

4 Untersuchungen zur Lipophilie und Reinheit

Die Lipophilie eines Wirkstoffs ist ein wichtiger pharmakodynamischer Faktor, der einen entscheidenden Einfluss auf die Zellmembranpassage und die Verteilung im Zytoplasma hat. Auch die Fähigkeit eines Pharmakons mit seinem Wirkort z. B. über elektrostatische oder van-der-Waals-Wechselwirkungen zu interagieren, steht damit in Zusammenhang. Somit stellt die Lipophilie ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung von pharmakologischen Eigenschaften einer Verbindung dar. Zur näheren Charakterisierung der lipophilen Eigenschaften analoger 2,4,5-Triaryl- (Typ 1, *N*-unaryliert) sowie 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrole (Typ 2, *N*-aryliert) sollte deren Elutionsverhalten mittels HPLC untersucht werden. Dabei sollten auch Rückschlüsse über die Reinheit der Verbindungen gezogen werden. Außerdem sollten die cLogP-Werte der Substanzen berechnet werden.

Zusätzlich sollten die Verbindungen (PBS-Lösungen) auch nach 24-stündiger Inkubation der bei 37°C (Wasserbad) mittels HPLC analysiert werden, um ihre Stabilität unter Zelltestbedingungen näher einzuschätzen.

4.1 HPLC-Methode

Die HPLC ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem unter hohem Druck meist eine polare mobile Phase eine unpolare stationäre Phase passiert (Umkehrphase). Durch unterschiedliche Adsorption der zu trennenden Verbindungen an die stationäre Phase kommt es zur Auftrennung des Stoffgemisches. Dabei nimmt die Elutionsgeschwindigkeit mit steigender Polarität einer Verbindung zu. Die Trennleistung ist dabei von der Wahl der stationären Phase, des Fließmittels und seiner Zusammensetzung sowie von der Flussrate abhängig.

Als apolares Trägermaterial wurde Nukleosil C₁₈ verwendet, ein Kieselgel, an dessen Silanolfunktionen Oktadekanylgruppen kovalent gebunden sind. Der Hauptsäule wurde eine Vorsäule vorgeschaltet, die Verunreinigungen von der Hauptsäule abhält. Da jedes Lösungsmittel geringe Mengen des Packungsmaterials in Form von modifizierter Kieselsäure anlöst, trägt die Vorsäule entscheidend zur Verlängerung der Lebensdauer der Hauptsäule bei [286].

Als mobile Phase diente ein Zweikomponentensystem aus Methanol und Wasser, mit dem die zu untersuchenden Verbindungen isokratisch eluiert wurden. Da Wasser mit der apolaren stationären Phase kaum in Wechselwirkung tritt, besitzt es nur eine sehr schwache Elutionskraft, sodass bei steigendem Wasseranteil im Fließmittelgemisch die Retentionszeit zunimmt.

4.2 Ergebnisse

Die Substanzen wurden in PBS (pH 7.4) gelöst und sofort bzw. nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C vermessen. Aus Gründen der Praktikabilität wurde das Methanol-Wasser-Verhältnis so gewählt, dass die Retentionszeit zwischen 5 und 30 min betrug. Zur pH-Wert-Einstellung (pH: ca. 2.5) erfolgte anschließend der Zusatz von 0.01% Trifluoressigsäure zum Fließmittelgemisch. Dadurch wurde die Dissoziation der phenolischen OH-Gruppen zurückgedrängt und ein Peak tailing verhindert. Zur Einschätzung der Stabilität wurde die Berechnung der Peakflächen (Software: Kroma System 2000) vor und nach der Inkubation vorgenommen und die Wiederfindungsrate (WFR) als Quotient der Peakflächen aus Messwert und Referenz ermittelt (Gleichung 4-1).

$$\text{WFR} [\%] = \frac{\text{Fläche}_{\text{Testsubstanz}}}{\text{Fläche}_{\text{Referenz}}} \cdot 100\%$$

Gleichung 4-1

Nach dem Austritt aus der Säule wurden die untersuchten Verbindungen aufgrund ihres chromophoren Systems bestehend aus Phenylringen und dem Pyrrolmolekül UV-spektroskopisch erfasst. Die geeignete Detektionswellenlänge (255 nm) wurde aus den UV-Spektren abgeleitet (Kapitel 1).

Für die Untersuchung wurden verschiedene 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrole (**80**, **85**, **86** und **94**) sowie 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrole (**147**, **148**, **166**, **167** und **170**) mit unterschiedlichen Substituenten ausgewählt und mittels HPLC vermessen (Abbildung 4-1).

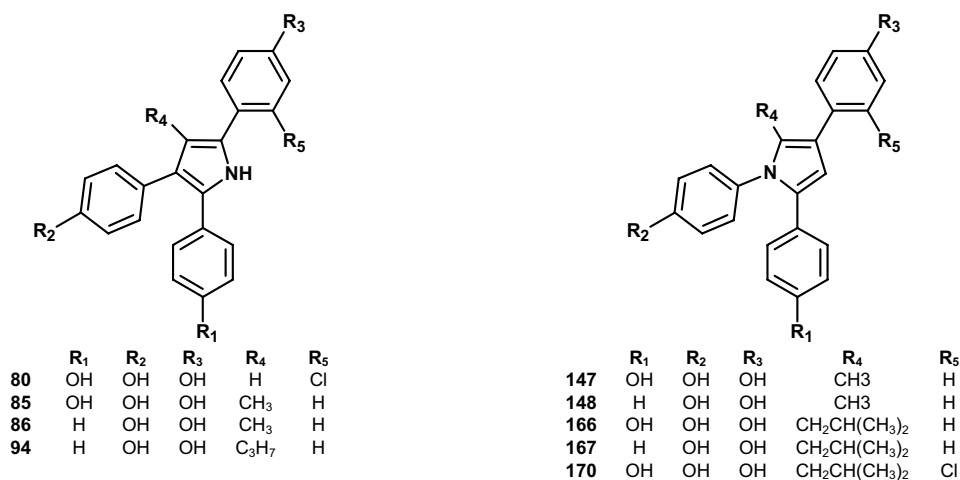


Abbildung 4-1: Links: untersuchte 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrole. Rechts: untersuchte 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrole.

In Abbildung 4-2 sind die Chromatogramme für das methylsubstituierte 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrol **86** sofort nach dem Lösen und nach 24-stündiger Inkubation (Wasserbad, 37°C) dargestellt. Die Verbindung eluierte im Fließmittelsystem 70:30 (MeOH:H₂O) nach 9.5 min, wobei nach einer Inkubationszeit von 24 h 98.7% ihres Gehalts wiedergefunden wurde. Die Bildung weiterer Peaks konnte nicht beobachtet werden.

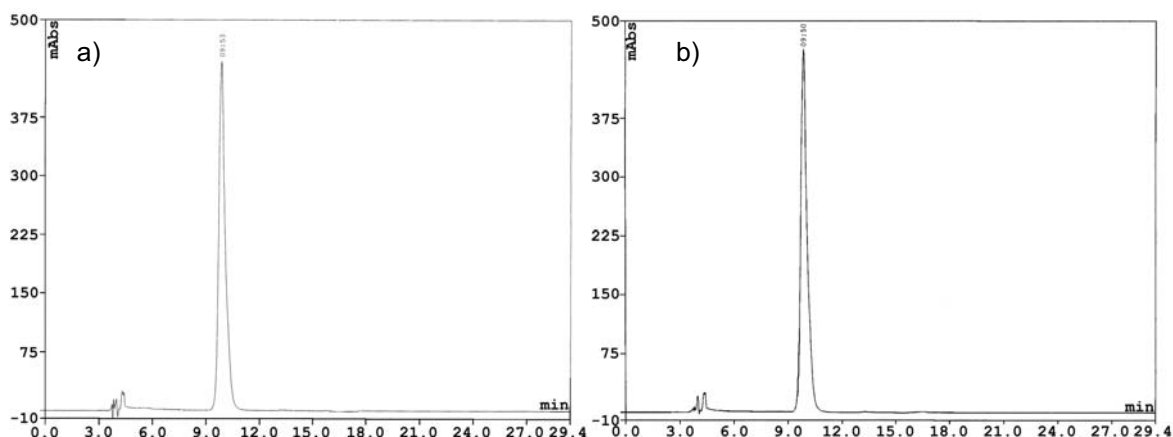


Abbildung 4-2: Chromatogramme der Verbindung **86** a) direkt nach dem Lösen in PBS, b) nach 24-stündiger Inkubation auf dem Wasserbad bei 37°C.

Das stellungsisomere *N*-substituierte 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrol **148** wies dagegen eine deutlich höhere Retentionszeit auf (16.2 min), was auf eine höhere Lipophilie schließen lässt. Es wurden nach 24-stündiger Inkubation 98.3% des Gehalts wiedergefunden, ohne dass weitere Peaks auftraten (Abbildung 4-3).

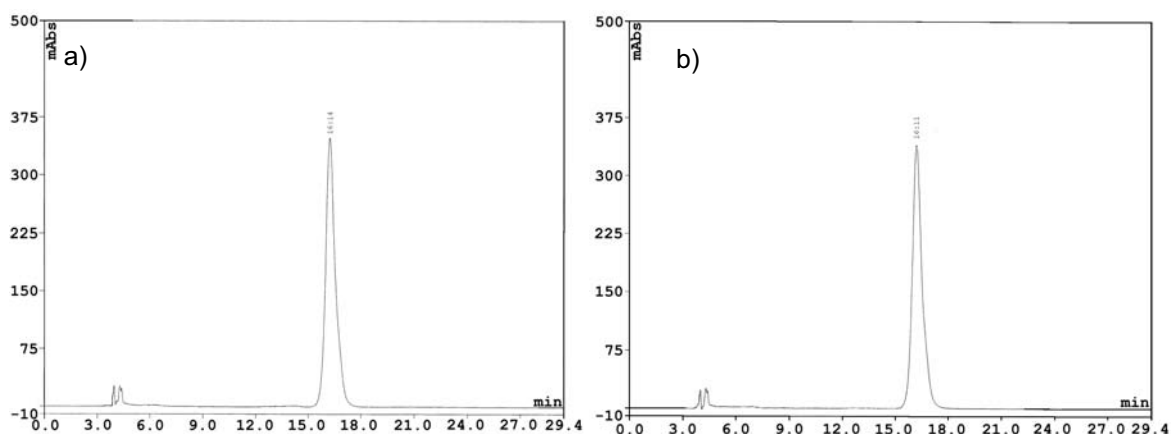


Abbildung 4-3: Chromatogramme der Verbindung **148** a) direkt nach dem Lösen in PBS, b) nach 24-stündiger Inkubation auf dem Wasserbad bei 37°C.

Das Vorhandensein einer zusätzlichen Hydroxyfunktion bewirkte eine starke Verringerung der Retentionszeit, denn das methylierte trihydroxylierte 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrol **147** eluierte bereits nach 5.5 min (MeOH:H₂O, 70:30). Im gleichen Fließmittelgemisch konnte das analoge 2,4,5-Triaryl-1*H*-pyrrolderivat **85** aufgrund seiner hohen Polarität nicht vermessen werden. In einem Fließmittel mit geringerem Methanolanteil

(MeOH:H₂O, 60:40) wurde eine Retentionszeit von 6.1 min erhalten. Auch für Untersuchung von **80** wurde diese mobile Phase (MeOH:H₂O, 60:40) verwendet, um eine sofortige Elution nach dem Einspritzen in die Anlage zu verhindern. Dadurch sind jedoch die erhaltenen Retentionszeiten schlecht mit den Messergebnissen der im Fließmittelsystem 70:30 (MeOH:H₂O) untersuchten Verbindungen vergleichbar.

Eine Verlängerung der Alkylfunktion (Me→Iso-But) führte erwartungsgemäß zu einer Erhöhung der Retentionszeit. 2-Isobutyl-1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**166**) eluierte nach 11.0 min (MeOH:H₂O, 70:30) von der Säule. Die Einführung eines lipophilen Chlorsubstituenten (**170**) vergrößerte die Retentionszeit im gleichen Fließmittel um 3.9 min gegenüber der nicht chlorierten Verbindung (**166**), jedoch in geringerem Maße als die Verringerung der Hydroxygruppenanzahl (**167**, Retentionszeit: 26.7 min). Das Fehlen einer OH-Gruppe, die Verlängerung des Alkylsubstituenten sowie die Chlorsubstitution der Aromaten führten sowohl bei den untersuchten Typ-1- als auch bei Typ-2-Verbindungen zu einer deutlichen Erhöhung der Retentionszeit. Dabei waren erstere stets deutlich polarer als die entsprechenden 1,3,5-triarylierten Pyrrole. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Verbindung	Fließmittelgemisch MeOH:H ₂ O	Retentionszeit [min]	WFR [%]
80	60:40	4.7	97.9
85	60:40	6.1	98.9
87	70:30	7.5	98.7
94	70:30	19.2	97.6
147	70:30	5.5	99.1
148	70:30	16.1	98.3
166	70:30	11.0	98.0
167	70:30	26.7	97.1
170	70:30	14.9	98.8

Tabelle 4-1: HPLC-Untersuchungsergebnisse für Verbindungen **80**, **85**, **86** und **94** (Typ 1) sowie **147**, **148**, **166**, **167** und **170** (Typ 2). Fließmittelzusammensetzung, Retentionszeit und Wiederfindungsrate (nach einer Inkubationszeit von 24 h) der vermessenen Verbindungen.

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die *N*-Substitution einen großen Einfluss auf die Lipophilie der Verbindungen hat. Die Arylierung des Stickstoffs erhöhte die Lipophilie stärker als die Verlängerung der Alkylkette um eine CH₂-Gruppe oder die Einführung von *ortho*-Chlorsubstituenten an die Aromaten. Da die Spektren der sofort nach dem Lösen vermessenen Proben nur einen Peak aufwiesen, lag eine hohe Reinheit der Substanzen vor. Auch nach 24-stündiger Inkubation (PBS-Lösung, 37 °C, Wasserbad) wurde keine zusätzliche Peakbildung beobachtet. Außerdem wurde eine nahezu vollständig Wiederfindung (97.1 - 99.6%) aller untersuchten Substanzen ermittelt, sodass von einer hohen Stabilität der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen ausgegangen werden kann.

Zur weiteren Charakterisierung der Lipophilie wurde der cLogP-Wert (calculated LogP-Wert) aus den Inkrementen berechnet (Software: Chem3D Ultra 6.0), der gut mit dem empirisch zu bestimmenden LogP-Wert korreliert. Der LogP-Wert beschreibt den Verteilungskoeffizienten P einer Verbindung zwischen 1-Oktanol und Wasser (Gleichung 4-2) [287].

$$\text{LogP} = \log \left(\frac{c_{\text{Oktanol}}}{c_{\text{Wasser}} \cdot (1 - \alpha)} \right)$$

Gleichung 4-2

P: Verteilungskoeffizient

α : Dissoziationsgrad in Wasser

c: Konzentration der Substanz in 1-Oktanol bzw. Wasser

Die cLogP-Werte sind in Tabelle 4-2 dargestellt.

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Typ 1	cLogP	Typ 2	cLogP
OH	OH	OH	H	Cl	80	5.00		
OH	OH	OH	Me	H	85	4.13	147	5.62
H	OH	OH	Me	H	86	4.80	148	6.28
OH	OH	OH	Et	H	89	4.66	152	6.15
OH	OH	OH	Prop	H	93	5.12	157	6.68
H	OH	OH	Prop	H	94	5.86	158	7.08
OH	OH	OH	Iso-But	H			166	7.07
H	OH	OH	Iso-But	H			167	7.48
OH	OH	OH	Iso-But	Cl			170	7.83

Tabelle 4-2: cLogP-Werte ausgewählter Verbindungen der Substitutionstypen 1 und 2.

Die ermittelten cLogP-Werte korrelieren gut mit den Ergebnissen der HPLC-Untersuchung. Auch hier konnte ein starker Einfluss der Stickstoffsubstitution gefunden werden. Während z. B. für 3-Ethyl-2,4,5-tris(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrol (**89**) ein cLogP-Wert von 4.66 berechnet wurde, wies das analoge 1,3,5-Triaryl-1*H*-pyrrol **152** einen cLogP-Wert von 6.15 auf. Demgegenüber hatte die Verlängerung der Alkylfunktion (**85** cLogP: 4.31, **89** cLogP: 4.66) oder das Fehlen einer Hydroxygruppe (**93** cLogP: 5.12, **94** cLogP: 5.86) einen kleineren Einfluss. Auch die Einführung eines Chlorsubstituenten führte nur zu einer geringen Erhöhung der Lipophilie (**166** cLogP: 7.07, **170** cLogP: 7.83).