

1 – Испытательный центр
ООО «ОЛФАРМ», 127006,
Россия, г. Москва,
ул. Нагатинская, 3а

2 – ФГАОУ ВПО «Российский
университет дружбы
народов», 117198, Россия,
г. Москва,
ул. Миклухо-Маклая, 6

1 – LLC «Olpharm», 3a,
Nagatinskaya str., Moscow,
127006, Russia

2 – Peoples' Friendship
University of Russia, 6,
Miklukho-Maklaya str.,
Moscow, 117198, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: iv.vasilenko@inbox.ru

ОПТИЧЕСКИЕ ИЗОМЕРЫ В ФАРМАЦЕВТИКЕ

И.А. Василенко^{1*}, М.В. Лебедева¹, В.А. Листров²

Резюме. Рассмотрены литературные данные, посвященные изучению оптических изомеров в фармацевтике. Приводится терминология, применяемая в данной области, и теоретические основы явления оптической активности различных веществ. Проведен сравнительный анализ биологической и фармакологической активности оптических изомеров. Обсуждаются методы разделения и анализа оптических изомеров соединений как на стадии разработки, так и в производстве лекарственных препаратов.

Ключевые слова: оптически активные вещества, оптическая активность, стереоизомеры, хиральность, рацематы, энантиомеры, жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез, дисперсия оптического вращения, ядерный магнитный резонанс, парамагнитные сдвиговые реагенты.

OPTICAL ISOMERS IN THE PHARMACEUTICS

I.A. Vasilenko^{1*}, M.V. Lebedeva¹, V.A. Listrov²

Abstract. The literature data devoted to the study of optical isomers in the pharmaceutical industry have been reviewed. The terminology used in this field and theoretical basis for the phenomenon of optical activity of various substances have been discussed. The article presents data of comparing biological and pharmacological activity of optical isomers. Methods of optical separation and analysis of isomers of the compounds at the stage of development, and manufacture of drugs have been discussed.

Keywords: optically active substances, optical activity, stereoisomers, chirality, the racemates, the enantiomers, liquid chromatography, capillary electrophoresis, the dispersion of the optical rotation, nuclear magnetic resonance, paramagnetic shift reagents.

ВВЕДЕНИЕ

Оптически активные соединения интересуют химиков и фармакологов с момента их открытия, вот уже более 150 лет [1, 2]. Наиболее сложная и интригующая проблема заключается в том, почему оптические изомеры проявляют различную биологическую и фармакологическую активности. История открытия оптической изомерии насчитывает более 150 лет, но до сих пор все свойства оптических изомеров описываются феноменологически (описательно, эмпирически), единой теории нет. Данная проблема обсуждается на уровне учебных пособий [3, 4], публикуется большое число экспериментальных статей на эту тему [5, 6]. Но, несмотря на это, даже на сегодня проблема разделения оптических изомеров, анализ состава оптических изомеров не является рутинной задачей, так же как и проведение сравнительного изучения фармацевтических свойств оптических изомеров. Данная публикация посвящена обзору литературных данных по изучению структуры оптических изомеров, методам их разделения и анализа, сравнительному изучению биологической и фармакологической активности.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Рассмотрим термины, используемые при описании молекул, обладающих оптической активностью.

Оптически активные вещества – среды (и молекулы), обладающие естественной оптической активностью.

Оптическая активность – способность среды (кристаллов, растворов, паров) вызывать вращение плоскости поляризации плоскополяризованного света.

Стереоизомеры – молекулы, отличающиеся только пространственным расположением заместителей.

Хиральность – свойство молекулы не совмещаться в пространстве со своим зеркальным отражением. Термин основан на древнегреческом названии наиболее узнаваемого хирального предмета, а именно руках. Так, левая и правая рука являются зеркальными отражениями, но не могут быть совмещены друг с другом в пространстве. Подобным образом свойством хиральности обладают молекулы, в которых отсутствуют зеркально-поворотные оси симметрии S_n , что эквивалентно наличию в молекуле элементов хиральности

(центра, оси, плоскости хиральности и др.). Такие зеркально-симметричные формы химических соединений называются энантиомерами.

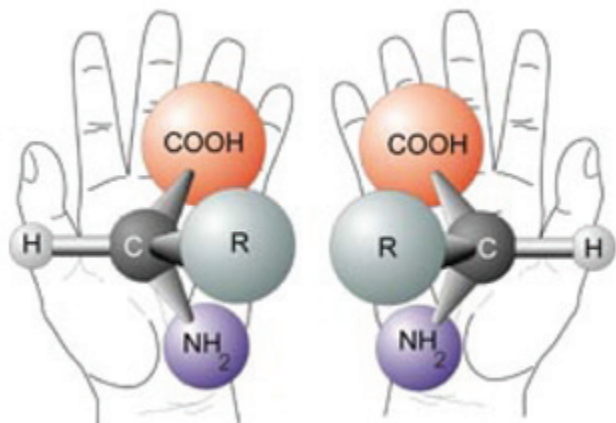


Рисунок 1. Хиральность – несовместимость в пространстве

Изменение пространственного расположения одних и тех же групп атомов в молекуле биологически активного вещества может иметь столь же значительные последствия, как и изменение химической природы этих групп. Изучение взаимосвязи таких стереических изменений с физиологической активностью молекулы позволяет с помощью стереоспецифичных методик синтеза получать лекарственные препараты, обладающие наибольшей эффективностью и/или наименьшей токсичностью.

Энантиомеры – оптические антиподы – молекулы, которые являются хиральными и соотносятся друг с другом посредством симметрии отражения.

Диастереоизомеры – стереомеры, вещества, которые не соотносятся друг с другом посредством симметрии отражения.

Рацематы – смесь оптических изомеров. Как правило, понятие «рацемат» относят к смеси оптических изомеров в соотношении один к одному.

СВОЙСТВА ОПТИЧЕСКИХ ИЗОМЕРОВ

Оптические изомеры (энантиомеры, хиральные изомеры) не отличаются друг от друга по таким показателям, как температура кипения, температура плавления; спектры ИК, УФ, ЯМР этих изомеров не отличаются друг от друга. Изомеры отличаются по биологическим свойствам (об этом будем говорить позже) и такому физическому свойству, как вращение плоскости поляризации плоскополяризованного света. Свет, как электромагнитные колебания с определенной длиной волны, представляет собой сумму векторов электромагнитных колебаний, двигающихся хаотично. После прохождения через некую среду, обладающую способностью поляризовать свет, на вы-

ходе будет получен свет с различным способом поляризации. Например, поляризованный по кругу или циркулярно поляризованный свет, когда вектор электромагнитных колебаний совершает движение по кругу без изменения по абсолютной величине, при этом движение может совершаться по кругу влево (циркулярно поляризованный свет влево) или вправо (циркулярно поляризованный свет вправо).

Наложение двух циркулярно поляризованных источников с одинаковой интенсивностью влево и вправо дает плоскополяризованный свет (правила сложения векторов из векторной алгебры [7, 8]). Исторически более ста пятидесяти лет назад было обнаружено явление вращения плоскости поляризации оптически активными молекулами (хиральными молекулами).

Угол вращения плоскополяризованного света говорит о том, что среда обладает этим свойством, это макроскопическое свойство среды. Данное свойство среды связано с тем, что показатель преломления циркулярно поляризованного света влево n_L отличается от показателя преломления циркулярно поляризованного света вправо n_R . Разница в показателях преломления циркулярно поляризованного света вправо и влево пропорциональна углу вращения плоскополяризованного света. Угол вращения плоскополяризованного света дает информацию только о том, что свойством вращать плоскость поляризации обладает данная среда. Эта среда должна содержать хиральные молекулы.

Некоторые из органических соединений (в чистом виде или в растворе) способны вращать плоскость поляризации света. Если вещество отклоняет плоскость поляризации вправо (при наблюдении навстречу лучу), его называют правовращающим (+), если влево – левовращающим (-). Распространенная среди органических соединений оптическая активность обусловлена их строением. Одной из причин ее возникновения является наличие в структуре органических молекул sp^3 -гибридизированного атома углерода, связанного с четырьмя различными группами. Такой атом называется хиральным или асимметричным [7, 8].

Асимметричными могут быть и другие атомы, например азота, серы, фосфора. Соединения с одним асимметричным атомом углерода существуют в виде двух изомеров, соотносящихся как предмет со своим зеркальным отражением, – правовращающих D (от лат. *dextro* – правый) и левовращающих L (от лат. *laevo* – левый) изомеров. Такие изомеры называют энантиомерами. Они похожи между собой, но не тождественны, имеют одинаковый состав и последовательность соединения атомов в молекуле, однако отличаются друг от друга относительным расположением атомов в пространстве, то есть конфигурацией. В настоящее время существует и другая, так называемая R,S-номенклатура оптических изомеров (от *rectus* – правый и *sinister* – левый), позволяющая наиболее точно описать конфигурацию вещества.

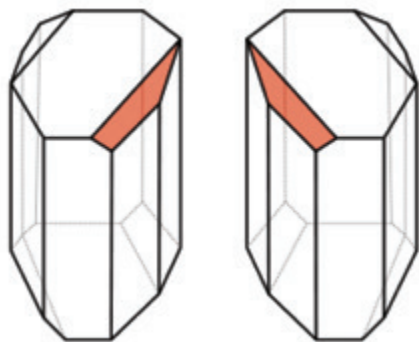


Рисунок 2. Энантиоморфные кристаллы правовращающего и левовращающего тартратов

Хиральность молекул была открыта Л. Пастером в 1848 году. Пастер обратил внимание на то, что кристаллы, выпадающие из раствора рацемического тартрата натрия-аммония, имеют две формы, представляющие собой зеркальные отражения, которые не совмещаются друг с другом в пространстве. Напротив, кристаллы индивидуального правовращающего тартрата натрия-аммония имели одинаковую форму с малыми плоскостями, направленными в одну сторону. Пастер провёл подобные кристаллизации с тринадцатью энантиомерно чистыми соединениями (различными тартратами и винной кислотой), а также с шестью рацемическими тартратами, и сделал вывод о существовании хиральности молекул, и объяснил ранее неизвестный вид изомерии винных кислот – энантиомерию.

Структурная трактовка хиральности стала возможной после введения в 1874 году Я. Вант-Гоффом и Ж. Ле Белем концепции асимметрического атома углерода, то есть тетраэдрического атома углерода с четырьмя различными заместителями.

Понятие хиральности было введено лордом Кельвином в конце XIX в.

«Я называю какую-либо геометрическую фигуру, или группу точек, хиральной и говорю, что она обладает хиральностью, если её изображение в идеальном плоском зеркале не может быть с ней совмещено».

Позже В. Мейер распространил понятие о хиральности на соединения азота, а У. Дж. Поуп – на атомы серы, селена и олова. Хиральность комплексных соединений металлов была изучена А. Вернером [9].

СИММЕТРИЯ ХИРАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ

Поскольку хиральность является отражением геометрии молекулы, её можно определить путём отнесения молекулы к той или иной группе симметрии. Очевидно, не являются хиральными молекулы с центром инверсии (*i*) или плоскостью симметрии (*s*), поскольку эти молекулы состоят из двух одинаковых частей, которые при отражении превращаются друг в друга, и отражение является эквивалентным исходной мо-

лекуле. Ранее геометрический критерий хиральности формулировали так: «у хиральной молекулы не должно быть плоскости симметрии и центра инверсии». В настоящее время пользуются более точным критерием, который предполагает отсутствие у хиральной молекулы также зеркально-поворотных осей S_n [10].

Виды хиральности предоставлены на рисунке 3.

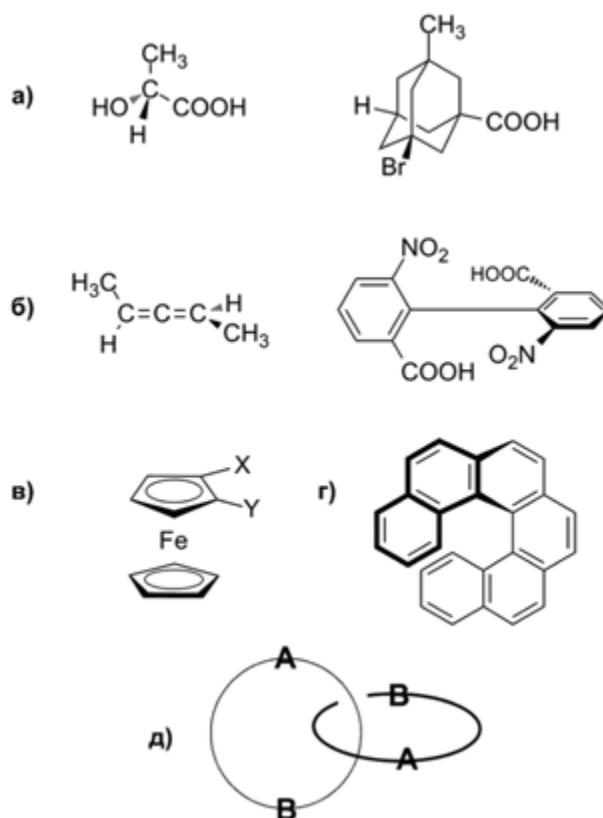


Рисунок 3. Примеры молекул, обладающих (а) центральной хиральностью; (б) аксиальной хиральностью; (в) планарной хиральностью; (г) спиральной хиральностью; (д) топологической хиральностью

В зависимости от элемента молекулы, наличие которого приводит к возникновению хиральности, различают следующие виды хиральности:

- 1) центральная (центр хиральности);
- 2) аксиальная (ось хиральности);
- 3) планарная (плоскость хиральности);
- 4) спиральная (спираль);
- 5) топологическая.

Центральная хиральность

Центральная хиральность возникает в результате наличия в молекуле центра хиральности (хирального центра), которым, как правило, является асимметрический атом углерода, имеющий 4 различных заместителя. Хиральными центрами могут быть также

атомы Si, P, S, реже – N. В хиральных производных адамантана центр хиральности находится в середине углеродного каркаса, где атомов нет вовсе.

Аксиальная хиральность

Аксиальная хиральность возникает в результате неплоского расположения заместителей относительно некоторой оси – оси хиральности. Ось хиральности существует в несимметрично замещённых алленах. Sp-гибридный атом углерода в аллене имеет две взаимно перпендикулярные p-орбитали. Их перекрывание с p-орбиталями соседних атомов углерода приводит к тому, что заместители в аллене лежат во взаимно перпендикулярных плоскостях. Подобная ситуация наблюдается также в замещённых бифенилах, в которых вращение вокруг связи, соединяющей ароматические кольца, затруднено, а также в спироциклических соединениях [11, 12].

Планарная хиральность

Плоскость хиральности присутствует в производных ферроцена, замещённых парациклофанах и др. При помощи данного термина описывают хиральное расположение внеплоскостных элементов молекулы относительно плоскости хиральности.

Спиральная хиральность

Спиральная хиральность характерна для соединений, имеющих элементы в форме спирали, пропеллера или винта, например для гелиценов. Шесть ароматических колец в гексагелицене не могут уложиться в одной плоскости, поэтому образуют спираль, которая может быть закручена влево или вправо. Данный вид хиральности наблюдается также в белках и нуклеиновых кислотах.

Топологическая хиральность

Топологическая хиральность связана с наличием структурной несимметричности, характерной для супрамолекул, например катенанов, ротаксанов, молекулярных узлов.

Хиральность соединений со стереогенной парой электронов

В аминах, фосфинах, ионах сульфония, оксония, сульфоксидах хиральность может возникать из-за пространственного окружения атомов азота, фосфора, серы и кислорода. Несмотря на то, что в данных соединениях все они имеют только три заместителя, четвёртое координационное место занимает неподелённая пара электронов, и происходит возникновение центра хиральности.

Хиральные амины отличаются от хиральных соединений кислорода, фосфора и серы, поскольку энантиомеры аминов, возникающие из-за стереогенно-

го атома азота, редко могут быть разделены, так как они легко превращаются друг в друга за счёт инверсии атома азота (рассчитанная энергия активации E_A для триметиламина составляет около 30 ккал/моль). В то же время соответствующие фосфины подвергаются инверсии весьма медленно (рассчитанная энергия активации E_A для триметилфосфина составляет около 190 ккал/моль). Исключением из данной особенности являются амины, в которых инверсия азота невозможна, поскольку его конфигурация пространственно закреплена, как, например, в основании Трёгера.



Рисунок 4. Старшинство заместителей аминов

Хиральность в биологии

Многие биологически активные молекулы обладают хиральностью, причём природные аминокислоты и сахара представлены в природе преимущественно в виде одного из энантиомеров: аминокислоты в основном имеют L-конфигурацию, а сахара – D-конфигурацию [11].

Две энантиомерные формы одной молекулы обычно имеют различную биологическую активность. Это связано с тем, что рецепторы, ферменты, антитела и другие элементы организма также обладают хиральностью и структурное несоответствие между этими элементами и хиральными молекулами препятствует их взаимодействию. Например, ферменты, являющиеся хиральными молекулами, часто проявляют специфическую реакционную способность по отношению к одному из энантиомеров. Подобные примеры характерны и для лекарственных соединений. Спиральность вторичной структуры белков или нуклеиновых кислот вносит свой вклад в оптическую активность.

Связь с оптической активностью

Хиральные соединения и их растворы обладают способностью вращать плоскость поляризации плоскополяризованного света, что можно наблюдать при помощи поляриметра. По этой причине хиральные вещества также называют оптически активными или оптически деятельными.

Световую волну, проходящую через раствор оптически активного вещества, можно представить в виде правой и левой циркулярно поляризованных состав-

ляющих, которые в хиральной среде распространяются с различными фазовыми скоростями, за счёт чего и возникает вращение плоскости поляризации света.

Гомохиральность

За редкими исключениями природные хиральные аминокислоты и моносахариды представлены в виде единственного изомера из двух возможных. Так, в состав белков входят практически только L-аминокислоты, а ДНК и РНК построены только на основе D-углеводов. Данное свойство химических соединений называется *гомохиральностью*. Происхождение и назначение данного явления до конца не установлены, однако его часто связывают с проблемой происхождения жизни.

Биологические и фармацевтические свойства оптических изомеров

Оптические изомеры обладают не только различными свойствами по отношению к вращению плоскости поляризации плоскополяризованного света, но и по отношению к участию в биохимических процессах – процессах метаболизма, катаболизма, если речь идет о природных веществах или о фармакологической активности [10–15].

Несмотря на то, что явление хиральности (оптической активности) было открыто более 150 лет назад, механизмов различия биологических и фармакологических свойств оптических изомеров авторы статей не предлагают, в редких случаях высказываются некие гипотезы, чаще дается просто феноменологическое описание явления. В рамках нашей публикации наибольший интерес представляет сравнительная оценка фармакологической активности оптических изомеров (хиральных молекул).

Со времени открытия оптической активности накопился достаточно большой фактический материал по сравнительной оценке фармакологических свойств оптических изомеров.

Талидомид

Молекула талидомида представляет собой два оптических изомера. Один из изомеров проявляет седативные свойства, другой изомер проявляет тератогенные свойства. Препарат был разрешен к применению в 1958 году. За время применения талидомида в виде смеси оптических изомеров беременными женщинами родилось более десяти тысяч детей с серьезными генетическими изменениями.

Почему исследователи предоставили регулятору (FDA) неполные данные о побочных свойствах? То, что талидомид представляет собой смесь оптических изомеров, было известно на начальных этапах исследования препарата. Так почему же регулятор разрешил оборот этого препарата?

Трагедия с талидомидом явилась толчком к формированию принципов надлежащей производственной практики (GMP), однако почему это не стало толчком к формированию надлежащей практики исследований или надлежащей регуляторной практики [10–15]?

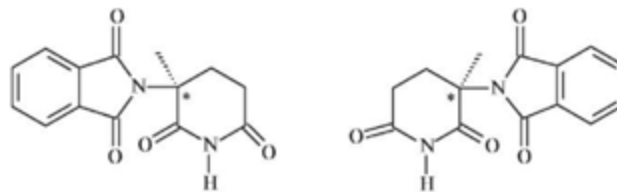


Рисунок 5. Два оптически активных энантиомера в лекарственном препарате «Талидомид»

Этамбутол

Молекула этамбутола существует в виде двух оптических изомеров. Один из изомеров этамбутола проявляет антимикробные свойства и используется при лечении туберкулеза, другой изомер обладает серьезными побочными действиями и вызывает слепоту.

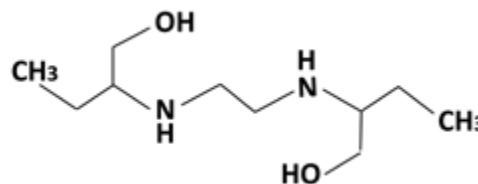


Рисунок 6. Этамбутол

Напроксен

Один оптический изомер проявляет активность при лечении артрита, другой изомер вызывает отравление печени без анальгетического действия.

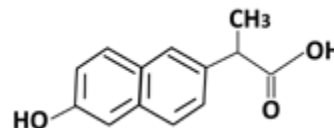


Рисунок 7. Напроксен

Офлоксацин

Фторхинолон, молекула существует в виде L-изомера и D- изомера. L-изомер называют левофлоксацин. Используется как антимикробный препарат, в 8128 раз активнее D-офлоксацина.

Примеров, когда синтетические биологически активные вещества используются как субстанции при производстве лекарственных препаратов, являются

рацемическими смесями и в таком виде используют без разделения на оптические изомеры, много. Во многих случаях это не вызывает каких-либо осложнений, но это возможно, когда один из изомеров является нежелательным компонентом (как в примере с талидамидом) [13].

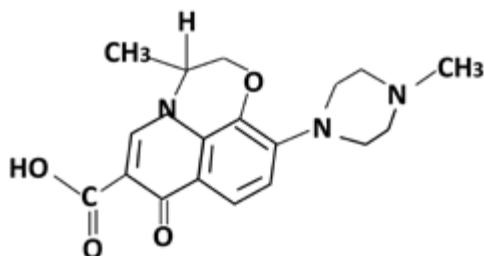


Рисунок 8. Офлоксацин

Левомецетин [15]

Антибиотик широкого спектра действия, эффективен в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов: к нему чувствительны эшерихии, сальмонеллы, пастереллы, стафилококки, стрептококки, диплококки, протей и др. Действует на штаммы бактерий, устойчивые к пенициллину, стрептомицину, сульфаниламидам.

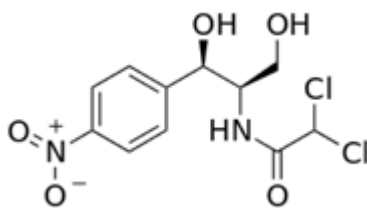


Рисунок 9. Левомецетин

Активен против грамотрицательных анаэробов. Неэффективен в отношении кислотоустойчивых бактерий, клостридий и синегнойной палочки. Антибиотик имеет четыре изомера, из которых только левовращающий активен. В СССР он получил название левомецетин. Поскольку получить левовращающий изомер трудно, в некоторых странах антибиотик готовят в рацемическом виде и называют синтомицином. Устойчивость микроорганизмов к левомецетину развивается медленно, ступенеобразно. Перекрестная устойчивость к другим антибиотикам, как правило, не развивается, однако патогенные штаммы грамотрицательных бактерий, устойчивые к ампициллину, карбенициллину, тетрациклину, стрептомицину, канамицину, гентамицину, чаще всего резистентны и к левомецетину. В обычно применяемых дозах левомецетин действует бактериостатически, нарушая синтез белка микробной клеткой на стадии переноса аминокислот от аминоацил-tРНК на рибосомы. Действует на

микроорганизмы, находящиеся как в стадии размножения, так и в стадии покоя, однако по отношению к размножающимся микробам более эффективен. Препарат хорошо проникает в клетки макроорганизма и действует на внутриклеточно расположенных возбудителей. Эффективные концентрации левомецетина по отношению к большинству чувствительных микробов составляют 4–10 мкг/мл.

Синтомицин

Представляет собой смесь лево- и правовращающих изомеров левомецетина. Антимикробной активностью обладает только левовращающий изомер. Белый или белый с зеленовато-желтым оттенком кристаллический порошок горького вкуса. Практически нерастворим в воде, устойчив в кислых и нейтральных средах, но легко разрушается щелочами. По спектру антимикробного действия и основным фармакокинетическим характеристикам не отличается от левомецетина, но уступает последнему по силе терапевтического эффекта.

Ибупрофен [7]

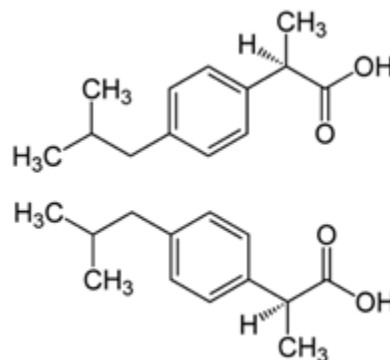


Рисунок 10. Энантиомеры ибупрофена

Молекула противовоспалительного препарата ибупрофена имеет один хиральный атом углерода в α -положении к карбоксильной группе, поэтому она существует в виде двух энантиомеров. Ибупрофен, производимый в промышленности, является рацемической смесью. Установлено, что биологической активностью обладает лишь один энантиомер – (S)-(-)-ибупрофен. В то время как его оптический антипод (R)-(+)-ибупрофен в организме неактивен. В связи с этим стало коммерчески доступно аналогичное лекарственное средство, представляющее собой энантиомерно чистый (S)-(-)-ибупрофен, так называемый дексипрофен. В ходе дальнейших исследований было обнаружено, что в организме человека присутствует изомераза, способная превращать неактивный (R)-(+)-ибупрофен в активный (S)-(-)-ибупрофен.

Циталопрам [7]

Другим примером могут служить антидепрессанты циталопрам и эсциталопрам (антидепрессант из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина).

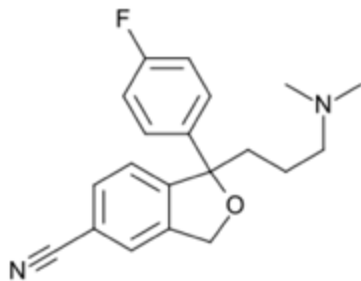


Рисунок 11. Циталопрам

Циталопрам является рацемической смесью (*R*)-циталопрама и (*S*)-циталопрама. Эсциталопрам является индивидуальным (*S*)-энантиомером. В отличие от рацемата циталопрама, эсциталопрам представлен только *S*-изомером (*R*-изомер не имеет терапевтического эффекта), что и отражено в названии данного препарата. При этом эсциталопрам превосходит предшественника по показателям эффективности и переносимости. По физическим свойствам это порошок белого или слегка жёлтого цвета. Легко растворим в метаноле и диметилсульфоксиде, трудно растворим в воде и этаноле. Было показано, что эсциталопрам более эффективен при лечении депрессивных состояний, чем аналогичная доза циталопрама.

Субстратная специфичность ферментов [4–6]

Ферменты обычно проявляют высокую специфичность по отношению к своим субстратам (субстратная специфичность). Это достигается частичной комплементарностью формы, распределением зарядов и гидрофобных областей на молекуле субстрата и в центре связывания субстрата на ферменте.

Ферменты обычно демонстрируют также высокий уровень стереоспецифичности (образуют в качестве продукта только один из возможных стереоизомеров или используют в качестве субстрата только один стереоизомер), региоселективности (образуют или разрывают химическую связь только в одном из возможных положений субстрата) и хемоселективности (катализируют только одну химическую реакцию из нескольких возможных для данных условий). Несмотря на общий высокий уровень специфичности, степень субстратной и реакционной специфичности ферментов может быть различной. Например, эндопептидаза трипсин разрывает пептидную связь только после аргинина или лизина, если за ними не следует

пролин, а пепсин гораздо менее специфичен и может разрывать пептидную связь, следующую за многими аминокислотами.

Связь пространственного строения соединений с их биологической активностью

В организме реакции протекают с участием биокатализаторов – ферментов. Ферменты построены из хиральных молекул α -аминокислот. Поэтому они могут играть роль хиральных реагентов, чувствительных к хиральности взаимодействующих с ними субстратов. Таким образом, пространственное строение молекул связано со стереоспецифичностью биохимических процессов.

Стереоспецифичность процессов, протекающих в организме, состоит в том, что в реакцию вовлекаются определенные стереоизомеры и результатом реакции являются также стереохимически определенные продукты.

Стереоспецифичность лежит в основе проявления биологического действия одним из энантиомеров, в то время как другой энантиомер может быть неактивным, а иногда оказывать иное или даже противоположное действие.

Многие лекарственные вещества проявляют фармакологический эффект при взаимодействии с рецепторами клетки. Для этого необходимо, чтобы молекула лекарственного вещества имела такую конфигурацию, которая позволяла бы наиболее полно связываться с рецептором. Изменение конфигурации на противоположную, как правило, снижает степень связывания и ослабляет биологическое действие. Например, из двух энантиомеров адреналина наибольшую гормональную активность проявляет левовращающий адреналин, являющийся (*S*)-изомером (рисунок 12, а).

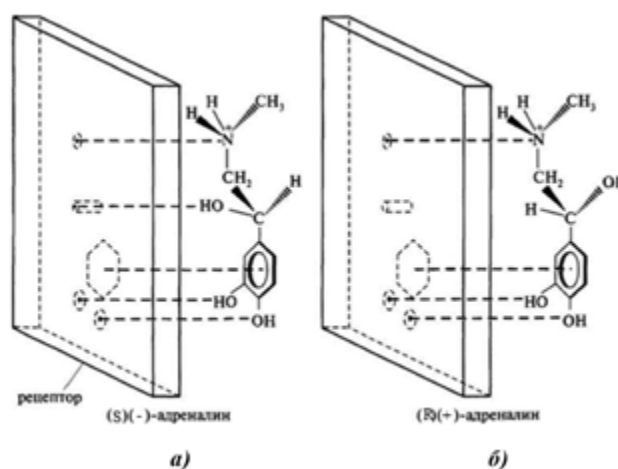


Рисунок 12. Схема взаимодействия энантиомеров адреналина с рецептором:
а – (*S*)-(-)-адреналин
б – (*R*)-(+)-адреналин

У правовращающего энантиомера – (R)-адреналина – OH-группа ориентирована в пространстве иначе и не взаимодействует с рецептором (рисунок 12, б). Этот энантиомер адреналина способен связываться не с тремя, а только с двумя точками рецептора, что приводит к ослаблению фармакологического действия. Это подтверждается тем фактом, что пониженная активность (-)-адреналина сравнима с активностью, проявляемой адреналином, содержащим OH-группу.

Аналогичная картина характерна для ряда лекарственных веществ, родственных по строению адреналину: так, (-)-изопропиладреналин (изадрин) проявляет в 800 раз более сильное бронхорасширяющее действие, чем его правовращающий энантиомер. Лекарственное средство противоопухолевого действия – сарколизин – также является левовращающим энантиомером; (+)-сарколизин неактивен.

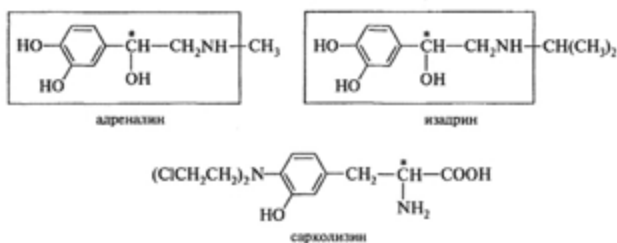


Рисунок 13. Адреналин. Изадрин. Сарколизин

Таким образом, биологическое действие биорегуляторов (гормоны, витамины, антибиотики и др.) и лекарственных веществ связано с пространственным строением их молекул.

Лиганды в биорегуляции

Лиганды – это вещества, способные специфически связываться с активным центром молекул определенной структуры. Биолигандами называют те лиганды, которые осуществляют биорегуляцию в живых организмах за счёт своего связывания с рецепторными молекулами-мишенями. Лиганды в биорегуляции (биолиганды) – это фактически сигнальные управляющие вещества, способные передавать управляющие команды за счёт своего связывания с активным центром молекулярных рецепторов, обладающих специфичностью к ним. Таким образом, можно сказать, что именно биолиганды осуществляют хеморегуляцию, т.е. химическое управление клетками, организмом, его частями или совокупностью организмов.

Механизм действия биолигандов

По влиянию лигандов на конформацию белков белок-лигандные взаимодействия можно разделить на несколько классов.

Взаимодействия класса I: лиганд, связываясь с белком, не вызывает существенных изменений конформации, но стабилизирует структуру белка. Пример – связывание ионов Ca^{2+} с лизоцимом. В присутствии лиганда (ионов Ca^{2+}) для денатурации лизоцима требуются большие концентрации соответствующего агента (мочевины или гуанидингидрохлорида). Видимо, в данном случае с помощью Ca^{2+} образуются дополнительные связи между радикалами.

Взаимодействия класса II: лиганд значительно меняет третичную структуру белка, и только в таком состоянии белок становится достаточно активным. Пример – связывание ионов Ca^{2+} с кальмодулином – внутриклеточным рецептором этих ионов. Связав два иона Ca^{2+} , кальмодулин приобретает способность влиять на активность многих белков клетки.

Взаимодействия класса III: при отсутствии лиганда белок находится в так называемом состоянии расплавленной глобулы, а именно имеет достаточно компактную глобулярную форму, но без какой-либо определенной третичной структуры – последняя формируется лишь при связывании лиганда. Пример такого белка – лактальбумин (компонент ферментного комплекса синтеза лактозы). Это небольшой белок, содержащий 4 дисульфидные связи и прочно связывающий один ион Ca^{2+} . Видимо, данный ион является ключевым структурообразующим элементом. При его удалении третичная структура белка разрушается. Но глобулярная форма и размер глобулы сохраняются благодаря стабилизирующему влиянию дисульфидных связей.

Взаимодействия класса IV: без лиганда у белка не до конца сформирована вторичная структура и полностью отсутствует третичная структура. При этом пептидная цепь частично развернута. Пример белка – остеокальцин, содержащийся в матриксе костей. Он содержит всего около 50 аминокислотных остатков и способен связывать 5 ионов Ca^{2+} . Связывание сопровождается существенным уменьшением объема глобулы, формированием третичной структуры и объединением глобул в димеры, то есть в данном случае лиганд необходим для появления у белка и четвертичной структуры.

Взаимодействия класса V: при отсутствии лиганда белковая цепь практически полностью развернута, т.е. представляет собой случайный клубок. Взаимодействие же с лигандом приводит к полному формированию пространственной структуры белка. Пример – цитохром с, один из белков цепи переноса электронов в митохондриях. Его лиганд – гем, сходный с гемом гемоглобина. Удаление гема приводит к почти полному разворачиванию белковой молекулы.

Взаимодействия класса VI: связывание лиганда вызывает масштабные подвижки доменов или субъединиц белка. Пример – взаимодействие гемоглобина (Hb_4) с кислородом. В ходе этого процесса происходят

многочисленные и сложные конформационные превращения. В том числе соседние субъединицы поворачиваются друг относительно друга на 10–15°.

В результате при связывании молекулы 2 с гемом одной субъединицы повышается сродство к кислороду соседних субъединиц. Это обозначается как кооперативный эффект и имеет большое физиологическое значение. Завершая данный пункт, сделаем два замечания:

- во-первых, как видно, лиганды действительно могут очень существенно влиять на конформацию белка;
- во-вторых, для белка, имеющего несколько лигандов (особенно если последние связываются с разными частями молекулы), характер подобного влияния для разных лигандов может быть совершенно разным.

Например, по-разному воздействуют на структуру гемоглобина такие его лиганды, как гем и кислород.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ ИЛИ ЭНАНТИОМЕРНОЙ ЧИСТОТЫ [8, 9]

Один из наиболее важных вопросов, возникающих при изучении оптически активных соединений, – это вопрос о том, как определить их чистоту. Речь в данном случае идет как о чистоте химического вещества, так и о структуре хирального изомера. Ряд методов анализа не предполагает разделения изомеров – это ЯМР-спектроскопия, дисперсия оптического вращения, круговой дихроизм. Ряд аналитических методов предполагает разделение в ходе анализа изомеров – это хроматографические методы анализа, так называемая хиральная хроматография, и разделение оптических изомеров веществ с использованием электрофореза.

Дисперсия оптического вращения (ДОВ, в англоязычной литературе ORD) и круговой дихроизм (КД, в англоязычной литературе CD) – это рекомендованные фармакопеями методы. Дисперсия оптического вращения основана на изучении вращения плоскости поляризации плоскополяризованного света в зависимости от длины волны. Круговой дихроизм основан на изучении различия в поглощении веществом циркулярно поляризованного света влево и циркулярно поляризованного света вправо. Это явление называется дихроическим поглощением и проявляется в случае, когда вещество оптически активно и когда хиральный центр и хромофор расположены в пространстве рядом. Само по себе значение угла вращения не дает информации о соотношении изомеров, оно говорит о том, что вещество просто обладает оптической активностью, то же можно сказать и о дихроическом поглощении. Вероятно, при наличии стандартов оптических изомеров можно провести некую калибровку и получить возможность определить соотношение изомеров. В любом случае эти показатели (удельный угол вращения плоскополяризованного света или дихроическое поглощение) должны являться важнейшими показателями качества оптически активных молекул.

Другие методы анализа, включая методы разделения оптических изомеров, а именно ЯМР, хроматографию, ферментативные методы, электрофорез, основаны на использовании обратимого образования комплексов двух хиральных молекул различного строения. Если условия образования подобных комплексов будут отличаться, то в случае хроматографии или электрофореза будет наблюдаться на хроматограмме или электрограмме появление двух пиков, относящихся к различным изомерам, в случае ЯМР наблюдается разделение сигнала в спектре ЯМР.

Ядерный магнитный резонанс

Спектры ЯМР оптических изомеров не отличаются друг от друга. Речь идет о сравнении химических сдвигов протонов, расположенных у хирального атома углерода [8]. Различий не наблюдается даже при применении магнитов, обеспечивающих рабочую частоту по протонам до 900 мГц. Один из подходов заключается в превращении энантиомеров в диастереоизомеры путем взаимодействия с подходящим хиральным реагентом. Другой подход – использование хирального растворителя. Растворитель вызывает различные химические сдвиги у энантиомеров, и соотношение энантиомеров можно определить путем простого интегрирования соответствующих пиков в спектре ЯМР. Применение хиральных растворителей не универсально и не всегда дает положительные результаты. Значительно более универсален метод ЯМР, основанный на применении лантаноидных сдвиговых реагентов, с применением комплексов парамагнитных ионов Eu^{3+} , Pr^{3+} , Yb^{3+} с хиральными лигандами. Подобный подход также не является универсальным и предполагает подбор хиральных лигандов, парамагнитных ионов. Есть еще одно ограничение: хиральный центр анализируемого вещества не должен располагаться в пространстве далеко от функциональных групп, участвующих в образовании комплексов с парамагнитными ионами. При разработке методов анализа с использованием парамагнитных сдвиговых реагентов необходимо подбирать условия эксперимента, варьируя концентрации сдвигового реагента, подбирать тип лантаноидного иона, хирального лиганда. Описанные в литературе методы анализа не могут быть универсальными.

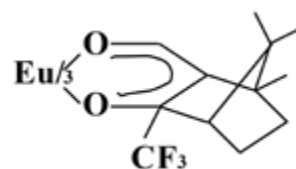


Рисунок 14. Структура хирального сдвигающего реагента на основе комплексных соединений Eu^{3+}

Хиральная хроматография

К сожалению, в хиральной хроматографии нет ни одной достаточно удовлетворительной теории, поз-

воляющей до проведения эксперимента заранее оценить эффективность разделения изомеров. При решении задачи необходимо предварительно проверить экспериментально применимость имеющихся хиральных колонок к решению поставленной задачи; если положительного результата не удастся добиться, ставится задача подбора нового сорбента. Выбор нового сорбента можно проводить из имеющегося перечня хиральных колонок, предлагаемых компаниями, специализирующимися на производстве хроматографических колонок. Такой подход не всегда дает положительный результат. Можно поставить задачу создания нового сорбента для хиральной хроматографии. Это задача не для аналитиков, а для химиков-синтетиков [8].

Для того чтобы облегчить задачу выбора колонок, создания новых сорбентов, решить задачу разделения и в последующем анализа состава оптических изомеров, рассмотрим некоторые принципы хроматографического процесса.

Процесс хроматографического разделения можно представить как совокупность трех процессов.

1. Связывание веществ разделяемой смеси с неподвижной фазой, которое описывается соответствующей константой связывания:

Вещество А + неподвижная фаза \leftrightarrow комплекс вещества А с неподвижной фазой;

Вещество В + неподвижная фаза \leftrightarrow комплекс вещества В с неподвижной фазой.

2. Освобождение (распад сформировавшихся комплексов неподвижной фазы с веществами А и В).

3. Перенос смеси веществ с подвижной фазой вдоль неподвижной фазы.

Сочетание этих процессов и приводит к разделению смеси веществ. Разделение оптических изомеров возможно, если условия образования комплексов будут различны.

Теория хиральной хроматографии, разделения оптических изомеров еще находится в начале своего развития [8]. В 1952 году Т. Далглишем был предложен механизм разделения, согласно которому в основе процесса разделения лежит обратимое образование комплекса между хиральным лигандом, конъюгированным на неподвижной фазе, и анализируемыми веществами. Предложена модель трехточечного взаимодействия. Взаимодействие происходит за счет образования водородных связей, ионных взаимодействий, диполь-дипольных взаимодействий, гидрофобных взаимодействий, имеющих важную роль в водной среде.

Разделение (чаще всего ВЭЖХ) энантиомеров смеси основано на использовании оптически селективной модификации сорбента. Метод элюентный.

Как добиться разделения энантиомеров (три способа разделения энантиомеров хроматографией)

1. Неподвижная фаза НЕ хиральна; подвижная фаза включает хиральные добавки (циклодекстрин; (+)-ди-*n*-бутил-тарtrat).
2. Неподвижная фаза НЕ хиральна, подвижная фаза также НЕ хиральна (реакция аналита с оптически активным реагентом, изменение свойств одного из изомеров, различное хроматографическое поведение).
3. Неподвижная фаза хиральна, подвижная фаза НЕ хиральна (использование специальных хиральных сорбентов для ВЭЖХ-анализа или разделения энантиомеров).



Рисунок 15. Схема, иллюстрирующая модификацию сорбента хиральными прививками

Хиральный компонент привит ковалентно, либо использована ионно разветвленная прививка «щеточного типа» (похоже на C18), в этом случае возможна элюция в нФ- или оФ-режимах, а именно: водородные взаимодействия; диполь-дипольные взаимодействия; π/π взаимодействия (донорная фаза, акцепторная фаза или фаза с совмещенными функциями).

Характер взаимодействия веществ с сорбентом:

- водородные взаимодействия;
- диполь-дипольные взаимодействия;
- π/π взаимодействия (донорная фаза, акцепторная фаза или фаза с совмещенными функциями), эффекты «включения».

Необходимо введение ионов металлов в элюент. При взаимодействии веществ с сорбентом возможно образование диастереоизомерных комплексов с участием ионов металлов.

Для данного типа модификаций характерны следующие виды взаимодействий:

- ионные взаимодействия;
- гидрофобные взаимодействия;
- электростатические взаимодействия;
- фермент-субстратные комплексы.

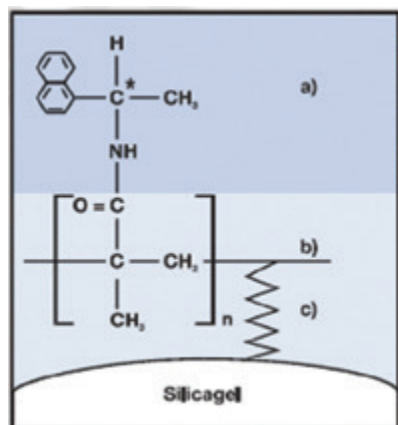


Рисунок 16. Целлюлозная или амилозная модификация силикагеля



Рисунок 17. Модификация силикагеля циклодекстрином или его производными

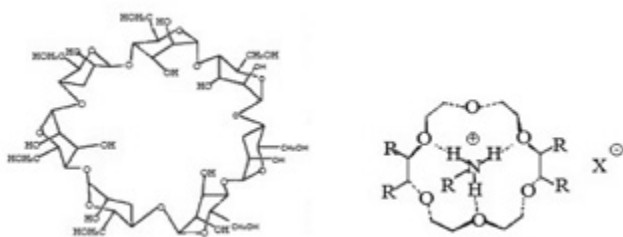


Рисунок 18. Модификация силикагеля краун-эфирами

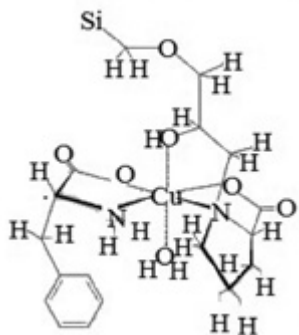


Рисунок 19. Модификация силикагеля через медные комплексоны с аминокислотами: для аминокислот, моно- и дикарбоновых кислот, α-гидроксильных групп

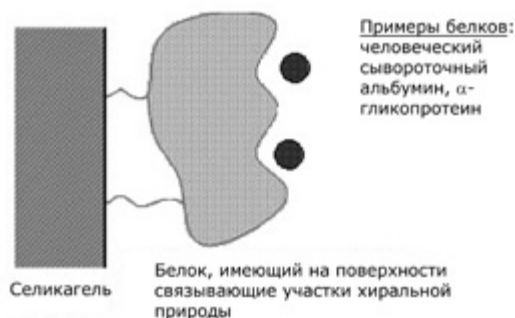


Рисунок 20. Иммунизация силикагеля белком со стереоспецифичной активностью (только оф-режим элюирования)

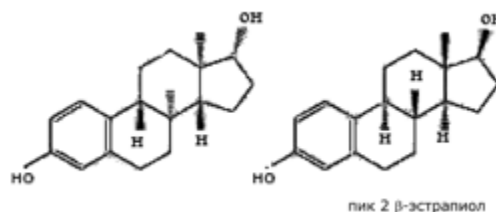


Рисунок 21. Примеры применения хиральной хроматографии

Капиллярный электрофорез как метод разделения оптических изомеров

Капиллярный электрофорез (КЭ) наряду с жидкостной хроматографией используется для оценки оптической чистоты веществ и характеризуется высокой эффективностью разделения оптических изомеров, что позволяет добиваться хорошего разрешения даже при малых значениях коэффициента селективности α , характерных для энантиоразделений. Метод капиллярного электрофореза основан на разделении заряженных компонентов смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Разделение достигается вследствие различия в подвижностях молекул, зависящих от заряда и ионного радиуса [17]. В хиральном КЭ для того, чтобы разделить одинаковые по размерам и удельным зарядам энантиомеры, необходимо получить их диастереомерные производные с хиральным селектором, добавляем, как правило, в буферный раствор, в котором проводится разделение. Различие подвижностей изомеров обусловлено, во-первых, разными константами устойчивости комплексов энантиомеров с хиральным селектором, во-вторых, отличием в подвижности полученных комплексов в результате различий в их геометрии и/или константах кислотности [17].

На данный момент универсального способа поиска подходящего хирального селектора для конкретного случая не существует, поскольку детальный механизм энантиоразделения изучен не полностью. Однако известно множество соединений, используемых в качестве хиральных селекторов. В настоящее время наиболее часто применяют циклодекстрины и их

производные, которые позволяют разделять энантиомеры достаточно большого числа соединений различного характера (амины, аминокислоты, производные аминокислот, аминокислоты и профены). Краун-эфиры подходят как хиральные селекторы для соединений, содержащих первичную аминогруппу. Нейтральные и заряженные полисахариды (декстраны, гепарин, хондроитин сульфат и др.) проявляют энантиоселективность по отношению к основным соединениям; белки (альбумин, авидин и др.) – к аминокислотам. Макроциклические антибиотики (ванкомицин, эритромицин и др.) энантиоселективны к широкому кругу соединений как кислотного, так и основного характера, но в отличие от циклодекстринов и полисахаридов достаточно сильно поглощают в УФ-области и могут адсорбироваться на стенках капилляра, что снижает чувствительность и ухудшает разделение. Для устранения данного недостатка рекомендуется использовать метод частичного заполнения или противотока и покрытые капилляры. Также для разделения энантиомеров используют комплексы аминокислот с металлами, ион-парные реагенты, мицеллообразующие соединения, реже для решения специфических задач – каликсарены, аптамеры ДНК и РНК, амфифильные аminosахариды и др. Наличие гидрофобных и/или гидрофильных полостей включения, стереоцентров и ряда функциональных групп обеспечивает энантиоселективность молекул хиральных селекторов. Между молекулами энантиомеров и хиральным селектором характерны различные типы взаимодействий (гидрофобные, диполь-дипольные, π-π взаимодействия, образование водородных связей) [18].

В большинстве случаев в качестве фоновых электролитов используют различные водные буферные растворы. Однако использование органических растворителей или их смесей позволяет расширить возможности метода. Так появляется возможность анализа гидрофобных и нестабильных в воде соединений, нейтральных соединений и значительного увеличения количества варьируемых параметров (природа растворителя, ионной добавки и хирального селектора, вязкость, поляриность) [19, 20].

Относительная простота метода капиллярного электрофореза, наличие широкого круга хиральных селекторов и возможность использования различных типов детектирования позволяет решать разнообразные задачи энантиоразделения соединений в сложных и простых матрицах [21].

ПОЛЯРИМЕТРИЯ

В основе поляриметрии лежит свойство оптически активных молекул вращать плоскость поляризации плоскополяризованного света [8, 9]. Ж.Н. Бийо-Варенн первым показал способность некоторых природных веществ проявлять данное свойство. Очень кратко суть явления можно объяснить следующим образом. Плоскополяризованный свет можно представить как

наложение двух составляющих, а именно циркулярно поляризованного света влево и вправо, обладающих одинаковой интенсивностью. Поскольку циркулярно поляризованный свет является хиральным объектом, он взаимодействует с хиральной молекулой, характер взаимодействия будет отличаться для различных оптических изомеров.

Оптическое вращение – угол вращения плоскополяризованного света, который зависит от ряда факторов: концентрация вещества, длины кюветы, типа растворителя, температуры. Для стандартизации условий измерения вводят понятие «удельный угол вращения»:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = 100 \alpha / Lc,$$

где α – наблюдаемое значение угла вращения, T – температура, L – длина оптического пути (длина кюветы), C – объемная концентрация вещества г/100 мл.

Эти условия измерения должны обязательно указываться в результатах эксперимента. Удельный угол вращения не может дать информацию о составе смеси оптических изомеров. Это макроскопический показатель свойств среды. Поляриметрия является рекомендованным фармакопеями методом.

Удельное вращение $[\alpha]$ соединения меняется с длиной волны света, при которой проводится измерение. Для многих простых соединений вращение увеличивается по абсолютной величине по мере перехода от видимого света к УФ-области. Функция, описывающая изменение вращения соединения с длиной волны, называется кривой дисперсии оптического вращения (ДОВ). Кривая упомянутого типа называется гладкой кривой. Больше всего ДОВ облегчает определение структуры органических соединений в том случае, когда соединение дает характеристический контур кривой дисперсии оптического вращения (кривая эффекта Коттона). Вблизи и в области поглощения, там, где происходят электронные переходы, часто наблюдаются нарушения дисперсии оптического вращения. Типичные кривые проходят через один или большее число максимумов («пиков») и минимумов («впадин»). Такие нарушения известны как эффект Коттона. Эти кривые называются положительными, если при переходе от длинных волн к коротким кривая сначала возрастает в положительном направлении, а затем становится более отрицательной. Если знаки сегментов меняются в обратной последовательности, то получается отрицательная кривая эффекта Коттона. Энантиомеры всегда дают зеркально-симметричные кривые ДОВ. Если контуры кривых ДОВ какого-либо оптически активного соединения с известной конфигурацией и химически сходной молекулы с неизвестной конфигурацией очень близки, то обе молекулы имеют, вероятно, одинаковые конфигурации. Наоборот, когда контур кривой ДОВ соединения с известной абсолютной конфигурацией является очень близким к зеркальному отражению кривой химически сходного оптически активного вещества, они имеют, видимо, противополо-

ложные конфигурации. Знак эффекта Коттона замещенных циклогексанонов (а также кетостероидов) может быть удовлетворительно предсказан с помощью правила октантов. Аналогичные правила можно разработать и для других классов соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накопленные экспериментальные данные, приведенные в данной работе, позволяют говорить о том, что оптические изомеры обладают различными биологическими и фармакологическими свойствами, что необходимо при наличии возможной изомерии проводить работу по сравнительному изучению фармакологической активности изомеров, что, в свою очередь, предполагает разделение этих изомеров. Необходимо приводить эти экспериментальные данные в регистрационном досье на стадии разработки лекарственного препарата. Это позволит избежать трагических событий, имевших место при использовании такого препарата, как «Талидомид». Разработанная инструментальная база проведения анализа оптически активных веществ, признание этих методов на уровне национальных фармакопей, методы ЯМР, ДОВ, жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез находятся в списке методов, рекомендованных при проведении контроля качества лекарственных препаратов. Разработанная методическая база – в литературе существует большое число публикаций, посвященных применению перечисленных методов как на стадии разработки лекарственных препаратов, так и на стадии контроля качества, – при производстве препаратов дает полное основание для утверждения о необходимости (обязательности) применения перечисленных методов в производстве лекарственных препаратов на основе оптически активных веществ на различных стадиях жизненного цикла лекарственного препарата [22–24].

ЛИТЕРАТУРА

1. У. Т. Кельвин. Балтиморские лекции по молекулярной динамике и волновой теории света. – М.: Мир, 1904. 328 с.
2. В.М. Потапов. Стереохимия. – М.: Химия, 1988. 464 с.
3. О.А. Реутов, А.Л. Курц, К.П. Бутин. Органическая химия. Углубленный курс. – М.: Изд-во МГУ, 1999. 820 с.
4. Ю.А. Овчинников. Биоорганическая химия. – М.: Просвещение, 1987. 816 с.
5. H.D. Flack. Louis Pasteur's discovery of molecular chirality and spontaneous resolution in 1848, together with a complete review of his crystallographic and chemical work // *Acta Cryst. Sect. A.* – Switzerland. 2009. 328 p.
6. Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков. Биоорганическая химия. – М.: Дрофа, 2004. 544 с.
7. М. Д. Машковский. Лекарственные средства. – 15-е изд. – М.: Новая Волна, 2005. 1164 с.
8. С. Алленмарк. Хроматографическое разделение энантиомеров. – М.: Мир, 1991. 269 с.
9. Д. Фрайфелдер. Физическая биохимия. – М.: Мир, 1980. 581 с.
10. Физическая энциклопедия / Под ред. А.М. Прохорова. – М.: Большая российская энциклопедия, 1994. 927 с.
11. Э. Илиел, С. Вайлен, М. Дойл. Основы органической стереохимии = *Basic Organic Stereochemistry* / Пер. с англ. З.А. Бредихиной; под ред. А.А. Бредихина. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2007. 704 с.
12. Р. Кан, О. Дермер. Введение в химическую номенклатуру = *Introduction to Chemical Nomenclature* / Пер. с англ. Н.Н. Щербиновской; под ред. В.М. Потапова, Р.А. Лидина. – М.: Химия, 1983. 224 с.
13. Е.Н. Падейская, С.В. Яковлев. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике. – М.: 1998. 352 с.
14. Фармацевт Практик. № 2' 2014. URL: <http://fp.com.ua/tag/8005-4092> (дата обращения 12.01.2015).
15. Н.С. Егоров. Основы учения об антибиотиках. – М.: Высшая школа, 1986. 448 с.
16. Руководство по капиллярному электрофорезу / Пер.: д.х.н. Р.Ш. Вартапетян; под ред. д.х.н. А.М.Волощука. – М.: 1996. 111 с.
17. A. Rizzi. Fundamental aspects of chiral separations by capillary electrophoresis // *Electrophoresis*. 2001. V. 22. P. 3079–3106.
18. *Chiral Capillary Electrophoresis in Current Pharmaceutical and Biomedical Analysis* / edited by P. Mikus. – Washington. 2012. 318 p.
19. M. Lammerhofer. Chiral separations by capillary electromigration techniques in nonaqueous media. I. Enantioselective nonaqueous capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1068. P. 3–30.
20. D.A. Williams, T.L. Lemke. Foyes Principles of Medicinal Chemistry. – Washington: Lippincott Williams&Wilkins, 2005. 346 p.
21. М.В. Лебедева. Макроциклические антибиотики как новые хиральные селекторы в неводном капиллярном электрофорезе: автореф дисс... канд. хим. наук. – М.: 2014. 28 с.
22. К. Ингольд. Теоретические основы органической химии. – М.: Мир, 1973. 1056 с.
23. E.J. Ariens, W. Sojudin, Timmermans P. *Stereochemistry and Biological Activity of Drugs*. Oxford, 1983. 249 p.
24. Фармацевтическая разработка. Концепции и практические рекомендации / Под ред. Быковского С.Н., Василенко И.А., Деминой Н.Б., Шохина И.Е., Новожилова О.В., Мешковского А.П., Спицкого О.Р. – М.: Изд-во Перо, 2015. 472 с.