

• 实验研究 •

阿哌沙班中3个杂质的合成研究

范巧云¹, 高立国¹, 韩学文¹, 穆 帅^{1*}, 王以富^{2*}, 梁兴运³, 张晓军¹, 闫少杰¹

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 天津海光药业股份有限公司, 天津 300457

3. 河南大学 药学院, 河南 开封 475000

摘要: 目的 设计并合成阿哌沙班中的3个杂质。方法 以2-氯-2-[2-(4-甲氧基苯基)亚肼基]乙酸乙酯和5,6-二氢-3-(4-吗啉基)-1-[4-(2-氧代-1-哌啶基)苯基]-2(1*H*)-吡啶酮为起始原料, 经过环合和水解反应得到目标化合物1, 化合物1分别经过水解和取代反应得到目标化合物2和3。结果 合成了目标化合物, 并利用MS、¹H-NMR和¹³C-NMR确证了结构: 目标化合物1~3的质量分数分别为99.3%、99.1%、99.2%。结论 3个杂质的合成和纯化为阿哌沙班的杂质研究奠定了物质基础。

关键词: 阿哌沙班; 杂质; 2-氯-2-[2-(4-甲氧基苯基)亚肼基]乙酸乙酯; 5,6-二氢-3-(4-吗啉基)-1-[4-(2-氧代-1-哌啶基)苯基]-2(1*H*)-吡啶酮

中图分类号: R914

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2016)08-1125-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.08.01

Synthesis of three impurities in apixaban

FAN Qiao-yun¹, GAO Li-guo¹, HAN Xue-wen¹, MU Shuai¹, WANG Yi-fu², LIANG Xing-yun³, ZHANG Xiao-jun¹, YAN Shao-jie¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Haiguang Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300457, China

3. School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475000, China

Abstract: Objective To design and synthesize three impurities in apixaban. **Methods** 2-Chloro-2-[2-(4-methoxyphenyl)hydrazono]acetate and 5,6-dihydro-3-(4-morpholinyl)-1-[4-(2-oxo-1-piperidinyl)phenyl]-2(1*H*)-pyridinone were used as starting materials to synthesize the target compound 1 by cyclization and hydrolysis reactions, and compound 1 was used to synthesize the target compound 2 and compound 3 by hydrolysis and substitution reactions. **Results** The target compounds were synthesized and characterized by MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR method. And the purity detected were 99.3%, 99.1%, and 99.2%, respectively. **Conclusion** The synthesis and purification of three impurities lay the material base for the study of impurities in apixaban.

Key words: apixaban; impurity; 2-chloro-2-[2-(4-methoxyphenyl) hydrazono]acetate; 5,6-dihydro-3-(4-morpholinyl)-1-[4-(2-oxo-1-piperidinyl)phenyl]-2(1*H*)-pyridinone

阿哌沙班, 化学名为1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氧代哌啶-1-基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1*H*-吡啶并[3,4-*c*]吡啶-3-甲酰胺, 是由百时美施贵宝公司和辉瑞公司联合研制的一种新型口服直接Xa因子抑制剂。于2011年3月在欧盟批准上市, 商品名Eliquis, 临床用于预防进行择期髋关节或膝关节置换术的成年

患者出现的静脉血栓栓塞症^[1-2]。临床研究表明, 与每日注射1次依诺肝素相比, 每日口服两次阿哌沙班对预防全膝和全髋关节置换术后出现的静脉血栓栓塞症效果更好, 且不会增加出血风险^[3-4]。本品具有安全性高、不必接受监测以调整剂量、可口服、无交叉耐药性及不良反应少等优点, 有望成为口服

收稿日期: 2016-03-28

作者简介: 范巧云(1982—), 女, 江苏徐州人, 助理研究员, 主要从事化学药物的开发及工艺研究。Tel: (022)23003587 E-mail: fanqy@tjpr.com

*通信作者 穆 帅, 助理研究员。E-mail: mus@tjpr.com

王以富, 副研究员。E-mail: wyfhy@163.com

抗血栓的一线药物^[5]。

通过对阿哌沙班原料药进行质量研究,发现阿哌沙班成品中有3个较大杂质,通过精制很难除去,在阿哌沙班产品的 LC-MS 图谱中,这3个杂质的保留时间分别为 16.926、2.752、14.236 min,其分子离子峰分别为 489.2、461.2、475.2,结合阿哌沙班的反应机制及文献资料^[6],推测这3个杂质可能是 1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氧代哌啶-1-基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1*H*-吡唑并[3,4-*c*]吡啶-3-甲酸乙酯(1)、1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氧代哌啶-1-基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1*H*-吡唑并[3,4-*c*]吡啶-3-甲酸(2)、1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氧代哌啶-1-基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1*H*-吡唑并[3,4-*c*]吡啶-3-甲

酸甲酯(3)。本课题组对这3个化合物进行了合成,并进行了纯化方法的考察,通过纯化使得这3个杂质的质量分数均大于98%,利用 LC-MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 确证结构,通过 HPLC 进一步证实了这3个化合物为阿哌沙班的主要杂质,这对建立和完善阿哌沙班的分析方法,制定已知杂质的限度,提高质量标准,具有重要意义。

本实验以 2-氯-2-[2-(4-甲氧基苯基)亚胍基]乙酸乙酯和 5,6-二氢-3-(4-吗啉基)-1-[4-(2-氧代-1-哌啶基)苯基]-2(1*H*)-吡啶酮为起始原料,经过环合、水解得到目标化合物 1,目标化合物 1 分别经过水解和取代反应得到目标化合物 2 和 3。目标化合物的合成路线见图 1。

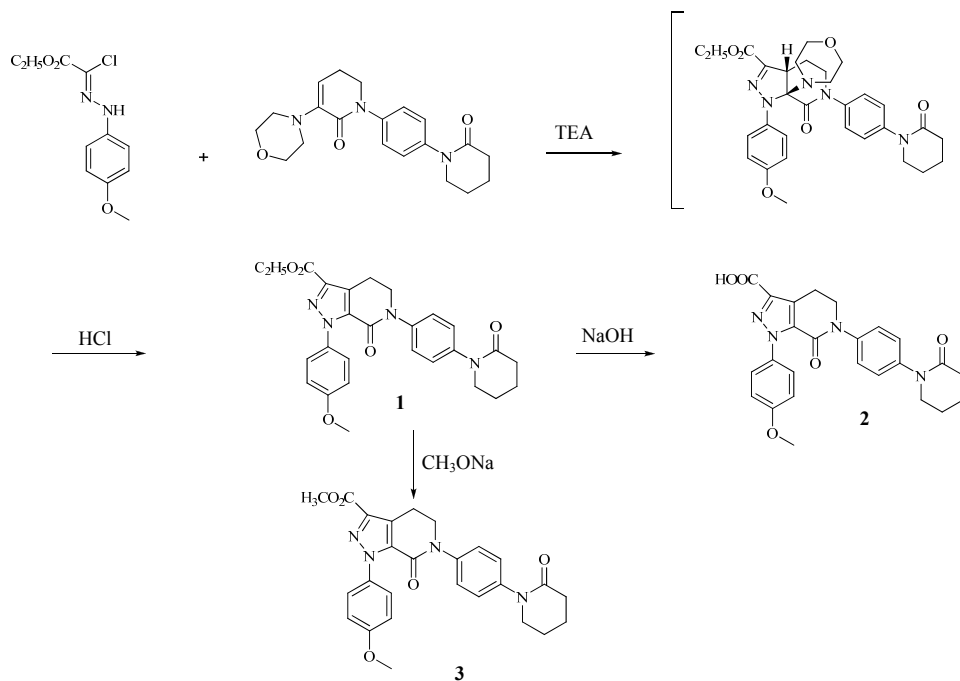


图 1 目标化合物的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of target compounds

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪; Bruker 400 MHz 核磁共振仪; 2-氯-2-[2-(4-甲氧基苯基)亚胍基]乙酸乙酯(质量分数>98%); 5,6-二氢-3-(4-吗啉基)-1-[4-(2-氧代-1-哌啶基)苯基]-2(1*H*)-吡啶酮(质量分数>98%); 其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氧代哌啶-1-基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1*H*-吡唑并[3,4-*c*]吡啶-3-甲酸乙酯(1)的合成^[7]

室温条件下,向配有球形冷凝管、温度计、恒

压滴液漏斗、机械搅拌的 2 L 四口瓶中,加入 2-氯-2-[2-(4-甲氧基苯基)亚胍基]乙酸乙酯(60 g, 0.23 mol),醋酸乙酯 1 200 mL,搅拌,完全溶解后,继续加入 5,6-二氢-3-(4-吗啉基)-1-[4-(2-氧代-1-哌啶基)苯基]-2(1*H*)-吡啶酮(61 g, 0.17 mol),通氮气保护,搅拌 15 min 后得悬浊液,滴加三乙胺 80 mL,滴毕,加热升温至 65 °C,保温反应 8 h 后,降温至 20 °C,滴加 4 mol/L 盐酸 72 mL,滴毕,加热升温至 45 °C,反应 3 h 后,降温至 25 °C,加入碳酸氢钠溶液调 pH 值至 6,静置,分液,有机层用水洗(200 mL×2),无水硫酸钠干燥,次日,滤过,滤液蒸干。

得化合物 **1** 粗品 (70 g), 收率 84%, 归一化法测得质量分数为 92.5%。

2.2 化合物 **1** 的纯化

室温条件下, 向配有球形冷凝管、温度计的 1 L 四口瓶中, 加入化合物 **1** 粗品 (70 g), 乙醇 700 mL, 磁力搅拌, 回流温度下至溶清, 加入活性碳 0.8 g, 脱色 30 min, 热滤, 滤液冷却至室温, 析晶 4 h, 滤过, 抽干, 得浅黄色固体 (60 g), 收率 86%, 面积归一化法测得质量分数为 99.3%。ESI-MS m/z : 489.2 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.32 (3H, t, $J=7.2$ Hz, CH_3), 1.83 (4H, m, $CH_2 \times 2$), 2.37 (2H, t, $J=6.4$ Hz, CH_2), 3.19 (2H, t, $J=6.4$ Hz, CH_2), 3.57 (2H, t, $J=5.2$ Hz, CH_2), 3.79 (3H, s, OCH_3), 4.06 (2H, t, $J=6.8$ Hz, CH_2), 4.33 (2H, m, CH_2), 6.99 (2H, d, $J=6.8$ Hz, Ar-H), 7.26 (2H, d, $J=6.8$ Hz, Ar-H), 7.34 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H), 7.47 (2H, d, $J=7.2$ Hz, Ar-H)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 14.12, 20.84, 21.09, 22.95, 32.54, 50.65, 50.76, 55.43, 60.55, 87.11, 87.98, 113.41, 125.95, 126.28, 126.69, 132.40, 132.96, 138.39, 139.61, 141.41, 156.32, 159.26, 161.33, 168.79。

2.3 1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氧代哌啶-1-基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-c]吡啶-3-甲酸 (**2**) 的合成

室温条件下, 向配有球形冷凝管、温度计的 500 mL 四口瓶中, 加入化合物 **1** (20 g, 0.041 mol), 醋酸乙酯 200 mL, 磁力搅拌, 升温至 45 $^{\circ}C$, 溶解至澄清后, 滴加入 10% 氢氧化钠水溶液 32 mL, 滴加完毕, 45 $^{\circ}C$ 搅拌 30 min 后, 加入水 100 mL, 醋酸乙酯 50 mL, 转移至分液漏斗中, 分出水层, 室温下滴加 2 mol/L 盐酸 25 mL, 滴加过程中有浅黄色固体产生, 滴毕, 室温下搅拌 2 h, 滤过, 抽干, 水洗, 得化合物 **2** 粗品 (13 g), 收率 88%, 归一化法测得质量分数为 96%。

2.4 化合物 **2** 的纯化

室温条件下, 向配有球形冷凝管、温度计的 250 mL 四口瓶中, 加入化合物 **2** 粗品 (13 g), 乙醇 150 mL, 磁力搅拌, 回流温度下至溶清, 加入活性碳 0.2 g, 搅拌脱色 30 min, 热滤, 滤液冷却至室温析晶 4 h, 滤过, 抽干, 得浅黄色固体 (11 g), 收率 85%, 归一化法测得质量分数为 99.1%。ESI-MS m/z : 461.2 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ :

1.84 (4H, m, $CH_2 \times 2$), 2.37 (2H, t, $J=6.4$ Hz, CH_2), 3.17 (2H, t, $J=6.8$ Hz, CH_2), 3.57 (2H, t, $J=5.6$ Hz, CH_2), 3.79 (3H, s, CH_3), 4.05 (2H, t, $J=6.4$ Hz, CH_2), 6.98 (2H, d, $J=9.2$ Hz, Ar-H), 7.26 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H), 7.33 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H), 7.47 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H), 13.15 (1H, s, COOH)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 20.84, 21.17, 22.95, 32.54, 50.71, 50.76, 55.42, 113.38, 125.94, 126.27, 126.63, 126.76, 132.50, 132.84, 139.26, 139.68, 141.36, 156.43, 159.17, 162.83, 168.79。

2.5 1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氧代哌啶-1-基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-c]吡啶-3-甲酸甲酯 (**3**) 的合成^[8]

室温条件下, 向配有球形冷凝管、温度计的 500 mL 四口瓶中, 加入化合物 **1** (20 g, 0.041 mol), DMF 160 mL, 甲醇 80 mL, 磁力搅拌, 室温下搅拌溶清后, 加入原甲酸三甲酯 4 mL, 三氟乙酸 1.5 mL, 升温至 45 $^{\circ}C$ 反应 0.5 h 后, 滴加 25% 甲醇钠的甲醇溶液 24.8 g, 滴加完毕, 反应 1 h, 将反应液滴加入 1 000 mL 冰水中, 析出絮状固体, 继续搅拌 2 h, 滤过, 抽干, 得化合物 **3** 粗品 12 g。收率 90%, 归一化法测得质量分数为 97%。

2.6 化合物 **3** 的纯化

室温条件下, 向配有球形冷凝管、温度计的 250 mL 四口瓶中, 加入化合物 **3** 粗品 (12 g), 甲醇 120 mL, 磁力搅拌, 回流温度下至溶清, 加入活性碳 0.2 g, 脱色 30 min, 热滤, 滤液冷却至室温, 析晶 4 h, 滤过, 抽干, 得浅黄色固体 (10 g), 收率 83%, 归一化法测得质量分数为 99.2%。ESI-MS m/z : 475.2 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.83 (4H, m, $CH_2 \times 2$), 2.37 (2H, t, $J=6.0$ Hz, CH_2), 3.18 (2H, t, $J=6.4$ Hz, CH_2), 3.57 (2H, t, $J=4.4$ Hz, CH_2), 3.79 (3H, s, CH_3), 3.86 (3H, s, CH_3), 4.06 (2H, t, $J=6.4$ Hz, CH_2), 6.99 (2H, d, $J=9.2$ Hz, Ar-H), 7.27 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Ar-H), 7.34 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H), 7.49 (2H, d, $J=8.8$ Hz, Ar-H)。 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 20.84, 21.05, 22.94, 32.54, 50.62, 50.75, 51.76, 55.41, 113.40, 125.92, 126.26, 126.61, 126.79, 132.37, 132.93, 138.19, 139.60, 141.40, 156.30, 159.26, 161.79, 168.78。

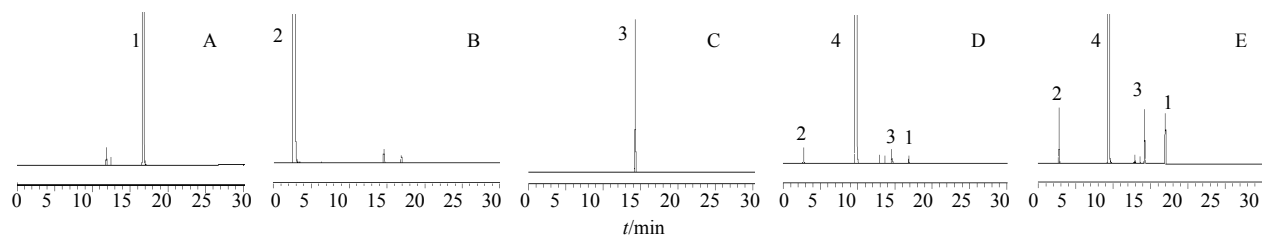
2.7 HPLC 色谱条件

色谱条件: Agilent Zobrax Eclipse Plus C₁₈ 色谱

柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 30 mmol/L 乙酸铵 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱, 0~3 min, 80%A, 3~15 min, 80%A→70%A, 15~22 min, 70%A→40%A, 22~35 min, 40%A→80%A; 柱温: 35 °C; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm。

在上述条件下, 化合物 1、2、3 的保留时间分

别为 16.926、2.752、14.236 min, 阿哌沙班产品中 3 个主要杂质的保留时间分别为 16.929、2.758、14.239 min, 将化合物 1、2、3 加入到阿哌沙班中进行高效液相色谱分析, 结果显示对应的杂质峰都明显增加, 即可确定化合物 1、2、3 即为阿哌沙班中的 3 个主要杂质。见图 2。



1-化合物 1 2-化合物 2 3-化合物 3 4-阿哌沙班

1-compound 1 2-compound 2 3-compound 3 4-apixaban

图2 化合物 1 (A)、化合物 2 (B)、化合物 3 (C)、阿哌沙班 (D) 和化合物 1、2、3+阿哌沙班混合物 (E) 的 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC chromatograms of compound 1 (A), compound 2 (B), compound 3 (C), apixaban (D), and compounds 1, 2, and 3 + apixaban (E)

3 讨论

药品是特殊的商品, 药品杂质是影响药品质量的重要因素, 故应该弄清杂质的来源、性质、检测方法及其限量, 同时改善工艺条件, 降低杂质的产生, 并制定相应法规, 从多方面保证和提高药品的质量, 减少药物的不良反应^[9-10]。

通过对阿哌沙班 3 个杂质的合成以及结构分析, 发现化合物 1 和 3 的产生与反应体系中甲醇钠的用量和反应时间相关, 而化合物 2 的产生与反应体系中的水分相关, 且化合物 2 是降解杂质, 根据仿制药申报要求, 在原料药中, 这 3 个已知杂质的限度均需要小于千分之一, 如果仅依靠精制方法使这 3 个杂质符合限度要求很难, 且多次精制严重影响原料药的收率, 造成成本过高。结合这 3 个杂质的性质及生成原理, 可以通过控制反应中甲醇钠的用量和反应时间以及反应体系中的水分来减少这 3 个杂质的产生, 从而使粗品中这 3 个杂质一次精制, 阿哌沙班原料药的纯度能达到 99.6% 以上。

参考文献

- [1] Wittkowsky A K. New oral anticoagulants: a practical guide for clinicians [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2010, 29(2): 182-191.
- [2] 许 昕, 薛晓文. 开发中的新型口服抗凝血药—Xa 因

子抑制剂 [J]. *药学与临床研究*, 2010, 18(3): 294-298.

- [3] 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): 17-20.
- [4] Ramirez A, Mudryk B, Rossano L, *et al.* A mechanistic study on the amidation of esters mediated by sodium form amide [J]. *J Org Chem*, 2012, 77(1): 775-779.
- [5] Maxwell I B D, Tran S B, Chen S Y, *et al.* The syntheses and *in vitro* biotransformation studies of [¹⁴C]apixaban, a highly potent, selective, efficacious and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa [J]. *J Label Compd Radiopharm*, 2011, 54(18): 418-425.
- [6] Landge S B, Jadhav S A, Dahale S B, *et al.* Development and validation of stability indicating RP-HPLC method on core shell column for determination of degradation and process related impurities of apixaban-an anticoagulant drug [J]. *AJAC*, 2015, 6: 539-550.
- [7] 王 冠, 郭晔堃, 钟静芬, 等. 阿哌沙班合成路线图解 [J]. *中国医药工业杂志*, 2012, 43(2): 157-159.
- [8] Ramirez A, Mudryk B, Rossano L, *et al.* A mechanistic study on the amidation of esters mediated by sodium [J]. *J Org Chem*, 2012, 77(1): 775-779.
- [9] 李 真, 龚培力, 曾繁典, 等. 药物杂质及其对安全性的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2001, 17(6): 451-453.
- [10] 胡向青, 郝 福, 李志刚, 等. 药物中杂质及有害物质控制限度的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(9): 953-964.