雷贝拉唑钠肠溶片有关物质的检测方法研究

刘　茜，宋冬梅，江文明，乐　健*

（上海市食品药品检验研究院，国家药品监督管理局化学药品制剂质量分析重点实验室，上海 201203）

摘要：建立了 HPLC 法测定雷贝拉唑钠（**1**）肠溶片中的有关物质，即美国药典（USP 40）收录的杂质 A ～ F。色谱柱采用 Thermo Hypersil BDS C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相 A 为乙腈：4.35 g/L 磷酸氢二钾溶液（用磷酸调至 pH 7.0）（5 ∶ 95），B 为甲醇，C 为乙腈，梯度洗脱。检测波长为 280 nm，柱温为 45 ℃，进样量为 5 μl。结果显示，**1** 在 0.3 ～ 102.5 μg/ml 内线性关系良好，检测限为 0.3 ng。**1** 峰与各杂质峰能完全分离，且辅料不干扰测定。较《中华人民共和国药典》2020 年版原有方法，本法可准确测定 **1** 肠溶片（共 21 批）中的共有杂质（杂质 A），同时增加控制了已知杂质 B、C 和 F，为 **1** 标准提高及药典标准的制定提供了参考。

关键词：雷贝拉唑钠；高效液相色谱；有关物质

中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)07-1018-09

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.07.014

Determination of the Related Substances in Rabeprazole Sodium Enteric-coated Tablets

LIU Qian, SONG Dongmei, JIANG Wenming, LE Jian*

(*NMPA Key Lab. for Quality Analysis of Chemical Drug Preparations, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: An HPLC method was established for the determination of the related substances specified in US pharmacopoeia 40 as impurities A to F in rabeprazole sodium (**1**) enteric-coated tablets. The Thermo Hypersil BDS C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, and the analysis was carried out in the gradient elution mode with acetonitrile∶4.35 g/L dipotassium hydrogen phosphate solution (adjusted to pH 7.0 with phosphoric acid) (5∶95) as mobile phase A, methanol as mobile phase B, and acetonitrile as mobile phase C. The detection wavelength was 280 nm, the column temperature was 45 ℃, and the injection volume was 5 μl. The results showed that it was linear for **1** in the range of 0.3 – 102.5 μg/ml, and the detection limit was 0.3 ng. The peaks of **1** and each impurity could be completely separated, and the excipients did not interfere with the determination. Compared with the method in Chinese pharmacopoeia 2020, the established method not only could accurately determine the common impurity (impurity A) found in twenty-one batches of **1** enteric-coated tablets, but also control other three known impurities (impurity B, C, F), which provided a reference for the improvement of the specification on active pharmaceutical ingredient and the formulation of **1**.

Key Words: rabeprazole sodium; HPLC; related substance

雷贝拉唑钠（rabeprazole sodium，**1**）是一种新型质子泵抑制剂，主要用于治疗与酸分泌有关的各种消化功能紊乱性疾病，主要剂型有肠溶片和肠溶胶囊。由于 **1** 性质不稳定，在光照、氧化等条件下易降解，因此已有研究对 **1** 原料药与各制剂中的有关物质进行检测[1—6]。本课题组曾对 **1** 原料药及其制剂中的有关物质进行研究，建立了可分离表 1 中序号 1 ～ 7 杂质的有关物质测定方法[7]，收载入《中华人民共和国药典》2015 年版（ChP 2015），并沿

收稿日期：2021-09-08

基金项目：食品药品监管总局2016年国家药品标准提高课题

作者简介：刘　茜（1982—），女，副主任药师，从事药物分析及质量控制研究。

通信作者：乐　健（1972—），男，主任药师，从事药品质量控制研究。

E-mail：fdalej@163.com

用至 ChP 2020。美国药典（USP 40）、欧洲药典（EP 9.0）开始收载 **1** 原料药，二者有关物质测定条件一致，并各自沿用至 USP 43 和 EP 10.6。

通过比较杂质对象，USP 43 和 EP 10.6 较本课题组前期研究，杂质种类中有新增控制杂质，3 种药典的杂质比较结果见表 1。在新增杂质中，USP 的杂质 A 是各企业 **1** 肠溶片中的共有杂质，需重点关注（除表 1 外，文中均用 USP 的杂质代号）。本课题组曾对 **1** 中的杂质 A 进行研究，结果显示，杂质 A 为羧酸盐，极性较大，当采用 ChP 2020 中的有关物质方法测定时，其保留时间较短（仅 2 ～ 3 min），且部分企业的辅料对测定有干扰，影响准确定量[8]。

本研究参照 USP 43 收载 **1** 原料药测定方法，建立了 HPLC 法测定 **1** 肠溶片中的有关物质（杂质 A ～ F），以期为 **1** 肠溶片的质量控制提供有效方法，也为本品标准提高及药典标准的制定提供参考。

1 仪器与试药

1200 型高效液相色谱仪（含二极管阵列检测器，美国 Agilent 公司）。

1 对照品（中国食品药品检定研究院，含量 97.5%，批号 100858-201203）；杂质 A（含量 100%，批号 R023B0）、杂质 B（含量 100%，批号 R08090）、杂质 C（含量 99%，批号 F1M253）、杂质 D（含量 99%，批号 F1M254）、杂质 E（含量 99%，批号 F1M255）和杂质 F（含量 100%，批号 R08050），以上对照品均购于美国药典委员会；**1** 肠溶片［企业 A（原研地产化），规格 10 mg，批号 1612090、1702031，规格 20 mg，批号 1611076、1611077；企业 B，规格 20 mg，批号 20170803、20170804、20170805；企业 C，规格 20 mg，批号 170511、171107、180314；企业 D，规格 10 mg，批号 039180712、039180801、039180802；企业 E，规格 10 mg，批号 170803、170806、180204；企业 F，规格 10 mg，批号 20180701、20180702、20180703；企业 G，规格 10 mg，批号 1705142、1707138］；**1** 原料药［企业 A，含量≥ 98.0%，批号 170626-a；企业 D，含量≥ 98.0 %，批号 180620-RAB20180502］；**1** 肠溶片辅料［企业 A，企业 D］。

乙腈、甲醇和 30%双氧水均为色谱纯，磷酸、磷酸氢二钾、磷酸氢二钠、氢氧化钾、氢氧化钠和盐酸均为分析纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 建立的色谱条件

色谱柱 Thermo Hypersil BDS C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为乙腈：4.35 g/L 磷酸氢二钾溶液（用磷酸调至 pH 7.0）（5 ∶ 95），B 为甲醇，C 为乙腈，梯度洗脱程序见表 2；检测波长 280 nm；柱温 45 ℃；流速 1.0 ml/ml；进样器温度 5 ℃；进样量 5 μl。

2.1.2 ChP 2020 中 **1** 肠溶片有关物质测定的色谱条件

色谱柱 Agilent Zorbax C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm，或效能相当的色谱柱）；流动相 0.015 mol/L 磷酸氢二钠溶液（用磷酸调至 pH 6.0）∶乙腈（60 ∶ 40），等度洗脱；检测波长 290 nm；柱温 30 ℃；流速 1.0 ml/ml；进样量 10 μl。

2.2 溶液配制

空白溶剂：甲醇∶磷酸盐缓冲液（取磷酸氢二钾 17.4 g，加水 950 ml 使溶解，用 2 mol/L 氢氧化钾溶液调至 pH 11.3，用水稀释至 1 000 ml）（20 ∶ 80）。

系统适用性溶液：取 **1** 与各杂质对照品适量，用空白溶剂溶解并稀释，制成每 1 ml 含 **1** 1 mg 和杂质 A、B、C、D、E、F 均为 0.002 mg 的系统适用性溶液。

杂质 A 与杂质 D 的混合对照品贮备溶液：分别精密称取杂质 A 与杂质 D 对照品约 10 mg，置 20 ml 量瓶中，加空白溶剂溶解并定容，摇匀，精密量取 10 ml，置 250 ml 量瓶中，用空白溶剂定容，摇匀。

供试品溶液：取 **1** 肠溶片 5 片，置 50 ml 量瓶（规格 10 mg）或 100 ml 量瓶（规格 20 mg）中，加空白溶剂适量，振摇至崩解，继续振摇 20 min，用空白溶剂定容，摇匀，离心（14 462×*g*）10 min，取上清液即得供试品溶液。

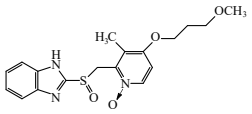
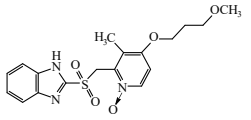
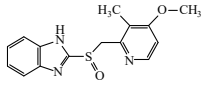
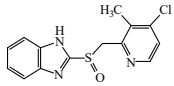
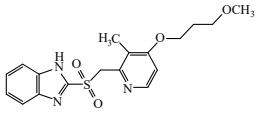
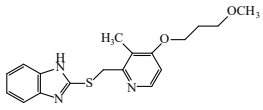
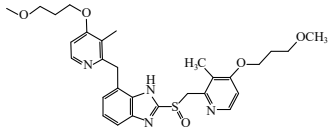
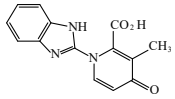
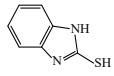
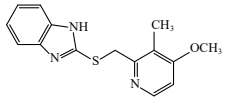
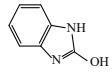
2.3 方法学验证

2.3.1 专属性试验

EP 10.6 与 USP 43 均采用杂质 F 峰与 **1** 峰的峰谷比≥ 1.5 作为系统适用性试验要求。EP 10.6 的

表 1　1 中的杂质信息

Tab.1　Information of Impurities in **1**

序号	化学结构式	化合物名称	ChP 2020	EP 10.6	USP 43
1		2-[[4-(3-甲氧基丙氧基)-3-甲基-2-吡啶氮氧化基]-甲亚磺酰基]-1*H*-苯并咪唑	研究，未单列	杂质D	杂质B
2		2-[[4-(3-甲氧基丙氧基)-3-甲基-2-吡啶氮氧化基]-甲基磺酰基]-1*H*-苯并咪唑	杂质Ⅰ	杂质Ⅰ	未收录
3		2-[(4-甲氧基-3-甲基-2-吡啶基)甲亚磺酰基]-1*H*-苯并咪唑	研究，未单列	杂质E	未收录
4		2-[(4-氯-3-甲基-2-吡啶基)甲基亚磺酰基]-1*H*-苯并咪唑	研究，未单列	杂质H	杂质F
5		2-[[4-(3-甲氧基丙氧基)-3-甲基-2-吡啶基]甲基磺酰基]-1*H*-苯并咪唑	杂质Ⅱ	杂质A	杂质D
6		2-[[4-(3-甲氧基丙氧基)-3-甲基-2-吡啶基]甲硫基]-1*H*-苯并咪唑	杂质Ⅲ	杂质B	杂质E
7		2-[[4-(3-甲氧基丙氧基)-3-甲基-2-吡啶基]甲亚磺酰基]-1-[4-(3-甲氧基丙氧基)-3-甲基-2-吡啶基]-苯并咪唑	研究，未单列	未收录	未收录
8		1-(1*H*-苯并咪唑-2-基)-3-甲基-4-羰基-1,4-二氢吡啶-2-羧酸	未研究	杂质C	杂质A（钠盐形式）
9		1*H*-苯并咪唑-2-巯基	未研究	杂质F	杂质C
10		2-[[(4-甲氧基-3-甲基-2-吡啶基)甲基]硫基]-1*H*-苯并咪唑	未研究	杂质G	未收录
11		1*H*-苯并咪唑-2-羟基	未研究	杂质K	未收录

系统适用性试验用杂质对照品含杂质 D 和杂质 F；USP 43 的系统适用性溶液为含 **1** 1 mg/ml 和杂质 A ～ F 各 0.002 mg/ml 的溶液。除峰谷比的分离应符合要求外，EP 10.6 与 USP 43 均规定含 **1** 0.5 μg/ml 的灵敏度溶液中主峰的信噪比≥ 10。

取“**2.2**”项下系统适用性溶液，按“**2.1.1**”项

表 2 梯度洗脱程序

Tab.2 Gradient Elution Procedure

时间/min	流动相A/%	流动相B/%	流动相C/%
0	100	0	0
2	100	0	0
7	85	0	15
27	30	40	30
32	15	55	30

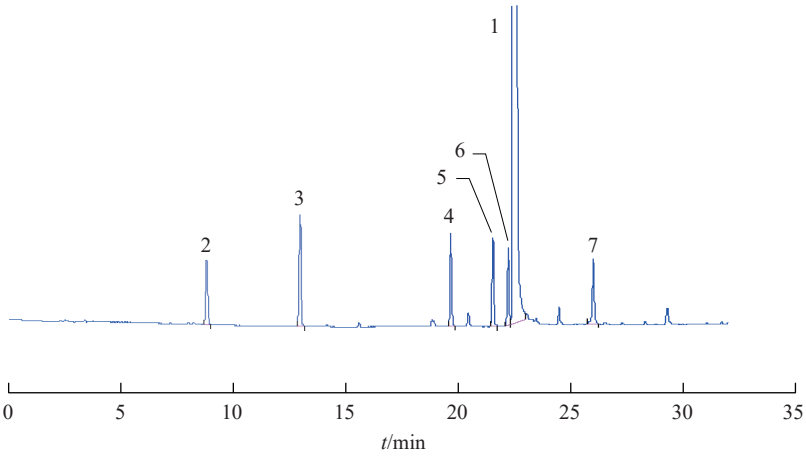
下色谱条件进样测定。结果见图 1，杂质 A、杂质 C、杂质 B、杂质 D、杂质 F、**1** 和杂质 E 依次出峰，保留时间分别为 8.8、13.0、19.7、21.5、22.2、22.5、26.0 min；主峰拖尾因子为 1.035；杂质 F 的相对保留时间为 0.988(22.206/22.484)，其与主峰的分离度为 1.92(>1.5)，与主峰峰谷比为 54.2；各杂质峰与主峰均分离良好，且各杂质峰之间均基线分离；以上均表明本法的系统适用性良好。

此外，对各企业 **1** 片剂中的辅料峰进行定位。结果显示，与企业提供的空白辅料吻合，且辅料均不干扰测定。

2.3.2 强降解试验

取企业 A、D 的 **1** 原料药、**1** 肠溶片和辅料各适量（原料药取约 20 mg，肠溶片和辅料均取约 2 片量），分别进行酸、碱、氧化、光照、高温强降解试验。①酸破坏。将 **1** 原料药加至 0.1 mol/L 盐酸 1 ml 中，放置 5 min 后，加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 ml 中和；将 **1** 肠溶片和辅料加至 0.1 mol/L 盐酸 1 ml 中，放置 30 min 后，加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 ml 中和。②碱破坏。将 **1** 原料药、**1** 肠溶片和辅料加至 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 ml，放置过夜后，加 0.1 mol/L 盐酸 1 ml 中和。③氧化破坏。向样品中加入 3%过氧化氢溶液 1 ml，放置 2 h。④高温破坏。将样品于 105 ℃放置 4 h。⑤光照破坏。将样品置紫外光灯（254 nm）下照射 6 h。待各破坏试验完成后，将各样品转移至 20 ml 量瓶中，分别用空白溶剂溶解，并稀释制成每 1 ml 含 **1** 1 mg 的溶液（辅料强降解试验溶液中所含的辅料量相当于 **1** 肠溶片强降解试验溶液中所含的辅料量）。

强降解试验结果见表 3。企业 A、D 的辅料在各条件下均不会产生杂质，对测定无干扰；企业 A、D 的 **1** 原料药与片剂在各破坏条件下，质量平衡值均在 90%～110%。**1** 原料药与片剂在各破坏条件下，杂质情况均一致（体现在杂质增长变化或新增杂质种类上），且降解产物不干扰测定；其中，酸破坏时 **1** 原料药中新增杂质 E；氧化破坏时 **1** 原料药与片剂中均新增杂质 A，且杂质 D 的量增大；高温破坏和光照破坏时，**1** 原料药与片剂中均新增杂质 A 和杂质 C；碱破坏时未见杂质变化。



1－**1**；2－杂质 A；3－杂质 C；4－杂质 B；5－杂质 D；6－杂质 F；7－杂质 E

图 1 典型色谱图

Fig.1 Typical Chromatogram

表 3　强降解试验中的质量平衡值结果

Tab.3　Mass Balance Results in Degradation Tests

生产企业	质量平衡/%				
	酸破坏	碱破坏	氧化破坏	高温破坏	光照破坏
企业 A 原料药	95	99	105	104	100
企业 A 片剂	100	94	99	92	98
企业 D 原料药	93	101	95	101	103
企业 D 片剂	98	92	107	102	106

2.3.3　线性试验

精密称取 **1** 对照品适量，加入“**2.2**”项下空白溶剂溶解并稀释，制成每 1 ml 中含 **1** 0.3 ～ 100 μg 的系列浓度线性试验溶液，以峰面积 *A* 为纵坐标、质量浓度 *c* 为横坐标，进行线性回归，得线性方程 *A*=10.35*c*+6.086，*r*=0.999 6，表明 **1** 在 0.3 ～ 102.5 μg/ml 内线性关系良好。

2.3.4　检测限与定量限

取 **1** 对照品适量，加入“**2.2**”项下空白溶剂溶解并稀释，制成每 1 ml 中含 **1** 0.107 6 和 0.322 9 μg 的溶液，分别作为检测限和定量限溶液，信噪比分别为 5.9 和 10.3。取上述检测限和定量限溶液，按“**2.1.1**”项下色谱条件进样测定，根据色谱峰的信噪比计算得到方法的检测限为 0.3 ng，定量限为 1.6 ng。

2.3.5　加样回收率试验

选取各企业共有的已知杂质 A 和杂质 D，进行加样回收率试验，对辅料用量多且辅料峰响应值大的企业 D 产品进行考察。取 **1** 肠溶片（批号 039180712）2 片，置 20 ml 量瓶中，精密加入杂质 A 与杂质 D 的混合对照品贮备溶液 5 ml，照“**2.2**”项下供试品溶液配制方法，自“加空白溶剂适量”起，同法操作，制成杂质 A 与杂质 D 的加入量均为 5 μg（杂质加入量相当于主药 **1** 的 0.5%）的加样回收样品，平行配制 3 份，计算加样回收率。结果显示，杂质 A 和杂质 D 的平均加样回收率（*n*=3）分别为 101.1%、96.5%，RSD 分别为 1.6%、1.1%。

2.3.6　精密度试验

取“**2.3.4**”项下定量限溶液，按“**2.1.1**”项下色谱条件连续进样 6 次。结果显示，峰面积 RSD（*n*=6）为 1.0%，说明方法精密度良好。

2.3.7　重复性试验

取 **1** 肠溶片（企业 A，批号 1612090），按“**2.2**”项下方法制备供试品溶液，平行配制 6 份，并按“**2.1.1**”项下色谱条件进样测定。结果显示，杂质 A、杂质 C、杂质 D、杂质 E 和其他最大单杂的含量平均值（*n*=6）分别为 0.09%、0.06%、0.42%、0.08%、0.07%，RSD 分别为 0.7%、0.7%、3.4%、3.1%、0.8%；杂质总量（*n*=6）为 1.2%，RSD 为 7.0%；杂质 B 和杂质 F 均未检出；说明方法重复性良好。

2.3.8　稳定性试验

取 2 批 **1** 肠溶片（企业 A，批号 1612090；企业 D，批号 039180712），按“**2.2**”项下方法制备供试品溶液，以杂质变化情况考察供试品溶液的稳定性。结果表明，供试品溶液在 6 ℃条件放置 31 h 内，单个杂质与杂质总量均未有明显增长。

2.3.9　耐用性试验

EP 10.6 中推荐使用的色谱柱型号为 Thermo Hypersil BDS 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），本研究中挑选了实验室常见的色谱柱型号以考察系统适用性。选用的色谱柱均为 C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），结果见表 4，Thermo Hypersil BDS、Dikma Diamonsil Plus、Supelco Supelcosil、纳谱分析 ChromCore 和 Agilent Extend 5 个色谱柱型号可满足 EP 10.6 与 USP 43 中对杂质 F 峰与 **1** 峰的分离要求。

2.4　样品测定结果

2.4.1　新方法测定结果

取各企业 **1** 肠溶片共 21 批，按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，采用外标法计算各杂质的量。结果见表 5，各批次均检出杂质 A、杂质 C、杂质 D 和杂质 E，杂质 B 和杂质 F 均未检出。

2.4.2　新方法与 ChP 2020 方法的测定结果比较

照 ChP 2020 中有关物质方法对各企业产品进行测定，测定结果与新方法的结果比较见表 6。结果显示，采用新方法测定的杂质总量略高。

2.4.3　同企业来源的 **1** 原料药与 **1** 肠溶片的杂质比较

照上法对各企业的原料药进行有关物质测定，将 **1** 原料药与 **1** 肠溶片已知杂质的检出情况进行比

表 4 耐用性试验结果

Tab.4 Results of Durability Test

序号	柱品牌	型号	相对保留时间			主峰拖尾因子	杂质 F 与主峰的分离度	杂质 F 与主峰的峰谷比	杂质 D 与主峰的分离度	杂质 F 与主峰的分离情况及其他说明
			杂质 A	杂质 D	杂质 F					
1	Thermo	Hypersil BDS	0.39	0.96	0.99	1.035	1.92	54.2	6.74	基线分离
2	Dikma	Diamonsil Plus	0.43	0.96	0.99	1.111	1.65	9.8	5.38	峰谷比>1.5
3	Supelco	Supelcosil	0.34	0.95	0.98	1.001	2.8	基线分离	7.48	基线分离
4	纳谱分析	ChromCore	0.40	0.97	0.99	1.117	1.78	27.3	3.66	基线分离
5	Agilent	Extend	0.36	0.96	0.99	1.065	1.37	2.5	5.76	峰谷比>1.5

表 5 1 肠溶片的有关物质测定结果 /%（*n*=2）

Tab.5 Determination Results of Related Substances in **1** Enteric-coated Tablets/%（*n*=2）

企业	批号	杂质 A	杂质 C	杂质 D	杂质 E	其他最大单杂	杂质总量
A	1612090	0.11	0.06	0.58	0.12	0.06	1.30
A	1702031	0.13	0.06	0.58	0.10	0.07	1.35
A	1611076	0.07	0.04	0.57	0.10	0.05	1.10
A	1611077	0.06	0.03	0.57	0.09	0.05	1.03
B	20170803	0.20	0.06	0.08	0.18	0.09	1.27
B	20170804	0.18	0.05	0.08	0.18	0.10	1.29
B	20170805	0.18	0.05	0.08	0.18	0.10	1.28
C	170511	0.17	0.08	0.12	0.11	0.09	1.18
C	171107	0.08	0.05	0.10	0.09	0.06	0.82
C	180314	0.09	0.04	0.09	0.07	0.06	0.75
D	039180712	0.11	0.03	0.20	0.07	0.22	1.46
D	039180801	0.11	0.04	0.14	0.09	0.11	1.09
D	039180802	0.09	0.03	0.14	0.12	0.11	1.27
E	170803	0.28	0.09	0.16	0.16	0.15	2.03
E	170806	0.22	0.07	0.15	0.12	0.12	1.53
E	180204	0.12	0.03	0.09	0.09	0.08	0.93
F	20180701	0.19	0.08	0.10	0.07	0.10	1.09
F	20180702	0.17	0.07	0.11	0.07	0.12	1.01
F	20180703	0.12	0.06	0.10	0.06	0.08	0.79
G	1705142	0.29	0.05	0.25	0.10	0.08	1.36
G	1707138	0.21	0.05	0.24	0.09	0.07	1.20

对，结果见表 7。杂质 C、杂质 D 和杂质 E 是 **1** 原料药与 **1** 肠溶片的共有杂质。杂质 A 在各企业原料中均未检出，却是所有企业制剂的共有杂质，且 **1** 肠溶片中杂质 A 的检出量不低，为 0.1%～0.3%，因此须增加控制。

3 讨论

3.1 系统适用性条件的考察

由于 EP 10.6 与 USP 43 中采用的对照品价格昂贵且不易获得，笔者尝试沿用 ChP 2020 的系统溶液，并结合耐用性试验结果，制定合理的系统适用性试验条件。EP 10.6 与 USP 43 均采用杂质 F 峰与 **1** 峰的峰谷比≥ 1.5 作为系统要求。杂质 F 峰对 **1** 主峰的相对保留时间为 0.98，是与主峰最邻近的杂质峰，两峰的分离情况直接影响杂质 F 控制的有效性。

在该液相条件下，ChP 2020 的系统适用性溶液（1）可破坏得到杂质Ⅲ（即 USP 杂质 E）和 USP 杂质 A（各企业制剂中均有检出，系应重点关注的杂质）；系统适用性溶液（2）可破坏得到杂质Ⅰ（USP 中不作为已知杂质控制）和杂质Ⅱ（即 USP 杂质 D）；2 种系统溶液均不能破坏得到 USP 杂质 F。在耐用性试验考察中发现，**1** 主峰的对称性对分离度影响大。当主峰的拖尾因子由 1.002 下降至 0.723 时，杂质 F 峰与主峰的实际分离情况由达到基线分离下降至峰谷比仅为 1.0。

考虑到杂质 F 对照品不易获得，且各企业产品中均未检出杂质 F，杂质 D 却是供试品中主要的降解杂质。因此笔者拟结合系统适用性试验结果，通过杂质Ⅱ峰（即 USP 杂质 D）与 **1** 峰的分离度要求

表 6　1 肠溶片的杂质结果比较 /%（*n*=2）

Tab.6　Comparison of Impurity Results of **1** Enteric-coated Tablets/%（*n*=2）

编号	企业	杂质 D		杂质 E		杂质总量	
		ChP 2020	新方法	ChP 2020	新方法	ChP 2020（含杂质A）	新方法
1	A	0.49	0.58	0.02	0.12	0.70	1.30
2	A	0.49	0.58	0.02	0.10	0.72	1.35
3	A	0.47	0.57	0.02	0.10	0.62	1.10
4	A	0.48	0.57	0.02	0.09	0.61	1.03
5	B	0.26	0.08	0.29	0.18	1.14	1.27
6	B	0.30	0.08	0.28	0.18	1.15	1.29
7	B	0.30	0.08	0.28	0.18	1.17	1.28
8	C	0.14	0.12	0.04	0.11	0.60	1.18
9	C	0.13	0.10	0.02	0.09	0.47	0.82
10	C	0.13	0.09	0.03	0.07	0.44	0.75
11	D	0.32	0.20	0.02	0.07	0.69	1.46
12	D	0.30	0.14	0.02	0.09	0.68	1.09
13	D	0.29	0.14	0.02	0.12	0.70	1.27
14	E	0.20	0.16	0.18	0.16	1.06	2.03
15	E	0.21	0.15	0.09	0.12	0.83	1.53
16	E	0.16	0.09	0.05	0.09	0.55	0.93
17	F	0.25	0.10	0.19	0.07	0.89	1.09
18	F	0.25	0.11	0.13	0.07	0.79	1.01
19	F	0.24	0.10	0.07	0.06	0.66	0.79
20	G	0.33	0.25	0.03	0.10	0.88	1.36
21	G	0.31	0.24	0.02	0.09	0.76	1.20

表 7　1 肠溶片已知杂质来源分析 /%

Tab.7　Source Analysis of Known Impurities in **1** Enteric-coated Tablets/%

杂质	企业 A		企业 B		企业 C		企业 D		企业 E		企业 F	
	原料药	片剂	原料药	片剂	原料药	片剂	原料药	片剂	原料药	片剂	原料药	片剂
杂质 A	–	0.10	–	0.20	–	0.20	–	0.10	–	0.30	–	0.20
杂质 B	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
杂质 C	–	0.06	0.01	0.06	0.02	0.08	0.01	0.03	–	0.09	–	0.08
杂质 D	0.60	0.60	0.06	0.08	0.10	0.10	0.05	0.20	0.10	0.20	0.07	0.10
杂质 E	0.20	0.10	0.20	0.20	0.30	0.10	0.30	0.07	0.30	0.20	0.30	0.07
杂质 F	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

注：“–”表示未检出

及 **1** 峰的峰对称性要求来间接控制，使试验条件满足杂质分离要求。因此拟定系统适用性条件为：系统适用性溶液（1）中杂质 A 峰、**1** 峰与杂质Ⅲ峰依次出峰，相对保留时间分别为 0.4、1.0 和 1.2，**1** 峰的拖尾因子应在 0.9 ～ 1.1。系统适用性溶液（2）中在 **1** 峰相对保留时间 0.96 处应有杂质Ⅱ峰。供试品溶液中杂质Ⅱ峰与 **1** 峰的分离度应≥ 3.5。

3.2　供试品溶液前处理方法的确认

3.2.1　取样方式

本试验最初采用了一般片剂的前处理方法，即将片剂研成细粉后称重，结果发现个别企业的产品由于主成分和辅料粉体性质差异较大，研磨时研钵对 **1** 存在吸附，使得主成分结果偏低。后续试验表明投片法制备供试品溶液可消除研磨吸附问题，因此前处理方法采用投片方式。

3.2.2　片剂崩解时间的考察

由于 **1** 较不稳定，但溶解性较好，为避免超声处理可能对有关物质结果产生的影响，供试品溶液制备时选择机械振摇的方式。各企业各规格分别取 1 批样品，取 5 片置 50 ml（规格 10 mg）或 100 ml（规格 20 mg）量瓶中，加空白溶剂适量，于振摇仪上机械振摇，振摇频次为每分钟 200 次，观察各企

业片剂的崩解时间。除企业 B 的片剂崩散需 75 min 外，其他企业的片剂在 30 min 内均能崩散。

3.2.3 振摇时间的考察

分别取各企业各规格 **1** 肠溶片 1 批，分别制成 1 mg/ml 的供试品溶液，振摇崩解后，继续振摇 10、20、30、60 min，以 **1** 含量结果为指标，比较振摇提取效率。结果表明，崩解后继续振摇 10 min 时，**1** 已提取完全，含量结果增量小于 2%。

以各企业共有的已知杂质 A、D、E 及杂质总量的峰面积为指标，考察振摇时间对杂质检出的影响。结果表明，崩解后继续振摇 10 ～ 60 min，杂质检出量持平，未有明显增长或降解。结合以上 2 项结果，确定振摇时间为待供试品崩解后，继续振摇 20 min。

3.2.4 离心时间的考察

由于 **1** 肠溶片的辅料较多，溶液的过滤通过性差，不适用于过滤法处理。取振摇后的样品，采用离心操作，分别离心 5、10、15 min。以 **1** 的含量结果为考察指标，离心时间由 5 min 增至 15 min，主成分含量结果无影响。以各企业共有已知杂质 A、D、E 及杂质总量的峰面积为指标，离心时间由 5 min 增至 15 min，杂质检出量持平，未有明显增长或降解。结合以上 2 项结果，确定离心时间为 10 min。

3.3 定量方法的确定

7 家企业来源的 **1** 肠溶片共有已知杂质为杂质 A、杂质 C、杂质 D 和杂质 E，其中杂质 A 与杂质 D 的量较大。同时结合已知杂质对破坏条件的敏感性结果和杂质来源分析的结果，杂质 A 在氧化、高温和光照强降解试验时增加；杂质 D 的量在氧化降解条件下增加，应单独控制。经考察，杂质 A 与 **1** 的响应因子为 0.943，杂质 D 与 **1** 的响应因子为 0.999，均在 0.90 ～ 1.00，在对照品较难获得的情况下，推荐采用主成分的校正因子计算。

3.4 新方法与 ChP 2020 方法的测定结果比较分析

由于 ChP 2020 方法不能有效分离杂质 A，因此在计算时，将 ChP 2020 测得的杂质总量与用新方法测得的杂质 A 的量加和，与新方法测得的杂质总量做比较。结果显示，新方法测得的杂质总量略高，分析原因为新方法采用梯度洗脱，辅料与杂质的分离更完全，且随着梯度程序有机相比例的增加，杂质检出数量较原方法多，因此新方法更能真实地反映供试品中的杂质水平，控制更为严格。

3.5 杂质 A 的来源途径探讨

已有文献报道杂质 A 为雷贝拉唑氧化重排的降解产物[9]。此次研究中发现杂质 A 在各企业原料中均未检出，却是所有企业制剂的共有杂质，推测其与制剂生产过程相关。强降解试验结果表明，**1** 原料药和 **1** 肠溶片在氧化、高温和光照破坏条件下均产生杂质 A，提示生产企业需关注制剂的隔离层能否隔离氧、贮存条件温度是否适宜、包装材料能否避光，这些生产工艺、贮存条件可能决定了降解产物杂质 A 的量。

3.6 小结

本研究参照 USP 43 方法建立了 **1** 肠溶片的有关物质测定方法，对杂质来源及强降解试验条件下各杂质的敏感性进行了分析，为产品包装和贮存条件的制订提供了参考。由于杂质对照品不易获得，本研究探索沿用 ChP 2020 中的系统溶液结合耐用性试验结果，制定合理的系统适用性试验条件，以期达到既经济又方便地控制新增杂质的目的。建立的方法可为本品的质量控制提供参考，并为药典标准提高提供依据。

参考文献：

[1] REDDY G M, BHASKAR B V, REDDY P P, *et al*. Structural identification and characterization of potential impurities of pantoprazole sodium [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, **45**(2): 201-210.

[2] VASU D R, SAI U K G, VENKATA S B, *et al*. Identification of degradation products in stressed tablets of rabeprazole sodium by HPLC-hyphenated techniques [J]. *Magn Reson Chem*, 2009, **47**(5): 443-448.

[3] RAO P S, RAY U K, GUPTA P B, *et al*. Identification, isolation and characterization of new impurity in rabeprazole sodium [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, **52**(4): 620-624.

[4] GARCIA C V, NUDELMAN N S, STEPPE M, *et*

al. Structural elucidation of rabeprazole sodium photodegradation products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, **46**(1): 88-93.

[5] 肖扬帆, 张　娜, 陈延祥, 等. HPLC法测定雷贝拉唑钠肠溶片的含量和有关物质[J]. 齐鲁药事, 2010, **29**(8): 472-474.

[6] 马　延, 王　媛, 畅瑞苗, 等. HPLC法测定雷贝拉唑钠肠溶微丸的有关物质[J]. 中国生化药物杂志, 2015, **35**(4): 165-168.

[7] 宋冬梅, 刘　路, 江文明, 等. 雷贝拉唑钠原料药中有关物质的HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2015, **46**(9): 1013-1016.

[8] 宋冬梅, 刘　茜, 江文明, 等. 雷贝拉唑钠肠溶片中1-(1*H*-苯并咪唑-2-基)-3-甲基-4-氧代-1,4-二氢吡啶-2-羧酸钠的HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2017, **48**(4): 559-563.

[9] RAJU T, KUMAR S R, RAO I M, *et al*. Development and validation of a stability indicating HPLC method for the estimation of rabeprazole impurities in pharmaceutical dosage forms by design of experiments [J]. *Asian J Pharm Clin Res*, 2013, **6**(4): 43-51.

(上接第991页)

高产量。通过超滤和阴离子交换柱色谱，可将**1**的纯度提高至 (97.94±0.42)%，收率为78.40%。另外，本研究还考察了**1**的主要酶学性质。综上所述，本研究得到了一种高产、工艺简单的**1**制备工艺，为其在重组多肽药物生产中应用奠定试验基础。

参考文献：

[1] 梁启星, 石竞成, 金学荣, 等. 肠激酶在毕赤酵母中的分泌表达优化[J]. 生物工程学报, 2020, **36**(8): 1689-1698.

[2] 李德华. 牛肠激酶基因工程菌的构建、高密度发酵、纯化及活性鉴定[D]. 重庆: 重庆师范大学硕士学位论文, 2007.

[3] 孙自勇, 陈均勇, 陈新园, 等. 牛肠激酶轻链在毕赤酵母中的分泌表达, 纯化和活性鉴定[J]. 南京大学学报: 自然科学版, 2004, **40**(1): 41-48.

[4] 姬秋彦, 毕研伟, 肖红剑, 等. 重组肠激酶催化亚基在毕氏酵母中的高密度发酵、纯化及活性鉴定[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2012, **34**(S2): 426-431.

[5] VOZZA L A, WITTWER L, HIGGINS D R, *et al*. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology*(N Y), 1996, **14**(1): 77-81.

[6] 刘国强, 林杨勇, 赵　林, 等. 肠激酶轻链在毕赤酵母中的组成型表达[J]. 生物技术, 2017, **27**(5): 446-451.

[7] FANG L, SUN Q M, HUA Z C. Expression of recombinant chinese bovine enterokinase catalytic subunit in *P.pastoris* and its purification and characterization [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*(Shanghai), 2004, **36**(7): 513-517.

[8] PENG L S, ZHONG X F, OU J X, *et al*. High-level secretory production of recombinant bovine enterokinase light chain by *Pichia pastoris* [J]. *J Biotechnol*, 2004, **108**(2): 185-192.