

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского»
(ННГУ)



**Методика использования спектроскопии ЯМР для
анализа фармацевтических препаратов**

г. Нижний Новгород
2020 г.

Список исполнителей

Должность	Фамилия И.О.	Подпись
Ответственный исполнитель, доцент каф. органической химии, к.х.н.	Малышева Ю.Б.	

Содержание

Метод измерения	4
Характеристики погрешности измерения	4
Средства измерения, материалы, реактивы	4
Пробоподготовка	5
Условия измерений	6
Проведение измерений	6
Обработка результатов	7
Анализ фармацевтических препаратов методом спектроскопии ЯМР	9

Настоящая методика предназначена для определения состава и чистоты фармацевтических препаратов методом спектрометрии ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Метод измерения

Метод спектроскопии ЯМР основан на поглощении электромагнитного излучения ядрами образца, помещенного в магнитное поле.

Наиболее важными являются спектроскопия протонного магнитного резонанса (^1H ЯМР-спектроскопия), а также спектроскопия ЯМР на ядрах углерода-13 (^{13}C ЯМР-спектроскопия). ЯМР спектроскопия выявляет информацию о молекулярном строении химических веществ, позволяет изучать динамические процессы в образце и межмолекулярные взаимодействия, обеспечивает получение информации о механизмах и константах скорости химических реакций, величинах энергетических барьеров внутримолекулярного вращения.

Спектроскопия ЯМР является наиболее информативным аналитическим методом исследования строения органических молекул. Химические сдвиги, интенсивности сигналов и константы спин-спинового взаимодействия дают общую информацию о структуре и взаимодействии молекул.

Характеристики погрешности измерения

При количественном анализе методом спектроскопии ЯМР ошибка составляет менее 2%, что является приемлемым пределом для точной количественной оценки.

Средства измерения, материалы, реактивы

- ЯМР-спектрометр Agilent DD2 400 NB (США, Великобритания).
- Датчики ЯМР:

широкополосный датчик (2-х канальный, диапазон частот от ^{15}N (40.5 МГц) до ^1H (400 МГц), диаметр образца 5 мм)

- широкополосный датчик инверсного наблюдения (2-х канальный, диапазон частот от ^{15}N (40.5 МГц) до ^1H (400 МГц), диаметр образца 5 мм)
- Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104, специального класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 220 г.
 - Пипетки градуированные по ГОСТ 29228 1-1-2-1, 1-1-2-2, 1-1-2-5, 1-1-2-10.
 - Растворители дейтерированные: диметилсульфоксид ($\text{DMSO}-d_6$), хлороформ (CDCl_3), метанол (CD_3OD).
 - ЯМР-ампулы (высота 18 см, диаметр 5 мм, предназначенные для спектрометров с рабочей частотой 400 МГц).

Пробоподготовка

Для определения состава и чистоты фармацевтического препарата 30 мг анализируемого вещества растворяют в 0.6 мл подходящего дейтерированного растворителя ($\text{DMSO}-d_6$, CDCl_3 , CD_3OD) и помещают в ЯМР-ампулу.

Выбор фактического растворителя для ЯМР анализа определяется растворимостью исследуемого вещества в выбранном растворителе. Анализируемое вещество должно полностью растворяться в выбранном растворителе, не должно образовывать суспензию или осадок. Один из обязательных критериев подбора растворителя – это отсутствие перекрывания сигналов анализируемого вещества и растворителя.

Для расчета концентрации анализируемого вещества в раствор необходимо добавить внутренний стандарт. Идеальным внутренним стандартом является тот, который легко доступен в высокоочищенной форме, стабилен, химически инертен и растворим в дейтерированном растворителе. Сигнал эталонного соединения не должен перекрываться с сигналами анализируемого вещества.

Условия измерений

Температура термостата спектрометра 27 ± 0.2 °C.

При выполнении измерений в помещении лаборатории необходимо соблюдать следующие условия:

- атмосферное давление 101.3 ± 3 кПа.
- температура воздуха рабочего помещения 20 ± 2 °C.
- относительная влажность воздуха 65 ± 15 %.
- напряжение в сети $220 +22/-33$ В.

Проведение измерений

Для проведения измерения ампулу с раствором анализируемого вещества в дейтерированном растворителе помещают в специальную турбину и опускают в спектрометр ЯМР с помощью автоматической системы подачи образцов (рисунок 1).

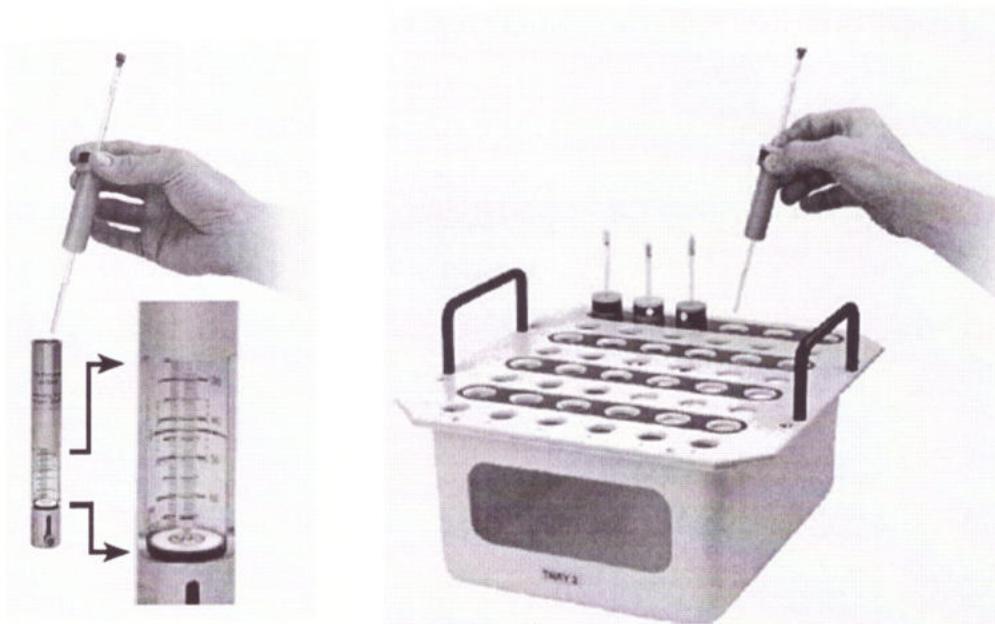


Рисунок 1. Подготовка эксперимента.

Экспериментальные параметры, такие как импульсная последовательность, релаксационная задержка, время аквизиции, влияют на количественную точность измерений, поэтому для количественного анализа

необходима их тщательная оптимизация. Значения параметров эксперимента задаются в программном обеспечении спектрометра.

Спектры ЯМР на ядрах протона и углерода-13 (^1H и ^{13}C) регистрируют на рабочих частотах 400 и 101 МГц соответственно.

Обработка результатов

Спектры ЯМР обрабатывают в программе MestReNova (version 6.0.2-5475). Для установления структуры анализируемого вещества вычисляют химические сдвиги (в м.д. относительно Me_4Si) и интегральную интенсивность сигналов спектра ЯМР. Полученные данные сравнивают с соответствующими данными для стандарта. Для определения содержания примесей вычисляют интегральную интенсивность сигналов, не относящихся к основному веществу. Затем находят соотношение интенсивностей сигналов примесей и сигналов основного вещества.

Чтобы корректно определить интегральную интенсивность сигнала ЯМР, нужно провести коррекцию базовой линии, кроме того, интегральная область должна превышать ширину сигнала в 20 раз.

Относительное количественное соотношение компонентов смеси X и Y можно рассчитать, используя уравнение 1.

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{I_x}{I_y} \cdot \frac{N_y}{N_x}$$

n_x/n_y – мольное соотношение компонентов смеси X и Y
I – интегральная интенсивность сигнала в спектре ЯМР
N – количество ядер.

Уравнение 1

Чистоту компонента X в смеси можно вычислить по уравнению 2.

$$P_x = \frac{I_x}{I_{std}} \cdot \frac{N_{std}}{N_x} \cdot \frac{M_x}{M_{std}} \cdot \frac{W_{std}}{W} \cdot P_{std}$$

P – чистота компонента смеси

I – интегральная интенсивность сигнала ЯМР

N – количество ядер

M – молекулярная масса

W – гравиметрическая масса

Уравнение 2

Количественное определение исследуемого вещества X в смеси осуществляется сравнением интегральных интенсивностей его сигналов и сигнала внутреннего стандарта и рассчитывается по уравнению 3.

$$m_x = \frac{I_x}{I_{std}} \cdot \frac{N_{std}}{N_x} \cdot M_x \cdot n_{std}$$

m – масса

I – интегральная интенсивность сигнала ЯМР

N – количество ядер

M – молярная масса

Уравнение 3

Анализ фармацевтических препаратов методом спектроскопии ЯМР

Анализ препарата «Тетрациклин»

Идентификацию основного вещества ((4S,6S,12aS)-4-(диметиламино)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-октагидро-3,6,10,12,12a-пентагидрокси-6-метил-1,11-диоксонафтацен-2-карбоксамид, рисунок 2) препарата «Тетрациклин» можно провести по спектру ^1H ЯМР.

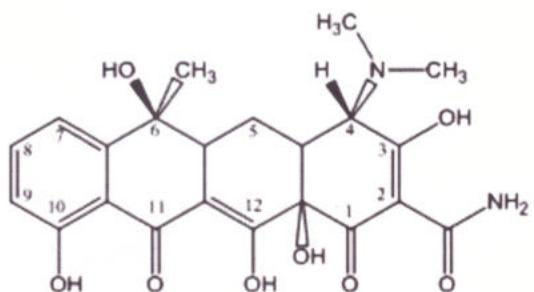


Рисунок 2. Структурная формула тетрациклина.

Спектр ^1H ЯМР «Тетрациклина» представлен на рисунке 3. Химические сдвиги сигналов ЯМР и константы спин-спинового взаимодействия мультиплетов, относящихся к основному веществу, необходимо сравнить с литературными данными. Для количественного определения основного вещества нужно сравнить интегральную интенсивность сигналов основного вещества с интегральной интенсивностью добавленного внутреннего стандарта (гексаметилдисилоксан, сигнал обозначен * на рисунке 3).

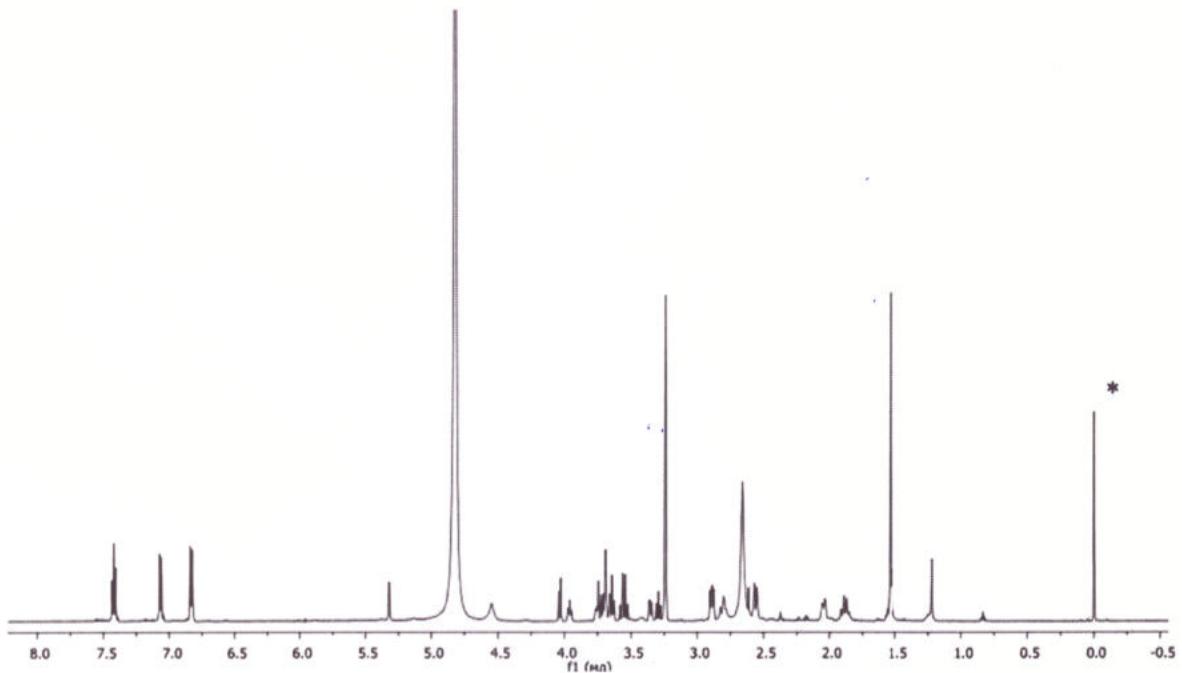


Рисунок 3. ^1H ЯМР спектр «Тетрациклина»

Анализ препарата «Таксол»

Идентификацию основного вещества $(2\alpha,4\alpha,5\beta,7\beta,10\beta,13\alpha)$ -4,10-бис(ацетилокси)-13-{[(2R,3S)-3-(бензоиламино)-2-гидрокси-3-фенилпропаноил]окси}-1,7-дигидрокси-9-оксо-5,20-эпокситакен-1-ил-2-бензоат, рисунок 4) препарата «Таксол» можно провести по спектру ^1H ЯМР.

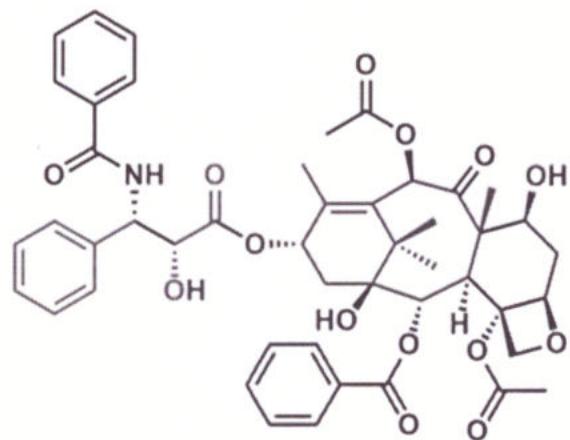


Рисунок 4. Структурная формула таксола.

Спектр ^1H ЯМР «Таксола» представлен на рисунке 5. Химические сдвиги сигналов ЯМР и константы спин-спинового взаимодействия мультиплетов, относящихся к основному веществу, необходимо сравнить с литературными данными.

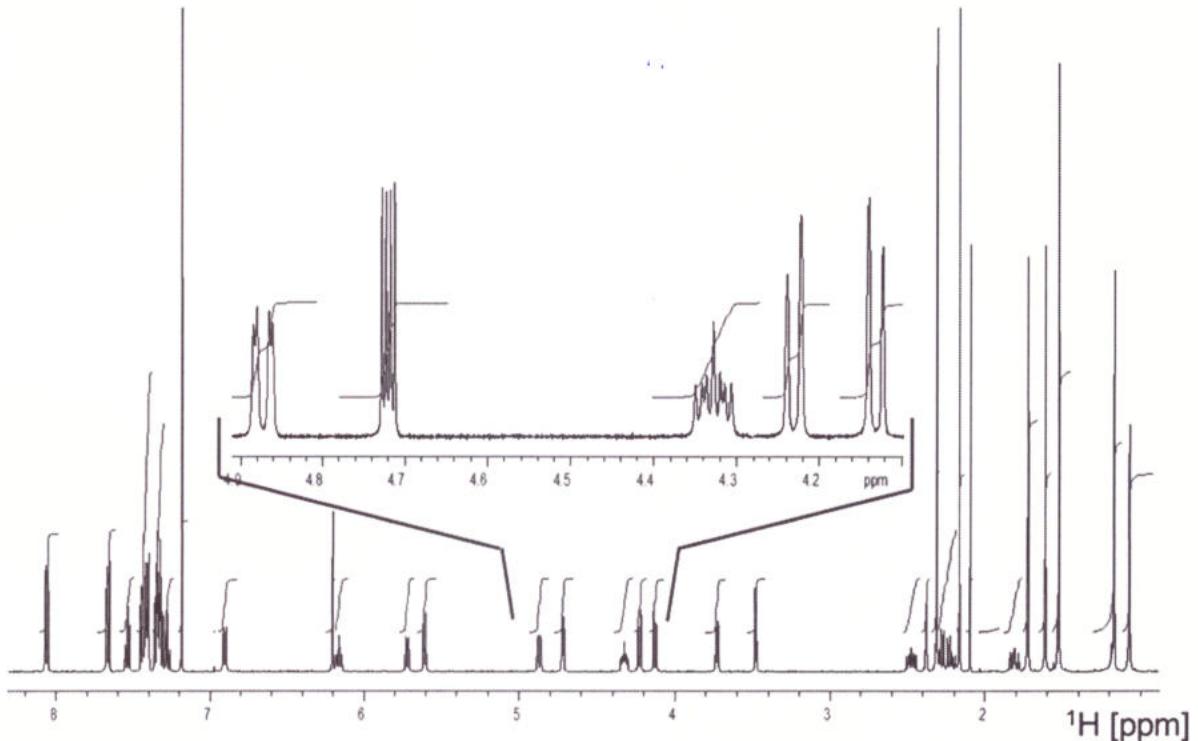


Рисунок 5. ^1H ЯМР спектр «Таксола».

Дополнительную идентификацию таксола можно также провести с помощью спектра ^{13}C ЯМР, представленном на рисунке 6, по химическим сдвигам сигналов в спектре, сравнив их с соответствующими литературными данными.

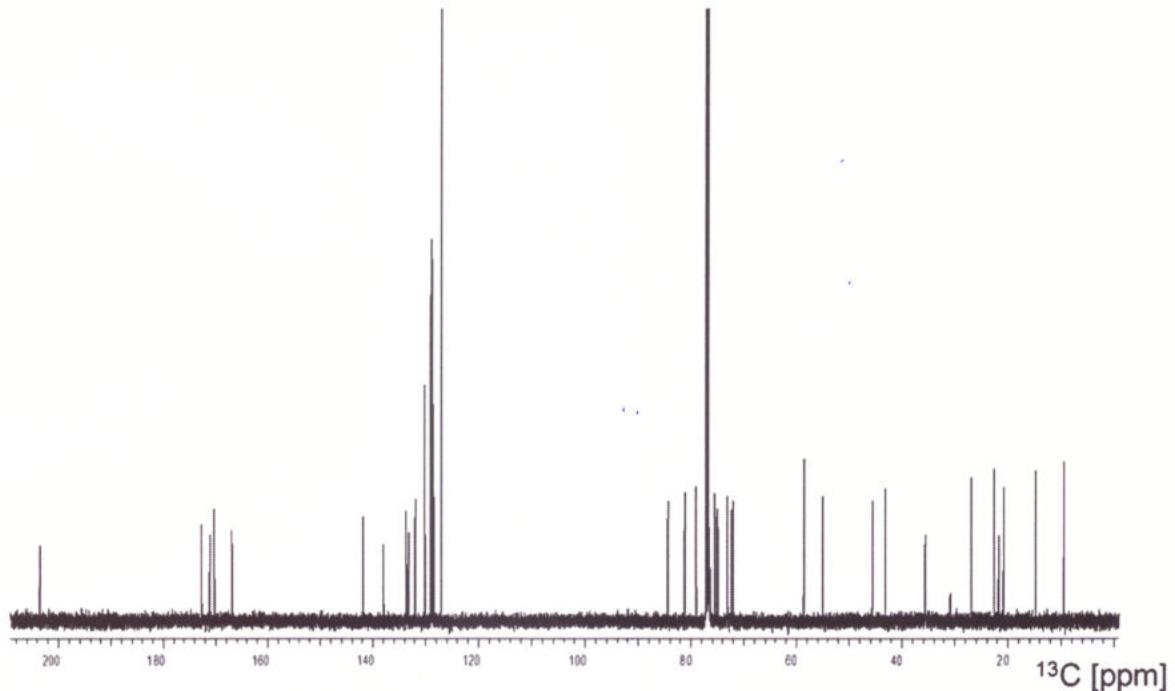


Рисунок 6. ^{13}C ЯМР спектр «Таксола».

Анализ препарата «Аскорутин»

Анализ препарата «Аскорутин» можно провести по спектрам ^1H ЯМР, сравнив его со спектрами аскорбиновой кислоты и рутина (рисунок 7) в $\text{DMSO}-d_6$.

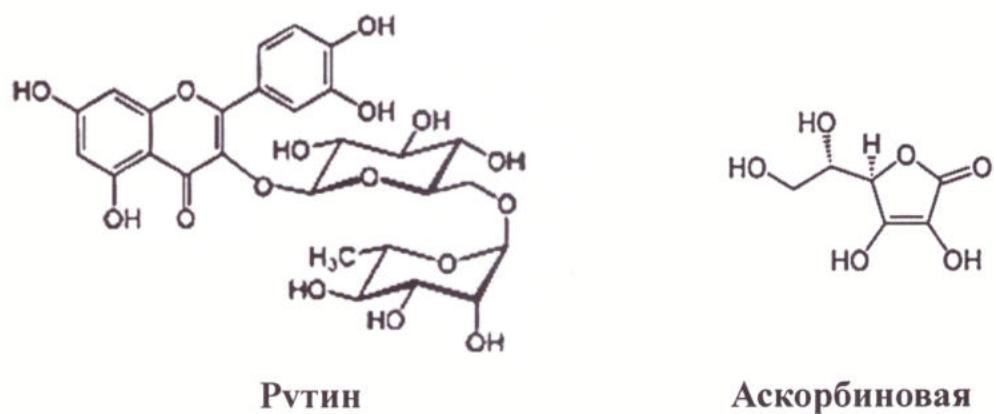


Рисунок 7. Структурные формулы рутина и аскорбиновой кислоты.

На рисунке 8 приведены спектры ^1H ЯМР препарата «Аскорутин», аскорбиновой кислоты и рутина. По данным спектрам можно установить наличие и провести количественную оценку компонентов препарата «Аскорутин», а также процентное содержание примесей.

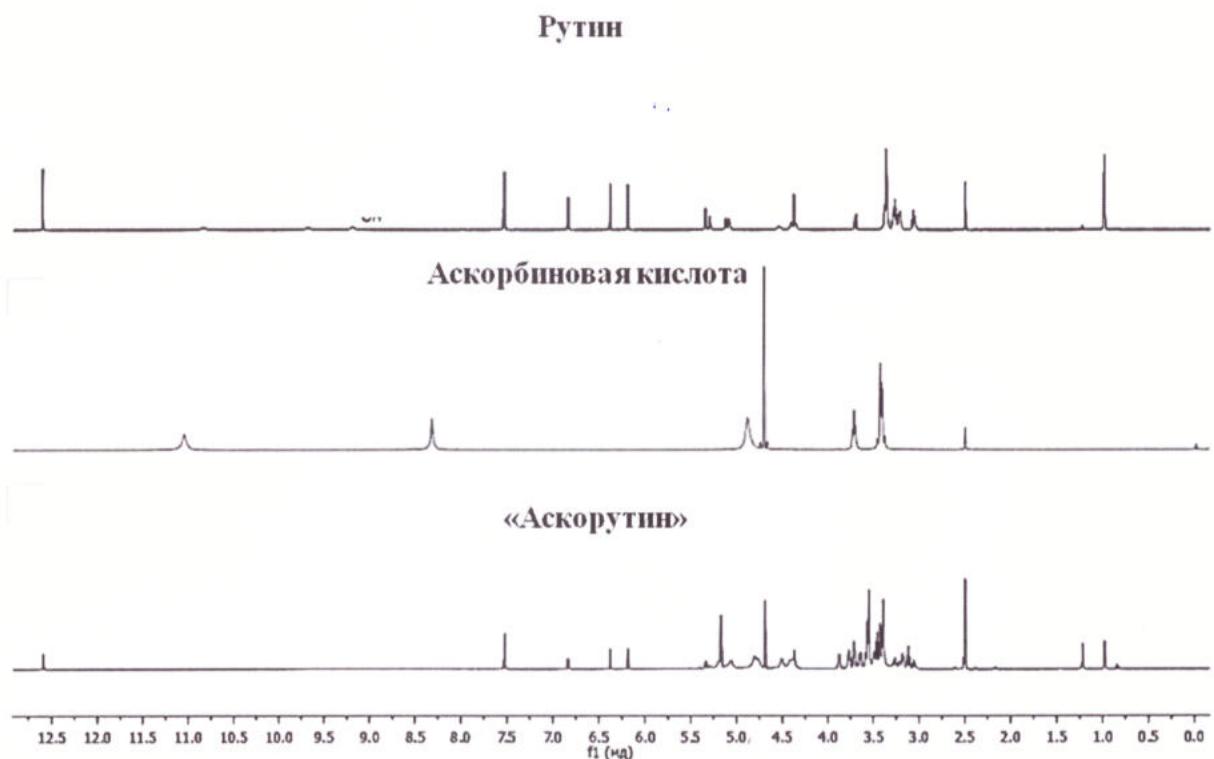


Рисунок 8. ^1H ЯМР спектры рутина, аскорбиновой кислоты и «Аскорутина».

Идентификацию компонентов «Аскорутина» можно также провести с помощью спектра ^{13}C ЯМР, представленном на рисунке 9, по химическим сдвигам сигналов в спектре, сравнив их с соответствующими литературными данными.

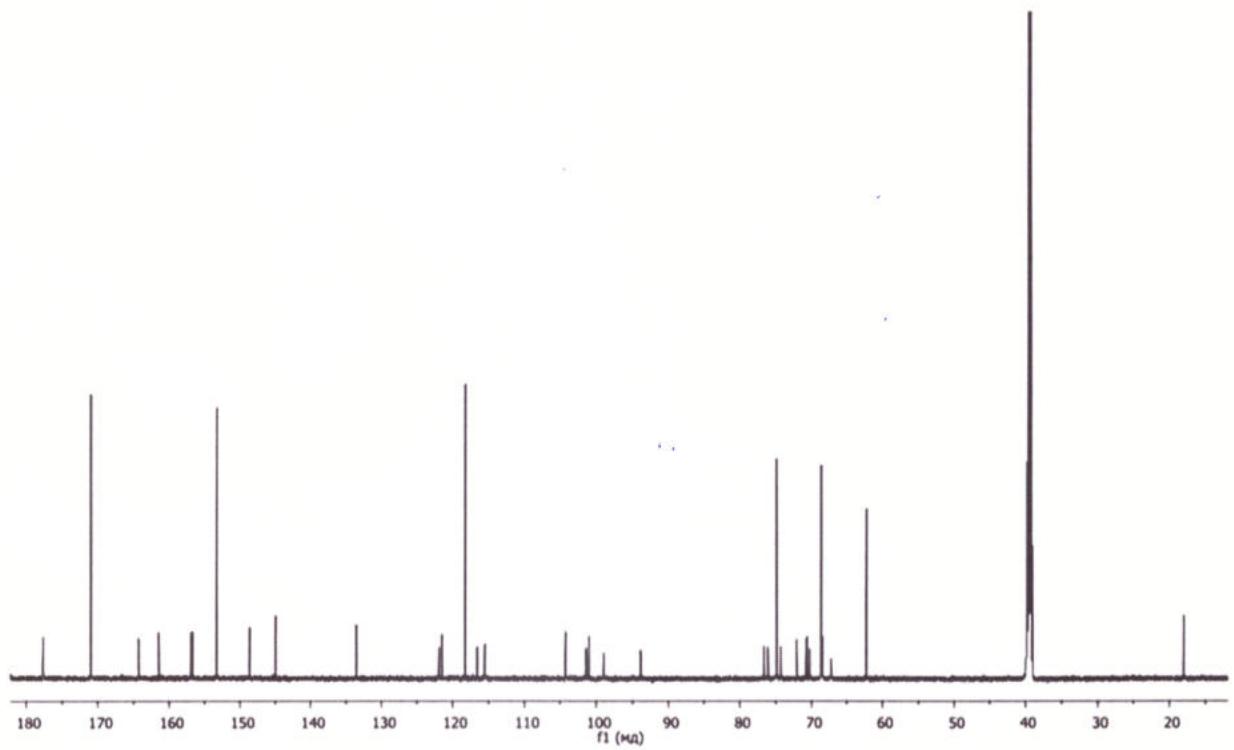


Рисунок 9. ^{13}C ЯМР спектр «Аскорутина».