

## ĐỊNH LƯỢNG ACID AMIN BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO ĐẦU DÒ UV

● Phan Nguyễn Thu Xuân\* ● Bùi Thế Vinh

Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này tiến hành định lượng hỗn hợp acid amin bằng kỹ thuật HPLC-UV dựa trên phản ứng tạo dẫn xuất trước cột và tiến hành định lượng 21 loại acid amin có trong mẫu thử nghiệm. Mẫu được thủy phân, dịch thủy phân được tạo dẫn xuất với thuốc thử dancyl ở 60°C trong 30 phút, sau đó được cô đặc làm sạch mẫu và chiết lại bằng dung dịch HCl 2%, dịch chiết tiếp tục được tiêm vào hệ thống sắc ký lỏng đầu dò tử ngoại (HPLC-UV). Đường chuẩn tuyến tính của các chuẩn acid amin được dựng với nồng độ từ 5ppm – 50ppm, hệ số tương quan  $R^2$  trong khoảng 0,992 – 0,998 cho tất cả 21 acid amin. Phương pháp có thể được áp dụng để định lượng acid amin trong các mẫu bột nguyên liệu, bột thành phẩm và các mẫu có chứa acid amin. Kết quả định lượng trong mẫu chứa acid amin cho thấy tất cả acid amin có hàm lượng từ 0,020 – 65,680 mg/mg, cao nhất là Lysine – 65,680 mg/mg, thấp nhất là Phenylalanine – 0,020 mg/mg, một số acid amin không phát hiện được như là: Ornithine, Tyrosine (trong mẫu 01); Hydroxyproline, Threonine, Cysteine, Tyrosine (trong mẫu 02) và Ornithine, Tyrosine, Hydroxyproline (trong mẫu 03).

**Từ khóa:** acid amin, HPLC – UV, dẫn xuất trước cột

## QUANTIFICATION OF AMINO ACIDS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC – UV)

● Phan Nguyen Thu Xuan\* ● Bui The Vinh

### ABSTRACT

This study develops a method to quantify amino acids by HPLC-UV technique based on pre-column derivatization reaction. The sample was hydrolyzed, the hydrolysate was derivatized with dancyl reagent at 60°C for 30 min, then concentrated, cleaned the sample and re-extracted with 2% HCl solution, continued to be injected into the liquid chromatography system. head caused by ultraviolet (HPLC-UV). Linear calibration curves of amino acid standard mixtures were constructed with concentrations from 5ppm to 50ppm, correlation coefficient  $R^2$  in the range of 0.992 - 0.998 for all 21 amino acids. The repeatability of the method was satisfactory. The method can be applied to the quantification of amino acids in samples containing amino acids. Quantitative results show that all amino acids have content from 0.020 to 65,680 mg/mg, the highest is Lysine - 65,680 mg/mg, the lowest is Phenylalanine - 0.020 mg/mg, some amino acids are not detected as: Ornithine, Tyrosine (in sample 01); Hydroxyproline, Threonine, Cysteine, Tyrosine (in sample 02) and Ornithine, Tyrosine, Hydroxyproline (in sample 03).

**Keywords:** amino acids, HPLC - UV, pre-column derivatives, hydrolysis.

\* Tác giả liên hệ: ThS. Phan Nguyễn Thu Xuân, Email: xuanpnt@hiu.vn

(Ngày nhận bài: 20/10/2022; Ngày nhận bản sửa: 06/11/2022; Ngày duyệt đăng: 16/11/2022)

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Acid amin là thành phần cấu tạo nên protein, đóng vai trò quan trọng trong quá trình di truyền. Phân tích các acid amin được quan tâm do vai trò quan trọng của chúng trong nhiều lĩnh vực: hóa sinh, y dược, nông nghiệp,... [1]. Cho đến nay, nhiều phương pháp để chiết tách, định tính và định lượng các acid amin cụ thể trong các mẫu quan tâm đã được phát triển như phương pháp điện hóa để phát hiện acid amin: đo quang,... phần lớn các phương pháp hiện nay sử dụng định lượng một số acid amin theo quy trình tạo dẫn xuất trước hoặc sau cột để tăng cường khả năng phát hiện hoặc sắc ký lớp mỏng, sắc ký lỏng hiệu năng cao. Theo Hansen D.B và cộng sự xác định các acid amin như propylen và hydroxyl-proline phản ứng với ninhydrin và tạo phức màu vàng và định lượng bằng đo cường độ màu sản phẩm của phản ứng ở bước sóng 750 nm [2]. Theo Anthony Le và cộng sự, sắc ký trao đổi cation (CEC) là một loại sắc ký sử dụng các ion để phân tách chúng. Phương pháp sắc ký để phân tích và định lượng acid amin dựa trên sự tạo dẫn xuất sau cột của các acid amin sau quá trình tách sắc ký trao đổi cation [3]. Sự hấp thụ khác biệt của acid amin trên bột như nhôm oxit ( $Al_2O_3$ ), silica gel và than hoạt tính đã được Demaster E.G. và cộng sự sử dụng trong các nghiên cứu về phân tích acid amin [4]. Mẫu có thể được phát hiện bằng cách sử dụng máy quang phổ để phát hiện các acid amin, phân tích sắc ký tạo dẫn xuất trước hoặc sau cột để tạo thành các dẫn xuất [5]. Theo Shen F. và cộng sự đã dùng phương pháp quang phổ cận hồng ngoại biến đổi Fourier xác định acid amin trong rượu gạo [6]. Pappa-Louisi A. và cộng sự đã tối ưu hóa việc tách và phát hiện các dẫn xuất 6-aminoquinolyl của acid amin bằng cách sử dụng sắc ký lỏng pha đảo với phát hiện bằng đầu dò tử ngoại, huỳnh quang và điện hóa trực tiếp [7]. Qua tham khảo các công trình công bố về phương pháp định lượng acid amin trước đây, với mục tiêu chọn ra được một phương pháp định lượng acid amin phù hợp với điều kiện của nhiều cơ sở phân tích trong nước hiện nay, nghiên cứu này khảo sát và áp dụng kỹ thuật HPLC với cột tách pha đảo C18 và phát hiện các dẫn xuất được tạo trước cột với thuốc thử Dancyl bằng đầu dò UV.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Máy Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Agilent 1100, cột Zorbax extend C18 (4.6 x 250 mm), đầu dò UV 250nm, hệ thống thổi khí làm khô mẫu.
- 21 Acid amin chuẩn (Merck, Đức)
- Thuốc thử Dancyl.
- Acid HCl, Phenol, LiOH, Nước cất khử ion, Ascorbic acid, Chloroform, Toluene, Aceton, Acetonitrile, Isopropanol, Borat
- Triethanolamin (TEA).
- Mẫu cần định lượng acid amin: 3 mẫu bột bổ sung vi lượng acid amin đang được nghiên cứu phát triển sản phẩm bổ sung vi lượng acid amin trong chế biến nông nghiệp và thực phẩm.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Chuẩn bị các mẫu chuẩn

Cân chính xác khoảng 4,00 mg mỗi chuẩn vào bình định mức 10mL, thêm nước cất đến vạch thu được chuẩn gốc 400 ppm. Pha loãng bằng nước cất thu được chuẩn trung gian 100 ppm.

#### 2.2.2. Chuẩn bị mẫu thử

- Thủy phân:

Cân một lượng mẫu chính xác khoảng 0,1g vào ống COD.

+ Thủy phân bằng HCl 6M (1% phenol) ở 100°C trong 18h trong bể điều nhiệt để thủy phân các

amino acid (trừ tryptophan).

+ Thủy phân bằng LiOH 5M (0,1% Ascorbic acid) ở 150°C trong 18h trong bể điều nhiệt COD để thủy phân tryptophan. Dịch thủy phân được acid hóa đến pH<1 bằng HCl đậm đặc.

Loại tạp nhiễu gốc phenol: Trong môi trường acid, tạp chất phenol có độ tan trong dung môi hữu cơ lớn nên phải loại bằng cách chiết với chloroform (5mL/lần, chiết 3 lần, lắc 10 phút, ly tâm 5000 vòng/phút, trong 5 phút) sau đó định mức bằng nước đến 25mL bình lắng gạn. Ghi chú: hút dịch trên để chiết tiếp, dịch ở dưới cho vào bình chứa chất thải đúng quy định.

#### - Phản ứng tạo dẫn xuất

+ Lấy 1 mL dịch thủy phân cho vào ống COD, thêm 4mL aceton và để yên tại 15°C khoảng 1h, ly tâm lấy dịch nổi phía trên.

+ Rút 2 mL dịch nổi cho vào ống COD, thổi khô cạn, hòa tan lại bằng 0,5 mL borat 0,2M pH=9 và 0,5 mL thuốc thử dancyl. Thực hiện phản ứng ở 60°C trong 30 phút.

+ Xây dựng đường chuẩn đồng thời quá trình tạo dẫn xuất mẫu như sau:

**Bảng 1.** Dụng đường chuẩn và tạo dẫn xuất

Chuẩn làm việc (ppm)	5	10	20	40	50
Thể tích chuẩn trung gian (mL)	0.05	0.1	0.2	0.4	0.5
Thể tích borat 0.2M, pH 9 (mL)	0.45	0.4	0.3	0.1	0.0
Thể tích thuốc thử (mL)	0.5				

+ Sau phản ứng cần loại bỏ tạp chất bằng cách chiết hỗn hợp sản phẩm dancyl hóa với toluene (1mL/lần, chiết 3 lần, lắc 10 phút, ly tâm 5000 vòng/phút, trong 5 phút). Sau 3 lần chiết toluene, để riêng dịch phía dưới vẫn trong ống mẫu ban đầu, thực hiện làm sạch dịch phía trên.

+ Chiết dịch phía trên với HCl 2% (1ml/lần, 2 lần, lắc 10 phút, ly tâm 5000 vòng/phút, trong 5 phút). Chú ý, hút bỏ dịch ở dưới, tiếp tục cho HCl 2% vào chiết lần 2, hút bỏ dịch phía dưới, sau đó cho toàn bộ dịch chiết phía trên thu được vào ống mẫu ban đầu. Tráng ống bằng aceton.

+ Thổi khô, hòa tan bằng pha động, lọc qua màng lọc 0.45 $\mu$ m và tiêm vào hệ thống HPLC – UV.

#### 2.2.4. Chương trình sắc ký

- Pha A: 5% ACN: 5% IPA: 90% đệm pH 2,70 của 0.1% TFA (hút 0,85 mL cho vào 1000mL nước cất khử ion). Chỉnh pH bằng TEA 2% (khoảng 75 mL).

- Pha B: 40% ACN: 40% IPA: 20% đệm pH 1.8 của 0.14% TFA (hút khoảng 0,35 mL cho vào 500 mL nước cất khử ion). Chỉnh pH bằng TEA 2%.

- Chương trình pha động:

**Bảng 2.** Chương trình pha động

	Thời gian	%B	Tốc độ dòng	Áp suất
1	0.00	0.00	1.00	400
2	23.00	11.50	1.00	400
3	24.00	15.00	1.00	400
4	29.00	41.00	1.00	400

5	34.00	50.00	1.00	400
6	37.00	100.00	1.00	400

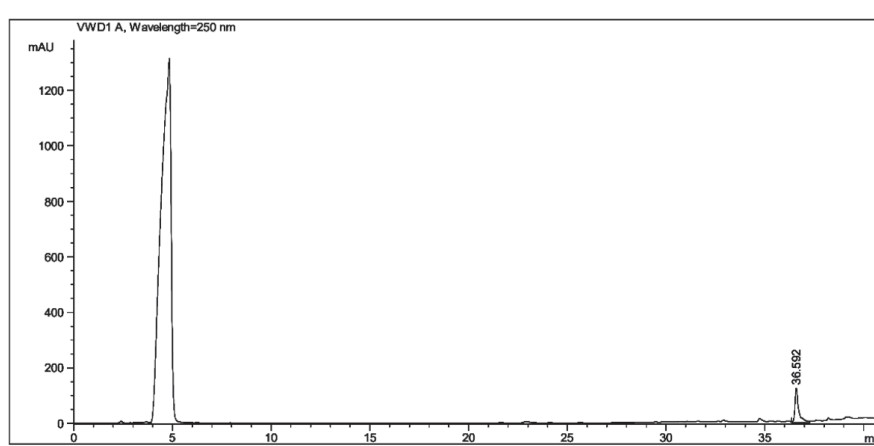
### 2.2.5. Dụng đường chuẩn tuyến tính acid amin

Từ dung dịch chuẩn trung gian 100ppm, các chuẩn acid amin được pha theo các nồng độ: 5 ppm, 10ppm, 20ppm, 40ppm và 50ppm trong nước cất. Các dung dịch chuẩn acid amin được tiến hành sắc ký theo điều kiện ở mục 2.2.4.

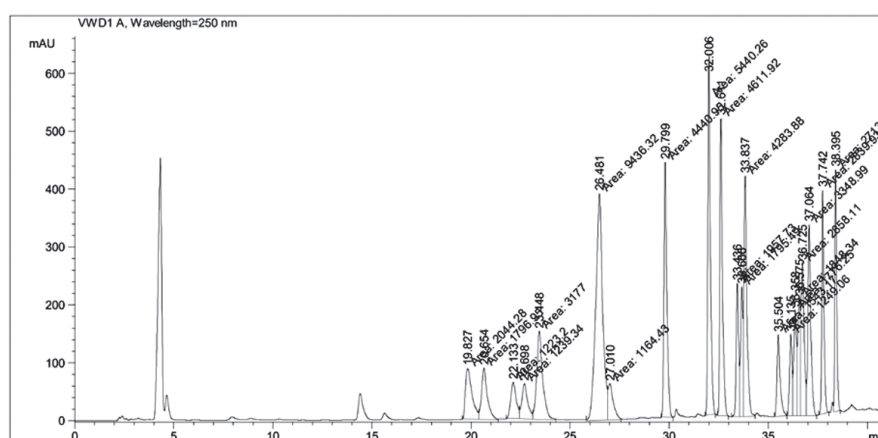
## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Dụng đường chuẩn các acid amin

Tiến hành sắc ký từng chuẩn đơn acid amin, ta thu được sắc ký đồ như Hình 1: Sắc ký đồ chuẩn Tyrosine 20ppm, các chuẩn acid amin khác cũng được thực hiện tương tự. Sau đó tiến hành sắc ký hỗn hợp acid amin thu được sắc ký đồ như hình 2: Sắc ký đồ 21 hợp chất amino acid của chuẩn 50ppm. Dựa vào thời gian lưu của từng chuẩn đơn acid amin để xác định các pic trong chuẩn hỗn hợp.



Hình 1. Sắc ký đồ chuẩn Tyrosine 20ppm



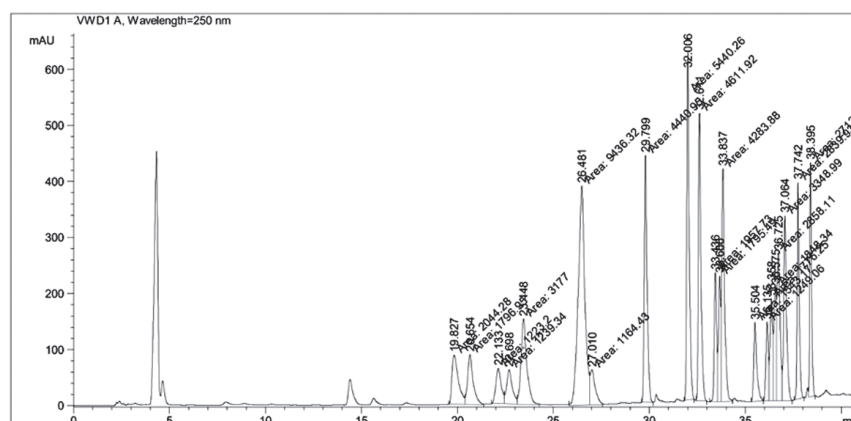
Hình 2. Sắc ký đồ 21 hợp chất amino acid của chuẩn 50ppm

Khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng đồng thời 21 acid amin: 5ppm – 50ppm, với  $R^2 \geq 0,992$ . Kết quả được trình bày trong bảng:

**Bảng 3.** Phương trình tuyến tính và hệ số tương quan tuyến tính tương ứng của từng loại acid amin

STT	Tên acid amin	Viết tắt	Thời gian lưu	Phương trình tuyến tính	Hệ số tương quan (R <sup>2</sup> )
1	Arginine	ARG	19,827	$y = 29,041x + 104,01$	0,993
2	Serine	SER	20,654	$y = 24,764x + 253,1$	0,992
3	Aspartate	ASP	22,133	$y = 22,051x + 146,6$	0,993
4	Glutamine	GLU	22,698	$y = 23,412x + 141,31$	0,994
5	Hydroxyproline	H-PRO	23,448	$y = 45,45x - 86,725$	0,998
6	Glycine	GLY	26,481	$y = 62,225x - 113,08$	0,995
7	Threonine	THR	27,01	$y = 18,879x + 120,68$	0,993
8	Alanine	ALA	29,799	$y = 79,041x + 98,27$	0,997
9	Abcsic Acid	ABA	32,006	$y = 76,096x + 93,048$	0,992
10	Proline	PRO	32,611	$y = 88,267x + 60,093$	0,993
11	Methionine	MET	33,436	$y = 40,862x - 86,393$	0,993
12	Tryptophan	TRP	33,666	$y = 46,957x - 29,122$	0,996
13	Valine	VAL	33,837	$y = 85,147x - 17,555$	0,994
14	Phenylalanine	PHE	35,504	$y = 53,998x - 13,475$	0,993
15	Cysteine	CYS	36,135	$y = 25,977x + 181,39$	0,994
16	D-Isoleusine	D-ILEU	36,358	$y = 65,184x - 3,0117$	0,993
17	Tyrosine	TYR	36,575	$y = 64,021x - 135,51$	0,994
18	Leucine	LEU	36,725	$y = 98,12x - 56,432$	0,992
19	Ornithine	ORN	37,064	$y = 121,75x + 64,927$	0,993
20	Lysine	LYS	37,742	$y = 51,957x - 9,4383$	0,993
21	Histidine	HIS	38,395	$y = 70,194x + 64,625$	0,994

### 3.2. Định lượng acid amin trong mẫu



**Hình 3.** Sắc ký đồ 20 hợp chất acid amin của mẫu 01

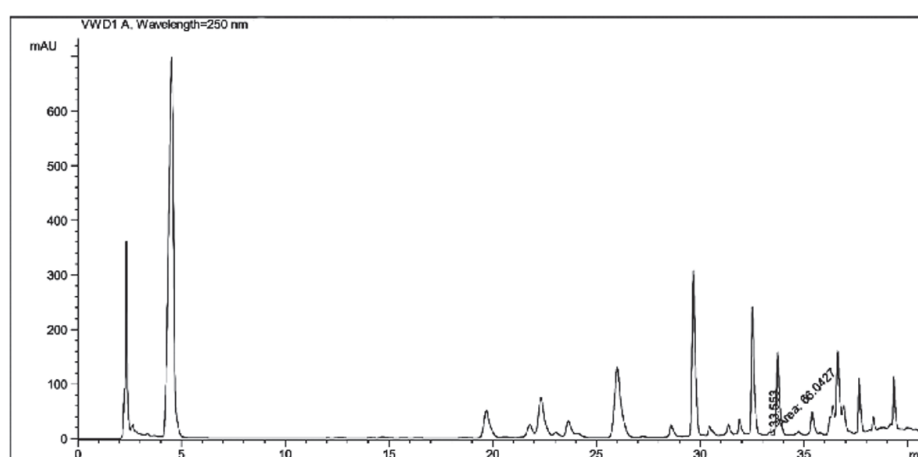
**Bảng 4.** Hàm lượng acid amin trong mẫu 01 (n=2)

STT	Tên	Mẫu 01 – lần 1 – cân 99,82 mg				Mẫu 01 – lần 2 – cân 113,94mg				Hàm lượng trung bình (µg/mg)
		Thời gian lưu	Diện tích	Nồng độ (ppm)	Hàm lượng (µg/mg)	Thời gian lưu	Diện tích	Nồng độ (ppm)	Hàm lượng (µg/mg)	
1	ARG	19,989	1361,000	35,338	22,130	20,069	1699,300	44,122	24,200	23,165
2	SER	20,724	704,200	20,512	12,840	20,769	766,000	22,312	12,240	12,540
3	ASP	22,196	853,100	26,241	16,430	22,231	879,600	27,056	15,840	16,135
4	GLU	22,774	1348,800	41,792	26,170	22,818	1526,600	47,301	25,950	26,060
5	H-PRO	23,496	548,700	12,298	7,700	23,536	449,100	10,066	6,520	7,110
6	GLY	26,470	2709,200	43,723	27,380	26,504	2641,000	42,623	26,380	26,880
7	THR	27,137	343,900	12,686	7,940	27,171	386,800	14,268	7,830	7,885
8	ALA	29,854	1997,900	22,304	13,970	29,864	2229,800	24,893	13,650	13,810
9	ABA	31,950	15,300	0,176	0,110	31,956	17,100	0,197	0,110	0,110
10	PRO	32,680	2388,900	24,335	15,240	32,688	2588,000	26,363	14,460	14,850
11	MET	33,528	184,400	4,622	2,890	33,574	173,530	4,397	2,440	2,665
12	TRP	33,553	66,5427	2,027	1,267	33,472	69,446	2,099	1,151	1,209
13	VAL	33,933	1039,000	10,893	6,820	33,944	1307,900	13,713	7,520	7,170
14	PHE	35,646	697,000	11,688	7,320	35,659	713,600	16,997	8,320	7,820
15	CYS	36,303	110,100	2,893	1,810	36,316	123,700	4,827	2,010	1,910
16	D-ILEU	36,492	338,800	4,946	3,100	36,505	365,000	8,248	4,520	3,810
17	TYR			-	-			-	-	-
18	LEU	36,868	1700,100	16,188	10,140	36,881	2409,300	22,940	12,580	11,360
19	ORN			-	-			-	-	-
20	LYS	37,827	2355,000	41,366	25,900	37,833	2949,500	51,809	28,420	27,160
21	HIS	38,441	649,400	5,976	3,740	38,445	908,500	8,361	4,590	4,165

**Bảng 5.** Hàm lượng acid amin trong mẫu 02 (n=2)

STT	Tên	Mẫu 02 – lần 1 – cân 110,72 mg				Mẫu 02 – lần 2 – cân 110,87mg				Hàm lượng trung bình (µg/mg)
		Thời gian lưu	Diện tích	Nồng độ (ppm)	Hàm lượng (µg/mg)	Thời gian lưu	Diện tích	Nồng độ (ppm)	Hàm lượng (µg/mg)	
1	ARG	19,734	546,500	14,546	8,210	20,018	489,200	13,013	7,346	7,778
2	SER	20,306	46,000	1,312	0,740	20,638	34,800	0,993	0,560	0,650
3	ASP	21,841	125,600	3,763	2,120	22,279	127,600	3,823	2,150	2,135
4	GLU	22,396	1432,200	41,921	23,660	22,832	1417,400	41,487	23,390	23,525
5	H-PRO			-	-			-	-	-

6	GLY	26,043	70,400	1,142	0,640	26,347	63,400	1,028	0,580	0,610
7	THR			-	-			-	-	-
8	ALA	29,731	906,700	10,250	5,790	29,808	869,900	9,834	5,540	5,665
9	ABA	31,987	28,700	0,338	0,190	31,991	21,500	0,253	0,140	0,165
10	PRO	32,611	104,000	1,068	0,600	32,645	80,300	0,825	0,460	0,530
11	MET	33,444	28,900	0,715	0,400	33,481	30,500	0,755	0,430	0,415
12	TRP	33,553	66,5427	2,027	1,267	33,472	69,446	2,099	1,151	1,209
13	VAL	33,861	111,600	2,800	1,580	33,899	94,000	1,004	0,570	1,075
14	PHE	35,570	4,600	0,077	0,040			-	-	0,020
15	CYS			-	-			-	-	-
16	D-ILEU	36,429	23,200	0,352	0,200	36,460	14,200	0,215	0,120	0,160
17	TYR			-	-			-	-	-
18	LEU	36,800	41,000	0,383	0,220	36,832	26,800	0,251	0,140	0,180
19	ORN	37,179	35,000	0,297	0,170	37,186	21,800	0,185	0,100	0,135
20	LYS	37,803	45,300	0,801	0,450	37,803	30,900	0,546	0,310	0,380
21	HIS	38,417	40,793	0,333	0,190	38,602	73,100	0,598	0,340	0,265



Hình 4. Sắc ký đồ hợp chất tryptophan của mẫu 01

Bảng 6. Hàm lượng acid amin trong mẫu 03 (n=2)

STT	Tên	Mẫu 03 – lần 1 – cân 110,76 mg				Mẫu 03 – lần 2 – cân 100,38mg				Hàm lượng trung bình (µg/mg)
		Thời gian lưu	Diện tích	Nồng độ (ppm)	Hàm lượng (µg/mg)	Thời gian lưu	Diện tích	Nồng độ (ppm)	Hàm lượng (µg/mg)	
1	ARG	19,882	1441,800	37,436	21,120	19,908	1538,900	39,957	24,880	23,000
2	SER	20,693	1105,900	32,212	18,180	20,701	1228,600	35,786	22,280	20,230
3	ASP	22,098	1872,500	57,597	32,500	22,092	1955,100	60,137	37,440	34,970
4	GLU	22,731	3476,400	107,714	60,780	22,729	3483,100	107,922	67,200	63,990

5	H-PRO				-				-	-
6	GLY	26,389	1937,000	31,261	17,640	26,401	1828,100	29,504	18,370	18,005
7	THR	27,094	646,800	23,859	13,460	27,113	699,000	25,785	16,050	14,755
8	ALA	29,841	3325,600	37,126	20,950	29,850	3146,400	35,125	21,870	21,410
9	ABA	31,963	84,100	0,969	0,550	31,965	54,800	0,631	0,390	0,470
10	PRO	32,665	2042,000	20,801	11,740	32,669	1928,100	19,641	12,230	11,985
11	MET	33,493	389,400	9,760	5,510	33,494	334,900	8,394	5,230	5,370
12	TRP	33,427	52,077	1,586	0,992	33,472	48,492	1,477	0,925	0,959
13	VAL	33,924	2110,500	22,127	12,490	33,927	1983,400	20,795	12,950	12,720
14	PHE	35,632	1272,400	21,337	12,040	35,634	1241,900	20,826	12,970	12,505
15	CYS	36,317	67,700	1,779	1,000	36,332	60,300	1,584	0,990	0,995
16	D-ILEU	36,483	1475,500	21,539	12,150	36,486	1383,300	20,194	12,570	12,360
17	TYR			-	-			-	-	-
18	LEU	36,855	3394,700	32,323	18,240	36,859	3020,400	28,759	17,910	18,075
19	ORN			-	-			-	-	-
20	LYS	37,827	6660,900	117,001	66,020	37,829	5974,300	104,940	65,340	65,680
21	HIS	38,433	1238,700	11,400	6,430	38,436	1171,800	10,784	6,710	6,570

Kết quả định lượng cho thấy tất cả acid amin có hàm lượng từ 0,020 – 65,680 mg/mg, cao nhất là Lysine – 65,680 µg/mg, thấp nhất là Phenylalanine – 0,020 µg/mg, một số acid amin không phát hiện được như là: Ornithine, Tyrosine (trong mẫu 01); Hydroxyproline, Threonine, Cysteine, Tyrosine (trong mẫu 02) và Ornithine, Tyrosine, Hydroxyproline (trong mẫu 03).

## 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Hiện nay, trên thế giới và trong nước sử dụng nhiều phương pháp định lượng các acid amin khác nhau như phương pháp điện hóa để phát hiện acid amin: đo quang,... Ngoài ra còn những phương pháp tạo dẫn xuất với ninhydrin tạo thành những hợp chất có màu và phát hiện bằng quang phổ hấp thụ (UV-VIS), hoặc sử dụng phương pháp sắc ký trao đổi cation, hoặc sắc ký ghép khối phổ (HPLC - MS). Nghiên cứu này góp phần đề xuất một phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò UV (HPLC-UV) để định lượng acid amin, đơn giản, dễ thực hiện hơn so với các phương pháp khác. Phương pháp này có thể áp dụng được cho nhiều phòng thí nghiệm trong nước để định lượng acid amin trong nhiều mẫu nguyên liệu hay chế phẩm khác nhau.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.P.Louisi, P.Agrafiotou, S.Sotiropoulos, “Optimal Conditions for the Direct RP-HPLC Determination of Underivatized Amino Acids with Online Multiple Detection”, *Methods Mol Biol.* 2030, 415-428, 2019.
- [2] Hansen D.B. and Joullie M.M, “The development of novel ninhydrin analogues”, *Chem. Soc. Rev.*; 34(5), p.408-417, 2005.
- [3] Le A, Ng A, Kwan T., Cusmano-Ozog K. and Cowan T.M., “A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)”, *Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 944, p.166–74, 2013.



- [4] Demaster E.G., Shirota F.N., Redfern B., Goon D.J. and Nagasawa H.T., “Analysis of hepatic reduced glutathione, cysteine and homocysteine by cation exchange high-performance liquid chromatography with electrochemical detection”, *J. Chromatogr.*, 8, p. 308:83–91, 1984.
- [5] Gusnawan P., Ganegamage X., Heagy M., and Yu J., “Reactive CO<sub>2</sub> absorption mechanism of a soybean-based (SBB) solvent containing 18 amino acid salts in polyvinylidene fluoride (PVDF) hollow fiber membrane-based gas-liquid membrane contactor”, *Chemical Engineering Journal*, 399, 125819, 2020.
- [6] Shen F., Niu X., Yang D., Ying Y., Li B., Zhu G., and Wu J.; (2010): “Determination of Amino Acids in Chinese Rice Wine by Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), p. 9809-9816, 2010.
- [7] Pappa-Louisi A., Nikitas P., Agrafiotou P. and Papageorgiou A., “Optimization of separation and detection of 6-aminoquinolyl derivatives of amino acids by using reversed-phase liquid chromatography with online UV, fluorescence and electrochemical detection”, *Anal Chim Acta.*, 593, p.92–97, 2007.