

# Новая методология быстрого мониторинга аутентичности и определения содержания фармацевтических субстанций в антибиотиках без использования стандартных образцов

А. С. ПРОКОПЬЕВ, В. А. ИВЛЕВ\*, В. Г. ВАСИЛЬЕВ, С. В. ГОРЯИНОВ, Р. А. АБРАМОВИЧ, Г. А. КАЛАБИН

Российский университет дружбы народов, Москва

## New Methodology for Rapid Monitoring of the Authenticity and for Determination of the Pharmaceutical Ingredients of Antibiotics Without the Use of Reference Materials

A. S. PROKOP'EV, V. A. IVLEV, V. G. VASIL'EV, S. V. GORYAINOV, R. A. ABRAMOVICH, G. A. KALABIN

RUDN., Moscow

Проведён анализ некоторых популярных антибиотиков методами количественной спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H и масс-спектрометрии DART без использования стандартных образцов.

*Ключевые слова:* ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия, количественный анализ.

An analysis of some popular antibiotics was carried out by quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and DART mass spectrometry without the use of reference standards.

*Keywords:* NMR spectroscopy, mass spectrometry, quantitative analysis.

### Введение

В условиях адекватности диагностики заболеваний, последующего выбора химиотерапевтических лекарственных средств (ЛС) и технологии лечения ими, особую важность обретает соответствие состава ЛС заявленному производителем. В практике фармакопейного анализа определение подлинности ЛС и содержания в них фармацевтических субстанций обычно осуществляется методами хроматографии и оптической спектроскопии и сводится к следующим основным этапам: количественное выделение субстанции → идентификация с использованием стандартного образца (СО) → количественное определение с использованием СО.

Независимо от выбранных методов выделения и анализа такой алгоритм безусловно требует наличия СО, что практически затруднительно или даже невозможно в конкретных ситуациях, например, на оптово/розничном этапе продвижения или хранения ЛС. Процесс выделения субстанции может вносить погрешности, учёт которых является довольно трудоёмким. Выявление и идентификация примесей и остаточных растворителей является самостоятельной и наиболее

трудной задачей. Нельзя полностью исключить ошибку в идентификации субстанции, например, при её анализе методом ВЭЖХ с УФ-детектированием, если вместо оригинального препарата используется очень близкое как по времени удерживания, так и по используемой длине волны поглощения индивидуальное вещество.

В Государственную фармакопею РФ Издание XIII впервые введена масс-спектрометрия (МС) как самостоятельный метод физико-химического анализа (ОФС 1.2.1.0008.15). Её использование в форме методик «мягкой ионизации» МС в условиях высокого разрешения позволяет наблюдать ионы, соответствующие молекулярной массе фармацевтической субстанции. Масс-спектрометр с возможностью определения точной массы молекул в режиме DART (Direct Analysis in Real Time), делает возможным за несколько секунд без пробоподготовки установить брутто-формулу субстанции без её выделения. Таким путём достигается частичная идентификация, поскольку развернутую структурную формулу субстанции с установлением изомерного и энантиомерного строения и её количественное содержание в ЛС этот метод без наличия СО определить не может. Это достигается использованием спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), которая является прямым первичным методом количественного измерения одной из основных величин в

© Коллектив авторов, 2017

\*Адрес для корреспонденции: E-mail: chemistron@mail.ru

системе СИ — мольного количества вещества. Метод входит в отечественную Государственную Фармакопею более 30 лет.

Количественная спектроскопия ЯМР протонов (КС ЯМР  $^1\text{H}$ ) — наиболее распространённый, информативный и экспрессный из методов ЯМР, позволяющий на микрограммовом уровне количественно определять в ЛС фармацевтические субстанции, вспомогательные вещества и примеси без их выделения и использования СО. Проблема чувствительности, как правило, не является принципиальной, т.к. анализ может осуществляться с тем количеством ЛС, которое за разумное время регистрации спектра (несколько минут) обеспечит желаемую погрешность анализа. Так, при использовании стандартного оборудования (400 МГц, ампула  $d=5\text{мм}$ ) для молекул массой до 1000 Да достаточно менее 100 мкг аналита, чтобы установить подлинность субстанции и выполнить её количественное определение с погрешностью менее 3%. Главное достоинство метода — отсутствие потребности в СО — обусловлено его физическим принципом, согласно которому интегральные интенсивности сигналов ядер  $^1\text{H}$  отдельных компонентов в смеси веществ прямо пропорциональны их мольным долям [1]. Т.е. для определения количественного содержания фармацевтической субстанции в растворе ЛС достаточно добавить в него известное количество выбранного несложного протонсодержащего вещества (эталона) и соотнести площади его сигнала и выбранных индикаторных сигналов субстанции в спектре ЯМР  $^1\text{H}$ . Спектр позволяет не только однозначно установить молекулярное и пространственное строение субстанции путём детального анализа одно- и двумерных спектров или сопоставления их с известными или теоретически рассчитанными, но и определить их содержание с желаемой погрешностью. Последняя уменьшается с ростом взятого количества ЛС, длительности эксперимента и некоторых других факторов, детально рассмотренных в обзорных работах [2, 3]. Для быстрого проведения анализа в качестве эталона для количественных определений удобно использовать дейтерорастворители ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CD}_3\text{SOCD}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{CN}$  и другие) с известным точным содержанием остаточных протонов, что исключает необходимость процедуры количественного добавления иного эталонного соединения.

Предлагаемая универсальная методология проведения экспертизы подлинности и определения содержания заявленной субстанции включает следующие этапы:

1. Перевод ЛС в раствор приемлемого дейтерорастворителя с контролем полноты извлечения лекарственной субстанции.

2. Подтверждение по точному значению брутто-формулы наличия в ЛС заявленной фар-

мацевтической субстанции путём регистрации экспресс-методом DART масс-спектра высокого разрешения.

3. Подтверждение структурной формулы фармацевтической субстанции и определение её количества в ЛС путём регистрации количественного спектра ЯМР  $^1\text{H}$ .

Представленный алгоритм анализа без использования стандартных образцов легко реализовать на основе двух независимых и комплементарных прецизионных методов анализа с использованием ЯМР и МС-спектрометров, имеющихся в аналитических лабораториях контрольных органов, университетов и химических институтов.

Прецизионность, однозначность заключений, быстрота и надёжность, лёгкая валидируемость методик — основные достоинства такого подхода, разработанного и широко используемого нами в течение ряда лет в исследовательской практике (см. например [4, 5]). Многие объекты, представленные на экспертизу подлинности по официальным валидированным фармакопейным методикам в аккредитованный Центр контроля качества лекарственных средств ЦКП (НОЦ) РУДН, были подвергнуты нами независимой экспертизе тандемом МС и ЯМР и показали его быстроту и надёжность.

В настоящем сообщении представлены примеры анализа некоторых антибиотиков: Тетрациклина, Таваника, Азитромицина и Тиенама в форме таблеток, капсул и порошков для приготовления инъекционных растворов, соответственно, широко используемых в химиотерапии, по разработанной нестандартной методологии.

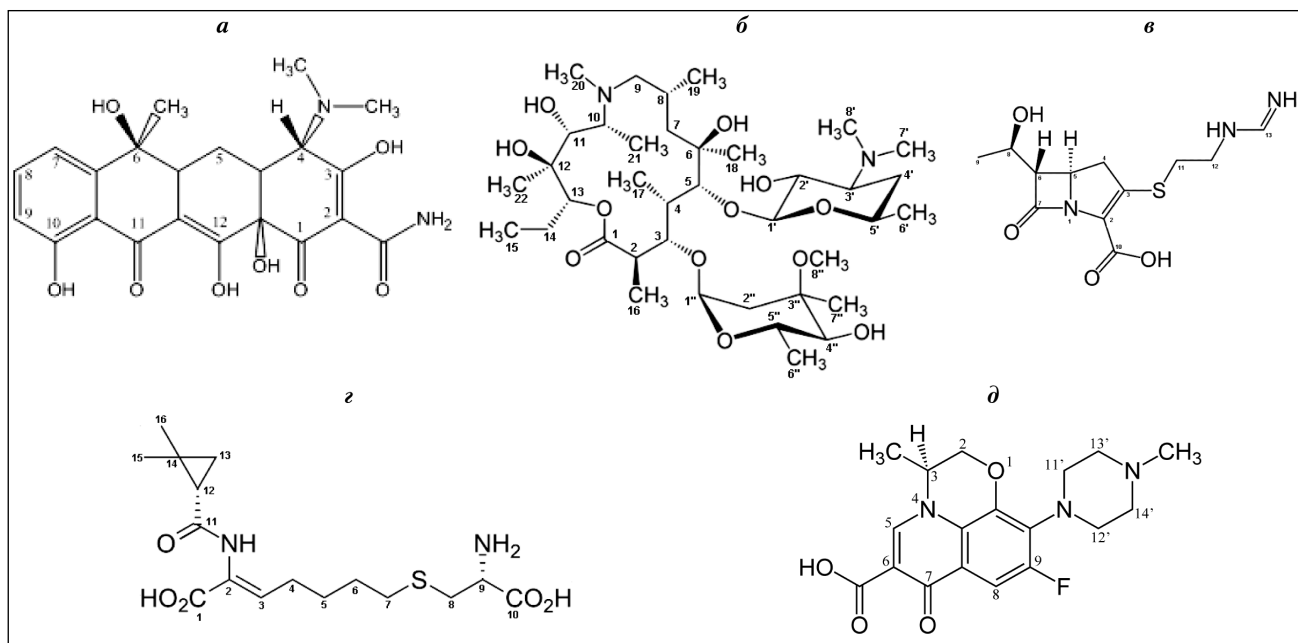
## Материал и методы

Тетрациклин — бактериостатический антибиотик группы тетрациклинов, структурная формула которого представлена на рис. 1, а. Нарушает образование комплекса между транспортной РНК и рибосомой, что приводит к подавлению синтеза белка. Активен в отношении грамположительных микроорганизмов. В ЛС применяется в форме мази и таблеток. Химическое название: [4S-(4альфа,4а альфа,5а альфа,6бета,12а альфа)]-4-(диметиламино)-1,4,4а,5,5а,6,11,12а-октагидро-3,6,10,12,12а-пентагидрокси-6-метил-1,11-диоксо-2-нафтаценкарбоксамид (в виде гидрохлорида или тригидрата). Брутто-формула  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$ ,  $M=444,35\text{ г/моль}$ .

В фармакопейном анализе идентификация и количественное определение тетрациклина осуществляется с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, что требует наличия стандартных образцов.

Проведён анализ препарата в форме таблеток, содержащих в пересчёте на активное вещество 100 мг тетрациклина. Вспомогательные вещества — сахароза, краситель арбутин Е-122 и другие, указанные в спецификации. Производитель РУП «Белмедпрепараты», серия 030116, годен до 02.19.

Азитромицин — антибиотик с антибактериальным действием широкого спектра. Химическое название: 9-Деоксо-9а-аза-9а-метил-9а-гомоэритромицин А. Брутто-формула  $\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_{12}$ ,  $M=748\text{ г/моль}$ . Структурная формула представлена на рис. 1, б. Проведён анализ препарата в форме капсул, содержащих 250 мг азитромицина дигидрата (в пересчёте на



**Рис. 1. Структурные формулы: а — тетрациклин; б — азитромицин; в — имипенем; г — циластатин; д — левофлоксацин.**

азитромицин). Вспомогательные вещества: натрия лаурилсульфат, магния стеарат, поливинилпирролидон низкомолекулярный, капсулы твердые желатиновые. Производитель ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н. А. Семашко, серия 21214, годен до 01.17.

Тиенам — антибиотик широкого спектра действия, содержащий два компонента. Основной компонент — имипенем — представитель нового класса  $\beta$ -лактамов (группы карбапенемов или тиенамицинов), ингибирующий синтез клеточной стенки бактерий, оказывающий бактерицидное действие в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных патогенных аэробных и анаэробных микроорганизмов. Химическая формула: (5R,6S)-6-[(1R)-1-гидроксиэтил]-3-({2-[(иминометил)амино]этил}тио)-7-оксо-1-азабицикло[3.2.0]гепт-2-ен-2-карбоновая кислота. Брутто-формула:  $C_{12}H_{17}N_3O_4S$ ,  $M=299$  г/моль. Структурная формула представлена на рис. 1, в. Второй компонент (циластатин натрия) — специфический фермент, тормозящий метаболизм имипенема в почках, т.е. увеличивающий концентрацию неизмененного имипенема в мочевыводящей системе. Химическое название: (Z)-7-[(2R)-2-амино-3-гидрокси-3-оксопропил] сульфанил-2-[[{(1S)-2-диметилциклопропанкарбонил]амино} гепт-2-еновая кислота. Брутто-формула:  $C_{16}H_{26}N_2O_5S$ ,  $M=358$  г/моль. Структурная формула представлена на рис. 1, г. Производитель ЗАО «ОПТАТ», серия 0000399598, годен до 20.06.16. Исследование состава выполнено до указанной даты.

Таваник — синтетический антибактериальный препарат широкого спектра действия из группы фторхинолонов, содержащий в качестве активного вещества левофлоксацин — левовращающий изомер офлоксацина. Левофлоксацин блокирует ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, нарушает суперспирализацию и сшивку разрывов ДНК, ингибирует синтез ДНК, вызывает глубокие морфологические изменения в цитоплазме, клеточной стенке и мембранах микробных клеток. Химическая формула: (-)-(S)-9-фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-7Н-пиридо[1,2,3-de]1,4-бензоксазин-6-карбоновая кислота гемигидрат. Брутто-формула:  $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ ,  $M=361,4$  г/моль. Структурная формула представлена на рис. 1, д. Производитель Санофи Винтроп Индустрия, серия 4CF5C, годен до 31.03.19.

Для приготовления растворов образцов антибиотиков использованы следующие дейтерированные растворители и эталоны:  $D_2O$  — deuterium oxide for NMR, 99,8% D (Acros organics);  $DMSO-d_6$  — methyl sulfoxide- $d_6$  for NMR, 99,9% D (Acros organics);  $methanol-d_4$  (euro-top);  $CDCl_3$  — chloroform- $d$  for NMR, 99,8% D (Acros organics); 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- $d_4$  acid, sodium salt, 98 atom % D (Sigma-Aldrich). Для каждого из них предварительно измерено точное содержание остаточных протонов (погрешность  $\pm 0,02\%$ ), сигналы которых присутствуют в спектрах ЯМР 1H и использованы в качестве эталонных при количественном определении содержания действующих фармацевтических субстанций.

**Пробоподготовка.** Процедура пробоподготовки таблетированных форм и содержимого капсул состояла в их измельчении путём растирания в ступке, что не требовалось для порошка Тиенама. Часть образца взвешивалась (весы Acculab ATL-220i, погрешность 0,0001 г) и переводилась в раствор в выбранном дейтерорастворителе (метанол- $d_4$  или  $DMSO-d_6$  для тетрациклина,  $DMSO-d_6$  для азитромицина,  $CDCl_3$  для левофлоксацина,  $D_2O$  для Тиенама), образцы перемешивались 1 мин на Vortex, затем 10 мин обрабатывались ультразвуком и помещались на 5 мин в центрифугу. Надосадочная жидкость отбиралась в ампулу для ЯМР диаметром 5 мм. В случае Тиенама в раствор добавляли навеску триметилсилилпропионат натрия d-4 (ТСП) в качестве внутреннего стандарта.

**Условия регистрации масс-спектров DART.** Определение точных молекулярных масс фармацевтических субстанций в индивидуальных образцах осуществлялось на времяпролетном (разрешение FWHM около 6000) хромато-масс-спектрометре JEOL AccuTOF T-100LP (Япония) с источником ионизации DART. Образцы растворов лекарственных препаратов вносились в ионный источник с помощью стеклянного капилляра. Параметры регистрации спектров: температура ионного источника  $300^\circ C$ , скорость потока газа (гелий) — 1,0 мл/мин, напряжение на электродах и входном конусе масс-спектрометра — 150 В, 250 В и 3 кВ, соответственно, регистрация положительных ионов, диапазон регистрируемых масс 100—1000 Да. Для калировки шкалы времяпролетного масс-спектрометра в начале и в конце серии измерений ЛС регистрировали масс-спектры ПЭГ (полиэтиленгликоль) с известным элементным составом. Для каждого образца ЛС спектры регистрировали три раза.

**Условия регистрации спектров ЯМР  $^1\text{H}$ .** Регистрация спектров ЯМР осуществлена на спектрометре JEOL JNM ECA 600 (Япония). Параметры регистрации спектров: импульс  $90^\circ$ , задержка между импульсами 20 с (в случае Тиенама 30 с), 16 накоплений, развертка 18 м.д. с установкой несущей частоты 8,0 м.д., 32 К точек на спектр. Обработка спектров проводилась по стандартной методике.

Количественное содержание активных веществ препаратов в навеске определялось сравнением интегральной интенсивности: в случае тетрациклина ароматического протона при С-8 (7,49 м.д.) и сигнала остаточных протонов растворителей (ОПР) DMSO-d<sub>5</sub> (2,5 м.д.) или CD<sub>3</sub>OD (3,31 м.д.); в случае азитромицина — совокупность двух отдельно стоящих сигналов в положениях С-1» и С-13 (4,81 м.д. и 4,70 м.д., соответственно) и сигнала ОПР DMSO-d<sub>5</sub>, в случае левофлоксацина — протона в положении С-5 при 8,63 м.д. и сигнала ОПР CDCl<sub>3</sub> и рассчитывалось по формуле:

$$m(X) = n(\text{ОПР}) \times (I(X)/N(X)) / (I(\text{ОПР})/N(\text{ОПР})) \times M(X)$$

где  $m$  — масса,  $X$  — искоемое соединение,  $M$  — молярная масса,  $I$  — интегральная интенсивность сигналов,  $N$  — количество протонов, обуславливающих индикаторные сигналы.

В случае Тиенама количественное определение содержания активных веществ препаратов в навеске определялось сравнением интегральной интенсивности сигнала С-9 циластатина при 3,89 м.д. и сигнала С-6 имипенема при 3,41 м.д. с сигналом триметилсиллилпропионовой кислоты (ТСП) в D<sub>2</sub>O (0 м.д.) и рассчитывалось по формуле:

$$m(X) = M(X) \times m(\text{ТСП}) / M(\text{ТСП}) \times ((I(X)/N(X)) / (I(\text{ТСП})/N(\text{ТСП})))$$

Общее содержание активных веществ в таблетке/капсуле/ампуле рассчитывается по формуле:

$$m_{\text{общая}}(X) = m(X) / m(\text{навески}) \times m(\text{таблетки/капсулы/ампулы}).$$

### Экспериментальная часть

Для тетрациклина характерно наличие сигналов трёх ароматических протонов в положениях С7, С8 и С9 с химическими сдвигами 7,14, 7,49, 6,90 м.д., соответственно, и гидроксильных групп при С10 и С12 с химическими сдвигами 11,87 и

15,10 м.д., соответственно. Гидроксильные группы не проявляются в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  препарата, зарегистрированного в CD<sub>3</sub>OD, из-за дейтерообмена их протонов. В спектре раствора в DMSO-d<sub>6</sub> сигнал протона при С12 проявляется в виде уширенного синглета, а сигнал протона при С10 — в виде синглета. Это обусловлено тем, что протон С10 группы образует прочную внутримолекулярную водородную связь с соседней карбонильной группой, что предотвращает дейтерообмен с растворителем. Это следует из равенства интегральных интенсивностей сигналов у протона С10 и ароматических протонов тетрациклина. Таким образом, количественное определение тетрациклинов в ЛС может быть проведено как по сигналам ароматических протонов в CD<sub>3</sub>OD, так и протона С10 в DMSO-d<sub>6</sub>.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  тетрациклина, полученный в условиях количественного эксперимента в CD<sub>3</sub>OD представлен на рис. 2.

Спектр препарата содержит следующие сигналы (CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ , м.д., J/Гц): 1,62 (с, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1,93 (дд, 1H, H-5); 2,10 (ддд, 1H, H-5'); 2,66 (ддд, 1H, H-4a); 2,72 (с, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,97 (дд, 1H, H-5a); 3,44-3,52 (уш. сигнал, 1H, H-4); 6,90 (д, 1H, J = 8,2, H-9); 7,14 (д, 1H, J = 7,7, H-7); 7,49 (т, 1H, J = 8,1, H-8). Химические сдвиги протонов тетрациклина полностью совпадают с данными литературы [6].

Во взятых навесках массами 43,8 мг (DMSO-d<sub>6</sub>) и 49,2 (CD<sub>3</sub>OD) проанализированного образца найдено содержание тетрациклина 16,66 и 18,7 мг, соответственно. При пересчёте на 1 таблетку (масса 1 таблетки 268 мг) содержание тетрацик-

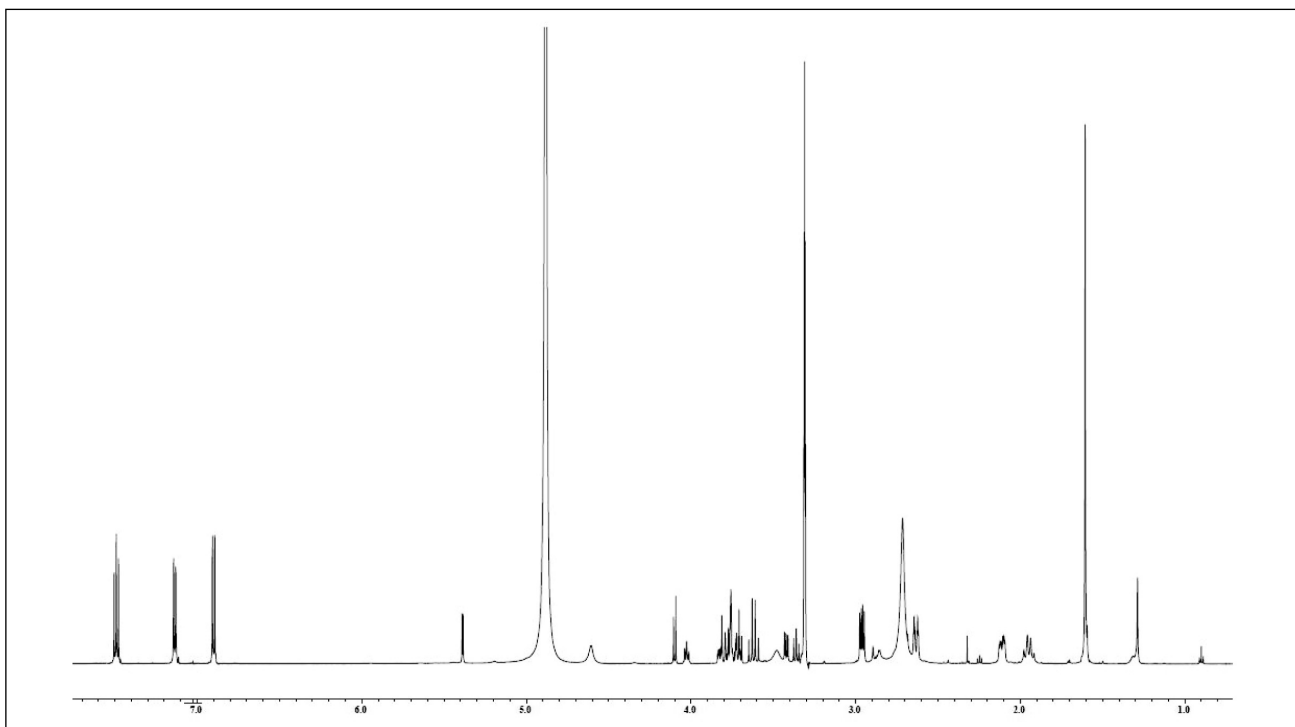
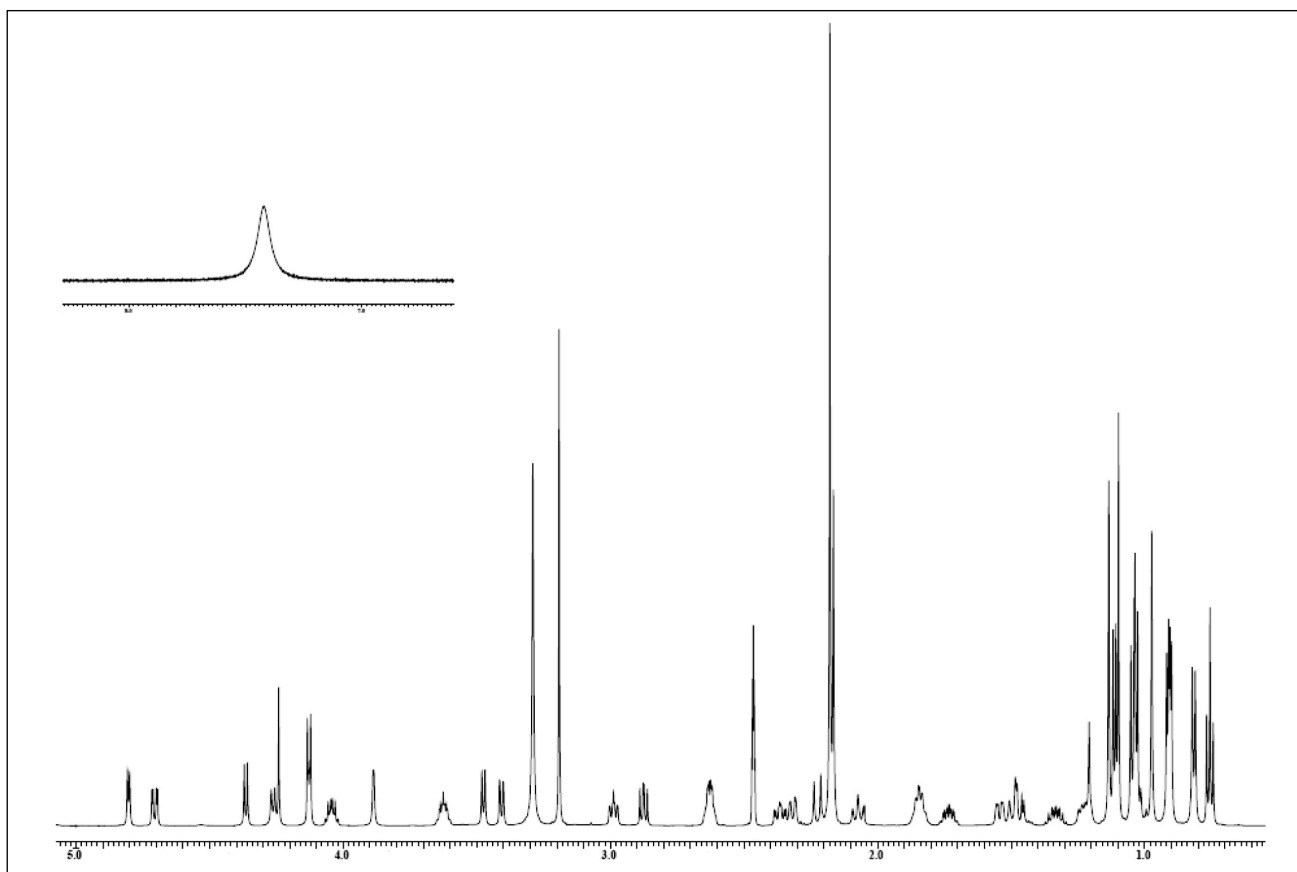


Рис. 2. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  препарата Тетрациклин в CD<sub>3</sub>OD.



**Рис. 3.** Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  препарата Азитромицин в  $\text{DMSO-d}_6$  (отдельно представлен сигнал протона гидроксильной группы в положении 6).

лина составило 101,9 и 102,4 мг, что соответствует заявленному производителем содержанию 100 мг с погрешностью менее 3%.

В масс-спектре DART образца содержатся интенсивные сигналы с  $m/z$  445 и  $m/z$  889, соответствующие протонированным молекулам тетрациклина и его протонированному димеру, подтверждающие наличие заявленного компонента ЛС в образце.

Основной сигнал в масс-спектре DART азитромицина соответствует ионам  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , пригодным для установления элементного состава активного вещества.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  Азитромицина, полученный в условиях количественного эксперимента в  $\text{DMSO-d}_6$ , представлен на рис. 3.

Спектр препарата содержит следующие сигналы ( $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ , м.д.,  $J/\text{Гц}$ ): 0,76 (3H, т,  $J = 7,5$  Гц, H-15); 0,82 (3H, д,  $J = 7,0$  Гц, H-19); 0,90 (3H, д,  $J = 6,7$  Гц, H-21); 0,91 (3H, д,  $J = 7,5$  Гц, H-17); 0,97 (3H, с, H-22); 1,01-1,06 (6H, м, H-4'R, H-6', H-16); 1,09 (3H, с, H-7''); 1,11 (3H, д,  $J = 6,3$  Гц, H-6''); 1,13 (3H, с, H-18); 1,21 (1H, м, H-7S); 1,33 (1H, м, H-14R); 1,40-1,52 (2H, м, H-7R, H-2'S); 1,53 (1H, м, H-4'S); 1,73 (1H, м, H-14S); 1,84 (2H, м, H-4, H-8); 2,07 (1H, т,  $J = 11,5$  Гц, H-9R); 2,17 (3H, с, H-20); 2,18 (6H, с, H-7', H-8'); 2,22 (1H, д,

$J = 14,7$  Гц, H-2''R); 2,28-2,40 (2H, м, H-9S, H-3'); 2,59-2,65 (2H, м, H-10, H-2); 2,87 (1H, дд,  $J = 9,3$  Гц,  $J = 7,3$  Гц, H-4''); 2,99 (1H, дт,  $J = 8,4$  Гц,  $J = 1,9$  Гц, H-2'); 3,19 (3H, с, H-8''); 3,41 (1H, д,  $J = 8,3$  Гц, H-11); 3,47 (1H, д,  $J = 7,2$  Гц, H-5); 3,62 (1H, м, H-5'); 3,88 (1H, с, 2'-ОН); 4,04 (1H, м, H-5''); 4,13 (1H, м, 4''-ОН); 4,24 (1H, с, 12-ОН); 4,26 (2H, м, 11-ОН, H-3); 4,37 (1H, д,  $J = 7,0$  Гц, H-1'); 4,70 (1H, дд,  $J = 9,9$  Гц,  $J = 2,5$  Гц, H-13); 4,81 (1H, д,  $J = 5,0$  Гц, H-1''); 7,42 (1H, уш.с., 6-ОН).

Представленный спектр полностью соответствует структурной формуле. Расхождения значений химических сдвигов с таковыми, известными из литературы [7], не превышают 0,03 м.д.

Выполнено 5 независимых измерений образцов азитромицина с вариацией концентраций от 5 до 50 мг/мл. Разница в полученных результатах в данном диапазоне не превышает 3%. Средняя масса азитромицина в таблетке составила 252 мг, тогда как в спецификации указано 250 мг.

Масс-спектр DART препарата Тиенам содержит сигналы ионов состава  $[\text{M}+\text{H}]^+$  с  $m/z$  300 и  $m/z$  359, соответствующие протонированным молекулам имипенема и циластатина, что подтверждает наличие искоемых соединений в представленном на анализ образце.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  препарата Тиенам, полученный в условиях количественного эксперимента в растворе  $\text{D}_2\text{O}$ , представлен на рис. 4.

Большинство сигналов протонов каждой из двух компонент ЛС хорошо разрешены в спектре в области от 0 до 8 м. д. Сигнал остаточных протонов растворителя  $\text{D}_2\text{O}$ , т. е. молекул  $\text{HDO}$  — интенсивный синглет около 4,78 м.д. Отнесение всех сигналов Имипенема выполнено на основе 1D и 2D  $^1\text{H}$  спектров ЯМР и верифицировано с использованием известных для растворителя  $\text{D}_2\text{O}$  литературных данных [8]. Характеристичность химических сдвигов отдельных сигналов Циластатина в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  и получение для него корреляционных 2D спектров ЯМР COSY позволили без привлечения литературных данных или расчёта спектра сделать полное отнесение сигналов всех протонов, кроме участвующих в протонном обмене с атомами водорода растворителя  $\text{D}_2\text{O}$ . Выявление последних не является необходимым для подтверждения подлинности и количественного определения этой компоненты, а их обнаружение легко реализуется путём добавления к растворителю  $\text{D}_2\text{O}$  анализируемого образца небольшого количества (5–10%)  $\text{H}_2\text{O}$ . Спектр, полученный в таких условиях, полностью соответствует представленным структурным формулам.

Значения химических сдвигов, интенсивности сигналов, мультиплетности и констант спин-спинового взаимодействия в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  циластатина и имипенема следующие: циластатин: 0,86 (1H, dd,  $J=4,7$  Гц,  $J=8,0$  Гц,  $\text{C}_{13}\text{H}$ ); 1,01 м.д. (1H, t,  $J=5,1$  Гц,  $\text{C}_{13}\text{H}$ ); 1,14 м.д. (3H, s,  $\text{C}_{15}\text{H}_3$ ); 1,19

м.д. (3H, s,  $\text{C}_{16}\text{H}_3$ ); 1,58–1,49 м.д. (2H, m,  $\text{C}_5\text{H}_2$ ); 1,67–1,58 м.д. (2H, m,  $\text{C}_6\text{H}_2$ ); 1,69 м.д. (1H, dd,  $J=5,5$  Гц,  $J=8,0$  Гц,  $\text{C}_{12}\text{H}$ ); 2,16–2,06 м.д. (2H, m,  $\text{C}_4\text{H}_2$ ); 2,67–2,57 м.д. (2H, m,  $\text{C}_7\text{H}_2$ ); 2,95–3,29 м.д. (2H, m,  $\text{C}_{11}\text{H}_2$ ); 3,89 м.д. (1H, dd,  $J=4,1$  Гц,  $J=7,7$  Гц,  $\text{C}_9\text{H}$ ); 6,46 м.д. (1H, t,  $J=7,5$  Гц,  $\text{C}_3\text{H}$ ). Имипенем: 1,30 м.д. (3H, d,  $J=6,5$  Гц,  $\text{C}_9\text{H}_3$ ); 2,95–3,29 м.д. (4H, m,  $\text{C}_4\text{H}_2$ ,  $\text{C}_{11}\text{H}$ ); 3,41 м.д. (1H, td,  $J=2,6$  Гц,  $J=6,1$  Гц,  $\text{C}_6\text{H}$ ); 3,68–3,54 м.д. (2H, m,  $\text{C}_{12}\text{H}$ ); 4,27–4,18 м.д. (2H, m,  $\text{C}_5\text{H}$ ,  $\text{C}_8\text{H}$ ); 7,84 м.д.; 7,82 м.д. (1H, 2s, изомерные  $\text{HC}_{13}=\text{NH}$ ).

Сигналы двух протонов циластатина в положении 11 и сигналы четырёх протонов имипенема в положениях 4 и 11 в области 2,95–3,29 м.д. перекрываются друг с другом, их отнесение сделано на основании спектра COSY.

Для отдельных протонов циластатина рядом с основными обнаружены минорные сигналы, свидетельствующие об изомерии по связи  $\text{C}_2-\text{C}_3$ . Содержание изомеров 9:1. Вследствие таутомерного равновесия сигнал фрагмента  $-\text{NH}-\text{CH}=\text{NH}$  имипенема проявляется в виде двух синглетов с отношением 2:3 при 7,82 и 7,84 м.д., соответственно.

Проанализировано три образца препарата из трёх различных ампул с указанным содержанием компонентов 500 мг имипенема и 500 мг циластатина. Найдено, что содержание имипенема составило  $512 \pm 14$  мг, что соответствует заявленному содержанию, тогда как найденное содержание циластатина  $375 \pm 11$  мг ниже заявленного на 25%, что может быть объяснено его недоложением, что требует независимой перепроверки по фармако-

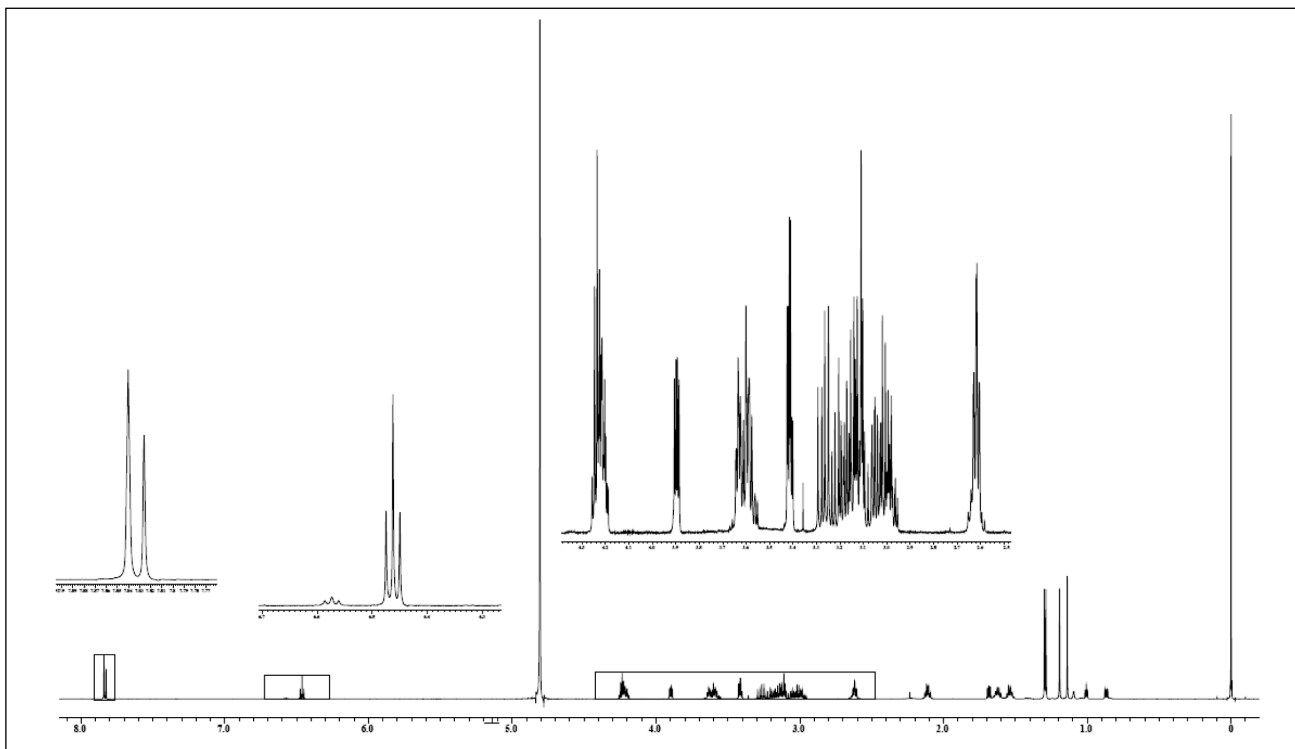


Рис. 4. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  препарата Тиенам в  $\text{D}_2\text{O}$ .

пейной методике с использованием стандартных образцов. Неполная растворимость циластатина в анализируемых растворах исключена, т.к. используемые концентрации были ниже, чем рекомендованные для инъекционного раствора 5 мг/мл.

Примесям в препарате соответствуют узкие синглеты при 3,36 и 2,24 м.д., имеющие интегральные интенсивности 0,03 и 0,15 (взяв за 1,00 интенсивность одного протона имипенема). Второй из них, по-видимому, обусловлен остаточным растворителем (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, имеющим характерный сигнал с таким химическим сдвигом.

Основной сигнал в масс-спектре DART левофлоксацина соответствовал ионам состава [M+H]<sup>+</sup>.

Спектр ЯМР <sup>1</sup>H левофлоксацина, полученный в условиях количественного эксперимента в CDCl<sub>3</sub>, представлен на рис. 5. Он содержит следующие сигналы (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д., J/Гц): 1,58 (3H, д, J = 7,0 Гц, C<sub>3</sub>H—CH<sub>3</sub>); 2,34 (3H, с, N—CH<sub>3</sub>); 2,46—2,58 (4H, м, H-13', H-14'); 3,30—3,44 (4H, м, H-11', H-12'); 4,34 (1H, д, J = 11,1 Гц, H-2); 4,43 (1H, д, J = 11,1 Гц, H-2); 4,52—4,59 (1H, м, 3-H); 7,63 (1H, д, J = 12,3 Гц, H-8); 8,62 (1H, с, H-5); 15,03 (1H, уш.с., COOH).

Представленный спектр полностью соответствует структурной формуле. Расхождения значений химических сдвигов с таковыми, известными из литературы [9], не превышают 0,03 м. д.

Результаты измерений методом КС ЯМР <sup>1</sup>H верифицированы с помощью количественной спектроскопии ЯМР <sup>19</sup>F. Для этого в раствор препарата левофлоксацина добавили точно измеренное количество трифторуксусной кислоты. Регистрировали

количественный спектр ЯМР <sup>19</sup>F при следующих условиях: импульс 45°, задержка между импульсами 20 с, 16 накоплений, развертка 100 м.д. с установкой несущей частоты -100,0 м.д., 64 К точек на спектр. Спектр содержит синглет трифторуксусной кислоты при -76,5 м.д. и дублет атома фтора левофлоксацина при -120,1 м.д. (J = 12,3 Гц). Расчёт содержания левофлоксацина проводили по формуле, приведенной выше. Расхождение независимых результатов ЯМР <sup>1</sup>H и ЯМР <sup>19</sup>F не превышают 2% и составляют 498,7 мг и 503,4 мг, соответственно, при заявленном содержании 500 мг.

## Заключение

На примере нескольких популярных антибиотиков показано, что сочетание двух независимых и комплементарных методов — десорбционной масс-спектрометрии DART и количественной спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H возможно осуществлять быстрый скрининг подлинности и определения содержания фармацевтических субстанций без использования аттестованных стандартных образцов. Важнейшим этапом жизненного цикла лекарственных средств, сопровождение которых целесообразно осуществлять с использованием такой методологии, является этап оптово-розничного обращения, на котором, с одной стороны, использование фармакопейных методов контроля подлинности и качества затруднено отсутствием стандартных образцов, а с другой, наиболее вероятно выявление фальсифицированных или низкокачественных (из-за условий, сроков хранения, или иных причин) лекарственных средств.

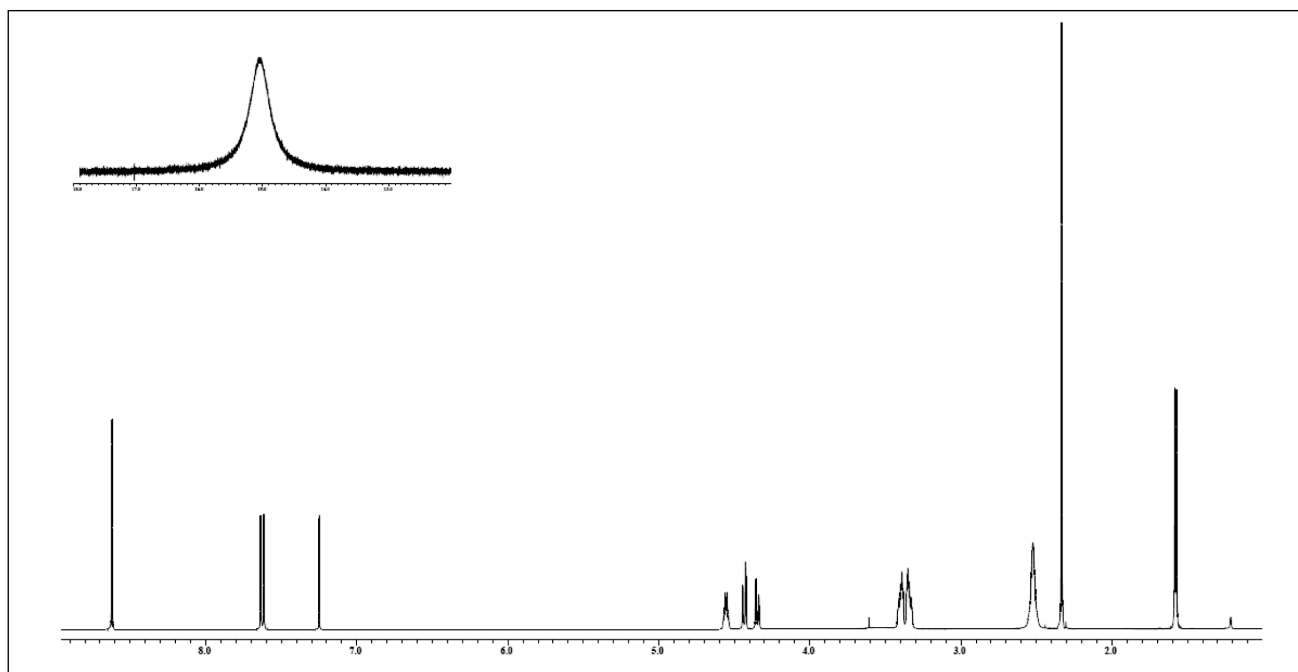


Рис. 5. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H препарата Левофлоксацин в CDCl<sub>3</sub> (отдельно вынесен сигнал протона карбоксильной группы).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Jancke H.* NMR Spectroscopy as a Primary Analytical Method, Document 98/02 to the 4th Session of the CCQM, Sèvres 1998.
2. *Holzgrabe Ulrike.* Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.* 2010; 57: 229—240.
3. *van Duynhoven J., van Velzen E., Jacobs D. M.* Quantification of Complex Mixtures by NMR. *Ann Reports NMR Spectroscop* 2013; 80: 181—236.
4. *Калабин Г.А., Горяинов С.В., Ивлев В.А., Нифтуллаев Ф.Ю., Абрамович Р.А.* Идентификация и количественное определение лекарственных субстанций в суппозиториях комбинацией методов спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H и десорбционной масс-спектрометрии. *Известия Академии наук. Серия химическая.* 2014; 8: 1848—1855. / *Kalabin G.A., Gorjainov S.V., Ivlev V.A., Niftullaev F.Ju., Abramovich R.A.* Identifikacija i kolichestvennoe opredelenie lekarstvennyh substancij v suppozitorijah kombinaciej metodov spektroskopii JaMR <sup>1</sup>H i desorbcionnoj mass-spektrometrii. *Izvestija Akademii nauk. Serija himicheskaja.* 2014; 8: 1848—1855. [in Russian]
5. *Ивлев В.А., Обидченко Ю.А., Прокопьев А.С., Абрамович Р.А., Горяинов С.В., Калабин Г.А.* Идентификация и контроль качества синтетических олигопептидных фармпрепаратов методом количественной спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H и масс-спектрометрии. *Биофарм журн* 2015; 7: 3: 36—44. / *Ivlev V.A., Obidchenko Ju.A., Prokop'ev A.S., Abramovich R.A., Gorjainov S.V., Kalabin G.A.* Identifikacija i kontrol' kachestva sinteticheskikh oligopeptidnyh farmpreparatov metodom kolichestvenno j spektroskopii JaMR <sup>1</sup>H i mass-spektrometrii. *Biofarm zhurn* 2015; 7: 3: 36—44. [in Russian]
6. *Othersen O. G., Waibel R., Lanig H., Gmeiner P., Clark T.* SCRF-DFT and NMR Comparison of Tetracyclines and 5a,6-Anhydrotetracycline in Solution. *J Phys Chem B* 2006; 110: 24766—24774.
7. *Richard J. Brennan and Jill Barber.* Full Assignments of the <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR Spectra of Azithromycin in Buffered D2O and DMSO-d<sub>6</sub>. *Magnetic resonance in chem* 1992; 30: 327—333.
8. *Klaus Florey.* Profiles of Drug Substances, Exc Relat Methodol 1988; 17.
9. *Salem A. A., Mossa H.A., Barsoum B.N.* Quantitative determination of levofloxacin and rifampicin in pharmaceutical and urine samples using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Spectrochim Acta Part A.* 2005; 62: 466—472.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

*Прокопьев Александр Сергеевич* — соискатель кафедры системной экологии экологического факультета РУДН, Москва

*Ивлев Василий Александрович* — инженер ЦКП (НОЦ) РУДН, Москва

*Васильев Василий Геннадиевич* — зам. директора центра ПРИМА ЦКП (НОЦ) РУДН, Москва

*Горяинов Сергей Владимирович* — зав. лабораторией масс-спектрометрии высокого разрешения и спектроскопии ЯМР ЦКП (НОЦ) РУДН, Москва

*Абрамович Римма Александровна* — д. фарм. н., доцент, директор ЦКП (НОЦ) РУДН, Москва

*Калабин Геннадий Александрович* — д. х. н., профессор, директор центра ПРИМА ЦКП (НОЦ) РУДН, Москва