

# 手性药物的药理及其 体内对映体的 HPLC 测定

(综述)

浙江医科大学药物分析教研室 曾 苏 沈向忠 刘志强

“手性”系一种化学结构特征,它引起分子的不对称性。国际纯粹与应用化学组织(I-UPAC)公布的命名规则规定:不能与镜象体重合的称为手性分子,有光学活性;反之,能与镜象体重合的称无手性分子,无光学活性。手性分子与其镜象体互不重合,手性异构体偏振光的旋转方向不同,故又称为光学异构体,按其对偏振光的旋转方向不同分为右旋体和左旋体。人体内的酶、受体、载体分子等都是具手性特征的物质。手性药物对映体进入人体,将由体内手性环境作完全不同的分子处理,显示不同的药理、毒理及药代动力学、不良反应等性质。这种立体选择性体现在只有一个对映体(即优对映体)产生期望的生理活性,一般认为外消旋体中 50%为杂质(即劣对映体),后者不但没有期望的活性,而且可能产生意料不到的别的药理或毒理作用。尽管如此,目前手性药物以外消旋体给药的仍占较大的比重。如盐酸美沙酮(仅一个对映体有镇痛作用)、普萘洛尔(一个对映体的 $\beta$ -阻滞作用比另一个对映体强 100 多倍),虽然它们存在显著的药理学不均一性,但药典上还是写着其纯度不低于 98.5%<sup>[1]</sup>,这种错误地表示手性药物的纯度只会带来虚假的自信感。目前对手性药物的研究还未普及,对其药效学、药动学等了解尚未深入。开展手性药物的研究,无疑对这类药物的体内活性、作用和机理的理解,正确引导药物的研制,进行安全有效的治疗有着重要的意义。

## 1 手性药物药理学

1.1 药理/毒理 手性药物除极少数如异丙嗪外,两个对映体的药理/毒理均有显著差异。

1.1.1 两个对映体有性质类似的药理作用,但作用强度有差异。普萘洛尔、噻吗洛尔、美托洛尔等 $\beta$ -阻滞剂,布洛芬、氟比洛芬、酮洛芬等 2-芳基丙酸非甾体抗炎药及其它如华法令、麻黄碱等皆属此类<sup>[2]</sup>。

1.1.2 优、劣对映体之间有竞争性拮抗作用,劣对映体与优对映体竞争结合受体以拮抗其药理作用。如异丙肾上腺素左旋体是 $\alpha_1$ -兴奋剂,而其右旋体则是竞争性拮抗剂。甲丙哌吩左旋体能竞争性拮抗左旋体的阿片样兴奋作用,所以外消旋体药物的活性未必是各个对映体活性的总和。

1.1.3 两个对映体的药理性质完全相反,如巴比妥类 DMBB [5-(1,3-二甲丁基)-5-乙基巴比妥]和 MPPB [N-甲基-5-丙基-5-苯基巴比妥],左旋体都具麻醉活性,但右旋体却起纯促惊厥作用<sup>[3]</sup>。长效钙拮抗剂 Niguldipine 右旋体为钾通道启开剂,其左旋体却为钾通道阻滞剂<sup>[4]</sup>。

1.1.4 一个对映体起主要治疗作用,而另一个对映体主要产生副作用。氯胺酮目前使用的是其外消旋体,研究表明起安眠镇痛作用的是 S(+ )体,而刺激 CNS 产生兴奋、心理失调等精神症状的副作用却是 R(- )体<sup>[5]</sup>。

抗风湿药青霉胺右旋体无生物毒性,但左旋体毒性强且 Ames 诱变试验呈阳性,有潜在致癌作用。

**1.1.5** 两个对映体都有疗效,主要副作用由其中一个对映体产生。噻吗洛尔的 S、R 体的降眼内压作用相同,但仅 S 体具较强的  $\beta$ -阻滞作用,局部应用以治疗青光眼,可因吸收进入循环而引起支气管收缩,据报道已有 16 例支气管哮喘或其它慢性肺病患者在使用噻吗洛尔眼药水后死亡<sup>[6]</sup>。所以治疗青光眼,R-噻吗洛尔是理想的选择。震惊世界的“反应停事件”,据研究两个对映体有相同镇静作用,但只有 S-反应停具很强的胚胎毒性和致畸作用<sup>[7]</sup>。

**1.1.6** 一个对映体有活性,另一个不具生理活性的对映体可视作不纯物,优对映体的作用是其外消旋体的若干倍。氟喹诺酮类抗生素氧氟沙星,具活性的是 S(-)体(DR-3355),R(+ )体(DR-3354)无活性,体外抗菌试验证实,前者的作用是其外消旋体的 2 倍<sup>[8]</sup>。 $\alpha$ -甲基多巴亦属此类,抗高血压作用来自其 S(-)体。

**1.1.7** 两个对映体都有药理活性,但性质不同。左旋的奎宁是抗疟药,而右旋的奎尼丁是抗心律失常药;右旋丙氧酚具镇痛作用,而左旋丙氧酚却有止咳作用。如以其消旋体给药,二者互为副作用,而以单个对映体给药则都是有效的治疗药。

**1.1.8** 劣对映体拮抗优对映体的副作用。这是一种不常见却很有意义的情况,试验表明,英达克酮(indacrinone)的左旋体有利尿作用,但与通常利尿剂一样可引起尿酸滞留,成为心血管病人的危险因素,其右旋体无利尿作用却有促尿酸排泄作用,可抵消前者的副作用,二者以 1:4 配比给药最佳<sup>[9]</sup>。所以当一对映体能减少另一个对映体的副作用时,可以考虑将二者混合使用,但应选择最佳配比。

**1.2 代谢** 手性药物的立体选择性代谢,主要由与蛋白结合的选择性亲和力和肝酶

催化活性的差别引起。任一代谢途径都有许多同功酶催化,每一种同功酶对两个对映体都有较高的立体选择性,所以代谢差异与药物代谢的酶步骤多寡、及手性中心与酶结合部位的距离(距离越近,立体选择性越大)相关。

**1.2.1** 对映体的代谢速率:多数  $\beta$ -阻滞剂口服后呈现显著的立体选择性首过效应,普萘洛尔“无活性”的 R 对映体首过代谢率高于具活性的 S 体;而静脉给予其外消旋体,两个对映体的血-时过程几乎完全相同。临床试验证实,两种给药方式在总血浓相同时口服的疗效比静注高 2~3 倍<sup>[10]</sup>。维拉帕米的立体选择性首过效应也很明显,活性型左旋体的口服生物利用度比右旋体小 2~3 倍。另外,如果外消旋体通过氧化进行代谢,则可因氧化代谢受遗传基因控制存在不同的遗传表型,而导致显著的立体化学选择性。美托洛尔的代谢与异喹啉氧化表型有很好的相关性,泛代谢体对活性低的 R 体能较快的代谢消除,而乏代谢体对两个对映体的代谢大致相同,这在临床上就意味着美托洛尔总血浓度相同时,在乏代谢体内可见较强的  $\beta$ -阻滞作用。美芬妥因的两个对映体,仅 S 体的羟基化存在个体差异:在乏代谢体内,两个对映体的血-时过程相同,但在乏代谢者体内,S 体的血浓就低得多,因此美芬妥因 8 小时尿液中的 S:R 浓度比可作为判定受试者羟化表型的指征<sup>[11]</sup>。

**1.2.2** 对映体的代谢途径:对映体的代谢不仅存在速率差异,而且由于酶结合部位的立体选择性竞争,生成的主要代谢物也不尽相同。在正常人体内,美替妥因(methetoin)左旋体的苯环对位迅速发生羟化,而右旋体则缓慢进行 N-脱甲基,生成 5-苯基-5-乙基乙内酰胺(PEH)<sup>[12]</sup>。附表列举了一些手性药物的立体选择性途径。

**1.2.3** 酶转化:非手性药物在体内酶催化作用下,可在分子中引入一个手性中心,立体选

附表 手性药物代谢的立体选择性途径

药物	立体选择性途径
甲基炔诺酮 <sup>[13]</sup>	16 $\alpha$ -、16 $\beta$ -和 1 $\beta$ -羟化(-); A 环氧化、2 $\alpha$ -羟化(+)
去甲苯妥因 <sup>[14]</sup>	脱甲基(R);芳环羟化(S)
普萘洛尔 <sup>[15]</sup>	环氧化(+);葡萄糖醛酸化(-)
环己比妥 <sup>[16]</sup>	3'-羟化生成 $\alpha$ -OH(-), $\beta$ -OH(+)
美托洛尔 <sup>[17]</sup>	0-脱甲基(+); $\alpha$ -羟化(-)
Bufuralol <sup>[18]</sup>	1'-羟化(+);4-羟化(-)
Aminoglutethimide (AG) <sup>[19]</sup>	乙酰化(S),原形排泄(R)

择性生成一种对映体,见图 1。安定和去甲安

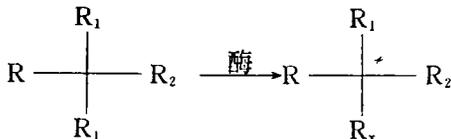


图 1 手性中心的引入机制 (\* 手性碳原子)

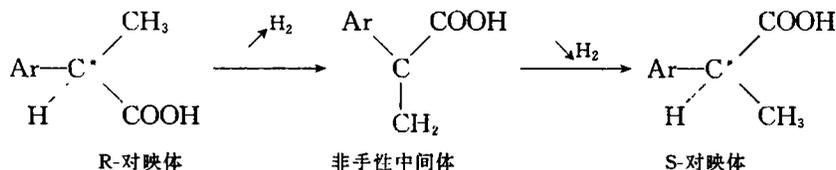


图 2 2-芳基丙酸类药物的手性转换 (\* 手性碳原子)

综上所述,鉴于对映体间存在的药效和药动学等差异,在评价手性药物及研究新药时,有必要研究对映体在体内的活性及命运,以立体选择性方法研究生物体液中每个对映体的浓度,确定血药浓度与临床疗效间的关系,分别评价每个对映体的药理、毒理、代谢、药代动力学、生物利用度和不良反应等。同样,在临床治疗药物监测(TDM)中,当服用外消旋体药物时,也应分别定量测定对映体的血药浓度,作出剂量调整。

## 2 生物体内对映体的 HPLC 分析

了解和掌握手性药物在体内的动态,需要有一种能拆分和定量测定生物体液中单个对映体的方法。因对映体除对偏振光的旋转方向不同外,理化性质几乎完全相同,所以拆分测定是一项困难和复杂的工作。尤其在生物样品中,手性药物及其代谢物的含量极微,

定,可被氧化酶在 C<sub>3</sub> 位羟化而形成手性中心,优先生成 S(-)-N-methylloxazepam 和 S(-)去甲羟安定;多巴胺被多巴胺羟化酶催化在侧链引入羟基生成 R(-)去甲肾上腺素;苯丙酮可还原生成(-)苯丙醇。所以,代谢过程中如存在酮基和不饱和键,经还原、羟化、N-烷化等反应均可能产生手性代谢物。另外,一个对映体在体内可转化成另一个对映体,如 2-芳基丙酸类抗炎药,其活性低的 R 体在体内可广泛转化成 S 体,转化机理见图 2,其中参与作用的酶系尚未清楚<sup>[20]</sup>。这种转化在一定程度上与动物种类、病人机体条件如肝功能等有关。转化现象的存在同时也表明,外消旋体的体内代谢决非其二个对映体代谢的简单相加。

且与大量内源性成分相混杂,难度则更大。旋光仪和圆二色散仪等经典仪器,由于灵敏度低,不能用于作体内微量分析。80 年代开始用 HPLC 作此项研究,十余年来已取得较大进展,主要有直接法和间接法两类,直接法是对映体不经柱前手性衍生化而直接作分离测定,又分为手性固定相法(CSP)、手性流动相法(CMP)和手性检测器法(CD)。

**2.1 手性固定相法** 连接在固定相上的手性识别剂,与药物对映体反应形成非对映复合物,然后作分离测定。分离的程度和洗脱顺序取决于复合物的相对强度。CSP 主要类型如下。

**2.1.1 蛋白质键合相:**蛋白质含手性氨基酸,具较大的分子量和复杂的结构,可提供许多不同的手性结合部位,利用蛋白质分子与对映体之间的立体选择性结合能将对映体分离出来。主要有酸糖蛋白(AGP)、牛血清白

蛋白(BSA)、卵粘蛋白(OVM)等,本类色谱柱可按通常反相方式操作,流动相的pH、离子强度、有机改性剂的极性和浓度、温度等对于对映体的保留时间和立体选择性有较大的影响。

**2.1.2 手性聚合物相:**它以纤维素、淀粉等高分子衍生物作为手性吸附材料,通常称为Chiralcel柱。该类手性识别机制主要通过氢键、偶极-偶极作用及被拆物进入纤维素网腔立体环境,尤适用于含苯基、羰基、磺酰基、羟基等药物的分离。流动相宜用非极性溶剂(如正己烷),也可用极性溶剂(如甲醇、乙醇),但不能使用氯化溶剂、乙腈、丙酮等溶剂。

**2.1.3 环糊精相:**主要指 $\beta$ -环糊精键合相(Cyclobond), $\beta$ -环糊精由7个葡萄糖单位通过 $\alpha(1,4)$ 连接构成,为环状低聚糖。每个葡萄糖分子有5个手性碳原子,故一分子环糊精具35个手性中心。分子呈桶状,内部是葡萄糖甙高密度电子云形成的疏水阱,内腔直径约0.8 nm,边缘排列着许多指针样的羟基,具高度立体特异性,各类水溶性与水不溶性手性药物均能与之形成非对映复合物,所以环糊精相能有效地用于分离对映体。流动相与普通反相系统相似,可用含水乙腈或甲醇洗脱。

**2.1.4 Pirkle相:**系根据Dalglish三点作用模式(实现手性分离,须在手性药物与CSP之间至少存在三种相互作用)设计的手性柱。将某些手性氨基如R或S苯甘氨酸等与3,5-二硝基苯甲酰氯反应后,以离子或共价键键合到氨基硅胶上获得。流动相采用正相方式,通常以正己烷加少量醇类改性剂,有时还可加入少量乙腈以改善分离。

**2.2 手性流动相法:**在流动相中加入某种手性流动相添加剂(CMPA),在常规的正相或反相非手性柱上进行对映体分离。分离的机理可能有①对映体与CMPA形成非对映复合物,后者在固定相和流动相之间分配特性不同,②CMPA吸附在固定相上形成动态的

CSP发挥作用,常用的CMPA如下。

**2.2.1 手性离子对试剂:**将常规离子对试剂的离子对试剂换成手性离子对试剂即是。适用于有机酸或碱等亲水性对映体的拆分。(+) -10樟脑磺酸、(+)双亚丁基洒石酸、N-苯甲酰甘氨酸脯氨酸等适用于氨基醇类如烯丙洛尔等的拆分,而奎尼丁、奎宁、辛可尼丁等对具极性基团的酸类,如普萘生、莨菪酸、布洛芬具有良好的拆分效果。Karlsson等<sup>[21]</sup>以N-苯甲酰甘氨酸脯氨酸为CMPA,分离测定了血浆中R、S-普萘洛尔。

**2.2.2 配位手性试剂:**主要是L-氨基酸及其衍生物和具光学活性的胺或酰胺,它们在流动相中分别与对映体及过渡金属离子如 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 形成两个非对映配位复合物,由于稳定性或物理性质的不同而达到拆分。L-脯氨酸、L-苯甘氨酸为常用的配位手性试剂。保留时间与疏水性有关。本法已用于氨基酸、巴比妥类、乙内酰脲、羧酸等手性药物对映体的测定。曾苏等<sup>[22]</sup>以L-苯甘氨酸- $\text{Cu}^{2+}$ 为流动相添加剂,研究了氧氟沙星两个对映体在人体内的代谢。

**2.2.3 环糊精类:** $\beta$ -环糊精对紫外检测无干扰,且价格较低,是理想的手性添加剂。Eto等<sup>[23]</sup>用本法测定了数种巴比妥类和乙内酰脲类药物在生物体液中的对映体浓度。

**2.3 手性检测器法** 本法适用于各类化合物,专属性好,无需与吸收波长相匹配,在手性药物的测定上具有很大的应用前景,特点是与紫外或差示折光检测器联用而不需经手性分离,以测定手性药物的对映体,机理为:如设计对映体旋光度为 $\alpha$ 、浓度为C,则有:

$$(+) \text{对映体} \quad \alpha = [\alpha] \cdot L \cdot C \cdot X \quad (1)$$

$$(-) \text{对映体} \quad \alpha = -[\alpha] \cdot L \cdot C \cdot (1-X) \quad (2)$$

式中: $L$ -检测池长度, $X$ 为(+)对映体摩尔分数,( $1-X$ )(-)对映体摩尔分数。

如果样品中(+)对映体浓度高于(-)体,旋光度将为 $\alpha = [\alpha] \cdot L \cdot C \cdot (2X-1)$ 。故检测器给出的信号不仅与浓度有关,且与

对映体比例有关。当二者比例趋于相近时, 色谱峰越来越小; 当二者比例一致 ( $X=0.5$ ) 时, 旋光度为零, 色谱峰消失; 当 (+) 对映体浓度低于 (-) 体时, 测得的旋光度将为  $\alpha = -[\alpha] \cdot L \cdot C \cdot (1-2X)$ , 色谱峰为倒峰。如串联其它检测器如紫外(或差示折光)测定手性药物的总浓度为  $C$ , 则有:

$$\alpha \propto C \cdot (2X-1) \quad (3)$$

$$A \propto C \quad (4)$$

(3)式与(4)式相比:  $\frac{\alpha}{A} \propto 2X-1$

所以将标准品(S)与未知样品(u)的检测响应作比较, 可得如下关系:

$$\frac{(\alpha/A)_s}{(\alpha/A)_u} = \frac{2X_s-1}{2X_u-1} \quad (5)$$

因此应用手性检测器可不必改动原来的液相色谱系统, 仅用所用的检测器后再串联一个旋光检测器即可, 使用双通道色谱数据处理机可同时得到两个检测器的结果, 通过计算机将两个对映体浓度直接计算出来。Dicesare 等<sup>[24]</sup>首先应用本法测定了青霉素, 另有人以本法测定了尿液中 R(-) 与 S(+) 布洛芬。

**2.4 间接法即手性试剂衍生化法(CDR),** 通过外消旋体与光学纯试剂反应, 导入第二个手性中心, 形成一对非对映异构体, 后者相互间无镜象关系, 理化性质不同, 可用常规的正相或反相 HPLC 测定<sup>[25-27]</sup>。但本法要求手性药物具活泼反应基团, 且此反应基越靠近手性中心分离效果越好, 同时两个对映体的衍生化速度应相同, 否则会引起非对映体与原对映体的组成产生差异。另外要求手性衍生化试剂光学纯度高。目前已有百余种 CDR 供选择。通常含氨基的手性药物可采用手性异氰酸酯或异硫氰酸酯, 含羟基的可用(-)樟脑酰氯, (R,R)-O,O-二乙酰酒石酸酐, 含羰

基的可用(+)- $\alpha$ -三氟甲基苄基肼, 含羧基的可用手性有机胺类等 CDR。

### 参 考 文 献

1. USP(XXII), 1990, 839, 1176
2. Ariene EJ, et al. *Stereochemistry and Biological Activity of Drugs*. Blackwell, Oxford, 1983, 11~32
3. Ticku MK, et al. *Eur J Pharmacol*, 1985, 112(1) : 1
4. Robertsen DW, et al. *J Med Chem*, 1990, 33(6) : 1529
5. White P, et al. *Anesthesiology*, 1980, 52(3) : 231
6. Fraunfelder FT, et al. *N Engl J Med*, 1984, 311(10) : 1441
7. Blaschke VG, et al. *Drug Res*, 1979, 29(12) : 1640
8. Mitscher LA, et al. *J Med Chem*, 1987, 30(12) : 2283
9. Tobert JA, et al. *Clin Pharmacol Ther*, 1981, 29(3) : 344
10. Vogelgesang B, et al. *Br J Clin Pharmacol*, 1984, 18(6) : 733
11. Jacqz E, et al. *Clin Pharmacol Ther*, 1986, 39(5) : 646
12. Kupfer A, et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 1984, 230(1) : 28
13. Sisenmine SF, et al. *Drug Metab Dispos*, 1975, 3(2) : 180
14. Bourgeois B F, et al. *Epilepsia*, 1986, 27(3) : 412
15. Walle T. *Drug Metab Dispos*, 1985, 13(2) : 279
16. Miyanol K, et al. *Drug Metab Dispos*, 1980, 8(1) : 104
17. Mayer UA, et al. *Xenobiotica*, 1986, 16(3) : 449
18. Dayer P, et al. *Eur J Clin Pharmacol*, 1986, 31(2) : 313
19. Aboul-Enein HY, et al. *Biomed Chromatogr*, 1991, 5(2) : 74
20. Lan, et al. *Drug Metab Dispos*, 1976, 4(2) : 330
21. Karlsson A, et al. *J Chromatogr*, 1989, 494(1) : 157
22. 曾 苏, 等. *中国药理学和毒理学杂志*, 待发表
23. Eto S, et al. *J Chromatogr Biomed Appl*, 1992, 579(2) : 253
24. Dicesare JL, et al. *J Chromatogr*, 1982, 251(1) : 1
25. 曾 苏. *现代应用药学*, 1993, 10(5) : 4
26. 曾 苏, 等. *国外医药合成药、生化药、制剂分册*, 1994, 15(1) : 54
27. 曾 苏, 等. *药学报*, 1994, 29(3) : 223

(1993年5月24日收稿, 1994年3月11日修回)