsLit, 2020, 333 p..
30. Eid S.M., Farag M.A., Bawazeer S. (2022) Underivatized amino acid chromatographic separation: optimized conditions for hplc-uv simultaneous quantification of isoleucine, leucine, lysine, threonine, histidine, valine, methionine, phenylalanine, tryptophan, and tyrosine in dietary supplements. *ACS Omega*, **7**(35), 31106-31114. DOI: 10.1021/acsomega.2c03228
31. Casetta, B., Tagliacozzi, D., Shushan, B., Federici, G. (2000) Development of a method for rapid quantitation of amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in plasma. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **38**(5), 391-401. DOI: 10.1515/CCLM.2000.057
32. Song, Y, Xu, C, Kuroki, H, Liao, Y, Tsunoda, M. (2018) Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **147**, 35-49. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.08.050
33. Tush, E.V., Eliseeva, T.I., Khaletskaia, O.V., Krasilnikova, S.V., Ovsyannikov, D.Yu., Potemina, T.E., Ignatov, S.K. (2019) Markers of the state of the extracellular matrix and methods of their study (review). *Sovremennyye Tekhnologii v Meditsine*, **2**, 133-149. DOI: 10.17691/stm2019.11.2.20
34. Salamata, A.A., Simonyan, A.V., Pokrovskaya, Yu.S., Avanesyan, A.A. (2007) Development of an accessible method for the quantitative determination of α-amino acids. *Volgogradskiy Nauchno-Meditsinskiy Zhurnal*, **2**, 17-19.
35. Suleymanova, E.I. (2023) Application of the spectrophotometric method for the determination of amino acids. *Vestnik Bashkirskogo Universiteta*, **28**(1), 100-104. DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2023.1.15
36. Nashchekina, Yu.A., Kurdyukova, K.E., Zorin, I.M., Mikhailova, N.A., Bilibin, A.Yu. (2018) Spectrophotometric determination of L-lysine concentration in aqueous organic solutions. *Zhurnal Tekhnicheskoy Fiziki*, **9**(88), 13843-1386. DOI: 10.21883/JTF.2018.09.46245.31-18
37. Qadri, S., Rathod, I., Kanakia, D. (2007) Colorimetry method for estimation of glycine, alanine and isoleucine. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **69**(3), 345-366. DOI: 10.4103/0250-474X.34566
38. Nergiz, M., Zenger, O., Peşint, G.B. (2024) L-proline determination by molecularly imprinted nanoparticles: A potential nanoscale tool for the diagnosis of metabolic disorders. *J. Chromatogr. A*, **1730**, 465106. DOI: 10.1016/j.chroma.2024.465106
39. Berketa, K., Saiapina, O., Fayyura, L., Sibirny, A., Dzyadevych, S., Soldatkin, O. (2022) Novel highly sensitive conductometric biosensor based on arginine deiminase from *Mycoplasma hominis* for determination of arginine. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, **367**, 132023 DOI: 10.1016/j.snb.2022.132023
40. Lavanya, R., Poovarasan, S., Srinivasadesikan, V., Lin, M.-c., Padmini, V. (2023) Selective fluorescence turn-off detection of lysine by a curcumin derivative with real sample analysis. *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*, **444**: 115008. DOI: 10.1016/j.jpphotochem.2023.115008
41. Pundir, C.S., Nohwal, B., Chaudhary, R. (2021) A comprehensive review of methods for determination of l-lysine with detailed description of biosensors. *Int. J. Biol. Macromol.*, **1**:186:445-461. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.010
42. Kugimiya, A., Takamitsu, E. (2013) Spectrophotometric detection of histidine and lysine using combined enzymatic reactions. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **33**(8), 4867-70. DOI: 10.1016/j.msec.2013.08.004
43. Chernova, R.K., Varygina, O.V., Berezkina, N.S. (2015) Selective determination of histidine in mixed solutions of α-amino acids. *Izvestiya Saratovskogo Universiteta. Novaya Seriya. Seriya Khimiya. Biologiya. Ekologiya*, **4**, 15-21.
44. Vecchione, G., Margaglione, M., Grandone, E., Colaizzo, D., Cappucci, G., Fermo, I., D'Angelo, A., Di Minno, G. (1999) Determining sulfur-containing amino acids by capillary electrophoresis: a fast novel method for total homocyst(e)ine human plasma. *Electrophoresis*, **20**(3), 569-74. DOI: 10.1002/(SICI)1522-2683(19990301)20:3<569:AID-ELPS569>3.0.CO;2-S
45. Lochman, P., Adam, T., Friedecký, D., Hlídková, E., Skopková, Z. (2003) High-throughput capillary electrophoretic method for determination of total aminothiols in plasma and urine. *Electrophoresis*, **24**(7-8), 1200-7. DOI: 10.1002/elps.200390154
46. Belskaya, L.V., Sarf, E.A. (2024) Application of the capillary electrophoresis method for the quantitative determination of tryptophan in the saliva of breast cancer patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, **69**(4), 117-122. DOI: 10.51620/0869-2084-2024-69-4-117-122
47. Wentao, Y., Zhang, H., Chen, G., Chunyan, T. (2004) Novel method for spectrophotometric determination of l-tryptophan in the enzymatic resolution of dl-n-acetyl-tryptophan. *Microchimica Acta*, **146**, 285-290. DOI: 10.1007/s00604-004-0180-z

48. Hosokawa, Sh., Morinishi, T., Ohara, K., Yamaguchi, K. (2023) A spectrophotometric method for the determination of tryptophan following oxidation by the addition of sodium hypochlorite pentahydrate. *PLoS One*, **18**(1), 3-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0279547
49. Gavrilov, V.B., Lobko, N.F., Konev, S.V. (2004) Determination of tyrosine and tryptophan-containing peptides in blood plasma by absorption in the UV spectral region. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, **3**, 12-16.
50. Kavitha, C., Bramhaiah, K., John, N.S. (2020) Low-cost electrochemical detection of L-tyrosine using an rGO-Cu modified pencil graphite electrode and its surface orientation on an Ag electrode using an ex situ spectroelectrochemical method. *RSC Adv*, **10**(39):22871-22880. DOI: 10.1039/d0ra04015k
51. Liu, M., Lao, J., Wang, H., Su, Z., Liu, J., Wen, L., Yin, Z., Luo, Q., Peng, H. (2021) Electrochemical determination of tyrosine on glassy carbon electrode modified with graphene composite and gold nanoparticles. *Elektrokimiya*, **57**(1), 47-58. DOI: 10.31857/S0424857020110067
52. Aravin, O.I., Novikov, A.Yu., Selifonova, E.I., Chernova, R.K., Shevyrev, S.P. (2011) Application of the artificial neural network method for determining some amino acids in binary mixtures. *Izvestiya Saratovskogo Universiteta. Novaya Seriya. Seriya Matematika. Mekhanika. Informatika*, **1**, 105-111
53. Petrova, Y.Yu. (2010) A sorption-catalytic procedure for determining histamine. *Journal of Analytical Chemistry*, **65**(5), 525-534. DOI: 10.1134/S1061934810050151
54. Beklemishev, M.K., Petrova, Yu.Yu., Abramova, O.M., Dolmanova, I.F. (2003) Sorption-catalytic method for determining nitrogen-containing organic compounds. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 2. Khimiya*, **44**(2), 115-122.
55. Suleymanova, E.I. (2023) Application of physical and chemical methods of analysis for the determination of alanine. *Vestnik Bashkirskogo Universiteta*, **28**(2), 206-210. DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2023.2.11
56. Arzumanyan, V.G., Foshina, E.P., Ozhovan, I.M., Iksanova, A.M., Kolyanova, T.I., Mironov, A.Yu. (2021) Method for determining salivary histatins. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, **66**(6), 358-363. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-6-358-363
57. Kolbasova, E.A., Kiseleva, N.I., Naumov, A.V. (2021) Sulfur-containing amino acids and their derivative metabolites in postmenopausal women with menopausal syndrome. *Vestnik VG MU*, **1**, 72-80. DOI: 10.22263/2312-4156.2021.1.72
58. Maistrenko, V.N., Ilyasova, R.R., Kudasheva, F.Kh., Sadretidinov, M.A., Maistrenko, T.V. (2008) Quantitative analysis of  $\alpha$ -amino acids in the urine of neurosurgical patients using thin layer chromatography on Armsorb plates. *Vestnik Bashkirskogo Universiteta*, **13**(2), 265-298.
59. Xiao-Lan, Y., Ning, X., Yong, H., Guang, P., Xue, Y., Fen, X. (2014) Research progress and application prospect of near-infrared spectroscopy in analysis of food amino acid. *Chinese*, **34**(9), 2377-81. DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2014)09-2377-05
60. Guzova, V.A., Stroganova, E.A. (2024) Application of IR spectroscopy method for detection of tyrosine obtained from metabolites. *Vestnik Nauki*, **6**(75), 1916-1921.
61. Aitekenov, S., Sultangaziyev, A., Abdirova, P., Yussupova, L., Gaipov, A., Utegulov, Z., Bukasov, R. (2023) Raman, Infrared and Brillouin Spectroscopies of Biofluids for Medical Diagnostics and for Detection of Biomarkers. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **53**(7), 1561-1590. DOI: 10.1080/10408347.2022.2036941
62. Gordetsov, A.S. (2010) Infrared spectroscopy of biological fluids and tissues. *Sovremennyye Tekhnologii v Meditsine*, **1**, 84-98.
63. Kazarina, L.N., Gordetsov, A.S., Smetanina, O.A., Krasnikova, O.V. (2017) Diagnosis and prevention of gingivitis using the method of infrared spectroscopy of biological fluids of the oral cavity. *Vyatskiy Meditsinskiy Vestnik*, **3**(55), 60-63. DOI: 10.25636/PMP.2.2018.4.14
64. Belskaya, L.V., Sarf, E.A., Solomatina, D.V. (2019) Quantitative determination of lipid content in biological material using infrared spectroscopy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, **64**(4), 204-209. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-4-204-209
65. Wolpert, M., Hellwig, P. (2006) Infrared spectra and molar absorption coefficients of the 20  $\alpha$  amino acids in aqueous solutions in the spectral range from 1800 to 500  $\text{cm}^{-1}$ . *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **64**(4), 987-1001. DOI: 10.1016/j.saa.2005.08.025

Поступила: 22.10.2024  
 После доработки: 12.03.2025  
 Принята к публикации: 18.03.2025

## METHODS FOR DETERMINING INDIVIDUAL AMINO ACIDS IN BIOLOGICAL FLUIDS

*E.A. Sarf, L.V. Bel'skaya\**

Omsk State Pedagogical University, 14, Tukhachevsky str, Omsk, 644099 Russia; \*e-mail: belskaya@omgpu.ru

Determination of the amino acid composition of biological fluids is of great diagnostic importance. Commonly accepted methods of amino acid analysis include chromatography, electrophoresis and mass-spectrometry. However, for research purposes, to solve specific problems, it is often necessary to determine not the complete amino acid profile, but the concentration of individual amino acids. This review presents literature data analysis on methods used for determining individual amino acids in biological fluids. It is shown that amino acids can be determined by spectrophotometric, electrochemical methods, as well as using a wide range of biosensors, are the detection limit is basically comparable to chromatographic methods of analysis.

**Key words:** amino acids; biological fluids; spectrophotometric method; capillary electrophoresis; electrochemical method

### FUNDING

The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation "Diagnostic and prognostic originality of the amino acid profile of saliva in breast cancer", project 23-15-00188.

Received: 22.10.2024, revised: 12.03.2025, accepted: 18.03.2025