

Lipofilnost lijekova. I. dio: Važnost lipofilnosti u istraživanju novih lijekova

Medić-Šarić, Marica; Franić, Danijela; Debeljak, Željko

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 1998, 54, 37 - 51**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:109839>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



STRUČNI RADovi

Marica Medić Šarić, Danijela Franić, Željko Debeljak (Zagreb)

Lipofilnost lijekova

I. dio: Važnost lipofilnosti u istraživanju novih lijekova

(Primljeno 14. XI. 1997.)

1. UVOD

Idealan lijek posjeduje savršeno selektivno biološko djelovanje, bez nuspojava i toksičnosti. Takav lijek ne postoji, ali približavanje tom idealu cilj je razvoja svakog novog lijeka. Pritom treba dobro definirati željeni učinak lijeka te odgovarajućim metodama ispitati posjeduje li lijek to specifično djelovanje. Ako posjeduje, potrebna je kvantitativna metoda, kojom će se procijeniti njegova učinkovitost i selektivnost djelovanja. Nakon toga, može se provesti usporedba između srodnih lijekova u svrhu utvrđivanja najselektivnijeg glede zadanog farmakološkog učinka (1). Poteškoće u pronalaženju novih lijekova analizirao je Spinks (2). On je procijenio da se jedan novi lijek pojavljuje na 200 tisuća novih spojeva. Prema njegovim pretpostavkama, može se očekivati da se na svakih 400 milijuna slučajno odabranih i testiranih spojeva pojavi jedan novi antitumorski lijek. Put od sinteze novog lijeka do njegove primjene u terapiji prilično je dug i složen. Proces traje godinama i ponekad zahtijeva ispitivanje tisuća spojeva, a troškovi rastu na milijune dolara.

Modeliranje novog lijeka mora obuhvatiti sve aspekte biološki djelotvorne tvari, od njezinog dobivanja, objašnjenja strukture, analize i biološkog ispitivanja do razjašnjenja djelovanja lijeka na molekularnoj razini. U takvoj interdisciplinarnoj znanosti potrebno je zajedničko djelovanje farmaceuta, organskih kemičara, biokemičara, fizikalnih kemičara, farmakologa, psihologa, mikrobiologa, patologa i toksikologa (3).

Znanstvene discipline uključene u stvaranje novog lijeka najčešće su obuhvaćane nazivom »*Pharmaceutical Chemistry*« ili »*Medicinal Chemistry*« u anglo-saksonskom svijetu, »*Chimie thérapeutique*« u francuskom, odnosno »*Arzneimittelforschung*« ili »*Wirkstoff-forschung*« u njemačkom govornom području. Kod nas se ta disciplina naziva »*Farmaceutska kemija*«.

Programirano stvaranje lijekova korisno je provoditi radi nekoliko osnovnih ciljeva:

(1) pronalaženja prikladnih lijekova za bolesti kod kojih je postupak liječenja nezadovoljavajući ili još uopće ne postoji,

(2) pronalaženje novih lijekova kao zamjena za one lijekove koji imaju zadovoljavajući terapijski učinak, ali i izraženi niz nuspojava,

(3) povećanja stupnja djelovanja lijekova, koji inače klinički zadovoljavaju.

Jedno od najznačajnijih istraživanja u rješavanju ovih problema usmjereno je na predviđanje odnosa između kemijske strukture i biološke učinkovitosti određenog spoja koji još nije sintetiziran, odnosno spojeva kojima biološki učinak nije potpuno istražen. Na osnovi poznavanja ovih odnosa možemo bolje razumijeti toksične, mutagene ili kancerogene učinke mnogih spojeva (4). Razumijevanje ovih odnosa važno je kako za razvoj novih farmakoloških agensa tako i za ispitivanje drugih biološki učinkovitih spojeva (ksenobiotika) kao što su pesticidi, herbicidi, stimulanse okusa i mirisa i drugi (5,6). Mayer i Overton pokazali su da se narkotska učinkovitost mnogih jednostavnih organskih spojeva slaže s njihovim koeficijentom razdiobe (P) dobivenim za sustav ulje/voda (7,8). Provedena su i istraživanja lipofilnosti u razjašnjenju molekularnih osnova slatkog okusa. Nakon analize zaslađivača otkriven je visok stupanj korelacije između potencijala zaslađivanja i lipofilnosti izražene putem izračunatih log P vrijednosti (7–9).

Postupak pronalazanja novih farmakološki djelatnih tvari obuhvaća dva osnovna pristupa:

(1) nastojanje da se pronađe novi vodeći spoj, tzv. spoj uzor (engl. *lead compound*), odnosno molekula koja posjeduje željenu biološku učinkovitost, iako ona ne mora biti jako izražena,

(2) nastojanje da se iskoriste već postojeći spojevi uzori.

Postupci koji koriste već postojeće spojeve uzore razvijeniji su od onih koji traže nove spojeve uzore. Istraživanja postojećih spojeva uzora provode se s ciljem da se promjenom strukture molekule:

(1) promijeni profil njezine biološke učinkovitosti (npr. uklanjane nepoželjnih učinaka, povećanje biološke učinkovitosti, povećanje selektivnosti glede organizma ili vrste, itd.),

(2) pronalazenje zamjena za poznate biološki učinkovite spojeve.

Osnovna je postavka u tim istraživanjima da »slične strukture imaju slično djelovanje«. Znanstvenici pritom nailaze na niz problema, jer ponekad i male promjene u strukturi molekule mogu znatno promijeniti biološku učinkovitost. Čak i kod malih molekula često su moguće velike promjene. Osim toga, strukturna sličnost nije prvenstveni čimbenik u djelovanju lijeka, jer je biološka učinkovitost određena kombinacijom elektronske i steričke prirode spoja, te uvjetima transporta. Strukturne promjene imat će različite učinke na svaki od ovih čimbenika pa sličnost strukture postaje složeniji problem. Ipak, ostaje činjenica da je promjena čimbenika odgovornih za biološku učinkovitost moguće provesti jedino promjenom kemijske strukture.

Rješavanje ovih i niza drugih problema u istraživanju novih lijekova potpomaže QSAR-metodologija (10). Prve članke iz područja QSPR- i QSAR-*

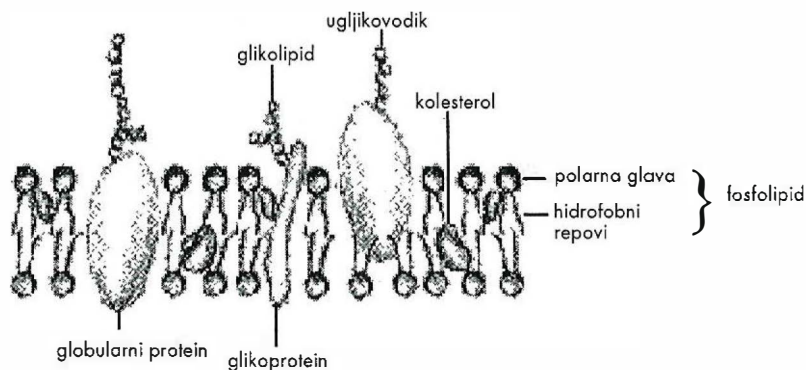
*QSPR = Quantitative structure-property relationship (kvantitativni odnos između strukture i svojstva); QSAR = Quantitative structure-activity relationship (kvantitativan odnos između strukture i djelovanja)

istraživanja objavio je Hansch prije tri desetljeća (6, 9). U tim prvim istraživanjima biološke učinkovitosti lijekova uporabljeni su brojni parametri, uključujući i lipofilnost koja se izražavala putem izmjerenih log P vrijednosti, koeficijenta razdiobe za sustav oktanol/voda. Ovaj parametar postao je opće prihvaćen u QSAR-u za kvantitativni opis lipofilnog karaktera biološki učinkovitih spojeva. On je postao jedan od najvažnijih parametara u dizajniranju novih lijekova, odnosno utvrđivanju biološke učinkovitosti sintetiziranih spojeva. Zbog tako velike važnosti koeficijenta razdiobe, zadnjih dvadesetak godina razvijen je velik broj empirijskih i teorijskih pristupa određivanja, odnosno izračunavanja vrijednosti log P.

2. BIOLOŠKE MEMBRANE I NJIHOV UTJECAJ NA DJELOVANJE LIJEKOVA

Osnovna funkcija membranskih sustava je zaštita stanice. Tu funkciju membrana obavlja tako da regulira protok određenih molekula iz vanjske u unutarnju biofazu i obratno, te istodobno regulira i određene vitalne procese u stanici. Jasno je da postoji velika raznolikost membrana glede prirode i propusnosti što ovisi o smještaju u biosustavu.

Danas se struktura biomembrana prikazuje modelom tekućeg mozaika, opće prihvaćenim konceptom, koji su još 1952. razvili Singer i Nicholson (11). Osnova ove strukture (prikazana na slici 1.) je dvosloj fosfolipida (fosfatidil-kolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin i sl.) koji su izrazito amfoterne molekule. Kolesterol je molekula koja često s visokim postotkom ulazi u sastav navedenog dvosloja.



Slika 1. Shematski prikaz strukture biološke membrane

Struktura dvosloja je prilično stabilna, ali nikako ne miruje. Molekule fosfolipida pokazuju sljedeće vrste gibanja:

- brzu rotaciju oko najduže osi,
- lateralnu difuziju i
- transferzalnu difuziju (flip-flop).

Ostali su dijelovi membrane proteini globularne ili linearne strukture. Među njima razlikujemo *ekstrinzične* – koji znatnim dijelom izlaze iz sastava dvosloja i *intrinzične* – koji su locirani samo u dvosloju. Ova razlika se uočava i glede sadržaja aminokiselina koje ulaze u sastav jednih ili drugih proteina. Naime, zbog izraženih razlika u lipofilnosti aminokiselina, jasno je da će proteini s većim sadržajem hidrofilnih aminokiselina biti locirani na kontaktnoj plohi dvosloj – voda (ekstrinzični proteini), dok će proteini s većim sadržajem lipofilnih aminokiselina biti smješteni u samom dvosloju (intrinzični proteini). Uloga je membranskih proteina, glede propusnosti membrane prije svega u aktivnom i olakšanom transportu te modifikaciji difuzije.

Glede lipofilnosti mogu se razlikovati sljedeće membrane:

1. bukalne i sublingvalne membrane (1,1 do 0,2),
2. gastrointestinalne membrane (3,3 do 0,4),
3. različite stanične membrane,
4. krvno-moždana barijera (4,2 do 1,4).

Ovakav redoslijed odgovara rastućoj potrebi za zaštitom vitalnih dijelova biosustava, što dublje prodiru tvari u biosustavu to je oštrija selekcija i time izraženije zaštitno djelovanje membranskog sustava.

Prema ovom prijedlogu najmanje je selektivna bukalna sluznica. U prosjeku, lijek se relativno kratko zadržava u usnoj šupljini, dok je apsorpcija uglavnom vrlo brza. Ovo može biti u vezi s osnovnim djelovanjem usne šupljine – osjetom okusa koji dovodi do poticanja ili odbijanja unosa.

Za razliku od usne šupljine, lijek se dulje zadržava u gastrointestinalnom traktu, jer je znatno smanjena mogućnost prodiranja.

Krvno-moždana barijera je poseban problem. Iako više nije potpuna nepoznanica, još postoje nejasnoće glede njezine propusnosti, pogotovo za lijekove koji se prenose aktivnim transportom. Za pasivni transport preko krvno-moždane barijere može se reći da je znatno selektivniji u odnosu na liposolubilne tvari, nego što je slučaj sa selektivnošću prema hidrofilnim lijekovima.

3. PARAMETRI LIPOFILNOSTI

Za opis hidrofobnih svojstava molekule u QSAR-istraživanjima primjenjuju se razni parametri, najčešće:

R_M – kromatografski parametar.

Dobiva se preračunavanjem iz eksperimentalno određenih R_f -vrijednosti tankoslojnom kromatografijom, pomoću jednadžbe:

$$R_M = \log (1/R_f - 1) \quad (1)$$

Tako dobivena R_M -vrijednost gotovo kvantitativno odgovara opisu lipofilnih svojstava molekule (12–14)

II – hidrofobna konstanta po Hanschu

Čini razliku u lipofilnosti promatranog supstituenta i atoma vodika koji je zamijenjen tim supstituentom na osnovnoj strukturi koju ispituje (15– 23).

f – hidrofobna konstanta po Rekkeru

Čini lipofilni doprinos (kontribuciju) promatranog fragmenta ukupnoj lipofilnosti molekule (11, 24, 25).

Kako se primjena parametara lipofilnosti ustalila među znanstvenicima različitog profila, tako se ovaj koncept produbljavao i prilagođavao različitim vrstama primjene. Istraživači Ruske akademije znanosti u Moskvi i Sveučilišta u Orléansu, (Francuska) ispitivali su doprinos vodikovih veza lipofilnosti molekule na primjerima amina i piridina (26). Rezultati su potvrdili pretpostavku istraživača da je lipofilnost organske komponente, odnosno njezin koeficijent razdiobe moguće izračunati na osnovu parametara koji se odnose na molarni volumen i svojstva vodikovih veza koje može tvoriti ta molekula. Među novijim pristupima, često se navodi ASC-(Approximate Surface Calculation) metoda izračunavanja log P, koju je razvila skupina autora (27). Ona omogućuje procjenu energije hidratacije i lipofilnosti uporabom malog broja odijeljenih točaka na van der Waalsovoj plohi molekule. Budući da taj izraz ovisi o trenutnoj geometriji molekule, energija otapanja i lipofilnost mogu biti prikazane kao funkcije konformacije. Testa je pokazao da se intramolekulskim interakcijama mogu objasniti razlike u lipofilnosti između konformacijskih diastereoizomera kao i između regioizomera (28, 29).

Lipofilnost je svojstvo molekule koje uključuje sve intramolekulske interakcije proizišle iz otopljene tvari, osim ionskih veza. Kao i sve intramolekulske interakcije, tako će i lipofilnost ovisiti o vremenski promjenjivoj trodimenzionalnoj strukturi ispitivane tvari (odnosno konformaciji), što znači da će to utjecati i na točnost današnjih fragmentarnih metoda izračunavanja koeficijenta razdiobe. Kako je interakcija lijeka s receptorom visokospecifična pojava danas se često pojavljuju kombinirani modeli koji, osim parametara lipofilnosti uključuju i brojne druge parametre, primjerice steričke ili elektronske prirode. Tako su Potts i Guy razvili novi model koji će opisivati razdiobu molekule lijeka u *stratum corneumu*, a koji ovisi o sposobnosti ispitivane tvari da bude donor i/ili akceptor u stvaranju vodikove veze, te o njenoj veličini (30). Rezultat je nova jednadžba, koja permeabilnost kože bolje opisuje od jednadžbe zasnovane samo na koeficijentu razdiobe za sustav oktanol/voda i veličini molekule.

4. KOEFICIJENT RAZDIOBE – DEFINICIJA

Kao mjerilo lipofilnosti ispitivanih supstancija primjenjuje se koeficijent razdiobe P (engl. *Partition coefficient*), koji je funkcija fizikalno-kemijskih svojstava molekule. Hansch i suradnici predložili su da se hidrofobni učinak

opiše logaritmom koeficijenta razdiobe ($\log P$) ispitivane tvari između lipofilnog otapala (n -oktanol) i vode (pufera), jer taj sustav vrlo dobro opisuje sposobnost prolaska molekule kroz staničnu membranu.

Ovako definiran koeficijent razdiobe čini Nernstov zakon razdiobe, a dan je sljedećim izrazom:

$$P = C_o/C_v \quad (2)$$

odnosno

$$\log P = \log (C_o/C_v) \quad (3)$$

gdje su C_o i C_v molarne koncentracije ispitivane tvari u organskoj fazi ($o = n$ -oktanol), odnosno vodenoj fazi ($v = \text{voda}$, odnosno pufer). Gornja je jednadžba omjer ravnotežnih koncentracija ispitivane tvari u dva otapala, koja se međusobno ne miješaju (odnosno samo se ograničeno miješaju), uz uvjet da se ispitivana tvar u oba otapala nalazi u istom molekularnom obliku.

Danas je poznat niz eksperimentalnih i računskih metoda za određivanje lipofilnosti lijekova, odnosno koeficijenata razdiobe, $\log P$. U nastavku ćemo ukratko prikazati na što sve valja obratiti pozornost pri eksperimentalnom određivanju te koje su prednosti i nedostaci u odnosu na računsko određivanje $\log P$.

5. EKSPERIMENTALNO ODREĐIVANJE $\log P$

Spoznaja o doprinosu lipofilnog parametra u razjašnjenju procesa transporta i učinkovitosti lijekova, pesticida i drugih ksenobiotika uvelike je doprinijela bržem razvitku metoda za njihovo određivanje. Po Hanschu i suradnicima, najprikladniji sustav za opis transporta lijekova je sustav membrana/pufer. No to je relativno nedostupan sustav jer zahtijeva izolaciju i pročišćavanje membrana. To znači da se u praksi farmakokemijskih istraživanja moramo orijentirati na pogodne sisteme organsko otapalo/voda s ograničenim međusobnim miješanjem. Ovo je lista mogućih sistema otapala:

- | | |
|----------------------------|---------------------------------|
| 1. cikloheksan – voda | 10. dietileter – voda |
| 2. heptan – voda | 11. oleil alkohol – voda |
| 3. tetraklorugljik – voda | 12. metil-izobutil-keton – voda |
| 4. ksilen – voda | 13. etilacetat – voda |
| 5. toluen – voda | 14. n-oktanol – voda |
| 6. benzen – voda | 15. cikloheksanon – voda |
| 7. kloroform – voda | 16. pentanol – voda |
| 8. trigliceridi – voda | 17. 2-butanon – voda |
| nitrobenzen – voda | 18. cikloheksanol – voda |
| 9. izopentil-acetat – voda | 19. butanol – voda |

Topljivost vode u organskoj fazi te miješanje vodene i organske faze povećava se od vrha prema kraju liste. Iako je uvrštavanje biomembranskih sustava u listu još prilično diskutabilno, današnje spoznaje potvrđuju da su:

- sustavi kao što su krvno-moždana barijera na vrhu liste,
- bukalne i sublingvalne membrane na dnu,
- krvne žile i slični sustavi u blizini sistema oktanol/voda (3).

Oktanol posjeduje niz povoljnih osobina koje su mu osigurale ulogu referentnog sistema u QSAR-istraživanjima. To su:

- prisutnost OH-skupine kombinirana sa zadovoljavajućom topljivošću vode u oktanolu (2,3 M kod zasićenja) što mu osigurava relativno dobre osobine kao otapala za većinu lijekova;
- zasićen vodom dovoljno je polaran tako da predpostavlja asocijaciju s molekulama otopljene tvari više nego s ostalim molekulama oktanola.

Osim toga, dodatne su mu prednosti: kemijska stabilnost, komercijalna raspoloživost, nehlapljivost, niska toksičnost, te vrlo niska apsorpcija u UV-području što ima veliku analitičku važnost (3).

Najčešća eksperimentalna metoda za određivanje koeficijenta razdiobe je metoda izmučkavanja (engl. *shake-flask metode*). Princip je jednostavan no zahtijeva dosta vremena, strogo određene uvjete, a osim toga neprimjenjiv je za nesintetizirane spojeve. Pri određivanju se moraju poštovati ove važne odredbe (3):

a) u pokusima je potrebno rabiti takve parove otapala koja su zasićena jedno drugim. Ako to nije postignuto, promijenit će se njihov volumen tijekom izmučkavanja, što je napose značajno kad očekujemo vrlo niske ili visoke vrijednosti;

b) izmučkavanje (mehaničko ili ručno) valja provoditi u dobro zatvorenim posudama, pola sata i to polagano. Odvojene slojeve zatim centrifugiramo na 2000 o/min, jedan sat ili dulje;

c) u uobičajenim slučajevima, kad obje faze nakon izmučkavanja sadrže dovoljnu količinu otopljene tvari koju je moguće analizirati, nepotrebno je vaganje otopine na početku pokusa. Analiza ispitivane supstancije se provdi u obje faze, a vrijednost log P izračunava se iz Nernstove jednadžbe (3). Ta vrijednost neovisna je o količini otopljene tvari i o uporabljenom volumenu oba otapala. Kod vrlo niskih ili visokih log P vrijednosti besmisleno je analitičko određivanje ispitivane supstancije u jednoj od faza. Tada se moramo osloniti na rezultate dobivene iz jedne faze, a log P ćemo izračunati iz jednadžbi:

$$\log P = \log c_0 - \log 'a' \quad (4)$$

$$\log P = \log 'a' - \log c_0 \quad (5)$$

ovisno o tome radi li se o vrlo visokim ili niskim vrijednostima. Tu je obvezno vaganje ispitivane tvari na početku pokusa ('a');

d) apsolutno je potrebna visoka čistoća ispitivane tvari, jer i najmanje onečišćenje može pokvariti pomno pripremljen pokus;

e) visoke vrijednosti log P, one iznad četiri, trebale bi se uzimati s rezervom. Naime, zbog još prilično nejasnih razloga vrijednosti dobivene u sistemu oktanol-voda uvijek padaju unutar određenih granica. Primjenom današnjih tehnika teško je precizno izmjeriti vrijednosti log P iznad četiri, osim ako ispitivana supstancija ne apsorbira jako u UV-području (14);

f) na točnost rezultata utjecat će i temperatura sustava, te pH vrijednost vodene faze. Ako temperatura sustava nije stalna ne važi Nernstov zakon razdiobe. Najprikladniji je pH onaj kod kojeg je 99,9% ispitivane supstancije u neioniziranom obliku. Ako se koeficijent razdiobe određuje kod pH gdje je supstancija djelomično ionizirana u obzir se mora uzeti stupanj ionizacije. Postotak neionizirane forme ispitivane supstancije varirat će ovisno o koncentraciji, osim ako se kao vodena faza ne uporabi pufer (3).

Često se ne pridaje dovoljna pažnja svojstvu tvari da se javlja u dva tautomerna oblika. Naime, prema Nernstovom zakonu razdiobe (3), konstanta razdiobe vrijedi samo ako se ispitivana tvar nalazi u istom molekularnom obliku, a dominantna tautomerna struktura ispitivane tvari u vodi ne mora biti takva i u oktanolu što će zasigurno komplicirati svaku metodu izračunavanja log P iz strukture za tautomerne spojeve (15).

Koncentracije tvari nakon razdjeljenja mogu se odrediti:

1. spektrofotometrijski,
2. fluorimetrijski
3. kromatografski (RPTLC, HPLC, GC),
4. titrimetrijski.

6. METODE IZRAČUNAVANJA log P

Kako je spomenuto, eksperimentalno određivanje koeficijenata razdiobe ima mnoge nedostatke, u prvom redu to su: složenost postupka i nemogućnost određivanja za nesintetizirane spojeve. Zato je zanimanje za uporabom lipofilnih parametara u razjašnjenju različitih mehanizama djelovanja ksenobiotika u biokemiji, medicinskoj kemiji i znanosti o okolišu pogodovalo bržem razvoju metoda izračunavanja lipofilnih parametara, u prvom redu koeficijenta razdiobe. Prve metode računanja log P razvili su Fujita, Iwasa i Hansch (17), a temelje se na zamjeni vodikova atoma nekim drugim supstituentom na osnovnoj strukturi molekule poznatog log P. Novije metode zasnivaju se na zbrajanju fragmentarnih vrijednosti s čimbenicima koji se odnose na razne interakcije među fragmentima (31). Potpuno drukčiji pristupi oslanjaju se na matematičke modele, predstavljene kvantno-kemijskim metodama (32–37).

6.1 Računanje putem Π -konstanti

6.1.1 Π , lipofilni karakter supstituenta

Fujita, Iwasa i Hansch dali su primamljivu metodu za opisivanje lipofilnog ponašanja spojeva, bez prethodnog mjerenja vrijednosti $\log P$ za te supstancije (17, 18).

Pri određivanju lipofilnosti ne uzima se u obzir čitava molekula, već skup derivata osnovnog spoja, gdje je veći dio strukture ostao isti. U tom slučaju, spoznaja o relativnoj lipofilnosti supstituenata dovoljna je za korelacijsku analizu. U stvari, pronađeno je da katkad samo supstituenti u određenim položajima lipofilno interferiraju s biosustavima. Hansch i suradnici smatrali su $\log P$ parametrom, koji linearno ovisi o slobodnoj energiji, što znači da ima aditivni karakter te se može numerički izraziti sumom $\log P$ osnovne strukture i člana Π koji čini razliku u vrijednosti $\log P$ između osnovne strukture i strukture gdje je vodikov atom zamijenjen nekim supstituentom. Oni su, analogno Hametovoj jednadžbi, definirali Π parametar kako bi istraživanje lipofilnosti bilo moguće, te da bi lipofilni karakter supstituenta odvojili od njegovog elektronskog i steričkog utjecaja:

$$\Pi_X = \log P_{(R-X)} - \log P_{(R-H)} \quad (6)$$

gdje $P_{(R-X)}$ i $P_{(R-H)}$ čine koeficijente razdiobe struktura R-X i R-H, s tim da je struktura R-X izvedena iz strukture R-H zamjenom jednog vodikovog atoma supstituentom X. Iz ove jednadžbe proizlazi da je, po definiciji, $\Pi_{(H)} = 0,00$ što nije točno. Pozitivna vrijednost Π znači da, u odnosu na vodik, supstituent X favorizira lipidnu fazu, a negativna vrijednost upućuje na lipofilniji karakter supstituenta. Aditivni karakter koeficijenta razdiobe dopušta istodobno zamjenu više vodikovih atoma u strukturi, pa se jednadžba (6) može poopćiti:

$$\log P_{(R-X_1, X_2, \dots, X_n)} = \log P_{(R-H)} + \sum \Pi_{(X_n)}$$

Valja naglasiti da $\log P$ nije suma Π vrijednosti već da se Π vrijednost supstituenata mora pribrojiti na $\log P$ osnovne strukture. Vrijednosti Π konstanti donekle se razlikuju od strukture do strukture kao što se vidi iz sljedeće tablice (38).

Tablica 1. Vrijednosti Π_X za različite osnovne strukture

| X | X- C ₆ H ₅ | 4-X- C ₆ H ₄ OCH ₂ COOH | 4-X- C ₆ H ₄ NO ₂ | 4-X- C ₆ H ₄ OH |
|-------------------|-------------------------------------|---|---|--|
| -H | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| -CH ₃ | 0,56 | 0,52 | 0,52 | 0,49 |
| -F | 0,14 | 0,15 | | 0,31 |
| -Cl | 0,71 | 0,78 | 0,54 | 0,93 |
| -OH | -0,67 | -0,61 | 0,11 | -0,87 |
| -OCH ₃ | -0,02 | -0,04 | 0,18 | -0,12 |
| -NH ₂ | -1,23 | | -0,46 | -1,63 |
| -NO ₂ | -0,28 | 0,24 | -0,39 | 0,50 |
| -CN | -0,57 | -0,32 | -0,66 | 0,14 |

Iz tablice je vidljivo da inertne skupine kao alkilne (primjerice $-\text{CH}_3$) imaju relativno konstantne Π vrijednosti, bez obzira na elektronski karakter drugog supstituenta u parapoložaju. Halogeni ($-\text{F}$, $-\text{Cl}$) su donekle osjetljiviji na prisutnost drugog supstituenta, njihove se vrijednosti značajno mijenjaju ako je taj supstituent jaki elektron-donor ili elektron-akceptor. Najosjetljiviji su oni supstituenti koji imaju slobodan elektronski par na heteroatomu izravno vezan na aromatski prsten ($-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{NH}_2$). Ako je drugi supstituent jaki elektron-akceptor kao naprimjer $-\text{NO}_2$ ili $-\text{CN}$ skupina, vrijednost Π će im se povećati, a ako je taj supstituent elektron-donor vrijednost Π će se sniziti. Kada se na aromatskom prstenu nalaze dva supstituenta, elektronski utjecaj jednog na drugi promijenit će vrijednost Π oba supstituenta. Pritom je često jedan supstituent dominantan. Sljedeći primjeri ilustrirat će nam uporabu Π konstanti u izračunavanju $\log P$:

(a) m-KSILEN

$$\begin{aligned}\log P_{\text{rač}} &= \log P_{(\text{C}_6\text{H}_6)} + 2 \times \Pi_{(\text{CH}_3)} & (8) \\ &= 2,13 + 1,12 \\ &= 3,25\end{aligned}$$

$$\log P_{\text{mjer}} = 3,20$$

(b) PENTAKLOROFENOL

$$\begin{aligned}\log P_{\text{rač}} &= \log P_{(\text{C}_6\text{H}_6)} + \Pi_{(\text{OH})} + 5 \times \Pi_{(\text{Cl})} & (9) \\ &= 2,13 - 0,67 + 3,55 \\ &= 5,01\end{aligned}$$

$$\log P_{\text{mjer}} = 5,12$$

(c) 3,5-DINITROFENOL

$$\begin{aligned}\log P_{\text{rač}} &= \log P_{(\text{C}_6\text{H}_6)} + \Pi_{(\text{OH})} + 2 \times \Pi_{(\text{NO}_2)} & (10) \\ &= 2,13 - 0,67 - 0,56 \\ &= 0,90\end{aligned}$$

$$\log P_{\text{mjer}} = 2,33$$

Vidimo da su prihvatljivi rezultati dobiveni kod struktura gdje supstituenti nisu nagomilani na aromatski prsten – primjer (a), za razliku od primjera (b) gdje se javlja značajnije odstupanje. U primjeru (c) javlja se snažna interakcija sustava elektronegativnih supstituenata, što definitivno onemogućuje dobivanje $\log P$ jednostavnim zbrajanjem. Prvotni Π -sustav Fujita i suradnici (31) primjenjivali su samo na supstituirane aromatske prstenove, s tim da su supstituenti morali biti »ugljikovodične« prirode. Neki su istraživači pokušali zamijeniti vodikov atom u nekim polarnim skupinama kao što su hidroksilna ili amino skupina. Iako to nije bilo pravilo, rezultati su

često bili pogrešni. Uz to, Fujita i suradnici su već u prvim radovima upozorili na to da se čak ni svi »aromatski« H-atomi ne mogu zamijeniti bez primjene faktora korekcije. Rekkerova skupina (3) također je imala nekoliko primjedbi na ovu metodu: Hanschova skupina uzima vrijednost $\Pi_{(H)} = 0,00$ što proizlazi iz jednadžbe (6), no to nije točno, jer je kasnije utvrđeno da ona iznosi približno 0,23 (3). Osim toga, ova metoda pretpostavlja jednakost $-CH_3$, $-CH_2$ i $-CH$ skupina, iako prisutnost $-CH$ skupine u strukturi uključuje primjenu faktora korekcije veze od -0.20 .

Primjeri:

(a) IZOPROPIL-BENZEN, $C_6H_5CH(CH_3)_2$

$$\begin{aligned} \log P_{\text{rač}} &= \log P_{(C_6H_5CH_2CH_3)} + \Pi_{(CH_3)} & (11) \\ &= \log P_{(C_6H_5CH_3)} + 2 \times \Pi_{(CH_3)} \\ &= \log P_{(C_6H_6)} + 3 \times \Pi_{(CH_3)} \\ &= 2,13 + 3 \times (0,5) \\ &= 3,63 \end{aligned}$$

$$\log P_{\text{mjer}} = 3,66$$

Primjena faktora korekcije veze dala bi vrijednost $3,63 - 0,20 = 3,43$, što je neprihvatljivo glede izmjereno log P.

(b) TERC-BUTIL-BENZEN, $C_6H_5C(CH_3)_3$ (12)

$$\log P_{\text{rač}} = 4,13$$

$$\log P_{\text{mjer}} = 4,11$$

bez faktora korekcije, no kako pravila zahtijevaju primjenu faktora, i to dva-put, rezultat bi trebao biti 3,73.

(c) BENZILALKOHOL, $C_6H_5CH_2OH$

$$\begin{aligned} \log P_{\text{rač}} &= \log P_{(C_6H_6)} + \Pi_{(CH_3)} + \Pi_{(OH)} & (13) \\ &= 2,13 + 0,50 - 1,16 \\ &= 1,47 \end{aligned}$$

$$\log P_{\text{mjer}} = 1,10$$

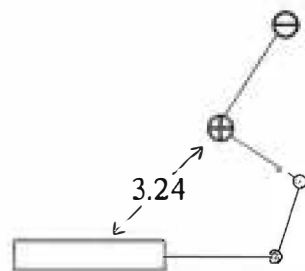
U ovom slučaju, primjena faktora korekcije bi dobrodošla, no Hanschov prvotni sustav ne pretpostavlja korekciju za ovu strukturu ili barem to nije učinio do prije nekoliko godina, kad je ponudio posebno prilagođenu vrijednost za $-CH_2OH$ skupinu, ako je ona vezana na aromatsku jezgru. U kasnijem tabeliranju Π konstanti, Hansch je odlučio načiniti oštru razliku između alifatskih i aromatskih supstituenata. Alifatska serija izgleda ovako: $-CH_3 = 0,50$; $-C_2H_5 = 1,00$; $n-C_3H_7 = 1,50$; $i-C_3H_7 = 1,30$; $terc-C_4H_9 = 1,60$ (uključeni

su faktori korekcije veze: jedanput, odnosno dvaput za zadnje dvije grupe). Aromatskoj seriji pripadaju sljedeće vrijednosti; $-\text{CH}_3 = 0,56$; $-\text{C}_2\text{H}_5 = 1,02$; $n\text{-C}_3\text{H}_7 = 1,55$; $i\text{-C}_3\text{H}_7 = 1,53$; $\text{terc-C}_4\text{H}_9 = 1,98$ (odgovarajući faktori su uključeni). Očigledni je nedostatak II sustava (prvenstveno se to odnosi na II vrijednosti koje pripadaju »aromatskim« alkil-supstituentima, ali i mnogi drugi supstituenti su se našli u sličnom položaju) u činjenici da je većina tih vrijednosti izvedena iz samo jedne vrijednosti $\log P$, od koje je odbijena vrijednost $\log P$ osnovne strukture – benzena. Kako bi se ovako dobivene vrijednosti $\log P$ mogle uspješno primijeniti u korelacijskoj analizi, potrebno je eksperimentalno odrediti dovoljan broj logaritama P za skup srodnih struktura tako da se mogu otkriti sve interakcije funkcionalnih skupina koje utječu na konačne rezultate.

6.1.2 Faktori korekcije

Kod zatvorenih prstenastih sustava i nezasićenih struktura, potrebna je korekcija. Zatvoreni prsteni zahtijevaju korekciju od $\approx 0,09$ za svaki prsten C-atoma (jasno, za složenije strukture, kao što je adamantan izračunavanje neće biti tako jednostavno). Dvostruke i trostruke veze između C-atoma zahtijevaju korekcije od $-0,30$ odnosno $-0,52$.

Vrlo zanimljiva korekcija javlja se zbog gibljivosti struktura tipa $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-X}$ gdje X čini elektronegativnu grupu: $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{J}$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{COOCH}_3$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CN}$, itd. Izmjerena je lipofilnost ovih struktura za $0,60 \pm 0,05$ niža od izračunatih vrijednosti. Hansch i Anderson (9) pretpostavljaju da su takve strukture savijene; kraj njihova bočnog lanca savijen je preko benzenske jezgre, kako je to prikazano na Slici 2.



Slika 2. Gibljivost strukture

Elektronegativna X grupa inducirat će dipol u C-X vezi, što će C-atom u susjedstvu X učiniti pozitivnim. Tad dolazi do interakcije između pozitivnog C-atoma i elektronskih orbitala prstena. Pritom se X grupa usmjerava od prstena kao što se može vidjeti na slici 2. Ovakvo savijanje daje mnogo kompaktiji oblik, što rezultira smanjenjem lipofilnosti. Drugim riječima, druga i treća jednostruka veza u ovakvim strukturama daju negativan doprinos lipofilnosti molekule, vjerojatno zbog savijanja strukture.

Primjer:4-FENILBUTIRAMID, $C_6H_5-CH_2-CH_2-CH_2CONH_2$

$$\begin{aligned} \log P_{\text{rač}} &= \log P_{(C_6H_6)} + 3\Pi_{(CH_2)} + \Pi_{(CONH_2)} + F_{\text{savijanja}} & (14) \\ &= 2,13 + 1,50 + (-1,71) + (-0.60) \\ &= 1,32 \\ \log P_{\text{mjer}} &= 1,41 \end{aligned}$$

Direktna povezanost dva aromatska prstena (kondenzirani prsteni) zahtijeva korekciju od $F = -0,20$. To se ilustrirano može pokazati na molekuli bifenila.

Primjer:BIFENIL, $C_6H_5 - C_6H_5$

$$\begin{aligned} \log P_{\text{rač}} &= 2 \log P_{(C_6H_6)} + F_{\text{kondenzacije}} & (15) \\ &= 2(2,13) + (-0,20) \\ &= 4.06 \\ \log P_{\text{mjer}} &= 4.09 \end{aligned}$$

No, ovdje je prekršena definicija konstante lipofilnog supstituenta dana jednadžbom (6) koja sadrži sljedeće: ma koliko bio složen proračun, broj izraza za $\log P$ na desnoj strani jednadžbe ne smije premašiti njihov broj na lijevoj strani. Prema tome, izračunavanje uključuje $\log P$ vrijednost za benzen ($\log P_{(C_6H_6)}$) i Π vrijednost za C_6H_5 grupu ($\Pi_{(C_6H_5)}$), a provodi se prema jednadžbi;

$$\log P_{(C_6H_5 - C_6H_5)} = \log P_{(C_6H_6)} + \Pi_{(C_6H_5)} \quad (16)$$

ZAKLJUČAK

Lipofilnost je svojstvo molekule, koje uključuje sve intramolekularne interakcije proizašle iz otopljene tvari. Kao mjerilo lipofilnosti lijekova (ili nekih drugih ispitivanih supstancija) primjenjuje se koeficijent razdiobe P , koji je funkcija fizikalno-kemijskih svojstava molekule.

Danas je poznat niz eksperimentalnih i računskih metoda za određivanje lipofilnosti lijekova. To potvrđuje sve veću važnost u određivanju ovog parametra i za nove lijekove. Stoga je važno poznavati svojstva bioloških membrana i njihov utjecaj na djelovanje lijekova. Najčešća metoda za eksperimentalno određivanje koeficijenta razdiobe, $\log P$, je metoda izmućkavanja (engl. *shake flask method*) kombinirana s različitim analitičkim tehnikama (UV, HPLC, GC).

Danas sve veću pažnju znanstvenika zaokupljaju računске metode određivanja lipofilnosti, koje su brze, točne i pouzdane.

(Zavod za farmaceutsku kemiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 10000 Zagreb, A. Kovačića 1)

Lipophilicity of drugs

(Part I)

by M. Medić-Šarić, D. Franić and Ž. Debeljak

Summary

Lipophilicity is a prime physicochemical descriptor of xenobiotics with relevance to their biological properties. The hydrophobic interaction of drugs with a receptor and the toxicological properties are examples of a steadily increasing number of topics in which lipophilicity plays an important role. A number of empirical and theoretical approach have been developed during the last twenty years for calculation of log P values. The most common experimental method for determining the equilibria of drugs partitioning between water and n-octanol is *shake-flask* method.

In this context calculative approaches are superior to experimental procedures.

(Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, A. Kovačića 1, Croatia)

Literatura - References

- (1) A. Goldstein, L. Arnow and M. Kalaman, Principles of Drug Action; The Basis of Pharmacology, II Ed., Wiley and Sons, New York, 1974.
- (2) A. Spinks, Chem. Ind. London, (1973) 885.
- (3) R. F. Rekker and R. Mannhold, Calculation of Drug Lipophilicity: The Hydrophobic Fragmental Constants Approach, VCH Publisher Inc., New York, USA, 1992.
- (4) A. J. Stuper, W. E. Brüger, and P. C. Jurs, Computer Assisted Study of Chemical Structure and Biological Function, Wiley and Sons, New York 1979.
- (5) Y. C. Martin, Jap. Med. Chem. **24** (1981) 229.
- (6) C. Hansch, J. E. Quinlan and G. Lawrence, J. Org. Chem., **33** (1968) 347.
- (7) H. H. Meyer, Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol., **42** (1899) 109.
- (8) E. Overton, Studien über die Narkose, Fischer Jena, Germany, 1901.
- (9) C. Hansch, and S. M. Anderson, J. Org. Chem. **32** (1967) 2538.
- (10) N. Trinajstić, Chemical Graph Theory, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.
- (11) R. F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- (12) C. B. C. Boyce and B. V. Milborrow, Nature **208** (1965) 537.
- (13) A. J. P. Martin, Biochem. Soc. Symp. (Cambridge Engl.) **3** (1950) 4.
- (14) G. L. Biagi, A. M. Barbaro, M. F. Gamba and M. C. Guerra, J. Chromatogr. **41** (1969) 371.
- (15) C. Hansch R. M. Muir, T. Fujita, P. P. Maloney, F. Geiger and M. Streich, J. Am. Chem. Soc. **85** (1963) 2817.
- (16) C. Hansch and T. Fujita, J. Am. Chem. Soc. **86** (1964) 1616.
- (17) T. Fujita J. Iwasa and C. Hansch J. Am. Chem. Soc., **86** (1964) 5175.
- (18) J. Iwasa, T. Fujita and C. Hansch J. Med. Chem., **8** (1965) 150.
- (19) C. Hansch, A. R. Steward, J. Iwasa, and E. W. Deutsch, Mol. Pharmacol., **1** (1965) 205.
- (20) C. Hansch, A. R. Steward and J. Iwasa, J. Med. Chem. **8** (1965) 868.
- (21) C. Hansch and A. R. Steward, J. Med. Chem. **7** (1965) 691.
- (22) C. Hansch and E. W. Deutsch, J. Med. Chem. **8** (1965) 705.
- (23) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins Chem. Rev. **71** (1971) 525.
- (24) G. G. Nys and R. F. Rekker, Chimie Therapeutique, **5** (1973) 521.

- (25) G. G. Nys and R. F. Rekker, *Eur. J. Med. Chem.* **4** (1974) 361.
- (26) O. A. Raevsky and J. R. Chrétien: Hydrogen Bond Contribution in Lipophilicity; from: Log P: An International Symposium on Lipophilicity in Drug Research and Toxicology, University of Lousanne, Switzerland, March 21–24, 1995, str P–45.
- (27) M. Kansy, M. Ulmschneider, H. van Waterbeemd and K. Müller: »Conformation and Calculation of Lipophilicity« from: Log P: An International Symposium on Lipophilicity in Drug Research and Toxicology, University of Lousanne, Switzerland, March 21–24, 1995, p.p. P–12.
- (28) B. Testa and P. Jenner, *Drug Metabolism, Chemical and Biochemical Aspects*, Marcel Dekker Inc., New York, (1976) 265.
- (29) B. Testa and J. Mayer, *Acta Pharm. Jugosl.* **40** (1990) 315.
- (30) R. O. Potts and R. H. Guy, »Predicting skin permeability: The Effects of Molecular and Hydrogen Bond Activity on Transport« from Log P: An International Symposium on Lipophilicity in Drug Research and Toxicology, University of Lousanne, Switzerland, March 21–24, 1995, p.p. 0–5.
- (31) T. Fujita, *Progr. Phys. Org. Chem.* **14** (1983) 75.
- (32) W. Dunn, III, S. Grigoras and M. J. Koehler, *J. Med. Chem.* **30** (1987) 1121.
- (33) W. Dunn, III, S. Grigoras and M. J. Koehler, *Quant. Struct. Act. Relat.* **7** (1988) 150.
- (34) K. Rogers and R. Cammarata, *Biochem. Biophys. Acta* **193** (1969) 22.
- (35) A. Hopfinger and A. Battershell, *J. Med. Chem.* **19** (1976) 569.
- (36) N. Bodor; Z. Gabanyi and C.-K. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 2783.
- (37) N. Bodor and M.-J. Huang, *J. Pharm. Sci.* **81** (1992) 272.
- (38) C. Hansch and A. Leo, *Substitution Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, John Wiley and Sons, New York, 1979, 15.
- (39) S. S. Davis, *J. Pharm. Pharmacol.* **25** (1973) 293.
- (40) A. Leo, P. Y. C. Jow, C. Silipo and C. Hansch, *J. Med. Chem.* **9** (1975) 865.
- (41) A. Leo, *Chem. Review* **93** (1993) 1283.