

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.01.0078

论著

高效液相色谱法测定药物中的哌啶羧酸类化合物

张慕军^{1,2,3}, 王银松¹, 王洪湘², 臧慧敏², 宫雪²

(1.天津医科大学药学院,天津市临床药物关键技术重点实验室,天津 300070;2.天津药物研究院原料药研发中心,天津 300000;3.中国医学科学院药物代谢新技术创新单元,北京 100730)

摘要 目的:建立高效液相色谱法(HPLC)测定药物中的哌啶羧酸类化合物(PADs)的通用方法。方法:采用2,4-二硝基氟苯(DNFB)作为衍生试剂,使用以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,0.1%磷酸水和乙腈为流动相进行梯度洗脱,紫外检测器,外标法定量。结果:PADs在不同溶剂中,定量限~3倍限度浓度范围内线性关系均良好, r 均大于0.999;定量限回收率均在85%~110%,且相对标准偏差(RSD)均小于4%,50%~200%限度浓度的回收率均在90%~108%,且RSD均小于3%;检测限均小于0.03 $\mu\text{g/mL}$ (相当于供试品溶液浓度的0.0075%),定量限均小于0.08 $\mu\text{g/mL}$ (相当于供试品溶液浓度的0.020%)。结论:该HPLC方法灵敏度高、通用性强、准确度高,可以作为测定药物中PADs的通用方法。

关键词 高效液相色谱法;2,4-二硝基氟苯;哌啶羧酸;柱前衍生

中图分类号 R917

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)01-0078-07

Determination of pipecolic acids and their derivatives in drug substance by High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Mujun^{1,2,3}, WANG Yinsong¹, WANG Hongxiang², ZANG Huimin², GONG Xue²

(1.School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, Tianjin 300070, China; 2. Active Pharmaceutical Ingredient Research Center, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300000, China; 3. Research Unit for Drug Metabolism, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

Abstract Objective: To establish a novel High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for the determining pipecolic acids and their derivatives (PADs) in drug substance. **Methods:** 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) was used as a derivative reagent, chromatographic column with octadecylsilane bonded silica gel as the filler was used. And water containing 0.1% phosphoric acid-acetonitrile system was utilized as a mobile phase with UV detector, and external standard method was used to quantify. **Results:** All PADs in different solvents had good linear relationship in between the range of the limit of quantitation (LOQ) to 300% with respect to specification limit, and all the linear correlation coefficients (r) were greater than 0.999. The spiked recoveries of LOQ were all between 85% and 110%, and relative standard deviation (RSDs) were all less than 4%. The spiked recoveries of 50% to 200% with respect to specification limit were all between 90% and 108%, and RSDs were all less than 3%. The limit of detection (LODs) were all less than 0.03 $\mu\text{g/mL}$ (0.0075% with respect to the concentration of the sample solution), LOQs were all less than 0.08 $\mu\text{g/mL}$ (0.020% with respect to the concentration of the sample solution). **Conclusion:** This HPLC method has high sensitivity, strong universality, and high accuracy, which can be used as a universal method for quantitative determining PADs in drug substance.

Key words HPLC; 2,4-dinitrofluorobenzene; pipecolic acid; pre-column derivatization

哌啶羧酸类化合物(pipecolic acids and their derivatives, PADs)是一类含有哌啶环和羧酸基团的有机化合物。该类化合物是六元环基序,由5个碳原子和1个氮原子组成,并在5个碳原子中的1个或多个上直接连上化学基团,并且至少含有1个羧基官能团。虽然PADs的种类非常多,但这类化合物的基础骨架均是哌啶甲酸,对哌啶甲酸结构中的不同位置进行化学修饰,从而改变其生物活性,得到

一系列的哌啶甲酸的衍生物。例如2-哌啶甲酸广泛用于许多手性药物和生物活性物质的制备,如局麻药罗哌卡因、抗精神病药物硫利达嗪等都是以2-哌啶甲酸为主要原料制得。4-哌啶甲酸可用于制备盐酸多奈哌齐的中间体N-苄基-4-哌啶甲酰胺^[1]。3-哌啶甲酸在合成 γ -氨基丁酸(GABA)摄入抑制剂、抗肿瘤药物、生长激素促分泌素、抗炎药物、心血管药物、促智药物、抗流感病毒等药物中均得到了很好的应用^[2]。PADs作为有机化学合成中的有机催化剂和新型底物^[3],需要在药物中对其含量进行控制。由于该类化合物同时含有氨基和羧基,是一类两性化

作者简介 张慕军(1983-),男,副研究员,硕士,研究方向:药学;通信作者:王银松,E-mail: wangyinsong@tmu.edu.cn。

合物,分子中的氨基与羧基会形成内盐,因此无法采用气相色谱法对其测定。同时,因为其结构中无共轭基团,也无法采用 HPLC 对其直接测定。研究报告哌啶甲酸测定方法主要有液相串联质谱法^[4-5]、气相串联质谱法^[6]、柱层析法^[7]、薄层色谱法^[8]以及离子交换法^[9],笔者在实验中发现这些方法需要依赖较为先进的仪器设备,实验操作也相对复杂,并且通用性较低。本研究的目的是建立一种采用 2,4-二硝基氟苯(2,4-dinitrofluorobenzene, DNFB)作为衍生化试剂,对 PADs 进行柱前衍生化,使用高效液相色谱仪简单、高效和快速地对这类化合物进行定量的通用方法。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent Infinity 1260 DAD 高效液相色谱仪(安捷伦,美国);G7117C 二极管阵列检测器(安捷伦,美国);G129C 自动进样器(安捷伦,美国);G7111A 计量泵(安捷伦,美国);Open lab CDS 2.7 工作站(安捷伦,美国);METTLER TOLEDO XS20DU 电子天平(梅特勒-托利多,瑞士);恒温水浴锅 HB-10(艾卡,德国);Waters Atlantis™T3(4.6 mm×150 mm×5 μm)色谱柱(沃特世,美国)。

1.2 试剂 乙腈(色谱级,德国默克);2,4-二硝基氟苯(99%,百灵威,批号:G187298);磷酸(分析纯,天津风船化学有限公司,批号:20230123);碳酸氢钠(分析纯,天津风船化学有限公司,批号:20220611);二甲基亚砜(顶空级,百灵威);N,N-二甲基甲酰胺(DMF,顶空级,阿拉丁);2-哌啶甲酸(99.87%,百灵威,批号:L17632);3-哌啶甲酸(99.34%,百灵威,批号:L21131);4-哌啶甲酸盐(99.60%,Acros, A0149241);5-羟基-2-哌啶甲酸(97.13%,上海源叶生物科技有限公司,批号:2020122301);1,2,3,6-四氢-4-吡啶甲酸(98%,上海易恩化学技术有限公司,批号:RH528239);1-(哌啶-4-甲酰基)-哌啶-4-甲酸(99.41%,山东沃德森生物科技有限公司,批号:F688091);5-氧代-2-哌啶甲酸(95.29%,天津药物研究院,批号:20231202);4-甲基-2-哌啶甲酸(99.54%,阿拉丁, L14355);阿加曲班(天津泰普制药有限公司,批号:032023021001);马来酸阿伐曲泊帕(天津泰普制药有限公司,批号:041022021001);4-哌啶甲酸乙酯(山东德信佳生物科技有限公司,批号:SEZ-200702);阿维巴坦钠(天津药物研究院,批号:230327);瑞来巴坦(天津药物研究院,批号:240117)。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 采用 Waters Atlantis™T3 色谱柱

(4.6 mm×150 mm×5 μm);以 0.1%磷酸水溶液为流动相 A,以乙腈为流动相 B,梯度洗脱,0~35 min,70%~70%A;35~35.1 min,70%~20%A;35.1~43 min,20%~20%A;43~43.1 min,20%~70%A;43.1~55 min,70%~70%A(梯度可根据待测物性质调整);检测波长为 384 nm(根据待测物的吸收情况调整);进样体积为 10 μL;衍生化反应时间为 60 min;衍生化反应温度为水浴 60℃;DNFB 与待测物哌啶环上的伯胺的物质的量摩尔比为 10;5 mg/mL 碳酸氢钠溶液 1 mL。

1.3.2 溶液的制备 (1)PADs 对照品贮备液的制备:取 PADs 对照品适量,精密称定,加乙腈或水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.1 mg 的溶液。精密量取适量,用水稀释制成每 1 mL 中约含 10 μg 的溶液。(2)供试品贮备液的制备:取样品适量,精密称定,加合适的溶剂溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 10 mg 的溶液。(3)PADs 对照品溶液的制备:分别精密量取 1 mL 碳酸氢钠溶液、DNFB 溶液适量、水 1 mL 和 PADs 对照品贮备液 0.4 mL,置 10 mL 量瓶中,用与供试品贮备液一致的溶剂稀释至刻度,密封。置 60℃水浴反应 60 min,放冷,用乙腈定容至刻度。(4)供试品溶液的制备:分别精密量取 1 mL 碳酸氢钠溶液、DNFB 溶液适量、水 1 mL 和供试品贮备液 0.4 mL,置 10 mL 量瓶中,用与供试品贮备液一致的溶剂稀释至刻度,密封。置 60℃水浴反应 60 min,用乙腈定容至刻度。(5)加标回收率溶液的制备:分别精密量取 1 mL 碳酸氢钠溶液、DNFB 溶液适量、水 1 mL、供试品贮备液 0.4 mL 和一定量的 PADs 对照品贮备液,置 10 mL 量瓶中,用与供试品贮备液一致的溶剂稀释至刻度,密封。置 60℃水浴反应 60 min,放冷,用乙腈定容至刻度。

1.3.3 衍生反应条件的筛选 在不同药物中测定 PADs(表 1 列举了一些哌啶甲酸衍生物)时所采用的溶剂不同的情况下,按 1.3.2 制备 PADs 对照品溶液,分别单因素考察衍生化反应时间、衍生化反应温度、DNFB 用量以及衍生化反应环境等对 PADs 衍生化产物的影响情况,以获得通用衍生化反应条件。例如:使用甲醇做溶剂在阿加曲班中测定 4-甲基-2-哌啶甲酸(A);使用 DMF 作溶剂在马来酸阿伐曲泊帕中测定 1-(哌啶-4-甲酰基)-哌啶-4-甲酸(B)和 1,2,3,6-四氢-4-吡啶甲酸(C);使用乙腈作溶剂在 4-哌啶甲酸乙酯中测定 2-哌啶甲酸(D)、3-哌啶甲酸(E)和 4-哌啶甲酸(F);使用二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂在阿维巴坦钠中测定 5-羟基-2-哌啶甲酸(G);使用 N-甲基吡咯烷酮(NMP)作为溶剂在瑞来巴坦中测定 5-氧代-2-哌啶甲酸(H)。

表1 哌啶甲酸类化合物

Tab.1 Pipercolic acid and its derivative

化学名称	结构式	基础骨架	应用药物
4-羟基-2-哌啶甲酸及羟基位置异构			
三羟基-2-哌啶甲酸			
1,2,3,6-四氢-2-吡啶甲酸及双键位置异构		2-哌啶甲酸	罗哌卡因 ^[10] 、硫利哒嗪 ^[11] 、雷帕霉素 ^[12] 、Sandramycin、卡波卡因、阿加曲班、阿维巴坦钠 ^[13] 、瑞来巴坦 ^[14]
4-氧代-2-哌啶甲酸及羰基位置异构			
4-甲基-2-哌啶甲酸及甲基位置异构			
4-氧代-3-哌啶甲酸及羰基位置异构			
4-羟基-3-哌啶甲酸及羟基位置异构		3-哌啶甲酸	γ -氨基丁酸抑制剂、金属蛋白酶抑制剂 ^[15] 、法尼基转移酶抑制剂 ^[16-17] 、胰蛋白酶抑制剂 85 ^[18] 、Enedomorphin-2 ^[19] 、噻加宾 ^[20] 、长春瑞滨、GHS80、唾液酸酶抑制剂
1,2,3,6-四氢-3-吡啶甲酸及双键位置异构			
4-甲基-3-哌啶甲酸及甲基位置异构			
2-羟基-4-哌啶甲酸及羟基位置异构			
3-甲基-4-哌啶甲酸			
1,2,3,4-四氢-4-吡啶甲酸及双键位置异构		4-哌啶甲酸	盐酸多奈哌齐 ^[1] 、马来酸阿伐曲泊帕、伊潘立酮
2-氧代-4-哌啶甲酸及羰基位置异构			
1-(哌啶-4-甲酰基)-哌啶-4-甲酸			

1.3.4 专属性试验 按 1.3.2 制备 PADs 对照品贮备液和 PADs 对照品溶液,各自生成相应的衍生化产物。

1.3.5 灵敏度试验 按 1.3.2 制备 PADs 对照品贮备液,逐级稀释后分别进行衍生化反应。以信噪比 (S/N)>3 时所对应的 PADs 浓度为检出限,以 S/N >10 时所对应的 PADs 浓度为定量限。

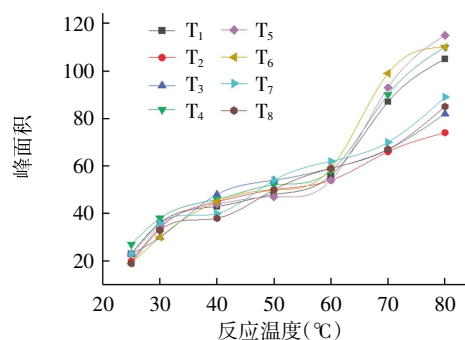
1.3.6 线性关系考察试验 按 1.3.2 制备 PADs 对照品贮备液,逐级稀释制备一系列线性溶液,分别

进行衍生化反应,以 PADs 浓度为横坐标,以衍生化产物峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程及相关系数。

1.3.7 加标回收试验 按 1.3.2 制备定量限浓度的加标回收溶液(6 份),50%限度浓度的加标回收溶液(3 份),100%限度浓度的加标回收溶液(3 份),200%的加标回收溶液(3 份)。分别计算阿加曲班中的 4-甲基-2-哌啶甲酸(A)(衍生化产物)回收率,马来酸阿伐曲泊帕中的 1-(哌啶-4-甲酰基)-哌啶-4-甲酸(B)(衍生化产物)和 1,2,3,6-四氢-4-吡啶甲酸(C)(衍生化产物)回收率,4-哌啶甲酸乙酯中的 2-哌啶甲酸(D)(衍生化产物),3-哌啶甲酸(E)(衍生化产物)和 4-哌啶甲酸(F)(衍生化产物)回收率,阿维巴坦钠中的 5-羟基-2-哌啶甲酸(G)(衍生化产物)回收率以及瑞来巴坦中的 5-氧代-2-哌啶甲酸(H)(衍生化产物)回收率。

2 结果

2.1 反应温度的筛选结果 DNFB 与哌啶环上的伯胺的物质的量摩尔比为 10、反应时间为 60 min、1 mL 的 5 mg/mL 碳酸氢钠溶液条件下,考察在不同溶剂中温度对衍生化产物的影响。由图 1 可知,几种 PADs 在不同的反应溶剂中其衍生化产物峰面积均随着反应温度升高而变大。



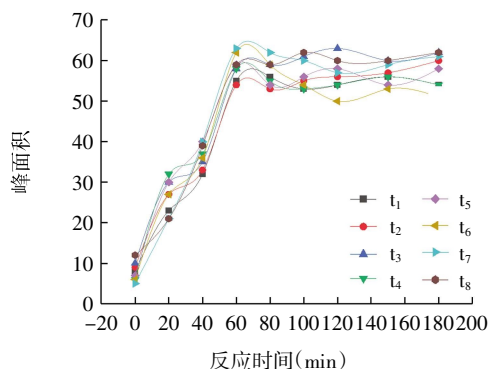
注:T₁:不同反应温度条件下4-甲基-2-哌啶甲酸衍生化产物(甲醇为溶剂)峰面积变化曲线;T₂:不同反应温度条件下1-(哌啶-4-甲酰基)-哌啶-4-甲酸衍生化产物(DMF为溶剂)峰面积变化曲线;T₃:不同反应温度条件下1,2,3,6-四氢-4-吡啶甲酸衍生化产物(DMF为溶剂)峰面积变化曲线;T₄:不同反应温度条件下2-哌啶甲酸衍生化产物(乙腈为溶剂)峰面积变化曲线;T₅:不同反应温度条件下3-哌啶甲酸衍生化产物(乙腈为溶剂)峰面积变化曲线;T₆:不同反应温度条件下4-哌啶甲酸衍生化产物(乙腈为溶剂)峰面积变化曲线;T₇:不同反应温度条件下5-羟基-2-哌啶甲酸衍生化产物(DMSO为溶剂)峰面积变化曲线;T₈:不同反应温度条件下5-氧代-2-哌啶甲酸衍生化产物(NMP为溶剂)峰面积变化曲线

图1 不同溶剂中反应温度对哌啶羧酸类化合物反应的影响

Fig.1 Effect of reaction temperature on pipercolic acid and its derivatives in difference solvents

2.2 反应时间的筛选结果 DNFB 与哌啶环上伯胺的物质的量摩尔比为 10、反应温度为 60℃、1 mL 的 5 mg/mL 碳酸氢钠溶液条件下,考察了在不同溶剂中反应时间对衍生化产物的影响。由图 2 可知,

几种 PADs 在不同的反应溶剂中其衍生化产物峰面积均随着反应时间的延长而变大,然后趋于稳定。



注: t_1 : 不同反应时间条件下 4-甲基-2-哌啶甲酸衍生化产物(甲醇为溶剂)峰面积变化曲线; t_2 : 不同反应时间条件下 1-(哌啶-4-甲酰基)-哌啶-4-甲酸衍生化产物(DMF 为溶剂)峰面积变化曲线; t_3 : 不同反应时间条件下 1,2,3,6-四氢-4-吡啶甲酸衍生化产物(DMF 为溶剂)峰面积变化曲线; t_4 : 不同反应时间条件下 2-哌啶甲酸衍生化产物(乙腈为溶剂)峰面积变化曲线; t_5 : 不同反应时间条件下 3-哌啶甲酸衍生化产物(乙腈为溶剂)峰面积变化曲线; t_6 : 不同反应时间条件下 4-哌啶甲酸衍生化产物(乙腈为溶剂)峰面积变化曲线; t_7 : 不同反应时间条件下 5-羟基-2-哌啶甲酸衍生化产物(DMSO 为溶剂)峰面积变化曲线; t_8 : 不同反应时间条件下 5-氧代-2-哌啶甲酸衍生化产物(NMP 为溶剂)峰面积变化曲线

图2 不同溶剂中反应时间对哌啶羧酸类化合物反应的影响

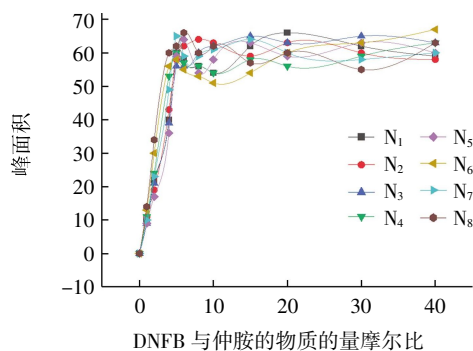
Fig.2 Effect of reaction time on piperidic acid and its derivatives in difference solvents

2.3 DNFB 用量的筛选结果 反应温度为 60℃、反应时间为 60 min, 1 mL 的 5 mg/mL 碳酸氢钠溶液条件下, 考察 DNFB 与哌啶环上伯胺的物质的量摩尔比对衍生化产物的影响。由图 3 可知, 几种 PADs 在不同的反应溶剂中其衍生化产物峰面积均随着 DNFB 用量的增多而明显变大。当 DNFB 与哌啶环上的伯胺物质的量摩尔比 > 5 时, 衍生化产物峰面积几乎不再变化。

2.4 反应体系的筛选结果 DNFB 与哌啶环上的伯胺的物质的量摩尔比为 10、反应温度为 60℃、反应时间为 60 min 条件下, 考察在不同溶剂中反应体系(以碳酸氢钠加入量表示)对衍生化产物的影响。由图 4 可知, 几种 PADs 在不同的反应溶剂中其衍生化产物峰面积均随着反应体系成碱性而变大, 达到峰值后随着 pH 值的继续增大而变小。

2.5 专属性试验结果 2,4-二硝基氟苯、2,4-二硝基氟苯水解物、2-哌啶甲酸衍生化产物、3-哌啶甲酸衍生化产物及 4-哌啶甲酸衍生化产物的色谱图见图 5, 结果表明各衍生化产物峰不受其他色谱峰干扰, 能够满足 PADs 的测定, 该方法专属性良好。

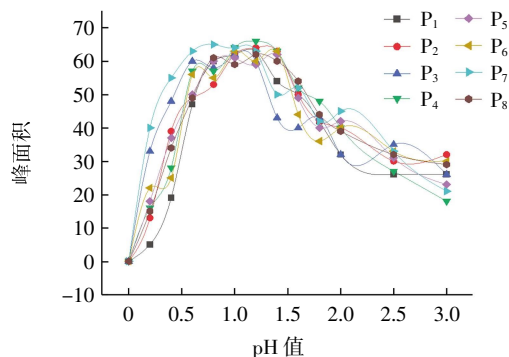
2.6 灵敏度试验结果 由表 2 可知, 各 PADs(衍生化产物)的检出限均小于 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 定量限均小于 0.08 $\mu\text{g/mL}$ 。按照 PADs 为一般杂质计, 0.4 mg/mL 的供试品溶液浓度是满足检测灵敏度要求的。



注: N_1 : 不同 DNFB 与仲胺的物质的量摩尔比条件下 4-甲基-2-哌啶甲酸衍生化产物(甲醇为溶剂)峰面积变化曲线; N_2 : 不同 DNFB 与仲胺的物质的量摩尔比条件下 1-(哌啶-4-甲酰基)-哌啶-4-甲酸衍生化产物(DMF 为溶剂)峰面积变化曲线; N_3 : 不同 DNFB 与仲胺的物质的量摩尔比条件下 1,2,3,6-四氢-4-吡啶甲酸衍生化产物(DMF 为溶剂)峰面积变化曲线; N_4 : 不同 DNFB 与仲胺的物质的量摩尔比条件下 2-哌啶甲酸衍生化产物(乙腈为溶剂)峰面积变化曲线; N_5 : 不同 DNFB 与仲胺的物质的量摩尔比条件下 3-哌啶甲酸衍生化产物(乙腈为溶剂)峰面积变化曲线; N_6 : 不同 DNFB 与仲胺的物质的量摩尔比条件下 4-哌啶甲酸衍生化产物(乙腈为溶剂)峰面积变化曲线; N_7 : 不同 DNFB 与仲胺的物质的量摩尔比条件下 5-羟基-2-哌啶甲酸衍生化产物(DMSO 为溶剂)峰面积变化曲线; N_8 : 不同 DNFB 与仲胺的物质的量摩尔比条件下 5-氧代-2-哌啶甲酸衍生化产物(NMP 为溶剂)峰面积变化曲线

图3 不同溶剂中 DNFB 与哌啶环上的伯胺的物质的量摩尔比对哌啶羧酸类化合物反应的影响

Fig.3 Effect of molar ratio of DNFB to amount of primary amine in the piperidine ringon piperidic acid and its derivatives in difference solvents

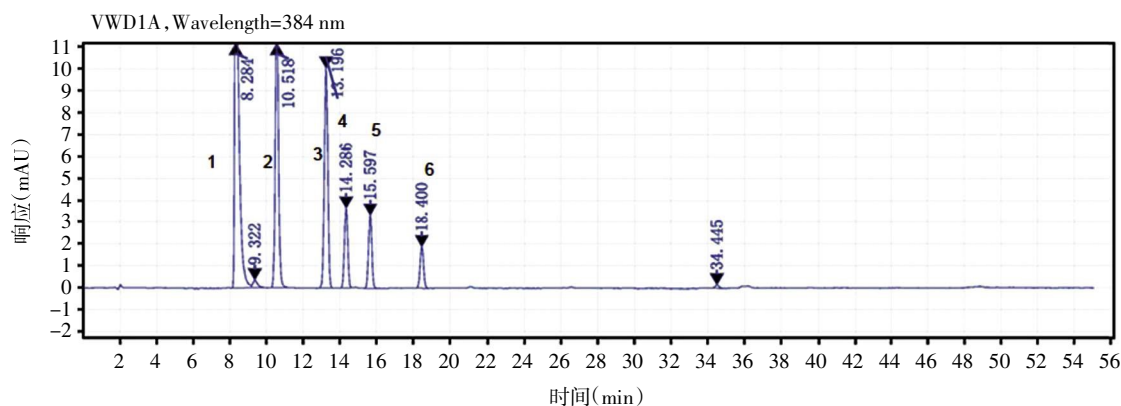


注: P_1 : 不同 pH 值条件下 4-甲基-2-哌啶甲酸衍生化产物(甲醇为溶剂)峰面积变化曲线; P_2 : 不同 pH 值条件下 1-(哌啶-4-甲酰基)-哌啶-4-甲酸衍生化产物(DMF 为溶剂)峰面积变化曲线; P_3 : 不同 pH 值条件下 1,2,3,6-四氢-4-吡啶甲酸衍生化产物(DMF 为溶剂)峰面积变化曲线; P_4 : 不同 pH 值条件下 2-哌啶甲酸衍生化产物(乙腈为溶剂)峰面积变化曲线; P_5 : 不同 pH 值条件下 3-哌啶甲酸衍生化产物(乙腈为溶剂)峰面积变化曲线; P_6 : 不同 pH 值条件下 4-哌啶甲酸衍生化产物(乙腈为溶剂)峰面积变化曲线; P_7 : 不同 pH 值条件下 5-羟基-2-哌啶甲酸衍生化产物(DMSO 为溶剂)峰面积变化曲线; P_8 : 不同 pH 值条件下 5-氧代-2-哌啶甲酸衍生化产物(NMP 为溶剂)峰面积变化曲线

图4 不同溶剂中 pH 值对哌啶羧酸类化合物反应的影响

Fig.4 Effect of pH on piperidic acid and its derivatives in difference solvents

2.7 线性关系考察试验结果 由图 6 可知, 在不同的溶剂中各 PADs 的浓度均与其(衍生化产物)峰面积成良好的线性关系, 各回归方程的相关系数均大



注:1;2,4-二硝基氟苯峰 1;2;2,4-二硝基氟苯水解物峰;3;2,4-二硝基氟苯峰 2;4;2-哌啶甲酸衍生化产物峰;5;3-哌啶甲酸衍生化产物峰;6;4-哌啶甲酸衍生化产物峰

图5 2-哌啶甲酸、3-哌啶甲酸和4-哌啶甲酸对照品混合溶液高效液相色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of mixture solution RS of pipecolic acid, 3-nipecotic acid and isonipecotic acid

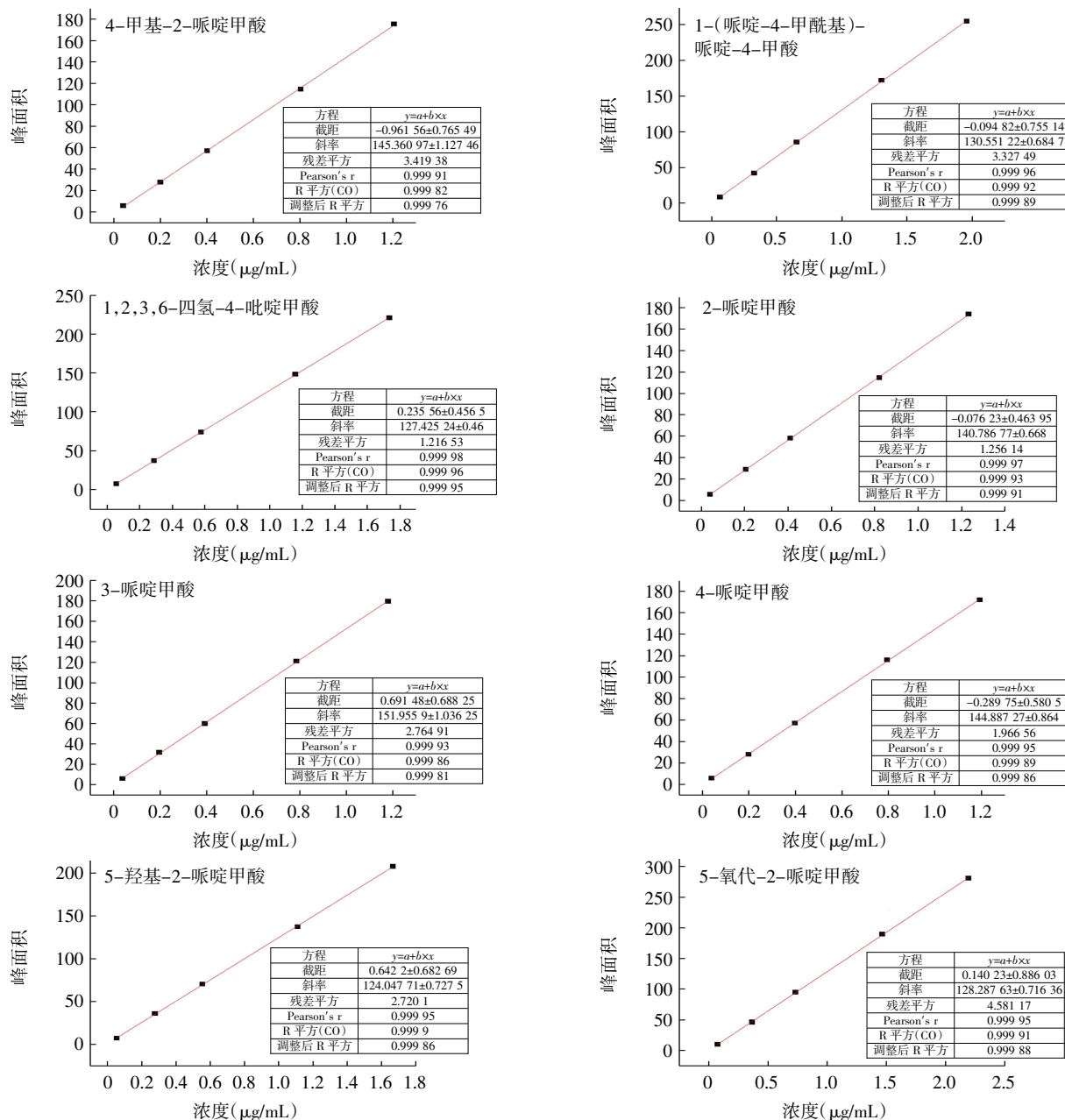


图6 哌啶羧酸类化合物在不同溶剂中的浓度和衍生物峰面积线性关系图

Fig.6 The linear relationship of pipecolic acid and its derivatives between concentration and peak area of derivative in difference solvents

表 2 不同溶剂中哌啶羧酸类化合物灵敏度结果

Tab.2 Sensitivity results of pipecolic acid and its derivatives in difference solvents

化合物	检出限		定量限		
	浓度($\mu\text{g/mL}$)	S/N	浓度($\mu\text{g/mL}$)	S/N	峰面积
A	0.013 40	4.7	0.040 21	15.7	5.769
B	0.021 77	5.5	0.065 31	12.2	8.433
C	0.019 28	6.4	0.057 83	14.9	7.322
D	0.013 70	3.9	0.041 11	10.7	5.777
E	0.013 11	6.4	0.039 32	13.3	6.032
F	0.013 26	5.2	0.039 77	15.7	5.777
G	0.018 52	4.3	0.055 56	16.4	6.949
H	0.024 41	6.9	0.073 24	11.0	9.433

注:S/N:信噪比

于 0.999, 各截距的绝对值均小于 100%响应值的 25%。能够满足外标定量要求, 线性范围均为定量限~3 倍限度浓度。

2.8 加标回收试验结果 由表 3 可知, 各 PADs(衍生化产物)的定量限回收率均在 85%~110%范围内, 回收率的 $RSD(n=6)$ 均小于 4%。50%~200%限度浓度回收率均在 90%~108%范围内, 回收率的 $RSD(n=9)$ 均小于 3%, 满足相关要求, 表明该方法准确度良好。

表 3 不同溶剂中哌啶羧酸类化合物加标回收结果

Tab.3 Spiked recoveries results of pipecolic acid and its derivatives in difference solvents

化合物	定量限回收率		50%~200%回收率	
	范围(%)	RSD(%)	范围(%)	RSD(%)
A	88.25~101.44	2.71	95.63~102.97	1.03
B	90.22~104.32	3.11	98.09~99.47	1.11
C	93.79~103.88	3.77	94.03~103.11	2.98
D	93.33~95.74	1.22	99.08~100.34	0.39
E	94.58~97.10	2.09	98.49~101.72	2.73
F	98.99~99.12	0.15	96.47~102.88	2.65
G	87.66~105.31	3.89	95.33~96.70	0.54
H	85.44~90.33	3.71	93.22~104.87	2.94

注:RSD:相对标准偏差

3 讨论

DNFB 是一种 Sanger 试剂^[21-22], 能够与蛋白质的 N 端氨基酸的 α -氨基发生反应^[23]。PADs 哌啶环上的伯胺可以与 DNFB 发生亲核取代, 生成具有紫外吸收的衍生产物, 从而采用 HPLC 对其含量进行测定。

采用甲醇和乙腈作溶剂时, 反应温度超过 70℃ 时衍生化产物峰面积出现骤升, 因为此时甲醇和乙腈均出现不同程度的沸腾, 造成反应溶剂损失, 影响定量。采用沸点较高的 DMF、NMP 和 DMSO 作溶

剂时, 衍生化产物峰面积均平稳变大。为了避免反应溶剂挥发, 造成测定结果假阳性, 60℃ 是比较通用的反应温度。

DNFB 用量越大, 各衍生化产物峰面积越大。当 DNFB 与哌啶环上的伯胺的物质的量摩尔比>5 时, 衍生物的峰面积几乎不再变化。可见, DNFB 与哌啶环上伯胺的物质的量摩尔比>5 时才能实现完全反应, 考虑到 PADs 中存在哌啶环之外的伯胺和仲胺, 因此选择 DNFB 与哌啶环上的伯胺的物质的量摩尔比为 10。

几种 PADs 在不同的反应溶剂中其衍生化产物峰面积均随着反应体系成碱性而变大, 达到峰值后随着 pH 值的继续增大而变小。这是因为碱性越强会增加 DNFB 的水解速度。多种溶剂在 0.6~1.4 mL 的 5 g/L 碳酸氢钠溶液范围内出现峰面积的“平台期”。综合选择 1 mL 的 5 g/L 碳酸氢钠溶液制造反应环境。

本研究提出了一种采用 DNFB 作为衍生剂, 在弱碱体系中(1 mL 的 5%碳酸氢钠溶液)以 10 倍摩尔物质的量在 60℃水浴加热 60 min, 与待测物哌啶环上的伯胺发生亲核取代反应生成具有紫外吸收的衍生化产物, 从而实现 PADs 的定量。与现有报道的 PADs 的测定方法不同, 该测定方法操作简便、产物稳定、分析时间短、灵敏度高^[24]、准确度高^[25]、不需要复杂的仪器设备, 可操作性强。本研究中的 PADs 在甲醇、乙腈、二甲基亚砜、DMF 以及 NMF 中的衍生化反应转化率基本一致, 并不受溶剂的影响, 并且不同结构的 PADs 的衍生化反应率也基本一致。因此该方法可以作为测定药物中 PADs 的通用分析方法。此外, 由于 DNFB 可作为伯胺和仲胺的定量试剂^[26], 该方法有可能成为测定药物结构中含有伯胺或仲胺基团化合物定量的通用分析方法。

参考文献:

- [1] MAKARIAN M, GONZALEZ M, SALVADOR S M, et al. Synthesis, kinetic evaluation and molecular docking studies of donepezil-based acetylcholinesterase inhibitors[J]. *J Mol Struct*, 2022, 1247: 131425.
- [2] LI Y, TANG F, MENG C, et al. Progress in the synthesis and application of nipecotic acid and its derivatives[J]. *Chinese J Org Chem*, 2009, 29(7): 1068.
- [3] MOHAPATRA S, BHAKTA S, BARAL N, et al. Synthetic application of pipecolic acid[J]. *Res Chem Intermediat*, 2015, 41: 4545–4553.
- [4] SEMERAROM, MURACA M, CATESINI G, et al. Determination of plasma pipecolic acid by an easy and rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry method[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 440: 108–112.
- [5] RASHED M S, AL-AHAIDIBL Y, ABOUL-ENEINH Y, et al. Determination of L-pipecolic acid in plasma using chiral liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Clin Chem*, 2001, 47(12): 2124–2130.
- [6] YU K, LIU H, KACHROO P. Pipecolic acid quantification using gas chromatography–coupled mass spectrometry[J]. *Bio Protocol*, 2020, 10(23): e3841–e3841.
- [7] HUTZLER J, DANCIS J. The determination of pipecolic acid: method and results of hospital survey[J]. *Clin Chim Acta*, 1983, 128(1): 75–82.
- [8] LAWRENCE J M, HERRICK H E, COAHRAN D R. Determination of pipecolic acid by thin-layer chromatography[J]. *Anal Biochem*, 1973, 53(1): 317–320.
- [9] GOVAERTS L, TRIJBELS F, MONNENS L, et al. Pipecolic acid levels in serum and urine from neonates and normal infants: comparison with values reported in Zellweger syndrome[J]. *J Inher Metab Dis*, 1985, 8: 87–91.
- [10] FRAMPTON G A C, ZAVAREH H S. Process for preparing levobupivacaine and analogues thereof: AU, 19950037049[P]. 2024–04–25.
- [11] ANTONSEN S, MONSEN E B, OVCHINNIKOV K, et al. Synthesis of the enantiomers of thioridazine[J]. *Syn Open*, 2020, 4(1): 12–16.
- [12] ATTUR M G, PATEL R, THAKKER G, et al. Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE₂ production[J]. *Inflamm Res*, 2000, 49: 20–26.
- [13] PEILLERON L, CARIOU K. Synthetic approaches towards avibactam and other diazabicyclooctane β -lactamase inhibitors[J]. *Org Biomol Chem*, 2020, 18(5): 830–844.
- [14] XU F, SHERRY B D, BLIZZARD T A. Discovery and chemical development of relebactam: a potent β -lactamase inhibitor in combination with primaxin[®] for the treatment of serious and antibiotic-resistant bacterial infections, complete accounts of integrated drug discovery and development; recent examples from the pharmaceutical industry volume 3[M]. Washington, DC: American Chemical Society, 2020: 253–284.
- [15] ZHANG J, ZHANG P, LIU X, et al. Synthesis and biological evaluation of (R)-N-(diarylmethylthio/sulfinyl) ethyl/propyl-piperidine-3-carboxylic acid hydrochlorides as novel GABA uptake inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(13): 3769–3773.
- [16] ZAKNOEN S L. Use of FPT inhibitors and at least two antineoplastic agents in the treatment of cancer: MX. 2004PA05425[P]. 2024–09–25.
- [17] ANTHONY N J, BERGMAN J M, DESOLMS S J, et al. Inhibitors of farnesyl-protein transferase: ZA, 19950008162[P]. 2024–09–25.
- [18] DHAR T G M, POTIN D, MAILLET M J B, et al. Spiro-hydantoin compounds useful as anti-inflammatory agents: US, 10262182[P]. 2024–09–25.
- [19] STANISZEWSKA R, FICHNA J, GACH K, et al. Synthesis and biological activity of endomorphin-2 analogs incorporating piperidine-2-, 3- or 4-carboxylic acids instead of proline in position 2[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2008, 72(1): 91–94.
- [20] SAŁAT K, WIĘCKOWSKA A, WIĘCKOWSKI K, et al. Synthesis and pharmacological properties of new GABA uptake inhibitors[J]. *Pharmacol Rep*, 2012, 64(4): 817–833.
- [21] HASSNER A, NAMBOOTHIRI I. Organic syntheses based on name reactions: a practical guide to 750 transformations[M]. Elsevier, Oxford: Elsevier Science Ltd. 2012: 415–476.
- [22] DEWANGAN Y, BERDIMURODOV E, VERMA D K. Amino acids: classification, synthesis methods, reactions, and determination[M]. Elsevier, Vienna: Springer Vienna, 2023: 3–23.
- [23] SEMERARO M, MURACA M, CATESINI G, et al. Determination of plasma pipecolic acid by an easy and rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry method[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 440: 108–112.
- [24] ARMBRUSTER D A, PRY T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation[J]. *Clin Bio Chem*, 2008, 29: 49–52.
- [25] BROWN P N, LISTER P. Current initiatives for the validation of analytical methods for botanicals[J]. *Curr Opin Biotech*, 2014, 25: 124–128.
- [26] MCINTIRE F C, CLEMENTS L M, SPROULL M. 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene as quantitative reagent for primary and secondary amines[J]. *Anal Chem*, 1953, 25(11): 1757–1758.

(2024–06–05 收稿)