

Primjena kromatografskih tehnika za predviđanje apsorpcije azatioprina i tiogvanina

Antolković, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:577339>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



Marija Antolković

**Primjena kromatografskih tehnika za
predviđanje apsorpcije azatioprina i tiogvanina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a izrađen je pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Mornar Turk. Pri izradi su korišteni radni prostor i oprema Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na stručnom vodstvu, prenesenom znanju i savjetima prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, posebice mojoj sestri Adriani i mami, kolegama i prijateljima na velikoj podršci tijekom studiranja.

Popis kratica i simbola

| | |
|--------------|---|
| 6-MMP | 6-metilmerkaptopurin |
| 6-MMPR | 6-metilmerkaptopurin-ribonukleotidi |
| 6-MP | 6-merkaptopurin |
| 6-MTG | 6-metiltiogvanin |
| 6-MTGMP | 6-metiltiogvanin monofosfat |
| 6-MTIDP | 6-metiltioinozin difosfat |
| 6-MTIMP | 6-metiltioinozin monofosfat |
| 6-MTITP | 6-metiltioinozin trifosfat |
| 6-TG | 6-tiogvanin |
| 6-TGDP | 6-tiogvanin difosfat |
| 6-TGMP | 6-tiogvanin monofosfat |
| 6-TGN | 6-tiogvanin-nukleotidi |
| 6-TGTP | 6-tiogvanin trifosfat |
| 6-TIDP | 6-tioinozin difosfat |
| 6-TIMP | 6-tioinozin monofosfat |
| 6-TITP | 6-tioinozin trifosfat |
| 6-TUA | 6-tiourična kiselina |
| 6-TXMP | 6-tioksantozin monofosfat |
| AZA | azatioprin |
| DPK | difosfat kinaza |
| GMPS | gvanozin monofosfat sintetaza |
| HPRT | hipoksantin fosforibozil transferaza |
| IAM | kromatografska kolona s vezanim umjetnim membranama (engl. <i>Immobilized Artificial Membrane</i>) |
| IAM-HPLC | tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz primjenu kromatografskih kolona s vezanim umjetnim membranama (engl. <i>Immobilized Artificial Membrane High Performance Liquid Chromatography</i>) |
| IMPD | inozin monofosfat dehidrogenaza |
| ITPA | inozin trifosfatpirofosfataza |
| <i>k</i> | faktor kapaciteta |
| log <i>D</i> | logaritamska vrijednost koeficijenta distribucije (<i>D</i>) |

| | |
|-----------------|--|
| $\log k$ | logaritamska vrijednost faktora kapaciteta (k) |
| $\log k_{IAM}$ | logaritamska vrijednost faktora zadržavanja analita određenog metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz primjenu kolona s vezanim umjetnim membranama |
| $\log k_w$ | ekstrapolirana vrijednost faktora kapaciteta, deskriptor lipofilnosti dobiven iz HPLC |
| $\log k_{wIAM}$ | kromatografski parametar koji opisuje interakciju analita s umjetnim membranama |
| $\log P$ | logaritamska vrijednost koeficijenta raspodjele (P) n -oktanol/voda |
| MPK | monofosfat kinaza |
| ODS | oktadecilsilan |
| pK_a | konstanta ionizacije |
| R_f | retencijski faktor |
| R_M | deskriptor lipofilnosti dobiven tankoslojnom kromatografijom |
| RP-HPLC | tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza (engl. <i>Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography</i>) |
| t_0 | vrijeme zadržavanja nezadržanog spoja određeno metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (tzv. mrtvo vrijeme) |
| t_R | vrijeme zadržavanja analita određeno metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti |
| TLC | tankoslojna kromatografija (engl. <i>Thin-Layer Chromatography</i>) |
| TPMT | tiopurin S-metiltransferaza |
| XO | ksantin oksidaza |
| φ | udio organskog otapala u pokretnoj fazi |

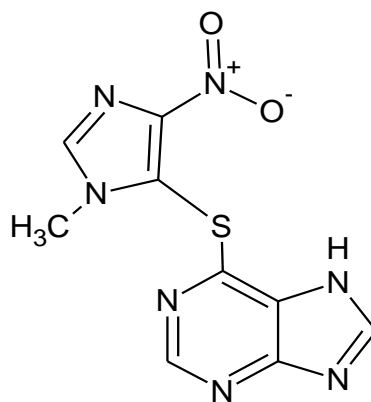
SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Azatioprin | 1 |
| 1.1.1. Farmakodinamička svojstva | 2 |
| 1.1.2. Farmakokinetička svojstva | 2 |
| 1.1.3. Fizikalno-kemijska svojstva | 5 |
| 1.2. Tiogvanin | 5 |
| 1.2.1. Farmakodinamička svojstva | 6 |
| 1.2.2. Farmakokinetička svojstva | 6 |
| 1.2.3. Fizikalno-kemijska svojstva | 7 |
| 1.3. Lipofilnost, koeficijent raspodjele (<i>P</i>), koeficijent distribucije (<i>D</i>) | 7 |
| 1.4. Kromatografske tehnike za određivanje farmakokinetike lijekova | 9 |
| 1.5. Kromatografski parametri koji opisuju farmakokinetiku lijekova | 13 |
| 1.5.1. R_M | 13 |
| 1.5.2. $\log k$ | 13 |
| 1.5.3. CHI | 14 |
| 1.5.4. $\log k_{IAM}$ | 14 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 17 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 18 |
| 3.1. Reagensi, pribor i instrumenti | 18 |
| 3.2. Priprema uzoraka azatioprina i tiogvanina | 18 |
| 3.3. Priprema pokretne faze..... | 19 |
| 3.4. Ispitivanje lipofilnosti azatioprina i tiogvanina pomoću kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-HPLC) | 20 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 21 |
| 5. ZAKLJUČAK | 33 |
| 6. LITERATURA | 35 |
| 7. SAŽETAK/ SUMMARY | 38 |
| 7.1. Sažetak..... | 38 |
| 7.2. Summary | 39 |
| Temeljna dokumentacijska kartica | 40 |
| Basic documentation card | 41 |

1. UVOD

1.1. Azatioprin

Azatioprin, poznat u Republici Hrvatskoj pod trgovačkim imenom Imuran i Atsimutin, je imunosupresivni lijek iz skupine antimetabolita – analog je purina (Slika 1.). Indiciran je u kombinaciji s drugim imunosupresivima za profilaksu odbacivanja transplantata u bolesnika koji su primili alogeni transplantat bubrega, jetre, srca, pluća ili gušterače. Primjenjuje se kao imunosupresivni antimetabolit u monoterapiji ili, što je češće, u kombinaciji s drugim lijekovima (obično kortikosteroidima) i postupcima koji utječu na imuni odgovor. Terapijski će učinak možda biti primjetan tek nakon više tjedana ili mjeseci i može uključivati smanjenje potrebe za kortikosteroidima, što rezultira manjom toksičnošću povezanom s velikim dozama i dugotrajnom primjenom kortikosteroida. Azatioprin je indiciran i u monoterapiji ili u kombinaciji s kortikosteroidima i/ili drugim lijekovima i postupcima kod bolesnika koji ne podnose steroide ili su ovisni o steroidima i nisu ostvarili odgovarajući odgovor na liječenje unatoč visokim dozama steroida: težak aktivni reumatoidni artritis koji se ne može držati pod kontrolom manje toksičnim lijekovima (antireumaticima koji mijenjaju tijek bolesti [engl. *disease-modifying anti-rheumatic drugs*, DMARD]), teška ili umjereno teška upalna bolest crijeva (Crohnova bolest ili ulcerozni kolitis), sistemski eritemski lupus, dermatomiozitis i polimiozitis, autoimuni kronični aktivni hepatitis, nodozni poliarteritis, autoimuna hemolitička anemija i kronična refraktorna idiopatska trombocitopenična purpura.



Slika 1. Struktura azatioprina (<http://pharmacopeia.cn>)

1.1.1. Farmakodinamička svojstva

Farmakoterapijska skupina: Pripravci za liječenje zloćudnih bolesti i imunomodulatori, ostali imunosupresivi.

Azatioprin je imidazolski derivat 6-merkaptopurina (6-MP). *In vivo* se vrlo brzo dijeli na 6-merkaptopurin (6-MP) i metilnitroimidazol u jednakom omjeru. 6-MP lako prolazi kroz staničnu membranu i unutar stanice biva konvertiran u različite tio-analoge purina u koje se ubraja i glavni aktivni nukleotid, tioinozinska kiselina. Omjer konverzije je različit u različitim osoba. Nukleotidi ne prolaze kroz staničnu membranu i stoga se ne nalaze u tjelesnim tekućinama. Neovisno o tome daje li se direktno ili nastaje u tijelu iz azatioprina, 6-MP se uglavnom odstranjuje kao neaktivni oksidirani metabolit tiourične kiseline. Oksidacija se zbiva pod utjecajem ksantin oksidaze, enzima kojeg inhibira alopurinol. Aktivnost polovine metilnitroimidazola nije jasno definirana. Međutim, zapaženo je da u više organskih sustava utječe na aktivnost azatioprina u odnosu na 6-MP. Određivanje razine plazmatskih koncentracija azatioprina ili 6-MP nema prognostičku vrijednost u odnosu na učinkovitost ili toksičnost ovih molekula.

Mehanizam djelovanja

Azatioprin utječe i na odgovor imunskog sustava i na rast tumora. Njegova je glavna uloga supresija imunog odgovora. Iako točan mehanizam djelovanja treba razjasniti, neki od predloženih mehanizama uključuju:

1. otpuštanje 6-MP koji djeluje kao antimetabolit purina,
2. moguću blokadu sulfhidrilne –SH skupine putem alkilacije,
3. inhibiciju različitih mehanizama biosinteze nukleinskih kiselina čime se sprječava proliferacija stanica koje određuju i pojačavaju imuni odgovor – inhibira se makrofagna diferencijacija, smanjuje se broj limfocita T i B, smanjuje se sinteza imunoglobulina G i M, smanjuje se sekrecija IL-2,
4. oštećenje molekule DNA inkorporacijom tioanaloge purina.

Zbog ovih mehanizama, učinak azatioprina postaje vidljiv tek nakon nekoliko tjedana ili mjeseci redovitog liječenja (<http://www.halmed.hr>; Katzung i sur., 2012).

1.1.2. Farmakokinetička svojstva

Apsorpcija

Azatioprin se dobro apsorbira nakon peroralne primjene u gornjem dijelu gastrointestinalnog sustava. Nakon oralne primjene [³⁵S]-azatioprina, maksimalna radioaktivnost plazme bilježi se

nakon 1-2 sata i smanjuje se s vremenom poluživota od 4-6 sati. To nije procjena vremena poluživota samog azatioprina, ali odražava eliminaciju azatioprina i njegovih [³⁵S]-metabolita iz plazme. Budući da se azatioprin metabolizira brzo i gotovo u potpunosti, samo djelić radioaktivnosti izmjerene u plazmi odražava nemetabolizirani dio lijeka. U ispitivanjima u kojima je koncentracija azatioprina i 6-MP utvrđena nakon intravenske primjene azatioprina, procijenilo se da je srednja vrijednost vremena poluživota u plazmi za azatioprin između 6 i 28 minuta te za 6-MP između 38 i 114 minuta nakon intravenske primjene lijeka.

Distribucija

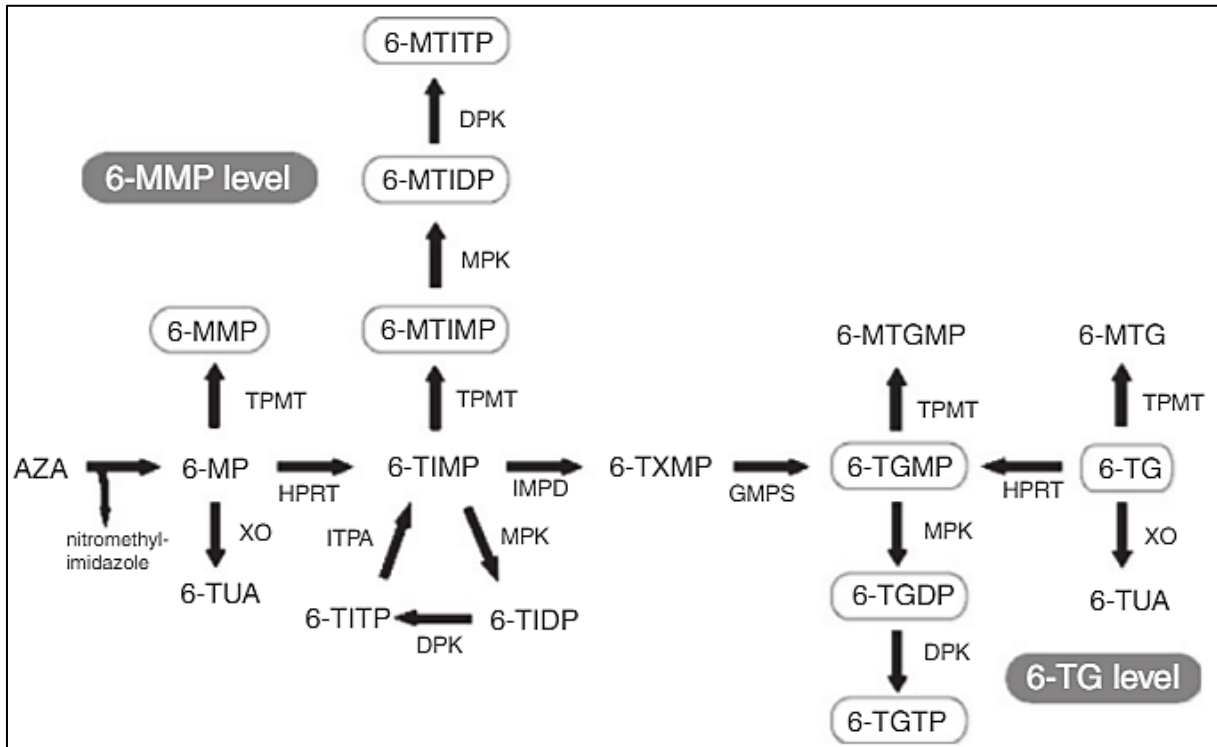
Azatioprin se brzo raspodjeljuje po tijelu. Poluvijek u plazmi iznosi 3 – 5 sati. Samo se 30% lijeka veže za proteine u plazmi, dok 12,5% lijeka ulazi u cerebrospinalnu tekućinu (<http://www.halmed.hr>).

Biotransformacija

Azatioprin je prolijek koji se neenzimatskom reakcijom prevodi u aktivni metabolit 6-merkaptopurin (6-MP). 6-MP se zatim metabolizira pomoću tri različita enzima: ksantin oksidaza (XO) prevodi 6-MP u 6-tiouričnu kiselinu (6-TUA; inaktivni metabolit), tiopurin S-metiltransferaza (TPMT) u 6-metilmerkaptopurin (6-MMP; aktivni metabolit), dok hipoksantin fosforibozil transferaza (HPRT) prevodi 6-MP u 6-tioinozinmonofosfat (6-TIMP) koji djelovanjem inozin monofosfat dehidrogenaze (IMPD) prelazi u 6-tioksantozin monofosfat (6-TXMP), a on se u konačnici, pomoću gvanozin monofosfat sintetaze (GMPS), metabolizira u 6-tiogvanin-monofosfat (6-TGMP), -difosfat (6-TGDP) i -trifosfat (6-TGTP), zajednički nazvanih 6-tiogvanin-nukleotidi (6-TGN). 6-TGN inhibiraju nukleotidnu konverziju i *de novo* sintezu purina. To dovodi do inhibicije sinteze DNA, RNA i proteina. Kao rezultat toga dolazi do inhibicije proliferacije stanica, osobito limfocita i leukocita. 6-TIMP se alternativno može metilirati pomoću TPMT, čime nastaje 6-metil tioinozin-monofosfat (6-MTIMP), -difosfat (6-MTIDP) i -trifosfat (6-MTITP), takozvani 6-metil-merkaptopurin ribonukleotidi (6-MMPR) koji su važni u inhibiciji *de novo* sinteze purina pa samim time i djelovanju lijeka. Konačno, pretpostavlja se da se 6-TIMP sukcesivno pretvara u 6-tioinozin-difosfat (6-TIDP) i trifosfat (6-TITP) te da 6-TIMP ponovno nastaje još jednom pomoću enzima inozin trifosfat pirofosfataze (ITPA) (Slika 2.) (Derijks i sur., 2006; Katzung i sur., 2012).

Postoje osobe s nasljednim nedostatkom enzima tiopurin metiltransferaze (TPMT) koje mogu biti osobito osjetljive na mijelosupresivni učinak azatioprina i sklone brzom razvoju depresije

koštane srži nakon početka liječenja azatioprinom. Ograničeni podaci upućuju na to da liječenje azatioprinom nije djelotvorno u bolesnika s nasljednim nedostatkom hipoksantin fosforibozil transferaze (Lesch-Nyhanov sindrom) (<http://www.halmed.hr>).



Slika 2. Metabolizam tiopurina azatioprina i tiogvanina.

AZA, azatioprin; **6-MP**, 6-merkaptopurin; **6-MMP**, 6-metilmerkaptopurin; **6-TUA**, 6-tiourična kiselina; **6-MTIMP**, 6-metiltioinozin monofosfat; **6-MTIDP**, 6-metiltioinozin difosfat; **6-MTITP**, 6-metiltioinozin trifosfat; **6-TIMP**, 6-tioinozin monofosfat; **6-TIDP**, 6-tioinozin difosfat; **6-TITP**, 6-tioinozin trifosfat; **6-TXMP**, 6-tioksantozin monofosfat; **6-TGMP**, 6-tiogvanin monofosfat; **6-TGDP**, 6-tiogvanin difosfat; **6-TGTP**, 6-tiogvanin trifosfat; **6-MTGMP**, 6-metiltiogvanin monofosfat; **6-TG**, 6-tiogvanin; **6-MTG**, 6-metiltiogvanin;

XO, ksantin oksidaza; **TPMT**, tiopurin S-metiltransferaza; **HPRT**, hipoksantin fosforibozil transferaza; **IMPD**, inozin monofosfat dehidrogenaza; **GMPS**, gvanozin monofosfat sintetaza; **MPK**, monofosfat kinaza; **DPK**, difosfat kinaza; **ITPA**, inozin trifosfatpirofosfataza. **6-MTIMP**, **6-MTIDP** i **6-MTITP** zajedno tvore 6-metilmerkaptopurin ribonukleotide (**6-MMPR**). **6-TGMP**, **6-TGDP** i **6-TGTP** zajedno tvore 6-tiogvanin-nukleotide (**6-TGN**) (Derijks i sur., 2006).

Eliminacija

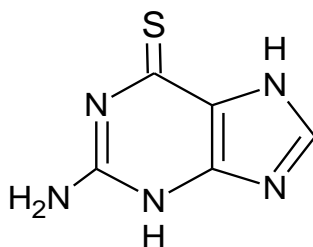
Azatioprin se najvećim dijelom izlučuje urinom u obliku 6-tiourične kiseline. 1-metil-4-nitro-5-tioimidazol se također nalazi u manjim količinama u urinu. To bi značilo da se azatioprin radije cijepa isključivo nukleofilnim napadom na 5-poziciju nitroimidazolskog prstena stvarajući 6-MP i 1-metil-4-nitro-5-(S-glutacionil) imidazol. Mali udio lijeka može biti cijepan između atoma sumpora i purinskog prstena. Samo mali dio primijenjenog azatioprina se u nemetaboliziranom obliku izlučuje urinom. Do 50% doze izluči se mokraćom tijekom prva 24 sata nakon primjene, od čega približno 10% u neizmijenjenu obliku. Samo 12,6% doze izluči se putem fecesa tijekom 48 sati. Nema dokaza enterohepatičke cirkulacije (<http://www.halmed.hr>).

1.1.3. Fizikalno kemijska svojstva

Svjetlo žuti kristali ili žućkasti prah. U vodi netopljiv. Vrlo slabo topljiv u etanolu i kloroformu, slabo topljiv u razrijeđenim mineralnim kiselinama, topljiv u razrijeđenim alkalijskim otopinama. Eksperimentalno određen $\log P = 0,1$. Predviđen pomoću računalnog programa ALOGPS $\log P = 0,84$, a pomoću računalnog programa ChemAxon $\log P = 1,17$ (<https://www.drugbank.ca>).

1.2. Tiogvanin

Tiogvanin je antineoplastični lijek iz skupine antimetabolita – analog je purina koji nije registriran na tržištu Republike Hrvatske (Slika 3.). Indiciran je za liječenje akutne leukemije, osobito akutne mijeloične leukemije i akutne limfoblastične leukemije.



Slika 3. Struktura tiogvanina (<http://pharmacopeia.cn>)

1.2.1. Farmakodinamička svojstva

Farmakoterapijska skupina: antineoplastični i imunomodulatorni lijek / antimetabolit - analog purina.

Mehanizam djelovanja

Tiogvanin je sulfhidrilni analog gvanina i djeluje kao antimetabolit purina. Analog je prirodnih purinskih baza hipoksantina i gvanina. Aktivira se u 6-tiogvanin monofosfat. Metaboliti tiogvanina (6-tiogvanin-nukleotidi) inhibiraju *de novo* sintezu purina i interkonverziju purinskih nukleotida. Aktivni metaboliti tiogvanina ugrađuju se u DNA u S-fazi staničnog ciklusa i time sprječavaju ugradnju prirodnih nukleotida u DNA što dovodi do zaustavljanja normalnog rasta, razvoja i diobe stanica. Dodatnom citotoksičnom efektu doprinosi i ugradnja tiopurinskih nukleotida u DNA i RNA (<https://www.drugbank.ca>; <http://www.mhra.gov.uk>; Katzung i sur., 2012).

1.2.2. Farmakokinetička svojstva

Apsorpcija

Nakon oralne primjene radioaktivnog tiogvanina, maksimalna radioaktivnost plazme se bilježi nakon 8 – 10 sati, nakon čega polako pada. Kasnije studije koje koriste HPLC pokazale su da je 6-tiogvanin glavni tiopurin prisutan barem prvih 8 sati nakon intravenske primjene. Najviše koncentracije u plazmi nakon intravenske primjene od 1 do 1,2 g 6-tiogvanina/m² površine tijela bile su 61-118 nmol/ml. Razina u plazmi smanjuje se bieksponecijalno s početnim i krajnjim vremenom poluraspada od 3 i 5,9 sati. Nakon oralne primjene 100 mg/m², najviše razine, mjereno pomoću HPLC bile su nakon 2-4 sata, a nalaze se u rasponu od 0,03 - 0,94 nmol/ml. Razine su smanjene kod istodobnog unosa hrane kao i uslijed povraćanja.

Distribucija

Podaci o raspodjeli tiogvanina u ljudi koji su dostupni u znanstvenoj literaturi su ograničeni. Kod intravenske infuzije u djece s akutnom limfatičkom leukemijom u dozi od 20 mg/m²/h tijekom 24 sata, tiogvanin prodire u cerebrospinalnu tekućinu.

Biotransformacija

Tiogvanin se *in vivo* ekstenzivno metabolizira. Tri različita enzima odgovorna su za metabolizam tiogvanina: hipoksantin fosforibozil transferaza (HPRT) koja 6-tiogvanin pretvara u 6-tiogvanin monofosfat (6-TGMP) koji se zatim pomoću proteinskih kinaza (MPK

i DPK) dodatno metabolizira do aktivnih metabolita, tiogvanin nukleotida (6-TGN); drugi enzim koji metabolizira tiogvanin je tiopurin S-metiltransferaza (TPMT) koji tiogvanin pretvara u 6-metiltiogvanin (6-MTG, aktivni metabolit) te 6-TGMP u 6-MTGMP (inaktivan metabolit); treći enzim ksantin oksidaza (XO) prevodi tiogvanin u 6-tiouričnu kiselinu (inaktivan metabolit) (Slika 2.).

Eliminacija

Nema podataka (<http://www.mhra.gov.uk>).

1.2.3. Fizikalno-kemijska svojstva

Blijedožuti kristalni prah bez mirisa ili gotovo bez mirisa. Lako topljiv u razrijeđenim alkalijskim otopinama. Netopljiv u vodi, alkoholu i kloroformu. Eksperimentalno određen $\log P = -0,07$. Predviđen pomoću računalnog programa ALOGPS $\log P = -0,36$, a pomoću računalnog programa ChemAxon $\log P = -0,35$ (<https://www.drugbank.ca>).

1.3. Lipofilnost, koeficijent raspodjele (P), koeficijent distribucije (D)

Lipofilnost je fizikalno-kemijsko svojstvo spoja koje opisuje njegovu sposobnost da se otapa u mastima, uljima i nepolarnim otapalima poput heksana ili toluena. Za lijekove je to vrlo važno svojstvo jer utječe na njihovu farmakokinetiku, farmakodinamiku i toksikološki profil, odnosno na topljivost, apsorpciju, distribuciju, metabolizam, eliminaciju, vezanje na proteine plazme i interakciju s receptorom. Lipofilnost se obično izražava logaritmom koeficijenta raspodjele ($\log P$) koji opisuje ravnotežu raspodjele otopljenog spoja između vode i organskog otapala koje se ne miješa s vodom (jednadžba 1).

$$\log P = \log \frac{[\text{neioniziranih specija}]_{n\text{-oktanol}}}{[\text{neioniziranih specija}]_{\text{voda}}} \quad (1)$$

Kao organsko otapalo najčešće se koristi n -oktanol koji se pokazao najprikladnijim zbog sličnosti s fosfolipidima bioloških membrana. Iz jednadžbe 1 moguće je utvrditi kako pozitivna vrijednost $\log P$ označava veći afinitet spoja za lipidnu fazu, dok negativna vrijednost označava relativni afinitet za vodu. No, $\log P$ kao parametar koji opisuje lipofilnost vrijedi samo za neionizirane forme, a moguće ga je odrediti eksperimentalno (metoda izmućkavanja, TLC, HPLC, potenciometrijska titracija, kapilarna elektroforeza) i računski pomoću računalnih programa.

Mnogi lijekovi mogu postojati i u ioniziranom i u neioniziranom obliku, između kojih postoji ravnoteža pri određenom pH. Za spojeve koji ioniziraju govorimo o logaritmu koeficijenta distribucije ($\log D$), ovisnom o pK_a . Koeficijent distribucije može se izračunati prema sljedećim jednadžbama:

$$\log D = \log \frac{[\text{ioniziranih i neioniziranih specija}]_{n\text{-oktanol}}}{[\text{ioniziranih i neioniziranih specija}]_{\text{pufer}}} \quad (2)$$

ili

$$\log D_{\text{kiseline}} = \log P + \log \left[\frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \right] \quad (3)$$

$$\log D_{\text{baze}} = \log P + \log \left[\frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \right] \quad (4)$$

On predstavlja relativnu raspodjelu svih specija (ioniziranih i neioniziranih) između organskog otapala i pufera pri čemu je važan pH pri kojem se određuje (Pliška i sur., 1996; Rajić Džolić, 2015; Rutkowska i sur., 2013; Tute, 1996).

Lipinski i suradnici utvrdili su svojstva koja lijek mora imati da bi bio oralno aktivan, odnosno učinkovit nakon peroralne primjene. Ta svojstva sažeta su u Lipinskijevom pravilu 5 koje glasi: relativna molekulska masa ljekovite tvari mora biti manja od 500, molekula ne smije sadržavati više od 5 donora vodikovih veza, molekula ne smije sadržavati više od 10 akceptora vodikovih veza, izračunata $\log P$ vrijednost mora biti manja od 5.

Da bi spojevi penetrirali kroz biološke membrane, apsorbirali se i postali biološki raspoloživi, mora postojati ravnoteža između lipofilnosti i hidrofilnosti tog spoja. Lijekovi koji su previše polarni ili hidrofilni ne prolaze lako kroz stanične membrane stijenke crijeva. Jedno od mogućih rješenja je promjena načina primjene lijeka s peroralnog na neperoralni način. Međutim, time se ne rješava problem lijekova koji trebaju djelovati unutar stanice, jer oni moraju proći kroz staničnu membranu. Osim toga, ti lijekovi vjerojatno imaju polarne funkcionalne skupine koje ih čine podložnima za vezanje na proteine plazme, reakcije konjugacije (II. faza metabolizma lijekova) i brzo izlučivanje iz organizma. Jako hidrofobni lijekovi također mogu imati nisku bioraspoloživost. Ako se primjenjuju peroralno, postoji vjerojatnost da će se apsorbirati u masne čestice u crijevima te da će udio slobodnog lijeka biti prenizak. Ako se primjenjuju putem injekcije, vjerojatno će se pohraniti u masnom tkivu. Njihova koncentracija u plazmi može biti niska i zbog slabe topljivosti. Lipofilnost lijeka u

inverznom je odnosu prema topljivosti; veća lipofilnost dovodi do niže topljivosti. Ravnoteža između tih dvaju svojstava vrlo je kritična za spojeve koji se apsorbiraju iz probavnog trakta, a odnos između $\log D/\log P$ vrijednosti i permeabilnosti preko bioloških membrana je nelinearan. Permeabilnost se smanjuje kod niskih i visokih $\log D$ vrijednosti, stoga se često $\log D$ vrijednost 5 smatra gornjom granicom željene lipofilnosti, kao što je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. $\log D$ vrijednosti kod pH 7,4 i utjecaj na permeabilnost, oralnu apsorpciju i distribuciju lijeka (Yanni, 2015).

| | |
|------------------|--|
| $\log D < 0$ | loša apsorpcija preko gastrointestinalnog trakta i krvno-moždane barijere, potencijalno brz bubrežni klirens |
| $\log D = 0 - 1$ | ravnoteža između topljivosti i permeabilnosti, dobra oralna apsorpcija, loša CNS permeabilnost |
| $\log D = 1 - 3$ | optimalna oralna apsorpcija i CNS permeabilnost, sporiji metabolizam |
| $\log D = 3 - 5$ | slaba topljivost, veća brzina metabolizma |
| $\log D > 5$ | slaba topljivost i apsorpcija kroz GI sustav, brz metabolizam |

Uočeno je da je $\log P$ vrijednost veća što je manja topljivost, a također se je pokazalo da su neutralne molekule slabije topljive u odnosu na ionizabilne molekule. Kada je $\log P < 3$, prosječna topljivost neutralnih molekula približava se prosječnoj topljivosti ionizirajućih molekula. Isti trend se je pokazao i s molekularnom masom, odnosno kako se molekularna masa povećava, topljivost se smanjuje. Odnos između $\log P$ vrijednosti (lipofilnosti) i topljivosti / permeabilnosti:

1. lijek $\log P$ vrijednosti 0 - 3 smatra se optimalnim za pasivnu difuziju,
2. $\log P$ vrijednosti < 1 ukazuje na to da će spoj imati dobru topljivost zato što je hidrofilniji, ali će imati slabu permeabilnost,
3. lijek $\log P$ vrijednosti > 3 ukazuje da je spoj jako lipofilan, imat će nisku topljivost i podliježe bržem metabolizmu i/ili bilijarnom izlučivanju (Rajić Džolić, 2015; Yanni, 2015).

1.4. Kromatografske tehnike za određivanje farmakokinetike lijekova

Zbog potrebe za brzim metodama kojima bi se u kratkom vremenu mogao dobiti uvid u farmakokinetičke parametre velikog broja molekula, u svrhu ispitivanja lipofilnosti uvedene su kromatografske tehnike. Pokazalo se da je zadržavanje analita u obrnuto-faznoj tekućinskoj

i tankoslojnoj kromatografiji povezano s lipofilnošću i da rezultati dobro koreliraju s koeficijentom raspodjele *n*-oktanol/voda (Rutkowska i sur., 2013). Za razliku od metode izmućkivanja, kromatografske tehnike su brze i reproducibilne, zahtijevaju vrlo malu količinu uzorka te je smanjeno samo rukovanje s uzorkom, a velika prednost je i što su neosjetljive na onečišćenja ili produkte degradacije budući da se radi o separacijskoj tehnici (Giaginis i Tsantili-Kakoulidou, 2008). Kromatografija je tehnika odjeljivanja koja se temelji na razdiobi spojeva između nepokretne i pokretne faze. Najčešće se koristi kromatografija obrnutih faza gdje je nepokretna faza nepolarna, odnosno hidrofobna. Prilikom prolaska pokretne faze kroz nepokretnu fazu, dolazi do raspodjele spojeva između dvije faze i samim time do određenog zadržavanja na nepokretnoj fazi. Iz podataka o zadržavanju, između ostalog, moguće je dobiti informaciju o lipofilnosti spoja (Nigović i sur., 2014; Luterotti, 2011). Za tu svrhu koriste se tankoslojna kromatografija (TLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-HPLC), centrifugalna particijska kromatografija (CPC), mikroemulzijska elektrokromatografija (MEEKC), kapilarna elektrokromatografija (CEC), no detaljnije će biti opisane samo TLC i HPLC (Giaginis i Tsantili-Kakoulidou, 2008).

U tankoslojnoj kromatografiji nepokretna faza (najčešće silikagel) je nanosena na staklenu, plastičnu ili aluminijsku ploču u tankom sloju. Kod obrnuto-fazne kromatografije, kakva se koristi u određivanju lipofilnosti, silikagel je dodatno modiciran tako da ima vezane oktadecil silanolne skupine. Pokretnu fazu čini smjesa vode i organskog otapala, tzv. organskog modifikatora (metanol, acetonitril, aceton). Kada bi se za pokretnu fazu koristila voda bez dodatka modifikatora, retencijske faktore za jako nepolarne analite ne bi bilo moguće odrediti zbog njihova prevelikog afiniteta za nepokretnu fazu (Luterotti, 2011; Mannhold i sur., 1996). Upotrebu tankoslojne kromatografije u ispitivanju lipofilnosti uveli su Biagi i sur. (Biagi i sur., 1969; Biagi i sur., 1970; Biagi i sur., 1975). Iz retencijskog faktora (R_f) koji je omjer između udaljenosti koju prijeđe analit i udaljenosti koju prijeđe otapalo, može se izvesti R_M koji služi kao deskriptor lipofilnosti (jednadžba 5).

$$R_M = \log \frac{1-R_f}{R_f} \quad (5)$$

Osim već navedenih prednosti, poput ponovljivosti, brzine, jednostavnosti, tankoslojnom kromatografijom moguće je istovremeno provoditi analizu nekoliko sastavnica uzorka što još više ubrzava postupak. Od negativnih strana valja spomenuti slobodne silanolne grupe koje stupaju u interakcije i nestabilnost stacionarne faze pri pH > 8 (Rutkowska, 2013).

Kao odlična alternativa sporoj metodi izmućkivanja pokazala se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-HPLC) te se danas gotovo smatra standardnom metodom za brzo određivanje lipofilnosti velikog broja molekula. Odjeljivanje se provodi u koloni punjenoj česticama nepokretne faze, dok pokretna faza pod pritiskom prolazi kroz nju. Nepokretna faza je silikagel modificiran alkilnim lancima različitih duljina. U obrnuto-faznoj kromatografiji pokretna faza je polarna, a otapala koja se koriste moraju biti vrlo visoke čistoće, pročišćena od otopljenih plinova ili eventualnih čestica. Za određivanje lipofilnosti najčešće se koristi C₁₈ kolona obrnutih faza kod koje je na silanolne skupine silikagela vezan oktadecilsilil (ODS), a pokretna faza je voda ili pufer s organskim modifikatorom, najčešće metanolom (Nigović i sur., 2014; Luterotti, 2011; Giaginis i Tsantili-Kakoulidou, 2008). Kao deskriptor lipofilnosti služi logaritamska vrijednost faktora kapaciteta (k) koji se pak izračunava iz vremena zadržavanja analiziranog spoja (t_R) i mrtvog vremena (t_0) prema jednadžbi:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (6)$$

Mnogi znanstvenici smatraju da bi umjesto $\log k$ trebalo koristiti $\log k_w$ koji opisuje uvjete sličnije raspodjeli n -oktanol/voda (Van de Waterbeemd i sur., 1996). Međutim, u većini slučajeva nije moguće koristiti čistu vodu kao pokretnu fazu, nego se $\log k_w$ dobiva ekstrapolacijom iz grafičkog prikaza odnosa $\log k$ o udjelu organskog otapala u pokretnoj fazi. Dakle, provedu se analize istog spoja s pokretnim fazama pripremljenim u gradijentnom nizu i tada $\log k$ linearno ovisi o udjelu organskog otapala (jednadžba 7):

$$\log k = S\varphi + \log k_w \quad (7)$$

pri čemu je S nagib pravca, a φ udio organskog otapala u pokretnoj fazi.

Ukoliko odnos nije linearan, ekstrapolira se iz dijela krivulje koji je linearan (manji udjeli otapala) ili pomoću kvadratne jednadžbe:

$$\log k = A\varphi^2 + B\varphi + \log k_w \quad (8)$$

gdje su A i B regresijski koeficijenti.

No, ne slažu se svi istraživači s ovim modelom, već smatraju da se najbolji rezultati dobivaju pri 50 % udjelu metanola u pokretnoj fazi (Yamagami, 2001).

Brojna istraživanja su pokazala da HPLC dobro simulira raspodjelu n -oktanol/voda, a $\log P$ linearno korelira s $\log k$, odnosno $\log k_w$. Iz kalibracijskog pravca, dobivenog iz odnosa $\log P$ i $\log k_w$ niza spojeva čije su vrijednosti $\log P$ poznate, može se izvesti $\log P$ ispitivanog spoja pomoću Collanderove jednadžbe:

$$\log P = a \cdot \log k + b \quad (9)$$

gdje su a i b koeficijenti linearnosti kalibracijskog pravca.

Iako $\log k$ može sam po sebi služiti kao deskriptor lipofilnosti, s obzirom da se metoda raspodjele n -oktanol/voda još uvijek smatra standardnom i s obzirom da postoje baze podataka s $\log P$ vrijednostima, uobičajeno je uspoređivati $\log k$ s $\log P$. Uz brzinu, ponovljivost, dobru korelaciju s $\log P$ vrijednostima, treba spomenuti i širi raspon vrijednosti $\log P$ koje je moguće izmjeriti te tzv. „on line“ detekciju. Negativna strana je mogućnost stupanja u interakciju sa slobodnim silanolnim skupinama, no postoje različita tehnološka rješenja koja umanjuju taj problem (Rutkowska i sur., 2013; Giaginis i Tsantili-Kakoulidou, 2008).

U novije vrijeme u ispitivanje lipofilnosti, odnosno permeabilnosti lijekova, uvedena je IAM (engl. *Immobilized Artificial Membrane*) kolona koja bolje opisuje interakciju lijeka s biološkim membranama. Koristi se za predviđanje apsorpcije lijekova pasivnim transportom, a neprimjenjiva je za one koji prelaze staničnu membranu paracelularnim putem ili aktivnim transportom. Umjesto alkilnih lanaca, na silanolne skupine su u monosloju kovalentno vezani fosfolipidi: fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, sfingomijelin ili kolesterol (Slika 4.). Samim time, ona je sličnija biološkim membranama pa daje i bolji uvid u permeabilnost lijekova. Fosfatidilkolin čini najveći udio fosfolipida membrana te se za predviđanje permeabilnosti najviše upotrebljava nepokretna faza upravo s tim fosfolipidom. Osim za ispitivanje permeabilnosti, IAM kolone se koriste i za pročišćavanje proteina membrane i u studijama interakcija između lijeka i membrane (www.registech.com; Morse i Pidgeon, 2001). Pozitivno je što je kod IAM kolone kao pokretnu fazu moguće koristiti vodu, odnosno pufer, bez dodatka organskog modifikatora što odmah dovodi do $\log k_w$ vrijednosti. Dakle, ispitivanje lipofilnosti analita moguće provesti u jednom koraku. Kolona je ograničena na primjenu u pH rasponu od 2,5–7,4 (Giaginis i Tsantili-Kakoulidou, 2008).

1.5. Kromatografski parametri koji opisuju farmakokinetiku lijekova

1.5.1. R_M

Kromatografski parametar R_M dobiva se preračunavanjem pomoću eksperimentalno određenih R_f vrijednosti. Za određivanje R_f vrijednosti primjenjuje se tankoslojna kromatografija (TLC). U eksperimentima su se nekada koristile kromatografske ploče sa silikagelom kao adsorbensom koje se impregniraju s otopinom parafinskog ili silikonskog ulja u n -heksanu, dok se danas najčešće koriste komercijalno dostupne obrnuto fazne ploče. Kao pokretna faza koriste se obično otopine pufera uz dodatak različitih koncentracija acetona ili etanola. Ispitivana supstancija se raspodjeljuje između lipofilne i hidrofilne faze. Izmjerene R_f vrijednosti koriste se za određivanje R_M parametra prema gore navedenoj jednadžbi 5. Određivanja R_M vrijednosti su jednostavnija, a često i bolje ponovljivosti od $\log P$ određenog klasičnim metodama. Osim toga, razdjelnom kromatografijom dobivena R_M vrijednost odgovara gotovo kvantitativno opisu lipofilnih svojstava supstancije. Za izrazito lipofilne spojeve izračunava se R_{Mw} vrijednost koja se temelji na mjerenjima R_M u različitim omjerima organske i vodene faze, koji čine pokretnu fazu, te na ekstrapolaciji odnosa između R_M i volumena organske frakcije, ϕ , do 100% vode (Mornar, 2007).

1.5.2. $\log k$

U RP-HPLC kromatografiji, raspodjela analita između nepokretne (hidrofobne) faze i pokretne (hidrofilne) faze povezana je sa zadržavanjem analita na kromatografskoj koloni. Faktor zadržavanja (k) je omjer koncentracije analita između stacionarne (c_S) i mobilne (c_M) faze te se računa koristeći vrijednosti vremena zadržavanja analita (t_R) i nezadržanog spoja (t_0):

$$k = \frac{c_S}{c_M} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (10)$$

Faktor zadržavanja moguće je izračunati i korištenjem koeficijenta razdjeljenja analita (K) između nepokretne i pokretne faze te uz korištenje omjera volumena nepokretne (V_S) i pokretne faze (V_M):

$$\log k = \log K + \log \frac{V_S}{V_M} \quad (11)$$

Kod ispitivanja lipofilnih spojeva u RP-HPLC kromatografiji, pokretnoj fazi se dodaje organsko otapalo, s obzirom da se lipofilni spojevi duže zadržavaju na koloni. Najčešći

organski modifikator je metanol. Logaritam faktora zadržavanja ($\log k$) određuje se u nekoliko pokretnih faza različitog omjera organskih otapala te se kromatografski parametar za 0% organskog otapala ($\log k_w$) dobije iz gore navedene jednadžbe 7. Navedeni logaritam faktora zadržavanja za vodenu fazu je kromatografski parametar koji se najviše koristi za određivanje hidrofobnosti u RP-HPLC metodi (Valkó, 2004).

1.5.3. CHI

Uvođenjem gradijente elucije, moguće je postupak određivanja lipofilnosti ubrzati. Valko i suradnici (Kaliszan, 2002) su uveli novi kromatografski parametar, CHI, kromatografski indeks hidrofobnosti, za analit određen gradijentnom elucijom s acetonitril/pufer pokretnom fazom. Vrijednosti CHI su kolerirale s vrijednostima $\log P$ ($R=0,92$).

$$\text{CHI} = A \times t_R + B \quad (12)$$

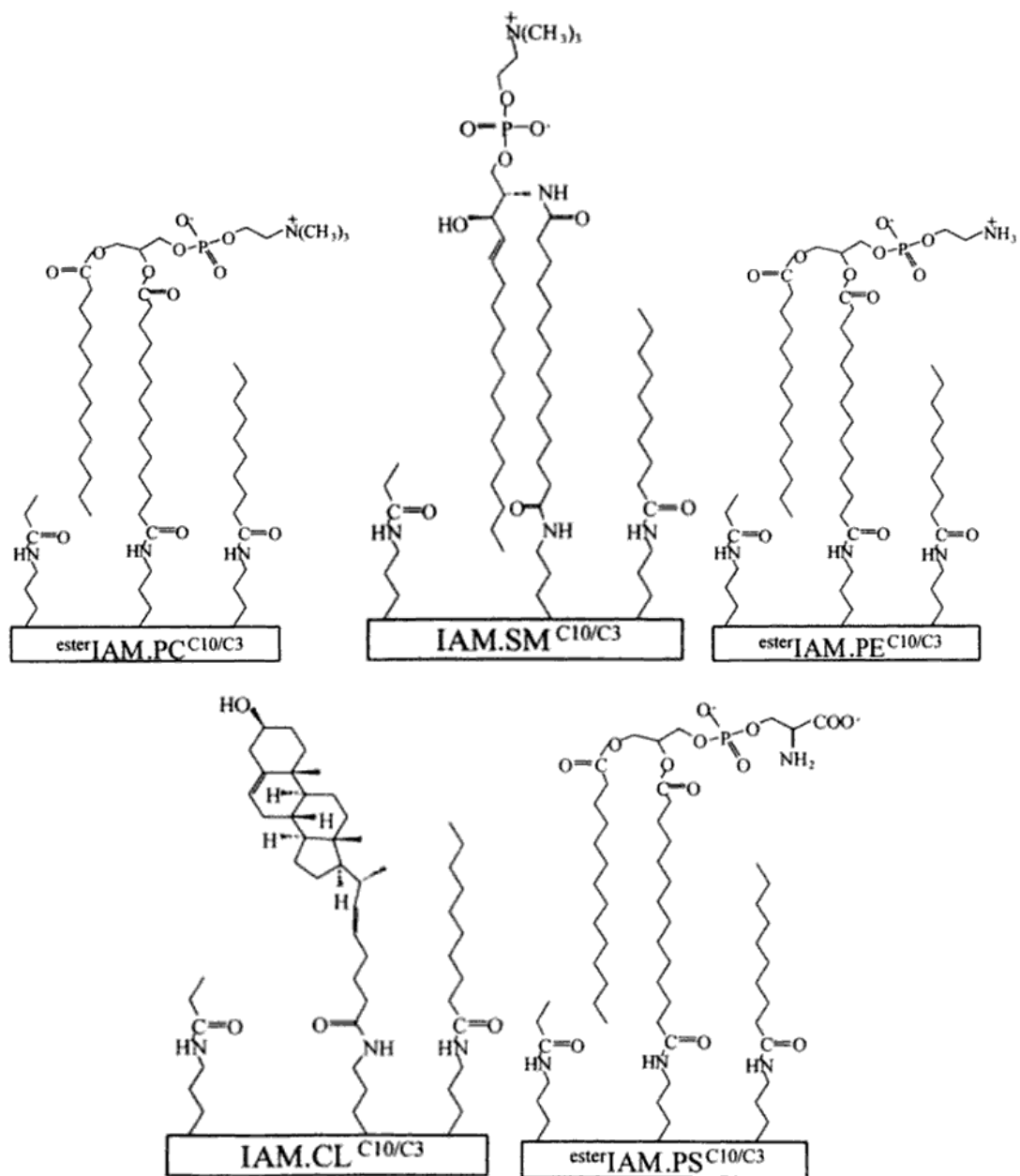
gdje je

t_R - vrijeme zadržavanja analita i

A, B - konstante dobivene ispitivanjem standardnog skupa analita.

1.5.4. $\log k_{IAM}$

Ukoliko je cilj primjene kromatografskih tehnika stvaranje modela koji će opisivati procese u biološkom sustavu, tada aktivne sastavnice kromatografskih i bioloških sustava moraju biti što sličnije. 1990-tih godina su Ong i Pidgeon (Kaliszan, 1999) predstavili novu kromatografsku kolonu, imobiliziranu umjetnu membranu (engl. *Immobilized Artificial Membrane*, IAM) za ispitivanje interakcije lijekova i fosfolipida koji se nalaze u staničnim membranama (Slika 4.). IAM nepokretnu fazu čine fosfolipidi s polarnim glavama i nepolarnim repovima, koji su kovalentno vezani za aminopropil-silanolnu skupinu s kojom čine monosloj imobiliziranih lipida. Ovakva struktura kolone omogućava da polarne skupine prve stupaju u kontakt s ispitivanim analitom.



Slika 4. Struktura Pidgeonove imobilizirane umjetne membrane (IAM) kao nepokretne faze (Morse i Pidgeon, 2001).

IAM kolone se označavaju oznakom "xIAM.PLy" te je

PL - vrsta fosfolipidnog lanca,

x - vrsta veze između acilnog lanca i glicerolske okosnice fosfolipida i

y - slobodne propilaminske skupine koje se prekrivaju dugolančanim i kratkolančanim ugljikovodicima (samo 60% propilaminskih skupina silikagela je moguće vezati za fosfolipide) (Mornar, 2007).

Logaritam koeficijenta zadržavanja ($\log k_{IAM}$) opisuje razdjeljenje analita između pokretne faze i nepokretne faze s vezanim umjetnim membranama, a izračunava se prema jednadžbi:

$$\log k_{IAM} = \log \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (13)$$

gdje je

t_R - vrijeme zadržavanja analita i

t_0 - vrijeme zadržavanja nezadržanog spoja.

Lipofilni spojevi se u IAM-HPLC kromatografiji ispituju u nekoliko pokretnih faza s različitim udjelom organskog otapala te se logaritam koeficijenta zadržavanja za 0% organskog otapala ($\log k_{wIAM}$) računa prema jednadžbi:

$$\log k_{IAM} = \log k_{wIAM} + S\varphi \quad (14)$$

gdje je

S - nagib pravca i

φ - udio organskog otapala u pokretnoj fazi.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Razvoj novog lijeka je izuzetno složen proces s prosječnim troškovima preko 900 milijuna \$, a može trajati i više od 10 - 15 godina. Regulatorni zahtjevi su progresivno veći, troškovi rastu, a konkurencija je sve jača. Svi ti čimbenici tjeraju farmaceutske tvrtke da se proces istraživanja i razvoja lijekova (R & D) ubrza, skрати i poboljša koliko god je to moguće. Slijedom toga, metodologije za povećanje produktivnosti procesa R & D postaju sve važnije. U suvremenom otkriću i razvoju lijekova istražuju se novi pristupi za racionalan dizajn lijekova u čemu veliku važnost imaju farmakokinetički parametri kemijskih entiteta jer su tri glavna razloga kliničkog neuspjeha novih kemijskih entiteta nedostatak učinkovitosti, toksičnost i nepovoljna farmakokinetička svojstva. Zbog toga je važno da se farmakokinetički profil potencijalnih lijekova ispita u što ranijoj fazi istraživanja lijekova kako bi se između mnogo sintetiziranih spojeva izdvojilo one koje imaju zadovoljavajuće farmakokinetičke parametre. Da bi to bilo moguće, potrebne su brze i pouzdane metode, a kao jedno od najvažnijih fizikalno-kemijskih svojstava koje utječe na farmakokinetiku lijeka ističe se lipofilnost. Fizikalno-kemijski parametar lipofilnost od iznimnog je značaja stručnjacima koji istražuju nove lijekove, ali i farmakolozima, analitičarima, farmaceutskim tehnolozima i drugim stručnjacima iz područja farmaceutske znanosti. Ovaj parametar utječe na topljivost lijeka, transport lijeka kroz stanične membrane i krvno moždanu barijeru, odnosno apsorpciju i oralnu bioraspoloživost, distribuciju, interakciju lijeka s transportnim proteinima, aktivnost i metabolizam lijeka, odnosno na njegovu farmakokinetiku i farmakodinamiku. Tradicionalna metoda za ispitivanje lipofilnosti, metoda izmućkavanja (engl. *shake-flask*), sve više postaje nedostatna jer nije u potpunosti reproducibilna metoda zbog dugotrajne optimizacije same metode i eksperimentalnih uvjeta koji moraju biti točno definirani pa se traže nove, brže, reproducibilnije i alternativne metode. Kromatografske tehnike pokazale su se kao dobar izbor za određivanje lipofilnog profila spojeva, posebno tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza. Danas postoje i kromatografske kolone s umjetnim membranama koje zbog svog sastava i interakcija s analitom omogućuju vjerniju usporedbu s rezultatima provedenima u *in vivo* uvjetima.

Stoga je cilj ovog rada na primjeru azatioprina i tiogvanina ispitati mogućnost primjene tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti za ispitivanje lipofilnosti lijekova.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Reagensi, pribor i instrumenti

Reagensi

- azatioprin - Imuran® 50 mg tablete (Excella GmbH, Feucht, Njemačka)
- tiogvanin – Thioguanine® 10 mg tablete (ACE Pharmaceuticals, Zeewolde, Nizozemska)
- metanol – čistoće za tekućinsku kromatografiju (Scharlau, Scharlab S.L., Barcelona, Španjolska)
- natrijev nitrit - čistoće p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- fosfatni pufer – 0,01 M, tablete Sigma®
- amonijak - čistoće p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- voda – MILIQ

Pribor i instrumenti

- analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Ohio, SAD)
- injekcijski filteri - CHROMAFIL®Xtra RC-20/25 0.20 µm (Macherey-Nagel)
- kolona IAM.PC.DD2, 10 cm x 4,6 mm, čestice promjera 12 µm (Regis Technologies, Austin, IL, SAD)
- kolona Symmetry C₁₈, 15 cm x 4,6 mm, čestice promjera 3.5 µm (Walters)
- vijale (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- računalni program - ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- spremnici za automatsko uzorkovanje tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)
- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

3.2. Priprema uzoraka azatioprina i tiogvanina

Otopina azatioprina pripremi se u koncentraciji od 1 mg/ml na način da se odvagne i usitni jedna Imuran® tableta (sadržaj azatioprina u jednoj tableti je 50 mg) te se zatim odvaže 1/5 usitnjene tablete, kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 10 ml, doda 0,5 ml amonijaka i nadopuni metanolom do oznake. Ekstrakcija analita se provede tijekom 10 min na

sobnoj temperaturi u ultrazvučnoj kupelji. Uzorak se zatim prenese u bočicu za uzorkovanje za tekućinsku kromatografiju uz prethodnu filtraciju kroz mikrofiltrar.

Otopina tiogvanina pripremi se u koncentraciji od 1 mg/ml na način da se usitni jedna Thioguanine® tableta (sadržaj tiogvanina u jednoj tableti je 10 mg), zatim se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 ml, doda 0,5 ml amonijaka i nadopuni se metanolom do oznake. Uzorak se stavi 10 min na sobnoj temperaturi u ultrazvučnu kupelj kako bi se potaknula ekstrakcija te se zatim prenese u bočicu za uzorkovanje za tekućinsku kromatografiju uz prethodno filtriranje kroz mikrofiltrar.

Za određivanje mrtvog vremena (t_0) koristi se 0,1%-tna otopina natrijevog nitrita dobivena otapanjem 1 mg natrijevog nitrita u 10 ml ultračiste vode.

3.3. Priprema pokrete faze

Pokretnu fazu čini smjesa fosfatnog pufera (pH 7,4) i metanola u različitim omjerima, počevši od omjera 50:50 pa prema opadajućem udjelu metanola. Pufer se pripremi otapanjem komercijalno dostupne tablete Sigma® definiranog sastava u 200 ml ultračiste vode.

Za eksperiment je korišteno 100 ml smjese metanola i pufera (pH 7,4), a one se izrađuju kako je prikazano u Tablici 2.

Tablica 2. Shema pripreme pokretne faze za ispitivanje lipofilnosti pomoću RP-HPLC tehnike.

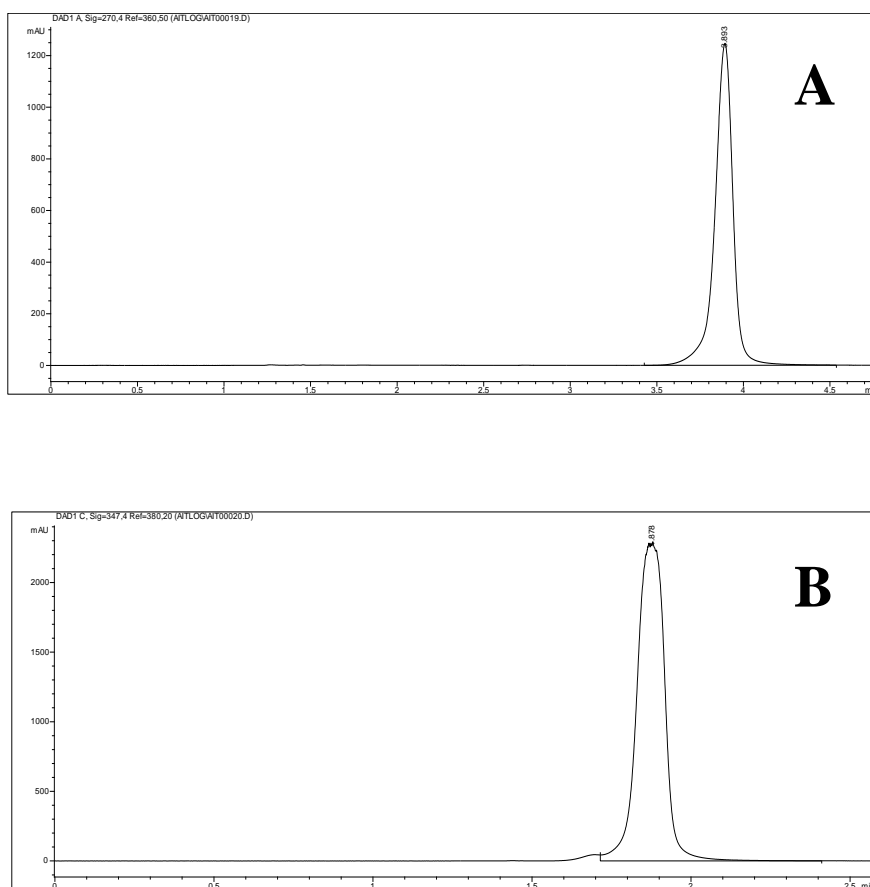
| Omjer MeOH : pufer (pH 7,4) | V(MeOH)/ml | V(pufer [pH 7,4])/ml |
|-----------------------------|------------|----------------------|
| 50:50 | 50 | 50 |
| 45:55 | 45 | 55 |
| 40:60 | 40 | 60 |
| 35:65 | 35 | 65 |
| 30:70 | 30 | 70 |
| 25:75 | 25 | 75 |
| 20:80 | 20 | 80 |
| 15:85 | 15 | 85 |
| 10:90 | 10 | 90 |
| 5:95 | 5 | 95 |
| 0:100 | 0 | 100 |

3.4. Ispitivanje lipofilnosti azatioprina i tiogvanina pomoću kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-HPLC)

Za određivanje lipofilnosti azatioprina i tiogvanina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti korištene su standardna C₁₈ kolona (4,6 x 150 mm, veličina čestica 3,5 μm) te IAM kolona (4,6 x 100 mm, veličina čestica 12 μm). Provedena je izokratna elucija, a kao pokretna faza korištena je smjesa metanol/fosfatni pufer (pH 7,4) u omjerima kako je navedeno u Tablici 2. U oba slučaja temperatura kolone bila je 25,0 ± 1 °C, injektirani volumen uzoraka azatioprina i tiogvanina bio je 5 μl, a protok pokretne faze 1 ml/min. Za određivanje mrtvog vremena (t_0) korištena je otopina natrijevog nitrita koncentracije 1 mg/ml te je za svaki omjer otapala pokretne faze najprije izmjereno vrijeme t_0 , a zatim t_R azatioprina i t_R tiogvanina. Kromatogrami su dobiveni pomoću DAD detektora. Spektri su snimani u UV spektru u rasponu od 200 do 400 nm, a kromatogrami pojedinog uzorka pri maksimumu apsorpcije i to na valnim duljinama od 270 nm za azatioprin te 254 nm i 347 nm za tiogvanin.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Analizom provedenom metodom kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza na C_{18} koloni i na IAM koloni dobivena su vremena zadržavanja (t_R) azatioprina i tiogvanina te mrtvo vrijeme (vrijeme zadržavanja natrijevog nitrita, t_0) za svaki pojedini omjer otapala u pokretnoj fazi (Slika 5.). Iz izmjerenih vrijednosti, također za svaki pojedini omjer otapala u pokretnoj fazi, izračunat je faktor kapaciteta k prema jednadžbi 10.



Slika 5. Kromatogram standardne otopine azatioprina (A) i 6-tiogvanina (B). Kromatografska kolona: Symmetry C_{18} , 15 cm x 4,6 mm, čestice promjera 3.5 μm (Walters), pokretna faza: metanol:pufer (25:75, v/v).

Budući da sam faktor kapaciteta ne govori mnogo o lipofilnosti spoja, potrebno je izračunati njegovu logaritamsku vrijednost da bi se dobio uvid u linearnost podataka. Dobivene su vrijednosti faktora kapaciteta i njegovog logaritma kako za azatioprin (Tablica 3.) tako i za tiogvanin (Tablica 4.) te su zatim stavljene u odnos s udjelom metanola u pokretnoj fazi što je prikazano grafički (Slike 6. – 8.).

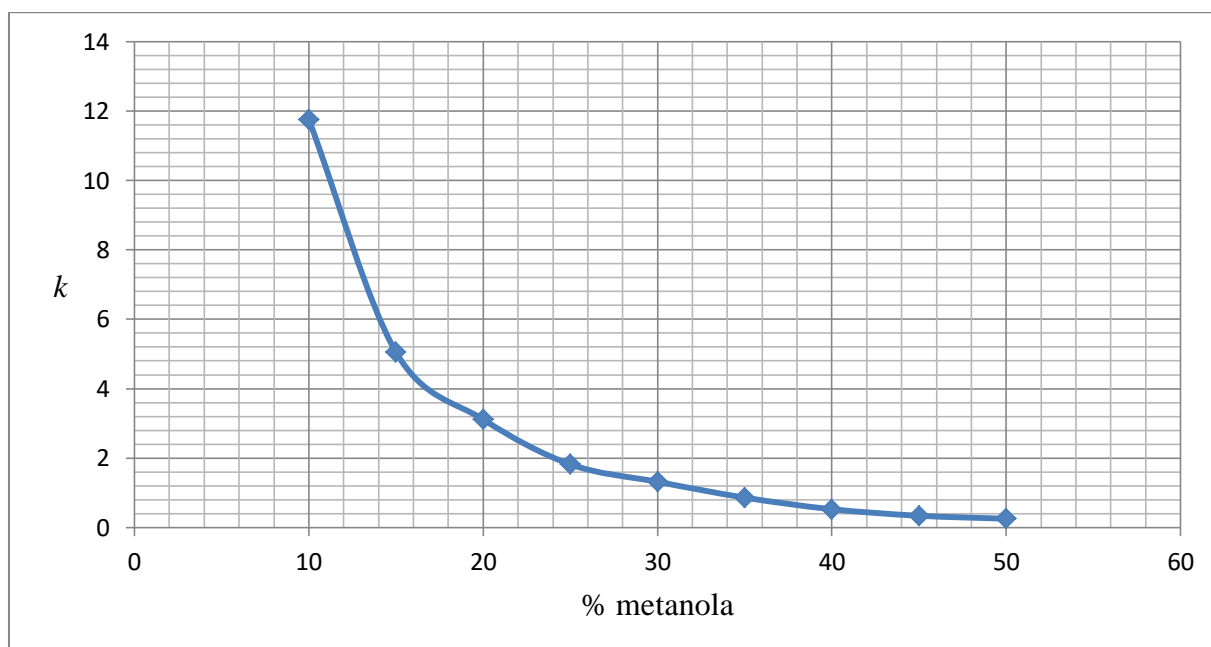
Niže su prikazani rezultati dobiveni kromatografijom na C₁₈ koloni za azatioprin (Tablica 3., Slike 6. i 7.).

Tablica 3. Prikaz rezultata dobivenih kromatografijom na C₁₈ koloni za azatioprin; izračunate k i $\log k$ vrijednosti.

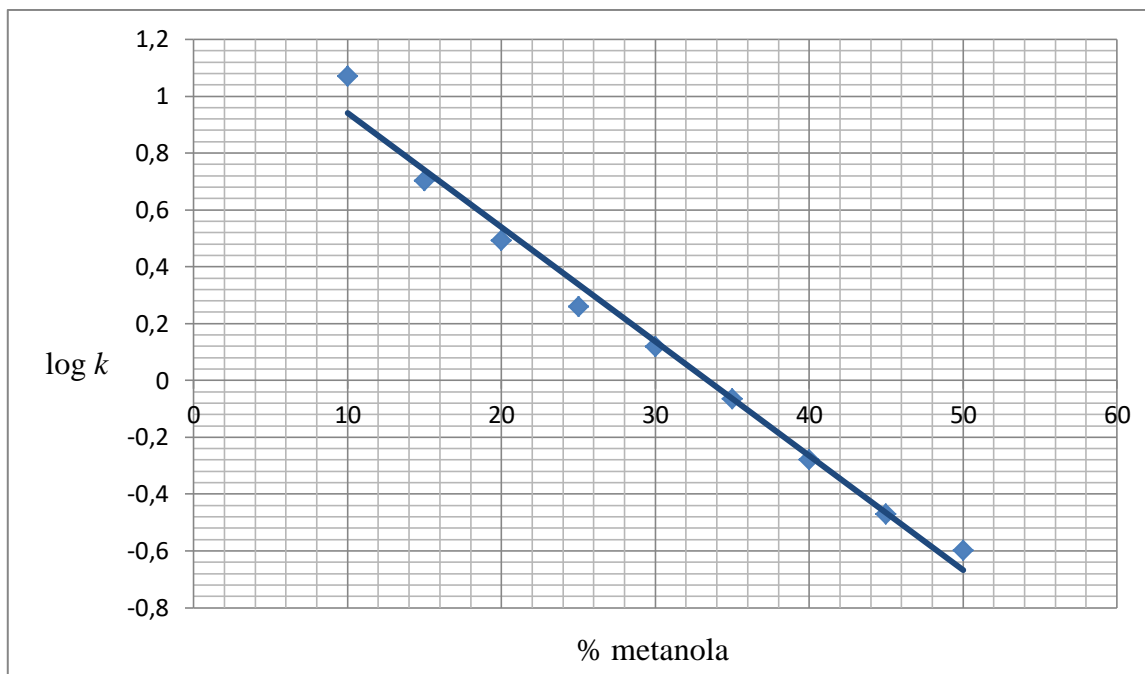
| % MeOH | t_0 / min | $t_R(\text{azatioprin})/\text{min}$ | k | $\log k$ |
|--------|-------------|-------------------------------------|-------|----------|
| 50 | 1,35 | 1,69 | 0,25 | -0,60 |
| 45 | 1,36 | 1,82 | 0,34 | -0,47 |
| 40 | 1,35 | 2,06 | 0,53 | -0,28 |
| 35 | 1,37 | 2,55 | 0,86 | -0,07 |
| 30 | 1,36 | 3,15 | 1,32 | 0,12 |
| 25 | 1,38 | 3,89 | 1,82 | 0,26 |
| 20 | 1,40 | 5,76 | 3,11 | 0,49 |
| 15 | 1,41 | 8,53 | 5,05 | 0,70 |
| 10 | 1,41 | 17,99 | 11,76 | 1,07 |
| 5 | 1,43 | > 30 | - | - |
| 0 | 1,45 | nije mjereno | - | - |

Dobiveni rezultati upućuju kako se faktor zadržavanja azatioprina eksponencijalno povećao smanjenjem udjela organskog otapala - metanola u pokretnoj fazi (Slika 6.). Nadalje, logaritam faktora zadržavanja ($\log k$) linearno se povećao smanjenjem udjela metanola u pokretnoj fazi (Slika 7.). Jednadžba koja opisuje tu ovisnost je $\log k = -0,040\varphi + 1,344$ gdje je φ udio metanola u mobilnoj fazi, a linearna koleracija iznosi $R^2 = 0,987$. Iz jednadžbe proizlazi vrijednost $\log k_w$ koja iznosi 1,344. Ta pozitivna vrijednost ukazuje na lipofilnost spoja, što objašnjava da se spoj dobro veže za nepokretnu hidrofobnu fazu kromatografske C₁₈ kolone. Kod većih udjela metanola u pokretnoj fazi nema velike razlike između vremena zadržavanja ispitivanog spoja i mrtvog vremena. Međutim, smanjenjem udjela metanola dolazi do većeg odmaka vremena zadržavanja te se kod niskih udjela organskog otapala vidi

višestruko duže zadržavanje azatioprina na nepokretnoj fazi C_{18} kolone. Kod C_{18} kolone obično je problematično korištenje čiste vode (pufera) za pokretnu fazu zbog prekomjernog zadržavanja spojeva što je i ovdje slučaj s azatioprinom pa je tako vrijeme zadržavanja azatioprina kod mobilne faze MeOH : pufer = 5:95 bilo veće od 30 minuta i stoga, mjerenje kod kojeg bi se kao pokretna faza koristio čisti pufer, nije provedeno.



Slika 6. Grafički prikaz odnosa faktora kapaciteta (k) i udjela metanola u pokretnoj fazi za azatioprin (C_{18} kolona).



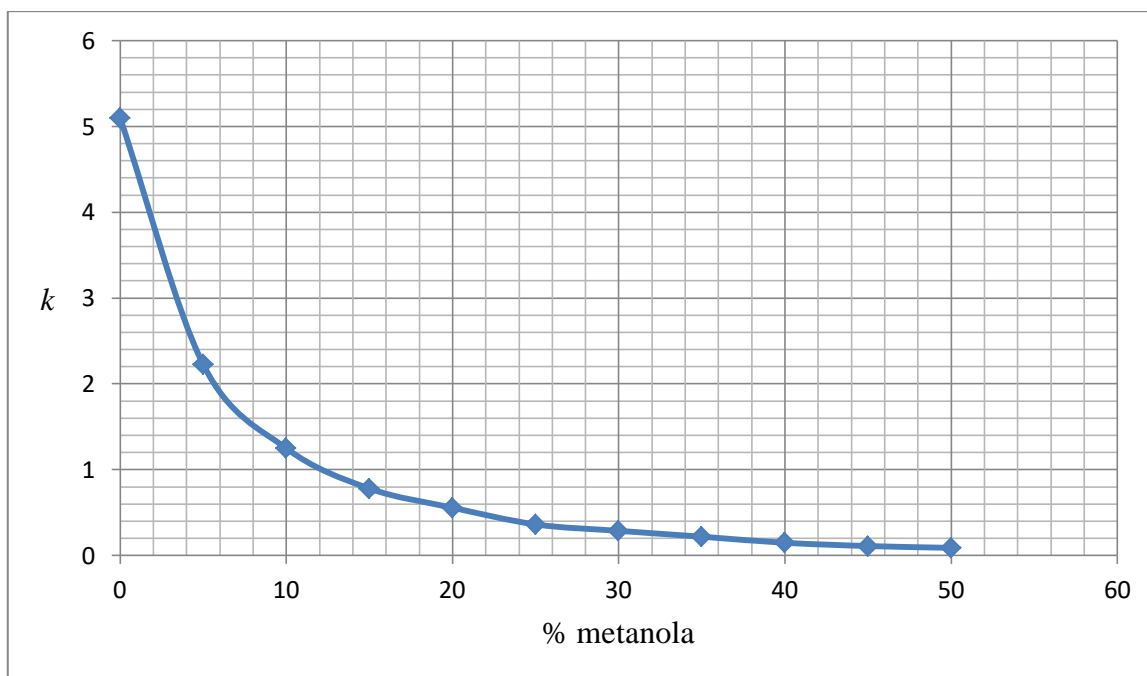
Slika 7. Grafički prikaz odnosa $\log k$ i udjela metanola u pokretnoj fazi za azatioprin (C_{18} kolona); $\log k = -0,040\varphi + 1,344$; $R^2 = 0,987$.

U nastavku slijede rezultati dobiveni kromatografijom na C_{18} koloni za tiogvanin (Tablica 4., Slike 8. i 9.).

Tablica 4. Prikaz rezultata dobivenih kromatografijom na C_{18} koloni za tiogvanin; izračunate k i $\log k$ vrijednosti.

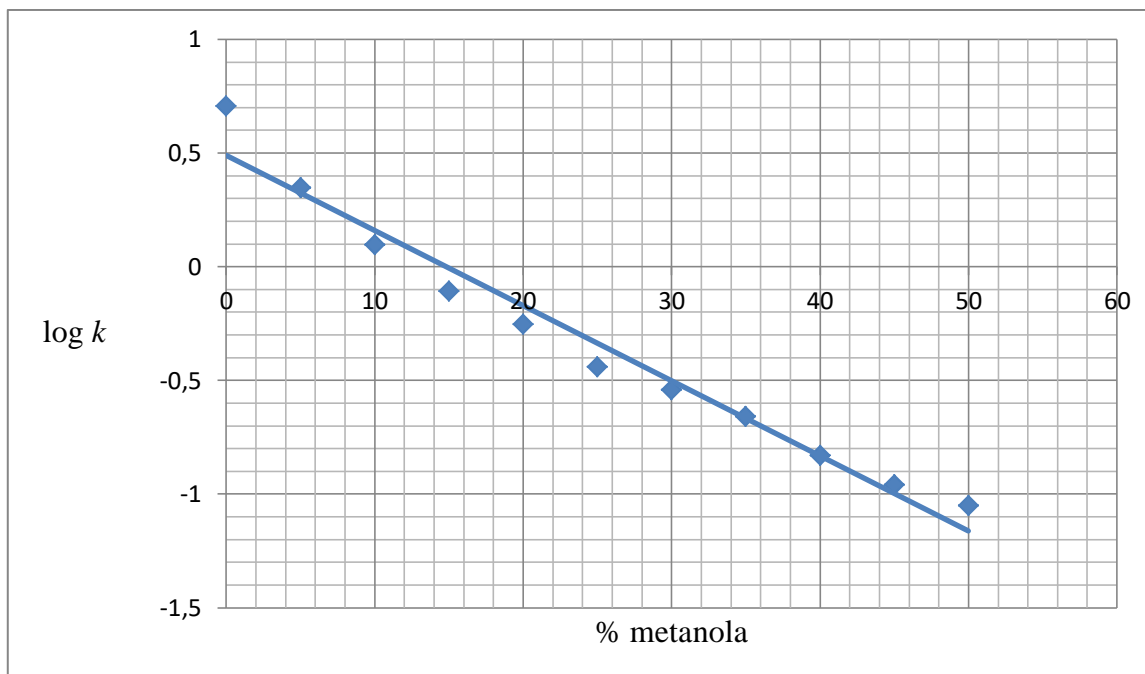
| % MeOH | t_0 / min | $t_R(\text{tiogvanin})/\text{min}$ | k | $\log k$ |
|--------|-------------|------------------------------------|------|----------|
| 50 | 1,35 | 1,47 | 0,09 | -1,05 |
| 45 | 1,36 | 1,51 | 0,11 | -0,96 |
| 40 | 1,35 | 1,55 | 0,15 | -0,83 |
| 35 | 1,37 | 1,67 | 0,22 | -0,66 |
| 30 | 1,36 | 1,75 | 0,29 | -0,54 |
| 25 | 1,38 | 1,88 | 0,36 | -0,44 |
| 20 | 1,40 | 2,18 | 0,56 | -0,25 |
| 15 | 1,41 | 2,51 | 0,78 | -0,11 |
| 10 | 1,41 | 3,17 | 1,25 | 0,10 |
| 5 | 1,43 | 4,61 | 2,22 | 0,35 |
| 0 | 1,45 | 8,84 | 5,10 | 0,71 |

Kod većih udjela metanola u pokretnoj fazi nema velike razlike između vremena zadržavanja tiogvanina i nezadržanog spoja. Međutim, smanjenjem udjela metanola ispod 20% i manje, dolazi do značajnijeg porasta vremena zadržavanja tiogvanina u odnosu na mrtvo vrijeme. Kao i kod azatioprina, faktor zadržavanja tiogvanina eksponencijalno se povećao smanjenjem udjela metanola u pokretnoj fazi (Slika 8.).



Slika 8. Grafički prikaz odnosa faktora kapaciteta (k) i udjela metanola u pokretnoj fazi za tiogvanin (C_{18} kolona).

Logaritam faktora zadržavanja ($\log k$) linearno se povećao smanjenjem udjela metanola u pokretnoj fazi (Slika 9.). Dobivena je krivulja koja slijedi linearnu jednadžbu $\log k = -0,033\phi + 0,491$ gdje je ϕ udio metanola u pokretnoj fazi, a linearna koleracija iznosi $R^2 = 0,969$. Iz jednadžbe se ekstrapolira $\log k_w$ koji iznosi 0,491 što ukazuje na blagu lipofilnost spoja.

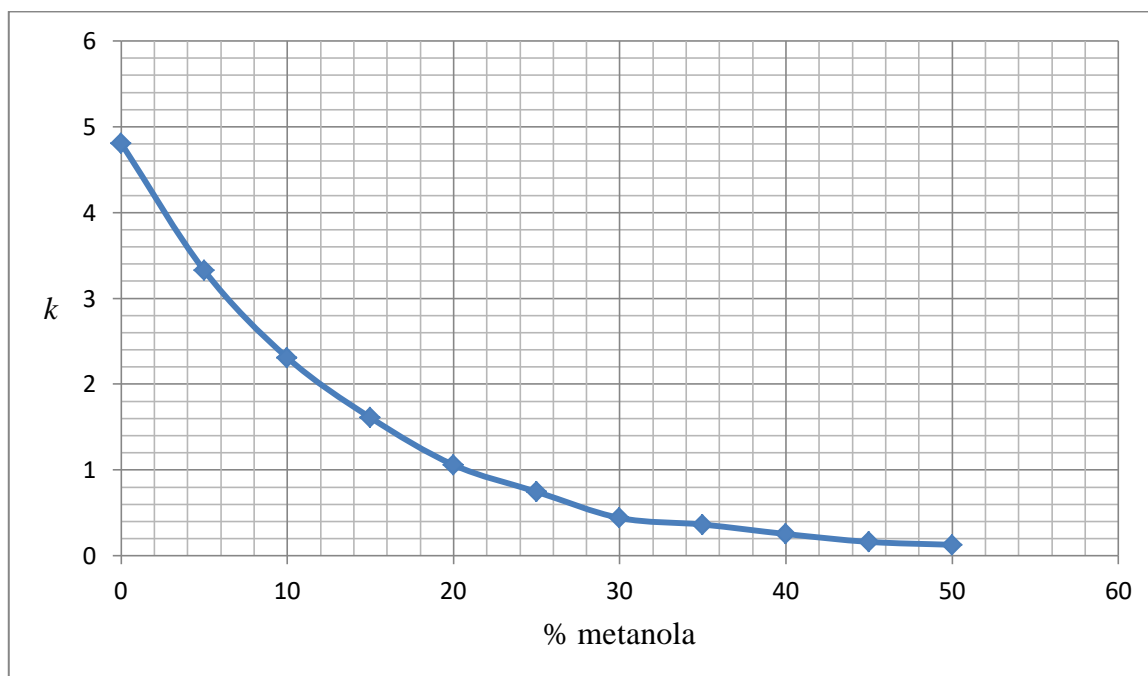


Slika 9. Grafički prikaz odnosa $\log k$ i udjela metanola u pokretnoj fazi za tiogvanin (C_{18} kolona); $\log k = -0,033\phi + 0,491$; $R^2 = 0,969$.

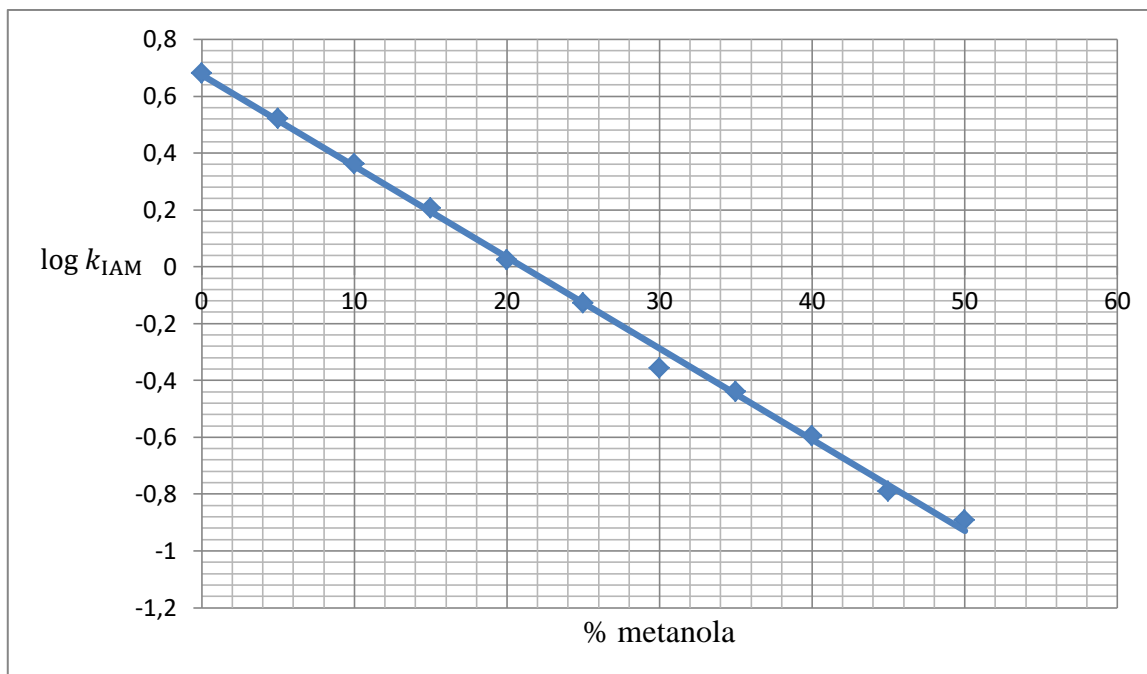
Rezultati za azatioprin dobiveni kromatografijom na IAM koloni slijede u nastavku (Tablica 5., Slike 10. i 11.). Kod većih udjela metanola u pokretnoj fazi, vrijeme zadržavanja azatioprina neznatno je duže od nezadržanog spoja. Međutim, smanjenjem udjela metanola u pokretnoj fazi na 25% i manje, dolazi do povećanja vremena zadržavanja azatioprina na IAM koloni. Smanjenjem udjela metanola dolazi i do ekponencijalnog porasta faktora zadržavanja (k) (Slika 10.). Odnos logaritma faktora zadržavanja azatioprina na IAM koloni i udjela metanola kao organskog otapala u pokretnoj fazi opisuje linearna jednadžba $\log k_{IAM} = -0,032\phi + 0,676$, a linearna korelacija iznosi $R^2 = 0,998$ (Slika 11.). Iz dobivene jednadžbe ekstrapolira se $\log k_{wIAM}$ koji iznosi 0,676. Azatioprin se kod niskih udjela metanola u pokretnoj fazi zadržava na IAM koloni. Uzimajući u obzir svojstvo IAM kolone da oponaša interakcije s biološkim membranama, zadržavanje spoja upućuje na činjenicu da on stupa u interakciju s fosfolipidima, a time i na permeaciju azatioprina kroz stanične membrane.

Tablica 5. Prikaz rezultata dobivenih kromatografijom na IAM koloni za azatioprin; izračunate k i $\log k_{IAM}$ vrijednosti.

| % MeOH | t_0 / min | t_R (azatioprin)/min | k | $\log k_{IAM}$ |
|--------|-------------|------------------------|------|----------------|
| 50 | 1,17 | 1,32 | 0,13 | -0,89 |
| 45 | 1,17 | 1,36 | 0,16 | -0,79 |
| 40 | 1,18 | 1,48 | 0,25 | -0,60 |
| 35 | 1,18 | 1,61 | 0,36 | -0,44 |
| 30 | 1,18 | 1,70 | 0,44 | -0,36 |
| 25 | 1,18 | 2,06 | 0,75 | -0,13 |
| 20 | 1,18 | 2,43 | 1,06 | 0,03 |
| 15 | 1,18 | 3,08 | 1,61 | 0,21 |
| 10 | 1,20 | 3,97 | 2,31 | 0,36 |
| 5 | 1,20 | 5,19 | 3,33 | 0,52 |
| 0 | 1,20 | 6,97 | 4,81 | 0,68 |



Slika 10. Grafički prikaz odnosa faktora kapaciteta (k) i udjela metanola u pokretnoj fazi za azatioprin (IAM kolona).

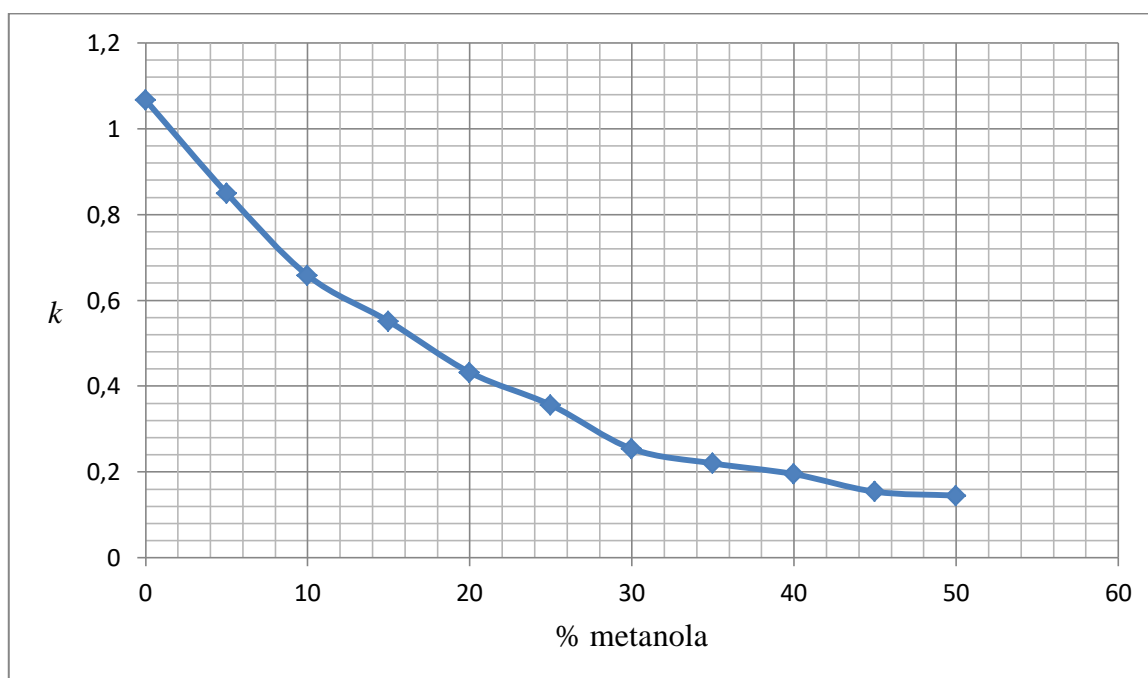


Slika 11. Grafički prikaz odnosa $\log k_{IAM}$ i udjela metanola u pokretnoj fazi za azatioprin (IAM kolona); $\log k_{IAM} = -0,0321\varphi + 0,6757$; $R^2 = 0,9975$.

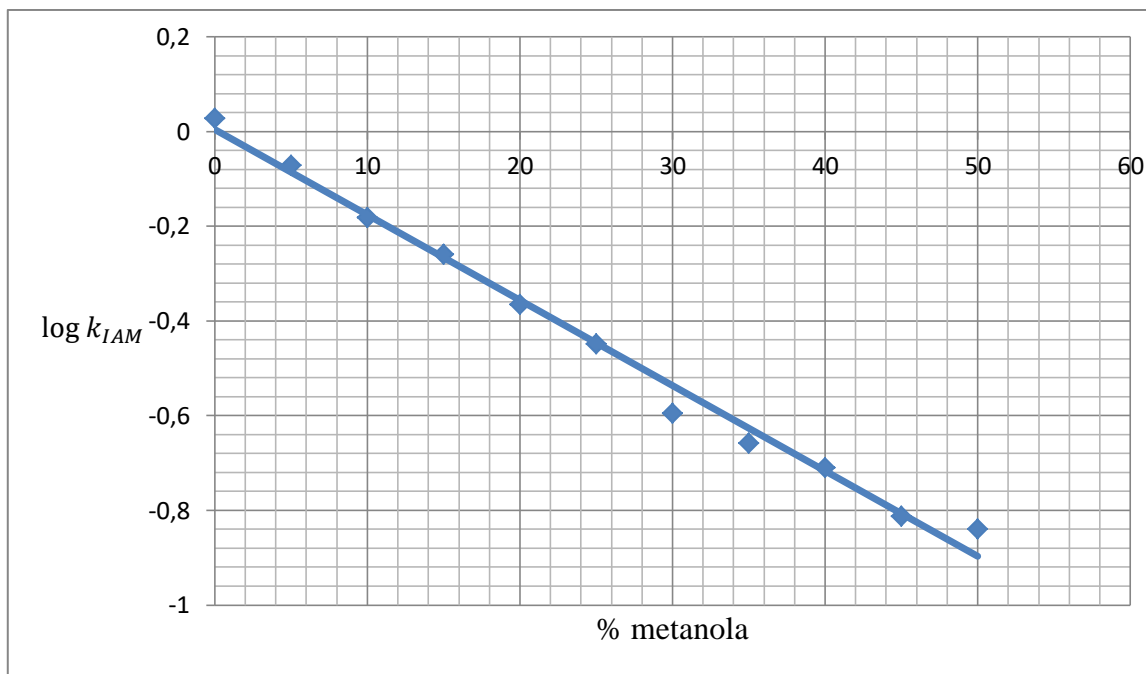
U nastavku su prikazani rezultati za tiogvanin dobiveni kromatografijom na IAM koloni (Tablica 6., Slike 12. i 13). Vremena zadržavanja tiogvanina i nezadržanog spoja neznatno se razlikuju pri većim udjelima metanola u pokretnoj fazi. Smanjenjem udjela metanola na 5% i primjenom čistog pufera kao pokretne faze dolazi do blagog povećanja vremena zadržavanja tiogvanina na IAM koloni. Faktor zadržavanja tiogvanina (k) eksponencijalno raste smanjenjem udjela metanola u pokretnoj fazi, a njegov logaritam ($\log k_{IAM}$) linearno ovisi o udjelu metanola u mobilnoj fazi što opisuje jednačina $\log k_{IAM} = -0,018\varphi + 0,004$, dok linearna korelacija iznosi $R^2 = 0,990$. Kad je udio metanola 0% iz jednačine se dobiva da $\log k_{wIAM}$ iznosi 0,004. Dobivena vrijednost ukazuje na vrlo slabu interakciju tiogvanina i fosfolipida.

Tablica 6. Prikaz rezultata dobivenih kromatografijom na IAM koloni za tiogvanin; izračunate k i $\log k_{IAM}$ vrijednosti.

| % MeOH | t_0 / min | t_R (tiogvanin)/min | k | $\log k_{IAM}$ |
|--------|-------------|-----------------------|------|----------------|
| 50 | 1,17 | 1,34 | 0,15 | -0,84 |
| 45 | 1,17 | 1,36 | 0,15 | -0,81 |
| 40 | 1,18 | 1,41 | 0,20 | -0,71 |
| 35 | 1,18 | 1,44 | 0,22 | -0,66 |
| 30 | 1,18 | 1,48 | 0,25 | -0,60 |
| 25 | 1,18 | 1,60 | 0,36 | -0,45 |
| 20 | 1,18 | 1,69 | 0,43 | -0,37 |
| 15 | 1,18 | 1,83 | 0,55 | -0,26 |
| 10 | 1,20 | 1,99 | 0,66 | -0,18 |
| 5 | 1,20 | 2,22 | 0,85 | -0,07 |
| 0 | 1,20 | 2,48 | 1,07 | 0,03 |

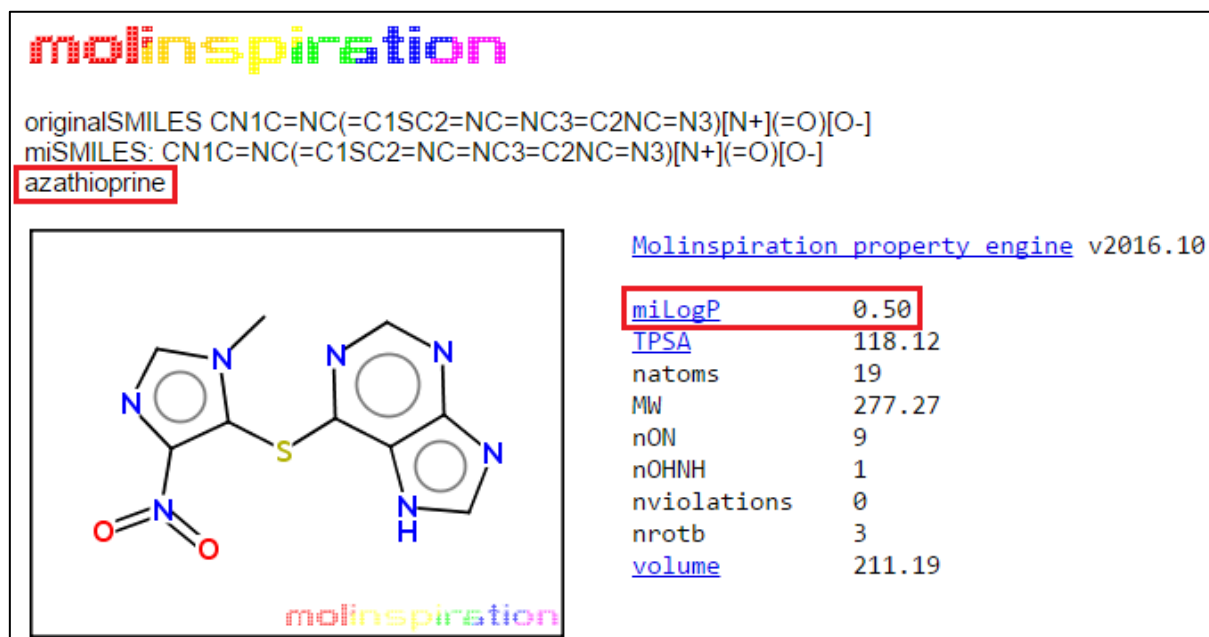


Slika 12. Grafički prikaz odnosa faktora kapaciteta (k) i udjela metanola u pokretnoj fazi za tiogvanin (IAM kolona).



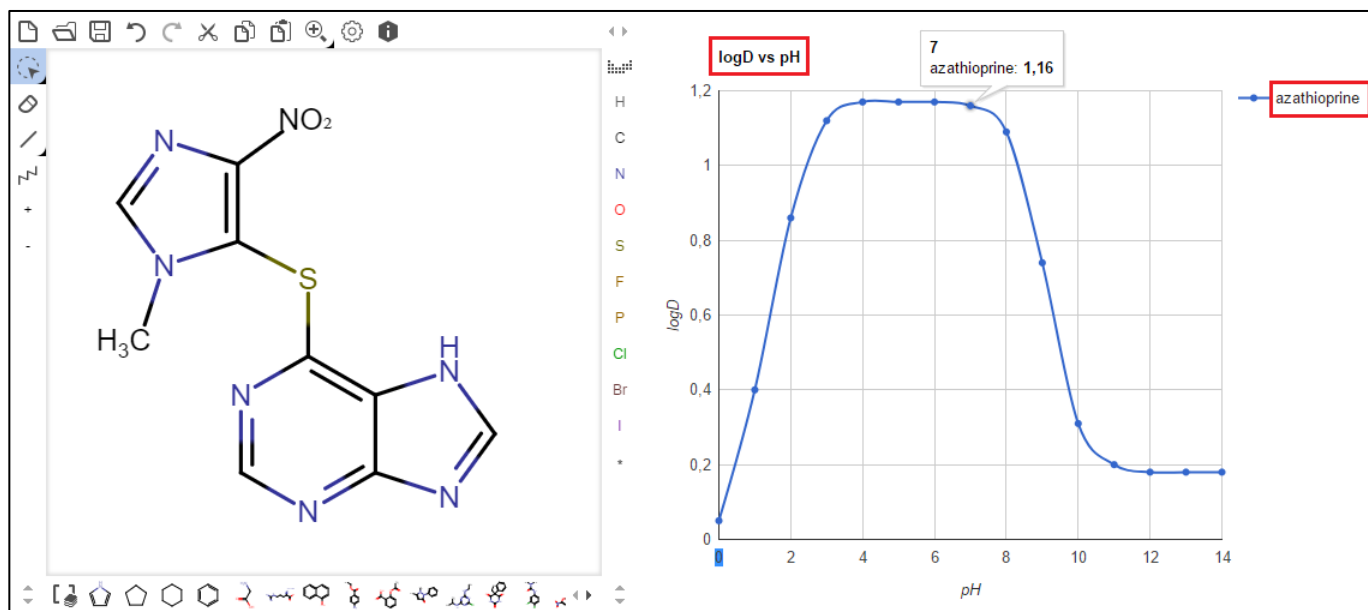
Slika 13. Grafički prikaz odnosa $\log k_{IAM}$ i udjela metanola u pokretnoj fazi za tiogvanin (IAM kolona); $\log k_{IAM} = -0,018\phi + 0,004$; $R^2 = 0,990$.

Primjenom računalnih programa Molinspiration i ChemAxon izračunata je $\log P$ vrijednost, odnosno $\log D$ vrijednost za azatioprin (Slike 14. i 15.) i tiogvanin (Slike 16. i 17.).



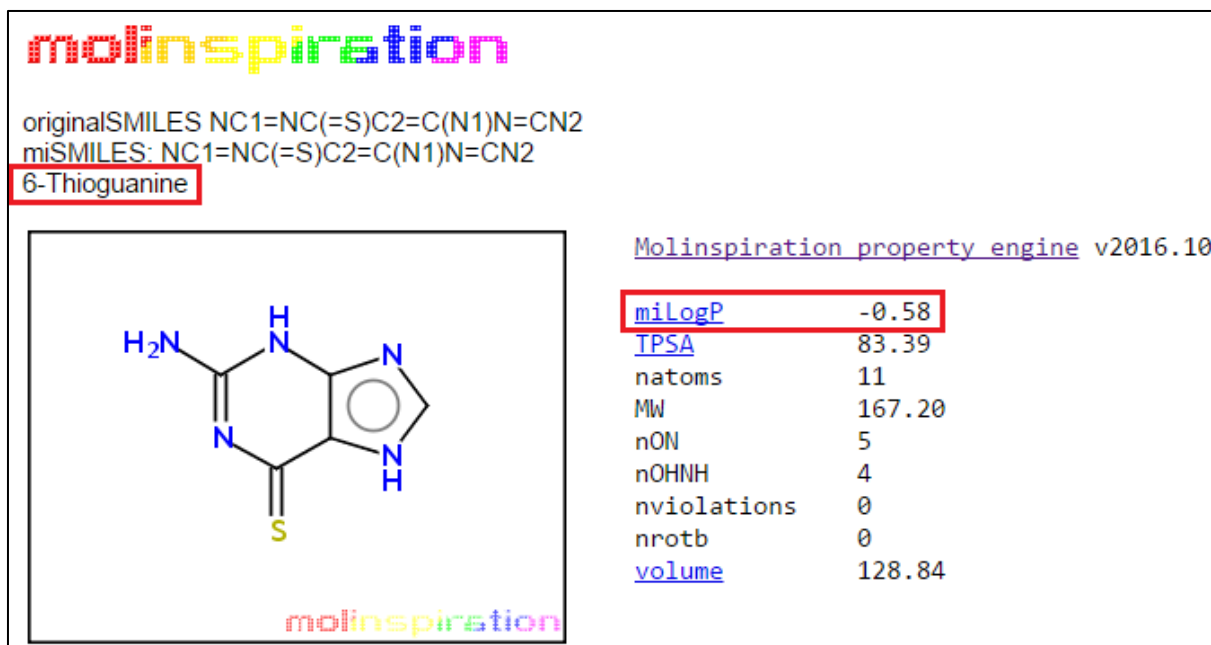
Slika 14. $\log P$ vrijednost azatioprina izračunata Molinspiration računalnim programom (<http://www.molinspiration.com>).

Utvrđeno je da je azatioprin lipofilan jer su $\log P$ vrijednosti dobivene u oba programa bile pozitivne. U programu Molinspiration dobiveni $\text{milog } P$ iznosi 0,5 (Slika 14.). Primjenom ChemAxon programa omogućen je uvid i u lipofilni pH profil azatioprina te je pri svim pH vrijednostima dobivena $\log D$ vrijednost bila pozitivna (Slika 15.).

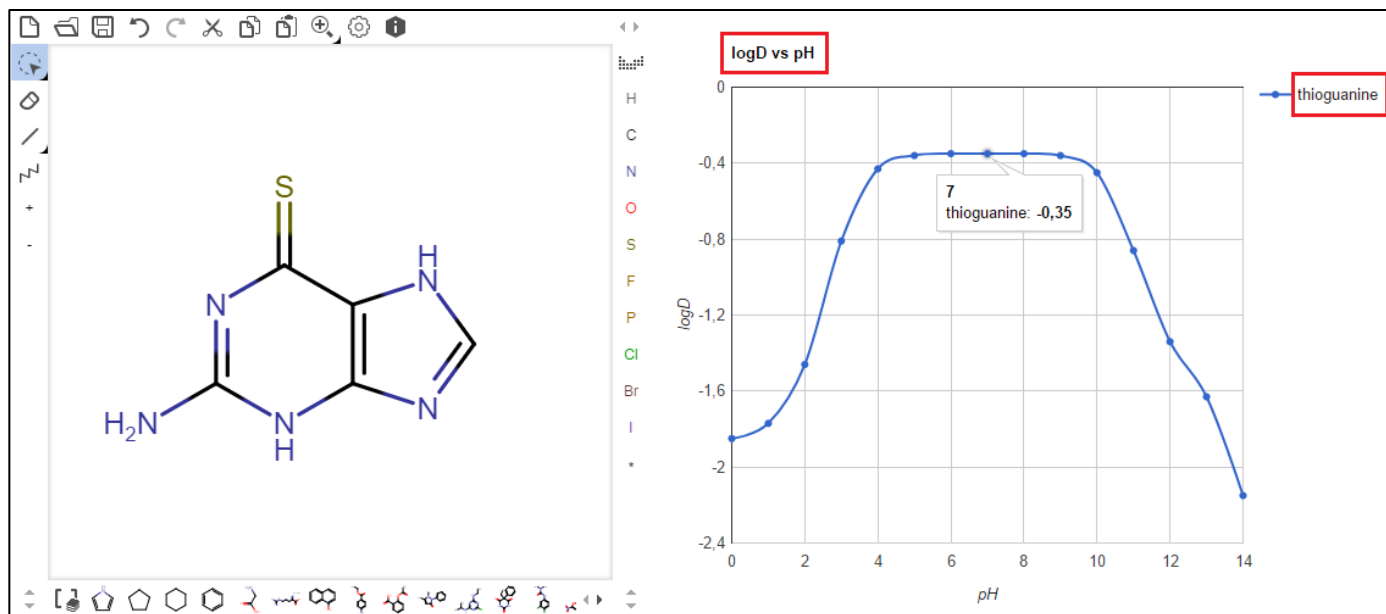


Slika 15. Grafički prikaz ovisnosti $\log D$ o pH za azatioprin dobiven ChemAxon računalnim programom (<https://disco.chemaxon.com>).

Za razliku od azatioprina, dobivene $\log P$ vrijednosti za tiogvanin u oba su programa bile negativne, odnosno u Molinspiration programu dobivena $\text{milog } P$ vrijednost iznosi -0,58 (Slika 16.), dok je $\log D$ vrijednost dobivena u ChemAxon programu pri svim pH vrijednostima negativna (Slika 17.).



Slika 16. log *P* vrijednost tiogvanina izračunata Molinspiration računanim programom (<http://www.molinspiration.com>).



Slika 17. Grafički prikaz ovisnosti log *D* o pH za tiogvanin dobiven ChemAxon računanim programom (<https://disco.chemaxon.com>).

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza za ispitavanje lipofilnosti lijekova na primjeru imunosupresivnog lijeka azatioprina i antineoplastičnog lijeka tiogvanina.

Korištena je C₁₈ kolona i IAM kolona s vezanim fosfolipidnim membranama kako bi se stvorili uvjeti slični biološkim te predvidjela bolja permeabilnost lijekova.

Azatioprin je imao pozitivnu vrijednost deskriptora lipofilnosti na C₁₈ koloni ($\log k_w = 1,344$) i pokazao je veliki odmak od mrtvog vremena pri nižim udjelima metanola u pokretnoj fazi što upućuje da se bolje zadržava na hidrofobnoj nepokretnoj fazi C₁₈ kolone te se prema tome azatioprin može smatrati lipofilnim lijekom. Umjetne membrane ne predviđaju samo lipofilnost lijekova, nego upućuju i na stupanj interakcije s fosfolipidima, a vrijednost kromatografskog parametra koji opisuje interakciju analita s umjetnim membranama također je kod azatioprina bila pozitivna ($\log k_{wIAM} = 0,676$) iz čega proizlazi da je azatioprin lipofilan lijek koji stupa u interakcije s fosfolipidima, odnosno upućuje da prolazi kroz stanične membrane. Sve te činjenice idu u prilog peroralnoj primjeni azatioprina u obliku tableta.

Tiogvanin je imao pozitivnu vrijednost deskriptora lipofilnosti na C₁₈ koloni ($\log k_w = 0,491$), ali manju od azatioprina. Pokazao je i odmak od mrtvog vremena pri nižim udjelima metanola u pokretnoj fazi što upućuje da se bolje zadržava na hidrofobnoj nepokretnoj fazi C₁₈ kolone te se prema tome tiogvanin može smatrati lipofilnim lijekom. Njegova vrijednost kromatografskog parametra koji opisuje interakciju analita s umjetnim membranama bila je vrlo niska, ali pozitivna ($\log k_{wIAM} = 0,004$) iz čega proizlazi da ipak neka minimalna interakcija s fosfolipidima postoji. Međutim, za tiogvanin postoji razlika između eksperimentalnih podataka za lipofilnost dobivenih HPLC-om i podataka dobivenih računalnim programima. Vrijednosti za $\log P$ i $\log D$ dobivene računalnim programima bile su negativne, dok su dobivene eksperimentalne vrijednosti za $\log k_w$ i $\log k_{wIAM}$ bile pozitivne.

Vrijednost $\log P$ lijeka od 0-3 smatra se optimalnom za pasivnu difuziju (Yanni SB, 2015).

Ako se uzme da je $\log k_w$ vrijednost dobivena kod HPLC-a ekvivalent $\log P$ vrijednosti, onda je $\log k_w$ vrijednost dobivena za azatioprin i tiogvanin unutar optimalnog područja za pasivnu difuziju. Iako ga na tržištu Republike Hrvatske još uvijek nema, tiogvanin se primjenjuje peroralno i u nekim državama već postoji u obliku tableta.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti danas zauzima važno mjesto u ispitivanju lipofilnosti lijekova jer je jednostavnija i brža od tradicionalne metode izmućkavanja.

IAM kolone u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti novije su u istraživanjima i nisu još sasvim dovoljno istražene u farmakokinetičkim ispitivanjima, niti ne predviđaju apsorpciju lijekova koji prelaze staničnu membranu paracelularnim putem i aktivnim transportom pa prostora za napredak u ovom području još uvijek ima.

Da bi se dobio bolji uvid u farmakokinetička svojstva lijekova primjenom ovih metoda, potrebno je provesti istraživanja na većem broju lijekova.

6. LITERATURA

1. Biagi GL, Barbaro AM, Guerra MC, Gamba MF. Partition data of penicillins determined by means of reversed-phase thin-layer chromatography. *J Chromatogr*, 1969, 41, 371–379.
2. Biagi GL, Gandolfi O, Guerra MC, Barbaro AM, Cantelli-Forti G. Rm values of phenols. Their relationship with log P values and activity. *J Med Chem*, 1975, 18, 868–873.
3. Biagi GL, Guerra MC, Barbaro AM. Relationship between lipophilic character and hemolytic activity of testosterone esters. *J Med Chem*, 1970, 13, 944–948.
4. ChemAxon, 2017., LogD Predictor za azatioprin, <https://disco.chemaxon.com/apps/demos/logd/>, pristupljeno 6.6.2017.
5. ChemAxon, 2017., LogD Predictor za tiogvanin, <https://disco.chemaxon.com/apps/demos/logd/>, pristupljeno 6.6.2017.
6. Derijks LJJ, Gilissen LPL, Hooymans PM, Hommes DW. Thiopurines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharm Ther*, 2006, 24, 715-729.
7. DrugBank, 2017., Azathioprine, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00993>, pristupljeno 5.6.2017.
8. DrugBank, 2017., Tioguanine, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00352>, pristupljeno 5.6.2017.
9. Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. Current State of the Art in HPLC Methodology for Lipophilicity Assessment of Basic Drugs. A Review. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2008, 31, 79–96.
10. HALMED - Sažetak opisa svojstava lijeka Atsimutin (azathiopinum), 2017., <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Atsimutin-25-mg-filmom-oblozene-tablete/12046/>, pristupljeno 25.5.2017.
11. HALMED - Sažetak opisa svojstava lijeka Imuran (azathiopinum), 2017., <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Imuran-50-mg-tablete/12462/>, pristupljeno 25.5.2017.
12. Kaliszan R. Chromatography and capillary electrophoresis in modelling the basic processes of drug action. *Trends Anal Chem*, 1999, 18, 400-410.
13. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic & Clinical Pharmacology. San Francisco, The McGraw-Hill Companies, 2012, str. 643, 644, 959, 961, 988, 1103, 1104.

14. Luterotti S. Postupci odjeljivanja: Temelji kromatografskih odjeljivanja. U: Uvod u kemijsku analizu, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2011, str. 202–239.
15. Mannhold R, Dross K, Sonntag C. Estimation of Lipophilicity by Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography. U: Lipophilicity in Drug Action and Toxicology. Pliška V, Mannhold R, van de Waterbeemd H, Kubinyi H, urednici, Weinheim, VCH, 1996, str. 141–156.
16. MHRA - Summary of product characteristics Tioguanine 40 mg Tablets, 2017., <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/spcpil/documents/spcpil/con1487913435916.pdf>, pristupljeno 5.6.2017.
17. Molinspiration, 2017., Calculation of Molecular Properties za azatioprin, <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>, pristupljeno 6.6.2017.
18. Molinspiration, 2017., Calculation of Molecular Properties za tiogvanin, <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>, pristupljeno 6.6.2017.
19. Mornar A. Fizikalno-kemijski parametri bioraspoloživosti polifenola. Zagreb, 2007.
20. Morse KL, Pidgeon C. Importance of the Mobile Phase in Immobilized Artificial Membrane Chromatography. U: Pharmacokinetic Optimization in Drug Research, Testa B, van de Waterbeemd H, Folkers G, Guy R, urednici, Zürich, WILEY-VCH, 2001, str. 429–445.
21. Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova – praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 40,106-108.
22. Pharmacopeia.cn - Azathioprine, 2017., http://pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m6690.html, pristupljeno 25.5.2017.
23. Pharmacopeia.cn - Thioguanine, 2017., http://pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m82810.html, pristupljeno 25.5.2017.
24. Pliška V, Testa B, van de Waterbeemd H. Lipophilicity: The Empirical Tool and the Fundamental Objective. An Introduction. U: Pliška V, Mannhold R, van de Waterbeemd H, Kubinyi H, ur. *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*. Weinheim: VCH, 1996, str. 1–6.
25. Rajić Džolić Z. Odabrana poglavlja iz farmaceutske kemije. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2015, str. 41,42.

26. Regis Technologies, 2017., IAM Chromatography
<http://www.registech.com/chromatography/iam-chromatography>, pristupljeno
26.5.2017.
27. Rutkowska E, Pajak K, Józwiak K. Lipophilicity – methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Pol Pharm*, 2013, 70, 3-18.
28. Tute MS. Lipophilicity: A History. U: Pliška, V, Mannhold R, van de Waterbeemd H, Kubinyi H, ur. *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*. Weinheim: VCH, 1996, str. 7–26.
29. Valkó K. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. *J Chromatogr A*, 2004, 1037, 299-310.
30. Van de Waterbeemd H, Kansy M, Wagner B, Fischer H. Lipophilicity Measurement by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). U: *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*. Pliška V, Mannhold R, van de Waterbeemd H, Kubinyi H, urednici, Weinheim, VCH, 1996, str. 73–87.
31. Yamagami C. Recent Advances in Reversed-Phase-HPLC Techniques to Determine Lipophilicity. U: *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*. Testa B, van de Waterbeemd H, Folkers G, Guy R, urednici, Zürich, WILEY-VCH, 2001, str. 383–400.
32. Yanni SB. *Translational ADMET for Drug Therapy: Principles, Methods, and Pharmaceutical Applications*. New Jersey, John Wiley & Sons, 2015, str. 9-12.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

7.1. SAŽETAK

U suvremenom otkriću i razvoju lijekova istražuju se novi pristupi za racionalan dizajn lijekova u čemu veliku važnost imaju farmakokinetički parametri jer su nepovoljna farmakokinetička svojstva jedan od najčešćih razloga kliničkog neuspjeha novih kemijskih entiteta. Jedno od najvažnijih fizikalno-kemijskih svojstava koje utječe na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijeka ističe se lipofilnost jer je to svojstvo koje utječe na topljivost lijeka, transport lijeka kroz stanične membrane i krvno moždanu barijeru, odnosno apsorpciju i oralnu bioraspoloživost, distribuciju, interakciju lijeka s transportnim proteinima, aktivnost i metabolizam lijeka. Kromatografske tehnike pokazale su se kao dobar izbor za određivanje lipofilnog profila spojeva, posebno tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza. Danas postoje i kromatografske kolone s umjetnim membranama koje zbog svog sastava i interakcija s analitom omogućuju vjerniju usporedbu s rezultatima provedenima u *in vivo* uvjetima. U ovom radu provedena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza za ispitavanje lipofilnosti lijekova na primjeru imunosupresivnog lijeka azatioprina i antineoplastičnog lijeka tiogvanina. Korištena je C₁₈ kolona i IAM kolona s vezanim fosfolipidnim membranama kako bi se stvorili uvjeti slični biološkim te predvidjela bolja permeabilnost lijekova. Dobiveni rezultati upućuju da su oba lijeka lipofilna, iako tiogvanin manje od azatioprina, a i stupaju u interakciju s fosfolipidima što je i razlog zbog kojeg se oba primjenjuju peroralno u obliku tableta.

7.2. SUMMARY

New approaches to rational drug design are being explored in the contemporary discovery and development of medicines, with pharmacokinetic parameters being of great importance because unfavorable pharmacokinetic properties are one of the most common causes of clinical failure of new chemical entities. One of the most important physico-chemical properties that affects the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the drug is lipophilicity because it is a property that affects drug solubility, drug delivery through cell membranes and blood brain barrier, absorption and oral bioavailability, distribution, drug interaction with transport proteins, activity and drug metabolism. Chromatographic techniques have proven to be a good choice for determining the lipophilic profile of the compounds, especially high performance reverse phase chromatography. Today, there are also chromatographic columns with artificial membranes which, due to their composition and analytical interactions, allow for a more accurate comparison with results performed in *in vivo* conditions. In this paper high performance reverse phase chromatography was performed for drug lipophilicity testing in the case of an immunosuppressive drug azathioprine and an antineoplastic drug thioguanine. C₁₈ columns and IAM columns with bound phospholipid membranes were used to create conditions similar to biological and predicted better drug permeability. The results show that both drugs are lipophilic, although thioguanine is less lipophilic than azathioprine, and both drugs interact with phospholipids, which is the reason why both are administered perorally in the form of tablets.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PRIMJENA KROMATOGRFSKIH TEHNIKA ZA PREDVIĐANJE APSORPCIJE AZATIOPRINA I TIOGVANINA

Marija Antolković

SAŽETAK

U suvremenom otkriću i razvoju lijekova istražuju se novi pristupi za racionalan dizajn lijekova u čemu veliku važnost imaju farmakokinetički parametri jer su nepovoljna farmakokinetička svojstva jedan od najčešćih razloga kliničkog neuspjeha novih kemijskih entiteta. Jedno od najvažnijih fizikalno-kemijskih svojstava koje utječe na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijeka ističe se lipofilnost jer je to svojstvo koje utječe na topljivost lijeka, transport lijeka kroz stanične membrane i krvno moždanu barijeru, odnosno apsorpciju i oralnu bioraspodjeljivost, distribuciju, interakciju lijeka s transportnim proteinima, aktivnost i metabolizam lijeka. Kromatografske tehnike pokazale su se kao dobar izbor za određivanje lipofilnog profila spojeva, posebno tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza. Danas postoje i kromatografske kolone s umjetnim membranama koje zbog svog sastava i interakcija s analitom omogućuju vjerniju usporedbu s rezultatima provedenima u *in vivo* uvjetima. U ovom radu provedena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza za ispitavanje lipofilnosti lijekova na primjeru imunosupresivnog lijeka azatioprina i antineoplastičnog lijeka tiogvanina. Korištena je C₁₈ kolona i IAM kolona s vezanim fosfolipidnim membranama kako bi se stvorili uvjeti slični biološkim te predvidjela bolja permeabilnost lijekova. Dobiveni rezultati upućuju da su oba lijeka lipofilna, iako tiogvanin manje od azatioprina, a i stupaju u interakciju s fosfolipidima što je i razlog zbog kojeg se oba primjenjuju peroralno u obliku tableta.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 39 stranica, 17 grafičkih prikaza, 6 tablica i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: azatioprin, tiogvanin, HPLC, C₁₈ kolona, IAM kolona, lipofilnost, farmakokinetika

Mentor: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Biljana Nigović, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Karmela Barišić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

APPLICATION OF CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES FOR PREDICTION OF ABSORPTION OF AZATHIOPRINE AND THIOGUANINE

Marija Antolković

SUMMARY

New approaches to rational drug design are being explored in the contemporary discovery and development of medicines, with pharmacokinetic parameters being of great importance because unfavorable pharmacokinetic properties are one of the most common causes of clinical failure of new chemical entities. One of the most important physico-chemical properties that affects the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the drug is lipophilicity because it is a property that affects drug solubility, drug delivery through cell membranes and blood brain barrier, absorption and oral bioavailability, distribution, drug interaction with transport proteins, activity and drug metabolism. Chromatographic techniques have proven to be a good choice for determining the lipophilic profile of the compounds, especially high performance reverse phase chromatography. Today, there are also chromatographic columns with artificial membranes which, due to their composition and analytical interactions, allow for a more accurate comparison with results performed in *in vivo* conditions. In this paper high performance reverse phase chromatography was performed for drug lipophilicity testing in the case of an immunosuppressive drug azathioprine and an antineoplastic drug thioguanine. C_{18} columns and IAM columns with bound phospholipid membranes were used to create conditions similar to biological and predicted better drug permeability. The results show that both drugs are lipophilic, although thioguanine is less lipophilic than azathioprine, and both drugs interact with phospholipids, which is the reason why both are administered perorally in the form of tablets.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 39 pages, 17 figures, 6 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: azathioprine, thioguanine, HPLC, C_{18} column, IAM column, lipophilicity, pharmacokinetics

Mentor: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Nigović, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Karmela Barišić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2017.