

X 射线衍射分析技术在药物研究中的应用^{*}

常颖 郑启泰 吕扬[†]

(中国协和医科大学 中国医学科学院药物研究所 北京 100050)

摘要 X 射线衍射分析已成为当今药物研究与开发中普遍应用的一种物理分析方法和常规检测技术. 它不仅广泛应用于化学药物研究领域, 而且在中药研究与质量控制方面正发挥着其他分析技术不可替代的重要作用.

关键词 X 射线, 单晶, 多晶, 化学药物, 中药

The application of X-ray diffraction analysis in pharmaceutical research

CHANG Ying ZHENG QiTai LU Yang[†]

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medicinal Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract X-ray diffraction analysis has become a widely accepted physical analysis and detection technology in pharmaceutical research and development. It is not only applied in the area of chemical drug research, but also plays an exclusive role in Chinese traditional medicine research and quality control.

Keywords X-ray, single crystal, polymorphism, chemical drug, Chinese traditional medicine

1 引言

X 射线晶体结构分析是晶体学中最活跃的研究领域之一. 自 1913 年布拉格测定了氯化钠等矿物晶体结构, 展示了其在空间排列的分子立体结构后, 使化学家对分子结构的认识开始进入了“真实”的微观世界. 这些成就终于使 X 射线衍射分析打开了有机分子 (特别是生物活性分子) 立体结构测定的大门, 为研究以药物分子结构、药物的结构改造、新药的结构预测、药物的结构与功能关系等为目标药物晶体学奠定了基础.

2 基本实验技术和理论

X 射线衍射分析是研究 X 射线、晶体、化合物结构三者之间关系. 在药学研究中, 根据不同分析目的, X 射线衍射技术包括单晶 X 射线衍射结构分析与粉末 X 射线衍射成分分析. 单晶 X 射线衍射结构分析的实质是完成两次傅里叶 (Fourier) 变换过程,

第一次傅里叶变换是在 X 射线衍射实验中完成的, 目的是获得衍射图谱数据; 第二次傅里叶反变换是在结构计算中完成的, 目的是获得分子的三维结构模型. 粉末 X 射线衍射分析是以粉晶或无定形样品为研究对象, 此分析方法的基础是布拉格方程即 $2d_{hkl} \sin\theta = n\lambda$, 它是把具有点阵结构的晶体看作一些平行平面, 其中 d_{hkl} 是指标为 (hkl) 晶面的晶面间距, 表示其方位, θ 为入射线与反射线所成角的一半, 表示衍射方向, λ 为入射 X 射线的波长, n 为整数.

3 单晶 X 射线衍射技术在药物研究中的应用

单晶 X 射线衍射结构分析是一种独立的结构分析方法, 不需要借助任何其他波谱学技术, 即可独

^{*} 国家自然科学基金 (批准号: 29775034) 资助项目
2006-12-30 收到初稿, 2007-03-22 收到修改稿

[†] 通讯联系人. Email: luy@imm.ac.cn

立地完成样品的结构、组分、含量、构型、构象、溶剂、晶型等各类分析研究。它可以应用于小分子化学药物(天然产物与合成化合物)^[1]、大分子生物药物(多肽类与蛋白质类)以及药物与受体靶点等分子的立体结构研究,其测定结构分子量可达数百万,因此,是现代药物结构与功能研究领域一种必备的物理分析方法与常用技术。

单晶 X 射线衍射结构分析是一种定量的分析技术,可以提供分子的三维立体结构信息,包括原子坐标、原子间键长与键角值、扭角(二面角)值、成环原子的平面性质、氢键(分子内、分子间)、盐键、配位键等相关晶体学参数,同时也是确定手性药物分子绝对构型、分子立体结构中差异构体的权威分析技术。此外,在晶型固体化学药物研究中,单晶 X 射线衍射分析技术不仅能够提供同质异晶(相同物质,不同晶型)样品的分子排列规律,同时可以给出样品中结晶水与各种溶剂的定量数值,并能阐明造成固体化学药物形成多晶型的原因,为寻找高效低毒的晶型固体化学药物,为人们安全用药,提供可靠的技术保障^[2]。

3.1 天然产物中微量成分的结构测定

从天然产物中寻找药物先导化合物是我国药物研究中的一条重要途径。通常从中草药中提取分离得到微量的有效化学成分,由于单晶 X 射线衍射结构分析仅需一颗适合衍射实验的单晶体(样品量小于 1mg),即可完成化合物分子立体结构测定。所以,衍射分析技术在微量成分的结构研究中具有独特优势。

10-Deacetyl-7-epitaxol 为天然紫杉醇二萜类化合物,与紫杉醇具有相同的骨架和 C₁₃侧链基团,其活性弱于紫杉醇。样品是从植物中提取的,获得样品量很少,所以只能应用单晶 X 射线衍射结构分析方法测定该化合物分子立体结构(图 1),为进一步阐明该化合物与紫杉醇结构和药效活性的差异提供了依据。

3.2 天然产物中全未知化合物的结构测定

随着提取分离技术的不断提高,在自然界中存在的许多新颖结构骨架化合物被不断发现。这些全新未知化合物的结构测定依赖于单晶 X 射线衍射分析,以阐明其准确的立体结构特征。目前,国际化学界对发现的具有新颖骨架类型的化合物结构,需要应用以下两种方法之一来证明其结构的存在:

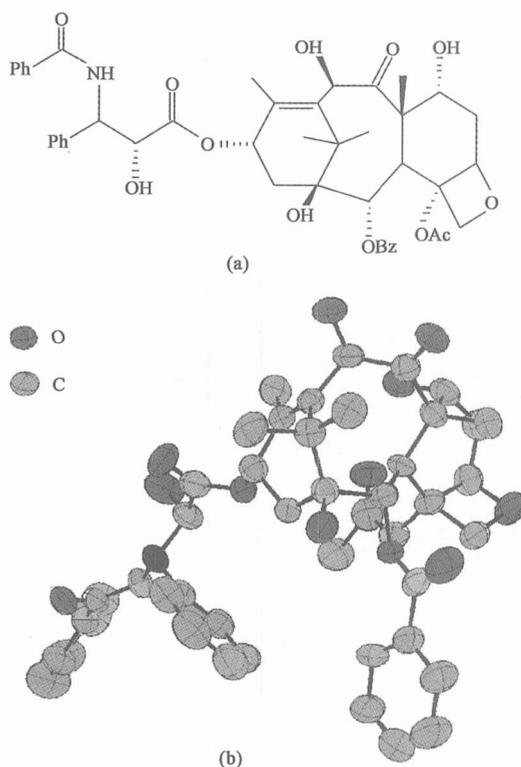


图 1 10-Deacetyl-7-epitaxol 分子相对构型图 (a) 和分子立体结构投影图 (b)

(1) 利用全合成方法来证明结构; (2) 利用单晶 X 射线衍射结构分析来确定结构。由此可见, X 射线衍射分析技术在天然有机分子结构分析中的权威性。

全新骨架类型分子结构测定: 紫杉烷二萜类化合物具有抗肿瘤和免疫抑制的药理活性,一般具有 5/7/6 环或 6/8/6 环分子骨架类型。Taxachitriene B 是从植物中提取的化合物,由于其骨架的复杂性,造成用全合成方法证明其结构十分困难。利用单晶 X 射线衍射结构分析技术,证明该结构与以前发现的各种紫杉烷二萜类化合物具有不同的骨架类型,其特征是在 C₃-C₈ 位置开环,形成了 6/12 双环体系的新颖骨架类型结构,如图 2 所示。

复杂新骨架类型化合物的结构测定: 图 3 所示化合物是从五味子科植物中提取分离得到的天然产物。经单晶 X 射线衍射结构分析,发现其结构是由 8 个环组成的复杂降三萜新骨架类型。

3.3 天然产物中的疑难结构测定

Langduin C 是从香茶菜中提取分离得到的化合物。应用质谱分析,测定其分子量为 345.4。核磁共振分析测定该化合物有 20 个碳原子,但在这些图谱中尚存在有不能解释的结构疑点。采用单晶 X 射线

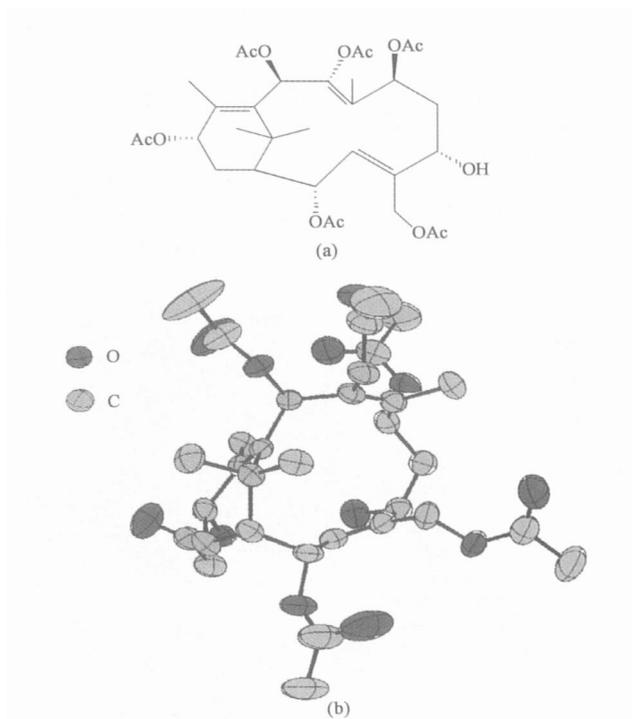


图 2 Taxachitriene B 的分子相对构型图 (a) 和分子立体结构投影图 (b)

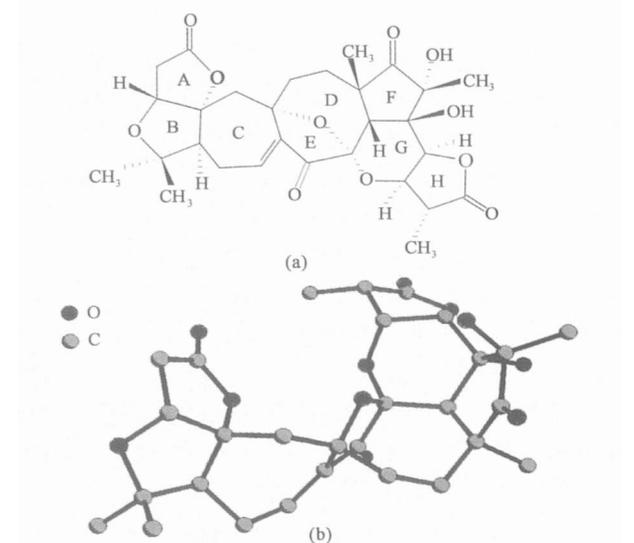


图 3 分子相对构型图 (a) 和分子立体结构投影图 (b)

衍射结构分析方法获得了化合物应为二萜类二聚体结构类型(图 4), 证明其他波谱分析结果仅得到了化合物二聚体的一半结构信息.

3.4 手性药物绝对构型分析

在化学药物研究中, 有一类药物为手性药物, 确定药物手性基团构型是需要解决的关键问题, 手性

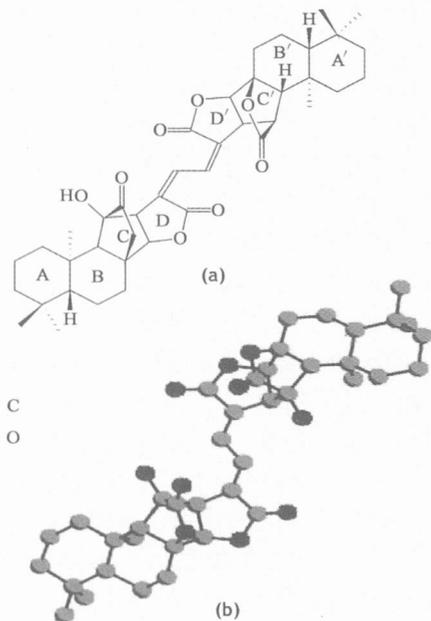


图 4 Langluin C 分子相对构型图 (a) 和分子立体结构投影图 (b)

问题会直接影响药物的疗效与毒副作用. 我国今年即将颁布的手性创新药物指导原则中明确规定: “手性药物分子绝对构型测定的直接方法为单晶 X 射线衍射结构分析”. 对于一般非手性创新药物而言, 也要求有单晶 X 射线衍射结构分析结果, 这表明单晶 X 射线衍射技术在我国新药研究中发挥着重要作用.

应用反常散射确定分子绝对构型: 反常散射法测定分子绝对构型是指利用分子中不同原子 (特别是重原子) 间的 X 射线反常散射 (色散) 效应差异测定分子绝对构型. 由于 “重原子 (如金属原子和卤素原子等)” 比 “轻原子 (如碳、氮、氧原子等)” 反常散射效应大, 故一般测定分子绝对构型时会利用含有或引入的重原子 (卤素以上元素). 对于不含重原子的有机药物样品, 则需要采用累积计数方式获得高精度的反常散射数据, 对经过吸收校正实验值 $|F_o(H)|$ 与 $|F_o(-H)|$, 计算差值 ΔF_o 的符号 (+ 或 -), 与相对构型的理论 ΔF_o 符号比较, 一致者即为分子的绝对构型.

利用 Flack 参数确定分子绝对构型: 在利用 sheks97 等软件进行晶体结构分析时, 可通过程序计算 Flack 参数 x 及其标准不确定度 u 来判断晶体的绝对构型. 当 $u > 0.3$ 时, 表示晶体没有足够的反常散射能力, 绝对构型不能被确定; 假如 u 足够小 ($u < 0.1$), 当 Flack 参数 x 为 0 则为正确的绝对构型, x 为 1 时则为反型^[3].

利用结构可靠因子 R 值测定分子绝对构型: 当分子中含有卤素或更重的元素时, 可以分别对正反构型分子的原子坐标参数, 同步进行最小二乘修正计算, 获得不同 R 值, 其中 R 值小者为正确的分子绝对构型。

关附甲素盐酸盐药物的构型确定就是利用氯原子对 $\text{CuK}\alpha$ 的反常散射效应, 通过对正反型分子的 R_f

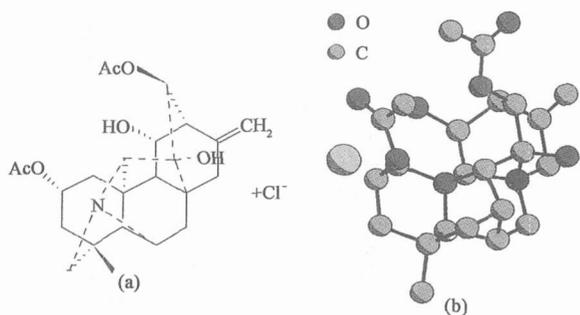


图 5 关附甲素盐酸盐分子绝对构型图 (a) 和分子立体结构投影图 (b)

值计算比较, 最终获得被测分子的绝对构型. 图 5 所示为该化合物分子绝对构型图与立体结构投影图。

利用手性试剂测定分子绝对构型: 利用手性试剂 (如 D 型或 L 型酒石酸等) 与被测药物样品形成共晶化合物, 以手性试剂的已知构型为参照, 即可获得待测药物分子的绝对构型. 例如: 利用 L 型蔗糖酸试剂, 测定了诺氟沙星药物分子的绝对构型, 图 6 所示为分子绝对构型图与分子立体结构投影图。

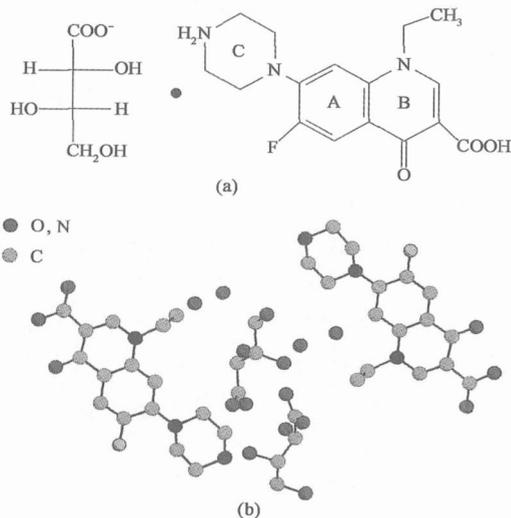


图 6 诺氟沙星分子和 L 型蔗糖酸分子的绝对构型图 (a) 与分子立体结构投影图 (b)

3.5 构象差异

化学药物分子立体结构与构象差异将会直接影

响药物的疗效, 分子构象在药物的结构与功能研究中具有十分重要作用. 晶态下药物分子的活性构象应该属低能构象, 也是药物客观存在的一种构象. 单晶 X 射线衍射分析可以提供定量的药物分子骨架、组成各环的构象、环与环间的顺反连接方式、环自身的平面性质、环与环之间的扭转角、侧链的相对取向位置、原子坐标等, 为药物分子立体结构与功能提供了基础研究数据。

$(\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{NaP})_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ 为一种药物, 晶态下一个不对称单位中含 4 个药物分子和 6 个结晶水分子. 由于单键旋转造成 4 个药物分子中苯环空间构象不同, 所以结构不能叠合. 4 个药物分子的 A、B 环二面角值分别为: 55.2° 、 58.3° 、 50.0° 、 48.8° . 图 7 (a), (b), (c) 分别为药物分子结构图、4 个药物分子叠合图与分子立体结构投影图。

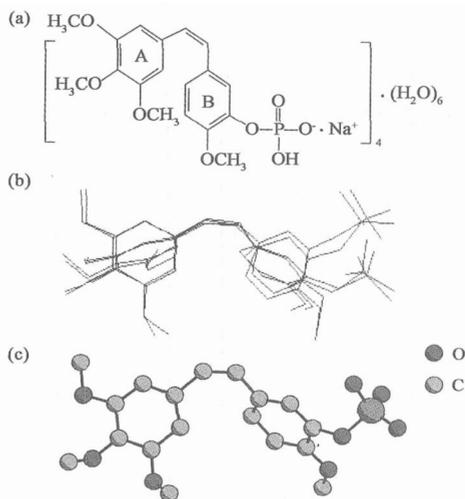


图 7 药物分子结构图 (a); 4 个分子的叠合图 (b); 与分子立体结构投影图 (c), 图中大球是 P

3.6 氢键、盐键、配位键等的计算与分子排列规律

氢键、盐键、配位键等是研究药物分子生物活性中的重要信息, 利用单晶 X 射线衍射分析可以准确计算出药物分子的氢键、盐键、配位键的成键方式和具体数值. 特别是分子内与分子间氢键关系, 将影响晶态下分子在空间形成确定排列方式, 由此可获得分子在空间的层状、螺旋、隧道或空穴等各种排列方式, 这些重要信息将有助于了解和解释药物分子的作用机理。

氢键分析: hydroquinone 为对苯二酚化合物, 晶态下 1 个不对称单位中含有 9 个对苯二酚分子, 形成九聚体结构. 3 个对苯二酚分子首尾氢键相接, 形

成 18 元环, 6 个对苯二酚分子的首部相接形成螺旋状氢键网, 对苯二酚分子间形成紧密排列氢键网. 图 8 所示为其分子结构图和分子沿 a 轴投影的晶胞堆积图.

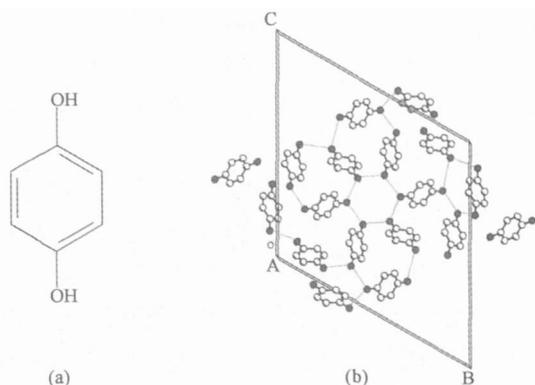


图 8 hydroquinone 的分子结构图 (a) 和分子沿 a 轴投影的晶胞堆积图 (b)

盐键分析: 图 9 所示晶体为 1, 2, 4-三氮唑酮类化合物的盐酸盐. 化合物分子骨架由五元三氮唑环 A (平面)、哌嗪环 B (椅式) 和 2 个苯环 C、D 组成. 分子间存在盐键值为 $\text{Cl} \cdots \text{N}_4$; 3.044 \AA 晶态下分子以盐键和范德瓦尔斯力维系其在空间的稳定排列.

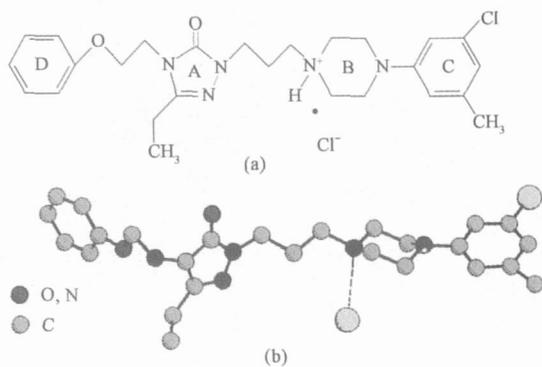


图 9 分子相对构型图 (a); 分子立体结构投影图 (b), 图中大球是 Cl

配位键分析: Calcium Glycine 样品为氨基酸螯合钙, 其中 Ca 与 2 个 Cl 及 4 个相邻甘氨酸分子中的 4 个 O 原子形成六配位化合物, 组成变形复四方双锥配位结构. 图 10 所示为分子相对构型图、分子立体结构投影图及 Ca 原子的配位示意图.

3.7 固体药物晶型分析

在有机化合物中大约有 $1/3$ 以上的化合物存在多晶型问题. 通过对中国药典 (2005 年版) 的统

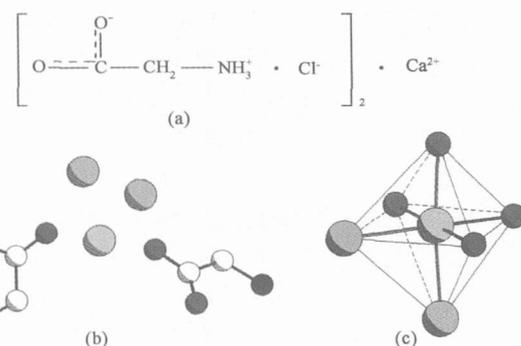


图 10 Calcium Glycine 的分子相对构型图 (a)、分子立体结构投影图 (b) 及 Ca 原子的配位示意图 (c)

计^[4], 在我国已有的化学药物中, 固体剂型大约占 80%. 多晶型是固体物质存在的一种客观现象. 引起固体化学物质形成多晶型的原因主要包括: 分子排列规律、分子构象差异、分子间作用力、晶体中含有溶剂或结晶水分子等. 同质异晶可造成药物的溶解度、溶出速率、作用部位、稳定性、有害溶剂残留种类与含量不同, 从而造成同质异晶药物的药效与毒副作用间存在较大差异. 近年来, 国内外均已将固体化学药物的晶型研究与晶型药物的质量控制作为新药研究的热点问题之一.

我国创新药物指导原则中规定: 固体化学原料药晶型与固体制剂药晶型应保持完全一致. 所以, 在固体化学药物中, 既要研究原料药晶型, 也应关注固体制剂中晶型.

沙利度胺是一种具有 2 种晶型的药物. 单晶 X 射线衍射分析发现: 沙利度胺形成多晶型的原因是由于分子间作用力与分子排列规律差异造成的 (如图 11 所示).

3.8 生物大分子结构测定

蛋白质 X 射线晶体学是分析蛋白质三维结构最有效的方法, 目前已经测定了分子量达到近百万的病毒蛋白质和核糖体结构. 由于蛋白质结晶比较脆弱, 而且晶胞较大, 通常使用同步辐射光源获得高分辨的衍射结构数据. 结构计算多采用同晶置换法 (即引入重原子)、分子置换法和多波长反常散射法, 后者还可作为消除单对同晶置换法相位双解的辅助方法. 一旦获得初始结构, 即可利用晶胞中不对称单位所提供的结构信息去优化相位, 反复计算电子云密度图. 当电子云密度图分辨率为 6 \AA 时, 可看到 α -螺旋或 β -折叠的轮廓; 在 2.5 \AA 分辨率时, 可对未知序列多肽中的 50% 的侧链结构进行指认; 在

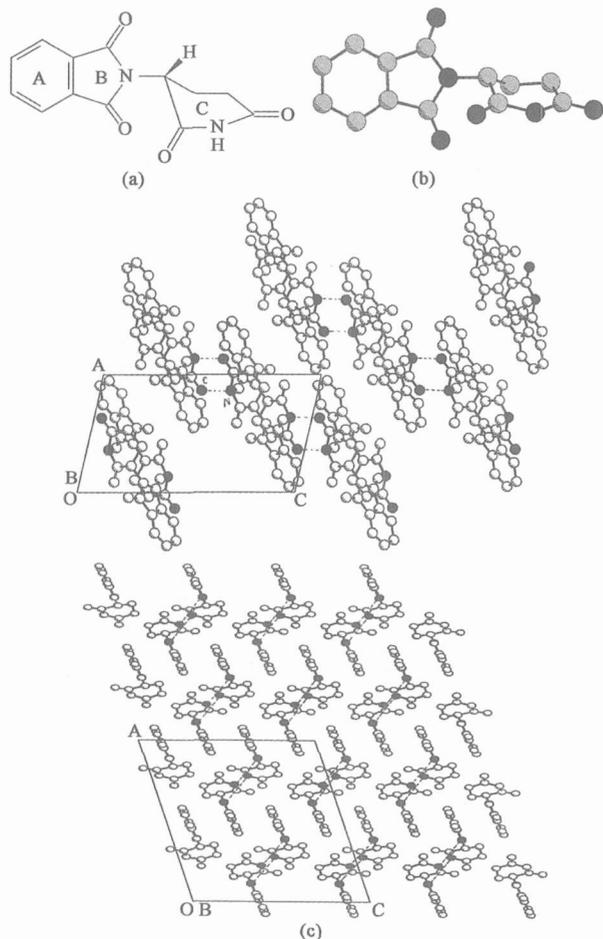


图 11 沙利度胺药物结构图 (a) 分子结构图; (b) 分子立体结构投影图; (c) 不同晶型的晶胞堆积图

1. 5\AA 时, 所有单个原子基本能被指认; 在 1.2\AA 时, 可辨认氢原子。

4 粉末 X 射线衍射技术在药物研究中的应用

早在 20 世纪 70 年代, 美国药典就将粉末 X 射线衍射技术列为固体药物的检测分析方法。目前我国药典也收录了该分析技术, 主要是应用于有机化学药物的检测分析。

4.1 化学药物研究中的应用

晶态与非晶态物质鉴别: 固体化学药物是由晶态有机化合物样品 (对应锐的 X 射线衍射峰) 或非晶态样品 (对应弥散的 X 射线衍射峰) 组成。采用粉末 X 射线衍射分析技术, 可有效地鉴别样品的存在状态, 并给出可重复的 X 射线衍射图谱与数据。图

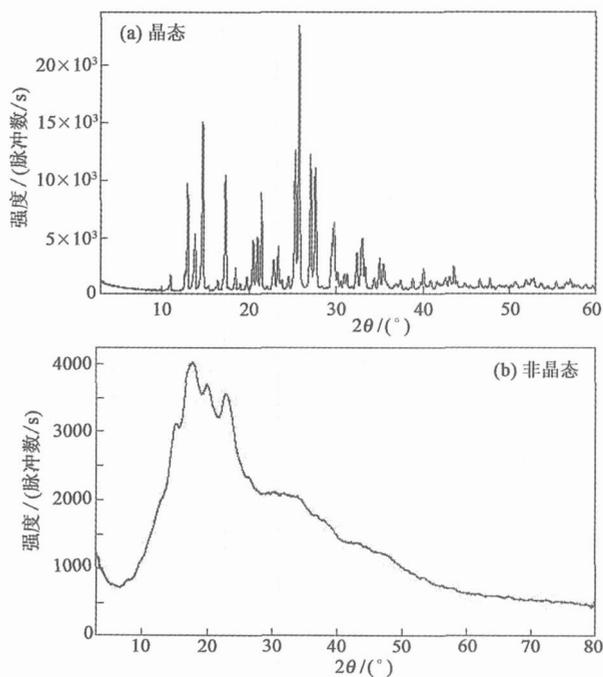


图 12 药物样品粉末 X 射线衍射图谱

12 为有机样品的晶态与非晶态的粉末 X 射线衍射图谱。

固体化学药物异同的鉴别: 利用粉末 X 射线衍射技术对 2 个未知的固体化学药物样品进行 X 射线衍射实验, 当二者衍射图谱与衍射数据值完全一致时 [包括衍射峰的位置 (2θ 或 d), 峰强度: (I/I_0), 峰形: (几何拓扑)], 即可确定 2 个样品为相同结晶状态的相同化学药物。

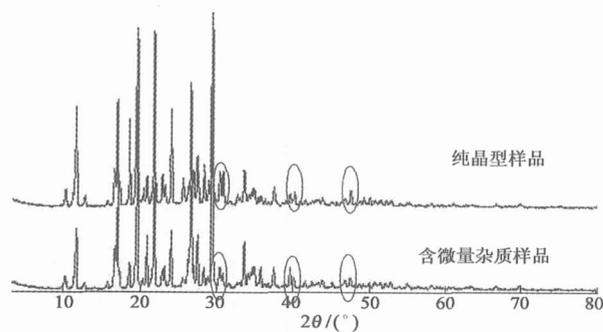


图 13 吲哚美辛纯晶型样品与含有微量杂质成分样品的粉末 X 射线衍射图

固体化学药物纯度鉴别: 固态下药物样品的纯度检测也是药物质量控制的重要环节。每种药物均有不同的纯度要求, 纯度指“化学纯度”和“晶型纯度”, 粉末 X 射线衍射分析技术可给出被测药物的“化学纯度”和“晶型纯度”的定量结果。

图 13 为吲哚美辛纯晶型样品与含有微量杂质

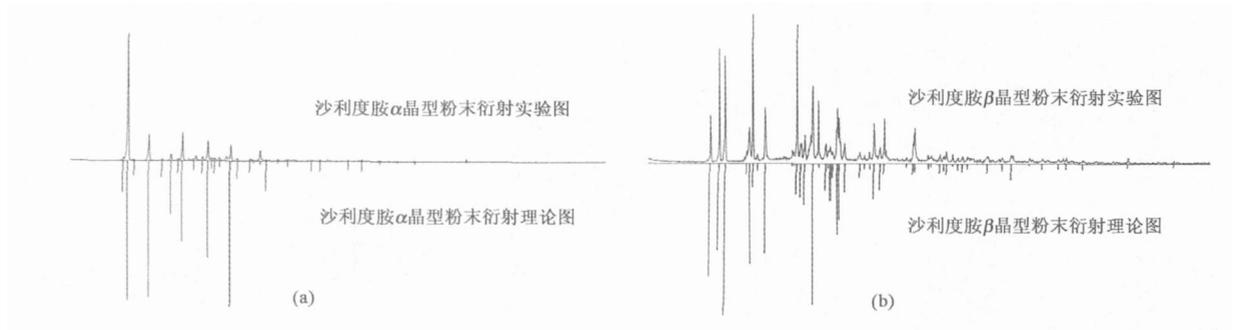


图 14 沙利度胺 2 种晶型的实验与理论粉末 X 射线衍射图谱 (a) α 晶型粉末衍射实验与理论图; (b) β 晶型粉末衍射实验与理论图

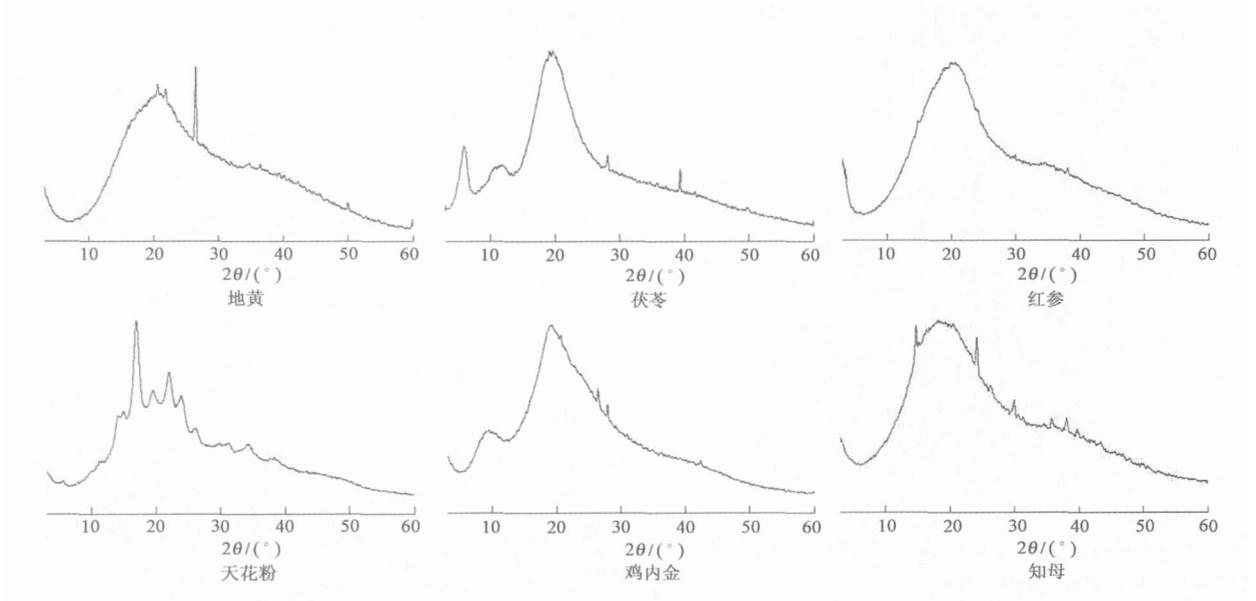


图 15 6 种不同中药材的对照粉末 X 射线衍射图谱

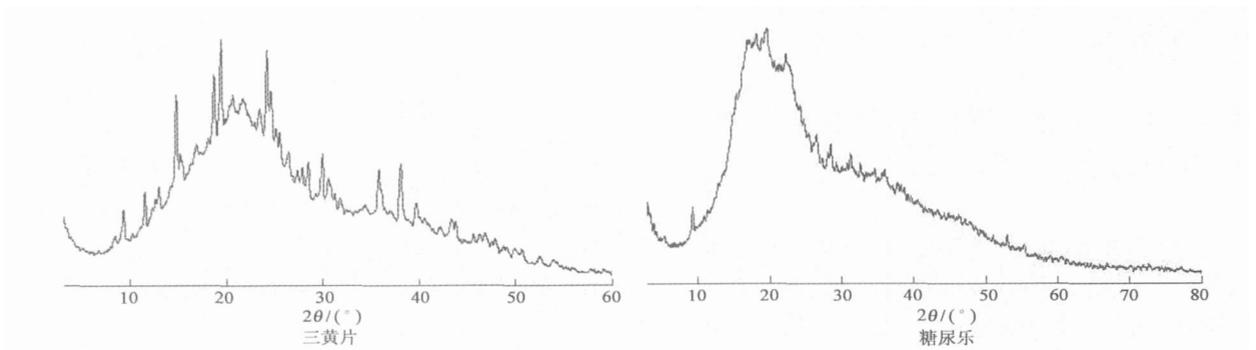


图 16 2 种不同中成药的对照粉末 X 射线衍射图谱

成分样品的粉末 X 射线衍射图谱. 从图 13 中可以观察到微量杂质衍射峰的存在.

固体化学药物的晶型测定: 同质异晶药物具有不同的粉末 X 射线衍射图谱. 利用单晶与粉末 X 射线衍射分析技术联合进行分析, 可以有效地进行纯晶型样品的晶型种类、混晶样品比例与晶型含量的测定.

图 14 所示为沙利度胺 2 种晶型的理论与实验粉末 X 射线衍射图谱. 通过对比, 可以发现两种晶型样品实验与理论图谱符合, 故可认为该样品为晶型纯品.

固体药物制剂中原料药成分含量与晶型状态分析: 首先要识别混合体系药物制剂中的原料药含量

与晶型状态,掌握组成药物制剂的各种辅料成分与含量.此外,需要对被测药物样品进行定量的 X 射线衍射分析,方可获得原料药物及其制剂的标准含量曲线,从而计算固体药物制剂中原料药成分含量.

4.2 中药研究中的应用

中草药是我国的瑰宝,已有几千年的用药历史.尽管我国的天然药物化学家已经对许多种类的常用中草药品种进行了化学成分提取分离及结构鉴定研究,但由于受到提取分离技术的限制,现在已经掌握的化学成分尚属高含量部分(其含量高于千分之一),植物中大量的低含量成分至今仍是一个亟待揭示的谜.中草药是我国药物化学家获取新化合物的主要来源.因此,保证中药的质量稳定性就成为药物学家的工作基础.中药属于一种复杂体系,它的物质属性不同于化学药物.中草药的生物活性作用是源于多成分的协同作用,已知的事实是:许多中药自身活性均比其单一化学成分活性高.

中药中含有数十乃至上百种化学成分.由于目前对于中药尚没有有效的质量控制标准和整体的定量检测分析方法,所以制约了中药的发展及全面走向世界.为此,需要在继承已延续数千年的传统中药宏观鉴定结果的前提下,引入能够再现其整体结构的现代物理分析技术.应用粉末 X 射线衍射分析技术,可以在微观世界再现中药整体结构特征.粉末 X 射线衍射分析技术在中药鉴定分析中有着独特的优势:(1)实验样品不需要化学处理,保持了中药各种成分的原始存在状态.(2)样品处理简单,经研磨并通过 100—200 目筛后即可作为实验样品.(3)实验获得的衍射图谱是中药中各种成分衍射图谱的信息叠加,完全符合傅里叶变换线性定理.在线性叠加的衍射图谱中,包含了全部成分的种类、存在状态及含量等结构信息.(4)不同种类的中药(中药材,中成药),由于其成分、状态、含量差异造成其衍射图谱

的指纹特征不同,包括衍射图形的几何拓扑与特征峰值.依此,可以实现对不同种类中药的微观鉴定,实现真伪、优劣、分类和药材质量控制目的^[5-6].

中药材傅里叶图谱分析:图 15 所示为 6 种不同中药材的对照粉末 X 射线衍射图谱.

中成药傅里叶图谱分析:图 16 为 2 种不同中成药的对照粉末 X 射线衍射图谱.

5 发展趋势

综上所述,X 射线衍射分析技术已广泛应用于我国药学研究的各个领域,并发挥着不可替代的作用.相信通过药学与晶体学科研究人员的共同努力,利用 X 射线衍射技术,不断建立新的分析方法,并扩展其应用范围,将使 X 射线衍射技术在我国和世界的不同交叉学科领域中发挥更为重要的作用,为我国的创新中、西药学的研究与开发提供有效的质量控制方法.

参考文献

- [1] Institute of Materia Medica Chinese Academy of Medical Science Chinese Traditional Medicine modern research (the edition of instrument analysis). Beijing: Peking University Health Science Center Peking Union Medical College Press, 1999. 366 - 486 (in Chinese)
- [2] Fang Q Ch. Natural Medicinal Chemistry Research. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2006. 87 - 143 (in Chinese)
- [3] Chen X M, Cai J W. Principle and Practice of Single-crystal Structure Analysis. Beijing: Science Press, 2003 (in Chinese)
- [4] Pharmacopoeia Commission of the Ministry of Public Health. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Beijing: Chemical Industry Press, 2005 (in Chinese)
- [5] Zhang L, Wang Sh Ch, Wu Y Sh *et al*. Chinese Traditional Patent Medicine, 2005, 27(5): 577 (in Chinese)
- [6] Chen H M, Wu Y Sh, Zhang Q T *et al*. Journal of China Pharmaceutical University, 2004, 35(2): 138 (in Chinese)

封面说明

封面的左上图为载体金属催化剂模型的示意图,即分散在高度有序的二维氧化物薄膜上的金属纳米颗粒.该模型中,氧化物薄膜的厚度通常为几个埃到 10 纳米,以便克服在使用与电子相关的表面仪器测量时,具有绝缘特性的氧化物产生的带电效应.通过该模型,人们能够使用各种常用的表面分析手段在原子尺度上研究催化反应特性与其结构的关系,并深入地理解反应机理.

高度有序的氧化铈薄膜的成功制备,为人们在原子尺度上研究该氧化物载体上的各种金属纳米颗粒的催化特性奠定了坚实的基础.右下图是室温时沉积在 $\text{CeO}_2(111)$ 薄膜上 0.1 ML Au 纳米颗粒的扫描电子隧道显微镜 (STM) 图像.

(中国科学院物理研究所 路军岭 高鸿钧)