

Wyznaczenie lipofilowości *acidum dehydrocholicum* różnymi metodami

Małgorzata Dołowy

Zakład Chemii Analitycznej, Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny

Adres do korespondencji: Małgorzata Dołowy, Zakład Chemii Analitycznej, Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, e-mail: mdolowy@wp.pl

Wstęp

Lipofilowość stanowiąca miarę właściwości hydrofobowo-hydrofilowych danego związku chemicznego to ważny parametr fizykochemiczny wpływający na jego aktywność biologiczną. To jeden z deskryptorów, który wykorzystuje się obecnie w projektowaniu nowych leków oraz w ocenie aktywności substancji leczniczych już istniejących na rynku farmaceutycznym. Okazuje się, że działanie farmakologiczne wielu substancji koreluje z ich lipofilowością, dzięki czemu ten parametr fizykochemiczny jest pomocny w projektowaniu nowych biologicznie czynnych struktur chemicznych [1]. Lipofilowość pozwala przewidzieć nie tylko profil ADME – wchłanianie, dystrybucję, metabolizm i wydalanie, czyli zachowanie się leku w organizmie pacjenta tuż po jego podaniu, ale także jego wiązanie się z odpowiednim receptorem. Poszukiwanie korelacji pomiędzy strukturą chemiczną związku i właściwościami a aktywnością biologiczną są przedmiotem badań typu: QSAR (*Quantitative Structure – Activity Relationship*) i QSPR (*Quantitative Structure – Property Relationship*) [2].

Ilościowo lipofilowość wyrażana jest jako współczynnik podziału P lub jego logarytm logP, definiowany w następujący sposób:

$$\log P = \log c_0 - \log c_w$$

gdzie:

c_0 – stężenie badanej substancji w fazie organicznej (niepolarniej),

c_w – stężenie badanej substancji w fazie wodnej (polarniej).

W danej grupie związków chemicznych najczęściej ze wzrostem lipofilowości wzrasta ich aktywność biologiczna ze względu na to, że lepsze jest

Determination of lipophilicity of *dehydrocholic acid* with the use of different methods

In presented work the lipophilicity of dehydrocholic acid with the use of experimental and theoretical methods was determined. Dehydrocholic acid is one of the bioactive compounds usually used in medicine in form of commercial samples such as: Raphacholin C and Raphacholin Forte. A reversed-phase system of thin-layer chromatography (RP-TLC and RP-HPTLC) was applied to find the chromatographic lipophilicity parameter R_{MW} of this compound. The R_{MW} values were measured in various chromatographic conditions, by using the mobile phases such as: methanol–water, acetone–water and dioxane–water (mixed in respective volume compositions) and on different kind of chromatographic plates: RP-18WF₂₅₄, RP-2F₂₅₄ and RP-18F₂₅₄. All experimentally determined values of lipophilicity (R_{MW}) were compared with partition coefficients (logP), which were computational calculated like: AlogPs, logP_{KOWIN}, xlogP2, xlogP3, milogP, AlogP and MlogP. On the basis of obtained results it can be concluded, that experimental and computational calculated lipophilicity parameter is useful to estimate the lipophilic properties of dehydrocholic acid.

Keywords: lipophilicity, logP, dehydrocholic acid.

© Farm Pol, 2009, 65(10): 689-693

powinowactwo substancji z błonami biologicznymi, lepsza przenikalność, a co się z tym wiąże lepszy dostęp do miejsca działania w organizmie. Natomiast dalszy wzrost lipofilowości wywołuje zwiększenie powinowactwa do lipidów i utrudnienie transportu cząsteczek związku przez fazę wodną, co powoduje jego wybiórczą absorpcję w błonach biologicznych. Dlatego w praktyce dąży się do wyboru substancji leczniczych o optymalnej lipofilowości, czyli o optymalnych właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych i współczynnika podziału (logP) [1].

Metody wyznaczania parametrów lipofilowości

Lipofilowość można wyznaczyć doświadczalnie:

- klasyczną metodą ekstrakcyjną w układzie oktanol – woda (*shake – flask*),
- metodą RP-TLC, czyli chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz,
- metodą RP-HPLC, czyli wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz oraz metodami teoretycznymi z zastosowaniem odpowiednich programów obliczeniowych.

Spośród metod doświadczalnych największym uznaniem w przewidywaniu lipofilowości cieszą się metody chromatograficzne, ze względu na ich szybkość, prostotę w wykonaniu i precyzję w porównaniu z klasyczną metodą ekstrakcyjną [1]. Ponadto metody chromatograficzne pozwalają wyznaczyć logP w szerokim zakresie wartości współczynnika podziału w odróżnieniu od metody ekstrakcyjnej. Duże znaczenie w przewidywaniu lipofilowości i in-

nych deskryptorów fizykochemicznych metodami teoretycznymi odgrywają programy komputerowe. Wśród nich bardzo przydatny do określania m.in. logP okazuje się ogólnodostępny zestaw oprogramowania zbudowany przez doktora Tetko [2, 3].

Celem powyższej pracy było wyznaczenie i ocena lipofilowości kwasu dehydrocholowego przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC i RP-HPTLC) oraz metod obliczeniowych.

Kwas dehydrocholowy to pochodna steroidowa stosowana jako lek żółciopędny w schorzeniach wątroby i dróg żółciowych w postaci takich preparatów, jak: Raphacholin C (40 mg)

i Raphacholin Forte (250 mg) [4, 5, 6]. Wyznaczenie lipofilowości kwasu dehydrocholowego doświadczalnie i teoretycznie może być pomocne do oceny jego właściwości farmakokinetycznych, wpływających na los kwasu dehydrocholowego w organizmie ludzkim, po jego zażyciu przez pacjentów stosujących ten związek jako substancję czynną pod postacią różnych preparatów handlowych.

Materiały i odczynniki

W badaniach użyto kwas dehydrocholowy min. 99% (Sigma – Aldrich, USA, nr serii D3750-25G). Składnikami faz ruchomych były: metanol (POCH, Gliwice), aceton (POCH, Gliwice), dioksan (POCH, Gliwice) oraz woda destylowana (Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny ŚUM, Sosnowiec).

Do wizualizacji plamek kwasu dehydrocholowego zastosowano kwas siarkowy (VI) około 95% (POCH, Gliwice). W pracy zastosowano szklane płytki chromatograficzne do RP-HPTLC: RP-18WF₂₅₄ (E. Merck, Art. 1.13124), RP-2F₂₅₄ (E. Merck, Art. 1.13726) oraz płytki aluminiowe do RP-TLC tj. RP-18F₂₅₄ (E. Merck, Art. 1.05559).

Metodyka badań

Warunki wyznaczania lipofilowości kwasu dehydrocholowego techniką RP-TLC i RP-HPTLC

W badaniach zastosowano płytki chromatograficzne o wymiarach 4 cm × 10 cm. Na płytce nanoszono 2 µl standardowego roztworu kwasu dehydrocholowego o stężeniu 5 mg/ml i rozwijano je na wysokość 8 cm w komorze chromatograficznej firmy Camag, o wymiarach 20 cm × 20 cm, zawierającej 50 ml odpowiedniej fazy ruchomej o następującym składzie:

- a) metanol i woda, o zawartości metanolu zmieniającej się od 50 do 95% (v/v)
- b) aceton i woda, o zawartości acetonu zmieniającej się od 50 do 90% (v/v)
- c) dioksan i woda, o zawartości dioksanu zmieniającej się od 50 do 90% (v/v)

Po rozwinięciu i wysuszeniu płytek, położenie plamek kwasu dehydrocholowego ustalono przez spryskanie 10% wodnym roztworem kwasu siarkowego (VI) i ogrzewanie w suszarce przez 15 minut w temperaturze 120°C. Na podstawie otrzymanych chromatogramów obliczono wartości współczynnika retencji chromatograficznej R_F , które następnie przeliczono na wartości R_M w następujący sposób:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right) \quad (1)$$

Chromatograficzny parametr lipofilowości (R_{MW})

Miarą lipofilowości wyznaczanej drogą chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz jest współczynnik R_M obliczany zgodnie z równaniem (1). W celu otrzymania dokładnej wartości chromatograficznego parametru lipofilowości (R_{MW}) wartości R_M uzyskane dla kwasu dehydrocholowego na płytkach: RP-18WF₂₅₄, RP-18F₂₅₄ i RP-2F₂₅₄ przy użyciu mieszanin metanol–woda, aceton–woda oraz dioksan–woda, w różnym stosunku objętościowym, ekstrapolowano do zerowego stężenia modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, zgodnie ze wzorem Soczewińskiego-Wachtmeistera [1, 7]:

$$R_M = R_{MW} - S \cdot \varphi \quad (2)$$

gdzie:

R_M – wartość R_M badanego związku przy zawartości φ ułamka objętościowego modyfikatora organicznego w fazie ruchomej,

Lipofilowość stanowiąca miarę właściwości hydrofobowo-hydrofilowych danego związku chemicznego to ważny parametr fizykochemiczny wpływający na jego aktywność biologiczną. To jeden z deskryptorów, który wykorzystuje się obecnie w projektowaniu nowych leków oraz w ocenie aktywności substancji leczniczych już istniejących na rynku farmaceutycznym.

Tabela 1. Współczynniki (\pm SD) równań $R_M = R_{MW} - S \cdot \varphi$ dla kwasu dehydrocholowego badanego na płytkach: RP-18WF₂₅₄, RP-18F₂₅₄ i RP-2F₂₅₄, rozwijanych przy użyciu fazy ruchomej: metanol-woda, aceton-woda oraz dioksan-woda^a

Płytki chromatograficzne	Faza ruchoma	R_{MW}	S	r	s	F	n	Numer równania
RP-18WF ₂₅₄	metanol-woda	1,9474 (\pm 0,0709)	2,9119 (\pm 0,0965)	0,9967	0,03	909,63	8	3
RP-18F ₂₅₄	metanol-woda	2,2514 (\pm 0,1496)	3,2357 (\pm 0,1856)	0,9919	0,05	304,01	7	4
RP-2F ₂₅₄	metanol-woda	2,4167 (\pm 0,0866)	4,02 (\pm 0,1216)	0,9968	0,05	1091,92	9	5
RP-18WF ₂₅₄	aceton-woda	2,4924 (\pm 0,2065)	3,9619 (\pm 0,2813)	0,9852	0,09	198,38	8	6
RP-18F ₂₅₄	aceton-woda	1,9021 (\pm 0,0736)	2,8967 (\pm 0,1034)	0,9956	0,04	785,18	9	7
RP-2F ₂₅₄	aceton-woda	2,7824 (\pm 0,6884)	4,7102 (\pm 0,9856)	0,9058	0,34	22,84	7	8
RP-18WF ₂₅₄	dioksan-woda	2,5314 (\pm 0,3403)	4,2192 (\pm 0,4975)	0,9669	0,17	71,91	7	9
RP-18F ₂₅₄	dioksan-woda	2,2665 (\pm 0,575)	3,6632 (\pm 0,3695)	0,9802	0,12	98,31	6	10
RP-2F ₂₅₄	dioksan-woda	2,2562 (\pm 0,1469)	3,9497 (\pm 0,2147)	0,9927	0,07	338,36	7	11

s – błąd standardowy, p – poziom istotności, F – wartość wg testu Fishera, n – liczba pomiarów, r – współczynnik korelacji
^a dla wszystkich równań $p < 0,01$

R_{MW} – teoretyczna wartość R_M analitu ekstrapolowana do zerowej zawartości modyfikatora organicznego w fazie ruchomej (R_{MW}),

S – nachylenie krzywej regresji (jest to różnica R_M w czystej wodzie lub buforze ($\varphi=0$) minus R_M w czystym modyfikatorze ($\varphi=1$)),

φ – ułamek objętościowy modyfikatora organicznego w fazie ruchomej.

Obliczanie parametrów lipofilowości

Teoretyczne współczynniki podziału

Teoretyczne wartości współczynników podziału: AlogPs, logP_{KOWIN}, xlogP2, xlogP3, milogP, AlogP oraz MlogP uzyskano z internetowej bazy danych [3].

Analiza korelacyjna i analiza podobieństwa

Analizę korelacyjną oraz analizę podobieństwa (tzw. analizę skupień) przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego Statistica 7.1.

Wyniki

Chromatograficzny parametr lipofilowości R_{MW} , wyznaczony na podstawie wartości R_M kwasu dehydrocholowego, zmierzonych w różnych warunkach chromatograficznych, tj. na płytkach do RP-TLC i RP-HPTLC: RP-18F₂₅₄, RP-18WF₂₅₄ i RP-2F₂₅₄, rozwijanych przy użyciu mieszanin: metanol-woda, aceton-woda oraz dioksan-woda zestawiono w **tabeli 1**. Ponadto w **tabeli 1** zaprezentowano parametry statystyczne liniowych korelacji $R_M = f(\varphi)$, takie jak: s – błąd standardowy, p – poziom istotności, F – wartość wg testu Fishera, n – liczba pomiarów, r – współczynnik korelacji, które posłużyły do określenia wartości R_{MW} kwasu dehydrocholowego dla wszystkich zastosowanych warunków chromatograficznych.

Natomiast w **tabeli 2** przedstawiono wartości teoretyczne współczynnika podziału (logP), wyrażonego

Tabela 2. Wartości współczynników podziału kwasu dehydrocholowego wyznaczone metodami obliczeniowymi [3]

Współczynnik podziału	Wartość współczynnika podziału
logPexp	–
AlogPs	3,37
logP _{KOWIN}	2,28
xlogP2	2,66
xlogP3	2,56
milogP	2,78
AlogP	2,34
MlogP	2,98

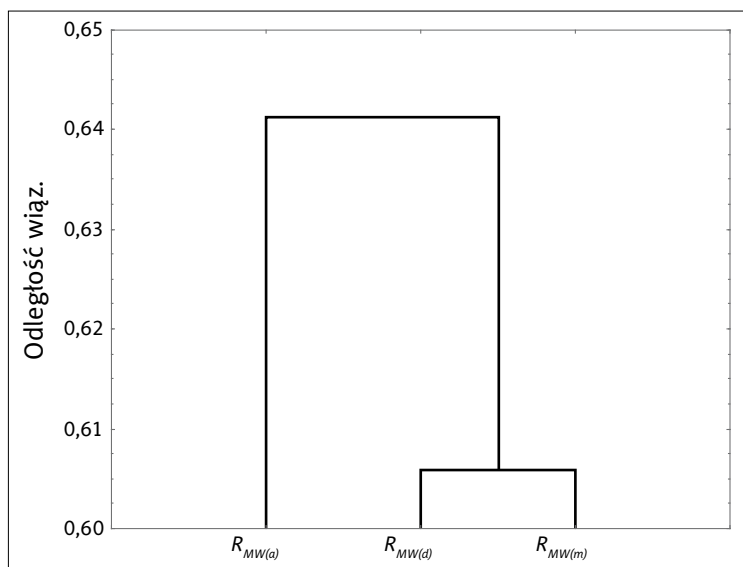
jako AlogPs, logP_{KOWIN}, xlogP2, xlogP3, milogP, AlogP, oraz MlogP. Dane te otrzymano z internetowej bazy danych [3].

Omówienie wyników

Celem powyższych badań było wyznaczenie lipofilowości kwasu dehydrocholowego przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej z odwróconym układem faz (RP-TLC i RP-HPTLC) oraz metod obliczeniowych. Uzyskane, na podstawie otrzymanych w różnych warunkach chromatograficznych, wartości R_M ekstrapolowano do zerowego stężenia modyfikatora organicznego w fazie ruchomej (φ) otrzymując równania korelacyjne (3–11) typu: $R_M = R_{MW} - S \cdot \varphi$. Wartość chromatograficznego parametru lipofilowości (R_{MW}) stanowi wyraz wolny w tym równaniu. Wszystkie otrzymane równania liniowe charakteryzują się wysokimi współczynnikami korelacji tzn. $r > 0,9$. Korzystne są również pozostałe parametry statystyczne tych równań, takie jak: poziom istotności (p) czy błąd standardowy (s).

W celu porównania chromatograficznego parametru lipofilowości (R_{MW}) kwasu dehydrocholowego wyznaczonego w zastosowanych warunkach chromatograficznych, tj. przy użyciu fazy ruchomej: metanol-woda ($R_{MW(m)}$), aceton-woda ($R_{MW(a)}$) oraz dioksan-woda ($R_{MW(d)}$) wykorzystano analizę skupień (rycyna 1).

Przedstawiony na rycynie 1 dendrogram podobieństwa wartości R_{MW} wskazuje na fakt, że najbardziej zbliżone do siebie wartości R_{MW} otrzymano przy użyciu mieszaniny: dioksan-woda oraz metanol-woda, jako fazy ruchomej (tworzą one jedno skupienie). Natomiast parametr lipofilowości R_{MW} uzyskany w układzie aceton-woda jest podobny do nich.



Rycyna 1. Dendrogram podobieństwa wartości R_{MW} kwasu dehydrocholowego otrzymanych przy użyciu różnych faz ruchomych

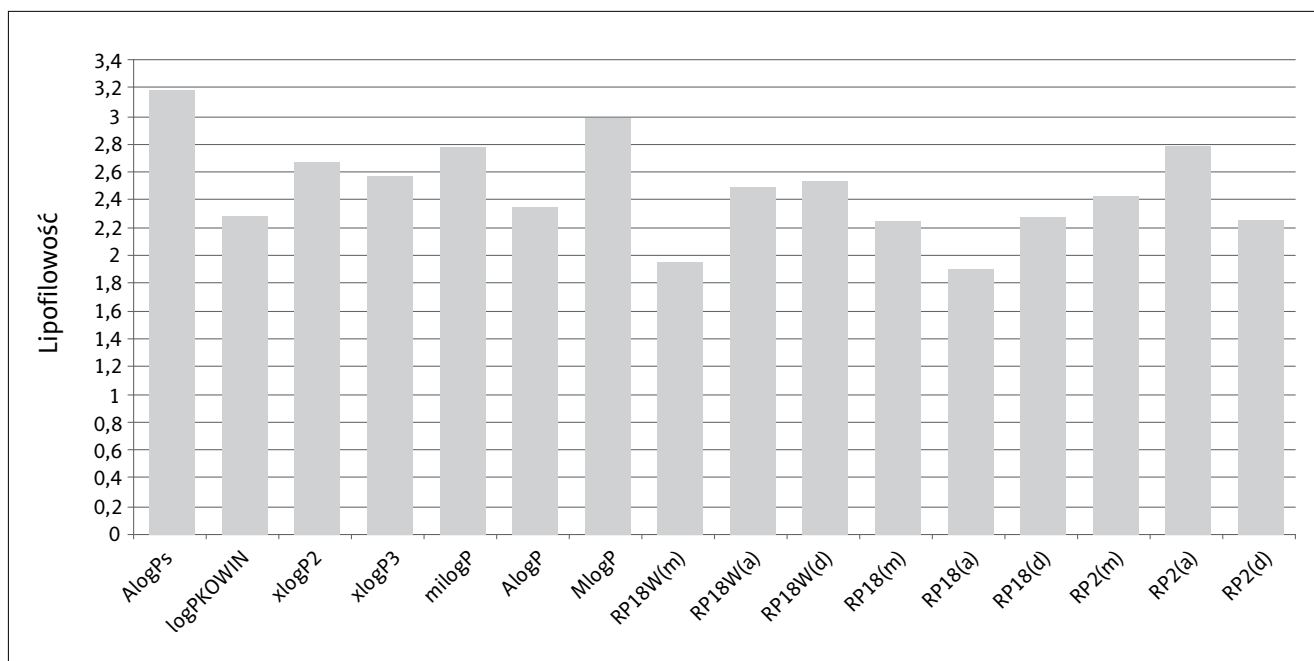
Otrzymane eksperymentalnie wartości R_{MW} porównano również z teoretycznymi wartościami współczynnika podziału, obliczonymi za pomocą programów komputerowych: AlogPs, $\log P_{KOWIN}$, xlogP2, xlogP3, milogP, AlogP, oraz MlogP (rycyna 2). Wartości teoretycznych współczynników podziału różnią się między sobą. Najniższą wartość posiada współczynnik podziału $\log P_{KOWIN}$, a najwyższą spośród teoretycznych współczynników podziału wykazuje AlogPs. Niestety brak jest danych dotyczących wartości eksperymentalnego $\log P$ tj. $\log P_{exp}$ dla kwasu dehydrocholowego.

Analiza wykresu zamieszczonego na rycynie 2 pozwala stwierdzić, że teoretyczny współczynnik podziału, wyrażony jako $\log P_{KOWIN}$ jest zbliżony do chromatograficznego parametru lipofilowości R_{MW} wyznaczonego przy użyciu płytek RP-18F₂₅₄ i fazy ruchomej metanol-woda oraz do R_{MW} uzyskanego na płytkach RP-18F₂₅₄ oraz RP-2F₂₅₄ przy fazy ruchomej dioksan-woda. Natomiast teoretyczny współczynnik podziału milogP jest zbliżony do wartości R_{MW} wyznaczonej na płytkach RP-2F₂₅₄ przy użyciu fazy ruchomej aceton-woda.

Wnioski

Przeprowadzone w powyższej pracy badania lipofilowości kwasu dehydrocholowego pozwoliły na wyodrębnienie następujących wniosków:

1. Chromatografia cienkowarstwowa z odwróconym układem faz i komercyjne programy komputerowe są użytecznym narzędziem w wyznaczaniu lipofilowości związków biologicznie aktywnych, do których należy kwas dehydrocholowy.



Rycyna 2. Porównanie eksperymentalnych i teoretycznych parametrów lipofilowości kwasu dehydrocholowego

- Otrzymany w różnych warunkach chromatograficznych parametr lipofilowości R_{MW} dla kwasu dehydrocholowego jest porównywalny z teoretycznymi współczynnikami podziału, obliczonymi dla tego związku za pomocą komercyjnych programów komputerowych.
- Techniki chemometryczne są pomocne w ocenie lipofilowości kwasu dehydrocholowego wyznaczonej różnymi metodami.

Otrzymano: 2009.08.01 · Zaakceptowano: 2009.08.20

Piśmiennictwo

- Jóźwiak K., Szumiło H., Soczewiński E.: Lipofilowość, metody wyznaczania i rola w działaniu biologicznym substancji chemicznych. *Wiad. Chem.* 2001. Vol. 55, nr 11–12, 1047–1073.
- Polak S., Wiśniowska B.: Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem – projektowanie i poszukiwanie cząstki aktywnej, ocena właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej. *Farm. Pol.* Marzec 2009. T. 65, nr 3, 214–223.
- Virtual Computational Chemistry Laboratory: <http://www.vcclab.org/lab/alogps> (dane z 8 lipca 2009).
- Danysz A., Buczek W.: *Kompedium farmakologii i farmakoterapii*. Wrocław.: Wyd. Urban&Partner. 2008.
- Zajac M., Pawelczyk E., Jelińska A.: *Chemia leków dla studentów farmacji i farmaceutów*. Wydanie II. Poznań.: Wyd. Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego. 2006.
- Leki Współczesnej Terapii. Vademecum (praca zbiorowa)*. Wydanie XVII. Warszawa.: Wyd. Split Trading Sp. z o. o. 2007.
- Pyka A., Dołowy M.: Lipophilicity of Selected Bile Acids as Determined by TLC. II. Investigations on RP18W Stationary Phase. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* 2005, Vol. 28, nr 2, 297–311.

Badania finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach z umowy KNW-2-023/09.