



УДК 54.06:547.466:543.54

Определение лизина после разделения смешанных растворов лизина и глицина с использованием катионита КУ-2-8

Агупова М.В., Бобрешова О.В., Бобринская Г.А., Якунина Т.В.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Аннотация

Исследованы условия разделения лизина и глицина с использованием катионита КУ-2-8. Разделение основано на различных значениях рI аминокислот. Разделение проводили при значениях рН от 5 до 7, когда лизин преимущественно находится в форме однозарядных катионов, а глицин – цвиттерионов. Процесс протекает по реакции ионного обмена между ионами Lys^+ фазы раствора и ионами Na^+ фазы сорбента. На основе спектрофотометрического и хроматографического анализов растворов определены коэффициенты распределения глицина и моногидрохлорида лизина (составили 26,3 и 0,05 соответственно), коэффициент разделения моногидрохлорида лизина и глицина с использованием катионита КУ-2-8 (526), степень извлечения моногидрохлорида лизина из раствора (99%). Разработанным нами потенциометрическим сенсором на основе перфторированной сульфокатионитовой мембраны МФ-4СК была определена концентрация лизина в анализе и элюате. Средние концентрационные константы селективности сенсора к катионам лизина в присутствии глицина и хлорида аммония не превышали 0,035. Относительная погрешность определения моногидрохлорида лизина в исследуемых растворах составила 2-5 %.

Ключевые слова: лизин, глицин, разделение, катионит КУ-2-8, коэффициент разделения, степень извлечения, доннановский потенциал, константа селективности

Conditions of separation lysine and glycine with application of cation-exchange resin CU-2-8 are investigated. Separation spent at values pH from 5 up to 7, when lysine is mainly in the form of singly charged cations, and glycine – zwitterions. On the basis of spectrophotometric and chromatographic analyses of solutions distribution factors of glycine and a monohydrochloride lysine (have made 26,3 and 0,05 accordingly), division factor of a monohydrochloride lysine and glycine with cation-exchange resin CU-2-8 (526), a extraction degree of a monohydrochloride lysine from a solution (99 %) are determined. Lysine concentrations in analyt and column effluent were determined by potentiometric sensor on the basis of perfluorinated sulfonic cation-exchange membranes MF-4SK, which was developed in our group. Average concentration selectivity constants of sensor to cations lysine at presence of glycine and ammonium chloride did not exceed 0,035. The ratio error of monohydrochloride lysine definition in investigated solutions has made 2-5 %.

Keywords: lysine, glycine, division, cation-exchange resin CU-2-8, factor of separation, extraction degree, Donnan potential, selectivity constant

Введение

Разработка методов количественного и качественного анализа аминокислот (АК) является важной задачей многих отраслей науки: медицины, биохимии, микробиологии, пищевой промышленности, фармакологии и сельского хозяйства. Проведение анализа осложняется тем, что АК относятся к классу амфолитов [1], и их

водные растворы представляют собой сложную многоионную систему, в состав которой входят как катионы и анионы, так и цвиттерионы АК. Кроме того, в такого рода системах протекают реакции протонирования/ депротонирования.

Получение АК возможно несколькими путями [2]: биотехнологическим, химическим синтезом и гидролизом природного белкового сырья. Получение оптически активных L-изомеров аминокислот из гидролизатов природных материалов связано с многоступенчатой и дорогостоящей очисткой. В микробиологическом синтезе образования большинства АК взаимосвязаны. При этом одни АК являются предшественниками для биосинтеза других.

В настоящее время наиболее точным методом контроля аминокислот в сложных смесях является высокоэффективная жидкостная хроматография, требующая дорогостоящего оборудования и постоянно обновляемой реактивной базы. Существующие иные способы количественного определения АК (неводное потенциометрическое и аргентометрическое титрование, экстракция, биосенсоры) требуют предварительной пробоподготовки, персонала высокой квалификации, труднодоступных и зачастую опасных реактивов, а так же являются длительными в исполнении или имеют большую ошибку определения. Активно создаваемые в настоящее время биосенсоры, например, для определения лизина [3], требуют подбора специфических ферментов и их иммобилизации и регенерации, не стабильны и имеют ошибку определения до 30 %.

Для облегчения анализа возможно предварительное разделение АК. Для фракционирования аминокислот применяются хроматография в тонком слое силикагеля или целлюлозы [4, 5]. Так же известны методы разделения аминокислот с помощью экстракции [6] и электрофореза [7]. Представленные процессы разделения АК сложны и длительны в исполнении.

Доступность и широкий выбор ионитов свидетельствуют о целесообразности их использования для разделения АК. Авторами [8, 9] разработан способ безреагентного ионообменного разделения тирозина и фенилаланина, основанный на различном сродстве индивидуальных АК к иониту. Процесс разделения тирозина и фенилаланина проходит по многоступенчатому механизму, к тому же для эффективности разделения требуется дополнительная терморегуляция.

Таким образом, известные методики основаны на многоступенчатых механизмах разделения, что приводит к существенному увеличению времени анализа. Поэтому, проблема разработки эффективных и экспрессных методик разделения аминокислот с использованием ионообменных смол весьма актуальна в настоящее время.

Целью настоящей работы явилось определение лизина с помощью разработанного нами потенциометрического сенсора после разделения смеси лизина и глицина, основанного на различных значениях pI АК, с использованием катионита КУ-2. При этом потенциометрический селективный сенсор для определения моногидрохлорида лизина в водных растворах впервые использовался в реальных, а не модельных системах.

Эксперимент

Объекты исследования. В качестве объектов исследования использовались индивидуальные и смешанные растворы моногидрохлорида лизина и глицина. Некоторые физико-химические характеристики исследуемых аминокислот представлены в таблице 1.

Таблица 1. Физико-химические свойства исследуемых аминокислот [1,10]

Аминокислота	Обозначение	pI	pK ₁ (COOH)	pK ₂ (α-NH ₂)	pK ₃ (ε-NH ₂)	Растворимость при 25 °С, г/100 г Н ₂ О	М, г/моль
Лизин	Lys	9,59	2,18	9,12	10,35	легко	146,19
Глицин	Gly	5,97	2,34	9,60	-	25	75,05

Концентрации аминокислот в исследуемых растворах не превышали $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л для глицина и $1,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л для моногидрохлорида лизина. Значения pH исследуемых растворов находилось в диапазоне значений от 5 до 7. Для приготовления растворов использовали реактивы марки ч.д.а. и дистиллированную воду с сопротивлением $0,35 \text{ МОм} \cdot \text{см}^2$.

В качестве сорбента в работе использовался гелевый катионит КУ-2-8, предварительно переведенный в Na^+ -форму по стандартной методике [11].

Методика разделения. Схематическое изображение рабочей колонки представлено на рисунке 1. Высота колонки составляла 10 см, диаметр 1 см, скорость пропускания разделяемого раствора – 25 мл/ч.

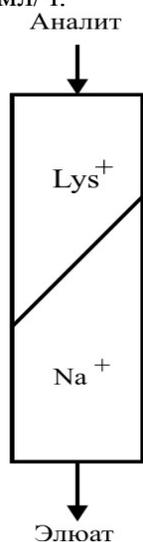


Рис.1. Схематическое изображение рабочей колонки

Методика определения оптической плотности. Измерение оптической плотности D растворов аминокислот проводили на фотоэлектрическом колориметре-нефелометре ФЭК-56 в кварцевых кюветах толщиной 3 мм при длине волны 546 см^{-1} . Измерения осуществляли по стандартной методике [12]. Погрешность измерения составила не более 5%.

Определение концентраций аминокислот в исследуемых растворах осуществляли методом градуировочного графика. В виду большого разброса концентраций исследуемых растворов построение градуировочных графиков в координатах $D-C$, где концентрация выражается в моль/л не информативно. Концентрационные зависимости оптической плотности для индивидуальных и смешанных растворов моногидрохлорида лизина и глицина в координатах $D-C$, где размерность концентрации, выраженная в мкг/мл, представлены на рисунке 2.

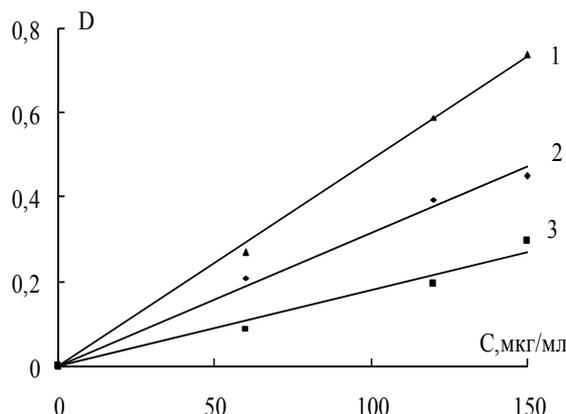


Рис.2. Концентрационная зависимость оптической плотности для
1 – LysHCl+Gly, 2 – Gly, 3 – LysHCl

Зависимости оптической плотности индивидуальных и смешанных растворов глицина и моногидрохлорида лизина от их концентрации линейны с достоверностью аппроксимации 0,98.

Методом калибровочных графиков (рис. 2) показано, что для исследуемых растворов соблюдается закон аддитивности оптических плотностей (1).

$$D_{смеси} = D_{LysHCl} + D_{Gly}, \quad (1)$$

где D_{LysHCl} , D_{Gly} и $D_{смеси}$ – оптическая плотность растворов моногидрохлорида лизина, глицина и их смеси соответственно.

Расчитаны минимальные концентрации исследуемых растворов индивидуальных аминокислот, которые можно определить спектрофотометрическим методом в кюветах толщиной 3 мм при длине волны 546 см^{-1} . Концентрация моногидрохлорида лизина и глицина составила 0,11 и 0,13 ммоль/л соответственно.

Методика проведения ТСХ. Для проведения ТСХ использовали пластины Silufol. Получение хроматограмм проводили по методике, описанной в [13].

Методика определения доннановского потенциала. В качестве лабораторной установки для количественного определения лизина в исследуемых растворах, использовали ячейку (схема представлена на рисунке 3) для оценки доннановского потенциала [14], в которой мембрана одним концом, уподобляемым датчику в ионоселективном электроде, погружена в исследуемый раствор C_1 , а другим концом – в раствор с концентрацией близкой к концентрации внутреннего раствора мембраны. Измерение производили с использованием двух хлорсеребряных электродов сравнения. В систему вводили солевые мостики, соединяющие электроды сравнения с рабочими растворами, для предотвращения разбавления рабочих растворов ионами калия. Состав солевых мостиков подбирали на основании уравнения Гендерсона [15] таким образом, чтобы суммарный вклад диффузионных потенциалов жидкостного соединения на их границах был минимален.

Для исследования были выбраны перфторированные сульфокатионитовые мембраны МФ-4СК.

Электрохимическая цепь (2) для оценки доннановского потенциала подробно представлена в [10]. Вклады скачков потенциала в общую ЭДС цепи на всех границах (3), кроме скачка потенциала на границе исследуемый раствор/ мембрана $\Delta\varphi_M^{C_1}$, либо пренебрежимо малы, либо компенсируют друг друга.

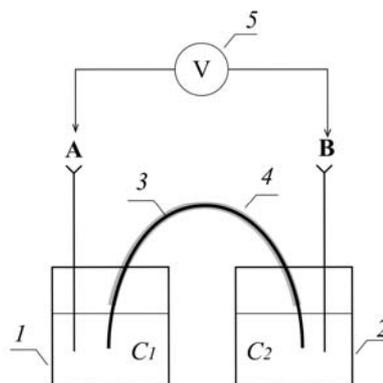


Рис.3. Схематическое изображение ячейки для определения доннановского потенциала на границе исследуемый раствор/ мембрана: 1 – исследуемый раствор, C_1 ; 2 – раствор сравнения, C_2 ; 3 – мембрана; 4 – защитный ПЭ кожух; 5 – вольтметр; А, В – хлорсеребряные электроды



$$\Delta\varphi = \Delta\varphi_A^0 + \Delta\varphi_{C_1}^{\text{KCl}} + \Delta\varphi_M^{C_1} + \Delta\varphi_{\text{diff}} + \Delta\varphi_{C_2}^M + \Delta\varphi_{\text{KCl}}^{C_2} - \Delta\varphi_B^0 \quad (3)$$

где $\Delta\varphi_{A(B)}^0$ – стандартный потенциал хлорсеребряного электрода А (В); $\Delta\varphi_{C_1}^{\text{KCl}}$ – разность потенциалов на границе насыщенный раствор КСl/раствор C_1 ; $\Delta\varphi_M^{C_1}$ – Доннановская разность потенциалов на границе раствор C_1 /мембрана; $\Delta\varphi_{\text{diff}}$ – диффузионный потенциал в фазе мембраны; $\Delta\varphi_{C_2}^M$ – разность потенциалов на границе мембрана/раствор C_2 ; $\Delta\varphi_{\text{KCl}}^{C_2}$ – разность потенциалов на границе раствор C_2 /насыщенный раствор КСl.

Все потенциометрические измерения выполняли на жидкостном анализаторе Эксперт–001–3 (0.1). Абсолютная погрешность прибора для измерения рН и ЭДС составляет $\pm 0,02$ и $\pm 1,5$ мВ соответственно. Для контроля рН использовали стеклянный электрод марки ЭЛС-43-07 и хлорсеребряный электрод сравнения марки ЭВС-1М3.1.

Результаты и их обсуждение

Условия разделения смеси моногидрохлорида лизина и глицина на катионите КУ-2-8

Предлагаемое разделение лизина и глицина с использованием сульфокатионообменника КУ-2-8 основано на различных значениях рI исследуемых аминокислот (табл. 1). Известно, что в нейтральной и слабокислых средах катионообменники в Na^+ -форме сорбируют только те аминокислоты, изоэлектрические точки которых выше рН смолы [16, 17]. Глицин относится к нейтральным аминокислотам (рI=5,97), а лизин – к основным (рI=9,59). Для создания нейтральной среды исследуемой смеси для приготовления растворов использовали соль лизина – моногидрохлорид лизина.

На основании экспериментальных значений рН, с учетом уравнений материального баланса и электронеutrальности [18], а также констант диссоциации

карбоксильных и аминогрупп (табл.1), был рассчитан ионный состав разделяемой смеси и растворов индивидуальных аминокислот (табл. 2). В исследуемом растворе глицин находится преимущественно в форме цвиттериона Gly^{\pm} , а лизин – в виде однозарядного катиона Lys^+ , а концентрации ионов Gly^+ , Gly^- и Lys^{2+} , Lys^{\pm} , Lys^- , пренебрежимо малы.

Таблица 2. Ионный состав индивидуальных и смешанных растворов моногидрохлорида лизина и глицина

раствор	C, моль/л	pH	$[\text{H}^+]\cdot 10^7$, моль/л	$[\text{OH}^-]\cdot 10^7$, моль/л	$[\text{Gly}^{\pm}]\cdot 10^3$, моль/л	$[\text{Lys}^+]\cdot 10^3$, моль/л
Gly	0,0040	5,78	16,6	0,60	4,00	–
LysHCl	0,0016	5,72	18,9	0,53	–	1,60
смесь	Gly	0,0040	6,17	6,68	1,50	4,00
	LysHCl	0,0016				

Концентрация анионов хлора соответствовала аналитической концентрации растворов.

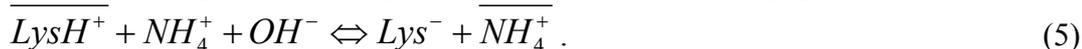
Измеренные обменные емкости (ОЕ) смолы в натриевой форме и после сорбции лизина на натриевую форму смолы в диапазоне pH от 5 до 7 составили $1,70 \pm 0,09$ ммоль/мл. Равные значения ОЕ свидетельствуют о том, что ионы лизина сорбируются в виде однозарядного катиона.

Разделение смеси LysHCl и Gly основано на реакции ионного обмена (4), в результате которой однозарядные катионы лизина сорбируются, вытесняя катионы натрия, цвиттерионы глицина выходят с элюатом:



где Lys^+ и Na^+ - ионы в растворе; $\overline{\text{Lys}^+}$ и $\overline{\text{Na}^+}$ - ионы в фазе ионита.

Элюирование лизина из фазы ионообменника проводилось 5% раствором аммиака (pH=11). Десорбция лизина основана на реакции депротонирования, в результате которой происходит переход лизина из катионной формы в анионную (5).



Качественный анализ индивидуальных и смешанных растворов моногидрохлорида лизина и глицина методом ТСХ

Для оценки степени разделения смеси моногидрохлорида лизина и глицина на катионите КУ-2-8 был проведен анализ качественного состава элюата (раствора, собранного после пропускания смеси моногидрохлорида лизина и глицина через сорбент) методом тонкослойной хроматографии. В качестве растворов сравнения были выбраны индивидуальные растворы LysHCl и Gly, а так же исходная смесь LysHCl+Gly. По полученным хроматограммам были рассчитаны значения R_f , результаты представлены в табл. 3.

Отсутствие окрашенного пятна, соответствующего моногидрохлориду лизина, на линии старта для элюата, свидетельствует об отсутствии данного компонента в исследуемой пробе. Это качественно подтверждает практически полное разделение исследуемой смеси по предложенной методике.

Таблица 3. Значение R_f для исследуемых растворов

Проба	R_f	
	LysHCl	Gly
LysHCl	0,07	-
Gly	-	0,12
исходная смесь (LysHCl + Gly)	0,07	0,12
элюат	-	0,12

Количественный анализ индивидуальных и смешанных растворов моногидрохлорида лизина и глицина спектрофотометрическим методом

Для количественного определения моногидрохлорида лизина и глицина в исследуемых растворах использовали спектрофотометрический метод (см. методику).

Предположив, что цвиттерионы глицина не сорбируются на катионите, считаем, что концентрация глицина в элюате соответствует концентрации глицина в исходной разделяемой смеси, которая составила $1,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л. По градуировочному графику (рис. 3) с учетом закона аддитивности оптических плотностей (1) была определена концентрация моногидрохлорида лизина в элюате, которая составила $8,6 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

Для количественной характеристики эффективности разделения были рассчитаны такие параметры [19, 20], как коэффициенты распределения глицина (K_{Gly}) и моногидрохлорида лизина (K_{LysHCl}) в фазе сорбента, степень извлечения моногидрохлорида лизина (R_{LysHCl}) из фазы раствора и коэффициент разделения (α_{LysHCl}) глицина и моногидрохлорида лизина с использованием катионита КУ-2-8 (табл. 4). Расчеты проводили по формулам (6 – 9):

$$K_{LysHCl} = \frac{\overline{C}_{LysHCl}}{C_{LysHCl}}; K_{Gly} = \frac{\overline{C}_{Gly}}{C_{Gly}} \quad (6, 7)$$

где \overline{C}_{LysHCl} , \overline{C}_{Gly} – концентрации моногидрохлорида лизина и глицина в фазе ионита; C_{Gly} , C_{LysHCl} – концентрации глицина и моногидрохлорида лизина в растворе на выходе из колонки.

$$\alpha_{LysHCl/Gly} = \frac{K_{LysHCl}}{K_{Gly}}; R_{LysHCl} = \frac{\overline{Q}_{LysHCl}}{Q_{LysHCl} + \overline{Q}_{LysHCl}}, \quad (8, 9)$$

где α_{LysHCl} – коэффициент разделения исследуемых аминокислот; R_{LysHCl} – степень извлечения лизина из фазы раствора; \overline{Q}_{LysHCl} , Q_{LysHCl} – количество моногидрохлорида лизина в растворе и в фазе ионита соответственно, моль. Для расчета количества моногидрохлорида лизина в растворе и в фазе ионита находили Q_{LysHCl} в исходном растворе и в элюате, собранном после разделения.

Таблица 4. Результаты расчета параметров разделения исследуемых аминокислот

K_{LysHCl}	K_{Gly}	$\alpha_{LysHCl/Gly}$	$K_{LysHCl} \cdot K_{Gly}$	R_{LysHCl} , %
26,30	0,05	526	1,31	99

Из данных табл. 4 можно сделать вывод, что разделение моногидрохлорида лизина и глицина на катионите КУ-2-8 прошло практически полностью.

Количественный анализ индивидуальных и смешанных растворов моногидрохлорида лизина и глицина методом доннановского потенциала

В качестве точного и экспрессного метода для количественного определения лизина использовали разработанный нами потенциометрический сенсор для определения лизина в водных растворах [21] на основе перфторированной сульфокатионитовой мембраны МФ-4СК. Откликом сенсора является доннановский потенциал на индивидуальной границе исследуемый раствор/ мембрана в лизиновой форме. Рабочий диапазон pH анализируемых растворов составил 5-7.

Для определения селективности сенсора к катионам лизина в водных растворах глицина и хлорида аммония использовали метод смешанных растворов [22]. На рисунке 4 представлены зависимости доннановского потенциала от концентрации мешающего компонента в смешанных растворах моногидрохлорида лизина и глицина.

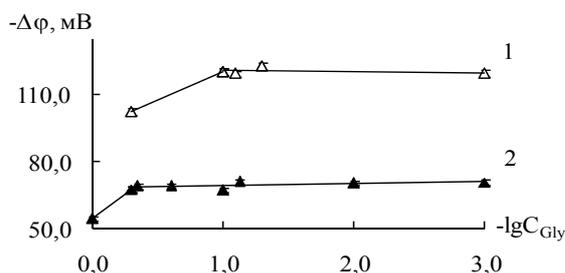


Рис.4. Зависимости доннановского потенциала в системах LysHCl+Gly / МФ-4СК от концентрации глицина при концентрациях моногидрохлорида лизина C_{LysHCl} , моль/л: 1 – 0,001; 2 – 0,010.

Значения константы селективности $K_{\text{LysH}^+/\text{Gly}^\pm}$ рассчитывали как отношение концентраций определяемого и мешающего компонентов в точках, начиная с которых наблюдается заметное отклонение отклика сенсора от постоянного значения.

$$K_{\text{LysH}^+/\text{X}} = \frac{C_{\text{LysH}^+}}{C_{\text{X}}} \quad (10)$$

Аналогичным способом были определены константы селективности (10) сенсора к катионам лизина в присутствии хлорида аммония.

Средние значения концентрационных констант селективности $K_{\text{LysH}^+/\text{X}}$ для исследуемых растворов, представлены в табл.5.

Таблица 5. Средние концентрационные константы селективности $K_{\text{LysH}^+/\text{X}}$ в исследуемых растворах

Исследуемый водный раствор	$K_{\text{LysH}^+/\text{X}}$
LysHCl+Gly	0,015 ± 0,004
LysHCl+NH ₄ Cl	0,030 ± 0,005

Для определения моногидрохлорида лизина в индивидуальных и смешанных растворах использовали метод калибровочного графика. Зависимость доннановского потенциала на границе раствор/ мембрана МФ-4СК от концентрации LysHCl в индивидуальном растворе (рис. 5) определяется уравнением (11) с достоверностью аппроксимации 0,99.

$$\Delta\varphi = -32,5 + 50,6 \cdot \lg C_{\text{LysHCl}} \quad (11)$$

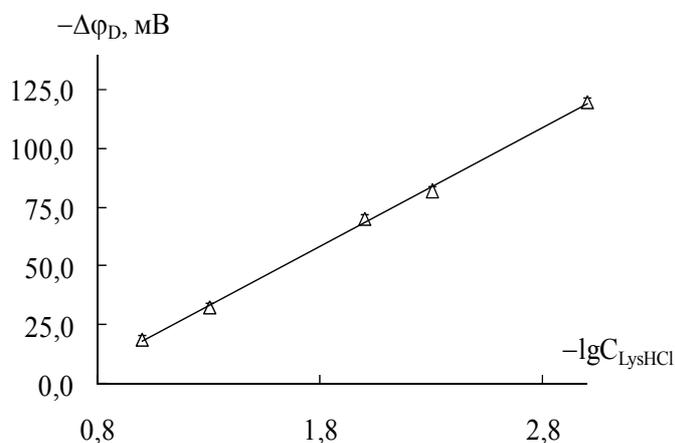


Рис.5. Калибровочная зависимость доннановского потенциала от концентрации LysHCl в индивидуальных растворах

Количество моногидрохлорида лизина в исходном разделяемом растворе, определенное с помощью разработанного метода составило $(1,64 \pm 0,09) \cdot 10^{-6}$ моль. Для разделения исходный раствор пропускали через колонку, заполненную сульфокатионитом КУ-2-8 в Na^+ -форме, в которой проходила сорбция катионов лизина. Десорбция ионов лизина из фазы сорбента проводилась 10% раствором аммиака. В состав элюата входили ионы Lys^- , NH_4^+ , OH^- . Для создания нейтральной среды полученный элюат подкисляли концентрированной соляной кислотой. Количество вещества моногидрохлорида лизина в элюате определенное с помощью разработанного потенциометрического метода, составило $(1,55 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$ моль. Погрешность определения моногидрохлорида лизина не превышала 5 %.

Заключение

Исследованы условия разделения лизина и глицина с использованием катионита КУ-2-8. Разделение основано на различных значениях pI АК: для лизина pI составляет 9,59, а для глицина – 5,97. Процесс разделения проводился в диапазоне pH от 5 до 7, когда в разделяемом растворе лизин находится в основном в форме однозарядных катионов, а глицин – цвиттерионов. Разделение протекает по реакции ионного обмена между ионами Lys^+ фазы раствора и ионами Na^+ фазы сорбента, цвиттерионы глицина не сорбируются и выходят из колонки с элюатом. Элюирование катионов лизина из фазы ионообменника проводили 5% раствором аммиака. Десорбция лизина основана на реакции протонирования/депротонирования.

Спектрофотометрическим и ТСХ методами были исследованы смешанные и индивидуальные растворы глицина и моногидрохлорида лизина, а так же раствор, полученный после разделения глицина и моногидрохлорида лизина. Методом ТСХ

было показано, что разделение произошло полностью. Рассчитаны такие количественные характеристики разделения, как коэффициенты распределения глицина и моногидрохлорида лизина, которые составили 26,3 и 0,05 соответственно; коэффициент разделения моногидрохлорида лизина и глицина, с использованием катионита КУ-2-8 в Na^+ форме, – 526; и степень извлечения моногидрохлорида лизина из раствора – 99%.

Для определения лизина в анализе и элюате использовали разработанный нами потенциометрический сенсор на основе перфторированной сульфокатионитовой мембраны МФ-4СК, откликом которого является доннановский потенциал. Определены средние концентрационные константы селективности сенсора к катионам лизина в присутствии аминокислоты глицин и хлорида аммония, которые не превышали 0,035. Относительная погрешность определения моногидрохлорида лизина в исследуемых растворах составила 2-5 %.

Список литературы

1. Основы биохимии. Под ред. А.А. Анисимова. М.: Высшая школа, 1986. 452 с.
2. Ленинджер А. Биохимия. Москва: Мир, 1976. 957 с.
3. Garsia-Villar N., Saurina J., Hernandez-Cassou S. Potentiometric sensor array for the determination of lysine in feed samples using multivariate calibration methods // Fresenius' journal of analytical chemistry. 2001. Volume 371. № 7. PP. 1001-1008.
4. Дэвени Т. Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976. – 368 с.
5. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. М.: Мир, 1980. Ч.1–2.
6. Нифталиев С.И., Мокшина Н.Я., Пахомова О.А. Экстракция некоторых алифатических аминокислот из водных растворов с применением смеси гидрофильных растворителей // Хим. технология. 2005. № 5. С. 44 – 46.
7. Boulat O., McLaren D. G., Arriaga E. A., Chen D. D.Y. Analysis of free amino acids in human plasma by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence // Journal of chromatography b. 2001. Volume 754. PP. 217-228.
8. Селеменев В.Ф. Дис. ...докт. хим. наук. Воронеж: Воронежский государственный университет, 1993. 587с.
9. Пат. 2155747 С07С229/02, С07К1/16, С07К1/18. Способ безреагентного разделения смеси триптофана и фенилаланина / Хохлов В.Ю.; Селеменев В.Ф.; Хохлова О.Н.; Мануковская А.Н.; Загородний А.А. № 98113900/04; Заявл. 14.07.1998; Оpubл. 10.09.2000.
10. Гурская Г.В. Структуры аминокислот. М.: Наука, 1966. 158с.
11. Ионообменные методы очистки веществ. Учебное пособие. Под ред. Г.А. Чикина, О.Н. Мягкого. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1984. 372 с.
12. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1970. 344 с.
13. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. М.: Мир, 1980, Ч.1-2.
14. Агупова М.В., Паршина А.В., Бобрешова О.В., Кулинцов П.И. Новый способ определения доннановского потенциала в электромембранных процессах // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т. 8. В.2. С. 241-245.
15. Феттер К. Электрохимическая кинетика. Москва: Химия, 1962. 856 с.
16. Козаренко Т.Д. Ионообменная хроматография аминокислот. Новосибирск: Наука, 1981. 160с.

17. Мазор Л. Методы органического анализа. М.: Мир, 1986. С.491-493.
 18. Батлер Дж. Н. Ионные равновесия. Л.: Химия, 1973. 446 с.
 19. Гельферих Ф. Иониты. Основы ионного обмена. М.: изд-во иностранной литературы, 1962. 492 с.
 20. Золотов Ю.А. Основы аналитической химии. Общие вопросы. Методы разделения. В 2 кн. Кн. 1. Учебник для вузов. М.: Высшая шк., 1999. 351 с.
 21. Бобрешова О.В., Агупова М.В., Паршина А.В. Потенциометрическое определение лизина в водных растворах с использованием модифицированных перфторированных мембран МФ-4СК // Журнал аналитической химии (в печати).
 22. Будников Г.К., Майстренко В.Н., Вяселев М.Р. Основы современного электрохимического анализа. Москва: Мир. БиномЛЗ, 2003. 592 с.
-

Агупова Мария Владимировна - аспирант кафедры аналитической химии химического факультета Воронежского государственного университета, тел (4732) 20-89-32

Agupova Maria V. - the post-graduate student of analytical chemistry department of chemical faculty, Voronezh state university, e-mail: mariaagupova@yandex.ru

Бобрешова Ольга Владимировна - д.х.н., профессор кафедры аналитической химии химического факультета Воронежского государственного университета

Bobreshova Olga V. - Dr.Sc. Chem., the professor of analytical chemistry department of chemical faculty, Voronezh state university

Бобринская Галина Алексеевна - научный сотрудник кафедры аналитической химии химического факультета Воронежского государственного университета

Bobrinskaya Galina A. - scientist of analytical chemistry department of chemical faculty, Voronezh state university

Якунина Татьяна Владимировна - кафедры аналитической химии химического факультета Воронежского государственного университета

Yakunina Tatyana V. - the undergraduate of analytical chemistry department of chemical faculty, Voronezh state university