超高效液相色谱法快速分析盐酸溴己新及其片剂中的有关物质

王志军[1]，岳瑞齐[1]，程奇蕾[1]，张艳海[2]，李慧义[1]*
（1. 国家药典委员会，北京 100061；2. 安捷伦科技（中国）有限公司，上海 200080）

摘要：建立了超高效液相色谱（UHPLC）法测定盐酸溴己新（**1**）中 15 种有关物质。采用 Zorbax Eclipse Plus C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3.5 μm），以甲酸铵缓冲液和乙腈（体积比 60 ∶ 40）为流动相。通过对流动相 pH 值、缓冲盐浓度、柱温等条件进行考察，确定了最终色谱条件。分别采用本法和药典标准方法对 3 个厂家的共 16 批次 **1** 原料药和 **1** 片进行对比分析，并采用高分辨质谱对发现的未知杂质结构进行初步推断。结果表明，15 个已知杂质和主成分分离良好，强制降解后产物对目标峰的分离没有干扰，表明本法专属性良好。所有 **1** 原料药和 **1** 片中的已知杂质和总杂含量均满足药典要求。通过 LC-MS 对其中未知单杂进行了分析，推断其可能为 2,4- 二溴 -6-[[甲基 -(4- 甲基环己基）氨基] 甲基]- 苯胺。该方法为开展一致性评价研究奠定了基础。

关键词：盐酸溴己新；超高效液相色谱；有关物质
中图分类号：R917　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2024)-02-0261-10
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.02.013

Fast Assays of Related Substances in Bromhexine Hydrochloride and Its Tablets by Ultra High Performance Liquid Chromatography

WANG Zhijun[1], YUE Ruiqi[1], CHENG Qilei1, ZHANG Yanhai[2], LI Huiyi[1]*
(*1. Chinese Pharmacopeia Commission, Beijing 100061; 2. Agilent Technologies (China) Co., Ltd., Shanghai 200080*)

ABSTRACT: An ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) method was established to determine the fifteen related substances in bromhexine hydrochloride (**1**). The Zorbax Eclipse Plus C_{18} column was used, with ammonium formate buffer-acetonitrile (60∶40) as the mobile phase. The final chromatographic conditions were screened out by examining the conditions such as mobile phase pH, buffer salt concentration, and column temperature. The UHPLC method and pharmacopoeia standard method were used to analyze and compare a total of sixteen batches of **1** bulk drugs and **1** tablets from three manufacturers, and high-resolution mass spectrometry was used to preliminarily infer the unknown impurities. The results showed that the fifteen related substances and principal component were well separated, and the products after forced degradation did not interfere with the separation of the target peak, indicating the good specificity of this method. All known impurities and total impurities in **1** bulk drugs and **1** tablets met the requirements of the pharmacopoeia. The unknown impurity was analyzed by LC-MS, and it was inferred that it might be 2,4-dibromo-6-[[methyl-(4-methylcyclohexyl)-amino]methyl]aniline. This method provided a reference for the consistency evaluation of **1**.

Key Words: bromhexine hydrochloride; UHPLC; related substance

盐酸溴己新（bromhexine hydrochloride，**1**）片是呼吸系统祛痰类的非处方药，口服后易吸收、代谢快，临床上主要用于急慢性支气管炎、哮喘、支气管扩张、肺气肿的治疗，是国家基本药物。该药最初于 1961 年由德国勃林格公司开发，我国于 1973 年开始仿制生产，自 1977 年开始收入《中华人民共和国药典》（ChP）。据药智网（www.yaozh.com）统计，**1** 相关的国产药品信息多达 114 条，涉及片剂、注射剂及其他复方制剂等。

收稿日期：2023-01-12
作者简介：王志军(1979—)，男，硕士，从事药品质量分析与控制研究。
通信作者：李慧义(1970—)，女，研究员，从事药品质量分析与控制研究。
E-mail：wzjforever@126.com

有关物质是药品质量控制的重要内容，药物的杂质谱也是比较仿制药与原研药质量一致性的重要内容[1]。另外，对未知杂质的分析也能为完善工艺和质量标准，以及为进一步提高产品质量奠定基础。现行 ChP 2020 年版二部采用液相色谱结合乙腈 - 磷酸盐等度洗脱的方法，仅对 1 个已知杂质（杂质Ⅰ，*N*- 甲基 -*N*- 环己基 -2- 氨基 -3- 氯 -5- 溴苯甲胺或 *N*- 甲基 -*N*- 环己基 -2- 氨基 -5- 氯 -3- 溴苯甲胺）和总杂进行控制；欧洲药典（EP 10.0）也采用液相色谱等度洗脱的分析方法对 5 个已知杂质和其他未指明杂质以及总杂含量进行控制。

随着对色谱条件的优化和对 **1** 杂质研究的不断深入，已建立了能够同时检测更多杂质的常规液相色谱分析方法[2—4]，用于实际药物的质量控制。但常规分析方法时间长、分析效率低、试剂消耗量大。

本研究采用超高效液相色谱（UHPLC），通过系统优化影响分离的关键因素，构建了能同时分析 15 种有关物质的快速分析方法（**1** 和 15 种有关物质的化学信息如表 1 所示），同时采用 ChP 2020 和 EP 10.0 收载的标准方法，对收集到的多个厂家来源的 **1** 原料药和 **1** 片剂进行分析评价，并对其中未指明的杂质进行了质谱分析和结构推断，以期为产品质量控制及一致性评价工作研究提供参考。

1　仪器与试药

1290 Infinity Ⅱ型液相色谱系统（美国 Agilent 公司），包括 G7104A 型四元泵、G7129A 型自动进样器、G7116A 型柱温箱、G7117A 型二极管阵列检测器，软件采用 Agilent OpenLab CDS 2.5 版；MS105DU 型分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1 原料药（广州一品红制药有限公司，批号 42621006、42621007、42621008；万邦德制药集团有限公司，批号 501U210807、501U210804、501U210801、Q02Y190301、Q02Y190302）；**1** 片（山西立业制药有限公司，规格 8 mg×100 片，批号 20200301、20211101、20210301；万邦德制药集团有限公司，规格 8 mg×24 片，批号 21A200501、21A200601；万邦德制药集团有限公司，规格 8 mg×60 片，批号 21A210508、21A210705、21A210501）；杂质 A、B、C、D、E、F、Ia、Ib、K、L、M、N、O、Q、R 均由成都新恒创药业有限公司提供（含量 >98%，供鉴定用）；乙腈、甲醇为色谱级，磷酸、乙酸铵为 HPLC 级，甲酸、乙酸为 LC-MS 级，水为去离子水。

2　方法和结果

2.1　色谱及质谱条件

2.1.1　ChP 2020 方法

色谱柱 Zorbax Eclipse Plus C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3.5 μm）；流动相 磷酸盐缓冲液（取磷酸二氢钾 1.0 g，加水 900 mL 使溶解，再用 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.0，用水稀释至 1 000 mL，摇匀）和乙腈（体积比 20 ∶ 80）；柱温 40 ℃；检测波长 245 nm；流速 1.0 mL/min；进样量 10 μL。

2.1.2　EP10.0 方法

色谱柱 Poroshell EC-C_{18} 柱（2.1 mm×150 mm，2.7 μm）；流动相 甲酸铵缓冲液（取甲酸铵 1.26 g，加水 950 mL 使溶解，用甲酸调至 pH 4.4，用水稀释至 1 000 mL，摇匀）和乙腈（体积比 60 ∶ 40）；柱温 30 ℃；检测波长 248 nm；流速 0.2 mL/min；进样量 3 μL。

2.1.3　本研究建立的 UHPLC 法

色　谱　柱 Zorbax Eclipse Plus C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相 A 为 100 mmol/L 乙酸铵（用乙酸调至 pH 5.5 ～ 5.6），B 为甲醇，梯度洗脱（0—8.4 min，B 35%—60%；8.4—10 min，B 60%—65 %；10—14 min，B 65 %—85 %；14—20 min，B 85%；20—20.5 min，B 85%—35%）；检测波长 245 nm；流速 0.5 mL/min；进样量 1 μL；柱温 40 ℃。

2.1.4　质谱法

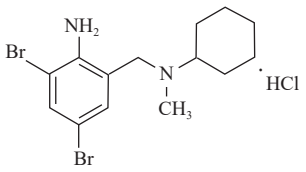
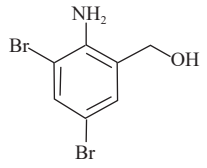
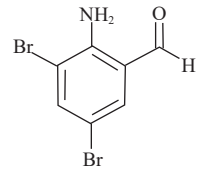
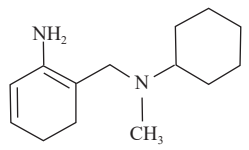
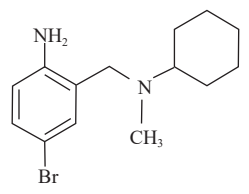
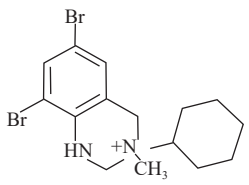
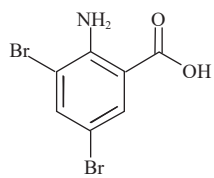
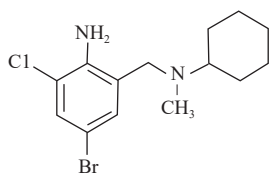
离子源 电喷雾电离源（ESI），正离子扫描模式；扫描电压 4 000 V；雾化气流量 344.738 kPa；干燥气流量 10 L/min；干燥气温度 300 ℃；鞘气流量 11 L/min；鞘气温度 350 ℃；碎裂电压电压 120 V；全扫描质谱范围（*m*/*z*）100 ～ 1 000；目标二级质谱扫描范围（*m*/*z*）10 ～ 500；碰撞能量 10、20、40 V。

2.2　溶液配制

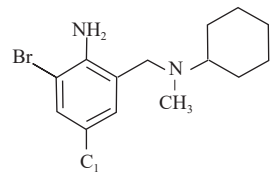
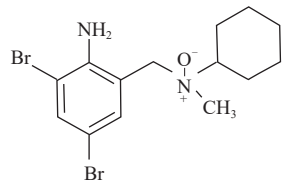
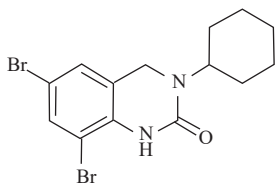
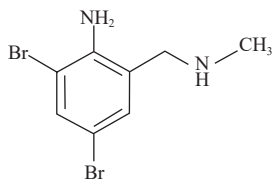
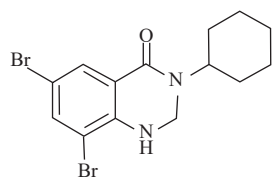
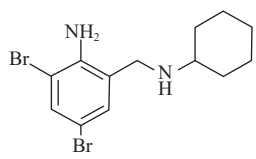
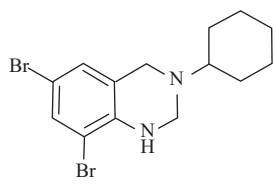
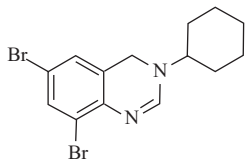
供试品溶液：取 **1** 原料药或片剂细粉适量，精

表 1　1 和 15 种有关物质的化学信息

Tab.1　Chemical Information of **1** and Fifteen Related Substances

化合物	中文化学名称	英文化学名称	分子式	相对分子质量	化学结构式
1	2,4-二溴-6-[[环己基(甲基)氨基]-甲基]苯胺盐酸盐	2,4-dibromo-6-[[cyclohexyl(methyl)-amino]methyl]aniline hydrochloride	$C_{14}H_{21}Br_2ClN_2$	412.59	
杂质A	(2-氨基-3,5-二溴苯基)甲醇	(2-amino-3,5-dibromophenyl)methanol	$C_7H_7Br_2NO$	280.95	
杂质B	2-氨基-3,5-二溴苯甲醛	2-amino-3,5-dibromobenzaldehyde	$C_7H_5Br_2NO$	278.93	
杂质C	2-[[环己基(甲基)氨基]甲基]苯胺	2-[[cyclohexyl(methyl)amino]methyl]-aniline	$C_{14}H_{22}N_2$	218.34	
杂质D	4-溴-2-[[环己基(甲基)氨基]甲基]-苯胺	4-bromo-2-[[cyclohexyl(methyl)-amino]methyl]aniline	$C_{14}H_{21}BrN_2$	297.24	
杂质E	6,8-二溴-3-环己基-3-甲基-1,2,3,4-四氢喹唑啉-3-鎓	6,8-dibromo-3-cyclohexyl-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-3-ium chloride	$C_{15}H_{21}Br_2N_2$	389.15	
杂质F	2-氨基-3,5-二溴苯甲酸	2-amino-3,5-dibromobenzoic acid	$C_7H_5Br_2NO_2$	294.93	
杂质Ia	4-溴-2-氯-6-[[环己基(甲基)-氨基]-甲基]苯胺	4-bromo-2-chloro-6-[[cyclohexyl(methyl)amino]methyl]-aniline	$C_{14}H_{20}BrClN_2$	331.68	

（续表 1）

化合物	中文化学名称	英文化学名称	分子式	相对分子质量	化学结构式
杂质Ib	2-溴-4-氯-6-[[环己基(甲基)-氨基]-甲基]苯胺	2-bromo-4-chloro-6-[[cyclohexyl(methyl)amino]methyl]-aniline	$C_{14}H_{20}BrClN_2$	331.68	
杂质K	*N*-(2-氨基-3,5-二溴苄基)-*N*-甲基环己胺氧化物	*N*-(2-amino-3,5-dibromobenzyl)-*N*-methylcyclohexanamine oxide	$C_{14}H_{20}Br_2N_2O$	392.14	
杂质M	6,8-二溴-3-环己基-3,4-二氢喹唑啉-2(1*H*)-酮	6,8-dibromo-3-cyclohexyl-3,4-dihydroquinazolin-2(1*H*)-one	$C_{14}H_{16}Br_2N_2O$	388.10	
杂质O	2,4-二溴-6-[(甲氨基)甲基]苯胺	2,4-dibromo-6-[(methylamino)methyl]-aniline	$C_8H_{10}Br_2N_2$	293.99	
杂质R	6,8-二溴-3-环己基-2,3-二氢喹唑啉-4(1*H*)-酮	6,8-dibromo-3-cyclohexyl-2,3-dihydroquinazolin-4(1*H*)-one	$C_{14}H_{16}Br_2N_2O$	388.10	
杂质L	2,4-二溴-6-[(环己基氨基)甲基]-苯胺	2,4-dibromo-6-[(cyclohexylamino)-methyl]aniline	$C_{13}H_{18}Br_2N_2$	362.11	
杂质N	6,8-二溴-3-环己基-1,2,3,4-四氢喹唑啉	6,8-dibromo-3-cyclohexyl-1,2,3,4-tetrahydroquinazoline	$C_{14}H_{18}Br_2N_2$	374.12	
杂质Q	6,8-二溴-3-环己基-3,4-二氢喹唑啉	6,8-dibromo-3-cyclohexyl-3,4-dihydroquinazoline	$C_{14}H_{16}Br_2N_2$	372.10	

密称定，加甲醇溶解并稀释制成约含 **1** 2.5 mg/mL 的溶液，经 0.22 μm 有机膜滤过后，即得。

1 对照品和各杂质标准品溶液：取上述供试品溶液适量，用甲醇定量稀释，制成约含 **1** 5 μg/mL

的溶液，对上述溶液中的杂质进行相对定量；再取各杂质标准品适量，加入甲醇溶解并稀释制成杂质质量浓度各约为 10 μg/mL 的混合标准品溶液，用于对各杂质进行定性鉴别。

另取杂质混合标准品溶液与供试品溶液按体积比 1 ∶ 1 混合均匀，用于优化色谱条件和方法对比评价。

2.3 UHPLC 方法的建立及优化

本试验共收集到了 15 个有关物质，即杂质 A、B、C、D、E、F、Ia、Ib、K、L、M、N、O、Q、R，包括了现行 ChP 2020 和 EP 10.0 中 **1** 项下所控制的已知有关物质。本研究参考已有的常规分析方法[3]，采用规格为不同烷基键合硅胶的色谱柱［2.1 mm×100（或 150）mm，1.8 μm］，在不改变流动相体系的条件下进行快速方法转换，转换后再分别对色谱柱的化学键合相、流动相的 pH 值、缓冲盐的浓度、柱温、流动相梯度进行了考察，以确定最优化的色谱条件。

2.3.1 色谱柱选择

分别选择 Eclipse Plus C_{18} 柱［2.1 mm×100（或 150）mm，1.8 μm］、SB-C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）、SB-Phenyl 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）和 Poroshell C_{18} 柱（2.1 mm×150 mm，2.7 μm）等色谱柱，对 15 个有关物质和主成分的保留及分离行为进行考察。

结果显示，SB-Phenyl 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）与其他类型的色谱柱选择性差异较大，前者分离得到的色谱峰数量最少，主峰相对保留较弱且峰重叠较多；Eclipse Plus C_{18} 柱［2.1 mm×100（或 150）mm，1.8 μm］与相同规格的 Poroshell C_{18} 柱（2.1 mm×150 mm，2.7 μm）相比，整体选择性差异不大，但在杂质 B 和 L 以及杂质 Q 与干扰成分的分离方面，前者显著优于后者；Eclipse Plus C_{18} 柱［2.1 mm×100（或 150）mm，1.8 μm］与 SB-C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）相比，二者对目标分析物的分离选择性相似，采用后者分离时，杂质 M 和 R 以及杂质 A 和 D 的分离度略优于前者，但前者整体上峰形的对称性更佳。综合以上比较分析，最终选择 Eclipse Plus C_{18} 柱作为分析柱，考虑到 150 mm 长度的系统压力更高及摩擦热效应较强等弊端，选择规格为（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）的 Eclipse Plus C_{18} 柱开展后续优化工作。

2.3.2 流动相体系的选择

乙酸铵缓冲体系与磷酸盐缓冲体系相比，除缓冲范围不一致以外，前者具有良好的有机相相容性，且能兼容 MS 检测，因此试验确定采用乙酸铵缓冲体系。甲醇和乙腈作为液相色谱常见有机相，二者选择性特征差异较大，也是影响分离的重要因素。乙腈具有低黏度和低背压，虽然更适于结合小粒径填料色谱柱做 UHPLC 的分离，但对比二者对所有目标物的整体分离结果，甲醇体系的选择性更佳，因此确定采用甲醇 - 乙酸铵体系。由于各目标待测物的结构及 p*K*a 的差异，可以初步判断流动相的 pH 值、缓冲盐浓度等对分离选择性影响较大。缓冲盐浓度越高，缓冲容量越大，但浓度过高也会引起溶解度降低、UV 背景吸收变大及 MS 响应性变化等。

本研究分别考察了 20、50、100 mmol/L 的乙酸铵缓冲液对整体分离效果的影响。结果显示，各杂质在乙酸铵缓冲液为 100 mmol/L 的条件下分离效果最佳。在 pH 值的考察中，本试验对比了在 pH 5.0、5.5 的条件下各目标峰的分离效果。结果显示，在 pH 5.5 的条件下，杂质 M、R、N、Ia、Ib 的分离度较好。进一步考察了 pH 值在 5.5±0.1 内变化对关键杂质峰 A/D 及 L/K 分离度的影响，结果如图 1 所示。可见，随着 pH 值的升高，杂质 A 和 D 的分离度逐渐升高，但杂质 L 和 K 分离度逐渐降低，在 pH 5.55±0.05 内，2 组关键峰的分离度均大于 1.5，因此确定最终的 pH 值为 5.55±0.05。

2.3.3 柱温和流动相梯度的考察

本研究分别考察了 35、40、45 ℃的柱温对分离效果的影响。柱温的提高有利于杂质 A 和 D 的分离，但会降低杂质 M 和 R 的分离度。综合考虑，选择 40 ℃作为最终柱温。

此外，流动相梯度程序采用分段梯度对关键峰对进行优化，其中甲醇从 65％到 85％这段梯度对

杂质 M 和 R 的分离度影响较明显，因此本研究系统考察了梯度坡度（$\Delta\varphi/t_G$）对二者分离度的变化规律。结果如图 2 所示。当 $\Delta\varphi/t_G$=5 时，杂质 M 和 R 的分离度最佳。按照优化的色谱条件，主成分和 15 个有关物质的混合溶液分离谱图如图 3 所示，各目标待测物分离良好，其中杂质 Ib 与主成分的分离度为 5.67，杂质 Ia 与 Ib 的分离度为 1.85，满足分析要求，各有关物质色谱峰的保留时间和相对保留时间如表 2 所示。

2.3.4　与药典方法分离效能的对比

分别按照现行 ChP 2020 和 EP 10.0 中 **1** 有关物质的测定方法，取“**2.2**”项下的 **1** 对照品和各杂质标准品溶液进样分析，并与本研究所构建方法的分析结果进行对比。结果如图 4 所示。由 ChP 2020 方法得到的测试结果（图 4B）可知，杂质 Ia+Ib 为叠加峰，二者与 **1** 的分离度为 3，虽满足 ChP 2020 二部 **1** 项下有关物质测定的系统适用性要求，但 RT 为 2 ～ 6 min 内，各有关物质的色谱峰较为集中，未能实现较好的分离效果。与 ChP 2020 相比，EP 10.0 对 **1** 中单个杂质 C 做了限度规定，也对其他 4 个有关物质（杂质 A、B、D、E）进行控制，由 EP 10.0 的测试结果（图 4C）可知，5 个目标有关物质相互分离良好，但在等度洗脱的 30 min 内仅能分离到 10 个明显色谱峰，在 30 min 后提高有机相比例（至 85%），仍有目标的杂质峰被洗脱，可见该法无法兼顾 15 个有关物质的分离和检测。

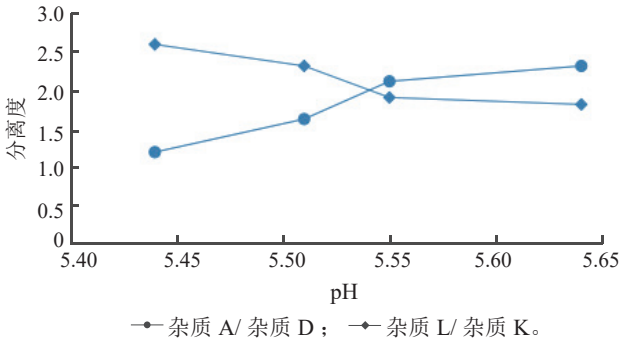


图 1　流动相 pH 值的变化对关键峰 A/D 及 L/K 分离的影响

Fig.1　Effect of Change in Mobile Phase pH Value on the Resolution of Key Peaks A/D and L/K

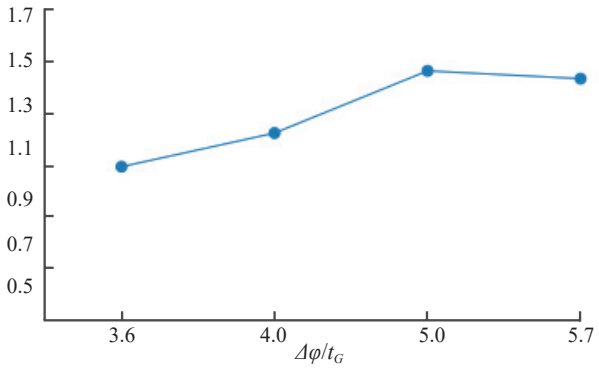


图 2　$\Delta\varphi/t_G$ 变化对杂质 M 和 R 分离度的影响

Fig.2　Effect of $\Delta\varphi/t_G$ Variation on the Resolution of Impurities M and R

2.4　专属性试验

为考察本研究所构建方法的专属性，试验采用强酸、强碱、UV 光照和过氧化氢氧化等强制降解破坏，研究可能的降解产物对 **1** 和各杂质分离测定的影响。结果显示，**1** 在酸、碱及 UV 光照条件下，降解产物并没有明显增加；在过氧化氢的氧化条件下，已知杂质峰 E 和 K 的含量明显增加，未产生其他明显杂峰；另基于 UV 纯度分析的结果表明主峰纯度良好，综合表明本法的专属性良好。

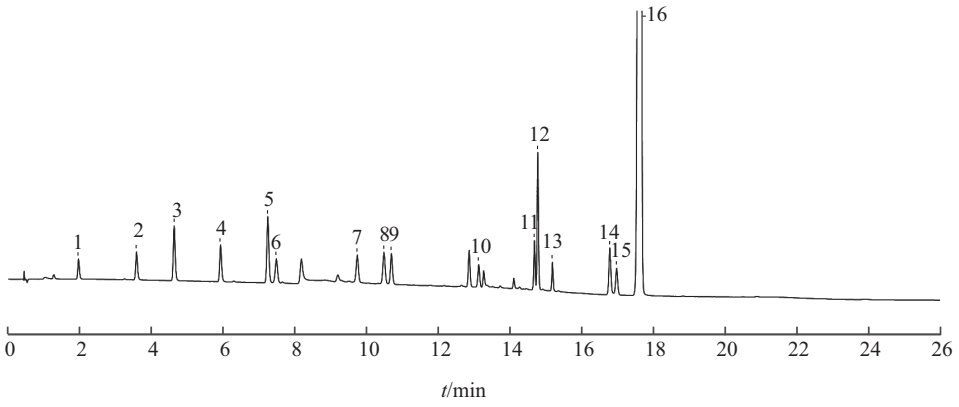
2.5　对 **1** 原料药和 **1** 片剂杂质谱的分析

本研究收集了 2 个厂家共 8 批 **1** 原料药，以及

表 2　1 与 15 个有关物质的保留时间（RT）和相对保留时间（RRT，以 1 为参照）

Tab.2　Retention Time (RT) and Relative Retention Time (RRT) of **1** and Fifteen Related Substances

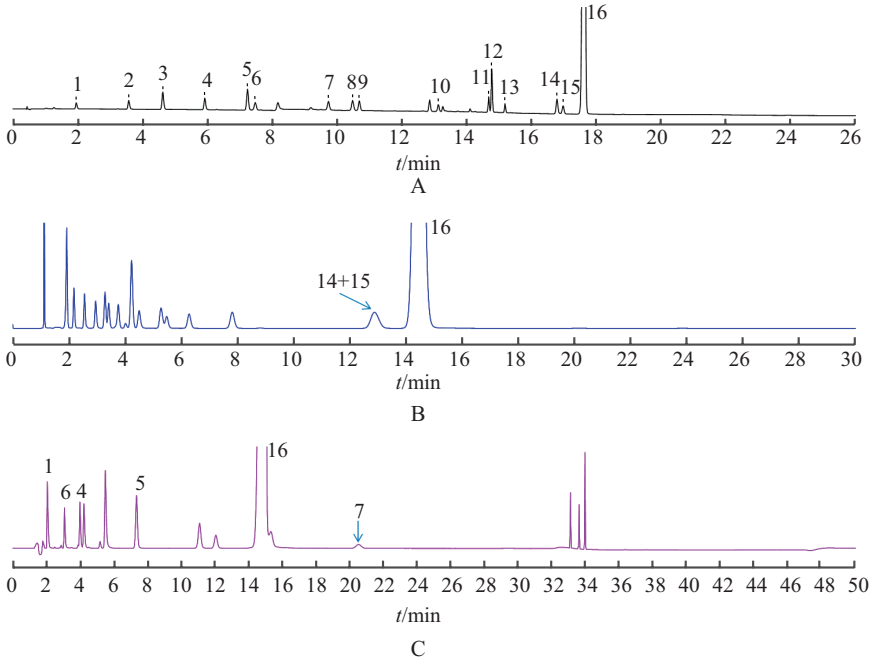
编号	化合物	RT/min	RRT
1	杂质C	1.958	0.111
2	杂质O	3.571	0.203
3	杂质F	4.623	0.262
4	杂质E	5.922	0.336
5	杂质A	7.245	0.411
6	杂质D	7.471	0.424
7	杂质B	9.743	0.553
8	杂质L	10.470	0.594
9	杂质K	10.691	0.607
10	杂质Q	13.117	0.745
11	杂质M	14.677	0.833
12	杂质R	14.771	0.839
13	杂质N	15.180	0.862
14	杂质Ia	16.777	0.953
15	杂质Ib	16.967	0.963
16	**1**	17.612	1



1—杂质 C；2—杂质 O；3—杂质 F；4—杂质 E；5—杂质 A；6—杂质 D；7—杂质 B；8—杂质 L；9—杂质 K；10—杂质 Q；11—杂质 M；12—杂质 R；13—杂质 N；14—杂质 Ia；15—杂质 Ib；16—**1**。

图 3　1 与 15 个有关物质的混合溶液分离谱图

Fig.3　Chromatogram of Mixed Solutions of **1** and Fifteen Related Substances



1—杂质 C；2—杂质 O；3—杂质 F；4—杂质 E；5—杂质 A；6—杂质 D；7—杂质 B；8—杂质 L；9—杂质 K；10—杂质 Q；11—杂质 M；12—杂质 R；13—杂质 N；14—杂质 Ia；15—杂质 Ib；16—**1**。

图 4　本研究建立的方法（A）、ChP 2020 方法（B）和 EP 10.0 方法（C）测得的 1 和 15 个有关物质的混合溶液分离色谱图的比较结果

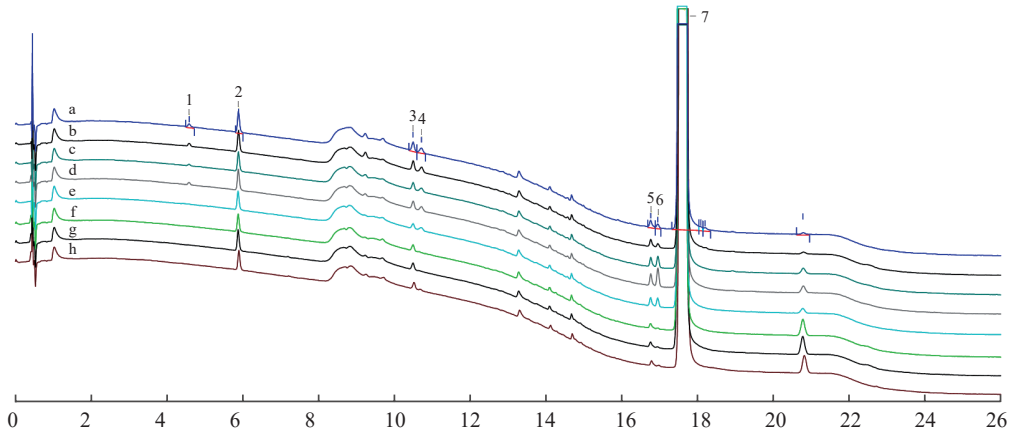
Fig.4　Comparative Chromatogram of Mixed Solutions of **1** and Fifteen Related Substances of Interest by the Present Method (A), ChP 2020 Method (B) and EP 10.0 Method (C) Respectively

2 个厂家的共 8 批 **1** 片样品，分别采用本研究建立的方法和 ChP 2020 方法进行杂质谱分析，并采用自身对照法对主要杂质进行定量。结果如图 5、6 所示，各原料药和制剂中的杂质组成基本一致，个

别杂质的相对含量存在差异；由表 3 结果可知，本法与 ChP 2020 方法所测得的含量大于 0.005%以上的杂质数量、最大单杂含量和总杂含量基本一致，均能满足药典要求。

2.6　未指明杂质的定性推断

对比 **1** 原料药和 **1** 片杂质谱的检测结果，除已知的杂质外，在主成分峰后均检测到 1 个未知杂质峰（RT=20.776 min），不同厂家来源的

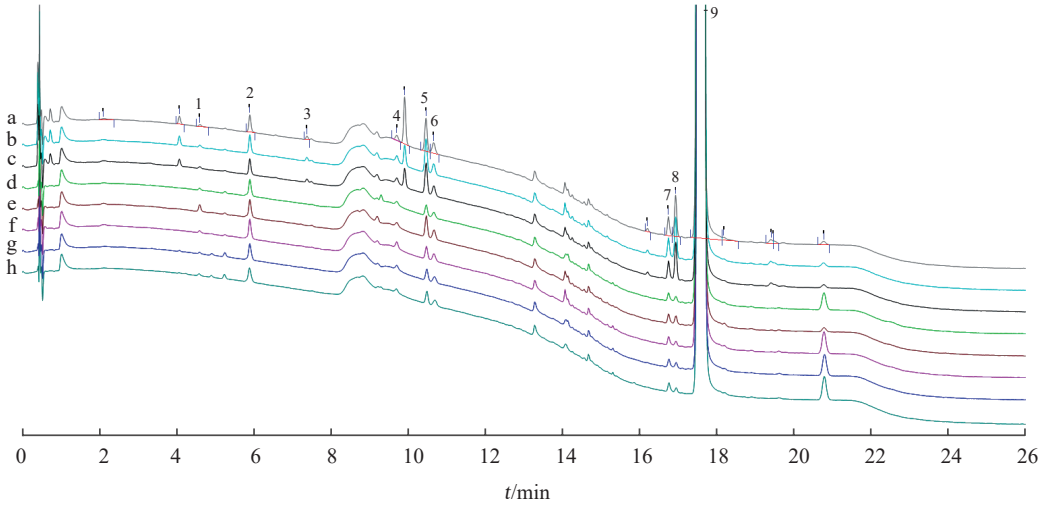


a—批号 Q02Y190302；b—批号 Q02Y190301；c—批号 501U210807；d—批号 501U210804；e—批号 501U210801；f—批号 42621008；g—批号 42621007；h—批号 42621006。

1—杂质 E；2—杂质 F；3—杂质 L；4—杂质 A；5—杂质 Ia；6—杂质 Ib；7—**1**。

图 5　不同厂家多批次 1 原料药的分析谱图

Fig.5　Chromatograms of Multi Batches of **1** Bulk Drugs from Different Suppliers



a—批号 20210301；b—批号 20211101；c—批号 20200301；d—批号 21A210501；e—批号 21A210705；f—批号 21A210508；g—批号 21A200601；h—批号 21A200501。

1—杂质 F；2—杂质 E；3—杂质 D；4—杂质 B；5—杂质 L；6—杂质 K；7—杂质 Ia；8—杂质 Ib；9—**1**。

图 6　不同厂家 1 片剂的分离谱图

Fig.6　Chromatograms of **1** Tablets from Different Suppliers

表 3 不同厂家 1 原料和片剂的杂质分析结果

Tab.3 Impurity Analysis of **1** Bulk Drugs and Tablets from Different Suppliers

1	厂家	批数	检出杂质数量		最大单杂含量/%		最大未知杂质含量/%		总杂含量/%	
			本法	ChP 2020	本法	ChP 2020	本法	ChP 2020	本法	ChP 2020
原料药	1	5	7	7	0.021	0.028	0.013	0.012	0.082	0.080
	2	3	5	6	0.033	0.032	0.033	0.032	0.064	0.065
片剂	3	5	9	10	0.042	0.038	0.042	0.038	0.117	0.100
	4	3	14	7	0.037	0.037	0.017	0.017	0.182	0.182

产品，该峰含量在 0.013 %～ 0.047 %。本研究通过 LC-MS 法对该未知杂质峰进行了探索性鉴别。首先，对比该杂质峰与主成分峰的 UV 吸收光谱，结果显示二者基本一致，说明该杂质与主成分的分子骨架结构相似；从 HRMS 的一级全扫描的高分辨谱图可以看出，主成分的单同位素的准分子离子峰为 *m*/*z* 375.007 1[M+H]$^+$，分子式为 $C_{14}H_{20}Br_2N_2$，分子中含有 2 个 Br，同位素信号丰度比为 1 ∶ 2 ∶ 1，而未知杂质的单同位素的准分子离子峰为 *m*/*z* 389.022 0[M+H]$^+$（图 7A），确定其分子式为 $C_{15}H_{22}Br_2N_2$；对比主成分和杂质峰的二级 MS 谱图，二者有共性的碎片离子 262、183、55 和 32（图 7B），进一步说明二者具有相似的结构片段。对碎片离子进行归属，说明该杂质分子含有 *N*- 甲基 -2- 氨基 -3,5- 二溴苯甲胺结构片段。此外，主成分二级 MS 碎片含有归属于 *N*- 环己基结构片段的 114 和 83，而该杂质峰对应的二级 MS 碎片离子为 128 和 97（图 7B），推断该杂质结构中可能含有甲基取代的 *N*- 环己基结构片段，因此推断该杂质的可能结构为 2,4- 二溴 -6-[[甲基 -(4- 甲基环己基）氨基] 甲基] 苯胺，该杂质化合物的 MS 可能裂解途径如图 8 所示。后续仍需结合 **1** 原料药的生产工艺流程，对该杂质可能存在的甲基取代位置进行判断，并制备相应对照品，做最终确认。

3 小结

本研究针对 **1** 中 15 个有关物质建立了超高效液相色谱分析方法，对影响关键色谱峰分离的条件进行考察和优化，确定了色谱条件。从关键因素考察结果可知，流动相的 pH 值和梯度对分离的影响较大，在实际方法确认和转移中需要重点关注。结合 **1** 原料药和 **1** 片等多批次样品的检测，以及与标准方法的比较，本法检测到的杂质数量和含量与标准方法基本匹配。另本法也发现 1 个未知杂质峰，基于高分辨质谱的一级分子离子峰和二级碎片离子峰，及与主成分裂解特征的比较，对未知杂质进行了探索性鉴别。后续仍需结合工艺过程等对该杂质进行确认。

致谢：成都新恒创药业有限公司提供杂质对照品。

参考文献：

[1] 王成刚, 张 喆, 王俊秋, 等. 盐酸溴己新片有关物质的质量分析[J]. 中国药学杂志, 2013, **48**(4): 304-308.

[2] 李文东, 王成刚, 吴科春, 等. 国产盐酸溴己新片与原研制剂质量比对研究[J]. 中国药事, 2016, **30**(1): 76-83.

[3] 马 欢, 张 宏, 李 敏, 等. 一种盐酸溴己新有关物质的高效液相色谱检测法: 中国, CN 107703230A [P]. 2018-02-16.

[4] 王玉立, 彭珊珊, 罗 杰, 等. 一种盐酸溴己新片中有关物质的质量控方法: 中国, CN 113533578A [P]. 2021-10-22.

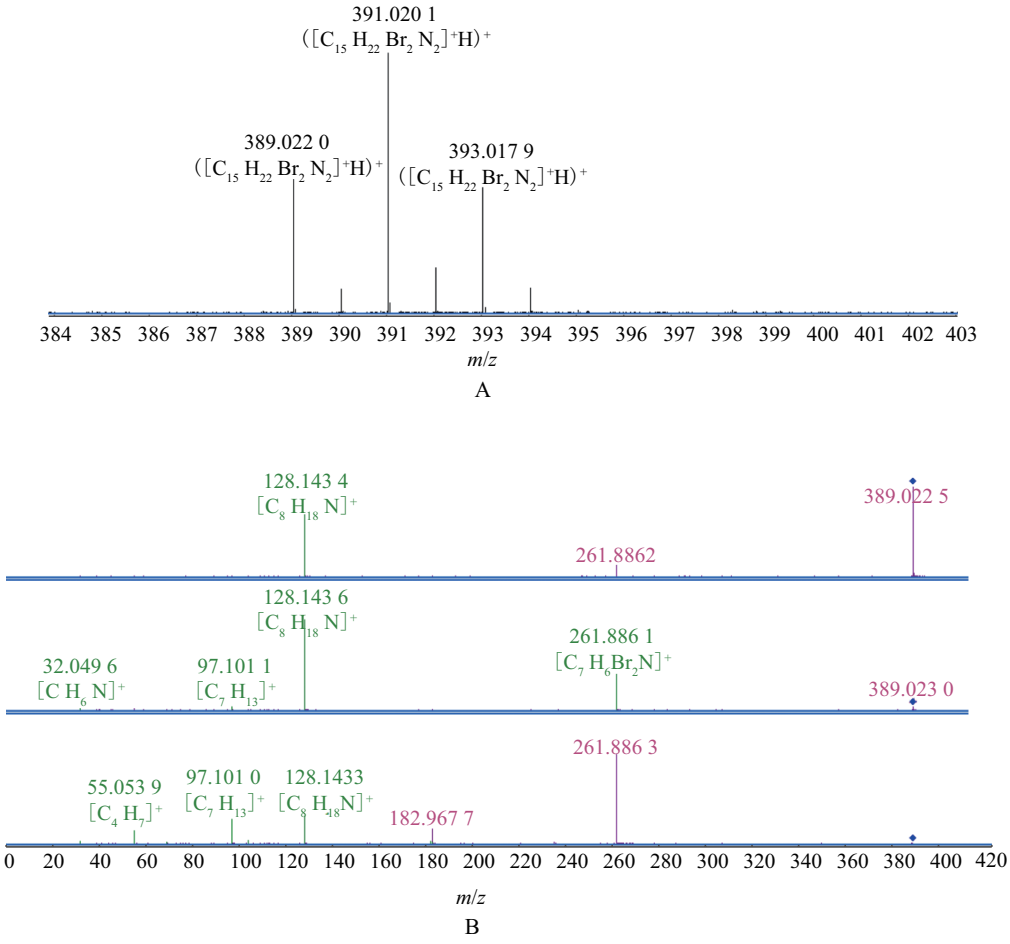


图 7　1 原料药（批号 42621006）中未知杂质峰的一级质谱图（A）及分别在 10、20 和 40 V 裂解电压下的二级碎片离子的质谱图（B）

Fig.7　MS^1 Spectrum of Unknown Impurities in **1** Bulk Drugs (Batch No. 42621006) (A) and MS^2 Spectra of Fragment Ions at 10, 20 and 40 V Fragmented Voltage (B) Respectively

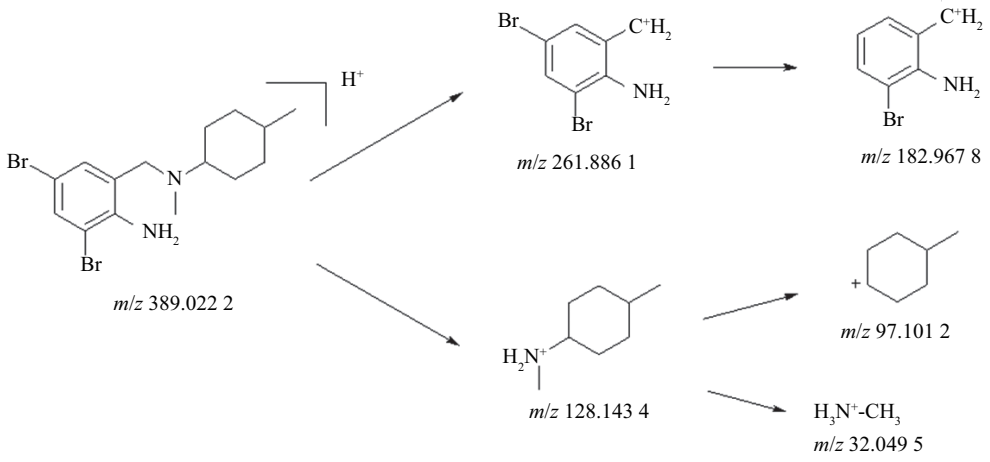


图 8　未知杂质的二级质谱可能裂解途径

Fig.8　Possible Fragmented Pathways for MS^2 of Unknown Impurities