

Экспресс-анализ суппозиториев методом количественной спектроскопии ЯМР ^1H

Р. А. АБРАМОВИЧ, С. А. КОВАЛЕВА, С. В. ГОРЯИНОВ, А. Н. ВОРОБЬЕВ, Г. А. КАЛАБИН

Центр коллективного пользования (научно-образовательный центр) РУДН, Москва

Rapid Analysis of Suppositories by Quantitative ^1H NMR Spectroscopy

R. A. ABRAMOVICH, S. A. KOVALEVA, S. V. GORYAINOV, A. N. VOROBYEV, G. A. KALABIN

Russian People's Friendship University, Moscow

Проведён анализ суппозиториев с микронизированным ибупрофеном и гидрохлоридом арбидола методом количественной спектроскопии ЯМР ^1H . Подобраны и оптимизированы условия анализа. На основании полученных результатов могут быть разработаны экспресс-методики контроля качества суппозиториев с различными действующими компонентами.

Ключевые слова: суппозитории, ЯМР спектроскопия, количественный анализ.

Rapid analysis of suppositories with ibuprofen and arbidol by quantitative ^1H NMR spectroscopy was performed. Optimal conditions for the analysis were developed. The results are useful for design of rapid methods for quality control of suppositories with different components

Key words: suppositories, NMR spectroscopy, quantitative analysis.

Введение

Детальное исследование состава суппозиториев как сложных многокомпонентных систем невозможно без использования наиболее информативных физико-химических методов анализа, таких как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и масс-спектрометрия. Спектроскопия ЯМР — признанный лидер среди инструментальных методов в отношении установления структурных формул, пространственного и электронного строения впервые синтезируемых или выделяемых природных и полусинтетических органических соединений, особенно их количественного определения [1]. В соответствии с международными протоколами количественная спектроскопия ЯМР официально признана первичным методом количественных измерений и рекомендована для широкого использования для этих целей [2—4], входит в общие и частные статьи Фармакопеи Европы, США, Японии и РФ [5]. В соответствии с рекомендациями Государственной Фармакопеи Российской Федерации XII издания, спектроскопия ЯМР является методом установления подлинности лекарственных веществ, определения в них количества посторонних примесей и остаточных растворителей [6].

© Коллектив авторов, 2012

Адрес для корреспонденции:

E-mail: journalgnca@yandex.ru

В ЦКП (НОЦ) РУДН разработан способ получения микронизированной субстанции ибупрофена с использованием нанораспылительной сушилки Büchi «Nano Spray Dryer B-90». Доклинические исследования сравнительной биодоступности, проведённые на животных в лаборатории фармакокинетики ЦКП, показали высокую биодоступность модифицированного микронизации ибупрофена.

Целью настоящего исследования явился экспресс-анализ разработанных суппозиториев, содержащих в одном случае ибупрофен, в другом — арбидол, методом количественной спектроскопии ЯМР ^1H . При оптимизации условий анализа учитывались рекомендации Государственной Фармакопеи Российской Федерации XII издания и соответствующих статей Европейской фармакопеи 6.0 и Фармакопеи США USP 29 [5, 6].

Материал и методы

Объектами исследования являлись ректальные суппозитории ибупрофена (общая масса 0,6 г с содержанием лекарственной субстанции микронизированного ибупрофена 60 мг) и арбидола (общая масса 1,4 г с содержанием лекарственной субстанции гидрохлорида арбидола 50 мг).

Количественные спектры ЯМР получены на спектрометре ECS 400 (JEOL, Япония) с рабочей частотой 400 МГц для протонов, обработка которых проводилась с помощью программы Delta (JEOL), обеспечивающей управление прибором, сбор и анализ данных.

Использованные растворители: CDCl_3 (обогащение 99,8% D, с содержанием 0,03 v/v% TMC) и трифтормукусная кислота (ХЧ).

Приготовление раствора исследуемого образца суппозитория ибuproфена для регистрации спектра ЯМР ^1H : один суппозиторий известной массы (0,583 г) растворяли в 2 мл CDCl_3 . Аликвоту полученного раствора (50 мкл) переносили пипеткой в стандартную ЯМР-ампулу диаметром 5 мм и добавляли 650 мкл растворителя CDCl_3 . Условия регистрации спектра ЯМР ^1H : импульсная последовательность WALTZ для устранения сателлитных сигналов, обусловленных спин-спиновым взаимодействием ^1H и ^{13}C , ширина развертки 19 м. д., импульс 90° 10 мксек, центр спектра 6 м. д., время регистрации ССИ 1 сек, число накоплений спектра 64, релаксационная задержка 20 сек. Химические сдвиги измерены в м. д. относительно сигнала ТМС (0,0 м. д.) как вторичного эталона.

Приготовление раствора исследуемого образца суппозитория арбидола для регистрации спектра ЯМР ^1H : один суппозиторий известной массы (1,395 г) растворяли в 1,5 мл трифтормукусной кислоты. Аликвоту полученного раствора (50 мкл) переносили пипеткой в стандартную ЯМР-ампулу диаметром 5 мм и добавляли 650 мкл растворителя CDCl_3 . Условия регистрации спектра ЯМР ^1H такие же, как и в случае суппозиториев с ибuproфеном.

Результаты и обсуждение

Состав суппозитория ибuproфена известен и содержит 60 мг микронизированного ибuproфена во вспомогательном веществе — твёрдом жире. Подобранный для анализа суппозитория растворитель (хлороформ) обеспечивал полное растворение образца, что позволило в рамках одного эксперимента без использования эталона идентифицировать действующее вещество (ибuproфен, рис. 1), определить количественное содержание лекарственной субстанции и жировой основы. Кроме того, установлена природа и некоторые показатели качества твёрдого жира, а также отсутствие каких-либо органических примесей, кроме диацилглицеридов, с содержанием выше 0,1%.

Идентификация лекарственной субстанции изучаемых суппозиториев ибuproфена сводится к соотнесению сигналов вещества с учётом химических сдвигов и стехиометрических отношений площадей сигналов. Так, спектр ЯМР ^1H ибuproфена в CDCl_3 должен содержать следующие сигналы: 0,88 м.д. (6Н, д, $J = 6,7$ Гц, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,50 м.д. (3Н, д, $J = 7,3$ Гц, CHCH_3), 1,79—1,90 м.д. (1Н, м, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,45 м.д. (2Н, д, $J = 7,2$ Гц, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,70 м.д. (1Н, кв, $J = 7,3$ Гц, CHCH_3), 7,10 м.д. (2Н, д, $J = 8,2$ Гц, Ar-CH),

7,22 м.д. (2Н, д, $J = 8,2$ Гц, Ar-CH), 7,26 (с, остаточный сигнал растворителя), 11,3—11,9 м.д. (1Н, м, COOH). (Обозначения: с-синглет, д-дублет, кв-квартет, м-мультиплет, J -константа спин-спинового взаимодействия). Рассмотрение характеристик спектра ЯМР ^1H анализируемого образца суппозитория ибuproфена (рис. 1) подтверждает строение субстанции.

Проанализирована природа основы суппозитория ибuproфена: твёрдый жир представляет собой смесь гидрированных триацилглицеридов (рис. 1) и диацилглицеридов. Содержание последних — около 1,5%. Подробное отнесение сигналов отдельных групп протонов в спектрах ЯМР ^1H твёрдого жира и основные этапы расчёта характеристик, необходимых для определения их показателей качества, рассмотрены нами ранее [7].

Ниже приведены результаты, полученные при анализе спектра ЯМР ^1H изученного образца суппозитория ибuproфена. Средняя длина цепи молекул триацилглицеридов (n) составила 11,3, из которой достаточно просто рассчитать среднюю молекулярную массу жира ($M_f=694$). Знание последней и относительного содержания триацилглицеридов и диацилглицеридов позволяют определить гидроксильное число (3,53) и число омыления (239,7). При определении интегральных интенсивностей сигналов компонентов исследуемых суппозиториев необходимо учитывать факт перекрывания отдельных сигналов субстанции и основы.

Количественное определение содержания ибuproфена (m_i) в суппозитории сводится к рас-

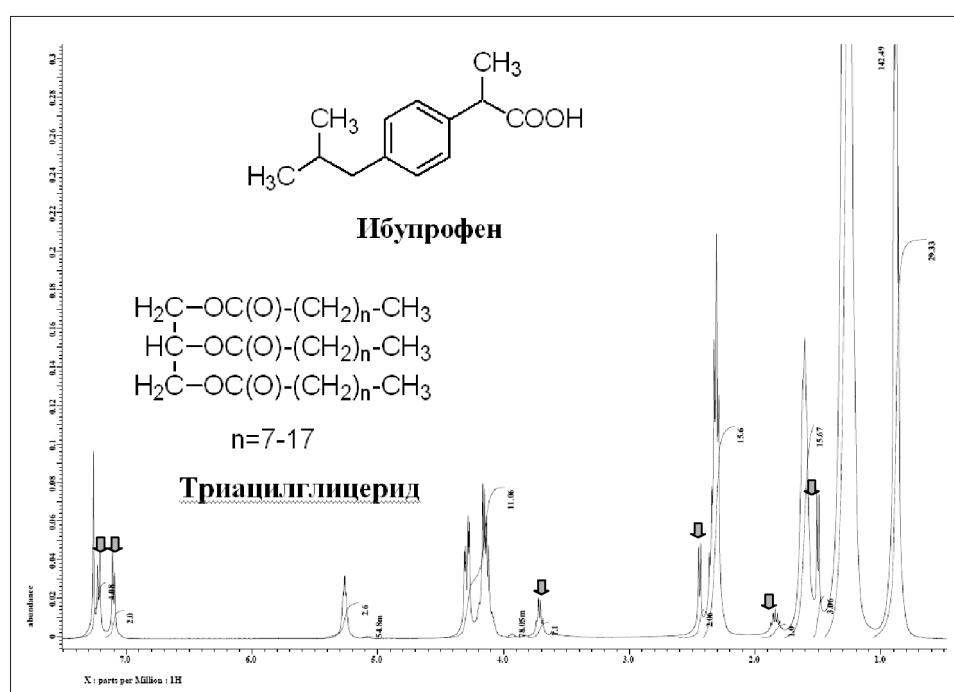


Рис. 1. Спектр ЯМР ^1H раствора образца суппозитория ибuproфена в CDCl_3 . Стрелкой отмечены сигналы ибuproфена.

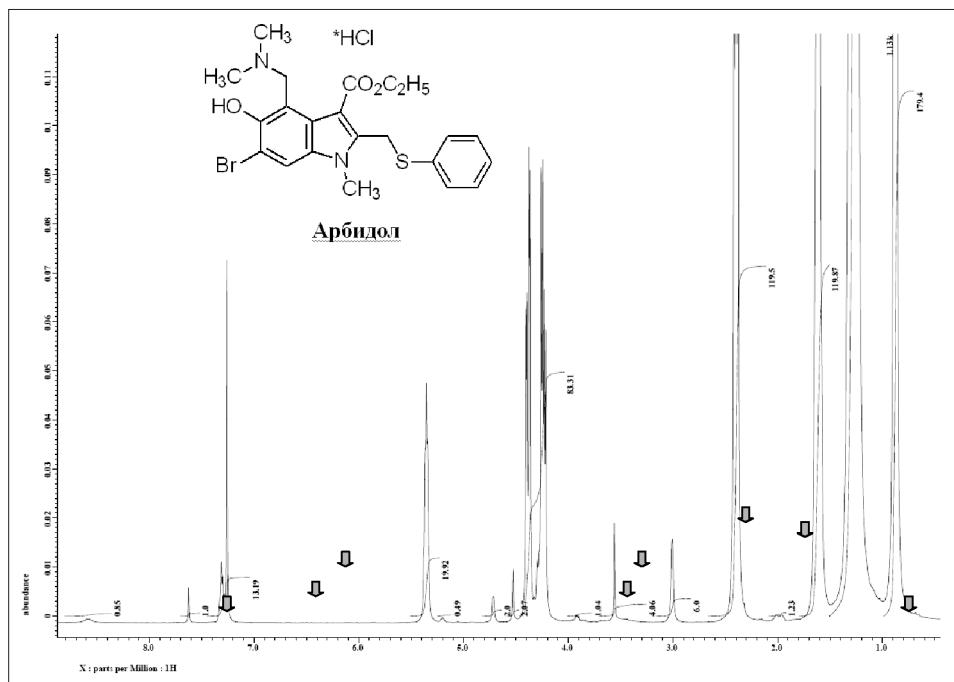


Рис. 2. Спектр ЯМР ^1H раствора образца суппозитория арбидола в CDCl_3 (увержен масштаб по оси Y).

Стрелкой отмечены некоторые сигналы арбидола.

чёту на основе знания массы суппозитория ($m_s=0,583$ г), молекулярной массы ибuproфена ($M_i=206$), средней молекулярной массы жира ($M_f=694$) и соотношения интегральных интенсивностей сигналов одного протона жира и ибuproфена ($n_f/n_i=2.59$):

$$m_i = m_s / ((n_f/n_i) \cdot (M_f/M_i) + 1) = \\ 0,583 / (2,59 \cdot (694/206) + 1) = 0,060 \text{ (г)}$$

Содержание твердого жира (m_f) в одном суппозитории, соответственно:

$$m_f = m_s - m_i = 0,583 - 0,060 = 0,523 \text{ (г)}$$

Аналогичная последовательность действий используется при анализе любых других суппозиториев. Рассмотрим на примере суппозитория арбидола известного состава: 50 мг активного компонента — гидрохлорида арбидола при основе — твёрдый жир. В рассматриваемом случае хлороформ в качестве растворителя не приемлем, поскольку лекарственная субстанция в нём плохо растворима. Для анализа в этом случае наиболее подходящим оказался другой растворитель — трифтормукусная кислота, обеспечившая полное растворение образца и не дающая сигналов в интересующей области (1–10 м.д.) спектра ЯМР ^1H . Добавление к аликовте (50 мкл) полученного раствора хлороформа (650 мкл) не приводит к выпадению субстанции в осадок.

Идентификация лекарственной субстанции суппозитория арбидола основана на соотнесении его сигналов с учётом химических сдвигов и сте-

хиометрических отношений площадей сигналов. Так, спектр ЯМР ^1H гидрохлорида арбидола в смеси растворителей дейтерированного хлороформа-трифтормукусной кислота (13:1) должен содержать следующие сигналы: 1,35 м.д. (3Н, т, $J = 7,1$ Гц, OCH_2CH_3), 3,01 м.д. (6Н, с, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3,56 м.д. (3Н, с, $\text{N}-\text{CH}_3$), 4,25 м.д. (2Н, кв, $J = 7,1$ Гц, OCH_2CH_3), 4,53 м.д. (2Н, с, CH_2S), 4,68 м.д. (2Н, с, CH_2N), 7,26 (с, остаточный сигнал растворителя — хлороформа), 7,29–7,35 м.д. (5Н, м, C_6H_5), 7,64 м.д. (1Н, с, 7-CH), 8,66 м.д. (1Н, уш.с, NH), 10,86 (с, сигнал растворителя — трифтормукусной кислоты). Рассмотрение характеристик спектра ЯМР ^1H

анализируемого образца суппозитория арбидола (рис. 2) подтверждает строение субстанции.

Основа суппозитория арбидола представляет собой смесь гидрированных триацилглицеридов с небольшим содержанием диацилглицеридов. Анализ данных спектра ЯМР ^1H суппозитория арбидола (см. рис. 2) позволяет определить среднюю длину цепи молекул триацилглицеридов (n , составляет 11,4), среднюю молекулярную массу жира ($M_f=694$), отношение интегральных интенсивностей сигналов протонов жира и арбидола ($n_f/n_a=19,9$), гидроксильное число — 3,53 и число омыления — 237,3.

Количественное определение компонентов суппозитория арбидола осуществляется аналогично описанному выше примеру с ибuproфеном.

Содержание гидрохлорида арбидола (m_a) в одном суппозитории рассчитывается по формуле:

$$m_a = m_s / ((n_f/n_a) \cdot (M_f/M_a) + 1)$$

Содержание жира (m_f) в одном суппозитории:

$$m_f = m_s - m_a$$

Поскольку молярная масса гидрохлорида арбидола $M_a=514$, а масса суппозитория $m_s=1,395$ г, получаем:

$$m_a = 1,395 / (19,9 \cdot (694/514) + 1) = 0,050 \text{ (г)}$$

$$m_f = 1,395 - 0,050 = 1,345 \text{ (г)}$$

Сходимость результатов при проведении параллельных измерений для одного образца составила 1% для ибuproфена и 2% для арбидола. Воспроизводимость результатов при использовании

отдельных частей одного спектра и проведении независимых измерений трёх образцов составила 2% для ибупрофена и 3% для арбидола.

Отсутствие взаимодействия изученных субстанций с твёрдыми жирами было доказано с помощью спектроскопии ЯМР путём сравнения положения и относительных интенсивностей сигналов в спектрах ЯМР ^1H субстанций в чистом виде и в суппозитории.

Заключение

Подобраны оптимальные условия проведения анализа суппозиториев с микронизированным ибупрофеном и гидрохлоридом арбидола методом количественной спектроскопии ЯМР ^1H . Затраты времени на анализ зависят от массового соотношения «субстанция—основа» и со-

ставляют, как правило, не более 30 минут даже в случае массовой доли субстанции около 1%. Полученные результаты показывают возможности метода количественной спектроскопии ЯМР при идентификации и количественном определении компонентов в суппозиториях, на основании которых могут быть разработаны экспресс-методики контроля качества готовых лекарственных форм — суппозиториев с различными действующими компонентами.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП (НОЦ) РУДН при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного контракта № 16.552.12.7002 по мероприятию 5.2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калабин Г. А., Каницкая Л. В., Кушнарев Д. Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000; 408.
2. King B. Metrology in chemistry: Part II. Future requirements in Europe. Accred Qual Assur 2000; 5: 266–271, 429–436.
3. Bharti S. K., Roy R. Quantitative ^1H NMR spectroscopy. Trends in Analytical Chemistry 2012; in press.
4. Holzgrabe U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 2010; 57: 229–240.
5. Фармакопея США: USP 29: Национальный формуляр: NF 24: сборник стандартов. Пер. с англ. Арзамасцев А. П., Бахтина С. М., Дорофеев В. Л. Издательство «ГЭОТАР-Медиа», 2009; том 1: 1720.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации, XII издание, часть 1. Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008; 73–78.
7. Абрамович Р. А., Горянинов С. .., Воробьев А. Н., Калабин Г. А. Возможности спектроскопии ЯМР ^1H в определении показателей качества твёрдых жиров — основы суппозиториев. Вопр биол мед фарм хим 2012, в печати.