

HPLC-DAD 法测定 2-氨基吡啶原料药中有关物质

张绿茵¹, 兰为环¹, 刘朋², 王歆¹, 唐海^{1*}

1. 江苏天士力帝益药业有限公司, 江苏 淮安 223001

2. 天士力控股集团有限公司, 天津 300410

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法(HPLC)-二极管阵列检测器(DAD)法测定 2-氨基吡啶原料药中的有关物质。方法 使用 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 10 mmol/L 磷酸氢二钾(磷酸调 pH 值至 7.5)-甲醇, 梯度洗脱; 检测波长为 225 nm (2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶)、260 nm (4-氨基吡啶); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温为 35 °C; 进样量: 10 μL。结果 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶在 0.01~2.00、0.01~2.00、0.06~2.00 μg/mL 线性关系良好。4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶的平均回收率分别为 99.6%、97.5%、102.7%, RSD 值分别为 4.6%、2.6%、3.5%。结论 建立的方法操作简便、准确、灵敏度高、专属性强, 可用于 2-氨基吡啶原料药的质量控制。

关键词: 2-氨基吡啶; 4-氨基吡啶; 2,4-二氨基吡啶; 2,6-二氨基吡啶; 有关物质; HPLC-DAD

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)11-2490-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.11.010

Determination of related substances in 2-aminopyridine active pharmaceutical ingredients by HPLC-DAD

ZHANG Lü-yin¹, LAN Wei-huan¹, LIU Peng², WANG Xin¹, TANG Hai¹

1. Jiangsu Tasly Diyi Pharmaceutical Co. Ltd, Huai'an 223001, China

2. Tasly Holding Group Co. Ltd, Tianjin 300410, China

Abstract: **Objective** To establish an HPLC-DAD method for the determination of related substances in 2-aminopyridine active pharmaceutical ingredients. **Methods** The analysis was performed on an Waters XBridge C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was 10 mmol/L dipotassium phosphate (pH value was adjusted to 7.5 with phosphoric acid) - methanol with gradient elution. The detection wavelength was 225 nm (2,4-diaminopyridine and 2,6-diaminopyridine) and 260 nm (4-aminopyridine), the flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 35 °C, and injection volume was 10 μL. **Results** The calibration curves of 4-aminopyridine, 2,4-diaminopyridine, and 2,6-diaminopyridine were linear within the concentration ranges of 0.01 — 2.00, 0.01 — 2.00, and 0.06 — 2.00 μg/mL, respectively. The average recoveries for 4-aminopyridine, 2,4-diaminopyridine, and 2,6-diaminopyridine were 99.6%, 97.5%, and 102.7% with RSD values of 4.6%, 2.6%, and 3.5%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive, and specific, and can be used for the quality control for 2-aminopyridine active pharmaceutical ingredients.

Key words: 2-aminopyridine; 4-aminopyridine; 2,4-diaminopyridine; 2,6-diaminopyridine; related substance; HPLC-DAD

吡啶环上氮原子具有较强的吸电子效应, 且吡啶 α 位基团具有特殊的作用, 使吡啶 α 位的衍生物作为合成子或中间体在有机合成、药物合成中日益引人瞩目^[1]。2-氨基吡啶作为氮杂环类化合物, 因其独特的双亲核结构特点为人们所重视^[2]。近年来基于 2-氨基吡啶的成环反应取得较大发展, 可与酮、

醛、酸、多官能团酯类、卤代芳烃等化合物反应, 以构建五元、六元含氮稠杂环^[3]。这些合成方法不仅丰富了有机合成方法学的研究途径, 而且在药物合成和荧光探针等领域有较广泛的应用^[4-5]。本研究根据 2-氨基吡啶的制备工艺和杂质谱特点, 采用 HPLC-DAD 双波长、外标法测定 2-氨基吡啶原料中

收稿日期: 2022-04-22

基金项目: 淮安市科技项目 (HAP201901)

作者简介: 张绿茵, 女, 工程师, 硕士。E-mail: tsl-zhanglvinyin@tasly.com

*通信作者: 唐海, 男, 研究员级高级工程师, 博士。E-mail: tsl-tanghai2020@tasly.com

4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶,同时采用自身对照法测定其他有关物质,建立的方法操作简便、准确、灵敏度高、专属性强,可用于 2-氨基吡啶原料药的质量控制。

1 仪器与试药

UltiMate 3000 型 (DAD) 高效液相色谱仪 (Thermo Fisher, Chromeleon 色谱工作站), XS105DU 分析电子天平 (十万分之一, 梅特勒-托利多仪器厂), MS204S/Z 分析电子天平 (万分之一, 梅特勒-托利多仪器厂); 2-氨基吡啶对照品 (批号 RH108229, 质量分数 >98.5%)、2,4-二氨基吡啶对照品 (批号 ATX525, 质量分数 >97%), 购自毕得医药; 2,6-二氨基吡啶对照品 (批号 C1921112, 质量分数 >98%), 购自阿拉丁; 4-氨基吡啶对照品 (批号 J1831044, 质量分数 >98%), 购自阿拉丁; 2-氨基吡啶原料药 (批号 20190310、20190311、20190312), 购自安徽星宇化工有限公司; 甲醇为色谱纯 (德国 Merk), 磷酸氢二钾为分析纯 (阿拉丁), 水为二纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters XBridge C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 10 mmol/L 磷酸氢二钾 (磷酸调 pH 值至 7.5) (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱 [0 min、95% A→20 min、60% A→30 min、20% A→31 min、95% A→35 min、95% A]; 检测波长为 225 nm (2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶)、260 nm (4-氨基吡啶); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温为 35 °C; 进样量: 10 μL。在该色谱条件下, 各组分的分离度均大于 1.5, 理论塔板数均大于 10 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 稀释液 (空白溶剂) 流动相 A - B (95 : 5)。

2.2.2 对照品溶液 I 取 2-氨基吡啶对照品和 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶对照品各适量, 精密称定, 用稀释液溶解并定量稀释, 制成含各组分约为 1 μg/mL 的溶液。

2.2.3 对照品溶液 II 取 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶对照品适量, 精密称定, 用稀释液溶解并定量稀释, 制成含各组分约为 1 μg/mL 的溶液。

2.2.4 供试品溶液 取 2-氨基吡啶原料药适量, 精密称定, 用稀释液溶解制成 1 mg/mL 的溶液。

2.2.5 自身对照溶液 精密量取 2-氨基吡啶原料药供试品溶液适量, 用稀释液定量稀释, 制成 1 μg/mL 的溶液。

2.2.6 混合溶液 取 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶对照品和 2-氨基吡啶对照品各适量, 用稀释液制成约 2 μg/mL 的混合溶液。

2.2.7 供试品加标溶液 取 2-氨基吡啶原料药适量, 精密称定, 加入混合溶液适量, 用稀释液定量稀释, 制成含 2-氨基吡啶 1 mg/mL 和含 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶各 1 μg/mL 的溶液。

2.3 专属性试验

2.3.1 选择性试验 分别取 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶对照品适量, 用稀释液分别制成 10 μg/mL 的溶液, 作为各杂质的定位溶液。取空白溶剂、对照品溶液 I、供试品溶液 (批号 20190312)、供试品加标溶液 (批号 20190312), 依次进样, 记录色谱图, 见图 1。结果表明, 空白溶剂对测定无干扰, 各组分之间分离度符合要求。

2.3.2 破坏试验 取 2-氨基吡啶原料药供试品 (批号 20190312) 4 份, 各约 25 mg, 置入 25 mL 量瓶中, 分别加入 1 mol/L 盐酸溶液 2 mL, 水浴 80 °C 放置 8 h, 中和; 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL, 水浴 80 °C 放置 8 h, 中和; 加入 3% 过氧化氢溶液 2 mL, 水浴 80 °C 放置 1.5 h; 加水 2 mL, 水浴 80 °C 放置 8 h, 进行酸、碱、氧化和高温破坏; 取 2-氨基吡啶适量于表面皿中, 敞口置 4 500 lx 光下照射 2 d 进行光照破坏, 取约 100 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中; 分别将上述被破坏的溶液用稀释液稀释至刻度, 摇匀, 进样测定。结果表明 2-氨基吡啶原料药供试品在高温、酸、碱、氧化、光照条件下均较稳定, 在氧化条件下产生一定降解, 各主要降解杂质之间、杂质与主峰之间均能有效分离, 物料平衡在 90%~110%, 说明此法具有稳定性指示能力, 适用于 2-氨基吡啶的检测。

2.4 检测限和定量限

取对照品溶液 I, 逐级稀释, 当 S/N 约为 10 时, 2-氨基吡啶、4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶定量限分别为 0.060、0.010、0.010、0.060 μg/mL; 当 S/N 约为 3 时, 2-氨基吡啶、4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶检测限分别为 0.015 0、0.002 5、0.002 5、0.015 0 μg/mL。

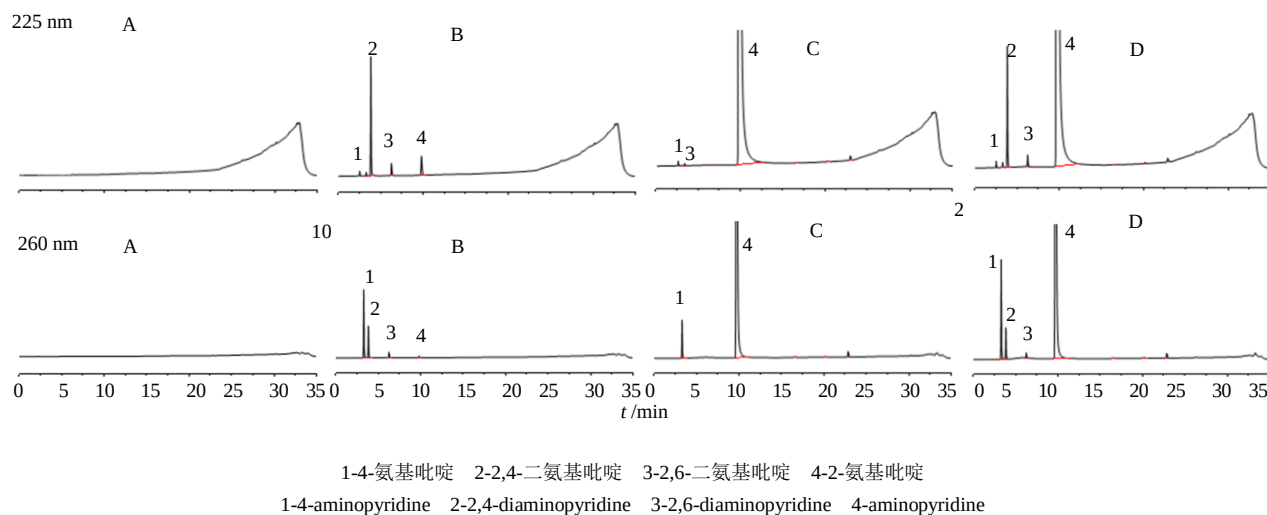


图 1 空白溶剂 (A)、对照品溶液 I (B)、供试品溶液 (C)、供试品加标溶液 (D) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank solution (A), reference substance I (B), sample (C), and sample added reference substance (D)

2.5 线性关系考察

取混合溶液，加稀释液稀释，制成分别含 2-氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶各 0.06、0.60、0.80、1.00、1.20、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 以及含 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡

啶各 0.01、0.60、0.80、1.00、1.20、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 的线性试验溶液，进样测定峰面积值。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，计算回归方程，见表 1。

表 1 线性关系

Table 1 Linear regression

成分	回归方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
4-氨基吡啶	$Y=98.7572X-0.2239$	1.0000	0.01~2.00
2,4-二氨基吡啶	$Y=167.0332X-0.3934$	1.0000	0.01~2.00
2,6-二氨基吡啶	$Y=23.0752X-0.1497$	0.9999	0.06~2.00
2-氨基吡啶	$Y=52.1315X-0.6887$	0.9998	0.06~2.00

2.6 回收率试验

精密称取 2-氨基吡啶原料药样品（批号 20190312）适量，分别制成含各杂质质量浓度分别为定量限浓度、1.0、1.2 $\mu\text{g/mL}$ 的回收率溶液，进样测定，记录色谱图，计算回收率。结果 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶的平均回收率分别为 99.6%、97.5%、102.7%，RSD 值分别为 4.6%、2.6%、3.5% ($n=9$)。

2.7 精密度试验

2.7.1 仪器精密度试验 取对照品溶液 I，连续进样 6 次，记录峰面积，结果 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶、2-氨基吡啶保留时间 RSD 值分别为 0.050%、0.043%、0.026%、0.016%，峰面积 RSD 值分别为 0.14%、1.3%、0.76%、0.78%。

2.7.2 重复性试验 对照品溶液 I 和对照品溶液 II 各配制 1 份，2-氨基吡啶原料药样品（批号 20190312）平行配制 6 份溶液，并依次稀释为对应的自身对照溶液，共 6 份；2-氨基吡啶原料药样品（批号 20190312）平行配制 6 份溶液，进样测定，结果显示，6 份供试品溶液中杂质检出个数一致；6 份供试品加标溶液中，4-氨基吡啶质量分数的 RSD 值为 2.2%，2,4-二氨基吡啶的质量分数 RSD 值为 1.5%，2,6-二氨基吡啶的质量分数 RSD 值为 0.57%。

2.7.3 中间精密度试验 按 2.7.2 项下各溶液方法配制，由不同的分析人员、不同时间、不同仪器依次测定，记录色谱图，结果显示，12 份供试品加标溶液中 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶的质量分数 RSD 值分别为 4.5%、1.6%、4.2%。

2.8 稳定性试验

配制空白溶剂、对照品溶液 I、供试品溶液(批号 20190312)、供试品加标溶液(批号 20190312),于室温放置 0、4、8、12、24、48 h,进样测定,记录色谱图,结果显示对照品 I 溶液中 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶、2-氨基吡啶峰面积的 RSD 值分别为 0.41%、0.42%、1.3%、0.34%;供试品溶液中 4-氨基吡啶质量分数的 RSD 值为 0.28%,其他最大单杂质量分数的 RSD 值为 0.83%;供试品加标溶液中 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶峰面积的 RSD 值分别为 0.24%、0.29%、1.8%。结果表明对照品 I 溶液、供试品溶液和供试品加标溶液在室温下放置 48 h 稳定。

2.9 耐用性试验

配制空白溶剂、对照品溶液 I、供试品溶液(批号 20190312)、供试品加标溶液(批号 20190312),分别考察不同 pH 值(7.5 ± 0.1)、柱温(35 ± 2)℃、体积流量(1.00 ± 0.05) mL/min、检测波长(225 ± 2 、 260 ± 2) nm、不同品牌色谱柱[Waters XBridge C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Thermo Acclaim™ 120-

C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)],进样测定,记录色谱图,结果显示对照品溶液中 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶、2-氨基吡啶峰面积的 RSD 值分别为 4.5%、3.5%、3.1%、2.9%;供试品溶液中 4-氨基吡啶质量分数的 RSD 值为 0.42%,其他最大单杂质量分数的 RSD 值为 3.7%;供试品加标溶液中 4-氨基吡啶出峰时间的 RSD 值为 3.4%,分离度均大于 1.5,质量分数的 RSD 值为 0.46%;2,4-二氨基吡啶出峰时间的 RSD 值为 4.0%,分离度均大于 1.5,质量分数的 RSD 值为 1.1%;2,6-二氨基吡啶出峰时间的 RSD 值为 3.6%,分离度均大于 1.5,质量分数的 RSD 值为 0.81%。

2.10 样品测定

取 3 批 2-氨基吡啶原料药样品,每批配制 2 份,作为供试品溶液,同时配制空白溶剂、对照品溶液 I、对照品溶液 II、自身对照溶液,进样测定峰面积值,记录色谱图。采用外标法测定 2-氨基吡啶原料中 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶,同时采用自身对照法测定 2-氨基吡啶原料中其他有关物质,结果见表 2。

表 2 2-氨基吡啶原料药中有关物质的测定结果(n=2)

Table 2 Determination of related substances in 2-aminopyridine active pharmaceutical ingredients (n=2)

批号	质量分数/%			
	4-氨基吡啶	2,4-二氨基吡啶	2,6-二氨基吡啶	其他最大杂质
20190310	0.05	0.002	—	0.02
20190311	0.05	0.003	—	0.02
20190312	0.05	—	—	0.02

—未检出

—not detected

3 讨论

3.1 检测波长的选择

4-氨基吡啶的最大吸收波长为 206、267 nm,2,4-二氨基吡啶的最大吸收波长为 223、263 nm,2,6-二氨基吡啶的最大吸收波长为 206、234、310 nm,2-氨基吡啶的最大吸收波长为 195、229、290 nm。由最大吸收波长可看出,此方法选择单一波长不利于对杂质的检出,故 4-氨基吡啶选择在 260 nm 波长下进行检测,2,4-二氨基吡啶、2,6-二氨基吡啶、2-氨基吡啶和样品中其他杂质均在 225 nm 波长下进行检测。

3.2 有机相的筛选

依次考察了甲醇、乙腈、甲醇-乙腈(45:55),

由试验结果和色谱图可得,加入乙腈有助于 4-氨基吡啶、2,4-二氨基吡啶的分离,且对各组分的峰型有明显改善,但是加入乙腈后,组分保留时间明显提前,与空白溶剂分不开,故有机相不选用乙腈、甲醇-乙腈(45:55);甲醇作为有机相对各组分的响应值有明显改善,且各组分之间分离度可满足基线分离,故选择纯甲醇作为有机相。

随着人们对 2-氨基吡啶新反应研究的不断深入,其在多环药物活性分子的合成应用方面会越来越广泛,本研究关于 2-氨基吡啶原料药中有关物质的测定方法经过专属性试验、检测限、定量限、线性、回收率、精密度和耐用性试验等考察,结果表明该方法操作简便,灵敏度高,检测结果精密、准

确、可靠。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kiefl G M, Gulder T. α -Functionalization of ketones via a nitrogen directed oxidative umpolung [J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(49): 20577-20582.
- [2] Ma S, Hill C K, Olen C L, *et al.* Ruthenium-catalyzed hydroamination of unactivated terminal alkenes with stoichiometric amounts of alkene and an ammonia surrogate by sequential oxidation and reduction [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(1): 359-368.
- [3] 陈淇, 陈思鸿, 吴汉清, 等. 2-氨基吡啶在构建五元,六元氮稠环合成中的应用 [J]. *有机化学*, 2021, 41(9): 3482-3491.
- [4] Li D, Wang Q, Rao N, *et al.* Development of imidazo [1,2-a]pyridine-based probe for detection of hydrazine and its applications in imaging of HepG2 cell [J]. *J Mol Struct*, 2021, 1239(19): 130521
- [5] Srivastava S, Thakur N, Singh A, *et al.* Development of a fused imidazo[1,2-a]pyridine based fluorescent probe for Fe^{3+} and Hg^{2+} in aqueous media and HeLa cells [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(51): 29856-29863.

[责任编辑 解学星]