

应用反相离子对色谱同时测定酸、碱及两性药物辛醇/水分配系数

祝 辉^{1,2*}, 杨日芳¹, 恽榴红¹, 姜 玉², 李 锦¹

(1. 中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850;
2. 中国人民解放军成都军区联勤部药品仪器检验所, 四川 成都 610017)

摘要: 建立一种适合同时测定酸、碱及两性药物辛醇/水分配系数 ($\log P$) 的反相离子对色谱 (RP-IPC) 方法。基于有机相比例 ϕ 变化与相应的色谱保留参数 $\log k'$ 值之间的线性关系, 回归计算相对于 100% 水相时分析物色谱保留 $\log k_w$ 值, 并用于表征化合物 $\log P$ 值。测得各药物对照品 $\log k_w$ 与文献报道“摇瓶法”测得 $\log P$ 值接近, 平均差值为 0.31。三氟乙酸反相离子对色谱提高了测定适用范围, 且准确度较高, 可用于一定范围内酸碱度不同药物辛醇/水分配系数的同时测定。

关键词: 反相离子对色谱; 辛醇/水分配系数; 三氟乙酸

中图分类号: R282.71; R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2009) 09-1025-04

Application of reversed-phase ion-pair chromatography for universal estimation of octanol-water partition coefficients of acid, basic and amphoteric drugs

ZHU Hui^{1,2*}, YANG Ri-fang¹, YUN Liu-hong¹, JIANG Yu², LI Jin¹

(1. Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;
2. Institute for Drug and Instrument Control of Chengdu Military Region of PLA, Chengdu 610017, China)

Abstract: This paper is to establish a reversed-phase ion-pair chromatography (RP-IPC) method for universal estimation of the octanol/water partition coefficients ($\log P$) of a wide range of structurally diverse compounds including acidic, basic, neutral and amphoteric species. The retention factors corresponding to 100% water ($\log k_w$) were derived from the linear part of the $\log k'/\phi$ relationship, using at least four isocratic $\log k'$ values containing different organic compositions. The $\log k_w$ parameters obtained were close to the corresponding $\log P$ values obtained with the standard “shake flask” methods. The mean deviation for test drugs is 0.31. RP-IPC with trifluoroacetic acid as non classic ion-pair agents can be applicable to determine the $\log P$ values for a variety of drug-like molecules with increased accuracy.

Key words: reversed-phase ion-pair chromatography; octanol-water partition coefficient; trifluoroacetic acid

近年来, 组合化学及自动化合成技术的发展极大的促进了药物研发进程, 大量新化学实体成为候选药物, 早期、快速预测化合物类药性对指导药物设计、合成具有重要意义。其中, 药物辛醇/水分配系数

($\log P$) 是一个重要的评价参数, 脂溶性大小显著影响药物在体内的吸收、分布、代谢、排泄等药动学过程^[1]。目前, 虽然已有 20 余种计算软件可用于 $\log P$ 的初步预测, 例如 Pallas、ClogP 等, 但对异构体、对映体及某些结构中含金属原子的药物, 计算方法不能准确预测^[2]。建立高效、准确的实验方法用于药物辛醇/水分配系数的测定具有重要意义。随着研究的深入开展, RP-HPLC 方法已经逐步替代了传统的

收稿日期: 2009-03-08.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2003CB 515400).

*通讯作者 Tel: 86-10-66874611, E-mail: zwhw797@gmail.com

“摇瓶法”。相比“摇瓶法”，RP-HPLC方法具有样品用量少、纯度要求低、测定快速、测定脂溶性范围广泛的优点，且其自动化程度高，有利于实现高通量筛选的目的^[3,4]。微乳液电动色谱、固定人工膜色谱、pH计方法等也有相关的研究，但应用有限^[5-7]。

目前，对于RP-HPLC测定体系的优化，主要集中在更精确的模拟药物在辛醇/水分配系统中的分配过程，提高测定的准确度^[8-10]。部分研究^[11]涉及色谱体系适用范围提高，但未取得明显的进展。RP-HPLC测定体系基于被测组分官能团构成可分为3大类，即酸性、碱性及两性药物测定体系，通常根据分析物酸碱性质调节流动相pH范围以抑制酸性药物的解离或碱性药物的质子化，在中性态对其色谱保留参数进行测定。反之，化合物离子化导致色谱保留参数复杂化，除自身疏水性因素外，还与流动相改变造成的解离常数(pK_a)变化相关^[12]。此外，酸性化合物解离造成的色谱峰拖尾及质子化碱出峰变快均影响测定的准确性。由此可见，酸、碱化合物对流动相pH要求的不同造成测定体系难以统一。

“Chaotropic”盐，例如三氟乙酸(CF₃COO⁻)、高氯酸(ClO₄⁻)、六氟磷酸(PF₆⁻)是一种非经典的阴离子对试剂，在酸性体系中能使含氮有机碱质子化，并与其形成“中性”离子对复合物，现已广泛用于碱性药物的分离测定，具有测定分离度好、柱效高的优点^[13]。对流动相含PF₆⁻色谱体系的研究认为：离子对复合物色谱保留参数与流动相变化线性相关，即logk'值与流动相比例φ同样符合线性溶剂强度模型，logk_w值能表征辛醇/水分配系数^[14]。本文对三氟乙酸(TFA)反相离子对色谱进行了考察，结果离子对复合物及中性化合物(包括非解离酸)logk'值与φ均符合线性溶剂强度模型，得到的logk_w值与已知中性化合物logP值具有线性相关。此外，对系列分析物在该色谱系统中的保留机制进行了讨论，证实三氟乙酸反相离子对色谱适用于不同酸碱度及两性药物辛醇/水分配系数的测定。

材料与方法

仪器与试剂 Waters 600型高效液相色谱仪，UV/VIS-155检测器，测定波长254 nm，色谱柱Apollo C₁₈(250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm)，Waters Millennium色谱工作站；苯甲酸(benzoic acid)、对氨基苯甲酸(4-aminobenzoic acid)等试剂购自Sigma公司；氟哌啶醇(haloperidol)、利多卡因(lidocaine)、丁螺环酮(buspirone)、吡罗昔康(piroxicam)等购自中国药品

生物制品检定所。

色谱条件 流动相A：含0.1% TFA的NaH₂PO₄缓冲液(v/v)，磷酸调至pH 3.0；流动相B：含0.1% TFA的甲醇(v/v)；A、B两相在线混合，流动相B比例范围为30%~80%，等度洗脱，测定4个流动相比例变化相应保留时间(t_r)；柱温：25℃，流速：1.0 mL·min⁻¹，死时间(t₀)由乙腈峰测定；每一进样重复测定3次，取平均值，按下式计算logk'值：

$$\log k' = \log[(t_r - t_0)/t_0] \quad (1)$$

统计学分析 使用Origin 6.0进行统计学分析。

结果与讨论

1 色谱条件的选择

本研究拟应用酸性三氟乙酸流动相体系对酸、碱、中性及两性化合物进行测定。在此条件下，流动相三氟乙酸浓度、pH值及分析物自身解离常数(pK_a、pK_b或pI)是影响其色谱保留行为的主要因素。基于以上考虑，首先根据实验用Apollo C₁₈色谱柱pH适用范围(2~10.5)，将测定pH值设定为3.0。在此pH条件下，对于酸性化合物，如本实验中酸性较强的苯甲酸(pK_a = 4.2)和水杨酸(pK_a = 2.98)，其解离被充分抑制，色谱保留行为与中性化合物一致；对于含氮有机碱类药物，实验用分析物(pK_b > 7)在pH值小于7时即被质子化，在pH 3.0缓冲液中主要以质子化氮形式存在；对于含氮两性化合物，其存在形式与缓冲液pH值及pI密切相关。本实验中对氨基苯甲酸(pI = 3.90)及吡罗昔康(pI = 3.66)的等电点均大于3，pH 3.0时整个分子同样表现为质子化氮形式。由此可见，通过对流动相pH的调节，将系列酸碱度不同分析物在流动相中存在形式进行了简化，可看作中性分子形式(包括未解离酸)和氮质子化形式。

当分析物以质子化氮形式存在时，进一步对质子化氮/三氟乙酸离子对色谱保留与CF₃COO⁻浓度变化关系进行了考察。根据待测系列化合物中可质子化氮的数量，分别测定了氟哌啶醇、丁螺环酮及邻氯苯胺(o-chloroaniline)在不同TFA浓度下的相对保留时间k'值。图1显示，随CF₃COO⁻浓度增加，k'值均增加，当浓度达到0.1%时趋向饱和，该结果与相关文献^[15]报道一致。从图1中还可看出，可质子化氮较多的氟哌啶醇在低浓度范围时，k'值变化最大，进一步说明离子对形成程度对分析物色谱保留有显著的影响。为有效避免TFA浓度导致的色谱保留差异，分析采用0.1% TFA作为测定浓度。

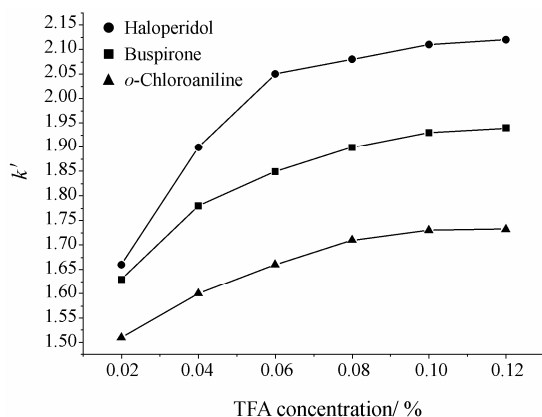


Figure 1 Dependence of solutes relative retention times on TFA concentration in isocratic elute (organic phase B fixed at 70%) at pH 3.0

2 辛醇/水分配系数测定

基于以下线性溶剂强度模型^[16], 对 8 个代表性参比化合物 ϕ 值与相应 4 次等度洗脱 $\log k'$ 进行线性回归, 得 100%水相时的 $\log k_w$ 值及相应回归斜率 S 值, 见表 1。

$$\log k' = \log k_w - S\phi \quad (2)$$

Table 1 Reference compounds and their derived $\log k_w$ values

Reference compound	$\log k_w$	$\log P^a$	S^b
Naphthalene	2.68	3.37	3.50
Benzoxazolone	1.14	1.16	2.60
<i>o</i> -Chloroaniline	1.58	1.90	3.00
Benzoic acid	1.56	1.87	2.80
Benzamide	0.69	0.64	2.36
4-Aminobenzoic acid	0.53	0.83	2.10
Anisole	1.88	2.11	2.96
Benzonitrile	1.34	1.56	2.67

^aReference values^[8-10]; ^bSlope in equation 2

普遍认为 $\log k_w$ 值与 S 值的线性相关表征被测物与色谱系统之间相互作用机制的一致性^[10]。根据表 1 测定结果, 将 8 个参比化合物 $\log k_w$ 值与相应斜率 S 值进行线性回归, 结果见方程 3 及图 2。

$$S = 1.60 (\pm 0.11) \log k_w - 2.96 (\pm 0.31) \quad (3)$$

$$n = 8, r = 0.98, s = 0.12, P < 0.000 1$$

在酸性 TFA 测定体系下, 酸性化合物的解离被充分抑制而处于中性态, 含氮碱性和两性分析物则转变为质子化氮形式, 再与非经典阴离子对试剂 CF_3COO^- 形成“中性”离子对复合物, 从而表现为“中性”分子色谱保留。方程 3 相关系数为 0.98, 线性关系显著 ($P < 0.000 1$), 图 2 表明无异常值, 证实三氟乙酸离子对复合物与中性化合物色谱保留机制一致, 主要通过疏水交互作用控制其色谱保留行为,

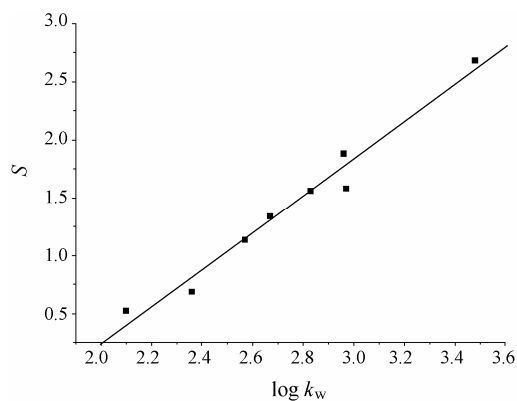


Figure 2 Relationship between $\log k_w$ and slope (S) in the presence of TFA

由于 CF_3COO^- 自身疏水性小且对色谱保留的贡献值恒定, 其色谱保留参数应与中性分子辛醇/水分配系数相对应。在实际应用中, 一般将测定所得 $\log k_w$ 直接作为分析物辛醇/水分配系数预测值或作为组合库化合物辛醇/水分配系数度量值。

本文拟对三氟乙酸反相离子对体系下分析物色谱保留过程与经典“摇瓶法”中辛醇/水分配过程相似程度进一步探讨。为此, 将 8 个参比化合物 $\log k_w$ 与已知 $\log P$ 线性回归, 得回归方程 4。方程 4 中斜率值是表征被测物色谱分配过程与经典“摇瓶法”中辛醇/水分配过程之间自由能相似程度的重要参数^[17]。实验测得的斜率值接近 1, 表明三氟乙酸反相离子对色谱体系能较好的模拟“摇瓶法”辛醇/水分配过程。

$$\log P = 1.25 \log k_w - 0.10 \quad (4)$$

$$n = 8, r = 0.98, s = 0.16, P < 0.000 1$$

最后, 采用该体系对结构较为复杂的药物分子 $\log k_w$ 进行了测定, 以验证该方法在实际应用中的可靠性。此外, 采用 ChemDraw 软件 ClogP 模块 (基于

Table 2 Test drug and their derived $\log k_w$ values

Test drugs	$\log k_w$	ClogP ^a	$\log P^b$	Type
Salicylic-acid	2.10	2.18	2.27	Acid
Ibuprofen	3.15	3.67	3.87	Acid
Fenbufen	3.04	3.14	3.39	Acid
Quinine	1.25	2.78	1.48	Base
Buspirone	2.06	1.22	2.60	Base
Trazodone	2.31	3.16	2.54	Base
Lidocaine	1.62	1.95	1.71	Base
Haloperidol	2.35	3.86	2.98	Base
Amitriptyline	2.15	2.85	2.50	Base
Carbamazepine	1.97	2.78	2.19	Neutral
Bromazepam	1.56	1.70	1.65	Neutral
Piroxicam	1.37	1.88	1.61	Ampholyte

^aCalculated values (ChemDraw Ultra11.0); ^bReported values of test drugs^[8, 9]

片段叠加算法) 计算了被测药物 $\log P$ 值, 结果见表 2。测得各药物对照品 $\log k_w$ 与文献报道“摇瓶法”测得 $\log P$ 值接近, 平均差值为 0.31, 计算值 (ClogP) 与报道 $\log P$ 值平均差值为 0.52。说明 TFA 反相离子对体系能较好的预测药物实际 $\log P$ 值, 且较之一般计算方法更为可靠, 可用于替代“摇瓶法”测定辛醇/水分配系数。

结论

本方法充分利用非经典阴离子对试剂 CF_3COO^- 能与质子化氨形成“中性”离子对复合物的特性, 综合考虑分析物酸碱解离常数大小及色谱柱酸碱适用范围, 确定了适宜的 pH 值条件, 在酸性三氟乙酸流动相体系下, 对该测定范围内酸、碱、中性及两性化合物的色谱保留机制进行了探讨, 实验结果表明, 系列分析物色谱保留行为与“中性”分子自身疏水性相关, 并且证实该反相离子对色谱体系能较好的模拟“摇瓶法”辛醇/水分配过程, 预测值与文献值接近。阴离子对试剂 CF_3COO^- 的应用避免了样品离子化造成色谱保留参数与 $\log P$ 值之间相关性差的缺点。更为重要的是, 该方法扩大了测定范围, 在色谱柱 pH 适用范围内, 适用于不同酸碱度药物及两性药物 $\log P$ 值的同时测定, 不必更换色谱体系, 结合色谱仪器本身自动化程度高的特点, 有望满足组合化学及自动化合成技术发展所需的高通量筛选需求。

References

- [1] Vieth M, Siegel MG, Higgs RE, et al. Characteristic physical properties and structural fragments of marketed oral drugs [J]. *J Med Chem*, 2004, 47: 224-228.
- [2] Su L, Yang J, Wang YQ, et al. Introduction and comparison of softwares used in calculating lipid/water partition coefficient of compounds [J]. *J Chin Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2008, 39: 178-182.
- [3] Henchoz Y, Guillarme D, Rudaz S, et al. High-throughput $\log P$ determination by ultraperformance liquid chromatography: a convenient tool for medicinal chemists [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 396-399.
- [4] Pliska V, Testa B, van de Waterbeemd H, et al. Lipophilicity in Drug Action and Toxicology [M]. Weinheim: VCH Publishers, 1996: 311-337.
- [5] Barbato F, Cirocco V, Grumetto L, et al. Comparison between immobilized artificial membrane (IAM) HPLC data and lipophilicity in *n*-octanol for quinolone antibacterial agents [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 31: 288-297.
- [6] Kah M, Brown CD. LogD: lipophilicity for ionisable compounds [J]. *Chemosphere*, 2008, 72:1401-1408.
- [7] Jiang XM, Wei WL, Xia ZN, et al. A novel microemulsion electrokinetic chromatography for measuring lipid-water partition coefficients of pharmaceuticals [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 2006, 41:1020-1024.
- [8] Benhaim D, Grushka E. Effect of *n*-octanol in the mobile phase on lipophilicity determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a modified silica column [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1209: 111-119.
- [9] Giaginis C, Theocharis S, Tsantili-Kakoulidou A. Contribution to the standardization of the chromatographic conditions for the lipophilicity assessment of neutral and basic drugs [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 573: 311-318.
- [10] Giaginis C, Theocharis S, Tsantili-Kakoulidou A. Octanol/water partitioning simulation by reversed-phase high performance liquid chromatography for structurally diverse acidic drugs: effect of *n*-octanol as mobile phase additive [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1166: 116-125.
- [11] Lombardo F, Shalaeva MY, Tupper KA, et al. ElogDoct: a tool for lipophilicity determination in drug discovery [J]. *J Med Chem*, 2001, 44: 2490-2497.
- [12] Rosés M, Subirats X, Bosch E. Retention models for ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography effect of variation of mobile phase composition and temperature [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 1756-1775.
- [13] Cecchi T, Passamonti P. Retention mechanism for ion-pair chromatography with chaotropic reagents [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 1789-1797.
- [14] Fliieger R, Świeboda R. Application of chaotropic effect in reversed-phase liquid chromatography of structurally related phenothiazine and thioxanthene derivatives [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1192: 218-224.
- [15] Hashem H, Jira T. Effect of chaotropic mobile phase additives on retention behaviour of beta-blockers on various reversed-phase high-performance liquid chromatography columns [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1133: 69-75.
- [16] Valkó K, Snyder LR, Glajch JL. Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition [J]. *J Chromatogr A*, 1993, 656: 501-520.
- [17] Liu XL, Tanaka H, Yamauchi A. Determination of lipophilicity by reversed-phase high-performance liquid chromatography influence of 1-octanol in the mobile phase [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1091: 51-59.