

# БЫСТРЫЙ СКРИНИНГ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ БЕЗ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ: РЕНЕССАНС НИЗКОПОЛЬНЫХ СПЕКТРОМЕТРОВ ЯМР

Г.А.Калабин, д.х.н., В.Г.Васильев, В.А.Ивлев, Н.А.Комаров,  
Р.А.Абрамович, д.фарм.н., РУДН  
kalabinga@mail.ru

УДК 543.51, 543.429.23;  
БАК 02.00.02

Предложено применение современных низкочастотных спектрометров ЯМР  $^1\text{H}$  на рабочей частоте 60 МГц для контроля подлинности лекарственных средств. Проведена апробация фурье-спектрометра ЯМР Pulsar компании Oxford Instruments (Великобритания) в качестве инструмента для идентификации и количественного анализа ряда лекарственных средств (ЛС). Показано, что спектры ЯМР  $^1\text{H}$  на рабочей частоте 60 МГц позволяют идентифицировать в ЛС лекарственные субстанции, а по выделенным обособленным индикаторным сигналам определять их количественное содержание без использования стандартных образцов. Для валидации и верификации разрабатываемых методик нестандартного скрининга рекомендовано применение тандема низкочастотной и высокочастотной (более 300 МГц для  $^1\text{H}$ ) аппаратуры ЯМР.

Для защиты здоровья потребителей несомненно важна быстрота скрининга лекарственных средств, поступающих в аптечную сеть и лечебные учреждения. Для доказательства подлинности и качества ЛС в фармакопейных статьях содержатся валидированные методики с применением стандартных образцов. В отличие от них скрининговые методы должны отвечать следующим требованиям: простота или отсутствие пробоподготовки, не сложная и не продолжительная процедура измерения, возможность быстро идентифицировать интересующую компоненту (обычно лекарственную субстанцию) и оценить ее содержание для оперативного принятия решения [1]. С позиций универсальности, информативности и фундаментальности среди известных методов анализа такими возможностями в наибольшей степени обладает единственный – количественная спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

## ПОДБОР ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ СКРИНИНГА

В международной системе СИ спектроскопия ЯМР признана прямым методом определения мольной доли веществ в растворах. Сегодня – это общепринятый уникальный метод обнаружения, идентификации строения и определения содержания компонентов сложных смесей, какими являются ЛС. Метод широко используется в фармакопеях развитых стран и входит в Государственную фармакопею РФ около 20 лет. Однако, его применение

в отечественной практике контроля ЛС по состоянию на 2017 год, помимо контроля подлинности стандартных образцов, ограничивается всего двумя фармакопейными статьями, относящимися к анализу гепарина и карбогидратов вакцин. Такое осторожное отношение к методу ЯМР можно объяснить высокой стоимостью и жесткими условиями эксплуатации современных высокочастотных исследовательских спектрометров ЯМР, которые требуют, в частности, бесперебойного снабжения их криожидкостями (гелий, азот)\*. Немаловажен и человеческий фактор: из-за недостатков профессиональной подготовки отечественных специалистов-фармацевтов среди них распространены ошибочные представления о сложности регистрации и интерпретации ЯМР-спектров.

После появления в 1960-х первой генерации коммерческих спектрометров ЯМР с резонансными частотами для протонов 40–100 МГц на базе электромагнитов весом несколько тонн и без фурье-преобразования потребовалось около 50 лет для технического ренессанса в производстве нового поколения низкочастотного аналитического оборудования ЯМР. Сегодня предлагается несколько серийных моделей фурье-спектрометров

\* Высокочастотными принято называть спектрометры ЯМР, в которых источниками магнитного поля служат сверхпроводящие магниты с криогенным охлаждением.

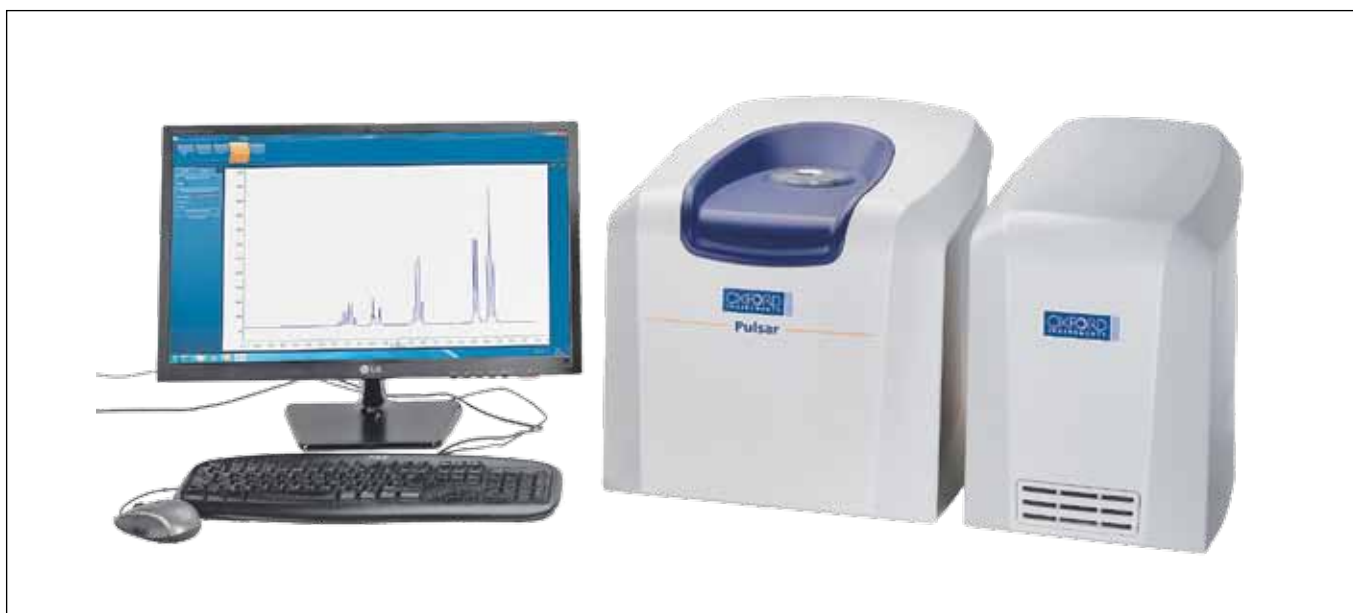


Рис.1. ЯМР-спектрометр Pulsar компании Oxford Instruments (Великобритания)

с рабочей частотой для ядер  $^1\text{H}$  60 МГц, главная особенность которых – новые компактные и легкие постоянные магниты вместо электромагнитов. Преимущества таких приборов перед высокопольными системами с криомагнитами: отсутствует необходимость в криожидкостях, малые энергопотребление, размер и вес, предельная простота использования, совершенное программное обеспечение и, как результат, сниженная на порядок и более стоимость. Однако уменьшение резонансной частоты влечет за собой неизбежные последствия: чувствительность уменьшается в несколько десятков раз, а спектры усложняются, поскольку мультиплетные сигналы отдельных протонов перекрываются значительно сильнее. Тем не менее, широкие возможности, очевидную эффективность и перспективность нового поколения низкопольного оборудования уже показали примеры их использования для решения учебно-образовательных, научно-прикладных и промышленных задач в химическом анализе [2–5], мониторинге реакций [6], оценке качества [7], хемометрике на основе корреляций "строение – свойства", а также для непрерывного контроля процессов в промышленности [8, 9]. В фармацевтической химии также появились единичные публикации, посвященные идентификации наиболее простых по составу лекарственных субстанций [10], выявлению фальсификаций синтетическими компонентами некоторых парафармацевтиков – ингибиторов ФДЭ-5 и средств снижения веса [11], выявлению природы и строения используемых в фармацевтике растительных масел [12]. Во всех случаях использовали методики быстрого скрининга со време-

нами регистрации спектров ЯМР  $^1\text{H}$  (зависит от концентрации аналита, характера задачи, уровня выявляемых примесей), не превышающими нескольких десятков минут.

Наша научная группа разрабатывает новую методологию фармакопейного анализа на основе сочетания методов спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии (см., например, [13] и ссылки в ней). С начала 2017 года проходит апробацию фурье-спектрометр ЯМР Pulsar (рис.1) компании Oxford Instruments (Великобритания) с рабочей частотой 60 МГц для  $^1\text{H}$ , обладающий среди приборов такого класса наиболее высокой чувствительностью ( $S/N > 150$  для раствора 1% этилбензола в хлороформе) и разрешением (лучше 0,5 Гц). Близкие характеристики имеет настольный ЯМР-спектрометр Spinsolve компании Magritek, параметры которого подробно описаны в [14]. Спектрометр Pulsar укомплектован мультиядерным датчиком  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$ , может работать в режиме двумерных гомо- и гетероядерных экспериментов, использует стандартные ампулы для ЯМР диаметром 5 мм, имеет пакет программного обеспечения Mnova NMR от Mestrelab. Проведена оценка его возможностей по идентификации и количественному анализу различных гипертензивных ЛС, антибиотиков, олигопептидных препаратов, флавоногликозидов, исследованных ранее на высокопольном оборудовании с рабочими частотами 400 и 600 МГц. В представленной работе в качестве объектов быстрого скрининга рассмотрено несколько популярных коммерческих антибиотиков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все анализируемые ЛС приобретены в аптечных сетях.

Офлоксацин (I) – синтетический антибактериальный препарат широкого спектра действия из группы фторхинолонов, содержащий смесь энантиомеров, активным веществом является левовращающий изомер – левофлоксацин. Химическая формула:  $(\pm)$ -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.2. Изучены таблетки дженерика "Офлоксацин" (производитель ООО "Озон", серия 030516, годен до 06.19) с указанным содержанием субстанции 200 мг на таблетку. Вспомогательные вещества – целлюлоза микрокристаллическая, крахмал картофельный, повидон (поливинилпирролидон), кроскармеллоза натрия, магния стеарат.

Левофлоксацин (II), левовращающий изомер офлоксацина. Изучены таблетки дженерика "Таваник" (производитель "Санофи Винтроп Индустрия", серия 4CF5C, годен до 31.03.19) с указанным содержанием лекарственной субстанции 500 мг на таблетку. Вспомогательные вещества – кросповидон, гипромеллоза, целлюлоза микрокристаллическая, натрия стеарилфумарат.

Тетрациклин (III) – бактериостатический антибиотик группы тетрациклинов. 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  $C_{22}H_{24}N_2O_8$ ,  $M=444,35$  г/моль. Структурная формула представлена на рис.3. Изучены таблетки дженерика "Тетрациклин" (производитель РУП "Белмедпрепараты", серия 030116, годен до 02.19), содержащие тетрациклин 100 мг на таблетку. Вспомогательные вещества – сахароза, краситель арбутин Е-122 и другие, указанные в спецификации.

Комбинация сульфаметоксазола (IV) и триметоприма (V) – бактерицидные препараты широкого спектра действия. Химические названия: 4-амино-N-(5-метилизоксазол-3-ил)-бензолсульфонамид и 5-(3,4,5-триметоксибензил)пиримидин-2,4-диамин, соответственно. Брутто-формулы и молярные массы  $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ ,  $M=253$  г/моль и  $C_{14}H_{18}N_4O_3$ ,  $M=290$  г/моль, соответственно; структурные формулы на рис.4. Изучены таблетки препарата "Бисептол" (производитель "Польфа" (Польша), номер серии 41611062, срок годности – до 01.07.2019), содержащие на одну таблетку специфицированное содержание 400 мг сульфаметоксазола и 80 мг триметоприма, соответственно. Вспомогатель-

ные вещества – картофельный крахмал, тальк, магния стеарат, поливиниловый спирт, пропиленгликоль, метил-п-гидроксибензоат, пропил-п-гидроксибензоат.

В работе использованы следующие растворители и стандарты: хлороформ- $d_1$  (99,8%, Sigma-Aldrich), метанол- $d_4$  (99,9%, Sigma-Aldrich), гексаметилдисилоксан (ГМДС) (99,8%, Sigma-Aldrich), трифторуксусная кислота (ХЧ), диметилсульфон (ДМСО<sub>2</sub>) (ХЧ).

Стандартная пробоподготовка: измельчение таблеток в ступке, отбор точной навески, рассчитанной на 30 мг лекарственной субстанции в 1 мл растворителя, растворение в выбранном растворителе, встряхивание, обработка в УЗ-бане, отделение нерастворимых веществ центрифугированием, перенесение надосадочной жидкости в ампулы для ЯМР, добавление точной навески калибровочного соединения (если в качестве него не используется сигнал точно измеренных остаточных протонов дейтерированного растворителя). Доказательство полноты экстракции лекарственной субстанции из ЛС всегда контролировали по отсутствию ее сигналов в спектре ЯМР <sup>1</sup>H раствора переработанного осадка.

Для подтверждения отнесения сигналов в спектре ЯМР на 60 МГц и верификации количественных результатов использовали ЯМР-спектрометр JNM ECA 600 (Jeol, Япония) с рабочей частотой для ядер <sup>1</sup>H 600 МГц.

Общие условия регистрации спектров ЯМР на 60 и 600 МГц: ширина фильтра 18 м.д. с установкой несущей частоты 7,0 м.д., импульс 90°, задержка между импульсами 30 с, 32 тыс. точек на спектр, автоматическая настройка фазы и базовой линии. Спектры регистрировали при температуре 23°C на частоте 600 МГц и 36°C – на 60 МГц. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Mnova NMR (MestreLab, Испания). Другие условия регистрации спектров для разных объектов могут определяться используемым растворителем, его концентрацией, выбором калибровочного сигнала для количественного определения интересующих соединений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Офлоксацин и левофлоксацин.** Спектры ЯМР <sup>1</sup>H левофлоксацина в ДМСО- $d_6$  [15] и D<sub>2</sub>O [16] опубликованы ранее, хотя отнесение сигналов в обоих случаях содержало ошибки. Так, для группы COOH в ДМСО- $d_6$  указано положение сигнала в области 4,5–5,0 м.д., что не соответствует реальному спектру (15,03 м.д.). Обнаружено, что в качестве растворителя для офлоксацина и левофлоксацина лучше подходит CDCl<sub>3</sub>, в растворе которого разрешаются все сигналы <sup>1</sup>H на 600 МГц и их большинство на 60 МГц. Использовали CDCl<sub>3</sub> с точно измерен-

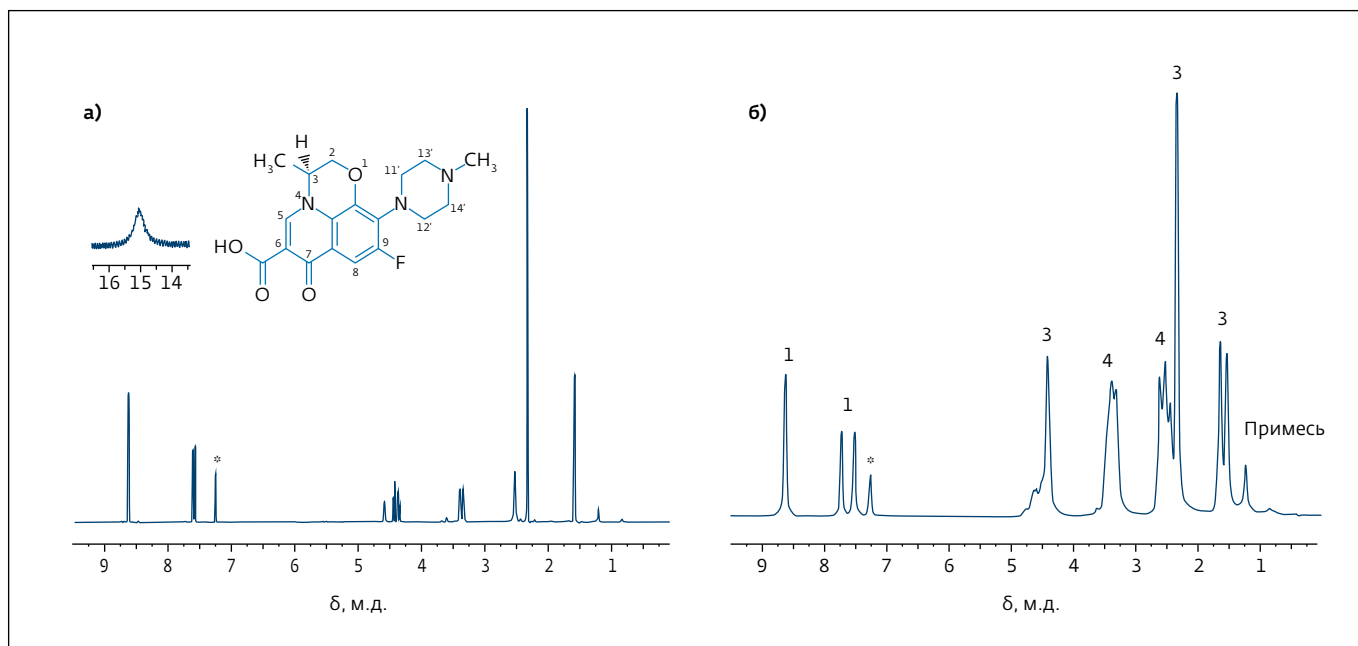


Рис.2. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ЛС "Таваник" в  $\text{CDCl}_3$ : а – на частоте 600 МГц, отдельно показан сигнал протона карбоксильной группы; б – на частоте 60 МГц; \* – сигнал калибровочного соединения  $\text{CHCl}_3$

ным содержанием остаточных протонов 0,2%, то есть 0,125 моль/мл.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ЛС "Таваник" на частоте 600 МГц (рис.2а) содержит следующие сигналы ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.,  $J/\text{Гц}$ ): 1,58 (3H, д,  $J=7,0$  Гц,  $\text{C}_3\text{H}-\text{CH}_3$ ); 2,34 (3H, с,  $\text{N}-\text{CH}_3$ ); 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.,  $\text{COOH}$ ).

Спектр полностью соответствует структурной формуле субстанции, сигналов вспомогательных веществ не обнаружено. Расчет содержания субстанции выполнен по соотношению интегральных интенсивностей ее сигналов и пиков протонов остаточных молекул  $\text{CHCl}_3$  в растворителе по уравнению, рекомендованному в Государственной Фармакопее РФ, XIII издание (ОФС. 1.2.1.1.0007.15) и учитывающему массы компонентов ( $m$ ), их молярные массы ( $M$ ), интенсивность отдельных сигналов, нормированных по числу эквивалентных протонов ( $l$ ):

$$m(\text{C}) = [m(\text{CHCl}_3)/M(\text{CHCl}_3)] \times [l(\text{C})/l(\text{CHCl}_3)] \times M(\text{C}).$$

Средний результат трех независимых измерений содержания субстанции – (497,7  $\pm$  2,9) мг на таблетку. Для левофлоксацина в качестве индикаторных приняты сигналы протонов у  $\text{C}_5$  и  $\text{C}_8$  при 8,62 м.д. и 7,63 м.д., соответственно. Для количественного определения субстанции

при 600 МГц также удобно использовать сигнал метильной группы  $\text{C}-\text{CH}_3$ , имеющий химический сдвиг 1,58 м.д.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  на частоте 60 МГц (рис.2б) содержит те же группы пиков и с теми же химическими сдвигами, однако некоторые (протоны у  $\text{C}_2$  и  $\text{C}_3$  в области около 4,5 м.д. и группы  $\text{CH}_2$  и  $\text{CH}_3$  около 2,5 м.д.) перекрываются из-за возросшего влияния спин-спинового взаимодействия на вид спектра. Наиболее очевидно это проявляется для сигналов протонов у  $\text{C}_8$ , являющегося дублетом с константой  $J=12,3$  Гц, за счет вицинального взаимодействия с ядром  $^{19}\text{F}$  и  $\text{C}-\text{CH}_3$ -группы. Над каждым пиком в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  на частоте 60 МГц указано число протонов, ответственных за него. Число и положение пиков в спектре на частоте 60 МГц, как и стехиометрическое соответствие их интенсивностей строению молекулы обеспечивают однозначную идентификацию левофлоксацина.

Количественное определение субстанции в таблетке по спектру 60 МГц сделано путем усреднения трех независимых измерений по трем отдельным сигналам протонов у  $\text{C}_5$  и  $\text{C}_8$  и  $\text{C}-\text{CH}_3$ -группы. Результаты: (484,8  $\pm$  5,0); (485,3  $\pm$  5,0) и (486,5  $\pm$  5,0) мг на таблетку, соответственно, то есть отклонение не более 3% от заявленного производителем.

На рабочей частоте ЯМР  $^1\text{H}$  60 МГц проведен быстрый скрининг подлинности и качества таблеток "Офлоксацин" производства ООО "Озон" с заявленным содержанием субстанции на таблетку 200 мг. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  энантио-

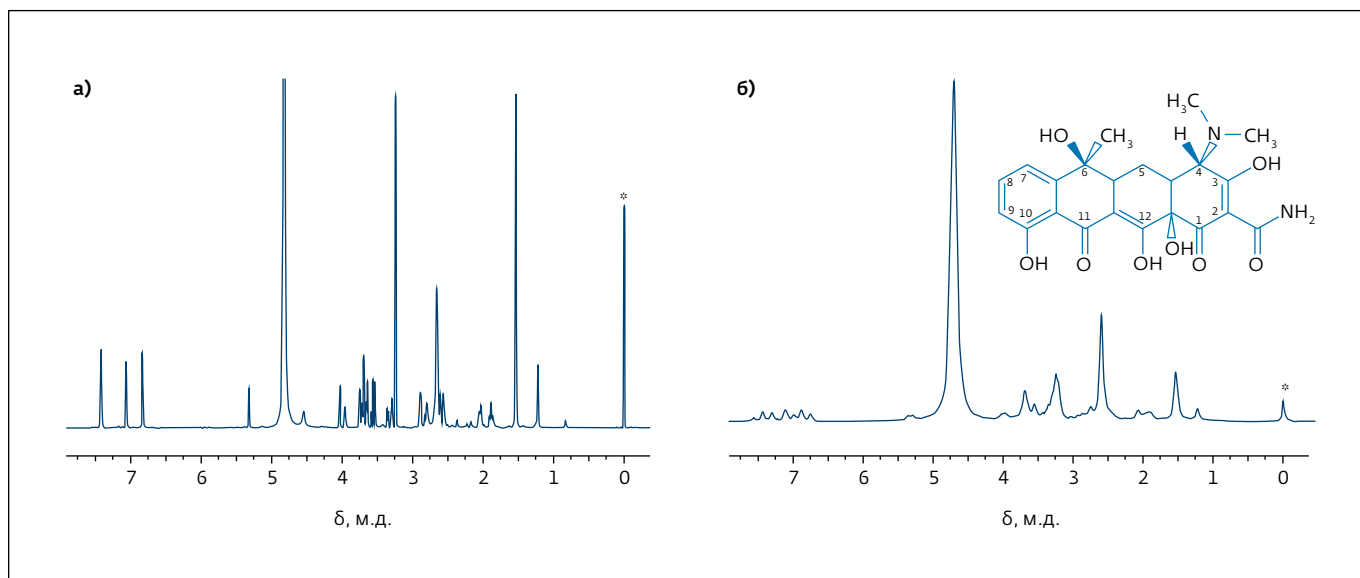


Рис.3. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  ЛС "Тетрациклин" в  $\text{CD}_3\text{OD}$ : а – на частоте 600 МГц, б – на частоте 60 МГц; \* – сигнал калибровочного соединения  $(\text{CH}_3)_3\text{SiOSi}(\text{CH}_3)_3$

меров проявляются одинаково, поэтому спектр хлороформного экстракта таблеток "Офлоксацин" на частоте 60 МГц идентичен представленному на рис.26. Однако, сравнение интегральных интенсивностей остаточных сигналов протонов  $\text{CHCl}_3$  и протонов у  $\text{C}_5$  и  $\text{C}_8$  привело к выводу, что содержание субстанции на таблетку составляет не 200 мг, а  $(95,6 \pm 1,5)$  мг (по  $\text{H}_\alpha$ ) или  $(96,4 \pm 1,5)$  мг (по  $\text{H}_\beta$ ). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  раствора после повторной экстракции из осадка, оставшегося после пробоподготовки, показал отсутствие в нем

субстанции. Верификация результата на спектрометре 600 МГц также подтвердила почти двойное недовложение субстанции в таблетке –  $(97,8 \pm 1,0)$  мг. За неимением стандартного образца доказательство фальсификации таблеток "Офлоксацин" методом ВЭЖХ проводили с использованием навески препарата "Таваник", содержащей известное количество лекарственной субстанции.

**Тетрациклин.** ЯМР-спектр на 600 МГц ЛС в растворителе  $\text{CD}_3\text{OD}$  (рис.3а) содержит следующие сигналы ( $\delta$ , м.д., J/Гц): 1,62 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,93 (дд, 1H, H-5); 2,10 (ддд, 1H, H-5'); 2,66 (ддд, 1H, H-4а); 2,72 (с, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ); 2,97 (дд, 1H, H-5а); 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). Его характеристики полностью совпадают с известными данными [17]. Помимо сигналов субстанции, спектр ЯМР  $^1\text{H}$  содержит ряд минорных пиков вспомогательных веществ в областях от 0,8 до 5,4 м.д. Для их устранения регистрацию спектра на 60 МГц выполнили также для экстракта из ЛС растворителем  $\text{DMSO}-d_6$ . Положение сигналов протонов незначительно изменилось, но появились пики отсутствующих в  $\text{CD}_3\text{OD}$  протонов ОН-групп, которые дополнительно подтверждают формулу и согласуются с литературными данными [18].

Спектр в  $\text{CD}_3\text{OD}$  на 60 МГц выглядит существенно сложнее из-за перекрывания мультиплетов отдельных протонов за исключением сигнала группы  $\text{C}_6-\text{CH}_3$ . Подтверждение строения субстанции в серии проб удобно выполнять путем сравнения профилей их спектров и уже подтвержденного (см. рис.3б) образца. Этот прием аналогичен широко используемому в Фармакопеях различных

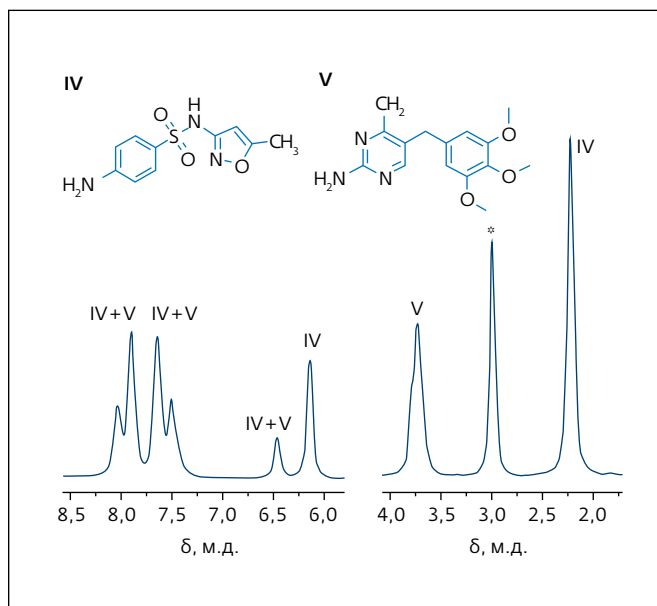


Рис.4. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  препарата "Бисептол" на частоте 60 МГц в трифторуксусной кислоте; \* – сигнал  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2$

Таблица 1. Содержание субстанций в ЛС

№	Название ЛС	Лекарственная субстанция	Содержание, мг на таблетку		
			заявленное производителем	измерено на спектрометре 600 МГц	измерено на спектрометре 60 МГц
I	Офлоксацин	Офлоксацин	200	97,8±1,0	96,0±1,5
II	Таваник	Левифлоксацин	500	497,7±2,9	485,3±5,0
III	Тетрациклин	Тетрациклин	100	101,4±1,0	96,8±1,5
IV	Бисептол	Сульфаметоксазол	400	408,7±4,1	401,2±8,0
V	Бисептол	Триметоприм	80	79,9±0,8	77,6±2,0

стран для спектров ИК. То есть представленный на рис.3б спектр в CD<sub>3</sub>OD может быть рекомендован как вторичный стандарт при идентификации других препаратов тетрациклина.

Количественное определение субстанции в растворе в CD<sub>3</sub>OD выполнено путем сравнения интенсивности сигнала добавленной навески гексаметилдисулоксана с суммарной интегральной интенсивностью трех ароматических протонов Н<sub>7</sub>, Н<sub>8</sub> и Н<sub>9</sub> в области 6,5–7,7 м.д. При измерении на 600 МГц рассчитано содержание субстанции – (101,4 ± 1,6), а для 60 МГц – (96,8 ± 3,5) мг на таблетку, что соответствует декларированному количеству. В обоих случаях результаты являются усредненными значениями для трех независимых образцов.

**Композиция сульфаметоксазол – триметоприм.** Выполнен скрининг подлинности таблеток комбинированного антимикробного препарата "Бисептол", содержащего на одну таблетку (~660 мг) специфицированное содержание 400 мг сульфаметоксазола (IV) и 80 мг триметоприма (V).

Интерпретация спектра ЯМР <sup>1</sup>H раствора ЛС "Бисептол" в ДМСО-d<sub>6</sub> на частоте 600 МГц и вопрос количественного определения компонент обсуждались нами ранее [13].

Содержание лекарственных субстанций по спектру на 600 МГц в ДМСО-d<sub>6</sub> легко определять сравнением интегральных интенсивностей сигнала трех протонов СН<sub>3</sub>-группы IV при 2,27 м.д. и шести протонов двух эквивалентных групп V при 3,72 м.д. с сигналом остаточных протонов молекул растворителя ДМСО-d<sub>5</sub> (2,50 м.д.) по приведенной выше формуле. В частности, в навеске массой 52,6 мг (масса таблетки "Бисептола" 666,4 мг)

обнаружено сульфаметоксазола 32,2 мг и триметоприма 6,3 мг, что при пересчете на целую таблетку составило содержание сульфаметоксазола и триметоприма (408,7±4,1) и (79,9±0,8) мг соответственно, что согласуется с указанными производителем значениями. Полученные результаты для двух других навесок отличались от представленной не более чем на 2%.

В спектре ЯМР <sup>1</sup>H на частоте 60 МГц в растворе ДМСО-d<sub>6</sub> разрешение некоторых сигналов оказалось существенно хуже из-за близости отдельных групп и мультиплетности. Использование сигнала остаточных протонов молекул ДМСО-d<sub>5</sub> для количественного определения субстанций в ЛС оказалось невозможным из-за его перекрывания с сигналом протонов СН<sub>3</sub>-группы IV при 2,27 м.д. Поэтому выполнена регистрация спектра раствора ЛС в трифторуксусной кислоте с добавкой (СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> около 3,0 м.д в качестве калибровочного пика. С этим сигналом сравнивали нормированные интегральные интенсивности трех протонов СН<sub>3</sub>-группы IV при 2,27 м.д. и совокупности одиннадцати протонов V в области 3,5–4,0 м.д. (рис.4). Расчет – (401,2±8,0) мг IV и (77,6±2,0) мг V на таблетку – хорошо согласуется как с измерениями для 600 МГц, так и с заявленными значениями.

Обобщенные результаты количественного определения рассмотренных субстанций в ЛС представлены в табл.1.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлено три примера быстрого скрининга ЛС с использованием спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H на рабочей частоте 60 МГц для идентификации и определения содер-



жания лекарственных субстанций. В первом (офлоксацин, левофлоксацин) характер спектра позволяет полностью его интерпретировать и количественно измерить содержание лекарственных субстанций. Во втором (тетрацилин) усложненная спектральная картина требует для однозначной идентификации строения предварительного анализа спектра  $^1\text{H}$  на более высоких частотах. Спектр на 60 МГц используется в формате "отпечатка пальцев" с количественным определением субстанции путем сравнения интенсивностей совокупности выделенных индикаторных и калибровочного сигналов. Для отдельных ЛС, содержащих композицию лекарственных субстанций (сульфаметоксазол+триметоприм), усложнение количественной интерпретации спектра на 60 МГц может быть преодолено сменой растворителя и калибратора.

Представленные результаты демонстрируют возможности спектрометра ЯМР  $^1\text{H}$  60 МГц для быстрой идентификации и измерения в ЛС содержания лекарственных субстанций без применения стандартных образцов. Для верификации результатов при создании валидированных методик, требующих выполнения необходимых тестов, целесообразно привлечение, как стандартных образцов, так и спектроскопии ЯМР в сильных магнитных полях. По экономичности, скорости и информативности методики на основе спектров ЯМР на рабочей частоте 60 МГц могут заметно превосходить применяемые ныне хроматографические и оптические. Приготовление трех независимых проб, регистрация их спектров и расчет результатов без использования стандартных образцов занимает менее часа.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Varcarel M., Caerdenas S., Gallego M.** Samples screening systems in analytical chemistry // *Trends in Anal. Chem.* 1999. 18 (11). P. 685–694.
2. **Danieli E., Mauler J., Perlo J., Blumich B., Casanova F.** Mobile sensor for high resolution NMR spectroscopy and imaging // *J. Mag. Res.* 2009. 198 (1). P. 80–87.
3. **Danieli E., Perlo J., Blumich B., Casanova F.** Small magnets for portable NMR spectrometers // *Angewandte Chemie.* 2010. 49 (24). P. 4133–4135.
4. **Jacobsen N.E.** NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology // John Wiley&Sons, New Jersey. 2007.
5. **Friebolin H.** Basic one – and two-dimensional NMR spectroscopy. 5<sup>th</sup> edition // Wiley-VCH, Germany. 2011.
6. **Berger S., Braun S.** 200 and more NMR experiments. A practical course // Wiley-VCH, Germany. 2004.
7. **Dalitz F., Cudaj M., Maiwald M., Guthausen G.** Process and reaction monitoring by low-field NMR spectroscopy // *Prog. Nuc. Mag. Res. Spec.* 2012. 60. P. 52–70.
8. **Edwards J.C., Giammatteo P.J.** Progress NMR spectroscopy: technology and on-line applications. Chapter 10 in process analytical technology: spectroscopic tools and Implementation strategies for the chemical and pharmaceutical industries, 2<sup>nd</sup> ed. // Blackwell-Wiley. 2010.
9. **Edwards J.C.** A review of applications of NMR spectroscopy in petroleum chemistry. Chapter 16 in monograph 9 on spectroscopic analysis of petroleum products and lubricants // ASTM Books. 2011.
10. **Gonilleux B., Cherrie B.** Ultrafast 2D NMR on a benchtop spectrometer: application and perspectives // *Trends in Anal. Chem.* 2016. 83. P. 65–75.
11. **Pages G., Gerdova A., Williamson D., Gilard V., Martino R., Malet-Martino M.** Evaluation of a benchtop cryogen-free low-field  $^1\text{H}$  NMR spectrometer for the analysis of sexual enhancement and weight loss dietary supplements adulterated with pharmaceutical substances // *Anal. Chem.* 2014. 86. P. 11897–11904.
12. **Parker T., Limer E., Watson A.D., Defernez M., Williamson D., Kamsley E.K.** 60 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy for the analysis of edible oils // *Trends in Anal. Chem.* 2014. 57. P. 147–158.
13. **Калабин Г., Васильев В., Чернецова Е., Прокопьев А., Абрамович Р., Ивлев В., Митео И.** Экспертиза качества лекарственных средств без стандартных образцов // *АНАЛИТИКА.* 2017. № 2. С. 106–112.
14. **Кудякова В., Чазов А.** Полноценный ЯМР-анализ на лабораторном столе: ЯМР-спектрометры Spinsolve компании Magritek // *АНАЛИТИКА.* 2017. № 2. С. 80–83.
15. **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 // *Spectrochimica Acta Part A.* 2005. 62. P. 466–472.
16. **Salem A.A., Mossa H.A.** Method validation and determinations of levofloxacin, metronidazole and sulfamethoxazole in an aqueous pharmaceutical, urine and blood plasma samples using quantitative nuclear magnetic resonance spectrometry // *Talanta.* 2012. 88. P. 104–114.
17. **Othersen O.G., Waibel R., Lanig H., Gmeiner P. and Clark T.** SCRF-DFT and NMR comparison of tetracycline and 5a,6-anhydrotetracycline in solution // *J. Phys. Chem. B.* 2006. 110. P. 24766–24774.
18. **Casy A.F., Yasin A.** Stereochemical studies of tetracycline antibiotics and their common impurities by 400 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy // *Mag. Res. in Chem.* 1985. 23 (9). P. 767–770.