

## 唑类抗真菌药物手性分离及药代动力学研究进展

郭凯欣<sup>1,3</sup>, 石宽<sup>1,4</sup>, 闻俊<sup>1,2</sup>, 周婷婷<sup>1,2</sup>, 范国荣<sup>1,2</sup> (1. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433; 2. 上海市药物(中药)代谢产物研究重点实验室, 上海 200433; 3. 解放军 75215 部队卫生队, 广东 惠州 516133; 4. 解放军 95890 部队卫生队, 湖北 武汉 434000)

**[摘要]** 唑类抗真菌药物具有手性特征, 给药后体内对映体血药浓度及药动力学参数显示出差异, 具有立体选择性特点, 代谢是导致该类物质呈现立体选择性变化的主要环节。而生物样本中对映体定量分析则依赖于手性拆分技术的不断发展。本文综述了近年来唑类抗真菌药物主要手性分析及酮康唑、伊曲康唑手性药代动力学研究进展, 以为唑类抗真菌新药研究提供参考。

**[关键词]** 唑类抗真菌药物; 手性分离; 药代动力学; 立体选择性

**[中图分类号]** R978.5; R94 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)06-0418-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.06.006

## Advance in chiral separation and stereo selectivity pharmacokinetics of azole antifungal drugs

GUO Kai-xin<sup>1,3</sup>, SHI Kuan<sup>1,4</sup>, WEN Jun<sup>1,2</sup>, ZHOU Ting-ting<sup>1,2</sup>, FAN Guo-rong<sup>1,2</sup> (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolite Research, Shanghai 200433, China; 3. Medical Team 75215 Force, Huizhou 516133, China; 4. Medical Team 95890 Force, Wuhan 434000, China)

**[Abstract]** Generally azole antifungal drugs possessed chiral center. After administration of the racemate, the results indicated the differences in plasma concentrations and pharmacokinetic parameters between enantiomers were stereoselective. The metabolism might be mainly responsible for the chiral pharmacokinetics of the enantiomers. The quantitation of enantiomers in biological matrix was based on the development of chiral separation techniques. In this paper, the chiral separation techniques of these agents and the advance in chiral pharmacokinetics of ketoconazole and itraconazole were reviewed, which could provide some references to the discovery of azole antifungal new agents.

**[Key words]** antifungal drugs; chiral separation; pharmacokinetics; stereo selectivity

### 1 引言

近年来药物的立体选择性生物活性及体内处置过程已经成为药物研究领域内的一个重要方向。手性药物是指分子结构中具有手性中心, 立体结构成镜像关系的药物, 互为镜像关系而不能重合的一对药物结构被称为对映体。在非手性条件下它们表现出相同的物理化学特征; 而在具有手性特征的碳水化合物、蛋白质和核酸类等组成的生命体中时, 便会在不同程度上表现出立体选择性的相互作用, 从而在体内导致不同的药理性质<sup>[1-3]</sup>。

一些国家相继制定了手性药物开发的政策和指导原则, 明确要求在评价新的候选药物时, 必须包括

对映体的化学、药理学、毒理学以及临床作用的所有信息, 这极大地推动了全球范围内手性药物的研究和发展<sup>[4,5]</sup>。对于生物体液中对手性药物的手性拆分技术的研究, 一直是手性药物研究过程中的重要环节, 有助于我们了解各单一对映体药物进入体内之后在血浆、组织、排泄物等各种生物样品中的比例, 为手性药代动力学研究提供必要的技术手段, 以更好的深入研究药物体内过程的立体选择性特点<sup>[6]</sup>。

唑类抗真菌药物的研究一直是抗真菌领域内关注的重点, 与早期的咪康唑、益康唑相比, 新型的三唑类抗真菌药物具有较强的抗真菌活性及更好的用药安全性, 通过抑制真菌的细胞色素 P-450 依赖性的羊毛甾醇 14- $\alpha$ -脱甲基酶来阻止麦角甾醇的合成, 而麦角甾醇是真菌质膜的重要的甾醇成分<sup>[7]</sup>。目前除了伏立康唑外<sup>[8]</sup>, 几乎所有的抗真菌药物都是采用消旋体给药。因此研究唑类抗真菌药物手性药代动力学特点, 弄清其体内立体选择性处置过程, 对

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81001420), 上海市教委重点课程建设项目(药物分析学)。

**[作者简介]** 郭凯欣(1989-)男, 第二军医大学药学本科 2007 级实习生。E-mail: kelvin2202@163.com。

**[通讯作者]** 闻俊, E-mail: wenjunapple@163.com。

其临床治疗及可能产生的药物相互作用的评价,均具有重要意义。

## 2 唑类抗真菌药物手性分析方法

生物体液中唑类抗真菌药物的手性拆分及其手性药代动力学研究依赖于现代分析技术不断发展,手性对映体药物的分离,尤其是具有多个手性中心的药物拆分是分离科学领域内的难题,其中高效液相色谱法(HPLC)和毛细管电泳(CE)是目前最为主要的手性拆分手段<sup>[9]</sup>。

### 2.1 手性高效液相色谱法

用高效液相色谱法对药物进行手性拆分主要包括手性流动相添加剂法、手性衍生化法和手性固定相法,其中手性固定相法因其操作较为方便,商品化手性色谱柱较为成熟而应用最为广泛。

有文献报道采用不同种类的纤维素手性固定相在正相流动相体系下对咪康唑、益康唑和硫康唑进行手性拆分<sup>[10]</sup>。咪康唑、益康唑和硫康唑对映体中电负性原子与纤维素衍生物固定相之间的不同氢键、偶极-偶极相互作用有助于手性分离;3种唑类抗真菌药在具有苯环取代基的纤维素三(4-氨基苯基氨基甲酸酯)柱(OE)和纤维素三苯基氨基甲酸酯柱(OC)上的手性拆分效果好于无取代基的纤维素三苯基氨基甲酸酯柱(OB),是由于对映体中的芳环结构可以通过不同的 $\pi-\pi$ 作用进一步增强手性识别能力。

汪永忠等<sup>[11]</sup>用反相流动相系统在纤维素三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)柱(OD)上实现了伏立康唑的手性拆分,选择了0.2 mol/L的磷酸二氢钾-乙腈(68:32)作为流动相,25 min内完成了伏立康唑对映体的分离。强极性流动相减弱了溶质分子与手性固定相的氢键作用,使得对映体与手性空穴的包容作用、疏水作用、 $\pi-\pi$ 作用和偶极-偶极相互作用成为了手性识别的关键因素。

刘爱等<sup>[12]</sup>直接在反相 $C_{18}$ 色谱柱上以添加环糊精手性选择剂的方式拆分酮康唑对映体,考察了不同种类的环糊精及其浓度、流动相pH值及甲醇比例等对酮康唑对映体拆分的影响。采用60%的甲醇-磷酸二氢钠(pH 3.0)为流动相,其中含有1.0 mmol/L的磺丁基- $\beta$ -环糊精作为手性选择剂,在6 min内即可完成酮康唑对映体的手性拆分,此法与手性固定相法相比更为简便快速。

Hamdy首次将手性固定相色谱法应用到大鼠血浆中酮康唑对映体分析中<sup>[13]</sup>,选择正己烷-乙醇-异丙醇为流动相,20 min内在直链淀粉三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)柱(AD)上实现对映体的基线分离。生物样品中对映体拆分的关键在于内源性物

质对色谱柱及对映体分离的影响,因此前处理步骤很关键:酸化蛋白沉淀后的血浆样品上清液,利用正己烷将内源性杂质萃取后弃去,再将含有酮康唑的剩余部分碱化后用叔丁基甲醚进行第2次萃取,则可以获得较为干净的样品净化富集过程,满足手性药代动力学研究的需要。

### 2.2 手性毛细管电泳法

毛细管电泳技术近年来在手性药物拆分中显示出强大的应用潜力,与其他方法相比,毛细管电泳技术具有溶剂消耗少、进样量小、快速、高效的特点,并且不需要专门的色谱柱作为必要条件,特别适合微量生物体液中的手性药物及其代谢产物的分离分析。同时在毛细管区带电泳、胶束电动毛细管色谱、毛细管电色谱等较多的分离模式下均可以实现令人满意的手性拆分<sup>[14]</sup>。

侯莹等<sup>[15]</sup>考察了毛细管区带电泳拆分三唑类化合物时所添加的 $\beta$ -环糊精衍生物种类及浓度等条件,发现羧甲醚- $\beta$ -环糊精作为手性选择剂可以使5个氟康唑类衍生物对映体达到较好的基线分离,硫酸酯- $\beta$ -环糊精和二氟代羧甲醚- $\beta$ -环糊精的空间位阻影响使得对映体不能和环糊精形成较好的包合物,从而无手性拆分能力。另外羧甲醚- $\beta$ -环糊精的浓度、缓冲液体系的pH值也是影响手性拆分的关键。

Puyana等<sup>[16]</sup>在pH为3.5的磷酸盐缓冲液中加入10 mM的7-(2,3,6-三-氧-甲基)- $\beta$ -环糊精作为手性选择剂,在15℃的操作温度下对酮康唑和特康唑进行了较好的手性拆分。其中特康唑对映体的分离度达到2.2,12 min内即可完成酮康唑和特康唑的对映体分离。进一步优化毛细管电泳条件后,选择有效长度为25 cm的短柱,pH为2.5的50 mM磷酸盐缓冲液,25 kV的操作电压,3 min内完成了上述两个唑类药物的手性拆分,并且可以用于上述药物制剂中对映体的快速定量分析。

100 mM pH 3.5的磷酸盐缓冲液中加入30 mM的上述手性选择剂,在15℃的操作温度及30 kV的操作电压下,30 min内可以实现4个伊曲康唑对映体的手性拆分,且彼此分离度均大于3<sup>[17]</sup>。

采用胶束电动毛细管色谱技术时<sup>[18]</sup>,添加的环糊精由于其亲水性而不能进入胶束,因此在缓冲液中便存在胶束相、水相和环糊精相,待分离的对映体因与环糊精形成包合物的稳定差异和在毛细管中的迁移速率不同而拆分,有利于缩短分析时间。Hermawan等<sup>[19]</sup>在20 mM pH 8.0的磷酸盐缓冲液中加入50 mM的十二烷基磺酸钠及40 mM的羟丙基- $\gamma$ -环糊精分离益康唑对映体,9 min内即完成了益康唑的手性拆分,所优化的条件与以往益康唑的手性拆分<sup>[20]</sup>相比可以获得更佳的重现性及较好的定量指标。

Michael 等<sup>[21]</sup>首次采用胶束电动毛细管色谱技术对伊曲康唑及其代谢产物羟基伊曲康唑的多个对映体进行了手性拆分,采用 1% 的硫酸 β-环糊精可以使上述化合物及结构类似的内标物质的 8 个对映体达到基线分离并互不干扰;低浓度的甲醇或者乙醇可以很好的分辨出 8 个对映体;在甲醇中进一步添加 2% 的聚乙二醇 4 000 后发现,水溶性的多聚物增加了缓冲液的粘度,减少了纵向扩散,使得分离效能进一步提高。经过乙醚液-液萃取之后的伊曲康唑血浆样品,用高浓度的甲醇进行复溶后,再利用毛细管场放大进样技术对其富集,十分有利于对映体的检出,200 μl 小体积血浆样品即可满足实际样品分析的灵敏度要求,20 min 内即完成了临床样品的监测,所有实际样本中各对映体的保留时间及峰面积相对标准偏差均小于 9.3%。

### 3 唑类抗真菌药物手性药代动力学

采用手性分析技术对生物样品中的唑类抗真菌药物对映体进行分别定量,对以消旋体给药后的体内立体选择性处置给予定性、定量描述,可以更加准确的评价药物作用。目前临床使用的唑类抗真菌药物中大部分具有手性特征以消旋体给药,但是深入研究其手性药动学的特征主要集中在最为常用的酮康唑和伊曲康唑上,可能因为其是主要的细胞色素酶 3A4 亚型(CYP3A4)的抑制剂,有可能导致潜在立体选择性代谢相互作用而引起药物不良反应。因此除了对血浆中对映体分布进行定量描述外,代谢过程及分子酶学机制也是探讨其体内立体选择性过程的重要环节。

**3.1 酮康唑** 酮康唑主要有(+)-(2R,4S)和(-)-(2S,4R)两种对映体,临床上以 1:1 的消旋体给药。研究结果表明<sup>[13]</sup>大鼠给药酮康唑消旋体 10 mg/kg 后,(+)-酮康唑的达峰浓度( $C_{max}$ )及药时曲线下面积(AUC)大约是(-)-酮康唑的 2.1 至 2.4 倍左右,表明酮康唑具有较高的立体选择性药动学特点。

Hamdy 等<sup>[22]</sup>进一步研究了大鼠静脉注射给药及不同口服剂量给药下的酮康唑的立体选择性药动学,并且通过体外代谢实验和血浆蛋白结合率实验,对探究造成酮康唑体内立体选择性过程的机制进行了探讨。静脉注射给药酮康唑消旋体后,(+)-酮康唑 AUC 是(-)-酮康唑的 2.1 倍。随着口服剂量的增大,给药酮康唑消旋体后,对映体各自的  $C_{max}$  及 AUC 与给药剂量都呈非线性相关,而立体选择性差异类似(+)-酮康唑的  $C_{max}$  和 AUC 分别大约是(-)-酮康唑的 3.7 至 5.7 倍左右。但是二者具有相似的达峰时间( $T_{max}$ ),说明对映体的吸收速率相似;相似的消除半

衰期表明对映体的清除率结果较为接近。酮康唑具有较高的血浆蛋白结合率(>97%)对映体体现出明显的血浆蛋白结合差异,游离型的(-)-酮康唑浓度大约是(+)-酮康唑的 2.5~2.9 倍,更容易向组织分布,使得血药浓度降低;同时肝代谢系统中的功能转运蛋白也有可能选择性的将游离型酮康唑泵入细胞内进行代谢,因此使得(+)-酮康唑的血药浓度明显高于(-)-酮康唑,呈现立体选择性药动学特点。

这种立体选择性也体现在对细胞色素 P450 酶系活性的抑制上<sup>[23]</sup>,通过以睾酮与美沙酮为底物的代谢抑制研究发现,(-)-酮康唑对 CYP3A4 活性的抑制是(+)-酮康唑的 2 倍左右,提示可能产生的药物相互作用。

**3.2 伊曲康唑** Michael 等<sup>[21]</sup>对连续服用 103 d 伊曲康唑(200 mg/d)的真菌感染病人血浆进行分析,采用毛细管电泳对其中的伊曲康唑及其代谢产物羟基伊曲康唑进行手性拆分研究,发现伊曲康唑的体内代谢具有明显的立体选择性特点,并且血浆中的代谢产物羟基伊曲康唑也具有明显的手性分布特征,对映体在给药期间具有较为稳定的血浆分布比例。体外 CYP3A4 温孵研究的代谢结果与实测血浆样品相一致。

Kunze<sup>[24]</sup>则进一步采用手性液相色谱质谱联用选择离子检测模式,对伊曲康唑体内代谢物进行分析,弄清伊曲康唑的立体选择性代谢途径及规律。研究中发现健康志愿者连续 7 d 口服给药伊曲康唑(100 mg/d)后,第 1 天和第 7 天的药代参数均表现出明显的立体选择性差异,(2S,4R)构型在血浆中占主导,第 1 天时(2S,4R)构型的 AUC 是(2R,4S)构型的 6.9 倍,具有立体选择性首过效应,这个差异随着给药天数的增加逐渐减小,第 7 天稳态后两种构型 AUC 的差异减小到 3 倍,但是除  $C_{max}$  外各项参数的手性差异依旧明显,可能是由于多剂量给药后伊曲康唑体内蓄积减少了  $C_{max}$  的差异。受试者血浆中还可以检测到羟基伊曲康唑、酮式伊曲康唑和 N-去乙基伊曲康唑 3 个代谢产物,其中酮式伊曲康唑和 N-去乙基伊曲康唑是(2R,4S)构型,可见伊曲康唑消旋体进入体内后(2R,4S)构型发生了广泛的立体选择性代谢。

研究者进一步采用经 CYP3A4 介导的体外代谢实验加以验证,发现羟基伊曲康唑来自于(2R,4S)构型的 2 个对映体,进而又代谢成酮式伊曲康唑,最终得到(2R,4S)构型的 N-去乙基伊曲康唑,而(2S,4R)构型的 2 个对映体则不发生代谢反应。体外酶抑制实验结果显示,(2R,4S)构型的 2 个对映体的半数酶抑制浓度大约为(2S,4R)构型的 1/2 至 1/4,但是 2 种构型的 4 个对映体与 CYP3A4 的亲合力没

有显著差异。从化学结构分析得出,分子结构中远离代谢位点的二氧戊环结构的立体化学显著地影响了伊曲康唑代谢转化的发生,而三氮唑 2' 位酮丁基侧链的立体结构则会影响氧化反应发生的程度。长期给药后,由于 CYP3A4 介导的(2R,4S) 构型对映体代谢发生饱和,使得其在体内的蓄积程度远大于(2S,4R) 构型,在发生代谢过程中同时也抑制了 CYP3A4 的活性,因而减少了多剂量给药后的立体选择性药动学差异,并同时改变了药物相互作用的强度,增大了临床长期用药可能产生的风险。因此推荐临床使用单一的(2S,4R) 构型对映体给药,与消旋体相比则可以显著减少对 CYP3A4 的抑制,降低由其介导的药物相互作用风险。

#### 4 结语

酮康唑和伊曲康唑的深入研究提示我们在唑类抗真菌药物研发及临床应用方面,都需要考虑手性药物或者候选化合物进入体内后有可能表现出的立体选择性处置特点。

随着手性分析技术的发展,越来越多的手性色谱或者毛细管电泳技术已经可以很好的应对小体积生物样品分析的需要。质量控制研究中的手性分析方法辅以多步骤纯化富集的前处理过程,可以直接应用到生物样品分析中,从而获得高灵敏度和高选择性的手性拆分定性、定量结果,以逐步实现手性药物立体选择性药代动力学的常规分析。因此,对于已有的唑类抗真菌药物的体内过程分析,可以从立体选择性处置角度加以完善;对于唑类抗真菌药物研发,可以在候选化合物早期进行体内对映体监测。通过手性药动学研究揭示药物或候选化合物可能的立体选择性代谢途径,鉴别具有手性特征的代谢产物,探讨对体内药物代谢特征酶系的诱导或者抑制的特点,从而更加准确地描述唑类抗真菌药物的手性代谢特性,为进一步的结构改造及临床用药提供更为合理的建议。

#### 【参考文献】

[1] 姚彤伟. 手性药物分析 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 9.  
[2] Williams ML, Wainer IW. Role of chiral chromatography in therapeutic drug monitoring and in clinical and forensic toxicology [J]. Ther Drug Monit, 2002, 24(2): 290.  
[3] Soudijn W, Van Wijngaarden I, Ijzerman AP. Stereoselectivity of drug-receptor interactions [J]. Drugs, 2003, 6(1): 43.  
[4] 黄晓龙. 浅谈在立体异构体新药研究中需注意的问题 [J]. 中国新药杂志, 2001, 10(1): 65.  
[5] 黄晓龙. 美国 FDA 关于开发立体异构体新药的政策简介 [J]. 中国新药杂志, 2000, 9(9): 650.  
[6] Wang X, Zeng S. Stereoselective metabolic and pharmacokinetic analysis of the chiral active components from herbal medicines

[J]. Curr Pharm Anal, 2010, 6(1): 39.  
[7] 盛春泉, 张万年, 季海涛, 等. 抗真菌药物的创新设计研究 [J]. 中国新药杂志, 2004, 13(2): 97.  
[8] 朱 静. 伏立康唑的药理特性及临床应用 [J]. 天津药学, 2007, 19(4): 48.  
[9] Ekiert RJ, Krzek J, Talik P. Chromatographic and electrophoretic techniques used in the analysis of triazole antifungal agents—a review [J]. Talanta, 2010, 82(4): 1090.  
[10] Hassan YA, Imran A. Comparative study of the enantiomeric resolution of chiral antifungal drugs econazole, miconazole and sulconazole by HPLC on various cellulose chiral columns in normal phase mode [J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 27(3-4): 441.  
[11] 汪永忠. 伏立康唑对映体的手性高效液相色谱分离 [J]. 中国药师, 2006, 9(3): 231.  
[12] 刘 爱, 葛文娜, 吴淑燕, 等. 手性流动相添加法拆分酮康唑外消旋体 [J]. 色谱, 2009, 27(2): 240.  
[13] Hamdy DA, Brocks DR. A stereospecific high-performance liquid chromatographic assay for the determination of ketoconazole enantiomers in rat plasma [J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22(5): 542.  
[14] 陈伟成, 刘长海, 张 海, 等. 毛细管电泳手性拆分方法的研发策略 [J]. 药实践杂志, 2010, 28(2): 130.  
[15] 侯 莹, 纪松岗, 赵 亮, 等. 毛细管区带电泳对 5 种三唑类化合物的手性分离 [J]. 药实践杂志, 2008, 26(3): 214.  
[16] Castro-Puyana M, Crego AL, Marina ML. Enantiomeric separation of ketoconazole and terconazole antifungals by electrokinetic chromatography: Rapid quantitative analysis of ketoconazole in pharmaceutical formulations [J]. Electrophoresis, 2005, 26(20): 3960.  
[17] Castro-Puyana M, Crego AL, Marina ML. Separation and quantitation of the four stereoisomers of itraconazole in pharmaceutical formulations by electrokinetic chromatography [J]. Electrophoresis, 2006, 27(4): 887.  
[18] 李关宾, 林秀丽, 蒋文强, 等. 胶束电动毛细管色谱法分离酮康唑手性异构体 [J]. 分析化学, 2000, 28(5): 653.  
[19] Hermawan D, Ibrahim WAW, Sanagi MM, et al. Chiral separation of econazole using micellar electrokinetic chromatography with hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53(5): 1244.  
[20] Castro-Puyana M, Crego AL, Marina ML, et al. Enantioselective separation of azole compounds by EKC. Reversal of migration order of enantiomers with CD concentration [J]. Electrophoresis, 2007, 28(15): 2667.  
[21] Breadmore MC, Thormann W. Capillary electrophoresis evidence for the stereoselective metabolism of itraconazole in man [J]. Electrophoresis, 2003, 24(15): 2588.  
[22] Hamdy DA, Brocks DR. Nonlinear stereoselective pharmacokinetics of ketoconazole in rat after administration of racemate [J]. Chirality, 2009, 21(7): 704.  
[23] Dilmaghanian S, Gerber JG, Filler SG, et al. Enantioselectivity of inhibition of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by ketoconazole: testosterone and methadone as substrates [J]. Chirality, 2004, 16(2): 79.  
[24] Kunze KL, Nelson WL, Kharasch ED, et al. Stereochemical aspects of itraconazole metabolism in vitro and in vivo [J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34(4): 583.

【收稿日期】 2011-05-11  
【修回日期】 2011-10-13