

国家药品抽检中硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂有关物质研究*

张连义¹, 李文馨¹, 李铁军², 牛冲¹, 杨书娟¹, 王文心¹,
窦艳丽¹, 郑静¹, 潘相蜜^{3**}, 徐玉文^{1,2**}

(1. 山东省食品药品检验研究院 国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室 山东省仿制药一致性评价工程技术研究中心 产业技术基础公共服务平台, 济南 250101; 2. 山东京卫制药有限公司, 泰安 271000; 3. 济南市第五人民医院, 济南 250022)

摘要 目的: 对国家药品抽检品种硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂的有关物质进行探索性研究, 比较各企业样品之间含有杂质的情况, 以评价药品质量。方法: 采用 HPLC 外标法同时测定硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂中有关物质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、N 及其他未知杂质含量。采用 Thermo Synchronis C₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以庚烷磺酸钠溶液 - 乙腈为流动相, 进行线性梯度洗脱; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 40 °C; 检测波长 220 nm; 进样体积 20 μL。结合强制降解试验探讨杂质来源, 并采用毒性预测软件进行杂质毒性评估。结果: 经方法验证, 方法专属性良好, 各杂质峰之间分离度均 > 1.5; 精密度试验的 RSD 为 0.30%~1.7% (n = 6); 线性范围在 0.050 ~ 5.000 μg · mL⁻¹ (r = 0.999 9); 定量限在 0.025 ~ 0.200 μg · mL⁻¹, 检测限在 0.008 ~ 0.070 μg · mL⁻¹; 原料药重复性的 RSD 为 0.80%~3.8%, 平均回收率 95.2%~104.8%; 吸入气雾剂重复性的 RSD 为 1.2%~2.9%, 回收率 98.7%~102.8%。强制降解试验表明, 杂质 D、F、I、J、N 均为降解杂质。对抽检的 110 批次样品进行检测, 有关物质结果均符合规定。各企业样品中, 杂质 C、D、F、N 检出频次较高, 杂质 E、G、H 均未检出, 杂质 J 仅检出 1 批次。其中杂质 D 的 QSAR 软件预测 ICH M7(R2) 分类为 2 级。结论: 建立的方法灵敏准确, 可准确地对硫酸沙丁胺醇气雾剂的有关物质含量进行定量测定, 能为科学监管提供有效的技术支持。应对杂质 D 进行进一步的毒性研究, 并确定合理的限度。**关键词:** 国家药品抽检; 探索性研究; 硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂; 有关物质; 杂质来源; 破坏试验; 相对校正因子; 高效液相色谱法; 定量构效关系

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)12 - 2078 - 10

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024 - 0227

Research on related substances of salbutamol sulfate inhalation aerosol in national drug sampling and testing*

ZHANG Lian - yi¹, LI Wen - xin¹, LI Tie - jun², NIU Chong¹, YANG Shu - juan¹,
WANG Wen - xin¹, DOU Yan - li¹, ZHENG Jing¹, PAN Xiang - mi^{3**}, XU Yu - wen^{1,2**}

(1. Shandong Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Consistency Evaluation of Generic Drugs, Industrial Technology Foundation Public Service Platform, Jinan 250101, China; 2. Shandong Jewim Pharmaceutical Co., Ltd., Taian 271000, China; 3. The Fifth People's Hospital of Jinan, Jinan 250022, China)

Abstract Objective: To study the related substances in salbutamol sulfate inhalation aerosol during national

* 泰山产业领军人才工程专项经费(tscx202306073)

** 通信作者 潘相蜜 Tel: 18668991066; E-mail: 3402553714@qq.com

徐玉文 Tel: 13553158409; E-mail: 13553158409@163.com

第一作者 Tel: 18853105319; E-mail: 18853105319@163.com

drug sampling and testing, and to compare the impurity content and evaluate the quality between samples from various enterprises. **Methods:** HPLC external standard method was utilized to simultaneously determine the content of related substances A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, N, and other unknown impurities in salbutamol sulfate inhalation aerosol. Thermo Synchronis C₈ chromatography column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. Sodium heptane sulfonate solution – acetonitrile was used as the mobile phase. Linear gradient elution was performed and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. Column temperature was 40 °C and detection wavelength was 220 nm. Injection volume was 20 μL. The sources of impurities through forced degradation experiments were explored. Toxicity prediction software for impurity toxicity assessment was applied. **Results:** After method validation, the specificity of the method was good, and the separation degree between each impurity peak was greater than 1.5. RSDs of precision test were 0.30% – 1.7% (n = 6); mass concentrations of linear range were from 0.050 to 5.000 μg · mL⁻¹ (r = 0.999 9). Limit of quantitative was in the range of 0.025 – 0.200 μg · mL⁻¹, limit of detection was in the range of 0.008 – 0.070 μg · mL⁻¹. The repeatability RSD of raw materials was 0.80% – 3.8%, and the recovery rate was 95.2% – 104.8%. The repeatability RSD of inhaled aerosol was 1.2% – 2.9%, and the recovery rate was 98.7% – 102.8%. The forced degradation test showed that impurities D, F, I, J, and N were all degradation impurities. 110 batches of samples were checked and the results of the relevant substances met the regulations. In the samples of diverse enterprises, impurities C, D, F, and N were detected more frequently, while impurities E, G, and H were not detected. Impurity J was only detected in one batch. The predicted impurity D by QSAR software falls to ICH M7 (R2) level 2. **Conclusion:** The established method is sensitive and accurate, and can accurately quantify the content of related substances in salbutamol sulfate aerosol, providing effective technical support for systematic supervision. Further toxicity studies should be conducted on impurity D and reasonable limits should be established.

Keywords: national drug sampling; exploratory research; salbutamol sulfate inhalation aerosol; related substances; source of impurities; forced degradation test; relative correction factor; high performance liquid chromatography; quantitative structure – activity relationship

硫酸沙丁胺醇化学名为4-羟基-α'-[(叔丁氨基)甲基]-1,3-苯二甲醇硫酸盐,是一种高选择性的β₂肾上腺素受体激动药,它能选择性的激动气管平滑肌表面的β₂受体,起到舒张支气管,促进纤毛运动的作用。临床上常用剂型为雾化吸入溶液剂、片剂、胶囊剂、注射剂等,用于治疗哮喘或慢阻肺(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、肺部感染等疾病。吸入气雾剂具有起效快,疗效好,同时减少不良反应等优点,已成为一种倍受关注的给药方式^[1-4],也可用于联合给药^[5-7]。经查询国家药监局网站数据库,国内硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂有3家企业生产,进口原研产品为Glaxo Wellcome, S. A. 生产,规格为每罐200揆,每揆0.1 mg。

硫酸沙丁胺醇原料中含有多种杂质^[8-10]。2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药

典》)二部采用等度洗脱方法测定硫酸沙丁胺醇中有关物质,仅对单个杂质和杂质总量进行控制,未对工艺杂质或降解杂质进行针对性的控制,并且分析时间长,效率较低。EP 11.0 收载硫酸沙丁胺醇原料,采用超高效液相色谱法测定有关物质,流动相中需加入三乙胺改善峰型。有文献报道了硫酸沙丁胺醇有关物质检测方法^[11-13],有一定借鉴意义,但未能给出各杂质的相对校正因子。

为快速准确的测定样品中的杂质,本文参考2020年版《中国药典》和EP 11.0 中硫酸沙丁胺醇有关物质检测方法,对杂质A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、N等11个杂质进行检测,并对方法进行优化。按照2020年版《中国药典》四部通则9101分析方法验证指导原则进行方法学验证,可同时用于检测硫酸沙丁胺醇原料及吸入气雾剂中的有关物质。本文结合国家药品抽检计划,考察了国内

各企业产品的有关物质情况,与原研制剂的杂质谱进行比较,探讨杂质来源,从而有助于全面评价该品种药品质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(Thermo Fisher Scientific 公司), Agilent 1260 高效液相色谱仪(Agilent 公司), CP225D 型十万分之一电子天平(Sartorius 公司), pH 计(Mettler-Toledo Group 公司)

1.2 试剂

硫酸沙丁胺醇对照品(硫酸盐,批号 100328-201804,含量 99.4%)、杂质 J 对照品(盐酸盐,批号 101409-201601,含量 100%)购于中国食品药品检定研究院;杂质 A(批号 1022-RB-0003,含量 95.9%)、杂质 C(批号 1227-RB-0010,含量 98.9%)、杂质 E(批号 1019-RB-0021,含量 98.4%)、杂质 H(批号 1020-RB-0025,含量 95.4%)、杂质 N(双甲酸盐,批号 1227-RB-0011,含量 100%),均购于广州佳途科技股份有限公司;杂质 B(批号 6.0,含量 100%)、杂质 D(硫酸盐,批号 7.0,含量 100%)、杂质 F(硫酸盐,批号 9.0,含量 80.1%)、杂质 G(盐酸盐,批号 4.0,含量 83.6%),均购于 EDQM 公司;杂质 I(批号 20190901,含量 97.95%)购于深圳市恒丰万达医药科技有限公司;硫酸沙丁胺醇原料(批号 1210105001)由山东京卫制药有限公司提供。

磷酸二氢钾(含量 $\geq 99.5\%$)、磷酸(含量 $\geq 85.0\%$)购自国药集团;庚烷磺酸钠(含量 $\geq 99.5\%$),购自山东禹王试剂;乙腈(纯度 99.999%),购自 Honeywell 公司;超纯水(超纯水机),购自 Merck Millipore 公司。

国家药品抽检样品,共计 110 批,a 企业 39 批,b 企业 32 批,c 企业 5 批,d 企业 34 批。耐压铝罐包装。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Thermo Synchronis C₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m),以庚烷磺酸钠溶液[取庚烷磺酸钠 2.87 g 与磷酸二氢钾 2.5 g,加水溶解并稀释至 1 000 mL,用磷酸溶液(用水稀释至 2 倍体积)调节 pH 至 3.65]为流动相 A,乙腈为流动相 B,梯度洗脱(见表 1),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,柱温 40 $^{\circ}$ C,检测

波长 220 nm,进样体积 20 μ L。

表 1 梯度洗脱

Tab. 1 Gradient elution

| t/min | 流动相比比例(ratio of mobile phase)/% | |
|-------|---------------------------------|----|
| | A | B |
| 0 | 80 | 20 |
| 30 | 80 | 20 |
| 40 | 60 | 40 |
| 50 | 60 | 40 |
| 50.1 | 80 | 20 |
| 60 | 80 | 20 |

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 取样品 1 罐(规格 20 mg),用乙醇将表面淋洗干净,温度 10 min,取出,在铝盖上钻一小孔,插入注射针头(勿与液面接触),放至室温,轻轻摇动罐体,待抛射剂挥尽后(针头内无抛射剂继续喷出),约 20~30 min,除去铝盖,加“2.1”项下流动相 A-流动相 B(80:20)(简称溶剂),分次洗涤(洗涤 3 次,每次 3 mL),合并洗液至 50 mL 量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 杂质对照品储备溶液 取各杂质对照品适量,精密称定,分别用溶剂溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 20 μ g 的溶液,即得。

2.2.3 对照品储备溶液 取硫酸沙丁胺醇对照品和各杂质对照品适量,精密称定,用溶剂溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 5 μ g 的溶液,即得。

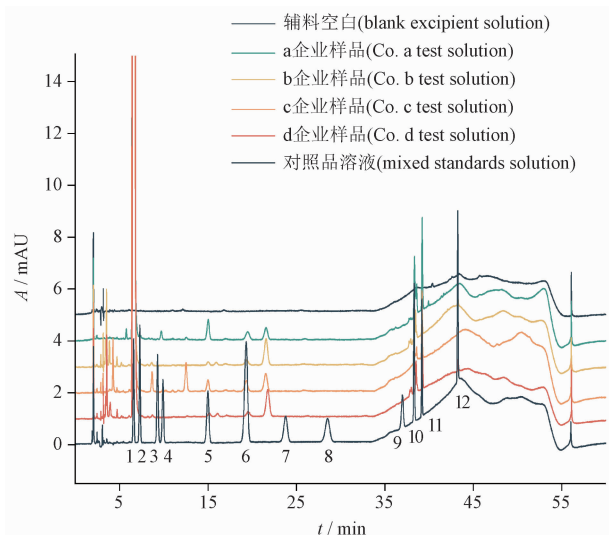
2.2.4 对照品溶液 取硫酸沙丁胺醇对照品和各杂质对照品适量,精密称定,用溶剂溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.4 μ g 的溶液,即得。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性试验 取生产企业提供的辅料(山东京卫制药有限公司提供空白辅料),照“2.2.2”项方法制备空白辅料溶液,按照“2.1”项方法测定,结果溶剂、辅料无干扰,专属性良好,见图 1。

2.3.2 强制降解试验 通过分析合成工艺与可能的降解途径,采用强酸、强碱、氧化、光照、加热的方式对硫酸沙丁胺醇进行破坏性试验,采用建立的 HPLC 方法进行测定和研究,综合分析各种可能条件和降解途径产生的杂质。

取样品 1 罐,将内容物转移至 50 mL 量瓶中。



1. 硫酸沙丁胺醇 (salbutamol sulfate) 2. 杂质 J (impurity J) 3. 杂质 B (impurity B) 4. 杂质 A (impurity A) 5. 杂质 C (impurity C) 6. 杂质 D (impurity D) 7. 杂质 H (impurity H) 8. 杂质 E (impurity E) 9. 杂质 G (impurity G) 10. 杂质 N (impurity N) 11. 杂质 F (impurity F) 12. 杂质 I (impurity I)

图1 典型液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

(1) 酸破坏: 原料中加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 2 mL, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 3 h 后, 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 2 mL 碱中和, 用溶剂定容至 50 mL; (2) 碱破坏: 原料中加入 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 2 mL, 水浴 ($98 \sim 100 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 加热 6 h 后, 加入 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 2 mL 酸中和, 用溶剂定容至 50 mL; (3) 氧化破坏: 原料中加入 30% 过氧化氢溶液 5 mL, $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热氧化 5 h 后, 放冷, 用溶剂定容至 50 mL; (4) 加热破坏: 原料中加入 5 mL 溶剂, 水浴 ($98 \sim 100 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 加热 6 h 后, 放冷, 用溶剂定容至 50 mL; (5) 光照破坏: 取原料 48 mg, 精密称定, 置石英比色皿中, 加入溶剂 2 mL, 置紫外灯下照射 48 h。精密量取 1 mL 置 50 mL 量瓶中, 用溶剂定容至刻度。各种破坏试验的杂质变化情况见图 2。

2.3.3 精密度试验 取对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算各杂质峰面积的 RSD。结果表明, 硫酸沙丁胺醇和各杂质峰面积精密度试验 RSD ($n = 6$) 为 0.30%~1.7%, 精密度良好。

2.3.4 线性关系、相对校正因子考察 取对照品储备溶液, 逐级稀释为浓度约为 0.05、0.1、0.25、0.4、1、1.5、2.5、 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品系列溶液注入液相色谱仪, 记录色谱图, 绘制质量浓度 (如果对照品

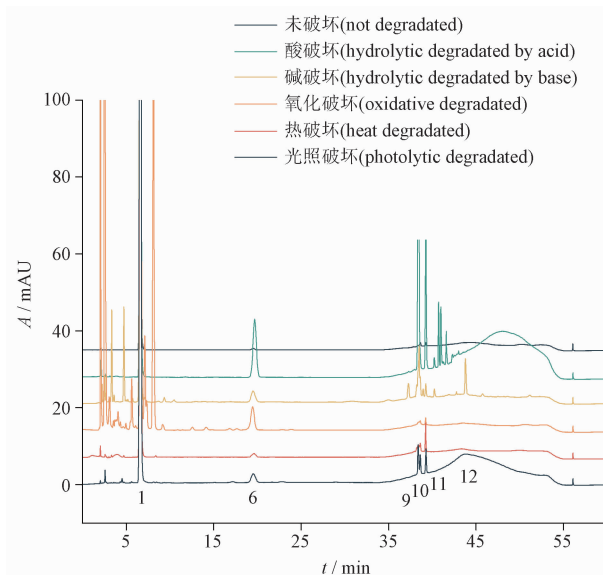


图2 API 强制降解试验色谱图

Fig. 2 Chromatograms of API after forced degradation

为盐, 则只计算碱基) 对其峰面积的回归曲线, 以主成分回归直线斜率与杂质回归直线斜率的比计算校正因子。结果见表 2。

2.3.5 定量限与检测限 取对照品溶液, 依次稀释, 分别进样。以信噪比 ≥ 10 的浓度确定定量限质量浓度。以信噪比 ≥ 3 的浓度确定检测限质量浓度, 结果见表 2。

2.3.6 回收率考察 取硫酸沙丁胺醇原料共 9 份, 每份约 20 mg, 置 50 mL 量瓶中, 分别加入杂质对照品储备溶液 0.8、1.0、1.2 mL, 作为 80%、100%、120% 3 个浓度水平回收率溶液, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀, 测定。用外标法测得原料中含有 0.014% 杂质 D、0.024% 杂质 F、0.020% 杂质 N, 表中测得量已扣除本底量, 除以加入量, 计算回收率。结果见表 3。

取空白辅料溶液 9 份, 每份 1.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 分别加入杂质对照品储备溶液 0.8、1.0、1.2 mL, 作为 80%、100%、120% 3 个浓度水平的回收率溶液, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀, 测定。测得量除以加入量, 计算回收率。结果见表 3。

2.3.7 耐用性试验 分别采用适当调整梯度、更换安捷伦 1260 高效液相色谱仪的方式进行耐用性试验。试验结果表明, 在各试验条件下均能满足系统适用性要求, 说明该方法耐用性良好。结果见表 4。

表 2 回归方程、相关系数、定量限和检测限

Tab. 2 Regression equation, r , LOQ and LOD

| 成分 (component) | 回归方程 (regression equation) | r | 相对校正因子 (relative correction factor) | LOQ/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) |
|-----------------------------|-------------------------------|--------|--|--|--|
| 硫酸沙丁胺醇 (salbutamol sulfate) | $Y = 0.6284C + 0.0032$ | 0.9999 | / | 0.050 | 0.017 |
| 杂质 A (impurity A) | $Y = 0.5061C + 0.0027$ | 0.9999 | 1.24 | 0.100 | 0.033 |
| 杂质 B (impurity B) | $Y = 0.6401C + 0.0013$ | 0.9999 | 0.98 | 0.050 | 0.017 |
| 杂质 C (impurity C) | $Y = 0.5926C + 0.0028$ | 0.9999 | 1.06 | 0.100 | 0.033 |
| 杂质 D (impurity D) | $Y = 1.9484C + 0.0034$ | 0.9999 | 0.32 | 0.050 | 0.017 |
| 杂质 E (impurity E) | $Y = 0.5314C - 0.0046$ | 0.9999 | 1.18 | 0.200 | 0.067 |
| 杂质 F (impurity F) | $Y = 0.6546C + 0.0015$ | 0.9999 | 0.96 | 0.050 | 0.017 |
| 杂质 G (impurity G) | $Y = 0.2653C - 0.0021$ | 0.9999 | 2.37 | 0.150 | 0.050 |
| 杂质 H (impurity H) | $Y = 0.4940C + 0.0064$ | 0.9999 | 1.27 | 0.200 | 0.067 |
| 杂质 I (impurity I) | $Y = 0.7666C + 0.0007$ | 1.000 | 0.82 | 0.025 | 0.083 |
| 杂质 J (impurity J) | $Y = 0.7381C + 0.0041$ | 0.9999 | 0.85 | 0.050 | 0.017 |
| 杂质 N (impurity N) | $Y = 0.7743C + 0.0026$ | 0.9999 | 0.81 | 0.050 | 0.017 |

表 3 回收率试验结果

Tab. 3 Results of recovery test

| 类别 (item) | 杂质 (impurity) | 加入量 (added)/ μg | 测得量 (measured)/ μg | 回收率 (recovery) /% | 平均回收率 (average recovery, $n=9$) /% | RSD ($n=9$) /% |
|--------------|-------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------|--|------------------|
| 原料药 (API) | 杂质 A (impurity A) | 15.283 | 16.098 | 105.3 | 102.8 | 3.8 |
| | | 19.103 | 19.693 | 103.1 | | |
| | | 22.924 | 22.931 | 100.0 | | |
| | 杂质 B (impurity B) | 15.808 | 16.684 | 105.5 | 104.8 | 1.5 |
| | | 19.760 | 20.695 | 104.7 | | |
| | | 23.712 | 24.681 | 104.1 | | |
| | 杂质 C (impurity C) | 16.425 | 17.330 | 105.5 | 102.3 | 2.6 |
| | | 20.532 | 20.664 | 100.6 | | |
| | | 24.638 | 24.824 | 100.8 | | |
| | 杂质 D (impurity D) | 13.291 | 14.020 | 105.5 | 102.9 | 2.1 |
| | | 16.613 | 16.863 | 101.5 | | |
| | | 19.936 | 20.263 | 101.6 | | |
| | 杂质 E (impurity E) | 16.153 | 15.750 | 97.5 | 96.7 | 2.2 |
| | | 20.192 | 19.618 | 97.2 | | |
| | | 24.230 | 23.142 | 95.5 | | |
| | 杂质 F (impurity F) | 10.729 | 11.166 | 104.1 | 103.6 | 3.0 |
| | | 13.411 | 13.629 | 101.6 | | |
| | | 16.093 | 16.925 | 105.2 | | |
| | 杂质 G (impurity G) | 20.671 | 20.688 | 100.1 | 100.2 | 3.5 |
| | | 25.839 | 25.126 | 97.2 | | |
| | | 31.006 | 32.002 | 103.2 | | |
| | 杂质 H (Impurity H) | 15.905 | 16.535 | 104.0 | 99.7 | 3.7 |
| | | 19.881 | 19.236 | 96.8 | | |
| | | 23.858 | 23.452 | 98.3 | | |
| | 杂质 I (impurity I) | 15.515 | 15.792 | 101.8 | 101.1 | 1.1 |

表 3(续)

| 类别 (item) | 杂质 (impurity) | 加入量 (added)/ μg | 测得量 (measured)/ μg | 回收率 (recovery) /% | 平均回收率 (average recovery, $n=9$)/% | RSD($n=9$)/% |
|-------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------|---------------------------------------|----------------|
| 制剂 (preparation) | 杂质 J (impurity J) | 19.394 | 19.507 | 100.6 | 95.2 | 1.4 |
| | | 23.273 | 23.504 | 101.0 | | |
| | | 14.288 | 13.497 | 94.5 | | |
| | 杂质 N (impurity N) | 17.860 | 17.209 | 96.4 | 101.6 | 0.80 |
| | | 21.432 | 20.280 | 94.6 | | |
| | | 13.675 | 13.826 | 101.1 | | |
| | 杂质 A (impurity A) | 17.093 | 17.458 | 102.1 | 100.4 | 1.8 |
| | | 20.512 | 20.836 | 101.6 | | |
| | | 15.283 | 15.547 | 101.7 | | |
| | 杂质 B (Impurity B) | 19.103 | 19.142 | 100.2 | 100.1 | 1.5 |
| | | 22.924 | 22.737 | 99.2 | | |
| | | 15.808 | 15.943 | 100.9 | | |
| | 杂质 C (impurity C) | 19.760 | 19.724 | 99.8 | 100.8 | 1.6 |
| | | 23.712 | 23.582 | 99.5 | | |
| | | 16.425 | 16.614 | 101.2 | | |
| | 杂质 D (impurity D) | 20.532 | 20.719 | 100.9 | 100.2 | 1.2 |
| | | 24.638 | 24.687 | 100.2 | | |
| | | 13.291 | 13.480 | 101.4 | | |
| | 杂质 E (impurity E) | 16.613 | 16.561 | 99.7 | 102.8 | 2.9 |
| | | 19.936 | 19.827 | 99.5 | | |
| | | 16.153 | 16.405 | 101.6 | | |
| | 杂质 F (impurity F) | 20.192 | 21.115 | 104.6 | 101.8 | 1.2 |
| | | 24.230 | 24.795 | 102.3 | | |
| | | 10.729 | 10.972 | 102.3 | | |
| | 杂质 G (impurity G) | 13.411 | 13.575 | 101.2 | 101.5 | 2.8 |
| | | 16.093 | 16.407 | 102.0 | | |
| | | 20.671 | 21.313 | 103.1 | | |
| | 杂质 H (impurity H) | 25.839 | 26.064 | 100.9 | 98.7 | 2.0 |
| | | 31.006 | 31.189 | 100.6 | | |
| | | 15.905 | 15.843 | 99.6 | | |
| 杂质 I (impurity I) | 19.881 | 19.433 | 97.8 | 100.4 | 1.4 | |
| | 23.858 | 23.518 | 98.6 | | | |
| | 15.515 | 15.467 | 99.7 | | | |
| 杂质 J (impurity J) | 19.394 | 19.377 | 99.9 | 102.0 | 1.4 | |
| | 23.273 | 23.612 | 101.5 | | | |
| | 14.288 | 14.758 | 103.3 | | | |
| 杂质 N (impurity N) | 17.860 | 18.217 | 102.0 | 101.8 | 1.5 | |
| | 21.432 | 21.609 | 100.8 | | | |
| | 13.675 | 13.873 | 101.5 | | | |
| | | 17.093 | 17.269 | 101.0 | | |
| | | 20.512 | 21.091 | 102.8 | | |

2.4 样品的测定

按本文建立的方法测定 4 家生产企业的硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂样品, 杂质 E、G、H 均未检

出, 其它已知杂质及检出频次较高的未知杂质检出情况见表 5, 已知杂质测定结果的柱形散点图见图 3。

表 4 耐用性试验结果

Tab. 4 Robustness test results

| 成分 (component) | 梯度 1 保留时间/分离度 (gradient 1 retention time/peak resolution) | 梯度 2 保留时间/分离度 (gradient 2 retention time/peak resolution) | 保留时间/分离度 (retention time/peak resolution) |
|----------------------------|---|---|---|
| 硫酸沙丁胺醇(salbutamol sulfate) | 6.587/- | 6.542/- | 6.722/- |
| 杂质 J(impurityJ) | 7.295/3.15 | 7.248/3.15 | 7.443/3.07 |
| 杂质 B(impurityB) | 9.300/7.53 | 9.233/7.45 | 9.499/7.55 |
| 杂质 A(impurityA) | 9.903/1.96 | 9.833/1.95 | 10.136/2.04 |
| 杂质 C(impurityC) | 14.957/12.58 | 14.852/12.48 | 15.354/13.05 |
| 杂质 D(impurityD) | 19.278/7.52 | 19.15/7.47 | 19.799/8.08 |
| 杂质 H(impurityH) | 23.738/6.20 | 23.598/6.04 | 24.385/6.71 |
| 杂质 E(impurityE) | 28.465/5.42 | 28.313/5.31 | 29.292/5.90 |
| 杂质 G(impurityG) | 35.958/12.20 | 37.330/11.78 | 37.419/12.64 |
| 杂质 N(impurityN) | 38.307/4.32 | 39.368/4.83 | 38.703/4.62 |
| 杂质 F(impurityF) | 39.185/5.04 | 40.653/5.31 | 39.559/5.02 |
| 杂质 I(impurityI) | 43.250/25.78 | 45.313/26.97 | 43.640/25.87 |

表 5 硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂有关物质测定结果

Tab. 5 Results of related substances in salbutamol sulfate inhalation aerosol

| 成分 (component) | 含量(content)/% | | | |
|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | a 企业检出批次 (Co. a detection batch) | b 企业检出批次 (Co. b detection batch) | c 企业检出批次 (Co. c detection batch) | d 企业检出批次 (Co. d detection batch) |
| 杂质 A(impurity A) | 0.009~0.032(39) | 0.009~0.036(8) | 0.009(1) | 0.015(1) |
| 杂质 B(impurity B) | -* | 0.002~0.009(20) | - | - |
| 杂质 C(impurity C) | 0.032~0.071(39) | 0.005~0.062(11) | 0.035~0.047(5) | 0.008~0.047(29) |
| 杂质 D(impurity D) | 0.008~0.019(39) | 0.009~0.050(32) | 0.015~0.022(5) | 0.007~0.020(34) |
| 杂质 F(impurity F) | 0.071~0.159(39) | 0.009~0.073(32) | 0.086~0.121(5) | 0.037~0.075(34) |
| 杂质 I(impurity I) | 0.006(1) | 0.003~0.010(9) | - | 0.006~0.020(33) |
| 杂质 J(impurity J) | - | 0.006(1) | - | - |
| 杂质 N(impurity N) | 0.034~0.075(39) | 0.002~0.058(30) | 0.006~0.010(5) | 0.004~0.057(32) |
| 未知杂质(unknown impurity) | RRT 0.48 | 0.014~0.021(2) | - | 0.011~0.056(10) |
| | RRT 0.54 | - | 0.013~0.016(3) | 0.016~0.093(34) |
| | RRT 0.59 | - | 0.033~0.083(5) | 0.004~0.093(34) |
| | RRT 0.70 | - | 0.009(1) | 0.010~0.030(24) |
| | RRT 0.88 | 0.011~0.026(39) | - | 0.009~0.031(7) |
| | RRT 1.32 | - | 0.008~0.046(9) | 0.007~0.041(18) |
| | RRT 1.90 | 0.006~0.009(8) | 0.006~0.102(11) | 0.009~0.038(6) |
| | RRT 2.42 | - | - | 0.008~0.017(22) |
| | RRT 3.28 | 0.041~0.082(39) | 0.006~0.180(32) | 0.067~0.124(5) |
| | RRT 5.76 | - | - | 0.007~0.044(18) |
| | RRT 5.84 | 0.008~0.022(39) | 0.010~0.081(5) | 0.134(1) |
| | RRT 6.04 | 0.005~0.009(8) | 0.003~0.010(16) | - |
| 最大未知单杂(unspecified impurity) | 0.041~0.082(39) | 0.006~0.180(32) | 0.094~0.124(5) | 0.090~0.214(34) |
| 各杂质总和(total impurities) | 0.233~0.452(39) | 0.053~0.494(32) | 0.393~0.600(5) | 0.303~0.630(34) |

注(note): 1. “-”表示未检出(not detected); 2. “RRT”为未知杂质相对保留时间(unknown impurity relative retention time)

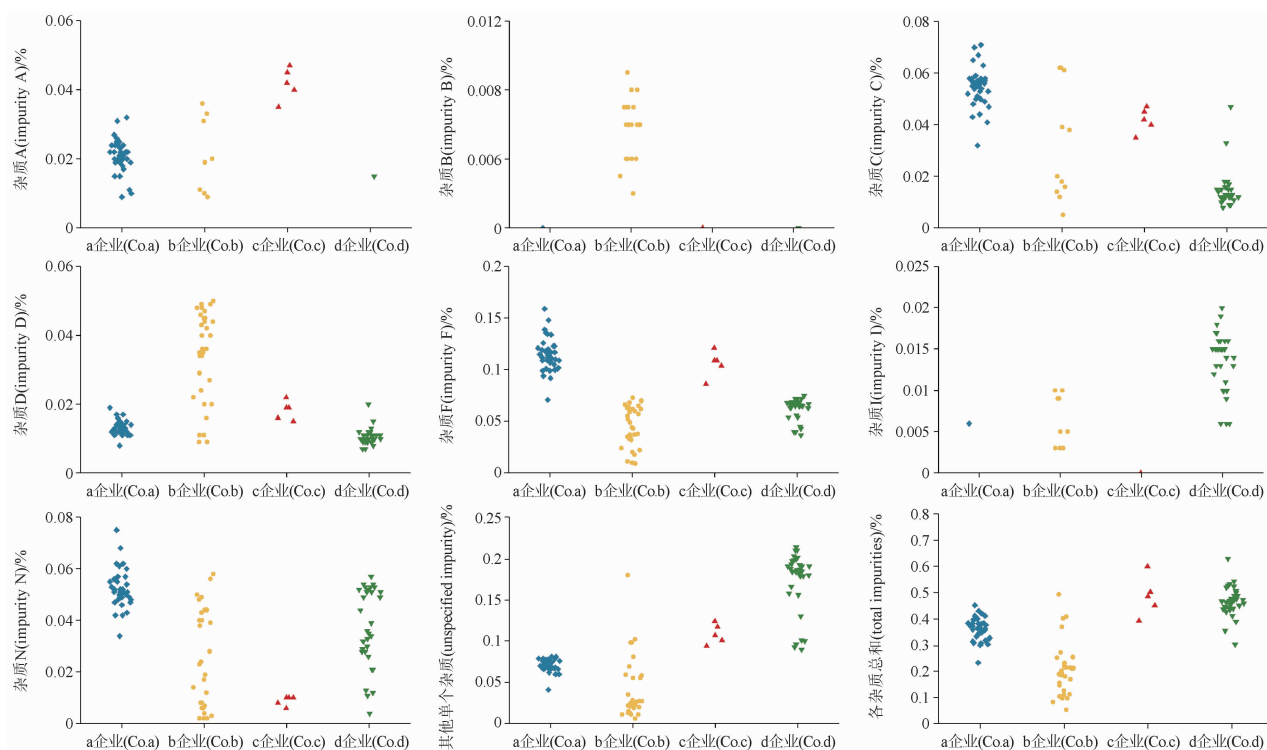


图3 各杂质测定结果柱状散点图

Fig. 3 Scatter diagram of the results of impurity content

3 讨论

3.1 波长选择

2020年版《中国药典》二部中硫酸沙丁胺醇^[14]有关物质的检测的波长为220 nm,通过二极管阵列检测器光谱扫描,由各峰吸收光谱可知硫酸沙丁胺醇、杂质A、杂质B、杂质C、杂质D、杂质E、杂质F、杂质H、杂质I、杂质N在220 nm附近有最大吸收或次大吸收,杂质G和杂质J在此波长也具有较大吸收,因此选定220 nm作为测定波长。

3.2 强制降解试验产生杂质分析

在文中试验条件下,加热、光照情况下比较稳定,产生的降解物较少,但对酸、氧化更为敏感。在酸情况下,杂质D、杂质F、杂质N显著增加。在碱情况下,杂质D、杂质I、杂质N增加较为明显,RRT 0.51、RRT 0.72处出现未知杂质。氧化情况下,杂质D、杂质J增加较为明显,RRT 1.23处出现大的未知杂质。光照条件下,杂质D、杂质N、杂质F略有增加。热破坏条件下,杂质D、杂质F略有增加。杂质A、杂质B、杂质C、杂质E、杂质G和杂质H等均没有增加,推测是工艺杂质。结果见表6。

3.3 样品检测结果分析

各企业样品检测结果均合格,杂质C、杂质D、

杂质F、杂质N和未知杂质RRT 3.28检出频次较高,另外a企业中杂质A、RRT 0.88和RRT 5.84,b企业中杂质B、RRT 1.90,d企业中杂质I、RRT 0.54、RRT 0.59、RRT 0.70、RRT 1.32、RRT 2.42和RRT 5.76检出频次较高。均未检出杂质E、杂质G、杂质H,仅1批次检出杂质J。

从柱形散点图可知,a企业、d企业检出杂质的分布区间较小,而b企业分布区间较大,说明a企业、d企业生产制剂的工艺比b企业更可控。

国内有3家企业生产硫酸沙丁胺醇原料药,一般是溴代苯乙酮衍生物和胺发生取代反应,硼氢化钠还原羰基,生成4-苄基沙丁胺醇(杂质I),然后在Pd/C作用下生成沙丁胺醇。沙丁胺醇在甲醇或无水乙醇、乙酸乙酯溶剂中与硫酸成盐,生成硫酸沙丁胺醇。a企业产品处方除原料药、四氟乙烷134A外,不含其它辅料。b企业、c企业处方均使用原料药、四氟乙烷134A、无水乙醇、油酸;d企业使用大豆磷脂酰胆碱替代油酸。各企业工艺基本一致,原料药经微粉化,与辅料调剂后,直接灌装。因收集的资料不详细,无法推测各企业检出杂质与原料药、制剂处方工艺之间的明确对应关系。

表 6 杂质检出情况及可能产生的途径

Tab. 6 Impurity detection results and possible pathways

| 成分 (component) | 检出率 (detectable rate)/% | 检出量 (checkout content)/% | 可能产生的途径 (possible pathway) |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|---|
| 杂质 A (impurity A) | 44.5 | 0.009 ~ 0.036 | 工艺杂质(process impurity) |
| 杂质 B (impurity B) | 18.2 | 0.002 ~ 0.009 | 工艺杂质(process impurity) |
| 杂质 C (impurity C) | 76.4 | 0.005 ~ 0.071 | 工艺杂质(process impurity) |
| 杂质 D (impurity D) | 100.0 | 0.007 ~ 0.050 | 酸、碱、氧化、热、光照降解杂质(hydrolytic by acid or base, oxidative, heat, photolytic impurity) |
| 杂质 E (impurity E) | - | - | 工艺杂质(process impurity) |
| 杂质 F (impurity F) | 100.0 | 0.009 ~ 0.159 | 酸、光照、热降解杂质(hydrolytic by acid, photolytic, heat impurity) |
| 杂质 G (impurity G) | - | - | 工艺杂质(process impurity) |
| 杂质 H (impurity H) | - | - | 工艺杂质(process impurity) |
| 杂质 I (impurity I) | 39.1 | 0.003 ~ 0.020 | 中间体、碱降解杂质(Intermediate, hydrolytic by base impurity) |
| 杂质 J (impurity J) | 0.9 | 0.006 | 氧化降解杂质(oxidative impurity) |
| 杂质 N (impurity N) | 96.4 | 0.002 ~ 0.075 | 酸、碱、光照降解杂质(hydrolytic by acid or base, photolytic impurity) |

注(note): “-”表示未检出(not detected)

3.4 杂质遗传毒性分析

参考 2020 年版《中国药典》9306 遗传毒性杂质控制指导原则^[15]、ICH M7 (R2)^[16]和欧洲药典委员会发布的基因毒性杂质结构警示^[17], 硫酸沙丁胺醇可能含有的杂质中有多个带有 N-羟甲基衍生物、芳香醛结构的遗传毒性致癌性警示结构。采用 Derek Nexus 6.1.1 (Lhasa 公司, 数控库 Derek

KB 2020, 版本 1.0) 和 Sarah Nexus 3.1.1 (Lhasa 公司, 模型 Sarah Model - 2020, 版本 1.8) 对上述杂质进行遗传毒性(致突变性)进行预测, 杂质 D 含有烷基醛(Aldehyde)结构, 按 ICH M7 分类为 2 类, 其余杂质为 5 类, 后续应对杂质 D 应进行进一步的毒性研究, 并确定合理的限度。评价结果请见表 7。

表 7 QSAR 基因毒性评价结果

Tab. 7 QSAR genotoxicity evaluation results

| 成分(component) | ICH M7 分类 (ICH M7 class) | Derek 预测 (Derek prediction) | Sarah 预测 (Sarah prediction) | 警示结构 (structural alert) |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| 杂质 A (impurity A) | 5 | ■ ■ ■ ■ □ | ■ ■ □ □ | 无(No) |
| 杂质 B (impurity B) | 5 | ■ ■ ■ ■ □ | ■ ■ □ □ | 无(No) |
| 杂质 C (impurity C) | 5 | ■ ■ ■ ■ □ | ■ ■ □ □ | 无(No) |
| 杂质 D (impurity D) | 2 | ■ ■ ■ ■ □ | ■ ■ ■ ■ ■ | 烷基醛(aldehyde) |
| 杂质 E (impurity E) | 5 | ■ ■ ■ ■ □ | ■ ■ ■ ■ ■ | 无(No) |
| 杂质 F (impurity F) | 5 | ■ ■ ■ ■ □ | ■ ■ □ □ | 无(No) |
| 杂质 G (impurity G) | 5 | ■ ■ ■ ■ □ | ■ ■ ■ ■ ■ | 无(No) |
| 杂质 H (impurity H) | 5 | ■ ■ ■ ■ □ | ■ ■ ■ ■ ■ | 无(No) |
| 杂质 I (impurity I) | 5 | ■ ■ ■ ■ □ | ■ ■ □ □ | 无(No) |
| 杂质 J (impurity J) | 5 | ■ ■ ■ ■ □ | ■ ■ □ □ | 无(No) |
| 杂质 N (impurity N) | 5 | ■ ■ ■ ■ □ | ■ ■ □ □ | 无(No) |

注(note): “+”表示阳性(indicates positivity), “-”表示阴性(indicates negative)

4 结论

本文制定的 HPLC 方法能准确地测定硫酸沙丁胺醇原料及吸入气雾剂中的常见有关物质,并给出各杂质的相对校正因子,分析了各杂质生成的可能途径和遗传基因毒性。该方法专属性强,灵敏度高,为该原料药及制剂的质量可控提供了准确的检验方法,为科学监管提供了有效的技术支持。采用新方法对国家药品评价抽验样品的有关物质进行了评价,结果均符合规定。

参考文献

- [1] 张雪梅. 左旋硫酸沙丁胺醇肺部吸入给药的制剂与药效与作用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013
ZHANG XM. The Study on Preparation and Pharmacodynamics of R-Salbutamol Sulfate for Pulmonary Inhalation[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [2] KHALE A, BAJAJ A. Formulation and development of metered dose inhalations of salbutamol in solution form[J]. *Indian J Pharm Sci*, 2012, 73(5): 543
- [3] 郑丹红. 硫酸沙丁胺醇雾化吸入治疗支气管哮喘急性发作的效果观察及护理[J]. *海峡药学*, 2011, 23(11): 116
ZHENG DH. Observation and nursing of the effect of nebulized inhalation of salbutamol sulfate in the treatment of acute attacks of bronchial asthma[J]. *Strait Pharm J*, 2011, 23(11): 116
- [4] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 四川美康医药软件研究开发有限公司. 药物临床信息参考[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2004: 495
Center for Drug Evaluation, CFDA. Sichuan Medicom Software Co., LTD. Clinical Drug Reference[M]. Chengdu: Sichuan Publishing House of Science & Technology, 2004: 495
- [5] 莫建容, 黄念华, 黎小华. 硫酸沙丁胺醇气雾剂吸入与茶碱控释片治疗急性老年哮喘的临床疗效[J]. *中国医药科学*, 2018, 8(12): 55
MO JR, HUANG NH, LI XH. Clinical efficacy of salbutamol sulfate aerosol inhalation and theophylline controlled release tablets in the treatment of acute senile asthma[J]. *Chin Med Pharm*, 2018, 8(12): 55
- [6] 王枫, 兰莉, 乔艳梅. 硫酸沙丁胺醇联合氨茶碱治疗小儿哮喘的疗效观察[J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(9): 1683
WANG F, LAN L, QIAO YM. Clinical observation of salbutamol sulfate combined with aminophylline in treatment of children with asthma[J]. *Drugs Clin*, 2017, 32(9): 1683
- [7] 梁利红, 许丽萍, 梁东阁, 等. 小儿定喘口服液联合硫酸沙丁胺醇治疗小儿轻中度支气管哮喘的临床研究[J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(3): 680
LIANG LH, XU LP, LIANG DG, et al. Clinical study on Xiao'er Dingchuan oral liquid combined with salbutamol[J]. *Drug Clin*, 2024, 39(3): 680
- [8] 仇中选, 王东, 管丽君, 等. 硫酸沙丁胺醇有关物质的合成[J]. *中国医药工业杂志*, 2023, 54(4): 540
QIU ZX, WANG D, GUAN LJ, et al. Synthesis of the related substances of salbutamol sulfate[J]. *Chin J Pharm*, 2023, 54(4): 540
- [9] 叶小辉, 孙宁云, 戴健, 等. 一种沙丁胺醇杂质的制备方法及应用: 中国, 112979480 B[P]. 2023-05-16
YE XH, SUN NY, DAI J, et al. A Preparation Method and Application of Impurities in Salbutamol: China, 112979480 B[P]. 2023-05-16
- [10] EP 11[S]. 2022: 3936
- [11] 王鑫, 刘宏大, 薛雁, 等. 高效液相色谱法测定硫酸沙丁胺醇有关物质的含量[J]. *安徽医药*, 2020, 24(2): 242
WANG X, LIU HD, XUE Y, et al. HPLC method was used to determine the content of albuterol sulfate[J]. *Anhui Med Pharm J*, 2020, 24(2): 242
- [12] 张冬梅, 牛冲, 冷佳蔚. HPLC 测定硫酸沙丁胺醇雾化吸入溶液有关物质方法的研究[J]. *食品与药品*, 2012, 14(11): 416
ZHANG DM, NIU C, LENG JW. Determination of related substances in salbutamol sulfate nebulized inhalation solution by HPLC[J]. *Food Drug*, 2012, 14(11): 416
- [13] 左文坚, 史欣. HPLC 测定硫酸沙丁胺醇缓释片有关物质及含量[J]. *中国药学杂志*, 2002, 37(7): 55
ZUO WJ, SHI X. Assay for the content and related substance of salbutamol sulfate sustained release tablets by HPLC[J]. *Chin Pharm J*, 2002, 37(7): 55
- [14] 中华人民共和国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020: 1583
ChP 2020. Vol II[S]. 2020: 1583
- [15] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 547
ChP 2020. Vol IV[S]. 2020: 547
- [16] ICH. Harmonised Guideline M7(R2): Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceutical to Limit Potential Carcinogenic Risk [EB/OL]. Geneva: ICH, 2013[2023-04-03]. <https://www.ich.org/page/multi-disciplinary-guidelines>
- [17] BENIGNI R, BOSSA C, TCHEREMENSKAIA O, et al. Development of Structural Alerts for the *In Vivo* Micronucleus Assay in Rodents [EB/OL]. Luxembourg: OPOCE, 2009[2009-06-03]. <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC52274>

(本文于 2024 年 4 月 7 日收到)