用LC分析生物体液中手性药物

陆峰译 李修禄校

当前测定生物体液中药物和代谢中光学异构体，先对药物作液-液提取，进行手性衍生化或直接分离，在手性固定相(CSP)上形成稳定性不同的瞬间过渡态非对映体，达到对映体分离，直接辩识，虽然有时可以进行衍生化但分析物的分离和检出率并没有因此而得到提高，而且方法复杂，冗长。CSPs也难以适用于生物体液。因此，目前生物体液中药物手性识别需先对手性药物进行提取，除去样品杂质，再注入CSP柱作直接手性识别。间接手性分离需一种高光学纯、高化学纯的手性试剂衍生化以形成离子对或共价的非对映体衍生物，于非手性固定相中分离，这样成本低，分离和检出率均有所提高，衍生化试剂光学纯度要求很高，否则其动态分离会影响定量准确性，但是，即使溶液衍生化实现自动化，对生物体液中药物进行在线预柱标记仍十分困难。

衍生化过程

1．用于体液中药物的非手性多聚物衍生化试剂

利用对检测器敏感的、固定化尾端标记的多聚衍生化试剂，可提高化学和对映体检测率及辨识力，它通过共价键把化合物键合到交联的多聚物表面，提高对pH和水的稳定性及提高分析的再现性，具有适宜粒径、孔径、交联度、表面积和其他物理参数的微孔多聚拉体是一种体液直接进样及亲核性药物衍生化的理想试剂，在体液相对组分的亲水作用下，其疏水性可防止高分子量蛋白质或其他生物大分子进入微孔，使之在表面活性剂增强的LC条件下，于溶剂前沿洗脱。

也可以利用传统的RP分离条件完成生物体液直接进样，预浓缩疏水性药物，于担体上洗脱高分子物，完成有效衍生化，再将衍生化物反冲至RP柱上，在残余样品组分中进行常规衍生化梯度洗脱分离，最终得到只被分析物衍生物峰和多聚物试剂产生的弱的水解物峰的最简单图谱。

以上方法均可用现代商品化仪器实现全自动化。仪器包括样品制备站、梯度洗脱LC系统及用于色谱数据处理的微电脑。

2．生物体液中药物手性多聚物衍生化试剂

此法是一种手性识别的间接法，系用符合下列要求的固相试剂生成能用非手性LC系统分离的非对映体，①非对映体形成速度相同；②衍生化过程中对映体、非对映体的外消旋化很小；③有效成份分离；④检测灵敏；⑤各种非对映体检测响应度相同。

Haginaka和Wakai采用β—CD作为SHP担体，用于直接进样后血清中药物对映体分析，CD不在微孔中，而是与亲水的不缩水甘油氧丙基相在微孔表面（实际上是一种混合相或多相SHP介质）。此手性包含试剂被固定，而在固相衍生化试剂中，一种活化酯与手性或非手性衍生物标记尾端一起被固定，这些多聚固相衍生化试剂限制了亲水蛋白质分子，同时允许小的疏水性胺类分析物从体液中直接有效地提取，从而达到选择性

衍生化，保证了限制性浸透功能，其基本原理和最终结果与体液中手性药物分析相似。

Chou 等介绍了一种用多聚手性试剂进行的对映体测定方法，在活化的氧硝基苯酚多聚物介质上，对检测器敏感、具光学活性的多聚物试剂与9-芴基甲氧氯甲酸酯(FMOC)—L脯氨磷和FMOC—L 苯丙氨酸尾端一起合成，Chou 等还叙述了负载的测定、衍生化、分离、检测以及对简单胺类与氨醇的应用，试剂所包含的手性中心通常在刚性多聚物骨架上联有氨基酸以及共价键合的对检测器敏感的标记尾端，FMOC一键合的氨基酸通常用作对UV及FC敏感的检测器探针形成对映体胺的非对映体，此非对映体在恒组成或梯度条件下用正相色谱分离，固相衍生化设计确证了不存在动态分离还有利于辨识，所形成的非对映体荧光检测良好，检测限可达 PPb 级或10^{-12}mol，可用于痕量分析及光学杂质鉴别，用UV、FL或其它检测技术可以检测不同类型检测器敏感尾端的非对映体，

Gao与Krull应用FMOC—L—脯氨酰标记尾端的固相衍生化手性试剂对尿中安非他命对映体进行测定。在线及离线衍生化都在相对温和的反应条件下短时间内进行。其在线衍生化结果与传统的 RP—LC 分离一致，动力学研究表明对映体动力学分离不存在，在固相试剂上观察到良好的热稳定性和水溶液稳定性，经过pH调整和过滤以后，不必再进行附加的样品处理和药物萃取，此法可以对复杂的生物固定液中安非他命对映体的光学性质和化学性质同时进行测定，其他手性胺类药(普萘洛尔、心得舒、麻黄碱、新福林、肾上腺素、去甲对羟福林、儿茶酚胺等) 也可经固相衍生化分析。

最新发展了对硝基苯基苯甲酮手性固定相衍生化试剂，接上FMOC—L—脯氨酸尾端后进行血浆样品的对映体直接分析。疏水的手性衍生化尾端固定在微孔中，使流动相引起的水化作用减至最小，固相试剂的微孔孔径很小，可限制蛋白质大分子浸透，防止其在微孔中沉淀。衍生化使用低浓度乙腈和表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)。SDS 溶解变性蛋白质，防止其在衍生化色谱柱中沉淀、衍生化所得非对映体用常规RP柱分离，已有体液中药物测定分析图谱中检测限、线性、衍生化中无外消旋化、无动力学分离等特点的报道，每种对映体的绝对水平和各对映体的比率可从图谱直接获得，不必把药物先从人血浆中除去。多聚羟苯并三唑或二甲氨基吡啶衍生化试剂，用多聚物基质疏水保护可能变得稳定，从而获得好的在线衍生化再现性。这些多聚物试剂对体液中弱亲核性药物的测定大有裨益。

3．对映体药物直接分析的非手性聚合试剂

Bourgue 和 Krull 介绍了两种用于强亲核性和弱亲核性衍生化3,5一 二硝基苯甲酰基固相试剂其标记尾端是强π一酸，手性基质能在 Pirkle 型对映体分离柱上衍 生化 和 分离。3，5一二硝基苯甲酰氨的仲胺衍生物在氨基氮上无质子，无法提供与CSPs作用的三个点位进行手性辨识。因此，仲胺对映体不能作为其3，5一二硝基苯甲酰氨衍生物分离基线。含安非他命的尿液在用聚合3，5一二硝基苯甲酰基标记尾端的苯并三唑试剂离线衍生化后进行分析，含药尿液经调 pH 后，直接注入离线固相衍生化试剂，衍生物在一定时间内洗脱，注入含有衍生物溶液，可在安非他命对映体峰面积基础上计算对映体比率。这是对映体识别中溶液相衍生化的新发展。甲基化手性氨基酸在液-液提取和3,5一二硝基苯酰基试剂离线衍生化后进行测定。其他手性、非手性胺类、氨基醇和氨基酸 也 有报道。

最近一种多聚物活化的氨甲酸酯可用于手性胺类和醇类的分离，该法唯一缺点是3,5一异氰酸硝基苯酯尚未上市，且其二聚作用会产生不溶性22-二硝基苯脲干扰，需临时制

备。大量未反应异氰酸须从衍生化溶液中提取除去。3,5-异氰酸硝基苯酯作为一种活性氨甲酸酯固定在多聚物材料上、活性氨甲酸酯由于多聚物基质的疏水性被保护起来，减少了与分析物反应的试剂消耗量，所以试剂可反复用于自动分析中的有效衍生化。因为异氰酸在聚合物骨架构造中仅以低浓度释放，其二聚作用或交叉反应还不造成多大问题，理想的聚合载体只允许亲脂性、亲核性分析物透过多聚物微孔，然后与活性氨甲酸酯反应，而排除亲水成分。

结论

已有利用对映体分析测定生物体液中药物的化学和手性参数的报道。当前用CSPs直接分离或非手性间接分离的样品净化过程太长，劳动强度也大。在多聚载体上固定衍生化试剂后给生物体液分析带来方便。聚合试剂的疏水性在药物测定中起着固相提取介质的作用。限制聚合试剂的孔径可抑制体液中大分子蛋白质浸透，因而避免了干扰，非手性和手性衍生化试剂用于生物体液的直接分析，以最小强度的样品处理就可完成对映体药物定量测定，这些方法简化了LC衍生化步骤，并且提供了一个生物体液中手性药物测定的崭新方法。

[Trend in Analytical chemistry, 1993, 12(4):159]

（上接41页）

别置于烘箱(39℃)、室温(25℃)冰箱(5℃)一个月。观察结果：涂膜剂的稠度、均匀性、色泽均稳定，无霉败现象。

三、临床疗效观察

1．病例选择

按流行病学，实验室检查及局部体检，明确诊断为流行性腮腺炎儿童患者40例。其中双侧腮腺肿大18例，单侧肿大22例。体温39～40℃3例，38～38.8℃18例，37.8℃19例。白细胞总数>1万，5例，<1万，7例，<5000，19例。性别与年龄分布，男19例，女21例，年9个月～3岁9例，4～6岁18例，6～12岁13例。

2．治疗方法

除体温≥39℃给于退烧药外，其余均采用腮腺局部应用本涂膜剂。先将患儿脸部用温水轻轻洗净、擦干，然后将本涂膜剂均匀涂在腮腺肿胀处，并轻轻按摩几分钟，一日2～3次用药后，局部可形成药膜。

3．疗效评价

40例患儿均为门诊病人，3d后复诊。疗效评价标准，显效：体温完全正常，局部腮腺完全消肿，无疼痛感。有效：体温下降，局部腮腺肿胀明显缩小，无疼痛感。无效：体温和腮腺肿痛无变化。观察结果：显效36例，有效2例，无效2例，总有效率达95%

讨论

三氮唑核苷系核苷类广谱抗病毒药，对多种RNA和DNA病毒有抑制作用，能阻止病毒的复制。全身用药有一定的毒副作用，由于首过效应，生物利用度也有一定的削弱。涂膜剂局部用于治疗腮腺炎、药物经皮吸收，提高了有效药物浓度，直接对抗腮腺炎病毒，减轻了副作用。涂膜剂型，避免了打针服药之苦。易于为病人，特别是儿童所接受。在药物稳定性试验中，我们发现涂膜剂表面易生霉，加入少量防腐剂至少三个月能避免发生霉变。