

谷浓度。取血时间为上午给药前 1h。

2 结果

2.1 将各种不同器官移植患者术后的 CsA 作两两比较,经 t 检验发现肺、肾移植患者的谷浓度无显著差异 ($P > 0.05$)。而与骨髓移植患者有显著差异 ($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 不同器官移植患者的 CsA 浓度

器官	谷浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)
肺	343.12 \pm 120.27	35.05
肾	325.71 \pm 140.46	43.12
骨髓	118.41 \pm 96.14	81.19

2.2 随着时间推移,器官移植术后患者,根据临床情况,术后时间逐步调整,以 1mo 为界,肺、肾与骨髓移植患者的 CsA 血药浓度均有显著差异 ($P < 0.05$),详见表 2。

表 2 不同时间器官移植患者的 CsA 浓度

术后时间	肺 CsA 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	肾 CsA 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	骨髓 CsA 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
< 1mo	386.67 \pm 114.72	390.08 \pm 162.82	121.31 \pm 74.23
> 1mo	94.12 \pm 86.87	311.14 \pm 142.73	84.76 \pm 62.58

3 讨论

3.1 从表 1 可看出,我院骨髓移植的 CsA 谷浓度偏低,这与血液科所用 CsA 制剂较少有关。一般术后 4wk 内 125mg,静滴, qd, 后改为 100~200mg/d,口服。1~2mo 后又开始减量。而肺、肾移植患者,在术后早期剂量一般为 40~500mg/d,分两次口服,以后根据临床情况逐步调整。骨髓移植与肾移植用 CsA 的量不同的原因可能为:骨髓移植患者的免疫力已极低下,用药的目的除抑制排斥反应外,更重要的是预防移植物的抗宿主反应,骨髓移植患者全血中 CsA 的浓度在什么范围最合适,既要考虑防止排斥反应,又要考虑减少对肝、肾的损害,因此需要进行药动学结合药效学的深入研究。

肺、肾移植患者的 CsA 全血浓度的正常范围不适合骨髓移植患者。

3.2 从表 2 可看出,对相同患者而言,随着时间的推移,谷浓度基本上呈现略减的趋势。但有些患者的血药浓度反而上升,呈现蓄积中毒的趋势,原因可能是长期服用 CsA 后,生物利用度显著增加,故谷浓度有所增加,此时应注意监测,及时调整剂量。

3.3 监测发现,在使用相同的 CsA 剂量的情况下,男性患者的 CsA 血药浓度高于女性,两者有显著差异 ($P < 0.05$) 这与朱有华^[2]等报道不同。

3.4 患者口服相同剂量的 CsA 后,全血浓度可相差数倍,这是由于 CsA 生物利用度、代谢速度受多种因素影响的结果。CsA 是一个乙烯链的十一肽,脂溶性强,因此食物的脂溶性或水溶性是影响 CsA 吸收的一个重要因素;CsA 主要经过肝脏代谢,肝功减退时可减少 CsA 的清除,增加 CsA 的浓度^[3]。因此,临床医师根据所测血药浓度值,结合肝、肾功及时调整用药剂量,实行个体化给药,使 CsA 全血浓度在理想的范围内,这对于提高 CsA 疗效,避免排斥反应及毒性的发生,具有极其重要的意义。

参考文献

- 1 Linholm A. Therapeutic monitoring of Cyclosporine an update. Eur J Clin Pharmacol, 1991, 41: 273
- 2 朱有华, 闵志廉, 顾超宁等. 肾移植术后应用荧光偏振法监测全血 CsA 浓度的经验. 中华器官移植杂志, 1993, 14 (3): 109
- 3 Wilms HMF, Straetue V, Lison AE. Different pharmacokinetics of cyclosporine A early and late after renal transplantation. Transplant Proc, 1988, 20(2): 481

(收稿 1998-08-25)

手性药物拆分的色谱方法

贺林 吴苏澄¹(成都市儿童医院药剂科 成都 610017; ¹成都军区总医院临床药理室 成都 610083)

摘要 比较常用于手性药物拆分的几种色谱分析方法。HPLC 仪器普及,在此领域应用较多,而 CE 较之其他色谱法具有更加突出的优点。

关键词 手性药物; 拆分; 色谱方法

手性药物在药物中占相当比例, 如甾体、维生素、生物碱类药物, 由于其分子结构中手性碳的存在, 药物消旋体和其两个对映体之间常具有不同的药理活性与药效, 现代制药工业倾向制备只含一种对映体的药物; 另外在体内药物分析中, 也常遇到手性药物, 甚至是多个手性药物在一起被分析的情况, 这都需要高效率的手性药物分析方法与之相匹配。本文拟就用于手性药物拆分研究中应用较多的气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳色谱法(CE)加以讨论。

1 气相色谱法与手性药物拆分

用气相色谱法拆分手性药物, 需要有手性固定相。自 1988 年环糊精衍生物用作毛细管 GC 固定相成功地拆分了对映体以来, 已有几十种改性的环糊精相继被合成, 成为新一代高选择性的手性色谱固定相。手性固定相 GC 法分析手性药物的步骤为: ①合成手性试剂。丁玉强等^[1]以 β - 环糊精(β - CD) 为原料合成了具有较高立体选择性的全甲基化羟丙基- β - 环糊精(PMHP- β - CD); ②制柱。将弹性石英毛细管柱清洗吹干处理后, 将手性试剂溶液以适当方法(如静态法)涂柱, 吹干, 老化即得; ③样品衍生化。多数药物样品需衍生化后以满足 GC 条件要求, 如将醇类药物酰化, 将酸类药物酯化等; ④设定恰当的色谱条件, 包括检测器、载气及流速、分流比、程序升温、汽化室温度、检测室温度等。对 GC 的手性药物分析影响最大的因素, 一是手性固定相的选择, 它将决定手性药物能否被拆分; 另一影响因素是样品的衍生化方法, 它将导致不同的拆分结果; 再就是影响 GC 的共同因素——色谱条件的选择。

2 高效液相色谱法与手性药物拆分

HPLC 法是药物分析的重要方法之一, 因其分离药物的机制的多样性, 如正相 HPLC、反相 HPLC、离子色谱等, 使其在手性药物拆分中的应用远较 GC 广泛。但由于手性固定相的选择性不高, 往往使手性固定相法不能直接用于

体内药物的分析。为克服这方面的不足, 现在发展的非手性——手性柱联用技术, 拓宽了 HPLC 手性对映体拆分的应用范围; 另外手性离子对 HPLC 法在带电荷对映体拆分中应用广泛, 其中又以正相系统效果较好^[2]。

2.1 非手性柱—手柱柱联用技术^[3]

在手性药物体内分析中, 存在多种干扰, 包括内源性物质、内标物质与被测手性药物之间、被测手性药物与其手性代谢物之间等。将非手性柱与手性柱以柱切换系统或直接相连方式连接起来, 使得经预处理的样品首先随流动相载入非手性柱, 将被测手性药物与干扰成分分离, 接着被测手性药物进入手性柱上, 不受干扰地各自拆分, 这样在提高手性固定相分离能力的同时, 还能延长手性固定相柱子的使用寿命。采用六通阀将两柱相连, 常使用两个检测器, 分别置于两柱后, 以分别测定手性药物总量和对映体比例量, 进而得到对映体绝对量。在这种柱切换模式中, 需注意流动相的匹配, 尤其因为手性固定相本身对流动相有种种限制, 如只能用于正相、有机溶剂浓度不能太大等。可采用 OdaY 等^[4]使用的在两柱之间加上一浓缩柱和一稀释管的流动相变换技术来解决两柱流动相互不兼容的难题。特殊手性固定相, 同时含有亲水基团(防止蛋白质沉淀)和手性识别基团(如 β - CD)的混合功能固定相, 能用于直接手性分析。将对映体先行柱前衍生化再上柱分离^[5], 也是手性药物 HPLC 分析的一种比较常用的方法。

2.2 手性离子对色谱法拆分药物对映体^[2]

手性离子对色谱法可用于拆分氨基酸类、 β - 氨基醇类、羟酸及磺酸类、胺类等对映体化合物。其原理是在 HPLC 流动相中加入反离子, 使之与流动相中对映体生成非对映体的离子对复合物, 由于这些离子对复合物间具有不同的稳定性和分配性质, 又与固定相发生静电、疏水或氢键作用, 而产生差速迁移得以分离。其方法立体选择性影响因素很多, 其中主要是反离

子的性质和浓度,同时也与流动相组成、固定相的性质等有关。

2.3 手性固定相法与手性离子对色谱法协同用于对映体拆分

Petterson 等以金鸡纳类生物碱(乙酰奎尼丁)连接于硅胶作手性固定相,在二氯甲烷流动相中加入奎宁(手性反离子),与加入胺类相比,会显著改善拆分萘普生对映体的立体选择性^[6]。手性固定相法中包括蛋白质固定相,具有独特的分离效果,蛋白质能与多种药物可逆结合,结合体的立体选择性差异构成了蛋白质键合固定相 HPLC 分离手性药物的基础。用于手性药物拆分的蛋白质化学键合固定相包括: α_1 - 酸性粘蛋白、卵类糖蛋白、牛血清蛋白、人血清蛋白等^[7-10]。

2.4 β - 环糊精或其衍生物作为手性流动相添加剂的药物对映体拆分

国内外学者在以 β - CD 或其衍生物作为手性流动相添加剂来拆分药物对映体方面的研究十分活跃,梁宏晞^[11]从理论和实验两方面对在不同色谱条件下的 β - CD 添加剂对甲基苯巴比妥异构体色谱行为的影响进行探讨,并总结出流动相中 CD 手性选择剂包含稳定常数与溶剂强度的数学关系式: CD 手性添加剂加上 1- 庚烷磺酸钠为反离子,可测定沙索林和 N- 甲基沙索林在人脑中的对映体组成^[12], Robert HP^[13]对碱性硅胶固定相和以 β - CD 作手性流动相添加剂的手性分离相制进行了研究。

3 高效毛细管电泳法(CE)的手性药物拆分研究

CE 法属液相分离技术的一种,是以高压电场为驱动力,以毛细管为分离通道,依据样品中各组分之间淌度(或称迁移率)和分配行为的差异而实现分离^[14]。CE 有多种分离模式,包括应用最广泛的毛细管区带电泳(以组分荷质比为流出顺序)毛细管等电聚焦(用于分离等电点差异小于 0.01pH 单位的相邻蛋白),胶束电动毛细管电泳(主要是中性粒子在毛细管力的胶束和缓冲液间的分配为基础),毛细管凝胶电泳(分离效率最高)以及毛细管等速电泳和毛细管

电色谱。

CE 能直接分离立体异构体,如果要分离每个非对映立体异构中的对映体,则需使之处于手性环境中,使被测对映体理化性质得以修饰,而转变成非对映异构才能被拆分。

3.1 高效 CE 拆分对映体的间接方法

Schutzner^[15,16]拆分氨基酸对映体以(+)-0,0'-二苯酒石酸酐和双乙酰基-L-酒石酸酐为手性衍生化试剂,并在背景电解质中加入聚乙烯吡咯烷酮,即将对映体与手性试剂进行衍生化反应后,在非手性电泳系统中进行拆分的方法。此法要求有恰当的且纯度很高的手性试剂,同时要求对映体含有反应基团,反应动力学差异可导致两非对映异构体所形成的峰面积的不同,正由于这些缺点,限制了此间接方法的应用。

3.2 高效 CE 拆分手性药物对映体的直接方法

此法将手性选择剂加入背景电解质中,也可将其结合于毛细管壁上,或固定在凝胶支撑剂上,在电泳过程中,与对映体作用生成的非对映异构体具有不同的稳定常数,进而有不同的迁移速率而得以分离。

与 CE 的间接方法相比,直接方法简单得多^[17],因不需衍生化而耗时少,且系统的手性试剂的纯化程度不具有至关重要性,因为在此法状态下,不纯的手性选择剂的存在仅减少对映体的拆分,而不会象间接方法中不纯的手性选择剂将导致生成四种非对映异构体,而增加拆分的难度。

环糊精(CD)及其衍生物是 CE 中常用手性添加剂,其价廉易得,供选择品种多,根据拆分的对映体不同可选用不同类型的 CD,而 CD 衍生物中取代基团和取代程度将影响其手性识别能力。不含或只含一个芳环的被测物(且邻、间位无取代基),选 α - CD; 含两个芳环选 β - CD; 含两个以上芳环则 γ - CD 可能是适合的手性选择剂。如果这样还不能很好地拆分对映体,则可考虑选择其他衍生物。 β - CD 和二甲- β - CD 均能成功地用于特布他林对映体的拆

分,二者对特布他林的包合正比于其浓度,但后者具有更高的立体选择性^[18]。

另外可以获得的手性选择剂还有冠醚^[19](用于分离氨基化合物,如蛋白质)、手性表面活性剂、糖类及抗生素类。CE 也能对不带电荷的对映体进行拆分,只需选择荷电手性选择剂并在一个合理的时间内使用相对较强的电渗流。

3.3 高效 CE 的影响因素

已证明对映体拆分的影响因素包括手性选择剂的种类和浓度,背景电解质的组成(离子强度、离子类型和浓度、pH、有机溶媒等),背景电解质的聚合添加剂,使用的电压及毛细管温度等。

4 几种对映体拆分色谱法的比较

目前在药物对映体拆分中,采用的主要手段仍然是 GC 和 HPLC^[20],其仪器较为普及,但弱点也很突出,手性柱固定相价格昂贵,且易被污染,手性衍生化常带进副产物,手性流动相受限较多;而用 CE 分离手性药物则相对价廉简单,分离速度快,使用样品更少,可分离的范围更广(从离子到大分子化合物),且维持费用更低。梁流^[21]用 CE 测定血清华法林浓度的结果与用反相 HPLC 比较,结果两法有很好的相关性,而罗毅^[22]在比较 GC、HPLC 和 CE 进行生物体液中药物对映体分析时,认为高效 CE 具有分离效率高,适用范围广,比 GC 和 HPLC 有更广泛的应用前景。但只能实现微量制备是高效 CE 的缺点。

参考文献

- 1 丁玉强,李 焰. 手性色谱固定相-全甲基化 2,3,6-三(0- β -混旋羟丙基)- β -环糊精的立体选择性研究. 色谱, 1998, 16(2): 152
- 2 李 新,曾 苏. 手性离子对色谱法. 色谱, 1998, 16(2): 118
- 3 王春祥,刘文英,安登魁 HPLC 非手性一手性柱联用技术和直接进样法在体内手性药物分析中的应用. 国外医学药学分册, 1997, 24(1): 6
- 4 Oda Y, Asakawa N, Kajima T, et al. On-line determination and resolution of verapamil enantiomers by high-performance liquid chromatography with column switching. J Chromatogr, 1991, 541(1/2): 411
- 5 蔡卫民. 立体选择性 HPLC 测定血浆中华法林对映体浓度. 中国药学杂志, 1996, 31(6): 361
- 6 Pettersson C, Gioeli C. J Chromatogr, 1988, 435: 225

- 7 Enquist M, Hermansson J. Influence of uncharged mobile phase additives on retention and enantioselectivity of chiral drugs using an α_1 acid glycoprotein column. J Chromatogr, 1990, 519: 271
- 9 Hermansson J, Grahn A. Optimization of the separation of enantiomers of basic drugs. Retention mechanisms and dynamic modification of the chiral bonding properties on an α_1 acid glycoprotein column. J Chromatogr. A, 1995, 694(1): 57
- 10 Miwa T, Miyakawa T, Kayano M, et al. Application of an ovomucoid-conjugated column for the optical resolution of some pharmaceutically important compounds. J Chromatogr, 1987, 408: 306
- 11 梁宏晞. HPLC β -CD 手性流动相添加剂的研究 I. RP-HPLC 系统中 β -CD 与甲基苯巴比妥手性选择性包合. 中国药科大学学报, 1997, 28(2): 82
- 12 翁家宝. 化学修饰 CD-胶束电动色谱法直接拆分巴比妥对映体. 分析化学, 1994, 22(11): 1085
- 13 Robert HP. Chiral separation retention mechanisms in high-performance liquid chromatography using base silica stationary phase and β CD as a mobile phase additive. J. Chromatogr, 1995, 696: 187
- 14 罗国安,王义明. 毛细管电泳的原理及应用. 色谱, 1995, 13(4): 254
- 15 Schutznern, W. Fanali, S, Rizzi, A, et al. Separation of diastereomeric derivatives of enantiomer by capillary zone electrophoresis with a polymer network: use of polyvinylpyrrolidone as buffer additive. J Chromatogr, 1993, 639: 375
- 16 Suhutzner W, Caponecchi G, Fanali S, et al. Improved separation of diastereomeric derivatives of enantiomer by a physical network of linear polyvinylpyrrolidone applied as pseudophase in capillary zone electrophoresis. Electrophoresis, 1994, 15: 769
- 17 Terbe S, Otsuka K And Nishi H. Separation of enantiomers by capillary electrophoretic techniques. J Chromatogr. A, 1994, 606: 295
- 18 Fanali S. Use of cyclodextrins in capillary zone electrophoresis: Resolution of terbutaline and proprunolol enantiomers. J Chromatogr, 1991, 545: 437
- 19 Kuhn R, Stoecklin F, Emi F, et al. Chiral separation by host-guest complexation with CD and crown ether in CE electrophoresis. Chromatographia, 1992, 33: 32
- 20 王 杰,丁 洁. 高效毛细管电泳技术. 中国医药工业杂志, 1997, 28(7): 327
- 21 梁 流. 毛细管胶束电动色谱法测定血清中华法林浓度的评价. 中国药学杂志, 1996, 31(6), 385
- 22 罗 毅. 生物体液中药物对映体的分析. 药物分析杂志, 1995, 15(2): 58

(收稿: 1998-10-05)