

文章编号: 1674-2869(2018)03-0250-04

# 两种列汀类药物在壳聚糖手性固定相上的拆分

龚凡, 陈伟\*

武汉工程大学化学与环境工程学院, 湖北 武汉 430205

**摘要:** 基于壳聚糖-二(3-氯-4-甲基苯基氨基甲酸酯)-(环丙基甲酰胺)涂敷型手性色谱柱, 在高效液相色谱的正相分离模式下, 以维格列汀和磷酸西他列汀作为拆分对象, 考察了流动相中有机改性剂的种类和比例、碱性改性剂的种类和柱温对对映体分离的影响, 建立了这2种手性对映体拆分的方法。最终维格列汀和磷酸西他列汀手性对映体分别在  $V(\text{异丙醇}):V(\text{正己烷}):V(\text{二乙胺})=80:20:0.1$  和  $V(\text{乙醇}):V(\text{正己烷}):V(\text{二乙胺})=60:40:0.1$  为流动相, 流速为  $0.5 \text{ mL/min}$  的色谱分离条件下, 两者获得分离度分别为 4.74 和 6.41, 结果对手性对映体的有效拆分具有一定的参考价值。

**关键词:** 高效液相色谱; 手性固定相; 对映体分离; 维格列汀; 磷酸西他列汀

**中图分类号:** TQ031.3      **文献标识码:** A      **doi:** 10.3969/j.issn.1674-2869.2018.03.003

## Enantioseparation of Two Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors on Chitosan Derivatives Based Chiral Stationary Phase

GONG Fan, CHEN Wei\*

School of Chemistry and Environmental Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China

**Abstract:** A method was successfully established for the chiral separation of the enantiomers of vildagliptin and sitagliptin phosphate monohydrate by high performance liquid chromatography (HPLC). Chitosan bis(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)-(cyclopropylformylamide) was utilized as chiral selector in the column. The effects of the type and ratio of organic modifiers and the alkaline modifiers in the mobile phase, as well as the column temperature on the enantioseparation were investigated. By using the mixture of  $V(\text{isopropanol}):V(n\text{-hexane}):V(\text{diethylamine})(80/20/0.1)$  for vildagliptin, and  $V(\text{ethanol}):V(n\text{-hexane}):V(\text{diethylamine})(60/40/0.1)$  for sitagliptin phosphate monohydrate as the mobile phase at a flow rate of  $0.5 \text{ mL/min}$ , the resolutions of 4.74 and 6.41 were achieved respectively, which can be reference to the efficient enantiomer separation.

**Keywords:** high performance liquid chromatography; chiral stationary phase; enantiomer separation; vildagliptin; sitagliptin phosphate monohydrate

维格列汀(vildagliptin)与磷酸西他列汀(sitagliptin phosphate monohydrate)(结构见图1)同属IV型二肽基肽酶抑制剂,均为2型糖尿病治疗药物。维格列汀和磷酸西他列汀在临床上均以单一对映体的形式使用<sup>[1-2]</sup>。因此,用高效液相色谱建立一种拆分维格列汀和磷酸西他列汀对映体的分

析方法具有重要意义。Rao等<sup>[3]</sup>人在正相和极性有机相模式下用四种多糖衍生物手性色谱柱研究了维格列汀的手性分离,发现其在涂覆型色谱柱(Chiralcel OD和Chiralcel OJ)上无法识别,仅在键合型Chiralpak IC柱上得到较好分离( $R_s=4.0$ )。Reddy<sup>[4]</sup>和Ramesh<sup>[5]</sup>分别在正相和反相色谱条件

收稿日期: 2018-02-07

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究项目(D20161505)

作者简介: 龚凡, 硕士研究生。E-mail: 1162318073@qq.com

\*通讯作者: 陈伟, 博士, 副教授, 硕士研究生导师。E-mail: wchen@wit.edu.cn

引文格式: 龚凡, 陈伟. 两种列汀类药物在壳聚糖手性固定相上的拆分[J]. 武汉工程大学学报, 2018, 40(3): 250-253, 258.

下用涂覆型多糖手性柱(Chiralcel OD和Chiralpak AD)研究了磷酸西他列汀对映体的拆分,Mone等<sup>[6]</sup>则在正相条件下用键合型色谱柱(Chiralpak IC-3)较好的实现了对磷酸西他列汀的手性分离( $R_s=3.38$ );Kazsoki等<sup>[7]</sup>和Sohajda等<sup>[8]</sup>用环糊精衍生物手性选择剂,分别研究了维格列汀和磷酸西他列汀的对映体分离条件。而Nageswara<sup>[9]</sup>采用柱前衍生化液相色谱法在 $C_{18}$ 柱上以荧光检测器测定了西他列汀对映体。在这些研究中,多以商品化的多糖类手性固定相(chiral stationary phase, CSP)拆分这两个对映体,且在键合型CSP上分离效果优于涂覆型CSP。而近年来壳聚糖衍生物CSP引起了人们广泛的关注,这类固定相也表现出优秀的手性识别能力<sup>[10-11]</sup>,并具有良好的有机溶剂耐受性<sup>[12]</sup>,是一类极具应用潜力的CSP。

采用壳聚糖CSP拆分维格列汀和磷酸西他列汀对映体尚未见文献报道。本文采用涂覆型壳聚糖-二(3-氯-4-甲基苯基氨基甲酸酯)-(环丙基甲酰胺)手性固定相<sup>[13]</sup>在正相模式下对维格列汀和磷酸西他列汀进行对映体分离,考察有机改性剂种类和比例、碱性改性剂种类和柱温对对映体分离的影响,并对手性识别机理进行了初步的探讨。

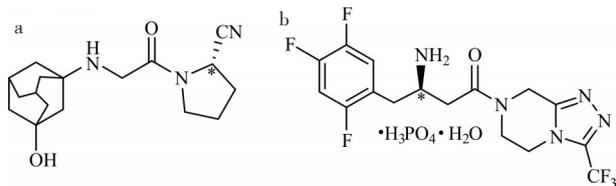


图1 (a)维格列汀和(b)磷酸西他列汀的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of (a) vildagliptin and (b) sitagliptin phosphate monohydrate

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Alltech 1666 色谱柱填充泵(美国 Alltech 公司);250 mm×4.6 mm 不锈钢空色谱柱(英国 Hypesil);Waters 高效液相色谱仪系统(包括 600E 泵、717plus 自动进样器、柱温箱、996 二级管阵列检测器、Empower 色谱工作站)(美国 Waters 公司)。维格列汀和磷酸西他列汀购自浙江华海药业股份有限公司;流动相购自国药集团化学试剂有限公司;二乙胺、乙醇胺和三乙胺购自国药集团化学试剂有限公司。硅胶(粒径 5  $\mu\text{m}$ , 孔径 100 nm)购自日本 Daiso 公司;壳聚糖-二(3-氯-4-甲基苯基氨基甲酸酯)-(环丙基甲酰胺)由本课题组制备。

### 1.2 色谱条件

按文献<sup>[13]</sup>制备了壳聚糖-二(3-氯-4-甲基苯基氨基甲酸酯)-(环丙基甲酰胺)手性柱。流动相的组成见文中,所有流动相均经 0.2  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤,并超声脱气。流速为 0.5 mL/min;柱温为 25  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量为 10  $\mu\text{L}$ ;死时间由 1,3,5-三叔丁基苯测定。维格列汀和磷酸西他列汀分别按照异构体质量比例 3:2 配置,分别溶于乙醇和甲醇中形成 1 mg/mL 样品溶液。测试样品均经 0.2  $\mu\text{m}$  微孔膜过滤。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相中有机改性剂对手性分离的影响

考察了流动相中醇的种类和比例对维格列汀和磷酸西他列汀手性分离行为的影响,其分离结果示于表 1。由表可见,在相同量的醇作为有机改性剂情况下,异丙醇有利于维格列汀分离,而乙醇有利于磷酸西他列汀分离。这可能由于异丙醇和乙醇的体积大小、形成氢键的能力、极性、空间立体结构以及浓度等多种因素有关<sup>[14]</sup>。乙醇的极性大于异丙醇,更易与固定相形成氢键作用,从而减弱了维格列汀与固定相之间的氢键作用力,故保留减弱,选择性减弱<sup>[15]</sup>。而磷酸西他列汀分子结构中含有苯环,除了与固定相间存在氢键作用外,还存在和固定相上高分子之间产生  $\pi$ - $\pi$  作用<sup>[16]</sup>,增强了对映体选择性。这说明了磷酸西他列汀手性识别过程中  $\pi$ - $\pi$  作用起主要作用。随着醇含量的逐渐升高,分析物的保留逐渐减弱,分离效果逐渐减弱,呈现规律性的变化,即使在 100% 醇中,维格列汀和磷酸西他列汀对映体仍可以实现手性拆分。图 2 为这两种手性药物分离典型色谱图。

### 2.2 流动相中碱性改性剂对手性分离的影响

在合适的有机改性剂和最佳比例基础上,以  $V(\text{乙醇}):V(\text{正己烷})=60:40$  为最佳条件,分别加入不同种类的碱性改性剂考察其对手性分离的影响,结果见表 2。从表中分离结果来看,流动相中分别加入 4 种不同碱性改性剂对维格列汀的分离基本没有影响;而在分离磷酸西他列汀过程中加入 4 种碱性改性剂,保留时间减小,分离度显著增大,且明显改善拖尾现象。碱性改性剂均能促进磷酸西他列汀对映体的手性拆分,它们能有效抑制手性药物与固定相手性选择点之间的非手性作用,从而改善对映体峰形,提高手性药物的分离选择性<sup>[17]</sup>。

对比四种碱性改性剂效果,可以看出,当加入三乙胺时,维格列汀对映体的分离度最大,而磷酸

表1 流动相中有机改性剂对手性分离的影响

Tab. 1 Influence of organic modifiers in mobile phase on enantioseparation

流动相的组成和比例	维格列汀				磷酸西他列汀				
	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$	
V(乙醇):V(正己烷):V(二乙胺)	100/0/0.1	0.59	—	1.00	—	0.58	0.88	1.50	2.50
	80/20/0.1	0.87	1.04	1.20	1.43	0.89	1.45	1.64	3.35
	60/40/0.1	1.55	2.06	1.33	2.58	1.44	2.52	1.75	4.93
	40/60/0.1	3.27	4.66	1.42	3.88	3.22	5.93	1.84	6.41
V(异丙醇):V(正己烷):V(二乙胺)	100/0/0.1	1.44	2.13	1.48	2.25	1.81	2.58	1.43	1.82
	80/20/0.1	2.16	3.60	1.67	3.71	2.44	3.69	1.51	2.56
	60/40/0.1	3.63	6.46	1.78	4.74	3.71	5.90	1.59	3.66
	40/60/0.1	—	—	—	—	—	—	—	—

注:流速为0.5 mL/min;柱温:25 °C;“—”代表无明显信号峰

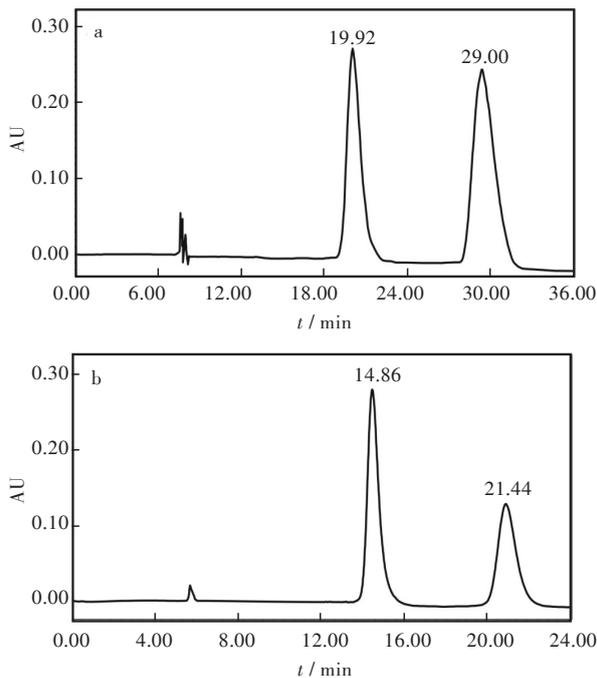


图2 对映体分离色谱图:(a)维格列汀和(b)磷酸西他列汀  
Fig. 2 Enantioseparation chromatograms of (a) vildagliptin and (b) sitagliptin phosphate monohydrate

注:流动相:(a)中V(异丙醇):V(正己烷):V(二乙胺)=80/20/0.1);  
(b)中V(乙醇):V(正己烷):V(二乙胺)(60/40/0.1)

西他列汀对映体的分离度最小,其原因可能与碱性改性剂结构有关。这四种碱性改性剂结构不同,其中,三乙胺的氮原子上没有氢,只可作氢键受体。根据氢键相互作用互补匹配,即氢键供体对应氢键受体<sup>[18]</sup>,三乙胺和维格列汀手性中心附近不能形成氢键,导致三乙胺作改性剂时,维格列汀对映体的分离度最大;而三乙胺只能和磷酸西他列汀手性中心附近产生氢键作用,导致三乙胺作改性剂时,磷酸西他列汀对映体的分离度最小。

表2 流动相中碱性改性剂对手性分离的影响

Tab. 2 Influences of alkaline modifiers in mobile phase on enantioseparation

手性药物	碱性改性剂	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$
维格列汀	不加碱性改性剂	1.61	2.14	1.33	2.50
	二乙胺0.1%	1.55	2.06	1.33	2.58
	乙醇胺0.1%	1.48	1.93	1.31	2.46
	乙醇胺0.1%	1.47	1.96	1.33	2.67
	三乙胺0.1%	1.48	1.99	1.34	3.10
磷酸西他列汀	不加碱性改性剂	2.21	3.35	1.52	2.66
	二乙胺0.1%	1.44	2.52	1.75	4.93
	二乙胺0.1%	1.53	2.70	1.76	4.82
	乙醇胺0.1%	1.45	2.54	1.75	4.81
	三乙胺0.1%	1.61	2.68	1.66	4.33

注:流速为0.5 mL/min;柱温:25 °C;流动相:V(乙醇):V(正己烷)(60/40)

### 2.3 柱温对手性分离的影响

柱温的变化不仅影响对映体在固定相上吸附平衡,影响分离度,而且还可能影响对映体的洗脱顺序<sup>[19]</sup>,柱温是色谱分离的一个重要参数。因此,在20 °C ~ 40 °C范围内,以乙醇-正己烷-二乙胺(60/40/0.1, v/v/v)为条件,研究了维格列汀和磷酸西他列汀对映体的拆分为行为。

温度对手性对映体分离因子 $\alpha$ 的影响可以用下式表示<sup>[18]</sup>:

$$\ln \alpha = -\Delta(\Delta H^\circ)/RT + \Delta(\Delta S^\circ)/R$$

式中, $R$ 是气体常数; $T$ 是绝对温度; $\Delta(\Delta H^\circ)$ 、 $\Delta(\Delta S^\circ)$ 分别代表对映体在两相间分配的焓变和熵变之差。如果对映体与固定相之间的相互作用在一定的温度范围内不发生变化,则该对映体分离因子的对数( $\ln \alpha$ )对 $1/T$ 作图,可得到直线的斜率为 $-\Delta(\Delta H^\circ)/R$ ,截矩为 $\Delta(\Delta S^\circ)/R$ ,由此可以计算出

对映体的焓变之差 $\Delta(\Delta H^\theta)$ 和熵变之差 $\Delta(\Delta S^\theta)$ 。

维格列汀和磷酸西他列汀对映体在20℃~40℃范围内 $\ln\alpha$ 对 $1/T$ 关系如图3所示,二者对映异构体的 $\ln\alpha$ 对 $1/T$ 均呈线性关系,其回归系数均大于0.99,由此可计算出其对映体的 $\Delta(\Delta H^\theta)$ 和 $\Delta(\Delta S^\theta)$ (如表3所示)。维格列汀对映体的 $\Delta(\Delta H^\theta)$ 和 $\Delta(\Delta S^\theta)$ 均为正值,说明其手性拆分过程为熵驱动,升高温度更有利于其分离;磷酸西他列汀对映体的 $\Delta(\Delta H^\theta)$ 和 $\Delta(\Delta S^\theta)$ 均为负值,说明其手性拆分过程为焓驱动,低温更有利于其分离。

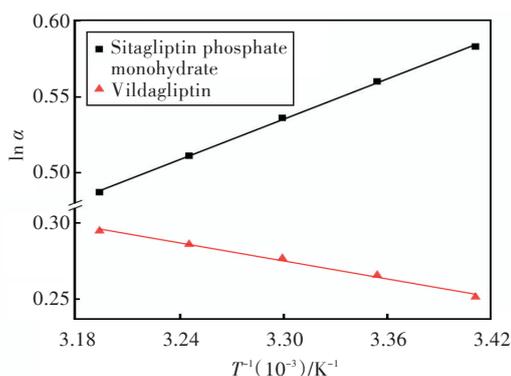


图3 磷酸西他列汀和维格列汀的 $\ln\alpha$ 对 $1/T$ 关系图

Fig. 3 Plots of  $\ln\alpha$  of sitagliptin phosphate monohydrate and vildagliptin versus  $1/T$

表3 维格列汀和磷酸西他列汀的 $\Delta(\Delta H^\theta)$ 和 $\Delta(\Delta S^\theta)$

Tab. 3 The  $\Delta(\Delta H^\theta)$  and  $\Delta(\Delta S^\theta)$  values for vildagliptin and sitagliptin phosphate monohydrate

手性药物	$\Delta(\Delta H^\theta)/(kJ/mol)$	$\Delta(\Delta S^\theta)/(J/mol/K)$	$t/^\circ C$
维格列汀	1.64	7.71	20~40
磷酸西他列汀	-3.67	-7.68	20~40

### 3 结语

在正相模式下,用壳聚糖-二(3-氯-4-甲基苯基氨基甲酸酯)-(环丙基甲酰胺)手性固定相分别开展了维格列汀和磷酸西他列汀对映体分离研究,并考察了流动相中有机改性剂种类和比例、碱性改性剂种类和柱温对对映体分离的影响。结果表明,两种药物的手性分离结果明显优于文献所报道的淀粉类和纤维素类手性固定相的结果;建立了手性固定相高效液相色谱拆分维格列汀和磷酸西他列汀对映体的方法;发现以异丙醇作有机改性剂更有利于维格列汀对映体分离,其手性拆分过程为熵驱动,升温更有利于其分离;而乙醇做有机改性剂更有利于磷酸西他列汀对映体分离,其手性拆分过程为焓驱动,低温更有利于其分离。

### 参考文献:

- [1] DEROSA G, RAGONESI P D, CARBONE A, et al. Evaluation of the positive effects on insulin-resistance and  $\beta$ -cell measurements of vildagliptin in addition to metformin in type 2 diabetic patients [J]. Pharmacological Research, 2013, 73:20-26.
- [2] HERMAN G A, STEIN P P, THORNBERRY N A, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: focus on sitagliptin [J]. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2007, 81 (5) : 761-767.
- [3] RAO C S N M, REDDY G M, REDDY P P, et al. A validated new chiral LC method for the enantiomeric separation of vildagliptin [J]. Analytical Chemistry, an Indian Journal, 2009, 8(3):371-375.
- [4] MONE M K, JAIN P, KURHADE S, et al. Development and validation of a liquid chromatographic enantiomer separation method for the estimation of (S)-enantiomer in sitagliptin [J]. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2014, 5(6): 2382-2386.
- [5] RAMESH T, RAO P N, SURESH K. Enantiomeric separation of sitagliptin by a validated chiral liquid chromatographic method [J]. Analytical Methods, 2014, 6(1):223-228.
- [6] KAZSOKI A, FEJOS I, SOHAJDA T, et al. Development and validation of a cyclodextrin-modified capillary electrophoresis method for the enantiomeric separation of vildagliptin enantiomers [J]. Electrophoresis, 2016, 37(10):1318-1325.
- [7] REDDY B V R, RAMAN N, KUMAR B S, et al. Chiral separation of sitagliptin phosphate enantiomer by HPLC using amylose based chiral stationary phase [J]. Journal of Pharmacy Research, 2013, 7(6):546-550.
- [8] SOHAJDA T, HU W H, ZENG L L, et al. Evaluation of the interaction between sitagliptin and cyclodextrin derivatives by capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. Electrophoresis, 2011, 32(19):2648-2654.
- [9] NAGESWARA Rao R, SRAVAN B, RAMAKRISHNA K, et al. Precolumn o-phthalaldehyde-N-acetyl-L-cysteine derivatization followed by RP-HPLC separation and fluorescence detection of sitagliptin enantiomers in rat plasma [J]. Chirality, 2013, 25(12):883-889.
- [10] ZHANG L, SHEN J, ZUO W, et al. Synthesis of chitosan 3, 6-diphenylcarbamate-2-urea derivatives and their applications as chiral stationary phases for