

# RP-HPLC法测定阿哌沙班片的含量及有关物质

王忠波<sup>1\*</sup>, 李丹<sup>2</sup>(1.沈阳市第五人民医院药剂科, 沈阳 110020; 2.沈阳医学院奉天医院药剂科, 沈阳 110034)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0828-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.38

**摘要** 目的: 建立测定阿哌沙班片的含量及有关物质的方法。方法: 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Waters XBridge Shield RP18 柱, 流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用 50% 磷酸溶液调节 pH 至 3.0)(20:80, V/V), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 293 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μl。结果: 在所建立的色谱条件下, 阿哌沙班与各杂质及其降解产物分离良好; 阿哌沙班的质量浓度在 4.30~45.00 μg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系( $r=0.9994$ ); 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD ≤ 1.10%; 阿哌沙班的平均加样回收率为 99.93%, RSD 为 0.30% ( $n=3$ ); 其最大单个杂质的质量分数为 0.019%~0.026%, 总杂质的质量分数为 0.062%~0.074%。结论: 本方法操作简便、结果准确、灵敏度高, 适用于阿哌沙班片的含量及有关物质测定, 对建立阿哌沙班片的质量控制标准有一定的参考价值。

**关键词** 阿哌沙班片; 反向高效液相色谱法; 含量; 有关物质; 质量控制

## Determination the Content and Related Substances of Apixaban Tablets by RP-HPLC

WANG Zhong-bo<sup>1</sup>, LI Dan<sup>2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, the Fifth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110020, China; 2.Dept. of Pharmacy, Fengtian Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of content and related substances of Apixaban tablets. METHODS: RP-HPLC was adopted with Water XBridge Shield RP18 column, the mobile phase was acetonitrile -0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (adjusted with 50% phosphoric acid to pH 3.0)(20:80, V/V) with flow velocity of 1.0 ml/min. Detection wavelength was set at 293 nm, the column temperature was 25 °C, the injection volume was 10 μl. RESULTS: Under the establishment of chromatographic conditions, apixaban impurities and its degradation products had a good degree of separation; there was a good linear relationship between the content of apixaban in the range of 4.30 - 45.00 μg/ml and peak area values ( $r=0.9994$ ). The RSD of precision, stability, repeatability tests were no more than 1.10%, the average recovery of apixaban was 99.93%, RSD was 0.30% ( $n=3$ ). The largest single impurity content in mass fraction was in the range of 0.019% to 0.026%, the total impurity content in mass fraction was 0.062% to 0.074%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, sensitive and can be used to determine the content and related substances of Apixaban tablets. It provides reference for the establishment of the quality control standard of Apixaban tablets.

**KEYWORDS** Apixaban tablets; RP-HPLC; Content; Related substances; Quality control

阿哌沙班(Apixaban)商品名为艾乐通,属于口服选择性活化 Xa 因子抑制剂,为全球第三代口服抗凝药,化学名为 4,5,6,7-四氢-1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氧代-1-哌啶基)苯基]-1H-咪唑并[3,4-C]吡啶-3-羧胺,化学结构式见图 1。该药由辉瑞公司与百时美施贵宝公司联合开发研制,2012 年通过美国食品与药品管理局(FDA)批准上市用于降低非瓣膜性房颤患者的卒中和系统性栓塞发生的风险,现有 2.5 mg 和 5 mg 两种片剂规格。相关调查数据显示,血栓栓塞性疾病具有高风险、高死亡率的特点<sup>[1-3]</sup>。在该药批准上市前,已有华法林、达比加群、利伐沙班等治疗相关疾病的药物。该药具有高选择性、高安全性等特点,预计 2017 年销售额能达到 42 亿美元,具有极高的市场经济价值<sup>[4-5]</sup>。目前,国内未见关于该药质量标准的相关报道,因此,本试验建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定该药的含量及有关物质,以为建立阿哌沙班片的质量控制标准提供依据。

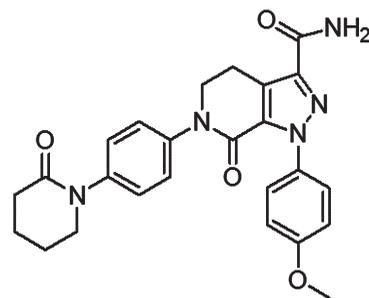


图 1 阿哌沙班的化学结构式

Fig 1 Chemical structure of Apixaban

### 1 材料

Waters e2695 型 HPLC 仪,含四元梯度输液泵、DAD-2695 检测器、Empower3 色谱工作站(美国 Waters 公司);ES125SM 电子分析天平(瑞士 Precisa 公司);KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

阿哌沙班对照品(凯美赛尔生物医药有限公司提供,批

\* 副主任药师。研究方向:药物质量控制、药物基础研究。  
E-mail: wzb197605@126.com

号:AX-20140401,纯度>99.80%);阿哌沙班片(美国施贵宝制药有限公司,规格:2.5 mg,批号:20140201、20140202、20140203);乙腈为色谱纯(西陇化工股份有限公司),磷酸二氢钾为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),水为自制纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Waters XBridge Shield RP18柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(用50%磷酸溶液调节pH至3.0)(20:80, V/V);检测波长:293 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:25 ℃;进样量:10 μl。

### 2.2 溶液的制备

对照品溶液:取阿哌沙班对照品约5 mg,精密称定,加流动相超声溶解并稀释制成约含0.02 mg/ml阿哌沙班的溶液,即得。

供试品溶液:取2片阿哌沙班片,置研钵中研细、混匀,取细粉适量(约含阿哌沙班5 mg),精密称定,置于100 ml量瓶中,加流动相适量超声(功率:200 W,频率:40 kHz)溶解,并稀释至刻度,滤过(0.50 μm滤膜),取续滤液,即得。

空白样品溶液:按比例称取空白辅料适量置于100 ml量瓶中,再加入流动相稀释至刻度,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)溶解,滤过(0.50 μm滤膜),取续滤液,即得。

### 2.3 专属性试验

2.3.1 空白样品试验 分别取“2.2”项下对照品、供试品和空白样品溶液适量,各精密量取10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱,详见图2。由图2可见,色谱基线平稳,各色谱峰分离度>1.5,理论板数以阿哌沙班计>3 500,且空白辅料对阿哌沙班测定无干扰。

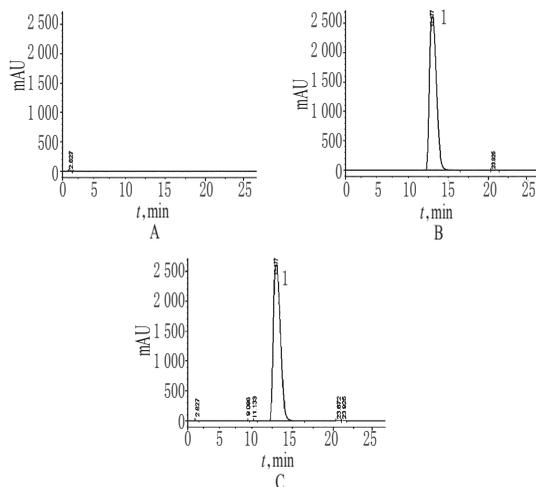


图2 高效液相色谱图

A.空白样品;B.对照品;C.供试品;1.阿哌沙班

Fig 2 HPLC chromatogram

A.blank sample; B.standard sample; C.test sample; 1.apixaban

2.3.2 强制降解试验 取数片阿哌沙班片(批号:20140201),置研钵中研细、混匀,取细粉适量(约含阿哌沙班25 mg),精密称定,平均分成5份,分别置于100 ml量瓶中,接受以下破坏性条件处理:(1)强光破坏试验:强光条件4 500 lx下照射12 h,加流动相稀释至刻度,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)溶解,滤过(0.50 μm滤膜),取续滤液,即得强光破坏样品溶液。(2)氧化破坏试验:加30%双氧水1 ml搅拌30 min,加流动相稀释至刻

度,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)溶解,滤过(0.50 μm滤膜),取续滤液,即得氧化破坏样品溶液。(3)强碱破坏试验:加入10 ml 35%氢氧化钠溶液,置于60 ℃水浴加热30 min,冷却后用适量盐酸溶液调节至中性,加流动相稀释至刻度,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)溶解,滤过(0.50 μm滤膜),取续滤液,即得强碱破坏样品溶液。(4)强酸破坏试验:加入1 mol/L盐酸溶液于密封状态下以50 ℃水浴加热30 min,冷却后再加入适量氢氧化钠溶液调节至中性,加流动相稀释至刻度,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)溶解,滤过(0.50 μm滤膜),取续滤液,即得强酸破坏样品溶液。(5)高温破坏试验:95 ℃水浴加热条件下持续放置6 h,冷却至室温,加流动相稀释至刻度,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)溶解,滤过(0.50 μm滤膜),取续滤液,即得高温破坏样品溶液。

按照“2.1”项下色谱条件,各精密量取上述强制降解试验样品溶液10 μl进样测定,记录色谱,详见图3。结果表明,阿哌沙班样品溶液经上述破坏性条件处理后,降解产物增加,杂质增多,而阿哌沙班峰与降解产物和杂质色谱峰分离度良好。

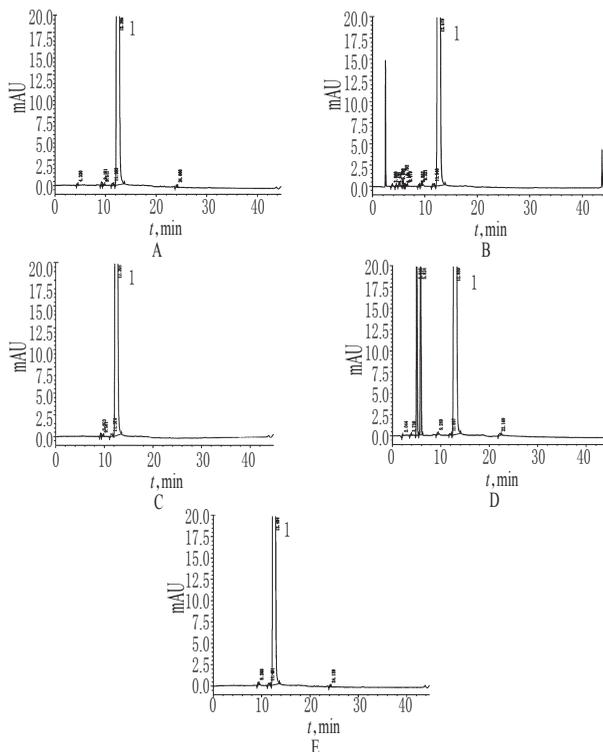


图3 强制降解试验高效液相色谱图

A.强光破坏样品;B.氧化破坏样品;C.强碱破坏样品;D.强酸破坏样品;E.高温破坏样品;1.阿哌沙班

Fig 3 HPLC chromatogram of forced degradation test

A. sample of light damage; B. sample of oxidation damage; C. sample of alkali damage; D. sample of acid damage; E. sample of high temperature damage; 1. apixaban

### 2.4 线性关系考察

取约5 mg阿哌沙班对照品,精密称定,置于100 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)使完全溶解,分别精密量取0.2、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 ml置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,制成梯度浓度溶液,按照“2.1”项下色谱条件依次进样,记录色谱。以阿哌沙班峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,进行线性回归,

回归方程为 $y=2.735\times 10^4x-1.127\times 10^3$ ( $r=0.9994$ )。结果表明,阿哌沙班的质量浓度在4.30~45.00  $\mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

## 2.5 精密度试验

取“2.2”项下的阿哌沙班对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续测定峰面积6次。结果,阿哌沙班峰面积和其保留时间的RSD分别为0.038%和0.024%( $n=6$ ),表明仪器的精密度良好。

## 2.6 稳定性试验

取“2.2”项下的供试品溶液,于25  $^{\circ}\text{C}$ 下放置0、2、4、6、8 h时进样分析,测定阿哌沙班的峰面积。结果,阿哌沙班峰面积和保留时间的RSD分别为1.07%和1.10%( $n=5$ ),表明供试品溶液在8 h内稳定。

## 2.7 重复性试验

取阿哌沙班片样品(批号:20140202)细粉适量,共5份,分别按“2.2”项下条件制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,平行操作5次,测定含量。结果,阿哌沙班含量的RSD为0.41%( $n=5$ ),表明本方法的重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

精密称取9份已知含量的阿哌沙班样品细粉(批号:20140202,每份约相当于阿哌沙班5 mg),置于100 ml量瓶中,每3份分别加入4、5、6 mg阿哌沙班对照品,再添加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液,得3组不同浓度的供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件注入HPLC仪测定,计算回收率,结果见表1。

表1 阿哌沙班加样回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 1 Results of recovery test in Apixaban sample( $n=9$ )

样品含量, $\mu\text{g}$	加入量, $\mu\text{g}$	测得量, $\mu\text{g}$	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
5.002	4.003	9.004	99.9		
5.002	4.002	9.003	99.9		
5.001	4.001	8.992	99.8		
5.001	5.002	9.997	99.8		
5.002	5.002	9.997	99.8	99.93	0.30
5.001	5.002	10.004	99.9		
5.002	6.001	11.001	99.9		
5.001	6.002	11.005	100.1		
5.001	6.001	11.009	100.2		

## 2.9 样品含量测定

分别取3批阿哌沙班片样品适量,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样分析,每批样品重复测定3次,记录色谱。采用外标一点法按峰面积计算阿哌沙班的含量,结果见表2。

表2 样品中阿哌沙班含量测定结果( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Tab 2 Results of apixaban content in samples( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

批号	含量, %	含量平均值, %
20140201	99.82	
20140202	99.87	99.84 $\pm$ 0.03
20140203	99.84	

## 2.10 有关物质测定

每批阿哌沙班片分别取5片置于研钵中研细、混匀,取细粉适量(约相当于阿哌沙班5 mg),置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,超声溶解后制成每1 ml中含0.5 mg阿哌沙班的溶液,滤过(0.50  $\mu\text{m}$ 滤膜),收集续滤液,即为供试品溶液。

精密量取适量该供试品溶液,用流动相稀释100倍,即得对照溶液。取对照溶液10  $\mu\text{l}$ 进样,调节检测灵敏度,使得阿哌沙班色谱峰高约为记录仪满量程的20%~30%。再精密量取供试品溶液和对照溶液各10  $\mu\text{l}$ ,按“2.1”项色谱条件连续进样3次,记录色谱至阿哌沙班峰保留时间的3倍,按照不加校正因子的主成分自身对照法计算有关物质的量。色谱图中,供试品溶液如有杂质峰,其最大单杂峰面积不得大于对照溶液主峰面积的0.3倍,总杂峰面积不得大于对照溶液主峰面积的0.5倍。有关物质测定结果见表3。

表3 样品中有关物质测定结果( $n=3$ )

Tab 3 Results of substances in samples( $n=3$ )

批号	最大单个杂质, %	总杂质, %
20140201	0.019	0.069
20140202	0.026	0.074
20140203	0.022	0.062

## 3 讨论

阿哌沙班作为第三个上市的新一代口服抗凝药,能有效地预防血栓,用于接受过髋部或膝部置换手术患者的血栓预防,其安全性和有效性均超出同类药物,具有极高的经济价值<sup>[6-9]</sup>。据国家食品药品监督管理局药品审评中心查询,当前已有数十家医药企业对其进行原料药以及制剂的仿制申报。所以建立该药物完善的质量控制方法具有很好的现实意义。

色谱检测过程选择200~400 nm波长进行光谱扫描,发现在293 nm检测波长附近阿哌沙班和相关成分均有最大吸收,因此确定本试验检测波长为293 nm。

在预实验中发现,柱温25  $^{\circ}\text{C}$ 时拖尾因子为0.89,柱温30  $^{\circ}\text{C}$ 时拖尾因子则为1.53。可见柱温升高会引起色谱峰的拖尾,对测定其有关物质可能会产生不同程度的影响。为确保整个试验结果的准确性,测定过程中应严格控制柱温参数,防止出现拖尾影响。

本试验在建立方法时对流动相也作了不同条件的摸索,对乙腈-磷酸二氢钾溶液体积比进行了梯度调整,最终发现流动相为乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(用50%磷酸溶液调节pH至3.0)(20:80, V/V)时,各组分分离度均符合分析要求,峰形良好,表明该色谱条件可用于阿哌沙班主成分含量及相关物质的测定。

综上所述,本试验建立的方法操作简便、结果准确、灵敏度高,适用于阿哌沙班片的含量及有关物质测定,对建立阿哌沙班片的质量控制标准有一定的参考价值。

## 参考文献

- [1] Charles F, Sunil N, Jessie Wang, *et al.* Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of multiple oral doses of apixaban, a factor X a inhibitor, in healthy subjects[J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2013, 76(5): 776.
- [2] 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.
- [3] 周建光,周颖奇.新型口服抗凝药的特点和临床研究[J].临床药物治疗杂志, 2013, 11(5):8.
- [4] 李姝雅,杜万良,王拥军.新型抗凝药物在心脑血管疾病中的临床评价[J].中国新药杂志, 2012, 21(11):1191.

# 毛细管气相色谱法同时测定盐酸普萘洛尔原料药中5种有机溶剂残留量

张佳莉<sup>1\*</sup>, 顾冬飞<sup>2</sup>, 武维新<sup>1</sup>, 汤金春<sup>2</sup>, 狄斌<sup>1,3</sup>, 苏梦翔<sup>1,3#</sup> (1. 中国药科大学药学院, 南京 210009; 2. 常州康普药业有限公司, 江苏常州 213172; 3. 中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0831-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.39

**摘要** 目的: 建立同时测定盐酸普萘洛尔原料药中乙醇、异丙胺、环氧氯丙烷、三乙胺和二甲苯残留量的方法。方法: 采用毛细管气相色谱法。色谱柱为 WondaCap-1 毛细管柱, 氢火焰离子化检测器, 载气为氮气, 流速为 3 ml/min, 进样口温度为 180 ℃, 检测器温度为 250 ℃, 程序升温, 直接进样, 进样量为 1 μl, 以 *N,N*-二甲基甲酰胺为溶剂, 采用外标法计算溶剂残留量。结果: 5 种有机溶剂均能得到良好分离; 各溶剂在所考察的质量浓度范围内与峰面积线性关系良好 ( $r=0.993\ 8\sim 0.999\ 8$ ); 精密度试验的  $RSD\leq 4.07\%$ ; 平均加样回收率为  $98.31\%\sim 103.75\%$  ( $RSD=0.12\%\sim 3.66\%$ ,  $n=3$ )。结论: 该方法简便、准确、可靠, 可用于盐酸普萘洛尔原料药中多种有机溶剂残留量的同时测定。

**关键词** 盐酸普萘洛尔; 毛细管气相色谱; 有机溶剂; 残留量测定

## Simultaneous Determination of 5 Kinds of Residual Organic Solvents in Propranolol Hydrochloride by Capillary GC

ZHANG Jia-li<sup>1</sup>, GU Dong-fei<sup>2</sup>, WU Wei-xin<sup>1</sup>, TANG Jin-chun<sup>2</sup>, DI Bin<sup>1,3</sup>, SU Meng-xiang<sup>1,3</sup> (1. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Changzhou Kangpu Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Changzhou 213172, China; 3. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of residual ethanol, isopropylamine, epichlorohydrin, triethylamine and xylene in propranolol hydrochloride. METHODS: Capillary GC method was adopted. The determination was performed on WondaCap-1 capillary column with FID detector. Nitrogen was the carrier gas at the flow rate of 3 ml/min. The injector temperature was 180 ℃ and the detector temperature was 250 ℃ by temperature programming with direct sampling. The Sample size was 1 μl. The residual organic solvents were determined by external standard method using *N,N*-dimethylformamide as solvent. RESULTS: The five residual organic solvents were completely separated. Good linearity of the five organic solvents were obtained ( $r=0.993\ 8\sim 0.999\ 8$ ). RSD of precision was lower than 4.07%. The average recoveries were ranged from 98.31% to 103.75% ( $RSD=0.12\%\sim 3.66\%$ ,  $n=3$ ). CONCLUSIONS: The established method is simple, accurate and reliable which can be used for the determination of multiple residual organic solvents in propranolol hydrochloride simultaneously.

**KEYWORDS** Propranolol hydrochloride; Capillary GC; Organic solvents; Residual determination

盐酸普萘洛尔为临床上常用的β肾上腺素受体阻滞药, 主要用于防治心率失常、心绞痛、高血压、心肌梗死等多种疾病<sup>[1]</sup>, 在使用过程中发现该药有不少新用途, 如可以治疗肝硬化、血管瘤、焦虑症、偏头痛、甲状腺机能亢进等<sup>[2-7]</sup>。常州康普药业有限公司开发了盐酸普萘洛尔原料药, 合成路线见图1。其在制

备过程中共使用了5种挥发性有机溶剂: 乙醇、异丙胺、环氧氯丙烷、三乙胺和二甲苯。其中, 环氧氯丙烷为步骤1起始原料/溶剂, 三乙胺为步骤1催化剂, 异丙胺为步骤2起始原料, 二甲苯为步骤2溶剂, 乙醇为步骤3结晶溶剂, 在制备工艺过程中均可能会有残留。当残留溶剂水平高于安全值时, 会对人体

[5] 田国祥, 魏万林, 张灵. 后华法林时代口服抗凝新秀: 达比加群、利伐沙班、阿哌沙班[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2011, 5(3): 403.

[6] 高雅莉, 徐莉英. 阿哌沙班[J]. 中国药物化学杂志, 2013, 23(3): 251.

\* 硕士。研究方向: 药物分析。电话: 025-83271269。E-mail: zhangjialiyx@163.com

# 通信作者: 讲师, 博士。研究方向: 药物分析。电话: 025-83271269。E-mail: sumengxiang@cpu.edu.cn

[7] 周建光, 周颖奇. 新型口服抗凝药的特点和临床研究[J]. 临床药物治疗杂志, 2013, 11(5): 8.

[8] 赵文丽. 阿哌沙班Ⅲ期临床试验结果与华法林一致[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 6(40): 764.

[9] 陶海燕, 米斌, 郭国贤, 等. 阿哌沙班的合成工艺研究[J]. 中国药物化学杂志, 2013, 23(5): 385.

(收稿日期: 2014-12-03 修回日期: 2015-01-12)

(编辑: 周 箫)