



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения



RegLek

Современные методы контроля качества лекарственных средств. Применение ЯМР спектроскопии в фармакопейном анализе.

Моисеев Сергей Владимирович, к.х.н., доцент
Ведущий эксперт лаборатории нанолекарств,
препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра
экспертизы качества лекарственных средств

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



Основные направления использования метода ЯМР спектроскопии в фармакопейном анализе

- экспертиза качества лекарственных субстанций;
- аттестация и экспертиза качества стандартных образцов;
- экспертиза качества биологических лекарственных препаратов;
- выявление фальсифицированных лекарственных препаратов и БАД природного и растительного происхождения



USP 40 NF35

- **General chapters – 5**

761 “Nuclear magnetic resonance spectroscopy”;

1761 “Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy”;

1234 “Vaccines for human use – polysaccharide and glycoconjugate vaccines”;

1238 “Vaccines for human use – bacterial vaccines”;

2 “Oral drug products – product quality tests”.

- **USP monographs - 24**



European pharmacopoeia 9.2

- **General monographs – 2**

2.2.33 “Nuclear magnetic resonance spectrometry”;

2.2.64 “Peptide identification by NMR”.

- **Monographs - 20**



РФ ГФ XIII

- **ОФС – 2**

1.2.1.1.0007.15 «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса»;

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

- **ФС - 0**

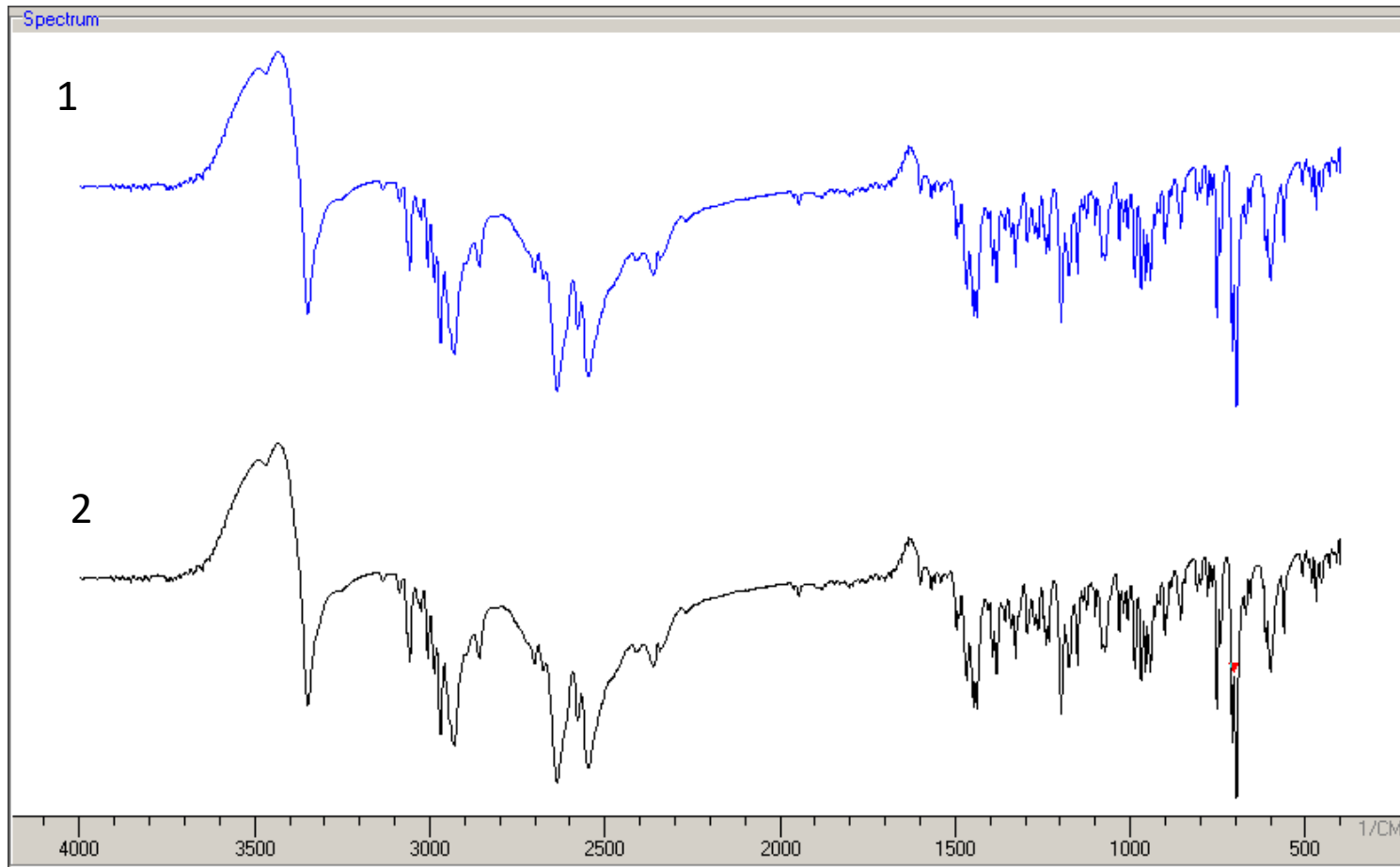


Комплекс задач, решаемый методом ЯМР при экспертизе качества лекарственных субстанций; аттестации и экспертизе качества стандартных образцов

- подтверждение подлинности индивидуальных лекарственных веществ (ЛВ) и смесей сложного состава;
- идентификация примесей, включая остаточные растворители;
- количественное определение содержания структурных фрагментов в макромолекулах нестехиометрического состава;
- количественное определение содержания посторонних примесей (остаточных органических растворителей) относительно ЛВ;
- количественное определение содержания вещества (ЛВ, примеси, остаточного растворителя) в лекарственной субстанции;
- определение молекулярной массы полимеров.

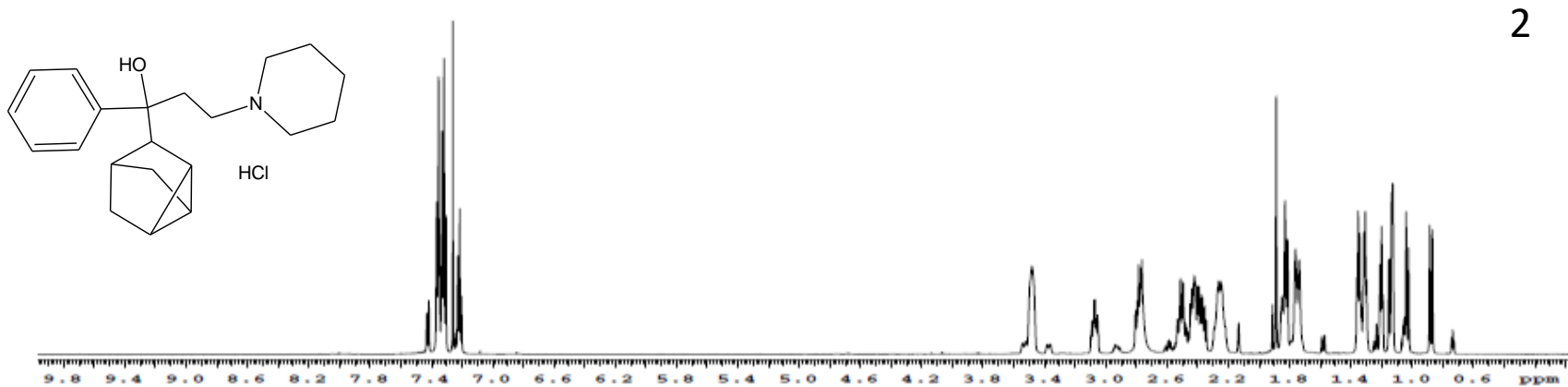
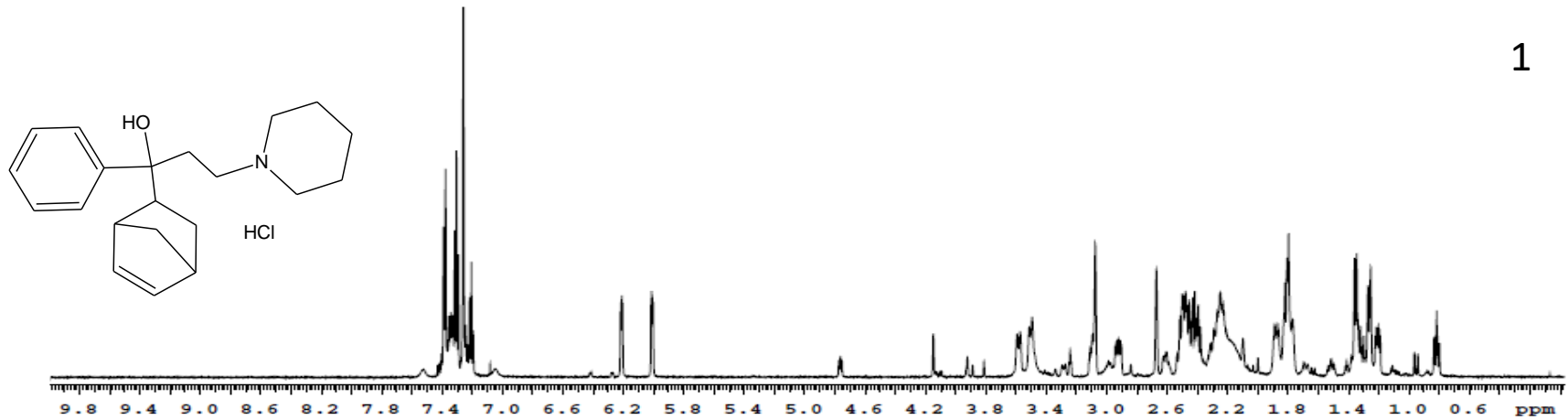


ИК-спектры стандартного (1) и испытуемого (2) образцов биперидена гидрохлорида





Протонные спектры стандартного (1) и испытуемого (2) образцов биперидена гидрохлорида





Определение аминокислотного состава глатирамера ацетата

Глатирамера ацетат – смесь ацетатных солей не имеющих одинаковой аминокислотной последовательности синтетических сополимеров L-аланина, L-лизина, L-глутаминовой кислоты и L-тирозина

Аминокислота	Мольная доля
L-Glu	0,13 – 0,15
L-Ala	0,39 – 0,46
L-Tyr	0,086 – 0,10
L-Lys	0,30 – 0,37

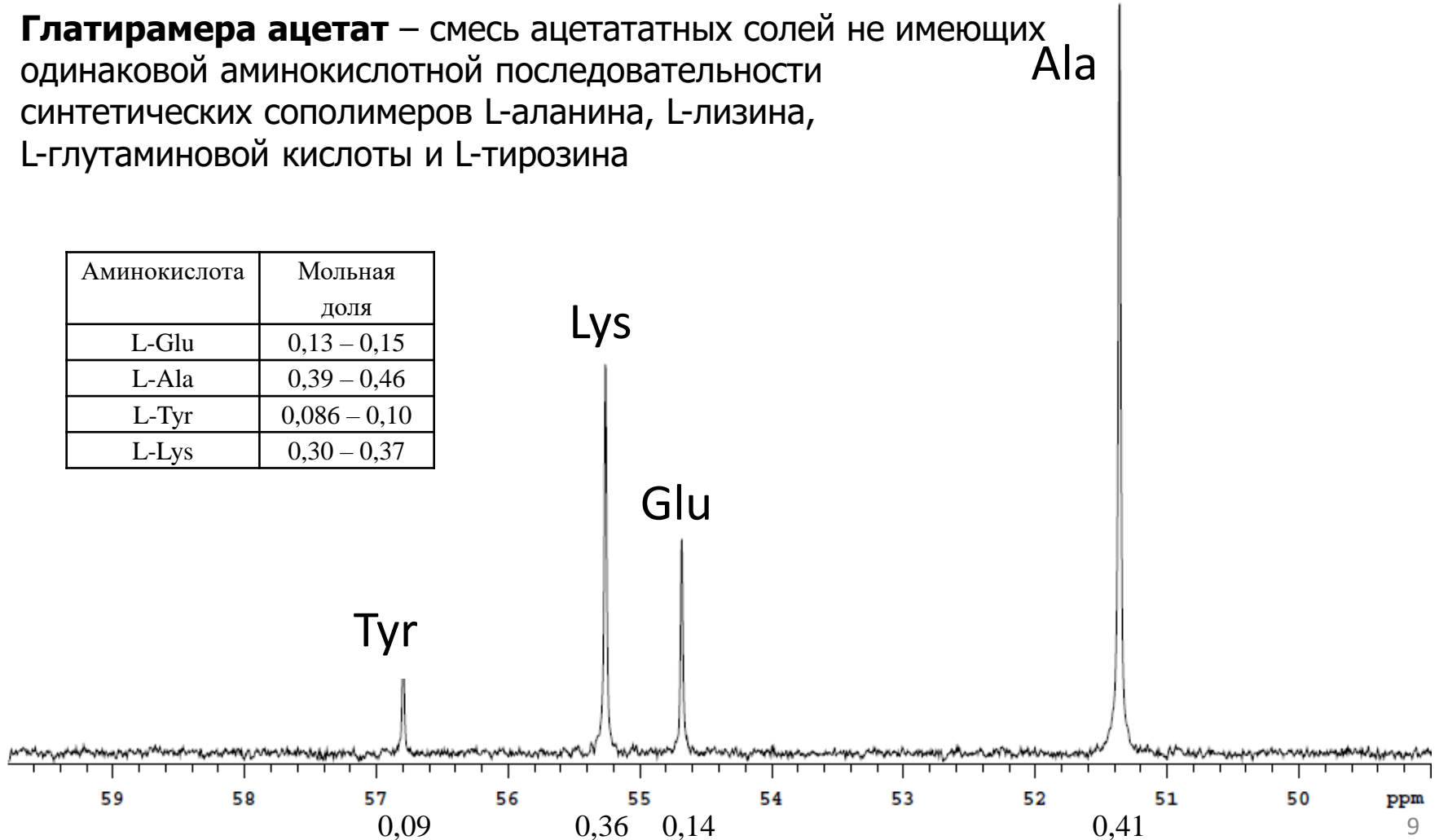
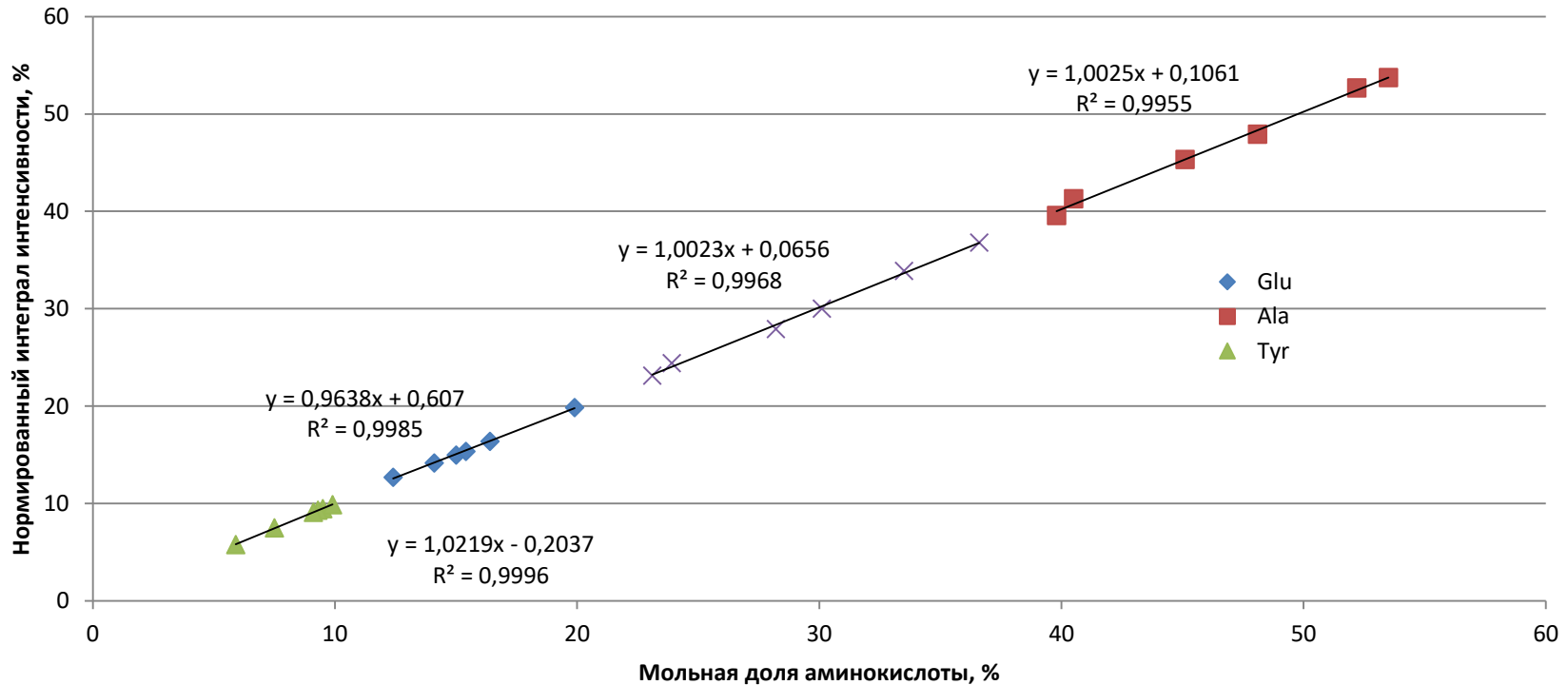




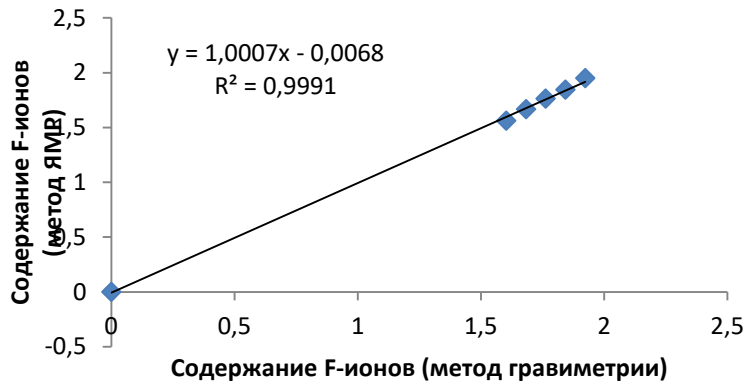
График зависимости нормированной интегральной интенсивности сигналов от относительного молярного содержания аминокислот



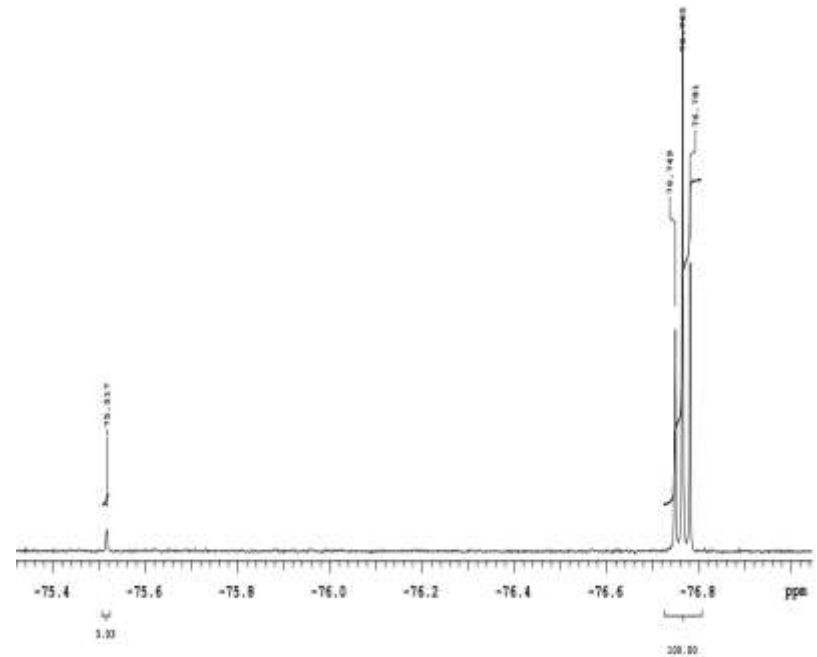
Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Кутин АА, Жуков ЕА, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Валидация методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «глатирамера ацетат» методом ^{13}C ЯМР спектроскопии. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017, т.7(3), с.175 – 181



Определение содержания трифторацетатов в субстанции «глатирамера ацетат» методом ^{19}F ЯМР (внутренний стандарт – трифторэтано́л)



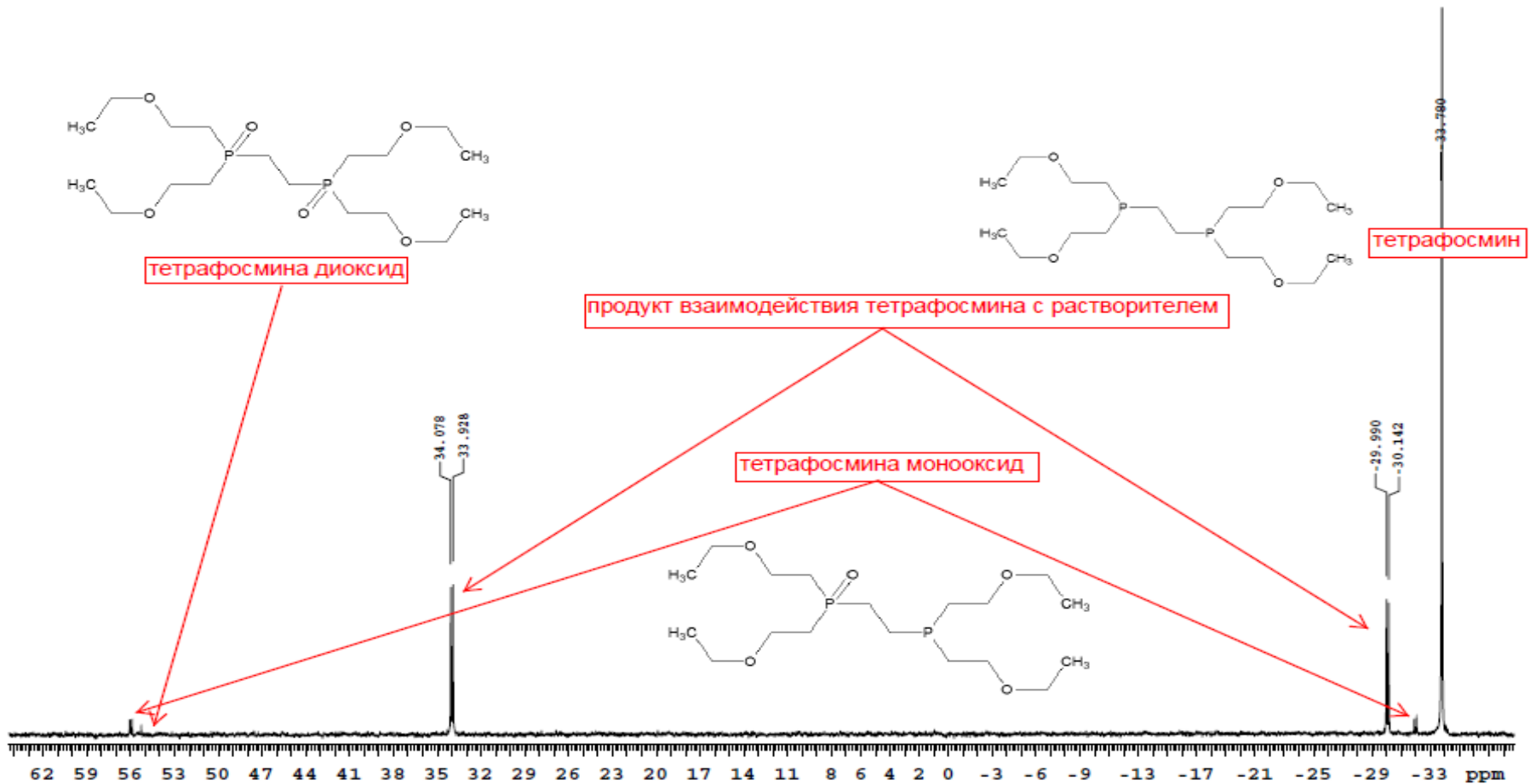
Образец	Содержание трифторацетата		
	Метод ^{19}F ЯМР		Потенциометрическое титрование (в виде фторид-иона), %
	по массе, %	В пересчете на фторид-ион, %	
I	0,0041	0,00205	менее 0,1
II	0,0042	0,0021	менее 0,1



Моисеев СВ, Крылов ВИ, Кузьмина НЕ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Разработка методики определения трифторацетатов в фармацевтической субстанции «глатирамера ацетат» методом ^{19}C ЯМР спектроскопии. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; (в печати)



Спектр ^{31}P миовью – лиофилизата для приготовления растворов для внутривенного введения





Преимущества метода ЯМР при решении задачи количественного определения содержания примесей (остаточных растворителей) относительно ЛВ

- метод является прямым и абсолютным, т.к. прямое измерение отношения интегральных интенсивностей сигналов примеси и ЛВ позволяет определить мольное содержание примеси относительно ЛВ ($n_{\text{пр}}/n_{\text{лв}}$) без использования СО и построения градуировочной функции
$$n_{\text{пр}}/n_{\text{лв}} = S'_{\text{пр}}/S'_{\text{лв}}$$
- этап пробоподготовки, не предусматривающий количественные измерения, не влияет на суммарную неопределенность измерения содержания примеси относительно ЛВ



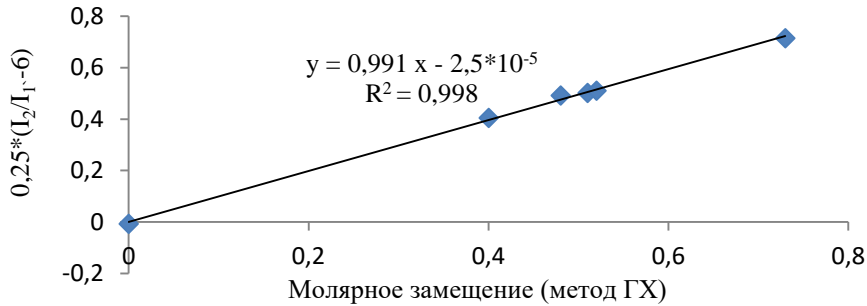
Статистические параметры, характеризующие прецизионность метода ЯМР при количественном определении содержания примесей относительно ЛВ

Параметр совокупности	Значение параметра совокупности							
	5×10^{-4} (0.5)	4×10^{-4} (0.4)	2.5×10^{-4} (0.25)	1×10^{-4} (0.1)	7.5×10^{-5} (0.075)	5×10^{-5} (0.05)	2×10^{-5} (0.025)	1×10^{-5} (0.01)
с, М (с, мол. %)*								
Число точек в совокупности, <i>n</i>	27	9	9	12	9	12	9	12
Среднее значение, \bar{x} , мол. %	0.4994	0.3990	0.2473	0.1002	0.0744	0.0494	0.0246	0.0102
Стандартное отклонение, мол. %	0.0041	0.0072	0.0060	0.0030	0.0034	0.0024	0.0012	0.0005
Относительное стандартное отклонение, s_r	8.2×10^{-3}	1.8×10^{-2}	2.4×10^{-2}	3.0×10^{-2}	4.6×10^{-2}	4.7×10^{-2}	4.8×10^{-2}	4.9×10^{-2}
Коэффициент Стьюдента ($P = 0.95$)	1.96	2.31	2.31	2.20	2.31	2.20	2.31	2.20
Полуширина доверительного интервала $\Delta \bar{x}$ ($P = 0.95$), мол. %	0.0015	0.0055	0.0046	0.0019	0.0026	0.0015	0.0009	0.0003

* Приведена концентрация микрокомпонента в растворе (М) и по отношению к основному компоненту (мол. %).

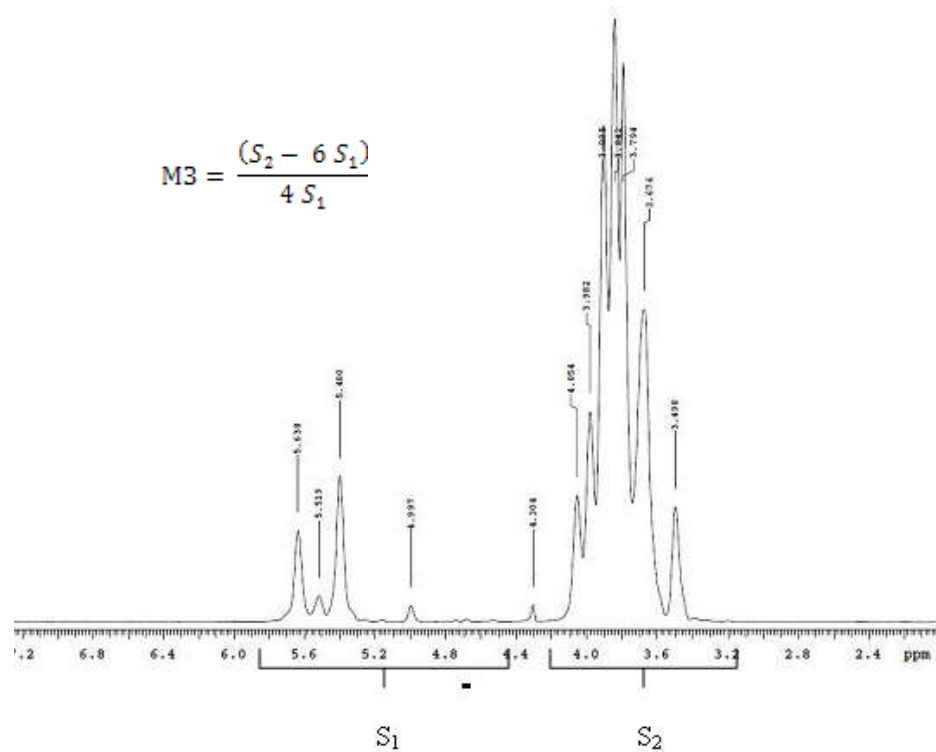


Определение молярного замещения гидроксиэтилкрахмалов методом ЯМР



$$MЗ = \frac{(S_2 - 6 S_1)}{4 S_1}$$

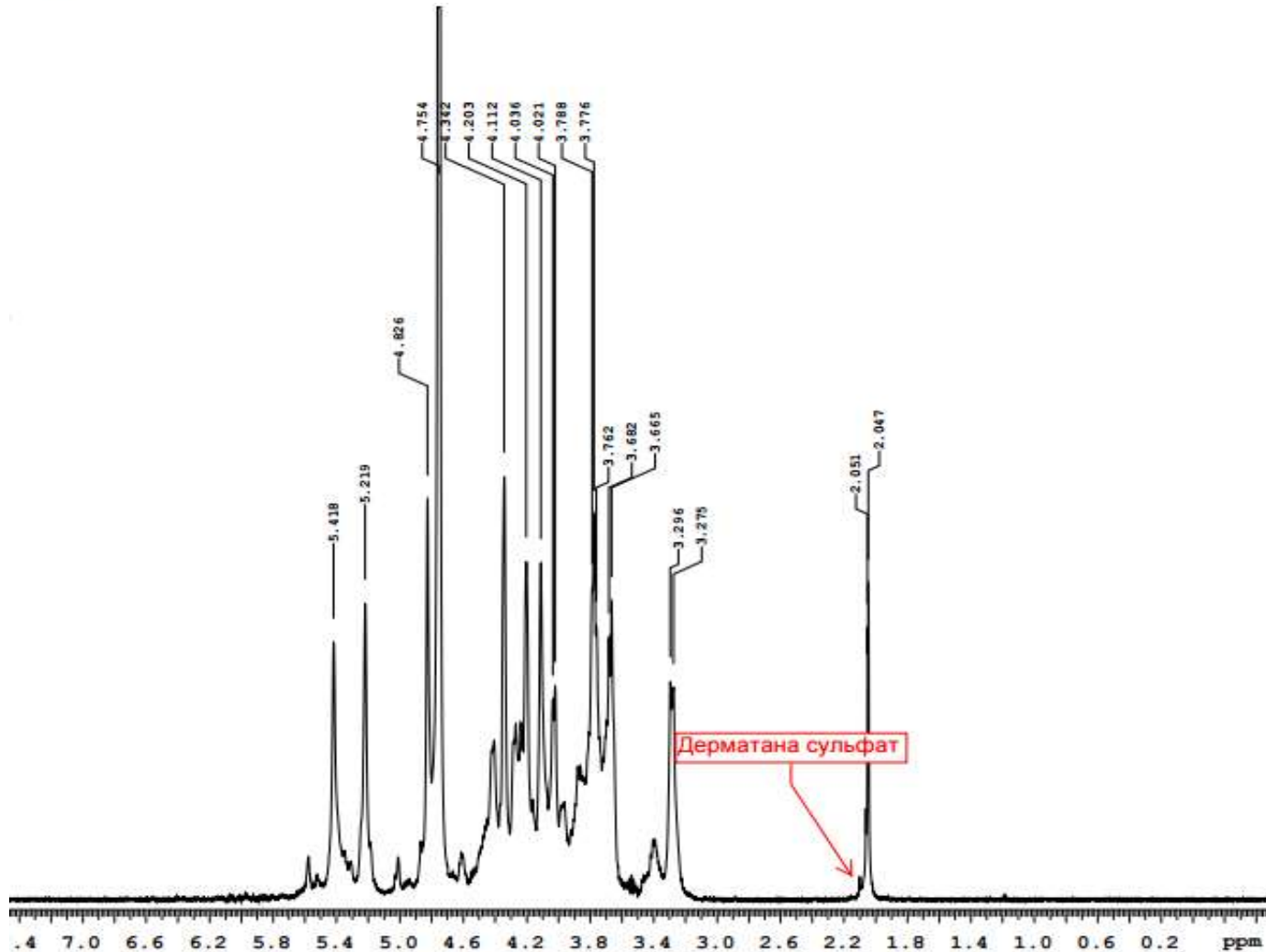
Образец	Степень молярного замещения	
	Метод ГХ	Метод ЯМР
гидроксиэтилкрахмала		
ГЭК 130/0.4	0,40±0,07	0,413±0,008
ГЭК 200/0.5 № 20100302	0,48±0,01	0,478±0,004
ГЭК 200/0.5 № 20110401	0,51±0,03	0,509±0,005
НЕТА130	0,73±0,08	0,706±0,009
НЕТА206	0,52±0,01	0,527±0,002



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.

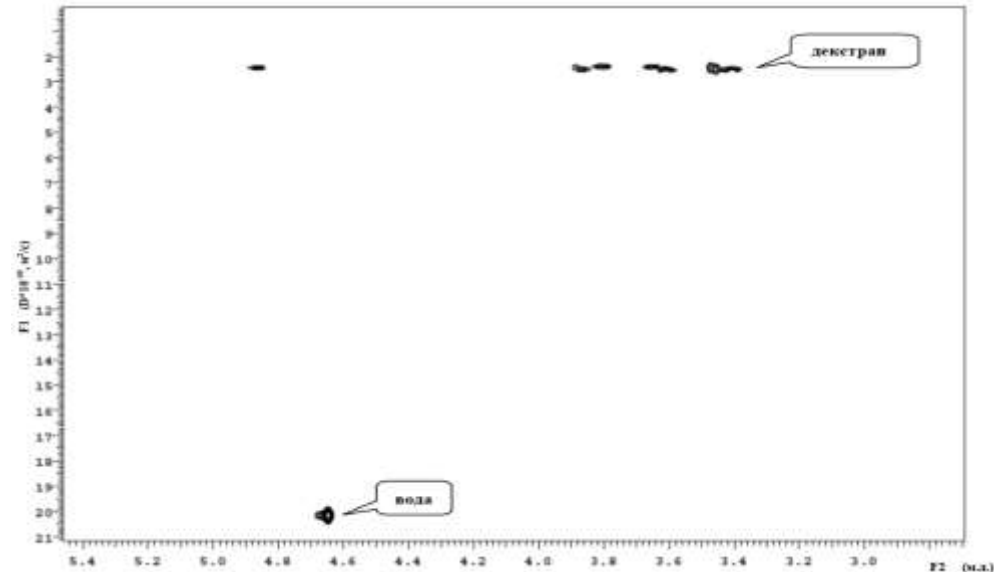
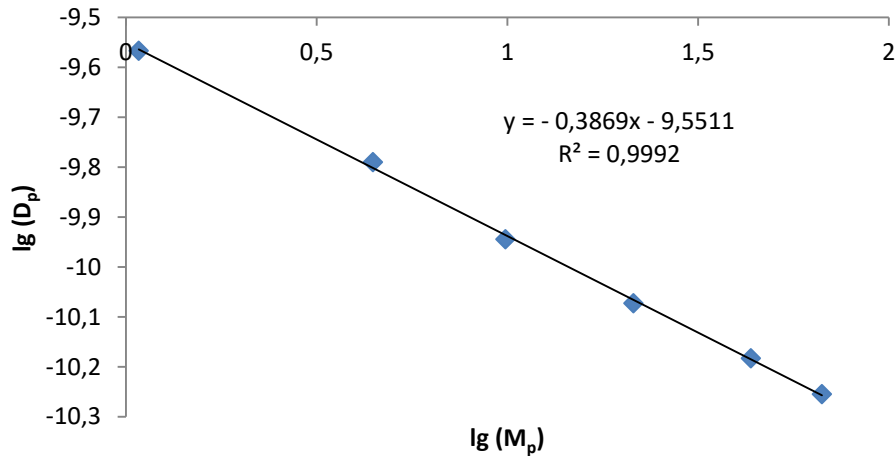


Протонный спектр субстанции гепарина натрия





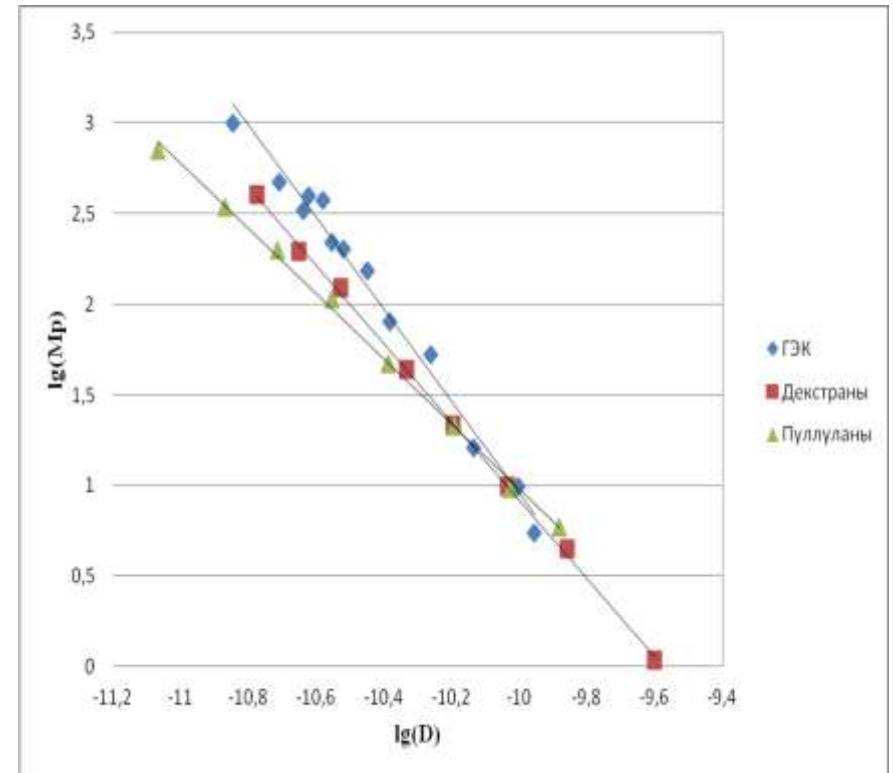
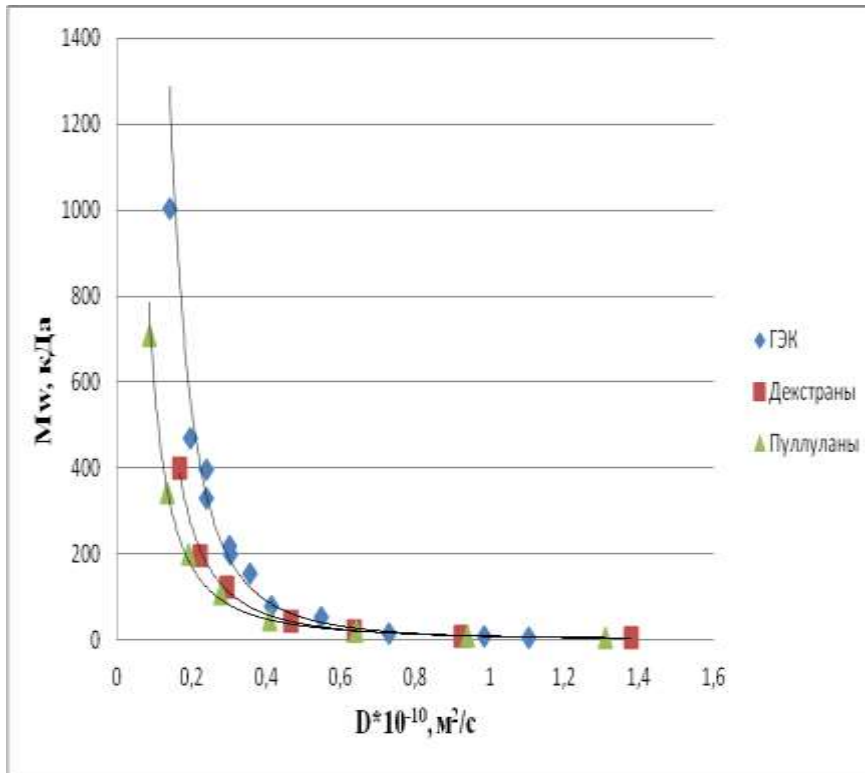
Определение средней молекулярной массы декстранов методом DOSY ЯМР



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.



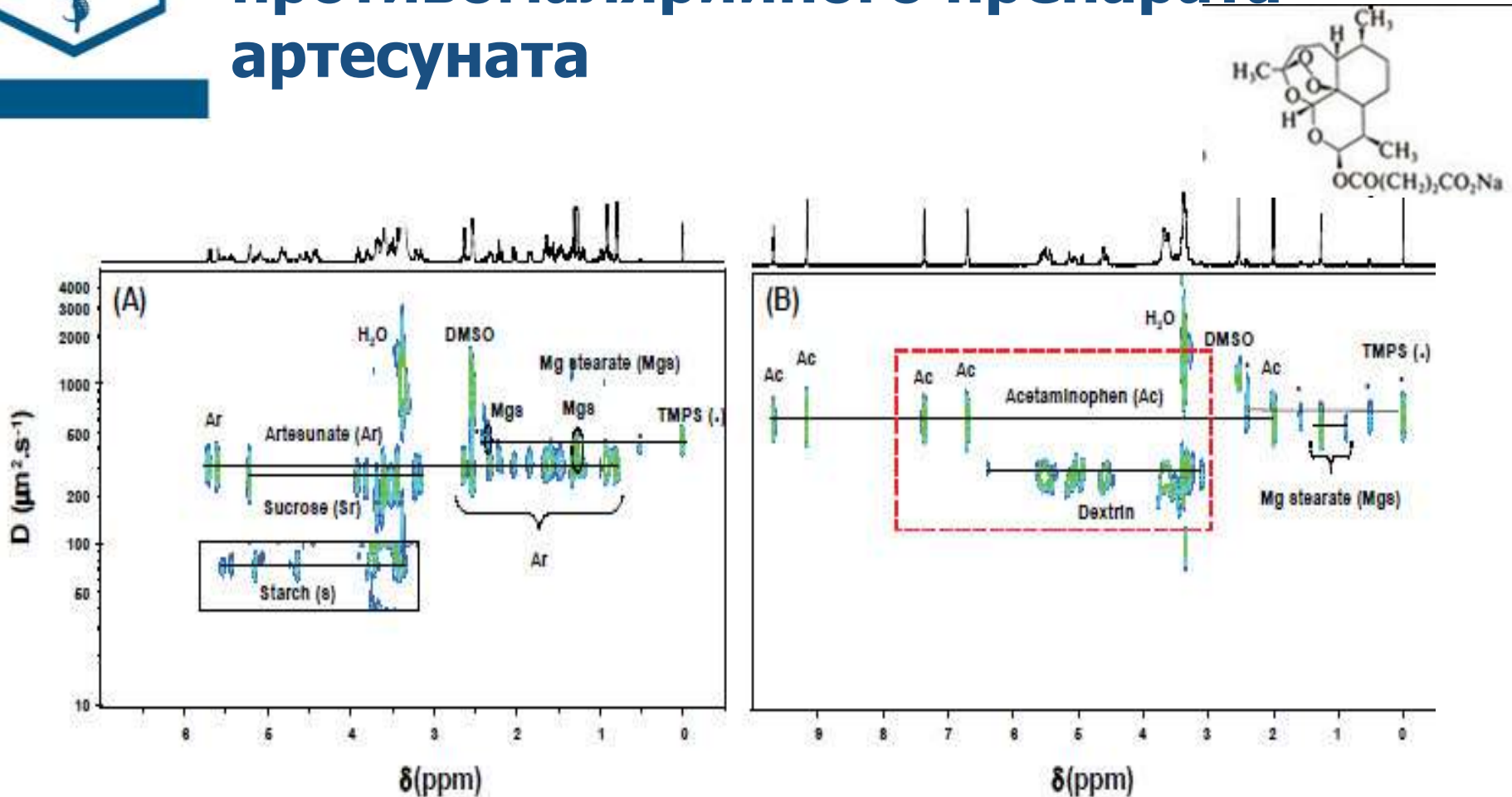
Регрессионный анализ зависимости молекулярной массы (ММ) от коэффициента самодиффузии (D) для полисахаридов



- $MM=9.0314D^{2.538}$ (разветвленные ГЭК)
- $MM=8.3038D^{2.164}$ (малоразветвленные декстраны)
- $MM=9.4862D^{1.801}$ (линейные пуллуланы)



Выявление фальсифицированного противомаларийного препарата артесуната

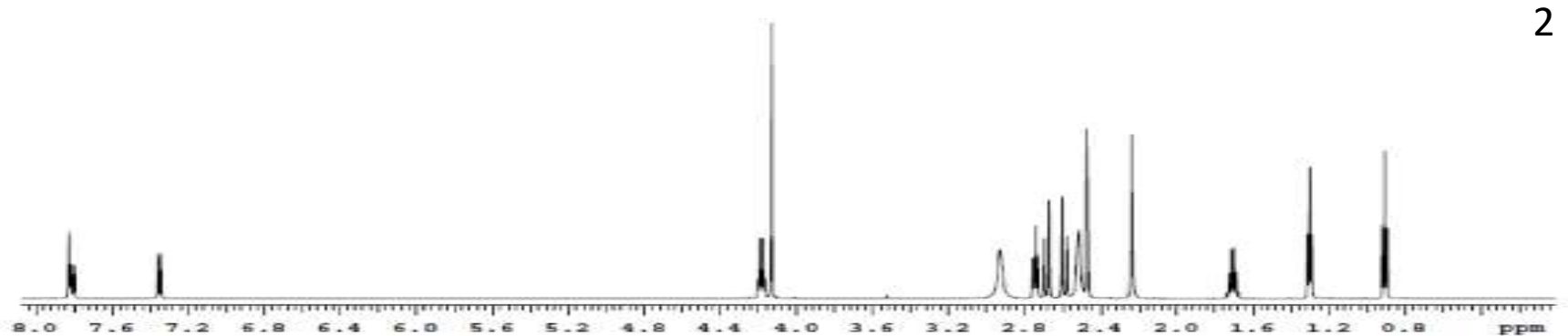
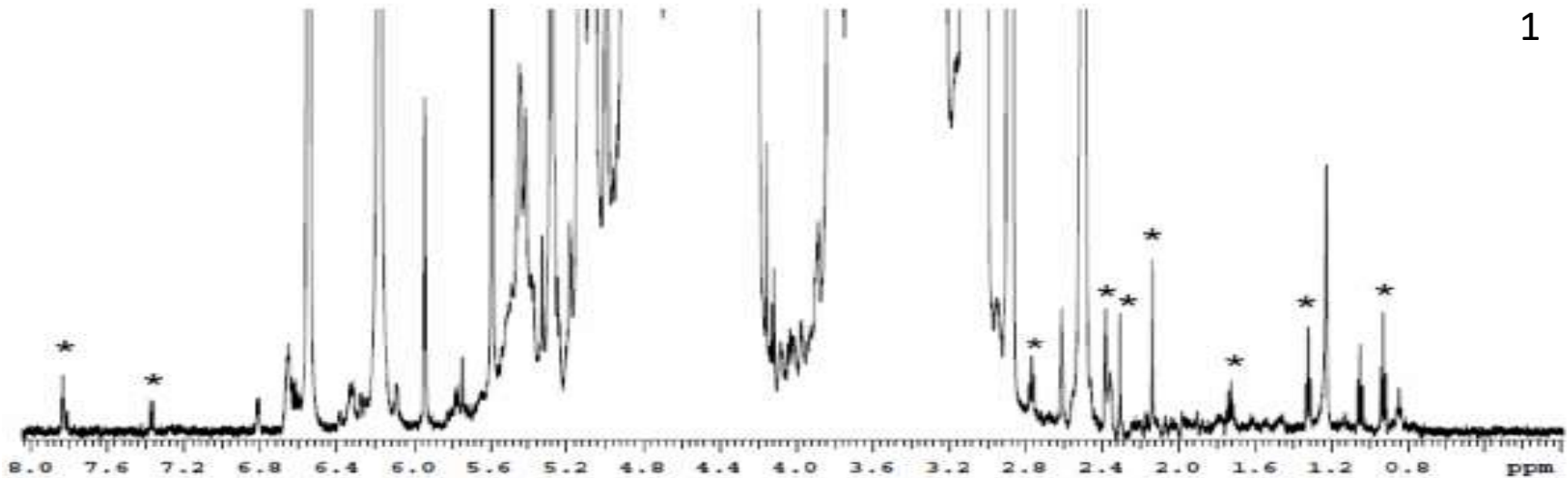


^1H -DOSY спектры противомаларийного препарата артесуната: подлинного (A) и фальсифицированного (B) (растворы в DMSO-d_6).

(Spectroscopy Europe, 2009, V. 21, №3, p. 10-14)



Протонные спектры БАД «био-мёд» (1) и субстанции силденафила цитрата (виагра) (2)





**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Атлас

спектров ядерного магнитного резонанса
лекарственных субстанций



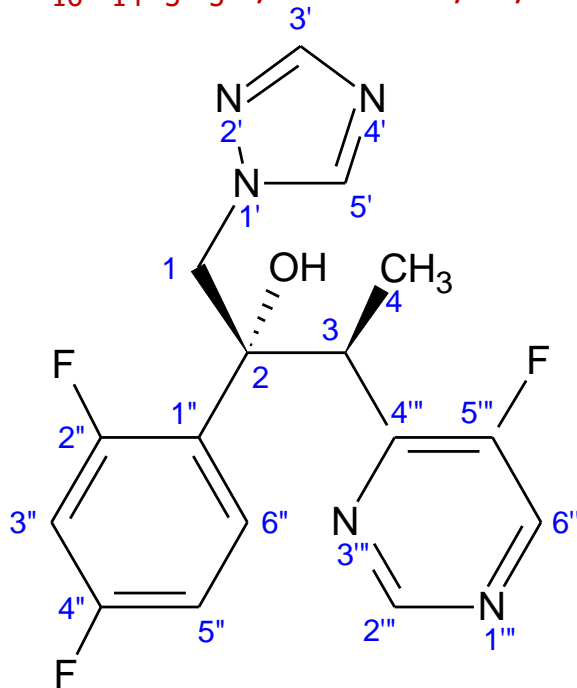


Вориконазол

•(2*R*,3*S*)-2-(2,4-Дифторфенил)-1-(1*H*-1,2,4-триазол-1-ил)-3-(5-фторпиримидин-4-ил)бутан-2-ол

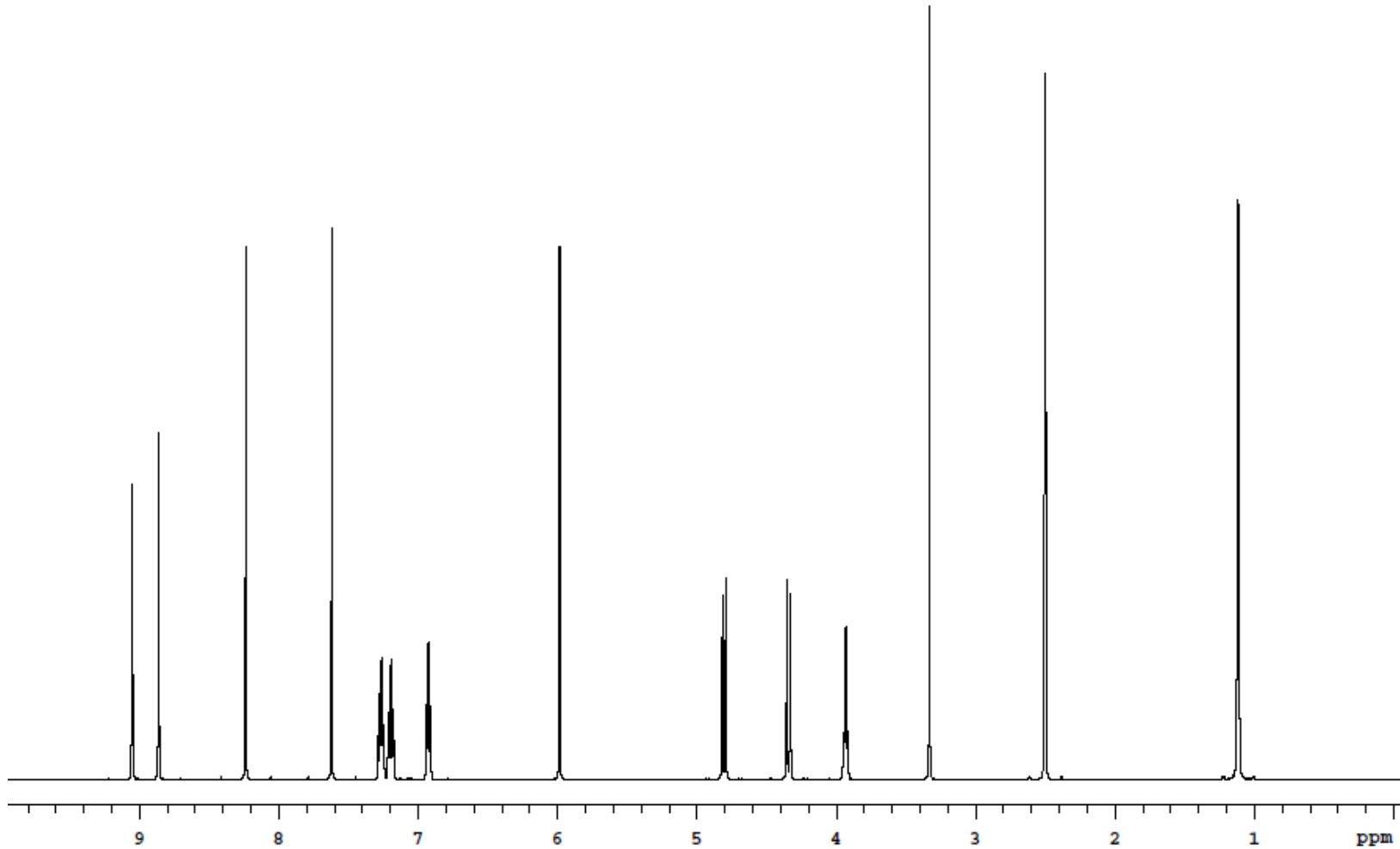
•(2*R*,3*S*)-2-(2,4-Difluorophenyl)-3-(5-fluoropyrimidin-4-yl)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol

• $C_{16}H_{14}F_3N_5O$; М.м. 349,32; CAS 137234-62-9



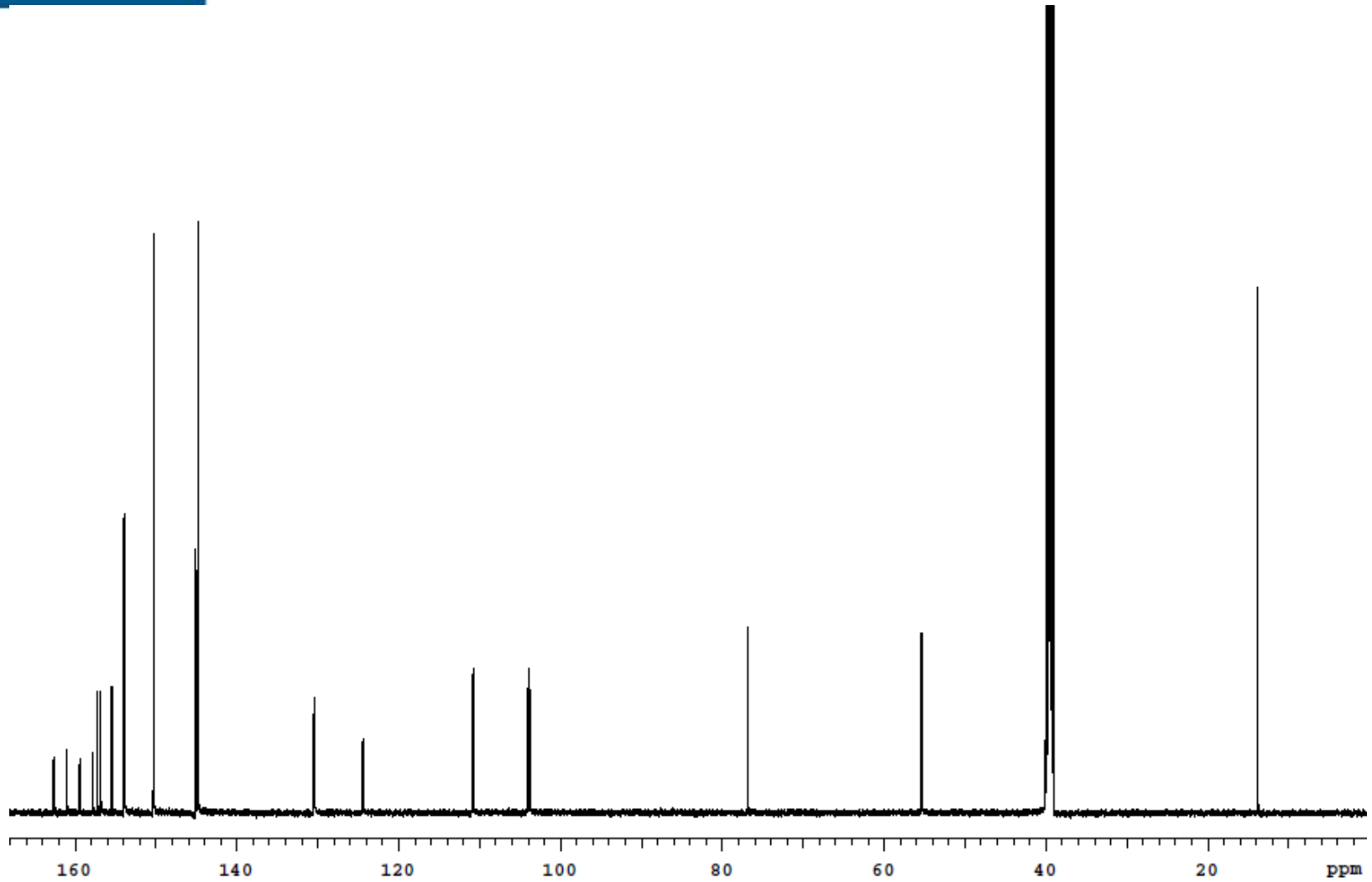


Спектр ЯМР 1H



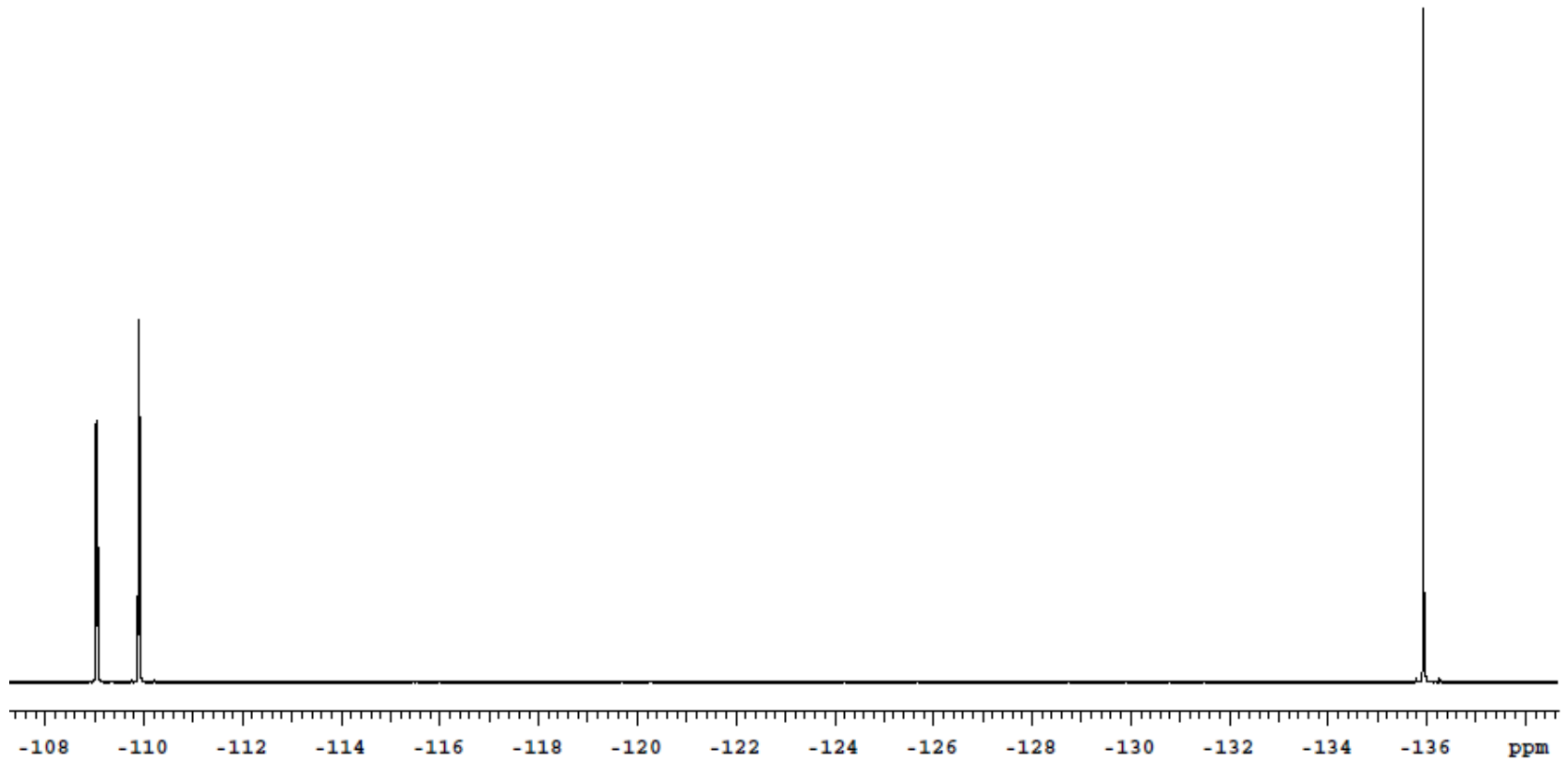


Спектр ЯМР ^{13}C





Спектр ЯМР ^{19}F





Спектральные характеристики
(ДМСО-d6, калибровка под растворитель
($\delta=2,50$ м.д. (^1H) и $39,52$ м.д. (^{13}C)), $c=23,6$ мг/мл, $t=25^\circ\text{C}$)

№ атом а	Химический сдвиг		№ атома	Химический сдвиг	
	^1H	^{13}C		^1H	^{13}C
1	4,34 д (J=14,1) 4,81 д (J=14,1)	55,35 с	4"		161,87 дд (J=246,2; 12,7)
2		76,86 д (J=5,2)	5"	6,93 ддд (J=8,8; 8,8; 2,3)	110,84 дд (J=20,8; 2,3)
3	3,93 к (J=7,0)	40,06 с	6"	7,27 ддд (J= 8,8; 8,6; 7,0)	130,43 дд (J=9,2; 5,8)
4	1,12 д (J=7,0)	13,79 с	2'''	9,05 д (J=2,4)	153,90 д (J=8,1)
3'	7,62 с	150,33 с	4'''		156,80 д (J=12,7)
5'	8,24 с	144,81 с	5'''		156,3 д (J=262,4)
1"		124,44 дд (J=12,7; 3,5)	6'''	8,86 д (J=1,8)	145,02 д (J=22,0)
2"		158,64 дд (J=246,2; 12,7)	2- <u>ОН</u>	5,99 с	
3"	7,20 ддд (J=12,0; 9,0;2,3)	103,92 дд (J=28,9; 25,4)			

^{19}F $\delta(\text{CFCl}_3)$, м.д.: -107,05, ддд (J=12,0; 7,0; 2,0), 1F, 2"-F;
-111,79, дддд (J=9,0; 8,8; 8,6; 2,0), 1F, 4"-F;
-134,85, уш.с, 1F, 5'''-F.

Спасибо за внимание!



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения