**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Спектроскопия ядерного магнитного резонанса** |  | **ОФС.1.2.1.1.0007** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.1.0007.15** |

|  |
| --- |
|  |

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – метод, основанный на поглощении радиочастотного электромагнитного излучения ядрами образца с ненулевым магнитным моментом, помещённого в постоянное магнитное поле (*B*0). Ненулевые магнитные моменты имеют изотопы ядер элементов с нечётной атомной массой (1H, 13C, 15N, 19F, 31P и др.).

**Область применения**

Многообразие структурной и аналитической информации, содержащейся в спектрах ЯМР, позволяет использовать метод ЯМР для проведения качественного и количественного анализа. Применение спектроскопии ЯМР в количественном анализе основано на прямой пропорциональности молярной концентрации магнитно-активных ядер интегральной интенсивности соответствующего сигнала поглощения в спектре.

**Метод**

Вращающееся вокруг своей оси ядро имеет собственный момент количества движения (угловой момент, или спин) *P*. Магнитный момент ядра μ прямо пропорционален спину: μ = γ*∙ P* (γ – коэффициент пропорциональности или гиромагнитное отношение). Угловой и магнитный моменты являются квантованными, т.е. могут находиться в одном из 2*I* + 1спиновых состояний (*I* – *спиновое квантовое число*). Различные состояния магнитных моментов ядер обладают одинаковой энергией, если на них не действует внешнее магнитное поле. При помещении ядер во внешнее магнитное поле *B*0 энергетическое вырождение ядер снимается и возникает возможность энергетического перехода с одного уровня на другой. Процесс распределения ядер между различными энергетическими уровнями протекает в соответствии с законом распределения Больцмана и приводит к появлению макроскопической равновесной продольной намагниченности *М*z. Время, которое требуется для создания *М*z после включения внешнего магнитного поля *В*0, называется временем *продольной* или *спин*-*решёточной* *релаксации* (*Т*1). Нарушение равновесного распределения ядер происходит под действием радиочастотного магнитного поля (*B*1), перпендикулярного *B*0, которое вызывает дополнительные переходы между энергетическими уровнями, сопровождающиеся поглощением энергии (явление *ядерного магнитного резонанса)*. Частота *ν*0, при которой возникает поглощение энергии ядрами (*Ларморова* или *резонансная частота поглощения*), изменяется в зависимости от величины постоянного поля *B*0: *ν*0 = γ*B*0/2π. В момент резонанса происходит взаимодействие между индивидуальными ядерными магнитными моментами и полем *В*1, которое выводит вектор *М*z из его равновесного положения вдоль оси *z*. В результате появляется *поперечная намагниченность* *М*xy. Её изменение, связанное с обменом внутри спиновой системы, характеризуют временем *поперечной* или *спин-спиновой* *релаксации* (*Т*2).

Зависимость интенсивности поглощения энергии ядрами одного типа от частоты радиочастотного магнитного поля при фиксированном значении *В*0 называют *одномерным спектром ядерного магнитного резонанса* ядра данного типа. Спектр ЯМР может быть получен 2 способами: при непрерывном облучении образца радиочастотным полем с изменяющейся частотой, в результате чего регистрируют непосредственно спектр ЯМР (спектроскопия с непрерывным облучением), или при воздействии на образец короткого радиочастотного импульса (*импульсная спектроскопия*). В импульсной спектроскопии ЯМР регистрируют затухающее во времени когерентное излучение, испускаемое ядрами при возвращении в исходное спиновое состояние (*сигнал спада свободной индукции*) с последующим преобразованием временной шкалы в частотную (*Фурье-преобразование*).

В молекулах электроны атомов уменьшают величину действующего внешнего магнитного поля *B*0 в месте нахождения ядра, т.е. проявляется *диамагнитное экранирование*:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *В*лок | – | напряжённость результирующего поля;  |
|  | *σ* | − | константа экранирования. |

Разница в резонансных частотах сигналов ядер, равная разнице в их константах экранирования, называют *химическим сдвигом* сигналов, обозначается символом *δ*, измеряется в миллионных долях (м.д.). Взаимодействие магнитных моментов ядер через посредство электронов химической связи (*спин-спиновое взаимодействие*) вызывает расщепление сигнала ЯМР (*мультиплетность, m*). Количество компонент в мультиплетах определяют спином ядра и количеством взаимодействующих ядер. Мерой спин-спинового взаимодействия является *константа спин-спинового взаимодействия* (*J*, измеряется в герцах, Гц). Значения δ, *m* и *J* не зависят от величины постоянного магнитного поля.

Интенсивность сигнала ЯМР ядра в спектре определяют заселённостью его энергетических уровней. Из ядер с естественным содержанием изотопов наиболее интенсивные сигналы дают ядра водорода. На интенсивность сигналов ЯМР также влияет время продольно-поперечной релаксации (большие *Т*1 ведут к уменьшению интенсивности сигнала).

Ширина сигналов ЯМР (разница между частотами на полувысоте сигнала) зависит от *Т*1 и *Т*2. Малые времена *T*1 и *Т*2 обуславливают широкие и мало интерпретируемые сигналы спектра.

Чувствительность метода ЯМР (предельно обнаруживаемая концентрация вещества) зависит от интенсивности сигнала ядра. Для ядер 1Н чувствительность составляет 10−9–10−11 моль.

Корреляции различных спектральных параметров (например, химических сдвигов различных ядер в пределах одной молекулярной системы) получают гомо- и гетероядерными методами в формате 2D или 3D.

**Оборудование**

Импульсный спектрометр ЯМР (ЯМР-спектрометр) с высокой разрешающей способностью состоит из:

- магнита для создания постоянного магнитного поля *B*0;

- термостатируемого датчика с держателем образца для подачи радиочастотного импульса и определения излучения, испускаемого образцом;

- электронного устройства для создания радиочастотного импульса, регистрации, усиления и преобразования сигнала спада свободной индукции в цифровую форму;

- устройства для настройки и регулировки электронных контуров;

- устройства сбора и обработки данных (компьютер);

и может также включать:

- проточную кювету для проведения жидкостной хроматографии ядерного магнитного резонанса или проточно-инъекционного анализа;

- систему для создания импульсного градиента магнитного поля.

Сильное магнитное поле генерируется катушкой сверхпроводимости в сосуде Дьюара, заполненном жидким гелием.

Проверяют надлежащее функционирование ЯМР-спектрометра. Для проверки проводят соответствующие испытания, включающие, как правило, измерение ширины спектральной линии на полувысоте определённых пиков при определённых условиях (*разрешение*), воспроизводимость положения сигнала и отношение сигнал/шум (отношение между интенсивностью определённого сигнала в спектре ЯМР и случайных колебаний в области спектра, не содержащего сигналов от анализируемого вещества, *S*/*N*) для стандартных смесей. В программном обеспечении спектрометров имеются алгоритмы по определению *S/N*.Все изготовители приборов предоставляют спецификации и протоколы измерения этих параметров.

**Установление подлинности действующего вещества**

Установление подлинности действующего вещества осуществляют путём сравнения спектра испытуемого образца со спектром фармакопейного стандартного образца или с известным эталонным спектром. Спектры стандартных и испытуемых образцов должны быть получены с использованием одних и тех же методик и условий. Пики в сравниваемых спектрах должны совпадать по положению (отклонения значений *δ* испытуемого и стандартных образцов в пределах ±0,1 м.д. для ядерного магнитного резонанса 1Н и ±0,5 м.д. для ядерного магнитного резонанса 13С), интегральной интенсивности и мультиплетности, значения которых приводят при описании спектров. При отсутствии фармакопейного стандартного образца можно используют образец сравнения, идентичность которого подтверждают самостоятельной структурной интерпретацией спектральных данных или альтернативными методами.

При подтверждении подлинности образцов нестехиометрического состава (например, природных полимеров переменного состава) допускают несовпадение пиков испытуемого и стандартных образцов по положению и интегральной интенсивности сигналов. Сравниваемые спектры должны быть подобны, т.е. содержать одинаковые характеристические области сигналов, подтверждающие совпадение фрагментного состава испытуемого и стандартных образцов.

Для установления подлинности смеси веществ (экстрактов) допускают использование одномерных спектров ЯМР целиком, как «отпечатков пальца» объекта, без детализации значений δ и мультиплетности отдельных сигналов. В случае использования двумерной спектроскопии ЯМР при описании спектров (фрагментов спектра), заявленных на подлинность, следует приводить значения кросс-пиков.

**Идентификация посторонних примесей/остаточных органических растворителей**

Идентификацию посторонних примесей/остаточных органических растворителей осуществляют аналогично установлению подлинности действующего вещества, ужесточая требования к чувствительности и цифровому разрешению.

**Определение содержания посторонних примесей/остаточных органических растворителей относительно действующего вещества**

Метод ЯМР является прямым абсолютным методом определения мольного соотношения действующего вещества и примесного соединения (*n*/*n*пр):

,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S'* и *S'*пр | – | нормированные значения интегральных интенсивностей сигналов действующего вещества и примеси. |

Нормирование проводят по числу ядер в структурном фрагменте, обуславливающих измеряемый сигнал.

Массовую долю примеси/остаточного органического растворителя относительно действующего вещества (*X*пр) определяют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *M*пр | – | молекулярная масса примеси;  |
|  | *M* | − | молекулярная масса действующего вещества; |
|  | *S'*пр | − | нормированное значение интегральной интенсивности сигнала примеси; |
|  | *S'* | − | нормированное значение интегральной интенсивности сигнала действующего вещества. |

**Количественное определение содержания вещества (действующего вещества, примеси/остаточного органического растворителя) в фармацевтической субстанции**

*Абсолютное содержание вещества* в фармацевтической субстанции определяют методом внутреннего стандарта, в качестве которого выбирают вещество, сигналы которого находятся вблизи сигналов определяемого вещества, не перекрываясь с ними. Интенсивности сигналов определяемого вещества и стандарта не должны существенно различаться.

Содержание определяемого вещества в испытуемом образце в пересчёте на сухое вещество в процентах (*X* масс) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *M* | – | молекулярная масса определяемого вещества;  |
|  | *M*0 | − | молекулярная масса вещества-стандарта; |
|  | *S'* | − | нормированное значение интегральной интенсивности сигнала определяемого вещества; |
|  | *S'*0 | − | нормированное значение интегральной интенсивности сигнала стандарта; |
|  | *a* | − | навеска испытуемого образца; |
|  | *a*0 | − | навеска вещества-стандарта; |
|  | *W* | − | содержание влаги, %. |

В качестве веществ-стандартов используют следующие соединения: малеиновая кислота (2H; 6,60 м.д., *M* = 116,07), бензилбензоат (2H; 5,30 м.д., *M* = 212,24), малоновая кислота (2H; 3,30 м.д., *M* = 104,06), сукцинимид (4H; 2,77 м.д., *M* = 99,09), ацетанилид (3H; 2,12 м.д., *M* = 135,16), *трет*-бутиловый спирт (9H; 1,30 м.д., *M* = 74,12).

*Относительное содержание вещества* как доля компонента в смеси компонентов фармацевтической субстанции определяют методом внутренней нормализации. Мольная (*X*моль) и массовая (*X*масс) доля компонента *i* в смеси *n* веществ определяется по формулам:

|  |  |
| --- | --- |
| , |  |
|  и . |

**Определение молекулярной массы белков и полимеров**

Молекулярные массы белков и полимеров определяют сравнением их подвижности с подвижностью соединений-стандартов с известной молекулярной массой, используя методики DOSY. Измеряют коэффициенты самодиффузии (*D*) испытуемых и стандартных образцов, строят график зависимости логарифмов молекулярных масс соединений-стандартов от логарифмов *D*. По полученному таким образом графику методом линейной регрессии определяют неизвестные молекулярные массы испытуемых образцов.

**Спектроскопия ЯМР образцов в растворах**

Испытуемый образец растворяют в растворителе, к которому добавляют соответствующий эталон для калибровки химического сдвига, как указано в фармакопейной статье. Величина относительного химического сдвига ядра вещества (δв-во) определяют следующим выражением:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *ν*в-во | – | частота резонанса ядра вещества, Гц;  |
|  | *ν*эталон | − | частота резонанса ядра эталона, Гц; |
|  | *ν*прибора | − | рабочая частота ЯМР-спектрометра (частота, на которой выполняются условия резонанса для ядер водорода при данном *В*0, МГц). |

Для растворов в органических растворителях химический сдвиг в спектрах 1H и 13C измеряют относительно сигнала тетраметилсилана, положение которого принято за 0 м.д. Отсчёт химических сдвигов ведут в сторону слабого поля (влево) от сигнала тетраметилсилана (δ–шкала химических сдвигов). Для водных растворов в качестве эталона в спектрах ЯМР 1H используют 2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфонат натрия или триметилсилилпропионат натрия, принимая химический сдвиг протонов метильных групп равным 0,0 м.д. Для спектров 13C водных растворов в качестве эталона используют диоксан, химический сдвиг которого равен 67,19 м.д.

При калибровке спектров 19F в качестве первичного эталона с нулевым значением химического сдвига используют трифторуксусную кислоту или трихлорфторметан; спектров 31P – 85 % раствор ортофосфорной кислоты или триметилфосфат; спектров 15N – нитрометан либо насыщенный раствор аммиака. В 1Н и 13С ЯМР, как правило, используют внутренний эталон, который непосредственно прибавляют к испытуемому образцу. В 15N, 19F и 31Р ЯМР часто используют внешний эталон, который находится отдельно в коаксиальной цилиндрической пробирке или капилляре.

При описании спектров ЯМР указывают растворитель, в котором растворен образец, и его концентрацию. В качестве растворителей используют легкоподвижные жидкости, в которых для уменьшения интенсивности сигналов растворителей атомы водорода заменены атомами дейтерия. Дейтерированный растворитель выбирают, исходя из следующих критериев:

1) растворимости в нём испытуемого образца;

2) отсутствия перекрывания сигналов остаточных протонов дейтерированного растворителя с сигналами испытуемого образца;

3) отсутствия взаимодействия между растворителем и испытуемым образцом, если не указано иначе.

Атомы растворителя дают сигналы, которые легко идентифицируют по их химическому сдвигу и используют для калибровки оси химического сдвига (вторичный эталон). Химические сдвиги сигналов остаточных протонов дейтерированных растворителей имеют следующие значения (м.д.): хлороформ − 7,26; бензол − 7,16; вода − 4,79; метанол − 3,31; диметилсульфоксид − 2,50; ацетон − 2,05; положение сигнала воды и протонов гидроксильных групп спиртов зависит от pH среды и температуры.

Для количественного анализа растворы не должны содержать нерастворённых частиц. При некоторых количественных определениях может потребоваться добавление внутреннего стандарта для сравнения интенсивности испытуемого и стандартного образцов. Соответствующие стандартные образцы и их концентрации должны быть указаны в фармакопейной статье. После помещения образца в пробирку и укупорки образец вводят в магнит ЯМР-спектрометра, устанавливают параметры испытания (параметры настройки, регистрации, оцифровки сигнала спада свободной индукции). Основные параметры испытания, приводимые в фармакопейной статье, записывают или сохраняют в компьютере.

Для предотвращения дрейфа спектра во времени выполняют стабилизационную процедуру (дейтериевый лок), используют сигнал дейтерия, вызываемый дейтерированными растворителями, если не указано иное. Прибор регулируют для получения наиболее оптимальных условий резонанса и максимального соотношения *S/N* (*шиммирование*).

В ходе испытания возможно выполнение многократных последовательностей циклов «импульс–сбор данных–пауза» с последующим суммированием отдельных сигналов спада свободной индукции и усреднением уровня шума. Время задержки между импульсными последовательностями, в течение которого система ядерных спинов восстанавливает свою намагниченность (*D*1), для количественных измерений должно превышать время продольной релаксации *T*1: *D*1 ≥5 *T*1. В программном обеспечении спектрометров имеются алгоритмы по определению *T*1. Если величина *T*1 неизвестна, рекомендуют использовать значение *D*1 = 25 c.

При количественных измерениях рекомендуют проводить испытание без вращения образца во избежание появления боковых сигналов.

После проведения Фурье-преобразования сигналы в частотном представлении калибруют под выбранный эталон и измеряют их относительную интенсивность путём интегрирования – измерения отношения площадей резонансных сигналов. В спектрах 13С интегрируют только однотипные сигналы. Точность интегрирования сигнала зависит от соотношения *сигнал–шум* (*S/N)*:

,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *u (I)%* | – | стандартная неопределённость интегрирования. |

Число накоплений спада свободной индукции, необходимое для достижения удовлетворительного соотношения *S/N*, должно быть приведено в фармакопейной статье.

Наряду с одномерными в аналитических целях используют гомо- и гетероядерные двумерные корреляционные спектры, основанные на определённой последовательности импульсов (COSY, NOESY, ROESY, HSQC, HMBC, HETCOR, CIGAR, INADEQUATE и др.). В двумерных спектрах взаимодействие между ядрами проявляется в виде сигналов, называемых кросс-пиками. Положение кросс-пиков определяют значениями химических сдвигов двух взаимодействующих ядер. Двумерные спектры предпочтительно использовать для определения состава сложных смесей и экстрактов, т.к. вероятность наложения сигналов (кросс-пиков) в двумерных спектрах существенно ниже, чем вероятность наложения сигналов в одномерных спектрах.

Для быстрого получения спектров гетероядер (13C, 15N и др.) применяют методики (HSQC, HMBC), которые позволяют получать на ядрах 1H спектры других ядер, используя механизмы гетероядерного взаимодействия.

Методика DOSY, основанная на регистрации потери фазовой когерентности ядерных спинов за счёт трансляционных перемещений молекул под действием градиента магнитного поля, позволяет получать спектры индивидуальных соединений (спектральное разделение) в смеси без их физического разделения и определять размеры, степени агрегированности и молекулярные массы молекулярных объектов (молекул, макромолекул, молекулярных комплексов, супрамолекулярных систем).

**Спектроскопия ЯМР твёрдых веществ**

Испытуемые образцы в твёрдом состоянии анализируют с помощью специально оборудованных ЯМР-спектрометров. Определённые технические операции (вращение порошкообразного образца в роторе, наклонённом под «магическим» углом (54,7°) к оси магнитного поля *В*0, силовое распаривание, перенос поляризации от легковозбудимых ядер к менее поляризуемым ядрам – кросс-поляризация) позволяют получать спектры органических и неорганических соединений с высокой разрешающей способностью. Полное описание процедуры должно быть приведено в фармакопейной статье. Применяют данную разновидность спектроскопии ЯМР при изучении полиморфизма твёрдых лекарственных средств.