

УДК 615.31:547.294.061:543.429.23

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ИКС И ЯМР  $^1\text{H}$  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  $^1\text{H}$  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  $^1\text{H}$  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  $^1\text{H}$  анализа.

Целью настоящей работы явилось выявление возможности применения ИКС и ЯМР  $^1\text{H}$  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 ( $\text{DMSO-d}_6$ ). Регистрацию спектров ЯМР  $^1\text{H}$  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  $^1\text{H}$  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.

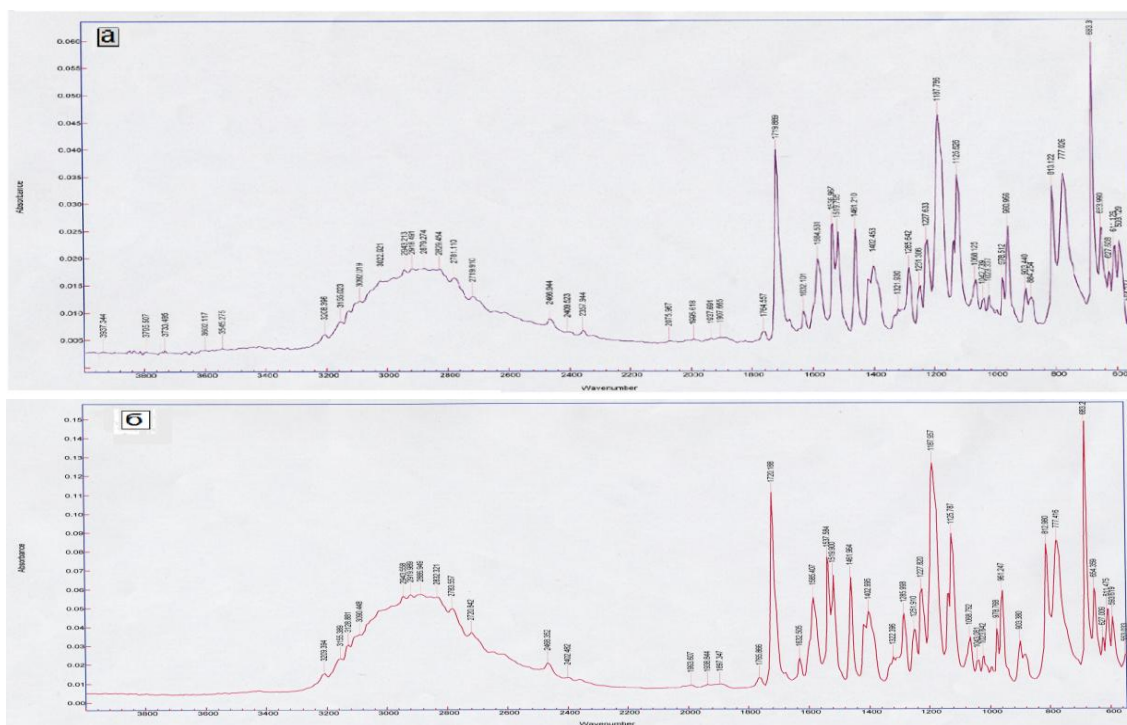


Рисунок 1 – ИК-спектры гидрохлорида 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты дигидрохлорида в таблетках калия бромида: а – стандартного и б – исследуемого образца.

Таблица 1 – Отнесение полос поглощения к структурным фрагментам молекул

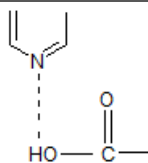
| Положение полосы, см <sup>-1</sup> | Отнесение                                                                   |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 3209 – 2404 ш.с.                   | $\nu$ ( $[-\text{NH}_3]^+$ )                                                |
| 2943 с.                            | $\nu$ (C – H пиридинового кольца)                                           |
| 1720 оч.с.                         | $\nu$ (C=O в группе COOH)                                                   |
| 1632 сл.                           | $\beta_{\text{as}}(\text{NH}_3)$ ; $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$          |
| 1585 с.                            | $\gamma$ пиридиновое кольцо                                                 |
| 1537 ср.                           | $\gamma$ пиридиновое кольцо                                                 |
| 1462 ср.                           | $\beta$ – ножничные C – H ( $\text{CH}_2$ ); $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ |
| 1187 оч.с.                         | $\gamma$ (O – H в группе COOH)                                              |
| 1125 ср.                           | $\nu$ (C – O в группе COOH)                                                 |
| 813 ср.                            | $\delta$ ( $[-\text{NH}_3]^+$ )                                             |
| 777 ср.                            | $\gamma$ (C – H - цикл)                                                     |

Примечание:  $\nu$  – симметричные валентные,  $\gamma$  – внеплоскостные деформационные,  $\beta$  – плоскостные деформационные,  $\delta$  – 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<sup>-1</sup>.

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<sup>-1</sup> она была отнесена к валентным колебаниям  $\nu$  ( $[-\text{NH}_3]^+$ ), в то время как деформационные колебания проявляются в виде средней полосы в области 813 см<sup>-1</sup>. Одной из особенностей ИК спектров пиридинкарбоновых кислот является наличие полосы поглощения в области 2468 см<sup>-1</sup>, 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  $\text{NH}_3$ ;  $\text{CH}$ , 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  $\text{NH}_3^+$ . Нами были отмечены асимметричные деформационные колебания  $\text{NH}_3^+$  в области  $1632\text{ см}^{-1}$ . Интенсивная полоса при  $1720\text{ см}^{-1}$  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  $1462\text{ см}^{-1}$ , соответствует ножничным колебаниям метиленовых групп. Веерные, крутильные и маятниковые колебания метиленовых групп мало интенсивны. В спектре наблюдается две средние полосы при  $777\text{ см}^{-1}$  относящейся к  $\delta\text{NH}_3$  и  $813\text{ см}^{-1}$ , которая принадлежит неплоским деформационным колебаниям двух смежных атомов водорода пиридинового кольца.

Основной задачей является расшифровка полос поглощения одинарной связи  $\text{C--N=}$ . 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  $\text{C--N=}$  может иметь значение частоты при  $1060\text{--}1140\text{ см}^{-1}$ [4]. В ИК спектре гетероциклического производного ГАМК полосы валентных колебаний  $\text{C--N=}$  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  $^1\text{H}$  спектры (рис. 2а,б) позволили идентифицировать 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты по структуре вещества.

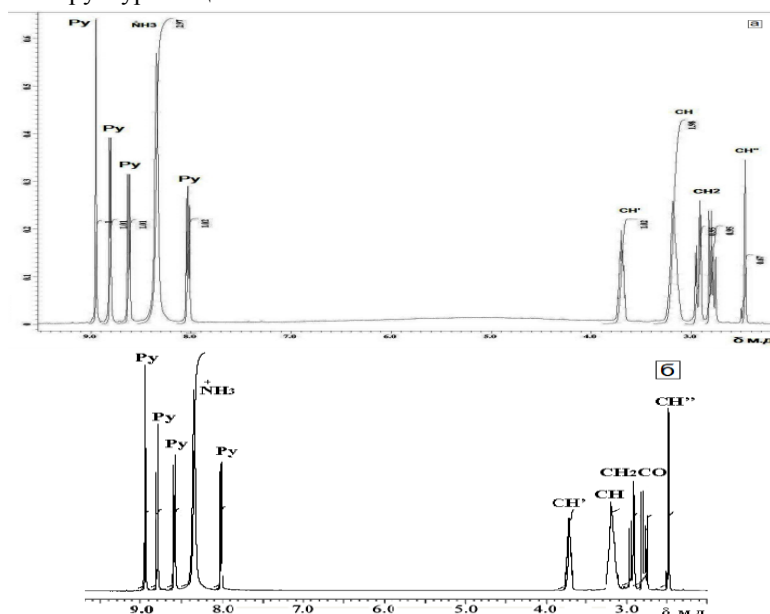


Рисунок 2 – ЯМР  $^1\text{H}$ -спектры 4-амино-3-(пиридил-3)-бутановой кислоты в ДМСО- $d_6$ :  
а-стандартного и б-исследуемого образца.

Важнейшей характеристикой спектра ЯМР  $^1\text{H}$  является химический сдвиг ( $\delta$ ), 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 ЯМР<sup>1</sup>H 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 <sub>3</sub> | 8,35 с | протон аминогруппы   |
|                                         | -H-              | 3,76 с | при -NH <sub>3</sub> |
|                                         | -OH-             | 2,98 д | при COOH             |
|                                         | -CH-             | 3,10 к | метиновый протон     |
|                                         | -OH-             | 2,82 д | при COOH             |
|                                         | —                | 2,55   | ДМСО-d <sub>6</sub>  |
|                                         | —                | 3,20   | молекула воды        |

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

Из таблицы 2 следует, что пики находящиеся в слабопольной области спектров ЯМР<sup>1</sup>H 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 сильнопольной 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<sup>-1</sup>, 1718 см<sup>-1</sup>, соответствующие: γ<sub>ас</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup> и γCOOH, что указывает на целесообразность использования ИКС для идентификации исследуемого вещества в субстанции по указанным полосам поглощения. В результате проведенного ЯМР <sup>1</sup>H 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 ЯМР<sup>1</sup>H 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.