

HPLC Determination of L-valine, L-leucine, and L-Isoleucine Using Pre-column Derivatization by Di-tert-butyl-dicarbonate

A.V. Yegorova^{*†}, G.A. Fedosenko[‡], G.V. Maltsev[‡], S.N. Kashutskyy[‡], V.P. Antonovich[†]

[†] A.V. Bogatsky Physico-chemical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine; *e-mail: yegorova@interchem.com.ua

[‡] «INTERCHEM SLC», Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

Received: May 11, 2017; Accepted: June 12, 2017

DOI: 10.17721/moca.2017.91-98

Cleaning equipment in the production of medicines is an important requirement of good manufacturing practice. On the same process equipment, as a rule, a number of different drugs are produced, which can lead to their cross contamination, for the prevention of which it is necessary to perform effective cleaning of equipment with validation of the procedures applied for each unit of equipment.

For the first time, methods for determining some amino acids (AA, L-valine, L-leucine and L-isoleucine) and their trace amounts in washings for purification of pharmaceutical equipment by reversed-phase high performance liquid chromatography with UV detection have been proposed for dietary supplementation. For pre-columnar derivatization, the reagent - di-tert-butyl dicarbonate, widely used in organic synthesis for protecting amino groups, has been used.

Chromatographic conditions and sample preparation procedures have been optimized. The developed methods for determining the AA are validated according to the following parameters: specificity, linearity, accuracy, detection limit.

The calibration curves are linear over the concentration range of L-leucine 3.0–300.0 µg/ml, L-isoleucine and L-valine 1.5–150.0 µg/ml. The detection limits of L-leucine, L-valine and L-isoleucine are 3.57 µg/ml, 1.61 µg/ml and 1.20 µg/ml, respectively. The degree of extraction of amino acids from the surface of pharmaceutical equipment is more than 90%.

Keywords: high-performance liquid chromatography, pre-column derivatization, amino acids, di-tert-butyl pyrocarbonate

ВЭЖХ определение L-валина, L-лейцина и L-изолейцина с использованием предколоночной дериватизации ди-трет-бутилдикарбонатом

A.V. Егорова^{*†}, A.A. Федосенко[‡], Г.В. Мальцев[‡], С.Н. Кашуцкий[‡], В.П. Антонович[†]

[†] Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина; *e-mail: yegorova@interchem.com.ua

[‡] ОДО «ИНТЕРХИМ», Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина

Поступила: 11 мая 2017 г; Принята: 12 июня 2017 г

DOI: 10.17721/moca.2017.91-98

Очистка оборудования при производстве лекарственных средств является важнейшим требованием надлежащей производственной практики. На одном и том же технологическом оборудовании, как правило, выпускают ряд различных лекарственных средств, что может привести к их перекрестной контаминации, для предотвращения которой необходимо проведение эффективной очистки оборудования с валидацией применяемых процедур для каждой единицы оборудования.

Впервые предложены методики определения в диетической добавке некоторых аминокислот (АК, L-валина, L-лейцина и L-изолейцина) и их следовых количеств в смывах при очистке фармацевтического оборудования методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. Для предколоночной дериватизации применен широко используемый в органическом синтезе для защиты аминогрупп реагент – ди-трет-бутилдикарбонат.

Оптимизированы условия хроматографирования и процедуры пробоподготовки. Разработанные методики определения АК валидированы по следующим показателям: специфичность, линейность, точность, предел обнаружения.

Градуировочные графики линейны в интервалах концентраций L-лейцина 3.0 – 300.0 мкг/мл, L-изолейцина и L-валина 1.5 – 150.0 мкг/мл. Пределы обнаружения L-лейцина, L-валина и L-изолейцина составляют – 3.57 мкг/мл, 1.61 мкг/мл и 1.20 мкг/мл, соответственно. Степень извлечения аминокислот с поверхности фармацевтического оборудования составляет более 90%.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, предколоночная дериватизация, аминокислоты, ди-трет-бутилдикарбонат

Аминокислотный анализ является хорошо изученным и в то же время развивающимся разделом современной аналитической химии [1, 2]. Определение аминокислот в пищевых продуктах и фармацевтических препаратах имеет большое значение для контроля технологии производства, оценки качества сырья и готовой продукции, выявления фальсификатов. Аминокислоты (АК) обычно определяют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Существует прямой метод определения аминокислот и их оптических изомеров на хиральных неподвижных фазах (такие колонки очень дорогие). Описан метод ВЭЖХ с УФ-детектированием для определения содержания 17 аминокислот в сложном лекарственном препарате без дериватизации и без какой-либо предварительной обработки образца [3]. Метод разработан на прямофазной колонке Kromasil SIL 0.25 м x 4.6 мм, заполненной силикагелем (USP, L3) с размером частиц 5 мкм. Анализ проводят в изократическом режиме с использованием подвижной фазы 2.5 мМ калия дигидрофосфат с рН 2.85 - ацетонитрил (25:75). Однако данная колонка предназначена для работы в среде безводных растворителей и оказалась недолговечной (2 недели).

Для полного качественного и количественно определения аминокислот недостаточно одного УФ-детектора, поскольку только три аминокислоты (триптофан, фенилаланин и тирозин) имеют светопоглощение в интервале длин волн 240-280 нм. Остальные аминокислоты поглощают при 190-210 нм, т.е. в зоне интенсивного светопоглощения большинства растворителей, что вызывает необходимость дериватизации пробы.

Метод ВЭЖХ с *постколоночной дериватизацией* нингидрином является арбитражным методом при определении цистина и метионина [4]. Разделение нативных аминокислот проводят на ионнообменной колонке с применением градиента рН. После разделения аминокислоты попадают в реактор, где происходит их дериватизация. В результате реакции первичные аминокислоты образуют производные красного цвета (с поглощением при $\lambda=570$ нм), вторичные аминокислоты образуют производные желтого цвета (поглощение при $\lambda=440$ нм). Метод постколоночной дериватизации требует дополнительного оборудования, удлиняет время определения, приводит к дополнительному размыванию пиков и, главное, не снимает одну из основных проблем определения АК - сложности разделения смеси, состоящей из компонентов с ярко выраженными различиями в степени полярности.

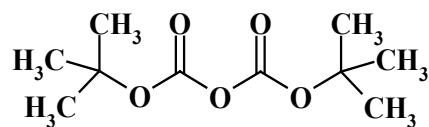
Для *предколоночной дериватизации* аминокислот предложено несколько десятков реагентов, из них наибольшими преимуществами обладают о-фталевый альдегид (ОФА) [5-10] и

5-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлорид (дансилхлорид) [11]. Для вторичных АК рекомендован флуоренилметил хлорформат [12].

О-Фталеый альдегид в присутствии серосодержащего нуклеофила быстро и количественно взаимодействует с аминокислотами при комнатной температуре. Однако стандартизация устойчивости производных ОФА в процессе хроматографического разделения и выбор условий, в которых разложение производных минимально, является недостатком данного метода. Предложен Agilent метод в котором используют хроматограф Agilent 1260 Infinity, коммерческий набор реактивов для анализа и специальные колонки Zorbax Eclipse, ААА Автосамплер прибора позволяет проводить дериватизацию в автоматическом режиме внесения, разведения и смешивания реагентов [13]. Недостаток метода - высокая стоимость оборудования и расходных материалов, а также необходимость использования серосодержащего нуклеофила (например, меркаптоэтанола).

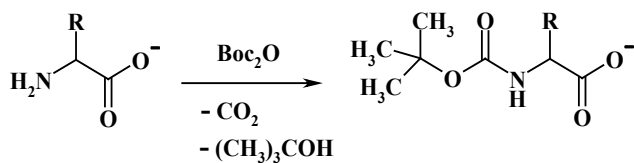
Преимуществом предколоночной дериватизации аминокислот является возможность придания им большей гидрофобности, что приводит к улучшению селективности разделения АК.

В связи с этим поиск и изучение свойств новых, универсальных реагентов для дериватизации аминокислот является актуальной задачей. В данной работе предложена новая методика определения L-валина (В), L-лейцина (Л) и L-изолейцина (ИЛ) с применением предколоночной дериватизации с широко используемым в органическом синтезе для защиты аминогрупп реагентом – ди-трет-бутилдикарбонатом (Boc_2O) [14]. Преимущество метода заключается в его пригодности для УФ-детектирования и использовании традиционных хроматографических колонок C_{18} .



ди-трет-бутилдикарбонат (Boc_2O)

АК содержат (по меньшей мере) 2 ионизируемые группы: карбоксильную, с рК, лежащим в интервале 1.7 - 3.0, и α -аминогруппу с рК около 10. В растворе с рН от 4 до 9 АК существуют в виде цвиттериона, в котором ионизированы карбоксильная и аминогруппа. В условиях разработанной методики предлагается проводить пробоподготовку в присутствии раствора гидроксида натрия. В щелочной среде АК находятся в анионной форме и реакция с Boc_2O протекает по следующей схеме:



Разработанные нами методики количественного определения аминокислот в диетической добавке (ДД) и смывах с поверхностей фармацевтического оборудования валидированы по следующим параметрам: специфичность, линейность, внутрिलाбораторная прецизионность, предел обнаружения.

Экспериментальная часть

Для приготовления подвижных фаз, растворов сравнения исследуемых аминокислот (активных фармацевтических ингредиентов, АФИ) применяли метанол, ацетонитрил (MERCK), воду для хроматографии и бидистиллированную.

0.5 М раствор натрия гидроксида. 500 мл 1 М раствора натрия гидроксида помещают в мерную колбу вместимостью 1000.0 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

0.1% (об/об) раствор муравьиной кислоты. 1.0 мл муравьиной кислоты безводной помещают в мерную колбу вместимостью 1000.0 мл, доводят объём раствора водой для хроматографии до метки и перемешивают.

Раствор ди-трет-бутилдикарбоната. 21.90 г ди-трет-бутилдикарбоната (CAS 24424-99-5), помещают мерную колбу вместимостью 100.0 мл, доводят объём раствора ацетонитрилом до метки и перемешивают.

Смывы с поверхности фармоборудования отбирают аппликаторами (свабами) Alpha® Sampling Swab марки TX 715, смоченными в 96% этаноле.

Анализ проводили на хроматографе Agilent 1200 2D LC System с УФ-детектором в изократическом режиме, используя колонку из нержавеющей стали размером 0.100 м x 4.6 мм, заполненную силикагелем для хроматографии октадецилсилильным с размером частиц 3.5 мкм.

В работе использовали весы лабораторные электронные AX 124 фирмы SARTORIUS (Германия), магнитную мешалку ARE (VELP Scientifica, Италия) и систему очистки воды arium® pro UV/UF фирмы Sartorius.

Результаты и их обсуждение

Определение аминокислот основано на изменении площадей их пиков на хроматограммах в зависимости от концентрации АК. Содержания АК в диетической добавке определяют по стандартному образцу, а в смывах (мкг/смыв) - по градуировочному графику.

Хроматографирование проводят при таких условиях: подвижная фаза: ацетонитрил– 0.1% (об/

об) раствор муравьиной кислоты – (30:70, об/об); скорость подвижной фазы: 1.0 мл/мин; температура колонки: 30 °С; детектирование при длине волны: 200 нм; объём инъекции: 2 мкл; время хроматографирования: 17 мин.

Хроматографическая система считается пригодной, если относительные стандартные отклонения для площадей пиков L-лейцина, L-изолейцина и L-валина на хроматограммах раствора сравнения соответствует требованиям ГФУ [15].

Методика определения АК в ДД

Построение градуировочного графика.

Раствор РСО аминокислот. 600.0 мг РСО L-лейцина, 300.0 мг РСО L-изолейцина, 300.0 мг РСО L-валина помещают в мерную колбу вместимостью 100.0 мл, добавляют 20 мл 0.5 М раствор гидроксида натрия, перемешивают в течение 5 мин на магнитной мешалке, затем добавляют 20 мл метанола и 10 мл раствора ди-трет-бутилдикарбоната, перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин (время перемешивания соблюдать обязательно), доводят объём раствора метанолом до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр (0.20 мкм; Minisart RC 25, «Sartorius», Германия).

В мерные колбы вместимостью 20.0 мл помещают по 5.0; 6.0; 7.5; 8.5; 10.0; 11.0; 13.0 мл раствора РСО аминокислот, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Хроматографируют полученные растворы при условиях, указанных выше. По полученным результатам строят градуировочные графики, откладывая на оси абсцисс значения концентрации АК(%), а по оси ординат – значения соответствующих площадей их пиков (%). Соответствующие зависимости линейны в интервалах концентраций L-лейцина 1.5–3.9 мг/мл, L-изолейцина и L-валина 0.75–1.95 мг/мл. Коэффициенты линейных аппроксимаций в исследуемом диапазоне содержаний соответствуют допустимым значениям для методик определения веществ [16]. Метрологические характеристики линейных зависимостей для определения L-валина, L-изолейцина, L-лейцина приведены в таблице 1.

Данные, приведенные в таблице 1, указывают на прямолинейные зависимости между площадями пиков АК и их содержаниями. Систематическая ошибка методики незначима, т.к. полученные значения коэффициентов «а» меньше допустимого.

Испытуемый раствор. Около 1320 мг (точная навеска) порошка растёртых таблеток ДД помещают в мерную колбу вместимостью 100.0 мл и далее поступают, как в случае раствора РСО аминокислот при построении градуировочного графика.

Таблица 1. Метрологические характеристики линейных зависимостей для определения L- валина, L-изолейцина, L-лейцина.

Величина	Значения			Допуски	Выводы
	L- валин	L-изолейцин	L-лейцин		
b	0.99684	0.99754	0.99873	Близко к 1	соответствует
a	0.301	0.029	0.109	≤3.1	соответствует
R	0.99998	0.99998	0.99999	≥0.99710	соответствует

Раствор сравнения. 300.0 мг PCO L-лейцина, 150.0 мг PCO L-валина и 150.0 мг PCO L-изолейцина помещают в мерную колбу вместимостью 100,0 мл и далее поступают, как в случае раствора PCO аминокислот при построении градуировочного графика.

Содержание L-лейцина (L-изолейцина и L-валина) (X) в одной таблетке, в миллиграммах, вычисляют по формуле:

$$X_3 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot b \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot b \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot 100},$$

где: S_1 – площадь пика L-лейцина (L-изолейцина и L-валина) на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика L-лейцина (L-изолейцина и L-валина) на хроматограмме раствора сравнения; m_1 – масса навески порошка растертых таблеток, в миллиграммах; m_0 – масса навески PCO L-лейцина (L-изолейцина и L-валина), в миллиграммах; b – средняя масса таблетки, в миллиграммах; P – содержание основного вещества в PCO L-лейцина (L-изолейцина и L-валина), в процентах.

Требования к неопределённости результатов измерений содержания АК в диетической добавке устанавливали, руководствуясь соответствующими разделами ГФУ [15], исходя из нормированных (по спецификации на готовый продукт) допусках содержания (B %):

$$\max(\Delta_{As}) = 0.32 \cdot B.$$

Для содержания АК в готовом препарате по спецификации $B = 10$ %, т. е. доверительный интервал количественного определения АК в ДД должен быть

$$\Delta_{As} \leq 3.2\%$$

Результаты определения аминокислот в диетической добавке и рассчитанные статистические показатели приведены в таблице 2.

Как видно из представленных в таблице 2 результатов, относительные доверительные интервалы результатов количественного определения (Δ_{As} , %) не превосходят требуемой метрологической характеристики – 3.2 %.

Таблица 2. Результаты определения аминокислот в диетической добавке ($n = 5$, $P = 0.95$).

АК	X, мг	$X_{cp} \pm \Delta X$, мг	RSD, %	Δ_{As} , %
L-лейцин	999.7	996.9 ± 14.3	1.15	1.43
	993.5			
	1009.4			
	1002.9			
	979.1			
L-изолейцин	509.9	500.0 ± 8.7	1.40	1.74
	500.9			
	500.8			
	490.3			
	498.3			
L-валин	494.7	498.6 ± 8.2	1.32	1.64
	503.5			
	505.7			
	489.5			
	499.6			

Методика определения АК в смывах с поверхностей фармацевтического оборудования

Построение градуировочного графика.

Раствор PCO L-лейцина, PCO L-валина, PCO L-изолейцина. 300.0 мг PCO L-лейцина, 150.0 мг PCO L-валина, 150.0 мг PCO L-изолейцина помещают в мерную колбу вместимостью 100.0 мл, растворяют в 70 мл воды для хроматографии, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают (3000 мкг/мл L-лейцина; 1500 мкг/мл L-валина; 1500 мкг/мл L-изолейцина).

В мерные колбы вместимостью 100,0 мл помещают по 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 1.0; 3.0; 5.0; 8.0; 10.0 мл раствора PCO L-лейцина, PCO L-валина, PCO L-изолейцина добавляют 2.0 мл 0.5 М раствор гидроксида натрия, 30 мл метанола и 1.0 мл раствора ди-трет-бутилдикарбоната, перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин (время перемешивания соблюдать обязательно), доводят объем раствора метанолом P до метки и перемешивают. Получают растворы с содержанием: L-лейцина – 3.0; 6.0; 9.0; 15.0; 30.0; 90.0; 150.0; 240.0 и 300.0 мкг/мл; L-валина – 1.5; 3.0; 4.5; 7.5; 15.0; 45.0; 75.0; 120.0 и 150.0 мкг/мл; L-изолейцина – 1.5; 3.0; 4.5; 7.5; 15.0; 45.0; 75.0; 120.0 и 150.0 мкг/мл, соответственно.

Хроматографируют полученные растворы при условиях, указанных выше (за исключением - объем инъекции: 10 мкл). Хроматограммы приведены на рисунке 1.

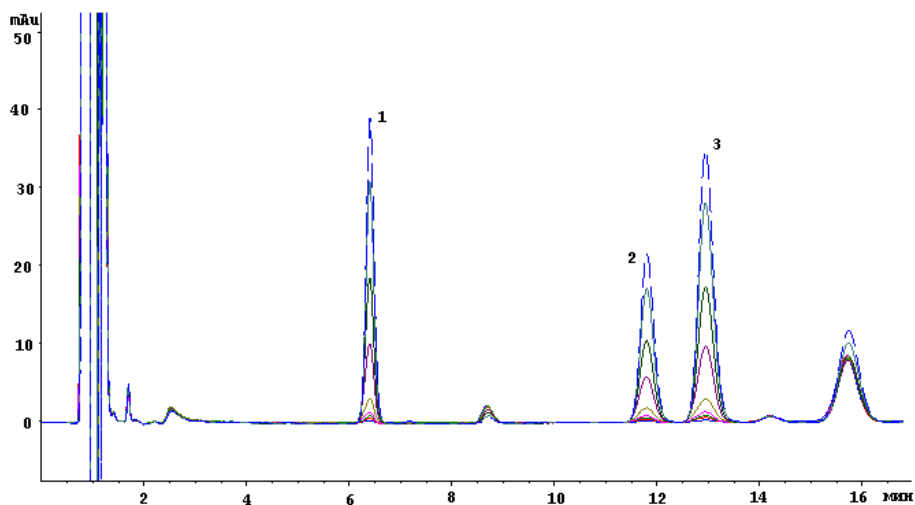


Рисунок 1. Хроматограммы модельных растворов РСО АК для градуировочных графиков (1- L-валин, 2- L-изолейцин, 3- L-лейцин).

По полученным результатам строят градуировочные графики (рис. 2), откладывая на оси абсцисс значения концентрации L- валина, L-изолейцина, L-лейцина, в микрограммах на миллилитр, а по оси ординат – значения площадей пиков L- валина, L-изолейцина, L-лейцина, которые

линейны в интервалах концентраций L-лейцина 3.0 – 300.0 мкг/мл, L-изолейцина и L-валина 1.5 – 150.0 мкг/мл.

Пределы обнаружения (ПО) L-лейцина, L-валина и L-изолейцина составляют – 3.57 мкг/мл, 1.61 мкг/мл и 1.20 мкг/мл, соответственно.

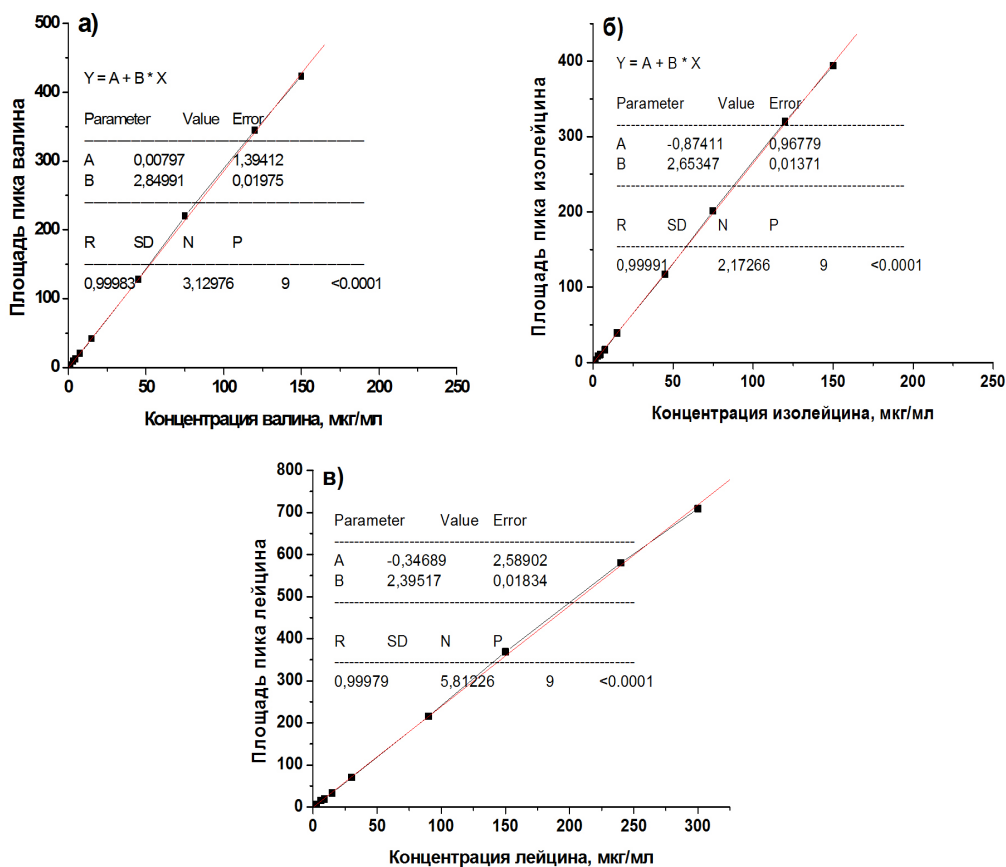


Рисунок 2. Градуировочные графики для определения а- L-валина, б- L-изолейцина, в- L-лейцина в сывах.

Исследуемый раствор. Сваб со смывом загрязнения оборудования (площадь смыва – 100.0 см²) помещают в лабораторный стакан вместимостью 25 мл, добавляют 2.0 мл 0.5 М раствор гидроксида натрия, 3.0 мл метанола и 1.0 мл раствора ди-трет-бутилдикарбоната, перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин (время перемешивания соблюдать обязательно). Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 10.0 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр (0.20 мкм; RC 25).

Содержание L- валина (L-изолейцина, L-лейцина) (X), в микрограммах, в смыве рассчитывают по формуле:

$$X = C \cdot 10,$$

где: C – концентрация L- валина (L-изолейцина, L-лейцина), полученная по градуировочному графику, в микрограммах на миллилитр.

Определение степени извлечения.

В модельных опытах в ходе валидации методики делали смывы свабом, смоченным водой для хроматографии, с поверхности (100.0 см²), на которую искусственно наносили 3.0 мкг L-лейцина, 1.5 мкг L-валина, 1.5 мкг L-изолейцина

(0.1 мл раствора PCO L-лейцина, PCO L-валина, PCO L-изолейцина с концентрацией 300.0 мкг/мл для L-лейцина, 150.0 мкг/мл для L-валина; 150.0 мкг/мл для L-изолейцина наносили и высушивали), далее проводили приготовление испытуемого раствора, как указано в разделе «Методика определения» (концентрации: L-лейцина – 15.0 мкг/мл; L-валина – 7.5 мкг/мл; L-изолейцина – 7.5 мкг/мл).

Было установлено, что количественное извлечение L-валина, L-изолейцина, L-лейцина в конечный раствор составляет 90.0% – 93.5% (таблица 3).

Ранее нами в работе [17] был предложен подход для установления метрологических характеристик методик контроля очистки оборудования. Руководствуясь этим, был установлен максимальный доверительный интервал для методики контроля остаточных количеств АК в смывах с поверхностей:

$$\Delta_x \leq 6.1 \%$$

По результатам определения степени извлечения АК с поверхностей (таблица 3), можно сделать вывод, что относительный доверительный интервал ($\Delta_x, \%$) не превосходит установленного критического значения 6.1 %.

Таблица 3. Степень извлечения АК.

АК	Номер смыва					$X_{cp} \pm \Delta X$	$\Delta_x, \%$
	1	2	3	4	5		
L-лейцин	90.0	92.6	90.3	91.5	90.8	91.0 ± 1.3	1.4
L-изолейцин	91.7	91.9	92.1	91.4	93.1	92.0 ± 0.8	0.9
L-валин	91.2	93.2	91.7	93.5	92.8	92.5 ± 1.2	1.3

Расчет максимально допустимого содержания остатков предыдущего препарата.

Методика определения остаточных количеств АФИ на поверхностях фармацевтического оборудования предусматривает обязательный расчет максимально допустимого содержания остатков предыдущего препарата (F_{crit}). Некоторые общие вопросы такого расчета в приложении к решаемой задаче приведены ниже.

При расчете предела содержания АФИ на оборудовании после производства и очистки использовался подход, который основан на принципе «наихудшего случая» по активности и на допущении переноса определенной дозы первого АФИ (АК) в последующее АФИ с учетом суточных доз. В качестве «наихудшего случая» фактического расчёта x_{crit} для АК был выбран последующий препарат с наибольшей максимальной суточной дозой, производимый на производственном участке ОДО «ИНТЕРХИМ» – а именно ТРАНКВИЛАР® IC, таблетки по 0.5 г АФИ, максимальное число дозированных форм в суточной дозе которого составляет $N_2 = 20$ шт,

а наименьшая загрузка таблетмассы серии – $N_1 = 0.150$ кг, номинальная масса одной таблетки $m_0 = 0.550$ г.

Предельно допустимая масса предшествующего продукта АК в максимальной суточной дозе последующего (ТРАНКВИЛАР® IC), D (мг) составит:

$$D = \frac{TD \cdot SF}{100},$$

где: TD – терапевтическая доза предшествующего продукта, мг; SF – фактор безопасности предшествующего АФИ: допустимая доля предшествующего продукта от его терапевтической дозы в максимальной суточной дозе последующего, %.

Теоретическое предельно допустимое значение остатков предыдущего продукта на всем оборудовании после очистки, E_T (мг):

$$E_T = \frac{D \cdot N_1}{m_0 \cdot N_2} \cdot 10^3$$

С учетом того, что на всей площади, контакти-

руемой с продуктом – S_2 , должно находиться E_T мг предшествующего продукта, в пробе взятой с участка оборудования с поверхностью пробоотбора площадью S_1 должно находиться теоретическое предельно допустимое значение массы остатков предыдущего продукта в пробе (в смыве с площади S_1) – x_{crit} (мкг):

$$F_{crit} = \frac{E_T \cdot S_1}{S_2} \cdot 10^3$$

Терапевтическая доза предшествующей ДД - ВСАА смарт, таблетки жевательные (средняя масса 4400 мг), составляет, согласно инструкции по применению, 3 таблетки. Содержание АФИ в 1 таблетке: L-лейцина – 1000 мг; L-валина – 500 мг; L-изолейцина – 500 мг.

Таким образом, терапевтическая доза будет для: L-лейцина – 3000 мг; L-валина – 1500 мг; L-изолейцина – 1500 мг.

Общая площадь рабочего оборудования, контактируемого с продуктом на участке составляет $S_2 = 8165 \text{ см}^2$. При факторе безопасности $SF = 0.1\%$, предельно допустимое значение массы остатков L-лейцина; L-валина; L-изолейцина в смыве с площади $S_1 = 100 \text{ см}^2$ составит: L-лейцина – $F_{crit} = 500.9 \text{ мкг/сваб}$; L-валина – $F_{crit} = 250.46 \text{ мкг/}$

сваб; L-изолейцина – $F_{crit} = 250.46 \text{ мкг/сваб}$.

Пределы обнаружения: L-лейцина – 35.7 мкг/сваб; L-изолейцина – 12.0 мкг/сваб; L-валина – 16.1 мкг/сваб.

F_{crit} превосходит ПО в смыве, таким образом, данная методика позволяет обнаруживать и достоверно определять остаточные количества предшествующих продуктов, с учетом требований к очистке оборудования.

Результаты анализа свабов

С использованием разработанной методики проведено определение остаточных количеств АК на поверхностях фармооборудования при производстве таблеток, содержащих данный АФИ, методом мазков (с помощью свабов). Для примера на рис.3 представлена типичная хроматограмма, полученная при анализе свабов, которыми проводили извлечение остаточных количеств АК с поверхности таблетпресса. Как видно из рисунков 1,3, времена удерживания пиков АК на хроматограммах свабов и модельных растворов РСО АК для градуировочного графика совпадают. Это подтверждает тождественность АФИ (АК), присутствующих в смывах и в соответствующем растворе РСО, а также отсутствие в смывах продуктов деградации этих АФИ.

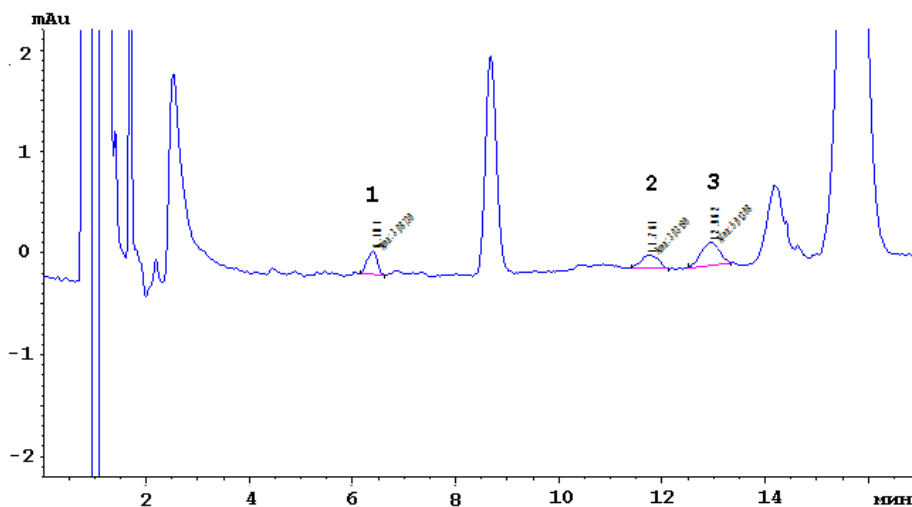


Рис. 3. Хроматограмма, полученная при анализе сваба, которым обработали поверхность таблетпресса Korsch ЕКО – точка 2 (1 – L-валин; 2 – L-изолейцин; 3 – L-лейцин).

Результаты определения остаточных количеств АК с поверхности таблетпресса Korsch ЕСО в 3 точках пробоотбора (по 2 параллельных определения) представлены в таблице 4.

Как видно из таблицы, все результаты определения остаточных количеств аминокислот на поверхности таблетпресса Korsch ЕСО в 3 точках пробоотбора не превосходят практическое предельно допустимое значение их остатков в смыве (F_{crit}), что свидетельствует о удовлетворительном качестве очистки данного оборудования.

Таблица 4. Результаты определения остаточных количеств аминокислот на поверхности таблетпресса Korsch ЕСО.

№ точки отбора	Найдено, мкг/сваб		
	L-лейцин	L-валин	L-изолейцин
№1	31.2	15.4	15.1
№2	24.9	10.8	14.7
№3	45.4	23.2	22.5

Выводы

Разработаны и валидированы методики определения в диетической добавке L-валина, L-лейцина и L-изолейцина и их следовых количеств в смывах при очистке фармацевтического оборудования методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием. Для предколоночной дериватизации применен широко используемый в органическом синтезе для защиты аминогрупп реагент – ди-трет-бутилдикарбонат. Оптимизированы условия хроматографирования и

процедуры пробоподготовки.

Предложенные методики экспрессны, обладают удовлетворительными метрологическими характеристиками и могут быть использованы для количественного определения содержаний перечисленных аминокислот в диетической добавке и при контроле качества очистки фармацевтического оборудования, с поверхности которого степень извлечения аминокислот составляет более 90%.

Литература

1. Anders J.C. Advances in amino acid analysis. *Bio Pharm.* 2002, 4, 32–39.
2. Reason A.J. Validation of amino acid analysis methods. In Smith BJ (ed), *Protein Sequencing Protocols, 2nd Edition: Methods in Molecular Biology, Vol. 211*. Totowa, NJ: Humana Press, 2003, 181–194.
3. 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, 2(2), 372-380.
4. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения цистина и метионина; ГОСТ 13496.22-90.
5. Bartolomeo M.P., Maisano F. Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Quantitative Amino Acid Analysis *J. Biomol. Techniq.* 2006, 17(2), 131–137.
6. Поздеев В.К., Поздеев Н.В. Определение общих аминотиолов и нейроактивных аминокислот в плазме крови при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием. *Биомедицинская химия.* 2010, 56(6), 726-738.
7. Чернобровкин М.Г. Определение аминокислот и их оптических изомеров в виде о-фталевых и дансильных производных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: дис. канд. хим. наук : 02.00.02 Москва, 2006, 150.
8. Натыкан А.А., Чернобровкин М.Г., Шпигун О.А. Изучение влияния природы нуклеофильного модификатора на хроматографические свойства производных аминокислот с о-фталевым альдегидом. *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2011, 11(6), 895 – 903.
9. Jajic I., Krstovic S., Glamocic D., Jaksic S., Abramovic B. Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed. *J. Serb. Chem. Soc.* 2013, 78 (6), 839–850.
10. Bruckner H., Haasmann S., et al. Liquid chromatographic determination of D- and L -amino acids by derivatization with o-phthalaldehyde and chiral thiols. *J. Chromatogr. A*, 1994, 611, 259-273.
11. Kaneda N., Sato M., Jagi K. Analysis of dansyl amino acids by reversed phase high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1982, 127, 49-54.
12. Fabiani A., Versari A., Parpinello G.P., Castellari M., Galassi S. High-performance liquid chromatographic analysis of free amino acids in fruit juices using derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate. *J. Chromatogr. Sci.* 2002, 40, 14-18.
13. Mengerink Y., Kutlan D., Toth F., Csampai A., Molnar-Perl I. Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the o-phthalaldehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents: High-performance liquid chromatography-mass spectrometry study. *J. Chromatogr A.* 2002, 949, 99–124.
14. Green T.W., Wuts P.G.M. Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd Edn.; Wiley: New York. 1999, pp 503-550.
15. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014 – 2015.
16. Гризодуб А.И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. *Фармаком.* 2006, 1-2, 35-44.
17. Егорова А.В., Федосенко А.А., Мальцев Г.В., Антонович В.П. Валидация методик контроля качества очистки фармацевтического оборудования. *Аналитика и контроль.* 2015, 19 (4), 387-395.