

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»



На правах рукописи

Алтыев Алексей Муратович

**БИОАКТИВНЫЕ ЭЛЕКТРОДНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АМИНОКИСЛОТ МЕТОДАМИ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ**

1.4.2 – аналитическая химия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель

кандидат химических наук, доцент

Шелковников Владимир Витальевич

Томск - 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	9
1.1 Хроматографические методы определения аминокислот	9
1.2 Определение метионина, триптофана, 5-гидрокситриптофана методами электрофореза.....	14
1.3 Спектрофотометрические методы определения метионина, триптофана, 5-гидрокситриптофана	17
1.4 Электрохимические методы анализа триптофана, 5-гидрокситриптофана, метионина	19
1.5 Витамины группы В, участвующие в процессах метаболизма метионина, триптофана и 5-гидрокситриптофана	47
ГЛАВА 2. МЕТОДИКА И АППАРАТУРА ЭКСПЕРИМЕНТА	53
2.1 Оборудование, электроды, химическая посуда	53
2.2. Приготовление растворов	54
2.3 Подготовка модифицированного электрода	56
2.4 Приготовление образцов к анализу.....	57
2.5 Методика эксперимента	57
2.6 Статистическая обработка данных.....	58
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ПОВЕДЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЭЛЕКТРОДАХ	59
3.1 Модификация электрода витамином В ₁₂ для определения метионина	59
3.2 Влияние различных факторов на сигнал электроокисления метионина.....	63
3.2.1 Влияние pH на формирование аналитического сигнала метионина	64
3.2.2 Влияние параметров электролиза на сигнал электроокисления метионина	66
3.3 Исследование механизма реакции электроокисления метионина на модифицированном электроде	67
3.5 Модификация электрода для одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана	71
3.6 Влияние pH фонового электролита на окисление триптофана и 5 - гидрокситриптофана	74

3.7 Влияние параметров электролиза на электроокисление триптофана и 5-гидрокситриптофана	76
3.8 Исследование механизма окисления триптофана и 5-гидрокситриптофана модифицированном электроде	78
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТИОНИНА, ТРИПТОФАНА И 5-ГИДРОКСИТРИПТОФАНА В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ.....	82
4.1 Вольтамперометрическое определение метионина.....	82
4.2 Разработка методики определения метионина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках.	84
4.3 Вольтамперометрическое одновременное определение триптофана и 5-гидрокситриптофана	86
4.4 Разработка методики определения триптофана и 5 - гидрокситриптофана в лекарственных препаратах и биологически активных добавках.	90
4.5 Метрологические характеристики вольтамперометрической методики определения метионина на модифицированном МУНТ и витамином В ₁₂ углеродсодержащем электроде.....	93
4.6 Метрологические характеристики вольтамперометрической методики одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана на модифицированном МУНТ и витамином В ₉ углеродсодержащем электроде.....	96
ВЫВОДЫ	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ.....	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106
Приложение А	117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. На настоящий момент известно около 500 аминокислот, из них около 20 являются незаменимыми. Растения и несколько известных микроорганизмов способны синтезировать аминокислоты нужные для производства клеточных белков, однако животные могут синтезировать лишь 10 аминокислот. Недостаток оставшихся 10 аминокислот может быть компенсирован только с пищей. Дисбаланс аминокислот ведет к проявлению отрицательного азотного баланса, могут возникать задержки в развитии организма, отрицательный азотный баланс может препятствовать синтезу необходимых для существования человека белков. [1]. Человек должен получать 9 незаменимых аминокислот: валин, изолейцин, лейцин, метионин, треонин, триптофан, 5-гидрокситриптофан, фенилаланин, лизин. Потребность в незаменимых аминокислотах возрастает в периоды интенсивного роста организма, при беременности, некоторых заболеваниях [2].

В организме человека метионин играет важную роль как донор метильных групп при синтезе адреналина и холина, а также является источником серы для биосинтеза цистеина. Недостаток метионина приводит к снижению уровня плазменных белков (альбуминов), вызывает анемию (снижается уровень гемоглобина), при одновременном недостатке витамина Е и селена способствует развитию мышечной дистрофии [3]. Триптофан (Трп) – незаменимая α -аминопропионовая кислота, необходимая для синтеза белков, но и не только для участия в этом процессе. Она способствует поддержанию азотистого равновесия в обменных процессах, а также является исходным веществом в синтезе гормонов млекопитающих, таких как ниацин, мелатонин и серотонин, нехватка которых приводит к психическим расстройствам и нарушению сна. 5-гидрокситриптофан является промежуточным звеном в метаболизме триптофана. Нехватка 5-гидрокситриптофана негативно влияет на получение гормона серотонина [4].

Поскольку эти аминокислоты могут поступать в организм только с пищей, лекарствами и биологически активными добавками, необходимы надежные методы их определения. Для определения аминокислот используют хроматографию,

спектрофотомерию, ЯМР, хемилюминесценцию, масс-спектрометрию, однако данные методы имеют ряд существенных недостатков: применяемое аппаратное оформление дорого и недоступно для небольших лабораторий, процесс пробоподготовки, как правило, длительный, при этом пробы могут загрязняться применяемыми реагентами. В последнее время для определения аминокислот стали использовать электрохимические методы, обладающие высокой чувствительностью, селективностью, низкой стоимостью оборудования. Однако, количество надежных методик невелико, поскольку многие аминокислоты проявляют слабую электрохимическую активность.

Целью данной работы является изучение электрохимического поведения триптофана, 5-гидрокситриптофана и метионина на электродах, модифицированных витаминами группы В и разработка методик их определения методами вольтамперометрии.

Для достижения цели диссертационной работы необходимо решить **следующие задачи:**

1. На основании биохимических процессов, протекающих в организме с аминокислотами, выбрать вещества, селективно реагирующие на метионин, триптофан и 5-гидрокситриптофан, предложить способ их закрепления на электроде с целью формирования аналитического сигнала и его регистрации методами вольтамперометрии.
2. Оценить влияние различных факторов (рН, потенциал и время электролиза, скорость развертки) на электрохимические сигналы триптофана, метионина, 5-гидрокситриптофана на модифицированном электроде
3. Изучить физико-химические закономерности окисления аминокислот на поверхности модифицированного электрода. Предложить возможные механизмы электродных процессов.
4. Оптимизировать условия определения метионина и одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана в условиях метода вольтамперометрии.

5. Оценить метрологические характеристики методик определения метионина, триптофана, 5-гидрокситриптофана в лекарственных препаратах и биологически активных добавках (БАД).

Научная новизна.

1. Впервые в основу методик определения аминокислот методами вольтамперометрии положены биохимические процессы, протекающие в организме с участием витаминов группы В.
2. Предложены возможные механизмы процессов концентрирования и электрорастворения концентратов триптофана и 5-гидрокситриптофана на электродах модифицированных полифоллиевой кислотой и метионина, на электродах, модифицированных цианокобаламином.
3. Впервые предложен способ модификации инертных графитсодержащих электродов путем последовательной электрохимической сборки многостенными углеродными нанотрубками и пленками цианокобаламина и полифоллиевой кислоты. Изучены физико-химические закономерности электроокисления метионина на электроде, модифицированном витамином В₁₂, триптофана и 5-гидрокситриптофан на электроде, модифицированном витамином В₉

Практическая значимость.

Разработаны методики определения метионина, и одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана на электродах, модифицированных пленками витаминов В₁₂, В₉, в лекарственных средствах и БАДах. Проведена оценка отдельных метрологических характеристик методик определения метионина, триптофана, 5-гидрокситриптофана. Установлено, что присутствие других аминокислот (лизина, валина, лейцина, фенилаланина и др.), а также крахмала и метилцеллюлозы в анализируемых объектах не влияет на аналитические сигналы определяемых компонентов. Разработанные методики позволяют определять метионин, триптофан и 5-гидрокситриптофан на уровне до $0,5 \cdot 10^{-7}$ М. Разработанные методики определения метионина, триптофана и 5-гидрокситриптофана могут быть рекомендованы для контроля качества

лекарственных средств и БАДов в аналитических лабораториях фармацевтических компаний.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования электрохимических свойств аминокислот (триптофан, 5-гидрокситриптофан, метионин) в зависимости от ряда факторов (рН раствора, природа фонового электролита, скорость развертки потенциала, время электролиза)
2. Физико-химические закономерности протекания реакции окисления аминокислот (триптофан, 5-гидроксириптофан, метионин) на углеродсодержащем электроде, модифицированном пленками витаминов группы В и многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ).
3. Влияние сопутствующих компонентов матрицы лекарственных средств и БАД на аналитические сигналы аминокислот (метионин, триптофан, 5-гидрокситриптофан).
4. Методики определения индивидуальных аминокислот (триптофан, 5-гидрокситриптофан, метионин) в лекарственных препаратах и БАДах методом инверсионной вольтамперометрии.

Апробация работы. Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018» (Москва, 2018); XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва, 2019); XXVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020» (Москва, 2020); Международной научной конференции «Полифункциональные химические материалы и технологии» (Томск, 2019); XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2020); IV Международной научной конференции

студентов, аспирантов и молодых ученых «Химические проблемы современности» (Донецк, 2020).

Работа выполнена при финансовой поддержке: Программы развития Томского Государственного Университета (Приоритет-2030), проект № 2.4.1.23 МЛ «Разработка научных основ для создания новых функциональных материалов на основе N-гетероциклических соединений как перспективных компонентов противоспаечных средств»; Программы развития Томского государственного университета на 2025–2036 годы, проект № 5.1.3.25 «Аналитические методы сопровождения новых химических технологий».

Публикации: Опубликовано 11 работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 4 статьи в журналах входящих в базы данных Web of Science и Scopus, 7 докладов на международных конференциях.

Личный вклад автора: состоял в обобщении и систематизации литературных данных по методам выделения, определения аминокислот в лекарственных средствах и БАДах, а также в проведении экспериментальных исследований и интерпретации полученных данных.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 113 страницах и 56 страниц приложения. Содержит 30 рисунков и 17 таблиц. Диссертация состоит из введения и 4 глав, включая литературный обзор. Список цитируемой литературы содержит 92 библиографические ссылки на работы российских и зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.

1.1 Хроматографические методы определения аминокислот

Хроматография – это универсальный метод определения аминокислотного состава белков и находящихся в крови человека в свободном доступе веществ. Авторами [5] приведен метод ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) с масс-спектрометрическим детектором для определения метионина в плазме человека. В данной работе отбирали кровь человека, которую быстро охлаждали на льду, затем центрифугировали. Отделившуюся плазму крови хранили в морозильной камере при -20°C . Перед анализом плазму полностью размораживали и тщательно перемешивали путем встряхивания. Далее добавляли аликвоту дитиотреитола для реакции восстановления гомоцистеина в метионин. После проведения центрифугирования, было добавлено 0,01% раствора гептафтормасляной кислоты. Для разделения смеси использовали колонку с обратной фазой, а в качестве элюента – раствор метанола и воды в соотношении 1:1. Диапазон определяемых концентраций метионина 0,8–400 мкмоль/дм³. Минимально определяемая концентрация метионина – 0,8 мкмоль/дм³.

При дериватизации аминокислот полярные N–H и O–H группы могут быть переведены в относительно неполярные группы. Получающийся в результате этой реакции продукт может быть менее полярным, более летучим, что позволяет его анализировать с помощью газовой хроматографии. Для этой цели часто используются громоздкие неполярные силильные группы, внедренные в неподвижную фазу хроматографической колонки. В работе [6] описан газохромато-масс-спектрометрический метод одновременного определения метионина и общего гомоцистеина в плазме человека. Метод включал восстановление дисульфидной связи гомоцистеина с дитиотреитолом, очистку катионообменной хроматографией и дериватизацию изобутилхлоркарбонатом в смеси вода-этанол-пиридин (1:1:1). Разделение смеси метионина и гомоцистеина осуществляли с использованием силикагелевой колонки. В качестве подвижной фазы использовался гелий. Диапазон определяемых концентраций метионина

15,78–66,94 нмоль/см³. Минимально определяемая концентрация метионина – 0,2 нмоль/см³.

Другие оценочные критерии определения метионина представлены в работе [7]. В данной работе определение метионина проводили методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором без предколоночной дериватизации аминокислот, таких как таурин и метионин, в энергетических напитках с использованием полиаминной колонки из полимерного геля. Раствор, удерживаемый данной колонкой, элюируется путем увеличения полярности подвижной фазы. Селективное разделение аналитов происходит между (гидрофобной) подвижной фазой и обогащенным полярным слоем на поверхности неподвижной фазы, которая участвует в разделении. Преимуществом данной работы является использование совершенно новой колонки при определении данных аминокислот. Диапазон определяемых концентраций метионина 50–100 мкмоль/дм³. Минимально определяемая концентрация метионина – 0,2 мкмоль/дм³.

Водная нормально-фазовая хроматография [8] представляет собой новую технологию для разделения эндогенных метаболитов в биологических матрицах, содержащих метионин. Это позволяет разделять гидрофильные соединения с высокой селективностью, которые не могут удерживаться и разделяться на традиционно используемые стационарные фазы в режиме работы с обращенно-фазовой системой. В отличие от гидрофильных колонок, использующихся в традиционной хроматографии и хроматографии обращенно-фазовых ионных пар, которая также была предложена для разделения гидрофильных молекул [7], водная нормально-фазовая хроматография не основывается ни на использовании более высоких концентраций буфера, ни ионных пар реагентов. В элюентных системах, подходящих для данного вида хроматографии, используется ацетонитрил (или ацетон) в качестве слабого и вода, в качестве сильного элюирующего растворителя, включая незначительные количества летучих буферов или кислот. Авторами [8] использовалась колонка на основе гидрида диоксида кремния в качестве стационарной фазы, а в качестве подвижной фазы использовалась 10% элюента А (вода с 0,1 % муравьиной кислотой) и 90 % элюента В (ацетонитрил с 0,1%

муравьиной кислотой), увеличивая до 70 % элюента А через 4 мин в качестве подвижной фазы. Предварительно проводилась дериватизация компонентов перед анализом дитиотреитолом. В качестве детектора использовался тройной квадрупольный масс-спектрометр. Минимально определяемая концентрация метионина $10,1 \text{ мкмоль/дм}^3$ с диапазоном определяемых концентраций 38,60–113 мкмоль/дм^3 .

Так же возможно прямое определение метионина в белках, после непосредственного гидролиза. Авторы [9] определяют метионин в молочном протеине, казеине и бета-лактоглобулине методом ВЭЖХ с УФ-диодноматричным детектором и колонкой с обращенной фазой. Перед началом анализа навеску белка помещали в пробирку с соляной кислотой и наполняли азотом. Далее смесь оставляли на 22 часа при 110°C после чего кислоту нейтрализовывали щелочью и разбавляли водой. Далее добавляли определенное количество ацетонитрила и загружали в автосемплер, после чего проводилось определение. Соответственно в протеине содержалось $44,3 \pm 2,5 \text{ мкмоль/дм}^3$ метионина, в казеине – $172 \pm 2 \text{ мкмоль/дм}^3$, в бета-лактоглобулине $170 \pm 1 \text{ мкмоль/дм}^3$. Так же стандартом для определения метионина в комбикормах и кормах является ГОСТ 32195-2013 [10]. В данном стандарте проводится гидролиз белков в отобранных пробах сырья и производится предколоночная дериватизация с последующим детектированием на аминокислотном анализаторе или ВЭЖХ с УФ-детектором. Данная методика не позволяет охватить более широкий спектр анализа аминокислот, например, таких как триптофан, из-за окисления последнего в кислой среде.

Для анализа содержания триптофана и 5-гидрокситриптофана в биологических образцах применяют различные методы хроматографии. Среди наиболее распространенных методов можно выделить ВЭЖХ с масс-спектрометрическими детекторами, ГХ с МС и флуориметрические детекторы. Эти методы позволяют проводить точное и чувствительное определение указанных аминокислот.

Одним из наиболее используемых методов в хроматографии для определения триптофана и 5-гидрокситриптофана является высокоэффективная жидкостная

хроматография (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическими детекторами. Этот метод позволяет проводить качественный и количественный анализ указанных аминокислот с высокой точностью и чувствительностью.

Помимо этого, в хроматографии для определения триптофана и 5-гидрокситриптофана также широко используется газовая хроматография (ГХ) с масс-спектрометрическими детекторами. Этот метод обеспечивает высокую разделительную способность и позволяет проводить анализ аминокислот в различных типах образцов. Авторы [11] предлагают методику определения триптофана в плазме крови человека методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. В качестве подвижной фазы использовались растворы 0,1 % (об./об.) муравьиной кислоты в воде и ацетонитриле. Перед анализом плазму крови человека предварительно обрабатывали углем и затем фильтровали в воде, после чего получали результаты. Минимально определяемая концентрация триптофана – 100 нг/см³; диапазон определяемых концентраций: 138–200 нг/см³. В работе [13] проводили определение триптофана в пищевых продуктах методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором и обращенно-фазовой колонкой. Предварительно перед анализом пищевые продукты ферментировались для разделения белков на составные части аминокислот. В качестве подвижной фазы использовались растворы 0,1 % муравьиной кислоты в воде и 0,1 % муравьиной кислоты в метаноле. Результаты показали наличие различных количеств триптофана в разных ферментированных продуктах, которые в основном потребляются во всем мире. Аналогичным образом определяли триптофан в плазме в присутствии 8 разных метаболитов организма человека [17]. Предварительно взятую кровь центрифугировали и охлаждали при -2°C. После забора крови ее растапливали и центрифугировали. Далее, чтобы избавиться от мешающего влияния некоторых компонентов крови добавляли древесный уголь, который отфильтровывали. Далее проводили анализ с масс-спектрометрическим детектором и обращенно-фазовой колонкой. Данный метод позволяет определять триптофан в диапазоне концентраций 139–400 нмоль/дм³, с минимально определяемой концентрацией 83 нмоль/дм³, а также 5-гидрокситриптофан с

минимально определяемой концентрацией $2,0 \text{ нмоль/дм}^3$ в диапазоне концентраций $2,3\text{--}400 \text{ нмоль/дм}^3$.

Однако триптофан возможно определять не только в плазме крови человека, но также и в волосах, в качестве одного из составляющих белков. Для определения триптофана так же подходит и флуориметрический детектор. Определение триптофана методом ВЭЖХ с флуориметрической детекцией проводилось в работе [12]. Предварительно проводили гидролиз образца волос раствором NaOH, после чего раствор фильтровали и проводили исследование. Минимально определяемая концентрация триптофана данным методом – $1,2 \cdot 10^{-6} \text{ моль/дм}^3$.

В хроматографическом анализе используются не только флуориметрические, масс-спектрометрические детекторы, а также и спектрофотометрические. Описана процедура количественного определения триптофана в кормах [14]. Проведение пробоподготовки проводится путем гидролиза в гидроксиде натрия при 100°C в течение 4 часов. После нейтрализации полученного гидролизата до нейтральной среды проводили разбавление боратом натрия. Далее проводили анализ с помощью обращенно-фазовой колонки ВЭЖХ со спектрофотометрическим определением триптофана при 280 нм. Так же для определения триптофана используют газовую хроматографию. В работе [15] проводили предварительную пробоподготовку биологической жидкости человека и предварительную дериватизацию аминокислот. Анализ проводили на газовом хроматографе с капиллярной колонкой и масс-спектрометрическим детектором. В качестве подвижной фазы использовали газ – гелий, а неподвижной – октадецилсилильную хроматографическую колонку. Триптофан возможно определить ионообменной хроматографией, что значительно удешевляет метод хроматографии, но в отличие от большинства других аминокислот, триптофан не может быть определен этим методом после кислотного гидролиза из-за окислительного разрушения последнего. В работе [19] проводили щелочной гидролиз белка с предварительной дериватизацией О-фталевым ангидридом с Na-катионообменной колонкой и флуориметрическим детектированием триптофана. Авторами проведено хроматографическое разделение белка, в котором содержался триптофан, в течение 15 минут без

мешающего влияния со стороны других соединений. Метод применим к системам, используемым для обычного аминокислотного анализа с помощью ионообменной хроматографии.

1.2 Определение метионина, триптофана, 5-гидрокситриптофана методами электрофореза

Изучение капиллярного электрофореза представляет собой важный аспект аналитической химии. Этот метод анализа основан на движении заряженных частиц в растворе электролита под воздействием электрического поля. Капиллярный электрофорез широко используется для определения различных веществ, включая аминокислоты, которые играют ключевую роль в биохимических процессах.

В отличие от других методов анализа аминокислот, капиллярный электрофорез является менее трудоемким и более простым в обслуживании. Этот факт делает его привлекательным для многих исследователей и лабораторий. При разделении аминокислот и других веществ в капиллярном электрофорезе применяются различные методы детектирования, такие как абсорбционная спектрофотометрия, флуориметрия, кондуктометрия, амперометрия и масс-спектрометрия [16]. Это обеспечивает точное и надежное определение состава и концентрации веществ в образце, что является важным для многих областей науки и медицины. Методы, основанные на ВЭЖХ, характеризуются высокой селективностью и точностью. Однако такие методы имеют ряд недостатков: высокий расход реагентов (особенно органических растворителей), сложность пробоподготовки, необходимость дериватизации, продолжительность анализа (до 80 минут). Методы определения аминокислот с помощью капиллярного электрофореза, в свою очередь, обычно характеризуются меньшей селективностью и меньшей точностью, но в то же время отличаются экспрессностью (анализ длится около 15 минут) и простотой процедуры пробоподготовки. Таким образом, при использовании тетраборатного буферного раствора одновременно можно определить до 11 аминокислот без предварительной дериватизации. В то же время

добавление метанола к фоновому электролиту позволяет увеличить количество разделенных аминокислот до 16 [18].

Одновременное определение метионина и триптофана в плазме крови человека проводили в работе [20]. Система капиллярного электрофореза была оборудована детектором с диодной матрицей. Перед началом анализа кровь собирали в герметичные контейнеры, замораживали. Перед анализом кровь растапливали, центрифугировали, отделяли плазму и к определенному объему плазмы добавляли стандартный образец метионина. Авторами данный шаг объясняется способностью избежать дериватизации метионина перед проведением анализа. Аналогично делали добавку стандартного образца триптофана. Наилучшим буферным раствором был выбран трис-фосфатный с $\text{pH}=2,3$. Увеличение значения pH или уменьшение концентрации рабочего буфера приводила к потере разрешения между пиками триптофана и метионина. Авторы проверили влияние температуры капилляра на разрешение с шагом 5°C между 20 и 45°C . Повышение температуры увеличивало ток миграции и уменьшало время миграции молекул метионина и триптофана. Хотя более высокие температуры позволили сократить время анализа, наблюдалась потеря разрешения. Таким образом была выбрана температура в капилляре, равная 15°C , которая показывала хорошее разрешение с приемлемым временем миграции. Минимально определяемая концентрация метионина составила 2 мкмоль/дм^3 , с диапазоном определения $10\text{--}40 \text{ мкмоль/дм}^3$.

Сообщается об электрофоретическом определении энантиомеров триптофана в работе [21]. Перед проведением анализа энантиомеров триптофана в раствор добавляли α -циклодекстрин. В данной работе рекомендуют использовать недериватизированные циклодекстрины из-за высокой селективности определения. При определении триптофана использовали буферный раствор триэтаноламинфосфорной кислоты в качестве фонового растворителя, при нем эффективно разделяются D/L-триптофан. Данная методика была оптимизирована и доказана эффективность определения триптофана. Были оптимизированы такие параметры, как время впрыска, pH фонового электролита, миграционный ток.

В работе [22] предлагается изучение аминокислотного и элементного состава листьев малины обыкновенной. Аминокислотный состав определяли следующим образом: навески образцов гидролизovali хлороводородной кислотой при температуре $110 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 16–18 часов, затем аликвоты образцов растворяли в натрий-фосфатном буферном растворе и проводили анализ. В результате исследования содержания аминокислот в листьях малины определено, что консистенция представлена 17 аминокислотами, 7 из которых являются незаменимыми, 2 частично заменимые и 8 заменимых аминокислот. Суммарное содержание аминокислот составило 15,57 %, из них незаменимых 4,84 %.

Авторами [23] приведен метод лигандообменного капиллярного электрофореза при определении аминокислот. Процесс заключается в комплексообразовании аминокислот с медью (II) при электрофорезе с УФ-детекторами. Данный метод детектирования позволяет обнаружить непоглощающие в УФ-области аминокислоты такие как триптофан, тирозин, гистамин. Предел обнаружения для определения аминокислот составляет 1–3 мг/л. Так же выявлено, что при определении таким образом аминокислот большое влияние оказывает pH раствора. Авторами данной работы высказано предположение о том, что высокая интенсивность аналитического сигнала появляется при приближении pH к изоэлектрической точке аминокислоты.

В работе [24] приведена методика определения триптофана, тирозина и 3,4-дигидроксифенилаланина методом капиллярно-зонного электрофореза и мицеллярной кинетической хроматографии. При использовании имидазола в качестве основы фонового электролита аналитические сигналы повышаются в два-три раза. Предел обнаружения аминокислот составил 30-55 нг/мл.

В работе [25] была разработана и изготовлена лабораторная система капиллярного электрофореза (КЭ) с использованием более короткой капиллярной колонки. Эта система КЭ была затем связана с конфокальной флуоресцентной микроскопией. Чтобы показать применимость этой новой системы для хирального разделения DL-триптофана, были проведены исследования с использованием циклодекстринов (ЦД) и их производных; сульфатированные (S-ЦД) и

высокосульфатированные циклодекстрины (HS-ЦД) в качестве хиральных селекторов. Различные концентрации селекторов протестированы при различных рН (рН 2,5, 4,0, 6,0, 9,0) для оптимизации условий разделения. Наилучшие результаты были достигнуты при более низких значениях рН (например, рН 2,5 и рН 4,0). Было обнаружено, что HS- β -ЦД и HS- γ -ЦД являются наиболее эффективными хиральными селекторами с более коротким временем удерживания при низких концентрациях селектора.

В работе [26] проводили исследование триптофана и кинуренина (продукт метаболизма триптофана) в мозгах крысы методом капиллярного электрофореза с электрохимическим детектором. Циклические вольтамперограммы триптофана и его метаболитов были получены с использованием стеклообразных электродов из углеродного волокна. В метаболитах триптофана проявляется широкий диапазон полуволновых потенциалов. Кинуреновая кислота проявляла очень высокую степень окисления потенциала (+1015 мВ). С другой стороны, 3-гидроксикинуренин, 3-гидроксиантраниловая кислота и 5-гидроксиантраниловая кислоты все показали очень низкие окислительные потенциалы (всего +00, +160 и +95 мВ соответственно). При использовании капиллярного электрофореза из углеродного волокна установлено, что фоновый ток значительно увеличивается при потенциалах выше +950 мВ. После проведения неоднократных измерений был выбран рабочий потенциал +900 мВ для определения триптофана. Минимально определяемая концентрация 9,8 нмоль/дм³.

1.3 Спектрофотометрические методы определения метионина, триптофана, 5-гидроксириптофана

Спектрофотометрия – метод, основанный на измерении оптической плотности растворов веществ, которые проявляют хоть какие-нибудь оптические свойства в УФ и видимой части спектра. Растворы аминокислот практически не поглощают ультрафиолетовый и видимый свет и не обладают собственной флуоресценцией. Чувствительность определения аминокислот прямыми спектрофотометрическими, флуориметрическими методами невысока. Для повышения чувствительности

проводят их дериватизацию, чаще всего используют для этой цели ортофталевый альдегид (ОФА) в присутствии 2-меркаптоэтанола (2МЕ) [27].

Согласно ГОСТ 32799-2014 [28] аминокислоты, в том числе метионин и триптофан определяют спектрофотометрически, предварительно проводя реакцию с нингидрином. Процесс проводят при температуре 100–135°C. Окрашенный элюат, содержащий смесь свободных аминокислот, детектируют с помощью фотометрического детектора при длинах волн 570 и 440 нм. Метод обладает невысокой чувствительностью и низкой воспроизводимостью результатов.

Было установлено, что фенилизотиоцианат (ФИТЦ) обладает способностью взаимодействовать с аминокислотами, образуя фенилтиокарбамильные производные (ФТК-производные). Эти производные обладают высокой чувствительностью и могут быть обнаружены при использовании длины волны 254 нм. Следует отметить, что предел обнаружения для большинства ФТК-производных аминокислот составляет всего 1 пмоль [28]. Это означает, что даже незначительные количества данных производных могут быть обнаружены и исследованы с высокой точностью. Таким образом, методика, основанная на использовании ФИТЦ и ФТК-производных, является надежным и эффективным инструментом в анализе аминокислот и может быть применена в различных областях науки и медицины.

Аминокислоты определяют, используя следующие реагенты:

-6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидилкарбамата (АНС). Реакционную смесь определяют при длине волны 395 нм. Предел обнаружения для каждой аминокислоты, за исключением цистеина, находится в диапазоне от 40 до 320 мкмоль

-9-фторенилметилхлороформиат (FMF). Производные аминокислот определяют при 313 нм. Предел обнаружения находится в нижнем фемтомолярном диапазоне. Линейность сигнала для большинства аминокислот наблюдается в диапазоне 0,1–50 ммоль

-7-фтор-4-нитробензо-2-окса1,3-дiazол (NBD). Смесь определяют при длине волны испускаемого света 530 нм. Предел обнаружения для каждой аминокислоты составляет около 10 мкмоль [29]

1.4 Электрохимические методы анализа триптофана, 5-гидрокситриптофана, метионина

Вольтамперометрия аминокислот является приоритетным направлением в области аналитической химии из-за простоты аппаратного оформления и хорошей чувствительности, точности и воспроизводимости результатов.

Авторами [30] разработан метод определения метионина с помощью биметаллических наночастиц (БМЧ) Ag-Au, которые были приготовлены с использованием метода химического восстановления. Приготовленные БМЧ типа Ag-Au охарактеризованы методами УФ-видимой спектроскопии, автоэмиссионной сканирующей электронной микроскопии, просвечивающей электронной микроскопии, просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (HR-TEM), рентгеновской дифракцией (XRD), атомно-силовой микроскопии (AFM) и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (XPS). Эти результаты показали, что Ag-Au БМЧ имеют форму ядро-оболочка. БМЧ Ag-Au исследовали на предмет электрокаталитического окисления l-метионина (l-Met) с помощью циклической вольтамперометрии (CV), линейной вольтамперометрии (LSV) и хроноамперометрии. По результатам данной работы метионин определяется с пределом обнаружения 30 мкМ.

В работе [31] был изготовлен новый электрод из углеродной пасты, модифицированный наностержнями ZnO и 3-(4'-амино-3'-гидроксибифенил-4-ил) акриловой кислотой (3,4'AAZCPE). Описано электрохимическое исследование модифицированного электрода, а также его эффективность для электрокаталитического окисления дофамина. Результаты вольтамперометрии показали хорошо выраженные анодные пики при потенциалах 240, 680, 990 и 1380 мВ, что соответствует окислению дофамина, мелатонина, метионина и кофеина соответственно. Предел обнаружения метионина – 20 мкМ/дм³.

Изучали электрохимию серосодержащих аминокислот (цистеин, цистинин и метионин) на графитовых электродах, модифицированных пленкой гексацианоферрата (II) рутения (III) в работе [32]. Установлены электрохимические параметры для регистрации аналитических сигналов и предложен метод проточно-инжекционного анализа данных аминокислот.

Авторы изучили электрохимические свойства метионина на модифицированном полиарилефталидном стеклоуглеродном электроде (PAF) и выбрали оптимальные условия [33]. Вольтамперные кривые регистрировали на фоне фосфатного буфера (pH=6,86) с помощью потенциостата при потенциалах от 0,0 до 1,8 В с амплитудой 50 мВ, длительностью импульса 0,25 с и положением импульса 0,025 с. Предварительно индикаторный электрод погружали в анализируемый раствор и проводили адсорбционное концентрирование в течение 60 с при интенсивном перемешивании. Максимальные аналитические сигналы наблюдаются при pH≈7. Предел обнаружения составляет 8,375 ммоль/л.

Изучение методов анализа питательных веществ в кормах – важная задача, которая позволяет контролировать качество кормов и обеспечивать животных необходимыми питательными веществами. В одном из исследований [33] был рассмотрен метод определения метионина в комбикормах с использованием катодной вольтамперометрии. Основным этапом данного метода является перенос метионина из исходного сырья в раствор, после чего происходит его определение по аналитическому сигналу восстановления при определенном потенциале.

Авторы исследования [33] использовали ртутный пленочный электрод (RPE) с потенциалом -0,315 В в боратном буферном растворе с pH 9,18 для определения метионина. Они обнаружили, что зависимость увеличения предельного тока восстановления метионина от его концентрации в растворе является линейной в пределах от $2,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л до $2,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Этот результат позволяет эффективно определять содержание метионина в комбикормах и контролировать его соответствие установленным стандартам качества.

Экспериментальные исследования показали, что скорость развертки в данной реакции составляла 0,06 В/с. Этот показатель играет важную роль в процессе

оценки количественного содержания метионина в комбикормах. Предел обнаружения данной аминокислоты составил $2,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, что является достаточным для точной оценки его присутствия в пищевых продуктах.

В работе [34] проведено исследование методом циклической вольтамперометрии для определения содержания метионина. Для этого использовался графитовый электрод, модифицированный коллоидными частицами золота. Однако, стоит отметить, что поверхность электрода формировалась путем электролиза из золя золота при потенциале накопления -1,0 В в течение 300 с. Экспериментально было показано, что катодный пик метионина использовался как аналитический сигнал, скорость развертки потенциала составляла 100 мВ/с. Фоном для измерений служил раствор NaOH концентрацией 0,1 М, а развертка потенциала производилась в пределах от -1,0 до 1,0 В. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о высокой эффективности метода циклической вольтамперометрии с использованием модифицированного графитового электрода для определения метионина.

В работе [35] проводили исследование по определению изомеров метионина на энантиоселективных электрохимических наносенсорах на основе электрополимеризованного молекулярного импринтинга. В данной работе изготавливали полимерную пленку из бензидина и метионина, концентрированные на поверхности модифицированного многослойными углеродными нанотрубками графитового электрода, на котором образуется амид, который в дальнейшем электрополимеризируется на поверхности электрода. В процессе электрополимеризации молекулы метионина мгновенно окислялись до метионинсульфона в виде печатных молекул с участием электростатически управляемых водородных связей в аддукте полимер-матрица. После приготовления данного «шаблона» (метионин-сульфона), данная полимерная пленка наносилась на поверхность электрода, имеющей несколько молекулярных полостей. Эти полости избирательно инкапсулированы l-метионином в окисленной форме. Диапазон концентраций составил: 11,7–206,3 нг/мл (для модельного раствора), 11,7–197,4 (лекарственное средство) и 11,8–152,3 нг/мл (сыворотка

крови) с пределом обнаружения 2,4–3,0 нг/мл. Предлагаемый метод был также исследован на энантиоселективное количественное определение изомеров метионина (d- и l-) в сложных матрицах реальных образцов.

Авторами [36] проводилось исследование MoS_2 , дисульфида переходного металла, широко используемого в конструкции фотоэлектрохимических (ПЕС) сенсоров. Датчик ПЕС на основе MoS_2 работает по стратегии «signal-on». Авторы обнаружили, что эффект ПЕС MoS_2 значительно подавлялся метионином. На основе этого открытия впервые произведено ПЕС-зондирование с использованием модифицированного MoS_2 электрода для обнаружения метионина. Были изучены экспериментальные факторы, такие как потенциал смещения, объем MoS_2 и pH. В оптимизированных условиях уменьшенная интенсивность сигнала фототока была пропорциональна логарифмическому значению концентраций метионина от 0,1 нМ до 1 мкМ с пределом обнаружения 0,03 нМ. Кроме того, этот метод показал хорошие характеристики и отличную селективность.

Авторами [37] проводилось исследование четырех аминокислот, которые одновременно определялись на CdSe-модифицированных квантовых точках / многослойных углеродных нанотрубках, полых волокнистых графитовых электродах в различных добавках для бодибилдинга. Квантовые точки CdSe синтезировались и использовались для создания модифицированного графитового электрода с полыми волокнами из углеродных нанотрубок. Методы FT-IR, ТЕМ, XRD применялись для характеристики синтезированных QD CdSe. Было изучено электроокисление аргинина (Арг), аланина (Ала), метионина (Мет) и цистеина (Цис) на поверхности модифицированного электрода. В оптимизированных условиях дифференциальные импульсные вольтамперометрические пиковые токи Арг, Ала, Мет и Цис линейно увеличивались с их концентрациями в диапазоне 0,287–33670 мкМ, а пределы обнаружения 0,081, 0,158, 0,094 и 0,116 мкМ соответственно. Данный модифицированный электрод обеспечивает очень хорошее разрешение между пиками четырех аминокислот, что делает его пригодным для обнаружения каждой аминокислоты в присутствии других в реальных образцах.

Авторами [38] предлагается последовательный метод определения триптофана и гистидина с помощью адсорбционной катодной вольтамперометрии с использованием стандартного добавления и метода стандартного добавления по точке. Комплексы меди (II) с аминокислотами накапливались на поверхности висящей ртутной капли в течение 60 с. Затем концентрированные комплексы восстанавливали с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии и измеряли пиковые токи. Влияние на аналитический сигнал изучалось с помощью нейросети. В оптимизированных условиях пиковые токи от +0,05 до -0,30 В пропорциональны концентрации триптофана и гистидина в диапазонах концентраций 5–220 и 100–1200 нМ соответственно. Оптимизация параметров поочередно показала, что при потенциале накопления 0,10 В (по сравнению с электродом сравнения Ag / AgCl) пиковый ток пропорционален только концентрации триптофана, а гистидин не имеет никакого вклада в ток. Результаты оптимизации с помощью искусственной нейронной сети показали, что при потенциале накопления -0,06 В (по сравнению с Ag/AgCl) пиковый ток пропорционален обеим концентрациям триптофана и гистидина. Поэтому метод добавления стандарта Н-точки использовали для разрешения перекрывающихся вольтамперограмм для определения гистидина в присутствии триптофана. Метод успешно применен для определения триптофана и гистидина в синтетических и реальных образцах.

Дифференциальную импульсную вольтамперометрию с электродами из углеродного волокна [39] использовали для изучения метаболизма серотонина (5-НТ) у крыс. Electrodes, имплантированные в полосатые мышцы крыс, регистрировали пик окисления внеклеточной 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НИАА) после перорального приема триптофана (150 мг/кг). Этот предшественник 5-НТ не изменял пик 5-НИАА ни у одной тестируемой крысы, но он повышал уровни 5-НИАА, определенные во всей ткани классическим биохимическим методом (ВЭЖХ). Введение 5-гидрокситриптофана (5-НТР) (25 мг/кг внутривенно) индуцировало увеличение 5-НИАА, обнаруживаемое как во внеклеточной среде с помощью вольтамперометрии, так и в образцах тканей. Как было показано ранее, электрическая стимуляция дорсального шва повышает

уровень внеклеточного 5-НІАА в полосатом теле, и этот эффект усиливается предварительной обработкой триптофаном. Результаты показывают, что триптофан в «нормальных» условиях усиливает метаболизм 5-НТ, не влияя на высвобождение 5-НТ, если такое высвобождение не стимулируется. 5-НТР увеличивает метаболизм и высвобождение 5-НТ.

Стеклоуглеродный электрод, с нанесенными наночастицами CeO_2 и восстановленным оксидом графена (RGO) для определения триптофана, получили в работе [40]. Структура и морфология поверхности электрода охарактеризованы методами рентгеновской дифракции (XRD), сканирующей электронной микроскопии (SEM) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDS). Обнаружено, что многочисленные нанокристаллы CeO_2 равномерно обернуты внутри тонкой пленкой оксида графена. Электрохимическое поведение триптофана (Trp) на стеклоуглеродном электроде, модифицированном данной пленкой, исследовали с помощью линейной вольтамперометрии второй производной и циклической вольтамперометрии. Установлено, что модифицированный электрод для окисления Trp проявляет высокую электрокаталитическую активность. В оптимальных условиях наблюдалась хорошая линейная зависимость между током пика окисления Trp и его концентрацией в диапазоне 0,01–10 мкМ, с чувствительностью 4,7306 мкА, с пределом обнаружения 6,0 нМ/дм³ после накопления при 0 В в течение 90 с. Разработанный метод также продемонстрировал хорошую воспроизводимость, стабильность и успешно применялся для обнаружения Trp в инъекциях, в образцах человеческой сыворотки и человеческой мочи с выходом 98,5–106,0%.

В исследовании [41] представлен новый метод прямого определения L-триптофана (Try) с использованием листьев *E. tereticornis* в качестве экологически чистого восстановителя для синтеза восстановленных наночастиц оксида графена / золота (rGO / AuNP). Сканирующая электронная микроскопия (FESEM), просвечивающая электронная микроскопия (TEM), рентгеновская дифракция (XRD) и спектроскопия комбинационного рассеяния показали равномерное распределение наночастиц золота на тонких слоях восстановленного оксида

графена. Синтезированный нанокомпозит использовали в качестве чувствительной и электроактивной подложки на поверхности электрода с Print-screen печатью для электрохимического окисления Trp в биологических образцах. Дифференциальная импульсная вольтамперометрия (DPV) и циклическая вольтамперометрия (CV) показали надежный аналитический сигнал для окисления триптофана при 0,65 В. В оптимальных условиях, калибровочная кривая Trp является линейной в диапазоне 0,5–500 мкмоль/л ($R = 0,9976$) с пределом обнаружения и пределом количественного определения 0,39 и 1,32 мкмоль/л соответственно. Кроме того, электрохимический сенсор показал хорошую воспроизводимость, высокую чувствительность и хорошую селективность в отношении определения Trp, что делает его пригодным для анализа Trp в плазме, сыворотке и слюне человека.

Авторами [42] сообщается о разработке графитового электрода, модифицированного наночастицами палладия, и его применении в качестве электрохимического сенсора для одновременного обнаружения прямого желтого 50, триптофана, карбендазима и кофеина в речной воде и образцах мочи. Сочетание проводящей поверхности графитового стержневого электрода и увеличения площади поверхности, вызванной использованием наночастиц палладия, привело к улучшению аналитических характеристик предлагаемого устройства. Поверхность модифицированного электрода охарактеризована с помощью сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной спектроскопии. Кинетику переноса заряда электрода оценивали на основании электрохимического анализа окислительно-восстановительного зонда феррицианида калия. Используя прямоугольную вольтамперометрию, для аналитов обнаружены четко определенные и полностью разрешенные анодные пики с разницей потенциалов между пиками не менее 200 мВ. В оптимизированных условиях были получены следующие линейные диапазоны концентраций: 0,99–9,9 мкмоль/дм³ для прямого желтого 50; 1,2–12 мкмоль/дм³ для триптофана; 0,20–1,6 мкмоль/дм³ для карбендазима; и 25–190 мкмоль/дм³ для кофеина. Датчик показал хорошую чувствительность, повторяемость и стабильность. Устройство успешно применено

для определения аналитов в пробах мочи и речной воды, где получены степени извлечения, близкие к 100 %.

Авторами [43] представлена работа о применении дифференциальной импульсной вольтамперометрии для одновременной количественной оценки клинически важных молекулярных маркеров – триптофана и его метаболита – кинуренина. Образцы определялись менее чем за 60 с на легированном бором алмазном электроде, модифицированном *in-situ* пленкой висмута (BiF/BDDE). Правильная корректировка состава фонового электролита позволила получить хорошее разделение пиков окисления триптофана и кинуренина, которые появлялись при потенциале 0,88 и 1,05 В (по сравнению с Ag/AgCl) соответственно. Исследования с использованием оптического профилометра подтвердили увеличение площади поверхности электрода после нанесения пленки Bi. В оптимизированных условиях получены пределы обнаружения триптофана и кинуренина при концентрациях 30 нМ. Авторы исследовали влияние множества соответствующих мешающих органических соединений (включая аминокислоты и различные метаболиты триптофана кинуренинового цикла) на вольтамперометрические сигналы измеряемых аналитов. Для подтверждения технологии датчик был использован для количественного определения триптофана и кинуренина в культуральной среде, собранной из линий раковых клеток человека (MDA – MB – 231 груди и SK – OV – 3 яичника). Целевые молекулы анализировали напрямую, без какой-либо стадии подготовки образца. Датчик показал хорошую точность в присутствии компонентов матрицы образца, что было подтверждено измерениями высокоэффективной жидкостной хроматографии. Данная работа подчеркивает преимущества применения предлагаемого здесь простого в изготовлении вольтамперометрического датчика вместо популярных хроматографических анализов. Метод может служить для быстрой оценки активности кинуренинового пути в раковых клетках.

Разработан в работе [44] модифицированный гидроксиапатитом / оксидом графена print-screen электрод (SP-HAp / GO). Модифицированный электрод исследовали на предмет обнаружения L-триптофана (Trp) с использованием метода

линейной вольтамперометрии (LSV). Композит HAp / GO приготовили путем выращивания гидроксиапатита на оксиде графена в модельной жидкости, на основе плазмы организма. Смачиваемость поверхности, морфологию поверхности и химические функциональные группы, находящиеся на модифицированных электродах, определяли с помощью измерения угла смачивания, сканирующего электронного микроскопа и инфракрасного спектрометра с преобразованием Фурье, соответственно. Угол смачивания электрода, модифицированного композитом гидроксиапатита / оксида графена, примерно в два и три раза больше, чем у модифицированного оксидом графена электрода (SP-GO) и голого электрода (SP) соответственно. SP-HAp / GO и SP показывают шероховатую поверхность с трещинами и пористыми структурами, тогда как SP-GO образует плотную и гладкую поверхность. После электрохимического определения концентрации Tgr составили линейный диапазон в пределах 7–1000 мкМ и предел обнаружения 5,5 мкМ полученные для гидроксиапатита / оксида графена-модифицированного электрода. Данные результаты лучше, чем у чистого print-screen электрода с линейным диапазоном 25–1000 мкМ, пределом обнаружения 17,5 мкМ и электродом, модифицированным оксидом графена с линейным диапазоном 10–1000 мкМ и пределом обнаружения 7,0 мкМ.

В работе [45] наночастицы золота (AuNP) электроосаждали на поверхность композитного электрода из графита и полиуретана (EGPU) с последующей электрохимической обработкой в среде NaOH с использованием циклической вольтамперометрии. После характеристики и оптимизации условий эксперимента полученное устройство (EGPU-tAuNP) использовали для вольтамперометрического определения триптофана (TRP). Поверхность электрода исследовали сканирующей электронной микроскопией (SEM) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (EDX). Данные методы выявили однородное покрытие поверхности электрода без изменения морфологии из-за электрохимической обработки в NaOH. Некоторые измерения спектроскопии электрохимического импеданса показали, что модификация AuNP и электрохимическая обработка в основных средах снижает сопротивление переносу

электронов и улучшает скорость переноса электронов. Хронокулометрические данные и циклические вольтамперограммы, полученные в присутствии 100,0 мкмоль/дм³ TRP, показали увеличение максимального тока и смещение потенциала пика к более отрицательным значениям после предварительной обработки в основной среде. Предложен механизм, включающий реакцию $\text{Au}^0 / \text{Au}^{3+}$ на поверхности электрода и окисление TRP. В оптимизированных условиях с использованием дифференциальной импульсной вольтамперометрии (DPV) EGPU-tAuNP получили предел обнаружения $5,3 \times 10^{-8}$ моль/дм³. Прибор использовали для определения TRP в моче и коммерческих добавках полиаминокислот.

Авторами [46] сообщается о новом датчике на основе print-screen углеродных электродов, ковалентно модифицированных самоорганизующимися наносферами из золота и полидофамина. Сенсор применялся для одновременного определения биологически значимых молекул аскорбиновой кислоты, дофамина, мочевой кислоты и триптофана. Золото-полидофамин прикрепляли к наночастицам золота, электроосажденным на неизолированные электроды через цистеамин-глутаральдегидные мостики, и исследовали с помощью сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии. Поэтапное изготовление электродов и их электрохимические характеристики оценивали с помощью циклической вольтамперометрии, спектроскопии электрохимического импеданса и дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Реакция окисления веществ зависит от pH. Авторами установлено, что при pH=6 возможно одновременное определение аскорбиновой кислоты, дофамина, мочевой кислоты и триптофана в двух последовательных линейных диапазонах от 10–80 мкМ до 80–240 мкМ; 1–160 мкМ и 160–350 мкМ; 10–120 мкМ и 120–350 мкМ; и 1–160 мкМ и 160–280 мкМ соответственно. Полученные пределы обнаружения составили 0,2 нМ, 0,1 нМ, 0,1 нМ и 0,1 нМ соответственно.

Авторами [47] проведено исследование и создание селективного электрохимического нанокompозитного сенсора на основе кобальт-дубильной (Co-TA) кислоты и металлоорганического каркаса на основе Zn (ZIF-8) для

одновременного определения ацетаминофена (АС), дофамина (DA), триптофана (Trp) и мочевой кислоты (UA). В качестве методов исследования электрохимического поведения данных веществ использовали хроноамперометрию, дифференциальную импульсную вольтамперометрию, спектроскопию электрохимического импеданса и циклическую вольтамперометрию. Каталитическая активность и высокий уровень проводимости ZIF-8 и Co-TA привели к идеально разделенным пикам и к улучшенным пиковым токам DA, UA, АС и Trp. В итоге разница потенциалов составила 130, 120, 310 мВ (по сравнению Ag/AgCl). Данные потенциалы соответствовали анодным пикам для DA-UA, UA-АС и АС-Trp соответственно. При минимально определяемой концентрации 3,4, 1,2, 5,1 и 6,7 нМ максимальные токи линейно зависели от концентраций DA, UA, АС и Trp в пределах 0,02–0,44.

Высокоселективный электрохимический сенсор, представляющий гибридную структуру оксид алюминия / графен / Cu, изготовили авторы [48] путем электроосаждения наночастиц меди на инкапсулированные графеном нановолокна оксида алюминия и использовали для одновременного определения адреналина (EP), ацетаминофена (AP) и l-триптофана (Trp) с низкими пределами обнаружения и широкими линейными диапазонами. Для исследования электрохимических свойств разработанного электрода использованы методы циклической вольтамперометрии, электрохимической импедансной спектроскопии, дифференциальной импульсной вольтамперометрии и хроноамперометрии. Хорошо разделенные пики окисления и повышенные пиковые токи EP, AP и Trp наблюдались благодаря превосходной проводимости сильно расслоенного многослойного графена и превосходной каталитической активности наночастиц Cu. В частности, разделение потенциалов анодных пиков для EP-AP, AP-Trp и EP-Trp составляло 160, 274 и 434 мВ относительно SCE, соответственно. Пиковые токи линейно зависели от концентраций EP, AP и Trp в диапазоне 1–1200, 1–700 и 1–1000 мкМ с пределом обнаружения 0,027, 0,012 и 0,009 мкМ соответственно. Химически модифицированный электрод был успешно обработан некоторыми

мешающими соединениями и был оценен в образце мочи человека для определения EP, AP и Trp, демонстрируя выдающуюся стабильность и повторяемость.

Авторы [49] проводили исследования определения триптофана на стеклоуглеродном электроде, поли -3,4-этилендиокситиофена (PEDOT). Процесс проводили методом электрохимической полимеризации при потенциостатическом (PS) или синусоидальном напряжении (SV), из водных растворов полистиролсульфоната (PSS) или додецилсульфата (SDS). Параметры процедуры SV настраиваются таким образом, чтобы слои PEDOT имели емкостные токи зарядки / разрядки, аналогичные тем, которые нанесены на электрод при потенциостатическом режиме. Окисление триптофана (Trp) изучали методом вольтамперометрии в растворах с pH от 4 до 9. Для электроаналитических исследований оптимальный pH = 7. Все четыре типа слоев PEDOT демонстрируют линейную концентрационную зависимость токов вольтамперометрических пиков в расширенном диапазоне концентраций (10–400 мкМ). Установлено, что электроаналитические параметры (чувствительность, минимально определяемая концентрация и диапазон линейного отклика) не зависят от природы легирующей примеси и электрохимического метода, использованного для получения покрытий PEDOT. После интенсивного воздействия TRP не наблюдается загрязнения электродов, покрытых PEDOT. Исследования демонстрируют возможность использования PEDOT в качестве сенсорного материала в присутствии дофамина, мочевой и аскорбиновой кислот.

Авторами [50] проведено исследование механизма электроокисления свободного метионина и связанного с ним различными пептидными последовательностями. Механизм электроокисления исследовали с помощью вольтамперометрии, на стеклоуглеродном электроде и масс-спектрометрии. Предполагается, что электроокисление свободного метионина происходит в две стадии, каждая из которых включает перенос одного электрона и превращает pH-независимый от слабокислого электролита к мягкому щелочному электролиту. Первая реакция окисления приводит к образованию катион-радикала, стабилизированного либо через аминогруппу, что приводит к образованию

промежуточного дегидрометионина, либо за счет взаимодействия с нейтральной молекулой метионина, приводящего к образованию димерного катионного радикала. Гидролиз дегидрометионина дал сульфоксид метионина в качестве конечного продукта окисления, тогда как будущее окисление катион-радикала димера метионина, то есть вторая стадия электроокисления, приводит к дикатированию димера метионина. Более того, в высококислой среде протонированная аминогруппа влияет на процесс электроокисления, протекающий через механизм переноса протона. Присутствие сульфоксида метионина и катионного радикала димера в качестве продуктов окисления метионина подтверждено масс-спектроскопией.

Электрохимическое определение триптофана на угольно-пастовом электроде, модифицированном наночастицами диоксида кремния, провели авторы [51]. Угольную пасту получали путем смешивания высокочистого графита с наночастицами SiO_2 . В качестве связующего использовали парафиновое масло и перемешивали до получения равномерно увлажненной пасты. Данную пасту помещали в тефлоновый цилиндр (внутренний диаметр ~ 3 мм, длина 5 см) с медной проволокой – электрическим контактом; поверхность электрода полировали на бумаге. Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации триптофана наблюдается в интервалах от $1,0 \times 10^{-7}$ до $5,0 \times 10^{-6}$ и $5,0 \times 10^{-6}$ до $5,0 \times 10^{-5}$ М; наименьшая определяемая концентрация составляет $3,6 \times 10^{-8}$ М. Метод разработан для определения триптофана в фармацевтических препаратах.

В работе [52] произведена одностадийная модификация AgO и электроаналитическое определение DL - метионина на чистом углеродном электроде. Электрод охарактеризован с помощью FE-SEM, EDX и XPS. Электрохимическую и электрокаталитическую активность Ag в 0,10 М NaOH $\text{pH}=13,70 \pm 0,20$ использовали для инициирования реакции окисления DL-метионина на чистом электроде с предварительно введенным в ячейку ионом Ag^{2+} . Реакция осуществляется благодаря радикализации иона OH^- в присутствии AgO на электроде. При исследовании других фоновых электролитов (0,10 М фосфатный буферный раствор $\text{pH}=7,00 \pm 0,20$) реакция окисления метионина не происходила.

Линейный диапазон концентраций 60 – 500 мкМ с коэффициент корреляции $R^2=0,986$ и предел обнаружения 0,42 мкМ. Разработанный метод не предполагает синтеза материалов, сложных технических процедур иммобилизации пленки на электрод. Совместимость с широким спектром электрохимических методов (вольтамперометрический и амперометрический), оперативность (обнаружение), доступность и экономичность графита облегчит проектирование и изготовление датчика для разработки нестандартных ферментативных сенсоров для определения метионина в сыворотке крови человека при влиянии мешающих веществ, таких как аскорбиновая кислота, L-аланин и L-цистеин.

Авторами [53] проведено сравнение электрохимического окисления серосодержащих аминокислот цистеина и метионина на легированных бором алмазных и стеклоуглеродных электродах с использованием циклической и дифференциальной импульсной вольтамперометрии в широком диапазоне pH. Реакции окисления этих аминокислот являются необратимыми, регулируемые диффузией процессами, зависящими от pH и протекающими по сложному каскадному механизму. Аминокислота цистеин претерпевает три одинаковые последовательные реакции окисления на обоих электродах. Первая стадия включает окисление сульфгидрильной группы с образованием радикалов, которые подвергаются нуклеофильной атаке водой с образованием промежуточных частиц, которые на второй стадии окисляются до цистеиновой кислоты. Окисление сульфгидрильной группы приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя подобными цистеиновыми фрагментами, образующими цистеин. Последующее окисление цистина происходит при более высоком потенциале из-за сильной ковалентной связи дисульфидного мостика. Электроокисление метионина на стеклоуглеродном электроде происходит в два этапа, соответствующих образованию сульфоксида и сульфона, включая адсорбцию и протонирование / депротонирование тиоловой группы с последующим электрохимическим окислением. Метионин подвергается одностадийной реакции окисления на легированных бором алмазных электродах из-за незначительной адсорбции, и окисление также приводит к образованию метионинсульфона.

Пригодность электродов из углеродной пасты, модифицированной коллоидным золотом и цистеамином (nAu-Cyst-CPE) для электрохимического определения серосодержащих соединений, проиллюстрирована в работе [54]. Определение метионина проводилось в реальных образцах. Вольтамперограммы растворов метионина с использованием электрода на основе nAu-Cyst-CPE показали улучшенные электроаналитические характеристики по сравнению с дисковыми электродами из Au, модифицированными коллоидным золотом и цистеамином (nAu-Cyst-AuE). Для определения метионина использовали дифференциальную импульсную вольтамперометрию в фосфатном буфере с pH 7,0 с диапазоном определяемых концентраций $(1,0-100) \times 10^{-6}$ моль / дм³ и пределом обнаружения $5,9 \times 10^{-7}$ моль/дм³. Пептиды метионина также имеют анодные пики, подходящие для обнаружения этого типа молекул. Метионин был определен с хорошими результатами в фармацевтическом продукте, содержащем несколько витаминов, аминокислот и других соединений, в мясном пептоне с добавками витаминов, а также в сложном образце, содержащем ферментативно переваренный белок.

В работе [55] продемонстрирован новый метод синтеза наночастиц TiO₂, легированных платиной (Pt – TiO₂), золь-гель методом. Синтезированные наночастицы TiO₂, легированные платиной, были охарактеризованы с использованием рентгеновской дифракции (XRD), просвечивающей электронной микроскопии (TEM) и FT-IR. Для исследования каталитической эффективности наночастиц Pt–TiO₂ изучили электроокисление L-метионина (l-Met) с использованием осажденной пленки наночастиц TiO₂, легированных Pt, и композита углеродных нанотрубок на стеклоуглеродном электроде (Pt – TiO₂ / CNT / GCE). в буферном растворе (pH 7,00) с использованием циклической вольтамперометрии (CV). Чистый стеклоуглеродный электрод показывает плохо выраженную волну окисления около 1,4 В для l-Met, тогда как Pt – TiO₂ / CNT / GCE показывает хорошо выраженный пик окисления при 1,1 В. Модифицированный электрод не показывает никакого загрязнения в отношении окисления l- метионина. Метод амперометрии использовался для определения l-

Met в диапазоне концентраций 0,5–100 мкМ с пределом обнаружения 0,1 мкМ. Селективность оценивалась без влияния тирозина, лизина, цистеина, триптофана, аланина и глутатиона. Настоящий модифицированный электрод показывает хорошие результаты по извлечению добавленного l-Met в образец сыворотки крови человека.

Представлен метод модификации волокон графитового электрода с использованием технологии поверхностного тиснения в работе [56]. В этом методе использовали иницируемую поверхность электрополимеризацию бензидинового мономера с одновременным нанесением шаблона (d- и l-метионин) на карбоксилированные многослойные углеродные нанотрубки, закрепленные на графитовом волокне электрода. Это давало наноструктурированную ультратонкую пленку с отпечатками (58,3 нм), равномерно покрытую по всему периметру и длине графитового волокна электрода для экстракции микротвердой фазы со значительной адсорбционной способностью. Та же самая пленка покрыта открытым концом графитового волокна электрода и служит дополнительным полимерным сенсором с молекулярной печатью. Как извлекающие, так и сенсорные устройства не способны измерить строгий предел (0,016 нг / мл) клинического обнаружения мутации гена метилентетрагидрофолатредуктазы, вызванной острой нехваткой метионина, при отдельном использовании. Однако при сочетании обоих методов успешный энантиоселективный анализ d- и l-метионина с отличными аналитическими характеристиками (диапазон количественного определения: 0,03–30,00 нг / мл, предел обнаружения: 0,0098 нг/см³) достигается без каких-либо проблем, связанных с неспецифическим ложноположительным вкладом и перекрестной реактивностью в реальных образцах.

Авторами [57] сообщается об определении l-метионина (L-Met) в фосфатном буферном растворе (рН = 4,0) с использованием электрополимеризованной пленки 1,8,15,22-тетрааминофталогцианато-меди(II) (p-4α-CuIIТАРс) на стеклоуглеродном электроде. Без пленки стеклоуглеродный электрод описывает плохо выраженную волну окисления около 1,32 (± 0,02) В для L-Met, тогда как электрод, с пленкой p-

4α-CuIIТАРс показывает хорошо выраженный пик окисления при 1,26 (± 0,02) В. Электрод, модифицированный p-4α-CuIIТАРс, успешно использовали для селективного определения L-Met в присутствии аскорбиновой кислоты (АА) и мочевой кислоты (UА). Для увеличения чувствительности метода использовали дифференциально-импульсную вольтамперометрию. Диапазон концентраций определения метионина составляет 50–500 мкМ с пределом обнаружения $2,7 \times 10^{-8}$ М. Данный модифицированный электрод показывает хорошие результаты окисления L-Met в образце сыворотки крови человека.

Для электрохимического определения триптофана (Trp) разработан простой и чувствительный сенсор на основе электрода из угольной пасты, модифицированный индолилдигидроксихиноном, в работе [58]. Индолилдигидроксихинон, в качестве модификатора на биологической основе, синтезировали электрохимическим методом, а затем включили в электрод из углеродной пасты в качестве модификатора. Электроокисление триптофана изучали на электроде из модифицированной угольной пасты с использованием в качестве диагностических методов циклической вольтамперометрии и дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Было обнаружено, что пиковый ток окисления триптофана на электроде из модифицированной углеродной пасты был значительно улучшен по сравнению с током, полученным на чистом электроде из углеродной пасты. В оптимальных условиях датчик обеспечивает два отклика дифференциально-импульсной вольтамперометрии в диапазоне 0,1–100 мкМ и 100–380 мкМ в фосфатном буферном растворе с рН=7 с пределом обнаружения 0,03 мкМ. Предложенный датчик был успешно применен для определения Trp в образцах сыворотки крови человека и мочи.

В исследовании [59] разработан новый электрохимический сенсор, содержащий упорядоченный мезопористый углерод, легированный азотом (NOMC), для чувствительного и селективного количественного определения l-триптофана (Trp). Механизм электроокисления Trp, на электроде NOMC / Nafion / стеклоуглерод (GCE), следует двухэлектронному/ двухпротонному переносу. В оптимальных условиях обнаружено, что ток окисления линейно возрастает с

концентрацией Trp в диапазонах 0,5–70,0 мкМ и 70,0–200,0 мкМ (разные наклоны в каждом диапазоне), при этом предел обнаружения определен как 35,0 нМ. Кроме того, сенсор высокоселективен в отношении Trp и показал хорошую повторяемость и долгосрочную стабильность. Исследования Trp в реальных системах, таких как смесь из 18 аминокислот и ферментативный гидролизат белка, показали отличное извлечение (99,30–103,60%). Результаты показывают, что сенсор NOMC / Nafion / GCE имеет превосходные рабочие характеристики для анализа Trp.

Новый тип нанопористого углерода (NPC) синтезирован с использованием пуха одуванчика в качестве экономичного источника углерода путем химической активации фосфорной кислотой в работе [60]. Высокая электрическая проводимость нанопористого углеродного модифицированного электрода (NPC / GCE) продемонстрирована циклической вольтамперометрией с использованием феррицианидной системы. Кроме того, сенсор продемонстрировал превосходную электрокаталитическую активность в отношении окисления Trp с уменьшенным перенапряжением и улучшенной токовой характеристикой, в основном из-за пористой структуры и большой удельной поверхности нанопористого углерода. Механизм электрокаталитического окисления Trp на модифицированном электроде был также исследован методом циклической вольтамперометрии. Амперометрический отклик сенсора на основе NPC является линейным в диапазоне концентраций от 1 мкМ до 103 мкМ, а чувствительность составляет 171,43 мкА мМ⁻¹см⁻². Предложенный сенсор применен для определения Trp в реальных образцах.

Многослойные углеродные нанотрубки, модифицированные наночастицами палладия (PdNP: MWCNT) предложена использовать в качестве модификатора электрода для определения 5-гидрокситриптофана в работе [61]. Наблюдалось значительное увеличение отклика пикового тока, а также сдвиг пикового потенциала в сторону менее положительных потенциалов, указывающий на облегченный процесс окисления на PdNP: MWCNT / GCE. Количественное определение 5-НТР проводили с помощью прямоугольной вольтамперометрии. Линейный диапазон определения 5-НТР 2–400 М с чувствительностью и пределом

обнаружения 0,2122 А / М и 77 нМ соответственно. Изготовленный сенсор дополнительно продемонстрировал отличную селективность в отношении 5-НТР в присутствии основных мешающих биомолекул в моче.

В работе [62] авторы исследовали окисление 5-гидрокситриптофана (5-НТР), который давал пассивирующую полимерную пленку на электроде из оксида индия и олова (ИТО). Показано, что покрытие ИТО наноразмерной золь-гелевой пленкой с мезопористой структурой изменяет путь химической реакции, связанной с переносом электронов. Золь-гель пленку наносили с помощью электрохимического процесса, а мезопористость была придана путем включения дендримера поли(амидоамина) в раствор прекурсора. Затем дендример удаляли кислородной плазмой воздуха. Этот электрод оставался активным во время циклической вольтамперометрии и электролиза с контролируемым потенциалом 5-НТР, который приписывали образованию димера, а не полимера из продукта окисления. Масс-спектрометрия подтвердила эту гипотезу. Анодный ток ограничивался кинетикой переноса электрона. Модификация золь-гель пленки включением гексацианоферрата кобальта, который катализирует окисление, приводит к току, ограниченному диффузией. Определение 5-НТР с помощью проточно-инжекционной амперометрии имело предел обнаружения 17 нМ.

Авторами [63] изготовлен электрод из углеродной пасты, модифицированный наноионообменной смолой Lewatit FO36, легированной никелем (Ni-LFONRCPE), который использовался в качестве чувствительного электрохимического сенсора для одновременного определения эpineфрина (EP), парацетамола (PT) и триптофана (TRP). Циклическая вольтамперометрия, спектроскопия электрохимического импеданса, дифференциальная импульсная вольтамперометрия (DPV) и хроноамперометрия использовались для изучения поведения EP, AC и TRP на этом модифицированном электроде. Пиковые токи дифференциально-импульсной вольтамперометрии для EP, PT и TRP линейно увеличивались с их концентрацией в диапазонах 7–560 мкМ, 5–580 мкМ и 4–560 мкМ с пределами обнаружения 0,45, 0,27 и 0,38 мкМ для EP, PT и TRP, соответственно. Также определены коэффициент диффузии (D), коэффициент

переноса электронов (α) и гетерогенная константа скорости для окисления EP, PT и TRP на модифицированной поверхности электрода. Ni-LFONRCPE применяли для одновременного определения EP, PT и TRP в различных реальных образцах, а извлечение находилось в диапазоне 96–100%.

В работе [64] изготовили наноллисты черного фосфора (BPNS), стабилизированные нафионом (NF) и композитом 6-О- α -мальтозил- β -циклодекстрина (G2- β -CD) (BPNS-G2- β -CD) в качестве электрохимического сенсора для хирального распознавания энантиомеров триптофана (Trp). Стеклоуглеродный электрод, модифицированный композитом BPNS-G2- β -CD (BPNSs-G2- β -CD / GCE) дополнительно покрывали NF, который служил защитной пленкой для иммобилизации BPNS-G2- β -CD на поверхности электрода для достижения высокой стабильности нанесенного материала. В оптимальных условиях отношение тока пика окисления L-Trp к D-Trp (I_L / I_D) и разница между потенциалом пика ($\Delta E_p = E_D - E_L$) наблюдались равными 1,49 и 20 мВ при NF / BPNS- G2- β -CD / GCE методом прямоугольной вольтамперометрии (SWV). Линейный диапазон концентраций 0,01–1,00 мМ с пределами обнаружения 1,07 мкМ и 1,71 мкМ для L-Trp и D-Trp соответственно. Предложенное покрытие электрода пленкой NF / BPNSs-G2- β -CD / GCE, показало превосходную стабильность, хорошую воспроизводимость и способность противодействовать помехам.

Разработка высокоэффективного и недорогого нанокompозита с большим количеством активных центров с превосходной способностью к переносу электронов и высокой проводимостью для одновременного обнаружения биомолекул, принадлежащих к разным системам, является критически важной и сложной задачей, решенная в работе [65]. В данном случае нанокompозит, состоящий из наночастиц оксида железа (Fe_3O_4), функционализированных полиоксометаллатами ($H_6PMo_9V_3O_{40} \times nH_2O$), синтезировали с использованием одностадийного гидротермального легированного метода. Он проявлял высокую электрокаталитическую активность в отношении окисления β -никотинамидадениндинуклеотида (NADH) и l-триптофана (l-trp) с хорошо

разделенными сигналами ($\Delta = 180$ мВ) между ними, исходящими от комбинации РМoV и Fe₃O₄. Сенсор на основе РМoV Fe₃O₄ / GCE продемонстрировал выдающуюся способность к обнаружению NADH и l-try одновременно с низким пределом обнаружения 53 нМ и 17 нМ соответственно, а также отличной селективностью по различным возможным мешающим веществам, что было обусловлено синергетическим эффектом РМoV. и Fe₃O₄. Возможность практического применения датчика РМoV Fe₃O₄ успешно продемонстрирована путем определения NADH и l-try в реальных образцах.

Авторы [66] разработали улучшенный электрохимический анализ клинических образцов жидкостей организма. Метод позволяет надежно идентифицировать несколько сосуществующих веществ (триптофан, мочева кислота, ксантин и гипоксантин), присутствующих на разных физиологических уровнях. Электрогенерированные оксиды графита (GrO) получали *in situ* непосредственно на поверхности графитового стержневого электрода. Присутствие GrO усиливает сигналы электроокисления небольших ароматических молекул и может изменять их окислительные потенциалы. Потенциалы окисления триптофана и тирозина в их свободных и связанных с белками формах, а также свободного ксантина очень близки друг к другу для обычных материалов на основе углерода. Обнаружено, что сигнал окисления свободного триптофана значительно сильнее (примерно в 11 раз), чем сигнал свободного тирозина (лишь незначительно в данных условиях). Отличить сигнал окисления ксантина от сигнала свободного триптофана позволяет их разделение примерно на 60 мВ, что достаточно для параллельного определения деконволюцией сигнала. Показано, что белки, содержащие тирозин и триптофан, ведут себя как электро-неактивные и не мешают определению свободных аминокислот на графитовых электродах, модифицированных GrO, в то время как они сильно влияют на обнаружение всех веществ на других углеродных материалах. Определение всех индивидуальных соединений возможно при соответствующих физиологических значениях после единственного разбавления человеческой плазмы (мочи) и прямого измерения без этапов предварительного разделения.

В работе [67] описывается прямое электрохимическое определение L-триптофана (L-Trp) с использованием композита политиофена (PT) и дендритов серебра (Ag), образованного электростатическим взаимодействием. В композите дендриты серебра обеспечивают энергию для ускорения химической реакции за счет наличия катионных свободных радикалов, которые, как обнаружено, прикреплены к основной цепи PT. Кроме того, серные группы PT помогают в образовании стабильного продукта и поддержании его в той же фазе. Стеклоуглеродный электрод (GCE), модифицированный PT-Ag, показал превосходную электрохимическую активность по отношению к окислению L-Trp в диапазоне концентраций 200–400 мкМ с пределом обнаружения 20 нМ. Изготовленный сенсор продемонстрировал селективное определение L-Trp в присутствии посторонних веществ, а модифицированный интерфейс PT-Ag привел к разработке биосенсора с высокой чувствительностью и хорошей стабильностью, что в основном связано с увеличенной площадью поверхности композита. Характеристики гибридного нанокompозита PT-Ag подтвердили, что определение L-Trp в реальных образцах пищи, таких как экстракт соевых бобов, дало удовлетворительные результаты.

Авторами [68] изучено электрохимическое поведение модифицированного электрода. Изначально добавляли бромид тетрабутиламмония *in-situ* к β -циклодекстрину, а затем включали в модифицированный стеклоуглеродный электрод с многослойными углеродными нанотрубками (TBABr $\cdots\beta$ -CD / MWCNTs / GCE). Проводили определение L-триптофана (Trp) в присутствии аскорбиновой кислоты (AA) и мочевой кислоты (UA). TBABr $\cdots\beta$ -CD / MWCNT / GCE продемонстрировал отличную электрохимическую каталитическую активность с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии (DPV) при потенциале окисления 0,75 В. Электрохимическое поведение Trp на TBABr $\cdots\beta$ -CD / MWCNT / GCE показал более высокий ток окисления и более низкий потенциал окисления, чем β -CD / MWCNT / GCE, MWCNT / GCE и чистый GCE. DPV обеспечивает линейную зависимость от концентрации Trp 1,5–30,5 мкМ. Низкий предел обнаружения Trp составил 0,07 мкМ. Электрохимический сенсор

продемонстрировал превосходную селективность и чувствительность, хорошую стабильность и воспроизводимость. TBABr... β -CD / MWCNTs / GCE применяли для обнаружения Trp в присутствии АК и УК в образцах сыворотки человека и дали выход 92,0–101,0%.

Многослойные углеродные нанотрубки, модифицированные этиловым эфиром l-аланина (MWNTs-Ala) получены и охарактеризованы с помощью FT-IR спектроскопии в работе [69]. Электрохимическое поведение d- и l-триптофана на электроде, покрытом MWNTs-Ala, исследовали с помощью циклической вольтамперометрии. Между тем, для понимания механизма электрохимического процесса также обсуждалось электрохимическое поведение d- и l-триптофана на голом стеклоуглеродном электроде и на электроде, покрытом MWNTs, имеющими карбоксильные группы (MWNTs-COOH) соответственно. Результаты показали, что электрод, покрытый MWNTs-Ala, определяет хиральные изомеры d- и l-триптофана из-за введения этилового эфира l-аланина на MWNT.

Селективное распознавание d-триптофана (d-Trp) в присутствии Cu (II) исследовали на пленке поли-l-лизина (p-l-Lys) с использованием спектроскопии электрохимического импеданса (EIS) и дифференциальной импульсной вольтамперометрии (DPV) представлено в работе [70]. Пленку p-l-Lys иммобилизовали на стеклоуглеродном электроде (GCE) с помощью циклической вольтамперометрии между 0,0 и 1,9 В в 20 мМ фосфатном буферном растворе (pH=8,6). После введения электрода p-l-Lys / GCE в раствор, содержащий d-Trp и ионы Cu (II), можно было наблюдать очевидное увеличение сопротивления переносу электрона и уменьшение вольтамперометрического тока. Если d-Trp был заменен l-триптофаном (l-Trp), не было видимых изменений сопротивления и тока. Более того, в отсутствие Cu (II) никаких изменений сопротивления и тока обнаружить не удалось. Это может быть связано с образованием комплекса Cu с l-лизином и d-триптофаном. Данный метод применяли для мониторинга энантиомерного состава смесей d-Trp и l-Trp.

В работе [71] проводили одновременное определение триптофана и тирозина. Исследования дифференциальной импульсной вольтамперометрии показывают

высокую степень перекрытия сигналов окисления Trp и Tyr. Для решения этой задачи применяли многовариантный метод наименьших квадратов с переменным разрешением кривой (MCR-ALS). В данной работе приготовили электрохимический сенсор с использованием модифицированного наночастицами ZnFe_2O_4 электрода из углеродной пасты. Характеристики модифицированного электрода изучали с использованием различных методов: автоэмиссионная сканирующая электронная микроскопия, дифракция рентгеновских лучей, спектроскопия электрохимического импеданса, методы дифференциальной импульсной и циклической вольтамперометрии. Рабочие условия были оптимизированы с помощью центральной композитной вращающейся конструкции (CCRD), связанной с методологией поверхности отклика (RSM). Предложенный метод в оптимизированных условиях использовали в диапазонах концентрации для Trp и Tyr 0,1–200,0 мкМ и 0,4–175,0 мкМ, с пределами обнаружения 0,04 мкМ и 0,10 мкМ соответственно. Метод применялся для одновременного определения Trp и Tyr в пробах сыворотки и мочи человека с добавками.

Представлен электрохимический сенсор для определения L-5-гидрокситриптофана (L-5-НТР), на основе модифицированной на поверхности стеклоуглеродного электрода (GR-MIP / GCE) пленки с молекулярным отпечатком графен-хитозан, в работе [72]. Морфологию и состав отпечатанной пленки наблюдали с помощью автоэмиссионной сканирующей электронной микроскопии (FESEM), рамановской спектроскопии и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR). Свойства сенсора оценивали электрохимическими методами. В оптимальных условиях пиковые токи L-5-НТР оказались линейными в диапазоне концентраций 0,05–7,0 мкМ. Сенсор также продемонстрировал отличные характеристики, такие как низкий предел обнаружения 6,0 нМ, превосходную селективность по отношению к структурным аналогам, хорошую противодействующую способность сосуществующих компонентов, отличную повторяемость и стабильность. Кроме того, предложенный метод был применен

для обнаружения L-5-НТР в сыворотке крови человека с удовлетворительным извлечением в диапазоне от 90,6% до 105,6%.

В настоящем исследовании авторы [73] представили новый электрохимический сенсор для обнаружения триптофана (TRP) на основе ванадата церия, похожего на цветок зеленого помпона (CeVO_4). Цветочная микроструктура CeVO_4 получена путем простой гидротермальной обработки с помощью мочевины. Свежеприготовленная микроструктура CeVO_4 в виде цветка охарактеризована различными аналитическими и спектроскопическими методами, такими как дифракция рентгеновских лучей, спектроскопия комбинационного рассеяния, инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье, сканирующая электронная микроскопия и исследования энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Электрохимические свойства оценивались с помощью циклической вольтамперометрии (CV) и дифференциальной импульсной вольтамперометрии (DPV). В качестве электрохимического сенсора выступал модифицированный стеклоуглеродный электрод CeVO_4 . Данный электрод продемонстрировал отличную электрокаталитическую активность для обнаружения TRP. Полученные электрохимические результаты показали, что окисление TRP показало более низкий потенциал и более высокий анодный пиковый ток по сравнению с немодифицированным GCE. Эти результаты предполагают, что подобный цветку CeVO_4 / GCE обладает хорошей электрокаталитической активностью в отношении окисления TRP. Сенсор демонстрирует широкий линейный диапазон концентраций и низкий предел обнаружения 0,1–94 мкМ и 0,024 мкМ соответственно. Сенсор успешно применяли для определения TRP при анализе реальных проб, таких как пищевые и биологические пробы.

В работе [74] исследовали одновременное определение триптофана и серотонина методом инверсионной вольтамперометрии. Серотонин представляет собой нейромедиатор моноаминов, продуцируемый триптофаном, и аномальные уровни этих молекул связаны с несколькими расстройствами, в частности с депрессией, мигренью, биполярным расстройством, тревогой и шизофренией. Авторы разработали электрохимический сенсор с использованием нанокompозита

$\text{SnO}_2\text{-SnS}_2$ для селективного и одновременного определения биомаркеров депрессии серотонина (SE) и триптофана (Trp) в присутствии аскорбиновой кислоты (AA). Композит $\text{SnO}_2\text{-SnS}_2$, полученный гидротермальным методом, охарактеризовали методами XRD, FE-SEM, FITR, UV-Visible, CV, EIS и SWV. Стеклоуглеродный электрод, модифицированный $\text{SnO}_2\text{-SnS}_2$ ($\text{SnO}_2\text{-SnS}_2$ / GCE), показал два четко определенных пика окисления при 0,43 и 0,83 В, соответствующих SE и Trp в фосфатном буфере при pH=7. В оптимальных условиях линейный диапазон концентраций составил 0,1–700 мкМ для SE и 0,1–800 мкМ для Trp с низкими пределами обнаружения 45 и 59 нМ соответственно. Значительное разделение от пика к пику и более высокие пиковые токи делают этот электрод подходящим для одновременного обнаружения двух важных нейрохимических веществ SE и Trp. Сенсор использовали для обнаружения SE в образцах крови человека и Trp в спиролине с высокой долей вероятности обнаружения данных веществ.

Разработана чувствительная процедура для одновременного определения аскорбиновой кислоты (AA), дофамина (DA), мочевой кислоты (UA) и триптофана (TRP) с использованием композитного электрода на основе наночастиц сажи (CBNB) и углеродных нанотрубок (CNT). CBNB / CNT / GCE в работе [75]. Сенсор проявил вольтамперометрические пики для AA, DA, UA и TRP. Предлагаемая методика продемонстрировала отличную каталитическую активность и позволила значительно улучшить отклики DA, AA, UA и TRP. Одновременное определение на CBNB / CNT / GCE проводили с помощью прямоугольной вольтамперометрии (SWV). Отклики на анодный ток изменяются линейно с концентрацией в диапазоне $2,0 \times 10^{-5} - 4,0 \times 10^{-4}$ М для AA, $5,0 \times 10^{-8} - 2,75 \times 10^{-6}$ М для DA, $1,0 \times 10^{-6} - 4,5 \times 10^{-5}$ М для UA и $2,5 \times 10^{-8} - 4,8 \times 10^{-6}$ М для Trp. Пределы обнаружения, полученные при CBNB / CNT / GCE, составили $5,71 \times 10^{-6}$ М для AA, $1,7 \times 10^{-8}$ М для DA, $4,2 \times 10^{-7}$ М для UA и $1,1 \times 10^{-8}$ М для Trp. Предложенная методика применима к фармацевтическим препаратам и образцам пищевых продуктов с удовлетворительными результатами.

В работе [76] предлагается подход к синтезу электрохимического сенсора для определения триптофана (Try). В этом процессе синтеза был успешно получен графеноподобный сульфид молибдена, и непосредственно на поверхности пленок сульфида молибдена (MoS_2) были синтезированы наночастицы серебра (AgNPs), при этом хитозан (CS) и аскорбиновая кислота (AA) действовали как стабилизатор и восстановитель соответственно. Этот нанокompозит охарактеризован методами просвечивающей электронной микроскопии (PEM) и дифракции рентгеновских лучей (XRD). Электрохимическую импедансную спектроскопию (EIS), циклическую вольтамперометрию (CV) и дифференциальную импульсную вольтамперометрию (DPV) использовали для оценки электрохимических свойств Ag-MoS_2 / CS в отношении окисления триптофана. В оптимизированных экспериментальных условиях токи пиков окисления пропорциональны концентрациям триптофана в диапазоне от 0,5 мкМ до 120 мкМ, а предел обнаружения составляет 0,05 мкМ. Предлагаемый способ определения триптофана не имеет мешающего влияния других аминокислот.

Композит, состоящий из восстановленного оксида графена (rGO) и наночастиц оксида олова (SnO_2) изготовили гидротермальным способом в работе [77]. Циклическая вольтамперометрия показала, что стеклоуглеродный электрод (GCE), модифицированный композитом rGO / SnO_2 , проявлял превосходную электрокаталитическую активность по отношению к окислению триптофана (Trp) в 0,1 М фосфатном буферном растворе (pH = 7). Совместное использование rGO и SnO_2 приводит к более высокому отклику по току и более низкому потенциалу окисления (0,76 В) по сравнению с таковыми у GCE, SnO_2 / GCE и rGO / GCE. Исследование дифференциальной импульсной вольтамперометрии показало линейную зависимость от концентрации Trp 1–100 мкМ. Низкий предел обнаружения Trp был идентифицирован на уровне 0,04 мкМ с чувствительностью 37,3 мкА мкМ⁻¹см⁻². Сенсор продемонстрировал отличную селективность, хорошую стабильность и воспроизводимость и применялся для определения Trp в пробах молока с добавками и инъекциями аминокислот стандартным методом добавок.

Электрохимический сенсор для обнаружения триптофана (TRP) разработали в работе [78] путем модификации поверхности стеклоуглеродного электрода (GCE) композитом из восстановленного оксида графена (AgM / RGO), содержащего молибдат серебра. Композит AgM / RGO синтезировали одностадийным гидротермальным синтезом. Свежеприготовленный композит AgM / RGO рассматривали различными аналитическими и спектроскопическими методами. Электрохимические свойства композита AgM / RGO исследованы методами циклической вольтамперометрии и амперометрии. GCE, модифицированный AgM / RGO, демонстрирует отличное электрохимическое обнаружение TRP. Комбинация AgM и RGO не только улучшает электрохимические свойства композита, но также улучшает перенос электронов между электродом и TRP. В оптимальных условиях предлагаемый сенсор показал широкий линейный диапазон концентраций от 0,02 до 146,96 мкМ с низким пределом обнаружения 0,0057 мкМ. Кроме того, расчетная чувствительность электрода составила 4,327 мкА мкМ⁻¹ см². Предложенный сенсор показал хорошую селективность, стабильность, воспроизводимость и повторяемость. AgM / RGO / GCE был успешно применен для определения TRP в пищевых и биологических образцах.

Авторами [79] изготовлен сенсор на основе стеклоуглеродного электрода (GCE), модифицированного наночастицами Ag (AgNP), оксидом графена (GO) и поли (L-аргинином) (P (Arg)). Сенсор изготовили для определения аскорбиновой кислоты (AA), дофамина (DA), мочевой кислоты (UA) и L-триптофана (L-Trp) одновременно с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Новый электрод GCE / AgNPs / P (Arg) -GO показал высокую электрокаталитическую активность в отношении AA, DA, UA и L-Trp. Сканирующая электронная микроскопия (SEM) использовали для характеристики морфологии поверхности композитного электрода. Электрохимические характеристики неизоллированных и составных электродов проводились с помощью циклической вольтамперометрии (CV) и спектроскопии электрохимического импеданса (EIS). По результатам дифференциальной импульсной вольтамперометрии (DVP) наблюдались линейные зависимости

между пиковыми токами и концентрациями в диапазонах 4,0–2400,0 мкМ для AA, 0,05–50,0 мкМ для DA, 0,5–150,0 мкМ для UA и 1,0–150 мкМ для L-TRP, с пределами обнаружения 0,984, 0,01, 0,142 и 0,122 мкМ для AA, DA, UA и L-TRP, соответственно. Сенсор применяли для обнаружения этих веществ в образцах мочи человека.

В работе [80] изготовлен электрохимический сенсор для определения L-триптофана (L-Trp), который основан на молекулярно отпечатанном сополимере (MIP) двухфункциональных мономеров и ионной жидкости (например, 1-бутил-3-метилимидазолий гексафторфосфат) с функционализированными многостенными углеродными нанотрубками (MWCNTs @ IL). MWCNTs @ IL получают посредством ионного обмена, тогда как MIP синтезируют с использованием L-Trp в качестве матрицы, стирола и 4-винилбензойной кислоты в качестве функциональных мономеров, Triton X-100 в качестве эмульгатора, 1,2-дивинилбензол в качестве сшивающего реагента и $K_2S_2O_8$ в качестве инициатора реакции. Перед сополимеризацией функциональный мономер 4-винилбензойная кислота объединяется с молекулой-шаблоном с образованием амидной связи. Молекула-шаблон элюируется путем гидролиза и отскакивает за счет электростатического взаимодействия, водородной связи и π - π взаимодействия. Чтобы сконструировать сенсор для определения L-Trp, вводят небольшое количество нафiona, чтобы повысить стабильность и способствовать повторному связыванию. Полученный в результате сенсор Nafion-MIP-MWCNTs @ IL / GCE показывает широкий линейный диапазон концентраций: 8–26 мкМ; и низкий предел обнаружения 6 нМ. Сенсор успешно применили для определения L-Trp в пероральной жидкости и образцах сыворотки крови человека.

1.5 Витамины группы В, участвующие в процессах метаболизма метионина, триптофана и 5-гидрокситриптофана

Важно отметить, что витамин B12 (рис.1) играет ключевую роль в обмене веществ человеческого организма. Этот водорастворимый компонент необходим для нормального функционирования каждой клетки. Он активно участвует в

процессах синтеза ДНК, а также в метаболизме жирных кислот и аминокислот. Исследования показывают, что недостаток витамина В₁₂ может привести к серьезным нарушениям в работе организма. Например, длительный дефицит этого витамина может вызвать анемию и повреждение нервной системы. Поэтому важно уделять внимание достаточному уровню витамина В₁₂ в рационе [81].

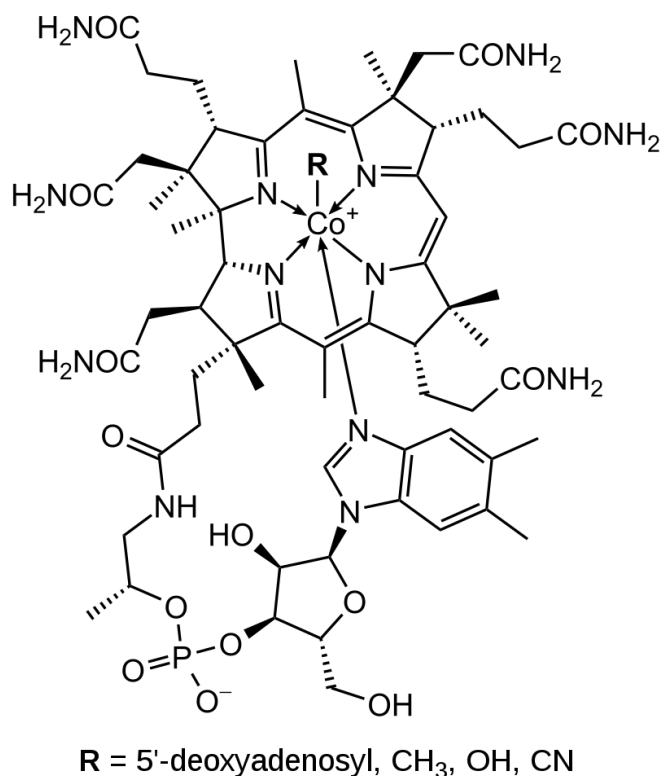


Рисунок 1 – Структурная формула витамина В₁₂

Исследования показывают [82, 83], что витамин В₁₂ играет ключевую роль в организме как кофермент, необходимый для активации ферментов и проведения важных биохимических реакций. Этот витамин необходим для функционирования трех классов ферментов, каждый из которых выполняет свою уникальную функцию. Перечислены три класса ферментов, которым для функционирования необходим В₁₂:

Первый класс ферментов, которым требуется В₁₂, — это изомеразы, ответственные за перегруппировки молекул, включая перенос атомов водорода между соседними атомами. В этом процессе используется форма витамина adoB12, или аденозилкобаламин [84].

Второй класс ферментов, зависимых от B_{12} , — это метилтрансферазы, которые осуществляют передачу метильной группы между молекулами. Для этого процесса используется форма витамина MeB_{12} , или метилкобаламин. [85]

Таким образом, витамин B_{12} играет важную роль в метаболизме, обеспечивая корректное функционирование различных ферментов и биохимических процессов в организме.

Исследования в области кофермент-зависимых ферментов выявили два ключевых семейства, соответствующих различным типам реакций в организме. Одним из них является фермент метионинсинтаза, который играет важную роль в передаче метильной группы витамину и гомоцистеину, превращая последний в метионин. Этот процесс отражает сложную биохимическую динамику, необходимую для поддержания здоровья клеток.

Другим заметным ферментом является мутаза метилмалонил-кофермента А (MUT), который выступает в качестве фермент-изомеразы и использует $AdoB_{12}$ для преобразования L-метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА. Этот процесс является ключевым звеном в катаболическом распаде некоторых аминокислот до сукцинил-КоА, который затем участвует в производстве энергии через цикл лимонной кислоты. Важно отметить, что эта биохимическая реакция становится невозможной при недостатке витамина B_{12} , что вызывает серьезные нарушения в клеточном метаболизме.

Таким образом, понимание работы кофермент-зависимых ферментов и их влияния на биохимические процессы в организме имеет большое значение для науки и медицины. Дальнейшие исследования в этой области могут пролить свет на механизмы регуляции клеточного метаболизма и разработку новых методов лечения нарушений, связанных с дефицитом витаминов и ферментов.

Механизм образования метионина, ключевой аминокислоты, в организме человека, осуществляется с помощью важного фермента - метионинсинтазы. Этот фермент, являющийся метилтрансферазой, применяет уникальный кофактор MeB_{12}

и процесс типа 2 для передачи метильной группы с 5-метилтетрагидроfolата на гомоцистеин. В результате этой реакции образуется тетрагидроfolат (THF) и метионин, играющий важную роль во многих биохимических процессах организма. [85] (рис.2).

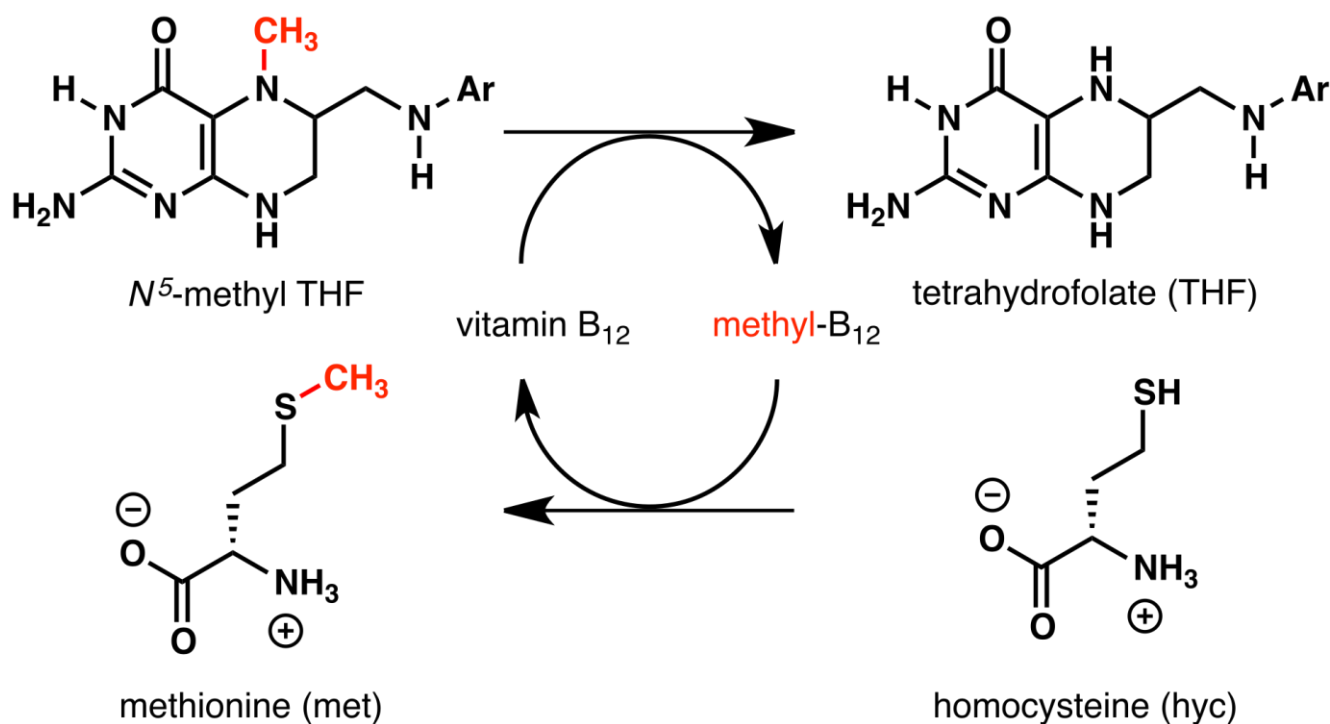


Рисунок 2 – Метаболизм витамина B₁₂

Один из ключевых аспектов, который следует рассмотреть, - это связь между уровнем гомоцистеина и функциональностью фолиевой кислоты в организме. При недостатке витамина B₁₂ происходит увеличение уровня гомоцистеина, а также захват фолиевой кислоты в виде 5-метил-тетрагидроfolата, что препятствует восстановлению активной формы фолиевой кислоты - THF. THF играет ключевую роль в синтезе ДНК, поэтому снижение доступности этого вещества ведет к неэффективному образованию клеток с высокой скоростью деления, включая красные кровяные тельца и клетки стенки кишечника, ответственные за поглощение питательных веществ. Отмечается, что все нарушения в синтезе ДНК, вызванные дефицитом витамина B₁₂, такие как мегалобластная анемия или злокачественная анемия, могут быть устранены при наличии достаточного количества фолиевой кислоты в рационе питания. Таким образом, правильное

сочетание данных витаминов играет важную роль в поддержании здоровья клеток и органов человеческого организма.

Исследования показывают, что витамин В₁₂ играет важную роль не только в синтезе ДНК, но и в метаболизме аминокислот и жирных кислот. Это позволяет клеткам правильно функционировать и обеспечивает нормальное деление клеток. Однако, наиболее известная "функция" В₁₂, связанная с синтезом ДНК и анемией, на самом деле является лишь одной из многих его функций. Существует представление о том, что В₁₂ активирует фолиевую кислоту, что в свою очередь способствует эффективному производству ДНК. Это важное взаимодействие между витамином В₁₂ и фолиевой кислотой обеспечивает нормальное функционирование клеток и обмен веществ. Таким образом, В₁₂ выполняет не только одну функцию, но и участвует в сложной цепочке процессов, необходимых для здоровья организма.

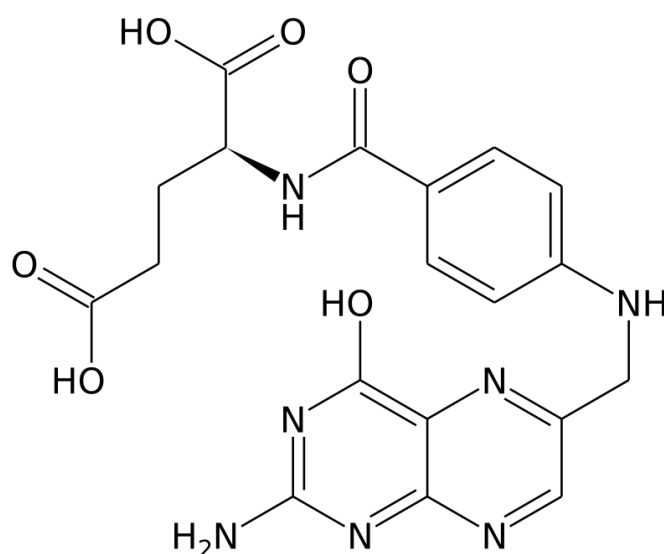


Рисунок 3 – Структурная формула витамина В₉

Фолиевая кислота (рис.3), также известная как витамин В₉, является одним из витаминов группы В. Фолиевая кислота необходима организму для производства ДНК и РНК и метаболизма аминокислот, необходимых для деления клеток. В организме человека фолиевая кислота (витамин В₉) участвует в фолатном цикле.

Фолатный цикл – это сложная многокомпонентная совокупность реакций, благодаря которой протекает ряд жизненно важных процессов в организме. Фолаты играют ключевую роль, поскольку их восстановленная форма участвует в переносе одноуглеродных фрагментов («формил» $-\text{CHO}$; «метенил» $-\text{CH}=\text{}$; «метилен» $-\text{CH}_2-$; «метил»- CH_3) от серина, триптофана и гистидина к нуклеиновым кислотам (ДНК, РНК). Эти фрагменты являются необходимыми элементами синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований, что обуславливает значимость тетрагидрофолиевой кислоты при делении клеток, так как без синтеза нуклеиновых кислот течение данного процесса не представляется возможным [86].

В проведенном литературном обзоре представленные выше методы хроматографического, капиллярного электрофореза, спектрофотометрического определения аминокислот обладают своими преимуществами, но и не лишены недостатков, связанных с длительной прободготовкой, дорогостоящим оборудованием и материалами, требующих тщательной очистки. Приведенные электрохимические методы значительно сокращают время проведения анализа, имеют высокую чувствительность, однако, они обладают недостатками в виде дорогостоящих материалов и длительным процессом формирования поверхности активного слоя.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И АППАРАТУРНОЕ ОФОРМЛЕНИЕ

2.1 Посуда, оборудование, электрохимические приборы

Оборудование

В качестве прибора для определения аминокислот использовали вольтамперометрический анализатор ТА-LAB. Данный прибор оснащен тремя электролитическими ячейками. В приборе находится три электрохимических ячейки с тремя отсеками для электродов: рабочего, сравнения и вспомогательного. Для определения аминокислот прибор позволяет регистрировать постояннотокую, дифференциально-импульсную вольтамперометрию, квадратно-волновую и ступенчатую вольтамперограммы.

Для измерения водородного показателя использовали рН-метр «рН-150МИ» (ООО НПП «Измерительная техника», г. Москва, Россия).

Для взятия навески использовали весы Sartorius Praxtum.

Бидистиллированную воду получали на Sartorius марки Arium Pro.

Исследование электродной поверхности проводили на растровом электронном микроскопе Hitachi TM-3000 при ускоряющем напряжении 15 кВ в условиях режима снятия зарядки с образца (электронная пушка 5×10^{-2} Па, камера для образца 30–50 Па).

Спектры комбинационного рассеяния регистрировали на спектрометре Nicolet NXR 9650.

Многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) на поверхность углеродсодержащего электрода наносили электролизом из водной суспензии МУНТ с помощью универсального источника питания УИП-2.

Для определения метионина методом ВЭЖХ использовали хроматограф Shimadzu LC-20 Prominence с УФ-детектором.

Электроды

В работе использовали модифицированные МУНТ и витаминами группы В углеродсодержащие электроды в качестве индикаторных, в качестве электрода сравнения и вспомогательного - хлорид-серебряные электроды.

Химическая посуда

В работе использовали следующую химическую посуду:

- колбы объемом 50, 100, 500 и 1000 см³,
- цилиндр объемом 50 см³,
- мензурки объемом 50 и 100 см³,
- кварцевые стаканы объемом 20 см³.

Точный объем приготовленного раствора определяли пипеткой (Thermo Fisher Scientific, Санкт-Петербург, Россия). Всю посуду промывали раствором бикарбоната натрия.

2.2 Реактивы

C₂H₅OH (30% водный раствор); деионизированная вода; многостенные углеродные нанотрубки (Carbon, США); Калий хлористый, х.ч. (Реахим, Россия); Фолиевая кислота (Sigma-Aldrich, Великобритания); Цианокобаламин (Беларусь, Борисовский завод медицинских препаратов); Азотная кислота, х.ч. (Реахим, Россия); Натрий гидроокись, х.ч. (Лабтех, Россия); Стандарт – титры с pH = 1,68; 4,01; 6,86; 9,18; Перекись водорода 30%; Диметилформамид, ч.д.а (Реахим, Россия); Желтая кровяная соль (Реахим, Россия); Красная кровяная соль (Реахим, Россия); Метионин (Sigma-Aldrich, США); Триптофан (Sigma, Германия); 5-гидрокситриптофан (Sigma, Германия); H₂SO₄ (Реахим, Россия); H₃BO₃ (Лабтех, Россия); H₃PO₄ (Лабтех, Россия); Уксусная кислота, х.ч. (Реахим, Россия)

2.2. Приготовление растворов

Фоновые электролиты

1) Буферный раствор Бриттона-Робинсона

Для приготовления буферного раствора были внесены определенные количества борной кислоты (1,2366 г), ортофосфорной кислоты (1,33 см³) и уксусной кислоты (2,85 см³) в колбу объемом 500 см³, после чего раствор доводили

до метки с помощью воды. Для приготовления раствора 2 М NaOH в колбу объемом 500 мл вносили навеску 4,0000 г NaOH, добавляли немного бидистиллированной воды, перемешивали и затем доводили до метки. Для достижения нужного значения pH к раствору кислоты, раствор NaOH добавляли постепенно, контролируя значение водородного показателя с помощью pH-метра.

2) Стандартные буферные растворы

Буферные растворы 1,68, 4,01 6,86, 9,18, 12,43 готовили из стандарт-титров в соответствии с инструкцией к ним.

- 1) Для приготовления раствора хлорида калия с концентрацией 3 М, навеску $(21,5200 \pm 0,0001)$ г KCl переносили в мерную колбу вместимостью 100 см³ и добавляли дистиллированную воду до метки объема.
- 2) Для приготовления раствора метионина с концентрацией 0,005 М, в колбу объемом 50 см³ добавляли навеску 0,0373 г метионина, приливали 10 см³ горячей бидистиллированной воды, перемешивали и доводили объем до метки.
- 3) Для приготовления раствора триптофана с концентрацией 0,025 моль/дм³, в колбу объемом 50 см³ переносили навеску 0,0510 г триптофана, добавляли 10 см³ горячей бидистиллированной воды, перемешивали и доводили объем до метки.
- 4) Для приготовления раствора 5-гидрокситриптофана с концентрацией 0,025 моль/дм³, в колбу объемом 50 см³ переносили навеску 0,055 г стандартного 5-гидрокситриптофана, добавляли немного воды, перемешивали и доводили объем до метки.
- 5) Для приготовления раствора витамина В₁₂ с концентрацией 0,025 мг/см³, в колбу объемом 50 см³ переносили навеску 0,0012 г цианокобаламина, добавляли 10 см³ бидистиллированной воды, перемешивали и доводили объем до метки.
- 6) В колбу 50 см³ переносили 0,4414 г стандартной фолиевой кислоты, добавляли 5 см³ 0,2 моль/дм³ раствора NaOH, перемешивали, и доводили до метки бидистиллированной водой.

9) Навеску 0,0500 г многостенных углеродных нанотрубок МУНТ, предварительно измельченных в фарфоровой ступке, смачивали небольшим количеством этилового спирта, добавляли воду мерным цилиндром и помещали в ультразвуковую ванну на 3 часа.

2.3 Нанесение модификаторов на поверхность углеродсодержащего электрода

1) Электрод для определения метионина

Раствор многостенных углеродных нанотрубок использовали для нанесения на поверхность углеродсодержащего электрода методом анодной поляризации. Рабочий электрод (диаметром 5,0 мм) опускали в раствор МУНТ и удерживали электрод в течение 40 секунд. В качестве катода (противоэлектрода) использовали пластину из нержавеющей стали. После нанесения МУНТ на поверхность электрод высушивали. Далее электроды с МУНТ опускали в 10 см³ буферного раствора с рН=4,01 и добавляли 1 см³ 0,025 мг/см³ витамина В₁₂. Пленку цианокобаламина наносили методом циклической вольтамперометрии в пределах потенциалов -1,4 В – +1,0 В. (рис. 4).

2) Электрод для одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана.

Суспензию многостенных углеродных нанотрубок готовили следующим образом: навеску МУНТ окисляли в смеси 1:1:0,5 HNO_{3(конц)} и H₂SO_{4(конц)} и H₂O_{2(конц)} до полного упаривания кислот. Затем окисленные нанотрубки промывали деионизированной водой и растворяли в диметилформамиде. Аликвоту суспензии (5 мкл) наносили на поверхность электрода до полного испарения растворителя. Пленку фолиевой кислоты наносили на поверхность углеродсодержащего электрода методом циклической развертки потенциала в диапазоне -1.4 В ÷ 0.5 В при 80 mV/s в течение 9 циклов из 0,02 М щелочного раствора витамина В₉.(рис.5)

2.4 Приготовление образцов к анализу

Перед началом анализа навески лекарственных средств и БАДов растворяли в течение 10 минут в кипящей деионизированной воде с последующим фильтрованием через бумажный фильтр «синяя лента».

2.5 Методика эксперимента

Определение метионина методом вольтамперометрии.

Вносили в кварцевый стаканчик (электрохимическую ячейку) 10 см³ буферного раствора pH=4,01. Перед проведением электролиза электрохимическую ячейку барботировали азотом для устранения мешающего влияния растворенного кислорода. Трехэлектродная ячейка состояла из модифицированного цианокобаламином электрода. Хлоридсеребряный электрод использовался в качестве сравнения и вспомогательного.

Изначально проводили развертку чистого буферного раствора на наличие мешающих ионов, затем вводили добавку 10 мкл раствора, содержащего метионин. После введения раствора в электролитическую ячейку, содержащий неизвестную концентрацию метионина, вводили стандартный раствор для расчета неизвестной концентрации. Определение метионина проводили анодной поляризацией рабочего электрода как в постоянно-токовом режиме, так и в дифференциально-импульсном режиме для увеличения чувствительности методики при следующих параметрах: $E_3 = -1,6$ В, $t_3 = 120-300$ с, $w = 50$ мВ/с, амплитуда волны 15 мВ, задержка измерения 7 мс, шаг развертки 10 мВ.

Одновременное определение триптофана и 5-гидрокситриптофана методом инверсионной вольтамперометрии.

В кварцевый стаканчик (электрохимическую ячейку), содержащий фосфатный буферный раствор (pH = 6,86) вносили точные объемы водных растворов триптофана и 5-гидрокситриптофана. Для одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана использовались следующие параметры электролиза: $E_3 = -0.1$ В, $w = 170$ мВ/с, $t_3 = 120$ с.

2.6 Статистическая обработка данных

Оценкой точности методик для определения аминокислот служат различные показатели, включая среднеквадратичное отклонение (СКО), правильность, внутрилабораторная прецизионность, предел обнаружения, а также систематическая и случайная погрешность. Эти критерии помогают оценить эффективность и надежность выбранного метода анализа [87-89].

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ПОВЕДЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЭЛЕКТРОДАХ

На основании литературного обзора можно сделать вывод, что определение метионина с низкими пределами обнаружения невозможно прямыми методами без модификации рабочих электродов. Анодный пик метионина на немодифицированных графитовых, угольно-пастовых и стеклоуглеродных электродах проявляется в области потенциалов положительнее +1,2 В относительно хлоридсеребряного электрода при концентрации на уровне $n \cdot 10^{-3}$ моль/л. Такую же чувствительность графитовые электроды проявляют при определении триптофана и 5-гидрокситриптофана. Для повышения чувствительности и снижения предела обнаружения рабочие электроды модифицируют различными полимерными материалами, процесс получения которых очень трудоемкий. При определении триптофана используют благородные металлы, пленки полимерных длиноцепочечных материалов.

Определение аминокислот можно упростить за счет реакций окисления-восстановления, проходящих в живой природе. В качестве «катализаторов» таких реакций используются ферменты, в состав которых могут входить витамины различных групп.

3.1 Модификация электрода витамином В₁₂ для определения метионина

Оценку эффективной площади поверхности проводили с помощью окислительно-восстановительной пары гексацианоферратов железа 2+ и 3+ (рис.4).

До модификации и после модификации регистрировали значения катодного и анодного тока при увеличении скорости развертки от 20 до 200 мВ/с. Зависимость тока пика от корня квадратного скорости развертки прямолинейна (рис.5). Данный факт указывает на обратимость электрохимической реакции и возможность применения для расчета электроактивной площади поверхности уравнения Рендлса-Шевчика (1).

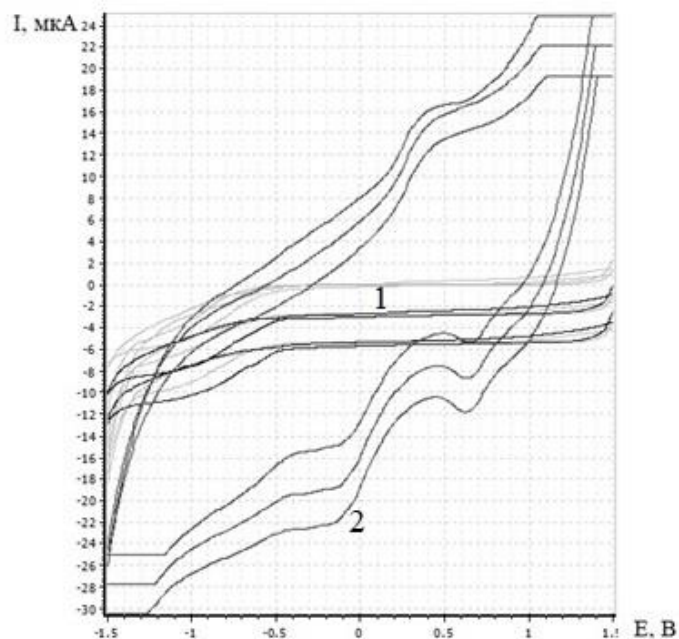


Рисунок 4 – Циклическая вольтамперная кривая $1 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ в 0,1 моль/дм³ KCl на углеродсодержащем (1) и модифицированном МУНТ В₁₂ (2) электроде. $W = 60$ мВ/с

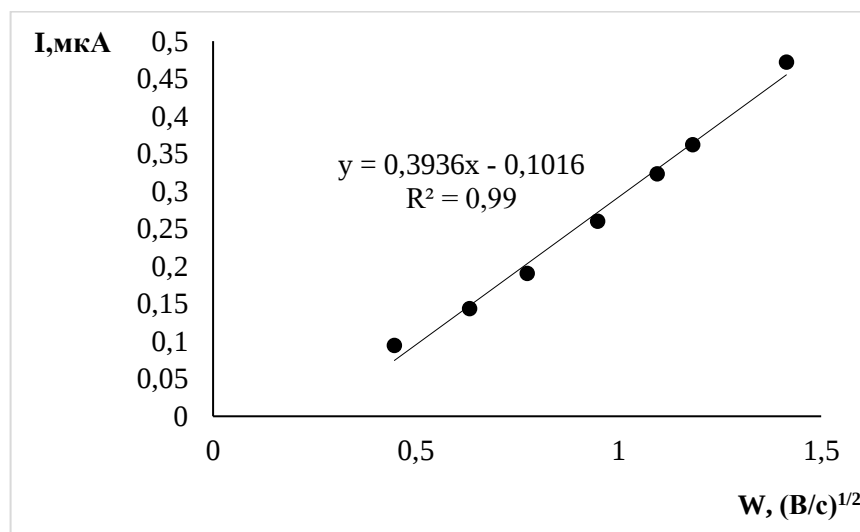


Рисунок 5 – Зависимость тока окисления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ от $W^{1/2}$

Уравнение Рэндлса-Шевчика (1):

$$I_p = \pm 2,69 \times 10^5 z^{3/2} A D^{1/2} C W^{1/2} \quad (1)$$

где: I_p – ток пика, А; z – число электронов ($n=1$); A – площадь электроактивной поверхности, см^2 ; D – коэффициент диффузии ($7,60 \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$); C – концентрация $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ в растворе.

В процессе создания оптимальных условий для прикрепления углеродных нанотрубок применен метод трехфакторного планирования эксперимента, учитывающий три основных параметра. Исследование сосредоточилось на анализе таких переменных, как напряжение источника питания (X_1), продолжительность процесса нанесения нанотрубок (X_2) и концентрация МУНТ (X_3). Оптимизация проводилась через максимизацию плотности тока анодного пика в стандартной окислительно-восстановительной паре гексацианоферратов железа, причем величина тока пика корректировалась в соответствии с активной областью поверхности электрода. Для точной оценки этой активной области применялись данные, полученные с помощью циклических вольтамперных кривых, анализируемых через уравнение Рендлса-Шевчика. Уравнение, полученное в результате проведенного эксперимента (Приложение Б) имеет вид:

$$Y = 16,4 + 0,52X_1 - 0,17X_2 - 1,25X_3 \quad (2)$$

Согласно полученному уравнению, для продвижения к области оптимума необходимо увеличивать поляризующее напряжение и уменьшать концентрацию витамина B_{12} и время нанесения нанотрубок. Уменьшение последних двух факторов вполне объяснимо: длительное время осаждения нанотрубок приводит к более шероховатой поверхности электрода, что влечет за собой высокие значения остаточного тока и, соответственно снижения или даже полного перекрывания полезного сигнала. После анализа данного уравнения было проведено крутое восхождение по поверхности отклика на основании которого выбраны оптимальные условия формирования электрода.

При осаждении нанотрубок на углеродсодержащий электрод при напряжении 6,5 В в течение 8 секунд с концентрацией МУНТ 0,025 мг/мл модифицированный электрод показывает примерно в шесть раз более высокую плотность тока ($2,02 \text{ мкА}/\text{см}^2$) по сравнению с не модифицированным ($0,33 \text{ мкА}/\text{см}^2$).

Для анализа изменений на поверхности электрода использовали сканирующую электронную микроскопию. При сравнении изображений до модификации углеродными нанотрубками (рис. 6а) и после модификации (рис. 6б), поверхность изменяется.

При поляризации витамина В₁₂ в щелочной среде, на электроде образуется адсорбционная пленка из цианокобаламина (см. 6в). На фотографии заметны изменения, вызванные адсорбированной пленкой витамина В₁₂, которая может участвовать в формировании аналитического сигнала метионина.

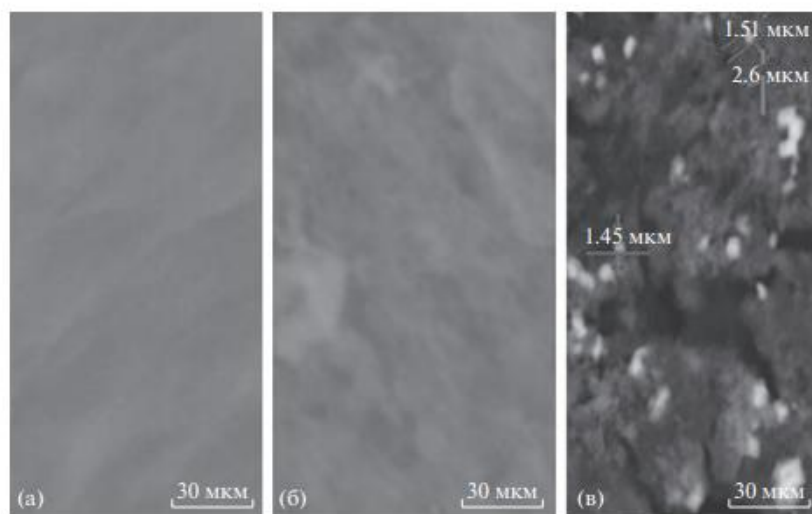


Рисунок 6 – Фотографии поверхности электрода при увеличении 1 : 2000: (а) – углеродсодержащий электрод; (б) – электрод после осаждения МУНТ; (в) – электрод, модифицированный витамином В₁₂.

Для нанесения модификатора использовали метод циклической вольтамперометрии (рис. 7) в области потенциалов от -1,4 В до +1 В.

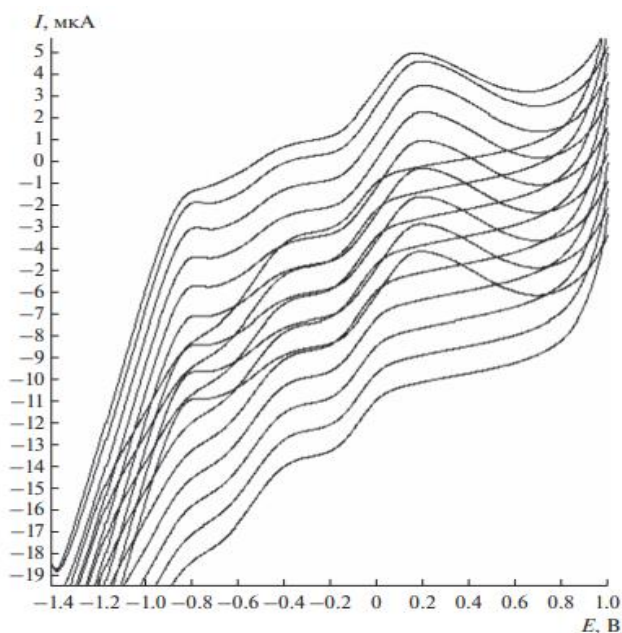


Рисунок 7 – Циклические вольтамперные кривые витамина В₁₂

На вольтамперограмме можно наблюдать несколько катодных пиков при значениях 0,36 В, 0,37 В и -0,75 В, которые являются характерными для постепенного восстановления кобальта из Co(III) в Co(I) в молекуле витамина В₁₂. Интенсивность пиков постепенно увеличивается, что указывает на накопление слоя витамина В₁₂ на поверхности углеродсодержащего электрода [93].

3.2 Изучение влияния факторов на аналитический сигнал метионина

С целью оптимизации условий формирования аналитического сигнала метионина изучили влияние таких параметров как рН фонового электролита, параметров накопления и скорости сканирования потенциала. На рис. 8 представлен анодный пик, пропорциональный содержанию метионина, полученный в оптимальных условиях.

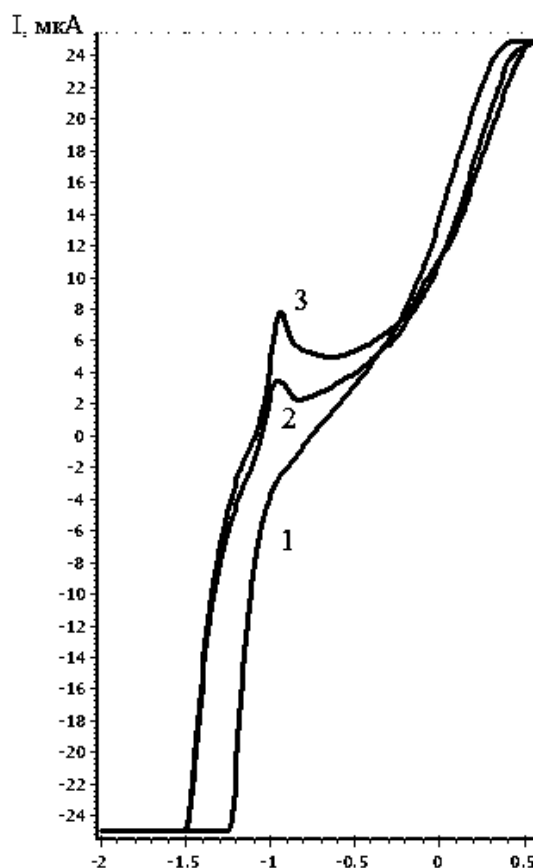


Рисунок 8 – Постоянноточковые вольтамперные кривые, полученные на модифицированном МУНТ и витамином В₁₂ электроде: 1 – буферный раствор рН 4,01; 2 – С метионина $2,29 \times 10^{-6}$ М; 3 – С метионина $4,58 \times 10^{-6}$ М

3.2.1 Влияние рН на формирование аналитического сигнала метионина

Для определения оптимального значения рН при получении аналитического сигнала метионина на модифицированном электроде использовали стандартные буферные растворы от 1,65 до 12,43 (рис. 9) и буферный раствор Бриттона-Робинсона.

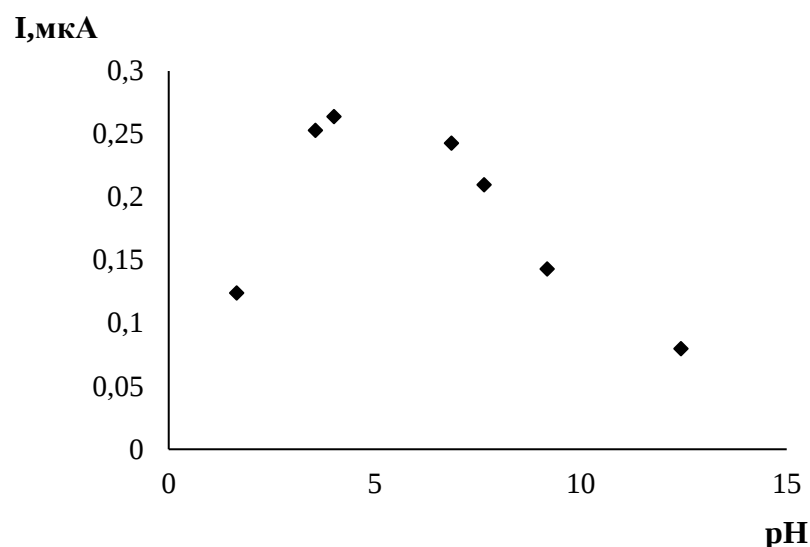


Рисунок 9 – Влияние pH раствора на величину анодного пика окисления комплекса метионина с цианокабаламином на модифицированном электроде от pH среды. $C(\text{Met}) = 1 \times 10^{-6}$ моль/дм³. $W = 80$ мВ/с

Кривая, представленная на рис.9 проходит через максимум при pH 4. При смещении pH в нейтральную и щелочную область анодный пик в присутствии метионина уменьшается, что может быть обусловлено нехваткой протонов, участвующих в окислительном процессе и электродной реакции. При смещении в область более «кислых» значений pH, сигнал уменьшается из-за протонирования аминогруппы в молекуле метионина. Для оценки влияния природы аниона фонового электролита аналогичные исследования были проведены на буферном растворе Бритона-Робинсона. Значимых различий в величинах аналитических сигналов при одинаковых значениях pH не замечено.

С ростом pH буферного раствора аналитический сигнал смещается к более отрицательным значениям (рис.10). Между потенциалом пика и pH наблюдается линейная зависимость: $y = -0,0492X + 0,6930$. Тангенс угла наклона равен 49,2 мВ/pH. Это значение близко к нернстовскому наклону (59,0 мВ/pH), что указывает на равное число электронов и протонов, участвующих в электрохимическом процессе.

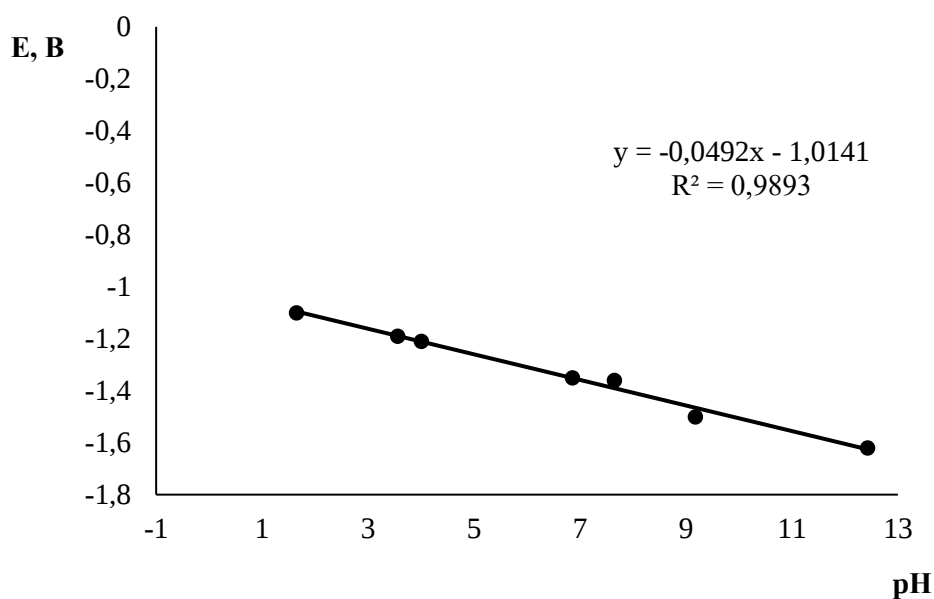


Рисунок 10 – Влияние pH фонового раствора на потенциал анодного пика окисления комплекса метионина с цианокобаламином С ($\text{Met}) = 1 \times 10^{-6}$ моль/дм³.
 $W = 80$ мВ/с

3.2.2 Влияние параметров электролиза аналитический сигнал метионина

Для формирования аналитического сигнала необходимо определить оптимальные параметры накопления вещества на поверхности электрода.

При выборе потенциала накопления исследовали область значений от $-1,9$ В до $-1,0$ В (рис. 11а). Зависимость тока анодного пика от потенциала электролиза проходит через максимум. При смещении потенциала в отрицательную область анодные пики уменьшаются, что обусловлено скорее всего выделением водорода препятствующего образованию комплекса на поверхности электрода. Поэтому в качестве оптимального для концентрирования метионина на модифицированном электроде выбран потенциал $-1,6$ В.

Как видно из рис. 11б, после накопления более 180 с сигнал меняется незначительно, что может быть обусловлено полным заполнением поверхности электрода монослоем осажденного метионина, поэтому при дальнейших исследованиях накопление проводили не более 180 с.

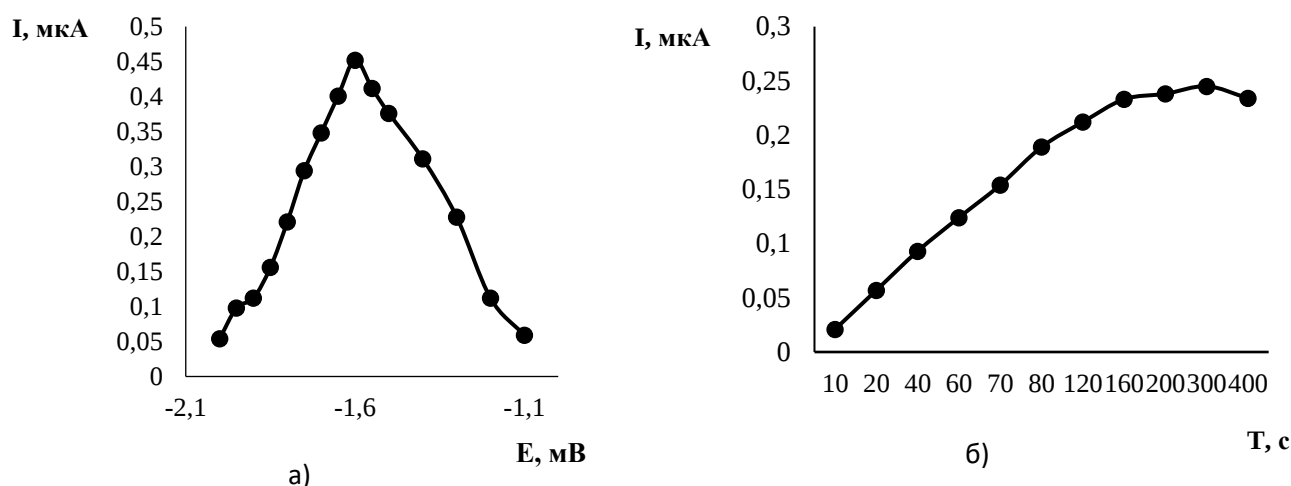


Рисунок 11 – Зависимость тока электроокисления комплекса метионина с цианокобаламином от потенциала накопления на модифицированном электроде (а) и зависимость тока электроокисления метионина от времени накопления (б)

3.3 Исследование механизма реакции электроокисления метионина на модифицированном электроде

Зависимости тока анодного пика и потенциала от скорости развертки потенциала позволяют оценить механизм электрохимической реакции. Для определения примерной схемы процесса реакции построены зависимости тока от корня квадратного скорости развертки (рис. 12а) и потенциала пика от $\ln(W^{1/2})$ в (рис. 12б).

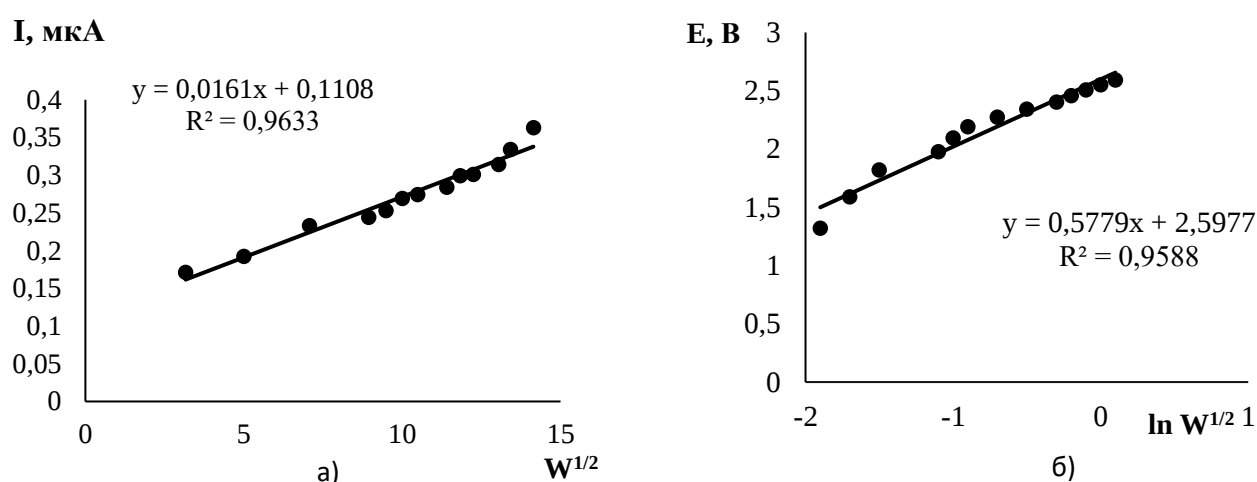


Рисунок 12 – Зависимость тока окисления комплекса метионина с цианокобаламином от корня квадратного скорости развертки потенциала (а), зависимость потенциала от $\ln W^{1/2}$ (б)

Анализ зависимости тока от корня квадратного скорости развертки позволяет выделить обратимые и необратимые процессы, исключая квазиобратимые. Одновременно прямолинейная зависимость потенциала пика от натурального логарифма корня квадратного скорости развертки является характеристикой необратимых процессов.

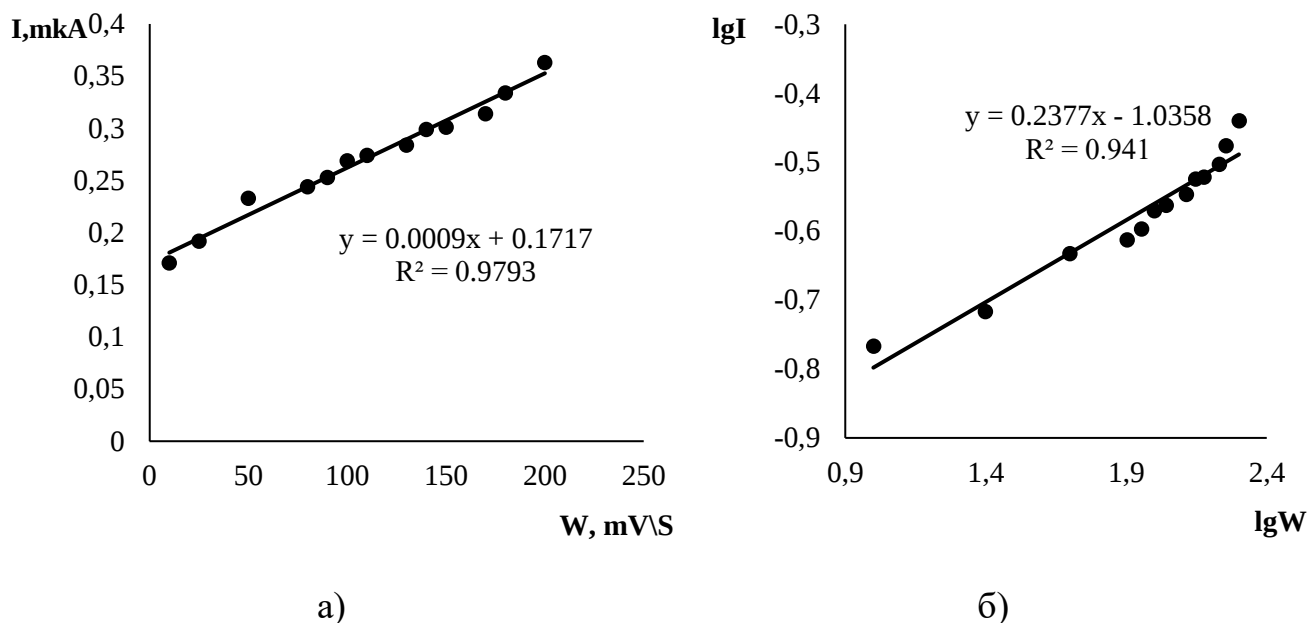


Рисунок 13 – Зависимости тока от скорости развертки потенциала (а) и $\lg I$ от $\lg W$ (б).

На рис. 13а изображена зависимость пика тока от скорости развертки. Зависимость между пиковым током и скоростью развертки линейна, что указывает на адсорбционный характер концентрирования. Однако адсорбция не является определяющим этапом процесса, так как зависимость пика тока от времени накопления (рис. 11б) демонстрирует достаточно широкий линейный диапазон (до 180 секунд). Прямолинейность логарифмической зависимости (рис. 13б) не характерна для процессов, где диффузия является определяющим фактором. Критерий Семерано (тангенс угла наклона логарифмической зависимости) составляет менее 0,5. Таким образом, электродный процесс определяется либо скоростью электрохимической реакции, либо адсорбцией метионина или предыдущей стадией образования комплекса витамина B_{12} с метионином.

Чтобы изучить как именно происходит концентрирование метионина и как формируется аналитический сигнал получили спектры комбинационного рассеяния Рамана. В рамках эксперимента метионин подвергался электрохимическому концентрированию при потенциале -1,6 В в течение пяти минут. После этого электрод тщательно очищали с помощью деионизированной воды, перенося его затем в емкость с чистым фоновым электролитом. Для удаления метионина с поверхности электрода применяли метод линейной развертки потенциала в диапазоне от - 1,6 до + 1,5 В. Эту процедуру повторяли более десяти раз, что позволяло значительно увеличить яркость и четкость спектральных линий.

На рис. 14 представлены спектры рамановского рассеяния водных растворов кобаламина (1), метионина (2) и продуктов электрохимического растворения метионина (3). После растворения концентрата в чистом фоновом электролите из спектра исчезают полосы при 2930 и 1410 см^{-1} , характерные для $\text{CH}_3(\text{vs})$, полоса при 723 см^{-1} , характерная $\text{CSC}(\text{s})$, смещается в более длинноволновую область до 782 см^{-1} , что отвечает $\text{HSC}(\text{vs})$ [94]. Таким образом, после растворения концентрата в растворе присутствует гомоцистеин, который образуется из метионина в результате электродной реакции.

Предлагается следующая возможная схема процесса: атом серы в молекуле метионина, обладая частичным отрицательным зарядом под действием электростатических сил соединяется с кобальтом(III) из витамина B_{12} . В момент катодной поляризации наблюдается смещение электронной плотности в сторону серы, что приводит к отделению метильной группы от метионина и её присоединению к кобаламину. Во время анодной поляризации в раствор переходит гомоцистеин. Рамановский спектр не показывает наличие тех полос, которые обычно ассоциируются с функциональными группами витамина B_{12} . Таким образом при анодной поляризации стабильность цианокобаламина на поверхности электрода сохраняется, и он не переходит с электрода в раствор.

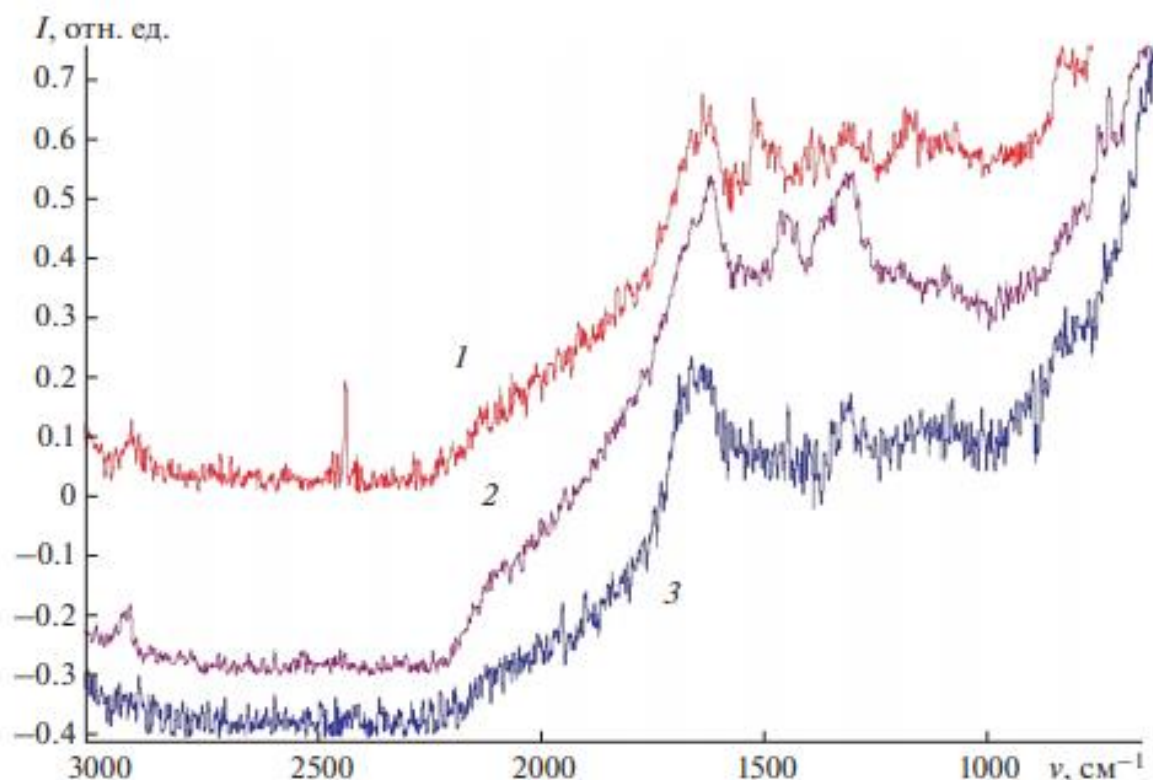


Рисунок 14 – Спектры комбинационного рассеяния: 1 – витамин В₁₂, 2 – 0,17 М раствор метионина, 3 – продукты растворения концентрата с электрода

Произвели расчет коэффициента переноса для реакции окисления комплекса с метионином. Расчет проводили по Тафелевской зависимости. Величина коэффициента переноса составила 0,44. Соответственно в процессе окисления комплекса участвует первый электрон.

Число электронов, принимающих участие в необратимом процессе, рассчитывали по формуле:

$$|E_p - E_{(p/2)}| = 47,7/\alpha n ;$$

где, E_p – потенциал пика; $E_{p/2}$ – потенциал полупика.

Значение $n = 1,08$ указывает на то, что в реакции окисления принимает участие 1 электрон и один протон. Это может быть обусловлено тем, что кобальт, находящийся в корриновом кольце витамина В₁₂, в процессе анодной развертки потенциала окисляется до Со(III). При катодной поляризации электрода кобальт в цианокобаламине сначала восстанавливается до +2 и именно восстановленный комплекс взаимодействует с метионином, а при анодной развертке происходит

обратный процесс окисления кобальта, перенос метильной группы метионина на кобаламин и переход в раствор гомоцистеина (рис.15).

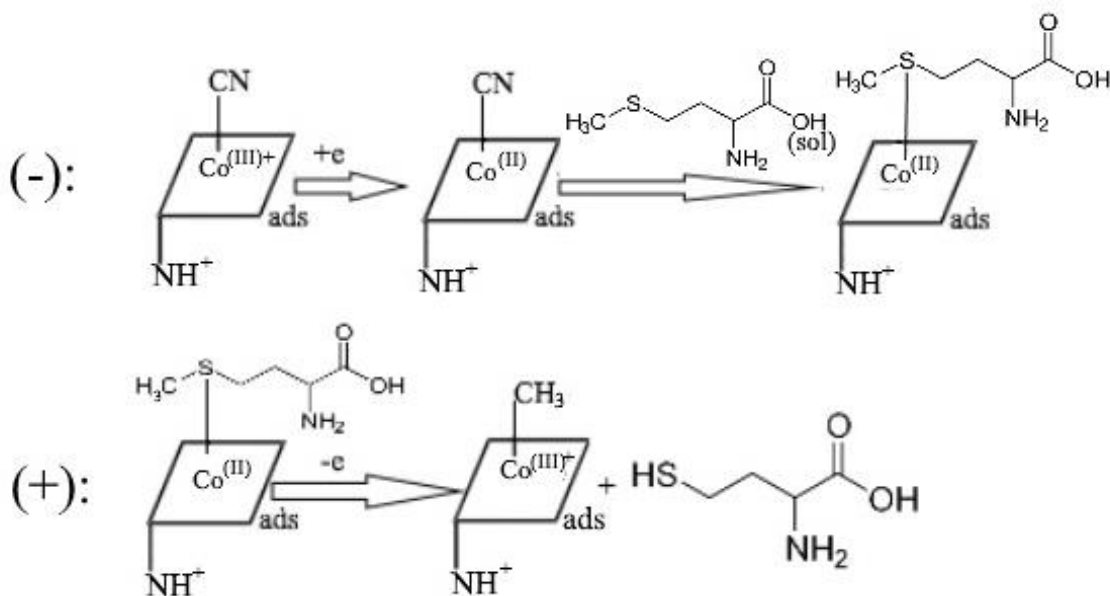


Рисунок 15 – Возможная схема процесса превращения метионина модифицированном электроде

Оптимальное значение скорости развертки для определения метионина составило 50 мВ/с. Рабочие условия определения метионина: pH=4,01; $E_3 = -1,6$ В; $t_3 = 300$ с. Для увеличения точности определения метионина был применен дифференциально-импульсный режим записи вольтамперных кривых. Оптимальные параметры метода: амплитуда 15 мВ, время задержки измерения 7 мс и шаг развертки 10 мВ.

3.5 Модификация электрода для одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана

Для закрепления модификатора витамина В₉ на поверхности электрода, модифицированном МУНТ использовали метод циклической вольтамперометрии (рис. 18) в пределах потенциалов: $-1,4$ В ÷ $+0,5$ В.

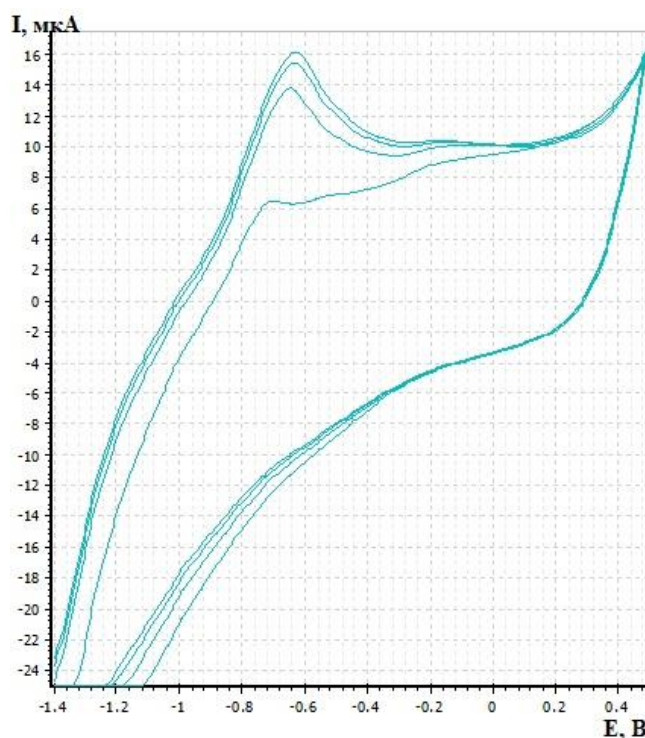


Рисунок 16 – Вольтамперные кривые фолиевой кислоты на углеродсодержащем электроде, модифицированном МУНТ

На рис. 16 представлен процесс полимеризации фолиевой кислоты в процессе циклической развертки потенциала. Пиковый ток при потенциале $-0,75$ В увеличивается, что свидетельствует о росте пленки на электроде. Процесс полимеризации витамина B_9 известен в литературе и хорошо согласуется с представленной вольтамперограммой [95]. Механизм электрополимеризации: под действием электрического тока амин, находящийся в птеридиновом кольце молекулы фолиевой кислоты, заряжается до положительного катион-радикала. Этот катион-радикал присоединяется к свободному амину птеридиновой группы, за счет этого происходит рост полимерной цепи.

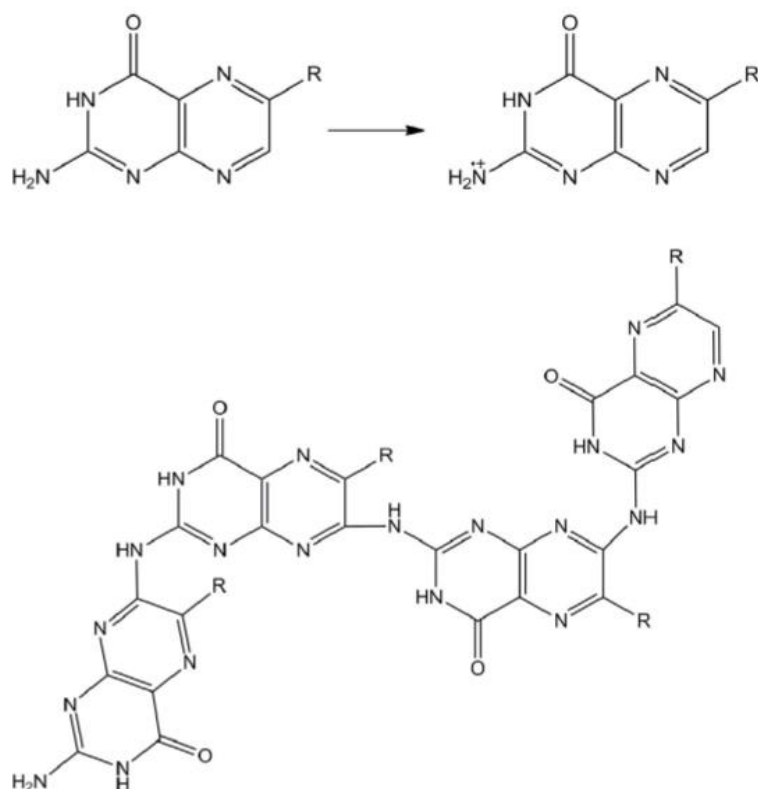


Рисунок 17 – Механизм полимеризации фолиевой кислоты на поверхности модифицированного МУНТ углеродсодержащего электрода.

Фиксировали значения тока окислительно-восстановительной пары гексацианоферратов железа II и III (рис.18) на электроде до и после его модификации в диапазоне скоростей развертки от 20-200 мВ/с. График зависимости тока от корня квадратного скорости развертки прямолинеен. Реакция является обратимой. Таким образом появляется возможность применения уравнения Рендлса-Шевчика для последующих расчетов.

В результате осаждения полифолиевой кислоты на электрод, модифицированный МУНТ, электроактивная поверхность электрода увеличивается (по уравнению Рендлса-Шевчика, она составила 0,38 см² против 0,013 см² у обычного УСЭ (рис.18).

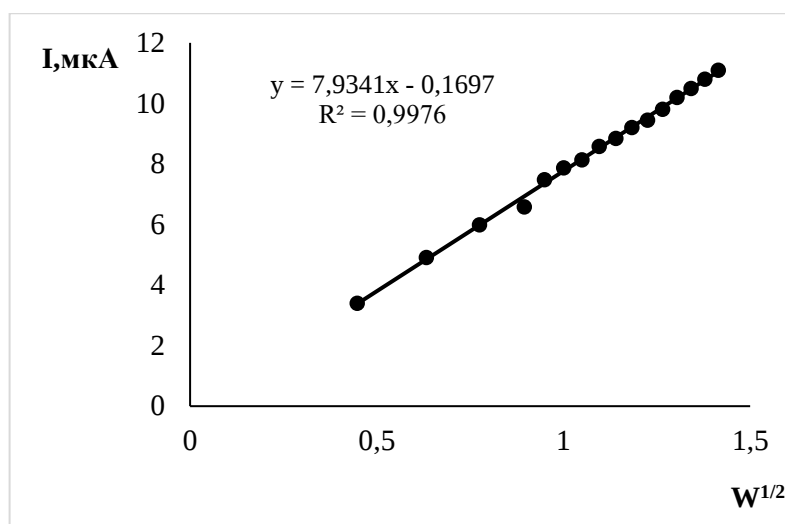


Рисунок 18 – Зависимость тока окисления $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ от $W^{1/2}$

Для формирования аналитических сигналов при одновременном определении триптофана и 5-гидрокситриптофана использовали анодную постояннотоковую вольтамперометрию.

3.6 Влияние pH фонового электролита на окисление триптофана и 5 - гидрокситриптофана

Значения pH для фонового электролита при определении триптофана и 5-гидрокситриптофана задавали с помощью стандарт-титров буферных растворов от 1,68 до 12,43 и буферного раствора Бриттона-Робинсона для исключения влияния природы анионного состава фонового электролита.

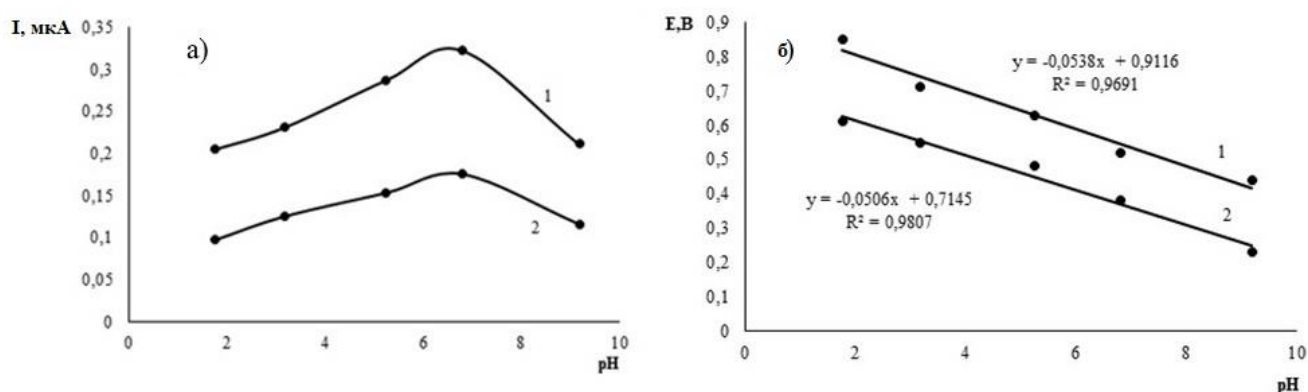


Рисунок 19 – Зависимость анодного тока (а) и потенциала пика (б) триптофана и 5-гидрокситриптофана от pH среды.

Различий между использованием буферного раствора и растворами, приготовленными из стандарт-титров не замечено. При увеличении рН фоновых электролитов потенциалы пиков смещаются в отрицательную область. Зависимости потенциала пика от рН (рис. 19 б) имеют прямолинейный характер. Для понимания электрохимического процесса важно отметить, что тангенсы углов наклонов соответствуют 53,8 мВ/рН для триптофана и 50,6 мВ/рН для 5-гидрокситриптофана. Эти значения подтверждают близость к нернстовскому наклону (59,0 мВ/рН), что свидетельствует о равном количестве электронов и протонов, участвующих в процессе. Проведенные расчеты мольных долей (рис. 20) выявили, что при рН = 6,85 триптофан и 5-гидрокситриптофан находятся в виде цвиттер-ионов. Это отражает особенности химической структуры и взаимодействия данных веществ в растворе. Подобные исследования позволяют более глубоко понять механизмы реакций, происходящих на электродах, и выявить особенности поведения различных соединений в условиях изменяющейся кислотности окружающей среды.

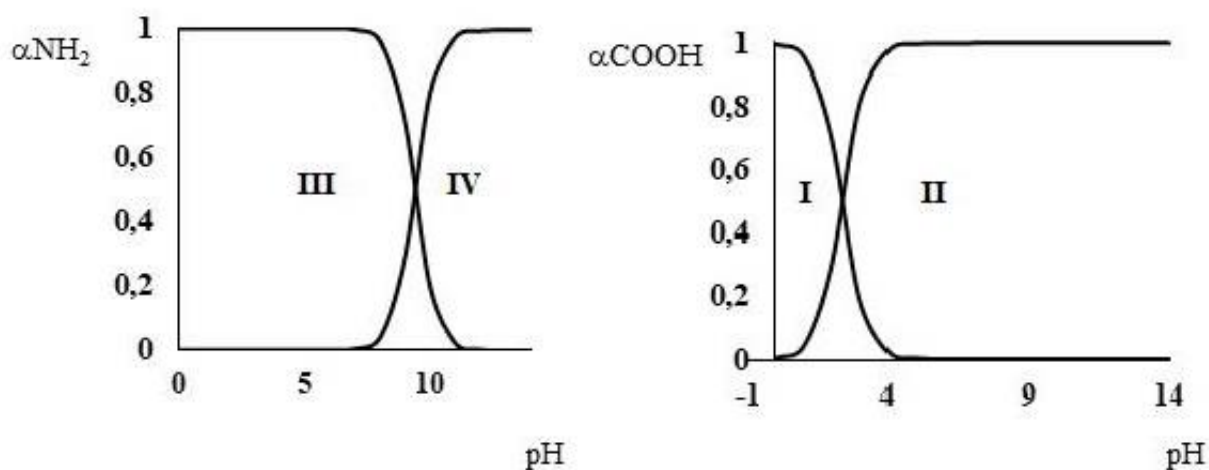


Рисунок 20 – Мольные доли триптофана и 5-гидрокситриптофана по кислотной группе (I - α COOH, II - α COO⁻) и основной группе (III - α NH₃⁺, IV - α NH₂)

Аминокислоты, содержащие COO⁻ группы, при данном рН концентрируются за счет взаимодействия с NH₃⁺. Однако в более щелочной среде происходит их депротонирование, что приводит к потере возможности электростатического взаимодействия. Электростатическое взаимодействие между полифолиевой

кислотой и аминокислотами замедляется из-за протонирования кислотных групп в кислой среде. Важно отметить, что в процессе концентрирования аминокислот играют ключевую роль COO^- и NH_3^+ группы, находящиеся в составе полифолиевой кислоты. При изменении кислотности среды происходят существенные изменения в заряде и взаимодействии этих групп, что влияет на процесс депротонирования аминокислот.

3.7 Влияние параметров электролиза на электроокисление триптофана и 5-гидрокситриптофана

В ходе исследования проанализировали воздействие потенциалов накопления на аналитический сигнал 5-гидрокситриптофана и триптофана в интервале значений потенциала от $-0,1$ до $1,0$ В. Эксперимент проводился при $\text{pH} = 7$, время накопления 30 секунд (рис. 21).

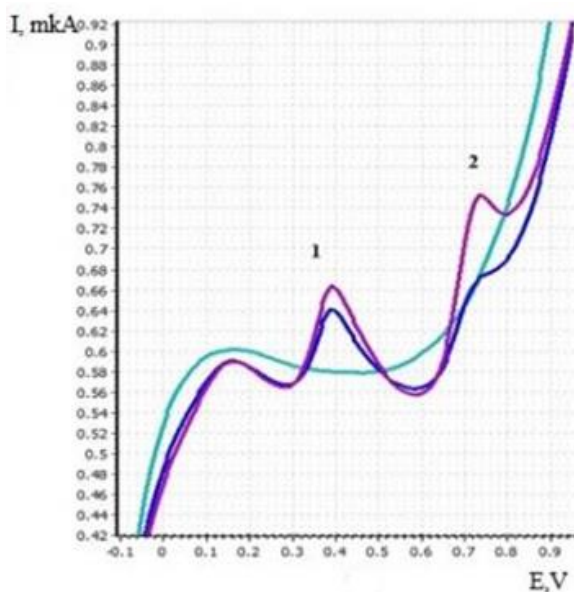


Рисунок 21 – Вольтамперные кривые окисления триптофана и 5-гидрокситриптофана при $\text{pH} = 6,86$ (1 – 5-гидрокситриптофан и триптофан с концентрациями

$1,0 \times 10^{-6}$ М; 2 – 5-гидрокситриптофана и триптофана с концентрацией 2×10^{-6} М

Установлено, что потенциал накопления практически не влияет на аналитические сигналы. Это может говорить об адсорбционном характере

концентрирования аминокислот на поверхности электрода Исходя из рис. 22 в качестве оптимального потенциала накопления выбрали $-0,1$ В.

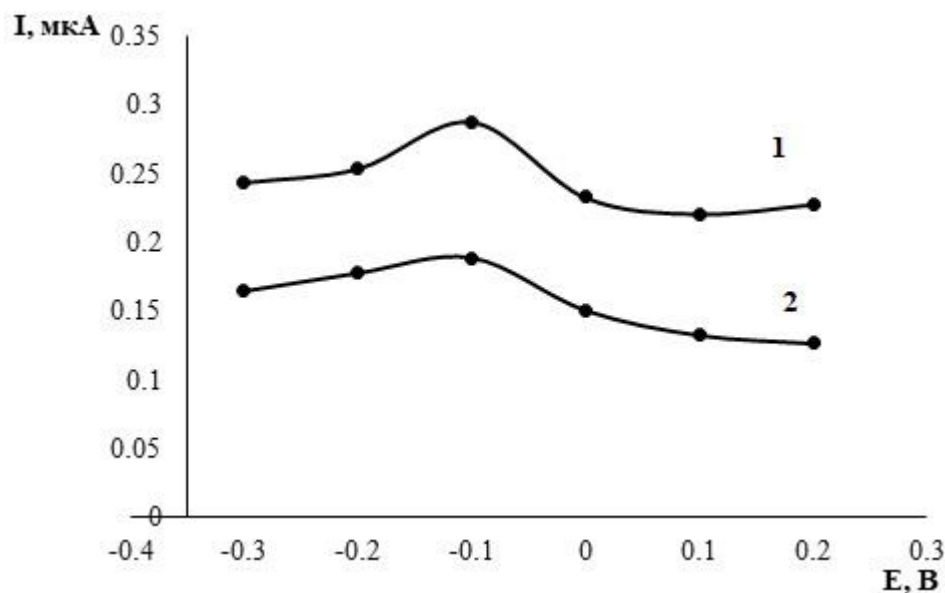


Рисунок 22 – Зависимость тока электроокисления триптофана (1) и 5-гидрокситриптофана (2) от потенциала накопления на модифицированном полифолиевой кислотой электроде в растворе $\text{pH}=6,86$.

После накопления более 120 с интенсивность сигнала триптофана изменяется незначительно, как показано на рис. 22. Такая же картина наблюдается и для 5-гидрокситриптофана.

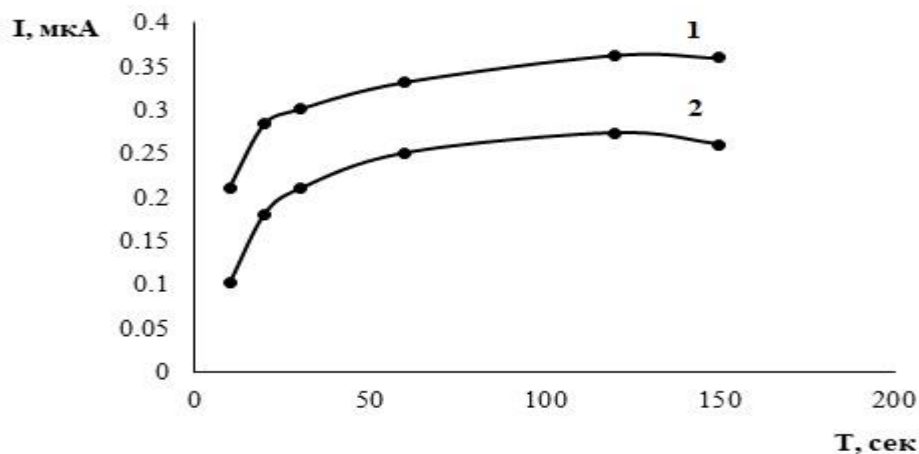


Рисунок 23 – Зависимость тока электроокисления триптофана (1) и 5-гидрокситриптофана (2) от времени накопления на модифицированном электроде при $\text{pH} = 6,86$.

Таким образом, установлены рабочие условия параметров концентрирования триптофана и 5-гидрокситриптофана на модифицированном полифольевой кислотой электроде: время 120 с, потенциал $-0,1$ В. Разность пиков окисления триптофана и 5-гидрокситриптофана составляет более $0,3$ В, анодные пики хорошо разрешимы, при варьировании соотношения концентраций аминокислот 1:100, 100:1 величины аналитических сигналов меняются не более 5%.

3.8 Исследование механизма окисления триптофана и 5-гидрокситриптофана модифицированном электроде

Соотношение между потенциалом и пиком тока от скорости развертки потенциала может дать конструктивную информацию о механизме электрохимической реакции. Аналитические сигналы триптофана и 5-гидрокситриптофана исследовали методом вольтамперометрии при различных скоростях развертки потенциала в диапазоне от 25 до 280 мВ/с.

Для оценки механизма окисления построены зависимости тока пика от $W^{1/2}$ (рис.24).

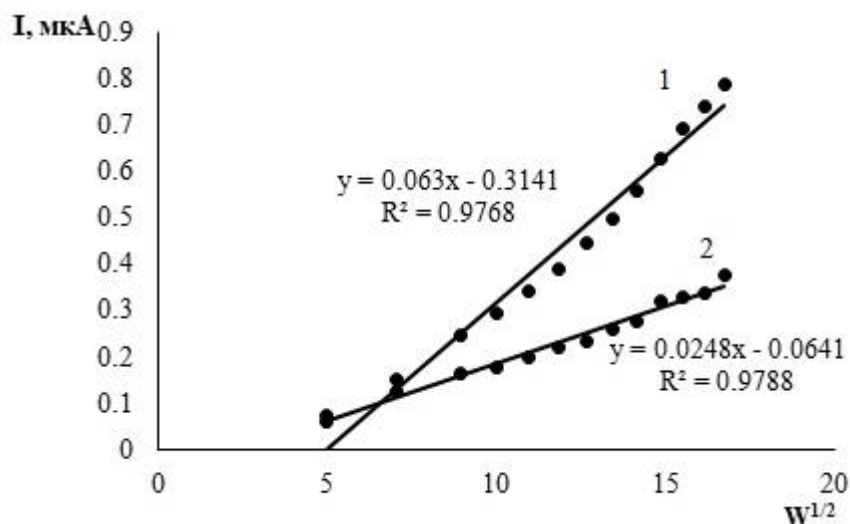


Рисунок 24 – Зависимости тока электроокисления триптофана (1) и 5-гидрокситриптофана (2) от корня квадратного скорости развертки $W^{1/2}$

Линейные зависимости на рис. 24 указывают как на обратимость, так же и на необратимость процессов. Так как зависимость потенциала от $\ln W^{1/2}$ прямолинейна, то процесс является необратимым. Линейная зависимость тока от

скорости развертки потенциала (рис. 25б) характерна для процессов контролирующихся адсорбцией.

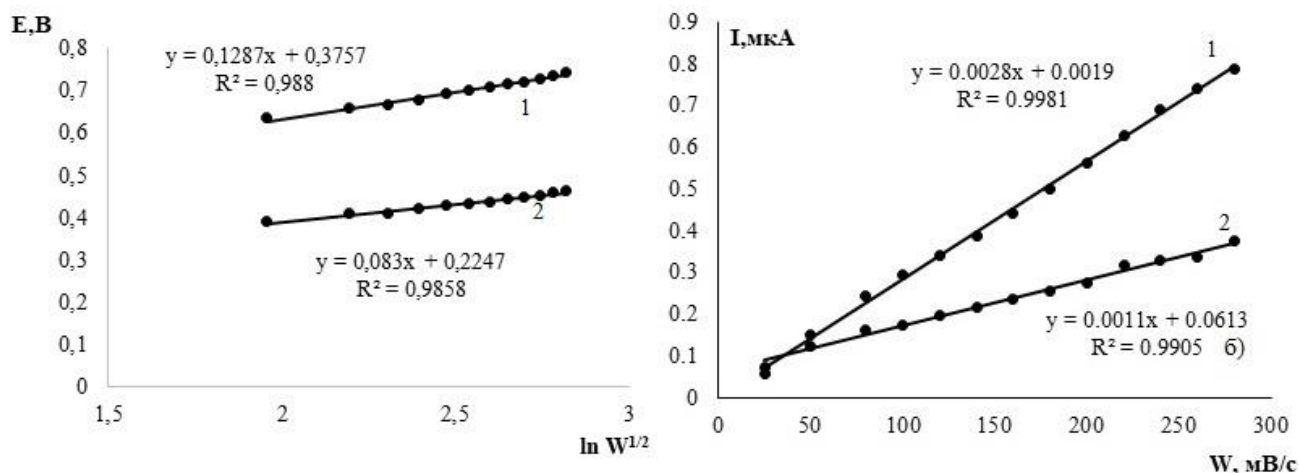


Рисунок 25 – Зависимости потенциала и тока электроокисления триптофана (1) и 5-гидрокситриптофана (2) от $\ln W^{1/2}$ (а) и скорости развертки (б).

Процессы с диффузионным контролем характеризуются линейной зависимостью потенциала пика от корня квадратного из скорости развертки потенциала. Это было подтверждено в исследовании [92] (см. рисунок 26а).

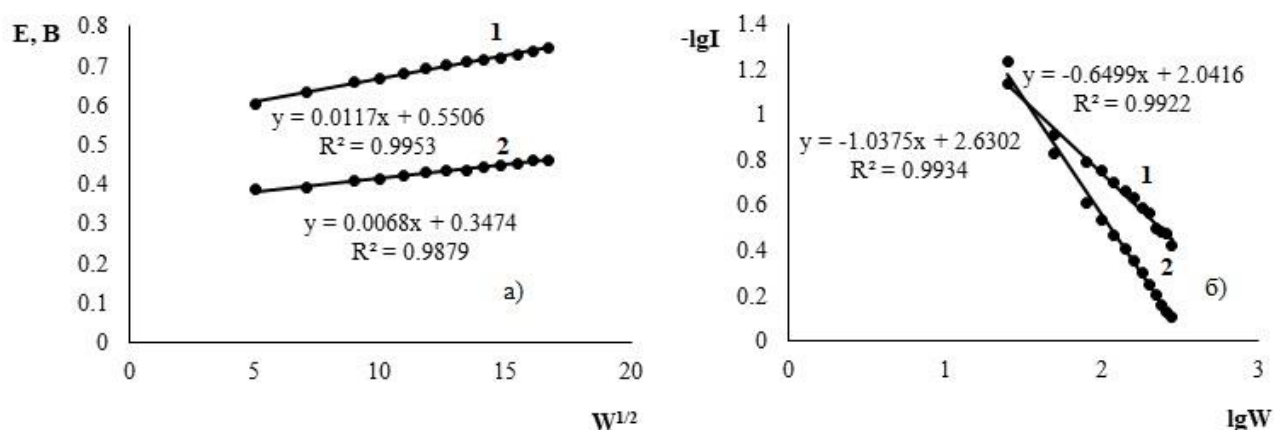


Рисунок 26 – Зависимости потенциала и $-\lg I$ триптофана (1) и 5-гидрокситриптофана (2) от $W^{1/2}$ (а) и $\lg W$ (б).

Основываясь на угле наклона графика $\lg I$ от $\lg W$ (рис. 26б) показатель критерия Семерано для триптофана и 5-гидрокситриптофана равен 0,65 и 1,04 соответственно. Если бы процессы контролировались только диффузией, то

критерий должен быть равен 0,5; более высокие значения критерия Семерано указывают на то, что процесс имеет и адсорбционный характер.

Предельную адсорбцию рассчитывали по уравнению [93]:

$$\Gamma_{\infty} = \frac{b}{9.4 \cdot 10^5 A n},$$

где b – тангенс угла наклона $I - W$,

A – площадь электроактивной поверхности электрода,

n – число электронов, участвующих в процессе.

Более высокий коэффициент чувствительности при определении можно объяснить тем, что величина предельной адсорбции для 5-гидрокситриптофана составила $6,41 \times 10^{-11}$ моль/см², а для триптофана – $1,63 \times 10^{-10}$ моль/см².

Изучая электродные реакции окисления триптофана и 5-гидрокситриптофана, определили лимитирующую стадию и число электронов, используя расчеты коэффициента переноса по выражению:

$$b = \alpha F / RT,$$

где b представляет собой тангенс угла наклона зависимости $\ln|I_{ox}| - E_p$, а α – коэффициент переноса. Полученные результаты показали, что эффективные коэффициенты переноса для триптофана и 5-гидрокситриптофана составляют соответственно 1,47 и 1,52. Для определения числа электронов в необратимом процессе использовалась соответствующая формула.

Значения, полученные для триптофана и 5-гидрокситриптофана, равные 1,94 и 2,18 соответственно, близки к 2, что свидетельствует о их близости.

Отношение $|E_p - E_{(n/2)}| = 47,7 / \alpha n$ позволяет рассчитать значения эффективных коэффициентов переноса. Рассчитанные значения эффективных коэффициентов переноса, приблизительно равные 1,5, указывают на то, что лимитирующим этапом является процесс переноса первого электрона.

Таким образом, исходя из предыдущих выкладок можно предположить возможную схему концентрирования и электрорастворения на примере триптофана (рис. 27): за счет электростатического взаимодействия на поверхности

электрода происходит концентрирование триптофана, который при анодной развертке потенциала окисляется.

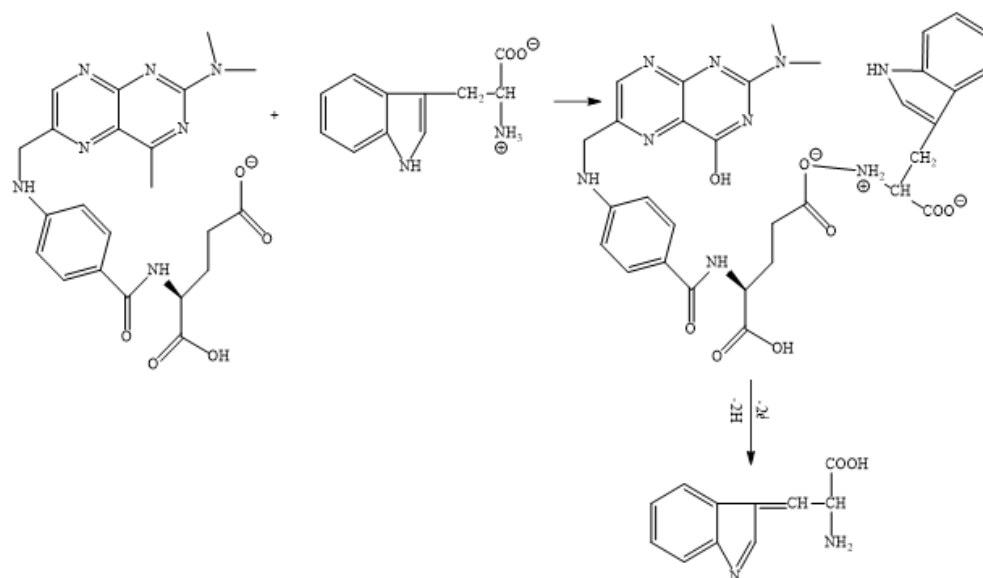


Рисунок 27 – Схема концентрирования и окисления триптофана на электроде, модифицированном полифоллиевой кислотой.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТИОНИНА, ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИПТОФАНА И 5-ГИДРОКСИТРИПТОФАНА МЕТОДОМ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ.

4.1 Методика определения метионина на модифицированном витамином В₁₂ электроде

Для достижения постоянного, воспроизводимого аналитического сигнала перед началом эксперимента электрод, модифицированный МУНТ и витамином В₁₂ подвергался электрохимической очистке с переменной потенциалов -1,2 В и 0,05 В в течение 15 секунд перед началом анализа. Вольтамперограммы метионина регистрировали в буферном растворе при рН 4,01 и скорости сканирования 50 мВ/с при $E_{\text{нак}} = -1,6$ В, $t_{\text{нак}} = 300$ с. В оптимальных условиях регистрации сигнала зависимость изменения тока окисления метионина от его концентрации в растворе в диапазоне концентраций от 1×10^{-7} до 50×10^{-7} моль/дм³ (рис.28) описывается уравнением регрессии: $I_c = 0,0243C + 0,0032$ где I – ток электроокисления метионина, мкА; C – концентрация метионина в анализируемом растворе, моль/дм³.

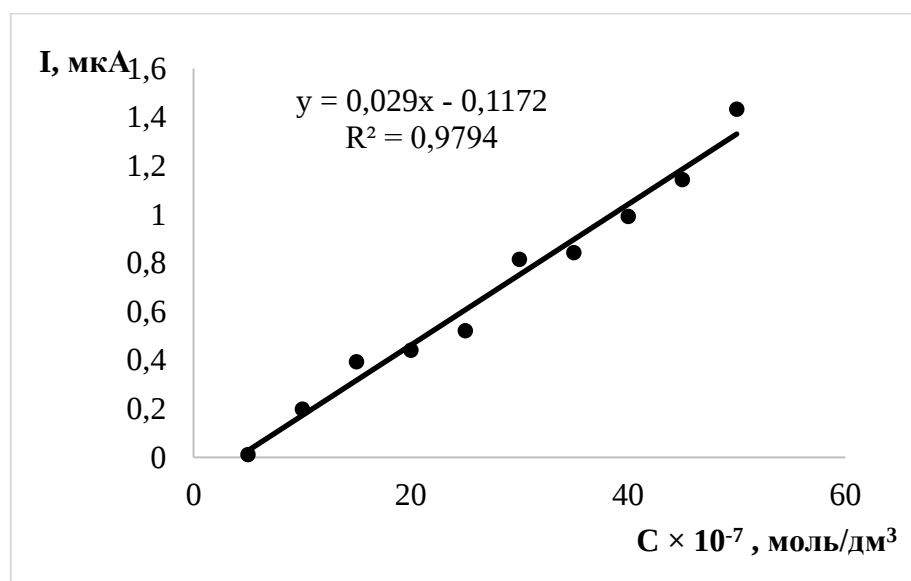


Рисунок 28 – Концентрационная зависимость метионина в диапазоне концентраций от 1×10^{-7} до 50×10^{-7} моль/дм³

Предел обнаружения, рассчитанный по 3σ -критерию, составил $5,0 \times 10^{-8}$ М. Увеличение концентрации метионина приводило к пропорциональному увеличению аналитического сигнала. Данный факт говорит о хорошей чувствительности и низком пределе обнаружения метионина. Образование комплекса витамина В₁₂ с метионином не влияет на количественную оценку в указанном диапазоне концентраций, так как зависимость от концентрации метионина имеет прямолинейный характер.

Чтобы гарантировать стабильность аналитических сигналов, модифицированный электрод протестирован на протяжении 25 циклов, включая холостой опыт, анализируемую пробу и пробу с добавкой. В процессе последовательных разверток потенциала величины аналитических сигналов триптофана и 5-гидрокситриптофана в течение 25 циклов изменяются не более, чем на 7 %. При более длительном использовании электрода его чувствительность уменьшается, поэтому требуется обновление поверхности. Для этого, поверхность электрода очищается при помощи электролиза в течение 300 секунд при потенциале $-0,5$ В, а затем наносится новая пленка витамина В₁₂ с использованием метода циклической вольтамперометрии.

Изучено влияние компонентов БАД и лекарственных препаратов на аналитический сигнал метионина. В таблице 1 указано влияние основных компонентов матрицы на величину аналитического сигнала метионина.

Таблица 1. Мешающее влияние основных компонентов матрицы БАД и лекарственных средств, $n = 6$, $p = 0,95$, $t_{\text{табл}} = 2,57$

Аналитический сигнал (ток) метионина перед добавлением компонентов матрицы(мкА/мВ)	Компонент	Соотношение концентрации метионина к компонентам матрицы	Ток метионина после добавления компонента матрицы	t(эксп)
0,651±0,043	Метилцеллюза	1:10	0,622±0,039	2,01
	TiO ₂	1:10	0,631±0,048	2,54
	Al ₂ O ₃	1:10	0,679±0,053	2,23

	Крахмал	1:100	0,631±0,035	2,36
	L-изолейцин	1:1	0,662±0,051	1,95
	L-лейцин	1:1	0,611±0,071	2,07
	L-лизина ацетат	1:1	0,624±0,053	2,31
	L-фенилаланин	1:1	0,672±0,052	2,42
	L-треонин	1:1	0,657±0,049	1,97
	L-триптофан	1:1	0,625±0,033	1,79
	L-валин	1:1	0,679±0,087	1,92
	L-аргинин	1:1	0,626±0,063	1,85
	L-гистидин	1:1	0,621±0,047	2,45
	L-аланин	1:1	0,664±0,051	2,08
	Глицин	1:1	0,606±0,075	1,73
	L-пролин	1:1	0,641±0,033	1,94
	L-серин	1:1	0,652±0,047	1,65
	L-тирозин	1:1	0,636±0,048	1,91
	Таурин	1:1	0,662±0,086	2,26

Присутствие основных компонентов в лекарственных средствах и биологически-активных добавках не мешает определению метионина. Вещества, такие как TiO_2 , Al_2O_3 , картофельный крахмал, стероидная кислота, метилцеллюлоза, L-изолейцин; L-лейцин; L-лизина ацетат; L-фенилаланин; L-треонин; L-триптофан; L-валин; L-аргинин; L-гистидин; L-аланин; глицин; L-пролин; L-серин; L-тирозин; не влияют на точность определения метионина.

4.2 Разработка методики определения метионина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках.

Для определения метионина в лекарственных средствах и БАДах предлагается следующий алгоритм: в колбу вместимостью 100,0 мл помещается точная навеска пробы, которая затем растворяется в 100 мл бидистиллированной

воды. Полученный раствор активно перемешивается и проходит фильтрацию через бумажный фильтр «синяя лента». Для анализа берется аликвота этого раствора.

Регистрация аналитических сигналов проводится в трехэлектродной ячейке, где в качестве индикаторного используют модифицированный МУНТ и витамином В12 электроде, а в качестве вспомогательного и сравнения – хлоридсеребряные электроды. Параметры: потенциал электролиза $-1,6$ В, время накопления 300 секунд, диапазон развертки потенциалов от $-1,9$ до $0,5$ В в дифференциально-импульсном режиме, скорость развертки 50 мВ/с.

В чистый кварцевый стаканчик вместимостью $15,0 - 25,0$ см³ добавляется $10,0$ см³ раствора фонового электролита с $pH = 4,01$ и стаканчик помещается в вольтамперометрический анализатор и регистрируются вольтамперные кривые в приведенных выше условиях. Затем в стаканчик с фоновым раствором добавляют аликвоту анализируемой пробы и регистрируют зависимость тока от потенциала в тех же условиях. Оценивают содержание метионина по методу стандартной добавки. Время анализа одной пробы составляет 15-20 минут, где измеряется высота пика для определения содержания метионина. Правильность полученных результатов проверяли методом "введено-найдено" (табл. 2). Для проверки результатов использовался метод введено-найдено и расчет степени открытия R , которая определяется отношением разности между найденной концентрацией и начальным содержанием вещества в пробе к введенной добавке. Значения R , близкие к 100%, указывают на отсутствие значимой систематической погрешности.

Таблица 2. Результаты определения содержания метионина в образце методом «введено-найдено».

Содержание в образце, М	Введено, М	Найдено, М	Δ	R , %
$3,05 \times 10^{-6}$	$3,00 \times 10^{-6}$	$(6,0 \pm 0,4) \times 10^{-6}$	$2,90 \times 10^{-6}$	97
$1,30 \times 10^{-7}$	$5,00 \times 10^{-7}$	$(6,0 \pm 0,5) \times 10^{-7}$	$4,72 \times 10^{-7}$	94

Данные о содержании метионина в лекарственных препаратах и биологически активных добавках были подвергнуты анализу с использованием инверсионной вольтамперометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Следует отметить, что проведение ВЭЖХ осуществлялось в соответствии с требованиями ГОСТ 32195-2013. Результаты, полученные с использованием различных методов анализа, показали высокую степень согласованности между собой, что свидетельствует о надежности и точности проведенных измерений (табл. 3).

Таблица 3. Результаты определения метионина в лекарственных средствах методами ВЭЖХ и инверсионной вольтамперометрии (ИВА) ($n = 5$; $P = 0,95$)

Препарат	Номинальное содержание метионина в 1 таблетке, мг	Содержание метионина, мг/табл		t(эксп)
Ревалид	100	101±10	98±14	2,01
Витрум-Бьюти	3,3	3 ± 1	3 ± 1	1,78
Метионин	250	248 ± 31	253 ± 33	1,55

Данный метод определения метионина можно рекомендовать для проведения контроля метионина в лекарственных препаратах и БАДах в аналитических лабораториях. Модифицированные электроды можно рекомендовать в качестве детекторов для методик хроматографии.

4.3 Разработка методики определения триптофана и 5-гидрокситриптофана при совместном присутствии методом вольтамперометрии

Подбор рабочих условий одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана описан в главе 3. Проводили регистрацию вольтамперограмм с использованием постоянноточковой вольтамперометрии. Эксперименты проходили в фосфатном буферном растворе с $pH = 6,86$ или в буферном растворе

Бритона-Робинсона с $\text{pH} = 7$ при скорости сканирования потенциала 100 мВ/с , потенциале накопления $-0,1 \text{ В}$ и времени накопления 120 с . Первоначально получали воспроизводимую фоновую кривую в диапазоне потенциалов от $-0,1$ до $1,0 \text{ В}$. Затем вносили аликвоты исследуемого водного раствора, содержащего триптофан. После этого проводились регистрации вольтамперограмм окисления триптофана в соответствии с описанной методикой.

Экспериментальный процесс включал в себя последовательность шагов, начиная с регистрации фоновой кривой и заканчивая оценкой анодных пиков триптофана и 5-гидрокситриптофана. В каждом этапе эксперимента осуществлялась подготовка пробы и внесение изменений в состав раствора. Важно отметить, что каждый этап эксперимента требовал точной настройки оборудования и строгого контроля параметров реакции. Пики окисления триптофана и 5-гидрокситриптофана были получены при потенциалах $0,4 \text{ В}$ и $0,7 \text{ В}$ соответственно. В оптимальных условиях регистрации сигнала зависимость изменения тока окисления триптофана и 5-гидрокситриптофана от его концентрации в растворе линейна в диапазоне концентраций: $5 \times 10^{-7} - 50 \times 10^{-7} \text{ моль/дм}^3$ (рис.29).

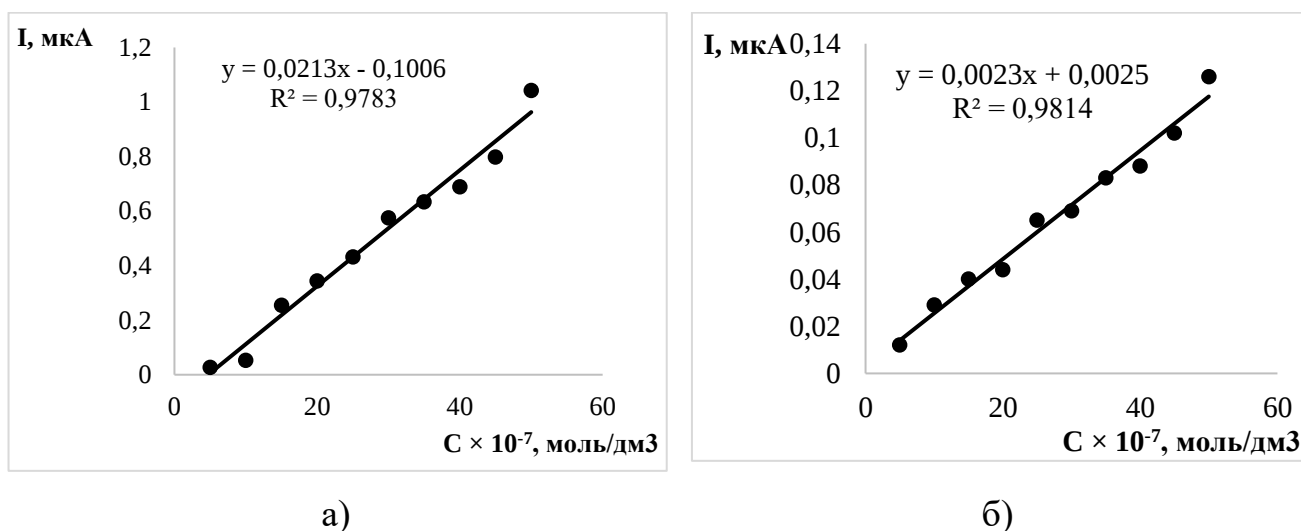


Рисунок 29 – Зависимость анодных пиков окисления триптофана (а) и 5-гидрокситриптофана (б) концентрации, полученные на электроде, модифицированном МУНТ и полифолиевой кислотой

Предел обнаружения, рассчитанный по 3σ -критерию, составил $1,0 \times 10^{-7}$ М для триптофана, для 5-гидрокситриптофана составил $0,5 \times 10^{-7}$ М. Концентрационные зависимости для триптофана и 5-гидрокситриптофана носят линейный характер. Важно отметить, что поверхность электрода требует обновления после использования более 60 циклов, когда его чувствительность уменьшается. Это может повлиять на точность аналитических сигналов. Для восстановления чувствительности электрода необходимо провести процедуру очистки поверхности электрода электролизом при потенциале 1,0 В в течение 30 секунд. После этого на поверхность наносится новая пленка витамина В₉ с использованием метода циклического сканирования потенциала. Это позволяет восстановить стабильность аналитических сигналов и обеспечить точность и надежность результатов анализа.

Проведена оценка влияния сопутствующих компонентов БАД и лекарственных средств на аналитические сигналы триптофана и 5-гидрокситриптофана (табл. 4 – 5).

Таблица 4. Исследование влияния компонентов матрицы на сигнал окисления триптофана, $n = 6$, $p = 0,95$, $t_{\text{табл}} = 2,57$

Ток триптофана перед добавлением компонентов матрицы(мкА/мВ)	Компонент	Соотношение концентрации метионина к компонентам матрицы	Ток метионина после добавления компонента матрицы	t(эксп)
0,732±0,062	FeCl ₃	1:10	0,681±0,041	2,55
	TiO ₂	1:10	0,771±0,056	2,33
	Al ₂ O ₃	1:10	0,721±0,053	2,22
	Крахмал	1:100	0,702±0,045	2,15

	L-изолейцин	1:1	0,781±0,081	1,96
	L-лейцин	1:1	0,711±0,061	2,53
	L-лизина ацетат	1:1	0,724±0,053	2,23
	L-фенилаланин	1:1	0,736±0,052	2,32
	L-треонин	1:1	0,747±0,049	1,74
	L-метиони	1:1	0,725±0,033	2,51
	L-валин	1:1	0,749±0,087	2,45
	L-аргинин	1:1	0,746±0,063	1,72
	L-гистидин	1:1	0,739±0,047	1,83
	L-аланин	1:1	0,741±0,051	2,04
	Глицин	1:1	0,756±0,059	2,43
	L-пролин	1:1	0,701±0,039	1,81
	L-серин	1:1	0,694±0,048	1,85
	L-тирозин	1:1	0,716±0,053	1,96
	Таурин	1:1	0,752±0,056	1,85

Таблица 5. Исследование влияния компонентов матрицы на сигнал окисления 5-гидрокситриптофана, n = 6, p = 0,95, t_{табл} = 2,57

Ток триптофана перед добавлением компонентов матрицы(мкА/мВ)	Компонент	Соотношение концентрации метионина к компонентам матрицы	Ток метионина после добавления компонента матрицы	t(эксп)
0,742±0,054	FeCl ₃	1:10	0,701±0,052	2,06
	TiO ₂	1:10	0,722±0,041	1,95
	Al ₂ O ₃	1:100	0,715±0,053	1,65

	Крахмал	1:1	0,781±0,063	1,79
	L-изолейцин	1:1	0,742±0,085	1,85
	L-лейцин	1:1	0,735±0,049	1,42
	L-лизина ацетат	1:1	0,726±0,059	1,76
	L- фенилаланин	1:1	0,778±0,052	1,83
	L-треонин	1:1	0,782±0,039	1,59
	L-метиони	1:1	0,758±0,048	1,68
	L-валин	1:1	0,746±0,084	1,65
	L-аргинин	1:1	0,738±0,069	1,89
	L-гистидин	1:1	0,782±0,057	1,92
	L-аланин	1:1	0,749±0,050	2,16
	Глицин	1:1	0,784±0,058	1,84
	L-пролин	1:1	0,771±0,054	1,65
	L-серин	1:1	0,748±0,075	1,76
	L-тирозин	1:1	0,762±0,043	1,82
	Таурин	1:1	0,774±0,052	1,65

Определению триптофана и 5-гидрокситриптофана не мешают присутствующие основные компоненты лекарственных средств и биологически-активных добавок, такие как TiO_2 , Al_2O_3 , картофельный крахмал, стероидная кислота, метилцеллюлоза, L-изолейцин; L-лейцин; L-лизина ацетат; L-фенилаланин; L-треонин; L-метионин; L-валин; L-аргинин; L-гистидин; L-аланин; глицин; L-пролин; L-серин; L-тирозин; таурин

4.4 Разработка методики определения триптофана и 5 - гидрокситриптофана в лекарственных препаратах и биологически активных добавках.

Для проведения анализа определения триптофана и 5-гидрокситриптофана необходимо следовать определенному алгоритму пробоподготовки: точную

навеску образца, содержащего триптофан и/или 5-гидрокситриптофан растворяют в бидистиллированной воде, фильтруют полученный раствор и добавляют аликвоту в буферный раствор с заданным pH-значением.

Следующим шагом является анализ полученного раствора методом анодной вольтамперометрии. Для этого аликвоту добавляют в электрохимическую ячейку, содержащую буферный раствор, и проводят анализ при заданных параметрах: скорость развертки, потенциал и время анализа.

Исследование триптофана и 5-гидрокситриптофана в лекарственных препаратах и биологически активных добавках является важным этапом в оценке их качества и безопасности. Для проведения анализа необходимо не более 20 минут, что делает этот метод быстрым и эффективным. Результаты испытаний, проведенных на различных образцах, содержатся в таблице 6. Данные результаты позволяют сделать выводы о содержании и качестве указанных веществ в исследуемых образцах, что имеет важное значение для дальнейшей оценки их потенциального воздействия на организм человека.

Таблица 6. Результаты одновременного определения содержания триптофана и 5 - гидрокситриптофана в образце методом «введено-найдено».

№ образца	Содержание в образце Трп, мг/кг	Введено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Δ , мг/кг	R, %
1	1,00	1,0	1,98±0,73	0,98	98
2	1,30	1,0	2,35±0,49	1,05	105
3	1,22	1,0	2,30±0,85	1,08	108

№ образца	Содержание в образце 5-ГТрп, мг/кг	Введено, мг/кг	Найдено, мг/кг	Δ , мг/кг	R, %
1	1,23	1,0	2,28 $\pm$ 0,50	1,05	105
2	1,31	1,0	2,29 $\pm$ 0,51	0,98	98
3	1,45	1,0	2,45 $\pm$ 0,45	1,00	100

В таблице 7 и 8 представлены результаты определения триптофана и 5 - гидрокситриптофана лекарственных препаратах и БАДах методами инверсионной вольтамперометрии и ВЭЖХ. ВЭЖХ проводили согласно ГОСТ 32195-2013.

Таблица 7. Результаты определения триптофана в лекарственных средствах и БАДах методами ВЭЖХ и инверсионной вольтамперометрии (ИВА) (n = 5; P = 0,95)

Препарат	Номинальное содержание, мг триптофана в 1 табл.	Содержание триптофана, мг/табл.		t(эксп)
		ВЭЖХ	ИВА	
Формула №4	180	183 $\pm$ 68	179 $\pm$ 66	1,98
Альфамаинд	1,6	1,5 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,6	2,03
Брейнджайзер	3,2	3,4 $\pm$ 1,2	3,1 $\pm$ 1,1	2,31

Таблица 8. Результаты определения триптофана в лекарственных средствах и БАДах методами ВЭЖХ и инверсионной вольтамперометрии (n = 5; P = 0,95)

Препарат	Номинальное содержание 5-гидрокситриптофана в 1 табл.	Содержание 5-гидрокситриптофана, мг/табл.		t(эксп)
		ВЭЖХ	ИВА	
НВ-2	40	41±14	42±16	2,32
Кинетоп	101	102±38	104±38	2,12
Ревитол стрессаут	50	50±19	52±20	2,01

Экспериментальные значения t-критерия меньше табличного $t_{0,05,4}$, что позволяет сделать вывод о сходимости результатов, полученных разными методами. Данный метод можно рекомендовать к апробации на физиологических жидкостях человека и животных.

4.5 Метрологические характеристики определения метионина на модифицированном электроде

В таблице 9 приведены результаты определения метионина при различных концентрациях.

Таблица 9. Зависимость высоты аналитического сигнала метионина от концентрации

№	$C \times 10^{-7}$, моль/дм ³	I_1 мкА	I_2 мкА	I_3 мкА	I_{cp} мкА	$\Sigma(I_i - I_{cp})^2$
1	1	0,016	0,043	0,023	0,027	0,0004
2	5	0,102	0,142	0,138	0,127	0,0009
3	10	0,238	0,234	0,294	0,255	0,0022
4	15	0,384	0,364	0,343	0,363	0,0008
5	20	0,434	0,493	0,511	0,479	0,0032

6	25	0,579	0,592	0,6	0,590	0,0002
7	30	0,715	0,758	0,759	0,744	0,0012
8	35	0,826	0,843	0,825	0,831	0,0002
9	40	0,948	0,981	0,998	0,976	0,0013
10	45	1,015	1,101	1,116	1,077	0,0059
11	50	1,176	1,211	1,229	1,205	0,0014
						0,0181

Провели расчет дисперсии воспроизводимости:

$$S_{\text{вос}}^2 = \frac{\sum (I_i - I_{\text{cp}})^2}{N(n - 1)} = \frac{0,0032}{11(3 - 1)} = 0,0082$$

где N – число экспериментальных точек;

n – число параллельных определений;

Провели оценку адекватности модели (таблица 10), основываясь на данных, представленных в таблице 10, где I^* – значения токов, вычисленные по уравнению регрессии $I^* = 0,0243c + 0,0032$.

Таблица 10. Зависимость высоты тока электроокисления метионина от его концентрации в растворе по уравнению регрессии

№	$C \times 10^{-7}$, моль/дм ³	I_{cp} мкА	I^* , мкА	$(I_{\text{cp}} - I^*)$, мкА	$(I_{\text{cp}} - I^*)^2$, мкА
1	1	0,0273	0,0275	0,0002	$2,8 \times 10^{-8}$
2	5	0,1273	0,1247	-0,003	$6,9 \times 10^{-6}$
3	10	0,2553	0,2462	-0,009	$8,3 \times 10^{-5}$
4	15	0,3637	0,3677	0,004	$1,6 \times 10^{-5}$
5	20	0,4793	0,4892	0,0099	$9,7 \times 10^{-5}$

6	25	0,5903	0,6107	0,0204	0,0004
7	30	0,744	0,7322	-0,012	0,0001
8	35	0,8313	0,8537	0,0224	0,0005
9	40	0,9757	0,9752	-5E-04	$2,2 \times 10^{-7}$
10	45	1,0773	1,0967	0,0194	0,0004
11	50	1,2053	1,2182	0,0129	0,0002
				$\Sigma(I_{cp}-I^*)^2$	0,0018

Расчет дисперсии адекватности по формуле:

$$s_{ад}^2 = \frac{n(\Sigma I^* - I_{cp})^2}{N - k} = \frac{3 \times 0,0018}{11 - 1} = 0,00054$$

где n – число параллельных опытов;

N – число экспериментальных точек;

k – число независимых переменных;

Провели расчет экспериментальное значение критерия Фишера:

$$F = \frac{S_{ад}^2}{S_{вос}^2} = \frac{0,00054}{0,00082} = 0,66$$

Находим табличное значение критерия Фишера для числа степеней свободы (1-P) = (1 – 0,95) = 0,05 и числа степеней свобод:

$$f_1 = n - k = 11 - 1 = 10$$

$$f_2 = n(N-1) = 11(3-1) = 22$$

$$F_{0,05,f_1,f_2} = 2,30$$

Расчетное значение критерия Фишера меньше табличного: $0,66 < 2,30$
полученная модель описывает процесс адекватно. В соответствии с данными, представленными в таблице 10, можно сделать вывод о приемлемости результатов,

полученных с использованием данной методики. В приложении А также представлена подробная оценка метрологических характеристик методики. В таблицах 11 и 12 отражены основные показатели, которые указывают на то, что при одновременном определении триптофана и 5-гидрокситриптофана точность в диапазоне концентраций $3 (5 - 50) \times 10^{-7}$ моль/дм³ не превышает 35,5%, повторяемость составляет 3,55%, а промежуточная прецизионность - 14,05%..

Таблица 11. Метрологические характеристики методики определения метионина ($p = 0,95$, $n = 2$, $l = 15$)

$C \times 10^{-7}$, моль/дм ³	σ_r^* , %	$\sigma_{RЛ}^*$, %	$\pm \Delta^*$, %	$\pm \Delta^*$, %
1	9,31	12,75	19,03	41,42
5	15,15	16,08	12,70	37,44
10	10,57	10,82	10,62	27,75
15	7,25	9,17	13,70	30,36
20	9,80	12,89	11,54	34,81
25	10,94	11,16	7,23	24,69
30	8,42	8,59	7,75	22,85
35	7,19	7,99	9,37	23,54
40	5,96	6,39	7,09	18,07
45	4,94	5,99	6,66	16,06
50	2,62	2,81	10,85	15,66

4.6 Метрологические характеристики методики одновременного определения триптофана и 5-гидрокситриптофана методом вольтамперометрии на модифицированном МУНТ и витамином В₉ углеродсодержащем электроде

В качестве аналитического сигнала для определения триптофана и 5-гидрокситриптофана были выбраны анодные пики при потенциалах 0,4 В и 0,7 В соответственно.

Линейная зависимость тока от потенциала была получена в диапазоне от 5×10^{-7} до 50×10^{-7} моль/дм³ с соответствующими уравнениями регрессии $y = 0,0181 x - 0,0124$ ($R^2 = 0,9997$) для триптофана и $y = 0,0023 x + 0,001$ ($R^2 = 0,9973$) для 5-гидрокситриптофана. Минимальная определяемая концентрация 1×10^{-7} М для триптофана и 1×10^{-8} для 5 – гидрокситриптофана. При оценке метрологических характеристик провели оценку адекватности полученной модели для триптофана (таблица 12) и 5-гидрокситриптофана (таблица 13):

Таблица 12. Зависимость высоты тока электроокисления триптофана от его концентрации в растворе

$C \times 10^{-7}$, моль/дм ³	I_1 , мкА	I_2 , мкА	I_3 , мкА	I_{cp} , мкА	$\Sigma(I_i - I_{cp})^2$
5	0,075	0,086	0,081	0,081	6×10^{-5}
10	0,134	0,172	0,209	0,172	0,0028
15	0,243	0,254	0,279	0,259	0,0007
20	0,311	0,344	0,378	0,344	0,0022
25	0,421	0,431	0,499	0,450	0,0036
30	0,511	0,545	0,598	0,551	0,0038
35	0,608	0,633	0,683	0,641	0,0029
40	0,632	0,688	0,945	0,755	0,0557
45	0,726	0,798	0,784	0,769	0,0029
50	0,901	0,911	0,912	0,908	7×10^{-5}
					0,0748

Таблица 13. Зависимость высоты тока электроокисления 5-гидрокситриптофана от его концентрации в растворе

$C \times 10^{-7}$, моль/дм ³	I_1 , мкА	I_2 , мкА	I_3 , мкА	I_{cp} , мкА	$\Sigma(I_i - I_{cp})^2$
5	0,015	0,012	0,011	0,0127	9×10^{-6}
10	0,02	0,024	0,021	0,0217	9×10^{-6}
15	0,03	0,032	0,039	0,0337	4×10^{-5}
20	0,041	0,046	0,048	0,045	3×10^{-5}
25	0,051	0,059	0,061	0,057	6×10^{-5}

30	0,068	0,071	0,078	0,0723	5×10^{-5}
35	0,076	0,083	0,088	0,0823	7×10^{-5}
40	0,091	0,092	0,097	0,0933	2×10^{-5}
45	0,101	0,102	0,109	0,104	4×10^{-5}
50	0,11	0,112	0,119	0,1137	4×10^{-5}
					0,00037

Рассчитали дисперсию воспроизводимости представленной модели:

$$S_{\text{вос}}^2 = \frac{\Sigma(I_i - I_{\text{cp}})^2}{N(n-1)} = \frac{0,0748}{10(3-1)} = 0,0037; \text{ для триптофана}$$

$$S_{\text{вос}}^2 = \frac{\Sigma(I_i - I_{\text{cp}})^2}{N(n-1)} = \frac{0,00037}{10(3-1)} = 2 \times 10^{-5}; \text{ для 5-гидрокситриптофана}$$

где N – число экспериментальных точек;

n – число параллельных определений;

Оценили адекватность модели, где I^* – значения токов, вычисленные по уравнениям регрессии для триптофана и 5-гидрокситриптофана соответственно

$$I^* = 0,0181 x - 0,0124; 0,0023 x + 0,001.$$

Таблица 14. Зависимость высоты тока аналитического сигнала триптофана от его концентрации в растворе по уравнению регрессии

$C \times 10^{-7};$ моль/дм ³	$I_{\text{cp}}, \text{мкА}$	$I^*, \text{мкА}$	$I^* - I_{\text{cp}}, \text{мкА}$	$(I^* - I_{\text{cp}})^2, \text{мкА}$
5	0,081	0,078	-0,003	7×10^{-6}
10	0,172	0,167	-0,003	9×10^{-6}
15	0,259	0,259	0,0004	2×10^{-7}
20	0,344	0,350	0,0053	3×10^{-5}
25	0,450	0,440	-0,01	0,0001
30	0,551	0,531	-0,021	0,0004
35	0,641	0,621	-0,02	0,0004
40	0,755	0,712	-0,043	0,0019
45	0,769	0,802	0,0328	0,0011
50	0,908	0,893	-0,015	0,0002
				0,0042

Таблица 15. Зависимость высоты тока аналитического сигнала т 5-гидрокситриптофана от его концентрации в растворе по уравнению регрессии

$C \times 10^{-7}$, моль/дм ³	I_{cp} , мкА	I^* , мкА	$I^* - I_{cp}$, мкА	$(I^* - I_{cp})^2$
5	0,0127	0,0125	-0,0002	4×10^{-8}
10	0,0217	0,024	0,0023	5×10^{-6}
15	0,0337	0,0355	0,0018	3×10^{-6}
20	0,045	0,047	0,002	4×10^{-6}
25	0,057	0,0585	0,0015	2×10^{-6}
30	0,0723	0,07	-0,002	5×10^{-6}
35	0,0823	0,0815	-0,0008	7×10^{-7}
40	0,0933	0,093	-0,0003	1×10^{-7}
45	0,104	0,1045	0,0005	3×10^{-7}
50	0,1137	0,116	0,0023	5×10^{-6}
				3×10^{-5}

Провели расчет дисперсии адекватности:

$$s_{ад}^2 = \frac{n(\Sigma I^* - I_{cp})^2}{N-k} = \frac{3 \times 0,0042}{10-1} = 0,0014; \text{ для триптофана}$$

$$s_{ад}^2 = \frac{n(\Sigma I^* - I_{cp})^2}{N-k} = \frac{3 \times 3 \times 10^{-5}}{10-1} = 9 \times 10^{-6}; \text{ для 5-гидрокситриптофана}$$

где n – число параллельных опытов ;

N – число экспериментальных точек;

k – число независимых переменных;

Далее находим экспериментальное значение критерия Фишера:

$$F = \frac{s_{ад}^2}{s_{вос}^2} = \frac{0,0014}{0,0037} = 0,37; \text{ для триптофана};$$

$$F = \frac{s_{ад}^2}{s_{вос}^2} = \frac{9 \times 10^{-6}}{2 \times 10^{-5}} = 0,48; \text{ для 5-гидрокситриптофана};$$

Находим табличное значение критерия Фишера для числа степеней свободы (1-P) = (1 – 0,95) = 0,05 и числа степеней свобод:

$$f_1 = n - k = 10 - 1 = 9$$

$$f_2 = n(N-1) = 10(3-1) = 20$$

$$F_{0,05,f1,f2} = 2,39$$

Расчетные значения критерия Фишера: $0,37 < 2,39$ и $0,48 < 2,39$. Представленные значения меньше табличных. Полученная модель описывает процесс адекватно.

Метрологические характеристики методики, представленные в таблицах 16 и 17, позволяют сделать вывод о ее высокой точности и повторяемости. Особенно важно отметить, что при одновременном определении триптофана и 5-гидрокситриптофана показатель точности в диапазоне концентраций от $0,5$ до 50×10^{-7} моль/дм³ не превышает 35,5%. Это говорит о том, что методика является надежным инструментом для определения данных веществ. Кроме того, показатель повторяемости составляет всего 3,55%, что свидетельствует о стабильности и воспроизводимости результатов. Промежуточная прецизионность, равная 14,05%, также подтверждает достоверность методики. В целом, проведенные исследования подтверждают удовлетворительность получаемых результатов по предлагаемой методике. Данные метрологические характеристики говорят о том, что методика является надежным и точным инструментом для определения концентрации триптофана и 5-гидрокситриптофана.

Таблица 16. – Метрологические характеристики методики определения триптофана ($p = 0,95$, $n = 2$, $l = 15$)

$C \times 10^{-7}$, моль/дм ³	σ_r^* , %	σ_{RL}^* , %	$\pm \Delta^*_{с}$, %	$\pm \Delta^*$, %
5	7,68	7,88	12,05	25,48
10	4,51	7,32	10,94	23,56
15	4,55	6,84	10,91	22,72
20	4,39	5,41	12,10	20,77
25	4,75	4,68	8,65	16,53
30	6,01	5,76	7,94	17,77
35	4,38	4,67	7,96	15,50

40	5,65	5,62	8,00	16,79
45	5,64	5,63	7,87	16,36
50	7,19	8,06	6,84	20,57

Таблица 17. Метрологические характеристики методики определения 5-гидрокситриптофана ($p = 0,95$, $n = 2$, $l = 15$)

$C \times 10^{-7}$, моль/дм ³	σ_r^* , %	$\sigma_{RЛ}^*$, %	$\pm \Delta_c^*$, %	$\pm \Delta^*$, %
5	12,25	13,83	9,55	33,79
10	6,10	11,57	10,26	31,56
15	5,13	10,21	9,58	27,39
20	8,47	10,16	7,96	25,98
25	7,30	8,52	11,40	23,72
30	7,58	8,01	4,21	16,63
35	5,97	6,82	5,55	15,42
40	5,33	5,37	3,99	14,33
45	2,02	2,30	9,95	13,84
50	3,43	3,91	4,25	11,33

ВЫВОДЫ

1. Исследован процесс модификации поверхности углеродсодержащего электрода многостенными углеродными нанотрубками. Выбраны рабочие условия, позволяющие увеличить электроактивную поверхность электрода на порядок, по сравнению с немодифицированным электродом. Для закрепления на поверхности нанотубок витаминов В₁₂ и В₉ предложено использовать циклическую вольтамперометрию.
2. Исследованы физико-химические закономерности, а также возможный механизм электроокисления метионина: при катодной поляризации кобальт(III) в кобаламине восстанавливается до кобальта (II), к которому за счет электростатических взаимодействий присоединяется частично отрицательно заряженный атом серы в молекуле метионина; при анодной поляризации кобальт(II) в комплексе окисляется до Co^{3+} , метильная группа с метионина переносится на кобаламин, при этом в раствор переходит гомоцистеин. Процесс окисления необратим, лимитирующей стадией является адсорбция, а в электрохимической стадии участвует один протон и один электрон.
3. Выбраны рабочие условия вольтамперометрического определения метионина на электроде, модифицированном МУНТ и пленкой витамина В₁₂: фоновый электролит – тартратный буферный раствор pH=4,01; потенциал электролиза -1,6 В; время накопления – до 180 с, режим регистрации – дифференциально-импульсный, амплитуда волны 15 мВ, задержка измерения 7 мс, шаг развертки 10 мВ. Диапазон определяемых содержаний – $(1-50) \times 10^{-7}$ М; предел обнаружения составляет $5,0 \times 10^{-8}$ М.
4. Исследованы физико-химические закономерности электроокисления триптофана и 5-гидрокситриптофана на электроде, модифицированном МУНТ и полифоллиевой кислотой: окисление триптофана и 5-гидрокситриптофана происходит при участии двух электронов и двух протонов, лимитирует электрохимическую реакцию процесс переноса первого электрона, процесс контролируется диффузией и адсорбцией. Коэффициенты диффузии равны $9,7 \cdot 10^{-6}$ см²/с и $7,4 \cdot 10^{-6}$ см²/с для триптофана и 5-гидрокситриптофана, величина предельной

адсорбции для триптофана составила $1,63 \cdot 10^{-10}$ моль/см², а для 5-гидрокситриптофана – $6,41 \cdot 10^{-11}$ моль/см².

5. Оптимизированы условия вольтамперометрического определения триптофана и 5-гидрокситриптофана при совместном присутствии в анализе на электроде, модифицированом МУНТ и пленкой витамина В₉: рН 6,8; потенциал накопления – 0,1 В, время электролиза до 120 с, оптимальная скорость развертки 120 мВ/с. Нижняя граница определяемых концентраций составила $5 \cdot 10^{-8}$ М.

6. Провели оценку отдельных метрологических показателей методик определения метионина, триптофана и 5-гидрокситриптофана, а также апробировали методики на лекарственных препаратах и биологически активных добавках. Использован метод "введено-найдено" и сравнили результаты, полученные по нашей методике и методом ВЭЖХ. Результаты показали удовлетворительную сходимость, что позволяет рекомендовать разработанные методики для определения метионина, триптофана и 5-гидрокситриптофана в лекарственных средствах и биологически активных добавках.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

Тгр, Трп – Триптофан;

5-ГТрп, 5-НТр – 5 –гидрокситриптофан;

Мет, Met – Метионин;

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография;

ВЭЖХ с УФ – Высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектором;

ГХ с МС – Газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором;

БАД – Биологически активная добавка;

КЭ – Капиллярный электрофорез;

ОФА – ортофталевый ангидрид;

ФИТЦ – Фенилизоцианат;

АХК - 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидилкарбамат;

ДАБС - (диметиламино)азобензолсульфонилхлорид;

ФМФ - 9- фторенилметилхлорформиат;

КЗЭ – Капиллярно-зонный электрофорез;

МЭКХ - Мицеллярная электрокинетическая хроматография;

ЦД – Циклодекстрины;

S-ЦД – Сульфатированные циклодекстрины;

HS-ЦД – Высокосульфатированные циклодекстрины;

НБД - Фтор-4-нитробензо-2-окса1,3-диазол;

БМЧ – Биметаллические наночастицы;

HR-ТЕМ - Просвечивающая электронная микроскопия высокого разрешения;

XRD – Рентгеновская дифракция;

AFM – Атомно-силовая микроскопия;

XPS - Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия;

CV – Циклическая вольтамперометрия;

LSV - Линейная вольтамперометрия;

ПАФ – Полиариленфталид;

РПЭ – Ртутно-пленочный электрод;

ХСЭ – Хлорид-серебряный электрод;
QD – Квантовые точки;
Арг – Аргинин;
Ала – Аланин;
Цис – Цистеин;
5-НТ – Серотонин;
5-HIAA – 5-гидроксииндолуксусная кислота;
RGO – Восстановленный оксид графена;
EDS – Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия;
AuNP – Золотые наночастицы;
GCE – Стеклоуглеродный электрод;
AA – Аскорбиновая кислота;
DA – Дофамин;
UA – Уриновая кислота;
ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота;
РНК – Рибонуклеиновая кислота;
DPV – Дифференциально-импульсная вольтамперометрия;
PEDOT - 3,4-этилендиокситиофен;
PSS – Полистиролсульфонат;
SDS – Додecilсульфат;
FT-IR – Ик-спектроскопия с преобразованием Фурье;
CNT – Углеродные нанотрубки
МУНТ – Многостенные углеродные нанотрубки;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Якубке Х.Д. Аминокислоты, пептиды, белки // М.: Мир, 1985. – 75с.
2. Imura K., Okada A. Amino acid metabolism in pediatric patients // Nutrition. - 1998. - V. 14, № 1. - P. 143-148.
3. Brown-Borg H. M., Rakoczy S., Wonderlich J. A., Borg K. E., Rojanathammanee L. Metabolic adaptation of short-living growth hormone transgenic mice to methionine restriction and supplementation // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2018. -V.1418, № 1. – P.118-136.
4. Fernstrom, J. D. Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain // Physiological Reviews, - 1983. - V.63, №2. – P. 484–546.
5. J. Yi, Mistretta B., Elsea S., Sin Q. Simultaneous determination of plasma total homocysteine and methionine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Clin. Chim. Acta, -2017, - V.464. P. 93-97.
6. Yoshihiko S., Hasegawa H., Kazunori T., Takao H. Simultaneous determination of methionine and total homocysteine in human plasma by gas chromatography–mass spectrometry // J. Chromatogr. B – 2001, - V.758, №1. P. 283-288.
7. Person de M., Aurelie H., Elfakir C. Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry assay for taurine and methionine in matrices rich in carbohydrates // J. Chromatogr. A – 2005, - V. 1081, № 2. P. 174-181.
8. Hellmuth C., Koletzko B., Peissner W. Aqueous normal phase chromatography improves quantification and qualification of homocysteine, cysteine and methionine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B – 2011, - V.879. P. 83-89.
9. Baxter.J. H., Lai C., Phillips R., Dowlati L., Chio J. J. Direct determination of methionine sulfoxide in milk proteins by enzyme hydrolysis/high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A – 2007, - V. 1157. P.10-16.
10. ГОСТ 32195-2013. Корма, комбикорма. Метод определения содержания аминокислот. // М.: Стандартинформ, 2016.

11. Chen Y., Yang M., Zheng F. Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantitative profiling of tryptophan metabolites in human plasma and its application to clinical study // J. Chromatogr. B – 2019, - V. 1128. 121745.
12. Dario M. F., Freire B. T., Velasco M. V. Tryptophan and kynurenine determination in human hair by liquid chromatography // J. Chromatogr. B – 2017, - V. 1065-1066. P.59-62.
13. Yilmaz C., Gökmen V. Determination of tryptophan derivatives in kynurenine pathway in fermented foods using liquid chromatography tandem mass spectrometry // Food Chemistry – 2018, - V.243, P.420-427.
14. Yust M. M., Pedroche J., Giron-Cale J., Vioque J. Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection // Food Chemistry – 2004, - V.85, P.317-320.
15. Shin J.S., Parka N. H., Leea W., Choi M. H., Chung B. C., Hong J. Metabolic profiling of tyrosine, tryptophan, and glutamate in human urine using gas chromatography–tandem mass spectrometry combined with single SPE cleanup // J. Chromatogr. B – 2017, - V. 1051. P.97-107.
16. Фармакопейная статья 1.2.1.0022.15 Капиллярный электрофорез. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.
17. Boule L., Faure P., Flore P., Monteremal J., Ducros V. Simultaneous determination of tryptophan and 8 metabolites in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B – 2017, - V. 1054. P.36-43.
18. Шпак А.В., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Определение аминокислот методом капиллярного электрофореза без предварительной дериватизации // Журн. аналит. хим. – 2003, - Т.58, № 7. С. 729а-730.
19. Ravindran G.M., Bryden W.L. Tryptophan determination in proteins and feedstuffs by ion exchange chromatography / G. Ravindran, // Food Chemistry – 2005, - V.89, P.309-314.
20. Zinellu A., Sotgia S. e, Usai M. F., Zinellu E. Plasma methionine determination by capillary electrophoresis–UV assay: Application on patients a Vected by retinal venous occlusive disease // Anal. Biochem. – 2007, - V.363, №1. P. 91-96

21. Altria K.D., Harkin E, Hindson M.G. Quantitative determination of tryptophan enantiomers by capillary electrophoresis // J. Chromatogr., Biomed. Appl. – 1996, - V.686. P. 103-110.
22. Мальцева А.А., Коренская И. М., Шевцова А. Ю., Чистякова А.С., Сливкин А.И., Каракозова С. А. Анализ аминокислотного и элементного состава листьев малины обыкновенной, заготовленных в воронежской области // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2017, № 3. С. 100-105.
23. Алексеева А. В., Карцова Л. А. Возможности лигандообменного капиллярного электрофореза при определении биологически активных веществ, // Журн. аналит. хим. – 2011, - Т.66, № 7. С. 764-772.
24. Колобова Е. А., Карцова Л. А., Бессонова Е. А. Применение ионных жидкостей на основе имидазола при электрофоретическом определении аминокислот в моче. // Журн. аналит. хим. – 2015, - Т.70, № 11. С. 1179–1185.
25. Belin K.G., Gärtner, S. S. Rapid analysis and sensitive detection of dl-tryptophan by using shorter capillary column coupled with deep-UV fluorescence detector // J. Chromatogr. B – 2009, - V. 877, №29. P. 3753-3756.
26. Malone M.A. Determination of tryptophan and kynurenine in brain microdialysis samples by capillary electrophoresis with electrochemical detection. // J. Chromatogr. A – 1995, - V. 700. P. 73-80
27. Zuman P. Reactions of Orthophthalaldehyde with Nucleophiles // Chem. Rev. – 2004, - V. 104, № 7. P. 3217
28. Захарова А.М., Гринштейн И.Л. Определение аминокислот в сухом экстракте мозга коров, пробах мяса телят и кур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы – 2012, - Т. 12. С. 845-853.
29. Фармакопейная статья 2.2.56. Анализ аминокислот. Европейская фармакопея 7.0. Т. 1; 2010.
30. Murugavelu M., Karthikeyan B. Synthesis, characterization of Ag-Au core-shell bimetal nanoparticles and its application for electrocatalytic oxidation/sensing of l-methionine // J. Mater. Sci. Eng. B – 2017, - Vol. 70, №1. P. 656-664

31. Molaakbari E., Mostafavi A., Beitollahi H. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, melatonin, methionine and caffeine // *Sens. Actuators, B* – 2015, - Vol. 208. P. 195-203
32. Шайдарова Л.Г., Зиганшина С.А., Тихонова Л.Н., Будников Г.К. Электрокаталитическое окисление и проточно-инжекционное определение серосодержащих аминокислот на графитовых электродах, модифицированных пленкой из гесацианаферрата рутения // *Журн. аналит. хим.* – 2003, - Т.58, № 12. С. 1277–1284.
33. Патент RU 2554280 C1 Российская Федерация, МПК G01N27/48, Способ определения метионина в комбикормах методом катодной вольтамперометрии / Е.В. Дорожко, Е. И. Короткова, Е.В. Плотников, Е.В. Булычева; заявитель и патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет". – опубл. 27.06.2015, Бюл. №18. – 6 с
- 34 Патент RU 2586961 C1 Российская Федерация, МПК G01N27/48, Способ определения метионина в модельных водных растворах методом циклической вольтамперометрии на графитовом электроде, модифицированным коллоидными частицами золота/ Д.О. Перевезенцева, Э. В. Горчаков, К. В. Скирдин, А.В. Коршунов; заявитель и патентообладатель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет". – опубл. 10.06.2016, Бюл. №16. – 7 с
35. Prasad B. B., Pandey I., Srivastava A., Deepak K., Mahavir P. T. Multiwalled carbon nanotubes-based pencil graphite electrode modified with an electrosynthesized molecularly imprinted nanofilm for electrochemical sensing of methionine enantiomers // *Sens. Actuators, B* – 2013, - Vol. 176. P. 863-874.
36. Yanxin L., Shuyu M., Sumin L., Xu H. A photoelectrochemical sensing strategy based on single-layer MoS₂ modified electrode for methionine detection // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2019, - Vol. 165. P. 94-100.

37. Hooshmand S., Es'haghi Z. Simultaneous quantification of arginine, alanine, methionine and cysteine amino acids in supplements using a novel bioelectro-nanosensor based on CdSe quantum dot/modified carbon nanotube hollow fiber pencil graphite electrode via Taguchi method // J. Pharm. Biomed. Anal – 2017, - Vol. 146. P. 226-235.
38. Ali A.Ensafi, R.Hajian. Determination of tryptophan and histidine by adsorptive cathodic stripping voltammetry using H-point standard addition method // Anal. Chim. Acta – 2006, - Vol. 580, № 2. P. 236-243.
39. Grazia De Simoni M., Sokola A., Giuseppe F. F., Dal Toso S. A. Functional meaning of tryptophan-induced increase of 5-HT metabolism as clarified by in vivo voltammetry // Brain Res. J., - 1987, - Vol. 411, №1. P. 89-94.
40. Xue N., Rui Zh., Zheng T., Haiyan W., Peihong D., Yougen T. Sensitive and selective determination of tryptophan using a glassy carbon electrode modified with nano-CeO₂/reduced graphene oxide composite // Microchem. J., - 2020, Vol. 159. P.105367
41. Nazarpoura S., Hajian R., Hosseini M. S. A novel nanocomposite electrochemical sensor based on green synthesis of reduced graphene oxide/gold nanoparticles modified screen printed electrode for determination of tryptophan using response surface methodology approach // Microchem. J., - 2020, Vol. 154. P.104634
42. Wonga A. A., Rafaelda M. S., Fernando C.V. Simultaneous determination of direct yellow 50, tryptophan, carbendazim, and caffeine in environmental and biological fluid samples using graphite pencil electrode modified with palladium nanoparticles // Talanta – 2021, Vol. 222. P.121539.
43. Sadoka I., Tyszczyk-Rotko K., Mroczka R., Staniszevska M. Simultaneous voltammetric analysis of tryptophan and kynurenine in culture medium from human cancer cells // Talanta – 2020, Vol. 209. P.120574.
44. Worapot P., Ibrar A., Piyapong A. Hydroxyapatite/Graphene oxide composite for electrochemical detection of L-Tryptophan // J. Taiwan Inst. Chem. Eng. – 2019, Vol. 102. P. 415-423.
45. Mattioli I. A., Baccarin Mro, Cervini P., Cavaleiro Éder T.G. Electrochemical investigation of a graphite-polyurethane composite electrode modified with

- electrodeposited gold nanoparticles in the voltammetric determination of tryptophan // J. Electroanal. Chem. – 2019, Vol. 835. P. 212-219.
46. Arroquia A., Acosta I., Pilar García A. M. Self-assembled gold decorated polydopamine nanospheres as electrochemical sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan // Mater. Sci. Eng.: C – 2020, Vol. 109. P. 110602.
47. Nazmaryam S., Shohreh J., Maryam K., Mohammad M., Foroughi H., Hassani N. Zeolitic imidazolate frameworks and cobalt-tannic acid nanocomposite modified carbon paste electrode for simultaneous determination of dopamine, uric acid, acetaminophen and tryptophan: Investigation of kinetic parameters of surface electrode and its analytical performance // J. Electroanal. Chem. – 2020, Vol. 863. P. 114045.
48. Taleb M., Ivanov R., Bereznev S., Kazemi S. H., Hussainova I. Alumina/graphene/Cu hybrids as highly selective sensor for simultaneous determination of epinephrine, acetaminophen and tryptophan in human urine // J. Electroanal. Chem. – 2018, Vol. 823. P. 184 - 192.
49. Karabozhikova V., Tsakova V., Lete C., Marin M., Lupu S. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified electrodes for tryptophan voltammetric sensing // J. Electroanal. Chem. – 2019, Vol. 848. P. 113309.
50. Diculescu V. C., Enache T. A. Voltammetric and mass spectrometry investigation of methionine oxidation // J. Electroanal. Chem. – 2019, Vol. 834. P. 124-129.
51. М. Су, М. Ма, Ё. Ма Электрохимическое определение триптофана с помощью угольного пастового электрода, модифицированного наночастицами диоксида кремния // Электрохимия - 2012, Том 48, № 5, С. 538–543
52. Nurudeen A. O., Abdel-Nasser K., Mohamed I. In-situ single-step electrochemical AgO modified graphite pencil electrode for trace determination of DL-methionine in human serum sample // Sens. Actuators, B – 2019, - Vol. 281. P. 765-773.
53. Enache T.A., Oliveira-Brett A.M. Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine // Bioelectrochemistry – 2011, - Vol.81, № 1. P. 46-52.

54. Agü' L., Manso J., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J.M. Colloidal-gold cysteamine-modified carbon paste electrodes as suitable electrode materials for the electrochemical determination of sulphur-containing compounds. Application to the determination of methionine // *Talanta* – 2004, - Vol. 64. P. 1041-1047.
55. Chekina F., Bagheri S., Bee S., Hamid A. Synthesis of Pt doped TiO₂ nanoparticles: Characterization and application for electrocatalytic oxidation of l-methionine // *Sens. Actuators, B* – 2013, - Vol. 177. P. 898-903.
56. Prasad B.B., Srivastava A., Pandey I., Tiwari M.P. Electrochemically grown imprinted polybenzidine nanofilm on multiwalled carbon nanotubes anchored pencil graphite fibers for enantioselective micro-solid phase extraction coupled with ultratrace sensing of d- and l-methionine // *J. Chromatogr. B* – 2013, - Vol.912. P. 65-74.
57. Jeevagan A. J., Abraham S. J. Electrochemical determination of L-methionine using the electropolymerized film of non-peripheral amine substituted Cu (II) phthalocyanine on glassy carbon electrode // *Bioelectrochemistry* – 2012, - Vol. 85, P.50-55.
58. Dehdashtian S., Shamsipur M., Gholivand M. B. Fabrication of a novel electrochemical sensor based on an electrosynthesized indolyldihydroxyquinone as a bio-based modifier for sensitive and selective direct electrochemical determination of tryptophan // *J. Electroanal. Chem.* – 2016, Vol. 780. P. 119-125.
59. Yi Z., Waterhousea Geoffrey I.N., Zhi-peng X., Jing C., Chong C., Weizheng S. A highly sensitive electrochemical sensor containing nitrogen-doped ordered mesoporous carbon (NOMC) for voltammetric determination of l-tryptophan // *Food Chem.* – 2020, Vol. 326. P.126976.
60. Junfeng H., Zhao J., Lib Z., Zhanga H., Yongde Y., Dianxue C., Guiling W. Nanoporous carbon derived from dandelion pappus as an enhanced electrode material with low cost for amperometric detection of tryptophan // *J. Electroanal. Chem.* – 2016, Vol. 818. P. 149-156.
61. Kumar N. R., Goyal N. R. Palladium nano particles decorated multi-walled carbon nanotubes modified sensor for the determination of 5-hydroxytryptophan in biological fluids // *Sens. Actuators, B* – 2017, - Vol. 239. P. 1060-1068.

62. Ranganathana D., Zamponi S., Berrettoni M., Mehdi B. L., Coxa J. A. Oxidation and flow-injection amperometric determination of 5-hydroxytryptophan at an electrode modified by electrochemically assisted deposition of a sol–gel film with templated nanoscale pores // *Talanta* – 2010, - Vol. 82. P. 1149-1155.
63. Bahmanzadeh S., Noroozifar M. Fabrication of modified carbon paste electrodes with Ni-doped Lewatit FO36 nano ion exchange resin for simultaneous determination of epinephrine, paracetamol and tryptophan // *J. Electroanal. Chem.* – 2018, Vol. 809. P. 153-162.
64. Zou J., Yu J. Nafion-stabilized black phosphorus nanosheets-maltosyl- β -cyclodextrin as a chiral sensor for tryptophan enantiomers // *Mater. Sci. Eng., C* – 2020, Vol. 112. P.110910
65. Zhua D., Baia Z., Maa H., Tana L., Panga H., Wang X. High performance simultaneous detection of β -nicotinamide adenine dinucleotide and L-tryptophan in human serum based on a novel nanocomposite of ferroferric oxide-functionalized polyoxometalates // *Sens. Actuators, B* – 2020, - Vol. 309. P. 127787.
66. Beitollahi H., Ali Taher M., Hosseini A. Fabrication of a nanostructure-based electrochemical sensor for simultaneous determination of epinephrine and tryptophan // *Measurement* – 2014, - Vol. 51. P156-163.
67. GunaVathana D. S., Thivya P., Wilson J., Cyrac Peter A. Sensitive voltammetric sensor based on silver dendrites decorated polythiophene nanocomposite: Selective determination of L-Tryptophan // *J. Mol. Struct.* – 2020, - Vol. 1205. P. 127649.
68. Mukdasai S., Poosittisak S., Ngeontae W., Srijaranai S. A highly sensitive electrochemical determination of L-tryptophan in the presence of ascorbic acid and uric acid using in situ addition of tetrabutylammonium bromide on the β -cyclodextrin incorporated multi-walled carbon nanotubes modified electrode // *Sens. Actuators, B* – 2018, - Vol. 272. P. 518-525.
69. Kang Shi-Zhao, Chen H., Li X., Mu J. Preparation of L-alanine ethyl ester modified multiwalled carbon nanotubes and their chiral discrimination between D- and L-tryptophan // *Diamond Relat. Mater.* – 2010, - Vol.19. P.1221-1224.

70. Wang F., Gong W., Wanga L., Chena Z. Selective recognition of d-tryptophan from d/l-tryptophan mixtures in the presence of Cu (II) by electropolymerized l-lysine film // *Anal. Biochem.* – 2016, - Vol. 492. P.30-33.
71. Ghoreishi S. M., Malekian M. Curve resolution on overlapped voltammograms for simultaneous determination of tryptophan and tyrosine at carbon paste electrode modified with ZnFe_2O_4 nanoparticles // *J. Electroanal. Chem.* – 2017, Vol. 805. P. 1-10.
72. Chen L., Hui-Ting L., Xiang-Ying S., Bin L. Sensitive detection of L-5-hydroxytryptophan based on molecularly imprinted polymers with graphene amplification // *Anal. Biochem.* – 2017, - Vol. 526. P.58-65.
73. Kumar J. V., Karthik R., Shen-Ming C., Marikkani S., Elangovan A., V. Muthuraj Green synthesis of a novel flower-like cerium vanadate microstructure for electrochemical detection of tryptophan in food and biological samples // *J. Colloid Interface Sci.* – 2017, - Vol. 496. P.78-86.
74. Lavanya N., Sekar C. SnO_2 - SnS_2 nanocomposite as electrocatalyst for simultaneous determination of depression biomarkers serotonin and tryptophan // *J. Electroanal. Chem.* – 2019, Vol. 840. P. 1-9.
75. Baytak A. K., Aslanoglu M. A novel sensitive method for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan using a voltammetric platform based on carbon black nanoballs // *Arabian J. Chem.* – Vol.13, №1. P. 1702-1711.
76. Xiaohong X., Zhixiang Z., Yan Z., Xiaojuan Z., Chunming W. Synthesis of Ag-MoS_2 /chitosan nanocomposite and its application for catalytic oxidation of tryptophan // *Sens. Actuators, B* – 2014, - Vol. 192. P. 42-59.
77. Yuvaraj H., Sun-Hwa Y., Yun S. H., Young-Kyu H., Electrochemical determination of tryptophan using a glassy carbon electrode modified with flower-like structured nanocomposite consisting of reduced graphene oxide and SnO_2 // *Sens. Actuators, B* – 2014, - Vol. 239. P. 1221-1230.
78. Kokulnathana T., Tse-Wei C., Shen-Ming C., Jeyaraj V.K., Subramanian S., Nagarajan E.R. Hydrothermal synthesis of silver molybdate/reduced graphene oxide hybrid composite: An efficient electrode material for the electrochemical detection of

tryptophan in food and biological samples // Composites, Part B – 2019, Vol. 165. P. 249-257.

79. Tiğ G. A. Development of electrochemical sensor for detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and l-tryptophan based on Ag nanoparticles and poly(l-arginine)-graphene oxide composite // J. Electroanal. Chem. – 2017, - Vol. 807. P. 19-28.

80. Yuanyuan X., Faqiong Z., Baizhao Z. A molecularly imprinted copolymer based electrochemical sensor for the highly sensitive detection of L-Tryptophan // Talanta – 2020, - Vol. 206. P. 120245.

81. Vitamin B₁₂ Fact Sheet for Health Professionals [Электронный ресурс]: Strengthening Knowledge and Understanding of Dietary Supplements/ National Institutes of Health. – URL: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB12-HealthProfessional/> (дата обращения: 21.09.2020).

82. "Vitamin B₁₂". Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. // Institute of Medicine 1998 Washington, DC: The National Academies Press. P. 306–356.

83. Banerjee R., Ragsdale S. W. The many faces of vitamin B₁₂: catalysis by cobalamin-dependent enzymes // Annu. Rev. Biochem. – 2003. Vol. 72. P. 209-247.

84. Takahashi-Iñiguez T., García-Hernandez E., Arreguín-Espinosa R., Flores M. E. Role of vitamin B₁₂ on methylmalonyl-CoA mutase activity // J. Zhejiang Univ., Sci., B – 2012. Vol. 13, №6. P.423-437.

85. Froese D. S., Fowler B., Baumgartner M. R. Vitamin B₁₂, folate, and the methionine remethylation cycle - biochemistry, pathways, and regulation // J. Inherited Metab. Dis. – 2018. Vol. 42, №4. P.673-685.

86. Wald N. J., Morris J. K., Blakemore C. Public health failure in the prevention of neural tube defects: time to abandon the tolerable upper intake level of folate // Public Health Reviews – 2018. Vol.39:2. P 1-11.

87. PMГ 61-2010 Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки – М. : Стандартинформ, 2013. – 62 с.

88. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. – М. : Стандартиформ, 2009. – 33 с.
89. ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике. – М. : Стандартиформ, 2009. – 50 с.
90. Jose A., Lima Jr. Using Raman spectroscopy to understand the origin of the phase transition observed in the crystalline sulfur based amino acid l-methionine // *Vib. Spectrosc.* – 2013. Vol. 65. P. 132-141.
91. Zhang Z., Wang B., Yin Y., Mo Y. Surface-enhanced Raman spectroscopy of vitamin B12 on silver particles in colloid and in atmosphere // *J. Mol. Struct.* – 2009. Vol. 927. P. 88-90.
92. Н.М. Носова, А.С. Зайцева, В.А. Арляпов., Применение метода циклической вольтамперометрии для изучения электрохимического поведения медиаторов электронного транспорта на угольно-пастовом электроде // *Известия ТулГУ. Естественные науки* – 2017, №3.
93. Nianjun Y., Qijin W., Xiaoxia W., Voltammetry of Vitamin B₁₂ on a thin self-assembled monolayer modified electrode //
94. Jose A., Lima Jr. Using Raman spectroscopy to understand the origin of the phase transition observed in the crystalline sulfur based amino acid l-methionine // *Vib. Spectrosc.* - 2013. V. 65. P. 132
95. Raimonda C., Tautvydas V., Šarūnas V., Rasa P. Electrosynthesis and characterisation of poly(folic acid) films // *Electrochimica Acta* - Volume 138, 2014, P. 62-68

Приложение А

Оценка повторяемости и воспроизводимости методики анализа

1) Оценка показателя повторяемости методики анализа:

Проводят следующие расчеты для определения показателя повторяемости. Для каждой серии рассчитывается среднее арифметическое результатов единичного анализа:

$$X_{\text{срн}} = \frac{\sum X_n}{N}; \text{ где } N - \text{число параллельных определений}$$

Затем рассчитывается выборочная дисперсия для каждой строки (серии):

$$S_l^2 = \frac{\sum (X_n - X_{\text{срн}})^2}{(N - 1)}$$

По критерию Кохрена проверяют, можно ли пренебречь разбросом между сериями. Для всех дисперсий выбирается наибольшее значение S_{max}^2 , находят сумму всех дисперсий $\sum S_l^2$. Находят расчетные значения критерия Кохрена:

$$G_{\text{расч}} = \frac{S_{\text{max}}^2}{\sum S_l^2}$$

Сравнивают расчетное значение с табличным значением критерия Кохрена для числа степеней свободы $v=N-1$ и $f=1$ (1 - количество дисперсий, участвующих в расчетах) для $P=0,95$. Если $G_{\text{расч}} > G_{\text{табл}}$, то соответствующее значение S_{max}^2 исключают из дальнейших расчетов и процедуру повторяют до следующего по значению S_{max}^2 и т.д. до тех пор, пока $G_{\text{расч}}$ не станет меньше или равно $G_{\text{табл}}$. Неисключенные из расчетов S_l^2 считают однородными и по ним оценивают СКО, по которым можно установить одно значение показателя повторяемости для результатов, полученных по методике в конкретной лаборатории:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum S_l^2}{L'}}$$

где L' - количество серий, которое осталось после проверки серий на однородность. Это значение СКО повторяемости $\sigma_r^* = S_r$ есть первая, полученная в лаборатории характеристика.

2) Оценка показателя внутрилабораторной прецизионности.

Проводят расчет для оценивания второй характеристики, то есть для показателя внутрилабораторной прецизионности. Для этого рассчитывают общее среднее арифметическое значение по сериям:

$$X = \frac{\sum X_l}{L}$$

Рассчитывают СКО в условиях промежуточной прецизионности:

$$S_{RI} = \sqrt{\frac{\sum (X_{l,n} - X_1)^2}{L - 1}}$$

$\sigma_R^* = S_{RI}$ есть значение показателя промежуточной прецизионности результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности.

3) Оценка систематической погрешности

Проводят оценивание систематической погрешности лаборатории при реализации методики. Для этого рассчитывают Θ – разность общего среднего значения в лаборатории и аттестованного значения образца (аттестованный раствор).

$$\Theta = X - C$$

Далее проверяют его значимость по критерию Стьюдента. Для этого рассчитывают $t_{\text{расч.}}$ и сравнивают $t_{\text{расч.}}$ с $t_{\text{табл.}}$

$$t_{\text{расч.}} = \frac{|\Theta|}{\sqrt{\frac{S_{RI}^2}{L} + \frac{A_0^2}{3}}}$$

$\frac{S_{RI}^2}{L}$ – дисперсия общего среднего результата;

A_0 – погрешность аттестованного значения раствора;

Полученное значение $t_{\text{расч.}}$ сравнивают с $t_{\text{табл.}}$ при числе степеней свободы $f = L - 1$ для доверительной вероятности $P = 0,95$. Если $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$ значит систематическая погрешность Θ не значима на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимают равной нулю и оценку систематической погрешности проводят по формуле:

$$\Delta_{B,C}^* = \Delta_{H,C}^* = |\Delta_C^*| = 1,96 \sqrt{\frac{S_{RI}^2}{L} + \frac{A_0^2}{3}} = 1,96 \times \sigma_C^*$$

Где σ_C^* – среднеквадратичное отклонение не исключенной систематической погрешности лаборатории.

Если $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, то оценка систематической погрешности значима на фоне случайного разброса и ее надо учитывать при дальнейших расчетах:

$$\Delta_{c(B,H)}^* = \theta \pm 1,96 \sqrt{\frac{S_{RL}^2}{L} + \frac{A_0^2}{3}} = \theta \pm 1,96 \cdot \sigma_c^*$$

Рассчитав верхнюю и нижнюю границы систематической погрешности, выбирают максимальное по модулю значение $|\Delta_{\max}^*| = |\Delta_{c,H}^*, \Delta_{c,B}^*| = \Delta_c^*$ и тогда можно записать:

$$\pm \Delta_c^* = \theta + 1,96 \cdot \sigma_c^*$$

4) Оценка характеристики погрешности

Вычисляют последнюю величину, которая характеризует погрешность. Рассчитывают границы, в которых погрешность любого из совокупности результатов измерений, полученных при реализации методики, находится с принятой $P=0,95$. Дисперсия погрешности формируется за счет дисперсий случайной и систематической погрешности. Характеристику погрешности рассчитывают по формуле:

$$\Delta_B^* = \Delta_H^* = |\Delta^*| = \theta + 1,96 \cdot \sqrt{(\sigma_{RL}^*)^2 + (\sigma_c^*)^2}$$

Оценка метрологических показателей вольтамперметрической методики развернуто показана для определения метионина рис. 32, триптофана (рис. 33) и 5 – гидрокситриптофана (рис.34). Для расчета была выбрана прямолинейная область концентрационных зависимостей в диапазоне от $1,00 \times 10^{-7}$ до $50,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³ для метионина; $5,00 \times 10^{-7}$ до $50,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³ для триптофана и 5-гидрокситриптофана.

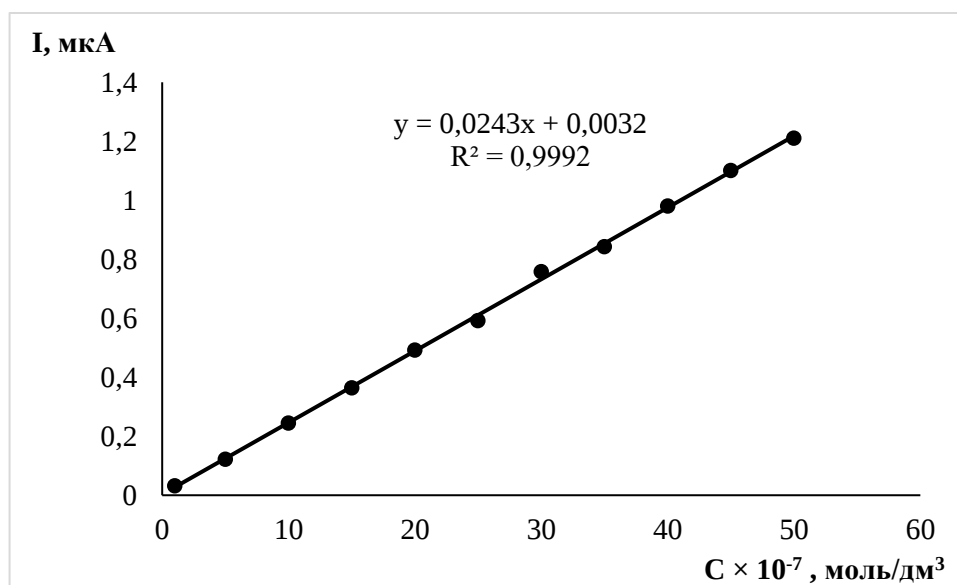


Рис. 32 Концентрационная зависимость метионина в диапазоне от $1,00 \times 10^{-7}$ до $50,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

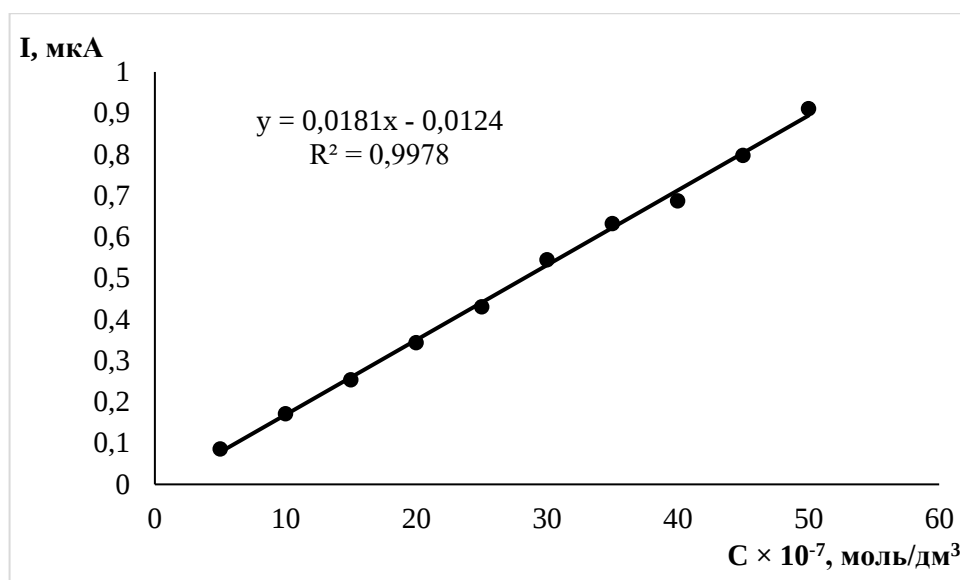


Рис. 33 Концентрационная зависимость триптофана в диапазоне от $5,00 \times 10^{-7}$ до $50,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

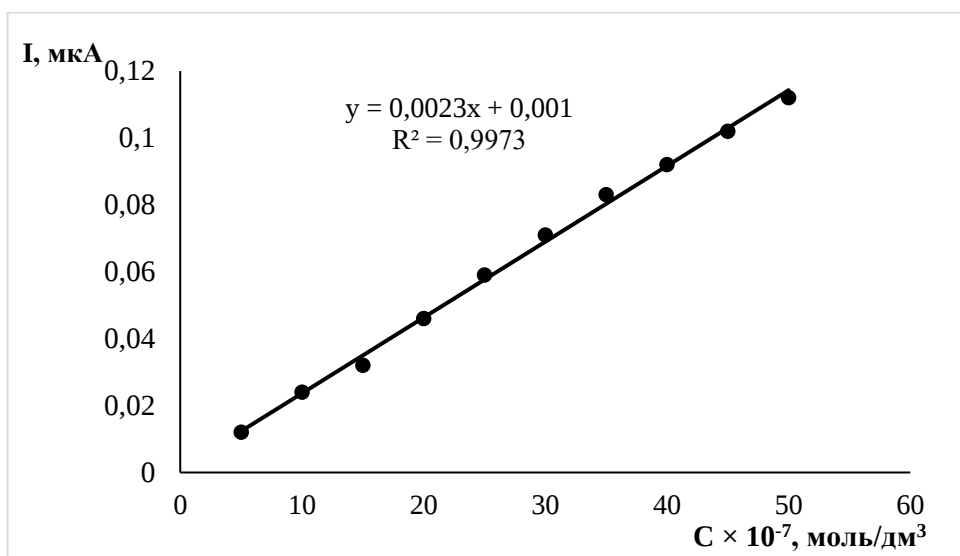


Рис. 34 Концентрационная зависимость 5-гидрокситриптофана в диапазоне от $5,00 \times 10^{-7}$ до $50,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

А.1 Концентрация метионина $1,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора метионина $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-17}$
1,00	0,38	1	1,38	1,50	1,44	7,14
		2	1,38	1,31	1,34	2,59
		3	1,03	1,17	1,10	10,29
		4	1,49	1,39	1,44	5,75
		5	1,15	1,43	1,29	40,09
		6	1,18	1,43	1,30	30,71
		7	1,11	1,26	1,18	11,38
		8	1,32	1,39	1,35	2,50
		9	1,23	1,06	1,15	14,78
		10	1,26	1,13	1,19	8,97
		11	1,10	1,06	1,08	0,91
		12	1,00	1,02	1,01	0,19
		13	1,11	1,29	1,20	16,68
		14	1,12	1,40	1,26	41,16
		15	1,23	1,13	1,13	5,49

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$4,11 \times 10^{-16}$	$1,98 \times 10^{-15}$	0,207	0,471	$1,15 \times 10^{-8}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$1,23 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{\text{RI}}^* = S_{\text{RI}}$	$1,57 \times 10^{-8}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$2,35 \times 10^{-8}$	1,057	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(\text{в,с})^* = \Delta(\text{н,с})^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm\Delta^*_{\text{с}} = 2,35 \times 10^{-8}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 5,11 \times 10^{-8}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием метионина $1,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\Gamma}^*, \times 10^{-8}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\Gamma}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-8}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \times 10^{-8}$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \%$	$\pm\Delta^*, \times 10^{-8}$ моль/ дм ³	$\pm\Delta^*, \%$
1,15	9,31	1,57	12,75	2,35	19,03	5,11	41,43

А.2 Концентрация метионина $5,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора метионина $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
5,00	0,44	1	6,00	4,36	6,00	13,45
		2	5,66	4,38	5,66	8,21
		3	5,51	6,78	5,51	8,12
		4	4,98	6,99	4,98	20,11
		5	5,72	6,39	5,72	2,25
		6	4,44	6,82	4,44	28,37
		7	5,53	7,19	5,53	13,64
		8	5,90	5,84	5,90	0,017
		9	6,61	7,02	6,61	0,83
		10	4,76	5,84	4,76	5,85
		11	4,71	5,22	4,71	1,31
		12	6,44	5,68	6,44	2,87
		13	5,96	6,40	5,96	0,96
		14	4,73	5,12	4,73	0,79
		15	4,85	5,97	4,85	6,26

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$2,83 \times 10^{-14}$	$1,13 \times 10^{-13}$	0,250	0,471	$8,68 \times 10^{-8}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$5,72 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{\text{RI}}^* = S_{\text{RI}}$	$9,21 \times 10^{-8}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$7,27 \times 10^{-8}$	2,091	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(\text{в,с})^* = \Delta(\text{н,с})^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 7,27 \times 10^{-8}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 2,14 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием метионина $10,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-8}$ моль/дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-8}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \times 10^{-8}$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
8,68	15,16	9,21	16,08	7,27	12,70	2,14	37,44

А.3 Концентрация метионина $10,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора метионина $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S_1^2 \times 10^{-15}$
10,00	0,83	1	10,21	10,30	10,25	0,037
		2	10,60	10,07	10,34	1,42
		3	10,94	10,16	10,55	3,03
		4	10,97	10,46	10,71	1,31
		5	10,04	10,62	10,33	1,69
		6	10,38	12,92	11,65	32,45
		7	10,44	13,08	11,76	34,84
		8	13,21	11,64	12,42	12,21
		9	10,31	13,20	11,75	41,79
		10	12,93	11,75	12,34	6,95
		11	10,03	13,52	11,78	60,91
		12	10,64	10,59	10,61	0,015
		13	10,63	11,98	11,31	9,13
		14	11,19	11,91	11,55	2,56
		15	10,19	10,72	10,45	1,45

S^2_{max}	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_{\text{г}}^* = S$
$6,09 \times 10^{-14}$	$2,09 \times 10^{-13}$	0,290	0,471	$1,18 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$11,18 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$8,22 \times 10^{-8}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$1,18 \times 10^{-7}$	2,076	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 1,18 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 3,10 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием метионина $10,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_r^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RI}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{RI}^*, \%$	$\pm \Delta^* c, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta^* c, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
1,18	10,57	1,21	10,82	1,18	10,62	3,11	27,75

А.4 Концентрация метионина $15,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора метионина $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
15,00	2,05	1	15,84	16,45	16,15	1,85
		2	17,77	19,60	18,69	16,78
		3	15,00	16,59	15,79	12,52
		4	15,89	16,00	15,94	0,068
		5	17,90	18,59	18,24	2,35
		6	15,16	15,32	15,24	0,13
		7	15,20	18,95	17,08	70,07
		8	16,57	17,77	17,17	7,24
		9	17,33	19,15	18,24	16,68
		10	19,39	19,01	19,20	0,71
		11	19,13	19,97	19,55	3,52
		12	16,90	17,75	17,33	3,66
		13	19,55	15,33	17,44	89,04
		14	18,44	17,87	18,16	1,60
		15	17,30	15,75	16,52	12,04

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$9,9 \times 10^{-14}$	$2,28 \times 10^{-13}$	0,373	0,471	$1,26 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$17,38 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{\text{RI}}^* = S_{\text{RI}}$	$1,59 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$2,38 \times 10^{-7}$	1,901	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(\text{в,с})^* = \Delta(\text{н,с})^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 2,38 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 5,27 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием метионина $15,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{Рл}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{Рл}}^*, \%$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
1,26	7,25	1,59	9,17	2,38	13,71	5,27	30,36

А.5 Концентрация метионина $20,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора метионина $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-14}$
20,00	3,07	1	20,17	26,63	23,40	20,91
		2	18,20	24,52	21,36	19,92
		3	25,79	25,38	25,58	0,086
		4	22,58	23,14	22,86	0,15
		5	22,55	24,58	23,56	2,04
		6	24,47	22,34	23,41	2,26
		7	20,80	19,72	20,26	0,58
		8	21,88	24,03	22,95	2,30
		9	21,35	18,85	20,10	3,12
		10	20,48	18,05	19,27	2,96
		11	26,49	23,99	25,24	3,14
		12	19,26	22,15	20,71	4,18
		13	21,73	26,51	24,12	11,41
		14	26,96	27,16	27,06	0,02
		15	18,68	19,81	19,24	0,64

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$2,09 \times 10^{-13}$	$7,37 \times 10^{-13}$	0,283	0,471	$2,21 \times 10^{-7}$

Внутрिलाбораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$22,61 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{\text{RI}}^* = S_{\text{RI}}$	$2,91 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$2,61 \times 10^{-7}$	1,354	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(\text{в,с})^* = \Delta(\text{н,с})^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 2,61 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 7,87 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием метионина $20,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{Рл}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{Рл}}^*, \%$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
2,21	9,80	2,91	12,89	2,60	11,53	7,87	34,82

А.6 Концентрация метионина $25,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора метионина $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-14}$
25,00	3,57	1	23,16	29,81	26,48	22,16
		2	25,12	30,83	27,98	16,26
		3	30,11	30,80	30,46	0,24
		4	26,71	30,53	28,62	7,31
		5	23,66	23,55	23,60	0,007
		6	26,99	31,72	29,36	11,21
		7	23,99	25,51	24,75	1,16
		8	23,58	30,48	27,03	23,79
		9	24,50	28,03	26,26	6,23
		10	24,22	30,05	27,14	17,03
		11	29,11	25,04	27,08	8,27
		12	29,61	27,94	28,77	1,39
		13	25,76	26,30	26,03	0,15
		14	25,88	23,91	24,90	1,93
		15	28,37	23,21	25,79	13,29

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$2,37 \times 10^{-13}$	$1,30 \times 10^{-12}$	0,182	0,471	$2,94 \times 10^{-8}$

ВнутрILAбораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$26,95 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{\text{RI}}^* = S_{\text{RI}}$	$3,00 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$1,94 \times 10^{-7}$	0,885	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(\text{в,с})^* = \Delta(\text{н,с})^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 1,94 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 6,65 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием метионина $25,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{Рл}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{Рл}}^*, \%$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
5,07	4,51	8,22	7,32	1,23	10,94	2,64	23,56

А.7 Концентрация метионина $30,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора метионина $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-14}$
30,00	4,02	1	34,29	36,36	35,33	2,14
		2	28,34	35,40	31,87	24,92
		3	35,91	35,58	35,75	0,054
		4	35,75	34,04	34,90	1,46
		5	30,42	29,49	29,95	0,44
		6	36,73	30,58	33,66	18,89
		7	28,66	36,45	32,56	30,38
		8	33,91	35,02	34,46	0,62
		9	31,66	29,05	30,36	3,39
		10	31,37	35,81	33,59	9,87
		11	29,25	34,00	31,62	11,32
		12	29,72	28,94	29,33	0,29
		13	32,67	34,25	33,46	1,24
		14	31,82	30,30	31,06	1,16
		15	29,62	32,03	30,83	2,92

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$3,03 \times 10^{-13}$	$1,22 \times 10^{-12}$	0,248	0,471	$2,85 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$32,44 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{\text{RI}}^* = S_{\text{RI}}$	$2,79 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$2,38 \times 10^{-7}$	0,983	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(\text{в,с})^* = \Delta(\text{н,с})^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 2,38 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 2,64 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием метионина $30,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
2,96	9,17	2,79	7,32	2,38	7,37	7,40	22,85

А.8 Концентрация метионина $35,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора метионина $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S_1^2 \times 10^{-15}$
35,00	4,52	1	41,27	41,85	41,56	1,68
		2	41,75	40,48	41,12	8,07
		3	41,83	39,76	40,79	21,42
		4	34,13	38,94	36,53	115,39
		5	39,65	38,26	38,96	9,64
		6	37,85	41,52	39,68	67,66
		7	37,56	35,18	36,37	28,42
		8	34,49	36,64	35,56	23,04
		9	42,69	43,64	43,17	4,50
		10	38,73	34,28	36,51	99,17
		11	42,79	34,12	38,45	375,89
		12	37,81	37,63	37,72	0,16
		13	37,01	39,44	38,23	29,54
		14	34,39	42,90	38,64	36,20
		15	35,24	36,80	36,02	12,21

S^2_{max}	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_{\text{г}}^* = S$
$3,75 \times 10^{-13}$	$1,15 \times 10^{-12}$	0,324	0,471	$2,78 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$38,62 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$3,08 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$3,62 \times 10^{-7}$	1,329	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 3,62 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 9,09 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием метионина $35,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_r^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RI}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{RI}^*, \%$	$\pm \Delta^* c, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta^* c, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
2,77	7,19	3,08	7,99	3,62	9,37	9,09	23,54

А.9 Концентрация метионина $40,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора метионина $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
40,00	5,01	1	40,34	41,65	41,00	8,67
		2	41,18	40,56	40,87	1,96
		3	44,30	47,93	46,12	65,97
		4	40,59	48,52	44,56	314,53
		5	47,63	42,00	44,81	158,54
		6	40,72	44,18	42,45	59,94
		7	40,81	44,42	42,62	65,13
		8	47,10	43,86	45,48	52,43
		9	40,29	42,59	41,44	26,54
		10	42,06	40,44	41,25	13,03
		11	43,88	44,26	44,07	0,71
		12	48,14	43,36	45,75	114,39
		13	43,98	41,07	42,53	42,44
		14	41,28	40,46	40,87	3,32
		15	43,74	40,27	42,00	60,40

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$3,14 \times 10^{-13}$	$9,88 \times 10^{-13}$	0,318	0,471	$2,57 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$43,05 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{\text{RI}}^* = S_{\text{RI}}$	$2,75 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$3,05 \times 10^{-7}$	1,028	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(\text{в,с})^* = \Delta(\text{н,с})^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 3,05 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 7,78 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием метионина $40,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
2,56	5,96	2,75	6,39	3,05	7,09	7,78	18,07

А.10 Концентрация метионина $45,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора метионина $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S_1^2 \times 10^{-15}$
45,00	5,34	1	49,46	48,43	48,94	5,33
		2	46,51	44,64	45,58	17,43
		3	44,85	44,21	44,53	2,04
		4	47,28	51,31	49,29	81,35
		5	50,23	49,74	49,99	1,23
		6	48,27	44,78	46,52	60,86
		7	51,88	49,77	50,82	22,34
		8	49,52	44,25	46,88	138,38
		9	46,01	51,23	48,62	136,19
		10	49,19	50,70	49,95	11,34
		11	48,87	46,98	47,92	17,77
		12	49,87	45,81	47,84	82,24
		13	46,87	46,74	46,81	0,088
		14	51,04	51,69	51,37	2,07
		15	51,82	44,44	48,13	272,87

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_{\text{г}}^* = S$
$2,72 \times 10^{-13}$	$8,51 \times 10^{-13}$	0,320	0,471	$2,38 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$48,21 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$2,89 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$3,21 \times 10^{-7}$	1,013	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 3,21 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 7,74 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием метионина $45,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_r^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RI}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{RI}^*, \%$	$\pm \Delta^* c, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta^* c, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
2,38	4,94	2,89	5,99	3,21	6,66	7,74	16,07

А.11 Концентрация метионина $50,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора метионина $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
50,00	5,34	1	52,78	51,34	52,06	10,39
		2	51,47	51,93	51,70	1,05
		3	48,28	51,34	49,81	46,54
		4	50,51	49,95	50,23	1,55
		5	51,60	50,24	50,92	9,27
		6	51,04	49,67	50,36	9,43
		7	51,32	48,78	50,05	32,29
		8	48,29	48,11	48,20	0,16
		9	50,55	50,52	50,54	$3,56 \times 10^{-18}$
		10	48,83	52,78	50,80	77,88
		11	49,79	50,97	50,38	6,98
		12	51,99	51,84	51,91	0,11
		13	51,28	48,95	50,12	26,96
		14	50,31	50,85	50,58	1,49
		15	50,95	48,12	49,53	40,06

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$7,78 \times 10^{-14}$	$2,64 \times 10^{-13}$	0,294	0,471	$1,32 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$50,47 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{\text{RI}}^* = S_{\text{RI}}$	$1,42 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$5,47 \times 10^{-7}$	1,764	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(\text{в,с})^* = \Delta(\text{н,с})^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 5,47 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 7,91 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием метионина $10,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
1,32	2,62	1,42	2,81	5,47	10,85	7,91	15,66

А.12 Метрологические характеристики методики определения метионина, полученные в лаборатории.

Обобщенные данные методики определения метионина.

$C \times 10^{-7},$ моль/дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \%$	$\pm \Delta^*, \%$
1	9,31	12,75	19,03	41,42
5	15,15	16,08	12,70	37,44
10	10,57	10,82	10,62	27,75
15	7,25	9,17	13,70	30,36
20	9,80	12,89	11,54	34,81
25	10,94	11,16	7,23	24,69
30	8,42	8,59	7,75	22,85
35	7,19	7,99	9,37	23,54
40	5,96	6,39	7,09	18,07
45	4,94	5,99	6,66	16,06
50	2,62	2,81	10,85	15,66

Из обобщенных данных, представленных в таблице выше, можно сделать вывод, что при определении метионина в БАДах и лекарственных средствах показатель точности не превышает 41,42 %, показатель повторяемости 9,31 %, воспроизводимости 12,75 %

Б.1 Концентрация триптофана $5,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора триптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
5,00	0,088	1	5,57	5,43	5,50	3,53
		2	5,37	6,12	5,75	0,96
		3	5,30	6,19	5,75	2,80
		4	5,38	6,23	5,80	4,02
		5	6,06	5,40	5,73	3,59
		6	5,50	6,25	5,88	2,23
		7	6,31	6,38	6,34	2,79
		8	5,05	5,17	5,11	0,21
		9	5,66	5,31	5,49	0,07
		10	6,13	5,90	6,01	0,60
		11	6,38	5,22	5,80	0,26
		12	5,41	5,38	5,39	6,84
		13	5,57	6,16	5,86	$4,79 \times 10^{-18}$
		14	5,38	5,30	5,34	1,75
		15	5,57	5,43	5,50	0,03

$S^2 \text{ max}$	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$6,84 \times 10^{-15}$	0,239	0,471	$4,48 \times 10^{-8}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям, моль/дм ³	$5,70 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$3,89 \times 10^{-8}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$0,70 \times 10^{-7}$	1,34	2,143

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 0,7 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 1,61 \times 10^{-7}$.

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием триптофана $5,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_r^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RЛ}^*, \times 10^{-8}$ моль/ дм ³	$\sigma_{RЛ}^*, \%$	$\pm \Delta_c^* \times 10^{-8}$	$\pm \Delta_c^*, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
0,31	5,43	3,89	7,88	6,85	12,05	1,44	25,48

Б.2 Концентрация триптофана $10,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора триптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
10,00	0,074	1	10,56	11,68	11,12	3,17
		2	11,46	12,30	11,88	1,76
		3	11,85	11,71	11,78	0,51
		4	11,77	12,41	12,09	1,03
		5	10,27	10,54	10,41	0,18
		6	11,99	12,43	12,21	0,48
		7	10,36	11,76	11,06	4,84
		8	10,20	10,29	10,25	0,03
		9	11,30	10,83	11,06	0,56
		10	10,18	10,91	10,55	1,34
		11	10,30	11,20	10,75	2,01
		12	11,99	10,01	11,01	9,76
		13	10,88	12,11	11,50	3,83
		14	11,23	11,69	11,46	0,53
		15	12,19	10,29	11,24	8,97

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$1,34 \times 10^{-15}$	$3,85 \times 10^{-15}$	0,232	0,471	$5,07 \times 10^{-8}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$11,22 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{\text{RI}}^* = S_{\text{RI}}$	$8,22 \times 10^{-8}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$1,22 \times 10^{-7}$	0,287	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 1,22 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 2,64 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием триптофана $10,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{Рл}}^*, \times 10^{-8}$	$\sigma_{\text{Рл}}^*, \%$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta_{\text{с}}^*, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
5,07	4,51	8,22	7,32	1,23	10,94	2,64	23,56

Б.3 Концентрация триптофана $15,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора триптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{cp} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
15,00	0,69	1	15,67	18,43	17,05	19,17
		2	17,30	18,40	17,85	3,03
		3	17,05	18,59	17,82	5,89
		4	17,52	18,38	17,95	1,85
		5	15,53	18,45	16,99	21,36
		6	15,34	16,68	16,01	4,53
		7	16,69	16,02	16,35	1,12
		8	18,06	17,25	17,66	1,67
		9	16,31	18,23	17,27	9,24
		10	17,06	15,83	16,44	3,74
		11	16,98	16,66	16,82	0,27
		12	15,08	15,50	15,29	0,44
		13	15,09	15,54	15,32	0,48
		14	15,23	17,63	16,43	14,41
		15	17,64	17,01	17,33	1,01

$S^2 \max$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$3,74 \times 10^{-15}$	$8,82 \times 10^{-14}$	0,042	0,471	$7,67 \times 10^{-8}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$16,83 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$1,15 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{расч.}$	$t_{табл.}$
$1,83 \times 10^{-7}$	0,460	2,093

Т.к. $t_{расч.} < t_{табл.}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm\Delta^*_{\text{с}} = 1,83 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 1,41$.

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием триптофана $15,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-8}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \times 10^{-7}$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \%$	$\pm\Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm\Delta^*, \%$
7,67	4,55	1,15	6,84	1,83	10,91	3,82	22,72

Б.4 Концентрация триптофана $20,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора триптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
20,00	0,71	1	22,00	23,83	22,92	16,77
		2	23,09	22,71	22,90	0,72
		3	23,03	23,50	23,26	1,11
		4	23,86	22,70	23,28	6,72
		5	22,43	22,03	22,23	0,81
		6	23,51	23,96	23,74	0,99
		7	20,59	22,15	21,37	12,14
		8	21,55	22,55	22,05	4,92
		9	23,62	23,99	23,80	0,68
		10	22,75	21,65	22,20	6,04
		11	24,29	23,05	23,67	7,75
		12	24,13	20,50	22,32	65,99
		13	24,46	22,76	23,61	14,41
		14	23,08	22,39	22,74	2,35
		15	20,60	21,89	21,24	8,34

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$6,04 \times 10^{-15}$	$1,49 \times 10^{-13}$	0,040	0,471	$10,00 \times 10^{-8}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	22,75
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$1,23 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	t _{расч.}	t _{табл.}
$2,75 \times 10^{-7}$	0,780	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(b,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c$:

$$\pm\Delta^*_{\text{с}} = 2,75 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 4,72 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием триптофана $20,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \times 10^{-7}$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \%$	$\pm\Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/дм ³	$\pm\Delta^*, \%$
1,00	4,39	1,23	5,41	2,75	12,11	4,72	20,77

Б.5 Концентрация триптофана $25,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора триптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
25,00	0,61	1	25,59	27,47	26,53	17,71
		2	26,07	28,83	27,45	37,98
		3	27,18	25,43	26,31	15,44
		4	25,44	26,57	26,00	6,28
		5	28,94	27,76	28,35	6,95
		6	28,32	28,00	28,16	0,52
		7	27,93	25,84	26,89	21,89
		8	25,98	27,74	26,86	15,45
		9	28,89	27,28	28,08	12,94
		10	28,66	29,16	28,91	1,21
		11	27,92	28,31	28,12	0,78
		12	28,71	25,62	27,16	47,71
		13	27,59	26,16	26,87	10,16
		14	27,46	27,25	27,36	0,29
		15	29,22	25,78	27,50	59,06

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_{\text{г}}^* = S$
$5,91 \times 10^{-14}$	$2,54 \times 10^{-13}$	0,232	0,471	$1,30 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$27,37 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$1,09 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{расч.}$	$t_{табл}$
$2,37 \times 10^{-7}$	0,671	2,093

Т.к. $t_{расч.} < t_{табл.}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 2,75 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 4,53 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием триптофана $25,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_r^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RЛ}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{RЛ}^*, \%$	$\pm \Delta^* c, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta^* c, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
1,30	4,75	1,28	4,68	2,37	8,66	4,52	16,53

Б.6 Концентрация триптофана $30,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора триптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
30,00	0,41	1	33,47	31,43	32,45	20,71
		2	34,44	33,26	33,85	6,97
		3	33,95	28,94	31,45	125,67
		4	29,75	34,44	32,09	109,96
		5	31,73	31,88	31,80	0,11
		6	30,72	30,60	30,66	0,07
		7	33,28	30,87	32,08	29,14
		8	30,39	32,42	31,40	20,64
		9	35,36	34,62	34,99	2,74
		10	33,23	33,73	33,48	1,26
		11	29,61	34,35	31,98	11,24
		12	34,39	29,72	32,06	10,89
		13	33,40	35,11	34,26	146,91
		14	32,73	33,30	33,01	1,59
		15	34,28	32,24	33,26	207,17

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$1,25 \times 10^{-13}$	$5,75 \times 10^{-13}$	0,218	0,471	$1,95 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$32,58 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$1,63 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$2,58 \times 10^{-7}$	1,076	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(b,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 2,58 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{в*} = \Delta_{н*} = \Delta^* = 5,79 \times 10^{-7}$.

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием триптофана $30,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_r^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RЛ}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{RЛ}^*, \%$	$\pm \Delta_{с}^*, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta_{с}^*, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
1,95	6,02	1,63	5,02	2,58	7,94	5,79	17,77

Б.7 Концентрация триптофана $35,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора триптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{ср} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
35,00	0,039	1	37,29	37,43	37,36	0,09
		2	39,58	38,50	39,04	5,74
		3	37,21	39,80	38,50	33,46
		4	36,14	39,39	37,77	52,79
		5	40,24	40,15	40,19	0,04
		6	39,37	38,72	39,04	2,14
		7	40,48	37,08	38,78	57,76
		8	40,08	36,27	38,17	72,51
		9	35,91	38,05	36,98	22,93
		10	35,69	37,46	36,58	15,81
		11	36,14	35,48	35,81	2,23
		12	40,08	36,70	38,39	56,96
		13	36,51	39,95	38,23	59,18
		14	38,39	38,37	38,38	$1,87 \times 10^{-18}$
		15	38,51	35,87	37,19	34,99

$S^2 \max$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$7,25 \times 10^{-14}$	$4,16 \times 10^{-13}$	0,174	0,471	$1,66 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$38,03 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$1,46 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$3,02 \times 10^{-7}$	1,326	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 3,02 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 3,02 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием триптофана $35,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_r^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RI}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{RI}^*, \%$	$\pm \Delta^* c, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta^* c, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
1,66	4,38	1,87	5,76	3,02	7,96	5,89	15,50

Б.8 Концентрация триптофана $40,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора триптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-14}$
40,00	0,33	1	42,09	45,06	43,57	4,40
		2	44,45	39,60	42,02	11,75
		3	43,19	39,50	41,34	6,84
		4	43,15	41,22	42,18	1,88
		5	45,47	42,84	44,16	3,46
		6	46,04	43,36	44,70	3,58
		7	40,94	43,95	42,44	4,53
		8	46,29	43,98	45,14	2,68
		9	42,96	45,30	44,13	2,73
		10	44,64	44,94	44,79	0,05
		11	41,54	44,35	42,94	3,93
		12	44,10	46,36	45,23	2,54
		13	39,50	46,59	43,04	25,15
		14	44,45	38,93	41,69	15,25
		15	44,78	43,26	44,02	11,49

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$2,51 \times 10^{-13}$	$8,99 \times 10^{-13}$	0,276	0,471	$2,46 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$43,39 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$2,44 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$3,39 \times 10^{-7}$	1,723	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(b,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm\Delta^*_{\text{с}} = 3,38 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 7,05 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием триптофана $40,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \times 10^{-7}$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \%$	$\pm\Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/дм ³	$\pm\Delta^*, \%$
2,46	5,67	2,44	5,62	3,38	7,80	7,04	16,24

Б.9 Концентрация триптофана $45,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора триптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-14}$
45,00	0,29	1	42,09	45,06	43,57	4,40
		2	44,45	39,60	42,02	11,75
		3	43,19	39,50	41,34	6,84
		4	43,15	41,22	42,18	1,88
		5	45,47	42,84	44,16	3,46
		6	46,04	43,36	44,70	3,58
		7	40,94	43,95	42,44	4,53
		8	46,29	43,98	45,14	2,68
		9	42,96	45,30	44,13	2,73
		10	40,78	44,94	42,86	8,63
		11	41,54	44,35	42,94	3,94
		12	44,10	46,36	45,23	2,54
		13	39,50	46,59	43,04	25,10
		14	44,45	38,93	41,69	15,25
		15	44,78	43,26	44,02	1,14

S^2_{max}	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_{\text{г}}^* = S$
$2,51 \times 10^{-13}$	$1,00 \times 10^{-12}$	0,279	0,471	$2,45 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$43,41 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{\text{РЛ}}^* = S_{\text{РЛ}}$	$2,45 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$3,41 \times 10^{-7}$	1,960	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 3,41 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 7,11 \times 10^{-7}$.

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием триптофана $45,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm \Delta^*_{\text{с}}, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta^*_{\text{с}}, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
2,45	5,64	2,44	5,63	3,41	7,87	7,11	16,36

Б.10 Концентрация триптофана $50,00 \times 10^{-7}$ ·моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора триптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-14}$
50,00	0,26	1	50,63	55,70	53,16	12,83
		2	53,21	53,87	53,54	0,21
		3	61,62	50,87	56,25	57,68
		4	47,25	56,12	51,68	39,31
		5	52,08	61,72	56,90	46,46
		6	47,44	56,33	51,89	39,51
		7	50,39	48,97	49,68	1,01
		8	55,26	60,31	57,79	12,76
		9	47,84	59,46	53,65	67,50
		10	49,51	61,29	55,40	69,44
		11	53,88	54,75	54,31	0,37
		12	47,52	49,19	48,35	1,40
		13	56,31	59,78	58,05	6,01
		14	49,85	50,86	50,35	0,52
		15	54,36	53,81	54,08	0,15

$S^2 \text{ max}$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$6,94 \times 10^{-13}$	$3,55 \times 10^{-12}$	0,195	0,471	$3,86 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$53,67 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$3,75 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$3,67 \times 10^{-7}$	2,054	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(b,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm\Delta^*_{\text{с}} = 3,67 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 11,04 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием триптофана $50,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{Г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/дм ³	$\sigma_{\text{Г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \times 10^{-7}$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \%$	$\pm\Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/дм ³	$\pm\Delta^*, \%$
3,86	7,19	4,32	8,06	3,67	6,84	11,04	20,57

Б.10 Метрологические характеристики методики определения триптофана, полученные в лаборатории.

Обобщенные данные методики определения триптофана.

$C \times 10^{-7},$ моль/дм ³	$\sigma_{\text{Г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \%$	$\pm\Delta^*, \%$
5	7,68	7,88	12,05	25,48
10	4,51	7,32	10,94	23,56
15	4,55	6,84	10,91	22,72
20	4,39	5,41	12,10	20,77
25	4,75	4,68	8,65	16,53
30	6,01	5,76	7,94	17,77
35	4,38	4,67	7,96	15,50
40	5,62	5,62	8,00	16,79
45	5,64	5,63	7,87	16,36
50	7,19	8,06	6,84	20,57

Из обобщенных данных, представленных в таблице выше, можно сделать вывод, что при определении триптофана в БАДах и лекарственных средствах показатель точности не превышает 25,50 %, показатель повторяемости 7,68 %, воспроизводимости 7,88 %

В.1 Концентрация 5-гидрокситриптофана $5,00 \times 10^{-7}$ ·моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора 5-гидрокситриптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{cp} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
5,00	0,69	1	5,43	5,00	5,21	0,92
		2	5,30	4,49	4,89	3,22
		3	4,46	5,25	4,86	3,09
		4	5,14	4,53	4,83	1,85
		5	6,31	5,98	6,14	0,57
		6	5,79	6,17	5,98	0,72
		7	4,80	5,27	5,03	1,11
		8	5,75	5,15	5,45	1,79
		9	6,99	5,89	6,44	6,10
		10	4,75	5,07	4,91	0,49
		11	5,14	6,64	5,89	11,24
		12	6,27	5,72	6,00	1,47
		13	4,29	6,27	5,28	19,71
		14	6,30	5,38	5,84	4,22
		15	5,37	6,94	6,15	12,30

$S^2 \max$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$1,97 \times 10^{-14}$	$6,88 \times 10^{-14}$	0,286	0,471	$6,77 \times 10^{-8}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$5,52 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$7,64 \times 10^{-8}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{расч.}$	$t_{табл}$
$5,28 \times 10^{-8}$	1,212	2,093

Т.к. $t_{расч.} < t_{табл.}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm\Delta^*_{\text{с}} = 5,28 \times 10^{-8}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 1,86 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием 5-гидрокситриптофана $5,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-8}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \times 10^{-7}$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \%$	$\pm\Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm\Delta^*, \%$
6,77	12,25	7,64	13,83	3,67	9,55	1,86	33,79

В.2 Концентрация 5-гидрокситриптофана $10,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора 5-гидрокситриптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta_{\text{м}} \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
10,00	0,97	1	11,83	9,50	10,67	13,59
		2	10,09	10,29	10,19	0,10
		3	10,52	9,15	9,83	4,70
		4	11,27	12,29	11,78	2,56
		5	12,39	12,91	12,65	0,68
		6	9,93	9,55	9,74	0,36
		7	9,13	11,92	10,53	19,47
		8	9,55	12,56	11,05	22,71
		9	11,83	11,73	11,78	0,028
		10	11,31	11,43	11,37	0,036
		11	12,60	12,81	12,71	0,10
		12	10,22	10,59	10,41	0,34
		13	12,11	11,12	11,62	2,44
		14	9,51	10,34	9,93	1,73
		15	13,16	12,67	12,92	0,59

S^2_{max}	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_{\text{г}}^* = S$
$2,27 \times 10^{-14}$	$6,94 \times 10^{-14}$	0,327	0,471	$6,80 \times 10^{-8}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$11,14 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$1,29 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$1,14 \times 10^{-7}$	0,203	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 1,14 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 3,51 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием 5-гидрокситриптофана $10,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_r^*, \times 10^{-8}$ моль/ дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RI}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{RI}^*, \%$	$\pm \Delta^* c, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta^* c, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
6,80	6,11	1,28	11,57	1,14	10,26	3,51	31,56

В.3 Концентрация 5-гидрокситриптофана $15,00 \times 10^{-7}$ ·моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора 5-гидрокситриптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{cp} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
15,00	1,15	1	16,68	15,81	16,24	1,91
		2	15,80	17,97	16,88	11,71
		3	15,16	18,84	17,00	33,87
		4	14,38	15,39	14,89	2,53
		5	16,82	17,84	17,33	2,62
		6	15,89	18,03	16,96	11,43
		7	19,00	17,81	18,40	3,56
		8	18,16	18,33	18,24	0,079
		9	19,04	17,56	18,30	5,43
		10	16,60	14,54	15,57	10,63
		11	19,16	16,07	17,61	23,82
		12	14,40	14,29	14,34	0,032
		13	14,10	14,79	14,45	1,19
		14	15,93	16,14	16,03	0,11
		15	16,51	16,70	16,60	0,097

$S^2 \max$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$3,38 \times 10^{-14}$	$1,09 \times 10^{-13}$	0,311	0,471	$8,52 \times 10^{-8}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$16,59 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$1,69 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{расч.}$	$t_{табл.}$
$1,59 \times 10^{-7}$	2,066	2,093

Т.к. $t_{расч.} < t_{табл.}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(b,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm\Delta^*_{\text{с}} = 1,59 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 4,55 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием 5-гидрокситриптофана $50,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-8}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \times 10^{-7}$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \%$	$\pm\Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm\Delta^*, \%$
8,52	5,13	1,69	10,21	1,59	9,58	4,54	27,39

В.4 Концентрация 5-гидрокситриптофана $20,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора 5-гидрокситриптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta_{\text{м}} \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
20,00	1,80	1	23,87	20,73	22,30	49,24
		2	25,00	23,76	24,38	7,67
		3	18,78	19,04	18,91	0,34
		4	24,68	19,40	22,04	139,73
		5	20,97	21,65	21,31	2,27
		6	20,58	21,74	21,16	6,75
		7	20,63	21,28	20,96	2,11
		8	18,74	21,07	19,90	27,12
		9	19,10	19,99	19,55	3,98
		10	23,72	24,57	24,14	3,64
		11	20,16	21,90	21,03	1,52
		12	19,74	22,74	21,24	44,99
		13	20,99	22,30	21,64	8,58
		14	19,72	25,66	22,69	176,67
		15	23,68	25,73	24,70	20,92

S^2_{max}	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_{\text{г}}^* = S$
$1,76 \times 10^{-13}$	$5,09 \times 10^{-13}$	0,346	0,471	$1,84 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$21,73 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$2,21 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{\text{расч.}}$	$t_{\text{табл}}$
$1,73 \times 10^{-7}$	1,491	2,093

Т.к. $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 1,73 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 5,64 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием 5-гидрокситриптофана $20,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_r^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RI}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{RI}^*, \%$	$\pm \Delta^* c, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta^* c, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
1,84	8,47	2,20	10,16	1,73	7,96	5,64	25,98

В.5 Концентрация 5-гидрокситриптофана $25,00 \times 10^{-7}$ ·моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора 5-гидрокситриптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{cp} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
25,00	2,62	1	27,69	28,52	28,10	3,51
		2	30,71	26,33	28,52	96,04
		3	30,69	28,25	29,47	29,72
		4	28,56	26,97	27,77	12,68
		5	27,81	26,42	27,11	9,62
		6	30,80	26,40	28,60	96,74
		7	25,15	28,11	26,63	43,78
		8	24,17	27,72	25,94	63,06
		9	24,22	27,10	25,66	41,63
		10	30,75	29,17	29,96	12,49
		11	28,29	31,03	29,66	37,73
		12	29,12	29,51	29,32	0,78
		13	29,84	29,76	29,80	0,0328
		14	29,78	25,80	27,79	79,02
		15	31,30	26,61	28,96	109,89

$S^2 \max$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$1,09 \times 10^{-13}$	$6,36 \times 10^{-13}$	0,175	0,471	$2,06 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$28,22 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$2,41 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{расч.}$	$t_{табл}$
$3,21 \times 10^{-7}$	2,037	2,093

Т.к. $t_{расч.} < t_{табл.}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(b,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm\Delta^*_{\text{с}} = 3,22 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 6,69 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием 5-гидрокситриптофана $25,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \times 10^{-7}$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \%$	$\pm\Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm\Delta^*, \%$
2,06	7,30	2,41	8,52	3,21	11,41	6,69	23,72

В.6 Концентрация 5-гидрокситриптофана $30,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора 5-гидрокситриптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta_{\text{т}} \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-14}$
30,00	3,005	1	34,99	28,83	31,91	18,93
		2	30,99	34,92	32,96	7,74
		3	29,40	33,88	31,64	10,05
		4	32,79	34,68	33,74	1,78
		5	31,54	28,02	29,78	6,18
		6	33,23	30,25	31,74	4,42
		7	29,43	31,36	30,39	1,85
		8	28,76	30,95	29,85	2,38
		9	28,78	31,52	30,15	3,75
		10	30,78	31,75	31,27	0,46
		11	32,04	35,91	33,97	7,47
		12	28,86	28,23	28,54	0,19
		13	29,16	31,47	30,31	2,68
		14	30,31	34,79	32,55	10,01
		15	29,15	32,83	30,99	6,79

S^2_{max}	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_{\text{г}}^* = S$
$1,89 \times 10^{-13}$	$8,47 \times 10^{-13}$	0,223	0,471	$2,37 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$31,32 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$2,51 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{расч.}$	$t_{табл}$
$1,31 \times 10^{-7}$	0,719	2,093

Т.к. $t_{расч.} < t_{табл.}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 1,32 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 5,21 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием 5-гидрокситриптофана $30,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_r^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RЛ}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{RЛ}^*, \%$	$\pm \Delta^* c, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta^* c, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
2,37	7,58	2,51	8,01	1,31	4,21	5,21	16,63

В.7 Концентрация 5-гидрокситриптофана $35,00 \times 10^{-7}$ ·моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора 5-гидрокситриптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{cp} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-14}$
35,00	3,50	1	34,92	37,27	36,10	2,76
		2	36,68	36,30	36,49	0,071
		3	34,27	38,49	36,38	8,89
		4	35,10	37,96	36,53	4,09
		5	38,52	35,22	36,87	5,43
		6	39,63	35,81	37,72	7,31
		7	34,48	40,50	37,49	18,11
		8	41,22	37,71	39,47	6,17
		9	35,24	38,05	36,64	3,95
		10	37,97	40,59	39,28	34,41
		11	34,34	37,27	35,81	4,28
		12	34,38	36,65	35,52	2,57
		13	34,17	35,13	34,65	0,46
		14	40,63	38,06	39,34	3,32
		15	38,73	36,41	37,57	2,69

$S^2 \max$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$1,81 \times 10^{-13}$	$7,35 \times 10^{-13}$	0,246	0,471	$2,21 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$37,05 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$2,53 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{расч.}$	$t_{табл.}$
$2,05 \times 10^{-7}$	0,990	2,093

Т.к. $t_{расч.} < t_{табл.}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(b,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm\Delta^*_{\text{с}} = 2,06 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 5,72 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием 5-гидрокситриптофана $35,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \times 10^{-7}$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \%$	$\pm\Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm\Delta^*, \%$
2,21	5,97	2,52	6,82	2,05	5,55	5,71	15,42

В.8 Концентрация 5-гидрокситриптофана $40,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора 5-гидрокситриптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta_{\text{м}} \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-14}$
40,00	3,80	1	39,62	42,48	41,05	4,09
		2	40,80	39,02	39,91	1,59
		3	39,21	39,96	39,59	0,27
		4	44,81	40,50	42,65	9,25
		5	43,26	38,02	40,64	136,87
		6	42,96	41,22	42,09	1,52
		7	40,52	42,25	41,39	1,50
		8	43,15	45,56	44,35	2,90
		9	45,00	43,78	44,39	0,74
		10	40,28	38,28	39,28	2,01
		11	38,93	40,28	39,60	0,91
		12	40,10	40,81	40,46	0,25
		13	42,47	38,52	40,50	7,82
		14	40,30	44,62	42,46	9,31
		15	45,74	42,82	44,28	4,26

S^2_{max}	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_{\text{г}}^* = S$
$1,36 \times 10^{-13}$	$6,01 \times 10^{-13}$	0,226	0,471	$2,01 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$41,52 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$2,24 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{расч.}$	$t_{табл}$
$1,52 \times 10^{-7}$	0,674	2,093

Т.к. $t_{расч.} < t_{табл.}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 1,52 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 5,67 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием 5-гидрокситриптофана $40,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_r^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RЛ}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{RЛ}^*, \%$	$\pm \Delta^* c, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta^* c, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
2,01	4,84	2,24	5,39	1,52	3,67	5,67	13,65

В.9 Концентрация 5-гидрокситриптофана $45,00 \times 10^{-7}$ ·моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора 5-гидрокситриптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta m \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{cp} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-15}$
45,00	4,11	1	43,75	43,61	43,68	0,095
		2	44,82	44,33	44,58	1,20
		3	45,71	45,90	45,80	0,18
		4	43,18	44,19	43,69	5,11
		5	44,53	45,84	45,19	8,54
		6	45,04	44,90	44,97	0,100
		7	43,23	45,28	44,26	20,91
		8	44,46	43,47	43,96	4,92
		9	43,51	45,61	44,56	22,01
		10	44,08	45,92	45,00	16,86
		11	44,82	43,79	44,31	5,33
		12	45,39	44,77	45,08	1,94
		13	43,50	43,71	43,61	0,23
		14	43,24	43,12	43,18	0,066
		15	45,76	43,15	44,45	34,24

$S^2 \max$	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_r^* = S$
$3,42 \times 10^{-14}$	$1,21 \times 10^{-13}$	0,281	0,471	$1,00 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$44,42 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$1,02 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{расч.}$	$t_{табл.}$
$4,42 \times 10^{-7}$	1,854	2,093

Т.к. $t_{расч.} < t_{табл.}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(b,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm\Delta^*_{\text{с}} = 4,42 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta_{\text{в}}^* = \Delta_{\text{н}}^* = \Delta^* = 6,15 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием 5-гидрокситриптофана $45,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_{\text{г}}^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_{\text{г}}^*, \%$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{\text{РЛ}}^*, \%$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \times 10^{-7}$	$\pm\Delta^*_{\text{с}}, \%$	$\pm\Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm\Delta^*, \%$
1,00	2,03	1,02	2,30	4,42	9,95	6,15	13,84

В.10 Концентрация 5-гидрокситриптофана $50,00 \times 10^{-7}$ моль/дм³

Повторяемость

С стандартного раствора 5-гидрокситриптофана $\times 10^{-7}$, моль/дм ³	Погрешность станд. раствора $\Delta_{\text{м}} \times 10^{-7}$	Номер серии L=15	$C_1 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_2 \times 10^{-7}$, моль/дм ³	$C_{\text{ср}} \times 10^{-7}$,	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2_1 \times 10^{-14}$
50,00	0,26	1	50,22	53,65	51,93	5,88
		2	51,07	52,22	51,65	0,66
		3	48,02	50,06	49,04	2,08
		4	53,57	52,48	53,02	0,59
		5	53,80	55,42	54,61	1,32
		6	52,19	54,13	53,16	1,88
		7	54,46	49,78	52,12	10,97
		8	54,07	52,06	53,06	2,03
		9	52,68	53,43	53,06	0,28
		10	55,20	53,46	54,33	1,51
		11	51,49	48,08	49,79	5,80
		12	52,22	53,79	53,00	1,24
		13	49,34	51,52	50,43	2,364
		14	53,49	49,27	51,38	8,91
		15	53,99	52,20	53,10	1,59

S^2_{max}	ΣS^2	Грасч.	Гтабл	СКО повторяемости $\sigma_{\text{г}}^* = S$
$1,09 \times 10^{-14}$	$4,71 \times 10^{-13}$	0,208	0,471	$1,87 \times 10^{-7}$

Внутрилабораторная прецизионность:

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$52,17 \times 10^{-7}$
СКО в условиях промежуточной прецизионности $\sigma_{RI}^* = S_{RI}$	$3,91 \times 10^{-7}$

Оценивание систематической погрешности:

Θ^*	Значимость по критерию Стьюдента	
	$t_{расч.}$	$t_{табл}$
$2,22 \times 10^{-7}$	0,771	2,093

Т.к. $t_{расч.} < t_{табл.}$, значит систематическая погрешность Θ^* не значима, ее учитывают по уравнению $\Delta(v,c)^* = \Delta(n,c)^* = |\Delta c^*| = 1,96 \cdot \sigma_c^*$

$$\pm \Delta^* c = 2,22 \times 10^{-7}$$

Характеристика погрешности:

Рассчитываем характеристику погрешности как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей: $\Delta v^* = \Delta n^* = \Delta^* = 5,91 \times 10^{-7}$

Обобщаем результаты, полученные в лаборатории для диапазона концентраций с содержанием 5-гидрокситриптофана $50,00 \times 10^{-7}$ моль/ дм³ по 30 результатам анализов:

$\sigma_r^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RЛ}^*, \times 10^{-7}$	$\sigma_{RЛ}^*, \%$	$\pm \Delta^* c, \times 10^{-7}$	$\pm \Delta^* c, \%$	$\pm \Delta^*, \times 10^{-7}$ моль/ дм ³	$\pm \Delta^*, \%$
1,79	3,43	2,04	3,91	2,22	4,25	5,92	11,33

**В.11 Метрологические характеристики методики определения 5-гидрокситриптофана,
полученные в лаборатории.**

Обобщенные данные методики определения 5-гидрокситриптофана.

$C \times 10^{-7},$ моль/дм ³	$\sigma_r^*, \%$	$\sigma_{RL}^*, \%$	$\pm \Delta^*, \%$	$\pm \Delta^*, \%$
5	12,25	13,83	9,55	33,79
10	6,10	11,57	10,26	31,56
15	5,13	10,21	9,58	27,39
20	8,47	10,16	7,96	25,98
25	7,30	8,52	11,40	23,72
30	7,58	8,01	4,21	16,63
35	5,97	6,82	5,55	15,42
40	5,33	5,37	3,99	14,33
45	2,02	2,30	9,95	13,84
50	3,43	3,91	4,25	11,33

Из обобщенных данных, представленных в таблице выше, можно сделать вывод, что при определении 5-гидрокситриптофана в БАДах и лекарственных средствах показатель точности не превышает 33,79 %, показатель повторяемости 12,25 %, воспроизводимости 13,83 %

Приложение Б

Условия факторного планирования эксперимента

	Потенциал электролиза, В (X_1),	Время нанесения нанотрубок, с (X_2)	Концентрация МУНТ, мг/см ³ (X_3)
X_0	4	20	0,1
I	2	5	0,05
В.У.	6	25	0,15
Н.У	2	15	0,05

Результаты факторного планирования эксперимента

№ опыта	X_1	X_2	X_3	Уср
1	-1	-1	-1	17.30
2	+1	-1	-1	18.34
3	-1	+1	-1	16.96
4	+1	+1	-1	18.00
5	-1	-1	+1	14.80
6	+1	-1	+1	15.84
7	-1	+1	+1	14.46
8	+1	+1	+1	15.50

$$S_y^2 = 0,356; \quad S_{ад}^2 = 0,982$$

$$F_{экс} = 2,76 < F_{(0,05;4; 8)} = 3,8$$

$$Y = 16,4 + 0,52X_1 - 0,17X_2 - 1,25X_3$$