

HPLC 法测定维格列汀原料药中对映异构体

王丽红, 刘均洪

青岛科技大学 制药工程系, 山东 青岛 266042

摘要: 目的 建立测定维格列汀原料药中对映异构体的 HPLC 测定方法。方法 采用 Chirapak IC-3 手性色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 3 μm); 流动相: 正己烷-乙醇-三乙胺 (150:750:1); 检测波长: 210 nm; 体积流量: 0.6 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 35 °C。结果 在上述色谱条件下, 维格列汀与其对映异构体的分离度大于 5; 最低定量限为 1.2 μg/mL, 最低检测限为 0.3 μg/mL; 维格列汀和对映异构体在 1.2~30.0 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。对映异构体的加样回收率为 99.67%, RSD 值为 2.1%; 色谱参数变动对对映异构体的检测没有影响。结论 本方法灵敏度高, 重现性好, 适用于维格列汀中对映异构体杂质的检查。

关键词: 维格列汀; 对映异构体; 原料药; 高效液相色谱

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)11-3215-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.11.004

Determination of enantiomer in vildagliptin API by HPLC

WANG Li-hong, LIU Jun-hong

Department of Pharmaceutical Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determination of enantiomer in vildagliptin API. **Methods** Chirapak IC-3 column (250 mm × 4.6 mm, 3 μm) was used. The mobile phase consisted of hexane-ethanol-triethylamine (150:750:1). The detection wavelengths were set at 210 nm. The flow rate was 0.6 mL/min, volume of injection was 20 μL, and temperature of column was set at 35 °C. **Results** The resolution of vildagliptin and enantiomer was good with $R > 5$. The LOQ was 1.2 μg/mL, and the LOD was 0.3 μg/mL. The linear relationship was good in the range of 1.2—30.0 μg/mL. The recovery of enantiomer was 99.67% with RSD 2.1%. The change of chromatographic parameters had no effect on the detection of enantiomer. **Conclusion** This method has high sensitivity and good reproducibility, and is suitable for the detection of enantiomer impurities in vildagliptin.

Key words: vildagliptin; enantiomer; API; HPLC

维格列汀是一种高效的、可逆的特异性二肽基肽酶-4 (DPP-4) 抑制剂, 通过与 DPP-4 结合形成 DPP-4 复合物而抑制该酶的活性^[1]。给药后能够迅速完全抑制 DPP-4 的活性, 使空腹和餐后内源性 GLP-1 和 GIP 含量升高, 进而降低血糖^[2]。维格列汀由诺华公司研发并于 2007 年 9 月由欧盟委员会批准上市, 商品名为佳维乐^[3]。维格列汀是手性药物, 分子中含有 1 个手性中心, 其临床有效构型为 S 构型, 其对映异构体为 R 构型, 见图 1。根据合成工艺, 该手性中心由合成起始原料 L-脯氨酸或 L-脯氨酸引入, 因此, 原料的对映异构体会引入成品维格列汀的异构体杂质。为了保证与药品制剂关联的原料药的安全性和有效性, 开发维格列汀原料药中

对映异构体的检测方法并对其进行方法学验证可为维格列汀的质量控制提供更为准确的方法学指导。文献中未见有关维格列汀对映异构体检测方法的报道, 只见有维格列汀中间体对映异构体检测方法的报道^[4]。本研究通过正相手性色谱法测定维格列汀原料药中维格列汀对映异构体, 并对该检测方法进行了验证。

1 仪器与试剂

岛津高效液相色谱仪, N2000 色谱工作站; 电子分析天平。维格列汀原料药 (实验室合成, 质量分数均大于 99.1%, 批号 B180311、B180318、B180326); 维格列汀对照品 (质量分数 99.8%, 由原料药精制而成); 维格列汀对映异构体对照品 (质

收稿日期: 2019-06-11

作者简介: 王丽红, 女, 博士研究生, 主要从事新药研发工作。E-mail: wanglihong1230@163.com

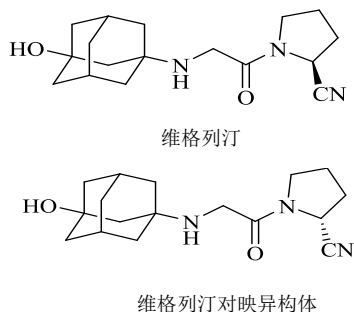


图1 维格列汀及其对映异构体的结构式

Fig. 1 Structure of vildagliptin and its enantiomer

量分数 98.7%，实验室合成)；正己烷、乙醇、三乙胺均为色谱纯，其余试剂均为分析纯；实验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Chirapak IC-3 手性色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 3 μm)；流动相：正己烷-乙醇-三乙胺 (150:750:1)；检测波长: 210 nm；体积流量: 0.6 mL/min；进样量: 20 μL；柱温: 35 °C。

2.2 溶液的配制

2.2.1 供试品溶液的制备 称取 30 mg 维格列汀样品，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，用无水乙醇溶解并稀释至刻度，得 3.0 mg/mL 的溶液。

2.2.2 对映异构体对照品溶液的制备 称取 30 mg 对映异构体对照品，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，用无水乙醇溶解并稀释至刻度，得 3.0 mg/mL 溶液。

2.2.3 维格列汀对照溶液的制备 称取 30 mg 维格列汀对照品，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，用无水乙醇溶解并稀释至刻度，得 3.0 mg/mL 溶液。

2.2.4 系统适用性溶液的制备 分别准确移取对映异构体对照溶液和维格列汀对照溶液各 1.0 mL，置于 200 mL 量瓶中，用无水乙醇稀释至刻度，得质量分数均为 15 μg/mL 的系统适用性溶液。

2.3 系统适用性试验

取系统适用性溶液进样测定，记录色谱图，结果见图 2。对映异构体、维格列汀的分离度大于 5，符合要求。连续进样 6 次，维格列汀峰和异构体杂质峰峰面积、出峰时间的 RSD 值均小于 2.0%

2.4 专属性试验

分别进样空白溶液、系统适用性溶液和供试品溶液，记录色谱图，见图 3。结果表明，溶剂在对映异构体杂质出峰处没有干扰，维格列汀与其对映异构体完全分离，符合要求。

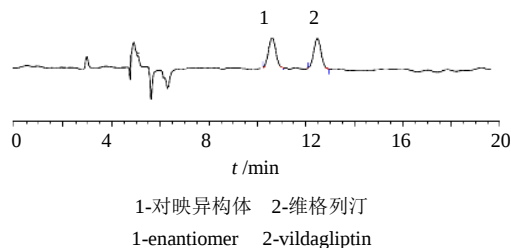


图2 系统适用性试验色谱图

Fig. 2 Chromatogram of system suitability test

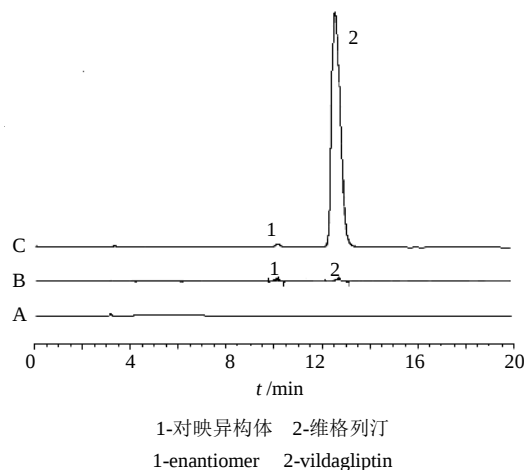


图3 空白溶液(A)、系统适用性溶液(B)和维格列汀原料药溶液(C)的HPLC图谱

Fig. 3 HPLC Chromatograms of blank solution (A), suitability test solution (B), and vildagliptin API (C)

2.5 检测限和定量限考察

精密量取对映异构体对照溶液，按倍比稀释法稀释，对稀释成不同质量浓度的对映异构体溶液进样测定。当峰高约为基线噪音的 3 倍时测得最低检测限为 0.3 μg/mL，相当于样品质量浓度的 0.01%；当峰高约为基线噪音的 10 倍时测得最低定量限为 1.2 μg/mL，相当于样品质量浓度的 0.04%。

2.6 线性关系和范围考察

分别精密量取维格列汀对照溶液和对映异构体对照溶液 0.04、0.12、0.4、0.6、1.0 mL 分别置于 100 mL 量瓶中，用无水乙醇稀释至刻度，摇匀制得质量浓度分别为 1.2、3.6、12、18、30 μg/mL 的溶液。分别进样测定，记录色谱图。以质量浓度对峰面积进行线性回归，得维格列汀的线性方程 $A = 0.1598C + 0.0143$, $r = 0.9997$ ；对映异构体的线性方程为 $A = 0.1324C + 0.0293$, $r = 0.9998$ 。结果表明维格列汀和对映异构体在 1.2~30.0 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 重复性试验

取批号 B180311 的维格列汀原料药样品 6 份, 平行配制供试品溶液, 进样分析, 测得样品中对映异构体质量分数的 RSD 值为 1.3%。

2.8 中间精密度试验

在不同日期, 由另一名测试人员重新配制 6 份维格列汀供试品溶液 (批号 B180311), 进样分析, 结果 6 份样品中对映异构体质量分数的 RSD 值为 1.4%, 12 份样品 (包括 6 份重复性测试样品) 的对映异构体质量分数的 RSD 值为 1.7%。

2.9 准确度-加样回收率试验

精密称取 30 mg 批号 B180311 维格列汀原料药样品 9 份, 置于 10 mL 量瓶中, 加适量无水乙醇溶解, 再准确加入 15 μ g/mL 对映异构体对照溶液 0.8、1.0、1.2 mL, 摇匀, 加无水乙醇至刻度, 每个质量浓度平行 3 份, 进样测定。由 (测定值-原有值)/添加值 $\times$ 100%计算加样回收率。结果对映异构体的加样回收率为 99.67%, RSD 值为 2.1%。

2.10 稳定性试验

取维格列汀供试品 (批号 B180311) 1 份, 室温放置, 分别在 0、1、2、4、6、8、12、24 h 后取样测定, 结果对映异构体质量分数的 RSD 值为 1.5%, 说明测试溶液室温放置 24 h 内稳定。

2.11 耐用性试验

通过改变流动相体积流量、柱温和流动相乙醇比例考察测定条件发生微小变动对结果的影响。当流动相体积流量为 0.5、0.6、0.7 mL/min 时, 分离度分别为 5.72、5.32、4.97; 当柱温为 33、35、37 $^{\circ}$ C 时, 分离度分别为 5.24、5.29、5.39; 当流动相乙醇体积分数为 78%、80%、82% 时, 分离度分别为 5.59、5.28、5.33。结果表明, 测定条件发生微小变动对对映异构体的检测没有影响, 方法耐用性良好。

2.12 样品中对映异构体测定结果

取 3 批维格列汀样品 (B180311、B180318、B180326), 制备供试品溶液, 分别进样分析, 计算对映异构体杂质的质量分数, 结果见表 1。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

对维格列汀及其对映异构体对照品溶液在 190~400 nm 波长进行扫描。最终选择维格列汀与其对映异构体均有最大吸收波长 210 nm 进行检测。

表 1 维格列汀原料药中对映异构体的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Results of enantiomer in vildagliptin API ($n=3$)

批号	对映异构体/%
B180311	0.052
B180318	0.054
B180326	0.055

3.2 流动相的选择

Chirapak IC-3 为多糖衍生物正相手性色谱柱, 通常选用正己烷与乙醇为流动相体系。在实验过程中, 通过调整正己烷-乙醇的比例, 使维格列汀与其对映异构体之间能达到分离要求。碱性改性剂三乙胺的加入可使色谱峰的保留行为、分离度和柱效显著改善。通过筛选, 得出以正己烷-乙醇-三乙胺 (150:750:1) 为流动相时分离条件最佳, 可使维格列汀与其对映异构体在较短时间内达到基线分离。经考察, 色谱条件在一定范围内上下波动时, 其系统适用性结果均符合要求。

3.3 其他测定条件的选择

优化流动相流速、柱温、进样量等测定条件, 结果表明, 流动相体积流量为 0.6 mL/min、柱温为 35 $^{\circ}$ C、进样量为 20 μ L 时, 维格列汀与其对映异构体的分离度较好。

本实验建立了手性高效液相色谱法测定维格列汀原料药中对映异构体杂质的方法, 并对该方法进行了方法学验证, 结果证明该方法专属性强, 灵敏度高, 选择性好, 适用于维格列汀对映异构体杂质的检测。

参考文献

- [1] Ishii M, Shibata R, Kondo K, et al. Vildagliptin stimulates endothelial cell network formation and ischemia-induced revascularization via an endothelial nitric-oxide synthase-dependent mechanism [J]. *J Bio Chem*, 2014, 289(39): 27235-27245.
- [2] Keating G M. Vildagliptin: a review of its use in type 2 diabetes mellitus [J]. *Drugs*, 2014, 74(5): 587-610.
- [3] Croxtall J D, Keam S J. Vildagliptin: a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus [J]. *Drugs*, 2008, 68(26): 2387-2409.
- [4] 栗伟娜, 胡佳, 翟梦宇, 等. 手性色谱柱测定维格列汀中间体对映异构体 [J]. *河北科技大学学报*, 2017, 38(3): 249-254.