

磷脂膜色谱与正辛醇/水系统亲脂性测量尺度的比较

孙进^{*}, 程刚, 何仲贵, 王淑君

(沈阳药科大学 药学院 生物药剂学研究室, 辽宁 沈阳 110016)

关键词: 磷脂膜色谱系统; 正辛醇/水系统; 亲脂性

中图分类号: R913; R945.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2003)10-0791-04

Comparative study of lipophilicity from immobilized artificial chromatography and *n*-octanol/buffer systemsSUN Jin^{*}, CHENG Gang, HE Zhong-gui, WANG Shu-jun

(Department of Biopharmaceutics, School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Aim** To compare lipophilicity measuring scale stemmed from immobilized artificial membrane chromatography and *n*-octanol/buffer systems. **Methods** A test set consisted of 27 structurally diverse compounds. The lipophilicity of these were evaluated by both immobilized artificial membrane chromatography (IAMC) and *n*-octanol/buffer systems, which were expressed as $\lg k_{IAM}$ and $\lg D_{n-o, 7.2}$, respectively. **Results** With regard to each individual group, good correlation coefficient (r^2) over 0.81 was obtained (0.82 for acid, 0.88 for neutral, 0.81 for base and 0.92 for ampholyte, respectively). However, a smaller r^2 (0.62) was acquired for all compounds studied than that of each individual group. **Conclusion** IAMC and *n*-octanol/buffer systems were shown to be different in lipophilicity.

Key words: immobilized artificial membrane chromatography; *n*-octanol/buffer system; lipophilicity

磷脂膜色谱 (immobilized artificial membrane chromatography, IAMC) 是 20 世纪 90 年代初发展起来的一个高通量筛选药物与磷脂膜相互作用和具有适宜体内药代动力学特征候选药物的工具¹⁻⁴。近年来, 研究结果^{5,6}表明, 由于磷脂膜色谱能较好的模拟细胞膜有序磷脂层的空间环境, 因此, 它通常要比正辛醇/水系统更能准确的评价药物与生物膜的相互作用和获得更精确的药物亲脂性参数。因为尚未见磷脂膜色谱和正辛醇/水系统亲脂性测量尺度的系统性比较研究, 所以本文选择了 27 个不同化学结构类型药物的集合, 包括酸性、碱性、中性和两性化合物, 分别使用正辛醇/水系统和磷脂膜色谱两种生物膜相互作用评价系统对这一系列化合物的亲脂性

参数进行考察, 进而比较这两种不同的生物膜模拟系统。

材料与方法

药品与试剂 格帕沙星、环丙沙星、左氧氟沙星和 OPC-17203 由日本大冢制药株式会社提供; HSR-903 和 NR-762 由日本北陆制药株式会社提供; 奎尼丁、普萘洛尔、阿莫西林、对氨基水杨酸、吡啶酸、利多卡因、普鲁卡因酰胺和正辛醇 (Sigma Chem Co., St Louis, MO, USA); 对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、氨基苄基林、红霉素、地塞米松、对硝基苯酚、链霉素、苯巴比妥、巴比妥、奥索利酸、奈啶酸和青霉素 G (Wako Chem Co., Osaka, Japan)。

仪器 高效液相色谱系统由 LC-10AD 泵、SPD-10AD 紫外分光检测器、CTO-6A 恒温箱和 C-R6A 积

收稿日期: 2002-10-17.

^{*} 通讯作者 Tel: 86-24-23953083, Fax: 86-24-23841116.

E-mail: sunjin66@21cn.com

分仪组成(Shimadzu, Kyoto, Japan); IAM PC-MC 磷脂膜色谱柱(12 μm , 4.6 mm $\times$ 150 mm, Regis Chem Co., Morton Grove, IL); pH 值测定仪(Horiba, pH-meter F-21, Tokyo, Japan); 紫外分光光度计(DU-650, Beckman Instrument, Inc., Fullerton, CA, USA)。

磷脂膜色谱容量因子的测定 使用 pH 7.4, 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 磷酸盐缓冲液作为流动相从色谱柱上洗脱药物。将 NaCl 8 g, KCl 0.2 g 和 KH $_2$ PO $_4$ 1.36 g 溶于 1 L 蒸馏水中, 搅拌至澄清, 用 NaOH 调节 pH 7.4, 得 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 磷酸盐缓冲液。对于不加有机调节剂不能从色谱柱上洗脱下来的强亲脂性化合物, 在流动相中加入了有机调节剂(乙腈)以增强其洗脱能力, 其中乙腈在流动相中的百分比(φ)在(0~30)%。药物在柱上的保留能力用其容量因子对数值($\lg k_{\text{IAM}}$)表示: $\lg k_{\text{IAM}} = \lg(t_R - t_0)/t_0$, 式中 t_R 为药物在色谱柱上的保留时间, t_0 为死时间。将不同流动相下药物的容量因子(k_{IAM})归一化到 φ 为零时的容量因子(k_{IAM}^0), 它代表磷脂膜色谱系统中药物的膜亲和性参数^[8]。柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$; 流速为 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$; 所有化合物的紫外检测波长为 215 nm; 受试药物浓度为 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 进样体积 15 μL 。

药物脂水分配系数的测定 用摇瓶法测定药物在正辛醇/水系统中的脂水分配系数($D_{\text{OW}, 7.4}$)。将 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液与正辛醇溶剂彼此饱和 24 h, 然后混合缓冲液与正辛醇, 加入药物储备液(浓度为 4~10 mmol $\cdot$ L $^{-1}$)至水相中, 使药物在水相中的浓度为 40~200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其中缓冲液与正辛醇的体积比根据药物的分配系数而定, 目的是使在分配平衡后水相中药物容易测定。然后样品在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴上振荡和平衡 4 h, 离心(700 $\times g$, 10 min), 分离两相。在不同药物最佳紫外检测波长下, 测定水相中药物浓度。根据质量守恒定律, 计算相应正辛醇相中药物浓度以及脂水分配系数。每个数值表示 3 次平行实验的平均值。

结果与讨论

本文的目的是比较研究磷脂膜色谱和正辛醇/水系统的亲脂性测量尺度, 选择的受试药物集合由不同化学结构类型的 27 个化合物组成, 包括碱性、酸性、中性和两性化合物共 4 类。鉴于该受试集合包括 9 个两性、5 个碱性、7 个酸性和 6 个中性化合物, 因此化合物与磷脂膜或正辛醇相的相互作用包括多种类型分子间作用力和多种分配机理, 即该集

合中药物的选择是用来比较磷脂膜色谱和正辛醇/水系统的亲脂性测量尺度的一个恰当组合。

由于某些药物与有序磷脂膜界面具有较强的亲和作用, 必须在流动相中加入有机调节剂(乙腈), 以在合适分析时间内将药物洗脱下来。受试药物的容量因子($\lg k_{\text{IAM}}$)均与 φ 呈现良好线性关系, 且相关系数均在 0.994 以上。使用外推法求出药物在磷脂膜色谱的膜亲和性参数 $\lg k_{\text{IAM}}^0$ (图 1E)^[7]。由正辛醇/水系统测定疏水性参数 $\lg D_{\text{OW}, 7.4}$ (图 1E)^[8]。

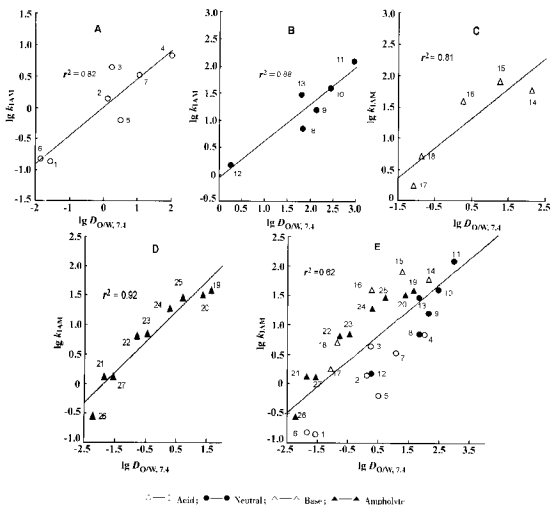
为比较磷脂膜色谱和正辛醇/水系统的亲脂性测定尺度, 分别使用这两种不同的药物与生物膜相互作用评价系统来测定药物的亲脂性参数, 并对这两个不同来源的亲脂性参数进行相关性分析以比较其异同。本研究中的两性物质具有两个碱性相近的质子结合中心, 存在复杂的质子解离平衡^[9], 例如格帕沙星在水溶液中以 4 种微离子存在, 微离子分布呈现 pH 值依赖性和喹诺酮抗菌素中差异较大的中性和两性微离子浓度比值。对于解离型化合物, $\lg k_{\text{IAM}}$ 、 $\lg D_{\text{OW}}$ 和 $\lg D_{\text{OW}, 7.4}$ 均表现出 pH 值依赖性且受溶质解离状态的影响。事实上, 这两个参数均包括了物质的内源亲脂性和解离程度等信息, 也许更代表该物质在生理环境下的亲脂性^[10]。因此, 本文对受试物质的 $\lg D_{\text{OW}, 7.4}$ 与 $\lg k_{\text{IAM}}$ 进行相关性考察。

依据化合物的酸碱性质, 将受试药物分为 4 类——酸性、碱性、中性和两性化合物, 分别对其 $\lg k_{\text{IAM}}$ 和 $\lg D_{\text{OW}, 7.4}$ 值进行相关(图 1)。由每一类化合物的 r^2 (酸性为 0.82, 中性 0.88, 碱性 0.81 和两性 0.92) 可见, $\lg k_{\text{IAM}}$ 和 $\lg D_{\text{OW}, 7.4}$ 间具有明显相关性, 说明选择正辛醇/水系统来模拟药物与有序磷脂膜相互作用的合理性。溶质与磷脂膜界面的结合在很大程度上取决于由 $\lg D_{\text{OW}, 7.4}$ 定量的疏水性, 也说明疏水作用力是药物与有序磷脂膜相互作用中的一种重要作用力。但是, 以上结果仅是对每一类特定化合物获得的结论, 图 1E 对全部化合物的 $\lg k_{\text{IAM}}$ 和 $\lg D_{\text{OW}, 7.4}$ 值进行相关性考察。由图可见, 对于全部受试化合物, 两者的回归质量不高 ($r^2 = 0.62$), $\lg k_{\text{IAM}}$ 数据群较为分散, 在回归直线的两侧。这说明对于包括不同酸碱特性的化合物集合, 由于药物与磷脂膜之间相互作用力具有多种类型, 而且非疏水性作用力对药物分配到有序磷脂膜的贡献不一致, 导致 $\lg k_{\text{IAM}}$ 和 $\lg D_{\text{OW}, 7.4}$ 间相关性差。同时暗示不仅疏水性而且还有其它作用力对药物分配入磷脂膜的

过程有贡献,也进一步证实磷脂膜色谱系统与正辛醇/水系统在测量药物亲脂性上存在明显区别。

对于全部受试化合物,其低 r^2 值(0.62)表明疏水性仅能解释膜亲和性变动的62%,而每一类特定酸碱性化合物的高 r^2 值(>0.81)说明疏水性至少能够解释膜亲和性变动的81%。两者看起来似乎相互矛盾。事实上,除了疏水性作用力,还存在其他驱动溶质分配到磷脂膜的作用力,例如与有序磷脂膜间的吸引力或排斥性的极性附加作用力(attractive or repulsive polar extra-interactions),如果它们在每一类特定药物集合内部的作用强度相似,则这些潜在

的作用力就不能够反映在上述回归方程中。因此即使 $\lg D_{OW,7.4}$ 与 $\lg k_{1M}$ 之间存在非常显著的相关性,也不能得出这些溶质与磷脂膜的相互作用仅仅是基于疏水性作用的结论³。综上所述,磷脂膜色谱评价系统的亲脂性测量尺度明显不同于正辛醇/水系统。另外,本文结果也说明对于结构相似的化合物集合,磷脂膜色谱和正辛醇/水系统能给出相似的亲脂性测量结果;但是对于结构差异较大的化合物集合,两个评价系统给出了相区别的亲脂性测量结果¹¹。



△—△ Acid; ●—● Neutral; △—△ Base; ▲—▲ Ampholyte
A: Acids; B: Neutrals; C: Bases; D: Ampholytes; E: All studied compounds. 1: *p*-Hydroxybenzoic acid; 2: Nalidixic acid; 3: Oxolinic acid; 4: Pentobarbital; 5: B. ribital; 6: *p*-Aminosalicylic acid; 7: *p*-Nitrophenol; 8: *p*-Hydroxybenzoic methyl ester; 9: *p*-Hydroxybenzoic ethyl ester; 10: *p*-Hydroxybenzoic propyl ester; 11: *p*-Hydroxybenzoic butyl ester; 12: Amprone; 13: Dexamethasone; 14: Quinidine; 15: Propranolol; 16: Erythromycin; 17: Streptomycin; 18: Procainamide; 19: OHP(-17203); 20: NR-762; 21: Pipemidic acid; 22: Caprolactam; 23: Levodopa; 24: HSR-903; 25: Gepafloxacin; 26: Amoxicillin; 27: Penicillin G.

Figure 1 Correlations between immobilized artificial membrane chromatographic indexes ($\lg k_{1M}$) with hydrophobicity ($\lg D_{OW,7.4}$) of *n*-octanol/ buffer system for 27 structurally diverse solutes. Solid lines represent the regression lines for selected groups

结论

本文选择了 27 个不同化学结构类型的药物, 包括酸性、碱性、中性和两性共 4 类化合物, 分别使用正辛醇/水系统和磷脂膜色谱两种生物膜相互作用评价系统对这一系列化合物的亲脂性参数进行考察, 比较这两种不同的生物膜模拟系统。在每一类特定酸碱性化合物集合内, $\lg k_{ow}$ 和 $\lg D_{oct, 7.4}$ 之间具有明显的相关性, 但是对于全部受试药物, 两者具有一定的相关性, 但明显劣于每一类特定化合物的相关性, 说明不仅疏水性而且还有静电、氢键和空间等作用力对药物分配到有序磷脂膜的过程有贡献, 也表明磷脂膜色谱和正辛醇/水系统的亲脂性测量尺度有明显区别。由于磷脂膜色谱界面为固态的有序磷脂分子单层体系, 并不是液态双分子层生物膜的真实模拟, 只是在一定程度上模拟生物膜的特征, 因此, 用磷脂膜色谱来评价药物与生物膜的相互作用还存在一定的局限性, 但比正辛醇/水系统更准确一些。

References:

- [1] Ong S, Liu H, Qin X, *et al.* Membrane partition coefficients chromatographically measured using immobilized artificial membrane surfaces [J]. *Anal Chem*, 1995, **67**(4): 755 - 762.
- [2] Ong S, Liu H, Pidgeon C. Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability [J]. *J Chromatogr*, 1996, **728**(1-2): 113 - 128.
- [3] Yang CY, Cao SJ, Liu HL, *et al.* Immobilized artificial membranes — screens for drug membrane interactions [J]. *Adv Drug Del Rev*, 1996, **23**(2): 229 - 256.
- [4] Pidgeon C, Ong S, Choi H, *et al.* Preparation of mixed ligand immobilized artificial membranes for predicting drug binding to membranes [J]. *Anal Chem*, 1994, **66**(17): 2701 - 2709.
- [5] Barbato F, Rotonda ML, Quaglia F. Chromatographic indexes on immobilized artificial membrane for local anesthetics: relationships with activity data on closed sodium channels [J]. *Pharm Res*, 1997, **14**(12): 1699 - 1705.
- [6] Sun J, Wang SJ, Cheng G, *et al.* Immobilized artificial membrane chromatography and its application in biopharmaceutics [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2003, **38**(6): 475 - 480.
- [7] Sun J, Deguchi Y, Chen JM, *et al.* Interactions between quinolone antibiotics and phospholipid membrane for prediction of alveolar macrophage uptake [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, **23**(5): 430 - 438.
- [8] Sun J, Deguchi Y, Chen JM, *et al.* Evaluating interactions of amphoteric molecules with phospholipid membrane using immobilized artificial membrane chromatography [J]. *Pharmazie*, 2002, **57**(7): 497 - 498.
- [9] Sun J, Sakai S, Tsuchi Y, *et al.* Determination of lipophilicity of two quinolone antibacterials, ciprofloxacin and grepafloxacin, in the protonation equilibrium [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2002, **54**(1): 51 - 58.
- [10] Barton P, Davis AM, McCarthy DJ, *et al.* Drug-phospholipid interactions. 2. Predicting the sites of drug distribution using *n*-octanol/water and membrane/water distribution coefficients [J]. *J Pharm Sci*, 1997, **86**(9): 1034 - 1039.