

• 研究报告 •

高效离子交换色谱-电化学检测法测定米卡芬净原料中盐酸羟胺

高燕霞¹ 徐艳梅¹ 闫凯¹ 韩彬¹ 高凡钦² [1.河北省药品医疗器械检验研究院 石家庄 050011 2.赛默飞世尔科技(中国)有限公司]

摘要 目的: 建立高效阳离子色谱-电化学法测定米卡芬净原料中残留的盐酸羟胺的方法。方法: 以 IonPac CS₁₆(250 mm×5 mm) 色谱柱进行分离, 采用 100 mmol·L⁻¹ 甲磺酸溶液为淋洗液梯度洗脱, 流速为 1.0 ml·min⁻¹; 柱后中和试剂为 500 mmol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液, 流速为 0.3 ml·min⁻¹。采用电化学检测器进行检测, 电极材料为金电极, 参比电极为 pH-Ag/AgCl 复合电极, 电位波形为氨基酸六电位, 柱温 30℃, 进样体积 25 μl。结果: 羟胺与供试品主峰的分离度良好, 羟胺在 0.004~4.2 μg·ml⁻¹ 范围内线性关系良好($r=1.0000$) 检出限(LOD) 为 0.06 ng。结论: 该方法操作简单、专属性强、灵敏度高、重复性好, 可用于米卡芬净中痕量羟胺残留的检测。

关键词 离子色谱; 安培检测器; 米卡芬净; 盐酸羟胺

中图分类号: R927.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2021) 04-0734-04

Determination of Hydroxylamine Hydrochloride in Micafungin by High Performance Ion Exchange Chromatography with Electrochemical Detection

Gao Yanxia¹, Xu Yanmei¹, Yan Kai¹, Han Bin¹, Gao Fanqin² [1. Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 2. Thermo Scientific Technology (China) Co., Ltd.]

ABSTRACT Objective: To establish a method of high performance ion exchange chromatography with electrochemical detection for determining residual hydroxylamine hydrochloride in micafungin. **Methods:** The sample was separated on an analytical column IonPac CS₁₆(250 mm×5 mm), and then analyzed by an external standard method. Gradient elution was performed using 100 mmol·L⁻¹ mesylate solution, and the flow rate was 1.0 ml·min⁻¹. The post-column neutralization reagent was 500 mmol·L⁻¹ sodium hydroxide solution at a flow rate of 0.3 ml·min⁻¹. The electrode was made of gold, the reference electrode was pH-Ag/AgCl composite electrode, the potential waveform was six potential of amino acid, the column temperature was 30℃, and the volume of injection was 25 μl. **Results:** The results showed that within the concentration range of 0.004~4.2 μg·ml⁻¹, the calibration curves were linear with the correlation coefficient of 1.0000. The detection limit was 0.06 ng for hydroxylamine hydrochloride. **Conclusion:** The method is simple, effective, sensitive and selective, and suitable for the determination of hydroxylamine hydrochloride in micafungin.

KEY WORDS Ion exchange chromatography; Ampere detector; Micafungin; Hydroxylamine hydrochloride

米卡芬净(micafungin) 是由美国默克公司研发的半合成棘白菌素 B 衍生物, 结构式如图 1 所示, 属 β-葡聚糖合成酶抑制剂, 在体外和真菌感染动物模型中对念珠菌属和曲霉菌属均有很高的抗菌活性, 对唑类药物产生耐药性的真菌具有良好的抗菌活性, 且对真菌细胞的选择性较强, 对人体正常细胞影响小, 具有低毒高效的临床效果, 是抗真菌药物开发的热点^[1]。

盐酸羟胺是一种在医药领域有着广泛用途的重要的有机合成中间体^[2], 也是合成米卡芬净的常用原料, 产品中残留的羟胺具有潜在基因毒性(PGI)^[3], 按照《基因毒性杂质限值指南》^[4] 要求, 测定残留羟胺的含量对保证药品质量, 减小人体危害具有重要意义。本文建立离子色谱-柱后衍生-安培检测器测定米卡芬净中盐酸羟胺的方法, 以用于药物中痕量盐酸羟胺的质量控制。

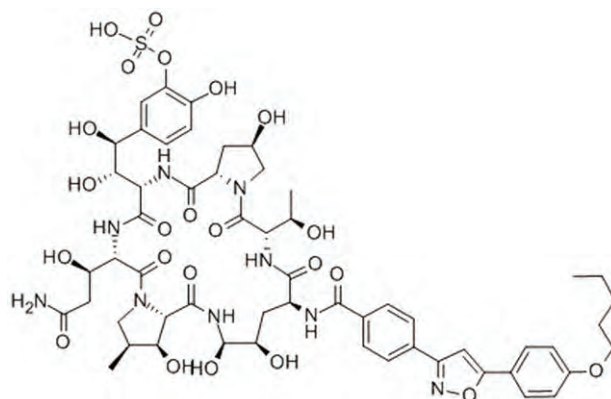


图1 米卡芬净结构式

1 仪器与试剂

DIONEX ICS-5000 型离子色谱仪(美国 Thermo Fisher 科技公司), 配备安培检测器(ED) 和双泵系统(淋洗液单泵和柱后衍生 AXP 泵); METTLER TOLEDO XS205 型电子天平(美国 Mettler-Toledo 公

通信作者: 韩彬 Tel: 13933853331 E-mail: 13933853331@139.com

司)。Ion Pac CS₁₆ 阳离子交换分析柱 (250mm × 4mm); On Guard II RP 柱(2.5ml, 美国 Thermo Fisher 公司)。

米卡芬净原料(批号: 180513、180514、180515, 购自河北某药厂); 盐酸羟胺对照品(批号: 100496-200801, 中国食品药品检定研究院, 含量100.0%); 甲基磺酸(MSA, 纯度99.5%, 阿拉丁); 氢氧化钠溶液(50%, 美国 Thermo Fisher 公司); 超纯水(实验室自制, Milli-Q, 电阻率为18.2 MΩ · cm); 试剂盐酸羟胺和氯化铵为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: IonPac CS₁₆(250 mm×5 mm) 阳离子交换分析柱, IonPac CG₁₆ 阳离子交换保护柱; 柱温: 30℃; 淋洗液条件: 100 mmol · L⁻¹ MSA 水溶液, 梯度洗脱, 见表1; 流速: 1.0 ml · min⁻¹; 进样体积: 25 μl; 柱后中和试剂组成及流速: 500 mmol · L⁻¹ NaOH 0.3 ml · min⁻¹; 检测器: 电化学检测器; 电极材料: 金电极; 参比电极: pH-Ag/AgCl; 检测器温度: 30℃; 电位波形: 积分脉冲安培检测, 6 电位波形, 见表2。

表1 淋洗液梯度洗脱程序

时间(min)	100 mmol · L ⁻¹ MSA	水
0	30	70
8.0	30	70
8.1	70	30
20.0	70	30
20.1	30	70
26.0	30	70

表2 安培电位波形

时间(s)	电位(v)	积分
0.000	0.130	
0.040	0.130	
0.050	0.330	
0.210	0.330	开
0.220	0.550	
0.460	0.550	
0.470	0.330	关
0.560	0.330	
0.570	-1.670	
0.580	-1.670	
0.590	0.930	
0.600	0.130	

2.2 溶液配制

2.2.1 空白溶液 30 mmol · L⁻¹ MSA 水溶液, 取1.95 ml 甲基磺酸, 加水1 000 ml 摇匀。

2.2.2 对照品储备液 精密称取盐酸羟胺21.86 mg, 置10 ml 量瓶中, 用30 ml · min⁻¹ MSA 溶解并稀释至刻度, 精密量取1 ml 置50 ml 量瓶中, 用

30 ml · min⁻¹ MSA 稀释至刻度, 制成每1 ml 中含羟胺约20 μg 的溶液, 作为对照品储备液, 备用。

2.2.3 对照品溶液 取对照品储备液1 ml, 置10 ml 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 得含羟胺浓度为0.2 μg · ml⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.4 系统适用性溶液 取氯化铵适量, 精密称定, 置于100 ml 量瓶中, 精密加入对照品储备液1.0 ml, 用30 ml · min⁻¹ MSA 溶液稀释并定容至刻度, 制成每1 ml 中含羟胺0.2 μg、铵离子0.4 μg 的溶液, 摇匀, 作为系统适用性溶液。

2.2.5 供试品溶液 取米卡芬净样品0.30 g, 精密称定, 置于10 ml 量瓶中, 用30 ml · min⁻¹ MSA 溶解并稀释至刻度, 摇匀。过0.22 μm 滤膜及 RP 柱后进样分析。

2.2.6 加标供试品溶液 取米卡芬净样品(批号: 180511) 约0.30 g, 精密称定, 置于10 ml 量瓶中, 用0.2 μg · ml⁻¹ 羟胺溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀。经0.22 μm 滤膜及 RP 柱处理后上样。

2.3 专属性试验

取空白溶液、系统适用性溶液、供试品溶液与供试品加标溶液分别注入离子色谱仪, 记录色谱图见图2, 盐酸羟胺峰与铵离子峰有效分离, 且色谱条件对样品分析无干扰。

2.4 专属性试验

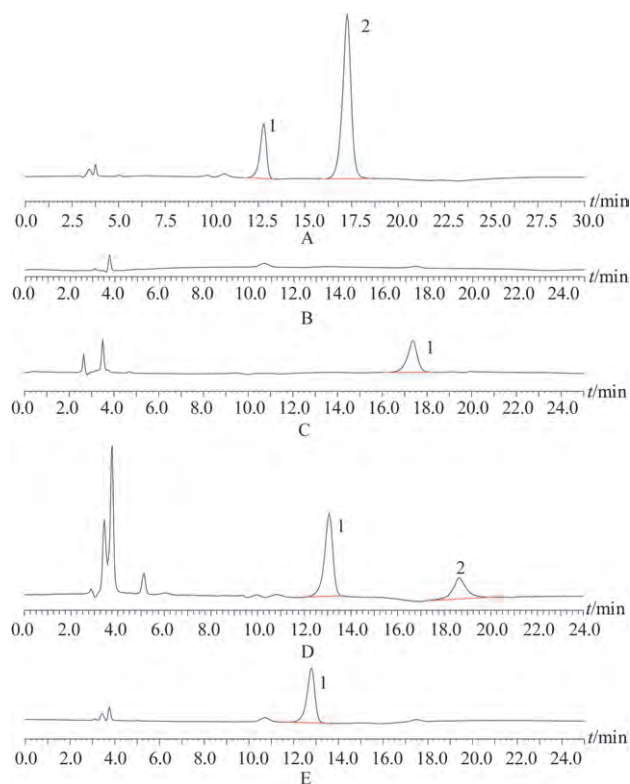
取米卡芬净原料1 批(批号: 180515), 按“2.2”项下方法制备溶液, 分别在酸(取0.1 mol · L⁻¹ HCL 溶液1 ml 加入摇匀, 静置30 min, 加入0.1 mol · L⁻¹ NaOH 溶液1 ml 摇匀)、碱(取0.1 mol · L⁻¹ NaOH 溶液1 ml 加入摇匀, 静置30 min, 加入0.1 mol · L⁻¹ HCL 溶液1 ml 摇匀)、高温(100℃水浴加热60 min)、光照(4 500 lx 放置24 h)和氧化(取30% H₂O₂ 加入1 ml, 放置30 min) 条件下, 进行强制降解试验, 所得溶液注入离子色谱仪, 记录色谱图见图3, 结果显示米卡芬净降解产物对本试验无干扰。

2.5 定量限及检出限试验

精密量取对照品溶液逐级稀释直至信噪比 S/N 约10, 即为定量限溶液。精密量取定量限溶液3 ml, 置10 ml 量瓶, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即为检出限溶液。取定量限溶液注入液相色谱仪, 连续测定6次, 记录色谱图, 结果: 定量限6次测定结果的峰面积 RSD 为1.02% (n=6), 定量限为0.207 ng, 检出限为0.062 1 ng。

2.6 线性关系考察

分别精密量取对照品储备溶液0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0 ml 分别置50 ml 量瓶中, 加水稀释

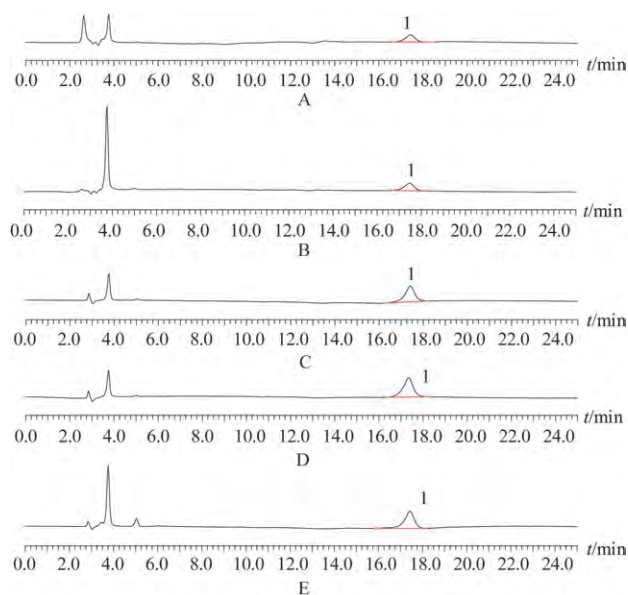


A. 系统适用性溶液 B. 空白溶剂 C. 供试品溶液

D. 对照品溶液 E. 供试品加标溶液

1. 羟胺离子 2. 铵根离子

图2 系统适用性试验 HPLC 色谱图



A. 酸降解 B. 碱降解 C. 高温降解 D. 光照降解 E. 氧化降解

图3 专属性试验 HPLC 色谱图

至刻度,作系列为线性溶液。精密量取上述溶液各 25 μl 分别注入液相色谱仪,记录色谱图,以峰面积(A)为纵坐标,以浓度($C, \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)为横坐标进行线性回归,结果线性方程为 $A = 30.4918C - 0.3899$, $r = 1.0000$,结果表明羟胺浓度在 $0.004 \sim 4.200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

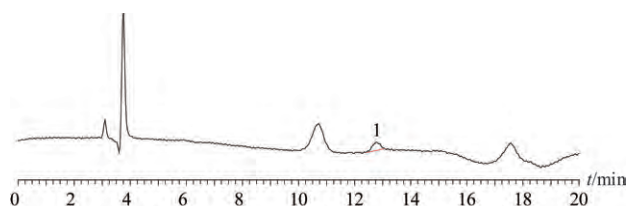


图4 检出限 HPLC 色谱图

2.7 回收率试验

精密称取米卡芬净原料(批号: 180515) 0.30 g, 共 9 份,置 10 ml 量瓶中,分别精密加入对照品储备溶液 25, 50, 75 μl 各 3 份,加 $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ MSA 稀释至刻度,过滤。精密量取上述溶液注入液相色谱仪,记录色谱图,计算回收率。结果羟胺回收率范围为 97.6%~100.3%,平均回收率为 99.0%,RSD 为 1.0% ($n=9$)。符合中国药典 2015 年版四部通则 9101 药品质量标准分析方法验证指导原则规定,准确性良好。

2.8 精密度试验

精密量取按照“2.1”项下对照品溶液注入液相色谱仪,重复进样 6 次,记录色谱图,计算 RSD,结果:羟胺峰保留时间 RSD 为 0.1% ($n=6$),峰面积 RSD 为 0.5% ($n=6$)。不同实验人员按“2.2”项下方法配制对照品溶液 6 份和供试品溶液(批号: 180515) 6 份。分别注入液相色谱仪,记录色谱图。不同实验人员重复测定 6 次, RSD 值均小于 2.0%。

2.9 重复性试验

取米卡芬净原料 1 批(批号: 180514),按照“2.1”项下方法配置,平行制备 6 份。精密量取对照品溶液和 6 份供试品溶液,注入离子色谱仪,记录色谱图。考察本法的重复性。结论:同一实验人员重复测定 6 次,测定结果一致,均未检出羟胺峰。

2.10 溶液稳定性试验

取“2.1”项下方法新鲜配置的对照品溶液和供试品溶液(批号: 180513),于室温放置 0, 2, 4, 6, 8 h,精密量取不同放置时间的上述溶液注入液相色谱仪,记录色谱图。结果:供试品溶液与对照品溶液在室温放置 8 h 样品中均未检出羟胺峰,米卡芬净在 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MSA 溶液中不会分解出新的羟胺离子;对照品溶液中羟胺峰的峰面积 RSD 为 0.3% ($n=5$),盐酸羟胺在 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MSA 溶液中稳定。

2.11 耐用性试验

取系统适用性溶液 25 μl 注入离子色谱仪,以分离度、理论塔板数为指标,分别考察了不同淋洗液浓度($28, 32 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、流速($0.7, 0.9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$)和柱温($25, 35^\circ\text{C}$)情况下对检测结果的影响。结果表明,当色谱条件参数有微小变化时,羟胺与供试品

主峰的分离度均大于 1.5,证明方法耐用性良好。

2.12 样品测定

取米卡芬净原料 3 批,按“2.1”色谱条件测试,结果见表 3。

表 3 样品测定结果($n=3$)

批号	取样量(g)	羟胺测得浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	盐酸羟胺含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
180513	0.2095	未检出	未检出
180514	0.2010	未检出	未检出
180515	0.2005	未检出	未检出

3 讨论

3.1 色谱条件筛选和优化

对比拟建立方法,分别考察了不同淋洗液浓度(28 和 32 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、流速(0.7 和 0.9 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)和柱温(25 和 35 $^{\circ}\text{C}$)情况下对检测结果的影响。结果表明,当色谱条件参数有微小变化时,羟胺与供试品主峰均能有效分离。综合保留时间、分离度和理论塔板数指标考量,最终确定色谱条件为:淋洗液浓度 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,流速 0.8 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.2 米卡芬净中羟胺限度的确定

羟胺在人用药品注册技术要求国际协调会(ICH) 2005 年指导原则 M7(R1) 中明确归属为基因毒杂质,并以该品种举例计算最大日暴露量(PDE)限度,在 2017 年新发布的指导原则中,典型杂质列表中只保留了具有相同致突变结构的苯胺,本文将有类似结构的羟胺按照 PGI 进行了控制。

羟胺 PDE 为 2 $\mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$,米卡芬净每日最大使用量为 300 mg,所以米卡芬净中羟胺的限度为 0.000 7%。

3.3 电化学-离子色谱法

查阅文献,测定盐酸羟胺的方法有酸碱滴定法^[5]、光谱法^[6]、共振光散射法^[7]、分光光度法^[8]等,操作繁琐,特异性不够,灵敏度低,共存离子容易对测定产生干扰,难以满足药品中微量盐酸羟胺测定的实际需要^[9]。近年来离子色谱在分析化学领域的应用已日趋成熟,特别是在针对强极性、水溶性好、可电离的有机离子化合物分析方面表现出了独特的优势,羟胺在紫外光区无特征吸收,尤其是具有相近性质的杂环仲胺盐,易受其他类似化合物干扰,但是羟胺在安培检测器上的高灵敏度,实现了其中痕量羟胺残留物的准确分离测定。

3.4 羟胺的分离检测原理

利用经阳离子交换色谱柱分离,碱性条件下盐酸羟胺在电极表面发生氧化还原反应引起的电流变化,进而测定盐酸羟胺的含量。离子交换色谱的色谱柱

的填料主要由基质(substrate material)和功能基(functional)两部分组成。功能基是可解离的无机基团,与流动相接触,在固定相表面形成带电荷的离子交换位置,与流动相中的离子发生离子交换,在离子交换反应中,功能基的本体结构不发生明显变化,仅由其离子交换功能基的离子与外界同性电荷的离子发生等量离子交换。色谱柱填料又被称为“离子交换剂”。IonPac CS₁₆ 阳离子交换剂的功能基主要是羧酸,米卡芬净结构中含有羟基,如果进入色谱系统,与羧酸基团发生酯化反应而降低柱效,OnGuard II RP 柱的主要功能基为二乙烯基苯,对疏水性有机化合物有非常好的吸附效果,水相溶液过 OnGuard II RP 柱后注入色谱仪,可确保去除全部有机物,并且色谱图背景较为干净,无任何有机物峰干扰。

3.5 小结

本文依据《已上市化学药品变更研究的技术指导原则(一)》^[10]、《化学药物质量标准建立的规范化过程技术指导原则》^[11]和《化学药物杂质研究技术指导原则》^[12]建立米卡芬净原料药中残留羟胺的检验方法,并通过《化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则》^[13]进行验证,方法专属性强,灵敏度高,耐用性好,结果准确可靠,为原料药中痕量羟胺的测定提供了参考。

参 考 文 献

- 1 孟国彬. 棘白霉素类抗真菌药的研究进展[J]. 河北化工, 2011, 34(1): 40-43
- 2 安孝德. 羟胺衍生物在含氮化合物合成中的应用[D]. 南京: 南京大学博士学位论文, 2018
- 3 马华志. 羟胺及盐酸羟胺的遗传毒性[J]. 中国公共卫生学报, 1996, 15(2): 136-138
- 4 EMEA. Committee For Medicinal Products for Human Use. Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities[S]. 2006
- 5 俞元龙, 聂善文. 盐酸羟胺含量测定法[J]. 医药工业, 1987, 18(8): 360-361
- 6 黄薇. 光谱法测定盐酸羟胺含量的研究[J]. 内蒙古师范大学学报: 自然科学(汉文)版, 2004, 33(2): 184-185
- 7 表明华. 共振光散射法测定盐酸羟胺[J]. 光谱实验室, 2012, 29(4): 2099-2101
- 8 马卫兴, 刘文明. 盐酸羟胺的分光光度测定法. 中国医药工业杂志, 1993, 24(7): 315-316
- 9 徐晨. 离子色谱法测定灭多威中的盐酸羟胺[J]. 现代农药, 2017, 16(1): 36-40
- 10 原国家食品药品监督管理局. 已上市化学药品变更研究的技术指导原则[S]. 2008
- 11 原国家食品药品监督管理局. 化学药物质量标准建立的规范化过程技术指导原则[S]. 2005
- 12 原国家食品药品监督管理局. 化学药物杂质研究的技术指导原则[S]. 2005
- 13 原国家食品药品监督管理局. 化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则[S]. 2005

(2020-06-27 收稿 2020-11-02 修回)