Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej w badaniach lipofilowościesomeprazolu magnezu

Justyna Musiel¹, Natalia Bolek¹, Rafał Sochacki¹, Klaudia Całus¹, Małgorzata Dołowy², Alina Pyka-Pająk²

¹ Koło Naukowe Zakładu Chemii Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej SUM w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

² Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej SUM w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Adres do korespondencji: Małgorzata Dołowy, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej SUM w Sosnowcu, ul. Jagiellońska 4, 41–200 Sosnowiec, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, e-mail: mdolowy@sum.edu.pl

Wstęp

W obecnych czasach racjonalne projektowanie leków jest dynamicznie rozwijającym się obszarem nauki, mieszczącym się w zakresie chemii medycznej. Obserwuje się, że jednym z ważniejszych parametrów wyznaczanych podczas procesu projektowania nowych (bio)molekuł jest ich lipofilowość, która warunkuje najważniejsze cechy fizykochemiczne danego związku oraz jego aktywność biologiczną [1, 2]. Podczas projektowania kandydatów na nowe leki, dąży się do uzyskania związków chemicznych o tzw. optymalnej lipofilowości, a co się z tym wiąże, mających zdolność do przenikania przez błony biologiczne oraz oddziaływania z określonym receptorem. Generalnie wraz ze wzrostem lipofilowości zwiększa się aktywność biologiczna leku. Z drugiej strony związki o zbyt dużej lipofilowości mogą ulegać absorpcji w błonie biologicznej, co jest zjawiskiem niekorzystnym. Liczne przykłady wskazują na to, że wstępne badania nad nowymi (bio)molekułami uwzględniające oszacowanie ich lipofilowości mogą przyspieszać i zmniejszyć koszty badań prowadzonych nad nowymi lekami [1].

Istnieje wiele metod określania lipofilowości związków chemicznych. Należą do nich m.in. [1, 2]:

- metody klasyczne, np. ekstrakcja w układzie n-oktanol/woda,
- metody pośrednie chromatograficzne w układzie faz odwróconych (RP-TLC i RP-HPLC), tj. chromatografia cienkowarstwowa i wysokosprawna chromatografia cieczowa,
- metody teoretyczne, tj. obliczeniowe.

Application of thin-layer chromatography in lipophilicity studies ofesomeprazole magnesium

The aim of this work was to use thin-layer chromatography in lipophilicity studies of magnesium esomeprazole as a member of a group of drugs reducing hydrochloric acid secretion in the stomach, i.e. proton pump inhibitors (PPIs).

Chromatographic parameter lipophilicity (R_{MW}) of examined compound was determined in reversed phase system i.e. RP-TLC and RP-HPTLC by means of different chromatographic plates such as RP-18F₂₅₄, RP-2F₂₅₄ and RP-18WF₂₅₄ as well as the following mixtures of solvents: methanol-water, 1,4-dioxane-water and acetonitrile-water as mobile phases. The results of these studies confirm the utility of economical and easy in use thin-layer chromatography to estimate the experimental lipophilicity parameter i.e. R_{MW} of esomeprazole magnesium. The chromatographic lipophilicity parameter (R_{MW}) presented in this paper may be used in the future to develop new forms of this drug with specific pharmacodynamic and pharmacokinetic parameters.

Keywords: esomeprazole magnesium, proton pump inhibitors, lipophilicity, TLC.

© Farm Pol, 2019, 75(6): 291–295

Metody obliczeniowe zostały opracowane w celu przewidywania teoretycznej wartości współczynnika podziału (P) lub logP (tj. logarytmu współczynnika podziału) związków organicznych na podstawie ich budowy chemicznej. Są one przydatne głównie podczas wstępnego etapu badania lipofilowości, w szczególności nowo zsyntezowanych cząsteczek i do dziś z uwagi na ich różną siłę predykcji nie są w stanie całkowicie zastąpić metod eksperymentalnych. Najczęściej używa się

je do szacowania lipofilowości cząsteczek o prostej budowie i małych rozmiarach. Zaobserwowano, że metody teoretyczne okazały się mniej wiarygodnymi w wyznaczaniu lipofilowości przede wszystkim związków złożonych, np. kompleksowych, których obliczone wartości logP znacznie odbiegają od rzeczywistych [1]. Aktualna baza eksperymentalnie otrzymanych wartości logP obejmuje tysiące substancji chemicznych, co stanowi nadal tylko niewielki odsetek wszystkich związków chemicznych [1]. W związku z tym, metody obliczeniowe pomagają przewidzieć wartość logP głównie tych związków, których lipofilowości nie przebadano jeszcze eksperymentalnie. Obecnie opracowano wiele metod obliczeniowych, w których odpowiednie algorytmy pozwalają przewidzieć teoretyczną wartość logP. Metody te zostały podzielone na trzy główne grupy, tj. metody oparte na fragmentach, atomach lub strukturze całych cząsteczek [1]. Spośród wielu dostępnych programów komputerowych, które stosowane są do predykcji różnych właściwości fizykochemicznych, w tym lipofilowości, można wymienić takie jak program PASS, ACDLabs, MMPPro czy ogólnie dostępne w internecie wirtualne laboratorium opracowane przez doktora Igora Tetko (<http://www.vcclab.org/lab/alogps>) [3, 4]. To narzędzie, które pozwala na określenie różnych parametrów fizykochemicznych, w tym lipofilowości wyrażonej jako logP związków na podstawie struktury danej molekuly, którą można również narysować posługując się dostępnym edytorem [4].

Celem niniejszej pracy było zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej w badaniach lipofilowości esomeprazolu magnezu (**rycina 1**). Esomeprazol to przedstawiciel jednej z najskuteczniejszych grup leków zmniejszających wydzielanie kwasu solnego w żołądku, tj. inhibitorów pompy protonowej (IPP) [5–7]. Z uwagi na dużą skuteczność oraz stosunkowo małą liczbę działań niepożądanych są

one obecnie lekami z wyboru stosowanymi w różnych schorzeniach, w tym m.in. takich jak wrzód żołądka lub odpowiednio dwunastnicy, refluks przełyku i zespół Zollingera–Ellisona [5–7]. Esomeprazol to pochodna benzimidazolu będąca S-izomerem omeprazolu. Stosowany jest w postaci hydratu soli magnezu (esomeprazolu magnezu) zarówno doustnie, jak i dożylnie w postaci m.in. tabletek i kapsulek dojelitowych, a także proszku do sporządzania roztworu do wstrzykiwań oraz wlewów [5–7]. Ponadto, dostępne są również produkty lecznicze złożone, zawierające esomeprazol i na przykład naproksen w postaci tabletek o modyfikowanym uwalnianiu [5–7]. Właściwości lipofilowe omawianego esomeprazolu magnezu w postaci hydratu są słabo opisane w dostępnej literaturze. Bhatt i współpracownicy zaprezentowali w swojej pracy porównanie chromatograficznych parametrów lipofilowości uzyskanych techniką chromatografii cienkowarstwowej (TLC) dla wybranych tylko inhibitorów pompy protonowej, tj. omeprazolu, pantoprazolu, rabeprazolu, lanzoprazolu, ilaprazolu oraz tenatoprazolu, czyli bez uwzględnienia esomeprazolu magnezu [8]. Podobnie, niedostateczne są również informacje na temat wartości logP dla tego związku wyznaczonej metodami teoretycznymi, co może mieć związek ze złożoną jego strukturą jako hydratu soli magnezu. Informacje te stały się przesłanką do podjęcia próby wyznaczenia w niniejszej pracy eksperymentalnego, tj. chromatograficznego, parametru lipofilowości esomeprazolu magnezu z użyciem prostej, szybkiej i ekonomicznej w porównaniu z innymi metodami chromatografii cienkowarstwowej w układzie odwróconych faz, tj. RP-TLC/HPTLC w różnych warunkach chromatograficznych.

Materiały i metody

Odczynniki i materiały stosowane w badaniach chromatograficznych parametru lipofilowości esomeprazolu magnezu techniką RP-TLC i RP-HPTLC

W badaniach zastosowano roztwór etanolowy wzorca hydratu esomeprazolu magnezu ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA) o stężeniu 2 mg/ml i następującym wzorze sumarycznym

Składnikami stosowanych w eksperymencie binarnych faz ruchomych były: woda, metanol, acetonitryl oraz 1,4-dioksan do HPLC produkcji POCh (Gliwice, Polska). W pracy wykorzystano płytki aluminiowe i szklane (5 cm × 10 cm) pokryte żelalem krzemionkowym RP-18F₂₅₄ do RP-TLC oraz RP-2F₂₅₄ i RP-18WF₂₅₄ do RP-HPTLC (E.

Rycina 1. Struktura chemiczna hydratu esomeprazolu magnezu.
Figure 1. Chemical structure of esomeprazole magnesium hydrate.

Merck, Niemcy). Płytki rozwijano do wysokości 7 cm w szklanej komorze chromatograficznej 20 cm×10 cm (Camag, Szwajcaria).

Wyznaczanie chromatograficznego parametru lipofilowości esomeprazolu magnezu (R_{MW})

W celu wyznaczenia chromatograficznego parametru lipofilowości (R_{MW}) omawianego związku, analizie poddawano każdorazowo 3 mikrolitry jego etanolowego roztworu badanego na trzech typach stosowanych płytek chromatograficznych przy użyciu faz ruchomych, takich jak metanol-woda, 1,4-dioksan-woda i acetonitryl-woda w różnym stosunku objętościowym. Zawartość modyfikatora organicznego w fazie ruchomej wynosiła od 40% do 80% i zmieniała się co 5% objętościowych w każdej z zastosowanych faz ruchomych. Po rozwinięciu płytek chromatograficznych i ich wysuszeniu w temperaturze pokojowej, dokonywano odczytu położenia plamek badanego związku na uzyskanym chromatogramie przy długości fali wynoszącej 254 nm i obliczano współczynnik opóźnienia (R_f). Następnie, zgodnie z procedurą zaprezentowaną we wcześniejszych pracach, wyznaczano na podstawie wartości R_f kolejny chromatograficzny parametr, tj. R_M esomeprazolu przy zastosowaniu poszczególnych układów chromatograficznych [1, 9–13]. Ekstrapolacja otrzymanych w ten sposób wyników R_M esomeprazolu magnezu do zerowego stężenia modyfikatora organicznego w danej fazie ruchomej (ϕ), wg równania Soczewińskiego-Wachtmeistera, pozwoliła uzyskać wartość chromatograficznego parametru lipofilowości R_{MW} dla badanego esomeprazolu przy użyciu testowanych układów chromatograficznych, złożonych z płytek RP-18F₂₅₄, RP-2F₂₅₄ i RP-18WF₂₅₄ oraz mieszanin: metanol-woda, 1,4-dioksan-woda i acetonitryl-woda jako faz ruchomych.

Wyniki

Ekstrapolacja uzyskanych w różnych układach chromatograficznych wartości R_M badanego esomeprazolu magnezu do zerowego stężenia modyfikatora organicznego (ϕ), według równania Soczewińskiego-Wachtmeistera w postaci

$$R_M = R_{MW} - S \cdot \phi$$

pozwoliła na otrzymanie dziewięciu wartości chromatograficznego parametru lipofilowości esomeprazolu magnezu, tj. R_{MW} . Wszystkie równania Soczewińskiego-Wachtmeistera wyznaczone dla badanego, w zastosowanych warunkach chromatograficznych, esomeprazolu magnezu

charakteryzowały się wysokim współczynnikiem korelacji liniowej (tj. $r > 0,9$) mieszczącym się w zakresie: 0,9763–0,9872 dla fazy ruchomej metanol-woda i zastosowanych płytek chromatograficznych oraz odpowiednio 0,9684–0,9978 w przypadku mieszaniny 1,4-dioksan-woda jako fazy ruchomej oraz od 0,9631 do 0,9975 dla fazy ruchomej acetonitryl-woda i zastosowanych płytek chromatograficznych.

Ze względu na złożoność budowy cząsteczki badanego związku, występującego w postaci hydratu soli magnezu, dane dotyczące teoretycznego, tj. obliczonego przy użyciu różnych algorytmów obliczeniowych współczynnika podziału (P) lub jego logarytmu tzn. logP dla esomeprazolu w postaci uwodnionej soli magnezu, są znikome. Zaczerpnięta z internetowej bazy o nazwie DrugBank wartość logP wynosi 1,66 (AlogPs) oraz 2,43 (ChemAxon) [7]. Z kolei wartość eksperymentalna jest słabo opisana, jeżeli chodzi o metodę jej wyznaczenia i źródło cytowania dla tego związku i wynosi 0,60 [7].

W związku z tym, w celu oceny przydatności zaprezentowanych w niniejszej pracy teoretycznych i eksperymentalnych parametrów do oceny lipofilowości badanego związku wszystkie uzyskane deskryptory lipofilowości porównano ze sobą wzajemnie. Oprócz tego dokonano także oceny wpływu fazy ruchomej i stacjonarnej na wartość chromatograficznego parametru lipofilowości (R_{MW}) analizowanego esomeprazolu magnezu.

Omówienie wyników

Zaprezentowane na **rycynie 2** wszystkie uzyskane, za pomocą różnych faz stacjonarnych w postaci płytek chromatograficznych do RP-TLC i odpowiednio RP-HPTLC, tj. RP-18F₂₅₄, RP-2F₂₅₄ i RP-18WF₂₅₄ oraz trzech faz ruchomych: metanol-woda (m), 1,4-dioksan-woda (d)

Rycina 2. Porównanie parametrów lipofilowości esomeprazolu magnezu.
Figure 2. Comparison of esomeprazole magnesium lipophilicity parameters.

i acetonitryl-woda (a), chromatograficzne parametry lipofilowości, tj. R_{MW} wskazują na to, że uzyskany eksperymentalnie, tj. za pomocą chromatografii

Rycina 3. Dendrogram podobieństwa wartości chromatograficznego parametru lipofilowości esomeprazolu magnezu (R_{MW}) uzyskanych za pomocą różnych faz ruchomych: metanol-woda (m), 1,4-dioksan-woda (d) oraz acetonitryl-woda (a).

Figure 3. Dendrogram of similarity of chromatographic values lipophilicity parameter of esomeprazole magnesium (R_{MW}) obtained using different mobile phases: methanol-water (m), 1,4-dioxane-water (d) and acetonitrile-water (a).

Rycina 4. Dendrogram podobieństwa wartości chromatograficznego parametru lipofilowości (R_{MW}) esomeprazolu magnezu otrzymanych przy użyciu różnych płytek chromatograficznych: RP-18F₂₅₄ (RP18), RP-18WF₂₅₄ (RP18W) i RP-2F₂₅₄ (RP2).

Figure 4. Dendrogram of similarity of chromatographic values lipophilicity parameter of magnesium esomeprazole (R_{MW}) obtained using different chromatographic plates: RP-18F₂₅₄ (RP18), RP-18WF₂₅₄ (RP18W) i RP-2F₂₅₄ (RP2).

ciенокwarstwowej, parametr lipofilowości esomeprazolu magnezu wynosi od 1,29 (dla płytek RP-2F₂₅₄ i fazy ruchomej acetonitryl-woda) do 2,58 (dla płytek RP-18F₂₅₄ i fazy ruchomej 1,4-dioksan-woda). Natomiast teoretyczna wartość logP wynosząca 1,66 (AlogPs) jest najbardziej zbliżona do chromatograficznego parametru lipofilowości, tj. R_{MW} wyznaczonego przy użyciu mieszaniny acetonitrylu i wody jako fazy ruchomej oraz płytek RP-18F₂₅₄ i RP-18WF₂₅₄ jako fazy stacjonarnej, jak również do wartości RP2(m), czyli uzyskanej za pomocą fazy ruchomej metanol-woda i płytek RP-2F₂₅₄. Z kolei teoretyczna wartość współczynnika podziału oznaczona jako logP_{ChemAxon} jest zbliżona do wartości R_{MW} określonych za pomocą płytek RP-18F₂₅₄ i fazy ruchomej metanol-woda (RP18(m)) oraz 1,4-dioksan-woda (RP18(d)) i odpowiednio płytek RP-2F₂₅₄ analizowanych przy użyciu mieszaniny 1,4-dioksan-woda, tj. RP2(d). Niestety brak jest podobieństwa pomiędzy wartością logP_{exp} zaczerpniętą z bazy DrugBank wynoszącą 0,60 i uzyskanymi metodą chromatograficzną oraz obliczeniową wartościami współczynnika podziału, tj. logP.

Porównanie uzyskanych dla esomeprazolu magnezu wartości chromatograficznego parametru lipofilowości R_{MW} z wynikami otrzymanymi przez autorów cytowanej pracy, tj. Bhatta i współpracowników dla grupy innych popularnych inhibitorów pompy protonowej, tzn. dla pantoprazolu, rabeprazolu, omeprazolu i lanzoprazolu badanych za pomocą impregnowanych 5% roztworem oleju silikonowego płytek chromatograficznych pokrytych żelazem krzemionkowym GF₂₅₄ i faz ruchomych złożonych z mieszaniny: metanol-woda, etanol-woda oraz acetonitryl-woda wskazuje na to, że są one porównywalne z nimi, jeśli chodzi o przedział wartości R_{MW} [8]. Można zauważyć także, że wartości R_{MW} uzyskane dla tych czterech spośród sześciu badanych przez Bhatta i współpracowników leków z grupy IPP wykazują podobnie pewne różnice w wartościach tego parametru, w zależności od zastosowanych warunków chromatograficznych, tj. składu fazy ruchomej. Obserwuje się, że za pomocą fazy ruchomej acetonitryl-woda uzyskuje się nieco niższe wartości R_{MW} dla badanych w ww. publikacji przedstawicieli IPP, podobnie jak dla analizowanego w niniejszej pracy esomeprazolu magnezu. Natomiast wyższe wartości R_{MW} uzyskuje się dla czterech badanych w pracy Bhatta i współautorów IPP przy użyciu metanolu i wody oraz odpowiednio etanolu i wody jako faz ruchomych, tak jak w przypadku esomeprazolu magnezu analizowanego w układzie metanol-woda. W celu porównania wartości R_{MW} esomeprazolu magnezu wyznaczonych za pomocą trzech różnych faz ruchomych oraz trzech różnych płytek chromatograficznych zastosowano analizę

skupień (tj. analizę klastrową), którą wykonano za pomocą programu Statistica 13.1. Zaprezentowane na **rycinie 3** oraz **rycinie 4** dendrogramy wskazują na największe podobieństwo wartości R_{MW} esomeprazolu magnezu otrzymanych w układzie metanol-woda ($R_{MW(m)}$) i 1,4-dioksan-woda ($R_{MW(d)}$), które tworzą wyraźne skupienie o najmniejszej odległości euklidesowej na dendrogramie (**rycina 3**). Z kolei porównanie rezultatów R_{MW} badanego związku w odniesieniu do rodzaju zastosowanych płytek chromatograficznych na dendrogramie zaprezentowanym na **rycinie 4** wskazuje na największe podobieństwo wartości tego parametru uzyskanego za pomocą płytek pokrytych żelalem krzemionkowym RP-18F₂₅₄ ($R_{MW}(RP18)$) i RP-2F₂₅₄ ($R_{MW}(RP2)$). Dane te wskazują na możliwość stosowania zamiennie w badaniach lipofilowości esomeprazolu magnezu fazy ruchomej metanol-woda i 1,4-dioksan-woda oraz odpowiednio płytek RP-18F₂₅₄ i RP-2F₂₅₄.

Biorąc pod uwagę znaczenie badanego parametru lipofilowości, m.in. w projektowaniu nowych form leku i sposobu jego podawania, można sugerować, że uzyskane na drodze eksperymentalnej wartości chromatograficznego parametru lipofilowości esomeprazolu magnezu mogą być wykorzystane w przyszłości w opracowywaniu nowych form tego leku o określonych parametrach farmakodynamicznych oraz farmakokinetycznych.

Wnioski

Rezultaty niniejszych badań potwierdzają przydatność ekonomiczną i prostą w użyciu chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz do wyznaczania eksperymentalnego parametru lipofilowości (R_{MW}) esomeprazolu magnezu jako przedstawiciela grupy inhibitorów pompy protonowej (IPP). W oparciu o uzyskane wartości R_{MW} zaobserwowano niewielki wpływ warunków chromatograficznych, tj. składu fazy ruchomej oraz płytek chromatograficznych na wartości tego eksperymentalnego parametru lipofilowości. Zastosowana w pracy analiza skupień pozwoliła na

określenie podobieństwa pomiędzy uzyskanymi w różnych warunkach wartościami R_{MW} esomeprazolu magnezu. Wyznaczony w niniejszej pracy chromatograficzny parametr lipofilowości (R_{MW}) może być wykorzystany w przyszłości w opracowywaniu nowych form tego leku o określonych parametrach farmakodynamicznych oraz farmakokinetycznych.

Badania finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach w ramach umowy statutowej KNW-1-057/K/8/O.

Otrzymano: 2019.06.25 · Zaakceptowano: 2019.06.28

Piśmiennictwo

1. Józwiak K., Szumilo H., Soczewiński E.: Lipophilicity, methods of determination and its role in biological effect of chemical substances. *Wiad. Chem.* 2001, 55 (9-10): 1047-1074.
2. Rutkowska E., Pająk K., Józwiak K.: Lipophilicity-methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Pol. Pharm.-Drug Res.* 2013, 70 (1): 3-18.
3. Polak S., Wiśniowska B.: Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem - projektowanie i poszukiwanie cząstki aktywnej, ocena właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej. *Farm. Pol.* 2009, 65 (3): 214-223.
4. Tetko I.V., Tanchuk V.J.: VCC - Lab, 2002, Interactive analysis logP prediction; <http://www.vclab.org/lab/alogs> (dostęp: 20.06.2019).
5. Janiec W. (red.): *Kompendium Farmakologii*, Warszawa, PZWL, 2016.
6. Kazberuk M., Brzóska Sz., Hryszko T., Naumnik B.: Nadużywanie inhibitorów pompy protonowej i jego konsekwencje. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2016, 70: 1112-1116.
7. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00736> (dostęp: 20.06.2019).
8. Bhatt N. M., Chavada V. D., Sanyal M., Shrivastav P. S.: Influence of organic modifier and separation modes for lipophilicity assessment of drugs using thin layer chromatography indices. *J Chromatogr. A.* 2018, 1571: 223-230.
9. Dołowy M.: Wyznaczanie lipofilowości acidum dehydrocholicum różnymi metodami. *Farm. Pol.* 2009, 65 (10): 689-693.
10. Dołowy M., Pyka A.: Lipophilicity assessment of spironolactone by means of reversed phase liquid chromatography and by newly developed calculation procedures. *Acta Pol. Pharm.-Drug Res.* 2015, 72 (2): 235-244.
11. Dołowy M., Pyka A.: Evaluation of the lipophilic properties of beta-methasone and its related compounds. *Acta Pol. Pharm.-Drug Res.* 2015, 72 (4): 671-681.
12. Dołowy M., Pyka-Pająk A., Cholewa J., Swolana D., Chyłka M.: Wyznaczenie lipofilowości propionianu klobetazolu oraz klobetazolu przy użyciu TLC oraz metod obliczeniowych. *Farm. Pol.* 2015, 71 (10): 603-608.
13. Dołowy M., Syc K., Raczek K., Sośnierz K., Pyka-Pająk A.: Zastosowanie TLC w układzie faz odwróconych oraz metod obliczeniowych do wyznaczenia lipofilowości eplerenonu. *Farm. Pol.* 2018, 74 (2): 123-128.