

HPLC 法测定艾司奥美拉唑钠中 3 个潜在基因毒性杂质的研究及控制

曹盼¹, 吴会斌², 陈焱², 赵龙山^{1*}

(1. 沈阳药科大学, 沈阳 110016; 2. 辽宁海思科制药有限公司, 葫芦岛 125107)

摘要 目的: 建立 HPLC 法测定艾司奥美拉唑钠中潜在基因毒性杂质 E、杂质 I、2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶。方法: 杂质 E 色谱条件: YMC-Triart C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.05 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲液, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 302 nm, 柱温为 30 °C; 杂质 I 色谱条件: Agilent Microspher C₁₈ 色谱柱(100 mm × 4.6 mm, 3 μm), 流动相 A 为水-磷酸盐缓冲液(pH 7.6)-乙腈(80:10:10), 流动相 B 为乙腈-磷酸盐缓冲液(pH 7.6)-水(80:1:19), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 302 nm, 柱温为 30 °C; 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶色谱条件: GL Inertsil ODS-3 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液(pH 6.5), 流动相 B 为乙腈, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 265 nm, 柱温为 30 °C。结果: 杂质 E、杂质 I、2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶的线性范围分别为 0.025 1 ~ 0.200 7、0.020 2 ~ 0.302 7、0.126 6 ~ 2.110 0 μg · mL⁻¹, 定量限分别为 0.50、0.40、2.53 ng, 检测限分别为 0.15、0.12、0.84 ng。平均回收率都在 96%~104%, RSD 均 < 2%。样品中均未检出潜在毒性杂质。结论: 该方法检测杂质的重现性好, 精密度高, 准确度高, 线性良好, 分析方法简便高效。

关键词: 艾司奥美拉唑; 基因毒性杂质; 高效液相色谱法; 杂质 E; 杂质 I; 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)02-0290-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.02.12

Determination of three genotoxic impurities in esomeprazole sodium by HPLC

CAO Pan¹, WU Hui-bin², CHEN Yan², ZHAO Long-shan^{1*}

(1. School of Pharmacy Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Liaoning Haisco Pharmaceutical Co., Ltd., Huludao 125107, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the determination of potentially genotoxic impurity E, impurity I, and 2-chloromethyl-4-methoxy-3,5-dimethylpyridine in esomeprazole sodium. **Methods:** The chromatographic conditions were as follows: impurity E, YMC-Triart C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),

* 通信作者 Tel:15809875200; E-mail:longshanzhao@163.com

第一作者 Tel:15042922028; E-mail:329099760@qq.com

mobile phase A 0.05 mol · L⁻¹ monopotassium phosphate buffer, mobile phase B was acetonitrile, the gradient elution program was used at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was 302 nm and the column temperature was 30 °C. Impurities I, Agilent Microspher C₁₈ column (100 mm × 4.6 mm, 3 μm), mobile phase A was water – phosphate buffer (pH 7.6) – acetonitrile (80:10:10), mobile phase B was acetonitrile – phosphate buffer (pH 7.6) – water (80:1:19), the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was 302 nm and the column temperature was 30 °C. 2 – chloromethyl – 4 – methoxy – 3,5 – dimethylpyridine, GL Inertsil ODS – 3 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase A was 0.01 mol · L⁻¹ disodium phosphate solution (pH 6.5), mobile phase B was acetonitrile, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was 265 nm and the column temperature was 30 °C. **Results:** The linear ranges of impurity E, impurity I and 2 – chloromethyl – 4 – methoxy – 3,5 – dimethylpyridine were 0.025 1 – 0.200 7, 0.020 2 – 0.302 7, 0.126 6 – 2.110 0 μg · mL⁻¹. The LOQ of impurity E, impurity I, 2 – chloromethyl – 4 – methoxy – 3,5 – dimethylpyridine were 0.50, 0.40, 2.53 ng, and the LOD were 0.15, 0.12, 0.84 ng. The average recovery rate ranged from 96% to 104%, and the RSD was less than 2%. No potential toxic impurities were detected in the samples. **Conclusion:** The method has the advantages of good repeatability, high precision, high accuracy and good linearity, and the analysis method are simple and efficient.

Keywords: esomeprazole; genotoxic impurities; high performance liquid chromatography; impurity E; impurity I; 2 – chloromethyl – 4 – methoxy – 3,5 – dimethylpyridine

艾司奥美拉唑钠属于抑制胃酸分泌药,是胃壁细胞中质子泵的特异抑制剂^[1-4],在胃壁细胞泌酸微管中的高酸条件下可以转化为活性模式,抑制该部位的质子泵活动,对于基础胃酸和受刺激后胃酸的分泌都有抑制作用。可以用于治疗急性上消化道出血^[5-7],急性消化性溃疡出血^[8],改善重症急性胰腺炎患者肠黏膜屏障功能^[9]等疾病。

杂质是指在药品生产、运输、贮藏等过程中产生或引入的影响药物纯度的物质。基因毒性杂质 (genotoxic impurities, GTIs) 是指能引起遗传毒性的杂质^[10-11],极微量水平即能诱发 DNA 突变,具有重大的遗传毒性安全风险,需要重点控制^[12]。根据艾司奥美拉唑钠的制备工艺,分析了其杂质来源,主要有工艺杂质和降解杂质。艾司奥美拉唑钠有关物质的 HPLC 检测方法已经收载于 2020 年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》),包括一部分杂质的质量标准^[13],但并未收载杂质 E、杂质 I、2 – 氯甲基 – 3,5 二甲基 – 4 – 甲氧基吡啶 (基因毒性杂质) 的检测方法。参考 ICH (M7) 中毒理学关注阈值 (TCC, 1.5 μg · d⁻¹) 作为基因毒性杂质的可接受限度^[14],按照注射用艾司奥美拉唑钠日最大服用剂量 40 mg 计算,则计算限度为 37.5 μg · g⁻¹。为了实现

对这几个基因毒性杂质的质量控制,利用 HPLC 法进行测定。

李锐等^[15]采用质谱法对艾司奥美拉唑钠基因毒性杂质杂质 E、杂质 I 进行检查,王璐等^[16]采用质谱法对艾司奥美拉唑钠中基因毒性杂质 2 – 氯甲基 – 3,5 二甲基 – 4 – 甲氧基吡啶进行检查。本文采用更加简便的方法、更普及的检测设备进行 3 个基因毒性杂质的检测。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (Agilent 公司); CPA225D 电子天平 (精度 0.001 g, Sartorius 公司); AUW220 电子天平 (精度 0.1 mg, 岛津公司); YMC Triart C₁₈ 色谱柱 (YMC 公司)、Agilent Microspher C₁₈ 色谱柱 (Agilent 公司); GL Inertsil ODS – 3 色谱柱 (GL 公司); Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (Waters 公司)。

样品: 艾司奥美拉唑钠原料 (批号 170601、170701、170702、C037 – 220006, 四川海思科制药有限公司); 乙腈 (色谱纯, Merck 公司); 杂质 E 对照品 (批号 ESE20130129, 纯度 98.57%, 上海诺星医药科技有限公司); 杂质 I 对照品 (批号 95.16.08.04, 纯度 99.10%, LGC 公司); 2 – 氯甲基 – 3,5 二甲基 –

4-甲氧基吡啶盐酸盐对照品(批号 02322CEV,纯度 99.7%,Sigma 公司);磷酸二氢钾、氢氧化钾、磷酸二氢钠及磷酸氢二钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 杂质 E 采用 YMC-Triart C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相 A 为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲液(1.25 g·mL⁻¹ 氢氧化钾溶液调 pH 7.6),流动相 B 为乙腈,梯度洗脱(0~5 min,85% A; 5~20 min,85% A→70% A; 20~30 min,70% A; 30~31 min,70% A→50% A; 31~36 min,50% A; 36~37 min,50% A→85% A; 37~50 min,85% A),流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 302 nm,进样量为 20 μL,柱温为 30 ℃。

2.1.2 杂质 I 采用 Agilent Microspher C₁₈ 色谱柱(100 mm×4.6 mm,3 μm),流动相 A 为水-磷酸盐缓冲液(pH 7.6)(每 1 000 mL 中含 0.005 2 mol 磷酸二氢钠与 0.032 mol 磷酸氢二钠)-乙腈(80:10:10),流动相 B 为乙腈-磷酸盐缓冲液(pH 7.6)-水(80:1:19),梯度洗脱(0~10 min,100% A→80% A; 10~30 min,80% A→0% A; 30~31 min,0% A→100% A; 31~45 min,100% A),流速为 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 302 nm,进样量为 20 μL,柱温为 30 ℃。

2.1.3 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶 采用 GL Inertsil ODS-3 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相 A 为 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液(pH 6.5),流动相 B 为乙腈,梯度洗脱(0~20 min,60% A; 20~21 min,60% A→20% A; 21~35 min,20% A; 35~36 min,20% A→60% A; 36~45 min,60% A),流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 265 nm,进样量为 20 μL,柱温为 30 ℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 杂质 E 取样品适量,精密称定,加 50% 乙腈溶液(稀释剂 1)溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 2.5 mg 的艾司奥美拉唑钠溶液,摇匀,作为杂质 E 供试品溶液。

精密称取杂质 E 对照品适量,用稀释剂 1 溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 1 μg 的溶液,摇匀,作为杂质 E 对照品储备液,精密量取 1.00 mL,置 10 mL 量瓶中,用稀释剂 1 稀释至刻度,摇匀,作为杂质

E 对照品溶液(0.1 μg·mL⁻¹)。

精密称取样品 25.00 mg,置 10 mL 量瓶中,加入杂质 E 对照品储备液 1 mL,用稀释剂 1 溶解并稀释至刻度,摇匀,作为杂质 E 系统适用性溶液。

2.2.2 杂质 I 取样品适量,精密称定,用流动相 A [水-磷酸盐缓冲液(pH 7.6)(每 1 000 mL 中含 0.005 2 mol 磷酸二氢钠与 0.032 mol 磷酸氢二钠)-乙腈(80:10:10)](稀释剂 2)溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 5 mg 的艾司奥美拉唑钠溶液,摇匀,作为杂质 I 供试品溶液。

另精密称取杂质 I 对照品适量,用稀释剂 2 溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 2 μg 的溶液,摇匀,作为杂质 I 对照品储备液,精密量取 1.00 mL,置 10 mL 量瓶中,用稀释剂 2 稀释至刻度,摇匀,作为杂质 I 对照品溶液(0.2 μg·mL⁻¹)。

精密称取样品 50.00 mg,置 10 mL 量瓶中,加入杂质 I 对照品储备液 1 mL,用稀释剂 2 溶解并稀释至刻度,摇匀,作为杂质 I 系统适用性溶液。

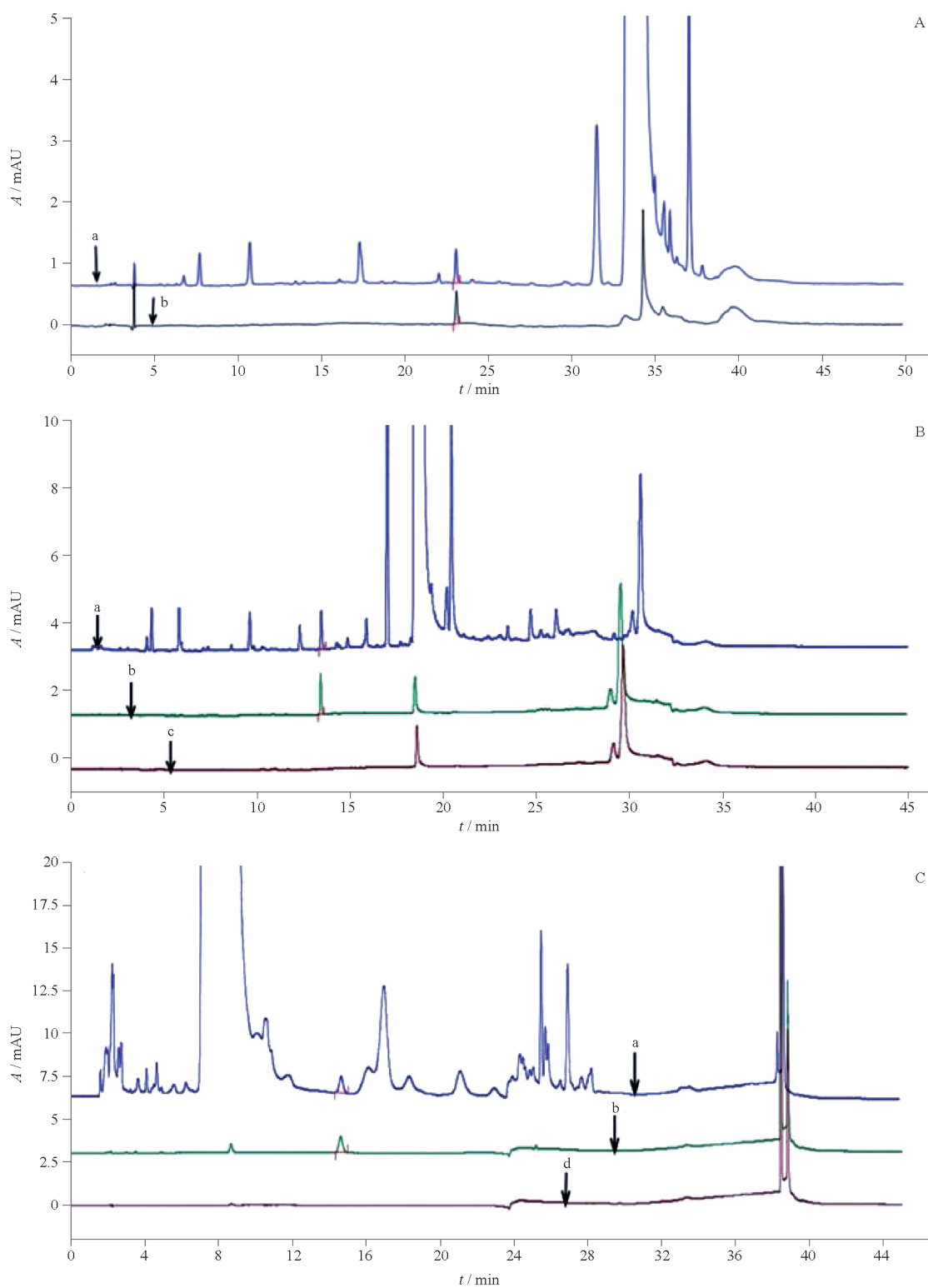
2.2.3 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶 取样品适量,精密称定,用 40% 乙腈溶液(稀释剂 3)溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 25 mg 的艾司奥美拉唑钠溶液,摇匀,作为 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶供试品溶液。

精密称取 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶对照品适量,用稀释剂 3 溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶 10 μg 的溶液,摇匀,作为 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶对照品储备液,精密量取 1.00 mL,置 10 mL 量瓶中,用稀释剂 3 稀释至刻度,摇匀,作为 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶对照品溶液(1 μg·mL⁻¹)。

精密称取样品 250.00 mg,置 10 mL 量瓶中,加入上述对照品储备液 1 mL,用稀释剂 3 溶解并稀释至刻度,摇匀,作为 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶系统适用性溶液。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性试验 取稀释剂 1~3,“2.2”项制备的 3 个成分的对照品溶液、供试品溶液和系统适用性溶液,分别按照拟定的色谱条件进行杂质定位。结果这 3 个杂质均能够很好地分离,系统适用性溶液样品中其他杂质均不干扰检测,色谱条件的专属性良好(图 1)。



a. 系统适用性溶液 (system applicability solution) b. 对照品溶液 (reference solution) c. 稀释剂 2 (solvent 2) d. 稀释剂 3 (solvent 3)
 A. 杂质 E (impurity E) B. 杂质 I (impurity I) C. 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶 (2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine)

图 1 专属色谱图

Fig. 1 Specific chromatograms

2.3.2 线性关系考察 取杂质 E 对照品适量,精密称定,分别用稀释剂 1 溶解并制成质量浓度为 0.025、0.05、0.08、0.10、0.15、0.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列浓度杂质 E 对照品溶液;取杂质 I 对照品适量,精密称定,分别用稀释剂 2 溶解并制成质量浓度为 0.02、0.04、0.10、0.15、0.20、0.30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列浓度杂质 I 对照品溶液;取 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-

甲氧基吡啉的对照品适量,精密称定,分别用稀释剂 3 溶解并制成质量浓度为 0.12、0.20、0.40、0.80、1.0、2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列浓度 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啉对照品溶液。按照“2.1”项的色谱条件分别进行测定,以溶液质量浓度 C ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标,相对应的峰面积 A 为纵坐标分别作图,进行线性回归,求得回归方程(表 1)。

表 1 3 个杂质的回归方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限

Tab. 1 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, quantitation limits and detection limits of 3 impurities

杂质 (impurity)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ/ ng	LOD/ ng	检出限度 (detection limit) * / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	进样量 (added)/ mg
杂质 E(impurity E)	$A = 47.6456C + 0.1586$	0.9995	0.0251 ~ 0.2007	0.50	0.15	3	0.05
杂质 I(impurity I)	$A = 49.625C + 0.1736$	0.9996	0.0202 ~ 0.3027	0.40	0.12	1.2	0.1
2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啉 (2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine)	$A = 18.1913C + 0.0117$	0.9998	0.1266 ~ 2.1100	2.53	0.84	1.7	0.5

注(note): * 检出限度 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) = 检测限 (μg) / 供试品溶液进样质量 (g) [detection limit ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) = detection limit (μg) / quality of sample solution (g)]

2.3.3 检测限和定量限 分别取杂质 E、杂质 I、2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啉的对照品溶液并逐步稀释进样,信噪比约 3:1 的浓度作为检测限,以信噪比约 10:1 的浓度作为定量限。结果见表 1。各色谱条件均能有效满足杂质检出的要求。

2.3.4 精密度考察 进样精密度:取 3 个杂质的对照品溶液,每种溶液分别连续进样 6 针,记录色谱图。杂质 E、杂质 I、2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啉峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 1.1%、2.3%、0.060%,表明进样精密度良好。

重复性试验:精密称取样品 25.00 mg,置 10 mL 量瓶中,加入杂质 E 对照品储备液 1 mL,用稀释剂 1 溶解并稀释至刻度,摇匀,平行制备 6 份,分别进样,记录色谱图,杂质 E 重复性试验回收率在 99.0%~101.2%,平均回收率为 100.1%,RSD ($n=6$) 为 0.98%;精密称取样品 50.00 mg,置 10 mL 量瓶中,加入杂质 I 对照品储备液 1 mL,用稀释剂 2 溶解并稀释至刻度,摇匀,平行制备 6 份,分别进样,记录色谱图,杂质 I 重复性试验回收率在 100.0%~103.2%,平均回收率为 102.0%,RSD ($n=6$) 为 1.2%;精密称取样品 250.00 mg,置 10 mL 量瓶中,加入 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啉对照

品储备液 1 mL,用稀释剂 3 溶解并稀释至刻度,摇匀,平行制备 6 份,分别进样,记录色谱图,2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啉重复性试验回收率在 97.0%~99.2%,平均回收率为 97.6%,RSD ($n=6$) 为 0.98%。结果表明测定方法的重复性均良好。

中间精密度试验:更换不同试验人员,按重复性试验方式进行测定,记录色谱图。杂质 E 中间精密度试验回收率 ($n=6$) 在 99.5%~101.8%,平均回收率为 100.5%,RSD ($n=6$) 为 0.97%;杂质 I 中间精密度试验回收率 ($n=6$) 在 100.5%~103.7%,平均回收率为 101.9%,RSD ($n=6$) 为 1.4%;2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啉中间精密度试验回收率 ($n=6$) 在 96.5%~100.8%,平均回收率为 98.0%,RSD ($n=6$) 为 1.6%。结果表明中间精密度均良好。

2.3.5 溶液稳定性 取“2.2”项下配制的各对照品溶液和各供试品溶液,按照“2.1”项下方法进样,测定 3 个杂质的峰面积以考察溶液稳定性。

杂质 E 对照品及供试品溶液分别于 0、2.5、10、14 h 进样,结果 14 h 内杂质 E 对照品溶液峰面积 RSD ($n=4$) 为 1.2%,供试品溶液 14 h 内均未检出杂质 E。表明杂质 E 对照品溶液与供试品溶液 14 h 内

稳定性良好。

杂质 I 对照品及供试品溶液分别于 0、2、4、8、12 h 进样,结果 12 h 内杂质 I 对照品溶液峰面积 RSD ($n=5$) 为 1.2%, 供试品溶液 12 h 内均未检出杂质 I。表明杂质 I 对照品溶液与供试品溶液 12 h 内稳定性良好。

2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶对照品及供试品溶液分别于 0、2、4、6、8 h 进样,结果 8 h 内 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶对照品溶液峰面积 RSD ($n=5$) 为 0.15%, 供试品溶液 8 h 内均未检出 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶。表明 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶对照品溶液与供试品溶液 8 h 内稳定性良好。

2.3.6 回收率试验 取杂质 E 对照品适量,精密称

定,用稀释剂 1 制成每 1 mL 中含杂质约 1 μg 的杂质 E 对照品溶液,再取样品 9 份,按 50%、100%、150% 限度浓度加入杂质 E 对照品溶液,进行杂质回收率试验;取杂质 I 对照品适量,精密称定,用稀释剂 2 制成每 1 mL 中含杂质约 2 μg 的杂质 I 对照品溶液,再取样品 9 份,按 50%、100%、150% 限度浓度加入杂质 I 对照品溶液,进行杂质回收率试验;取 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶对照品适量,精密称定,用稀释剂 3 制成每 1 mL 中含杂质约 10 μg 的 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶对照品溶液,再取样品 9 份,按 50%、100%、150% 限度浓度加入 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶对照品溶液,进行杂质回收率试验。结果见表 2。

表 2 3 个杂质回收率试验结果

Tab. 2 The recovery of the determination of 3 impurities

杂质 (impurity)	本底 (background)/ μg	加入量 (added)/ μg	测得值 (measured)/ μg	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (mean recovery)/ %	RSD ($n=9$)/ %
杂质 E (impurity E)	0	0.501 7	0.506 9	101.0	101.2	0.78
		1.003 4	1.024 6	102.1		
		1.505 2	1.513 8	100.6		
杂质 I (impurity I)	0	1.153 6	1.196 2	103.7	102.5	1.1
		2.307 0	2.359 8	102.3		
		3.460 6	3.508 4	101.4		
2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶 (2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine)	0	5.025 4	4.912 3	97.8	97.7	0.94
		10.050 8	9.918 1	98.7		
		15.076 2	14.595 3	96.8		

2.3.7 耐用性试验 采用 3 个色谱条件下系统适用性溶液的配制方式制备供试品溶液,以“2.1”项的色谱条件为基础,进行部分调整(表 3),用以考察色谱条件微小变化下杂质的回收率情况。色谱条件部分微调后,杂质 E 回收率均在 98.8%~100.2%, 杂质 I 回收率均在 100.8%~103.2%, 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶回收率均在 97.2%~98.4%, 表明耐用性良好。

2.4 样品测定

按照“2.1”色谱条件,对多批样品(批号 170601、170701、070702、C037-220006)进行测定,记录色谱图,结果多批样品中均未检出杂质 E、杂质 I、2-氯甲

基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

本研究通过对流动相组成、pH、洗脱方式及色谱柱的筛选来确定杂质检测的色谱条件,在确定检测杂质 E 的色谱条件时,探索了 3 种色谱条件,但以 Waters Symmetry C_{18} 为色谱柱,水或者 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾缓冲液为流动相 A 时不能很好地分离杂质峰和样品峰,故而选择 YMC-Triart C_{18} 色谱柱, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾缓冲液作为流动相 A,可以实现样品与杂质 E 的良好分离,且稀释剂 1 与样品中其他杂质不干扰杂质 E 的测定。在确定检测

表 3 耐用性色谱条件参数
Tab. 3 Chromatographic condition parameter

杂质 (impurity)	色谱参数 (chromatographic parameter)	原条件 (primary condition)	变动范围 (range of variation)
杂质 E(impurity E)	流速(velocity of flow)/(mL · min ⁻¹)	1.0	0.9、1.1
	柱温(column temperature)/°C	30	25、35
	流动相 pH(pH of mobile phase)	7.6	7.4、7.8
杂质 I(impurity I)	流速(velocity of flow)/(mL · min ⁻¹)	1.0	0.9、1.1
	柱温(column temperature)/°C	30	25、35
2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶 (2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine)	流速(velocity of flow)/(mL · min ⁻¹)	1.0	0.9、1.1
	柱温(column temperature)/°C	30	28、32
	流动相 pH(pH of mobile phase)	6.5	6.4、6.6

2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶的色谱条件时,发现梯度洗脱比等度洗脱相能更好分离样品与杂质,稀释剂 3 及样品中其他杂质不干扰 2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶的测定。

3.2 波长选择

在选择测定波长时,取杂质对照品溶液采用高效液相色谱仪(HPLC-DAD)在 190~400 nm 波长处进行测定,记录色谱图,通过紫外光谱确定各个杂质的吸收波长,发现杂质 E 和杂质 I 在 302 nm 处有较大吸收,2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶在 265 nm 处有较大吸收,因此将这这几个波长作为相应杂质的检测波长。

3.3 小结

本研究采用高效液相色谱法,对杂质 E、杂质 I、2-氯甲基-3,5-二甲基-4-甲氧基吡啶进行检测,为了确定方法的可靠性,进行了专属性试验、线性考察、中间精密度试验、检测限和定量限确定、准确度试验和耐用性试验,该方法具有重现性好、精密度高、准确度高、线性良好等优点,并且比质谱法操作更加简单,可以用于药品的杂质检测和质量控制,保证药品质量安全。

参考文献

- [1] 支旭然,宋浩静,王冕,等.注射用艾司奥美拉唑钠配伍稳定性考察[J].中国现代应用药学,2017,34(12):1727
ZHI XR, SONG HJ, WANG M, *et al.* Compatibility stability of esomeprazole sodium for injection[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2017, 34(12): 1727
- [2] 薄晓文,沈永,孟凯,等.注射用艾司奥美拉唑钠丁基橡胶塞中抗氧化剂 BHT 及其氧化产物迁移量的测定[J].药物分析杂

志,2020,40(10):1863

BO XW, SHEN Y, MENG K, *et al.* Determination of antioxidant BHT and its oxidation product migration in esomeprazole sodium butyl rubber stoppers for injection[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2020, 40(10): 1863

- [3] 矫冬梅,孙敬蒙,王丹,等.艾司奥美拉唑钠肠溶固体分散体片的制备及表征[J].中国药理学杂志,2021,56(13):1083
JIAO DM, SUN JM, WANG D, *et al.* Preparation and characterization of esomeprazole sodium enteric-coated solid dispersion tablets[J]. *Chin Pharm J*, 2021, 56(13): 1083
- [4] 肖术平,郑超.艾司奥美拉唑钠改善重症急性胰腺炎患者肠黏膜屏障功能的临床效果研究[J].现代医药卫生,2022,38(18):3187
XIAO SP, ZHENG C. Clinical efficacy of esomeprazole sodium in improving intestinal mucosal barrier function in patients with severe acute pancreatitis[J]. *Mod Med Heal*, 2022, 38(18): 3187
- [5] 陈祥峰,龚昌凯,刘志朋.艾司奥美拉唑钠两种磺类杂质的一锅法合成研究[J].中国药物化学杂志,2019,29(1):49
CHEN XF, GONG CK, LIU ZP. One-pot synthesis of two sulfone impurities in esomeprazole sodium[J]. *Chin J Med Chem*, 2019, 29(1): 49
- [6] 宗在伟,龚昌凯,刘志朋,等.艾司奥美拉唑钠有关物质的合成[J].中国药物化学杂志,2019,29(4):297
ZONG ZW, GONG CK, LIU ZP, *et al.* Synthesis of the impurities of esomeprazole sodium[J]. *Chin J Med Chem*, 2019, 29(4): 297
- [7] 张雪宁,张利敏,张静,等.UPLC-MS/MS法测定注射用埃索美拉唑钠的含量[J].中国药房,2016,27(27):3852
ZHANG XN, ZHANG LM, ZHANG J, *et al.* Contents determination of esomeprazole sodium for injection by UPLC-MS/MS[J]. *China Pharm*, 2016, 27(27): 3852
- [8] 王雪芹,张竞,王倩,等.LC-MS/MS法同时测定艾司奥美拉唑钠中3个杂质[J].药物分析杂志,2019,39(7):1302
WANG XQ, ZHANG J, WANG Q, *et al.* Determination of three

- impurities in esomeprazole sodium by LC - MS/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(7): 1302
- [9] 刘克锋, 刘宇, 王雪芹, 等. LC - MS/MS 法同时测定艾司奥美拉唑钠原料药及其制剂中 3 种杂质的含量[J]. *中国药房*, 2019, 30(6): 775
- LIU KF, LIU Y, WANG XQ, *et al.* Simultaneous determination of 3 impurities in crude drug and preparation of esomeprazole sodium by LC - MS/MS[J]. *China Pharm*, 2019, 30(6): 775
- [10] 张慧敏, 林建群, 冯康彪, 等. 药品中遗传毒性杂质的评估和控制[J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(9): 1160
- ZHANG HM, LIN JQ, FENG KB, *et al.* Evaluation and control of genotoxic impurities in drugs[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2014, 31(9): 1160
- [11] 朱玲, 胡楚红, 朱叶芬, 等. 左旋泮托拉唑钠中基因毒性杂质的 LC - MS/MS 测定方法[J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(12): 2115
- ZHU L, HU CH, ZHU YF, *et al.* Determination of potential genotoxic impurities in S - pantoprazole sodium by LC - MS/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(12): 2115
- [12] 陈雪帆, 许配玉, 陈爽. GC - MS 法测定兰索拉唑原料中基因毒性杂质二氯亚砷[J]. *中国药师*, 2020, 23(7): 1461
- CHEN XF, XU PY, CHEN S. Determination of the genotoxic impurity thionyl chloride in lansoprazole raw material by GC - MS[J]. *China Pharm*, 2020, 23(7): 1461
- [13] 中华人民共和国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020: 143
- ChP 2020. Vol II [S]. 2020: 143
- [14] ICH. Multidisciplinary Guidelines M7(R2): Addendum to M7: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk Assessment[EB/OL]. Montreal, Canada: ICH Assembly Meeting [2021 - 10 - 06]. <https://www.ich.org/page/multidisciplinary-guidelines>
- [15] 李锐, 徐金梅, 孙卫东, 等. 高效液相色谱 - 四极杆/线性离子阱质谱法同时测定艾司奥美拉唑钠中 2 种潜在基因毒性杂质残留[J]. *分析测试学报*, 2019, 38(4): 449
- LI R, XU JM, SUN WD, *et al.* Simultaneous determination of two potentially genotoxicity impurities residues in esomeprazole sodium by high performance liquid chromatography quadrupole/linear ion hydrazine mass spectrometry[J]. *J Instrum Anal*, 2019, 38(4): 449
- [16] 王璐, 刘峰. LC - MS/MS 测定艾司奥美拉唑钠中潜在基因毒性杂质 2 - 氯甲基 - 3,5 - 二甲基 - 4 - 甲氧基吡啶[J]. *中国药师*, 2021, 24(2): 399
- WANG L, LIU F. Determination of potential genotoxic impurity 2 - chloromethyl - 4 - methoxy - 3,5 - dimethylpyridine in esomeprazole sodium by LC - MS/MS[J]. *China Pharm*, 2021, 24(2): 399

(本文于 2023 年 2 月 11 日收到)