



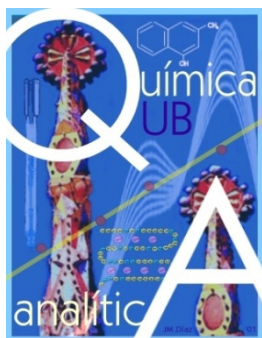
Avaluació de la lipofilicitat de compostos d'interès farmacèutic

Juan Manuel Pallicer Santana

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



AVALUACIÓ DE LA LIPOFILICITAT DE COMPOSTOS D'INTERÈS FARMACÈUTIC

Tesi Doctoral presentada per

Juan Manuel Pallicer Santana

per optar al grau de

Doctor per la Universitat de Barcelona

Sota la direcció de

Dra. Elisabeth Bosch i José

Dra. Clara Ràfols i Llach

Barcelona, novembre 2012

Programa de Doctorat
del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona
QUÍMICA ANALÍTICA DEL MEDI AMBIENT I DE LA POL·LUCIÓ

***AVALUACIÓ DE LA LIPOFILICITAT DE COMPOSTOS
D'INTERÈS FARMACÈUTIC***

Memòria presentada per **Juan Manuel Pallicer Santana**
per optar al grau de **Doctor per la Universitat de Barcelona**

La **Dra. Elisabeth Bosch i José** i la **Dra. Clara Ràfols i Llach**

CERTIFIQUEN

Que la present Tesi Doctoral presentada per Juan Manuel Pallicer Santana ha estat realitzada sota la seva direcció al Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, 19 de setembre de 2012

Dra. Elisabeth Bosch i José

Catedràtica del Departament
de Química Analítica de la
Universitat de Barcelona

Dra. Clara Ràfols i Llach

Professora Titular del Departament
de Química Analítica de la
Universitat de Barcelona

AGRAÏMENTS

Voldria agrair a totes les persones que m'han ajudat a assolir aquest repte i després d'aquests anys, és just posar nom i llinatges a tots els que m'heu animat, recolzat, empès i m'heu fet arribar tan amunt.

En primer lloc, vull agrair a la Dra. Elisabeth Bosch per haver-me donat la possibilitat de realitzar aquesta tesi doctoral en el seu grup de recerca. Vull destacar tot el que he pogut aprendre, com treballar amb rigor i serietat, fer les coses bé i finalment, veure aquest temps de formació com un tot on el doctorand no només desenvolupa unes capacitats científiques, sinó també personals. Així mateix, vull donar les gràcies a la Dra. Clara Ràfols per la seva contribució a aquesta tesi, especialment en tota la part numèrica i de càlcul, on ha estat una gran mestra. Finalment, vull agrair al Dr. Martí Rosés les seves aportacions en les diverses discussions científiques que hem tingut al llarg d'aquests anys.

Gràcies també a la Dra. Adriana Port i a la Dra. Rosalia Pascual per haver-me donat la oportunitat de col·laborar amb la indústria farmacèutica, en una empresa tan representativa del país com Esteve, i també per haver-me permès conèixer alguns dels seus *secrets*. La col·laboració entre empresa i universitat no només és desitjable, sinó que en moments com els actuals és imprescindible.

Sense l'ajut i el suport de la família açò tampoc hauria estat possible. Gràcies als meus pares i als meus germans, que m'han recolzat durant aquests 11 anys que han passat des que vaig emigrar de Menorca. Ells sempre han estat allà i m'han fet arribar la seva energia i els seus ànims, creuant aquesta Mediterrània tan nostra.

Un agraïment a tots els companys que han passat per aquest laboratori al llarg d'aquests anys, molt especialment a la Marta, amb la que he compartit tants i tants moments, a l'Axel, per tantes bones estones, i al Dr. Xavier Subirats, una autèntica referència, amb el que m'encantaria algun dia tenir el luxe de poder treballar. També una menció especial per a la Dra. Elisabet Fuguet.

Esmentar al Dr. Albert Cots per les seves classes de Word i d'història. Gràcies!

Gràcies als meus amics i companys de promoció amb els que he passat tant bones estones i he fet tants quilòmetres i viatges: Àlex i Bea, David i Anna, Albert, Miki, i, molt especialment, al meu *compatriota* i amic des de fa tants anys, en Pere i també na Ingrid. Moltes gràcies, al·lots i al·lotes!!!

Ich bedanke mich bei PD Dr. Stefanie Krämer von der ETH Zürich für die Einladung in die Biopharmazie Gruppe. Ich kann sagen, dass ich die schönste Zeit meines Lebens (bis jetzt) in Zürich hatte. Ich würde nicht an diesem Punkt sein, wenn ich diese Chance nicht gehabt hätte.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Knut Baumann für sein Vertrauen und die Chance zu arbeiten beim Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig bedanken.

Und natürlich muss ich mich bei dir bedanken. Du weißt, dass das ohne dich nicht möglich gewesen wäre. Du hast mir so viel Energie, Motivation und Kraft gegeben. Diese Zeit war nicht immer einfach, die Tage sind manchmal langsam gelaufen, aber endlich haben wir das Ziel erreicht! Danke, mein Schatz!

ÍNDEX

ÍNDEX

PRÒLEG	1
i. Objectius	3
ii. Estructura de la tesi	4
iii. Nomenclatura	6
iv. Abstract	8
CAPÍTOL I. Introducció	11
1.1. La lipofilicitat com a paràmetre d'interès biològic	13
1.1.1. Introducció	13
1.1.2. Interaccions de fàrmacs amb membranes biològiques	15
1.1.3. Lipofilicitat o hidrofobicitat?	16
1.2. El coeficient de partició 1-octanol/aigua ($\log P_{o/w}$)	17
1.3. Mètodes per a la determinació del $\log P_{o/w}$	20
1.3.1. Predicció del $\log P_{o/w}$ amb programes de càlcul	20
1.3.1.1. <i>Mètodes basats en subestructures</i>	20
1.3.1.2. <i>Altres mètodes</i>	21
1.3.2. Mètode d'equilibratge de fases o shake-flask	24
1.3.3. Mètode potenciomètric	24
1.3.4. Mètodes cromatogràfics per a la determinació del $\log P_{o/w}$	26
1.3.4.1. <i>Cromatografia de líquids</i>	26
1.3.4.1.1. <i>Retenció en cromatografia de líquids</i>	27
1.3.4.1.2. <i>Fases mòbils tamponades</i>	27
1.3.4.2. <i>Mètodes cromatogràfics per a la determinació del $\log P_{o/w}$</i>	30
1.3.4.2.1. <i>Mètodes cromatogràfics basats en l'elució isocràtica</i>	30
1.3.4.2.2. <i>Mètodes cromatogràfics basats en l'elució en gradient</i>	32
1.3.4.2.3. <i>Altres mètodes cromatogràfics</i>	33
1.4. Mètode cromatogràfic proposat per determinar el $\log P_{o/w}$	35
1.4.1. Model de polaritat	35
1.4.1.1. <i>Fonament teòric</i>	35
1.4.1.2. <i>Aplicacions</i>	38
1.4.2. Models QSAR	38
1.4.2.1. <i>Descriptors moleculars</i>	39

1.4.2.1.1. <i>Descriptors fisicoquímics</i>	40
1.4.2.1.2. <i>Descriptors d'Abraham</i>	40
1.4.2.1.3. <i>Descriptors basats en camps d'interacció molecular (MIFs)</i>	42
1.4.2.2. <i>Descripció de la polaritat del solut (p) a partir d'un model QSPR</i>	43
1.5. Lipofilicitat anisotròpica: Interaccions amb liposomes	45
1.5.1. Liposomes	45
1.5.2. Mesura de la partició de fàrmacs en liposomes	46
1.5.2.1. <i>Diàlisi en equilibri</i>	46
1.5.2.2. <i>Mètode potenciomètric</i>	47
1.5.2.3. <i>Mètodes espectroscòpics</i>	48
1.6. Referències	51
CAPÍTOL II. Part experimental	57
2.1. Mesura de la retenció en cromatografia de líquids	59
2.1.1. <i>Aparells</i>	59
2.1.2. <i>Columnes</i>	59
2.1.3. <i>Procediment</i>	60
2.2. Preparació i caracterització de liposomes. Mesura de la lipofilicitat	61
2.2.1. <i>Preparació i caracterització de liposomes</i>	61
2.2.2. <i>Mesura de la lipofilicitat</i>	62
2.2.2.1. <i>Diàlisi en equilibri</i>	62
2.2.2.2. <i>Potenciometria</i>	63
2.2.2.3. <i>Mesura de l'anisotropia</i>	63
2.3. Càlcul de descriptors moleculars	64
2.3.1. <i>Descriptors calculats amb CODESSA</i>	64
2.3.2. <i>Descriptors calculats amb Discovery Studio i Volsurf</i>	65
2.4. Referències	66
<u>RESULTATS I DISCUSSIÓ</u>	
CAPÍTOL III. Establiment d'un mètode cromatogràfic per estimar el log $P_{o/w}$ de fàrmacs	69
3.1. Introducció	71
3.2. Establiment del mètode. Selecció del sistema cromatogràfic	73
3.2.1. <i>Paràmetres fisicoquímics dels compostos estudiats</i>	73

3.2.2. <i>Caracterització del sistema cromatogràfic</i>	74
3.2.3. <i>Selecció del pH de la fase mòbil</i>	75
3.2.4. <i>Optimització del tipus i fracció de modificador orgànic a la fase mòbil</i>	77
3.2.5 <i>Valors de log $P_{o/w}$ obtinguts en l'establiment del mètode</i>	80
3.3. Estudi de compostos bàsics	81
3.3.1. <i>Sistema cromatogràfic. Columnes i pH de la fase mòbil</i>	81
3.3.2. <i>Estudi de la lipofilicitat de fàrmacs de característiques bàsiques</i>	86
3.4. Estudi de compostos d'interès farmacèutic d'estructura complexa	89
3.4.1. <i>Introducció</i>	89
3.4.2. <i>Descriptors estructurals</i>	90
3.4.3. <i>Estudi dels valors obtinguts</i>	92
3.5. Referències	98
CAPÍTOL IV. Contribució de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen en el log $P_{o/w}$	99
4.1. Introducció	101
4.1.1. <i>Equació general de solvatació. Descripció del log $P_{o/w}$</i>	101
4.1.2. <i>Influència de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen en HPLC</i>	102
4.2. Generació de models QSPR	107
4.2.1. <i>Descriptor A</i>	107
4.2.2. <i>Descriptor calculat amb CODESSA, HDCA-2</i>	107
4.2.3 <i>Descriptors calculats amb Volsurf+, WO1 i DRDODO</i>	108
4.2.3.1. <i>Anàlisi conformacional</i>	109
4.2.3.2. <i>Anàlisi de l'estereoisomeria</i>	111
4.2.4. <i>Comparació entre models</i>	113
4.3. Referències	115
CAPÍTOL V. Estudi de la lipofilicitat de fàrmacs en liposomes	117
5.1. Introducció	119
5.2. Determinació de la partició amb tècniques de referència	120
5.2.1. <i>Diàlisi en equilibri</i>	120
5.2.2. <i>Potenciometria</i>	122
5.3. Determinació de la partició a partir de l'anisotropia	123
5.3.1. <i>Relació entre l'anisotropia i la partició dels soluts</i>	123

5.3.2 Consideracions pràctiques en la mesura	125
5.3.3. Determinació del coeficient de partició en liposomes	126
5.4. Referències	129
CONCLUSIONS	131
EPÍLEG	137
ANNEX	141
Article I. Determination of the hydrophobicity of organic compounds measured as $\log P_{o/w}$ through a new chromatographic method. J.M. Pallicer, S. Pous-Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch. <i>J. Chromatogr. A</i> 1217 (2010) 3026	143
Article II. Lipophilicity assessment of basic drugs ($\log P_{o/w}$ determination) by a chromatographic method. J.M. Pallicer, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch. <i>J. Chromatogr. A</i> 1218 (2011) 6356	157
Article III. Extension of the liquid chromatography/quantitative structure-property relationship method to assess the lipophilicity of neutral, acidic, basic and amphoteric compounds. J.M. Pallicer, C. Calvet, A. Port, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch. <i>J. Chromatogr. A</i> 1240 (2012) 113	173
Article IV. The contribution of hydrogen bond acidity on the lipophilicity of drugs estimated from chromatographic measurements. J.M. Pallicer, R. Pascual, A. Port, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, enviat per la seva publicació a <i>Eur. J. Pharm. Sci.</i>	185
Article V. Evaluation of fluorescence anisotropy to assess drug-lipid membrane partitioning. J.M. Pallicer, S.D. Krämer. <i>J. Pharm. Biomed. Anal.</i> 71 (2012) 219	223

PRÒLEG

I. OBJECTIUS

L'estudi de la lipofilitat de compostos d'interès farmacèutic ha estat, i és encara, un de les etapes essencials en el desenvolupament de nous fàrmacs. La lipofilitat és un paràmetre que té una influència decisiva en les propietats d'absorció, distribució, metabolisme, excreció i toxicitat d'un fàrmac, també conegudes com propietats *ADMET*. Per tant, és de gran interès per a la indústria farmacèutica comptar amb metodologies *high-throughput*, que permetin avaluar ràpidament la lipofilitat d'un gran nombre de compostos en poc temps. La lipofilitat s'expressa normalment com el coeficient de partició en 1-octanol/aigua ($\log P_{o/w}$) del solut.

L'objectiu principal d'aquesta Tesi és proporcionar una metodologia robusta, simple i d'utilitat pràctica per tal d'avaluar el coeficient de partició 1-octanol/aigua de fàrmacs basada en l'ús de la cromatografia de líquids d'alta eficàcia. La metodologia a desenvolupar es fonamenta en dos models previs. El primer relaciona la retenció en cromatografia de líquids amb la polaritat del solut i la de les dues fases cromatogràfiques. El segon permet calcular el coeficient de partició 1-octanol/aigua del solut mitjançant la seva polaritat determinada cromatogràficament, i alguns descriptors moleculars, que contenen informació relacionada amb la capacitat donadora d'enllaç d'hidrogen i altres propietats significatives del fàrmac d'interès.

Un altre aspecte a considerar és l'estudi de la interacció dels fàrmacs amb membranes artificials, ja que aquestes permeten simular millor que l'1-octanol l'entorn en el que es troba un fàrmac en la seva acció *in vivo* degut a que la seva estructura en forma de bicapa lipídica emula l'estructura de les membranes biològiques. En aquesta part, l'objectiu és estudiar una metodologia nova basada en la fluorescència per a la determinació de la partició de fàrmacs en sistemes que contenen liposomes i comparar-la amb les tècniques considerades de referència per a aquest propòsit.

ii. ESTRUCTURA DE LA TESI

Aquesta memòria està dividida en quatre parts d'acord amb l'estructura general d'un treball científic: Introducció, Part Experimental, Resultats i Discussió, i Conclusions. En la Introducció, corresponent al Capítol I, es mostra la importància de la lipofilitat com a paràmetre d'interès biològic. Seguidament, es defineix el coeficient de partició 1-octanol/aigua com a paràmetre per expressar la lipofilitat d'un solut, així com els diferents mètodes existents per avaluar-lo, fent menció especial als mètodes basats en la cromatografia de líquids d'alta eficàcia. A continuació, es detallen les bases teòriques en que es fonamenta la metodologia proposada en aquesta Tesi. Finalment, s'introdueix l'estudi de la lipofilitat de fàrmacs mitjançant l'ús de liposomes.

En la segona part de la memòria, corresponent al Capítol II, s'expliquen els procediments experimentals usats en el transcurs d'aquesta Tesi: la cromatografia de líquids d'alta eficàcia, la preparació i caracterització de liposomes, la potenciomètria així com l'ús de programari adient per tal de calcular els descriptors moleculars de les substàncies.

La part corresponent als Resultats i Discussió està dividida en tres capítols. En el Capítol III es discuteix l'establiment d'un mètode cromatogràfic per determinar el $\log P_{o/w}$ de compostos orgànics de diversa complexitat, incloent fàrmacs amb diverses funcionalitats. En el Capítol IV s'estudien correlacions entre el $\log P_{o/w}$, la retenció cromatogràfica i diversos descriptors que expressen la donació per enllaç d'hidrogen dels soluts. En el Capítol V es discuteixen tres aproximacions experimentals per avaluar la lipofilitat de fàrmacs mitjançant l'ús de liposomes. La quarta part de la memòria correspon a les Conclusions generals, en què es resumeixen breument els resultats més rellevants dels estudis duts a terme.

Finalment, l'annex conté els articles publicats com a resultat d'aquesta Tesi Doctoral. Els articles s'organitzen d'una forma equivalent als Capítols indicats en la part de Resultats i Discussió. El primer bloc comprèn els articles I a III publicats al *Journal of Chromatography A* amb els següents títols:

- I. Determination of the hydrophobicity of organic compounds measured as $\log P_{o/w}$ through a new chromatographic method. J.M. Pallicer, S. Pous-Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3026.

II. Lipophilicity assessment of basic drugs ($\log P_{o/w}$ determination) by a chromatographic method. J.M. Pallicer, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6356.

III. Extension of the liquid chromatography/quantitative structure-property relationship method to assess the lipophilicity of neutral, acidic, basic and amphoteric drugs. J.M. Pallicer, C. Calvet, A. Port, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1240 (2012) 113.

Aquests tres articles descriuen el mètode cromatogràfic per avaluar el $\log P_{o/w}$ de compostos orgànics. En l'article I s'estableix el mètode a partir de l'estudi de substàncies orgàniques d'estructura més senzilla, tant compostos no ionitzables com compostos àcids. En l'article II s'amplia l'estudi a compostos bàsics d'interès farmacèutic, utilitzant diverses columnes cromatogràfiques preparades per treballar amb tampons de pH elevat. En l'article III s'avalua la lipofilitat de fàrmacs d'estructura més complexa mitjançant columnes cromatogràfiques amb característiques força diferents, des de columnes amb una grandària de partícula convencional fins a les noves columnes de UHPLC. S'inclou també un estudi dels descriptors moleculars utilitzats.

El segon bloc està format per l'article IV, enviat per a la seva publicació al *European Journal of Pharmaceutical Sciences* amb el següent títol:

IV. The contribution of the hydrogen bond acidity on the lipophilicity of drugs estimated from chromatographic measurements. J.M. Pallicer, R. Pascual, A. Port, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, enviat per a la seva publicació al *Eur. J. Pharm Sci.*

En aquest treball s'avalua la rellevància de la donació d'enllaç d'hidrogen del solut en la predicció del $\log P_{o/w}$ a partir de mesures cromatogràfiques. S'estudien diversos descriptors de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen derivats de representacions bi i tridimensionals del solut. A partir d'ells i de la polaritat del solut, es proposen diversos models per predir el $\log P_{o/w}$. En el cas dels descriptors tridimensionals, es considera la influència de les possibles conformacions generades a l'optimitzar l'estructura 3D del solut i la influència de la estereoquímica dels compostos en els descriptors calculats.

El tercer i últim bloc conté l'article V, publicat al *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* i que porta com a títol:

V. Evaluation of fluorescence anisotropy to assess drug-lipid membrane partitioning. J.M. Pallicer, S.D. Krämer, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 71 (2012) 219.

L'article descriu un estudi de la lipofilitat de fàrmacs mitjançant l'ús de diverses tècniques experimentals que mesuren la partició d'alguns principis actius seleccionats amb

liposomes. Per fer-ho, d'una banda s'utilitzen dues tècniques ben conegudes tals com la diàlisi en equilibri i la potenciometria, i d'altra banda, es proposa un mètode alternatiu als anteriors tal com la mesura de l'anisotropia de la radiació fluorescent. Finalment, es comparen els resultats obtinguts amb les tres tècniques i es remarquen les consideracions inherents a la mesura de l'anisotropia.

iii. NOMENCLATURA

Atès que en el transcurs d'aquesta memòria el lector trobarà amb freqüència termes referits a la partició d'un compost entre dues fases immiscibles, és necessari esmentar breument les divergències entre la nomenclatura utilitzada en aquesta Tesi Doctoral i la recomanada per la Unió Internacional de Química Pura i Aplicada, IUPAC d'acord amb el seu acrònim anglès.

D'acord amb el Compendi de Nomenclatura de Química Analítica [1], la partició d'un solut entre dos líquids immiscibles defineix la constant de partició (K_D^0) que és la raó entre l'activitat d'una espècie determinada, A , a l'extracte, i la seva activitat a l'altra fase amb la qual es troba en equilibri. Per a la partició d'un solut entre un solvent orgànic i l'aigua, la constant de partició pren la següent forma:

$$(K_D^0)_A = a_{A,org}/a_{A,aq}$$

El seu valor és independent de la composició però depèn de l'elecció dels estats estàndard i de la temperatura.

Ara bé, donat que normalment es treballa amb concentracions i no amb activitats donada la dificultat de mesurar-les, es defineix la raó de partició d'un solut entre dues fases immiscibles com la raó entre la concentració d'una sola forma definida d'una substància A , a l'extracte i la concentració de la mateixa forma a l'altra fase un cop assolit l'equilibri, d'acord amb la següent expressió:

$$(K_D)_A = [A]_{org}/[A]_{aq}$$

on els subíndexs indiquen la fase orgànica i l'aquosa. S'ha d'esmentar que en el camp farmacèutic la raó de partició es simbolitza mitjançant la lletra P .

D'una forma similar, es defineix la raó de distribució d'un solut (D) com la raó entre la concentració analítica total d'un solut a l'extracte (independentment de la seva forma química) i la seva concentració analítica total a l'altra fase:

$$D = (C_A)_{org} / (C_A)_{aq}$$

de manera que el seu valor varia en funció de les condicions experimentals, tals com el pH o la formació de parells iònics.

Tant la raó de partició com la raó de distribució són els paràmetres emprats habitualment en l'avaluació de la lipofilicitat de compostos orgànics mitjançant l'estudi del seu comportament en el sistema 1-octanol/aigua. Ara bé, la nomenclatura de la IUPAC no s'ha adoptat de forma generalitzada en el camp de la química farmacèutica i la química mèdica i per tant, es segueix emprant amb tota normalitat nomenclatura no recomanada per la IUPAC. En conseqüència, la raó de partició s'anomena com coeficient de partició (P), i la raó de distribució com coeficient de distribució o coeficient de distribució aparent (D).

Així doncs, en aquest treball s'empraran els termes coeficient de partició per referir-se a la partició d'una espècie única entre dues fases immiscibles, i coeficient de distribució a la distribució de diverses espècies del mateix compost entre aquestes dues fases.

- [1] *Compendi de Nomenclatura de Química Analítica. Regles definitives de 2007. Unió Internacional de Química Pura i Aplicada. Versió Catalana*, Eds. E. Bosch i José, S. Alegret i Sanromà. Secció de Ciències i Tecnologia, Institut d'Estudis Catalans. Barcelona, 2007.

iv. ABSTRACT

This Thesis includes two parts that are written in English, the abstract, the conclusions and also the articles published in peer-reviewed journals which form the basis of the work exposed here.

There are two reasons for having these parts written in English. First of all, the English language is the *lingua franca* in science. Secondly, it is also necessary to make possible that anybody who does not know Catalan, the language in which this Dissertation is written, could understand completely this work. Then, the abstract, conclusions and papers are in English, because these parts should be enough to allow the English reader to understand it.

The Thesis is entitled *Avaluació de la lipofilicitat de compostos d'interès farmacèutic*, which could be translated as *Evaluation of the lipophilicity of drugs*. The Dissertation is then focused to the study of the lipophilicity of drugs based on common partitioning systems such as the classical, well-known 1-octanol/water partitioning, and the liposome/water partitioning system. The two systems are complementary due to the differences between them: the 1-octanol/water partitioning permits the evaluation of the isotropic lipophilicity, which is independent of the region in which the lipophilicity is measured, while the liposome/water partitioning allows the assessment of the anisotropic lipophilicity, which depends on the area in which is studied. The relationship between both lipophilicities and the behavior of the drugs in *in vivo* systems is also illustrated in the Introduction section of the Dissertation. Then, a brief review of the several procedures to determine the 1-octanol/water partition coefficient or $\log P_{o/w}$ is included, focused to the description of the most relevant chromatographic methods to determine the $\log P_{o/w}$. Finally, the Introduction includes a short description of the evaluation of the liposome/water partitioning by means of the reference and spectroscopic techniques.

The main subject of this thesis is to establish a chromatographic method to determine the lipophilicity of organic compounds, especially drugs. The study is focused to the lipophilicity assessment of drugs with diverse structures, functionalities and acid-base properties. The chromatographic method is based on a quantitative structure-property relationship method (QSPR), which permits the estimation of the $\log P_{o/w}$ from the chromatographic retention complemented with several molecular descriptors calculated from the structure of the compound. The method was set up with a collection of benzene, phenol and aniline derivatives and then, the experimental conditions of the chromatographic measurement were optimized. Later, the performance of the method was extended with the study of basic compounds, including several commercial drugs. This

involved the use of alkaline mobile phases and, hence, columns prepared for working with mobile phases with high pH. Finally, the proposed method was used to assess the lipophilicity of drugs which showed a very complex structure and the structural descriptors were again evaluated because these drugs showed significantly different descriptor values compared to those from the substances used to establish the method. The performance of the new UHPLC systems to obtain the chromatographic data was also considered.

As a consequence of the study of the structural descriptors involved in the proposed chromatographic method, the ability of several hydrogen bond acidity descriptors to complement the chromatographic retention in order to predict the $\log P_{o/w}$ is studied. Four QSPR models are proposed, which are based on the chromatographic retention and a hydrogen bond descriptor. The four proposed models show similar statistical parameters among them, although the model which is based on the calculated Abraham hydrogen bond acidity parameter shows some advantages. This is because this parameter is easier to calculate and, thus, it is recommended for routine work in pharmaceutical laboratories.

In the third part of this Dissertation, the evaluation of lipophilicity in liposomal systems is assessed. First, the lipophilicity of several drugs is determined by means of the reference techniques, equilibrium dialysis and potentiometry and, in a second part, a new approach to study the lipophilicity of fluorescence compounds is established, based on the measurement of the fluorescent anisotropy of drug-liposome solutions. The anisotropy of these solutions is related to the lipid concentration and the values obtained following a titration procedure can be used to calculate the partition coefficient of the drugs.

The Conclusions are given in the final part of this Dissertation.

Capítol I

Introducció

1.1. LA LIPOFILICITAT COM A PARÀMETRE D'INTERÈS BIOLÒGIC

1.1.1. Introducció

“L'efecte relatiu d'aquests narcòtics ha de dependre de la seva afinitat per substàncies lipídiques, d'una banda, i d'altres parts del cos, essencialment aigua, d'altra banda; en altres paraules, dependrà del coeficient de partició que determini la seva partició en una mescla d'aigua i lípids” [1]. Així, a finals del segle XIX, es va començar a estudiar la relació entre la partició d'un compost entre l'aigua i un solvent immiscible i el seu possible efecte sobre els organismes vius. Aquests estudis inicials són la base de la predicció de l'absorció dels fàrmacs a partir dels seus paràmetres fisicoquímics.

Les membranes biològiques estan formades per una doble capa de fosfolípids, essent els més habituals la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE), el fosfatidilinositol (PI) i la fosfatidilserina (PS). Els fosfolípids són molècules amfipròtiques amb un cap polar i una cua hidrofòbica, de manera que al formar una bicapa les cues hidrofòbiques queden enfrontades entre sí a la part interna mentre que els caps polars queden orientats cap a l'exterior, tal com es pot observar a la Figura 1.1. A part dels fosfolípids, hi ha altres lípids que poden formar part de la membrana tals com el colesterol, que proporciona fluïdesa i millora la permeabilitat, i els glicolípids, que són fosfolípids enllaçats a un hidrat de carboni i que actuen com a marcadors cel·lulars i també proporcionen energia. Les membranes biològiques també poden contenir proteïnes.

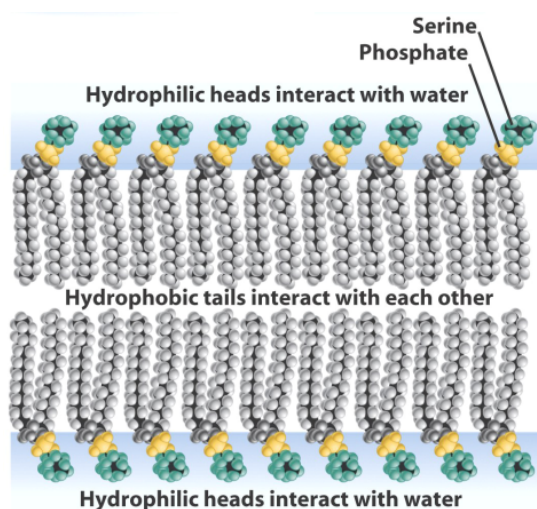


Figura 1.1. Representació esquemàtica d'una membrana biològica on s'observa la disposició en doble capa dels fosfolípids. Les cues hidrofòbiques interaccionen entre elles a l'interior de la membrana, mentre que els caps hidròfils queden orientats cap a l'exterior de la mateixa.

El disseny de nous compostos d'interès farmacèutic està no només condicionat per la seva previsible activitat farmacològica i terapèutica, sinó també per la seva capacitat de ser absorbits i d'arribar al lloc on s'ha de produir la seva acció, és a dir, han de ser capaços de creuar diverses barreres cel·lulars. A la Figura 1.2 es mostren les diferents rutes per travessar les membranes de les cèl·lules epitelials, que recobreixen la paret intestinal i que, per tant, juguen un paper fonamental en l'absorció de fàrmacs administrats per via oral.

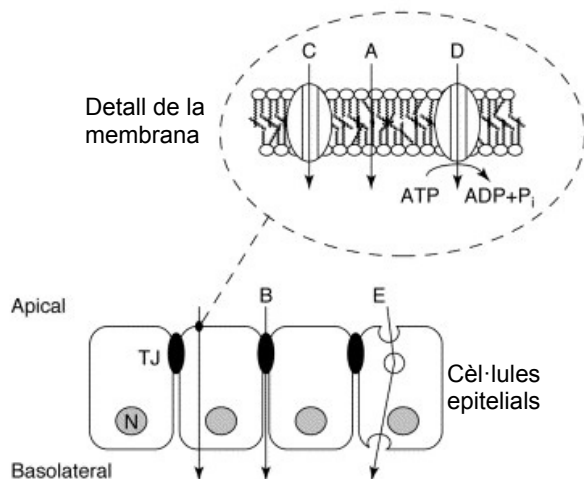


Figura 1.2. Les diferents rutes per travessar membranes *in vivo*. Esquema de cèl·lules epitelials connectades per zònules oclusives o *tight junctions* (TJ).

(A) Via transcel·lular: difusió passiva a través de la bicapa de lípids.

(B) Via paracel·lular a través dels porus entre les cèl·lules.

(C) Transport facilitat a través de sistemes transportadors a la membrana cel·lular.

(D) Transportadors actius a la membrana cel·lular. Requereixen energia, com s'indica a ATP/ADP.

(E) Permeació transcel·lular de macromolècules mitjançant vesícules a la membrana amb o sense receptors específics a la seva superfície.

N indica el nucli de la cèl·lula, *apical* representa la part externa de la membrana i *basolateral* la part interna de la mateixa [2].

La difusió passiva d'un compost en una biomembrana pot tenir lloc a través de la bicapa de lípids de les cèl·lules (Fig. 1.2, A), anomenada via transcel·lular, o bé a través de les zònules oclusives o *tight junctions* (Fig. 1.2, B) que s'anomena via paracel·lular [3]. Per molts compostos, el transport es realitza a través de la via transcel·lular, és a dir, han de travessar primer la membrana del costat *apical* (extern) de les cèl·lules, després passen per l'interior de la cèl·lula i finalment han de travessar la membrana del costat *basolateral* (intern). L'extensió de la difusió passiva mitjançant la via transcel·lular depèn de la partició de la molècula en la membrana, és a dir, el compost ha de tenir una lipofilitat òptima per difondre's mitjançant aquest procés. Per exemple, si la molècula és massa lipòfila quedarà retinguda a l'interior de la membrana, mentre que si és massa hidròfila no podrà travessar-la o bé quedarà retinguda a l'interior de la cèl·lula. La lipofilitat s'expressa normalment com el coeficient de partició 1-octanol/aigua, i també amb el coeficient de partició en liposomes/aigua.

1.1.2. Interaccions de fàrmacs amb membranes biològiques

L'estudi de les interaccions entre fàrmacs i membranes biològiques té una gran importància en els camps de la química mèdica i la química farmacèutica, ja que aquestes interaccions condicionen els processos farmacocinètics i farmacodinàmics d'un fàrmac. La farmacocinètica comprèn l'estudi dels processos que pateix un fàrmac des de la seva administració fins a la seva completa eliminació del cos (*què fa el cos amb el fàrmac*), i que es resumeixen amb l'acrònim anglès *ADMET*, és a dir, els processos d'absorció, distribució, metabolisme, excreció i toxicitat als quals es veu sotmès el fàrmac. D'altra banda, la farmacodinàmica estudia els mecanismes d'acció del fàrmac (*què fa el fàrmac amb el cos*) i la relació entre la concentració del fàrmac i el seu efectes, bioquímics i biològics, sobre el cos [4].

Les membranes existents a l'organisme tenen diverses funcions. La més bàsica d'elles és quan la membrana actua com a barrera entre dos compartiments aquosos, entre els quals es distribueix el solut. Aquest procés farmacocinètic de distribució es pot modelar mitjançant l'estudi de la partició del fàrmac en dos solvents immiscibles, de manera que es mesura la lipofilitat isotròpica del compost. Una membrana també pot actuar com a diana per a un fàrmac, per tant, s'ha de considerar un procés farmacodinàmic que es pot modelar amb fases anisotròpiques tals com els liposomes o micel·les, que serveixen per mesurar la lipofilitat anisotròpica. Finalment, en alguns casos les membranes actuen com a matriu en la qual hi ha incorporats enzims i, per tant, es necessiten assajos específics enzim-ligand per avaluar aquestes interaccions. A la Taula 1.1 es troba una classificació de les diverses funcions que tenen les membranes en els processos descrits.

Taula 1.1. Principals funcions que tenen les membranes en els processos farmacocinètics i farmacodinàmics [5]. S'indiquen les mesures experimentals per estudiar la interacció del fàrmac per a cadascuna de les funcions que pot tenir una membrana.

	Barrera	Diana	Matriu per enzims o receptors
Camp d'estudi	Farmacocinètica	Farmacocinètica i farmacodinàmica	Farmacodinàmica
Mesures experimentals	Lipofilitat isotròpica	Lipofilitat anisotròpica	Experiments enzim-ligand
Localització de les càrregues	No localitzable	Parcialment localitzable	Localitzada
Interaccions involucrades	Hidrofobicitat, interaccions polars	Hidrofobicitat, interaccions polars i enllaços iònics	Hidrofobicitat, interaccions polars i enllaços iònics
Paràmetres que permeten modelar les interaccions	$\log P$ i $\log D$	$\log P$ i $\log D$	pEC_{50} i pIC_{50}
Mecanismes d'interacció	Partició	Partició	Enllaç

La diferència fonamental entre la lipofilitat isotròpica i la anisotròpica es la formació d'enllaços iònics. Els enllaços iònics no tenen lloc en sistemes isotròpics mentre que sí poden existir en medis anisotròpics. La distribució espacial de les càrreges dels ions és el factor determinant que discrimina entre ambdós sistemes. En els sistemes isotròpics, les càrregues presents provenen dels tampons utilitzats i dels propis fàrmacs, però no tenen una localització definida ja que estan distribuïts de forma equivalent en tot el sistema. En medis anisotròpics tals com els liposomes, les càrregues es troben localitzades en els caps polars dels fosfolípids. Canvis translacionals o conformacionals afecten la seva posició però no la seva capacitat de formar enllaços iònics amb soluts ionitzats. La distribució de les càrreges en cadascun dels sistemes es pot observar a la Figura 1.3.

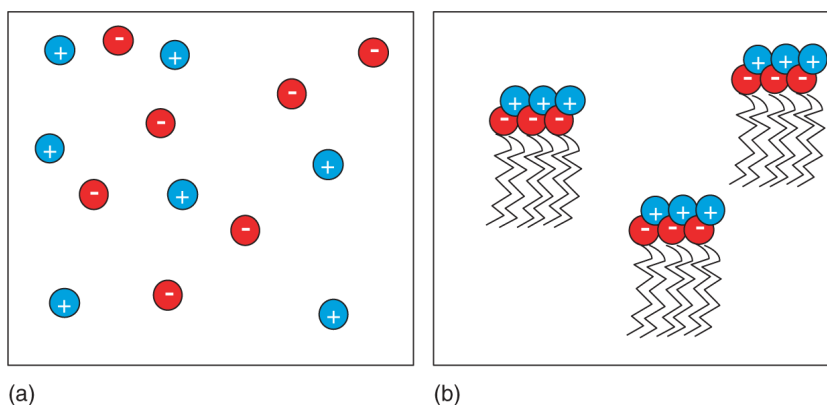


Figura 1.3. La distribució de les càrregues determina la absència o presència d'interaccions entre ions en sistemes isotròpics (a) o anisotròpics (b) [6].

1.1.3. Lipofilitat o hidrofobicitat?

La lipofilitat és, com s'ha vist, un paràmetre que té un paper molt rellevant en la difusió d'un fàrmac a través d'una membrana biològica. El propi nom indica afinitat pels lípids, mentre que la hidrofobicitat indica la repulsió respecte a l'aigua. Els dos termes s'utilitzen freqüentment com a sinònims, encara que alguns autors consideren que no reflecteixen exactament la mateixa propietat: la hidrofobicitat considera la interacció entre el compost i l'aigua, mentre que la lipofilitat es una mesura de la interacció del compost amb els lípids. De fet, s'ha suggerit que la hidrofobicitat pot ser un component de la lipofilitat i que pot ser descrita com un terme relacionat amb la grandària i que només depèn de la pròpia molècula, mentre que la lipofilitat també inclou un terme de polaritat que depèn del lípid o fase immiscible utilitzat [7, 8].

$$\log P = aV + \Lambda \quad (1.1)$$

En aquesta equació, $\log P$ representa la raó de partició entre l'aigua i la fase immiscible, que es definirà a la secció següent, V és el volum molecular i Λ un terme relacionat amb la polaritat de la molècula. El terme lipofilicitat s'utilitza habitualment en els estudis d'absorció, distribució, metabolisme, excreció i toxicitat (ADMET) de fàrmacs, com es veurà a continuació, malgrat que la hidrofobicitat també s'avalua amb el mateix paràmetre, $\log P_{o/w}$.

En aquest treball, s'estudiaran les dues formes de lipofilicitat que s'han descrit en aquesta secció. La lipofilicitat isotròpica, que s'avalua a partir del coeficient de partició 1-octanol/aigua o $\log P_{o/w}$, i la lipofilicitat anisotròpica, que s'estudia mitjançant la partició de fàrmacs en liposomes.

1.2. EL COEFICIENT DE PARTICIÓ 1-OCTANOL/AIGUA ($\log P_{o/w}$)

A finals del segle XIX Berthelot i Jungfleisch [9], i Nernst [10], estudiaren el comportament d'una substància quan és afegida a un sistema format per dos líquids immiscibles. Segons demostraren, el solut tendirà a distribuir-se entre les dues fases fins arribar a l'equilibri, moment en el que la relació de concentracions assolirà un valor constant, anomenat el coeficient de partició de la substància. Per a un solut X distribuït entre dues fases immiscibles, una orgànica (org) i una aquosa (aq), el coeficient o raó de partició P prendrà la següent forma:

$$P = \frac{[X]_{org}}{[X]_{aq}} \quad (1.2)$$

La partició és un procés que està influenciat per diferents variables com la temperatura, la concentració del solut o l'existència d'altres equilibris associats com la protonació o polimerització del mateix. Per això és preferible referir la partició a la mateixa espècie molecular, de manera que es defineix com la raó de partició [10]. S'ha de recordar que al Pròleg s'ha fet una breu ressenya sobre la nomenclatura recomanada per la IUPAC i la utilitzada en aquesta tesi.

Els primers estudis esmentats parlaven de coeficients de partició oli/aigua, on *oli* volia dir freqüentment oli d'oliva o qualsevol altre solvent orgànic immiscible amb l'aigua. A

mitjans del segle XX es va estudiar la partició de compostos orgànics en altres sistemes com isobutanol/aigua, èter/aigua o oleil-alcohol/aigua. A partir dels treballs de Hansch i Fujita [11] i Leo *et al.* [12] es va sistematitzar l'ús del sistema 1-octanol/aigua com a referència en l'expressió de la lipofilitat de compostos orgànics i la correlació d'aquest paràmetre amb els processos *in vivo*. Avui en dia, es disposa d'una base de dades de 53 000 valors de $\log P_{o/w}$ experimentals, dels quals 11 000 es consideren d'alta qualitat, una col·lecció de valors molt àmplia comparada amb qualsevol paràmetre fisicoquímic [13].

L'1-octanol és un alcohol lineal de cadena llarga, és a dir, conté una cadena carbonada hidrofòbica i un extrem hidrofílic. Comparat amb altres solvents no polars com el tetraclorur de carboni o l'hexà, l'1-octanol emula millor l'entorn fisicoquímic que trobarà un compost en un teixit viu, essent aquesta una de les raons fonamentals de la universalització del seu ús. Encara que es considera immiscible amb l'aigua, la solubilitat de l'aigua en 1-octanol no és en cap cas negligible, més quan es volen determinar els coeficients de partició de forma experimental, com es veurà més endavant.

L'estructura de l'1-octanol saturat en aigua té una complexitat considerable. La solubilitat de l'aigua en l'1-octanol és molt elevada, fins a una fracció molar de 0.275 [14], de manera que 4 molècules d'aigua formen un clúster, tal com es pot observar a la Figura 1.4, i són rodejades per aproximadament 16 molècules d'1-octanol, amb els caps polars que contenen el grup hidroxil orientats cap al clúster de molècules d'aigua mitjançant interaccions per enllaç d'hidrogen. Les cues alifàtiques s'ordenen de manera similar a la part interna de les membranes cel·lulars.

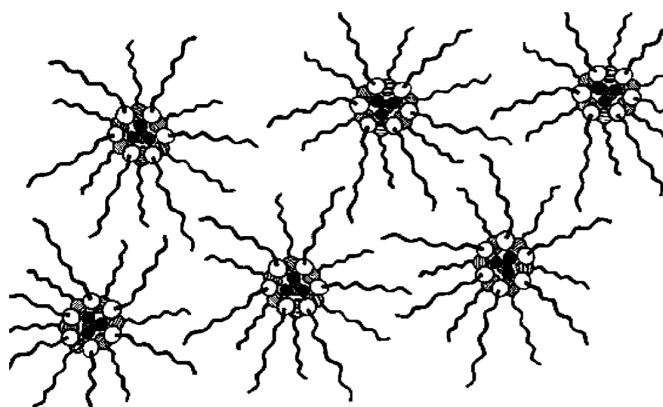


Figura 1.4. Estructura de l'1-octanol saturat en aigua, basada en mesures de difracció de raigs X. Les quatre molècules d'aigua que interaccionen per enllaç d'hidrogen formant un clúster són simultàniament rodejades per unes 16 molècules d'1-octanol mitjançant enllaç d'hidrogen entre elles i amb les molècules d'aigua [15].

Per a un àcid monopròtic HA, el coeficient de partició 1-octanol/aigua s'expressa de la següent manera:

$$P_{o/w} = \frac{[HA]_{oct}}{[HA]_{aq}} \quad (1.3)$$

on $[HA]_{oct}$ i $[HA]_{aq}$ representen la concentració de l'àcid en la fase orgànica i la fase aquosa, respectivament. Es més freqüent trobar el coeficient de partició expressat en forma de logaritme decimal, $\log P_{o/w}$.

Atès que una majoria de fàrmacs són compostos orgànics amb grups ionitzables, s'ha de considerar la partició de les diferents espècies de la molècula. Si es considera de nou el cas d'un àcid monopròtic, s'ha de comptar amb l'equilibri entre l'espècie neutra i l'espècie iònica, a més de l'equilibri de cadascuna d'elles entre ambdues fases, tal com indica la Figura 1.5:

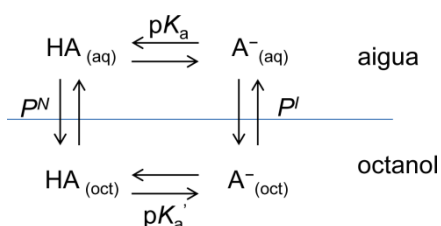


Figura 1.5. Esquema de la partició d'un àcid monopròtic entre l'aigua i l'1-octanol. K_a és la constant d'acidesa en aigua, K_a' és la constant d'acidesa aparent en el solvent orgànic, P^N el coeficient de partició de l'àcid neutre P^I el coeficient de partició de la forma ionitzada.

Pels soluts ionitzables cal definir el coeficient de distribució aparent o raó de distribució D o D_{pH} . El coeficient D és en realitat una mitjana ponderada dels coeficients de partició de les espècies neutra i iònica. Aquest coeficient depèn del pH i pren la següent forma en el cas d'un àcid monopròtic:

$$D_{pH} = \frac{P^N}{1+10^{(pH-pK_a)}} + \frac{P^I}{1+10^{(pK_a-pH)}} \quad (1.4)$$

on P^N és el coeficient de partició de la forma neutra i P^I el de la forma ionitzada.

En general s'assumeix, encara que no és totalment cert, que l'espècie iònica no es particiona cap a la fase orgànica de manera significativa. Llavors es pot simplificar l'equació (1.4) eliminant el terme corresponent a la partició de la forma ionitzada:

$$D_{pH} = \frac{P^N}{1+10^{(pH-pK_a)}} \quad (1.5)$$

Així mateix, relacionant l'expressió anterior amb la definició del coeficient de partició (Eq. (1.3)) i la constant d'acidesa de l'àcid monopròtic HA, es pot arribar a la següent expressió, similar a l'equació (1.3), per determinar el coeficient de distribució aparent:

$$D_{pH} = \frac{[HA]_{oct}}{[HA]_{aq}+[A^-]_{aq}} \quad (1.6)$$

on $[HA]_{oct}$ i $[HA]_{aq}$ representen de nou la concentració de l'àcid en la fase orgànica i la fase aquosa, respectivament, i $[A^-]_{aq}$ la concentració de l'espècie iònica en la fase aquosa.

1.3. MÈTODES PER A LA DETERMINACIÓ DEL $\log P_{o/w}$

Obtenir valors del coeficient de partició 1-octanol/aigua de qualitat ha estat i és encara de molt interès per a la indústria farmacèutica en el procés de desenvolupament de molècules amb potencial activitat terapèutica. Com s'ha exposat abans, la determinació de la lipofilitat té un paper fonamental en les primeres fases d'estudi de nous compostos farmacèutics, juntament amb altres paràmetres fisicoquímics com les constants d'acidesa o la solubilitat del compost. Així doncs, la indústria farmacèutica necessita mètodes precisos, robustos i ràpids per avaluar la lipofilitat de nous candidats a fàrmac. A continuació es descriuran algunes aproximacions, teòriques i experimentals, per mesurar el $\log P_{o/w}$ de compostos d'interès farmacèutic.

1.3.1. Predicció del $\log P_{o/w}$ amb programes de càlcul

La predicció de valors del coeficient de partició 1-octanol/aigua mitjançant programes de càlcul, també coneguda com *in silico*, està força estesa, per la facilitat per obtenir valors de $\log P_{o/w}$ de qualsevol compost d'una manera ràpida i còmoda només a partir de la seva estructura, atesa la manca de dades experimentals per a un grapat de substàncies i també per a compostos que encara no s'han sintetitzat. Malgrat això, aquests mètodes tenen alguns inconvenients, essent el més important, sens dubte, la falta d'exactitud en els valors obtinguts en comparació amb valors experimentals, però també entre valors obtinguts amb diversos programes (i, per tant, diversos algoritmes). Tot seguit es proporcionarà una breu ressenya d'alguns mètodes de càlcul de $\log P_{o/w}$.

1.3.1.1. Mètodes basats en subestructures

Un primer grup de mètodes per calcular el $\log P_{o/w}$ està basat en la divisió de les estructures en diverses parts, ja sigui en fragments o en àtoms. En el primer cas, el $\log P_{o/w}$ es calcula d'acord amb la següent expressió, aplicant factors de correcció per compensar les interaccions intramoleculares [16]:

$$\log P_{o/w} = \sum_{i=1}^n a_i f_i + \sum_{j=1}^m b_j F_j \quad (1.7)$$

on f_i representa la contribució de cada fragment i a_i la seva incidència, F_j la contribució del factor de correcció i b_j el seu pes.

Basant-se en l'equació (1.7), Albert J. Leo va desenvolupar el mètode de càlcul conegut com ClogP [12, 16-19]. Els valors corresponents als fragments a_i es van establir a partir de valors de $\log P_{o/w}$ de molècules senzilles i també a partir de mesures experimentals. Els factors de correcció es divideixen en dos tipus, per una banda els factors que contemplen els enllaços presents (lineals, cíclics o ramificats) i d'altra banda els factors d'interacció, com la proximitat en enllaços alifàtics, efectes electrònics a partir d'enllaços π o altres efectes *orto* com els enllaços d'hidrogen intramoleculars. El ClogP és un dels programes de càlcul més usats i acompanya als valors experimentals en la base de dades BioLoom [13].

Un altre mètode de càlcul molt habitual és el que proporciona ACD/Labs en el seu software, conegut com ACD/LogP. El seu algoritme està basat en les contribucions individuals d'àtoms, fragments i interaccions intramoleculars derivades d'una base de dades amb 18400 estructures amb valors experimentals de $\log P_{o/w}$. Aquesta base de *fragmental contributions* conté valors de més de 1200 grups funcionals, mentre que la base de dades de *intramolecular interaction contributions* conté increments per més de 2400 interaccions entre parells de grups funcionals [20].

Altres mètodes per calcular el $\log P_{o/w}$ estan basats en dividir les molècules en els seus components fonamentals, és a dir, els àtoms, calculant el $\log P_{o/w}$ a partir d'una relació que té la forma següent:

$$\log P_{o/w} = \sum_{i=1}^n n_i a_i \quad (1.8)$$

on a_i és la contribució del àtom i i n_i la seva freqüència. Ja que la partició d'un solut no és una propietat additiva, en aquestes aproximacions es classifiquen els àtoms d'un mateix element segons el seu entorn estructural a la molècula de manera que no hi ha ambigüitats, és a dir, a cada tipus d'àtom li correspon exactament un valor de a_i . El principal desavantatge d'aquest model rau en les interaccions a llarga distància dins de la molècula, que no es tenen en consideració.

1.3.1.2. Altres mètodes

Una gran quantitat de mètodes de càlcul de $\log P_{o/w}$ estan basats en l'ús de descriptors topològics. Aquests descriptors es deriven de representacions moleculars on s'han

eliminat els àtoms d'hidrogen. Les connexions entre àtoms poden ser descrites per diverses matrius que contenen informació com la distància o els àtoms adjacents. Els descriptors que s'obtenen operant aquestes matrius només depenen de la representació en 2D de la molècula. El principal avantatge d'aquests mètodes és la velocitat amb la que poden calcular valors de $\log P_{o/w}$ en relació amb altres aproximacions que necessiten de computadores potents, com els mètodes basats en càlculs *ab initio* o de dinàmica molecular. Dins d'aquest grup de mètodes esmentarem el programa ALOGPS [21, 22] disponible a la web [23].

En la literatura [24] es troba un estudi comparatiu entre diferents mètodes de càlcul de $\log P_{o/w}$ per un gran nombre de compostos d'interès farmacèutic. En primer lloc, es compara la resposta dels mètodes per predir el $\log P_{o/w}$ de 223 substàncies de les quals es tenen valors experimentals publicats. La precisió dels mètodes s'avalua mitjançant l'error mitjà (*root mean square error, RMSE*) i la diferència entre els valors calculats i els valors experimentals. A la Taula 1.2 s'indiquen aquests paràmetres pels mètodes esmentats en aquest capítol.

Taula 1.2. Comparació entre diferents mètodes de càlcul de $\log P_{o/w}$ per 223 substàncies [24].

Mètode	RMSE	% de molècules en l'interval d'error		
		<0.5	0.5-1	>1
ACD/logP	0.50	75	17	6
CLOGP	0.52	74	20	6
ALOGPS	0.53	71	23	6

Per aprofundir més es va ampliar l'estudi amb el conjunt de fàrmacs de *Pfizer*, que conté 95809 substàncies. Els resultats s'indiquen a la Taula 1.3.

Taula 1.3. Comparació entre tres mètodes de càlcul per a la col·lecció de fàrmacs de *Pfizer*, que comprèn 95809 substàncies [24].

Mètode	RMSE	% de molècules en l'interval d'error		
		<0.5	0.5-1	>1
ACD/logP	1.28	35	27	38
CLOGP	1.23	37	28	35
ALOGPS	1.02	48	29	24

Un anàlisi més detallat d'aquests resultats mostra que la precisió de la predicció de valors de $\log P_{o/w}$ disminueix a mesura que creix la grandària de les molècules. S'ha comprovat que hi ha una relació clara entre l'error en la predicció i el número d'àtoms de la molècula excloent els hidrògens (*NHA, non hydrogen atoms*) [25], com es mostra a la Figura 1.6:

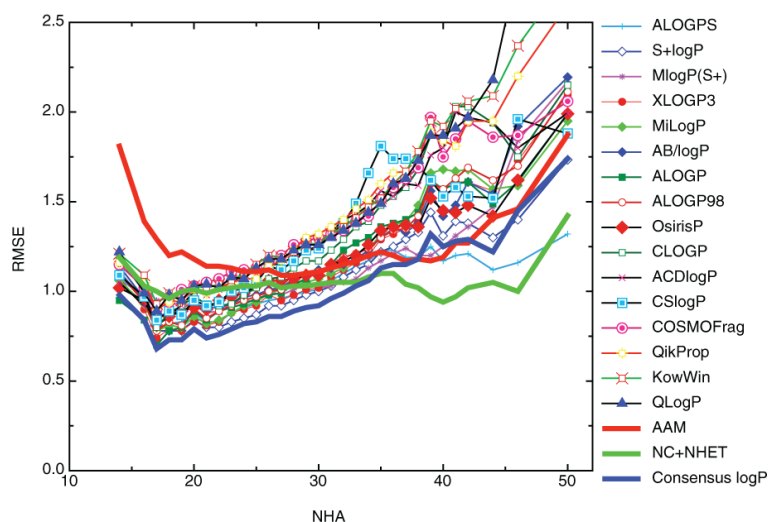


Figura 1.6. Avaluació de la precisió de diferents mètodes de càlcul de log P_{ow} . RMSE és l'error mitjà i NHA el nombre d'àtoms de la molècula excloent els hidrògens [24].

Altres factors analitzats a l'hora d'avaluar la precisió dels mètodes són el nombre d'heteroàtoms (*NHET*) i el nombre d'enllaços amb lliure rotació (*NROT*). Els errors dels mètodes també creixen en funció d'ambdós paràmetres, però en menor grau que amb el descriptor *NHA*, és més, tant el *NHET* com el *NROT* estan molt correlacionats amb el *NHA*, és a dir, aquest és suficient per descriure la complexitat de les molècules.

En general, els inconvenients més comuns en aquests programes de càlcul són essencialment dos: en primer lloc, la disparitat de mètodes de càlcul, és a dir, l'existència d'aproximacions matemàtiques i algorismes que poden proporcionar valors de log P_{ow} molt diferents per a una mateixa molècula. En segon lloc, la majoria d'aquests mètodes han estat desenvolupats a partir de molècules de mida petita per predir log P_{ow} de molècules de mida similar, de manera que els errors en la predicció són més grans quan s'intenta calcular el log P_{ow} de substàncies més complexes, com són la majoria dels fàrmacs.

1.3.2. Mètode d'equilibratge de fases o *shake-flask*

El mètode d'equilibratge de fases és un procés similar a una extracció líquid-líquid, el procediment clàssic emprat en química orgànica per tal de separar un compost aprofitant la seva afinitat per a un solvent concret. Per mesurar els coeficients de partició, el solut es dissol en una de les dues fases i després, mitjançant agitació, es distribueix entre elles. Un cop s'han equilibrat les fases durant un temps determinat, es quantifica el solut en cadascuna d'elles, mitjançant diversos mètodes, com per exemple mesures espectrofotomètriques o cromatogràfiques.

Encara que a primera vista pugui semblar un mètode senzill i de fàcil aplicació, la obtenció de valors consistents implica controlar una gran quantitat de detalls experimentals. En primer lloc, les dues fases s'han de saturar entre elles, és a dir, l'1-octanol s'ha de saturar amb aigua (o tampó aquós) i l'aigua (o tampó aquós) s'ha de saturar amb 1-octanol. Com s'ha descrit a l'Apartat 1.2, l'1-octanol pot contenir fins a gairebé una fracció molar de 0.3 d'aigua, és a dir, que es comet un error significatiu si no es saturen les fases prèviament. En segon lloc, es requereix una elevada puresa dels solvents però també del solut, especialment si l'anàlisi final es realitza per espectrofotometria.

A l'hora de realitzar la quantificació, s'haurien d'analitzar les dues fases. Malgrat això, en procediments de rutina, la quantificació es realitza en una de les fases i el coeficient de partició es calcula a partir de la concentració inicial i de la relació de volums de les fases. Un dels desavantatges d'aquest procediment és que s'ha d'establir un mètode analític per a cadascun dels compostos que es vulguin analitzar. També s'ha de remarcar que tot el procés d'equilibratge i quantificació és llarg i tediós. Malgrat els desavantatges esmentats, el *shake-flask* segueix essent considerat el mètode de referència per determinar el $\log P_{o/w}$.

1.3.3. Mètode potenciomètric

La determinació del $\log P_{o/w}$ mitjançant mesures potenciomètriques ha anat guanyant importància, encara que només és aplicable a substàncies amb grups funcionals àcids o bàsics. El mètode es basa en el desplaçament de la corba de valoració de l'anàlit en una mescla 1-octanol/aigua i, per tant, de la constant d'ionització aparent (p_oK_a) respecte la corba de valoració i constant de ionització obtinguts en solució aquosa (pK_a).

Aquest desplaçament depèn de les característiques àcides o bàsiques de l'anàlit, de la seva pròpia lipofilitat i de la relació de volums r entre l'1-octanol/aigua que s'hagi considerat [15, 26-29].

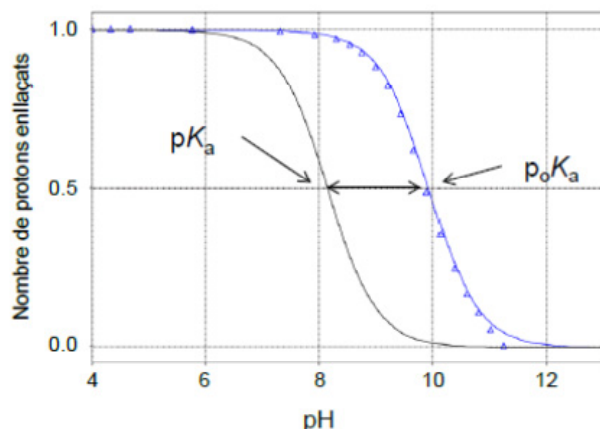


Figura 1.7. Determinació potenciomètrica del $\log P_{o/w}$ d'un àcid monopròtic a partir de les corbes de valoració en aigua (pK_a) i en 1-octanol/ aigua (p_oK_a). S'indica la diferència entre els dos valors de pK_a .

Un cop s'han obtingut ambdues corbes, s'aplica la següent equació:

$$|p_oK_a - pK_a| = \log\left[\frac{1 + rP_n}{1 + rP_i}\right] \quad (1.9)$$

P_n representa la partició de la forma neutra, P_i la de la forma iònica de l'anàlit i r la relació entre el volum de la fase orgànica i el de la fase aquosa. Com s'observa a la Figura 1.7, per a un àcid HA la constant d'ionització en la mescla 1-octanol/aigua es desplaça cap a valors de pH més alts, mentre que per a una base BH^+ es desplaça cap a valors de pH àcids.

Generalment s'assumeix que només s'extreu la forma neutra de l'anàlit (HA o B), però si és una substància força lipòfila, també es poden extreure les espècies iòniques (A^- o BH^+). Per a la obtenció del valor de $\log P_{o/w}$ de l'anàlit és suficient amb una valoració, però si es vol determinar la partició de les espècies iòniques, s'han de realitzar al manco dues valoracions a diferents relacions 1-octanol/aigua. En el cas de substàncies amfòteres, una sola valoració permet determinar la partició de la forma neutra i una de les formes iòniques, per tant, si es vol determinar la partició de l'altra forma iònica caldrà realitzar al manco una valoració amb una relació de volums r diferent.

Els principals avantatges de la determinació potenciomètrica són la seva robustesa i la major comoditat a l'hora de realitzar les mesures en comparació amb el *shake-flask*, especialment si es disposa d'un valorador automàtic amb el seu programari associat. La instrumentació d'última generació permet un grau elevat d'automatització, així com una disminució important en la quantitat de mostra necessària, de fet amb 1-2 mg de mostra és possible realitzar una determinació.

La principal limitació d'aquest mètode és precisament que només és aplicable a substàncies amb propietats àcid-base. L'interval de valors de $\log P_{o/w}$ que es pot mesurar està limitat pel desplaçament del pK_a , que per una banda ha de ser suficientment gran com per poder ser mesurat però per l'altra banda no ha de sortir dels límits de pH de la tècnica, és a dir, que el p_0K_a no ha de ser superior a 11.5 o inferior a 2.5. Una altra limitació és la necessitat de tenir mostres d'elevada puresa per evitar errors en la mesura.

Molt recentment s'ha desenvolupat un mètode alternatiu per determinar el $\log P_{o/w}$ basat en l'ús d'un sensor piezoelèctric acústic on hi ha una superfície amb cadenes alquíliques que permet emular la partició d'un compost en un medi amb 1-octanol i aigua [30]. Els resultats obtinguts són bons i la quantitat de mostra que es requereix mínima, amb l'inconvenient de que es necessita un sensor específic.

1.3.4. Mètodes cromatogràfics per a la determinació del $\log P_{o/w}$

La major part d'aquest treball es basa en la mesura de paràmetres de retenció en cromatografia de líquids d'alta eficàcia, també coneguda com HPLC. Per tant, és necessari fer una breu introducció d'aquesta tècnica analítica de gran rellevància i considerar també alguns aspectes associats, com el treball amb anàlits de característiques àcides o bàsiques i, per tant, amb fases mòbils tamponades.

1.3.4.1. Cromatografia de líquids

La cromatografia és una tècnica de separació fonamentada en la distribució d'un anàlit entre una fase mòbil i una fase estacionària de diferent polaritat. La distribució depèn de la naturalesa dels anàlits, que regeix les interaccions amb cadascuna de les fases. La tècnica s'anomena cromatografia de líquids quan la fase mòbil és un líquid. Aquesta fase mòbil, en la que s'introdueix la mescla d'anàlits, es fa passar a través de la columna reblerta amb fase estacionària. Els anàlits que presenten una interacció més forta amb la fase estacionària es mouen més lentament a través de la columna, mentre que els tenen una interacció més feble s'eluiran més ràpidament. Com a conseqüència d'aquesta diferència en la interacció, principalment hidrofòbica, de cada anàlit amb la fase estacionària, és possible l'estimació de la polaritat de cada anàlit i també la separació dels diversos components de la mostra, permetent la seva anàlisi.

Si la composició de la fase mòbil, és a dir, la relació entre la fracció aquosa i de modificador orgànic, es manté constant durant el procés de separació, es treballa en mode isocràtic, mentre que si la composició de la fase mòbil varia de forma preestablerta, es parla d'elució és en gradient.

1.3.4.1.1. Retenció en cromatografia de líquids

El factor de retenció d'un solut k es defineix com la seva quantitat en la fase estacionària (s) dividida entre la quantitat en la fase mòbil (m). Aquestes quantitats s'obtenen a partir del producte de les concentracions de solut en cadascuna de les fases (C_s i C_m) pels volums de les fases (V_s i V_m) d'acord amb l'equació (1.10):

$$k = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = \frac{C_s / C_m}{V_m / V_s} \quad (1.10)$$

En la pràctica, el factor de retenció es calcula a partir del temps de retenció t_R , que és el temps que tarda un anàlit en eluir-se des de la injecció en el sistema cromatogràfic fins a l'aparició del màxim del pic en el cromatograma [31], i el temps mort t_0 , corresponent a una substància no retinguda:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1.11)$$

La determinació del temps mort de la columna no és una qüestió trivial. S'han proposat diverses metodologies, de les que se'n deriven resultats significativament diferents encara que això no signifiqui necessàriament que siguin erronis. Els mètodes més habituals són la injecció d'un marcador no retingut neutral, de sals orgàniques o inorgàniques, la mesura de la primera pertorbació del cromatograma o la injecció d'una sèrie de compostos homòlegs [32]. La principal dificultat en la determinació del temps mort d'un sistema cromatogràfic està en la variabilitat dels valors obtinguts, que depenen de la metodologia escollida per mesurar-lo però també de les condicions experimentals de la mesura, és a dir, de la naturalesa i composició de la fase mòbil així com del treball amb fases mòbils tamponades.

1.3.4.1.2. Fases mòbils tamponades

L'ús de fases mòbils tamponades en HPLC és molt habitual en la separació d'anàlits amb propietats àcid-base. D'altra banda, algunes aplicacions requereixen la mesura del factor de retenció de la forma neutra d'anàlits ionitzables, de manera que s'ha d'assegurar que aquest està totalment en la seva forma neutra mitjançant l'ús de fases mòbils tamponades.

La retenció (k) d'un àcid monopròtic HA en funció del pK_a de l'anàlit i del pH de la fase mòbil segueix la següent relació (1.12):

$$k = \frac{k_{HA} + k_A \cdot 10^{pH - pK_a}}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (1.12)$$

En aquesta relació, k_{HA} i k_A són els factors de retenció de la forma neutra i de la forma ionitzada, respectivament. Aquesta equació defineix una gràfica de forma sigmoïdal com la indicada a la Figura 1.8.

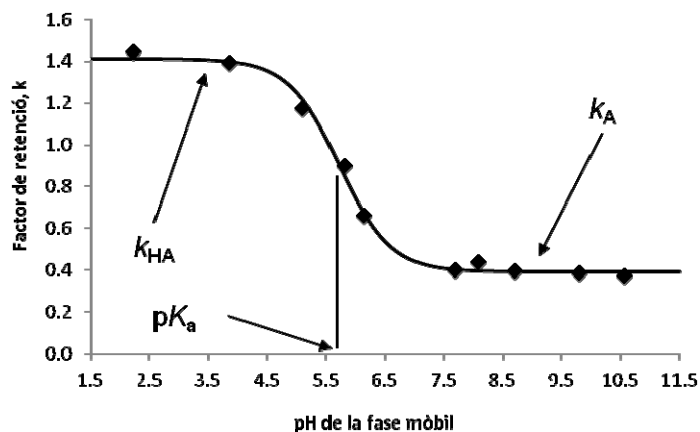


Figura 1.8. Variació del factor de retenció d'un àcid monopròtic HA en funció del pH de la fase mòbil. S'indiquen els factors de retenció de la forma neutra i ionitzada de l'anàlit (k_{HA} i k_A) i el pK_a del mateix.

Quan s'afegeix el modificador orgànic a un tampó aquós per preparar la fase mòbil, es produeix un canvi en el pK_a de agent tamponant i en la constant d'autoprotòlisi del sol·vent, que defineix l'amplitud de l'escala de pH [33]. Per tant, hi ha una variació del pH de la fase mòbil en relació al pH del tampó aquós en absència de modificador orgànic. A més a més, el pK_a de l'anàlit també canvia. Aquestes variacions afecten el grau d'ionització dels anàlits amb propietats àcid-base i poden produir canvis significatius en la retenció cromatogràfica i la selectivitat. El signe i magnitud de la variació del pH amb l'addició de modificador orgànic no només depèn de la fracció del mateix en la fase mòbil, del pH i concentració del tampó, sinó també de la naturalesa de l'agent tamponant [34].

El pH de la fase mòbil creix amb l'addició de modificador orgànic per tampons neutres o aniònics però disminueix, en menor grau, per tampons de naturalesa catiònica. El mateix comportament s'observa amb el pK_a dels anàlits. El pK_a augmenta per àcids carboxílics i fenols amb l'addició de modificador orgànic, mentre que disminueix per amines i heterocicles nitrogenats.

La mesura del pH en cromatografia de líquids requereix el coneixement d'alguns aspectes essencials per tal d'obtenir mesures acurades. El procediment per a la preparació de fases mòbils tamponades i la mesura del seu pH [34] implica la definició de les escales de pH en solució aquosa i en solvents orgànics i hidroorgànics, que es descriu a continuació.

Atès que el pH es defineix com el logaritme de l'activitat del protó, depèn de l'estat estàndard de l'activitat, que representa les condicions en què el coeficient d'activitat de l'ió hidrogen és igual a la unitat. En aigua, l'estat estàndard de l'activitat de l'ió hidrogen és el de dilució infinita. Però quan considerem un solvent diferent a l'aigua, com per exemple una mescla hidroorgànica usada com a fase mòbil, es poden escollir dos estats estàndard diferents: dilució infinita de l'ió hidrogen en la pròpia mescla hidroorgànica o bé, dilució infinita de l'ió hidrogen en aigua. L'elecció d'un o altre estat estàndard defineix dues escales diferents, una relativa a cada solvent concret (^spH) i una altra relativa a l'aigua (^wpH). En el cas de l'aigua, l'escala ^spH s'expressa com ^wpH . Aquesta és la notació recomanada per la IUPAC [35, 36], d'acord amb la qual el superíndex a l'esquerra indica el solvent (w, aigua o s, solvent orgànic o hidroorgànic) en el que es mesura el pH, i el subíndex a l'esquerra es refereix al solvent en el qual el coeficient d'activitat a dilució infinita és igual a la unitat (w o s). Així doncs, l'escala ^spH és diferent per a cada solvent i composició, ja que presenta un estat estàndard diferent, de manera que només es poden comparar les acideses en un mateix solvent en particular. D'altra banda, l'escala ^wpH sí que permet comparar l'acidesa d'una solució en diferents solvents, ja que l'estat estàndard (aigua a dilució infinita) és el mateix en tots els casos.

És possible relacionar ambdues escales a partir del coeficient d'activitat de transferència del protó ($^s\gamma_{\text{H}}^0$) que rep el nom d'efecte primari del medi i que està relacionat amb el canvi d'energia lliure derivat de la transferència d'ions a dilució infinita des de l'aigua fins a un solvent s, també a dilució infinita. La relació entre les escales és la següent (1.13):

$$^w\text{pH} = ^s\text{pH} - \log ^s\gamma_{\text{H}}^0 \quad (1.13)$$

Ara bé, aquestes definicions teòriques presenten les seves limitacions ja que el coeficient d'activitat d'un únic ió és immesurable. Per tant, és necessari definir les corresponents escales operacionals del pH.

La mesura del pH es fa mitjançant la potenciometria. Normalment s'utilitza un elèctrode combinat de vidre, que està format per un bulb de parets primes d'un vidre espe-

cial a dins del qual es troba un elèctrode de referència intern. Per a la mesura del pH en solució aquosa, l'elèctrode es calibra emprant dues o tres solucions estàndard de pH conegut (normalment, de pH 4, 7 i/o 9). Aquest calibratge també s'aplica a solvents orgànics i hidroorgànics, quan cal emprar l'escala ${}^s\text{pH}$. En el cas d'utilitzar l'escala ${}^s\text{pH}$ s'han d'utilitzar solucions estàndard de pH exactament conegut preparades en un solvent amb la mateixa composició que la solució problema.

La relació entre les escales ${}^s\text{pH}$ i ${}^w\text{pH}$ s'expressa mitjançant el terme δ , que a més a més de l'efecte del medi ${}^w\gamma_{\text{H}}^0$, considera la diferència en el potencial d'unió líquida entre les solucions en un solvent orgànic o hidroorgànic i els estàndards en aigua. Conèixer el valor de δ representa un important avantatge ja que permet, d'una banda, calibrar l'elèctrode amb solucions estàndard aquoses, i d'altra banda, transferir els valors mesurats de l'escala ${}^w\text{pH}$ a l'escala ${}^s\text{pH}$, que és el valor que es relaciona directament amb la constant termodinàmica de dissociació d'anàlits ionitzables.

$$\delta = {}^s\text{pH} - {}^w\text{pH} \quad (1.14)$$

Es disposa d'equacions que relacionen δ i la fracció de modificador orgànic a la solució, per acetonitril i metanol, de manera que es pot calcular el paràmetre a partir de la fracció de modificador orgànic per poder transformar els valors de ${}^w\text{pH}$ en ${}^s\text{pH}$ [34].

1.3.4.2. Mètodes cromatogràfics per a la determinació del $\log P_{o/w}$

Els mètodes cromatogràfics per a la determinació del $\log P_{o/w}$ estan fonamentats en la relació entre la lipofilicitat d'una substància i la seva retenció en cromatografia de líquids en fase invertida. El temps de retenció d'un solut és característic del solut i és l'indicador principal d'un procés de partició. Així mateix, les impureses no afecten a la mesura ja que són separades del component principal. En aquest apartat també s'esmentaran altres mètodes com la cromatografia en contracorrent o els derivats de les tècniques electroforètiques.

1.3.4.2.1. Mètodes cromatogràfics basats en l'elució isocràtica

El factor de retenció k i el seu logaritme $\log k$ són paràmetres que defineixen una escala de lipofilicitat pròpia de cada sistema cromatogràfic, encara que no s'utilitzen com a tals, ja que hi ha tantes escales de lipofilicitat com sistemes cromatogràfics. En canvi, els factors de retenció extrapolats a aigua pura o $\log k_w$ són considerats uns ín-

dex de lipofilitat més representatius, ja que els seus valors són del mateix ordre de magnitud que el log $P_{o/w}$ i poden ser comparables entre sistemes cromatogràfics.

Els valors de log k_w s'obtenen a partir de l'extrapolació de les relacions lineals entre el logaritme del factor de retenció log k i la fracció de modificador orgànic a la fase mòbil, φ , d'acord amb l'equació (1.15) [37-39]:

$$\log k = -S\varphi + \log k_w \quad (1.15)$$

on log k_w és l'ordenada en l'origen de la correlació i S el pendent. Per establir aquesta correlació, cal fer mesures a diferents composicions de fase mòbil per a cada compost, i això provoca que el procés sigui lent i tediós. Aquesta relació no és lineal en tot l'interval de fraccions de modificador orgànic, ja que s'observen desviacions quan es treballa amb fases mòbils amb alt contingut de modificador orgànic o d'aigua, és a dir, es poden obtenir diferents valors de log k_w pel mateix solut, columna i instrument si es canvia de tipus o composició de modificador orgànic a la fase mòbil. Malgrat això, s'obtenen bones correlacions lineals en l'interval de valors de log k entre -0.5 i 1.5 , de manera que es pot minimitzar l'error en l'extrapolació. Un cop determinat el log k_w , es pot correlacionar amb el log $P_{o/w}$ d'acord amb la següent relació (1.16):

$$\log P_{o/w} = a \log k_w + b \quad (1.16)$$

Aquestes equacions s'estableixen a partir de compostos amb valors de log $P_{o/w}$ conegut i poden ser utilitzades com a equacions de calibratge per determinar el log $P_{o/w}$ d'altres compostos. El procediment funciona bé per congèneres, però no tant quan es consideren substàncies d'estructura diversa. Així doncs, la principal limitació d'aquesta metodologia és l'extrapolació per obtenir el valor del log k_w , que està condicionada per la dificultat d'optimitzar les condicions experimentals de la mesura.

L'anàlisi del sistema 1-octanol/aigua mitjançant relacions lineals d'energia de solvatació o *LSE*R demostra, tal com es veurà més endavant, que el log $P_{o/w}$ és independent de la capacitat de donació d'enllaç d'hidrogen del solut, mentre que la retenció en cromatografia de líquids sí que en depèn [40]. Per tant, una bona estratègia per poder transferir mesures entre els dos sistemes ha d'aconseguir que la partició del solut en cromatografia de líquids simuli el millor possible la partició en 1-octanol/aigua [41]. L'addició de 1-octanol a la fase mòbil al mesurar el log k_w és un procediment habitual per millorar les correlacions que segueixen l'equació (1.16) [41-50].

En alguns casos, aquest procediment permet obtenir correlacions entre el log k_w i el log $P_{o/w}$ on el pendent de la correlació és gairebé la unitat i la ordenada en l'origen és

zero, és a dir, es pot assimilar que ambdós processos són homoenergètics [41]. Malgrat això, quan la complexitat estructural dels anàlits és gran o bé estan parcial o totalment ionitzats, les correlacions es desvien d'aquest comportament i per tant, s'han d'emprar com a equacions de calibratge i no com una mesura directa del $\log P_{o/w}$ [50].

1.3.4.2.2. Mètodes cromatogràfics basats en l'elució en gradient

L'elució utilitzant un gradient predeterminat permet evitar la dificultat en l'elecció d'una fase mòbil isocràtica òptima per a tots els compostos que es vulguin analitzar i separar substàncies amb diferents lipofilicitats en un temps curt. L'elució en gradient també ha estat utilitzada per a la determinació del paràmetre $\log k_w$, proporcionant resultats molt similars als valors obtinguts treballant en mode isocràtic [51-54].

A partir de l'equació (1.15) es pot definir el paràmetre φ_0 , que correspon a la fracció de modificador orgànic que produeix una distribució equimolar del solut entre la fase mòbil i la fase estacionària, és a dir, un $\log k$ igual a zero. Aquest paràmetre s'obté d'acord amb la següent equació:

$$\varphi_0 = -\log k_w / S \quad (1.17)$$

φ_0 ha servit de base per definir una escala de lipofilicitat alternativa al $\log P_{o/w}$ i al $\log k_w$, el *chromatographic hydrophobicity index* o CHI [55]. Aquest paràmetre està fonamentat en la mesura del temps de retenció de qualsevol solut en un gradient determinat i el posterior càlcul del paràmetre CHI, com es veurà a continuació.

En l'elució en gradient, el paràmetre S (equacions 1.15 i 1.17) es manté gairebé constant i per tant, té una influència negligible en el temps de retenció. Durant l'elució, qualsevol punt del gradient és equivalent a una composició de fase mòbil, que pot ser determinada coneixent el temps mort i el temps de residència del sistema cromatogràfic. Així doncs, és possible conèixer la composició de fase mòbil en la qual el compost s'elueix de la columna. Per tant, el paràmetre φ_0 es pot relacionar linealment amb el temps de retenció del solut en el gradient (t_G):

$$\varphi_0 = a t_G + b \quad (1.18)$$

Les constants a i b s'utilitzen per definir l'escala del *chromatographic hydrophobicity index* o CHI, que s'expressa en la mateixa escala que φ_0 i, per tant, es pot definir com la fracció de modificador orgànic necessària per tal que el compost es distribueixi de forma equivalent entre la fase mòbil i la fase estacionària. D'acord amb això, es defineix l'equació (1.19):

$$CHI = A t_G + B \quad (1.19)$$

Per tal de fer que la determinació del CHI sigui ràpida, s'ha proposat una col·lecció de 10 substàncies amb un valor de CHI tabulat per calibrar el sistema cromatogràfic utilitzat, és a dir, determinar les constants A i B de l'equació (1.19). Un cop fet això, el valor de CHI de qualsevol compost es calcula interpolant el temps de retenció del compost t_G en l'equació (1.19). S'han proposat diferents escales de CHI, en funció del modificador orgànic (acetonitril, metanol) i de la fase estacionària (C_{18} , IAM, polimèrica) ja que presenten diferents interaccions que determinen el procés de partició [56].

Ara bé, com per a la majoria de paràmetres de lipofilitat, el valor de CHI de substàncies ionitzables depèn del pH del medi. Atès que la gran majoria de substàncies d'interès farmacèutic formen part d'aquest grup, el valor de CHI s'ha de definir en funció del pH. La següent expressió, equivalent a l'equació (1.12), relaciona la CHI d'un àcid monopròtic HA amb el seu pK_a i el pH del medi:

$$CHI = \frac{CHI_{HA} \cdot 10^{s(pK_a - pH)} + CHI_A}{10^{s(pK_a - pH)} + 1} \quad (1.20)$$

CHI_{HA} correspon a la forma neutra, CHI_A a la forma ionitzada i s és un paràmetre empíric que està relacionat amb la diferent variació del pK_a i del pH en funció de la retenció de l'anàlit [57]. L'estudi de la variació de CHI amb el pH és complexa ja que, d'una banda, en un gradient de modificador orgànic utilitzant una fase aquosa tamponada el pH de la fase mòbil i el pK_a dels anàlits varia contínuament, i d'altra banda, la retenció de substàncies en la seva forma iònica pot ser difícil de mesurar [58, 59].

Una altra metodologia per a la determinació de la hidrofobicitat basada en l'elució en gradient és la proposada per Donovan i Pescatore [60], mitjançant l'ús de columnes amb fase estacionària C_{18} enllaçada a un suport de polivinilalcohol (ODP) que són estables en un ampli interval de valors de pH de treball. El mètode proposa el calibratge amb dos patrons de $\log P_{o/w}$ conegut, tot determinant el seu temps de retenció en un gradient ràpid utilitzant metanol com a modificador orgànic. Després es construeix una equació de calibratge i els valors de $\log P_{o/w}$ de qualsevol anàlit es determinen per comparació amb els patrons.

1.3.4.2.3. *Altres mètodes cromatogràfics*

En aquest apartat s'esmentaran mètodes basats en altres tècniques de separació que també s'han emprat per a la determinació del $\log P_{o/w}$ de substàncies orgàniques, incloent-hi en alguns casos substàncies d'interès farmacèutic.

La cromatografia de líquids amb fases mòbils micel·lars s'ha utilitzat per determinar el $\log P_{o/w}$ de fàrmacs, emprant diversos tensioactius no iònics tals com el dodecilsulfat de sodi (SDS) o el Brij35. L'ús d'aquests additius permet millorar les correlacions entre els paràmetres de retenció i el $\log P_{o/w}$ de la substància [61, 62].

La cromatografia en contracorrent (CCC) és una tècnica usada per mesurar la raó de partició d'un solut entre dues fases immiscibles, on la fase mòbil i la fase estacionària són precisament dos líquids immiscibles. En el cas de mesurar el $\log P_{o/w}$, els líquids immiscibles són l'aigua i l'1-octanol [63]. El procediment experimental té una certa dificultat i requereix una instrumentació específica. El $\log P_{o/w}$ es calcula a partir del volum de retenció de l'anàlit i del volum mort del sistema [64-66]. Els avantatges que proporciona aquesta tècnica són la possibilitat d'automatització, la insensibilitat a les impureses així com el fet de poder treballar al pH desitjat sense haver de tenir en compte la influència del modificador orgànic ja que es treballa amb tampó aquós, és a dir, es pot determinar directament el $\log P_{o/w}$ o el $\log D_{pH}$ de l'anàlit.

Una altra grup de mètodes per determinar el $\log P_{o/w}$ està format pels procediments basats en les tècniques derivades de l'electroforesi capil·lar (CE) [67]. Aquestes tècniques estan fonamentades en la separació dels anàlits mitjançant l'aplicació d'un potencial elèctric que els separa en funció de la seva mobilitat electroforètica. La cromatografia electrocinètica micel·lar (MECK) [68] es diferencia de la electroforesi capil·lar convencional en què s'introdueixen micel·les en la solució problema, de manera que els anàlits es separen en funció de la seva interacció amb les micel·les. Aquesta tècnica ha estat utilitzada per determinar el $\log P_{o/w}$ de substàncies orgàniques mitjançant l'establiment d'una equació de calibratge equivalent a l'equació (1.16). Herbert i Dorsey [69] van demostrar el potencial de la MECK com a tècnica útil en la determinació de la lipofilitat de compostos orgànics, malgrat que s'ha indicat que els valors obtinguts amb aquesta tècnica mostren una dependència significativa respecte la naturalesa dels anàlits, és a dir, funciona bé per substàncies de la mateixa família química o congèneres però perd aplicabilitat si els compostos no tenen relació estructural [70].

A diferència de la cromatografia electrocinètica micel·lar o MECK, la cromatografia electrocinètica de microemulsió o MEECK es basa en l'ús de microemulsions en lloc de micel·les. La solució de separació conté una fase orgànica, per exemple un hidrocarbur lineal com l'hexà, heptà o octà, un surfactant com el dodecilsulfat de sodi (SDS) i un co-surfactant, com l'1-butanol, i la retenció dels anàlits depèn de la seva interacció amb les gotetes que forma la fase orgànica, que tenen una grandària de l'ordre dels nanòmetres [71]. La determinació del $\log P_{o/w}$ es duu a terme de manera equivalent als

mètodes basats en MECK, és a dir, s'estableix una equació de calibratge amb una sèrie de patrons i després es determina el $\log P_{o/w}$ de qualsevol substància per interpolació [71-75]. La tècnica té una bona aplicabilitat en la determinació del $\log P_{o/w}$ i en alguns casos ha substituït a la cromatografia de líquids.

1.4. MÈTODE CROMATOGRÀFIC PROPOSAT PER DETERMINAR EL $\log P_{o/w}$

En aquest apartat s'introduiran els models utilitzats en el desenvolupament d'aquesta Tesi Doctoral. Per començar, s'explicarà el model cromatogràfic que s'ha utilitzat per descriure la retenció cromatogràfica. Després, s'introduiran de manera genèrica els models de relacions quantitatives estructura-propietat (QSPR), ja que la metodologia proposada en aquest treball està basada en un model d'aquest tipus i, finalment, s'exposarà el model QSPR considerat.

1.4.1. Model de polaritat

La predicció i descripció de la retenció en cromatografia de líquids d'alta eficàcia ha estat un camp que ha concentrat força interès per part de molts investigadors. En alguns casos aquesta modelització de la retenció en HPLC està basada en l'ús de paràmetres solvatocròmics, que van ser establerts per avaluar propietats dels solvents tals com la seva polaritat o la capacitat d'accepció o donació per pont d'hidrogen. Aquests paràmetres solvatocròmics s'obtenen a partir dels desplaçaments de l'espectre d'absorció ultraviolat-visible d'un o diversos indicadors al canviar la naturalesa i composició del solvent per comparació amb un espectre obtingut en un solvent de referència.

1.4.1.1. Fonament teòric

El model de polaritat descrit en aquesta secció és un model establert mitjançant l'ús d'un paràmetre solvatocròmic que respon a l'ús de la betaïna de Dimroth-Reichardt com a indicador de la polaritat del solut, la E_T (30) [76]. La correlació entre la retenció

cromatogràfica, expressada com a $\log k$, i el paràmetre E_T (30) mostrarà un comportament més lineal que la correlació directa amb la fracció de modificador orgànic a la fase mòbil. A partir d'aquestes relacions amb el paràmetre E_T (30) es va desenvolupar un model de polaritat que pren la forma de les relacions lineals d'energia de solvatació (LFERs) [77]:

$$\log k = (\log k)_0 + p(E_{Tm}^N - E_{Ts}^N) \quad (1.21)$$

D'acord amb aquesta equació, una propietat relacionada amb l'energia lliure ($\log k$) és pot calcular com la suma d'una constant $(\log k)_0$ i diferents termes d'interacció solut-solvent, que poden ser descrits com el producte entre un paràmetre de polaritat del solut (p), i un paràmetre que expressa la diferència entre la polaritat del solvent, que en aquest cas és la fase mòbil, (E_{Tm}^N) i la de la fase estacionària (E_{Ts}^N), ja que el $\log k$ està relacionat amb la distribució entre les dues fases cromatogràfiques. Tal com indica el superíndex, els paràmetres E_{Tm}^N i E_{Ts}^N estan normalitzats.

Ara bé, l'ús d'aquest model de polaritat està limitat per l'interval de composició de fase mòbil en el qual és vàlid, ja que les relacions que segueixen l'equació (1.21) només són lineals en l'interval de composició de fase mòbil 20-100% de metanol i 0-80% d'acetonitril, degut a que el paràmetre E_T (30) (i, per tant, E_{Tm}^N) presenta solvatació preferencial en solvents binaris, de manera que no descriu tan bé les seves propietats com les dels solvents purs.

Així doncs, es va desenvolupar un model derivat de l'anterior amb la mateixa estructura que l'equació (1.21) però aplicable en tot l'interval de composicions de fase mòbil per acetonitril i metanol [78]:

$$\log k = (\log k)_0 + p(P_m^N - P_s^N) \quad (1.22)$$

on p és la polaritat del solut, encara que té una certa dependència respecte del sistema cromatogràfic on ha estat determinada, i es defineixen els nous paràmetres P_m^N i P_s^N , corresponents a les polaritats de la fase mòbil i de la fase estacionària, respectivament. En aquest cas, la normalització dels paràmetres P_m^N i P_s^N es fa assignant el valor zero a la polaritat de la fase estacionària, mentre que s'assigna la unitat a l'aigua ja que és el solvent més polar. Els valors de la polaritat de la fase mòbil es poden calcular fàcilment a partir de les següents expressions,

$$P_m^N = 1.00 - \frac{2.13\varphi}{1+1.42\varphi} \quad (1.23)$$

per fases mòbils acetonitril-aigua i

$$P_m^N = 1.00 - \frac{1.33\varphi}{1+0.47\varphi} \quad (1.24)$$

per metanol-aigua. El paràmetre $(\log k)_0$ és el terme independent de la correlació i representa la retenció d'un solut en un hipotètic sistema cromatogràfic on la fase mòbil tingués la mateixa polaritat que la fase estacionària. $(\log k)_0$ i P_s^N són els dos paràmetres que caracteritzen un sistema cromatogràfic, ja que només depenen de la parella columna-modificador orgànic considerada. Per tant, la caracterització d'un sistema cromatogràfic consisteix en la determinació d'aquests dos paràmetres.

El procediment de caracterització d'un sistema cromatogràfic està convenientment descrit a la bibliografia [79]. Es proposa una col·lecció de 12 compostos que cobreixen un ampli interval de valors de polaritat del solut p , distribuïts homogèniament i amb diversos grups funcionals. Aquestes substàncies s'injecten en el sistema cromatogràfic a caracteritzar a diferents fraccions de modificador orgànic, entre un 20 i un 80% en increments d'un 10%. Es determinen els valors de $\log k$ i a continuació s'aplica la següent equació:

$$\log k = q + pP_m^N \quad (1.25)$$

derivada de l'equació (1.22) si s'admet la següent relació:

$$q = (\log k)_0 + pP_s^N \quad (1.26)$$

Per a cada solut es determinen els seus paràmetres p i q . Després, es representen els valors de p envers els de q per a les 12 substàncies del conjunt de caracterització i es determinen els valors de $(\log k)_0$ i P_s^N per regressió lineal de l'equació (1.26), i després es refinen juntament amb els valors de p de cada solut. Es calculen els valors de $\log k$ mitjançant l'equació (1.22) i es comparen amb els valors experimentals, optimitzant simultàniament la p dels 12 compostos, el $(\log k)_0$ i P_s^N de manera que la suma dels quadrats dels residuals sigui mínima. Un cop s'ha arribat al mínim, es prenen els valors de p dels 12 soluts, $(\log k)_0$ i P_s^N com a òptims [79].

La polaritat d'un solut p depèn del sistema cromatogràfic, però es pot transferir fàcilment entre sistemes cromatogràfics mitjançant correlacions com la següent:

$$p_{\text{sistema},1} = a \cdot p_{\text{sistema},2} + b \quad (1.27)$$

Les constants a i b es determinen a partir de la correlació entre els valors de p de les 12 substàncies de caracterització en els dos sistemes cromatogràfics. Per establir

l'equació (1.22), es va usar una columna Spherisorb ODS-2 i acetonitril com a modificador orgànic, de manera que aquest sistema és considerat com el de referència.

1.4.1.2. Aplicacions

L'aplicació inicial del model de polaritat va ser la de proporcionar una eina per poder predir temps de retenció de qualsevol substància a partir d'un sol paràmetre de polaritat del solut i de la composició de la fase mòbil en un sistema cromatogràfic prèviament caracteritzat (Eq. (1.22)) [78]. A la literatura es troben models de predicció de la retenció a partir de dos i tres paràmetres [80], davant els quals el model de polaritat d'un paràmetre presenta l'avantatge de la seva simplicitat amb bons resultats, tant en isocràtic com en gradient [79, 81-85].

D'altra banda, el model de polaritat ha estat utilitzat per caracteritzar diversos sistemes cromatogràfics [82], i la polaritat del solut ha estat analitzada en termes de l'equació de solvatació d'Abraham [83, 86]. Finalment, i aquest és l'aspecte que presenta major interès en aquest treball, es va establir un model de relació quantitativa d'estructura-propietat o QSPR, que es detallarà en la secció següent, per descriure la polaritat del solut p en funció del $\log P_{o/w}$ i de quatre descriptors moleculars [87], com es veurà a la secció 1.4.2.2.

1.4.2. Models QSAR

Els models de relacions quantitatives estructura-activitat, coneguts més pel seu acrònim anglès QSAR, són models basats en regressions multilineals que correlacionen l'activitat biològica d'un compost amb la seva estructura, descrita per una sèrie de descriptors moleculars que són les variables independents. Si en lloc de l'activitat biològica el que es vol predir és una propietat fisicoquímica, els models s'anomenen relacions quantitatives estructura-propietat o QSPR i si la variable dependent és la retenció cromatogràfica, relacions quantitatives estructura-retenció o QSRR.

Així doncs, aquests models permeten estimar una gran varietat de propietats de compostos tals com punts de fusió o ebullició, coeficients de partició o reactivitat de substàncies [88]. La informació estructural, que està continguda en les variables independents del model, està en forma de descriptors moleculars, que poden ser de dos

tipus: els que provenen de mesures experimentals, tals com el $\log P_{o/w}$ o el pK_a , o descriptors teòrics que es calculen mitjançant programari dissenyat a l'efecte. Aquests últims són el resultat d'un procediment matemàtic que transforma informació química provinent d'una representació química de la molècula en un nombre. El descriptor té, doncs, dues característiques fonamentals: d'una banda el valor numèric permet una bona interpretació de les propietats moleculars, i d'altra banda, pot ser utilitzat en un model establert per predir una propietat molecular d'interès en altres molècules [89]. Els models QSAR tenen una gran aplicació en alguns camps com l'avaluació de riscos de substàncies químiques, la predicció de la seva toxicitat així com el descobriment i desenvolupament de nous fàrmacs [90].

Un model QSAR ha de tenir les següents característiques per tal que la seva aplicabilitat i els seus resultats siguin correctes: ha de tenir un objectiu clar, l'algoritme/equació no ha de ser ambigu/a, ha de tenir un domini d'aplicabilitat ben definit i ha de proporcionar mesures de seva bondat, robustesa i predictibilitat [91].

Normalment, el model es genera dividint el total de substàncies en dos grups, anomenats *training set* i *test set*. El primer grup s'utilitza per establir el model i el segon grup per validar-lo, ja que s'ha d'assegurar la robustesa (validació interna del *training set*) i predictibilitat del model (validació externa amb el *test set*). La bondat del model s'avalua mitjançant el coeficient de correlació (R^2), la desviació estàndard (SD), la mitjana dels residuals entre els valors predits i els experimentals, així com el coeficient de correlació de la validació creuada (R_{cv}^2). Un model QSAR que compleixi amb aquests requeriments pot avaluar amb garanties l'activitat biològica o la propietat fisicoquímica desitjada [92].

1.4.2.1. Descriptors moleculars

A l'apartat anterior s'han descrit els descriptors moleculars com els portadors de la informació estructural de la molècula. Aquests descriptors contenen propietats tals com la grandària, les interaccions per enllaç d'hidrogen a la molècula i altres característiques estructurals. Els descriptors poden ser tan senzills com el nombre d'àtoms de la molècula o el nombre d'àtoms donadors o acceptors d'enllaç d'hidrogen, o bé més complexos com els descriptors quàntics, les càrregues parcials atòmiques o energies dels orbitals tals com HOMO o LUMO [93]. Es poden classificar genèricament en funció de la seva dimensionalitat, és a dir, com descriptors 1D, 2D i 3D. Els descriptors unidimensionals (1D) poden ser definits com aquells que no necessiten de la informa-

ció relativa a la connectivitat dels àtoms en la molècula per ser calculats. Alguns exemples són el nombre d'àtoms o el pes molecular. Altres descriptors macroscòpics com el $\log P_{o/w}$ també poden ser considerats com 1D, encara que es necessita la representació en 2D de la molècula si s'obtenen a partir de programes de càlcul. Els descriptors bidimensionals (2D) s'obtenen a partir de l'estructura en 2D de la molècula i també són coneguts com descriptors topològics, com per exemple, els índexs de connectivitat o el còmput de fragments de la molècula. Finalment, els descriptors 3D es deriven de la estructura tridimensional de la molècula, com per exemple, el volum molecular o l'àrea polar superficial.

1.4.2.1.1. *Descriptors fisicoquímics*

Aquí es poden agrupar els descriptors més senzills emprats per generar models QSAR. Per exemple, Lipinski [94] va proposar una senzilla regla coneguda com *rule of five* per avaluar si una molècula amb possible potencial com a fàrmac tindrà una bona absorció. Per fer-ho hauria de tenir menys de 5 grups donadors d'enllaç d'hidrogen (OH o NH), un pes molecular menor que 500 Da, un $\log P_{o/w}$ menor que 4.5 i menys de 10 grups acceptors d'enllaç d'hidrogen (O o N). Com es pot veure, en aquesta regla intuïtiva apareixen descriptors fisicoquímics tals com el pes molecular o el $\log P_{o/w}$. Cal assenyalar que la grandària de la molècula també es un descriptor físic rellevant en la predicció de les propietats *ADMET* de la molècula.

Les interaccions per enllaç d'hidrogen tenen una gran importància en l'avaluació de propietats *ADMET* de fàrmacs. Com es veurà més endavant, la donació per enllaç d'hidrogen esdevé bàsica quan es determinen els valors de $\log P_{o/w}$ a partir de mesures cromatogràfiques. Per tant, és d'interès comptar amb descriptors moleculars que avaluin correctament aquestes interaccions. Els que es deriven del model de solvatació proposat per M.H. Abraham seran descrits a continuació. Altres descriptors de l'enllaç d'hidrogen s'obtenen a partir de l'àrea polar superficial o de les càrregues parcials atòmiques.

1.4.2.1.2. *Descriptors d'Abraham*

Els descriptors d'Abraham estan basats en l'establiment de *relacions lineals de l'energia lliure de solvatació* o *Linear Solvation Energy Relationships*, normalment conegudes com *LSER*. En un sistema format per dos solvents relativament immiscibles, la partició d'un solut expressada, per exemple, amb el $\log P_{o/w}$ pot ser considerada proporcional a l'energia lliure de Gibbs molar de la seva transferència entre l'1-octanol i l'aigua:

$$-2.303RT \log P_{o/w} = \Delta G_{oct} - \Delta G_w = \Delta G_{o/w} = \Delta G_{o/w}^{el} + \Delta G_{o/w}^{nel} \quad (1.28)$$

on ΔG_{oct} i ΔG_w són les energies lliures de solvatació del solut en l'1-octanol i l'aigua, respectivament, i $\Delta G_{o/w}^{el}$, $\Delta G_{o/w}^{nel}$ corresponent als termes electrostàtics i no-polar, és a dir, descriuen les interaccions solut-solvent que corresponen a la formació d'una cavitat i la dispersió de van der Waals. Atès que el càlcul de les energies de Gibbs d'acord amb l'equació (1.28) és difícil, una solució aproximada consisteix en considerar els efectes físics que influeixen la partició d'una molècula entre les dues fases i deduir-ne una sèrie de paràmetres experimentals que determinin la partició. Aquest tipus d'aproximacions són les conegudes com *LSER*.

L'anàlisi del procés de partició d'una molècula mitjançant *LSER* permet expressar el seu $\log P_{o/w}$ com una combinació lineal de descriptors, proporcionant una solució empírica de l'equació (1.28) per a la partició 1-octanol/aigua. En aquesta relació *LSER* s'assumeix que el procés de solvatació implica, per una banda, la creació d'una cavitat en el solut (procés endotèrmic) i la incorporació del solut en aquesta cavitat, tot establint-se diferents interaccions solut-solvent. M. H. Abraham va proposar la següent correlació basada en cinc descriptors del solut [95, 96]:

$$\log SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1.29)$$

on SP és la propietat del solut a mesurar, E correspon a la refracció molar en excés, S expressa la dipolaritat-polaritzabilitat del solut, A i B l'acidesa i basicitat de l'enllaç d'hidrogen, respectivament, i V el volum de McGowan. Així mateix, els coeficients de l'equació son constants relacionades amb les característiques fisicoquímiques del sistema i representen les diferències en les propietats de solvatació entre les dues fases: e expressa la tendència del sistema per interaccionar amb el solut a través d'enllaços π i n , s és una mesura de la capacitat per participar en interaccions dipol-dipol o dipol-dipol induït, a i b representen l'acidesa i basicitat de l'enllaç d'hidrogen, respectivament, i v és una mesura de la facilitat per formar una cavitat per al solut.

L'avantatge d'aquest model està en que qualsevol sistema de partició, ja sigui biològic o fisicoquímic, pot ser expressat mitjançant l'equació (1.29). A més a més, els descriptors tenen un sentit físic perfectament conegut. D'altra banda, el model d'Abraham permet avaluar la similitud entre dos sistemes per comparació entre els coeficients de l'equació (1.29) [45-47, 97, 98].

Dels cinc descriptors que inclou aquesta correlació, V i E poden ser fàcilment calculats a partir de l'estructura molecular del compost, mentre que S , A i B s'han de determinar

a partir de mesures experimentals. Aquest és el principal desavantatge del model, ja que limita l'aplicabilitat del mateix per predir el log *SP* de nous compostos. Així doncs, s'han desenvolupat diverses aproximacions per obtenir els valors d'aquests descriptors a partir de les estructures dels compostos d'interès. Platts *et al.* [99] desenvoluparen un model per calcular els descriptors a partir de fragments, mentre que Jover *et al.* [100] proposaren expressar cadascun dels descriptors de l'equació (1.29) com una combinació lineal d'altres descriptors calculats a partir de l'estructura dels compostos.

1.4.2.1.3. Descriptors basats en camps d'interacció molecular (MIFs)

Aquests descriptors estan basats en el càlcul de l'energia d'interacció entre una partícula o molècula petita que actua com a *sonda* i un compost *problema*, del qual es volen calcular els descriptors, en una graella tridimensional que genera un camp d'interacció molecular o MIF, tal i com es pot veure en la Figura 1.9.

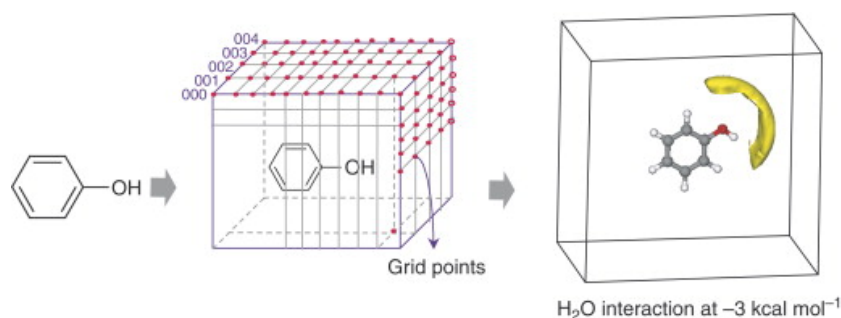


Figura 1.9. Representació esquemàtica del funcionament d'un camp d'interacció molecular (MIF) [93].

En funció del tipus de sonda que s'utilitzi, es poden determinar interaccions electrostàtiques, estèriques, d'enllaç d'hidrogen o hidrofòbiques. També es poden avaluar varies interaccions simultàniament, per exemple usant una molècula d'aigua com a sonda. D'aquesta manera, totes les interaccions d'aquesta sonda amb la molècula problema es concentren en una sola mesura. D'altra banda, els camps d'interacció molecular depenen de la orientació i conformació de la molècula estudiada, és a dir, el càlcul de descriptors mitjançant aquest procediment requereix un estudi conformacional. L'ús de descriptors derivats de camps d'interacció molecular en l'establiment de models QSAR requereix emprar eines d'anàlisi multivariant tals com l'anàlisi per components principals (PCA) o la regressió per mínims quadrats parcials (PLS) donada la gran quantitat de descriptors generats que poden estar intercorrelacionats. Dins d'aquesta tipus de descriptors, el programa VolSurf proporciona descriptors molecular basats en el camps d'interacció anomenats GRID, que treballen amb quatre sondes diferents: l'aigua (H₂O), la hidrofòbica (DRY), l'acceptor d'enllaç d'hidrogen (O) i el donador d'enllaç d'hidrogen (N1) [101, 102].

1.4.2.2. Descripció de la polaritat del solut (p) a partir d'un model QSPR

Una part molt significativa d'aquesta Tesi Doctoral està basada en el model QSPR que s'explicarà a continuació [87]. Fins ara s'han anat descrivint diferents aspectes que ajuden a comprendre aquesta aproximació, tals com el model de polaritat que descriu la retenció cromatogràfica, una visió general dels models de relacions quantitatives estructura-propietat i finalment una pinzellada sobre els descriptors moleculars.

El model QSPR seleccionat per a aquest treball es va establir per descriure la polaritat del solut, p , definida en la secció 1.4.1 d'aquesta introducció en funció de diversos descriptors moleculars. De fet es va establir una equació robusta que explica el valor de p com a combinació multiparamètrica del $\log P_{o/w}$ del solut i de quatre descriptors moleculars calculats a partir de l'estructura de cada substància.

Per generar el model es va partir de 233 substàncies de les quals es coneixien les dades de retenció. Després, les substàncies es van dividir en un *training set* per establir el model i fer la validació interna, i un *test set* per fer la validació externa. Es va concloure que cinc descriptors eren suficients ja que l'addició de més descriptors no millorava significativament el model. Aquests descriptors són el $\log P_{o/w}$, HDCA-2, HOMO-LUMO, pol/d^2 i DPSA-1. El model generat és el següent:

$$p_{reference} = 0.82 \log P_{o/w} - 1.55(\text{HDCA-2}) + 0.143(\text{HOMO-LUMO}) - 1.63(\text{pol}/d^2) + 1.04 \cdot 10^{-3}(\text{DPSA-1}) + 0.81 \quad (1.30)$$

Així doncs, la polaritat del solut en el sistema de referència, $p_{reference}$, es descriu a partir del $\log P_{o/w}$, d'un descriptor que està relacionat amb la donació d'enllaç d'hidrogen de la molècula, HDCA-2, d'un descriptor quàntic, HOMO-LUMO, i de dos descriptors electrostàtics, pol/d^2 i DPSA-1. El descriptor HDCA-2 pertany als descriptors anomenats com *charged partial surface area descriptors* o CPSA, que estan relacionats amb les possibles interaccions polars entre molècules. HDCA-2 descriu la capacitat de donació d'enllaç d'hidrogen de la molècula i es defineix com la càrrega superficial relativa de qualsevol donador per enllaç d'hidrogen a la molècula que tingui una càrrega parcial positiva. El descriptor quàntic HOMO-LUMO conté la diferència d'energia entre l'orbital molecular ocupat de més alta energia (HOMO) i l'orbital molecular buit de més baixa energia (LUMO). El primer descriptor electrostàtic, pol/d^2 , es calcula a partir de la diferència entre les càrregues parcials màxima i mínima de la molècula i es divideix entre el quadrat de la distància entre els àtoms que contenen aquestes càrregues. El segon descriptor electrostàtic, DPSA-1, també pertany als descriptors CPSA i representa la

diferència entre l'àrea superficial parcial positiva, PPSA-1, i negativa, PNSA-1, que es defineixen com la suma de les àrees superficials positiva o negativament carregades accessibles pel solvent en la molècula.

Aquests descriptors estan relacionats amb els paràmetres de l'equació d'Abraham descrits a la secció 1.4.2.1.2. Per exemple, l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen A mostra una bona correlació amb HDCA-2. El descriptor pol/d^2 està relacionat amb la polaritat de la molècula, mentre que el descriptor S descriu la polaritat/polaritzabilitat simultàniament, i posa de manifest la dificultat d'avaluar ambdues propietats separatament. El descriptor HOMO-LUMO descriu la polaritzabilitat de la molècula, doncs la distribució electrònica pot ser més fàcilment alterada si l'energia del LUMO és més propera a la de l'HOMO, generant una polaritzabilitat significativa. El descriptor E d'Abraham també està relacionat amb la polaritzabilitat ja que aquesta depèn de la refracció molar. Aquest fet, és a dir, que els descriptors involucrats en aquest model estiguin estretament relacionats amb els descriptors de l'equació de solvatació d'Abraham confirma les propietats del solut implicades en el valor del $\log P_{o/w}$ i la robustesa de l'equació (1.30).

Una reordenació de l'equació (1.30) permet expressar el $\log P_{o/w}$ en funció de la retenció cromatogràfica i dels quatre descriptors moleculars:

$$\log P_{o/w} = 1.22 p_{reference} + 1.89(\text{HDCA-2}) - 0.17(\text{HOMO-LUMO}) + \\ + 1.98(\text{pol}/d^2) + 1.27 \cdot 10^{-3}(\text{DPSA-1}) - 0.99 \quad (1.31)$$

Aquesta equació és el fonament de la metodologia proposada en aquest treball per tal de determinar el coeficient de partició 1-octanol/aigua de substàncies orgàniques en general i de fàrmacs en particular.

1.5. LIPOFILICITAT ANISOTRÒPICA: INTERACCIONS AMB LIPOSOMES

Com s'ha explicat a la primera secció d'aquesta Capítol, la lipofilitat d'una substància depèn del medi en el que es trobi. Si el sistema on es mesura està format per aigua i un solvent orgànic immiscible, com l'1-octanol, es parla de lipofilitat isotròpica, mentre que si el sistema conté liposomes, es parla de lipofilitat anisotròpica, ja que les càrregues estan parcialment localitzades a la superfície dels liposomes.

En general, les mesures de la lipofilitat isotròpica, expressada com el $\log P_{o/w}$ del fàrmac, permeten modelar les seves interaccions amb membranes si es tracta de compostos no ionitzables o estan en la seva forma neutra en els valors de pH d'interès. Si, en canvi, els fàrmacs estan ionitzats, per tal de modelar correctament les interaccions esmentades és necessari avaluar també la lipofilitat anisotròpica, ja que el sistema anisotròpic és el que proporciona la informació més rellevant en relació a la interacció de compostos ionitzats amb membranes biològiques on les càrregues estan parcialment localitzades [5, 6].

1.5.1. Liposomes

Els liposomes són vesícules esfèriques tancades formades a partir de bicapes corbades. Les bicapes estan compostes per molècules amfipròtiques tals com els fosfolípids, que en solució aquosa s'ordenen espontàniament formant agregats com ara membranes o liposomes. Els liposomes es poden preparar a partir de diversos fosfolípids encara que no tots ells són adients per formar liposomes estables. La fosfatidilcolina (PC) és el fosfolípid més utilitzat en la formació de liposomes [103]. A diferència d'altres molècules amfipròtiques tals com alguns surfactants que formen micelles, la fosfatidilcolina forma bicapes, ja que té una estructura en forma de tub a causa de la existència de dues cadenes alquíliques (Figura 1.10):

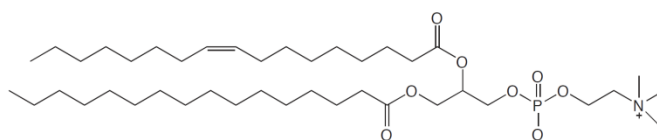


Figura 1.10. Estructura de la fosfatidilcolina.

L'organització en forma de bicapes implica, com s'ha vist a les seccions 1.1.1 i 1.1.2, que els fosfolípids s'organitzen de manera que la part hidròfila (cap polar) queda en contacte amb la fase aquosa, mentre que la part hidrofòbica (les cadenes alquíliques) queda orientada cap a l'interior de la bicapa. Els liposomes tenen forma esfèrica i que poden estar formats per una sola bicapa o bé per centenars de bicapes concèntriques. En funció de la seva grandària i del nombre de bicapes, els liposomes es classifiquen en *LMV* o vesícules multilamel·lars grans, *LUV* o vesícules unilamel·lars grans, que tenen un diàmetre superior a 100 nm i *SUV* o vesícules unilamel·lars petites, amb un diàmetre menor a 100 nm.

Per estudiar les interaccions entre fàrmacs i liposomes, és necessari conèixer les propietats de la part externa de la membrana, és a dir, dels grups polars dels fosfolípids que la formen. La càrrega superficial de les membranes és un paràmetre fisicoquímic de gran rellevància ja que determina les interaccions electrostàtiques entre el solut ionitzat i la membrana. Aquesta càrrega superficial depèn del pH de la fase aquosa que envolta a la membrana i també dels lípids que la formen. Els liposomes formats per fosfatidilcolina, que té una càrrega positiva i una negativa, tenen una càrrega neta igual a zero en l'interval de pH de 3 a 11. Per sobre de pH 11 la càrrega superficial es torna negativa per la hidròlisi de la fosfatidilcolina, mentre que per sota de pH 2 el grup fosfat es protona ($pK_a = 1.97$) i per tant, desapareix la càrrega negativa, de manera que la superfície de la membrana queda carregada positivament [104-106].

Atès que els liposomes són una eina complementària a la partició en 1-octanol/aigua per tal d'avaluar la lipofilitat de fàrmacs, en la secció següent s'exposaran breument els mètodes més habituals per mesurar la partició dels fàrmacs en aquests sistemes.

1.5.2. Mesura de la partició de fàrmacs en liposomes

1.5.2.1. Diàlisi en equilibri

La tècnica de diàlisi en equilibri és va introduir com a mètode de referència equivalent a l'equilibratge de fases o *shake-flask* descrita per avaluar la partició 1-octanol/aigua [107]. La tècnica es basa en l'equilibratge entre una suspensió aquosa que conté els liposomes i el solut, i una altra solució aquosa, separades per una membrana semipermeable que permet el pas del solut però no dels liposomes. Així, al començar l'equilibratge el solut només està en un costat de la membrana semipermeable, mentre

que al assolir-se l'equilibri el solut està distribuït en ambdós compartiments i es pot determinar la seva concentració i calcular el coeficient de distribució. A la Figura 1.11 es mostra el muntatge utilitzat per portar a terme la diàlisi en equilibri.

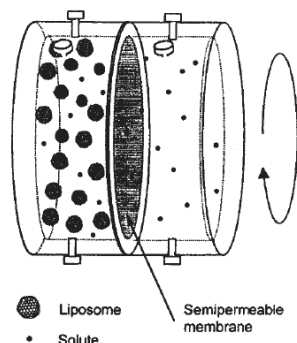


Figura 1.11. Cel·la de diàlisi en equilibri per experiments de partició en sistemes liposoma/aigua [108].

Un cop assolit l'equilibri, el coeficient de distribució es calcula a partir de la concentració total de solut en el compartiment que conté la suspensió de liposomes (C_{LB}) i en el compartiment que conté la fase aquosa (C_B), d'acord a la següent expressió:

$$D_{pH} = \frac{C_{LB} - C_B}{C_B} \cdot \frac{V_{LB}}{V_{Lipo}} + 1 \quad (1.32)$$

V_{LB} és el volum de la part que conté els liposomes i V_{Lipo} el volum total de lípids, que es determina a partir de la concentració de lípids i de la seva densitat.

Si es treballa en les condicions òptimes (concentració inicial, relació lípid/solut) els valors de $\log D$ o $\log P$ obtinguts són reproduïbles. Malgrat això, la tècnica té alguns desavantatges significatius, tals com la necessitat d'optimitzar el mètode per cada solut, pH, concentració de lípid i/o relació molar lípid/solut, especialment si es treballa amb soluts que no són congenèrics. Es tracta d'un procediment tediós ja que l'equilibratge requereix com a mínim 5 hores.

1.5.2.2. Mètode potenciomètric

La metodologia explicada en la secció 1.3.3 per a la determinació del $\log P_{o/w}$ mitjançant potenciomètria és també aplicable als sistemes formats per liposomes i aigua [109, 110]. El procediment és el mateix, és a dir, es determina la constant d'ionització del solut en aigua (o barreja metanol/aigua si és poc soluble) i després torna a determinar la constant d'ionització aparent en una barreja d'aigua amb una quantitat coneguda de liposomes. El coeficient de partició es calcula mitjançant una equació equivalent a la (1.9). La validesa del mètode ha estat comprovada per comparació amb valors de $\log P$ obtinguts per diàlisi en equilibri [5, 111, 112].

1.5.2.3. Mètodes espectroscòpics

S'han utilitzat diverses tècniques espectroscòpiques per avaluar la interacció entre un solut i membranes formades per lípids, per exemple, la espectrofotometria UV-vis o la fluorescència. En aquestes tècniques, el senyal mesurat és una combinació dels senyals de la forma lliure del solut (la que no ha interaccionat amb els liposomes) i la forma *enllaçada*, que és la que ha interaccionat amb la membrana. En general, els valors s'obtenen mesurant el senyal del solut en solucions que contenen diferents quantitats de liposomes, seguint un procés de valoració [113]. Dins de les tècniques espectroscòpiques, les derivades de la fluorescència molecular tals com l'emissió o la mesura de la anisotropia de la radiació emesa tenen força aplicabilitat. L'estudi de la partició d'un solut mitjançant aquestes tècniques espectroscòpiques requereix que es compleixi una d'aquestes condicions: (i) que existeixi una diferència quantificable en un paràmetre relacionat amb la fluorescència, tal com el rendiment quàntic, l'anisotropia o el temps de vida, quan el solut està lliure en solució o incorporat a la membrana, o (ii) la incorporació del solut a la membrana produeix un canvi en un paràmetre de fluorescència d'una sonda incorporada a la membrana.

En aquesta Tesi només es considerarà una de les tècniques espectroscòpiques, la mesura de la anisotropia de la radiació fluorescent. Entre les diverses tècniques basades en la fluorescència, l'anisotropia s'ha utilitzat per caracteritzar interaccions específiques i no específiques entre lligands i proteïnes [114-116], per estudiar la fluïdesa de la membrana dels liposomes [117-121], i també per avaluar la partició de fàrmacs en liposomes [122-128].

La mesura de l'anisotropia està fonamentada en l'excitació de la mostra mitjançant un feix de radiació polaritzada. Les molècules excitades preferentment són aquelles que tinguin els vectors d'absorció orientats paral·lelament a la direcció de polarització. Aquest procés té com a resultat una emissió fluorescent d'elevada polarització si les molècules no roten lliurement durant l'interval entre l'absorció i l'emissió de llum [129, 130]. Aquest és el cas de molècules que interactuen amb macromolècules en solució. En la Figura 1.12 s'indica el procés de polarització de la radiació quan una molècula fluorescent interacciona amb un receptor, que en aquest cas representa els liposomes en solució.

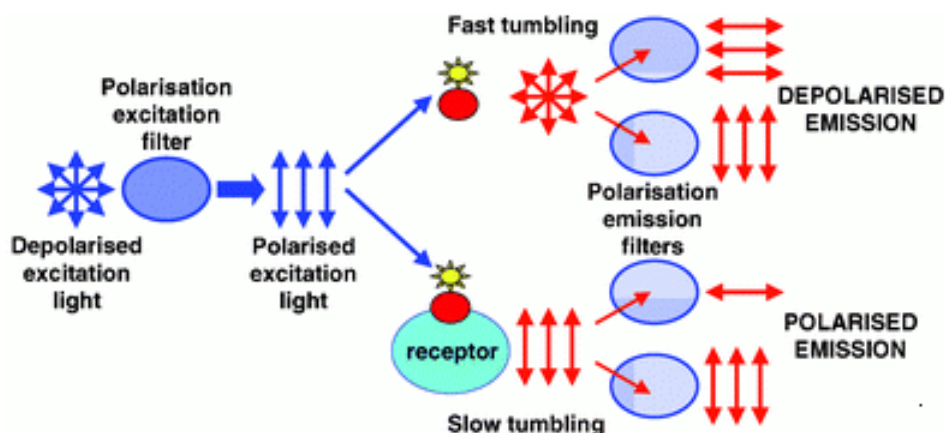


Figura 1.12. Procés d'excitació i emissió de radiació fluorescent polaritzada.

L'anisotropia (A) es calcula a partir de l'observació de la intensitat emesa amb els polaritzadors d'emissió orientats verticalment (I_{vv}) i la intensitat amb el polaritzador d'excitació orientat verticalment i el polaritzador d'emissió horitzontalment (I_{vh}). L'expressió utilitzada és la següent:

$$A = \frac{I_{vv} - G \cdot I_{vh}}{I_{vv} + 2 \cdot G \cdot I_{vh}} \quad (1.33)$$

El paràmetre G s'anomena *grating factor* i és un factor de correcció que serveix per compensar la polarització causada pels components interns del fluorímetre i es defineix de la següent forma:

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \quad (1.34)$$

On I_{hv} i I_{hh} són les intensitats mesurades amb el polaritzador d'excitació en posició horitzontal mentre que el polaritzador d'emissió està orientat verticalment i horitzontalment, respectivament. La anisotropia A mesurada depèn de la fracció de solut que interacciona amb la macromolècula o membrana i de la rigidesa del complex format pel solut i la macromolècula. Per tant, es compleix una de les condicions per avaluar la partició a partir de mesures espectroscòpiques.

S'han proposat diverses expressions matemàtiques per calcular els coeficients de partició a partir de les mesures d'anisotropia. Si es treballa en concentracions molt baixes de solut i en excés de liposomes, l'anisotropia descriu una funció hiperbòlica a l'augmentar la concentració dels liposomes. Per tant, s'utilitza una expressió com la següent:

$$A = \frac{A_B \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad (1.35)$$

En aquesta expressió A_B és l'anisotropia mesurada quan tot el solut està en la membrana, $[L]$ és la concentració molar dels lípids i K_D és la constant d'equilibri de la interacció entre el solut i la membrana. A partir d'aquesta expressió se'n deriven d'altres que seran considerades al capítol corresponent d'aquest treball, tenint en compte diversos efectes que afecten a la mesura, tals com la dispersió de la radiació o l'efecte de la concentració del solut. Finalment, el coeficient de distribució del solut en la membrana es calcula a partir de la següent equació:

$$D = [Lip]_{membrana} / K_D \quad (1.44)$$

on $[Lip]_{membrana}$ es la concentració de fosfatidilcolina en la membrana, 1.3 M.

1.6. REFERÈNCIES

- [1] H. Meyer, *Arch. Exp. Pathol. Phar.* 42 (1899) 109.
- [2] S.D. Krämer, *Pharm. Sci. Technol. Today* 2 (1999) 373.
- [3] X. Liu, B. Testa, A. Fahr, *Pharm. Res.* 28 (2011) 962.
- [4] E.H. Kerns, L. Di, *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*, Academic Press, San Diego, 2008, pp. 228-241.
- [5] G.P. van Balen, C.M. Martinet, G. Caron, G. Bouchard, M. Reist, P.A. Carrupt, et al., *Med. Res. Rev.* 24 (2004) 299.
- [6] G. Caron, G. Ermondi, R.A. Scherrer, 5.18 - Lipophilicity, Polarity, and Hydrophobicity, in: Editors-in-Chief: John B. Taylor, David J. Triggle (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Elsevier, Oxford, 2007, pp. 425-452.
- [7] P.A. Carrupt, B. Testa, P. Gaillard, *Computational Approaches to Lipophilicity: Methods and Applications*, *Rev. Comp. Ch.*, John Wiley & Sons, Inc., 1997; pp. 241-315.
- [8] N. El Tayar, B. Testa, P.A. Carrupt, *J. Phys.Chem.* 96 (1992) 1455.
- [9] E. Jungfleisch, M. Berthelot, *Annales des Chimie et des Physique* 4th. 26 (1872) 396.
- [10] W. Nernst, *Z. Phys. Chem.* 8 (1891) 110.
- [11] C. Hansch, T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 1616.
- [12] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins. *Chem. Rev.* 71 (1971) 525.
- [13] Biolum Online Database: <http://www.biobyte.com/>
- [14] J. Sangster, *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, 1st ed., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 1997, pp. 170.
- [15] A. Avdeef, *Partitioning into Octanol, Absorption and Drug Development*, John Wiley & Sons, Inc., 2003, pp. 42-66.
- [16] A. Leo, *Chem. Rev.* 93 (1993) 1281.
- [17] A. Leo, P.Y. Jow, C. Silipo, C. Hansch, *J. Med. Chem.* 18 (1975) 865.
- [18] A. Leo, *J. Pharm. Sci.* 76 (1987) 166.
- [19] A. Leo, D. Hoekman, *Perspect. Drug Discov.* 18 (2000) 19.
- [20] A. Pretrauskas, E. Kolovanov, *Perspect. Drug Discov.* 19 (2000) 99.
- [21] I.V. Tetko, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 42 (2002) 717.
- [22] I.V. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, et al., *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 19 (2005) 453.
- [23] ALOGPS Software: <http://www.vcclab.org/lab/alogps/>
- [24] R. Mannhold, G.I. Poda, C. Ostermann, I.V. Tetko, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 861.
- [25] I.V. Tetko, V.Y. Tanchuk, A.E.P. Villa, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41 (2001) 1407.
- [26] A. Avdeef, *Quant. Struct.-Act. Rel.* 11 (1992) 510.
- [27] A. Avdeef, *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 183.

- [28] K. Takacs-Novak, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1405.
- [29] S.D. Krämer, J. Gautier, P. Saudemon, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1310.
- [30] X. Li, M.A. Cooper, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2609.
- [31] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Basic Concepts and the Control of Separation, Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., 2009; pp. 19-86.
- [32] C.A. Rimmer, C.R. Simmons, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 219.
- [33] M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 1.
- [34] X. Subirats, M. Rosés, E. Bosch. *Sep. Purif. Rev.* 36 (2007) 231.
- [35] T. Mussini, A.K. Covington, P. Longhi, S. Rondinini, *Pure & Appl. Chem.* 57 (1985) 865.
- [36] R.P. Buck, S. Rondinini, A.K. Covington, F.G.K. Baucke, C.M.A. Brett, M.F. Camoes, M.J.T. Milton, et al., *Pure & Appl. Chem.* 74 (2002) 2169.
- [37] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, *J. Chromatogr.* 165 (1979) 3.
- [38] C. Nong, Z. Yukui, L. Peichang, *J. Chromatogr. A* 633 (1993) 31.
- [39] K. Valkó, L.R. Snyder, J.L. Glajch, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 501.
- [40] M.H. Abraham, M. Rosés, *J. Phys. Org. Chem.* 7 (1994) 672.
- [41] F. Lombardo, M.Y. Shalaeva, K.A. Tupper, F. Gao, M.H. Abraham, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 2922.
- [42] F. Lombardo, M.Y. Shalaeva, K.A. Tupper, F. Gao, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 2490.
- [43] X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, H. Chuman, *J. Chromatogr. A.* 1091(2005) 51.
- [44] C. Giaginis, S. Theocharis, A. Tsantili-Kakoulidou, *J. Chromatogr. A* 1166 (2007) 116.
- [45] D. Benhaim, E. Grushka, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 31 (2008) 2198.
- [46] D. Benhaim, E. Grushka, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 111.
- [47] D. Benhaim, E. Grushka, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 65.
- [48] X Liu, H. Hefesha, H. Tanaka, G. Scriba, A. Fahr, *Chem. Pharm. Bull.* 56 (2008) 1417.
- [49] X Liu, P. Fan, M. Chen, H. Hefesha, G. Scriba, D. Gabel, A. Fahr, *Helv. Chim. Acta.* 93 (2010) 203.
- [50] Y. Henchoz, D. Guillaume, S. Martel, S. Rudaz, J.L. Veuthey, P.A. Carrupt, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1919.
- [51] R. Kaliszan, P. Haber, T. Baczek, D. Siluk, K. Valkó, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 1167.
- [52] P. Wiczling, P. Kawczak, A. Nasal, R. Kaliszan, *Anal. Chem.* 78 (2006) 239.
- [53] P. Wiczling, M. Waszczuk-Jankowska, M.J. Markuszewski, R. Kaliszan, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 109.
- [54] P. Wiczling, A. Nasal, Ł. Kubik, R. Kaliszan, *Eur. J. Pharm. Sci.* 47 (2012) 1.
- [55] K. Valkó, C. Bevan, D. Reynolds, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2022.

- [56] M. Rosés, E. Bosch, C. Ràfols, E. Fuguet, Chromatographic Hydrophobicity Index (CHI), in: E. Gruska, N. Grinberg (Eds.), *Adv. Chromatogr.* 50 (2012) pp. 377-414.
- [57] I. Canals, K. Valkó, E. Bosch, A.P. Hill, M. Rosés, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4937.
- [58] E. Fuguet, C. Ràfols, E. Bosch, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 110.
- [59] E. Fuguet, C. Ràfols, E. Bosch, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7798.
- [60] S.F. Donovan, M.C. Pescatore, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 47.
- [61] L. Escuder-Gilabert, J.M. Sanchis-Mallols, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernández, R.M. Villanueva-Camañas, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 549.
- [62] L. Escuder-Gilabert, Y. Martín-Biosca, R. Villanueva-Camañas, M. Medina-Hernández, S. Sagrado, *Chromatographia* 50 (1999) 325.
- [63] A. Berthod, Chapter 1: Fundamentals of countercurrent chromatography, In: *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, 2000, pp. 1-20.
- [64] A. Berthod, S. Carda-Broch, M.C. García-Álvarez-Coque, *Anal. Chem.* 71 (1999) 879.
- [65] A. Berthod, S. Carda-Broch, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 3.
- [66] M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, A. Levet, A. Berthod, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6044.
- [67] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298.
- [68] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* 56 (1984) 111.
- [69] B.J. Herbert, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 67 (1995) 744.
- [70] M.D. Trone, M.S. Leonard, M.G. Khaledi, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1228.
- [71] Y. Ishihama, Y. Oda, K. Uchikawa, N. Asakawa, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1588.
- [72] W.L. Klotz, M.R. Schure, J.P. Foley, *J. Chromatogr. A* 930 (2001) 145.
- [73] W.L. Klotz, M.R. Schure, J.P. Foley, *J. Chromatogr. A* 962 (2002) 207.
- [74] Y. Henchoz, S. Romand, J. Schappler, S. Rudaz, J. Veuthey, P.A. Carrupt, *Electrophoresis* 31 (2010) 952-964.
- [75] L.S. Foteeva, D.A. Trofimov, O.V. Kuznetsova, C.R. Kowol, V.B. Arion, B.K. Keppler, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 409.
- [76] C. Reichardt, T. Welton, *Empirical Parameters of Solvent Polarity, Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010, pp. 425-508.
- [77] M. Rosés, E. Bosch, *Anal. Chim. Acta.* 274 (1993) 147.
- [78] E. Bosch, P. Bou, M. Rosés, *Anal. Chim. Acta.* 299 (1994) 219.
- [79] P. Izquierdo, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 96.
- [80] A. Pappa-Louisi, P. Nikitas, P. Balkatzopoulou, C. Malliakas, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 29.
- [81] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 955 (2002) 19.
- [82] E. Lázaro, C. Ràfols, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 163.

- [83] E. Lázaro, P. Izquierdo, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5214.
- [84] A. Téllez, M. Rosés, E. Bosch, *Anal. Chem.* 81 (2009) 9135.
- [85] A. Andrés, A. Téllez, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1247 (2012) 70.
- [86] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, A.M. Zissimos, M.H. Abraham, *J. Chromatogr. A* 515 (2004) 209.
- [87] R. Bosque, J. Sales, E. Bosch, M. Rosés, M.C. García-Álvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (2003) 1240.
- [88] A. Leo, Octanol/Water Partition Coefficients, Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals, CRC Press, 2000.
- [89] R. Todeschini, V. Consonni, Handbook of Molecular Descriptors, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000; pp. 1-123.
- [90] J.C. Dearden, *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 17 (2003) 119.
- [91] P. Gramatica, *QSAR Comb. Sci.* 26 (2007) 694.
- [92] C. Ventura, F. Martins, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 612.
- [93] S. Winiwarter, M. Ridderström, A. Ungell, T.B. Andersson, I. Zamora, 5.22 - Use of Molecular Descriptors for Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Predictions, in: Editors-in-Chief: John B. Taylor, David J. Trigg (Eds.), Comprehensive Medicinal Chemistry II, Elsevier, Oxford, 2007, pp. 531-554.
- [94] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1997) 3.
- [95] M.H. Abraham, *Chem. Soc. Rev.* 22 (1993) 73.
- [96] M.H. Abraham, H.S. Chadha, G.S. Whiting, R.C. Mitchell, *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 1085.
- [97] M. Hidalgo-Rodríguez, E. Fuguet, C. Ràfols, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1701.
- [98] M. Hidalgo-Rodríguez, E. Fuguet, C. Ràfols, M. Rosés, *Anal. Chem.* 82 (2010) 10236.
- [99] J.A. Platts, D. Butina, M.H. Abraham, A. Hersey, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 39 (1999) 835.
- [100] J. Jover, R. Bosque, J. Sales, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 44 (2004) 1098.
- [101] G. Cruciani, P. Crivori, P.-A. Carrupt, B. Testa, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 503 (2000) 17.
- [102] G. Ermondi, G. Caron, *J. Chromatogr. A* 1252 (2012) 84.
- [103] D. Marsh, Handbook of Lipid Bilayers, 2nd ed., CRC, Boston, MA, USA, 2010.
- [104] S.D. Krämer, H. Wunderli-Allenspach, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1851.
- [105] S.D. Krämer, C. Jakits-Deiser, H. Wunderli-Allenspach, *Pharm. Res.* 14 (1997) 827.
- [106] S.D. Krämer, A. Braun, C. Jakits-Deiser, H. Wunderli-Allenspach, *Pharm. Res.* 15 (1998) 739.
- [107] G.M. Pauletti, H. Wunderli-Allenspach, *Eur. J. Pharm. Sci.* 1 (1994) 273-282.

- [108] S.D. Krämer, Liposome/water partitioning: Theory, techniques and applications. In: Testa B, van de Waterbeemd H, Folkers G, Guy R (Eds.), *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*, Wiley-VCH, Zürich, 2001, pp. 401
- [109] A. Avdeef, K.J. Box, J. Comer, C. Hibbert, K.Y. Tam, *Pharm. Res.* 15 (1998) 209.
- [110] C. Barzanti, R. Evans, J. Fouquet, L. Gouzin, N.M. Howarth, G. Kean, et al., *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 3337.
- [111] B.I. Escher, R.P. Schwarzenbach, J.C. Westall, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 3962.
- [112] G.P. van Balen, G. Caron, G. Ermondi, A. Pagliara, T. Grandi, G. Bouchard, et al., *Pharm. Res.* 18 (2001) 694.
- [113] N. Santos, M. Prieto, M.A.R.B Castanho, *BBA Biomembranes* 1612 (2003) 123.
- [114] M.H.A. Roehrl, J.Y. Wang, G. Wagner, *Biochem. (NY)* 43 (2004) 16067.
- [115] T. Wybranowski, M. Cyrankiewicz, B. Ziolkowska, S. Kruszewski. *Biosystems* 94 (2008) 258.
- [116] A. Vaasa, I. Viil, E. Enkvist, K. Viht, G. Raidaru, D. Lavogina, et al., *Anal. Biochem.* 385 (2009) 85.
- [117] A. Marczak, *Bioelectrochemistry* 74 (2009) 236.
- [118] S. Bhandary, R. Basu, D. Sucken, P. Nandy, *Phase Transit.* 82 (2009) 821.
- [119] S. Bhandary, R. Basu, D. Sucken, P. Nandy, *Phase Transit.* 83 (2010) 518.
- [120] S. Lopes, C.S. Neves, P. Eaton, P. Gameiro, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1357.
- [121] C. Nunes, G. Brezesinski, D. Lopes, J.L.F.C. Lima, S. Reis, M. Lúcio, *J. Phys. Chem. B*, 115 (2011) 12615
- [122] T.G. Burke, T.R. Tritton, *Biochem. (N.Y.)*. 24 (1985) 1768.
- [123] Z. Huang, R.P. Haugland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181 (1991) 166.
- [124] M.A.R.B. Castanho, M.J.E. Prieto, *Eur. J. Biochem.* 207 (1992) 125.
- [125] A. Lopes, A.L. Maçanita, F.S. Pina, E. Melo, H. Wamhoff, *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 2448.
- [126] H. Bensikaddour, K. Snoussi, L. Lins, F. Van Bambeke, P.M. Tulkens, R. Basseur, et al., *BBA Biomembranes* 1778 (2008) 2535.
- [127] G. Neunert, P. Polewski, M. Markiewicz, P. Walejko, S. Witkowski, K. Polewski, *Biophys. Chem.* 146 (2010) 92.
- [128] S. Veiksina, S. Kopanchuk, A. Rinken, *Anal. Biochem.* 402 (2010) 32.
- [129] G.G. Gibault, *Practical Fluorescence. Second Edition, Revised and Expanded*, (1990) 812.
- [130] J.R. Lakowicz, *Fluorescence Anisotropy, Principles of Fluorescence Anisotropy*, 2nd ed., Springer, New York, 1999, pp. 291.

Capítol II

Part Experimental

2.1. MESURA DE LA RETENCIÓ EN CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS

En aquest primer apartat es descriuran els aspectes experimentals relacionats amb la mesura de la retenció en diferents sistemes cromatogràfics. S'esmentaran els aparells utilitzats així com les diverses columnes estudiades. Finalment, es resumirà el procediment utilitzat.

2.1.1. Aparells

Les mesures cromatogràfiques s'han realitzat en diversos sistemes de cromatografia d'alta eficàcia (HPLC) de Shimadzu (Kioto, Japó), que en tots els casos han consistit en dues bombes isocràtiques (LC-10AD o LC-20AD), un autoinjector (SIL-10AD o SIL-20AC), un forn termostatitzat a 25°C (CTO-10AS), un controlador (SCL-10A o CBM-20A) i un detector ultraviolat-visible (SPD-10AV) o en sèrie de diodes (SPD-10M). També s'ha emprat un sistema cromatogràfic d'elevada pressió (UHPLC) Shimadzu Nexera, equipat amb dues bombes isocràtiques LC-30AD, un autoinjector SIL-30AC, un detector en sèrie de diodes SPD-M20A i un forn CTO-10AS. Tots els instruments tenen un ordinador associat que compta amb el programari adient per a l'adquisició i processament de les dades.

Per mesurar el pH de les fases mòbils s'ha utilitzat un elèctrode combinat Crison (Alella, Espanya) 5014 acoblat a un potenciòmetre pH-METER GLP 22 també de Crison amb una precisió de 0.002 unitats de pH.

2.1.2. Columnes

Per establir la metodologia indicada en el Capítol III d'aquesta tesi, s'han utilitzat diverses columnes cromatogràfiques, totes elles amb una característica comú, doncs la seva fase estacionària està formada per cadenes alquíliques C₁₈. Les característiques de les columnes s'indiquen a la Taula 2.1. Totes les columnes utilitzades han patit un procés de recobriment dels silanols residuals o *endcapping*.

Taula 2.1. Característiques de les columnes cromatogràfiques utilitzades en aquest treball.

Característiques	Luna C ₁₈ (2)	Chromolith RP-18e	Gemini NX	XTerra RP-18	XTerra MS C ₁₈	Kinetex C ₁₈	Acquity BEH C ₁₈
Fabricant	Phenomenex	Merck	Phenomenex	Waters	Waters	Phenomenex	Waters
Estructura	Particulada	Monolítica	Particulada	Particulada	Particulada	Particulada	Particulada
Grandària de partícula (µm)	5	-	5	5	5	2.6	1.7
Diàmetre mitjà dels porus (Å)	110	-	105	127	125	92	139
Àrea superficial (m ² ·g ⁻¹)	372	300	372	178	179	200	183
Volum dels porus (cm ³ ·g ⁻¹)	-	1.00	1.10	0.70	0.69	-	0.70
Contingut total de carboni (%)	18.1	18.0	14.0	14.6	15.4	12.0	17.4
Longitud de la columna (mm)	150	150	150	150	150	100	50
Diàmetre de la columna (mm)	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	2.1
Interval de pH de treball	1.5-10	2-7.5	1-12	2-12	1-12	2-8	1-12

2.1.3. Procediment

Les mesures cromatogràfiques es van realitzar treballant amb fases mòbils que contenen acetonitril o metanol com a modificadors orgànics i tampons aquosos per tal d'assolir el pH desitjat. Els compostos ionitzables estudiats van ser agrupats en funció del seu pK_a per tal d'escollir el tampó que tingués un valor de pH adient per tal que aquests compostos estiguessin en la seva forma neutra. També es va comptar amb la variació del pH en funció del contingut de modificador orgànic en la fase mòbil, aspecte que es discutirà amb profunditat al Capítol III.

Els tampons emprats per preparar les fases mòbils, tots ells en una concentració 0.01 M, són els següents:

- Àcid trifluoroacètic, pH 2
- Àcid cítric/citrat de sodi, pH 3, 4, 5 i 6.
- Àcid acètic/acetat de sodi, pH 4, 5 i 6
- Dihidrogenfosfat de sodi/hidrogenfosfat de sodi, pH 7
- Hidrogencarbonat d'amoni, pH 11
- Pirrolidina, pH 11 i 11.7

Després de mesclar el tampó i el modificador orgànic per preparar la fase mòbil, el pH de la mateixa va ser mesurat amb un elèctrode de vidre. El cabal de fase mòbil fou 1 mL/min per a les mesures realitzades en HPLC, és a dir, per totes les columnes amb una grandària de partícula de 5 µm i també de 2.6 µm, de 2 mL/min per a la columna monolítica mentre que va ser de 0.5 mL/min per a la columna amb una grandària de partícula de 1.7 µm. El volum d'injecció va ser de 10 µL per totes les columnes excepte per la Kinetex C₁₈ i la Acquity BEH C₁₈, on es van injectar 1 µL de mostra. S'utilitzà bromur de potassi com a compost no retingut per mesurar el temps mort del sistema.

2.2. PREPARACIÓ DELS LIPOSOMES. MESURA DE LA LIPOFILICITAT

En aquesta secció es descriuran els procediments seguits per a la preparació i caracterització de liposomes a partir de solucions de lípids així com la posterior determinació de la concentració de lípids en les solucions emprades per tal de poder calcular els coeficients de partició. Finalment, s'explicaran els tres mètodes emprats per avaluar la lipofilicitat de fàrmacs en sistemes liposomes/aigua.

2.2.1. Preparació i caracterització de liposomes

Els liposomes es van preparar per el procediment d'extrusió descrit a la bibliografia [1]. D'acord amb aquest procediment, una quantitat de lípids coneguda dissolta en una barreja de cloroform i metanol s'asseca en un matràs de fons rodó utilitzant un rotavapor. Un cop els lípids formen una pel·lícula en el fons del baló, es redissolen afegint la quantitat necessària d'una solució tampó universal ajustat a pH 7.4 (*standard universal buffer solution*, SUBS [2]) de manera que la concentració de lípids estigui entre 20 i 100 mg/L. Aquesta solució tampó universal conté borat, citrat i fosfat i s'ajusta al pH desitjat amb hidròxid de sodi, tot mantenint una força iònica constant de 0.23 M mitjançant l'addició de clorur de sodi.

La redissolució de la pel·lícula de lípids amb tampó fa que aquests s'associïn formant vesícules multilamel·lars grans (MLVs), que són convertides en vesícules unilamel·lars grans (LUVs) a partir d'un procediment d'extrusió a 25°C a través de filtres de policar-

bonat amb un grandària de porus de 0.2 μm , tot utilitzant un extrusor amb un volum de 10 mL (Northern Lipids, Burnaby, Canada).

La distribució de la grandària dels liposomes es va analitzar mitjançant la dispersió dinàmica de la radiació de les solucions de liposomes utilitzant un Zetasizer 3000 HAS (Malvern Instruments, Regne Unit). La grandària mitjana dels liposomes va estar en l'interval entre 180 i 200 nm, amb un índex de polidispersitat inferior a 0.1.

Finalment, la concentració de lípids en les solucions de liposomes utilitzades es va determinar mitjançant la cromatografia de líquids, utilitzant un cromatògraf LaChrom Elite de Hitachi. L'instrument consistia en una bomba quaternària L-2130, un autoinjector L-2200, un forn L-2300, un detector UV-2400 i un detector de fluorescència L-2480. La concentració es va determinar a partir de la injecció de 50 μL de solució de liposomes dissolta en metanol en una columna BDS Hypersil C_8 (150 x 4.6 mm, 5 μm) de Thermo (Belefonte, PA, Estats Units) a 50°C. La fase mòbil consistí en una barreja d'acetonitril i aigua 87% i el cabal fou de 2 mL/min. La longitud d'ona del detector va ser 215 nm. Les concentracions de lípids van ser calculades per interpolació utilitzant una recta de calibratge adient.

2.2.2. Mesura de la lipofilicitat

Aquest apartat conté la informació relativa als procediments experimentals seguits per mesurar la lipofilicitat de fàrmacs en sistemes que contenen liposomes a partir de tres mètodes diversos, tal com s'ha explicat al primer capítol d'aquesta memòria. En primer lloc, es descriurà la tècnica de diàlisi en equilibri, en segon lloc es veuran les determinacions potenciomètriques de coeficients de partició i finalment, un procediment alternatiu basat en la mesura d'una propietat de la radiació fluorescent polaritzada tal com l'anisotropia.

2.2.2.1. Diàlisi en equilibri

La diàlisi en equilibri, com s'ha vist en la secció 1.5.2.1, és una tècnica basada en posar en contacte dues solucions separades per una membrana semipermeable. Una suspensió de liposomes (1 mg/mL) en una solució de *SUBS* a pH 2, pH 7.4 o pH 10.5 i força iònica constant s'equilibra amb 20 μM de fàrmac durant 1 h. Un cop fet això, es

munten les cel·les de diàlisi amb la membrana semipermeable de cel·lulosa (que permet el pas de molècules de fins a 5000 Da), posant-t'hi a una banda la solució amb liposomes i fàrmac i a l'altra banda només solució tampó. El sistema es deixa equilibrar durant 5 hores i després es quantifica la concentració de fàrmac a cadascuna de les dues solucions, diluint-les amb metanol (1:1) mitjançant cromatografia de líquids emprant la recta de calibratge adient per a cadascun dels compostos. Atès que tots els fàrmacs estudiats presentaven fluorescència, es va utilitzar el detector de fluorescència al cromatògraf de líquids.

2.2.2.2. Potenciometria

Les mesures de potenciometria es van fer amb un valorador automàtic PCA-101 (Sirius Analytical Instruments Ltd., Forest Row, East Sussex, Regne Unit), amb força iònica controlada (0.15 M KCl). El valorador automàtic afegeix les quantitats necessàries d'àcid clorhídric 0.5 M i hidròxid de potassi 0.5 M per tal de fer les valoracions, que es fan en absència d'oxigen utilitzant argó.

En primer lloc, es van determinar els valors de pK_a dels compostos en medi aquós o bé en medi hidroorgànic (afegint metanol) si els compostos eren poc solubles en aigua. Per aquests darrers compostos, el pK_a en aigua es va determinar a partir de l'equació de Yasuda-Shedlovsky, que es basa en determinar el pK_a del compost en diverses mescules metanol/aigua i extrapolar al valor de l'aigua per obtenir el pK_a en medi aquós [3].

Seguidament, es van dur a terme valoracions en suspensions de liposomes on la concentració del fàrmac era de l'ordre de 1 mM. Les relacions de volums entre els lípids i la fase aquosa (r) van ser en l'interval des de 0.001 fins a 0.028, i les valoracions es van realitzar des de pH 10.5 fins a pH 3.5 i després a la inversa. Les corbes de valoració obtingudes van ser analitzades amb el software pKalogP V5.2a. Els valors de $\log P_{lip}$ de la forma neutra i de les formes iòniques es van obtenir a partir de refinaments múltiples de les dades obtingudes a partir de com a mínim quatre valoracions amb diferents relacions de volum entre els liposomes i l'aigua per a cada compost.

2.2.2.3. Mesura de l'anisotropia

L'anisotropia de la fluorescència fou mesurada amb un fluorímetre LS50B (Perkin Elmer, Boston, MA, Estats Units). Les longituds d'ona màximes d'emissió i excitació de

cada compost es van determinar a partir dels respectius espectres de les substàncies en *SUBS* a pH 7.4 i força iònica constant. Per cada fàrmac es van preparar diverses solucions amb concentracions creixents de liposomes mantenint la concentració de fàrmac constant i es van deixar equilibrar durant 30 minuts. Un cop equilibrades, es va mesurar l'anisotropia d'aquestes solucions així com un blanc de fàrmac sense liposomes.

2.3. CÀLCUL DE DESCRIPTORS MOLECULARS

El càlcul de descriptors moleculars a partir de l'estructura del compost estudiat ha tingut un paper molt rellevant en aquesta tesi. Per tant, aquesta secció està dedicada a descriure els diversos programes i procediments utilitzats a l'efecte. Essencialment, s'han calculat descriptors a partir del programa CODESSA, que té un abast més acadèmic, i dels programes Discovery Studio, MOE i Volsurf, que són utilitzats habitualment en la indústria farmacèutica.

També s'ha d'esmentar un altre programa, el ADME Suite 5.0 de ACD/Labs (Toronto, ON, Canadà), que no s'explicarà amb detall ja que només s'ha utilitzat per obtenir els descriptors d'Abraham calculats a partir de l'aproximació proposada per Platts *et al.* [4, 5]. Aquest programa també conté una base de dades de valors experimentals dels descriptors d'Abraham anomenada *ABSOLV*.

2.3.1. Descriptors calculats amb CODESSA

CODESSA (University of Florida, Gainesville, FL, Estats Units) és l'acrònim de *Comprehensive DEscriptors for Structural and Statistical Analysis*). Aquest programa proporciona un gran nombre de descriptors així com la possibilitat de generar models QSPR mitjançant regressió lineal múltiple. CODESSA genera cinc classes de descriptors: constitucionals, topològics, geomètrics, electrostàtics i químic-quàntics.

Per calcular els descriptors moleculars, s'ha de partir de les estructures optimitzades dels soluts. Per fer-ho, s'han de dibuixar les estructures amb el programa HyperChem Lite (Hypercube Inc., Gainesville, FL, Estats Units), que després són exportades en el

format adient per la optimització geomètrica de les mateixes mitjançant MOPAC. Aquesta optimització es duu a terme amb el mètode semiempíric AM1 per tal de trobar el mínim d'energia real de la molècula. Un cop fet això, el fitxers de sortida proporcionats per MOPAC són utilitzats per calcular els descriptors moleculars amb CODESSA.

2.3.2. Descriptors calculats amb Discovery Studio i Volsurf

El programa Discovery Studio 3.0 (Accelrys, San Diego, CA, Estats Units) és una eina molt potent utilitzada en la indústria farmacèutica per a la modelització d'interaccions entre lligands i receptors, l'estudi de farmacòfors o la generació de descriptors estructurals.

Les estructures en 2D dels compostos foren dibuixades amb el programa Symyx Draw 4.0, també d'Accelrys, i després es generaren les estructures tridimensionals amb Discovery Studio 3.0. El programa també genera totes les possibles conformacions per a cada compost, de manera que permet l'estudi conformacional de les molècules i la seva influència en els descriptors o les interaccions amb proteïnes.

Un cop generades aquestes estructures tridimensionals, es van calcular dues col·leccions de descriptors a partir d'elles. En primer lloc, els descriptors generats pel propi Discovery Studio, uns 100, que van des de l'estimació de paràmetres fisicoquímics tals com el $\log P_{o/w}$ o el pK_a fins a descriptors electrostàtics tals com les àrees superficials polars de la molècula. En segon lloc, a partir de les estructures tridimensionals obtingudes amb el Discovery Studio es van calcular els 128 descriptors proporcionats per Volsurf+ (Molecular Discovery, Pinner, Regne Unit) [6]. Aquests descriptors contenen informació de la molècula tal com el volum de les regions hidrofòbiques o el volum dels grups donadors o acceptors d'enllaç d'hidrogen.

2.4. REFERÈNCIES

- [1] S.D. Krämer, H. Wunderli-Allenspach, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1851.
- [2] G.M. Pauletti, H. Wunderli-Allenspach, *Eur. J. Pharm. Sci.* 1 (1994) 273.
- [3] A. Avdeef, K.J. Box, J.E.A. Comer, M. Gilges, M. Hadley, C. Hibbert, W. Patterson, K.Y. Tam, *J. Pharmaceut. Biomed.* 20 (1999) 631.
- [4] J.A. Platts, D. Butina, M.H. Abraham, A. Hersey, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 39 (1999) 835..
- [5] J.A. Platts, M.H. Abraham, D. Butina, A. Hersey, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 40 (2000) 71.
- [6] G. Cruciani, P. Crivori, P.A. Carrupt, B. Testa, *J. Mol. Struct.-THEOCHEM* 503 (2000) 17.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Capítol III

**Establiment d'un mètode cromatogràfic
per estimar el log $P_{o/w}$ de fàrmacs**

3.1. INTRODUCCIÓ

Aquest Capítol descriu el procediment establert per estimar el coeficient de partició 1-octanol/aigua ($\log P_{o/w}$) de compostos orgànics a partir de mesures cromatogràfiques. El Capítol compila tres publicacions [1-3] en les quals s'ha anat desenvolupant el mètode, primer optimitzant-lo i després comprovant la seva validesa amb substàncies de complexitat creixent. El Capítol està estructurat en tres apartats, seguint precisament el desenvolupament del mètode.

En primer lloc, s'explicaran els aspectes relacionats amb l'establiment del mètode, tals com els compostos estudiats, la caracterització dels sistemes cromatogràfics, les consideracions relacionades amb l'ús de fases mòbils tamponades, la variació del seu pH i del pK_a dels anàlits, i la selecció del modificador orgànic. A l'última secció es comentaran els resultats obtinguts en aquest primer estadi del desenvolupament del mètode. En una segona part, es discutirà l'estudi dels resultats obtinguts per compostos amb grups funcionals bàsics, la major part d'ells d'interès farmacèutic, així com els aspectes pràctics relacionats a tenir en compte. En la tercera i última part, es considerarà l'avaluació de la lipofilicitat de fàrmacs d'estructura complexa amb diverses funcionalitats i grups ionitzables. Una part important de la discussió rau en l'estudi dels valors dels descriptors moleculars d'aquestes darreres substàncies i les diferències que presenten amb els de les substàncies utilitzades per establir el mètode.

L'avaluació de la bondat del mètode es realitza mitjançant la comparació dels valors de $\log P_{o/w}$ obtinguts a partir de l'aplicació del mètode amb els valors de referència. Es varen considerar els compostos amb una diferència major que 0.6 unitats logarítmiques entre el valor determinat i el de referència com a compostos amb comportament anòmal o *outliers*. Aquest valor de referència es va seleccionar atesa la gran variabilitat entre valors de $\log P_{o/w}$ d'un mateix compost que ofereix la literatura i també pel fet que al mètode oficial d'anàlisi per *shake-flask* [4] s'accepten diferències de 0.3 entre determinacions consecutives, de manera que 0.6 equival a dos cops la desviació estàndard entre determinacions consecutives de $\log P_{o/w}$ mitjançant el *shake-flask*.

La Figura 3.1 conté una representació esquemàtica del mètode a fi de millorar la seva comprensió i identificar correctament cadascuna de les parts així com de poder estimar les diverses contribucions al valor final del $\log P_{o/w}$ determinat amb aquest mètode.

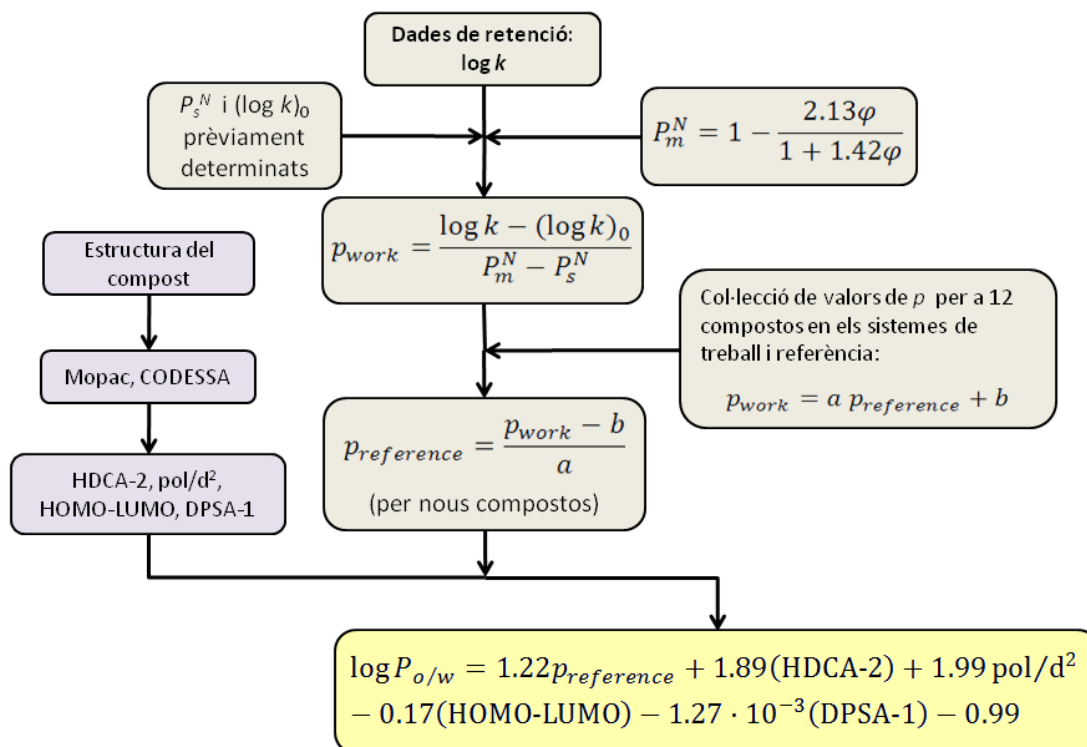


Figura 3.1. Esquema del mètode cromatogràfic per a la determinació del $\log P_{o/w}$ de compostos orgànics desenvolupat en aquesta Tesi.

Tots els paràmetres i descriptors que apareixen a la Figura 3.1 han estat descrits a la Introducció. Ara bé, per tal de facilitar la lectura i comprensió del diagrama de flux, el significat de tots ells es resumeix a continuació.

$\log k$	Logaritme del factor de retenció.
φ	Fracció de modificador orgànic a la fase mòbil.
P_m^N	Polaritat de la fase mòbil.
P_s^N	Polaritat de la fase estacionària.
$(\log k)_0$	Terme independent de l'equació (1.22).
p_{work}	Polaritat del solut en el sistema cromatogràfic de treball.
$p_{preference}$	Polaritat del solut en el sistema cromatogràfic de referència.
a i b	Constants de l'equació (1.27) per a la transferència entre sistemes.
HDCA-2	Descriptor de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen del solut.
pol/d ²	Descriptor de la polaritat del solut.
HOMO-LUMO	Descriptor de la polaritzabilitat del solut.
DPSA-1	Descriptor de les interaccions polars entre molècules.
$\log P_{o/w}$	Coefficient de partició 1-octanol/aigua.

3.2. ESTABLIMENT DEL MÈTODE. SELECCIÓ DEL SISTEMA CROMATOGRÀFIC

3.2.1. Paràmetres fisicoquímics dels compostos estudiats

El coeficient de partició 1-octanol/aigua ($\log P_{o/w}$) és un paràmetre fisicoquímic que, tal com s'ha vist al primer Capítol d'aquesta memòria, presenta una gran variabilitat en funció del mètode escollit per avaluar-lo, ja sigui mitjançant programes de càlcul o aproximacions experimentals més o menys acurades. Per tant, a l'hora d'establir aquest mètode es va constatar la necessitat de tenir valors de $\log P_{o/w}$ de referència que fossin valors experimentals el més acurats possible, obtinguts amb el procediment experimental de referència (*shake-flask*) o en el seu defecte, de valors obtinguts per potenciometria. En la literatura es troben diverses bases de dades de valors experimentals. La base de dades de Leo, Hoekman i Hansch [5] és la més antiga i considerada de referència. Derivada de l'anterior, la base de dades online BioLoom [6] conté els valors de $\log P_{o/w}$ compilats per Leo, Hoekman i Hansch i a més a més, s'actualitza periòdicament i proporciona un valor experimental de $\log P_{o/w}$ recomanat per cada substància així com altres valors experimentals publicats amb les referències corresponents. Aquesta bases de dades també porta incorporat el programa CLOGP que proporciona valors calculats de $\log P_{o/w}$ a partir dels fragments de la molècula, com s'ha vist a la Introducció d'aquesta memòria.

Una altra base de dades que conté valors experimentals de $\log P_{o/w}$ és la compilada per Avdeef [7], anomenada "Gold Standard" i que proporciona valors d'alta qualitat determinats per potenciometria per uns 250 fàrmacs i pesticides.

S'ha de remarcar, per tant, la necessitat de comptar amb valors de referència de $\log P_{o/w}$ de màxima qualitat ja que els valors determinats amb la metodologia proposada en aquest treball es validen precisament per comparació amb dits valors de referència.

L'altre paràmetre fisicoquímic d'interès en aquest treball és la constant d'ionització (pK_a) dels anàlits, doncs a partir del valor de la mateixa es seleccionen els tampons utilitzats per preparar les fases mòbils. Encara que és desitjable que els valors de pK_a siguin valors experimentals acurats, en alguns casos també s'han considerat programes d'estimació de pK_a atesa la manca de valors experimentals per a unes poques substàncies i comptant amb que és un paràmetre accessori, és a dir, que serveix per

tenir una idea aproximada de l'interval de pH on la substància estudiada estarà en la seva forma neutra però en cap cas determina el valor final de $\log P_{o/w}$. En aquest punt fóra bo recordar que el $\log P_{o/w}$ només es defineix per la forma neutre del solut i que tant el model de polaritat com el model QSPR utilitzats estan basats en la mesura cromatogràfica de la retenció de l'espècie neutra. Per tant, si tenim l'anàlit totalment o parcialment ionitzat, els models i, conseqüentment, el mètode derivat perden la seva validesa.

3.2.2. Caracterització del sistema cromatogràfic

La caracterització de sistemes cromatogràfics, és a dir, la determinació dels valors $(\log k)_0$ i P_S^N per una columna i modificador orgànic concrets ha estat descrita a la secció 1.4.1 de la Introducció. Està basada en la injecció de 12 compostos seleccionats en el sistema cromatogràfic i el posterior refinament conjunt dels valors de p , $(\log k)_0$ i P_S^N . En aquest treball s'han utilitzat columnes amb valors de $(\log k)_0$ i P_S^N determinats prèviament i recollits a la literatura, tals com els corresponents a les columnes Luna C₁₈ (2), Chromolith RP-18e, Symmetry C₁₈ i Resolve C₁₈ [8] utilitzant tant acetonitril com metanol com a modificadors orgànics, i també s'han caracteritzat altres columnes, com la Gemini NX, XTerra RP-18, XTerra MS C₁₈ [2] o la Kinetex C₁₈ i Acquity BEH C₁₈ [3] emprant només acetonitril com a modificador orgànic.

Els valors de $(\log k)_0$ i P_S^N dels sistemes cromatogràfics caracteritzats en aquest treball, així com els valors de p dels 12 compostos del conjunt de caracterització, s'indiquen a la Taula 3.1. En tots els casos, els paràmetres indicats van ser determinats utilitzant acetonitril, per tant només s'indica la columna emprada. Així mateix, es mostren els respectius paràmetres del sistema cromatogràfic de referència format per una columna Spherisorb ODS-2 i acetonitril com a modificador orgànic. Els paràmetres de transferència a i b corresponen al pendent i el terme independent de l'equació (1.27), nomenada en aquest Capítol com a (3.1), que serveix per transferir valors de p entre dos sistemes cromatogràfics, en aquest cas entre qualsevol dels sistemes de treball i el de referència:

$$p_{work} = a \cdot p_{reference} + b \quad (3.1)$$

Aquestes relacions lineals s'estableixen a partir dels valors de p dels 12 compostos utilitzats per caracteritzar els sistemes i indicats en la Taula 3.1.

Taula 3.1. Paràmetres de polaritat i de transferència dels sistemes cromatogràfics determinats en aquest treball utilitzant acetonitril com a modificador orgànic. També es mostren els valors de polaritat dels 12 compostos del set de caracterització en cadascun dels sistemes considerats.

	Spherisorb ODS-2	Gemini NX	XTerra RP-18	XTerra MS C ₁₈	Kinetex C ₁₈	Acquity BEH C ₁₈
Paràmetres de polaritat						
$(\log k)_0$	-1.02	-0.88	-0.35	-0.48	-0.84	-0.74
P_s^N	-0.03	-0.03	0.06	0.01	-0.02	0.01
Paràmetres de transferència						
a	-	0.86	0.78	0.85	0.88	0.95
b	-	0.21	-0.25	-0.22	0.09	-0.29
Polaritat dels compostos p						
1,2-dihidroxibenzè	1.79	1.71	1.22	1.33	1.42	1.28
Benzamida	1.69	1.44	0.98	1.14	1.67	1.48
3-metilfenol	2.82	2.69	2.08	2.15	2.56	2.38
Propiofenona	3.70	3.40	2.57	2.85	3.33	3.19
Benzoat de metil	3.59	3.31	2.48	2.78	3.24	3.06
4-nitrotoluenè	3.95	3.69	2.86	3.13	3.58	3.44
Naftalè	4.19	3.93	3.01	3.29	3.82	3.73
Propilbenzè	4.86	4.42	3.55	3.83	4.32	4.34
Heptanofenona	5.56	5.08	3.98	4.50	4.99	5.05
Butilbenzè	5.78	5.48	4.49	4.95	5.41	5.50
Crisè	6.13	5.64	4.48	5.07	5.61	5.70

3.2.3. Selecció del pH de la fase mòbil

Un aspecte fonamental en l'anàlisi de compostos ionitzables en cromatografia de líquids és el pH de treball de la fase mòbil, ja que condiciona la seva retenció. En la secció 1.3.4.1.2 s'han comentat algunes consideracions teòriques com les diverses escales de pH definides d'acord amb la IUPAC, necessàries per poder discutir la importància de la selecció dels tampons adients per treballar en cromatografia de líquids.

La variació del pH d'acord a la naturalesa del tampó i del tipus i fracció de modificador orgànic a la fase mòbil ha estat àmpliament discutida a la literatura [9-12]. Per tampons de naturalesa neutra o aniònica, tals com els formats pels parells àcid acètic/acetat o àcid fòrmic/formiat, el pH de les fases mòbils augmenta al afegir modificador orgànic. En canvi, per tampons de naturalesa catiònica com per exemple amoni/amoníac, el pH de la fase mòbil disminueix al augmentar la fracció de modificador orgànic. Això implica que dues fases mòbils preparades a partir de dos tampons aquosos amb el ma-

teix pH poden tenir un pH totalment diferent si la naturalesa dels tampons es diferent. A la Taula 3.2 s'indiquen alguns dels tampons utilitzats en aquest Treball per preparar fases mòbils així com la variació del seu pH amb l'addició d'acetonitril.

Taula 3.2. Variació del pH de diversos tampons aquosos amb l'addició d'acetonitril a la fase mòbil.

Sistema tamponant	$w_p\text{pH}$	$s_p\text{pH}$ en funció de la fracció d'acetonitril a la fase mòbil				
		20%	30%	40%	50%	60%
Acetat	3.00	3.23	3.35	3.46	3.58	3.69
Citrat	6.00	6.46	6.68	6.91	7.14	7.37
Fosfat	7.00	7.35	7.53	7.70	7.88	8.05
Pirrolidina	11.00	-	10.75	10.63	10.57	10.45
Carbonat	11.00	-	11.36	11.73	11.85	11.88

Tal com és d'esperar, la Taula 3.2 mostra que en el cas de l'acetat, citrat, fosfat i carbonat el pH de les fases mòbils augmenta amb l'addició d'acetonitril a la fase mòbil, mentre que disminueix en el cas de la pirrolidina. També s'observa com els valors de pH de fases mòbils preparades a partir de tampons aquosos d'igual pH com els de la pirrolidina i el carbonat van divergint fins a tenir més d'una unitat de pH de diferència en una fase mòbil que conté un 60% d'acetonitril. Per tant, s'ha de tenir en compte aquesta variació per garantir la presència de la forma neutra de la substància a l'hora de determinar el factor de retenció.

L'efecte del modificador orgànic sobre el pH la fase mòbil depèn del canvi en el pK_a de l'espècie tamponant en la fase mòbil. El pK_a dels anàlits segueix el mateix patró que l'esmentat abans pels tampons i, per tant, el pK_a de grups funcionals tals com àcids carboxílics o fenols augmentarà amb l'addició de modificador orgànic, mentre que per amines o piridines protonades, el pK_a disminuirà. A la literatura [11] es troben equacions que prediuen la variació del pK_a d'aquests grups funcionals en funció de la quantitat de modificador orgànic a la fase mòbil i que permeten, per tant, seleccionar un tampó de pH adient per preparar la fase mòbil desitjada. A la Taula 3.3 s'indica la variació predita del pK_a amb l'addició d'acetonitril d'alguns dels grups funcionals més rellevants.

Taula 3.3. Variació del pK_a d'alguns grups funcionals amb l'addició d'acetonitril a la fase mòbil.

Grups funcionals	${}^w pK_a$	${}^s pK_a$ en funció de la fracció d'acetonitril a la fase mòbil				
		20%	30%	40%	50%	60%
Àcids carboxílics alifàtics	3.00	3.38	3.56	3.76	4.01	4.32
Àcids carboxílics aromàtics	3.00	3.27	3.45	3.64	3.85	4.08
Fenols	10.00	10.86	11.03	11.29	11.71	12.34
Amines	10.00	9.84	9.71	9.55	9.37	9.22
Piridines	6.00	5.64	5.45	5.23	4.98	4.65

L'elució isocràtica permet un control acurat del pH, a diferència de l'elució en gradient, on hi ha a un canvi continu en la composició de la fase mòbil i, per tant, en el pH, de manera que per a un anàlit parcialment ionitzat, la relació entre la forma àcida i la forma bàsica va canviant durant el procés d'elució, afegint un punt de complexitat a l'anàlisi de substàncies ionitzables. Aquesta fou una raó important a l'hora d'escollir l'elució isocràtica per desenvolupar aquesta metodologia.

En definitiva, el coneixement dels efectes esmentats en aquesta secció és essencial a l'hora d'assegurar la mesura cromatogràfica de la forma neutra de qualsevol anàlit.

3.2.4. Optimització del tipus i fracció de modificador orgànic a la fase mòbil

El model de polaritat descrit a la secció 1.4.2. va ser establert utilitzant els dos solvents orgànics més habituals en cromatografia de líquids, l'acetonitril i el metanol. Així mateix, s'han caracteritzat diversos sistemes cromatogràfics dels esmentats a la secció 3.2.2. d'aquest Capítol emprant ambdós modificadors orgànics [8]. Per tant, atès que els valors de polaritat en qualsevol sistema caracteritzat, ja sigui utilitzant acetonitril o metanol, es poden transferir fàcilment al sistema de referència, es va considerar l'ús d'ambdós solvents en un interval de composició des d'un 20 a un 60% de modificador orgànic. En la Figura 3.2 es mostren els resultats obtinguts emprant dues fases mòbils, una amb acetonitril i l'altre amb metanol, d'igual composició (50% (v/v)). Els gràfics mostren la representació dels valors del $\log P_{ow}$ determinats amb l'aplicació de la metodologia desenvolupada en aquesta Tesi (secció 1.4.2.2) respecte els valors de la literatura [6] per a cada compost.

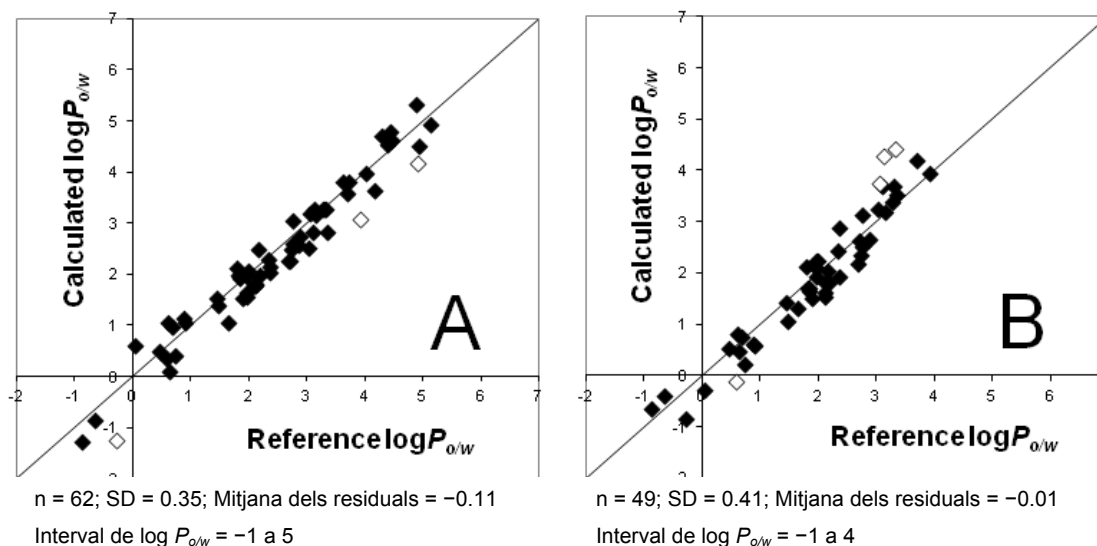


Figura 3.2. Representació gràfica dels valors de $\log P_{o/w}$ determinats en la columna Luna C₁₈ (2) envers els valors de referència. (A) Fase mòbil acetonitril/aigua 50% (v/v). (B) Fase mòbil metanol/aigua 50 % (v/v). Els punts marcat amb (\diamond) són outliers i la recta dibuixada correspon a la recta teòrica, de pendent unitat i terme independent zero.

Aquest exemple i d'altres que es poden observar a l'article I que es troba a l'Annex indiquen que l'acetonitril és un millor solvent en la determinació del $\log P_{o/w}$ d'acord amb el mètode proposat, doncs la dispersió dels resultats observats és major quan el solvent orgànic és metanol. A més a més, per a una mateixa composició de fase mòbil, els temps de retenció dels anàlits (i per tant, el temps total d'anàlisi) sempre és més gran utilitzant metanol que acetonitril donada la major força eluotròpica d'aquest últim. Una raó que pot explicar l'existència d'una major dispersió en els resultats obtinguts en metanol és la transferència entre sistemes cromatogràfics. Quan els valors de p s'obtenen en acetonitril utilitzant qualsevol columna diferent de la de referència, la transferència entre sistemes cromatogràfic només inclou un pas, que és el canvi de columna. En canvi, l'ús de metanol implica dues transferències, una transferència de columna però també una transferència de solvent encara que sigui en un únic pas (equació (3.1)).

Encara que alguns autors recomanen l'ús de metanol com a modificador de la fase mòbil per la seva similitud amb l'1-octanol, especialment en els procediments de determinació del $\log P_{o/w}$ a partir del factor de retenció extrapolat a aigua pura ($\log k_w$), l'acetonitril és el solvent orgànic recomanat en el càlcul de la polaritat del solut p i, conseqüentment, del seu $\log P_{o/w}$. Aquesta conclusió coincideix amb les observacions fetes per K. Valkó en la determinació del $\log P_{o/w}$ a partir del *chromatographic hydrophobicity index* o *CHI*, que ja va concloure que els resultats eren més consistents quan s'emprava acetonitril en lloc de metanol [13].

Un altre aspecte que es va estudiar és la fracció òptima de modificador orgànic. L'interval de composicions de fase mòbil considerat va anar des d'un 20% fins a un 60% de solvent tant per acetonitril com per metanol. Es va concloure que les fases mòbils que contenien un 40-50% d'acetonitril o un 50-60% de metanol proporcionaven els millors resultats. L'ús de concentracions més baixes implica que els compostos més retinguts tinguin precisament uns temps de retenció molt elevats o que fins i tot no s'elueixin de la columna, mentre que en les fraccions més elevades de solvent orgànics, els compostos menys retinguts elueixen molt a prop del temps mort de la columna, de manera que els valors de $\log k$ determinats tenen una elevada incertesa donada la pròpia variabilitat del temps mort de la columna en funció del tampó, tipus i fracció de modificador orgànic [14,15]. Atès que la majoria de compostos s'elueixen en un temps raonable utilitzant fases mòbils que contenen un 40-50% d'acetonitril, es considera aquesta composició com a òptima. L'efecte de la composició de la fase mòbil sobre els resultats es pot observar a la Taula 3.4.

Taula 3.4. Efecte de la fracció d'acetonitril en la fase mòbil sobre els resultats obtinguts. Columna Luna C₁₈ (2). *n*, nombre de compostos; SD, desviació estàndard.

Fracció d'acetonitril	<i>n</i>	SD	Mitjana dels residuals	Interval de $\log P_{o/w}$
20%	33	0.34	-0.10	-1 a 3
30%	44	0.37	-0.10	-1 a 3
40%	54	0.31	-0.11	-1 a 5
50%	62	0.35	-0.11	-1 a 5
60%	63	0.40	-0.13	-1 a 6

En la Taula 3.4 s'observa com a l'incrementar la fracció d'acetonitril a la fase mòbil augmenta el nombre de compostos que poden ser estudiats (*n*) i, com a conseqüència, l'interval de valors de $\log P_{o/w}$ també s'amplia. La mitjana dels residuals es manté gairebé inalterada però la desviació estàndard és mínima a un 40% d'acetonitril.

3.2.5. Valors de $\log P_{o/w}$ obtinguts en l'establiment del mètode

En aquesta primera secció s'ha il·lustrat l'optimització de la metodologia proposada en base a diverses consideracions tals com l'ús de fases mòbils tamponades, de dos modificadors orgànics habituals com l'acetonitril i el metanol, i la seva fracció en la fase mòbil. Per realitzar aquest procés, es van estudiar una seixantena de substàncies derivades del fenol, de l'anilina i alguns hidrocarburs policíclics aromàtics tals com el naftalè o l'antracè. Així mateix, es van incloure alguns fàrmacs amb funcionalitat àcida com per exemple l'ibuprofèn o el flurbiprofèn. Els resultats obtinguts per les diverses columnes estudiades mostren que el mètode proporciona valors de $\log P_{o/w}$ molt similars als de referència per gairebé totes les substàncies, amb l'excepció d'algunes substàncies més lipòfiles.

D'altra banda, aquesta primera etapa permeté avaluar la importància dels descriptors moleculars en els valors finals de $\log P_{o/w}$ determinats. D'acord amb l'equació (1.31), aquí nomenada com (3.2), els factors més importants en la determinació del $\log P_{o/w}$, a part del terme cromatogràfic, són la capacitat de donació d'enllaç d'hidrogen del solut (HDCA-2) i la polaritzabilitat (HOMO-LUMO). La influència de la donació per enllaç d'hidrogen serà discutida al llarg d'aquest Capítol III i especialment en el Capítol IV d'aquesta memòria. Així mateix, el pes relatiu de cada terme en l'equació (3.2) serà estudiat més detalladament en la secció 4 d'aquest Capítol III.

$$\log P_{o/w} = 1.22 p_{reference} + 1.89(\text{HDCA-2}) - 0.17(\text{HOMO-LUMO}) + 1.98(\text{pol/d}^2) + 1.27 \cdot 10^{-3}(\text{DPSA-1}) - 0.99 \quad (3.2)$$

Alguns dels resultats obtinguts permeten corroborar la influència dels descriptors a l'hora de complementar la retenció cromatogràfica. Per exemple, el 4-nitrotoluen i el 3,5-diclorofenol tenen una retenció igual ($p_{reference} = 4.02$) però en canvi el valor de $\log P_{o/w}$ determinat divergeix en 1.5 unitats logarítmiques (2.29 i 3.84, respectivament). Un altre exemple pot ser el 2,4,6-triclorofenol, el toluè i el clorobenzè, que tenen una retenció cromatogràfica equivalent ($p_{reference} = 4.42$) i en canvi els seus valors de $\log P_{o/w}$ són 3.81, 2.56 i 2.84, respectivament.

3.3. ESTUDI DE COMPOSTOS BÀSICS

El següent pas en el desenvolupament del mètode va ser l'avaluació de la lipofilicitat de compostos bàsics [2]. Per fer-ho, es van seleccionar una sèrie de columnes adients pel treball amb fases mòbils d'elevat pH i una col·lecció de substàncies que comprengués d'una banda alguns dels compostos no ionitzables estudiats a la primera part, per tal d'avaluar la robustesa del mètode, i d'altra banda una sèrie de substàncies amb característiques bàsiques, incloent-hi compostos d'interès farmacèutic.

Una gran quantitat dels compostos farmacèutics presenta grups funcionals bàsics. Això implica una dificultat afegida en la determinació de la seva lipofilicitat, doncs el fet que tinguin pK_a alts limita l'aplicabilitat del mètode potenciomètric [16]. L'ús de la cromatografia de líquids en fase inversa requereix emprar columnes que siguin estables en medi alcalí [17, 18]. Com s'ha explicat en l'apartat anterior, s'ha de considerar el control del pH de les fases mòbils i el coneixement pK_a dels soluts, aspectes que es comentaran a continuació.

3.3.1. Sistema cromatogràfic. Columnes i pH de la fase mòbil

Els sistemes cromatogràfics utilitzats consistiren en tres columnes diferents (Gemini NX, XTerra RP-18 i XTerra MS C₁₈) i acetonitril com a modificador orgànic en tots els casos. La composició de les fases mòbils fou d'un 40% o 50% d'acetonitril, atès que aquestes foren considerades com a òptimes al treball inicial.

La característica principal d'aquestes columnes és que permeten treballar amb fases mòbils amb un pH de fins a 12. Ara bé, no s'indica si aquest valor és el del tampó aquós o el d'una fase mòbil que ja conté modificador orgànic. Aquest fet és habitual, ja que es tracta de proporcionar un valor indicatiu, i no es té en compte la variabilitat del pH de la fase mòbil en funció del tampó utilitzat. En qualsevol cas, no és recomanable treballar amb tamps aquosos que tinguin un pH més gran de 11.5, pels possibles danys que podrien provocar a la columna.

En aquest treball, es van seleccionar dos tamps diferents: la pirrolidina i el carbonat, per preparar solucions a pH 11. Com s'ha mostrat a la Taula 3.3, la pirrolidina és un

tampó catiònic de manera que el seu pH disminueix a mesura que s'afegeix acetonitril a la fase mòbil. El carbonat, en canvi, és un tampó aniònic i per tant, el pH de la solució augmenta significativament amb l'addició d'acetonitril.

Amb aquestes condicions inicials, es van estudiar 58 compostos, dels quals 20 eren no ionitzables mentre que els altres 38 contenien algun grup funcional bàsic. Aquest grup compregué 26 fàrmacs comercials. A la Figura 3.3 es mostren les gràfiques dels valors determinats envers els de referència, utilitzant la columna Gemini NX.

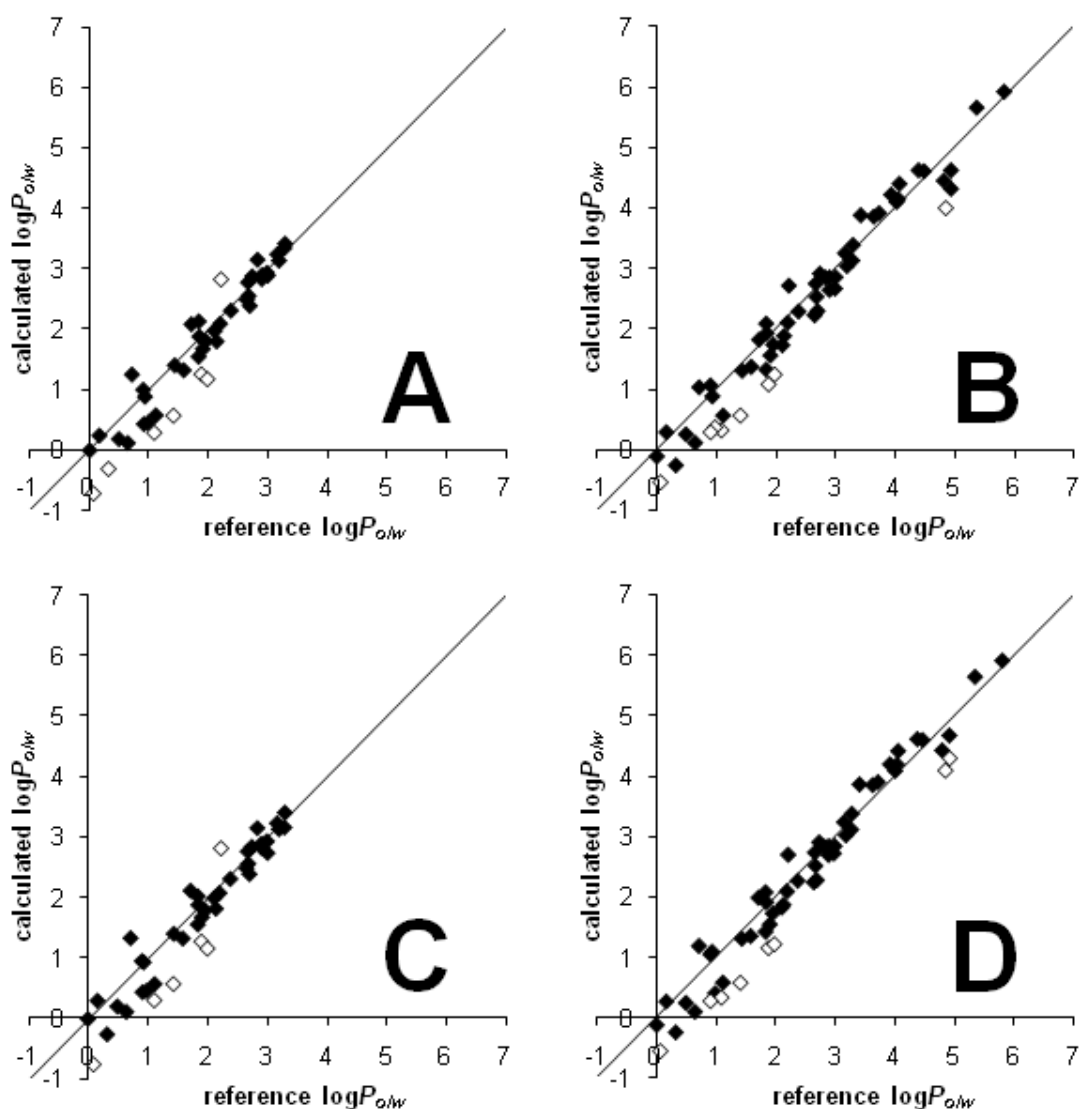


Figura 3.3. Representacions gràfiques dels valors de $\log P_{ow}$ obtinguts en la columna Gemini NX envers els valors de referència. (A) Fase mòbil acetonitril/aigua 40%, tampó hidrogencarbonat d'amoni. (B) Fase mòbil acetonitril/aigua 50%, tampó hidrogencarbonat d'amoni. (C) Fase mòbil acetonitril/aigua 40%, tampó pirrolidina. (D) Fase mòbil acetonitril/aigua 50%, tampó pirrolidina. Els punts marcat amb (\diamond) són outliers i la recta dibuixada correspon a la recta teòrica, de pendent unitat i terme independent zero.

En la Figura 3.3 mostra, en primer lloc, que l'ús de fases mòbils que contenen un 50% d'acetonitril (B i D) permeten determinar còmodament una major quantitat de compostos atesa la disminució en el temps de retenció de les substàncies, mantenint un temps de retenció adequat per als compostos menys retinguts, mentre que l'abast de les fases mòbils que contenen un 40% d'acetonitril (A i C) és menor. En segon lloc, no s'aprecien diferències significatives entre l'ús d'un tampó o d'un altre. Els gràfics A i B corresponen a l'ús de carbonat d'amoní com a tampó, mentre que els C i D es van obtenir utilitzant pirrolidina.

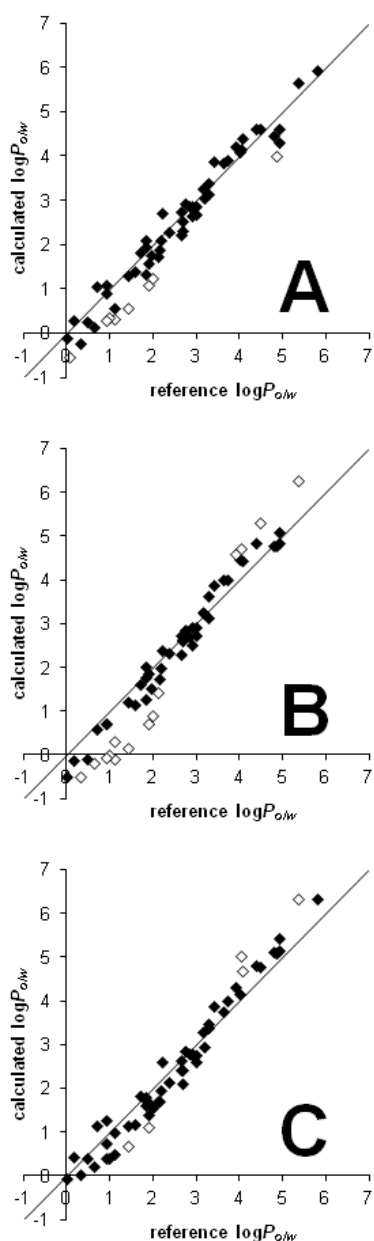


Figura 3.4. Valors obtinguts en les columnes (A) Gemini NX, (B) XTerra RP-18 i (C) XTerra MS C₁₈ amb una fase mòbil acetonitril/aigua 50% (v/v).

També es van avaluar els resultats obtinguts utilitzant cadascuna de les tres columnes, i es poden observar a la Taula 3.5 i a la Figura 3.4. La columna que proporcionà pitjors resultats fou la XTerra RP-18, com es pot observar al gràfic B de la Figura 3.4. En aquest gràfic, i també en el corresponent a la XTerra MS C₁₈ (C), els compostos amb valors de $\log P_{o/w}$ més baixos estan per sota de la recta teòrica, és a dir, els valors determinats són inferiors als de referència, mentre que els compostos amb $\log P_{o/w}$ alts tenen valors determinats superiors als de referència. En canvi, la columna Gemini NX (A) proporcionà valors uniformement distribuïts al llarg de tot l'interval de $\log P_{o/w}$ estudiat, encara que la mitjana dels residuals sigui lleugerament negativa. Si s'observa a la Taula 3.5 la columna que conté els valors de la suma dels quadrats dels residuals, es veu com la Gemini NX mostra millors resultats. El fet d'avaluar només les mitjanes dels residuals pot provocar conclusions enganyoses, ja que la columna XTerra MS C₁₈ té unes mitjanes dels residuals molt properes a zero però en canvi la suma dels quadrats és clarament superior a la calculada per la Gemini NX. En aquest cas, els errors es compensen al fer el promig.

Taula 3.5. Resultats obtinguts utilitzant tres columnes, dos tampons i dues composicions de fase mòbil diferents.

Columna	Tampó	Fracció d'acetonitril	<i>n</i>	Mitjana dels residuals	Suma quadrat residuals	Outliers
Gemini NX	Carbonat	40%	43	-0.15	6.1	7
		50%	58	-0.14	8.3	8
	Pirrolidina	40%	43	-0.16	6.4	6
		50%	58	-0.14	8.0	8
X Terra RP-18	Carbonat	40%	45	-0.05	11.7	13
		50%	58	-0.15	19.8	16
	Pirrolidina	40%	45	-0.02	11.3	13
		50%	58	-0.11	17.4	15
X Terra MS C ₁₈	Carbonat	40%	45	-0.06	6.0	5
		50%	58	-0.03	10.0	6
	Pirrolidina	40%	45	-0.07	6.4	5
		50%	58	-0.08	11.0	11

Arran d'aquesta diferència en el comportament observat en les tres columnes, es va considerar que la columna Gemini NX com a representativa i per tant, els resultats obtinguts d'aquí en endavant només faran referència a aquesta columna.

Com s'ha indicat, un dels objectius d'aquest estudi era comprovar l'efecte de treballar amb tampons de pH elevat en l'estimació de valors de $\log P_{o/w}$ mitjançant la metodologia proposada. Per tant, es va determinar el $\log P_{o/w}$ d'algunes substàncies no ionitzables o neutres al pH de treball i després es van comparar amb els valors obtinguts en altres columnes treballant amb tampons a pH neutre. Aquestes substàncies i el $\log P_{o/w}$ obtingut s'indiquen a la Taula 3.6.

Taula 3.6. Valors de $\log P_{o/w}$ obtinguts en tres sistemes cromatogràfics diferents.

Compost	Luna C ₁₈ (2) MeCN 50%	Chromolith RP-18 MeCN 40%	Gemini NX MeCN 50%
1,2,4-trimetilbenzè	-	3.70	3.86
1,4-dimetilbenzè	3.16	3.27	3.26
2,4-dinitroanilina	1.53	-	1.57
2,6-dimetilanilina	1.93	1.88	1.93
3,4-dicloroanilina	2.27	2.29	2.30
4-cloroanilina	1.98	2.29	2.09
4-nitrotoluen	2.15	1.99	2.30
Anilina	1.06	0.97	1.07
Benzamida	0.09	0.42	0.13
Benzè	1.79	1.86	1.89
Bifenil	3.96	4.18	4.10
Butilbenzè	4.52	4.61	4.63
Butirofenona	2.60	2.73	2.75
Clorobenzè	2.73	2.84	2.86
Crisè	-	6.22	5.92
Naftalè	3.28	3.33	3.39
Fenantrè	4.63	4.64	4.61
Propiofenona	1.98	2.09	2.11
Propilbenzè	3.80	3.89	3.92
Toluen	2.48	2.56	2.85

Observant els resultats de la Taula 3.6 es pot veure la consistència del procediment proposat i també, com era d'esperar, la nul·la influència del pH en la determinació del $\log P_{o/w}$ quan les substàncies estan en la seva forma neutra.

3.3.2. Estudi de la lipofilicitat de fàrmacs de característiques bàsiques

En aquest apartat es discutiran els resultats obtinguts en la determinació del $\log P_{o/w}$ dels 26 fàrmacs estudiats, tots ells de característiques bàsiques i amb valors de pK_a entre 7.12 i 10.20. En la Taula 3.7 s'indiquen els valors de $\log P_{o/w}$ determinats a partir del factor de retenció obtingut en la columna Gemini NX.

Taula 3.7. Determinació del $\log P_{o/w}$ a partir del factor de retenció $\log k$ obtingut en la columna Gemini NX en una fase mòbil acetonitril amb tampó de pirrolidina (50% (v/v)).

Fàrmac	$\log k$	$p_{reference}$	$\log P_{o/w}$ determinat	Residual
Atenolol	-0.44	0.99	0.28	0.12
Trimetoprim	-0.37	1.20	0.28	-0.63
Nadolol	-0.28	1.45	1.20	0.49
Pilocarpina	-0.27	1.48	-0.11	-0.11
Procaïnàmidà	-0.24	1.55	0.42	-0.56
Acebutolol	-0.08	2.02	1.99	0.28
Efedrina	-0.06	2.07	1.10	0.17
Clonidina	0.02	2.31	1.32	-0.11
Atropina	0.03	2.32	1.43	-0.40
Metoprolol	0.13	2.62	1.16	-0.72
Quinina	0.26	2.98	2.25	-0.39
Oxprenolol	0.30	3.08	1.83	-0.27
Mepivacaïna	0.31	3.13	1.73	-0.22
Trazodona	0.40	3.36	2.83	0.01
Propranolol	0.50	3.66	2.72	-0.26
Alprenolol	0.55	3.81	2.70	-0.19
Lidocaïna	0.66	4.11	2.70	0.49
Difenhidramina	0.87	4.70	3.12	-0.15
Bupivacaïna	1.03	5.15	3.86	0.45
Nortriptilina	1.05	5.21	4.19	0.15
Maprotilina	1.06	5.23	4.09	-0.76
Penbutolol	1.08	5.30	4.41	0.35
Ciproheptadina	1.17	5.57	4.29	-0.63
Imipramina	1.24	5.76	4.42	-0.38
Amitriptilina	1.34	6.04	4.66	-0.26
Clorpromazina	1.43	6.31	5.63	0.28

A partir de les dades indicades en la Taula 3.7 es va obtenir la següent correlació entre els valors determinats i els $\log P_{o/w}$ de referència (3.3):

$$\log P_{o/w} (det.) = 0.98(\pm 0.05) \log P_{o/w} (ref.) - 0.06(\pm 0.15)$$

$$n = 26, R^2 = 0.94, SD = 0.39, F = 399 \quad (3.3)$$

En aquesta correlació s'observa com el pendent de la correlació és gairebé la unitat mentre que l'ordenada en l'origen és molt propera a zero. La precisió del mètode en la determinació de la lipofilicitat de fàrmacs és força bona, d'aproximadament 0.4 unitats logarítmiques, equivalent a la desviació estàndard de la correlació.

Per tal de realitzar un estudi més ampli, es van combinar els valors de $\log P_{o/w}$ de compostos farmacèutics determinats en la primera etapa d'aquest treball i es van combinar amb els indicats a la Taula 3.7. Els compostos seleccionats presenten una gran diversitat d'estructures i funcionalitats, per exemple antiinflamatoris no esteroïdals tals com l'ibuprofèn o el naproxèn, anestèsics com la bupivacaïna, antidepressius com la nortriptilina o beta-bloquejants com l'acebutolol. A partir d'aquests resultats, es va obtenir la següent correlació entre els valors determinats i els de referència considerant les diverses columnes i composicions de fase mòbil estudiades:

$$\log P_{o/w} (det.) = 0.98(\pm 0.02) \log P_{o/w} (ref.) - 0.07(\pm 0.07)$$

$$n = 84, R^2 = 0.96, SD = 0.35, F = 1828 \quad (3.4)$$

De nou, aquesta correlació indica que el mètode proporciona valors de $\log P_{o/w}$ equivalents als de referència amb una precisió inferior a 0.4 unitats logarítmiques. Aquesta desviació estàndard és de l'ordre de les esmentades a la bibliografia [13, 17-20], amb la particularitat que el mètode aquí proposat proporciona directament el $\log P_{o/w}$ dels compostos, a diferència dels altres mètodes cromatogràfics descrits que els determinen a partir de diversos paràmetres de lipofilicitat tals com el $\log k$, el $\log k_w$ o el CHI.

Per últim, cal discutir la influència dels descriptors moleculars en els valors de $\log P_{o/w}$ determinats. En primer lloc, es demostra la incapacitat de la retenció cromatogràfica per predir directament el $\log P_{o/w}$ sense incloure cap tipus de correcció relacionada amb l'estructura de la molècula, i molt especialment, amb la capacitat de donació d'enllaç d'hidrogen per part dels soluts. Aquest aspecte té una gran rellevància, i de fet, s'ampliarà la discussió en el Capítol IV d'aquesta memòria. Abraham [21, 22] demostrà que l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen dels soluts no afecta a la seva partició en el sistema 1-octanol/aigua, mentre que sí que és rellevant en la partició en cromatografia de líquids [23], és a dir, que dues substàncies que presenten una retenció equivalent en cromatografia de líquids no tenen necessàriament la mateixa lipofilicitat. Aquest fet va ser corroborat per K. Valkó [13] que va millorar la correlació entre el paràmetre cromatogràfic CHI i el $\log P_{o/w}$ afegint un descriptor que reflectia l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen del solut. En aquest treball, el descriptor que conté aquesta informació és l'HDCA-2. A la Taula 3.8 es poden observar les contribucions de cadascun dels descriptors moleculars en la determinació del $\log P_{o/w}$ a partir de l'equació (3.2).

Taula 3.8. Comparació entre les contribucions de cada terme a l'equació (3.2) per grups de substàncies amb la mateixa retenció

Compound	$\log k$	1.22 $p_{reference}$	1.89 HDCA-2	- 0.17 HOMO-LUMO	1.99 pol/d ²	- 1.27·10 ⁻³ DPSA-1	$\log P_{o/w}$ determinat
Acebutolol	-0.08	2.47	1.80	-1.42	0.56	-0.42	1.99
Efedrina	-0.06	2.52	0.95	-1.69	0.56	-0.25	1.10
Quinina	0.56	3.87	1.34	-1.44	0.02	-0.32	2.48
Mepivacaïna	0.57	3.88	0.79	-1.60	0.06	-0.35	1.79
Oxprenolol	0.58	3.92	0.96	-1.57	0.02	-0.36	1.99
Bupivacaïna	1.03	6.29	0.55	-1.59	0.06	-0.45	3.86
Nortriptilina	1.05	6.35	0.36	-1.52	0.34	-0.35	4.19
Maprotilina	1.06	6.38	0.36	-1.62	0.34	-0.38	4.09
Penbutolol	1.08	6.47	1.00	-1.60	0.02	-0.49	4.41

A la Taula 3.8 es pot observar com compostos amb la mateixa retenció tenen una contribució del terme $p_{reference}$ equivalent, per tant, les diferències en el $\log P_{o/w}$ derivat provenen del termes corresponents als descriptors estructurals. Per exemple, la efedrina i l'acebutolol tenen una retenció similar, i la diferència en el seu $\log P_{o/w}$ (≈ 0.9) és pràcticament igual a la diferència en el terme corresponent a l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen HDCA-2. Els altres exemples indicats en la Taula mostren també com les diferències es deuen majoritàriament al terme HDCA-2, mentre que els altres termes tenen una contribució força similar en els diversos compostos a comparar.

En definitiva, la segona part d'aquest treball ha permès ampliar la determinació de la lipofilitat a compostos bàsics d'interès farmacèutic amb uns resultats consistents per la majoria d'ells. A més s'han estudiat els diversos factors que contribueixen a la determinació del $\log P_{o/w}$ a partir de l'equació 3.2, remarcant la importància de complementar la retenció cromatogràfica amb informació estructural de la substància estudiada.

3.4. ESTUDI DE COMPOSTOS D'INTERÈS FARMACÈUTIC D'ESTRUCTURA COMPLEXA

3.4.1. Introducció

L'última secció d'aquest Capítol versa sobre l'extensió del mètode cromatogràfic proposat en aquesta Tesi a l'avaluació de la lipofilitat d'una col·lecció de fàrmacs amb un grau de complexitat estructural sensiblement més elevat que els estudiats fins el moment. Aquest canvi no afecta a la part cromatogràfica del mètode, que segueix essent la mateixa per qualsevol compost que es vulgui estudiar independentment de la seva estructura, però sí que ho fa sobre els descriptors moleculars.

Aquest treball sorgeix d'una col·laboració amb els Laboratoris Esteve, S.A., que va proporcionar 33 fàrmacs representatius de la seva col·lecció de compostos per tal de determinar la seva lipofilitat amb la metodologia proposada. Els fàrmacs considerats presenten una gran diversitat d'estructures i de grups funcionals, de manera que hi ha compostos àcids, bàsics, neutres i amfòters. La complexitat de les estructures va obligar a explorar els límits de l'equació (3.2). El model QSPR en el qual està basada aquesta equació va ser establert amb una col·lecció de 188 substàncies [24], la major part de les quals eren derivats benzènics, de l'anilina i del fenol. Malgrat això, el model i el mètode cromatogràfic que se'n deriva han proporcionat resultats consistents en la determinació del $\log P_{o/w}$ de fàrmacs àcids i bàsics, tal com s'ha vist a les seccions anteriors. A la Figura 3.5 es pot observar la creixent complexitat de les substàncies estudiades al llarg de l'establiment d'aquest mètode. A la primera part del treball es van estudiar substàncies amb funcionalitat àcida tal com el flurbiprofèn, a la segon compostos bàsics com la maprotilina i en aquesta última substàncies més complexes com l'atorvastatina.

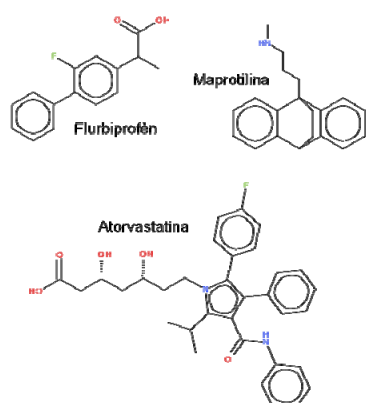


Figura 3.5. Exemples de tres compostos farmacèutics de complexitat creixent que s'han estudiat en aquest treball: flurbiprofèn, maprotilina i atorvastatina.

En aquesta secció s'estudiarà la diferència en els descriptors moleculars dels diversos compostos estudiats prèviament i els procedents dels Laboratoris Esteve, i també es compararan amb els dels 188 compostos utilitzats per establir el model QSPR.

Un segon aspecte objecte d'estudi és l'avaluació de la cromatografia de líquids d'elevada pressió o UHPLC en l'aplicació de la metodologia proposada. En general, els mètodes cromatogràfics per avaluar la lipofilicitat són mètodes *high-throughput*, és a dir, permeten estudiar una gran quantitat de compostos en un temps curt. Per fer-ho, s'han proposat diverses estratègies en HPLC tals com reduir la longitud de les columnes cromatogràfiques o augmentar el cabal de la fase mòbil, però aquests dos fets redunden en una menor precisió de les mesures cromatogràfiques, especialment pels compostos menys retinguts, ja que, com s'ha vist, la determinació del $\log k$ d'aquests compostos té una certa incertesa donada la dificultat en mesurar correctament el temps mort del sistema. En canvi, la irrupció de les columnes de UHPLC, que es caracteritzen per tenir una grandària de partícula menor a 2 μm , ha permès reduir el temps d'anàlisi fins a 6 vegades per compost mantenint la precisió. L'ús d'aquestes columnes requereix una instrumentació específica que permeti treballar amb pressions tan elevades com 15000 psi (\approx 1000 bar) i alhora han de tenir volums morts molt petits. Entre les columnes convencionals d'HPLC amb una grandària de partícula de 5 μm i les de UHPLC (per sota de 2 μm) es troba un ventall de columnes amb una grandària de partícula intermèdia que permet treballar amb sistemes convencionals d'HPLC però millorant els resultats comparats amb les columnes de 5 μm . Finalment, els valors obtinguts a partir de les mesures cromatogràfiques s'han comparat amb els valors de referència de la literatura, encara que per algunes substàncies no es van poder trobar valors experimentals, i d'altra banda també s'han determinat els valors de $\log P_{ow}$ mitjançant un mètode independent, la potenciometria.

3.4.2. Descriptors estructurals

Com s'ha exposat abans, un dels objectius d'aquest treball és l'avaluació de la robustesa de l'equació (3.2). Per fer-ho, s'han comparat els descriptors moleculars de les 188 substàncies emprades per establir el model QSPR, amb els dels 38 fàrmacs estudiats prèviament, i finalment amb els dels 33 estudiats en aquesta secció. La comparació s'ha fet representant dels valors de cada descriptor per cada substància envers el seu valor de $p_{reference}$. Aquestes representacions es mostren a la Figura 3.6.

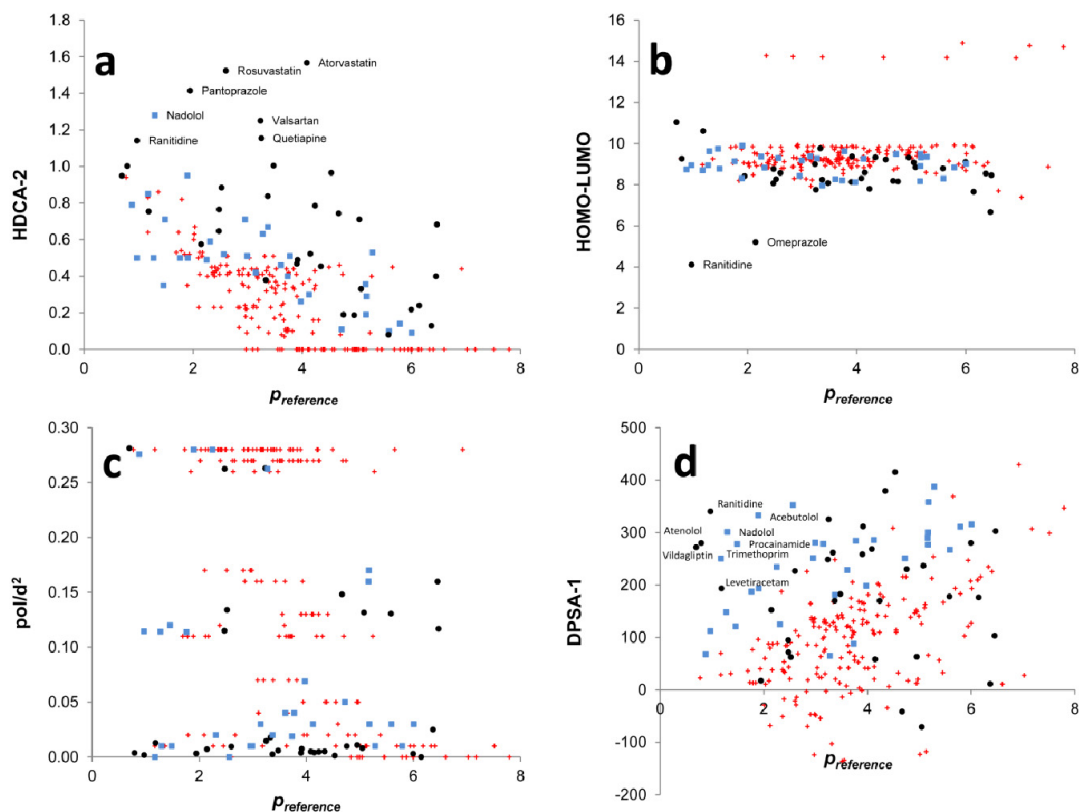


Figura 3.6. Representació gràfica dels valors dels descriptors estructurals envers la polaritat dels soluts $p_{reference}$. (a) HDCA-2, (b) HOMO-LUMO, (c) pol/d^2 , (d) DPSA-1. Llegenda: (+) substàncies del set original, (■) fàrmacs estudiats als treballs descrits en les dos primers seccions i (●) fàrmacs estudiats en aquesta secció.

Al gràfic **a** s'observa la representació del descriptor HDCA-2 en funció de la polaritat del solut en el sistema de referència. Es pot observar com un 20% dels fàrmacs estudiats presenten uns valors significativament superiors que els del grup original, de manera que tenen una capacitat de donació d'enllaç d'hidrogen força més alta que les substàncies utilitzades per establir el model QSPR. Entre aquestes substàncies que tenen valors de HDCA-2 grans, el pantoprazole, l'atorvastatina i la rosuvastatina són les que presenten uns valors més alts. El gràfic **b** mostra la representació del descriptor HOMO-LUMO que presenta uns valors molt similar per totes les substàncies considerades, a l'igual que el gràfic **c** pel descriptor pol/d^2 . La representació **d** mostra el descriptor DPSA-1, on es pot observar com alguns dels fàrmacs estudiats amb $p_{reference}$ petita tenen valors de DPSA-1 grans comparats amb el del grup original de substàncies. Encara que, en termes generals, aquest descriptor contribueix relativament poc a l'equació (3.2), pot causar lleugeres desviacions per compostos poc retinguts ($p_{reference}$ petita) però amb una elevada contribució del descriptor DPSA-1. Una vegada s'ha

analitzat la Figura 3.6, es pot considerar que l'equació (3.2) ha de ser prou robusta per avaluar el log $P_{o/w}$ d'una gran quantitat de compostos d'interès farmacèutic, potser amb l'excepció d'aquells que presentin una gran capacitat de donació per enllaç d'hidrogen o bé, en menor grau, els que tinguin un valor elevat de DPSA-1 i poca retenció cromatogràfica.

3.4.3. Estudi dels valors obtinguts

En aquest apartat s'analitzaran els valors de log $P_{o/w}$ pels 33 fàrmacs estudiats en tres sistemes cromatogràfics diversos i després es compararan amb els valors determinats per potenciometria i els de la literatura.

La llista de 33 fàrmacs compren substàncies àcides com la rosuvastatina, bàsiques com la fluoxetina, no ionitzables com la carbamazepina i amfòteres com la rosiglitazona. A la Taula 3.9 es poden observar els resultats obtinguts en la determinació del log $P_{o/w}$ mitjançant el mètode proposat en tres sistemes cromatogràfics diferents. En aquest punt s'ha de recordar que les tres columnes tenen dimensions i grandàries de partícula diferents. Per tant, la consistència dels resultats obtinguts amb cada sistema cromatogràfic demostra la robustesa de la determinació de la polaritat del solut $p_{reference}$ i, consegüentment, del log $P_{o/w}$. La desviació estàndard de les determinacions per tots els compostos és inferior a 0.15, amb l'excepció de la vildagliptina. Com s'observa a les columnes encapçalades amb "pH", els compostos van ser agrupats en funció del seu pK_a . Els que presentaven característiques àcides van ser analitzats utilitzant una fase mòbil acetonitril/àcid trifluoroacètic 50%, els compostos bàsics amb la mateixa composició utilitzant pirrolidina, mentre que els amfòters van ser analitzats a un valor de pH corresponent a la seva forma neutra.

Els valors obtinguts s'apleguen a la Taula 3.9 i mostren una concordança excel·lent entre els obtinguts en els diversos sistemes cromatogràfics i també amb els determinats potenciomètricament i els aportats per la literatura.

Taula 3.9. Valors de $\log P_{o/w}$ de 33 fàrmacs determinats en tres sistemes cromatogràfics diferents així com la seva comparació amb els valors determinats potenciomètricament i de la literatura.

Compound	Phenomenex Gemini NX		Phenomenex Kinetex C ₁₈		Waters Acquity BEH C ₁₈		$\log P_{o/w}$ cromatogràfic	$\log P_{o/w}$ potenciomètric	$\log P_{o/w}$ literatura
	pH	$\log P_{o/w}$	pH	$\log P_{o/w}$	pH	$\log P_{o/w}$			
Àcid flufenàmic	2.0	4.99	2.0	5.17	2.0	5.06	5.07 ± 0.09	5.19	5.25
Atenolol	11.7	0.11	-	-	11.7	-0.06	0.03 ± 0.12	0.06	0.16
Atorvastatina	2.0	5.13	2.0	5.15	2.0	5.20	5.16 ± 0.04	4.08	4.18
Carbamazepina	2.0	1.89	2.0	2.01	2.0	1.98	1.96 ± 0.06	-	2.19
Celecoxib	2.0	5.11	2.0	5.14	2.0	5.06	5.10 ± 0.04	-	-
Clorpromazina	11.7	5.47	-	-	11.7	5.43	5.45 ± 0.03	5.27	5.35
Clofazimina	11.7	6.68	-	-	-	-	6.68	-	7.48
Clopidogrel	11.7	4.53	6.0	4.57	11.7	4.50	4.53 ± 0.03	4.52	-
Diltiazem	11.7	3.07	-	-	11.7	2.94	3.01 ± 0.09	2.84	2.80
Duloxetina	11.7	3.58	-	-	11.7	3.50	3.54 ± 0.05	4.54	-
Fluoxetina	11.7	3.86	-	-	11.7	3.75	3.80 ± 0.08	4.42	4.50
Flurbiprofèn	2.0	3.70	2.0	3.56	2.0	3.52	3.60 ± 0.09	3.84	3.86
Glimepirida	2.0	4.27	2.0	4.39	2.0	4.26	4.31 ± 0.07	3.97	-
Indometacina	2.0	3.91	2.0	4.15	2.0	4.12	4.06 ± 0.13	4.10	4.27
Ketorolac	2.0	2.62	2.0	2.50	2.0	2.41	2.51 ± 0.10	2.62	2.72
Levetiracetam	2.0	-0.22	2.0	-0.32	2.0	-0.15	-0.23 ± 0.09	-	-
Loratadina	11.7	4.14	6.0	4.43	11.7	4.28	4.28 ± 0.14	4.88	4.40
Mebendazole	4.5	2.75	4.5	2.65	4.5	2.53	2.64 ± 0.11	-	2.83
Miconazole	11.7	5.42	-	-	11.7	5.59	5.56 ± 0.05	5.38	-
Milnacipran	11.7	1.87	-	-	11.7	1.83	1.85 ± 0.03	1.72	2.03
Naproxèn	2.0	3.05	2.0	3.18	2.0	3.10	3.10 ± 0.07	3.24	3.34
Omeprazole	5.7	1.74	5.7	1.81	5.7	1.64	1.73 ± 0.09	2.14	2.23
Pantoprazole	4.5	2.95	4.5	2.81	4.5	2.99	2.91 ± 0.10	2.04	-
Quetiapina	11.7	3.55	-	-	11.7	3.45	3.50 ± 0.07	3.13	3.54
Ranitidina	11.7	1.39	-	-	11.7	1.22	1.31 ± 0.12	0.26	1.03
Rimonabant	11.7	6.40	6.0	6.68	11.7	6.59	6.56 ± 0.14	-	6.70
Rosiglitazona	5.7	3.57	5.7	3.57	5.7	3.55	3.56 ± 0.01	3.10	-
Rosuvastatina	2.0	3.50	2.0	3.40	2.0	3.33	3.41 ± 0.09	2.52	-
Sertralina	11.7	4.75	-	-	11.7	4.83	4.79 ± 0.05	5.17	-
Tramadol	11.7	2.68	-	-	11.7	2.73	2.71 ± 0.03	2.70	2.63
Valsartan	2.0	4.26	2.0	4.19	2.0	3.99	4.15 ± 0.14	3.52	3.90
Venlafaxina	11.7	3.26	-	-	11.7	3.10	3.18 ± 0.11	3.05	3.00
Vildagliptina	11.7	0.50	-	-	11.7	-0.02	0.24 ± 0.37	-0.16	-

Tot i així, alguns compostos presenten valors de $\log P_{o/w}$ cromatogràfic diferents als potenciomètrics i també als de la literatura. Els valors de $\log P_{o/w}$ cromatogràfic per l'atorvastatina i la rosuvastatina són gairebé una unitat logarítmica més gran que els potenciomètrics o els de la literatura. La causa és la seva elevada capacitat de donació per enllaç d'hidrogen, doncs com es pot observar a la Figura 3.5, l'atorvastatina té una subestructura que conté dos grups alcohol al costat de l'àcid carboxílic i, com a conseqüència, un elevat valor pel descriptor HDCA-2. La rosuvastatina mostra també la mateixa subestructura. Per tant, el terme corresponent a HDCA-2 en l'equació (3.2) pot ser inadequat per compostos que tinguin una gran capacitat de donació d'enllaç d'hidrogen. Malgrat això, altres compostos amb elevats valors de HDCA-2 tals com la quetiapina o el valsartan presenten valors de $\log P_{o/w}$ cromatogràfic similars als de la literatura encara que una mica més grans que els potenciomètrics. Per aquests compostos, un elevada contribució de HDCA-2 pot ser parcialment compensada quan el terme cromatogràfic ($p_{reference}$) a l'equació (3.2) també és gran. En qualsevol cas, per compostos amb valors d'HDCA-2 més grans de 1.5, el $\log P_{o/w}$ pot ser sobreestimat.

Un altre cas és el de dos compostos bàsics com la duloxetina o la fluoxetina, que presenten valors cromatogràfics inferiors als de referència. En aquest cas, atès que el descriptor HDCA-2 és similar al d'altres molècules amb una estructura equivalent, pot ser que la desviació sigui causada per una sobreestimació dels termes HOMO-LUMO i DPSA-1, que són els que tenen una contribució negativa en l'equació (3.2).

L'estudi de compostos amfòters té una dificultat afegida atesa l'existència de com a mínim dos valors de pK_a . En aquest treball s'han considerat quatre compostos d'aquest tipus: omeprazole, mebendazole, pantoprazole i rosiglitazona. Els tres primers presenten unes estructures similars entre ells, de manera que els pK_a es poden assignar al mateix grup funcional. A la Figura 3.7 s'indica l'estructura de l'omeprazole amb els dos grups funcionals que presenten equilibri àcid-base, el grup piridini, que es desprotona a un pK_a de 4.25 i la subestructura corresponent al benzimidazole, que perd el seu protó enllaçat a l'àtom de nitrogen, quedant carregat negativament ($pK_a = 8.64$). Per tant, la forma neutra de l'omeprazole es troba entre aquests dos valors de pK_a . A la Figura 3.7 també es pot observar l'estructura de la rosiglitazona. En aquest cas els dos pK_a són molt més propers. El primer pK_a (6.26) correspon a la desprotonació de l'ió piridini, mentre que el segona (6.67) s'assigna a la desprotonació del grup imida que queda carregat negativament.

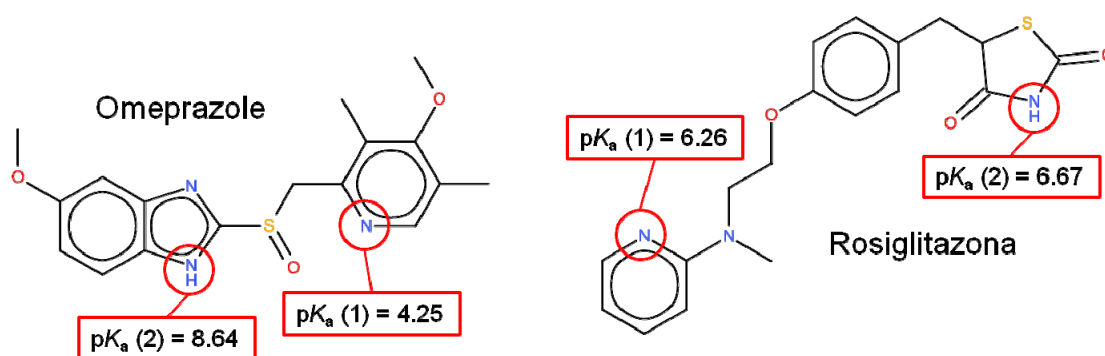


Figura 3.7. Estructura de dos compostos amfòters, l'omeprazole i la rosiglitazona, amb els valors de pK_a en aigua assignats al seu grup funcional corresponent.

D'altra banda, en la fase mòbil utilitzada (acetonitril/aigua 50%) els valors de ${}^s pK_a$ de l'omeprazole són 3.32 i 9.55, respectivament. Aquests valors s'han determinat experimentalment a partir de la corba de retenció del omeprazole en funció del pH de la fase mòbil, que es pot observar a la Figura 3.8 (A). L'interval de pH on l'omeprazole es troba en la seva forma neutra és força ample, de gairebé 4 unitats. L'estudi de la rosiglitazona, en canvi, presenta majors dificultats atesa la poca diferència entre els dos valors de pK_a . En aigua, la diferència entre ells (ΔpK_a) és de només 0.44, i la fracció de forma neutra és de 0.44 a un pH equidistant dels dos pK_a . Ara bé, el treball amb una fase mòbil acetonitril/aigua 50% permet separar els dos pK_a incrementant la fracció de forma neutra. Atès que el primer pK_a correspon a un grup piridini protonat, el seu valor disminueix de 6.26 a 5.41, mentre que el segon pK_a , corresponent a la desprotonació del grup imida, augmenta de 6.67 a 7.36. Així doncs, el ΔpK_a és ara de 1.95 i la fracció de forma neutra és 0.8 a un pH de 6.44, permetent una determinació més precisa del $\log P_{o/w}$ a l'aprofitar l'efecte de l'addició d'acetonitril a la fase mòbil. La corba de retenció vs. el pH per la rosiglitazona també es pot observar a la Figura 3.8 (B).

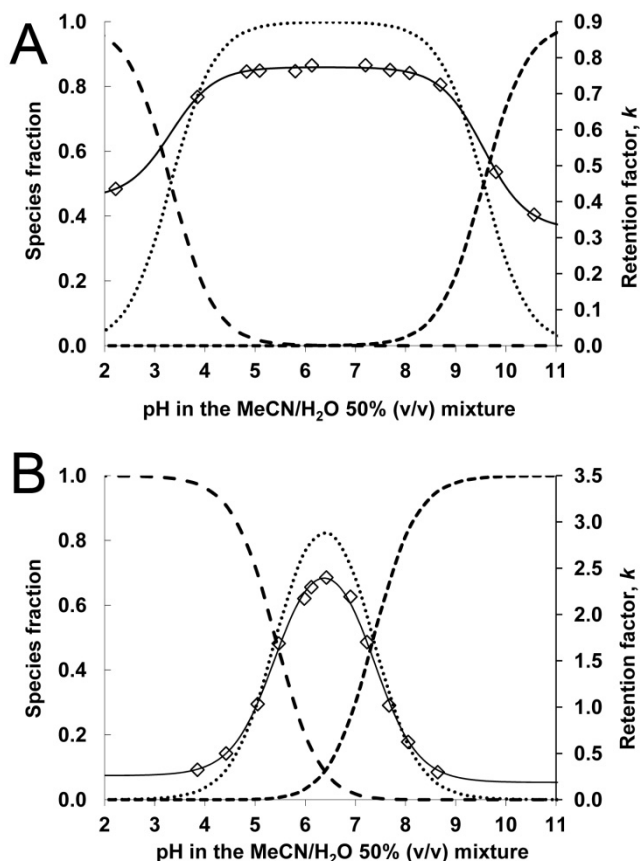


Figura 3.8. Perfils de retenció envers el pH per (A) omeprazole i (B) rosiglitazona. L'escala de l'esquerra correspon a la fracció de les espècies presents i la de la dreta al factor de retenció. Llegenda:

- (---) espècie positiva
- (.....) espècie neutra
- (- - -) espècie negativa
- (—) factor de retenció ajustat
- (◊) punts experimentals.

Com a part final d'aquest treball es va comprovar la bondat del mètode per determinar el $\log P_{o/w}$ de compostos d'interès farmacèutic a través de la correlació entre els valors cromatogràfics determinats per tots els fàrmacs estudiats en aquest Capítol i els valors de referència per a cadascun d'ells. S'ha d'esmentar que, pels compostos que no tenien valor de referència a la literatura es van considerar com a tals els determinats potenciomètricament en aquest treball. Els valors cromatogràfics seleccionats provinents de determinacions realitzades prèviament foren aquells obtinguts en les columnes Gemini NX i Luna C₁₈ (2) i treballant amb una fase mòbil acetonitril/aigua 50% (v/v). L'equació (3.5) mostra dita correlació, també il·lustrada a la Figura 3.9.

$$\log P_{o/w} (det.) = 0.97(\pm 0.03) \log P_{o/w} (ref.) - 0.01(\pm 0.09)$$

$$n = 66, R^2 = 0.95, SD = 0.40, F = 1250 \quad (3.5)$$

La correlació de la Figura 3.9 mostra l'ampli interval de valors de $\log P_{o/w}$ que proporciona la metodologia proposada, des de -1 fins a 7, és a dir, de gairebé 8 unitats logarítmiques, molt més ample que l'obtingut mitjançant el *shake-flask* o les determinacions potenciomètriques.

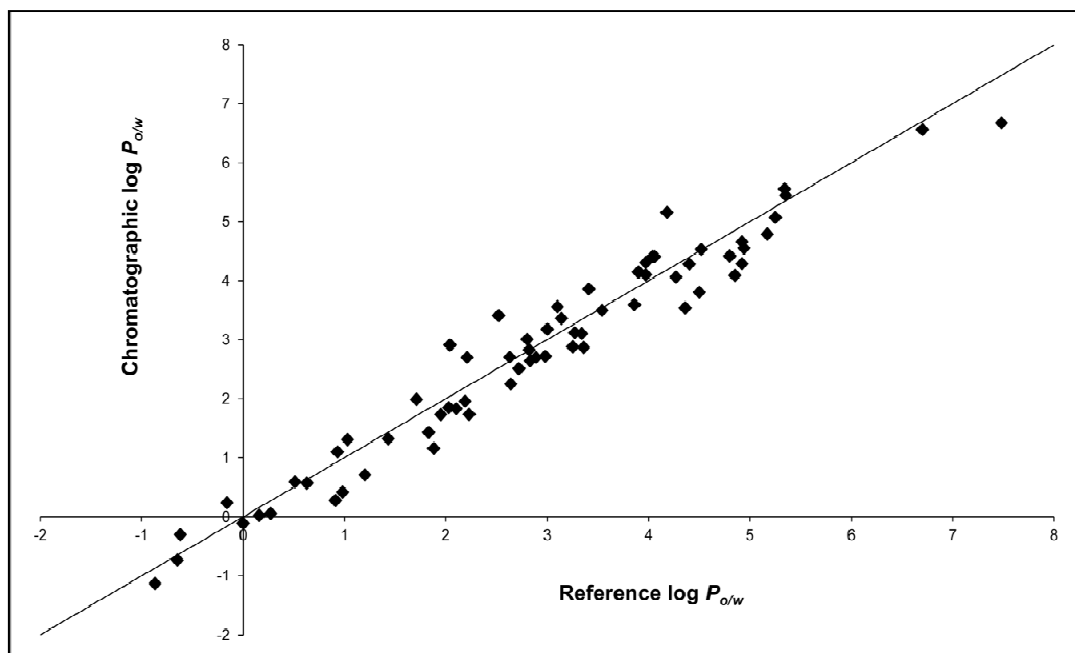


Figura 3.9. Relació lineal entre els valors de $\log P_{o/w}$ determinats amb el mètode proposat i els valors de referència de cada substància. S'inclouen les 66 substàncies d'interès farmacèutic estudiades en aquest Capítol. La recta correspon a la recta teòrica de pendent unitat i terme independent zero.

3.5. REFERÈNCIES

- [1] J.M. Pallicer, S. Pous-Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3026.
- [2] J.M. Pallicer, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6356.
- [3] J.M. Pallicer, C. Calvet, A. Port, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1240 (2012) 113.
- [4] EPA Product Properties Test Guidelines, OPPTS 830.7550, Partition Coefficient (n-octanol/water), Shake Flask Method, 1996.
- [5] A. Leo, D.H. Hoekman, C. Hansch, Exploring QSAR, Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants., American Chemical Society, Washington DC 1995.
- [6] Biolum Online Database: <http://www.biobyte.com/>
- [7] A. Avdeef, Partitioning into Octanol, Absorption and Drug Development, John Wiley & Sons, Inc., 2003, pp. 42-66.
- [8] E. Lázaro, P. Izquierdo, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5214.
- [9] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1059 (2004) 33.
- [10] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 203.
- [11] X. Subirats, M. Rosés, E. Bosch, *Sep. Purif. Rev.* 36 (2007) 231.
- [12] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, *LC GC North Am.* 27 (2009) 1000.
- [13] K. Valkó, C. My Du, C. Bevan, D.P. Reynolds, M.H. Abraham, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 1137.
- [14] C.A. Rimmer, C.R. Simmons, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 219.
- [15] F.Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, *Talanta* 53 (2000) 667.
- [16] C. Ràfols, E. Bosch, R. Ruiz, K.J. Box, M. Reis, C. Ventura, S. Santos, M.E. Araújo, F. Martins, *J. Chem. Eng. Data* 57 (2012) 330.
- [17] D. Benhaim, E. Grushka, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 65.
- [18] X. Liu, H. Hefesha, H. Tanaka, G. Scriba, A. Fahr, *Chem. Pharm. Bull.* 56 (2008) 1417.
- [19] R. Kaliszan, P. Haber, T. Baczek, D. Siluk, K. Valkó, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 117.
- [20] C. Giaginis, S. Theocharis, A. Tsantili-Kakoulidou, *J. Chromatogr. A* 1166 (2007) 116.
- [21] M.H. Abraham, *Chem. Soc. Rev.* 22 (1993) 73.
- [22] M.H. Abraham, H.S. Chadha, A.J. Leo, *J. Chromatogr. A* 685 (1994) 203.
- [23] M.H. Abraham, M. Rosés, *J. Phys. Org. Chem.* 7 (1994) 672.
- [24] R. Bosque, J. Sales, E. Bosch, M. Rosés, M.C. García-Álvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (2003) 1240.

Capítol IV

Contribució de l'acidesa de l'enllaç
d'hidrogen en el log $P_{o/w}$

4.1. INTRODUCCIÓ

En aquesta part de la memòria es tractarà en profunditat un aspecte que s'ha anat esmentant en els Capítols anteriors: la rellevància de la informació estructural en l'estimació del $\log P_{o/w}$ a partir de mesures cromatogràfiques, i especialment, de la correcció a partir de la capacitat de donació o acidesa de l'enllaç d'hidrogen dels soluts. S'ha demostrat que entre els quatre descriptors moleculars continguts en el model proposat, el que conté la informació relativa a l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen (HDCA-2) és el més important, en el sentit que permet discriminar entre molècules amb una retenció similar [1]. Per tant, en aquest Capítol s'estudiarà de forma qualitativa i mitjançant l'equació de solvatació d'Abraham la influència d'aquesta propietat del solut en el $\log P_{o/w}$ quan es determina a partir de mesures cromatogràfiques.

Una segona part d'aquest Capítol consistirà en la comparació de diversos descriptors de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen calculats a partir de diversos procediments i programaris indicats al Capítol II (Part Experimental). S'avaluaran descriptors que es deriven de les representacions bi i tridimensionals de la molècula mitjançant l'establiment de models QSPR basats en la polaritat del solut $p_{reference}$. Aquests models són convenientment validats mitjançant un procés de validació interna i un de validació externa. Per últim, es consideraran dos aspectes relacionats amb l'ús de descriptors determinats a partir de representacions tridimensionals de les estructures tals com l'estereoisomeria i les diverses conformacions generades en el procés d'optimització de la geometria de la molècula.

Per desenvolupar aquest treball, s'han considerat un centenar de compostos d'interès farmacèutics provinents de les publicacions desenvolupades al Capítol III així com d'altres que s'han afegit específicament per aquest treball. Finalment, cal esmentar que aquest estudi ha donat lloc a la submissió d'una publicació [2].

4.1.1. Equació general de solvatació. Descripció del $\log P_{o/w}$

El model de paràmetres de solvatació d'Abraham [3], descrit al Capítol I, està basat en la relació lineal entre una propietat del solut i una sèrie de descriptors del solut i del solvent, d'acord amb l'equació (1.28), anomenada (4.1) en aquest Capítol:

$$\log SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (4.1)$$

on SP és la propietat del solut, E representa a la refracció molar en excés, S conté la dipolaritat-polaritzabilitat del solut, A i B l'acidesa i basicitat de l'enllaç d'hidrogen, respectivament, i V el volum de McGowan. Com s'ha esmentat, aquesta equació només és aplicable si el compost està en la seva forma neutra.

Quan el model de paràmetres de solvatació s'aplicà a la partició en 1-octanol/aigua, es va obtenir la següent correlació [4]:

$$\log P_{o/w} = 0.09 + 0.56E - 1.05S + 0.03A - 3.46B + 3.81V \quad (4.2)$$

$$n = 613, \quad R^2 = 0.99, \quad SD = 0.12, \quad F = 23161$$

L'anàlisi dels termes corresponents a cada propietat del solut mostra com tots ells són rellevants a l'hora d'explicar la partició d'un solut en una mescla 1-octanol/aigua amb l'excepció de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen. El gran nombre de soluts utilitzats per establir la correlació dona una idea de la robustesa de la mateixa, que també es va corroborar en un treball posterior [5] on es va obtenir la següent correlació a partir d'una altra col·lecció de substàncies:

$$\log P_{o/w} = 0.19 + 0.53E - 1.02S - 0.01A - 3.51B + 3.74V \quad (4.3)$$

$$n = 146, \quad R^2 = 0.99, \quad SD = 0.10, \quad F = 12200$$

4.1.2. Influència de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen en HPLC

L'anàlisi de la polaritat del solut, $p_{reference}$, mitjançant l'equació d'Abraham va donar lloc a la següent correlació [5]:

$$p_{reference} = 2.29 + 0.58E - 1.24S - 1.33A - 3.09B + 3.33V \quad (4.4)$$

$$n = 146, \quad R^2 = 0.99, \quad SD = 0.17, \quad F = 6620$$

on s'observen diferències menors respecte a l'equació (4.2) en els coeficients dels diferents termes amb l'excepció del de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen, que presenta una diferència molt significativa. Aquest anàlisi coincideix amb els d'altres paràmetres de retenció en HPLC tals com el *chromatographic hydrophobicity index* (CHI) [6], o el factor de retenció ($\log k$) [7] on s'observà que tots els descriptors, incloent l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen, són rellevants en la partició entre una fase mòbil que conté metanol

o acetonitril i una fase estacionària formada per cadenes alquílques C₁₈ tal com les emprades en aquest treball.

En conseqüència, l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen afecta significativament la retenció en HPLC mentre que no té una influència rellevant en la partició en 1-octanol/aigua. Això significa que el log $P_{o/w}$ i el log k en HPLC només presenten una correlació lineal en el cas de soluts amb una acidesa de l'enllaç d'hidrogen negligible, i que s'ha de corregir aquest efecte quan es determina el log $P_{o/w}$ a partir de mesures cromatogràfiques. Per exemple, en l'equació (4.5) s'indica una correlació entre $p_{reference}$ i el log $P_{o/w}$ on s'observa aquest efecte, encara que també cal afegir un descriptor menys rellevant, la polaritat/polaritzabilitat S , per tal d'obtenir resultats satisfactoris [8].

$$p_{reference} = 0.917 \log P_{o/w} - 1.441A - 0.367S + 2.190 \quad (4.5)$$

$$n = 225, \quad R^2 = 0.99, \quad SD = 0.25, \quad F = 2002$$

Com s'ha vist en el Capítol I, el paràmetre CHI determina una altra escala de lipofilitat a partir de mesures cromatogràfiques en gradient i també en aquest cas la correlació entre CHI i el log $P_{o/w}$ requereix l'addició del descriptor A de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen [6].

De les cent i escaig substàncies considerades en aquest Capítol, es van trobar publicats els descriptors experimentals d'Abraham (E , S , A , B , V) per a 42 d'elles. Així doncs, es van establir les següents correlacions pel log $P_{o/w}$ i $p_{reference}$:

$$\log P_{o/w} = 0.39(\pm 0.31) + 0.47(\pm 0.11)E - 1.01(\pm 0.09)S$$

$$- 0.00(\pm 0.17)A - 3.46(\pm 0.16)B + 3.71(\pm 0.19)V \quad (4.6)$$

$$n = 42, \quad R^2 = 0.95, \quad SD = 0.30, \quad F = 137$$

$$p_{reference} = 2.04(\pm 0.37) + 0.26(\pm 0.14)E - 0.85(\pm 0.11)S$$

$$- 0.82(\pm 0.21)A - 3.15(\pm 0.19)B + 3.22(\pm 0.23)V \quad (4.7)$$

$$n = 42, \quad R^2 = 0.93, \quad SD = 0.37, \quad F = 90$$

Com es pot observar a ambdues correlacions, tots els termes tenen un coeficient similar amb l'excepció de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen, corroborant el que s'havia il·lustrat a les equacions (4.2), (4.3) i (4.4).

Per confirmar aquesta anàlisi des d'un punt de vista més quantitatiu, s'ha utilitzat un procediment descrit a la literatura [9, 10] per comparar sistemes fisicoquímics o biolò-

gics mitjançant el model de paràmetres de solvatació o equació d'Abraham. El mètode està basat en el càlcul de la norma del vector dels coeficients d'acord amb la següent expressió:

$$l = \sqrt{e^2 + s^2 + a^2 + b^2 + v^2} \quad (4.8)$$

Després, els coeficients són normalitzats dividint el seu valor per la norma del vector, i finalment s'avalua la diversitat en els coeficients a través de la diferència entre els coeficients normalitzats. Els resultats obtinguts aplicant aquest procediment per les Eqs. (4.6) i (4.7) s'il·lustren a la Taula 4.1.

Taula 4.1. Valors dels coeficients normalitzats i de la norma l per a cadascun dels dos sistemes, així com les diferències. Per establir les correlacions s'han utilitzats les substàncies amb valors experimentals dels descriptors d'Abraham ($n = 42$).

Coeficient	log $P_{o/w}$	$p_{reference}$	Diferència
e/l	0.09	0.06	0.03
s/l	-0.19	-0.18	-0.01
a/l	0.00	-0.18	0.18
b/l	-0.67	-0.68	0.01
v/l	0.72	0.69	0.03
l	5.19	4.66	

Per tant, com s'observa a la Taula 4.1., l'únic descriptor que presenta una diferència significativa entre el sistema cromatogràfic $p_{reference}$ i el sistema de partició 1-octanol/aigua és l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen.

Així doncs, en la propera secció d'aquest Capítol s'avaluaran diversos descriptors de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen, que addicionats a la polaritat del solut $p_{reference}$ serviran per generar equacions QSPR aptes, en principi, per determinar el log $P_{o/w}$ de compostos orgànics d'interès farmacèutic.

S'ha vist que el model de paràmetres de solvatació d'Abraham proporciona una eina molt valuosa per estudiar sistemes de partició i que és de gran interès conèixer aquest tipus de relacions lineals. Ara bé, com s'ha comentat al Capítol I, no es disposa de

descriptors per a totes les substàncies d'interès ja que han de ser determinats experimentalment, i això limita l'aplicabilitat del model, que d'altra banda proporciona resultats molt consistents, com per exemple l'equació (4.2) per predir el $\log P_{o/w}$. Com a conseqüència d'aquesta manca de valors experimentals pels descriptors, s'han proposat diverses aproximacions teòriques per calcular aquests descriptors a partir de l'estructura del compost d'interès. L'aproximació proposada per Platts *et al.* [11, 12] ha estat utilitzada en aquest treball ja que els valors són fàcilment accessibles al programa ADME Suite 5.0 de ACD/Labs, doncs només es requereix de l'usuari el nom de la substància.

Un altre grup de descriptors són els anomenats tridimensionals, que són determinats a partir de l'estructura tridimensional de les molècules. En aquest cas, s'ha de dibuixar l'estructura i optimitzar la seva geometria. La generació d'estructures tridimensionals provoca l'aparició d'estereoisòmers per aquelles substàncies amb estereocentres, que en els descriptors d'Abraham calculats no es consideren. Per tant, per una mateixa substància es generaran diverses estructures en 3D en funció del nombre de estereocentres que tingui, afegint un punt de complexitat a l'estudi.

D'altra banda, el procés d'optimització de les estructures també genera diverses conformacions. Per conveni s'agafen els descriptors calculats a partir de la conformació de mínima energia com els propis de la substància. Ara bé, l'ús d'un programari específic (Discovery Studio 3.0) permeté generar totes les conformacions simultàniament. Es van considerar a efectes d'aquest estudi la de mínima energia i també la conformació més diferent respecte a la de mínima energia. A partir d'elles es van calcular els descriptors moleculars i es va avaluar l'efecte de les diferents conformacions en el valor final del $\log P_{o/w}$.

A la Part Experimental s'ha descrit el procediment per calcular els descriptors a partir dels programes corresponents. Entre els descriptors tridimensionals generats, s'han seleccionat l'HDCA-2 provinent del programa CODESSA, que s'ha estudiat al Capítol anterior, i dos descriptors de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen generats a partir del programa Volsurf+: el volum dels donadors d'enllaç d'hidrogen WO1 i un altre descriptor anomenat DRDODO. Cal esmentar que els models generats a partir d'aquests descriptors 3D s'hagueren de complementar mitjançant l'addició d'un descriptor de polaritzabilitat que també forma part del model cromatogràfic explicat al Capítol III, el descriptor HOMO-LUMO. L'addició d'aquest descriptor al de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen millorà la correlació entre la polaritat del solut $p_{reference}$, i el $\log P_{o/w}$.

Els models QSPR van ser generats a partir de 125 estructures. El conjunt de substàncies comptava amb 103 estructures, 22 de les quals van ser desdoblades en els seus dos estereoisòmers, atès que la mesura cromatogràfica es va realitzar a partir d'una mescla racèmica, mentre que per altres substàncies amb estereocentres només es va considerar un estereoisòmer ja que només es va injectar aquest en el sistema cromatogràfic. D'aquestes 125 estructures se'n van eliminar 6 que eren outliers d'acord amb el criteri estadístic establert (residuals superiors a dos cops la desviació estàndard dels resultats) i finalment es va dividir el total de les estructures en un *training set* amb 2/3 de les mateixes (79 estructures) i un *test set* amb 1/3 (40 estructures).

L'avaluació de la bondat dels models es realitzà mitjançant una validació interna al *training set* seguida de una validació externa al *test set* [13, 14]. Per la primera, es considerà la desviació estàndard de la correlació entre el log $P_{o/w}$ predit i el log $P_{o/w}$ de referència, el coeficient de determinació R^2 i el coeficient de correlació de la validació creuada Q^2_{LMO} (*leave-many-out*). Per la validació externa, s'avaluaren els paràmetres obtinguts a partir de la correlació entre el log $P_{o/w}$ predit i el de referència, tals com la desviació estàndard, el coeficient de determinació del *test set* R^2 , el coeficient de correlació de la validació creuada Q^2_{LMO} (*leave-many-out*), el coeficient de correlació quan la regressió passa per l'origen R^2_0 i el pendent de la correlació m . També es van calcular l'error mitjà AE i l'error absolut mitjà AAE .

4.2. GENERACIÓ DE MODELS QSPR

Els models QSPR s'han generat d'acord amb totes les consideracions exposades abans. Així doncs, en aquesta secció s'exposaran aquests models, s'analitzaran els aspectes tal com l'estereoisomeria o la conformació dels compostos i el seu efecte en els descriptors tridimensionals i finalment es compararan els diversos models proposats.

4.2.1. Descriptor A

El model es genera a partir de la retenció cromatogràfica, expressada com la polaritat del solut $p_{reference}$ i del descriptor de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen A calculat a partir de l'aproximació de Platts [11]. Utilitzant les 79 estructures del *training set*, el model pren la següent forma (4.9):

$$\log P_{o/w} = 1.06(\pm 0.03)p_{reference} + 0.76(\pm 0.14)A - 1.20(\pm 0.13) \quad (4.9)$$

$$n = 79, \quad R^2 = 0.95, \quad SD = 0.35, \quad F = 658$$

Aquesta equació és consistent amb una expressió equivalent derivada de les 42 substàncies de les quals es tenien els valors experimentals d' A (4.10):

$$\log P_{o/w} = 1.08(\pm 0.04)p_{reference} + 0.80(\pm 0.17)A - 1.19(\pm 0.18) \quad (4.10)$$

$$n = 42, \quad R^2 = 0.95, \quad SD = 0.28, \quad F = 400$$

És important veure que els coeficients de tots els descriptors involucrats en ambdues equacions són molt similars, malgrat que ambdues col·leccions de valors de A (experimentals i calculats) estan només moderadament correlacionades [11].

4.2.2. Descriptor calculat amb CODESSA, HDCA-2

El descriptor HDCA-2 ha estat seleccionat per aquest treball donats els bons resultats obtinguts utilitzant el model cromatogràfic proposat en el Capítol anterior i basat en l'ús d'aquest descriptor, entre d'altres. Dels quatre descriptors, a més del paràmetre p_{refe-

$reference$, que contenia el model QSPR utilitzat en la metodologia proposada, els descriptors HDCA-2 i HOMO-LUMO mostraren una major rellevància estadística. S'ha de recordar que aquest últim expressa la polaritzabilitat de la substància. Per a les substàncies del *training set* es va establir la següent correlació (4.11):

$$\begin{aligned} \log P_{o/w} = & 1.06(\pm 0.03)p_{reference} + 0.67(\pm 0.13)(\text{HDCA-2}) + \\ & -0.22(\pm 0.05)(\text{HOMO-LUMO}) + 0.61(\pm 0.53) \end{aligned} \quad (4.11)$$

$n = 79, \quad R^2 = 0.95, \quad SD = 0.33, \quad F = 492$

Es pot observar com l'equació (4.11) mostra coeficients i paràmetres estadístics similars a les equacions (4.9) i (4.10), per tant, proporciona una capacitat predictiva similar als anteriors.

4.2.3. Descriptors calculats amb Volsurf+, WO1 i DRDODO

De l'amplia col·lecció de descriptors que proporciona Volsurf+, s'han seleccionat dos dels relacionats amb l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen a efecte d'avaluar la seva capacitat a l'hora de predir el log $P_{o/w}$ combinats amb la retenció cromatogràfica. Volsurf+ proporciona dues col·leccions de descriptors relacionats amb l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen, els volums de donació d'enllaç d'hidrogen (WO1-6) i una sèrie de descriptors farmacofòrics (DR-DO-AC). Així doncs, es van avaluar tots els descriptors de cada col·lecció per separat i de cadascuna d'elles es va seleccionar el descriptor que proporcionà millors resultats en la seva correlació amb $p_{reference}$ per estimar el log $P_{o/w}$. També en aquest cas s'ha considerat convenient l'addició del descriptor HOMO-LUMO incorporat al programa Volsurf+.

Amb la primera col·lecció proporcionada per Volsurf+, es va generar el següent model QSPR a partir del descriptors WO1, HOMO-LUMO i $p_{reference}$ de les 79 estructures del *training set* (4.12):

$$\begin{aligned} \log P_{o/w} = & 1.01(\pm 0.03)p_{reference} + 1.75 \cdot 10^{-3}(\pm 4.95 \cdot 10^{-4})\text{WO1} + \\ & -0.24(\pm 0.06)(\text{HOMO-LUMO}) + 1.11(\pm 0.54) \end{aligned} \quad (4.12)$$

$n = 79, \quad R^2 = 0.95, \quad SD = 0.35, \quad F = 427$

De la segona col·lecció de descriptors, es va seleccionar el descriptor DRDODO. Utilitzant-lo en lloc de WO1 per expressar l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen dels soluts, s'obté la següent correlació a partir de les substàncies del *training set* (4.13)

$$\log P_{o/w} = 1.01(\pm 0.03)p_{reference} + 2.73 \cdot 10^{-2}(\pm 5.9 \cdot 10^{-3})DRDODO + \\ -0.23(\pm 0.05)(HOMO-LUMO) + 1.11(\pm 0.51) \quad (4.13)$$

$$n = 79, \quad R^2 = 0.95, \quad SD = 0.34, \quad F = 472$$

Les equacions (4.12) i (4.13) tenen un paràmetres estadístics molt similars als de les equacions (4.9), (4.10) i (4.11). Per tant, sembla clar que qualsevol descriptor de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen permet generar models robustos per predir la lipofilicitat de compostos d'interès farmacèutic. El descriptor HOMO-LUMO serveix per millorar les correlacions quan es consideren els descriptors HDCA-2, WO1 o DRDODO però no és necessari incloure un terme similar, per exemple la polaritat/polaritzabilitat S, quan l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen està descrita pel descriptor A.

4.2.3.1. Anàlisi conformacional

Com s'ha esmentat, el programa Discovery Studio 3.0 utilitzat per optimitzar les geometries a partir de les que s'han calculat els descriptors de Volsurf+ (WO1 i DRDODO) permet realitzar un anàlisi conformacional d'aquesta optimització geomètrica, de manera que per cada estructura es generen totes les conformacions i en aquest treball es seleccionen la conformació de mínima energia i la conformació més diferent a ella. Aquesta última es determina a partir d'una alineació de totes les conformacions respecte de la de mínima energia i es calcula la divergència entre les conformacions mitjançant la superposició de les coordenades atòmiques de cadascuna d'elles. Per tant, es va seleccionar la conformació que tenia un divergència més gran a efectes d'aquest estudi.

Els descriptors calculats a partir de les conformacions seleccionades es mostren a la Figura 4.1. Pels dos descriptors analitzats en aquest apartat, els valors derivats de la conformació més diferent són un 5% més baixos que els respectius calculats a partir de la conformació de mínima energia. Això es pot observar a la Figura 4.1, on el pendent de les correlacions entre ambdues sèries de valors per WO1 i DRDODO són lleugerament inferiors a 1. Es pot veure també com el descriptor DRDODO presenta més dispersió. Aquest fet suggereix que el descriptor és més sensible a la conformació atès que és calculat a partir de la posició de tres àtoms (*pharmacophoric points*) i aquesta posició pot variar significativament amb els canvis en la conformació. Finalment, els valors del descriptor HOMO-LUMO mostren una dispersió més baixa tot i que els paràmetres de la recta que s'indica a la Figura 4.1 mostren que els valors per a la conformació de mínima energia són lleugerament inferiors als de la més diferent.

La diferència més gran observada entre els valors de $\log P_{o/w}$ obtinguts a partir d'ambdues conformacions fou de 0.28, que correspon al descriptor DRDODO per l'hesperetina. En aquest cas, els valors del descriptor són dels més alts, és a dir, la seva magnitud és suficientment gran com per provocar desviacions significatives en els valors de $\log P_{o/w}$ que se'n deriven, com ja s'ha discutit al Capítol anterior. Per a altres compostos, les diferències observades són molt més petites, de l'ordre de 0.05 unitats de $\log P_{o/w}$. Per tant, la influència de la conformació emprada per calcular els descriptors en el valor de $\log P_{o/w}$ determinat és menor.

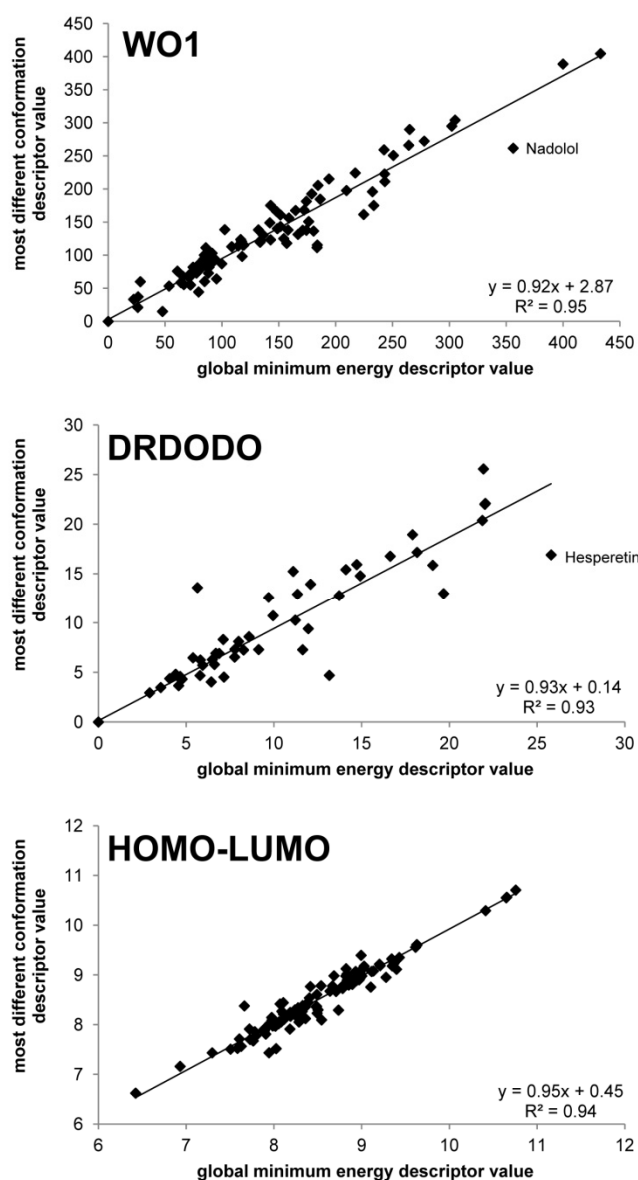


Figura 4.1. Representació gràfica dels descriptors calculats a partir de la conformació més diferent envers els obtinguts a partir de la conformació de mínima energia pels descriptors calculats a partir de Volsurf+. També s'inclou el descriptor HOMO-LUMO.

4.2.3.2. Anàlisi de l'estereoisomeria

És ben sabut que l'estereoisomeria d'un compost no influeix en la seva lipofilitat, és a dir, dos enantiòmers tenen el mateix valor de $\log P_{o/w}$. Ara bé, els descriptors tridimensionals adquireixen valors diferents per a cada enantiòmer ja que l'estructura tridimensional de cadascun d'ells és diferent. Per tant, és d'interès avaluar la possible influència de l'estereoisomeria en la determinació del $\log P_{o/w}$ a partir dels models basats en descriptors 3D proposats en aquest treball.

Per fer-ho, s'han comparat els valors dels descriptors HDCA-2, WO1, DRDODO i HOMO-LUMO dels isòmers (S) i (R) obtinguts per les 20 substàncies de les quals s'ha determinat la retenció cromatogràfica dels seus racemats. Els gràfics que il·lustren les correlacions entre els valors dels descriptors per l'isòmer (S) envers l'isòmer (R) es mostren a la Figura 4.2. En el cas de HDCA-2, els valors calculats per l'isòmer (R) són lleugerament inferiors als respectius per l'isòmer (S), i en el cas de la warfarina i de l'acebutolol són significativament diferents. També mostren desviacions significatives l'alprenolol pel descriptor WO1 i l'acebutolol i el metoprolol pel descriptor DRDODO.

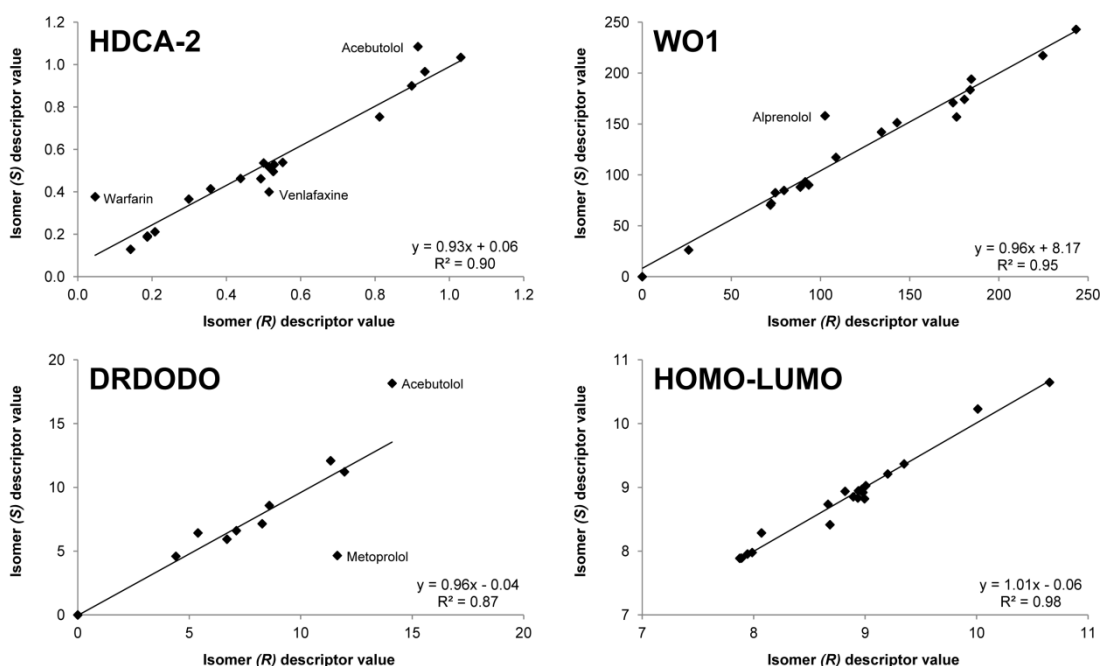


Figura 4.2. Representació gràfica dels valors dels descriptors dels isòmers (S) envers els respectius per als isòmers (R) per als quatre descriptors tridimensionals considerats en aquest Capítol (HDCA-2, WO1, DRDODO i HOMO-LUMO).

A la Taula 4.2 es mostren els valors de log $P_{o/w}$ determinats per cadascun dels estereoisòmers utilitzant els descriptors tridimensionals. Com es pot observar a la taula i a la Figura 4.2, no hi ha una influència significativa de l'estereoisomeria en els valors de log $P_{o/w}$ determinats a partir de cadascun dels models. Aquest fet no és sorprenent, atès que el terme de major rellevància en cadascuna de les equacions QSPR proposades és la polaritat del solut $p_{reference}$ i, atès que no s'ha utilitzat cromatografia quiral, el seu valor és el mateix pels dos estereoisòmers. Les petites desviacions observades (≈ 0.05) corroboren aquest fet, i permeten concloure que no hi ha una diferència significativa entre els valors de log $P_{o/w}$ obtinguts pels dos estereoisòmers d'una substància quiral.

Taula 4.2. Valors de log $P_{o/w}$ obtinguts per a cadascun dels estereoisòmers estudiats amb els descriptors tridimensionals.

Compost	Isòmer (R) log $P_{o/w}$			Isòmer (S) log $P_{o/w}$		
	HDCA-2	WO1	DRDODO	HDCA-2	WO1	DRDODO
Acebutolol	1.57	1.56	1.69	1.63	1.53	1.75
Alprenolol	2.94	3.01	3.09	2.95	3.10	3.07
Atenolol	0.14	0.19	0.17	0.17	0.20	0.22
Atropina	1.42	1.52	1.39	1.46	1.57	1.43
Clorfeniramina	2.71	2.80	2.86	2.68	2.78	2.85
Duloxetina	4.03	4.17	4.10	4.03	4.16	4.10
Fluoxetina	4.02	4.16	4.08	4.00	4.14	4.06
Ibuprofèn	3.85	3.90	3.84	3.89	3.91	3.83
Ketoprofèn	2.70	2.68	2.59	2.69	2.68	2.59
Mepivacaïna	2.20	2.22	2.24	2.24	2.23	2.25
Metoprolol	1.74	1.94	2.02	1.74	1.92	1.84
Milnacipran	2.41	2.58	2.33	2.40	2.58	2.33
Oxprenolol	2.09	2.42	2.41	2.15	2.50	2.45
Penbutolol	4.57	4.56	4.62	4.59	4.57	4.59
Pentobarbital	1.64	1.41	1.46	1.64	1.41	1.46
Propranolol	3.06	3.24	3.14	3.04	3.23	3.17
Sotalol	0.79	0.99	0.95	0.75	1.00	0.93
Venlafaxina	3.57	3.53	3.44	3.49	3.54	3.44
Vildagliptina	-0.26	-0.24	-0.25	-0.29	-0.30	-0.30
Warfarina	3.15	3.42	3.36	3.37	3.42	3.35

4.2.4. Comparació entre models

En aquest últim apartat es compararan els resultats obtinguts a partir de les validacions interna i externa dels quatre models QSPR proposats. A la Taula 4.3 s'indiquen els paràmetres derivats de les validacions interna i externa que s'ha esmentat a la introducció d'aquesta secció. Atès que aquests paràmetres compleixen els requisits estadístics requerits per a aquests tipus de models, qualsevol d'ells proporciona valors acurats de $\log P_{o/w}$ a partir de la retenció cromatogràfica i de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen dels soluts.

Taula 4.3. Paràmetres de validació interna i externa dels quatre models de predicció del $\log P_{o/w}$ proporcionats en aquest Capítol. AE és l'error mitjà i AAE és l'error absolut mitjà.

Model		<i>n</i>	AE	AAE	SD	R^2	R_0^2	Q^2_{LMO}	F
A calculada	TRAINING SET	79			0.336	0.945		0.942	1334
	TEST SET	40	-0.09	0.29	0.328	0.946	0.987	0.935	664
HDCA-2	TRAINING SET	79			0.318	0.952		0.950	1516
	TEST SET	40	-0.06	0.30	0.357	0.940	0.986	0.935	601
WO1	TRAINING SET	79			0.338	0.945		0.941	1316
	TEST SET	40	-0.05	0.29	0.345	0.939	0.985	0.940	628
DRDODO	TRAINING SET	79			0.324	0.950		0.947	1453
	TEST SET	40	-0.09	0.31	0.358	0.939	0.985	0.931	587

Com es pot observar a la Taula 4.3, les desviacions estàndard són molt similars entre els diversos models. Així mateix, el terme cromatogràfic ($p_{reference}$) és gairebé igual en els quatre models (Eqs. (4.9), (4.11), (4.12) i (4.13)). Encara que, com és ben sabut, la retenció cromatogràfica pot servir per predir el log $P_{o/w}$ de substàncies que tenen una capacitat de donació d'enllaç d'hidrogen menyspreable, en tots els models proposats aquest terme és estadísticament rellevant, i per tant s'ha d'incloure.

També s'ha d'esmentar que els models que contenen els descriptors tridimensionals s'ha afegit el descriptor de polaritzabilitat HOMO-LUMO ja que millora sensiblement les correlacions respecte les obtingudes sense aquest descriptor. Malgrat això, el model generat a partir del descriptor l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen d'Abraham calculat (A) no va requerir l'addició del terme de polaritat/polaritzabilitat S , relacionat amb l'anterior, ja que era estadísticament irrellevant. Les desviacions estàndard de les correlacions entre els valors predits i els de referència observades estan entre 0.30 i 0.35 per tots els models. S'ha de remarcar que tots els models considerats proporcionen un interval de valors de log $P_{o/w}$ de 8 unitats (de -1 a 7).

Els tres models basats en descriptors tridimensionals proporcionen resultats similars malgrat la diversitat en els mètodes de càlcul de la capacitat de donació d'enllaç d'hidrogen. D'altra banda, tampoc s'observen diferències significatives entre el model 2D i els models 3D. Per tant, es pot recomanar l'ús dels descriptors d'Abraham calculats per predir el log $P_{o/w}$ ja que per a obtenir resultats similars la seva obtenció és molt més senzilla que la dels descriptors 3D, que requereixen més passos.

S'ha d'esmentar que el model proposat en el Capítol III és més complet ja que conté un major nombre de descriptors relacionats amb les interaccions involucrades en el procés de partició del solut en 1-octanol/aigua. Els resultats obtinguts amb la seva aplicació proporcionen bones correlacions entre els valors determinats i els de referència, essent el pendent d'aquestes correlacions lineals molt proper a la unitat i el terme independent gairebé igual a zero. En el cas de les correlacions derivades dels diversos models QSPR mostrats en aquest Capítol IV, els paràmetres són sensiblement pitjors que els esmentats anteriorment. Això pot ser degut a què les Eqs. (4.9), (4.11), (4.12) i (4.13) representen una simplificació respecte el model QSPR estudiat en el Capítol III, i això explicaria les lleugeres diferències en els resultats obtinguts.

4.3. REFERÈNCIES

- [1] J.M. Pallicer, C. Calvet, A. Port, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1240 (2012) 113.
- [2] J.M. Pallicer, R. Pascual, A. Port, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, enviat per publicació a *Eur. J. Pharm. Sci.*
- [3] M.H. Abraham, *Chem. Soc. Rev.* 22 (1993) 73.
- [4] M.H. Abraham, H.S. Chadha, G.S. Whiting, R.C. Mitchel, *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 1085.
- [5] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, A.M. Zissimos, M.H. Abraham, *Anal. Chim. Acta* 515 (2004) 209.
- [6] K. Valkó, C. My Du, C. Bevan, D.P. Reynolds, M.H. Abraham, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 1137.
- [7] M.H. Abraham, M. Rosés, *J. Phys. Org. Chem.* 7 (1994) 672.
- [8] R. Bosque, J. Sales, E. Bosch, M. Rosés, M.C. García-Álvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (2003) 1240.
- [9] E. Lázaro, C. Ràfols, M.H. Abraham, M. Rosés, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 4861.
- [10] M. Hidalgo-Rodríguez, E. Fuguet, C. Ràfols, M. Rosés, *Anal. Chem.* 82 (2010) 10236.
- [11] J.A. Platts, D. Butina, M.H. Abraham, A. Hersey, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 39 (1999) 835.
- [12] J.A. Platts, M.H. Abraham, D. Butina, A. Hersey, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 40 (2000) 71.
- [13] A. Tropsha, P. Gramatica, V. Gombar, *QSAR Comb. Sci.* 22 (2003) 69.
- [14] C. Ventura, F. Martins, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 512.

Capítol V

**Estudi de la lipofilicitat de
fàrmacs en liposomes**

5.1. INTRODUCCIÓ

L'últim Capítol de la part de Resultats i Discussió d'aquesta memòria tracta de l'estudi de la partició de fàrmacs que presenten fluorescència en sistemes que contenen liposomes per tal d'avaluar la lipofilitat anisotròpica d'aquestes substàncies. Aquesta lipofilitat també s'expressa com el logaritme del coeficient de partició, en aquest cas en el sistema format per liposomes i tampó aquós, que s'expressarà com $\log P_{lip}$ per diferenciar-lo del coeficient de partició en 1-octanol/aigua, $\log P_{o/w}$. De la mateixa manera, $\log D_{lip}$ expressa la partició quan el compost està parcial o totalment ionitzat.

Les tècniques estudiades comprenen la tècnica de referència en l'estudi de la partició de fàrmacs en liposomes, anomenada diàlisi en equilibri, i una altra tècnica que proporciona molt bons resultats i que ja s'ha descrit en aquesta memòria, la potenciometria. D'altra banda, atès que els compostos estudiats presentaven fluorescència, es va considerar l'ús d'una tècnica basada en la mesura de l'anisotropia de la radiació fluorescent polaritzada. Aquesta tècnica ha estat limitada a la mesura d'interaccions entre lligands i proteïnes o bé a la caracterització de liposomes mitjançant l'ús de sondes fluorescentes incorporades a la membrana. Per tant, la novetat d'aquest treball, que ha donat lloc a una publicació [1], resideix en l'estudi de l'aplicabilitat de les mesures d'anisotropia en l'estimació de la partició de fàrmacs fluorescentes en membranes.

Als Capítols I i II, corresponents a la Introducció i a la Part Experimental d'aquesta memòria, s'han exposat algunes consideracions referents a aquesta tècnica, tals com els aspectes més teòrics i també la mesura experimental de les solucions que contenen fàrmac i liposomes mitjançant una valoració que permet dibuixar una corba de saturació. En aquest Capítol també es comentaran altres aspectes com ara la influència de la dispersió de la radiació fluorescent i les dificultats que això produeix en la mesura experimental.

Els compostos estudiats i els seus paràmetres fisicoquímics, s'indiquen a la Taula 5.1:

Taula 5.1. Compostos estudiats i els seus paràmetres fisicoquímics.

Compost	CAS	Massa molecular	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	$\log P_{o/w}$
Clorpromazina	50-53-3	318.86	9.24 (B)	-	5.35
Diflunisal	22494-42-4	250.20	3.00 (A)	-	4.44
Labetalol	36894-69-6	328.41	7.35 (A)	9.11 (B)	3.09
Propranolol	525-66-6	259.34	9.45 (B)	-	2.98
Quinina	130-95-0	324.42	4.18 (B)	8.63 (B)	2.64
Trifluoperazina	117-89-5	407.50	3.92 (B)	7.96 (B)	5.03

(A) i (B) indiquen un pK_a àcid o bàsic, respectivament. Els valors de $\log P_{o/w}$ són els recomanats a la base de dades BioLoom [2].

Finalment, es discutiran els resultats obtinguts així com els avantatges i inconvenients que planteja aquest procediment enfront de les altres tècniques utilitzades en el treball. Així doncs, el Capítol està dividit en dues seccions, la que correspon a les tècniques clàssiques i la que explica aquesta nova aproximació experimental proposada.

5.2. DETERMINACIÓ DE LA PARTICIÓ AMB TÈCNiques DE REFERÈNCIA

La partició dels compostos estudiats es va avaluar en primer lloc mitjançant les tècniques de referència, que són la diàlisi en equilibri i la potenciometria. La primera tècnica té un abast més limitat donat que es treballa amb concentracions molt baixes i, per tant, la quantificació del solut requereix instrumentació específica tal com un comptador de centelleig per soluts marcats isotòpicament [3] o bé un detector de fluorescència si es treballa amb soluts fluorescents. D'altra banda, la potenciometria permet l'anàlisi de qualsevol solut que tingui propietats àcid-base amb l'inconvenient de que es necessiten quantitats més grans de mostra.

5.2.1. Diàlisi en equilibri

La diàlisi en equilibri, com s'ha esmentat, és l'equivalent al *shake-flask* com a procediment per a l'avaluació de la lipofilicitat en sistemes que contenen liposomes. El muntatge experimental així com els seus detalls s'han explicat als Capítols I i II d'aquesta

memòria i, per tant, en aquest apartat només es farà referència als resultats obtinguts. Les mesures de diàlisi en equilibri es van realitzar en tres pHs diferents: 2.0, 7.4 i 10.5. Els valors obtinguts s'indiquen a la Taula 5.2.

Taula 5.2. Valors de $\log D_{lip}$ obtinguts a tres pHs diferents mitjançant diàlisi en equilibri. Es marquen en negreta els valors de $\log D_{lip}$ que corresponen a $\log P_{lip}$.

Compost	pH 2.0	pH 7.4	pH 10.5
Clorpromazina	3.69 ± 0.04	-	4.87 ± 0.03
Diflunisal	3.80 ± 0.04	2.75 ± 0.02	2.73 ± 0.01
Labetalol	2.32 ± 0.21	2.73 ± 0.05	1.84 ± 0.25
Propranolol	2.40 ± 0.09	2.72 ± 0.02	3.17 ± 0.03
Quinina	1.33 ± 0.26	2.47 ± 0.13	2.73 ± 0.02
Trifluoperazina	3.76 ± 0.02	4.52 ± 0.03	4.61 ± 0.01

Es prenen com a valors de partició, $\log P_{lip}$, els mesurats a pH 10.5 pels fàrmacs bàsics i a pH 2.0 pel diflunisal, encara que en aquest últim cas, els grups fosfat de la fosfatidilcolina tenen un pK_a de 1.97 i, per tant, estan parcialment protonats. Això provoca que la superfície de la membrana estigui carregada positivament i per tant, es produeixi un canvi en les seves propietats que poden afectar la partició del diflunisal [3-5]. D'altra banda, el labetalol és una substància amfòtera que té dos valors de pK_a molt propers, 7.35 que correspon a un fenol i 9.35, que s'assigna a una amina secundària protonada. Així doncs, a pH 2 està carregat positivament i a pH 10.5 negativament, mentre que a pH 7.4 no es pot assignar una càrrega neta.

La correlació entre els valors de $\log P_{lip}$ i $\log P_{o/w}$ s'indica a la següent equació (5.1):

$$\log P_{lip} = 0.74 \log P_{o/w} + 0.83 \quad (5.1)$$

$$n = 5, R^2 = 0.96$$

Aquesta relació lineal és similar a la trobada a la literatura entre valors de $\log P_{lip}$ i $\log P_{o/w}$ determinats potenciomètricament per una altra col·lecció de substàncies diferents, essent el propranolol l'únic compost en comú [6] (5.2):

$$\log P_{lip} = 0.86 \log P_{o/w} + 0.47 \quad (5.2)$$

$$n = 8, R^2 = 0.94$$

5.2.2. Potenciometria

La valoració potenciomètrica es va poder utilitzar per avaluar el $\log P_{lip}$ de la clorpromazina, el labetalol, el propranolol i la quinina. El diflunisal no va poder ser estudiat atès el seu valor de pK_a , molt baix i per tant fora dels límits de la tècnica, mentre que la trifluoperazina és un compost poc soluble i precipita a valors de pH superiors a 8. S'ha d'esmentar que per les substàncies dipròtiques es van determinar els valors de $\log P_{lip}$ de les formes iòniques a partir de les dades conjuntes corresponents a quatre determinacions diferents.

Per a les substàncies estudiades, els valors de $\log P_{lip}$ s'indiquen a la Taula 5.3. Es pot observar com per la clorpromazina, el propranolol i la quinina, els valors de $\log P_{lip}$ de la forma neutre són força concordants amb els determinats mitjançant diàlisi en equilibri, posant de manifest la robustesa del mètode potenciomètric per avaluar la lipofilicitat en aquest sistema format per liposomes de fosfatidilcolina i 0.15 M KCl. A diferència de la metodologia emprada per determinar el $\log P_{o/w}$, es recomana realitzar valoracions potenciomètriques duals, és a dir, primer es valora la suspensió de liposomes de pH bàsic cap a pH àcid i després es repeteix el procés en la mateixa suspensió de forma inversa.

Taula 5.3. Valors de $\log P_{lip}$ obtinguts mitjançant valoracions potenciomètriques. XH_2 representa la forma doblement protonada, XH la protonada i X la forma neutra dels soluts

	XH_2	XH	X
Clorpromazina	-	3.00 ± 0.01	4.45 ± 0.01
Labetalol	1.10 ± 0.07	1.43 ± 0.04	1.84 ± 0.02
Propranolol	-	2.29 ± 0.02	3.35 ± 0.03
Quinina	1.73 ± 0.17	2.26 ± 0.09	2.94 ± 0.17

Com és d'esperar, les formes protonades dels compostos presenten una partició inferior que la de les formes neutres.

5.3. DETERMINACIÓ DE LA PARTICIÓ A PARTIR DE L'ANISOTROPIA

En aquesta secció es discutiran els resultats obtinguts en l'estimació de la partició de fàrmacs fluorescents a partir de la mesura de l'anisotropia de les solucions que contenen una quantitat constant de fàrmac i una quantitat variable de liposomes. En el primer apartat es tractaran els aspectes més teòrics d'aquesta determinació, seguidament es faran d'algunes consideracions relacionades amb la mesura, que presenta algunes dificultats (allò que en anglès s'anomenaria *tricky*) i per acabar aquest apartat, es mostraran els resultats obtinguts amb aquesta aproximació experimental.

5.3.1. Relació entre l'anisotropia i la partició dels soluts

Al Capítol I s'ha descrit el procés d'excitació d'una mostra fluorescent mitjançant radiació polaritzada i la posterior emissió de radiació, que té un grau major o menor de polarització en funció de la interacció del fluoròfor (en aquest cas el fàrmac) amb la membrana, és a dir, si està lliure en solució la radiació emesa no serà polaritzada mentre que si el fluoròfor està fixat a la membrana, la radiació sí que estarà polaritzada. S'ha descrit també que la anisotropia segueix una corba de saturació tal com la que es mostra a l'equació (1.33), anomenada en aquest Capítol com (5.3):

$$A = \frac{A_B \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad (5.3)$$

on A representa l'anisotropia mesurada, A_B l'anisotropia de la forma enllaçada a la membrana, que defineix una asymptota horitzontal, K_D és la constant d'equilibri de la interacció entre el solut i la membrana, i $[L]$ la concentració total de lípids. La linearització de l'expressió anterior porta a l'equació (5.4):

$$\frac{1}{A} = \frac{K_D}{A_B} \cdot \frac{1}{[L]} + \frac{1}{A_B} \quad (5.4)$$

Ara bé, aquestes dues expressions no contenen cap contribució de l'anisotropia de la forma lliure, si és diferent de zero, de la concentració de fàrmac ni de les contribucions del solvent o de la dispersió de la radiació.

En el cas de les interaccions entre fàrmacs i liposomes, s'ha descrit l'anisotropia mesurada en qualsevol instant com una mitjana ponderada de les anisotropies de la forma lliure (A_F), de la forma enllaçada (A_B) i de l'anisotropia que produeix la radiació dispersada, si n'hi ha, (A_S) [7]. Aquest últim terme no és irrellevant, ja que en els estudis amb liposomes la radiació dispersada contribueix significativament al senyal mesurat. D'altra banda, també s'ha d'incloure un terme que reflecteixi la possibilitat de que les formes lliures i incorporada a la membrana tinguin diferents rendiments quàntics, i això es fa introduint el terme Q , que correspon a la relació de rendiments quàntics entre les dues formes considerades.

Roehrl *et al.* [8] proposaren una base teòrica per interpretar les interaccions entre fàrmacs i proteïnes mesurades mitjançant anisotropia que pot ser aplicada a les interaccions entre fàrmacs i liposomes. Aquesta aproximació recull les contribucions de la concentració total de fàrmac, de l'anisotropia de la forma lliure A_F i del rendiment quàntic Q . La fracció molar de fàrmac particionat a la membrana (f_B) s'expressa d'acord a les següents expressions (5.5) i (5.6) on $[S]$ representa la concentració de fàrmac:

$$f_B = \frac{A - A_F}{(A_B - A) \cdot Q + A - A_F} \quad (5.5)$$

$$f_B = \frac{K_D + [S] + [L] - \sqrt{(K_D + [S] + [L])^2 - 4 \cdot [S] \cdot [L]}}{2 \cdot [S]} \quad (5.6)$$

Si la relació de rendiments quàntics de les formes lliure i enllaçada Q és igual a la unitat, la combinació de les equacions (5.5) i (5.6) permet arribar a la següent expressió:

$$\frac{(A - A_F)}{(A_B - A_F)} = \frac{K_D + [S] + [L] - \sqrt{(K_D + [S] + [L])^2 - 4 \cdot [S] \cdot [L]}}{2 \cdot [S]} \quad (5.7)$$

En el cas que les condicions de mesura depenguin de la concentració de solut, cal tenir en compte les concentracions de lípids $[L]$ i de solut $[S]$. Aquest és el cas de les anàlisis que requereixen concentracions petites de lípids per poder observar un canvi en la fracció de solut enllaçat f_B i per tant, en l'anisotropia mesurada. D'acord amb l'equació (5.3), aquest és el cas de soluts amb un valor de K_D elevat, és a dir, d'una elevada afinitat per la membrana. En aquest cas, K_D pot ser estimada per regressió no lineal utilitzant l'equació (5.7) a partir de diverses mesures en mostres amb concentració de lípids variable i concentració de solut constant.

Un cop s'ha determinat la K_D , el coeficient de distribució es pot estimar a partir de la següent expressió (5.8):

$$D_{anisotropia} = [Lip]_{membrana} / K_D \quad (5.8)$$

on $[Lip]_{membrana}$ representa la concentració local de fosfatidilcolina en la membrana, és a dir, 1.3 M (1000 g/L / 780 g/mol).

5.3.2. Consideracions pràctiques en la mesura

En la mesura de l'anisotropia per estimar la partició d'un compost fluorescent en la membrana s'han de considerar alguns aspectes experimentals per tal d'obtenir valors acurats. L'equació (5.7) posa de manifest algunes de les limitacions derivades d'aquest tractament matemàtic. La primera limitació és la concentració de solut [S], que es manté constant al llarg del procés de mesura. Si $K_D \ll [S]$, la funció és independent de K_D i per tant, no es pot estimar la partició a partir d'aquest procediment. Per tant [S] ha de ser de l'ordre de K_D però suficientment gran com per permetre la mesura de la fluorescència.

Per poder dibuixar una corba que permeti la determinació de K_D , la concentració de lípids [L] ha de ser en l'interval de $K_D \pm 1-3$ unitats logarítmiques. Ara bé, l'inconvenient més significatiu d'aquesta tècnica és la dispersió de la radiació a causa dels liposomes presents en solució, que és més important si la concentració dels mateixos és alta. La influència de la dispersió depèn de la relació entre les concentracions de solut i lípid, de la fluorescència intrínseca del solut i de la grandària i concentració dels liposomes. Els liposomes unilamel·lars grans (LUV) són més utilitzats en aquests estudis que els liposomes unilamel·lars petits (SUV) ja que presenten menor efecte de la curvatura de la membrana, encara que la intensitat de la radiació dispersada és proporcional al quadrat del volum de la partícula dispersant. La dispersió provoca una desviació en la corba de saturació definida a l'equació (5.3) que s'aprecia a les concentracions altes de liposomes.

S'han proposat alguns procediments per corregir aquest efecte de la dispersió, com per exemple la mesura d'un blanc [9] o l'avaluació de la dispersió mitjançant mesures turbidimètriques [10, 11]. En qualsevol cas, aquest és l'inconvenient principal d'una tècnica que, malgrat això, és senzilla i molt sensible.

5.3.3. Determinació del coeficient de partició en liposomes

Les mesures de l'anisotropia es van realitzar tal com s'ha explicat en el Capítol II d'aquesta memòria. Per cadascun dels fàrmacs estudiats, es va mesurar l'anisotropia en dues concentracions diferents, primer de l'ordre dels μM i després deu vegades més concentrades. Els resultats obtinguts van ser ajustats a l'equació (5.7) per tal de determinar la constant K_D i el coeficient de partició d'acord amb l'equació (5.8). En molts casos l'anisotropia mesurada fou més gran de 0.4, el valor teòric màxim, malgrat que s'aplicaren correccions utilitzant els blancs mesurats [9]. Això indica la presència d'interferències en la solució mesurada, degudes a la radiació dispersada pels liposomes. Les representacions gràfiques de l'anisotropia envers la concentració de lípids d'acord amb l'equació 5.7 es mostren a la Figura 5.3.

Aplicant la correcció del blanc, només es van obtenir resultats coherents pel diflunisal i labetalol. L'efecte de la correcció provocà una disminució en la diferència entre els valors de $\log D_{anisotropia}$ determinats a les dues concentracions, i d'altra banda, tingué un efecte més gran sobre els valors determinats a la concentració més baixa. Atès que per aquests dos compostos els valors de $\log D_{anisotropia}$ obtinguts treballant a la concentració de fàrmac més alta són més robustos, s'utilitzaren per aprofundir en l'estudi.

D'altra banda, tal com s'observa a la Figura 5.3, per la clorpromazina i la trifluoperazina no es van poder ajustar les corbes a partir de les dades experimentals determinades a partir de la concentració més alta. És possible que en aquest cas es produís saturació i/o alteracions de la membrana atesa l'elevada afinitat dels compostos per la mateixa. Per tant, només es pogué calcular el valors de $\log D_{anisotropia}$ a partir dels valors d'anisotropia mesurats en les solucions amb la concentració més baixa.

La Figura 5.3 mostra que el propranolol presenta la major diferència entre els valors de K_D derivats de les dues concentracions considerades, essent la K_D derivada de la concentració més baixa 9 vegades més gran que la respectiva calculada a partir de la concentració més alta. En aquest cas, no s'espera que hi hagi pertorbacions a la membrana i d'altra banda, la partició del propranolol en liposomes és independent de la concentració fins a un valor de $1.2 \mu\text{M}$ [12]. Finalment, el valor de $\log D_{anisotropia}$ derivat de la concentració més alta (3.4) és força concordant amb els determinats a partir de la potenciometria i de la diàlisi en equilibri. L'estudi de la partició de la quinina proporcionà valors de K_D molt similars per ambdues concentracions, tal i com es pot observar a la Figura 5.3.

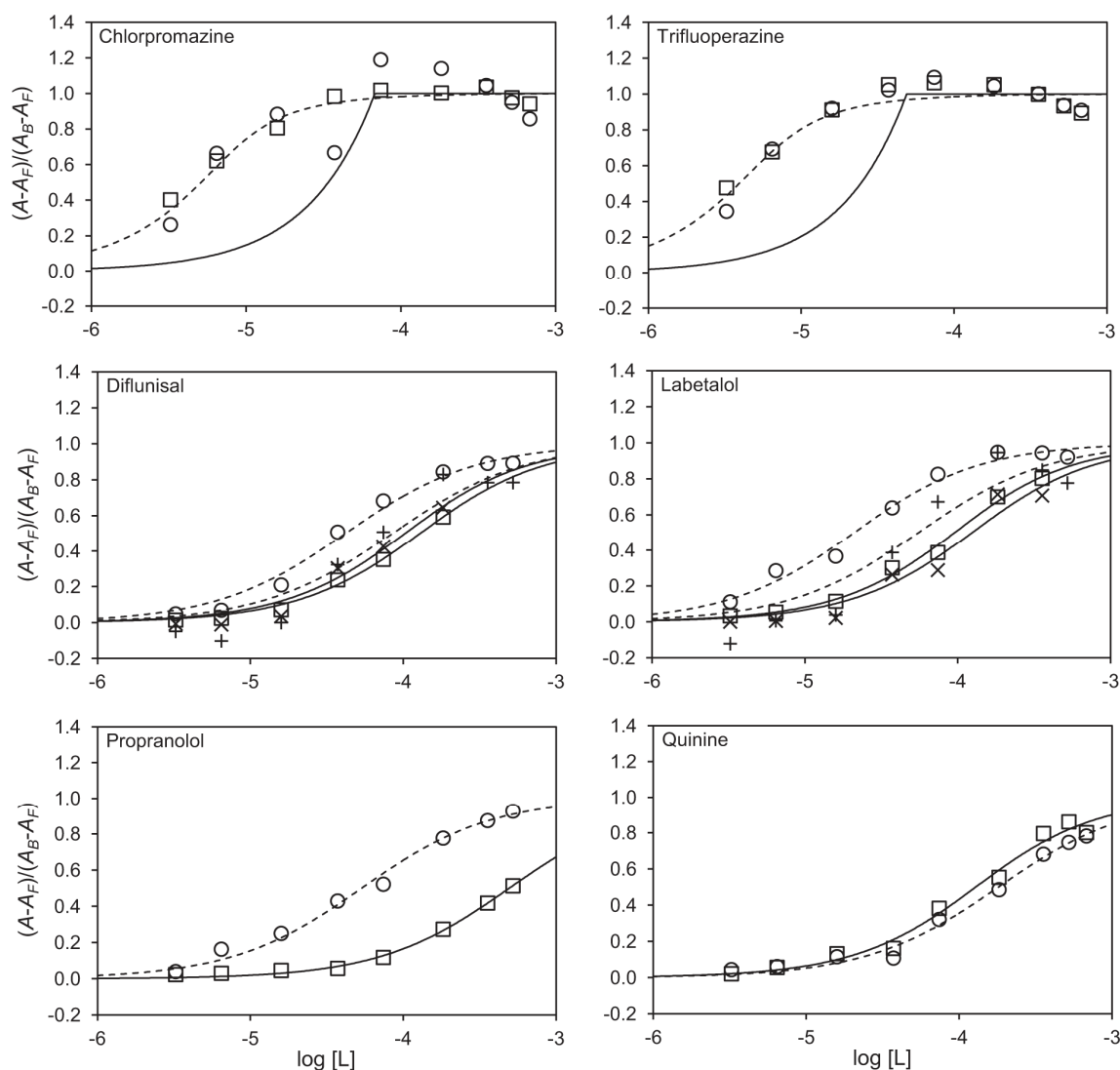


Figura 5.3. Influència de la concentració de liposomes i fàrmac en l'anisotropia normalitzada pels sis compostos estudiats. L'anisotropia es va determinar a dues concentracions de fàrmac diferents, una més baixa (3.6-6.8 μM , cercles), i una més alta (36-68 μM , quadrats). Les dades experimentals s'ajustaren amb l'equació 5.7. Les línies de punts indiquen la funció ajustada per les concentracions baixes i la línia contínua les concentracions altes. En aquest últim cas, no es va poder ajustar la corba per la clorpromazina i la trifluoperazina. En el cas del labetalol i el diflunisal, també s'ajustaren els punts derivats de la correcció amb el blanc (+, concentracions baixes, x, concentracions altes).

Un cop coneguts els valors de $\log D_{anisotropia}$ mitjançant les mesures d'anisotropia, es trobaren les següents correlacions entre aquests valors i el $\log P_{lip}$ i el $\log P_{o/w}$ determinats per diàlisi en equilibri (Eqs. (5.9) i (5.10), respectivament):

$$\log D_{anisotropia} = 1.05 \log P_{lip} + 1.16 \quad (5.9)$$

$$n = 5, R^2 = 0.87$$

$$\log D_{anisotropia} = 0.78 \log P_{o/w} + 1.54 \quad (5.10)$$

$$n = 6, R^2 = 0.74$$

D'acord amb l'equació (5.9), el pendent és gairebé igual a la unitat però el terme independent és proper a 1, és a dir, un factor de 10 en l'escala lineal. Aquesta desviació pot ser deguda a algunes hipòtesis prèvies tals com que la interacció entre els lípids i el fàrmac té una estequiometria 1:1, que seria certa en el cas de lípids lliures en solució però que pot ser una simplificació excessiva en el cas de liposomes, en els quals es requereix més d'una molècula de lípid per acomodar una molècula de solut. Una altra suposició és que només les molècules que interaccionen en la membrana es polaritzen, encara que aquest fenomen pot existir en els voltants de la membrana a conseqüència del potencial superficial de la membrana i per tant, dites molècules poden comportar-se com si realment haguessin interaccionat amb la membrana.

Per il·lustrar d'una manera qualitativa els avantatges i inconvenients de cada tècnica, a la Taula 5.4 es proporciona una comparació entre les tres tècniques utilitzades en aquest treball. Si es compara l'anisotropia amb la potenciometria, aquesta última presenta l'avantatge de no requerir la presència d'un fluoròfor, mentre que l'anisotropia permet treballar amb concentracions més baixes de fàrmac evitant problemes de solubilitat o saturació de membrana, així com que l'existència d'un grup ionitzable no és necessària. De fet, l'absència d'un grup àcid o bàsic pot ser desitjable, ja que només una espècie és la que presenta fluorescència i per tant, la que es pot determinar en les mesures d'anisotropia. Per tant, aquesta pot ser una tècnica complementària de la potenciometria si la diàlisi en equilibri no és una opció.

Taula 5.4. Comparació de les mesures d'anisotropia, potenciometria i diàlisi en equilibri per l'estimació de la partició de fàrmacs en membranes.

	Anisotropia	Potenciometria	Diàlisi en equilibri
Característiques del solut necessàries	Grup fluoròfor, idealment fluoresc. independent del pH	Grup àcid o bàsic feble	Sense restricció, només el mètode de quantificació
Possibles interferències	Dispersió a causa dels liposomes; fluorescència dependent del pH	Protonació dels grups fosfat a pH < 3 (compostos amb pK _a baixos)	Cap
Desviacions de les condicions de Nernst ^{a)}	[S] altes. Les [S] baixes limitades pel rendiment de la fluorescència.	[S] altes. Les [S] baixes limitades per la precisió de la valoració, normalment 0.3 mM.	[S] altes. Les [S] baixes limitades pel mètode analític.
Temps necessari per compost ^{b)}	Una hora	Dos hores (perfil de logD/pH complet)	Cinc hores (possibilitat de mesures en paral·lel) més el temps de quantificació
Quantitat necessària de liposomes (lípids)	5 mg	20 mg (perfil de logD/pH complet)	3 mg per un valor de logD (n=3)

^{a)} Excloent l'associació/dissociació d'àcids i bases febles i la miscibilitat de les fases. ^{b)} No es considera la preparació de liposomes.

5.4. REFERÈNCIES

- [1] J.M. Pallicer, S.D. Krämer, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 71 (2012) 219.
- [2] Biolum Online Database: <http://www.biobyte.com/>
- [3] S.D. Krämer, H. Wunderli-Allenspach, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1851.
- [4] S.D. Krämer, C. Jakits-Deiser, H. Wunderli-Allenspach, *Pharm. Res.* 14 (1997) 827.
- [5] S.D. Krämer, A. Braun, C. Jakits-Deiser, H. Wunderli-Allenspach. *Pharm. Res.* 15 (1998) 739.
- [6] A. Avdeef, K.J. Box, J.E.A. Comer, C. Hibbert, K.Y. Tam, *Pharm. Res.* 15 (1998) 209.
- [7] T.G. Burke, T.R. Tritton, *Biochemistry-US* 24 (1985) 1768.
- [8] M.H.A. Roehrl, J.Y. Wang, G. Wagner, *Biochemistry-US* 43 (2004) 16056.
- [9] A.S. Ladokhin, S. Jayasinghe, S.H. White, *Anal. Biochem.* 285 (2000) 235.
- [10] M.A.R.B. Castanho, M.J.E. Prieto, *Eur. J. Biochem.* 207 (1992) 125.
- [11] M.A.R.B. Castanho, N.C. Santos, L.M.S. Loura, *Eur. Biophys. J.* 26 (1997) 253.
- [12] G.M. Pauletti, H. Wunderli-Allenspach, *Eur. J. Pharm. Sci.* 1 (1994) 273.

CONCLUSIONS

A CHROMATOGRAPHIC METHOD TO ESTIMATE THE $\log P_{o/w}$ OF ORGANIC COMPOUNDS

A new method to determine the lipophilicity of organic compounds with high molecular complexity such as most drugs has been developed. The proposed method allows a convenient estimation of the lipophilicity, expressed as the 1-octanol/water partition coefficient or $\log P_{o/w}$ of organic compounds with diverse complexity, structures and functionalities. The method is based on the estimation of the $\log P_{o/w}$ by means of the retention in HPLC complemented by molecular descriptors derived from the structure of the compound. These descriptors are calculated from a single software (CODESSA) and, hence, from a unique mathematical approach.

Several columns with a C_{18} stationary phase were used to optimize the method, including more conventional HPLC columns with a 5 μm particle size but also UHPLC columns with a smaller particle size, 1.7 μm . The two most common mobile phase modifiers in liquid chromatography, acetonitrile and methanol, were tested in order to evaluate their performance. Both solvents provided similar results but the use of acetonitrile was advisable due to the higher quality of the results obtained. Furthermore, it allowed the estimation of a wider range of $\log P_{o/w}$ values using an equal mobile phase volume composition compared to methanol. A rigorous control of the pH of the mobile phases was done because of its relevance in the charge state of ionizable compounds and, hence, in the retention of these compounds. The use of alkaline mobile phases was also evaluated to determine the lipophilicity of basic compounds, including a relevant amount of drugs. A previous estimation of the $\text{p}K_a$ values is advisable in order to select the appropriate mobile phase pH for measuring the neutral form. Thus, it can be concluded that any C_{18} column is suitable for the lipophilicity determination by means of this method, that acetonitrile is the recommended organic modifier and that it is necessary a strict control of the pH of the mobile phase.

It has to be pointed out that the method requires a previous calibration of the chromatographic system which is going to be used, that is to say, the P_s^N and $(\log k)_0$ parameters have to be determined, as well as the linear relationships which allow the transference of the polarity of the solute between the working and reference systems. Then, the proposed method allows the determination of the $\log P_{o/w}$ without a previous calibration with standard compounds with known $\log P_{o/w}$ values. Furthermore, the method is essentially an experimental procedure since the chromatographic term involved in the QSPR equation is the most significant one. However, it is necessary to complement it

with several structural descriptors, being the most relevant the hydrogen bond acidity related descriptor.

The method was validated for the determination of the $\log P_{o/w}$ of drugs. For this purpose, 66 pharmaceuticals with a wide variety of structures were studied. The results were compared to the reference values from the literature and a linear regression with a slope close to the unity and an intercept similar to zero obtained. The method shows a precision of approximately 0.4 logarithmic units, similar to other chromatographic methods reported in the literature. Furthermore, the method is valid in a wide range of $\log P_{o/w}$ values, up to 8 logarithmic units (-1 to 7).

THE CONTRIBUTION OF HYDROGEN BOND ACIDITY ON LIPOPHILICITY OF DRUGS ESTIMATED FROM CHROMATOGRAPHIC MEASUREMENTS

By means of the solvation parameter model (or Abraham equation) it was previously demonstrated that the main difference between the partitioning in HPLC and in 1-octanol/water system is the hydrogen bond acidity term. Thus, the addition of an hydrogen bond acidity-related term should improve the correlation between the chromatographic retention and the $\log P_{o/w}$ of compounds.

Based on this statement, four QSPR models based on the polarity of the solute $p_{reference}$ obtained from chromatographic measurements were generated using several hydrogen bond acidity descriptors. The first model embodied the calculated Abraham hydrogen bond acidity parameter A , and the remaining ones were based on the use of three-dimensional descriptors. These descriptors were derived from the optimized 3D structures of each compound.

The use of 3D descriptors involves several considerations such as the geometrical optimization of the structures, the generation of stereoisomers if there are stereocenters, and conformers. Both stereoisomery and conformation effects were evaluated in this work. The results showed that there was a minor impact of these effects in the $\log P_{o/w}$ values. The performance of the four models was assessed by means of an internal and external validation with the respective training and test sets. The validation of the results proved the predictive ability of any of the models to determine the $\log P_{o/w}$ since

all of them achieve the statistical criteria used to validate them. Furthermore, all the correlations provided really similar results among them and, hence, the use of the calculated Abraham descriptor is recommended due to the results obtained with much less effort compared to the 3D descriptors.

The QSPR model described in the previous section is more complete and provides more accurate results but it requires the use of four descriptors generated from the 3D structure of each compound. The models proposed in this section are simpler but also better for routine purposes, although their performance is not as good as the original QSPR model.

EVALUATION OF THE FLUORESCENCE ANISOTROPY TO ASSESS DRUG-LIPID MEMBRANE PARTITIONING

The liposome/water partitioning of several of drugs was studied using equilibrium dialysis and potentiometry. In both cases, the values agreed very well between them. However, the equilibrium dialysis is a time-consuming technique and requires a specific quantification technique due to the low drug concentrations that had to be used. Potentiometric measurements provided good results but the compounds which showed low solubility could not be studied and in all cases and the substances must have acid-base functionality.

The partitioning of the drugs in liposomes was also evaluated by a new experimental procedure based on fluorescence anisotropy measurements. The influence of several experimental factors was taken into account in these measurements, for instance, the drug concentration or the scattering caused by the liposomes. Although the fluorescence anisotropy is a really sensible and specific technique, the measurements are tricky and the derived data has to be carefully analyzed since it can be affected by many processes which are not derived from the partitioning, such as the presence of artifacts. Thus, several mathematical approaches were tested to estimate a anisotropy-derived partition coefficient.

The anisotropy-derived partition coefficient show a good correlation with the values derived from the reference techniques, although the intercept of the correlation is high-

er than the unity, corresponding to a factor 10 in a linear scale. This could be caused by several assumptions that were done for the interpretation of the experimental data which may be not exact, such as the stoichiometry of the drug-lipid interaction or the bilayer polarization.

Finally, the performance of the methods studied were compared in order to show which are the advantages and disadvantages of each technique, in terms of sample consumption, analysis time, type of solutes and so forth. Both potentiometry and anisotropy can be considered as complementary techniques for some compounds, while equilibrium dialysis is kept as the reference technique although it is slow and tedious.

EPÍLEG

Per acabar aquesta memòria, vull fer algunes reflexions que sobrepassen la temàtica acadèmica i que estan més aviat relacionades amb algunes experiències que he anat recollint al llarg d'aquests anys.

No vull parlar aquí de la situació de la recerca al país, ni de la disminució de la inversió (que no despesa) en recerca, temes aquests ben coneguts i patits per la majoria d'investigadors del nostre país.

Més aviat m'agradaria esmentar de la manca d'oportunitats que tenen molts joves investigadors, que es veuen empesos a treballar per sota del seu nivell de qualificació o directament a l'emigració.

Segurament això és degut a la pèssima visió de futur dels nostres governants però també per un sector privat que no és capaç d'absorbir a tots els seus potencials treballadors, amb una formació que no té res a envejar a la d'altres països europeus.

Les raons de tot plegat, les desconec o no m'atreveixo a explicar-les – no vull avorrir al lector més del necessari – però sí que m'agradaria que algú es plantegés cap a on va el país si el seu millor capital humà es veu obligat a marxar.

Jo mateix veng d'un territori petit i aïllat – en hivern – que ha vist com els seus millors talents marxaven generació rere generació, sense poder brindar a la seva terra els millors anys de la seva vida. I des de les abundants institucions locals mai s'ha fet una reflexió en aquest sentit.

La vida és així, diuen. Però estaria bé fer alguna cosa per canviar-la.

ANNEX

Article I

**Determination of the hydrophobicity
of organic compounds
measured as $\log P_{o/w}$
through a new chromatographic method**

**Juan M. Pallicer, Sandra Pous-Torres, Joaquim Sales,
Martí Rosés, Clara Ràfols, Elisabeth Bosch
J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3026**



Determination of the hydrophobicity of organic compounds measured as $\log P_{o/w}$ through a new chromatographic method

Juan M. Pallicer^a, Sandra Pous-Torres^b, Joaquim Sales^c, Martí Rosés^a, Clara Ràfols^a, Elisabeth Bosch^{a,*}

^a *Departament de Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain*

^b *Departament de Química Analítica, Universitat de València, Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot, València, Spain*

^c *Departament de Química Inorgànica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2009

Received in revised form 16 February 2010

Accepted 22 February 2010

Available online 1 March 2010

Keywords:

Hydrophobicity

$\log P_{o/w}$

HPLC

Polarity model

QSPR model

ABSTRACT

A new chromatographic method to determine the octanol–water partition coefficient ($\log P_{o/w}$) of organic substances is proposed in this paper. This method is based on a previously reported model that relates the retention factor in reversed-phase liquid chromatography with solute (p), mobile phase (P_m^N) and stationary phase (P_s^N) polarity parameters: $\log k = (\log k)_0 + p(P_m^N - P_s^N)$. P_m^N values are calculated through expressions that depend only on the organic solvent fraction in the mobile phase. $(\log k)_0$ and P_s^N parameters are characteristic of the chromatographic system and are determined from the retention of a selected set of 12 compounds. Then, the p value of a solute determined in a properly characterized system is easily derived from the retention factor data. Solute p values are slightly dependent on the chromatographic system but they are linearly related to those obtained in the reference system (Spherisorb ODS-2 column and acetonitrile as organic modifier). Therefore, they can be easily transferred from any experimental system to the reference one. A Quantitative Structure–Property Relationship study reveals that the p parameter in the reference chromatographic system depends, mainly, on the hydrophobicity of the compound, expressed as the n-octanol/water partition coefficient ($\log P_{o/w}$), and five additional structural descriptors which can be easily calculated through the CODESSA program from the chemical structure of the solute. In this work the p descriptors of a wide set of structurally different organic compounds have been determined in several chromatographic systems and transferred to the reference one from these and the CODESSA structural parameters. The $\log P_{o/w}$ values have been determined. The obtained values agree with those determined from classical experimental techniques and validate the new method as a useful tool to determine the hydrophobicity of a wide variety of compounds in a broad $\log P_{o/w}$ range.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

It is widely recognized that the pioneer work published by Overton and Meyer at the end of the XIX century opened the door to the modern QSAR studies. Later, after the contribution of Hansch and Fujita [1], many researchers have established relationships between octanol–water partition coefficient ($\log P_{o/w}$), the most common index of lipophilicity, and biological activity of organic compounds or pharmacokinetic behaviour of drugs. As $\log P_{o/w}$ plays this important role in ADMET properties of drugs (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity), its measurement is essential in the first steps of drug discovery.

The classical procedure to determine the $\log P_{o/w}$ is the shaking flask method [2], which involves the control of a high number of experimental details if accuracy is required, and it is a highly

time-consuming method. Potentiometric methods offer accurate results but are only suitable for acidic or basic compounds [3,4]. There are also several software packages (e.g., ClogP, AlogPs, ACD-Labs) to calculate $\log P_{o/w}$ values but the results frequently show a lack of consistency among them because different $\log P_{o/w}$ values are obtained from different softwares, which apply different algorithms. Nowadays, reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) is considered one of the best techniques for estimating octanol–water partition, due to its high throughput, insensitivity to impurities or degradation products, broader dynamic range, on-line detection, and reduced sample size.

Lipophilicity indices in HPLC are usually derived from the logarithm of retention factor, $\log k$, expressed as:

$$\log k = \log \left(\frac{t_r - t_0}{t_0} \right) \quad (1)$$

where t_r and t_0 are the retention times of solute and void volume marker, respectively. Isocratic $\log k$ values may be a relative scale of lipophilicity, but most researchers [5–13] prefer work-

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 12 84; fax: +34 93 402 12 33.
E-mail address: e.bosch@ub.edu (E. Bosch).

ing with retention factors extrapolated to pure water ($\log k_w$), to obtain more comparative lipophilicity indexes avoiding the effect of changing the organic modifier. Commonly, extrapolated $\log k_w$ values are obtained from linear plots of $\log k$ versus φ :

$$\log k = -S\varphi + \log k_w \quad (2)$$

where S is the slope and φ is the volume fraction of organic modifier in the mobile phase [14].

Frequently, these plots present deviations at higher organic modifier fractions and at water-rich mobile phases. This means that different $\log k_w$ values can be obtained for the same solute, column and instrument if a different organic modifier or mobile phase compositions are used. Thus, working in the linear part of the plot is required to minimize error in $\log k_w$ extrapolation [15,16]. Linearity holds better for organic modifier fractions that give $\log k$ values between 0 and 1 [17]. The ability of $\log k_w$ parameter to express the hydrophobicity of the solute led Kaliszan et al. to propose a gradient elution method to estimate it, even for compounds with acid–base character [11,13].

Some studies relate extrapolated $\log k_w$ with $\log P_{o/w}$ values, obtaining good correlations for several sets of compounds via linear regression [5–10]:

$$\log P_{o/w} = a \log k_w + b \quad (3)$$

where a , b are constants. However, the main drawback of these methods is the accuracy of the extrapolation via Eq. (2), which is limited by the difficulty of optimizing the experimental conditions of lipophilicity measurement. This means that a careful selection of stationary phase, organic modifier and mobile phase additives (e.g. 1-octanol or *n*-decylamine) is required in order to fix the experimental conditions for the measurements [15,16,18]. For instance, hydrophobic amines are used as masking agent to suppress silanophilic interactions [8], or the addition of 1-octanol to the mobile phase [6–9] is used to improve the correlation between $\log P_{o/w}$ and $\log k_w$ values compared to experiments without 1-octanol addition.

Derived from the extrapolation procedure (Eq. (2)), another lipophilicity parameter was established by Valkó et al. [19]. This parameter, φ_o , stands for the organic modifier fraction that produces an equal molar distribution between the stationary and mobile phases in order to obtain $\log k=0$. φ_o is obtained by the following expression:

$$\varphi_o = \frac{\log k_w}{S} \quad (4)$$

where S is already defined by Eq. (2). Based on φ_o parameter, a fast gradient method was proposed by Valkó et al. to determine the chromatographic hydrophobicity index (CHI) [19]. This approach allows a convenient estimation of the hydrophobicity for compounds without acid–base properties but a right interpretation of the measurements is more difficult for acids and bases. This is because of the continuous change in the composition and pH of the mobile phase, which favours the existence of different ratios of acidic and basic species during the chromatographic run [20,21]. The CHI values of neutral species can be easily related to their $\log P_{o/w}$ and hydrogen bonding acidity [22].

In order to calculate directly the $\log P_{o/w}$, Donovan and Pescatore [23] proposed a fast method to determine the $\log P_{o/w}$ based on the measurement of gradient retention times of solutes in short ODP columns, using methanol as organic modifier, followed by interpolation of these retention times in a linear calibration equation previously established using two internal standards. They studied a wide set of structurally diverse compounds, obtaining good predictions of the literature $\log P_{o/w}$ values.

In this study we propose a new chromatographic method to determine octanol–water partition coefficients based on two pre-

viously published models: firstly, a polarity model which relates retention in HPLC with the polarity of the solute, p , [24,25] and secondly, a QSPR model that relates the polarity of the solute, p , with the octanol–water partition coefficient of the solute, $\log P_{o/w}$. Our aim in this paper is to establish a robust way to determine $\log P_{o/w}$ values for a wide variety of compounds. The particular feature of this method is that chromatographic retention is not the unique contribution to the hydrophobicity measurement of the solute, but it is complemented by the properties of the compound contained in some descriptors derived from its structure.

2. Theory

2.1. The polarity model

The polarity model describes retention in RP-HPLC as a function of the polarity of the non-ionized solute p , the polarity of the mobile phase P_m^N and the polarity of the stationary phase P_s^N according to Eq. (5) [24–30]:

$$\log k = (\log k)_0 + p(P_m^N - P_s^N) \quad (5)$$

The p values depend mainly on the solute polarity, but also on the nature of the mobile and stationary phases. The value of P_m^N depends only on the mobile phase composition and $(\log k)_0$ and P_s^N are constants that depend on the working chromatographic system. The polarity parameters of mobile and stationary phases are normalized, being $P_m^N = 1$ for pure water and $P_s^N = 0$ for the stationary phase used in the original work and taken as a reference [25]. As in RP-HPLC the mobile phase is always more polar than the stationary phase, P_m^N values are always greater than P_s^N .

P_m^N values are easily calculable from the mobile phase volume fractions:

$$P_m^N = 1.00 - \frac{2.13\varphi}{1 + 1.42\varphi} \quad (6)$$

for acetonitrile–water, and

$$P_m^N = 1.00 - \frac{1.33\varphi}{1 + 0.47\varphi} \quad (7)$$

for methanol–water mixtures.

The intercept in Eq. (5), $(\log k)_0$, stands for the retention of any solute eluted with a hypothetical mobile phase which has the same polarity as the stationary phase ($P_m^N = P_s^N$). The two descriptors of the chromatographic system ($(\log k)_0$ and P_s^N) are characteristic of each column for each organic modifier and are obtained by linear regression from the retention factor of a selected set of 12 compounds [28–30]. Once the chromatographic system is characterized, the p polarity parameter of any solute can be obtained from only one injection of the solute of interest and Eq. (5).

This polarity model was developed using literature retention values obtained in a Waters Spherisorb ODS-2 column and acetonitrile as organic modifier, and this chromatographic arrangement was considered as the reference system. However, the p values for any solute can be easily transferred between chromatographic systems by means of linear relationships:

$$p_{\text{working}} = ap_{\text{reference}} + b \quad (8)$$

where p_{working} is the p value for any solute in the working chromatographic system and $p_{\text{reference}}$ is the p value of the same solute in the reference system. The p values of the same 12 compounds selected to characterize the chromatographic systems were used here to establish linear relationships between chromatographic systems according to Eq. (8) [30].

2.2. The QSPR model

The method developed in this work is also based on a Quantitative Structure–Property Relationship model [31] which relates the solute polarity parameter p with the octanol–water partition coefficient ($\log P_{o/w}$) and four descriptors directly derived from the structure of the solute and calculated by means of the CODESSA software:

$$p_{\text{reference}} = 0.82(\pm 0.02)\log P_{o/w} - 1.55(\pm 0.12)(\text{HDCA-2}) + 0.14(\pm 0.02)(\text{HOMO-LUMO}) - 1.63(\pm 0.21)\left(\frac{\text{pol}}{d^2}\right) + 1.04 \times 10^{-3}(\pm 2.6 \times 10^{-4})(\text{DPSA-1}) + 0.81(\pm 0.19);$$

$$r^2 = 0.964; n = 188; \text{SD} = 0.25 \quad (9)$$

This equation was validated with a new set of 45 compounds.

The molecular descriptors encode the following information: HDCA-2 is a hydrogen bond acidity descriptor, pol/d^2 , is related to the molecular polarity, HOMO–LUMO gap descriptor stands for the molecular polarizability since the electron distribution can be distorted readily if the LUMO energy lies close to the HOMO energy, generating then, a large polarizability. DPSA-1 is also an electrostatic descriptor that belongs to the charged partial surface area group. Eq. (9) can be rewritten to calculate the $\log P_{o/w}$ values from the solute polarity parameter p values (obtained from chromatographic retention measurements), and the four structural descriptors:

$$\log P_{o/w} = 1.22p_{\text{reference}} + 1.89(\text{HDCA-2}) - 0.17(\text{HOMO-LUMO}) + 1.98\left(\frac{\text{pol}}{d^2}\right) - 1.27 \times 10^{-3}(\text{DPSA-1}) - 0.99 \quad (10)$$

In this model, the solute polarity parameter p is referred to Spherisorb ODS-2 column and acetonitrile as organic modifier ($p_{\text{reference}}$). Then, retention data obtained in different chromatographic systems (column, organic modifier) must be transferred to reference system by using linear relationships according to Eq. (8).

3. Experimental

3.1. Apparatus

Two Shimadzu (Kyoto, Japan) HPLC systems were employed: one equipped with two LC-10ADvp isocratic pumps, a SIL-20AChT autoinjector (fixed to 10 μl), a SPD-M10Avp diode array detector, a CTO-10ASvp oven at $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and a SCL-10Avp system controller. The other one was equipped with two isocratic pumps (LC-10ADvp/LC-10ATvp), a SIL-10ADvp autoinjector (also fixed to 10 μl), a SPD-10AVvp UV detector and a SCL-10Avp system controller. Column temperature was fixed at 25°C and controlled by a water thermostatic bath. Using this chromatograph, detection wavelengths were 200 nm for potassium bromide, 210 nm for isoniazide and benzimidazole derivatives, 254 nm for benzene derivatives and 282 nm for phenols.

pH measurements were taken with a combined Crison 5014 electrode in a Crison pH meter GLP22 potentiometer with a precision of ± 0.002 pH units. The electrode system was standardized with ordinary aqueous buffers of pH 4.01 and 7.00 (Crison Instruments, Alella, Spain).

3.2. Columns

Retention data from four different columns were used: Phenomenex Luna C₁₈ (2), 5 μm , 150 mm \times 4.6 mm column; Merck Chromolith Performance RP-18e monolithic 100 mm \times 4.6 mm column; Waters Symmetry C₁₈, 5 μm , 150 mm \times 4.6 mm column; and Waters Resolve C₁₈, 5 μm , 150 mm \times 3.9 mm column. Retention data from Luna C₁₈ (2) and Chromolith RP-18e were obtained in this work and the ones from Symmetry C₁₈ and Resolve C₁₈ were taken from the literature [30]. Characteristics of the studied columns are given in Table 1.

3.3. Chemicals

Acetonitrile and methanol were HPLC grade from Merck (Darmstadt, Germany). Water was purified by the Milli-Q plus system from Millipore, with a resistivity of 18.2 M Ω . All the solutes studied were reagent grade or better and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), Fluka (Steinheim, Germany), Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany), Baker (Deventer, Netherlands), Riedel de Haën (Seelze, Germany) and Carlo Erba (Milano, Italy). Some of the studied solutes were from new synthesis carried out in CQB of FCUL.

Table 1
Chromatographic features of the columns studied and experimental conditions of the measurements.

Features	Luna C ₁₈ (2)	Chromolith RP-18e	Symmetry C ₁₈	Resolve C ₁₈
Structure type	Particulate	Monolithic	Particulate	Particulate
Particle size (μm)	5	–	5	5
Total porosity	–	–	65	–
Average pore diameter (\AA)	110	–	89	90
Macropore size (μm)	–	2	–	–
Mesopore size (\AA)	–	130	–	–
Surface area ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	372	300	346	200
Pore volume (ml g^{-1})	–	1	–	–
Total carbon (%)	18.12	18	19.77	10.20
Endcapped	Yes	Yes	Yes	No
Column length (mm)	150	100	150	150
Column diameter (mm)	4.6	4.6	4.6	3.9
pH stability range	1.5–10	2–7.5	2–8	2–8
Experimental conditions				
Flow rate (ml min^{-1})	1	2	1	1
Acetonitrile composition range	20–60%	20–60%	20–60%	20–60%
Methanol composition range	20–70%	20–70%	20–70%	20–70%
Working aqueous pH	3.0/6.0/7.0	3.0/6.0	2.7/7.0	2.7/7.0

Table 2Physico-chemical data of the studied compounds: CAS number, reference log $P_{o/w}$ values, aqueous pK_a (${}^w pK_a$) and molecular descriptor values.

Compound	CAS	Reference log $P_{o/w}$	${}^w pK_a$	Molecular descriptors			
				pol/ d^2	HDCA-2	HOMO-LUMO	DPSA-1
1,2,3-Trihydroxybenzene	87-66-1	0.68	9.01	0.02	1.23	9.23	4.85
1,2,4-Trimethylbenzene	95-63-6	3.63	–	0.01	0.00	9.48	193.12
1,2-Dihydroxybenzene*	120-80-9	0.88	9.12	0.02	0.82	9.18	11.95
1,3-Dihydroxybenzene	108-46-3	0.80	9.81	0.01	0.84	9.37	23.84
1,4-Dihydroxybenzene	123-31-9	0.59	9.91	0.01	0.83	8.94	26.03
1,4-Dimethylbenzene	106-42-3	3.15	–	0.00	0.00	9.55	149.12
1-Acetyl-2-isonicotinoyl-hydrazine	–	–0.87	3.26	0.01	0.94	9.81	16.99
1-Ethyl-2-ethylthio-1H-benzo[d]imidazole	–	3.36	4.68	0.07	0.26	8.12	198.45
1-Naphthoic acid	86-55-5	3.10	3.69	0.26	0.52	8.21	10.10
1-Phenylthiourea	103-85-5	0.73	–	0.03	0.43	8.24	16.33
2-(2-Cyclohexylethylthio)-1H-benzo[d]imidazole	–	4.94	4.56	0.16	0.36	8.17	289.87
2,4,6-Trichlorophenol	88-06-2	3.69	6.21	0.27	0.36	8.89	182.57
2,4-Dichlorophenol	120-83-2	3.06	7.85	0.27	0.35	9.03	–135.21
2,4-Dinitroaniline	97-02-9	1.90	4.53	0.03	0.18	8.45	21.33
2,6-Dichlorophenol	87-65-0	2.75	7.02	0.27	0.40	9.11	12.98
2,6-Dimethylaniline	87-62-7	1.84	3.95	0.16	0.19	8.95	161.05
2-Amino-4-chlorophenol	95-85-2	1.81	3.68	0.27	0.64	8.86	–35.24
2-Aminophenol	95-55-6	0.62	4.74	0.28	0.64	8.98	60.13
2-Benzidrilthio-1H-benzo[d]imidazole	–	4.90	4.22	0.16	0.34	7.84	147.54
2-Benzylthio-1H-benzo[d]imidazole	–	3.92	4.28	0.16	0.47	8.21	110.99
2-Bromophenol	95-56-7	2.35	8.39	0.27	0.43	9.23	101.12
2-Chlorophenol	95-57-8	2.67	8.11	0.27	0.44	9.26	95.74
2-Naphthol	135-19-3	2.70	9.52	0.03	0.40	8.22	30.99
2-Nitroaniline	88-74-4	1.85	0.26	0.16	0.24	8.27	24.76
3,4-Dichloroaniline	95-76-1	2.69	2.90	0.01	0.23	8.74	170.81
3,5-Dichlorophenol	591-35-5	3.52	8.18	0.27	0.43	9.25	–135.33
3-Bromobenzoic acid	585-76-2	2.86	3.59	0.26	0.51	9.23	63.92
3-Methylbenzoic acid	99-04-7	2.37	4.27	0.26	0.50	9.32	40.63
3-Methylphenol*	108-39-4	1.96	10.09	0.28	0.43	9.41	90.08
3-Nitrophenol	554-84-7	2.00	8.39	0.27	0.42	8.80	–20.10
4-Acetaminophenol	103-90-2	0.46	9.76	0.28	0.79	8.75	67.72
4-Aminophenol	123-30-8	0.04	5.28	0.28	0.64	8.71	68.62
4-Chloroaniline	106-47-8	1.83	3.98	0.17	0.23	8.79	–7.62
4-Iodophenol	540-38-5	2.90	9.38	0.28	0.41	9.27	114.48
4-Nitrotoluene*	99-99-0	2.37	–	0.02	0.00	9.26	35.88
5-Hydroxyflavone	491-78-1	4.30	7.31	0.27	0.25	8.38	–35.27
Aldrin	309-00-2	6.50	–	0.02	0.00	9.49	33.58
Aniline	62-53-3	0.90	4.60	0.17	0.22	8.97	81.48
Anthracene	120-12-7	4.45	–	0.00	0.00	7.28	34.24
Benzaldehyde	100-52-7	1.48	–	0.04	0.24	9.57	24.89
Benzamide*	55-21-0	0.64	–	0.11	0.51	9.73	25.85
Benzene	71-43-2	2.13	–	0.00	0.00	10.20	51.14
Benzoic acid	65-85-0	1.96	4.19	0.26	0.51	9.62	–14.06
Biphenyl	92-52-4	4.01	–	0.00	0.00	8.55	27.34
Butylbenzene*	104-51-8	4.38	–	0.00	0.00	9.83	200.53
Butyrophenone*	495-40-9	2.66	–	0.11	0.09	9.58	141.07
Chlorobenzene	108-90-7	2.89	–	0.05	0.00	9.72	–34.53
Chrysene*	218-01-9	5.81	–	0.00	0.00	7.70	11.05
Flurbiprofen	5104-49-4	4.16	4.21	0.00	0.51	8.59	58.31
Heptanophenone*	1671-75-6	–	–	0.10	0.10	9.53	217.51
Hexachlorobenzene	118-74-1	5.73	–	0.01	0.00	8.87	298.14
Hexylbenzene	1077-16-3	5.52	–	0.01	0.00	9.83	264.81
Ibuprofen	15687-27-1	3.97	4.31	0.26	0.53	9.59	212.51
Isoniazide	54-85-3	–0.65	3.53	0.11	0.93	9.83	36.44
Isonicotinamide	1453-82-3	–0.28	3.51	0.11	0.52	9.71	–14.43
Ketoprofen	22071-15-4	3.14	4.25	0.26	0.63	9.28	65.01
Methoxybenzene	100-66-3	2.11	–	0.05	0.00	9.49	95.56
Methyl-4-hydroxybenzoate	93-58-3	1.96	–	0.28	0.41	9.14	17.61
Methyl benzoate*	93-58-3	2.12	–	0.13	0.00	9.64	27.24
Metoxuron	19937-59-8	1.64	–	0.01	0.48	8.61	247.92
Naphthalene*	91-20-3	3.28	–	0.00	0.00	8.45	44.33
Naproxen	22204-53-1	3.34	4.18	0.00	0.84	8.25	169.98
N-Ethylaniline	103-69-5	2.16	5.12	0.16	0.18	9.02	167.81
Pentachlorophenol	87-86-5	5.12	4.67	0.26	0.40	8.60	252.37
Phenanthrene	85-01-8	4.46	–	0.00	0.00	8.21	12.83
Phenol	108-95-2	1.46	10.09	0.28	0.41	9.51	40.89
Propiophenone*	93-55-0	2.19	–	0.11	0.10	9.58	110.56
Propyl-4-hydroxybenzoate	2315-68-6	3.04	–	0.28	0.40	9.14	128.31
Propylbenzene*	103-65-1	3.72	–	0.00	0.00	9.83	171.48
Pyrene	129-00-0	4.88	–	0.00	0.00	7.24	5.61
Thymol	89-83-8	3.30	–	0.28	0.20	9.27	198.15
Toluene	108-88-3	2.73	–	0.01	0.00	9.85	100.42
Warfarin	81-81-2	3.25	4.50	0.02	0.40	8.21	87.91

The compounds marked with (*) are used to characterize the chromatographic systems involved in this work.

Table 3
Polarity parameters of the chromatographic systems and parameters of the transference between these working systems to the reference system, where a is the slope and b the intercept of the linear regression (Eq. (8)).

Polarity parameters		Luna C ₁₈ (2)	Chromolith RP-18e	Symmetry C ₁₈	Resolve C ₁₈
Acetonitrile	(log k) ₀	-0.83	-1.49	-1.40	-1.00
	p_s^N	-0.04	-0.06	-0.14	-0.04
Methanol	(log k) ₀	-1.03	-1.76	-1.31	-1.02
	p_s^N	-0.06	-0.12	-0.12	-0.06
Transference parameters		Luna C ₁₈ (2)	Chromolith RP-18e	Symmetry C ₁₈	Resolve C ₁₈
Acetonitrile	a	0.87	0.89	0.80	0.83
	b	0.22	0.27	0.73	0.39
	R^2	0.998	0.993	0.992	0.994
Methanol	a	0.94	0.91	0.97	0.92
	b	0.20	0.40	0.19	-0.14
	R^2	0.992	0.995	0.989	0.994

Table 4
pH variation of aqueous buffers with the addition of organic modifier.

Buffering system	Aqueous concentration	w_p pH	s_w pH at some acetonitrile volume fractions					
			20%	30%	40%	50%	60%	
Citrate	0.01 mol L ⁻¹	3.00	3.23	3.35	3.46	3.58	3.69	
Acetate	0.01 mol L ⁻¹	6.00	6.46	6.68	6.91	7.14	7.37	
Phosphate	0.01 mol L ⁻¹	7.00	7.35	7.53	7.70	7.88	8.05	
Buffering system	Aqueous concentration	w_p pH	s_w pH at some methanol volume fractions					
			20%	30%	40%	50%	60%	70%
Citrate	0.01 mol L ⁻¹	3.00	3.25	3.42	3.60	3.79	3.99	4.20
Acetate	0.01 mol L ⁻¹	6.00	6.30	6.50	6.71	6.94	7.19	7.44
Phosphate	0.01 mol L ⁻¹	7.00	7.40	7.66	7.95	8.25	8.57	8.90

3.4. Chromatographic procedure

The eluents were mixtures of acetonitrile or methanol as organic modifiers and several aqueous buffers adjusted at different pH values in order to get the ionizable solutes in their neutral form. The ranges of organic modifier fraction in the mobile phase used depend on the column considered and they are shown in Table 1. Isocratic conditions were always used; flow rates are also given in Table 1.

The solutes were grouped according to their aqueous pK_a and three different aqueous buffers were used: pH 3.0 buffer (citric acid 0.01 M), pH 6.0 buffer (acetic acid 0.01 M) and pH 7.0 buffer (dihydrogenphosphate 0.01 M).

The solutes were dissolved in the working organic modifier (acetonitrile or methanol). The injection volume was 10 μ l for all analytes. A solution of 0.1 mg mL⁻¹ of potassium bromide was used as void volume marker. Retention data were expressed as the logarithm of the retention factor

Table 5
 pK_a variation of analytes in several acetonitrile–water mixtures.

Family of analytes	w_p pK_a	s_w pK_a at several acetonitrile volume fractions				
		20%	30%	40%	50%	60%
Aliphatic carboxylic acids	2.00	2.28	2.43	2.61	2.82	3.09
	3.00	3.38	3.56	3.76	4.01	4.32
	4.00	4.47	4.68	4.92	5.19	5.55
	5.00	5.57	5.81	6.07	6.38	6.78
Aromatic carboxylic acids	2.00	2.12	2.23	2.35	2.47	2.57
	3.00	3.27	3.45	3.64	3.85	4.08
	4.00	4.41	4.66	4.94	5.24	5.58
	5.00	5.56	5.88	6.23	6.63	7.08
Phenols	8.00	8.55	8.67	8.89	9.28	9.88
	9.00	9.71	9.85	10.09	10.50	11.11
	10.00	10.86	11.03	11.29	11.71	12.34
	11.00	12.02	12.21	12.49	12.93	13.58
Amines	8.00	7.79	7.63	7.44	7.25	7.08
	9.00	8.82	8.67	8.49	8.31	8.15
	10.00	9.84	9.71	9.55	9.37	9.22
	11.00	10.87	10.75	10.60	10.43	10.29
Pyridines	4.00	3.64	3.46	3.25	3.01	2.70
	5.00	4.64	4.45	4.24	3.99	3.68
	6.00	5.64	5.45	5.23	4.98	4.65
	7.00	6.63	6.44	6.22	5.96	5.63

Table 6
 pK_a variation of analytes in several methanol–water mixtures.

Family of analytes	${}^w pK_a$	${}^s pK_a$ at several methanol volume fractions					
		20%	30%	40%	50%	60%	70%
Aliphatic carboxylic acids	2.00	2.32	2.50	2.72	2.96	3.21	3.45
	3.00	3.35	3.55	3.78	4.04	4.30	4.54
	4.00	4.38	4.60	4.85	5.12	5.40	5.63
	5.00	5.41	5.65	5.92	6.20	6.49	6.73
Aromatic carboxylic acids with ortho-substituents	2.00	2.33	2.38	2.56	2.78	3.03	3.29
	3.00	3.29	3.47	3.68	3.93	4.22	4.53
	4.00	4.34	4.55	4.79	5.08	5.41	5.76
	5.00	5.39	5.63	5.90	6.23	6.60	6.99
Aromatic carboxylic acids without ortho-substituents	2.00	2.17	2.28	2.41	2.56	2.73	2.87
	3.00	3.26	3.43	3.62	3.84	4.09	4.32
	4.00	4.36	4.57	4.83	5.12	5.45	5.77
	5.00	5.45	5.72	6.04	6.40	6.81	7.22
Phenols	8.00	8.27	8.43	8.61	8.81	9.03	9.24
	9.00	9.30	9.48	9.68	9.90	10.13	10.35
	10.00	10.34	10.54	10.75	10.99	11.23	11.45
	11.00	11.38	11.59	11.83	12.08	12.33	12.56
Amines	8.00	7.81	7.72	7.64	7.56	7.49	7.37
	9.00	8.79	8.70	8.61	8.53	8.45	8.33
	10.00	9.78	9.68	9.59	9.50	9.42	9.30
	11.00	10.77	10.66	10.56	10.47	10.39	10.26
Pyridines	4.00	3.57	3.38	3.20	3.05	2.91	2.76
	5.00	4.54	4.35	4.17	4.01	3.86	3.72
	6.00	5.52	5.32	5.13	4.97	4.82	4.67
	7.00	6.50	6.29	6.10	5.93	5.78	5.63

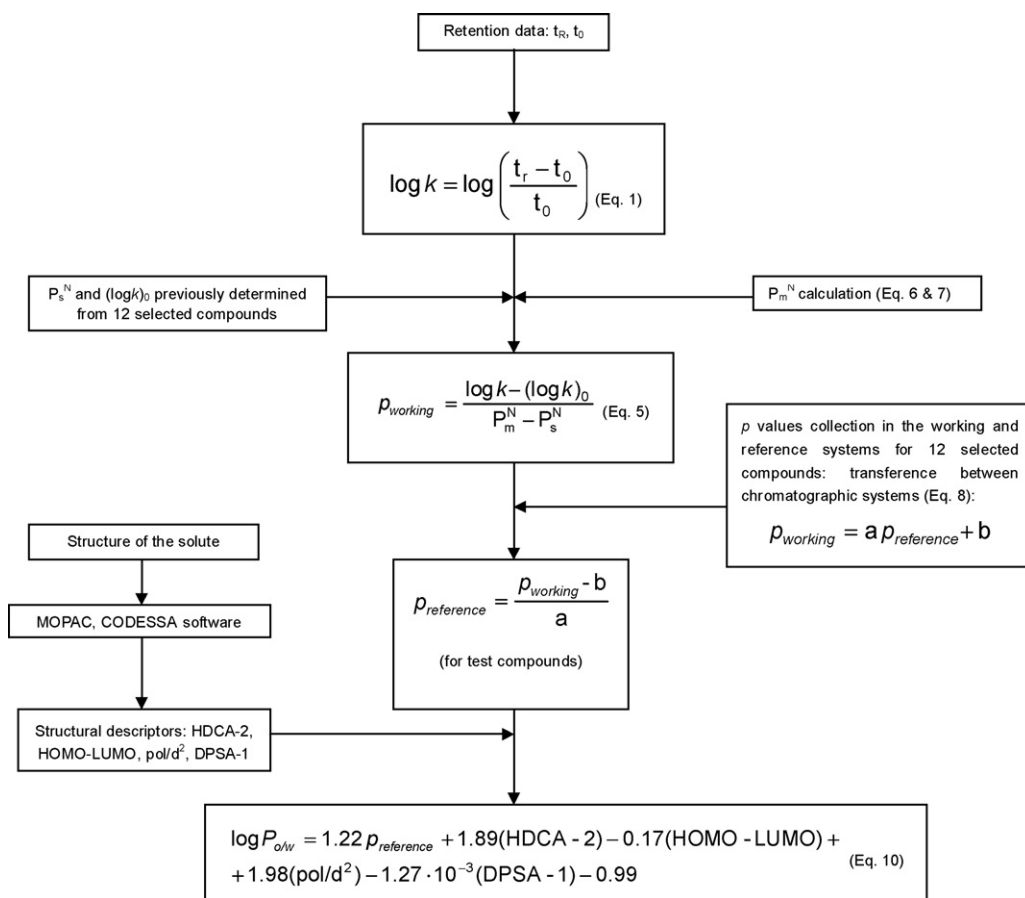


Fig. 1. Flowchart of the procedure described in the introduction section.

as defined by Eq. (1). All measurements were taken in triplicate.

3.5. Structural descriptors and calculations

Descriptors were calculated from the structure of each compound. The structures were drawn using HyperChem Lite software (HyperCube, Gainesville, USA). The geometrical optimization of the structures was done with MOPAC 6.0 and AuxQSPR program in order to obtain an actual energy minimum. These programs provided files prepared to calculate the numeric values of the structural descriptors using CODESSA software (University of Florida, USA). Microsoft Excel was used to obtain the calculated $\log P_{o/w}$ values.

4. Results and discussion

4.1. Physico-chemical data and molecular descriptors of investigated compounds

The compounds investigated, some of their physical properties, (pK_a values, reference $\log P_{o/w}$), as well as their structural descriptors values are shown in Table 2. The reference $\log P_{o/w}$ values were those selected among the experimental values compiled in the Leo et al. [32] and BioLoom on-line [33] databases by the database managers, excepting the compounds whose $\log P_{o/w}$ have been determined experimentally in our laboratory. However, it should be pointed out that a significant variety of values for each compound is given in the mentioned databases and sometimes it is really difficult to select the best value since different methods and experimental conditions were used and, often, these details are omitted. The pK_a values were taken from the literature [34–37] and BioLoom online database [33]. The compounds without CAS number are new synthesis substances and their $\log P_{o/w}$ and pK_a values have been determined potentiometrically in our laboratory since all of them show acid–base properties. Titrations in aqueous solution (or hydroalcoholic mixtures for the more insoluble compounds) allow the pK_a determination. The differences between the titration curves obtained with and without a controlled amount of n-octanol lead to the determination of the $\log P_{o/w}$ value. The solutes studied present diverse structures, functional groups, acid–base properties and a broad range of hydrophobicity.

4.2. Chromatographic system characterization

The procedure to characterize the chromatographic system was already carefully described [28–30]. Columns were characterized from the retention factors of 12 standard compounds (shown in Table 2 marked with an asterisk) at various mobile phase compositions.

Four C_{18} columns have been used in this work: three particulate columns (Luna C_{18} (2), Symmetry C_{18} and Resolve C_{18}) and one monolithic column (Chromolith RP-18e). From each one the p polarity parameter of the solutes under study has been determined. The system parameters ($\log k_0$ and P_s^N) for each chromatographic arrangement are shown in Table 3 [30]. As the solute polarity parameter, p , depends on the chromatographic system used, these values must be transferred to the reference system (Spherisorb ODS-2, acetonitrile), as discussed before. Table 3 shows also the correlations between p values of the selected set of 12 compounds for all columns and organic modifiers with the reference systems, as well as their associated statistics. It should be noticed that two transfer steps are included in a correlation when methanol is selected as the mobile phase modifier (solvents and columns) whereas only one transfer is necessary when acetonitrile is used (only column).

Table 7 Number of compounds studied, number of outliers, standard deviation of the results, average of the residuals ($\log P_{o/w}$ (calc.) ($\log P_{o/w}$ (ref.)) and $\log P_{o/w}$ range values obtained for each column studied and organic modifier fraction in the mobile phase.

	Luna C_{18} (2)				Chromolith RP-18e				Symmetry C_{18}				Resolve C_{18}							
	n	Outliers	SD	Residual average	$\log P_{o/w}$ range	n	Outliers	SD	Residual average	$\log P_{o/w}$ range	n	Outliers	SD	Residual average	$\log P_{o/w}$ range	n	Outliers	SD	Residual average	$\log P_{o/w}$ range
Acetonitrile fraction	20%	33	2	0.34	-0.10	42	6	0.40	0.14	1 to 3	21	1	0.35	0.16	1 to 3	24	2	0.31	-0.03	1 to 3
	30%	44	2	0.37	-0.10	54	3	0.31	0.07	1 to 5	27	1	0.29	0.17	1 to 4	29	0	0.22	-0.02	1 to 4
	40%	54	2	0.31	-0.11	60	4	0.31	0.01	1 to 5	31	0	0.30	0.23	1 to 4	34	1	0.22	0.00	1 to 5
	50%	62	3	0.35	-0.11	62	6	0.37	-0.02	1 to 6	38	5	0.41	0.33	1 to 6	38	1	0.28	0.02	1 to 6
	60%	63	8	0.40	-0.13	63	12	0.47	-0.03	1 to 7	38	6	0.46	0.39	1 to 6	38	2	0.29	0.03	1 to 6
Methanol fraction	20%	23	3	0.46	-0.10	32	5	0.46	0.04	1 to 3	14	2	0.48	0.05	1 to 2	20	4	0.49	-0.09	1 to 2
	30%	34	3	0.38	0.03	37	7	0.44	0.12	1 to 4	19	3	0.45	0.13	1 to 3	25	5	0.46	-0.06	1 to 3
	40%	42	4	0.38	0.02	46	8	0.45	0.18	1 to 4	25	5	0.49	0.22	1 to 3	29	5	0.41	-0.10	1 to 4
	50%	49	4	0.41	-0.01	55	10	0.45	0.19	1 to 5	29	5	0.45	0.24	1 to 4	31	3	0.37	-0.13	1 to 4
	60%	58	8	0.40	-0.01	57	10	0.44	0.12	1 to 6	31	6	0.44	0.26	1 to 4	35	4	0.44	0.20	1 to 5
70%	45	4	0.40	0.12	56	9	0.49	0.15	1 to 6	37	13	0.61	0.42	1 to 6	38	5	0.47	0.04	1 to 6	

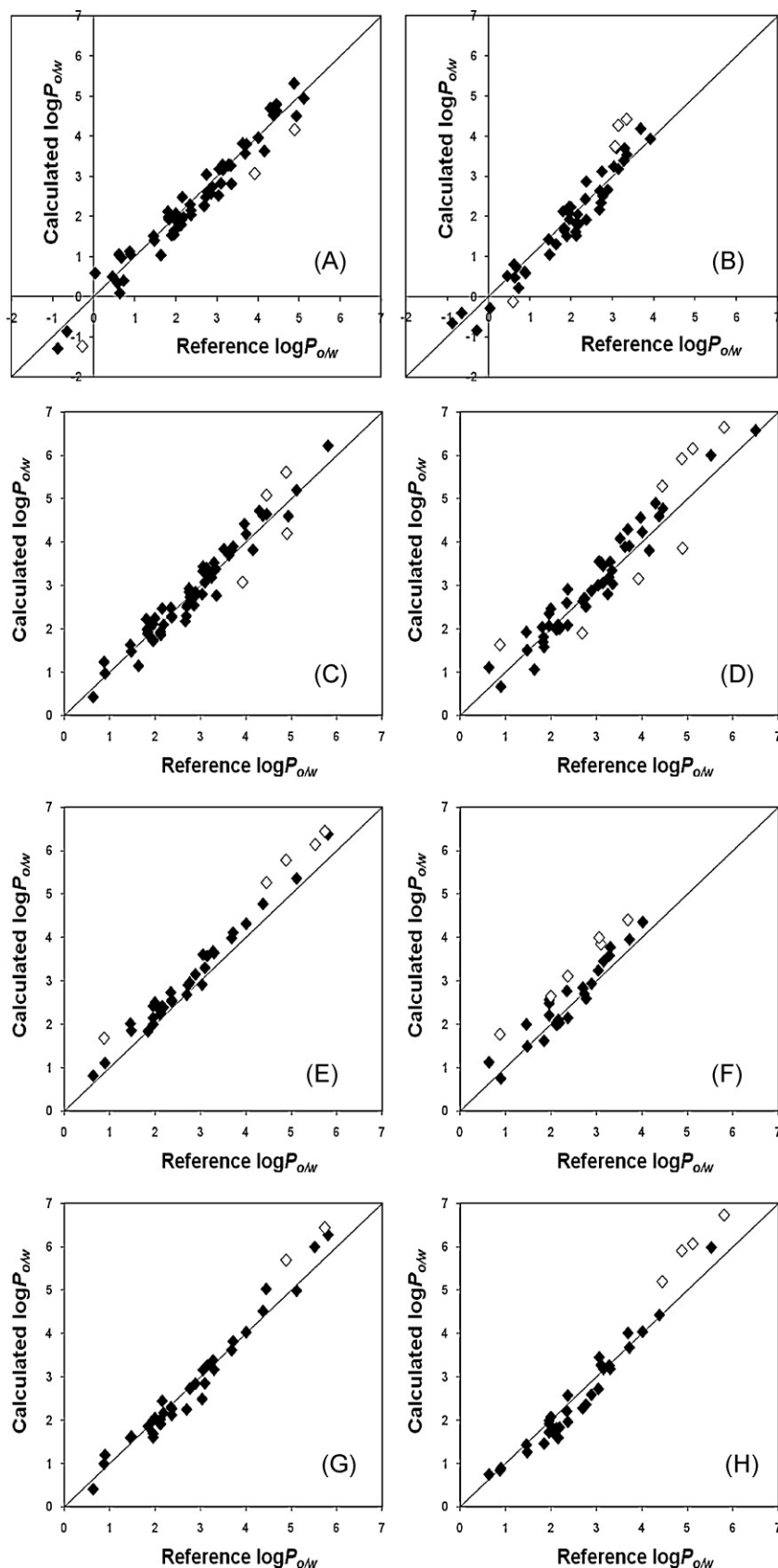


Fig. 2. Plots of calculated $\log P_{o/w}$ vs. reference $\log P_{o/w}$ values: (A) Luna C₁₈ (2) column, MeCN/H₂O 50% (v/v); (B) Luna C₁₈ (2) column, MeOH/H₂O 50% (v/v); (C) Chromolith C₁₈ column, MeCN/H₂O 40% (v/v); (D) Chromolith C₁₈ column, MeOH/H₂O 70% (v/v); (E) Symmetry C₁₈ column, MeCN/H₂O 50% (v/v); (F) Symmetry C₁₈ column, MeOH/H₂O 60%; (G) Resolve C₁₈ column, MeCN/H₂O 60% (v/v); (H) Resolve C₁₈ column, MeOH/H₂O 70% (v/v). Symbols: (\diamond) outliers.

Table 8
log $P_{o/w}$ calculation from p solute polarity parameter. Luna C₁₈ (2) column, mobile phase acetonitrile/water 50% (v/v). Residual column: log $P_{o/w}$ (calc.) – log $P_{o/w}$ (ref.).

Compound	log k	p column	p reference	Calculated log $P_{o/w}$	Residual
1-Acetyl-2-isonicotinoil-hydrazine	-0.87	-0.03	-0.29	-1.28	-0.41
Isoniazide	-0.77	0.16	-0.07	-0.86	-0.21
Isonicotinamide	-0.67	0.40	0.20	-1.24	-0.96
4-Acetaminophenol	-0.43	0.98	0.88	0.50	0.04
1,2,3-Trihydroxybenzene	-0.38	1.10	1.01	0.97	0.29
1,4-Dihydroxybenzene	-0.34	1.19	1.11	0.34	-0.25
4-Aminophenol	-0.32	1.24	1.17	0.59	0.55
Benzamide	-0.26	1.39	1.35	0.09	-0.55
2-Aminophenol	-0.17	1.60	1.59	1.06	0.44
1-Phenylthiourea	-0.16	1.64	1.63	0.40	-0.33
1,2-Dihydroxybenzene	-0.10	1.76	1.77	1.13	0.25
Benzoic acid	0.09	2.23	2.31	1.64	-0.32
Methyl-4-hydroxybenzoate	0.09	2.24	2.33	1.55	-0.41
2-Amino-4-chlorophenol	0.10	2.26	2.35	2.12	0.31
Phenol	0.11	2.29	2.38	1.52	0.06
Metoxuron	0.12	2.31	2.41	1.04	-0.60
Aniline	0.13	2.33	2.43	1.06	0.16
3-Nitrophenol	0.21	2.53	2.65	2.07	0.07
3-Methylbenzoic acid	0.21	2.53	2.66	2.04	-0.33
3-Methylphenol	0.25	2.61	2.75	1.96	0.00
Benzaldehyde	0.31	2.75	2.92	1.40	-0.08
2,4-Dinitroaniline	0.33	2.81	2.99	1.53	-0.37
2-Nitroaniline	0.33	2.82	2.99	1.96	0.11
2-Bromophenol	0.34	2.84	3.02	2.30	-0.05
4-Chloroaniline	0.36	2.88	3.07	1.98	0.15
1-Naphthoic acid	0.36	2.89	3.08	2.83	-0.27
3-Bromobenzoic acid	0.37	2.90	3.09	2.57	-0.29
2-Naphthol	0.42	3.02	3.22	2.27	-0.43
Propyl 4-hydroxybenzoate	0.43	3.05	3.25	2.53	-0.51
2,6-Dimethylaniline	0.44	3.07	3.28	1.93	0.09
Ketoprofen	0.52	3.26	3.50	3.29	0.15
Methylbenzoate	0.52	3.26	3.50	1.82	-0.30
Naproxen	0.53	3.30	3.55	3.27	-0.07
2,6-Dichlorophenol	0.54	3.15	3.37	3.05	0.30
2,4-Dichlorophenol	0.55	3.33	3.58	3.18	0.12
Propiophenone	0.55	3.35	3.60	1.98	-0.21
2-Benzylthio-1H-benzo[d]imidazole	0.57	3.38	3.64	3.07	-0.85
Methoxybenzene	0.57	3.40	3.66	1.79	-0.32
3,4-Dichloroaniline	0.60	3.46	3.73	2.27	-0.42
N-ethylaniline	0.61	3.50	3.77	2.48	0.32
Benzene	0.62	3.51	3.79	1.79	-0.34
4-Nitrotoluene	0.66	3.62	3.91	2.15	-0.22
1-Ethyl-2-ethylthio-1H-benzo[d]imidazole	0.69	3.67	3.97	2.82	-0.54
Butyrophenone	0.75	3.83	4.16	2.60	-0.17
2,4,6-Trichlorophenol	0.77	3.88	4.21	3.57	-0.12
Thymol	0.80	3.94	4.28	3.28	-0.02
Flurbiprofen	0.80	3.94	4.28	3.63	-0.53
Chlorobenzene	0.82	3.98	4.33	2.73	-0.16
Toluene	0.82	4.00	4.35	2.48	-0.25
2-Benzidrilthio-1H-benzo[d]imidazole	0.95	4.31	4.71	4.16	-0.73
Naphthalene	0.97	4.35	4.75	3.28	0.00
1,4-Dimethylbenzene	1.03	4.50	4.92	3.16	0.01
5-Hydroxyflavone	1.05	4.55	4.99	4.69	0.39
Biphenyl	1.17	4.83	5.31	3.96	-0.05
Pentachlorophenol	1.17	4.84	5.32	4.94	-0.18
2-(2-Cyclohexylethylthio)-1H-benzo[d]imidazole	1.18	4.70	5.16	4.50	-0.44
1,2,4-Trimethylbenzene	1.23	4.99	5.49	3.82	0.19
Propylbenzene	1.24	5.00	5.51	3.80	0.08
Phenanthrene	1.34	5.25	5.79	4.63	0.17
Anthracene	1.35	5.27	5.81	4.79	0.34
Butylbenzene	1.46	5.55	6.13	4.52	0.14
Pyrene	1.49	5.61	6.21	5.31	0.43

4.3. Selection of the pH of the mobile phase

In accordance with that exposed previously, an appropriate control of the pH of the mobile phases should be done to obtain the right log $P_{o/w}$ values, that is to say, those of the neutral form of the solutes. Thus, the variation of the pK_a of solutes and the pH of the mobile phases with the organic modifier content was taken into account according to their specific behaviour. This means that, using a particular aqueous buffer at a given pH, the solute can be at its neutral form at lower organic modifier content but partially or fully ion-

ized at higher organic modifier fractions, and vice versa [38,39]. For instance, the pH of citric acid buffer was 3.0 in pure water, 3.2 when the mobile phase contents a 20% of acetonitrile, and 3.7 at 60% of acetonitrile. The variation of pH with the addition of organic modifier to the mobile phase for the buffers used in this work is given in Table 4 [39]. The solutes with acid-base properties also show a change in their pK_a values, which depends on the family of compounds considered: pK_a increases for neutral acids, carboxylics and phenolic compounds, and decreases for cationic acids, protonated amines and nitrogenated heterocycles, with the addition of organic

Table 9log $P_{o/w}$ calculation from p solute polarity parameter. Chromolith C₁₈ column, mobile phase acetonitrile/water 40% (v/v). Residual column: log $P_{o/w}$ (calc.) – log $P_{o/w}$ (ref.).

Compound	log k	p column	p reference	Calculated log $P_{o/w}$	Residual
Benzamide	-0.60	1.72	1.62	0.42	-0.22
1,2-Dihydroxybenzene	-0.49	1.93	1.86	1.23	0.35
Aniline	-0.26	2.38	2.36	0.97	0.07
Benzoic acid	-0.24	2.42	2.40	1.75	-0.21
2-Amino-4-chlorophenol	-0.23	2.44	2.43	2.22	0.41
Methyl-4-hydroxybenzoate	-0.21	2.48	2.46	1.72	-0.24
Phenol	-0.21	2.48	2.47	1.63	0.17
Metoxuron	-0.20	2.50	2.49	1.14	-0.50
3-Nitrophenol	-0.06	2.77	2.79	2.24	0.24
3-Methylbenzoic acid	-0.04	2.81	2.84	2.26	-0.11
3-Methylphenol	-0.02	2.84	2.87	2.11	0.15
2-Chlorophenol	-0.01	2.86	2.90	2.17	-0.50
2-Nitroaniline	0.02	2.92	2.96	1.92	0.07
Benzaldehyde	0.03	2.93	2.98	1.47	-0.01
3-Bromobenzoic acid	0.06	3.01	3.06	2.54	-0.32
4-Chloroaniline	0.07	3.02	3.07	1.99	0.16
2-Bromophenol	0.11	3.10	3.17	2.48	0.13
2,6-Dimethylaniline	0.15	3.17	3.24	1.88	0.04
1-Naphthoic acid	0.17	3.21	3.28	3.07	-0.03
2,6-Dichlorophenol	0.22	3.32	3.41	2.85	0.18
2-Naphthol	0.23	3.33	3.42	2.51	-0.19
4-Iodophenol	0.24	3.35	3.45	2.77	-0.13
Propyl 4-hydroxybenzoate	0.26	3.38	3.47	2.79	-0.25
Ketoprofen	0.31	3.49	3.59	3.40	0.26
Methylbenzoate	0.31	3.49	3.60	1.94	-0.18
Naproxen	0.33	3.53	3.64	3.38	0.04
2-Benzylthio-1H-benzo[d]imidazole	0.33	3.53	3.64	3.08	-0.85
Propiophenone	0.36	3.57	3.69	2.09	-0.10
Methoxybenzene	0.38	3.62	3.74	1.89	-0.22
3,4-Dichloroaniline	0.38	3.63	3.75	2.29	-0.40
N-Ethylaniline	0.39	3.63	3.76	2.46	0.30
2,4-Dichlorophenol	0.40	3.66	3.79	3.43	0.37
Benzene	0.43	3.71	3.84	1.86	-0.27
1-Ethyl-2-ethylthio-1H-benzo[d]imidazole	0.47	3.79	3.93	2.77	-0.59
4-Nitrotoluene	0.51	3.87	4.02	2.29	-0.08
3,5-Dichlorophenol	0.51	3.87	4.02	3.84	0.32
Warfarin	0.51	3.88	4.03	3.18	-0.07
Butyrophenone	0.62	4.08	4.26	2.73	-0.04
2,4,6-Trichlorophenol	0.69	4.21	4.41	3.81	0.12
Toluene	0.69	4.22	4.42	2.56	-0.17
Chlorobenzene	0.69	4.23	4.42	2.84	-0.05
Flurbiprofen	0.70	4.24	4.43	3.82	-0.34
Thymol	0.72	4.27	4.48	3.52	0.22
2-Benzidrilthio-1H-benzo[d]imidazole	0.84	4.51	4.74	4.20	-0.70
Ibuprofen	0.86	4.55	4.78	4.42	0.45
Naphthalene	0.86	4.56	4.79	3.33	0.05
5-Hydroxyflavone	0.96	4.75	5.01	4.72	0.42
1,4-Dimethylbenzene	0.96	4.75	5.01	3.27	0.12
2-(2-Cyclohexylethylthio)-1H-benzo[d]imidazole	1.07	4.96	5.24	4.60	-0.34
1,2,4-Trimethylbenzene	1.14	5.09	5.39	3.70	0.07
Biphenyl	1.19	5.18	5.49	4.18	0.17
Pentachlorophenol	1.20	5.21	5.52	5.20	0.08
Propylbenzene	1.23	5.26	5.58	3.89	0.17
Phenanthrene	1.33	5.46	5.80	4.64	0.18
Anthracene	1.45	5.68	6.05	5.08	0.63
Butylbenzene	1.51	5.81	6.20	4.61	0.23
Pyrene	1.63	6.04	6.45	5.61	0.73
Chrysene	1.89	6.54	7.02	6.22	0.41

modifier. For example, an aqueous pK_a of 8.0 will be 9.9 for a phenolic compound at 60% of acetonitrile, whilst the same aqueous pK_a will be 7.1 for a protonated amine at the same acetonitrile fraction. The variation patterns for different chemical families according to the nature of the acidic group are given in Tables 5 and 6 [39]. It should be pointed out that the symbol ${}^s_w pH$ in Table 4 refers to the mobile phase pH measured after the addition of organic modifier to the aqueous buffer by means of a glass electrode standardized with ordinary aqueous buffers. The symbol ${}^s_w pK_a$ in Tables 5 and 6 refers to the analyte pK_a in the mobile phase with pH measured in ${}^s_w pH$ scale. Thus, Tables 4–6 allow us a good estimation of pH and analyte pK_a in the mobile phase from their aqueous pH (${}^w pH$) and pK_a (${}^w pK_a$) values, respectively. Therefore it becomes easy to

select the chromatographic conditions that assure the presence of the analyte in its pure neutral form.

4.4. Recommended procedure and determined log $P_{o/w}$ values

The proposed method is illustrated by means of the flowchart given in Fig. 1. According to it, the log $P_{o/w}$ values of the compounds given in Table 2 have been determined from isocratic measurements performed with different mobile phases and the Luna C₁₈ (2) and Chromolith RP-18e columns. Moreover, the log $P_{o/w}$ values of several compounds, also included in Table 2, have been calculated from their published retention factors obtained in the Symmetry C₁₈ and the Resolve C₁₈ columns [30]. It should be noticed that

the number of compounds studied and the $\log P_{o/w}$ range covered cannot be the same for each arrangement since the $\log P_{o/w}$ limiting values in each chromatographic system strongly depends on the organic modifier fraction, i.e. high fractions allow the elution of the most hydrophobic compounds. Moreover, compounds partially dissociated in the mobile phases used have been excluded. For each column and mobile phase composition, the number of compounds studied, the number of outliers, the standard deviation of the results, the $\log P_{o/w}$ range achieved and the average of the differences between determined $\log P_{o/w}$ values and those taken as the reference, named “Residual Average”, are given in Table 7. According to these data, Luna C₁₈ (2) column is suitable for studying not only very hydrophilic compounds ($\log P_{o/w} < 0$) but also strongly hydrophobic ones ($\log P_{o/w} > 5$), when the adequate organic modifier fraction in the mobile phase is used. Symmetry C₁₈ and Resolve C₁₈ columns allow the determination of higher $\log P_{o/w}$ values but the lack of retention factors of very hydrophilic compounds prevents to verify the lower hydrophobicity limits. The $\log P_{o/w}$ range covered by the monolithic Chromolith RP-18e column is slightly higher than that of Symmetry C₁₈ and Resolve C₁₈ columns and it seems particularly appropriate for highly hydrophobic compounds ($\log P_{o/w} > 5$), due to its ability for working at high flow rates and, then, reduced retention times.

Fig. 2 illustrates the linear relationships between reference and calculated $\log P_{o/w}$ values for each studied column using acetonitrile and methanol as organic modifiers. For the same column, methanol appears to give more dispersion than acetonitrile, although all plots show a good correlation between calculated and reference $\log P_{o/w}$ values. These higher deviations could be caused by the transference of p polarity parameters obtained in methanol to the reference system (Spherisorb ODS-2 column and acetonitrile as organic modifier). Thus, whilst from measurements in acetonitrile mobile phases this transference includes only one step, this transference requests two steps from data obtained in methanol mobile phases: solvent transference (from methanol to acetonitrile) and column transference (working column to Spherisorb ODS-2).

The comparison of our results with those published by Donovan and Pescatore [23], who used methanol as organic modifier and gradient elution mode to determine $\log P_{o/w}$ values directly from the chromatographic data, shows that the standard deviations obtained in this work using methanol are similar to those published, 0.43, but lower values are obtained using acetonitrile. At this point, it should be noticed that the isocratic mode proposed in this work allows us the pH control of each mobile phase, avoiding the possibility of partial or total ionization of the solutes during the gradient elution guarantying the unique presence of the neutral form of the analyzed compound.

Tables 8 and 9 present the $\log P_{o/w}$ values obtained using the Luna C₁₈ (2) and the Chromolith RP-18e columns working with mobile phases containing 50% and 40% in volume of acetonitrile, respectively. Aqueous buffers of suitable pH to get each solute in its pure neutral form have been used in all cases. The strong influence of the structural descriptors on the final $\log P_{o/w}$ values should be pointed out as shown by the fact that some groups of compounds with equal $\log k$ (and $p_{\text{reference}}$) values can or cannot lead to significantly different $\log P_{o/w}$ values according to their structures. Thus, Table 8 shows 4-chloroaniline and 1-naphtoic acid ($\log k = 0.36$) that lead to $\log P_{o/w}$ of 1.98 and 2.83, respectively, or ketoprofen and methylbenzoate ($\log k = 0.52$) give $\log P_{o/w}$ of 3.29 and 1.82, in this order, whereas compounds with more similar structure such as methyl-4-hydroxy benzoate and benzoic acid ($\log k = 0.09$) show very similar derived $\log P_{o/w}$. The same can be observed in Table 9 where ketoprofen and methyl benzoate ($\log k = 0.31$) lead to $\log P_{o/w}$ 3.40 and 1.94, respectively, 4-nitrotoluene, 3,5-dichlorophenol and warfarin ($\log k = 0.51$) to

$\log P_{o/w}$ 2.29, 3.84 and 3.18, in that order, or ibuprofen and naphthalene ($\log k = 0.86$) to $\log P_{o/w}$ 4.42 and 3.33, respectively. More examples can be found in Tables 8 and 9. Thus, the calculated molecular descriptors modulate the derived $p_{\text{reference}}$ values with structural information such as hydrogen bonding acidity, polarizability and polar interactions between molecules leading to proper $\log P_{o/w}$ values. In fact, the literature attempts to relate any parameter directly derived to retention measurements with $\log P_{o/w}$ values involve also the hydrogen bond acidity of the solute [18,22] or the number of hydrogen atoms in the molecule able to form hydrogen bonds as the most significant molecular properties although other molecular properties also show some influence [22].

The last column of these tables, labelled “Residual”, show the difference between the determined $\log P_{o/w}$ values and the reference ones. Absolute values of residuals higher of 0.6 units have been taken as outliers. This limiting value was selected because of the experimental variability in $\log P_{o/w}$ measurements, that led the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) to admit differences of 0.3 units between $\log P_{o/w}$ values measured from replicates using the shaking flask reference method [40], and, as mentioned above, the variety of values shown for most compounds in the Leo et al. [32] and on-line BioLoom [33] databases. In addition, the results obtained by the method proposed here using different columns and mobile phases involve a high number of values and the tolerance limit, 0.6, has been fixed as the 1.5 times the global standard deviation.

The results given in Fig. 2 and Tables 7–9 clearly show that acetonitrile is the best organic modifier. This recommendation agrees with the one of Valko et al. [22] who got better results with acetonitrile in the development of the chromatographic hydrophobicity index, CHI, parameter. The optimal working organic modifier fractions were 40–50% of acetonitrile in the mobile phase. At lower organic modifier content, hydrophobic compounds show too large retention times or even did not elute. At higher organic solvent fractions, hydrophilic compounds had retention times close to the void time, leading to a significant uncertainty in $\log k$ calculation (Eq. (1)) which definitely affects the final calculated $\log P_{o/w}$ value. In addition, most of compounds eluted with reasonable retention times at acetonitrile fractions of 40–50%. Thus, these are the compositions we recommend in order to obtain the optimal experimental conditions and the best results in $\log P_{o/w}$ determination. Using methanol as organic modifier, the best results are also obtained at intermediate organic modifier fractions (50–60%), slightly higher than those for acetonitrile.

In addition, both studied columns can be recommended for practical uses but the Luna C₁₈ (2) is preferred for hydrophilic compounds and the Chromolith RP-18e for very hydrophobic substances. Compounds with intermediate hydrophobicity can be equally studied by means of any of the tested columns. In general, any commercial C₁₈ column is a good candidate to evaluate the hydrophobicity of organic compounds via the proposed method.

In summary, the proposed method combines an experimental measurement of the hydrophobicity of any solute in its pure neutral form with some specific molecular properties calculated by means of the well-known commercial software package, CODESSA. The experimental measurement is very simple and the only requirement is the use of a chromatographic system with known parameters ($(\log k)_0$ and P_S^N). Once the system is characterized, it can be used for any kind of compound without other calibration until the end of the column life. The evaluation of the molecular properties should be made by means of the algorithms included in CODESSA since the QSPR model was performed according to them. This approach should be very useful in laboratories which need a rapid response for a wide variety of structurally diverse organic compounds covering a broad range of $\log P_{o/w}$ values because of the simplicity of both experimental work and associated calculations.

5. Conclusions

The proposed method leads to a right evaluation of the hydrophobicity, expressed as octanol–water partition coefficient $\log P_{o/w}$, for a wide range of structurally diverse organic compounds including some drugs. This method estimates the $\log P_{o/w}$ from an experimental measurement of the hydrophobicity (chromatographic retention, $\log k$) and modulates it with four parameters calculated from the structure of the compound. These parameters are calculated with a unique algorithm (contained in CODESSA software) which is the same for all compounds, avoiding the variability of results that appears when different ClogP software packages are used. We tested this procedure using the two most common organic modifiers in HPLC, acetonitrile and methanol. Both solvents gave good predictions, but the use of acetonitrile is advisable, due to the higher quality of the results obtained. The usefulness of the method in several chromatographic columns has been tested, obtaining similar results in terms of $\log P_{o/w}$ determination. The most relevant factor in column selection is the hydrophobicity of the compounds that will be analysed (ClogP values of the compounds can help at this point). The pH of the mobile phase is the other factor to be controlled, a previous estimation of the aqueous pK_a of the compound (e.g. with commercial software) is advisable in order to select the buffer that let the solute be in its neutral form.

Acknowledgements

We thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología of the Spanish Government and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional of the European Union (Project CTQ2007-61623/BQU) for financial support. The authors thank M.E. Araújo and S. Santos of Centro de Química e Bioquímica (CQB) of Universidade de Lisboa (FCUL) for their synthetic work. SPT acknowledges a FPI grant from the MEC supported by Project CTQ2004-02760/BQU.

References

- [1] C. Hansch, T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 1616.
- [2] P.H. Stahl, C.G. Wermuth, *Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use*, VHCA, Verlag Helvetica Chimica Acta, WILEY-VCH, Zurich (Switzerland) and Weinheim (Germany), 2002.
- [3] A. Avdeef, *Quant. Struct.-Act. Relat.* 11 (1992) 510.
- [4] K. Takacs-Novak, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1405.
- [5] V. Makovskaya, J.R. Dean, W.R. Tomlinson, S.M. Hitchen, M. Comber, *Anal. Chim. Acta* 315 (1995) 183.
- [6] D. Benhaim, E. Grushka, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 111.
- [7] X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, H. Chuman, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 51.
- [8] F. Lombardo, M.Y. Shalaeva, K.A. Tupper, F. Gao, M.H. Abraham, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 2922.
- [9] C. Giaginis, S. Theocharis, A. Tsantili-Kakoulidou, *J. Chromatogr. A* 1166 (2007) 116.
- [10] P. Vallat, W. Fan, N. El Tayar, P.A. Carrupt, B. Testa, *J. Liq. Chromatogr.* 15 (1992) 2133.
- [11] R. Kaliszán, P. Haber, T. Baczek, D. Siluk, K. Valkó, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 117.
- [12] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *J. Chromatogr. A* 721 (1996) 3.
- [13] P. Wiczling, M. Waszczuk-Jankowska, M.J. Markuszewski, R. Kaliszán, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 109.
- [14] K. Valkó, L.R. Snyder, J.L. Glajch, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 501.
- [15] C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 31 (2008) 79.
- [16] P.A. Tate, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 37.
- [17] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. De Galan, *J. Chromatogr.* 185 (1979) 179.
- [18] K. Valkó, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 299.
- [19] K. Valkó, C. Bevan, D. Reynolds, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2022.
- [20] E. Fuguet, C. Ràfols, E. Bosch, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 110.
- [21] E. Fuguet, C. Ràfols, E. Bosch, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7798.
- [22] K. Valko, C. My Du, C. Bevan, D.P. Reynolds, M.H. Abraham, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 1137.
- [23] S.F. Donovan, M.C. Pescatore, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 47.
- [24] M. Rosés, E. Bosch, *Anal. Chim. Acta* 274 (1993) 147.
- [25] E. Bosch, P. Bou, M. Rosés, *Anal. Chim. Acta* 299 (1994) 219.
- [26] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 955 (2002) 19.
- [27] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, A.M. Zissimos, M.H. Abraham, *J. Chromatogr.* 515 (2004) 209.
- [28] P. Izquierdo, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 96.
- [29] E. Lázaro, C. Ràfols, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 163.
- [30] E. Lázaro, P. Izquierdo, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5214.
- [31] R. Bosque, J. Sales, E. Bosch, M. Rosés, M.C. García-Álvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (2003) 1240.
- [32] A. Leo, D.H. Hoekman, C. Hansch, *Exploring QSAR, Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*, American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
- [33] BioLoom online database: <http://www.davidhoekman.com/bio-loom/bin/details>.
- [34] G. Bouchard, P.A. Carrupt, B. Testa, V. Gobry, H.H. Girault, *Chem. Eur. J.* 8 (2002) 3478.
- [35] D.D. Perrin, *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution*, Butterworths (IUPAC), London, 1965.
- [36] D.D. Perrin, *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution*, Suppl. 1972, Butterworths (IUPAC), London, 1972.
- [37] G. Kortüm, W. Vogel, K. Andussow, *Dissociation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, Butterworths (IUPAC), London, 1961.
- [38] M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 1.
- [39] X. Subirats, M. Rosés, E. Bosch, *Sep. Purif. Rev.* 36 (2007) 231.
- [40] EPA Product Properties Test Guidelines, OPPTS 830.7550, Partition Coefficient (n-octanol/water), Shake Flask Method, 1996.

Article II

Lipophilicity assessment of basic drugs (log $P_{o/w}$ determination) by a chromatographic method

**Juan M. Pallicer, Joaquim Sales, Martí Rosés,
Clara Ràfols, Elisabeth Bosch**

J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6356



Lipophilicity assessment of basic drugs ($\log P_{o/w}$ determination) by a chromatographic method

Juan M. Pallicer^a, Joaquim Sales^b, Martí Rosés^a, Clara Ràfols^a, Elisabeth Bosch^{a,*}

^a *Departament de Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain*

^b *Departament de Química Inorgànica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 May 2011

Received in revised form 30 June 2011

Accepted 1 July 2011

Available online 8 July 2011

Keywords:

Hydrophobicity of basic drugs

$\log P_{o/w}$ of basic drugs

HPLC

Polarity model

QSPR model

ABSTRACT

A previously reported chromatographic method to determine the 1-octanol/water partition coefficient ($\log P_{o/w}$) of organic compounds is used to estimate the hydrophobicity of bases, mainly commercial drugs with diverse chemical nature and pK_a values higher than 9. For that reason, mobile phases buffered at high pH to avoid the ionization of the solutes and three different columns (Phenomenex Gemini NX, Waters XTerra RP-18 and Waters XTerra MS C₁₈) with appropriate alkaline-resistant stationary phases have been used. Non-ionizable substances studied in previous works were also included in the set of compounds to evaluate the consistency of the method. The results showed that all the columns provide good estimations of the $\log P_{o/w}$ for most of the compounds included in this study. The Gemini NX column has been selected to calculate $\log P_{o/w}$ values of the set of studied drugs, and really good correlations between the determined $\log P_{o/w}$ values and those considered as reference were obtained, proving the ability of the procedure for the lipophilicity assessment of bioactive compounds with very different structures and functionalities.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The ability to cross biological membranes affects the pharmacokinetic behaviour of drugs and their capability to access the receptor site. The reference property to predict passive diffusion of drugs through biological barriers is the hydrophobicity, commonly expressed as the 1-octanol/water partition coefficient ($\log P_{o/w}$) [1–6].

The reference procedure for determining the $\log P_{o/w}$ is the shake-flask method [7,8]. However, it is highly time-consuming, narrow in applicability range and needs relatively high amounts of sample. Potentiometric methods [9–12] are a good alternative in the case of acidic or basic compounds, but they also require relatively high quantities of sample. It is also possible to get estimations of the $\log P_{o/w}$ from several software packages (e.g., ACD-Labs, ClogP, AlogPs) but different values can be obtained, depending on the software, because each one uses a different algorithm [13].

Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) came to be a good alternative to the methods mentioned above because of its high throughput ability (essential in the pharmaceutical industry because of the high number of potential drug candidates), insensitivity to impurities or degradation products,

low sample consumption, good accuracy, broad dynamic range, and on-line detection. In RP-HPLC, the lipophilicity indexes are commonly derived from the logarithm of the retention factor, $\log k$:

$$\log k = \log \left(\frac{t_r - t_0}{t_0} \right) \quad (1)$$

where t_r and t_0 are the retention times of the solute and an unretained compound, respectively.

Isocratic $\log k$ has been considered as a direct measure of the hydrophobicity, although most investigators use the retention factors extrapolated to pure water ($\log k_w$) in order to eliminate the effects of organic solvent and make them comparable between chromatographic systems. Several correlations between $\log k_w$ and $\log P_{o/w}$ have been also reported [14]. Some researchers have studied the performance of the addition of 1-octanol to the mobile phase in order to mimic the 1-octanol/water partitioning and improve the correlations mentioned before [15–22]. Another lipophilicity parameter described in the literature is the chromatographic hydrophobicity index (CHI) [23,24], which permits a convenient estimation of the hydrophobicity for non-ionizable compounds, although a right interpretation of the results is more difficult in the case of acids and bases [25,26].

Nowadays, most of the commercial drugs are bases, and lipophilicity assessment is essential in their development. However, the determination of 1-octanol/water partition coefficients can be difficult because of a high pK_a , which affects the applicability of potentiometric methods and also the use of HPLC methods. In this

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 12 84; fax: +34 93 402 12 33.
E-mail address: e.bosch@ub.edu (E. Bosch).

last case, the lipophilicity assessment requires the use of columns stable in alkaline media [20,22,27]. Moreover, the pH value of the buffered mobile phase and the pK_a of the solutes in the mobile phase have to be taken into account [28], in both isocratic and gradient elution measurements. The control of pH is especially critical in gradient elution [16] because of the continuous change in the composition and pH of the mobile phase, which favours the existence of different fractions of acidic and basic forms during the chromatographic run [26].

The purpose of this work is to extend the previously proposed method [29] to the determination of the 1-octanol/water partition coefficient ($\log P_{o/w}$) of strongly basic compounds ($pK_a > 9$), because most of pharmaceuticals belong to this kind of chemicals. Thus, it is of great interest to provide a useful tool to measure the hydrophobicity of these basic drugs. The careful selection of experimental conditions plays here a very important role because they have to ensure that the solutes are in neutral form in the measurement conditions.

1.1. The chromatographic method used to determine $\log P_{o/w}$

The reported method [29] is based on the polarity model [30–34] that describes retention in RP-HPLC as a function of the polarity of the neutral solute, p , the polarity of the mobile phase (P_m^N) and the polarity of the stationary phase (P_s^N), according to Eq. (2):

$$\log k = (\log k)_0 + p(P_m^N - P_s^N) \quad (2)$$

where $(\log k)_0$ stands for the intercept of the $\log k$ vs. $(P_m^N - P_s^N)$ correlation. P_m^N is calculated through expressions that depend only on the organic solvent fraction in the mobile phase. In this work, acetonitrile was used as organic modifier, so the polarity of the mobile phase is calculated according to Eq. (3):

$$P_m^N = 1.00 - \frac{2.13\varphi}{1 + 1.42\varphi} \quad (3)$$

where φ stands for the acetonitrile volume fraction in the mobile phase. The p value can be easily determined in a characterized chromatographic system (i.e. when $(\log k)_0$ and P_s^N are known [32,33]) with a single isocratic run. Thus, the p values in the working system (column, organic modifier) have to be transferred to the reference chromatographic system (Waters Spherisorb ODS-2 column and acetonitrile as organic modifier), by means of the linear relationships:

$$p_{\text{working}} = ap_{\text{reference}} + b \quad (4)$$

Once this p value is expressed in the reference system, $p_{\text{reference}}$, the 1-octanol/water partition coefficient is determined by applying a Quantitative Structure–Property Relationship model [35] that relates it to the polarity of the solute ($p_{\text{reference}}$) and four descriptors directly derived from the structure of the compound:

$$\log P_{o/w} = 1.22p_{\text{reference}} + 1.89(\text{HDCA-2}) - 0.17(\text{HOMO-LUMO}) + 1.98(\text{pol/d}^2) - 1.27 \times 10^3(\text{DPSA-1}) - 0.99 \quad (5)$$

These descriptors encode different information. HDCA-2 is the hydrogen bond acidity descriptor, pol/d^2 is related to the molecular polarity, HOMO–LUMO belongs to the molecular polarizability and DPSA-1 encodes the features responsible for polar interactions between molecules.

2. Experimental

2.1. Apparatus and columns

For the chromatographic measurements, a Shimadzu (Kyoto, Japan) HPLC system equipped with two LD-20AD isocratic pumps, a

SIL-10Avp autoinjector, a DGU-20A₅ degasser, a CTO-10ASvp oven thermostated at 25 °C, a SPD-M20A diode array detector and a CBM-20ALite controller was used.

pH measurements were taken with a combined Crison 5014 electrode (Crison Instruments, Alella, Spain) in a Crison pH meter GLP 22 potentiometer. The electrode system was standardized with the ordinary aqueous buffers of pH 7.00 and 9.21 also from Crison.

Retention data were obtained using three columns: a Gemini NX column from Phenomenex (Torrance, CA, USA), a XTerra RP-18 and a XTerra MS C₁₈ columns from Waters (Milford, MA, USA). Their characteristics are given in Table 1.

2.2. Chemicals

Acetonitrile HPLC gradient grade was purchased from VWR (West Chester, PA, USA). Water was purified by the Milli-Q[®] plus system from Millipore (Billerica, MA, USA) with a resistivity of 18.2 MΩ. The solutes studied were reagent grade or better, and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), Fluka (Steinheim, Germany), Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany), Baker (Deventer, Netherlands), Riedel de Haën (Seelze, Germany) and Carlo Erba (Milano, Italy). For buffer preparation, pyrrolidine, redistilled (>99.5%) from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) and ammonium hydrogencarbonate, p.a., from Fluka (Steinheim, Germany) were used.

2.3. Chromatographic procedure

The mobile phases used were mixtures of acetonitrile and aqueous buffers adjusted at pH 11.0 in order to have the solutes in their neutral form. Acetonitrile/buffer mixtures with a volume fraction of 40 or 50% of organic modifier were used. Two different buffers were prepared at pH 11.0: pyrrolidine 0.01 M, which is a cationic buffer (PyrH⁺/Pyr), and ammonium hydrogencarbonate 0.01 M, which is an anionic buffer (HCO₃⁻/CO₃²⁻), to compare the performance of the buffers in the same chromatographic conditions.

The compounds were solved in methanol, and the injection volume was 10 μL. Potassium bromide was used as the void volume marker. The flow rate was 1 mL min⁻¹ for all the measurements. Retention data were expressed as the logarithm of the retention factor as defined by Eq. (1). All measurements were taken in triplicate.

2.4. Structural descriptors and calculations

Descriptors were calculated from the structure of each compound. The structures were drawn using HyperChem Lite software (HyperCube, Gainesville, USA). The geometrical optimization of the structures was done with MOPAC 6.0 and AuxQSPR program in order to obtain the energy minimum. These programs provided files prepared to calculate the numeric values of the structural descriptors using CODESSA software (University of Florida, USA). Microsoft Excel was used to perform all the calculations involved in this work.

3. Results and discussion

3.1. Physico-chemical data and molecular descriptors of the selected compounds

The set of 58 studied compounds comprises 20 non-ionizable and 38 basic compounds, including 26 commercial drugs which are shown in Fig. 1. Some of the substances were already studied in the previous work [29] and have been included in this set in order to verify the consistency of the method by comparison of the values obtained before. The studied compounds, their pK_a and the reference $\log P_{o/w}$ values, as well as their structural descriptors values are shown in Table 2. The reference $\log P_{o/w}$ values were

Table 1
Characteristics of the studied columns.

Features	Phenomenex Gemini NX	Waters XTerra RP-18	Waters XTerra MS C ₁₈
Structure type	Particulate	Particulate	Particulate
Particle size (μm)	5	5	5
Average pore diameter (Å)	105	127	125
Surface area (m ² g ⁻¹)	372	178	179
Pore volume (cm ³ g ⁻¹)	1.10	0.70	0.69
Total carbon (%)	14.0	14.6	15.4
Endcapped	Yes	Yes	Yes
Column length (mm)	150	150	150
Column diameter (mm)	4.6	4.6	4.6
pH stability range	1–12	2–12	1–12

Table 2
Physico-chemical data of the studied compounds: reference log $P_{o/w}$, aqueous p*K*_a (w p*K*_a) and molecular descriptor values.

Compound	#	CAS	Reference log $P_{o/w}$	w p <i>K</i> _a	Molecular descriptors			
					pol/d ²	HDCA-2	HOMO–LUMO	DPSA-1
1,2,4-Trimethylbenzene	1	95-63-6	3.63	–	0.01	0.00	9.48	193.12
1,4-Dimethylbenzene	2	106-42-3	3.15	–	0.00	0.00	9.55	149.12
1-Phenylethylamine	3	64-04-0	1.41	9.74	0.17	0.22	9.95	162.03
1-Phenylpiperazine	4	92-54-6	1.11	9.02	0.16	0.30	8.99	199.18
2,4-Dinitroaniline	5	97-02-9	1.90	4.53	0.03	0.18	8.45	21.33
2,6-Dimethylaniline	6	87-62-7	1.84	3.95	0.16	0.19	8.95	161.05
2-Aminopyridine	7	504-29-0	0.49	6.68	0.16	0.50	9.06	49.92
3,4-Dichloroaniline	8	95-76-1	2.69	2.90	0.01	0.23	8.74	170.81
4-Aminopyridine	9	504-24-5	0.32	9.11	0.17	0.45	9.31	43.03
4-Chloroaniline	10	106-47-8	1.83	3.98	0.17	0.23	8.79	–7.62
4-Nitrotoluene	11	99-99-0	2.37	–	0.02	0.00	9.26	35.88
Acebutolol	12	37517-30-9	1.71	9.41	0.28	0.95	8.31	332.95
Acenaphthene	13	83-32-9	3.92	–	0.00	0.00	8.28	110.83
Acetophenone	14	98-86-2	1.58	–	0.11	0.10	9.58	52.26
Allylamine	15	107-11-9	0.07	9.49	0.17	0.23	10.85	128.53
Alprenolol	16	13655-52-2	2.89	9.60	0.04	0.51	9.63	284.37
Amitriptyline	17	50-48-6	4.92	9.42	0.03	0.09	9.02	315.78
Aniline	18	62-53-3	0.90	4.60	0.17	0.22	8.97	81.48
Atenolol	19	29122-68-7	0.16	9.60	0.04	1.00	9.27	254.85
Atropine	20	51-55-8	1.83	9.60	0.28	0.49	9.37	234.36
Benzamide	21	55-21-0	0.64	–	0.11	0.51	9.73	25.85
Benzene	22	71-43-2	2.13	–	0.00	0.00	10.20	51.14
Benzofuran	23	271-89-6	2.67	–	0.05	0.00	8.95	23.51
Benzophenone	24	119-61-9	3.18	–	0.11	0.00	9.44	36.98
Benzylamine	25	100-46-9	1.09	9.33	0.17	0.23	9.77	113.81
Biphenyl	26	92-52-4	4.01	–	0.00	0.00	8.55	27.34
Bromobenzene	27	108-86-1	2.99	–	0.01	0.00	9.66	110.11
Bupivacaine	28	2180-92-9	3.41	8.10	0.03	0.29	9.33	358.21
Butylbenzene	29	104-51-8	4.38	–	0.00	0.00	9.83	200.53
Butyrophenone	30	495-40-9	2.66	–	0.11	0.09	9.58	141.07
Chlorobenzene	31	108-90-7	2.89	–	0.05	0.00	9.72	–34.53
Chlorpromazine	32	50-53-3	5.35	9.21	0.00	0.24	7.66	176.40
Chrysene	33	281-01-9	5.81	–	0.00	0.00	7.70	11.05
Clonidine	34	4205-90-7	1.43	8.05	0.02	0.59	8.83	124.94
Cyproheptadine	35	129-03-3	4.92	8.87	0.03	0.10	8.30	267.18
Diphenhydramine	36	58-73-1	3.27	9.02	0.05	0.11	9.50	250.95
Ephedrine	37	299-42-3	0.93	9.59	0.28	0.50	9.90	193.57
Imipramine	38	50-49-7	4.80	9.40	0.01	0.14	8.84	311.09
Lidocaine	39	137-58-6	2.21	7.84	0.03	0.30	9.27	285.83
Maprotiline	40	10262-69-8	4.85	10.20	0.17	0.19	9.49	300.26
Mepivacaine	41	96-88-8	1.95	7.92	0.03	0.42	9.38	278.55
Metoprolol	42	37350-58-6	1.88	9.56	0.00	0.52	9.30	352.47
N,N-dimethylbenzylamine	43	103-83-3	1.98	8.80	0.03	0.10	9.64	192.43
Nadolol	44	42200-33-9	0.71	9.39	0.01	1.28	9.63	301.22
Naphthalene	45	91-20-3	3.28	–	0.00	0.00	8.45	44.33
Nortriptyline	46	72-69-5	4.04	10.11	0.17	0.19	8.91	277.05
Oxprenolol	47	6452-71-7	2.10	9.32	0.01	0.51	9.18	280.89
Penbutolol	48	36507-48-9	4.06	9.40	0.01	0.53	9.36	387.58
Phenanthrene	49	85-01-8	4.47	–	0.00	0.00	8.21	12.83
Pilocarpine	50	92-13-7	0.00	7.07	0.12	0.35	9.75	121.28
Procainamide	51	51-06-9	0.98	9.38	0.01	0.71	8.78	278.22
Propiophenone	52	93-55-0	2.19	–	0.11	0.10	9.58	110.56
Propranolol	53	525-66-6	2.98	9.47	0.04	0.46	8.27	228.52
Propylbenzene	54	103-65-1	3.72	–	0.00	0.00	9.83	171.48
Quinine	55	130-95-0	2.64	9.01	0.01	0.71	8.43	251.34
Toluene	56	108-88-3	2.73	–	0.11	0.11	9.77	173.88
Trazodone	57	19794-93-5	3.80	6.73	0.02	0.67	7.96	181.08
Trimethoprim	58	738-70-5	0.91	7.12	0.00	0.85	8.70	250.54

the ones recommended from the experimental data compiled in BioLoom on-line database [36], and they are between 0.00 and 5.81. The pK_a values of the compounds were obtained from the same database and they are in the range from 2.90 to 10.20, including 23 basic compounds with $pK_a > 9$.

3.2. Chromatographic system characterization

The characterization of a chromatographic system, i.e., the determination of $(\log k)_0$ and P_s^N parameters, is widely described in the literature [29,32–34]. The systems are characterized from

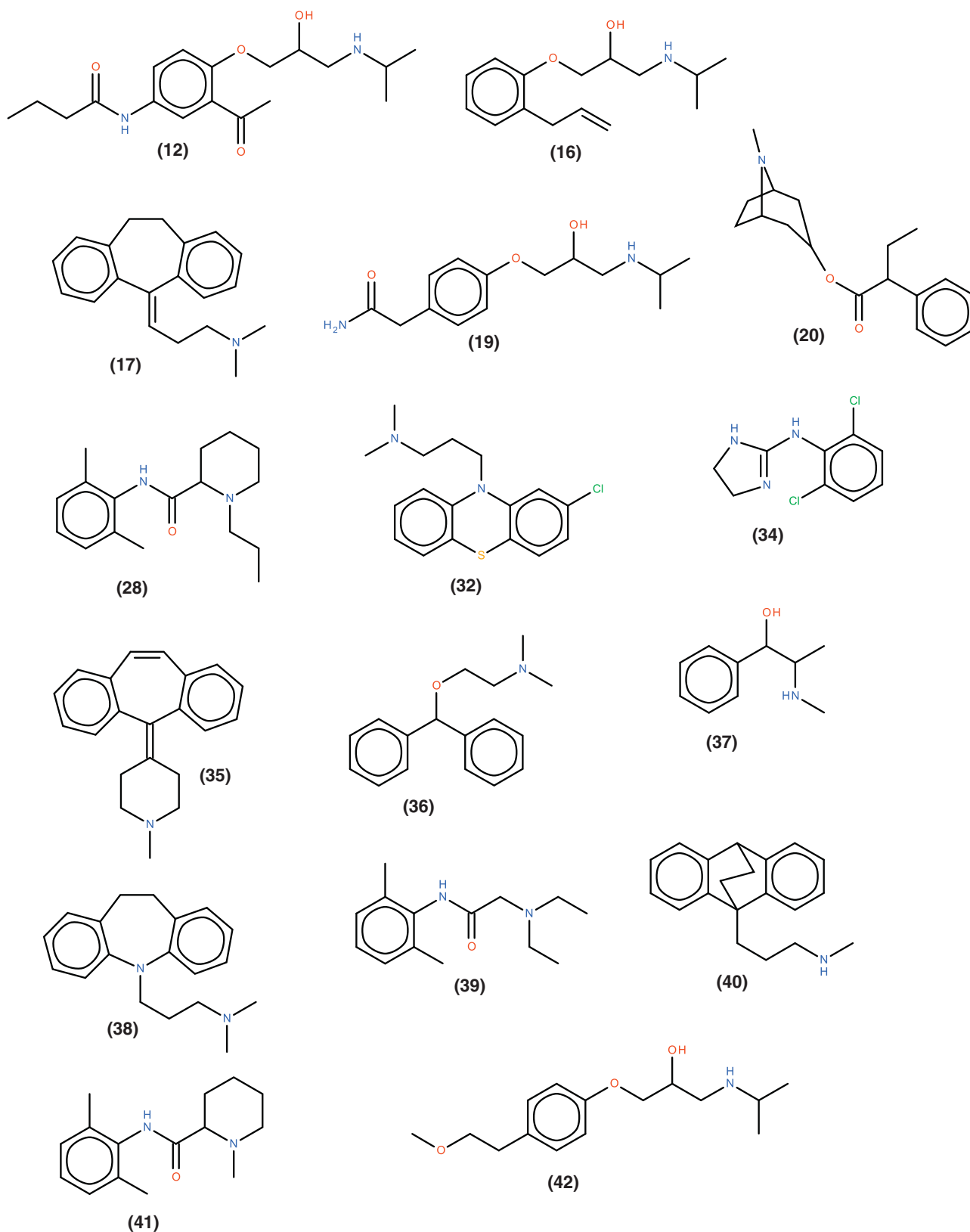


Fig. 1. Structures of the new 26 drugs studied in this work. Numbers at the bottom refer to compounds in Table 2.

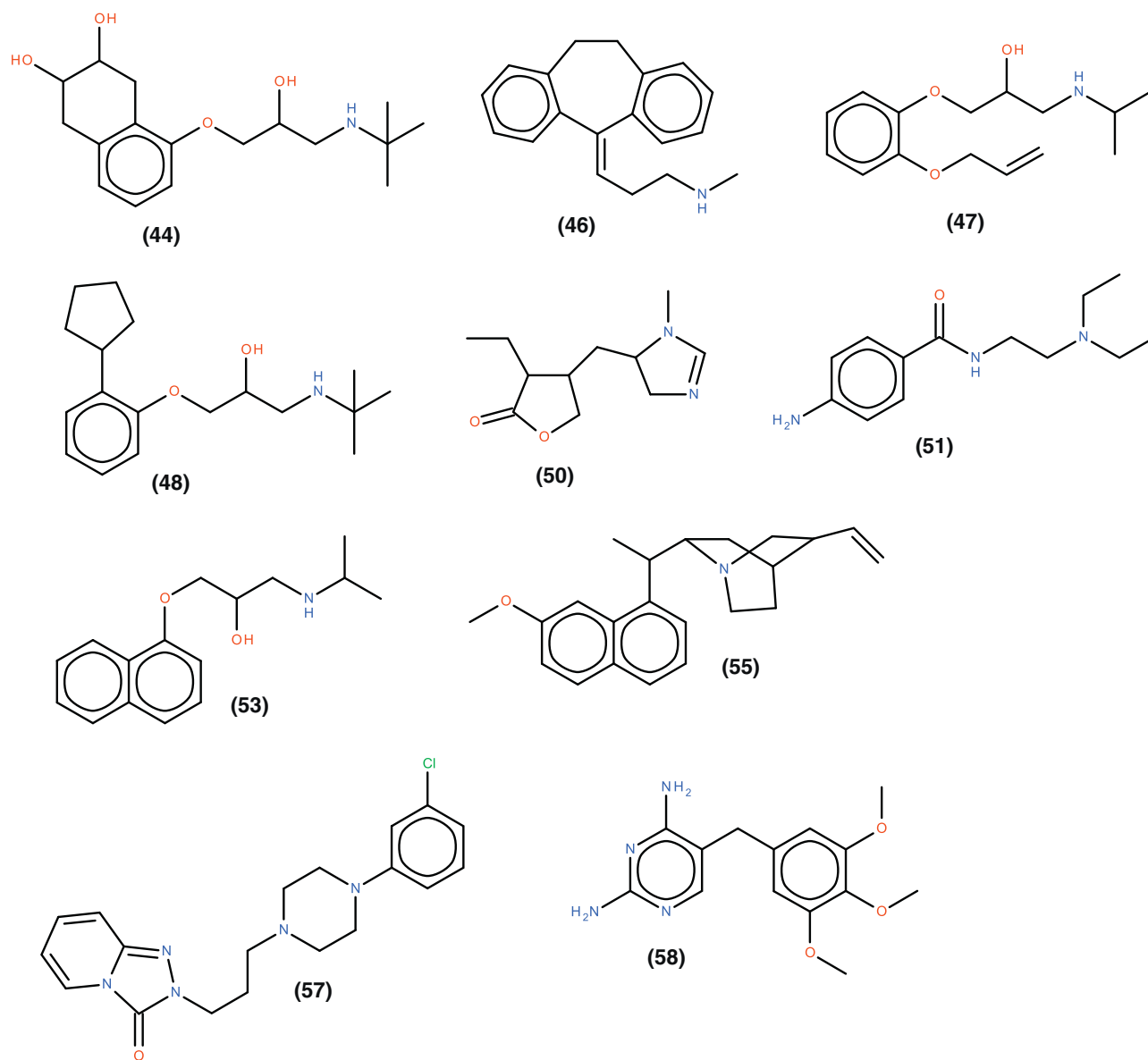


Fig. 1. (Continued)

the retention factors of 12 standard substances at several mobile phase compositions. Phenomenex Gemini NX and both Waters XTerra columns have been characterized and the obtained parameters are shown in Table 3, which also shows the transference parameters between chromatographic systems according to Eq. (4).

Table 3

Polarity parameters of the chromatographic systems and parameters of the transference between the working systems to the reference system, where a is the slope and b the intercept of the linear regression (Eq. (4)).

	Phenomenex Gemini NX	Waters XTerra RP-18	Waters XTerra MS C ₁₈
Polarity parameters (acetonitrile)			
$(\log k)_0$	-0.88	-0.35	-0.48
p_N^S	-0.03	-0.06	-0.01
Transference parameters			
a	0.86	0.78	0.85
b	0.21	-0.25	-0.22
R^2	0.98	0.99	0.99

3.3. Mobile phase pH and compound pK_a

The variation of the pH of the mobile phases and the pK_a of the solutes with the organic modifier fraction has been widely discussed [28,37]. The pH variation depends on the type of the buffer and the organic modifier. Thus, the pH of mobile phases increases with the addition of organic modifier for neutral or anionic buffers but it decreases, in a minor degree, when cationic buffers are used, and the same occurs with the pK_a of compounds. The pK_a of any compound in a specific acetonitrile-water mixture (until 60% of acetonitrile) can be easily calculated from the equations already proposed [28]. These pH and pK_a variations have to be taken into account in order to make sure that there is no ionization of the solutes in the chromatographic conditions of the measurements. Two different buffers were used: pyrrolidine and carbonate, both at aqueous pH 11. The variation of the pH of the buffered mobile phases with the acetonitrile fraction is shown in Table 4. As expected, the pH of mobile phases buffered with pyrrolidine shows a slight decrease when increasing the acetonitrile content, while the pH of those buffered with carbonate increases with the

Table 4

pH variation of the aqueous buffers used in this work with the acetonitrile fraction in the mobile phase.

Buffer	s_w pH at several acetonitrile volume fractions				
	0%	30%	40%	50%	60%
Pyrrolidine	10.99	10.75	10.63	10.57	10.45
Carbonate	11.00	11.36	11.73	11.85	11.88

addition of acetonitrile. It must be pointed out that the symbol s_w pH refers to the mobile phase pH measured after the addition of organic modifier (in this case, acetonitrile) to the aqueous buffer by means of a glass electrode standardized with ordinary aqueous buffers.

3.4. Determined $\log P_{o/w}$ values

The 1-octanol/water partition coefficients of the compounds shown in Table 2 have been determined according to the method explained in the introduction section using the Phenomenex Gemini NX, Waters XTerra RP-18 and XTerra MS C₁₈ columns. Mobile phases containing 40% or 50% of acetonitrile were used since they provide the best results in terms of accuracy and run time [29]. As explained before, mobile phases were buffered at aqueous pH 11 with pyrrolidine or carbonate. No significant difference between the results obtained with each buffer was observed, despite the diversity in the behaviour of the pH of the buffered solutions with

the addition of acetonitrile (Table 4). This means that the pH of the different mobile phases is high enough to have the bases completely in their neutral form, regardless of the different buffer pH variation.

The correlations between the determined and reference $\log P_{o/w}$ values are illustrated in Figs. 2–4. For each column, mobile phase composition and buffer, the number of compounds, the average of the differences between the determined and reference $\log P_{o/w}$ values (residual average), as well as the number of outliers, are given in Table 5. As in the previous work, absolute values of residuals higher than 0.6 units have been taken as outliers. It should be pointed out that, in all instances, most outliers are hydrophilic compounds, whose retention times are close to the void time. In this instance, slight errors in the experimental measurements may involve significant errors in $\log k$ calculations and, hence, in $p_{reference}$ and $\log P_{o/w}$ calculated values.

The covered $\log P_{o/w}$ range obtained depends mostly on the retention time of the most hydrophobic substances, as reten-

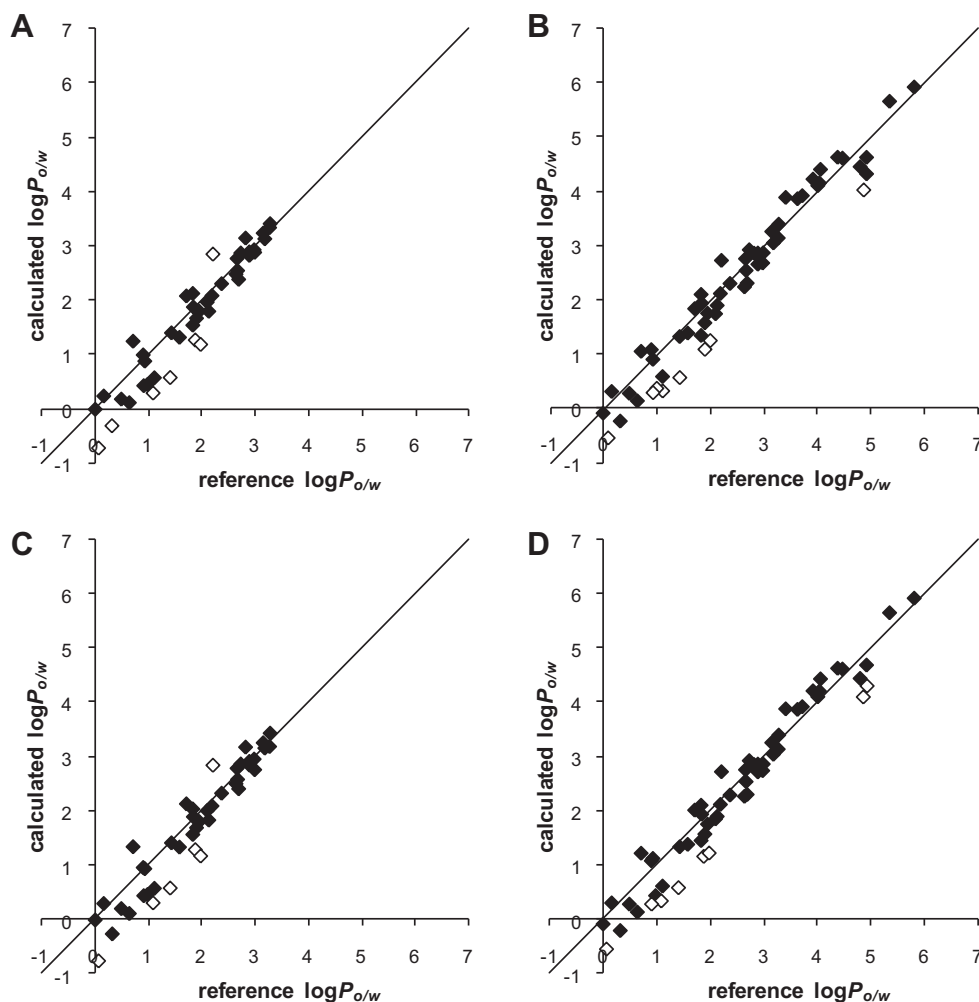


Fig. 2. Plots of calculated $\log P_{o/w}$ vs. reference $\log P_{o/w}$ values for Phenomenex Gemini NX column. (A) MeCN/carbonate buffer 40%; (B) MeCN/carbonate buffer 50%; (C) MeCN/pyrrolidine buffer 40%; (D) MeCN/pyrrolidine buffer 50%. Symbols: (◆) compounds; (◇) outliers.

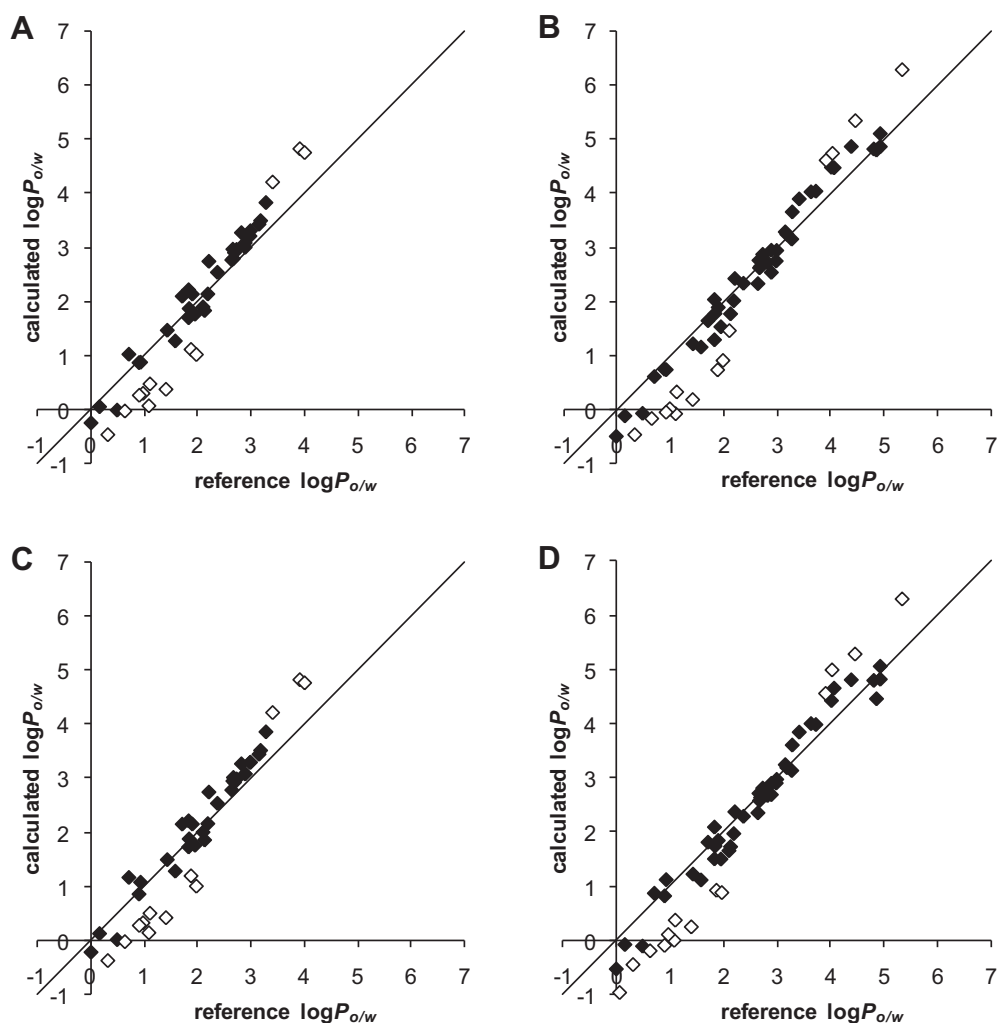


Fig. 3. Plots of calculated $\log P_{o/w}$ vs. reference $\log P_{o/w}$ values for Waters XTerra RP-18 column. (A) MeCN/carbonate buffer 40%; (B) MeCN/carbonate buffer 50%; (C) MeCN/pyrrolidine buffer 40%; (D) MeCN/pyrrolidine buffer 50%. Symbols: (●) compounds; (◇) outliers.

tion times of approximately 45 min have been considered as long enough in these experiments. This has led to the following $\log P_{o/w}$ ranges: for mobile phases containing 40% of acetonitrile it is approximately between 0 and 3.5 and working with 50% of acetonitrile it is between 0 and 6.

Table 5 shows similar results for all the tested columns without any difference attributable to the buffer used in the mobile phase preparation. However, the number of outliers is higher for XTerra RP-18 column. According to the results shown in Table 5

and Figs. 2–4, Phenomenex Gemini NX column has been selected as typical column for further studies. For instance, in this column, the parameters of the correlation between calculated and reference $\log P_{o/w}$ values for the entire set of 58 compounds, working with 50% of acetonitrile and pyrrolidine buffer, are the following: slope, $1.06 (\pm 0.03)$; intercept, $-0.29 (\pm 0.09)$; with $r^2 = 0.95$, the standard deviation is 0.37 and $F = 1158$.

In Table 6, the comparison of the final calculated $\log P_{o/w}$ values for a set of compounds previously studied with

Table 5

Number of compounds studied, average of the residuals ($\log P_{o/w}$ (calc.) – $\log P_{o/w}$ (ref.)) and number of outliers for column, buffer and acetonitrile fraction.

Column	Buffer	Acetonitrile fraction	<i>n</i>	Residual average	Outliers
Gemini NX	Carbonate	40%	43	–0.15	7
		50%	58	–0.14	8
	Pyrrolidine	40%	43	–0.16	6
		50%	58	–0.14	8
X Terra RP-18	Carbonate	40%	45	–0.05	13
		50%	58	–0.15	16
	Pyrrolidine	40%	45	–0.02	13
		50%	58	–0.11	15
X Terra MS C ₁₈	Carbonate	40%	45	–0.06	5
		50%	58	–0.03	6
	Pyrrolidine	40%	45	–0.07	5
		50%	58	–0.08	11

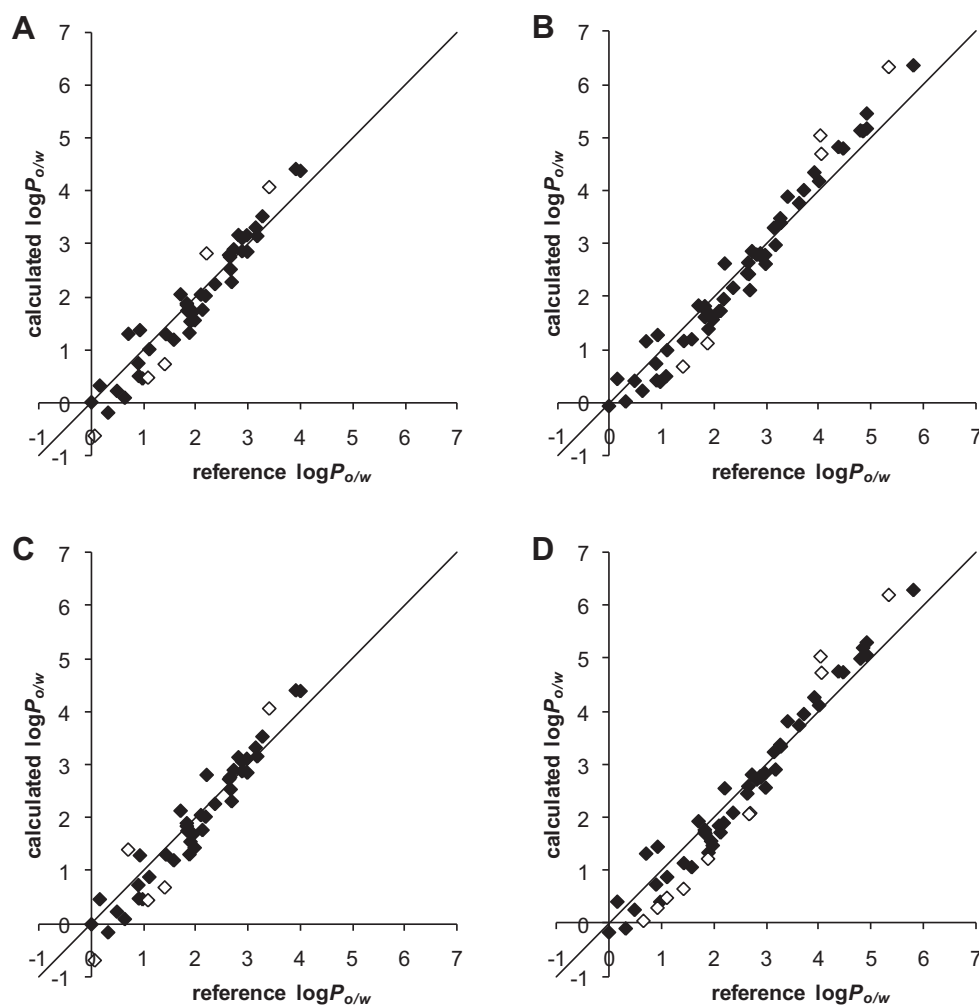


Fig. 4. Plots of calculated $\log P_{o/w}$ vs. reference $\log P_{o/w}$ values for Waters XTerra MS C₁₈ column. (A) MeCN/carbonate buffer 40%; (B) MeCN/carbonate buffer 50%; (C) MeCN/pyrrolidine buffer 40%; (D) MeCN/pyrrolidine buffer 50%. Symbols: (◆) compounds; (◇) outliers.

Phenomenex Luna C₁₈ (2) and Merck Chromolith Performance RP-18 columns [29] shows the consistency of results and, hence, the suitability of the Phenomenex Gemini NX column for $\log P_{o/w}$ determinations.

3.5. Lipophilicity assessment of the studied drugs

Tables 7 and 8 illustrate the steps to obtain the $\log P_{o/w}$ from the retention factor ($\log k$) for the 26 drugs included in this study,

Table 6
Comparison between $\log P_{o/w}$ values obtained in three different chromatographic systems.

Compound	Luna C ₁₈ (2), MeCN/water 50%	Chromolith RP-18, MeCN/water 40%	Gemini NX, MeCN/water 50%
1,2,4-Trimethylbenzene	–	3.70	3.86
1,4-Dimethylbenzene	3.16	3.27	3.26
2,4-Dinitroaniline	1.53	–	1.57
2,6-Dimethylaniline	1.93	1.88	1.93
3,4-Dichloroaniline	2.27	2.29	2.30
4-Chloroaniline	1.98	2.29	2.09
4-Nitrotoluene	2.15	1.99	2.30
Aniline	1.06	0.97	1.07
Benzamide	0.09	0.42	0.13
Benzene	1.79	1.86	1.89
Biphenyl	3.96	4.18	4.10
Butylbenzene	4.52	4.61	4.63
Butyrophenone	2.60	2.73	2.75
Chlorobenzene	2.73	2.84	2.86
Chrysene	–	6.22	5.92
Naphthalene	3.28	3.33	3.39
Phenanthrene	4.63	4.64	4.61
Propiophenone	1.98	2.09	2.11
Propylbenzene	3.80	3.89	3.92
Toluene	2.48	2.56	2.85

Table 7
log $P_{o/w}$ calculation from retention factor log k . Phenomenex Gemini NX column, mobile phase MeCN/pyrrolidine buffer 40%. Residual column: log $P_{o/w}$ (calc.) – log $P_{o/w}$ (ref.).

Compound	log k	$P_{reference}$	calc. log $P_{o/w}$	Residual
Atenolol	-0.36	0.99	0.28	0.12
Trimethoprim	-0.22	1.32	0.43	-0.48
Pilocarpine	-0.12	1.55	-0.02	-0.02
Nadolol	-0.12	1.56	1.33	0.62
Procainamide	-0.11	1.58	0.45	-0.53
Ephedrine	0.04	1.92	0.92	-0.01
Acebutolol	0.12	2.12	2.11	0.40
Clonidine	0.23	2.37	1.40	-0.03
Atropine	0.25	2.42	1.55	-0.28
Metoprolol	0.37	2.71	1.27	-0.61
Quinine	0.56	3.17	2.48	-0.16
Mepivacaine	0.57	3.18	1.79	-0.16
Oxprenolol	0.58	3.21	1.99	-0.11
Trazodone	0.75	3.63	3.15	0.33
Propranolol	0.84	3.83	2.93	-0.05
Alprenolol	0.90	3.97	2.89	0.00
Lidocaine	1.00	4.20	2.82	0.61
Diphenhydramine	1.22	4.74	3.16	-0.11

being the retention data lower than 45 obtained with mobile phases containing 40 or 50% of acetonitrile with pyrrolidine buffer at pH 11 and using the Gemini NX column. From these data, the following correlations between the determined and the reference log $P_{o/w}$ values were obtained (Eq. (6) from data given in Table 7 and Eq. (7) from those in Table 8):

$$\log P_{o/w}(\text{calc.}) = 1.01(\pm 0.05)\log P_{o/w}(\text{ref.}) - 0.04(\pm 0.18),$$

$$n = 18; \quad r^2 = 0.89; \quad \text{SD} = 0.36; \quad F = 126 \quad (6)$$

$$\log P_{o/w}(\text{calc.}) = 0.98(\pm 0.05)\log P_{o/w}(\text{ref.}) - 0.06(\pm 0.15),$$

$$n = 26; \quad r^2 = 0.94; \quad \text{SD} = 0.39; \quad F = 399 \quad (7)$$

The slope of the correlations is 1 and the intercept is 0. Thus, the accuracy of the method is very good and it provides

directly the log $P_{o/w}$ values of the drugs, with a precision lower than 0.4 logarithmic units, shown as the standard deviation of the correlations. These correlations are plotted in Fig. 5.

To evaluate, from a general point of view, the validity, the reproducibility and the robustness of the proposed chromatographic method to estimate the hydrophobicity of drugs, the determined log $P_{o/w}$ values of bioactive compounds published in the previous work [29] were added to those obtained in this study, and they are all shown in Table 9. The set of bioactive compounds include compounds with different structures and functional groups: non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as ibuprofen or naproxen, anesthetics like bupivacaine or mepivacaine, antidepressants such as maprotiline or nortriptyline, antihistaminics like cyproheptadine, β -blockers like alprenolol or propranolol and others. The correlation obtained by comparison of the calculated values vs. the reference values for each compound,

Table 8
log $P_{o/w}$ calculation from retention factor log k . Phenomenex Gemini NX column, mobile phase MeCN/pyrrolidine buffer 50%. Residual column: log $P_{o/w}$ (calc.) – log $P_{o/w}$ (ref.).

Compound	log k	$P_{reference}$	calc. log $P_{o/w}$	Residual
Atenolol	-0.44	0.99	0.28	0.12
Trimethoprim	-0.37	1.20	0.28	-0.63
Nadolol	-0.28	1.45	1.20	0.49
Pilocarpine	-0.27	1.48	-0.11	-0.11
Procainamide	-0.24	1.55	0.42	-0.56
Acebutolol	-0.08	2.02	1.99	0.28
Ephedrine	-0.06	2.07	1.10	0.17
Clonidine	0.02	2.31	1.32	-0.11
Atropine	0.03	2.32	1.43	-0.40
Metoprolol	0.13	2.62	1.16	-0.72
Quinine	0.26	2.98	2.25	-0.39
Oxprenolol	0.30	3.08	1.83	-0.27
Mepivacaine	0.31	3.13	1.73	-0.22
Trazodone	0.40	3.36	2.83	0.01
Propranolol	0.50	3.66	2.72	-0.26
Alprenolol	0.55	3.81	2.70	-0.19
Lidocaine	0.66	4.11	2.70	0.49
Diphenhydramine	0.87	4.70	3.12	-0.15
Bupivacaine	1.03	5.15	3.86	0.45
Nortriptyline	1.05	5.21	4.19	0.15
Maprotiline	1.06	5.23	4.09	-0.76
Penbutolol	1.08	5.30	4.41	0.35
Cyproheptadine	1.17	5.57	4.29	-0.63
Imipramine	1.24	5.76	4.42	-0.38
Amitriptyline	1.34	6.04	4.66	-0.26
Chlorpromazine	1.43	6.31	5.63	0.28

Table 9Summary of the log $P_{o/w}$ determination of bioactive compounds.

Compound		Reference log $P_{o/w}$	Column	MeCN Fraction (%)	Buffer pH	Calculated log $P_{o/w}$	Residual
1-Acetyl-2-isonicotinoil-hydrazine ^a	Antitubercular	-0.87	Luna C ₁₈ (2)	40	7	-1.13	-0.26
			Luna C ₁₈ (2)	50	7	-1.14	-0.27
1-Ethyl-2-ethylthio-1H-benzo[d]imidazole ^a	Antitubercular	3.36	Chromolith RP-18e	40	6	2.82	-0.54
			Chromolith RP-18e	50	6	2.77	-0.59
			Luna C ₁₈ (2)	40	7	2.78	-0.57
			Luna C ₁₈ (2)	50	7	2.87	-0.49
2-(2-Cyclohexylethylthio)-1H-benzo[d]imidazole ^a	Antitubercular	4.94	Luna C ₁₈ (2)	50	7	4.55	-0.38
			Chromolith RP-18e	40	6	4.65	-0.29
			Chromolith RP-18e	50	6	4.40	-0.54
4-Methylcyclohexanone-isonicotinoil-hydrazine ^a	Antitubercular	0.63	Luna C ₁₈ (2)	40	7	0.57	-0.06
			Luna C ₁₈ (2)	50	7	0.57	-0.06
Acebutolol	β-Blocker	1.71	Gemini NX	40	11	2.11	0.40
			Gemini NX	50	11	1.99	0.28
Aldrin	Insecticide	6.50	Chromolith RP-18e	60	3	6.71	0.21
Alprenolol	β-Blocker	2.89	Gemini NX	40	11	2.89	0.00
			Gemini NX	50	11	2.70	-0.19
Amitriptyline	Antidepressant	4.92	Gemini NX	50	11	4.66	-0.26
Atenolol	β-Blocker	0.16	Gemini NX	40	11	0.28	0.12
			Gemini NX	50	11	0.28	0.12
Atropine	Alkaloid	1.83	Gemini NX	40	11	1.55	-0.28
			Gemini NX	50	11	1.43	-0.40
Bupivacaine	Anesthetic	3.41	Gemini NX	50	11	3.86	0.45
Chlorpromazine	Antipsychotic	5.35	Gemini NX	50	11	5.63	0.28
Clonidine	Analgesic	1.43	Gemini NX	40	11	1.40	-0.03
			Gemini NX	50	11	1.32	-0.11
Cyclohexanone-isonicotinoil-hydrazine ^a	Antitubercular	0.27	Luna C ₁₈ (2)	40	7	0.00	-0.27
			Luna C ₁₈ (2)	50	7	0.06	-0.21
Cyclopentanone-isonicotinoil-hydrazine ^a	Antitubercular	-0.62	Luna C ₁₈ (2)	40	7	-0.27	0.35
			Luna C ₁₈ (2)	50	7	-0.30	0.32
Cyproheptadine	Antihistaminic	4.92	Gemini NX	50	11	4.29	-0.63
Diphenhydramine	Antihistaminic	3.27	Gemini NX	40	11	3.16	-0.11
			Gemini NX	50	11	3.12	-0.15
Ephedrine	Decongestant	0.93	Gemini NX	40	11	0.92	-0.01
			Gemini NX	50	11	1.10	0.17
Flurbiprofen	NSAID	4.16	Chromolith RP-18e	40	3	3.90	-0.26
			Chromolith RP-18e	50	3	3.42	-0.74
			Luna C ₁₈ (2)	40	3	4.15	-0.01
			Luna C ₁₈ (2)	50	3	3.71	-0.45
Ibuprofen	NSAID	3.97	Chromolith RP-18e	40	3	4.48	0.51
			Chromolith RP-18e	50	3	4.10	0.13
Imipramine	Antidepressant	4.80	Gemini NX 50	50	11	4.42	-0.38
Isoniazid	Antibiotic	-0.65	Luna C ₁₈ (2)	40	7	-1.04	-0.39
			Luna C ₁₈ (2)	50	7	-0.73	-0.08
Ketoprofen	NSAID	3.14	Chromolith RP-18e	40	3	3.48	0.34
			Chromolith RP-18e	50	3	3.09	-0.05
			Luna C ₁₈ (2)	40	3	3.68	0.54
			Luna C ₁₈ (2)	50	3	3.36	0.22
Lidocaine	Anesthetic	2.21	Gemini NX	40	11	2.82	0.61
			Gemini NX	50	11	2.70	0.49
Maprotiline	Antidepressant	4.85	Gemini NX	50	11	4.09	-0.76
Mepivacaine	Anesthetic	1.95	Gemini NX	40	11	1.79	-0.16
			Gemini NX	50	11	1.73	-0.22
Metoprolol	β-Blocker	1.88	Gemini NX	40	11	1.27	-0.61
			Gemini NX	50	11	1.16	-0.72
Metoxuron	Herbicide	1.64	Chromolith RP-18e	40	6	1.23	-0.41
			Chromolith RP-18e	50	6	1.19	-0.45
			Luna C ₁₈ (2)	40	6	1.21	-0.43
			Luna C ₁₈ (2)	50	6	1.13	-0.51

Table 9 (Continued)

Compound		Reference $\log P_{o/w}$	Column	MeCN Fraction (%)	Buffer pH	Calculated $\log P_{o/w}$	Residual
Nadolol	β -Blocker	0.71	Gemini NX	40	11	1.33	0.62
			Gemini NX	50	11	1.20	0.49
Naproxen	NSAID	3.34	Chromolith RP-18e	40	3	3.50	0.16
			Chromolith RP-18e	50	3	3.09	-0.25
			Luna C ₁₈ (2)	40	3	3.70	0.36
			Luna C ₁₈ (2)	50	3	3.38	0.04
Nortriptyline	Antidepressant	4.04	Gemini NX	50	11	4.19	0.15
Oxprenolol	β -Blocker	2.10	Gemini NX	40	11	1.99	-0.11
			Gemini NX	50	11	1.83	-0.27
Paracetamol	Analgesic	0.51	Luna C ₁₈ (2)	40	6	0.55	0.04
			Luna C ₁₈ (2)	50	6	0.59	0.08
Penbutolol	β -Blocker	4.06	Gemini NX	50	11	4.41	0.35
Pilocarpine	Alkaloid	0.00	Gemini NX	40	11	-0.02	-0.02
			Gemini NX	50	11	-0.11	-0.11
Procainamide	Antiarrhythmic	0.98	Gemini NX	40	11	0.45	-0.53
			Gemini NX	50	11	0.42	-0.56
Propranolol	β -Blocker	2.98	Gemini NX	40	11	2.93	-0.05
			Gemini NX	50	11	2.72	-0.26
Quinine	Antimalarial	2.64	Gemini NX	40	11	2.48	-0.16
			Gemini NX	50	11	2.25	-0.39
Trazodone	Antidepressant	2.82	Gemini NX	40	11	3.15	0.33
			Gemini NX	50	11	2.83	0.01
Trimethoprim	Antibiotic	0.91	Gemini NX	40	11	0.43	-0.48
			Gemini NX	50	11	0.28	-0.63
Warfarin	Anticoagulant	3.25	Chromolith RP-18e	40	3	3.25	0.00
			Chromolith RP-18e	50	3	2.88	-0.37

^a Drug candidates, whose reference $\log P_{o/w}$ values have been submitted for publication.

column and mobile composition tested, is illustrated in Eq. (8):

$$\log P_{o/w}(\text{calc.}) = 0.98(\pm 0.02)\log P_{o/w}(\text{ref.}) - 0.07(\pm 0.07),$$

$$n = 84; r^2 = 0.96; \text{SD} = 0.35; F = 1828 \quad (8)$$

The substances included, the reference $\log P_{o/w}$ values, the experimental conditions of the measurements, the determined $\log P_{o/w}$ as well as the differences between the determined and reference values are shown in Table 9. In spite of the diversity of columns, mobile phases and buffers that were used, the correlation

between the determined and reference values is really good. As mentioned before, absolute values of residuals higher than 0.6 units were considered outliers. Again, this correlation shows that the method provides accurate $\log P_{o/w}$ values with a precision lower than 0.4 $\log P_{o/w}$ units. This standard deviation (0.35) is similar to those observed in the literature [16,18,22,24,27] although most of those correlations are between a variety of hydrophobicity parameters such as $\log k$, $\log k_w$ or CHI, and not directly between calculated and reference $\log P_{o/w}$ values as in the methodology discussed here.

It has to be pointed out the significance of the descriptors contribution in $\log P_{o/w}$ evaluation and, consequently, the

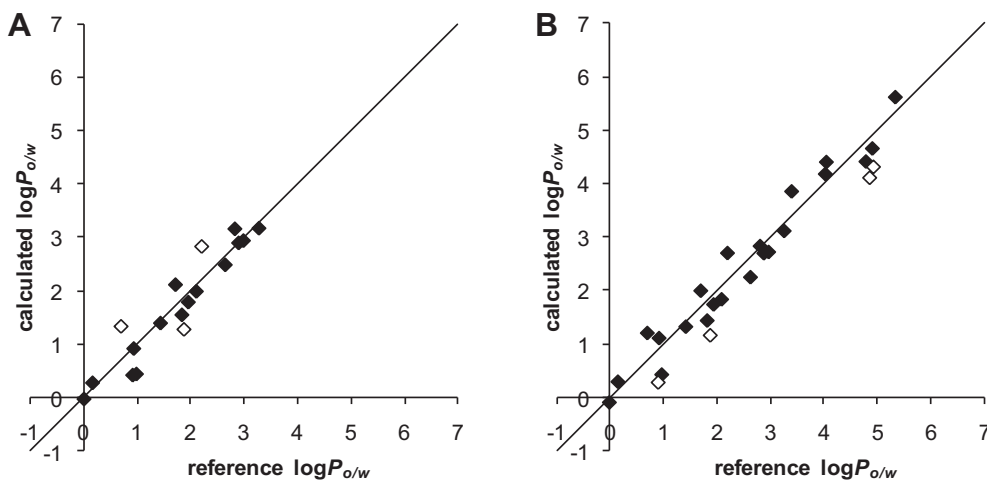


Fig. 5. Plots of calculated $\log P_{o/w}$ vs. reference $\log P_{o/w}$ values. (A) Plot for the studied drugs, Gemini NX column, mobile phase MeCN/pyrrolidine buffer 40%; (B) plot for the studied drugs, Gemini NX column, mobile phase MeCN/pyrrolidine buffer 50%. Symbols: (◆) compounds; (◇) outliers.

Table 10Contribution of the descriptor terms in the calculated $\log P_{o/w}$ according to Eq. (5) of some representative compounds.

Compound	MeCN fraction	$\log k$	1.22 $p_{\text{reference}}$	1.99 pol/d^2	1.89 HDCA-2	-0.17 HOMO-LUMO	-1.27×10^{-3} DPSA-1	calc. $\log P_{o/w}$
Acebutolol	50	-0.08	2.47	0.56	1.80	-1.42	-0.42	1.99
Ephedrine	50	-0.06	2.52	0.56	0.95	-1.69	-0.25	1.10
Quinine	40	0.56	3.87	0.02	1.34	-1.44	-0.32	2.48
Mepivacaine	40	0.57	3.88	0.06	0.79	-1.60	-0.35	1.79
Oxprenolol	40	0.58	3.92	0.02	0.96	-1.57	-0.36	1.99
Bupivacaine	50	1.03	6.29	0.06	0.55	-1.59	-0.45	3.86
Nortriptyline	50	1.05	6.35	0.34	0.36	-1.52	-0.35	4.19
Maprotiline	50	1.06	6.38	0.34	0.36	-1.62	-0.38	4.09
Penbutolol	50	1.08	6.47	0.02	1.00	-1.60	-0.49	4.41

inadequacy of chromatographic retention solely to predict $\log P_{o/w}$ partition coefficients properly when compounds of different structures and hydrogen bond capabilities are considered. Abraham et al. [38,39] analysed the dependence of the $\log P_{o/w}$ from the main property descriptors for a wide set of 613 compounds and no significant dependence of $\log P_{o/w}$ on the hydrogen bond acidity of the compounds have been noticed. However, the chromatographic retention in C_{18} columns is really influenced by the hydrogen bond acidity of the solutes, which significantly decreases the retention of the solute [19,20,22,32,34,40,41]. According to this fact, when $\log P_{o/w}$ is estimated from chromatographic measurements, the hydrogen bond acidity of the solute has to be taken into account, because two compounds with the same chromatographic retention do not necessarily have the same hydrophobicity. This fact was already shown by Valkó et al. [24], who established a nice correlation between $\log P_{o/w}$ and the CHI parameter, where the chromatographic index is complemented with a molecular descriptor of the solute which expresses its hydrogen bond acidity. In this work, the hydrogen bond acidity is expressed by the HDCA-2 descriptor, which is highly correlated with the A (effective hydrogen bond acidity) term of the Abraham's general solvation equation [35,42]. Abraham's descriptors are continuously validated through a wide variety of chemical and biological systems. Nevertheless, they are usually determined experimentally and this is a drawback in the case of new compounds, while HDCA-2 and the other descriptors used in this work can be easily calculated solely from the structure of the compound.

Table 10 shows the contribution of each term of Eq. (5) in the calculated $\log P_{o/w}$ values of some representative compounds. It can be observed that HDCA-2 is the descriptor term which has the strongest influence in the $\log P_{o/w}$ values discrimination. For example, acebutolol and ephedrine have the same chromatographic retention ($\log k \approx -0.07$) and the contribution of the descriptors is really similar with the exception of HDCA-2. The calculated $\log P_{o/w}$ values are 1.99 and 1.10, respectively, and they have the same difference between them (≈ 0.9) as the contribution of HDCA-2 term for each substance. The same can be observed for quinine, mepivacaine and oxprenolol. They have similar retention factors ($\log k \approx 0.57$) but significantly different $\log P_{o/w}$ values (2.48, 1.79 and 1.99, respectively), and the difference between them comes again from the difference in the contribution of HDCA-2 term, which is the biggest for quinine, followed by oxprenolol and finally by mepivacaine. Similar reasoning can be applied to bupivacaine, nortriptyline, maprotiline and penbutolol, which have $\log k \approx 1$. In this example, the contribution of pol/d^2 term is also significant and calculated $\log P_{o/w}$ for nortriptyline and maprotiline, which have the same pol/d^2 term, is very similar because the HDCA-2 term is the same for both compounds. However, the $\log P_{o/w}$ of bupivacaine and penbutolol, which also shows the same value for the pol/d^2 term, differs in 0.55 $\log P_{o/w}$ units, according to the difference between their HDCA-2 terms.

4. Conclusions

The described method allows the determination of the 1-octanol-water partition coefficient ($\log P_{o/w}$) of neutral substances and, specifically, drugs with very different structures, hydrophobicity, functional groups and acid-base properties from a single isocratic run, working with a characterized chromatographic system. The only requirement of the method is an accurate control of the pH of the mobile phase in order to avoid the ionization of the solutes, and for this purpose it is advisable a previous estimation of their pK_a (for example, with an appropriate commercial software). The structural descriptors can be easily calculated from the structure of the solutes using CODESSA software. The results obtained, as well as their comparison with the reference $\log P_{o/w}$ for the solutes demonstrate that the method provides good estimations (with a precision of 0.4 logarithmic units) of the hydrophobicity of the compounds. The applicability of the method for drugs is especially remarkable, because of its interest for drug research and development.

Acknowledgements

The authors thank the Ministerio de Ciencia e Innovación of the Spanish Government and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) of the European Union (Project CTQ2010-19217/BQU) for financial support. JMP also thanks the Ministerio de Ciencia e Innovación for a FPI grant supported by the Project CTQ2007-61623/BQU.

References

- [1] C. Hansch, T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 1616.
- [2] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, *Chem. Rev.* 71 (1971) 525.
- [3] G.V. Betageri, J.A. Rogers, *Int. J. Pharm.* 36 (1987) 165.
- [4] S.D. Krämer, *Pharm. Sci. Technol. Today* 2 (1999) 373.
- [5] B. Testa, H. Van de Waterbeemd, G. Folkers, R. Guy (Eds.), *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2001.
- [6] H. Van de Waterbeemd, B. Testa, R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers (Eds.), *Drug Bioavailability Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2003.
- [7] J. Sangster, *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, 1st ed., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 1997.
- [8] P.H. Stahl, C.G. Wermuth, *Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use*, VCH, Verlag Helvetica Chimica Acta; Wiley-VCH, Zurich, Switzerland; Weinheim, Germany, 2002.
- [9] A. Avdeef, *Quant. Struct. Act. Relat.* 11 (1992) 510.
- [10] K. Tákacs-Novak, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1405.
- [11] S.D. Krämer, J.C. Gautier, P. Saudemon, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1310.
- [12] C. Barzanti, R. Evans, J. Fouquet, L. Gouzin, M.N. Howarth, G. Kean, et al., *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 3337.
- [13] I.V. Tetko, G.I. Poda, C. Ostermann, R. Mannhold, *Chem. Biodivers.* 6 (2009) 1837.
- [14] R. Kaliszan, *Chem. Rev.* 107 (2007) 3212.
- [15] F. Lombardo, M.Y. Shalaeva, K.A. Tupper, F. Gao, M.H. Abraham, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 2922.
- [16] R. Kaliszan, P. Haber, T. Baczek, D. Siluk, K. Valkó, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 117.

- [17] X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, H. Chuman, J. Chromatogr. A 1091 (2005) 51.
- [18] C. Giaginis, S. Theocharis, A. Tsantili-Kakoulidou, J. Chromatogr. A 1166 (2007) 116.
- [19] D. Benhaim, E. Grushka, J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol. 31 (2008) 2198.
- [20] D. Benhaim, E. Grushka, J. Chromatogr. A 1209 (2008) 111.
- [21] P. Wiczling, M. Waszczuk-Jankowoska, M.J. Markuszewski, R. Kaliszan, J. Chromatogr. A 1214 (2008) 109.
- [22] D. Benhaim, E. Grushka, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 65.
- [23] K. Valkó, C. Bevan, D. Reynolds, Anal. Chem. 69 (1997) 2022.
- [24] K. Valkó, C. My Du, C. Bevan, D.P. Reynolds, M.H. Abraham, Curr. Med. Chem. 8 (2001) 1137.
- [25] E. Fuguet, C. Ràfols, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1173 (2007) 110.
- [26] E. Fuguet, C. Ràfols, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 7798.
- [27] X. Liu, H. Hefesha, H. Tanaka, G. Scriba, A. Fahr, Chem. Pharm. Bull. 56 (2008) 1417.
- [28] X. Subirats, M. Rosés, E. Bosch, Sep. Purif. Rev. 36 (2007) 231.
- [29] J.M. Pallicer, S. Pous-Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3026.
- [30] M. Rosés, E. Bosch, Anal. Chim. Acta 274 (1993) 147.
- [31] E. Bosch, P. Bou, M. Rosés, Anal. Chim. Acta 299 (1994) 219.
- [32] E. Lázaro, C. Ràfols, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1081 (2005) 163.
- [33] P. Izquierdo, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 1107 (2006) 96.
- [34] E. Lázaro, P. Izquierdo, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5214.
- [35] R. Bosque, J. Sales, E. Bosch, M. Rosés, M.C. García-Alvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasíó, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 43 (2003) 1240.
- [36] BioLoom Online Database: <http://www.davidhoekman.com/bio-loom/bin/details>.
- [37] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, LC GC North Am. 27 (2009) 1000.
- [38] M.H. Abraham, H.S. Chadha, A.J. Leo, J. Chromatogr. A 685 (1994) 203.
- [39] M.H. Abraham, in: P. Politzer, J.S. Murray (Eds.), Quantitative Treatments of Solute/Solvent Interactions, 1st ed., Elsevier, Amsterdam, 1994 (Chapter 4).
- [40] K. Valkó, M. Plass, C. Bevan, D. Reynolds, M.H. Abraham, J. Chromatogr. A 797 (1998) 41.
- [41] E. Lázaro, C. Ràfols, M.H. Abraham, M. Rosés, J. Med. Chem. 49 (2006) 4861.
- [42] J. Jover, R. Bosque, J. Sales, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 44 (2004) 1098.

Article III

**Extension of the liquid chromatography/
quantitative structure-property
relationship method to assess the
lipophilicity of neutral, acidic, basic and
amphoteric compounds**

**Juan M. Pallicer, Carme Calvet, Adriana Port,
Martí Rosés, Clara Ràfols, Elisabeth Bosch
J. Chromatogr. A 1240 (2012) 113**



Extension of the liquid chromatography/quantitative structure–property relationship method to assess the lipophilicity of neutral, acidic, basic and amphoteric drugs

Juan M. Pallicer^a, Carme Calvet^b, Adriana Port^b, Martí Rosés^a, Clara Ràfols^a, Elisabeth Bosch^{a,*}

^a Departament de Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

^b ESTEVE, Av. Mare de Déu de Montserrat 221, 08041 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 February 2012

Received in revised form 26 March 2012

Accepted 27 March 2012

Available online 5 April 2012

Keywords:

Lipophilicity

Drugs

HPLC

UHPLC

QSPR model

Polarity model

ABSTRACT

A reported chromatographic method to determine the 1-octanol/water partition coefficient ($\log P_{o/w}$) has been used to estimate the lipophilicity of 33 drugs with diverse structures and functionalities, including neutral, acid, basic, and amphoteric compounds. The applicability of the chromatographic method has been extended to the UHPLC technique, and the results obtained were compared to those obtained from conventional HPLC. No significant difference between the results obtained by both techniques is noticed. Thus, the suitability of UHPLC, which involves shorter run times, for lipophilicity assessment is demonstrated. In order to show the consistency of this chromatographic method, the $\log P_{o/w}$ values of those drugs which have acid–base properties have been also determined by potentiometry, and the final results have been compared with both values derived from the chromatographic method and the ones from the literature.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lipophilicity is a key property of drugs which significantly contributes to understand and model drug–target interactions and predict pharmacokinetic processes such as absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity, commonly abbreviated as ADMET. Therefore, as both pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviours of the drug are influenced by the lipophilicity, it is clear that its proper determination plays a major role in drug discovery [1].

Usually, lipophilicity is measured by the 1-octanol/water partition coefficient ($\log P_{o/w}$) of the solute. Several procedures have been considered for its determination, being the shake-flask method the reference one [2]. Nevertheless, it is tedious, applicable in a limited range of $\log P_{o/w}$ values and demands significant amounts of sample with high purity. Potentiometric methods [3,4] came to be a great alternative in the case of acidic or basic compounds, although it also requires relatively high quantities of pure sample. In silico methods are also widely used to estimate the

$\log P_{o/w}$. However, the values obtained from different software can show a lack of consistency, due to the omission of 3D or hydration effects, the presence of unknown fragments, or because different algorithms are used in the $\log P_{o/w}$ estimation [5].

In the last years, HPLC became a useful tool for the study of the lipophilicity [6] since it provides several advantages such as low sample consumption, good accuracy, on-line detection, wide dynamic range and insensitivity to impurities or degradation products. Many HPLC methods to evaluate lipophilicity have been proposed, based on the measurement of different parameters such as the retention factor extrapolated to pure water ($\log k_w$) [7–13], the chromatographic hydrophobicity index (CHI) [14,15], or from the combination of retention in HPLC with descriptors derived from the structure of the solutes [16–18].

Some experimental strategies to improve lipophilicity assessment by HPLC have been proposed. For instance, the use of higher flow rates or shorter columns, as well as monolithic supports [16,19,20]. These strategies led to a convenient decrease in the run times and, hence, a broader range of $\log P_{o/w}$ values can be measured. Nevertheless, both facts reduce the accuracy of the chromatographic measurements, particularly if analytes show low retention (close to the dead time of the column). UHPLC columns, with sub-2 μm particles, became a great improvement compared to the strategies mentioned above, as they provide a dramatic increase in the efficiency while decreasing the retention times by a

* Corresponding author at: Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain.
Tel.: +34 93 402 12 84; fax: +34 93 402 12 33.

E-mail address: e.bosch@ub.edu (E. Bosch).

factor up to 6. Nevertheless, they require compatible instrumentation which must be able to deal with really high back-pressures (up to 15,000 psi) and they also must have really low dead volumes. However, nowadays many LC systems are already able to work in those conditions and, therefore, provide a powerful tool in lipophilicity assessment. It is also possible to work with columns with intermediate particle size (2–3 μm) that can be also used in conventional HPLC systems as these columns give lower back-pressures than sub-2 μm ones.

In this work, a chromatographic method previously reported [17,18] is validated using sub-2 μm particle size C_{18} columns. The procedure is based on a previously reported polarity model [21,22] that relates the retention in RP-HPLC with solute (p), mobile phase (P_m^N) and stationary phase (P_s^N) polarity parameters (Eq. (1)):

$$\log k = (\log k)_0 + p(P_m^N - P_s^N) \quad (1)$$

$(\log k)_0$, which is the intercept of the correlation, and P_s^N values are characteristic of the chromatographic system and they are previously determined by calibration with 12 standards [23–25]. P_m^N is obtained from the organic solvent volume fraction in the mobile phase (φ). When acetonitrile is used, P_m^N is calculated from Eq. (2):

$$P_m^N = 1.00 - \frac{2.13\varphi}{1 + 1.42\varphi} \quad (2)$$

The polarity of the solutes (p_{working}) is converted into the reference system by means of Eq. (3):

$$p_{\text{working}} = ap_{\text{reference}} + b \quad (3)$$

where a and b are the slope and the intercept of the correlation, respectively. Once this p_{working} value is expressed in the reference system, $p_{\text{reference}}$, the 1-octanol/water partition coefficient is determined by applying a quantitative structure–property relationship (QSPR) model [26], according to Eq. (4):

$$\log P_{o/w} = 1.22p_{\text{reference}} + 1.89(\text{HDCA-2}) - 0.17(\text{HOMO-LUMO}) + 1.98(\text{pol/d}^2) - 1.27 \cdot 10^{-3}(\text{DPSA-1}) - 0.99 \quad (4)$$

These descriptors encode different information of the studied compounds. HDCA-2 is the hydrogen bond acidity descriptor, HOMO–LUMO belongs to the molecular polarizability, pol/d^2 is related to the molecular polarity and DPSA-1 encodes the features responsible for polar interactions between molecules.

This QSPR model was established with a set of 188 substances [26], most of which derivatives of benzene, aniline and phenol. Nevertheless, it was successfully tested with 38 different drugs showing more complex structures and different functionalities [18]. With the aim to explore the limits of Eq. (4) to cover properly calculations referred to a wide variety of molecules of pharmaceutical interest, a set of 33 new drugs, with a much higher grade of molecular complexity than the original substances, has been carefully selected. This set of compounds shows wide ranges for all molecular descriptors involved in Eq. (4), for acidity constants and also for

lipophilicity values, as evaluated from the $\text{C log } P$ software package. Hence, the values of the molecular descriptors of both sets of substances have been compared to evaluate their similarity and, thus, the validity of Eq. (4) for determining the $\log P_{o/w}$ of drugs with complex structures.

In summary, the aims of this paper are to enlarge the previously proposed chromatographic method [17,18] to the determination of the $\log P_{o/w}$ of drugs with complex structure, to introduce the ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) as a suitable technique for lipophilicity measurements, and to validate the obtained $\log P_{o/w}$ values by comparison with those determined by HPLC and by potentiometry.

2. Experimental

2.1. Chromatographic determination of the $\log P_{o/w}$

2.1.1. Apparatus and columns

For HPLC measurements, a Shimadzu (Kyoto, Japan) HPLC system equipped with two LC-20AD isocratic pumps, a SIL-10ADvp autosampler, a DGU-20A₅ degasser, a CTO-10ASvp oven thermostated at 25 °C, a SPD-10AVvp UV detector and a CBM-20Alite controller was used. For UHPLC measurements, a Shimadzu Nexera UHPLC system was used. The system was equipped with two LC-30AD high-pressure pumps, a DGU-20A₅ online degasser, a SIL-30AC autosampler, a SPD-M20A diode array detector and a CBM-20Alite controller.

pH measurements were performed with a combined Crison (Alella, Spain) 5014 electrode in a Crison GLP22 pH meter. The electrode system was standardized with ordinary aqueous buffers of pH 4.01, 7.00 and 9.21.

Retention data were obtained from three different columns: a Phenomenex (Torrance, CA, USA) Gemini NX, 5 μm , 150 mm \times 4.6 mm; a Phenomenex Kinetex C_{18} , 2.6 μm , 100 mm \times 4.6 mm; a Waters (Milford, MA, USA) Acquity BEH C_{18} , 50 mm \times 2.1 mm. Their characteristics are given in Table 1. Phenomenex Gemini NX and Waters Acquity BEH allowed the study of basic drugs because of their extended working pH range (up to 12). However, Phenomenex Kinetex C_{18} has a lower upper pH limit and, therefore, only compounds with pK_a values lower than 6 could be studied.

2.1.2. Chemicals

Acetonitrile HPLC gradient grade was purchased from VWR (West Chester, PA, USA). Water was purified by the Milli-Q® plus system from Millipore (Billerica, MA, USA) with a resistivity of 18.2 M Ω . The chemicals used for buffer preparation were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), Fluka (Steinheim, Germany), Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany), Baker (Deventer, Netherlands), Riedel de Haën (Seelze, Germany) and Carlo Erba (Milano, Italy). The drugs were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany), TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium), Molekula (Dorset, United Kingdom), Huzhou Hengyuan

Table 1
Characteristics of the columns used.

	Phenomenex Gemini NX	Phenomenex Kinetex C_{18}	Waters Acquity BEH C_{18}
Structure type	Particulate	Particulate	Particulate
Particle size (μm)	5	2.6	1.7
Average pore diameter (Å)	105	92	139
Surface area ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	372	200	183
Pore volume ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	1.10	–	0.70
Total carbon (%)	14	12	17.4
Column length (mm)	150	100	50
Column diameter (mm)	4.6	4.6	2.1
pH stability range	1–12	2–8	1–12

Table 2

Acidity constants at $I=0.15$ M and molecular descriptors of the studied drugs. A and B stands for acidic or basic pK_a , respectively. pK_a of clofazimine was taken from Ref. [29] and pK_a values of mebendazole ($I=0.05$ M) from Ref. [30].

#		CAS	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	pol/d^2	HDCA-2	HOMO–LUMO	DPSA-1
1	Atenolol	29122-68-7	9.40 (B)	–	0.00	1.00	9.27	280.05
2	Atorvastatin	134523-00-5	4.04 (A)	–	0.00	1.57	8.31	268.60
3	Carbamazepine	298-46-4	–	–	0.12	0.65	8.07	94.83
4	Celecoxib	169590-42-5	9.46 (A)	–	0.15	0.74	8.19	-41.42
5	Chlorpromazine	50-53-3	9.25 (B)	–	0.00	0.24	7.66	176.40
6	Clofazimine	2030-63-9	8.40 (B)	–	0.16	0.40	6.67	103.36
7	Clopidogrel	113665-84-2	4.99 (B)	–	0.13	0.08	8.79	178.11
8	Diltiazem	42399-41-7	7.79 (B)	–	0.00	0.47	8.13	258.64
9	Duloxetine	116539-59-4	9.81 (B)	–	0.01	0.19	8.16	230.12
10	Flufenamic acid	530-78-9	4.16 (A)	–	0.01	0.71	9.09	-70.85
11	Fluoxetine	54910-89-3	9.89 (B)	–	0.01	0.19	9.32	63.14
12	Flurbiprofen	5104-49-4	4.35 (B)	–	0.00	0.52	8.59	58.31
13	Glimepiride	93479-97-1	5.38 (B)	–	0.00	0.97	9.23	415.34
14	Indomethacin	53-86-1	3.98 (A)	–	0.00	0.79	7.80	169.90
15	Ketorolac	74103-06-3	3.50 (A)	–	0.26	0.77	8.77	71.83
16	Levetiracetam	102737-28-2	–	–	0.01	0.75	10.61	193.53
17	Loratadine	79794-75-5	4.86 (B)	–	0.13	0.33	8.85	236.74
18	Mebendazole	31431-39-7	3.20 (B)	9.64 (A)	0.14	1.00	8.66	57.10
19	Miconazole	22916-47-8	5.99 (B)	–	0.03	0.13	8.55	11.45
20	Milnacipran	92623-85-3	9.55 (B)	–	0.02	0.38	9.77	261.82
21	Naproxen	22204-53-1	4.28 (A)	–	0.00	0.84	8.25	169.98
22	Omeprazole	73590-58-6	4.25 (B)	8.64 (A)	0.01	0.57	5.21	152.40
23	Pantoprazole	102625-70-7	3.84 (B)	8.15 (A)	0.00	1.41	8.42	17.42
24	Quetiapine	111974-69-7	3.57 (B)	6.89 (B)	0.01	1.15	7.76	325.33
25	Ranitidine	66357-35-5	2.18 (B)	8.38 (B)	0.00	1.14	4.12	340.43
26	Rimonabant	158681-13-1	2.80 (B)	–	0.12	0.68	8.46	302.73
27	Rosiglitazone	122320-73-4	6.26 (B)	6.67 (A)	0.01	1.00	8.08	182.65
28	Rosuvastatin	287714-41-4	4.44 (A)	–	0.01	1.52	8.57	226.66
29	Sertraline	79617-96-2	9.31 (B)	–	0.00	0.22	9.11	280.20
30	Tramadol	27203-92-5	9.50 (B)	–	0.01	0.49	9.38	311.59
31	Valsartan	137862-53-4	3.84 (A)	4.69 (A)	0.26	1.25	9.00	248.72
32	Venlafaxine	93413-69-5	9.59 (B)	–	0.01	0.45	9.33	379.43
33	Vildagliptin	274901-16-5	7.52 (B)	–	0.28	0.95	11.04	272.06

Biochem. (Huzhou, China), Chemos (Regenstauf, Germany), Aesica (Newcastle upon Tyne, United Kingdom), Carbone Scientific (London, United Kingdom) and Apac (Yancheng City, China) in high purity grade. Other drugs were synthesized in ESTEVE (Barcelona, Spain) only for the purpose of this study.

2.1.3. Chromatographic procedure

Retention data were obtained working with mobile phases containing 50% (v/v) of acetonitrile and aqueous buffers at different pH values for all compounds. The compounds were grouped according to their pK_a values to select the appropriate buffers to have the neutral form of the solutes.

The drugs were solved in methanol, and potassium bromide was used as dead time marker. The injection volume for Phenomenex Gemini NX was 10 μ L and for Phenomenex Kinetex C₁₈ and Waters Acquity BEH C₁₈ was 1 μ L. The flow rate was 1 mL min⁻¹ for both Phenomenex columns and 0.5 mL min⁻¹ for the Waters Acquity BEH.

Table 3

Polarity parameters of the chromatographic systems and parameters of the transference between the working systems to the reference system, where a is the slope and b the intercept of the linear regression (Eq. (3)).

	Phenomenex Gemini NX	Phenomenex Kinetex C ₁₈	Waters Acquity BEH C ₁₈
Polarity parameters (acetonitrile)			
$(\log k)_0$	-0.88	-0.84	-0.74
P_s^N	-0.03	-0.02	0.01
Transference parameters			
a	0.86	0.88	0.95
b	0.21	0.29	-0.29
R^2	0.98	0.99	0.99

2.1.4. Calculation of the molecular descriptors

Descriptors were calculated from the structure of each compound. The structures were drawn using HyperChem Lite software (HyperCube, Gainesville, USA). The geometrical optimization of the structures was done with MOPAC 6.0 and AuxQSPR program in order to obtain the energy minimum. These programs provided files prepared to calculate the numeric values of the structural descriptors using CODESSA software (University of Florida, USA). Microsoft Excel was used to perform all the calculations involved in this work.

2.2. Potentiometric determination of pK_a and $\log P_{o/w}$

2.2.1. Apparatus

For the potentiometric determination of pK_a and $\log P_{o/w}$ a GLpka automated titrator fitted with a D-PAS spectrometer or a T3 titrator (both from Sirius Analytical Instruments Ltd., East Sussex, UK) were used indistinctively. Instrument control and data processing were done by RefinementPro™ v.2 software for GLpka or Sirius T3 v1.1 software for T3.

2.2.2. Chemicals

Methanol HPLC supergradient grade was purchased from Scharlab. Solutions and solvent mixtures were made up of water purified by the Milli-Q® plus system from Millipore (Bedford, MA, USA). Readymade 0.5 M solutions of potassium hydroxide and hydrochloric acid were obtained from Merck and Sigma, respectively. Potassium hydroxide is standardized against a primary standard using potassium hydrogen phthalate. Potassium hydrogen phthalate, 1-octanol ACS reagent and potassium chloride were purchased from Sigma.

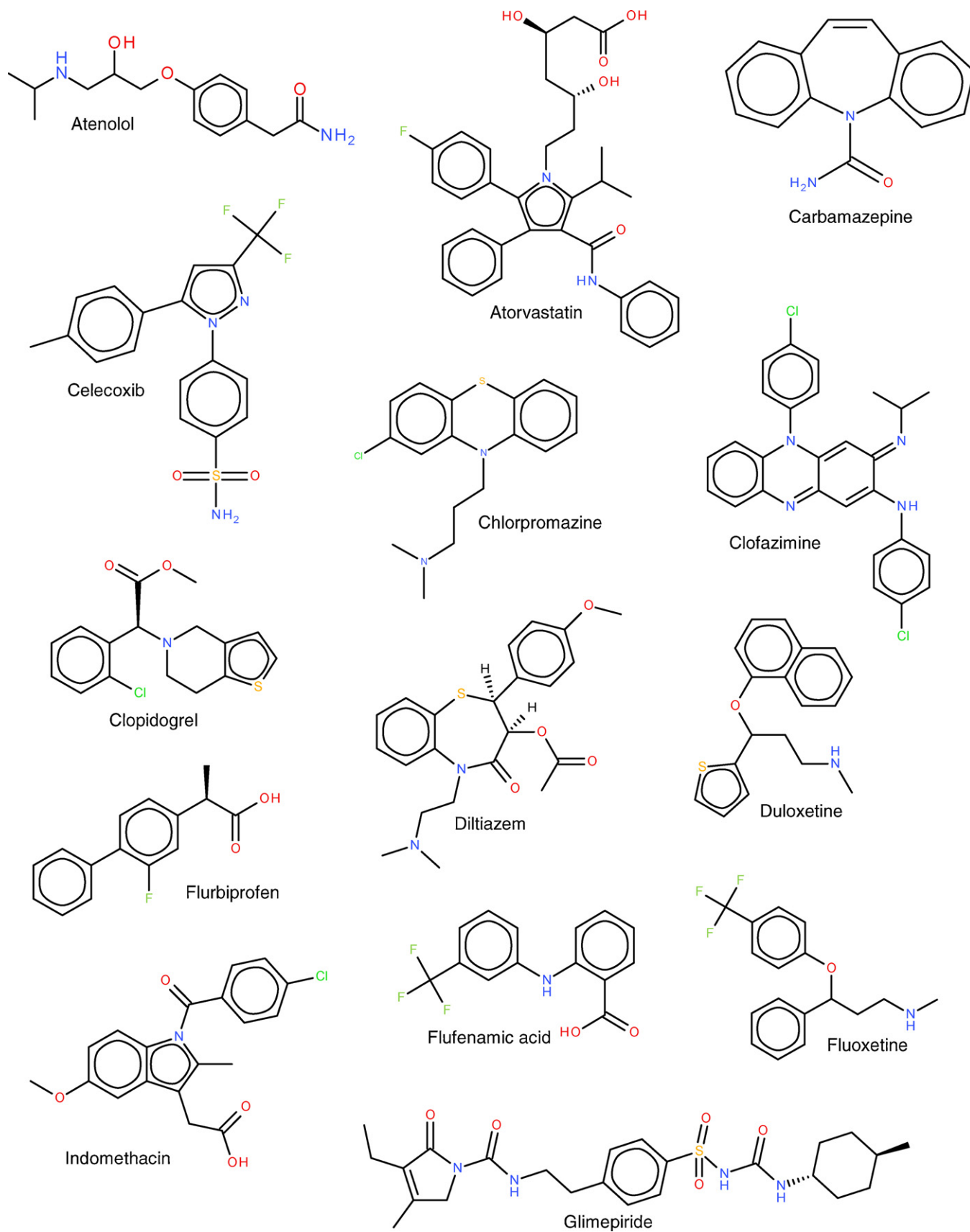


Fig. 1. Structures of the substances studied in this work.

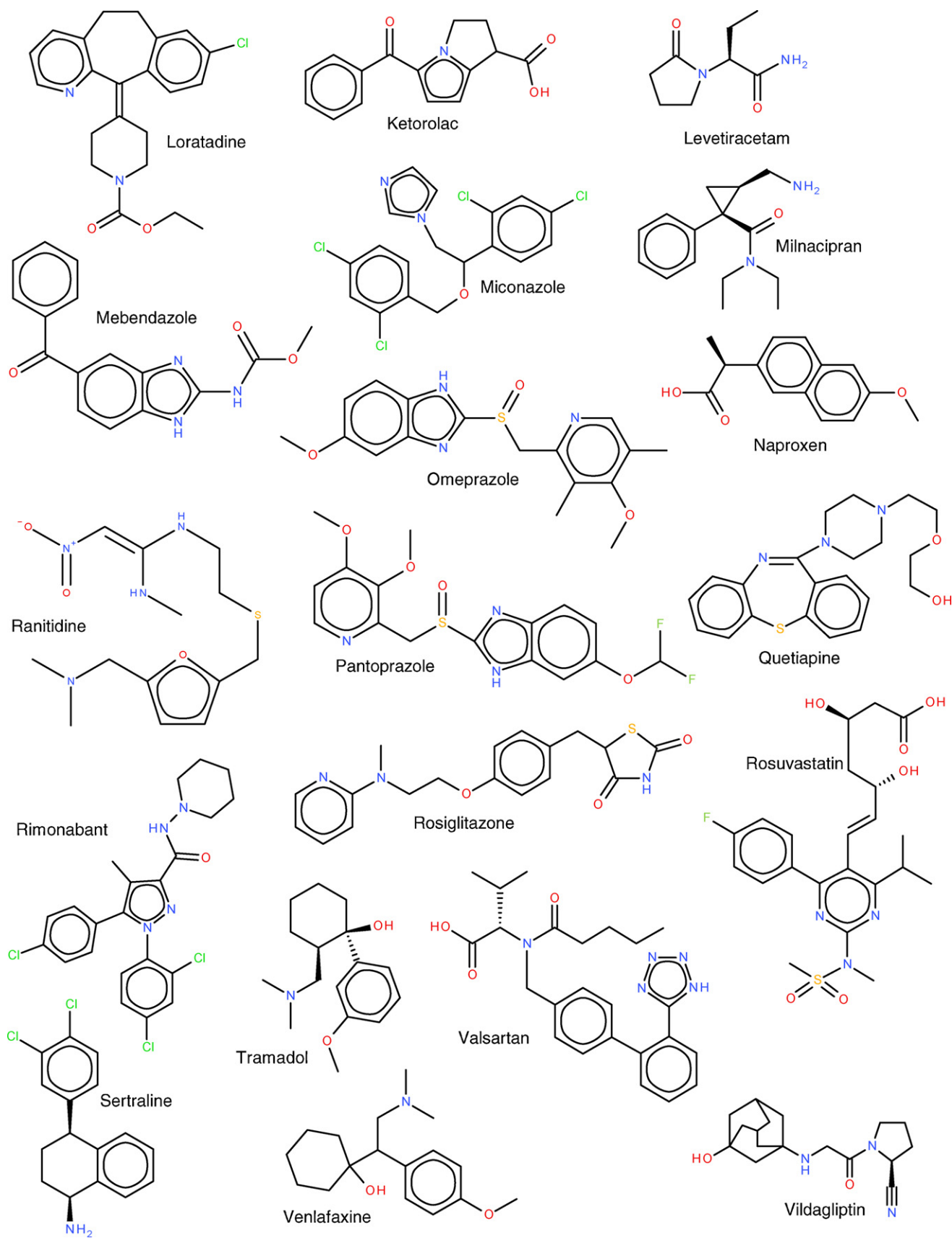


Fig. 1. (Continued).

2.2.3. Potentiometric procedures

The pK_a values were determined by the pH-metric technique. For bases and ampholytes, 5–10 mg (GLPKa) or 1–2 mg (T3) of the samples were dissolved in 0.15 M KCl or in methanol/0.15 M KCl mixtures, pre-acidified to pH 2.0 with 0.5 M HCl and then titrated with 0.5 M KOH solution. In the case of acids, the titration was performed in the opposite direction. To obtain aqueous pK_a value from pK_a data, the Yasuda–Shedlovsky relationship was used.

The $\log P_{o/w}$ was obtained from the difference between the aqueous pK_a of the species and the apparent pK_a , determined from dual-phase titrations (1-octanol/KCl 0.15 M). Typically, 5–10 mg (GLPKa) or 1–2 mg (T3) of the samples were titrated as in aqueous pK_a , in presence of various amounts of the partitioning solvent, water-saturated 1-octanol. The phase ratio applied was varied depending on the expected $\log P_{o/w}$ value of the compound. $\log P_{o/w}$ values were estimated and refined by a weighted non-linear least-squares. $\log P_{o/w}$ values determined from different phase volume ratios were averaged.

3. Results and discussion

The set of 33 drugs studied includes 2 neutral, 8 acidic, 19 basic and 4 amphoteric compounds, and their structures are shown in Fig. 1. The substances, their pK_a values (at $I=0.15$ M) determined by potentiometry as explained in Section 2 and the values of the molecular descriptors are gathered in Table 2.

3.1. Molecular descriptors of the studied compounds

To evaluate the robustness of the established QSPR model for pharmaceutical compounds with complex molecular structures, the molecular descriptors for the 33 drugs involved in this study have been compared to those from the 188 compounds used to establish Eq. (4). To improve the significance of this study, the descriptors of the 38 drugs previously studied [18] have been added, too. For each compound, each molecular descriptor (HDCA-2, HOMO–LUMO, pol/d^2 , and DPSA-1) has been plotted against the chromatographic descriptor, $p_{\text{reference}}$, which is involved in the most relevant term of Eq. (4).

Fig. 2a shows the plot of the hydrogen bond donor descriptor HDCA-2 with respect to the polarity of the solutes $p_{\text{reference}}$. According to it, about of 20% of the drugs studied show significant higher hydrogen bond donor ability than the substances from the original set in the whole solute polarity range and, particularly, atorvastatin, pantoprazole and rosuvastatin show very high HDCA-2 values. This means that for drugs with high HDCA-2 values, the coefficient of Eq. (4) could not be robust enough to determine properly the $\log P_{o/w}$ value.

The descriptor HOMO–LUMO is plotted against the polarity of the solute $p_{\text{reference}}$ parameter in Fig. 2b. In this instance, no significant deviations from the original set are observed with the exception of omeprazole and ranitidine, which show lower values. Fig. 2c shows the relation between the pol/d^2 descriptor and the polarity of the solutes. It must be noticed that the studied drugs show similar values of pol/d^2 compared to the original set of substances. In Fig. 2d the plot from the descriptor DPSA-1 against the polarity $p_{\text{reference}}$ is given. In this instance, the drugs have values a little bit higher compared to those from the original set of substances, particularly for compounds with $p_{\text{reference}}$ values lower than 2, and this can slightly affect the $\log P_{o/w}$ values for compounds which show low retention and high DPSA-1 contribution.

At this point it should be noticed that ranitidine is the only compound that shows three molecular descriptors (HDCA-2, HOMO–LUMO and DPSA-1) out of the space defined for the original set of compounds and this can affect the resulting $\log P_{o/w}$ value. In

fact, ranitidine is a really flexible molecule and, therefore, multiple conformations with apparent minimum energy are found when its geometry is optimized and, then, it is not easy to assess the best conformation to calculate properly the molecular descriptors.

Therefore, Eq. (4) seems to be suitable and robust enough to estimate the $\log P_{o/w}$ values of a large variety of drugs with, perhaps, the exception of those with very high hydrogen bond donor ability and, in a minor degree, for those with have large DPSA-1 contributions and show low chromatographic retention.

3.2. Characterization of the chromatographic systems

The $(\log k)_0$ and P_s^N parameters for Phenomenex Kinetex C₁₈ and Waters Acquity BEH C₁₈ were determined according to the procedure described in the literature [23–25]. The parameters for Phenomenex Gemini NX were taken from a previous work [18]. These values are given in Table 3, as well as the transference parameters between these chromatographic systems and the reference one, which consists in a Waters Spherisorb ODS-2 column and acetonitrile as organic modifier [22,26].

3.3. Evaluation of the obtained $\log P_{o/w}$ values

The $\log P_{o/w}$ values determined by means of the chromatographic method in three chromatographic systems, as well as the working aqueous pH, the average of the $\log P_{o/w}$ values and the related standard deviations, are given in Table 4. These values are really consistent, in spite of being obtained from three columns which are very different in terms of length, particle size, and used technology (HPLC or UHPLC). Then, the standard deviation of the values is lower than 0.15 logarithmic units, with the only exception of vildagliptin, for which the standard deviation is higher. This can be attributable to the fact that hydrophilic compounds have retention times close to the dead time of the column. Thus, slight errors in the experimental measurements may lead to a significant deviation in $\log k$ calculation and, therefore, in the derived $\log P_{o/w}$ values. Despite of that, consistent and accurate results were obtained for other hydrophilic drugs such as atenolol or levetiracetam, whose $\log P_{o/w}$ are given in Table 4, or isoniazid, which shows $\log P_{o/w}$ values from –0.65 to –0.80 [18,27].

To measure the $\log P_{o/w}$ of the neutral form of the solute, the working pH values were carefully selected. This selection was made according to the aqueous pK_a of the compounds and the buffer pH and analyte pK_a variations with the addition of acetonitrile to aqueous buffer [28]. This is particularly important when amphoteric compounds with close pK_a values are analysed, since the mobile phase pH becomes more critical in these instances.

The average results determined by applying the chromatographic method are gathered also in Table 4 as well as those obtained from potentiometric measurements, and also from the literature (those recommended in BioLoom online database [29]).

It must be noticed that potentiometric $\log P_{o/w}$ of celecoxib is not given in Table 4. This is because its acidic pK_a (given in Table 2) and $\log P_{o/w}$ are too high to be used in a proper $\log P_{o/w}$ determination, since the shift of the neutralization curve in presence of 1-octanol is on the limit of the working range of the technique. However, potentiometric $\log P_{o/w}$ values of several basic compounds (atenolol, duloxetine, fluoxetine, milnacipran, sertraline, tramadol and venlafaxine) have been properly determined despite their high pK_a values (shown in Table 2) because the curve shift is in the opposite sense. $\log P_{o/w}$ values of clofazimine, rimonabant and mebendazole could also not be determined potentiometrically. For clofazimine and rimonabant the determination was not possible due to the very strong lipophilicity of these compounds, which is out of the available range for $\log P_{o/w}$ determination by means of

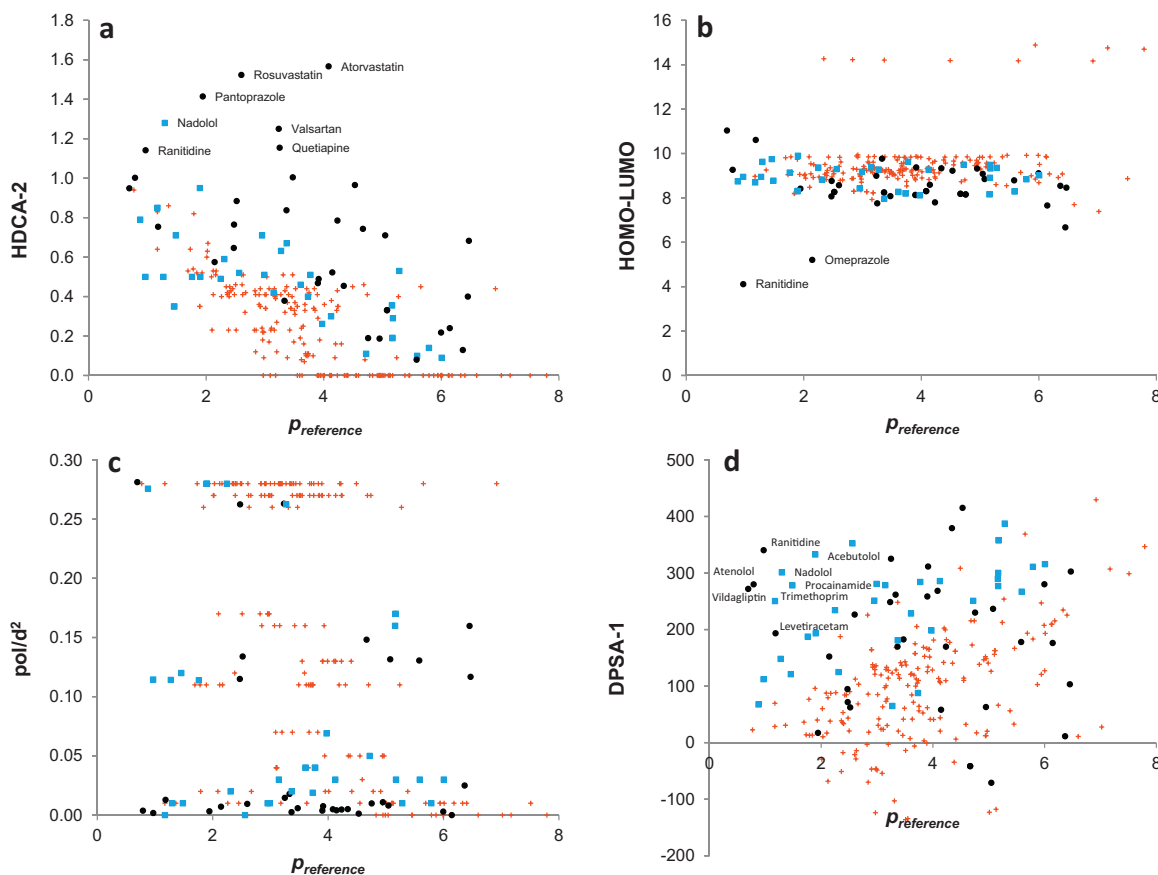


Fig. 2. Plot of molecular descriptors values against $p_{\text{reference}}$ for each compound: (a) HDCA-2, (b) HOMO-LUMO, (c) pol/d^2 and (d) DPSA-1. Symbols: (+) stands for the substances of the original set, (■) for the drugs studied in Ref. [18] and (●) for the drugs studied in this work.

the potentiometric approach [27]. For mebendazole, the $\log P_{o/w}$ could not be determined due to the low solubility of the compound.

3.3.1. Neutral compounds

Two neutral drugs have been studied here, carbamazepine and levetiracetam. Their $\log P_{o/w}$ values could not be determined by potentiometry due to the inexistence of acid–base groups. The chromatographic $\log P_{o/w}$ of carbamazepine agrees with the literature value, whereas no data about the lipophilicity of levetiracetam have been published. Nevertheless, the chromatographic $\log P_{o/w}$ determined in this work agrees with the obtained by C log P calculator (-0.34) included in BioLoom database [29].

3.3.2. Acidic and basic compounds

The retention of the acidic drugs was measured in mobile phases buffered with trifluoroacetic acid 0.01 M. For basic drugs, mobile phases buffered with pyrrolidine 0.01 M were used. In both cases, the pH of the mobile phases was low or high enough, respectively, to ensure that the drugs were completely in their neutral form.

For the acidic and basic compounds, the values determined by means of the chromatographic method agree with those obtained from potentiometric measurements and the values from the literature. However, two acidic compounds show chromatographic $\log P_{o/w}$ values about one unit higher than the potentiometrically determined: atorvastatin and rosuvastatin. Both compounds show the same substructure, which is not present in any other compound studied. It consists in two alcohol groups next to the carboxylic acid (see Fig. 1), and it results in the highest hydrogen bond donor descriptor values (Table 2 and Fig. 2a). It could be that the presence of these three hydrogen bond donor groups, very close between

them, led to overestimated values of HDCA-2 and, therefore, to inaccurate and high $\log P_{o/w}$ values. In any way, according to Fig. 2a, the HDCA-2 term coefficient in Eq. (4) is probably inadequate for compounds with very high hydrogen bond donor abilities. Nevertheless, reasonable results have been obtained for other drugs with HDCA-2 values higher than 1 such as quetiapine, ranitidine and valsartan (Fig. 2a). For quetiapine and valsartan, the chromatographic $\log P_{o/w}$ values agree with those from the literature, although they are slightly higher than the potentiometric values. Ranitidine shows a chromatographic $\log P_{o/w}$ value higher than the potentiometric and also slightly higher than the literature value. The same occurs with nadolol, from Ref. [18], which shows a chromatographic $\log P_{o/w}$ of 1.20 and a smaller literature value (0.71). Comparing ranitidine and nadolol with valsartan and quetiapine, it can be concluded that in all cases the high value of HDCA-2 term results in high values of the chromatographic $\log P_{o/w}$, but for the last two compounds the high HDCA-2 term is partially compensated by the higher weight of the $p_{\text{reference}}$ term in Eq. (4) since these compounds are less polar and, then, more retained. Then, $\log P_{o/w}$ values of drugs with HDCA-2 values higher than those of the reference set can be successfully evaluated for lipophilic compounds ($p_{\text{reference}} > 2$). Only very high values of HDCA-2, higher than 1.5, led to overestimated $\log P_{o/w}$ values, such as those from atorvastatin and rosuvastatin.

Duloxetine and fluoxetine, two basic compounds, give lower $\log P_{o/w}$ values than those determined by potentiometry. Both compounds exhibit a secondary amino group in the linear moiety of the molecule, showing a very similar substructure, which strongly differs from the other compounds considered in this work, as shown in Fig. 1. The retention of both compounds is also similar and, hence,

Table 4
Determined $\log P_{o/w}$ values in each chromatographic system and the average of the values, as well as the values obtained by potentiometry and from the literature.

Compound	Phenomenex Gemini NX		Phenomenex Kinetex C ₁₈		Waters Acquity BEH C ₁₈		Average $\log P_{o/w}$	$\log P_{o/w}$ potentiometry	$\log P_{o/w}$ literature
	pH	$\log P_{o/w}$	pH	$\log P_{o/w}$	pH	$\log P_{o/w}$			
Atenolol	11.7	0.11	–	–	11.7	–0.06	0.03 ± 0.12	0.06	0.16 [33]
Atorvastatin	2.0	5.13	2.0	5.15	2.0	5.20	5.16 ± 0.04	4.08	4.18 [34]
Carbamazepine	2.0	1.89	2.0	2.01	2.0	1.98	1.96 ± 0.06	–	2.19 [35]
Celecoxib	2.0	5.11	2.0	5.14	2.0	5.06	5.10 ± 0.04	–	–
Chlorpromazine	11.7	5.47	–	–	11.7	5.43	5.45 ± 0.03	5.27	5.35 [36]
Clofazimine	11.7	6.68	–	–	–	–	6.68	–	7.48 [37]
Clopidogrel	11.7	4.53	6.0	4.57	11.7	4.50	4.53 ± 0.03	4.52	–
Diltiazem	11.7	3.07	–	–	11.7	2.94	3.01 ± 0.09	2.84	2.80 [38]
Duloxetine	11.7	3.58	–	–	11.7	3.50	3.54 ± 0.05	4.54	–
Flufenamic acid	2.0	4.99	2.0	5.17	2.0	5.06	5.07 ± 0.09	5.19	5.25 [39]
Fluoxetine	11.7	3.86	–	–	11.7	3.75	3.80 ± 0.08	4.42	4.50 [40]
Flurbiprofen	2.0	3.70	2.0	3.56	2.0	3.52	3.60 ± 0.09	3.84	3.86 [41]
Glimepiride	2.0	4.27	2.0	4.39	2.0	4.26	4.31 ± 0.07	3.97	–
Indomethacin	2.0	3.91	2.0	4.15	2.0	4.12	4.06 ± 0.13	4.10	4.27 [42]
Ketorolac	2.0	2.62	2.0	2.50	2.0	2.41	2.51 ± 0.10	2.62	2.72 [42]
Levetiracetam	2.0	–0.22	2.0	–0.32	2.0	–0.15	–0.23 ± 0.09	–	–
Loratadine	11.7	4.14	6.0	4.43	11.7	4.28	4.28 ± 0.14	4.88	4.40 [43]
Mebendazole	4.5	2.75	4.5	2.65	4.5	2.53	2.64 ± 0.11	–	2.83 [44]
Miconazole	11.7	5.42	–	–	11.7	5.59	5.56 ± 0.05	5.38	–
Milnacipran	11.7	1.87	–	–	11.7	1.83	1.85 ± 0.03	1.72	2.03 [45]
Naproxen	2.0	3.05	2.0	3.18	2.0	3.10	3.10 ± 0.07	3.24	3.34 [39]
Omeprazole	5.7	1.74	5.7	1.81	5.7	1.64	1.73 ± 0.09	2.14	2.23 [46]
Pantoprazole	4.5	2.95	4.5	2.81	4.5	2.99	2.91 ± 0.10	2.04	–
Quetiapine	11.7	3.55	–	–	11.7	3.45	3.50 ± 0.07	3.13	3.54 [47]
Ranitidine	11.7	1.39	–	–	11.7	1.22	1.31 ± 0.12	0.26	1.03 [48]
Rimonabant	11.7	6.40	6.0	6.68	11.7	6.59	6.56 ± 0.14	–	6.70 [49]
Rosiglitazone	5.7	3.57	5.7	3.57	5.7	3.55	3.56 ± 0.01	3.10	–
Rosuvastatin	2.0	3.50	2.0	3.40	2.0	3.33	3.41 ± 0.09	2.52	–
Sertraline	11.7	4.75	–	–	11.7	4.83	4.79 ± 0.05	5.17	–
Tramadol	11.7	2.68	–	–	11.7	2.73	2.71 ± 0.03	2.70	2.63 [49]
Valsartan	2.0	4.26	2.0	4.19	2.0	3.99	4.15 ± 0.14	3.52	3.90 [50]
Venlafaxine	11.7	3.26	–	–	11.7	3.10	3.18 ± 0.11	3.05	3.00 [51]
Vildagliptin	11.7	0.50	–	–	11.7	–0.02	0.24 ± 0.37	–0.16	–

their $p_{\text{reference}}$ values (4.75 and 4.95, respectively). The analysis of the molecular descriptors in Eq. (4) shows that the HDCA-2 value is equal for these two compounds and very similar to those calculated for drugs containing secondary or tertiary amino groups in the linear parts of the molecule (about 0.2) [18]. Therefore, the observed differences between potentiometric and chromatographic $\log P_{o/w}$ seem to be attributable to an overestimation of HOMO–LUMO or DPSA-1 descriptors by CODESSA software. Consistent results are obtained for other acidic and basic compounds studied.

3.3.3. Amphoteric compounds

The study of amphoteric compounds is more difficult due to the existence of at least two pK_a values. In this work, four amphoteric compounds have been included: omeprazole, pantoprazole, rosiglitazone and mebendazole.

Omeprazole has two pK_a values. The first one is 4.25, which stands for the deprotonation of the pyridinium, and the second one is 8.64, which corresponds to the deprotonation of the benzimidazole moiety. The neutral form of the solute exists between these values. In a mobile phase containing 50% of acetonitrile, these pK_a values are 3.32 and 9.55, as obtained from the k vs. pH curve of omeprazole, which is shown in Fig. 3a. Thus, the ΔpK_a is wide enough (6.24 units) in this mobile phase, and the compound is completely in its neutral form between pH 5 and 8. Hence, the retention measured in this pH range easily leads to the $\log P_{o/w}$ value.

Pantoprazole shows two pK_a values, 3.84 and 8.15. The first pK_a corresponds to the deprotonation of the pyridinium and the second one stands for the deprotonation of the benzimidazole group. In a mobile phase containing 50% of acetonitrile, these pK_a values are, respectively, 2.81 and 8.38 and, then, the neutral species predominates in a wide pH range, as it can be observed in Fig. 3b, which

allows the $\log P_{o/w}$ determination. However, the chromatographic $\log P_{o/w}$ is 0.9 logarithmic units higher than the potentiometric value. This can be easily explained since pantoprazole is a compound with a very high HDCA-2 and intermediate p polarity value. This fact has been already discussed above for atorvastatin and rosuvastatin and, hence, the same reasoning can be applied in this particular instance.

Rosiglitazone is an amphoteric compound which shows two close pK_a values: 6.26, which corresponds to the deprotonation of a pyridinium group and 6.67, which stands for the deprotonation of a neutral imide. The neutral form of rosiglitazone exists between these two pK_a values. In water, the ΔpK_a is 0.41 and, hence, only 0.44 of neutral form can be found at pH 6.45. Nevertheless, in a mobile phase containing 50% of MeCN, the first pK_a is 5.41 and the second one is 7.36, according to the retention factor vs. pH curve of rosiglitazone shown in Fig. 3c. The ΔpK_a is 1.95 and the fraction of neutral form is approximately 0.8 at pH 6.44. As the fraction of neutral form is high enough and the retention of the charged species very low, the $\log P_{o/w}$ can be determined with acceptable precision taking advantage of the pK_a variation of the solute with the addition of acetonitrile to the mobile phase.

Mebendazole is another amphoteric compound with two pK_a values, 3.20 and 9.64 [28], where the former corresponds to the deprotonation of the benzimidazolium moiety and the later to the deprotonation of the benzimidazole group. The NH acidity corresponds to the benzimidazole group instead of the carbamate NH group as confirmed through replacement of the active hydrogen by a suitable functionality using strong bases, such as sodium hydride [31,32]. Between the two pK_a values only the neutral form exists. This can be observed in the species diagram in Fig. 3d, being the pK_a values in the mobile phase 2.53 and 10.82. The $\log P_{o/w}$

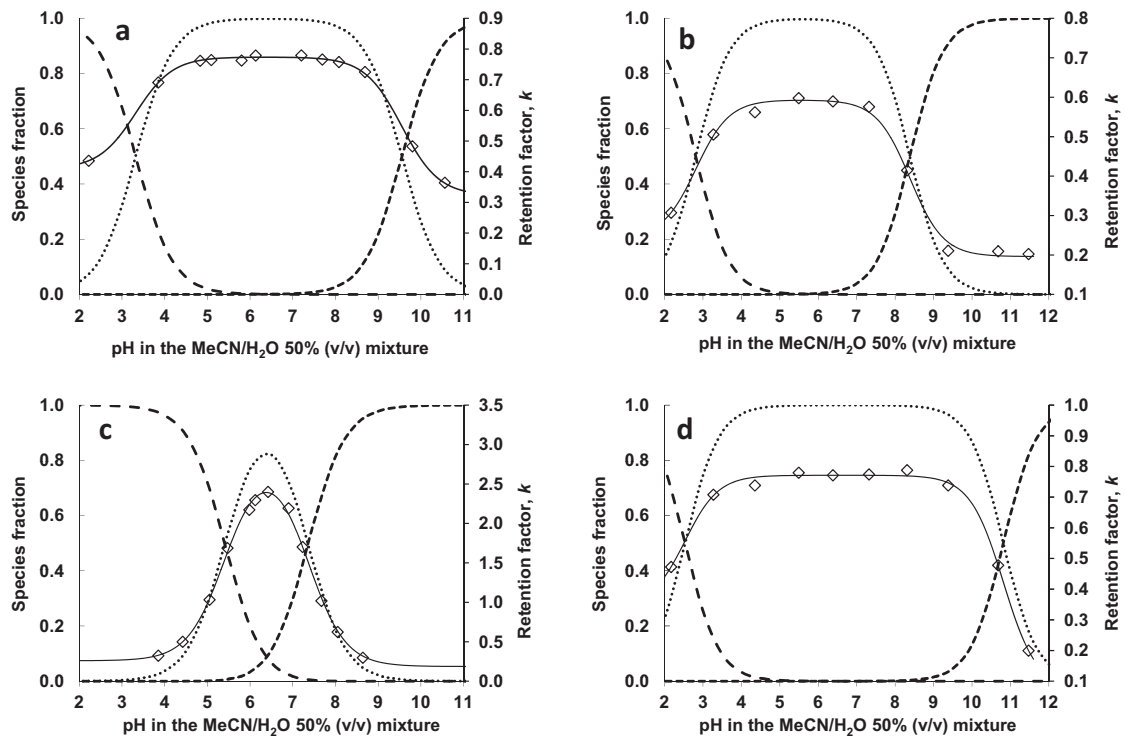


Fig. 3. Diagram of species and retention factor (k) vs. pH for the amphoteric drugs: (a) omeprazole, (b) pantoprazole, (c) rosiglitazone and (d) mebendazole. Legend: (---) positive species, (····) neutral species, (----) negative species, (—) adjusted retention factor and (◇) experimental points.

is obtained from the retention factor measured at any pH in the interval between the two pK_a values, and agrees with the literature value, 2.83.

3.3.4. Global correlation

In Fig. 4 the correlation between the chromatographic $\log P_{o/w}$ and the reference $\log P_{o/w}$ for the drugs studied in this work, and those from Ref. [18] is illustrated. For this correlation, chromatographic $\log P_{o/w}$ from Ref. [18] were those obtained from Phenomenex Gemini NX and Luna C₁₈ (2) and working with a mobile phase containing 50% (v/v) of acetonitrile. The reference $\log P_{o/w}$ values were those from the literature for the compounds

which have them available, whereas for the rest of the compounds the reference values were the potentiometric $\log P_{o/w}$ determined in this work. Eq. (5) is obtained from the correlation illustrated in Fig. 4:

$$\log P_{o/w}(\text{chrom.}) = 0.97(\pm 0.03) \log P_{o/w}(\text{ref.}) - 0.01(\pm 0.09) \quad (5)$$

$n = 66, R^2 = 0.95, SD = 0.40, F = 1250$

The slope of this correlation is very close to 1 and the intercept to 0. Hence, it can be assumed that the chromatographic method provides $\log P_{o/w}$ values which are equal to those given in the literature or determined experimentally by potentiometry, with a

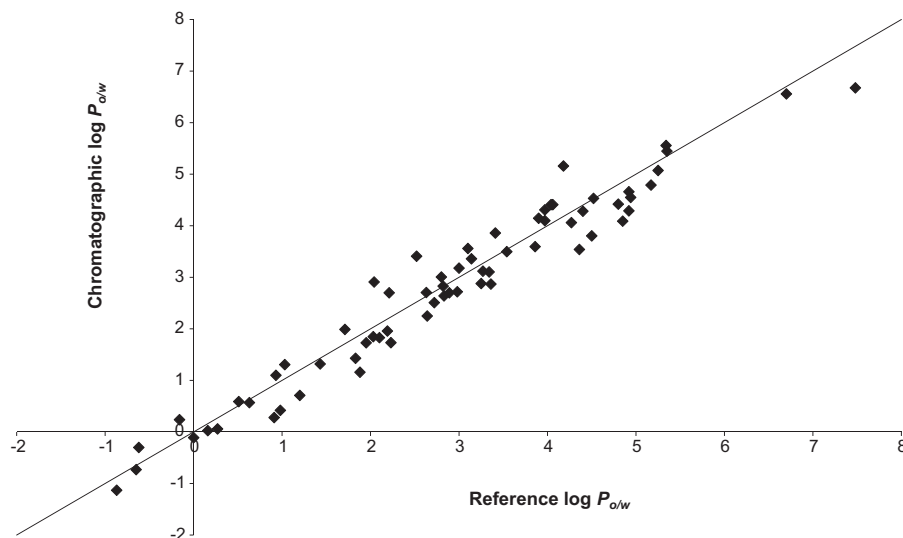


Fig. 4. Plot of chromatographic $\log P_{o/w}$ vs. reference $\log P_{o/w}$ values for the drugs involved in this work and those from Refs. [17,18].

precision of 0.4 logarithmic units, given as the standard deviation of the correlation. It must be pointed out that, despite the differences between the molecular descriptors of the original set and those from the drugs studied here, Eq. (4) is robust enough to determine the lipophilicity of these drugs with good accuracy and precision. It can be noticed that the range of $\log P_{o/w}$ values in which the method is valid is really wide, from -1 to 7 .

4. Conclusions

A set of 33 pharmaceuticals was studied to evaluate the performance of a previously reported chromatographic method for determining the $\log P_{o/w}$ values of complex drugs. The suitability of UHPLC technique for $\log P_{o/w}$ determination was evaluated by comparison with $\log P_{o/w}$ values determined from classic HPLC, proving that there is no significant difference between the two techniques as far as the columns used have the same chemistry (C_{18}) and the differences come from the particle type and size and the length of the column. The method is valid in a wide range of lipophilicity, that is to say, $\log P_{o/w}$ values from -1 to 7 .

When amphoteric compounds are studied, the change of the pK_a and pH values in the mobile phases containing acetonitrile has to be taken into account, because they determine the ratios of neutral and ionized forms and, hence, the measured retention. This means that a previous knowledge of the pK_a and pH variations in the buffered mobile phases is required in order to have accurate $\log P_{o/w}$ values.

In addition, the similarity between the original set of substances and the drugs studied here has been evaluated by comparison of the descriptors values of each set. Despite the fact that there are significant differences between the HDCA-2 descriptors of both sets of substances, the determination of the $\log P_{o/w}$ by means of the chromatographic method provides values that agree with those experimental ones found in the literature as well as $\log P_{o/w}$ values determined by potentiometric measurements, with the exception of those compounds with show very high values for HDCA-2 descriptor (>1.4). It must be pointed out that the geometrical optimization is essential in order to calculate accurate molecular descriptors values, mainly when the substances are really flexible and multiple conformations can be found.

Acknowledgements

The authors thank the Ministerio de Ciencia e Innovación of the Spanish Government and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) of the European Union (Project CTQ2010-19217/BQU) for financial support. JMP also thanks the Ministerio de Ciencia e Innovación for a FPI grant supported by the Project CTQ2007-61623/BQU. The authors also acknowledge the assistance of Joan A. Morató who has measured most of the potentiometric values reported here.

References

- [1] B. Testa, H. Van de Waterbeemd, G. Folkers, R. Guy (Eds.), *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2001.
- [2] EPA Product Properties Test Guidelines, OPPTS 830.7550, Partition Coefficient (n-octanol/water), Shake Flask Method, 1996.
- [3] A. Avdeef, *Quant. Struct. Act. Rel.* 11 (1992) 510.
- [4] A. Avdeef, *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 183.
- [5] R. Mannhold, G.I. Poda, C. Ostermann, I.V. Tetko, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 861.
- [6] C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 31 (2008) 79.
- [7] D. Benhaim, E. Grushka, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 111.
- [8] X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, H. Chuman, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 51.
- [9] X. Liu, H. Hefesha, H. Tanaka, G. Scriba, A. Fahr, *Chem. Pharm. Bull.* 56 (2008) 1417.
- [10] A. Guillot, Y. Henchoz, C. Moccand, D. Guillarme, J.-L. Veuthey, P.-A. Carrupt, S. Martel, *Chem. Biodivers.* 6 (2009) 1828.
- [11] Y. Henchoz, D. Guillarme, S. Martel, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, P.-A. Carrupt, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1919.
- [12] R. Kalisz, P. Haber, T. Baczek, D. Siluk, K. Valkó, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 117.
- [13] R. Kalisz, *Chem. Rev.* 107 (2007) 3212.
- [14] K. Valkó, C. Bevan, D. Reynolds, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2022.
- [15] M. Rosés, E. Bosch, C. Ràfols, E. Fuguet, *Adv. Chromatogr.* 50 (2012) 377.
- [16] K. Valkó, C. My Du, C. Bevan, D.P. Reynolds, M.H. Abraham, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 1137.
- [17] J.M. Pallicer, S. Pous-Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3026.
- [18] J.M. Pallicer, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6356.
- [19] F. Lombardo, M.Y. Shalaeva, K.A. Tupper, F. Gao, M.H. Abraham, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 2922.
- [20] L. Ayouni, G. Cazorla, D. Chaillou, B. Herbreteau, S. Rudaz, P. Lantéri, P.-A. Carrupt, *Chromatographia* 62 (2005) 251.
- [21] M. Rosés, E. Bosch, *Anal. Chim. Acta* 274 (1993) 147.
- [22] E. Bosch, P. Bou, M. Rosés, *Anal. Chim. Acta* 299 (1994) 219.
- [23] E. Lázaro, C. Ràfols, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 163.
- [24] P. Izquierdo, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 96.
- [25] E. Lázaro, P. Izquierdo, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5214.
- [26] R. Bosque, J. Sales, E. Bosch, M. Rosés, M.C. García-Alvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (2003) 1240.
- [27] C. Ràfols, E. Bosch, R. Ruiz, K.J. Box, M. Reis, C. Ventura, S. Santos, M.E. Araújo, F. Martins, *J. Chem. Eng. Data* 57 (2012) 330.
- [28] X. Subirats, M. Rosés, E. Bosch, *Sep. Purif. Rev.* 36 (2007) 231.
- [29] BioLoom online database: <http://www.davidhoekman.com/bio-loom/bin/details>.
- [30] M. Shalaeva, J. Kenseth, F. Lombardo, A. Bastin, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2581.
- [31] C. Chassaing, M. Berger, A. Heckerth, T. Ilg, M. Jaeger, C. Kern, K. Schmid, M. Uphoff, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 1111.
- [32] K. Rathore, U. Ameta, S. Ojha, R. Sharma, G.L. Talesara, E.-J. Chem. 4 (2007) 166.
- [33] R.D. Schoenwald, H. Huang, *J. Pharm. Sci.* 72 (1983) 1266.
- [34] H.N. Joshi, M.G. Fakes, A.T.M. Serajuddin, *Pharm. Pharmacol. Commun.* 5 (1999) 269.
- [35] M. Henczi, J. Nagy, D.F. Weaver, *J. Pharm. Pharmacol.* 47 (1995) 345.
- [36] S. Anderson, C. Hansch, *Private Communication*.
- [37] R. O'Connor, J.F. O'Sullivan, R. O'Kennedy, *Drug Metab. Rev.* 27 (1995) 591.
- [38] K. Belsner, M. Pfeifer, B. Wilffert, *J. Chromatogr. A* 629 (1993) 123.
- [39] M.I. La Rotonda, G. Amato, F. Barbato, C. Silipo, A. Vittoria, *Quant. Struct. Act. Rel.* 2 (1983) 168.
- [40] K. Balon, B.U. Riebesehl, B.W. Müller, *Pharm. Res.* 16 (1999) 882.
- [41] T. Hatanaka, M. Inuma, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990) 3452.
- [42] H. Wan, M. Åhman, A.G. Holmen, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 1693.
- [43] A.M. ter Laak, R.S. Tsai, G.M. Donné-Op den Kelder, P.-A. Carrupt, B. Testa, H. Timmerman, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2 (1994) 373.
- [44] L.S. Nielsen, H. Slök, H. Bundgaard, *Int. J. Pharm.* 102 (1994) 231.
- [45] M. Bauer, C. Megret, A. Lamure, C. Lacabanne, M. Fauran-Clavel, *J. Pharm. Sci.* 79 (1990) 897.
- [46] C.N. Manners, D.W. Payling, D.A. Smith, *Xenobiotica* 19 (1989) 1387.
- [47] T. Degim, V. Zaimoglu, C. Akay, Z. Degim, *Il Farmaco* 56 (2001) 659.
- [48] D.A. Griffith, J.R. Hadcock, S.C. Black, P.A. Iredale, P.A. Carpino, P. DaSilva-Jardine, et al., *J. Med. Chem.* 52 (2009) 234.
- [49] R. Thai, P.-A. Carrupt, B. Testa, G. Gruenewald, A. Casy, *J. Chem. Res.* 8 (1993) 298.
- [50] B. Faller, H.P. Grimm, F. Loeuillet-Ritzler, S. Arnold, X. Briand, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 2571.
- [51] H. Wan, M. Rehngren, F. Giordanetto, F. Bergstroem, A. Tunek, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 4606.

Article IV

**The contribution of hydrogen bond acidity
on the lipophilicity of drugs estimated from
chromatographic measurements**

**Juan M. Pallicer, Rosalia Pascual, Adriana Port,
Martí Rosés, Clara Ràfols, Elisabeth Bosch
enviat per a la seva publicació a Eur. J. Pharm. Sci.**

Manuscript Number:

Title: The contribution of the hydrogen bond acidity on the lipophilicity of drugs estimated from chromatographic measurements

Article Type: Full Length Article

Keywords: Lipophilicity; Drugs; log Po/w; UHPLC; Solvation parameter model; Hydrogen bond donor descriptors.

Corresponding Author: Professor Elisabeth Bosch, PhD

Corresponding Author's Institution: Universitat de Barcelona

First Author: Juan M Pallicer

Order of Authors: Juan M Pallicer; Rosalia Pascual, PhD; Adriana Port, PhD; Martí Rosés, PhD; Clara Ràfols, PhD; Elisabeth Bosch, PhD

Manuscript Region of Origin: SPAIN

Abstract: The influence of the hydrogen bond acidity when the 1-octanol/water partition coefficient ($\log P_{o/w}$) of drugs is determined from chromatographic measurements was studied in this work. This influence was firstly evaluated by means of the comparison between the Abraham solvation parameter model when it is applied to express the 1-octanol/water partitioning and the chromatographic retention, expressed as the solute polarity p .

Then, several hydrogen bond acidity descriptors were compared in order to determine properly the $\log P_{o/w}$ of drugs. These descriptors were obtained from different software and comprise two-dimensional parameters such as the calculated Abraham hydrogen bond acidity A and three-dimensional descriptors like HDCA-2 from CODESSA program or WO1 and DRDODO descriptors calculated from Volsurf+ software. The additional HOMO-LUMO polarizability descriptor should be added when the three-dimensional descriptors are used to complement the chromatographic retention.

The models generated using these descriptors were compared studying the correlations between the determined $\log P_{o/w}$ values and the reference ones. The comparison showed that there was no significant difference between the tested models and any of them was able to determine the $\log P_{o/w}$ of drugs from a single chromatographic measurement and the correspondent molecular descriptors terms. However, the model that involved the calculated A descriptor was simpler and it is thus recommended for practical uses.

1 ***The contribution of the hydrogen bond acidity on the***
2 ***lipophilicity of drugs estimated from chromatographic***
3 ***measurements***

4 *Juan M. Pallicer¹, Rosalia Pascua², Adriana Port², Martí Rosés¹, Clara Ràfols¹*
5 *and Elisabeth Bosch¹*

6 ¹ *Departament de Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de*
7 *Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain*

8 ² *ESTEVE, Av. Mare de Déu de Montserrat, 221, 08041 Barcelona (Spain).*

9 *Correspondence to:

10 Elisabeth Bosch

11 Departament de Química Analítica

12 Universitat de Barcelona

13 Martí i Franquès 1-11

14 E-08028 Barcelona (Spain)

15 Tel.: +34 93 402 12 84

16 Fax: +34 93 402 12 33

17 E-mail: e.bosch@ub.edu

18 **ABSTRACT**

19 The influence of the hydrogen bond acidity when the 1-octanol/water partition
20 coefficient ($\log P_{o/w}$) of drugs is determined from chromatographic measurements was
21 studied in this work. This influence was firstly evaluated by means of the comparison
22 between the Abraham solvation parameter model when it is applied to express the 1-
23 octanol/water partitioning and the chromatographic retention, expressed as the solute
24 polarity p .

25 Then, several hydrogen bond acidity descriptors were compared in order to determine
26 properly the $\log P_{o/w}$ of drugs. These descriptors were obtained from different software
27 and comprise two-dimensional parameters such as the calculated Abraham hydrogen
28 bond acidity A and three-dimensional descriptors like HDCA-2 from CODESSA
29 program or WO1 and DRDODO descriptors calculated from Volsurf+ software. The
30 additional HOMO-LUMO polarizability descriptor should be added when the three-
31 dimensional descriptors are used to complement the chromatographic retention.

32 The models generated using these descriptors were compared studying the
33 correlations between the determined $\log P_{o/w}$ values and the reference ones. The
34 comparison showed that there was no significant difference between the tested models
35 and any of them was able to determine the $\log P_{o/w}$ of drugs from a single
36 chromatographic measurement and the correspondent molecular descriptors terms.
37 However, the model that involved the calculated A descriptor was simpler and it is thus
38 recommended for practical uses.

39 **KEYWORDS**

40 Lipophilicity; Drugs; $\log P_{o/w}$; UHPLC; Solvation parameter model; Hydrogen bond
41 donor descriptors.

42 1. INTRODUCTION

43 The evaluation of the lipophilicity of drug candidates, expressed as the logarithm of the
44 1-octanol/water partition coefficient ($\log P_{o/w}$), is of main interest for the pharmaceutical
45 industry, due to the role of the lipophilicity in the *in vivo* activity of drugs and, hence, in
46 their *ADMET* (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicology) properties
47 (Testa et al., 2006; Van de Waterbeemd, 2003). The $\log P_{o/w}$ is the major descriptor in
48 many QSAR/QSPR equations for estimating pharmacokinetic and pharmacodynamic
49 parameters of drugs such as toxicity, solubility and others. It is considered part of
50 Lipinski's rule of five, an approach for the evaluation of potential drug candidates
51 (Lipinski et al., 1997).

52 The reference method to determine the $\log P_{o/w}$ is the *shake-flask* procedure (EPA,
53 1996), but it has several drawbacks: it is tedious, high amounts of pure sample are
54 required and it is only applicable in a moderate range of $\log P_{o/w}$ values. The
55 potentiometric method (Avdeef, 1992; Avdeef, 1993) is a good alternative, but only for
56 acidic and basic compounds. It demands a significant amount of pure compound and
57 the range of $\log P_{o/w}$ values that can be measured is also limited (Ràfols et al., 2012).

58 The methods to determine the $\log P_{o/w}$ of drugs from RP-LC measurements overcome
59 some of these disadvantages. HPLC or UHPLC are high-throughput techniques which
60 have low sample consumption, broad applicability range, good accuracy and they are
61 insensitive to impurities and degradation products since they are separation
62 techniques. Chromatographic methods are generally based on the relationship
63 between retention or migration factors in LC and CE, respectively, and the lipophilicity
64 of the compounds (Benhaim and Gruska, 2008; Henchoz et al., 2009; Henchoz et al.,
65 2010; Kaliszan et al., 2002; Kaliszan, 2007; Liu et al., 2008). Usually, these methods
66 are based on the correlations build from retention measurements and the lipophilicity
67 values for a set of standards. Then, the quality of the values obtained for new

68 compounds depends on the goodness of the calibration line and, very often, they
69 provide good results when standards and samples belong to similar chemical families
70 but just fair results if structurally diverse compounds are studied.

71 Many reliable chromatographic methods for lipophilicity determination lead to the
72 polarity parameter ($p_{reference}$) (Pallicer et al., 2010; Pallicer et al., 2011; Pallicer et al.,
73 2012) or to the chromatographic hydrophobicity index (CHI) (Rosés et al., 2012; Valkó
74 et al., 1997; Valkó et al., 2001; Valkó, 2004) of the drug. The correlations of any of
75 these parameters with the actual $\log P_{o/w}$ for test sets including a wide variety of drugs
76 are fair, but they become highly improved if parameters accounting for structural
77 information are included in the final models (Fikri et al., 2011; Pallicer et al., 2010;
78 Pallicer et al., 2011; Pallicer et al., 2012; Valko et al., 2001). In consequence, in this
79 study the Abraham's solvation model has been selected to investigate the contribution
80 of some relevant molecular properties on both $\log P_{o/w}$ and chromatographic retention
81 descriptors.

82 **1.1. The solvation parameter model**

83 Abraham developed the solvation parameter model, based on linear free energy
84 relationships (LFERs), which assume that the free energy change associated with the
85 solute-solvent property of study is linearly related to solute and solvent descriptors
86 (Abraham, 1993). The solvation parameter model is based on the following equation:

$$87 \quad \log SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1)$$

88 where SP is the solute property in a given system, for instance, the 1-octanol/water
89 partitioning or the retention factor in LC. The E , S , A , B , and V are the solute
90 descriptors. E stands for the excess molar refraction, S the solute
91 dipolarity/polarizability, A and B are the effective hydrogen bond acidity and hydrogen
92 bond basicity of the solute, respectively, and V is the McGowan solute volume. It has to
93 be pointed out that Eq. (1) is only applicable to neutral compounds. The coefficients of

94 the equation are characteristic of the system and reflect their complementary properties
95 to the corresponding solute property. For any system, the coefficients of the correlation
96 equation can be obtained by multiple linear regression analysis between the log SP
97 values measured for a selected group of solutes and their descriptor values.

98 1.1.1. 1-octanol/water partitioning and reversed phase chromatographic retention

99 The solvation parameter model was applied to the 1-octanol/water partitioning system
100 (Abraham et al., 1994) and the following relationship was obtained:

$$101 \log P_{o/w} = 0.09 + 0.56E - 1.05S + 0.03A - 3.46B + 3.81V \quad (2)$$

$n = 613, R^2 = 0.99, SD = 0.12, F = 23161$

102 This correlation shows that all the descriptors are relevant in the 1-octanol/water
103 partitioning with the exception of the hydrogen bond acidity of the solute. This fact was
104 also observed in the correlation obtained by Torres-Lapasió and coworkers (Torres-
105 Lapasió et al., 2004), derived from a smaller set of substances:

$$106 \log P_{o/w} = 0.19 + 0.53E - 1.02S - 0.01A - 3.51B + 3.74V \quad (3)$$

$n = 146, R^2 = 0.99, SD = 0.10, F = 12200$

107 The analysis of the retention factor in RP-LC ($\log k$), by means of the solvation
108 parameter model reveals that all the descriptors are also relevant in chromatographic
109 retention, particularly, the hydrogen bond acidity of the solutes (Abraham and Rosés,
110 1994). Thus, the $\log P_{o/w}$ and the $\log k$ will show a linear relationship only when the H-
111 bond acidity of the solute is negligible.

112 1.1.2. $p_{reference}$ and CHI lipophilicity parameters

113 To express the chromatographic retention, a reported polarity model (Rosés and Bosch
114 1993; Bosch et al., 1994) which relates the retention in RP-LC with solute (p), mobile
115 phase (P_m^N) and stationary phase (P_s^N) polarity parameters was proposed (Eq. (4)):

$$116 \quad \log k = (\log k)_0 + \rho(P_m^N - P_s^N) \quad (4)$$

117 $(\log k)_0$, which is the intercept of the correlation, and P_s^N values are characteristic of the
 118 chromatographic system and they are previously determined by calibration with 12
 119 standards (Izquierdo et al., 2006; Lázaro et al., 2005; Lázaro, 2009). P_m^N is obtained
 120 from the organic solvent volume fraction in the mobile phase (φ). When acetonitrile is
 121 used, P_m^N is calculated from Eq. (5):

$$122 \quad P_m^N = 1.00 - \frac{2.13\varphi}{1 + 1.42\varphi} \quad (5)$$

123 The polarity of the solutes ($\rho_{working}$) is converted into the reference system ($\rho_{reference}$),
 124 which consists in a Waters Spherisorb ODS-2 column and acetonitrile as organic
 125 modifier, by means of Eq. (6):

$$126 \quad \rho_{working} = a\rho_{reference} + b \quad (6)$$

127 where a and b are the slope and the intercept of the correlation, respectively. The
 128 existence of a reference system allows working with any chromatographic system in
 129 HPLC or UHPLC to obtain comparable retention data, expressed by the polarity of the
 130 solute, $\rho_{reference}$. Since $\rho_{reference}$ is a retention parameter, it can be analyzed in terms of
 131 the solvation parameter model. Then, the following correlation (Torres-Lapasió et al.,
 132 2004) was obtained from the same set of compounds used to establish Eq. (3):

$$133 \quad \rho_{reference} = 2.29 + 0.58E - 1.24S - 1.33A - 3.09B + 3.33V \quad (7)$$

n = 146, R² = 0.99, SD = 0.17, F = 6620

134 A glance at both equations shows that all coefficients are slightly different with the
 135 exception of the hydrogen bond acidity of the solute, which differs significantly. Thus,
 136 the hydrogen bond acidity very much affects the $\rho_{reference}$, but it does not have a
 137 significant influence on the 1-octano/water partitioning. This fact suggests that the
 138 hydrogen bond acidity of the solutes has to be taken into account when estimating the

139 lipophilicity from chromatographic measurements. A correlation between the polarity of
140 the solute and the $\log P_{o/w}$ plus the Abraham descriptors is indicated in Eq. (8) (Bosque
141 et al., 2003). This relationship also indicates the relevance of the hydrogen bond acidity
142 when both partitioning systems are compared, although the dipolarity/polarizability is
143 also a solute property to be considered.

$$144 \quad P_{reference} = 0.92 \log P_{o/w} - 1.44A - 0.37S + 2.19 \quad (8)$$

145 $n = 225, R^2 = 0.99, SD = 0.25, F = 2002$

145 CHI is a lipophilicity parameter which is derived from the measurement of gradient
146 retention time of any analyte in a system previously calibrated with ten standards. The
147 CHI value of the sample is interpolated from the calibration curve (Valkó et al., 1997).
148 The correlation between the CHI and $\log P_{o/w}$ was significantly improved with the
149 addition of the hydrogen bond acidity of the solute A , as shown in Eq. (9) (Valkó et al.,
150 2001):

$$151 \quad \log P_{o/w} = 0.054CHI_{MeCN} + 1.32A - 1.88 \quad (9)$$

152 $n = 86, R^2 = 0.97, SD = 0.29, F = 655$

152 The correlation is quite good and the authors point out that there is no need to add
153 other descriptors since the hydrogen bond acidity term is the only which shows
154 significant difference with the 1-octanol/water partition system.

155 **1.2. Hydrogen bond acidity descriptors**

156 Any application of the general solvation equation depends on the availability of the
157 solute descriptors. As explained, the V and E descriptors can be easily calculated, but
158 the S , A and B descriptors have to be determined experimentally. This is a serious
159 limitation for the applicability of the solvation parameter model in high-throughput
160 applications involving new compounds.

161 Since the use of accurate H-bond acidity descriptors, such as the *A* descriptor, seems
162 to be compulsory to complement the chromatographic retention in order to obtain
163 accurate $\log P_{o/w}$ values, two procedures to estimate the values of *A* have been
164 considered. Thus, Platts and coworkers (Platts et al., 1999) proposed a group
165 contribution approach to estimate the molecular descriptors involved in Eq. (1). This
166 approach is based on fragmental contributions which are conveniently combined in
167 order to obtain the molecular descriptor for the whole molecule. A set of 81 atom and
168 group fragments with the subsequent *E*, *S* and *B* values is used to predict these
169 descriptors for a whole molecule and an alternative set of 51 fragments has to be used
170 in order to obtain accurate predictions for the *A* descriptor, due to the particular
171 complexity in the estimation of the H-bond acidity. Despite of that, the calculated *A*
172 values show worse correlation with the experimental ones in comparison to the other
173 considered molecular descriptors (*E*, *S* and *B*). This procedure to estimate the
174 Abraham descriptors was applied to the calculation of partition coefficients (Platts et al.,
175 2000) such as 1-octanol/water, chloroform/water or cyclohexane/water and it is
176 nowadays available in the ACD/ADME Suite from ACD/Labs.

177 Another methodology for estimating the Abraham solute parameters was proposed by
178 Jover *et al.* (Jover et al., 2004). A quantitative structure-property relationship (QSPR) is
179 reported for estimating the *E*, *S*, *A* and *B* parameters from descriptors calculated solely
180 from the molecular structure of the solutes by means of CODESSA software. In this
181 instance, the generation of CODESSA descriptors is based on the 3D structure of the
182 compound, that is to say, different values of *A* descriptor could be obtained if different
183 conformations or stereoisomers are considered. Furthermore, the calculated *A* values
184 computed using this procedure also show worse correlations with the respective
185 experimental values with regard to other analyzed descriptors (*E*, *S* and *B*). Thus, the
186 calculated *A* values from the fragmental approach proposed by Platts have been used
187 in this work since they are obtained in an easier way from the appropriate software.

188 At this point it should be pointed out that in previous works (Pallicer et al., 2010;
189 Pallicer et al., 2011; Pallicer et al., 2012) the descriptors provided by CODESSA
190 software have been used to complement the chromatographic measurements to obtain
191 the log $P_{o/w}$ of drugs. Among the selected descriptors, the most relevant was the
192 hydrogen bond acidity, HDCA-2. It belongs to the charged partial surface area (CPSA)
193 descriptors, and it is defined as the area-weighted surface charge of any hydrogen
194 bonding donor atom in the molecule with a positive partial charge.

195 Another group of descriptors is contained in the Volsurf+ software, which creates 128
196 descriptors from 3D Molecular Interaction Fields (MIFs) (Cruciani et al., 2000). The
197 descriptors which express the hydrogen bond donor abilities of the solutes are the H-
198 bond donor volumes (WO1-WO6), which may be defined as the molecular envelope
199 generating attractive H-donor interactions. Volsurf computes hydrogen acidity
200 descriptors adapted to the usual energy range of these interactions (-1 to -6 kcal·mol⁻¹).
201 Besides this family of descriptors, Volsurf+ provides pharmacophoric descriptors
202 also related with the hydrogen bond capacity of the solutes, which are based on the
203 triplets of pharmacophoric points descriptors. The atoms of a given structure are
204 classified as Dry, H-bond donor and H-bond acceptor and all possible triplets of
205 distances between the atoms are generated. Dry describes a space on the surface of
206 the molecule at which hydrophobic atoms may interact with hydrophobic atoms of
207 another molecule, while H-bond donor and H-bond acceptor contain the points in the
208 molecule which show the respective interaction features. The derived descriptors are
209 the maximum area of the triangles derived from every class of triplets, that is to say, all
210 the possible combinations between Dry (DR), H-bond donor (DO) and H-bond acceptor
211 (AC) descriptor triplets. Any descriptor which contains at least one hydrogen bond
212 donor point can be considered as an H-bond descriptor of the molecule.

213 Therefore, since the 1-octanol/water partitioning is properly predicted from
214 chromatographic measurements when at least an hydrogen bond donor descriptor is

215 added to the correlation, several approaches to express the hydrogen bond acidity of
216 the solutes are evaluated by means of the comparison of the log $P_{o/w}$ values obtained
217 for a wide variety of drugs with the reference ones. The difference between the 2D
218 (ACD/ADME) and the 3D (CODESSA and Volsurf+) descriptors is studied. Three
219 dimensional structures involve the generation of stereoisomers if the compound shows
220 stereocenters, that is to say, for each 2D structure different 3D structures are
221 generated. Furthermore, prior to the calculation of the three-dimensional descriptors, a
222 geometrical optimization is required and thus different conformations generated. Both
223 effects are also studied.

224 The final purpose of this work is to propose a chromatographic and simple procedure to
225 evaluate the lipophilicity of any kind of molecule in a convenient high-throughput way.

226 **2. EXPERIMENTAL**

227 **2.1. Chromatographic measurements**

228 *2.1.1. Apparatus and columns*

229 Chromatographic measurements were performed with a Shimadzu Nexera UHPLC
230 system, which was equipped with two LC-30AD high-pressure pumps, a DGU-20A₅
231 online degasser, a SIL-30AC autosampler, a SPD-M20A diode array detector and a
232 CBM-20Alite controller. Retention data were obtained from a Waters (Milford, MA,
233 USA) Acquity BEH C₁₈, 50 x 2.1 mm column.

234 pH measurements were performed with a combined Crison (Alella, Spain) 5014
235 electrode in a Crison GLP22 pH meter. The electrode system was standardized with
236 ordinary aqueous buffers of pH 4.01, 7.00 and 9.21.

237 *2.1.2. Chemicals*

238 Acetonitrile HPLC gradient grade was purchased from Panreac (Barcelona, Spain).
239 Water was purified by the Milli-Q® plus system from Millipore (Billerica, MA, USA) with

240 a resistivity of 18.2 M Ω . The chemicals used for buffer preparation were obtained from
241 Merck (Darmstadt, Germany), Fluka (Steinheim, Germany), Sigma–Aldrich (Steinheim,
242 Germany), Baker (Deventer, Netherlands), Riedel de Haën (Seelze, Germany) and
243 Carlo Erba (Milano, Italy). The drugs were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim,
244 Germany), TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium), Molekula (Dorset, United Kingdom),
245 Huzhou Hengyuan Biochem. (Huzhou, China), Chemos (Regenstauf, Germany),
246 Aesica (Newcastle upon Tyne, United Kingdom), Carbone Scientific (London, United
247 Kingdom) and Apac (Yancheng City, China) in high purity grade.

248 *2.1.3. Chromatographic procedure*

249 Retention data were obtained working with mobile phases containing 50% (v/v) of
250 acetonitrile and aqueous buffers at different pH values. The compounds were grouped
251 according to their pK_a values to select the appropriate buffers to have the neutral form
252 of the solutes. The drugs were solved in methanol, and potassium bromide was used
253 as dead time marker. The injection volume was 1 μ L and the flow rate was 0.5 mL/min.

254 **2.2. Calculation of the descriptors**

255 *2.2.1. Two-dimensional descriptors*

256 The values of the solvation parameter model descriptors were obtained using the
257 ABSOLV software contained in the ACD/ADME Suite 12.0 from ACD/Labs (Toronto,
258 ON, Canada), as well as the experimental values of these descriptors from the
259 ABSOLV database.

260 *2.2.2. Three-dimensional descriptors*

261 The CODESSA descriptors (University of Florida, USA) were calculated according to
262 the following process. First, the geometry of the structures was optimized using
263 MOPAC 6.0 and AuxQSPR programs in order to obtain the global energy minimum.

264 Then, the generated files were used to calculate the numeric values of the descriptors
265 using CODESSA software.

266 To calculate the Volsurf+ descriptors (Molecular Discovery, Pinner, UK), the 3D
267 structures and all the possible conformations were generated using Discovery Studio
268 3.0 (Accelrys, San Diego, CA, USA). The descriptors were calculated using the
269 conformation with minimum energy and the most different conformation, that is to say,
270 the one that showed the biggest root mean square deviation (rmsd) compared to the
271 minimum energy one.

272 **2.3. Models and validation**

273 Multiple linear regressions (MLR) were performed in order to establish the models
274 presented in this work. The data set was randomly split into independent training and
275 test sets. The training set contained 2/3 of the structures (79 structures) and the
276 remaining 1/3 (40 structures) was used as a test set. Then, predictive models were
277 established. The compounds which showed differences between $\log P_{o/w}$ (pred.) and
278 $\log P_{o/w}$ (ref.) higher than twice the standard deviation were considered outliers and
279 thus, they were removed and the models refitted.

280 Then, an internal and external validation, referred to the training and test sets
281 respectively, were performed for each model according to the indicated procedure
282 (Tropsha et al, 2003; Ventura and Martins, 2008). For the internal validation of the
283 training set, the standard deviation of the correlation $\log P_{o/w}$ (pred.) vs. $\log P_{o/w}$ (ref.),
284 the determination coefficient R^2 and the cross-validated correlation coefficient Q^2_{LMO}
285 (leave-many-out) were calculated. For the external validation, the predictive ability of
286 the model was evaluated by means of parameters obtained from the $\log P_{o/w}$ (pred.) vs.
287 $\log P_{o/w}$ (ref.) correlations. Thus, the standard deviation SD , the test set determination
288 coefficient R^2 , the cross-validated correlation coefficient Q^2_{LMO} (leave-many-out), the
289 determination coefficient for the regression that goes to the origin (R^2_0) and the slope of

290 the correlation m were evaluated. Furthermore, the average error AE and the absolute
291 average error AAE were also obtained.

292 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

293 **3.1. Substances studied**

294 The set of substances studied comprises 103 drugs with a wide variety of $\log P_{o/w}$
295 values and functionalities. The $\log P_{o/w}$ of the compounds, their $p_{reference}$ values as well
296 as the hydrogen bond donor and polarity/polarizability descriptors are gathered in
297 Table 1. The reference $\log P_{o/w}$ are experimental values previously determined (Pallicer
298 et al., 2012), the values recommended in BioLoom online database (Biolum) and the
299 “Gold Standard” list selected by Avdeef (Avdeef, 2003).

300 It must be pointed out that for 22 compounds the descriptors from the stereoisomers
301 generated with the 3D structures are also indicated. Although more drugs showed
302 stereoisomery, it was only considered for those compounds whose chromatographic
303 measurements were done from the racemic mixture. Hence, because of this 125
304 structures were considered (103 drugs plus the 22 enantiomers generated).

305 **3.2. Hydrogen bonding donor ability**

306 The Abraham solvation parameter model was applied to the 1-octanol/water
307 partitioning and to the chromatographic retention, expressed as the polarity of the
308 solute $p_{reference}$, using the experimental descriptors which were available for 42 drugs of
309 the set studied. The values of the descriptors are gathered in Table 2. The following
310 correlations were obtained:

$$\begin{aligned} \log P_{o/w} = & 0.39(\pm 0.31) + 0.47(\pm 0.11)E - 1.01(\pm 0.09)S + \\ 311 & -0.00(\pm 0.17)A - 3.46(\pm 0.16)B + 3.71(\pm 0.19)V \end{aligned} \quad (10)$$

$n = 42, R^2 = 0.95, SD = 0.30, F = 137$

$$p_{reference} = 2.04(\pm 0.37) + 0.26(\pm 0.14)E - 0.85(\pm 0.11)S +$$

312 $-0.82(\pm 0.21)A - 3.15(\pm 0.19)B + 3.22(\pm 0.23)V$ (11)

313 $n = 42, R^2 = 0.93, SD = 0.37, F = 90$

313 As expected, the *A* term is negligible in Eq. (10) but it is significant in Eq. (11). It should
314 be also noticed that the coefficients obtained for Eq. (10) agree with those of Eq. (2),
315 which was derived from an impressive number of compounds showing a wide variety of
316 molecular structures. Eq. (10) also agrees with Eq. (3). Beside, Eq. (11) is similar to
317 Eq. (7) although some differences in the coefficients of *E*, *S* and *A* terms are noticed. A
318 glance at Eqs. (10) and (11) show that their statistics are slightly worse than those from
319 Eqs. (3) and (7). This could suggest that the higher molecular complexity of the set of
320 substances used here may affect the coefficients of these equations, especially for
321 $p_{reference}$ which might show a larger dependence at this point.

322 The following procedure is applied to compare both systems (Eqs. (10) and (11)). First,
323 the norm of the coefficient vector is calculated by means of the following equation
324 (Lázaro et al., 2006, Hidalgo-Rodríguez et al, 2010):

$$325 \quad l = \sqrt{e^2 + s^2 + a^2 + b^2 + v^2} \quad (12)$$

326 Then, the coefficients are normalized by dividing them by the norm of the vector, and
327 finally the difference for each coefficient is evaluated by means of the difference
328 between the normalized coefficients. The results obtained by applying this procedure
329 are shown in Table 3. It can be observed that the unique term that shows a significant
330 difference between the two systems is the hydrogen bond acidity *A*, that is to say, it
331 confirms that the hydrogen bond acidity of the solutes must be taken into account in
332 order to have accurate $\log P_{ow}$ values from chromatographic measurements. Hence,
333 several descriptors containing hydrogen bond donor features were tested to
334 complement the chromatographic retention.

335 **3.3. Generation of the QSPR models**

336 The hydrogen bond descriptors considered in this work were used to generate four
337 QSPR models based on multilinear regressions (MLR). The criterion used to detect
338 outliers revealed that six molecules had to be excluded: amiloride, apigenin, and both
339 stereoisomers of bendroflumethiazide and bupivacaine, as the difference between their
340 predicted and reference $\log P_{o/w}$ values were higher than 2 *SD* in all the models. Then,
341 the four models were refitted without those points and the results obtained are detailed
342 in the following sections.

343 The use of 3D descriptors involves some more steps compared to the calculation of 2D
344 descriptors. A geometrical optimization is required and, thus, multiple conformations
345 are generated, corresponding to the global energy minimum and the local minima.
346 Therefore, an exhaustive conformational analysis should be performed in order to find
347 the global energy minimum and then, to calculate the derived descriptors. On the other
348 hand, the existence of stereocenters leads to different 3D structures and thus, different
349 values of the descriptors. The effect of the stereoisomery and the conformation are
350 thus assessed in this section.

351 3.3.1. Abraham hydrogen bond acidity descriptor

352 As explained in the Introduction, the Abraham descriptors provide reliable information
353 of the features of the solute in physicochemical systems such as partitioning systems.
354 However, the number of substances whose experimental Abraham descriptors are
355 available is limited. In this instance, only descriptors for 42 of the 103 drugs studied
356 here are published. Hence, the approach proposed by Platts (Platts et al., 1999; Platts
357 et al., 2000) and contained in the ACD/ADME Suite from ACD/Labs have been used in
358 this work. The model generated using these calculated *A* values for the training set is
359 given in Eq. (13):

$$\begin{aligned} \log P_{o/w} &= 1.06(\pm 0.03) p_{reference} + 0.76(\pm 0.14) A - 1.20(\pm 0.13) \\ n &= 79, R^2 = 0.95, SD = 0.35, F = 658 \end{aligned} \quad (13)$$

361 Eq. (13) is consistent with the equivalent correlation derived from the 42 substances
362 whose experimental A values are available (Eq. (14)):

$$\begin{aligned} \log P_{o/w} &= 1.08(\pm 0.04) p_{reference} + 0.80(\pm 0.17) A - 1.19(\pm 0.18) \\ n &= 42, R^2 = 0.95, SD = 0.28, F = 400 \end{aligned} \quad (14)$$

364 It must be noticed that coefficients for $p_{reference}$ and A terms agree in both equations
365 although both series of A values (experimental and calculated) are only moderately
366 correlated (Platts et al., 1999).

367 3.3.2. CODESSA HDCA-2 descriptor

368 Among the variety of descriptors which CODESSA furnishes to express the hydrogen
369 bond donor ability of the solutes, the HDCA-2 has been selected because it provided
370 successful results in previous work, where a more complete QSPR model was used
371 (Pallicer et al., 2010; Pallicer et al., 2011; Pallicer et al., 2012). Besides the
372 chromatographic $p_{reference}$ parameter, this model involves four molecular descriptors
373 which account for the hydrogen bond acidity (HDCA-2), the polarizability (HOMO-
374 LUMO), the polarity (pol/d^2) and also one descriptor which encodes polar interactions
375 between molecules (DPSA-1), all of them computed by CODESSA software. However,
376 the last two descriptors show a minor statistical relevance (Pallicer et al., 2011). Then,
377 the following correlation is proposed (Eq. (15)) for the training set of substances using
378 the descriptors obtained from the global minimum energy conformation.

$$\begin{aligned} \log P_{o/w} &= 1.06(\pm 0.03) p_{reference} + 0.67(\pm 0.13)(\text{HDCA-2}) \\ &- 0.22(\pm 0.05)(\text{HOMO-LUMO}) + 0.61(\pm 0.53) \\ n &= 79, R^2 = 0.95, SD = 0.33, F = 492 \end{aligned} \quad (15)$$

380 It must be noticed that the addition of the HOMO-LUMO descriptor improves
381 significantly a simpler correlation involving the HDCA-2 descriptor solely. HOMO-
382 LUMO descriptor stands for the molecular polarizability since the electron distribution
383 can be distorted easily if the LUMO energy lies close to the HOMO energy, generating

384 then a large polarizability. Eq. (15) shows statistical parameters similar to those of Eq.
385 (13) and, then, similar predictive ability should be expected.

386 3.3.3. *Volsurf+* descriptors

387 As explained in the Introduction section, *Volsurf+* provides several hydrogen bond
388 acidity-related descriptors. The family of descriptors expressing the hydrogen bond
389 donor volumes (WO1-WO6) was studied. WO1 shows values between 0 and 433,
390 WO2 between 0 and 157 or WO6 among 0 and 1.75. The WO1 descriptor shows a
391 better correlation than the others, whose coefficients loose statistical significance in the
392 generated models. Hence, the WO1 descriptor has been selected for this study. The
393 correlation between the $\log P_{o/w}$, the $p_{reference}$, WO1 and HOMO-LUMO for the training
394 set is the following:

$$\begin{aligned} \log P_{o/w} &= 1.01(\pm 0.03) p_{reference} + 1.75 \cdot 10^{-3} (\pm 4.95 \cdot 10^{-4}) \text{WO1} + \\ 395 &- 0.24(\pm 0.06) (\text{HOMO-LUMO}) + 1.11(\pm 0.54) \end{aligned} \quad (16)$$

$n = 79, R^2 = 0.95, SD = 0.35, F = 427$

396 Another collection of hydrogen bond donor-related descriptors are the 3D
397 pharmacophoric descriptors, which provide three descriptors of interest: DODODO,
398 DRDODO and DRDRDO, where DO stands for a hydrogen bond donor point and DR
399 the Dry point in the molecule, as detailed in the Introduction. The different descriptors
400 were studied, and DRDODO showed a slightly better correlation and it was considered
401 for this study. The correlation obtained with the training set for the $\log P_{o/w}$, the $p_{reference}$,
402 DRDODO and HOMO-LUMO is also given in Eq. (17):

$$\begin{aligned} \log P_{o/w} &= 1.01(\pm 0.03) p_{reference} + 2.73 \cdot 10^{-2} (\pm 5.9 \cdot 10^{-3}) \text{DRDODO} + \\ 403 &- 0.23(\pm 0.05) (\text{HOMO-LUMO}) + 1.11(\pm 0.51) \end{aligned}$$

$n = 79, R^2 = 0.95, SD = 0.34, F = 472$

404 Eqs. (16) and (17) show very similar statistics and also with those of Eqs. (13) and
405 (15). Then, it seems clear that any reliable hydrogen bond descriptor can be

406 successfully used to build a suitable equation to estimate the lipophilicity of drugs. The
407 inclusion of HOMO-LUMO term improves the results when HDCA-2, WO1 or DRDODO
408 are used, but it is not necessary when calculated A stands for the hydrogen bond
409 acidity of the molecule.

410 **3.4. Conformational analysis**

411 The use of Discovery Studio 3.0 to generate the three-dimensional structures used to
412 calculate Volsurf+ descriptors allowed the performance of a conformational analysis
413 where the influence of the conformations in the derived $\log P_{o/w}$ values is assessed.
414 This analysis is based on the generation of minimum conformations of the molecule,
415 that is to say, the determination of the global energy minimum and all the local minima.
416 Then, a structural alignment of the conformations is performed, which determines the
417 minimal rmsd (root mean square difference) between all these conformations
418 generated in the optimization of the molecule from the superposition of their atomic
419 coordinate sets. The rmsd of the two aligned structures indicates the divergence
420 among them. Finally, the values of the Volsurf+ descriptors values were calculated
421 from the global energy minimum conformation and the most different conformation, this
422 is, the conformation which showed the highest rmsd compared to the minimum energy
423 conformation.

424 The descriptors obtained from the selected conformations have been plotted in Fig. 1.
425 For the two H-bond descriptors involved in the conformational analysis, the values for
426 the most different conformation are up to 5% lower than the respective ones from the
427 global minimum energy conformation. This can be observed in Fig. 1 since the slope of
428 the correlations for WO1 and DRDODO is slightly lower than the unity. A glance at the
429 plots shows that the scattering is higher for the DRDODO descriptor, suggesting that
430 this descriptor is more sensitive to the conformation since the position of the
431 pharmacophoric points which form the triplet can be significantly affected by the

432 changes in the conformation. Hence, this may explain the higher dependence of this
433 descriptor on the conformation of the molecule. On the other hand, the values of the
434 HOMO-LUMO descriptor do not show a relevant dependence on the conformation of
435 the molecule as it can be observed in the respective plot in Fig. 1.

436 The highest difference observed between the $\log P_{o/w}$ obtained from both
437 conformations was 0.28, which corresponds to the hesperetin $\log P_{o/w}$ value
438 determined from DRDODO descriptor. In this instance, the values for the descriptor are
439 among the highest, that is to say, the H-bond donor contribution is high enough to
440 produce significant differences in the $\log P_{o/w}$, as previously discussed (Pallicer et al.,
441 2012). For the other compounds, the observed variations in the $\log P_{o/w}$ values were
442 much lower. In fact, these differences in the descriptors from both conformations result
443 in differences in the prediction of the $\log P_{o/w}$ by means of Eqs. (16) and (17) of
444 approximately 0.05 logarithmic units. Thus, the influence of the selected conformation
445 on the $\log P_{o/w}$ is of minor relevance since the values obtained from both conformations
446 are very similar.

447 **3.5. Study of the stereoisomery**

448 It is well known that the stereoisomery of a compound has hardly influence in its
449 lipophilicity. The 3D descriptors, however, may show different values for each
450 enantiomer since its three-dimensional structure is different. Hence, it is interesting to
451 evaluate the influence of the stereoisomery in the determination of the $\log P_{o/w}$ values
452 by means of the equations proposed for each 3D descriptor considered in this work:
453 HDCA-2, WO1, DRDODO and HOMO-LUMO. Then, the 20 drugs whose racemates
454 were used for the experimental determination of the chromatographic retention are
455 analyzed in terms of comparing the descriptor values for the (*R*) and (*S*) isomers. The
456 plots of the descriptor values for the (*S*) isomer against the (*R*) isomer are given in Fig.
457 2. It can be observed that there is a significant correlation between the (*R*) and (*S*)

458 descriptors values in all the cases. For HDCA-2, the values calculated for isomer (S)
459 are systematically slightly lower than those of isomer (R), since the slope of the
460 correlation between both series of values is smaller than the unity. Only warfarin,
461 acebutolol and, perhaps, venlafaxine, showed significantly different values for both
462 stereoisomers. Table 4 gathers the $\log P_{o/w}$ for both stereoisomers calculated from the
463 3D descriptors models and shows their consistency. It can be observed that the
464 diversity in the HDCA-2 descriptor for both stereoisomers of warfarin results in a
465 difference of just 0.2 $\log P_{o/w}$ units and 0.06 and 0.08 for acebutolol and venlafaxine,
466 respectively.

467 The WO1 descriptor shows a better correlation between both series of descriptor
468 values. Alprenolol has different values for (R) and (S) isomers, as it can be observed in
469 Table 1 and Fig. 2, although this difference lead to $\log P_{o/w}$ which differs in 0.1 $\log P_{o/w}$
470 units (Table 4). In the case of DRDODO, more scattering is observed in Fig. 2,
471 probably due to the specific characteristics of the descriptor, which have been
472 discussed in the previous section. For this descriptor, metoprolol and acebutolol show
473 different descriptor values for both stereoisomers, but the differences between the \log
474 $P_{o/w}$ values are 0.18 and 0.06, respectively (Table 4). Finally, the HOMO-LUMO
475 descriptor shows the same correlation between the values for the (R) and (S)
476 stereoisomers. It has to be pointed out that these differences in the descriptors values
477 for each pair of stereoisomers lead to standard deviations in the derived $\log P_{o/w}$ values
478 which are in the range between 0.03 and 0.05, that is to say, the minor relevance of the
479 stereoisomery in the determined $\log P_{o/w}$ values is illustrated.

480 **3.6. Comparison between models**

481 To evaluate the robustness and the predictive ability of each model, the results
482 obtained from the correlation between the predicted and reference $\log P_{o/w}$ values for
483 both training and test sets are given in Table 5. The validation parameters are those

484 indicated in the Section 2.3 and they achieve the statistical criteria for both training and
485 test sets. Hence, it can be assumed that any of the four models is able to provide
486 reliable $\log P_{o/w}$ values from the chromatographic retention and the hydrogen bond
487 acidity of the solutes.

488 It can be noticed that the correlation coefficients and the standard deviations are very
489 similar for all the models. Furthermore, the $\rho_{reference}$ term is almost the same for all
490 correlations (Eqs (13) and (15-17)). This can be attributable to the fact that the
491 chromatographic retention may be able to predict solely the $\log P_{o/w}$ of the substances,
492 because of the direct relationship between retention and $\log P_{o/w}$ when the H-bond
493 acidity of the solute is not relevant. Nevertheless, the H-bond donor descriptors
494 included are statistically significant in all instances and this confirms what was already
495 discussed in the Section 3.2. It has to be pointed out that the models based on 3D
496 descriptors also contain a polarizability descriptor, HOMO-LUMO, which was included
497 because it improved significantly the correlations. However, the model generated from
498 the calculated Abraham's hydrogen bond acidity A does not include the related
499 polarity/polarizability term S because the descriptor did not show statistical relevance in
500 the correlation and it was thus discarded.

501 The standard deviation of the correlations is in the range of 0.32-0.36 $\log P_{o/w}$ units in
502 all instances and it is very similar between both training and test sets for each model
503 but also between the four models. It must be pointed out that the determination of \log
504 $P_{o/w}$ by means of the proposed models provided a wide range of lipophilicity that
505 comprises up to 7 logarithmic units.

506 The three 3D-based models are equivalent between them despite the different ways to
507 estimate the hydrogen bond donor capacity of the molecules. Furthermore, no
508 significant difference is observed when the 2D and 3D models are compared and, thus,
509 the use of the calculated Abraham descriptors for predicting the lipophilicity is

510 recommended. 3D descriptors provide also good correlations but their calculation may
511 be tedious and, in any way, it is much easier to obtain the calculated A simply from the
512 SMILES notation or the name of the compound, that is to say, it is not necessary to
513 perform geometrical optimizations which also have other drawbacks such as the
514 generation of conformers or enantiomers, although both effects do not affect
515 significantly the prediction of the $\log P_{o/w}$.

516 **4. CONCLUSIONS**

517 The determination of the 1-octanol/water partition coefficient of drugs from
518 chromatographic measurements is of great interest because of the advantages that LC
519 provides compared to the classical procedures for determining it. It has been
520 demonstrated that the addition of structural information to the chromatographic
521 retention, especially a hydrogen bond acidity term, improves significantly the estimation
522 of $\log P_{o/w}$ values. This has been shown by means of comparing the two partitioning
523 systems using the Abraham's solvation parameter model.

524 Four models to estimate the $\log P_{o/w}$ from the chromatographic retention, expressed as
525 the polarity of the solute $p_{reference}$, have been proposed in this paper. One is based on
526 the 2D fragment-based method to calculate the Abraham hydrogen bond acidity
527 parameter A . The other three models established are based on 3D descriptors, which
528 are calculated from the three-dimensional structures of the drugs. In this case, the
529 structures should be optimized to obtain a global energy minimum. The generation of
530 3D structures implies the consideration of the stereoisomery if the studied compound
531 has any stereocenter. Furthermore, the effect of the diverse conformations generated
532 is also evaluated. In both cases, their influence is limited because the chromatographic
533 retention is the same for the stereoisomers and conformers and the $p_{reference}$ term has
534 major relevance in all the correlations.

535 All the correlations provide really similar results among them. Thus, the use of the
536 calculated Abraham descriptors is recommended because they are obtained with much
537 more less effort, the conformation or stereochemistry of the drugs is not relevant and
538 the results obtained are equivalent to the other models.

539 **ACKNOWLEDGEMENTS**

540 Financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación of the Spanish
541 Government and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) of the European
542 Union (Project CTQ2010-19217/BQU) is acknowledged. JMP also thanks the Ministerio
543 de Ciencia e Innovación for a FPI grant supported by the Project CTQ2007-
544 61623/BQU. The authors thank Prof. F. Martins from the Universidade de Lisboa for
545 her helpful suggestions and comments.

546 **REFERENCES**

- 547 Abraham, M.H., 1993. Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and
548 application to physicochemical and biochemical processes. *Chem. Soc. Rev.* 22, 73-
549 83.
- 550 Abraham, M.H., Chadha, H.S., Whiting, G.S., Mitchell, R.C., 1994. Hydrogen bonding.
551 32. An analysis of water-octanol and water-alkane partitioning and the $\Delta\log P$
552 parameter of seiler. *J. Pharm. Sci.* 83, 1085-1100.
- 553 Abraham, M.H., Rosés, M., 1994. Hydrogen bonding. 38. Effect of solute structure and
554 mobile phase composition on reversed-phase high-performance liquid chromatographic
555 capacity factors. *J. Phys. Org. Chem.* 7, 672-684.
- 556 Avdeef, A., 2003. Partitioning into Octanol. In: *Absorption and Drug Development*. John
557 Wiley & Sons, Inc., pp. 42-66.
- 558 Avdeef, A., 1993. pH-Metric log P. II. Refinement of partition coefficients and ionization
559 constants of multiprotic substances. *J. Pharm. Sci.* 82, 183-190.
- 560 Avdeef, A., 1992. pH-metric log P. Part 1. Difference plots for determining ion-pair
561 octanol-water partition coefficients of multiprotic substances. *Quant. Struct. Act. Rel.*
562 11, 510-517.

563 Benhaim, D., Grushka, E., 2008. Effect of n-octanol in the mobile phase on lipophilicity
564 determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a
565 modified silica column. *J. Chromatogr. A* 1209, 111-119.

566 Bosch, E., Bou, P., Rosés, M., 1994. Linear description of solute retention in reversed-
567 phase liquid chromatography by a new mobile phase polarity parameter. *Anal. Chim.*
568 *Acta* 299, 219-229.

569 Bosque, R., Sales, J., Bosch, E., Rosés, M., García-Álvarez-Coque, M.C., Torres-
570 Lapasió, J.R., 2003. A QSPR study of the p solute polarity parameter to estimate
571 retention in HPLC. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43, 1240-1247.

572 Cruciani, G., Crivori, P., Carrupt, P.-A., Testa, B., 2000. Molecular fields in quantitative
573 structure-permeation relationships: the VolSurf approach. *J. Mol. Struct.-THEOCHEM*
574 503, 17-30.

575 EPA, 1996. Product Properties Test Guidelines OPPTS 830.7550 Partition Coefficient
576 (n-Octanol/Water), Shake Flask Method.

577 Fikri, K., Debord, J., Bollinger, J., Cledat, D., Penicaut, B., Robert, J.H., 2011. RP-
578 HPLC Lipophilicity Studies for some (hetero)arylamides Derived From 2-Amino-4,6-
579 Dimethylpyridine. Introduction of an Hydrogen Bond Descriptor. *J. Liq. Chromatogr. R.*
580 *T.* 34, 1356-1366.

581 Henchoz, Y., Guillarme, D., Martel, S., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., Carrupt, P.-A., 2009.
582 Fast log P determination by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with UV
583 and mass spectrometry detections. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1919-1930.

584 Henchoz, Y., Romand, S., Schappler, J., Rudaz, S., Veuthey, J., Carrupt, P.-A., 2010.
585 High-throughput log P determination by MEEKC coupled with UV and MS detections.
586 *Electrophoresis* 31, 952-964.

587 Hidalgo-Rodríguez, M., Fuguet, E., Ràfols, C., Rosés, M., 2010. Estimation of
588 biological properties by means of chromatographic systems: Evaluation of the factors
589 that contribute to the variance of biological-chromatographic correlations. *Anal. Chem.*
590 82, 10236-10245.

591 Izquierdo, P., Rosés, M., Bosch, E., 2006. Polarity parameters of the Symmetry C18
592 and Chromolith Performance RP-18 monolithic chromatographic columns. *J.*
593 *Chromatogr. A* 1107, 96-103.

594 Jover, J., Bosque, R., Sales, J., 2004. Determination of Abraham Solute Parameters
595 from Molecular Structure. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 44, 1098-1106.

596 Kaliszan, R., 2007. QSRR: Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention
597 Relationships. Chem. Rev. 107, 3212-3246.

598 Kaliszan, R., Haber, P., Baczek, T., Siluk, D., Valkó, K., 2002. Lipophilicity and pKa
599 estimates from gradient high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A
600 965, 117-127.

601 Lázaro, E., Ràfols, C., Rosés, M., 2005. Characterization of immobilized artificial
602 membrane (IAM) and XTerra columns by means of chromatographic models. J.
603 Chromatogr. A 1081, 163-173.

604 Lázaro, E., Izquierdo, P., Ràfols, C., Rosés, M., Bosch, E. 2009. Prediction of retention
605 in reversed-phase liquid chromatography by means of the polarity parameter model. J.
606 Chromatogr. A 1216, 5214-5227.

607 Lázaro, E., Ràfols, C., Abraham, M.H., Rosés, M., 2006. Chromatographic Estimation
608 of Drug Disposition Properties by Means of Immobilized Artificial Membranes (IAM) and
609 C18 Columns. J. Med. Chem. 49, 4861-4870.

610 Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 1997. Experimental and
611 computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and
612 development settings. Adv. Drug Deliv. Rev. 23, 3-25.

613 Liu, X., Hefesha, H., Tanaka, H., Scriba G., Fahr, A., 2008. Lipophilicity measurement
614 of drugs by reversed phase HPLC over wide pH range using an alkaline-resistant
615 silica-based stationary phase, XBridge shield RP18. Chem. Pharm. Bull. 56, 1417-
616 1422.

617 Pallicer, J.M., Pous-Torres, S., Sales, J., Rosés, M., Ràfols, C., Bosch, E., 2010.
618 Determination of the hydrophobicity of organic compounds measured as $\log P_{o/w}$
619 through a new chromatographic method. J. Chromatogr. A 1217, 3026-3037.

620 Pallicer, J.M., Sales, J., Rosés, M., Ràfols, C., Bosch, E., 2011. Lipophilicity
621 assessment of basic drugs ($\log P_{o/w}$ determination) by a chromatographic method. J.
622 Chromatogr. A 1218, 6356-6368.

623 Pallicer, J.M., Calvet, C., Port, A., Rosés, M., Ràfols, C., Bosch, E., 2012. Critical
624 evaluation of a new chromatographic method to assess the lipophilicity of acidic, basic
625 and amphoteric drugs. J. Chromatogr. A 1240, 113-122.

626 Platts, J.A., Abraham, M.H., Butina, D., Hersey, A., 2000. Estimation of Molecular
627 Linear Free Energy Relationship Descriptors by a Group Contribution Approach. 2.
628 Prediction of Partition Coefficients. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 40, 71-80.

629 Platts, J.A., Butina, D., Abraham, M.H., Hersey, A., 1999. Estimation of Molecular
630 Linear Free Energy Relation Descriptors Using a Group Contribution Approach. *J.*
631 *Chem. Inf. Comput. Sci.* 39, 835-845.

632 Ràfols, C., Bosch, E., Ruiz, R., Box, K.J., Reis, M., Ventura, C., Santos, S., Araújo,
633 M.E., Martins, F., Acidity and Hydrophobicity of Several New Potential Antitubercular
634 Drugs: Isoniazid and Benzimidazole Derivatives. *J. Chem. Eng. Data* 57, 330-338.

635 Rosés, M., Bosch, E., 1993. Linear solvation energy relationships in reversed-phase
636 liquid chromatography. Prediction of retention from a single solvent and a single solute
637 parameter. *Anal. Chim. Acta* 274, 147-162.

638 Rosés, M., Bosch, E., Ràfols, C., Fuguet, E., 2012. Chromatographic Hydrophobicity
639 Index (CHI). *Avd. Chromatogr.* 50, 377-

640 Testa, B., Krämer, S.D., Wunderli-Allenspach, H., Folkers, G., 2006. Pharmacokinetic
641 Profiling in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies.

642 - Álvarez-Coque, M.C., Rosés, M., Bosch, E., Zissimos,
643 A.M., Abraham, M.H., 2004. Analysis of a solute polarity parameter in reversed-phase
644 liquid chromatography on a linear solvation relationship basis. *Anal. Chim. Acta* 515,
645 209-227.

646 Tropsha, A., Gramatica, P., Gombar, V.K., 2003. The importance of being earnest:
647 Validation is the absolute essential for successful application and interpretation of
648 QSPR models. *QSAR Comb. Sci.* 22, 69-77.

649 Valkó, K., 2004. Application of high-performance liquid chromatography based
650 measurements of lipophilicity to model biological distribution. *J. Chromatogr. A* 1037,
651 299-310.

652 Valkó, K., Bevan, C., Reynolds, D., 1997. Chromatographic Hydrophobicity Index by
653 Fast-Gradient RP-HPLC: A High-Throughput Alternative to logP/logD. *Anal. Chem.* 69,
654 2022-2029.

655 Valkó, K., My Du, C., Bevan, C., Reynolds, D.P., Abraham, M.H., 2001. Rapid method
656 for the estimation of octanol/water partition coefficient (log P(oct)) from gradient RP-
657 HPLC retention and a hydrogen bond acidity term ($\zeta_{\alpha(2)}(H)$). *Curr. Med. Chem.*
658 8, 1137-1146.

659 Van de Waterbeemd, H., Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability,
660 Absorption and Bioavailability. [In: *Methods Princ. Med. Chem.*, 2003 18].

661 Ventura, C., Martins, F., 2008. Application of Quantitative Structure–Activity
662 Relationships to the Modeling of Antitubercular Compounds. 1. The Hydrazone Family.
663 J. Med. Chem. 51, 612-624.

664 **FIGURE CAPTIONS**

665 **Figure 1.** Plot of the descriptor values determined from the most different conformation
666 vs. those from the global minimum energy conformation.

667 **Figure 2.** Plot of the descriptor values for the (*S*) isomer vs. those for the (*R*) isomer for
668 the drugs whose stereochemistry has been investigated.

Figure 1

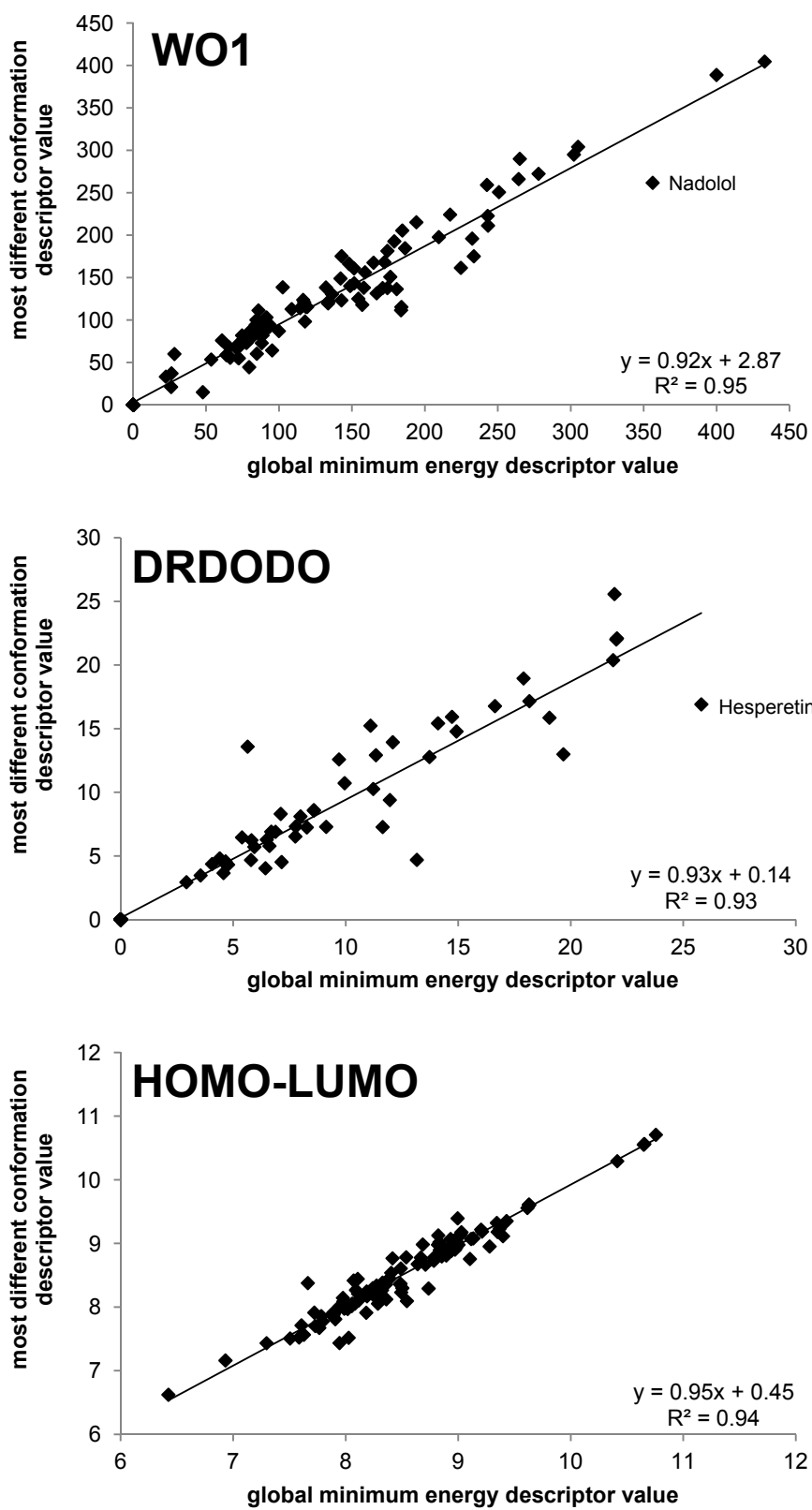


Figure 2

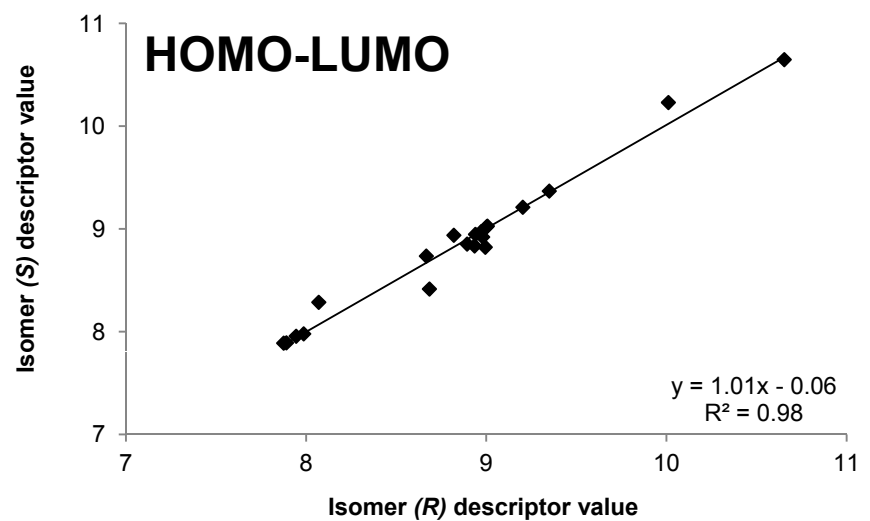
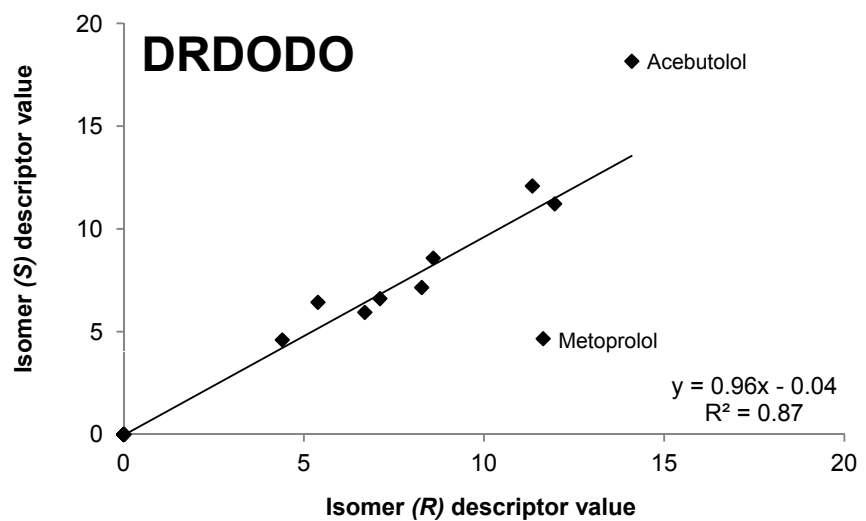
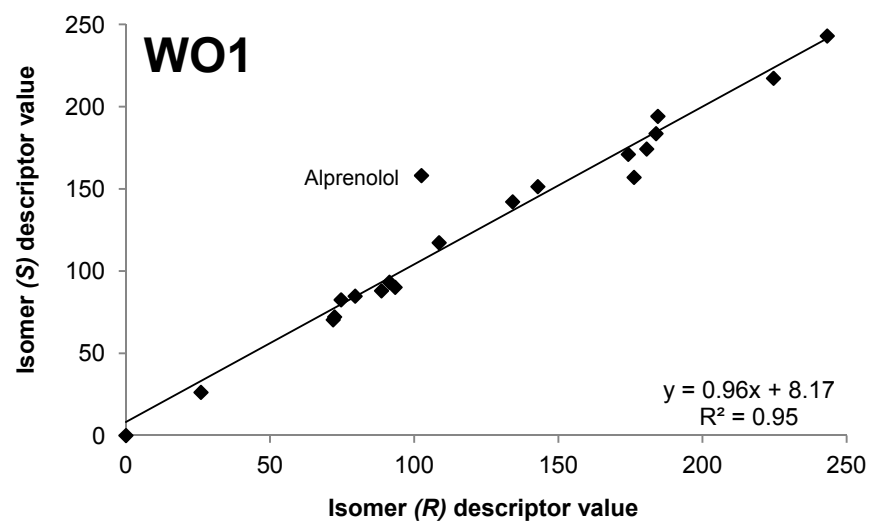
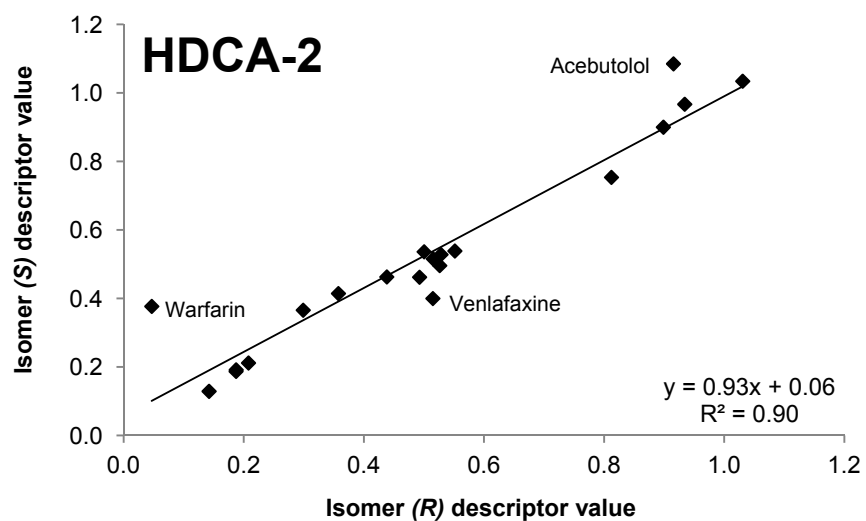


Table 1. Substances studied, $\log P_{o/w}$, $p_{reference}$ and values of the descriptors involved in this work.

Substance	$\log P_{o/w}$ ref.	$p_{reference}$	A (exp.)	A (calc.)	HDCA-2	WO1	DRDODO	HOMO-LUMO
4-aminophenazone ^a	0.33	1.51	-	0.21	0.67	74.75	0.00	8.08
Acebutolol <i>R</i> ^a	1.71	2.02	0.90	0.70	0.92	184.50	14.10	8.07
Acebutolol <i>S</i> ^a	1.71	2.02	0.90	0.70	1.09	194.13	18.16	8.29
Alprenolol <i>R</i> ^b	2.89	3.81	0.15	0.29	0.44	102.50	7.11	9.00
Alprenolol <i>S</i> ^a	2.89	3.81	0.15	0.29	0.46	158.13	6.61	9.02
Amiloride ^c	0.10	1.33	-	1.06	1.96	308.88	8.47	7.79
Amitriptyline ^b	4.92	6.04	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	8.71
Apigenin ^c	3.02	2.29	-	1.30	1.06	277.00	21.96	7.93
Atenolol <i>R</i> ^b	0.06	0.79	0.69	0.78	1.03	224.63	11.34	8.93
Atenolol <i>S</i> ^a	0.06	0.79	0.69	0.78	1.03	217.25	12.09	8.83
Atorvastatin ^a	4.08	4.08	-	1.61	1.49	265.00	21.94	7.72
Atropine <i>R</i> ^a	1.83	2.32	0.26	0.31	0.53	108.63	0.00	8.99
Atropine <i>S</i> ^b	1.83	2.32	0.26	0.31	0.53	117.25	0.00	8.82
Barbital ^a	0.65	1.60	-	0.52	0.94	83.75	4.06	10.76
Bendroflumethiazide <i>R</i> ^c	1.95	3.07	-	1.01	0.88	226.88	13.00	8.16
Bendroflumethiazide <i>S</i> ^c	1.95	3.07	-	1.01	0.83	233.50	15.40	8.16
Benzthiazide ^a	1.73	2.67	-	0.81	0.96	179.00	7.99	8.03
Bromazepam ^b	1.69	2.27	0.33	0.47	0.61	73.88	0.00	8.22
Brompheniramine <i>S</i> ^a	2.88	3.88	-	0.00	0.14	0.00	0.00	8.64
Bupivacaine <i>R</i> ^c	3.41	5.15	-	0.26	0.26	22.13	0.00	8.84
Bupivacaine <i>S</i> ^c	3.41	5.15	-	0.26	0.31	32.50	0.00	8.83
Carbamazepine ^a	2.19	2.47	0.53	0.39	0.62	88.13	0.00	7.79
Celecoxib ^a	3.91	4.67	-	0.44	0.75	172.25	0.00	8.05
Chlordiazepoxide ^b	2.44	2.79	-	0.13	0.37	73.13	0.00	7.51
Chlorpheniramine <i>R</i> ^a	3.17	3.70	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00	8.67
Chlorpheniramine <i>S</i> ^a	3.17	3.70	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	8.74
Chlorpromazine ^b	5.27	6.14	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	6.93
Chrysin ^a	3.52	3.51	-	0.80	0.42	186.38	22.05	8.11
Cinchonidine ^b	2.62	2.65	-	0.23	0.54	117.75	0.00	8.24
Clobazam ^b	2.12	3.33	-	0.00	0.55	0.00	0.00	8.00
Clofazimine ^a	6.30	6.45	-	0.19	0.44	88.63	0.00	6.42
Clofibrilic acid ^b	2.57	3.43	-	0.57	0.35	85.75	0.00	8.86
Clonazepam ^a	2.41	2.81	0.33	0.47	0.61	87.38	0.00	8.11
Clonidine ^b	1.57	2.31	0.55	0.42	0.55	77.63	2.92	8.20
Clopidogrel ^a	4.52	5.58	-	0.00	0.07	0.00	0.00	8.50
Clotiazepam ^b	3.49	4.23	-	0.00	0.46	0.00	0.00	8.00
Codeine ^a	1.14	1.93	0.33	0.23	0.51	132.13	0.00	8.40
Corticosterone ^a	1.94	2.58	0.40	0.48	0.96	209.50	9.70	9.63
Cortisone ^a	1.47	2.02	0.36	0.41	1.13	233.50	13.16	9.61
Cyproheptadine ^a	4.92	5.57	-	0.00	0.10	0.00	0.00	7.95
Diazepam ^a	2.99	3.78	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	8.22
Diclofenac ^a	4.50	4.41	0.63	0.70	0.39	85.88	4.77	7.98
Diltiazem ^b	2.84	3.90	-	0.00	0.50	0.00	0.00	7.76
Diphenhydramine ^a	3.27	4.70	-	0.00	0.11	0.00	0.00	9.11
Duloxetine <i>R</i> ^a	4.54	4.75	-	0.13	0.19	71.88	0.00	7.88
Duloxetine <i>S</i> ^b	4.54	4.75	-	0.13	0.19	70.38	0.00	7.89
Ephedrine ^b	0.93	2.07	0.21	0.38	0.59	154.38	5.81	9.40
Fenbufen ^b	3.20	3.53	0.62	0.57	0.55	84.00	0.00	8.19
Flufenamic acid ^b	5.19	5.04	-	0.72	0.52	142.75	6.49	7.66
Flunitrazepam ^a	2.06	3.11	0.00	0.00	0.47	0.00	0.00	8.06
Fluoxetine <i>R</i> ^b	4.42	4.95	-	0.13	0.19	79.50	0.00	8.82
Fluoxetine <i>S</i> ^a	4.42	4.95	-	0.13	0.19	84.75	0.00	8.94
Flurazepam ^a	3.94	4.39	-	0.00	0.51	0.00	0.00	8.02
Flurbiprofen <i>R</i> ^a	3.84	4.14	-	0.57	0.51	80.38	0.00	8.32
Furosemide ^a	2.60	2.39	1.35	1.25	1.25	242.50	13.72	8.18
Glimepiride ^a	3.97	4.53	-	0.75	0.92	136.25	19.05	8.83
Haloperidol ^b	3.82	4.20	0.40	0.31	0.48	116.50	0.00	8.54
Hesperetin ^a	2.60	2.51	-	1.07	1.26	277.88	25.80	8.09
Hydrocortisone ^a	1.61	1.96	0.71	0.73	1.39	302.13	14.92	9.63
Ibuprofen <i>R</i> ^a	3.97	4.79	-	0.57	0.30	74.63	0.00	9.20
Ibuprofen <i>S</i> ^a	3.97	4.79	-	0.57	0.37	82.50	0.00	9.21
Imipramine ^a	4.80	5.76	-	0.00	0.14	0.00	0.00	8.36
Indomethacin ^a	4.10	4.23	0.57	0.57	0.78	119.25	0.00	7.63

Ketoprofen R ^b	3.14	3.50	0.55	0.57	0.55	93.38	0.00	8.97
Ketoprofen S ^b	3.14	3.50	0.55	0.57	0.54	90.13	0.00	8.97
Ketorolac ^b	1.68	2.47	0.65	0.57	0.78	84.50	0.00	8.32
Levetiracetam ^a	0.14	1.18	-	0.49	0.71	63.88	0.00	10.41
Lidocaine ^a	2.65	4.11	0.12	0.26	0.30	22.38	0.00	8.85
Loratadine ^a	4.40	5.08	-	0.00	0.33	0.00	0.00	8.49
Lormetazepam ^b	2.72	3.34	0.12	0.17	0.88	166.88	0.00	8.25
Maprotiline ^b	4.67	5.23	-	0.13	0.17	66.50	0.00	9.13
Mepivacaine R ^a	1.95	3.13	-	0.26	0.36	26.00	0.00	8.89
Mepivacaine S ^a	1.95	3.13	-	0.26	0.41	26.25	0.00	8.85
Metoprolol R ^a	1.88	2.62	0.17	0.29	0.53	176.25	11.64	8.98
Metoprolol S ^a	1.88	2.62	0.17	0.29	0.50	157.00	4.66	8.92
Miconazole ^a	5.34	6.36	-	0.00	0.08	0.00	0.00	8.19
Milnacipran RS ^a	2.03	3.33	-	0.21	0.52	183.88	0.00	9.35
Milnacipran SR ^a	2.03	3.33	-	0.21	0.52	183.63	0.00	9.37
Morin ^b	1.56	1.75	-	2.11	1.76	432.88	22.02	7.61
Nadolol ^a	0.71	1.45	0.85	0.83	1.10	356.13	19.67	8.93
Naproxen S ^a	3.24	3.37	0.60	0.57	0.51	87.00	0.00	7.91
Naringenin ^a	2.52	2.38	-	1.30	1.26	264.25	21.88	8.48
Nortriptyline ^a	4.36	5.21	-	0.13	0.19	65.63	0.00	8.54
Omeprazole ^a	1.80	2.14	-	0.35	0.47	64.38	0.00	7.90
Oxprenolol R ^b	2.10	3.08	0.17	0.29	0.21	142.88	6.69	8.68
Oxprenolol S ^a	2.10	3.08	0.17	0.29	0.21	151.38	5.94	8.42
Paracetamol ^a	0.51	0.88	1.04	0.91	0.76	118.38	3.55	8.36
Penbutolol R ^a	4.62	5.30	0.08	0.29	0.50	134.13	8.27	9.01
Penbutolol S ^a	4.62	5.30	0.08	0.29	0.54	142.13	7.15	9.03
Pentobarbital R ^b	2.10	2.64	0.47	0.52	0.90	88.63	4.40	10.65
Pentobarbital S ^a	2.10	2.64	0.47	0.52	0.90	88.00	4.60	10.65
Phenobarbital ^b	1.47	2.06	0.73	0.52	0.92	86.38	6.88	9.43
Pilocarpine ^b	0.00	1.48	-	0.00	0.32	0.00	0.00	9.34
Procainamide ^b	1.09	1.55	-	0.50	0.70	114.38	7.76	8.39
Progesterone ^a	3.87	4.85	0.00	0.00	0.21	0.00	0.00	9.63
Propranolol R ^a	2.98	3.66	0.17	0.29	0.49	174.25	5.39	7.89
Propranolol S ^b	2.98	3.66	0.17	0.29	0.46	171.00	6.43	7.89
Pyricarbonate ^a	0.24	1.39	-	0.43	0.68	95.25	9.13	9.28
Pyridoxine ^b	0.33	0.95	-	0.94	1.36	305.00	7.78	8.78
Pyrilamine ^a	3.12	3.38	0.00	0.00	0.48	0.00	0.00	8.49
Quetiapine ^b	3.13	3.25	-	0.23	1.18	148.75	0.00	7.30
Quinine ^b	2.64	2.98	0.37	0.23	0.60	133.63	0.00	7.94
Ranitidine ^a	0.26	0.97	0.25	0.27	0.74	47.75	4.57	8.33
Rimonabant ^b	5.57	6.47	-	0.26	0.61	81.50	0.00	8.11
Rosiglitazone ^a	3.10	3.47	-	0.34	0.98	28.25	0.00	7.78
Rosuvastatin ^a	2.52	2.60	-	1.20	1.53	399.88	11.10	8.21
Sertraline ^a	5.17	5.99	-	0.13	0.15	60.88	0.00	8.78
Sotalol R ^a	0.24	1.33	-	0.74	0.81	243.25	11.96	7.99
Sotalol S ^a	0.24	1.33	-	0.74	0.75	243.00	11.22	7.98
Spirolactone ^a	2.26	3.80	-	0.00	0.44	0.00	0.00	9.10
Sulfadimethoxine ^a	1.63	2.23	-	0.59	0.80	164.75	9.95	8.30
Sulfamethoxazole ^b	0.89	2.00	-	0.59	0.48	151.50	5.79	8.27
Sulfaquinoxaline ^a	1.68	2.17	-	0.59	0.59	158.88	5.64	8.11
Theophylline ^a	-0.02	1.29	0.54	0.35	0.94	53.50	0.00	8.36
Tramadol ^a	2.70	3.91	-	0.31	0.55	99.88	0.00	8.99
Trazodone ^b	2.82	3.36	-	0.00	0.68	0.00	0.00	7.59
Triamterene ^a	1.22	1.13	-	0.68	1.51	250.75	16.63	7.73
Valsartan S ^b	3.59	3.23	-	1.13	0.80	148.00	14.72	8.49
Venlafaxine R ^a	3.05	4.34	-	0.31	0.51	91.38	0.00	8.94
Venlafaxine S ^a	3.05	4.34	-	0.31	0.40	93.25	0.00	8.95
Vildagliptin R ^b	-0.16	0.69	-	0.45	0.93	180.63	8.59	10.01
Vildagliptin S ^a	-0.16	0.69	-	0.45	0.97	174.25	8.58	10.23
Warfarin R ^b	3.25	4.03	0.35	0.31	0.05	72.38	0.00	7.94
Warfarin S ^a	3.25	4.03	0.35	0.31	0.38	72.13	0.00	7.96
Xipamide ^a	2.80	3.29	-	1.03	1.01	232.38	17.90	7.92

^a substances used as training set, ^b substances used as test set, ^c outliers

Table 2. Abraham descriptors for the 42 substances whose experimental values were available.

Objects	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>V</i>
Acebutolol	1.60	2.42	0.90	2.10	2.76
Alprenolol	1.25	1.09	0.15	1.44	2.16
Amitriptyline	2.25	1.78	0.00	1.00	2.40
Atenolol	1.45	1.88	0.69	2.00	2.18
Atropine	1.20	1.58	0.26	1.73	2.28
Bromazepam	2.31	1.38	0.33	1.62	1.94
Carbamazepine	2.15	2.11	0.53	1.10	1.81
Chlorpheniramine	1.47	1.34	0.00	1.35	2.21
Chlorpromazine	2.20	1.83	0.00	0.94	2.41
Clonazepam	2.46	1.75	0.33	1.50	2.11
Clonidine	1.60	1.34	0.55	1.16	1.53
Codeine	1.78	1.95	0.33	1.78	2.21
Corticosterone	1.86	3.43	0.40	1.63	2.74
Cortisone	1.96	3.50	0.36	1.87	2.75
Diazepam	2.08	1.57	0.00	1.25	2.07
Diclofenac	2.28	1.22	0.63	0.96	2.03
Ephedrine	0.92	0.76	0.21	1.21	1.44
Fenbufen	1.78	1.80	0.62	1.05	1.98
Flunitrazepam	2.10	2.15	0.00	1.48	2.14
Furosemide	2.05	2.14	1.35	1.45	2.10
Haloperidol	1.90	1.39	0.40	1.76	2.80
Hydrocortisone	2.03	3.49	0.71	1.90	2.80
Indomethacin	2.24	1.35	0.57	1.57	2.53
Ketoprofen	1.65	2.26	0.55	0.89	1.98
Ketorolac	1.60	2.03	0.65	1.05	1.87
Lidocaine	1.01	1.50	0.12	1.21	2.06
Lormetazepam	2.44	1.65	0.12	1.61	2.26
Metoprolol	1.17	1.33	0.17	1.76	2.26
Nadolol	1.63	1.64	0.85	2.34	2.49
Naproxen	1.51	1.98	0.60	0.68	1.78
Oxprenolol	1.31	1.49	0.17	1.62	2.22
Paracetamol	1.06	1.63	1.04	0.86	1.17
Penbutolol	0.93	1.15	0.08	1.51	2.52
Pentobarbital	1.03	1.11	0.47	1.23	1.80
Phenobarbital	1.63	1.80	0.73	1.15	1.70
Progesterone	1.45	3.29	0.00	1.14	2.62
Propranolol	1.88	1.43	0.17	1.42	2.15
Pyrimidine	1.82	1.92	0.00	1.59	2.39
Quinine	2.47	1.23	0.37	1.97	2.55
Ranitidine	1.60	1.63	0.25	2.33	2.40
Theophylline	1.50	1.60	0.54	1.34	1.22
Warfarin	2.30	2.18	0.35	1.49	2.31

Table 3. Values of the normalized coefficients and the norm of the vector for the two systems studied. Difference column stands for the difference between the normalized coefficients.

	$\log P_{\alpha/w}$	$\rho_{reference}$	Difference
<i>e/l</i>	0.09	0.06	0.03
<i>s/l</i>	-0.19	-0.18	-0.01
<i>a/l</i>	0.00	-0.18	0.18
<i>b/l</i>	-0.67	-0.68	0.01
<i>v/l</i>	0.72	0.69	0.03
<i>l</i>	5.19	4.66	

Table 4. log $P_{o/w}$ values obtained for each esteroisomer using the three-dimensional descriptors.

Compound	Isomer (R)			Isomer (S)		
	HDCA-2	WO1	DRDODO	HDCA-2	WO1	DRDODO
Acebutolol	1.57	1.56	1.69	1.63	1.53	1.75
Alprenolol	2.94	3.01	3.09	2.95	3.10	3.07
Atenolol	0.14	0.19	0.17	0.17	0.20	0.22
Atropine	1.42	1.52	1.39	1.46	1.57	1.43
Chlorpheniramine	2.71	2.80	2.86	2.68	2.78	2.85
Duloxetine	4.03	4.17	4.10	4.03	4.16	4.10
Fluoxetine	4.02	4.16	4.08	4.00	4.14	4.06
Ibuprofen	3.85	3.90	3.84	3.89	3.91	3.83
Ketoprofen	2.70	2.68	2.59	2.69	2.68	2.59
Mepivacaine	2.20	2.22	2.24	2.24	2.23	2.25
Metoprolol	1.74	1.94	2.02	1.74	1.92	1.84
Milnacipran	2.41	2.58	2.33	2.40	2.58	2.33
Oxprenolol	2.09	2.42	2.41	2.15	2.50	2.45
Penbutolol	4.57	4.56	4.62	4.59	4.57	4.59
Pentobarbital	1.64	1.41	1.46	1.64	1.41	1.46
Propranolol	3.06	3.24	3.14	3.04	3.23	3.17
Sotalol	0.79	0.99	0.95	0.75	1.00	0.93
Venlafaxine	3.57	3.53	3.44	3.49	3.54	3.44
Vildagliptin	-0.26	-0.24	-0.25	-0.29	-0.30	-0.30
Warfarin	3.15	3.42	3.36	3.37	3.42	3.35

Table 5. Summary of the internal and external validation parameters for each model

Model		<i>n</i>	AE ^a	AAE ^b	SD	<i>R</i> ²	<i>R</i> ₀ ²	<i>Q</i> ² _{LMO}	F
A calculated	TRAINING SET	79			0.34	0.95		0.94	1334
	TEST SET	40	-0.09	0.29	0.34	0.95	0.99	0.94	664
HDCA-2	TRAINING SET	79			0.32	0.95		0.95	1516
	TEST SET	40	-0.06	0.30	0.36	0.94	0.99	0.94	601
WO1	TRAINING SET	79			0.34	0.94		0.94	1316
	TEST SET	40	-0.05	0.29	0.34	0.94	0.99	0.94	628
DRDODO	TRAINING SET	79			0.32	0.95		0.95	1453
	TEST SET	40	-0.09	0.31	0.36	0.94	0.99	0.93	587

^a average error, ^b absolute average error

Article V

Evaluation of fluorescence anisotropy to assess drug-lipid membrane partitioning

**Juan M. Pallicer, Stefanie D. Krämer
J. Pharm. Biomed. Anal. 71 (2012) 219**



Evaluation of fluorescence anisotropy to assess drug–lipid membrane partitioning

Juan M. Pallicer¹, Stefanie D. Krämer*

Biopharmacy, Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zürich, Wolfgang-Pauli-Strasse 10, CH-8093 Zurich, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2012

Received in revised form 5 August 2012

Accepted 8 August 2012

Available online 17 August 2012

Keywords:

Liposomes

Partition coefficient

Fluorescence anisotropy

Lipophilicity

Membrane affinity

ABSTRACT

Purpose: We evaluated fluorescence anisotropy measurements as an alternative technique to estimate drug–lipid membrane partitioning of fluorescent solutes.

Methods: The lipid bilayer partitioning of six drugs ($\log P$ in octanol/water between 2.6 and 5.4) was investigated by fluorescence anisotropy measurements with egg phosphatidylcholine liposomes at pH 7.4. Anisotropy was measured at about 5 and 50 μM drug and varying lipid concentrations between 3 and 700 μM . Fluorescence was corrected for light scattering and membrane affinities were estimated by non-linear regression analysis of the relative anisotropy as a function of lipid and solute concentrations. Liposome partitioning was in addition determined by equilibrium dialysis and potentiometric titration for comparison.

Results: Correction for light scattering by the liposomes was possible to some extent for two drugs. The estimated partition coefficients of three drugs were concentration-independent. For two drugs, membrane saturation was expected at the higher drug concentration. One drug showed significant differences between the parameters estimated at high and low drug concentrations, indicating measurement artifacts. Linear regression between the estimated logarithmic partition coefficients from anisotropy measurements and equilibrium dialysis revealed a slope of 1.05 and an intercept of 1.16 ($n=5$, $r^2=0.87$). **Conclusion:** Anisotropy measurement with liposomes is hampered by light scattering and pH-dependent fluorescence properties of ionizable drugs. Taking these limitations into account, the technique may offer an alternative to established methods for the estimation of drug membrane partitioning, in particular when potentiometric titration or equilibrium dialysis are not applicable.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lipophilicity is a fundamental physicochemical property of organic compounds. It controls their disposition in biological

systems and in the case of drugs their ADMET properties, *i.e.*, Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity [1]. The parameters to describe lipophilicity are based on the distribution ratio between a non-water miscible solvent (commonly, an organic solvent) and water [2]. As many biologically active compounds are weak acids or bases, two parameters are distinguished: the partition coefficient P describes the partitioning of one single species, usually the neutral species under Nernst conditions and the distribution coefficient D refers to all species present under the experimental conditions, expressed as the ratio of the total solute concentration in both phases.

Generally, lipophilicity is expressed as the 1-octanol/water partition coefficient of the uncharged solute ($\log P_{o/w}$) [3,4]. However, the ability to predict the behavior of drugs in biological systems with $\log P_{o/w}$ has some limitations since the partitioning in 1-octanol/water is not governed by the same physicochemical forces as the partitioning in biological membranes [5]. Artificial lipid bilayers in the form of liposomes have overcome some of the drawbacks of the $\log P_{o/w}$ in ADMET prediction and are frequently used to investigate drug membrane-interactions in more detail [6–9].

Abbreviations: A , anisotropy; A_B , A of the membrane-associated solute; A_F , A of the free solute; An, anion; C, cation; D , apparent partition coefficient, distribution coefficient; $D_{anisotropy}$, D estimated from anisotropy experiments; D_{lip} , D between lipid bilayer and aqueous phase; G , grating factor; I , fluorescence intensity, indices indicate the alignment of the excitation and emission polarizers; K_D , dissociation constant; L, lipid; LUV, large unilamellar vesicles; N, neutral species; P , partition coefficient of one molecular species; P_{lip} , P between lipid bilayer and aqueous phase; $P_{lip,n}$ and $P_{lip,i}$, P_{lip} of neutral and ionized species; $P_{o/w}$, P between n-octanol and aqueous phase; P_{XH_n} , P of the ionization species XH_n with n , number of protons; PC, phosphatidylcholine; pK_a , apparent (titrated) pK_a in biphasic system; r , volume ratio lipophilic to aqueous phase; S, solute; SUBS, standardized universal buffer solution; SUV, small unilamellar vesicles; V_L , volume of lipid bilayers; V_{total} , total sample volume; XH₂, XH, X, ionization species with 2, 1, no acidic proton; Z, zwitterion.

* Corresponding author. Tel.: +41 44 633 7403; fax: +41 44 633 1457.

E-mail address: stefanie.kraemer@pharma.ethz.ch (S.D. Krämer).

¹ Permanent address: Departament de Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain.

Phosphatidylcholine (PC) is the major phospholipid in mammalian cell membranes and is, therefore, often used for the preparation of liposomes. In water, it spontaneously forms multilamellar vesicles which can easily be processed to unilamellar liposomes with similar physicochemical characteristics as biological membranes [10]. Beside PC, liposomes can be prepared from other lipids and lipid mixtures to mimic specific features of cell membranes [11–14].

1.1. Measuring drug–lipid membrane partitioning

Pauletti and Wunderli-Allenspach [7] introduced equilibrium dialysis to study drug partitioning in egg PC liposomes over a wide pH range from 2 to 11. If combined with a sensitive analytical method such as liquid scintillation counting or HPLC, equilibrium dialysis allows to measure D values under optimal conditions.

Beside the shake flask method for 1-octanol/water partitioning and the equilibrium dialysis technique for liposomes, log P determination by potentiometric titrations in biphasic systems has gained much interest [15–19]. The method works for acidic, basic and amphoteric solutes and has been applied to study partitioning of solutes in liposomes [20,21]. The accuracy of the method was confirmed by equilibrium dialysis [9,22,23]. Both standard methods for the determination of liposome partitioning have their limitations. Equilibrium dialysis requires several hours equilibration time while an acidic or basic characteristic of the solute is an absolute prerequisite for potentiometric titration. Low solute solubility may in addition challenge the interpretation of potentiometric titration data.

Spectroscopic techniques such as UV–vis absorption or fluorescence spectrometry may overcome these limitations and, therefore, offer complementary methodologies for the estimation of drug–lipid bilayer partitioning. Partition coefficients can be determined under one of the following conditions: either there is a significant difference in a spectroscopic parameter between the molecules free in solution and associated with the lipid bilayer, or the incorporation of the solute of interest in the membrane results in a change of a spectroscopic property of a membrane probe. In the former, the signal response is the combination of the signals from free and membrane-associated molecules. In both cases, partition coefficients can be obtained from measurements at various lipid concentrations. Several fluorescence spectroscopy methodologies have been considered to evaluate the partitioning of a given molecule between a lipid and an aqueous phase, including fluorescence intensity, steady-state anisotropy and life-time weighted quantum yield [24].

1.2. Fluorescence anisotropy

Among the fluorescence experimental parameters, steady-state anisotropy has proven a suitable technique to characterize specific and unspecific ligand–protein interactions [25–27], to study liposome membrane fluidity [28–32] but also for evaluating lipid bilayer interactions of selected compounds with high membrane affinity [33–39]. Fluorescence anisotropy is a powerful technique to investigate the molecular dynamics of fluorescent solutes. Upon excitation of the sample by linearly polarized light the molecules with the absorption oscillators oriented parallel to the direction of polarization will be preferentially excited. This will result in highly polarized fluorescence if the molecules do not rotate during the interval between the absorption and emission of the light [40,41]. In solution, this is the case for macromolecules or small molecules associated with macromolecules.

In a typical experiment, fluorescence anisotropy (A) is evaluated by observing I_{vv} and I_{vh} , that are the measured fluorescence intensities with the excitation polarizer aligned vertically whilst the

emission polarizer is oriented first vertically and then horizontally, resulting in the following expression (Eq. (1)):

$$A = \frac{I_{vv} - G \times I_{vh}}{I_{vv} + 2 \times G \times I_{vh}} \quad (1)$$

where G is the grating factor, which stands for the correction factor needed to compensate for the polarization caused by the internal components of the fluorometer, and is defined as $G = I_{hv}/I_{hh}$, where I_{hv} and I_{hh} are respectively the measured intensities with the excitation polarizer aligned horizontally while the emission polarizer is oriented first vertically and then horizontally. The anisotropy A of a small solute depends on the fraction of fluorescent solute interacting with a macromolecule and on the rigidity of the formed complex.

Several relationships have been considered to derive affinity constants or partition coefficients from the anisotropy measurements. Those relevant for our work are summarized in Appendix. Most suitable for the analysis of our data was the relationship shown in Eq. (2) (and Appendix, (A5)) taking into account the molar lipid $[L]$ and solute $[S]$ concentrations, the anisotropy of the membrane-associated (A_B) and free (A_F) solute and the ratio between fluorescent intensity of membrane-associated to aqueous solute (Q) [42].

$$\frac{A - A_F}{A_B - A_F} = \frac{K_D + [S] + [L] - \sqrt{(K_D + [S] + [L])^2 - 4 \times [S] \times [L]}}{2 \times [S]} \quad (2)$$

1.3. Practical considerations on fluorescence anisotropy measurements

A closer look at Eq. (2) reveals some limitations that need be considered when estimating partition coefficients from anisotropy measurements. The drug concentration $[S]$ must not exceed the solute–lipid membrane dissociation constant K_D (see Appendix) to an extent that renders K_D negligible in Eq. (2). If $K_D \ll [S]$, the function becomes independent of K_D and the partitioning cannot be estimated by means of this approach. Thus $[S]$ should be in the range of or lower than K_D to avoid these limitations but, on the other hand, high enough to allow fluorescence quantification. Furthermore, the product of $[S]$ and D should not exceed about one tenth of the local lipid concentration within the bilayer ($[L]_{\text{bilayer}}$) to avoid significant alterations in membrane properties by the partitioned solute. $[L]_{\text{bilayer}}$ equals 1.3 M, i.e., the lipid density (ca. 1000 g/L) divided by the molecular weight (MW, 780 g/mol). The lipid concentration ideally covers the range of $K_D \pm 1$ –3 logarithmic units to obtain curves which allow a precise determination of K_D .

The most relevant drawback of the anisotropy measurement with liposomes is the light scattering caused by the vesicles, which increases with increasing liposome concentrations. The influence of the scatter depends on the liposome concentration, the size of the liposomes and the fluorescence properties of the solute. Although small unilamellar vesicles (SUV) would scatter less, larger liposomes in the range of 100–200 nm diameter (LUV) are preferred because of their thermodynamic stability and lower curvature effects [43]. The scattering leads to a deviation of the saturation function described in Eq. (2) at the highest lipid concentrations, as shown by Castanho and Prieto [35]. Several procedures have been suggested to correct for the scattering effect in the fluorescence measurements, such as a blank compensation [43] or the evaluation of the scattering by means of turbidity measurements [35,44]. However, light scattering remains a major limitation of this procedure.

In this work, the fluorescent anisotropy behavior of six fluorescent drugs (Fig. 1) was studied in egg PC liposomes. Partition coefficients were estimated taking into account light scattering by the liposomes and membrane saturation by the solute. Partitioning

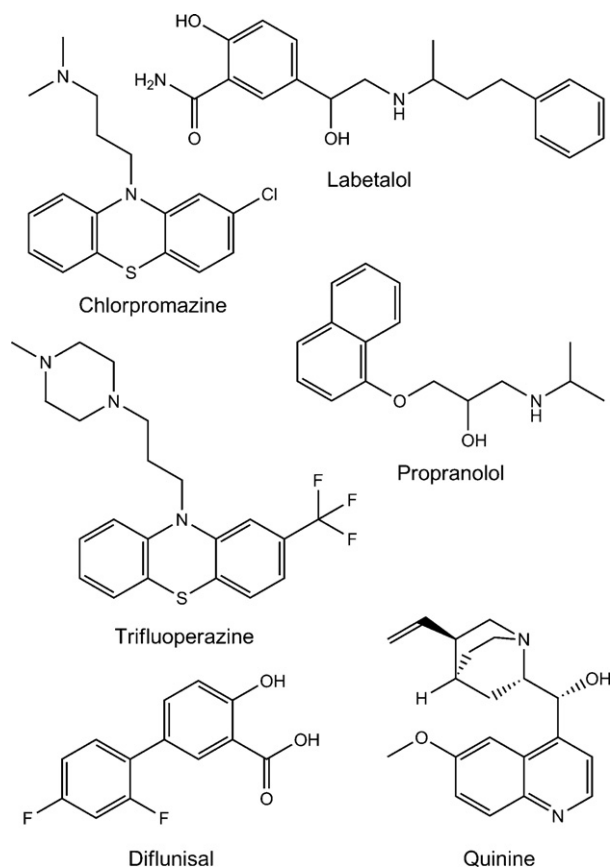


Fig. 1. Structures of the investigated drugs.

was in addition investigated by potentiometry and the reference method equilibrium dialysis, for comparison. The aim was to evaluate fluorescence anisotropy as an alternative methodology for the estimation of drug–lipid bilayer partitioning.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and buffers

Chlorpromazine, diflunisal, labetalol and trifluoperazine hydrochlorides were purchased from Sigma–Aldrich (Buchs, Switzerland). Propranolol hydrochloride and quinine anhydrous were from Fluka (Buchs, Switzerland). For liposome preparation, methanol p.a. (Sigma–Aldrich) and chloroform HPLC grade (Scharlau, Hamburg, Germany) were used. Egg PC was purchased from Lipid Products (Nutfield, UK). For HPLC analysis, acetonitrile (HPLC grade) was used (Sigma–Aldrich).

2.2. Preparation and characterization of liposomes

PC liposomes were prepared by extrusion according to the procedure described by Krämer and Wunderli-Allenspach [11]. The lipids were dried from a chloroform/methanol solution to a thin layer in a round flask. The lipid film was resuspended to 20–100 mg mL⁻¹ lipids with standardized universal buffer solution (SUBS containing borate, citrate and phosphate adjusted with NaCl to 0.23 M ionic strength, pH 7.4 [7]), to form multilamellar vesicles. LUVs were prepared at 25 °C by extrusion of the multilamellar vesicles through polycarbonate filters (0.2 μm, Nucleopore®, Whatman) using a 10 mL Lipex extruder from Northern Lipids (Burnaby, Canada). The liposome size distribution was analyzed by dynamic light scattering with a Zetasizer 3000 HAS (Malvern

Instruments, UK). The hydrodynamic average mean diameter of all preparations was between 180 and 200 nm. The polydispersity index was generally below 0.1, indicating a narrow size distribution with a standard deviation under 32% assuming a Gaussian distribution function.

2.3. Lipid quantification

An HPLC system LaChrom Elite from Hitachi, consisting of a four-channel pump L-2130, a thermostated autosampler L-2200, a column oven L-2300, an UV detector L-2400 and a fluorescence detector L-2480 was used for all chromatographic determinations in this work. The PC concentrations were determined by injecting 50 μL methanol-dissolved sample onto a BDS Hypersil C₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size) from Thermo (Bellefonte, PA, USA), heated to 50 °C. The mobile phase was acetonitrile–water (87:13, v/v) at a flow rate of 2 mL min⁻¹. The detection wavelength (UV detector) was 215 nm. Lipid concentrations were calculated using an appropriate calibration curve (*n* = 5). The sum of all peak areas corresponding to the various unsaturated acyl chains of PC was used for quantification.

2.4. Determination of liposome/water partition coefficients by equilibrium dialysis

Liposomes (1 mg egg PC per mL) were equilibrated with 20 μM drug in SUBS at pH 2.0, pH 7.4 and pH 10.5 for 1 h at room temperature in a reaction tube. The equilibrated suspension was dialyzed for 5 h at 25 °C against SUBS buffer with the corresponding pH in equilibrium dialysis cells (1 mL; Dianorm, Munich, Germany) with cellulose membranes (5000 Da cut-off; Dianorm). Liposome and buffer samples were collected from the dialysis cells, diluted with methanol (1:1) and analyzed by HPLC with fluorescence detection. An appropriate calibration curve (*n* = 6) was used to determine the drug concentrations in the buffer ([S]_{SUBS}) and liposome-containing ([S]_{liposomes}) chambers of the dialysis cells. Distribution coefficients *D*_{lip} were calculated by means of Eq. (3):

$$D_{lip} = \frac{[S]_{liposomes} - [S]_{SUBS}}{[S]_{SUBS}} \times \frac{V_{total}}{V_L} + 1 \quad (3)$$

where *V*_L is the volume of the lipid bilayers (calculated from the lipid concentration [L] determined by HPLC and the bilayer density of 1.014 g mL⁻¹ [11]) within the sample volume *V*_{total}.

2.5. Determination of p*K*_a and liposome/water partition coefficients by potentiometry

Titrations were performed with a PCA101 automatic titrator (Sirius Analytical Instruments Ltd., Forest Row, East Sussex, UK) with 0.5 M HCl and 0.5 M KOH, under argon at 25 °C. The p*K*_a of labetalol was determined in 20 mL 0.15 M KCl while p*K*_a values of the less water-soluble propranolol, quinine, chlorpromazine and trifluoperazine were extrapolated from titrations in 20 mL methanol/0.15 M KCl at various volume ratios with the Yasuda–Shedlovsky plot [45]. The p*K*_a titrations were otherwise performed under the same experimental conditions as titrations with liposomes (see below). This is a prerequisite for the accurate determination of log *P* values with Eq. (4).

To characterize the partitioning between egg PC bilayers and water, the compounds were titrated at concentrations between 0.67 and 2.0 mM in 5 mL liposomes/0.15 M KCl. The lipid/water volume ratios (*r*) were varied from 0.001 to 0.028. The titrations were conducted from pH 10.5 to 3.5 and then back to 10.5. The titration curves were analyzed with the p*K*Allog*P* software V5.2a (Sirius Analytical Instruments Ltd., Forest Row, East Sussex, UK). The log *P*_{lip}

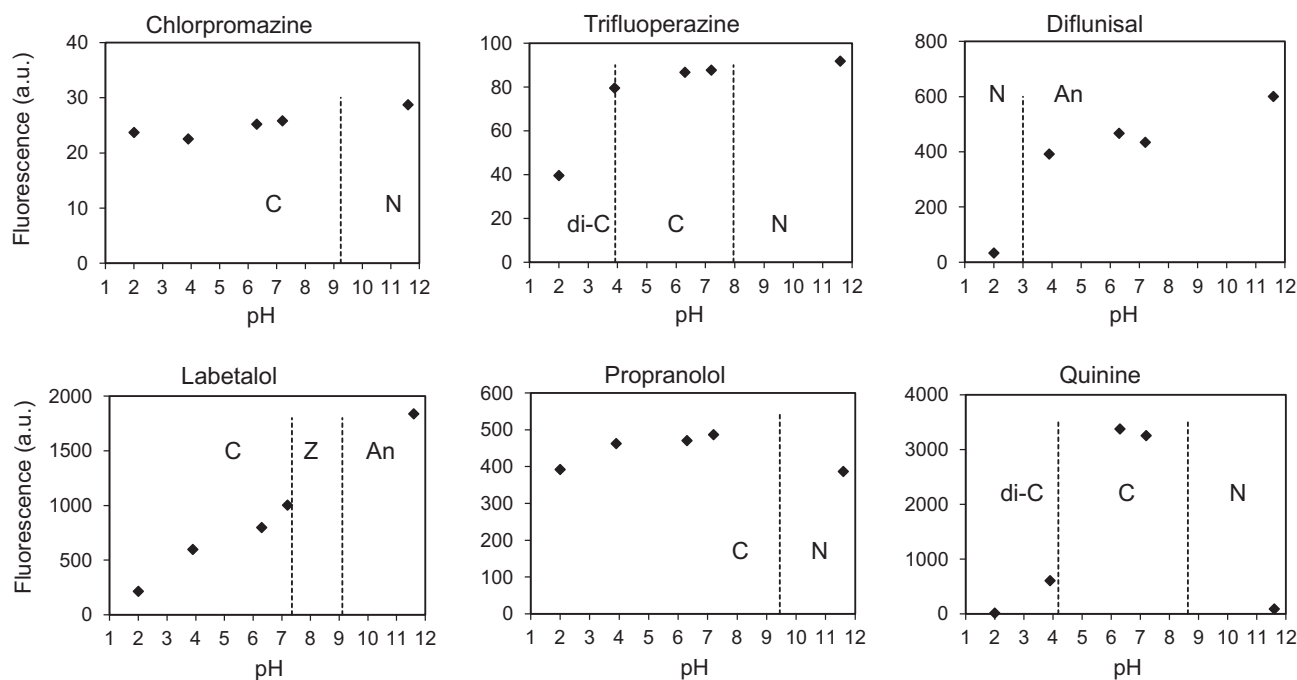


Fig. 2. pH-dependent fluorescence of the investigated drugs. Drugs were dissolved in SUBS at various pH and fluorescence was determined at the following concentrations and wavelengths: chlorpromazine, 5 μM , $\lambda_{\text{ex/em}}$ 310/430 nm; diflunisal, 5 μM , 305/420 nm; labetalol, 5 and 1 μM (pH 7.2 and 11.6), 305/420 nm; propranolol, 0.25 μM , 295/380 nm; quinine, 5 and 0.25 μM (pH 6.3 and 7.2), 280/390 nm; trifluoperazine, 5 μM , 305/410 nm. Signals were extrapolated to 5 μM if measured at lower concentrations, except for propranolol. Dotted lines, pK_a values. di-C, C, N, Z, An, pH region where the di-cation, cation, neutral species, zwitterion, anion, respectively, prevails; a.i., arbitrary units.

values of the neutral ($\log P_{\text{lip},n}$) and ionized ($\log P_{\text{lip},i}$) compounds were derived from titrations of at least four different lipid/water volume ratios [15,19]. In brief, the $\log P_{\text{lip}}$ of the neutral and ionized species were estimated from the difference between the pK_a of the compound and the apparent pK'_a values (pK'_a) in the liposomes at various r by non-linear regression analysis (Eq. (4)).

$$\text{pK}'_a - \text{pK}_a = \log(P_{\text{XH}_n} \times r + 1) - \log(P_{\text{XH}_{n-1}} \times r + 1) \quad (4)$$

P_{XH_n} and $P_{\text{XH}_{n-1}}$ are the partition coefficients of the ionization species XH_n and XH_{n-1} respectively, where X is the fully deprotonated compound.

2.6. Fluorescence anisotropy measurements

The measurements were performed in SUBS at pH 7.4 with a fluorescence spectrometer LS50B (Perkin Elmer, Boston, MA) at 25 °C. The optimal excitation and emission wavelengths for the anisotropy measurements were determined from the excitation and emission spectra of each compound in SUBS at pH 7.4. As shown in Fig. 2, fluorescence resulted mainly from the ionization species prevailing at the investigated pH.

The samples containing liposomes at various concentrations between 3.2 and 680 μM PC and drug at two concentrations, the lower between 3.6 and 6.8 μM and the higher between 36 and 68 μM , were equilibrated for 30 min prior to the measurements. I_{vv} , I_{vh} and G were determined of the samples and of blank solutions containing drug without liposomes and liposomes without drug, respectively. A values were calculated according to Eq. (1) and as described below and K_D values were estimated by non-linear regression analysis applying the function described in Eq. (2).

To correct for the contribution of light scattering, I_{vv} and I_{vh} of liposomes without drug were subtracted from the respective values of the samples containing drug and liposomes as suggested by Borenstain and Barenholz [46]. Distribution coefficients were

estimated from the fitted K_D values as shown in Eq. (5), assuming a 1:1 drug–lipid interaction [8]:

$$D_{\text{anisotropy}} = \frac{[L]_{\text{bilayer}}}{K_D} \quad (5)$$

3. Results

3.1. Equilibrium dialysis and potentiometric titration

The membrane partitioning of the six fluorescent drugs chlorpromazine, trifluoperazine, diflunisal, labetalol, propranolol and quinine (Fig. 1) was studied by equilibrium dialysis, potentiometry and fluorescence anisotropy measurements with egg PC liposomes. First, the pK_a values were determined by potentiometric titration as described in Section 2.5. Table 1 shows the molecular weight (MW), pK_a and $\log P_{o/w}$ values of the drugs.

Equilibrium dialysis was performed with PC liposomes as described in Section 2.4. Table 2 shows the $\log D_{\text{lip}}$ values at pH 2.0, 7.4 and 10.5. The monoprotic bases chlorpromazine and propranolol and the diprotic bases quinine and trifluoperazine are mainly in their neutral form in the aqueous phase at pH 10.5 (molar fraction of neutral species > 0.9). Their $\log P_{\text{lip},n}$ is, therefore, close to the $\log D$ at pH 10.5. The monoprotic acid diflunisal is mainly neutral in water at pH 2.0 (molar fraction of neutral species ~ 0.9), $\log P_{\text{lip},n}$ is thus close to $\log D$ at pH 2.0. However, the phosphate groups of PC are partially neutral at this pH (pK_a 2.46 [11]) resulting in a net positively charged membrane surface. These changes in the membrane properties can significantly affect partitioning [11,13,14]. Labetalol is an amphoteric compound, with a basic (secondary amine, pK_a 9.11) and an acidic (phenol, pK_a 7.35) group. The pK_a values were assigned according to Martinez et al. [47]. As the pK_a values are relatively close, no net neutral form exists to $\geq 90\%$ at any pH. In the pH range between the two pK_a values the zwitterion prevails.

As shown in Fig. 3, there is a good correlation between $\log P_{o/w}$ and the estimated $\log P_{\text{lip},n}$ of the tested compounds. The

Table 1
Physicochemical parameters of the studied compounds.

	CAS	MW	pK _{a,1}	pK _{a,2}	log P _{o/w} ^c
Chlorpromazine	50-53-3	318.86	9.24 ^b 9.26 ^d	–	5.35
Trifluoperazine	117-89-5	407.50	3.92 ^b 3.90 ^e	7.96 ^b 8.10 ^e	5.03
Diflunisal	22494-42-4	250.20	3.00 ^a	–	4.44
Labetalol	36894-69-6	328.41	7.35 ^a 7.38 ^f	9.11 ^b 9.36 ^f	3.09
Propranolol	525-66-6	259.34	9.45 ^b 9.53 ^g	–	2.98
Quinine	130-95-0	324.42	4.18 ^b 4.24 ^h	8.63 ^b 8.55 ^h	2.64

^a Acidic functionality, this work.^b Basic functionality, this work.^c From [48].^d From [49].^e From [50].^f From [47].^g From [20].^h From [51].**Table 2**
Log D values in egg PC liposomes/SUBS determined by equilibrium dialysis.

	pH 2.0	pH 7.4	pH 10.5
Chlorpromazine	3.69 ± 0.04	–	4.87 ± 0.03 ^a
Trifluoperazine	3.76 ± 0.02	4.52 ± 0.03	4.61 ± 0.01 ^a
Diflunisal	3.80 ± 0.04 ^a	2.75 ± 0.02	2.73 ± 0.01
Labetalol	2.32 ± 0.21	2.73 ± 0.05	1.84 ± 0.25
Propranolol	2.40 ± 0.09	2.72 ± 0.02	3.17 ± 0.03 ^a
		2.76 ± 0.02 ^b	3.27 ± 0.01 ^b
Quinine	1.33 ± 0.26	2.47 ± 0.13	2.73 ± 0.02 ^a

^a Estimated log P_{lip,n} value (see text).^b P_{lip,i} and P_{lip,n} from [13].

zwitterionic labetalol was excluded from the analysis. Linear regression analysis revealed the following relationship (Eq. (6)):

$$\log P_{lip,n} = 0.74 \cdot \log P_{o/w} + 0.82 \quad (r^2 = 0.961, n = 5) \quad (6)$$

A similar relationship between log P_{lip,n} and log P_{o/w} determined by potentiometric titration was found by Avdeef et al. [20] (Eq. (7)):

$$\log P_{lip,n} = 0.86 \cdot \log P_{o/w} + 0.47 \quad (r^2 = 0.940, n = 8) \quad (7)$$

The membrane partitioning of chlorpromazine, labetalol, propranolol and quinine was in addition determined by potentiometric

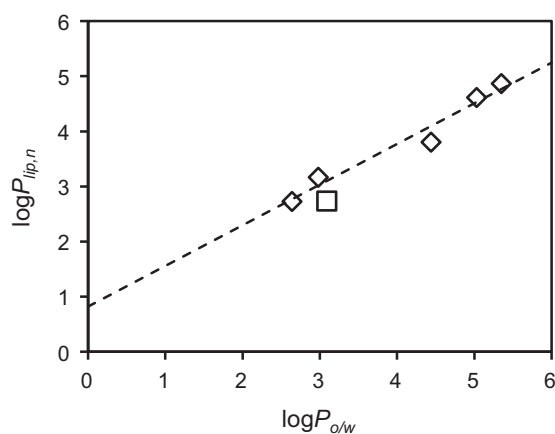


Fig. 3. Correlation between the estimated log P_{lip,n} from equilibrium dialysis and log P_{o/w}. Data from Tables 1 and 2, log P_{lip,n} correspond to the log D values at pH 10.5 (chlorpromazine, propranolol, quinine, trifluoperazine) and at pH 2.0 (diflunisal), respectively, where the molar fraction of neutral species is >0.9 in the aqueous phase (diamonds). Dashed line, linear regression line, see Eq. (6). Labetalol is zwitterionic and was excluded from the analysis (open square).

Table 3
Log P_{lip} of neutral and ionic species determined by potentiometry in the egg PC liposomes/0.15 M KCl system.

	XH ₂	XH	X
Chlorpromazine	–	3.00 ± 0.01 4.45 ^b	4.45 ± 0.01 ^a 5.4 ^b
Labetalol	1.10 ± 0.07	1.43 ± 0.04	1.84 ± 0.02
Propranolol	–	2.29 ± 0.02 2.61 ± 0.02 ^c	3.35 ± 0.03 ^a 3.45 ± 0.01 ^c
Quinine	1.73 ± 0.17	2.26 ± 0.09	2.94 ± 0.17 ^a

^a Log P_{lip,n}.^b From [52]. We have no explanation for the differences between the values determined in this work and the published values.^c From [20].

titration. The log P_{lip} values of the respective ionization species are shown in Table 3 together with published values for propranolol and chlorpromazine. The log P_{lip,n} values agreed reasonably with those determined by equilibrium dialysis. Diflunisal and trifluoperazine were not included because of the low pK_a of diflunisal close to the pK_a of the excess lipid phosphate groups and because of the precipitation of trifluoperazine at pH values ≥ 8, respectively.

3.2. Fluorescence anisotropy measurements

Fluorescence anisotropy titrations were performed as described in Section 2.6 taking into account the conditions described in Section 1. In most cases A exceeded the theoretically maximal value of 0.4 [39] by up to 0.3 at high [L] despite the correction with I_{vv} and I_{vh} of the liposome blanks. This indicates artifacts in the measurements, most probably resulting from light scattering by the liposomes. Nevertheless, all data were included for data analysis. Fig. 4 shows the plots of relative A values as functions of [L].

Only for diflunisal and labetalol resulted corrections for I_{vv} and I_{vh} of the liposome blanks in meaningful relative A values. The effect of correction was higher at the lower solute concentrations and higher for labetalol than diflunisal. Log D of labetalol was estimated to 4.84 at the lower concentration without correction and 4.39 with correction. For both drugs, correction reduced the difference between the log D values determined at the two drug concentrations. After correction, the differences were 0.29 (labetalol) and 0.01 (diflunisal), respectively, as compared to 0.60 and 0.44 without correction. As the correction had a lower impact at the higher drug concentrations, the corrected log D values determined with the higher concentrations were used for further comparisons.

For chlorpromazine and trifluoperazine, the product of [S] and D_{lip} or P_{lip,n} exceeded [L]_{bilayer} at the higher drug concentrations. It was 5.0 and 1.6, respectively. Partitioning saturation and alterations in membrane properties are expected at the higher and possibly already at the lower drug concentrations. Indeed, the anisotropy plots of chlorpromazine and trifluoperazine were independent of [S] and no K_D could be estimated at the higher [S] of both drugs. The log D estimated from the lower drug concentrations were used for further comparisons.

Propranolol showed the highest deviation between the plots of relative A versus [L] of the low and high drug concentrations (Fig. 4). The fitted K_D value was 9-fold higher at 37 than at 3.7 μM propranolol. The estimated log D was 4.4 at the lower and 3.4 at the higher propranolol concentration. As mentioned above, correction with the I_{vv} and I_{vh} of the liposomes did not reveal meaningful relative A values and was, therefore, not considered. Concentration-independent liposome partitioning was previously confirmed up to 1.2 μM propranolol [7]. No significant membrane perturbations are expected at the higher concentration (37 μM) neither as the product of [S] and log D_{lip} does not exceed one tenth of [L]_{bilayer}. The log D estimated with the higher drug concentration was closer

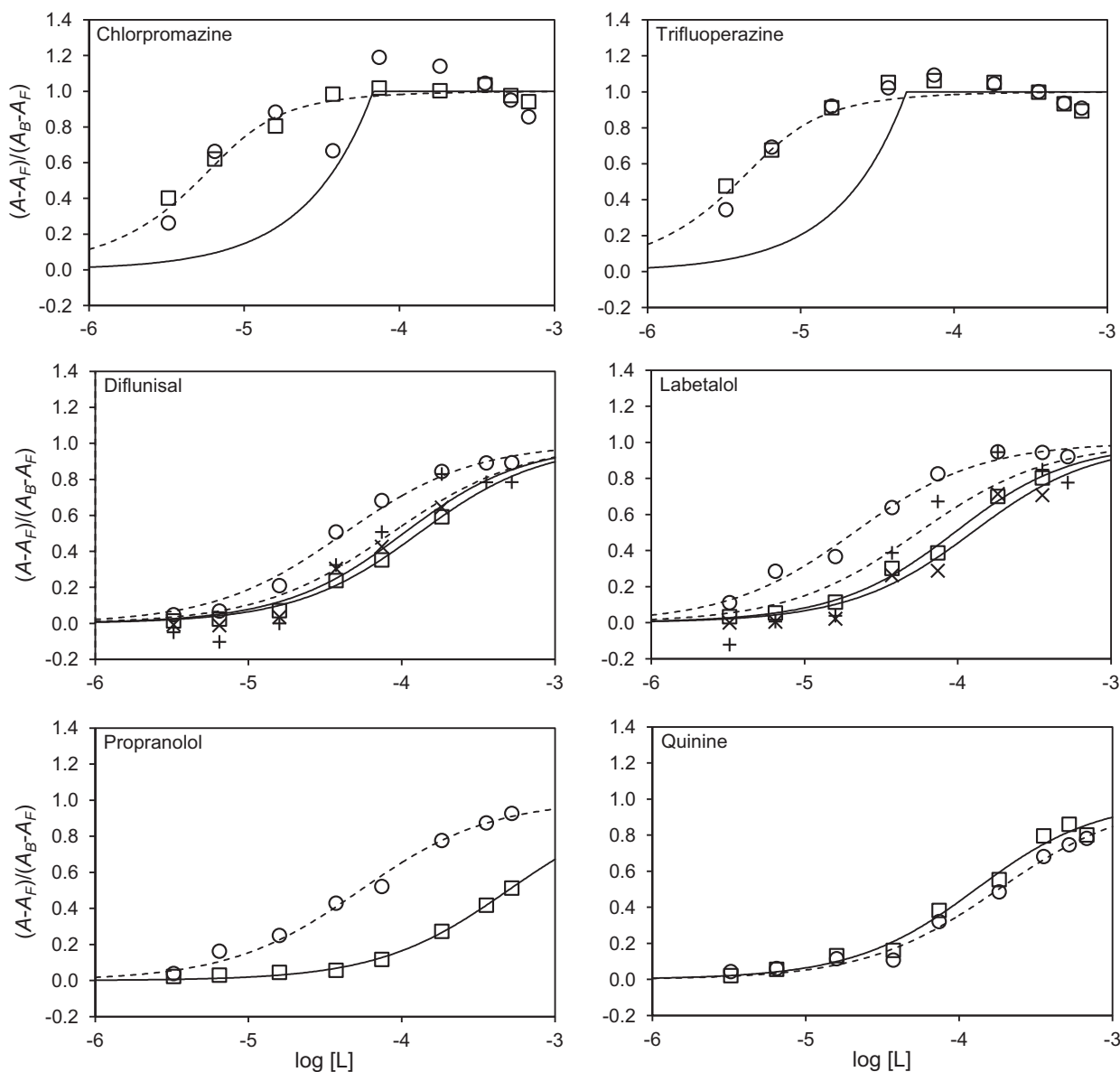


Fig. 4. Influence of liposome and drug concentrations on the normalized fluorescence anisotropy of six drugs. Relative A was determined at various egg PC concentrations and low (between 3.6 and 6.8 μM , circles) and high (between 36 and 68 μM , squares) drug concentrations. I_{vv} and I_{vh} of liposome solutions were subtracted from the respective sample values (labetalol and diflunisal) to correct for light scattering (+, low concentrations; \times high concentrations). Data were fit with Eq. (2). Dashed lines show the fit function at low concentrations, solid lines at high concentrations. No fit was possible for the data with high concentrations of chlorpromazine and trifluoperazine (solid lines indicate the functions with $K_D = 0$).

to that determined by equilibrium dialysis and potentiometry (see Tables 2 and 3).

Taking into account that for both labetalol and diflunisal correction with I_{vv} and I_{vh} of liposomes had lower impact on K_D estimated with the higher than the lower drug concentration and that no membrane alterations due to propranolol partitioning are expected, K_D estimated with the higher propranolol concentration was used for further analysis. The K_D values determined for quinine were similar at the two concentrations. $\log D$ was 3.9 at the lower and 4.1 at the higher concentration. Based on the above considerations, the latter was used for further comparisons.

3.3. Comparison of the results from fluorescence anisotropy measurements and equilibrium dialysis

Fig. 5A shows the relationships between $\log D_{anisotropy}$ and $\log D_{lip}$ determined by equilibrium dialysis. The correlation with

$\log P_{o/w}$ is shown in Fig. 5B. Eqs. (8) and (9) show the respective correlation functions.

$$\log D_{anisotropy} = 1.05 \cdot \log D_{lip} + 1.16 \quad (r^2 = 0.87, n = 5) \quad (8)$$

$$\log D_{anisotropy} = 0.78 \cdot \log P_{o/w} + 1.54 \quad (r^2 = 0.75, n = 6) \quad (9)$$

4. Discussion

Investigating the egg PC bilayer partitioning of six fluorescent drugs with different lipophilicity and acid/base characteristics we found a moderate correlation between the $\log D$ values estimated by fluorescence anisotropy and the reference method equilibrium dialysis. The goal was to evaluate fluorescence anisotropy measurements as an alternative approach to estimate membrane partitioning of a wide variety of drugs. We encountered several limitations that are summarized in Table 4.

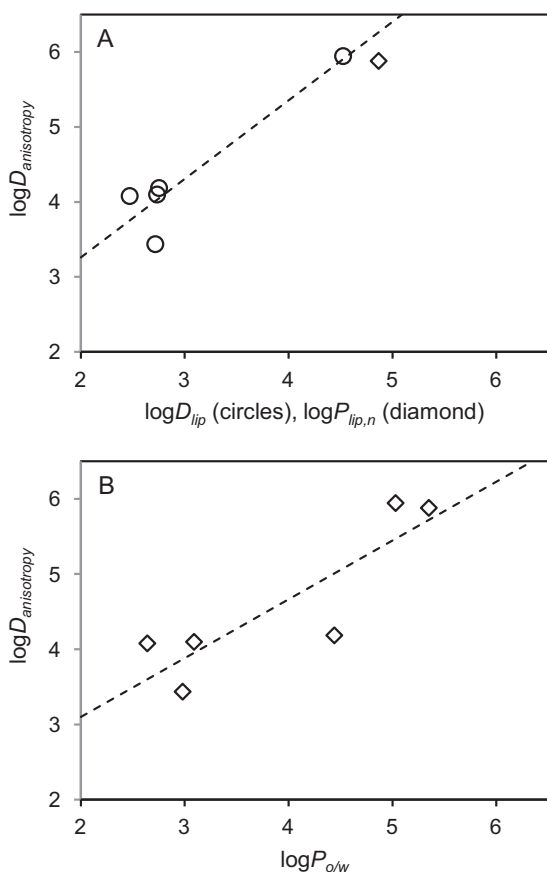


Fig. 5. Correlations between $\log D$ at pH 7.4 estimated by fluorescence anisotropy and other lipophilicity parameters. (A) Comparison with $\log D_{lip}$ at pH 7.4 from equilibrium dialysis (circles). Diamond, $\log P_{lip,n}$ of chlorpromazine for comparison (no $\log D_{lip}$ available at pH 7.4). Dashed line, linear regression between $\log D_{anisotropy}$ and $\log D_{lip}$, see Eq. (8). (B) Correlation between $\log D_{anisotropy}$ at pH 7.4 with published $\log P_{o/w}$ values (see Table 1). Dashed line, linear regression, see Eq. (9).

First, the solute needs fluorescent properties. The quantum yield should be high enough to allow $[S]$ below or in the range of K_D and $[S] \times D < 0.1 \times [L]_{bilayer}$. The quantum yield and spectral properties of weak acids or bases should ideally be pH-independent. This was not the case for the compounds in this work. The relationship between relative A and lipid concentration of acids and bases may, therefore, not only depend on the $\log P$ values of all relevant ionization species and their molar fractions, but also on their quantum yields. If only one species has significant fluorescence, the experimental $\log D$ corresponds to the $\log P$ of the fluorescent species. In our study, this would be the case for quinine. Only the cation showed significant fluorescence under the experimental conditions.

Comparing fluorescence anisotropy measurement and potentiometric titration, the latter has the advantage that no fluorescence or light absorbance or any other quantifiable property of the test compound is required. Fluorescence anisotropy has the advantages that no ionizable moiety is required and lower drug concentrations may be used, depending on the fluorescence quantum yield, avoiding solubility problems or saturation phenomena. Absence of an acidic or basic group is even preferable in anisotropy measurements as only one species with a particular quantum yield is present at any pH. The $\log P$ of these compounds cannot be determined by potentiometric titration and fluorescence anisotropy measurements could fill this gap if equilibrium dialysis is not an option. The two methods are thus complementary to each other. Compounds

Table 4

Comparison of fluorescence anisotropy measurement, potentiometric titration and equilibrium dialysis for the estimation of drug membrane partitioning.

	Fluorescence anisotropy	Potentiometric titration	Equilibrium dialysis
Required solute characteristics	Fluorescent moiety, ideally pH-independent fluorescence	Weak acidic or basic group	No restriction; quantification method required
Perturbing factors	Light scattering by liposomes; pH-dependent fluorescence	Protonation of phosphate groups at pH < 3 (relevant for compounds with low pK_a)	None obvious
Deviations from Nernst conditions ^a	At too high $[S]$. Low $[S]$ limited by fluorescence quantum yield	At too high $[S]$. Low $[S]$ limited by titration accuracy, typically 0.3 mM	At too high $[S]$. Low $[S]$ limited by analytical method
Required time for one compound ^b	1 h	Two hours (complete $\log D/pH$ profile)	Five hours (parallel measurements possible) plus time for analytics
Required amount of liposomes (lipids) ^b	5 mg	20 mg (complete $\log D/pH$ profile)	3 mg for one $\log D$ value ($n = 3$)

^a Excluding dissociation/association of weak acids/bases and phase miscibility.

^b Not including liposome preparation and other preparations.

that cannot be studied by potentiometric titration may be analyzed by fluorescence anisotropy.

Light scattering by the liposomes can significantly affect the anisotropy measurements and lead to artifacts. We used liposomes of about 200 nm diameter. A reduction in vesicle size could reduce the scattered light. Correction by subtracting the I_{vv} and I_{vh} of liposomes from the sample values did not result in $A < 0.4$. In addition, correction resulted in negative A values or significant data scatter in the A versus $[L]$ plots for four of the six investigated compounds. For two drugs the correction with I_{vv} and I_{vh} of the liposomes was possible and reduced the influence of $[S]$ on $\log D$, resulting in nearly concentration-independent results. Note that $\log D$ and $\log P$ are solute-concentration independent parameters.

The slope of the correlation line between anisotropy-derived $\log D$ values and $\log D_{lip}$ from equilibrium dialysis was close to unity. However, the intercept of the correlation was about 1, corresponding to a factor 10 in a linear scale. This means that D values estimated by anisotropy measurements were in average 10-fold higher than those determined by equilibrium dialysis. We can only speculate on the origin of this factor. We made several assumptions for the estimation of $\log D$ from the anisotropy measurements. One of them is that the drug–lipid interaction follows a 1:1 stoichiometry and that the interaction sites are independent of each other. This would be true for single dispersed lipids but is an oversimplification for the liposomes where more than one lipid may be required to accommodate one solute molecule. Another assumption was that only drug molecules partitioned into the bilayer become polarized. However, polarization may already occur in the vicinity of the membrane surface due to the membrane surface potential. Molecules in the vicinity of membrane surfaces could, therefore, mimic partitioned molecules. The observed intercept should be taken into account when $\log D$ is estimated from fluorescence anisotropy measurements.

5. Conclusion

The membrane affinity of a fluorescent solute can be estimated from fluorescence anisotropy measurements with liposomes at varying lipid concentrations. Light scattering effects by the liposomes and concentration-dependent partitioning of high affinity solutes can be corrected for to some extent. Although equilibrium dialysis and potentiometric titration reveal more accurate data, fluorescence anisotropy measurements may offer an alternative for a first estimation of lipid bilayer partitioning or if standard methods are not applicable. Differences in fluorescence quantum yields of the relevant ionization species should be taken into account for the interpretation of the results.

Acknowledgments

Financial support for J.M.P. from the Ministerio de Ciencia e Innovación of the Spanish Government is gratefully acknowledged (FPI Grant BES-2008-004463). We thank Sarah von Werdt for assistance with fluorescence measurements.

Appendix A. Estimation of membrane partitioning from anisotropy measurements

At very low concentrations of fluorescent solute (S) and an excess of lipids (L), anisotropy titrations with liposomes follow a hyperbolic function, thus an expression relating the observed A and $[L]$ can be written (Eq. (A1)):

$$A = \frac{A_B \times [L]}{K_D + [L]} \quad (\text{A1})$$

where A_B is A of the membrane-associated solute, *i.e.*, the maximal A if all solute molecules are associated with the bilayer, $[L]$ is the molar lipid concentration in the sample and K_D equals $[L]$ at half maximal A , *i.e.*, at $A_B/2$. The constant K_D may be defined here as the dissociation constant of the solute–lipid membrane interaction. Linearization of Eq. (A1) reveals Eq. (A2):

$$\frac{1}{A} = \frac{K_D}{A_B} \times \frac{1}{[L]} + \frac{1}{A_B} \quad (\text{A2})$$

Any contribution to the measured A by the free solute, the solvent or light scattering is not considered in Eqs. (A1) and (A2).

In the case of drug–liposome interactions, the experimentally determined A results from A of the partitioned solute, free solute and from background scatter (A_S) [32]. The contribution of partitioned solute equals the product of A_B and the molar fraction of partitioned solute, f_B , while the contribution of free solute equals the product of $1 - f_B$ and A_F , the anisotropy of the free species. A correction is required if free and partitioned solute have different quantum yields, according to the quantum yield ratio Q , defined as the quotient between the fluorescent intensities of the partitioned and free solute. Depending on the size and concentration of liposomes and the relation between solute fluorescence intensity and scattered light intensity, A_S significantly contributes to the observed A .

Roehrl et al. [42] established a theoretical base for the interpretation of drug–protein interactions measured by fluorescence anisotropy that can also be applied to drug–liposome interaction studies. This approach takes the contribution of A_F and Q into account. The molar fraction of bound drug, f_B , is calculated according to Eqs. (A3) and (A4):

$$f_B = \frac{A - A_F}{(A_B - A) \times Q + A - A_F} \quad (\text{A3})$$

$$f_B = \frac{K_D + [S] + [L] - \sqrt{(K_D + [S] + [L])^2 - 4 \times [S] \times [L]}}{2 \times [S]} \quad (\text{A4})$$

If Q equals 1, Eqs. (A3) and (A4) can be combined to Eq. (A5), which describes relative changes in A as a function of K_D , $[S]$ and $[L]$:

$$\frac{A - A_F}{A_B - A_F} = \frac{K_D + [S] + [L] - \sqrt{(K_D + [S] + [L])^2 - 4 \times [S] \times [L]}}{2 \times [S]} \quad (\text{A5})$$

In case of solute–concentration dependent conditions, both lipid and solute concentrations have to be considered. This is the case when the analysis requires low lipid concentrations in the range of the solute concentration to observe a change in f_B and thus A . As seen in Eq. (A1), this applies to solutes with a low K_D value, *i.e.*, high membrane affinity. In this case, K_D can be estimated from measurements at various lipid concentrations $[L]$ and known drug concentrations $[S]$ by non-linear regression analysis with Eq. (A5).

References

- [1] B. Testa, S.D. Krämer, H. Wunderli-Allenspach, G. Folkers (Eds.), *Pharmacokinetic Profiling in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies*, Wiley-VCH, Weinheim and Zurich, 2006.
- [2] M.P.E. Berthelot, E.C. Jungfleisch, Sur les lois qui président au partage d'un corps entre deux dissolvants (expériences), *Ann. Chim. Phys.* 4th 26 (1872) 396–407.
- [3] C. Hansch, T. Fujita, A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 1616–1626.
- [4] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* 71 (1971) 525–616.
- [5] M.M.B. Ribeiro, M.N. Melo, I.D. Serrano, N.C. Santos, M.A.R.B. Castanho, Drug–lipid interaction evaluation: why a 19th century solution? *Trends Pharmacol. Sci.* 31 (2010) 449–454.
- [6] G.V. Betageri, J.A. Rogers, Thermodynamics of partitioning of β -blockers in the *n*-octanol–buffer and liposome systems, *Int. J. Pharm.* 36 (1987) 165–173.
- [7] G.M. Pauletti, H. Wunderli-Allenspach, Partition coefficients in vitro: artificial membranes as a standardized distribution model, *Eur. J. Pharm. Sci.* 1 (1994) 273–281.
- [8] S.D. Krämer, Liposome/water partitioning: theory, techniques and applications, in: B. Testa, H. van de Waterbeemd, G. Folkers, R. Guy (Eds.), *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*, Wiley-VCH, Zürich, 2001, pp. 401–428.
- [9] G.P. van Balen, C.A.M. Martinet, G. Caron, G. Bouchard, M. Reist, P. Carrupt, et al., Liposome/water lipophilicity: methods, information content, and pharmaceutical applications, *Med. Res. Rev.* 24 (2004) 299–324.
- [10] D. Marsh, *Handbook of Lipid Bilayers*, 2nd ed., CRC Press, Boston, MA, USA, 2010.
- [11] S.D. Krämer, H. Wunderli-Allenspach, The pH-dependence in the partitioning behaviour of (RS)-[3H]propranolol between MDCK cell lipid vesicles and buffer, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1851–1855.
- [12] C. Ottiger, H. Wunderli-Allenspach, Partition behaviour of acids and bases in a phosphatidylcholine liposome–buffer equilibrium dialysis system, *Eur. J. Pharm. Sci.* 5 (1997) 223–231.
- [13] S.D. Krämer, C. Jakits-Deiser, H. Wunderli-Allenspach, Free fatty acids cause pH-dependent changes in drug–lipid membrane interactions around physiological pH, *Pharm. Res.* 14 (1997) 827–832.
- [14] S.D. Krämer, A. Braun, C. Jakits-Deiser, H. Wunderli-Allenspach, Towards the predictability of drug–lipid membrane interactions: the pH-dependent affinity of propranolol to phosphatidylinositol containing liposomes, *Pharm. Res.* 15 (1998) 739–744.
- [15] A. Avdeef, pH-metric $\log P$. Part 1: difference plots for determining ion-pair octanol–water partition coefficients of multiprotic substances, *Quant. Struct.: Act. Relat.* 11 (1992) 510–517.
- [16] A. Avdeef, pH-metric $\log P$. II: refinement of partition coefficients and ionization constants of multiprotic substances, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 82 (1993) 183–190.
- [17] K. Takács-Novák, A. Avdeef, Interlaboratory study of $\log P$ determination by shake-flask and potentiometric methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1405–1413.
- [18] K. Takács-Novák, K.J. Box, A. Avdeef, Potentiometric pK_a determination of water-insoluble compounds: validation study in methanol/water mixtures, *Int. J. Pharm.* 151 (1997) 235–248.
- [19] S.D. Krämer, J. Gautier, P. Saudemon, Considerations on the potentiometric $\log P$ determination, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1310–1313.
- [20] A. Avdeef, K.J. Box, J. Comer, C. Hibbert, K.Y. Tam, pH-metric $\log P$ 10. Determination of liposomal membrane–water partition coefficients of ionizable drugs, *Pharm. Res.* 15 (1998) 209–215.
- [21] C. Barzanti, R. Evans, J. Fouquet, L. Gouzin, N.M. Howarth, G. Kean, et al., Potentiometric determination of octanol–water and liposome–water partition coefficients ($\log P$) of ionizable organic compounds, *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 3337–3341.
- [22] B.I. Escher, R.P. Schwarzenbach, J.C. Westall, Evaluation of liposome–water partitioning of organic acids and bases. 2: comparison of experimental determination methods, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 3962–3968.

- [23] G.P. van Balen, G. Caron, G. Ermondi, A. Pagliara, T. Grandi, G. Bouchard, et al., Lipophilicity Behaviour of the zwitterionic antihistamine cetirizine in phosphatidylcholine liposomes/water systems, *Pharm. Res.* 18 (2001) 694–701.
- [24] N.C. Santos, M. Prieto, M.A.R.B. Castanho, Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods, *Biochim. Biophys. Acta* 1612 (2003) 123–135.
- [25] M.H.A. Roehrl, J.Y. Wang, G. Wagner, Discovery of small-molecule inhibitors of the NFAT-calcineurin interaction by competitive high-throughput fluorescence polarization screening, *Biochemistry – US* 43 (2004) 16067–16075.
- [26] T. Wybranowski, M. Cyrankiewicz, B. Ziolkowska, S. Kruszewski, The HSA affinity of warfarin and flurbiprofen determined by fluorescence anisotropy measurements of camptothecin, *Biosystems* 94 (2008) 258–262.
- [27] A. Vaasa, I. Viil, E. Enkvist, K. Viht, G. Raidaru, D. Lavogina, et al., High-affinity bisubstrate probe for fluorescence anisotropy binding/displacement assays with protein kinases PKA and ROCK, *Anal. Biochem.* 385 (2009) 85–93.
- [28] A. Marczak, Fluorescence anisotropy of membrane fluidity probes in human erythrocytes incubated with anthracyclines and glutaraldehyde, *Bioelectrochemistry* 74 (2009) 236–239.
- [29] S. Bhandary, R. Basu, D. Suckan, P. Nandy, Effect of some statin group of drugs on the phase profile of liposomal membrane – a fluorescence anisotropy study, *Phase Transit.* 82 (2009) 821–830.
- [30] S. Bhandary, R. Basu, D. Suckan, P. Nandy, Comparison of the effect of anti-hyperlipidemic drugs from different groups on the phase profile of liposomal membrane—a fluorescence anisotropy study, *Phase Transit.* 83 (2010) 518–525.
- [31] S. Lopes, C.S. Neves, P. Eaton, P. Gameiro, Cardiolipin, a key component to mimic the *E. coli* bacterial membrane in model systems revealed by dynamic light scattering and steady-state fluorescence anisotropy, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1357–1366.
- [32] C. Nunes, G. Brezesinski, D. Lopes, J.L.F.C. Lima, S. Reis, M. Lúcio, Lipid–drug interaction: biophysical effects of tolmetin on membrane mimetic systems of different dimensionality, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 12615–12623.
- [33] T.G. Burke, T.R. Tritton, Structural basis of anthracycline selectivity for unilamellar phosphatidylcholine vesicles: an equilibrium binding study, *Biochemistry – US* 24 (1985) 1768–1776.
- [34] Z. Huang, R.P. Haugland, Partition coefficients of fluorescent probes with phospholipid membranes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181 (1991) 166–171.
- [35] M.A.R.B. Castanho, M.J.E. Prieto, Fluorescence study of the macrolide pentaine antibiotic filipin in aqueous solution and in a model system of membranes, *Eur. J. Biochem.* 207 (1992) 125–134.
- [36] A. Lopes, A.L. Maçanita, F.S. Pina, E. Melo, H. Wamhoff, Multiequilibria of 2-(2'-furanyl)-1H-benzimidazole neutral and protonated forms in the presence of amphiphilic aggregates, *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 2448–2453.
- [37] H. Bensikaddour, K. Snoussi, L. Lins, F. Van Bambeke, P.M. Tulkens, R. Brasseur, et al., Interactions of ciprofloxacin with DPPC and DPPP: fluorescence anisotropy, ATR-FTIR and ³¹P NMR spectroscopies and conformational analysis, *BBA – Biomembranes* 1778 (2008) 2535–2543.
- [38] G. Neunert, P. Polewski, M. Markiewicz, P. Walejko, S. Witkowski, K. Polewski, Partition of tocopheryl glucopyranoside into liposome membranes studied by fluorescence methods, *Biophys. Chem.* 146 (2010) 92–97.
- [39] S. Veiksina, S. Kopanchuk, A. Rincken, Fluorescence anisotropy assay for pharmacological characterization of ligand binding dynamics to melanocortin 4 receptors, *Anal. Biochem.* 402 (2010) 32–39.
- [40] G.G. Gibault, *Practical Fluorescence*, 2nd ed., Revised and Expanded, CRC Press, London, UK, 1990.
- [41] J.R. Lakowicz, *Fluorescence Anisotropy, Principles of Fluorescence Anisotropy*, 2nd ed., Springer, New York, 1999.
- [42] M.H.A. Roehrl, J.Y. Wang, G. Wagner, A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein–protein interactions by fluorescence polarization, *Biochemistry* 43 (2004) 16056–16066.
- [43] A.S. Ladokhin, S. Jayasinghe, S.H. White, How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Anal. Biochem.* 285 (2000) 235–245.
- [44] M.A.R.B. Castanho, N.C. Santos, L.M.S. Loura, Separating the turbidity spectra of vesicles from the absorption spectra of membrane probes and other chromophores, *Eur. Biophys. J.* 26 (1997) 253–259.
- [45] A. Avdeef, K.J. Box, J.E.A. Comer, M. Gilges, M. Hadley, C. Hibbert, W. Patterson, K.Y. Tam, pH-metric log *P* 11. p*K*_a determination of water-insoluble drugs in organic solvent–water mixtures, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999) 631–641.
- [46] V. Borenstain, Y. Barenholz, Characterization of liposomes and other lipid assemblies by multiprobe fluorescence polarization, *Chem. Phys. Lipids* 64 (1993) 117–127.
- [47] V. Martínez, M.I. Maguregui, R.M. Jiménez, R.M. Alonso, Determination of the p*K*_a values of β-blockers by automated potentiometric titrations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 459–468.
- [48] Biolum Online Database. <http://www.biobyte.com/index.html>.
- [49] L.G. Chatten, L.E. Harris, Relationship between p*K*_b(H₂O) of organic compounds and E_{1/2} values in several nonaqueous solvents, *Anal. Chem.* 34 (1962) 1495–1501.
- [50] M.J. O'Neil, P.E. Heckelman, C.B. Koch, K.J. Roman (Eds.), *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 14th ed., Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA, 2006.
- [51] R.I. Allen, K.J. Box, J.E.A. Comer, C. Peake, K.Y. Tam, Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants of ionizable drugs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 699–712.
- [52] A. Avdeef, *Absorption and Drug Development*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 2003.

