ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Спектроскопия ядерного магнитного резонанса
для идентификации пептидов**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для идентификации пептидов.

Подтверждение подлинности пептидов методом ЯМР проводят в соответствии с ОФС Спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

**Общие принципы.** Установление подлинности пептида осуществляют путем сравнения одномерных спектров испытуемого образца (как правило, 1Н и 13С) со спектрами стандартного образца или с опубликованными стандартными спектрами. При отсутствии стандартного образца можно использовать рабочий стандартный образец, идентичность которого подтверждают самостоятельной структурной интерпретацией одномерных спектров (применимо к олигопептидам до 20 аминокислотных остатков при естественном содержании изотопов 13С и 15N). Структурная интерпретация осуществляется с использованием двумерных методов корреляционной спектроскопии (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC). В основе данных методов лежит общий подход переноса намагниченности от одного спина ядра к другому посредством спин-спинового взаимодействия, химического обмена или кросс-релаксации.

Гомоядерная корреляционная спектроскопия (COSY) в различных модификациях используется для идентификации ядер (чаще всего 1Н), разделенных двумя или тремя химическими связями и участвующих в спин-спиновом взаимодействии друг с другом. Полная корреляционная спектроскопия (TOCSY) позволяет регистрировать наличие спин-спинового взаимодействия между однотипными ядрами, которые связаны между собой непрерывной цепочкой взаимодействий. Гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия HSQC определяет корреляции между атомными ядрами двух разных типов, которые разделены одной связью (как правило, между протонами и ядрами углерода в определенном углеводородном фрагменте). Гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия НMBC определяет корреляции между протонами и ядрами X (как правило, 13C), разделенными двумя или тремя связями (в редких случаях большим числом связей).

**Прибор.** Если не предписано иное, используют импульсный ЯМР спектрометр с рабочей частотой не менее 300 МГц.

**Методика.** При необходимости испытуемый образец подвергают предварительной лиофилизации. Испытуемый образец или его лиофилизат растворяют в дейтерированном растворителе, к которому может быть добавлен соответствующий эталон для калибровки химического сдвига (см. ОФС 1.2.1.1.0007.15). В качестве дейтерированного растворителя, как правило, используют дейтерированную воду или буферный раствор в дейтерированной воде. Состав буферного раствора, его рН, концентрация пептида приводят в частной фармакопейной статье.

После помещения в магнит образец термостатируют не менее 5 мин. Регистрацию спектров испытуемого и стандартного образцов проводят в идентичных условиях (одинаковые растворитель, концентрация, температура, параметры эксперимента – ширина спектра, время задержки, число накоплений сигнала спада свободной индукции, количество точек для Фурье-преобразования), которые приводят в частной фармакопейной статье.

Регистрацию спектра при температуре, существенно отличающейся от комнатной, проводят в режиме температурной стабилизации. В противном случае проводят валидацию эффекта температурных изменений на внешний вид спектра.

*Проверка идентичности*

При установлении подлинности олигопептидов путем сравнения спектра испытуемого образца со спектром стандартного образца или с опубликованным стандартным спектром пики в 2 спектрах должны совпадать по положению, интегральной интенсивности и мультиплетности (см. ОФС 1.2.1.1.0007.15). Характеристические сигналы, уникальные для каждой аминокислоты, должны быть охарактеризованы определёнными химическими сдвигами с соответствующими доверительными интервалами, приведенными в частной фармакопейной статье.

При установлении подлинности полипептидов используют одномерные спектры 1Н целиком, как «отпечатки пальца» объекта, без детализации значений химических сдвигов и мультиплетности отдельных сигналов. Рекомендуется проводить сравнение нормированных интегральных интенсивностей характеристичных областей спектров 1Н испытуемого и стандартного образцов, содержащих сигналы определенных аминокислотных функциональных групп. Например, сигналы протонов метильных групп алифатических остатков находятся в интервале 0,9 ÷ 1,5 м.д., области сигналов остальных протонов алифатических боковых цепей – 1,5 ÷ 3,5 м.д., протонов α-СH – 3,5 ÷ 4,5 м.д., ароматических протонов, протонов пептидных групп – 6,7 ÷ 9,0 м.д. Характеристическая область протона имидазола в гистидине 8,0 ÷ 9,2 м.д., NH-индольного протона триптофана 9,0 ÷ 11,0 м.д. Области спектра, содержащие сигналы остаточных органических растворителей, не учитывают при проведении нормированного интегрирования. Доверительные интервалы нормированных интегральных интенсивностей характеристичных областей спектров 1H приводят в частной фармакопейной статье.

Установление подлинности олигопептидов при отсутствии стандартных образцов включает в себя идентификацию аминокислот и определение аминокислотной последовательности в пептидной цепи. Идентификацию аминокислот проводят в 3 этапа:

1. соотнесение сигналов спектров 1Н и 13С к конкретным углеводородным фрагментам (метильным, метиленовым, метиновым, ароматическим группам) на основе данных спектра 1Н-13С HSQC;
2. определение соседних углеводородных фрагментов, связанных ковалентной связью, и составление последовательности из углеводородных фрагментов на основе данных 1H-1H COSY и при необходимости 1H-1H TOCSY;
3. объединение в молекулу углеводородных фрагментов (алифатических и ароматических) и амидных групп на основе данных спектра 1Н-13С HMBC.

Аминокислотную последовательность в олигопептиде устанавливают на основе данных спектра 1Н-13С HMBC по наличию кросс-пиков между сигналами α-СН групп и С=О групп соседних аминокислот.