



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения



PerЛек

Использование метода ЯМР спектроскопии для оценки показателей качества природных и модифици- рованных полисахаридов.

Моисеев Сергей Владимирович,
главный эксперт лаборатории СМА.

27.04.2022.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации



Цель доклада.



Полисахариды (пуллуланы, декстраны и гидроксипэтилкрахмалы) широко используются в клинической практике, а липополисахариды *Shigella flexneri* являются перспективными кандидатами для создания вакцин против дизентерии Флекснера.

При контроле их качества применяется целый комплекс методов, в том числе и хроматографических (газовая, жидкостная и гель-проникающая хроматография).

Цель доклада – показать возможность использования метода ЯМР спектроскопии для подтверждения подлинности, определения средневесовой молекулярной массы и степени модификации природных и модифицированных полисахаридов.



Преимущества метода ЯМР спектроскопии.



Метод ЯМР спектроскопии имеет ряд преимуществ перед другими физико-химическими методами анализа, так как метод:

- не требует использования эталонов и внутренних стандартов при установлении подлинности;
- является абсолютным количественным методом, поэтому не требует использования стандартных образцов при количественных измерениях;
- не разрушает исследуемый образец, позволяя установить строение примесей в объекте исследования, количественно определить их содержание;
- не требует сложной пробоподготовки, отличается высокой производительностью при небольшом расходе реактивов;
- особенности агрегатного состояния, дисперсность, элементный состав, молекулярно-массовое распределение не препятствуют получению спектров ЯМР.



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Определение подлинности полисахаридных вакцин.



RegLec – EAES

ОФС.1.7.2.0014.15 «Метод спектроскопии ЯМР для определения подлинности полисахаридных вакцин»

- идентификация и подлинность полисахаридных вакцин осуществляется методом ЯМР спектроскопии на ядрах ^{13}C ;
- выявление характеристических сигналов в спектрах ^{13}C в области аномерных атомов углерода;
- определении доверительных интервалов (Δ) их химических сдвигов.



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

МЛПС подтипов 1b, 2a, 3a, 6, Y для профилактики шигеллензов Флекснера.



RegLec – EAES

Молекула МЛПС включает три структурные области:

- О-специфический полисахарид (ОПС), построенный из повторяющихся олигосахаридных звеньев, содержащий в своем составе 3 остатка L-рамнопиранозы (RhaI-RhaIII) и один остаток 2-ацетамидо-2-дезоксид-D-глюкопиранозы (GlcNAc), а для подтипа 6, содержащий остаток D-галактопиранурановой кислоты (GalpA) вместо RhaI и остаток GalNAc вместо остатка GlcNAc;
- олигосахарид кора, содержащий α -пиранозы;
- липид А, с содержанием не более 3 остатков ВЖК.



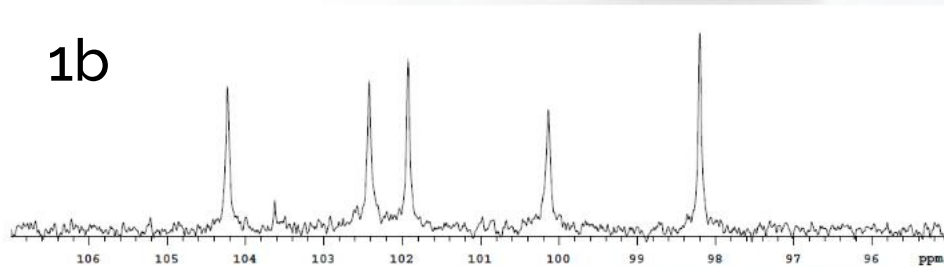
научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Характеристические сигналы МЛПС S. Flexneri подтипов 1b, 2a, 3a, Y, 6.

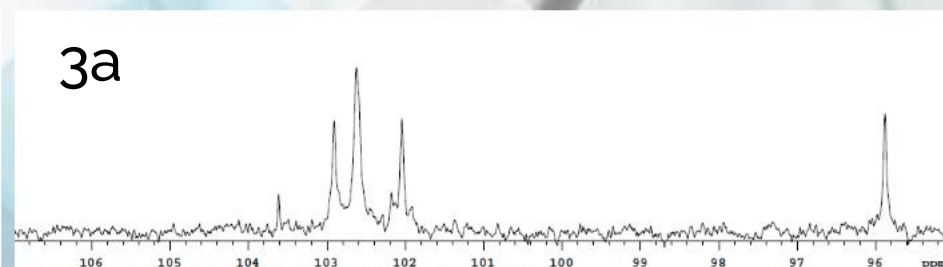


РегЛек – ЕАЭС

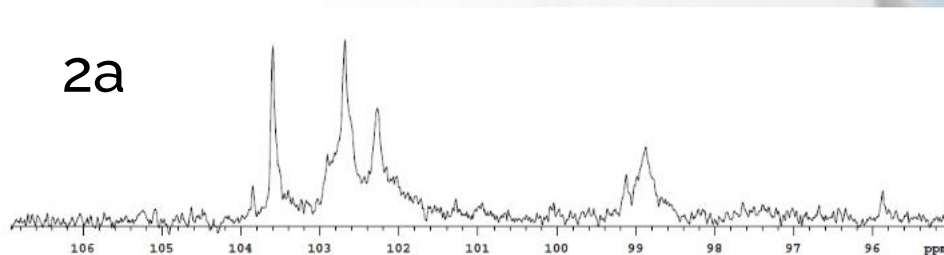
1b



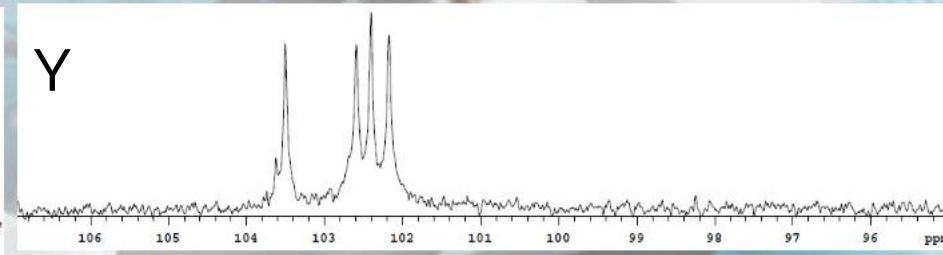
3a



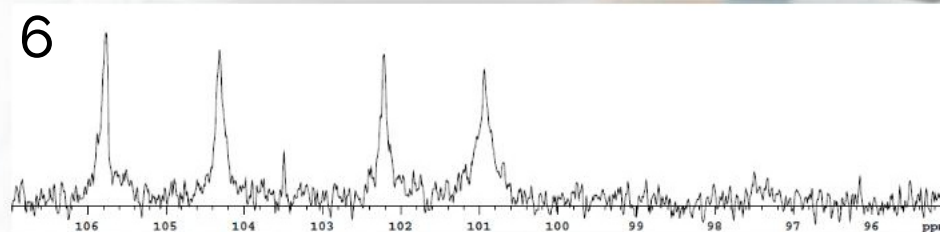
2a



Y



6





Химические сдвиги характеристических сигналов.



Химические сдвиги (м.д.) характеристических сигналов мЛПС S. Flexneri подтипов 1b, 2a, 3a, 6, Y

Подтип	α -L-RhapI (β -D-GalpA)*	α -L-RhapII	α -L-RhapIII	β -D-GlcpNAc (β -D-GalpNAc)	α -D-Glcp
1b	100,14±0,02	101,928±0,006	102,43±0,02	104,25±0,03	98,18±0,03
2a	102,280±0,006	102,86±0,06	102,693±0,006	103,604±0,003	98,91±0,03
3a	102,62±0,007	102,045±0,004	102,625±0,004	102,910±0,004	95,879±0,004
Y	102,594±0,003	102,176±0,003	102,406±0,002	103,505±0,002	
6	105,77±0,03	100,94±0,02	102,22±0,01	104,32±0,01	

*В скобках указаны структурные фрагменты S. Flexneri подтипа 6



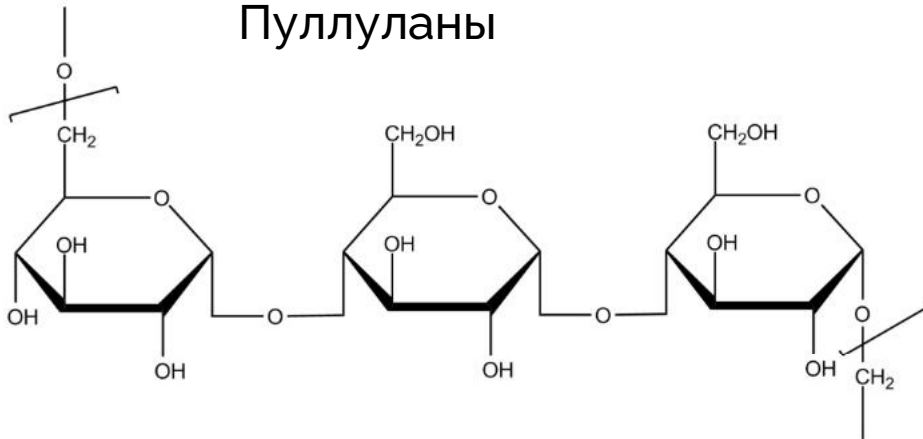
научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Полисахариды, используемые в клинической практике.

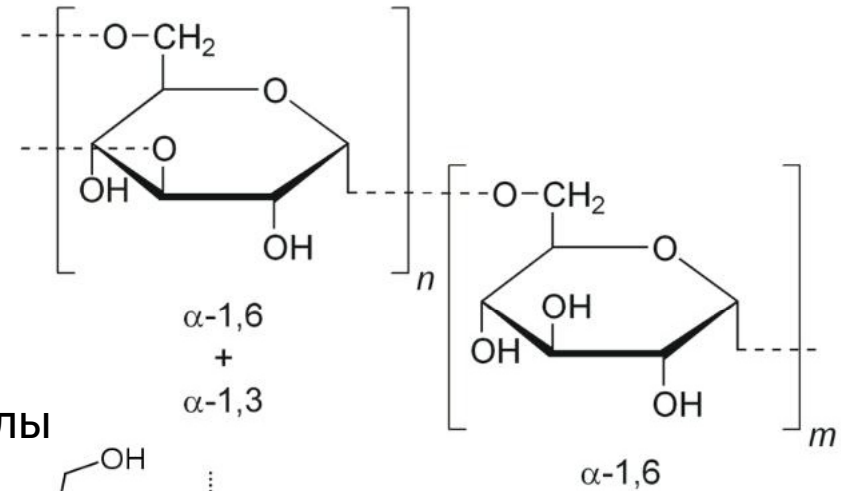


RegLek – EAES

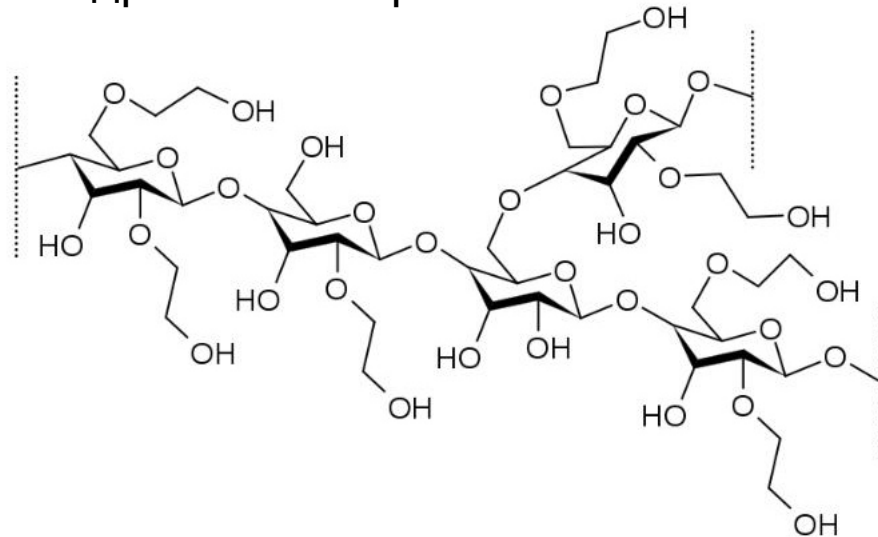
Пуллуланы



Декстраны



Гидроксиэтилкрахмалы





Подбор оптимальных условий DOSY- эксперимента.



Метод диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР (Diffusion Ordered Spectroscopy, DOSY) является перспективным методом определения ММ полимеров. При постоянных условиях проведения DOSY-эксперимента для однотипных молекулярных объектов количественная зависимость величины D от ММ будет иметь вид степенной функции:

$$D = k \cdot MM^a$$

где k и a – числовые константы, зависящие от вязкости раствора и температуры

При подборе оптимальных значений времени диффузии (Δ , мс) и длительности градиентного импульса (δ , мс) мы руководствовались следующими критериями:

- воспроизводимость литературного значения коэффициента самодиффузии воды в растворах полисахаридов, равного $20,2 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$;
- применение импульсной градиентной последовательности с данными параметрами к декстранам в широком диапазоне молекулярных масс;
- разрешение по величине D декстранов с близкими значениями ММ.



Оптимальные условия DOSY-эксперимента.



Основные параметры DOSY-эксперимента:

- температура - 300°K (27 °C);
- Растворитель - D₂O;
- концентрация раствора - 1 мг/мл;
- 15-шаговое линейное увеличение амплитуды импульса градиента - магнитного поля в интервале от 1,82 до 53 Гс/см;
- время диффузии - 285 мс;
- длительность градиентного импульса - 2,0 мс;
- релаксационная задержка 5 с.

Представленные параметры применимы как для декстранов, так и для пуллуланов и ГЭК и позволяют получить корреляционные уравнения парной регрессии с высоким коэффициентом детерминации.

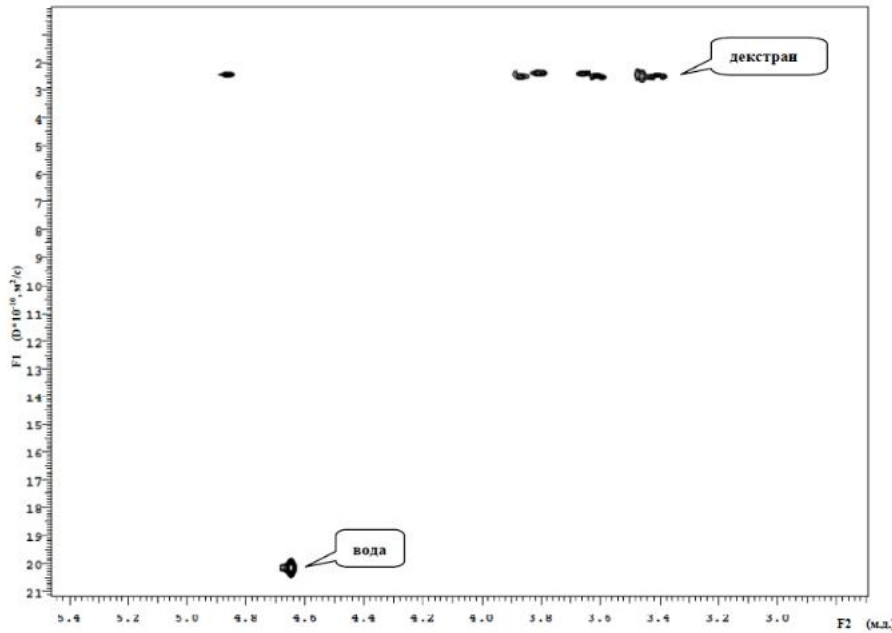


научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

^1H -DOSY спектр и D компонентов водного раствора декстрана.

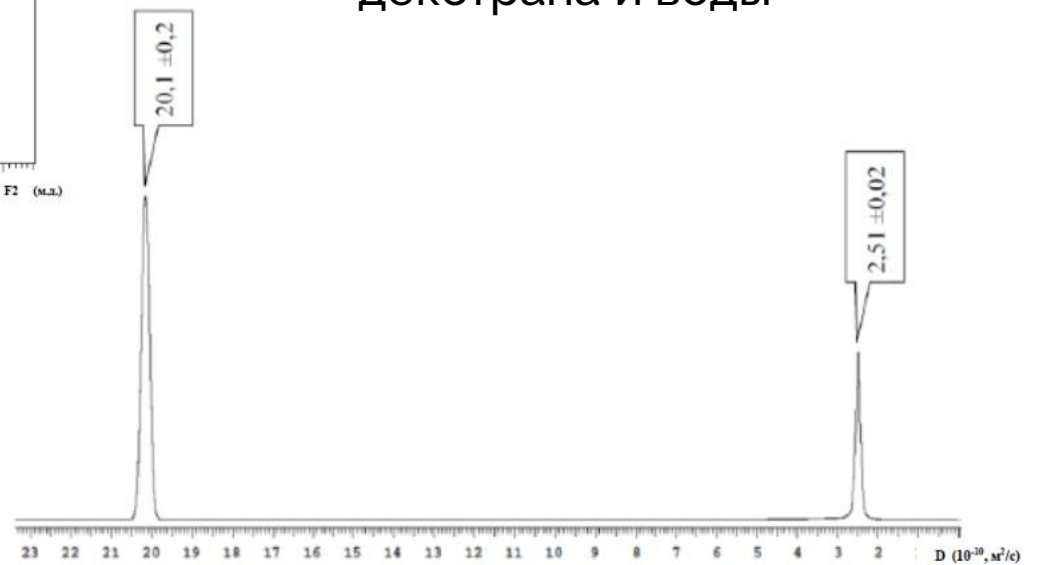


RegLek – ЕАЭС



^1H DOSY спектр

Диаграмма распределения D
декстрана и воды

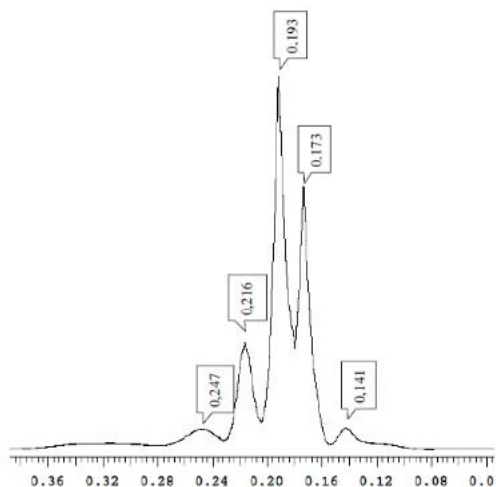




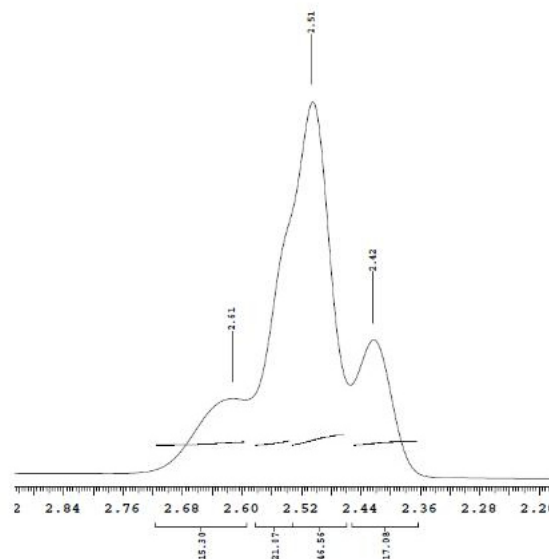
D различных молекулярных фракций полисахаридов.



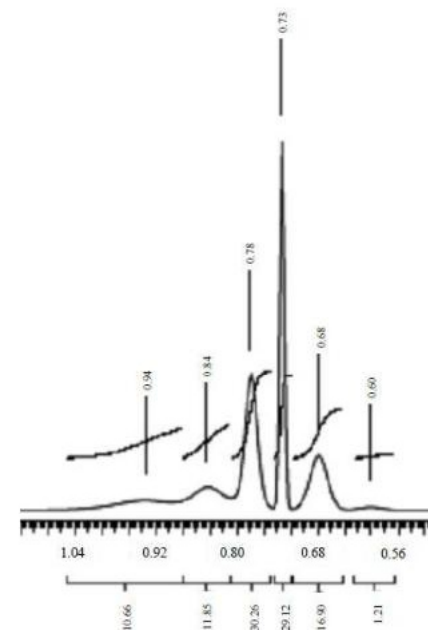
Пуллуланы



Декстраны



ГЭК



$$D_s = \sum p_i D_i$$

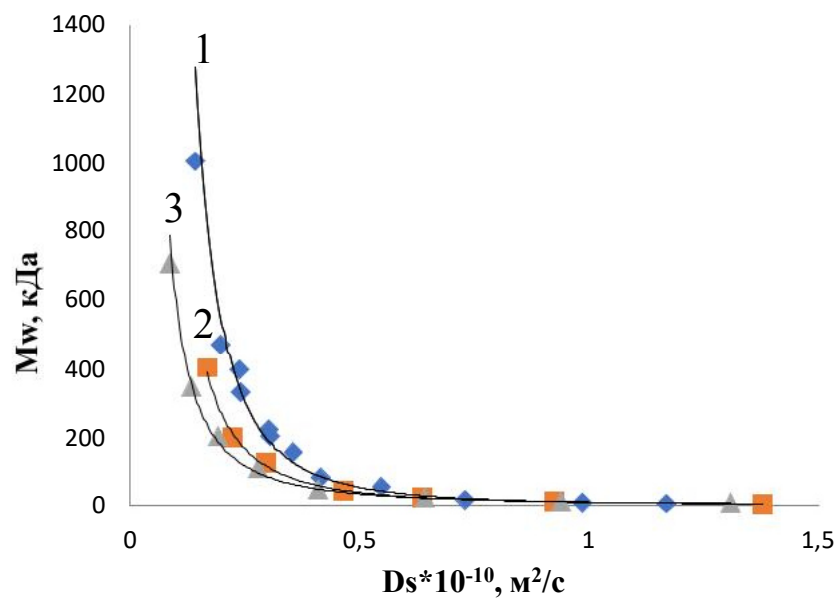
где p_i – относительная доля резонирующих ядер в образце,
характеризующихся значением D_i



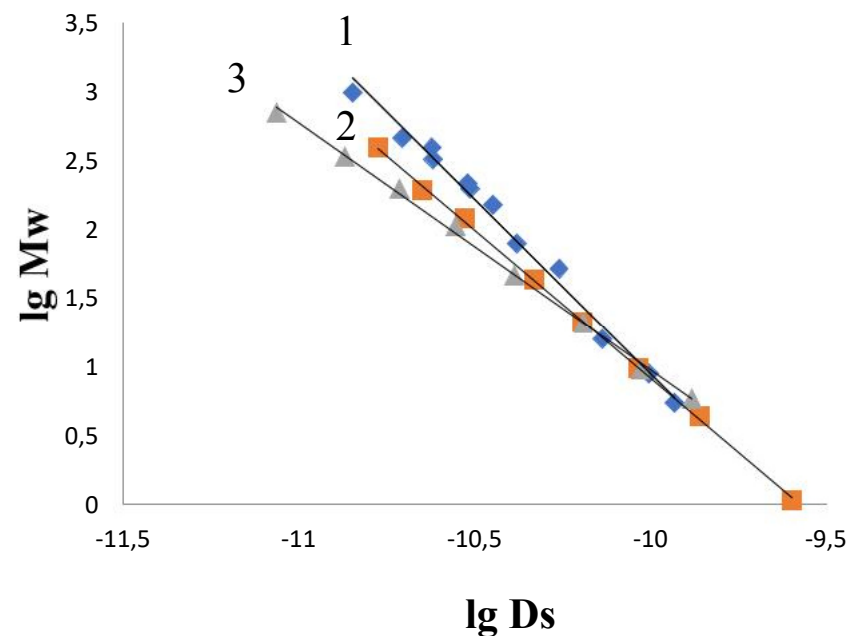
Зависимость параметра M_w от величины D_s .



Степенные зависимости $M_w = cD_s^{-\alpha}$



Линейные зависимости $\lg M_w$ от $\lg D_s$



для ГЭК (1), декстранов (2) и пуллуланов (3)



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Уравнения регрессии M_w от D_s для полисахаридов.



РегЛек – ЕАЭС

№ п/п	Уравнение $M_w = a D_s^x$	Уравнение $\lg M_w = a \lg D_s + b$	R^2	Область применения
I	$M_w = 9,4862 D_s^{-1,801}$	$\lg M_w = -1,8008 \lg D_s - 17,03$	0,998	Линейные пуллуланы
II	$M_w = 8,3038 D_s^{-2,164}$	$\lg M_w = -2,1637 \lg D_s - 20,718$	0,999	Малоразветвленные декстраны
III	$M_w = 9,0314 D_s^{-2,538}$	$\lg M_w = -2,5375 \lg D_s - 24,419$	0,990	Разветвленные ГЭК



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Значения M_w , M_z и D_s образцов ГЭК.



РегЛек – ЕАЭС

№ п/п	Образец ГЭК	M_w , кДа	M_z	$D_s \times 10^{10}$, M_2/c
1	НЭТА6К	6.0	0.533±0.008	1.215
2	НЭТА9К	9.4	0.566±0.009	1.033
3	НЭТА18К	18.3	0.714±0.008	0.771
4	НЭТА88К	88.0	0.720±0.009	0.58
5	НЭТА130К	130.6	0.706±0.009	0.389
6	НЭТА160К	159.2	0.752±0.008	0.379
7	НЭТА175К	206.5	0.737±0.008	0.331
8	НЭТА230К	229.0	0.776±0.005	0.317
9	НЭТА250К	250.4	0.748±0.009	0.315
10	НЭТА380К	379.8	0.742±0.004	0.266
11	НЭТА460К	459.4	0.520±0.007	0.278
12	Субстанция ГЭК 130/0.4 серия 17121742	135.6	0.413±0.008	0.442
13	Субстанция ГЭК 200/0.5 серия 20100302	204.0	0.478±0.004	0.370
14	Субстанция ГЭК 200/0.5 серия 20110401	199.8	0.509±0.005	0.371



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Влияние степени МЗ на подвижность макромолекул ГЭК в растворе.



RegLec – ЕАЭС

ММ макромолекул ГЭК зависит от:

- числа мономерных звеньев в полимерной цепи (n);
- степени молярного замещения (МЗ)

Линейная зависимость значения логарифма M_w от значений логарифмов D_s и МЗ

$$\lg M_w = - 0,6826 \lg MЗ - 2,9079 \lg D_s - 28,236$$

$$R^2=0,999$$

где M_w – средневесовая молекулярная масса ГЭК (кДа);

МЗ – степень молярного замещения;

D_s – средний коэффициент самодиффузии (m^2/c).



Погрешности определения Mw методом DOSY.



	Пуллула ны	Декстраны	ГЭК	
			без учета МЗ	с учетом МЗ
Погрешность определения, δ , % отн	2,27	7,03	18,16	1,71

$$\delta = |(X_{\text{ГПХ}} - X_{\text{DOSY}}) / X_{\text{ГПХ}}| \cdot 100\%$$



Молярное замещение (M3) – отношение количества гидроксипропановых групп к общему количеству α -D-Glcp в молекулах ГЭК

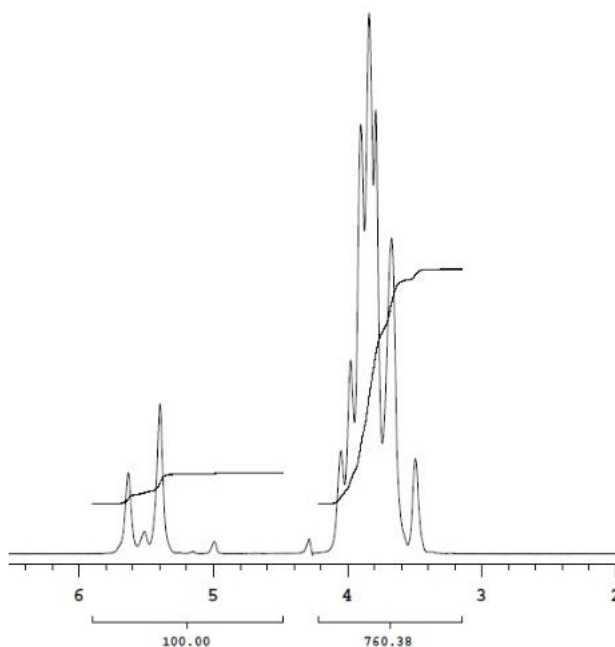
В фармакопейном анализе параметр M3 устанавливают методом газовой хроматографии (ГХ) на основе количественного определения йодэтана, высвобождающегося после гидролиза макромолекулы ГЭК йодистоводородной кислотой в присутствии адипиновой кислоты.

Недостатки метода:

- значительное время проведения анализа;
- необходимость использования стандартных образцов для количественных измерений.



Определение степени МЗ ГЭК методом ^1H ЯМР.



Параметры эксперимента:

- растворитель - D_2O ;
- температура - 353°K (80°C);
- калибровка шкалы химических сдвигов – 2,22 м.д. (ацетон- d_6) или 4,28 м.д. (вода при 353°K);
- диапазон спектра - $0 \div 7$ м.д.

Интегрируют две области спектра:

- 1) 4,48 – 5,90 м.д., содержит сигналы аномерных протонов Н(1) замещенных и незамещенных остатков $\alpha\text{-D-Glcp}$;
- 2) 3,15 – 4,23 м.д., содержит сигналы остальных протонов ГЭК (6 протонов $\alpha\text{-D-Glcp}$ и 4 протона гидроксильных групп).

Величина МЗ вычисляется по формуле:

$$\text{МЗ} = \frac{I_2 - 6 \times I_1}{4 \times I_1} = 0,25 \times \left(\frac{I_2}{I_1} - 6 \right)$$



№ п/ п	Образец ГЭК	Метод ГХ	Метод ¹ H ЯМР
1	НЭТА 130К	0,73 ± 0,08	0,706 ± 0,009
2	НЭТА 206К	0,52 ± 0,01	0,527 ± 0,002
3	ГЭК 130/0,4	0,40 ± 0,07	0,413 ± 0,008
4	ГЭК 200/0,5 (№ 20100302)	0,48 ± 0,01	0,478 ± 0,004
5	ГЭК 200/0,5 (№ 20110401)	0,51 ± 0,03	0,509 ± 0,005
6	Крахмал	0,00 ± 0,00	-0,008 ± 0,002

Преимущества метода ЯМР:

- простота пробоподготовки;
- не требуется использование стандартного образца йодэтана;
- нивелируется неопределенность измерения, связанная со взвешиванием проб и чистотой реактивов.



Заключение.



Таким образом, использование метода ЯМР спектроскопии для подтверждения подлинности, определения средневесовой молекулярной массы и степени модификации природных и модифицированных полисахаридов имеет ряд преимуществ перед другими физико-химическими методами анализа, а включение его в нормативную документацию для оценки данных показателей качества будет полностью экономически оправданным.



Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Крылов В.И., Яшкир В.А., Меркулов В.А. / Возможности применения метода диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР для количественной оценки средней молекулярной массы пуллуланов. // Ведомости НЦЭСМП, 2013. №4, с. 8-11.

Моисеев С.В., Кузьмина Н.Е., Крылов В.И., Яшкир В.А., Меркулов В.А. / Определение параметров молекулярно-массового распределения декстранов методом диффузионно упорядоченной спектроскопии ЯМР // Ведомости НЦЭСМП, 2014. №2, с.9-15.

Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Крылов В.И., Яшкир В.А., Меркулов В.А. / Количественное определение средней молекулярной массы декстранов методом диффузионно упорядоченной спектроскопии ЯМР // Журн. аналит. химии. 2014. Т. 69. № 10. с. 1047-1053. DOI 10.7868/S0044450214100089.

Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Крылов В.И., Яшкир В.А., Меркулов В.А. / Определение средней молекулярной массы гидроксиэтилкрахмалов методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 1. с. 30-36. DOI 10.7868/S0044450215010107.

Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Крылов В.И., Яшкир В.А., Меркулов В.А. / Определение параметров молекулярно-массового распределения гидроксиэтилкрахмалов методом диффузионно упорядоченной спектроскопии ЯМР // Журн. аналит. химии. 2015. Т. 70. № 7. с. 727-733. DOI: 10.7868/S0044450215070075.



Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Крылов В.И., Князькина О.В., Яшкир В.А., Меркулов В.А. / Модификация методики определения молярного замещения гидроксиэтилкрахмалов методом ^1H ЯМР спектроскопии // Хим.-фарм. Журн., 2015. т.49. №8. с. 44-48. DOI 10.30906/0023-1134-2015-49-8-44-48.

Моисеев С.В., Кузьмина Н.Е., Крылов В.И., Яшкир В.А., Меркулов В.А. / Влияние молярного замещения на подвижность макромолекул гидроксиэтилкрахмалов в растворе // Хим.-фарм. Журн., 2016. т.50. №1. с. 53-56. DOI 10.30906/0023-1134-2016-50-1-53-56.

Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Крылов В.И., Яшкир В.А., Меркулов В.А. / Валидация методики определения молярного замещения гидроксиэтилкрахмалов методом ^1H ЯМР спектроскопии // Хим.-фарм. Журн., 2016. т.50. №4. с. 47-51. DOI 10.30906/0023-1134-2016-50-4-47-51.

Моисеев С.В., Кузьмина Н.Е., Крылов В.И., Яшкир В.А., Меркулов В.А. / Валидация методики определения средней молекулярной массы декстранов методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии // Хим.-фарм. Журн., 2017. Т.51. № 9, с. 60-63. DOI 10.30906/0023-1134-2017-51-9-60-63.

Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Лутцева А.И. / Разработка и валидация методики подтверждения подлинности модифицированных липополисахаридов энтеробактерий *Shigella Flexneri* подтипов 1b, 2a, 3a, 6, Y методом ЯМР ^{13}C спектроскопии // Хим.-фарм. Журн. 2020. Т.54. № 1, с. 49-53. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-1-49-53.



PerLek – EAES

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения