



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120119** (13) **U**

(51) МПК (2017.01)

G01N 30/00

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 03754**

(22) Дата подання заявки: **18.04.2017**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.10.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.10.2017, Бюл.№ 20**

(72) Винахідник(и):

**Сгорова Алла Володимирівна (UA),
Федосенко Ганна Олександрівна (UA),
Мальцев Георгій Володимирович (UA),
Кашуцький Сергій Миколайович (UA),
Антонович Валерій Павлович (UA)**

(73) Власник(и):

**ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О.В.
БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Люстдорфська дорога, 86, м. Одеса,
65080 (UA)**

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АМІНОКИСЛОТ

(57) Реферат:

Спосіб кількісного визначення амінокислот включає приготування проби, її предколонну дериватизацію, що включає взаємодію амінокислот з реагентом, та їх подальше хроматографічне визначення УФ детектуванням. Як реагент використовують ди-трет-бутилдикарбонат, а хроматографічне визначення здійснюють при наступному співвідношенні компонентів рухомої фази: ацетонітрил: 0,1 % (об./об.) розчин мурашиної кислоти (30:70, об./об.) за довжини хвилі 200 нм.

UA 120119 U

Корисна модель належить до аналізу матеріалів, а саме до предколоночної дериватизації амінокислот (АК), наприклад L-валіну (В), L-лейцину (Л) та L-ізолейцину (ІЛ)) з подальшим їх визначенням методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Відомий спосіб визначення амінокислот за допомогою ВЕРХ [див. Bhandare P., Madhavan P., Rao B.M., Someswar rao N. Determination of amino acid without derivatization by using HPLC-HILIC column. J. Chem. Pharm. Res. - 2010.- V. 2, № 2. - P. 372-380].

Спосіб передбачає визначення амінокислот без процедури дериватизації, а також використання прямофазної колонки Kromasil SIL 0,25 м × 4,6 мм, яка заповнена силікагелем з розміром часток 5 мкм. Визначення проводять за наступних умов: рухома фаза - 2,5 мМ розчин калію дигідрофосфату з рН 2,85: ацетонітрил (25:75); детектування за довжини хвилі 200 нм. Інтервал визначення не ароматичних амінокислот 0,4-0,65 мкг/мл.

Недоліком відомого способу є те, що використовувана колонка призначена для безводних розчинників і в рамках даного аналізу виявилася недовговічною (2 тижні). Також інтервал визначення амінокислот дуже вузький.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є визначення амінокислот за допомогою методу ВЕРХ з попередньою процедурою предколоночної їх дериватизації [див. Bartolomeo M.P., Maisano F. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis J. Biomol. Techniq. - 2006. - V. 17, № 2. - P. 131-137]. Спосіб базується на використанні о-фталевого альдегіду (ОФА) як дериватизуючого агента. ОФА в присутності сульфовмісного нуклеофіла швидко та кількісно взаємодіє з амінокислотами при кімнатній температурі.

Визначення проводять за наступних умов: рухома фаза А - 40 мМ розчин натрію дигідрофосфату (доведений до рН 7,8 за допомогою розчину натрію гідроксиду); рухома фаза В - ацетонітрил:метанол:вода (45:45:10); детектування за довжини хвилі 338 нм.

Даний спосіб вибрано прототипом.

Прототип та спосіб, що заявляється, мають такі спільні ознаки:

- процес предколоночної дериватизації амінокислоти,
- хроматографічне визначення амінокислоти з УФ детектуванням.

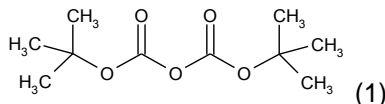
Але спосіб за прототипом призводить до утворення похідних ОФА, стандартизація стійкості яких в процесі хроматографічного розділення, а також вибір умов, в яких деградація похідних мінімальна, є недоліком даного методу. У способі за прототипом використовують автосамплер приладу, який дозволяє проводити дериватизацію в автоматичному режимі внесення, розведення і змішування, а також спеціальні колонки Zorbax Eclipse, AAA, що говорить про високу вартість обладнання та витратних матеріалів. Також необхідно використовувати ще другий компонент - сульфовмісний нуклеофіл (наприклад меркаптоетанол).

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити простий у виконанні спосіб кількісного визначення амінокислот, наприклад L-валіну, L-лейцину та L-ізолейцину із застосуванням предколоночної дериватизації з реагентом, який широко використовується в органічному синтезі для захисту аміногруп) - ди-трет-бутилдикарбонат (BOC_2O). Перевага способу також полягає в тому, що для УФ детектування використовуються традиційні хроматографічні колонки з силікагелем октадецилсилільним для хроматографії (C18).

Поставлена задача вирішується тим, що в способі визначення амінокислот, що включає приготування проби, її предколоночну дериватизацію, що включає взаємодію амінокислоти з реагентом - та її подальше хроматографічне визначення УФ детектуванням, згідно з корисною моделлю, як реагент використовують ди-трет-бутилдикарбонат, а хроматографічне визначення здійснюють при наступному співвідношенні компонентів рухомої фази: ацетонітрил: 0,1 % (об/об) розчин мурашиної кислоти (30:70, об/об) за довжини хвилі 200 нм.

Новим в заявленій корисній моделі є наявність наступних ознак:

предколоночна дериватизація амінокислот здійснюється дериватизуючим агентом ди-трет-бутилдикарбонатом (1)



- співвідношення компонентів рухомої фази: ацетонітрил: 0,1 % (об/об) розчин мурашиної кислоти (30:70, об/об);

- детектування здійснюють за довжини хвилі 200 нм.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю суттєвих ознак, що заявляються, і технічним результатом, що досягається, полягає в наступному:

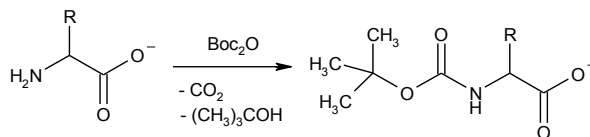
- дериватизація амінокислот з ди-трет-бутилдикарбонатом (BOC_2O) призводить до утворення стійких сполук;

визначення АК можливе на традиційних хроматографічних колонках (C18) (не потребує спеціальних колонок);

- при пробопідготовці не треба використовувати спеціальне обладнання для предколонної дериватизації (автоматичний автосампелер).

Заявлені суттєві ознаки дозволяють досягнути наступного технічного результату - спростити процес дериватизації амінокислот, а також зробити його більш доступним.

В умовах розробленої методики пропонується проводити пробопідготовку в присутності 0,5 М розчину гідроксиду натрію. У лужному середовищі АК знаходяться в аніонній формі та реакція з Voc_2O протікає за наступною схемою:



Приклад

Кількісне визначення залишкових кількостей амінокислот на поверхні фармацевтичного обладнання, на якому відбувалось виробництво дієтичної добавки "BCAA смарт" (активні фармацевтичні інгредієнти - L-валін, L-лейцин та L-ізолейцин), проводили із застосуванням ВЕРХ.

Методика визначення амінокислот заснована на зміні площин їхніх піків на хроматограмах в залежності від їх концентрації. Вміст амінокислот в змивах (мкг/змив) визначають за градувальними графіками.

Градувальний графік

Розчин ди-трет-бутилдикарбонату. 21,90 г ди-трет-бутилдикарбонату (CAS 24424-99-5) поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину ацетонітрилом до позначки та перемішують.

Розчин PC3 L-лейцину, PC3 L-валіну, PC3 L-ізолейцину. У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносять 300,0 мг L-лейцину (Л), 150,0 мг L-валіну (В), 150,0 мг L-ізолейцину (ІЛ), розчиняють в 70 мл води та доводять до позначки тим же розчинником.

У мірні колби місткістю 100,0 мл вносять 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 8,0 та 10,0 мл отриманого розчину, додають 2,0 мл 0,5 М розчину натрію гідроксиду, 30 мл метанолу та 1,0 мл розчину ди-трет-бутилдикарбонату, перемішують на магнітній мішалці протягом 30 хв. (часу перемішування дотримуватися обов'язково). Доводять об'єм розчину метанолом до позначки та перемішують. Розчини фільтрують крізь мембранний фільтр (0,20 мкм; Minisart RC 15, "Sartorius", Німеччина).

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка з нержавіючої сталі розміром 0,10 м × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії з розміром часток 3,5 мкм;

- рухома фаза: суміш ацетонітрил: 0,1 % (об/об) розчин мурашиної кислоти (30:70 об/об);

- швидкість рухомої фази 1,0 мл/хв.;

- об'єм проби, що вводиться, 10 мкл;

- детектування за довжини хвилі 200 нм;

- температура колонки 30 °С;

- час хроматографування 17 хв.

Хроматографування проводять в ізократичному режимі (на Фіг. 1 наведено хроматограми розчинів PC3 АК для градувальних графіків, де 1-L-валін, 2-L-ізолейцин, 3-L-лейцин).

За отриманими результатами будують градувальні графіки, відкладаючи на осі абсцис концентрації амінокислот (Л / В / ІЛ), а по осі ординат - значення інтенсивності абсорбції за довжини хвилі 200 нм (площі піків, AU) Градувальні залежності площ піків від концентрації амінокислот (Л / В / ІЛ) наведено на Фіг. 2.

Межі виявлення (МВ) L-лейцину, PC3 L-валіну, PC3 L-ізолейцину. складають - 3,57 мкг/мл, 1,61 мкг/мл и 1,20 мкг/мл, відповідно.

Методика визначення

Випробовуваний розчин Сваб (аплікатор Alpha® Sampling Swab марки TX 71) зі змивом з поверхні фармацевтичного обладнання (площа змиву -100,0 см) поміщають в лабораторний стакан місткістю 25 мл, додають 2,0 мл 0,5 М розчину натрію гідроксиду, 3,0 мл метанолу та 1,0 мл розчину ди-трет-бутилдикарбонату, перемішують на магнітній мішалці протягом 30 хв. (часу перемішування дотримуватися обов'язково). Отриманий розчин кількісно переносять у мірну колбу місткістю 10,0 мл, доводять об'єм розчину метанолом до позначки та перемішують. Розчин фільтрують крізь мембранний фільтр (0,20 мкм; Minisart RC 25, "Sartorius", Німеччина). Далі роблять як при побудові градувального графіку.

Вміст амінокислот (X), в мкг/змив розраховують за формулою:

$$X = C \cdot 10$$

де: C - концентрація амінокислоти (Л / В / ІЛ) на хроматограмі випробовуваного розчину, отримана за грабуювальним графіком, мкг/мл.

На Фіг. 3 наведена хроматограма розчину після обробки свабу, яким робили змиви з поверхні фармацевтичного обладнання (таблетпрес Korsch ЕКО, де 1-Л-валін, 2-Л-ізолейцин, 3-Л-лейцин). Встановлено залишкові кількості АК: Л-валін - 10,8 мкг/сваб, Л-ізолейцин - 14,7 мкг/сваб, Л-лейцин - 24,9 мкг/сваб. Результати визначення залишкових кількостей амінокислот на поверхні таблетпресу Korsch ЕКО не вище за практичне гранично допустиме значення їх залишків в змиві (250 мкг/сваб), розраховане по фактору безпеки 0,1 %, що свідчить про задовільну якість очищення даного обладнання.

Визначення ступеня вилучення

У модельних дослідях в ході валідації методики робили змиви свабом, змоченим водою, з поверхні (100,0 см²), на яку штучно наносили (0,1 мл розчину з концентрацією 1500,0 мкг/мл Л-лейцину, 750,0 мкг/мл Л-валіну; 750,0 мкг/мл Л-ізолейцину наносили та висушували). Далі готували випробуваний розчин як у розділі "Методика визначення" (отримували концентрації: лейцину - 15,0 мкг/мл; валіну - 7,5 мкг/мл; ізолейцину - 7,5 мкг/мл).

Ступінь вилучення амінокислот з поверхні фармацевтичного обладнання наведений у таблиці.

Таблиця

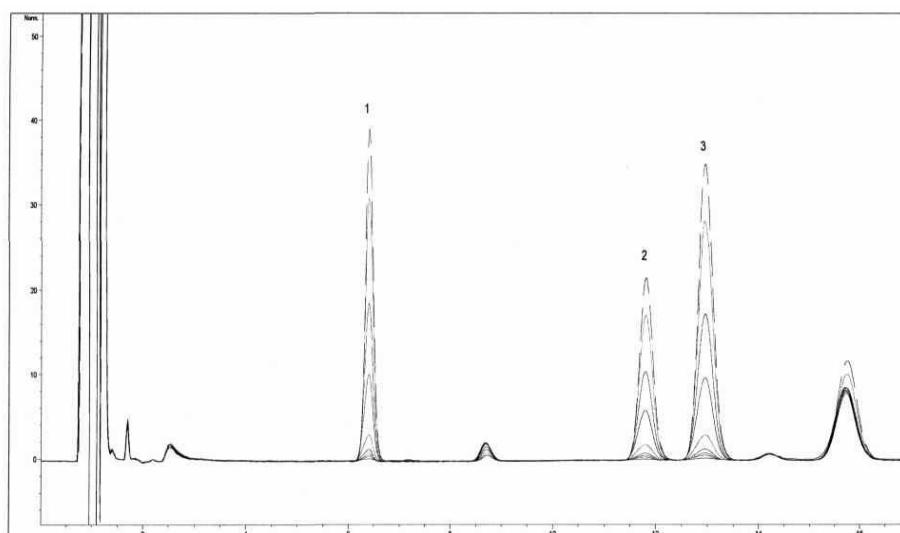
| Номер змиву | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------------------------------|------|------|------|------|------|
| Ступінь вилучення Л-лейцину, % | 90,0 | 92,6 | 90,3 | 91,5 | 90,8 |
| Ступінь вилучення Л-валіну, % | 91,7 | 91,9 | 92,1 | 91,4 | 93,1 |
| Ступінь вилучення Л-ізолейцину, % | 91,2 | 93,2 | 91,7 | 93,5 | 92,8 |

Встановлено, що ступінь вилучення амінокислот з поверхні фармацевтичного обладнання становить 90,0 % - 93,5 % (див. таблиця).

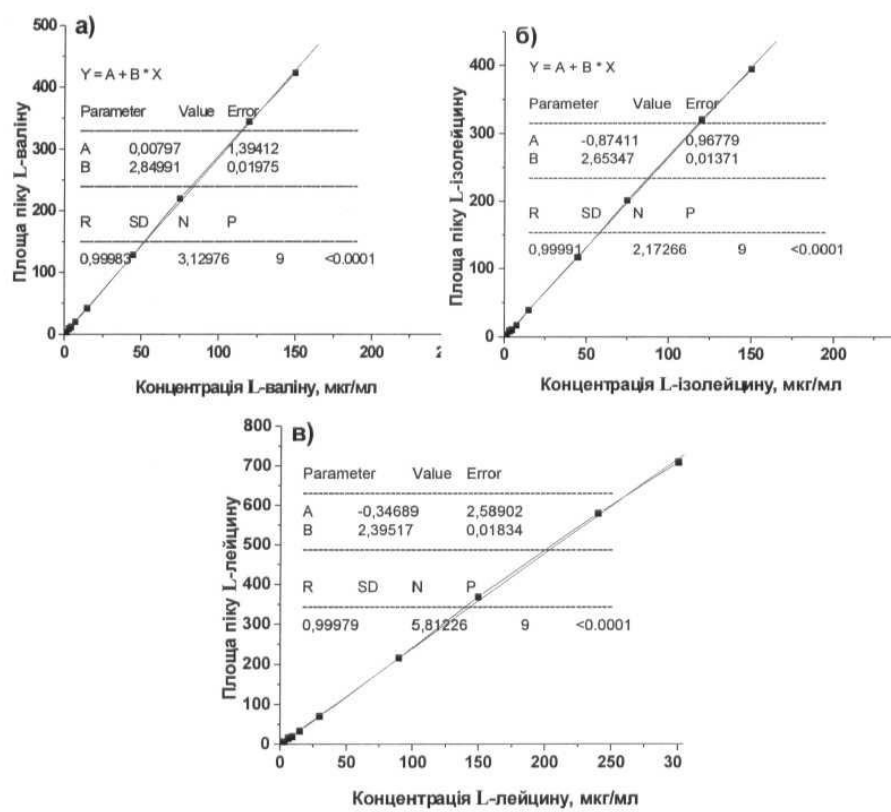
Таким чином, спосіб дозволяє отримати більш стійкі сполуки амінокислот (наприклад, Л-валіну, Л-лейцину, Л-ізолейцину) з тільки одним дереватизуючим новим реагентом - ди-трет-бутилдикарбонатом, проводити хроматографування на традиційних хроматографічних колонках (С18), що робить аналіз дешевшим та значно його спрощує у порівнянні з прототипом.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

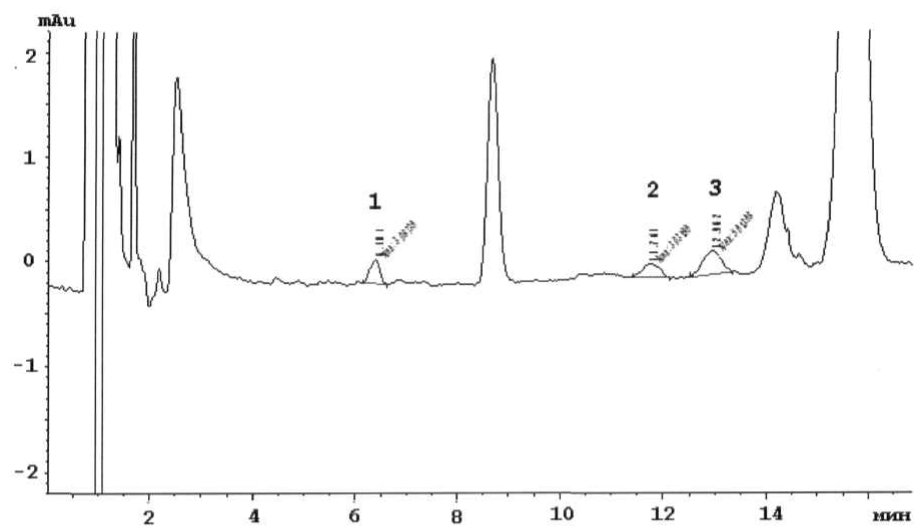
Спосіб кількісного визначення амінокислот, що включає приготування проби, її предколонну дериватизацію, що включає взаємодію амінокислот з реагентом, та їх подальше хроматографічне визначення УФ детектуванням, який **відрізняється** тим, що як реагент використовують ди-трет-бутилдикарбонат, а хроматографічне визначення здійснюють при наступному співвідношенні компонентів рухомої фази: ацетонітрил: 0,1 % (об./об.) розчин мурашиної кислоти (30:70, об./об.) за довжини хвилі 200 нм.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601