

核磁共振法测定甲磺酸阿帕替尼原料药中甲磺酸阿帕替尼

秦雯雯¹, 袁松², 张晓明¹, 岳昊坤², 刘阳^{2*}, 杨平荣^{1*}

1. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃 兰州 730000

2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要:目的 采用核磁共振法测定甲磺酸阿帕替尼原料药中甲磺酸阿帕替尼, 提供一种有效的化学样品测定手段。方法 以1,4-二硝基苯为内标, 甲磺酸阿帕替尼为样品, DMSO-*d*₆为溶剂, 采用zg30脉冲序列在恒温(25℃)下获取¹H-NMR谱。以 δ 7.50处样品定量峰和 δ 8.46处内标峰面积比值测定氢核磁共振谱, 计算甲磺酸阿帕替尼的质量分数。并与质量平衡法测定结果进行了比较。结果 甲磺酸阿帕替尼在0.01~0.05 mmol/L线性关系良好。原料药中甲磺酸阿帕替尼质量分数为96.66%, RSD值为0.33%。与质量平衡法测定的结果96.25%基本一致。结论 本法样品制备简单, 测定快速, 结果准确, 可用于测定甲磺酸阿帕替尼原料药中甲磺酸阿帕替尼。

关键词: 甲磺酸阿帕替尼原料药; 甲磺酸阿帕替尼; 氢核磁共振法; 质量平衡法

中图分类号: R914 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2016)12-1887-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.12.004

Determination of apatinib mesylate in apatinib mesylate raw material by nuclear magnetic resonance

QIN Wen-wen¹, YUAN Song², ZHANG Xiao-ming¹, YUE Hao-kun², LIU Yang², YANG Ping-rong¹

1. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730000, China

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To establish a nuclear magnetic resonance method to determine the content of apatinib mesylate in apatinib mesylate raw materials, so as to provide an effective method for chemical sample. **Methods** 1,4-Dinitrobenzene was used as an internal standard, apatinib mesylate was used as a sample, DMSO-*d*₆ was used as solvent, and the ¹H-NMR data of apatinib mesylate were determined at constant temperature (25℃) using zg30 pulse sequence. ¹H-NMR data of the sample peak area at δ 7.50 and internal standard peak area ratio at δ 8.46 were obtained. And the results of nuclear magnetic resonance method were compared with those of mass balance method. **Results** There was a good linear relationship of apatinib mesylate in the rang of 0.01 — 0.05 mmol/L. The content of apatinib mesylate in raw material was calculated to be 96.66% with RSD 0.33%. The result was consistent with that calculated by mass balance method (96.25%). **Conclusion** This method is simple, rapid, and accurate results, which can be used for determination content of apatinib mesylate in raw material.

Key words: apatinib mesylate raw materials; apatinib mesylate; nuclear magnetic resonance method; mass balance method

甲磺酸阿帕替尼化学名为 *N*-[4-(1-氰基环戊基)苯基]-2-[(4-吡啶甲基)氨基]-3-吡啶甲酰胺甲磺酸盐, 是一种酪氨酸激酶血管内皮生长因子受体-2抑制剂^[1], 用于治疗既往至少接受2种系统化疗后进展或复发的晚期胃癌或胃-食管结合部腺癌^[2-3]。

甲磺酸阿帕替尼的测定方法主要有 HPLC 法^[4]和 UV 法^[5], 但是这些方法不仅需要对照品, 而且操作繁琐消耗时间, 并且 UV 法经常会受到样品中有紫外吸收杂质的干扰。由于核磁共振法定量检测具有样品需求小、预处理简单, 且不破坏化学结构等

收稿日期: 2016-06-21

基金资助: 国家重大新药创制专项(2015ZX09303001); 中国食品药品检定研究院中青年基金资助项目(2014A6、2015A01)

作者简介: 秦雯雯, 女, 药师, 硕士, 研究方向: 药物分析。Tel: (0931)7822983 E-mail: 15002504008@163.com

*通信作者 刘阳, 男, 副研究员, 研究方向: 药物分析。Tel: (010) 67095319

杨平荣, 男, 高级工程师, 研究方向: 检验管理。Tel: (0931) 7633003

优点^[6-7]，因此本实验建立了核磁共振法测定甲磺酸阿帕替尼原料药中甲磺酸阿帕替尼的方法。该方法无需对照品、样品制备简单，检测结果准确，是一种有效的化学样品测定手段。

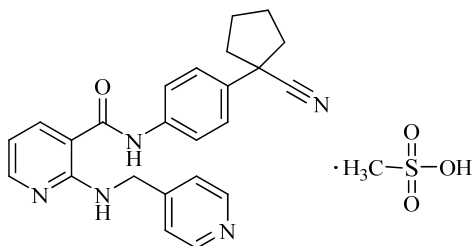


图 1 甲磺酸阿帕替尼的结构

Fig. 1 Structure of apatinib mesylate

1 材料

Bruker Ascend 500 型核磁共振谱仪（瑞士布鲁克公司），配有 11.74 T 的超屏蔽超导磁体，5 mm 双核 z-梯度探头（DUEL），BVT-2000 温控单元和 Topspin(3.2) 实验控制与数据处理专用软件。Mettler Toledo XP205 电子天平（Mettler Toledo 公司）。

甲磺酸阿帕替尼原料药（江苏恒瑞医药股份有限公司，批号 668110301）甲磺酸阿帕替尼对照品（中国食品药品检定研究院，批号 101253-0201101，质量分数 96.25%）；DMSO-*d*₆（Sigma 公司，质量分数 99.9%）；内标 1,4-二硝基苯（TCI Chemical，批号 3EUXH-JB，质量分数 99.0%）。乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

精密称取甲磺酸阿帕替尼原料药、对照品、内标物 1,4-二硝基苯适量，置同一离心管中，用 DMSO-*d*₆ 稀释，使磺酸阿帕替尼、1,4-二硝基苯浓度均约为 0.03 mmol/L。取约 0.7 mL 以上溶液，转入 5 mm 核磁管中，备用。

2.2 参数设置^[8]

采用 zg30 脉冲序列在恒温（25 °C）下获取 ¹H-NMR 谱。试验参数设置：谱宽（SWH）=10 000 Hz，射频中心频率（O1P）=3088 Hz，采样点数（TD）=64 K，采样时间（AQ）=3.3 s，驰豫延迟时间（D1）=20 s，采样次数（NS）=16 次，空扫次数（DS）=2 次，增益 RG=89。

2.3 图谱定性分析

测定甲磺酸阿帕替尼的 ¹H-NMR 谱，氢谱信号峰见图 2，氢谱解析和化学位移见表 1。

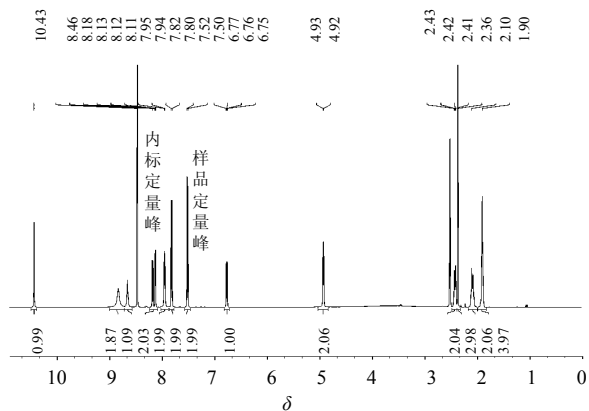


图 2 甲磺酸阿帕替尼样品与内标的核磁共振响应峰

Fig. 2 NMR peaks of apatinib mesylate sample and internal standard

表 1 甲磺酸阿帕替尼的 ¹H-NMR 谱解析

Table 1 ¹H-NMR analysis of apatinib mesylate

δ	氢数	峰型	J/Hz	归属
1.89~2.06	4	m		25-H、26-H
2.07~2.12	2	m		24(a)-H、27(a)-H
2.35	3	s		-CH ₃
2.42	2	d	10	24(b)-H、27(b)-H
4.92	2	d	5	11-H
6.75~6.77	1	m		1-H
7.50~7.52(定量峰)	2	m		21-H、19-H
7.80	2	d	10	18-H、22-H
7.94	2	d	5	13-H、17-H
8.11~8.13	2	m		2-H、6-H
8.46(定量峰)	4	s		1,4-二硝基苯(内标)
8.65	1	s		10-H
8.83	2	s		14-H、16-H
10.42	1	s		8-H

2.4 线性关系考察

分别精密称取甲磺酸阿帕替尼对照品 5.87、10.48、15.93、20.60、24.76 mg 和内标 1,4-二硝基苯 6.86、6.62、5.76、7.62、7.10 mg，置同一离心管中，精密加入 1 mL DMSO-*d*₆ 试剂使溶解，得 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mmol/L 甲磺酸阿帕替尼对照品溶液和 0.03 mmol/L 1,4-二硝基苯溶液。取约 0.7 mL 溶液转入 5 mm 核磁管中，测定 ¹H-NMR 谱，记录积分面积，以 δ 7.50 处样品定量峰和 δ 8.46 处内标峰面积比值为横坐标，甲磺酸阿帕替尼与 1,4-二硝基苯质量比为纵坐标进行线性回归，得回归方程

$Y=6.093\ 90\ X-0.035\ 41$, $R^2=0.999\ 9$, 结果表明甲磺酸阿帕替尼在 0.01~0.05 mmol/L 线性关系良好。

2.5 精密度试验

取 0.03 mmol/L 甲磺酸阿帕替尼对照品溶液, 连续测定 6 次, 记录积分面积, 计算 $\delta 7.50$ 处样品和 $\delta 8.46$ 处内标峰面积定量峰面积比值, 结果 RSD 值为 0.78%。

2.6 重复性试验

平行配制 0.03 mmol/L 甲磺酸阿帕替尼对照品溶液 6 份, 按上述试验条件进行测定, 以 $\delta 7.50$ 处样品定量峰和 $\delta 8.46$ 处内标峰面积比值计算甲磺酸阿帕替尼的平均质量分数, 结果其 RSD 值为 0.33%。

2.7 稳定性试验

取 0.03 mmol/L 甲磺酸阿帕替尼对照品溶液分别在 0、12 h 进行测定, 以 $\delta 7.50$ 处样品定量峰和 $\delta 8.46$ 处内标峰面积比值计算, 结果其 RSD 值为 0.36%, 结果表明甲磺酸阿帕替尼对照品溶液在室温下放置 12 h 稳定。

2.8 样品测定

取甲磺酸阿帕替尼原料药, 平行配制 6 份溶液, 采用以 $\delta 7.50$ 处样品定量峰和 $\delta 8.46$ 处内标峰面积比值定量峰, 计算甲磺酸阿帕替尼质量分数, 见表 2。原料药中甲磺酸阿帕替尼质量分数为 96.66%, RSD 值为 0.33%。

$$\text{质量分数} = [(A_s/A_r) \times (n_r/n_s) \times (M_s/M_r) \times W_r \times m_r] / W_s$$

A_s 为甲磺酸阿帕替尼定量峰的峰面积, A_r 为内标的峰面积, n_s 为甲磺酸阿帕替尼定量峰包含的质子数 ($n_s=2$), n_r 为内标峰包含的质子数 ($n_r=4$), M_s 为甲磺酸阿帕替尼的相对分子质量 (493.58), M_r 为内标的相对分子质量 (168.11), W_s 为甲磺酸阿帕替尼的称样量, W_r 为内标的称样量, m_r 为内标质量分数 (99.0%)

表 2 甲磺酸阿帕替尼原料药中甲磺酸阿帕替尼的测定结果
Table 2 Determination of apatinib mesylate in apatinib mesylate raw materials method

编号	质量分数/%	平均质量分数%	RSD/%
1	96.20		
2	96.95		
3	96.30		
4	96.84	96.66	0.33
5	96.78		
6	96.86		

为了验证核磁共振法测定结果的准确性, 实验同时利用质量平衡法测定了甲磺酸阿帕替尼。采用 HPLC 法, Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱; 流动相: 磷酸盐缓冲液 (pH 3.0) (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱, 0~10 min, 70%A, 10~20 min, 40%A, 20~31 min, 25%A, 31 min 以后, 70%A; 体积流量 1.2 mL/min; 检测波长 260 nm; 进样量 10 μ L。采用不加校正因子的自身对照计算得质量分数为 99.90%。卡氏水分仪测定样品中含水量为 3.62%, 残留溶剂量结果为 0.03%, 残渣未检出。根据质量平衡法计算原料中甲磺酸阿帕替尼的质量分数。质量分数 = (100% - 含水量 - 残留溶剂量 - 残渣量) \times HPLC 法质量分数 = (100% - 3.62% - 0.03% - 0) \times 99.90% = 96.25%。

3 讨论

3.1 内标和定量峰的选择

1,4-二硝基苯与甲磺酸阿帕替尼均易溶于 DMSO- d_6 , 且 1,4-二硝基苯的响应信号出现在 $\delta 8.46$, 与甲磺酸阿帕替尼的所有响应信号有良好的分离, 互不干扰。于是将 1,4-二硝基苯选为内标。内标的响应信号在 $\delta 8.46$ 处, 样品在 $\delta 7.50$ 处氢原子化学环境与内标氢原子类似, 该处信号峰不仅与内标峰分离度良好且不受样品中其他氢原子信号峰影响, 故选择 $\delta 7.50$ 处信号峰为样品定量峰。

3.2 质量平衡法与核磁共振法结果比较

甲磺酸阿帕替尼采用氢核磁共振法定量结果为 96.66%, RSD 值为 0.33%, 质量平衡法测定结果为 96.25%, 两种方法测定结果基本一致, 证明核磁共振法可以测定甲磺酸阿帕替尼。采用质量平衡法进行试验时, 消耗样品约 1 g, 且经过数天试验才能得到甲磺酸阿帕替尼的质量分数, 而采用核磁共振法对甲磺酸阿帕替尼进行定量时, 样品消耗量小于 100 mg, 数小时内就可以得到结果, 大大提高了实验效率。除此之外, 核磁定量法测得的质量分数为样品的绝对含量, 数据更准确更可靠。

本实验建立了氢核磁共振法定测定甲磺酸阿帕替尼原料药中甲磺酸阿帕替尼的方法, 该定量方法样品制备简单, 测定快速, 结果准确, 尤其适用于贵重或难以获得的样品, 样品需求量小且无需对照品, 可以广泛应用于药品质量控制

参考文献

[1] Tian S, Quan H T, Xie C Y, et al. YN968D1 is a novel and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor

- receptor-2 tyrosine kinase with potent activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Sci*, 2011, 107 (7): 1374-1380.
- [2] 秦叔逵, 李 进. 阿帕替尼治疗胃癌的临床应用专家共识 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2005, 20(9): 841-847.
- [3] Li J, Zhao X M, Chen L, *et al.* Safety and pharmacokinetics of novel selective vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor YN968D1 in patients with advanced malignancies [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 529.
- [4] 江苏恒瑞医药股份有限公司. N-[4-(1-氰基环戊基)苯基]-2-[(4-吡啶甲基)氨基]-3-吡啶甲酰胺的盐 [P]. 中国: CN200810149651.1, 2008-09-16.
- [5] 杜秋江. 紫外分光光度法测定原料药中阿帕替尼的含量 [J]. 淮海工学院学报: 自然科学版, 2013, 22(1): 38-40.
- [6] Li C Y, Xu H X, Han Q B, *et al.* Quality assessment of *Radix Codonopsis* by quantitative nuclear magnetic resonance [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2124-2429.
- [7] 罗乔奇, 田祥琴, 张 琦, 等. 基于氢核磁共振-主成分分析建立洁尔阴洗液质量控制的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1907-1911
- [8] 刘 阳, 张才煜, 程奇蕾, 等. 核磁共振法测定 13-顺阿维 A [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(3): 251-254.