



С.В. Моисеев 
Н.Е. Кузьмина 
Е.Ю. Северинова 
Е.П. Симонова 
В.В. Косенко 

Идентификация и количественное определение компонентного состава фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Моисеев Сергей Владимирович; MoiseevSV@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Гентамицина сульфат — бактерицидный антибиотик широкого спектра действия из группы аминогликозидов, продуцируемый *Micromonospora purpurea*. В медицинской практике используется фармацевтическая субстанция «Гентамицина сульфат», представляющая собой смесь гентамицинов групп C_1 и C_2 , содержание которых нормировано и контролируется при проведении фармацевтической экспертизы. В настоящее время при контроле качества субстанции гентамицина сульфата для идентификации и количественного определения компонентного состава применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), в котором идентификацию осуществляют косвенно, путем сравнения со стандартным образцом; количественное определение проводят путем калибровки с использованием стандартного образца.

Цель работы: разработать методику идентификации и количественного определения компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ЯМР-спектроскопии без использования стандартных образцов.

Материалы и методы: в качестве объекта исследования использовали образец фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат». Регистрацию спектров проводили на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 NMR System 600. Хроматограммы получены на жидкостном хроматографе Agilent 1200 MWD.

Результаты: определены спектральные характеристики сульфатов гентамицинов C_1 , C_{1A} , C_2 , C_{2A} , C_{2B} , входящих в состав фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат». Для каждого из сульфатов гентамицинов выделены однотипные характеристические сигналы, не перекрывающиеся с другими сигналами в спектре ^1H или ^{13}C . Данные сигналы являются спектральными маркерами наличия анализируемых гентамицинов в образце, а их нормализованные интегральные интенсивности равны мольной доле каждого из гентамицинов. Проведено сравнение результатов количественного определения компонентного состава субстанции «Гентамицина сульфат», полученных методами ЯМР-спектроскопии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Выводы: разработана методика идентификации и количественного определения компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии. Показано, что разработанная методика менее трудозатратна, чем методика с применением ВЭЖХ, и не требует использования стандартных образцов как для подтверждения подлинности, так и при количественных измерениях.

Ключевые слова: гентамицина сульфат; ЯМР-спектроскопия; нормализованная интегральная интенсивность; мольная доля; фармакопея; подлинность; контроль качества

Для цитирования: Моисеев С.В., Кузьмина Н.Е., Северинова Е.Ю., Симонова Е.П., Косенко В.В. Идентификация и количественное определение компонентного состава фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2-1):283–291. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-2-1-283-291>

S.V. Moiseev 
N.E. Kuz'mina 
E.Yu. Severinova 
E.P. Simonova 
V.V. Kosenko 

Identification and Quantification of the Component Composition of the Active Substance Gentamicin Sulfate by ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopy

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ **Sergey V. Moiseev;** MoiseevSV@expmed.ru

ABSTRACT

Gentamicin sulfate is a broad-spectrum bactericidal aminoglycoside antibiotic produced by *Micromonospora purpurea* and used in clinical practice as an active substance containing a mixture of gentamicins C_1 and C_2 . Gentamicin content is a standardised parameter controlled as part of a pharmaceutical product review. Currently, the quality control of the active substance gentamicin sulfate involves the use of high-performance liquid chromatography (HPLC) for the indirect identification of the component composition by comparison with a reference standard and for its quantification by calibration against the reference standard.

The aim of the study was to develop a procedure for identifying and quantifying the components of the active substance gentamicin sulfate using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy that would not require reference standards.

Materials and methods. The authors studied a sample of the active substance gentamicin sulfate using an Agilent DD2 NMR spectrometer operating at 600 MHz to record NMR spectra and an Agilent 1200 HPLC system equipped with a multiple wavelength detector (MWD) to obtain chromatograms.

Results. Having determined the spectral properties of the C_1 , C_{1A} , C_2 , C_{2A} and C_{2B} gentamicins comprising the active substance, the authors observed characteristic signals of the same type that corresponded to each of the gentamicins and did not overlap with other signals in the ^1H and ^{13}C spectra. These characteristic signals provided spectral markers indicative of the gentamicins of interest in the sample, with normalised integrated intensities equal to the mole fractions of the analytes. The authors compared NMR and HPLC measurements of the active substance composition.

Conclusions. The authors developed a procedure for identifying and quantifying the constituents of the active substance gentamicin sulfate by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, which requires less effort than HPLC procedures and no reference standards for the intended applications.

Key words: gentamicin sulfate; NMR spectroscopy; normalised integrated intensity; mole fraction; pharmacopoeia; identification; quality control

For citation: Moiseev S.V., Kuz'mina N.E., Severinova E.Yu., Simonova E.P., Kosenko V.V. Identification and quantification of the component composition of the active substance gentamicin sulfate by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2-1):283–291. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-2-1-283-291>

Введение

Гентамицина сульфат — бактерицидный антибиотик широкого спектра действия из группы аминогликозидов, продуцируемый *Micromonospora*

purpurea. Он подавляет бактериальный синтез белка, высокоактивен по отношению к аэробным грамотрицательным бактериям и применяется для лечения различных инфекционно-

воспалительных заболеваний, таких как холецистит, пневмония, фурункулез, конъюнктивит и др. [1–3].

В медицинской практике используется фармацевтическая субстанция «Гентамицина сульфат», представляющая собой смесь гентамицинов групп C_1 и C_2 (рис. 1), содержание которых строго нормировано и контролируется при проведении фармацевтической экспертизы. В отечественной и Европейской фармакопеях установлены следующие нормы содержания гентамицинов¹: для гентамицина C_1 от 25,0 до 45,0%, для гентамицина C_{1A} от 10,0 до 30,0% и для суммы гентамицинов C_2 , C_{2A} и C_{2B} от 35,0 до 55,0%. Фармакопея США² устанавливает несколько иные нормы: для гентамицина C_{1A} — от 10,0 до 35,0%, для суммы гентамицинов C_2 и C_{2A} — от 25,0 до 55,0%, а для суммы гентамицинов C_1 и C_{2B} — от 25,0 до 50,0%.

В настоящее время при контроле качества субстанции гентамицина сульфата для идентификации и количественного определения компонентного состава применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)³, с помощью которого идентификацию осуществляют косвенно, путем сравнения времен выхода компонентов субстанции на хроматограмме со временами выхода соответствующих стандартных образцов (СО); количественное определение проводят путем калибровки с использованием СО компонентов субстанции.

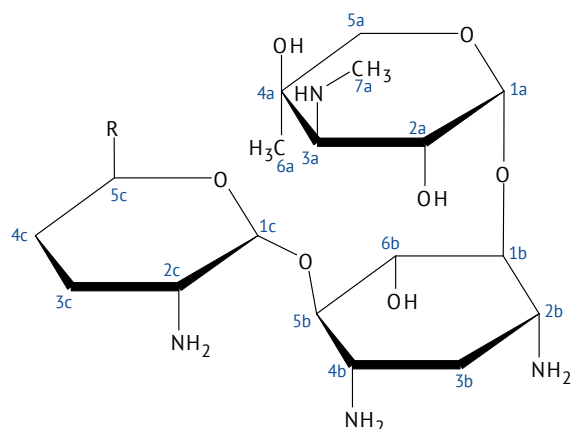
Использование метода ЯМР-спектроскопии позволяет подтверждать наличие и количественное

содержание каждого вида гентамицина, входящего в состав субстанции, напрямую, без установления градуировочной функции с использованием СО. При этом заметно снижается неопределенность результата измерения, так как из суммарной неопределенности исключаются неопределенность измерения навесок образца и объемов растворителя при приготовлении испытуемых и стандартных растворов.

Цель работы — разработка методики идентификации и количественного определения компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ЯМР-спектроскопии без использования стандартных образцов.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали образец фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» («Янтай Джуставаре Фармасьютикал Ко., Лтд», Китай). Регистрацию спектров раствора 12,5 мг гентамицина сульфата в 0,5 мл оксида дейтерия (D_2O , Cambridge Isotope Laboratories, США) проводили на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 NMR System 600 с 5-мм мультядерным датчиком, оснащенным градиентной катушкой, используя программное обеспечение VNMRJ, версия 4.2. Параметры 1D-экспериментов: температура — 27 °С, ширина спектра — 5733,9 Гц (1H) и 37878,8 Гц (^{13}C), угол поворота намагниченности — 45°, время релаксации — 5 с (1H) и 1 с (^{13}C), количество накоплений спада свободной индукции — 8 (1H)



$R=CH(CH_3)NHCH_3$ — гентамицин C_1 / *gentamicin* C_1

$R=CH_2NH_2$ — гентамицин C_{1A} / *gentamicin* C_{1A}

$R=(R)-CH(CH_3)NH_2$ — гентамицин C_2 / *gentamicin* C_2

$R=(S)-CH(CH_3)NH_2$ — гентамицин C_{2A} / *gentamicin* C_{2A}

$R=CH_2NHCH_3$ — гентамицин C_{2B} / *gentamicin* C_{2B}

Рис. 1. Структурная формула компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат»

Fig. 1. Structural formula of gentamicin sulfate active substance components

¹ Monograph 07/2012:0331 Gentamicin sulfate. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.

ФС.2.1.0082.18 Гентамицина сульфат. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. III. М.; 2018.

² Monograph Gentamicin sulfate. United States Pharmacopoeia. USP43–NF38 Rockville, MD: USP; 2020.

³ ФС.2.1.0082.18 Гентамицина сульфат. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. III. М.; 2018.

Monograph 07/2012:0331 Gentamicin sulfate. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2022.

Monograph Gentamicin sulfate. United States Pharmacopoeia. USP43–NF38 Rockville, MD: USP; 2020.

и 16000 (^{13}C), число точек аналого-цифрового преобразования — 64к, экспоненциальное умножение — 0,3 Гц (^1H) и 2 Гц (^{13}C), дополнение нулями 64К, автоматическая коррекция базовой линии спектра, ручная настройка фазы, калибровка шкалы химических сдвигов (δ) под сигнал триметилсилильной группы внутреннего стандарта — тетрадегтерированного 3-(триметилсилил)-пропионата натрия (Cambridge Isotope Laboratories, США), $\delta=0,00$ м.д. (^1H , ^{13}C). Цифровое разрешение на ядре ^1H 0,09 Гц, соотношение S/N 300 (^1H) и 20 (^{13}C) для минорного компонента $\text{C}_{2\text{B}}$. При определении молярных долей интегральные интенсивности измеряли в пяти повторностях. Результаты измерений усредняли. Расчет массовых долей проводили по формуле⁴:

$$X_{i, \text{масс}} = \frac{M_i \times S'_i}{\sum_{j=1}^{j=n} M_j \times S'_j}, \quad (1)$$

где M_i — молекулярная масса гентамицина сульфата, S'_i — нормированное значение интегральной интенсивности сигнала.

Регистрацию двумерных спектров ^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C gHSQC, ^1H - ^{13}C gHMBC проводили с применением стандартных параметров⁵.

Определение компонентного состава гентамицина сульфата методом ВЭЖХ проводили на хроматографе Agilent 1200 MWD (программное обеспечение ChemStation). Условия хроматографирования: колонка Nucleosil 120-3 C18, 3 мкм, 125×4,6 мм; скорость потока — 1 мл/мин; детектор — УФ, 330 нм; объем вводимой пробы — 5 мкл; температура колонки — 25 °С. Подвижная фаза: 5,5 г натрия гептансульфоната (Sigma-Aldrich, кат. № H2766), растворенного в смеси 50 мл уксусной кислоты ледяной (PanReas AppliChem, кат. № 131008), 250 мл воды деионизованной, очищенной на установке Milli-Q Integral 3 (Millipore), и 700 мл метанола, (ООО «ТД Химмед», кат. № КА-ВО499080).

Дериватизацию гентамицинов проводили путем нагревания в течение 15 мин при температуре 60 °С 25 мл раствора, содержащего 10 мл 50% водного раствора испытуемого образца гентамицинов, 5 мл метанола, 4 мл реактива фталевого альдегида, с последующим охлаждением до комнатной температуры. Реактив фталевого

альдегида представляет собой 100 мл раствора (pH = 10,4), содержащего 1 г фталевого альдегида (Sigma-Aldrich, кат. № P1378), 5 мл метанола, 95 мл раствора 2,5% раствора борной кислоты (99,7%, Merck, кат. № 100165), 2 мл кислоты меркаптоуксусной (99,9%, Sigma-Aldrich, кат. № 528056). При определении массовых долей гентамицинов готовили 2 испытуемых раствора, измерение площадей пиков для каждого испытуемого раствора проводили в двух повторностях.

Статистическую обработку результатов, полученных методами ЯМР и ВЭЖХ, осуществляли с помощью программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Возможность идентификации и количественного определения компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ЯМР-спектроскопии ранее рассматривалась в литературе [1, 4]. В работе [1] было показано, что в ^1H ЯМР-спектрах сигналы различных гентамицинов перекрываются между собой, поэтому авторы поставили под сомнение возможность получения корректного результата для количественного определения компонентного состава методом ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и предложили использовать ядра ^{13}C . Следует отметить, что выбранные авторами [1] для количественных измерений изолированные сигналы в спектре ^{13}C ЯМР принадлежат к различным (неоднотипным) углеводородным фрагментам. Известно, что интенсивность сигналов ^{13}C , полученных с развязкой от протонов, зависит не только от концентрации вещества, но и от числа водородных заместителей при углеродном атоме. Это связано с тем, что атомы углерода, связанные с различным числом протонов, имеют разный коэффициент усиления сигнала вследствие ядерного эффекта Оверхаузера⁶. Кроме того, авторы [1] проигнорировали правило прецизионного интегрирования [5], согласно которому при проведении количественных измерений методом ЯМР время задержки между импульсными последовательностями должно составлять не менее пятикратного значения времен продольной спин-решеточной релаксации (T_1). Экспериментально измеренные значения T_1 ядер ^{13}C в молекулах гентамицинов находятся в интервале 0,18–0,92 с [1]. Используемое в [1] время задержки

⁴ ОФС.1.2.1.1.0007.15 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV изд. Т. I. М.; 2018.

⁵ COSY — корреляционная спектроскопия (correlation spectroscopy); TOCSY — полная корреляционная спектроскопия (total correlation spectroscopy); HSQC — гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия (heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy); HMBC — гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия (heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy).

⁶ Дероум Э. Современные методы ЯМР для химических исследований. М.: Мир; 1992.

между импульсными последовательностями (0,6 с) существенно меньше требуемого при прецизионных измерениях. Как следствие, предложенная авторами [1] методика количественного определения компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» приводит к некорректным результатам.

В работе [4] основной акцент сделан на идентификацию и хроматографическое разделение гентамицинов комбинацией методов ЯМР-спектроскопии и жидкостной хроматографии (ЖХ). Авторами проведено соотнесение сигналов в спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР с конкретными структурными фрагментами молекул гентамицинов и показана возможность их хроматографического разделения с использованием комбинации ЖХ-ЯМР. В данной работе отсутствует конкретная методика, позволяющая количественно оценить компонентный состав фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат».

В ходе разработки собственной методики количественного определения компонентного состава фармацевтической субстанции «Гентамицина

сульфат» мы уточнили структурное соответствие сигналов спектров ^1H и ^{13}C анализируемых гентамицинов на основе комплексного анализа результатов двумерных ЯМР-экспериментов (^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C gHSQC, ^1H - ^{13}C gHMBC) (табл. 1).

Применение ЯМР-спектрометра с большей рабочей частотой по сравнению с рабочей частотой ЯМР-спектрометра, используемого авторами [1], позволило получить отдельные сигналы, не перекрывающиеся между собой в спектре ^1H ЯМР субстанции «Гентамицина сульфат» (рис. 2а), и выделить для каждого из гентамицинов характеристические сигналы, которые можно использовать как спектральные маркеры их присутствия в анализируемом образце. Нормализованные интегральные интенсивности характеристических сигналов компонентов субстанции «Гентамицина сульфат» равны мольной доле каждого.

Характеристическими сигналами гентамицинов C_1 и C_2 являются сигналы протона аномерной СН-группы пиранозного цикла (1с в соответствии

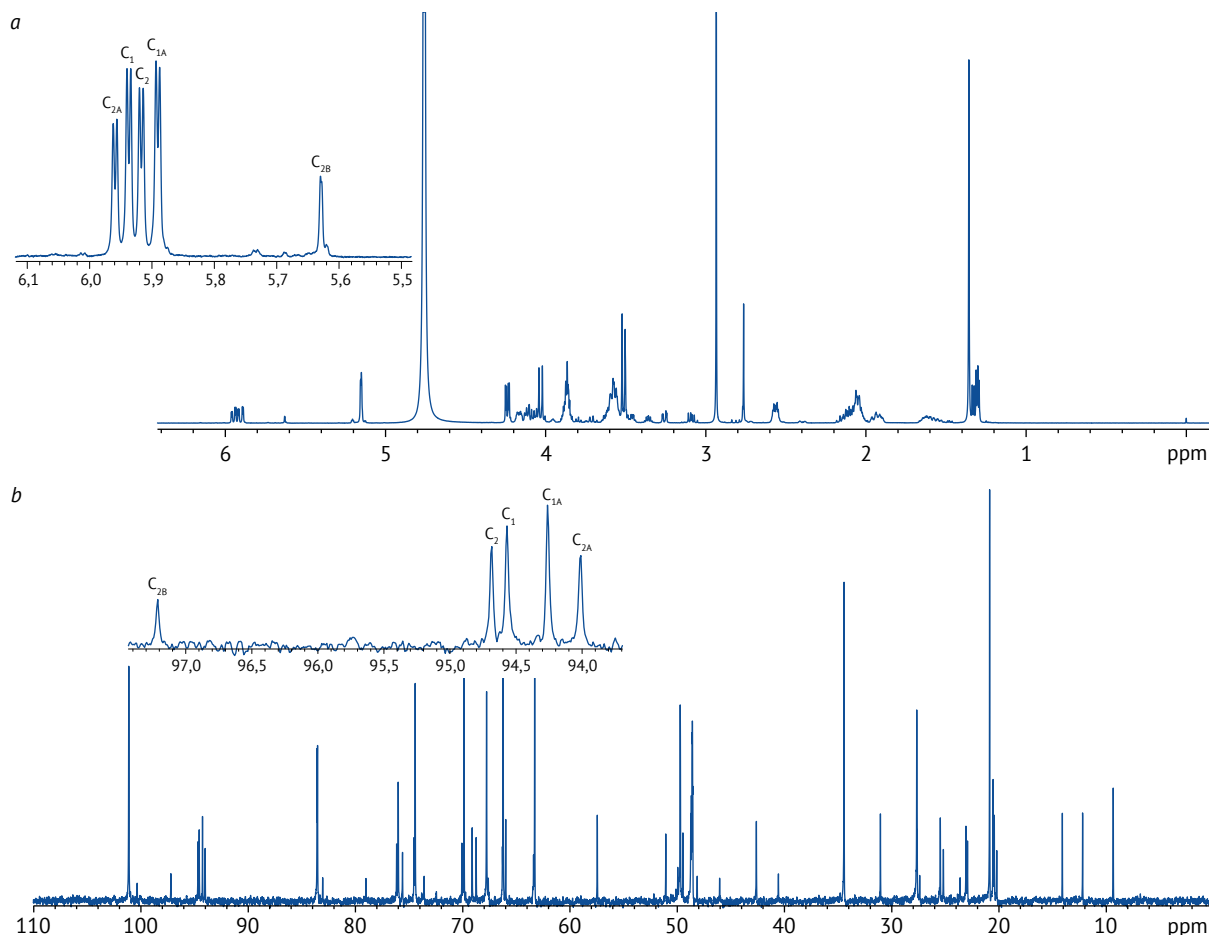


Рис. 2. ЯМР-спектры раствора субстанции «Гентамицина сульфат» с характеристическими сигналами: а – ^1H ЯМР; б – ^{13}C ЯМР

Fig. 2. NMR spectra of a solution of the active substance gentamicin sulfate with characteristic signals: а, ^1H NMR; б, ^{13}C NMR

Таблица 1. Спектральные характеристики гентамицинов C_1 , C_{1A} , C_2 , C_{2A} , C_{2B} Table 1. Spectral characteristics of gentamicins C_1 , C_{1A} , C_2 , C_{2A} , C_{2B}

Позиция атома <i>Atom position</i>	Химический сдвиг, м.д. (J, Гц) <i>Chemical shift, ppm (J, Hz)</i>		Позиция атома <i>Atom position</i>	Химический сдвиг, м.д. (J, Гц) <i>Chemical shift, ppm (J, Hz)</i>	
	¹ H	¹³ C		¹ H	¹³ C
1a	5,15 д/ <i>d</i> (J=3,7) 5,15 д/ <i>d</i> (J=3,7)	101,14	1b	3,88 м/ <i>m</i>	83,54; 83,58
2a	4,24 дд/ <i>dd</i> (J=11,0; 3,7)	66,23	2b	3,58 м/ <i>m</i>	49,72
3a	3,51 м/ <i>m</i>	63,29	3b	2,12 м/ <i>m</i> ; 2,57 м/ <i>m</i>	27,67
4a		69,87	4b	3,57 м/ <i>m</i>	48,59
5a	3,51 д/ <i>d</i> (J=12,8) 4,03 д/ <i>d</i> (J=12,8)	67,77	5b	4,10 м/ <i>m</i>	76,02
6a	1,36 с/ <i>s</i>	20,87	6b	3,86 м/ <i>m</i>	74,43
7a	2,93 с/ <i>s</i>	34,44			
Гентамицин C _{1A} / <i>gentamicin C_{1A}</i> (R=CH ₂ NH ₂)					
1c	5,89 д/ <i>d</i> (J=3,5)	94,26	4c	1,59 м/ <i>m</i> ; 1,96 м/ <i>m</i>	25,47
2c	3,58 м/ <i>m</i>	48,69	5c	4,17 м/ <i>m</i>	65,99
3c	2,06 м/ <i>m</i>	20,55	CH ₂ NH ₂	3,09 м/ <i>m</i> ; 3,26 м/ <i>m</i>	42,62
Гентамицин C ₁ / <i>gentamicin C₁</i> (R=CH(CH ₃)NHCH ₃)					
1c	5,94 д/ <i>d</i> (J=3,7)	94,57	5c	4,17 м/ <i>m</i>	69,11
2c	3,58 м/ <i>m</i>	48,74	CH(CH ₃)NHCH ₃	3,46 дд/ <i>dd</i> (J=6,8; 3,0)	57,45
3c	2,06 м/ <i>m</i>	20,44	CH(CH ₃)NHCH ₃	2,76 с/ <i>s</i>	31,06
4c	1,62 м/ <i>m</i> ; 1,93 м/ <i>m</i>	23,68	CH(CH ₃)NHCH ₃	1,31 д/ <i>d</i> (J=6,8)	9,35
Гентамицин C ₂ / <i>gentamicin C₂</i> (R=(R)-CH(CH ₃)NH ₂ , диастереомеры / <i>diastereomers</i>)					
1c	5,92 д/ <i>d</i> (J=3,6)	94,69	5c	3,88 м/ <i>m</i>	70,08
2c	3,56 м/ <i>m</i>	48,63	CH(CH ₃)NH ₂	3,63 м/ <i>m</i>	49,47
3c	2,06 м/ <i>m</i>	20,55	CH(CH ₃)NH ₂	1,30 д/ <i>d</i> (J=6,8)	12,21
4c	1,62 м/ <i>m</i> ; 1,92 м/ <i>m</i>	22,93			
Гентамицин C _{2A} / <i>gentamicin C_{2A}</i> (R=(S)-CH(CH ₃)NH ₂ , диастереомеры / <i>diastereomers</i>)					
1c	5,96 д/ <i>d</i> (J=3,6)	94,01	5c	4,11 м/ <i>m</i>	68,74
2c	3,56 м/ <i>m</i>	48,55	CH(CH ₃)NH ₂	3,36 м/ <i>m</i>	51,07
3c	2,02 м/ <i>m</i>	20,21	CH(CH ₃)NH ₂	1,33 д/ <i>d</i> (J=6,8)	14,09
4c	2,06 м/ <i>m</i>	25,18			
Гентамицин C _{2B} / <i>gentamicin C_{2B}</i> (R=CH ₂ NHCH ₃)					
1c	5,63 д/ <i>d</i> (J=1,4)	97,21	5c	4,24 м/ <i>m</i>	66,30
2c	3,95 м/ <i>m</i>	46,04	CH ₂ NHCH ₃	3,71 уш.д/ <i>bd</i> (J=12,2)	40,56
3c	2,06 м/ <i>m</i>	20,44	CH ₂ NHCH ₃	2,77 с/ <i>s</i>	31,06
4c	1,62 м/ <i>m</i> ; 1,93 м/ <i>m</i>	23,63			

с нумерацией рис. 1): 5,94 д (гентамицин C_1); 5,89 д (гентамицин C_{1A}); 5,92 д (гентамицин C_2); 5,96 д (гентамицин C_{2A}); 5,63 д (гентамицин C_{2B}).

Сигналы этих же структурных фрагментов являются характеристическими и в спектре ^{13}C (рис. 2b): 94,57 (гентамицин C_1); 94,26 (гентамицин C_{1A}); 94,69 (гентамицин C_2); 94,01 (гентамицин C_{2A});

97,21 (гентамицина C_{2B}). В связи с тем что характеристические сигналы различных гентамицинов в углеродном спектре принадлежат однотипным углеводородным фрагментам, они имеют одинаковый коэффициент усиления вследствие ядерного эффекта Оверхаузера и их корректно интегрировать при определении мольного соотношения компонентов субстанции.

Значения соответствующих нормированных интегральных интенсивностей характеристических сигналов сульфатов гентамицинов в спектрах 1H и ^{13}C близки между собой (рис. 3). Точность измерения содержания гентамицинов методом 1H выше, чем методом ^{13}C : диапазон значений относительного стандартного отклонения (RSD) составляет 0,3–0,5 (1H) и 0,9–2,3% (^{13}C) (табл. 2). Этот результат хорошо согласуется с известным фактом: неопределенность измерений методом ЯМР существенно зависит от соотношения сигнал:шум (S/N) и не превышает 1% при S/N 150:1 [5]. В нашем случае S/N 300 для 1H и 20 для ^{13}C (данные для минор-

ного компонента C_{2B}). Независимо от используемого метода (1H или ^{13}C) точность проведенных измерений соответствует фармакопейным требованиям к точности измерений методом ЯМР: RSD не более 1% для действующего вещества субстанции, не более 3% для составного компонента и не более 25% для примеси анализируемого образца⁷.

Сравнительный анализ статистических характеристик точности измерений методами ЯМР и ВЭЖХ подтверждает более высокую точность прямого метода ЯМР по сравнению с косвенным методом ВЭЖХ (табл. 2). В прямом измерении искомую величину (в случае ЯМР – мольное соотношение компонентов) получают непосредственно от средства измерения. При косвенных измерениях значение содержания вещества в испытуемом образце находят на основании результатов других измерений (в случае ВЭЖХ – содержания вещества в СО, связанных с искомой величиной градуировочной функцией).

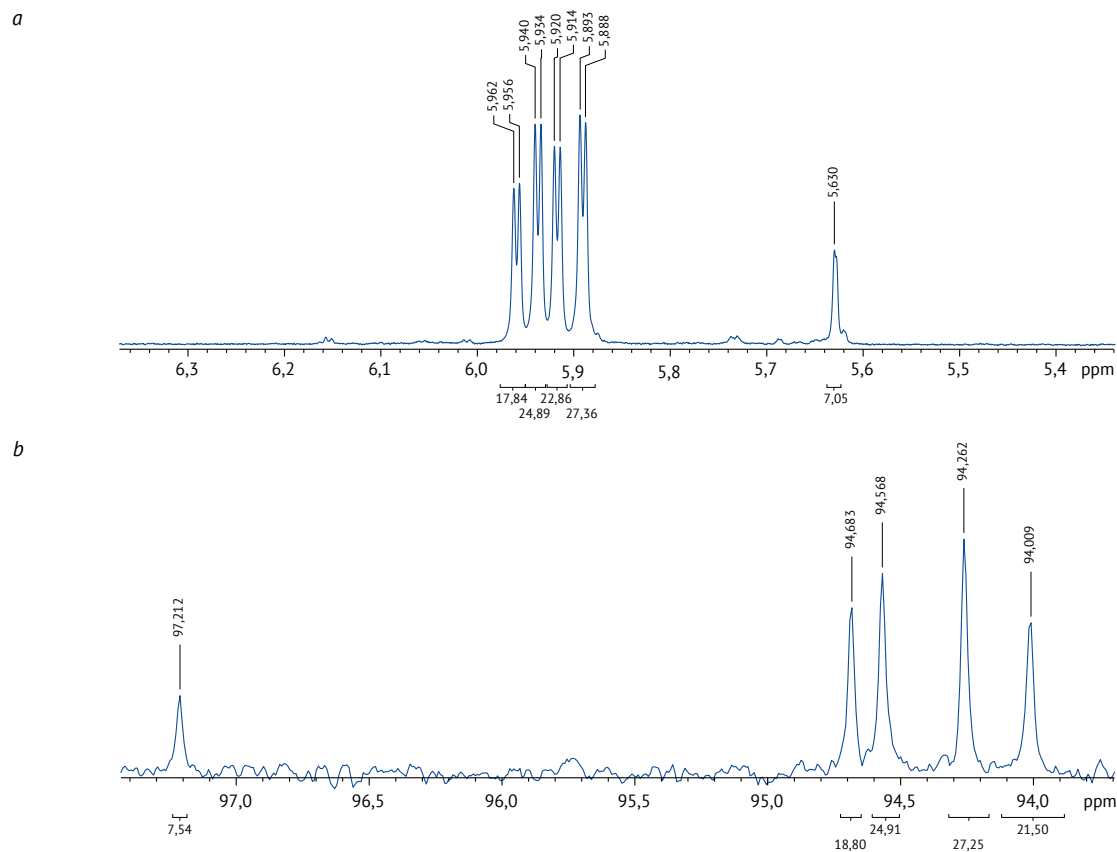


Рис. 3. Фрагмент ЯМР-спектров раствора субстанции «Гентамицина сульфат» с интегральными интенсивностями характеристических сигналов: а – 1H ЯМР; б – ^{13}C ЯМР

Fig. 3. Fragments of the 1H NMR spectra of a solution of the active substance gentamicin sulfate with integrated intensities of characteristic signals: a, 1H NMR; b, ^{13}C NMR

⁷ General monograph <761> Nuclear magnetic resonance spectroscopy. United States Pharmacopeia. USP43–NF38 Rockville, MD: USP; 2020.

Таблица 2. Результаты количественных измерений содержания сульфатов гентамицинов в фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ЯМР и ВЭЖХ**Table 2.** Results of NMR and HPLC gentamicin content measurements for the active substance gentamicin sulfate

Компоненты фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» <i>Gentamicin sulfate active substance components</i>	Метод ^1H ЯМР ^1H NMR			Метод ^{13}C ЯМР ^{13}C NMR			Метод ВЭЖХ HPLC	
	мольн.% <i>molar%</i>	мас.% <i>mass%</i>	среднее мас. <i>mean mass</i> (RSD, %)	мольн.% <i>molar%</i>	мас.% <i>mass%</i>	среднее мас. <i>mean mass</i> (RSD, %)	мас.% <i>mass%</i>	среднее мас. <i>mean mass</i> (RSD, %)
Гентамицина сульфат C_1 <i>Gentamicin sulfate C_1</i>	24,89	25,53	25,7±0,1 (0,5)	24,91	25,54	26,0±0,5 (1,7)	24,27	25,0±0,9 (2,3)
	25,19	25,83		25,65	26,30		24,92	
	24,95	25,59		24,82	25,46		25,45	
	25,01	25,65		25,39	26,04		25,49	
	25,09	25,73		25,78	26,43		–	
Гентамицина сульфат C_{1A} <i>Gentamicin sulfate C_{1A}</i>	27,36	26,69	26,6±0,1 (0,3)	27,25	25,59	26,0±0,4 (1,2)	26,37	27,1±1,3 (3,0)
	27,13	26,45		26,87	26,21		26,53	
	27,30	26,63		26,96	26,30		27,88	
	27,30	26,63		26,85	26,19		27,78	
	27,29	26,62		26,48	25,83		–	
Гентамицина сульфат C_2 <i>Gentamicin sulfate C_2</i>	22,86	22,87	22,8±0,1 (0,4)	21,50	21,51	21,1±0,5 (1,8)	22,96	22,0±1,3 (3,6)
	22,70	22,71		20,80	20,81		22,34	
	22,95	22,96		21,37	21,38		21,35	
	22,84	22,85		21,07	21,07		21,33	
	22,80	22,81		20,63	20,63		–	
Гентамицина сульфат C_{2A} <i>Gentamicin sulfate C_{2A}</i>	17,84	17,85	17,8±0,1 (0,5)	18,80	18,81	18,9±0,2 (0,9)	–	–
	17,94	17,94		18,68	18,69			
	17,72	17,72		19,02	19,03			
	17,84	17,85		18,83	18,84			
	17,77	17,78		19,12	19,12			
Гентамицина сульфат C_{2B} <i>Gentamicin sulfate C_{2B}</i>	7,05	7,05	7,0±0,1 (0,4)	7,54	7,54	7,8±0,2 (2,3)	–	–
	7,04	7,04		7,99	7,99			
	7,08	7,08		7,83	7,83			
	7,01	7,01		7,85	7,85			
	7,05	7,05		7,98	7,98			
Гентамицина сульфат $\text{C}_{2A} + \text{C}_{2B}$ <i>Gentamicin sulfates $\text{C}_{2A} + \text{C}_{2B}$</i>	–	–	24,8	–	–	26,7	24,99	24,4±0,96 (2,5)
							24,78	
							23,81	
							23,89	

Примечание. «–» – данные отсутствуют; RSD – относительное стандартное отклонение; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

Note. –, no data; RSD, relative standard deviation; HPLC, high-performance liquid chromatography.

Заключение

Разработана методика идентификации и количественного определения компонентов фармацевтической субстанции «Гентамицина сульфат» методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии. По сравнению с фармакопейной методикой, основанной на методе ВЭЖХ, она не предусматривает использования

СО и характеризуется более высокой точностью, так как в ней отсутствуют стадии приготовления растворов СО всех компонентов субстанции с точным взятием навесок образцов, объемов растворителя и построения калибровочной функции, которые вносят свой вклад в суммарную неопределенность результатов измерений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Busson R, Claes PJ, Vanderhaeghe H. Determination of the composition of gentamicin sulfates by ^1H and ^{13}C nuclear magnetic spectroscopy. *J Assoc Off Anal Chem.* 1986;69(4):601–8. PMID: 3745084
2. Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi JD. Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J.* 1998;17(22):6437–48. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6437>
3. Beale JM, Block JH, eds. *Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry.* 12th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams and Wilkins; 2011.
4. Deubner R, Schollmayer C, Wienen F, Holzgrabe U. Assignment of the major and minor components of gentamicin for evaluation of batches. *Magn Reson Chem.* 2003;41(8):589–98. <https://doi.org/10.1002/mrc.1222>
5. Malz F, Jancke H. Validation of quantitative NMR. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;38(5):813–23. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.043>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: С.В. Моисеев — идея, подбор и анализ литературы, проведение экспериментальных исследований методом ЯМР, анализ, систематизация и обобщение экспериментальных данных, интерпретация результатов исследования, написание и оформление рукописи; Н.Е. Кузьмина — идея, планирование исследования, анализ, систематизация и обобщение экспериментальных данных, интерпретация результатов исследования, редактирование текста рукописи; Е.Ю. Северинова — пробоподготовка образцов, подбор и анализ литературы; Е.П. Симонова — проведение экспериментальных исследований методом жидкостной хроматографии; В.В. Косенко — ответственность за все аспекты работы, включая надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с достоверностью данных и целостностью всех частей статьи, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022400083-1).

Конфликт интересов. В.В. Косенко — главный редактор, Н.Е. Кузьмина — член редакционной коллегии журнала «Ведомости НЦЭСМП. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Sergey V. Moiseev elaborated the study idea; selected and analysed literature; conducted NMR experiments; analysed, systematised, and summarised experimental data; interpreted the study results; drafted and formatted the manuscript. Natalia E. Kuz'mina elaborated the study idea; planned the study; analysed, systematised, and summarised experimental data; interpreted the study results; and edited the manuscript. Elena Yu. Severinova prepared the samples, selected and analysed literature. Elena P. Simonova conducted liquid chromatography experiments. Valentina V. Kosenko agreed to be accountable for all aspects of the work, including ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any of its parts are appropriately investigated and resolved; and approved the final version of the article.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400083-1).

Conflict of interest. Valentina V. Kosenko is the Editor-in-Chief and Natalia E. Kuz'mina is a member of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Моисеев Сергей Владимирович, канд. хим. наук, доцент
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1310-4477>
MoiseevSV@expmed.ru

Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9133-0835>
KuzminaN@expmed.ru

Северинова Елена Юрьевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5695-8048>
Severinova@expmed.ru

Симонова Елена Павловна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>
Simonovae@expmed.ru

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
kosenko@expmed.ru

Sergey V. Moiseev, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1310-4477>
MoiseevSV@expmed.ru

Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9133-0835>
KuzminaN@expmed.ru

Elena Yu. Severinova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5695-8048>
Severinova@expmed.ru

Elena P. Simonova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>
Simonovae@expmed.ru

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
kosenko@expmed.ru

Поступила 16.01.2023

После доработки 13.02.2023

Принята к публикации 07.03.2023

Received 16 January 2023

Revised 13 February 2023

Accepted 7 March 2023