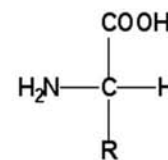
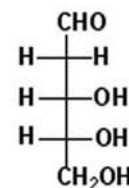
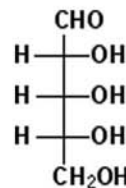
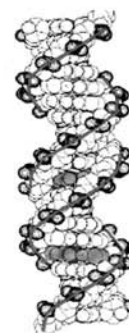


手性药物分析

姚彤炜主讲

手性现象

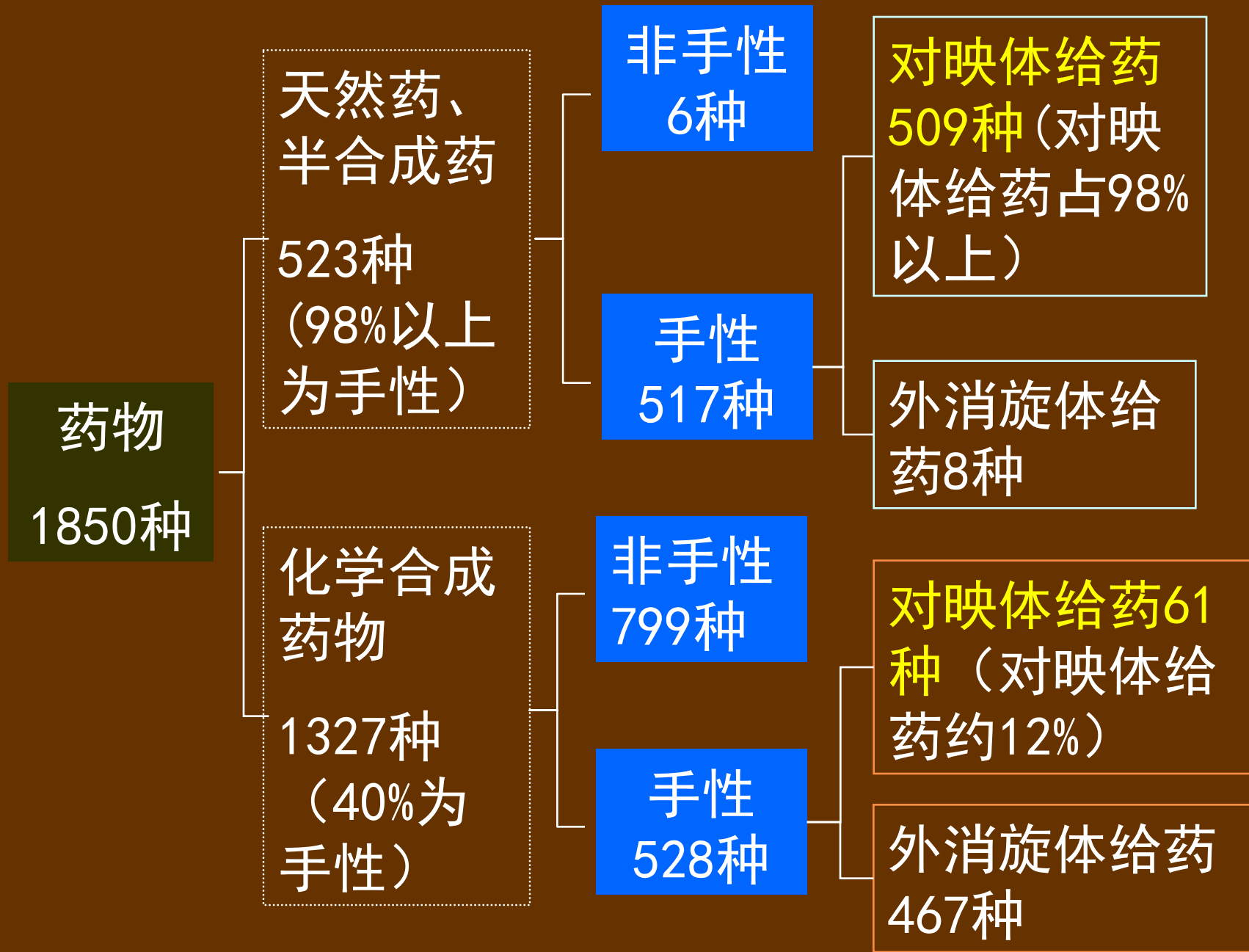
手性是自然界的基本属性之一，手性普遍存在，如攀缓和缠绕植物的茎蔓旋向，海螺的旋向，按照右手螺旋定则，它们的缠绕方向绝大部分都是右旋的。NDA的双螺旋结构是右旋的。组成核酸的核糖和去氧核糖均为左旋的D型糖；组成蛋白质的氨基酸都是L-氨基酸（甘氨酸除外）；



螺旋的左手性

螺旋的右手性

- 手性物质的两个对映体在自然界中的存在量是不同的，有的仅以单一对映体存在。
- 许多天然存在的手性小分子也主要以一种对映体形式存在，这种现象称为**手性优择**（chiral preference）。手性优择使得作为生命活动重要基础物质的生物大分子如核酸、蛋白质、酶等以及受体、离子通道等具有不对称的性质，因此当手性化合物的两个对映体与这些生物大分子作用时，就会显示不同的作用方式，产生不同的效果。



立体异构体

(空间三维排列不同)

对映体
(enantiomer)
不能重叠, 互为镜像



右旋体

左旋体

外消旋体

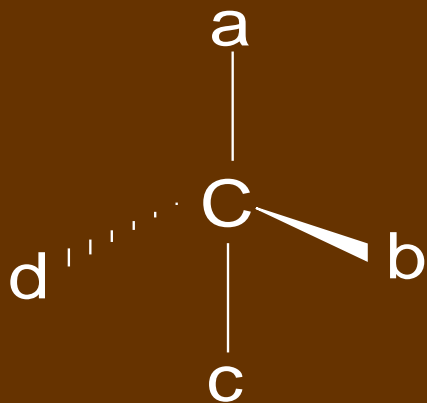
非对映体
(diastereomer)

几何异构体

有光学活性但
无镜像关系的
立体异构体

● 手性药物

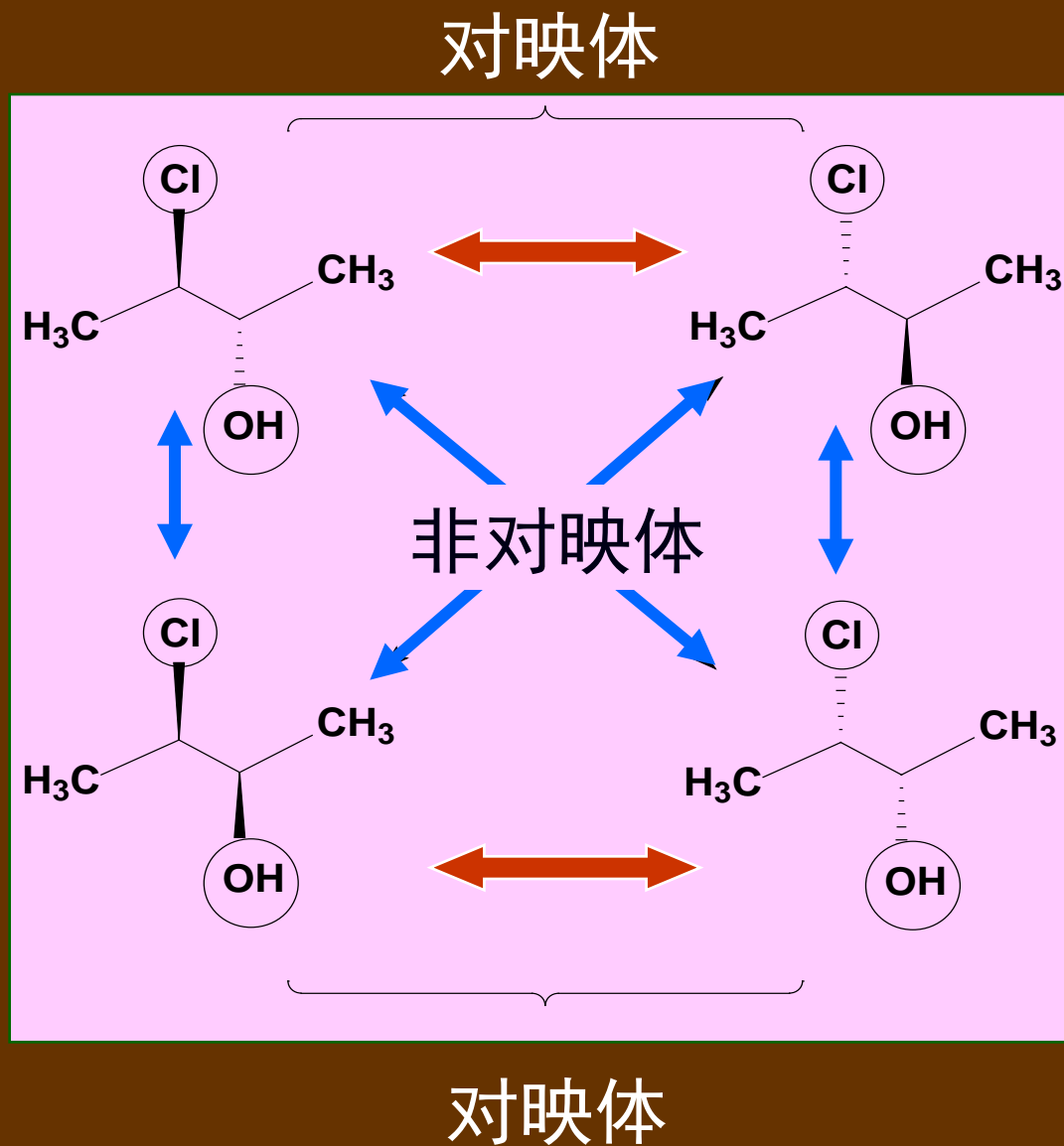
- 当药物分子中碳原子上连接有4个不相同的基团时，该碳原子被称为不对称碳或手性碳（中心），相应的药物称为手性药物（**chiral drug**）。



分子中含有 n 个手性中心，
将产生 2^n 个立体异构体，
 2^{n-1} 对对映体。

如2-氯-3-羟基丁烷有2个手性碳原子，产生4个异构体，其中2对为对映体，4对非对映体。

非对映体



非对映体

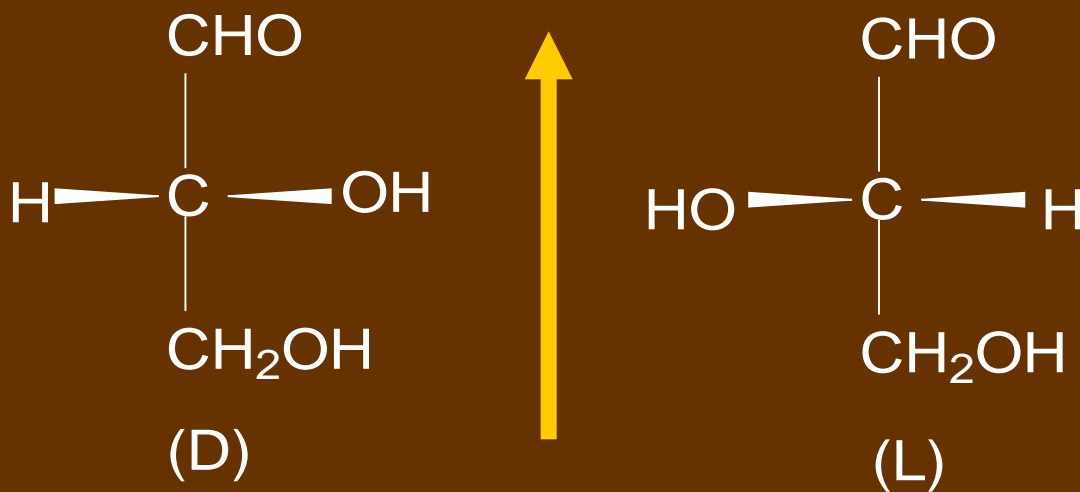
● 手性药物的表示方法

● 右旋体和左旋体

- 右旋体 (dextrorotatory) ——能使偏振光的偏振面按顺时针方向旋转的对映体为右旋体。用 **d**- 或 **(+)**-表示。
- 左旋体 (levorotatory) ——能使偏振光的偏振面按逆时针方向旋转的对映体为左旋体。用 **l**- 或 **(-)**-表示。
- 外消旋体 (racemate) ——由等量右旋体和左旋体构成，无旋光性。用 **(dl)**- 或 **(±)**-表示。
- 上述表示方法较直观，但不能提供空间排列信息。

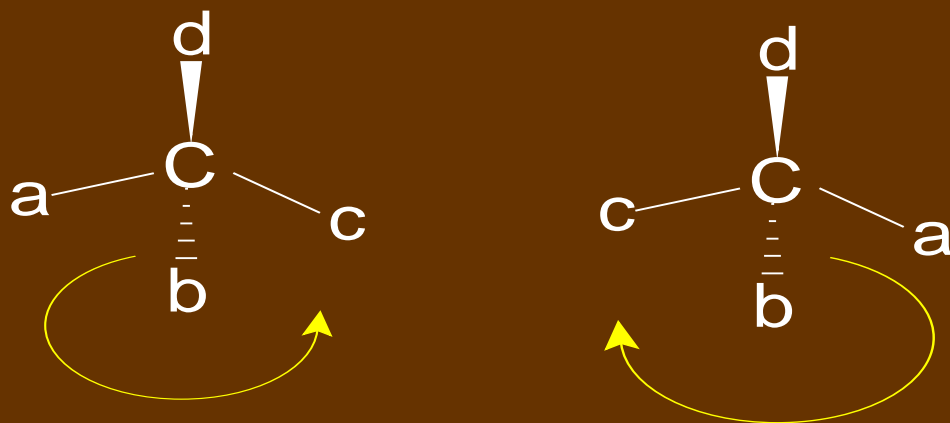
● D和L系统

- 以标准参照物的化学相关性来确定药物的立体构型。在RR' XHC型光学异构体中，按国际命名原则，取其**主链竖向排列**，以氧化态较高或1号碳原子置于上方，照Fisher投影法投影，X在右边的称为D型，反之为L型。D，L与左旋、右旋无关。此法易与前者混肴，目前用得较少。



R和S系统

- 手性中心连接的取代基按原子序数大小依次排列， $a > b > c > d$ ，把d作为手性碳四面体的顶端，a，b，c分别为四面体底部的3个角。



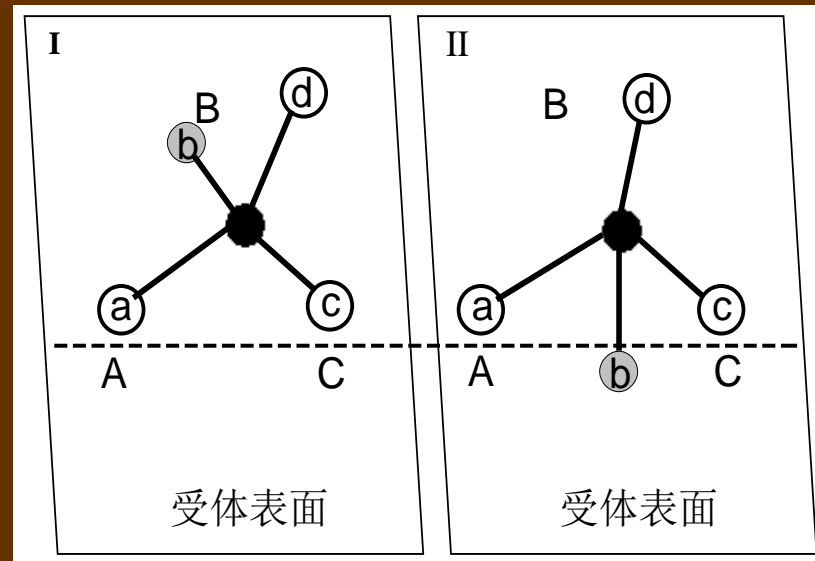
从底部向顶端看，按从大到小顺序：

顺时针排列的为R型 (rectus, 右)

逆时针排列的为S型 (sinister, 左)

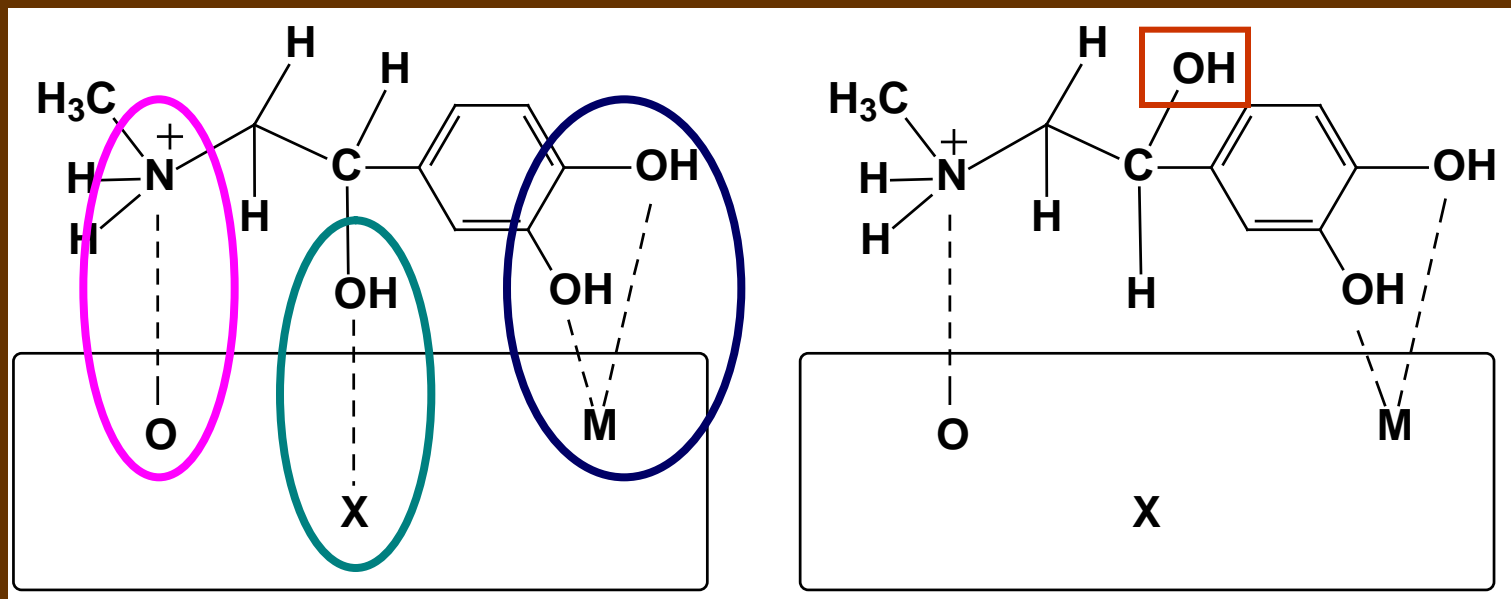
手性识别的三点作用模式

- 由于自然界的手性优择现象，生物大分子如药酶、蛋白质、受体等具有不对称的性质，手性药物的两个对映体在体内显示出药理活性、毒副作用、吸收、分布、代谢、排泄等方面的差异。这种差异源自于药物与受体的相互作用，可用三点作用模式来扼要地描述。



例 肾上腺素与受体间的作用

(1) 肾上腺素分子中的氨基与体液中质子结合成铵离子而带正电荷，与受体上带负电荷的部位产生静电引力；(2) 侧链的羟基与受体上相应基团产生氢键作用；(3) 苯环上的羟基带有弱酸性，与受体上原子产生螯合作用。



天然肾上腺素为R型，表明R构型适合这种受体结构

手性药物对映体间的药理学差异

● 药效学立体选择性

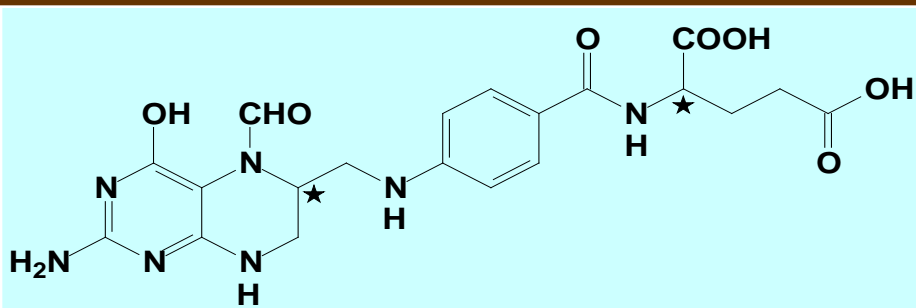
- 对映体药物的药理活性可用亲合力或活性表示：
- 与受体有高亲和力的为**优映体** (eutomer) ；
- 低亲和力的为**劣映体** (distomer)

● 对映体药理作用类型：

1. 竞争拮抗作用
2. 相近或相同作用
3. 一种主要是治疗作用，另一种主要产生副作用，或均有治疗作用，但主要副作用是其中一种产生的
4. 均有治疗作用，但作用不同
5. 一种有活性，另一种无活性或活性很弱
6. 互补作用

● 药物动力学的立体选择性

- 吸收——通过生物膜被动扩散没有立体选择性，但通过载体转运系统的吸收有立体选择性

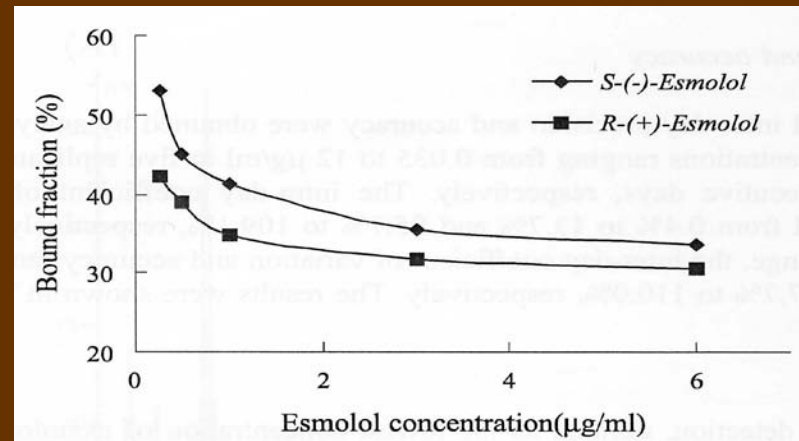


亚叶酸 (leucovorin)

如天然亚叶酸为左旋体，而合成亚叶酸为外消旋体。左旋体吸收速率是右旋体的5倍

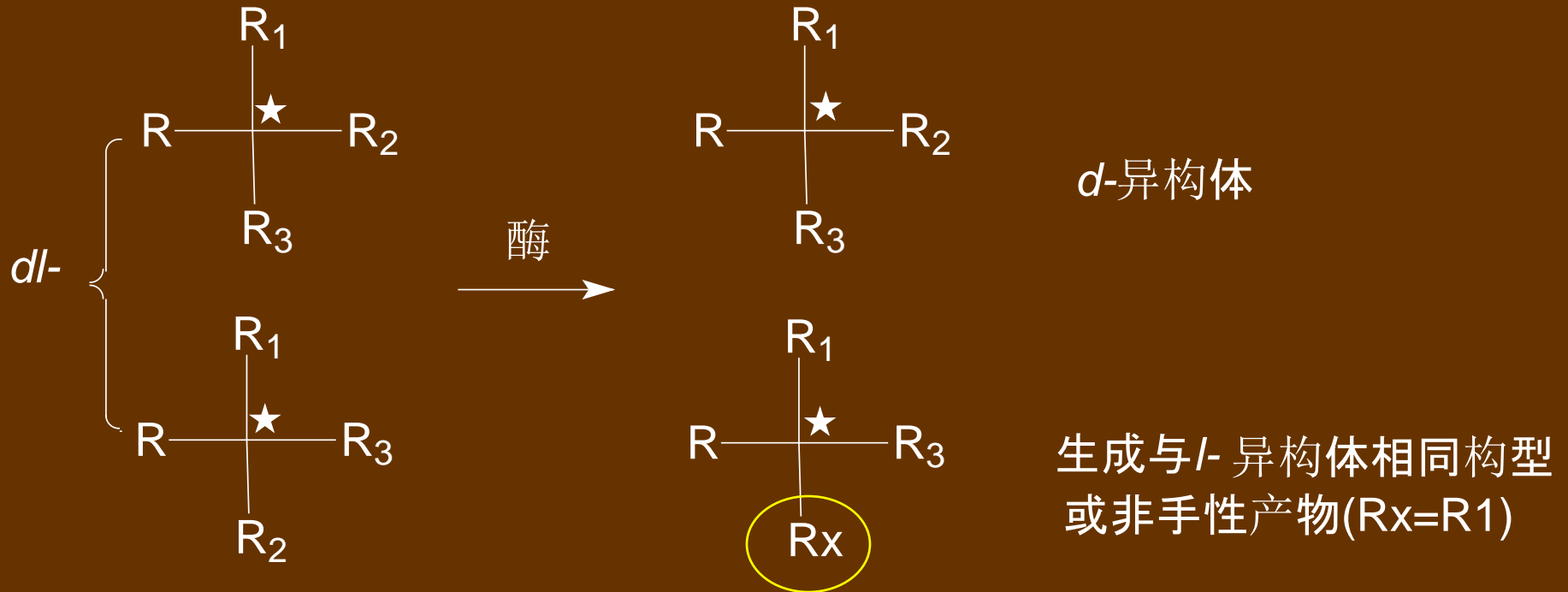
- 分布——与血浆蛋白、组织结合有立体选择性

S-41.7%, R-35.6%;
S/R=1.16

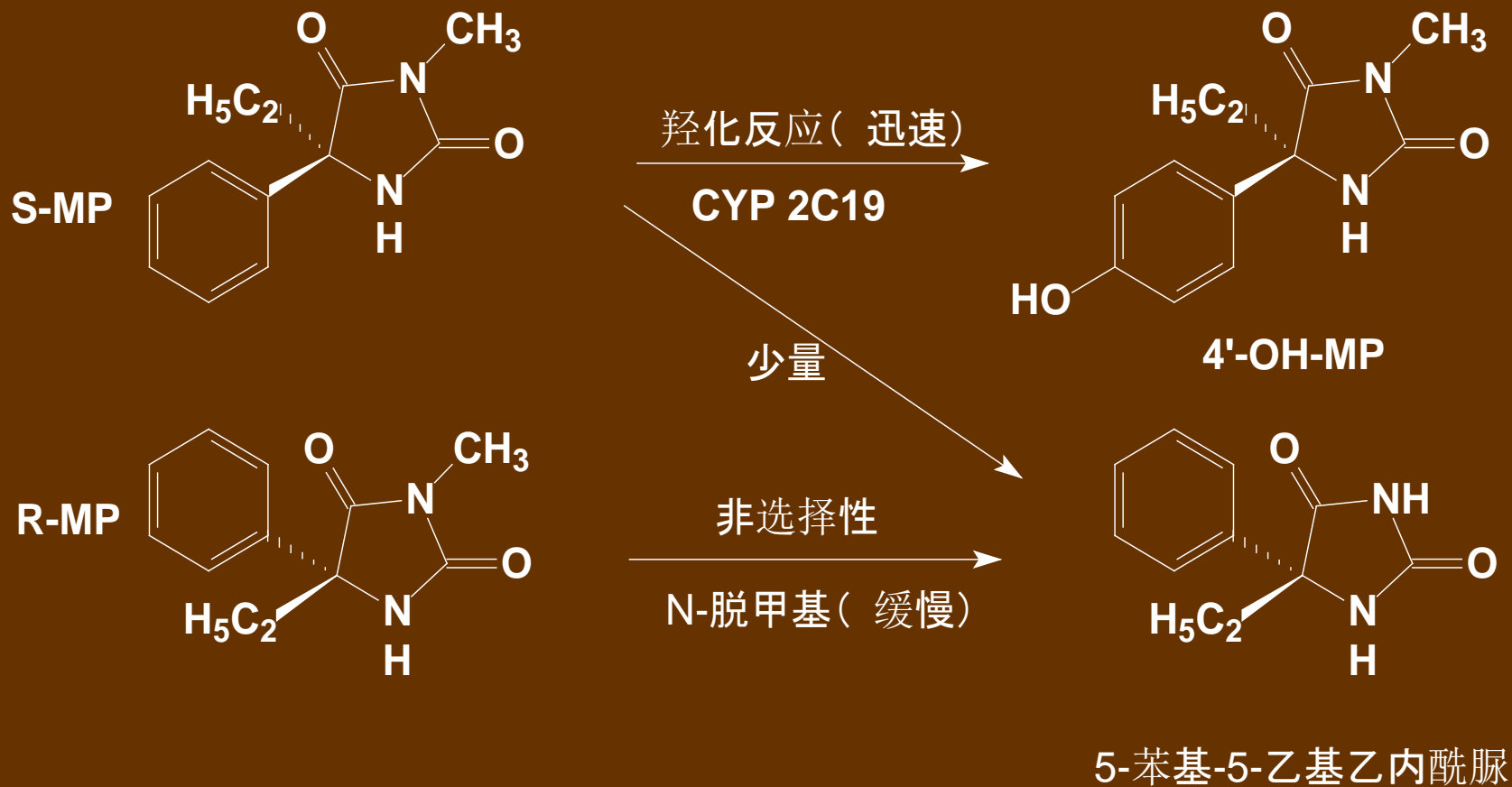


- **代谢——有立体选择性：**

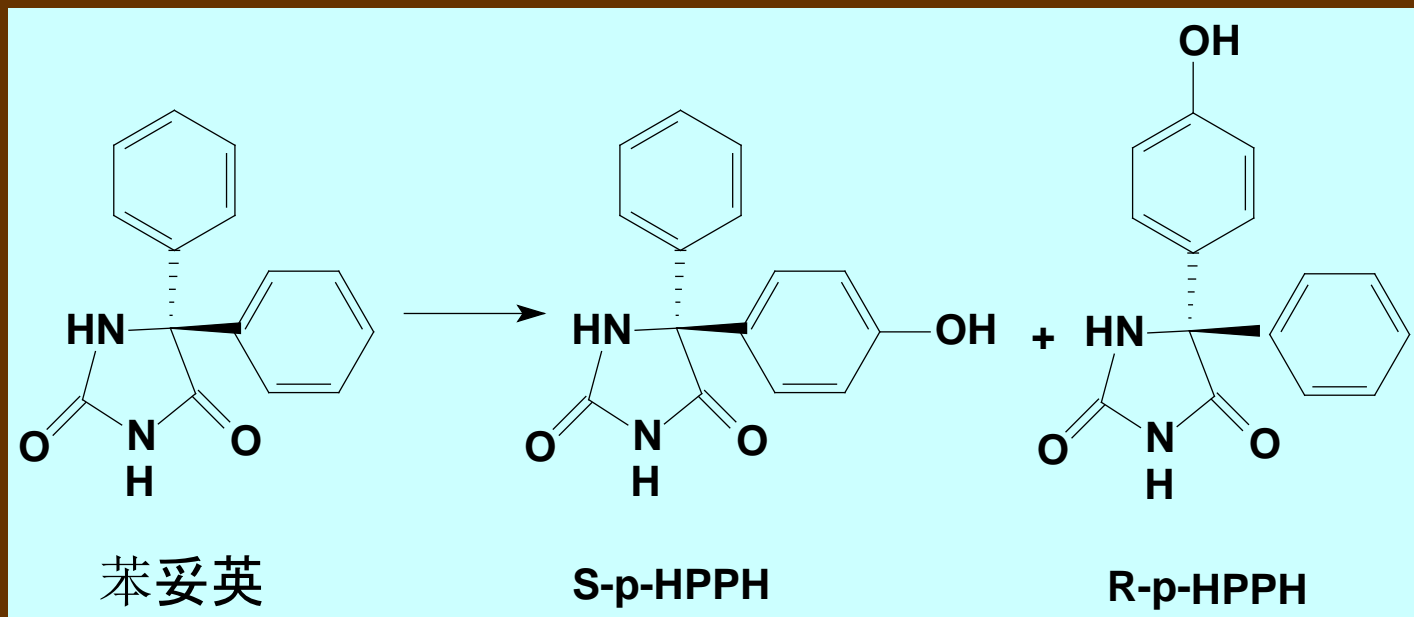
➤ **底物对映体选择性代谢：** 两对映体与酶形成非对映体复合物具有不同的代谢速率。



例：美芬妥因立体选择性代谢反应



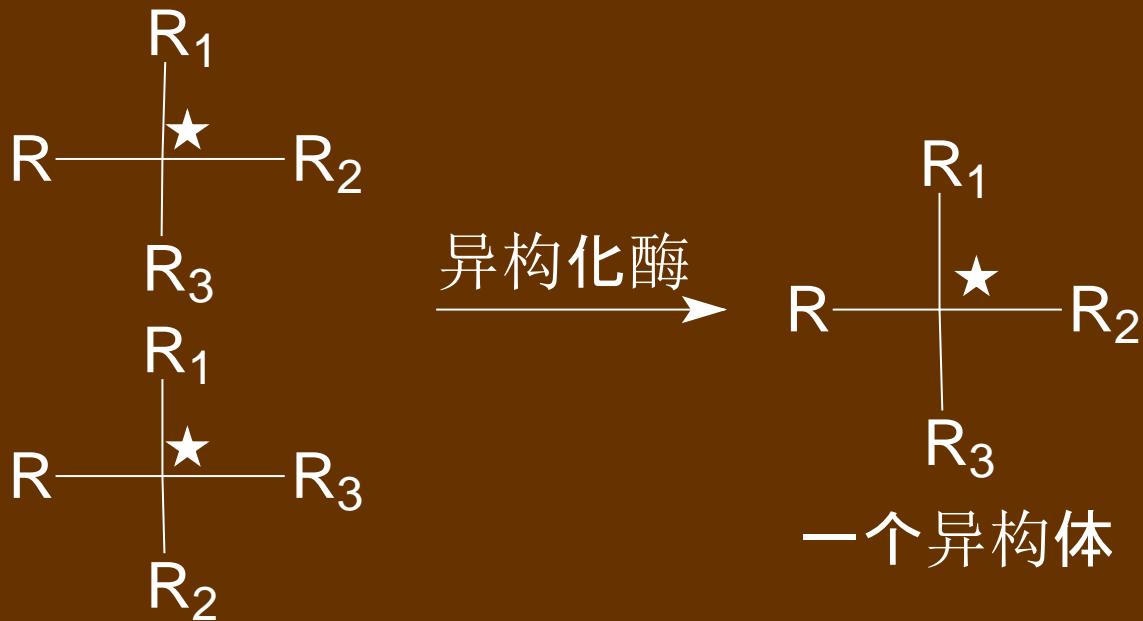
- 产物对映体选择性代谢：非手性分子代谢生成一个新的手性中心，并以不同速率形成对映体。

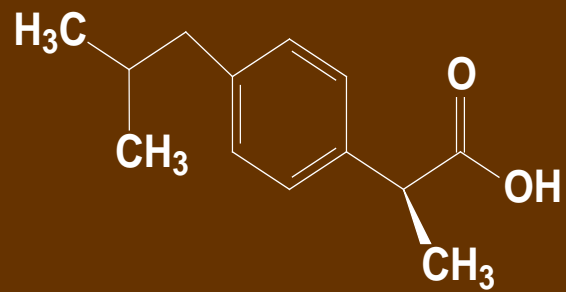


• 前手性中心

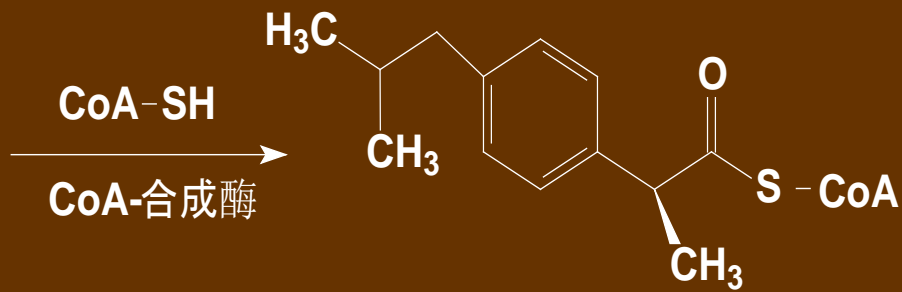
★ 手性中心

➤ **手性转化** ——指对映体在代谢过程中发生构型的转化

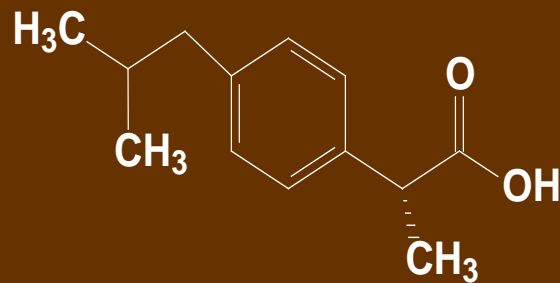




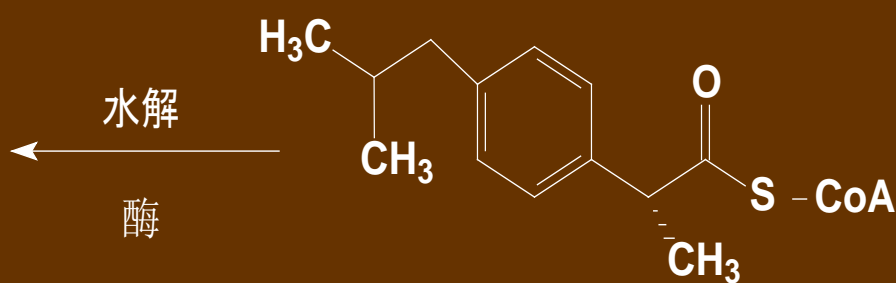
R-布洛芬



差向异构化酶 异构化

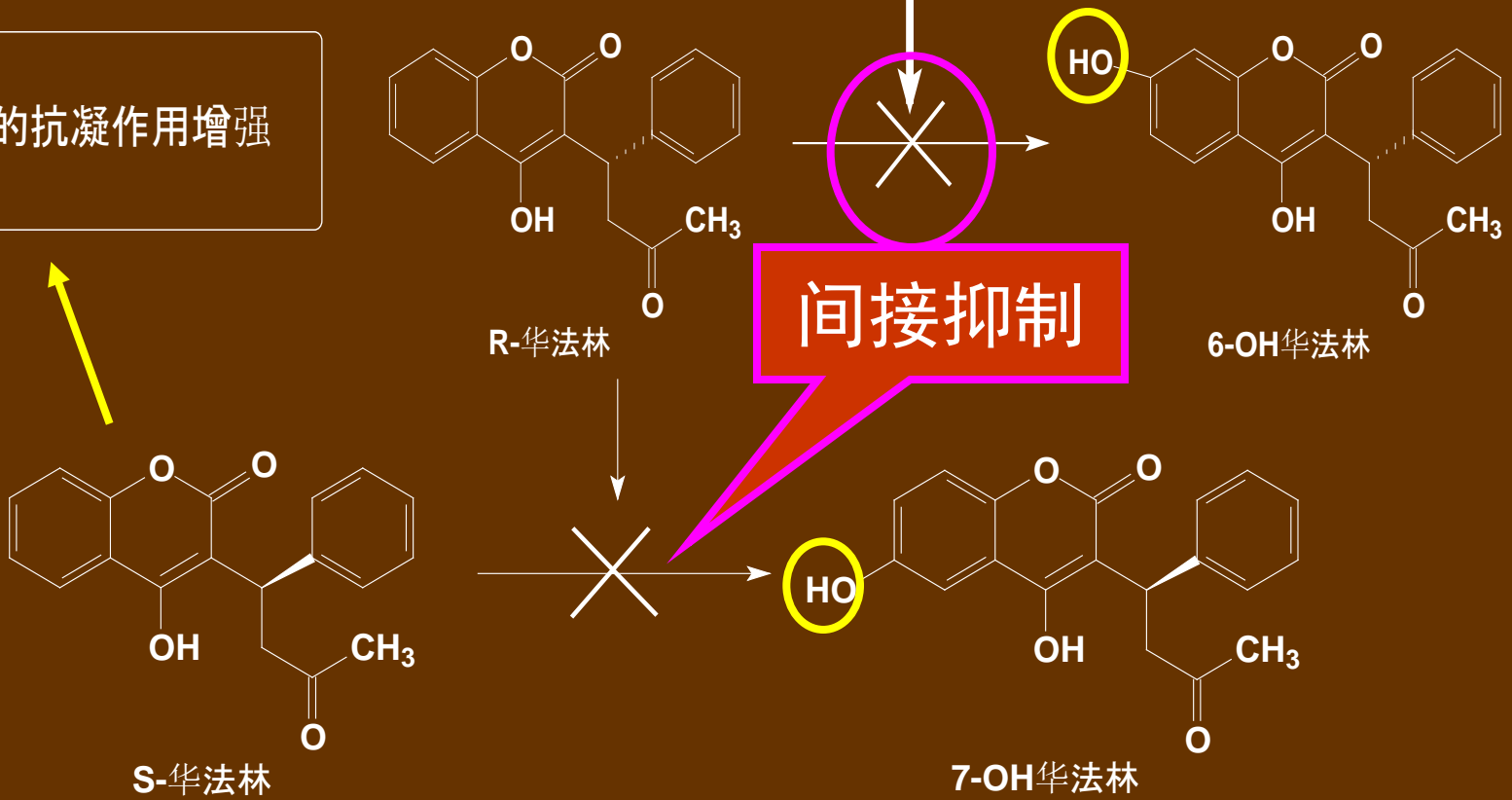


S-布洛芬



对映体之间的相互作用：

S-华法林的抗凝作用增强



在人体肝脏微粒体中，R-华法林可竞争性地抑制S-华法林的羟化代谢

●**消除**——肾脏清除率是肾小球过滤、主动分泌、主动和被动重吸收过程的综合结果，主动消除有立体选择性。

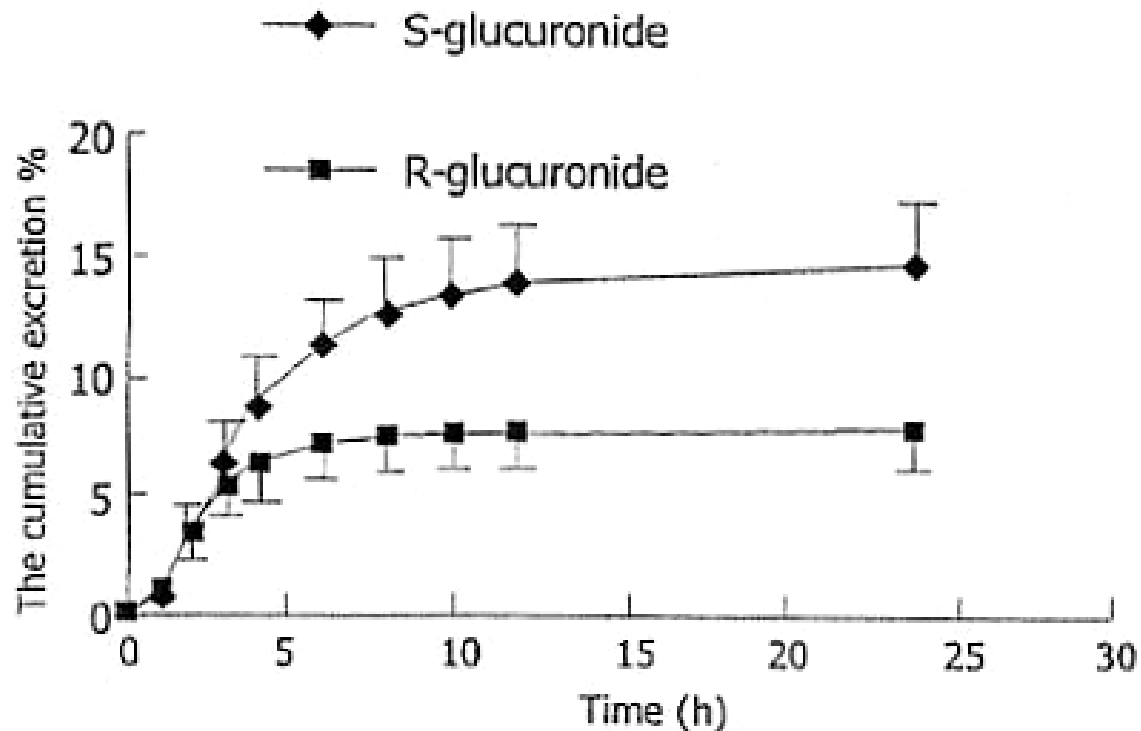


Figure 2 The cumulative excretion percentage of S-(-)- and R-(+)-propranolol glucuronide in urines of Chinese Han subjects after 20 mg oral administration of RS-(±)-propranolol tablet (n = 16).

● 影响立体选择性作用的因素

- 生理因素——年龄、性别、妊娠
- 病理因素——胃、肝、肾疾病
- 遗传因素——代谢多态性
- 药物因素——剂型、给药途径、
药物相互作用
- 环境因素

- 根据FDA关于手性药物研制的政策和SFDA发布的《手性药物质量控制研究技术指导原则》要求，需对手性药物开展光学活性**鉴别**；对映体**纯度检查**；手性药物的含量测定；**稳定性考察**；对映体和消旋体的体内外**药动学**、**生物利用度**、**生物等效性**、体内**手性转化**、**药-药相互作用**等研究。
- 根据研究结果，确定单个对映体给药还是消旋体给药

欲开展这些研究工作，首先要解决的是？

手性药物拆分方法

间接法——手性衍生化法
直接法——手性固定相法
手性流动相法

● 手性分析技术

● 手性HPLC

● 手性GC

● 手性TLC

● 手性毛细管电泳

● 超临界色谱

● 圆二色谱

● 核磁共振

● 制备手性拆分技术

● 直接结晶法

● 化学衍生化法

● 生物拆分法（酶催化反应）

● 液相色谱制备性拆分法
（分批洗脱色谱法、闭环循环色谱法和模拟流动床色谱法）

● 超临界色谱法

手性试剂衍生化法

(chiral derivatization reagent, **CDR**)

原理:



(手性药物) (衍生试剂) (非对映体产物)

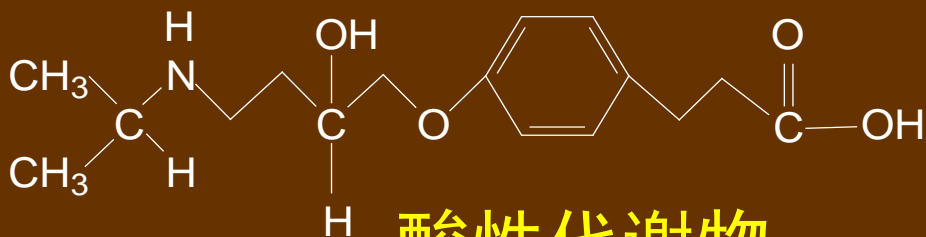
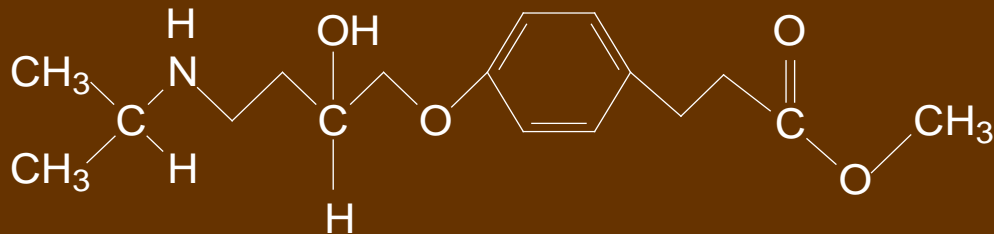
利用非对映体产物在普通**ODS柱**上的保留行为不同达到分离目的。

● 常用手性试剂

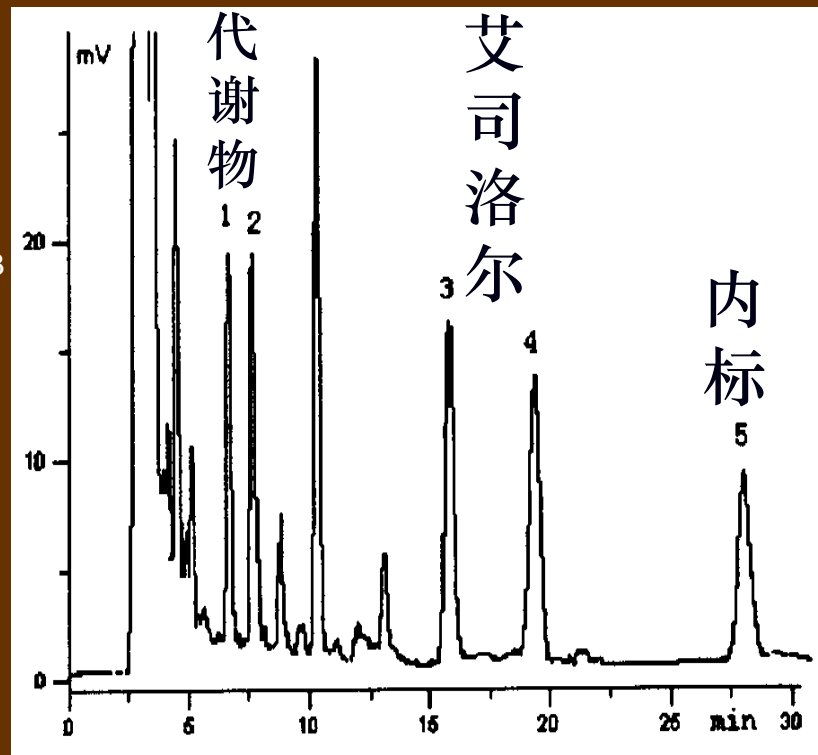
- **酰化试剂**——包括酰胺、酰氯和酸酐等
- **异硫氰酸酯类**——常用试剂有2, 3, 4, 6-四-O-乙酰基- β -D-吡喃葡萄糖异硫氰酸酯 (GITC)、AITC等
- **胺类试剂**——如取代苯乙胺、萘乙胺、二甲胺基萘乙胺、对硝基苯乙胺等
- **氯甲酸酯**——常用试剂有氯甲酸薄荷醇酯等, 主要用于分离羟基醇、胺和氨基酸等。
- **邻苯二醛**——邻苯二醛在手性硫醇存在下用于分离胺类、氨基酸、氨基醇等

艾司洛尔及其酸性代谢物的手性分离

艾司洛尔



酸性代谢物



血样+适量三乙胺 + GITC 室温, 20min → 衍生物
→ 蒸干, 加流动相溶解残渣, 取20 μ L进样。

● 手性流动相添加剂法 (CMPA)

● (chiral mobile phase additives)

● 原理——在流动相中添加手性试剂，与被测物形成手性配位化合物，根据配位化合物的非对映异构体性质，在普通反相柱上进行分离，根据添加的试剂不同，CMPA可分为：

- 手性包含复合
- 手性离子对
- 蛋白质复合物

- 手性配合交换
- 手性氢键试剂
- 动态手性固定相

手性包含复合色谱——环糊精

- 常用的为 β -环糊精。其对亲水性和疏水性化合物均有包含作用，使包含物的理化性质发生改变

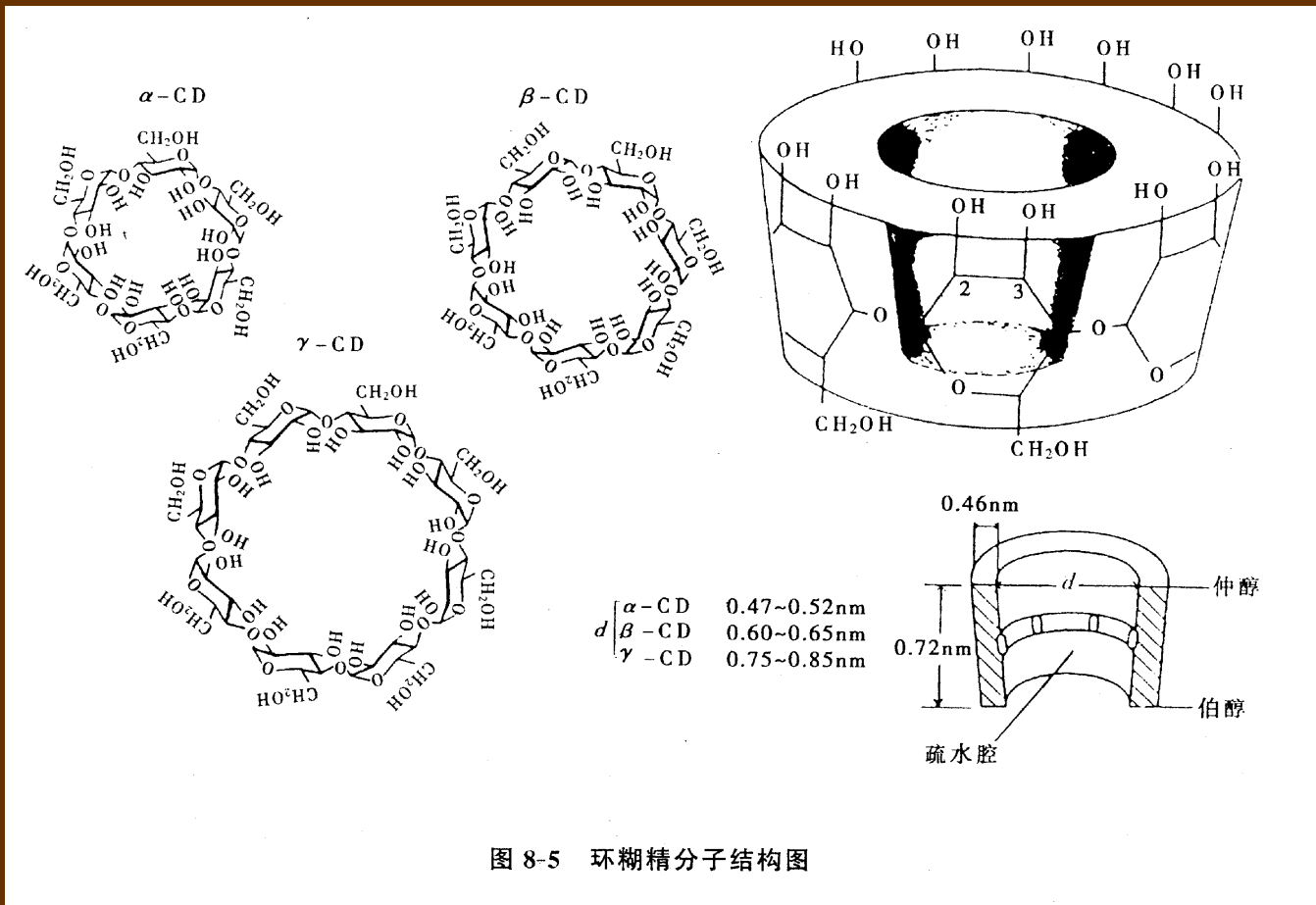


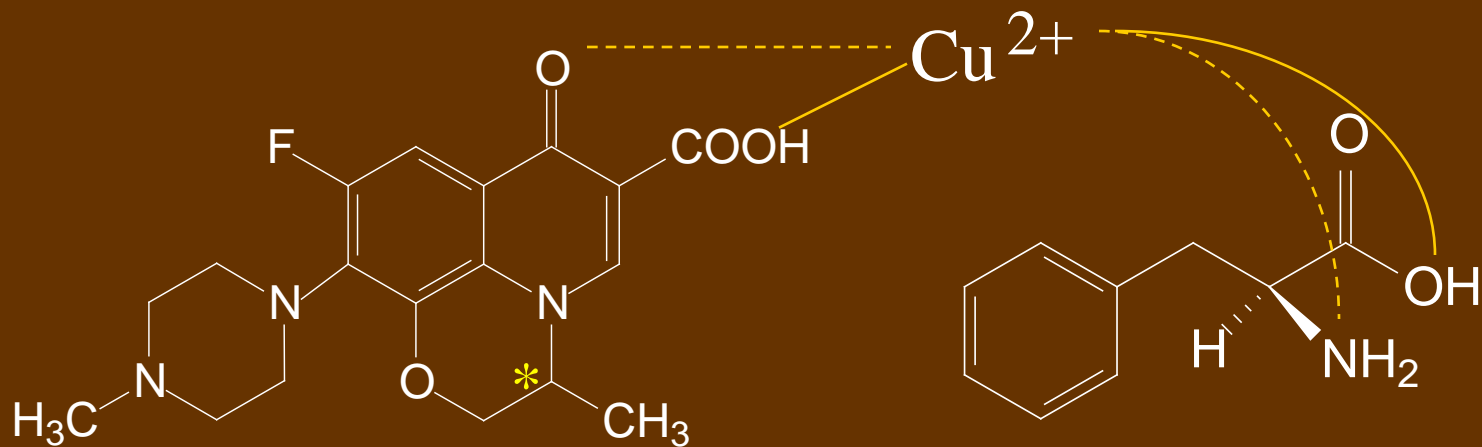
图 8-5 环糊精分子结构图

● 手性配合交换

- 将手性金属配合剂和金属离子加入流动相中，与被测物形成三元非对映体配合物。
- 常用配合剂为氨基酸类，如L-脯氨酸、L-苯丙氨酸等，
- 常用配合金属有 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} 等。

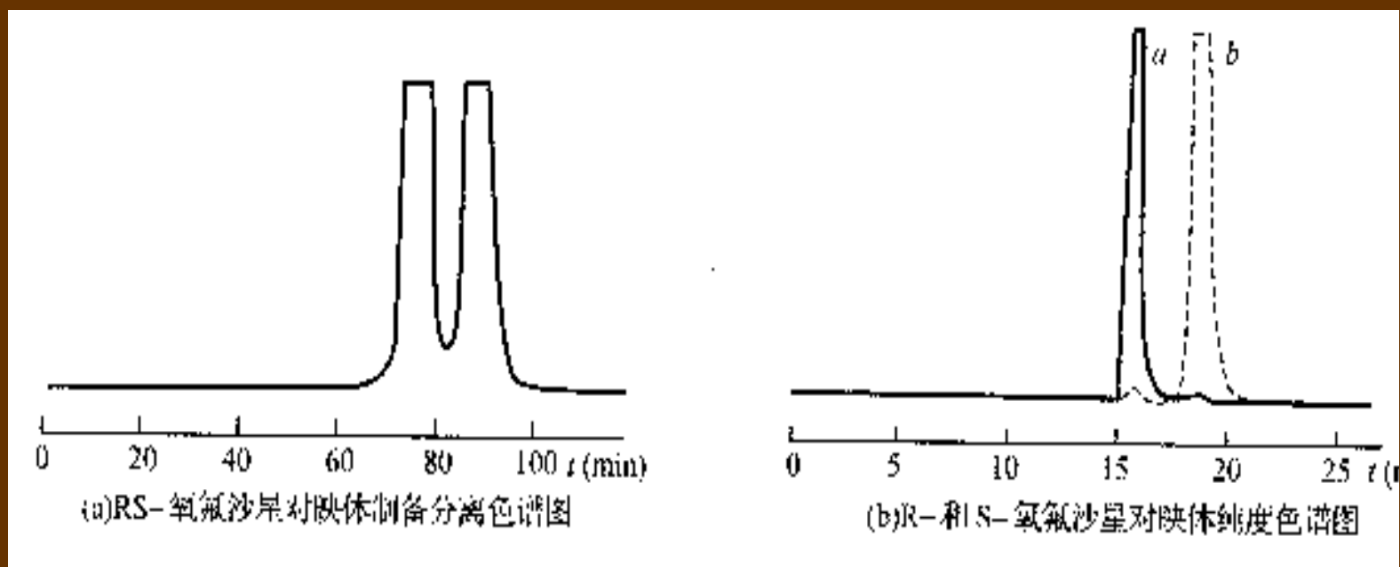
根据配合物结构稳定性和能量差异，以及与固定相发生立体选择性吸引或排斥反应，使两对映体得以分离。

- 例：手性配位交换法拆分氧氟沙星对映体
- 色谱柱：ODS (150 × 4.6mm, 10μm)
- 流动相：甲醇- (6mmol/L L-苯丙氨酸和 3mmol/L硫酸铜, pH3.5) (16: 84)
- 流速：1.1 ml/min
- 荧光检测： λ_{ex} 330nm, λ_{em} 505nm
- 或紫外检测：293nm



氧氟沙星

L-苯丙氨酸



- 手性离子对

- 在流动相中加入手性离子对试剂，与手性药物反应形成非对映体离子对被分离。

- 常用手性离子对试剂有：奎宁、奎尼丁、10-樟脑磺酸等。

- 本法主要为正相离子对色谱，常用的固定相为硅胶、氰基柱、醇基柱。

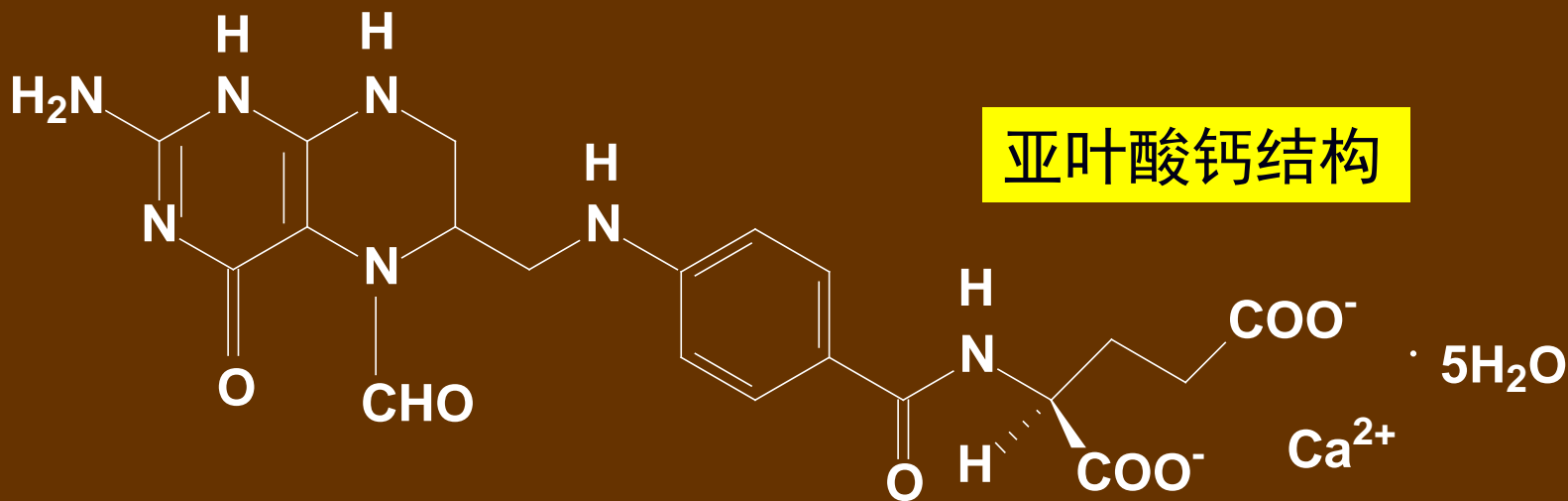
● 手性固定相法 (chiral stationary phase, CSP)

- 将手性试剂通过化学方式键合到固定相上与药物对映体反应形成非对映体复合物，因两非对映体复合物稳定常数的不同而被分离。
- 常用的手性固定相有：
 - 蛋白质键合相
 - 纤维素和多糖衍生物
 - 合成手性聚合物相
 - 分子烙印手性固定相
 - 环糊精相
 - 配体交换相
 - Pirkie相
 - 大环抗生素

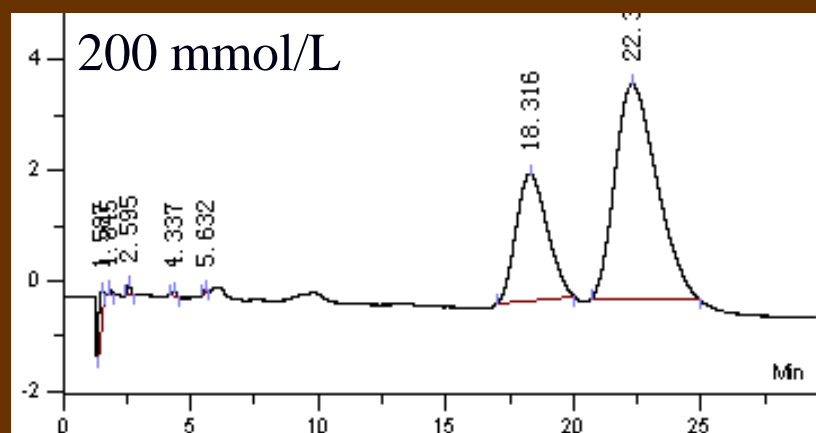
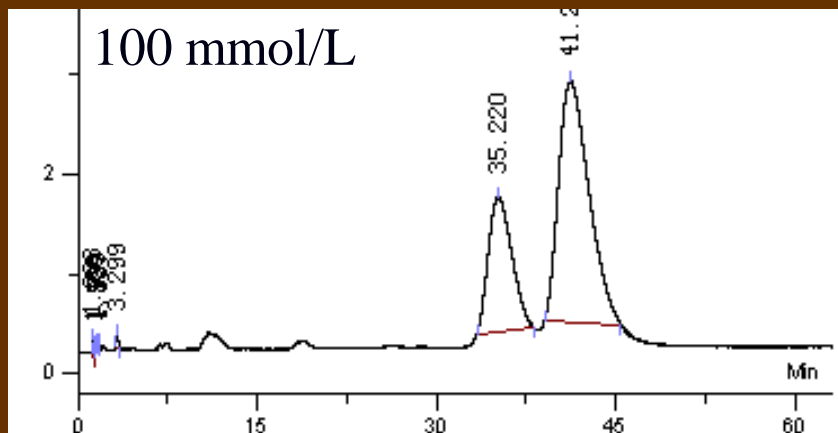
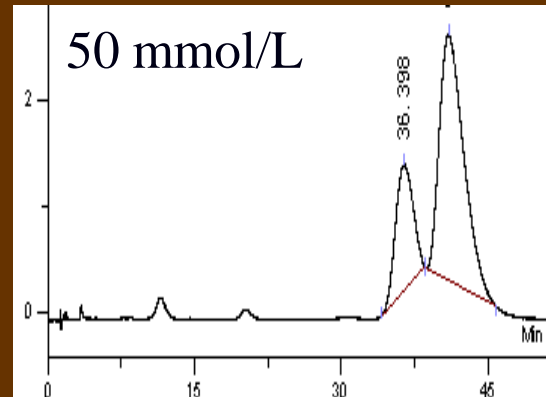
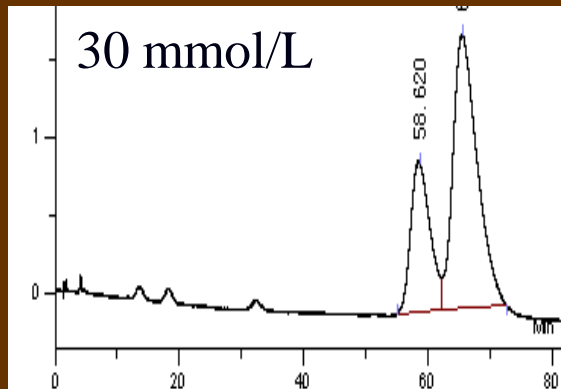
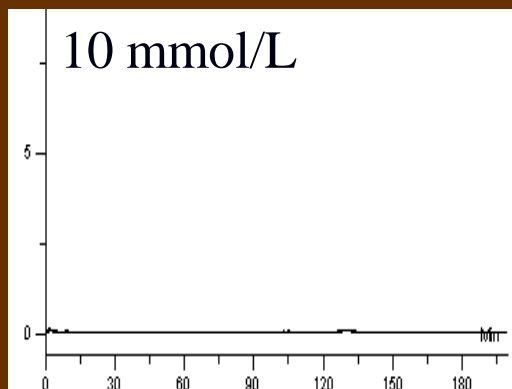
例：牛血清白蛋白手性柱拆分亚叶酸钙消旋体

色谱柱：德国Macherey-Nagel EC 150/4 RESOLVOSIL BSA-7 (15 cm × 4 mm i.d. , 4 μm) 牛血清白蛋白手性柱。

流动相：采用磷酸盐缓冲液，比较了不同流动相pH、不同磷酸盐浓度等对分离的影响。



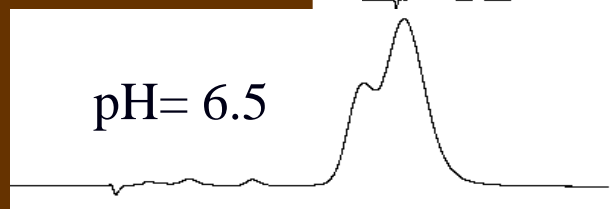
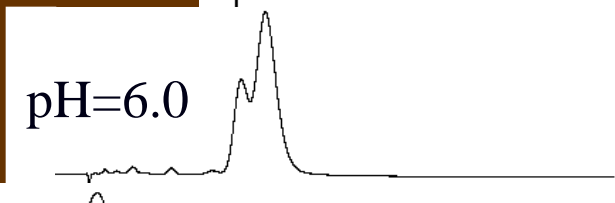
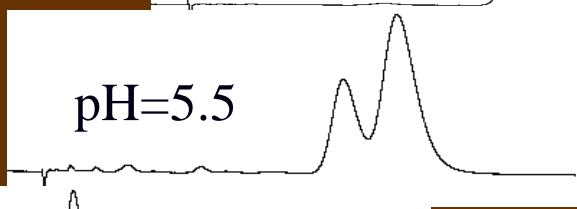
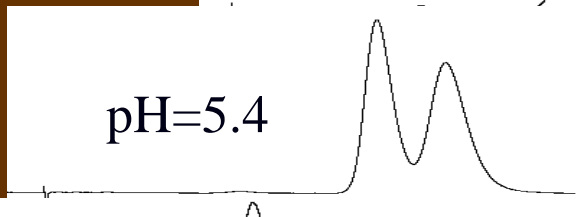
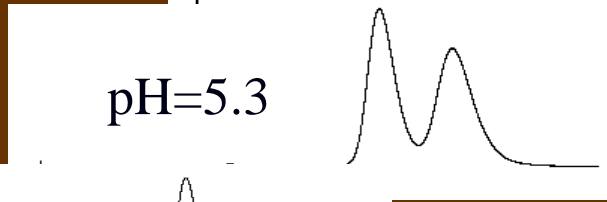
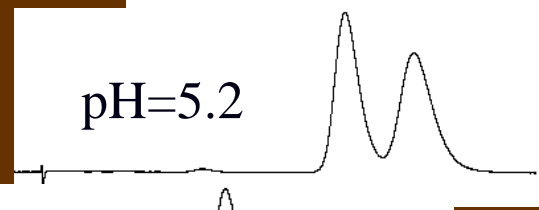
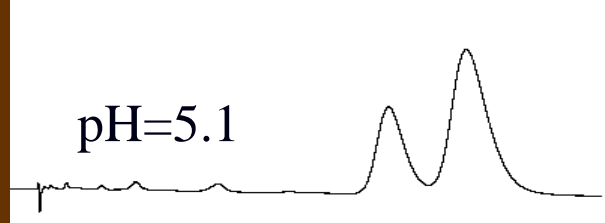
不同缓冲液浓度对分离度的影响 (pH=5.0)



样品：0.1mg/ml的水溶液，进样20 μ l，流动相流速1ml/min，柱温40°C，检测波长286 nm。

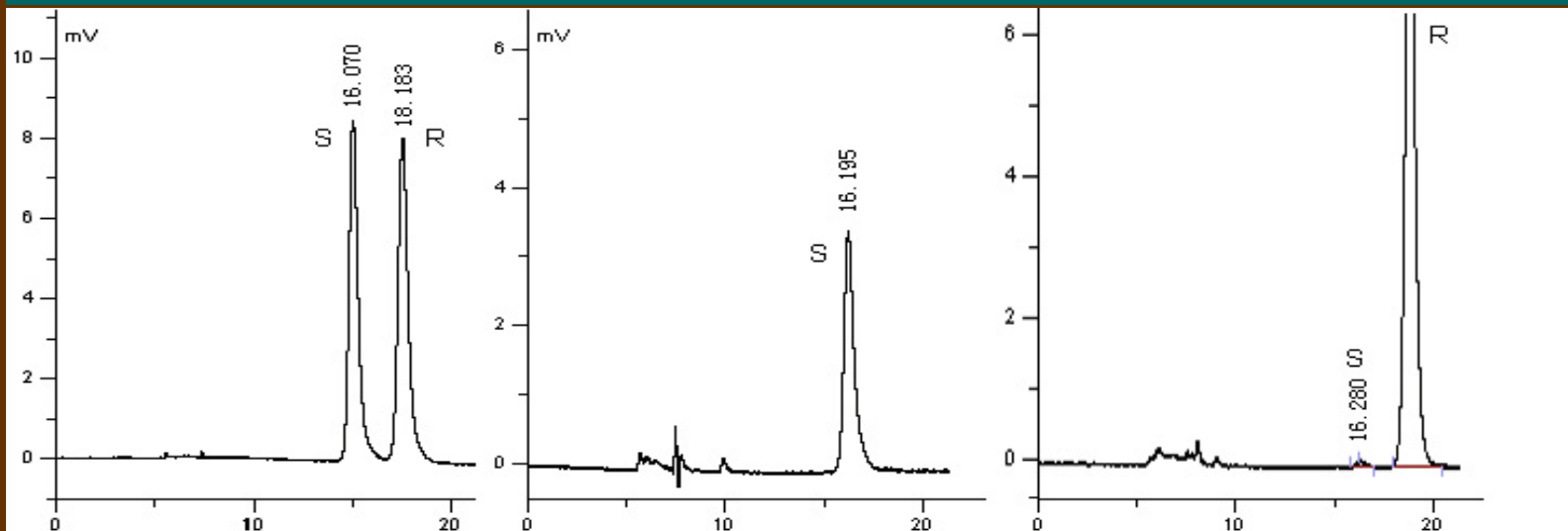
pH对分离度的影响

(200mmol/L缓冲液浓度)



- **纤维素和多糖衍生物**——纤维素三酯衍生物，涂敷在大孔硅胶上用作固定相。其手性识别来自酯的部位与被测物之间形成氢键、偶极-偶极作用，或被测物两对映体立体选择性地进入聚多糖空间螺旋结构中。
- 本法一般用**正相**色谱操作，流动相为正己烷-异丙醇，正己烷-乙醇，有时添加少量三氟乙酸或三乙胺提高分离效率。
- 但一般不使用氯代烃、乙腈、甲醇、丙酮等能溶解或过度溶胀该类固定相的溶剂。

例： R-酒石酸托特罗定中S-对映体杂质的检查



R/S体混合液； S-对映体； R-对映体

色谱柱： ChiralpakAD-H (250mm × 4.6mm i.d)；
流动相： 正己烷-异丙醇-三氟乙酸-三乙胺
(85:15:0.05:0.075, v/v/v/v) ， 流速0.5 mL/min；
UV检测波长283nm

- Pirkie型手性固定相

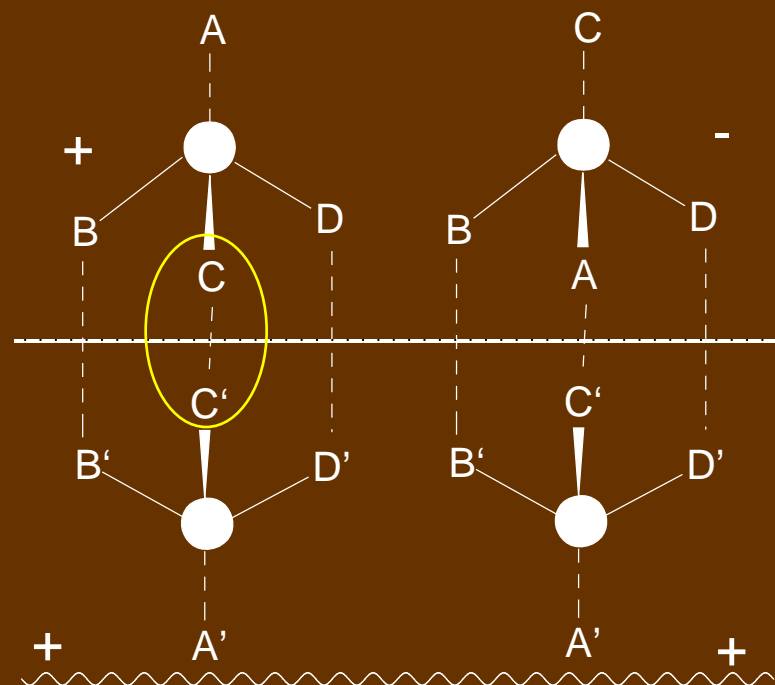
- 原理:

 - 三点作用模式

- 结构:

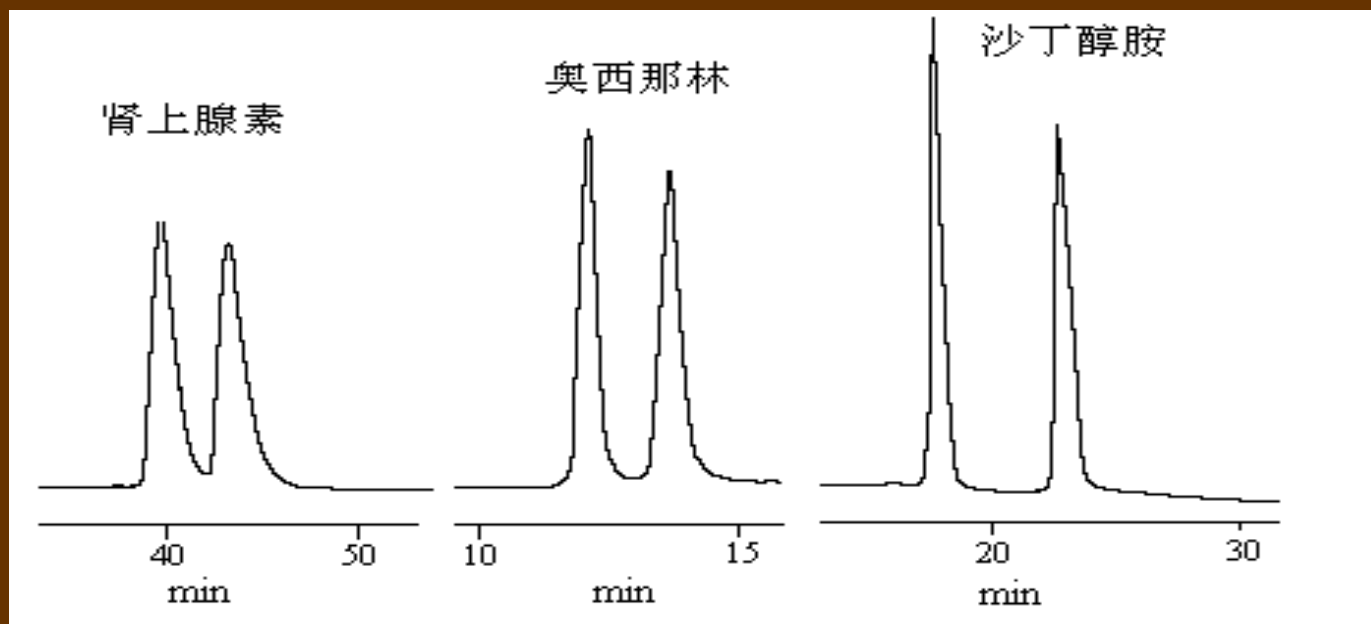
- 通过含末端羧基或异氰酸基手性前体与氨基键合硅胶进行缩合, 形成含酰胺或脲型结构的固定相。

对映体



固定相

肾上腺素、奥西那林和沙丁醇胺对映体在 脲型手性柱上的手性色谱图



流动相:

正己烷-1,2-二氯乙烷-甲醇/乙醇-三氟乙酸

● 三种方法的比较

- CDR法：应用条件简易，可用常规的HPLC柱和流动相，但对衍生化试剂要求高，异构体衍生化反应速率不一，样品中相关物质须预先分离。
- CMPA法：对固定相无特殊要求，样品也不用特殊处理，色谱过程中形成的配合物可逆，有利于制备。但拆分化合物的范围有限，一些添加剂不够稳定，对固定相有损害。
- CSP法：制备、分析操作方便，定量可靠性高。但拆分化合物的范围有限，色谱柱价贵。