

核磁共振波谱法对维莫非尼的定性和定量分析

陈忠兰, 靳龙龙, 徐翊雯, 孙会敏, 张雅军, 吴先富

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

[摘要] **目的:** 建立定量核磁共振氢谱法 (qHNMR) 测定维莫非尼含量的方法。**方法:** 首先采用质谱、核磁共振方法对维莫非尼结构进行确证, 然后采用 Bruker ANANCE NEO 600 型核磁共振波谱仪测定一维定量氢谱, 90° 脉冲, 弛豫时间 (D1) 15 s, 扫描次数 (NS) 32 次, 测定温度 25 °C, 以对苯二酚为内标, 氘代二甲亚砜 (DMSO- d_6) 为溶剂, 对维莫非尼进行定量研究。**结果:** 对维莫非尼核磁共振氢谱和碳谱数据进行归属, 利用 qHNMR 对维莫非尼进行定量分析, 测得含量为 98.78%, 与质量平衡法测得的结果 (98.91%) 基本一致。**结论:** 建立的 qHNMR 法操作简单、快速、准确, 可用于维莫非尼含量测定。

[关键词] 定量核磁共振氢谱法; 含量测定; 维莫非尼; 对苯二酚; 质量平衡法

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)07-0747-05

Qualitative and quantitative analysis of vemurafenib by nuclear magnetic resonance spectroscopy

CHEN Zhong-lan, JIN Long-long, XU Yi-wen, SUN Hui-min, ZHANG Ya-jun, WU Xian-fu

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative proton nuclear magnetic resonance method for the determination of vemurafenib. **Methods:** The structure of vemurafenib was confirmed by MS and NMR. The spectra of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy were obtained in dimethylsulfoxide- d_6 by using Bruker ANANCE NEO 600, the parameters of which were set up as follows: 90° pulse sequences, the relaxation delay time was 15 s, the number for scanning was 32, the experiment temperature was controlled at 25 °C, and hydroquinone were selected as internal standard. The quantitative study was conducted on vemurafenib. **Results:** The ^1H and ^{13}C NMR spectra of vemurafenib was assigned. The content of vemurafenib determined by qHNMR were 98.78%, which was basically consistent with the results of mass balance method (98.91%). **Conclusion:** The method is simple, rapid and accurate, and can be used for the determination of vemurafenib.

[Key words] quantitative proton nuclear magnetic resonance method; determination of content; vemurafenib; hydroquinone; mass balance method

维莫非尼是针对丝氨酸-苏氨酸激酶 (BRAF) 突变的抑制剂, 用于治疗 BRAF V600 突变的不可切除或转移性黑色素瘤, 2011 年 8 月在美国上市, 2017 年 3 月在中国上市^[1-2]。维莫非尼作为被批准用于治疗 BRAF 基因突变患者的靶向药物之一, 研究表

明, 该药对于 BRAF V600 突变的患者具有确切的疗效^[3-6]。目前文献报道的维莫非尼含量测定方法主要是 HPLC 法^[6-7], 而定量核磁共振氢谱法 (qHNMR) 相对于传统定量方法具有样品制备简单、无需待测成分相应的标准物质就可测定绝对含量、不破坏样品等优势。随着核磁灵敏度的提高, qHNMR 已被广泛用于化学药物、中药及中药材、药用辅料等的定量分析, 并先后被美国药典、英国药典及欧洲药典等收录, 《中华人民共和国药典》自 2010 年版收录该方法^[8-15]。

[作者简介] 陈忠兰, 女, 药师, 研究方向: 药品标准物质研究。E-mail: 550736995@qq.com。

[通讯作者] 吴先富, 男, 研究员, 研究方向: 药品标准物质及药品质量控制研究。E-mail: wuxf99@163.com。张雅军, 女, 副主任药师, 研究方向: 药品标准物质研究。E-mail: zyj95860@126.com。

本研究对维莫非尼进行核磁共振波谱法(NMR)测定与完整归属。同时采用核磁共振内标法选择不同定量峰测定维莫非尼的含量,结果与质量平衡法测定结果基本一致,可为其定性、定量分析提供参考。

材料与方法

1 仪器

Bruker ANANCE NEO 600 型核磁共振波谱仪(Bruker 公司);Waters 2695 高效液相色谱仪(Waters 公司);MX5 百万分之一电子天平(Mettler Toledo 公司);851 型水分测定仪(Metrohm 公司);Thermo concept KL09/12 型马弗炉(Thermo 公司);Thermo LTQ ORBITRAP XL 高分辨质谱仪(Thermo 公司)。

2 试剂

维莫非尼(中国食品药品检定研究院,批号:510184-201901,含量:98.9%);对苯二酚对照品(Sigma-Aldrich 公司,批号:BCBW1282,含量:99.5%);氘代二甲基亚砜(DMSO- d_6 , Cambridge Isotope Laboratories, Inc., 批号:PR-31973/06080DM1);三氟乙酸(Alfa Aesar 公司,批号:Q17D716);乙腈(Fisher 公司,批号:211775,含量:99.9%)。

3 定量核磁共振法的测定

3.1 供试品溶液的制备 分别取维莫非尼样品约 15 mg 和对苯二酚对照品约 4 mg,精密称定,用 0.5 mL DMSO- d_6 溶解,混匀,作为供试品溶液,转移至直径为 5 mm 的核磁共振样品管中,待测。

3.2 测试条件及数据处理 采用 90°脉冲序列,温度 25 °C,采集时间(AQ)2.75 s,弛豫时间(D1)15 s,扫描次数(NS)32 次,采样点数(TD)为 65 536,谱宽(SWH)为 11 904.76 Hz,采集维莫非尼样品(含内标物) $^1\text{H-NMR}$ 谱,见图 1。

在上述实验条件下,调整仪器参数、调谐、锁场、匀场、采样,得到 $^1\text{H-NMR}$ 谱,然后对谱图进行相位校正和基线调整。选取氢谱图中化学位移 6.57 位置的信号峰为内标物定量峰,化学位移 7.30,7.80,8.26 这 3 个位置的信号峰为样品定量峰。

对选定的内标定量峰信号和样品定量峰信号进行积分,所有谱图采用相同积分区间,根据《中华人民共和国药典》2020 年版四部附录,待测物的含量计算公式^[16]:

$$P_s = \frac{M_s \times A_s \times N_r \times m_r}{M_r \times A_r \times m_s \times N_s} \times P_r \times 100\%$$

其中 P_s, P_r 分别为样品与内标物质量百分含量; M_s, M_r 分别为样品与内标物相对分子量; A_s, A_r 分别为样品与内标物定量峰积分面积; N_s, N_r 分别为样品与内标物定量峰包含的质子数; m_s, m_r 分别为样品与内标物称量。

4 HPLC 法测定

4.1 供试品溶液制备 取本品约 10 mg,精密称定,置于 10 mL 棕色量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀;再精密量取适量,用乙腈稀释 1 000 倍,作为 0.1% 自身对照溶液。

4.2 HPLC 色谱条件 采用 Agilent ZORBAX Bonus-RP(150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱;以 0.1% 三氟乙酸水溶液(A)和乙腈(B)为流动相;梯度洗脱(0 ~ 1 min, 55% A; 1 ~ 20 min, 40% A; 30 ~ 31 min, 10% A; 31 ~ 41 min, 55% A);流速为 1.0 mL · min⁻¹;柱温为 25 °C;检测波长为 254 nm;进样体积为 10 μL 。

5 高分辨质谱测定

取供试品适量,加乙腈溶解并稀释至浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,待用。采用 ESI 正离子模式;源电压:4.2 kv,鞘气流速:1.3 L · min⁻¹;毛细管电压:35 V;毛细管温度:320 °C;检测方式:FT-HRMS;质量范围(m/z):100 ~ 1 500。

6 核磁定性测定

精密称取维莫非尼适量,用 0.5 mL 的 DMSO- d_6 溶解,混匀,作为供试品溶液,转移至直径为 5 mm 的核磁共振样品管中,采用 Bruker ANANCE NEO 600 型核磁共振谱仪,进行 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY,HSQC 及 HMBC 谱的测定。

结果

1 核磁定性的分析结果

在维莫非尼供试品的 $^1\text{H-NMR}$ 谱中,显示 1 个

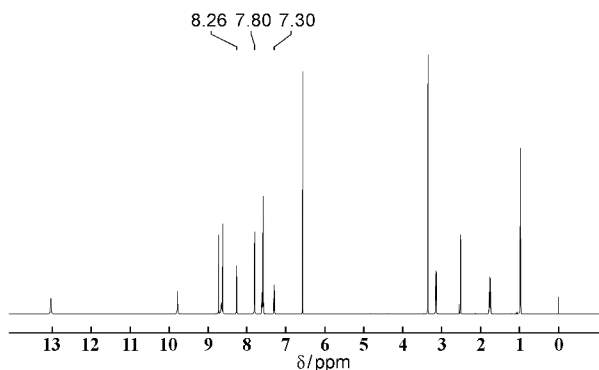


图 1 维莫非尼 $^1\text{H-NMR}$ 谱图

的线性关系。

表 2 线性回归方程

序号	定量信号/ppm	回归方程	R ²
1	7.30	$y = 0.0558x - 0.0019$	1.000
2	7.80	$y = 0.1113x - 0.0049$	1.000
3	8.26	$y = 0.0555x - 0.0020$	1.000

3 精密度实验

取供试品溶液,按照“3.2”项下测定条件连续测定 5 次,分别计算样品定量核磁氢谱 $\delta 7.30, \delta 7.80, \delta 8.26$ 这 3 个位置处定量峰面积与内标物定量峰面积比值的 RSD 分别为 0.06%, 0.23% 和 0.02%,表明仪器精密度良好。

4 重复性实验

按照“3.1”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按“3.2”项下实验条件测定,分别以样品定量核磁氢谱中 3 个定量峰 ($\delta 7.30, \delta 7.80, \delta 8.26$) 进行含量测定,结果表明重复性良好,见表 3。

表 3 重复性测定结果 %

序号	含量		
	定量峰($\delta 7.30$)	定量峰($\delta 7.80$)	定量峰($\delta 8.26$)
1	98.52	98.36	98.63
2	98.54	98.59	98.96
3	98.72	98.40	98.77
4	99.33	98.85	99.25
5	99.28	98.98	99.37
6	98.41	98.13	98.50
平均值	98.87	98.55	98.91
RSD	0.39	0.32	0.35

5 稳定性实验

取供试品溶液,按照“3.2”项下实验条件,分别于 0, 2, 4, 8, 10 h 测定,计算定量核磁氢谱中 $\delta 7.30, \delta 7.80, \delta 8.26$ 这 3 个位置定量峰与内标峰面积比值的 RSD 分别为 0.04%, 0.08% 和 0.06%,表明样品溶液在 10 h 内测定稳定性良好。

6 核磁定量结果

按照“3.1”项下方法平行制备样品溶液 6 份,按照“3.2”项下实验条件,以维莫非尼 qHNMR 谱中 $\delta 7.30, \delta 7.80, \delta 8.26$ 这 3 个位置处信号峰作为定量峰,以 ($\delta 6.57$) 为内标物定量峰信号,测得其含量分别为 98.87%, 98.55%, 98.91%, 平均含量为 98.78%

(RSD = 0.2%)。

7 质量平衡法

按照“4.2”项下方法测得供试品溶液 0.1% 自身对照法的纯度为 99.09%;按照《中华人民共和国药典》2020 年版第四部 0841 通则项下炽灼残渣检查法,测得炽灼残渣含量为 0.059%;按照《中华人民共和国药典》2020 年版第四部 0832 通则项下水分测定法第一法(费休氏法)进行水分测定,测得水分含量为 0.12%,按照《中华人民共和国药典》2020 年版第四部 0861 法测定,残留溶剂未检出。

根据质量平衡法^[17-18],含量/% = (100% - 水分/% - 炽灼残渣/% - 残留溶剂/%) × HPLC 纯度,计算本品含量为 98.91%。结果表明核磁定量法与质量平衡法测定结果基本一致。

讨 论

qHNMR 法测定含量所用内标物的选择:① 不能与待测物发生反应。② 其定量峰与待测物的定量峰不重叠且不发生干扰^[19-21]。③ 在定量核磁实验溶剂中有较好的溶解性,为此选择对苯二酚可作为 qHNMR 含量测定的内标物。本研究根据样品的溶解性,选择 DMSO-*d*₆ 作为溶剂,且溶剂峰的信号 ($\delta 2.51$) 与样品定量峰信号 ($\delta 7.30, \delta 7.80, \delta 8.26$) 以及内标物定量峰信号 ($\delta 6.57$) 无干扰。

D1 对核磁共振信号积分值的影响较大,定量实验中通常设定 D1 值不低于 5 倍的定量峰中最长的纵向弛豫时间(T1)值^[22]。测量待测物和内标物定量峰在 DMSO-*d*₆ 中的 T1 值,待测物定量峰 ($\delta 7.30, \delta 7.80, \delta 8.26$) 的 T1 值分别为 2.126, 1.855, 2.429 s, 内标物定量峰 ($\delta 6.57$) 的 T1 值为 2.639 s,为保证每次采样质子能够充分弛豫,将 D1 设置为 15 s。

质量平衡法受多种因素的影响,当用 HPLC 法测定纯度时,由于杂质的紫外响应因子不同或分离度的影响,会造成 HPLC 纯度值检测结果产生误差,从而影响质量平衡法的准确性;而核磁定量法只与待测物的氢质子数相关,与紫外响应因子等无关,且无需与待测物相同的对照品。因此对于新药的首批化学对照品,除采用通用的质量平衡法定值外,还需其他方法对其验证,以确保标准物质赋值的准确性。

本文建立了维莫非尼的 qHNMR 方法,并对该方法的线性、精密度、重复性和稳定性等进行了考察,结果均显示良好。质量平衡法是化学对照品最为常用的定值方法,本文将 qHNMR 法的测定结果

与质量平衡法的结果进行比较,2种方法测定结果基本一致。综上所述,本文建立的测定维莫非尼含量的^qHNMR法,具有准确度高、操作简单、快捷等优点,为维莫非尼含量测定和对照品的标定提供了新的测定方法。

[参 考 文 献]

- [1] 赵媛媛,周建英,范云,等. BRAF V600 突变型非小细胞肺癌的治疗进展[J]. 中国癌症杂志, 2021, 31(12): 1145 - 1152.
- [2] 尹月,邱新野,张艳华. 维莫非尼致皮肤系统不良反应的文献计量学研究分析[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(22): 2116 - 2120.
- [3] CHAPMAN PB, HAUSCHILD A, ROBERT C, *et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(26): 2507 - 2516.
- [4] SI L, KONG Y, XU XW, *et al.* Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort [J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(1): 94 - 100.
- [5] FLAHERTY KT, PUZANOV I, KIM KB, *et al.* Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(9): 809 - 819.
- [6] ŞANLI S, ÖZDEMİR A, GÜVEN G, *et al.* Determination of pKa and degradation products of the mutated BRAF inhibitor vemurafenib and UPLC assay in human urine[J]. *J Pharm Res Int*, 2020: 18 - 27.
- [7] ZHEN Y, THOMAS-SCHOEMANN A, SAKJI L, *et al.* An HPLC-UV method for the simultaneous quantification of vemurafenib and erlotinib in plasma from cancer patients[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 928: 93 - 97.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2010年版. 二部. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 81.
- [9] 吴先富,肖新月. 核磁共振波谱在药物领域中的应用[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 1907 - 1913.
- [10] 张芬芬,蒋孟虹,沈文斌,等. 定量核磁共振(QNMR)技术及其在药学领域的应用进展[J]. 南京师范大学学报(工程技术版), 2014, 14(2): 8 - 18.
- [11] 闫慧娇,王志伟,林云良,等. 氢核磁定量分析技术测定人参皂苷Rd对照品含量的研究[J]. 山东科学, 2018, 31(4): 26 - 30.
- [12] 秦玲萍,王新仙,卢定强. 核磁共振定量法测定盐酸莫西沙星的含量[J]. 生物加工过程, 2020, 18(3): 375 - 380.
- [13] 仙云霞,耿岩玲,周洪雷,等. 核磁共振内标法测定覆盆子酮对照品的含量[J]. 山东科学, 2015, 28(1): 7 - 11.
- [14] 耿岩玲,马然,刘伟,等. 核磁共振内标法测定苏丹红I对照品的含量[J]. 山东科学, 2013, 26(5): 10 - 13.
- [15] SKIERA C, STELIOPOULOS P, KUBALLA T, *et al.* Determination of free fatty acids in pharmaceutical lipids by ¹H NMR and comparison with the classical acid value[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 93: 43 - 50.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020年版. 四部. 北京:中国医药科技出版社, 2020:53 - 55.
- [17] 张才煜,张娜,何兰. 核磁共振内标法测定波生坦的含量[J]. 药学报, 2014, 49(2): 249 - 251.
- [18] 吴先富,张琪,马玲云,等. 定量核磁共振法测定去水卫矛醇的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(1): 181 - 184.
- [19] 高红梅,王志伟,闫慧娇,等. 氢核磁定量分析技术的研究进展[J]. 山东化工, 2016, 45(22): 60 - 62, 65.
- [20] 韦英亮,莫建光,潘艳坤. 磺胺类标准物质期间核查NMR定量方法研究[J]. 波谱学杂志, 2013, 30(3): 371 - 379.
- [21] 费昊,崔锋,唐飞,等. 骨化三醇的核磁共振定量法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(6): 783 - 785.
- [22] 师小春,冯玉飞,陈忠兰,等. 6种核磁共振法含量测定用标准物质纵向弛豫时间影响因素分析[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 1928 - 1934.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-10-29