

柱前衍生化 HPLC 法测定 1 种酰氯类化合物

尹秀娥¹, 陈阳², 董乔², 张嘉月¹, 侯德粉¹

(1. 沈阳沈化院测试技术有限公司, 沈阳 110021; 2. 辽宁远大诺康生物制药有限公司, 沈阳 110171)

摘要 **目的:** 建立高效液相色谱法测定 1 种酰氯类化合物 5-氯噻吩-2-甲酰氯。**方法:** 采用 Ameritech Accurasil C₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸水溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B 进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 274 nm; 以无水甲醇为衍生化试剂, 三乙胺为缚酸剂, 经衍生后进样测定。**结果:** 5-氯噻吩-2-甲酰氯含量检测方法的专属性好; 在 1.012~2.040 mg · mL⁻¹ 浓度范围内线性良好 $r=0.998\ 2$, $n=5$; 精密度、溶液稳定性好, RSD 分别为 0.040% ($n=6$) 和 1.2% ($n=7$); 平均回收率 ($n=9$) 为 99.0%, RSD 为 0.80%; 色谱条件发生微小变化时, 方法耐用性好; 5-氯噻吩-2-甲酸的定量下限和检测下限分别为 1.871 μg · mL⁻¹ 和 0.623 7 μg · mL⁻¹, 5-氯噻吩-2-甲酰氯的定量下限和检测下限分别为 1.562 μg · mL⁻¹ 和 0.468 6 μg · mL⁻¹; 3 批供试品中特定杂质和最大单一未知杂质含量均小于 1.0%, 主成分含量分别为 98.5%、98.4%、98.4%。**结论:** 本方法适用于 5-氯噻吩-2-甲酰氯的测定, 对于其他酰氯类化合物的测定也有重要的参考价值。

关键词: 酰氯类化合物; 5-氯噻吩-2-甲酰氯; 高效液相色谱法; 柱前衍生化; 含量测定; 利伐沙班

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2019) 11-2064-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.11.20

Determination of an acyl chloride compound with pre-column derivatization by HPLC

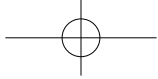
YIN Xiu-e¹, CHEN Yang², DONG Qiao², ZHANG Jia-yue¹, HOU De-fen¹

(1. Shenyang SYRICI Festing Co., Ltd., Shenyang 110021, China;

2. Liaoning Grand Nuokang Biopharmaceutical Co., Ltd., Shenyang 110171, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the determination of an acyl chloride compound 5-chlorothiophene-2-carbonyl chloride. **Methods:** HPLC was performed on an Ameritech Accurasil C₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a gradient elution system of 0.01 mol · L⁻¹ phosphoric acid solution-acetonitrile. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, and the column temperature was maintained at 35 °C, the detection wavelength was 274 nm. Triethylamine and anhydrous methanol were added into the drug solution sequentially as acid binding and derivatization reagents, respectively. **Results:** The method had good specificity and it showed an excellent linearity within the range of 1.012–2.040 mg · mL⁻¹ ($r^2=0.998\ 2$, $n=5$). The precision and solution stability were satisfactory,

第一作者 Tel: 13889805379; E-mail: xiaofeixiang@126.com



with the RSDs of 0.040% ($n=6$) and 1.2% ($n=7$), respectively. The average recovery was 99.0%, with the RSD of 0.80% ($n=9$). The method had good durability when chromatographic conditions changed slightly. The limit of quantitation of 5-chloro-2-thiophenecarboxylic acid and 5-chlorothiophene-2-carbonyl chloride were $1.871 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1.562 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The limit of detection of 5-chloro-2-thiophenecarboxylic acid and 5-chlorothiophene-2-carbonyl chloride were $0.623 7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $0.468 6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The determination results of the three batches of samples showed that the contents of the specified impurity and the maximum single unknown impurity were less than 1.0%, and the contents of 5-chlorothiophene-2-carbonyl chloride were 98.5%, 98.4% and 98.4%, respectively. **Conclusion:** The method is suitable for the determination of and it also has important reference value for the determination of other acyl chloride compounds.

Keywords: acyl chloride compounds; 5-chlorothiophene-2-carbonyl chloride; HPLC; pre-column derivatization; quantitative determination; rivaroxaban

酰氯作为1种重要的化学合成中间体,在医药、农药、资源环境等方面有着广泛的应用^[1-3]。利用酰氯化合物的活性基团及催化作用,可以合成一系列医药化工产品,在医药分子中引入酰基也可以改变药性。例如,用5-氯噻吩-2-甲酰氯合成抗凝血药物利伐沙班^[4-5],2-氨基噻唑-4-乙酰氯合成抗菌药头孢替安^[6]、*N*-甲氧亚氨基咪喃乙酰氯合成抗菌药头孢呋辛酯^[7]等。以酰氯为中间体,通过醇解或胺解,以及对取代基的修饰和活性结构的拼接等方法,能合成许多结构新颖且具备高生物活性的农药,例如以2-噻吩甲酰氯合成新型杀线虫剂 Tioxazafen^[8-9]。以酰氯为中间体合成的酰基硫脲衍生物,含有丰富的硫原子和氧原子,是较强的电子给予体和较好的金属螯合剂,在螯合树脂领域也有非常广泛的应用^[2-3]。

此类具有通式 -RCOCl 的酰氯类化合物应用虽然广泛,但其为潜在的基因毒性杂质,且本身化学性质活泼,久置后不稳定,故对其质量进行研究显得十分重要^[10-12]。本文建立1种柱前衍生化 HPLC 方法^[13-15],用来检测合成利伐沙班过程中用到的一个重要酰化剂:5-氯噻吩-2-甲酰氯。该方法以无水甲醇为衍生化试剂,与5-氯噻吩-2-甲酰氯反应生成相对应的酯5-氯噻吩-2-甲酸甲酯,然后采用 HPLC 法对其进行检测。又因5-氯噻吩-2-甲酰氯在存储过程中极易水解为5-氯噻吩-2-甲酸,因此本法将5-氯噻吩-2-甲酸作为特定杂质同时进行检测。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(紫外检测器,安捷伦公司),XS205DU 型电子天平(0.01 mg,梅特勒-托利多公司),KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),HH-S1 型数显恒温水浴锅(江苏金怡仪器科技有限公司)。

1.2 试药

5-氯噻吩-2-甲酰氯对照品(TCI公司,含量99.2%),5-氯噻吩-2-甲酸甲酯对照品(TCI公司,含量99.0%),5-氯噻吩-2-甲酸对照品(Sigma公司,含量98.6%),5-氯噻吩-2-甲酰氯供试品(上海迈瑞尔化学技术有限公司)。

乙腈和磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Ameritech Accurasil C₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸水溶液作为流动相 A,乙腈为流动相 B,梯度洗脱(程序见表1),流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 35 °C,检测波长 274 nm。

表1 梯度洗脱程序

Tab. 1 The program of gradient elution

时间 (time)/min	比例(ratio)/%	
	A	B
0	55	45
10	25	75
15	25	75
22	55	45

2.2 测定方法

取 5-氯噻吩-2-甲酰氯供试品约 15 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加无水甲醇 8 mL 使溶解, 再加入三乙胺 500 μ L, 室温下反应 20 min, 加无水甲醇定容, 摇匀, 作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 5 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 另取 5-氯噻吩-2-甲酰氯对照品约 15 mg, 同法测定, 按外标法以 5-氯噻吩-2-甲酰氯衍生物峰面积计算含量。

2.3 衍生化反应条件优化

2.3.1 溶剂及催化剂筛选 选用无水甲醇作为衍生化试剂, 且无水甲醇本身是 5-氯噻吩-2-甲酰氯的良溶剂, 因此将无水甲醇既作为衍生试剂又作为溶剂。

为筛选不同催化剂对衍生化反应的影响, 本研究考察了加入乙酸、碳酸钾、三乙胺为催化剂以及不加催化剂条件下衍生化反应(室温, 30 min)的转化率情况, 结果见图 1。

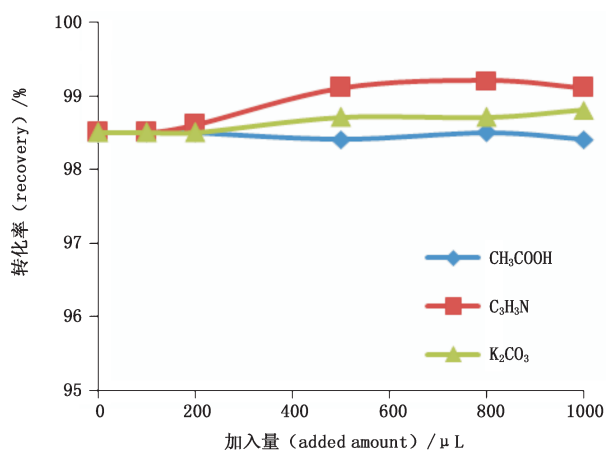


图 1 不同催化剂对衍生化反应的转化率影响

Fig. 1 Effects of different catalysts on the recovery of derivative reactions

由图 1 可见, 三乙胺为催化剂衍生化反应的转化率略高, 碳酸钾和乙酸催化反应和不加催化剂反应的转化率基本一致, 综合考虑, 选择三乙胺作为衍生化反应催化剂, 最佳用量为 500 μ L。

2.3.2 反应时间和温度筛选 考察了反应温度和反应时间对衍生化反应(三乙胺作为催化剂)转化率的影响, 结果见图 2。

由图 2 可见, 反应温度对回收率的影响较小; 反应 20 min 后回收率可达 98.5% 以上, 且延长反应时间后回收率没有明显提升, 因此选择室温条件下反应 20 min 作为最佳条件。

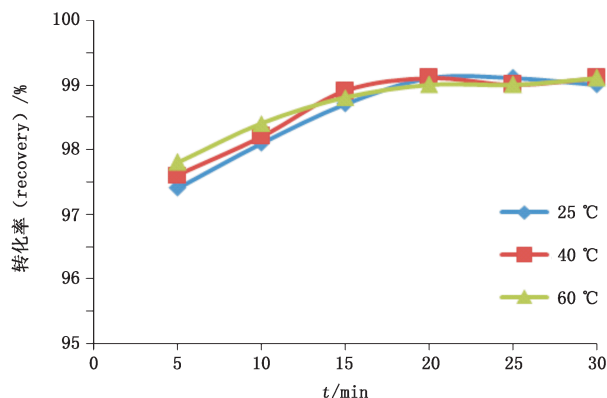


图 2 不同反应温度和反应时间对衍生化反应的转化率影响

Fig. 2 Effect of different reaction temperature and reaction time on the recovery of derivative reactions

2.3.3 反应体系含水量影响条件考察 考察了反应体系含水量对衍生化反应转化率的影响, 结果见图 3。

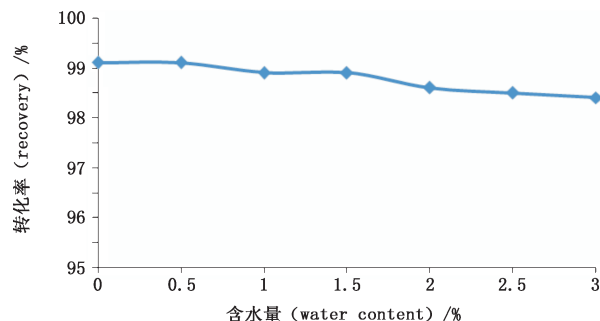


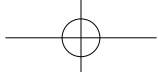
图 3 反应体系含水量对衍生化反应的转化率影响

Fig. 3 Effect of water content on the recovery of derivative reactions

由图 3 可见, 当反应体系含水量大于 2.0% 时, 反应转化率开始下降, 因此选择无水甲醇作为反应溶剂和衍生化试剂, 并要求样品称量结束后立即进行衍生化反应。

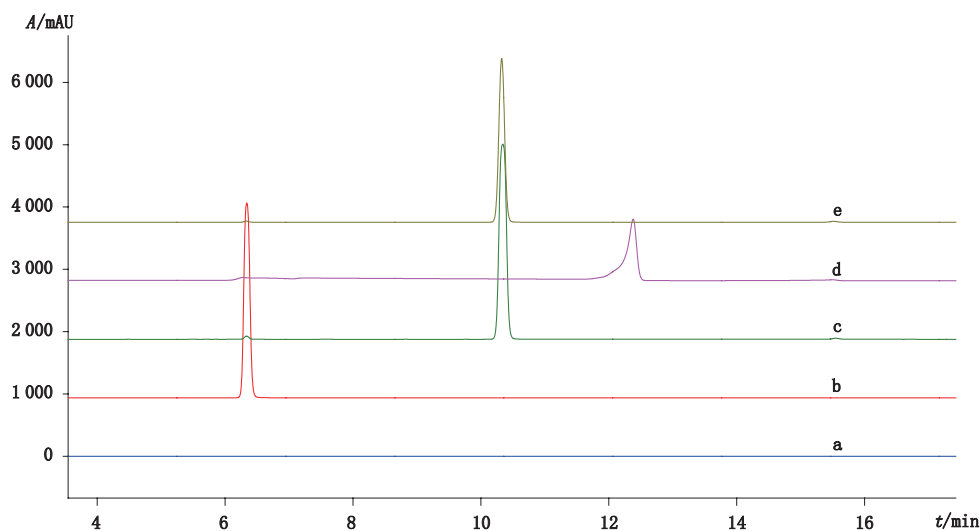
2.4 方法学验证

2.4.1 专属性考察 取 5-氯噻吩-2-甲酰氯供试品约 15 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加二氯甲烷溶解并定容至刻度, 作为 5-氯噻吩-2-甲酰氯未衍生溶液; 取 5-氯噻吩-2-甲酸对照品约 15 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加无水甲醇溶解并定容至刻度, 作为 5-氯噻吩-2-甲酸鉴别溶液; 再取 5-氯噻吩-2-甲酸甲酯对照品约 15 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加无水甲醇溶解并定容至刻度, 作为 5-氯噻吩-2-甲酸甲酯鉴别溶液。按照“2.1”项下液相色谱条件, 分别精密量取甲醇空白溶液、5-氯噻吩-2-甲酰氯未衍生溶液、5-氯噻吩-2-甲酸鉴别溶液、5-氯噻吩-2-甲酸甲酯鉴别溶液和供试品溶液 5 μ L 进样测定。结果见图 4, 甲醇空白



溶液无干扰峰,5-氯噻吩-2-甲酸色谱峰保留时间为6.340 min,5-氯噻吩-2-甲酸甲酯色谱峰保

留时间为10.344 min,供试品溶液中无其他干扰峰存在。



a. 空白溶剂 (blank solvent) b. 5-氯噻吩-2-甲酸鉴别溶液 (5-chloro-2-thiophenecarboxylic acid identification solution) c. 供试品溶液 (sample test solution) d. 5-氯噻吩-2-甲酰氯未衍生溶液 (5-chlorothiophene-2-carbonyl chloride-derivatized solution) e. 5-氯噻吩-2-甲酸甲酯鉴别溶液 (5-chlorothiophene-2-methyl formate identification)

图4 专属性试验图谱

Fig. 4 Chromatograms of specificity tests

2.4.2 检测下限与定量下限 本研究对5-氯-噻吩-2-甲酸和5-氯噻吩-2-甲酰氯的检测下限和定量下限进行考察,并在其定量下限浓度水平进行样品重复性考察,结果见表2。

表2 检测下限与定量下限试验结果

Tab. 2 The result of LOQ and LOD solution

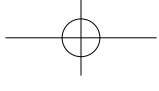
成分 (component)	限度 (limit)	浓度 (concentration) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	面积 (area) / mAu	RSD ($n=6$) / %	信噪比 (S/N) $6 \times SD$
5-氯噻吩-2-甲酸 (5-chloro-2 thiophene-2-carboxylic acid)	LOQ	1.871	30.156	1.7	21
	LOD	0.623 7	8.743	—	9
5-氯噻吩-2-甲酰氯 (5-chlorothiophene-2-carbonyl chloride)	LOQ	1.562	36.724	1.9	19
	LOD	0.468 6	12.091	—	8

2.4.3 线性关系考察 精密称取5-氯噻吩-2-甲酰氯对照品约10、12.5、15、17.5、20 mg,分别置10 mL量瓶中,按最佳条件进行衍生化处理后得到系列浓度的线性溶液。按照“2.1”项下液相色谱条件进样测定。以5-氯噻吩-2-甲酸甲酯峰面积对5-氯噻吩-2-甲酰氯浓度进行线性回归。回归方程为 $Y=7.681 \times 10^3 X + 1.047 \times 10^4$ $r^2=0.998 2$

结果表明,5-氯噻吩-2-甲酰氯浓度在1.012~2.040 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与5-氯噻吩-2-甲酸甲酯峰面积线性关系良好。

2.4.4 精密度试验 精密称取5-氯噻吩-2-甲酰氯供试品约15 mg,置10 mL量瓶中,按最佳条件进行衍生化处理,平行6份,按“2.1”项下液相色谱条件,测定5-氯噻吩-2-甲酸甲酯峰面积和保留时间,计算其RSD ($n=6$) 分别为0.040%和0.050%,表明该方法精密度良好。

2.4.5 回收率试验 精密称取5-氯噻吩-2-甲酰氯对照品10、15、20 mg,分别置10 mL量瓶中,按最佳条件进行衍生化处理后制备溶液,每个浓度平行制备3份。按照“2.1”项下液相色谱条件测定,计算平



均回收率为 99.0%, RSD ($n=9$) 为 0.80%。

2.4.6 溶液稳定性试验 取供试品溶液, 分别于衍生化后 0、1、2、4、6、8、12 h 进样测定, 以 5-氯噻吩-2-甲酸甲酯峰面积计算, 其 RSD ($n=7$) 为 1.2%, 且杂质峰面积和个数未增加, 表明供试品溶液在室温下 12 h 内基本稳定。

2.4.7 耐用性考察 改变色谱柱厂家和型号 (Sepax Bio-C₈, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm) / (Ultimate XB-C₈, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 改变流动相起始比例 (50 : 50) / (60 : 40), 改变流速 (0.8 mL · min⁻¹) / (1.2 mL · min⁻¹), 考察色谱条件耐用性。结果表明, 色谱条件发生微小变化时, 检测结果未发生明显变化, 表明该方法耐用性良好。

2.5 样品测定

取 3 批 5-氯噻吩-2-甲酰氯供试品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液并进样测定。主成分的含量以 5-氯噻吩-2-甲酸甲酯峰面积按外标法计算, 特定杂质的含量以 5-氯噻吩-2-甲酸峰面积按外标法计算, 未知杂质的含量以自身对照法计算, 结果见表 3。

表 3 3 批供试品检测结果 (%)

Tab. 3 The result of three batches of sample

序号 (No.)	特定杂质 (specified impurity)	最大未知杂质 (unknown maximum single impurity) of main component	主成分含量 (assay of main component)
1	0.77	0.41	98.5
2	0.72	0.54	98.4
3	0.67	0.65	98.4

3 讨论

酰氯类化合物的化学性质非常活泼, 采用气相色谱直接测定法, 酰氯会损坏色谱柱的固定相; 采用液相色谱直接测定法, 酰氯会与流动相中的水或甲醇发生反应而无法检测。根据化学性质, 酰氯类化合物可以与醇类生成与其对应的酯, 该反应为定量反应且产物稳定, 故可通过柱前衍生化 HPLC 法间接地对酰氯类化合物进行定量检测, 方法简单易操作。

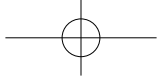
本文考察了不同的流动相组成 (乙腈-水溶液、乙腈-0.01 mol · L⁻¹ 磷酸水溶液、甲醇-水溶液、甲醇-0.01 mol · L⁻¹ 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液

等), 不同流动相 pH (3.0、4.5、6.0), 不同色谱柱 (C₈、C₁₈) 及不同流动相梯度洗脱程序对检测结果的影响, 最终确定本文的液相色谱条件, 该方法专属性强, 准确度高, 耐用性好, 适用于 5-氯噻吩-2-甲酰氯的检测。

根据 5-氯噻吩-2-甲酰氯的制备工艺及其化学性质, 推断其主要杂质为 5-氯噻吩-2-甲酸, 实际应用过程中可通过测定 5-氯噻吩-2-甲酰氯中主成分及已知杂质 5-氯噻吩-2-甲酸的含量来对其质量进行内控。酰氯类化合物作为潜在的基因毒性杂质, 是药品杂质研究及过程控制中非常重要的部分^[16-18]。本研究提供的分析方法检测灵敏度高, 故亦可用于检测利伐沙班中 5-氯噻吩-2-甲酰氯及 5-氯噻吩-2-甲酸的残留量。此外, 该研究所述的分析方法对于其他类似酰氯类化合物的检测具有极其重要的参考价值。

参考文献

- [1] 喻名强, 刘广义, 尹兴荣, 等. 酰氯的合成方法及其应用新进展 [J]. 精细化工中间体, 2011, 41 (4): 1
YU MQ, LIU GY, YIN XR, *et al.* Recent advancement of synthesis and application of acyl chloride [J]. Fine Chem Intermed, 2011, 41 (4): 1
- [2] 徐兆瑜. 一些重要酰氯化合物的合成和应用 [J]. 精细化工原料及中间体, 2009 (3): 26
XU ZY. Synthesis and its application of acid-chloride compounds [J]. Fine Chem Ind Raw Mater Intermed, 2009 (3): 26
- [3] 徐兆瑜. 一些重要酰氯化合物的合成和应用 [J]. 精细化工原料及中间体, 2009 (4): 25
XU ZY. Synthesis and its application of acid-chloride compounds [J]. Fine Chem Ind Raw Mater Intermed, 2009 (4): 25
- [4] 陈诚, 潘振涛, 罗文俊, 等. 利伐沙班的合成工艺研究 [J]. 精细化工中间体, 2015, 45 (1): 53
CHEN C, PAN ZT, LUO WJ, *et al.* Study on the synthesis of rivaroxaban [J]. Fine Chem Intermed, 2015, 45 (1): 53
- [5] 杨银萍, 王红波, 马庆文. 利伐沙班的合成工艺改进 [J]. 中国药物化学杂志, 2013, 23 (1): 26
YANG YP, WANG HB, MA QW. Improvement of synthesis process of rivaroxaban [J]. Chin J Med Chem, 2013, 23 (1): 26
- [6] 陈鑫, 陈识峰, 王晨竹, 等. 盐酸头孢替安酰氯法合成工艺专有杂质的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42 (1): 33
CHEN X, CHEN SF, WANG CZ, *et al.* Study of proprietary impurities introduced by acyl chloride method for cefotiam dihydrochloride [J]. Chin J Antibiot, 2017, 42 (1): 33
- [7] 曹卫凯. 头孢呋辛酯的合成研究 [J]. 合成技术及应用, 2016, 31



- (2): 4
CAO WK. Optimization of synthesis technology of cefuroxime axetil [J]. *Synth Technol Appl*, 2016, 31(2): 4
- [8] 贺书泽. 七氟菊酯合成方法改进[J]. *现代农药*, 2015, 14(2): 28
HE SZ. Improved synthesis of tefluthrin [J]. *Mod Agrochem*, 2015, 14(2): 28
- [9] 刘安昌, 冯佳丽, 贺晓露, 等. 新型杀线虫剂 Tioxazafen 的合成 [J]. *农药*, 2014, 53(8): 561
LIU AC, FENG JL, HE XL, *et al.* Study of synthetic process of novel pesticides tioxazafen [J]. *Chin J Pestic*, 2014, 53(8): 561
- [10] 张辉, 张晨杰, 徐敏敏, 等. HPLC 与 SERS 联用技术及其在有机反应现场监测的应用 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2018, 38(10): 213
ZHANG H, ZHANG CJ, XU MM, *et al.* On-line monitoring of organic reactions based on high performance liquid chromatography and surface enhanced raman spectroscopy [J]. *Spectrosc Spectral Anal*, 2018, 38(10): 213
- [11] 郑秀萍, 乔文强, 王植源, 等. 基于 3 种荧光化合物检测草酰氯气体的化学发光试纸法 [J]. *应用化学*, 2016, 33(10): 1203
ZHENG XP, QIAO WQ, WANG ZY, *et al.* Test paper method of chemiluminescence based on three fluorescent compounds for the detection of oxalyl chloride vapor [J]. *Chin J Appl Chem*, 2016, 33(10): 1203
- [12] 吴暎, 林萍. 分步滴定法测定草酰氯的含量 [J]. *理化检验 - 化学分册*, 2014, 50(10): 1307
WU Y, LIN P. Determination of oxalyl chloride by stepwise titration [J]. *Phys Test Chem Anal Part B: Chem Anal*, 2014, 50(10): 1307
- [13] 楼姝含, 王栋, 顾晓彤, 等. 柱前衍生化 HPLC 法测定盐酸美金刚的含量 [J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(19): 2268
LOU SH, WANG D, GU XT, *et al.* Determination of memantine hydrochloride with pre-column derivatization HPLC [J]. *Chin J New Drugs*, 2016, 25(19): 2268
- [14] 王丽, 邢旭, 秦青, 等. 柱前衍生化 HPLC 法测定加巴喷丁胶囊中主药的含量 [J]. *药学进展*, 2013, 37(1): 38
WANG L, XING X, QIN Q, *et al.* Determination of gabapentin in gabapentin capsules by pre-column derivation HPLC method [J]. *Prog Pharm Sci*, 2013, 37(1): 38
- [15] 黄滔敏, 陈念祖, 王东蕾, 等. 柱前衍生化 HPLC 法测定注射用氨磷汀的含量 [J]. *复旦学报 (医学版)*, 2013, 40(1): 60
HUANG TM, CHEN NZ, WANG DL, *et al.* HPLC method using pre-column derivatization for determinating the content of amifostine [J]. *J Fudan Univ Med Sci*, 2013, 40(1): 60
- [16] 阮晓玲, 郑项元, 徐洁, 等. 药物中基因毒性杂质分析方法的研究进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2016, 47(3): 267
RUAN XL, ZHENG XY, XU J, *et al.* Advances in analytical techniques for the determination of genotoxic impurities in pharmaceuticals [J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(3): 267
- [17] FU M, LU Q, HEWITT E, *et al.* Ultra high performance liquid chromatography coupled with high resolution quantitation mass spectrometry method development and validation for determining genotoxic 2, 5-dichlorobenzoyl chloride in MLN9708 drug substance [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 89(4): 233
- [18] RAMAN NV, PRASAD AV, REDDY KR, *et al.* Sensitive derivatization methods for the determination of genotoxic impurities in drug substances using hyphenated techniques [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 89: 276

(本文于 2018 年 11 月 17 日收到)