

UHPLC-Q-Orbitrap/MS 技术鉴定阿哌沙班片的有关物质

吕广云, 姚奕然, 徐丹洋, 王 舒, 肖 蓓*

(南通市食品药品监督管理局, 南通 226000)

摘 要 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Orbitrap/MS) 技术研究阿哌沙班片中的有关物质。采用 Waters Xbridge C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 30 mmol/L 醋酸铵缓冲液 (pH4.50) -乙腈为流动相梯度洗脱, 对阿哌沙班片有关物质进行分离; 电喷雾正离子化-四极杆-静电场轨道阱串联质谱法测定各有关物质的母离子及碎片离子的准确质荷比和元素组成, 并解析鉴定有关物质的结构。在所建立条件下, 阿哌沙班与其有关物质分离良好, 检测并鉴定出阿哌沙班片及其强制降解试验样品中 30 个主要有关物质, 其中 11 个为已知杂质, 其余 19 个为新鉴定的未知有关物质。研究结果可为阿哌沙班的生产工艺控制和质量保障提供参考依据。

关键词 阿哌沙班; 有关物质; 结构鉴定; UHPLC-Q-Orbitrap/MS

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2025)03-0341-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024081401

引用本文 吕广云, 姚奕然, 徐丹洋, 等. UHPLC-Q-Orbitrap/MS 技术鉴定阿哌沙班片的有关物质 [J]. 中国药科大学学报, 2025, 56(3): 341–349.

Cite this article as: LYU Guangyun, YAO Yiran, XU Danyang, *et al.* Identification of related substances in apixaban tablets by UHPLC-Q-Orbitrap/MS[J]. *J China Pharm Univ*, 2025, 56(3): 341–349.

Identification of related substances in apixaban tablets by UHPLC-Q-Orbitrap/MS

LYU Guangyun, YAO Yiran, XU Danyang, WANG Shu, XIAO Bei*

Nantong Food and Drug Control Center, Nantong 226000, China

Abstract A UHPLC-Q-Orbitrap/MS method was developed to identify the related substances in apixaban tablets. Complete separation was accomplished with a Waters Xbridge C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column by linear gradient elution using a mobile phase consisting of 30 mmol/L ammonium acetate buffer solution (pH 4.50) and acetonitrile. The related substances were successfully characterized through the accurate mass and elemental composition of the parent ions and their product ions determined by electrospray positive ionization high-resolution Q-Orbitrap/MS methods. Under the established analytical condition, apixaban and its related substances were well separated, and 30 related substances were detected and identified by hyphenated techniques in apixaban tablets and their stressed samples. Among them, 11 were known impurities and the rest 19 were unknown related substances identified for the first time in this study. The results obtained are valuable for apixaban manufacturing process optimization and quality control.

Key words apixaban; related substances; structural identification; UHPLC-Q-Orbitrap/MS

This study was supported by the Open Project of the National Medical Products Administration Key Laboratory for Impurity Profile of Chemical Drugs (NMPA-KLIPCD-2023-03)

收稿日期 2024-08-14 * 通信作者 Tel: 0513-51001919 E-mail: xbybh@126.com

基金项目 国家药品监督管理局化学药品杂质谱研究重点实验室开放课题 (NMPA-KLIPCD-2023-03)

阿哌沙班 [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]-1*H*-吡唑并 [3,4-*c*] 吡啶-3-甲酰胺, apixaban, 图 1] 是一种可口服给药、直接、可逆、高选择性的 Xa 因子抑制剂^[1-2], 临床上用于全髋、全膝关节置换术后静脉血栓栓塞的预防^[3-4]。因其安全性高、不必接受监测以调整剂量及不良反应少, 具有广阔的市场前景。

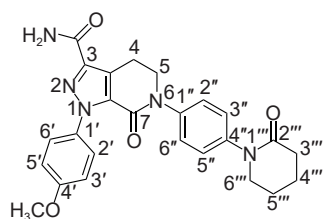


Figure 1 Chemical structure of apixaban

目前, 最新的国内外药典中均未收载阿哌沙班的质量标准, 已有文献报道了阿哌沙班的有关物质检测^[5-9], 但主要侧重于分析方法的建立和方法学验证, 关于阿哌沙班有关物质的系统研究与鉴定未见报道, 也未见针对不同厂家制剂有关物质的比较分析报道。

本研究建立了适用于阿哌沙班有关物质检查的 UHPLC-Q-Orbitrap/MS 分析方法, 测定了阿哌沙班及其强制降解样品中 30 个有关物质的准确相对分子质量和分子式, 同时结合其二级质谱特征和合成工艺分析^[10-12], 综合解析鉴定它们的结构, 可为其工艺控制和质量保障提供参考依据^[13-14]。

1 材料

1.1 试剂

阿哌沙班片(国产市售样品: 企业 a~r; 参比制剂: 美国 Pfizer 公司); 阿哌沙班对照品(中国食品药品检定研究院); 有关物质 A~L 对照品(深圳博泰尔生物技术有限公司)。乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司), 冰醋酸、醋酸铵(色谱纯, 阿拉丁试剂公司); 盐酸、过氧化氢、氢氧化钠(分析纯, 麦克林公司), 自制超纯水。

1.2 仪器

Vanquish Flex-Q Exactive Plus 液质联用仪(美国赛默飞世尔公司); XS205DU 电子天平, FE 20 pH 计(瑞士梅特勒托利多公司); KQ-500DB 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q

Reference 超纯水机(法国密理博公司)。

2 方法

2.1 色谱方法

Waters Xbridge C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相 A 相为 30 mmol/L 醋酸铵缓冲液(用冰醋酸调节 pH 至 4.50), B 相为乙腈, 线性梯度洗脱(A:B): 0 min(78:22)→2 min(78:22)→20 min(57:43)→27 min(12:88)→32 min(12:88)→32.1 min(78:22)→40 min(78:22), 流速 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm; 柱温 40℃, 进样体积 10 μL。

2.2 质谱方法

电喷雾离子源(ESI), 正离子检测模式; 鞘气流速约 5.34 L/min(40 arb, 1 arb = 101325 Pa), 辅助气流速约 9.36 L/min(10 arb), 喷雾电压 3.80 kV, 毛细管温度 320℃, 雾化温度 350℃, 透镜电压水平(S-lens RF level)55%; 一级质谱全扫描范围为 *m/z* 100~1000; 使用 Full-MS/ddMS² 模式获得二级质谱数据, 归一化碰撞能量设为步进式 20、40、60。

2.3 溶液配制

2.3.1 供试品溶液 取本品 10 片, 研细, 混匀, 精密称取细粉适量(约相当于阿哌沙班 10 mg)置 20 mL 量瓶中, 加溶剂[乙腈-水(35:65)]适量, 超声使溶解, 放冷, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液。精密量取上述溶液适量, 加溶剂定量稀释制备 0.1% 的自身对照溶液。

2.3.2 对照品溶液 取阿哌沙班、有关物质 A~L 对照品各适量, 精密称定, 加溶剂溶解并定量稀释制成质量浓度均约为 1.0 μg/mL 的溶液。

2.3.3 强制降解试验溶液 精密称取本品细粉适量(约相当于阿哌沙班 10 mg), 加 2.0 mol/L 盐酸溶液 1 mL 并于 40℃ 水浴放置 33 h; 或加 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL 并于 40℃ 水浴放置 24 h; 或加 30% 过氧化氢溶液 1 mL 并于 40℃ 水浴放置 33 h; 或于 90℃ 烘箱放置 7 d; 或加溶剂 1 mL 并于 90℃ 水浴放置 24 h; 或于照度 4500 lx 放置 7 d; 或加溶剂 1 mL 并于照度 4500 lx 放置 7 d 分别处理。放冷(酸碱处理溶液先中和)后, 加溶剂超声溶解并稀释至 20 mL, 滤过, 取续滤液作为阿哌沙班质量浓度约为 0.5 mg/mL 的强制降解试验溶液。同时进行空白溶剂试验。

3 结果

3.1 有关物质检查

建立的挥发性流动相 HPLC 法, 适用于阿哌沙班片有关物质检查和联用质谱鉴定。采用该方法对阿哌沙班的 19 批制剂(图 2, 选取能覆盖制剂中所有有关物质的 6 批作为代表)和强制降解试验溶液(图 3)进行有关物质分析, 选用 0.1% 自身对照法计算有关物质的含量, 按保留时间由小到大的顺序对制剂中主要有关物质和含量大于 0.1% 的主要降解产物进行识别和编号, 共检出分离良好的 30 个主要有关物质。

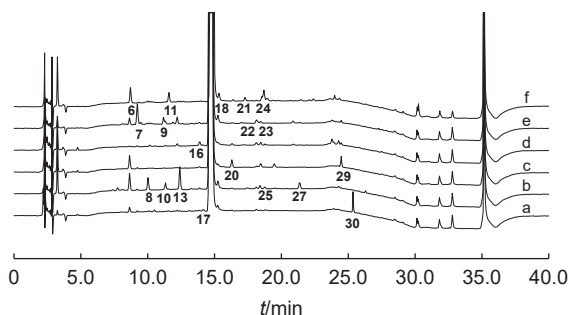


Figure 2 HPLC-UV chromatograms of representative samples of apixaban tablets

a: Producer g; b: Producer h; c: Producer j; d: Producer k; e: Producer q; f: Producer Pfizer

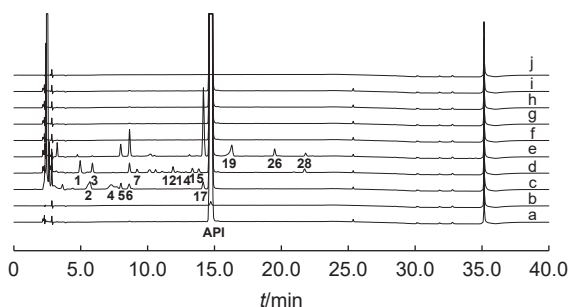


Figure 3 HPLC-UV chromatograms of apixaban stress solutions

a: Normal; b: 0.1% Reference; c: Alkaline; d: Oxidation; e: Acid; f: Wet heat; g: Dry heat; h: Dry light; i: Wet light; j: Blank

19 批阿哌沙班制剂中共检出 19 个有关物质(有关物质 6~11、13、16~18、20~25、27、29~30)。强制降解试验结果表明, 本品在溶液降解状态下, 对酸、碱、氧化条件比较敏感; 在固体粉末干法降解状态下, 对高温和光照较为稳定。强酸条件下形成 6 个主要降解产物(图 3-e, 有关物质 5~6、17、19、26、28); 强碱条件下形成 5 个主要降解产物(图 3-c, 有关物质 2、4、5~6、17); 氧化条件下形成 7 个主要降解产物(图 3-d, 有关物质 1、3、6~7、12、14~15)。

3.2 有关物质的结构鉴定

采用 Q-Orbitrap/MS 测定各有关物质母离子的准确质荷比和元素组成, 以及它们的二级质谱特征碎片, 并通过与阿哌沙班和已知有关物质的质谱特征进行对比分析, 鉴定各主要有关物质的结构。结果见表 1 和图 4。

3.2.1 已知有关物质的确证 通过有关物质 HPLC 定位、DAD 共轭体系比对及质谱定性(图 5), 确证有关物质 5~7、11、17~18、21、23、25、27、29 分别与已知有关物质 A~I、K~L 对应。对阿哌沙班及各已知有关物质的二级质谱碎片进行裂解途径和规律分析, 可以辅助未知杂质结构的推断与鉴定。

阿哌沙班及已知有关物质紫外共轭体系规律总结如下: (1)除有关物质 A(5)、D(11)、E(17)和 F(18)以外, 阿哌沙班和其他有关物质均为同一母核结构, 为主要发色基团, 在 210 nm 附近有强吸收, 280 nm 附近有中等强度的吸收, 分别为芳香族化合物 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁所产生的 E1 带和 E2 带; (2)有关物质 A、D 和 E 结构中 2-氧代哌啶基团的酰胺键发生水解或氨解, 2-氧代哌啶环断裂开环, 共轭体系发生变化, 在 252 nm 和 280 nm 附近有最大吸收; (3)有关物质 F 的吡唑并吡啶环中吡啶环有一个碳碳双键, 共轭体系也发生变化, 在 280 nm 和 325 nm 附近有最大吸收。这一规律可辅助推断未知杂质是否发生母核结构的改变。

阿哌沙班及已知有关物质二级质谱裂解规律总结如下: (1)在母离子 P^+ 中, 吡唑环 3 位氨基/甲氧基等极易脱去, 生成质量数为 $[P-45]^+/[P-60]^+$ 的碎片离子峰, 可据此推测 3 位的基团; (2)质谱中常会产生 m/z 199、241、185 和 135 的特征碎片离子峰, 均与 1-(4-甲氧基苯基)-吡唑并吡啶基团相关, 其中特征碎片 m/z 241 逐级裂解得到 m/z 185 和 135。(3)吡唑环 1 位和 3 位上连接的基团脱去后, 吡唑环易断裂开环, 产生 m/z 282 的特征碎片。(4)有关物质 D 和 E 为 2-氧代-1-哌啶基的酰胺键水解或氨解的化合物, 开环后的碳链易断裂, 产生 m/z 416 和 404 的特征碎片。

3.2.2 未知有关物质的确证 根据 HPLC 保留行为、DAD 及质谱信息, 结合合成工艺^[10-12]和裂解规律, 对各未知有关物质进行综合研析, 鉴定其结构。

有关物质 1、3、12、14、15 有关物质 1、3、12、14、15 均为阿哌沙班在氧化条件下产生。有关

Table 1 Related substances identified in apixaban tablets and its stressed samples by UHPLC-Q-Orbitrap/MS

No.	t_R/min	Parent ion(m/z)	Ion formula	Dif.($\times 10^{-6}$)	Product ions(m/z)	Origins
1	4.957	354.15570	$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_3^+$	-1.03	337.13354,309.13425,281.12778,253.13300,217.09698,203.11769,191.11775,130.06525,93.04529,79.01844	Dr
2	5.695	478.20804	$\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_5^+$	-0.96	461.18130,417.19214,288.09775,271.07101,244.10800,215.08163,199.08658,184.06310	Dr
3	5.872	287.11365	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3^+$	-0.76	270.08600,242.09224,227.06659,215.08138,199.08670,184.06326,172.06281,125.05952,95.04979	Dr
4	7.283	479.19235	$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_6^+$	-0.33	461.18173,435.20178,417.15460,405.15543,373.16574,361.16571,238.09680,199.08669,184.06293	Dr
5/A	7.993	479.19217	$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_6^+$	-0.71	461.18179,435.20258,417.15460,405.15564,379.14029,373.16577,361.16562,330.14725,238.09718,199.08675,184.06303	Pr/Dr
6/B	8.658	461.18112	$\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_5^+$	-1.79	443.16852,417.19180,374.17343,282.12360,241.06036,199.08653,184.06300,144.06816	Pr/Dr
7/C	9.222	446.18121	$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_4^+$	-2.39	429.15308,401.16098,282.12350,227.04492,185.07085,171.05521,121.03982	Pr/Dr
8	10.022	560.25038	$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_6^+$	0.03	505.21857,487.20856,470.18341,416.17093,387.18143,348.12958,254.12752,199.08675,82.06573	Pr
9	11.188	458.18210	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_4^+$	-0.40	430.18930,268.07141,242.09233,227.06895,199.07393,109.04006	Pr
10	11.327	476.19275	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_5^+$	-0.20	459.16357,430.18747,413.16397,371.15039,298.11911,252.11378,241.06096,224.11874,199.08667,185.07103,173.10721,135.05548,125.05988,95.04975	Pr
11/D	11.527	477.22354	$\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_4^+$	-1.97	460.19757,432.20313,416.17123,404.17154,299.15009,282.12308,238.09738,219.13611,199.08649,185.07111,130.06505,100.07608	Pr
12	11.902	492.18680	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_6^+$	-1.95	475.16025,447.19019,418.15030,404.13452,377.14792,241.06052,199.08667,185.07072	Dr
13	12.400	515.20319	$\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_5^+$	-1.08	488.19284,404.17267,309.13464,241.06091,199.08658,185.07127,125.06004,84.04510	Pr
14	13.348	492.18741	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_6^+$	-0.71	475.16023,447.19057,418.15032,404.13442,377.14790,241.06049,199.08659,185.07112	Dr
15	13.825	492.18732	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_6^+$	-0.90	475.16064,447.19012,418.15032,404.13452,377.14788,241.06052,199.08647,185.07079	Dr
16	13.897	430.18738	$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_3^+$	0.03	413.15930,385.16495,357.17020,282.12396,254.12938,211.05048,169.07608,155.06036,105.04514,95.04968	Pr
17/E	14.178	478.20786	$\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_5^+$	-1.34	460.19757,432.20282,416.17139,404.17142,399.14438,377.14865,333.13385,300.13397,238.09715,199.08658,185.07085,101.06010	Pr/Dr
API	14.723	460.19699	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_4^+$	-2.04	443.16870,415.17426,374.17432,282.12344,241.06059,199.08643,185.07082,135.05528,95.04959	-
18/F	15.263	458.18124	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_4^+$	-2.26	441.15524,415.17575,385.16565,372.15762,341.13919,318.08701,277.10870,249.11378,221.08209	Pr
19	16.295	507.19867	$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_6^+$	0.02	477.20041,404.17062,390.15579,373.12817,241.06075,199.08659,185.07086,95.04922	Dr
20	16.297	460.19754	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_4^+$	-0.85	443.16888,415.17413,374.17529,282.12350,241.06078,199.08655,185.07097,135.05547,95.04964	Pr
21/G	17.203	474.21265	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_4^+$	-1.97	457.18423,429.19089,296.13904,241.06065,199.08646,185.07086,156.06802,125.05978,95.04958	Pr
22	18.140	474.21304	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_4^+$	-1.13	457.18332,429.19083,296.13912,241.06070,199.08650,185.07088,156.06813,125.05976,95.04971	Pr
23/H	18.470	474.21252	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_4^+$	-2.23	457.18393,429.19186,296.13913,241.06062,199.08644,185.07079,156.06807,125.05978,95.04958	Pr

(Continued)

No.	t_R/min	Parent ion(m/z)	Ion formula	Dif. ($\times 10^{-6}$)	Product ions(m/z)	Origins
24	18.692	474.21338	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_4^+$	-0.43	457.18344, 429.18976, 296.13916, 241.06065, 199.08646, 185.07080, 156.06816, 125.05990, 95.04955	Pr
25/I	18.790	464.14771	$\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{ClN}_5\text{O}_3^+$	-1.48	447.12000, 419.12436, 282.12338, 245.01115, 203.03696, 189.02141, 168.06822, 139.00574	Pr
26	19.500	512.16968	$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{ClN}_5\text{O}_5^+$	0.30	494.15887, 466.16422, 450.13263, 414.15585, 391.13983, 334.09528, 272.05835, 225.06609, 199.08661, 185.07097, 101.06019	Dr
27/K	21.378	475.19714	$\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_5^+$	-0.95	461.18185, 443.16876, 415.17664, 282.12375, 241.06076, 199.08664, 185.07101, 172.07568, 135.05542, 125.05988, 95.04966	Pr
28	21.835	546.13098	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_5^+$	0.79	528.12018, 500.12521, 484.09381, 446.07825, 389.08011, 268.00394, 225.06563, 199.08675, 185.07100, 101.06020	Dr
29/L	24.480	489.21268	$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_5^+$	-1.16	461.18170, 443.16855, 417.19278, 374.17368, 282.12366, 241.06078, 227.11781, 199.08656, 185.07088, 156.06808, 135.05539, 125.05988, 95.04965	Pr
30	25.358	387.15508	$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6^+$	0.02	279.64178, 212.84285, 147.06519, 129.05489, 119.04932, 105.07024	Pr

Pr: Process related substance; Dr: Degradation related substance

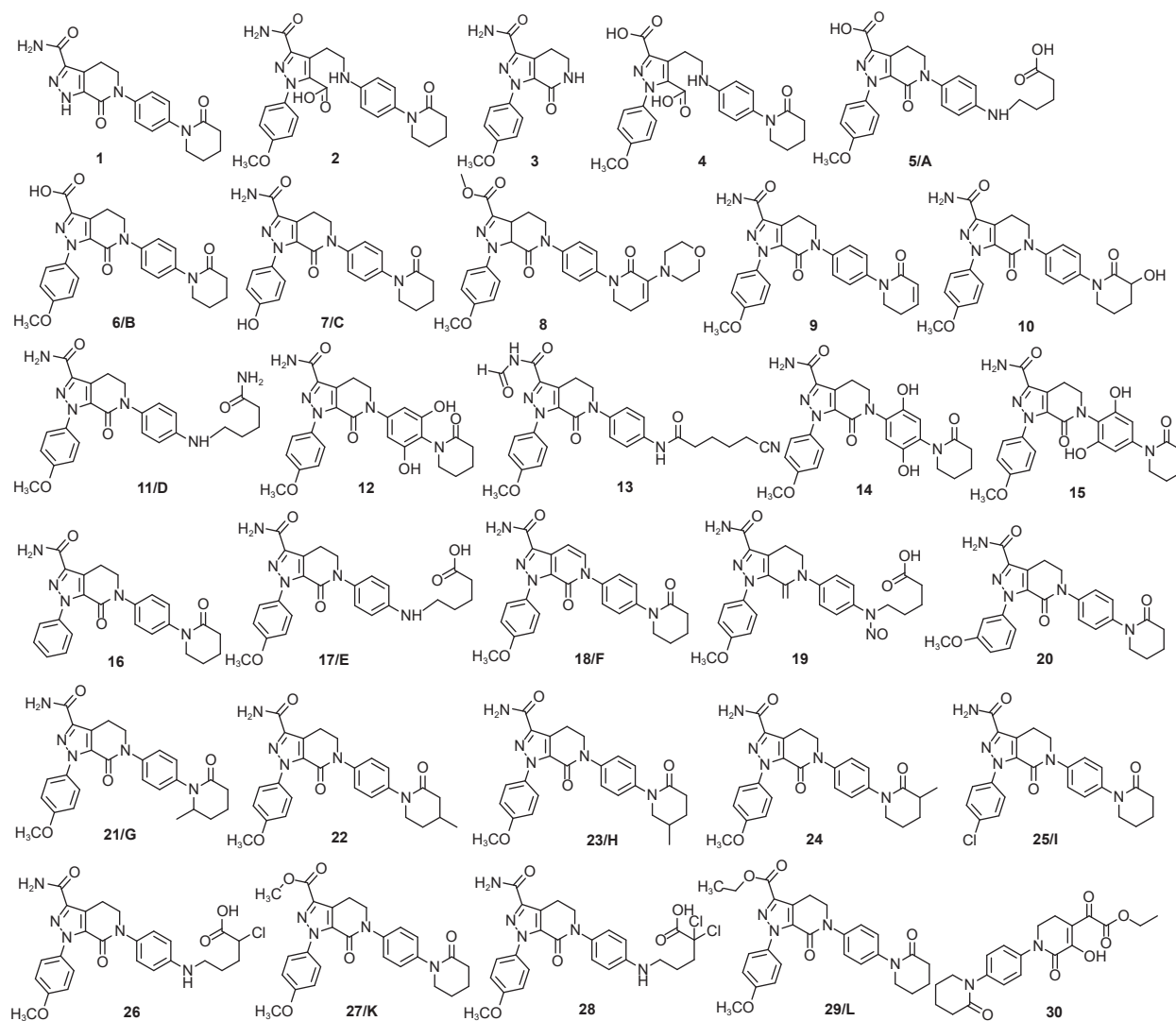


Figure 4 Chemical structures of apixaban and its related substances 1-30

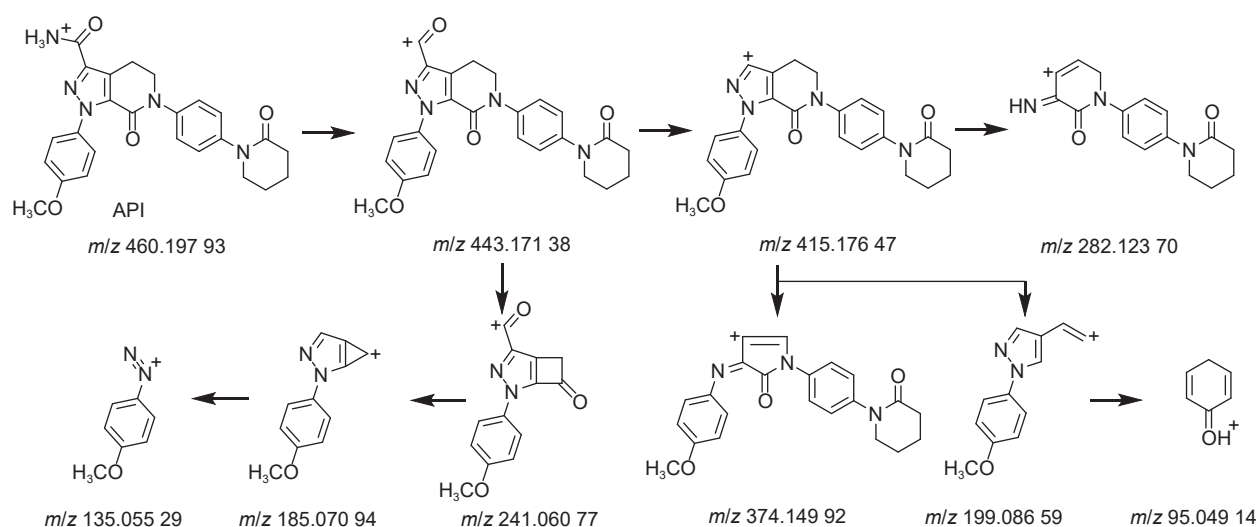


Figure 5 MS/MS fragmentation pathways of $[M+H]^+$ ions of apixaban

物质 **1** 的相对分子质量比阿哌沙班小 106 对应元素组成 C_7H_6O , MS/MS 特征碎片仅有 m/z 309.134 25 ($[P-45]^+$) 与阿哌沙班一致, 提示结构中不含 1-(4-甲氧基苯基)-吡唑并吡啶母核, 故推测有关物质 **1** 是由阿哌沙班吡唑环 1 位连接的 4-甲氧基苯基的断裂而成。有关物质 **3** 的相对分子质量比阿哌沙班小 173 对应元素组成 $C_{11}H_{11}NO$, MS/MS 主要特征碎片 m/z 242.092 24 ($[P-45]^+$) 和 199.086 70 均与阿哌沙班一致, 表明结构中含 1-(4-甲氧基苯基)-吡唑并吡啶母核且吡唑环的 3 位为氨甲酰基, 推定有关物质 **3** 是由阿哌沙班吡唑环 6 位连接的 4-(2-氧代-1-哌啶基) 苯基断裂而成。有关物质 **12**、**14**、**15** 为同分异构体且比阿哌沙班多 2 个 O 原子。三者的 MS/MS 特征碎片均一致且 m/z 447 ($[P-45]^+$)、241、185 和 199 均与阿哌沙班一致, 提示有关物质 **12**、**14**、**15** 为阿哌沙班在氧化条件下产生的二羟基取代产物, 且取代发生 4-(2-氧代-1-哌啶基) 苯基上。结合化学反应规律, 苯环上的 1 位和 4 位均与酰胺基团的氮原子相连, 而酰胺基为中等致活的邻/对位定位基团, 故氧化反应易发生在活性较高的苯环上, 但考虑到空间位阻的因素, 综上, 2 个羟基取代分别为苯环的 2, 6-二羟基取代、3, 5-二羟基取代和 2, 5-二羟基取代。有关物质 **12**、**14**、**15** 的保留时间很接近, 反向色谱保留行为类似, 无法通过极性的大小将三者与上述的 3 个鉴定结构进行一一对应, 需要辅助其他手段进行确证。

有关物质 2 和 4 有关物质 **2** 和 **4** 均为阿哌沙班在强碱条件下产生。有关物质 **2** 的相对分子质量比阿哌沙班大 18 对应元素组成 H_2O , 有关物

质 **4** 的相对分子质量比阿哌沙班大 19, 元素组成多 1 个 H 和 2 个 O, 少 1 个 N。有关物质 **2** 和 **4** 的反相色谱保留较阿哌沙班弱, 表明二者极性较大, 结合化学反应规律, 酰胺在酸或碱催化下可水解为羧酸, 故推测有关物质 **2** 为四氢-氧代-吡啶的酰胺键水解成羧酸的产物, 有关物质 **4** 为四氢-氧代-吡啶的酰胺键和吡唑环 3 位的酰胺键同时水解的产物。

有关物质 19、26、28 有关物质 **19**、**26**、**28** 均为阿哌沙班在强酸条件下产生, 对阿哌沙班的化学结构进行分析, 其 2-氧代-1-哌啶基的酰胺键在强酸条件下易水解为羧基, 而羧基的 α -H 较为活泼, 故有关物质 **26** 为羧基的 α -H 被 1 个氯原子取代的产物, 有关物质 **28** 为羧基的 α -H 被 2 个氯原子取代的产物; 有关物质 **19** 为酰胺水解后与苯环 4 位相连的仲胺和强酸溶液中存在的少量亚硝酸发生反应生成 N-亚硝基胺。

有关物质 8、9、10、13、30 有关物质 **8**、**9**、**10**、**13**、**30** 均为阿哌沙班制剂中检出的工艺杂质。结合合成工艺, 阿哌沙班结构中 2-氧代-1-哌啶基的 α 位活泼氢易与合成路线中残留的五氯化磷反应生成单氯代和双氯代化合物, 双氯代化合物与过量的吗啉发生缩合-消除反应的同时吡唑环 3 位的酰胺键与甲醇钠发生酯交换得到有关物质 **8**; 单氯代化合物经过水解 α 位的氯原子被羟基取代而生成有关物质 **10**, 或者经过消除反应失去一分子 HCl 从而产生有关物质 **9**; 有关物质 **13** 为合成路线中参与环合反应的中间体反应不完全, 继而与氰化钠/钾发生取代反应同时 3 位的酰胺键与反应釜中过量的甲酰胺发生氨解反应而生成的副产物; 有关

物质 **30** 的 MS/MS 主要特征碎片均不符合阿哌沙班及其已知有关物质的裂解规律, 参考文献报道的合成工艺^[12], 推测有关物质 **30** 为合成路线中未转化完全而残留的中间体, 即乙基-2-(5-羟基-6-氧代-1-

(4-(2-氧代哌啶-1-基) 苯基)-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基)-2-氧代乙酸乙酯。

以上结构以有关物质 **12**、**9**、**13** 为例进行解析, 质谱裂解均得到合理归属(图 6)。

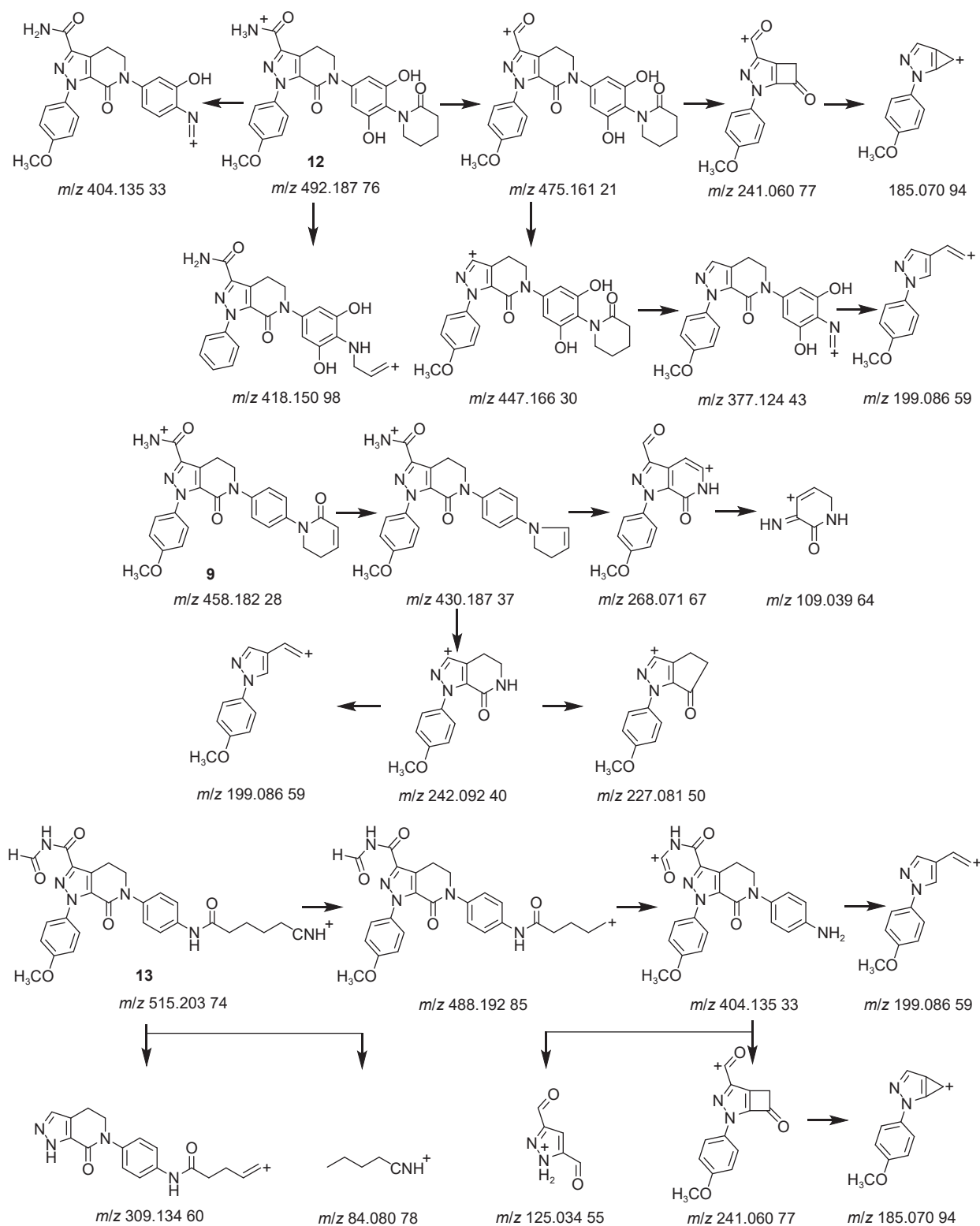


Figure 6 MS/MS fragmentation pathways of $[M+H]^+$ ion of related substances **12**, **9** and **13**

3.3 样品测定

对从市场流通环节收集的 19 家企业(18 家国内企业 a~r 和 1 家原研企业 Pfizer)生产的阿哌沙班片进样测定。结果显示, 19 种阿哌沙班制剂中共检出 19 个有关物质, 分别为有关物质 6~11、13、16~18、20~25、27、29~30, 其中有关物质 6、7、11、17、18、21、23、25、27、29 确证为已知有关物质 B~I、K~L。前期研究工作中已通过绘制阿哌沙班和各已知有关物质的线性方程, 以斜率计算各有关物质的校正因子, 故已知有关物质按加校正因子的主成分自身对照法计算含量, 其他未知有关物质按主成分自身对照法计算含量, 结果显示各杂质含量均在 0.1% 以下, 总体质量水平优良。国产制剂之间的杂质种类和个数差异较大, 但杂质含量差别较小, 可能与起始原料的来源和生产工艺不同相关, 且国产制剂在杂质数量和含量的水平上与原研片无明显差距。

4 讨论

在建立的挥发性流动相色谱-质谱联用条件下, 阿哌沙班与各有关物质得到了有效的分离, 共检测到 30 个有关物质, 其中 11 个为已知杂质, 其余均为本研究新鉴定的未知有关物质。阿哌沙班有关物质的产生途径见图 7。

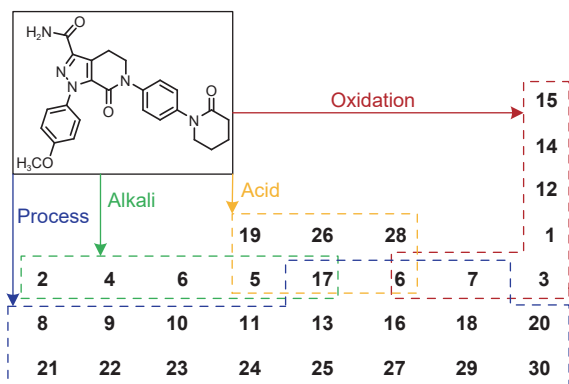


Figure 7 Generation of the related substance in apixaban tablets

根据杂质来源, 30 种有关物质可分为 2 类, 即工艺杂质(合成副产物、合成中间体)和降解杂质。有关物质 6、17 和 27 为阿哌沙班合成工艺过程中 3 位的酯键或 2-氧代哌啶环的酰胺键水解而产生的副产物; 有关物质 8、9 和 10 为内酰胺关环反应步骤之后 2-氧代哌啶环的 α 位活泼氢参与反

应生成的副产物; 有关物质 11 为重结晶精制过程中的副产物, 即阿哌沙班结构中 2-氧代哌啶环的酰胺键与反应残留的甲酰胺发生氨解反应; 有关物质 13 为内酰胺关环反应步骤的副产物; 有关物质 16、20~25 为反应原料中所引入的杂质参与反应的副产物; 有关物质 29 和 30 为未反应完全的合成中间体。

强制降解试验表明, 阿哌沙班对高温和光照相对稳定, 对酸、碱和氧化剂较不稳定。阿哌沙班在酸破坏条件下 3 位的酰胺键和 2-氧代哌啶环的酰胺键易水解, 而碱破坏条件下 3 位的酰胺键、2-氧代哌啶环的酰胺键和四氢-氧代-吡啶的酰胺键均易水解, 氧化破坏条件下, 氧化位点主要在与 2-氧代哌啶环相连的苯环上。强制降解产生的有关物质 5、6、7 和 17 在阿哌沙班制剂中均检出, 表明在合成过程中需严格控制酸碱试剂的残留以及反应温度来控制杂质的产生, 同时在贮存的过程中避免潮湿, 在密封干燥处保存。

References

- [1] Raynor A, Lunte K, Gaaloul M, *et al.* Stability of rivaroxaban and apixaban anti-xa activities in whole blood samples: a French bicentric study[J]. *Thromb Haemost*, 2023, **123**(5): 565-567.
- [2] Wasan SM, Feland N, Grant R, *et al.* Validation of apixaban anti-factor Xa assay and impact of body weight[J]. *Thromb Res*, 2019, **182**: 51-55.
- [3] Byon W, Garonzik S, Boyd RA, *et al.* Apixaban: a clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic review[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2019, **58**(10): 1265-1279.
- [4] Cortese F, Scicchitano P, Gesualdo M, *et al.* Apixaban: effective and safe in preventing thromboembolic events in patients with atrial fibrillation and renal failure[J]. *Curr Med Chem*, 2017, **24**(34): 3813-3827.
- [5] Subramanian VB, Katari NK, Dongala T, *et al.* Stability-indicating RP-HPLC method development and validation for determination of nine impurities in apixaban tablet dosage forms. Robustness study by quality by design approach[J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, **34**(1): e4719.
- [6] Surukonti SR, Surendrababu MS. Understanding the stress testing characteristics of apixaban, structural elucidation of a novel degradation impurity, and stability-indicating method development for quantification of related substances[J]. *J AOAC Int*, 2024, **107**(1): 22-30.
- [7] Kilari J, Brahman PK. Using the AQbD approach, development and validation of a simple, rapid stability indicating chromato-

- graphic method for quantification of related impurities of apixaban[J]. *J Chromatogr Sci*, 2024, **62**(10): 978-989.
- [8] Nie ZL, Guo ZY, Hu YB, *et al.* Quantitative determination of eight known kinds of impurities in Apixaban by HPLC[J]. *China Meas Test* (中国测试), 2017, **43**(3): 36-42.
- [9] Sun YY, Zhao YL, Duan MM, *et al.* Determination of related substances in apixaban by HPLC[J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2017, **34**(1): 37-42.
- [10] Wang P, Lin LH. Improvement on synthesis process of apixaban[J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2019, **36**(14): 1783-1786.
- [11] Zheng QK, Shen SS, Zhang JM, *et al.* The process research of apixaban[J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2022, **32**(03): 199-203.
- [12] Xiang CH. A study on the process synthesis of the anticoagulant drug: apixaban(抗凝血剂阿哌沙班的合成工艺研究)[D]. Harbin: Northeast Agricultural University(东北农业大学), 2014.
- [13] Zhu S, Jiang J, Liu Y, *et al.* Structural identification of the related substances of lorazepam tablets by LC-MS[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2021, **52**(5): 555-565.
- [14] Fu XT, Chen MH, Yan F, *et al.* Identification of the related substances of tacrolimus by LC-MS[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2022, **53**(5): 563-576.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2025年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由中华人民共和国教育部主管,中国药科大学主办的药学中文核心期刊,主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药代动力学、药物生物技术、药理学、药事管理等学科的原创新研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉,目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, EMBASE)等所收录,被国内权威数据库《中文核心期刊要目总览》(2023年版),中国科学引文数据库(CSCD)、中国科技论文统计源数据库等列为药学类核心期刊,屡获原国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2024年,《中国药科大学学报》被再度评为中国高校百佳科技期刊,成功入选2024年度中国高校科技期刊建设示范案例库·百佳科技期刊。根据中国知网《中国学术期刊影响因子年报》的数据显示:《中国药科大学学报》2024年复合影响因子为1.119,在药学期刊界的学术声誉和影响力稳步提升,在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊,128页。国际标准开本,国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅,漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32-1157/R

国内邮发代号:28-115

地址:南京市童家巷24号

电话:025-83271566

E-mail:xuebao@cpu.edu.cn

ISSN:1000-5048

定价:40元/期,全年240元

邮政编码:210009

<https://jcpcpu.cpu.edu.cn>