

Nye metoder til studier af lægemiddelfordeling

En ny elektrokemisk metode har vist sig at være velegnet til fysisk-kemisk karakterisering og detektion af lægemiddelstoffer

Af Henrik Jensen, Anne E. Thomsen og Jesper Østergaard, Institut for Analytisk Kemi, DFU

Ved udvikling af nye lægemidler er det vigtigt at have et godt kendskab til, hvordan lægemiddelkandidaterne absorberes af organismen, hvordan de fordeler sig, nedbrydes, og udskilles fra kroppen.

Når et nyt potentielt lægemiddelstof syntetiseres, er det første trin på vejen til et færdigt lægemiddel derfor at bestemme en række fysisk-kemiske parametre, som har betydning for lægemidlets skæbne i kroppen.

Det er langt fra givet, at et lægemiddelstof havner på apotekerens hylde, selvom det er velegnet til at behandle en sygdomstilstand et sted i organismen. Ofte viser det sig nemlig, at være svært at få stoffet transporteret hen til virkningsstedet.

En af de fysisk-kemiske parametre, der har stor betydning for transporten af lægemiddelstoffer i kroppen, er fordelingskoefficienten for stoffet mellem olie og vand. Koefficienten bestemmes som forholdet mellem stoffets ligevægtskoncentration i olie og vand og er et mål for, hvor lipofilt eller hydrofilt lægemiddelstoffet er. Lipofile molekyler befinder sig godt i fedtholdige miljøer og skyr vand, mens det forholder sig lige omvendt med hydrofile molekyler.

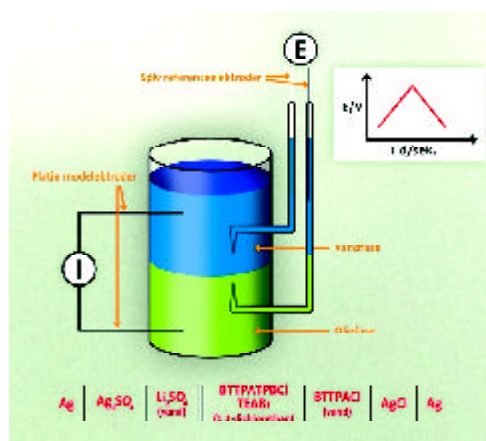
Ud fra fordelingskoefficienten kan man få en ide om, hvor godt et stof optages via mavesækken og tarmene, gennem huden, over cellemembraner eller fra blodbanen ind i hjernen. En simpel, men ret tidskrævende metode til bestemmelse af fordelingskoefficienten, er udrystning af lægemiddelkandidaten i et tofase-system, som består af en vandfase og en olie (som oftest oktanol). I nogle tilfælde er det også et problem, at metoden kræver en relativt stor mængde lægemiddelstof, der kan være dyrt at fremstille. Endelig har metoden begrænsninger, hvis lægemiddelstoffet er stærkt lipofilt eller hydrofilt, da det kan være vanskeligt at kvantificere små stofmængder i den ene fase.

Elektrokemiske studier

I forskningsgruppen for Farmaceutisk Fysisk Kemi ved Institut for Analytisk Kemi arbejder vi på at udvikle nye, hurtige og effektive teknikker til at forudsige distribution af lægemiddelstoffer i kroppen. En af metoderne er baseret på elektrokemiske studier af fordelingen af lægemiddelstoffer mellem to væsker, der ikke er blandbare [1-3].

Til studierne bruges en elektrokemisk celle, som øverst indeholder en vandig opløsning og nederst en olie (figur 1). Vha. en referenceelektrode i vandfasen og en anden i olien skabes der en regulerbar spændingsforskel mellem de to faser, som får ladede lægemiddelstoffer til at bevæge sig mellem dem.

Strømmen, svarende til passage af ladede forbindelser mellem de to faser, måles med to platinelektroder. Alle elektroderne er forbundet til en computerstyret potentiostat (Autolab



Figur 1. En elektrokemisk celle til cyklisk voltammetri. Elektroderne er forbundet til en computerstyret potentiostat, der kontrollerer spændingsforskellen mellem referenceelektroderne, E, og som måler den elektriske strøm gennem modelektroderne, I. Potentialet varieres lineært over tid, hvilket er vist i den indsatte graf. Nederst ses et cellediagram, der angiver indholdet af de forskellige faser og referenceelektroderne beskaffenhed. Støtteelektrolytten i oliefasen er det lipofile salt bis(triphenyl)phosphoranylidenammonium-tetrakis(4-chlorphenyl)borat (BTTPATPBCl).

PGSTAT30), der sikrer potential kontrol og måler strømmen. I modsætning til de fleste andre elektrokemiske teknikker svarer den målte strøm til en ionoverførsel, frem for en elektronoverførselsreaktion (f.eks. en redoxreaktion ved en metalelektrode).

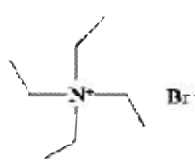
Potentialforskellen mellem de to faser, $\Delta\phi$, er differencen mellem potentialet i vandfasen, ϕ^w , og potentialet i oliefasen, ϕ^o :

$$\Delta\phi = \phi^w - \phi^o \quad (1)$$

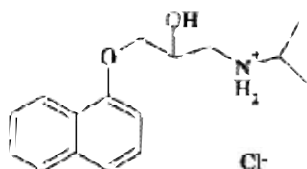
Positivt ladede lipofile ioner overføres fra vand til olie ved lave potentialforskelle, mens positivt ladede hydrofile ioner overføres ved høje potentialforskelle. For negative ioner forholder det sig omvendt. Ved analysen bestemmes strømmen af ioner mellem olien og vandfasen. Signalets beliggenhed afhænger af ionernes tendens til at fordele sig mellem vand og olie samt af deres ladning. Mere præcist kan ionernes standardoverførselspotential, $\Delta\phi_i^w$, relateres til ændringen i Gibbs fri energi ved overførsel af ionen fra vand til olie, $\Delta G_{ij}^{\text{overførsel}}$:

$$\Delta\phi_i^w = \frac{\Delta G_{ij}^{\text{overførsel}}}{z_i F} \quad (2)$$

Hvor z_i er ionens ladning og F er Faradays konstant.



TEABr



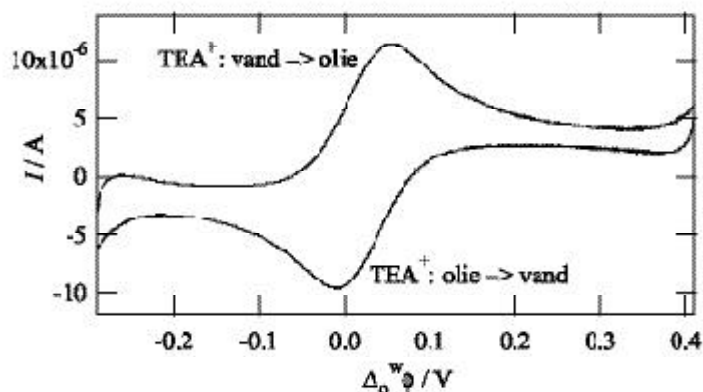
Propranolol hydrochlorid

Figur 2. Tetraethylammoniumbromid, TEABr, og Propranolol hydrochlorid.

Et modeleksperiment

Figur 3 viser resultatet af et modelexperiment med tetraethylammoniumionen (TEA, figur 2). I forsøget blev spændingsforskellen mellem vand- og oliefasen varieret lineært, samtidig med at strømmen af ladede stoffer mellem de to faser blev målt. Resultatet er et cyklisk voltammogram, fordi spændingsforskellen først blev øget og derpå sænket, inden målingen blev afsluttet ved udgangspotentialet. Den lineære variation af potentialet er illustreret i den indsatte graf i figur 1.

Ved lave spændingsforskelle (venstre side af voltammogrammet) er potentialvinduet begrænset af overførslen af sulphationer fra støtteelektrolytten i den vandige opløsning til olien. I midten af vinduet ses signalet fra TEA, der overføres fra vand til olie ved 20 mV, som er et gennemsnit af de to toppotentiale. Overførselpotentialet for TEA er altså 20 mV. Ved højere spændingsforskelle overføres TEA-ionen spontant fra vand til olie.



Figur 3. Et cyklisk voltammogram der viser overførslen af TEA (50mM) mellem vand og olie. Potentialforskellen mellem vand og olie er givet ved $\Delta\phi$. Den vandige støtteelektrolyt var 10 mM Li_2SO_4 , og støtteelektrolytten i olien var 5mM BTTPATPBCl.

Ved spændingsforskelle på over 400 mV overføres lithiumioner fra støtteelektrolytten fra vand til olie, hvilket begrænser mulighederne for at anvende teknikken i dette område.

På vejen tilbage til udgangspotentialet ses først overførslen af lithiumionen fra olie til vand, dernæst overførslen af tetraethylammoniumionen fra olie til vand og endelig signalet fra sulphationen, der føres tilbage til vandfasen tæt ved udgangspotentialet. Fordelingen af tetraethylammoniumionen følger Nernst-ligningen:

$$\Delta\phi = \Delta\phi^0 + \frac{RT}{z_{\text{TEA}}F} \ln \frac{a_{\text{TEA}}^{\text{olie}}}{a_{\text{TEA}}^{\text{vand}}} \quad (3)$$

Hvor $a_{\text{TEA}}^{\text{olie}}$ og $a_{\text{TEA}}^{\text{vand}}$ er aktiviteterne af TEA i hhv. vand og olie. R og T er hhv. gaskonstanten og den absolutte temperatur.

Den præcise potentialforskelle for overførslen af TEA er derfor direkte relateret til ionens fordelingskoefficient, P (givet som forholdet mellem aktiviteten af TEA i olie og vand).

For at kunne sammenligne forskellige ioners fordeling er det nødvendigt at definere en standardfordelingskoefficient: ►

Kemiske stoffer i miljøet

- Råd og vejledning om REACH
- EU's nye kemikalieforskrifter
- Kemikalieforskrifter
- Miljøfarlighed
- Krævsikkerhed for arbejdsmiljø
- Laboratorierisiko
- Ekstremt toksiske
- Mikrobiologiske

1000 sider på CD-ROM, 200 sider på DVD-ROM
 med 1000 sider tekst og 1000 billeder
 (inkluderer 1000 sider tekst og 1000 billeder)
 www.dhi.dk

Mange daglige afspaltninger kan være belastende, derfor "udnyt" din arbejdsplads til **EROSIONEN** som muligt

Erstatning af Fugler
Målt ved 8 eksperimenter

Erstatning af Fugler
Erstatning af Fugler

"Hvor" eksperiment
til mikrobiologiske

"Lange Arthropode"

DANDIAG
Fugler April

$$\log P^o = - \frac{zF}{RT \ln 10} \Delta \phi_{TEA}^o \quad (4)$$

For det konkrete system svarer det målte overførselspotential på 20 mV til en standardfordelingskoefficient på 0.46, hvilket betyder, at TEA er relativt hydrofil. Havde koefficienten været større end 1, ville TEA være placeret i gruppen af lipofile stoffer.

Eksemplet repræsenterer en simpel ladningsoverførsel mellem to ikke blandbare væsker. Signalet påvirkes ofte af syre-base-ligevægte for lægemiddelkandidaten i vandfasen eller f.eks. kompleksbinding af lægemiddelkandidaten med molekyler i oliefasen.

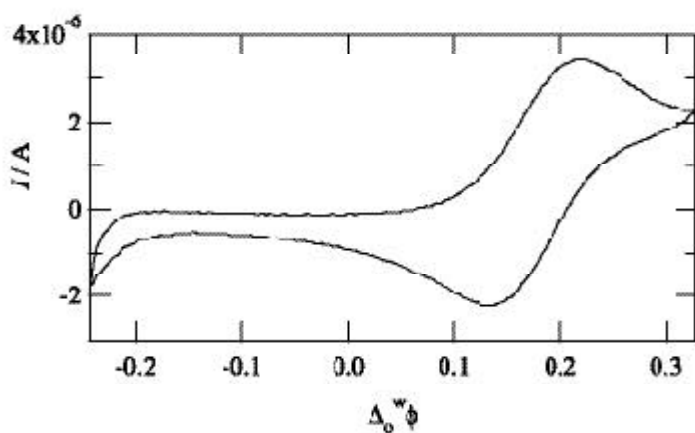
Undersøgelse af lægemiddelstoffet Propranolols fordeling

Et lidt mere kompliceret system, hvor stoffets syre-base-egenskaber influerer på signalet, er vist i figur 4. Lægemiddelstoffet Propranolol tilhører gruppen af β -blokkere, der bruges i behandlingen af kredsløbssygdomme. Propranolol (på hydrochloridformen, figur 2) er opløst i vandfasen ved pH = 7.0. Ved denne pH er lægemiddelstoffet overvejende positivt ladet i vandfasen, da det har en pK_a -værdi på 9.5. Som for TEA ses der også her et signal for overførslen af ionen fra vand til olie.

Når vandfasen har en pH, der er væsentlig lavere end Propranolols pK_a -værdi, kan det elektrokemiske signal beskrives på samme måde som for TEA. Er pH-værdien for vandfasen derimod meget højere end pK_a -værdien, er Propranolol på neutral form, og der kan ikke observeres et elektrokemisk signal. Ligner vandfasens pH-værdi tæt på pK_a -værdien afhænger signalet af hydrogenionkoncentrationen.

Ud fra en serie eksperimenter svarende til ovenstående er det derfor muligt at få information om fordelingskoefficienten for den ladede form af et lægemiddelstof og lægemiddelstoffets pK_a -værdi. Det observerede overførselspotential på 0.17 V indikerer, at den ladede form af Propranolol er mindre lipofil end TEA. Overførselspotential svarer (under standardbetingelser) til en $\log P^o$ på -2.9.

Er der en forbindelse til stede i olie- eller vandfasen, der kan vekselvirke med Propranolol, påvirker det også det elektrokemiske potential. På den måde kan teknikken også bruges til at bestemme lægemiddelstof-ligand-interaktioner.



Figur 4. Et cyklisk voltammogram der viser overførslen af den ladede form af Propranolol (100 mM) mellem vand og olie. Potentialforskellen mellem vand og olie er givet ved $\Delta \phi$. Den vandige støtteelektrolyt bestod af 2 mM NaCl og 5 mM fosfatbuffer (pH=7.0), mens støtteelektrolytten i olien var 5 mM BTTPATPBCl. I dette forsøg blev der anvendt en Ag/AgCl-referenceelektrode i vandfasen.

Videreudvikling

For visse stoffer indikerer de elektrokemiske målinger snarere, at cellen bør betragtes som et trefase-system, fordi mange kemiske forbindelser vekselvirker kraftigt med grænsefladen mellem vand og olie. Derfor er det nærliggende at betragte grænsefladen som en fase i sig selv. Netop vekselvirkningen med grænsefladen har særlig biologisk relevans, da grænsefladen mellem vand og olie kan bruges som en model for f.eks. cellemembraner.

Vekselvirkningen med grænsefladen kan studeres med en særlig elektrokemisk teknik, hvor man anvender et oscillerende elektrisk felt. Strømsignalet vil svinge med en tilsvarende frekvens.

Det elektrokemiske udstyr er indrettet, så alle andre strøm-signaler, end dem med samme frekvens som det elektriske felt, kan frasorteres. Det betyder, at signal-støjforholdet forbedres så dramatisk, at det er muligt at undersøge biomolekyler og lægemiddelstoffers vekselvirkninger med grænsefladen. En sådan vekselvirkning kan have betydning for deres farmakologiske effekt. Desuden hænger interaktionen med grænsefladen af specielt proteiner ofte sammen med proteinets stabilitet, som er en afgørende parameter i udviklingen af proteinbaserede lægemidler.

I øjeblikket bruger vi en elektrokemisk celle, der kræver mellem 1 og 2 ml olie og vand. Et af vores mål er at udvikle et miniaturiseret system, der kan arbejde med mindre prøver og dermed mindre mængder lægemiddelstof. Desuden arbejdes der med at koble yderligere analysetrin på teknikken. I den forbindelse er det nærliggende at anvende kapillarelektroforese, der udmærker sig ved at kunne anvendes på små prøvemængder [4-6].

Små og alsidige analysesystemer er specielt relevante ved analyser af biologiske molekyler (som f.eks. proteiner), der ofte kun er til rådighed i meget små mængder eller i blandinger med andre stoffer. I den farmaceutiske industri er der desuden et stigende behov for at kunne analysere mange lægemiddelkandidater på kort tid. Et miniaturiseret analysesystem kan udføre en sådan opgave mere tilfredsstillende. I sidste ende betyder det, at udviklingsprocessen for nye lægemidler bliver væsentlig kortere end i dag.

Ud over fysisk-kemisk karakterisering af lægemiddelstoffet kan den elektrokemiske metode også bruges til at detektere lægemiddelstoffer (og evt. lægemiddelstoffernes metabolitter) i biologiske prøver. I eksemplet med Propranolol er det f.eks. i princippet muligt at bruge metoden til at måle koncentrationen af stoffet i blod eller urin, idet strømsignalet er proportionalt med koncentrationen af lægemiddelstoffet. Ved på denne måde at anvende teknikken som en lægemiddelsensor vil det være muligt at overvåge omdannelsen (og optagelsen) af lægemiddelstoffet i kroppen.

E-mail-adresse
Henrik Jensen: hj@dfuni.dk

Referencer

1. F. Reymond, V. Gobry, G. Bouchard, H. H. Girault; *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*; B. Testa, H. v. d. Waterbend, G. Folkers, R. Guy, Ed.; Wiley-VCH: Zürich, 2001.
2. David J. Fermín, Henrik Jensen, Hubert H. Girault; *Encyclopedia of Electrochemistry* Vol. 2, Wiley, 2003, Eds. Bard/Stratmann, side 360-390.
3. Sorina M. Ulmeanu, Henrik Jensen, Geraldine Bouchard, Pierre-Alain Carrupt, Hubert H. Girault; *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1317-1322.
4. Jesper Østergaard, Henrik Jensen; *Dansk Kemi*, **2004**, *85*, 32-35.
5. Xiaoxia Bai, Christophe Roussel, Henrik Jensen, Hubert H. Girault; *Electrophoresis*, **2004**, *25*, 931-935.
6. Zhiyong Wu, Henrik Jensen, Jean Gamby, Xiaoxia Bai, Hubert H. Girault; *Lab on a Chip*, **2004**, *3*, 512-516.

