

HPLC法测定戊二酸酐中的有关物质

刘 敏^{1,2}, 廉贞霞^{1,2}, 刘延新^{1,2}, 王 帆^{1,2}, 李 霞^{1,2}, 杨海霞^{1,2}



1. 山东省药学院 (济南 250101)

2. 山东省化学药物重点实验室 (济南 250101)

【摘要】目的 建立 HPLC 法测定戊二酸酐中有关物质的方法。**方法** 采用 HPLC 法, 色谱柱: Waters Symmetry C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液 (3:97); 流速: 0.9 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样体积: 20 μL; 检测波长: 210 nm。**结果** 戊二酸酐中丁二酸、己二酸及未知杂质均能有效检出, 丁二酸、己二酸、戊二酸的线性范围分别为 5.925~59.251 μg/mL ($r=0.999\ 6$)、6.210~62.100 μg/mL ($r=0.999\ 7$)、5.110~8 516.000 μg/mL ($r=0.999\ 9$); 丁二酸和己二酸的平均回收率分别为 100.92% ($RSD=0.86\%$) 和 105.89% ($RSD=2.99\%$) ($n=9$)。**结论** 该方法专属性强、灵敏度高、准确度高, 可用于测定戊二酸酐的有关物质。

【关键词】 戊二酸酐; 丁二酸; 己二酸; 有关物质; 高效液相色谱法

Determination of related substances in glutaric anhydride by HPLC

LIU Min^{1,2}, LIAN Zhenxia^{1,2}, LIU Yanxin^{1,2}, WANG Fan^{1,2}, LI Xia^{1,2}, YANG Haixia^{1,2}

1. Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250101, China

2. Key Laboratory for Chemical Drug Research of Shandong Provincial, Jinan 250101, China

Corresponding author: YANG Haixia, Email: hxyangxu@163.com

【Abstract】Objective To establish a method for the determination of related substances in glutaric anhydride by HPLC. **Methods** The HPLC method was performed on a Waters Symmetry C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid solution (3:97) at a flow rate of 0.9 mL/min, the column temperature was 30 °C, the injection volume was 20 μL, and the detection wavelength was set at 210 nm. **Results** Succinic acid, adipic acid and unknown impurities in glutaric anhydride can be effectively detected. The linear range was 5.925-59.251 μg/mL for succinic acid ($r=0.999\ 6$), 6.210-62.100 μg/mL for adipic acid ($r=0.999\ 7$), and 5.110-8 516.000 μg/mL for glutaric acid ($r=0.999\ 9$). The average recoveries of succinic acid and adipic acid were 100.92% ($RSD=0.86\%$) and 105.89% ($RSD=2.99\%$) ($n=9$), respectively. **Conclusion** The method has strong specificity, high sensitivity and good accuracy, and can be used for the related substances determination of glutaric anhydride.

【Keywords】 Glutaric anhydride; Succinic acid; Adipic acid; Related substances; High performance liquid chromatography

DOI: 10.12173/j.issn.1008-049X.202401122

基金项目: 医药绿色智能制造与新药评价关键技术研究项目 (2021ZDSYS07)

通信作者: 杨海霞, 硕士, 工程技术应用研究员, Email: hxyangxu@163.com

戊二酸酐又称为胶酸酐, 针状晶体, 分子式为 $C_5H_6O_3$, 易溶于氯仿、乙醚、丙酮、甲苯和四氢呋喃等, 吸水后转化为戊二酸, 需于密闭、干燥的环境下储存^[1]。在医药原料合成过程中, 戊二酸酐常作为酰化试剂^[2], 通过参与酰化、酰胺化、脱水缩合等多种反应, 在原料药中引入羰基结构。文献检索显示, 在依折麦布、来那度胺、盐酸苯达莫司汀、普巴瑞林等多种医药原料的合成过程中, 戊二酸酐均可用作起始物料^[3-6]。目前文献资料中多采用滴定法对其含量进行测定^[7-8], 药典中未收载戊二酸酐有关物质的测定方法, 也未检索到戊二酸酐中有关物质测定的相关文献。对戊二酸酐中有关物质进行测定, 对于该物料、原料药终产品及相关制剂的质量控制有重要意义^[9-11]。本文介绍了一种 HPLC 法测定戊二酸酐中有关物质的方法, 并对杂质含量的限度进行了规定。

戊二酸酐通常由戊二酸脱水制备, 而戊二酸多由混合二元酸提纯而来^[12-13], 在戊二酸酐制备过程中, 其他二元酸如丁二酸、己二酸脱水生成丁二酸酐、己二酸酐, 因此, 在进行戊二酸酐有关物质测定时, 需对戊二酸酐中可能存在的丁二酸酐、己二酸酐等杂质进行控制。戊二酸酐及相关杂质进行液相测定时, 容易与水发生反应生成戊二酸及相应杂质的酸, 不能以酸酐的形式存在。根据这一特点, 将戊二酸酐及其有机杂质水解为戊二酸及相应杂质的酸(如丁二酸、己二酸)后, 再进行测定和控制。对于戊二酸酐中本身存在的戊二酸, 在此方法中计为戊二酸酐水解后的主成分, 在后续合成步骤生成的中间体或终产品原料中, 可对戊二酸以及未完全反应的戊二酸酐进行进一步控制, 以保证终产品的质量。因此本文自拟色谱条件, 建立了 HPLC 法测定戊二酸酐的有关物质, 将戊二酸酐水解后以酸的形式进行测定, 并采用对照品外标法测定其水解产物中可能存在的杂质丁二酸、己二酸, 作为已知杂质定入质量标准, 并规定了其他单个杂质及总杂质限度。方法学验证结果表明, 该方法专属性强、灵敏度高、准确度高, 能有效地对戊二酸酐中的有关物质进行控制。

1 材料

1.1 主要仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪和 2998 PDA

检测器(美国 Waters 公司); XS205 DU 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 主要药品与试剂

戊二酸酐(宜兴市联阳化工厂, 批号: 20180203、20180228、20180306、20180512); 丁二酸(批号: L6B0R19, 纯度 98.95%) 和己二酸(批号: LH40R97, 纯度: 99.84%) 购自北京百灵威科技有限公司; 磷酸(优级纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, 天津市康科德科技有限公司); 水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry C_{18} 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液 (3:97); 流速: 0.9 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 进样体积: 20 μ L; 检测波长: 210 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

分别取丁二酸和己二酸各约 30 mg, 精密称定, 置同一 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液。精密量取对照品贮备液 1 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液

取样品约 80 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 室温反应 80 min 后, 作为供试品溶液。

2.2.3 测定方法及限度

精密量取供试品溶液与对照品溶液, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至 20 min。供试品溶液的色谱图中如有与丁二酸、己二酸保留时间一致的色谱峰, 按外标法计算, 丁二酸、己二酸均不得过 0.15%, 其他单个杂质按面积归一化法计算不得过 0.5%, 所有杂质总量不得过 1.0%。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性试验

精密量取空白溶剂(水) 20 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果表明, 空白溶剂对本品有关物质测定无干扰。精密量取加标供试品溶液(丁二酸、己二酸及戊二酸浓度分别约为 0.016, 0.017, 8.300 mg/mL) 20 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 出峰顺序依次为丁二酸、戊二酸、

己二酸,保留时间分别为4.496, 5.815, 9.270 min, 加标供试品溶液中各杂质之间及杂质与主峰之间分离度良好。具体见图1。

2.3.2 线性关系考察

精密量取线性贮备液A(戊二酸浓度为8.516 mg/mL) 1 mL及杂质对照品贮备液(丁二酸浓度为0.593 mg/mL, 己二酸浓度为0.621 mg/mL) 5 mL, 置同一50 mL量瓶中, 用水稀释至刻度,

摇匀, 作为线性7号溶液。精密量取线性贮备液A 4 mL, 置5 mL量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为线性贮备液B。分别精密量取线性7号溶液0.3, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 5.0 mL, 各置10 mL量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为线性1~6号溶液。以线性1~7号溶液及线性贮备液A、线性贮备液B作为戊二酸线性溶液, 以线性2~7号溶液作为丁二酸、己二酸线性溶液。

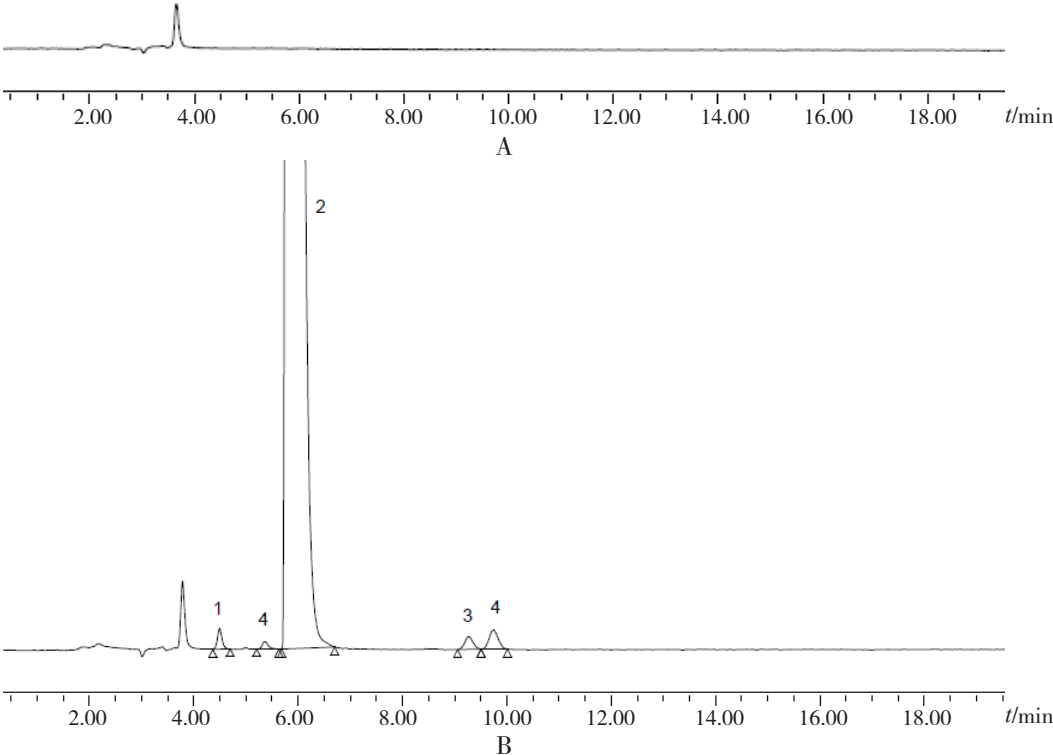


图1 HPLC色谱图

Figure 1. HPLC chromatogram

注: A. 空白溶剂; B. 加标供试品溶液; 1.丁二酸; 2.戊二酸; 3.己二酸; 4.未知杂质。

分别精密量取线性1~7号溶液及线性贮备液A、线性贮备液B, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。以浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标, 相应峰面积(Y)为纵坐标, 进行线性回归, 结果见表1。结果表明, 线性范围内, 各组分浓度与峰面积之间线性关系良好。

表1 各组分的线性方程、线性范围及相关系数

组分	线性方程	r	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)
丁二酸	$Y=1\,006.0X+626.13$	0.999 6	5.925~59.251
戊二酸	$Y=1\,097.5X+4078.3$	0.999 9	5.110~8\,516.000
己二酸	$Y=1\,141.9X-436.18$	0.999 7	6.210~62.100

2.3.3 精密度试验

精密量取“2.3.2”项下线性4号溶液(丁二酸浓度为11.850 $\mu\text{g/mL}$ 、己二酸浓度为12.420 $\mu\text{g/mL}$ 、戊二酸浓度为34.064 $\mu\text{g/mL}$) 20 μL , 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 连续进样6次, 记录色谱图, 分别计算得丁二酸、己二酸和戊二酸峰面积的 RSD 分别为1.42%, 1.82%, 1.48% ($n=6$), 结果表明仪器精密度良好。

2.3.4 定量限和检测限试验

取对照品溶液及供试品溶液, 分别加水稀释制成不同浓度的溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。以信噪比约为10:1时的样品浓度作为定量限, 结果得丁二酸、己二酸、戊二酸的定量限浓度分别为5.925, 6.210,

5.110 $\mu\text{g/mL}$ ，分别相当于供试品进样浓度的 0.074%，0.078%，0.064%。定量限溶液连续进样 6 次，丁二酸、己二酸、戊二酸峰面积的 *RSD* 分别为 2.61%，3.28%，1.46% ($n=6$)。以信噪比约为 3 : 1 时的样品浓度作为检测限，结果得丁二酸、己二酸、戊二酸的检测限浓度分别为 1.777，1.863，1.533 $\mu\text{g/mL}$ ，分别相当于供试品进样浓度的 0.022%，0.023%，0.019%。

2.3.5 回收率试验

取戊二酸酐（批号：20180512，丁二酸含量为 0.047%，己二酸含量为 0.027%）约 80 mg，共 9 份，精密称定，各置 9 个 10 mL 量瓶中，精密量取对照品贮备液（丁二酸、己二酸浓度分别为 0.080、0.081 mg/mL ）1.0，1.5，2.0 mL 各 3 份，置上述 9 个 10 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，室温反应 80 min 后，作为供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进行测定，同时测定对照品溶液，扣除背景含量，以测得量与加入量计算回收率，结果丁二酸和己二酸的平均回收率分别为 100.92% (*RSD*=0.86%) 和 105.89% (*RSD*=2.99%) ($n=9$)。结果表明，丁二酸及己二酸回收率良好。

2.3.6 重复性与中间精密度试验

按“2.2”项下方法制备对照品溶液及供试品溶液，供试品溶液平行配制 6 份，按“2.1”项下色谱条件进行测定。6 份样品中丁二酸的含量均值为 0.052%，极差为 0.012%，己二酸均未检出，最大未知单杂含量均值为 0.31%，*RSD* 为 5.16% ($n=6$)，总杂质含量均值为 0.45%，*RSD* 为 3.56% ($n=6$)。结果表明该方法重复性良好。

另取本品，由不同人员在不同时间、采用不同仪器依法测定有关物质，分别平行测定 6 份，计算同重复性试验共 12 份的平均值，12 份样品中丁二酸的含量均值为 0.052%，极差为 0.014%，己二酸均未检出，最大未知单杂含量均值为 0.31%，*RSD* 为 4.52% ($n=12$)，总杂质含量均值为 0.44%，*RSD* 为 4.32% ($n=12$)。结果表明该方法中间精密度良好。

2.3.7 稳定性试验

按“2.2”项下方法制备对照品溶液及供试品溶液，分别于配制后 0，2，4，6，8，10，12，18，24 h 各进样 20 μL ，记录色谱图，考察对照品溶液峰面积的变化情况和供试品溶液杂质含量

的变化情况。对照品溶液在室温下放置 24 h，丁二酸峰面积的 *RSD* 为 2.95% ($n=9$)，己二酸峰面积 *RSD* 为 4.18% ($n=9$)。供试品溶液在室温下放置 24 h，己二酸未检出，丁二酸含量均值为 0.055%，极差为 0.013%，最大未知单杂均值为 0.31%，*RSD* 为 3.23% ($n=9$)，总杂质均值为 0.47%，*RSD* 为 2.13% ($n=9$)。结果表明对照品溶液及供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定。

2.3.8 耐用性试验

精密量取加标供试品溶液（丁二酸、乙二酸及戊二酸浓度分别约为 0.016，0.017，8.300 mg/mL ）20 μL ，按“2.1”项下色谱条件进行测定，分别调整色谱参数甲醇 -0.1% 磷酸的比例（2 : 98~4 : 96）、流速（0.85~0.95 mL/min ）及柱温（28~32 $^{\circ}\text{C}$ ），考察各杂质峰之间的最小分离度（己二酸与其后面相邻杂质峰的分离度），均能完全分离，表明本方法耐用性良好。

2.3.9 样品处理方法筛选

配制供试品溶液时，于配制后不同反应时间进样分析，考察戊二酸酐完全转化为戊二酸的反应时间。结果表明，戊二酸酐供试品溶液室温反应 80 min 后，戊二酸酐才能够完全转化为戊二酸。试验数据见表 2。因此，本品供试品溶液配制后在室温反应 80 min 后再进样分析。

表2 戊二酸酐转化为戊二酸的反应时间考察

Table 2. Investigation of reaction time for the conversion of glutaric anhydride to glutaric acid

反应时间 (min)	戊二酸酐 (%)	戊二酸 (%)
0	27.65	71.91
20	2.55	96.99
40	0.33	99.22
60	0.05	99.50
80	0	99.54

2.4 样品测定

分别取 4 批戊二酸酐样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，同时测定对照品溶液，按外标法以峰面积计算丁二酸、己二酸的含量，按面积归一化法计算其他杂质的含量，结果见表 3。

根据样品测定结果，参考 ICH Q3A 指导原则杂质控制策略，已知杂质丁二酸及己二酸的质控限度均为 0.15%，戊二酸酐有关物质限度规定为：

按外标法计算，丁二酸及己二酸均不得过 0.15%，其他单个杂质按面积归一化法计算不得过 0.5%，所有杂质总量不得过 1.0%。

表3 样品测定结果 (%, n=4)
Table 3. Determination results of
the samples (%, n=4)

成分	批号			
	20180203	20180228	20180306	20180512
丁二酸	0.03	0.05	0.04	0.05
己二酸	未检出	未检出	未检出	0.03
最大未知单杂	0.39	0.40	0.40	0.31
总杂质	0.47	0.50	0.50	0.39

3 讨论

采用梯度洗脱方式，升高流动相中甲醇比例，对供试品溶液进行分析，发现有机相比比例升高后，供试品溶液中并没有新的杂质洗脱出来，因此，本品可以不用提高有机相比比例，使用更省时的等度洗脱方式进行分析。己二酸后有一未知杂质，方法优化要保证己二酸与该杂质分离度大于 1.5。通过优化流动相甲醇 -0.1% 磷酸溶液比例、流速以及柱温，最终保证方法既能满足杂质分离度要求，又能高效检测供试品中的杂质含量。

经方法学验证和样品测定结果表明，本文建立的 HPLC 法测定戊二酸酐有关物质的方法，专属性强、灵敏度高、操作简便，能准确测定戊二酸酐的有关物质。同时，该方法也可用于其他产品中丁二酸、己二酸或戊二酸的测定。相较于文献中笼统地测定戊二酸酐的含量，本文建立的有关物质标准中规定了已知杂质，其他单个杂质及总杂质限度，规避了杂质在后续反应中向下传递的风险，该方法能更好地控制戊二酸酐的产品质量，为戊二酸酐杂质去向研究提供了方法依据，为相应原料药终产品提供了源头控制策略。

参考文献

1 Wang Z, Dupré N, Lajaunie L, et al. Effect of glutaric anhydride additive on the LiNi_{0.4}Mn_{1.6}O₄ electrode/electrolyte interface evolution: a MAS NMR and TEM/EELS study[J]. Journal of Power Sources, 2012, 215: 170–178. DOI: 10.1016/j.jpowsour.2012.05.027.

2 陈福泉, 陈思, 洪清林, 等. 戊二酸酐酯化 κ- 卡

拉胶的制备及理化性质[J]. 食品工业科技, 2021, 42(9): 30–35. [Chen FQ, Chen S, Hong QL, et al. Preparation and physicochemical properties of glutaric acid esterified κ-Carrageenan[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(9): 30–35.] DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020070142.

3 张翠兰, 李如梦, 胡玉娇, 等. 依折麦布的合成研究进展[J]. 山东化工, 2022, 51(24): 51–55, 58. [Zhang CL, Li RM, Hu YJ, et al. Research progress in synthesis of ezetimib[J]. Shandong Chemical Industry, 2022, 51(24): 51–55, 58.] DOI: 10.19319/j.cnki.issn.1008-021x.2022.24.057.

4 赵靛琳, 赵智伟, 陈晓杰, 等. 来那度胺的合成方法研究进展[J]. 山东化工, 2020, 49(23): 68–70, 73. [Zhao LL, Zhao ZW, Chen XJ, et al. Research progress in synthesis method of lenalidomide[J]. Shandong Chemical Industry, 2020, 49(23): 68–70, 73.] DOI: 10.19319/j.cnki.issn.1008-021x.2020.23.026.

5 殷昕, 崔美姬, 江森, 等. 盐酸苯达莫司汀的合成[J]. 合成化学, 2016, 24(5): 457–460. [Yin X, Cui MJ, Jiang M, et al. Synthesis of bendamustine hydrochloride[J]. Chinese Journal of Synthetic Chemistry, 2016, 24(5): 457–460.] DOI: 10.15952/j.cnki.cjsc.1005-1511.2016.05.15185.

6 熊非, 陈璐, 朱元杰, 等. 普瑞巴林的合成研究进展[J]. 合成化学, 2021, 29(2): 148–165. [Xiong F, Chen L, Zhu YJ, et al. Research advance on the synthetic process of pregabalin[J]. Chinese Journal of Synthetic Chemistry, 2021, 29(2): 148–165.] DOI: 10.15952/j.cnki.cjsc.1005-1511.21042.

7 赵志建, 王训道. 滴定法测定戊二酸酐的含量[J]. 化工生产与技术, 2016, 23(5): 43–45, 10. [Zhao ZJ, Wang XQ. Measuring the content of glutaric anhydride by titration method[J]. Chemical Production and Technology, 2016, 23(5): 43–45, 10.] DOI: 10.3969/j.issn.1006-6829.2016.05.014.

8 马金芬, 陈永霞, 胡迈声, 等. 戊二酸酐含量的测定[J]. 石油化工应用, 2011, 30(8): 56–58. [Ma JF, Chen YX, Hu MS, et al. Measurement for content of glutaric anhydride[J]. Petrochemical Industry Application, 2011, 30(8): 56–58.] DOI: 10.3969/j.issn.1673-5285.2011.08.018.

9 韦日伟, 王昆, 吴先富, 等. 药物中有关物质检测方法的研究进展及应用[J]. 中国药师, 2015, 18(5): 851–855. [Wei RW, Wang K, Wu XF, et al. Research advance

- and application of detection methods for related substances in drugs[J]. China Pharmacist, 2015, 18(5): 851–855.] DOI: [10.3969/j.issn.1008-049X.2015.05.053](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-049X.2015.05.053).
- 10 王云, 朱建伟. 化学合成原料药起始物料的选择原则[J]. 中国医药工业杂志, 2022, 53(5): 728–734. [Wang Y, Zhu JW. Principles for selection of starting materials for chemical synthetic API[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2022, 53(5): 728–734.] DOI: [10.16522/j.cnki.cjph.2022.05.020](https://doi.org/10.16522/j.cnki.cjph.2022.05.020).
- 11 杜爽, 梁毅. 化学合成原料药申报过程中起始物料的选择与控制[J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(8): 1172–1176. [Du S, Liang Y. Selection and control of starting materials in the process of chemical synthetic APIs submission[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2018, 49(8): 1172–1176.] DOI: [10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.020](https://doi.org/10.16522/j.cnki.cjph.2018.08.020).
- 12 马帅. 混合二元酸中戊二酸的分离研究进展[J]. 当代化工研究, 2018, (4): 42–43. [Ma S. Research progress on separation of glutaric acid from mixed dibasic acid[J]. Modern Chemical Research, 2018, (4): 42–43.] DOI: [10.3969/j.issn.1672-8114.2018.04.028](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-8114.2018.04.028).
- 13 庞贝. 二元酸的回收利用工艺[J]. 河南化工, 2019, 36(11): 39–40. [Pang B. Recycling process of dibasic acid[J]. Henan Chemical Industry, 2019, 36(11): 39–40.] DOI: [10.14173/j.cnki.hnhg.2019.11.012](https://doi.org/10.14173/j.cnki.hnhg.2019.11.012).
- 收稿日期: 2024 年 01 月 17 日 修回日期: 2024 年 02 月 24 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳