

УДК 615.31:547.294.061:543.429.23

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ИКС И ЯМР ^1H АНАЛИЗА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ НОВОГО
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА ПРОИЗВОДНОГО ГАМК:
4-АМИНО-3-(ПИРИДИЛ-3)-БУТАНОВОЙ КИСЛОТЫ ДИГИДРОХЛОРИДА**

© 2013 **Беликов В.Г.**, **Боровский Б.В.**, **Ларский М.В.**

boryusikxxl@rambler.ru

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России,
г. Пятигорск

На основании измеренных ИК и ЯМР ^1H спектрах субстанции 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты дигидрохлорида, проведена интерпретация полос поглощения и установлены структурные фрагменты анализируемого соединения. Полученные результаты позволили рекомендовать эти методы исследования для использования в фармацевтическом анализе как субстанции, так и лекарственного препарата, для установления структуры и идентификации исследуемого вещества.

Ключевые слова: производные гамма-аминомасляной кислоты, инфракрасный спектр, ЯМР ^1H анализ, идентификация, пиридиновое кольцо, первичная аминогруппа, карбоксильная группа.

Введение

Одним из перспективных путей создания новых лекарственных препаратов остается принцип модификации структуры эндогенных физиологически активных соединений, в том числе и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК).

С этой целью сотрудниками кафедры органической химии Российского государственного педагогического университета имени А.И. Герцена (г. Санкт-Петербург) было синтезировано новое гетероциклическое производное ГАМК: 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты дигидрохлорида. Учёными Волгоградского государственного медицинского университета проведены доклинические исследования, которые показали, что данное химическое соединение обладает кардиопротекторным и анксиоседативным действием, а также ноотропной и нейропротекторной активностью [5].

По мере развития фармации предъявляются все более высокие требования к обеспечению качества и безопасности лекарственных средств. В связи с этим возникает необходимость использования в фармацевтическом анализе методов исследования позволяющих достигать максимальной специфичности и достоверности результатов. Поэтому в проекты нормативной документации, как на фармацевтические субстанции, так и на лекарственные препараты все шире вводятся требования использования ИК спектрометрии и ЯМР ^1H анализа.

Целью настоящей работы явилось выявление возможности применения ИКС и ЯМР ^1H для идентификации 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты дигидрохлорида.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись перекристаллизованные и хроматографически очищенные образцы субстанций 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты дигидрохлорида и стандартные образцы исследуемого вещества, предоставленные разработчиками.

Экспериментальную работу проводили на ИК спектрофотометре Varian Excalibur 3100 FT-IR (Япония). Образцы для записи спектров готовили методом прямого прессования с оптически чистым калия бромидом, измеряли спектры в режиме пошагового сканирования в диапазоне $3800\text{--}600\text{ см}^{-1}$ [2]. Определение проводили в шестикратной повторности, при этом каждый раз готовили новый образец. На рисунке 1 приведены ИК спектры поглощения 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты дигидрохлорида стандартного и исследуемого образца.

Экспериментальную работу по определению ЯМР спектров исследуемого вещества проводили на Spectrometer JNM-ECX400A. Навеску стандартного и анализируемого вещества 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты дигидрохлорида, массой 70 мг, растворяли в 0,7 мл дейтерированного диметилсульфоксида (DMSO-d_6). Регистрацию спектров ЯМР ^1H проводили при рабочей частоте 400 МГц в диапазоне от $\delta=0,00$ до $\delta=9,00$ м.д. В качестве внутреннего стандарта измерений использовали тетраметилсилан. Полученные спектры ЯМР ^1H анализируемого вещества представлены на рисунке 2: а–стандартного и б–исследуемого образца.

Результаты и их обсуждение

Спектральные кривые ИК-спектров поглощения (рис. 1) позволили составить таблицу отнесения полос поглощения к функциональным группам для подтверждения структуры.

По результатам изучения спектров была составлена таблица 1 отнесения полос поглощения к некоторым структурным фрагментам анализируемой молекулы.

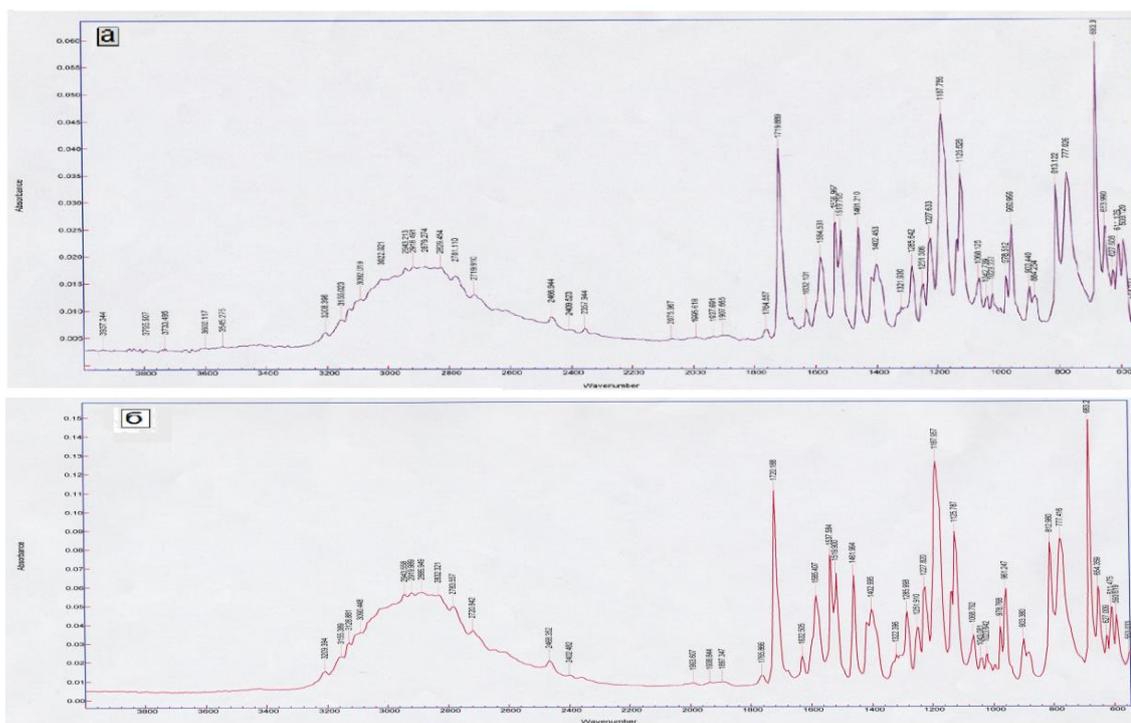


Рисунок 1 – ИК-спектры гидрохлорида 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты дигидрохлорида в таблетках калия бромида: а – стандартного и б – исследуемого образца.

Таблица 1 – Отнесение полос поглощения к структурным фрагментам молекул

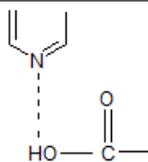
Положение полосы, см ⁻¹	Отнесение
3209 – 2404 ш.с.	ν ($[-\text{NH}_3]^+$)
2943 с.	ν (C – H пиридинового кольца)
1720 оч.с.	ν (C=O в группе COOH)
1632 сл.	$\beta_{\text{as}}(\text{NH}_3)$; $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1585 с.	γ пиридиновое кольцо
1537 ср.	γ пиридиновое кольцо
1462 ср.	β – ножничные C – H (CH_2); $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
1187 оч.с.	γ (O – H в группе COOH)
1125 ср.	ν (C – O в группе COOH)
813 ср.	δ ($[-\text{NH}_3]^+$)
777 ср.	γ (C – H - цикл)

Примечание: ν – симметричные валентные, γ – внеплоскостные деформационные, β – плоскостные деформационные, δ – деформационные колебания; полосы: ш. с. – широкая сильная, оч. с. – очень сильная, с. – сильная, ср. – средняя, сл. – слабая.

Полученные данные целесообразно рассмотреть для каждой спектральной области.

1. Область 4000 – 2000 см⁻¹.

При рассмотрении данной спектральной области идентифицируются асимметричные и симметричные валентные колебания первичной алифатической аминогруппы анализируемого вещества. Наблюдение этих полос сильно затруднено из-за наложения полос поглощения C–H– связей пиридинового цикла. При рассмотрении области валентных колебаний первичной алифатической аминогруппы исследуемого вещества нами была обнаружена широкая полоса поглощения с рядом максимумов на ней. В области 2404–3209 см⁻¹ она была отнесена к валентным колебаниям ν ($[-\text{NH}_3]^+$), в то время как деформационные колебания проявляются в виде средней полосы в области 813 см⁻¹. Одной из особенностей ИК спектров пиридинкарбоновых кислот является наличие полосы поглощения в области 2468 см⁻¹, которая обусловлена, вероятно, возникновением димеров за счет образования водородной связи между азотом пиридинового ядра и карбоксильной группой [1]. Для рассматриваемого гетероциклического производного ГАМК можно предположить следующую структуру:



Таким образом, изучение области ИК спектра $4000\text{--}2000\text{ см}^{-1}$ позволяет получить важную и специфическую информацию о валентных колебаниях связей типа NH_3 ; CH , а также о наличии внутри- и межмолекулярного взаимодействия.

2. Область $2000\text{--}600\text{ см}^{-1}$.

Анализируемая область содержит большое число полос поглощения, интерпретация которых имеет значение для структурных исследований.

Главной задачей является расшифровка деформационных колебаний иона NH_3^+ . Нами были отмечены асимметричные деформационные колебания NH_3^+ в области 1632 см^{-1} . Интенсивная полоса при 1720 см^{-1} принадлежит карбоксильной группе $\nu\text{ COOH}$. В этой области также отмечаются плоскостные колебания скелета пиридинового цикла при $1537\text{--}1585\text{ см}^{-1}$. Полоса, лежащая в области 1462 см^{-1} , соответствует ножничным колебаниям метиленовых групп. Верные, крутильные и маятниковые колебания метиленовых групп мало интенсивны. В спектре наблюдается две средние полосы при 777 см^{-1} относящейся к δNH_3 и 813 см^{-1} , которая принадлежит неплоским деформационным колебаниям двух смежных атомов водорода пиридинового кольца.

Основной задачей является расшифровка полос поглощения одинарной связи --C=N= . В литературе имеются различные сведения об этой полосе поглощения. Например, К. Наканиси считает, что эта полоса поглощения расположена в области $1250\text{--}1360\text{ см}^{-1}$ [3]. Дайер Дж. отмечает, что связь --C=N= может иметь значение частоты при $1060\text{--}1140\text{ см}^{-1}$ [4]. В ИК спектре гетероциклического производного ГАМК полосы валентных колебаний --C=N= предположительно лежат в области $1252\text{--}1286\text{ см}^{-1}$. Кроме того, скелетные колебания в $2000\text{--}600\text{ см}^{-1}$ отчетливы, что свидетельствуют о том, что молекула анализируемого вещества находится в упорядоченном кристаллическом порядке.

Полученные ЯМР ^1H спектры (рис. 2а,б) позволили идентифицировать 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты по структуре вещества.

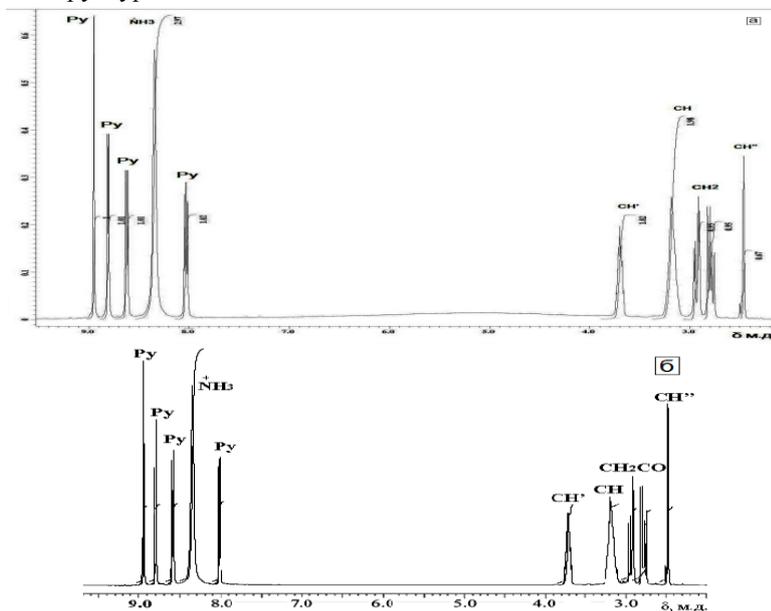


Рисунок 2 – ЯМР ^1H -спектры 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты в DMCO-d_6 : а – стандартного и б – исследуемого образца.

Важнейшей характеристикой спектра ЯМР ^1H является химический сдвиг (δ), который зависит от структуры молекулы. Электронная плотность протонов в молекулах определяется характером химической связи и индукционными эффектами окружающих групп, вследствие чего экранирование протонов становится различным и их сигналы проявляются в разных областях спектра [6]. Результаты отнесения полос к водородсодержащим функциональным группам молекул исследуемого вещества представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты анализа спектров ЯМР¹H анализа 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты дигидрохлорида

Вещество	Группа атомов	δ, м.д	Отнесение сигналов
4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты	-CH-	8,93 т	протон пиридиния
	-CH-	8,87 т	протон пиридиния
	-CH-	8,65 т	протон пиридиния
	-CH-	8,10 т	протон пиридиния
	-NH ₃	8,35 с	протон аминогруппы
	-H-	3,76 с	при -NH ₃
	-OH-	2,98 д	при COOH
	-CH-	3,10 к	метиновый протон
	-OH-	2,82 д	при COOH
	—	2,55	ДМСО-d ₆
—	3,20	молекула воды	

Обозначения: т – триплет, с – синглет, д – дублет, к – квартет.

Из таблицы 2 следует, что пики находящиеся в слабополюной области спектров ЯМР¹H наблюдаются сигналы ароматических четырех протонов пиридинового цикла в виде триплета, пик при δ=8,35 м.д. принадлежит протонированной аминогруппе и наблюдается в виде синглета. В сильнополюной области наблюдаются пики, соответствующие метиленовым протонам при карбоксильной группе (δ=2,98 м.д.) в виде дублета и протонированной аминогруппе (δ= 3,76 м.д.) в виде синглета.

Выводы

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что в ИК спектрах исследуемого вещества наблюдаются специфичные полосы в областях 3300–2500 см⁻¹, 1718 см⁻¹, соответствующие: γ_{ас}NH₃⁺ и γCOOH, что указывает на целесообразность использования ИКС для идентификации исследуемого вещества в субстанции по указанным полосам поглощения. В результате проведенного ЯМР¹H анализа была также подтверждена структура исследуемого и стандартного вещества, определены специфические пики, с помощью которых можно провести идентификацию 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты.

Показана возможность применения ИК и ЯМР спектроскопии для подтверждения подлинности 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты. Изучены ИК и ЯМР спектры нового биологически активного производного гидрохлорид 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты, дана интерпретация полос поглощения и пиков.

Литература

1. Смит А. Прикладная ИК – спектроскопия. – М.: Мир, 1982. – С.164- 292.
2. Государственная фармакопея РФ: Методы анализа (ОФС) / Минздравсоцразвития. – 12-е изд., доп. – М.: Медицина, 2008. – Вып. 1. – С.62-65.
3. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений: пер. с англ. / под ред. А.А. Мальцева. -3-е рус. изд.- М.: Мир, 1985.- 352с.
4. Дайер Д. Приложение абсорбционной спектроскопии органических соединений: пер. с англ. / Д. Дайер 2-е рус. изд.- М.: Химия, 1970.- 164с.
5. Перфилова В.Н. Кардиопротекторные свойства структурных аналогов ГАМК: дис. ...д-ра. биол. наук. - Волгоград, 2009.-348с.
6. Карташов В.С. Идентификация методом ЯМР¹H ароматических, алифатических карбоновых кислот и их производных с использованием персонального компьютера // Фармация. -1996. – Т 45, №4. - С.35–37.

Беликов Владимир Георгиевич – доктор фармацевтических наук, профессор.

Боровский Борис Владимирович – кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры физической и коллоидной химии Пятигорского медико-фармацевтического института - филиала ВолгГМУ. E-mail: boryusikxxl@rambler.ru.

Ларский Михаил Владимирович – кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры ФТВ, гигиены и экологии Пятигорского медико-фармацевтического института - филиала ВолгГМУ.