

pH-metriás titrálás a fizikai-kémia alapú gyógyszerkémia szolgálatában: ciklodextrin-gyógyszermolekula komplexképzés vizsgálata (gyors) UV-pH titrálással

DARGÓ Gergő^{a,b} és BALOGH György Tibor^{a,*}

^a Richter Gedeon Nyrt., Szintézistámogató laboratórium, Gyömrői út 19-21, 1103 Budapest

^b BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Budafoki út 8., 1111 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A Richter Gedeon Nyrt. kutatási menedzsmentje még a 2000-es évek közepén határozta el, hogy saját kutatási szervezetén belül kialakít egy olyan önálló csoportot, ahol az újonnan szintetizált vegyületek fizikai-kémiai jellemzése zajlik. A csoport megalakulásakor az elsődleges cél az alapvető, addig csak *in silico* becslések, illetve külső megbízások révén mért adatként előálló fizikai-kémiai paraméterek meghatározására alkalmas módszerek kialakítása, beállítása, „Richter-komforttá” tétele volt. Ennek megfelelően 1-2 év alatt beállításra kerültek a vegyületek proton-disszociációs állandójának (pK_a) és lipofilitásának ($\log P/D_{pH}$) meghatározására szolgáló potenciometrikus és UV-pH titrálási módszerek, a kinetikai és termodinamikai oldhatóság, továbbá a kémiai stabilitás (DMSO oldatban és fiziológiásan releváns vizes alapú pufferekben) meghatározására alkalmas, elsősorban 96-llyukú mérőtálcán/szűrőtálcán alapuló mérési módszerek, illetve a hatóanyagok permeabilitását jellemző két, vagy szendvics elrendezésű mérőtálcás *in vitro* nem-sejtes PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) módszer. Ezen vizsgálati módszerek közös vonásaként fontos kiemelni, hogy kiválasztásuknál, illetve kidolgozásuknál a legfontosabb szempontok a nagyon kis, jellemzően pár mg-ban rendelkezésre álló mintamennyiség, ami jellemzően diverz szerkezeti körből kerül ki, illetve további kihívás a minták nagy száma és a szűk időintervallumhoz kötött információigény voltak. Tekintettel a fentiekben említett széleskörű fizikai-kémiai vizsgálatokra, illetve a jelen írásos mű terjedelmi korlátjára a továbbiakban a leginkább a gyógyszerkémiai kutatások léptékéhez igazított, fokozottan annak igényét kielégítő, fizikai-kémiai paraméterek meghatározásban is általánosan használható módszerre a potenciometrikus, illetve különböző spektroszkópia, jellemzően spektrofotometrián alapuló UV-pH-metriás titrálási módszerre fókuszálunk. Hasonló módon az ezen a piacon egyeduralkodó néhány cég is a pH-metriás technikákon alapuló készülékeiken hajtott végre jelentősebb fejlesztéseket. A fejlesztés legfontosabb irányai (i) a pH-metriás titrálási technika alkalmazásának kiterjesztése a klasszikus pK_a és $\log P/D$ meghatározás mellett az oldhatóság vizsgálatra, (ii) a mérés anyagigényének gyakorlatilag egy nagyságrenddel történő csökkentése, (iii) a mérés ciklusidejének lerövidítése és így áteresztőképességének növelése (1. ábra).

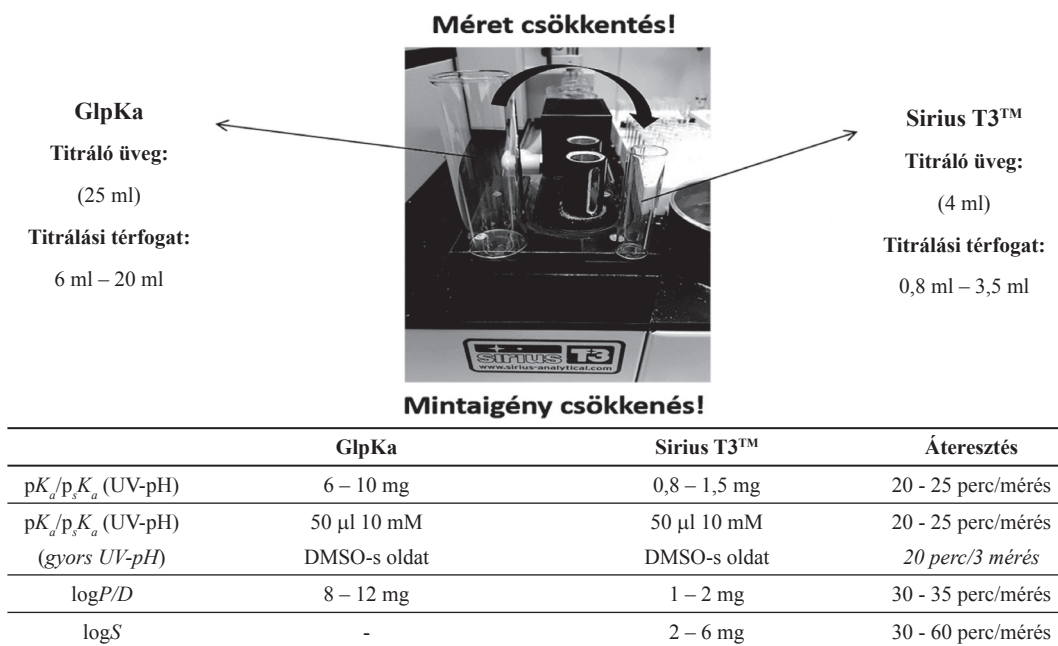
A következőkben ez utóbbi két fejlesztési irány előnyeire, illetve az ezek által biztosított lehetőségekre térünk ki

részletesebben. A jellemző paraméterek változását a Sirius Analytical Inc. cég 2000-es években forgalmazott GIpKa, illetve a pár éve a piacon megjelent SiriusT3™ berendezésén mutatjuk be. Az 1. ábra alapján jól látható, hogy a mintaigény csökkenését a klasszikus pH-metriás (potenciometrikus), illetve csak a pK_a mérésnél alkalmazható UV-pH-metriás titrálásoknál is a titrálási térfogat egy nagyságrenddel történő csökkentésével (6-20 ml $\rightarrow$ 0,8-3,5 ml) sikerült megoldani. A másik fejlesztési irány a mérés ciklusidejének csökkentése, amit a mintamozgatás robotizálásával, illetve a reagenseket adagoló automatikus buretták párhuzamos működésének biztosításával oldottak meg, mintánként 20-30 perces mérési időt eredményezve. Ezen felül a klasszikus egyensúlyi, illetve termodinamikai oldhatóság mérés 24-48 órás időigényéhez képest jelentős változást jelentett a kifejlesztett potenciometrikus oldhatóság-mérési módszer, melynek mérési ideje 60 perc/mérésre rövidült. A másik jelentősebb előrelépést a ciklusidő lerövidítésében egy új, ún. gyors UV-pH-metriás titrálási módszer bevezetésével sikerült a fejlesztőknek elérni (1. ábra). A számottevő ciklusidő rövidülést (20 perc/ 3 párhuzamos mérés) két, a vizsgálati módszert érintő változtatással sikerült elérni. A klasszikus két küvetás módszer helyett, az azonos oldószer hátterű (azonos koncentrációban adagolt, azonos koszosolvenssel készített törzsoldatból kiinduló) minták esetében csak egy referencia küvetát alkalmaznak, ily módon a háttér UV-vis-pH spektrumok felvétele még nagyszámú minta esetében (akár 50 db minta) is csak egyszer szükséges. A másik ciklusidő rövidítését eredményező változtatás a gyors pH egyensúly beállítását, illetve a teljes titrálási pH-tartomány pufferálását biztosító puffer oldat kifejlesztése, ami együttesen biztosítja, hogy a teljes pH-tartományban a titrálási idő mintegy 6-7 percre rövidült.

Fentieknek megfelelően a következőkben ez utóbbi gyors UV-pH-metriás titrálással végzett kísérletes munkánkat szeretnénk bemutatni, amely során a gyógyszermolekulák és egyes ciklodextrinek között kialakuló kölcsönhatásokat vizsgáltuk a hatóanyagok proton-disszociációs képességének, ionizációs állandójának (pK_a), illetve multiprotikus vegyület esetében az adott szerkezeti egységre vonatkozóan szeparáltan az egyes pK_a értékeinek megváltozásán keresztül.

A szervezetbe kerülő, a gasztrointesztinális (GI)-rendszeren végighaladó, *per os* adagolású gyógyszerek biohasznosulását

* Tel.: +36-1-431-48-55; fax: +36-1-889-87-82; e-mail: gy.balogh@richter.hu



A fent megjelölt mintaigények 3 párhuzamos mérés mellett értendők

1. Ábra. A pH-metriás titrló berendezés fejlesztése.

nagyban befolyásolja felszívódási hajlamuk, ami fizikai-kémiai értelemben elsősorban oldhatóságuktól és permeabilitásuktól függ. Ennek megfelelően már a gyógyszerkutatás korai fázisában fontos információt nyernünk a gyógyszer-jelölt molekulák ezen paramétereiről. A gyógyszermolekulákat az oldhatóságuk és permeabilitásuk alapján kialakított Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BCS) négy osztályba sorolja.¹

Megfigyelhető, hogy az egyes osztályok esetén a felszívódási sebességet más-más paraméterek fogják limitálni (1. táblázat), úgy, mint a gyomor ürülése, az oldhatóság, a permeabilitás, vagy ezek kombinációja (BCS IV. osztály).² Ciklodextrinek (CD-ek) alkalmazása főként a gyógyszermolekulák oldhatóságának növelésére irányul, így első megközelítésben alkalmazásukkal a II., illetve a IV. BCS osztályokba sorolható anyagok biohasznosulásának növelésére láthatunk esélyt.

1. Táblázat. A Biofarmácia Osztályozási Rendszer (BCS) és a CD-ek hatása a biohasznosulásra²

Paraméterek	I. osztály	II. osztály	III. osztály	IV. osztály
Vizes oldhatóság	Fokozott	Rossz	Fokozott	Rossz
Permeabilitás	Magas	Magas	Alacsony	Alacsony
In vitro/ in vivo korreláció	Lehet jó	Jó	Rossz	Rossz
A felszívódási sebességet befolyásolja	Gyomor ürülése	Oldhatóság	Permeabilitás	Oldhatóság és permeabilitás
CD-ek alkalmazásának hatása a biohasznosulásra	Csökkentheti	Növelheti	Csökkentheti	Növelheti

Megfigyelhető, hogy az egyes osztályok esetén a felszívódási sebességet más-más paraméterek fogják limitálni (1. táblázat), úgy, mint a gyomor ürülése, az oldhatóság, a permeabilitás, vagy ezek kombinációja (BCS IV. osztály).² Ciklodextrinek (CD-ek) alkalmazása főként a gyógyszermolekulák oldhatóságának növelésére irányul, így első megközelítésben alkalmazásukkal a II., illetve a IV. BCS osztályokba sorolható anyagok biohasznosulásának növelésére láthatunk esélyt.

2. Ciklodextrinek

A CD-ek α -D-glükopiranoz egységek 1-4 kapcsolódásával kialakuló ciklikus oligoszacharidok, amelyeket keményítőből

enzimes átalakítással nyernek.³ A gyűrűk tagszáma 6, 7, 8, 9 lehet, a növekvő tagszám szerint elnevezésük α -, β -, γ -, illetve δ -CD-ek.

A csonkakúp alakú molekulákban a henger peremén találhatóak a glükóz egységek hidroxilcsoportjai, az üreg belsejében pedig a hidrogének, illetve a glikozil-kötésű oxigének.⁴ Ennek következtében a henger belseje apoláris, míg pereme és külseje poláris jellegű lesz, így vízben jól oldódnak, belső üregükben pedig különböző apoláris csoportot tartalmazó molekulákkal, mint vendégmolekulákkal képesek reverzibilis, nem kovalens zárvány-komplexek létrehozására.

Az üreg mérete a gyűrűtagszámmal változik, így eltérő méretű molekulákat, molekularészeket képesek az egyes CD-ek komplexálni. A hidroxilcsoportok különböző módosításával tovább növelhető a CD-ek vizes oldhatósága, így származékaikat is előszeretettel alkalmazzák a gyógyszeriparban.⁵

Az irodalomban számos példát találhatunk olyan gyógyszerekre, amelyek biohasznosulása növelhető CD-ek

alkalmazásával.^{6,7,8,9} A 2. táblázatban néhány olyan példa látható, ahol a CD-ek hatására bekövetkező biohasznosulás növekedést, a relatív biohasznosulást (F_{rel}) vizsgálták, melyeket a CD-t tartalmazó és a CD-t nem tartalmazó készítmények esetén mért plazma koncentráció időbeli függését leíró görbe alatti területek (AUC) hányadosából kapunk.² Látható, hogy ciklodextrinek alkalmazásával néhányszorostól akár több tízszeresre is sikerült növelni a hatóanyag biohasznosulását.

2. Táblázat Példák a biohasznosulás növelésére CD-ek alkalmazásával¹

Hatóanyag	CD ^a	Formulálás	Vizsgált faj	F_{rel}
Albendazol	HPBCD	Per os oldat	Bárány, egér	≤2,5
Karbamazepin	DIMEBCD	Per os por, oldat vagy tabletta	Nyúl, kutya, patkány	≤5,6
Cinnarizin	BCD, SBEB CD, HPBCD	Per os oldat, tabletta, port tart. kapszula	Kutya	≤48
Digoxin	GCD	Tabletta	Kutya	5,4
17β-Ösztradiol	HPBCD	Szublingvális tabletta	Ember	5,8
Glibenklamid	BCD, SBEB CD	port tart. kapszula	Kutya, patkány	≤6,2
Nifedipin	BCD, HPBCD	port tart. kapszula	Nyúl, kutya	≤2,9
Spirolonakton	BCD, GCD, DIMEBCD, SBEB CD, HPBCD	Per os por és oldat	Patkány, kutya	≤3,6

^a BCD: β-ciklodextrin, GCD: γ-ciklodextrin, HPBCD: 2-hidroxiipropil-β-ciklodextrin, DIMEBCD: dimetil-β-ciklodextrin, SBEB CD: szulfobutil-éter-β-ciklodextrin

3. A komplexképzés vizsgálatának módszerei

A CD-ek gyógyszerek felszívódására, biohasznosulására gyakorolt hatásának azonosításához, a CD hatóanyaggal történő komplexképzésének vizsgálatára van szükség. A komplexképzés vizsgálatára alkalmas módszereket két fő csoportba sorolhatjuk. Az első a szabad és a komplexált hatóanyagforma elválasztásán alapuló technikák. Ide tartoznak a különböző kromatográfiák, az affinitás kapilláris elektroforézis, a dialízis, és tömegspektrometriás módszerek. A másik csoportba azok a vizsgálatok sorolhatók, melyek a gyógyszervegyület, vagy a CD valamilyen fizikai-kémiai sajátosságának megváltozásán alapulnak. Ilyen módszerek a fázis-oldhatóságon, UV-vis spektrofotometrián, potenciometrián, NMR-en, konduktometrián, valamint hidrolízis kinetikán alapuló módszerek.¹⁰ Az itt felsorolt technikák közül munkánk során az UV-vis spektroszkópia és potenciometria összekapcsolása révén előálló UV-pH titrálást alkalmaztuk (2. ábra). Célunk egy gyors, szűrés léptékű, a vizsgált hatóanyag proton-disszociációs sajátosságának, pK_a értékének megváltozásán alapuló mérési módszer kialakítása volt, mely segítségével könnyen előrejelezhető, hogy a gyógyszermolekula mely CD származékkal fog stabil/stabilabb komplexet képezni.

3.1. Komplexképzés vizsgálata UV-pH titrálással

Az UV-pH titrálással az olyan proton-disszociációra képes vegyületek esetében, melyek UV-vis spektruma pH-függést

mutat, a mért spektrumokból a két szélső (teljesen ionizált és teljesen neutrális forma) és egy átmeneti pH-n vett abszorbanciából a **Henderson-Hasselbalch egyenletet** felhasználva megadható(k) a vegyület pK_a értéke(i).¹¹

$$pK_a = pH + \log \left(\frac{[\text{proton donor}]}{[\text{proton akceptor}]} \right) \quad (1)$$

Az egyenlet UV-pH titrálás esetén átalakítható oly módon, hogy a koncentrációk hányadosának helyére a mért spektrofotometriás adatokból, az abszorbancia-változásokból származtatható mennyiségeket írunk, ily módon a **Henderson-Hasselbalch egyenlettel** analóg összefüggés írható fel, mely egy monoprotikus sav esetében a következő.¹³

$$pK_a = pH + \log \left(\frac{(A_A - A_{\text{átmeneti}})}{(A_{\text{átmeneti}} - A_{AH})} \right) \quad (2)$$

Az egyenlet bázisok és bizonyos megkötések mellett multiprotikus vegyületek esetében is analóg módon alkalmazható. Az egyenlet felhasználásával, több módszerrel is, már akár egy darab átmeneti pH értékből, és a három szükséges abszorbancia-értékből számolható a pK_a , de napjainkban a mérés automatizálása következtében, kifejezetten erre a célra írt programok is léteznek, melyek több átmeneti pH-hoz és választható hullámhossz intervallumhoz tartozó abszorbancia-értékek sokaságának mátrixából képesek meglehetősen nagy pontossággal megadni az adott vegyület pK_a értékét (pl.: RefinementPro, SiriusT3 Refine).

A módszerrel különböző CD-koncentrációk mellett mérve a proton-disszociációs állandót (pK_a -t), számolhatók a

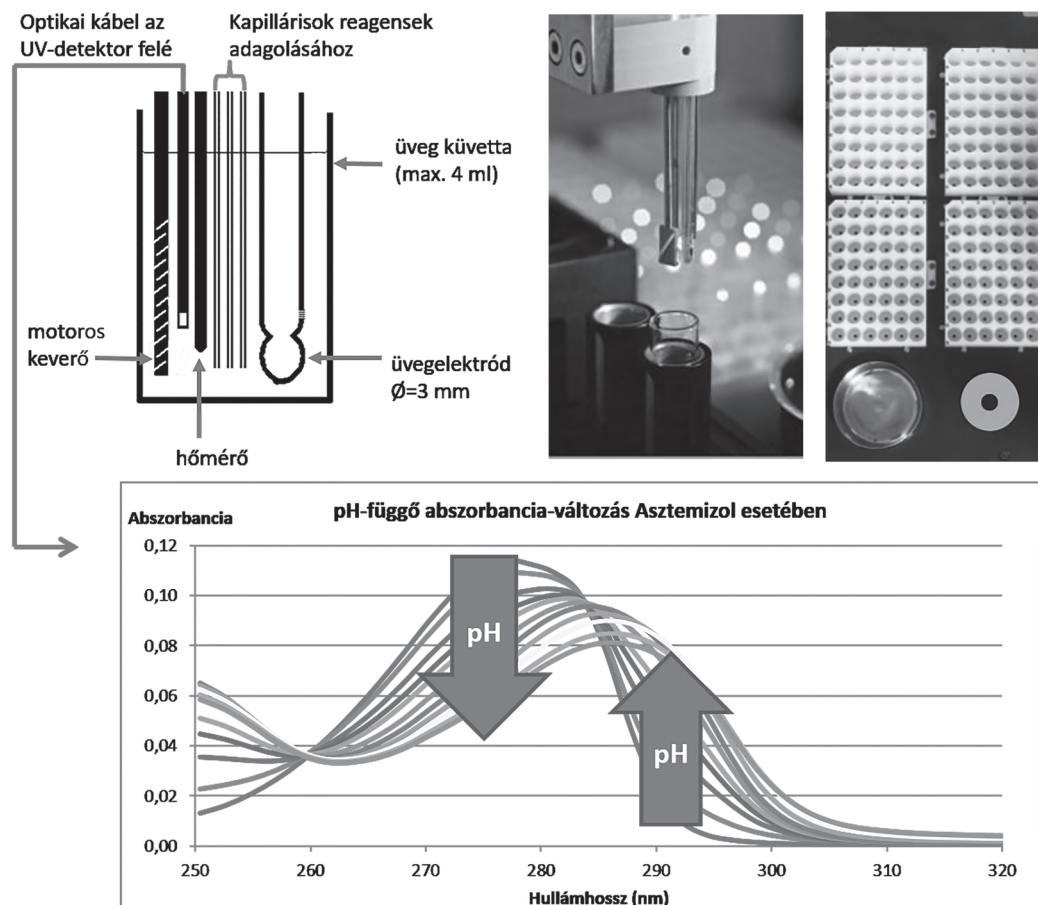
komplexálódás hatására megváltozó, látszólagos ionizációs állandók, $pK_{a,app}$ értékek is.

Azokban az esetekben, ahol CD hozzáadására azt tapasztaljuk, hogy a $pK_{a,app}$ érték szignifikánsan eltér a vegyület saját pK_a értékétől, stabil CD-gyógyszermolekula komplex kialakulása feltételezhető az oldatban. A két ionizációs állandó különbségének ($pK_a - pK_{a,app}$) nagysága a kialakuló komplex stabilitására utal, amit különböző CD-koncentráció mellett mérve, majd a kapott adatokat

a **Benesi-Hildebrand-egyenlet** szerint transzformálva a komplexstabilitási állandók nagysága megadható mind a proton-disszociált és a disszociálatlan molekulaformára (K_{11a} , K_{11b}).¹⁴

$$K_a / (K_{a,app} - K_a) = (1 / ((K_{11b} - K_{11a}) \cdot [CD])) + ((K_{11a} / (K_{11b} - K_{11a})), \quad (3)$$

ahol az Asztemizol piperidin szerkezeti részének bázikus nitrogénjére vonatkozó proton-disszociációt figyelembe véve ($pK_{a,2}$), a neutrális molekulaformához tartozó stabilitási állandó (3. ábra):



2. Ábra. Az UV-pH titrálás vázlata.

$$K_{11a} = y\text{-tengelymetszet} / \text{meredekség}, \quad (4)$$

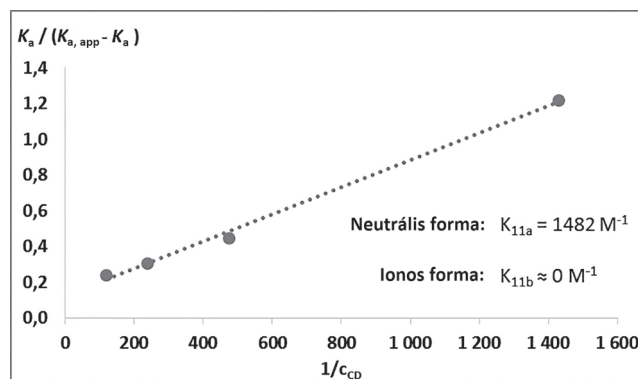
az egyszerűen protonált molekulaformához tartozó stabilitási állandó pedig:

$$K_{11b} = (1 + y\text{-tengelymetszet}) / \text{meredekség} \quad (5)$$

4. Használt módszerek, mintaelőkészítés

A méréseink során az UV-pH titrálásokhoz a Sirius Analytical cég SiriusT3™ készülékét használtuk. A készülék gyors mérési módjában (Fast UV-pH) a vizes közegben mérhető pK_a értékek meghatározására a vizsgált anyagok 5 μ l 10 mM-os koncentrációjú DMSO-törzsoldataiból konstans ionerősségű vízben titrálva (kezdeti térfogat: 1,2 ml, $I=0,15$ M KCl) anyagoként kb. 10-20 perc alatt végezhetünk 3 párhuzamos mérést, így a módszer gazdaságosan

alkalmazható nagyobb számú mérendő anyag esetében is (3. táblázat).



3. Ábra. Asztemizol-HPBCD komplex stabilitási együtthatóinak számítása a Benesi-Hildebrand egyenletből.

3. Táblázat. A pK_a változást vizsgáló mérési módszerek összehasonlítása

	potenciometrikus titrálás	(két küvetás) UV-pH titrálás	gyors (Fast) UV-pH titrálás
szükséges anyag mennyiség	0,8-1,5 mg szilárd minta 0,8-1,5 ml kezdeti titrálási térfogathoz	5 μ l 10 mM-os törzsoldat 0,8-1,5 ml kezdeti titrálási térfogathoz	5 μ l 10 mM-os törzsoldat 0,8-1,5 ml kezdeti titrálási térfogathoz
szükséges CD mennyiség	300 μ l 20 mg/ml koncentrációjú CD-oldat	300 μ l 20 mg/ml koncentrációjú CD-oldat	300 μ l 20 mg/ml koncentrációjú CD-oldat

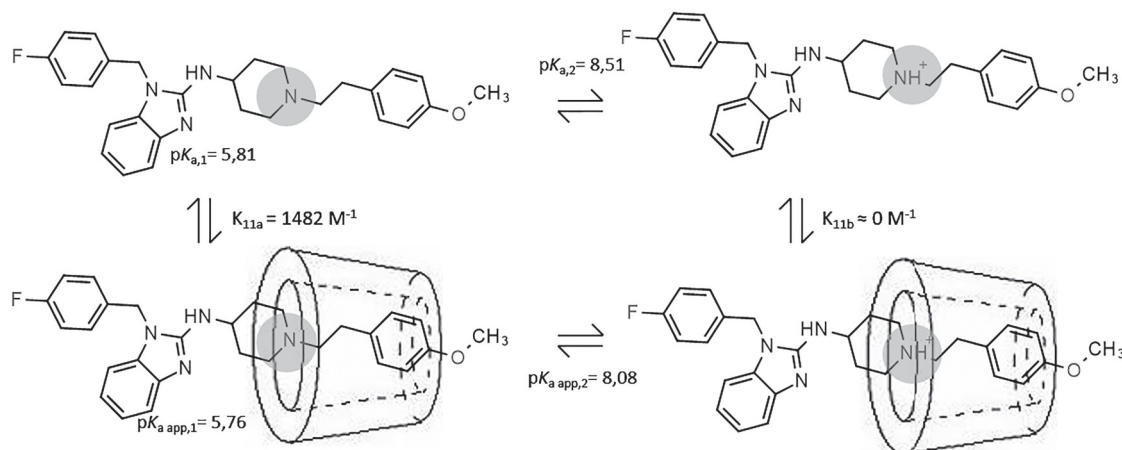
A CD-ek jelenlétében végzett méréseknél az 1,2 ml kezdeti titrálási térfogat 300 μ l-ét 20 mg/ml HPBCD-es oldattal helyettesítettük, mivel előzetes próbák alapján ekkora CD koncentráció mellett már szignifikáns pK_a változást tapasztaltunk, ha komplexálódás történt, így ezen beállítást mellett a módszerrel szűrés jelleggel azonosíthatók a vizsgált CD-el komplexálódásra hajlamos vegyületek.

5. Eredmények

Az eredmények alapján látható, hogy a vegyületek egy részénél jelentős pK_a változás tapasztalható, amit a HPBCD-el képzett komplex kialakulásával azonosítottunk, így elkülöníthetők azok a vegyületek, melyeknél esély van az oldhatóság növelésére az adott CD alkalmazásával (4. táblázat). A több pK_a értékkel rendelkező anyagok esetében az is megfigyelhető, hogy az egyes pK_a értékeket eltérő mértékben változtatta meg a CD jelenléte, ez alapján arra is lehet következtetni, hogy a CD-el kialakuló komplex a vendégmolekula mely szerkezeti részét érinti. Ez azt jelenti, hogy amelyik ionizálható molekularésznél nagyobb pK_a -változást tapasztalunk, ott valószínűsíthető, hogy az adott szerkezeti elem a CD belső üregébe, illetve annak közelébe

került, így a proton-disszociáció visszaszorulását, az egyensúlynak a neutrális forma irányába történő eltolódását okozza, a CD nélküli, szabad gyógyszer-molekula proton-disszociációs egyensúlyához képest. A kisebb méretű változás esetén pedig feltételezhetjük, hogy a molekula ionizálható szerkezeti eleme a CD gyűrűn kívül helyezkedik el, vagy a vegyület nem komplexálódott, így kevésbé van kitéve a komplexálódásból adódó, a proton-disszociációt befolyásoló hatásnak. Erre jó példa az Asztemizol-HPBCD komplexe is, melynek négy-egyensúlyát a 4. ábra mutatja, az ionos, illetve neutrális formákhoz tartozó proton-disszociációs állandók, valamint komplexstabilitási állandók feltüntetésével.

Tekintettel arra, hogy az alkalmazott UV-pH titrálás pK_a értékre vonatkoztatott átlagos hibája 0,01-0,02 nagyságú, az eredmények kiértékeléskor a 0,1-nél nagyobb pK_a változást mutató anyagokat ítéltük a HPBCD-el ténylegesen zárványkomplext képzőnek, hiszen így a titrátor várható mérési hibájánál ez az eltérés már szignifikánsan, egy nagyságrenddel nagyobb. Néhány esetben oldhatósági problémák miatt (vizes közegben) csak a két küvetás méréssel volt meghatározható a valódi pK_a , így a kiértékelésnél az ezzel a módszerrel kapott értékeket használtuk (Asztemizol, Flufenaminsav, Glibenklamid).

4. Ábra. A pK_a értékek változása az Asztemizol-HPBCD komplexben.

A 4. táblázatban látható eredmények alapján az is megfigyelhető, hogy a vegyületek bázikus, illetve savas jellegének megfelelően néhány kivételtől eltekintve a HPBCD a $pK_{a,app}$ értéket a bázisok esetében csökkenti, míg savak esetében növeli. Ez megegyezik a várt hatással, hogy a komplexképződés a vegyület proton-disszociációját visszaszorítja, így annak savas/bázikus jellege is csökken. A trendtől eltérő esetekben feltételezhető, hogy a HPBCD komplexképző hatásán kívül más ok, pl. szterikus gátlás is fellép a disszociábilis protont tartalmazó csoporttal, így

ennek hatása jelenik meg az eredményben (pl. Nimeszulid). Az irodalom is megemlíti néhány hasonló esetet.¹⁵

6. Összefoglalás

Munkánk során egy UV-pH titráláson alapuló, a gyógyszer-molekulák és különböző CD származékok közötti komplexképzés vizsgálatára alkalmas szűrési módszert alakítottunk ki. A módszer gyógyszeripari relevanciája,

4. Táblázat. CD hatására bekövetkező pK_a változások

	vizes pK_a	SD	300 μ l HPBCD $pK_{a,app}$	SD	ΔpK_a
Savas karakterű hatóanyagok					
Glibenklamid	5,38	0,02	5,33	0,02	-0,05
Flufenaminsav	3,93	0,02	4,10	0,00	0,17
Dietilstilbesztrol $pK_{a,2}$	10,31	0,04	10,57	0,02	0,26
Dietilstilbesztrol $pK_{a,1}$	9,57	0,02	9,78	0,02	0,21
Diflunizál $pK_{a,1}$	2,58	0,01	3,17	0,01	0,59
Ösztadiol	10,33	0,02	10,32	0,02	-0,01
Ketoprofen	4,00	0,00	4,31	0,02	0,31
Fenilbutazon	4,33	0,00	4,48	0,01	0,15
Diklofenák Na	3,97	0,00	4,17	0,02	0,20
Nimeszulid	6,49	0,01	6,14	0,03	-0,35 (!)
Amfoter hatóanyagok					
Piroxikám $pK_{a,1}$	5,31	0,01	5,33	0,00	0,02
Diflunizál $pK_{a,2}$	12,85	0,14	12,96	0,03	0,11
Szalbutamol $pK_{a,1}$	10,15	0,02	10,24	0,06	0,09
Nitrazepám $pK_{a,1}$	10,51	0,01	10,43	0,02	-0,08
Szulfadimidin $pK_{a,1}$	7,51	0,01	7,58	0,00	0,07
Szulfadimidin $pK_{a,2}$	2,31	0,02	2,28	0,02	-0,03
Nitrazepám $pK_{a,2}$	2,94	0,02	2,83	0,03	-0,11
Szalbutamol $pK_{a,2}$	9,08	0,01	9,14	0,01	0,06
Piroxikám $pK_{a,2}$	1,88	0,02	1,93	0,04	0,05
Bázikus karakterű hatóanyagok					
Klozapin $pK_{a,2}$	7,66	0,02	7,68	0,02	0,02
Nifedipin	2,33	0,05	2,36	0,07	0,03
Asztemizol $pK_{a,1}$	5,81	0,01	5,76	0,04	-0,05
Papaverin	6,47	0,02	6,47	0,01	0,00
Ketokonazol $pK_{a,2}$	6,18	0,08	6,05	0,05	-0,13
Diazepám	3,41	0,02	3,26	0,03	-0,15
Ketokonazol $pK_{a,1}$	3,28	0,02	3,15	0,03	-0,13
Kodein	8,24	0,03	8,23	0,02	-0,01
Benzokain	2,54	0,02	2,13	0,05	-0,41
Asztemizol $pK_{a,2}$	8,53	0,06	8,08	0,08	-0,45
Klozapin $pK_{a,1}$	3,99	0,02	3,45	0,07	-0,54
Loratadin	5,26	0,02	4,14	0,02	-1,12
Dipiridamol	6,20	0,02	6,13	0,03	-0,07

hogy elősegítheti a megfelelő *per os* formulációk kiválasztását az in vivo állatkísérletekhez, oly módon, hogy segítséget nyújt a biohasznosulás javításához legalkalmasabb CD származék kiválasztásában, valamint a CD-gyógyszer arány beállításában.

A módszer előnyeként kiemeljük, hogy nagy érzékenységgel, minimális anyagmennyiségből, nagy áteresztőképességgel képes adatokat szolgáltatni, illetve multiprotikus vegyületek esetében arról is információt nyújthat, hogy a komplexképzés a molekula melyik szerkezeti részét érintette. Természetesen a kialakuló komplex egzakt szerkezetének megállapítására a szükséges a nagyműszeres technikák (pl. NMR) alkalmazása, és habár ezek a módszerek szolgáltatják a legpontosabb információt, számos hátránnyal rendelkeznek a szűrési módszerrel szemben (az NMR-pH-titrálás kivitelezése nehézkes, jelentősen nagyobb mintamennyiséget, és időt vesz igénybe, így áteresztőképessége kicsi).

Köszönetnyilvánítás

A levelező szerző köszönettel tartozik a Richter Gedeon Nyrt. Kutatási Igazgatóságának korábbi és jelenlegi menedzsmentjéből Dr. Greiner Istvánnak és Dr. Keszérü György Miklósnak, akik rábízták és szakmai tanácsokkal segítettek a fizikai-kémiai alapú gyógyszerkémiai támogató tevékenység kialakítását, illetve Dr. Takácsné Dr. Novák Krisztina professzorasszonynak, aki az első években segítette a gyógyszerek fizikai-kémiájának mélyebb megismerésében. A szerzők köszönettel tartoznak Dr. Sente Lajosnak és Dr. Sohajda Tamásnak, akik tanácsaikkal segítettek ciklodextrinokkal végzett vizsgálatokat, illetve a CycloLab Kft-nek az ciklodextrin származékok biztosításáért.

Hivatkozások

- Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P.; Crison, J.R.; *Pharm. Res.* **1995**, *12* (3), 413-420.
- Brewster, M. E.; Másson, M.; Loftsson, T. *Am. J. Drug Delivery*. **2004**, *2* (4), 1-15.
- Biwer, A.; Antranikian, G.; Heinzle, E. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2002**, *59*, 609-617.
- Sente, L.; Szemán, J. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8024-8030.
- Sente, L.; Szejtli, J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, *36*, 17-28.
- CycloLab, *CD News* **2013**, *27* (2), 1-16.
- Brewster, M. E.; Davis, M.E. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 1023-1035.
- Miller, L. A.; Ahmed, I.; Carrier, R. L. *J. Controlled Release*. **2007**, *123*, 78-99.
- Iglesias, E.; Brandariz, I. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 3050-3063.
- Chen, Z.; Lu, D.; Weber, S. G. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 229-238.
- Avdeef, A. *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State (2nd Edition)*, Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, **2012**
- Kép: <http://www.sirius-analytical.com/resource-library/literature/brochures>
- Vargas-Hernández, C.; Vidal Salgado, L. E. *Am. J. Anal. Chem.* **2014**, *5*, 1290-1301.
- Holzgabe, U.; Kahle, C. *Chirality*. **2004**, *16*, 509-515.
- Dahab, A. A. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 6624-6637.

pH-metric titration as a versatile tool for physico-chemical based medicinal chemistry: study on the cyclodextrin complexation of drugs using (fast) UV-pH titration

In the early 2000s the management of Gedeon Richter Plc. decided on establishing an independent research group for profiling the physicochemical properties of newly synthesized compounds. The main objective of this group was to create and fine-tune methods for measurement of physicochemical properties which prior to that originated from *in silico* estimations only. As a result, adequate techniques were designed in order to measure the proton dissociation constant (pK_a) and lipophilicity ($\log P/D_{pH}$) by potentiometric and UV-pH-metric titrations, kinetic and thermodynamic solubility and chemical stability using 96-well plate-based methods and permeability using the 96-well sandwich plate-based PAMPA™ technique. During the creation of these methods we had to take into consideration that only miniscule amounts of compounds are available from molecules with diverse chemical structure, moreover we had to be able to provide information about numerous compounds within narrow time intervals. This article focuses on development of potentiometric and UV-pH-metric titration techniques which are widely spread methods for measuring physicochemical properties in the pharmaceutical industry.

In recent years the few monopolistic suppliers of instruments for potentiometric and UV-pH-titrations made significant improvements on their techniques in order to improve the classical pK_a and $\log P/D$ measurements and expand the applicability of potentiometric titration for solubility measurements also. Sirius Analytical Inc. improved their former GlpKa instrument creating Sirius T3™ by reducing the amount of required sample and the titration volume by an order of magnitude and by shortening the time of measurements using a fully automated sample handling and reagent dosing system (Figure 1.). In addition, a new, potentiometric-based method was developed for measuring solubility values thus significantly reducing the time of classical solubility measurements. As a result, SiriusT3™ became a convenient tool for physicochemical characterisation of drugs that can satisfy the need for high-throughput methods in pharmaceutical drug development.

Absorption of orally administered drugs mainly depends on their solubility and permeability. Based on these physicochemical parameters APIs can be categorized into the four classes of the Biopharmaceuticals Classification System (BCS). The absorption rate of the API is limited by different aspects in each class. (Table 1.) Bioavailability of APIs in BCS classes II and IV might be increased by improving their solubility through complexation with cyclodextrins (CDs).

CDs are cyclic oligosaccharides bonding into a toroid structure which is capable of forming inclusion complexes with hydrophobic moieties of drugs due to its apolar interior cavity. Besides, the hydrophilic external surface of the toroid ensures good aqueous solubility thus increasing the solubility of complexed APIs. Depending on the number of glucose units in the toroid CDs can form host-guest complexes with molecules of various sizes. Due to these prosperous properties CDs and their derivatives are widely used in pharmaceutical products. Several cases have been already reported where CDs were successfully used for improving bioavailability (Table 2.).

For studying complexation with CDs we used UV-pH-titration that combines UV-vis spectroscopy with potentiometric titration. Using UV-pH titration we can determine the pK_a values of the APIs from pH-dependent absorbance changes. Adding CDs to the medium and monitoring the changes in pK_a values due to complexation the determined apparent pK_a values ($pK_{a,app}$) can help us to identify the CD derivatives capable of complexation with the APIs. By applying different concentrations of CD the strength of the complex can be determined also. Our goal was to establish a fast and screening-like testing method that can be easily used for this purpose.

Using the built-in Fast UV-pH assay of SiriusT3™ instrument we were able to create a screening method where using 300 μ l of CD stock solution the presence or absence of complexation can be detected. Table 4. contains the results of our tests for complexation with HPBCD. In several cases significant changes could be detected in the pK_a values, suggesting the presence of CD-API complexes. In the case of APIs with more than one pK_a value the extent of the changes were different for each pK_a value. Based on this we can determine which part of the molecule entered the CD cavity and which part is located outside of the toroid. According to the data it can be concluded that pK_a values belonging to basic groups undergo a negative change in pK_a while those of acidic groups show a positive change in pK_a value. This is in agreement with the fact that complexation diminishes proton-dissociation, hence decreasing the acidic or alkaline character of the groups. In few cases the change was opposite to the expected which might be explained by steric inhibition of protonation of which there are already examples in the literature.¹⁵

The established testing method can be used in practice for determining the adequate CD derivate and CD-API ratio for the *per os* formulations for in vivo animal testing. We can highlight that the method can provide information with high sensitivity from numerous samples using only miniscule amounts of samples and might also provide structural information. However, it should be noted that for exact structural identification of the host-guest complexes using high resolution techniques (e.g. NMR) might be necessary, albeit they have several disadvantages compared to the screening method.