

## МЕТОДЫ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИПТОФАНА

© Магеррамова Латафат Муса гызы (а), Джафарова Нахида Али гызы (б),  
Сулейманова Эльмира Исмаил гызы (с)

(а) Азербайджанский Государственный Университет Нефти и Промышленности, Азербайджана, г. Баку; кандидат химических наук, преподаватель кафедры «Химия и технология неорганических веществ»

(б) Азербайджанский Государственный Университет Нефти и Промышленности, Азербайджана, г. Баку; кандидат химических наук, преподаватель кафедры «Химия и технология неорганических веществ»

(с) Азербайджанский Государственный Университет Нефти и Промышленности, Азербайджана, г. Баку; кандидат химических наук, преподаватель кафедры «Химия и технология неорганических веществ»

**Аннотация.** Триптофан представляет собой аминокислоту, из которой в организме синтезируются ниацин (витамин В) и серотонин. Последний участвует в мозговых процессах, управляет аппетитом, сном, настроением и болевым порогом. Триптофан является естественным релаксантом, который помогает бороться с бессонницей, вызывая нормальный сон; помогает бороться с состоянием беспокойства и депрессии; помогает при лечении головных болей при мигренях; укрепляет иммунную систему; уменьшает риск спазмов артерий и сердечной мышцы; вместе с Лизином борется за понижение уровня холестерина. В Канаде и во многих странах Европы назначается в качестве антидепрессанта и снотворного. Триптофан обладает различными физиологическими функциями и играет очень важную роль в организме человека и животных. Поэтому необходима разработка новых и усовершенствование уже известных эффективных физико-химических методов определения триптофана в лабораториях и в промышленном масштабе.

**Ключевые слова:** физические методы исследования, триптофан, аминокислоты, рацемические смеси, энантиомеры, спектрофотометрия

## METHODS OF PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS FOR DEFINITIONS OF TRYPTOPHAN

© Magerramova Latafat Musa (a), Kafarova Nakhida Ali (b),  
Suleymanova Elmira Ismayil (c)

(a) Azerbaijan State University of Oil and Industry, Azerbaijan, Baku; doctor of philosophy in chemistry, Lecturer at the Department of Chemistry and Technology of Inorganic Substances

(b) Azerbaijan State University of Oil and Industry, Azerbaijan, Baku; doctor of philosophy in chemistry, Lecturer at the Department of Chemistry and Technology of Inorganic Substances

(c) Azerbaijan State University of Oil and Industry, Azerbaijan, Baku; doctor of philosophy in chemistry, Lecturer at the Department of Chemistry and Technology of Inorganic Substances

**Abstract.** Tryptophan is an amino acid from which niacin (vitamin B) and serotonin are synthesized in the body. The latter is involved in brain processes, controls appetite, sleep, mood and pain threshold. Tryptophan is a natural relaxant that helps fight insomnia by inducing normal sleep; helps fight anxiety and depression; helps in the treatment of migraine headaches; strengthens the immune system; reduces the risk of spasms of arteries and heart muscle; together with Lysine, it fights to lower cholesterol levels. In Canada and in many European countries, it is prescribed as an antidepressant and sleeping pill. Tryptophan has various physiological functions and plays a very important role in the human and animal body. Therefore, it is necessary to develop new and improve already known effective physicochemical methods for the determination of tryptophan in laboratories and on an industrial scale.

**Key words:** physical research methods, tryptophan, amino acids, racemic mixtures, enantiomers, spectrophotometry

Триптофан ( $\beta$ -( $\beta$ -индолил)- $\alpha$ -аминопропионовая кислота, Trp) представляет собой ароматическую альфа-аминокислоту. Существует в двух оптически изомерных формах - L и D, и в виде рацемата (рацемической смеси) (DL). L-триптофан является протеиногенной аминокислотой и входит в состав белков всех известных живых организмов. Относится к ряду гидрофобных аминокислот, поскольку содержит ароматическое ядро индола. Участвует в гидрофобных и стэкинг-взаимодействиях.

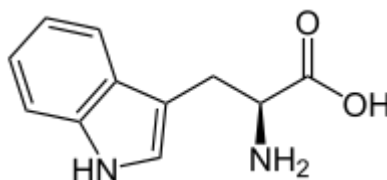


Рис. 1. Триптофан

Впервые триптофан был выделен в 1890 г. из пищеварительного фермента трипсина немецким химиком Рихард Ноймайстером.

Триптофан является биологическим прекурсором серотонина и ниацина. Часто гиповитаминоз по витамину B<sub>3</sub> сопряжён с недостатком триптофана. Также триптофан является биохимическим предшественником индольных алкалоидов. Учитывая высокое биологическое значение триптофана, разработка эффективных методов его определения в биологических объектах представляет важный как научный, так и практический интерес. В продолжении исследований в области разработки методов определения белковых молекул и аминокислот [1-3], в этой работе нами представлен обзор результатов научных исследований в области определения триптофана различными физико-химическими методами анализа. Так, в работе [4] разработан новый спектрофотометрический метод определения со-

держания триптофана в белковых гидролизатах. В качестве реагента используется сульфат дифениламина, который окисляется до дифенилбензидинсульфокислоты после реакции с нитритом натрия в среде серной кислоты. Нестабильный продукт окисления быстро реагирует с нитритом натрия с образованием диазотированного промежуточного продукта. Когда диазотированный промежуточный продукт сочетается с триптофаном, образуется продукт розового цвета, который стабилен в течение не менее 1 часа при температуре окружающей среды. Этот окрашенный продукт имеет максимум поглощения при 522 нм и молярную абсорбционную способность  $0,89 \cdot 10^4$  л/(моль·см). Закон Бера соблюдается в диапазоне 0,30–12 мг/мл. Метод применен для анализа содержания триптофана в белковых гидролизатах белого амура. Кроме того, его сравнивают с анализом высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой. Метод прост, быстр и точен по сравнению с предыдущими методами.

В работе [5] сообщается, что триптофан является незаменимой аминокислотой, которая участвует в различных биологических процессах и ежедневном здоровье человека. По мере того, как важные функции Тгр становятся все более очевидными, его измерение становится все более важным в различных ситуациях. В этой работе авторы улучшили цветную реакцию Тгр на основе реакции Хопкинса-Коула и разработали простой колориметрический метод определения Тгр с использованием нескольких различных реагентов, включая пентагидрат гипохлорита натрия и глутамат натрия. Метод обнаружения может быть выполнен с использованием безопасных материалов, а не обычных токсичных веществ, и вызывает изменение малинового цвета с пиком поглощения при 525 нм, что позволяет количественно определить Тгр с помощью простой спектрофотометрии всего за 10 минут. Этот анализ показал линейный диапазон обнаружения от 10 до 100 мг/л ( $R^2 = 0,9996$ ). Среднее восстановление в спинномозговой жидкости с добавлением колебалось от 90,5% до 104,3% с относительным стандартным отклонением от 0,27% ( $n = 3$ , 29,40 мг/л Тгр) до 1,19% ( $n = 3$ , 72,90 мг/л Тгр). Этот новый спектрофотометрический метод может позволить многим исследователям и лаборантам обнаруживать Тгр в различных растворах образцов без дорогостоящих аналитических инструментов или сложных операций.

Описан новый спектрофотометрический метод количественного определения триптофана и тирозина в пептидах и белках [6]. Он основан на двух специфических цветных реакциях: реакции триптофана с формальдегидом и реакции тирозина и триптофана с гидроксиламином и катионами церия. Комбинацией этих двух реакций можно одновременно определять и тирозин, и триптофан. Тирозин и/или триптофан, связанные в пептидах и/или белках, реагируют независимо от остальной части молекулы пептида или белка. Метод прост, точен и чувствителен. Гидролиз не требуется.

Предложен новый спектрофотометрический метод определения триптофана (Тгр) [7]. Чувствительный и простой метод был основан на том, что  $\text{NaNO}_2$  и Тгр образуют диазотированный продукт в среде азотной кислоты и что продукт приобретает ярко-пурпурный цвет при связывании с дигидрохлоридом N-(1-нафтил) этилендиамина (NEDA), который был стабилен не менее 40 мин. Максимум поглощения наблюдался при 550 нм, а кажущаяся молярная поглощательная способность составляла  $8,48 \times 10^3$  л/моль см. Линейная зависимость поглощения от концентрации Тгр позволила провести чувствительное количественное определение Тгр в диапазоне 1–20 мкг/мл а предел обнаружения составил 0,5 мкг/мл. Метод был успешно применен для определения L-Тгр в системе ферментативного

разделения DL-N-ацетилтриптофана. Относительные стандартные отклонения ( $n=6$ ) и извлечения составили 0,97–2,21% и 97,5–101,3% соответственно. Точность нового метода была подтверждена результатами капиллярного электрофореза. Кроме того, исследование интерференции показало, что DL-N-ацетилтриптофан (субстрат),  $\text{CoCl}_2$  (активатор) и другие распространенные аминокислоты не оказывали заметного влияния на определение Тгр.

Осуществлено быстрое и точное разделение бинарных смесей триптофана и тирозина [8]. Дифференциально-производная спектрофотометрия с методом измерения пересечения нуля использовалась для количественного определения триптофана и тирозина в лабораторно приготовленных смесях. Ни предварительной обработки образца, ни разделения не требовалось. Линейные калибровочные графики дифференциальной второй производной значения были (при 222,4 и 217,9 нм для триптофана и тирозина, соответственно) в зависимости от концентрации в диапазонах 0,1–20,0 и 1,0–50,0 мкг/мл, а линейность была удовлетворительной ( $r = 0,9987$  и  $r = 0,9997$ ), для триптофана и тирозина соответственно) менее 1,03%, что указывает на достаточную воспроизводимость метода. Результаты, полученные предложенным методом были статистически сравнены с помощью t-критерия Стьюдента и F-критерия отношения дисперсии, при этом показано хорошее согласие результатов.

В работе [9] показано спектрофотометрическое определение триптофана и тирозина в белках.

Разработан упрощенный метод анализа триптофана (Тгр) и его метаболитов в плазме крови человека с использованием тандемной масс-спектрометрии жидкостной хроматографии с ионизацией электрораспылением [10]. Тгр и его метаболиты обладают различными химическими свойствами, но не имеют общей функциональной группы для дериватизации. Используя колонку с пентафторфенилом с обращенной фазой (PFP) для разделения методом жидкостной хроматографии, Тгр и его 15 метаболитов (3-гидроксиантраниловая кислота, 3-гидроксикинуренин, 3-индолуксусная кислота, 5-гидроксииндол-3-уксусная кислота, 5-гидрокси-L-триптофан, антраниловая кислота, индол-3-молочная кислота, кинуренин, кинуреновая кислота, мелатонин, никотиновая кислота, пиколиновая кислота, хинолиновая кислота, серотонин и ксантуруеновая кислота) были успешно разделены в течение 15 мин без дериватизации. биомаркер воспаления и часто оценивается с метаболитами Тгр в нескольких отчетах, также может быть одновременно проанализирован. С помощью этого метода Тгр и его метаболиты были обнаружены с хорошей чувствительностью и селективностью без дериватизации и твердофазной экстракции. Метод был валидирован в этом исследовании, показывая, что относительное стандартное отклонение 14 метаболитов Тгр было  $<15\%$ , а точность была в пределах  $100\% \pm 20\%$ , за исключением никотиновой кислоты. Диапазон количественного определения был оптимизирован до 0,0150–100 мкМ, охватывающий концентрацию метаболитов Тгр в организме человека.

Отмечается [11], что триптофан является ключевым компонентом многих биологических процессов и незаменимой аминокислотой в продуктах питания и кормах. Анализ содержания триптофана в белках или белковосодержащих матрицах всегда был сложной задачей. В этой работе авторы показали, что подготовка образцов перед анализом триптофана может быть значительно упрощена, а затраты времени сокращены за счет использования аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта для устранения проблемы деградации триптофана во время щелочного гидролиза. В сочетании с разделением с помощью ВЭЖХ

и детектированием с помощью одноквадрупольной масс-спектрометрии это позволяет сократить время анализа до 10 минут. Щелочной гидролизат, полученный в представленном авторами методе, может быть объединен с окисленным гидролизатом, полученным при измерении содержания серосодержащих аминокислот, таким образом, по существу обеспечивая два анализа за время одного.

Для определения энантиомерного состава триптофана (Тгр) был предложен метод, сочетающий флуоресцентную спектроскопию, химию «гость-хозяин» и регрессию основных компонентов (ПЦР) [12]. С помощью флуоресцентной спектроскопии измерено хиральное взаимодействие между энантиомерами триптофана и бычьим сывороточным альбумином (БСА), играющим роль хирального селектора. ПЦР использовали для моделирования количественной связи между полученными спектральными данными флуоресценции и энантиомерным составом Тгр. Для проверки предлагаемого метода использовались перекрестная проверка с исключением одного и внешняя проверка. Результаты показывают, что метод применим для количественного определения энантиомерного состава Тгр. Кроме того, метод показывает высокую чувствительность. Когда было 2,50 мкмоль/л Тгр в растворах точно определен энантиомерный состав триптофана.

Флуоресцентные свойства остатков триптофана чувствительны к микроокружению флуорофоров в белках. Поэтому характеристики флуоресценции широко используются для изучения структурных переходов в белках [13]. Однако расшифровка структурной информации из спектроскопических данных является сложной задачей. В этой работе представляем обзор подходов, разработанных для разложения спектров флуоресценции многокомпонентного белка триптофана и корреляции этих спектральных параметров со структурными свойствами белка.

Отмечается [14], что триптофан — незаменимая аминокислота, которая не может быть синтезирована человеком и животными, но должна поступать из экзогенных источников, особенно с пищей. Масса пищевого ТРП поступает для синтеза белков организма. Среди белковых продуктов молочные белки обеспечивают относительно высокое количество ТРП. В этой работе предложен быстрый хроматографический метод определения ТРП в йогурте, с использованием обращенно-фазовой колонки с флуоресцентным детектированием (280 нм  $E_x$ ; 360 нм  $E_m$ ), Линейный градиент элюции ацетонитрила в воде позволил провести анализ ТРП за 8,0 мин. Предел обнаружения и предел количественного определения метода составили 0,011 нг/мкл и 0,029 нг/мкл, соответственно, используя 5-метил-1-триптофан в качестве внутреннего стандарта. Аналитический метод был успешно применен к коммерческим йогуртам из разных видов животных, а значения ТРП колебались от 35,19 до 121,97 мг/100 г (козий и коровий йогурт греческого типа соответственно).

В работе [15] авторы оценили оптическое поведение триптофана в присутствии наночастиц золота различного диаметра (5, 10 и 20 нм) и концентраций (в диапазоне 0,2-1,4 мкМ). Результаты показали, что как поглощение, так и флуоресценция триптофана сильно зависят от размера и концентрации наночастиц. Однако при анализе флуоресценции и поглощения было обнаружено противоположное поведение. Результаты показали, что поглощение усиливалось в присутствии наночастиц золота, в то время как флуоресценция подавлялась наночастицами.

Канари (*Canarium indicum L.*) — местное растение Индонезии, произрастающее в основном в восточной части Индонезии, особенно на островах Малуку, Северный Сулавеси

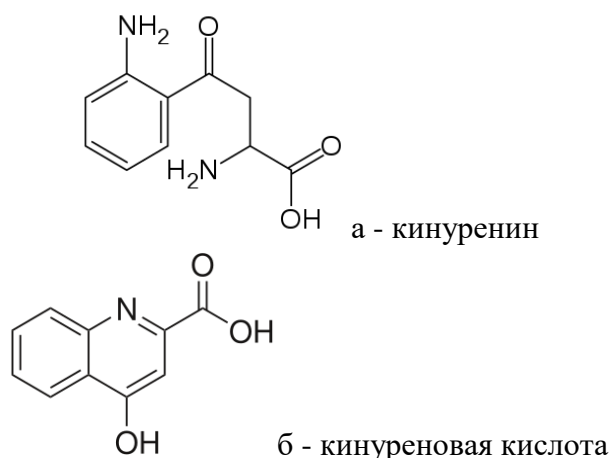
и Серам. Ранее никаких научных отчетов о содержании L-триптофана в *Canarium indicum* не проводилось. Поэтому данное исследование [16] было проведено для определения присутствия и количественного определения ароматической аминокислоты (L-триптофана) в гидролизате белка канари спектрофлуориметрическим методом. Гидролизат белка готовили двумя способами гидролиза: ферментативным и щелочным гидролизом. L-триптофан можно дифференцировать от тирозина напрямую, без использования какого-либо реагента, путем возбуждения образца при 295 нм, чтобы избежать эмиссии тирозина. Уравнение корреляции калибровочной кривой с использованием стандарта в диапазоне 0,5-5 ppm составило  $y = 6632,3x - 845,42$  и коэффициент корреляции 0,9997, а коэффициент дисперсии линейной регрессии составил 1,29%. Полученные предел обнаружения и предел количественного определения составили 0,116 м.д. и 0,35 м.д. соответственно. Восстановление точности теста было получено в диапазоне 95-96%. Относительное стандартное отклонение тестов прецизионности внутри анализа было получено в диапазоне 0,5-1,8%, а промежуточная прецизионность в диапазоне 2,18-3,74%. L-триптофан был обнаружен во всех образцах (папаин, пепсин и щелочной гидролизат) в концентрациях 5,6, 5 и 1,53 мг/100 мг белка соответственно. Используемый флуорометрический метод соответствовал требованиям валидации и может быть использован для анализа L-триптофана в образцах, содержащих тирозин, без перекрытия спектров и без использования какого-либо специфического реагента.

Триптофан и его метаболиты выполняют важные биологические функции в организме человека. Молоко является важным источником триптофана. В работе [17] авторы разработали метод определения уровней триптофана и 12 метаболитов в молоке. Аналиты были извлечены с использованием процедуры QuEChERS (быстрая, простая, дешевая, эффективная, прочная и безопасная) и проанализированы методом жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. Предложенный метод показал подходящую точность (стандартное отклонение  $\leq 10,31\%$ ) и высокую чувствительность (пределы количественного определения находились в пределах от 0,05 до 5 нг/мл). Извлечения находились в диапазоне от 44 до 126%. Наконец, разработанный метод был успешно применен для сравнения содержания триптофана и его метаболитов в 4-х молочных продуктах, произведенных разными способами: пастеризованном молоке, ультрапастеризованном молоке, сухом молоке и йогурте. Результаты частичного дискриминантного анализа методом наименьших квадратов (PLS-DA) показали, что в соответствии с используемым здесь методом можно четко различать различные типы переработанного молока. Определенные уровни триптофана и метаболитов в молоке могут дать новый ориентир для оценки молока.

L-триптофан является чрезвычайно важной аминокислотой для множества биологических функций в живых организмах. В работе [18] авторы смогли измерить изменения концентрации L-триптофана при включении в гранулы с полиэтиленом в качестве носителя. Изменения были измерены как по характеристическим полосам поглощения связей C11 и C12 в низком терагерцовом диапазоне частот, так и по изменениям показателя преломления, где гранулы с более высокими концентрациями L-триптофана показали более высокие показатели преломления. Объемная концентрация L-триптофана в гранулах полиэтилена была точно определена с помощью простой модели, которая объясняет вклад в комплексный показатель преломления полученного образца из-за двух составных материалов.

Эти измерения показывают, что методы терагерцовой временной области могут применяться для быстрого обнаружения изменений в концентрации определенных аминокислот путем изучения относительной фазовой задержки и изменения амплитуды терагерцовых переходных процессов.

Для определения триптофана, кинуренина и кинуреновой кислоты в сыворотке человека был разработан быстрый и высокопроизводительный метод жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС). Биологические образцы перед разделением осаждали метанолом на Agilent Eclipse XDB-C18. Внутренние стандарты, меченные стабильными изотопами (кинуренин- $^{13}\text{C}_4\text{ }^{15}\text{N}$  и кинурениновая кислота-d<sub>5</sub>) использовались для количественной оценки. Детекцию проводили с помощью мониторинга множественных реакций в режиме ионизации электрораспылением при  $m/z$  205,1→188,1 для триптофана,  $m/z$  209,1→146,1 для кинуренина,  $m/z$  190,1→144,1 для кинурениновой кислоты. Хорошая линейность соотношений площадей пиков аналита и внутреннего стандарта наблюдалась в диапазоне концентраций 1 000–50 000 нг/мл для триптофана, 100–5 000 нг/мл для кинуренина и 1–60 нг/мл для кинурениновой кислоты. Объединенную человеческую сыворотку без лекарств очищали с использованием активированного угля, и было показано, что метод является линейным с параметрами валидации в допустимых пределах. Недавно разработанный метод был успешно использован для определения концентрации триптофана, кинуренина и кинуреновой кислоты в сыворотке крови 26 здоровых добровольцев и 54 больных депрессией [19].



**Рис. 2.** а – кинуренин; б – кинуреновая кислота

Качественная протеиновая кукуруза (QPM) имеет приблизительно вдвое более высокие концентрации триптофана (Trp) и лизина (Lys) в белке по сравнению с обычной кукурузой. Поскольку несколько генетических систем контролируют качество белка QPM, важно регулярно контролировать Trp и/или Lys в программах разведения QPM. Цель исследования [20] состояла в том, чтобы оценить возможности метода NIRS в определении содержания триптофана в QPM, которые повышают эффективность исследований QPM, частично заменяя более дорогой и трудоемкий анализ, 268 образцов кукурузы были использованы для разработки моделей NIRS для содержания триптофана. Стандартная ошибка (SEC) и коэффициент детерминации для калибровки составили 0,007 и 0,76 соответ-

ственно. Когда модель NIRS была подвергнута внешней проверке с использованием 40 линий S2 из племенных популяций QPM, стандартная ошибка прогноза (SEP) для проверки и коэффициент детерминации между NIRS и химическими данными составляли 0,008 и 0,84 соответственно. Таким образом, результат подтверждает, что модель NIRS является эффективным инструментом для скрининга QPM из обычной кукурузы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Сулейманова Э.И. Применение метода спектрофотометрии для определения аминокислот // Вестник Башкирского Государственного Университета. 2023. № 1. С. 100-105.
2. Сулейманова Э.И. Применение потенциометрического метода в биомедицине // Вестник Башкирского Государственного Педагогического Университета. 2022. № 1. С. 166-174.
3. Сулейманова Э.И. Определение органических соединений в лекарственных препаратах методом экстрактивной спектрофотометрии // Вестник Башкирского Государственного Педагогического Университета. 2022. № 2. С. 237-243.
4. Ren J., Zhao M., Wang J. Spectrophotometric Method for Determination of Tryptophan in Protein Hydrolysates // Food Technology and Biotechnology. 2007. Vol. 45. N 4. Pp. 360-366.
5. Hosokawa Sh., Morinishi T., Ohara K., Yamaguchi K. A spectrophotometric method for the determination of tryptophan following oxidation by the addition of sodium hypochlorite pentahydrate // PLOS One. 2023. Vol. 18. N 1. Pp. 3-10.
6. Chrastil J. Spectrophotometric determination of tryptophan and tyrosine in peptides and proteins based on new color reactions // Anal Biochem. 1986. Vol. 158. N 2. Pp. 443-446
7. Wentao Y., Zhang H., Chen G., Chunyan T. Novel Method for Spectrophotometric Determination of L-Tryptophan in the Enzymatic Resolution of DL-N-Acetyl-Tryptophan // Microchimica Acta. 2004. Vol. 146. Pp. 285-290.
8. Jihad R.M. Simultaneous determination of tryptophan and tyrosine in binary mixture by zero-crossing second derivative spectrophotometry // J. of University of Anbar for pure science. 2010. Vol.4. N. 1. Pp 1-7.
9. Edelhoch H. Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins // Biochemistry. 1967. Vol. 6. N 7. Pp. 1948-1954.
10. Karakawa S., Nishimoto R., Harada M., Arashida N. Simultaneous Analysis of Tryptophan and Its Metabolites in Human Plasma Using Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry // Chromatography. 2019. Vol. 40. N 3. Pp. 127-133.
11. Cour R., Jorgensen H., Schioerring J. Improvement of Tryptophan Analysis by Liquid Chromatography-Single Quadrupole Mass Spectrometry Through the Evaluation of Multiple Parameters // Frontiers in Chemistry. 2019. Vol. 7. Pp. 121-128.
12. Long J., Deng Q., Wang Y., Hua L. Determination of Enantiomeric Composition of Tryptophan by Fluorescence Spectroscopy Combined with Principal Component Regression // Analytical Letters. 2013. Vol. 46. N 5. Pp. 831-843.
13. Hixon J., Reshetnyak Y.K. Algorithm for the Analysis of Tryptophan Fluorescence Spectra and Their Correlation with Protein Structural Parameters // Algoritms. 2009. Vol. 2. N 3. Pp. 1155-1176.



14. Ritota M., Manzi P. Rapid Determination of Total Tryptophan in Yoghurt by Ultra High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection // *Molecules*. 2020. Vol. 25. Pp. 5025-5064.
15. Silva G., Fernandes J., Caires R. Size-Dependent Interaction of Gold Nanoparticles with Tryptophan: A Spectroscopic Analysis // *Bio-Optics – Design and Application*. 2015. Vancouver. Canada. 131 p.
16. Nugrahani I., Abotbina I., Apsari C., Gusdinar T. Spectrofluorometric determination of L-tryptophan in canary (*Canarium indicum* L.) seed protein hydrolysate // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2020. Vol. 10. N 1. Pp. 4780-4785.
17. Meicheng S., Cheng Y., Zhang C., Huaxing W. Determination of the levels of tryptophan and 12 metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the QuEChERS method // *Journal of Dairy Products*. 2020. Vol. 103. N 11. Pp. 1-13.
18. Ozep Z., Seher G., Severcan F. Concentration-Based Measurement Studies of L-Tryptophan Using Terahertz Time-Domain Spectroscopy (THz-TDS) // *Applied Spectroscopy*. 2014. N 1. Pp. 23-32.
19. Jun X., Fang X., Qing J., Xiao L. A Simple HPLC–MS/MS Method for Determination of Tryptophan, Kynurenine and Kynurenic Acid in Human Serum and its Potential for Monitoring Antidepressant Therapy // *Journal of Analytical Toxicology*. 2017. Vol. 41. N 1. Pp. 37-44.
20. Shiferaw L., Tsegay G., Asamenew G. Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the determination of tryptophan content in quality protein maize (QPM) // *International Journal of Development Research*. 2016. Vol. 6. N 11. Pp. 10262-10264.

#### REFERENCES

1. Suleymanova E.I. Application of the spectrophotometry method for the determination of amino acids // *Bulletin of Bashkir State University*. 2023. No. 1. Pp. 100-105.
2. Suleymanova E.I. Application of the potentiometric method in biomedicine // *Bulletin of the Bashkir State Pedagogical University*. 2022. No. 1. Pp. 166-174.
3. Suleymanova E.I. Determination of organic compounds in medicinal preparations by extraction spectrophotometry // *Bulletin of the Bashkir State Pedagogical University*. 2022. No. 2. Pp. 237-243.
4. Ren J., Zhao M., Wang J. Spectrophotometric Method for Determination of Tryptophan in Protein Hydrolysates // *Food Technology and Biotechnology*. 2007. Vol. 45. N 4. Pp. 360-366.
5. Hosokawa Sh., Morinishi T., Ohara K., Yamaguchi K. A spectrophotometric method for the determination of tryptophan following oxidation by the addition of sodium hypochlorite pentahydrate // *PLOS One*. 2023. Vol. 18. N 1. Pp. 3-10.
6. Chrastil J. Spectrophotometric determination of tryptophan and tyrosine in peptides and proteins based on new color reactions // *Anal Biochem*. 1986. Vol. 158. N 2. Pp. 443-446.
7. Wentao Y., Zhang H., Chen G., Chunyan T. Novel Method for Spectrophotometric Determination of L-Tryptophan in the Enzymatic Resolution of DL-N-Acetyl-Tryptophan // *Microchimica Acta*. 2004. Vol. 146. Pp. 285-290.

8. Jihad R.M. Simultaneous determination of tryptophan and tyrosine in binary mixture by zero-crossing second derivative spectrophotometry // J. of University of Anbar for pure science. 2010. Vol.4. N. 1. Pp 1-7.
9. Edelhoch H. Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins // Biochemistry. 1967. Vol. 6. N 7. Pp. 1948-1954.
10. Karakawa S., Nishimoto R., Harada M., Arashida N. Simultaneous Analysis of Tryptophan and Its Metabolites in Human Plasma Using Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry // Chromatography. 2019. Vol. 40. N 3. Pp. 127-133.
11. Cour R., Jorgensen H., Schioerring J. Improvement of Tryptophan Analysis by Liquid Chromatography-Single Quadrupole Mass Spectrometry Through the Evaluation of Multiple Parameters // Frontiers in Chemistry. 2019. Vol. 7. Pp. 121-128.
12. Long J., Deng Q., Wang Y., Hua L. Determination of Enantiomeric Composition of Tryptophan by Fluorescence Spectroscopy Combined with Principal Component Regression // Analytical Letters. 2013. Vol. 46. N 5. Pp. 831-843.
13. Hixon J., Reshetnyak Y.K. Algorithm for the Analysis of Tryptophan Fluorescence Spectra and Their Correlation with Protein Structural Parameters // Algorithms. 2009. Vol. 2. N 3. Pp. 1155-1176.
14. Ritota M., Manzi P. Rapid Determination of Total Tryptophan in Yoghurt by Ultra High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection // Molecules. 2020. Vol. 25. Pp. 5025-5064.
15. Silva G., Fernandes J., Caires R. Size-Dependent Interaction of Gold Nanoparticles with Tryptophan: A Spectroscopic Analysis // Bio-Optics – Design and Application. 2015. Vancouver, Canada. 131 p.
16. Nugrahani I., Abotbina I., Apsari C., Gusdinar T. Spectrofluorometric determination of L-tryptophan in canary (*Canarium indicum* L.) seed protein hydrolysate // Biointerface Research in Applied Chemistry. 2020. Vol. 10. N 1. Pp. 4780-4785.
17. Meicheng S., Cheng Y., Zhang C., Huaxing W. Determination of the levels of tryptophan and 12 metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the QuEChERS method // Journal of Dairy Products. 2020. Vol. 103. N 11. Pp. 1-13.
18. Ozep Z., Seher G., Severcan F. Concentration-Based Measurement Studies of L-Tryptophan Using Terahertz Time-Domain Spectroscopy (THz-TDS) // Applied Spectroscopy. 2014. N 1. Pp. 23-32.
19. Jun X., Fang X., Qing J., Xiao L. A Simple HPLC–MS/MS Method for Determination of Tryptophan, Kynurenine and Kynurenic Acid in Human Serum and its Potential for Monitoring Antidepressant Therapy // Journal of Analytical Toxicology. 2017. Vol. 41. N 1. Pp. 37-44.
20. Shiferaw L., Tsegay G., Asamenew G. Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the determination of tryptophan content in quality protein maize (QPM) // International Journal of Development Research. 2016. Vol. 6. N 11. Pp. 10262-10264.