ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ КАПІЛЯРНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ L-АРГІНІНУ В КОРМОВИХ ДОБАВКАХ

Г. П. Ривак, канд. с.-г. наук,
Т. Р. Левицький, канд. с.-г. наук,
Р. О. Ривак, молодший науковий співробітник,
С. В. Чорний, старший лаборант

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок,
вул Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна
hryvak@gmail.com,

У статті поданий літературний огляд щодо необхідності балансування комбікормів за вмістом L-аргініну, його характеристику, шляхи поповнення ним раціону тварин і птиці, а також розглянуто сучасні методи кількісного визначення L-аргініну в харчових продуктах, фармацевтичних препаратах тощо.

В розділі «Матеріали і методи» подано характеристику розробленої методики випробувань, параметри проведення дослідження, калібрувальні характеристики із застосуванням стандартного зразка L-аргініну та проведення випробувань вмісту амінокислоти у кормовій добавці за допомогою системи капілярного електрофорезу «Капель-105М». Подано опис валідаційних характеристик, проведених у процесі валідації методики.

У результаті проведених досліджень розроблено методику визначення вмісту L-аргініну в кормових добавках за допомогою методу капілярного електрофорезу. Методика випробувань базується на розчиненні зразка кормової добавки, в подальшому розділенні і кількісному визначенні вільної форми L-аргініну, його ідентифікації за індивідуальним поглинанням за довжині хвилі 200 нм, температури в робочому капілярі 30 °С, напруги 25 кВ та за допомогою провідного електроліту. Подано результати валідації методики за такими характеристиками: збіжність, відтворюваність, точність, лінійність, межа виявлення, бюджет невизначеності. Значення показників точності, збіжності, відтворюваності і невизначеності методу (при довірчій ймовірності (P) 0,95) не перевищує 5,0 %, гіпотеза про лінійність є прийнятною, розраховані на основі стандартного відхилення (SD) межі виявлення для визначення вмісту аргініну є задовільними. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що метод капілярного електрофорезу з використанням приладу «Капель-105М» є достатньо точним та вірогідним у випадку досліджень кормових добавок L-аргініну із вмістом основної речовини не менше 98,0 %.

Ключові слова: КОРМОВІ ДОБАВКИ, АМІНОКИСЛОТИ, МЕТОД КАПІЛЯРНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ, L-АРГІНІН, ВАЛІДАЦІЯ.

APPLICATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD FOR DETERMINATION OF L-ARGININE CONTENT IN FEED ADDITIVE

H. P. Ryvak, T. R. Levytskyi, R. O. Ryvak, S. V. Chorniy

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives
11. Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine
hryvak@gmail.com

The article presents a literature review on the need to balance feed on L-arginine content, its characteristics, ways to supplement the diet of animals and poultry, as well as modern methods for quantitative determination of L-arginine in food, pharmaceuticals, etc.

In the section «Materials and methods» the characteristic of the developed test technique, parameters of carrying out research, calibration characteristics with application of a standard sample of L-arginine and carrying out tests of amino acid content in a feed additive by means of system of capillary electrophoresis «Kapel-105M» are given. A description of the validation characteristics performed in the process of validation of the method is given.

As a result of the conducted researches the technique of definition of the content of L-arginine in feed additives by means of a method of capillary electrophoresis is developed. The test procedure is based on the dissolution of the feed additive sample, further separation and quantification of the free form of L-arginine, its identification by individual absorption at a wavelength of 200 nm, temperature in the working capillary 30 °C, voltage 25 kV and conductive electrolyte. The results of validation of this technique by the following characteristics are presented: repeatability, reproducibility, trueness, linearity, limit of quantification, budget uncertainty. The values of trueness, repeatability, reproducibility and uncertainty of the method (with a confidence level of (P) 0.95) does not exceed 5.0 %, the hypothesis of Linearity is acceptable, calculated on the basis of standard deviation (SD) limit of quantification for determining the content of arginine are satisfactory. The results allow us to conclude that the method of capillary electrophoresis using the device «Kapel-105M» is quite accurate and reliable in the case of studies of feed additives L-arginine with a content of the main substance of at least 98,0 %.

Keywords: FEED ADDITIVES, AMINO ACIDS, CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD, L-ARGININE, VALIDATION.

При балансуванні раціонів сільськогосподарських тварин і птиці особливо важливо приділяти увагу амінокислотам (лізин, метіонін, триптофан, аргінін тощо), оскільки потреба організму в них може забезпечуватись повністю або частково за рахунок їх надходження з кормами. Це необхідна умова для ефективного використання кормів, забезпечення росту тварин, їх відтворення та продуктивності.

Аргінін (δ -гуанідин- α -аміновалеріанова кислота) – основна α -амінокислота, L-форма якої входить до 20 амінокислот, що кодуються генетичним кодом і становлять основу білків. Ця амінокислота також важлива для багатьох інших метаболічних процесів у клітинах клітини, зокрема для синтезу Нітрогену (II) оксиду, поліамінів, проліну, глутамату, креатину та агматину (Morris, 2006). Аналіз більше 1150 білків показав, що аргінін становить близько 5,1 % усіх амінокислот в їх складі (Nelson & Cox, 2008).

Для сільськогосподарських тварин аргінін є напівнезамінною амінокислотою, тобто біохімічні шляхи для її біосинтезу існують, проте в певні періоди життя, зокрема інтенсивного росту та розвитку, а також під час деяких захворювань вони не можуть забезпечувати достатньої кількості цієї сполуки, через що вона повинна потрапляти в організм із кормом (Nelson & Cox, 2008). Для деяких видів тварин (хижих та морських ссавців), молодняка ссавців, а також птиці, аргінін є незамінною амінокислотою (Wu et al., 2008).

Багатими на аргінін є зерно сої – 2611 мг/100 г, чечевиці – 2050 мг/100 г, кунжуті – 1900 мг/100 г, насінні соняшника – 1785 мг/100 г, в лущеному горосі – 1620 мг/100 г, а також в продуктах їх переробки, особливо високобілкових. В дещо менших кількостях аргінін входить у склад білків зернових: пшениці – 500-600 мг/100 г, вівса – 600-650 мг/100 г, жита – 470-520 мг/100 г, ячменю – 450-480 мг/100 г. Цією амінокислотою багаті продукти тваринного походження, такі як м'ясо від 720 до 1250 мг/100 г залежно від виду тварин і птиці, риба і водорості, а також продукти їх переробки.

Однак майже 40 % аргініну від його загальної кількості, що поступає в організм із кормом, не потрапляє в кров, а розщеплюється у тонкому кишківнику (Wu et al., 2008), тому

існує необхідність застосування кормових добавок аргініну в L-формі для балансування комбікормів і преміксів для сільськогосподарських тварин і птиці за його вмістом.

Офіційно зареєстровано і реалізується на ринку України значна кількість амінокислотних кормових добавок з високим вмістом L-аргініну в їх складі, а також однокомпонентні L-форми із вмістом аргініну не менше 98 % різних фірм Європи та Азії.

Контролювання якості кормових добавок L-аргініну за його вмістом є важливим аспектом для оптимального забезпечення потреб виробництва комбікормів і преміксів.

На сьогоднішній день для визначення вмісту аргініну використовуються різноманітні методи досліджень, зокрема, іонообмінної хроматографії у добривах (Sprayd et al., 1994; Huang & Ough, 1989), флюориметрії, потенціометрії у харчових продуктах (соках і винах) та фармацевтичних препаратах (Parniak et al., 1983), спектрофотометрії для визначення залишків аргініну в білках р-нітрофенілгліоксалу (Yamasaki et al., 1981; Sastry & Tummuru, 1994; Wang et al., 2008), капілярного зонного електрофорезу у фітофармацевтичних препаратах (Zhang et al., 2004; Narezhnaya et al., 2010), полярографії у фармацевтичних препаратах (Rong et al., 1999), проточно-інжекційного аналізу шляхом ферментної іммобілізації аргініну на епоксидній матриці (Alonso et al., 1995), високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у плазмі крові, фармацевтичних препаратах, харчових і кормових добавках (Chu et al., 2003) та ензиматичні, зокрема, біосенсорні, у фармацевтичних препаратах за використання рекомбінантної аргінази I печінки людини (Gaede & Grieshaber 1975; Mira, 2001; Soldatkin et al., 2008; Mayoral et al., 2010; Stasyuk et al., 2012).

Для визначення L-аргініну в кормових добавках із вмістом діючої речовини не менше 98,0 % найчастіше використовується метод високоефективної рідинної хроматографії, який вимагає високочистих реактивів, хроматографічних колонок, що є доволі затратним.

Метод капілярного зонального електрофорезу традиційно порівнюють з високоефективною рідинною хроматографією, оскільки в обох методах розділення проходить в обмеженому просторі (капілярі або колонці) з участю рухомої рідкої фази (буферного розчину або елюента) і для реєстрації сигналів використовують подібні принципи детектування і програмної обробки даних.

Перевагами методу капілярного електрофорезу є: висока ефективність розділення зразка; невеликий об'єм аналізованої проби і буферів, при цьому практично непотрібне застосування високочистих, дорогих органічних розчинників; відсутність колонки, сорбента; швидкість досліджень.

Виходячи з вищесказаного в лабораторії контролю кормових добавок і преміксів ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок розроблено і валідовано методику для контролювання вмісту L-аргініну в кормових добавках даним методом.

Матеріали і методи. Для досліджень було взято кормову добавку L-аргініну із вмістом діючої речовини не менше 98,5 %. Визначення вмісту L-аргініну проводили методом капілярного зонального електрофорезу, в основі якого закладено електрокінетичні явища — електроміграція іонів та інших заряджених частинок і електроосмос, які виникають у розчинах при розташуванні їх в електричному полі, переважно, високої напруги. На розчин, який знаходиться в тонкому капілярі діє електричне поле ззовні та викликає в ньому рух заряджених частинок і пасивний потік рідини, в результаті чого проба розділяється на індивідуальні компоненти, так як параметри електроміграції специфічні для кожного виду заряджених частинок. Дослідження проводили за допомогою приладу «Капель-105М» із позитивною полярністю джерела високої напруги (внутрішній діаметр капіляру 50 мкм, повна довжина капіляру 75 см, ефективна довжина 65 см), отримані дані обробляли спеціальним програмним забезпеченням на основі персонального комп'ютера.

У період проведення дослідження в приміщенні лабораторії дотримувались наступні умови: температура повітря 18-20 °С; вологість повітря 68-73 %; напруга в мережі 220 В; частота перемінного струму (50±1) Гц.

Згідно з методикою випробувань, було проведено підготовку капіляра до роботи, шляхом почергового промивання його розчинами кислоти, лугу, бідистильованої води і буферу. Буферний розчин попередньо фільтрували через целюлозо-ацетатний фільтр з розміром пор 0,2 мкм і діаметром 25 мм, виробництва фірми «SARTORIUS STEDIMUM» (каталоговий номер 16517). Для калібрування приладу застосовували стандартний зразок L-аргініну із вмістом діючої речовини не менше 99,0 %, виробництва фірми “Sigma”, США. Перевірку стабільності калібрувального графіку проводили за допомогою контрольного розчину, аналізуючи його три рази в умовах, відповідних аналізу.

Зразки кормової добавки L-аргініну екстрагували бідистильованою водою, підігрітою до 40 °С, струшуючи 10 хв. за допомогою шутель-апарату, а також застосовували додаткове розведення. В процесі робіт було проведено серію випробувань кормової добавки L-аргініну за відповідних параметрів приладу, наведених в таблиці 1.

Таблиця 1

Параметри приладу Капель-105М

Вихідний компонент	L-аргінін
Введення проби	30 мбар, 10 сек
Довжина хвилі, нм	200
Напруга в системі, кВ	25
Температура в капілярі, °С	30
Провідний електроліт	Буферний розчин – натрій тетраборнокислий

Згідно з вимогами ДСТУ ISO/IEC 17025:2017 і Настанови з якості Випробувального центру (ВЦ), було проведено валідацію даної методики відповідно до затвердженого Положення про валідацію, Commission Decision 2002/657/EC і процедури ВЦ ПСМ 7.2-02/2019. Збіжність, лінійність і межу кількісного виявлення було розраховано на основі результатів 10 повторів визначень вмісту L-аргініну даною методикою. Для встановлення точності проведено 6 визначень із застосуванням стандартного зразка даної амінокислоти, а для внутрішньо-лабораторної відтворюваності – 3 серії визначень по 8 зразків у кожній за двома факторами: температура навколишнього середовища і оператор. На завершення було розраховано бюджет невизначеності методики згідно PI 7.6-02/2019. Для розрахунку валідаційних характеристик використовували програмне забезпечення «Валідація 1.4» і «Невизначеність 1.6», яке базується на вимогах нормативних документів ISO 5725.2:2019, JCGM 100:2008, EURACHEM/CITAC Guide CG 4 (Ellison & Williams, 2000) тощо і валідоване у ВЦ.

Результати й обговорення. При побудові калібрувального графіка враховували такі параметри: час виходу, висоту і площу піків, задана концентрація калібрувального розчину L-аргініну становила 200 мг/дм³. Отримані дані щодо параметрів калібрувального графіка та розрахованих відхилень концентрації калібрувальних розчинів L-аргініну в процесі аналізування, наведено на електрофореграмі рис. 1 і в табл. 2.

Рис. 1. Калібрувальний графік L-аргініну (вісь X – площа піків, вісь Y – концентрація, мг/дм³)

Встановлено ширину вікна 5,0 % і на отриманих електрофореграмах перевірено автоматичну ідентифікацію піків L-аргініну.

Характеристики калібрувального графіка L-аргініну (n=3)

Номер калібрувального розчину	Час виходу піку, хв.	Висота піку	Площа піку	Концентрація, мг/дм ³	Відхилення, %
1	4.845	3.707	85.88	200.0	0.4
2	4.848	3.527	85.89	200.0	0.4
3	4.852	3.497	84.74	200.0	0.9

Дані таблиці показують, що час виходу піку калібрувальних розчинів № 1 і 2 є ідентичним, а калібрувального розчину № 3 збільшується на 0,14 %. Висота піку калібрувального розчину № 2 знижується на 5,1 %, а калібрувального розчину № 3 – на 6,0 %, порівняно з калібрувальним розчином № 1, однак ці показники не впливають на відхилення концентрації аргініну при аналізуванні калібрувальних розчинів.

Площа піків, як фактор відгуку, калібрувальних розчинів № 1 і 2 є ідентичною, калібрувального розчину № 3 знижується на 1,33 %, порівняно з ними. Відхилення концентрації L-аргініну між калібрувальними розчинами коливаються в межах 0,4-0,9 %, абсолютне середньоквадратичне відхилення (СКВ) становить 2,1982, коефіцієнт кореляції – 0,9999.

Перевірку стабільності калібрувального графіку проводили за допомогою контрольного розчину, з заданою концентрацією L-аргініну 200 мг/дм³. Відхилення концентрації L-аргініну між контрольними розчинами коливаються в межах 0,6-1,35 %, що не перевищує 5,0 %.

Приготовані, згідно з методикою, зразки кормової добавки L-аргініну з вмістом діючої речовини 98,5 % було проаналізовано і розраховано валідаційні характеристики методу для даного визначення. Електрофореграму зразка кормової добавки L-аргініну наведено на рисунку 2.

Рис. 2. Електрофореграма аналізування кормової добавки L-аргініну 98,5 % за вмістом діючої речовини

Згідно з результатами аналізування необхідної кількості зразків кормової добавки L-аргініну для проведення валідації, було розраховано отримані концентрації діючої речовини, враховуючи при цьому масу наважки та розведення зразка. Карту індивідуальних значень, отриманого вмісту L-аргініну подано на рис. 3.

Рис. 3. Карта індивідуальних значень вмісту L-аргініну проаналізованої кормової добавки

Середнє значення вмісту L-аргініну ($n=10$, довірча ймовірність (P) 95 %) при встановленні збіжності становить 98,98 %, стандартне відхилення (SD) – 0,73606 %, відносне стандартне відхилення (RSD) – 0,74364 %, межа збіжності (s_r) – 2,06. Висновок – результат задовільний.

Середня точність повернення (T) становить 100,487 %, нижня межа точності при даному вмісті аналіту – 85 %, верхня межа – 115 %, результат задовільний. Результати перевірки вимірювань на аномальність подано в таблиці 3.

Таблиця 3

Результати перевірки вимірювань точності на аномальність ($n=10$)

Показники	Значення
Максимальне значення	99,8 %
Обчислене значення статистики Грабса	1,11405
Мінімальне значення	97,5 %
Обчислене значення статистики Грабса	1,9183
Висновок для значень	Значення нормальні
Друге після максимального значення	99,7 %
Значення статистики для найбільшої пари	0,69499
Висновок для найбільшої пари	Значення нормальні
Друге після мінімального значення	98,6 %
Значення статистики для найменшої пари	0,20098
Висновок для найменшої пари	Значення нормальні

За внутрішньо-лабораторних умов відтворюваності при двох групах умов (температура, оператор) за довірчої ймовірності (P) 95 % різниця для групи № 1 становила 0,21667 %, № 2 – 0,11667 %, стандартне відхилення для різниць (SD) – 0,24608 %, внутрішній лабораторний коефіцієнт зміни величини не перевищував 5,0 %.

Розрахунок параметрів лінійності даного медоту для визначення вмісту L-аргініну наведено в таблиці 4.

На основі стандартного відхилення (SD) – 0,73606 % при встановленні межі виявлення для визначення вмісту аргініну методом капілярного електрофорезу, отримано наступні результати: межа виявлення – перший спосіб становить 3,68028 %, другий спосіб – 4,41633 %, третій спосіб – 7,36056 %, результати задовільні.

**Результати розрахунку параметрів лінійності для методу
капілярного електрофорезу за визначення вмісту L-аргініну в кормовій добавці**

Показники	Значення
Вибіркове середнє (вміст)	98,98 %
Вибіркове середнє (сигнал)	135,95 %
Стандартне відхилення (вміст)	0,73606 %
Стандартне відхилення (сигнал)	1,08244 %
Відносне стандартне відхилення (вміст)	0,74364 %
Відносне стандартне відхилення (сигнал)	0,7962 %
Коефіцієнт Фішера обчислений з стандартних відхилень	1,47059
Табличне значення коефіцієнта Фішера	3,17889
Гіпотеза про рівність стандартних відхилень	Прийнята
Коефіцієнт Фішера обчислений з відносних відхилень	1,07068
Табличне значення коефіцієнта Фішера	3,17889
Гіпотеза про рівність відносних відхилень	Прийнята
Стандартне відхилення для різниці	0,52292 %
Коефіцієнт кореляції	0,90369
Лінійне наближення: коефіцієнт при змінній	1,32896
Лінійне наближення: вільний коефіцієнт	4,40972
Стандартне відхилення від лінійного наближення	0,4916
Стандартне відхилення для коефіцієнту при змінній	0,00002
Стандартне відхилення для вільного коефіцієнту	0,00159
Квадратичне наближення: коефіцієнт при змінній	85,0012
Стандартне відхилення від квадратичного наближення	0,38642
Відношення відхилень	1,61847
Критичне значення розподілу Фішера	3,72573
Гіпотеза про лінійність	Прийнята

За розрахунками невизначеності методу для визначення вмісту аргініну відносна сумарна стандартна невизначеність (u_c) становить 1,47 %, а відносна розширена невизначеність (U) із коефіцієнтом охоплення $k = 2$ – 2,94 %, що не перевищує 5,0 %.

В И С Н О В К И

1. Отримані результати досліджень свідчать, що розроблена методика визначення L-аргініну в кормових добавках із вмістом діючої речовини не менше 98,0 % методом капілярного зонального електрофорезу є достатньо точною та вірогідною.

2. Значення показників точності, збіжності, відтворюваності і невизначеності методу (при довірчій ймовірності (P) 0,95) не перевищує 5,0 %, гіпотеза про лінійність є прийнятною, розраховані на основі стандартного відхилення (SD) межі виявлення для визначення вмісту аргініну є задовільними.

Перспективи досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на розробку та валідацію методу капілярного електрофорезу для визначення вмісту L-аргініну в кормових добавках у діапазоні концентрацій 20 – 80 % діючої речовини.

References

Alonso, A., Almendral, M.J., Baez, M.D., Porras, M.J., Alonso, C. (1995). Enzyme immobilization on an epoxy matrix. Determination of L-arginine by flow-injection techniques. Anal. Chim. Acta. 308(1–3). 164–169.

Chu, K.M., Huang, P.W., Pao Li, H. (2003). Determination of arginine, asymmetrical dimethylarginine, and symmetrical dimethylarginine in human plasma by high performance liquid chromatography. *J. Med. Sci.* 23(4). 201–206.

Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C(2002) 3044).

DSTU ISO/IEC 17025:2017 National standard of Ukraine. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [Text]. – Date of introduction 2018-01-01, – 30.

Ellison S. R. L. & Williams A. (2000). Eurachem/CITAC Guide CG4. // Quantifying Measurement Uncertainty in Analytical Measurement, January. 133.

Gaede G. & Grieshaber M. (1975). A rapid and specific enzymatic method for the estimation of L-arginine. *Anal. Biochem.* 66(2), P. 393–399.

Huang, Z. & Ough, C.S. (1989). Effect of vineyard locations, varieties and rootstocks on the juice amino acid composition of several cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* V. 40, P. 135–139.

ISO 5725-2:2019 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method

Mayoral, J.G., Alarcón, F.J., Martínez, T.F., Barranco, P., Noriega, F. (2010). An Improved End-point Fluorimetric Procedure for the determination of low amounts of trypsin activity in biological samples using rhodamine-110-based substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* V. 160. 1–8.

Mira, O.R. (2001). Quantitative determination of L-arginine by enzymatic End-Point analysis. *J. Agric. Food Chem.* 49(2), 549–552. 34.

Morris, S.M.Jr. (2006). Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr* 83: 508S–512S. PMID 16470022. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.508S>.

Narezhnaya, E.V., Askalepova, O.I., Nikashina, A.A., Krukier, I.I., Pogorelova, T.N. (2010). Determination of L-arginine in amniotic fluid by capillary disk electrophoresis. *Zh. Anal. Chim.* 65(12), 1309–1312. (In Russian).

Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* (5th). W. H. Freeman. ISBN 978-0-7167-7108-1.

Parniak, M.I., Lange, G., Viswanatha, T. (1983). Quantitative determination of monosubstituted guanidines: a comparative study of different procedures. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 7(4). 267–276.

Rong, Y., Junr, H., Dayi, C. (1999). Determination of L-arginine in drug by single sweep oscillopolarography. *J. Sichuan Containing Educ. Coll. Med. Sci.* V. 12. 1219–1236.

Sastry, C.S.P. & Tummuru, M.K. (1994). Spectrophotometric determination of arginine in proteins. *J. Food Chem.* V. 15. 257–260.

Soldatkin, O.O., Nazarenko, O.A., Pavliuchenko, O.S., Kukla, O.L., Arkhipova, V.M., Dzyadevich, S.V., Soldatkin, O.P., Yelska, H.V. (2008). Optymizatsiia roboty fermentnykh bioselektivnykh elementiv v skladi potentsiometrychnoho multybiosensora // *Biopolimery i klityna* 24(1), P. 42-50 (in Ukrainian).

Spayd, S.E., Wample, R.L., Evans, R.G., Stevens, R.G, Seymour, B.J., Nagel, C.W. (1994). Nitrogen fertilization of white Riesling grapes in Washington. Must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* V. 45, P. 34–42.

Stasyuk, N., Smutok, O., Gayda, G., Vus, B., Gonchar, M., Kovalchuk, Ye. (2012). Bi-enzyme L-arginine-selective amperometric biosensor based on ammonium-sensing polyaniline-modified electrode. *Biosens Bioelectron* 37(1). 46–52.

Yamasaki, R.B., Shimer, D.A., Feeney, R.E. (1981). Colorimetric determination of arginine residues in proteins by p-nitrophenylglyoxal. *Anal. Biochem.* 111(2). 220–266.

Wang, H., Liang, X.H., Zhao, R. X., Feng, L.D., Li, H. (2008). Spectrophotometric determination of arginine in grape juice using 8-hydroquinoline. *Agric. Sci. China.* 7(10), 1210–1215.

Wu, G., Bazer, F.W., Davis, T.A., Kim, S.W., Li, P., Marc Rhoads, J., Carey Satterfield, M., Smith, S.B., Spencer, T.E., Yin, Y. (2008). Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 37: 153–68. PMID 19030957. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0210-y>.

Wu, G. & Morris, S.M.Jr. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 15: 1–17. PMID 9806879. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0210-y>.

Zhang, L., Liu, Y., Chen, G. (2004). Simultaneous determination of allantoin, choline and L-arginine in *Rhizoma Dioscoreae* by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 1043(2), 317–321.