在线固相萃取 - 高效液相色谱法测定兰索拉唑中 7 种氮氧化物基因毒性杂质

赵建辉[1]，马壹文[1]，李士桥[2]，潘红娟[1]*

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 蚌埠丰原医药科技发展有限公司，安徽蚌埠 233010）

摘要：建立了在线固相萃取 - 高效液相色谱 - 二极管阵列检测法测定兰索拉唑（**1**）原料药及其制剂中 7 种氮氧化物基因毒性杂质［兰索拉唑氮氧化物（**2**）、兰索拉唑氮氧砜（**3**）、兰索拉唑氮氧硫醚（**4**）、兰索拉唑杂质 G（**5**）、2,3- 二甲基 -4-（2,2,2- 三氟乙基）吡啶 -*N*- 氧化物（**6**）、2,3- 二甲基 -4- 硝基吡啶 -*N*- 氧化物（**7**）和 2,3- 二甲基吡啶 -*N*- 氧化物（**8**）］。在线固相萃取柱采用 XB-C_{18} 柱（4.6 mm×50 mm，4.6 μm），分析柱为 XB-C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，4.6 μm），通过六通阀切换实现样品的去除。流动相 A 为 15 mmol/L 磷酸氢二钾溶液，B 为甲醇，梯度洗脱。采用多波长对 7 个杂质进行分析（**2**、**3**、**4**、**5** 为 285 nm，**6** 和 **8** 为 260 nm，**7** 为 310 nm）。结果显示，7 种杂质之间分离度均符合要求，并在相应浓度范围内线性关系良好。7 种杂质的定量限和检测限分别为 4 和 2 μg/g。本法重复性与准确度良好，为 **1** 原料药及其制剂的质量控制提供了参考。

关键词：兰索拉唑；氮氧化物；基因毒性杂质；在线固相萃取；高效液相色谱

中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）01-0101-07

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.01.011

Determination of Seven Nitrogen Oxide Genotoxic Impurities in Lansoprazole by Online SPE-HPLC

ZHAO Jianhui[1], MA Yiwen[1], LI Shiqiao[2], PAN Hongjuan[1]*

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203;*
2. Bengbu BBCA Pharmaceutical Scientific Development Co., Ltd., Bengbu 233010)

ABSTRACT: An online solid phase extraction (SPE)-high performance liquid chromatography (HPLC)-diode array detection (DAD) method was established for the determination of seven nitrogen oxide genotoxic impurities in lansoprazole (**1**) and its preparations, namely lansoprazole *N*-oxide (**2**), lansoprazole sulfone *N*-oxide (**3**), lansoprazole sulphide *N*-oxide (**4**), lansoprazole impurity G (**5**), 2,3-dimethyl-4-(2,2,2-trifluoroethyl)pyridine-*N*-oxide (**6**), 2,3-dimethyl-4-nitropyridine-*N*-oxide (**7**) and 2,3-dimethylpyridine-*N*-oxide (**8**). The XB-C_{18} online SPE column (4.6 mm×50 mm, 4.6 μm) was used, and the analytical column was XB-C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 4.6 μm). And the sample was removed by switching the six-way valve. The analysis was carried out in the gradient elution mode with 15 mmol/L dipotassium hydrogen phosphate solution as mobile phase A, and methanol as mobile phase B. Seven impurities were detected with multiple wavelengths, 285 nm for **2**, **3**, **4** and **5**, 260 nm for **6** and **8**, and 310 nm for **7**. The results showed that the separation among the seven impurities all met the requirements, and it was linear for **2** − **8** in the corresponding concentration range. The limits of quantification and detection of the seven impurities were 4 and 2 μg/g, respectively. This method had good repeatability and accuracy, which provided a reference for the quality control of **1** and its preparations.

Key Words: lansoprazole; nitrogen oxide; genotoxic impurity; online solid phase extraction (SPE); HPLC

收稿日期：2021-01-21

作者简介：赵建辉（1997—），男，硕士研究生，专业方向：药品质量研究。

E-mail：624416491@qq.com

通信作者：潘红娟（1976—），女，研究员，从事药品质量分析、质量控制研究以及新技术新方法在药物分析上的应用研究。

Tel：021-20572123

E-mail：panhongjuan@sinopharm.com

兰索拉唑（lansoprazole，**1**）为第二代质子泵抑制剂，能够抑制胃酸分泌，是治疗因幽门螺杆菌引起的消化道溃疡的首选药物[1—2]。氮氧化物可以破坏人体免疫系统功能，引发免疫系统疾病，是一类具有遗传毒性和致癌性的物质[3]。欧洲药典（EP 9.3）

中介绍了 **1** 的杂质 A ～ F，其中杂质 A 即兰索拉唑氮氧化物（**2**）的规定限度为 0.1%。此外，本研究还加入了新的 6 种氮氧化物杂质，即兰索拉唑氮氧砜（**3**）、兰索拉唑氮氧硫醚（**4**）、兰索拉唑杂质 G（**5**）、2,3- 二甲基 -4-（2,2,2- 三氟乙基）吡啶 -*N*- 氧化物（**6**）、2,3- 二甲基 -4- 硝基吡啶 -*N*- 氧化物（**7**）和 2,3- 二甲基吡啶 -*N*- 氧化物（**8**），并对其进行系统分析。这 7 种杂质均为 **1** 及其合成中间体的 *N*- 氧化物，结构见图 1。

在线固相萃取（online solid phase extraction，online SPE）将传统固相萃取技术转移为在线处理过程，能实现自动净化浓缩。样品溶液经过萃取柱一次分离后，可以去除样品或部分干扰杂质，从而保护分析柱并提高分离度；还可以增大进样量将待测物富集在萃取柱上，通过管路切换再将其洗脱到分析柱中进行分析，从而提高灵敏度，节省操作时间，整个过程封闭操作，能够减少样品污染和降解、减少操作引起的误差，从而提高方法重复性、减少有机试剂消耗等[4]。

目前对于 **1** 中氮氧化物杂质常见的分析方法有液相色谱 - 紫外（LC-UV）法和液相色谱 - 质谱（LC-MS）法。张晓睿等通过直接进样 LC-UV 法测定 **1** 肠溶片中 13 种有关物质，其中氮氧化物类杂质 LOQ 仅为 300 μg/g[5]。杜益等建立了 LC-MS 法测定 **1** 中 3 种氮氧化物杂质，并对其进行了毒性预测，根据杂质半数中毒量（TD_{50}）、用药量以及用药周期进行计算，将杂质限度定为 25 μg/g[6]。已有研究采用的直接进样 LC-UV 法灵敏度较低；而 LC-MS 法虽灵敏度高，但因方法要求高，且仪器贵重，不易普及。

本研究采用在线固相萃取去除 **1** 样品及富集杂质，通过分析柱分析达到杂质分离，建立了多波长高效液相色谱 - 二极管阵列检测（HPLC-DAD）法测定 **1** 原料药、**1** 肠溶片、**1** 胶囊和注射用 **1** 中的 7

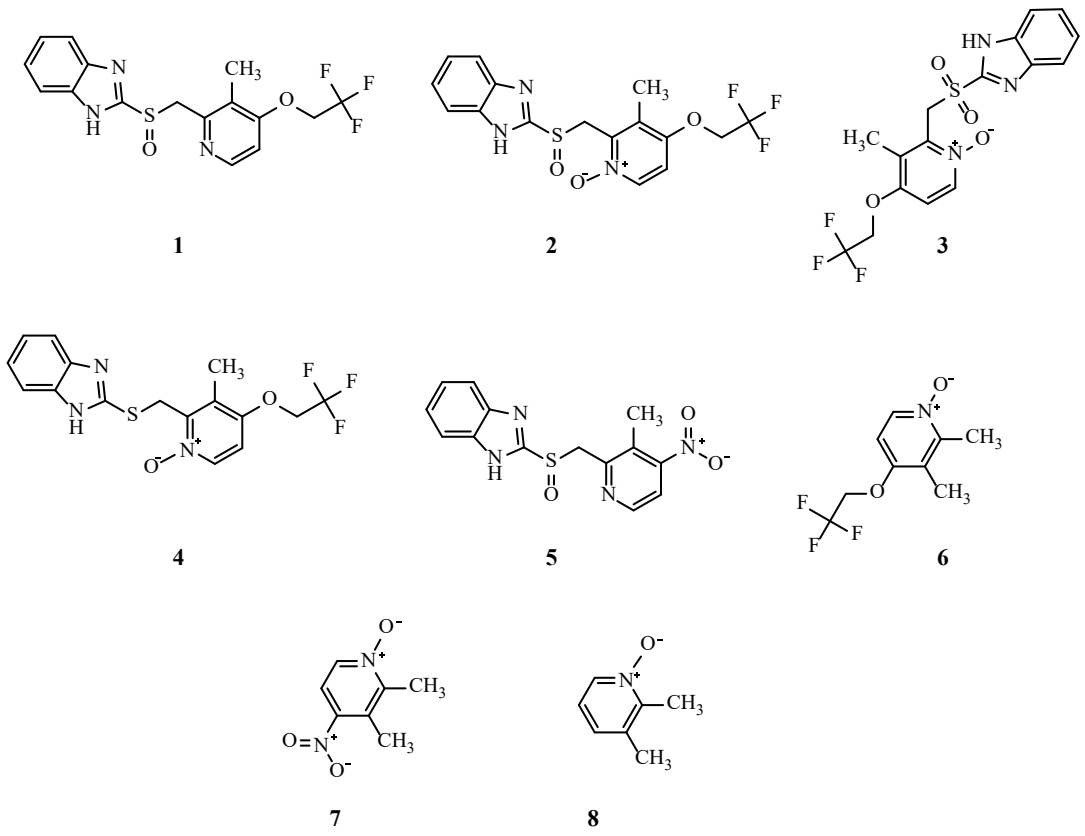


图 1　1 及 7 种氮氧化物杂质的化学结构式

Fig.1　Chemical Structures of **1** and Seven Nitrogen Oxide Impurities

种氮氧化物杂质，以期为**1**原料药及其制剂的生产质量控制提供参考。

1 仪器与试药

Dionex Ultimate 3000型高效液相色谱仪（双三元泵体系，配置DAD和六通阀，美国Thermo Fisher公司）；PHC-24R型圆形水浴氮吹仪（上海月旭科技有限公司）；0.22 μm有机相针式过滤器（上海安谱实验科技股份有限公司）；XP250型分析天平和XP6型分析天平均购于瑞士Mettler Toledo公司。

1原料药（批号P211-1811001）和注射用**1**（规格30 mg，批号171220-1）均购于安徽丰原药业有限公司；**1**胶囊（湖北潜龙药业有限公司，规格30 mg，批号190108）；**1**肠溶片（康普药业股份有限公司，规格15 mg，批号191002）；**2**对照品（中国食品药品检定研究院，含量100 %，批号510046-201401）；**3**（含量99.3 %，批号76181）、**4**（含量99.5%，批号76196）、**6**（含量99.5%，批号L-0910）和**8**（含量99.2%，批号223-003）的对照品均购于上海科维化学技术有限公司；**5**对照品（加拿大TRC公司，含量100%，批号3-ACM-55-1）；**7**对照品（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，含量97.7%，批号F1701084）；氢氧化钠、磷酸氢二钾为分析纯，二氯甲烷、甲醇为色谱纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

在线固相萃取柱XB-C_{18}柱（4.6 mm×50 mm，4.6 μm）；分析柱XB-C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，4.6 μm）；流动相A为15 mmol/L磷酸氢二钾溶液（用氢氧化钾溶液调至pH 7.0），B为甲醇，梯度洗脱，阀切换程序为：左泵为0—37 min，A 50%；37—40 min，A 50%—35%；40—50 min，A 35%，右泵为0—5 min，A 80%；5—20 min，A 80%—50%；20—22 min，A 50%；22—25 min，A 50%—45%；25—37 min，A 45%；37—40 min，A 45%—35%；40—50 min，A 35 %；流速 左泵为0—21 min，0；21—22 min，0—0.8 ml/min；22—27.5 min，0.8 ml/min；27.5—27.6 min，0.8—0 ml/min；27.6—37 min，0；37—37.1 min，0—0.8 ml/min；37.1—50 min，0.8 ml/min，右泵为0.8 ml/min；柱温30 ℃；检测波长**2**、**3**、**4**、**5**为285 nm，**6**和**8**为260 nm，**7**为310 nm；进样量50 μl；六通管路连接方式见图2，六通阀切换程序为0 min，位置6-1；22 min，位置1-2；35 min，位置6-1；37 min，位置1-2。

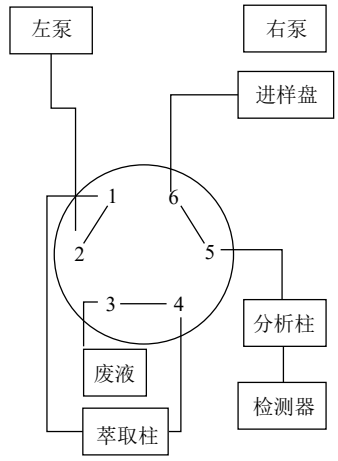


图2 管路连接图

Fig.2 Pipeline Connection

2.2 样品前处理

精密称取供试品适量（含**1** 10 mg），置试管中，加入二氯甲烷10 ml使溶解，超声提取1 min，静置后取上清液离心（694×*g*）5 min，精密量取上清液5 ml，氮吹至干，用空白溶剂［即0.05 mol/L氢氧化钠溶液∶甲醇（80 ∶ 20）］1 ml复溶，经0.22 μm有机滤膜过滤后，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析。

2.3 溶液配制

对照品贮备液：精密称取**2**、**3**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**对照品各1 mg，分别置10 ml量瓶中，用甲醇溶解并定容，混匀即得**2**、**3**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**对照品贮备液。

混合对照品贮备液：精密量取**2**、**3**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**对照品贮备液各1 ml，置10 ml量瓶中，加入甲醇定容，混匀即得混合对照品贮备液。

混合对照品溶液：精密量取混合对照品贮备液0.5 ml，置50 ml量瓶中，用空白溶剂定容，摇匀即得混合对照品溶液。

1原料药供试品溶液：精密称取**1**原料药10 mg，置试管中，按“**2.2**”项下方法处理，即得**1**原料药

供试品溶液。

1 制剂供试品溶液：分别精密称取 **1** 肠溶片、**1** 胶囊、注射用 **1** 适量（含 **1** 10 mg），置试管中，按“**2.2**”项下方法处理，即得 3 种 **1** 制剂供试品溶液。

系统适用性溶液Ⅰ：精密称取 **1** 原料药 10 mg 和混合对照品贮备液 20 μl，置试管中，按“**2.2**”项下方法处理，即得系统适用性溶液Ⅰ。

系统适用性溶液Ⅱ～Ⅳ：分别精密称取 **1** 肠溶片、**1** 胶囊、注射用 **1** 适量（含 **1** 10 mg）和混合对照品贮备液 20 μl，置试管中，按“**2.2**”项下方法处理，即得系统适用性溶液Ⅱ～Ⅳ。

2.4 专属性试验

取空白溶剂和“**2.3**”项下的混合对照品溶液、**1** 原料药供试品溶液、**1** 肠溶片供试品溶液和系统适用性溶液Ⅰ和Ⅱ，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析。结果见图 3 ～ 5，可见空白溶剂和供试品溶液对 **2** ～ **8** 的测定无干扰，理论塔板数以 **2** 计大于 2 000，**1** 原料药和 **1** 肠溶片中均有 **2** 检出，各峰分离度良好。

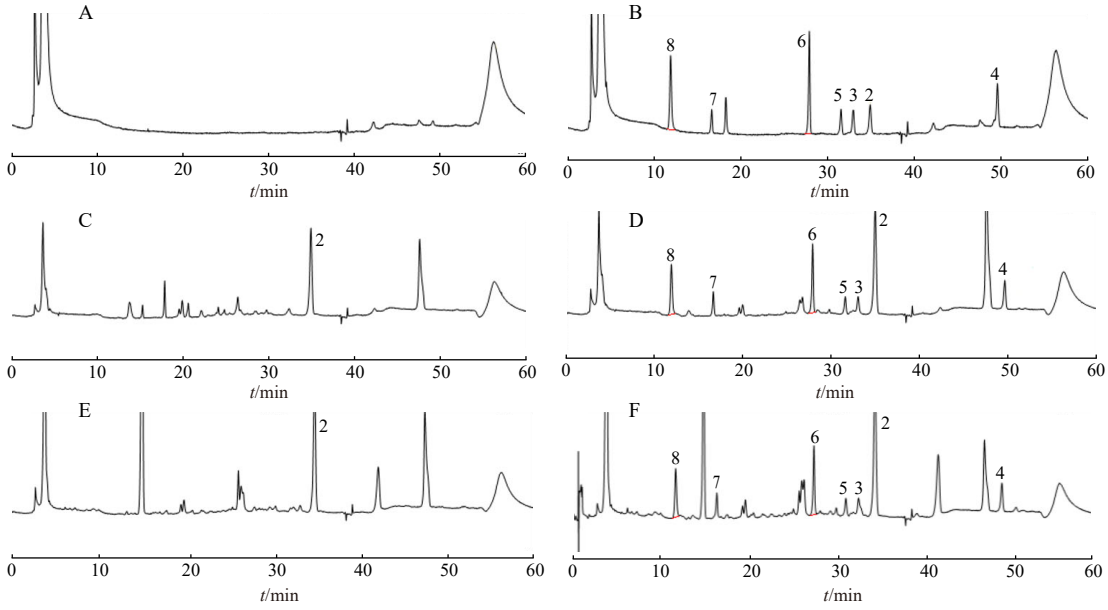
2.5 线性试验、定量限和检测限

取“**2.3**”项下混合对照品贮备液，用空白溶剂逐级稀释成含 **2** ～ **8** 分别为 0.2、0.1、0.08、0.05、0.02 μg/ml 的溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析。以峰面积（*A*）为纵坐标、质量浓度（*c*）为横坐标绘制标准曲线，所得线性回归方程及相关系数见表 1，说明 **2** ～ **8** 在 0.2 ～ 0.02 μg/ml 内，线性关系良好。

另取“**2.3**”项下混合对照品溶液，用空白溶剂逐级稀释，以信噪比（*S*/*N*）为 10 和 3 时的结果为定量限（LOQ）和检测限（LOD）。结果显示，**2** ～ **8** 的 LOD 均为 2 μg/g，LOQ 均为 4 μg/g。

2.6 加样回收率和重复性试验

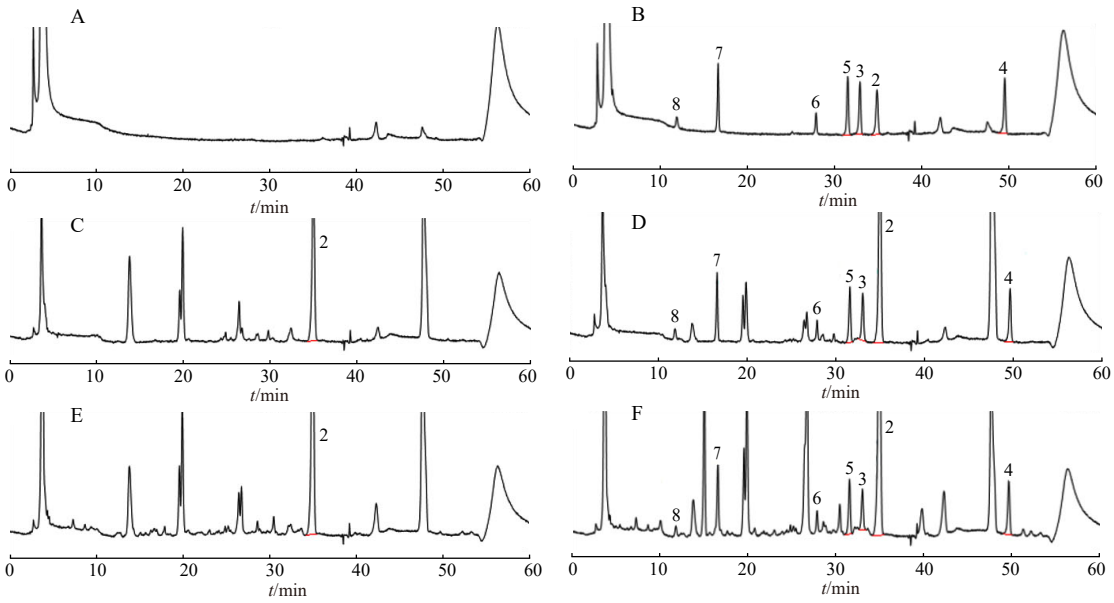
精密称取 **1** 原料药、**1** 肠溶片、**1** 胶囊（含 **1** 10 mg），分别加入“**2.3**”项下混合对照品贮备液 4、16、20、24 μl，按“**2.2**”项下方法进行前处理，制得 4 个加标浓度（LOQ、80%、100%、120%）的溶液，每个浓度平行配制 3 份，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，根据结果计算回收率。由于 **1** 原料药、**1** 肠溶片和 **1** 胶囊中 **2** 的检出浓度超过线性范



A：空白溶剂，B：混合对照品溶液，C：**1** 原料药供试品溶液，D：系统适用性溶液Ⅰ，
E：**1** 肠溶片供试品溶液，F：系统适用性溶液Ⅱ
2－**2**；3－**3**；4－**4**；5－**5**；6－**6**；7－**7**；8－**8**

图 3　260 nm 专属性色谱图（杂质 **6**、**8**）

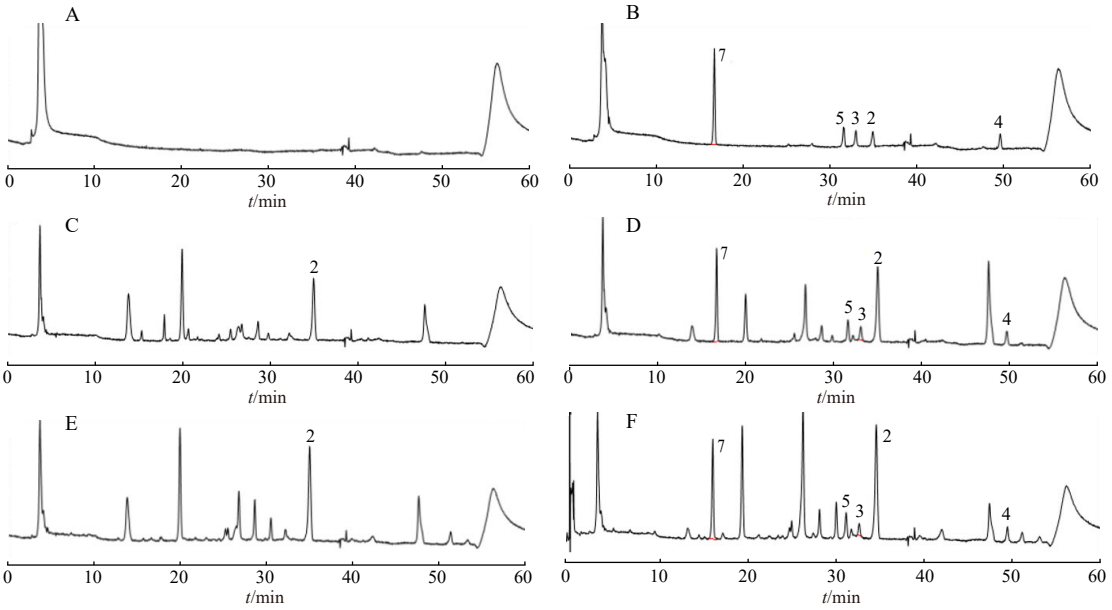
Fig3　Specific Chromatograms at 260 nm (Impurities **6** and **8**)



A：空白溶剂，B：混合对照品溶液，C：**1** 原料药供试品溶液，D：系统适用性溶液Ⅰ，
E：**1** 肠溶片供试品溶液，F：系统适用性溶液Ⅱ
2－**2**；3－**3**；4－**4**；5－**5**；6－**6**；7－**7**；8－**8**

图 4　285 nm 专属性色谱图（杂质 2、3、4、5）

Fig.4　Specific Chromatograms at 285 nm (Impurities **2**, **3**, **4**, **5**)



A：空白溶剂，B：混合对照品溶液，C：**1** 原料药供试品溶液，D：系统适用性溶液Ⅰ，
E：**1** 肠溶片供试品溶液，F：系统适用性溶液Ⅱ
2－**2**；3－**3**；4－**4**；5－**5**；7－**7**

图 5　310 nm 专属性色谱图（杂质 7）

Fig.5　Specific Chromatograms at 310 nm (Impurity **7**)

表 1　线性试验结果

Tab.1　Results of Linearity Test

化合物	线性方程	*r*
2	*A*=3.413 5*c* − 0.012 8	0.998 2
3	*A*=3.351 5*c* − 0.012 1	0.999 5
4	*A*=3.725 3*c* − 0.014 4	0.999 3
5	*A*=3.403 7*c* − 0.007 2	0.998 4
6	*A*=6.156 9*c* − 0.019 1	0.998 6
7	*A*=4.157 8*c* − 0.016 3	0.998 5
8	*A*=6.078 1*c* − 0.035 6	0.998 1

围，故需降低供试品浓度进行杂质 **2** 的回收率试验，配制时精密称取 **1** 原料药、**1** 肠溶片、**1** 胶囊适量（含 **1** 1.5 mg），其他步骤同上。结果表明，**1** 原料药中 **2** ～ **8** 的平均回收率（*n*=9）分别为 102.2％、99.5 ％、102.3 ％、99.7 ％、102.1 ％、102.4 ％、105.6％，RSD 为 5.7％～ 9.2％；**1** 肠溶片中 **2** ～ **8** 的平均回收率（*n*=9）分别为 110.7％、91.7％、112.0%、101.7%、106.8%、114.0%、96.4%，RSD 为3.3%～10.4%；**1** 胶囊中 **2** ～ **8** 的平均回收率（*n*=9）分别为 110.8%、96.1%、97.5%、97.0%、90.1%、106.7%、92.6%，RSD 为 8.0%～ 12.0%，说明测定方法准确度高。

精密称取注射用 **1** 适量（含 **1** 10 mg），加入“**2.3**”项下混合对照品贮备液 20 μl，按“**2.2**”项下方法进行样品前处理，制得重复性试验溶液，平行配制 6 份，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，根据结果计算回收率。结果表明，**2** ～ **8** 的平均回收率（*n*=6）分别为 96.0％、97.5％、99.7％、98.7％、96.6％、100.9 ％和 102.9 ％，RSD 分别为 12.7 ％、7.8 ％、10.6%、11.6%、10.2%、9.3%和 9.4%，说明本方法重复性较好。

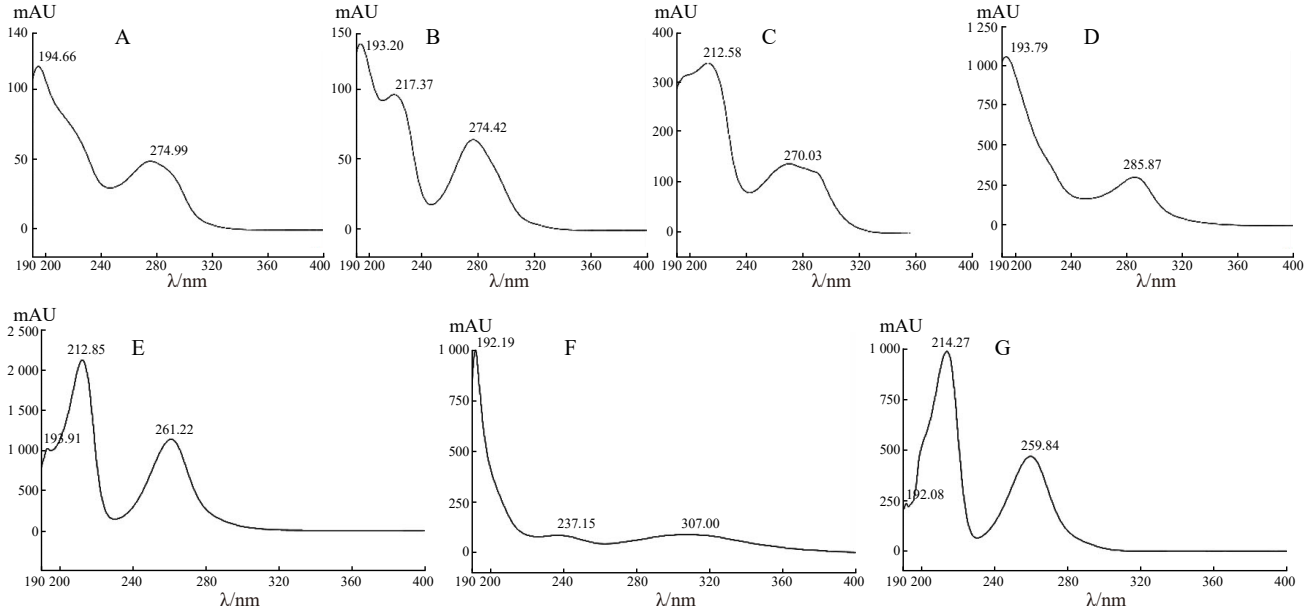
2.7　样品测定

精密称取 **1** 原料药、**1** 肠溶片、**1** 胶囊、注射用 **1** 适量（含 **1** 10 mg），置试管中，按“**2.2**”项下方法进行样品前处理，即得样品溶液，每种样品平行配制 2 份，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析。结果显示，除 **2** 和 **5** 有检出外，**3**、**4**、**6**、**7** 和 **8** 均未检出；**2** 在 **1** 胶囊、**1** 肠溶片和 **1** 原料药中均有检出，含量分别为 60.6、158.1、92.4 μg/g；**5** 在 **1** 胶囊和注射用 **1** 中有检出，含量均在 LOQ 以下。

3　讨论

本研究采用 C_{18} 柱对氮氧化物杂质进行分析，可实现各杂质之间以及杂质与 **1** 之间的基线分离。**1** 的最大服药量为 60 mg/d，根据氮氧化物毒理学数据以及人用药品技术要求国际协调理事会指南（ICH-M7）中的规定进行计算，**1** 中氮氧化物杂质的限度推荐为 25 μg/g[7]，然而直接进样分析时，氮氧化物杂质在紫外检测器中的响应难以达到此限度，因此需提高样品 **1** 溶解度或增大进样量来提高氮氧化物杂质在紫外检测器中的响应。此外，要考虑到溶剂效应随着进样量的增加而增强的影响。综上所述，选择 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液：甲醇（80 ： 20）作为空白溶剂。试验过程中观察到，直接在分析柱中增大进样量，会使样品峰超载且拖尾严重，对其他杂质产生明显干扰，因此本研究采用 Online SPE-HPLC-DAD 法，在提高方法灵敏度的基础上，保证了各杂质的分离度满足要求，同时因去除了样品，避免超载样品进入分析柱，从而保护了色谱柱。本研究在 285 nm 下测定 **2**、**3**、**4**、**5**，在 260 nm 下测定 **6**、**8**，在 310 nm 下测定 **7**，进一步提高了方法灵敏度，各杂质的全波长扫描图见图 6。

在线固相萃取是由 2 个泵和六通阀组成的管路系统，阀位置为 6-1 时，萃取柱与分析柱为串联状态；阀位置为 1-2 时，萃取柱和分析柱断开，可独立运行。运行步骤为：①平衡色谱柱，左泵和右泵分别平衡萃取柱和分析柱；②样品进样和主成分前杂质洗脱，阀位置为 6-1 时，右泵将样品带入萃取柱分离，出峰顺序依次为 **8**、**7**、**6**、**5**、**3**、**2**、**1**、**4**，待杂质 **2** 完全洗脱至串联的分析柱后，改变阀位置为 1-2；③主成分 **1** 的去除，左泵将萃取柱主成分 **1** 洗脱至废液（约 2 min），此时杂质 **4** 未洗脱，流速降至 0；④杂质 **4** 的洗脱，改变阀位置为 6-1，右泵继续将萃取柱中的 **4** 洗脱至分析柱；⑤清洗平衡色谱柱，最后将阀位置调整为 1-2，左泵冲洗萃取柱待用。通过在线固相萃取提高进样量至 50 μl，并在线去除样品、富集杂质，既减小了高进样量对待测杂质的影响，又避免了高浓度样品进入分析柱对其造成损



A：**2**，B：**3**，C：**4**，D：**5**，E：**6**，F：**7**，G：**8**

图 6 杂质 DAD 图

Fig6 DAD Diagrams of Impurities

害，方法灵敏度与专属性都有显著提高。

在研究 **1** 制剂产品时发现辅料干扰严重，且不同制剂辅料干扰不同，所以采用二氯甲烷溶解供试品，离心去除其中的不溶物质，再通过氮吹去除二氯甲烷。该前处理方法可有效减少制剂样品中的干扰物质，提高方法专属性。此外，为考察样品基质对方法回收率和重复性的影响，回收率试验分别选择原料药和辅料干扰较为严重的 **1** 肠溶片和 **1** 胶囊作为样品，重复性试验选择注射用 **1** 作为样品，结果显示各杂质的平均回收率（n=9）为 90.1%～114.0%，RSD 为 3.3%～12.0%，未见明显的影响。**2** 在 **1** 胶囊、**1** 肠溶片和 **1** 原料药中均有检出，含量分别为 60.6、158.1、92.4 μg/g，均超过推荐限度 25 μg/g，建议进一步优化工艺路线并深入评估制剂产品的安全性。

参考文献：

[1] 徐宝财, 刘家胜, 周雅文. 苯并咪唑类质子泵抑制剂的合成研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2008, **16**(20): 28-31.

[2] 陈汉卿, 林 琪. 质子泵抑制剂抗炎抗氧化作用研究进展[J]. 现代实用医学, 2013, **25**(3): 356-358.

[3] 肖 飞. 氮氧化物的危害及其卫生检测方法研究[J]. 检验检疫学刊, 2020, **30**(2): 95-97.

[4] 梁艳珊. 在线萃取-色谱质谱联用系统及其在药物和兴奋剂测定中的应用[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2019.

[5] 张晓睿, 何仲贵. HPLC法测定兰索拉唑肠溶片中13种有关物质[J]. 沈阳药科大学学报, 2020, **37**(7): 603-610.

[6] 杜 益, 张 营, 汪玉馨, 等. 右兰索拉唑*N*-氧化物杂质测定及毒性分析[J]. 中国药品标准, 2018, **19**(1): 32-37.

[7] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Assessment and control of DNA reactive(mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [EB/OL]. http://www. ich. org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_R1_Addendum_Step_4_2017_0031. pdf.