Zastosowanie TLC w układzie faz odwróconych oraz metod obliczeniowych do wyznaczenia lipofilowości eplerenonu

Małgorzata Dołowy¹, Katarzyna Syc², Karolina Raczek², Karolina Sośnierz², Alina Pyka-Pająk¹

¹ Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

² Koło Naukowe działające przy Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

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

Wstęp

Spośród wielu parametrów fizykochemicznych jednym z ważniejszych determinujących aktywność biologiczną związków chemicznych jest lipofilowość. Parametr ten często jest wykorzystywany w projektowaniu nowych leków do przewidywania nie tylko ich potencjalnego działania biologicznego, mechanizmu wiązania z receptorami, ale również do określenia ich biodostępności i toksyczności [1]. Miarą lipofilowości danej cząsteczki związku chemicznego jest wartość P lub $\log P$, czyli współczynnik podziału lub odpowiednio jego logarytm, który wyrażany jest jako stosunek stężenia danej substancji odpowiednio w fazie organicznej (C_o) i w fazie wodnej (C_w) w stanie równowagi:

$$P = \frac{C_o}{C_w} \quad (1)$$

Najczęściej stosowanym parametrem lipofilowości jest współczynnik podziału wyznaczony metodą ekstrakcji ciecz-ciecz (*shake-flask method*) w układzie n-oktanol/woda, który jest najbliższy układowi faz polarnych i niepolarnych występujących w ustroju biologicznym. Ze względu na dużą pracochłonność i małą precyzję klasycznej ekstrakcji jest ona zastępowana przez chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych, tj. RP-TLC/RP-HPTLC lub odpowiednio RP-HPLC. Chromatograficzny parametr lipofilowości wyznaczony techniką chromatografii cienkowarstwowej lub odpowiednio wysokosprawnej chromatografii cieczowej

posłużył do oceny lipofilowości, a następnie aktywności biologicznej wielu nowo zsintezowanych związków organicznych [2-6]. W praktyce, w celu dokonania krytycznej oceny uzyskanych wyników, często dokonuje się porównania danych doświadczalnych otrzymanych różnymi technikami, w tym chromatograficznymi, z wartościami współczynnika podziału ($\log P$) wyznaczonymi teoretycznie, tj. obliczonymi przy użyciu różnych programów komputerowych, czyli tzw. metody *in silico*. Eksperymenty *in silico* wykonywane przy użyciu różnych algorytmów obliczeniowych coraz częściej stosowane są w badaniach nad nowymi lekami [7, 8]. Pozwalają one już w początkowych etapach projektowania nowych cząsteczek jako potencjalnych kandydatów nowych leków wyznaczyć różne deskryptory fizykochemiczne, w tym lipofilowość, które warunkują nie tylko określoną aktywność biologiczną tych nowych związków, ale również ich właściwości toksyczne i potencjalne działania niepożądane.

W niniejszej pracy, w celu określenia lipofilowości eplerenonu, zastosowano technikę chromatografii cienkowarstwowej w układzie faz odwróconych (RP-TLC i RP-HPTLC) oraz metody obliczeniowe, tj. ogólnie dostępny w internecie zestaw oprogramowania do przewidywania właściwości fizykochemicznych, w tym lipofilowości związków chemicznych na podstawie ich struktury chemicznej, autorstwa doktora Igora Tetko [9].

Eplerenon to steroid, pochodna spironolaktonu o działaniu diuretycznym, który jest

przedstawicielem nowej klasy leków zalecanych pacjentom po zawale serca z cechami niewydolności lewej komory [10–14]. Ten syntetyczny steroid jest antagonistą receptora mineralokortykoidowego. W przeciwieństwie do spironolaktanu wykazuje większą specyficzność do powyższego receptora. Dlatego obserwuje się znacznie mniej przypadków działań niepożądanych podczas jego stosowania, takich jak: ginekomastia u mężczyzn czy obfite krwawienie z dróg rodnych u kobiet, w porównaniu z innymi lekami [10–14].

Ze względu na brak danych literaturowych dotyczących doświadczalnej wartości parametru lipofilowości eplerenonu, w niniejszej pracy zastosowano technikę chromatografii cienkowarstwowej RP-TLC/RP-HPTLC i różne układy chromatograficzne do wyznaczenia eksperymentalnej wartości parametru lipofilowości tego związku. Uzyskane dane porównano z teoretycznymi wartościami logP uzyskanymi za pomocą różnych algorytmów obliczeniowych.

Materiały i metody

Przedmiotem badań był metanolowy roztwór eplerenonu (Sigma-Aldrich, ≥98%). Metanol, dioksan i aceton do HPLC (POCH, Gliwice, Polska) oraz wodę zastosowano jako składniki faz ruchomych. Wykorzystano różne płytki chromatograficzne, tj. do RP-TLC pokryte żelem krzemionkowym RP-18F₂₅₄ oraz odpowiednio do RP-HPTLC pokryte żelem krzemionkowym RP-18WF₂₅₄ i RP-2F₂₅₄ (E. Merck, Niemcy), o wymiarach 5 cm×10 cm. Komora chromatograficzna 20 cm×10 cm (Camag, Szwajcaria) służyła do rozwijania stosowanych w badaniach płytek chromatograficznych.

Natomiast densytometr TLC 3 (Camag, Szwajcaria) z oprogramowaniem winCATS 1.4.2 oraz lampa deuterowa jako źródło promieniowania wykorzystano w pomiarach densytometrycznych wartości współczynnika opóźnienia (R_F) analizowanego związku.

Wyznaczenie chromatograficznego parametru lipofilowości eplerenonu techniką RP-TLC i RP-HPTLC

Analizę lipofilowości badanego eplerenonu przeprowadzono, stosując jego metanolowy roztwór o stężeniu 1 mg/ml. Roztwór ten nanoszono każdorazowo na płytki chromatograficzne w ilości 3 mikrolitrów. Płytki rozwijano przy użyciu następujących faz ruchomych: metanol-woda, dioksan-woda i aceton-woda. Objętość stosowanej fazy ruchomej wynosiła 50 ml. Zawartość modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, czyli odpowiednio metanolu, dioksanu i acetonu, zmieniała się co 5% objętościowych w zakresie od 50 do 100% (v/v). Po wysuszeniu przez 24 godz., płytki poddawano skanowaniu densytometrycznemu, przy optymalnej długości fali $\lambda=246$ nm. Na **rycinie 1** przedstawiono przykładowy densytogram eplerenonu, uzyskany na płycie pokrytej żelem krzemionkowym RP-18F₂₅₄, która była rozwijana przy użyciu fazy ruchomej metanol-woda.

Uzyskane na drodze skanowania densytometrycznego chromatogramy eplerenonu (otrzymanych techniką RP-TLC i RP-HPTLC) wartości współczynnika opóźnienia we wszystkich zastosowanych układach chromatograficznych posłużyły do obliczenia wartości R_M dla eplerenonu, zgodnie z poniższym wzorem:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right) \quad (2)$$

Ekstrapolacja liniowa otrzymanych wartości R_M do zerowego stężenia modyfikatora organicznego w fazie ruchomej będąca konsekwencją zastosowania w kolejnym etapie równania Soczewińskiego-Wachtmeistera (3) pozwoliła na uzyskanie wartości parametru lipofilowości wyrażonej jako R_{MW} , zgodnie z poniższym równaniem regresji liniowej:

$$R_M = R_{MW} - S \cdot \varphi \quad (3)$$

gdzie:

φ – ułamek objętościowy organicznego składnika, tj. metanolu, dioksanu lub odpowiednio acetonu w eluencie;

S – nachylenie krzywej regresji.

Rycina 1. Densytogram eplerenonu otrzymany na płytkach chromatograficznych RP-18F₂₅₄ przy użyciu fazy ruchomej metanol-woda

Wyznaczenie teoretycznych wartości współczynnika podziału (logP) eplerenonu

Źródłem teoretycznych wartości współczynnika podziału w postaci logP dla analizowanego eplerenonu, które zostały wyznaczone przy użyciu różnych algorytmów obliczeniowych, takich jak: AlogPs, AClogP, milogP, AlogP, MlogP, xlogP3, xlogP2 oraz średniej wartości logP ($\log P_{\text{śred}}$), była internetowa baza danych Virtual Computational Chemistry Laboratory [9].

Wyniki

W tabeli 1 zestawiono teoretyczne wartości współczynnika podziału w postaci jego logarytmu, czyli logP, oraz wartość średnią ($\log P_{\text{śred}}$). Natomiast w tabeli 2 przedstawiono parametry równań liniowej ekstrapolacji wartości R_M do zerowego stężenia modyfikatora organicznego w eluencie, czyli metanolu, dioksanu i acetonu, uzyskane przy użyciu różnych płytek chromatograficznych, tj. RP-18WF₂₅₄, RP-18F₂₅₄ i RP-2F₂₅₄, w tym współczynnik kierunkowy uzyskanych liniowych zależności (S) oraz wyraz wolny, stanowiący wartość chromatograficznego parametru lipofilowości (R_{MW}) badanego eplerenonu. W tabeli 2 zamieszczono również współczynniki korelacji liniowej (r) dla każdego z zaprezentowanych równań, uzyskane w oparciu o liczbę pomiarów (n) oraz błąd standardowy dla wszystkich estymacji (s) i wartość F.

Porównanie eksperymentalnych wartości parametru lipofilowości (R_{MW}) wyznaczonych dla eplerenonu techniką RP-TLC oraz RP-HPTLC w różnych układach chromatograficznych z teoretycznymi

Tabela 1. Współczynnik podziału (logP) uzyskany za pomocą różnych algorytmów obliczeniowych (Virtual Computational Chemistry Laboratory, stan z dnia 10 stycznia 2018r.) [9]

Współczynnik podziału	Wartość liczbową współczynnika podziału
$\log P_{\text{exp}}$	–
AlogPs	1,67
AlogP	2,02
AClogP	1,85
milogP	1,74
MlogP	3,03
xlogP2	1,28
xlogP3	1,39
$\log P_{\text{śred}}$	1,85(±0,58)

wartościami współczynnika podziału w postaci logP zaprezentowano na rycinie 2.

Rycina 3 przedstawia dendrogram podobieństwa wartości chromatograficznych parametrów lipofilowości (R_{MW}) uzyskanych w trzech układach chromatograficznych: metanol-woda (m), aceton-woda (a) oraz dioksan-woda (d) z użyciem płytek RP-18WF₂₅₄, RP-18F₂₅₄ i RP-2F₂₅₄.

Omówienie wyników

Głównym celem pracy było wyznaczenie eksperymentalnej wartości parametru lipofilowości eplerenonu przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej w układzie faz odwróconych, tj. RP-TLC i odpowiednio RP-HPTLC w różnych warunkach chromatograficznych, a następnie porównanie uzyskanych danych z teoretycznymi wartościami współczynnika podziału, tj. logP, uzyskanymi za pomocą metod obliczeniowych. Badany eplerenon,

Tabela 2. Wartości chromatograficznego parametru lipofilowości eplerenonu (R_{MW}) wyznaczone techniką TLC w układzie faz odwróconych (RP-TLC i RP-HPTLC)

Parametry liniowej korelacji $R_M = R_{MW} - S \times (p)^*$							
Badany związek	Płytki chromatograficzne	$R_{MW}(\pm SD)$	$S(\pm SD)$	r	s	F	n
Eplerenon	metanol-woda (v/v)						
	RP-18WF ₂₅₄	0,63(±0,04)	1,14(±0,05)	0,999	0,011	533,3	6
	RP-18F ₂₅₄	3,11(±0,58)	4,11(±0,68)	0,974	0,151	37,0	7
	RP-2F ₂₅₄	1,55(±0,16)	2,58(±0,19)	0,994	0,043	180,9	6
	aceton-woda (v/v)						
	RP-18WF ₂₅₄	2,62(±0,46)	4,35(±0,60)	0,964	0,252	52,2	6
	RP-18F ₂₅₄	1,92(±0,19)	2,92(±0,25)	0,986	0,104	138,8	6
	RP-2F ₂₅₄	2,35(±0,59)	3,94(±0,76)	0,933	0,319	26,7	6
	dioksan-woda (v/v)						
	RP-18WF ₂₅₄	1,37(±0,16)	2,52(±0,21)	0,993	0,046	148,4	6
	RP-18F ₂₅₄	1,73(±0,07)	2,94(±0,08)	0,999	0,026	1271,1	7
	RP-2F ₂₅₄	2,20(±0,31)	3,83(±0,40)	0,989	0,117	93,5	6

gdzie: * – $p < 0,001$, SD – odchylenie standardowe

Rycina 2. Dendrogram podobieństwa wartości R_{MW} uzyskanych w trzech układach chromatograficznych: metanol-woda (m), dioksan-woda (d) oraz aceton-woda (a)

podobnie jak spironolakton, to syntetyczny steroid z grupy antagonistów aldosteronu stosowany w leczeniu nadciśnienia tętniczego i niewydolności serca. W poprzedniej pracy wykazano przydatność techniki TLC, jak również HPLC do wyznaczenia lipofilowości spironolaktonu [15]. Kontynuując powyższe badania, w niniejszej pracy postanowiono dokonać oceny przydatności chromatografii cienkowarstwowej do określenia lipofilowości innego (nowego) steroidu z grupy antagonistów receptorów aldosteronowych, mianowicie eplerenonu.

W literaturze brak jest eksperymentalnej wartości współczynnika podziału eplerenonu wyznaczonego metodą ekstrakcji w układzie n-oktanol/woda lub za pomocą innych technik analitycznych, w tym chromatografii cienkowarstwowej, który mógłby być miarą jego lipofilowości.

Analiza teoretycznych wartości współczynnika podziału (tabela 1) dostępnych w postaci logP, które zostały oszacowane za pomocą różnych algorytmów obliczeniowych (AlogPs, AlogP, AClogP, milogP, MlogP, xlogP2, xlogP3), wskazuje na różną siłę predykcji programów komputerowych, jeśli chodzi o przewidywanie wartości logP jako istotnego parametru lipofilowości. Uzyskana za pomocą programów obliczeniowych wartość liczbową współczynnika podziału dla eplerenonu mieści się w zakresie 1,28–3,03, co daje wartość średnią wynoszącą dla eplerenonu $1,85 \pm 0,58$. Najmniejszą wartość obserwuje się w przypadku xlogP2 (1,28), a największą dla MlogP (3,03).

Najbardziej zbliżone do siebie wyniki logP uzyskuje się dla eplerenonu w przypadku AlogPs (1,67) oraz milogP (1,74), a także dla xlogP2 (1,28) i odpowiednio xlogP3 (1,39).

Wartości chromatograficznego parametru lipofilowości (R_{MW}) wyznaczone techniką RP-TLC i RP-HPTLC w różnych warunkach chromatograficznych, zestawione w tabeli 2, wskazują również na pewne zróżnicowanie w wartościach tego parametru lipofilowości. Najniższą wartość, równą 0,63, obserwuje się dla płytek pokrytych żel krzemionkowym RP-18WF₂₅₄ i fazy ruchomej metanol-woda. Z kolei najwyższą wartość R_{MW} , tj. 3,11, uzyskano

Rycina 3. Porównanie teoretycznych oraz wyznaczonych eksperymentalnie, tj. techniką RP-TLC i RP-HPTLC, parametrów lipofilowości eplerenonu

stosując tę samą fazę ruchomą i płytki chromatograficzne RP-18F₂₅₄. Średnia wartość chromatograficznego parametru lipofilowości obliczona na podstawie wszystkich uzyskanych wyników R_{MW} wynosi $1,94 \pm 0,73$, co oznacza, że jest ona zbliżona do średniej wartości współczynnika podziału ($\log P$) dla badanego eplerenonu otrzymanego metodami obliczeniowymi.

Dalsza analiza wyników chromatograficznego parametru lipofilowości otrzymanych przy użyciu wszystkich trzech faz ruchomych oraz płytek chromatograficznych (tabela 2) wskazuje na duże podobieństwo pomiędzy wartościami R_{MW} otrzymanymi w następujących warunkach chromatograficznych:

- na płytkach RP-2F₂₅₄ dla fazy ruchomej dioksan-woda (RP2(d)) oraz przy użyciu mieszaniny aceton-woda (RP2(a));
- na płytkach RP-2F₂₅₄ dla fazy ruchomej metanol-woda (RP2(m)) i RP-18F₂₅₄ analizowanych za pomocą fazy ruchomej dioksan-woda (RP18(d));
- na płytkach RP-18F₂₅₄ badanych za pomocą fazy ruchomej dioksan-woda (RP18(d)) i odpowiednio aceton-woda (RP18(a)).
- na płytkach RP-18WF₂₅₄ analizowanych przy użyciu fazy ruchomej dioksan-woda (RP18W(d)) oraz RP-2F₂₅₄ rozwijanych za pomocą mieszaniny metanol-woda (RP2(m)).

Dendrogram podobieństwa wartości R_{MW} na **rycinie 2** wskazuje na to, że spośród trzech przebadanych faz ruchomych największe podobieństwo wykazują do siebie wartości chromatograficznego parametru lipofilowości otrzymane przy użyciu fazy ruchomej dioksan-woda RMW(d) i aceton-woda, tj. RMW(a), co tłumaczy zbliżona polarność dioksanu i acetonu, stanowiących składniki tych dwóch faz ruchomych.

Zestawienie wszystkich, tj. teoretycznych i chromatograficznych, parametrów lipofilowości na **rycinie 3** świadczy o tym, że najbardziej zbliżone do siebie teoretyczne i eksperymentalne (tj. chromatograficzne) parametry lipofilowości, to:

- $M\log P$ i R_{MW} na płytkach RP-18F₂₅₄ dla fazy ruchomej metanol-woda (RP18(m)),
- $x\log P$ oraz R_{MW} na płytkach RP-18WF₂₅₄ dla fazy ruchomej dioksan-woda (RP18W(d)),
- $A\log P$ i R_{MW} na płytkach RP-2F₂₅₄ dla fazy ruchomej dioksan-woda (RP2(d)),
- $A\log Ps$ i R_{MW} na płytkach RP-18F₂₅₄ dla fazy ruchomej dioksan-woda ((RP18(d)).

Z kolei porównanie zarówno teoretycznych, jak i eksperymentalnych wartości chromatograficznego parametru lipofilowości uzyskanych dla eplerenonu z danymi otrzymanymi dla spironolaktonu wskazuje na to, że spironolakton wykazuje większą lipofilowość wyrażoną w postaci $\log P_{\text{śred}} = 2,78$ oraz

odpowiednio za pomocą $R_{MW} = 2,88 - 3,77$, uzyskanych techniką RP-TLC i RP-HPTLC dla tych samych warunków chromatograficznych, co badany eplerenon [15].

Zaprezentowane w niniejszej pracy wartości eksperymentalnego parametru lipofilowości (R_{MW}) wskazują na przydatność techniki TLC w układzie faz odwróconych jako techniki alternatywnej w odniesieniu do klasycznej ekstrakcji do wyznaczania lipofilowości eplerenonu. Wyniki te mogą być przydatne w przyszłości w badaniach farmakokinetyki eplerenonu lub jego analogów.

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że chromatografia cienkowarstwowa w układzie faz odwróconych, tj. RP-TLC i RP-HPTLC, jest przydatnym narzędziem w przewidywaniu rzeczywistej wartości parametru lipofilowości eplerenonu, steroidu o działaniu diuretycznym stosowanego w leczeniu nadciśnienia tętniczego i niewydolności serca. Wyznaczona techniką TLC, na podstawie analizy chromatograficznej eplerenonu przeprowadzonej w różnych układach chromatograficznych, średnia wartość chromatograficznego parametru lipofilowości (R_{MW}) jest zbliżona do średniej teoretycznej wartości współczynnika podziału ($\log P$) wyznaczonej metodami obliczeniowymi. Oznacza to, że technika TLC może być z powodzeniem stosowana jako alternatywna do klasycznej ekstrakcji w układzie n-oktanol/woda w badaniach lipofilowości steroidów z grupy diuretyków, do których należy obok spironolaktonu analizowany w poniższej pracy eplerenon.

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach. Projekt nr KNW-1-019/K/6/O oraz KNW-1-013/K/7/O.

Otrzymano: 2018.02.06 · Zaakceptowano: 2018.02.15

Piśmiennictwo

1. 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.
2. Paneth A., Hawrył A., Plech T., Hawrył M., Świeboda R., Janowska D., Wujec M., Paneth P.: Lipophilicity studies on thiosemicarbazide derivatives. Molecules, 2017, 22(6): 952.
3. Flieger J., Czajkowska-Żelazko A., Rządowska M., Szacoi E., Matosiuk D.: Usefulness of reversed-phase HPLC enriched with room temperature imidazolium based ionic liquids for lipophilicity determination of the newly synthesized analgesic active urea derivatives. J. Pharm. Biomed. Anal. 2012, 66: 58-67.
4. Fijałkowski L., Nowaczyk A.: Zależność między strukturą a aktywnością w grupie związków o działaniu przeciwrzybczym. Farm. Pol. 2016, 72(6): 406-415.
5. Rudraraju A.V., Amoyaw P.N., Hubin T.J., Khan M.O.: Determination of $\log P$ values of new cyclen based antimalarial drug leads using RP-HPLC. Pharmazie, 2014, 69(9): 655-662.

6. Bajda M., Bucki A., Szlek J., Szwachkiewicz M., Świerczek M., Malaw-ska B.: Determination of lipophilicity of alpha- (4-phenylpiperazine) derivatives of N-benzylamides using chromatographic and computational methods. *Biomed. Chromatogr.* 2008, 22(4): 428–432.
7. 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.
8. Wiśniowska B., Polak S. Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem – przewidywanie potencjalnych działań toksycznych. *Farm. Pol.* 2009, 65(6): 445–452.
9. Tetko I.V., Tanchuk V.J.: VCC n Lab. Interactive analysis logP prediction [Internet] <http://www.vccclab.org/lab/alogps> [dane z dnia 10 stycznia 2018].
10. Brennan B. J., Martin N. E.: Eplerenone: selective aldosterone antagonism in management of cardiovascular and renal disease. *J. Am. Pharm. Assoc.* 2004, 44(5): 604–611.
11. Watanabe M., Krum H.: Eplerenone for the treatment of cardiovascular disorders. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2012, 10(7): 831–838.
12. Colussi G., Catena C., Sechi L.A.: Spironolactone, eplerenone and the new aldosterone blockers in endocrine and primary hypertension. *J. Hypertens.* 2013, 31(1): 3–15.
13. Trzaska E., Gumulka W., Makulska-Nowak H. E.: Antagoniści aldosteronu w farmakoterapii chorób układu krążenia. *Kardiolog. Pol.* 2009, 67: 667–671.
14. Brown N.J.: Eplerenone: cardiovascular protection. *Circulation*, 2003, 107(19): 2512–2518.
15. 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.