

# СПЕКТРОСКОПИЯ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

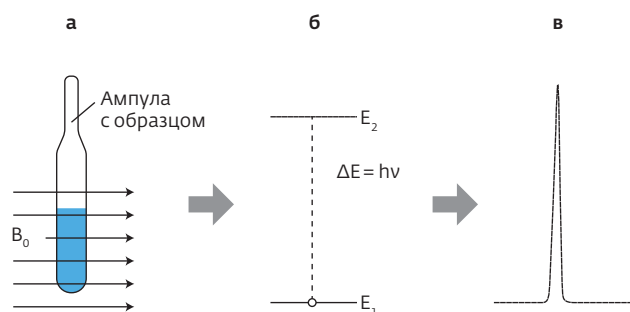
**Чазов А.И.**, к.ф.-м.н., **Черкасов А.М.**, ООО "ЭЛЕМЕНТ", info@element-msc.ru;  
**Липеева А.В.**, к.х.н., ООО "ЛабПро Медиа"

Сегодня ни один исследователь не обходится без спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Метод ведет свое начало с 1946 года, когда американские ученые Эдвард Парселл и Роберт Паунд впервые наблюдали сигнал ЯМР на протонах. С тех пор спектрометры ЯМР стали неотъемлемой частью исследовательских и прикладных лабораторий, а число применений метода постоянно растет.

ЯМР-спектроскопия определяет пространственные структуры молекул любой сложности – белков, полимеров, макроциклических соединений. ЯМР-релаксация позволяет изучать подвижность молекул и тем самым различать отдельные компоненты смесей. В химии и фармакологии ЯМР-спектроскопия является важным методом для подтверждения структуры синтезированных соединений и изучения кинетики реакций, практически ни одно химическое исследование не обходится без ЯМР. Среди доступных неразрушающих методов только ЯМР-спектроскопия способна в полной мере ответить на вопросы о химическом строении, результатах и механизмах реакции, чистоте и составе химических соединений и их смесей.

## ОСНОВЫ МЕТОДА ЯМР

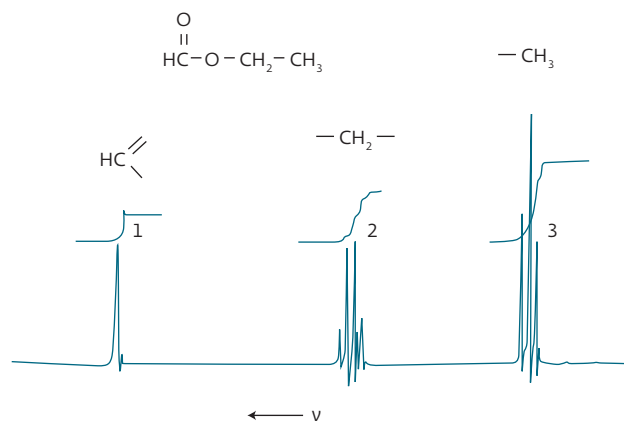
Физические основы спектроскопии ЯМР определяются магнитными свойствами атомных ядер. Взаимодействие магнитного момента ядра с внешним магнитным полем  $B_0$  происходит в соответствии с правилами квантовой механики – энергия ядра принимает строго определенные дискретные значения  $E_i$ , поэтому существует конечный набор стационарных состояний, в которых может находиться элементарная частица. С помощью высокочастотного генератора можно вызвать переходы между стационарными состояниями, зарегистрировать поглощение энергии, усилить и детектировать резонансный сигнал



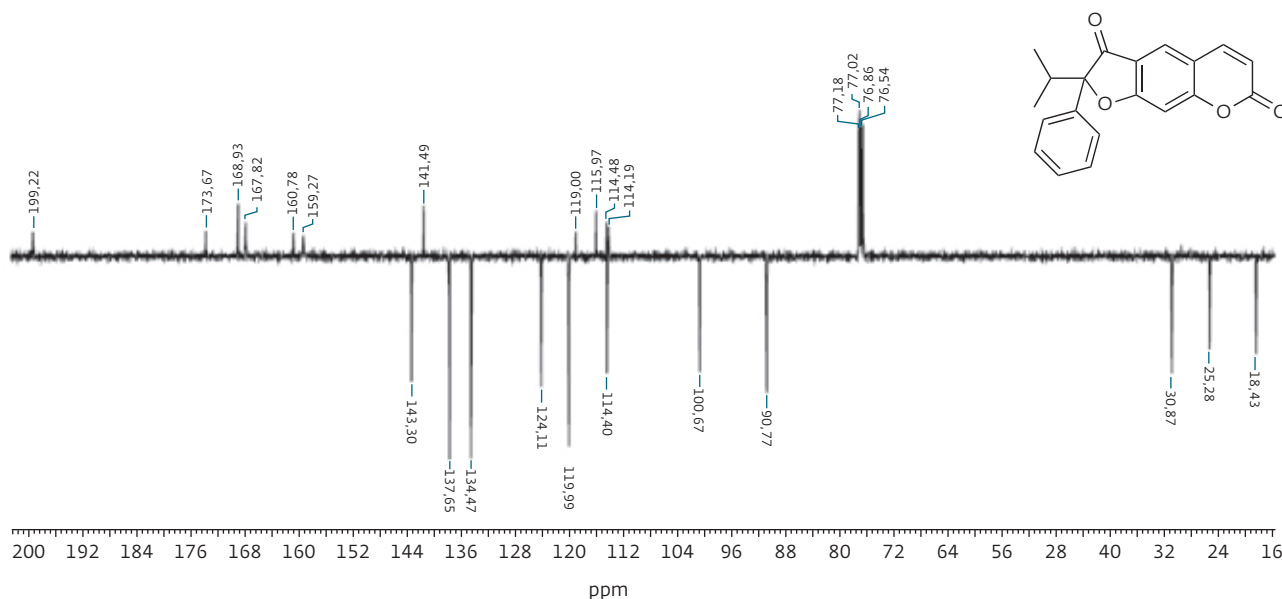
**Рис.1.** Образец в магнитном поле  $B_0$  (а); диаграмма энергетических уровней (б); резонансный сигнал (в)

(рис.1) [1]. Таким образом – получить спектр соединения, содержащего атомы с ненулевыми ядерными магнитными моментами.

Основными ядрами, наиболее широко используемыми в ЯМР, являются протон  $^1\text{H}$ , ядра фтора  $^{19}\text{F}$ , азота  $^{14}\text{N}$  и  $^{15}\text{N}$ . Поскольку ядро углерода  $^{12}\text{C}$ , самого распространенного элемента в органической химии, как и другие ядра с четными массовыми числами и четным атомным номером не имеют магнитных моментов и не дают сигналов в спектре, методом ЯМР можно исследовать только изотоп углерода  $^{13}\text{C}$ . В более специфических исследованиях возможна регистрация спектров на ядрах  $^{31}\text{P}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{45}\text{Sc}$ ,  $^{129}\text{Xe}$  и  $^{195}\text{Pt}$ .



**Рис.2.** Спектр протонного магнитного резонанса этилформиата



**Рис.3.** Вид спектра <sup>13</sup>C замещенного фурукумарина

Интегральная кривая спектра в области резонансных сигналов образует ступенчатые кривые. Высота каждой ступеньки пропорциональна площади под соответствующей спектральной линией, которая, в свою очередь, пропорциональна числу дающих этот сигнал протонов (рис.2).

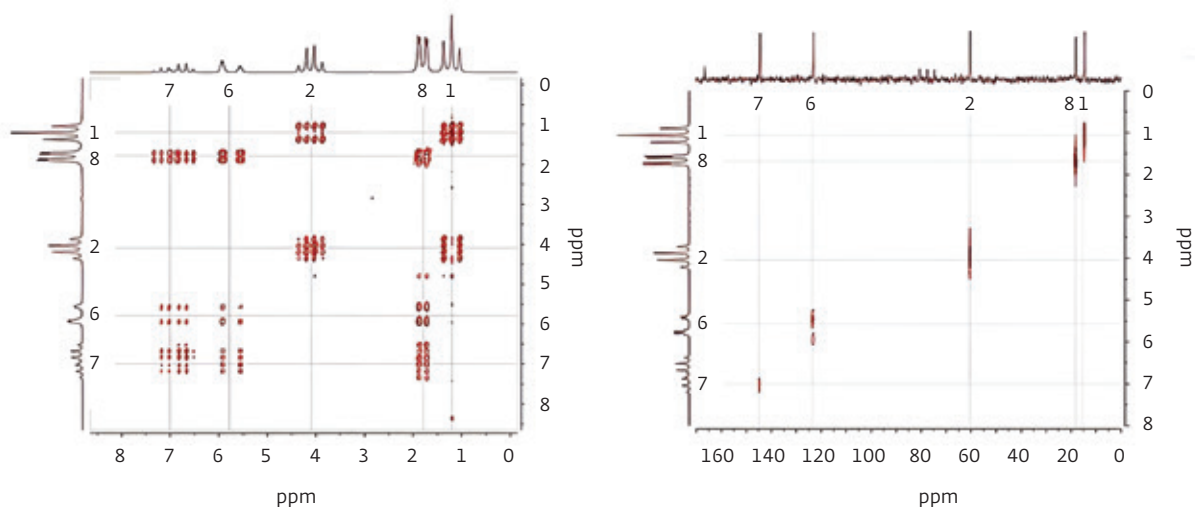
Вследствие различного химического окружения протоны в молекуле резонируют по-разному, а их положение в спектре характеризуется химическим сдвигом. Найденные корреляции между спектральными параметрами, химическим сдвигом и спин-спиновым взаимодействием позволяют эмпирически установить структуру соединения: значение химического сдвига определяет химическое окружение ядра, дающего резонансный сигнал, интегрирование – относительное количество присутствующих ядер, а спин-спиновое взаимодействие – положение ядер друг относительно друга. Мультиплетность резонансных сигналов и распределение интенсивности внутри мультиплетов строго определяет число протонов в соседних группах.

Часто одного спектра <sup>1</sup>H для подтверждения или определения структуры недостаточно, обычно в паре с ним всегда измеряют спектр <sup>13</sup>C, число сигналов в котором соответствует числу углеродов в молекуле (рис.3). Спектр <sup>13</sup>C отличается широким диапазоном химических сдвигов, в каждом участке которого поглощают атомы углерода разной гибридизации. В области сильного поля (0–50 м.д.) расположены сигналы атомов

C в состоянии sp<sup>3</sup>-гибридизации, от 70–100 м.д. лежат sp-гибридизованные атомы C, от 100 до 150 м.д. находятся sp<sup>2</sup>-гибридизованные C-атомы алкенов и ароматических соединений, в области слабого поля (150–220 м.д.) – sp<sup>2</sup>-гибридизованные атомы углерода в составе различных функциональных групп, связанных с гетероатомами O, N и S. По спектру <sup>13</sup>C можно однозначно определить вид атома углерода и его окружение для гетероциклических соединений. На рис.3 приведен спектр производного фурукумарина, где четко идентифицируются характерные сигналы всех скелетных углеродов, а также нового ароматического заместителя. В качестве внутреннего стандарта в спектрах <sup>13</sup>C обычно используется дейтерохлороформ (характерный сигнал при 76,54–77,15 м.д.), относительно которого определяются остальные атомы углерода, включая карбонильные группы и четвертичные атомы C, не имеющие связей с протонами [2].

Фтор-19 (<sup>19</sup>F) имеет ядро со спином ½, является основным природным изотопом и обладает высоким гироманнитным отношением, что обеспечивает очень высокую чувствительность в ЯМР-спектрах. Диапазон химических сдвигов фтора гораздо шире протонных, что обеспечивает более высокую чувствительность к окружающим группам. Спектроскопия ЯМР <sup>19</sup>F – основной метод определения структуры и молекулярных взаимодействий фторсодержащих соединений [3].

Традиционные спектры ЯМР представляют собой зависимость амплитуды сигнала от химиче-



**Рис.4.** Двумерные спектры COSY 1,75 М этилкротоноата в  $\text{CDCl}_3$ : гомоядерный спектр COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (время регистрации 10 мин) (а); гетероядерный корреляционный спектр  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HETCOR, время регистрации 5–6 ч) (б)

ского сдвига или частоты. Двумерная спектроскопия ЯМР [4] расширяет это представление до двух частотных переменных [5], когда на горизонтальной оси находится один из спектров, чаще всего  $^1\text{H}$ , а по вертикальной оси – другой ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  и др.). Кросс-пики, наблюдаемые на таких спектрах, однозначно определяют связи атомов (рис.4).

### РАЗВИТИЕ ПРИБОРНОЙ БАЗЫ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

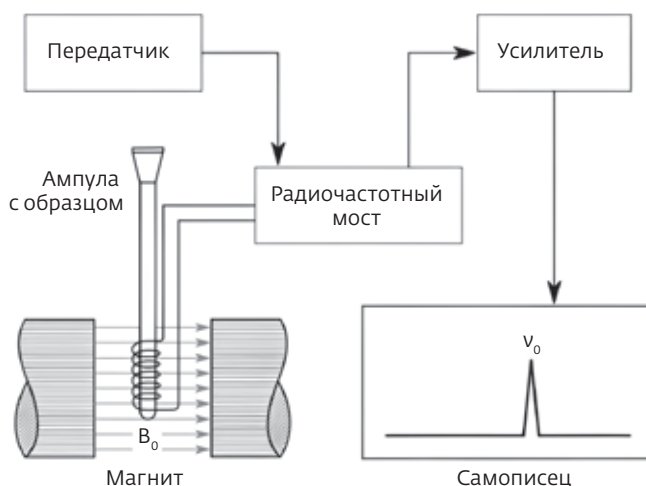
Первый ЯМР-спектрометр, собранный в 1946 году исследовательской группой Эдуарда Миллса Перселла, представлял собой источник излучения, ячейку для образца и детектор (рис.5).

Образец в стеклянной трубке диаметром 5 мм помещался в датчик спектрометра между полюсными наконечниками магнита. Дополнительно в области образца создавали электромагнитное поле в радиодиапазоне, частоту которого можно было менять. В качестве источника излучения использовался радиочастотный генератор или передатчик, а поглощение ядрами энергии передатчика регистрировалось с помощью радиочастотного моста, затем сигнал усиливался и записывался самописцем.

В те годы быстрое открытие явлений ЯМР, включая химический сдвиг [6], спин-спиновое взаимодействие [7], обменные протоны (-NH-, -OH) [8], широкополосное развязывание [9, 10], селективное развязывание [11] и ядерный эффект Оверхаузера

(ЯЭО) [12] было обнаружено на экспериментальных медных и железных электромагнитах [13] и постоянных магнитах из алюминиево-никелево-кобальтового сплава (AlNiCo) [14, 15]. Было установлено, что при увеличении напряженности магнитного поля возрастает чувствительность прибора и спектральное разрешение пиков вдоль оси химического сдвига.

В 1961 году на рынке появился первый коммерческий ЯМР-спектрометр на постоянных маг-



**Рис.5.** Схема первого ЯМР-спектрометра

**1920**

Открытие спина электрона и магнитного момента

**1930–40**

Открытие магнитных свойств ядер  
Первое наблюдение спектра ЯМР-Фурье

**1950**

Увеличение чувствительности приборов и однородности магнитного поля.  
Открытие магнитного экранирования, химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия

**1960**

Открытие двойного резонанса и ядерного эффекта Оверхаузера.  
Переход к сверхпроводящим магнитам

**1970**

Развитие компьютерных систем контроля спектрометром.  
Новые области применения ЯМР

**1980**

Дальнейшее усовершенствование приборов.  
Многоимпульсные эксперименты.  
Внедрение двумерной ЯМР

**1990**

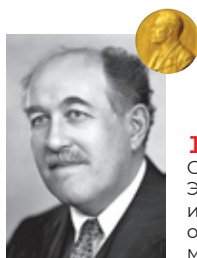
Градиент импульсного поля

**2000**

Криоэксперименты

**2010**

Появление настольных НП-ЯМР



**1943**

Отто Штерн  
Эксперимент Штерна-Герлаха в опытах с атомными и молекулярными пучками подтвердил представления о том, что электрон и атомные ядра имеют собственные магнитные моменты



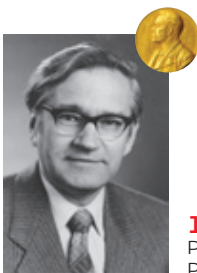
**1944**

Исидор Раби  
Первые ЯМР-эксперименты в молекулярных пучках



**1952**

Феликс Блох и Эдвард Парселл  
Получили ядерный магнитный резонанс в жидкостях и твердых телах



**1991**

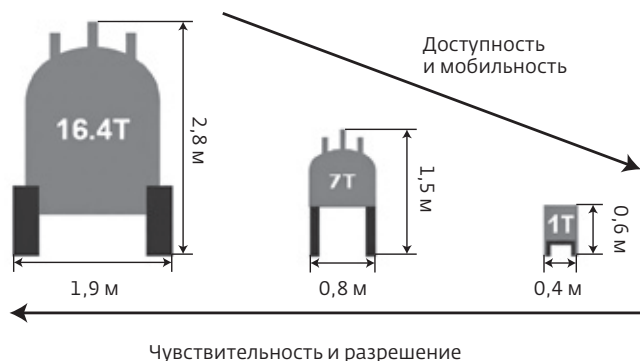
Ричард Эрнст  
Развитие метода ЯМР, двумерные эксперименты



**2002**

Курт Вютрих  
Определение трехмерной структуры биомолекул в жидкости

Рис.6. История ЯМР-спектроскопии



**Рис.7.** Относительные размеры ряда ЯМР-спектрометров: 16,4 Тл (700 МГц), 7 Тл (300 МГц) и 1 Тл (43 МГц, настольный)

нитях Varian-A60. А менее чем через 5 лет после своего появления технология с постоянными магнитами была вытеснена более мощными сверхпроводящими магнитами. Вместо магнитных сплавов стали использовать плотно скрученные ниобий-титановые провода, охлажденные до 4 К жидким гелием. Это нововведение произвело революцию в конструкции ЯМР-спектрометров, открыв эру повышения напряженности поля (5–23 Тл), чувствительности и разрешения (рис.6). Однородные магнитные поля высокой напряженности в сочетании с усовершенствованным аппаратным и программным обеспечением привели к стремительному развитию инструментальных приложений метода ЯМР-спектроскопии и, как следствие, дали толчок широкому кругу исследований в области органической, неорганической, физической и химии твердого тела [16].

В 1990-х годах в исследовательском сообществе вырос интерес к компактному ЯМР [17] с использованием новых ЯМР-детекторов – микрокатушек [18], конфигураций с внешним полем [19] и силовых детекторов [20].

В ЯМР-спектрометрах высокого разрешения используются сверхпроводящие магниты, размер которых увеличивается с ростом напряженности магнитного поля (рис.7). Так, в наиболее мощных на сегодняшний день ЯМР-спектрометрах установлены сверхпроводящие магниты с  $B_0 = 28$  Тл (1,2 ГГц) [21]. Такие ЯМР-спектрометры обычно размещаются в специализированных помещениях, обслуживаемых опытным техническим персоналом, и требуют регулярной подачи жидкого гелия – ограниченного и высокоза-

тратного ресурса [22]. Этим сложностей лишены бескриогенные низкочастотные модели.

В начале 2000 годов на рынке появилось сразу несколько моделей настольных низкочастотных ЯМР-приборов (НП-ЯМР). Они работали в диапазоне от 1 до 2 Тл (40–80 МГц по ларморовской частоте протонов) и обладали достаточным разрешением (~1 Гц). НП-ЯМР выгодно отличались от высокочастотных небольшими размерами, минимальным энергопотреблением и низкими затратами на обслуживание благодаря автоматизации и отсутствию криогенных жидкостей. Однако напряженность магнитного поля НП-ЯМР на порядок ниже. Кроме того, в компактном приборе трудно достичь сравнимого уровня однородности магнитного поля по всему объему стандартного образца [16]. Поэтому спектры ЯМР, полученные с помощью портативных ЯМР-приборов, имеют более низкие отношения сигнал/шум, что усложняет интерпретацию из-за перекрытия сигналов.

### **ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ В ФАРМАЦЕВТИКЕ И МЕДИЦИНЕ**

ЯМР спектрометры являются незаменимой техникой для фармацевтических исследований, поскольку обеспечивают комплексное, экспрессное и надежное решение химико-аналитических задач экспертизы фармацевтических субстанций. Спектроскопия ЯМР имеет богатый и успешный опыт установления как химической структуры индивидуальных органических соединений, так и деталей их электронного и пространственного строения. Протонная спектроскопия ЯМР обычно используется как дополнительный метод для подтверждения результатов ВЭЖХ и получения информации, которую сложно или невозможно получить с помощью других прецизионных методов химического анализа.

### **Контроль качества лекарственных препаратов\***

В настоящее время метод ЯМР-спектроскопии описан во всех фармакопеях мира, где присутствует общая фармакопейная статья (ОФС) или монография "Спектроскопия ядерного магнитного резонанса". В данных ОФС отражены базовые возможности метода ЯМР при решении задач контроля качества лекарственных средств. Применение ЯМР для оценки некоторых показателей качества конкретных ЛС регламентируется общими и частными фармакопейными ста-

\* Раздел подготовлен по материалам ОФС.1.2.1.1.0007 "Спектроскопия ядерного магнитного резонанса" Государственной фармакопеи РФ, изд. 15.

тями (ФС). XV Государственная фармакопея РФ предполагает использование метода ЯМР-спектроскопии для установления подлинности и количественного определения действующего вещества, идентификации посторонних примесей и остаточных органических растворителей, их относительного содержания в препарате. Подлинность действующего вещества лекарственного средства и идентификацию посторонних примесей методом ЯМР проводят путем сравнения спектра испытуемого образца со спектром фармакопейного стандартного образца или с известным эталонным спектром. При этом спектры стандартных и испытуемых образцов должны быть получены с использованием одних и тех же методик и условий, а пики в сравниваемых спектрах должны совпадать по положению, интегральной интенсивности и мультиплетности, значения которых приводят при описании спектров. При отсутствии фармакопейного стандартного образца используют образец сравнения, идентичность которого подтверждают самостоятельной структурной интерпретацией спектральных данных или альтернативными методами. Для контроля качества лекарственных средств разрешения НП-ЯМР достаточно, чтобы количественно определить состав антибиотиков офлоксацина и левофлоксацина без применения стандартов. Но для более сложной структуры тетрациклина для однозначного отнесения сигналов требуется измерение спектра на высокопольном ЯМР [23].

При подтверждении подлинности образцов нестехиометрического состава, например, природных полимеров, допускается 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 смесей веществ (например, растительных экстрактов) используют одномерные спектры ЯМР целиком, как "отпечатки пальца" объекта, без детализации значений химических сдвигов и мультиплетности отдельных сигналов. В случае использования двумерной спектроскопии ЯМР при описании спектров (фрагментов спектра), заявленных на подлинность, приводят значения кросс-пиков.

Молекулярные массы белков и полимеров определяют сравнением их подвижности с подвижностью соединений-стандартов с известной молекулярной массой, используя методики диффузионно-упорядо-

ченной спектроскопии ядерного магнитного резонанса (DOSY): измеряют коэффициенты самодиффузии испытуемых и стандартных образцов, строят график зависимости логарифмов молекулярных масс соединений-стандартов от логарифмов. По полученному таким образом графику методом линейной регрессии определяют неизвестные молекулярные массы испытуемых образцов.

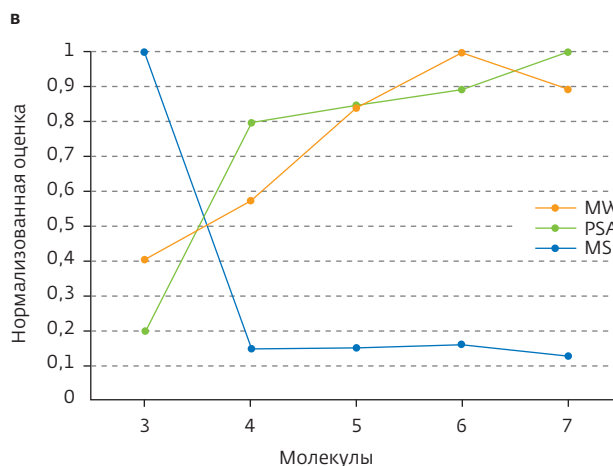
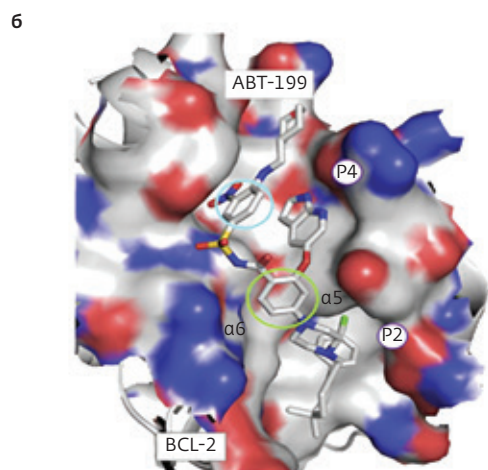
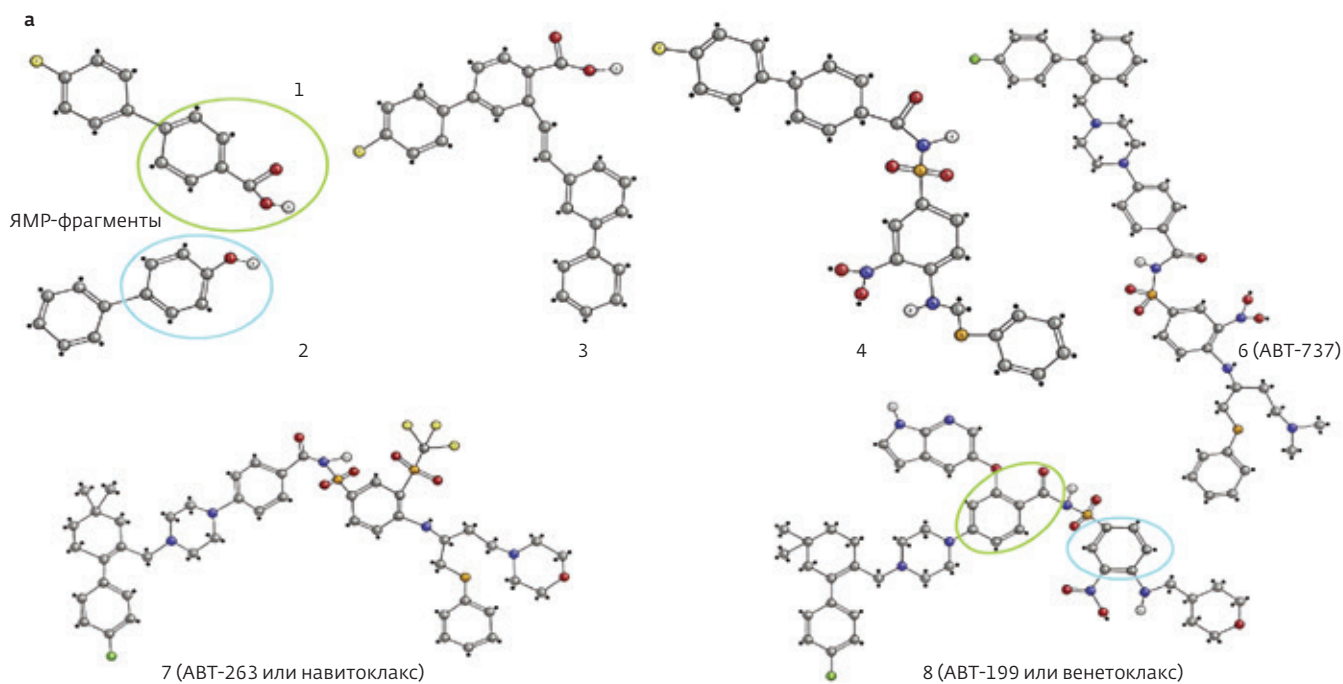
В аналитических целях также используют гомо- и гетероядерные двумерные корреляционные спектры, основанные на определенной последовательности импульсов. Двумерные спектры предпочтительно использовать для определения состава сложных смесей и экстрактов, так как вероятность наложения сигналов (кросс-пиков) в двумерных спектрах существенно ниже, чем вероятность наложения сигналов в одномерных спектрах.

Для быстрого получения спектров гетероядер ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  и др.) применяют методики (HSQC, HMBSC), которые позволяют получать на ядрах  $^1\text{H}$  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 – для получения спектров индивидуальных соединений (спектральное разделение) в смеси без их физического разделения и определения размеров, степени агрегированности и молекулярных масс молекулярных объектов (молекул, макромолекул, молекулярных комплексов, супрамолекулярных систем).

Испытуемые 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  $B_0$ , перенос поляризации от легковозбудимых ядер к менее поляризуемым ядрам – кросс-поляризация – позволяют получать спектры органических и неорганических соединений с высокой разрешающей способностью. Применяют данную разновидность спектроскопии ЯМР при изучении полиморфизма твердых плохо растворимых лекарственных средств.

### **Создание новых биологически активных веществ**

Помимо контроля качества лекарственных средств, ЯМР-спектроскопия широко востребована при создании новых фармацевтических субстанций. За последнее столетие определения понятий "фармацевти-



**Рис.8.** Путь оптимизации от результатов ЯМР-спектроскопии к ABT-199:

ароматические фрагменты, выявленные с помощью ЯМР-спектроскопии (зелёные и голубые круги), изначально были идентифицированы как взаимодействующие с активными центрами BCL-XL. Соединения 1, 2, 3, 4 были идентифицированы и оптимизированы с помощью методов ЯМР, в то время как для оптимизации последних соединений ABT использовались методы рентгеновской кристаллографии (а); изображение молекулярной структуры BCL-2 в комплексе с венетоклаксом (код PDB: 6O0L). Зелёными и голубыми кружками обозначены ароматические мотивы, первоначально выявленные с помощью первичного скрининга методом ЯМР (б); молекулярное сходство, выраженное коэффициентом Танимото (MS, синий), нормализованной молекулярной массой (MW, оранжевый) и площадью полярной поверхности (PSA, зелёный) для соединений 3–7 на пути разработки ABT-199 (в)

ческий препарат" и "разработка лекарственного препарата" претерпели значительные изменения. Если раньше разработка лекарственных препаратов была почти полностью основана на случайном поиске, то сегодня она включает в себя несколько отдельных, но взаимосвязанных этапов, направленных на получение молекул, способных взаимодействовать с определенной биомолекулярной мишенью и вызывать подходящую биологическую реакцию. Для получения результатов, необходимых для перехода к следующему этапу, используется широкий спектр методов. Высокопроизводительный скрининг (High Throughput Screening, HTS) и дизайн лекарств на основе фрагментов (Fragment Based Drug Design, FBDD) – два основных подхода, используемых для выявления лекарственных соединений на ранних стадиях разработки лекарств.

ЯМР-спектроскопия применяется на всех трех этапах процесса FBDD. Современные исследования показывают, что ЯМР-спектроскопия использовалась для идентификации начальных фрагментов связывания, так называемого этапа "выявления мишеней" в 80% случаев. На последующих этапах FBDD, которые включают "идентификацию места связывания" и "оптимизацию связывания", ЯМР-спектроскопия – в 50 и 40% случаев соответственно.

С помощью стратегии рациональной оптимизации структуры лиганда в кратчайшие сроки создан вемурафениб, активно используемый для терапии BRAF-позитивной меланомы. Еще один яркий пример ведущей роли ЯМР в разработке лекарственного препарата – создание АВТ-199, ингибитора антиапоптотических белков BCL-2, BCL-xL и BCL-w, которые играют ключевую роль в выживании клеток. Эти белки чрезмерно экспрессируются при многих видах рака и напрямую связаны с возникновением, прогрессированием и устойчивостью к терапии. Препарат "Венетоклакс" (ABT-199, Venetoclax), в 2016 году получивший одобрение FDA в качестве ингибитора BCL-2 для лечения хронического лимфолейкоза, был создан только благодаря большому вкладу ЯМР-спектроскопии в его разработку, а группа ЯМР-спектроскопии компании Abbott, которая инициировала исследования этого препарата, стала первопроходцем в так называемом методе "SAR с помощью ЯМР", который лежал в его основе (рис.8) [24].

### Мониторинг реакций в реальном времени

Мониторинг химических реакций в реальном времени – одна из самых интересных и важных возможностей бескриогенных НП-ЯМР-спектрометров. Отслеживать процесс можно тремя способами: используя

ЯМР-трубку в качестве реактора периодического действия (мониторинг на линии), проводя реакцию в реакторе вне магнита и пропуская реагирующую среду через прибор (онлайн-мониторинг) и отбирая образцы через определенные промежутки времени. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки.

Контроль реакции внутри ЯМР-трубки имеет более узкий диапазон допустимых температур и давлений. В данном подходе присутствует задержка по времени при смешивании реагентов, поэтому начало реакции определяется неточно, а измерение происходит при изменяющейся температуре образца.

В установке с непрерывным мониторингом потока реакционная смесь с помощью насоса прокачивается из реакционного сосуда в проточную ячейку магнита по трубке из ПТФЭ [25] (рис.9). Серию последовательных спектров получают с нужной задержкой между измерениями за счет подбора скорости потока и длины трубки.

Такую серию спектров ЯМР используют для установления механизма и кинетики реакции, отслеживая изменение интенсивности сигналов исходных, промежуточных соединений и целевых продуктов реакции.

В последние годы появились быстрые методы двумерного ЯМР, позволяющие получать двумерные спектры в реальном времени с помощью некриогенных приборов [26]. Для увеличения интенсивности сигнала используют методы гиперполяризации, наиболее известные из которых – усиление сигнала обра-

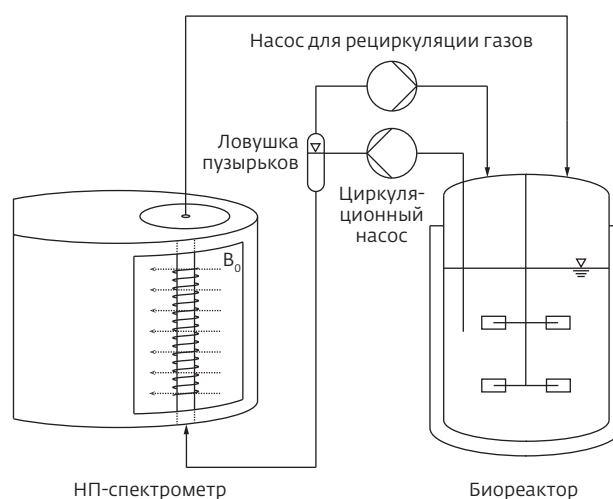
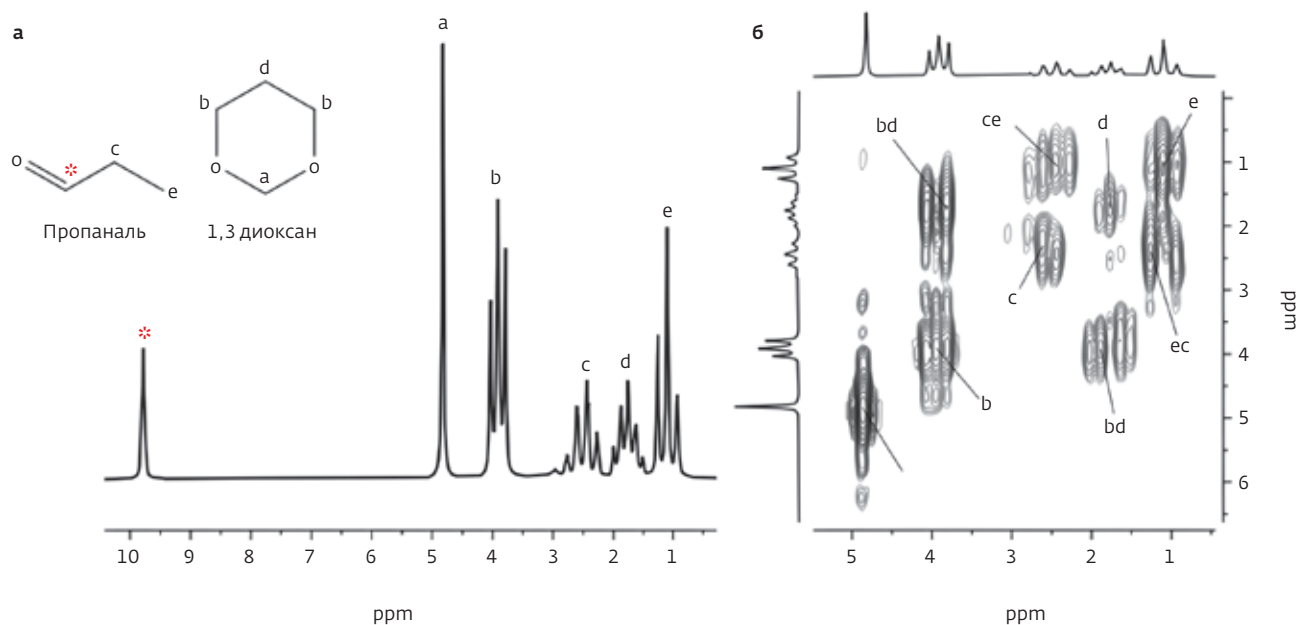


Рис.9. Схема экспериментальной установки, используемой для мониторинга ферментации



**Рис.10.**  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр эквимольной смеси пропионового альдегида и 1,3-диоксана (а); двумерная COSY ЯМР-спектр смеси 50:50 пропионового альдегида и 1,3-диоксана (б)

тимым обменом (УСОО) [27] и динамическая ядерная поляризация Оверхаузера (ДЯПО) [28]. ДЯПО применим к широкому спектру молекул, доступен технически и может работать в непрерывном потоке [29]. За одно сканирование модельной смеси пропионового альдегида и 1,3-диоксана были получены спектры  $^1\text{H}$  (COSY) смеси, как в непрерывном, так и в режиме с остановкой процесса при различных скоростях потока (рис.10).

### Метабомика

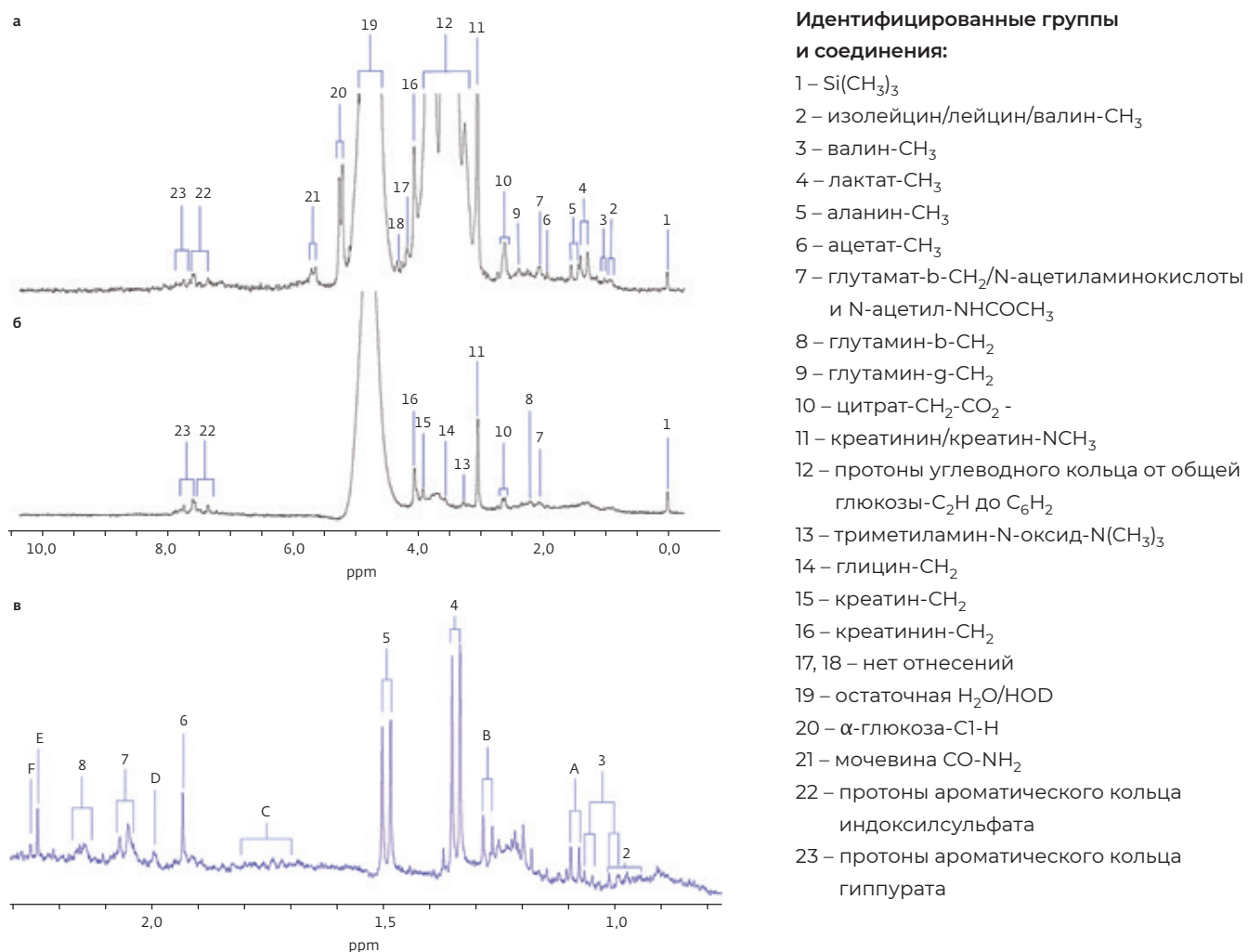
Говоря о фармацевтике, нельзя не упомянуть и о роли ЯМР в клинических приложениях. Методы ЯМР-спектроскопии с высоким и сверхвысоким полем успешно используются для многокомпонентного анализа сложных биожидкостей (кровь, плазма, моча и др.). В результате получают информацию о молекулярной природе и концентрации эндогенных биомолекул и экзогенных агентов биообъектов. Эти исследования востребованы в метабомике, клинической практике, при поиске, идентификации и валидации биомаркеров.

Недавно продемонстрировали первое применение настольных НП- ЯМР для метаболомного анализа мочи человека на основе ЯМР  $^1\text{H}$ , для диагностики и мониторинга пациентов с диабетом 2-го типа [30]. Спектральными методами обнаружены и количественно

оценены ключевые биомаркеры этого заболевания, несмотря на ряд проблем с перекрытием сигналов на низкой рабочей частоте. По сравнению с контрольной группой у больных диабетом помимо увеличения концентрации глюкозы и 3-D-гидроксибутирата в моче, было выявлено повышение аланина, цитрата и креатинина. Содержание же ароматических биомолекул, особенно гиппурата и сульфат индоксила (предположительно возникающий при диабетической полиурии), оказалось снижено. Эти результаты согласуются с данными, полученными ЯМР  $^1\text{H}$  в высоком поле (600 МГц) [31] и коррелируют со значениями, полученными традиционными хроматографическими методами.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры образцов мочи пациентов с диабетом 2-го типа и здоровых лиц контрольной группы на частоте 60 МГц, показаны на рис.1а и б соответственно.

Характеристические спектральные различия, в частности наличие сигналов глюкозы в образце у пациентов с диабетом 2-го типа и их отсутствие в образцах у здоровых лиц контрольной группы, могут быть оперативно интерпретированы медицинским персоналом для установления предварительного диагноза.

Возможности бескриогенного НП-ЯМР были исследованы при анализе плазмы крови больных диабетом. Таким образом надежно идентифи-



**Рис.11.** <sup>1</sup>H-спектры образцов мочи, собранных у больных диабетом 2-го типа и здоровых участников контрольной группы соответственно (а, б); расширенная область 0,60–2,30 м.д. соответствующего спектра 400 МГц, показанного на рис.12а (в). Внутренний стандарт Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, J = 0,00 м.д.

**Табл.1.** Особенности применения бескриогенных НП-ЯМР в биомедицинских исследованиях

Критерий	Применимость
Требования к растворителю	Низкая минимальная концентрация дейтерированных растворителей 10% (об.) для образца
Чувствительность	При увеличении концентрации определяемого компонента и частоты прибора, увеличивается разрешение сигналов
Количественное определение метаболитов	Описаны методики определения аминокислот с разветвленной цепью, производных муравьиной, молочной, лимонной, 3-D-гидроксимасляной кислот, креатинина/креатина, мочевины, индоксилсульфата, гиппурата, 3-D-гидроксибутирата, ацетона и общего содержания глюкозы в моче человека

**Табл.1.** Особенности применения бескриогенных НП-ЯМР в биомедицинских исследованиях

Критерий	Применимость
Воспроизводимость аналитических данных	Высокая сходимость результатов в серии экспериментов, коррелирующая с результатами других методов анализа
Производительность	Высокая производительность анализа биологических жидкостей в медицинских учреждениях и полевых условиях
Универсальность	Большинство биологических жидкостей и биопсийных экстрактов тканей
Ограничения	Малоприменим для белковых молекул со сложными паттернами связей, при которых возникает сильная мультиплетность сигналов

цированы жирнокислотные цепи триацилглицеринов, ассоциированных с липопротеинами, и остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилнейраминовой боковой цепи углевода гликопротеина и протоны углеводного кольца глюкозы. Достоинства и ограничения использования НП-ЯМР в биомедицинских исследованиях обобщены в табл.1 [32].

**ВЫСОКОПОЛЬНЫЕ ЯМР-СПЕКТРОМЕТРЫ СЕРИИ CAN (400/600 МГц)**

Современные ЯМР-спектрометры ZHONGTAI CAN400 и CAN600 с рабочей частотой на ядрах <sup>1</sup>H на 400 и 600 МГц обеспечивают полный цикл исследований методом ядерного магнитного резонанса. Оборудование используется для определения молекулярной

структуры, количественного анализа, изучения кинетики процессов и работы с различными ядрами. Высокая чувствительность и разрешение спектрометров позволяют проводить исследования как стандартных образцов, так и сложных систем. ЯМР-спектрометры состоят из сверхпроводящего ультраэкранированного магнита со сверхвысокой однородностью поля, многофункциональной консоли управления и высокочувствительной полностью автоматизированной внутренней камеры (рис.12).

Усовершенствованная конструкция магнита минимизирует тепловые потери, датчик контроля уровня криожидкостей сигнализирует о низком уровне гелия заранее. Приборы просты в обслуживании, требуют систематического добавления во внешний и внутрен-



**Рис.12.** Высокопольные ЯМР-спектрометры CAN400 и CAN600



**Рис.13.** Предусилитель спектрометров CAN

ний контуры жидкого азота и жидкого гелия. Контур с жидким азотом позволяет уменьшить расход более дорогого жидкого гелия. Расход жидкого гелия в приборах CAN составляет 23–25 мл/ч, а время удерживания жидкого гелия для CAN400 составляет более 180 дней, для CAN600 больше 120 дней.

Важнейшей частью любого ЯМР-спектрометра является предусилитель – блок предварительного усиления сигнала в датчике ЯМР (рис.13). В спектрометрах CAN предусилитель расположен на минимально возможном расстоянии от датчика, чтобы избежать потери сигнала из-за затухания в кабеле и возможных наводок на него. Он имеет многоканальную архитектуру за счет подключения к основному блоку с помощью специальных мультиплексоров и сверхнизкий уровень шумов, минимизирующий влияние на целевые сигналы. В табл.2 приведены основные технические характеристики спектрометров CAN.

Для обеспечения высокой однородности поля в приборах использована усовершенствованная система шиммирования – дополнительные катушки, в которые подается постоянный ток, силу которого можно изменять. Создаваемые шиммами небольшие магнитные поля помогают компенсировать остаточную неоднородность поля магнита. Для того чтобы дополнительно усреднить неоднородность поля, ампулу с образцом вращают в зазоре вокруг вертикальной оси с частотой 20–30 Гц с помощью воздуш-



**Рис.14.** ЯМР-зонд спектрометров CAN

ной турбинки. Настройка однородности поля выполняется управляющим компьютером спектрометра по специальной программе.

ЯМР-зонд (датчик) спектрометров подходит для современных многоядерных исследований ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{109}\text{Ag}$  и др.) в химии, фармацевтике и материаловедении (рис.14). Он имеет ручной и автоматический режим подстройки и позволяет регистрировать спектры температурном диапазоне от 20 до 150 °С. Дополнительно возможно подключение криомодуля для проведения экспериментов при отрицательных температурах.

Достоинством зонда является возможность измерения спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР с развязкой по  $^{19}\text{F}$  и  $^{19}\text{F}$ -ЯМР с развязкой по  $^1\text{H}$ . Это позволяет упростить спектральную картину, исключая множественное расщепление атомов фтора на протонах и наоборот, и однозначно установить пространственное строение молекулы, экспериментально влияя на проявление спин-спинового взаимодействия Н-Ф. Используя режим развязки от протонов можно определить положение атомов фтора в молекуле.

Спектрометры CAN дополнительно оборудованы автосамплером на 72 ампулы, обеспечивающим не только быструю смену образцов, но и возможность подготовки следующего образца во время записи спектра предыдущего (рис.15).

Возможность программирования последовательности экспериментов для каждого образца позволяет

**Табл.2.** Основные технические характеристики спектрометров CAN

Технические характеристики		CAN400	CAN600
Магнит	Магнитное поле, Тл	9,39	14,09
	Рабочая частота на ядрах $^1\text{H}$ , МГц	400	600
	Диаметр теплого отверстия, мм	54	
Расход азота	Расход, мл/час	250	300
	Потребление за цикл, л	84	108
	Время удержания, сутки	14	15
Расход гелия	Расход, мл/час	23	25
	Потребление за цикл, л	100	72
	Время удержания, сутки	180	120
Блок управления	RF-приемопередающие каналы	По умолчанию – 2; с возможностью расширения – до 8	
	Разрешение по частоте, Гц	$\leq 0,0005$	
	Временное разрешение, нс	$\leq 4$	
	Разрешение по фазе, °	$\leq 0,001$	
	Диапазон радиочастот, МГц	5–1300	
	Цифровое разрешение, бит	16	
	Максимальная спектральная ширина приемника, МГц	12,5	
Датчик	Наблюдаемые ядра	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{31}\text{P}$ , $^{19}\text{F}$ и др.	
	Дейтериевый лок	Поддерживается	
	Чувствительность по $^1\text{H}$ (0,1%ЕВ)	$\geq 500:1$	$\geq 850:1$
Автоматический сменщик образцов	Вместимость, амп.	72	
	Направление вращения	Двунаправленное вращение	
Система контроля температуры	Диапазон температур, °С	+20 – +150 (стандартно), -150 – +150 (опциональный криомодуль)	
	Точность поддержания температуры, °С	$\pm 0,1$	



Рис.15. Автосамплер

вести многочасовую работу в автоматическом режиме без присутствия оператора за прибором. Выполнив все измерения, спектрометр разместит результаты в виде исходных файлов FID или спектров после Фурье-преобразования в соответствующих директориях на ПК.

Спектрометры CAN имеют высокие показатели надежности, легкость обслуживания и возможность работы в полностью автоматическом режиме, обеспечивают точность и высокую скорость работы как в исследовательской лаборатории, так и на производстве.



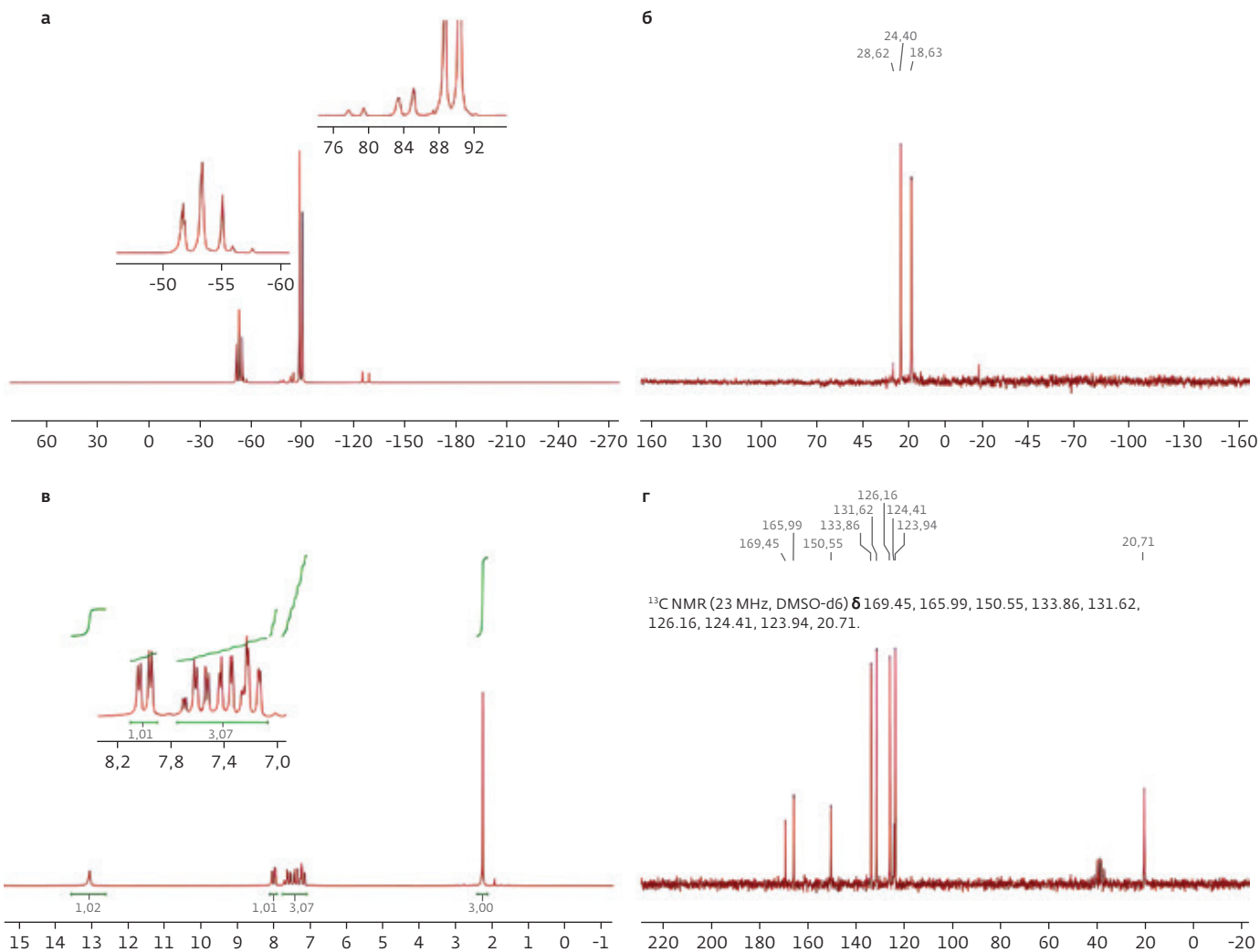
Рис.16. Низкопольный некриогенный спектрометр HT-PNMR12-6

### БЕСКРИОГЕННЫЕ ЯМР-СПЕКТРОМЕТРЫ HTPNMR12 (60/90 МГц)

Бескриогенные НП-ЯМР компании Zhenyi Scientific Instruments представлены моделями HT-PNMR12-6 и HT-PNMR12-9 на 60 и 90 МГц соответственно (рис.16). ЯМР-спектрометр HT-PNMR12-6 (60 МГц) – это компактный бескриогенный спектрометр для рутинного анализа и исследований. ЯМР-спектрометр HT-PNMR12-9 (90 МГц) – более профессиональное решение для исследовательских и промышленных задач, которое обеспечивает лучшее разрешение и чувствительность. В обоих

Табл.3. Технические характеристики НП-ЯМР серии HT-PNMR12

Характеристика	HT-PNMR12-6	HT-PNMR12-9
Напряженность магнитного поля, Т	1,4	2,1
Частота, МГц	60	90
Поддерживаемые ядра	$^1\text{H}$ , $^7\text{Li}$ , $^{11}\text{B}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{19}\text{F}$ , $^{31}\text{P}$ ; другие – по запросу	
Разрешение, Гц	0,8	0,5
Сигнал/шум	>100:1 (1% этилбензол)	>120:1 (1% этилбензол)
Однородность поля, Гц	1	
Температурная стабильность, К/ч (после 4 часов с момента запуска)	0,001	
Программное обеспечение	ПО производителя	



**Рис.17.** Спектры модельных соединений с прибора HT-PNMR12-9:  $^{19}\text{F}$  перфторполиэфира (а);  $^{31}\text{P}$  фосфорного лиганда (б);  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  аспирина (в, г)

приборах используются постоянные магниты на основе редкоземельных металлов, они не требуют низких температур, поэтому при эксплуатации отсутствуют затраты на криогенное охлаждение и специальное помещение. Обе модели представляют собой компактный моноблок – магнит и спектрометр в едином корпусе на шасси. Приборы не чувствительны к перепадам температуры и влажности, не требуют дополнительного экранирования магнитного поля. Основные технические характеристики моделей приведены в табл.3.

Быстрое сканирование ( $^1\text{H}$ -спектр менее чем за минуту) и возможность работы без дейтерорастворителей с опциональным подавлением сигналов делает HT-PNMR12 подходящим для мониторинга химических процессов в реальном времени.

Модельные эксперименты показали высокое качество получаемых спектров  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  и  $^{19}\text{F}$  (рис.17).

Спектрометры HT-PNMR12 поставляются в готовой сборке, с калибровочными стандартами. Установка, первичная настройка и обучение работе с приборами проводятся инженерами компании "ЭЛЕМЕНТ" и занимают немногим больше одного дня.

\*\*\*\*

Спектроскопия ЯМР является прецизионным методом определения состава и структуры соединений и широко применяется в химическом и биохимическом анализе уже несколько десятилетий. Приборы высокого разрешения обладают чувствительностью для успешного исследования сложных

молекул. Активное развитие бескриогенных ЯМР, благодаря их компактным размерам и доступной цене, а также легкости обслуживания и возможности записи спектров на различных ядрах, расширило применимость метода ЯМР от лабораторных исследований до промышленности. С помощью новых моделей НП-ЯМР можно проводить не только стандартные одномерные, но и двумерные экспе-

рименты, такие как HSQC, HMBC, HETCOR и COSY. ЯМР-спектроскопия внесена в национальные фармакопеи как эффективный метод контроля лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций, а методы ЯМР-скрининга и рационального дизайна биоактивных молекул доказали свою эффективность и получили широкое распространение в фармацевтической индустрии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Keeler J. *Understanding NMR Spectroscopy* // University of Cambridge, Department of Chemistry. 2002.
2. Гюнтер Х. Введение в курс спектроскопии ЯМР: Пер. с англ. М.: Мир, 1984. 478 с., ил.
3. Dolbier W.R. Jr. *Guide to Fluorine NMR for organic chemists*. Wiley, Chichester. 2009.
4. Harris R.K., Becker E.D., Cabral de Menezes S.M. et al. NMR Nomenclature: nuclear spin properties and conventions for chemical shifts: IUPAC recommendations // *Pure Appl. Chem.* 2001. Vol. 73. P. 1795–1818.
5. Aue W.P., Bartholdi E., Ernst R.R. Two-dimensional spectroscopy-Application to nuclear magnetic resonance // *J. Chem. Phys.* 1976. Vol. 64. P. 2229–2246
6. Ernst R., Bodenhausen G., Wokaun A. *Principles of Nuclear magnetic Resonance in One and Two Dimensions* // Clarendon Press, Oxford University Press. 1990.
7. Ramsey N.F. A molecular beam resonance method with separated oscillating fields // *Phys. Rev.* 1950. Vol. 78. P. 695.
8. Arnold J.T., Dharmatti S.S., Packard A.E. Chemical effects on nuclear induction signals from organic compounds // *J. Chem. Phys.* 1951. Vol. 19. P. 507.
9. Arnold J.T. Magnetic resonances of protons in ethyl alcohol // *Phys. Rev.* 1956. Vol. 102. P. 136–150.
10. Royden V. Measurement of the spin and gyromagnetic ratio of C-13 by the collapse of spin-spin splitting // *Phys. Rev.* 1954. Vol. 96. P. 543–544.
11. Bloom A.L., Shoolery J.N. Effects of perturbing radiofrequency fields on nuclear spin coupling // *Phys. Rev.* 1955. Vol. 97. P. 1261–1265.
12. Anderson W.A. Nuclear magnetic resonance spectra of some hydrocarbons // *Phys. Rev.* 1956. Vol. 102. P. 151–167.
13. Anet F.A.L., Bourn A.J.R., Carter P., Winstein S. Effects of steric compression on coupling constants // *J. Am. Chem. Soc.* 1965. Vol. 87. P. 5249–5250.
14. Pake G.E. Nuclear resonance absorption in hydrated crystals: fine structure of the proton line // *J. Chem. Phys.* 1948. Vol. 16. P. 327.
15. Gutowsky H.S., McClure R.E. Magnetic shielding of the proton resonance in H-2, H<sub>2</sub>O, and mineral oil // *Phys. Rev.* 1951. Vol. 81. P. 276–277.
16. Freeman R. [www.ray-freeman.org/nmr-history.html](http://www.ray-freeman.org/nmr-history.html), 2015 (accessed 1.10.15).
17. Zaleskiy S.S., Danieli E., Blümich B., Ananikov V.P. Miniaturization of NMR systems: desktop spectrometers, microcoil spectroscopy, and "NMR on a chip" for chemistry, biochemistry, and industry // *Chem. Rev.* 2014. Vol. 114. P. 5641–5694.
18. Blümich B., Haber-Pohlmeier Z.W. *Compact NMR* // Walter de Gruyter GmbH, Boston. 2014.
19. Webb A.G. Radiofrequency microcoils for magnetic resonance imaging and spectroscopy // *J. Magn. Reson.* 2013. Vol. 229. P. 55–66.
20. Blümich B., Blümli P., Eidmann G. et al. The NMR-mouse: construction, excitation, and applications // *Magn. Reson. Imaging.* 1998. Vol. 16. P. 479–484.
21. Siddles J.A., Garbini J.L., Bruland K.J. et al. Magnetic resonance force microscopy // *Rev. Mod. Phys.* 1995. Vol. 67. P. 249–265.
22. Luchinat E., Barbieri L., Cremonini M., Banci L. Protein in-cell NMR spectroscopy at 1.2 GHz // *J. Biomol. NMR.* 2021. Vol. 75. P. 97–107.
23. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса [ОФС.1.2.1.1.007] // Государственная фармакопея Российской Федерации. 15-е изд.
24. Mureddu L.G., Vuister W.G. Fragment-based drug discovery by nmr. where are the successes and where can it be improved? // *Front Mol. Biosci.* 2022. V.9. P. 834453
25. Cocivera M., Woo K.W. Flow NMR study of rapid cyclization following nucleophilic addition Reaction of NH<sub>2</sub>OH with acetylacetone // *Tetr. Lett.* 1976. Vol. 36. P. 3109–3112.
26. Fyfe C.A., Malkiewich C.D., Damji S.W.H., Norris A.R. Flow nuclear magnetic resonance investigation of the transient and stable species formed by the attack of alkoxide ions on 2,4,6-trinitrotoluene // *J. Am. Chem. Soc.* 1976. Vol. 98. P. 6983 - 6988.
27. Fyfe C.A., Cocivera M., Damji S.W.H. High resolution nuclear magnetic resonance study of chemical reactions using flowing liquids: kinetic and thermodynamic intermediates formed by the attack of methoxide ion on 3,5-dinitrocyano benzene // *Chem. Comm.* 1973. Vol. 19. P. 743–744.
28. Robinson M.J.T., Rosenfeld S.M. Stopped flow pulse-Fourier transform NMR. Observation of intermediates in the tricyanovinylolation of N, N-dimethylaniline in methanol // *Tet. Lett.* 1975. Vol. 17. P. 1431–1434.
29. Giraudeau P., Frydman L. Ultrafast 2D NMR: an emerging tool in analytical spectroscopy // *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2014. Vol. 7. P. 129–161.
30. Stepanek P., Sanchez-Perez C., Telkki V.V. et al. High-throughput continuous-flow system for SABRE hyperpolarization // *J. Magn. Reson.* 2019. Vol. 300. P. 8–17.
31. Kircher R., Hasse H., Münnemann K. High flow-rate benchtop NMR spectroscopy enabled by continuous overhauser DNP // *Anal. Chem.* 2021. Vol. 93. P. 8897–8905.
32. Kircher R., Mross S., Hasse H., Münnemann K. Functionalized controlled porous glasses for producing radical-free hyperpolarized liquids by Overhauser DNP // *Molecules.* 2022. Vol. 27. P. 6402.

# ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ

## ZHONGTAI/ZHENYI SCIENTIFIC INSTRUMENTS

### Высокопольные ЯМР-спектрометры ZHONGTAI

Современные ЯМР-спектрометры ZHONGTAI CAN400 и CAN600 с рабочей частотой на ядрах  $^1\text{H}$  400 и 600 МГц обеспечивают полный цикл исследований методом ядерного магнитного резонанса для определения молекулярной структуры, количественного анализа, изучения кинетики процессов и работы с различными ядрами. Высокая чувствительность и разрешение обеспечивают эффективность работы как со стандартными образцами, так и при анализе сложных систем.



Высокопольный ЯМР-спектрометр ZHONGTAI CAN 400

#### CAN400

##### Спектрометр ядерного магнитного резонанса с частотой 400 МГц

Высокопроизводительное оборудование и интеллектуальное программное обеспечение.

Точность, скорость и удобство работы.

#### Области применения

##### Химия

Изучение структуры молекул, кинетики реакций, катализаторов.

##### Фармацевтика

Анализ лекарств, скрининг соединений, исследование белков.

##### Материаловедение

Характеристика электролитов для батарей, полимеров.

##### Пищевая промышленность

Контроль качества, идентификация примесей.

##### Медицина

Исследование биомолекул и вирусных мишеней.



Высокопольный ЯМР-спектрометр ZHONGTAI CAN 600

#### CAN600

##### Спектрометр ядерного магнитного резонанса с частотой 600 МГц

Модель нового поколения, оснащенная сверхпроводящим магнитом 600 МГц с исключительной однородностью поля, передовой распределенной системной архитектурой с модульными датчиками и полной автоматизацией настройки.

#### Ключевые преимущества

Высокоинтегрированные приемопередающие РЧ-каналы для экспериментов с многоканальным приемом.

Быстрая настройка и шиммирование.

Интеллектуальная сенсорная панель управления.

Широкий ПО-функционал:

отслеживание статуса прибора;

управление вводом и извлечением образца с помощью сенсорного экрана;

гибкие настройки для проведения ЯМР-экспериментов.

Подробная информация на сайте:



## Модули ЯМР-спектрометров ZHONGTAI



### Датчик

Каналы  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$  и др.  
 Дейтериевый канал стабилизации лока.  
 Ручная и автоматическая настройка.  
 Высокие чувствительность и разрешение.  
 Температурный диапазон:  $-150$ – $150$  °C.  
 Наблюдение  $^{19}\text{F}$  с развязкой по  $^1\text{H}/^1\text{H}$  с развязкой по  $^{19}\text{F}$ .



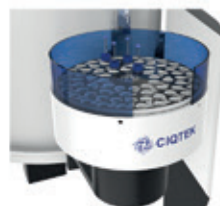
### Блок управления

Два радиочастотных канала по умолчанию, с возможностью расширения до 8.  
 Высокоточное цифровое управление с временным разрешением 4 нс, частотным разрешением 0,0005 Гц и фазовым разрешением 0,001°.  
 Высокоскоростной сбор данных с амплитудным разрешением 16 бит и частотой дискретизации 250 Мвыб/с.  
 Максимальная ширина спектра приемника – 12,5 МГц.  
 Включение и выключение блока управления из управляющего ПО.



### Многоканальный предусилитель

Отдельный блок, независимый от блока управления.  
 Низкий уровень шума для минимального воздействия на регистрацию сигнала.  
 Встроенное динамическое переключение «прием/передача» на всех каналах.  
 Масштабируемая конструкция.



### Автосамплер

Вмещает 72 образца.  
 Установка в средней части магнита.  
 Быстрая смена образцов и подготовка к загрузке следующей ампулы во время предыдущего анализа

## Бескриогенные ЯМР-спектрометры Zhenyi Scientific Instruments



Бескриогенные ЯМР-спектрометры NT-PNMR12-6/9 (60/90 МГц)

### NT-PNMR12-6/9 (60/90 МГц)

#### Бескриогенные ЯМР-спектрометры

Среднегабаритные модели от Zhenyi Scientific Instruments не требуют криогенного охлаждения, что снижает эксплуатационные расходы. Подходят для рутинных и аналитических исследований по подтверждению структуры молекул средней сложности, для количественных измерений и оценки чистоты соединений. Простота конструкции, устойчивость к внешним воздействиям и минимальные операционные издержки делают эти приборы наиболее подходящими для обучения методу ЯМР больших групп пользователей.

#### Дополнительные опции

Мониторинг химических реакций в реальном времени.

Работа с недейтерированными растворителями.

Индивидуальная настройка ПО.

#### Ключевые преимущества

Высокая стабильность благодаря уникальной конструкции магнита и вращению ампулы.

Многоядерный анализ ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^7\text{Li}$  и др.).

Чувствительность 100:1/120:1 и выше для 1% этилбензола в дейторохлороформе.

Быстрое сканирование –  $^1\text{H}$ -спектр за 5 секунд.

Экономичность – отсутствие затрат на жидкий азот или гелий.

# pharmtech & ingredients

27-я Международная выставка оборудования,  
сырья и технологий для фармацевтического  
производства

25–28.11.2025

Москва, Крокус Экспо



[pharmtech-expo.ru](http://pharmtech-expo.ru)

+7 495 799 55 85  
[pharmtech@ite.group](mailto:pharmtech@ite.group)



ОРГАНИЗАТОР  
ORGANISER



## Официальная поддержка

Ассоциация Российских  
Фармацевтических  
Производителей



Союз Профессиональных  
Фармацевтических  
Организаций



Ассоциация Фармацевтических  
Производителей Евразийского  
Экономического Союза



АССОЦИАЦИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ  
ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЕВРАЗИЙСКОГО  
ЭКОНОМИЧЕСКОГО СОЮЗА