บทความฟื้นฟูวิชาการ ออนไลน์
สำหรับการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์

การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ตามข้อกำหนดในตำรายา

Identification Test by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy according to the Pharmacopoeial Specifications

อรอุมา โต๊ะยามา*, อมรรัตน์ ไชยเดชกำจร
ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม
ติดต่อผู้นิพนธ์: toyama_o@su.ac.th

Onoomar Toyama, Amornrut Chaidedgumjorn
Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University,
Sanamchandra Palace, Nakhon-Pathom
*Corresponding author: toyama_o@su.ac.th

รหัส 1006-1-000-002-01-2563
จำนวนหน่วยกิต 2.50 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง
วันที่รับรอง : 12 มีนาคม 2563
วันที่หมดอายุ : 11 มีนาคม 2564

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. เพื่อให้เข้าใจหลักการของโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี
2. เพื่อให้สามารถอธิบายการพิสูจน์เอกลักษณ์วัตถุดิบยาด้วยโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีได้
3. เพื่อให้เข้าใจข้อกำหนดเกี่ยวกับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีที่ปรากฏในตำรายา

บทคัดย่อ

โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีเป็นวิธีวิเคราะห์ที่อาศัยคุณสมบัติทางแม่เหล็กของโปรตอน เมื่อโปรตอนอยู่ในสนามแม่เหล็กจะสามารถดูดกลืนพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงความถี่คลื่นวิทยุที่เหมาะสมแล้วเกิดการเรโซแนนซ์ได้ เนื่องจากโปรตอนแต่ละตัวในโมเลกุลอยู่ในสิ่งแวดล้อมทางโมเลกุลที่ไม่เหมือนกัน ได้รับอิทธิพลจากความเข้มของสนามแม่เหล็กไม่เท่ากัน จึงเกิดการเรโซแนนซ์และปรากฏเป็นสัญญาณบนสเปกตรัมในตำแหน่งที่แตกต่างกัน ทำให้การวิเคราะห์ด้วยโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์มีความจำเพาะเจาะจงสูง สามารถใช้ในการอธิบายโครงสร้างทางเคมีและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอินทรียสารได้ ในตำรายาทั้ง British Pharmacopoeia, European Pharmacopoeia และ United States Pharmacopeia จึงมีการนำโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์มาประกอบเป็นข้อกำหนดในการพิสูจน์เอกลักษณ์ยา โดยเฉพาะยาที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น เปปไทด์

คำสำคัญ : โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี การพิสูจน์เอกลักษณ์ การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ตำรายา

Abstract

Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{1}H- NMR) is an analytical method that employs the magnetic property of a proton. When a proton in a magnetic field absorbs electromagnetic energy in the radio frequency range, a resonance of that proton occurs. Because protons in a molecule are located in different molecular environments, the magnetic field strength influences them differently, and they exhibit different resonant frequencies and signals on the spectrum. The analysis by ^{1}H-NMR is of high specificity and, thereby, benefits chemical structure elucidation and identification of organic compounds. According to the British, European, and United States Pharmacopeias, ^{1}H- NMR is implicated in the Identification Test, especially for drugs with a complex structure such as peptides.

Keywords: ^{1}H-NMR, proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, identification, qualitative analysis, pharmacopoeia

---

บทนำ

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy) เป็นวิธีวิเคราะห์ที่อาศัยคุณสมบัติทางแม่เหล็ก (magnetic properties) ของนิวเคลียสในอะตอม สามารถใช้ทำนายโครงสร้างทางเคมีของอินทรียสารได้เช่นเดียวกับวิธีทางสเปกโทรสโกปีอื่น ๆ ที่มีการดูดกลืนหรือปลดปล่อยพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic energy) ที่ค่าความถี่เฉพาะของอะตอมหรือหมู่ฟังชั่นหนึ่ง ๆ เช่น อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet spectroscopy, UV) เป็นการดูดกลืนพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงรังสียูวี อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared spectroscopy, IR) เป็นการดูดกลืนพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงรังสีอินฟราเรด สำหรับ NMR นิวเคลียสที่เคลื่อนที่อยู่ในสนามแม่เหล็ก (magnetic field) จะสามารถดูดกลืนพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงความถี่คลื่นวิทยุ (radiofrequency, RF) ที่เหมาะสมแล้วทำให้เกิดการเรโซแนนซ์ (resonance) ของนิวเคลียส[1-3] การเรียกชื่อประเภทของ NMR ขึ้นอยู่กับชนิดของนิวเคลียส

ที่เกิดการเรโซแนนซ์ ในกรณีอะตอมของไฮโดรเจนซึ่งนิวเคลียสคือโปรตอน จะเรียกว่าโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Proton NMR, ^{1}H-NMR) หากเป็นอะตอมของคาร์บอน จะเรียกว่าคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Carbon NMR, ^{13}C-NMR) ซึ่งทั้ง 2 วิธีเป็นวิธีทาง NMR ที่พบบ่อย ข้อมูลที่ได้จาก NMR เมื่อประกอบกับข้อมูลที่ได้จากวิธีทางสเปกโทรสโกปีอื่น ๆ เช่น อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี และแมสสเปกโทรเมทรี (Mass spectrometry) จะเป็นประโยชน์ในการอธิบายโครงสร้างทางเคมีและพิสูจน์เอกลักษณ์ของอินทรียสาร นอกจากนี้ NMR ยังเป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและเภสัชภัณฑ์ตามข้อกำหนดในตำรายา ในระหว่าง ค.ศ. 1970–1980 British Pharmacopoeia (BP) เริ่มนำวิธีการทาง NMR มาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และหาปริมาณ Gentamicin Sulfate แม้ว่าต่อมาจะใช้ Liquid chromatography แทน ส่วน European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) ในหัวข้อ Peptide Identification by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (method 2.2.64) ได้นำ ^{1}H-NMR มาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีกรดอะมิโนไม่เกิน 15 ตัว เช่นเดียวกับ United States Pharmacopeia (USP) ที่นำ NMR มาใช้ในการควบคุมคุณภาพของชีววัตถุ และยังนำเทคนิคอื่น ๆ ทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีมาใช้ในการจัดทำสารอ้างอิง (Chemical Reference Substances, CRS) เพื่อเป็นสารอ้างอิงตามข้อกำหนดในตำรายาด้วย[4]

หลักการของ ^{1}H-NMR (Principles of ^{1}H-NMR)

เมื่อนำโปรตอนไปวางในสนามแม่เหล็กและให้ได้รับพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าในรูปของความถี่คลื่นวิทยุ โปรตอนนั้นจะเกิดการเรโซแนนซ์ได้ ซึ่งคุณสมบัติทางแม่เหล็กนี้เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของนิวเคลียสที่มีความสัมพันธ์กับเลขมวล (mass number) และเลขอะตอม (atomic number) โดยนิวเคลียสที่มีเลขมวลและ/หรือเลขอะตอมเป็นเลขคี่ เช่น $^{1}H_{1}$ และ $^{13}C_{6}$ จะมีคุณสมบัติทางแม่เหล็ก เกิดการเรโซแนนซ์ในสนามแม่เหล็กได้[1]

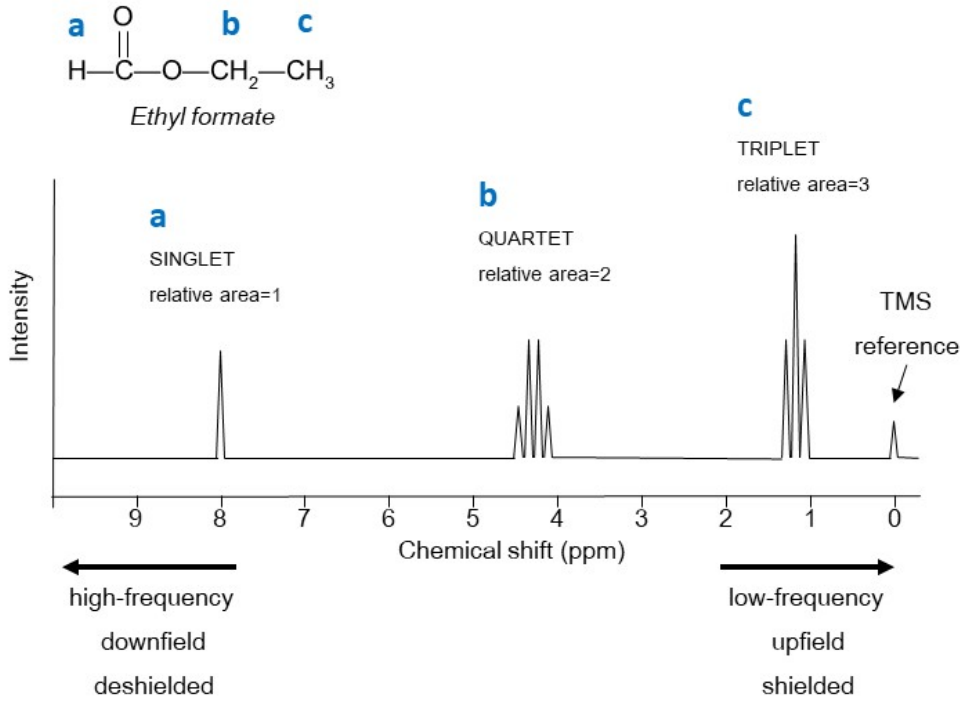
ในสนามแม่เหล็ก (B_0) โปรตอนที่เคลื่อนที่อยู่ในทิศทางเดียวกับทิศทางของสนามแม่เหล็ก B_0 เมื่อดูดกลืนพลังงานในช่วงความถี่คลื่นวิทยุ แล้วจะเคลื่อนตัวขึ้นไปอยู่ในระดับพลังงาน (energy level) ที่สูงขึ้นและเปลี่ยนการวางตัว (spin states) ไปอยู่ในทิศทางที่ตรงกันข้าม (ต้าน) กับสนามแม่เหล็ก B_0 การเปลี่ยนแปลงนี้คือการเกิดเรโซแนนซ์ (หรือการสั่นพ้อง) ของโปรตอน ซึ่งสามารถตรวจวัดและบันทึกผลเป็นสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR (^{1}H-NMR spectrum หรือ Proton NMR spectrum) NMR เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงแต่มีความไวค่อนข้างต่ำ เพราะระดับพลังงานและจำนวนโปรตอนที่อยู่ในระดับพลังงานทั้ง 2 ระดับมีความแตกต่างกันไม่มาก[5] NMR สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการวิเคราะห์ได้ เนื่องจากโปรตอนแต่ละตัวในโมเลกุลจะอยู่ในสิ่งแวดล้อมทางโมเลกุล (molecular environments) ที่แตกต่างกัน ทำให้ได้รับอิทธิพลจากความเข้มของสนามแม่เหล็กไม่เท่ากัน จึงเกิดการเรโซแนนซ์และปรากฏเป็นสัญญาณบนสเปกตรัมในตำแหน่งที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของแต่ละโปรตอน จึงทำให้มีความจำเพาะเจาะจงสูง

โดยปกติโปรตอนได้รับสนามแม่เหล็กจาก 2 ทาง คือ จากสนามแม่เหล็ก B_0 ของเครื่องมือ และจากการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนที่อยู่ล้อมรอบโปรตอนแต่ละตัว การเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนล้อมรอบโปรตอนนี้จะทำให้เกิดสนามแม่เหล็ก (B_1) ค่าต่ำ ๆ และมีทิศทางต้านกับทิศทางของสนามแม่เหล็กหลัก B_0 เสมอ ทำให้ความเข้มของสนามแม่เหล็ก B_0 จากเครื่องมือที่โปรตอนได้รับทั้งหมดมีค่าลดลง (เท่ากับ B_0 - B_1) เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า shielding คือการที่อิเล็กตรอนที่ล้อมรอบโปรตอนสร้างสนามแม่เหล็ก B_1 มาบดบัง (shield) โปรตอนจากสนามแม่เหล็กหลัก B_0 โปรตอนที่ถูกบดบังนี้ (shielded proton) จะปรากฏเป็นสัญญาณบนสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ซึ่งเรียกว่าค่า chemical shift (ใช้สัญลักษณ์ δ) มีหน่วยเป็น parts per million หรือ ppm โดย

เทียบกับ NMR reference (บางครั้งเรียกว่า NMR shift reference หรือ chemical shift reference) เช่น tetramethylsilane (TMS), 2,2,3,3-d_4 sodium 3-(trimethylsilyl)propionate (TMSP), sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ใช้กำหนดตำแหน่ง chemical shift เท่ากับศูนย์ (0 ppm) บนสเปกตรัม[5]

ตัวอย่างลักษณะสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ของ ethyl formate ดัดแปลงจากสเปกตรัมที่ปรากฏในฐานข้อมูล AIST: Spectral Database for Organic Compounds, SDBS[6] (ภาพที่ 1) จากด้านขวาไปด้านซ้ายจะแสดงค่า chemical shift ที่เพิ่มขึ้น (จาก 0 ถึง 9 ppm) สัญญาณทางขวามือสุดของสเปกตรัมที่ตำแหน่งศูนย์เกิดจากโปรตอนของ NMR reference (เช่น TMS) ที่เติมลงไป มักเรียกสัญญาณที่ปรากฏทางขวาของสเปกตรัมว่า upfield peaks และทางซ้ายว่า downfield peaks แต่ในปัจจุบันนิยมใช้คำว่า low-frequency region (shielded resonances) และ high-frequency region (deshielded resonances) แทน ตามลำดับ[5]

พื้นที่สัมพัทธ์ (relative area) หรือความสูง (peak height) ของสัญญาณ แสดงให้ทราบถึงจำนวน (หรือจำนวนทวีคูณ) ของโปรตอนในโมเลกุลที่ปรากฏเป็นสัญญาณที่ตำแหน่งนั้น ๆ[1] เช่น สัญญาณของหมู่เมทิลแสดงพื้นที่สัมพัทธ์เท่ากับ 3 หมายถึงสัญญาณนี้มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 3 หรือเป็นทวีคูณของ 3 (เช่น มีหมู่เมทิล 2 หมู่)



ภาพที่ 1 สเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ของ ethyl formate ดัดแปลงจากสเปกตรัมที่ปรากฏในฐานข้อมูล AIST Spectral Database for Organic Compounds, SDBS[6]

นอกจากโปรตอนแต่ละตัวจะปรากฏเป็นสัญญาณที่ตำแหน่งแตกต่างกันบนสเปกตรัมแล้ว ลักษณะของสัญญาณอาจมีการแยกออก (splitting) เนื่องจากเกิดการคู่ควบ (spin-spin coupling) กับโปรตอนข้างเคียงที่อยู่บนคาร์บอนตัวเดียวกัน (germinal carbon) หรือที่อยู่บนคาร์บอนที่ห่างออกไป 1 พันธะ (vicinal carbon) จำนวนยอดของสัญญาณที่แยกออก (multiplicity) ขึ้นอยู่กับจำนวนโปรตอนข้างเคียงและคำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

จำนวนยอดของสัญญาณที่แยกออก = n + 1

โดย n = จำนวนโปรตอนข้างเคียงทั้งหมดที่อยู่บนคาร์บอนตัวเดียวกันและ/หรือที่อยู่บนคาร์บอนที่ห่างออกไป 1 พันธะ

สัญญาณของโปรตอนที่แยกออกจะมีความสูงหรือความเข้มสัมพัทธ์ (relative intensity) สอดคล้องกับ Pascal's triangle[1] จากภาพที่ 1 สัญญาณของหมู่เมทิล (CH_3, สัญญาณ c) แยกออกเป็น 3 ยอด เนื่องจากหมู่เมทิลอยู่ติดกับหมู่เมทิลีน (CH_2) จึงมีจำนวนโปรตอนข้างเคียงเท่ากับ 2 (n=2) และคำนวณจำนวนยอดของสัญญาณได้เท่ากับ 2+1 คือ 3 (เรียกว่า triplet) โดยมีความสูงในอัตราส่วน 1:2:1 ตาม Pascal's triangle ในขณะที่สัญญาณของหมู่เมทิลีน (สัญญาณ b) แยกออกเป็น 4 ยอด เนื่องจากหมู่เมทิลีนอยู่ติดกับหมู่เมทิลและออกซิเจน จึงมีจำนวนโปรตอนข้างเคียงเท่ากับ 3 (n=3) และคำนวณจำนวนยอดของสัญญาณได้เท่ากับ 3+1 คือ 4 (เรียกว่า quartet) โดยมีความสูงในอัตราส่วน 1:3:3:1 ตาม Pascal's triangle

ระยะห่างของสัญญาณที่แยกออกใช้คำนวณค่าคงที่การคู่ควบ (coupling constant หรือ *J* value) ที่มีหน่วยเป็น Hz (hertz) ได้จากสูตรต่อไปนี้

ค่าคงที่การคู่ควบ = $\Delta\delta$ x MHz

โดย $\Delta\delta$ = ผลต่างระหว่างตำแหน่งของยอดสัญญาณที่แยกออก (หน่วยเป็น ppm)

MHz = ความถี่ของคลื่นวิทยุของเครื่อง NMR ที่ใช้ (หน่วยเป็น MHz)

โปรตอนที่อยู่ใกล้กันหรือมีการคู่ควบกันจะแสดงค่าคงที่การคู่ควบที่เท่ากัน ช่วยในการยืนยันลำดับการจัดเรียงตัวของโปรตอนในโมเลกุล

ตำแหน่งและลักษณะของสัญญาณที่ปรากฏบนสเปกตรัม เช่น chemical shift พื้นที่สัมพัทธ์ จำนวนยอดของสัญญาณที่แยกออก ค่าคงที่การคู่ควบ ล้วนเป็นประโยชน์ในการให้ข้อมูลเกี่ยวกับการวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (quantitative analysis) กรณีการวิเคราะห์เชิงคุณภาพสามารถนำข้อมูลที่ได้จากสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR มาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารได้ ดังนี้[7]

- จำนวนสัญญาณ แสดงถึงจำนวนกลุ่มของโปรตอนที่แตกต่างกัน
- Chemical shift แสดงถึงชนิด/ลักษณะทางเคมีของโปรตอน
- พื้นที่สัมพัทธ์หรือความเข้มของสัญญาณ แสดงถึงอัตราส่วนของจำนวนโปรตอนที่ตำแหน่งนั้น ๆ เทียบกับจำนวนโปรตอนทั้งหมดในโมเลกุล
- ลักษณะการแยกของยอดของสัญญาณ แสดงถึงจำนวนโปรตอนข้างเคียง

การตรวจสอบคุณสมบัติของเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สำหรับงานวิเคราะห์ (Qualification of NMR instruments)

ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่อง NMR ได้แก่ สนามแม่เหล็กไฟฟ้า probe สำหรับวางสารตัวอย่างและรับส่งคลื่นความถี่วิทยุ แหล่งกำเนิดคลื่นความถี่วิทยุ แหล่งรับสัญญาณจากสารตัวอย่าง และคอมพิวเตอร์ประมวลผล

คุณลักษณะจำเพาะของเครื่อง NMR จะพิจารณาจากความแรงของสนามแม่เหล็กหรือ resonance frequency ที่ทำให้โปรตอนเรโซแนนซ์ได้ เช่น สนามแม่เหล็กความเข้ม 14.1 tesla จะให้ resonance frequency เท่ากับ 600 MHz ในปัจจุบันมีเครื่องมือที่ให้ความแรงของสนามแม่เหล็กสูงถึง 23.5 tesla (1 GHz)

ตาม USP 42[5] กำหนดให้ตรวจสอบคุณสมบัติของเครื่อง NMR ใน 3 ด้านเช่นเดียวกับเครื่องมือวิเคราะห์อื่น ๆ คือ Installation qualification (IQ), Operational qualification (OQ) และ Performance qualification (PQ)

Installation qualification เป็นการตรวจสอบว่าการติดตั้งฮาร์ดแวร์ (hardware) และซอฟต์แวร์ (software) มีความปลอดภัยและใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Operational qualification เป็นการตรวจสอบว่าเครื่อง NMR มีการทำงานได้ตามที่กำหนดในรายละเอียดคุณลักษณะจำเพาะ (specification) โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบคุณสมบัติทาง NMR ในการวัดค่า signal-to-noise (S/N) และรูปร่างของสัญญาณ

Performance qualification เป็นการตรวจสอบว่าเครื่อง NMR สามารถทำงานได้ตามความต้องการของผู้ใช้งาน ซึ่งครอบคลุมถึงจุดวิกฤตต่อคุณภาพ (critical-to-quality, CTQ) ได้แก่ S/N ratio และ resolution

นอกจากนี้หากในเภสัชตำรับกำหนดวิธีการวิเคราะห์ไว้แล้ว USP 42[5] กำหนดให้ทำ Verification of suitability ในสภาพการใช้งานปกติ <1226> และควรทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (validation) ในกรณีที่ต้องการใช้ NMR เป็นวิธีทางเลือกที่ต่างจากวิธีที่กำหนดในเภสัชตำรับ

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วย NMR (Qualitative NMR analysis)

ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ การเปรียบเทียบระหว่างลักษณะของสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR (เช่น ค่า chemical shifts ลักษณะการแยกออกของสัญญาณ ค่าคงที่การคู่ควบ) ของสารตัวอย่างกับเอกสารอ้างอิงหรือสารอ้างอิงที่อยู่ในสภาวะเดียวกัน หรือเปรียบเทียบกับค่าที่กำหนดในตำรายา สามารถนำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารได้ในเวลาอันรวดเร็ว โดยเฉพาะในงานที่ต้องทำเป็นประจำ และยังสามารถตรวจหาสิ่งเจือปนได้จากสัญญาณที่ปรากฏเกินมา สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ข้อมูลเกี่ยวกับ chemical shift ค่าคงที่การคู่ควบ และจำนวนโปรตอนหรือคาร์บอนตรงที่เกิดสัญญาณ และตัวทำละลายที่ใช้ อาจเพียงพอที่จะใช้อธิบายลักษณะโครงสร้างทางเคมีได้

นอกจากข้อมูลทาง NMR ที่ได้แล้ว การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่เหมาะสม รวมทั้งวิธีการใช้/การตั้งค่าต่าง ๆ ของเครื่อง NMR ล้วนมีความสำคัญต่อคุณภาพของสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ที่วัดได้ ซึ่งมีผลต่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

สารตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัด NMR มักเตรียมอยู่ในรูปสารละลาย โดยใช้ตัวทำละลายที่เป็น deuterated solvent เช่น deuterium oxide (D_2O), deuterated chloroform (chloroform-D, $CDCl_3$) ^{1}H ของตัวทำละลายเหล่านี้จะถูกแทนที่ด้วย ^{2}H (deuterium, D หรือ ^{2}H) ซึ่งเป็นไอโซโทปของโปรตอนที่ไม่ปรากฏ

สัญญาณใน ^{1}H-NMR จึงไม่รบกวนสัญญาณของสารตัวอย่างแต่อาจปรากฏสัญญาณที่หลงเหลือของ ^{1}H (residual ^{1}H signal) ในตัวทำละลายได้บ้าง เนื่องจากไม่สามารถแทนที่ ^{1}H ทุกตัวด้วย ^{2}H ได้ เช่น deuterated chloroform จะพบสัญญาณของ ^{1}H ที่ 7.27 ppm[5] ดังนั้นในการเตรียมสารตัวอย่าง ควรเลือกตัวทำละลายที่ไม่แสดงสัญญาณรบกวนสัญญาณจาก ^{1}H ของสารตัวอย่าง

โดยปกติในเภสัชตำรับจะกำหนดวิธีการเตรียมตัวอย่างและการตั้งค่าต่าง ๆ ของเครื่องมือไว้แล้ว มักเตรียมตัวอย่างเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นระหว่าง 1–50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อบรรจุในหลอดบรรจุสารตัวอย่างที่เรียกว่า NMR tube ซึ่งเป็นหลอดแก้วมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (outside diameter, OD) 5–10 มิลลิเมตร ความยาว 15–20 เซ็นติเมตร นอกจากนี้อาจพบหลอดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1–3 มิลลิเมตร ซึ่งใช้สารตัวอย่างในปริมาณที่น้อยกว่า

การประยุกต์ใช้ ^{1}H-NMR ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ตามตำรายา (Application of ^{1}H-NMR in pharmacopoeial identification)

ตำรายาเล่มต่าง ๆ ทั้ง Ph. Eur., USP และ Japanese Pharmacopoeia (JP) กำหนดการพิสูจน์เอกลักษณ์วัตถุดิบยาตามแนวทางของ International Conference on Harmonization (ICH) ซึ่งมักใช้ IR และ Thin-layer chromatography (TLC) ร่วมกับการทำปฏิกิริยาทางเคมี และมีการใช้ NMR เท่าที่จำเป็น รวมทั้งการนำ ^{1}H- และ ^{13}C-NMR มาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์วัตถุดิบยาที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น เปปไทด์ สเตียรอยด์ อะมิโนไกลโคไซด์ วัคซีน แทนวิธีทางโครมาโทกราฟี และเช่นเดียวกับการใช้ IR ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ คือจะอ่านผลโดยการเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารอ้างอิงหรือจากเอกสารอ้างอิง ตัวอย่างวัตถุดิบยาที่ปรากฏในตำรายาที่ใช้ NMR เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ เช่น Buserelin (Ph.Eur. 6.0), Goserelin (Ph.Eur. 6.0), Tobramycin (Ph.Eur. 6.0), Heparin-low molecular mass (Ph.Eur. 6.0), Hydrocortisone sodium phosphate (BP 1998), Amyl nitrite isomers (USP30) ทั้งนี้การนำ NMR มาใช้แทนวิธี amino acid analysis (AAA) ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเปปไทด์ขนาดเล็ก เช่น oxytocin เพื่อลดเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ลดค่าใช้จ่ายของตัวทำละลาย รวมทั้งลดปัญหาในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และการแปลผล นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ยังถูกต้องแม่นยำกว่าการใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)[8]

ตั้งแต่ Ph.Eur 6.1 มีการนำ NMR มาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเปปไทด์สังเคราะห์ ร่วมกับ IR, TLC, electrophoresis และ HPLC รวมทั้งการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำ NMR มาแทน AAA ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเปปไทด์ Kellenbach และคณะ[9] พบว่าสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR สามารถแยกความแตกต่างและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเปปไทด์ 8 ชนิด ได้แก่ Oxytocin, Desmopressine acetate, Gonadorelin acetate, Gonadorelin diacetate, Buserelin acetate, Goserelin, Protirelin และ Tetracosactide โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารอ้างอิง และไม่ต้องทำการย่อยสลายกรดอะมิโนทีละตัว โดยเฉพาะการจำแนกชนิดระหว่าง Buserelin (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tBu)-Leu-Arg-Pro-Gly-NHEt) และ Goserelin (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tBu)-Leu-Arg-Pro-AzaGly-NH_2) ซึ่งมีกรดอะมิโนแตกต่างกันเพียง 1 ตัว และยังสามารถแยกความแตกต่างของกรดอะมิโน เช่น glutamic acid (Glu) กับ glutamine (Gln) และ aspartic acid (Asp) กับ asparagine (Asn) ได้[9]

ในที่นี้จะขอยกตัวอย่างการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเปปไทด์บางชนิดด้วย ^{1}H-NMR ตามข้อกำหนดในตำรายา

Buserelin BP 2019

Buserelin เป็นโพลีเปปไทด์สังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของฮอร์โมน gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 9 ตัว มีโปรตอนทั้งหมด 86 ตัว

การพิสูจน์เอกลักษณ์ ให้ใช้วิธี HPLC (A) ร่วมกับ NMR (B) หรือ HPLC (A) ร่วมกับ AAA (C)

สำหรับวิธี NMR ให้เตรียมตัวอย่างเป็นสารละลาย ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนผสมของ deuterated acetic acid R และ deuterium oxide R (20:80) แล้วเปรียบเทียบสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ในช่วง 0–9 ppm กับสเปกตรัมที่ได้จากสารอ้างอิง (Buserelin for NMR identification CRS) ซึ่งเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายชนิดเดียวกัน

ในกรณีที่ไม่มีสารอ้างอิง Kuz'mina และคณะ[10] ได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ Buserelin โดยใช้เทคนิคทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์แบบต่าง ๆ ในการหาโครงสร้างทางเคมีแทนการเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ Buserelin for NMR identification CRS ซึ่งเป็นสารอ้างอิงที่สหพันธรัฐรัสเซียไม่สามารถผลิตได้เองและต้องนำเข้า

Heparin sodium USP 42

Heparin sodium เป็นมิวโคโพลีแซคคาไรด์ (mucopolysaccharides) หรือไกลโคอะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycans) ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นสายตรงไม่มีสาขา ประกอบด้วยไดแซคคาไรด์เรียงต่อกัน โดยไดแซคคาไรด์จะประกอบด้วย aminosugar เช่น *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) หรือ α-D-*N*-sulfoglucosamine-6-*O*-sulfate (GlcNS(6S)) และ uronic sugar เช่น glucuronic acid หรือ iduronic acid

การพิสูจน์เอกลักษณ์ต้องใช้ร่วมกัน 5 วิธี คือ ^{1}H-NMR (A), Chromatographic identity (B), Anti-Factor Xa to Anti-Factor IIa Ratio (C), Molecular weight determinations (D) และการทดสอบโซเดียม (E)

สำหรับวิธี NMR ให้เตรียมตัวอย่างโดยการละลาย Heparin sodium ให้มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน deuterium oxide ที่เติม 0.002% (w/v) deuterated sodium trimethylsilylpropionate และอาจเติม EDTA ได้ไม่เกิน 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อ chelate แมงกานีสที่หลงเหลือมาจากกระบวนการผลิต heparin และมีผลรบกวนการวัดสัญญาณ การเตรียมสารอ้างอิง USP Heparin sodium Identification RS ให้เตรียมด้วยวิธีเดียวกัน

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ ให้ลากเส้น baseline จากสัญญาณที่ 8.00 ถึง 0.10 ppm จะพบค่า chemical shift ของ H_1 ของ *N*-acetyl-D-glucosamine หรือ α-D-*N*-sulfoglucosamine-6-*O*-sulfate, H_1 ของ 2-*O*-sulfo-α-L-iduronic acid (IdoA2S), H_2 ของ α-D-*N*-sulfoglucosamine (GlcNS) และหมู่เมทิลของ *N*-acetyl-D-glucosamine เท่ากับ 5.42, 5.21, 3.28 (doublet) และ 2.05 ppm ตามลำดับ (ทุกสัญญาณ ± 0.03 ppm) เมื่อวัดความสูงเหนือ baseline ของสัญญาณที่ 5.42 ppm และ 5.21 ppm แล้วหาค่าเฉลี่ย ต้องไม่พบสัญญาณใด ๆ บนสเปกตรัมในช่วง 0.10–2.00, 2.10–3.20 และ 5.70–8.00 ppm ที่มีขนาดสูงกว่า 4% ของความสูงเฉลี่ยของทั้ง 2 สัญญาณดังกล่าว นอกจากนี้ยังอาจพบสัญญาณที่มีความสูงและค่า chemical shift ต่าง ๆ ในช่วง 4.55–5.21 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณอื่น ๆ ของ heparin และน้ำ (ในรูป HOD) กรณี porcine heparin ต้องไม่พบสัญญาณที่มีขนาดสูงกว่า 200% ของความสูงเฉลี่ยของสัญญาณที่ 5.42 ppm และ 5.21 ppm บนสเปกตรัมในช่วง 3.75–4.55 ppm

Heparin sodium BP 2019

Heparin sodium เป็นมิวโคโพลีแซคคาไรด์หรือไกลโคอะมิโนไกลแคน ที่มีโปรตอน 41 ตัว

การพิสูจน์เอกลักษณ์ต้องใช้ร่วมกัน 5 วิธี คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการเป็น anti-factor IIa ตามวิธีใน Assay (A), วิเคราะห์ฤทธิ์ในการเป็น anti-factor Xa (B), NMR spectrometry (C), HPLC ตามข้อกำหนดของ Related substances (D) และการทดสอบโซเดียม (E)

สำหรับวิธี NMR ให้เตรียมตัวอย่าง โดยละลาย heparin sodium 20 มิลลิกรัม ใน 0.7 มิลลิลิตรของ deuterium oxide R ที่มี 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ deuterated sodium trimethylsilylpropionate R และถ้าสัญญาณที่ 5.22 ppm มีขนาดเล็กกว่า 80% ของขนาดของสัญญาณที่ 5.44 ppm ให้เติม 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ sodium edetate R ลงไปด้วย สำหรับการเตรียมสารอ้างอิง Heparin sodium for NMR identification CRS ให้เตรียมด้วยวิธีเดียวกัน

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ ต้องพบสัญญาณขนาดใหญ่ที่ 2.04, 3.27 (doublet), 4.34, 5.22, 5.42 ppm (ทุกสัญญาณ ± 0.03 ppm) และเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR ของ Heparin sodium for NMR identification CRS ควรพบสัญญาณของหมู่เมทิลใน dermatan sulfate ที่ 2.08 ± 0.02 ppm และต้องไม่พบสัญญาณที่มีขนาดสูงกว่า 4% ของสัญญาณของ heparin ที่ 5.42 ppm บนสเปกตรัมช่วง 0.10–2.00, 2.10–3.10 และ 5.70–8.00 ppm นอกจากนี้อาจพบสัญญาณของตัวทำละลายและสารอื่น ๆ ใน heparin ซึ่งควรระบุได้ว่ามาจากสารใดบ้าง

Oxytocin USP 42

Oxytocin เป็นโพลีเปปไทด์ฮอร์โมนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 9 ตัว มีโปรตอนทั้งหมด 66 ตัว

การพิสูจน์เอกลักษณ์ต้องใช้ร่วมกัน 3 วิธี คือ HPLC ตามวิธีใน Assay (A), NMR (B) และ Amino acid content (C)

สำหรับวิธี NMR ให้เตรียม oxytocin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ประมาณ 1 มิลลิลิตรของตัวยา oxytocin) ใน sodium phosphate buffer pH 5.0 ทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilize) เติม deuterium oxide แล้วทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งอีกครั้ง จากนั้นเติม 1 มิลลิลิตร ของ deuterium oxide ที่มี 0.5% deuterated sodium trimethylsilylpropionate ในการเตรียมสารอ้างอิง USP Oxytocin Identification RS ให้เตรียมด้วยวิธีเดียวกัน

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ ให้เปรียบเทียบลักษณะของสัญญาณทุกสัญญาณในสเปกตรัมของสารตัวอย่างและสารอ้างอิง ค่า chemical shift ต้องเหมือนกัน (± 0.1 ppm) หากมีสัญญาณในสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่เกินจากสัญญาณที่พบในสเปกตรัมของสารอ้างอิง ต้องอธิบายให้ได้ว่าเกิดจากอะไร ทั้งนี้ความสูงของสัญญาณของหมู่ acetate และ deuterium oxide ที่ 1.9 ppm และ 4.9 ppm ตามลำดับ ระหว่างสเปกตรัมของสารตัวอย่างกับสเปกตรัมของสารอ้างอิง อาจแตกต่างกันได้

Beta Glucan USP 42

Beta Glucan เป็น (1,3)-β-D-glucose polysaccharides และ/หรือ (1,6)-β-D-glucose polysaccharides ที่พบใน cell wall ของธัญพืช แบคทีเรีย และเชื้อรา

การพิสูจน์เอกลักษณ์ ใช้วิธี NMR เพียงวิธีเดียว โดยให้ละลาย Beta Glucan 10 มิลลิกรัม ใน 0.6 มิลลิลิตร ของ deuterated dimethyl sulfoxide แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 100°ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม deuterium oxide 0.1 มิลลิลิตร ในการเตรียมสารอ้างอิง USP Beta Glucan RS ให้เตรียมด้วยวิธีเดียวกัน

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ ให้เปรียบเทียบลักษณะของสัญญาณทุกสัญญาณในสเปกตรัมของสารตัวอย่างและสารอ้างอิง โดยค่า chemical shift ต้องเท่ากัน นอกจากนี้เมื่อคำนวณ relative percentage ของ (1,6) linked glucan จะต้องมีค่า 10%–18% ของ total linkage

การคำนวณ relative percentage ของ (1,6) linked glucan สำหรับแต่ละตัวอย่าง ให้คำนวณพื้นที่ใต้สัญญาณ 5 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย โดยคำนวณได้จาก

relative percentage ของ (1,6) linked glucan = $\{A/(A + B)\} \times 100$

A = พื้นที่ใต้สัญญาณที่ 4.27 ppm (เป็นสัญญาณของ H-1 ของ (1,6) linked glucan)

B = พื้นที่ใต้สัญญาณที่ 4.52 ppm (เป็นสัญญาณ H-1 ของ (1,3) linked glucan)

นอกจากการใช้ NMR ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ยาแล้ว ในเภสัชตำรับบางตำรับยังนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณด้วย เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณ $C_5H_{11}NO_2$ ในหัวข้อ Assay ของ Amyl nitrite (USP 42) การวิเคราะห์หา degree of deacetylation ในหัวข้อ Assay ของ Chitosan (USP 42) และการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนในหัวข้อ Specific tests ของ Goserelin acetate (USP 42) การใช้ NMR ในการวิเคราะห์หาปริมาณมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากเภสัชภัณฑ์ในปัจจุบันมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ผลิตด้วยวิธีทางไบโอเทคโนโลยีมากกว่าการสังเคราะห์เป็นโมเลกุลเล็ก ๆ แบบเดิม องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาจึงมีแนวโน้มที่จะนำ MS และ NMR มาใช้ร่วมกันในการควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์ที่ปรากฏใน USP ในอนาคต[11]

บทสรุป

โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง เนื่องจากโปรตอนแต่ละตัวของอินทรียสารอยู่ในสภาพแวดล้อมทางโมเลกุลที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับจำนวนอิเล็กตรอนและอะตอมอื่น ๆ ที่ล้อมรอบ ทำให้โปรตอนเกิดการเรโซแนนซ์ไม่เท่ากัน จึงแสดงเป็นสัญญาณที่มีค่า chemical shift แตกต่างกัน และใช้ในการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของอินทรียสารได้ แม้ ^{1}H-NMR จะมีความไวค่อนข้างต่ำ แต่การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ด้วย ^{1}H-NMR สามารถทำได้รวดเร็ว ไม่ต้องผ่านวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ซับซ้อน ^{1}H-NMR จึงได้รับการนำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์วัตถุดิบยาตามข้อกำหนดในตำรายาเพิ่มเติมจากวิธีการอื่น ๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ, Bryce DL. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 8th Edition. NJ: Wiley; 2015.
2. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, VyVyan JR. Introduction to spectroscopy. 4th Edition. CA: Brooks/Cole; 2009.
3. อรอุมา ภู่ประเสริฐ. การประยุกต์ใช้นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ในการพิสูจน์โครงสร้างของอินทรียสาร. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2547. หน้า 121.
4. Corns H, Branch SK. NMR spectroscopy in the European and US pharmacopeias. eMagRes. 2015;4:219-230. DOI 10.1002/9780470034590.emrstm1403.
5. United States Pharmacopeial Convention. U.S. Pharmacopeia National Formulary 2019: USP 42 NF 37. United States Pharmacopeial; 2019.
6. Ethyl formate. AIST: Spectral Database for Organic Compounds, SDBS. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology [online]. [cited 2018 Sep 28]. Available from: https://sdbs.db.aist.go.jp
7. British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia (BP) 2019. London: The Stationery Office; 2019.
8. Holzgrabe U. qNMR Spectroscopy in drug analysis-A general view. In: Holzgrabe U, Wawer I, Diehl B, editors. NMR Spectroscopy in pharmaceutical analysis. Oxford: Elsevier, 2008;131-7.
9. Kellenbach E, Sanders K, Overbeeke PLA. The use of proton NMR as an alternative for the amino acid analysis as identity test for peptides. In: Holzgrabe U, Wawer I, Diehl B, editors NMR Spectroscopy in pharmaceutical analysis. Oxford: Elsevier, 2008;429-36.
10. Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Deryabin AS, Yashkir VA, Merkulov VA. Validation of an NMR-spectroscopic method for authenticity confirmation of buserelin acetate pharmaceutical substance. Pharm Chem J. 2018;52(2):159-65. DOI 10.1007/s11094-018-1783-8.
11. Spectroscopy. FDA and US pharmacopeia explore expanding use of NMR for drug quality testing [online]. 2012 [cited 2018 Sep 28]. Available from: http://www.spectroscopyonline.com/fda-and-us-pharmacopeia-explore-expanding-use-nmr-drug-quality-testing.