

# 体内药物手性拆分方法研究进展

王倩如

(南京市妇幼保健院,江苏 南京 210004)

**摘要:**基于国内外关于手性拆分的文献资料,综述了近年来手性药物的拆分方法在体内药物分析中的进展情况,介绍了超临界流体色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法、毛细管电泳法在手性药物拆分上的应用及其发展方向。

**关键词:**手性药物;拆分;高效液相色谱法;毛细管电泳法

中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1673-2197(2010)05-0149-03

手性药物的立体结构与其生物活性有着密切的关系,通常一种对映体具有良好的生物活性,另一种活性很弱或没有活性,甚至还有毒副作用。因此,研究对映体的拆分,尤其是体内药物代谢过程中对映体的拆分,具有非常重要意义。目前,手性药物的拆分方法主要有化学拆分法、结晶法、生物拆分法和色谱法等,其中色谱法由于简便快捷,分离效果好而被认为是体内药物手性异构体拆分最有效的方法。本研究基于国内外关于手性拆分的文献资料,介绍了超临界流体色谱法(SFC)、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)和毛细管色谱法(CE)在体内药物手性拆分中的应用,分述如下。

## 1 超临界流体色谱拆分法(SFC)

SFC具有高效、快速、操作条件易于变换等特点,且在手性分离方面与高效液相色谱、气相色谱相互补充,在光学纯药物的制备方面有独到的优越性。该方法是以超临界流体做流动相的色谱过程,超临界流体是指超过了物质的

临界温度和临界压力的流体,它既具有与气体相似的粘度,又兼有与液体密度相近的特性,是处于气态和液态之间的中间状态的物质<sup>[1]</sup>,因此它具有传质速率快、密度、介电常数等物理性质对温度和压力变化敏感等优点。SFC系统既可使用HPLC检测器,也可使用GC检测器,如氢火焰离子化检测器(FID)、紫外检测器(UV)、电子捕获监测器(ECD)等,并容易与质谱傅立叶变换红外光谱等相连接,操作简便。超临界流体的粘度近于气体,过程阻力小,采用细长色谱柱可以增加柱效。

## 2 气相色谱手性拆分法(GC)

气相色谱是较早用来分离对映体的一种方法,具有分离速度快、分离效率高、选择性好、样品用量少和检测灵敏度高且操作简单、费用低等优点<sup>[2]</sup>。GC法分离对映体的方法主要有间接拆分法和直接拆分法。

### 2.1 间接拆分法

间接拆分法又称手性试剂衍生化法(Chiral derivatiza-

- [7] MOTOKAZU IWATA,TERUKAZU TANAKA.Selection of the solvent system for the preparation of poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing tumor necrosis factor- $\alpha$  [J].Inter-national Journal of Pharmaceutics,1998,160(2):145-156.
- [8] 孙爱平.喷雾干燥法制备聚乳酸载药微球及其药物释放行为研究[D].天津:天津大学材料科学与工程学院.
- [9] MARYELLEN S,DAVID E,PANLA W.Effect of protein molecular weight on release from micron-sized PIGA microspheres [J].J Controlled Release,2001,76(6):297-311.

- [10] FWULONG M,SHINSHING S,YIMEI L.Chintin/PLGA blend microsphere as a biodegradable drug delivery system;a new delivery system for protein [J].Biomaterials,2003 (11):5023-5036.
- [11] HUO DONGJIE,DENG SHUHAI,LI LINGBING,et al.Studies on the poly (lactic-co-glycolic)acid microspheres of cisplatin for lungtargeting [J]. International Jo-urnal of Pharmaceutics, 2005,289(1-2):63-67.

(责任编辑:陈涌涛)

收稿日期:2010-02-16

作者简介:王倩如(1984-),女,南京市妇幼保健院药师。

tion reagent, CDR)。这种方法先通过共价结合作用,在对映体分子中引入另一个手性中心,形成非对映体后,再用非手性 GC 拆分。如章立等<sup>[3]</sup>采用柱前衍生化法测定了大鼠肝微粒体中安非他明对映体,以氯仿为提取溶剂, N-三氟乙酰基-脯氨酸为手性衍生化试剂,三乙胺为催化剂,将安非他明转变成

相应的酰胺类非对映异构体对,用常规非手性毛细管柱气相色谱、程序升温法分离了大鼠肝微粒体中 R-和 S-安非他明,在 5~250 $\mu\text{g/mL}$  范围内线性良好,方法检测限为 12.5ng,定量限为 125ng,重现性和精密度均良好。实验表明,空白微粒体样品对安非他明对映体及内标无干扰。

## 2.2 直接拆分法

直接拆分法又称手性固定相法 (Chiral stationary phases, CSP), 这种方法通过使用一个具有光学活性的环境,称之为手性固定相,来提供拆分所需要的手性中心。它与 CDR 法的区别是不需要柱前手性衍生化反应。常见的手性固定相有羧基-双氨基酸酯类和环糊精及其衍生物类。如匡唐永等<sup>[4]</sup>采用手性毛细管气相色谱法测定了人尿中美芬妥英对映体,仪器为常用的气相色谱仪、数据处理机,配以氮磷检测器(NPD),色谱柱为手性交联石英毛细管色谱柱,涂渍 OV-225-缬氨酸-t-丁基酰胺,以二氯甲烷为提取剂,最低检测浓度小于 50ng $\cdot\text{mL}^{-1}$ ,两种对映体的线性关系良好,回收率和精密度也较好。姚彤炜等<sup>[5]</sup>采用相似的方法测定了人尿中美芬妥英对映体,但将氮磷检测器改为常见的氢火焰检测器(FID),虽然 FID 在选择性和灵敏度方面不及 NPD,但更具普及、经济、实用和方便的优点,为了提高 FID 的检测灵敏度和选择性,可以加大尿液取样量,并用酸、碱洗涤有机溶剂提取液,以除去酸、碱性杂质。尿液用二氯乙烷提取,测得各对映体的最低检测限为 60 $\mu\text{g/L}$ ,在 115~690 $\mu\text{g/L}$  浓度范围内,标准曲线呈良好的线性关系,回收率和精密度也较好。

## 3 毛细管电泳法 (CE)

CE 为近几十年发展起来的一种高效分离技术,它以高压电场为驱动力,以毛细管为分离通道,依据样品中各组分间电荷及质量的差异所造成的样品在电场中分配行为的差异而实现分离。毛细管区带电泳(CZE)与胶束电动毛细管(MECC)是其应用最广泛的两种模式。CE 用于手性药物的拆分具有高效、快速、简便的特点,在拆分对映体方面已得到很快发展。共有 6 种分离模式,但无论采用哪种模式,在手性拆分中都必须加入各种不同的手性选择剂才能达到分离目的。常用手性选择剂有环糊精、冠醚、手性混合胶束、手性纤维素、蛋白、糖类、大环抗生素等。其中,环糊精(CDs)及其衍生物应用最为广泛。如李晓海等<sup>[6]</sup>以羟丙基- $\beta$ -环糊精(HP- $\beta$ -CD)为手性选择剂,实现了叶菰碱

的高效毛细管电泳手性分离,且对其在大鼠体内立体选择性代谢进行了研究,测定条件为:分离介质 32mmol/L HP- $\beta$ -CD 的 Tris  $\text{H}_3\text{PO}_4$  缓冲液 (40mmol/L,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  调至 pH=6.0);分离电压 15kV,柱温 16 $^{\circ}\text{C}$ ,压力进样 6s,检测波长 254nm;大鼠各生物样品碱化后乙酸乙酯萃取。测定条件下 SE 基本达到基线分离,大鼠生物样品测定不受内源及代谢物干扰。大鼠 ipSE 经胆汁、尿和粪排泄以 d 型为主,具有立体选择性。Takayarra 等利用七(2,3-二乙酰基-6-磷酸基)- $\beta$ -CD 在 pH 为 1.7 的 1mol/L 甲酸溶液中分离了尿素、麻黄素和甲基麻黄素 6 种手性药物。

## 4 高效液相色谱法 (HPLC)

HPLC 分离药物对映体的方法可分为间接法和直接法两大类。

### 4.1 间接拆分法

间接拆分法又称手性试剂衍生化法,虽需进行衍生化反应,但生成的非对映体异构体,物化性质不同,可用常规的正相或反相法分离,因此被不少学者采用。如 Peccinini 等<sup>[7]</sup>使用(-)-薄荷基氯甲酸酯作为衍生化试剂,建立了血浆和尿液中卡维诺尔的 HPLC 法。采用  $\text{C}_{18}$  柱为固定相,荧光检测器检测。血浆中的 S(-)-卡维诺尔的定量限为 0.25ng/mL,血浆中的 R(+)-卡维诺尔和尿液中的两种对映体的定量限均为 0.5ng/mL。间接拆分法分离效果好,分离条件简便,但需要使用高纯度的手性衍生化试剂,且该试剂对两种对映体的衍生化效率应相同,故应用范围有限<sup>[8]</sup>。

### 4.2 直接拆分法

直接法应用范围较广,其优点是在分离前不需要进行衍生化反应,而且对分离机制的解释显示出优越性,因此得到迅速发展,成为手性拆分最有效的工具之一。直接法分离手性药物对映体可分为手性流动相添加剂法(CMPA)和手性固定相法(CSP)两法<sup>[9]</sup>。

(1)手性流动相添加剂法(CMPA)。CMPA 是指在普通色谱流动相中加入手性添加剂(CA),CA 与对映体溶质通过静电引力和氢键等非共价键结合方式,形成可逆的不同稳定性的非对映体配合物,从而实现对映异构体分离的方法。常见的 CA 有金属配合物、环糊精、蛋白质、手性离子对试剂等。其中金属配合物添加剂色谱法系通过溶解在流动相中的配合物而实现的。如以 L-苯丙氨酸为配合剂,以  $\text{Cu}^{2+}$  为配合离子,使用 RP-HPLC 非手性固定相(ODS 柱)测定人尿中 R-和 S-氧氟沙星对映体。该法机理可用手性配合剂、金属离子和手性药物对映体之间形成三元配合物加以解释,在该法中  $\text{Cu}^{2+}$  为最常使用的配位金属离子, L-苯丙氨酸和 L-脯氨酸为常用的配合剂。环糊精添加剂法中最常用的手性添加剂为环糊精,该添加剂独特的立体化学结构使其能够与各种极性、非极性分子以及离子形成包含复合

物。如詹少卿等<sup>[10]</sup>以 $\beta$ -CD为手性流动相添加剂,建立了特布他林对映体血药浓度测定的高效液相色谱手性添加剂法。以Waters Atlantis C<sup>18</sup>色谱柱(4.6mm×150mm,5 $\mu$ m)为固定相,含8.4mmol·L<sup>-1</sup> $\beta$ -CD(作为手性流动相添加剂)和0.05mmol·L<sup>-1</sup>醋酸铵(pH3.0)的水-乙腈(95:5)为流动相,流速为0.6mL·min<sup>-1</sup>,采用荧光器检测,Ex=280nm,Em=320nm。结果表明,特布他林两对映体在0.25~25mg·L<sup>-1</sup>的浓度范围内线性良好。

(2)手性固定相法(CSP)。手性固定相色谱法是指固定相与对映体溶质通过氢键、 $\pi$ - $\pi$ 键、偶-偶极、包含络合物、配位交换、疏水和极性相互作用的偶合,形成可逆的不同稳定性的非对映体配合物,从而实现对映异构体分离的方法。常见的手性固定相有选择键合相(Pirkle手性固定相)、纤维素和多糖衍生物、环糊精、蛋白质键合相和合成聚合物与分子烙印手性固定相。如刘文等<sup>[11]</sup>使用万古霉素手性柱(CHRIOBIOTIC VTM)(250mm×4.6mm,5 $\mu$ m),建立了同时测定人血浆中文拉法新(VEN)及其主要代谢产物氧去甲基文拉法新(ODV)对映体的浓度的反相高效液相色谱-质谱法。以甲醇-醋酸铵缓冲液(30mmol·L<sup>-1</sup>)(15:85,pH6.0)为流动相对两化合物进行手性拆分,流速设为1.0mL·min<sup>-1</sup>,柱后分流比为3:1。采用质谱电喷雾电离正源(ESI)将样品离子化,选择性离子监测(SIM)准分子离子峰。结果表明,在所建立的色谱条件下,VEN与ODV得到很好的手性分离。S-(+)与R-(-)-VEN在5.0~400ng·mL<sup>-1</sup>,S-(+)与R-(-)-ODV在4.0~300ng·mL<sup>-1</sup>范围内线性关系良好,相关系数均大于0.9991;萃取回收率均大于76%;方法回收率均大于92%;最低检测浓度:S-(+)与R-(-)-VEN为1.0ng·mL<sup>-1</sup>,S-(+)与R-(-)-ODV 1.5ng·mL<sup>-1</sup>;日内及日间RSD均小于9%。Mohamde等<sup>[12]</sup>使用万古霉素手性柱(Chirobiotic V),建立了同时测定血浆和药物制剂中丁哌洛尔对映体含量的HPLC法。采用甲醇-冰醋酸-三乙胺(100:0.015:0.010,v/v/v)为流动相,流速为0.5mL·min<sup>-1</sup>,在254nm处检测。每个对映体在5~500ng·mL<sup>-1</sup>血药浓度范围内,线性良好,血浆中S-(-)-和R-(+)丁哌洛尔平均回收率在97%~102%范围内。该法适合于丁哌洛尔处方的手性质量控制。

## 5 结语

体内药物对映异构体除需对映体拆分外,它的极限浓度、要求快速分析等特点也限制了很多方法的应用。SFC具有工业应用前景,但由于条件要求高,在体内药物手性分析中,目前应用不是很广泛;GC法对于药物的沸点要求严格,而且非对映体制备也很困难,故GC法仅适用于有限的一些药物。HPLC法目前仍是较常用的方法,但手性固定相的成本太高,手性流动相添加剂使色谱条件复杂

化。二者均要求对生物样品进行较好的前处理。HPLC法在准确度、精密度、检测限、重现性等方面均优于GC或HPLC,已被广泛采用,但CE法在非对映异构体制备和痕量分析中有其技术缺陷,适用的手性固定相不多。

仪器联用技术和超临界流体色谱等的发展给我们提供了新的思路,相信在不久的将来,CE的迅猛发展,各种手性选择剂的开发,联合最新的仪器分析技术,必将为对映体的分离开辟广阔的空间。

## 参考文献:

- [1] 朱自强.超临界流体技术原理和应用[M].北京:化学工业出版社,2000:3-4.
- [2] 朱京科,石祖芸.气相色谱法定量分析3,4-二氯硝基苯[J].精细石油化工,2002(2):59-60.
- [3] 章立,姚彤炜,曾苏.柱前手性衍生化-毛细管气相色谱测定大鼠肝微粒体中安非他明对映体[J].药物分析杂志,1998,18(5):291.
- [4] 匡唐永,张家美,邹安庆,等.手性毛细管色谱法测定人尿中美芬妥英光学异构体含量的方法学研究[J].药学学报,1993,28(4):307.
- [5] 姚彤炜,曾苏,阮宏强,等.手性毛细管色谱法测定人尿中美芬妥英对映体的含量及其在代谢分型中的应用[J].色谱,1998,16(5):408.
- [6] 李晓海,张金兰,周同惠.叶获碱的高效毛细管电泳手性分离及其大鼠体内立体选择性代谢研究[J].药学学报,2002,37(1):50.
- [7] ROSANGELA G,PECCININI,VALDECIR F,et al.Stereoselective Analysis of Carvedilol in human Plasma and Urine using HPLC after Chiral Derivatization[J].Biopharm Drug Dispos,2008,29:280-288.
- [8] SALAMI M, JIRA T,OTTO HH.Capillary electrophoretic separation of enantiomers of amino acids and amino acid derivatives using crown ether and cyclodextrin[J].Pharmazie,2005,60(3):181-185.
- [9] GRIREAN G,CONG X,LEBRILA CB.Chiral analy SeS of peptides by ion/molecule reactions[J].Int J Mass Spectrom,2004,234(1-3):71-77.
- [10] 詹少卿,何振伟,张冬梅,陈桂平.高效液相色谱手性添加剂法测定特布他林对映体血药浓度[J].药学与临床研究,2008,16(6):460-462.
- [11] 刘文,王峰,李焕德.HPLC-MS/ESI法测定人血浆中文拉法新及其代谢产物氧去甲基文拉法新对映体血药浓度[J].药物分析杂志,2008,28(2):211-215.
- [12] MOHAMED M,HEFNAWY,MAHA A,et al.HPLC separation technique for analysis of bupropion enantiomers in plasma and pharmaceutical formulations using a vancomycin chiral stationary phase and UV detection[J].Journal of Chromatography B,2007,856:328-336.

(责任编辑:陈涌涛)