

盐酸溴己新注射液中溴己新与辅料反应杂质研究

曾智丽^{1,2}, 吴中礼², 刘保林², 贾飞², 楼金芳², 余露山^{1*}(1. 浙江大学, 杭州 310058; 2. 杭州百诚医药科技股份有限公司, 杭州 311103)

摘要: 目的 对盐酸溴己新注射液中特有的未知杂质进行结构鉴定、合成和分析, 并作为已知杂质控制。方法 通过二维液相色谱串联质谱推导了未知杂质的结构, 根据产品的处方工艺推导出了杂质来源, 分析杂质产生机制, 采用定向合成的方式获得杂质单体, 并采用二维液相色谱串联质谱、核磁共振等技术确证杂质的结构, 最后采用 HPLC 对杂质进行分析方法验证。结果 确证该类杂质为溴己新与辅料葡萄糖反应生成, 2 个杂质与盐酸溴己新的校正因子分别为 2.2 和 2.4, 分析方法专属性和重现性良好。结论 将该 2 个注射液特有杂质分别命名为杂质 1 和杂质 2, 并作为已知杂质定入标准, 按照自身对照加校正因子法计算杂质含量。本研究对指导盐酸溴己新注射液的杂质控制以及辅料葡萄糖筛选有着重要的意义。

关键词: 盐酸溴己新; 杂质解析; 未知杂质; 高效液相色谱-质谱联用

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)03-0378-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223213

引用本文: 曾智丽, 吴中礼, 刘保林, 等. 盐酸溴己新注射液中溴己新与辅料反应杂质研究[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(3): 378-385.

Study on the Reaction Impurities Between Bromhexine Hydrochloride and Excipients in Bromhexine Hydrochloride Injection

ZENG Zhili^{1,2}, WU Zhongli², LIU Baolin², JIA Fei², LOU Jinfang², YU Lushan^{1*}(1. Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Hangzhou Bio-Sincerity Pharma-Tech Co., Ltd., Hangzhou 311103, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify, synthesize and analyze the structure of unknown impurities unique to bromhexine hydrochloride injection and set the impurities as known impurity to control. **METHODS** The structure of unknown impurities was derived through two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry(2DLC-HRMS/MS), and the source of impurities was derived based on the product's prescription process. The mechanism of impurities generation was analyzed, and impurity monomers were obtained through directional synthesis. The structure of impurities was confirmed using techniques such as 2DLC-HRMS/MS and nuclear magnetic resonance. Finally, HPLC was used to verify the analysis method of impurities. **RESULTS** It was confirmed that such impurities were produced in a reaction between bromhexine and the excipient glucose. The correction factor of the two impurities were 2.2 and 2.4, the analytical method was specific and reproducible. **CONCLUSION** Name the two injection specific impurities as impurity 1 and impurity 2 respectively, and use them as known impurities to be included in the standard, calculate the impurity content using the self control and correction factor method. This study is of great significance in guiding the impurity control of bromhexine hydrochloride injection and the screening of excipient glucose.

KEYWORDS: bromhexine hydrochloride; impurities analysis; unknown impurity; LC-MS/MS

盐酸溴己新分子式为 $C_{14}H_{20}Br_2N_2 \cdot HCl$, 结构式见图 1。盐酸溴己新为临床常用的祛痰药, 具有较强的黏液溶解调节作用, 主要用于治疗慢性支气管炎、支气管哮喘、支气管扩张、矽肺等有白色黏痰又不易咳出的患者^[1]。其作用机制主要是对糖蛋白与细胞核黏液腺体合成起抑制作用, 进而有效地减少唾液酸分泌, 痰黏度有效降低, 能够更好地排出体外^[2-3]。目前盐酸溴己新上市剂型包括片剂、口服溶液、注射液等。由国家药品审评中心公布的盐酸溴己新注射液参比制剂为勃林格殷格翰公司在日本上市的盐酸溴己新注射液, 商

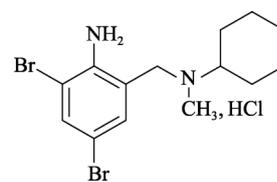


图 1 盐酸溴己新结构式

Fig. 1 Structure of bromhexine hydrochloride

品名 Bisolvon[®], 目前未进口至国内。呼吸道疾病在中国发病率高且患者群广, 根据中国卫生统计年鉴(2020年版)数据, 2018年中国居民呼吸系统疾病患病率为 2.72%。呼吸系统疾病是中国居民

作者简介: 曾智丽, 女, 硕士 E-mail: 470122685@qq.com

*通信作者: 余露山, 男, 博士, 教授 E-mail: yuls@zju.edu.cn

第4大死因, 2019年呼吸系统疾病患者的死亡率为65.02/10万^[4]。

注射液较片剂有更高的生物利用度, 无首过效应。因此研究开发与参比制剂质量和疗效一致的盐酸溴己新注射液具有良好的市场前景以及应用价值。

盐酸溴己新原料药及盐酸溴己新片的质量研究相对成熟。其中, 中国药典2020年版二部收载了盐酸溴己新原料药及盐酸溴己新片, 收载的已知杂质为杂质I^[5], 日本药典XVIII版收载盐酸溴己新原料药, 但未收载已知杂质^[6], 欧洲药典10.0版收载了盐酸溴己新原料药, 收载的已知杂质为杂质A、B、C、D、E^[7]。以上杂质均为盐酸溴己新原料药合成工艺杂质或降解杂质。笔者所在团队在开发盐酸溴己新注射液的过程中, 发现了1个药典未收载的杂质(含量约0.5%)大于鉴定限(0.2%), 该杂质虽然在参比制剂中的检出量与自制制剂基本一致, 但是根据ICH指导原则Q3B(R2)的规定, 该杂质超过了产品的鉴定限, 由于药物杂质会增加不良反应风险, 需严格控制, 因此对该未知杂质进行结构解析很有必要。

1 仪器与试剂

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); 色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈键合硅胶(4.6 mm×250 mm, 5 μm); U3000双三元高效液相+QE型高分辨质谱联用仪(美国赛默飞公司); 400 MHz核磁共振波谱仪和500 MHz核磁共振波谱仪(美国Bruker公司); KQ5200DE型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); S210型pH计、XPE26型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

盐酸溴己新注射液(2 mL: 4 mg)(日本サノフイ株式会社, 批号: 8981004); 盐酸溴己新注射液(2 mL: 4 mg)(A企业, 批号: 1902001、1902002、1902003); 甲醇和乙腈(色谱纯, 美国Merck公司); 磷酸二氢钾、磷酸和三乙胺(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 超纯水由Milipore超纯水机制备。

2 盐酸溴己新注射液中的杂质分析与辅料杂质的发现

2.1 盐酸溴己新原料杂质谱的解析

根据供应商提供的制备工艺, 盐酸溴己新的合成过程是2-氨基苯甲酸甲酯经溴代得到溴化物

(2-氨基-3,5-二溴苯甲酸甲酯), 经硼氢化钾还原得到还原物, 再和N-甲基环己胺缩合得到溴己新, 再与盐酸成盐后精制得到盐酸溴己新。通过原料合成工艺、原料影响因素试验及强制降解试验结果, 笔者判断中国药典杂质I、欧洲药典杂质A、C和D为原料合成工艺杂质, 欧洲药典杂质B、E是降解杂质, 另有氧化降解杂质(N位氧化)。杂质的生成路径见图2。

2.2 盐酸溴己新注射液中未知杂质来源分析

盐酸溴己新注射液中的辅料有L-酒石酸、葡萄糖和注射用水, 通过处方研究发现, 辅料中加葡萄糖与不加葡萄糖直接影响相对保留时间(relative retention time, RRT)0.42未知杂质的产生, 结果见表1。同时本研究对葡萄糖不同处方用量(90%, 92.5%, 95%和100%)的样品检测有关物质, 发现该杂质随处方中葡萄糖用量增加而增大, 结果见表2。表明辅料葡萄糖是RRT 0.42杂质产生的重要因素。

表1 添加葡萄糖与不添加葡萄糖杂质对比研究结果

Tab. 1 Comparative study results of impurities of adding glucose and without adding glucose

样品	含量/%				
	RRT 0.42	杂质D	RRT 0.74	杂质A	杂质B
不加葡萄糖(未灭菌)	ND	0.01	0.04	0.05	ND
不加葡萄糖(灭菌)	ND	0.01	0.04	0.04	0.03
加葡萄糖(未灭菌)	0.49	0.01	0.04	0.04	ND
加葡萄糖(灭菌)	0.49	0.01	0.04	0.04	0.02

表2 不同葡萄糖加入量杂质对比研究结果

Tab. 2 Comparative study results of impurities with different adding glucose additions

葡萄糖加入量	含量/%				
	RRT 0.42	杂质D	RRT 0.74	杂质A	杂质B
90%处方量(灭菌)	0.45	0.02	0.03	0.04	0.04
92.5%处方量(灭菌)	0.48	0.02	0.03	0.04	0.06
95%处方量(灭菌)	0.50	0.02	0.03	0.04	0.06
100%处方量(灭菌)	0.52	0.02	0.03	0.04	0.06

3 盐酸溴己新注射液中未知杂质结构分析

3.1 色谱条件

该杂质结构确证所采用的色谱条件是基于中国药典2020年版盐酸溴己新标准及相关参考文献^[8-12]中的相关色谱条件进行优化后开发获得。

一维色谱条件: 以Agilent Zorbax SB C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)为色谱柱; 以0.02 mol·L⁻¹磷酸二氢钾缓冲液(取磷酸二氢钾2.74 g, 加水1 000 mL使溶解, 加三乙胺1 mL, 用磷酸调pH

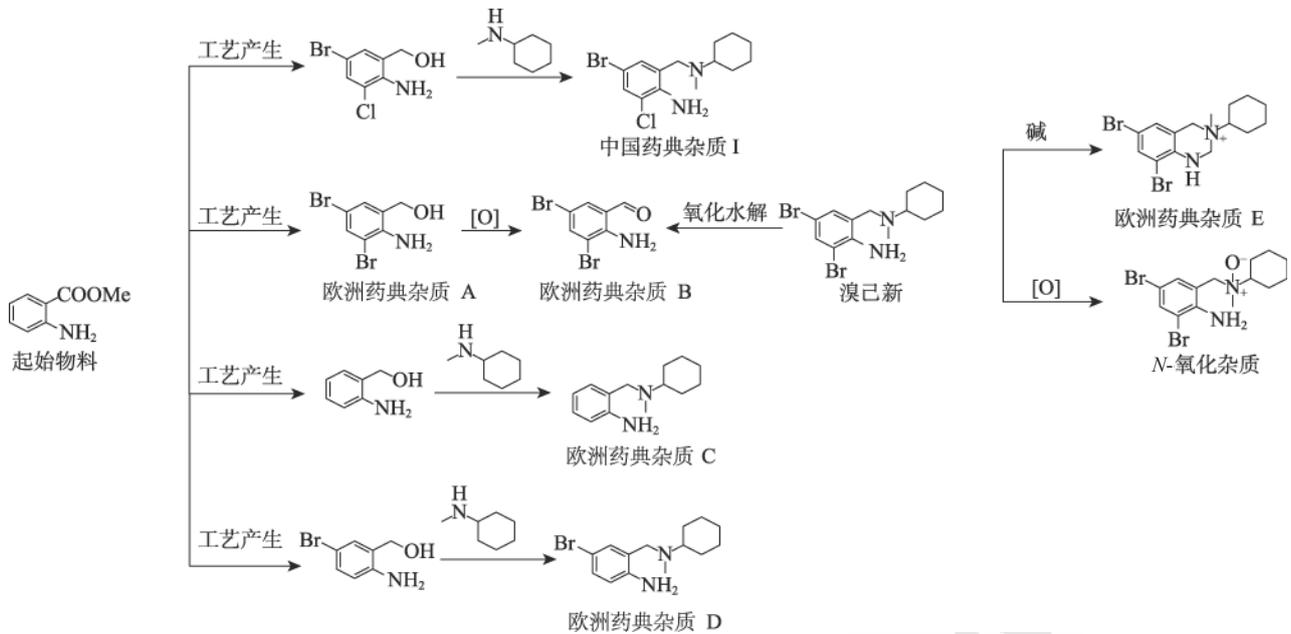


图2 杂质生成路径

Fig. 2 Generation path of impurity

值至 3.3) 为流动相 A, 乙腈为流动相 B; 进行梯度洗脱 (0~10 min, 75%→60%A; 10~30 min, 60%→25%A; 30~30.01 min, 25%→75%A; 30.01~35 min, 75%A); 检测波长 245 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 45 °C; 进样体积 10 μL。

二维色谱条件: YMC-Triart Bio C₁₈(4.6 mm×50 mm, 3 μm) 色谱柱; 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B; 非线性梯度洗脱: 按表 3 的梯度方法进行洗脱; 柱温 45 °C; 进样体积 50 μL。

表 3 梯度洗脱
Tab. 3 Gradient elution

时间/min	流速/mL·min ⁻¹	流动相A/%	流动相B/%
42.0	0	95	5
42.5-43.0	0.5	95	5
50.0-51.5	0.5	5	95
52.0-56.5	0.5	95	5
57.0	0	95	5

3.2 质谱条件

电喷雾离子源, 正离子检测模式 (ESI⁺), 扫描范围 (*m/z*): 100~1 500; 鞘气: 48 arb; 辅助气: 10 arb; 辅助气温度: 350 °C; 离子传输管温度: 300 °C; 正离子电压: 3.0 kV; MS² 碰撞能: NCE 10/30/45。

3.3 杂质的结构推测

取盐酸溴己新注射液直接进样, 质谱图显示 RRT 0.42 的未知杂质的质荷比 (*m/z*)[M+H]⁺ 为 537.058 9, 质谱图见图 3, 结合溴己新的结构特点

对未知杂质进行推测, 杂质的相对分子质量比溴己新多约 162, 正离子峰为 537.058 9, 推断杂质分子式为 C₂₀H₃₀Br₂N₂O₅⁺ ([M+H]⁺)。进一步形成

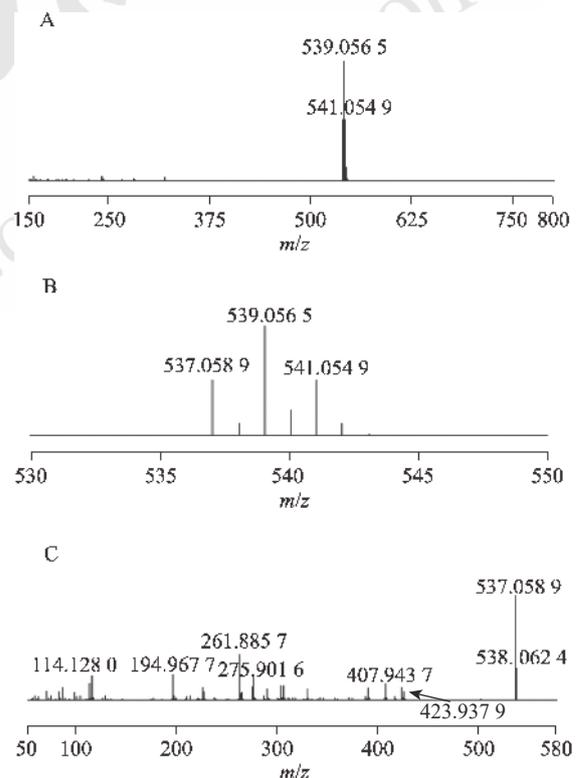


图3 杂质质谱图

A—一级质谱; B—局部放大一级质谱; C—二级质谱。

Fig. 3 2DLC-HRMS/MS spectra of impurity

A—Primary mass spectrometry; B—partial magnification of primary mass spectrometry; C—secondary mass spectrometry.

负离子碎片峰 423.937 9, 407.943 7, 261.885 7, 114.1280, 推测杂质的裂解途径。推断该杂质是葡萄糖与溴己新发生脱水缩合反应而生成。可能的杂质裂解见图 4。

3.4 杂质生成机制分析

葡萄糖为盐酸溴己新注射液处方辅料之一,葡萄糖结构中的羟基与主药盐酸溴己新结构中的氨基在水溶液中极易缩合生成杂质,葡萄糖在水溶液中存在开链和环状的 2 种平衡态,其中以环状为稳定构型,占优势比例。将环状葡萄糖与溴己新脱水缩合反应生成的杂质命名为杂质 1。开链葡萄糖与溴己新缩合应生成 1 个直链型亚胺杂质 A,直链型亚胺杂质 A 与杂质 1 为互变异构体,而亚胺杂质 A 不稳定,易转化为杂质 1(仅杂质 1 可以被成功提纯分离),亚胺杂质 A 在还原剂或还原性杂质存在的情况下,可被还原生成杂质 2。反应机制见图 5。

3.5 其他潜在注射液制剂杂质

由于葡萄糖中可能含有一些杂质(如山梨醇),而溴己新与山梨醇也会发生脱水反应生成杂质 2,反应机制见图 6。

4 盐酸溴己新注射液中特有杂质合成及结构鉴定

4.1 盐酸溴己新注射液中杂质 1 的合成

取 25 g 盐酸溴己新加入 500 mL 锥形瓶中,加 150 mL 水和 150 mL 乙酸乙酯,用碳酸钠调 pH 值到 8~9,搅拌,静置分出乙酸乙酯,水相用乙酸乙酯萃取,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤干燥后的乙酸乙酯减压蒸干得游离溴己新。

将 11.28 g 游离溴己新,54.00 g 葡萄糖溶解在 250 mL *N,N*-二甲基甲酰胺中,再加入 8.52 g 钛酸四异丙酯,搅拌加热到 48 °C 搅拌反应 48 h。将反应液减压蒸干,得黏稠状固体,加入乙腈打浆,滤出固体,固体用乙醇加热到 70 °C 搅拌溶解,冷却后过滤,合并乙醇和乙腈溶液,减压蒸干得黏稠状固体。柱层析(二氯甲烷:甲醇=20:1)洗脱液洗脱组分,减压蒸干,得微黄色固体粉末,即为杂质 1,纯度约为 91%。杂质 1 合成工艺见图 7。

4.2 盐酸溴己新注射液中杂质 1 结构确证

4.2.1 2DLC-HRMS/MS 确证杂质分子量 采用 2DLC-HRMS/MS 确证,由质谱图可知,降解杂质质荷比 (m/z) $[M+H]^+$ 为 537.0589。

4.2.2 $^1\text{H-NMR}$ 确证 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500MHz) δ 7.61(d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.32(d, $J=2.4$ Hz, 1H), 4.50~4.48(d, $J=8.4$ Hz, 1H), 3.94~3.91(d, $J=12.9$ Hz, 1H), 3.60~3.58(dd, $J=11.7$, 2.1Hz, 1H), 3.476~3.45(d, $J=12.9$ Hz, 1H), 3.41~3.37(dd, $J=11.6$, 5.3 Hz, 1H), 3.20~3.16(m, 1H), 3.09~3.05(t, $J=9.1$ Hz, 1H), 3.02~2.99(m, 2H), 2.45~2.40(td, $J=9.7$, 5.5 Hz, 1H), 2.03(s, 3H), 1.83~1.81(d, $J=12.1$ Hz, 1H), 1.77~1.75(d, $J=12.4$ Hz, 4H), 1.60~1.57(d, $J=12.5$ Hz, 1H), 1.27~1.15(m, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 144.79, 135.44, 134.23, 132.01, 115.72, 112.78, 87.53, 77.89, 77.41, 75.18, 70.24, 61.81, 61.27, 56.96, 36.19, 27.95, 27.77,

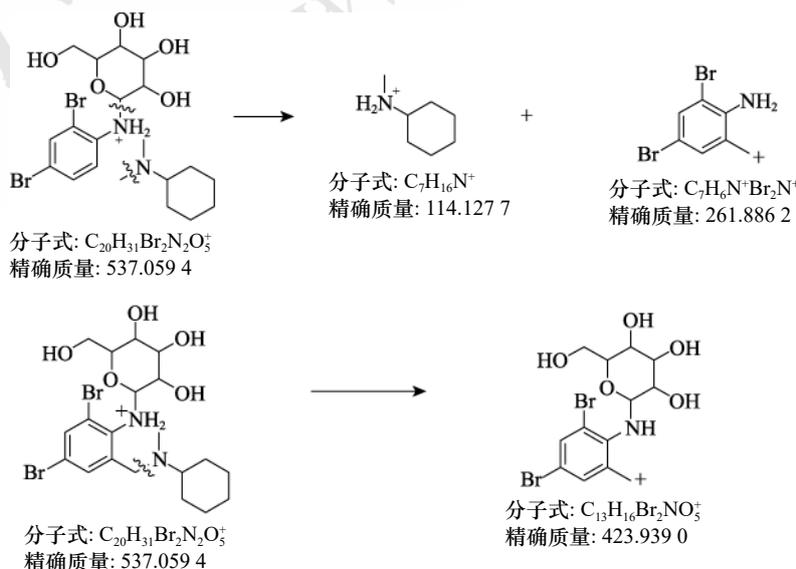


图 4 杂质质谱裂解途径

Fig. 4 Fragmentation pathway of impurity mass spectrometry

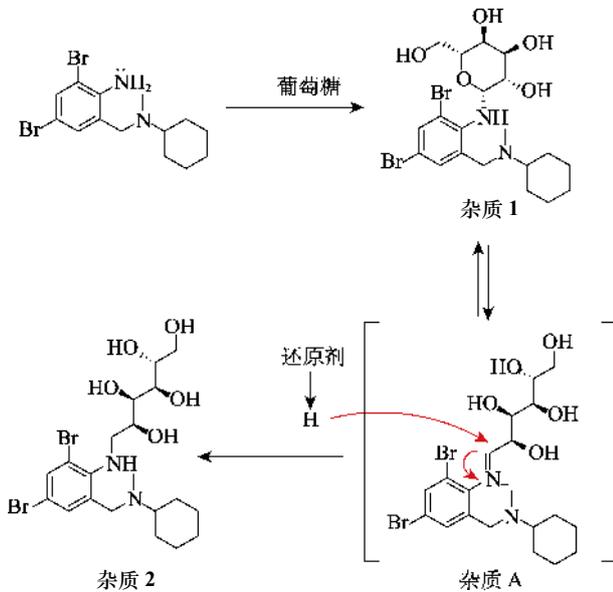


图5 杂质1和杂质2生成机制图

Fig. 5 Mechanism diagram of impurity 1 and impurity 2 generation

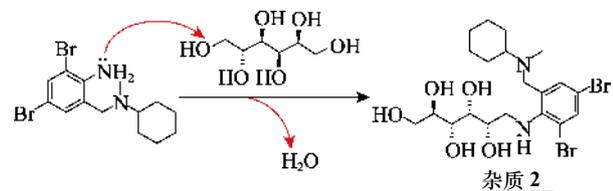


图6 杂质2其他产生途径机制图

Fig. 6 Other generation mechanism of impurity 2



图7 杂质1合成工艺图

Fig. 7 Synthesis diagram of impurity 1

25.88, 25.63, 25.58。

氢谱分析： δ_{H} 7.61 和 δ_{H} 7.32 分别归属于苯环上氢 H-6 和 H-2； δ_{H} 4.50~4.48、 δ_{H} 3.20~3.16、 δ_{H} 3.09~3.05、 δ_{H} 3.02~2.99、 δ_{H} 2.45~2.40 分别归属于次甲基 H-19、H-20、H-23、H-21/H-26 和 H-13； δ_{H} 3.94~3.91 和 δ_{H} 3.48~3.45、 δ_{H} 3.60~3.58 和 δ_{H} 3.41~3.37、 δ_{H} 1.83~1.81 和 δ_{H} 1.60~1.57、 δ_{H} 1.77~1.75、 δ_{H} 1.27~1.15 分别归属于亚甲基 H-10、H-27、H-16、H-14/H-18 和 H-15/H-17； δ_{H} 2.03 归属于甲基 H-12。

碳谱分析：核磁碳谱显示该样品含有 20 组共 20 个碳的碳信号， δ_{C} 144.79、 δ_{C} 135.44、 δ_{C} 134.23、 δ_{C} 132.01、 δ_{C} 115.72、 δ_{C} 112.78 分别归属

于苯环上的 C-4、C-5、C-2、C-6、C-3 和 C-1； δ_{C} 87.53、 δ_{C} 77.89、 δ_{C} 77.41、 δ_{C} 75.18、 δ_{C} 70.24、 δ_{C} 61.81 分别归属于 C-19、C-21、C-20、C-26、C-23 和 C-13； δ_{C} 61.27、 δ_{C} 56.96、 δ_{C} 27.95、 δ_{C} 27.77、 δ_{C} 25.88、 δ_{C} 25.63、 δ_{C} 25.58 分别归属于 C-27、C-10、C-14、C-18、C-16、C-15 和 C-17； δ_{C} 36.19 归属于 C-12。

由高分辨质谱和核磁氢谱判断，合成的产物结构见图 8，与所推测杂质 1 结构式相同。

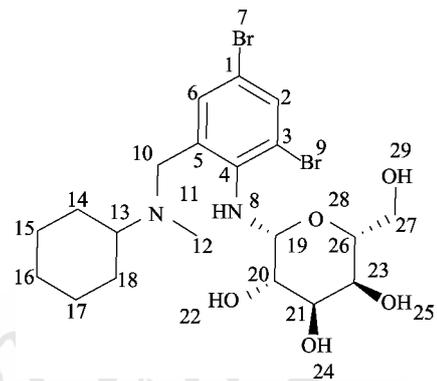


图8 杂质1结构式

Fig. 8 Structure of impurity 1

4.3 盐酸溴己新注射液中的杂质 2 制备合成

将 1 g 游离溴己新，480 mg 葡萄糖和 3 滴醋酸依次加至 50 mL 无水甲醇中，氮气保护后升温至 70 °C 反应 24 h，降至室温，然后加入 300 mg 硼氢化钠继续反应 12 h，停止反应，浓缩除去甲醇溶液，柱层析 (100%DCM~80%DCM/MeOH) 得白色固体，即为杂质 2，纯度约 99%。合成工艺见图 9。

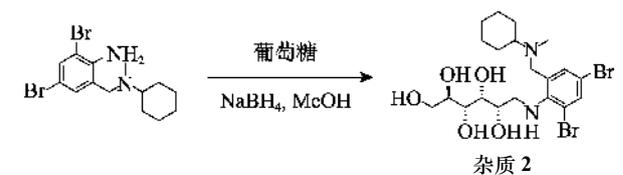


图9 杂质2合成工艺图

Fig. 9 Synthesis diagram of impurity 2

4.4 盐酸溴己新注射液中杂质 2 结构确证

4.4.1 二维液相色谱串联质谱法确证杂质相对分子质量 采用 LC-MS 确证，由质谱图可知，降解杂质质荷比 (m/z) $[M+H]^+$ 为 539.073 9。

4.4.2 $^1\text{H-NMR}$ 确证 $^1\text{H-NMR}$ (MeOD, 400 MHz) δ 7.91(d, 1H, $J=2.20$ Hz), 7.60(d, 1H, $J=2.20$ Hz), 4.46(s, 2H), 4.01~3.97(m, 1H), 3.85~3.78(m, 2H), 3.75~3.71(m, 1H), 3.68~3.64(m, 2H), 3.35~

3.24(m, 2H), 3.21~3.15(m, 1H), 3.09~3.04(m, 1H), 2.69(s, 3H), 2.09~1.92(m, 5H), 1.72~1.69(m, 1H), 1.61~1.55(m, 2H), 1.37~1.21(m, 3H), 0.73(s, 1H), 0.51(s, 1H), 0.29(s, 1H), 0.07(s, 1H)。¹³C-NMR (MeOD, 400 MHz) δ 147.49, 136.71, 134.41, 133.53, 120.52, 116.32, 73.66, 73.61, 73.05, 72.15, 64.79, 64.07, 57.39, 52.12, 36.18, 28.50, 28.29, 26.85, 26.64。

氢谱分析： δ 7.91 和 7.60 处为 2 个单峰，属于 H-2 和 H-6； δ 4.46 处有 2 个氢质子，归属为 H-10； δ 4.01~3.64 处有 6 个氢质子，归属为 H26、H-20、H21、H23、H27； δ 3.35~3.24 处有 2 个氢质子，归属于 H19； δ 3.21~3.15 处有 1 个氢质子，归属为羟基活泼氢； δ 3.09~3.04 处有 1 个氢质子，归属于 H-13； δ 2.69 处有 3 个氢质子，归属为 H-12； δ 2.09~1.92、 δ 1.72~1.69、 δ 1.61~1.55、 δ 1.37~1.21 有 11 个氢质子，归属为 H-14、H-18、H-16、H-15、H-17 以及 1 个氨基活泼氢； δ 0.73、 δ 0.51、 δ 0.29 以及 δ 0.07 处各有 1 个氢质子，归属于 4 个羟基活泼氢。

碳谱分析： δ_c 147.49、 δ_c 136.71、 δ_c 134.41、 δ_c 133.53、 δ_c 120.52、 δ_c 116.32 分别归属于苯环上的 C-2、C-1、C-4、C-6、C-3 和 C-5； δ_c 73.66、 δ_c 73.61、 δ_c 73.05、 δ_c 72.15、 δ_c 64.79、 δ_c 64.07、 δ_c 57.39、 δ_c 52.12 分别归属于 C-26、C-22、C-21、C-13、C-23、C-27、C-10、C19； δ_c 36.18、 δ_c 28.50、 δ_c 28.29、 δ_c 26.85 分别归属于 C-12、C-14、C-18、C-16； δ_c 26.64 归属于甲基 C-15 和 C-17。

由质谱和核磁氢谱判断，合成的产物结构见图 10，与所推测杂质 2 结构式相同。

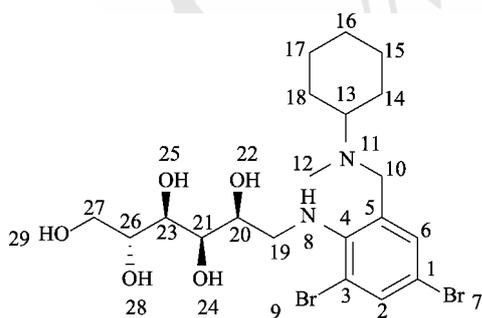


图 10 杂质 2 结构式
Fig. 10 Structure of impurity 2

5 盐酸溴己新注射液中的未知杂质归属分析

5.1 HPLC 杂质定位

取 3 批自制制剂、1 批参比制剂样品溶液和杂质 1、2 对照品溶液，按“3.1”项下的一维色谱

条件进样分析，结果杂质 1、2 对照品出峰时间分别为 7.42, 8.04 min, RRT 分别为 0.42, 0.46, HPLC 纯度分别为 91.4%, 98.9%，4 批样品中 RRT 0.42 未知杂质为杂质 1，均未检出杂质 2。

5.2 2DLC-HRMS/MS 确证杂质归属

采用 2DLC-HRMS/MS 测定杂质 1 对照品、3 批自制制剂和 1 批参比制剂中的 RRT 0.42 杂质在一维液相下相同保留时间杂质峰的相对分子质量，并分析汇总其质谱信息以及结构，结果表明 4 批样品中 RRT 0.42 未知杂质与杂质 1 对照品为同一个物质，见表 4。

6 方法学研究

依据中国药典 2020 年版通则 9101 “药品标准分析方法指导原则”的要求^[13]，对杂质 1、2 进行分析方法验证，验证内容包括专属性、定量限与检测限、线性与范围、重复性、溶液稳定性和准确度。

6.1 溶液配制

供试品溶液：取本品直接进样作为供试品溶液（每 1 mL 含盐酸溴己新 2 mg）。

自身对照溶液：精密量取供试品溶液 1 mL，置 200 mL 量瓶中，用水稀释制成每 1 mL 中约含盐酸溴己新 10 μ g 的溶液，摇匀，作为自身对照溶液。

系统适用性溶液：取盐酸溴己新及杂质 1、杂质 2、中国药典杂质 I、欧洲药典杂质 A、B、C、D、E 对照品、N-氧化杂质对照品适量，用甲醇溶解并稀释制成每 1 mL 中约盐酸溴己新 2 mg 及各杂质约为 4 μ g 的溶液。

混合对照品储备溶液：精密称取盐酸溴己新对照品及杂质 1、杂质 2 对照品各适量，置同一 20 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释制成每 1 mL 中约盐酸溴己新 0.1 mg 及各杂质约为 20 μ g 的溶液。

空白辅料溶液：按制剂处方中各辅料处方量配制，直接作为空白辅料溶液。

空白溶液：水。

6.2 色谱条件

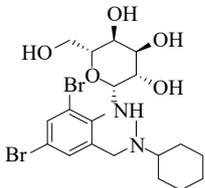
色谱条件按照“3.1”项下的一维色谱条件。

6.3 专属性试验

取盐酸溴己新对照品适量，用甲醇溶解并定量稀释制成每 1 mL 含 10 μ g 的溶液，作为盐酸溴己新对照品溶液；另取杂质 1、杂质 2、中国药典杂质 I、欧洲药典杂质 A、B、C、D、E 对照品

表 4 LC-MS 分析数据

Tab. 4 LC-MS analysis data

样品	切峰时间/min	[M+H] ⁺ <i>m/z</i>	推测离子分子式	偏差	碎片离子(<i>m/z</i>)	化学结构
杂质1对照品	7.410±0.025	537.058 9	C ₂₀ H ₃₀ Br ₂ N ₂ O ₅ ⁺	-0.93	114.127 9 261.885 6 537.058 6	
1902001批自制制剂	7.416±0.025	537.058 9	C ₂₀ H ₃₀ Br ₂ N ₂ O ₅ ⁺	-0.93	423.938 3 114.128 0 261.885 7 537.058 9	
1902002批自制制剂	7.420±0.025	537.059 0	C ₂₀ H ₃₀ Br ₂ N ₂ O ₅ ⁺	-0.74	423.937 9 114.128 0 261.885 8 537.059 0	
1902003批自制制剂	7.420±0.025	537.058 6	C ₂₀ H ₃₀ Br ₂ N ₂ O ₅ ⁺	-1.49	423.938 5 114.127 9 261.885 7 537.058 7	
8981004批参比制剂	7.419±0.025	537.058 9	C ₂₀ H ₃₀ Br ₂ N ₂ O ₅ ⁺	-0.93	423.938 5 114.127 7 261.886 2 537.059 4 423.939 0	

和 *N*-氧化杂质对照品适量，分别用甲醇稀释制成每 1 mL 中约含 4 μg 的溶液，作为各杂质对照品溶液。进样分析，记录色谱图，见图 11。在该色谱条件下，杂质 1、杂质 2 与主成分及各杂质均得到良好分离，空白溶剂和空白辅料溶液均无干扰，见图 12。

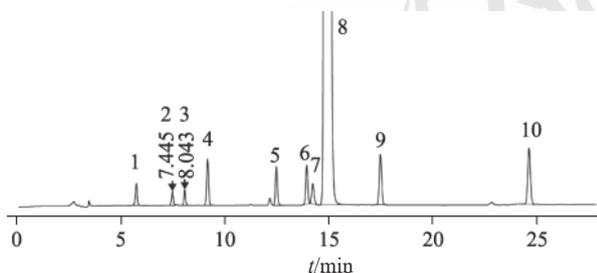


图 11 专属性试验系统适用性溶液高效液相色谱图

1-欧洲药典杂质 C；2-杂质 1；3-杂质 2；4-欧洲药典杂质 D；5-欧洲药典杂质 E；6-中国药典杂质 I；7-*N*-氧化杂质；8-溴己新；9-欧洲药典杂质 A；10-欧洲药典杂质 B。

Fig. 11 HPLC chromatograms of system suitability solution for specific test

1-EP impurity C；2-impurity 1；3-impurity 2；4-EP impurity D；5-EP impurity E；6-ChP impurity I；7-*N*-oxide impurity；8-bromhexine；9-EP impurity A；10-EP impurity B。

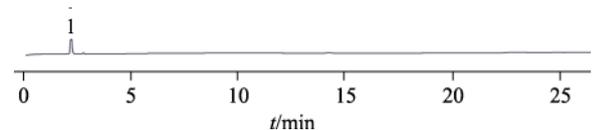


图 12 专属性试验空白辅料溶液高效液相色谱图

1-空白辅料峰。

Fig. 12 HPLC chromatograms of excipient solution for specific test

1-excipient.

6.4 定量限与检测限试验

取“6.1”项下配制的混合对照品储备溶液不断稀释进样分析，直至杂质 1、2 峰信噪比约为 10 和 3，即为定量限溶液和检测限溶液。结果杂质 1 定量限浓度为 0.04 μg·mL⁻¹，定量限为 0.4 ng，信噪比为 11.0，检测限浓度为 0.01 μg·mL⁻¹，检测限为 0.1 ng，信噪比为 3.0；杂质 2 定量限浓度为 0.08 μg·mL⁻¹，定量限为 0.8 ng，信噪比为 11.9，检测限浓度为 0.03 μg·mL⁻¹，检测限为 0.3 ng，信噪比为 4.9。

6.5 线性试验

分别量取“6.1”项下配制的混合对照品储备溶液 1.0、1.6、2.0 和 3.0 mL，置 20 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，和“6.4”项下的定量限溶液作为系列线性对照品溶液进样分析，以浓度 (*X*) 为横坐标，以峰面积 (*Y*) 为纵坐标，进行线性回归，绘制标准曲线，求得线性回归方程。结果表明，杂质 1 在 0.04~14.52 μg·mL⁻¹ 线性关系良好，*R* 为 1.000 0，线性方程为 $Y=6.270\ 3X-0.009\ 8$ 。杂质 2 在 0.08~6.25 μg·mL⁻¹ 线性关系良好，*R* 为 1.000 0，线性方程为 $Y=5.839\ 9X-0.101\ 3$ 。根据盐酸溴己新和杂质 1、2 的线性斜率计算，得出杂质 1、2 的校正因子分别为 2.2 和 2.4。

6.6 重复性试验

取 A 企业样品，按“6.1”项下方法平行配制供试品溶液和对照溶液各 6 份进样分析，按加校正因子的主成分自身对照法计算杂质 1、2 的含量，结果 6 份供试品溶液中杂质 1 均约为 0.53%，

RSD 为 0.6%，杂质 2 均未检出，说明方法重复性良好。

6.7 溶液稳定性试验

按“6.1”项下方法配制供试品溶液，于室温下放置 0, 3.5, 9, 12, 20, 26.5 h 后测定，结果表明，室温下放置 26.5 h 后，供试品溶液中杂质 1 含量基本不变，RSD 为 2.8%，杂质 2 均未检出。

6.8 回收率试验

分别量取“6.1”项下配制的混合对照品储备溶液 1.0, 2.0 和 3.0 mL，置 20 mL 量瓶中，分别加入盐酸溴己新注射液 16 mL，再加空白辅料溶液稀释至刻度，摇匀，同法配制 3 份进样分析，按外标法计算各杂质的回收率，结果杂质 1、2 回收率均符合要求，结果见表 5。

表 5 回收率试验结果

杂质	%				RSD
	低浓度	中浓度	高浓度	平均值	
杂质1	97.5	98.1	99.9	98.5	2.5
杂质2	108.3	107.9	106.5	107.6	0.9

7 样品检测

按照上述经过验证的有关物质检查方法对 3 批盐酸溴己新注射液自制制剂和 1 批原研制剂的有关物质进行检测，采用加校正因子的自身对照法对杂质 1、2 进行计算，结果见表 6 和图 13。

表 6 杂质 1、2 检测结果

样品批号	含量/%	
	杂质1	杂质2
1912001	0.53	ND
1912002	0.53	ND
1912003	0.54	ND
8981004	0.53	ND

注：“ND”代表未检出。

Note: "ND" stood for not detected.

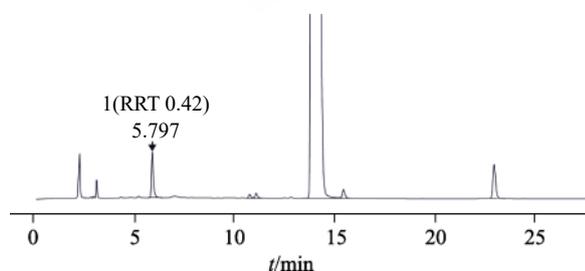


图 13 供试品溶液高效液相色谱图

1-杂质 1。

Fig. 13 HPLC chromatograms of test solution

1-impurity 1.

8 讨论

制剂的有关物质研究中，除了需要关注原料药合成工艺中的杂质和降解杂质外，还需要关注原料药与辅料及与辅料中的杂质反应产生的制剂工艺杂质。

盐酸溴己新注射液中原料药与辅料葡萄糖反应产生注射液剂型特有杂质。同时，葡萄糖中可能存在其他还原性杂质糖(如山梨醇)也可能与溴己新反应生成制剂工艺杂质。

因此，盐酸溴己新注射液研发及生产过程中需要关注盐酸溴己新与辅料葡萄糖及葡萄糖中可能存在的其他还原糖反应生成的相关杂质。

本研究为制剂研究中的部分未知杂质的控制提供了一个新的思路，并对盐酸溴己新注射液仿制药的研发中的辅料筛选及辅料质量控制等工作有一定的指导意义。

REFERENCES

- [1] ZHENG F X. Clinical application of bromhexine hydrochloride in the treatment of children bronchial pneumonia[J/OL]. Chin J Lung Dis(Electr Edit)(中华肺部疾病杂志: 电子版), 2014, 7(3): 347-348.
- [2] 李忻, 邵丹, 严明兰. 盐酸溴己新葡萄糖注射液致严重不良反应 1 例 [J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(11): 1954-1955.
- [3] OLIVIERI D, CIACCIA A, MARANGIO E, et al. Role of bromhexine in exacerbations of bronchiectasis. Double-blind randomized multicenter study versus placebo [J]. Respiration, 1991, 58(3/4): 117-121.
- [4] 国家卫生健康委员会. 中国卫生健康统计年鉴[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2020.
- [5] 中国药典. 二部[S]. 2020: 附录 1325-1326.
- [6] JP(18)[S]. 2021: 521-522.
- [7] EP(10.0)[S]. Vol III. 2019: 2000-2001.
- [8] 艾建高, 张从俊, 谢国龙, 等. 盐酸溴己新葡萄糖注射液中有关注物质的检测方法: 中国, CN103499647B[P]. 2015-09-16.
- [9] ABDEL-GHANI N, ISSA Y M, AHMED H. Potentiometric flow injection analysis of bromhexine hydrochloride and its pharmaceutical preparation using conventional and coated wire ion-selective electrodes [J]. Sci Pharm, 2006, 74(3): 121-135.
- [10] SUN L. Determination of bromhexine hydrochloride injection and its related substances by HPLC [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2008, 12(2): 121-122.
- [11] JIA X D, ZHANG W, LI Z L, et al. Structural identification of related substances of ivabradine based on UHPLC-Q-orbitrap HRMS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2022, 39(15): 1992-2000.
- [12] WANG Jian, ZHOU Ping, LIU Gui-jun, et al. Study on genotoxic impurities and elimination of matrix effect in apixaban by HPLC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2022, 39(10): 1336-1341.
- [13] 中国药典. 四部[S]. 2020: 附录 480-483.

收稿日期: 2023-03-01

(本文责编: 李艳芳)