

首批利伐沙班国家对照品的研制

刘倩,冯玉飞,綦梦洁,杨东升,关皓月,牛剑钊
(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

[摘要] **目的:**建立供含量测定用的首批利伐沙班国家对照品。**方法:**应用红外光谱、核磁共振和液质联用仪对利伐沙班进行结构确证,采用 HPLC 法测定样品色谱纯度,同时测定水分和炽灼残渣,以质量平衡法计算利伐沙班的含量。**结果:**确证利伐沙班的结构,确定首批利伐沙班对照品含量为 99.6%。**结论:**首批利伐沙班化学对照品的研制可作为利伐沙班原料及其相关制剂的鉴别和含量测定用对照品。

[关键词] 利伐沙班;标准物质定值;质量平衡法;对照品;HPLC 法

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)06-0572-04

Establishment of the first batch of national reference standard of rivaroxaban

LIU Qian, FENG Yu-fei, QI Meng-jie, YANG Dong-sheng, GUAN Hao-yue, NIU Jian-zhao
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the first batch of national reference standard of rivaroxaban. **Methods:** The structure of rivaroxaban was confirmed by IR, NMR and LC-MS spectroscopy. The purity of rivaroxaban was determined by HPLC. Moreover, moisture and residual ignition were determined. The content of rivaroxaban was calculated by mass balance method. **Results:** The structure of rivaroxaban was confirmed. The content of the first batch of national reference standard of rivaroxaban was assigned as 99.6%. **Conclusion:** The first batch of national reference standard of rivaroxaban can be applied for the identification and content determination of rivaroxaban and its related preparations.

[Key words] rivaroxaban; certification of standard material; mass balance methods; reference substance; HPLC

利伐沙班是拜耳公司研发的全球第一个口服的直接 Xa 因子抑制剂,通过抑制因子 Xa 可以中断凝血瀑布的内源性和外源性途径,抑制凝血酶的产生和血栓形成^[1]。利伐沙班并不抑制凝血酶(活化因子 II),也并未证明其对于血小板有影响,广泛用于血栓栓塞性疾病的治疗或预防,如预防择期髋、膝关

节置换术后静脉血栓形成;深静脉血栓形成和肺栓塞的治疗和降低复发风险;预防合并一种或多种危险因素的非瓣膜性房颤脑卒中及全身性栓塞等不良事件的发生^[2]。2008 年 10 月利伐沙班片在加拿大和欧盟获得批准上市,2011 年 7 月 1 日在美国上市,商品名为拜瑞妥(Xarelto)。自 2008 年 9 月起,拜瑞妥已在全球 50 多个国家上市,并于 2009 年 6 月在中国正式上市。目前,利伐沙班收载于美国药典(USP43-NF38)、欧洲药典(EP 10.0)、英国药典(BP 2022),我国药典尚未收载。国内已有多家利伐沙班片仿制制剂上市,为了有效控制产品质量,亟需制备利伐沙班国家化学对照品。本研究对利伐沙

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2017ZX09101001)

[作者简介] 刘倩,女,博士,研究员,研究方向:药检药理。E-mail: liuqian@nifdc.org.cn。

[通讯作者] 牛剑钊,男,硕士,副主任药师,研究方向:药检药理。联系电话:(010)67095456,E-mail: njz@nifdc.org.cn。

班进行了结构确证、纯度分析,最后通过质量平衡法赋值,最终建立了首批利伐沙班国家对照品。

材 料

1 药品与试剂

利伐沙班原料(吉林汇康制药有限公司,批号:20180001);利伐沙班 EP 对照品(批号:Y0002187, Batch 1,纯度:99.8%);氘代二甲基亚砜(CTL,批号:PR-28072/07206DM1);内标:马来酸(Sigma公司,批号:BCBM8127,纯度:99.94%);甲醇、乙腈均为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

2 仪器

Spectrum two 红外光谱仪(PE公司);Avance III HD 600 核磁共振仪(Bruker公司);Thermo LTQ ORBITRAP XL 液质联用仪(Thermo公司);mcp5500 旋光仪(安东帕公司);1260 型液相色谱仪(安捷伦公司);紫外分光光度计(岛津公司);Mettler XS205 电子天平、S400-K 酸度计、DSC3 差示扫描量热仪(梅特勒-托利多公司);852 Titrand 水分仪(万通公司);LT15/11/C450 马弗炉(Nabertherm公司);YRT-3 熔点仪(天大天发公司);Milli Q 纯水机(Millipore公司)。

方法与结果

1 理化特性

1.1 概述 利伐沙班结构式如图1所示,化学名:5-氯-N-[(5S)-2-氧代-3-[4-(3-氧代吗啉-4-基)苯基]-1,3-噁唑烷-5-基]甲基]-噁吩-2-甲酰胺;分子式: $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$;相对分子量:435.88 $g \cdot mol^{-1}$;CAS号:366789-02-8。

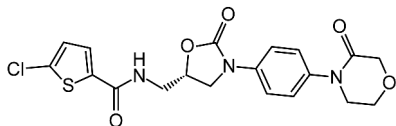


图1 利伐沙班结构式

1.2 外观性状 待标品为白色结晶性粉末。

1.3 熔点 按照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则0612,测得待标品熔点为230.4 $^{\circ}C$ ~ 232.1 $^{\circ}C$ 。

1.4 比旋度测定 将待标品用N,N-二甲基乙酰胺(DMF)制成浓度为10 $mg \cdot mL^{-1}$ 的溶液,采用钠光谱

D线(589 nm)测定旋光度,比旋度为 -47° 。

1.5 引湿性 采用SMS DVS-2 动态蒸气吸附仪,样品在25 $^{\circ}C$ 、相对湿度为80%的条件下放置24 h,实时测定样品重量。结果显示待标品无引湿性。

2 结构确证

2.1 紫外光谱 将待标品用稀释液(乙腈:水=60:40)制成浓度为0.01 $mg \cdot mL^{-1}$ 的溶液,在200~400 nm进行光谱扫描,待标品溶液在紫外可见光区最大吸收为249.3 nm,待标品的红外光吸收图谱与EP对照品红外图谱一致,见图2。

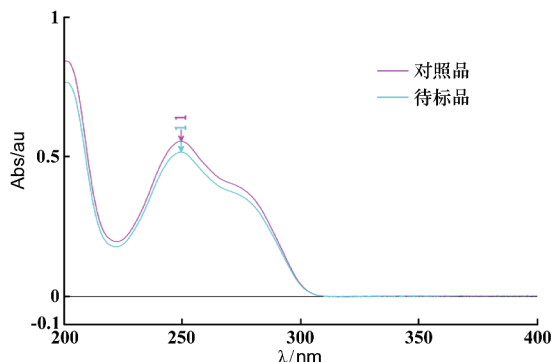


图2 利伐沙班紫外光谱

2.2 红外光谱 采用溴化钾压片法制备样品,扫描次数为32,分辨率为4.000 cm^{-1} ,采集速度为0.6 $次 \cdot s^{-1}$;狭缝宽度为100.00 μm 。待标品的红外光吸收图谱与EP对照品红外图谱一致,见图3。

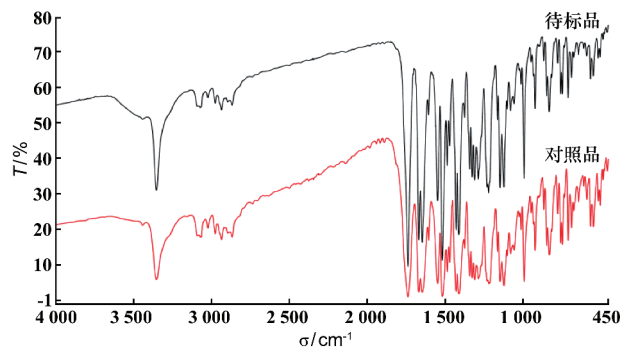


图3 利伐沙班红外光谱

2.3 核磁共振 精密称取待标品,于氘代二甲基亚砜中完全溶解,在核磁共振仪上采集一维 1H 谱、一维 ^{13}C 谱。待标品的氢谱碳谱与利伐沙班 EP 对照品图谱一致,见图4。

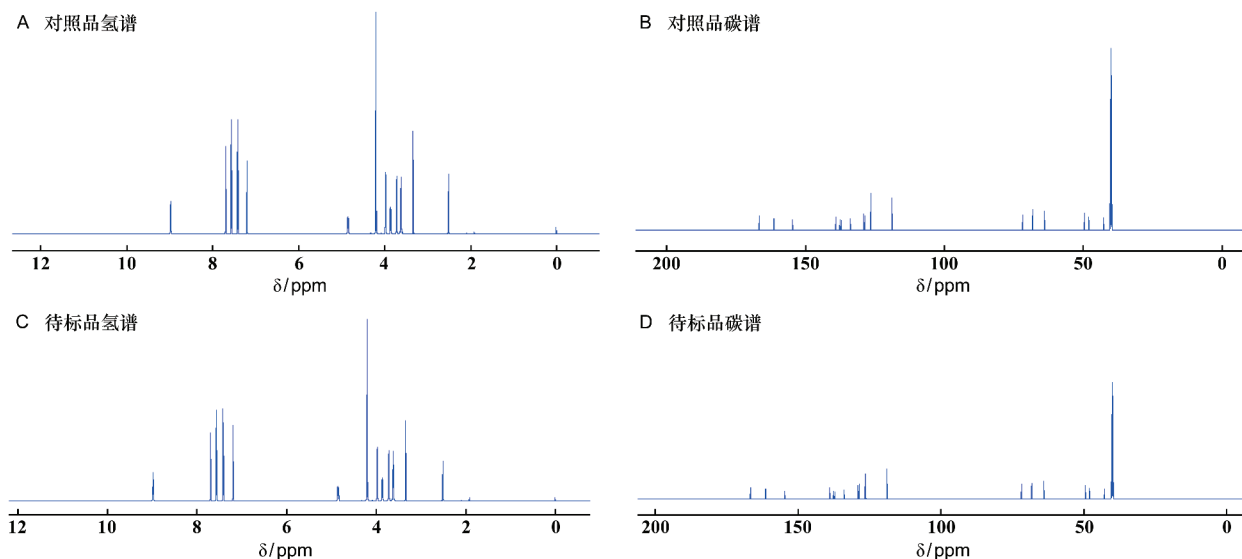


图4 利伐沙班核磁共振图谱

2.4 相对分子量测定 采用液质联用仪进行测定, 高效液相条件: 甲醇-水(3:1), 流速: $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样体积 $20 \mu\text{L}$ 。质谱条件: ESI 离子源 -4.5 kV , 鞘气流速 30 arb , 负离子扫描。待标品高分辨率质谱负离子准分子离子峰 m/z 470.032 07, 为 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 离子信号, 与理论计算值 470.033 87 相差 0.001 8, 见图 5。

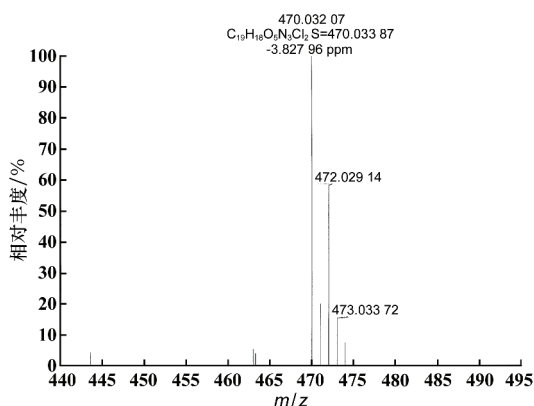


图5 利伐沙班液质联用光谱

3 杂质和纯度

3.1 炽灼残渣 精密称取待标品, 于 $700 \text{ }^\circ\text{C}$ 下测定, 炽灼残渣量为 0.05% ($n=2$)。

3.2 水分 采用卡式库仑法测定, 测定待标品水分含量为 0.22% ($n=5$)。

3.3 干燥失重 精密称取待标品, 在 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥至恒重, 重量减失为 0.36% ($n=2$)。

3.4 纯度分析 色谱柱为 Agela Venusil C_{18} Plus 柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$); 0.1% 磷酸溶液-乙腈; 梯

度洗脱; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 250 nm ; 柱温: $45 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样器温度: $10 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样体积: $25 \mu\text{L}$; 样品浓度: $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 记录色谱图。待标品按面积归一化法计算总杂质含量为 0.09% , 最大单个杂质为 0.02% ; 采用 0.1% 自身对照法计算总杂质含量为 0.04% , 最大单个杂质为 0.02% 。待标品 HPLC 纯度为 99.96% 。待标品溶液及 0.1% 自身对照溶液典型色谱图见图 6 和图 7。

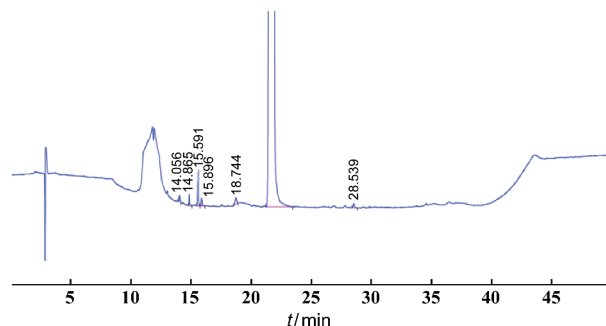


图6 利伐沙班($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) HPLC 典型色谱图

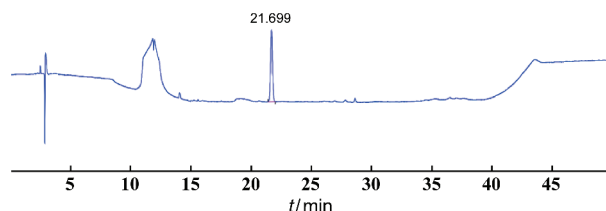


图7 利伐沙班 0.1% 自身对照溶液 HPLC 典型色谱图

4 含量测定

4.1 HPLC 外标法 以利伐沙班 EP 对照品作为对照,外标法测得待标品含量为 99.6% ($n=2$)。

4.2 质量平衡法 根据水分、炽灼残渣及 HPLC 纯度的测定结果,以质量平衡法计算,本批对照品的 HPLC 法含量/ $\%$ = (100% - 干燥失重/ $\%$ - 炽灼残渣/ $\%$) \times HPLC 纯度 = 99.55%,修约为 99.6%。

4.3 核磁共振定量 以马来酸 6.27 ppm 波谱峰为内标物,以待标品 7.69 ppm 波谱峰定量,含量为 99.24%,RSD 为 0.152% ($n=3$)。

4.4 DSC 定量 采用差示扫描量热仪^[3],起始温度:40℃,终止温度:250℃,升温速率:5℃ \cdot min⁻¹,氮气载气流速 50 mL \cdot min⁻¹,测得待标品纯度为 99.88%。

5 均匀性和稳定性^[4-5]

5.1 均匀性 取 12 支待标品,每支待标品称取 2 份,使用 HPLC 法测定,以称样量/峰面积进行均匀性检验。采用单因素方差分析进行统计, $P > 0.05$ ($F < F_{\alpha}$),结果表明本待标品均匀性符合要求,支间均匀。

5.2 短期稳定性 取待标品置于温度 40℃、湿度 75% 恒温箱中,分别于 0,3,7 和 10 d 各取 2 支检测有关物质,采用面积归一化法测定总杂质及最大单杂质。结果表明待标品 40℃ 放置 10 d,有关物质未见明显变化。

5.3 长期稳定性 取 2℃ ~ 8℃ 放置 6 个月的待标品 2 支检测有关物质,采用面积归一化法测定总杂质及最大单杂质含量。结果表明待标品于 2℃ ~ 8℃ 放置 6 个月,有关物质未见明显变化。

讨 论

本待标品作为首批利伐沙班对照品,对其化学

结构确证、纯度及杂质、理化性质等进行了考察^[6]。目前,一级对照品的绝对含量测定多采用质量平衡法,该法也是世界卫生组织(WHO)、多国药典及药品监管机构推荐的方法,另外,本实验也采用核磁共振波谱法、差示扫描量热法与质量平衡法相互验证,保证定值的准确度。此外,参考《中华人民共和国药典》2020 年版通则 9901 国家药品标准物质制备指导原则对本批待标品进行均匀性和稳定性考察。最终通过 WHO 推荐的标准物质定值法,即质量平衡法,以扣除水分、炽灼残渣后的 HPLC 纯度对本批对照品含量进行赋值^[7]。经过药品标准物质专家委员会审定,批准待标品(批号:430060-202101)作为利伐沙班 HPLC 鉴别和含量测定用国家对照品使用,其含量为 99.6%。

[参 考 文 献]

- [1] EINSTEIN Investigators, BAUERSACHS R, BERKOWITZ SD, et al. Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(26): 2499 - 2510.
- [2] PATEL MR, MAHAFFEY KW, GARG J, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(10): 883 - 891.
- [3] 刘毅,吴建敏,鲁涓,等. 差示扫描量热法在化学药品对照品纯度分析中的应用[J]. 中国新药杂志,2017,26(10): 1115 - 1118.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 四部. 北京:中国医药科技出版社,2020: 550 - 551.
- [5] 张雅军,吴先富,肖新月. 差示扫描量热法测定磺胺类化学对照品的纯度[J]. 中国现代应用药学,2022,39(1): 93 - 96.
- [6] 李丹,王婷,梁莉,等. 利伐沙班在健康人体的药动学及生物等效性评价[J]. 中国新药杂志,2021,30(15): 1401 - 1406.
- [7] 韩永志. 标准物质讲座(第七讲)标准物质的定值[J]. 化学分析计量,2001,10(5): 38 - 39.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-09-23