HPLC 法测定阿瑞匹坦胶囊的有关物质

曹嘉玉[1,2]，王夕静[2]，王　媛[2]，张文君[2]，张继业[1*]
（1. 西安交通大学药学院，陕西西安 710061；2. 西安新通药物研究股份有限公司，陕西西安 710077）

摘要：建立了 HPLC 法测定阿瑞匹坦（**1**）胶囊中的有关物质。采用 ZORBAX SB-Aq C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以四丁基硫酸氢铵缓冲溶液 - 乙腈为流动相体系，梯度洗脱，流速为 1.0 mL/min，柱温为 30 ℃，检测波长为 210 nm，进样量为 20 μL。结果表明，在该色谱条件下主成分与各杂质峰均能良好分离。**1** 和杂质 A、C、E、F 的定量限分别为 0.36、0.52、0.48、0.46、0.39 ng，且在相应浓度范围内线性关系良好（$r \geqslant 0.999\ 6$）。6 批 **1** 胶囊样品的测定结果显示，已知杂质及其他最大单个杂质均小于 0.07%，总杂质含量小于 0.07%。该方法专属性强、准确度高，可用于 **1** 胶囊中有关物质的测定。

关键词：阿瑞匹坦胶囊；止吐药；高效液相色谱法；相对校正因子；有关物质
中图分类号：R917；R975^{+}.4　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)08-1051-06
引用：曹嘉玉，王夕静，王　媛，等．HPLC 法测定阿瑞匹坦胶囊的有关物质［J］．中国医药工业杂志，2025, **56**(8)：1051-1056．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.08.011

Determination of Related Substances in Aprepitant Capsules by HPLC

CAO Jiayu[1,2], WANG Xijing[2], WANG Yuan[2], ZHANG Wenjun[2], ZHANG Jiye[1*]
(*1. School of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061; 2 Xi'an Xintong Pharmaceutical Research Co., Ltd., Xi'an 710077*)

ABSTRACT: An HPLC method was established for the determination of the related substances in aprepitant (**1**) capsules. A ZORBAX SB-Aq C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, and the analysis was carried out in the gradient elution mode with tetrabutylammonium hydrogen sulfate buffer solution-acetonitrile as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 210 nm, and the injection volume was 20 μL. The results showed that the main component and each impurity peak could be well separated under this chromatographic condition. The quantification limits of **1**, impurities A, C, E, and F were 0.36, 0.52, 0.48, 0.46, and 0.39 ng, respectively. And it was linear for **1**, impurities A, C, E, and F in the corresponding concentration ranges ($r \geqslant 0.999\ 6$). The determination results of 6 batches of **1** capsules showed that the known impurities and an unknown maximum individual impurity were all less than 0.07%, and the total impurity content was less than 0.07%. The established method has strong specificity and high accuracy, which can be used for the determination of the related substances in **1** capsules.

Key Words: aprepitant capsule; antiemetics; HPLC; correction factor; related substances

2024 年 2 月，国际癌症研究中心在线发布的全球癌症负担数据[1]显示，2022 年恶性肿瘤新增病例近 2 000 万例，死亡病例近 1 000 万例。其中，肺癌、乳腺癌、结直肠癌是较为常见的类型。化疗是治疗恶性肿瘤的有效手段，而恶心和呕吐是常见的化疗相关不良反应，会引起肿瘤患者较大痛苦[2]，并严重影响依从性。我国临床主导的恶性肿瘤止吐药主要作用于 5- 羟色胺 3 型受体，但这类药物对不同程度的呕吐症状都难以实现完全控制，因此需要与其他类型的药品联合使用[3—4]。神经激肽 -1（neurokinin-1，NK-1）[5—6]类药物是通过与 P 物质竞争性结合大脑呕吐中枢的 NK-1 受体，维持长时间的中枢活性以达到较好的止吐作用[7—8]。阿瑞匹

收稿日期：2025-03-01
作者简介：曹嘉玉，硕士研究生，专业方向：药品处方工艺研究。
通信作者：张继业，教授，博士生导师，从事药物递送系统研究与开发。

坦（aprepitant，**1**）为首个 NK-1 受体拮抗药，由美国默克公司开发，其胶囊剂于 2003 年获美国 FDA 批准上市。**1** 能够透过血脑屏障，结合 90％以上的 NK-1 受体，改善因化疗引起的急性或延迟性恶心和呕吐。

于美芹等[9]采用 HPLC 法测定 **1** 原料药中的有关物质，仅针对起始产物、中间体进行研究。余丽等[10]采用等度洗脱的方式检测了 **1** 原料药中的有关物质，检测时间较短，容易造成漏检。本研究考察、对比了 USP、EP 中收载的 **1** 有关物质检测方法，发现上述方法存在杂质控制不严、梯度洗脱过程中容易出现基线波动、重复性差等不足。

丁军等[11]报道了 **1** 的多种合成路线，本研究采用如图 1 所示的合成路线，并建立了 HPLC 法用于测定自制 **1** 胶囊中的 **1** 及有关物质 A[5-[[(2*R*,3*R*)-2-[(1*R*)-1-[3,5-二（三氟甲基）苯基]乙氧基]-3-(4-氟苯基)-4-吗啉基]甲基]-1,2-二氢-3*H*-1,2,4-三唑-3-酮，**2**]、有关物质 C[(*S*)-1-[3,5-双（三氟甲基）-苯基]乙醇，**3**]、有关物质 E[(*R*)-4-苄基-2-[(*R*)-1-[3,5-双（三氟甲基）苯基]乙氧基]吗啉-3-酮，**4**]、有关物质 F[(2*R*,3*S*)-2-[(1*R*)-1-[(3,5-双三氟甲基）苯基]乙氧基]-3-(4-氟苯基）吗啉，**5**]，以期能够有效监测 **1** 胶囊中的杂质，保障药品质量。

1　仪器与试药

LC-2010AHT 型液相色谱仪（含 SPD-M20A 检测器，日本 Shimadzu 公司）；CPA225D 型电子天平（德国赛多利斯公司）；S210 型 pH 计（瑞士梅特勒 - 托利多公司）。

1 对照品（含量 99.81％，批号 201-127）、**2** 对照品（含量 100.00％，批号 202-106）、**3** 对照品（含量 99.83％，批号 203-164）、**4** 对照品（含量 99.76％，批号 204-187）、**5** 对照品（含量 99.91％，批号 205-136）、**1** 胶囊（规格 40 mg，批号 140901、140902、140903、140904、140905、140906）均由西安新通药物研究股份有限公司提供；乙烯基吡咯烷酮及乙酸乙烯酯共聚物（德国巴斯夫公司，批号 09811868E0，**1** 胶囊的主要辅料）；介孔二氧化硅 Syloid® XDP3050（美国格雷斯公司，批号 1000414036，**1** 胶囊的主要辅料）；四丁基硫酸氢铵（德国默克公司，含量 98.00％，批号 20170123）；磷酸（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，含量 98.00％，批号 H2426431）；乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯，水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱 ZORBAX SB-Aq C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相　A 为乙腈 -1 mmol/L 四丁基硫酸氢

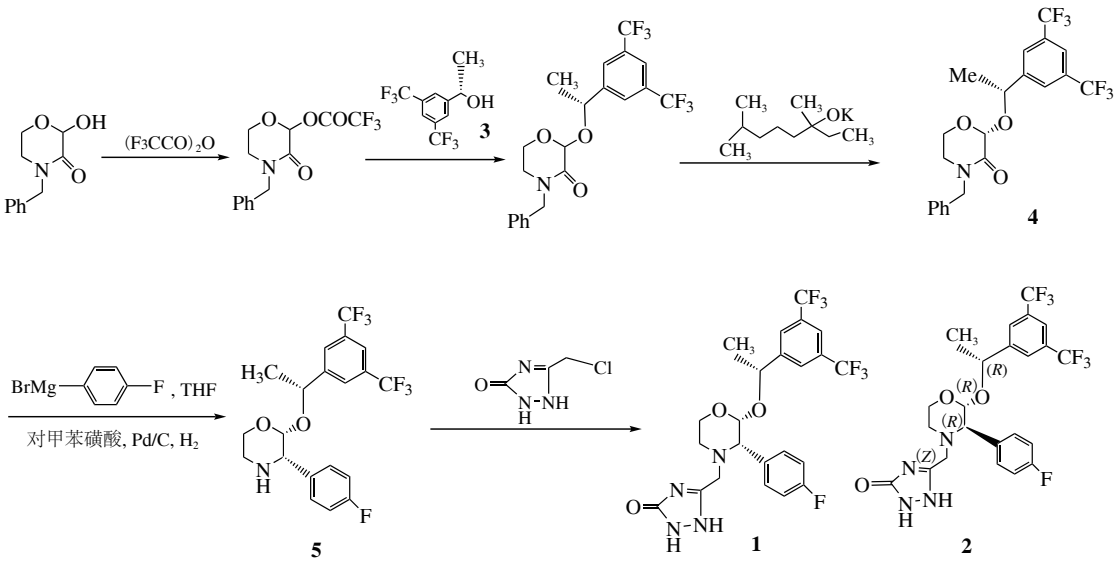


图 1　1 合成路线及其有关物质

Fig.1　Synthetic Route of **1** and Its Related Substances

铵溶液（用磷酸调至 pH 2.1）（体积比 20 ∶ 80），B 为乙腈 -1 mmol/L 四丁基硫酸氢铵溶液（用磷酸调至 pH 2.1）（体积比 80 ∶ 20），梯度洗脱（0—5 min，A 65 %；5—35 min，A 65 %—20 %；35—50 min，A 20%；50—52 min，A 20%—65%；52—60 min，A 65%）；检测波长 210 nm；流速 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 20 μL。

2.2 溶液配制

空白溶剂（稀释液）：乙腈 - 水（体积比 1 ∶ 1）。

杂质贮备液：精密称取杂质 **2**、**3**、**4**、**5** 对照品各 25 mg，分别置 50 mL 量瓶中，加稀释液超声使溶解，定容，摇匀，作为杂质贮备液。

系统适用性溶液：精密称取 **1** 对照品 50 mg，置 50 mL 量瓶中，加入各杂质贮备液 1 mL，加稀释液超声使溶解，定容，摇匀，作为系统适用性溶液。

空白辅料溶液：按处方比例配制混合辅料溶液，取相当于 **1** 胶囊内容物 10 mg 的辅料，置 10 mL 量瓶中，加稀释剂定容，离心（2 680×*g*）5 min，取上清液作为空白辅料溶液。

供试品溶液：取 **1** 胶囊内容物适量（约相当于 **1** 50 mg），精密称定，置 50 mL 量瓶中，加稀释液超声使溶解，定容，摇匀，离心（2 680×*g*）5 min，取上清液作为供试品溶液。

对照溶液：精密量取供试品溶液 1 mL，置 100 mL 量瓶中，加入稀释液定容，摇匀即得。

2.3 专属性试验

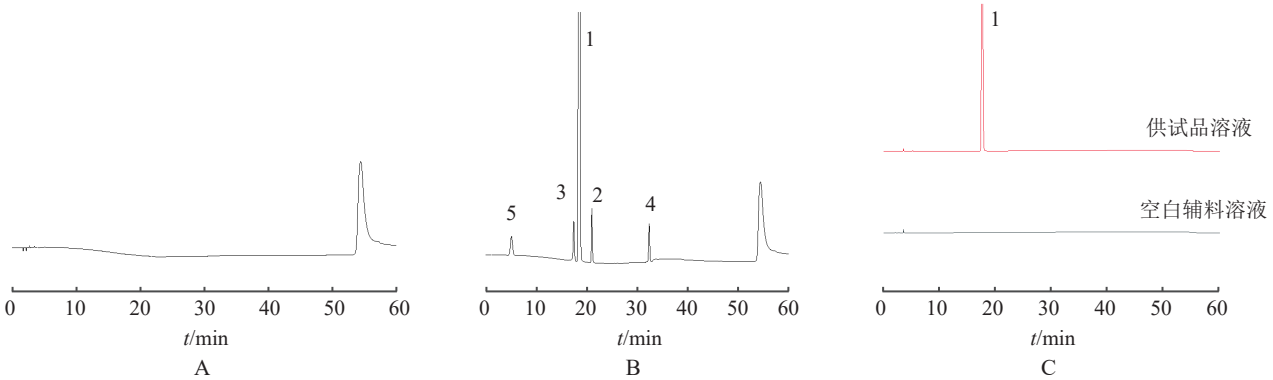
2.3.1 辅料干扰

取“**2.2**”项下空白溶剂、系统适用性溶液、空白辅料溶液、供试品溶液，分别按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，所得结果如图 2 所示。辅料和溶剂不干扰本品有关物质的检测。系统适用性溶液中各杂质与主峰、杂质与杂质之间分离完全，**1** 与前相邻杂质 **3** 的分离度为 1.5，与后相邻杂质 **2** 的分离度为 7.4，表明系统适用性良好。

2.3.2 强制降解试验

分别取 **1** 胶囊内容物适量（约相当于含 **1** 10 mg），进行如下破坏性试验。（1）高温破坏：直火加热至微黄色。（2）强光破坏：强光［(4 500±500) lx］照射 10 d。（3）酸破坏：加入 1 mol/L 盐酸 1 mL，水浴加热 1 h，冷却至室温，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液中和。（4）碱破坏：加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL，水浴煮沸 1 h，冷却至室温，用 1 mol/L 盐酸中和。（5）氧化破坏：加入 30 % 过氧化氢溶液 1 mL，水浴加热 1 h。取上述破坏性试验样品，另取未破坏样品，分别加稀释液稀释至 **1** 质量浓度为 1 mg/mL，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析。各降解条件下的色谱图叠加如图 3 所示，按峰面积归一化法计算杂质含量（0.05 % 以下的杂质忽略不计）。

结果显示，**1** 胶囊在光照、强碱、高温条件下



A—空白溶剂；B—系统适用性溶液；C—供试品与空白辅料溶液。

1—**1**；2—**2**；3—**4**；4—**4**；5—**5**。

图 2 专属性试验色谱图

Fig.2 Chromatograms of Specificity Test

比较稳定，在强酸和强氧化条件下不稳定。强酸条件下主要的降解产物为杂质 **3** 以及相对保留时间（RRT）为 0.14、0.15 和 0.17 的杂质；强氧化条件下的主要降解产物为 RRT0.30 的杂质。各强制降解产生的杂质峰之间及其与 **1** 之间的分离度符合规定，证明该色谱条件测定有关物质的专属性较强，能够满足杂质检测需要。

将各条件下供试品溶液中峰面积进行统计，计算物料平衡。结果显示，高温、强酸、强碱、光照、氧化条件下的物料平衡率分别为 97.92%、97.74%、98.82%、99.61%、101.71%，表明本品在所有破坏条件下物料基本平衡。

采用光电二极管阵列检测器（PDA）对强制降解后的主峰进行纯度检测，主峰的峰纯度因子达到 0.999 9，表明主峰中不包含其他峰。

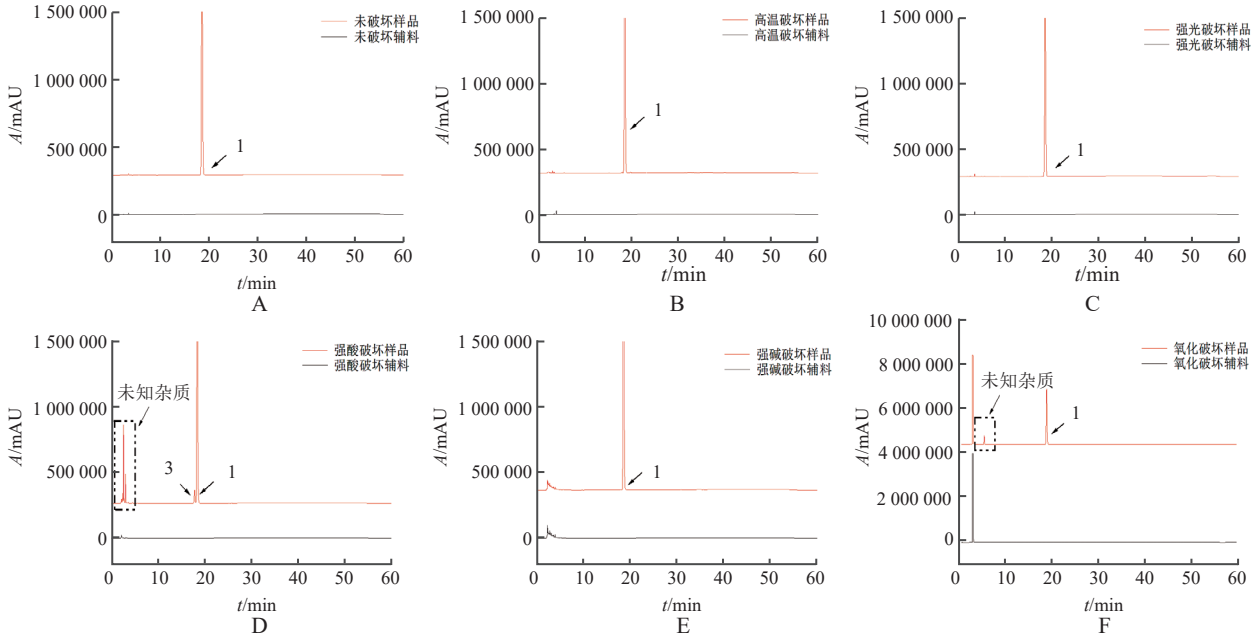
2.4　线性试验

取 **1** 对照品约 12.5 mg，精密称定，置 25 mL 量瓶中，加稀释剂适量使溶解，并定容，摇匀；精密量取 1 mL，置 50 mL 量瓶中，加入“**2.2**”项下杂质贮备液各 1 mL，再用稀释剂定容；然后按不同比例配制相当于供试品 0.05%、0.08%、0.10%、0.15%、0.20%的对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。以进样量（m）为横坐标、峰面积（A）为纵坐标进行线性回归，所得回归方程以及相对校正因子如表 1 所示。

表 1　回归方程、相关系数、相对校正因子、检测限、定量限的测定结果

Tab.1　The Results of Regression Equation, Correlation Coefficients, Relative Correction Factors, LODs and LOQs

化合物	回归方程	r	相对校正因子	检测限 / ng	定量限 / ng
1	A=3 423 163.27m − 537.6	0.999 8	—	0.27	0.36
2	A=3 667 296.45m − 824.5	0.999 6	0.93	0.19	0.52
3	A=2 761 008.56m − 590.6	0.999 8	1.24	0.20	0.48
4	A=4 807 952.47m − 1 323.2	0.999 7	0.71	0.20	0.46
5	A=2 992 086.57m+71.9	0.999 9	1.14	0.19	0.39



A—未破坏；B—高温破坏；C—光破坏；D—酸破坏；E—碱破坏；F—氧化破坏。

1—**1**；3—**3**。

图 3　强制降解试验色谱图

Fig.3　Chromatograms of Forced Degradation Tests

2.5 定量限与检测限

取“**2.4**”项下的线性溶液（相当于供试品 0.20%的对照品溶液），逐步稀释，按“**2.1**”项下色谱条件进行测定，记录色谱图。以信噪比 *S*/*N* ≥ 3 为检出限，*S*/*N* ≥ 10 为定量限。测定结果如表 1 所示。

2.6 重复性试验

精密量取“**2.2**”项下杂质贮备液各 1 mL，置同一 50 mL 量瓶中，用稀释剂定容，摇匀，作为 1%杂质混合溶液。取 **1** 胶囊内容物适量（约相当于含 **1** 50 mg），精密称定，置 50 mL 量瓶中，精密加入 1%杂质混合溶液 5 mL，用稀释剂溶解并定容，摇匀，平行制备 6 份供试品溶液，并配制对照溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进行测定。结果显示，6 份供试品溶液中，各杂质含量的 RSD（*n*=6）为 0 ～ 14.84%，均符合规定，表明该方法重复性良好。

2.7 中间精密度试验

在同一实验室，由不同操作人员在不同日期、使用不同仪器，进行重复性试验。使用与“**2.6**”项下相同的方法配制样品以及对照溶液，共 6 份。结果显示，各杂质含量的 RSD（*n*=6）为 0 ～ 7.24%，与“**2.6**”项下 6 组的含量结果合并计算 RSD，各杂质含量的 RSD（*n*=12）为 0 ～ 13.41%，表明该方法中间精密度良好。

2.8 耐用性试验

取“**2.2**”项下系统适用性溶液，置 5 ℃条件下，分别于 0、1、2、5、8、11、24 h 时取样，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，考察溶液稳定性，按面积归一化法计算杂质含量。结果显示，在 24 h 内，各杂质含量的绝对值变化在 ±0.04%内，说明溶液稳定性良好。

分别采用安捷伦 ZORBAX SB-Aq C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）、Thermo Hypersil GOLD 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）、Boston pH lex ODS 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）进行试验，结果表明，3 种色谱柱下检出的杂质个数相同，且能完全分离。这表明该方法对色谱柱的变动有良好的耐用性。

继续考察流动相 pH 值变化（控制在 ±0.2 内）时方法的耐用性。不改变其他色谱条件，将流动相中缓冲盐的 pH 值分别调至 1.90 和 2.30，再配制流动相。分别取系统适用性试验溶液及空白溶液，进样测定，记录色谱图，并与流动相 pH 2.1 时的色谱进行比较，考察不同色谱柱中杂质的分离情况。结果表明，随着 pH 值的增加，主峰及杂质 **2**、**3**、**4**、**5** 的保留时间均推后，但分离度基本无变化，均满足大于 1.5 的要求，检出杂质的含量基本一致，因此缓冲盐 pH 在 2.10±0.2 内具有良好的耐用性。

2.9 回收率试验

精密称取 **1** 胶囊内容物适量，共 9 份，置不同大小的量瓶中，分别加入“**2.6**”项下 1%杂质混合溶液 5 mL，用稀释液溶解并定容，分别配制成低、中、高水平（50%、100%和 200%各杂质限度）的加标溶液，每个水平配制 3 份，分别进样测定，用加校正因子的主成分自身对照法计算。结果显示，**2** ～ **5** 的平均回收率（*n*=9）分别为 97.68%、97.84%、96.48%、98.66%，RSD 分别为 2.07%、1.71%、3.24%、1.61%。

2.10 样品检测

取 **1** 胶囊内容物适量（约相当于含 **1** 50 mg），精密称定，置 50 mL 量瓶中，加稀释液超声使溶解，定容，摇匀；离心（2 680×*g*）5 min，取上清液作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL，置 100 mL 量瓶中，定容，摇匀，作为对照溶液。取溶剂、系统适用性溶液、对照溶液和供试品溶液各 20 μL，分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果如表 2 所示，均符合内控标准。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

取“**2.2**”项下系统适应性溶液，在配置二极

表 2 6 批样品测定结果（*n*=6）

Tab.2 Determination Results of 6 Batches of Sample（*n*=6）

化合物	有关物质含量/%					
	140901	140902	140903	140904	140905	140906
2	0.04	0.04	0.04	未检出	未检出	未检出
3	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
4	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
5	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
未知杂质	0.03	0.02	0.03	0.06	0.07	0.07
总杂质	0.07	0.06	0.07	0.06	0.07	0.07

管阵列检测器的液相色谱仪上进样测定。在 190 ～ 370 nm 处扫描各杂质的特征吸收峰。结果显示，**1** 和大部分杂质在 192 nm 处有最大吸收波长，在 200 ～ 220 nm 有次级吸收峰，考虑到流动相在 200 nm 以下会有末端吸收，从而影响杂质检出，故选择 210 nm 为有关物质的检测波长。

3.2　杂质含量的计算方式

根据《化学药物杂质研究的技术指导原则》[12]，已知杂质对主成分的相对校正因子在 0.9 ～ 1.1 时，可以用主成分的自身对照法计算含量，超出 0.9 ～ 1.1 时，宜用杂质对照品法计算含量，也可用加校正因子的主成分自身对照法。取“**2.6**”项下样品的测定结果，分别按照峰面积归一化法、不加校正因子的主成分自身对照法、加校正因子的主成分自身对照法与杂质对照品外标法计算杂质含量。结果显示，加校正因子的主成分自身对照法与杂质外标法结果较为接近。在线性关系研究时，杂质 **2** 的校正因子为 0.93，因此最终杂质计算方式选择杂质 **2** 以不加校正因子的主成分自身对照法计算，杂质 **3**、**4**、**5** 均按照加校正因子的主成分自身对照法计算，其他未知杂质以不加校正因子的主成分自身对照法计算。

3.3　杂质限度的确定

1 原料药成品中未检出杂质 **3**，影响因素试验及加速 6 个月的稳定性试验均未检出杂质 **3**，并且 **1** 胶囊的影响因素试验也均未检出杂质 **3**。因此，**1** 胶囊的有关物质中不单独订入杂质 **3** 的限度；对自制胶囊的杂质分析及对胶囊的破坏性试验降解杂质的分析结果显示，胶囊在制备过程会产生新的杂质，并且原料药中已有的杂质含量也会增加；同时考虑到胶囊放大生产后的杂质变化情况、贮存过程中杂质的增长以及患者每日最大剂量等情况[13]，拟定 **1** 胶囊的有关物质限度为：杂质 **2** 不得超过 0.1%，单个最大杂质不得过 0.1%，总杂质不得过 1.0%。

参考文献：

[1] 王培宇, 黄　祺, 王少东, 等.《全球癌症统计数据 2022》要点解读 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2024, **31**(7): 1-22.

[2] 陈露露, 王亚芹, 欧阳冬生. 化疗止吐药物的研究进展 [J]. 肿瘤药学, 2014, **4**(2): 107-111.

[3] ALALIKHAN A, EBRAHIMI S, ALIEE A, *et al*. The combined anti-tumor effects of 5-fluorouracil and neurokinin receptor inhibitor, aprepitant, against colorectal cancer: *In vitro* and *in vivo* study [J]. *Med Oncol*, 2024, **41**(3): 70.

[4] 张红爱, 宗丙丙, 贾志玲. 肿瘤患者阿片类药物与高致吐性化疗药联用时止吐方案的选择 [J]. 基层医学论坛, 2017, **21**(35): 4979-4981.

[5] YANG Y, CAO X, WANG Y, *et al*. Neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant regulates autophagy and apoptosis via ROS/JNK in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Liver Inter*, 2024, **44**(7): 1651-1667.

[6] INANO H, MORIMOTO Y, KITAGAWA K, *et al*. Comparing the efficacy of fosnetupitant, an NK1 receptor antagonist in CDDP-based regimens, with that of fosaprepitant and aprepitant: a retrospective observational study [J]. *Biol Pharm Bull*, 2024, **47**(3): 692-697.

[7] YAN F, LIU S W, LI X Y, *et al*. A study on the efficacy and safety of aprepitant injection in preventing and treating nausea and vomiting induced by platinum‐based chemotherapy in lung cancer [J]. *Precis Med Sci,* 2024, **13**(1): 63-68.

[8] KANUKOLLU S, SPATZ K, LAVERY J A, *et al*. Safety and tolerability of intravenous aprepitant and fosaprepitant in children with cancer: a retrospective, single-center review [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2024, **71**(4): e30882.

[9] 于美芹, 田兆兴, 刘宝枚, 等. 梯度洗脱 HPLC 法检查阿瑞匹坦原料药中的有关物质 [J]. 中国药房, 2014, **25**(21): 1992-1995.

[10] 余　丽, 辜　慧, 晁若冰. 阿瑞匹坦中有关物质检查方法的研究 [J]. 药物分析杂志, 2013, **33**(8): 1372-1376.

[11] 丁　军, 吴忠玉, 孙敬勇, 等. 阿瑞吡坦合成工艺研究进展 [J]. 食品与药品, 2015, **17**(1): 68-71.

[12] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药物杂质研究技术指导原则 [EP/OL]. (2005-03-18)[2024-07-13]. https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=d5e37f20dbe191fdaa2e1543a3d82c0c.

[13] ICH. Q3B(R2): impurities in New Drug Products [EP/OL]. (2006-06-02)[2024-07-13]. https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/toGuideIch/1/1.