

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Спектроскопия ядерного
магнитного резонанса

ОФС.1.2.1.1.0007.15
Взамен ГФ XII, ч.1,
ОФС 42-0046-07

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – метод, основанный на поглощении радиочастотного электромагнитного излучения ядрами образца с ненулевым магнитным моментом, помещенного в постоянное магнитное поле (B_0). Ненулевые магнитные моменты имеют изотопы ядер элементов с нечетной атомной массой (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P и др.).

Общие принципы. Вращающееся вокруг своей оси ядро имеет собственный момент количества движения (угловой момент, или спин) P . Магнитный момент ядра μ прямо пропорционален спину: $\mu = \gamma \cdot P$ (γ – коэффициент пропорциональности или гиромагнитное отношение). Угловой и магнитный моменты являются квантованными, т.е. могут находиться в одном из $2I + 1$ спиновых 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 M_z . Время, которое требуется для создания M_z после включения внешнего магнитного поля B_0 , называется временем *продольной* или *спин-решеточной релаксации* (T_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 : $\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$. В момент резонанса происходит взаимодействие между индивидуальными ядерными магнитными моментами и полем B_1 , которое выводит вектор M_z из его равновесного положения вдоль оси z . В результате появляется *поперечная намагниченность* M_{xy} . Ее изменение, связанное с обменом внутри спиновой системы, характеризуется временем *поперечной* или *спин-спиновой релаксации* (T_2).

Зависимость интенсивности поглощения энергии ядрами одного типа от частоты радиочастотного магнитного поля при фиксированном значении B_0 называется *одномерным спектром ядерного магнитного резонанса* ядра данного типа. Спектр ЯМР может быть получен двумя способами: при непрерывном облучении образца радиочастотным полем с изменяющейся частотой, в результате чего регистрируется непосредственно спектр ЯМР (спектроскопия с непрерывным облучением), или при воздействии на образец короткого радиочастотного импульса (*импульсная спектроскопия*). В импульсной спектроскопии ЯМР регистрируется 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*:

$$B_{\text{лок}} = B_0 \cdot (1 - \sigma),$$

где $B_{\text{лок}}$ – напряженность результирующего поля;

σ – константа экранирования.

Разница в резонансных частотах сигналов ядер, равная разнице в их константах экранирования, называется *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 определяется 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 определяется заселенностью 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 T_1 ведут к уменьшению интенсивности сигнала).

Ширина сигналов ЯМР (разница между частотами на полувысоте сигнала) зависит от T_1 и T_2 . Малые времена T_1 и T_2 обуславливают широкие и мало интерпретируемые сигналы спектра.

Чувствительность метода ЯМР (предельно обнаруживаемая концентрация вещества) зависит от интенсивности сигнала ядра. Для ядер ^1H чувствительность составляет $10^{-9} \div 10^{-11}$ моль.

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

Прибор. 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.

Следует проверять надлежащее функционирование ЯМР-спектрометра. Для проверки проводят соответствующие испытания, включающие, как правило, измерение ширины спектральной линии на полувысоте определенных пиков при определенных условиях (*разрешение*), воспроизводимость положения сигнала и отношение сигнал/шум (отношение между интенсивностью определенного 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.

Спектроскопия ЯМР образцов в растворах

Методика. Испытуемый образец растворяют в растворителе, к которому может быть добавлен соответствующий эталон для калибровки химического сдвига, как указано в нормативной документации. Величина относительного химического сдвига ядра вещества ($\delta_{в-во}$) определяется следующим выражением:

$$\delta_{в-во} = (v_{в-во} - v_{эталон})/v_{прибора},$$

где $v_{в-во}$ – частота резонанса ядра вещества, Гц;

$\nu_{\text{эталон}}$ – частота резонанса ядра эталона, Гц;

$\nu_{\text{прибора}}$ – рабочая частота ЯМР-спектрометра (частота, на которой выполняются условия резонанса для ядер водорода при данном B_0 , МГц).

Для растворов в органических растворителях химический сдвиг в спектрах ^1H и ^{13}C измеряется относительно сигнала тетраметилсилана, положение которого принято за 0 м.д. Отсчет химических сдвигов ведется в сторону слабого поля (влево) от сигнала тетраметилсилана (дельта – шкала химических сдвигов). Для водных растворов в качестве эталона в спектрах ЯМР ^1H используется 2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфонат натрия, химический сдвиг протонов метильной группы которого равен 0,015 м.д. Для спектров ^{13}C водных растворов в качестве эталона используют диоксан, химический сдвиг которого равен 67,4 м.д.

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

При описании спектров ЯМР необходимо указывать растворитель, в котором растворено вещество, 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 нем испытуемого соединения;
- 2) отсутствия перекрывания сигналов остаточных протонов дейтерированного растворителя с сигналами испытуемого соединения;

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

Атомы растворителя дают сигналы, которые легко идентифицируются по их химическому сдвигу и могут использоваться 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 – 4,7; метанол – 3,35 и 4,78; 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 нерастворенных 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 нормативной документации. 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 нормативной документации, записывают или сохраняют в компьютере.

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

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 : $D_1 \geq 5 T_1$. В программном обеспечении спектрометров имеются алгоритмы по определению T_1 . Если величина T_1 неизвестна, рекомендуется использовать значение $D_1 = 25$ с.

При количественных измерениях рекомендуется 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 путем интегрирования – измерения отношения площадей резонансных сигналов. В спектрах ^{13}C интегрируют только однотипные сигналы. Точность интегрирования сигнала зависит от соотношения *сигнал – шум* (S/N):

$$uI\% = 0,25 + 100SN,$$

где $u(I)$ – стандартная неопределенность интегрирования.

Число накоплений спада свободной индукции, необходимое для достижения удовлетворительного соотношения S/N , должно быть приведено в нормативной документации.

Наряду с одномерными в аналитических целях используют гомо- и гетероядерные двумерные корреляционные спектры, основанные на определенной 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 определяется 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 (^{13}C , ^{15}N 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 счет 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).

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

1. Установление подлинности действующего вещества.

Установление подлинности действующего вещества осуществляют путем сравнения спектра испытуемого образца со спектром стандартного образца или с опубликованным 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 $\pm 0,1$ м.д. для ядерного магнитного резонанса ^1H и $\pm 0,5$ м.д. для ядерного магнитного резонанса ^{13}C), интегральной интенсивности и мультиплетности, значения которых следует приводить при описании спектров. При отсутствии стандартного образца можно использовать фармакопейный стандартный образец, идентичность которого подтверждают самостоятельной структурной интерпретацией спектральных данных и 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. Сравнимые 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.

2. 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.

3. Определение содержания посторонних примесей/остаточных органических растворителей относительно действующего вещества. Метод ЯМР является прямым абсолютным методом определения мольного соотношения действующего вещества и примесного соединения ($n/n_{\text{примесь}}$):

$$S' / S'_{\text{примесь}} = n / n_{\text{примесь}},$$

где S' и $S'_{\text{примесь}}$ – 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 ($X_{\text{пр}}$) определяют по формуле:

$$X_{\text{пр}} = M_{\text{пр}} \cdot S_{\text{пр}}' / M \cdot S',$$

где $M_{\text{пр}}$ – молекулярная масса примеси;

M – молекулярная масса действующего вещества;

$S'_{\text{пр}}$ – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала примеси;

S' – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала действующего вещества.

4. Количественное определение содержания вещества (действующего вещества, примеси/остаточного растворителя) в фармацевтической субстанции. Абсолютное содержание вещества в фармацевтической субстанции определяется методом внутреннего стандарта, в качестве которого выбирается вещество, сигналы которого находятся вблизи сигналов определяемого вещества, не перекрываясь с ними. Интенсивности сигналов определяемого вещества и стандарта не должны существенно различаться.

Процентное содержание определяемого вещества в испытуемом образце в пересчете на сухое вещество ($X, \%_{\text{масс}}$) вычисляют по формуле:

$$X, \%_{\text{масс}} = 100 \cdot (S' / S'_0) \cdot (M \cdot a_0 / M_0 \cdot a) \cdot [100 / (100 - W)],$$

где S' – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала определяемого вещества;

S'_0 – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала стандарта;

M – молекулярная масса определяемого вещества;

M_0 – молекулярная масса;

a – навеска испытуемого образца;

a_0 – навеска вещества-стандарта;

W – содержание влаги, %.

В качестве веществ-стандартов можно использовать следующие соединения: малеиновая кислота (2Н; 6,60 м.д., $M = 116,07$), бензилбензоат (2Н; 5,30 м.д., $M = 212,25$), малоновая кислота (2Н; 3,30 м.д., $M = 104,03$),

сукцинимид (4Н; 2,77 м.д., $M = 99,09$), ацетанилид (3Н; 2,12 м.д., $M = 135,16$), *трет*-бутанол (9Н; 1,30 м.д., $M = 74,12$).

Относительное содержание вещества как доля компонента в смеси компонентов фармацевтической субстанции определяется методом внутренней нормализации. Мольная ($X_{\text{моль}}$) и массовая ($X_{\text{масс}}$) доля компонента i в смеси n веществ определяется по формулам:

$$X_i, \text{ моль} = \frac{S_i}{\sum_{j=1}^n S_j}, \quad X_i, \text{ масс} = \frac{M_i \cdot S_i}{\sum_{j=1}^n M_j \cdot S_j},$$

$$X_i, \text{ моль}\% = X_{\text{моль}} \cdot 100 \quad \text{и} \quad X_i, \text{ масс}\% = X_{\text{масс}} \cdot 100.$$

5. 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. Полное описание DOSY-эксперимента должно быть приведено в нормативной документации.

Спектроскопия ЯМР твердых веществ

Образцы в твердом состоянии анализируют с помощью специально оборудованных ЯМР-спектрометров. Определенные технические операции (вращение порошкообразного образца в роторе, наклоненном под магическим углом ($54,7^\circ$) к оси магнитного поля B_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 нормативной документации. Основная область применения данной разновидности спектроскопии ЯМР – изучение полиморфизма твердых лекарственных средств.