

HPLC 法测定阿哌沙班及其 12 个有机杂质

金云^{1,2}, 王俊², 张显华², 张桐露², 陈应芝², 赵龙山^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 浙江华海药业股份有限公司, 临海 317024)

摘要 目的:建立 HPLC 法检测阿哌沙班原料药中的有关物质。**方法:**采用 ACE Excel3 C₁₈ - PFP(150 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 以缓冲液(30 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液) - 乙腈(90:10) 为流动相 A, 缓冲液(30 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液) - 乙腈(5:95) 为流动相 B, 梯度洗脱, 流速 1.2 mL · min⁻¹, 检测波长 280 nm, 柱温 40 °C, 进样量 10 μL, 样品温度 5 °C。**结果:**阿哌沙班与各杂质及降解产物能够完全分离(分离度 > 2.0), 供试品溶液在 48 h 内稳定性良好; 阿哌沙班和甲酯化物、乙酯化物、氯代杂质、脱氢杂质、双水解杂质、开环甲酯化物、环合物、杂质 D、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质的定量限均为 0.05%; 阿哌沙班和甲酯化物、乙酯化物、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质线性相关系数均 > 0.99, 范围为杂质含量的 LOQ 到指标浓度的 150%; 甲酯化物、乙酯化物、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质平均回收率(RSD)(n=9) 分别为 102.0%(2.7%)、106.4%(2.2%)、111.2%(4.0%)、104.4%(2.9%)、102.9%(2.7%)、101.8%(2.9%); 重复性和中间精密密度符合规定。经检测, 3 批阿哌沙班原料药 6 个月加速稳定性各个杂质结果均符合质量标准。**结论:**该方法简便快速, 灵敏度高, 专属性强, 可用于阿哌沙班原料药有关物质的测定。

关键词:阿哌沙班; 阿哌沙班原料药; 有关物质; 高效液相色谱; 质量控制; 分析方法; 分离

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)12 - 2088 - 07

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024 - 0063

Determination of apixaban and its 12 organic impurities by HPLC

JIN Yun^{1,2}, WANG Jun², ZHANG Xian - hua²,
ZHANG Tong - lu², CHEN Ying - zhi², ZHAO Long - shan^{1*}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Zhejiang Huahai Pharmaceuticals Co., Ltd., Linhai 317024, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determination of related substances in apixaban API. **Methods:** The analytical column was an ACE Excel3 C₁₈ - PFP (150 mm × 4.6 mm, 3 μm). The mobile phase A was buffer(30 mmol · L⁻¹ ammonium acetate in water) - acetonitrile(90:10) and the mobile phase B was buffer(30 mmol · L⁻¹ ammonium acetate in water) - acetonitrile(5:95). The whole run carried out by gradient elution at a flow rate of 1.2 mL · min⁻¹. The detection wavelength was set at 280 nm, the column temperature was 40 °C and the injection volume was 10 μL. **Results:** Apixaban was separated completely from the impurities and degradation products(the resolution > 2.0). The test solution was stable for at least 48 h. The LOQs of apixaban,

* 通信作者 Tel:15802456191; E-mail:longshanzhao@163.com

第一作者 Tel:13958554867; E-mail:845978280@qq.com

methyl ester product, ethyl ester product, chlorine impurity, dehydrogenation impurity, bihydrolytic impurity, ringopen methyl ester product, cyclate, impurity D, hydrolytic impurity, ringopen acid impurity, ringopen amide impurity and 5 - chlorhexyl chloride derived impurity, were all 0.05%. The linear correlation coefficients of apixaban, methyl ester product, ethyl ester product, hydrolytic impurity, ringopen acid impurity, ringopen amide impurity and 5 - chlorhexyl chloride derived impurity were all more than 0.99. The range were from the LOQ for impurity content to 150% of the target concentration. The average recoveries(RSD) ($n=9$) of methyl ester product, ethyl ester product, hydrolytic impurity, ringopen acid impurity, ringopen amide impurity and 5 - chlorhexyl chloride derived impurity were 102.0% (2.7%), 106.4% (2.2%), 111.2% (4.0%), 104.4% (2.9%), 102.9% (2.7%), 101.8% (2.9%). The repeatability and intermediate precision completely met the requirements. The impurities contents in three batches of apixaban API 6 months accelerate stability test completely met the requirements, respectively. **Conclusion:** This method is simple, rapid, sensitive and specific to be used for the determination of related substances in apixaban API.

Keywords: apixaban; apixaban API; related substances; HPLC; quality control; methodology; resolution

阿哌沙班是新型口服抗凝药物,也是一种新型口服 Xa 因子抑制剂,用于预防和治疗血栓,用于关节或膝关节择期置换术的成年患者,预防静脉血栓栓塞事件(VTE)^[1-5]。2007年,百时美施贵宝与辉瑞正式执行全球战略合作协议,联合开发并销售抗凝血产品阿哌沙班;2011年,在欧盟27国及冰岛、挪威,率先批准用于择期关节或膝关节置换手术中成人患者静脉血栓症的预防^[6-8];2013年1月,阿哌沙班获得国家食品药品监督管理总局颁发的进口药品许可证,用于成年患者的髌关节或膝关节择期置换术,预防VTE,于2013年4月正式在中国上市^[9-11]。

目前《中华人民共和国药典》、USP、EP的现行版本中尚无阿哌沙班原料药的质量控制方法。有文献报道,采用HPLC法测定阿哌沙班中的有关物质,但并未列全降解产物及可能存在的杂质^[12-16],如阿哌沙班脱氢杂质,由于结构及性质与阿哌沙班较为相似,常规反相方法无法有效分离,在已有文献中均未对它进行控制。基于对产品质量控制的需求,迫切需要开发有关物质的检测方法。

质量研究中涉及的物质有活性成分阿哌沙班,工艺杂质甲酯化物、乙酯化物、氯代杂质、脱氢杂质、开环甲酯化物、杂质D、环合物、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质、降解杂质、双水解杂质、水解杂质等。主要杂质信息见表1,其中“工艺杂质”为生产过程中确定会产生的杂质,“潜在工艺杂质”为生产过程中可能会产生的杂质。

各杂质的指标浓度:甲酯化物、乙酯化物(以上杂质含量均 $\leq 0.15\%$);氯代杂质、脱氢杂质、双水解杂质、开环甲酯化物、环合物、杂质D、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质(以上杂质含量均 $\leq 0.10\%$)。指标制定的依据来源于ICH Q3A^[17],界定阈值 $\leq 0.15\%$,鉴定阈值 $\leq 0.10\%$ 。

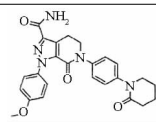
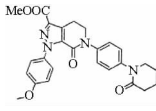
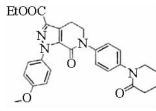
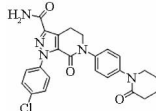
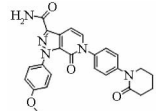
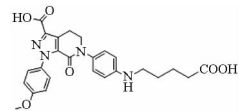
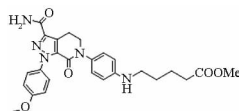
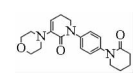
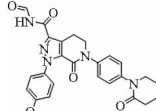
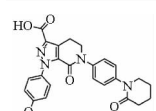
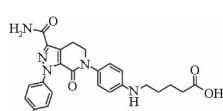
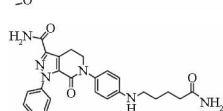
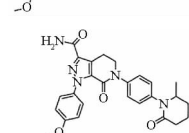
甲酯化物、乙酯化物、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质在USP论坛发行的阿哌沙班个论中^[18](待收载于正式版USP),已定为已知杂质,进行全套方法学验证;氯代杂质、脱氢杂质、双水解杂质、开环甲酯化物、环合物、杂质D在工艺中去除效果较好,不定为已知杂质,进行限度验证,验证内容包括专属性、LOD、LOQ。

1 仪器与试剂

Agilent1260 高效液相色谱仪(Agilent公司);XP205 十万分之一电子天平,XP26 百万分之一电子天平和S400pH计(Mettler Toledo公司);色谱柱ACE Excel 3 C₁₈-PPF(150 mm×4.6 mm, 3 μm);乙酸铵(色谱纯,Honeywell公司);乙腈(色谱纯,Sigma-Aldrich公司);超纯水(MiLLi-Q纯水仪制备)。

对照品阿哌沙班、甲酯化物、乙酯化物、氯代杂质、脱氢杂质、双水解杂质、开环甲酯化物、环合物、杂质D、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质(以上13个对照品均来自浙江华海药业股份有限公司,含量分别为100.0%、97.6%、97.1%、97.7%、99.3%、97.6%、98.0%、90.0%、99.1%、98.7%、93.2%、98.1%、97.1%)。

表 1 阿哌沙班原料药主要物质信息
Tab. 1 Main substances in apixaban API

化合物 (compound)	分子式 (molecular formula)	结构 (chemical structure)	类型 (type)
阿哌沙班 (apixaban)	$C_{25}H_{25}N_5O_4$		活性成分 (active ingredient)
甲酯化物 (methyl ester product)	$C_{26}H_{26}N_4O_5$		工艺杂质 (process impurity)
乙酯化物 (ethyl ester product)	$C_{27}H_{28}N_4O_5$		工艺杂质 (process impurity)
氯代杂质 (chlorine impurity)	$C_{24}H_{22}ClN_5O_3$		潜在工艺杂质 (potential process impurity)
脱氢杂质 (dehydrogenation impurity)	$C_{25}H_{23}N_5O_4$		工艺杂质 (process impurity)
双水解杂质 (bihydrolytic impurity)	$C_{25}H_{26}N_4O_6$		降解杂质 (degradation impurity)
开环甲酯化物 (ringopen methyl ester product)	$C_{26}H_{29}N_5O_5$		潜在工艺杂质 (potential process impurity)
环合物 (cyclate)	$C_{20}H_{25}N_5O_3$		中间体 (intermediate product)
杂质 D (impurity D)	$C_{26}H_{25}N_5O_5$		潜在工艺杂质 (potential process impurity)
水解杂质 (hydrolytic impurity)	$C_{25}H_{24}N_4O_5$		降解杂质 (degradation impurity)
开环酸杂质 (ringopen acid impurity)	$C_{25}H_{27}N_5O_5$		潜在工艺杂质 (potential process impurity)
开环酰胺杂质 (ringopen amide impurity)	$C_{25}H_{28}N_6O_4$		潜在工艺杂质 (potential process impurity)
5-氯己酰氯衍生杂质 (5-chlorhexyl chloride derived impurity)	$C_{26}H_{27}N_5O_4$		潜在工艺杂质 (potential process impurity)

阿哌沙班原料药(浙江华海药业股份有限公司, 批号 D5420-22-002 ~ D5420-22-007, 共 6 批次)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 ACE Excel3 C₁₈ - PFP (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 以缓冲液 (30 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液) - 乙腈 (90:10) 为流动相 A, 缓冲液 (30 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液) - 乙腈 (5:95) 为流动相 B, 以水 - 乙腈 (65:35) 为稀释液, 按表 2 的条件进行梯度洗脱, 流速 1.2 mL · min⁻¹, 检测波长 280 nm, 柱温 40 °C, 进样量 10 μL, 样品温度 5 °C。

表 2 梯度洗脱程序

Tab. 2 Gradient elution program

t/min	流动相比例 (ratio of mobile phase) / %	
	A	B
0 ~ 9	80	20
9 ~ 19	80 → 60	20 → 40
19 ~ 27	60 → 10	40 → 90
27 ~ 32	10	90
32 ~ 32.01	10 → 80	90 → 20
32.01 ~ 40	80	20

2.2 溶液的配制

2.2.1 杂质储备液 精密称取甲酯化物、乙酯化物、氯代杂质、脱氢杂质、双水解杂质、开环甲酯化物、环合物、杂质 D、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质对照品各适量, 分别加稀释液溶解并稀释制成每 1 mL 含 0.1 mg 的各个杂质对照品储备液。

2.2.2 阿哌沙班对照品储备液 精密称取阿哌沙班对照品适量, 加稀释液溶解并稀释, 制成每 1 mL 含 0.5 mg 的阿哌沙班的对照品储备液。

2.2.3 对照品溶液 精密量取阿哌沙班对照品储备液适量, 加稀释液溶解并稀释, 制成每 1 mL 含 0.5 μg 的阿哌沙班的对照品溶液。

2.2.4 供试品溶液 精密称取阿哌沙班原料药适量, 加稀释液溶解并稀释, 制成每 1 mL 含 0.5 mg 的阿哌沙班的供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 分别称取阿哌沙班样品 25 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 通过酸降解 (1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液, 60 °C, 2 h)、碱降解 (1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液,

60 °C, 2 h)、氧化降解 (10% 过氧化氢溶液, 室温 1 d)、高温高湿 (60 °C, 75% RH, 16 d)、高温低湿 (60 °C, 30% RH, 16 d)、光降解 (证实性: 强白光总照度 ≥ 1.2 × 10⁶ lx · h, 紫外光能量 ≥ 200 W · h · m⁻²; 强制性为 3 倍证实性)、金属降解 (50 mmol · L⁻¹ 硫酸铜溶液, 室温 10 d) 研究可知, 最容易产生降解的杂质为双水解杂质、水解杂质、开环酸杂质, 而在碱破坏条件下各杂质降解程度最大。

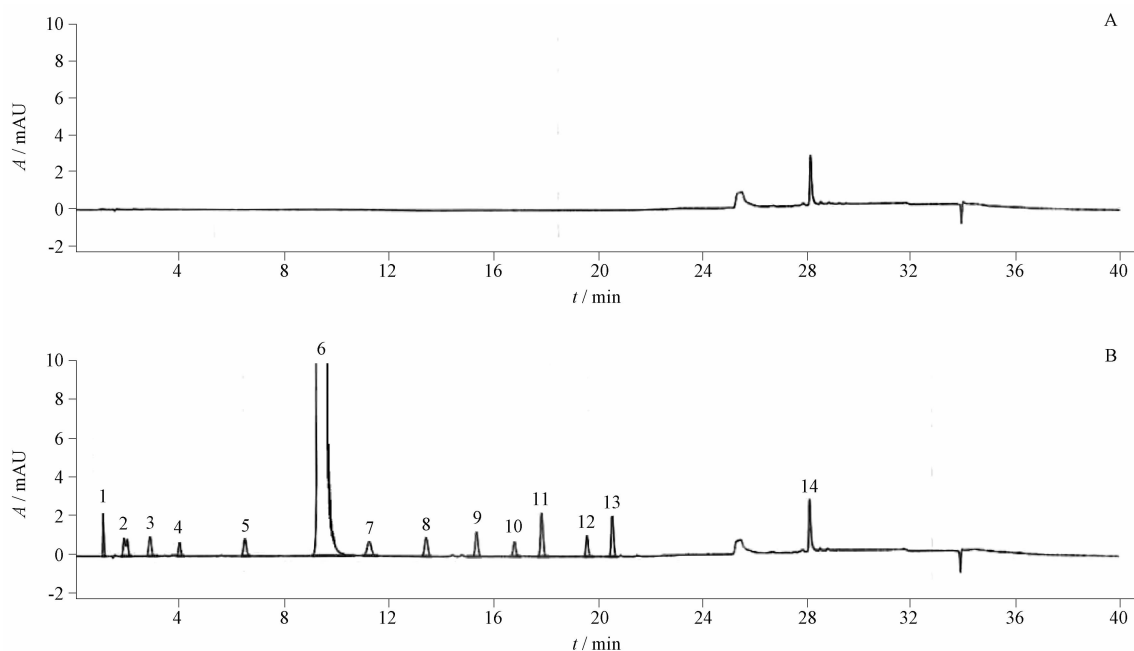
结合工艺分析, 可能产生的副产物、降解杂质为甲酯化物、乙酯化物、氯代杂质、脱氢杂质、双水解杂质、开环甲酯化物、环合物、杂质 D、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质。现对以上杂质进行定位研究。

精密称取阿哌沙班对照品适量, 精密量取“2.2.1”项下各杂质储备液适量, 置于同一量瓶中, 加稀释液溶解并稀释制成每 1 mL 含 0.5 mg 的阿哌沙班、0.75 μg 的甲酯化物、0.75 μg 的乙酯化物、0.5 μg 的氯代杂质、0.5 μg 的脱氢杂质、0.5 μg 的双水解杂质、0.5 μg 的开环甲酯化物、0.5 μg 的环合物、0.5 μg 的杂质 D、0.5 μg 的水解杂质、0.5 μg 的开环酸杂质、0.5 μg 的开环酰胺杂质、0.5 μg 的 5-氯己酰氯衍生杂质的选择性溶液。

在“2.1”项色谱条件下, 精密量取选择性溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 记录图谱。阿哌沙班与各杂质分离度均 > 2.0。空白溶液 (稀释液)、选择性溶液图谱见图 1。

2.3.2 检测限和定量限 精密量取“2.2.1”项下杂质储备液、“2.2.2”项下阿哌沙班对照品储备液适量, 并用稀释液进行逐级稀释, 按“2.1”项下色谱条件进样, 以信噪比约为 10 时, 阿哌沙班及各杂质的浓度作为定量限; 以信噪比约为 3 时, 阿哌沙班及各杂质的浓度作为检测限。结果显示, 阿哌沙班和甲酯化物、乙酯化物、氯代杂质、脱氢杂质、双水解杂质、开环甲酯化物、环合物、杂质 D、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质的定量限 (LOQ) 均为 0.05%, 检测限 (LOD) 均为 0.02%。

2.3.3 线性关系 精密量取甲酯化物、乙酯化物储备液各 7.5 mL, 水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质储备液各 5 mL, 阿哌沙班对照品储备液 1 mL, 置于同一 100 mL 量瓶中, 加稀释液稀释至刻度, 即得母液。分别精密量取母液 6、8、10、12、15 mL, 各置 100 mL 量瓶中, 用稀释液稀释



1. 双水解杂质(bihydrolytic impurity) 2. 水解杂质(hydrolytic impurity) 3. 开环酸杂质(ringopen acid impurity) 4. 环合物(cyclate) 5. 开环酰胺杂质(ringopen amide impurity) 6. 阿哌沙班(apixaban) 7. 脱氢杂质(dehydrogenation impurity) 8. 5-氯己酰氯衍生杂质(5-chlorhexyl chloride derived impurity) 9. 氯代杂质(chlorine impurity) 10. 杂质D(impurity D) 11. 甲酯化物(methyl ester product) 12. 开环甲酯化物(ringopen methyl ester product) 13. 乙酯化物(ethyl ester product) 14. 空白峰(blank peek)

图1 空白溶液(A)和选择性溶液(B)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank solution(A), selectivity solution(B)

至刻度,摇匀,即得含各个杂质60%、80%、100%、120%、150%的指标浓度线性溶液。精密量取甲酯化物、乙酯化物储备液各2 mL,水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质储备液各5 mL,阿哌沙班对照品储备液1 mL,置于同一100 mL量瓶中,加稀释液稀释至刻度,再精密量取5 mL至

100 mL量瓶中,用稀释液稀释至刻度,摇匀,即得各杂质LOQ浓度线性溶液。

各杂质LOQ浓度线性溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。以阿哌沙班、各杂质浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程及线性范围见表3,结果说明线性关系良好。

表3 7个化合物的回归方程和线性范围

Tab. 3 The regression equations and linear ranges of seven compound

化合物 (compound)	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
阿哌沙班(apixaban)	$Y = 17.57X + 0.03090$	0.9998	0.2576 ~ 0.7728
甲酯化物(methyl ester product)	$Y = 16.19X + 0.1850$	0.9999	0.2505 ~ 1.1273
乙酯化物(ethyl ester product)	$Y = 14.95X + 0.09910$	0.9999	0.2556 ~ 1.1502
水解杂质(hydrolytic impurity)	$Y = 17.29X + 0.03210$	0.9999	0.2844 ~ 0.8532
开环酸杂质(ringopen acid impurity)	$Y = 13.90X + 0.01100$	0.9999	0.2503 ~ 0.7509
开环酰胺杂质(ringopen amide impurity)	$Y = 13.41X - 0.00220$	1.000	0.2894 ~ 0.8682
5-氯己酰氯衍生杂质(5-chlorhexyl chloride derived impurity)	$Y = 15.57X - 0.02200$	1.000	0.2846 ~ 0.8537

2.3.4 重复性与中间精密度试验 精密称取阿哌沙班原料药(D5420-22-002)适量,精密量取

“2.2.1”项下各杂质储备液适量,于同一量瓶中,加稀释液稀释制成每1 mL含0.5 mg的阿哌沙班,其他

各杂质均为上述指标浓度,同法配制 6 份,按“2.1”项下色谱条件分别各进样 1 次。结果显示,甲酯化物、乙酯化物、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质峰面积的 RSD 分别为 0.80%、0.53%、0.67%、0.78%、1.4%、0.64%。更换人员、色谱柱(部件号:A244164、EXL-1110-1546U)、仪器(Agilent 公司:Agilent 1260、Agilent 1260 Infinity II)、实验日期,同法配制中间精密度溶液 6 份,按“2.1”项下色谱条件分别进样 1 次。结果显示,甲酯化物、乙酯化物、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质峰面积的 RSD 分别为 0.71%、0.48%、0.33%、1.2%、0.94%、1.3%,表明方法精密度良好。

2.3.5 溶液稳定性 取“2.2.3”项下对照品溶液、“2.2.4”项下供试品溶液、“2.3.1”项下选择性溶液,室温下分别于 0、24、48 h 按“2.1”项下色谱条件进样。结果对照品溶液中阿哌沙班的峰面积在 48 h 时比 0 h 时为 1.00,供试品溶液中各杂质的含量无明显变化,选择性溶液中各杂质回收率均 >95.0%,表明对照品溶液、供试品溶液及选择性溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.3.6 准确度试验 精密称取阿哌沙班原料药(D5420-22-002)适量,精密量取“2.2.1”项下各杂质储备液适量,于同一量瓶中,加稀释液稀释制成每 1 mL 含 0.5 mg 的阿哌沙班、其他各杂质浓度分别为上述指标浓度的 80%、100%、150%,每个浓度点同法配制 3 份,共 9 份溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定并记录色谱图,甲酯化物、乙酯化物、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质的平均回收率($n=9$)分别为 102.0% (RSD 2.7%)、106.4% (RSD 2.2%)、111.2% (RSD 4.0%)、104.4% (RSD 2.9%)、102.9% (RSD 2.7%)、101.8% (RSD 2.9%),说明方法准确度高。

2.3.7 耐用性试验 更换不同批号的色谱柱(部件号:A244164、EXL-1110-1546U)、不同编号的高效液相色谱仪(Agilent 公司:Agilent 1260、Agilent 1260 Infinity II),柱温 ± 2 °C、流速 ± 0.1 mL·min⁻¹、流动相比比例 $\pm 1.5\%$ 等,在“2.1”项下的色谱条件下检测选择性溶液,结果阿哌沙班、甲酯化物、乙酯化物、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质的分离情况及峰面积无明显差别,说明方法耐用性好。

2.3.8 原料药样品检测 对不同批次阿哌沙班原料药的加速稳定性样品(放置条件: $T=40$ °C ± 2 °C, RH 为 75% $\pm 5\%$;放置时间:0 d、1 月、2 月、3 月、6 月),按照“2.2.4”项下制备供试品溶液,在“2.1”项下色谱条件进行测定。检测结果显示,稳定性样品中各个杂质的含量 6 个月的结果与 0 d 一致,均未见明显增长,说明原料药稳定性良好。

3 讨论

3.1 阿哌沙班质量研究有关物质分析

各强制降解条件下产生的杂质主要为双水解杂质、水解杂质、开环酸杂质;加速样品检验数据表明阿哌沙班原料药各个杂质结果均未见明显增长。本品性质稳定,杂质限度符合要求。

3.2 色谱条件确定

3.2.1 溶液稳定性考察 采取常温进样盘考察时,杂质 D 在溶液状态下易降解,故进样盘采取 5 °C 控温,以延缓杂质降解时间。

3.2.2 色谱柱的考察 采用常规 C₁₈ 以及 C₈ 色谱柱,脱氢杂质无法有效与阿哌沙班主成分分离,如 Waters sunfire C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 3.5 μ m) 色谱柱,以及 USP 论坛中提到的 Zorbax SB C₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱等,通过色谱柱排查,最终选用五氟苯基 [ACE Excel 3C₁₈ - PFP (150 mm \times 4.6 mm, 3 μ m)] 色谱柱,能有效将各个杂质分离。

3.2.3 流动相比比例的考察 通过理论分析可知,将阿哌沙班及其 12 个杂质在短时间内全部洗脱并有效分离,需要用到梯度洗脱的方法。由于 12 个杂质极性跨度较大,在洗脱初始阶段,采取高比例的缓冲液加小比例的乙腈的等度洗脱方式,保留并分离强极性杂质,后与高比例的乙腈以梯度洗脱方式,保留并分离弱极性杂质。通过摸索,最终定流动相 A 为 [30 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液 - 乙腈 (90:10)], 并与流动相 B (30 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液 - 乙腈 (5:95)) 进行梯度洗脱。

3.3 小结

综合分析,阿哌沙班原料药在生产过程中涉及降解杂质、副产物、中间体等性质差别较大的物质,色谱峰较多,建立能将所有物质有效分离的分析方法,是阿哌沙班原料药有关物质方法开发的关键。通过对不同型号色谱柱、流动相比比例以及梯度洗脱方式等色谱条件的反复摸索,建立了阿哌沙班有关物质分析方法,并通过酸、碱、氧、光照等破坏试验

以及各个杂质的加标试验,验证了该分析方法的专属性,保证了该方法在原料药稳定性样品检测过程中的耐用性;本试验对于阿哌沙班工艺杂质进行了检测能力的确认(定量限、检测限),对工艺中去除效果较好的氯代杂质、脱氢杂质、双水解杂质、开环甲酯化物、环合物、杂质D进行限度验证,对于各指标杂质甲酯化物、乙酯化物、水解杂质、开环酸杂质、开环酰胺杂质、5-氯己酰氯衍生杂质进行了定量限、检测限、线性关系、回收率等一系列方法学验证,结果证明该分析方法精密度高,重复性好,稳定无干扰,可用于阿哌沙班原料药的质量控制。

参考文献

- [1] 王磊,钟静芬,时惠麟.口服Xa因子直接抑制剂阿哌沙班的临床研究进展[J].上海医药,2012,33(17):17
WANG L, ZHONG JF, SHI HL. Progress in clinical studies of apixaban, a direct inhibitor of oral Xa factor[J]. Shanghai Med Pharm J, 2012, 33(17): 17
- [2] 黄仲义.口服凝血因子Xa直接抑制剂阿哌沙班的临床药理学[J].中国新药与临床杂志,2013,32(7):530
HUANG ZY. Clinical pharmacology of apixaban, a direct inhibitor of the oral coagulation factor Xa [J]. Chin J New Drugs Clin Rem, 2013, 32(7): 530
- [3] 张先龙.新型口服抗凝药物阿哌沙班[J].中华关节外科杂志(电子版),2014,8(4):96
ZHANG XL. The new oral anticoagulant drug, apixaban [J]. Chin J Joint Surg (Electron Ed), 2014, 8(4): 96
- [4] 王乔宇,武明芬,柳鑫,等.2021中国静脉血栓栓塞症防治抗凝药物的选用与药学监护指南[J].中国临床药理学杂志,2021,37(21):2999
WANG QY, WU MF, LIU X, et al. Selection of anticoagulant drugs for prevention and treatment of venous thromboembolism in China and guidelines for pharmaceutical care in 2021[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2021, 37(21): 2999
- [5] 范正达,张东,卞敏凯,等.阿哌沙班与低分子肝素预防髌/膝关节置换术后下肢深静脉血栓形成的临床效果比较[J].临床合理用药杂志,2023,16(2):27
FAN ZD, ZHANG D, BIAN MK, et al. Clinical effect of apixaban and low molecular weight heparin in prevention of deep venous thrombosis of lower limbs after hip/knee replacement results comparison[J]. Chin J Clin Ration Drug Use, 2023, 16(2): 27
- [6] CHARLES F, SUNIL N, WANG JS, et al. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of multiple oral doses of apixaban, a factor Xa inhibitor, in healthy subjects[J]. Br J Clin Pharmacol, 2013, 76(5): 776
- [7] 张先龙.新型口服抗凝药物阿哌沙班[J].中华关节外科杂志,2014,8(4):543
ZHANG XL. Apixaban, a novel oral anticoagulant[J]. Chin J Joint Surg, 2014, 8(4): 543
- [8] KROEGEL C, REISSIG A. Principle mechanisms underlying venous thromboembolism: epidemiology, risk factors, pathophysiology and pathogenesis [J]. Respiration, 2003, 70(1): 7
- [9] PATEL J, FROST C, 贾晶晶,等.阿哌沙班制剂:中国,102770126[P].2012-11-07
PATEL J, FROST C, JIA JP, et al. Apixaban Preparation; China, 102770126[P]. 2012-11-07
- [10] MACAULAY T E, ALLEN C, ZIADA KM. Thrombin receptor-antagonism - the potential of antiplatelet medication SCH530348 [J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(6): 1015
- [11] 钱毅.新型口服抗凝剂临床应用的进展[J].中国循环杂志,2012,27(4):246
QIAN Y. Progress of clinical application of novel oral anticoagulants[J]. Chin Circ J, 2012, 27(4): 246
- [12] 张震,孙燕.HPLC法测定阿哌沙班中的有关物质[J].天津药学,2014,26(6):9
ZHANG Z, SUN Y. Determination of related substances in apixaban by HPLC[J]. Tianjin Pharm, 2014, 26(6): 9
- [13] 王忠波,李丹.RP-HPLC法测定阿哌沙班片的含量及有关物质[J].中国药房,2015,26(6):828
WANG ZB, LI D. Determination of apixaban tablets and related substances by RP-HPLC[J]. China Pharm, 2015, 26(6): 828
- [14] 聂忠莉,郭兆元,胡一冰,等.阿哌沙班中8种已知杂质的HPLC法定量检测[J].中国测试,2017,43(3):36
NIE ZL, GUO ZY, HU YB, et al. Determination of 8 known impurities in Apixaban by HPLC [J]. China Meas Test Technol, 2017, 43(3): 36
- [15] 孙媛媛,赵云丽,段蒙蒙,等.高效液相色谱法测定阿哌沙班中的有关物质[J].沈阳药科大学学报,2017,34(1):37
SUN YY, ZHAO YL, DUAN MM, et al. Determination of related substances in apixaban by high performance liquid chromatography [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2017, 34(1): 37
- [16] 陈思,石靖,米贤伟.阿哌沙班杂质分析与控制[J].中国药理学杂志,2020,55(22):1906
CHEN S, SHI J, MI XW. Analysis and control of apixaban impurities[J]. Chin Pharm J, 2020, 55(22): 1906
- [17] ICH. Impurities in New Drug Substances Q3A (R2) [S/OL]. [2024-01-28]. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
- [18] USP-NF PF [S/OL]. [2024-01-28]. https://online.uspnf.com/uspnf/document/2_GUID-4D3213B8-95A5-44F8-8433-A6FB58E0211A_10101_EN-US

(本文于2024年1月28日收到)