

手性色谱学与手性药物分析

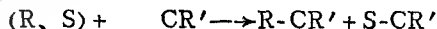
曾 苏* (浙江医科大学药物分析教研室, 杭州 310006)

自1848年 Pasteur 发现酒石酸光学异构体后, 光学活性化合物已引起极大的注意。1987年美国药典药名字典收录的2050种药物中约一半含有一个不对称中心。在生物体内的手性环境中, 药物的吸收、分布、代谢和排泄都牵涉到与酶、受体、载体、核酸和多糖的反应, 这些生物大分子都具有立体特征结构。也就是说对映体分子应具有不同的生理活性, 这种差异不仅表现在药效学而且还影响到药动力学模式^[1]。美国 FDA 和欧共体等已要求在申报具手性结构的新药时, 需要有各对映体的药理、毒理和药动力学资料^[2]。对映体的理化性质在非手性条件下完全相同, 为了分离对映体, 手性色谱学应运而生迅速发展。其主要应用有: 生物样品中对映体的分析; 绝对映体药物中光学异构体杂质的检查; 不对称合成起始物和中间体光学纯度监测和消旋体制备水平的拆分。常用手性色谱学方法分为三

类:

1 手性试剂衍生化法(Chiral Reagent Derivatization, CRD)

这种方法也称做非对映体衍生物色谱法。原理是: 光学活性药物与手性试剂于柱前衍生化, 形成的共价结合非对映体对与固定相之间的键合力如偶极-偶极、电荷转移、氢键、疏水性不等, 产生差速迁移而被分离。含胺基的手性药物可被衍生化为酰胺、氨基甲酸酯、脲、硫脲和磺酰胺; 含羟基者可衍生化成酯、碳酸酯、氨基甲酸酯; 含羧基者可衍生化为酯和酰胺; 环氧化物衍生成异硫氰酸酯; 烯类衍生成水性铂复合物; 硫醇则衍生成硫酯^[2,3]。



消旋体药物 手性试剂 非对映体衍生物

该法的优点是: 可使用已有的非手性固定相; 花费较少; 选用具强烈发色团或荧光的手性试剂, 可提

* 曾 苏, 男, 34岁。1986年获药物分析学硕士学位。1990年赴美进修, 1992年回浙医大药物分析教研室。

高检测能力。其局限性是：手性试剂需有高的光学纯度；各对映体的衍生化速率和平衡常数应一致；衍生化和色谱过程应不发生消旋化；药物需有可被

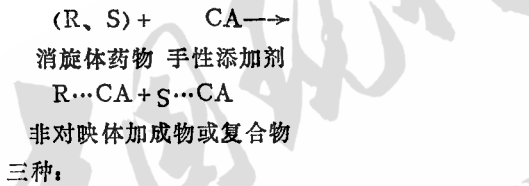
衍生化的基团。一些常用的手性试剂及其应用列于表 1^[16,17]。

表 1 一些用于HPLC和GC的手性衍生化试剂

试 剂	方 法	应 用
α-甲苯胺	HPLC、GC	非甾体抗炎药、氨基酸类、醇类、羧酸类
甲氧萘丙酰氯	HPLC	β-阻滞剂、氯(氟)苯氨丁酸
TPC、HPC	HPLC、GC	羟丙替林、β-阻滞剂、苯丙胺类、
N-苯酯苯丙氨酸	HPLC	倍他米松、地塞米松
异氰酸酯类	HPLC、GC	β-阻滞剂、苯丙胺、氟丙氧丙酸、美西律
异硫氰酸酯类	HPLC	氯霉素、甲氧霉素、苯酚多潘、β-阻滞剂、拟肾上腺素药
氯甲酸酯类	HPLC、GC	法华令、β-阻滞剂、氨基酸、芳氧丙醇胺、非甾体抗炎药
OPA/手性硫醇	HPLC	氨基酸类、氨基甲氧丙酸
手性醇类	HPLC、GC	非甾体抗炎药、棉酚

2 手性流动相添加剂法 (Chiral Mobile Phase Additive, CMPA)

将手性试剂加到 LC 流动相中^[15]，与手性药物生成可逆的非对映体复合物，根据复合物的稳定性，在流动相中的溶解性和与固定相的键合力差异，于非手性固定相上分离对映体。主要应用形式有



2.1 配合交换^[2,16]这是分离手性氨基酸、类似氨基酸药物的优良方法，但只有能与过渡金属形成相应配合物的药物才能被分离，常用的金属离子是 Cu²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺等，配合剂有 L-脯氨酸、L-苯丙氨酸等氨基酸。这一方法已用于巴比妥类、氨基酸、乙内酰脲、琥珀酰亚胺、羧酸和氨基醇类药物的分析。

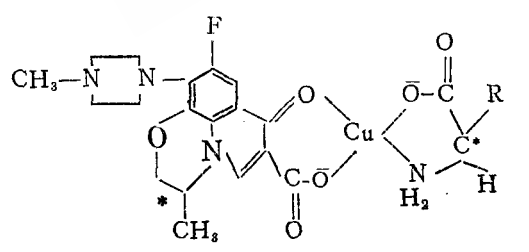
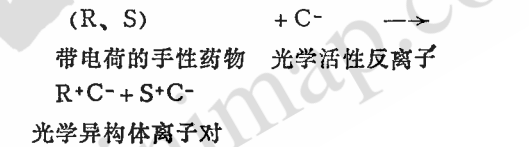


图 1 氧氟沙星-Cu-氨基酸三元配合物示意图

2.2 离子对色谱^[16,17]这是一类用于带电荷对映体分离的 LC。当药物和反离子具有光学活性时，即可形成光学异构体离子对，根据离子对的溶解性和键合力不同而将它们分离。



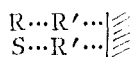
常用的反离子包括：(+) -10-樟脑磺酸、奎宁、奎尼丁、辛可尼丁、(+)-双-正丁基酒石酸盐等，被分离的药物有：氨基酸如烯丙洛尔、羧酸如萘普生和萘苄酸、氨基酸如色氨酸。

2.3 包含色谱^[16,18]环糊精具有立体选择性的环形结构，是环状低聚糖由 d-α-葡萄糖单位通过 1, 4 位连接而成，其内腔是疏水性的，各类水溶性和水不溶性药物均能与之形成非对映体包含物。常用的是 α、β、γ 三种类型及其衍生物。环糊精作为 CMPA 已用于分离 3-甲基苯乙妥因、甲基苯巴比妥、环己巴比妥、扁桃酸、咪唑类药物。

3 手性固定相法 (Chiral Stationary Phase CSP)

将手性试剂化学键合到固定相上与药物对映体反应形成非对映体对复合物，这种固定相称作 CSP。在 CSP 表面所形成的非对映体对，可根据其稳定常数不同而获得分离。





对映体键合到CSP

尽管CSP种类繁多,但其价格昂贵,各种CSP都

有各自的适用范围,有时柱效也欠佳,使用者需根据药物类型和用途选择。主要的CSP及其应用列于表2^[19,24]。

表2 主要色谱手性固定相及其应用

CSP 种类	主要操作模式	键合基团	应用
HPLC			
π -复合物 H-键合	正相	3,5-二硝基苯甲酰- α -苯甘氨酸、N-2-萘缬氨酸、[蔡乙基氨基酸酯- β -环糊精	非甾体抗炎药、 β -阻滞剂、安定类巴比妥类、氨基酸、酰胺类
包含复合	反相	环糊精、衍生化环糊精、手性冠醚	吡啶生物碱、扁桃酸、芳基酰胺、季胺、胺类
配合交换	缓冲溶液加铜盐	脯氨酸、羧基脯氨酸、组氨酸	羧酸、氨基酸、氨基酸类衍生物
蛋白质	缓冲液	人和牛血清白蛋白、 α 酸糖蛋白、卵类粘蛋白	氨基酸、羧酸、酰胺、法华令、氨基酸
聚合物	正相	衍生化纤维素、衍生化多糖、聚异丁烯酸衍生物	胺类、醇、羧酸、氨基酸、酰胺类
GC			
金属复合	CC、PC	N-亚水杨基-2-氨基-1,1-双苯基-1-丙醇/ Cu^{2+} 、双HFB樟脑/ Ni^{2+}	胺类、氨基酸、氨基酸酯、醇类
羧基-双-缬氨酸酯	CC、PC	羧基-双-缬氨酸异丙酯、羧基-双-脯氨酸异丙酯	氨基酸、胺类及其衍生物
胺类及其酯	PC	N-月桂基-缬氨酸酯-缬氨酸月桂酯、双苄基苹果酸(酒石酸)酯	羧酸、胺类、氨基酸酯衍生物
酰胺类	CC	多硅氧烷、N-月桂酰-缬氨酸酰胺	胺类、羧酸、氨基酸酯、醇类、腈类、酰胺
环糊精类	CC	α 、 β 、 γ -环糊精及衍生物	多种药物

*: CC: 手性毛细管柱 PC: 手性填充柱

手性分析方法一般要满足以下条件: 1. 手性衍生化试剂或手性流动相添加剂或CSP, 应易于获得或合成, 并在分析条件下稳定; 2. 对映体分离度应尽量达到基线分离, HPLC 理论塔板数要求在2000/柱以上, 最好在5000/柱以上; 3. 分析结果应有良好的重现性, 对消旋体标准品 $\text{CV} < 1\%$; 药物制剂 $< 2\%$; 对光学纯度为99%的标准对映体或对映体制剂中光学异构体杂质检查可放宽到3%以上; 对生物药物分析则可放得更宽些。手性色谱学中, 无论是间接法(CDR)还是直接法(CMPA、CSP)都有各自的优点和局限性, 它们在药物科学中的应用也是互相补充、各具特色。

参考文献

- Janali F, Mehvar R, Pasutto F M. Enantioselective Aspects of Drug Action and

Disposition, Therapeutic Pitfalls. J Pharm Sci, 1989, 78(9):695.

- Lough WJ. Chiral Liquid Chromatography, New York, Beackie, 1989, 14—101, 185—202.
- Satinder A. Chiral Separations by Liquid Chromatography, Washington DC, American Chemical Society, 1991, 1—140
- Clark CR. Diastereoisomeric determination and analysis of N-(Phenylsulfonyl)-2-phenyl-glycine aldose reductase inhibitors. J Chromatogr Sci, 1990, 28(8):407.
- Huffer M. HRGC resolution of chiral primary alcohol and acid as their diastereomeric 1-phenylethylamides. J Chromatogr, 1990, 519, 263.
- Peyton AL, Carpenter R, Rutkowski K,

- The stereospecific determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by HPLC with fluorescence detection. *Pharm Res*, 1991, 8(12):1528.
- 7 Hermansson J. Rahrh Simultaneous determination of d- and l-propanolol in human plasma by HPLC, *J Chromatogr*, 1980, 221, 109.
- 8 Fitzgerald R L. Stereoselective pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in the rat, *Chirality*, 1990, 2, 241.
- 9 曾苏. GC/MS 测定尿中 MDMA 及代谢物的手性对映体. 杭州: 浙江省第三届色谱学术报告会文集, 1993.18—21.
- 10 Brooks CW Cde WJ. Analytical GC Separation of diastereomeric tertbutylmethoxyphenylsilyl ethers, *J Chromatogr*, 1990, 514, 305.
- 11 Boppann VK. Determination of R and S fenoldopam in plasma, *J Chromatogr*, 1992, 592, 317.
- 12 Aycard M. Determination of R and S. Warfarine in plasma by HPLC using precolum derivatization, *J Liq Chromatogr*, 1992, 15, 2175.
- 13 Hisaka A. Quantification of L-3-(3-hydroxy-4-pivaloyloxyphenyl) alanine by HPLC using OPA/N-acetyl-L-Cysteine derivatization. *J Chromatogr*, 1989, 494, 183.
- 14 Rex W Souter. Chromatographic Sepavations of Stereoisomers, Florida, CRC, 1985, 27—65.
- 15 Duncan JD, Armstrong DW. Chiral mobile phase additives in reversed-phase TLC, *J Planar Chromatogr*, 1990, 3, 65.
- 16 Krstulovic AM. Chiral Separations by HPLC, Chichete, Ellis Horwood Limited, 1989, 107—537.
- 17 Zief M and Crane LJ(Eds). Chromatographic Chiral Separations, New York, Marcel Dekker, 1988, 131—283.
- 18 Rona K. Szabo I. Determination of mephenytoin stereoselective oxidative metabolism in urine by chiral LC employing β -CD as a mobile phase additive. *J Chromatogr*, 1992, 573, 173.
- 19 Armstrong DW. Multimodal chiral stationary phase for LC, (R)- and (S)-naphthyl-carbamate-derivatized β -CD, LC.GC, 1991, 9, 646.
- 20 Chan KY. George RC. Chen TM, et al. Direct enantiomeric separation of terfenadine and its major acid metabolite by HPLC and the lack of stereoselective terfenadine enantiomer biotransformation in man. *J chromatogr*, 1991, 571, 291.
- 21 Tracy TS, Hael SD. Determination of the epimeric composition of ibuprofenyl-COA, *Anal Biochem*, 1991, 195(1), 24.
- 22 Ching CB, Lim BG, Lee EJ, et al. Chromatographic resolution of the chiral isomers of several β -blockers over cellulose tris (3, 5-dimethylphenylcarbate) chiral stationary phase, *chirality*, 1992, 4, 174.
- 23 Bruner F(Ed). The science of chromatography, Nethereands, Elsevier Science Publishers, 1985, 1—42, 111—130.
- 24 Stevenson D and Wilson I D (Eds). Recent Advances in Chiral Separation, New York, Plenum Press, 1990, 24—162.

Chiral Chromatography and Chiral Drug Analysis

Zeng Su

(Zhejiang Medical University Hangzhou 310006)

Abstract With the increasing appreciation that the enantiomers of a chiral drug can differ pharmacokinetically and pharmacodynamically, there is considerable interest in methods for the resolution and quantification of enantiomers. Chiral chromatography is the most developed and widely used technique. The technique was divided into three classes including Chiral Derivatization Reagent (CDR) Chiral Mobile Phase Additive (CMPA) and Chiral Stationary Phase (CSP). Each of the methods available has its limitations, advantages and applications in the chiral drug analysis.

Key words Chiral chromatography Enantiomer Chiral drug analysis

(Original article on page 4)