

注射用兰索拉唑杂质检测优化与细胞毒性评估



张 浩, 郑 航, 乔 露, 陈 吉

湖北省药品监督检验研究院 (武汉 430075)

【摘要】目的 本研究对注射用兰索拉唑主要杂质进行了色谱条件优化与体外细胞毒性评价,建立了高灵敏、高特异性分析方法,以揭示其潜在生物安全风险。通过方法学改进与毒性验证相结合,为完善《中国药典》中兰索拉唑制剂质量控制标准提供科学依据。**方法** 通过考察色谱条件,建立兰索拉唑主要杂质分析的新方法,并通过专属性、检测限/定量限、线性范围等指标进行方法学验证。采用 MTT 比色法构建 L929 细胞毒性评价模型,系统检测主要杂质对细胞增殖的抑制作用。最后应用建立的分析方法对多批次制剂进行有关物质含量测定和差异性分析。**结果** 建立可同时测定兰索拉唑 6 种杂质的 HPLC 法,经方法学验证,系统适用性、专属性、线性、检测限以及定量限均符合要求,同时根据细胞毒性实验中各处理组的吸光度计算相对增殖率判断细胞分级及毒性反应程度,判定 6 种杂质的细胞毒性大小为 II>I>V>IV>VI>III。**结论** 与现行《中国药典》收录的兰索拉唑有关物质测定方法及限度要求相比,本方法优化了色谱条件。同时,在实际样品检测中,新方法显著提高了杂质检出率,揭示了市场上不同企业生产的注射用兰索拉唑样品在杂质含量上的差异。其中毒性最高的杂质 II 含量普遍偏高,这一发现进一步凸显了对其进行严格监管的重要性。

【关键词】 兰索拉唑; 杂质检测; 高效液相色谱; 细胞毒性; 质量控制; 方法学验证; 中国药典; 相对增殖率

【中图分类号】 R917; R96

【文献标识码】 A

Optimization of impurity detection and evaluation of *in vitro* cytotoxicity for lansoprazole for injection

ZHANG Hao, ZHENG Hang, QIAO Lu, CHEN Ji

Hubei Institute for Drug Control, Wuhan 430075, China

Corresponding author: QIAO Lu, Email: qiaolu@whu.edu.cn

【Abstract】Objective To optimize the chromatographic conditions for major impurities and conduct *in vitro* cytotoxicity evaluation of impurities in lansoprazole for injection, establish a highly sensitive and specific analytical method for related substances through methodological validation, and reveal its potential biosafety risks. By combinig methodological improvement and toxicity validation, this study provides scientific evidence for enhancing the quality control standards of lansoprazole preparations in the *Chinese Pharmacopoeia*. **Methods** By investigating chromatographic conditions, a novel analytical method for major impurities in lansoprazole was developed and validated through methodological evaluation of specificity, detection limit/quantitation limit, and linearity range. An L929 cytotoxicity evaluation model was established using the MTT colorimetric assay to systematically

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202509044

基金项目: 湖北省药品监管工作政策研究课题项目 (鄂药监函〔2025〕25 号)

通信作者: 乔露, 硕士, 药师, Email: qiaolu@whu.edu.cn

assess the inhibitory effects of major impurities on cell proliferation. The established analytical method was subsequently applied to determine related substance contents and analyze batch-to-batch variability in multiple production batches of the formulation. **Results** An high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of six lansoprazole impurities was established and validated for system suitability, specificity, linearity, limits of detection, and quantification. Cytotoxicity was ranked as II>I>V>IV>VI>III based on relative proliferation rates derived from absorbance measurements. **Conclusion** Compared with the current method and limit requirements for the determination of related substances of lansoprazole specified in the *Chinese Pharmacopoeia*, this method optimizes the chromatographic conditions. Furthermore, the established method significantly improved the impurity detection rate in practical sample testing and revealed differences in impurity contents among lansoprazole for injection products manufactured by different enterprises. Notably, impurity II, which exhibited the highest cytotoxicity, was found to have generally high contents in these samples, which further underscores the importance of stringent regulatory oversight.

【Keywords】 Lansoprazole; Impurities detection; High-performance liquid chromatography; Cytotoxicity; Quality control; Method validation; *Chinese Pharmacopoeia*; Relative proliferation rates

注射用兰索拉唑 ($C_{16}H_{14}F_3N_3O_2S$) 作为一种强效质子泵抑制剂, 通过特异性抑制胃壁细胞 H^+/K^+-ATP 酶, 有效阻断胃酸分泌, 在临床上广泛用于治疗胃溃疡、十二指肠溃疡及胃食管反流等相关疾病^[1-3]。然而, 该化合物在结构上对光、热及 pH 变化极为敏感, 在生产、储存和用药过程中易发生降解, 产生多种有机杂质^[4-7] (兰索拉唑及其各杂质结构式见图 1), 从而影响药品的安全性与有效性。目前, 各国药典^[8-11] 对于兰

索拉唑杂质的控制标准不尽一致, 企业检测方法亦不统一, 常见方法包括 HPLC 法以及液质联用衍生版本^[4, 6-7, 12-14]。尽管现有方法可实现杂质的初步分离与检测, 但在实际应用中仍存在诸多局限性, 如杂质分离度不足、灵敏度不高、系统适用性欠佳等, 导致部分潜在杂质无法被有效检出与准确定量, 难以全面反映药品的真实质量。因此, 构建一种具备高分离效能与灵敏度的杂质分析方法, 对于保障药品质量与安全至关重要。

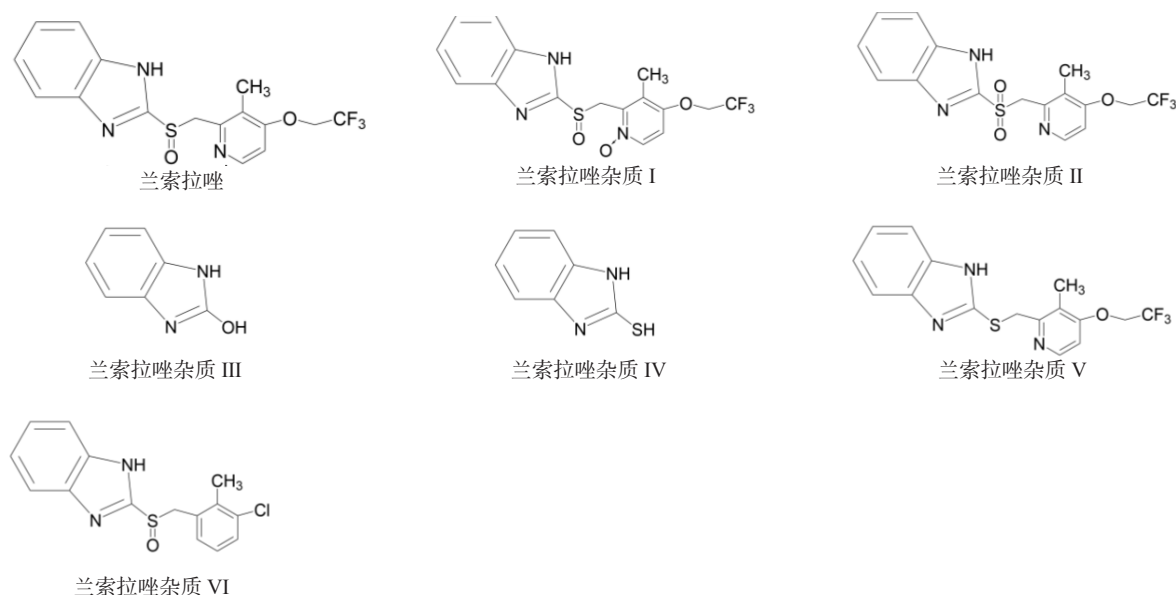


图1 兰索拉唑及其杂质结构式

Figure 1. Structural formulas of lansoprazole and its impurities

本研究针对注射用兰索拉唑开发了一种新型 HPLC 分析方法, 通过优化色谱条件, 显著提升了 6 种主要杂质的分离效果与检测灵敏度, 实现

了各成分的基线分离。值得注意的是, 单纯依靠化学分析尚不足以科学评估杂质的潜在风险。杂质控制的根本目的在于保障临床用药安全, 而不

同杂质其生物学影响可能存在显著差异^[15]。为此，本研究进一步结合体外细胞毒性实验，采用 L929 小鼠成纤维细胞模型，对分离得到的 6 种主要杂质进行了系统的毒性评估。该评估不仅明确了各杂质的相对毒性强弱，也为杂质限度的合理设置提供了实验依据。本研究将杂质检测分析与毒性试验结果相关联，显著提升了注射用兰索拉唑杂质控制的科学性与针对性，从而为相关制剂质量标准的修订与完善提供了关键数据支持。

1 材料

1.1 主要仪器

Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱系统，配备二极管阵列检测器（美国 Agilent）；Thermo Orbitrap 液质联用仪（美国 Thermo Fisher Scientific）；XDS-1B 倒置光学显微镜（日本索尼公司）；HF90 二氧化碳培养箱（力康生物医疗科技控股有限公司）；VS-1300L-U 超净工作台（美国 Airtech 公司）；G154DW 高压灭菌锅[致微（厦门）仪器有限公司]；TC20 细胞计数仪（美国 Bio-Red 公司）；Spark10M 多功能酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；XS205 分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1.2 主要药品与试剂

对照品：兰索拉唑（批号：100709-202106，纯度 99.8%）、兰索拉唑杂质 I（批号：510046-201401，纯度 100%）、兰索拉唑杂质 II（批号：510047-202102，纯度 100%）、兰索拉唑杂质 III（批号：510048-201401，纯度 100%）、兰索拉唑杂质 IV（批号：510049-202302，纯度 100%）、兰索拉唑杂质 V（批号：510228-202301，纯度 100%）均购自中国食品药品检定研究院；兰索拉唑杂质 VI（南京华威医药科技集团有限公司，批号：LS20160801，纯度 99.7%）；注射用兰索拉唑[瑞康医药集团（北京）有限公司，批号：RK11951117]；RPMI1640 培养基（美国 Gibco，批号：8766）；新生牛血清（杭州四季青生物工程材料有限公司，批号：0206）；高密度聚乙烯（广东省茂名乙烯厂，批号：090702413）；二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide, DMSO，批号：RNBB4297）和 MTT 溶液（批号：MKBP6775V）购自 Sigma 公司；甲醇和乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为纯化水。

1.3 细胞

GDC0698 小鼠成纤维细胞 L929 购自中国典型培养物保藏中心，所用细胞的传代次数控制在第 3 至 6 代之间。

2 方法与结果

2.1 有关物质测定

2.1.1 色谱条件

采用资生堂 SPOLAR C₁₈ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相为 0.01 mol/L 醋酸铵溶液（用氨水调 pH 至 7.3）（A）- 乙腈（B），按表 1 进行梯度洗脱；检测波长为 285 nm；柱温为 35 ℃；流速为 1.0 mL/min；进样量为 10 μL。

表1 梯度洗脱程序 Table 1. Gradient elution program		
时间（min）	流动相A	流动相B
0~7	83→65	17→35
7~20	65	35
20~25	65→30	35→70
25~40	30	70
40~41	30→83	70→17
41~51	83	17

2.1.2 系统适用性溶液的制备

稀释溶剂为 0.01 mol/L 的醋酸铵溶液（用氨水调 pH 至 10.5）- 乙腈（65 : 35）。分别精密称取兰索拉唑对照品及各杂质适量，用稀释溶剂溶解并定量配制成含兰索拉唑 1.0 mg/mL、各杂质浓度约为 5.0 μg/mL 的溶液，摇匀，即得。

2.1.3 供试品溶液的制备

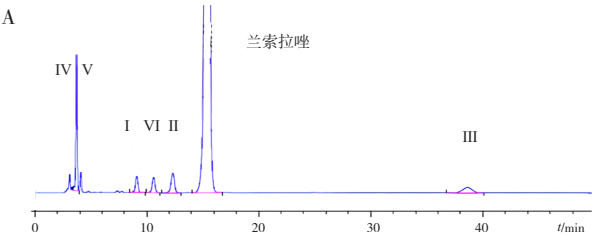
取注射用兰索拉唑适量，用稀释溶剂溶解并定量配制成含兰索拉唑 1.0 mg/mL 的溶液，摇匀，即得。

2.1.4 系统适用性和专属性试验

按照《中国药典（2025 年版）》^[11]相关要求以及“2.1.1”项下拟定的色谱条件进行检测，系统适用性试验色谱图见图 2。结果显示，在此色谱条件下，主峰与各已知杂质及未知杂质之间、以及不同杂质相互之间均能有效分离，且杂质 III 的出峰时间明显提前。

取用注射用兰索拉唑进行专属性试验。具体破坏条件如下：酸破坏为加入 0.01 mol/L 盐酸 1 滴，放置 2 min；碱破坏为加入 0.1 mol/L 氢氧化钠 1 mL，放置 10 min；氧化破坏为加入 0.3 mol/L 过氧化氢溶液 1 mL，放置 2 min；高温破坏为置于

60 ℃水浴中 30 min；光破坏为在 254 nm 紫外灯下照射 2 h。各破坏处理后的样品色谱图见图3。结果显示，在拟定的色谱条件下，主峰与各降解杂质之间以及杂质彼此之间均能实现良好分离，表明该方法能有效区分主成分及其降解产物，符合国际人用药品注册技术协调会（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH）指南指导原则 Q2（R1）对专属性试验的要求。



2.1.5 线性考察

由系统适用性试验色谱图可知，在相同浓度下，不同杂质的紫外响应强度存在差异。为确保各杂质定量计算的准确性，本研究分别对兰索拉唑及各杂质进行了线性考察，并计算其相对响应因子。精密称取对照品适量，用稀释溶剂配制成系列浓度的对照品溶液。以浓度为横坐标（ X , $\mu\text{g/mL}$ ）、峰面积为纵坐标（ Y ）进行线性回归，计算回归方程与相关系数，结果见表2。

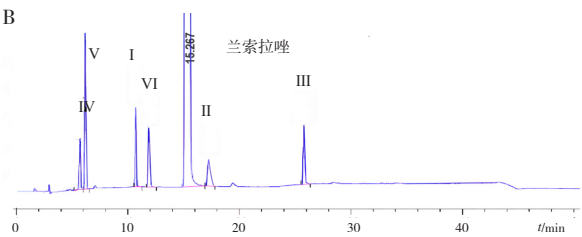


图2 系统适用性试验HPLC色谱图
Figure 2. HPLC chromatogram of the system suitability test

注：A. 《中国药典》色谱条件；B. 本方法色谱条件。

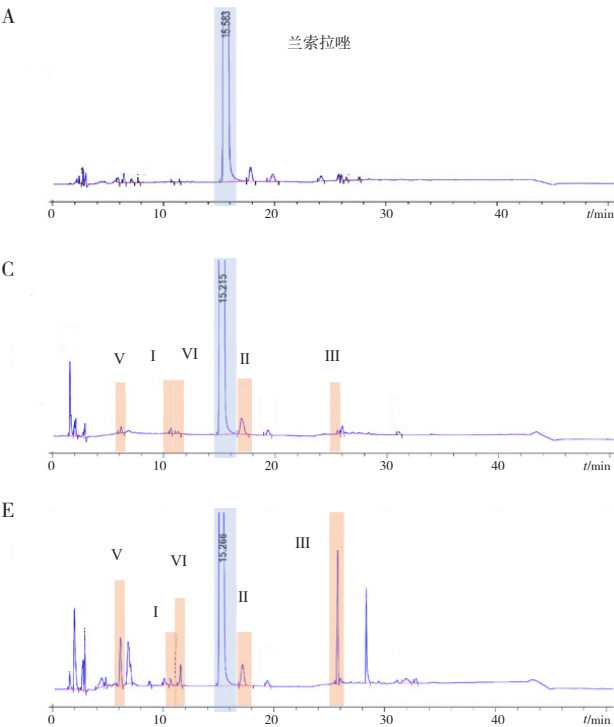


图3 专属性试验HPLC色谱图
Figure 3. HPLC chromatogram for the specificity test

注：A. 未破坏；B. 酸破坏；C. 碱破坏；D. 氧化破坏；E. 高温破坏；F. 光破坏。

表2 兰索拉唑及各杂质的HPLC分析参数

Table 2. HPLC analytical parameters of lansoprazole and its related impurities

药物名称	相对保留时间	回归方程	r	浓度范围（ $\mu\text{g/mL}$ ）	校正因子	定量限（ $\mu\text{g/mL}$ ）	检出限（ $\mu\text{g/mL}$ ）
兰索拉唑	1.00	$Y=21.158X+3.468$	0.999 7	1.092~21.840	—	0.546	0.182
杂质I	0.70	$Y=22.031X+0.182$	0.999 8	1.094~21.880	1.00	0.540	0.180
杂质II	1.13	$Y=15.307X-0.316$	0.999 7	1.048~20.960	1.32	0.410	0.137

续表2

药物名称	相对保留时间	回归方程	<i>r</i>	浓度范围 (μg/mL)	校正因子	定量限 (μg/mL)	检出限 (μg/mL)
杂质III	1.69	$Y=20.222X+0.061$	0.999 2	1.034~20.680	1.00	0.540	0.180
杂质IV	0.37	$Y=16.617X+0.204$	0.999 9	1.014~20.280	1.27	0.430	0.143
杂质V	0.40	$Y=45.623-0.781$	0.999 8	1.128~22.560	0.46	0.230	0.077
杂质VI	0.78	$Y=22.441X+0.182$	0.999 7	1.078~21.560	1.00	0.540	0.180

2.1.6 定量限和检出限

取线性试验中最低浓度溶液, 稀释 10 倍, 精密吸取 5 μL 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。分别以信噪比约为 3 和 10 时对应的浓度计算检出限与定量限, 结果见表 2。

2.1.7 精密度试验

分别精密称取兰索拉唑对照品 0.005 46 g、杂质 I 0.005 47 g、杂质 II 0.005 24 g、杂质 III 0.005 17 g、杂质 IV 0.005 07 g、杂质 V 0.005 64 g 与杂质 VI 0.005 39 g, 置同一 50 mL 量瓶中, 加稀释溶剂溶解并定容至刻度。精密量取该溶液 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用稀释溶剂稀释至刻度。精密吸取上述溶液 10 μL, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。结果显示, 兰索拉唑及 6 种杂质峰面积的 *RSD* 分别为 0.22%、0.15%、0.18%、0.42%、0.12%、0.35%、0.31% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验

精密吸取同一份供试品溶液 10 μL, 于室温下分别放置 0、5、10、15、20、24、48 h 后, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果显示, 兰索拉唑及 6 种杂质峰面积的 *RSD* 分别为 0.20%、0.20%、0.25%、0.55%、0.30%、0.13%、0.68% ($n=7$), 表明供试品溶液在 20 °C 条件放置 48 h 稳定性良好。

2.1.9 重复性试验

取同一批次注射用兰索拉唑(批号: RK11951117), 按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 并按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。采用外标法和校正因子的自身对照法计算 6 种杂质及最大单杂的含量, 并评估其精密度。结果显示, 杂质 I~VI 的平均含量分别为 0.200%、0.130%、0.006%、0.005%、0.005%、0.006%, 最大单杂的平均含量为 0.030%。各成分含量测定的 *RSD* 分别为 0.52%、0.47%、0.88%、0.94%、1.21%、1.52% ($n=6$), 表明该方法重复性良好。

2.2 注射用兰索拉唑中杂质的细胞毒性试验研究

本研究通过考察注射用兰索拉唑中可能存在的 6 种杂质对 L929 细胞的毒性反应, 评价其体外细胞毒性, 为优化注射用兰索拉唑的杂质检测方法提供依据。

2.2.1 受试物溶液的制备

将 6 种杂质分别用含 0.5% DMSO、10% 血清的 RPMI 1640 培养液配制成 1、0.5、0.25、0.125 mg/mL 的受试溶液。

阴性对照采用高密度聚乙烯, 经高压灭菌 (121 °C, 30 min) 后, 按 0.2 g/mL 的比例加入含 10% 血清的 RPMI1640 培养液, 于 37 °C 浸提 24 h 制得。

溶剂对照为含 10% 血清的 RPMI 1640 培养液配制的 0.5% DMSO 溶液。

阳性对照为含 10% 血清的 RPMI 1640 培养液配制的 5% DMSO 溶液。

2.2.2 MTT 比色法

取生长 48~72 h、状态旺盛的 L929 细胞, 经消化、计数后, 以每孔约 1×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板。设置空白对照组、阴性对照组 (高密度聚乙烯浸提液)、溶剂对照组 (0.5% DMSO)、阳性对照组 (5% DMSO) 以及受试物组 (含 1、0.5、0.25、0.125 mg/mL 4 个浓度的杂质溶液, 每个浓度设 6 个复孔), 每孔加入 100 μL 相应液体, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。

培养结束后, 弃去原培养液, 各组分别加入 100 μL 新鲜配制的相应溶液: 空白对照组加入新鲜培养液, 阴性对照组加入阴性对照液, 溶剂对照组加入 0.5% DMSO 溶液, 阳性对照组加入 5% DMSO 溶液, 各受试物组分别加入对应浓度的杂质溶液。继续培养 72 h 后于显微镜下观察细胞形态变化。

随后, 每孔加入 50 mg/mL MTT 溶液 20 μL, 继续培养 4 h。弃去孔内液体, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min 使甲臢结晶充分溶解。采用

酶标仪在 570 nm 和 630 nm 双波长下测定各孔光密度 (OD) 值, 并按以下公式计算相对增殖率 (relative growth rate, RGR) 及受试物的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀), 计算公式如下:

$$RGR_1 = (A_1/A_0) \times 100\%$$

$$RGR_2 = (A_2/A_3) \times 100\%$$

式中: RGR₁: 阴性、阳性及溶剂对照组的相对增殖率; RGR₂: 各受试物组的相对增殖率; A₀: 空白对照组 OD 值; A₁: 阴性对照组、阳性对照组或溶剂对照组 OD 值; A₂: 受试物组吸光度; A₃: 溶剂对照组 OD 值。

2.2.3 结果判定

根据计算得到的 RGR, 根据 GB/T 14233.2-2005 标准^[16], 依照以下分级标准进行毒性评价: 0 级: RGR ≥ 100%; 1 级: 80% ≤ RGR ≤ 99%; 2 级: 50% ≤ RGR ≤ 79%; 3 级: 30% ≤ RGR ≤ 49%; 4 级: RGR ≤ 29%。试验成立的条件为: 阴性对照组的毒性反应不高于 1 级, 且阳性对照组的毒性反应至少达到 3 级。若阴性对照组或阳性对照组的反

应不符合上述要求, 则试验无效, 需重新进行。

2.2.4 试验结果

空白对照组和阴性对照组细胞贴壁生长良好, 形态呈梭形或不规则三角形, 细胞数量增加正常。其中, 阴性对照组 RGR 为 92%, 毒性反应分级为 1 级; 阳性对照组细胞层几乎完全破坏, 细胞多数呈圆形, 胞核固缩或崩解, 无折光性, 细胞数量未见增加, RGR 为 9%, 毒性反应分级为 4 级。上述结果符合试验成立条件。

溶剂对照组细胞贴壁生长良好, 形态呈梭形或不规则三角形, 细胞数量增加正常 RGR 为 95%, 毒性反应分级为 1 级, 表明 0.5% DMSO 无细胞毒性反应, 对细胞生长无影响。

6 种杂质 (I、II、III、IV、V、VI) 在 1 mg/mL 浓度下细胞均贴壁生长不佳, 多数细胞呈现圆缩形态, 毒性反应分级为 3 级或 4 级, 即表现为中度至重度细胞毒性。当杂质浓度降至 0.5、0.25、0.125 mg/mL 时, 细胞数量逐渐恢复增长, RGR 相应升高, 细胞毒性反应逐渐减轻, 呈现一定的浓度依赖性效应。具体结果见表 3。

表3 注射用兰索拉唑中6种杂质的细胞毒性试验结果 (n=6)
Table 3. Cytotoxicity test results for six impurities in lansoprazole for injection (n=6)

组别	浓度 (mg/mL)	RGR (%)	分级	IC ₅₀ (mg/mL)
阴性对照	—	92	1	—
阳性对照	5%	9	4	—
溶剂对照	0.5%	95	1	—
杂质I	1	16	4	0.286
	0.5	23	4	
	0.25	64	2	
	0.125	73	2	
	0.0625	87	1	
杂质II	1	11	4	0.181
	0.5	12	4	
	0.25	37	2	
	0.125	66	2	
	0.0625	87	1	
杂质III	1	47	3	0.903
	0.5	64	2	
	0.25	79	2	
	0.125	87	1	
	0.0625	91	1	
杂质IV	1	30	3	0.535
	0.5	46	3	
	0.25	81	1	
	0.125	91	1	
	0.0625	91	1	
杂质V	1	15	4	0.341
	0.5	27	4	
	0.25	69	2	
	0.125	86	1	
	0.0625	91	1	
杂质VI	1	31	3	0.656
	0.5	68	2	
	0.25	76	2	
	0.125	91	1	
	0.0625	91	1	

注: “—” 在阴性对照组中表示该指标不适用; 在阳性对照与溶剂对照组中表示该数值未予测定。

根据各处理组 OD 值计算 RGR 并进行细胞毒性分级。结果显示, 6 种杂质的 IC₅₀ 大小依次为: 杂质 III > 杂质 VI > 杂质 IV > 杂质 V > 杂质 I > 杂质 II, 表明其细胞毒性强弱顺序为: 杂质 II > 杂质 I > 杂质 V > 杂质 IV > 杂质 VI > 杂质 III。因此, 杂质 II、I、V 应作为检测方法优化的重点目标。

2.3 样品测定

对市售的 11 个生产企业样品的有关物质进行了检测, 杂质个数、杂质总量结果见表 4。考虑到现有企业执行标准仅对杂质 I、II、III、IV、V 的限度有要求, 按照拟定的方法仅对上述 5 种杂质进行检测, 并对比了本方法和《中国药典》^[11] 现行方法的差异 (表 5)。在拟定的色谱条件中发现杂质 II、III、IV、V 的检出率大大提高。杂质个数有所增加, 但由于增加的杂质含量均很低, 故对杂质总含量的影响并不明显。样品中最大的杂质为毒性较大的杂质 II, 其含量在 0.04%~0.26% 之间, 其他单个最大杂质含量在 0.01%~0.06% 之间, 杂质总量在 0.1%~0.4% 之间, 提示不同企业样品质量存在一定差异。

表4 检测样品中杂质个数和杂质总量
Table 4. Number and total content of lansoprazole impurities in the tested samples

企业代号	杂质个数	杂质总量占比 (%)
原研	11	0.18
CX	7	0.17
HC	11	0.19
ASK	9	0.09
JSL	8	0.21
RK	12	0.32
HNZH	11	0.31
SHYX	12	0.14
HP	7	0.33
LX	12	0.18
CDBY	8	0.10
PS	8	0.21

3 讨论

注射用兰索拉唑现行有关物质检测方法主要包括氨基柱法、C₁₈ 柱等度法及 C₁₈ 柱梯度法等。本研究对氨基柱与 C₁₈ 柱的检测效果进行了对比, 结果表明两者检测结果未见显著差异。鉴于 C₁₈ 柱在常规分析中的普及性, 后续重点考察了基于 C₁₈ 柱的几种方法。按现行药典方法操作时, 发现杂质 III 峰形较宽, 杂质 IV 与杂质 V 易发生重叠。为解决上述问题, 本研究在 C₁₈ 柱梯度洗脱体系基础上, 参考文献方法^[4, 14], 综合考虑分离效果

与检测灵敏度, 建立了适用于注射用兰索拉唑杂质分析的新 HPLC 法。经系统优化后, 兰索拉唑与 6 种主要杂质 (I~VI) 实现基线分离。方法学验证表明, 兰索拉唑与各杂质的检出限和定量限均展现出较为优异的方法性能。

在强制降解试验中, 酸破坏条件下未检出杂质 I 和 IV; 碱破坏、高温破坏及光破坏条件下均未产生杂质 IV。该现象与各杂质结构及降解机制相符: 杂质 IV 作为兰索拉唑合成前体——硫醚类似物, 其结构中的硫醚键在各类降解条件下难以通过逆向反应生成, 因而其来源应归属于合成工艺过程而非后期降解, 属于典型的工艺杂质; 杂质 I 作为苯并咪唑环的开环产物, 在强酸环境中, 兰索拉唑分子优先发生亚磺酰基的 Smiles 重排这一快速竞争性反应, 从而显著抑制了开环路径的进行, 导致其在酸破坏条件下难以检出。结合兰索拉唑原料药的合成工艺以及文献^[4] 推测, 杂质 I、II、III、VI 属降解杂质, 杂质 IV、V 则可能为合成原料药合成工艺中的副产物。

本研究选用小鼠成纤维细胞 L929 作为体外毒性评价模型, 主要基于其在药品和生物材料安全性评价领域的国际公认性及科学合理性。L929 细胞系是国际标准化组织 (ISO 10993-5) 及《美国药典》生物学安全性评价指南中推荐的常用细胞模型之一, 长期广泛应用于药物杂质及其他相关领域的体外细胞毒性筛选研究^[17-18]。该模型具有生长稳定、代谢活性均一、对化学刺激响应灵敏等特点, 能够可靠地反映外源物质对哺乳动物细胞的潜在毒性效应。考虑到注射用兰索拉唑通过静脉给药后, 其所含杂质可随体循环分布于全身各组织, 而成纤维细胞作为广泛存在于结缔组织的基础细胞类型, 是评价此类化学物质细胞相容性的适宜体外模型。细胞毒性评估结果显示, 杂质 II 的毒性反应最为显著, 且该杂质在市售样品中普遍检出含量较高, 因此被确定为重点监控对象。

综合杂质谱分析与毒性评价结果, 建议提高对杂质 II 和总杂质量的科学控制标准。参考 ICH M7 及文献^[15, 19] 基于临床暴露周期的设定思路, 对杂质 II 的限度进行了深入论证。尽管右兰索拉唑中某些杂质控制极严 (如 0.002 5%), 但杂质 II 不属于遗传毒性杂质, 结合工艺可行性, 建议将其特定限度设为 0.2%, 总杂质限度不超过 0.6%。参考《欧洲药典》^[9] 对特定已知杂质 II 的限度为

表5 基于药典标准方法与探索性方法的兰索拉唑有关物质测定结果对比 (%, n=3)
Table 5. Comparison of lansoprazole related substances determination results: pharmacopoeial method vs. exploratory method (%, n=3)

生产企业	批号	杂质个数		杂质I		杂质II		杂质III		杂质IV		杂质V		其他单个杂质		总杂质	
		本研究	药典	本研究	药典	本研究	药典	本研究	药典	本研究	药典	本研究	药典	本研究	药典	本研究	药典
原研	H470	11	10	—	—	0.130	0.130	0.007	—	0.005	—	0.005	0.005	0.040	0.050	0.187	0.185
CX	03091011	7	6	—	—	0.120	—	0.006	—	—	—	0.007	—	0.040	0.100	0.173	0.100
HC	0601	10	8	—	—	0.080	—	0.030	—	0.009	—	0.006	—	0.070	0.050	0.195	0.050
HC	1204	12	8	—	—	0.080	0.200	0.020	—	0.006	—	0.010	—	0.070	0.050	0.186	0.250
ASK	B07022	8	2	—	—	0.040	—	0.040	—	0.005	—	0.006	—	0.010	0.040	0.101	0.040
ASK	F05082	10	4	—	—	0.040	—	0.020	—	0.005	—	—	—	0.020	0.040	0.085	0.040
JSL	1210103	7	7	—	—	0.130	0.100	0.006	—	0.006	—	0.003	0.003	0.050	0.040	0.195	0.143
JSL	0410104	9	9	—	—	0.130	0.100	0.020	—	0.006	—	0.010	—	0.050	0.040	0.216	0.140
RK	11951117	13	5	0.200	0.200	0.130	0.100	0.006	0.010	0.005	—	0.005	—	0.030	0.030	0.376	0.340
RK	11851122	10	5	0.020	0.020	0.070	0.100	0.100	0.010	0.013	—	0.050	—	0.030	0.030	0.283	0.160
HNZH	0111	12	8	0.020	—	0.260	0.300	0.006	—	0.009	0.005	0.006	0.007	0.040	0.040	0.341	0.352
HNZH	0102	11	10	0.020	—	0.210	0.200	0.006	—	0.008	0.004	0.005	0.080	0.040	0.050	0.289	0.334
SHYX	30303	12	6	—	—	0.080	0.070	0.020	—	—	—	0.006	0.003	0.030	0.030	0.136	0.103
SHYX	40307	12	7	—	—	0.090	0.070	0.009	—	0.005	—	0.007	0.005	0.020	0.030	0.131	0.105
HP	0601	7	7	0.050	0.050	0.260	0.300	—	—	—	—	0.005	0.003	0.020	0.010	0.335	0.363
HP	0401	7	7	0.060	0.050	0.260	0.200	—	—	—	—	0.002	0.003	0.020	0.010	0.342	0.263
LX	5045252	11	10	—	—	0.050	—	0.100	—	0.008	—	0.004	—	0.020	0.050	0.182	0.050
LX	5105154	12	10	—	—	0.070	—	—	—	0.009	—	0.005	—	0.060	0.200	0.144	0.200
CDBY	130504	7	9	—	—	0.070	0.060	0.009	0.007	—	—	0.003	—	0.010	0.020	0.092	0.087
CDBY	130514	8	9	0.006	0.006	0.050	0.050	0.010	0.010	0.004	—	0.003	—	0.030	0.040	0.103	0.106
PS	0304-8	7	6	0.010	—	0.110	—	0.030	—	0.006	—	0.004	—	0.050	0.200	0.210	0.200
PS	0703-3	8	6	—	—	0.080	0.060	0.010	—	0.006	—	0.005	—	0.030	0.080	0.131	0.110

注：“—”表示未检出。

0.4%，总杂质不超过 0.6%，《日本药典》^[10]对单个杂质的通用限度为 0.1%，总杂质不超过 0.6%，而《中国药典》^[11]对单个杂质的通用限度为 0.5%，总杂质不超过 1.0%。试验数据表明，本研究建议限度在现有工艺下具有普遍可达性，既能有效识别工艺不稳定的批次，又符合 ICH Q3B 指导原则中基于临床暴露量的设定理念。

本方法较《中国药典》现行方法在分离度、灵敏度及杂质识别能力上均有提升，确保上述毒性较强的杂质与主成分兰索拉唑以及其他杂质之间实现良好分离，避免了共流出干扰，提高了分离度、检测灵敏度及方法特异性，实现杂质准确定量。研究还发现，目前各企业标准虽严于药典，但控制策略不一，不利于质量标准化。因此，本研究所建立的分析方法与提议的控制标准，可为统一和提升注射用兰索拉唑质量控制水平提供技术支持，促进国内标准与国际接轨。

参考文献

- 1 Benchamana A, Mori H, Macdougald OA, et al. Regulation of adipocyte differentiation and metabolism by lansoprazole[J]. Life Sci, 239(15): 116897. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116897.
- 2 Satoh H. Discovery of lansoprazole and its unique pharmacological properties independent from anti-secretory activity[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(1): 67–75. DOI: 10.2174/138161213803903119.
- 3 Ji N, Li H, Zhang YX, et al. Lansoprazole (LPZ) reverses multidrug resistance (MDR) in cancer through impeding ATP-binding cassette (ABC) transporter-mediated, chemotherapeutic drug efflux and lysosomal sequestration[J]. Drug Resist Updat, 2024, 76: 101100. DOI: 10.1016/j.drug.2024.101100.
- 4 李岩, 贾欢欢, 黄青, 等. 高效液相色谱-高分辨轨道阱质谱联用法对兰索拉唑肠溶制剂的杂质谱研究[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(5): 577–585. [Li Y, Jia HH, Huang Q, et al. Impurity spectra of lansoprazole enteric-coated preparations by high performance liquid chromatography-high resolution orbitrap mass spectrometry[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2023, 54(5): 577–585.] DOI: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023042601.
- 5 刘文欣, 李岩, 袁耀佐, 等. 多种技术不同维度分析兰索拉唑肠溶片溶出度异常原因[J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(2): 224–229. [Liu WX, Li Y, Yuan YZ, et al. Analysis of the causes for abnormal dissolution of lansoprazole enteric-coated tablets by multiple techniques and different dimensions[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2024, 55(2): 224–229.] DOI: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023052401.
- 6 刘宇澄, 冯雪松. 电感耦合等离子体质谱法测定兰索拉唑原料药中 10 种杂质元素[J]. 分析科学学报, 2024, 40(3): 369–372. [Liu YC, Feng XS. Determination of 10 elemental impurities in lansoprazole API by ICP-MS[J]. Journal of Analytical Science, 2024, 40(3): 369–372.] DOI: 10.13526/j.issn.1006-6144.2024.03.017.
- 7 杨良, 张毅, 朱高峰, 等. 兰索拉唑潜在杂质的合成[J]. 化学试剂, 2020, 42(9): 1120–1124. [Yang L, Zhang Y, Zhu GF, et al. Synthesis of potential impurities of lansoprazole[J]. Chemical Reagents, 2020, 42(9): 1120–1124.] DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2020007576.
- 8 United States Pharmacopeia and National Formulary (USP-NF)[S]. 2025.
- 9 The European Pharmacopoeia 11.0[S]. 2022: 3204–3205.
- 10 The Japanese Pharmacopoeia 18th edition[S]. 2021: 1241–1242.
- 11 中国药典 2025 年版. 二部[S]. 2025: 283–286.
- 12 张余霞, 谭定渊, 史朝晖. HPLC 法对注射用右兰索拉唑中有关物质的测定[J]. 中国合理用药探索, 2021, 18(8): 106–111. [Zhang YX, Tan DY, Shi ZH. Determination of related substances in dexlansoprazole for injection by HPLC[J]. China Licensed Pharmacist, 2021, 18(8): 106–111.] DOI: 10.3969/j.issn.2096-3327.2021.8.022.
- 13 王伟姣, 李彩花, 唐敬亮, 等. 高效液相色谱法测定右兰索拉唑含量及其异构体[J]. 中南药学, 2024, 22(9): 2424–2428. [Wang WJ, Li CH, Tang JL, et al. Determination of dexlansoprazole and its isomer by high performance liquid chromatography[J]. Central South Pharmacy, 2024, 22(9): 2424–2428.] DOI: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.09.028.
- 14 吴莉, 仲艳. HPLC-MS/MS 法分析兰索拉唑中潜在基因毒性杂质[J]. 中国药师, 2022, 25(2): 378–381. [Wu L, Zhong Y. Analysis of potential genotoxic impurities in lansoprazole by HPLC-MS/MS[J]. China Pharmacist, 2022, 25(2): 378–381.] DOI: 10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.02.035.
- 15 张倩, 申芸, 赵恂, 等. 兰索拉唑相关杂质的遗传毒性研究[J]. 中国药学杂志, 2023, 58(23): 2165–2171. [Zhang Q, Shen Y, Zhao X, et al. Study on the genotoxicity of lansoprazole related impurities[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2023, 58(23): 2165–2171.] DOI: 10.11669/cpj.2023.23.009.
- 16 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会. 医用输液、输血、注射器具检验方法第 2 部分: 生物学试验方法. GB/T 14233.2-2005[S]. 2005.
- 17 黄雅理, 孙会敏, 林飞, 等. 采用细胞毒性试验对 23 个药用包装材料进行生物安全性评价[J]. 癌变·畸变·突变, 2022, 34(2): 139–143. [Huang YL, Sun HM, Lin F, et al. Biocompatibility evaluation of 23 pharmaceutical packaging materials using cytotoxicity tests[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2022, 34(2): 139–143.] DOI: 10.3969/j.issn.1004-616x.2022.02.012.
- 18 张钰莹, 单颖. 激活素 A 对 L929 成纤维细胞迁移、侵袭及细胞因子分泌的影响[J]. 免疫学杂志, 2022, 38(1): 22–29. [Zhang YY, Shan Y. Effects of activin a on migration, invasion and cytokine secretion of L929 fibroblasts[J]. Immunological Journal, 2022, 38(1): 22–29.] DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20220004.
- 19 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. [Du Y, Zhang Y, Wang YX, et al. Determination and toxicity analysis of dexlansoprazole N-oxide impurity[J]. Drug Standards of China, 2018, 19(1): 32–37.] DOI: 10.19778/j.chp.2018.01.007.

收稿日期: 2025 年 09 月 22 日 修回日期: 2025 年 12 月 24 日

本文编辑: 钟巧妮 李 阳