

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИЦЕРИНА И АЦЕТАТА КАЛИЯ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ $^1\text{H}$ ЯМР

### В.И. Шейченко

к.ф.-м.н., вед. науч. сотрудник, отдел стандартизации,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)  
E-mail: vladimir.sheychenko@gmail.com

### Ю.В. Абрамов

к.б.н., вед. науч. сотрудник, отдел медико-биологических проблем,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)  
E-mail: abramov.vilar@yandex.ru

### Г.И. Блинова

ст. науч. сотрудник, отдел медико-биологических проблем,  
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

Представлены результаты разработки методических подходов к идентификации и количественному определению содержания ацетата калия и глицерина в высококонцентрированных водных растворах методом  $^1\text{H}$  ЯМР. Выявлено, что метод  $^1\text{H}$  ЯМР не уступает по точности используемым в настоящее время аналитическим методикам раздельного определения каждого компонента. Полученные данные относительной погрешности измерения количества каждого компонента в растворе методом  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии не превышает 1,0%.

**Ключевые слова:**  $^1\text{H}$  ЯМР, консервирующий раствор, высококонцентрированный раствор, ацетат калия, глицерин, количественное определение.

**Для цитирования:** Шейченко В.И., Абрамов Ю.В., Блинова Г.И. Количественное определение глицерина и ацетата калия в водном растворе методом  $^1\text{H}$  ЯМР. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019; 22(8): 10–14. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-08-02>

Проблема консервации и сохранения биологических структур в неизменном состоянии является актуальным направлением для биомедицинских исследований. В исследовательских учреждениях и музеях медико-биологической направленности при сохранении биологических объектов и структур часто используются концентрированные растворы с различными химическими компонентами, в том числе с ацетатом калия и глицерином. Мониторинг количественного содержания компонентов данных растворов позволяет не только осуществлять контроль необходимых концентраций реагентов в растворах, но и осуществлять опосредованную оценку состояния сохраняемых биосубстанций.

В настоящее время количественное содержание ацетата калия и глицерина в консервирующих растворах осуществляется с помощью аналитических методик на основе метода потенциометрического титрования. Аналитические методики определения концентрации данных веществ в высококонцентрированных водных растворах показывают довольно хорошую точность определения, однако

отличаются трудоемкостью, требуют больших временных и материальных затрат и относительно большого количества анализируемой пробы.

Известен метод количественного определения содержания в консервирующих растворах глицерина и ацетата калия методом спектроскопии комбинационного рассеяния (рамановской спектроскопии). Данный метод может служить средством неразрушающего количественного экспресс-анализа химического состава водных растворов для консервации и сохранения биологических структур, в том числе с использованием портативных приборов [1]. Несмотря на свои преимущества (быстрый анализ, возможность снятия спектров растворов через пластмассовую или стеклянную тару) метод рамановской спектроскопии не обладает достаточной точностью количественного определения компонентов растворов.

Цель исследования – изучение возможности одновременного количественного определения содержания глицерина, ацетата калия и воды в консервирующих растворах методом  $^1\text{H}$  ЯМР (спектроскопия ядерного магнитного резонанса).

нанса на ядрах  $^1\text{H}$ ) и разработка методических подходов к применению данного метода для количественного определения компонентов консервирующих высококонцентрированных водных растворов при опосредованном контроле сохранности биоструктур.

Принципиально новые возможности метода  $^1\text{H}$  ЯМР позволяют применить его в новых областях [2]. Сущность метода заключается в определении интегральной интенсивности сигналов компонентов консервирующего раствора, в котором отношение приведенных интегралов сигналов различных молекул равно отношению количества молекул (молей) веществ в анализируемом образце. Положение сигналов в спектрах ЯМР индивидуально для каждого вещества и характеризуется химическим сдвигом, измеряемым в миллионных долях (м.д.), относительно сигнала эталонного образца.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись образцы экспериментальных консервирующих растворов, используемых для консервации биологических структур. Для проведения анализов готовили модельные водные растворы с определенной концентрацией ацетата калия и глицерина. Исследовали пробы растворов как с одновременным содержанием глицерина и ацетата калия в диапазоне концентраций 24–36%, так и по отдельности в том же диапазоне концентраций.

Аналитические исследования растворов проводили методом потенциометрического автоматического титрования с использованием титратора DL 70 («Mettler Toledo», Швейцария) и программного обеспечения Lab X. В работе использовался рН/мВ/°С-метр HI1230В HANNA (Германия). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью прикладной статистической программы «Statistica».

Для приготовления опытных растворов и проведения исследований использовали глицерин, extrapure («Merk», Германия); калий уксуснокислый ч.д.а. («Химмед», Россия); свежеприготовленную деионизованную воду; воду дейтерированную; химические реактивы фирмы «ДиАМ», (Россия): хлористоводородную кислоту (0,1 н. фиксагал); калий хлористый х.ч.; перйодат калия (иоднокислый калий мета,  $\text{KIO}_4$ ) ч.д.а. 0,02 М раствор; этиленгликоль ч.д.а.; кали едкое ч.д.а. 0,05 н. раствор. Ацетат калия предварительно просуши-

вали при температуре 105 °С до достижения постоянного веса и охлаждали в закрытом бюксе. Реактивы дозировали по массе с помощью весов Kern ABJ 120-4М (Германия) с точностью до 0,0001 г.

Для анализа методом  $^1\text{H}$  ЯМР применяли 12-ти кратное разбавление исследуемых растворов. Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР получали на спектрометре GEMINI 200 («Varian», США) при следующих параметрах: время отклика – 5 с; длина радиочастотного импульса – 3,3 мкс (10 град.); релаксационная задержка – 10 с; число накоплений – 16. Приведенные параметры получения спектра позволяют к следующему импульсу системе ядер прийти в термическое равновесие. Интегрирование сигналов производили в следующих областях:

1,8 – 2,0 м.д. – сигнал протонов метильной группы ацетата калия;

3,4 – 3,8 м.д. – сигналы протонов метиленовых и метиновой групп глицерина;

4,6 – 4,9 м.д. – сигнал протонов воды.

Масс-процент содержания компонентов в смеси рассчитывали по формуле, приведенной в ГФ XIII [3]:

$$I'1 = I1/3; \quad I'2 = I2/5; \quad I'3 = (I3 - 0,6 \times I2)/2,$$

где  $I1$ ,  $I2$ ,  $I3$  и  $I'1$ ,  $I'2$ ,  $I'3$  – значения измеренных и приведенных интегралов сигнала протонов метильной группы ацетата калия, сигнала протонов метиленовых и метиновой групп глицерина и сигнала протонов воды соответственно.

В формулах расчета значений интегралов из измеренных значений учтено, что в сигнал измеряемого интеграла метильной группы ацетата калия вносят вклад три протона, в сигнал измеряемого интеграла сигнала глицерина – пять протонов, в сигнал протонов в области 4,60–4,90 м.д. – протоны гидроксильных групп глицерина. В сигнал воды вносят вклад два протона.

Определение масс-процентов ацетата калия (1), глицерина (2) и воды (3) выполняли по следующим формулам:

$$1) X1(\%) = 100 \times I'1 \times M1 / (I'1 \times M1 + I'2 \times M2 + I'3 \times M3);$$

$$2) X2(\%) = 100 \times I'2 \times M2 / (I'1 \times M1 + I'2 \times M2 + I'3 \times M3);$$

$$3) X3(\%) = 100 \times I'3 \times M3 / (I'1 \times M1 + I'2 \times M2 + I'3 \times M3),$$

где  $M1 = 98,142$ ;  $M2 = 92,094$ ;  $M3 = 18,015$  – молярные веса ацетата калия, глицерина и воды соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении анализа методом  $^1\text{H}$  ЯМР предварительно определяли положение сигналов в

спектрах ЯМР для каждого определяемого вещества, характеризующееся их химическим сдвигом. Для этого методом  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии проводили анализ каждого компонента отдельно и в смеси. Образец  $^1\text{H}$  ЯМР-спектра экспериментального консервирующего раствора с характерными для ацетата калия, глицерина и воды областями химического сдвига пиков представлен на рис. 1.

Полученные данные показали, что сигналы компонентов раствора хорошо разделены и не пересекаются между собой, что позволяет определять эти компоненты в одном растворе и обеспечить высокую точность определения значения интегралов. Относительная ошибка методики обусловлена только ошибкой измерения интегралов. При выбранных параметрах получения и математической обработки спектра коэффициент сигнал/шум превосходит значение 100, а ошибка измерения интегралов не превосходит 1%. Данный пока-

затель свидетельствует о высокой точности этого метода. Результатом анализа методом  $^1\text{H}$  ЯМР является определение молярного и масс-процентного состава компонентов в консервирующем растворе.

Выполняли сравнение результатов анализа опытных водных растворов с разным содержанием ацетата калия и глицерина двумя методами – методом титрования, применяющимся в настоящее время, и исследуемым методом  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии. Для оценки правильности получаемых результатов проведено количественное определение концентраций исследуемых веществ методами  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии и потенциометрического титрования в модельных растворах с концентрациями ацетата калия и глицерина в водном растворе 25,0; 30,0 и 35,0 %масс, приготовленных по точной навеске (с точностью до второго знака после запятой). Результаты представлены на рис. 2–4.

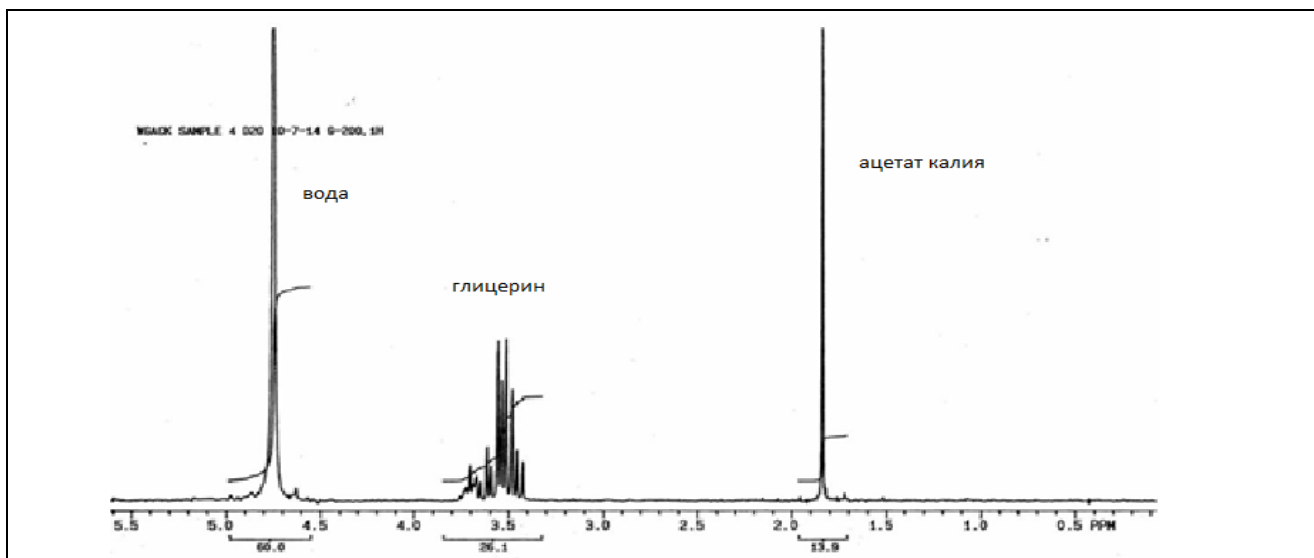


Рис. 1. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР консервирующего раствора

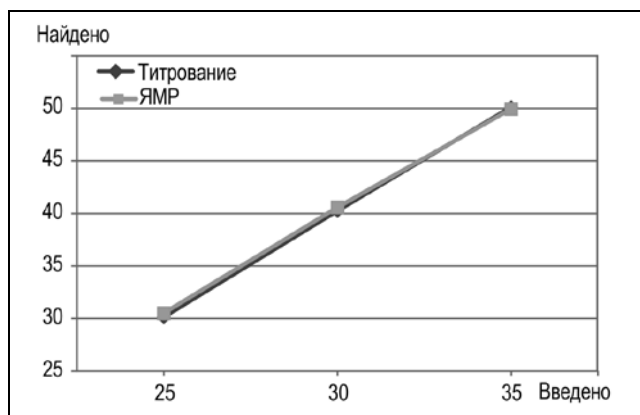


Рис. 2. Сравнительная диаграмма содержания (%) воды

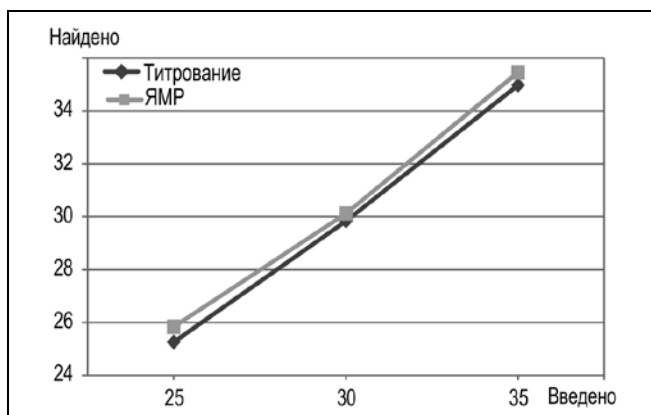


Рис. 3. Сравнительная диаграмма содержания (%) ацетата калия

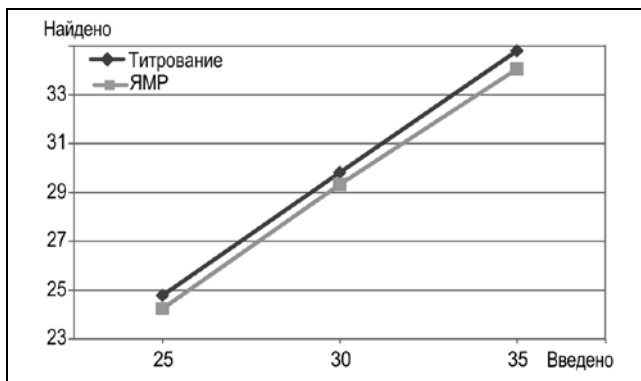


Рис. 4. Сравнительная диаграмма содержания (%) глицерина

Методами потенциометрического титрования и <sup>1</sup>H ЯМР исследовали следующие пробы растворов в диапазоне концентраций определяемых веществ 24–36%:

1. Проба водного раствора глицерина и ацетата

- (ацетат калия – 29,50 % масс и глицерин – 30,00 % масс.);
2. Проба водного раствора глицерина и ацетата (ацетат калия – 34,50 % масс и глицерина – 35,50 % масс.);
3. Проба водного раствора глицерина и ацетата (ацетат калия – 24,50 % масс и глицерина – 25,50 % масс.);
4. Проба водного раствора глицерина и ацетата (ацетат калия – 34,50 % масс и глицерин – 25,50 % масс.);
5. Проба водного раствора глицерина и ацетата (ацетат калия – 25,00 % масс и глицерина – 35,00 % масс.);
6. Проба водного раствора глицерина и ацетата (ацетат калия – 30,50 % масс и глицерина – 32,00 % масс).

Результаты анализа растворов представлены в таблице.

**Таблица. Результаты определения ацетата калия, глицерина и воды в их смеси аналитическим методом с использованием потенциометрического автоматического титрования и методом <sup>1</sup>H ЯМР**

№ раствора	Ацетат калия, % масс			Глицерин, % масс			Вода, % масс		
	Введено	Найдено		Введено	Найдено		Введено	Найдено	
		<sup>1</sup> H ЯМР спектроскопия	Метод титрования		<sup>1</sup> H ЯМР спектроскопия	Метод титрования		<sup>1</sup> H ЯМР спектроскопия	Метод титрования
1	29,50	29,33	29,82±0,11	30,00	30,11	29,83±0,08	40,50	40,57	40,24
2	34,50	34,05	34,79 ±0,10	35,50	35,45	34,97±0,07	30,00	30,50	30,14
3	24,50	24,24	24,78 ±0,13	25,50	25,83	25,25±0,10	50,00	49,93	50,09
4	34,50	33,77	34,93±0,10	25,50	25,45	24,98±0,07	40,00	40,78	39,96
5	25,00	24,91	24,96±0,12	35,00	35,21	34,80±0,11	40,00	39,88	40,11
6	30,50	30,41	31,00±0,07	32,00	32,04	31,54±0,09	37,50	37,55	37,37

Результаты измерения компонентов раствора методом <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопии соответствуют их истинному количественному содержанию, а также сопоставимы с результатами, полученными методом потенциометрического титрования. Кроме того, метод <sup>1</sup>H ЯМР оказался более воспроизводимым.

**Выводы**

1. В соответствии с поставленной целью определена возможность использования метода <sup>1</sup>H ЯМР для анализа содержания основных компонентов в консервирующих высококонцентрированных водных растворах. В результате исследования впервые были разработаны методические подходы по применению метода

<sup>1</sup>H ЯМР к идентификации основных компонентов экспериментального консервирующего раствора, применен оригинальный алгоритм улучшения разрешения получаемых спектров, подобраны характеристические полосы, пригодные для анализа раствора и показана возможность количественного определения содержания ацетата калия и глицерина в консервирующих растворах данным методом.

2. В результате проведенной работы выявлено, что метод <sup>1</sup>H ЯМР не уступает по точности используемым в настоящее время аналитическим методикам раздельного определения каждого компонента. Полученные данные относительной погрешности измерения

количества каждого компонента в растворе методом  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии не превышает 1,0%. В отличие от метода потенциометрического титрования, метод  $^1\text{H}$  ЯМР является неdestructивным методом, обладает значительно меньшей трудоемкостью, не требует наличия большого количества лабораторной посуды и реагентов, суммарное время пробоподготовки и измерения не превышает 15 мин., что намного меньше времени измерения содержания компонентов раствора другими методами. Вес пробы для анализа значительно меньше (около 50 мг), в то время как для метода титрования требуется не менее 25 г. Кроме того, метод позволяет анализировать

одновременно несколько основных компонентов раствора в одной пробе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аграфенин А.В., Абрамов Ю.В., Денисов-Никольский Ю.И., Блинова Г.И. Одновременное количественное определение глицерина и ацетата калия в водном растворе методом спектроскопии комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия) // Микроэлементы в медицине. 2014. Т. 15. № 3. С. 48–51.
2. Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия. 2000. 408 с.
3. ГФ XIII, ОФС.1.2.1.1.0007.15 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

Поступила 8 апреля 2019 г.

# QUANTITATIVE DETERMINATION OF GLYCEROL AND POTASSIUM ACETATE IN AQUEOUS SOLUTION BY THE METHOD OF $^1\text{H}$ NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

© Authors, 2019

### V.I. Sheychenko

Ph.D. (Phys.-Math.), Leading Research Scientist,  
All-Russia Scientific Research Institute of Medical and Aromatic Plants (Moscow)  
E-mail: vladimir.sheychenko@gmail.com

### Yu.V. Abramov

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist,  
All-Russia Scientific Research Institute of Medical and Aromatic Plants (Moscow)  
E-mail: abramov.vilar@yandex.ru

### G.I. Blinova

Senior Research Scientist,  
All-Russia Scientific Research Institute of Medical and Aromatic Plants (Moscow)

Methodical approaches to the application of  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy for the simultaneous quantitative determination of potassium acetate and glycerol in highly concentrated aqueous solutions. The results obtained can be used in the manufacture and analysis of chemical composition of preservative solution used in preservation of biological substances in research institutions and museums biological focus.

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum was obtained with the following parameters: response time - 5 seconds; RF pulse length - 3.3  $\mu\text{s}$  (10 degrees); relaxation delay - 10 seconds; the number of accumulations is 16. Then, the integral intensity of the signals is determined in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum, after which the obtained values of the integrals in the ranges of chemical shifts 1.8 - 2.0; 3.4 - 3.8 and 4.6 - 4.9 ppm calculate the molar and mass percentage of each component.

The high accuracy of the quantitative determination of the components of the preservative solution and the high economic efficiency compared with the method of potentiometric titration were determined.

**Key words:**  $^1\text{H}$  NMR, preservative solution, potassium acetate, glycerin, quantitative determination, highly concentrated solution.

**For citation:** Sheychenko V.I., Abramov Yu.V., Blinova G.I. Quantitative determination of glycerol and potassium acetate in aqueous solution by the method of  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019; 22(8): 10–14. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-08-02>

## REFERENCES

1. Agraфенин А.В., Абрамов Ю.В., Денисов-Никольский Ю.И., Блинова Г.И. Одновременное количественное определение глицерина и ацетата калия в водном растворе методом спектроскопии комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия) // Микроэлементы в медицине. 2014; 15: 3: 48–51.
2. Kalabin G.A., Kanickaya L.V., Kushnarev D.F. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000. 408 с.
3. ГФ XIII, ОФС.1.2.1.1.0007.15 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса.