



Universitat de Barcelona
Facultat de Química
Departament de Química Analítica

Caracterització de membranes artificials. Mesura de la seva aptitud per a estimar propietats biològiques

Elisabet Lázaro Mallén

Directors: Dr. Martí Rosés i Pascual, Dra. Clara Ràfols i Llach

Memòria presentada per a optar al grau de Doctora per la

Universitat de Barcelona

Programa de doctorat: Química analítica del medi ambient i

la pol·lució (bienni 2003-2005)

Barcelona, abril de 2009

Martí Rosés i Pascual, Catedràtic del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, i Clara Ràfols i Llach, Professora Titular del mateix Departament,

FAN CONSTAR

Que la present memòria, que porta per títol "Caracterització de membranes artificials. Mesura de la seva aptitud per a estimar propietats biològiques", ha estat realitzada sota la nostra direcció per la Sra. Elisabet Lázaro Mallén al Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona i que tots els resultats presentats són fruit de la recerca realitzada per l'esmentada doctoranda.

Barcelona, abril de 2009

Dr. Martí Rosés i Pascual

Dra. Clara Ràfols i Llach

Para mis padres y hermanos

I a l'Ignasi, sempre al meu costat

Agraïments

Finalment, després de molts anys, una etapa de la meua vida s'acaba. Sembla que faci segles des del primer dia que vaig trepitjar el laboratori, inexperta i insegura. La meua intenció era realitzar un màster experimental i prou, però un cop dintre d'aquest món, i com els hi passa a tants d'altres, vaig continuar amb la tesi. Ara sóc una persona diferent de la que era llavors, per la formació que he rebut, per tot el que he après en el dia a dia, per la gent que m'ha envoltat. I per tot això, vull donar les gràcies.

En primer lloc vull agrair als meus directors de tesi, el Dr. Martí Rosés i la Dra. Clara Ràfols, l'oportunitat de realitzar aquest treball sota la seva direcció. Els hi vull donar les gràcies pels seus consells, per la seva guia i per les seves correccions. Sense ells, avui aquesta memòria no estaria escrita.

En segon lloc li vull agrair a la Dra. Elisabeth Bosch la possibilitat de pertànyer al seu grup de recerca. Sempre m'he sentit molt ben acollida. Gràcies també per la seva col·laboració en aquesta última part de la tesi, de la mesura de la polaritat. Però gràcies, per damunt de tot, per les xerrades compartides i l'interès que sempre ha mostrat per mi, demostrant-me que a més de científica, és una gran persona.

Vull donar també les gràcies al Dr. Josep Lluís Torres del CSIC per confiar en mi i proposar-me una col·laboració amb ell. Gràcies a tots els membres del seu grup que van fer les meves estades allà molt més entretingudes. I en especial a Jose Antonio Castillo, que va tenir una infinita paciència per ensenyar-me tot el que sabia sobre els liposomes. I no podia oblidar-me de l'Amelia López, qui em va fer tots els anàlisis DSC, sempre tan servicial i bona persona.

A més de treballar a la UB i al CSIC, una part de la meva tesi també es va realitzar a Novartis (Basel, Suïssa). Vull agrair al Dr. Bernard Faller que m'acceptés al seu grup i m'assignés un projecte tan atractiu, així també com les llargues discussions de resultats que vam mantenir, i de les que tantes coses vaig aprendre d'ell. Vull agrair també la inestimable ajuda de Phil Lowe, sense ell encara m'estaria barallant amb les equacions diferencials. Moltes gràcies a Xavier Briand per fer-me la vida allà més fàcil i ensenyar-me fins l'últim detall del dia a dia al laboratori. I per suposat, gràcies als meus companys (Heloise, Daniel, Gaele, Norbert, Sophie, Soulonge, Sabine) per brindar-me la seva amistat i fer de la meva estada a Novartis una experiència inoblidable.

Arriba el moment d'agrair tantes i tantes bones estones compartides amb la gent del laboratori, i ara és quan segur que em deixo algú (i espero que em perdoni), però després de tants anys és inevitable... Gràcies als companys de ISS: Eli, Rebe, Jose Manuel, Xavi, Alberto, Txell, Vasco, Leo, Carme, Adolfo, Juanma, Marta, Elham i als de BioA: Cristian, Balbina, Lali, Beni, Elvira, Estela, Elena, Pilu, Cris, Marta, Sandra... per tots aquests moments, per les rises, per fer la feina de cada dia molt més amena. Gràcies en especial a la Gemma per les llargues converses i per les confidències, ella sap que és més que una companya de laboratori. I per últim a la persona que va compartir amb mi els inicis del Shimi, evidentment parlo d'en Pere. Moltes gràcies per ajudar-me sempre que ho he necessitat, tant professional com personalment, pels "cotilleos", pels consells, però sobretot, per ser el meu amic (sempre deies que no et perdries la meva tesi... espero que puguis venir!!).

Deixant de banda el món estrictament lligat al laboratori, també hi ha molta gent al meu voltant que m'ha donat suport tots aquests anys i han confiat en mi, sense dubtar que aquest dia havia d'arribar. Gràcies a Maria i Núria, per continuar sent aquí encara que els anys passin i no deixar que es

perdi el contacte del tot. Cadascuna ha seguit camins professionals diferents després de la carrera però això ens enriqueix a les nostres trobades. Moltes gràcies a Silvia, la Cochi, encara que no sabia molt bé on "classificar-te!!". Vam començar alhora el màster al mateix laboratori, però la nostra relació realment no va començar fins que no vas marxar d'aquí. Ànims per la teva tesi, ja veuràs com un dia o altre tot s'acaba, i encara que la mala sort et persegueix, estic segura que tu també ho aconseguiràs! Hem compartit i ho seguim fent, moltes penes i alegries i espero que ho continuem fent tota la vida. Gràcies als amics del cole: Mónica, espero que continuem compartint tots els diumenges a la tarda del món i que una amistat tant forta com la nostra no s'acabi mai. Als "pocheros" els hi vull agrair les bones estones que em fan passar i que m'oblidi dels problemes quotidians. Magda, encara que no ens veiem gaire sovint últimament, saps que sempre penso en tu i et tinc present. Massa coses hem compartit com per oblidar-me de tu! I Àgata, la meva amiga de l'ànima, companya de pis, coautora de la nostra novel·la, artista, i bellíssima persona. No puc expressar prou bé el que voldria dir, però tu ja ho saps, oi? Moltes gràcies per TOT :)

Muchas gracias a mi familia, a mis padres y hermanos, que siempre están a mi lado, incondicionalmente. Gracias por su apoyo, y por creer en mí. Sé que allí estarán, en primera fila, el día que presente este trabajo. I gràcies a la "nova" família, als sogres i als cunyats, per mostrar-me des del primer dia el seu interès en la feina que estava fent.

I per últim, però no menys important (sinó al contrari), un milió de gràcies a l'Ignasi, que ha canviat la meva vida. Per cuidar-me, per estimar-me, per estar al meu costat sempre, per deixar-ho tot de banda i seguir-me a Suïssa. Per ajudar-me al màxim quan havia de posar-me a escriure la tesi i em feia mandra. Amor, gràcies per voler compartir la teva vida amb mi.

Abreviatures i acrònims

a	Basicitat per pont d'hidrogen del medi Pendent d'una recta
A	Acidesa del solut per pont d'hidrogen Àrea superficial accessible del filtre en un assaig PAMPA
ACN	Acetonitril
AMCys-Ec	4 β -(S-(N-acetil-O-metil-cisteinil)epicatequina
a_u	Coefficient LSER a normalitzat
b	Acidesa per pont d'hidrogen del medi Ordenada a l'origen d'una recta
B	Basicitat del solut per pont d'hidrogen
BBB	Barrera hematoencefàlica
b_u	Coefficient LSER b normalitzat
c	Constant de la correlació
C18	Fase estacionària d'octadecilsilà
C_A	Concentració del solut en el compartiment acceptor
C_D	Concentració del solut en el compartiment donador
C_{eq}	Concentració teòrica del solut quan s'arriba a l'equilibri en un assaig PAMPA
C_M	Concentració del solut retingut a la membrana
C_{nar}	Narcosi de cap-grossos
<i>Complex</i>	Complex fàrmac-albúmina
$\cos \theta_{ij}$	Cosinus de l'angle que formen els vectors LSER

Cya-Ec	4 β -(2-aminoetil)epicatequina
Cys-Ec	4 β -(S-cisteinil)epicatequina
d	Distància entre dos vectors LSER normalitzats
δ	Constant que relaciona diferents escales de pH (${}^s_w pH$ i ${}^s_s pH$)
D'	Distància entre dos vectors LSER
D_{hxd}	Coefficient de distribució hexadecà-aigua
D_{mem}	Coefficient de distribució de qualsevol tipus de membrana
D_{oct}	Coefficient de distribució octanol-aigua
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DSC	Calorimetria d'escaneig diferencial
$\Delta T_{1/2}$	Amplitud a mitja alçada del pic de transició entre fases d'un liposoma
e	Capacitat del medi per interaccionar amb els electrons $-n$ i $-\pi$ del solut
E	Refractivitat molar en excés
Ec	(-)-Epicatequina
Ecys-Ec	4 β -(S-(O-etil-cisteinil)epicatequina
$E_T(30)$	Paràmetre de polaritat de Dimroth-Reichardt
E_{Tm}^N	Paràmetre de polaritat de la fase mòbil de Dimroth-Reichardt normalitzat
E_{Ts}^N	Paràmetre de polaritat de la fase estacionària de Dimroth-Reichardt normalitzat
e_u	Coefficient LSER e normalitzat
ϕ	Fracció de volum en tant per u de solvent orgànic a la fase mòbil
F	Paràmetre estadístic F de Fisher
F_c	Cabal de la fase mòbil
HIA	Absorció intestinal humana
HPLC	Cromatografia de líquids d'alta resolució
HSA	Albúmina humana

IAM	Membrana artificial immobilitzada
IUPAC	Unió internacional de química pura i aplicada
IUVs	Vesícules unilamel·lars intermèdies
k	Factor de retenció
K_a	Constant d'acidesa
K_d	Constant d'enllaç albúmina-fàrmac
K_h	Coefficient de distribució en un assaig PAMPA, englobant la retenció del compost a la membrana i l'adsorció no específica a les parets dels compartiments
k_i	Factor de retenció d'un determinat tipus i de silanols
$K_{Na^+}^{Li^+}$	Coefficient de selectivitat del catió liti respecte el catió sodi
k_{off}	Constant de dissociació
k_{on}	Constant d'associació
K_p	Permeació a través de la pell humana
K_{sc}	Partició a la pell humana
l	Longitud d'un vector
L_α	Fase cristall-líquid d'un liposoma
L_β	Fase gel d'un liposoma
LC-MS/MS	Cromatografia de líquids acoblada a un espectròmetre de masses en tàndem
$(\log k)_0$	Constant del model de polaritat per a un determinat sistema columna-solvent orgànic
LSER	Relacions lineals de l'energia lliure de solvatació
LUVs	Vesícules unilamel·lars grans
m	Nombre de diferents tipus de silanols presents a una columna
MLVs	Vesícules multilamel·lars
n	Nombre de punts de la correlació
n_i	Nombre total d'un determinat tipus i de silanols
ρ	Paràmetre de polaritat del solut
P_a	Permeabilitat aparent en un assaig PAMPA

PAMPA	Assaig de permeabilitat a través d'una membrana artificial
PCA	Anàlisi per components principals
P_m^N	Paràmetre de polaritat de la fase mòbil normalitzat
P_{oct}	Coefficient de partició octanol/aigua
P_s^N	Paràmetre de polaritat de la fase estacionària normalitzat
q	Constant del model de polaritat per un determinat sistema columna-solvent orgànic
QSAR	Relacions quantitatives estructura-activitat
r	Coefficient de correlació
s	Capacitat del medi per establir interaccions dipol-dipol i dipol-dipol induït
S	Dipolaritat/polaritzabilitat del solut
SD	Desviació estàndard
SDS	Dodecilsulfat de sodi
SP	Propietat d'interès d'un solut
${}_s pH$	pH mesurat en una fase hidroorgànica amb un elèctrode calibrat amb tampons hidroorgànics
${}_s pK_a$	Acidesa dels silanols mesurada en una escala de ${}_s pH$
S_u	Coefficient LSER s normalitzat
SUVs	Vesícules unilamel·lars petites
${}_w pH$	pH mesurat en una fase hidroorgànica amb un elèctrode calibrat amb tampons aquosos
t	Temps
t_M	Temps mort
T_m	Temperatura de transició entre fases d'un liposoma
t_R	Temps de retenció
V	Hidrofobicitat del medi
V	Volum de McGowan
V_A	Volum del compartiment acceptor
V_D	Volum del compartiment donador

V_M	Volum de membrana
v_u	Coefficient LSER v normalitzat
\vec{w}	Vector de coeficients LSER
\vec{W}	Vector de descriptors LSER del solut
\vec{w}_u	Vector de coeficients LSER normalitzats

Índex

Objectiu	1
1. Introducció	5
1.1. Avaluació de les interaccions fàrmac - membrana	7
1.2. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)	13
1.2.1. Caracterització de l'acidesa de fases estacionàries	14
1.2.2. Model de polaritat	17
1.2.3. Model LSER (Relacions lineals de l'energia lliure de solvatació) ...	19
1.2.3.1. Model LSER global	21
1.3. Modelació de sistemes biològics per sistemes físico-químics	23
1.3.1. Estimació de processos biològics a partir de relacions LSER.....	24
1.4. Assaig de permeabilitat a través d'una membrana artificial (PAMPA). 29	
1.5. Liposomes	35
1.5.1. Calorimetria d'escaneig diferencial (DSC).....	37

2. Publicacions	41
Article 1. " <i>Characterization of the acidity of residual silanol groups in immobilized artificial membranes</i> "	45
Article 2. " <i>Chromatographic estimation of drug disposition properties by means of immobilized artificial membranes (IAM) and C18 columns</i> "	49
Article 3. " <i>Characterization of immobilized artificial membrane (IAM) and XTerra columns by means of chromatographic models</i> "	59
Article 4. " <i>Prediction of retention in reversed phase liquid chromatography by means of the polarity parameter model</i> "	71
Article 5. " <i>New approach to measure protein binding based on a parallel artificial membrane assay and human serum albumin</i> "	99
Article 6. " <i>Interaction of antioxidant biobased epicatechin conjugates with biomembrane models</i> "	109
3. Resultats i discussió	115
3.1. Caracterització de sistemes de cromatografia de líquids	117
3.1.1. Caracterització de l'acidesa d'una columna IAM	117
3.1.2. Caracterització de sistemes cromatogràfics mitjançant el model LSER.....	124
3.1.3. Caracterització de sistemes cromatogràfics mitjançant el model LSER global i el model de polaritat	129
3.1.4. Predicció de la retenció cromatogràfica mitjançant el model de polaritat.....	136
3.2. Estimació de propietats biològiques a partir de sistemes de cromatografia de líquids	141
3.2.1. Exemples de diferents propietats modelades per sistemes cromatogràfics	144
3.3. Determinació de la constant d'enllaç albúmina-fàrmac	147

3.4. Avaluació de la interacció de derivats de l'epicatequina amb liposomes de DPPC	157
3.4.1. Estudi calorimètric dels liposomes	158
3.4.2. Retenció cromatogràfica dels derivats d'epicatequina en una columna IAM	161
4. Conclusions	163
Referències	169

Objectiu

L'objectiu d'aquesta tesi doctoral ha estat l'estudi i caracterització de membranes artificials de diversa naturalesa, utilitzant diferents tècniques analítiques que ens proporcionessin informació de com els compostos es comportaven davant de les membranes. Un cop que estiguessin caracteritzades es pretenia determinar la seva capacitat per modelar propietats biològiques, de manera que es poguessin conèixer alguns d'aquests paràmetres sense necessitat de mesurar-los experimentalment.

Introducció

1.1. Avaluació de les interaccions fàrmac-membrana

En el procés de desenvolupament de nous fàrmacs l'avaluació de la interacció entre fàrmac i membrana és un pas crític, perquè la seva activitat, toxicitat, distribució i absorció depenen de la seva partició a través de diferents membranes (com l'intestinal, la pell o la barrera hematoencefàlica)¹⁻³. Encara que un fàrmac tingui un gran potencial en estudis *in vitro* no podrà ser efectiu si no arriba al lloc on ha d'actuar. Per tant, conèixer el seu comportament farmacocinètic és clau, en particular els processos d'absorció i distribució. El problema radica en portar a terme experiments amb sistemes biològics, ja que sovint pot resultar difícil per raons tècniques i ètiques, a més de comportar un elevat cost econòmic. Per aquesta raó va sorgir la necessitat de trobar models capaços de predir el comportament de compostos en sistemes biològics, amb l'objectiu d'estalviar temps i diners en les primeres etapes de desenvolupament del fàrmac.

La lipofilitat, expressada pel coeficient de partició octanol/aigua ($\log P_{\text{oct}}$), s'ha considerat tot sovint un paràmetre decisiu per modelar la difusió passiva^{4,5}. No obstant, la biodistribució de compostos d'estructura complexa, com són molts fàrmacs, no sempre resulta ben explicada per aquest coeficient⁶, degut a que els processos de distribució en sistemes biològics són significativament més complexos que els típics sistemes de partició químics.

L'assaig de permeabilitat a través d'una membrana artificial (PAMPA) també ha estat utilitzat per mesurar la permeabilitat passiva⁷⁻¹⁰, amb l'objectiu de predir l'absorció oral de nous fàrmacs, obtenint excel·lents resultats. En aquest cas no es basa en la partició octanol/aigua sinó que s'utilitza un altre solvent orgànic, l'hexadecà, per formar una membrana artificial situada entre dos compartiments aquosos que els compostos creuen o no en funció de la seva lipofilitat.

Un altre sistema utilitzat àmpliament per avaluar la interacció fàrmac-membrana són els liposomes. Preparats a partir de fosfolípids, presenten una estructura similar a la bicapa fosfolipídica que conforma les membranes cel·lulars.

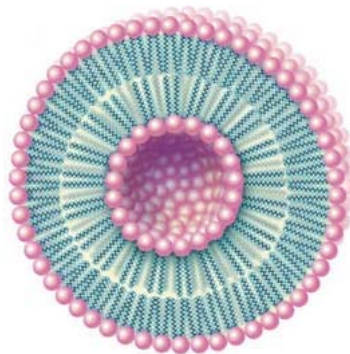


Figura 1.1. Estructura d'un liposoma

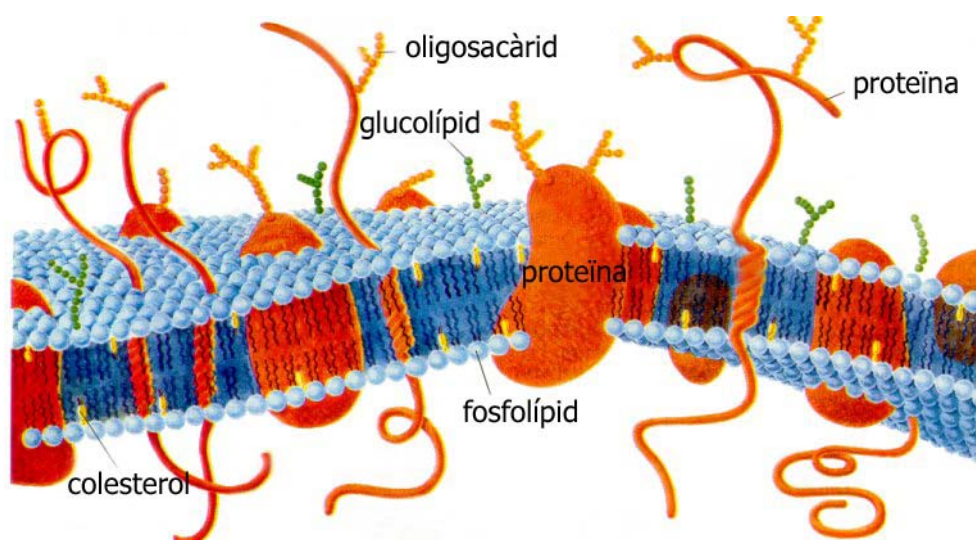


Figura 1.2. Estructura d'una membrana cel·lular

Tot i que les cèl·lules presenten més elements a les seves membranes (com proteïnes, colesterol, sucres, etc.) l'estructura bàsica és molt similar a la dels liposomes, ja que en els dos casos els fosfolípids formen una bicapa enfrontant les cadenes apolars i deixant els caps polars cap a l'interior i exterior en contacte amb medis aquosos, tal i com es veu a les figures 1.1 i 1.2.

Diversos estudis QSAR (Relacions Quantitatives Estructura-Activitat) realitzats demostren l'utilitat del coeficient de partició dels liposomes per modelar la partició en membranes cel·lulars, proporcionant bones correlacions amb l'activitat dels fàrmacs¹¹⁻¹³. Però aquesta tècnica també presenta les seves limitacions, degut a la dificultat de la preparació dels liposomes, l'equilibració del solut a la suspensió del liposoma, la quantificació del solut lliure en presència dels liposomes, etc. El procés és llarg i tediós, i això impedeix que la tècnica s'apliqui a gran escala.

Basant-se en la mateixa idea d'emprar els principals constituents de la membrana cel·lular, els fosfolípids, va sorgir la cromatografia de membrana artificial immobilitzada (IAM), desenvolupada per Pidgeon i Venkataram a finals dels anys 80¹⁴.

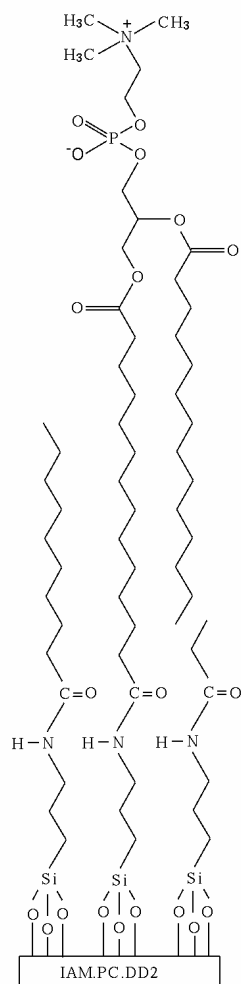


Figura 1.3. Estructura d'una columna IAM

La fase estacionària IAM (Figura 1.3) es prepara enllaçant covalentment molècules de fosfatidilcolina a la sílice, formant en aquest cas una monocapa de fosfolípids, en lloc de la bicapa de les membranes. La sílice està desactivada (*endcapped*) amb cadenes alquíliques C10 i C3 mitjançant enllaços amida, per evitar interaccions no desitjades. De totes maneres, a causa de l'impediment estèric, queden alguns grups propilamino lliures que donen a la columna IAM una certa basicitat¹⁵.

L'objectiu d'aquesta nova tècnica era obtenir prediccions ràpides i precises de la distribució de fàrmacs en sistemes biològics a partir de les mesures de retenció en cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC). Durant els últims anys s'han intentat trobar varies correlacions entre el factor de retenció en columnes IAM i diferents paràmetres biològics, com són l'absorció intestinal en rates^{16,17}, la permeabilitat i participació a través de la pell^{18,19}, o a través de la barrera hematoencefàlica^{20,21}. Es van obtenir bones correlacions en alguns casos i en altres no tant, o només limitades a petits grups de fàrmacs homòlegs. Però és una tècnica amb un gran potencial, i es continua estudiant i treballant amb ella.

Durant tota la meva tesis he anat treballant amb les tècniques fins ara esmentades. A continuació parlaré amb més detall del fonament de cadascuna d'elles i dels models teòrics que vaig aplicar durant el seu estudi.

1.2. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

La cromatografia líquida d'alta resolució és una tècnica de separació basada en la diferent distribució dels components d'una mescla entre una fase mòbil i una fase estacionària. Les fases són escollides de tal forma que els soluts es distribueixen de diferent manera entre elles. És a dir, o tenen més tendència a quedar retinguts a la fase estacionària, o tenen més tendència a ser eluïts per la fase mòbil. A conseqüència de la seva diferent mobilitat, els components de la mescla se separen en bandes (pics cromatogràfics) que poden analitzar-se qualitativament i/o quantitativament²².

El factor de retenció (k) és un paràmetre important que s'utilitza freqüentment per descriure les velocitats de migració dels soluts a les columnes. Es pot definir com:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

El temps de retenció (t_R) és el temps que triga qualsevol solut en arribar al detector des del moment en que és injectat, mentre que el temps mort (t_M) és el temps necessari perquè un compost que no es retengui en absolut a la fase estacionària arribi fins al detector.

Quan treballes amb cromatografia de líquids és molt important conèixer les propietats de les fases implicades en el procés de transferència per poder escollir les millors condicions de treball. D'aquesta manera, part de l'estudi realitzat està dedicat a la caracterització de fases estacionàries mitjançant diferents models, sent una d'elles la columna IAM.

1.2.1. Caracterització de l'acidesa de fases estacionàries

La sílice és el suport més emprat per fabricar fases estacionàries degut a la seva facilitat per enllaçar amb diferents components, a més de les seves propietats físiques i mecàniques. Malgrat això també presenta alguns desavantatges, especialment en l'anàlisi de substàncies bàsiques que interaccionen fortament amb els grups silanols lliures. És freqüent observar en els pics cromatogràfics de compostos bàsics una baixa eficàcia de la columna, pics asimètrics, o augment de la retenció, deguts a una interacció amb el suport més que amb la fase estacionària²³.

S'han portat a terme diversos estudis per bloquejar o eliminar el nombre de silanols residuals, o si més no disminuir la seva quantitat, com són l'*endcapping*, el pretractament de la sílice, o l'ús de sílices híbrides (formades per sílice i metilsiloxans)²⁴⁻²⁶. Tot i així continuen quedant silanols residuals a la superfície, en menor o major grau depenent de la columna^{27,28}. Aquests silanols poden ser de diferents tipus: aïllats, geminals o veïnals (Figura 1.4) i poden interaccionar entre ells per donar diferents estructures.

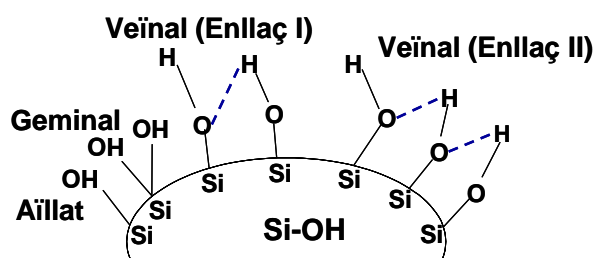
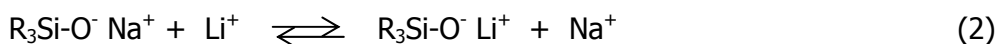


Figura 1.4. Silanols residuals lliures a la superfície de la sílice.

S'han realitzat diversos estudis per determinar la interacció dels soluts amb la sílice²⁹. Molts d'aquests models estan basats en la retenció d'amines, però no hi ha cap acceptat universalment ja que els resultats depenen fortament del solut emprat²⁹⁻³¹. A més, aquests compostos tendeixen a ser voluminosos, fent difícil el seu accés als porus més petits de la sílice i interaccionant també amb la fase estacionària, no només amb el suport, degut a la seva hidrofobicitat.

El mètode que nosaltres fem servir per caracteritzar l'acidesa de la sílice de la columna IAM està basat en la variació de la retenció d'un compost iònic (nitrat de liti) en funció de la variació del pH d'una fase mòbil iònica^{27,28}. El liti, a diferència de les amines, només experimenta interacció amb el suport per intercanvi iònic, i pot accedir als porus més petits degut a la seva grandària. Els cations sodi de la fase mòbil queden retinguts als silanols ionitzats, i s'intercanvien pels ions liti quan són injectats:



El nitrat no queda retingut pels silanols carregats negativament, pel que podem associar el seu temps de retenció amb el temps mort. En el cas que la columna presenti silanols lliures l'injecció del nitrat de liti ens donarà dos pics separats, degut a la major retenció del liti. Si els dos pics estan

solapats mostrant un únic pic, ens indica que no hi ha silanols lliures en aquella columna i per a aquell pH de treball. A mesura que augmentem el pH de la fase mòbil els silanols es van desprotonant i retenint el liti, depenent del seu pK_{ai} .

L'acidesa dels silanols (pK_{ai}) i la seva abundància (k_i) es calculen a través de la següent equació²⁸, per ajust de les dades experimentals (k) al pH de les solucions de treball:

$$k = \sum_{i=1}^m \left(\frac{k_i}{1 + 10^{pK_{ai} - pH}} \right) \quad (3)$$

on k és el factor de retenció de l'ió liti i k_i és la màxima retenció que es pot aconseguir per a un tipus específic i de silanols amb acidesa pK_{ai} . Aquest paràmetre k_i es defineix amb la següent equació:

$$k_i = \frac{K_{Na^+}^{Li^+} n_i}{t_M [Na^+]_M F_c} \quad (4)$$

on $K_{Na^+}^{Li^+}$ és el coeficient de selectivitat del catió liti respecte al catió sodi, n_i és el nombre total de silanols de tipus i , t_M és el temps mort (o sigui el temps de retenció del nitrat), $[Na^+]_M$ és la concentració de cations sodi a la fase mòbil i F_c és el cabal de la fase mòbil.

Una sílice de bona qualitat serà aquella que tingui uns pK_{ai} elevats, ja que els silanols aguanten sense desprotonar-se en la major part de l'interval de pH de treball de la fase mòbil.

1.2.2. Model de polaritat

El model que relaciona la retenció amb la polaritat de la fase mòbil ha evolucionat al llarg del temps passant per diverses etapes. Inicialment es van demostrar relacions lineals en un ampli interval de composicions de fase mòbil entre el $\log k$ dels soluts i el paràmetre $E_{\tau}(30)$ (paràmetre de polaritat de Dimroth-Reichardt)^{32,33}. En la forma normalitzada d'aquest paràmetre, l'equació queda:

$$\log k = q + p E_{Tm}^N \quad (5)$$

A continuació es va observar que els coeficients q i p de soluts estudiats amb la mateixa fase estacionària i fase mòbil estaven interrelacionats, i per aquest motiu es va reescriure l'equació (5) per convertir-se en la següent:

$$\log k = (\log k)_0 + p(E_{Tm}^N - E_{Ts}^N) \quad (6)$$

on E_{Ts}^N és el paràmetre de polaritat normalitzat de la fase estacionària. De l'equació (6) es pot deduir que la retenció d'un solut vindria descrita per un paràmetre constant per a cada solut (p) i un paràmetre relacionat amb la fase mòbil (E_{Tm}^N). Els altres paràmetres $(\log k)_0$ i E_{Ts}^N són constants per a un determinat sistema columna-modificador orgànic.

El principal problema d'aquest model es que no es podia aplicar a totes les composicions de fase mòbil, la linealitat estava limitada a un determinat interval. Per aquest motiu Rosés i Bosch van modificar l'equació introduint un paràmetre nou de polaritat³⁴:

$$\log k = q + \rho P_m^N \quad (7)$$

on el paràmetre P_m^N es defineix mitjançant les següents relacions empíriques:

$$P_m^N = 1.00 - \frac{2.13\phi}{1.00 + 1.42\phi} \quad (8)$$

$$P_m^N = 1.00 - \frac{1.33\phi}{1.00 + 0.47\phi} \quad (9)$$

per a acetonitril i metanol respectivament. ϕ és la fracció de volum en tant per u de solvent orgànic a la fase mòbil.

Els paràmetres ρ i q estan relacionats linealment segons la següent equació:

$$q = (\log k)_0 - \rho P_s^N \quad (10)$$

Substituint l'equació (10) a l'equació (7) s'obté una equació similar a la (6), funció d'un paràmetre del solut, altre de la fase mòbil, i dos constants del sistema:

$$\log k = (\log k)_0 + \rho (P_m^N - P_s^N) \quad (11)$$

on P_s^N és el paràmetre de polaritat de la fase estacionària. Aquest model ha estat comprovat per Rosés i Bosch en tot l'interval de composicions de fases mòbils acetonitril/aigua i metanol/aigua amb diferents columnes C18 obtenint bones correlacions³⁵⁻³⁷.

1.2.3. Model LSER (Relacions lineals de l'energia lliure de solvatació)

El model LSER es basa en la correlació de qualsevol propietat d'interès (relacionada linealment amb l'energia lliure de solvatació) amb propietats moleculars del dissolvent o dels soluts que participen en el procés³⁸. Aquest model es pot aplicar a una propietat físico-química (coeficient de partició octanol-aigua (P_{oct}), factor de retenció en HPLC (k)...) o a una propietat biològica o toxicològica (barrera hematoencefàlica (BBB), factors de toxicitat...) ³⁹⁻⁴¹.

El logaritme de la propietat d'interès es pot correlacionar linealment amb propietats moleculars del solut representades a través dels descriptors moleculars segons l'equació (12), que descriu la transferència d'un solut entre dues fases condensades:

$$\log SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (12)$$

on SP és la propietat d'interès, en el nostre cas el factor de retenció (k).

Les propietats representades pels descriptors són les següents:

- La refractivitat molar en excés ve representada pel terme de polaritzabilitat E , que mesura la capacitat del solut per interaccionar amb el medi mitjançant els seus electrons $-n$ o $-\pi$ per interaccions de dispersió tipus dipol induït - dipol induït entre el solut i el dissolvent.

- El terme S avalua la dipolaritat i la polaritzabilitat conjuntament perquè no és possible separar les dues contribucions. Mesura la capacitat del solut per interaccionar amb el dissolvent mitjançant interaccions dipol - dipol i dipol - dipol induït.
- El descriptor V representa el volum característic de McGowan del solut.
- L'acidesa i basicitat per pont d'hidrogen venen representades pels termes A i B respectivament.

Els coeficients de l'equació (12) reflecteixen les diferències entre les dues fases implicades en el procés de transferència respecte la propietat del descriptor al que estan multiplicant. El coeficient e representa la diferència de capacitat que tenen la fase mòbil i estacionària per interaccionar amb els electrons $-n$ o $-\pi$ del solut. El coeficient s indica la diferència entre aquestes fases quan interactuen amb el solut a través de dipol-dipol i dipol-dipol induït. Els coeficients a i b mesuren la diferència en basicitat i acidesa del medi per pont d'hidrogen, respectivament. Per últim, el coeficient v ens informa de la diferència en hidrofobicitat de les dues fases.

Aquests coeficients, i la constant (c), es calculen mitjançant una regressió multilineal dels logaritmes experimentals de la propietat de interès d'una sèrie de soluts neutres i els seus corresponents descriptors. Un cop que els coeficients ja s'han calculat es pot predir aquella propietat per a qualsevol solut neutre de descriptors coneguts per a aquell mateix sistema (mateixa fase estacionària i composició de fase mòbil). En canvi, el model deixa de ser útil per a altres composicions de fase mòbil, i s'haurien de calcular novament els coeficients.

Per poder aplicar el model LSER és necessari conèixer els descriptors dels soluts. El volum de McGowan (V)⁴² i la refracció molar en excés (E)⁴³ es poden calcular directament a partir de l'estructura molecular del compost, però la dipolaritat/polaritzabilitat (S)⁴⁴ i acidesa i basicitat per pont d'hidrogen (A i B)^{38,45,46} s'han de determinar experimentalment. Una altra manera d'estimar aquests descriptors és mitjançant el programa de càlcul ABSOLVE que Abraham i col·laboradors van desenvolupar fa uns anys^{47,48}, encara que no és tan precís com les mesures experimentals.

1.2.3.1. Model LSER global

El principal desavantatge del model LSER és que només es pot aplicar a una composició de fase mòbil, pel que és necessari realitzar tantes correlacions com composicions es vulguin estudiar, implicant un gran volum de feina experimental. Per solventar aquest problema es va desenvolupar una equació que permet predir la retenció de soluts neutres de descriptors coneguts a múltiples composicions de fase mòbil⁴⁹. Si es considera que cadascun dels coeficients de l'equació (12) varia de forma lineal amb la composició de la fase mòbil, s'arriba a la següent relació:

$$\log k = (c_w - c_m\phi) + (e_w - e_m\phi)E + (s_w - s_m\phi)S + (a_w - a_m\phi)A + (b_w - b_m\phi)B + (v_w - v_m\phi)V \quad (13)$$

on ϕ és la fracció de volum en tant per u de modificador orgànic a la fase mòbil. Els coeficients d'aquesta expressió global s'obtenen de manera similar al model LSER clàssic, mitjançant una regressió multilíneal, i presenta l'avantatge que amb només 12 coeficients queden definides totes les composicions de fase mòbil per a una fase estacionària concreta,

estalviant moltes mesures experimentals respecte al model LSER clàssic, que requereix del càlcul de 6 coeficients per a cada composició diferent.

1.3. Modelació de sistemes biològics per sistemes físico-químics

L'equació (12) es pot aplicar a un gran nombre de processos. Per fer-ho, és necessari determinar experimentalment la propietat d'interès, sent en alguns casos un procés senzill (com el factor de retenció en cromatografia de líquids) i en altres casos força més complicat (com molts paràmetres biològics). A la taula 1.1 es troben representats exemples de coeficients LSER d'una sèrie de sistemes, extrets de la bibliografia.

Taula 1.1. Aplicació de l'equació LSER a diferents sistemes.

<i>Processos físico-químics</i>	<i>SP</i>	<i>e</i>	<i>s</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>v</i>	<i>Ref.</i>
Octanol-aigua	$\log P_{oct}$	0.56	-1.05	0.03	-3.46	3.81	40
Hexà-aigua	$\log P_{hx}$	0.58	-1.72	-3.60	-4.76	4.34	50
Columna C18-ACN/aigua	$\log k$	0.38	-0.63	-0.63	-2.10	2.27	51

Columna IAM-ACN/aigua	$\log k$	0.47	-0.34	0.10	-2.26	2.17	52
Liposomes-tampó aquós	$\log k$	0.60	-0.69	0.32	-3.12	3.01	53
SDS-tampó aquós	$\log k$	0.24	-0.30	-0.18	-1.85	2.98	54
Processos biològics							
Narcosi en capgrossos	$\log (1/C_{nar})$	0.77	-0.70	0.24	-2.59	3.34	55
Barrera hematoencefàlica	$\log BBB$	0.51	-0.89	-0.72	-0.67	0.86	56
Partició a la pell	$\log K_{sc}$	0.34	-0.21	-0.02	-2.18	1.85	19
Absorció intest.humana	$\log HIA^*$	-0.03	0.14	-0.41	-0.51	0.20	57

* $HIA = \ln[100/(100-\% Abs)]$

Els coeficients mostrats a la taula 1.1 són molt útils, ja que un cop ben caracteritzat el sistema, es pot predir la propietat d'interès de qualsevol solut (sempre i quan coneguem els seus descriptors) sense la necessitat de determinar-la experimentalment.

1.3.1. Estimació de processos biològics a partir de relacions LSER

Ja que la mateixa equació (12) es pot aplicar satisfactòriament a processos biològics i físico-químics, hauria de ser possible trobar correlacions entre els dos tipus de processos que permetrien estimar unes propietats a partir de les altres, més senzilles de determinar. En aquesta línia d'investigació diversos autors han estudiat la relació dels coeficients

LSEI de dos sistemes per determinar si eren semblants entre sí. Ishihama i Asakawa⁵⁸ consideraven aquests coeficients com a components d'un vector en un espai de cinc dimensions i van proposar el cosinus de l'angle ($\cos \theta_{ij}$) que formaven els dos vectors com a mesura de la similitud entre els sistemes. Si els dos sistemes són matemàticament similars, el cosinus de l'angle ha de ser un valor molt proper a 1. Com no és possible representar aquí un vector de cinc dimensions, hem fet un símil amb un espai de dues dimensions (Figura 1.5).

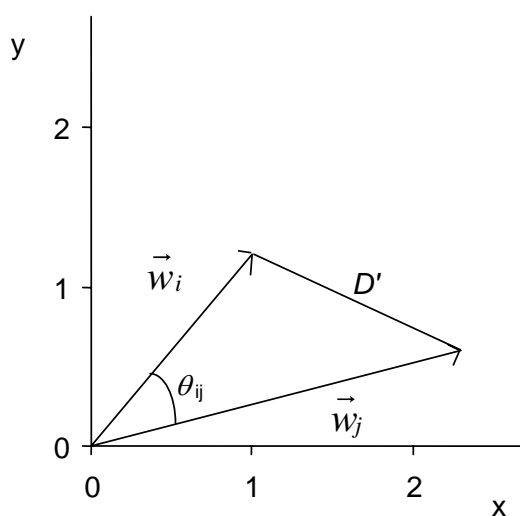


Figura 1.5. Representació esquemàtica en dues dimensions dels vectors LSEI (només dos coeficients), separats per un angle θ_{ij} i una distància D' .

Abraham^{19,59} també va comparar diferents sistemes LSEI mitjançant un altre paràmetre, la distància D' . Va considerar els cinc coeficients de cada sistema com un punt en un espai de cinc dimensions, i calculava la

distància entre dos punts. Per poder considerar dos sistemes similars, ell va proposar que tinguessin una distància compresa entre 0.5 i 0.8.

Nosaltres proposem utilitzar com a paràmetre de mesura la distància entre els dos vectors, però després de normalitzar els coeficients (Figura 1.6). Podem escriure l'equació (12) de forma vectorial:

$$SP = c + \vec{w} \vec{W} \quad (14)$$

on \vec{w} és el vector dels coeficients i \vec{W} el vector dels descriptors del solut.

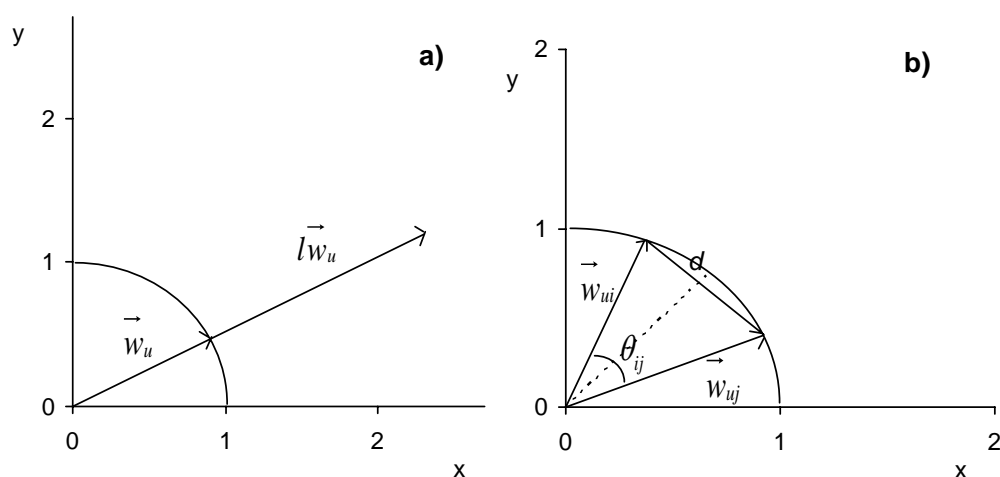


Figura 1.6. Representació en dos dimensions de la normalització d'un vector LSER (a) i de la distància entre dos vectors normalitzats (b).

El vector normalitzat \vec{w}_u és un vector unitari, que multiplicat per la longitud (l) del vector LSER ens dóna el vector original. El podem calcular mitjançant les següents equacions:

$$\vec{w}_u = \frac{1}{l} (e \ s \ a \ b \ v) \quad (15)$$

$$l = \sqrt{e^2 + s^2 + a^2 + b^2 + v^2} \quad (16)$$

La distància d entre els vectors \vec{w}_{ui} i \vec{w}_{uj} de la figura 1.6.b) ens informa de la similitud entre els sistemes. Com més petita sigui la distància, més semblants són, i en el cas que la distància fos 0, els sistemes serien idèntics o proporcionals. La distància es calcula amb tots els coeficients LSER normalitzats:

$$d = \sqrt{(e_{ui} - e_{uj})^2 + (s_{ui} - s_{uj})^2 + (a_{ui} - a_{uj})^2 + (b_{ui} - b_{uj})^2 + (v_{ui} - v_{uj})^2} \quad (17)$$

on $e_u = |e/l|$, $s_u = |s/l|$, $a_u = |a/l|$, $b_u = |b/l|$ i $v_u = |v/l|$.

La nostra distància d i la distància D' d'Abraham no donen la mateixa informació, perquè vectors unitaris que tinguin una distància d molt petita podrien donar una distància D' molt gran si les longituds dels vectors LSER fossin molt diferents entre sí.

En canvi, el nostre paràmetre sí està relacionat amb el cosinus de l'angle de Ishihama, per una relació trigonomètrica, ja que els dos vectors unitaris i la distància d formen un triangle isòsceles, com s'aprecia a la Figura 1.6.

$$\cos \theta_j = \cos (2 \cdot \arcsen (d/2)) \quad (18)$$

Els dos paràmetres mesuren el mateix concepte, però considerem que és més fàcil i intuïtiu comparar sistemes a partir de la distància d , perquè l'escala del cosinus no és lineal. Encara que les dues escales són de similar llargada (de 0 a 1 per a $\cos \theta_j$ i de 0 a $\sqrt{2}$ per a d) només els valors de cosinus entre 0.97 i 1 indicaran sistemes similars, mentre que les distàncies que ho fan van de 0 a 0.25.

1.4. Assaig de permeabilitat a través d'una membrana artificial (PAMPA)

En els darrers anys una nova tècnica ha sigut dissenyada i utilitzada per mesurar la permeabilitat passiva de nous fàrmacs, amb l'objectiu de predir la seva absorció oral. L'assaig de permeabilitat a través d'una membrana artificial (PAMPA)⁷⁻¹⁰ consisteix en dos compartiments aquosos (un donador i un acceptor) separats per una placa filtrant porosa impregnada d'hexadecà, que fa la funció de membrana líquida (Figura 1.7). El compost d'interès es carrega en el compartiment donador, i després de certs intervals de temps d'incubació es mesura la quantitat de compost que va creuant la membrana cap al compartiment acceptor. D'aquesta manera, es pot representar un perfil cinètic on es veu com la concentració de fàrmac va augmentant progressivament en el compartiment acceptor i disminuint en el donador fins arribar a un equilibri.

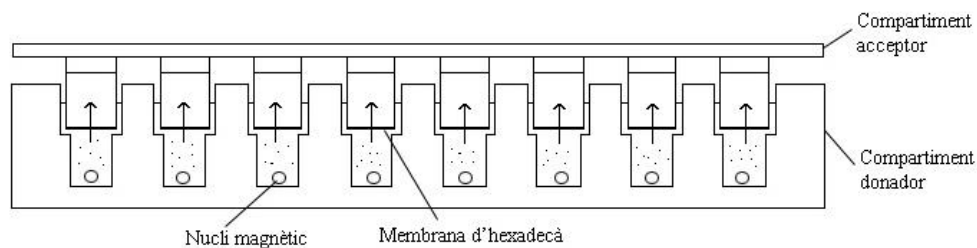


Figura 1.7. Esquema d'un assaig PAMPA

Els perfils cinètics dels fàrmacs en els dos compartiments venen definits per les següents equacions:

$$\frac{dC_D}{dt} = -P_a A \left(\frac{C_D}{V_D} - \frac{C_A}{V_A} \right) \quad (19)$$

$$\frac{dC_A}{dt} = +P_a A \left(\frac{C_D}{V_D} - \frac{C_A}{V_A} \right) \quad (20)$$

on C_D , V_D i C_A , V_A són les concentracions i volums dels compartiments donadors i acceptors respectivament, i A és l'àrea superficial accessible del filtre (àrea total multiplicada pel factor de porositat del filtre).

La solució de les equacions diferencials (19) i (20) ens proporciona el valor de la permeabilitat aparent:

$$P_a = -\frac{V_D V_A}{(V_D + V_A) A t} \ln \left(1 - \frac{C_A}{C_{eq}} \right) \quad (21)$$

on C_{eq} és la concentració teòrica a l'equilibri, sent la meitat de la que es posa inicialment al compartiment donador en el cas que els dos

compartiments tinguin el mateix volum. S'agafa com a temps t un temps d'incubació inferior al necessari per arribar a l'equilibri.

L'objectiu del nostre treball va ser utilitzar aquesta tècnica PAMPA ja perfectament establerta per a una aplicació completament innovadora: determinar la constant d'enllaç proteïna-fàrmac (K_d). Aquest paràmetre és molt important dintre del disseny de nous fàrmacs, ja que dependrà de la seva major o menor afinitat per les proteïnes de la sang que el fàrmac arribi al seu lloc d'acció i en la proporció necessària. Degut a la seva importància, fa molt de temps que aquest paràmetre s'estudia per diferents tècniques, sent les més àmpliament utilitzades la diàlisi i la ultrafiltració⁶⁰⁻⁶². Recentment, alguns autors també han intentat determinar la constant d'enllaç utilitzant albúmina humana (HSA) immobilitzada en diferents suports⁶³⁻⁶⁵. Tot i tenir l'avantatge de ser tècniques fàcils d'automatitzar, requereixen l'assumpció de que la proteïna immobilitzada conservarà completament les seves característiques d'enllaç.

La nostra aplicació també utilitza l'albúmina humana, ja que és la proteïna més abundant a la sang, però no està immobilitzada sinó en solució, pel que conserva completament la seva conformació. Una certa quantitat de proteïna és afegida al compartiment donador juntament amb el fàrmac i s'estudia com afecta la seva presència a la permeabilitat del compost. Com més afinitat tingui el fàrmac per l'albúmina, menys fracció lliure quedarà en solució i per tant, menys fàrmac creuarà al compartiment acceptor, donant una permeabilitat aparent inferior a la que té el fàrmac en absència de proteïna. Ni la proteïna ni el complex que forma amb el fàrmac poden creuar la membrana d'hexadecà, només el fàrmac lliure. A la Figura 1.8 es mostra l'esquema del procés que té lloc.

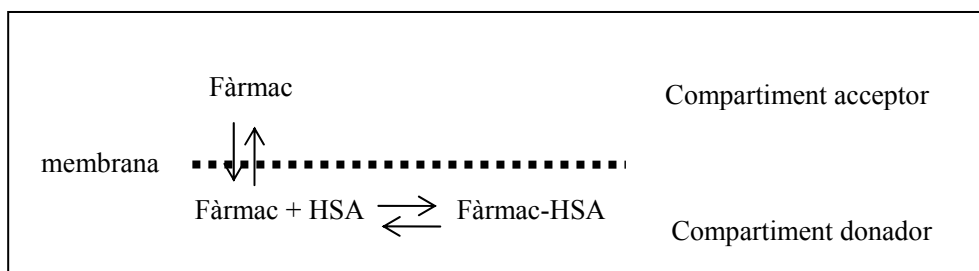


Figura 1.8. Esquema d'un assaig PAMPA introduint albúmina humana al compartiment donador.

En presència de proteïna, l'equació (19) es transforma en l'equació (22), mentre que l'equació (20) resta igual, perquè en el compartiment acceptor continua havent només fàrmac.

$$\frac{dC_D}{dt} = -P_a A \left(\frac{C_D}{V_D} - \frac{C_A}{V_A} \right) - k_{on} HSA \cdot C_D + k_{off} Complex \quad (22)$$

A l'equació (22) *Complex* i *HSA* representen les concentracions de fàrmac-proteïna i proteïna lliure, respectivament. Les equacions (23) i (24) descriuen la formació i dissociació del complex fàrmac-proteïna.

$$\frac{dHSA}{dt} = -k_{on} HSA \cdot C_D + k_{off} Complex \quad (23)$$

$$\frac{dComplex}{dt} = k_{on} HSA \cdot C_D - k_{off} Complex \quad (24)$$

Però no només la proteïna que afegim afecta a la cinètica de difusió del fàrmac, sinó que també es pot produir una certa retenció del compost a la membrana. Aquest fenomen depèn del coeficient de distribució de la

membrana ($\log D_{mem}$), i per tenir-ho en compte s'han de transformar les equacions (22) i (20) en (25) i (26).

$$\frac{dC_D}{dt} = -P_a A \left(\frac{C_D}{V_D} - \frac{C_M}{V_M} \right) - k_{on} HSA \cdot C_D + k_{off} Complex \quad (25)$$

$$\frac{dC_A}{dt} = +P_a A \left(\frac{C_M}{V_M} - \frac{C_A}{V_A} \right) \quad (26)$$

on C_M és la concentració del fàrmac a la membrana a un determinat temps t_i i V_M és el volum de membrana aparent (volum de membrana real multiplicat pel coeficient de distribució de la membrana). Per últim, ens falta afegir una altra equació diferencial, la que descriu el pas del fàrmac a través de la membrana:

$$\frac{dC_M}{dt} = +P_a A \left(\frac{C_D}{V_D} - \frac{2C_M}{V_M} + \frac{C_A}{V_A} \right) \quad (27)$$

Totes aquestes equacions diferencials no tenen solució analítica, pel que és necessari utilitzar el programa Berkeley Madonna⁶⁶ per calcular els perfils cinètics mitjançant integració numèrica. Es fixen les condicions inicials de l'experiment i s'introdueixen les equacions diferencials de la (23) a la (27), i el programa simula el perfil cinètic i troba els paràmetres òptims de P_a i K_d per ajustar les corbes als punts experimentals. De fet K_d es troba desglossada a les equacions diferencials en les seves constants d'associació i dissociació,

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (28)$$

pel que l'equació (28) també ha de ser inclosa en el programa.

1.5. Liposomes

Els liposomes estan formats per una bicapa de molècules lipídiques, deixant una cavitat aquosa al seu interior. Quan els lípids de la composició (que poden ser un o diversos fosfolípids diferents) es posen en contacte amb l'aigua, s'ordenen espontàniament en forma de vesícules de diferents grandàries. Els liposomes han sigut utilitzats per modelar interaccions de fàrmacs i altres biomolècules (com proteïnes, pèptids, carbohidrats...) amb membranes cel·lulars en nombroses ocasions⁶⁷⁻⁷⁰, degut a la seva semblança estructural.

S'utilitzen fosfolípids per formar els liposomes perquè són els principals constituents de les membranes biològiques. L'estructura general d'un fosfolípid (figura 1.9) consta de dues cadenes d'àcids grassos de llargada variable, esterificades a un grup glicerol. A la vegada el grup glicerol està esterificat a un grup fosfat en la posició 3', el qual té lligat un alcohol. És aquest alcohol del grup fosfat el que dóna nom al fosfolípid, obtenint

diferents compostos com ara fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, etc.

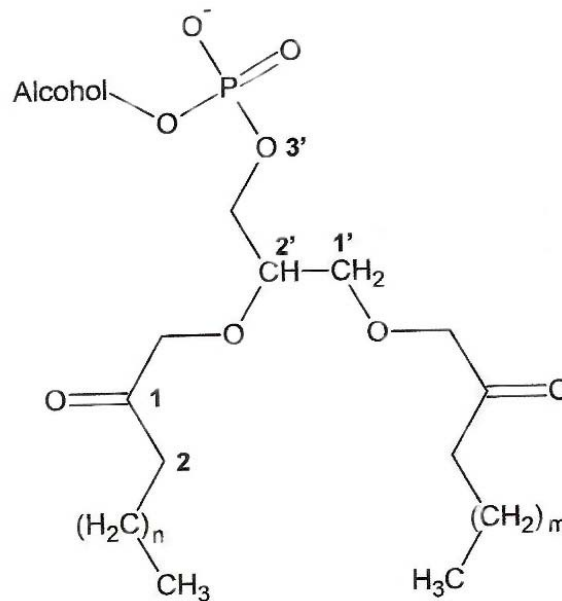


Figura 1.9. Estructura general d'un fosfolípid.

De tots ells, el més comú és la fosfatidilcolina, que consta de dues cadenes de 16 carbonis esterificades al glicerol i una colina al fosfat (com es pot apreciar a la figura 1.3). Presenta una càrrega negativa del fosfat i una positiva de la colina, pel que la càrrega neta és zero. Aquest fosfolípid és l'utilitzat en les columnes IAM i també és molt emprat en la fabricació de liposomes.

Com ja he comentat, els liposomes poden ser de diferent grandària, ja que poden estar formats per una sola bicapa o per diverses bicapes concèntriques. En funció de la grandària que es vulgui obtenir el procés de fabricació serà diferent. Quan els liposomes estan compostats de diverses bicapes són anomenats vesícules multilamel·lars (MLVs), i quan només

presenten una única membrana es diuen vesícules unilamel·lars, diferenciant-se per la grandària en petites (SUVs), intermèdies (IUVs) o grans (LUVs)⁷¹.

1.5.1. Calorimetria d'escaneig diferencial (DSC)

La calorimetria d'escaneig diferencial (DSC) va ser la tècnica que vaig emprar en l'estudi de la interacció de determinats compostos amb liposomes. La tècnica estudia el comportament termotròpic dels lípids en presència i absència del compost, donant informació de les interaccions lípid-compost. Es basa en el diferent comportament de fase dels fosfolípids quan se sotmeten a uns cicles de temperatura.

A baixes temperatures, les bicapes lipídiques es troben ordenades en forma de gel (fase L_{β}) on les cadenes són paral·leles les unes amb les altres, en contacte estret i estirades al màxim, presentant majoritàriament

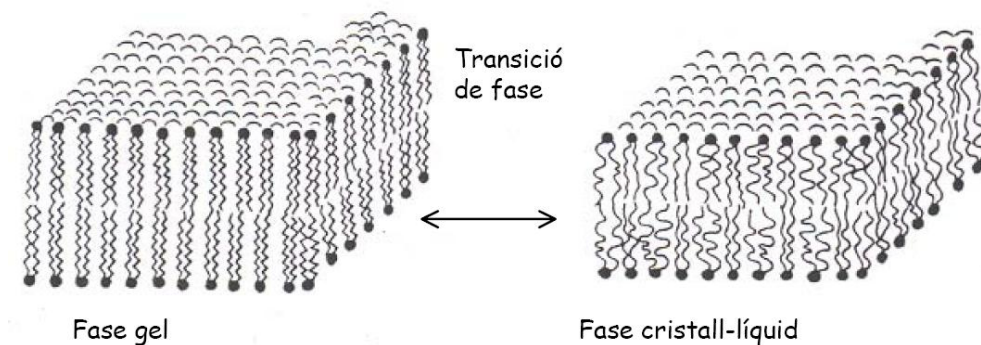


Figura 1.10. Diferents conformacions de les cadenes lipídiques dins d'una bicapa.

conformació *trans*. Quan augmentem la temperatura el gruix de la bicapa disminueix, perquè les cadenes ja no estan completament estirades, augmenten els moviments i la presència de conformacions *gauche*. En conseqüència, es passa a un estat desordenat de cristall-líquid (fase L_α)⁷², com es mostra a la figura 1.10.

La temperatura de transició de fase (T_m) és aquella temperatura a la qual la meitat dels lípids estan en fase gel, mentre que l'altra meitat estan en fase cristall-líquid. Aquesta T_m és específica per a un determinat fosfolípid, i si introduint un compost a la solució dels liposomes aquest paràmetre resulta alterat, ens indica que el compost està interaccionant amb el liposoma.

Els lípids que tenen caps polars molt voluminosos, com la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), presenten una petita pretransició abans de la transició principal, degut a que el volum dels caps polars fa inclinar les cadenes del lípid^{73,74}.

Altre paràmetre que es pot estudiar d'un termograma és l'amplitud a mitja alçada del pic ($\Delta T_{1/2}$), el qual informa de la cooperativitat de les molècules lipídiques durant el procés de transició. Si a l'afegir un compost als liposomes el pic es fa més ample, això ens indica que el compost està interaccionant amb la bicapa, trencant la cooperativitat de les cadenes que la formen⁷⁵. A la figura 1.11 trobem un exemple de termograma amb els paràmetres comentats fins ara.

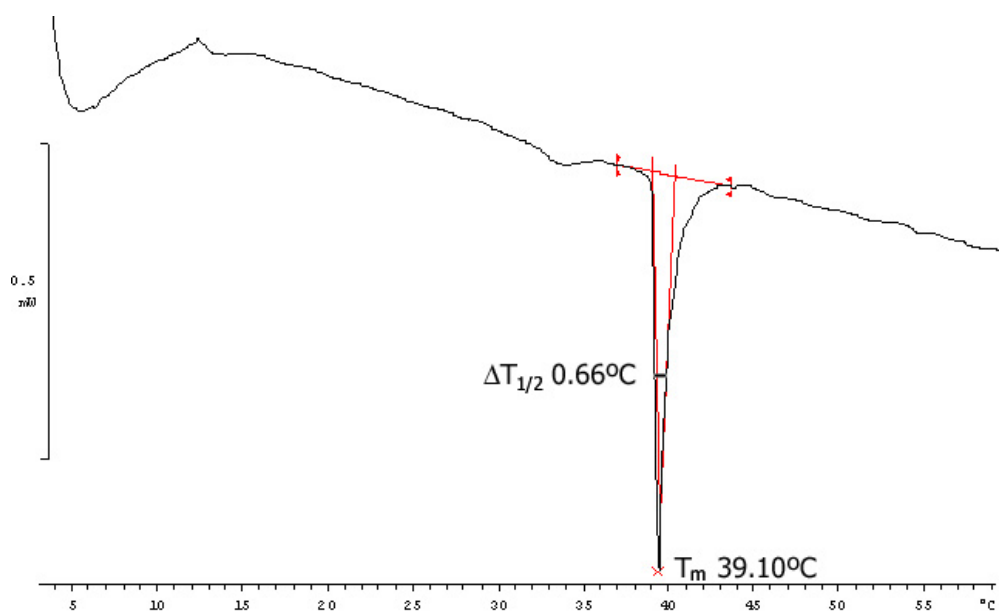


Figura 1.11. Típic termograma obtingut de MLVs de DPPC.

Publicacions

A continuació es presenta el llistat de les publicacions derivades de la recerca desenvolupada durant la realització d'aquesta tesi doctoral, així com una còpia de cadascuna d'elles:

Article 1: "Characterization of the acidity of residual silanol groups in immobilized artificial membranes", E. Lázaro, C. Ràfols and M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1182 (2008) 233.

Article 2: "Chromatographic estimation of drug disposition properties by means of immobilized artificial membranes (IAM) and C18 columns " E. Lázaro, C. Ràfols, M.H. Abraham and M. Rosés, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 4861.

Article 3: "Characterization of immobilized artificial membrane (IAM) and XTerra columns by means of chromatographic models" E. Lázaro, C. Ràfols and M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 163.

Article 4: "Prediction of retention in reversed phase liquid chromatography by means of the polarity parameter model" E. Lázaro, P. Izquierdo, C. Ràfols, M. Rosés and E. Bosch, acceptat al *J. Chromatogr. A*

Article 5: "New approach to measure protein binding based on a parallel artificial membrane assay and human serum albumin" E. Lázaro, P.J. Lowe, X. Briand and B. Faller, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 2009.

Article 6: "Interaction of antioxidant biobased epicatechin conjugates with biomembrane models" E. Lázaro, J.A. Castillo, C. Ràfols, M. Rosés, P. Clapés and J.L. Torres, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 2901.



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Chromatography A, 1182 (2008) 233–236

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Short communication

Characterization of the acidity of residual silanol groups in immobilized artificial membranes

Elisabet Lázaro, Clara Ràfols, Martí Rosés*

Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1, E-08028 Barcelona, Spain

Received 5 October 2007; received in revised form 21 December 2007; accepted 4 January 2008
Available online 8 January 2008

Abstract

Residual silanol acidity and activity of one immobilized artificial membrane (IAM) column have been measured from the retention of LiNO_3 in the column with a methanol/buffer (1 mM in Na^+) (60:40, v/v) mobile phase buffered to different pH values. Just one type of silanol with $\text{p}K_a = 7.61$ (near the pH limit recommended by the manufacturer) was found, although these silanols show large activity. The results obtained have been compared with those obtained previously for Resolve C18, Resolve Silica, Symmetry C18, Symmetry Silica, XTerra MS C18, underivatized XTerra, Lichrospher 100 RP-18, Purospher RP-18e, Luna C18 (2) and Chromolith Performance RP-18e, showing that the IAM column is similar to Luna C18 and Symmetry C18 in terms of silica quality, as measured by Li^+ retention. A warning about the use of IAM columns for emulsion of biological systems at physiological pH 7 is given because the ionized silanols may contribute to the retention of some drugs at this pH. © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Immobilized artificial membranes; HPLC; Silanol acidity; Silanol activity

1. Introduction

Silica is the most widely used support for HPLC stationary phases [1–4], due to the fact that it is quite easy to bond very different stationary phases to the particle, as phospholipids in immobilized artificial membrane (IAM) columns. However, during the manufacturing process of the stationary phases free residual silanols remain on the surface of the silica, in more or less extent. Basic analytes show a strong interaction with these silanols, producing broad and tailing peaks [2–7].

There are several types of silanols (single, geminal, vicinal) on the silica surface [6], which could have different acidity. Although several methods have been studied to block, remove or decrease the number of residual silanols [2,4,8,9], column end-capping is the most widely used [1,2,4,9]. Another possibility is to reduce the accessibility to free silanols by means of bulky or sterically groups, bidentate ligands, etc. [2,4,10–13].

Several characterization tests have been reported in literature to study the activity of residual silanols [3]. Most of them are based on the retention of amines, although there is not a universal method. The problem is that these compounds have not

only silanophilic interactions but also hydrophobic interactions. In order to correct the contribution of hydrophobicity, some tests analyze the relative retention between bases and neutral compounds [14,15]. Another alternative is to study the retention of small cations, since they are not retained by the stationary-phase due to their charge. We studied the possibility of using different cations [16] and finally we chose the lithium due to its facility to access to the smallest pores of the silica surface. Thus, we developed a method to determine the solute–silica interactions, based on an ion exchange between injected lithium ions and the sodium ions of the mobile phase retained by the ionized silanols in the column [16–18]. Lithium is not retained by the stationary phase due to its charge and small size. Therefore, retention changes of the lithium peak with the pH of the mobile phase indicate an interaction with silanol groups partially or totally ionized. The acidity of the silanols is obtained by means of the following equation:

$$k = \sum_{i=1}^m \left(\frac{k_i}{1 + 10^{\text{p}K_{a_i} - \text{pH}}} \right) \quad (1)$$

where k is the retention factor of the lithium ion, and k_i is the maximum retention that can be achieved by the specific type i of silanols (with acidity $\text{p}K_{a_i}$).

* Corresponding author. Tel.: +34 9340 39275; fax: +34 9340 21233.
E-mail address: marti@apolo.ubi.ub.es (M. Rosés).

Initially we characterized derivatized (Resolve C18, Symmetry C18, XTerra MS C18) and underivatized columns (Resolve Silica, Symmetry Silica, XTerra column) [17], and later, we extended the method to Lichrospher 100 RP-18, Purospher RP-18e, Luna C18 (2) and Chromolith Performance RP-18e [18]. Now, we are applying the method to a new HPLC column, the IAM.PC.DD2. We have chosen this column due to its importance in studies related with biological properties. IAMs were introduced as HPLC column-packing materials by Pidgeon and Venkataram [19]. They are prepared by linking covalently synthetic phospholipid analogues to silica-propylamine particles, in order to mimic the lipid environment of a fluid cell membrane on a solid matrix. Due to this chemical similarity, IAM columns are mainly used for the estimation of biomembrane transport properties. Different correlations between the retention factor on IAM columns and biological systems, such as drug transport across the blood–brain barrier [20,21], human intestinal absorption [22–24], and human skin permeability and partition [25,26], have been reported in literature. The retention of some compounds used in this kind of correlations could be affected in some way by their interaction with the residual silanols, producing false results. Therefore, we consider very interesting to evaluate the purity of the silica used in IAM columns. The results obtained in the present paper are compared with those published in a previous work for other columns [18], in order to understand better the properties of its silica.

2. Experimental

2.1. Apparatus

All measurements were performed with a ISCO Model 2350 dual-pump system with a 10- μ L loop valve connected to a Shimadzu CDD-10Avp conductivity detector. Data were acquired through the ISCO ChemResearch data management program. The retention data were measured using an IAM.PC.DD2 column (100 mm \times 4.6 mm I.D., 12 μ m of particle size, 300 Å of pore size, endcapped, Regis Technologies, Morton Grove, IL, USA).

Our previous studies [17,18] demonstrated that mass spectrometry (MS) and conductimetric detection could be both employed to evaluate the ionic exchange between Li^+ ion and Na^+ ions from the mobile phase retained in the column by the ionized silanols. In this study, we have employed conductimetric detection instead of MS, due to its lower cost and greater simplicity.

All pH measurements were taken with a Ross Combination electrode Orion 8102 (glass electrode and a reference electrode with a 3.0M KCl solution in water as salt bridge) in a Cision micropH 2002 potentiometer with a precision of ± 0.1 mV (± 0.002 pH units).

2.2. Chemicals

Methanol was HPLC grade from Merck (Darmstadt, Germany) and water purified by the Milli-Q plus system from Millipore, with a resistivity of 18.2 M Ω cm. Buffers were pre-

pared from sodium acetate and trisodium citrate, purchased from Merck. Lithium nitrate was from Prolabo (Barcelona, Spain), 99% purified.

2.3. Procedure

The mobile phase used was methanol/water (60:40, v/v) buffered to different pH values, between 2 and 7.5 (pH range recommended by the manufacturer, measured in the aqueous buffer before mixing it with the organic modifier). Acetate and citrate buffers were used. The sodium concentration was kept constant to 1 mM in the aqueous portion of the mobile phase. This mobile phase was filtered through a 0.45 μ m pore-size nylon membrane (Whatman, Maidstone, Kent, UK) and degassed for 20 min by a helium stream. The mobile phase flow was 1 mL min⁻¹.

Solutions of 0.01 mol L⁻¹ LiNO_3 in methanol/water (60:40) were prepared and filtered through 0.45 μ m nylon filter, and 10 μ L of the LiNO_3 solution were injected into the HPLC system. A change of sensitivity of the conductimetric detector was done just after the elution of NO_3^- because the signal of Li^+ was significantly lower than that of NO_3^- . Additionally, the polarity was reversed for the acquisition of the Li^+ ion in positive mode. All results obtained were the mean of at least three injections.

In all experiments, the column was first equilibrated with the mobile phase for at least 30 min.

3. Results and discussion

The residual silanol acidity of a HPLC column can be measured from the retention of LiNO_3 with a methanol/buffer (1 mM in Na^+) (60:40, v/v) mobile phase buffered at different pH values. Fig. 1 shows two examples of conductimetric chromatograms obtained at pH 5.1 and 7.1 for IAM.PC.DD2 column. In the first chromatogram NO_3^- and Li^+ are eluted together in one peak (void time), which indicates there is no cation exchange for Li^+ at this pH. Nevertheless, at pH 7.1, there are two peaks, the second one corresponding to Li^+ , which was retained a longer time due to the ionized silanols. After elution of the NO_3^- peak, the polarity was changed and the sensitivity was increased 10 times in order to see better the second peak. It might be argued that the negative phosphate head-group of the phosphatidylcholine chains could contribute to Li^+ retention. However, the $\text{p}K_a$ of this phosphate group is between 1 and 2 [27,28], so at pH 3.5 more than 90% of them are deprotonated [27]. In Fig. 1 it can be seen that at pH 5.1 there is not retention of Li^+ yet, so we conclude that the phosphate groups of the stationary phase does not contribute to a significant retention of the injected Li^+ .

The retention factor of Li^+ ion was measured at different pH between 3 and 8.5, and fitted to the mobile phase pH values through Eq. (1) with Sigma Plot 9.0 software to determine the extent of the silanols interaction. The best fit ($r^2 = 0.997$, $\text{SD} = 0.27$) was obtained with $m = 1$, i.e. only one type of silanols was observed in the pH range studied. Each type of silanol is described by two parameters: its acidity ($\text{p}K_a$) and its effective activity (k). The acidity determines the pH value from which the interaction of cationic solutes with the silanol

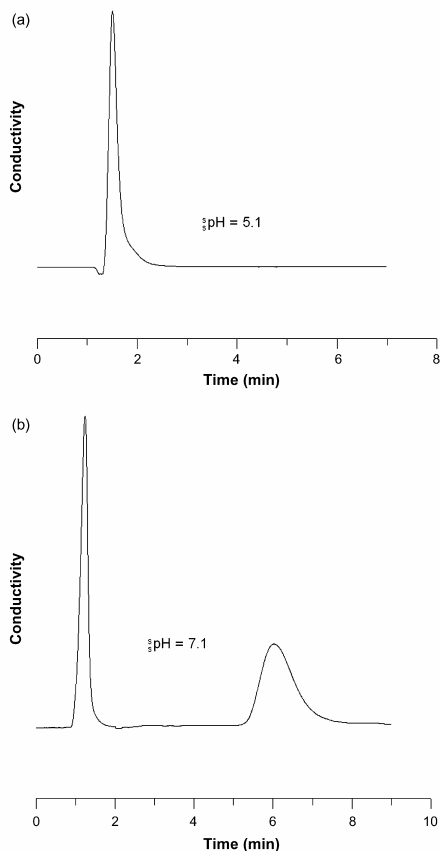


Fig. 1. Chromatograms for the elution of LiNO_3 from the IAM.PC.DD2 column at two mobile phase pH values obtained by conductimetric detection. Sensitivity of the detector was increased 10 times and polarity changed just after elution of the NO_3^- peak.

will be noticed, while the effective activity measures the extent of these interactions, i.e. the retention of the cation that will be observed. For the IAM.PC.DD2 column, the model fitted to one type of silanol with $\text{p}K_a$ 7.61 ± 0.02 , similar in terms of acidity to Luna C18 (7.24 ± 0.17) and Symmetry C18 (7.87 ± 0.12) [18], two HPLC columns with very high quality silica. In fact, these two columns have more than one type of silanol because their pH range studied is larger, but they would only show one type working from pH 3–8.5. The similarity of the silica in all three columns is clear, although the importance of the IAM.PC.DD2 silanols is bigger, since the associated k_i value is very large (18.14 ± 0.32). In fact, the silanols of IAM.PC.DD2 are the most active of all columns studied. Thus, the activity of its silanols will only be shown near the pH limit recommended by the manufacturer, but in a large extent.

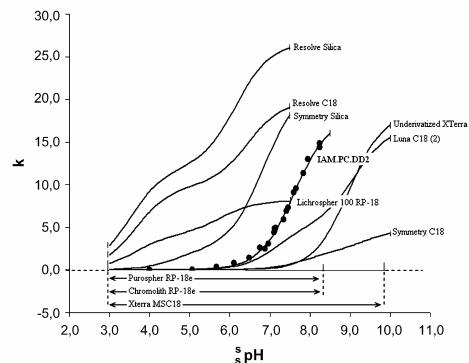


Fig. 2. Variation of silanol activity of stationary phases with the pH of the mobile phase. For IAM.PC.DD2 column, experimental points have been added. ($\leftarrow\right\rangle$) pH range studied.

There are also columns with silica of better quality than IAM.PC.DD2, such as Purospher RP-18e, Chromolith RP-18e and XTerra MSC18, since no evidence of silanol activity was found at any pH studied [18].

Fig. 2 shows all experimental points of IAM.PC.DD2 and the fitting line calculated according to Eq. (1). Moreover, the curves of those columns studied in the previous work [18] have been added. By means of this plot, it is possible to know which silanol activity is expected for a particular column at a known pH of mobile phase. In all cases the derivatization decreases silanol activity (see Resolve Silica – Resolve C18 or Symmetry Silica – Symmetry C18), and this effect is larger when the column has been end-capped. IAM.PC.DD2 shows less silanol activity than Resolve Silica, Resolve C18, Symmetry Silica, and LiChrospher 100 RP-18 for one particular pH, increasing steeply its activity at pH 6.5. However, Luna C18 (2), Underivatized XTerra and Symmetry C18 are less active than IAM.PC.DD2. Eventually, Purospher RP-18e, Chromolith RP-18e and XTerra MSC18 do not show any activity in the pH range of use recommended by the manufacturers.

We have also tested the possibility of anion exchange for IAM.PC.DD2 column, since some evidence of anion exchange was observed in some columns in a previous work [17], but in this case no evidence of this process was found.

4. Conclusions

We have demonstrated that residual silanol acidity and activity of IAM.PC.DD2 column can both be characterized through the model proposed, being conductivity detection a suitable technique to evaluate the retention of cationic solutes due to the ionized silanols. Analysis of Li^+ retention factor shows that it does not have silanol interaction up to pH 6. Nevertheless, at higher pH values, a large proportion of silanols was evidenced.

Although the relative population of silanols is very high, their activity will not be shown until pH values close to the limit recommended by the manufacturer. Since IAM.PC.DD2 column

is widely used to emulate biological systems and these studies are mostly done at pH 7, activity of ionized silanols can be relevant in some applications. Special care must be taken when working with basic compounds, as many drugs are, because their retention can be affected by the ionized silanols.

Acknowledgement

We are grateful for financial support from the Spanish Government (Project CTQ2004-00965/BQU).

References

- [1] K.K. Unger, Porous Silica, Elsevier, Amsterdam, New York, 1979.
- [2] U.D. Neue, HPLC Columns—Theory, Technology, and Practice, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [3] S.D. Rogers, J.G. Dorsey, J. Chromatogr. A 892 (2000) 57.
- [4] U.D. Neue, in: R.A. Meyers (Ed.), Encyclopedia of Analytical Chemistry, Wiley, Chichester, 2000.
- [5] D.V. McCalley, LC–GC Eur. J. 12 (1999) 638.
- [6] J. Nawrocki, J. Chromatogr. A 779 (1997) 29.
- [7] G.B. Cox, J. Chromatogr. A 656 (1993) 353.
- [8] L.C. Sander, S.A. Wise, CRC Crit. Rev. Anal. Chem. 18 (1987) 299.
- [9] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, Practical HPLC Method Development, 2nd ed., Wiley, New York, 1997.
- [10] U.D. Neue, C.H. Phoebe, K. Tran, Y.F. Cheng, Z. Lu, J. Chromatogr. A 925 (2001) 49.
- [11] J.J. Kirkland, J.B. Adams, M.A. van Straten, H.A. Claessens, Anal. Chem. 70 (1998) 4344.
- [12] M. Petro, D. Berek, Chromatographia 37 (1993) 549.
- [13] R. Arora, F. Ahmed, I. Rustamov, D. Babusis, T. Hanai, M. Arora, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 21 (1998) 2763.
- [14] T. Daldrup, B. Kardel, Chromatographia 18 (1984) 81.
- [15] U.D. Neue, E. Serowik, P. Iraneta, B.A. Alden, T.H. Walter, J. Chromatogr. A 849 (1999) 87.
- [16] M. Rosés, F.Z. Oumada, E. Bosch, J. Chromatogr. A 910 (2001) 187.
- [17] A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés, U.D. Neue, J. Chromatogr. A 986 (2003) 33.
- [18] J.M. Herrero-Martínez, A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1060 (2004) 135.
- [19] C. Pidgeon, U.V. Venkataram, Anal. Biochem. 176 (1989) 36.
- [20] A. Ducarme, M. Neuwels, S. Goldstein, R. Massingham, Eur. J. Med. Chem. 33 (1998) 215.
- [21] A. Reichel, D.J. Begley, Pharm. Res. 15 (1998) 1270.
- [22] S. Ong, H. Liu, C. Pidgeon, J. Chromatogr. A 728 (1996) 113.
- [23] C. Pidgeon, S. Ong, H. Liu, X. Qiu, M. Pidgeon, A.H. Dantzig, J. Munroe, W.J. Hornback, J.S. Kasher, L. Glunz, T. Szczerba, J. Med. Chem. 38 (1995) 590.
- [24] M. Genty, G. Gonzalez, C. Clere, V. Desangle-Gouty, J.Y. Legendre, Eur. J. Pharm. Sci. 12 (2001) 223.
- [25] A. Nasal, M. Sznitowska, A. Bucinski, R. Kaliszan, J. Chromatogr. A 692 (1995) 83.
- [26] F. Barbato, B. Cappello, A. Miro, M.I. La Rotonda, F. Quaglia, Il Farmaco 53 (1998) 655.
- [27] J.M. Boggs, Biochim. Biophys. Acta 906 (1987) 353.
- [28] M.R. Moncelli, L. Becucci, R. Guidelli, Biophys. J. 66 (1994) 1969.

Chromatographic Estimation of Drug Disposition Properties by Means of Immobilized Artificial Membranes (IAM) and C18 Columns

Elisabet Lázaro,[†] Clara Rafols,[†] Michael H. Abraham,[‡] and Martí Rosés^{*†}

Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1, E-08028 Barcelona, Spain, and Department of Chemistry, University College London, 20 Gordon Street, London WC1H 0AJ, U.K.

Received February 23, 2006

Chromatographic retention measurement in immobilized artificial membranes (IAMs) is considered a fast and reliable method to predict biological properties (drug distribution) because of the IAM structure, which consists of phospholipid analogues bonded covalently to silica particles. A new parameter (d) is proposed to estimate the similarity between IAM columns, conventional HPLC columns, and drug distribution systems, and thus the performance of chromatographic systems to predict drug distribution. An IAM.PC.DD2 column has been used for this study, together with two XTerra columns (MSC18 and RP18), at several acetonitrile–water mobile phases. According to the d parameter, good correlations should be obtained between chromatographic systems (both IAM and C18) and octanol–water partition coefficient ($\log P$), and thus both types of columns could be used to obtain $\log P$ values. The IAM.PC.DD2 system shows a close similarity to human skin partition, tadpole narcosis, and blood–brain permeability processes, showing that it can be useful as a model for these biological processes. Controversially, it is shown that human skin permeation is more similar to C18 partition than to IAM partition. Other biological processes such as blood–brain distribution and tissue–blood partition show a poor similarity to IAM and C18 systems, demonstrating that estimation of these drug distribution processes by chromatographic measurements may not be adequate.

Introduction

Drug distribution and activity depend on interactions with biological membranes, so the evaluation of these interactions is a key issue in the drug discovery process. Partition coefficients between an aqueous phase and a lipid phase are thought to predict the drug transport across biological membranes. As an example, the logarithm of octanol–water partition coefficient ($\log P$)¹ and the logarithm of the partition coefficient in liposome systems ($\log P_{\text{LUV}}$)^{2,3} have been tested. Since drug distribution prediction by means of these techniques may be experimentally laborious, there is a need for faster predictive models. In this sense, there have been different approaches, such as biosensors⁴ or IAM (immobilized artificial membranes) chromatography.

IAMs were introduced as HPLC column-packing materials by Pidgeon and Venkataram.⁵ The IAMs are prepared by linking covalently synthetic phospholipid analogues to silica–propylamine particles to mimic the lipid environment of a fluid cell membrane on a solid matrix. The goal was to get fast and accurate predictions of drug distribution in biological systems directly from the HPLC retention measurements. Several correlations between IAM chromatography and biological systems have been published. Pidgeon et al.⁶ observed a weak correlation of the IAM retention factor logarithm ($\log k_{\text{IAM}}$) with rat intestinal absorption ($r = 0.791$) and with permeability through Caco-2 cells ($r = 0.762$) for structurally different drugs, but they improved correlations by means of a molecular weight correction ($r = 0.858$ and $r = 0.854$, respectively). Nasal et al.⁷ found a good correlation ($r = 0.942$) between $\log k_{\text{IAM}}$ and skin permeability coefficients ($\log K_p$) for a set of 10 steroids. However, they obtained a poorer correlation ($r = 0.765$) for a

set of 14 phenolic compounds. Barbato et al.⁸ showed a good correlation ($r = 0.952$) of $\log k_{\text{IAM}}$ with the activity data on closed sodium channels for a set of 13 anaesthetics, after removing two outliers. The retention factors on IAM showed poor correlation ($r = 0.576$) with the blood–brain concentration ratios ($\log \text{BB}$) in the study by Salminen et al.⁹ using 26 structurally different drugs. When they took into account the effect of ionization and solute size and removed five outliers, the regression model was improved ($r = 0.921$). Reichel and Begley¹⁰ studied the correlation between the $\log k_{\text{IAM}}$ and the logarithm of brain uptake index ($\log \text{BUI}$) for six steroids ($r = 0.854$) and six biogenic amines ($r = 0.864$). A good correlation ($r = 0.91$) of $\log k_{\text{IAM}}$ with rat passive intestinal permeability (P_a) was observed for a set of 12 structurally diverse drugs, with molar volume as an additional descriptor, in the study by Genty et al.¹¹ The relation between IAM binding data (CHI IAM) of known drug molecules and human serum albumin (HSA) binding, both obtained by chromatography, was studied by Valko et al.,¹² showing that compounds with a certain lipophilicity bind to both membrane and HSA.

The main purpose of this work is to characterize an IAM column by means of the solvation parameter model and to study its similarity with common C18 chromatographic (Waters XTerra columns) and biological (blood–brain distribution, intestinal absorption, skin permeability, and partition ...) systems. According to these similarities, we can choose the most suitable systems (IAM or C18) in order to estimate biological properties by means of chromatographic measures.

Theoretical Basis

Biological activities of solutes can be related to structural descriptors by means of quantitative structure–activity relationships (QSARs). Among the QSAR models, the solvation parameter model^{13,14} has successfully described many biologi-

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +34934039275. Fax: +34934021233. E-mail: marti@apolo.qui.ub.es.

[†] Universitat de Barcelona.

[‡] University College London.

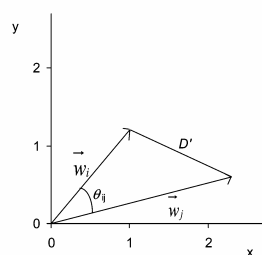


Figure 1. Schematic representation in two dimensions (only two coefficients) of LSER vectors, showing the angle θ_{ij} and the distance D' between them.

cally interesting processes as well as physicochemical ones. For instance, this model was used to characterize the octanol–water partition ($\log P$),¹⁵ tadpole narcosis ($1/\log C_{\text{nar}}$),¹⁶ skin permeation and partition ($\log K_p$ and $\log K_{\text{sc}}$),¹⁷ drug transport across the blood–brain barrier ($\log \text{BBB}$),^{18,19} human intestinal absorption,^{20–22} tissue–blood partition,^{23,24} micellar electrokinetic chromatography (MEKC),^{25–28} and reversed-phase liquid chromatography (RPLC)^{29–31} processes.

This solvation parameter model, the linear free energy relationship (LFER), can be written as

$$\text{SP} = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1)$$

where SP is the dependent solute property. The solute descriptors are the excess molar refraction E , the dipolarity/polarizability S , the solute's effective hydrogen-bond acidity A and hydrogen-bond basicity B , and McGowan's characteristic volume V .

When SP is the chromatographic retention factor (as $\log k$), the coefficients in eq 1, which are calculated by multiple linear regression, represent the difference in solvation properties of both phases forming the chromatographic system. Coefficient e depends on the difference in the capacity of the solvated stationary and mobile phases to interact with solute n - or π -electrons; s is a measure of the difference in the capacity of the solvated phases to take part in dipole–dipole and dipole–induced dipole interactions; coefficients a and b represent the differences in hydrogen-bond basicity and acidity, respectively, between the stationary and the mobile phases; and v is a measure of the relative ease of forming a cavity for the solute in the solvated stationary and mobile phases.

Since the same eq 1 can be applied to biological and physicochemical processes, it should be possible to find correlations between both kinds of processes. Since the solvation parameter model, as many QSAR and chromatographic models, can only characterize drug passive transport processes, the correlations are restricted to these kind of processes. Active transport processes, such as protein transport, cannot be modeled well by eq 1, and thus they are not considered in our approach. To test if a physicochemical process can model a biological process, it is useful to study the relation between their LFER coefficients. Ishihama and Asakawa³² considered these coefficients as components of a vector in five dimensional (coefficients) space and proposed $\cos \theta_{ij}$ as a measure of the similarity of the two LFERs, θ_{ij} being the angle between the two LFER vectors (\vec{w}_i and \vec{w}_j) (see Figure 1). If the two systems are mathematically similar, the value of $\cos \theta_{ij}$ becomes close to 1. The $\cos \theta_{ij}$ can be calculated as follows:

$$\cos \theta_{ij} = \frac{\vec{w}_i \cdot \vec{w}_j}{|\vec{w}_i| |\vec{w}_j|} = \frac{e_i e_j + s_i s_j + a_i a_j + b_i b_j + v_i v_j}{\sqrt{e_i^2 + s_i^2 + a_i^2 + b_i^2 + v_i^2} \sqrt{e_j^2 + s_j^2 + a_j^2 + b_j^2 + v_j^2}} \quad (2)$$

Later, Abraham^{17,33} compared different systems by means of the distance (D') between them (see Figure 1). He considered the five coefficients of any system as a point in five-dimensional space and calculated the distance between each two points, suggesting that D' should be less than about 0.5–0.8 if the systems are chemically similar.

We proposed to use the distance between the normalized vectors of the systems as another measure of the similarity of these systems.³⁴ The LFER system can be written in matrix or vectorial notation as

$$\text{SP} = c + (e \ s \ a \ b \ v) \begin{pmatrix} E \\ S \\ A \\ B \\ V \end{pmatrix} \quad (3)$$

or

$$\text{SP} = c + \vec{w} \vec{W} \quad (4)$$

where \vec{w} is the coefficients vector and \vec{W} the solute descriptors vector. The coefficients vector can be normalized (\vec{w}_n) by the following equations:

$$\vec{w}_n = l \vec{w}_u \quad (5)$$

$$\vec{w}_n = \frac{1}{l} (e \ s \ a \ b \ v) \quad (6)$$

$$l = \sqrt{e^2 + s^2 + a^2 + b^2 + v^2} \quad (7)$$

where l is the length of the coefficients vector.

If there are two different systems with \vec{w}_{ni} and \vec{w}_{nj} , respectively, the distance (d) between both vectors provides a measure of the two systems' mathematical similarity (see Figure 2b). The distance can be calculated according to

$$d = \sqrt{\frac{(e_{ni} - e_{nj})^2 + (s_{ni} - s_{nj})^2 + (a_{ni} - a_{nj})^2 + (b_{ni} - b_{nj})^2 + (v_{ni} - v_{nj})^2}{(e_{ni} - e_{nj})^2 + (s_{ni} - s_{nj})^2 + (a_{ni} - a_{nj})^2 + (b_{ni} - b_{nj})^2 + (v_{ni} - v_{nj})^2}} \quad (8)$$

where all the coefficients have been normalized. The smaller the distance value is, the more mathematically similar are the two compared systems. For instance, if two i and j LFERs are linearly related, they will show the same normalized vector:

$$\log \text{SP}_i = c_i + l_i \vec{w}_n \quad (9)$$

$$\log \text{SP}_j = c_j + l_j \vec{w}_n \quad (10)$$

The d distance will be zero, and it is obvious that each LFER system may model the other, although the D' parameter is not zero in this situation, since

$$D' = l_j - l_i \quad (11)$$

On the other hand, we can relate the d distance parameter with the Ishihama $\cos \theta_{ij}$ by simple trigonometry, since the two

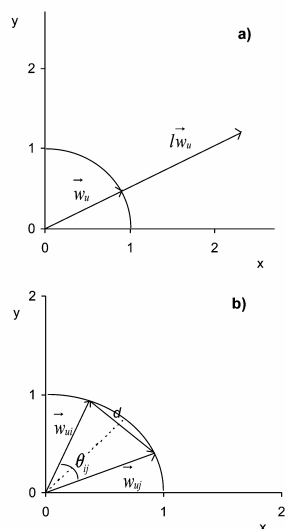


Figure 2. Schematic representation in two dimensions of a LSER vector normalization (a) and the distance d between two normalized vectors (b).

unitary vectors and the distance (d) constitute an isosceles triangle. This relation can be written as follows:

$$\cos \theta_{ij} = \cos(2 \arcsin(d/2)) \quad (12)$$

This equation shows that both parameters measure the same concept. The $\cos \theta_{ij}$ is a measure of similarity (the higher the $\cos \theta_{ij}$ is, the larger the similarity of the systems is), and d is a measure of distance (the lower d is, the closer the two systems are). When the two systems approach each other, d tends to 0 and $\cos \theta_{ij}$ to 1.

Experimental Section

Apparatus. The retention data were measured in an IAM.PC.DD2 column (100 mm \times 4.6 mm i.d., 12 μ m, Regis Technologies Inc., Morton Grove, IL) and XTerra MSC18 and XTerra RP18 columns (150 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μ m, Waters Corporation, Milford, MA). All measurements were performed with a Shimadzu liquid chromatograph (Kyoto, Japan) equipped with two Shimadzu LC-10AD pumps and a Shimadzu SPD-10AV detector. The temperature was controlled at 25.0 ± 0.1 °C with a Shimadzu CTO-10AS column oven. All pH measurements were taken with a Ross combination electrode Orion 8102 (glass electrode and a reference electrode with a 3.0 M KCl solution in water as salt bridge) in a Crison micro-pH 2002 potentiometer with a precision of ± 0.1 mV (± 0.002 pH units).

Chemicals. Acetonitrile was HPLC grade from Merck (Darmstadt, Germany) and water purified by the Milli-Q plus system from Millipore, with a resistivity of 18.2 M Ω cm. The sodium dihydrogenphosphate monohydrate (GR), the disodium hydrogenphosphate (GR), and the sodium hydroxide (GR) were from Merck. The test solutes employed were reagent grade or better and obtained from Merck, Fluka (Steinheim, Germany), Aldrich (Steinheim, Germany), or Carlo Erba (Milano, Italy).

Procedure. The eluents were mixtures of acetonitrile and 0.01 M phosphate aqueous buffer adjusted to pH 7, in percentages ranging from 10% to 60% for the IAM.PC.DD2 column and from 20% to 60% for the XTerra columns because of the extremely large retention times of several solutes in these columns. All compounds were dissolved in methanol, and their concentrations were 0.1 mg

mL $^{-1}$. The injection volume was always 10 μ L. The detection wavelength was 254 nm for all the compounds (except geraniol, α -pinene, pyrrole, furan, 4-hydroxybenzyl alcohol, lidocain, and *p*-cresole, whose wavelength was at 214 nm). Isocratic conditions were always used at a flow rate of 1 mL min $^{-1}$. The column holdup time was determined by using an aqueous solution of potassium bromide (0.1 mg mL $^{-1}$) as an unretained solute. Its detection was performed at 200 nm. Retention data were expressed by the logarithm of the capacity factor, $\log k$, defined as $\log k = \log[(t_r - t_0)/t_0]$ where t_r and t_0 are the retention times of the solute and the unretained compound, respectively. All measurements were taken in triplicate.

Results and Discussion

Characterization of Chromatographic Systems. IAM.PC.DD2, XTerra MSC18, and XTerra RP18 columns have been characterized with the solvation parameter model through eq 1 by analysis of the $\log k$ data of 59 solutes. This set of solutes with known descriptors must have properties sufficiently varied to define properly all interactions in eq 1. In a previous study²⁸ we selected an adequate collection of 71 solutes from the current database, which contains 2975 solutes with all five descriptors characterized. We applied principal component analysis (PCA) in order to select compounds that embraced a wide range of descriptor values, avoiding cross-correlation among the descriptors. In this study we have used 59 of these solutes that have a reasonable absorbance for their detection and are neutral at the working pH. We must emphasize again that characterization by the solvent parameter model requires a set of solutes neutral at the working pH with well-known descriptors. Thus, the solutes selected are neutral at pH 7; they are mostly monofunctional and only part of them are druglike molecules because descriptors for most drugs and complex structures are not yet available. The conclusions of this study might not be applicable to molecules with a more complex structure and surely not to ionized or partly ionized solutes.

The solute descriptors and the $\log k$ values obtained in the different chromatographic systems are given in Table 1 except for some compounds that could not be measured in all mobile phases because of their strong retention. The structures and properties of these columns have been given before.³⁵ The structure of the IAM.PC.DD2 column shows positive and negative charges in the IAM surface, but we consider that they do not affect significantly the distribution of neutral solutes through the stationary phase.

The system constants and the statistics for the fit of the solvation parameter model to the experimental $\log k$ data are summarized in Table 2. The outliers (solute with a standard residual greater than [2.5]) were removed when the models were calculated (two to six outliers for correlation). Table 2 shows that the solvation parameter model gives good statistical fits and correlation coefficients. As far as we know, there are only two studies in the literature^{30,31} reporting LSER parameters for IAM columns. Both refer to 20% acetonitrile, but there are some differences in the coefficients obtained by both sets of authors. Our coefficients for 20% acetonitrile in Table 2 are between those reported in these previous studies. Our e and v are very similar to those reported by Lepont and Poole,³¹ while the a and b are closer to the coefficients established by Valko et al.³⁰ The s coefficient shows small differences with both literature values. Regarding XTerra columns, there are not LSER correlations reported, but we have compared the coefficient ratios (e/v , s/v , a/v , b/v) with those reported in a previous study²⁹ for different C18 columns with acetonitrile–water mobile phases, and they are in good agreement.

Table 1. Solute Descriptors and Retention Factors (log *k*) of All Studied Solutes

solute	descriptors					IAM.PC.DD2, $\phi_{ACN}^{a,c}$				XTerra MSC18, $\phi_{ACN}^{a,c}$			XTerra RP18, $\phi_{ACN}^{a,c}$		
	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>V</i>	0.6	0.4	0.2	0.1	0.6	0.4	0.2	0.6	0.4	0.2
2,3-benzofuran	0.888	0.83	0.00	0.15	0.9053	-0.498	-0.404	0.879	1.194	0.305	0.870	1.683	0.242	0.805	1.525
2,3-dimethylphenol	0.850	0.90	0.52	0.36	1.0569	-0.432	0.095	0.799	1.152	0.037	0.521	1.301	0.084	0.570	1.250
2,4-dimethylphenol	0.840	0.80	0.53	0.39	1.0569	-0.441	0.096	0.804	1.170	0.027	0.535	1.326	0.085	0.574	1.265
2-naphthol	1.520	1.08	0.61	0.40	1.1441	-0.318	0.260	1.130	1.614	0.013	0.548	1.418	0.105	0.646	1.493
2-nitroaniline	1.180	1.37	0.30	0.36	0.9904	-0.586	-0.076	0.554	0.847	-0.060	0.363	1.021	-0.008	0.430	1.003
2-nitroanisole	0.968	1.34	0.00	0.38	1.0902	-0.701	-0.154	0.486	0.799	0.035	0.519	1.220	0.015	0.495	1.098
3-chloroaniline	1.050	1.10	0.30	0.36	0.9390	-0.547	-0.023	0.636	0.911	0.016	0.467	1.144	0.036	0.495	1.085
3-nitroaniline	1.200	1.71	0.40	0.35	0.9904	-0.642	-0.155	0.408	0.664	-0.153	0.286	0.852	-0.073	0.346	0.858
4-chloroacetanilide	0.980	1.50	0.64	0.51	1.2357	-0.538	-0.074	0.626	1.009	-0.187	0.243	1.040	-0.109	0.310	1.033
4-chloroaniline	1.060	1.10	0.30	0.35	0.9390	-0.552	-0.050	0.589	0.878	-0.022	0.410	1.084	-0.069	0.426	1.010
4-chlorophenol	0.915	1.08	0.67	0.20	0.8975	-0.371	0.153	0.884	1.249	-0.056	0.418	1.210	0.038	0.518	1.215
4-nitroaniline	1.220	1.91	0.42	0.38	0.9904	-0.604	-0.149	0.461	0.760	-0.211	0.170	0.751	-0.119	0.293	0.825
acetanilide	0.870	1.36	0.46	0.69	1.1137	-0.759	-0.402	0.042	0.298	-0.364	-0.109	0.429	-0.325	-0.041	0.422
acetophenone	0.818	1.01	0.00	0.48	1.0139	-0.747	-0.283	0.247	0.522	-0.029	0.360	0.976	-0.064	0.316	0.828
<i>o</i> -pinene	0.446	0.14	0.00	0.12	1.2574	0.034	0.289			1.262			0.938		
aniline	0.955	0.96	0.26	0.50	0.8162	-0.744	-0.368	0.003	0.155	-0.229	0.071	1.207	-0.213	0.070	0.379
anisole	0.708	0.75	0.00	0.29	0.9160	-0.627	-0.085	0.516	0.771	0.194	0.687	1.353	0.126	0.601	1.159
antipyrine	1.320	1.50	0.00	1.48	1.5502	-0.833	-0.565	-0.182	0.092	-0.571	-0.367	0.239	-0.551	-0.381	0.110
benzaldehyde	0.820	1.00	0.00	0.39	0.8730	-0.713	-0.286	0.189	0.404	-0.053	0.338	0.869	-0.065	0.302	0.747
benzamide	0.990	1.50	0.49	0.67	0.9728	-0.807	-0.555	-0.220	-0.005	-0.582	-0.403	-0.197	-0.537	-0.347	0.025
benzene	0.610	0.52	0.00	0.14	0.7164	-0.580	-0.061	0.493	0.663	0.262	0.735	1.324	0.164	0.631	1.132
benzophenone	1.447	1.50	0.00	0.50	1.4808	-0.448	0.236	1.196	1.683	0.382	1.065	2.104	0.333	0.974	1.929
benzotrifluoride	0.742	1.11	0.00	0.33	0.8711	-0.715	-0.236	0.287	0.512	0.004	0.425	1.004	-0.020	0.393	0.881
benzyl benzoate	1.264	1.42	0.00	0.51	1.6804	-0.375	0.452	1.655	2.232	0.620	1.435		0.509	1.304	
bromobenzene	0.882	0.73	0.00	0.09	0.8914	-0.363	0.267	1.067	1.389	0.456	1.069	1.896	0.368	0.956	1.729
butylbenzene	0.600	0.51	0.00	0.15	1.2800	-0.179	0.653	1.835		0.953	1.798		0.720	1.543	
butyrophenone	0.797	0.95	0.00	0.51	1.2957	-0.556	0.066	0.829	1.237	0.348	0.932	1.808	0.257	0.824	1.612
caffeine	1.500	1.60	0.00	1.33	1.3632	-0.894	-0.734	-0.506	-0.210	-0.599	-0.560	-0.199	-0.575	-0.479	-0.221
chlorobenzene	0.718	0.65	0.00	0.07	0.8388	-0.430	0.191	0.945	1.231	0.408	0.999	1.766	0.321	0.888	1.615
corticosterone	1.860	3.43	0.40	1.63	2.7389	-0.543	-0.081	0.819	1.444	-0.174	0.284	0.780	-0.202	0.251	1.406
cortisone	1.960	3.50	0.36	1.87	2.7546	-0.736	-0.310	0.487	1.076	-0.388	0.010	1.225	-0.367	0.038	1.079
dodecanophenone	0.720	0.95	0.00	0.50	2.4229	0.382	1.637			1.873			1.484		
estradiol	1.800	3.30	0.88	0.95	2.1988	0.014	0.639	1.836		-0.004	0.604		0.181	0.807	
estriol	2.000	3.36	1.40	1.22	2.2575	-0.289	0.109	1.059	1.328	-0.560	-0.183	0.897	-0.385	0.054	1.188
ethylbenzene	0.613	0.51	0.00	0.15	0.9982	-0.404	0.276	1.104	1.419	0.587	1.239	2.116	0.425	1.068	1.852
furane	0.369	0.53	0.00	0.13	0.5363	-0.735	-0.358	0.025	0.104	0.001	0.356	0.732	-0.048	0.304	0.601
geraniol	0.513	0.63	0.39	0.66	1.4903	-0.451	-0.067	1.050	1.464	0.260	0.861	1.980	0.153	0.742	1.730
heptanophenone	0.720	0.95	0.00	0.50	1.7184	-0.227	0.642	1.909	2.477	0.898	1.775		0.709	1.561	
hydrocortisone	2.030	3.49	0.71	1.90	2.7975	-0.590	-0.232	0.540	1.112	-0.410	-0.043	0.944	-0.374	0.000	1.055
<i>m</i> -cresole	0.822	0.88	0.57	0.34	0.9160	-0.527	-0.077	0.505	0.810	-0.122	0.279	0.940	-0.067	0.343	0.895
methyl benzoate	0.733	0.85	0.00	0.46	1.0726	-0.648	-0.116	0.521	0.819	0.151	0.622	1.368	0.086	0.549	1.177
monuron	1.140	1.50	0.47	0.78	1.4768	-0.605	-0.115	0.574	0.979	-0.181	0.257	1.050	-0.121	0.306	1.024
myrcene	0.483	0.29	0.00	0.21	1.0090	-0.147	0.745	2.001		1.082			0.804		
naphthalene	1.340	0.92	0.00	0.20	1.0854	-0.299	0.390	1.323	1.762	0.533	1.202	2.171	0.436	1.089	1.995
nitrobenzene	0.871	1.11	0.00	0.28	0.8906	-0.636	-0.090	0.503	0.747	0.107	0.584	1.220	0.077	0.549	1.087
<i>o</i> -toluidine	0.970	0.90	0.23	0.59	0.9571	-0.672	-0.255	0.211	0.424	-0.100	0.267	0.463	-0.104	0.243	0.667
phenol	0.805	0.89	0.60	0.30	0.7751	-0.617	-0.223	0.250	0.476	-0.238	0.083	0.583	-0.173	0.164	0.586
propylphenone	0.804	0.95	0.00	0.51	1.1548	-0.642	-0.099	0.544	0.878	0.179	0.666	1.500	0.112	0.591	1.227
propylbenzene	0.604	0.50	0.00	0.15	1.1391	-0.294	0.472	1.458	1.845	0.769	1.520		0.571	1.306	
<i>p</i> -xylene	0.613	0.52	0.00	0.16	0.9982	-0.380	0.293	1.121	1.455	0.584	1.248	2.129	0.436	1.075	1.854
pyrimidine	0.606	1.00	0.00	0.65	0.6342	-0.854	-0.735	-0.637	-0.544	-0.606	-0.604	-0.534	-0.590	-0.517	-0.516
pyrocatechol	0.970	1.10	0.88	0.47	0.8338	-0.555	-0.248	0.124	0.329	-0.447	-0.238	0.170	-0.380	-0.137	0.194
pyrrole	0.613	0.73	0.41	0.29	0.5774	-0.748	-0.397	-0.096	-0.007	-0.216	0.052	0.321	-0.200	0.078	0.284
quinoline	1.268	0.97	0.00	0.51	1.0443	-0.451	0.237	1.196	1.685	-0.107	0.224	1.174	-0.165	0.167	0.778
resorcinol	0.980	1.00	1.10	0.58	0.8338	-0.653	-0.376	0.000	0.249	-0.569	-0.380	-0.022	-0.491	-0.260	0.073
thiourea	0.840	0.82	0.77	0.87	0.5696	-0.803	-0.732	-0.687	-0.641	-0.953	-1.166	-1.158	-0.966	-1.047	-1.264
thymol	0.822	0.79	0.52	0.44	1.3387	-0.309	0.385	1.356	1.795	0.352	1.034	2.080	0.352	1.020	1.959
toluene	0.601	0.52	0.00	0.14	0.8573	-0.480	0.116	0.809	1.066	0.412	0.988	1.707	0.298	0.847	1.517
valerophenone	0.795	0.95	0.00	0.50	1.4366	-0.456	0.246	1.190	1.611	0.513	1.209	2.232	0.405	1.065	2.000

^a ϕ_{ACN} represents the different volume fractions of acetonitrile in the three studied columns.

Table 2. Constants for All Studied Chromatographic Systems (Standard Deviations in Parentheses)

system	coefficients						statistics			
	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>s</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>v</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	SD	<i>F</i>
IAM.PC.DD2 (10% acetonitrile)	-0.730(0.039)	0.761(0.059)	-0.774(0.042)	0.128(0.035)	-1.963(0.050)	2.400(0.045)	49	0.994	0.068	708
IAM.PC.DD2 (20% acetonitrile)	-0.705(0.038)	0.498(0.058)	-0.577(0.042)	0.187(0.034)	-1.999(0.057)	2.131(0.038)	52	0.994	0.066	742
IAM.PC.DD2 (40% acetonitrile)	-0.710(0.027)	0.292(0.042)	-0.344(0.029)	0.141(0.024)	-1.193(0.040)	1.161(0.027)	51	0.991	0.047	480
IAM.PC.DD2 (60% acetonitrile)	-0.978(0.028)	0.268(0.041)	-0.258(0.028)	0.189(0.025)	-0.593(0.035)	0.616(0.028)	55	0.963	0.050	125
XTerra MSC18 (20% acetonitrile)	-0.149(0.049)	0.272(0.076)	-0.669(0.053)	-0.432(0.045)	-2.346(0.060)	2.764(0.062)	49	0.993	0.093	606
XTerra MSC18 (40% acetonitrile)	-0.152(0.036)	0.151(0.059)	-0.463(0.036)	-0.424(0.034)	-1.719(0.043)	1.759(0.039)	55	0.994	0.072	764
XTerra MSC18 (60% acetonitrile)	-0.295(0.034)	-0.003(0.054)	-0.333(0.035)	-0.317(0.033)	-1.108(0.041)	1.191(0.030)	58	0.991	0.069	551
XTerra RP18 (20% acetonitrile)	-0.281(0.032)	0.375(0.052)	-0.579(0.036)	-0.211(0.030)	-2.352(0.046)	2.564(0.040)	48	0.996	0.066	1189
XTerra RP18 (40% acetonitrile)	-0.172(0.029)	0.233(0.047)	-0.460(0.032)	-0.260(0.027)	-1.574(0.036)	1.582(0.028)	55	0.996	0.056	1121
XTerra RP18 (60% acetonitrile)	-0.330(0.020)	0.120(0.034)	-0.335(0.023)	-0.195(0.020)	-0.996(0.026)	1.025(0.018)	55	0.996	0.040	1229

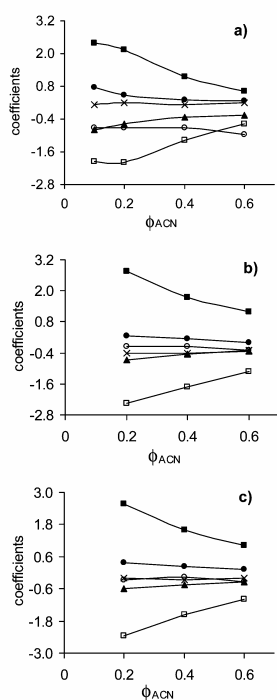


Figure 3. Plot of LSER coefficients vs volume fraction of acetonitrile in the mobile phase, using as stationary phase a IAM.PC.DD2 (a), a XTerra MSC18 (b), and a XTerra RP18 (c) columns: (■) coefficient v ; (●) coefficient e ; (×) coefficient a ; (▲) coefficient s ; (□) coefficient b ; (○) constant c .

Positive coefficients imply an increase in $\log k$; i.e., partition into the stationary phase is favored. Therefore, negative coefficients indicate a greater affinity to the mobile phase. The larger the coefficient absolute value, the greater the influence on the retention in RPLC. The comparison between the coefficients of each system shows that solute volume and hydrogen-bond acidity are the largest coefficients in absolute value (v and b , respectively). The coefficient v is large and positive in all cases, and its value increases with the water content in the mobile phase. This is due to the cohesive density of water. Therefore, creating a cavity inside the mobile phase requires more energy than is necessary in the stationary phase. All coefficients b are large and negative, which indicates that the hydrogen-bond acidity of the stationary phase is lower than the hydrogen-bond acidity of the mobile phase. Thus, solutes with greater hydrogen-bond basicity (large B descriptor value) are less retained.

All systems have negative s coefficient values, which shows that stationary phases are less dipolar than mobile phases. Regarding the coefficient e , all systems have positive values, which indicates that stationary phases are more polarizable than mobile phases.

The aA term depends on the column. Both XTerra columns have negative a coefficient values; therefore, the stationary phase has a lower hydrogen-bond basicity than the mobile phase. However, the IAM.PC.DD2 column has a positive coefficient a , which indicates that this stationary phase is a stronger hydrogen-bond base than is the mobile phase. Thus, IAM has

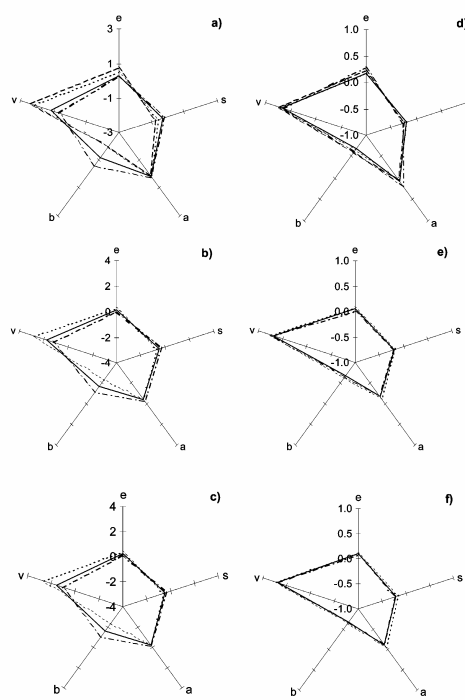


Figure 4. Radial plots of LSER coefficients before and after their normalization, in IAM.PC.DD2 column ((a) and (d), respectively), in XTerra MSC18 ((b) and (e), respectively), and in XTerra RP18 ((c) and (f), respectively): (---) $\phi_{ACN} = 0.6$; (—) $\phi_{ACN} = 0.4$; (···) $\phi_{ACN} = 0.2$; (- - -) $\phi_{ACN} = 0.1$.

stronger affinity to hydrogen-bond donor compounds than C18 columns. This is the main difference between all the columns.

The different proportions of the acetonitrile–water mobile phases change the properties of the mobile phase and therefore the values of the coefficients (see Table 2 and Figure 3). For the IAM column the hydrogen-bond acidity of the mobile phase, with respect to the same property of the solvated stationary phase, is reduced significantly by addition of acetonitrile (coefficient b increases). However, the lipophilicity of the mobile phase is significantly increased by the addition of acetonitrile (coefficient v decreases); i.e., the cohesion of the mobile phase is strongly reduced when the content of acetonitrile in the mobile phase increases. These properties change little at first (10–20%) and more noticeably from 20% to 60% of organic modifier. The variation of the other properties is smaller, but there is a moderate increase in the polarizability (coefficient e decreases) and a decrease in the dipolarity (coefficient s increases) of the mobile phase with acetonitrile content. However, the hydrogen-bond basicity of the system is hardly influenced by the composition of the mobile phase. Therefore, solutes that differ in size and hydrogen-bond basicity will show the greatest change in retention with increasing acetonitrile content of the mobile phase. The same trends are observed in all the studied stationary phases.

Modeling of Biological Processes. The LFER coefficients of selected biological systems were obtained from the literature and are summarized in Table 3.

Table 3. Constants for All Selected Biopartitioning Systems

number	biopartitioning systems	coefficients					statistics				
		<i>c</i>	<i>e</i>	<i>s</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>v</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	SD	<i>F</i>
1	blood-brain distribution ¹⁹	0.044	0.511	-0.886	-0.724	-0.666	0.861	148	0.843	0.367	71
2	blood-brain permeability ¹⁵	-1.210	0.770	-1.870	0.000	-2.800	3.310	18	0.976	0.481	65
3	human intestinal absorption ²²	0.544	-0.025	0.141	-0.409	-0.514	0.204	127	0.894	0.290	94
4	human skin permeation ¹⁷	-5.426	-0.106	-0.473	-0.473	-3.000	2.296	119	0.912	0.461	112
5	human skin partition ¹⁷	0.341	0.341	-0.206	-0.024	-2.178	1.850	45	0.962	0.216	97
6	tadpole narcosis ¹⁶	0.582	0.770	-0.696	0.243	-2.592	3.343	114	0.952	0.341	263
7	octanol-water distribution ¹⁵	0.088	0.562	-1.054	0.034	-3.460	3.814	613	0.997	0.116	23 162
8	tissue-blood partition brain ²³	0.523	0.195	-0.603	-0.627	-0.623	0.627	302	0.75	0.30	138
9	muscle ²⁴	0.039	-0.100	-0.080	-0.254	0.041	0.233	163	0.595	0.220	33

Table 4. Distances (*d*, *D'*) and $\cos \theta_{ij}$ Obtained between All Studied Chromatographic Columns with 40% of Acetonitrile and Selected Biopartitioning Systems

biopartitioning systems	chromatographic systems, 40% of acetonitrile								
	IAM.PC.DD2			XTerra MSC18			XTerra RP18		
	<i>d</i>	<i>D'</i>	$\cos \theta_{ij}$	<i>d</i>	<i>D'</i>	$\cos \theta_{ij}$	<i>d</i>	<i>D'</i>	$\cos \theta_{ij}$
blood-brain distribution	0.712	1.208	0.747	0.603	1.521	0.818	0.605	1.348	0.817
blood-brain permeability	0.234	3.127	0.973	0.300	2.473	0.955	0.250	2.614	0.969
human intestinal absorption	0.888	1.420	0.606	0.702	2.065	0.754	0.747	1.863	0.721
human skin permeation	0.317	2.260	0.950	0.181	1.413	0.984	0.200	1.644	0.980
human skin partition	0.179	1.222	0.984	0.223	0.694	0.975	0.187	0.754	0.983
tadpole narcosis	0.143	2.661	0.990	0.276	2.038	0.962	0.223	2.176	0.975
octanol-water distribution	0.116	3.573	0.993	0.184	2.825	0.983	0.128	3.014	0.992
tissue-blood partition									
brain	0.696	1.130	0.758	0.527	1.595	0.861	0.549	1.405	0.850
muscle	1.194	1.663	0.2871	1.001	2.380	0.499	1.049	2.164	0.450

Table 5. Distances (*d*) Obtained between All Selected Biopartitioning Systems

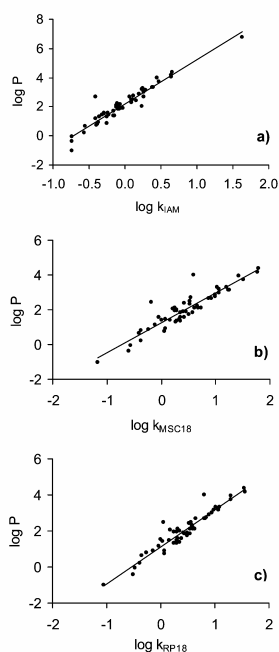
biopartitioning systems	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
blood-brain distribution	1	0								
blood-brain permeability	2	0.544	0							
human intestinal absorption	3	0.917	0.954	0						
human skin permeation	4	0.728	0.412	0.643	0					
human skin partition	5	0.757	0.368	0.742	0.199	0				
tadpole narcosis	6	0.706	0.250	0.909	0.372	0.238	0			
octanol-water distribution	7	0.674	0.213	0.848	0.268	0.182	0.121	0		
tissue-blood partition										
brain	8	0.199	0.550	0.779	0.627	0.705	0.702	0.642	0	
muscle	9	0.879	1.085	1.032	1.087	1.175	1.127	1.103	0.819	0

Estimation of the Similarity between Systems. To compare chromatographic and biological systems, we propose to use the distance (*d*) between these systems calculated according to eq 8, where all the coefficients are normalized. When all components of the system vectors are represented (see Figure 4a-c), we can observe large differences depending on the mobile phase composition. However, if the system coefficients are normalized (see Figure 4d-f), these differences practically disappear, and the distances between them become very small. There are significant differences in the retention of the solutes depending on the concentration of acetonitrile, so we obtain very different coefficients for each mobile phase composition (see Figure 3). However, the differences between these chromatographic systems are minimized when we normalize the coefficients. If we calculate the distance *d* between systems with the same stationary phase and extreme percentages of acetonitrile (IAM.PC.DD2 *d* = 0.192 from 10% to 60% acetonitrile; XTerra MSC18 *d* = 0.114 from 20% to 60% acetonitrile; XTerra RP18 *d* = 0.104 from 20% to 60% acetonitrile), we can conclude that these systems are analogous. For this reason, it is not necessary to calculate *d* between all chromatographic and biological systems. We choose 40% of acetonitrile as an intermediate and representative mobile phase composition, and estimate *d* between all columns with this percentage and all biological systems. The results are shown in Table 4. The

distance *D'*, where the system coefficients are not normalized, and $\cos \theta_{ij}$, calculated according to eq 2, are also presented in this table. Obviously, the same conclusions about the similarity of the systems will be obtained if we use *d* or $\cos \theta_{ij}$, since they are related by a trigonometric equation. If $\cos \theta_{ij}$ is near 1, the distance *d* is short (0-0.25), and the two compared systems can be considered similar. However, we consider it to be easier and more intuitive to compare partition systems by means of the *d* parameter, since the $\cos \theta_{ij}$ scale is not linear. Both *d* and $\cos \theta_{ij}$ scales range from 0 to 1, but because of the lack of linearity in the $\cos \theta_{ij}$ scale, the range of the adequate cosines for similar systems goes from 1 to 0.97 while the distances go from 0 to 0.25. The wider and linear range allows us to observe at first sight the small differences between various systems, which is more difficult with the cosine range. On the other hand, *D'* does not provide the same information, as was proved by eq 11, since it is possible that two systems are separated by a small *d* but a large *D'* distance. For example, the distances *D'* for the chromatographic systems studied above are very large (IAM.PC.DD2 *D'* = 2.360 between 10% and 60% acetonitrile; XTerra MSC18 *D'* = 2.052 between 20% and 60% acetonitrile; XTerra RP18 *D'* = 2.081 between 20% and 60% acetonitrile). It is obvious that these long distances point to poor similarity of related systems for which *d* indicates close similarity (e.g., *D'* = 2.081 but *d* = 0.104 between 20% and

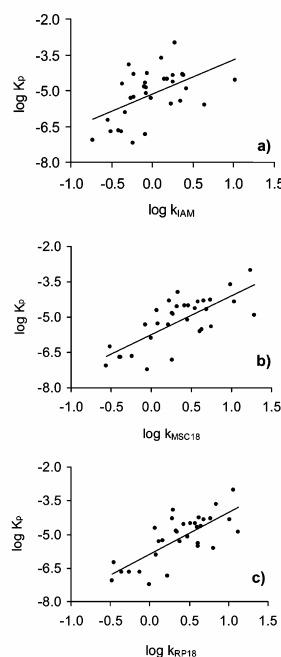
Table 6. Solute Descriptors and Retention Factors ($\log k$) of Some Selected Solutes from ref 17 in the Three Studied Columns

solute	descriptors					$\log k, \phi_{ACN} = 0.4$		
	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>V</i>	IAM.PC.DD2	XTerra MSC18	XTerra RP18
2,4,6-trichlorophenol	1.010	0.80	0.68	0.15	1.1423	-0.229	0.228	0.281
2,4-dichlorophenol	0.960	0.84	0.53	0.19	1.0199	0.376	0.651	0.767
2-chlorophenol	0.853	0.88	0.32	0.31	0.8975	1.014	0.326	0.429
2-nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	1.525	2.05	0.35	0.70	1.0902	-0.412	-0.237	-0.126
3-nitrophenol	1.050	1.57	0.79	0.23	0.9493	-0.011	0.214	0.381
4-amino-2-nitrophenol	1.360	1.50	0.30	0.66	1.0491	-0.331	0.005	0.082
4-bromophenol	1.080	1.17	0.67	0.20	0.9501	0.187	0.463	0.583
4-chloro-3-methylphenol	0.920	1.02	0.67	0.22	1.0384	0.250	0.587	0.683
4-hydroxybenzyl alcohol	0.998	1.20	0.86	0.81	0.9747	-0.544	-0.516	-0.457
4-nitrophenol	1.070	1.72	0.82	0.26	0.9493	-0.262	-0.070	0.114
8-methoxypsoralen	1.611	1.70	0.00	0.80	1.4504	-0.068	0.451	0.477
cortisone 21-acetate	1.820	3.11	0.21	2.13	3.0521	-0.088	0.573	0.593
hydrocortisone 21-acetate	1.890	2.88	0.46	2.16	3.0951	-0.066	0.470	0.525
lidocaine	1.010	1.49	0.11	1.27	2.0589	0.349	0.753	0.613
<i>o</i> -phenylenediamine	1.260	1.40	0.24	0.73	0.9160	-0.507	-0.390	-0.354
<i>p</i> -cresole	0.820	0.87	0.57	0.31	0.9160	-0.093	0.261	0.334
progesterone	1.450	3.29	0.00	1.14	2.6215	0.425	1.287	1.122
testosterone	1.540	2.59	0.32	1.19	2.3827	0.232	0.630	0.611

**Figure 5.** Plots of experimental $\log P$ vs experimental $\log k$ in IAM.PC.DD2 (a), XTerra MSC18 (b), and XTerra RP18 (c) columns.

60% acetonitrile in XTerra RP18). This fact can be also observed when we compare biological with chromatographic systems (Table 4). There is a short D' distance (1.208) between blood–brain distribution and IAM.PC.DD2 but a large d distance (0.712). In contrast, the D' distance between IAM.PC.DD2 and blood–brain permeability is large (3.127) but d is short (0.234).

If the values of d are analyzed, blood–brain permeability, human skin partition, tadpole narcosis, and octanol–water distribution would be the only systems considered as analogues to the IAM.PC.DD2 with 40% of acetonitrile system ($d < 0.25$), while the human skin permeation would be better explained by

**Figure 6.** Plots of experimental $\log K_p$ (skin permeation logarithm) vs experimental $\log k$ (retention factor logarithm) in IAM.PC.DD2 (a), XTerra MSC18 (b), and XTerra RP18 (c) columns.

means of the XTerra MSC18 ($d = 0.18$). However, the small differences between the XTerra RP18 and IAM.PC.DD2 columns in relation to the d parameter suggest that the XTerra RP18 column could provide good correlations with the same biological systems as well (see Table 4). On the other hand, according to D' , the XTerra columns should be good models for the human skin partition ($D' < 0.8$). Finally, some biological systems, such as the blood–brain distribution and the tissue–blood partition (for muscle), cannot be modeled with any of these chromatographic systems because all values of the distance parameter are too large.

We can also compare all biological systems between them by means of the d parameter (see Table 5). Not surprisingly, blood–brain distribution and the tissue–blood partition (for brain) are similar systems, and the same similarity can be found between human skin permeation and partition. Regarding the other systems, tadpole narcosis and octanol–water distribution are analogue to blood–brain permeability and human skin partition. Moreover, octanol–water distribution is also similar to tadpole narcosis. The rest of the systems are too different between them, according to d .

Examples of Modeling. According to d , the octanol–water distribution should be well modeled by means of IAM.PC.DD2 ($d = 0.12$) and XTerra RP18 ($d = 0.13$) and slightly worse by XTerra MSC18 ($d = 0.18$), although taking into account D' , they cannot be considered similar systems because the distances are very large. Thus, according to the d distance, a good linear relationship should be obtained between the logarithm of the retention factor ($\log k$) and the logarithm of octanol–water partition coefficient ($\log P$). The $\log P$ data for all studied solutes were obtained from refs 15, 36, 37 (except α -pinene, geraniol, and myrcene, which were not available), and their plots against $\log k$ are presented in Figure 5. Three correlations were obtained (for IAM.PC.DD2, XTerra MSC18, and XTerra RP18 columns, respectively):

$$\log P = 2.185 + 3.034 \log k_{\text{IAM}} \quad (13)$$

$n = 56, r = 0.960, \text{SD} = 0.362$

$$\log P = 1.231 + 1.722 \log k_{\text{MSC18}} \quad (14)$$

$n = 55, r = 0.924, \text{SD} = 0.433$

$$\log P = 1.109 + 2.040 \log k_{\text{RP18}} \quad (15)$$

$n = 55, r = 0.952, \text{SD} = 0.347$

In these equations and in the following ones, n denotes the number of solutes, r is the correlation coefficient, and SD is the standard deviation. It is obvious that there are good correlations in all cases, specially for IAM.PC.DD2 and XTerra RP18, since they present better statistics as is predicted by our d distance. The correlations embrace a large large lipophilicity range of 7 $\log P$ units, with very few outliers (2,3-benzofuran and thiourea for IAM.PC.DD2; estradiol and estriol for XTerra MSC18 and XTerra RP18). These results are in good agreement with other ones published before,^{38–42} where it was shown that HPLC can be used to determine $\log P$ easily using suitable stationary and mobile phases.

The human skin permeation and partition systems were also selected in order to be modeled by chromatographic systems. The experimental data of $\log K_p$ (skin permeation) and $\log K_{sc}$ (skin partition) were extracted from ref 17. Seventeen substances from Table 1 (2-naphthol, 4-chlorophenol, aniline, anisole, benzaldehyde, benzene, caffeine, corticosterone, cortisone, estradiol, ethylbenzene, hydrocortisone, *m*-cresole, phenol, resorcinol, thymol, and toluene) were included in this study, since their experimental $\log K_p$ or $\log K_{sc}$ values were known. Moreover, a set of new solutes was selected and studied in the three columns, using 40% of acetonitrile. Their descriptors and the experimental $\log k$ data are summarized in Table 6.

Plots of experimental $\log K_p$ versus experimental $\log k$ for the selected solutes in the three columns are shown in Figure 6. Three correlations were obtained (for IAM.PC.DD2, XTerra MSC18, and XTerra RP18 columns, respectively):

$$\log K_p = -5.154 + 1.443 \log k_{\text{IAM}} \quad (16)$$

$$n = 32, r = 0.514, \text{SD} = 0.916$$

$$\log K_p = -5.728 + 1.636 \log k_{\text{MSC18}} \quad (17)$$

$$n = 32, r = 0.739, \text{SD} = 0.719$$

$$\log K_p = -5.865 + 1.849 \log k_{\text{RP18}} \quad (18)$$

$$n = 32, r = 0.746, \text{SD} = 0.711$$

The human skin permeation gave fair correlations with XTerra MSC18 and XTerra RP18 (according to $d = 0.18$ and $d = 0.20$, respectively), while the IAM.PC.DD2 column ($d = 0.32$) showed such a poor correlation that it is not useful for predicting skin permeation. Although the d distance between XTerra and skin permeation is only slightly larger than the d distance between IAM (or XTerra) and octanol–water partition, the correlation is worse. This fact is due to the precision of the original data, since parameters for physicochemical processes (octanol–water distribution) can be measured more easily, precisely, and accurately than those for biological processes (skin permeation). This can be easily observed in the statistics (r and F) of the original LFER correlations presented in Table 3. Thus, there are two main factors that influence the precision (r and F) of the biological–chromatographic systems correlations. One is the similarity of the two systems correlated, measured by the d distance between them. The other one is the precision (e.g., standard deviation) with which the correlated data (both chromatographic and especially biological) have been measured. The larger the d distance among systems and the standard deviation of the biological data are, the poorer is the correlation with chromatographic parameters.

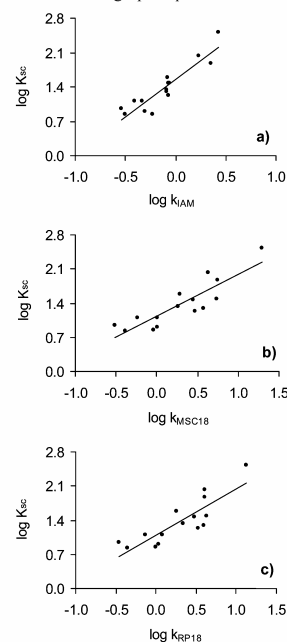


Figure 7. Plots of experimental $\log K_{sc}$ (skin partition logarithm) vs experimental $\log k$ (retention factor logarithm) in IAM.PC.DD2 (a), XTerra MSC18 (b), and XTerra RP18 (c) columns.

Chromatographic Estimation of Drug Properties

Good correlations were obtained between the human skin partition ($\log K_{sc}$) and chromatographic systems ($\log k$). Relationships are shown by the following:

$$\log K_{sc} = 1.555 + 1.522 \log k_{IAM} \quad (19)$$

$$n = 15, \quad r = 0.919, \quad SD = 0.196$$

$$\log K_{sc} = 1.131 + 0.855 \log k_{MSC18} \quad (20)$$

$$n = 15, \quad r = 0.872, \quad SD = 0.242$$

$$\log K_{sc} = 1.099 + 0.950 \log k_{RP18} \quad (21)$$

$$n = 15, \quad r = 0.847, \quad SD = 0.263$$

for IAM.PC.DD2, XTerra MSC18, and XTerra RP18 columns, respectively.

These correlations are illustrated in Figure 7. The best of them corresponds to the IAM.PC.DD2 column ($d = 0.179$), which has the smallest d . Statistics for the other two columns ($d = 0.223$ and 0.187) are not as good, although they are still quite reasonable.

Conclusions

It has been shown that the proposed d parameter is a good measure of the mathematical similarity between biological and chromatographic systems, previously characterized by means of the solvation parameter model. It allows a choice to be made for the most appropriate chromatographic system (IAM or C18) to model a particular biological system and to estimate drug distribution parameters in the biological system from retention measurements in the selected chromatographic column.

The results obtained demonstrate that contrary to common belief immobilized artificial membranes are not always the best choice to model a biological drug distribution system, since for some of them common C18 columns may show better performances. The octanol–water partition, tadpole narcosis, human skin partition, and blood–brain permeability can be well modeled by IAM columns, but human skin permeation is better modeled by C18 columns. Application of the d parameter shows that some biological systems (e.g., blood–brain or tissue–blood distribution) cannot be well modeled by IAM or C18 columns, and thus use of IAMs to estimate drug-distribution parameters for these systems is inadvisable.

Acknowledgment. We are grateful for financial support from the Spanish Government (Project CTQ2004-00965/BQU). E.L. was supported by Grant AP2002-3049 from the Spanish Government.

References

- Smith, R. N.; Hansch, C.; Ames, M. M. Selection of a reference partitioning system for drug design work. *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 599–606.
- Rogers, J. A.; Choi, Y. W. The liposome partitioning system for correlating biological activities of imidazolidine derivatives. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 913–917.
- Balon, K.; Riebeschl, B. U.; Müller, B. W. Drug liposome partitioning as a tool for the prediction of human passive intestinal absorption. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 882–888.
- Dancian, E.; Karlén, A.; Karlsson, R.; Winiwarter, S.; Hansson, A.; Löfås, S.; Lennernäs, H.; Hämaläinen, M. D. SPR biosensor studies of the direct interaction between 27 drugs and a liposome surface: correlation with fraction absorbed in humans. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2083–2086.
- Pidgeon, C.; Venkataram, U. V. Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids. *Anal. Biochem.* **1989**, *176*, 36–47.
- Pidgeon, C.; Ong, S.; Liu, H.; Qiu, X.; Pidgeon, M.; Dantzig, A. H.; Munroe, J.; Hornback, W. J.; Kasher, J. S.; Glunz, L.; Szczerba, T. IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 590–594.
- Nasad, A.; Sznitowska, M.; Bucinski, A.; Kaliszan, R. Hydrophobicity parameter from high-performance liquid chromatography on an immobilized artificial membrane column and its relationship to bioactivity. *J. Chromatogr. A* **1995**, *692*, 83–89.
- Barbato, F.; La Rotonda, M. I.; Quaglia, F. Chromatographic indexes on immobilized artificial membranes for local anesthetics: relationships with activity data on closed sodium channels. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1699–1705.
- Salminen, T.; Pulli, A.; Taskinen, J. Relationship between immobilized artificial membrane chromatographic retention and the brain penetration of structurally diverse drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15*, 469–477.
- Reichel, A.; Begley, D. J. Potential of immobilized artificial membranes for predicting drug penetration across the blood–brain barrier. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1270–1274.
- Genty, M.; González, G.; Clere, C.; Desangle-Gouty, V.; Legendre, J. Y. Determination of the passive absorption through the rat intestine using chromatographic indices and molar volume. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *12*, 223–229.
- Valko, K.; Nunhuck, S.; Bevan, C.; Abraham, M. H.; Reynolds, D. P. Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 2236–2248.
- Abraham, M. H. Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes. *Chem. Soc. Rev.* **1993**, *22*, 73–83.
- Abraham, M. H.; Chadha, H. S.; Martins, F.; Mitchell, R. C.; Bradbury, M. W.; Gratton, J. A. Hydrogen bonding part 46: A review of the correlation and prediction of transport properties by an LFER method: physicochemical properties, brain penetration and skin permeability. *Pestic. Sci.* **1999**, *55*, 78–88.
- Abraham, M. H.; Chadha, H. S.; Whiting, G. S.; Mitchell, R. C. Hydrogen bonding. 32. An analysis of water–octanol and water–alkane partitioning and the $\Delta \log P$ parameter of seiler. *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 1085–1100.
- Abraham, M. H.; Rafols, C. Factors that influence tadpole narcosis. An LFER analysis. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 1843–1851.
- Abraham, M. H.; Martins, F. Human skin permeation and partition: General linear free-energy relationships analyses. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1508–1523.
- Gratton, J. A.; Abraham, M. H.; Bradbury, M. W.; Chadha, H. S. Molecular factors influencing drug transfer across the blood–brain barrier. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 1211–1216.
- Platts, J. A.; Abraham, M. H.; Zhao, Y. H.; Hersey, A.; Ijaz, L.; Butina, D. Correlation and prediction of a large blood–brain distribution data set. An LFER study. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 719–730.
- Zhao, Y. H.; Le, J.; Abraham, M. H.; Hersey, A.; Eddershaw, P. J.; Luscombe, C. N.; Butina, D.; Beck, G.; Sherborne, B.; Cooper, I.; Platts, J. A. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure–activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 749–784.
- Zhao, Y. H.; Abraham, M. H.; Le, J.; Hersey, A.; Luscombe, C. N.; Beck, G.; Sherborne, B.; Cooper, I. Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1446–1457.
- Abraham, M. H.; Zhao, Y. H.; Le, J.; Hersey, A.; Luscombe, C. N.; Reynolds, D. P.; Beck, G.; Sherborne, B.; Cooper, I. On the mechanism of human intestinal absorption. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 595–605.
- Abraham, M. H.; Ibrahim, A.; Zhao, Y.; Acree, W. E., Jr. A data base for partition of volatile organic compounds and drugs from blood/plasma/serum to brain, and an LFER analysis of the data. *J. Pharm. Sci.*, in press.
- Abraham, M. H.; Ibrahim, A.; Acree, W. E., Jr. Air to muscle, and blood/plasma to muscle, distribution of volatile organic compounds and drugs: linear free energy analyses. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 494–502.
- Abraham, M. H.; Treiner, C.; Rosés, M.; Rafols, C. Linear free energy relationship analysis of microemulsion electrokinetic chromatographic determination of lipophilicity. *J. Chromatogr. A* **1996**, *752*, 243–249.
- Poole, S. K.; Poole, C. F. Characterization of surfactant selectivity in micellar electrokinetic chromatography. *Analyst* **1997**, *122*, 267–274.

- (27) Rosés, M.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Martínez, A. M.; Abraham, M. H. Solute-solvent interactions in micellar electrokinetic chromatography. Characterization of sodium dodecyl sulfate-Brij 35 micellar systems for quantitative structure-activity relationship modelling. *J. Chromatogr. A* **1999**, *845*, 217-226.
- (28) Fuguet, E.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Abraham, M. H.; Rosés, M. Solute-solvent interactions in micellar electrokinetic chromatography. III. Characterization of the selectivity of micellar electrokinetic chromatography systems. *J. Chromatogr. A* **2002**, *942*, 237-248.
- (29) Abraham, M. H.; Rosés, M.; Poole, C. F.; Poole, S. K. Hydrogen bonding. 42. Characterization of reversed-phase high-performance liquid chromatographic C_{18} stationary phases. *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, *10*, 358-368.
- (30) Valko, K.; Du, C. M.; Bevan, C. D.; Reynolds, D. P.; Abraham, M. H. Rapid-gradient HPLC method of measuring drug interactions with immobilized artificial membrane: comparison with other lipophilicity measures. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1085-1096.
- (31) Lepout, C.; Poole, C. F. Retention characteristics of an immobilized artificial membrane column in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *946*, 107-124.
- (32) Ishihama, Y.; Asakawa, N. Characterization of lipophilicity scales using vectors from solvation energy descriptors. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 1305-1312.
- (33) Abraham, M. H. Can we identify models for intestinal absorption, blood-brain barrier distribution and intestinal absorption?. In *EuroQSAR 2002. Designing Drugs and Crop Protectants: Processes, Problems and Solutions*; Ford, M., Livingstone, D., Dearden, J., Van de Waterbeemd, H., Eds.; Blackwell: Oxford, U.K., 2003; pp 5-7.
- (34) Fuguet, E.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Abraham, M. H.; Rosés, M. Selectivity of single, mixed, and modified pseudostationary phases in electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1900-1914.
- (35) Lázaro, E.; Ràfols, C.; Rosés, M. Characterization of immobilized artificial membrane (IAM) and XTerra columns by means of chromatographic models. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1081*, 163-173.
- (36) Green, C. E.; Abraham, M. H.; Acre, W. E.; De Fina, K. M.; Sharp, T. L. Solvation descriptors for pesticides from the solubility of solids: diuron as an example. *Pest Manage. Sci.* **2000**, *56*, 1043-1053.
- (37) Ràfols, C.; Poza, A.; Fuguet, E.; Rosés, M.; Bosch, E. Solute-solvent interactions in micellar electrokinetic chromatography: V. Factors that produce peak splitting. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2408-2416.
- (38) Du, C. M.; Valko, K.; Bevan, C.; Reynolds, D.; Abraham, M. H. Rapid gradient RP-HPLC method for lipophilicity determination: a solvation equation based comparison with isocratic methods. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4228-4234.
- (39) Lombardo, F.; Shalacva, M. Y.; Tupper, K. A.; Gao, F.; Abraham, M. H. ElogPoct: a tool for lipophilicity determination in drug discovery. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2922-2928.
- (40) Du, C. M.; Valko, K.; Bevan, C.; Reynolds, D.; Abraham, M. H. Rapid method for estimating octanol-water partition coefficient ($\log P_{ow}$) from isocratic RP-HPLC and a hydrogen bond acidity term (A). *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, *24*, 635-649.
- (41) Valko, K.; Du, C. M.; Bevan, C.; Reynolds, D. P.; Abraham, M. H. Rapid method for the estimation of octanol/water partition coefficient ($\log P_{ow}$) from gradient RP-HPLC retention and a hydrogen bond acidity term ($\Sigma\alpha^H$). *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1137-1146.
- (42) Poole, S.; Poole, C. F. Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients. *J. Chromatogr. B* **2003**, *797*, 3-19.

JM0602108

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Chromatography A, 1081 (2005) 163–173

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY Awww.elsevier.com/locate/chroma

Characterization of immobilized artificial membrane (IAM) and XTerra columns by means of chromatographic models

Elisabet Lázaro, Clara Ràfols, Martí Rosés*

Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Diagonal 647, E-08028 Barcelona, Spain

Received 19 December 2004; received in revised form 17 May 2005; accepted 23 May 2005

Abstract

Immobilized artificial membranes (IAMs) prepared from phosphatidylcholine analogs are used as stationary phases in liquid chromatography systems to model drug partitioning between an aqueous phase (mobile phase) and a cell membrane (IAM column). Two different chromatographic models, which describe retention as a function of solute and column-mobile phase properties, have been applied to characterization of an IAM and two reversed phase C18 columns (Waters XTerra MSC18 and XTerra RP18) with acetonitrile–water mobile phases. The comparison of the results shows that the phosphatidylcholine group makes IAM column more polar than both XTerra columns, specially in terms of hydrogen-bond acceptor ability. XTerra RP18 is slightly more polar than XTerra MSC18 because of the presence of the embedded carbamate polar group.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Immobilized artificial membranes; XTerra columns; HPLC; LSER model; Polarity model

1. Introduction

Immobilized artificial membranes (IAMs) were developed by Pidgeon and Venkataram [1] by covalent binding of a phospholipids monolayer (typically phosphatidylcholine-PC) to silica-propylamine particles. Because of steric hindrance, some residual free propylamino groups still remain on the silica surface after coupling with the phosphatidylcholine molecules. As a result, IAM columns show a basic IAM.PC subsurface [2].

IAM columns are mainly used for the estimation of biomembrane transport properties due to the fact that they are physically and chemically similar to cell membranes and, therefore, mimic fluid phospholipid bilayers. Thus, for instance, the retention factor on IAM columns correlated well with solute partition coefficients in fluid liposome systems [3,4] and has been used to predict drug transport across the blood–brain barrier [5,6]; to prognosticate skin permeability and skin partition coefficients [7,8] and to predict intestinal absorption [3,9,10].

There is not a universal model to characterize chromatographic columns due to the fact that the retention process is very complex and depends on many factors. One of the models tested lately is a solvation parameter model [11–13]. However, there are many others which have been developed to predict the retention of a solute in RPLC. The main purpose of this work is to characterize several columns by means of two chromatographic models: the global linear solvation energy relationship (LSER) model and the polarity model. In addition to IAM.PC.DD2 column, in this report XTerra MSC18 and XTerra RP18 columns have also been tested, and all of them have been compared.

2. Theory

2.1. Linear solvent strength theory (LSST)

The retention data ($\log k$) of a neutral solute can be related to the composition of the mobile phase by means of a quasi-linear function [14–17], over a limited range of organic solvent:

$$\log k = \log k_w - m_k \phi \quad (1)$$

* Corresponding author. Tel.: +34 934039275; fax: +34 934021233.
E-mail address: marti@apolo.qui.ub.es (M. Rosés).

where k is the solute retention factor at a specific mobile phase composition, ϕ is the mobile phase composition expressed as the volume fraction of the organic modifier, k_w is the solute retention factor extrapolated to mobile phase equivalent to pure water, and m_k is a solute-dependent solvent strength parameter specific to the organic modifier on the stationary phase under consideration.

The value of k_w varies substantially with the type of mobile phase modifier, which should not vary if the Eq. (1) was valid over the entire range of mobile phase composition. Another problem of this model is that it is only valid for one solute, since different solutes require different k_w and m_k parameters.

2.2. Linear solvation energy relationship (LSER)

The LSER model has been widely used for a lot of different systems, including many chromatographic systems. The logarithmic retention factors ($\log k$) at a single mobile phase composition can be correlated with the solutes molecular properties using the LSER model [18–20]:

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (2)$$

where k is the solute retention factor. The solute descriptors are the excess molar refraction E , the dipolarity/polarizability S , the solute's effective hydrogen-bond acidity A and hydrogen-bond basicity B and McGowan's characteristic volume V .

The coefficients in Eq. (2), which are calculated by multiple linear regression, represent the difference in solvation properties of both phases forming the chromatographic system. The e coefficient depends on the difference in capacity of the solvated stationary and mobile phases to interact with solute n - or π - electrons; s is a measure of the difference in capacity of the solvated phases to take part in dipole–dipole and dipole–induced dipole interactions; the a and b coefficients represent the differences in hydrogen-bond basicity and acidity, respectively, between the stationary and the mobile phases; and v is a measure of the relative ease of forming a cavity for the solute in the solvated stationary and mobile phases.

Each mobile phase composition is characterized by a different LSER equation. Therefore, the number of retention measurements increases with the number of mobile phase compositions being characterized.

2.3. The global LSER model

It would be much more efficient if we could predict retention for multiple neutral solutes at multiple mobile phase compositions. For this reason, the LSER and LSST models were both combined [16,17]. The $\log k_w$ and m_k parameters were modelled by the LSER theory, as shown by the following equations:

$$\log k_w = c_w + e_w E + s_w S + a_w A + b_w B + v_w V \quad (3)$$

$$m_k = c_m + e_m E + s_m S + a_m A + b_m B + v_m V \quad (4)$$

Replacing Eqs. (3) and (4) in Eq. (1), a global linear solvation energy relationship model (global LSER) was derived:

$$\log k = (c_w - c_m \phi) + (e_w - e_m \phi)E + (s_w - s_m \phi)S + (a_w - a_m \phi)A + (b_w - b_m \phi)B + (v_w - v_m \phi)V \quad (5)$$

It is also possible to obtain the same model considering the coefficients of Eq. (2) as linear relationships of ϕ . The global LSER is a great experimental simplification, since it only requires 12 coefficients instead of six coefficients for every ϕ value using the LSER model.

2.4. The polarity model

We have developed a polarity model for neutral solutes [17,21] based on a new solvent parameter (P_m^N), which is related to acetonitrile–water mobile phase composition:

$$P_m^N = 1.00 - \frac{2.13\phi}{1 + 1.42\phi} \quad (6)$$

The retention factors in all experimental mobile phases are related to this parameter, according to:

$$\log k = q + pP_m^N \quad (7)$$

where q and p are constants depending on the solute. Next, a linear correlation is established between q and p for all solutes in order to obtain first estimates of $(\log k)_0$ and P_s^N parameters:

$$q = (\log k)_0 - pP_s^N \quad (8)$$

Replacing Eq. (8) in Eq. (7) leads to the following equation:

$$\log k = (\log k)_0 + p(P_m^N - P_s^N) \quad (9)$$

where p is a solute parameter, P_m^N is a mobile phase parameter and $(\log k)_0$ and P_s^N are two stationary phase constant parameters. Nevertheless, these values can be improved in an iterative process by minimising the sum of squared residuals (SSR) between the predicted and the experimental $\log k$. After a few iterations, we obtain not only the optimal $(\log k)_0$ and P_s^N parameters, but also refined p values [22].

3. Experimental

3.1. Apparatus

The retention data were measured in an IAM.PC.DD2 column (100 mm \times 4.6 mm I.D., 12 μ m, Regis Technologies Inc., Morton Grove, IL, USA), XTerra MSC18 and XTerra RP18 columns (150 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μ m, Waters Corporation, Milford, MA, USA). All measurements were

performed with a Shimadzu liquid chromatograph (Kyoto, Japan) equipped with two Shimadzu LC-10AD pumps and a Shimadzu SPD-10AV detector. The temperature was controlled at 25.0 ± 0.1 °C with a Shimadzu CTO-10AS column oven. All pH measurements were taken with a Ross Combination electrode Orion 8102 (glass electrode and a reference electrode with a 3.0 M KCl solution in water as salt bridge) in a Crison micropH 2002 potentiometer with a precision of ± 0.1 mV (± 0.002 pH units).

3.2. Chemicals

Acetonitrile was HPLC grade from Merck (Darmstadt, Germany) and water purified by the Milli-Q plus system from Millipore, with a resistivity of 18.2 M Ω cm. The sodium dihydrogenphosphate monohydrate (GR), the disodium hydrogenphosphate (GR) and the sodium hydroxide (GR) were from Merck. The test solutes employed were reagent grade or better and obtained from Merck, Fluka (Steinheim, Germany), Aldrich (Steinheim, Germany) or Carlo Erba (Milano, Italy).

3.3. Procedure

The eluents were mixtures of acetonitrile and 0.01 M phosphate aqueous buffer adjusted at pH 7, in percentages ranging from 10 to 60 % for IAM.PC.DD2 column, and from 20 to 60% for XTerra columns, due to the extremely large retention times of several solutes in these columns. All compounds were solved in methanol and their concentration were 0.1 mg mL⁻¹. The injection volume was always 10 μ L. The detection wavelength was at 254 nm for all the compounds (except geraniol, alpha-pinene, pyrrole and furan, whose wavelength was at 214 nm). Isocratic conditions were always used at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The column hold-up time was determined by using an aqueous solution of potassium bromide (0.1 mg mL⁻¹) as an unretained solute. Its detection was performed at 200 nm. Retention data were expressed by the logarithm of the capacity factor, $\log k$, defined as $\log k = \log[(t_r - t_o)/t_o]$ where t_r and t_o are the retention times of the solute and the unretained compound, respectively. All measurements were taken in triplicate.

4. Results and discussion

The retention of 59 solutes in IAM.PC.DD2, XTerra MSC18 and XTerra RP18 columns has been characterized by means of the global LSER and the polarity models. The $\log k$ values were obtained for all solutes in the different chromatographic systems. However, some compounds could not be measured in all mobile phases due to their strong retention. The retention data follow the trend expected in the reversed-phase liquid chromatography (RPLC), i.e., retention increases when the acetonitrile content of the mobile phase decreases.

4.1. Application of the global LSER model to neutral compounds

The global LSER model (Eq. (5)) is derived taking LSST and LSER models into account. The LSST model describes a linear relationship between the solute retention and the volume fraction of organic solvent, but it is only observed over a limited range of mobile phase composition. Eq. (1) was applied to the retention data of each solute at the mobile phase compositions studied in order to check if the tested mobile phase range was included in the linear range. The $\log k_w$, m_k and statistics of all solutes and columns are shown in Table 1. In general, very good correlations were obtained.

The LSER model correlates the retention data with the molecular properties of the solutes studied, whose descriptors are shown in Table 2. In order to check the applicability of the global LSER model (Eq. (5)), we correlate the solute descriptors with the $\log k_w$ and m_k parameters of Table 1. We obtained two relationships ($\log k_w$ and m_k) for each column (IAM.PC.DD2, XTerra MSC18 and XTerra RP18, respectively):

$$\log k_w = -0.572 + 0.716E - 0.843S + 0.124A - 2.317B + 2.785V \quad \text{SD} = 0.102, r = 0.993, F = 639 \quad (10)$$

$$m_k = 0.555 + 0.844E - 0.941S - 0.039A - 3.035B + 3.734V \quad \text{SD} = 0.177, r = 0.989, F = 450 \quad (11)$$

$$\log k_w = -0.031 + 0.312E - 0.766S - 0.456A - 3.082B + 3.533V \quad \text{SD} = 0.090, r = 0.996, F = 915 \quad (12)$$

$$m_k = 0.386 + 0.608E - 0.929S - 0.123A - 3.486B + 4.215V \quad \text{SD} = 0.145, r = 0.990, F = 394 \quad (13)$$

$$\log k_w = -0.213 + 0.471E - 0.720S - 0.222A - 2.991B + 3.299V \quad \text{SD} = 0.076, r = 0.997, F = 1212 \quad (14)$$

$$m_k = 0.158 + 0.449E - 0.659S + 0.043A - 3.369B + 4.012V \quad \text{SD} = 0.109, r = 0.994, F = 666 \quad (15)$$

After this proof, the global LSER model was applied to the retention data, and three equations were obtained (for IAM.PC.DD2, XTerra MSC18 and XTerra RP18 columns, respectively):

$$\log k = (-0.520 - 0.603\phi) + (0.758 - 0.979\phi)E + (-0.843 + 0.849\phi)S + (0.146 + 0.066\phi)A + (-2.199 + 2.787\phi)B + (2.644 - 3.426\phi)V \quad \text{SD} = 0.096, r = 0.992, F = 1153 \quad (16)$$

166

E. Lázaro et al. / J. Chromatogr. A 1081 (2005) 163–173

$$\begin{aligned} \log k &= (0.002 - 0.505\phi) + (0.423 - 0.746\phi)E & \log k &= (-0.219 - 0.192\phi) + (0.470 - 0.615\phi)E \\ &+ (-0.811 + 0.803\phi)S + (-0.400 + 0.132\phi)A & &+ (-0.584 + 0.494\phi)S + (-0.248 + 0.060\phi)A \\ &+ (-3.094 + 3.338\phi)B + (3.419 - 3.738\phi)V & &+ (-3.003 + 3.317\phi)B + (3.180 - 3.642\phi)V \\ \text{SD} &= 0.092, r = 0.993, F = 902 & (17) & \text{SD} = 0.062, r = 0.996, F = 1559 & (18) \end{aligned}$$

Table 1

Correlations of $\log k$ values of the studied solutes with the mobile phase composition (ϕ) according to Eq. (1)

Solute	IAM.PC.DD2, $\log k = \log k_w - m_k\phi$					XTerra MSC18, $\log k = \log k_w - m_k\phi$					XTerra RP18, $\log k = \log k_w - m_k\phi$				
	$\log k_w$	m_k	r	SD	F	$\log k_w$	m_k	r	SD	F	$\log k_w$	m_k	r	SD	F
2,3-Benzofuran	1.496	3.702	0.944	0.352	16	2.331	3.446	0.994	0.101	93	2.141	3.208	0.998	0.064	201
2,3-Dimethylphenol	1.441	3.192	0.997	0.061	398	1.885	3.162	0.991	0.121	55	1.800	2.914	0.995	0.079	109
2,4-Dimethylphenol	1.460	3.239	0.997	0.062	404	1.929	3.248	0.992	0.116	63	1.822	2.951	0.995	0.082	103
2-Naphthol	1.933	3.880	0.994	0.114	170	2.065	3.513	0.990	0.137	52	2.137	3.471	0.992	0.125	61
2-Nitroaniline	1.125	2.893	0.999	0.037	906	1.523	2.704	0.992	0.096	63	1.486	2.527	0.997	0.055	172
2-Nitroanisole	1.088	3.016	0.999	0.031	1410	1.776	2.962	0.994	0.089	89	1.619	2.708	0.998	0.050	232
3-Chloroaniline	1.207	2.961	0.999	0.039	864	1.671	2.821	0.993	0.092	75	1.587	2.622	0.997	0.053	196
3-Nitroaniline	0.925	2.635	0.999	0.022	2052	1.334	2.514	0.997	0.052	189	1.308	2.327	0.998	0.038	302
4-Chloroacetanilide	1.267	3.110	0.994	0.090	176	1.592	3.067	0.985	0.150	34	1.553	2.855	0.988	0.124	42
4-Chloroaniline	1.156	2.892	0.998	0.042	714	1.597	2.765	0.992	0.099	63	1.495	2.548	0.996	0.061	141
4-Chlorophenol	1.541	3.269	0.997	0.071	310	1.790	3.164	0.989	0.130	47	1.768	2.944	0.994	0.089	88
4-Nitroaniline	1.012	2.752	0.997	0.052	415	1.199	2.405	0.993	0.082	70	1.277	2.360	0.997	0.049	188
Acetanilide	0.480	2.109	0.997	0.041	400	0.778	1.980	0.979	0.116	23	0.765	1.866	0.991	0.073	53
Acetophenone	0.760	2.541	0.999	0.026	1450	1.441	2.513	0.991	0.093	59	1.252	2.229	0.996	0.054	136
Aniline	0.351	1.813	0.999	0.016	1846	1.785	3.589	0.948	0.341	9	0.671	1.481	1.000	0.010	1740
Anisole	1.062	2.826	0.999	0.020	3081	1.904	2.897	0.996	0.071	134	1.661	2.581	0.999	0.034	471
Antipyrine	0.222	1.827	0.991	0.068	108	0.577	2.025	0.961	0.164	12	0.387	1.651	0.963	0.131	13
Benzaldehyde	0.630	2.252	0.999	0.014	3842	1.307	2.307	0.996	0.057	132	1.140	2.029	0.999	0.031	333
Benzamide	0.121	1.593	0.995	0.045	189	-0.009	0.962	0.999	0.011	616	0.275	1.404	0.983	0.074	28
Benzene	0.955	2.542	0.998	0.043	511	1.836	2.656	0.998	0.047	256	1.610	2.420	1.000	0.014	2292
Benzophenone	2.063	4.295	0.996	0.097	291	2.906	4.307	0.993	0.145	71	2.675	3.991	0.994	0.128	78
Benzonitrile	0.767	2.477	0.999	0.015	3874	1.478	2.500	0.996	0.064	121	1.318	2.251	0.999	0.031	426
Benzyl benzoate	2.706	5.276	0.996	0.124	267	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bromobenzene	1.748	3.564	0.998	0.049	773	2.580	3.600	0.996	0.087	137	2.378	3.402	0.997	0.075	163
Butylbenzene	2.784	5.035	0.995	0.143	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butyrophenone	1.561	3.591	0.998	0.056	605	2.490	3.651	0.993	0.120	74	2.253	3.388	0.996	0.090	114
Caffeine	-0.166	1.291	0.964	0.097	26	-0.052	1.001	0.907	0.131	5	-0.071	0.884	0.967	0.066	14
Chlorobenzene	1.584	3.384	0.999	0.041	982	2.416	3.396	0.997	0.072	178	2.235	3.235	0.997	0.065	199
Corticosterone	1.694	3.951	0.982	0.205	55	1.251	2.385	0.999	0.015	2013	2.093	4.020	0.970	0.287	16
Cortisone	1.294	3.584	0.982	0.188	53	1.895	4.032	0.960	0.333	12	1.696	3.616	0.969	0.259	15
Estradiol	2.652	4.557	0.984	0.234	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estriol	1.658	3.406	0.985	0.160	67	1.508	3.643	0.963	0.286	13	1.859	3.933	0.969	0.284	15
Ethylbenzene	1.805	3.713	0.999	0.046	949	2.843	3.823	0.996	0.092	139	2.541	3.567	0.998	0.058	307
Furan	0.322	1.732	0.994	0.050	180	1.095	1.829	0.999	0.009	3676	0.935	1.623	0.999	0.022	430
Geraniol	1.799	3.999	0.979	0.224	47	2.753	4.299	0.985	0.211	33	2.452	3.943	0.989	0.163	47
Heptanophenone	2.985	5.492	0.996	0.123	292	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrocortisone	1.303	3.371	0.977	0.201	42	1.517	3.384	0.967	0.253	14	1.656	3.572	0.964	0.278	13
m-Cresole	1.050	2.685	0.997	0.049	435	1.428	2.657	0.990	0.106	50	1.352	2.404	0.996	0.058	139
Methyl benzoate	1.106	2.959	0.999	0.032	1233	1.930	3.041	0.991	0.112	59	1.694	2.725	0.996	0.068	130
Monuron	1.237	3.166	0.995	0.086	198	1.606	3.077	0.986	0.145	36	1.548	2.862	0.989	0.119	46
Myrcene	3.014	5.370	0.995	0.149	104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Naphthalene	2.149	4.169	0.997	0.078	423	2.941	4.096	0.994	0.123	89	2.733	3.898	0.996	0.103	114
Nitrobenzene	1.040	2.796	0.999	0.020	2901	1.751	2.784	0.996	0.065	148	1.581	2.526	0.999	0.027	708
o-Toluidine	0.645	2.208	0.999	0.014	3729	0.774	1.408	0.985	0.070	32	1.039	1.926	0.998	0.032	293
Phenol	0.687	2.202	0.999	0.025	1142	0.964	2.053	0.992	0.073	63	0.952	1.898	0.998	0.034	246
Propiophenone	1.161	3.048	0.999	0.038	942	2.103	3.303	0.989	0.141	44	1.758	2.786	0.997	0.064	150
Propylbenzene	2.287	4.359	0.998	0.064	682	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Xylene	1.834	3.728	0.999	0.045	1015	2.865	3.862	0.996	0.088	152	2.540	3.547	0.998	0.057	308
Pyrimidine	-0.499	0.597	0.994	0.017	175	-0.509	0.181	0.881	0.027	3	-0.467	0.184	0.872	0.029	3
Pyrocatechol	0.487	1.768	0.998	0.028	584	0.446	1.544	0.983	0.081	29	0.466	1.435	0.996	0.036	127
Pyrrrole	0.177	1.505	0.995	0.040	211	0.589	1.341	1.000	0.000	1.5E+7	0.538	1.209	0.996	0.029	138
Quinoline	2.065	4.303	0.996	0.096	296	1.711	3.201	0.963	0.253	13	1.204	2.360	0.986	0.114	34
Resorcinol	0.396	1.787	0.994	0.054	160	0.224	1.369	0.984	0.069	31	0.338	1.410	0.994	0.042	89
Thiourea	-0.615	0.309	0.993	0.010	152	-1.297	0.513	0.851	0.090	3	-1.390	0.746	0.967	0.055	14
Thymol	2.194	4.267	0.997	0.086	363	2.883	4.319	0.992	0.149	68	2.717	4.018	0.995	0.110	106
Toluene	1.401	3.147	0.999	0.035	1167	2.331	3.239	0.998	0.058	248	2.107	3.049	0.998	0.049	304
Valerophenone	2.010	4.191	0.998	0.073	482	3.037	4.298	0.994	0.133	83	2.752	3.989	0.995	0.113	100

Table 2
Solute descriptors studied in this work

Solute	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>V</i>
2,3-Benzofuran	0.888	0.83	0.00	0.15	0.9053
2,3-Dimethylphenol	0.850	0.90	0.52	0.36	1.0569
2,4-Dimethylphenol	0.840	0.80	0.53	0.39	1.0569
2-Naphthol	1.520	1.08	0.61	0.40	1.1441
2-Nitroaniline	1.180	1.37	0.30	0.36	0.9904
2-Nitroanisole	0.968	1.34	0.00	0.38	1.0902
3-Chloroaniline	1.050	1.10	0.30	0.36	0.9390
3-Nitroaniline	1.200	1.71	0.40	0.35	0.9904
4-Chloroacetanilide	0.980	1.50	0.64	0.51	1.2357
4-Chloroaniline	1.060	1.10	0.30	0.35	0.9390
4-Chlorophenol	0.915	1.08	0.67	0.20	0.8975
4-Nitroaniline	1.220	1.91	0.42	0.38	0.9904
Acetanilide	0.870	1.36	0.46	0.69	1.1137
Acetophenone	0.818	1.01	0.00	0.48	1.0139
Alpha-pinene	0.446	0.14	0.00	0.12	1.2574
Aniline	0.955	0.96	0.26	0.50	0.8162
Anisole	0.708	0.75	0.00	0.29	0.9160
Antipyrine	1.320	1.50	0.00	1.48	1.5502
Benzaldehyde	0.820	1.00	0.00	0.39	0.8730
Benzamide	0.990	1.50	0.49	0.67	0.9728
Benzene	0.610	0.52	0.00	0.14	0.7164
Benzophenone	1.447	1.50	0.00	0.50	1.4808
Benzonitrile	0.742	1.11	0.00	0.33	0.8711
Benzyl benzoate	1.264	1.42	0.00	0.51	1.6804
Bromobenzene	0.882	0.73	0.00	0.09	0.8914
Butylbenzene	0.600	0.51	0.00	0.15	1.2800
Butyrophenone	0.797	0.95	0.00	0.51	1.2957
Caffeine	1.500	1.60	0.00	1.33	1.3632
Chlorobenzene	0.718	0.65	0.00	0.07	0.8388
Corticosterone	1.860	3.43	0.40	1.63	2.7389
Cortisone	1.960	3.50	0.36	1.87	2.7546
Dodecanophenone	0.720	0.95	0.00	0.50	2.4229
Estradiol	1.800	3.30	0.88	0.95	2.1988
Estriol	2.000	3.36	1.40	1.22	2.2575
Ethylbenzene	0.613	0.51	0.00	0.15	0.9982
Furan	0.369	0.53	0.00	0.13	0.5363
Geraniol	0.513	0.63	0.39	0.66	1.4903
Heptanophenone	0.720	0.95	0.00	0.50	1.7184
Hydrocortisone	2.030	3.49	0.71	1.90	2.7975
<i>m</i> -Cresole	0.822	0.88	0.57	0.34	0.9160
Methyl benzoate	0.733	0.85	0.00	0.46	1.0726
Monuron	1.140	1.50	0.47	0.78	1.4768
Myrcene	0.483	0.29	0.00	0.21	1.0000
Naphthalene	1.340	0.92	0.00	0.20	1.0854
Nitrobenzene	0.871	1.11	0.00	0.28	0.8906
<i>o</i> -Toluidine	0.970	0.90	0.23	0.59	0.9571
Phenol	0.805	0.89	0.60	0.30	0.7751
Propiophenone	0.804	0.95	0.00	0.51	1.1548
Propylbenzene	0.604	0.50	0.00	0.15	1.1391
<i>p</i> -Xylene	0.613	0.52	0.00	0.16	0.9982
Pyrimidine	0.606	1.00	0.00	0.65	0.6342
Pyrocatechol	0.970	1.10	0.88	0.47	0.8338
Pyrrole	0.613	0.73	0.41	0.29	0.5774
Quinoline	1.268	0.97	0.00	0.51	1.0443
Resorcinol	0.980	1.00	1.10	0.58	0.8338
Thiourea	0.840	0.82	0.77	0.87	0.5696
Thymol	0.822	0.79	0.52	0.44	1.3387
Toluene	0.601	0.52	0.00	0.14	0.8573
Valerophenone	0.795	0.95	0.00	0.50	1.4366

The coefficients of Eqs. (16)–(18), which are multiplying to the capital letters, correspond to the same coefficients shown in Eq. (2), but represented as a linear relationship of ϕ . Positive coefficients imply an increase in $\log k$, i.e., partition into the stationary phase is favoured. For the same reason, negative coefficients mean that partition into the mobile phase is favoured. The larger the coefficient absolute value, the greater the influence on the retention in RPLC.

For all columns studied, b and v coefficients have the largest absolute values. The v coefficient is large and positive in all cases and its value increases with the water content in the mobile phase. This fact is due to the cohesive density of water. Therefore, creating a cavity inside the mobile phase requires more energy than the necessary in the stationary phase. All b coefficients are large and negative, which indicates that the hydrogen-bond acidity of the stationary phase is lower than the hydrogen-bond acidity of the mobile phase. Therefore, solutes with greater hydrogen-bond acceptor ability (large B descriptor value) are less retained.

All columns have negative s coefficient values, which shows that they are less dipolar than the mobile phase. Regarding the e coefficient, all columns have positive values, which indicates that they are more polarizable than mobile phase.

The solute hydrogen-bond basicity term (a coefficient) depends on the column. Both XTerra columns have a negative values; therefore, they are worse hydrogen-bond acceptors than mobile phase. However, the IAM.PC.DD2 column has a positive a coefficient, which indicates that this stationary phase is more hydrogen-bond basic than mobile phase.

The global LSER model for neutral compounds requires 12 mobile–stationary phase parameters ($c_w, c_m, e_w, e_m, s_w, s_m, a_w, a_m, b_w, b_m, v_w, v_m$) and five solute parameters (E, S, A, B, V) [16].

4.2. Application of the polarity model to neutral compounds

The polarity model relates the retention factor (k) of a neutral compound with a solute parameter (p), a mobile phase parameter (P_m^N) and two stationary phase constant parameters ($(\log k)_0$ and P_s^N) [21]. In order to obtain first estimations of p values, $\log k$ values were correlated with P_m^N for each solute according to Eq. (7).

Next, q versus p values were represented to achieve initial $(\log k)_0$ and P_s^N parameters, according to Eq. (8) (see Fig. 1). These parameters were respectively $(-0.940, 0.172)$ for IAM.PC.DD2 column, $(-1.102, -0.027)$ for XTerra MSC18 column and $(-0.905, 0.013)$ for XTerra RP18 column. In order to improve these parameters, two or three iterations were done for each column [22]. The best fitting parameters are represented in the following equations:

$$\log k = -0.982 + p(P_m^N - 0.154) \quad (19)$$

SD = 0.071, $r = 0.996$, $F = 25059$

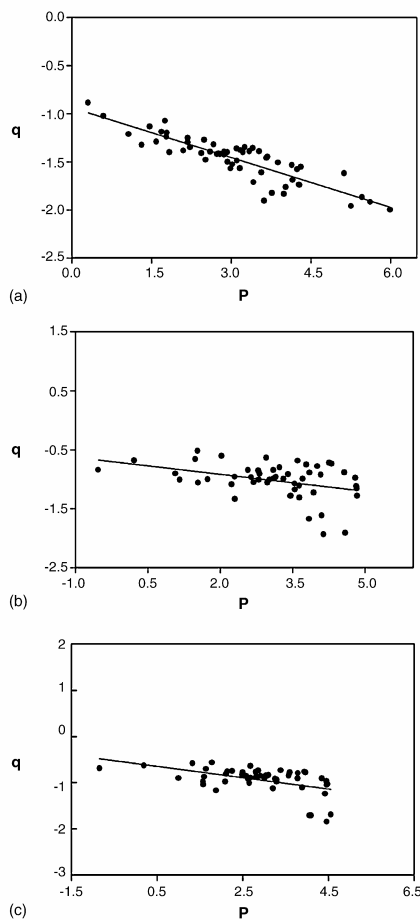


Fig. 1. Plot of q vs. p parameters for all solutes and columns tested: (a) IAM.PC.DD2, (b) XTerra MSC18 and (c) XTerra RP18 column.

$$\log k = -0.992 + p(P_m^N + 0.010) \quad (20)$$

SD = 0.058, $r = 0.997$, $F = 22062$

$$\log k = -0.813 + p(P_m^N - 0.022) \quad (21)$$

SD = 0.048, $r = 0.997$, $F = 26075$

for IAM.PC.DD2, XTerra MSC18 and XTerra RP18 columns, respectively. The $(\log k)_0$ parameter is the retention of any solute in a hypothetical mobile phase with the same polarity as that in the stationary phase ($P_m^N = P_s^N$), whereas the p value represents the ability of the solute to interact with

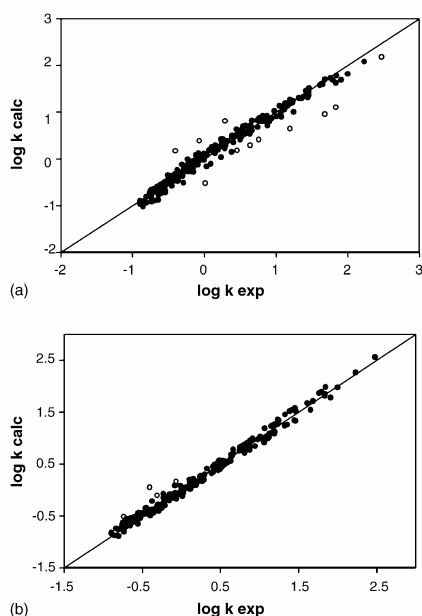


Fig. 2. Plot of calculated $\log k$ with the global LSER model (a) or the polarity model (b) vs. experimental $\log k$ for all solutes and mobile phase compositions studied in IAM.PC.DD2 column. Symbols: (●) solutes used to construct the models, (○) outliers.

both phases. The p values were also improved by means of the iterative process, and are shown in Table 3.

4.3. Comparison of all columns and models studied

The plots calculated $\log k$ versus experimental $\log k$ for all columns and models are presented in Figs. 2–4. The outliers (solutes with a standard residual $>|2.5|$) were removed when the models were calculated, but they are also represented (by empty circles). The theoretical line with slope 1 and intercept 0 is also represented for each plot.

4.3.1. Comparison of the global LSER model with the polarity model

It has been possible to apply successfully both models to the three studied columns. The main difference between models is that Eq. (5) requires five solute parameters and twelve mobile–stationary phase parameters. Therefore, the polarity model is simpler than the global LSER model, since it requires less parameters. For this reason, it can be easier to implement it in RPLC retention prediction. However, the global LSER model characterizes better the solute–solvent interactions in the RPLC system and therefore provides more chemical information.

Table 3
Refined p values for all solutes and columns

Solute	p (Solute polarity parameter)		
	IAM.PC.DD2	XTerra MSC18	XTerra RP18
2,3-Benzofuran	3.413	3.971	3.655
2,3-Dimethylphenol	3.357	3.321	3.182
2,4-Dimethylphenol	3.374	3.347	3.199
2-Naphtol	4.025	3.430	3.467
2-Nitroaniline	2.862	2.943	2.823
2-Nitroanisole	2.729	3.248	2.963
3-Chloroaniline	2.993	3.144	2.960
3-Nitroaniline	2.581	2.713	2.608
4-Chloroacetanilide	3.049	2.837	2.734
4-Chloroaniline	2.925	3.042	2.828
4-Chlorophenol	3.523	3.143	3.098
4-Nitroaniline	2.703	2.532	2.524
Acetanilide	1.938	2.022	1.849
Acetophenone	2.296	2.916	2.564
Aniline	1.813	2.375	1.925
Anisole	2.765	3.529	3.134
Antipyrine	1.554	1.618	1.248
Benzaldehyde	2.169	2.799	2.479
Benzamide	1.460	1.212	1.195
Benzene	2.681	3.560	3.143
Benzophenone	4.086	4.487	4.179
Benzonitrile	2.339	2.991	2.680
Benzyl benzoate	4.919	–	–
Bromobenzene	3.794	4.337	3.993
Butylbenzene	5.443	–	–
Butyrophenone	3.410	4.135	3.754
Caffeine	1.035	1.109	0.865
Chlorobenzene	3.549	4.163	3.824
Corticosterone	3.520	2.640	–
Cortisone	3.022	–	–
Estradiol	5.512	–	–
Estriol	3.695	4.140	–
Ethylbenzene	3.838	4.685	4.203
Furan	1.794	2.712	2.350
Geraniol	3.790	4.207	3.770
Heptanophenone	5.372	–	–
Hydrocortisone	3.009	1.962	–
<i>m</i> -Cresole	2.813	2.798	2.642
Methyl benzoate	2.792	3.560	3.101
Monuron	2.964	2.856	2.719
Myrcene	5.753	–	–
Naphthalene	4.316	4.688	4.356
Nitrobenzene	2.734	3.317	3.013
<i>o</i> -Toluidine	2.221	2.729	2.350
Phenol	2.310	2.322	2.196
Propiophenone	2.862	3.639	3.186
Propylbenzene	4.500	–	–
<i>p</i> -Xylene	3.889	4.700	4.215
Pyrimidine	0.689	0.788	0.558
Pyrocatechol	2.113	1.686	1.552
Pyrrrole	1.611	2.084	1.846
Quinoline	4.087	3.117	2.381
Resorcinol	1.904	1.384	1.314
Thiourea	0.590	–0.233	–0.635
Thymol	4.360	4.434	4.243
Toluene	3.292	4.107	3.697
Valerophenone	4.027	4.737	4.332

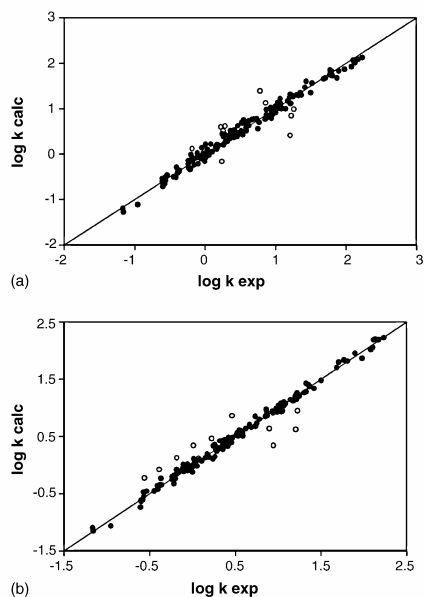


Fig. 3. Plot of calculated $\log k$ with the global LSER model (a) or the polarity model (b) vs. experimental $\log k$ for all solutes and mobile phase compositions studied in XTerra MSC18 column. Symbols: (●) solutes used to construct the models, (○) outliers.

Plots of calculated $\log k$ (with each model) versus experimental $\log k$ for all solutes, mobile phase compositions and columns are shown in Figs. 2–4. For IAM.PC.DD2 column, we can compare its plots and its respective correlations:

$$\log k \text{ calc} = 0.003 + 0.984 \log k \text{ exp} \\ n = 222, \text{SD} = 0.093, r = 0.992, F = 13288 \quad (22)$$

which corresponds to Fig. 2a and:

$$\log k \text{ calc} = 0.002 + 0.991 \log k \text{ exp} \\ n = 225, \text{SD} = 0.071, r = 0.996, F = 24830 \quad (23)$$

for Fig. 2b. The statistics of both correlations are very similar, but they are slightly better for the polarity model. The same can be observed for XTerra MSC18. The correlation of Fig. 3a is:

$$\log k \text{ calc} = 0.007 + 0.986 \log k \text{ exp} \\ n = 156, \text{SD} = 0.088, r = 0.993, F = 10615 \quad (24)$$

which should be compared with the correlation of Fig. 3b:

$$\log k \text{ calc} = 0.003 + 0.994 \log k \text{ exp} \\ n = 142, \text{SD} = 0.058, r = 0.997, F = 22062 \quad (25)$$

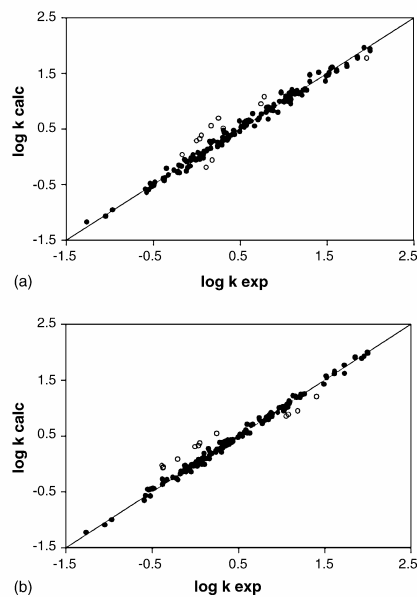


Fig. 4. Plot of calculated $\log k$ with the global LSER model (a) or the polarity model (b) vs. experimental $\log k$ for all solutes and mobile phase compositions studied in XTerra RP18 column. Symbols: (●) solutes used to construct the models, (○) outliers.

Moreover, both models show very good fitting for XTerra RP18 column. The correlation of Fig. 4a is:

$$\log k \text{ calc} = 0.004 + 0.992 \log k \text{ exp} \\ n = 151, \text{SD} = 0.060, r = 0.996, F = 18383 \quad (26)$$

which we compare with the correlation of Fig. 4b:

$$\log k \text{ calc} = 0.002 + 0.995 \log k \text{ exp} \\ n = 141, \text{SD} = 0.048, r = 0.997, F = 26075 \quad (27)$$

Therefore, we must conclude that both models predict retention with a similar accuracy.

4.3.2. Comparison of the studied columns

The structures of all stationary phases are presented in Figs. 6–8 and their main characteristics are shown in Table 4. The XTerra columns are longer and have a surface area and bonding density higher than those of the IAM.PC.DD2 column, thus they have more stationary phase that can interact with solutes. Therefore, all compounds are less retained in the IAM.PC.DD2 column, which shows shorter retention times.

On the other hand, the chemical properties of the studied columns can be compared by examining the coefficients of Eqs. (16)–(18). The most hydrophobic stationary phase

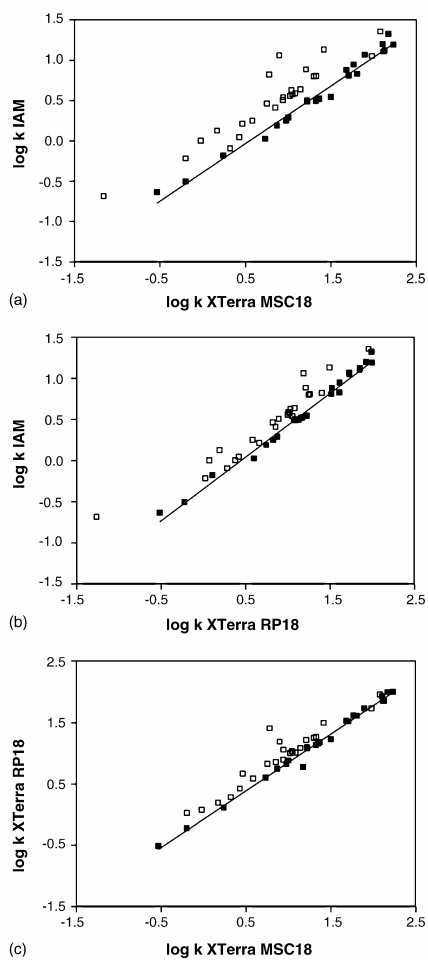


Fig. 5. Plots of experimental $\log k$ in: IAM.PC.DD2 column versus X Terra MSC18 column (a) or X Terra RP18 column (b), and experimental $\log k$ in X Terra RP18 column versus X Terra MSC18 column (c). Symbols: (■) solutes with $A=0$, (□) solutes with $A>0$.

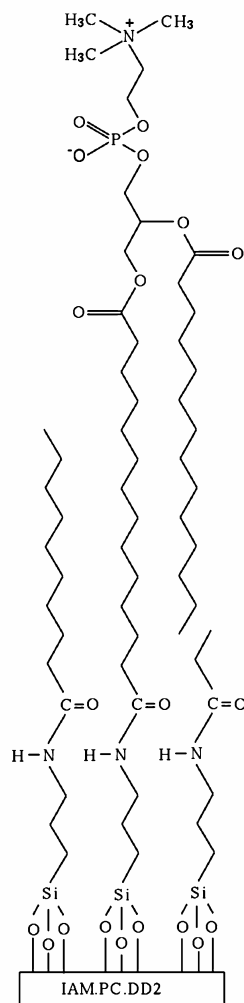


Fig. 6. Structure of studied IAM.PC.DD2 stationary phase.

Table 4
Characteristics of columns used in the present study

Column	Dimensions (mm)	Particle size (μm)	Pore diameter (\AA)	Surface area (m^2/g)	Bonding density ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)
IAM.PC.DD2	100 \times 4.6	12	300	120	0.66 (C(iam)) 0.52 (C ₁₀ /C ₃)
X Terra MSC18	150 \times 4.6	5	125	179	2.14 (C ₁₈)
X Terra RP18	150 \times 4.6	5	127	178	2.28 (C ₁₈)

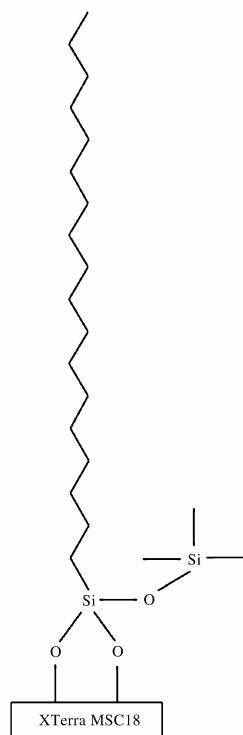


Fig. 7. Structure of studied X Terra MSC18 stationary phase.

(the largest v coefficient) is X Terra MSC18, and the least one is IAM.PC.DD2. X Terra RP18 column has an intermediate hydrophobicity between the two other columns. As regards a coefficient, IAM.PC.DD2 has the largest positive value; therefore it would become the most hydrogen-bond basic of the columns studied. X Terra RP18 goes behind it, and next, X Terra MSC18. The hydrogen-bond acidity (b coefficient) follows the same order. Regarding the e coefficient, IAM.PC.DD2 column is the most polarizable system, and X Terra RP18 is slightly more polarizable than X Terra MSC18.

However, from among all coefficients described above, the most important differences are shown by coefficient a , whereas the other coefficients are quite similar. This means that solutes without hydrogen-bond acidity ($A=0$) should behave similarly in all columns, whereas hydrogen-bond acids ($A>0$) should show retention differences. In order to prove the different hydrogen-bond acceptor ability of each column, plots of retention data of each tested column versus the other two at 20% of acetonitrile were constructed separately (Fig. 5). All solutes were divided

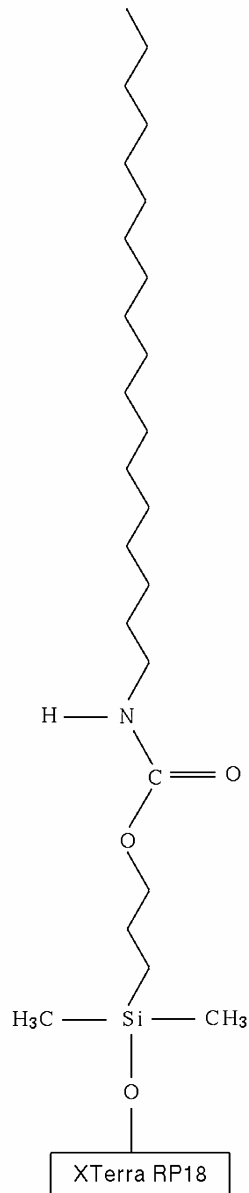


Fig. 8. Structure of studied X Terra RP18 stationary phase.

into two groups. Those compounds represented by a full square have a descriptor $A=0$, whereas the empty squares show solutes with $A>0$. Due to the great hydrogen-bond acceptor ability of IAM.PC.DD2 column, hydrogen-bond donors solutes ($A>0$) should be more retained in this column than in XTerra columns. We can appreciate clearly this trend in Fig. 5a. In contrast, XTerra RP18 column has an intermediate basicity. Consequently, the differences of data retention between solutes with $A=0$ and $A>0$ in relation to the other tested columns are less evidenced (see Fig. 5b,c). Taillardat-Bertschinger et al. [2] proposed that the basicity of IAM.PC.DD2 column was mainly due to the residual-free propylamino groups on the silica surface. Nevertheless, other groups such as negatively charged head group could also influence its hydrogen-bond acceptor ability. On the other hand, the intermediate basicity of XTerra RP18 column could be attributed to its embedded carbamate polar group, which behaves as hydrogen-bond acceptor. Unlike IAM.PC.DD2 column, in this column there are not residual-free propylamino groups, since the amide polar group is introduced in the bonding process to silica support in a different way [23].

The differences in stationary phase hydrogen-bond basicity should be reflected in the overall polarity of the columns, which can be measured through P_s^N parameters of Eqs. (19)–(21). The IAM.PC.DD2 column is more polar than the XTerra RP18 column, being XTerra MSC18 the least polar column.

5. Conclusions

It has been proved that it is possible to apply successfully the global LSER and polarity models to the three studied columns, and therefore, they can be considered as models with general applicability for prediction of RPLC retention in acetonitrile/water mobile phase. Regarding the polarity model, we can conclude that the IAM.PC.DD2 column is the most polar, followed by the XTerra RP18 column, while the XTerra MSC18 column is the least polar. The polarity model is easier to implement in RPLC retention prediction than the global LSER model, since it requires less solute and mobile-stationary phases parameters. However, the global LSER model characterizes better the solute-solvent interactions in the RPLC system. According to this model the IAM.PC.DD2 is the most polarizable, hydrogen-bond acid and basic of the columns tested, followed by the XTerra

RP18, and finally the XTerra MSC18. Nevertheless, the IAM.PC.DD2 is the least hydrophobic stationary phase. The XTerra RP18 column has an intermediate hydrophobicity, and the XTerra MSC18 column is the most hydrophobic.

Acknowledgements

We are thankful for financial support from the Spanish Government (Project CTQ2004-00965/BQU) and the Catalan Government (2001SGR00055). E.L. was supported by a grant from the Spanish Government (AP2002-3049).

References

- [1] C. Pidgeon, U.V. Venkataram, *Anal. Biochem.* 176 (1989) 36.
- [2] A. Taillardat-Bertschinger, P.A. Carrupt, F. Barbato, B. Testa, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 655.
- [3] S. Ong, H. Liu, C. Pidgeon, *J. Chromatogr. A* 728 (1996) 113.
- [4] A. Taillardat-Bertschinger, C.A.M. Martinet, P.A. Carrupt, M. Reist, G. Caron, R. Fruttero, B. Testa, *Pharm. Res.* 19 (2002) 729.
- [5] A. Ducarme, M. Neuwels, S. Goldstein, R. Massingham, *Eur. J. Med. Chem.* 33 (1998) 215.
- [6] A. Reichel, D.J. Begley, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1270.
- [7] A. Nasal, M. Sznitowska, A. Bucinski, R. Kaliszan, *J. Chromatogr. A* 692 (1995) 83.
- [8] F. Barbato, B. Cappello, A. Miro, M.I. La Rotonda, *Il Farmaco* 53 (1998) 655.
- [9] C. Pidgeon, S. Ong, H. Liu, X. Qiu, M. Pidgeon, A.H. Dantzig, J. Munroe, W.J. Hornback, J.S. Kasher, L. Glunz, T. Szczerba, *J. Med. Chem.* 38 (1995) 590.
- [10] M. Genty, G. González, C. Clere, V. Desangle-Gouty, J.Y. Legendre, *Eur. J. Pharm. Sci.* 12 (2001) 223.
- [11] K. Valko, C.M. Du, C.D. Bevan, D.P. Reynolds, M.H. Abraham, *J. Pharm. Sci.* 89 (2000) 1085.
- [12] C. Lepont, C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 107.
- [13] D.M. Cimpean, C.F. Poole, *Analyst* 127 (2002) 724.
- [14] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, *J. Chromatogr.* 165 (1979) 3.
- [15] M.A. Quarry, R.L. Grob, L.R. Snyder, *Anal. Chem.* 58 (1986) 907.
- [16] A. Wang, L.C. Tan, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 848 (1999) 21.
- [17] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 83.
- [18] M.H. Abraham, G.S. Whiting, R.M. Doherty, W.J. Shuely, *J. Chromatogr.* 587 (1991) 229.
- [19] M.H. Abraham, M. Rosés, C.F. Poole, S.K. Poole, *J. Phys. Org. Chem.* 10 (1997) 358.
- [20] M.H. Abraham, M. Rosés, *J. Phys. Org. Chem.* 7 (1994) 672.
- [21] E. Bosch, P. Bou, M. Rosés, *Anal. Chim. Acta* 299 (1994) 219.
- [22] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 955 (2002) 19.
- [23] J.E. O'Gara, D.P. Walsh, B.A. Alden, P. Casellini, T.H. Walter, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2992.

Prediction of retention in reversed phase liquid chromatography by means of the polarity parameter model

Elisabet Lázaro, Pere Izquierdo, Clara Ràfols, Martí Rosés, Elisabeth Bosch*

*Departament de Química Analítica and Institut de Biomedicina (IBUB),
Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1, E-08028, Barcelona, Spain*

Abstract

The polarity parameter model previously developed: $\log k = (\log k)_0 + p(P_m^N - P_s^N)$ has been successfully applied to study several chromatographic systems involving new generation RPLC columns (Luna C18, Resolve C18, XTerra MSC18, and XTerra RP18). In this model the retention of the solutes ($\log k$) is related to a solute parameter (p), a mobile phase parameter (P_m^N) and two chromatographic system parameters (P_s^N and $(\log k)_0$). The studied systems have been characterized with different acetonitrile-water and methanol-water mobile phases, using a set of 12 neutral solutes of different chemical nature. The polarity parameter model allows prediction of retention of any solute in any mobile phase composition just using the retention data obtained in one percentage of organic modifier and the polarity parameters established in the characterization of the chromatographic systems. This model also allows the solute polarity data transference between RPLC characterized systems, so it is possible to predict the retention in various RPLC systems working experimentally with just one of them. Moreover, the global solvation parameter model (global LSER) has also been applied to the same chromatographic systems using a wide set of solutes in order to compare its predictive ability with the one of the polarity parameter model. The results clearly show that both models predict retention with very similar accuracy but the polarity parameter model requires much less preliminary experimental measurements to achieve equivalent results than the global solvation approach.

Keywords: Polarity parameter model; Global solvation parameter model; RPLC; stationary phases; prediction of retention.

* Corresponding autor: Elisabeth Bosch, e.bosch@ub.edu

1. Introduction

There is not a universal model to characterize chromatographic systems in RPLC since the retention process is very complex and depends on many factors, such as the nature of stationary phase [1], type of organic modifier, mobile phase composition [2-4] or temperature [5,6].

Several models have been developed to characterize RPLC systems based on the different interactions produced between the solute and the stationary-mobile phases. One approach is the solvation parameter model (LSER model), which relates the logarithmic retention factors ($\log k$) at a single mobile phase composition with the solutes molecular properties [3,7]:

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1)$$

where k is the solute retention factor. The solute descriptors are the excess molar refraction E , the dipolarity/polarizability S , the solute's effective hydrogen-bond acidity A and hydrogen-bond basicity B and McGowan's characteristic volume V .

The coefficients in Eq. (1), which are calculated by multiple linear regression, represent the difference in

solvation properties of both phases forming the chromatographic system. The e coefficient depends on the difference in capacity of the solvated stationary and mobile phases to interact with solute n - or π - electrons; s is a measure of the difference in capacity of the solvated phases to take part in dipole-dipole and dipole-induced dipole interactions; the a and b coefficients represent the differences in hydrogen-bond basicity and acidity, respectively, between the stationary and the mobile phases; and v is a measure of the relative ease of forming a cavity for the solute in the solvated stationary and mobile phases.

In a given column, each mobile phase composition is characterized by a different LSER equation. Therefore, the number of retention measurements increases with the number of mobile phase compositions being characterized. To solve this problem, a global solvation parameter model was developed, which describes the retention of neutral solutes in one column at any mobile phase composition [8]. The coefficients of Eq. (1) were considered as linear relationships of the volume fraction of the organic modifier (ϕ), getting the following equation:

$$\log k = (c_w - c_m\phi) + (e_w - e_m\phi)E + (s_w - s_m\phi)S + (a_w - a_m\phi)A + (b_w - b_m\phi)B + (v_w - v_m\phi)V \quad (2)$$

The global solvation parameter model involves a great experimental simplification over the LSER model, since it only requires 12 global coefficients instead of 6 coefficients for every ϕ value. However, it is still a high number of coefficients that requires a high number of experiments to obtain them, which is a serious drawback for the implementation of the global solvation parameter model in optimization of chromatographic separations or in prediction of retention.

Literature shows other similar approaches based on solute and column properties, but that include ionic interactions and shape selectivity [9-11]. Thus, Snyder and coworkers developed an empirical linear-free-energy equation:

$$\log k = \log k_{\text{ref}} + \eta'H + \sigma'S + \beta'A + \alpha'B + \kappa'C \quad (3)$$

where the quantities η' , σ' , β' , α' and κ' refer to some property of the solute molecule, while H, S, A, B and C refer to properties of the chromatographic system. Each term of Eq. (3) stands for a different kind of interaction: hydrophobic interaction, steric

selectivity, attraction of protonated bases by ionized silanols, hydrogen bonding between acceptor solutes and non-ionized silanols in the stationary phase or between donor solutes and one acceptor group in stationary phase. The authors characterized the columns using a constant mobile phase composition (50% acetonitrile-aqueous phosphate buffer pH 2.8), and although changes in mobile phase composition have been investigated [10], a general model relating retention of compounds to this system variable has not been developed. This model gives a lot of chemical information about the chromatographic interactions, but it is not useful for quantitative prediction of the retention of new solutes, since it would require excessive experimental effort, as it is explained by the authors [9].

Another interesting model is the one proposed by Euerby and Petersson [12,13]. They have performed an approach based on Tanaka's methodology, using 6 parameters to characterize each column (surface coverage, hydrophobic selectivity, shape selectivity, hydrogen bonding capacity, total ion exchange capacity and acidic ion exchange capacity). To get each parameter they use the retention factor of one specific solute or the ratio of retention factors of two solutes. After that, they classify and

compare the columns basically by Principal Component Analysis (PCA). This approach allows to differentiate between columns, but not to predict retention of new solutes.

In previous works [14-21] we have set up a “polarity parameter model”. This model relates the retention in RPLC ($\log k$) to a mobile phase parameter (P_m^N) (related to the mobile phase composition), a solute parameter (p) and two chromatographic system parameters (P_s^N and $(\log k)_0$), that are related to RPLC system properties. This model has been successfully applied to the characterization of several RPLC C18 columns of different nature [17,20]. The model is based on the equation:

$$\log k = (\log k)_0 + p(P_m^N - P_s^N) \quad (4)$$

The polarity parameter of the mobile phase (P_m^N) is related to its volume fraction of the organic modifier (ϕ) [15,17], according to Eq. (5) for acetonitrile-water and Eq. (6) for methanol-water mobile phases:

$$P_m^N = 1.00 - \frac{2.13\phi}{1+1.42\phi} \quad (5)$$

$$P_m^N = 1.00 - \frac{1.33\phi}{1+0.47\phi} \quad (6)$$

The $(\log k)_0$ is the retention of any solute eluted with a hypothetical

mobile phase showing the same polarity as the stationary phase ($P_m^N = P_s^N$), being P_s^N the polarity parameter of the column. $(\log k)_0$ and P_s^N parameters are constants that depend on the chromatographic system. The p parameter basically depends on the solute, although the nature of the mobile and stationary phases slightly modify its value.

It must be noticed that in agreement with Reichart’s definition of “solvent polarity” [22], adopted by IUPAC [23], here the term “polarity” is taken in a broad sense as the ability of solvent (mobile or stationary phases) and solute to interact by all possible non specific and specific intermolecular interactions (dipole-dipole, dipole-induced dipole, hydrogen bonding, etc) that contribute to the studied effect (i.e. chromatographic retention), excluding, however, those interactions leading to definite chemical alteration of the solute (such as protonation, oxidation, reduction, chemical complex formation, etc).

At first glance, it seems that the hydrophobic subtraction model of Snyder et al. [9-11] or the solvation parameter model should be better than the polarity parameter model, since they consider five independent interactions related to the retention and, therefore, these models embody five different parameters. However, this

perception is not exact, since the analysis of some Snyder's data by means of principal component analysis showed that one principal component already explained 99.7% of the retention variation among solutes [24]. Therefore, one model with less parameters, such as the polarity one, could be considered.

In a previous work [20] we demonstrated that the RPLC systems can be accurately characterized by means of the polarity parameter model with a small set of solutes, and we proposed 12 compounds as a standard characterization set. Since we have already established a wide database for *p* parameters (more than 250 compounds) [18], it is possible to set up linear equations which transfer

solute polarity data between the studied chromatographic systems, allowing easy prediction of the retention of new solutes in the characterized systems. In fact, any RPLC characterized system could be used as a reference to transfer solute polarity data to other RPLC systems, as we show in this article. Now, we extend our study to four new generation columns: Luna C18, Resolve C18, XTerra MSC18, and XTerra RP18 (see Table 1). All of them have C18 chains bound to the silica as stationary phase. Luna C18 and XTerra columns are endcapped and with a very good quality silica support, with almost no residual acidic silanols, but Resolve C18 is not endcapped and shows more acidic silica support [25,26].

Table 1

Characteristics of all columns used in this study, other columns studied in a previous work [20] and the column used to construct the database [18]; data supplied by manufacturers

	Spherisorb ODS-2	Symmetry C18	Chromolith RP-18e	Luna C18(2)	Resolve C18	XTerra RP18	XTerra MS C18
Particle size (μm)	5	5	-	5	5	5	5
Pore size, ϕ (\AA)	80	86 ^c	13 ^a nm/ 2 ^b mm	100	90 ^c	127	125
Surface area (m^2/g)	200	346	300	400	200	178	179
Endcapped	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
Dimensions (mm) (l.xi.d.)	100x5	150x4.6	100x4.6	150x4.6	150x3.9	150x4.6	150x4.6
pH range	3.5-7.5	2-8	2-7.5	2-8	2-8	2-12	1-12
Manufacturer	Waters	Waters	Merck	Phenomenex	Waters	Waters	Waters

The aim of this work is to evaluate the ability of the polarity parameter model to predict accurately the retention of solutes from few experimental measurements. Thus, firstly the global solvation parameter and the polarity parameter models have been applied to chromatographic systems involving the mentioned set of C18 columns and a wide set of solutes. Experimental retention data fit well the predicted ones by means of both models, but the polarity parameter one requires much less experimental effort. Secondly, the polarity parameter model has been tested in order to predict the retention of solutes at any composition of mobile phase using the system parameters established by means of the own model. The idea is to do few experiments using a percentage of organic modifier and to be able to predict retention using any other percentage in the mobile phase. On the other hand, the transference of solute polarity data between RPLC characterized systems should allow the prediction of retention in any RPLC system starting from one of them used as a reference without any additional experimental work.

2. Experimental

2.1. Apparatus

All studied columns are detailed in Table 1. The retention measurements were performed with a Shimadzu liquid chromatograph (Kyoto, Japan) equipped with two Shimadzu LC-10AD pumps and a Shimadzu SPD-M10A diode array detector. The temperature was controlled at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ with a Shimadzu CTO-10AS column oven. All pH measurements were taken with a Ross Combination electrode Orion 8102 (glass electrode and a reference electrode with a 3.0 M KCl solution in water as salt bridge) in a Crison micropH 2002 potentiometer with a precision of ± 0.1 mV (± 0.002 pH units).

2.2. Chemicals

Methanol and acetonitrile were RPLC grade from Merck (Darmstadt, Germany) and water purified by the Milli-Q plus system from Millipore, with a resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$. The sodium dihydrogenphosphate monohydrate (GR), the disodium hydrogenphosphate (GR), the acetic acid (GR) and the sodium hydroxide (GR) were from Merck. The solutes employed were reagent grade or better and obtained from Merck, Fluka (Steinheim, Germany), Aldrich (Steinheim, Germany) or Carlo Erba (Milano, Italy).

2.3. Procedure

The eluents were mixtures of organic modifier (acetonitrile or methanol) and water phase in percentages ranging from 10 to 80 % (v/v). Depending on the solutes, the aqueous phase was 0.01 M phosphate aqueous buffer adjusted at pH = 7 or 0.1 M acetic acid (pH = 2.7), in order to get neutral solutes. All compounds were solved in methanol and their concentration were 0.1 mg mL⁻¹. The injection volume was always 10 µL. Isocratic conditions were always used at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The column hold-up time was determined by using an aqueous solution of potassium bromide (0.1 mg mL⁻¹) as unretained solute. Retention data were expressed by the logarithm of the capacity factor, log *k*, defined as log *k* = log [(*t_r* - *t₀*)/*t₀*] where *t_r* and *t₀* are the retention times of the solute and the unretained compound, respectively. All measurements were taken in triplicate.

2.4. Calculation of polarity parameters

Initial estimations of the equation parameters (P_s^N , ($\log k$)₀ and *p* for each solute) were obtained from linear correlations of the retention data of each solute (log *k*) against the polarity value of the mobile phase (P_m^N) [14-21], according to Eq.(7):

$$\log k = q + p P_m^N \quad (7)$$

with

$$q = (\log k)_0 - p P_s^N \quad (8)$$

Final values were obtained by non-linear regression of Eq.(4), by using these initial estimations and minimizing the sum of residual squares between the experimental and calculated retention data. To implement the iterative process, the Solver tool of Microsoft Excel was used [20].

3. Results and discussion

3.1. Study of several RPLC columns with the global solvation parameter model and the polarity parameter model

First, we applied the global solvation parameter model to Symmetry C18, Chromolith RP-18e, Luna C18, Resolve C18, XTerra MSC18, and XTerra RP18 columns. To apply the global LSER model we needed at least 5 solutes for each coefficient. The set used for XTerra RP18 and MSC18 columns was the same previously selected to study these columns using acetonitrile [27], and now we have extended the study to methanol. However, the set used for Symmetry C18, Chromolith RP-18e,

Luna C18 and Resolve C18 columns is the same used in a previous work about the polarity parameter model [20]. All these solutes are included together in Table 2, which also shows the Abraham's descriptors [28]. These

compounds were injected using different percentages of acetonitrile and methanol in the hydroorganic mobile phases. The coefficients of Eq. (2) obtained after the linear regression are showed in Table 3.

Table 2
Solute descriptors of all solutes studied in this work.

Solute	E	S	A	B	V
1-Naphthoic acid	1.460	1.27	0.65	0.45	1.3007
2,3-Benzofuran	0.888	0.83	0.00	0.15	0.9053
2,3-Dimethylphenol	0.850	0.90	0.52	0.36	1.0569
2,4,6-Trichlorophenol	1.010	0.80	0.68	0.15	1.1423
2,4-Dichlorophenol	0.960	0.84	0.53	0.19	1.0199
2,4-Dimethylphenol	0.840	0.80	0.53	0.39	1.0569
2-Bromophenol	1.037	0.90	0.35	0.31	0.9501
2-Naphthol	1.520	1.08	0.61	0.40	1.1441
2-Nitroaniline	1.180	1.37	0.30	0.36	0.9904
2-Nitroanisoie	0.968	1.34	0.00	0.38	1.0902
3-Chloroaniline	1.050	1.10	0.30	0.36	0.9390
3-Methylbenzoic acid	0.730	0.90	0.59	0.38	1.0726
3-Nitroaniline	1.200	1.71	0.40	0.35	0.9904
3-Nitrophenol	1.050	1.57	0.79	0.23	0.9493
4-Chloroacetanilide	0.980	1.50	0.64	0.51	1.2357
4-Chloroaniline	1.060	1.10	0.30	0.35	0.9390
4-Chlorophenol	0.915	1.08	0.67	0.20	0.8975
4-Nitroaniline	1.220	1.91	0.42	0.38	0.9904
4-Nitrotoluene	0.870	1.11	0.00	0.28	1.0315
Acetanilide	0.870	1.36	0.46	0.69	1.1137
Acetophenone	0.818	1.01	0.00	0.48	1.0139
alpha – Pinene	0.446	0.14	0.00	0.12	1.2574
Aniline	0.955	0.96	0.26	0.50	0.8162
Anisoie	0.708	0.75	0.00	0.29	0.9160
Anthracene	2.290	1.34	0.00	0.28	1.4544
Antipyrine	1.320	1.50	0.00	1.48	1.5502
Benzaldehyde	0.820	1.00	0.00	0.39	0.8730
Benzamide	0.990	1.50	0.49	0.67	0.9728
Benzene	0.610	0.52	0.00	0.14	0.7164
Benzoic acid	0.730	0.90	0.59	0.40	0.9317
Benzonitrile	0.742	1.11	0.00	0.33	0.8711
Benzophenone	1.447	1.50	0.00	0.50	1.4808
Benzyl benzoate	1.264	1.42	0.00	0.51	1.6804

Biphenyl	1.360	0.99	0.00	0.26	1.3242
Bromobenzene	0.882	0.73	0.00	0.09	0.8914
Butylbenzene	0.600	0.51	0.00	0.15	1.2800
Butyrophenone	0.797	0.95	0.00	0.51	1.2957
Caffeine	1.500	1.60	0.00	1.33	1.3632
Chlorobenzene	0.718	0.65	0.00	0.07	0.8388
Chrysene	3.027	1.73	0.00	0.36	1.8234
Corticosterone	1.860	3.43	0.40	1.63	2.7389
Cortisone	1.960	3.50	0.36	1.87	2.7546
Dodecanophenone	0.720	0.95	0.00	0.50	2.4229
Estradiol	1.800	3.30	0.88	0.95	2.1988
Estriol	2.000	3.36	1.40	1.22	2.2575
Ethylbenzene	0.613	0.51	0.00	0.15	0.9982
Furan	0.369	0.53	0.00	0.13	0.5363
Geraniol	0.513	0.63	0.39	0.66	1.4903
Heptanophenone	0.720	0.95	0.00	0.50	1.7184
Hexachlorobenzene	1.490	0.99	0.00	0.00	1.4508
Hydrocortisone	2.030	3.49	0.71	1.90	2.7975
m-Cresole	0.822	0.88	0.57	0.34	0.9160
Methyl 4-hydroxybenzoate	0.900	1.37	0.69	0.45	1.1313
Methyl benzoate	0.733	0.85	0.00	0.46	1.0726
Monuron	1.140	1.50	0.47	0.78	1.4768
Myrcene	0.483	0.29	0.00	0.21	1.0000
Naphthalene	1.340	0.92	0.00	0.20	1.0854
N-Ethylaniline	0.945	0.85	0.17	0.51	1.0980
Nitrobenzene	0.871	1.11	0.00	0.28	0.8906
n-Propyl 4-hydroxybenzoate	0.860	1.35	0.69	0.45	1.4131
o-Toluidine	0.970	0.90	0.23	0.59	0.9571
Pentachlorophenol	1.220	0.87	0.96	0.01	1.3871
Phenol	0.805	0.89	0.60	0.30	0.7751
Propiophenone	0.804	0.95	0.00	0.51	1.1548
Propylbenzene	0.604	0.50	0.00	0.15	1.1391
p-Xylene	0.613	0.52	0.00	0.16	0.9982
Pyrene	2.808	1.71	0.00	0.28	1.5846
Pyrimidine	0.606	1.00	0.00	0.65	0.6342
Pyrocatechol	0.970	1.10	0.88	0.47	0.8338
Pyrrole	0.613	0.73	0.41	0.29	0.5774
Quinoline	1.268	0.97	0.00	0.51	1.0443
Resorcinol	0.980	1.00	1.10	0.58	0.8338
Thiourea	0.840	0.82	0.77	0.87	0.5696
Thymol	0.822	0.79	0.52	0.44	1.3387
Toluene	0.601	0.52	0.00	0.14	0.8573
Valerophenone	0.795	0.95	0.00	0.50	1.4366

Table 3
Coefficients of all studied systems with the global solvation parameter model using Eq. (2).

Parameters	Symmetry C18	Chromolith RP-18e	Luna C18 (2)	Resolve C18	XTerra MSC18	XTerra RP18
<u>Acetonitrile-</u>						
<u>water</u>						
c_w	0.671	0.137	0.523	0.347	0.002	-0.219
c_m	-1.456	-1.361	-1.104	-1.044	-0.505	-0.192
e_w	-0.070	0.162	0.295	0.145	0.423	0.470
e_m	0.475	-0.021	-0.311	-0.003	-0.746	-0.615
s_w	-0.290	-0.558	-0.378	-0.463	-0.811	-0.584
s_m	-0.396	0.336	0.052	0.269	0.803	0.494
a_w	-0.450	-0.585	-0.507	-0.540	-0.400	-0.248
a_m	-0.264	0.013	-0.071	0.025	0.132	0.060
b_w	-2.630	-2.588	-2.358	-2.243	-3.094	-3.003
b_m	2.051	2.031	1.916	1.773	3.338	3.317
v_w	2.710	2.875	2.364	2.694	3.419	3.180
v_m	-2.258	-2.755	-2.022	-2.691	-3.738	-3.642
r	0.986	0.987	0.983	0.988	0.993	0.996
n	154	184	155	172	156	151
<u>Methanol-</u>						
<u>water</u>						
c_w	0.408	-0.543	0.056	-0.335	-0,110	-0,456
c_m	-1.040	-0.415	-0.593	-0.319	-0,838	-0,287
e_w	-0.055	0.190	0.081	0.122	0,375	0,355
e_m	0.380	0.096	0.146	0.086	-0,544	-0,359
s_w	-0.926	-0.862	-0.573	-0.535	-0,986	-0,642
s_m	0.672	0.429	0.139	0.245	0,878	0,550
a_w	-0.095	-0.266	-0.393	-0.504	-0,347	-0,168
a_m	-0.283	-0.111	0.153	0.255	0,073	0,072
b_w	-3.167	-2.842	-2.668	-2.386	-2,800	-3,029
b_m	1.931	1.580	1.712	1.245	2,215	2,584
v_w	3.909	4.080	3.591	3.524	3,920	3,712
v_m	-3.371	-3.595	-3.089	-3.062	-3,382	-3,494
r	0.993	0.996	0.992	0.992	0.993	0.995
n	179	226	184	207	195	201

n is the number of experimental points used to obtain the coefficients (after removing the outliers)

Next, we applied the polarity parameter model to the same columns in order to compare the results with

those obtained with the global salvation parameter model. In this case, we need much less compounds, only twelve, as

it was previously demonstrated [20]. The set of twelve reference solutes (see Table 4) was injected in all columns using different percentages of acetonitrile and methanol in the hydroorganic mobile phases.

Table 4
Polarity parameters of the chromatographic systems and each compound

Parameters	Spherisorb ODS-2 ^a	Symmetry C18 ^a	Chromolith RP-18e ^a	Luna C18	Resolve C18	XTerra MSC18	XTerra RP18
<u>Acetonitrile-water</u>							
P_s^N	-0.03	-0.14	-0.06	-0.04	-0.04	-0.02	0.00
$(\log k)_0$	-1.02	-1.40	-1.49	-0.83	-1.00	-1.02	-0.91
$p(1,2-$							
Dihydroxybenzene)	1.79	2.13	1.84	1.79	1.78	1.69	1.67
$p(\text{Benzamide})$	1.69	1.88	1.65	1.68	1.78	1.23	1.33
$p(3\text{-Methylphenol})$	2.82	3.04	2.85	2.72	2.70	2.78	2.71
$p(\text{Propiophenone})$	3.70	3.66	3.54	3.38	3.43	3.61	3.23
$p(\text{Methyl benzoate})$	3.59	3.60	3.46	3.30	3.36	3.46	3.15
$p(4\text{-Nitrotoluene})$	3.95	3.93	3.83	3.67	3.70	3.76	3.48
$p(\text{Butyrophenone})$	4.19	4.14	4.09	3.89	3.93	4.09	3.77
$p(\text{Naphthalene})$	4.86	4.65	4.66	4.38	4.43	4.64	4.34
$p(\text{Propylbenzene})$	5.56	5.21	5.28	5.01	4.97	5.34	4.81
$p(\text{Heptanophenone})$	5.78	5.49	5.69	5.36	5.45	5.82	5.33
$p(\text{Butylbenzene})$	6.13	5.64	5.81	5.51	5.49	5.91	5.31
$p(\text{Chrysene})$	7.33	6.28	6.52	-	6.23	-	6.18
<u>Methanol-water</u>							
P_s^N	-0.05	-0.12	-0.12	-0.06	-0.06	-0.16	-0.08
$(\log k)_0$	-1.13	-1.31	-1.76	-1.03	-1.02	-1.76	-1.25
$p(1,2-$							
Dihydroxybenzene)	1.98	2.07	2.05	1.87	1.48	2.29	1.85
$p(\text{Benzamide})$	2.10	2.06	2.07	1.98	1.67	2.35	1.73
$p(3\text{-Methylphenol})$	2.98	3.03	3.05	2.91	2.46	3.27	2.79
$p(\text{Propiophenone})$	3.88	3.59	3.63	3.51	3.18	3.83	3.18
$p(\text{Methyl benzoate})$	3.89	3.63	3.63	3.55	3.17	3.86	3.22
$p(4\text{-Nitrotoluene})$	4.08	3.80	3.76	3.69	3.29	3.93	3.43
$p(\text{Butyrophenone})$	4.36	4.10	4.14	4.05	3.65	4.30	3.65
$p(\text{Naphthalene})$	5.12	4.92	4.80	4.77	4.24	4.90	4.41
$p(\text{Propylbenzene})$	5.71	5.54	5.41	5.52	4.87	5.45	4.77
$p(\text{Heptanophenone})$	6.06	5.73	5.77	5.82	5.29	5.69	5.04
$p(\text{Butylbenzene})$	6.32	6.10	6.01	6.16	5.51	5.93	5.23
$p(\text{Chrysene})$	8.46	7.70	7.11	6.98	6.74	-	-

^a from ref. [20]

The resulting retention data were used to get P_s^N and $(\log k)_0$ as we explained above. Thus, each chromatographic system (column and organic modifier) is characterized by means of these two parameters. They are reported in Table 4, together with those determined previously [20]. In some cases it was not possible to get the p value of chrysene due to its strong retention. All columns show similar P_s^N and $(\log k)_0$ parameters as we expected, since all of them are C18 columns, and no significant differences can be observed due to the manufacturing process of stationary phases.

To check the goodness of the models, we have plotted calculated $\log k$ vs. experimental $\log k$ for all columns and models (see Figs. 1-4). The outliers (solutes with a standard residual $>|2.5|$) were removed when the models were calculated, but they are also represented (by empty circles). The theoretical line with slope 1 and intercept 0 is also represented for each plot. However, we have used different number of solutes to characterize the chromatographic systems by means of both models. For that reason, in the case of polarity parameter model, we have not only represented the set of characterization, but that we have added the compounds given in Table 5. In order to get their calculated $\log k$

values we have used the P_s^N and $(\log k)_0$ parameters of Table 4, and p suitable values for the solutes (average p parameter for any solute from those determined at each studied mobile phase composition). Now, each pair of graphs of the same column (applying the polarity or the global LSER model) have almost the same experimental points. As it can be seen in Figs. 1-4, good correlations were obtained with both models. Global LSER parameter model shows deviation in some points, which had mobile phases containing high percentage of organic modifier, while polarity parameter model shows deviation for mobile phases with high content of water.

In order to compare the accuracy of both models, Table 6 was constructed. It can be observed that the standard deviation is better for polarity parameter model in most cases. The number of outliers which were removed depends on the chromatographic system. In five systems we removed more experimental points with the polarity parameter model (being the total number of experimental points slightly higher), but in the other seven systems was the opposite. Therefore, the polarity parameter model can be considered as good as the global LSER parameter model, or slightly better.

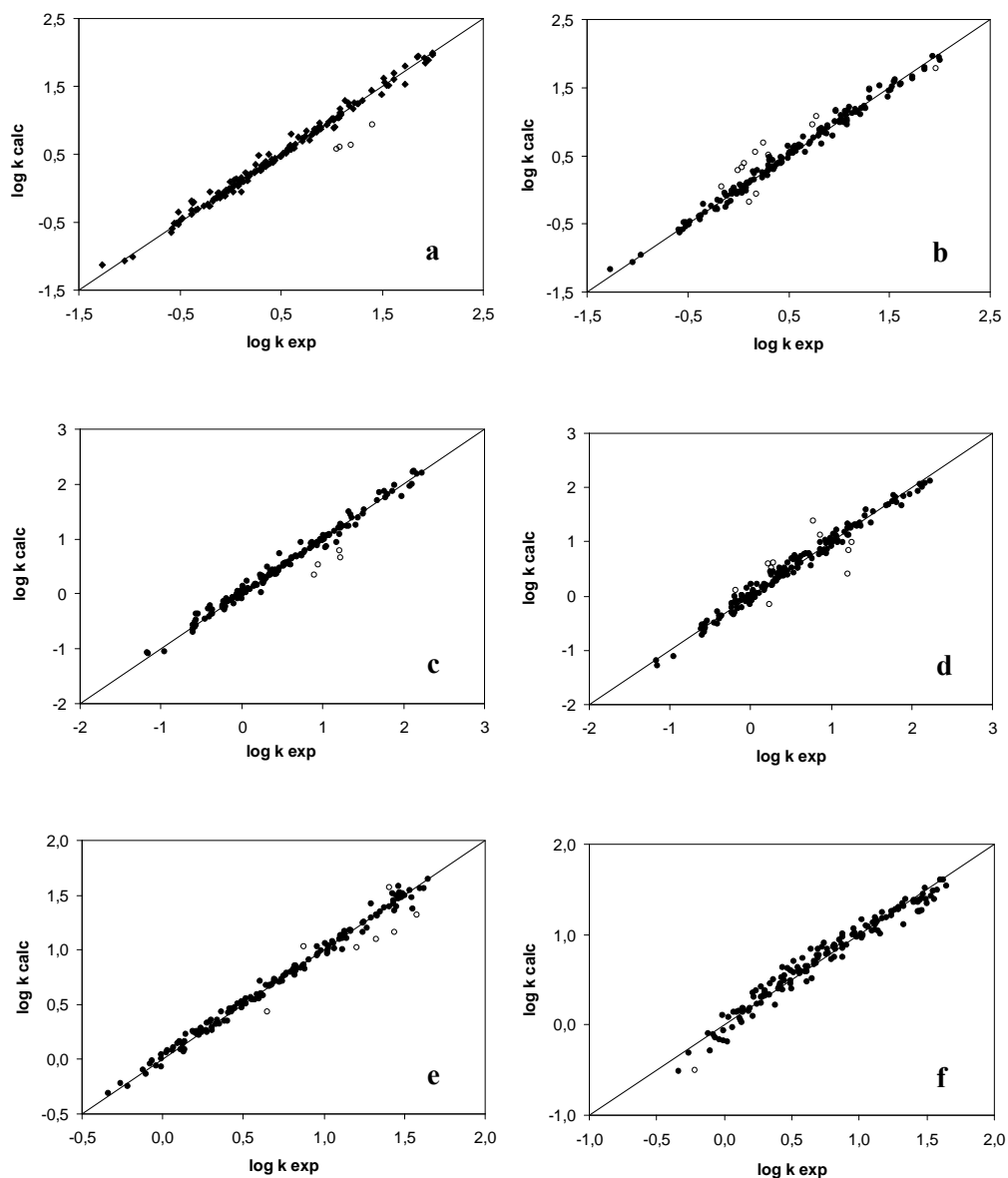


Fig. 1. Plot of calculated $\log k$ vs. experimental $\log k$ values for all studied mobile phase compositions with acetonitrile, using the polarity parameter model (a, c, e) and the global LSER parameter model (b, d, f). The studied columns were X Terra RP18 (a, b), X Terra MSC18 (c, d) and Luna C18 (e, f). Symbols: (●) solutes used to construct the models, (○) outliers.

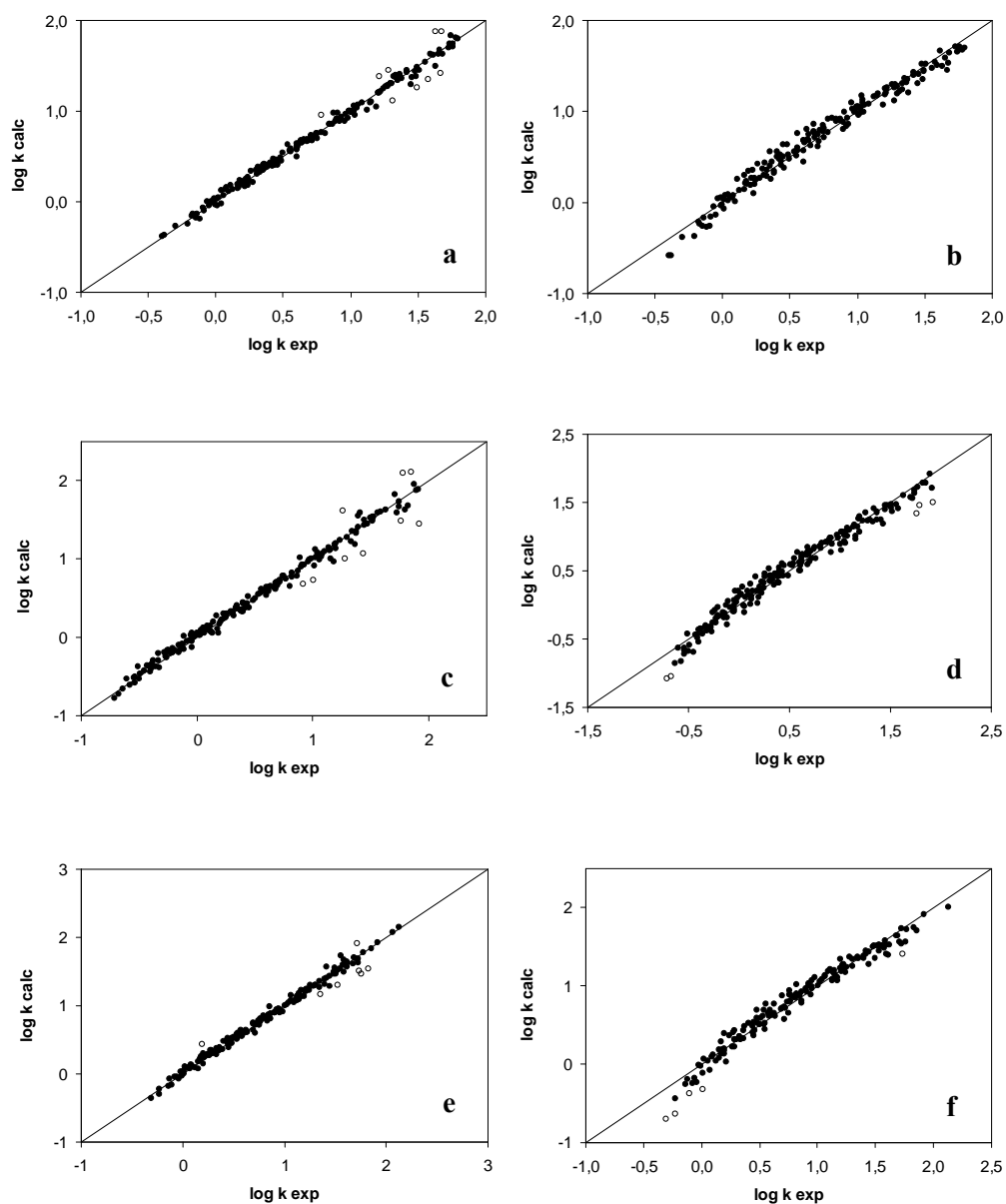


Fig. 2. Plot of calculated $\log k$ vs. experimental $\log k$ values for all studied mobile phase compositions with acetonitrile, using the polarity parameter model (a, c, e) and the global LSER parameter model (b, d, f). The studied columns were Resolve C18 (a, b), Chromolith RP-18e (c, d) and Symmetry C18 (e, f). Symbols: (●) solutes used to construct the models, (○) outliers.

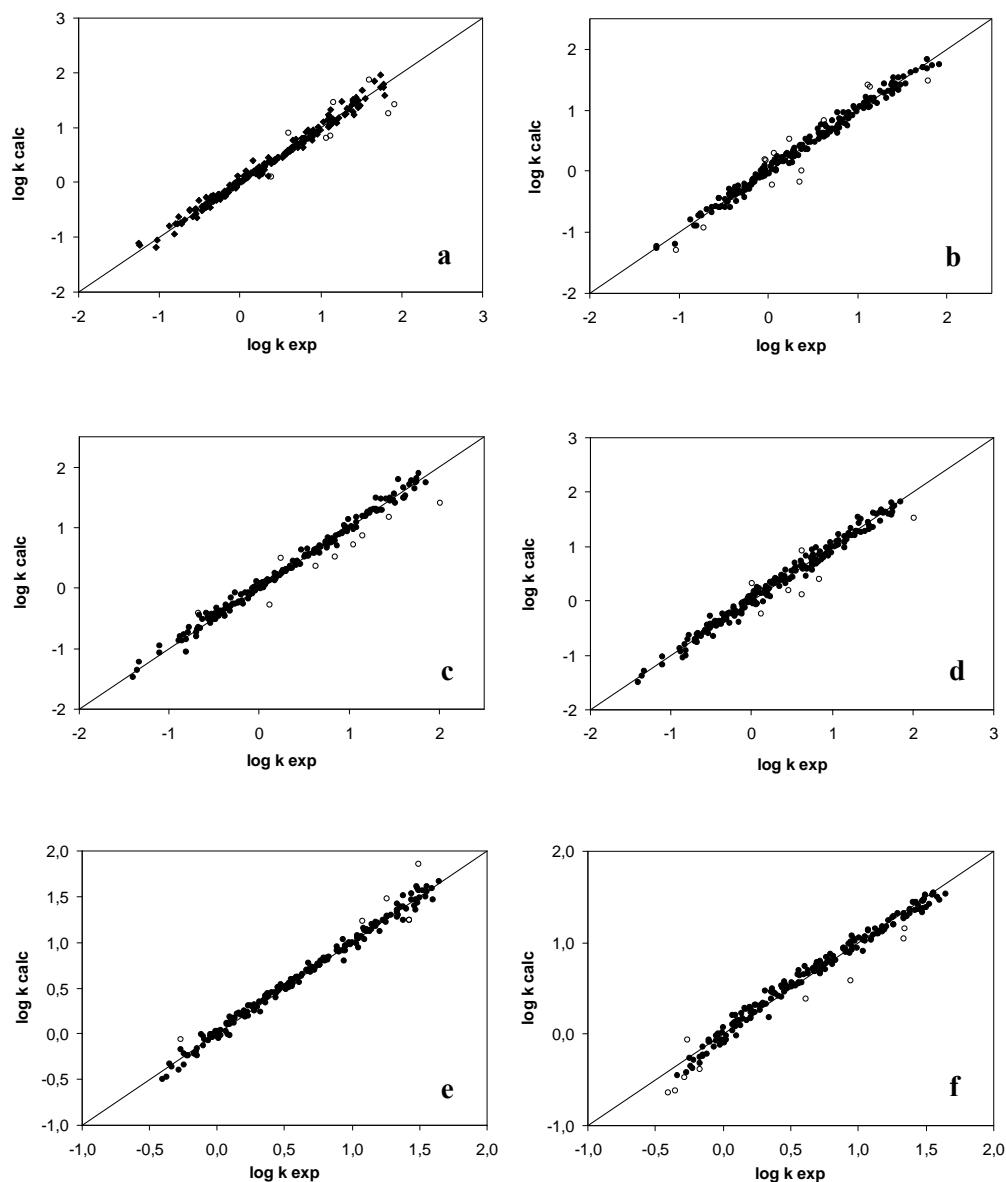


Fig. 3. Plot of calculated $\log k$ vs. experimental $\log k$ values for all studied mobile phase compositions with methanol, using the polarity parameter model (a, c, e) and the global LSER parameter model (b, d, f). The studied columns were XTerra RP18 (a, b), XTerra MSC18 (c, d) and Luna C18 (e, f). Symbols: (●) solutes used to construct the models, (○) outliers.

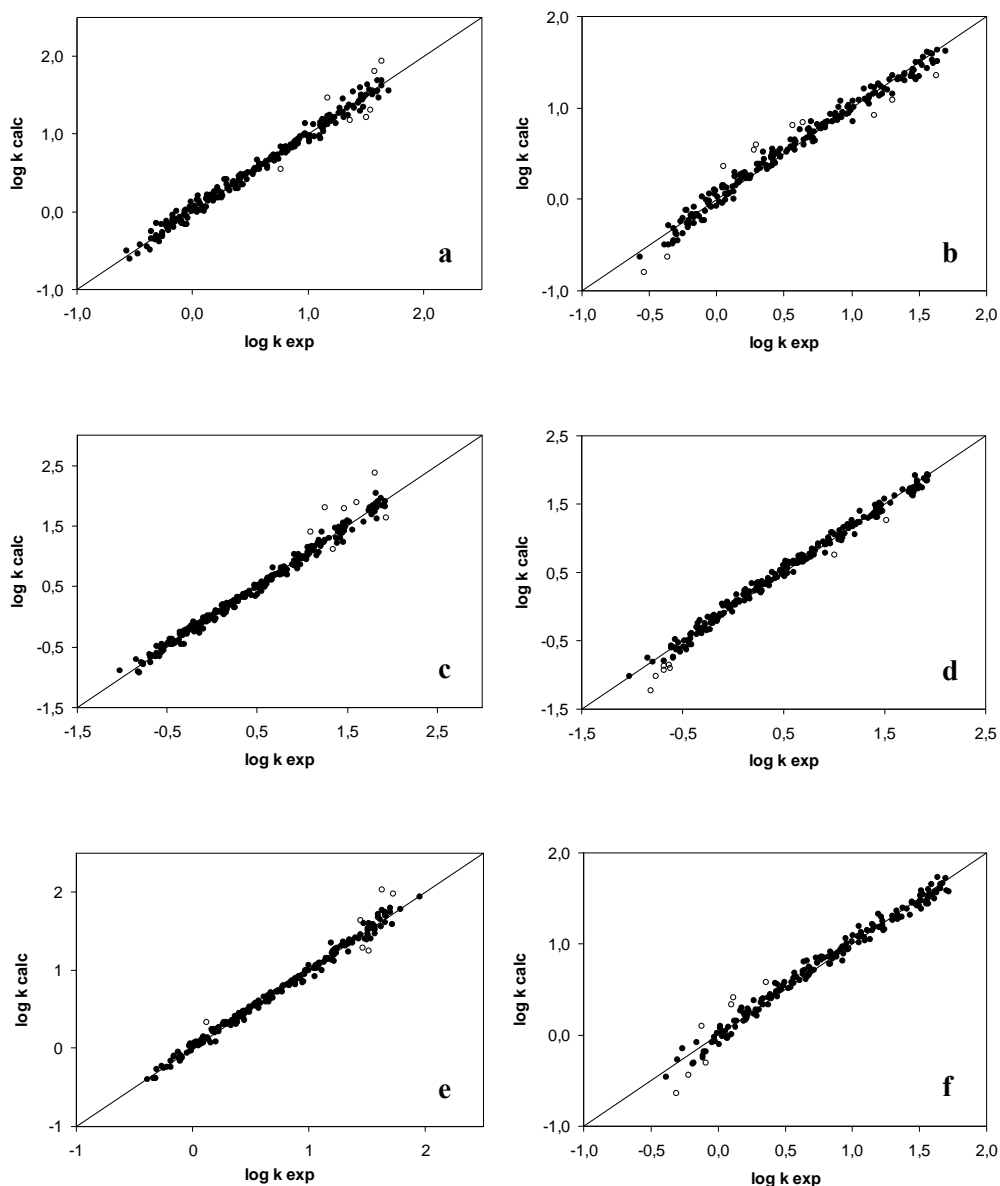


Fig. 4. Plot of calculated $\log k$ vs. experimental $\log k$ values for all studied mobile phase compositions with methanol, using the polarity parameter model (a, c, e) and the global LSER parameter model (b, d, f). The studied columns were Resolve C18 (a, b), Chromolith RP-18e (c, d) and Symmetry C18 (e, f). Symbols: (●) solutes used to construct the models, (○) outliers.

Table 5
Set of commercial compounds used in this study and their p parameters in acetonitrile and methanol.

Compounds	Symmetry C18		Chromolith RP-18e		Luna C18 (2)		Resolve C18		XTerra MSC18		XTerra RP18	
	p (ACN)	p (MeOH)	p (ACN)	p (MeOH)	p (ACN)	p (MeOH)	p (ACN)	p (MeOH)	p (ACN)	p (MeOH)	p (ACN)	p (MeOH)
1,4-Dimethylbenzene	4.75	5.06	4.66	4.87	4.47	4.86	4.49	4.27	-	-	-	-
1-Benzofuran	-	-	-	-	-	-	-	-	3.95	4.25	3.74	3.78
1-Naphthoic acid	3.29	3.88	3.06	3.74	2.99	3.77	3.11	3.3	-	-	-	-
2,3-Dimethylphenol	-	-	-	-	-	-	-	-	3.22	3.77	3.23	3.36
2,4,6-Trichlorophenol	4.22	4.88	4.1	4.68	3.96	4.64	4.03	4.11	-	-	-	-
2,4-Dichlorophenol	3.7	4.2	3.53	4.04	3.42	4.01	3.49	3.49	-	-	-	-
2,4-Dimethylphenol	-	-	-	-	-	-	-	-	3.24	3.84	3.24	3.4
2-Bromophenol	3.17	3.24	2.96	3.15	2.87	3.15	2.96	2.65	-	-	-	-
2-Naphthol	3.38	3.63	3.19	3.53	3.11	3.52	3.2	3.03	3.27	3.94	3.39	3.7
2-Nitroaniline	2.91	2.51	2.77	2.69	2.82	2.81	2.81	2.07	2.88	3.23	2.92	3
2-Nitroanisole	-	-	-	-	-	-	-	-	3.21	3.34	3.06	2.96
2-Toluidine	-	-	-	-	-	-	-	-	2.68	3.04	2.52	2.45
3-Chloroaniline	-	-	-	-	-	-	-	-	3.1	3.39	3.07	3.01
3-Methylbenzoic acid	2.9	3.41	2.65	3.33	2.57	3.34	2.71	2.86	-	-	-	-
3-Nitroaniline	-	-	-	-	-	-	-	-	2.72	2.9	2.74	2.67
3-Nitrophenol	2.85	2.87	2.61	2.78	2.56	2.82	2.66	2.32	-	-	-	-
4-Chloroacetanilide	-	-	-	-	-	-	-	-	2.63	3.59	2.66	3.21
4-Chloroaniline	-	-	-	-	-	-	-	-	2.98	3.34	2.92	2.95
4-Chlorophenol	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3.63	3.12	3.39
4-Nitroaniline	-	-	-	-	-	-	-	-	2.48	2.71	2.63	2.64
4-Xylene	-	-	-	-	-	-	-	-	4.74	-	4.33	4.29
Acetanilide	-	-	-	-	-	-	-	-	1.9	2.77	1.9	2.27
Acetophenone	-	-	-	-	-	-	-	-	2.88	3.33	2.67	2.71
Aniline	2.4	1.83	2.21	2.02	2.25	2.13	2.33	1.65	2.27	2.6	2.14	2.02
Anisole	-	-	-	-	-	-	-	-	3.56	3.82	3.3	3.25
Anthracene	-	-	5.63	6.16	-	-	5.45	-	-	-	-	-
Antipyrine	-	-	-	-	-	-	-	-	1.36	2.5	1.16	1.64

Benzaldehyde	3	2.7	2.78	2.7	2.69	2.68	2.84	2.34	2.83	3.17	2.65	2.59
Benzene	3.76	3.69	3.58	3.59	3.45	3.57	3.49	3.03	3.66	3.85	3.36	3.23
Benzoic acid	2.54	2.83	2.24	2.75	2.17	2.77	2.33	2.29	-	-	-	-
Benzonitrile	-	-	-	-	-	-	-	-	3.02	3.23	2.84	2.69
Benzophenone	-	-	-	-	-	-	-	-	4.36	4.73	4.11	4.19
Biphenyl	5.15	-	5.11	5.46	4.92	-	4.95	4.89	-	-	-	-
Bromobenzene	-	-	-	-	-	-	-	-	4.36	4.57	4.07	4.06
Caffeine	-	-	-	-	-	-	-	-	0.95	2.19	0.94	1.55
Chlorobenzene	4.25	4.36	4.12	4.23	3.96	4.23	4.01	3.69	4.22	4.44	3.92	3.9
Corticosterone	-	-	-	-	-	-	-	-	2.72	4.49	2.53	3.74
Cortisone	-	-	-	-	-	-	-	-	2.15	3.94	2.07	3.2
Estriol	-	-	-	-	-	-	-	-	1.74	3.69	2.11	3.67
Ethylbenzene	-	-	-	-	-	-	-	-	4.72	4.84	4.31	4.23
Furan	-	-	-	-	-	-	-	-	2.87	3.13	2.65	2.51
Geraniol	-	-	-	-	-	-	-	-	3.93	-	3.6	4.2
Hydrocortisone	-	-	-	-	-	-	-	-	2.04	4.08	1.99	3.39
Methoxybenzene	3.66	3.6	3.49	3.52	3.36	3.51	3.44	3.01	-	-	-	-
Methyl 4-hydroxybenzoate	2.56	2.67	2.3	2.62	2.25	2.68	2.39	2.23	-	-	-	-
Monuron	-	-	-	-	-	-	-	-	2.66	3.52	2.65	3.11
<i>N</i> -Ethylaniline	3.6	3.26	3.5	3.33	3.46	3.42	3.44	2.52	-	-	-	-
Nitrobenzene	-	-	-	-	-	-	-	-	3.35	3.51	3.18	3.08
<i>n</i> -Propyl 4-hydroxybenzoate	3.41	3.87	3.24	3.78	3.16	3.82	3.25	3.33	-	-	-	-
Pentachlorophenol	-	-	5.14	6.22	4.97	-	5.02	-	-	-	-	-
Phenol	2.58	2.45	2.31	2.38	2.24	2.37	2.35	1.87	2.3	2.83	2.34	2.43
Pyrene	-	-	5.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyrimidine	-	-	-	-	-	-	-	-	0.86	1.54	0.86	0.77
Pyrrole	-	-	-	-	-	-	-	-	2.23	2.36	2.16	1.9
Quinoline	-	-	-	-	-	-	-	-	2.59	3.53	2.35	2.85
Resorcinol	-	-	-	-	-	-	-	-	1.33	2.64	1.42	1.69
Thiourea	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.32	0.6	-0.3	-0.01
Thymol	4.28	4.72	4.17	4.55	4.01	4.55	4.05	3.95	4.29	4.75	4.21	4.33
Toluene	4.24	4.36	4.11	4.22	3.95	4.19	3.98	3.64	4.19	4.36	3.83	3.76
Valerophenone	4.6	4.76	4.54	4.64	4.38	4.69	4.44	4.2	4.66	4.89	4.31	4.28

Table 6

Comparison of the accuracy of the global solvation parameter model and the polarity model, using the standard deviation and the number of outliers.

Parameters	Symmetry C18	Chromolith RP-18e	Luna C18 (2)	Resolve C18	XTerra MSC18	XTerra RP18
<u>Acetonitrile-water</u>						
Global LSER model						
<i>SD</i>	0.094	0.108	0.092	0.089	0.092	0.062
<i>n</i>	159	189	156	172	166	166
<i>Outliers</i>	5	5	1	0	10	15
Polarity model						
<i>SD</i>	0.046	0.058	0.039	0.042	0.075	0.061
<i>n</i>	170	202	165	184	165	164
<i>Outliers</i>	7	9	7	9	4	4
<u>Methanol-water</u>						
Global LSER model						
<i>SD</i>	0.068	0.070	0.069	0.074	0.092	0.073
<i>n</i>	187	234	193	217	202	214
<i>Outliers</i>	8	8	9	10	7	13
Polarity model						
<i>SD</i>	0.048	0.064	0.047	0.061	0.065	0.072
<i>n</i>	208	258	203	237	202	212
<i>Outliers</i>	6	7	6	7	9	8

n is the number of experimental points (included the outliers)

The polarity parameter model combines all free energy terms in one unique term and thus, needs one unique descriptor for solute and one unique descriptor for each phase (mobile and stationary phases), instead of 12 fitting coefficients and 5 solute parameters of global solvation parameter model. The global LSER model characterizes better the fundamental solute-solvent interactions in the RPLC system and therefore, it provides more chemical information. However, the polarity parameter model is simpler because it

requires less parameters, so it can be easier to implement in RPLC retention prediction programs [29]. Moreover, although polarity parameter model seems less rigorous, there is no loss of precision regarding global solvation parameter model (as it could be expected).

In order to predict data retention we need to have the system characterized with one of these models and to know *p* values of the new compounds (for the polarity parameter model) or all their LSER descriptors

(for the global solvation parameter model). To characterize one system with the polarity parameter model we only need 12 solutes, while the global LSER model requires at least 5 compounds for each coefficient of the equation. The p values can be obtained by measurement in one unique mobile phase composition in the characterized chromatographic system or by transference from the p values of these compounds in the solute data base or in any other characterized system through Eq. (4). They can be also calculated by means of the CODESSA program [18]. This is much easier than getting LSER descriptors. There is a wide data base of these descriptors, but if one new compound is not included there, it is necessary to get the values experimentally or calculate them with ABSOLVE software [30, 31], although the values obtained with the software are less accurate. For these reasons, we consider simpler to predict data retention with the polarity parameter model.

3.2. Prediction of retention of new compounds by the polarity parameter model

In order to demonstrate the predictive ability of the polarity parameter model, we have used a set of commercial compounds different to the set used in the characterization of the

columns. The wide p range of this set goes from 0 to 6, and the compounds are structurally different. The compounds used to check the prediction of the retention are those reported in Table 5.

3.2.1. Prediction of retention from data obtained in the same column

The first aim was to achieve the prediction of retention at any percentage of organic modifier in one specific column. The idea was to work with only one mobile phase composition and to be able to predict the behaviour of all compounds at any other composition. We select 40% for acetonitrile and 50% for methanol as average compositions in the studied percentage range. First, we obtained the experimental values for all compounds with different mobile phases (60, 50, 40, 30, 20, 10 % of acetonitrile and 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 % of methanol) in order to check the predictions. After this experimental work, we used the retention factors ($\log k$) in 40% acetonitrile or 50% methanol to obtain the values of the solute polarity (p) using Eq. (4) (see Table 5). The parameters of the system P_s^N and $(\log k)_0$ were taken from Table 4, and the P_m^N values for the intermediate compositions calculated by Eq. (5) or (6).

Finally, we also obtained the calculated retention factors ($\log k$) for

the other mobile phase compositions using again Eq. (4), where the solute polarity (p) values were those calculated previously, as we explained above. The correlations achieved between the calculated and experimental data are shown in Fig. 5 and Fig. 6, for acetonitrile and methanol respectively. A theoretical line with slope 1 and intercept 0 is represented for each plot, together with the standard deviation. It can be seen that all predictions are good, and the standard deviations are similar. However, when we compare the plots for each column and both solvents, we observe that the predictions are always more accurate with methanol, except for Resolve C18 (Figs. 5d and 6d) where the standard deviation is lower with acetonitrile. The largest dispersion in each plot is observed for data at 20 or 10 % of organic modifier, where the precision of the model is the lowest. This is due to the difficulty in measuring the retention with accuracy working at these mobile phase compositions, since the solutes spend a long time inside the column. For this reason, we recommend to use the model in order to predict the retention of solutes for any mobile phase containing between 80 and 30 % of methanol and between 60 and 30 % of acetonitrile. For less than 30 % you can have an idea of the retention, but this

estimation is not accurate enough. The dispersion obtained with methanol is smaller than with acetonitrile, and thus, the estimation at low percentages of methanol is better.

3.2.2. Prediction of retention from data obtained in any other column

The second aim was to predict the retention in any RPLC system (column and mobile phase) starting from one specific system, used as a reference. The system XTerra RP18/acetonitrile has been chosen to predict all the others. We used the solute polarity data from Table 4 to establish linear relationships between the systems, according to:

$$p_2 = a p_1 + b \quad (9)$$

where p_1 is the p value in the reference system and p_2 is the p value of the same solute in any other chromatographic system. The slopes a and interceptions b (shown in Table 7) allow the solute polarity data transference between RPLC systems.

First, we transferred the p values of 10 test solutes (those of Table 5 that were injected in all 6 columns) from the reference system to all other systems using the linear relationships from Table 7. After that, we calculated all retention data with them (using Eq. (4)). The correlations between calculated

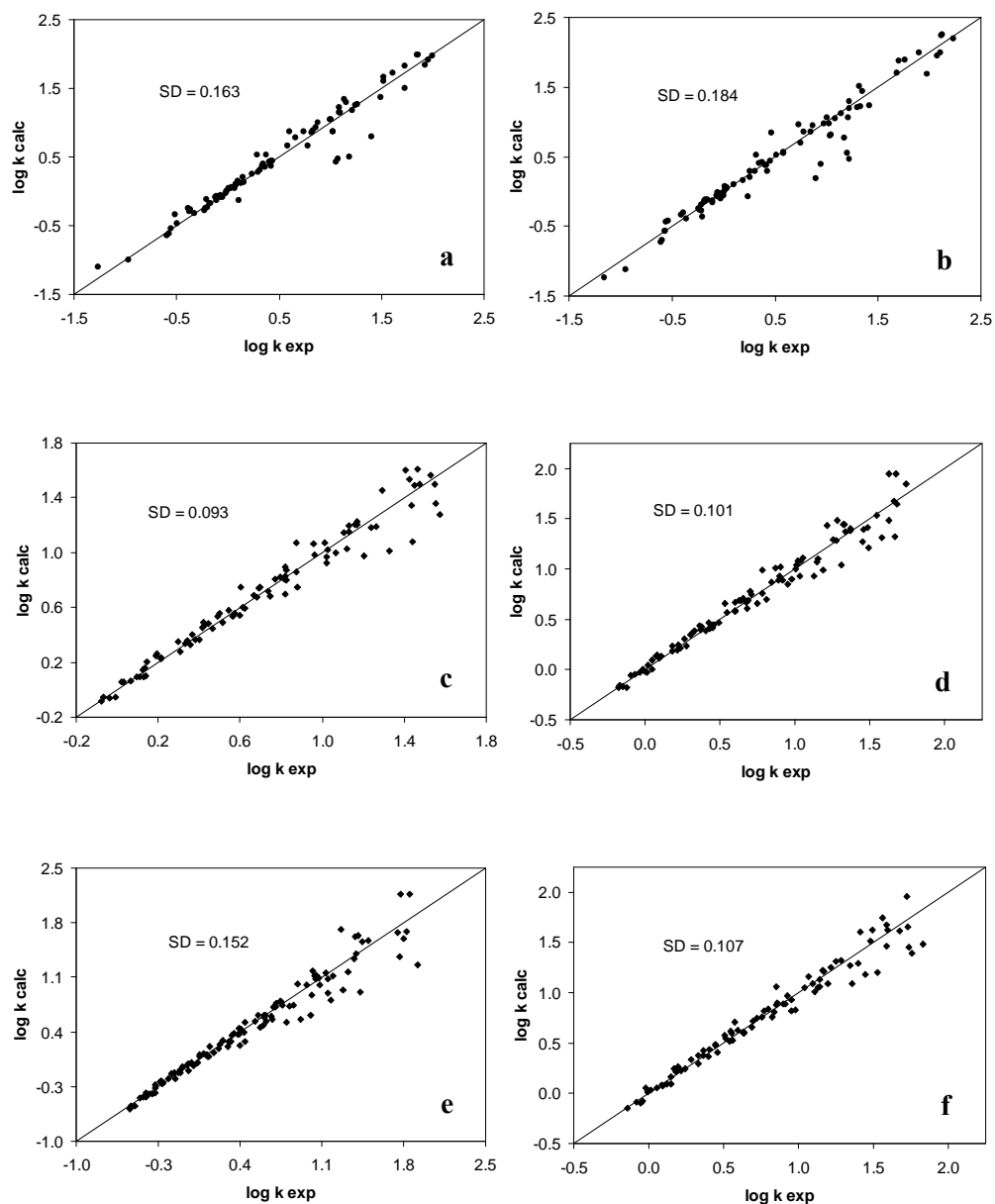


Fig. 5. Prediction of retention factors of new solutes in different mobile phases (60, 50, 30, 20 and 10 % of acetonitrile), and different columns: a) XTerra RP18, b) XTerra MSC18, c) Luna C18, d) Resolve C18, e) Chromolith RP-18e, f) Symmetry C18. The predictions of each column were made by means of the study of one percentage of acetonitrile (40%) in that column.

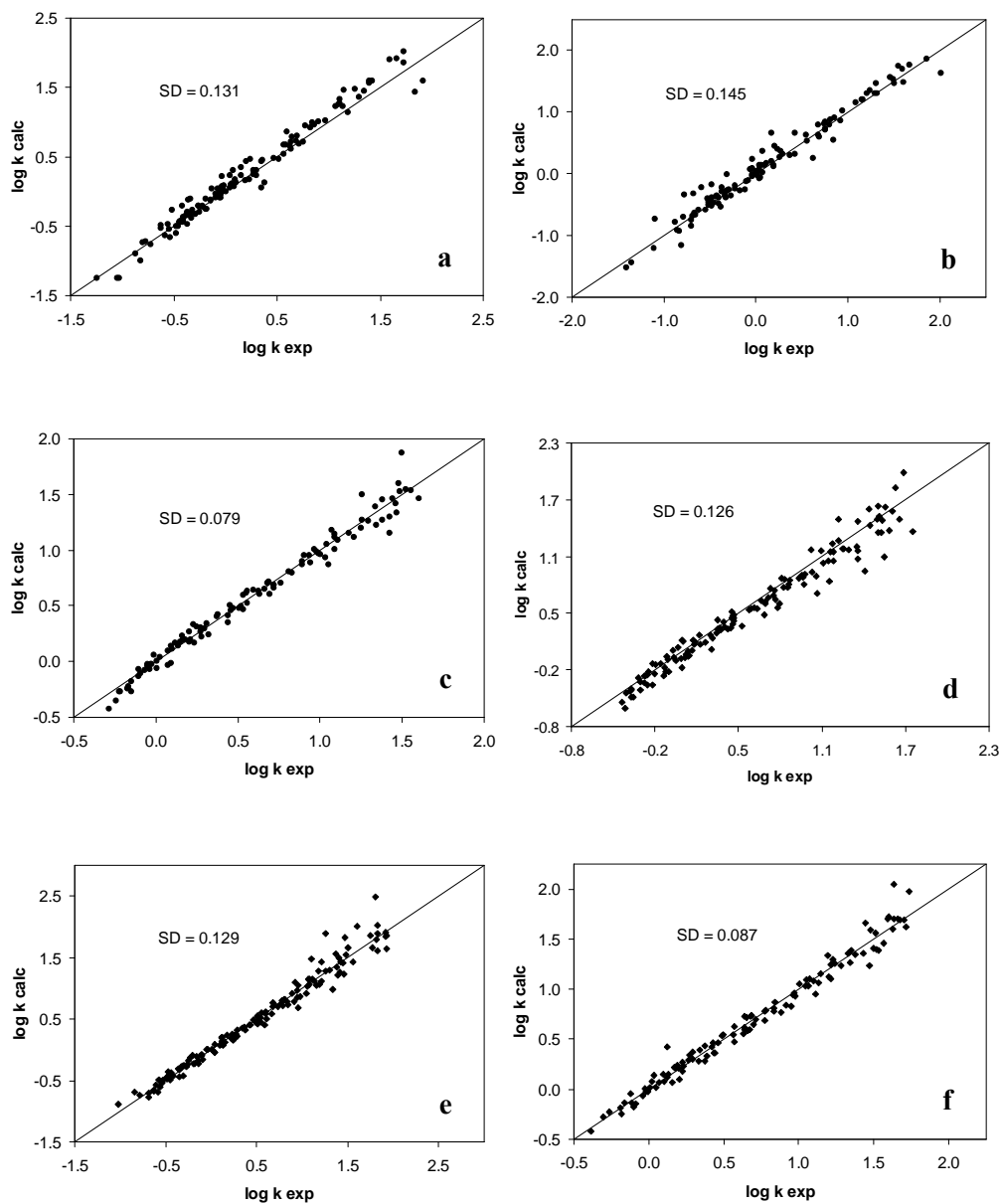


Fig. 6. Prediction of retention factors of new solutes in different mobile phases (80, 70, 60, 40, 30, 20 and 10 % of methanol), and different columns: a) XTerra RP18, b) XTerra MSC18, c) Luna C18, d) Resolve C18, e) Chromolith RP-18e, f) Symmetry C18. The predictions of each column were made by means of the study of one percentage of methanol (50%) in that column.

Table 7

Slopes a and intercepts b of the linear relationships between p values to transfer solute polarity data between RPLC systems. The reference system is XTerra RP18/acetonitrile, used always as the independent variable.

RPLC systems	a	b	r^2	SD
XTerra RP18, methanol	0.89	0.41	0.993	0.10
XTerra MSC18, acetonitrile	1.15	-0.25	0.998	0.09
XTerra MSC18, methanol	0.92	0.88	0.989	0.14
Luna C18, acetonitrile	0.98	0.23	0.995	0.08
Luna C18, methanol	1.09	0.10	0.986	0.21
Resolve C18, acetonitrile	0.97	0.29	0.995	0.11
Resolve C18, methanol	1.06	-0.21	0.981	0.23
Chromolith RP-18e, acetonitrile	1.05	0.09	0.996	0.10
Chromolith RP-18e, methanol	1.12	-0.01	0.982	0.23
Symmetry C18, acetonitrile	0.96	0.52	0.997	0.08
Symmetry C18, methanol	1.26	-0.32	0.963	0.38

and experimental data are shown in Fig. 7 and Fig. 8, for acetonitrile and methanol respectively. In Fig. 7a, 8a and 8b there are more points than in the other graphs, due to the fact that we used all compounds of Table 5 in common with those of the reference system (not only 10 solutes, but 44). A theoretical line with slope 1 and intercept 0 is represented for each plot, together with the standard deviation. In this case it is just the opposite, although all predictions are quite good we obtained better

standard deviations with acetonitrile. This fact is due to the solute polarity data transference. In Fig. 7 the transference is only between columns, but same solvent (acetonitrile). However, in Fig. 8 we transferred solute polarity data to other column and solvent, so the accuracy of the predictions is slightly worse. It can also be observed that in Figs. 8c-f most of the calculated $\log k$ values are higher than the theoretical values, while in Fig. 7 this fact does not happen.

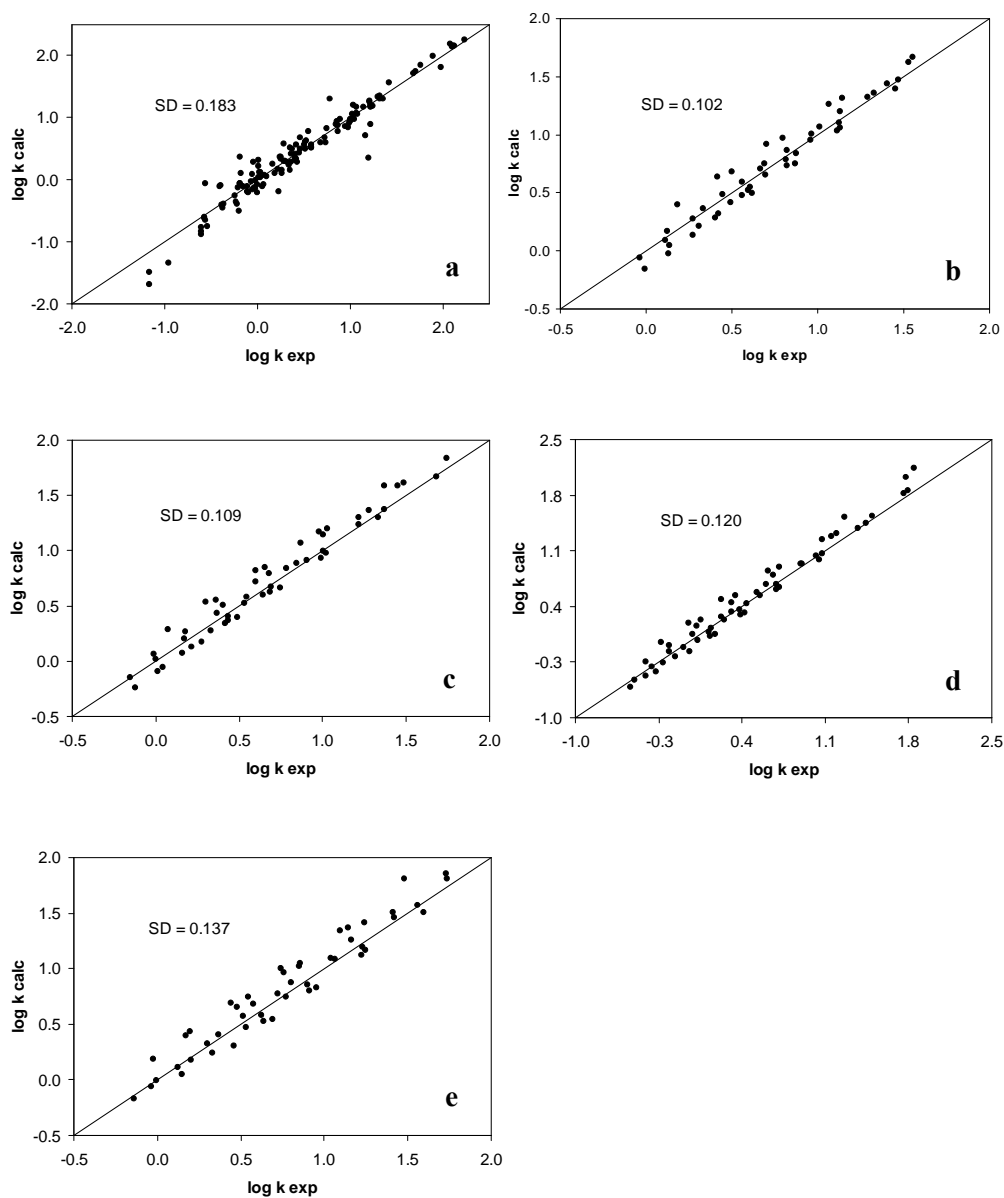


Fig. 7. Prediction of retention factors of different systems transferring solute polarity data from one reference system (XTerra RP18, acetonitrile). The studied mobile phases contained acetonitrile ranging from 60 to 10%, and the different columns are: a) XTerra MSC18, b) Luna C18, c) Resolve C18, d) Chromolith RP-18e, e) Symmetry C18.

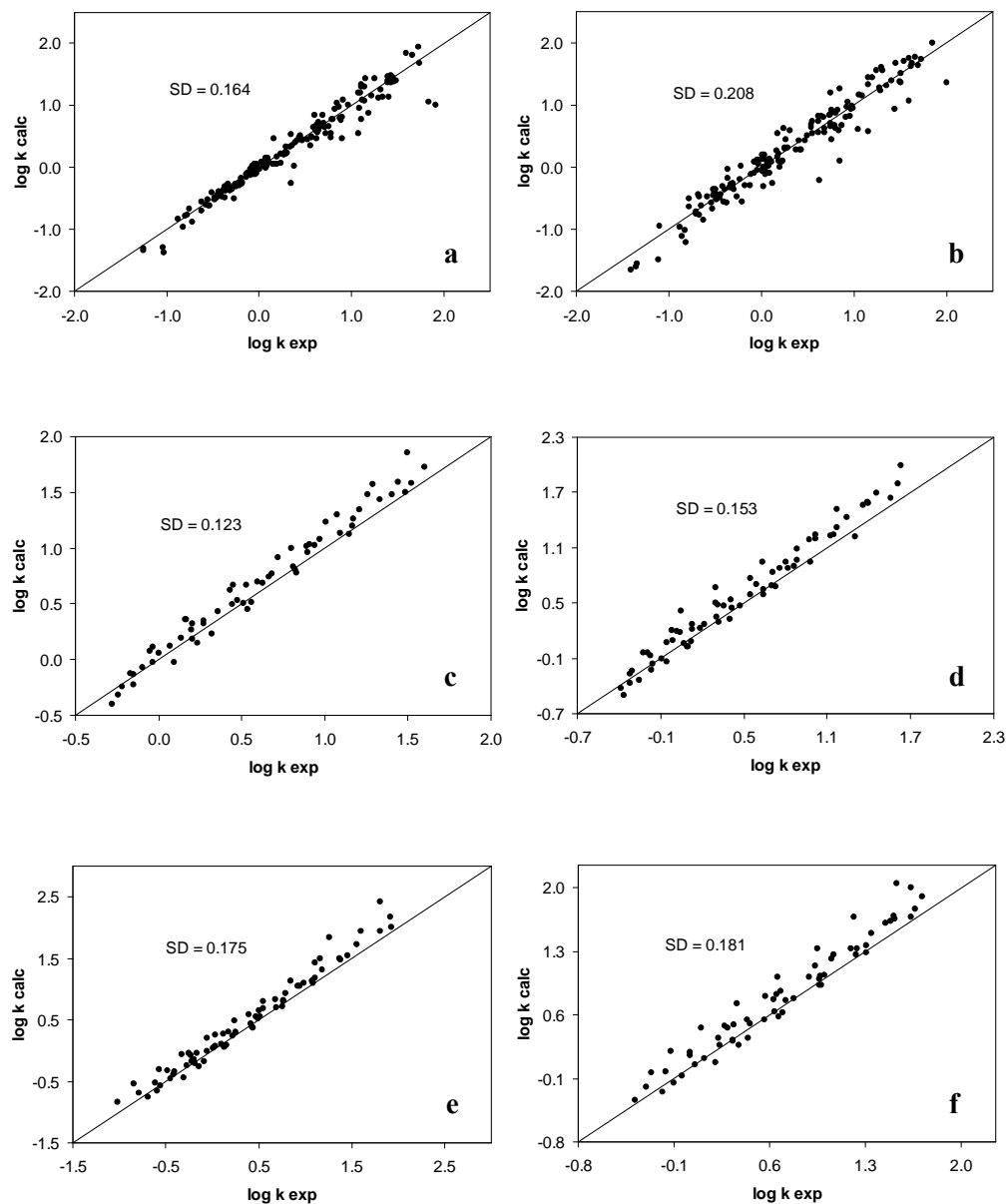


Fig. 8. Prediction of retention factors of different systems transferring solute polarity data from one reference system (XTerra RP18, acetonitrile). The studied mobile phases contained methanol ranging from 80 to 10%, and the different columns are: a) X Terra RP18, b) X Terra MSC18, c) Luna C18, d) Resolve C18, e) Chromolith RP-18e, f) Symmetry C18.

This prediction method have an enormous potential, since it is possible to know the chromatographic behaviour of one compound in any studied system just working with one reference system. This information can be very useful in order to predict the best conditions to get good chromatographic separations.

4. Conclusions

The global solvation parameter and the polarity parameter models have been successfully applied to several RPLC systems involving modern C18 columns and methanol and acetonitrile as organic modifiers of the mobile phases. Then, a proper characterization of these systems has been done requiring the polarity parameter model much less experimental effort although the global LSER parameter model gives more chemical information. Both models show similar ability in the prediction of retention of solutes.

We have demonstrated that the system parameters (P_s^N and $(\log k)_0$) of a given chromatographic system (column and organic modifier) determined by means of the polarity parameter model can be used to predict retention in any other characterized chromatographic system. There are two ways to get these predictions. First, it is possible to predict the retention for any

mobile phase composition in one specific column working with only one percentage of organic modifier in the mobile phase. Second, we have extended the prediction to any system (stationary and mobile phase) just working with one specific system used as a reference. To get this approximation it is necessary to transfer solute polarity data by means of linear relationships between the different systems. In both cases the results obtained are really good, showing the big potential of this polarity parameter model.

Acknowledgements

We are grateful for financial support from the Spanish Government (Project CTQ2007-61623/BQU).

References

- [1] L.C. Tan, P.W. Carr, M.H. Abraham, J. Chromatogr. A 752 (1996) 1.
- [2] K. Valko, L.R. Snyder, J.L. Glajch, J. Chromatogr. A 656 (1993) 501.
- [3] M.H. Abraham, M. Rosés, J. Phys. Org. Chem. 7 (1994) 672.
- [4] L.C. Tan, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 799 (1998) 1.
- [5] D. Bolliet, C.F. Poole, Analyst 123 (1998) 295.

- [6] J. Li, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2202.
- [7] M.H. Abraham, M. Rosés, C.F. Poole, S.K. Poole, *J. Phys. Org. Chem.* 10 (1997) 358.
- [8] A. Wang, L.C. Tan, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 848 (1999) 21.
- [9] N.S. Wilson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, P.W. Carr, L.C. Sander, *J. Chromatogr. A* 961 (2002) 217.
- [10] N.S. Wilson, M.D. Nelson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 961 (2002) 195.
- [11] N.S. Wilson, M.D. Nelson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, R.G. Wolcott, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 961 (2002) 171.
- [12] M.R. Euerby, P. Petersson, *J. Chromatogr. A* 994 (2003) 13.
- [13] P. Petersson, M.R. Euerby, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2120.
- [14] M. Rosés, E. Bosch, *Anal. Chim. Acta* 274 (1993) 147.
- [15] E. Bosch, P. Bou, M. Rosés, *Anal. Chim. Acta* 299 (1994) 219.
- [16] M. Rosés, P. Bou, E. Bosch, K. Siigur, *Org. React.* 29 (1995) 51.
- [17] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 955 (2002) 19.
- [18] R. Bosque, J. Sales, E. Bosch, M. Rosés, M.C. García-Álvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (2003) 1240.
- [19] J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, A.M. Zissimos, M.H. Abraham, *Anal. Chim. Acta* 515 (2004) 209.
- [20] P. Izquierdo, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 96.
- [21] J.R. Torres-Lapasió, M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1166 (2007) 85.
- [22] C. Reichardt, *Chem. Rev.* 94 (1994) 2319.
- [23] P. Müller, *Pure Appl. Chem.* 66 (1994) 1077.
- [24] L.A. Lopez, S.C. Rutan, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 301.
- [25] A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés, U.D. Neue, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 33.
- [26] J.M. Herrero-Martínez, A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 135.
- [27] E. Lázaro, C. Ràfols, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 163.
- [28] M.H. Abraham, University College London Database (1997).
- [29] M. Rosés, X. Subirats, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1756.
- [30] M.H. Abraham, J. Le, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 868.
- [31] J.A. Platts, D. Butina, M.H. Abraham, A. Hersey, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 39 (1999) 835.

New Approach To Measure Protein Binding Based on a Parallel Artificial Membrane Assay and Human Serum Albumin

Elisabet Lázaro,[†] Philip J. Lowe,[‡] Xavier Briand,[§] and Bernard Faller^{*,*§}

Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1, E-08028 Barcelona, Spain, Novartis Pharma AG, Modelling and Simulation, WSJ-27.1.22, CH-4002 Basel, Switzerland, and Novartis Institutes for BioMedical Research, WSJ-350.3.04, CH-4002 Basel, Switzerland

Received October 11, 2007

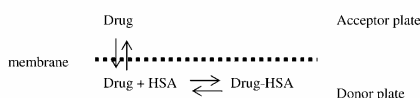
We report here a new, label-free approach to measure serum protein binding constants. The assay is able to measure HSA K_d values in the milli-molar to micromolar range. The protein is not immobilized on any surface and the assay self-corrects for nonspecific adsorption. No mass balance is required to get accurate binding constants and it is not necessary to wait for equilibrium to extract the binding constant. The assay runs in a 96-well format using commercially available parts and is, therefore, relatively easy to implement and automate. As the chemical membranes used are not water permeable, there is no volume change due to the osmotic pressure and pretreatment (soaking) is not necessary. The concept can potentially be extended to other proteins and could thus serve as a label-free technique for general binding constant measurements.

Introduction

Plasma protein binding is an important factor to understand the pharmacokinetics and pharmacodynamic properties of drug candidates, as it strongly influences drug distribution and determines the free fraction, which is available to the target. Human serum albumin (HSA⁹) is the most abundant plasma protein, so the determination of its binding constant (K_d) with early drug candidates is particularly relevant. In early drug discovery, protein binding is a key issue in compound optimization when compounds that are potent in a primary biochemical assay fail to retain activity in subsequent cell-based and in vivo assays. Other than pharmacokinetic clearance, two main reasons for this loss of activity are poor membrane permeability and high protein binding. This study shows that the measurement of passive permeability through an artificial membrane in the presence and absence of protein can be used to estimate the protein–ligand K_d and generate valuable information for compound optimization.

A broad variety of techniques have been applied to measure protein binding, with equilibrium dialysis and ultrafiltration being the most widely used methods.^{1–3} Although attempts to increase the throughput with these methods are described in the literature,^{4–6} they remain difficult to apply in early discovery. In addition, accurate rank ordering of compounds that are highly protein bound is a significant challenge, especially when recovery is not complete, and varies from compound to

Scheme 1. Chemical Equilibrium in the PAMPA-HSA Assay



compound. Spectroscopic methods^{7,8} are cheaper and faster alternatives that examine the molecular properties of the drug–protein complex; however, they do not correlate well with equilibrium dialysis for various reasons. More recently, some authors have proposed protein binding determinations using HSA immobilized on an HPLC stationary phase^{9,10} or on beads.¹¹ However, these methods assume that the immobilized HSA retains its full binding characteristics and that nonspecific binding has little impact on the result.

In the method described in this paper, the protein-binding K_d value is estimated from transmembrane permeation kinetics measured in the presence and absence of protein.

Assay Principle

A parallel artificial membrane permeation assay (PAMPA) is used to measure the permeation kinetics through an artificial membrane coated on a porous filter plate.^{12–15} Various PAMPA assays have been described in the literature to measure passive (transcellular) permeability, with the aim to predict oral absorption of drug candidates. In this study, we report for the first time the use of a PAMPA to measure binding constants. Permeability is measured in the presence and absence of protein in the donor compartment, and the difference between the two experiments is used to estimate the binding constant. The key experiment in this approach is that only the free ligand is able to cross the membrane, while both the protein and the protein–ligand complex are either unable to cross the membrane, or do so at a velocity far lower than that of the free ligand (see Scheme 1).

The donor and acceptor compartments are separated by a thin liquid membrane coated on a porous filter in a 96-well microtiter-plate format (setup details available as Supporting Information). At the end of the incubation time, the compound concentration in the acceptor compartment is measured and then

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +41 61 324 7090. Fax: +41 61 324 3357. E-mail: bernard.faller@novartis.com.

[†] Universitat de Barcelona.

[‡] Novartis Pharma AG.

[§] Novartis Institutes for BioMedical Research.

^a Abbreviations: A, surface of filterplate well \times porosity; V_A , volume of acceptor well; V_D , volume of donor well; C_A , concentration in acceptor; C_D , concentration in donor; complex, HSA–ligand; K_b , membrane + non specific binding sites distribution coefficient extracted from PAMPA kinetics; K_d , protein–ligand binding affinity (defined as k_{off}/k_{on}); k_{on} , association rate constant; k_{off} , dissociation rate constant; D_{mem} , membrane distribution coefficient measured by dual-phase potentiometric titration; D_{hex} , hexadecane distribution measured by dual-phase potentiometric titration; V_M , apparent volume of the membrane (= membrane volume \times D_{mem}); HSA, human serum albumin; P_a , apparent permeability; C_{int} , initial concentration in donor; C_{eq} , theoretical concentration at equilibrium; C_M , concentration in the membrane.

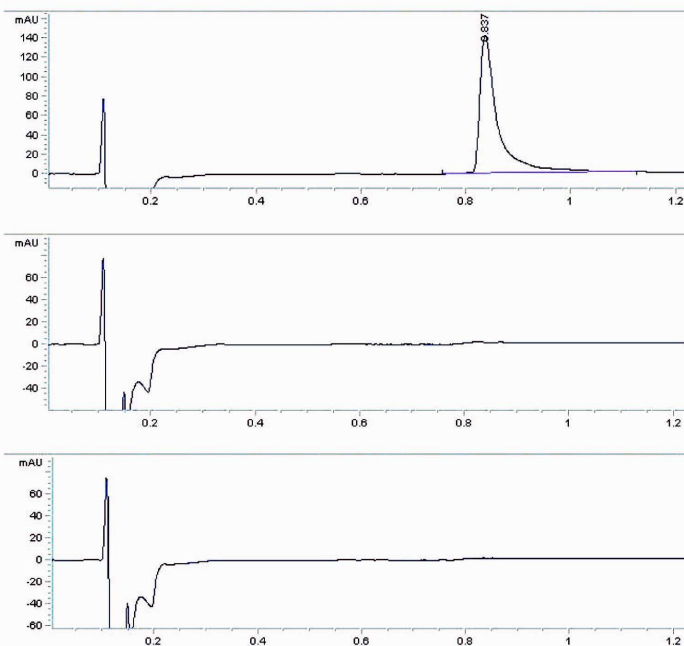


Figure 1. Permeability of HSA through the hexadecane and octanol membranes. Upper panel, 1 μM HSA (as a reference signal); Middle panel, donor and acceptor compartments separated by a hexadecane membrane. HPLC trace in acceptor compartment after 4 h incubation of 100 μM HSA in the donor compartment; Lower panel, donor and acceptor compartments separated by an octanol membrane. HPLC trace in acceptor compartment after 4 h incubation of 100 μM HSA in the donor compartment.

the apparent permeability (P_a) is calculated from the concentration vs. time data. In absence of protein, P_a can be calculated using the following differential equations, which describe passive diffusion under nonsink conditions:

$$\frac{dC_D}{dt} = -P_a A \left(\frac{C_D}{V_D} - \frac{C_A}{V_A} \right) \quad (1)$$

$$\frac{dC_A}{dt} = +P_a A \left(\frac{C_D}{V_D} - \frac{C_A}{V_A} \right) \quad (2)$$

where C_D , V_D , and C_A , V_A are the concentrations and volumes of the donor and acceptor compartment, respectively, and A is the accessible filter surface area (total filter area multiplied by the filter porosity factor).

Equation 3 is the solution of the above differential eqs 1 and 2:

$$P_a = -\frac{V_D V_A}{(V_D + V_A) A t} \ln \left(1 - \frac{C_A}{C_{eq}} \right) \quad (3)$$

where

$$C_{eq} = \frac{V_D}{V_A + V_D} C_{ini} \quad (4)$$

C_{eq} is the theoretical concentration at equilibrium defined by 4 and C_{ini} is the initial concentration in donor plate ($t = 0$).

When HSA is added to the donor compartment, the apparent permeability (P_a) of the test compound decreases, because only the free fraction can diffuse through the membrane. The choice

of the membrane material is critical for the assay. The ideal membrane is highly permeable to the free ligand but impermeable to the protein and ligand-protein complex. With HSA as the target protein, we found at least two chemical membranes fulfilling these criteria: hexadecane and octanol. HSA does not cross these membranes due to its low lipophilicity and high hydrogen bond potential (Figure 1). In the presence of protein, eq 1 becomes eq 5; new equations 6 and 7 are added to describe the formation and dissociation of the HSA-ligand complex. Equation 2 remains unchanged, as no protein is added to the acceptor compartment.

$$\frac{dC_D}{dt} = -P_a A \left(\frac{C_D}{V_D} - \frac{C_A}{V_A} \right) - k_{on} \text{HSA} \cdot C_D + k_{off} \text{Complex} \quad (5)$$

$$\frac{d\text{HSA}}{dt} = -k_{on} \text{HSA} \cdot C_D + k_{off} \text{Complex} \quad (6)$$

$$\frac{d\text{Complex}}{dt} = k_{on} \text{HSA} \cdot C_D - k_{off} \text{Complex} \quad (7)$$

All concentrations are expressed in molar units. Complex and HSA are the concentrations of protein-ligand complex and free HSA at time t , respectively.

Another phenomenon which potentially affects diffusion kinetics is membrane retention. Membrane retention is characterized by the membrane/buffer distribution coefficient, also known as the log D_{mem} . To take this phenomenon into account 5 becomes 8 and 2 becomes 9:

$$\frac{dC_D}{dt} = -P_s A \left(\frac{C_D}{V_D} - \frac{C_M}{V_M} \right) - k_{\text{on}} \text{HSA} C_D + k_{\text{off}} \text{Complex} \quad (8)$$

$$\frac{dC_A}{dt} = +P_s A \left(\frac{C_M}{V_M} - \frac{C_A}{V_A} \right) \quad (9)$$

where C_M is the concentration in the membrane compartment at time t and V_M is the apparent membrane volume, that is, membrane volume multiplied by the ligand distribution coefficient, K_h . In this paper, D_{mem} refers to the membrane distribution coefficient measured using an independent method (dual-phase potentiometric titration) and K_h is the membrane distribution coefficient derived from the PAMPA assay using equations 8 and 10. In the absence of nonspecific adsorption to the device, D_{mem} and K_h should be identical within the noise of the experiment. An additional equation that describes the concentration of the free ligand in the membrane is also needed (eq 10):

$$\frac{dC_M}{dt} = +P_s A \left(\frac{C_D}{V_D} - \frac{2C_M}{V_M} + \frac{C_A}{V_A} \right) \quad (10)$$

As there is no simple analytical solution to solve the differential equations 8 and 10, $C_A(t)$ was calculated using numerical integration with the Berkeley Madonna software.¹⁶ Although the above equations decompose K_d into its microscopic constants ($K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$), k_{off} was fixed at 1 s^{-1} in all data analyses. Berkeley Madonna is a differential equation solver developed by R. I. Macey and G. I. Oster at the University of California at Berkeley. It allows both simulation and fitting of one or more differential equations simultaneously.

Results

As recovery is a critical aspect in protein-binding measurement, especially with the lipophilic compounds encountered in modern drug discovery, we started to study the impact of nonspecific binding and membrane retention on the permeation kinetics. A simulation was carried out based on equations 8 and 10 using the Berkeley Madonna software. Figure 2 shows the theoretical concentration/time profiles obtained in the absence (Figure 2A) and presence of HSA (Figure 2B) in the donor compartment. Both HSA binding and membrane retention lead to a reduced concentration in the acceptor compartment and, thus, an underestimation of the true membrane permeability of the free test compound. Interestingly, the comparison between panel A and panel B shows that the shape of the concentration versus time curve is different. Membrane retention creates a lag phase, during which the membrane is filled with the ligand, before the compound effectively reaches the acceptor compartment (Figure 2A, curves C, D). This is not the case when the decrease in apparent permeability is caused by HSA binding (Figure 2B, curves C, D). This shows that recording appropriate time points allows one to (i) correct the apparent permeability for membrane retention and (ii) differentiate between protein binding and membrane trapping.

The impact of low k_{off} (and k_{on}) values on the permeability kinetics is shown in Figure 3. The assay has the capability to detect low microscopic rate constants if the association/dissociation process half-time is comparable or slower than the diffusion kinetics. When the microscopic rate constants are low ($k_{\text{off}} \leq 0.001 \text{ s}^{-1}$), the diffusion of the free ligand through the membrane is faster than the binding to HSA (Figure 3, curves B, C) and, as a result, the concentration of the free ligand in

the acceptor compartment goes down again due to slow binding of the free ligand to the protein in the donor compartment.

The model has been applied to 11 drugs with different properties in terms of lipophilicity ($\log D_{7.4}$), polar surface area, acidic and basic character, with protein binding K_d data taken from literature sources.^{7,8,17-46} Compound selection is shown in Table 1. The permeability of these 11 drugs (see chemical structures in Figure 4) was measured in the presence and absence of human serum albumin.

Figure 5 shows the concentration versus time profile of quinine, a low binding affinity compound²⁴ with a low membrane retention ($\log D_{\text{hxd}} = -1.3$), in the absence (–) and presence of HSA (+) in the donor compartment. The solid lines are the best fit obtained with eqns 8–10 with $\log P_a = -4.07$, $\log K_h < 1$, and $-\log K_d (\text{HSA}) = 3.6$.

Figure 6 shows the concentration versus time profile of warfarin, a high binding affinity compound¹⁷⁻²³ with low membrane retention ($\log D_{\text{hxd}} = -2$) in the absence (–) and presence of protein in the donor compartment (+). The solid lines were obtained with $\log P_a = -4.4$, $\log K_h < 1$ and $-\log K_d (\text{HSA}) = 5.4$. Comparison of Figures 5 and 6 shows that the impact of protein on the apparent permeability is much higher with warfarin than with quinine, consistent with its higher HSA binding affinity. Figure 7 shows chlorpromazine, a lipophilic compound ($\log D_{\text{hxd}} = 2.6$) with a medium HSA binding affinity.^{7,25,29-31} In this case, membrane retention significantly influences the $C_A(t)$, and the best fit was obtained with $\log P_a = -2.5$, $\log K_h = 3.4$, and $-\log K_d (\text{HSA}) = 4.3$.

As described above, the method is based on the change in apparent permeability upon addition of protein to the donor compartment. One obvious limitation of this approach is with compounds that are poorly permeable through the membrane. Initially, the hexadecane membrane was designed to mimic transcellular gastrointestinal permeability,¹⁵ and therefore, compounds with a poor transcellular permeability would be difficult to measure. This is typically the case of diflunisal, a peripherally active non-narcotic analgesic that diffuses poorly through the hexadecane membrane. Successful measurement of protein-binding K_d with the less lipophilic compounds was achieved by using an alternative membrane to separate free from protein-bound ligand. Octanol (5 μL of 30% octanol dissolved in hexane) was found to work well for most compounds with poor hexadecane permeability. Diflunisal ($\log D_{\text{oct}} = 0.5$, $\log D_{\text{hxd}} < -2$) was successfully measured using an octanol membrane. The HSA K_d does not depend on the nature of the membrane used to separate the free ligand from the HSA–ligand complex, as demonstrated with verapamil, which was measured using both hexadecane and octanol membranes. HSA $-\log K_d$ values of 3.2 and 3.5 were obtained using hexadecane and octanol, respectively. The difference between the two experiments is in the membrane retention, which is higher with the octanol membrane ($\log K_h = 3.75$) compared with hexadecane ($\log K_h = 2.1$).

The results obtained with the 11 test compounds are shown in Table 1, together with the HSA K_d values taken from literature sources. A very good agreement was found between the HSA K_d values obtained with the PAMPA–HSA assay and the reference values were taken from literature (Figure 8). Both sets agree with a correlation coefficient greater than 0.9 and a slope close to 1.

Most of the measurements in this study were performed with $[\text{HSA}] = 100 \mu\text{M}$ and $[\text{ligand}] = 50 \mu\text{M}$. Data in Table 2

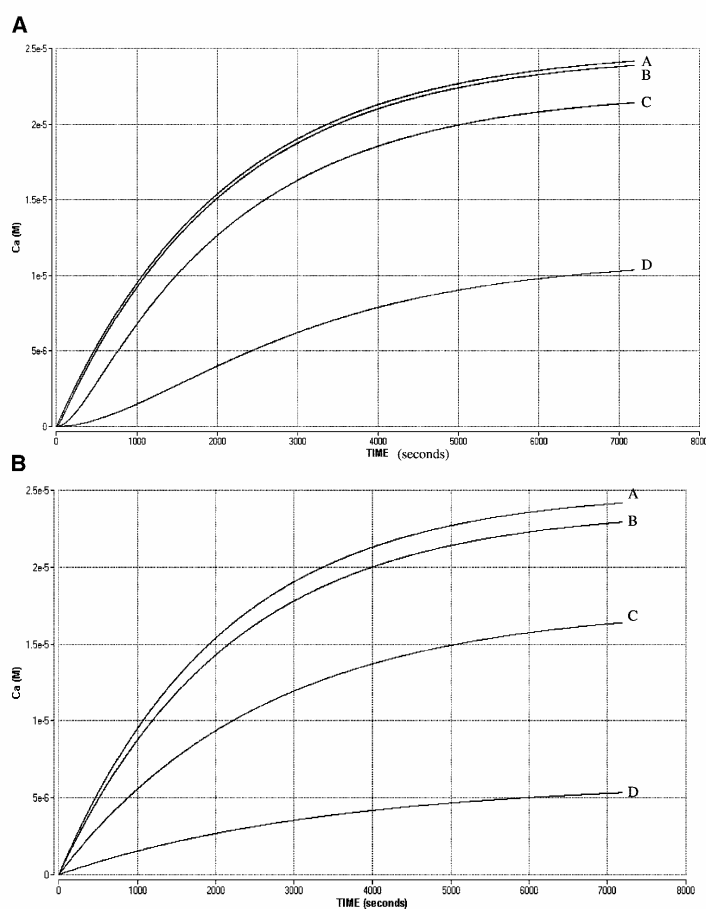


Figure 2. (A) Theoretical concentration/time profiles in the absence of HSA, obtained with $\log P_a = -2.5$ and $D_{mem} = 1, 10, 100,$ and 1000 (A–D). The loading concentration is $50 \mu\text{M}$, $V_A = 0.3 \text{ mL}$, $V_D = 0.3 \text{ mL}$, and the membrane volume is $0.75 \mu\text{L}$. (B) Theoretical concentration/time profiles in the presence of HSA, obtained with $\log P_a = -2.5$, $\log D_{mem} = 1$, and HSA $K_d = 10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-4},$ and 10^{-5} M (A–D). The loading concentration is $50 \mu\text{M}$, $V_A = 0.3 \text{ mL}$, $V_D = 0.3 \text{ mL}$, and the membrane volume is $0.75 \mu\text{L}$.

demonstrate the reproducibility of the method with different drug/protein concentrations.

Discussion

Careful inspection of Figures 5 and 6 shows that there is a small lag phase in the $C_A(t)$ kinetics. This cannot be explained by membrane retention as the membrane (hexadecane) distribution coefficients of quinine and warfarin are too small (-1.3 and -2 , respectively). What likely explains this deviation from linearity is nonspecific adsorption of the compounds in the acceptor compartment. The compounds only appear after the nonspecific binding sites are fully saturated, but the K_b parameter in equations 8–10 does not differentiate between membrane retention and nonspecific binding in the acceptor compartment. For this reason, the $\log K_b$ values are always equal or higher than the membrane distribution coefficients $\log D_{mem}$ measured independently. When membrane retention becomes significant,

as with chlorpromazine, the relative contribution of nonspecific binding is lower and, in this case, $\log K_b$ becomes close to $\log D_{mem}$ (3.4 vs 2.6 for chlorpromazine).

The method presented here has the advantage of being label-free and does not require immobilization of the protein on a surface, which can potentially affect the binding affinity. Desipramine can be used to illustrate this point; a $-\log K_d$ of 4.85 has been reported using a fluorescent method,²⁵ while a quite different value ($-\log K_d = 3.48$) has been recently reported using an ultrafiltration technique.²⁶ Interestingly, using the PAMPA–HSA method gives a result that is in good agreement with the one obtained by ultrafiltration (3.10 vs 3.48).

We have shown that the assay dynamic range is about 3 log units from millimolar (desipramine, $-\log K_d = 3.5$) down to micromolar (diflunisal, $-\log K_d = 6.2$). This window can be further adjusted to the desired range depending on the protein and ligand concentrations used.

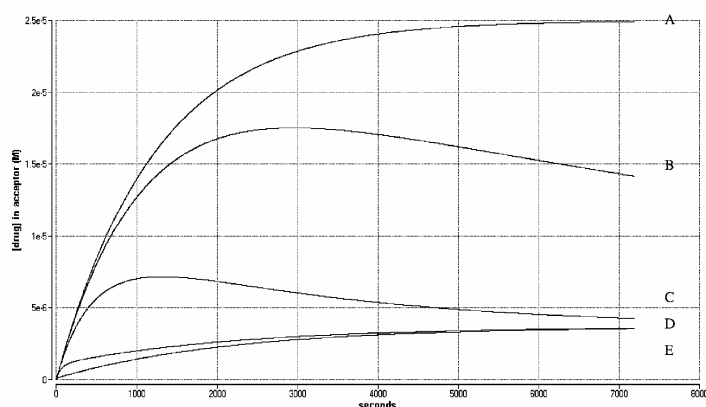


Figure 3. Impact of slow dissociation (low k_{off}) on the concentration in acceptor time profile. Eqns 8–10 were used to simulate the impact of low on and off rates on $Ca(t)$. Conditions were $K_d = 5 \mu\text{M}$, $[\text{drug}] = 50 \mu\text{M}$, $[\text{HSA}] = 100 \mu\text{M}$. Curves were calculated for $k_{off} = 0.00001, 0.0001, 0.001,$ and 0.01 s^{-1} (curves B, C, D, and E, respectively). The reaction is initiated by the addition of the drug to the PAMPA sandwich containing HSA in the donor compartment at time 0. Curve A represents $Ca(t)$ in the absence of protein in the donor compartment.

Table 1. Result Summary of PAMPA-HSA Results Obtained with the 11 Test Compounds^a

compound	A/B	ClogP	membrane	$\log P_a$	$\log K_b$	PAMPA-HSA $-\log K_d$	$-\log K_d$ (lit. value)	avg ref' value used ^d
chlorpromazine ^{7,25,29–31}	B	5.3	Hxd	-2.51	3.4	4.26 (91.5)	4.62 ^e , 3.89 ^b , 4.25 ^b	4.26
desipramine ²⁶	B	4.5	Hxd	-3.01	1.3	3.07 (41.3)	3.48 ^d	3.48
diazepam ^{8,18–20,32–37}	B	3.0	Hxd	-2.87	1.6	4.61 (96.0)	5.0 ^b , 4.89 ^b , 3.94 ^f	4.60
diclofenac ^{27,28}	A	4.7	Hxd	-4.71	<1	5.61 (99.6)	5.74 ^b , 5.70 ^b	5.72
diflunisal ^{27,28}	A	4.4	Hxd	-6.10	<1	undefined	5.70 ^b , 6.70 ^b	6.20
diflunisal ^{27,28}	A	4.4	Oct	-2.82	1.4	5.91 (99.8)	5.70 ^b , 6.70 ^b	6.20
oxazepam ³⁹	B	2.3	Hxd	-4.09	<1	4.16 (89.6)	4.55 ^c	4.55
propranolol ⁴⁰	B	2.7	Hxd	-4.00	1.8	3.36 (57.8)	3.58 ^b	3.58
quinine ²⁴	B	2.8	Hxd	-4.07	<1	3.51 (65.8)	3.88 ^d	3.88
tolbutamide ^{41–45}	A	2.5	Hxd	-4.96	<1	5.22 (99.0)	4.61 ^b , 4.68 ^b , 4.90 ^f	4.73
verapamil ⁴⁶	B	4.5	Hxd	-2.85	2.09	3.19 (48.3)	3.43 ^e	3.43
verapamil ⁴⁶	B	4.5	Oct	-2.73	3.75	3.53 (66.9)	3.43 ^e	3.43
warfarin ^{17–23}	A	2.9	Hxd	-4.40	<1	5.33 (99.2)	5.23 ^b , 5.20 ^d , 5.48 ^f	5.30
warfarin ^{17–23}	A	2.9	Oct	-3.86	<1	5.37 (99.3)	5.23 ^b , 5.20 ^d , 5.48 ^f	5.30

^a A, acids; B, bases. All measurements have been performed at pH 7.4. The numbers in brackets represent the fraction bound in % derived from the K_d values assuming a $[\text{HSA}] = 600 \mu\text{M}$ and $[\text{drug}] = 5 \mu\text{M}$. ClogP values were obtained with the BioByte software v. 4.71. ^b Equilibrium dialysis. ^c Spectroscopic technique. ^d Ultrafiltration. ^e Capillary electrophoresis. ^f HPLC chromatography. ^g Gel filtration. ^h Calorimetry. ⁱ Average value used to compare with PAMPA-HSA values (Figure 7).

There are also some limitations in this approach that we would like to briefly discuss. The first one is that not all compounds can be measured with the same chemical membrane; We have shown that general lipophilic compounds can be measured with a hexadecane membrane, whereas more hydrophilic compounds (like Diflunisal) only worked with an octanol membrane. Can one select the appropriate membrane prior to the experiment? As a rule, we would propose that compounds with calculated octanol/water $\log D$ values lower than 1 will not work with the hexadecane membrane; however, there are probably a few exceptions to that rule. The other option is to run the assay with both membranes in parallel and select the relevant one after the experiment.

Another aspect that deserves some comments lies with the fact that the compounds in the training set are “old” drugs and, therefore, how well will the method work with “real life” discovery compounds? Drug candidates are generally more difficult to handle than generic drugs in many assays, essentially because they are often more lipophilic, bigger, and less-soluble. To answer the question whether the method would be able to cope with these more difficult compounds, experiments were done at a lower ligand concentration with propranolol (Table

2). Essentially, the $\log K_d$ values obtained at $10 \mu\text{M}$ was identical to the one obtained at $50 \mu\text{M}$. Extremely insoluble compounds might require to go further down in ligand concentration, and the lower limit of quantification of the analytical method can then become rate limiting. However, the same limitation applies to all known methods, as LC-MS/MS is the readout of choice in most if not all high-quality protein-binding assays. High lipophilicity is another characteristics of new “real life” compounds and leads to membrane retention and nonspecific binding. We have shown that this is usually not an issue with the method presented here, as these phenomena are taken into account in the K_b parameter.

A common issue encountered with protein-binding assays is the resolution, which can be reliably obtained for highly protein-bound compounds. To get a feel for the performance of our method, we repeated experiments over a six-week time period with a number of highly protein-bound compounds (Table 3).

In general, the resolution of the method depends on the targeted K_d value and the concentration of HSA and ligand used. In this study, most measurements were done at $100 \mu\text{M}$ HSA with the intent to cover a K_d from the millimolar to the micromolar range. We suggest to use these conditions as a first

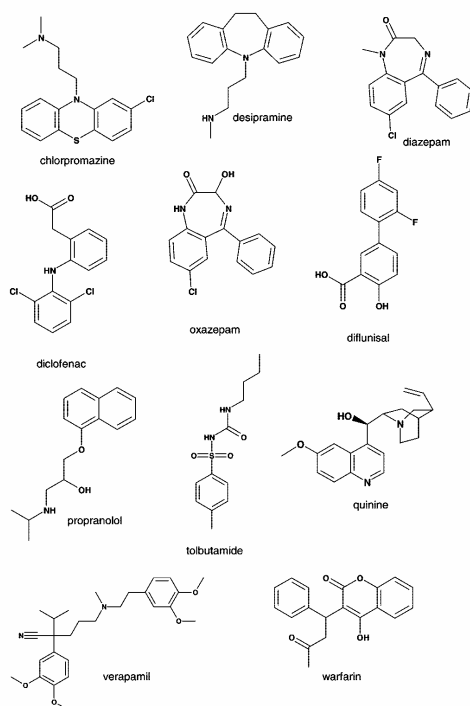


Figure 4. Chemical structures of the compounds of the test set.

line generic screen. For refined measurements, one can repeat the experiment with lower HSA concentration for very strong binders (permeability in the presence of protein drops below the lowest limit of quantification) or with a higher HSA concentration for weak binders (permeability \pm protein becomes too small).

In comparison with membrane dialysis, the analytical burden is more or less identical, as both methods used LC-MS/MS as a readout. The advantages of the PAMPA–HSA approach are elsewhere; this approach is faster (i) with no need to reach equilibrium to estimate the binding constant (and lower risk of compound or protein degradation), and (ii) the loss of material to the plate walls or the membrane interface does not affect the quality of the result. As with alternative approaches, membrane retention and nonspecific binding to the walls of the device does occur, but it is taken care in the analysis of the kinetic data as the K_b parameter accounts for compound retention. In principle, the kinetic approach described here can also be used with an equilibrium dialysis technique and would be a powerful alternative to mass balance calculations. However, there are a few advantages provided by the liquid membranes. Liquid membranes allow equilibrium to be reached faster because the effective surface of exchange provided by a liquid membrane is larger. As these membranes are not permeable to water, there is no volume change due the osmotic pressure (and, therefore, no correction needed). Finally, there is no need to pretreat membranes prior to use, which makes it easier for automation. The PAMPA–HSA approach can also be viewed as a direct way to study the impact of protein binding on drug absorption or diffusion through cell membranes. In this respect, the hexadecane membrane gives the ability to establish and maintain a pH gradient between the donor and the acceptor compartment, which would not be possible with the traditional membrane dialysis technique.

Perhaps a more general application of this work lies in the use of permeability kinetics as opposed to end point measurements as a method to correct permeability values for adsorption, such as nonspecific binding and membrane trapping. For example, in cell-based permeability assays (Caco-2, MDCK), poor compound recovery has been identified as a factor that should be taken into account when judging the validity of the result. We have shown that permeability corrected from nonspecific binding can be estimated from the permeability time course. This could be a powerful alternative to the traditional recovery calculations (mass balance) performed in cell-based permeability and PAMPA assays.

The assay principle described in this study could also be considered as a general label free technology to study protein–

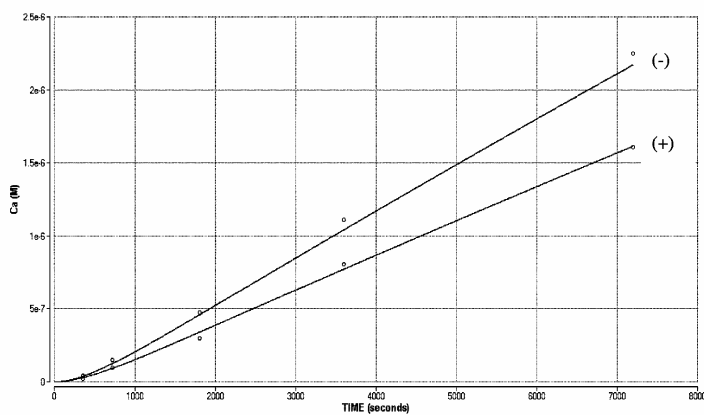


Figure 5. Concentration in acceptor (C_A) vs time profile of quinine in presence (+) and absence of HSA (–) in the donor compartment. Open circles represent the measured concentrations in acceptor compartment and the solid line is the best fit obtained using eqns 8–10.

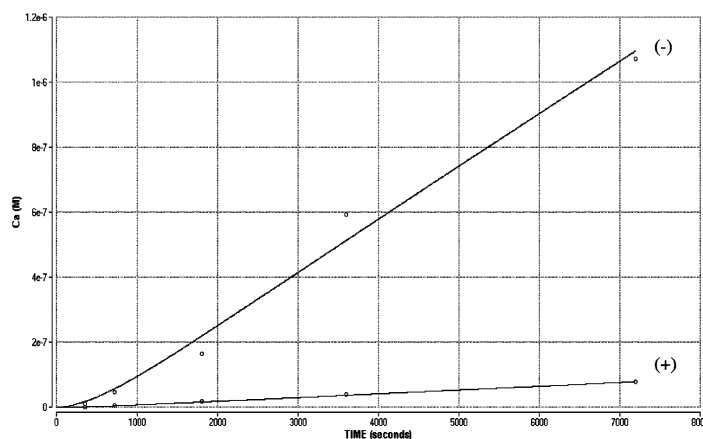


Figure 6. Concentration in acceptor (C_A) vs time profile of warfarin in presence (+) and absence (-) of HSA in the donor compartment. Open circles represent the measured concentrations in acceptor compartment and the solid line is the best fit obtained using eqns 8–10.

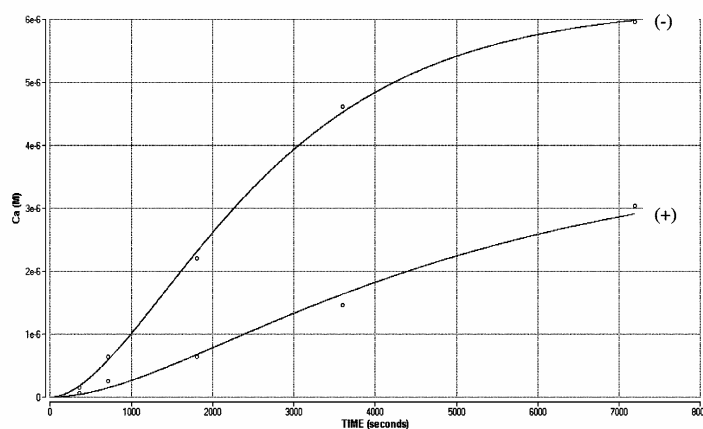


Figure 7. Concentration in acceptor (C_A) vs time profile of chlorpromazine in presence (+) and absence of HSA (-) in the donor compartment. Open circles represent the measured concentrations in acceptor compartment and the solid line is the best fit obtained using eqns 8–10.

ligand interactions. In particular, water-soluble proteins are expected to behave similarly to HSA and a chemical liquid membrane, such as those described in this study, will most probably separate most free ligands from the protein–ligand complexes efficiently.

Experimental Section

Reagents. All drugs were purchased from Sigma (Div. of Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) and were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 10 mM each and used without further purification. DMSO and hexane were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany) with a purity grade >99.8% and >99%, respectively. Hexadecane (>98%) and 1-octanol (99.5%) were purchased from Fluka and Riedel-de Haen, respectively (both from Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland). Human serum albumin (HSA), 99% fatty acid free, essentially globulin-free, was from Sigma. Phosphate buffer, pH 7.4 (0.014 M KH_2PO_4 and 0.054 M Na_2HPO_4), was from Fluka.

Analytics. The LC-MS/MS analyses were performed with a system equipped with two Rheos pumps 2000 (Flux Instruments, Basel, Switzerland) and a TSQ Quantum Discovery Max detector equipped with an electrospray ionization (ESI) source (ThermoFinnigan, San Jose, CA, U.S.A.). Nitrogen is used as a nebulizer gas at 40 psi, while the auxiliary gas is set at 10 psi. The capillary voltage is set at 4 kV, and its temperature is set at 350 °C. The collision pressure is 1 mTorr. The 96-well plates containing the samples are stored at 20 °C. Prior to injecting the sample, a solution of ACN/water 1/1 with internal standards (1.0 μM alprenolol for positive mode and 1 μM warfarin for negative mode) is added to the sample. The mobile phase is composed of a mixture of acetonitrile and water (containing 0.1% (v/v) of formic acid). Samples are injected (20 μL in a loop of 10 μL) and chromatographed on a Zorbax SB-C18, 30 \times 2.1 mm, 1.8 μm , column (Millian SA, Meyrin/Geneva, Switzerland) at a flow rate of 0.25 mL/min using the following gradient: 0–1 min constant mobile phase composition of 5% acetonitrile; 1–3 min linear gradient from 5 to 100% acetonitrile; 3–4.8 min remained constant; 4.8–4.81

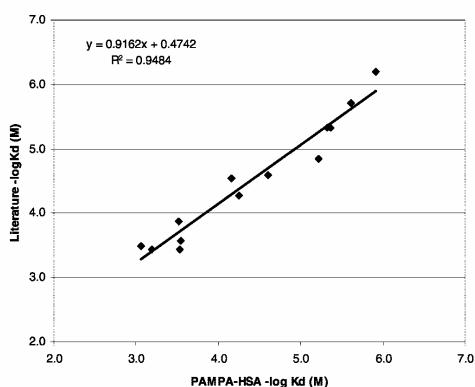


Figure 8. Correlation between literature and PAMPA-HSA K_d values.

Table 2. Impact of Drug and Protein Concentrations on K_d Determination

[propranolol], μM	[HSA], μM	$\log P_a$	$\log K_h$	PAMPA $-\log K_d$
10	50	-4.2	1.3	3.45
10	100	-4.2	1.5	3.18
10	300	-4.0	1.8	3.22
10	600	-4.0	2.0	3.20
50	100	-4.0	1.8	3.36

Table 3. Assay Variability for Highly Protein-Bound Compounds^a

	$N = 1$	$N = 2$	$N = 3$
warfarin	5.24 (99.0)	5.39 (99.3)	5.33 (99.2)
tolbutamide	5.56 (99.5)	4.95 (98.2)	5.16 (98.9)
diclofenac	5.61 (99.6)	5.60 (99.6)	5.61 (99.6)
diazepam	4.48 (94.7)	4.64 (96.3)	4.70 (96.7)
chlorpromazine	4.22 (90.8)	4.03 (86.5)	4.52 (95.2)

^a Numbers are the PAMPA-HSA $\log 1/K_d$ (M) obtained from three independent experiments over a six-week time period using [HSA] = 50 μM and [ligand] = 100 μM . The numbers in brackets represent the fraction bound in % derived from the K_d values, assuming a [HSA] = 600 μM and [drug] = 5 μM .

linear gradient back to 5% acetonitrile; and 4.81–6 min was constant. The use of two chromatographic pumps allowed the MS analysis of one column elute while the other column is reconditioned, reducing therefore the total run time per sample to 4.8 min.

Permeability Measurements. Permeation experiments are carried out in a teflon 96-well plate, which acts as the donor compartment. All wells are filled with 300 μL of 50 μM drug solution in buffer pH = 7.4, containing 0.75% DMSO, and a little magnet is placed in each one. Half of the plate contains 100 μM HSA and the other half is protein-free. Microtiter filter plates obtained from Millipore AG (Zug, Switzerland) are used as acceptor plates. Each well of the filter plate is impregnated with 5 μL of a 15% (v/v) hexadecane solution (or 5 μL of a 30% (v/v) octanol solution) dissolved in hexane and incubated for 15 min until complete evaporation of hexane. After that, the acceptor compartment is hydrated with 300 μL of phosphate buffer, pH = 7.4. The resulting sandwich construct (acceptor plate above donor plate) is incubated at room temperature under constant stirring. At different time points (0.1, 0.2, 0.5, 1 and 2 h), 75 μL from acceptor plate wells is transferred to a disposable polystyrene plate and loaded to the LC-MS autosampler. Each sample is quantified by comparing the peak surface area of the analyte with a 25 μM (theoretical equilibrium concentration) reference solution prepared independently.

To ensure that the donor/acceptor fluxes are not due to porous or unstable hexadecane layers, the stability of the membranes is tested by electrical resistance measurements at the end of the 2 h incubation. These measurements are performed using a Keithley 6517A electrometer (Keithley Instruments S.A., Dübendorf, Switzerland) with Ag/AgCl electrodes from World Precision Instruments (Berlin, Germany). Trans-wells with electrical resistance lower than 25 kOhm are discarded.

Measurement of HSA Permeability. HSA is quantified using an LC-UV method. Analyses were performed with an Agilent 1200 series LC-UV HPLC with a binary pump and a diode array detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The chromatography was performed on a Vydac 214TP C4 column, 50 \times 2.1 mm, 5 μm (Bucher Biotec AG, Basel, Switzerland), maintained at 40 $^{\circ}\text{C}$. The mobile phase solution is composed of acetonitrile and water delivered at 1.75 mL/min. Trifluoroacetic acid (TFA, 0.1%) is added in the mobile phase as an ion pair agent. The initial condition is 37% acetonitrile during 0.59 min; 0.59–0.6 min linear gradient from 37 to 40% acetonitrile; 0.6–1.0 min remained constant; 1.0–1.1 min linear gradient back to 37%; and is then constant until 2 min. The analytical wavelength was set at 210 nm.

Acknowledgment. E.L. was supported by a grant from the Spanish Government (AP2002-3049). We also thank Dr. Markus Weiss (Novartis Pharma AG) for helpful discussions and for providing reference data.

Supporting Information Available: Berkeley Madonna script used to solve eqns 8–10, and technical details of the PAMPA sandwich. This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Kurz, H.; Trunk, H.; Weitz, B. Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs. Equilibrium dialysis, ultrafiltration, ultra-centrifugation, gel filtration. *Arzneim.-Forsch.* **1977**, *27*, 1373–1380.
- Bowers, W. F.; Fulton, S.; Thompson, J. Ultrafiltration vs equilibrium dialysis for determination of free fraction. *Clin. Pharmacokin.* **1984**, *9*, 49–60.
- Sebille, B.; Zini, R.; Madjar, C. V.; Thuaud, N.; Tillement, J. P. Separation procedures used to reveal and follow drug-protein binding. *J. Chromatogr., A* **1990**, *531*, 51–77.
- Fung, E. N.; Chen, Y.; Lau, Y. Y. Semi-automatic high-throughput determination of plasma protein binding using a 96-well plate filtrate assembly and fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., B* **2003**, *795*, 187–194.
- Wan, H.; Rehgren, M. High-throughput screening of protein binding by equilibrium dialysis combined with liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1102*, 125–134.
- Banker, M. J.; Clark, T. H.; Williams, J. A. Development and validation of a 96-well equilibrium dialysis apparatus for measuring plasma protein binding. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92* (5), 967–974.
- Gabay, S.; Huang, P. C. The binding behavior of phenothiazines and structurally related compounds to albumin from several species. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **1974**, *9*, 175–189.
- Brodersen, R.; Sjödin, T.; Sjöholm, I. Independent binding of ligands to human serum albumin. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 5067–5072.
- Valko, K.; Nunhuck, S.; Bevan, C.; Abraham, M. H.; Reynolds, D. P. Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 2236–2248.
- Hollosy, F.; Valko, K.; Hersey, A.; Nunhuck, S.; Keri, G.; Bevan, C. Estimation of volume of distribution in humans from high throughput HPLC-based measurements of human serum albumin binding and immobilized artificial membrane partitioning. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6958–6971.
- Hartmann, T.; Schmitt, J.; Rohring, C.; Nimptsch, D.; Noller, J.; Mohr, C. ADME related profiling in 96 and 384 well plate format—A novel and robust HT-assay for the determination of lipophilicity and serum albumin binding. *Curr. Drug Delivery* **2006**, *3*, 181–192.
- Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (7), 1007–1010.
- Wohnsland, F.; Faller, B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 923–930.

- (14) Sugano, K.; Nabuchi, Y.; Machida, M.; Aso, Y. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *Int. J. Pharm.* **2003**, *257* (1-2), 245-251.
- (15) Avdeef, A.; Bendels, S.; Di, L.; Faller, B.; Kansy, M.; Sugano, K.; Yamachi, Y. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA): critical factors for better predictions of absorption. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, (11), 2893-2909.
- (16) Berkeley Madonna, <http://www.berkeleymadonna.com/>, <http://www.berkeleymadonna.com/BM%20User's%20Guide%208.0.pdf>, accessed 31-Aug-2007.
- (17) Zaton, A. M.; Ferrer, J. M.; Ruiz de Gordo, J. C.; Marquinez, M. A. Binding of coumarins to site I of human serum albumin. Effect of the fatty acids. *Chem.-Biol. Interact.* **1995**, *97*, 169-174.
- (18) Kragh-Hansen, U. Evidence for a large and flexible region of human serum albumin possessing high affinity binding sites for salicylate, warfarin, and other ligands. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 160-171.
- (19) Kragh-Hansen, U. Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin. *Biochem. J.* **1985**, *225*, 629-638.
- (20) Vestberg, K.; Galliano, M.; Minchiotti, L.; Kragh-Hansen, U. High-affinity binding of warfarin, salicylate and diazepam to natural mutants of human serum albumin modified in the C-terminal end. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 1515-1521.
- (21) Sengupta, A.; Hage, D. S. Characterization of minor site probes for human serum albumin by high-performance affinity chromatography. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3821-3827.
- (22) Brown, K. F.; Crooks, M. J. Displacement of tolbutamide, glibenclamide, and chlorpropamide from serum albumin by anionic drugs. *Biochem. Pharmacol.* **1976**, *25*, 1175-1178.
- (23) Chattopadhyay, A.; Tian, T.; Kortum, L.; Hage, D. S. Development of tryptophan-modified human serum albumin columns for site-specific studies of drug-protein interactions by high-performance affinity chromatography. *J. Chromatogr., B. Biomed. Sci. Appl.* **1998**, *715*, 183-190.
- (24) Paubel, J. P.; Niviere, P. La liaison des molécules organiques thérapeutiques avec les protéines: Cas de la quinine. *Eur. J. Med. Chem.* **1974**, *9*, 508-512.
- (25) Sharples, D. Competition for plasma protein binding sites between phenothiazine tranquilizers and iminodibenzyl antidepressants. *J. Pharm. Pharmacol.* **1975**, *27*, 379-381.
- (26) Szymura-Oleksiak, J.; Wyska, E.; Wasieczko, A. Pharmacokinetic interaction between imipramine and carbamazepine in patients with major depression. *Psychopharmacology (Berlin)* **2001**, *154*, 38-42.
- (27) Honore, B.; Brodersen, R. Albumin binding of anti-inflammatory drugs. Utility of a site-oriented versus a stoichiometric analysis. *Mol. Pharmacol.* **1984**, *25*, 137-150.
- (28) Larsen, C. G.; Larsen, F. G.; Jakobsen, P.; Brodersen, R. Multiple cobinding of two ligands to serum albumin: a stoichiometric description of binding equilibria. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *239*, 74-86.
- (29) Huang, P. C.; Gabay, S. Examination of phenothiazine-albumin interaction by ultraviolet difference spectrophotometry. *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *23*, 957-972.
- (30) Nambu, N.; Nagai, T. Binding of phenothiazines to bovine serum albumin and related phenomena. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1972**, *20*, 2463-2470.
- (31) Romer, J.; Bickel, M. H. A method to estimate binding constants at variable protein concentrations. *J. Pharm. Pharmacol.* **1979**, *31*, 7-11.
- (32) Bagatolli, L. A.; Kivatinitz, S. C.; Fidelio, G. D. Interaction of small ligands with human serum albumin IIIA subdomain. How to determine the affinity constant using an easy steady state fluorescent method. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1131-1132.
- (33) Viani, A.; Cappiello, M.; Pacifici, G. M. Binding of diazepam, salicylic acid, and digitoxin to albumin isolated from fetal and adult serum. *Dev. Pharmacol. Ther.* **1991**, *17*, 100-108.
- (34) Wiltling, J.; Hart, B. J.; De Gier, J. J. The role of albumin conformation in the binding of diazepam to human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *626*, 291-298.
- (35) Lucas, D.; Menez, J. F.; Daniel, J. Y.; Bardou, L. G.; Floch, H. H. Acetaldehyde adducts with serum proteins: Effect on diazepam and phenytoin binding. *Pharmacology* **1986**, *32*, 134-140.
- (36) Kober, A.; Ekman, B.; Sjöholm, I. Direct and indirect determination of binding constants of drug-protein complexes with microparticles. *J. Pharm. Sci.* **1978**, *67*, 107-109.
- (37) Müller, W.; Wollert, U. Characterization of the binding of benzodiazepines to human serum albumin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1973**, *280*, 229-237.
- (38) Chamouard, J. M.; Barre, J.; Urcien, S.; Houin, G.; Tillement, J. P. Diclofenac binding to albumin and lipoproteins in human serum. *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 1695-1700.
- (39) Epps, D. E.; Raub, T. J.; Kezdy, F. J. A general, wide-range spectrofluorometric method for measuring the site-specific affinities of drugs toward human serum albumin. *Anal. Biochem.* **1995**, *227*, 342-350.
- (40) Zini, R. Les modes de fixation des médicaments sur les protéines plasmatiques humaines et leurs conséquences pharmacologiques. UER de Sciences de l'Université Paris XII, France, Dissertation, 1984.
- (41) Tanaka, M.; Asahi, Y.; Masuda, S.; Minagawa, K. Binding position of tolbutamide to human serum albumin. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1998**, *46*, 817-821.
- (42) Judis, J. Binding of sulfonylureas to serum proteins. *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61*, 89-93.
- (43) Zini, R.; d'Athis, P.; Hoareau, A.; Tillement, J. P. Binding of four sulphonamides to human albumin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1976**, *10*, 139-145.
- (44) Jakoby, M. G. 4th.; Covey, D. F.; Cistola, D. P. Localization of tolbutamide binding sites on human serum albumin using titration calorimetry and heteronuclear 2-D NMR. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8780-8787.
- (45) Koizumi, K.; Ikeda, C.; Ito, M.; Suzuki, J.; Kinoshita, T.; Yasukawa, K.; Hanai, T. Influence of glycosylation on the drug binding of human serum albumin. *Biomed. Chromatogr.* **1998**, *12*, 203-210.
- (46) Ding, Y.; Zhu, X.; Liu, B. Study of interaction between drug enantiomers and serum albumin by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 1890-1894.

JM7012826

Interaction of Antioxidant Biobased Epicatechin Conjugates
with Biomembrane ModelsELISABET LÁZARO,[†] JOSÉ A. CASTILLO,[‡] CLARA RÁFOLS,[†] MARTÍ ROSÉS,[†]
PERE CLAPÉS,^{*,†} AND JOSEP LLUÍS TORRES^{*,†}Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1, E-08028 Barcelona,
and Institute for Chemical and Environmental Research, CSIC, Jordi Girona 18-26,
08034 Barcelona, Spain

(-)-Epicatechin conjugates with sulfur-containing moieties are strong free radical scavengers with cell-protecting activities, which may be in part modulated by their capacity to bind to biological membranes. We present here a study of the interaction of these conjugates with membrane models such as multilamellar vesicles and a phospholipid-coated silica column (immobilized artificial membrane), monitored by differential scanning calorimetry and high-performance liquid chromatography, respectively. The nonpolyphenolic moiety significantly influenced the membrane behavior of the whole molecules. Bulky and hydrophobic conjugates clearly interacted with the phospholipids and may have a tendency to penetrate into the hydrophobic core of the vesicles. In contrast, the smaller cationic 4 β -(2-aminoethylthio)epicatechin may be located at the outer interface of the lipid membrane. The outcomes from both experimental set-ups were in good agreement. The differences detected in the biological activities of the conjugates may be explained in part by their tendency to penetrate the cell membrane.

KEYWORDS: Antioxidants; catechins; flavonoids; liposomes; artificial membranes

INTRODUCTION

Natural polyphenols present in foods and supplements are widely appreciated for their putative health-promoting effects (1). They may be behind the low incidence of cancer and cardiovascular diseases of animals and humans following a diet rich in fruits and vegetables (2, 3). Catechins and their oligomeric forms (proanthocyanidins) are the main polyphenolic components of nutraceutical preparations from grape or pine (4, 5). We have described a new type of catechin conjugates with sulfur-containing compounds (6, 7), which can be readily obtained from agrofood byproducts (8). The nonphenolic part of these molecules influences the antiproliferative and proapoptotic activities on skin and colon cancer cells (9), neuronal survival (10), and immunomodulation (11). Interestingly, the conjugates appear to protect cells against oxidative damage by maintaining the levels of endogenous antioxidant systems (e.g., glutathione) rather than just scavenging free radicals (10). Changes in the capacity to interact with biological membranes driven by the nonphenolic substituents may be partially responsible for the differences detected among the conjugates. In fact, we have shown that cationic derivatives penetrate the skin layers more efficiently than zwitterionic and underivatized catechins

(12). To search for clues as to how the new molecules interact with biomembranes, simple membrane models such as liposomes and phospholipid-coated HPLC (high-performance liquid chromatography) columns are convenient tools.

Liposomes (e.g., multilamellar vesicles, MLVs) have been widely used as models for the interaction of small drugs and other biomolecules (proteins, peptides, DNA, and carbohydrates) with the cell membrane (13–16). In contrast, information about polyphenol interactions with membrane models is scarce. Simple catechins such as (-)-epicatechin (Ec) and (-)-epicatechin-gallate show some ability to penetrate into liposomes by a mechanism driven mainly by the capacity to establish hydrophobic interactions (17, 18). The more hydrophobic gallate esters appear to penetrate more deeply into the bilayer (18). An alternative and more simple way to screen bioactive compounds for their interaction with biomembranes is the so-called immobilized artificial membrane (IAM). IAMs were introduced as HPLC column-packing materials by Pidgeon and Venkataram (19) and have proven to be useful tools to predict drug permeability in different biological systems (20, 21). As far as we know, catechins and their derivatives have not been studied on IAM columns. The IAMs are prepared by covalently linking synthetic phospholipid analogues to silica-propylamine particles, in order to mimic the lipid environment of a fluid cell membrane on a solid matrix. Because of this chemical similarity, IAM columns are mainly used for the estimation of biomembrane transport properties. In previous studies, the retention factor on

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 93 400 61 12. Fax: +34 93 204 59 04. E-mail: jltqbp@iiqab.csic.es (J.L.T.) and pcsqbp@iiqab.csic.es (P.C.).

[†] Universitat de Barcelona.

[‡] Institute for Chemical and Environmental Research, CSIC.

IAM columns correlated well with solute partition coefficients in fluid liposome systems (22, 23).

We describe here the behavior of bioactive sulfur derivatives of Ec on MLV liposomes and a IAM column. Because some differences in the biological activities of the electrically charged catechin conjugates might be explained by a differential capacity to penetrate or somehow interact with biological membranes, these model systems may provide valuable information to help explain the biological properties of the new bioactive conjugates.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) was purchased from Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL). Ec and 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Chloroform and acetonitrile were from E. Merck (Darmstadt, Germany), and methanol was from Carlo Erba (Milano, Italy). Sodium dihydrogenphosphate monohydrate and disodium hydrogenphosphate were from E. Merck. All solvents and reagents used were of analytical grade. 4 β -(*S*-Cysteinyl)epicatechin (Cys-Ec), 4 β -(2-aminoethylthio)epicatechin (Cya-Ec), 4 β -[*S*-(*O*-ethyl-cysteinyl)]epicatechin (ECys-Ec), and 4 β -[*S*-(*N*-acetyl-*O*-methyl-cysteinyl)]epicatechin were synthesized in our laboratory by a previously published methodology (7, 24). The structures of the molecules studied are depicted in Figure 1. Ultrapure water, produced by a Nanopure purification system coupled to a Milli-Q water purification system, with a resistivity of 18.2 M Ω cm, was used for the aqueous solutions.

Preparation of MLVs of DPPC. A standard solution of DPPC (4.4 mg/mL) in chloroform/methanol 1/1 v/v was prepared and aliquoted (100 μ L) in glass tubes. This solution was evaporated to dryness under a nitrogen stream while the tube was rotated in order to obtain a thin film at the bottom of the tube walls. The residual solvent was removed by keeping the samples under high vacuum. MLVs were formed by hydrating the dried lipid with 100 μ L of 5 mM oxygen-free HEPES buffer, pH 7.4, containing the corresponding amount of epicatechin or its derivatives, followed by five alternative cycles of sonication (2 min) and heating at 60 $^{\circ}$ C (2 min). Under these conditions, the polyphenolics remained intact as ascertained by reversed-phase HPLC before and after the treatment.

Differential Scanning Calorimetry (DSC). Calorimetric experiments were performed with a DSC 821E Mettler Toledo (Greifensee, Switzerland) calorimeter. DSC runs were carried out with fresh liposome preparations. Aluminum pans were loaded with 30 μ L of DPPC MLV suspension (containing 0.13 mg of DPPC). Then, they were hermetically sealed. Three heating/cooling cycles were performed in a temperature range between 0 and 60 $^{\circ}$ C at a constant scanning rate of 5 $^{\circ}$ C/min. The data from the first scan were always discarded to avoid mixing artefacts. Experiments were carried out in triplicate.

HPLC. The retention data were acquired with an IAM.PC.DD2 column (100 mm \times 4.6 mm i.d., 12 μ m, Regis Technologies Inc., Morton Grove, IL). All measurements were performed with a Shimadzu liquid chromatograph (Kyoto, Japan) equipped with two Shimadzu LC-10AD pumps and a Shimadzu SPD-10AV detector. The eluent was 0.01 M phosphate aqueous buffer, pH 7, containing 20% CH₃CN. All compounds were dissolved in a mobile phase at a concentration of 0.1 mg/mL. The injection volume was always 10 μ L. The detection wavelength was 214 nm. Isocratic conditions were always used at a flow rate of 1 mL/min. The column hold-up time was determined by using an aqueous solution of potassium bromide (0.1 mg/mL) as an unretained solute. Its detection was performed at 200 nm. Retention data were expressed by the logarithm of the capacity factor, log k , defined as log $k = \log [(t_r - t_0)/t_0]$ where t_r and t_0 are the retention times of the solute and the unretained compound, respectively. All measurements were taken in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Lipid MLVs as a Membrane Model: DSC Studies. To evaluate the interaction between epicatechin derivatives (Figure

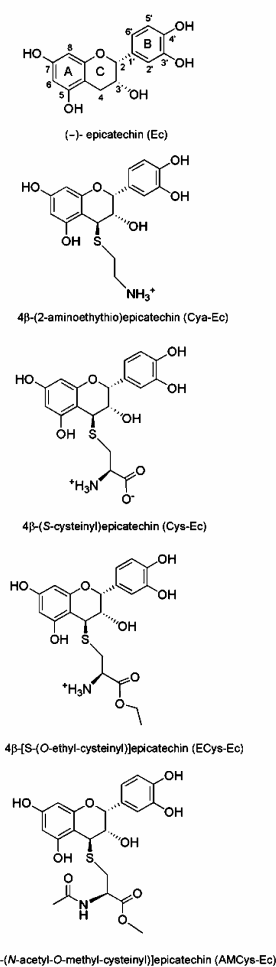


Figure 1. Structures of the epicatechin derivatives.

1) and lipid membranes, the phase transitions of DPPC MLVs with and without the solutes were evaluated by DSC. DSC thermograms of DPPC MLVs show a sharp transition at 41 $^{\circ}$ C and a pretransition at 35 $^{\circ}$ C, consistent with previously reported values (25, 26). The pretransition corresponds to the transition between a gel phase and a ripple phase characterized by a tilt of the acyl chains caused by the bulky polar heads. The main transition takes place from an ordered gel state (P_{β} phase) at lower temperature to a more disordered liquid crystalline state (L_{α} phase) at higher temperature. In the gel state, the acyl chains are largely in *trans* conformation, while in the liquid state they tend more to *gauche* conformation. The average number of *gauche* conformers is related to the bilayer fluidity.

The thermotropic parameters studied were the phase transition temperature (T_m) and the width at half-height of the heat absorption peak ($\Delta T_{1/2}$). The former relates to the stability of the membrane structure, and the latter carries information about

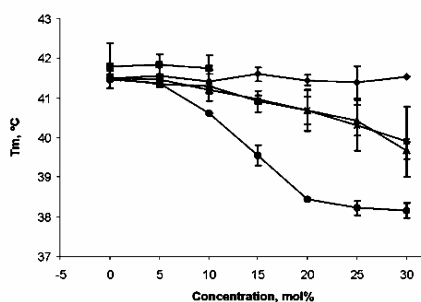


Figure 2. Phase transition temperature (T_m) of DPPC MLV liposomes as a function of the molar percentage of epicatechin derivatives in a concentration range between 0 and 30 mol %: Ec (x), Cya-Ec (♦), Cys-Ec (■), ECys-Ec (●), and AMCys-Ec (▲).

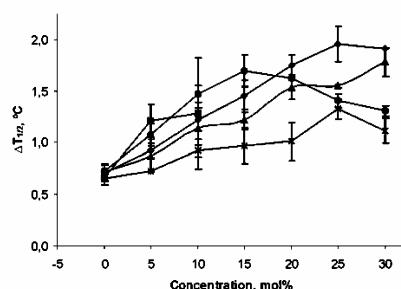


Figure 3. Transition width ($\Delta T_{1/2}$) of DPPC MLV liposomes as a function of the molar percentage of epicatechin derivatives in a concentration range between 0 and 30 mol %: Ec (x), Cya-Ec (♦), Cys-Ec (■), ECys-Ec (●), and AMCys-Ec (▲).

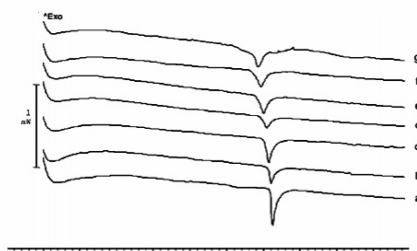


Figure 4. DSC curves obtained with DPPC-Ec. The molar percentages of Ec were a, 0% (i.e., pure DPPC); b, 5%; c, 10%; d, 15%; e, 20%; f, 25%; and g, 30%. The heating rate was 5 °C/min.

the cooperativity of the phase-transition process. Both parameters were plotted against the concentration of each product in the MLV preparation (0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 mol %). The results are summarized in **Figures 2** and **3**. **Figure 4** illustrates the endothermic transition peaks obtained in the presence of the parent polyphenol Ec. The effect of polyphenols such as Ec and other naturally occurring flavonoids on DPPC or 1,2-miristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine membrane models has been described by other authors (17, 18). The polyphenols abolish the pretransition and induce a decrease in the phase transition temperature and some broadening of this main transition peak. This behavior is common to other small organic

molecules (27, 28). In our hands, all of the compounds abolished the pretransition at 5 mol % whereas different effects on the main transition were recorded. Ec and the uncharged hydrophobic derivative AMCys-Ec behaved much like other small species. Both compounds caused a moderate decrease in T_m (**Figure 2**) meaning that they slightly affected the stability of the liposomes. Interestingly, a significant increase in $\Delta T_{1/2}$ was recorded for the bulkier hydrophobic derivative AMCys-Ec (**Figure 3**). This compound appears to raise the fluidity of the lipid bilayer much like other lipophilic molecules (e.g., short chain alkanes), which show a tendency to be located at the center of the hydrophobic core (29, 30). Ec did not alter the membrane fluidity significantly. These results show that the introduction of a protected cysteine moiety may facilitate the incorporation of the polyphenol into the lipid. This may carry an improved capacity to protect membrane lipids from peroxidation. In fact, it has been suggested that similar hydrophobic sulfur-containing derivatives of no amino acidic nature are better antioxidants than more hydrophilic conjugates in a liposome lipid peroxidation model (31).

The electrically charged conjugates influenced the stability of the liposomes in different ways. Cationic ECys-Ec exerted the strongest perturbation of the liposome stability and fluidity recorded in this study. The temperature of the main transition (T_m) slumped until 25 mol % and then reached a plateau (**Figure 2**). This behavior indicates that the positively charged ECys-Ec interacts strongly with the phospholipid bilayer. In agreement with this, the $\Delta T_{1/2}$ suffered a steep increase until 15–20 mol %. At higher concentrations, the phase transition peaks are narrowed again. Under these conditions, the phospholipid molecules would be freed from the interaction with the catechin and participate in the phase transition again, increasing the cooperativity. This might be explained by the formation of clusters or self-aggregates of ECys-Ec. In fact, at high concentrations, π - π stacking or cation- π interactions might be relevant. The effects on the phase transition caused by the cationic derivatives may have points in common with those of cationic surfactants (32) and peptides (33).

The effect of the positively charged Cya-Ec on the thermotropic behavior of DPPC liposomes set this compound apart from the rest of the series. The thermograms showed no change in T_m , while $\Delta T_{1/2}$ clearly increased over the interval between 0 and 25 molar percentage (**Figures 2** and **3**). The broadening of the main transition endothermic peak without any change in the melting temperature is characteristic of molecules localized in the outer cooperative zone of the bilayer. The same behavior has been described for peptide epitopes (34). The results are compatible with an interfacial location of Cya-Ec with some penetration of the more hydrophobic flavonoid ring into the hydrocarbon chain region closer to the polar head. In fact, it has been described that aromatic rings may penetrate the surfactant layers, making them fragile (35). This penetration might be driven by an effective interaction with the glycerol moiety connecting the acyl chains to the phosphocholine group. This would be supported by the observation that poly(oxyethylene) chains are highly soluble in aromatic hydrocarbons (36, 37). In any case, Cya-Ec neither stabilized nor destabilized the liposomes, since the main transition happened at the same temperature at any concentration.

When liposomes were prepared in the presence of the zwitterionic Cys-Ec, the main transition was completely abolished already at 10 mol %. To obtain a more detailed description of its behavior, Cys-Ec was tested at a lower concentration range (0, 2, 4, 6, and 8 mol %). The plots obtained (**Figure 5**) show

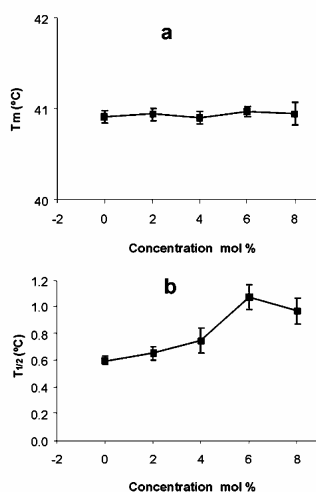


Figure 5. Phase transition temperature (T_m) (a) and transition width ($\Delta T_{1/2}$) (b) of DPPC MLV liposomes as a function of the molar percentage of Cys-Ec in a concentration range between 0 and 8 mol %.

Table 1. Retention of the Conjugates on the IAM Column^a

compound	t_r	t_b	$\log k$
ECys-Ec	1.21	19.65	1.183
AMCys-Ec	1.21	7.35	0.706
Ec	1.21	4.71	0.462
Cya-Ec	1.21	4.72	0.463
Cys-Ec	1.21	2.61	0.062

^a Mobile phase, phosphate buffer, pH 7, 20% CH₃CN; k (retention factor) = $(t_r - t_b)/t_b$; experiments performed in triplicate.

no changes in T_m and a slight increase in $\Delta T_{1/2}$, meaning that the cooperativity of lipid–lipid interactions was only slightly affected. The liposomes appeared to be destroyed at concentrations of 10 mol % and above, while the lipid molecules remain in solution. The effect of this compound does not follow the most common tendency of membrane active substrates, which gradually affect the phase transition and cooperativity. At low concentrations (10% mol and below), Cys-Ec appeared to interact slightly with liposomes, probably by the same mechanism that Cya-Ec does. At higher concentrations, the lipidic structure was effectively disrupted.

IAM. Ec and its sulfur derivatives were tested on an IAM column using a mobile phase buffered at pH 7 containing 20% CH₃CN. The conditions inside the column, with a continuous flow of fresh solvent, may be comparable to the situation on the MLV model at low molar solute concentrations. The retention factors obtained are summarized in Table 1. The results are in good agreement with those obtained with MLV vesicles. ECys-Ec was the most retained solute followed by AMCys-Ec and Ec. The observation that AMCys-Ec was more efficiently retained than Ec on the column may be explained by the tighter interaction of the former compound with the hydrophobic part of the lipid as shown by its effect on the liposome fluidity (Figure 3). Cya-Ec and Ec eluted at the same time. In this case, while Ec appears to be able to establish hydrophobic contact with the lipid (18), Cya-Ec might be mainly interacting with the polar outer interface of the lipid, as

suggested by the observations on the liposome model. The IAM column is not able to discriminate between the two kinds of interaction. Finally, Cys-Ec was not retained by the IAM stationary phase, in agreement with the plots obtained with liposomes (Figure 5), which indicate that no perturbation of the vesicle structure occurs at low concentrations.

The retention of epicatechin derivatives on an IAM relates well with their behavior on MLVs. In agreement with previous results for other compounds (21, 38), IAM chromatography proved to be a convenient way to quickly test polyphenolic derivatives for their putative interaction with membranes. On the other hand, IAM does not tell us about the kind of interaction (polar, hydrophobic) involved or where the solute may be located. More detailed information about the nature of the interaction of the active molecules can be obtained from experiments on vesicles using DSC. This is particularly important for compounds such as Cya-Ec, which appears to bind to the lipids by both polar and hydrophobic interactions, with a possible biologically significant tendency to be located in the outer parts of the membrane.

The results presented here show that the incorporation of a nonpolyphenolic moiety onto the epicatechin structure may significantly influence its interaction with model membranes. Particularly, while cationic Cya-Ec may have a tendency to be located at the outer interface of the lipid membrane, ECys-Ec, also cationic with a bulkier nonpolyphenolic moiety, appears to efficiently penetrate into the inner zones of the liposome. The uncharged AMCys-Ec may penetrate into the core lipids mostly by hydrophobic interactions. We have shown that some biological properties of the epicatechins are influenced by the nonpolyphenolic part of the molecules and the present results clearly show that the same modifications influence the capacity of the conjugates to interact with biological membrane models. So far, while no clear-cut relation seems to arise from the comparison between the biological and the physicochemical behavior of the conjugates, the results suggest that the nonphenolic part of the molecules might determine whether the phenolics are available for action on surface receptors, inside the membrane, or even intracellularly. The information gained about the behavior of the cell-protecting antioxidant thiocjugates in membrane environments may contribute to elucidate their mechanisms of action and open new avenues for the valorization of agrofood byproducts.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Josep Carilla and Amelia López from the Thermal Analysis Facility at IQAB-CSIC for the DSC analyses.

LITERATURE CITED

- (1) Shahidi, F.; Naczk, M. *In Phenolics in Food and Nutraceuticals*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2004.
- (2) Nichenametla, S. N.; Taruscio, T. G.; Barney, D. L.; Exon, J. H. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2006**, *46*, 161–183.
- (3) Manach, C.; Mazur, A.; Scalbert, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* **2005**, *16*, 77–84.
- (4) Ray, S.; Bagchi, D.; Lim, P. M.; Bagchi, M.; Gross, S. M.; Kothari, S. C.; Preuss, H. G.; Stohs, S. J. Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **2001**, *109*, 165–197.
- (5) Rohdewald, P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol (R)), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2002**, *40*, 158–168.

- (6) Torres, J. L.; Lozano, C.; Juliá, L.; Sánchez-Baeza, F. J.; Anglada, J. M.; Centelles, J. J.; Cascante, M. Cysteinyflavan-3-ol conjugates from grape procyanidins. Antioxidant and antiproliferative properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2497–2509.
- (7) Torres, J. L.; Bobet, R. New flavanol-derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4627–4634.
- (8) Selga, A.; Torres, J. L. Efficient preparation of catechin thio conjugates by one step extraction/depolymerization of pine (*Pinus pinaster*) bark procyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7760–7765.
- (9) Lozano, C.; Torres, J. L.; Juliá, L.; Jiménez, A.; Centelles, J. J.; Cascante, M. Effect of new antioxidant cysteinyl-flavanol conjugates on skin cancer cells. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 4219–4225.
- (10) Torres, J. L.; Lozano, C.; Maher, P. Conjugation of catechins with cysteine generates antioxidant compounds with enhanced neuroprotective activity. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2032–2037.
- (11) Mijang, M.; Del Campo, J.; Abajo, C.; Martínez, V.; Selga, A.; Lozano, C.; Torres, J. L.; Vinardell, M. P. Immunomodulatory activity of a new family of antioxidants obtained from grape polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7297–7299.
- (12) Alonso, C.; Notario, J.; Ramón, E.; Lozano, C.; Parra, J. L.; Torres, J. L.; Codereh, L. Percutaneous absorption of flavan-3-ol conjugates from plant procyanidins. *Drug. Exp. Clin. Res.* **2004**, *30*, 1–10.
- (13) Busquets, M. A.; Alsina, M. A.; Haro, I. Peptides and liposomes: From biophysical to immunogenic studies. *Curr. Drug Targets* **2003**, *4*, 633–642.
- (14) Ohtake, S.; Schebor, C.; De Pablo, J. J. Effects of trehalose on the phase behavior of DPPC-cholesterol unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 65–73.
- (15) Pignatello, R.; Intravaia, V. D.; Puglisi, G. A calorimetric evaluation of the interaction of amphiphilic prodrugs of idebenone with a biomembrane model. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *299*, 626–635.
- (16) Boija, E.; Johansson, G. Interactions between model membranes and lignin-related compounds studied by immobilized liposome chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 620–626.
- (17) Saija, A.; Bonina, F.; Trombetta, D.; Tomaino, A.; Montenegro, L.; Smeriglio, P.; Castelli, F. Flavonoid-biomembrane interactions: A calorimetric study on dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. *Int. J. Pharm.* **1995**, *124*, 1–8.
- (18) Caturla, N.; Vera-Samper, E.; Villalain, J.; Mateo, C. R.; Micol, V. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biol. Med.* **2003**, *34*, 648–662.
- (19) Pidgeon, C.; Venkataran, U. V. Immobilized artificial membrane chromatography: Supports composed of membrane lipids. *Anal. Biochem.* **1989**, *176*, 36–47.
- (20) Yang, C. Y.; Cai, S. J.; Liu, H.; Pidgeon, C. Immobilized artificial membranes—Screens for drug-membrane interactions. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 229–256.
- (21) Lázaro, E.; Ràfols, C.; Abraham, M. H.; Rosés, M. Chromatographic estimation of drug disposition properties by means of immobilized artificial membranes (IAM) and C18 columns. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4861–4870.
- (22) Ong, S.; Liu, H.; Pidgeon, C. Immobilized-artificial-membrane chromatography: Measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. *J. Chromatogr. A* **1996**, *728*, 113–128.
- (23) Taillardat-Bertschinger, A.; Martinet, C. A. M.; Carrupt, P. A.; Reist, M.; Caron, G.; Fruttero, R.; Testa, B. Molecular factors influencing retention on immobilized artificial membranes (IAM) compared to partitioning in liposomes and *n*-octanol. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 729–737.
- (24) Lozano, C.; Juliá, L.; Jiménez, A.; Touriño, S.; Centelles, J. J.; Cascante, M.; Torres, J. L. Electron transfer capacity of catechin derivatives and influence on the cell cycle and apoptosis in HT29 cells. *FEBS J.* **2006**, *273*, 2475–2486.
- (25) Lo, Y.-L.; Rahman, Y.-E. Protein location in liposomes, a drug carrier: A prediction by differential scanning calorimetry. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 805–814.
- (26) Ramaswami, V.; Haaseth, R. C.; Matsunaga, T. O.; Hruby, V. J.; O'Brien, D. F. Opioid peptide interactions with lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1109*, 195–202.
- (27) Lohner, K. Effects of small organic molecules on phospholipid phase transitions. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 341–362.
- (28) Jutila, A.; Söderlund, T.; Pakkanen, A. L.; Huttunen, M.; Kinnunen, P. K. J. Comparison of the effects of clozapine, chlorpromazine, and haloperidol on membrane lateral heterogeneity. *Chem. Phys. Lipids* **2001**, *112*, 151–163.
- (29) McIntosh, T. J.; Simon, S. A.; MacDonald, R. C. The organization of *n*-alkanes in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *597*, 445–463.
- (30) Pope, J. M.; Dubro, D. W. The interaction of *n*-alkanes and *n*-alcohols with lipid bilayer membranes: A 2H-NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *858*, 243–253.
- (31) Tanaka, T.; Kusano, R.; Kouno, I. Synthesis and antioxidant activity of novel amphipathic derivatives of tea polyphenol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1801–1806.
- (32) Castillo, J. A.; Pinazo, A.; Carilla, J.; Infante, M. R.; Alsina, M. A.; Haro, I.; Clapés, P. Interaction of antimicrobial arginine-based cationic surfactants with liposomes and lipid monolayers. *Langmuir* **2004**, *20*, 3379–3387.
- (33) Abrunhosa, F.; Faria, S.; Gomes, P.; Tomaz, I.; Pessoa, J. C.; Andreu, D.; Bastos, M. Interaction and lipid-induced conformation of two Cecropin-Melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 17311–17319.
- (34) Sospedra, P.; Mestres, C.; Haro, I.; Muñoz, M.; Busquets, M. A. Effect of amino acid sequence change on peptide-membrane interaction. *Langmuir* **2002**, *18*, 1231–1237.
- (35) Kunieda, H.; Yano, N.; Solans, C. The stability of gel-emulsions in a water/non-ionic surfactant/oil system. *Colloids Surf.* **1989**, *36*, 313–322.
- (36) Christenson, H.; Friberg, S. E. Spectroscopic investigation of the mutual interactions between nonionic surfactant, hydrocarbon, and water. *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, *75*, 276–285.
- (37) Bailey, F. E.; Koleske, J. V. *Nonionic Surfactants*. Physical Chemistry, Marcel Dekker: New York, 1987; pp 927–969.
- (38) Vrakas, D.; Giaginis, C.; Tsantili-Kakoulidou, A. Different retention behavior of structurally diverse basic and neutral drugs in immobilized artificial membrane and reversed-phase high performance liquid chromatography: Comparison with octanol-water partitioning. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1116*, 158–164.

Received for review November 17, 2006. Revised manuscript received February 2, 2007. Accepted February 5, 2007. This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Grants PPQ2003-06602-C04 01, CTQ2004-00965/BQU, and PTR1995-0880-OP) and an associated contract with Greenlane Biodevelopments SL. Grants PPQ2003-06602-C04 01 and CTQ2004-00965/BQU were partially financed by ERDF of the European Union. J.A.C. acknowledges the CSIC I3P postgraduate scholarship program for the financial support. The work of E.L. was supported by a grant from the Spanish Government (AP2002-3049).

JF063327D

Resultats i discussió

3.1. Caracterització de sistemes de cromatografia de líquids

Tal i com s'explica a la introducció, les columnes IAM emprades en cromatografia de líquids pretenen modelar propietats biològiques gràcies a la seva estructura, similar a la de les membranes cel·lulars. No obstant, abans d'estudiar la seva relació amb sistemes biològics, vam voler caracteritzar mitjançant diversos models cromatogràfics aquesta fase estacionària per tal de conèixer millor les seves propietats.

3.1.1. Caracterització de l'acidesa d'una columna IAM

L'acidesa d'una columna ens informa de si queden grups silanols lliures a la sílice després del procés de fabricació de la fase estacionària i de la seva activitat. A partir de la determinació del pK_a dels silanols podem saber

a quins pH's la retenció d'alguns compostos (especialment bàsics) pot resultar afectada.

Per calcular l'acidesa dels silanols s'estudia la retenció del nitrat de liti a diferents valors de pH. De fet treballem amb l'escala de s_pH . El valor de ${}^s_w pH$ correspon al pH mesurat en una fase hidroorgànica amb un elèctrode calibrat amb tampons aquosos, fàcilment mesurable. A partir d'aquest valor podem passar a l'escala de s_pH senzillament, ja que la diferència entre les dues escales és una constant per a cada fase mòbil anomenada δ (en el nostre cas experimental, 60% de metanol, $\delta = 0.17$)⁷⁶⁻⁷⁸.

Quan els silanols estan desprotonats, interaccionen amb el liti injectat, provocant un augment a la seva retenció (figura 1, article 1). Encara que l'estructura de la fase estacionària IAM presenta un grup fosfat carregat negativament (figura 1.3), aquest grup no afecta significativament a la retenció del catió liti, com es demostra als cromatogrames obtinguts. El pK_a del grup fosfat està entre 1 i 2^{79,80}, pel que està totalment desprotonat a ${}^s_pH = 5.1$. No obstant, quan es va injectar nitrat de liti amb aquest pH a la fase mòbil, els dos pics van coeluir, és a dir, cap dels dos ions va quedar retingut a la fase estacionària (figura 1a, article 1). Per tant, el comportament del liti a s_pH 's superiors és degut únicament a la desprotonació dels silanols.

Les dades experimentals de retenció del catió liti van ser representades enfront dels diferents s_pH 's estudiats (figura 3.1), i els punts es van ajustar a l'equació (3), obtenint la línia representada a la figura 3.1. El millor ajust es va aconseguir amb $m=1$, el que vol dir que només s'ha trobat un grup de silanols a la columna IAM en el rang de s_pH estudiat (de 3 a 8.5). De l'equació (3) podem obtenir dos paràmetres que ens informen dels silanols presents a la columna: pK_{ai} ens informa de la seva acidesa i k_i de la seva

activitat. Per a la columna IAM vam obtenir un ${}^s pK_{ai} = 7.61 \pm 0.02$. Tenint en compte que el fabricant recomana treballar amb aquesta columna fins a un pH màxim de 7, el valor obtingut és molt bo, perquè els silanols lliures només ens afectaran quan estiguem a les condicions de treball extremes de la columna. Per altra banda, l'activitat que presenten és molt elevada ($k_i = 18.14 \pm 0.32$). És a dir, que encara que no es manifesten fins pH's elevats, quan ho fan són molt actius, i el seu efecte s'hauria de tenir en compte.

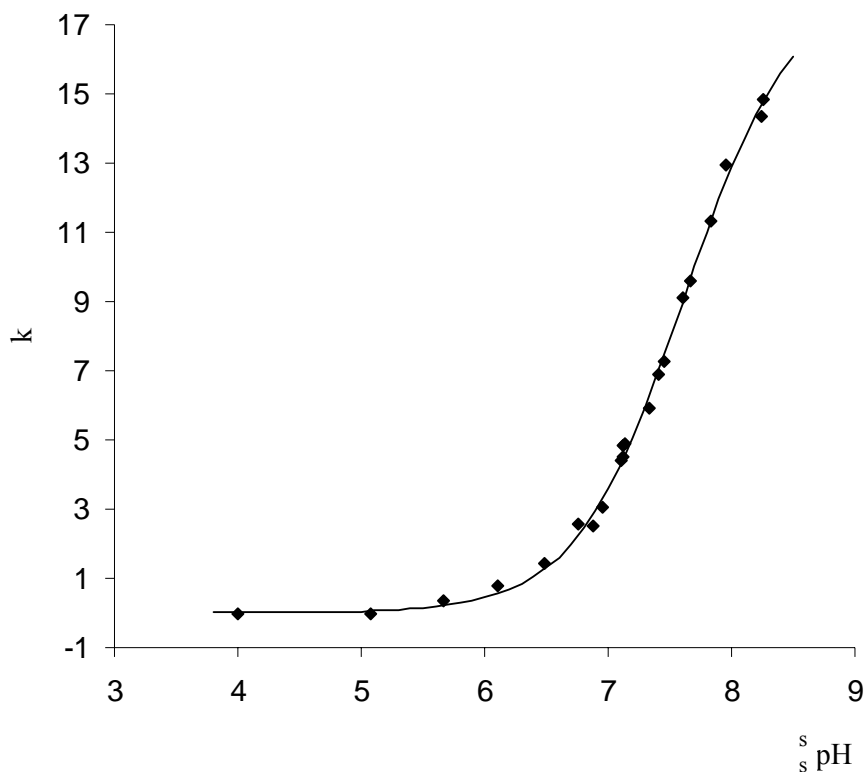


Figura 3.1. Dependència de la retenció del Li^+ a la columna IAM enfront del ${}^s pH$ de la fase mòbil.

En estudis previs realitzats al nostre grup es va determinar l'acidesa de diversos tipus de fases estacionàries^{27,28}. A la taula 3.1 es troben resumides

Taula 3.1. Característiques de la columna IAM i de totes les fases estacionàries estudiades previament

	Tamany de partícula (μm)	Tamany de porus (\AA)	Area superficial (m^2/g)	"Endcapped"	Dimensions (mm) (llarg x d.int.)	Rang de pH	Fabricant
IAM, PC-DD2	12	300	120	Sí	100×4.6	2-7.5	Regis Tech. (Morton Grove, IL, EEUU)
LiChrospher 100 RP-18	5	100	350	No	250×4.0	2-7.5	Merck (Darmstadt, Alemanya)
Purospher RP-18e	3	120	300	Sí	125×2.0	2-7.5	Merck (Darmstadt, Alemanya)
Chromolith RP-18e	-	13nm ^a /2nm ^b	300	Sí	100×4.6	2-7.5	Merck (Darmstadt, Alemanya)
Luna C18 (2)	5	100	400	Sí	150×4.6	2-10	Phenomenex (Torrance, CA, EEUU)
Resolve C18	5	90 ^c	200	No	150×3.9	2-8	Waters (Milford, MA, EEUU)
Resolve Silica	5	90	200	No	150×3.9	2-8	Waters (Milford, MA, EEUU)
Symmetry C18	5	86 ^c	346	Sí	150×4.6	2-8	Waters (Milford, MA, EEUU)
Symmetry Silica	5	90	341	No	150×4.6	2-8	Waters (Milford, MA, EEUU)
XTerra MSC18	5	125 ^c	175	Sí	150×4.6	1-12	Waters (Milford, MA, EEUU)
Underivatized XTerra	5	123	169	No	150×4.6	1-12	Waters (Milford, MA, EEUU)

^a Mesoporus.^b Macroporus.^c Dades corresponents a l'empaquetament abans de la derivatització.

Taula 3.2. Paràmetres d'acidesa i estadístics obtinguts per a les columnes estudiades

	IAM.PC.DD2		LiChrospher 100 RP-18		Luna C18 (2)		Resolve C18		Resolve Silica		Symmetry C18		Symmetry Silica		Underivatized XTerra	
	3-8.5	3-8.5	3-7.5	3-10	3-7.5	3-7.5	3-7.5	3-7.5	3-7.5	3-7.5	3-10	3-10	3-8	3-8	3-10	3-10
s_pH estudiat	3-8.5	3-8.5	3-7.5	3-10	3-7.5	3-7.5	3-7.5	3-7.5	3-7.5	3-10	3-10	3-10	3-8	3-8	3-10	3-10
m	1	1	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
s_pK_1			3.09±0.28		3.66±0.05	3.66±0.05	3.66±0.05	3.66±0.05	3.66±0.05							
k_1			2.45±0.56		9.86±0.33	9.86±0.33	9.86±0.33	9.86±0.33	9.86±0.33							
s_pK_2			4.69±0.26	5.65±2.33								4.65±0.17				
k_2			3.19±0.43	0.29±0.67								2.41±0.31				
s_pK_3		7.61±0.02	6.27±0.22	7.24±0.17	6.45±0.12	6.45±0.12	6.45±0.12	6.45±0.12	6.45±0.12	7.87±0.12	7.87±0.12	7.87±0.12	6.84±0.07	6.84±0.07		
k_3		18.14±0.32	2.99±0.38	5.07±0.56	10.05±0.80	10.05±0.80	10.05±0.80	10.05±0.80	10.05±0.80	2.19±0.37	2.19±0.37	2.19±0.37	19.22±1.06	19.22±1.06		
s_pK_4				9.14±0.07						9.39±0.29	9.39±0.29				8.97±0.02	
k_4				11.61±0.42						2.65±0.34	2.65±0.34				18.59±0.39	
r^2	0.997	0.997	0.997	0.997	0.993	0.993	0.993	0.993	0.993	0.989	0.989	0.989	0.997	0.997	0.999	0.999
S.D.	0.27	0.27	0.14	0.27	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.15	0.15	0.15	0.27	0.27	0.09	0.09
F	5533	5533	652	1349	623	623	623	623	623	515	515	515	2181	2181	15035	15035

les principals característiques d'aquestes columnes, incloent la IAM que jo he caracteritzat. Per altra banda, a la taula 3.2 es troben els diferents ${}^s pK_{ai}$ obtinguts per a cada columna en els diferents rangs de pH estudiats, i els estadístics corresponents a l'ajust dels punts experimentals a l'equació (3). Es pot observar com la sílice de la columna IAM (${}^s pK_{ai}$ 7.61 \pm 0.02) és d'una qualitat similar a la que presenten les columnes Luna C18 (${}^s pK_{ai}$ 7.24 \pm 0.17) i Symmetry C18 (7.87 \pm 0.12). Encara que la columna Luna C18 presenta també un ${}^s pK_{ai}$ de 5.65 \pm 2.33, l'activitat d'aquests silanols és pràcticament inexistent, ja que $k_2 = 0.29 \pm 0.67$. Aquestes dues columnes presenten altres tipus de silanols a pH's més elevats, mentre que per a la columna IAM només se'n observa un tipus. Però això és degut a que el rang de pH estudiat es va poder ampliar més per a la Luna C18 i la Symmetry C18, d'acord amb les especificacions del fabricant. Per altra banda s'ha de tornar a incidir en el fet que l'activitat dels silanols de la columna IAM és molt alta. Comparant el seu valor de k_i amb els altres valors obtinguts per a la Luna C18 i la Symmetry C18, veiem que encara que la sílice de totes tres columnes presenti una acidesa similar, els silanols seran molt més actius a la columna IAM, ja que n'hi ha molts més de lliures.

La taula 3.2 també ens mostra com hi ha altres columnes cromatogràfiques fabricades amb una sílice de pitjor qualitat que la sílice de la columna IAM, com són la LiChrospher 100 RP-18, la Resolve C18, la Resolve Silica i la Symmetry Silica. Per altra banda, també vam trobar columnes amb una sílice de major qualitat. A la taula 3.2 falten les columnes XTerra MSC18, Chromolith RP-18e i Purospher RP-18e, perquè la seva sílice és tan bona que no presenten cap activitat dels silanols en tot l'interval de pH treballat.

Una manera ràpida i visual de comparar l'acidesa de totes les columnes estudiades és mitjançant la figura 3.2. En el gràfic està representada l'activitat dels silanols de cada columna respecte el seu $^s pK_{ai}$. Per tenir sílices de bona qualitat interessa que el valor de k_i sigui el més petit possible mentre que el valor de $^s pK_{ai}$ sigui el més gran possible. Gràficament podem veure a simple vista els resultats comentats fins ara: com la columna IAM presenta una sílice de bona qualitat respecte les altres columnes, encara que els seus silanols són uns dels més actius de tots.

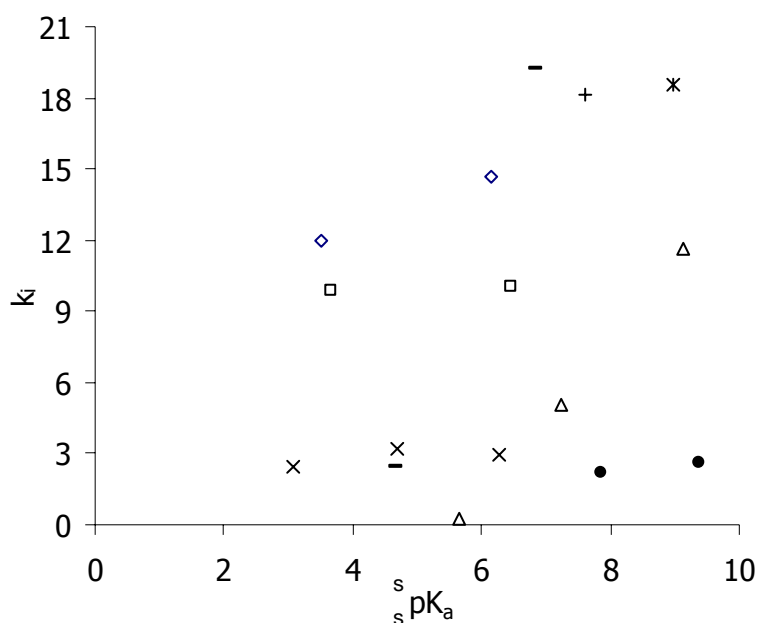


Figura 3.2. Distribució de les columnes depenent de l'acidesa i activitat dels seus silanols. (x) LiChrospher 100 RP-18, (□) Resolve C18, (◇) Resolve Silica, (●) Symmetry C18, (-) Symmetry Silica, (△) Luna C18 (2), (*) Underivatized XTerra, (+) IAM.PC.DD2.

Una altra figura que pot resultar de gran utilitat és la representació de la retenció de cada columna respecte el pH_s en un mateix gràfic (figura 2, article 1). D'aquesta manera podem saber per a un determinat pH_s quines columnes presentaran silanols actius i en quin grau. Per exemple, fins a pH_s 6 veiem com la columna IAM no presenta activitat dels silanols, mentre que altres columnes (Lichrospher 100 RP-18, Symmetry Silica, Resolve C18, Resolve Silica) ja presenten una gran activitat, perquè les seves corbes estan per sobre de la de la columna IAM. A partir d'aquest pH_s l'activitat dels silanols de la columna IAM s'incrementa ràpidament. També es pot deduir de la gràfica que la derivatització fa disminuir l'activitat dels silanols en els 2 casos estudiats (Resolve i Symmetry), i que aquest efecte encara s'aprecia més si la columna ha patit un procés d'*endcapping*.

3.1.2. Caracterització de sistemes cromatogràfics mitjançant el model LSER

Per conèixer millor les propietats de la fase estacionària d'interès, la columna IAM, es va aplicar el model cromatogràfic de solvatació LSER descrit a la introducció. Es va seleccionar una sèrie de 59 soluts d'estructura i propietats ben diferents i es van injectar al sistema amb diferents fases mòbils acetonitril-aigua (entre el 60 i el 10% de modificador orgànic). La selecció dels soluts provenia d'un estudi previ fet al nostre grup⁸¹ on es van escollir 71 compostos d'una base de dades amb quasi 3000 soluts. La selecció es va dur a terme a partir de l'anàlisi de components principals (PCA), de manera que els descriptors dels soluts seleccionats cobrien un

interval de valors elevat i no estaven correlacionats entre si. D'aquests 71 compostos vam triar només els 59 que presentaven una absorbància raonable per a la seva detecció en el cromatògraf de líquids i que eren neutres al pH de treball (pH=7). Aquest últim punt és molt important, perquè el model LSER tal i com està aquí explicat (equació (12)) no es pot aplicar a compostos parcialment o totalment ionitzats. Existeixen estudis realitzats amb aquest tipus de soluts⁸², però va ser necessària una modificació de l'equació (12). Per evitar això, ens vam assegurar que els 59 soluts seleccionats fossin neutres a pH=7. Els descriptors de tots els compostos estudiats, a més de les seves dades de retenció cromatogràfica, es poden trobar a la taula 1, article 2. En aquesta taula no només trobem les dades de retenció de la columna IAM, sinó també aquelles corresponents a les columnes XTerra MSC18 i XTerra RP18. Es tracta de dues columnes C18 comercials on també es van aplicar els diferents models cromatogràfics per poder comparar els resultats obtinguts amb els de la columna IAM. Les característiques principals d'aquestes tres columnes queden recollides a la taula 4, article 3.

Per aplicar el model LSER a cada columna i fase mòbil estudiada es fa una regressió multilíneal entre les dades de retenció i els descriptors dels soluts. Els coeficients obtinguts i els paràmetres estadístics es poden trobar a la taula 2, article 2, mostrant bones correlacions en tots els casos. A la taula es pot observar com el nombre de punts utilitzats (n) és inferior a 59 en tots els casos perquè es van eliminar alguns punts aberrants a l'hora de construir el model. El criteri utilitzat va ser eliminar tots els punts que presentessin un residu estàndard superior a 2.5 en valor absolut. A part d'això, a percentatges baixos d'acetonitril les substàncies quedaven molt més retingudes a la columna, i no es va poder obtenir el factor de retenció de totes elles.

L'anàlisi dels coeficients de la taula 2, article 2, ens informa de les diferències entre les fases mòbil i estacionària de cada sistema. A partir de l'equació (12) es dedueix que els coeficients positius impliquen un increment en el factor de retenció, es a dir que la partició a la fase estacionària està afavorida. De la mateixa manera, els coeficients negatius ens indiquen que els compostos tindran major afinitat per la fase mòbil. Per altra banda, com més gran sigui el coeficient en valor absolut, més influència tindrà aquella propietat en la retenció del compost. En tots els sistemes cromatogràfics estudiats, els coeficients que presenten una major influència són ν i b . Es a dir, el volum del solut i la basicitat per pont d'hidrogen són les propietats del solut que més influeixen en la seva retenció. Si observem els signes dels coeficients, veiem que ν i e són positius, mentre que s i b són sempre negatius. Aquest fet ens indica, per una banda, que és més fàcil la creació d'una cavitat de la grandària de la molècula del solut a la fase estacionària que a la fase mòbil, i que la fase estacionària és més polaritzable. Per altra banda, els coeficients s i b negatius ens indiquen que la fase mòbil és més dipolar i força més àcida per pont d'hidrogen que les tres fases estacionàries estudiades.

L'únic coeficient on canvia el signe entre la columna IAM i les altres dues columnes C18, és el coeficient a , positiu per a la columna IAM i negatiu per a les columnes XTerra. La columna IAM és, per tant, més bàsica per pont d'hidrogen que la fase mòbil, succeint a la inversa per a les altres dues columnes. Degut a aquesta diferència en la basicitat, els compostos donadors de pont d'hidrogen quedaran més retinguts quan s'injectin a la columna IAM que en les altres columnes C18. Per tant, els compostos que no presentin acidesa per pont d'hidrogen ($A=0$) s'haurien de comportar d'igual manera a les tres columnes, mentre que els compostos àcids ($A>0$) haurien de mostrar diferències en la seva retenció. Per tal de comprovar això es va construir la figura 5, article 3. Es va

representar la retenció dels compostos d'unes columnes enfront de les altres (una a una), indicant els soluts àcids mitjançant quadrats blancs i els que no ho eren amb quadrats negres. Tal i com esperàvem, la figura 5a, article 3, mostra que tots els compostos es comporten de manera similar en les dues columnes, excepte els compostos àcids significativament més retinguts a la columna IAM. En aquest gràfic és on es pot apreciar més clarament, perquè la columna IAM és la més bàsica de les tres, mentre la XTerra MSC18 és la menys bàsica. La columna XTerra RP18 presenta una basicitat intermèdia, pel que les figures 5b, 5c, article 3, presenten la mateixa tendència, però menys acusada. La basicitat de la columna IAM pot ser deguda, segons Taillardat-Bertschinger i col·laboradors¹⁵, als grups propilamino que resten lliures a la superfície de la sílice. No obstant, el grup negatiu que presenta l'estructura del fosfolípid potser també influeix en la seva capacitat acceptora de pont d'hidrogen. La diferència en basicitat respecte les dues columnes XTerra pot ser explicada pel grup carbat que la columna XTerra RP18 porta incorporat a la seva estructura (figura 8, article 3) i que es comporta com a acceptor de pont d'hidrogen.

Per comparar totes les propietats de les columnes entre sí observem detalladament els coeficients de la taula 2, article 2. Podem concloure que la fase estacionària més hidrofòbica és la columna XTerra MSC18, i la menys hidrofòbica la columna IAM, restant la columna XTerra RP18 entre les dues. La columna IAM és la més bàsica, la més àcida i la més polaritzable, seguida per la columna XTerra RP18, i en últim lloc la columna XTerra MSC18.

Els coeficients no només varien amb les diferents fases estacionàries, sinó també amb la composició de la fase mòbil. Les diferents proporcions d'acetonitril afegides a la fase aquosa fan variar les propietats del solvent i per tant, els coeficients canvien. A la figura 3, article 2, trobem representades aquestes variacions gràficament. Els coeficients de les tres

columnes presenten tendències similars entre el 20 i el 60% d'acetonitril. L'acidesa de la fase mòbil es veu dràsticament reduïda quan augmentem la proporció d'acetonitril (coeficient b disminueix), respecte a l'acidesa de la fase estacionària, mentre que la lipofilitat de la fase mòbil s'incrementa al mateix temps que ho fa el contingut de modificador orgànic (coeficient ν augmenta). Es a dir, que per a continguts baixos d'acetonitril les diferències entre fase mòbil i estacionària s'accentuen, mentre que per a continguts alts d'acetonitril les diferències entre fases són menors. Les altres propietats també es veuen afectades pel contingut d'acetonitril a la fase mòbil, però en menor grau. Sobretot la basicitat del sistema (coeficient a), pràcticament resta invariable amb la composició de la fase mòbil. En el cas de la columna IAM també es va estudiar el 10% d'acetonitril, observant-se com es perdia la linealitat de la variació dels coeficients en aquest punt.

Els resultats obtinguts en aquest estudi s'han comparat amb les caracteritzacions que altres autors havien realitzat per a la columna IAM (taula 3.3).

Taula 3.3. Comparació entre sistemes cromatogràfics caracteritzats per diferents autors utilitzant la columna IAM i 20% d'acetonitril a la fase mòbil

Coeficients						Referències
c	e	s	a	b	ν	
-0.71 (0.04)	0.50 (0.06)	-0.58 (0.04)	0.19 (0.03)	-2.00 (0.06)	2.13 (0.04)	Article 2
-0.83	0.23 (0.08)	-0.20 (0.08)	0.22 (0.09)	-2.03 (0.17)	1.89 (0.11)	83
-0.95 (0.06)	0.47 (0.05)	-0.34 (0.04)	0.10 (0.05)	-2.26 (0.07)	2.17 (0.18)	52

Els coeficients que vam obtenir per a la columna IAM són molt similars als extrets de la bibliografia. Els coeficients e i ν són pràcticament iguals als que van obtenir Lepont i Poole⁵², mentre que els coeficients a i b són molt similars als obtinguts per Valko i col·laboradors⁸³. L'únic que varia una mica és el coeficient s , però en general podem afirmar que vam obtenir els mateixos resultats que altres autors.

3.1.3. Caracterització de sistemes cromatogràfics mitjançant el model LSER global i el model de polaritat

El desavantatge que presenta el model LSER és que es necessari construir una equació per a cada fase mòbil estudiada. Un cop caracteritzat un sistema, i coneixent els descriptors d'un nou solut, es pot predir la seva retenció sense més treball experimental. Però si es vol conèixer la retenció d'un compost a diferents composicions de fase mòbil, s'han de caracteritzar diversos sistemes. Per solucionar això, va sorgir el model LSER global, que engloba en una única equació totes les composicions, ja que estableix cada coeficient del model LSER com una variació lineal del tant per u de modificador orgànic.

El model LSER global es va aplicar a les columnes IAM, XTerra MSC18 i XTerra RP18 (equacions (16-18), article 3), obtenint bons paràmetres estadístics després d'eliminar els punts aberrants amb el mateix criteri d'abans (residu estàndard superior a 2.5 en valor absolut). Es van eliminar com a punts aberrants aproximadament entre un 5% i un 6% dels punts experimentals inicials. La informació sobre les propietats del sistema que es pot extreure d'aquestes equacions és la mateixa que amb el model LSER, aplicant a ϕ el valor desitjat. Aquest model global requereix 12 paràmetres

per definir el sistema (c_{w_r} , c_{m_r} , e_{w_r} , e_{m_r} , s_{w_r} , s_{m_r} , a_{w_r} , a_{m_r} , b_{w_r} , b_{m_r} , v_{w_r} , v_{m_r}) i 5 paràmetres pel solut (descriptors E , S , A , B , V) (veure equació (13)).

Un altre model cromatogràfic que engloba totes les composicions de fase mòbil en una única equació és el model de polaritat. El model relaciona el factor de retenció d'un compost neutre amb un paràmetre de polaritat del solut (ρ), un paràmetre de polaritat de la fase mòbil (P_m^N) i dos paràmetres del sistema ($(\log k)_0$ i P_s^N), segons l'equació (11). El model es va aplicar a la mateixa sèrie de 59 compostos utilitzada fins ara, injectats a diferents percentatges d'acetoneitril. Primerament es representen les dades de retenció enfront del paràmetre de polaritat de la fase mòbil, que depèn de la composició d'aquesta, segons l'equació (8). D'aquesta relació lineal podem extreure q i p de l'ordenada a l'origen i del pendent, respectivament (veure equació (7)). A continuació es representen els valors de q enfront de p de cada solut, obtenint la figura 1, article 3. Aquestes relacions ens permeten obtenir una primera estimació dels paràmetres del sistema ($\log k)_0$ i P_s^N (veure equació (10)). Per optimitzar aquests paràmetres, i els de polaritat del solut ρ , s'aplica un procés iteratiu sobre l'equació (11) amb l'eina Solver del programa Excel, buscant la minimització de la suma dels quadrats dels residuals entre les dades de retenció experimentals i calculades per l'equació. Un cop finalitzat el procés iteratiu, s'obtenen les equacions (19-21), article 3, que caracteritzen a cadascun dels sistemes.

El paràmetre P_s^N ens informa de la polaritat de la fase estacionària d'una manera global, d'acord amb la definició que va fer Reichardt⁸⁴ de la "polaritat d'un solvent" i que va ser adoptada per la IUPAC⁸⁵. El terme de polaritat del solvent (fase mòbil o estacionària) es defineix com la seva capacitat per a interaccionar amb el solut mitjançant qualsevol interacció intermolecular específica i/o no específica (dipol-dipol, dipol-dipol induït, pont d'hidrogen, etc.) contribuint, en aquest cas, a la retenció

cromatogràfica. En canvi, el terme de polaritat no recull cap interacció que provoqui algun tipus d'alteració química del solut, tal com protonació, oxidació, reducció, formació d'un complex químic, etc. La columna IAM presenta la polaritat més elevada (0.154), seguida de les columnes XTerra RP18 (0.022) i XTerra MSC18 (-0.010), amb polaritats molt similars entre sí.

Per comparar els dos models aplicats a les tres columnes, observem les figures 2-4, article 3, i les equacions (22-27), article 3. Observant les equacions (22, 24, 26) corresponents al model LSER global respecte les equacions (23, 25, 27) corresponents al model de polaritat podem veure com els paràmetres estadístics són lleugerament millors pel model de polaritat, encara que els dos models s'ajusten molt bé a les dades experimentals. Les gràfiques representen els valors calculats respecte els experimentals, ajustant-se perfectament a les línies teòriques de pendent 1 i ordenada a l'origen 0. S'han inclòs també amb cercles buits els punts aberrants exclosos a l'hora de construir el model.

A continuació es va ampliar l'estudi d'aquests dos models amb un altre solvent a la fase mòbil, metanol, i més columnes C18 comercials (Symmetry C18, Chromolith RP-18e, Luna C18 i Resolve C18). Les característiques d'aquestes columnes es troben a la taula 1, article 4. A les dues columnes XTerra vam injectar la mateixa sèrie de 59 soluts amb diferents percentatges de metanol a la fase mòbil. Però per a les altres quatre noves columnes C18 vam fer servir una altra sèrie de soluts, perquè part de les dades experimentals provenien d'un estudi previ sobre el model de polaritat realitzat al nostre grup⁸⁶. El conjunt total de soluts, i els seus descriptors, queda recollit a la taula 2, article 4. Es van aplicar els dos models a totes les columnes i pels dos solvents, acetonitril i metanol. A la taula 3, article 4, queden recollits tots els coeficients del model LSER global obtinguts després de fer la regressió multilíneal i els paràmetres estadístics. El model es va

ajustar perfectament a les dades experimentals en totes les columnes i ambdós solvents.

Per caracteritzar correctament un sistema es necessiten al menys cinc soluts per cada coeficient a determinar. Per això la sèrie de soluts pel model LSER (o LSER global) ha de ser tan extensa. Però en el cas del model de polaritat no cal una sèrie de soluts tan gran. En un estudi previ del nostre grup⁸⁶ es va establir una sèrie de 12 soluts idonis per realitzar la caracterització, d'estructures diferents i que cobreixen un ampli interval de valors de ρ . En aquest mateix estudi es va demostrar que els paràmetres del sistema obtinguts a partir d'aquests 12 soluts eren molt similars als que s'obtenien amb una sèrie de soluts més àmplia, i per tant, es van establir aquests compostos com a sèrie de caracterització per a treballs futurs. Tenint en compte això, es van caracteritzar totes les columnes amb acetonitril i metanol amb aquests 12 soluts. Els paràmetres del sistema i els valors de ρ de cadascun dels soluts després del procés d'optimització queden reflectits a la taula 4, article 4. Els paràmetres del sistema són molt similars en tots els casos, com era d'esperar. Totes són columnes C18 i no s'aprecien diferències significatives en els seus termes de polaritat.

Per comparar l'ajust dels dos models ens basem en les figures 1-4, article 4. Els punts aberrants també estan representats, encara que s'haguessin eliminat per construir el model. Per poder comparar els ajustos en igualtat de condicions, hauríem de tenir el mateix nombre de dades experimentals en el gràfic de cada model. Per tant, en el cas del model de polaritat, no només es van representar els 12 compostos de la sèrie de caracterització, sinó també tots aquells de la taula 5, article 4 que s'haguessin fet servir amb el model LSER global. Per determinar els factors de retenció calculats d'aquests soluts complementaris es va fer servir l'equació (11), substituint els paràmetres del sistema prèviament obtinguts a la taula 4, article 4. Els valors de ρ del solut es van obtenir de la mitjana

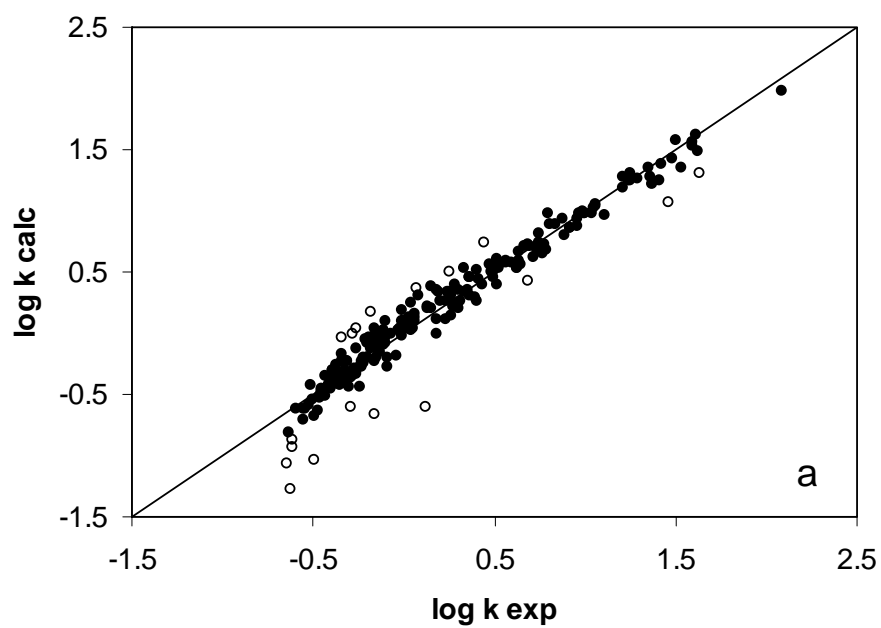
entre els valors obtinguts a cada composició de fase mòbil estudiada. D'aquesta manera es va aconseguir que cada parell de gràfics tingués el mateix nombre de punts experimentals, encara que per realitzar els ajustos feien falta moltes menys substàncies amb el model de polaritat. Els dos models s'ajustaven bé a les dades experimentals, com es veu a les figures 1-4, article 4, encara que alguns punts es desviaven de la recta teòrica. En el cas del model LSER global les desviacions provenien principalment de fases mòbils amb un alt contingut de modificador orgànic, mentre que el model de polaritat presentava desviacions per a baixos continguts de solvent orgànic. Per comparar la precisió dels dos models, es va construir la taula 6, article 4. Es pot veure com les desviacions estàndards són una mica inferiors en el model de polaritat, en la majoria de casos, mentre que el nombre de punts aberrants eliminats per construir els models és a vegades superior, a vegades inferior. Si a més tenim en compte la gran senzillesa del model de polaritat (un paràmetre del solut, dos paràmetres del sistema) enfront del model LSER global (cinc paràmetres del solut, dotze paràmetres del sistema), es pot considerar com una bona opció en la caracterització de sistemes cromatogràfics, encara que perdem la informació química que ens dona el model LSER.

Encara que no s'ha publicat a cap article, també s'han aplicat els dos models a la columna IAM fent servir metanol com a modificador orgànic (taula 3.4, figura 3.3).

Taula 3.4. Paràmetres resultants de l'ajust del model LSER global i de polaritat a la columna IAM utilitzant metanol com a solvent orgànic.

Model LSER global		Model de polaritat	
C_w	-0.954	P_s^N	0.08
C_m	0.358	$(\log k)_0$	-0.75

e_w	0.695	ρ (1,2-dihidroxibenzè)	1.87
e_m	-0.586	ρ (benzamida)	1.01
s_w	-0.672	ρ (3-metilfenol)	2.14
s_m	0.666	ρ (propiofenona)	2.16
a_w	0.340	ρ (benzoat de metil)	2.15
a_m	-0.343	ρ (4-nitrotoluè)	2.58
b_w	-2.974	ρ (butirofenona)	2.60
b_m	3.238	ρ (naftalè)	3.57
v_w	3.122	ρ (propilbenzè)	3.61
v_m	-3.477	ρ (heptanofenona)	4.31
r	0.989	ρ (butilbenzè)	4.42
n	216	ρ (crisè)	7.35



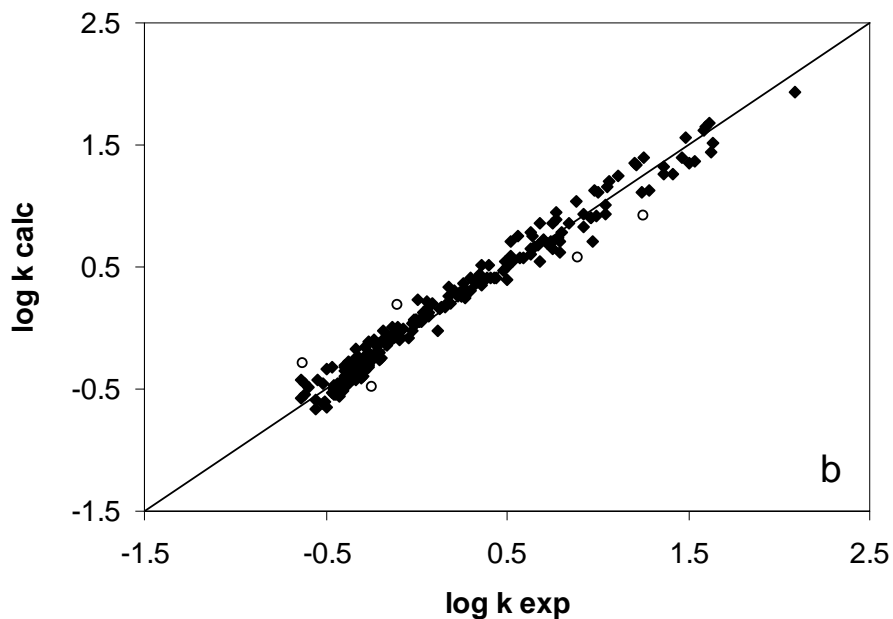


Figura 3.3. Representació dels $\log k$ calculats enfront dels $\log k$ experimentals de la columna IAM, utilitzant metanol com a solvent orgànic a la fase mòbil, amb el model a) LSER global i b) de polaritat. Símbols: (●) compostos utilitzats per construir el model, (○) punts aberrants.

En el cas del metanol també es van obtenir bons ajustos per a la columna IAM, i exactament la mateixa desviació estàndard amb els dos models (0.088), encara que va ser necessari eliminar molts més punts aberrants durant la construcció del model LSER global que amb el model de polaritat. La polaritat de la fase estacionària és 0.08, un valor moderadament superior al que presentaven totes les columnes C18.

3.1.4. Predicció de la retenció cromatogràfica mitjançant el model de polaritat

En cromatografia de líquids resulta molt útil poder predir la retenció dels compostos en el disseny de nous mètodes. Pot estalviar-nos molt temps i treball experimental, i encaminar-nos cap al sistema (fase mòbil i fase estacionària) més adient per resoldre el nostre problema analític.

Dels dos models cromatogràfics estudiats, considerem més apropiat el model de polaritat per fer prediccions de la retenció. Això es degut en part a la seva senzillesa. Per poder fer prediccions, necessitem primer tenir els sistemes caracteritzats. Per fer-ho, només necessitem 12 compostos en el cas del model de polaritat, mentre que pel model LSER (o LSER global) necessitem almenys cinc compostos per cada coeficient a determinar, és a dir 30 compostos. Segon, necessitem conèixer els valors de ρ dels nous soluts o els seus descriptors, depenent del model. Els valors de polaritat del solut s'obtenen amb una única mesura experimental, a una composició de fase mòbil en el sistema caracteritzat. Altra possibilitat és per transferència del valor de polaritat del mateix compost però en un altre sistema, ja que disposem d'una àmplia base de dades de polaritat del solut⁸⁷. La transferència es fa mitjançant una relació lineal que explicaré amb detall en aquest mateix apartat 3.1.4. Per poder obtenir els descriptors del solut es pot consultar la base de dades que els conté⁸⁸, però en cas de que no hi siguin allà es força més complicat aconseguir-los experimentalment. Aquests paràmetres també es poden estimar amb programes informàtics, fent servir el programa CODESSA⁸⁷ pel paràmetre ρ del solut i el programa ABSOLVE^{47,48} pels descriptors, encara que els valors així obtinguts són menys precisos.

Per demostrar la capacitat predictiva del model de polaritat utilitzem la sèrie de 12 compostos per a la caracterització i tots els altres compostos de la taula 5, article 4, per fer les prediccions. Tots els compostos que farem servir presenten estructures diferents i cobreixen un ampli interval de valors de ρ (entre 0 i 6).

Predicció de la retenció a diverses composicions de fase mòbil partint de les dades experimentals d'un únic percentatge en aquella mateixa columna

Per realitzar aquest tipus de predicció només cal tenir caracteritzada una determinada columna, injectar un nou solut a un percentatge intermedi de solvent orgànic, i ja es pot predir la retenció a qualsevol altre percentatge. Per comprovar la bondat de les prediccions vam seleccionar com a percentatge intermedi del rang estudiat el 40% d'acetonitril i el 50% de metanol, encara que els compostos van ser injectats a totes les composicions de fase mòbil per comprovar si el model era capaç de predir la retenció correctament. Els factors de retenció obtinguts amb aquests percentatges intermedis són els que es van fer servir per calcular el valor de ρ de cada solut aplicant l'equació (11) i els paràmetres del sistema prèviament caracteritzat. Tots els paràmetres de polaritat del solut així calculats estan recollits a la taula 5, article 4. No apareixen els valors de ρ de tots els compostos perquè recordem que hi ha dos sèries de compostos diferents, i a cada columna es va injectar una o altra. Un cop disposem d'aquestes dades de polaritat del solut, només vam haver d'aplicar novament l'equació (11) per a cada fase mòbil desitjada i vam obtenir els factors de retenció calculats per a totes les composicions. Finalment, vam representar les dades experimentals enfront de les calculades (figures 5 i 6, article 4, per a acetonitril i metanol, respectivament).

Totes les prediccions obtingudes són bones, i les desviacions estàndards que es mostren als gràfics en general són similars entre sí. Però si es mira

amb més detall la predicció a cada columna per a ambdós solvents es pot veure com les prediccions sempre són més precises utilitzant metanol (excepte per a la columna Resolve C18, que és més precisa la predicció amb acetonitril). Els punts que més es desvien de les rectes teòriques són aquells corresponents a percentatges baixos de solvent orgànic (10 o 20%), degut a que els soluts queden molt més retinguts a la columna i és més difícil mesurar la seva retenció amb precisió, encara que aquesta dispersió és més rellevant en el cas d'acetonitril que en el de metanol. Per això considerem més adient utilitzar el model per fer prediccions entre el 30 i el 80% de metanol, i entre el 30 i el 60% d'acetonitril. A percentatges més baixos es pot fer servir per tenir una idea aproximada dels factors de retenció, però la predicció no es prou bona.

Predicció de la retenció en una columna partint de les dades experimentals de qualsevol altre sistema cromatogràfic

La predicció de la retenció amb el model de polaritat encara resulta més interessant si es pot injectar un solut en una columna amb un únic percentatge de modificador orgànic, i a partir d'aquesta dada experimental predir la retenció del compost a qualsevol altre sistema cromatogràfic (diferent columna i/o fase mòbil). Per poder portar-ho a terme necessitem tenir tots els sistemes desitjats caracteritzats (conèixer els seus paràmetres ($\log k)_0$ i P_s^N) i establir unes relacions lineals de transferència de polaritat del solut. Es pot escollir qualsevol sistema com a referència i relacionar tots els altres amb ell. En aquest estudi es va triar com a sistema referent la columna XTerra RP18 i l'acetonitril com a solvent, i es va predir la retenció en tots els altres. Per establir les relacions lineals de transferència es van correlacionar les dades de polaritat del solut dels 12 compostos de caracterització (taula 4, article 4), obtenint una relació d'aquest tipus:

$$\rho_2 = a \rho_1 + b \quad (29)$$

El valor de ρ del solut en el sistema de referència és ρ_1 i el valor de ρ del mateix solut però en un altre sistema és ρ_2 . A la taula 7, article 4, queden recollits tots els valors d' a i b , la pendent i la ordenada a l'origen de les rectes obtingudes. També estan inclosos els paràmetres estadístics, mostrant bones correlacions en tots els casos.

En aquest estudi es va predir la retenció de deu compostos, aquells que hi havia en comú en les dues llistes de soluts i s'havien injectat a totes les columnes (2-naftol, 2-nitroanilina, anilina, benzaldehid, benzè, clorobenzè, fenol, timol, toluè i valerofenona). Primer de tot es va obtenir el valor de ρ d'aquests deu soluts a tots els sistemes per transferència del valor obtingut al sistema de referència (fent servir les relacions de la taula 7, article 4). Amb aquests valors, i els paràmetres que caracteritzen a cada sistema, es va poder aplicar l'equació (11) per calcular tots els factors de retenció a totes columnes i composicions de fase mòbil, i representar-los enfront de les dades de retenció experimentals (figures 7 i 8, article 4). En el cas de les figures 7a, 8a, i 8b, article 4, es veuen molts més punts representats perquè disposàvem de més soluts en comú amb el sistema de referència (en lloc de 10 vam predir la retenció de 44 substàncies). A totes les figures s'obtenen prediccions raonables, tot i que les desviacions estàndard són millors fent servir acetonitril. Aquest fet era d'esperar, degut a que a la figura 7, article 4, només hem transferit dades de polaritat entre columnes, però hem mantingut el mateix solvent, acetonitril. En canvi a la figura 8, article 4, la transferència té lloc entre columnes i solvents, tot alhora, provocant una pèrdua de precisió. De fet s'observa com a les figures 8c-f, article 4, hi ha una tendència a sobreestimar els factors de retenció, perquè donen la majoria de $\log K$'s calculats un valor lleugerament superior al teòric.

3.2. Estimació de propietats biològiques a partir de sistemes de cromatografia de líquids

Per poder avaluar la possibilitat d'estimar propietats biològiques amb un sistema físico-químic, en aquest cas cromatografia de líquids, és necessari tenir caracteritzats ambdós sistemes amb el model LSER. Llavors, a partir de la distància d (equació (17)) entre els dos sistemes, podem determinar si són similars entre sí, i per tant, si un d'ells pot servir per modelar l'altre. Els sistemes biològics utilitzats per fer aquest estudi d'estimació es van extreure de la bibliografia^{19,39,55-57,89-91}. A la taula 3, article 2, queden recollits els coeficients del model LSER que altres autors van obtenir a l'aplicar el model a certes dades biològiques (com l'absorció intestinal, la permeabilitat i la partició a través de la pell, etc.).

Per trobar el sistema cromatogràfic més adient per estimar una determinada propietat biològica hauríem de calcular la seva distància amb tots els sistemes estudiats (totes les columnes i totes les composicions de fase mòbil). Però en realitat no és necessari, ja que el càlcul de la distància

d es fa amb els coeficients LSER normalitzats, i les diferències als coeficients degudes a la composició de fase mòbil desapareixen. Això queda reflectit a la figura 4, article 2. En aquesta figura s'han representat els coeficients LSER de les columnes IAM, XTerra RP18 i XTerra MSC18 a diferents percentatges d'acetonitril a la fase mòbil mitjançant uns gràfics radials de 5 eixos. Els gràfics a-c d'aquesta figura corresponen als coeficients sense normalitzar, mentre que els gràfics d-f estan fets després de la normalització. Gràficament es pot veure a primera vista com les diferències existents entre els coeficients (sobre tot b i ν) es fan mínimes un cop s'han normalitzat. Per tant, no és necessari calcular les distàncies amb cada fase mòbil diferent, perquè els resultats seran molt similars. El que es va fer és escollir un percentatge intermedi i representatiu del rang estudiat, el 40% d'acetonitril, i determinar la distància entre els sistemes cromatogràfics (les 3 columnes amb aquesta composició de fase mòbil) i els biològics.

A la taula 4, article 2, es mostren les distàncies d que vam determinar, junt amb la distància D' d'Abraham i el cos θ_{ij} d'Ishihama. El cosinus de l'angle està relacionat trigonòmicament amb el nostre paràmetre de distància (equació (17)), pel que els dos paràmetres ens proporcionen la mateixa informació. L'únic problema que presenta el cosinus de l'angle és que la seva escala no és lineal, pel que costa més de diferenciar entre parelles de sistemes, en termes de similitud. En canvi la distància d , que va de 0 a 1, sí que segueix una escala lineal, considerant similars aquells sistemes que estiguin separats per una distància igual o inferior a 0.25. En canvi, el paràmetre D' ens pot donar una informació diferent. També és un paràmetre de distància, però sense normalitzar els coeficients. En el cas de que dos vectors tinguin similar direcció però mòduls molt diferents, obtindrem una distància d petita però D' gran, proporcionant-nos informació contradictòria. De fet, això és exactament el que passa en

alguns casos de la taula 4, article 2. Per exemple, segons el nostre paràmetre d , la columna IAM podria modelar la permeabilitat a través de la barrera hematoencefàlica (0.234), però arribaríem a la conclusió contrària fixant-nos en un paràmetre D' molt elevat (3.127). En canvi per a la distribució a través d'aquesta mateixa barrera vam obtenir una gran d (0.712) però una relativament petita D' (1.208). Recordem que per considerar dos sistemes similars necessitem una d entre 0 i 0.25 mentre que la D' hauria d'estar entre 0.5 i 0.8.

Sorprenentment el paràmetre d ens informa que no només la columna IAM es capaç de modelar bé paràmetres biològics, idea per la qual va ser dissenyada. També la columna XTerra RP18 presenta similitud amb diversos sistemes de biopartició, ja que les distàncies calculades eren inferiors a 0.25. De fet, totes dues columnes mostren similitud amb els mateixos sistemes: partició a la pell humana, narcosi en cap-grossos, permeabilitat a través de la barrera hematoencefàlica i distribució octanol-aigua. Per altra banda, la columna IAM no pot modelar correctament la permeació a través de la pell humana ($d = 0.317$), mentre que les columnes XTerra RP18 ($d = 0.200$) i XTerra MSC18 ($d = 0.181$) sí poden fer-ho. En canvi, si ens fixem en el paràmetre D' , l'únic sistema que es podria modelar correctament seria la partició a través de la pell humana, per les dues columnes XTerra, mentre que la columna IAM no seria similar a cap dels sistemes de biopartició presentats a la taula. Per últim, hi ha alguns sistemes que no es podrien modelar amb els sistemes cromatogràfics aquí estudiats perquè totes les distàncies calculades són massa grans (com són la distribució a través de la barrera hematoencefàlica i la partició a través del múscul i del cervell).

La distància d també pot ser utilitzada per buscar analogies entre els diferents sistemes biològics (veure taula 5, article 2). Com és lògic, el paràmetre d va trobar similituds entre la distribució a través de la barrera

hematoencefàlica i la partició a través del cervell, i per altra banda, entre la partició i la permeació a través de la pell humana. També mostrava com a anàlegs els sistemes de narcosi en cap-grossos i distribució octanol-aigua, com efectivament queda demostrat al treball d'Abraham i Ràfols⁵⁵. A més, aquests dos sistemes eren a la vegada similars a la permeabilitat a través de la barrera hematoencefàlica i a la partició a través de pell humana. La resta de parelles de sistemes donaven distàncies superiors a 0.25 i per tant no es poden considerar anàlegs.

3.2.1. Exemples de diferents propietats modelades per sistemes cromatogràfics

Després de realitzar el càlcul de les distàncies d , el més adient era comprovar si les conclusions extretes eren correctes i si efectivament aquests sistemes cromatogràfics eren capaços de modelar les propietats corresponents. En aquest cas, hauríem d'obtenir bones relacions lineals entre les propietats i el sistema cromatogràfic escollit. Vam triar tres sistemes de biopartició a mode de exemple: distribució octanol-aigua, i partició i permeació a través de la pell humana.

Respecte al coeficient de partició octanol-aigua ($\log P_{oct}$), vam poder trobar a la bibliografia^{39,50,92} dades experimentals per a quasi tots els 59 soluts (taula 1, article 2) injectats als sistemes IAM, i XTerra's (exceptuant α -pinè, geraniol i mircè). Vam representar aquestes dades de $\log P$ enfront dels $\log k$ per cada columna estudiada i 40% d'acetonitril a la fase mòbil i vam obtenir bones correlacions (veure figura 5 i equacions (13-15), article 2). Segons el nostre paràmetre d esperàvem bones correlacions en tots els casos, sent una mica millors per a la columna IAM i XTerra RP18 ($d=0.12$ i

$d=0.13$ respectivament), respecte la columna XTerra MSC18 ($d=0.18$). I efectivament, això és el que vam obtenir. Observant les equacions resultants de la correlació, veiem que els millors paràmetres estadístics (coeficient de la correlació i desviació estàndard) són per a la columna IAM i la XTerra RP18, i que tots tres sistemes modelen bé la distribució octanol-aigua. Aquests resultats concorden amb els publicats prèviament per altres autors⁹³⁻⁹⁷, demostrant que la cromatografia de líquids és una tècnica adequada per estimar el $\log P_{oct}$ amb la fase estacionària i mòbil adient. Aquests resultats confirmen que el paràmetre d ens ha proporcionat la informació correcta, mentre que el paràmetre D' indicava que cap dels tres sistemes cromatogràfics era similar a la distribució octanol-aigua.

Els següents sistemes a estudiar van ser la permeació ($\log K_p$) i la partició ($\log K_{sc}$) a través de la pell humana. Del nostre llistat de 59 soluts només vam trobar valors de $\log K_p$ i/o de $\log K_{sc}$ a la bibliografia¹⁹ per a 17 d'aquests compostos. Per aquest motiu vam seleccionar una nova sèrie de soluts (taula 6, article 2) dels que tinguéssim les dades biològiques i els vam injectar a les tres columnes amb 40% d'acetonitril a la fase mòbil. D'aquesta manera disposàvem de més punts per fer les correlacions. Segons el paràmetre d , esperàvem bones correlacions de $\log K_p$ amb el factor de retenció de les columnes XTerra RP18 i XTerra MSC18 ($d=0.20$ i $d=0.18$, respectivament), però no amb la columna IAM ($d=0.32$). Les correlacions que vam obtenir es mostren a la figura 6, article 2, junt amb les equacions (16-18) del mateix article. Encara que les distàncies són igual de petites, les correlacions obtingudes són més pobres que en l'anterior cas de $\log P_{oct}$. Això és degut a la precisió de les dades originals. Per obtenir bones correlacions necessitem que els dos sistemes siguin similars (distància d petita), però també que la desviació estàndard de les dades que volem correlacionar no sigui gaire gran. Com pitjor sigui la desviació estàndard resultant de la mesura d'una propietat, pitjor és la correlació. A

la taula 3, article 2, podem trobar aquestes dades, sent la desviació del paràmetre $\log P_{oct}$ 0.116 mentre que la del $\log K_p$ és 0.461. Aquestes dades no són sorprenents, degut a que els processos físico-químics (com és la distribució octanol-aigua) són més fàcils de mesurar amb precisió que no pas els processos biològics. De totes maneres, podem veure a les figures 6b-c, article 2 (columnes XTerra), com les correlacions són millors que la figura 6a, article 2 (corresponent a la columna IAM). Aquesta última correlació és tan pobre que no es pot fer servir per fer cap estimació.

Per últim, vam correlacionar les dades de $\log K_{sc}$ amb la retenció als tres sistemes cromatogràfics (veure figura 7 i equacions (19-21), article 2). En aquest cas les correlacions són molt millors, però també la desviació estàndard de les dades originals ho és ($SD=0.216$). La millor correlació, segons els paràmetres estadístics, és amb la columna IAM, tal i com havia predit la distància d .

Aquests tres exemples han demostrat la fiabilitat del paràmetre de distància d per avaluar la similitud entre sistemes, permetent-nos tenir una idea de quins sistemes cromatogràfics podrien fer-se servir per estimar propietats biològiques. Evidentment, la distància d es pot aplicar també entre altres tipus de processos, sempre que aquests hagin estat caracteritzats mitjançant el model LSER.

3.3. Determinació de la constant d'enllaç albúmina-fàrmac

La constant d'enllaç albúmina-fàrmac (K_d) és un paràmetre biològic molt important en el disseny de nous fàrmacs. Hi ha fàrmacs que funcionen perfectament en assajos in vitro, però que no són efectius quan finalment es realitzen els assajos in vivo. Aquesta pèrdua d'activitat pot ser deguda a diverses causes, però principalment es deu a una baixa permeabilitat a través de la membrana i/o a un fort enllaç amb les proteïnes de la sang (sent la albúmina la més abundant). Tampoc interessa que la K_d sigui molt petita, perquè sinó el fàrmac no serà transportat per la sang fins el seu lloc d'acció. Per tant, la possibilitat de determinar aquest paràmetre a l'inici del desenvolupament d'un nou fàrmac és clau per a la indústria farmacèutica.

Un assaig PAMPA, normalment utilitzat per determinar la permeabilitat passiva dels compostos, va ser modificat amb l'objectiu d'estimar constants d'enllaç albúmina-fàrmac. L'experiment es va realitzar amb onze fàrmacs de propietats molt diferents en termes de permeabilitat i constant d'enllaç amb

la proteïna. Per seleccionar els compostos adients vam representar a la figura 3.4 els valors de $-\log K_d$ de 35 fàrmacs extrets de la bibliografia⁹⁸ enfront dels de la permeabilitat aparent a pH=7.4 (extrets de la base de dades interna de Novartis Pharma AG).

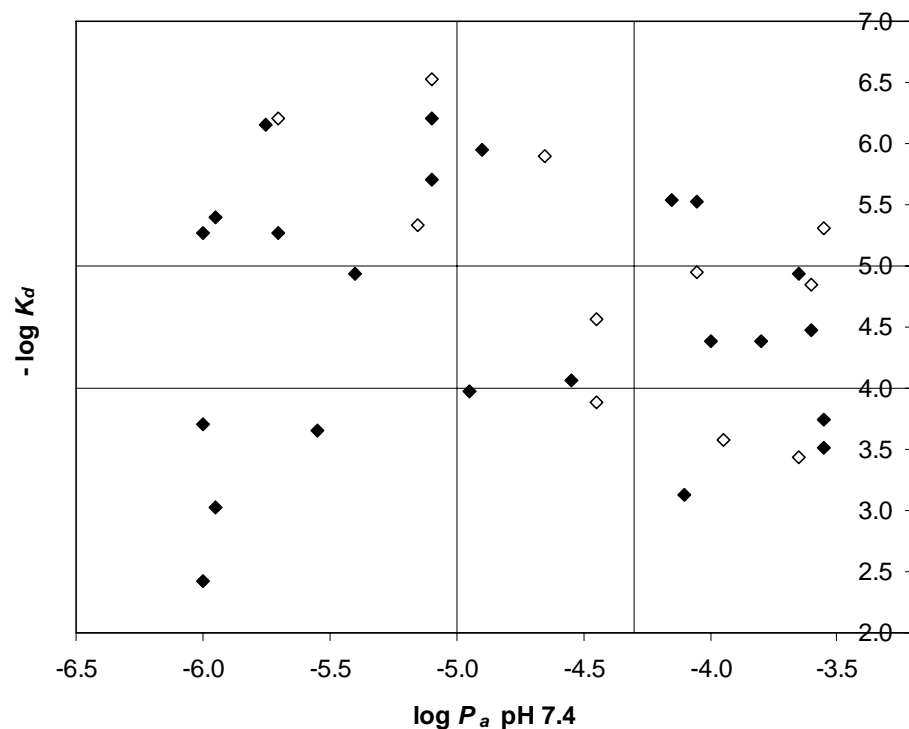


Figura 3.4. Mapa de compostos utilitzant com a variables la permeabilitat aparent a pH=7.4 i la constant d'enllaç albúmina-fàrmac. Els fàrmacs utilitzats en aquest estudi estan representats pel símbol ◊.

El gràfic està dividit en vèries zones, depenent del que es considera alta, mitja o baixa permeabilitat i un fort, intermig o feble enllaç a l'albúmina. La selecció dels 11 fàrmacs (veure figura 4, article 5) es va realitzar intentant cobrir al màxim tot l'espai de propietats. L'únic compost que ens va donar problemes va ser el diflunisal, perquè és molt poc

permeable, i a sobre, s'enllaça fortament a l'albúmina deixant poca fracció de fàrmac lliure, pel que la mesura de la seva concentració al compartiment acceptor va ser analíticament impossible.

Per solventar aquest problema, que tindriem amb tots els compostos de similars característiques al diflunisal, es va provar també amb una altra membrana líquida alternativa a l'hexadecà (hxd), l'octanol (oct). Es va triar aquest solvent orgànic perquè el $\log D_{oct}$ del diflunisal era 0.5 mentre que el $\log D_{hxd}$ era inferior a -2. De totes maneres s'ha de tenir en compte que perquè una membrana sigui adequada pel nostre estudi ha de ser altament permeable al compost d'interès però impermeable a la proteïna i al complex que forma amb aquell compost. Abans de fer servir l'octanol es va comprovar que fos efectivament impermeable a l'albúmina humana, al menys en el període de temps que necessitàvem per dur a terme el perfil cinètic (2 hores). A la figura 1, article 5, es mostren els tres cromatogrames corresponents a la injecció de la proteïna, i de solució del compartiment acceptor fent servir hexadecà o octanol com a membrana líquida. Fins que no van passar quatre hores no es va detectar cap resta de proteïna en el compartiment acceptor per a cap de les dues membranes, i quan es va fer va ser a nivell de traça. Per tant, en aquest sentit totes dues opcions, hexadecà i octanol, són adequades per a aquest estudi, ja que la proteïna no les penetra.

Els 11 fàrmacs escollits es presenten a la taula 1, article 5, mostrant diferents propietats també a nivell d'acidesa/basicitat, lipofilitat, etc. Es va mesurar la seva permeabilitat aparent en presència i absència de proteïna, recollint fraccions del compartiment acceptor a diferents temps d'incubació (0.1, 0.2, 0.5, 1 i 2 hores). L'experiment es va realitzar en plats que contenien 96 compartiments (veure figura 3.5), dividint el plat en dues zones (la meitat contenia proteïna i l'altra meitat no) i les files en funció del temps d'incubació. Per tant, la concentració del fàrmac en el compartiment

acceptor va ser calculada fent la mitjana de dotze valors (per a $t=0.1, 0.2$ i 0.5 hores) i de sis valors (per a $t=1$ i 2 hores).

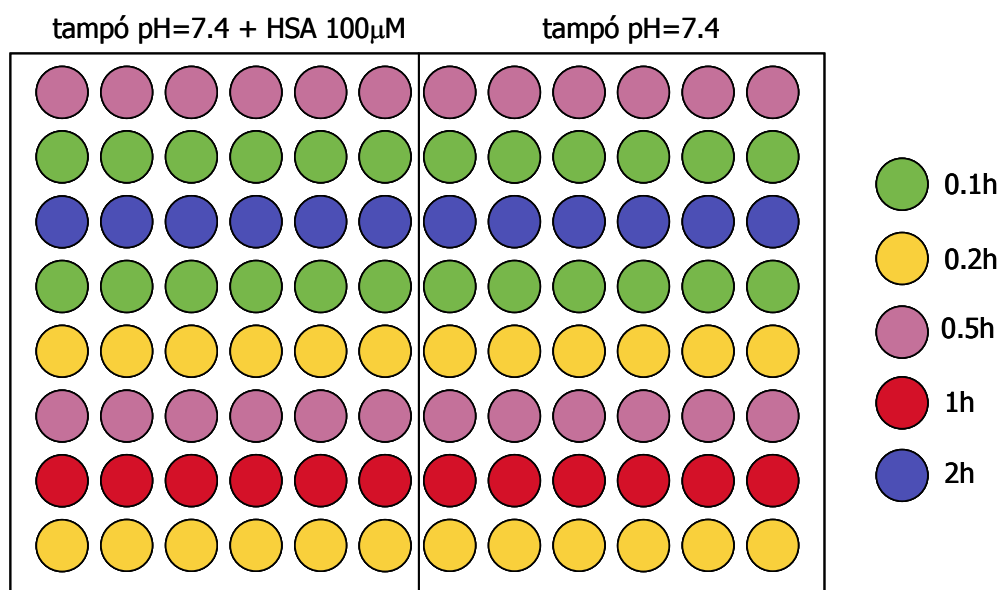


Figura 3.5. Disseny experimental de l'estudi PAMPA-HSA.

A continuació es va representar la concentració de fàrmac en el compartiment acceptor enfront del temps, i mitjançant el programa informàtic Berkeley Madonna es van ajustar simultàniament les dues corbes teòriques (presència i absència de proteïna) als punts experimentals proporcionant el valor òptim de K_d per a aquell ajust. A la taula 1, article 5, es mostren els valors de $-\log K_d$ que vam obtenir, juntament amb aquells que vam extreure de la bibliografia⁹⁹⁻¹³⁰. Per tal de determinar si la tècnica era reproducible, la mesura de K_d es va fer per triplicat durant un període de 6 setmanes. Es a dir, entre la mesura del primer, segon i tercer replicat passaven 2 setmanes. Els valors de cada replicat obtinguts pels fàrmacs més afins a la albúmina es poden consultar a la taula 3, article 5.

A mode d'exemple presentem l'ajust de les corbes als punts experimentals per a quinina, warfarina i clorpromazina (veure figures 5-7, article 5). Els perfils cinètics obtinguts són molt diferents, però també ho són les propietats dels compostos. Com la quinina s'enllaça a l'albúmina molt feblement, les dues corbes són molt pròximes entre sí. Justament al contrari del que passa amb la warfarina, un compost que presenta una elevada afinitat per a l'albúmina, donant per tant corbes àmpliament separades. El perfil de la clorpromazina presenta una forma diferent al dels altres dos compostos, i és degut a que queda retingut parcialment a la membrana d'hexadecà. En aquest estudi vam diferenciar entre el coeficient de distribució de la membrana (D_{mem}), que va ser mesurat al grup de treball mitjançant una tècnica potenciomètrica, i el coeficient de distribució (K_h) que ens proporcionava el programa Berkeley Madonna i que no diferenciava entre retenció de membrana i adsorció no específica a les parets del compartiment. En el cas de que no hi hagués cap tipus d'adsorció a les parets, D_{mem} i K_h serien idèntics. En el cas de la clorpromazina vam obtenir $\log K_h = 3.4$ i $\log D_{hxd} = 2.6$, pel que també quedava en part adsorbida a les parets del plat. Quan es produeix algun dels dos fenòmens (o tots dos), s'observa al principi del perfil cinètic un petit desfase. En un primer moment el fàrmac s'adsorbeix, o queda retingut a la membrana, i després comença a creuar cap al compartiment acceptor. Aquesta peculiar forma del perfil cinètic pot observar-se a les corbes C i D de la figura 2A, article 5. Aquesta figura és una simulació feta pel programa Berkeley Madonna per a suposats compostos que tinguessin diferents valors de D_{mem} , i per tant, quedessin retinguts a la membrana de menor a major grau. Encara que es doni aquesta pèrdua de compost per adsorció o retenció de membrana, el model ho té en compte a través de les equacions diferencials (25-27) i per tant no ens perjudica en l'estimació de la constant d'enllaç.

A la taula 1, article 5, es pot veure com tres compostos van ser analitzats amb una membrana d'octanol enlloc d'hexadecà. La warfarina i el verapamil es van estudiar en ambdues membranes per comprovar que els resultats obtinguts de K_d no depenguessin de la naturalesa de la membrana emprada, i es van obtenir valors similars en els dos casos. Va ser impossible analitzar el diflunisal utilitzant hexadecà, tal i com he explicat abans, però amb octanol sí va ser possible, obtenint-se un $-\log K_d = 5.91$. Un cop determinades totes les constants d'enllaç albúmina-fàrmac es van representar enfront de les dades extretes de la bibliografia, obtenint una molt bona correlació, com es mostra a la figura 8, article 5. Per tant, el nostre mètode d'estimació de K_d és una alternativa vàlida a les tècniques clàssiques de diàlisi i ultrafiltració.

La presència de proteïna en el comportament donador provoca una disminució de la permeabilitat aparent del fàrmac. Per aquest motiu vam mirar de relacionar la constant d'enllaç amb la diferència de valors de permeabilitat que obteníem. Els valors obtinguts es troben a la taula 3.5.

Taula 3.5. Constants d'enllaç K_d obtingudes amb l'assaig PAMPA i diferències en la permeabilitat aparent provocades per la presència de proteïna a l'assaig.

Compost	$-\log K_d$	$\Delta \log P_a$
Clorpromazina	4.26	0.20
Desipramina	3.07	0.09
Diazepam	4.61	0.72
Diclofenac	5.61	1.38
Oxazepam	4.16	0.41
Propranolol	3.36	0.05
Quinina	3.51	0.17
Tolbutamida	5.22	0.90

Verapamil	3.19	0.16
Warfarina	5.33	1.02

La relació que vam obtenir entre aquests dos paràmetres no és lineal, sinó quadràtica (veure figura 3.6). L'equació de segon grau obtinguda ens permet tenir una primera aproximació de $\log K_d$ sense la necessitat de construir tot el perfil cinètic. Només cal mesurar la permeabilitat després de dues hores d'incubació (procés completament automatitzat) i a partir de la figura 3.6 obtenir el valor aproximat de la constant d'enllaç. Per conèixer aquest paràmetre amb precisió és necessari fer el perfil cinètic, però si només volem tenir una idea aproximada de si el fàrmac presentarà un

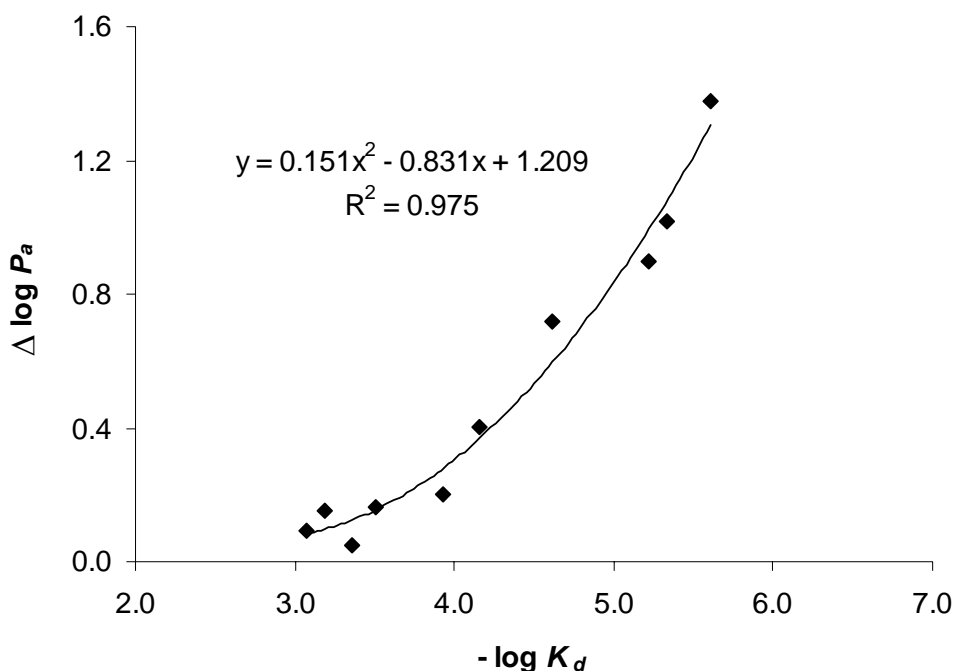


Figura 3.6. Relació entre la diferència en permeabilitat de fàrmacs en presència i absència de proteïna i la seva constant d'enllaç albúmina-fàrmac

enllaç fort o feble amb l'albumina, llavors la figura 3.6 pot resultar molt útil.

Tots els experiments van ser realitzats amb una concentració inicial de fàrmac de $50\mu\text{M}$ i de $100\mu\text{M}$ per a l'albumina. Però tenint en compte que avui en dia hi ha fàrmacs cada cop més lipofílics i insolubles, podria ser necessari fer els experiments a una concentració més baixa, fins el punt on ho permeti el límit de quantificació de la tècnica de mesura, LC-MS/MS en el nostre cas. Per comprovar que el canvi de les condicions experimentals no influiria en l'estimació de la constant d'enllaç es va estudiar el propranolol a una concentració inicial de $10\mu\text{M}$ i variant la concentració de proteïna entre 50 i $600\mu\text{M}$ (veure taula 2, article 5). Tots els paràmetres resultants són similars, pel que les condicions inicials de l'experiment es poden variar en funció del compost a analitzar sense cap perjudici per a la determinació de K_d .

L'ús d'un assaig PAMPA per a determinar el paràmetre K_d és una bona alternativa i presenta alguns avantatges respecte la tècnica de diàlisi, tradicionalment utilitzada per a la mesura d'aquesta constant:

- La nostra aproximació és més ràpida, perquè no hem d'esperar que s'arribi a l'equilibri per a l'estimació de K_d .
- La pèrdua de compost per adsorció a les parets del plat o a la membrana es tinguda en compte i no influeix en la nostra mesura de la constant d'enllaç. Per tant, no es necessari fer els càlculs de balanç de massa propis de la diàlisi.
- La membrana d'hexadecà no és permeable a l'aigua, i per tant, no hi ha canvi de volum als compartiments degut a la pressió osmòtica ni cal fer cap correcció al respecte (com sí succeeix a la diàlisi).
- A l'assaig PAMPA les membranes no necessiten cap tipus de pretractament, pel que l'automatització de la tècnica és molt senzilla.

Encara que aquest estudi s'ha basat només en la determinació de la constant d'enllaç albúmina-fàrmac, podria ser aplicat en el futur a altres proteïnes solubles en aigua, sempre que es doni la condició que la membrana líquida utilitzada sigui impermeable per a aquestes proteïnes. En definitiva, considerem que és una tècnica amb un gran potencial.

3.4. Avaluació de la interacció de derivats de l'epicatequina amb liposomes de DPPC

Els flavonoids són uns compostos polifenòlics presents en certs aliments (com fruites, verdures, vi negre, etc.) de propietats beneficioses per a la salut humana. Tenen caràcter antioxidant i es creu que ajuden a prevenir el càncer i les malalties cardiovasculars^{131,132}. Hi ha molts tipus de flavonoids naturals classificats segons la seva estructura (calcones, flavones, isoflavones, flavonols, catequines, etc.). En general, tots són compostos orgànics heterocíclics constituïts per dos anells aromàtics (A i B) amb diferents grups hidròxid, units per una cadena de tres àtoms de carboni que poden formar, o no, un tercer anell (C). A la figura 1, article 6, es poden trobar les estructures dels flavonoids seleccionats per a aquest estudi, l'epicatequina i quatre dels seus derivats. Torres i col·laboradors^{133,134} van descriure aquests compostos, els quals contenen un àtom de sofre en la posició 4.

La part no fenòlica de cada una d'aquestes molècules influeix en les diferents propietats que presenten els compostos, i pot ser degut en part a la seva diferent capacitat d'interacció amb les membranes cel·lulars. De fet, s'ha demostrat que els derivats catiónics penetren més a la pell que les catequines zwitteriòniques i sense derivatitzar¹³⁵. Per tal d'entendre una mica més el comportament d'aquests derivats de l'epicatequina davant de les biomembranes, s'ha estudiat la seva interacció amb liposomes de DPPC, degut a que la seva estructura és similar a la de les membranes cel·lulars. En estudis previs d'altres autors^{136,137} s'ha demostrat que l'epicatequina i l'epicatequina-gallat podien penetrar en els liposomes establint, principalment, interaccions hidrofòbiques. Però de fet hi ha molt poca informació avui en dia sobre la interacció d'aquest tipus de compostos i les membranes.

3.4.1. Estudi calorimètric dels liposomes

Per tal de determinar si els compostos estudiats interaccionaven d'alguna manera amb els liposomes es va emprar la tècnica DSC (calorimetria d'escaneig diferencial). Es van preparar una sèrie de liposomes amb diferents concentracions de compost (de 0 a 30% molar), i es van sotmetre a uns cicles de temperatura (escalfament/refredament) obtenint els termogrames corresponents. Cada experiment es va fer per triplicat en dies no consecutius.

La figura 4, article 6, mostra un exemple dels termogrames obtinguts amb diferents concentracions de l'epicatequina, representats conjuntament en un únic gràfic. El termograma "a" correspon al liposoma de DPPC pur, mostrant una transició a $T_m = 41$ °C. En realitat també hi ha una petita pretransició a 35 °C, però no es pot apreciar a l'escala que s'ha fet servir en

aquesta figura. Els valors observats estan en bona concordança amb els obtinguts per altres autors^{73,138}. Els termogrames b-g corresponen a un increment de la concentració d'epicatequina fins a un màxim de 30% molar. Es pot apreciar clarament com el pic es va desplaçant cap a l'esquerra (disminueix la temperatura de transició) i es va fent més ample cada vegada. A més desapareix la pretransició típica del DPPC. Aquest és el comportament habitual dels flavonoids en solucions de liposoma de DPPC, tal i com s'ha publicat en altres treballs^{136,137}.

La relació entre T_m i $\Delta T_{1/2}$ respecte la concentració dels diferents compostos és avaluada a les figures 2 i 3, article 6, respectivament. Es poden observar comportaments molt diferents, depenent del compost. El flavonoid catiònic ECys-Ec va ser el compost que va presentar la interacció més forta amb la membrana lipídica. La temperatura de transició del liposoma decreix abruptament a mesura que augmenta la concentració de ECys-Ec. A partir de 20% molar continua disminuint, però més gradualment. Per tant, aquest compost interacciona fortament amb el liposoma, pertorbant l'estabilitat de la membrana. També es pot veure a la figura 3, article 6, com el paràmetre $\Delta T_{1/2}$ s'incrementa amb la concentració de ECys-Ec fins 15% molar, i després disminueix. Això significa que concentracions baixes d'aquest compost fan augmentar la fluïdesa de la membrana, però a concentracions més altes les molècules de fosfolípid interaccionen menys amb el compost i més entre sí, augmentant la cooperativitat del procés. Aquest comportament suggereix que el compost ECys-Ec pot estar formant agregats a partir de certes concentracions.

L'altre flavonoid catiònic estudiat és Cya-Ec. Aquest compost sembla no afectar a l'estabilitat del liposoma, ja que la temperatura de transició resta invariable per a tot l'interval de concentracions de Cya-Ec estudiat. En canvi, sí que s'observa un increment de l'amplada a mitja alçada del pic. Aquest és el típic comportament de molècules situades en la zona més

externa de la bicapa, com s'ha descrit per a alguns pèptids¹³⁹. La part més hidrofòbica del compost penetra dintre de la membrana, en la part més superficial, a prop dels caps polars, pertorbant la cooperació de les molècules lipídiques en el procés de transició de fase. No obstant, el compost Cya-Ec ni estabilitza ni desestabilitza la membrana, perquè la transició es dona a la mateixa temperatura que si tinguéssim el liposoma pur.

Els flavonoids no carregats, epicatequina (Ec) i AMCys-Ec, es comporten de forma similar. Com no presenten càrregues, només interaccionen hidrofòbica. Els dos compostos provoquen una moderada disminució de la temperatura de transició en augmentar la seva concentració, afectant només lleugerament a l'estabilitat dels liposomes. En canvi l'augment de l'amplada del pic és més pronunciat en el cas de AMCys-Ec que en l'epicatequina. Aquest diferent comportament ens indica que el substituent que diferencia a la AMCys-Ec de l'epicatequina influeix en la interacció amb la membrana i provoca una major incorporació del compost en el lípid, pel que les propietats antioxidants dels dos compostos podrien variar en funció d'això.

L'últim compost estudiat és l'espècie zwitteriònica Cys-Ec. El seu comportament és molt diferent als altres, ja que a baixes concentracions sembla no afectar gaire a l'estabilitat del liposoma, però a concentracions superiors al 10% molar destrueix completament el liposoma, pel que ja no veiem cap transició. Per aquest motiu es va estudiar amb més detall l'interval entre 0 i 10% molar per a aquest compost (veure figura 5, article 6). Es va poder constatar com la temperatura de transició restava pràcticament invariable i l'amplada de pic augmentava només lleugerament. Per tant, semblava que el compost no pertorbava gaire als liposomes, fins una certa concentració crítica on trencava completament la seva estructura.

Aquest és el comportament que vam observar pel flavonoid Cys-Ec, encara que no és l'habitual en aquest tipus de compostos.

Els resultats obtinguts demostren que els diferents substituents que units a l'epicatequina formen alguns dels seus derivats, influeixen en la seva diferent interacció amb les biomembranes i per tant, també en les seves propietats específiques.

3.4.2. Retenció cromatogràfica dels derivats d'epicatequina en una columna IAM

Les columnes IAM, com els liposomes, també presenten una estructura similar a les membranes cel·lulars, ja que estan constituïdes per cadenes de fosfatidilcolina enllaçades a la sílice. De fet, s'ha demostrat en alguns estudis previs^{140,141} una bona correlació entre el factor de retenció en columnes IAM i el coeficient de partició en liposomes.

L'epicatequina i els seus quatre derivats van ser injectats en la columna IAM amb una fase mòbil a pH=7 i 20% d'acetonitril com a modificador orgànic. Els factors de retenció obtinguts es troben a la taula 1, article 6. El compost més retingut, amb diferència, és Ecys-Ec, en concordància amb els resultats obtinguts amb els liposomes, ja que era el compost que presentava una interacció més forta amb ells. A continuació anaven el AMCys-Ec i l'epicatequina, en aquest ordre, tal i com s'esperava a partir de les conclusions extretes dels liposomes, on AMCys-Ec interaccionava més amb els liposomes, afectant en major grau a la cooperació de les molècules lipídiques. El compost Cya-Ec va quedar retingut a la columna el mateix temps que l'epicatequina. Segons el model dels liposomes, l'epicatequina presenta una interacció hidrofòbica amb el lípid mentre que la Cya-Ec més

aviat interacciona amb la part polar de la bicapa que es troba a la superfície. Per tant, la columna IAM no és capaç de diferenciar entre aquests dos tipus d'interacció, mentre que els liposomes sí ho fan. Per últim tenim a la Cys-Ec, que pràcticament no queda retinguda a la columna, concordant amb la informació dels liposomes (a baixes concentracions del compost no hi havia pràcticament cap interacció amb la membrana).

Per tant, la columna IAM també ens ofereix informació sobre si aquests tipus de compostos interaccionen o no amb les membranes, encara que els liposomes ens aporten més informació (tipus d'interacció polar o hidrofòbica, zona més exterior o interior on té lloc, etc.).

Conclusions

A partir dels resultats obtinguts s'extreuen les següents conclusions:

1. La caracterització de l'acidesa d'una columna de membrana artificial immobilitzada (IAM) no va mostrar cap evidència de silanols lliures a la sílice fins a un s_{pH} de 6. A partir d'aquest valor, els cations liti injectats comencen a quedar retinguts pels silanols lliures per interacció iònica, mostrant una gran activitat. La qualitat de la sílice d'aquesta columna és comparable a la de la Luna C18 i la Symmetry C18, dues columnes comercials amb una sílice de gran qualitat. Encara que s'ha demostrat que els silanols de la columna IAM són molt més actius, també es cert que només es presenten a un pH extrem de treball, a prop del límit recomanat pel fabricant.
2. L'estudi a partir del model de paràmetres de solvatació LSER indica que és més favorable crear una cavitat de la grandària del solut en totes les fases estacionàries estudiades que en les fases mòbils. Mentre que dintre de les columnes estudiades podem concloure que la columna IAM és la menys hidrofòbica de totes. Totes les fases estacionàries són menys àcides per pont d'hidrogen que les fases mòbils, essent la columna IAM més àcida que les altres columnes C18 estudiades. També és la columna IAM la més polaritzable de totes, essent totes les fases estacionàries més polaritzables que les fases mòbils. Respecte la basicitat per pont d'hidrogen es va trobar la principal diferència entre les fases estacionàries. La columna IAM era més bàsica per pont d'hidrogen que la fase mòbil, mentre que les altres columnes no ho eren. Degut a aquesta diferència, els compostos donadors de pont d'hidrogen queden més retinguts quan s'injecten a la columna IAM que en altres columnes C18.

3. El model de paràmetres de solvatació permet predir la retenció de soluts neutres en cromatografia de líquids, en base als descriptors dels soluts i als coeficients de l'equació de solvatació corresponent. Un sistema cromatogràfic que posseeixi el valor d'un dels coeficients molt elevat en valor absolut respecte la resta, serà capaç de discriminar molt bé entre soluts que difereixin en aquella propietat.
4. Per poder conèixer la retenció de qualsevol compost, de descriptors coneguts, a qualsevol composició de fase mòbil sense necessitat de caracteritzar-les totes, es pot construir el model LSER global que proporciona excel·lents resultats amb una única equació, encara que s'han de determinar dotze coeficients per caracteritzar un sol sistema.
5. El model de polaritat és una bona alternativa al perfectament establert model LSER. Ambdós models tenen una capacitat similar per predir la retenció de nous compostos, un cop coneguts els paràmetres del solut. El model de polaritat és més senzill d'aplicar, ja que només requereix dos paràmetres per caracteritzar el sistema (incloent totes les composicions de fase mòbil), però proporciona menys informació química de les interaccions que tenen lloc entre el solut i les fases. A més, presenta l'avantatge que es poden transferir les dades de polaritat del solut d'un sistema a un altre, de manera que es poden efectuar les prediccions a qualsevol sistema cromatogràfic treballant només amb un sistema de referència, i estalviant una gran feina experimental.
6. El paràmetre de distància d entre dos vectors LSER de coeficients normalitzats és una bona eina per determinar la similitud matemàtica de dos sistemes (siguin físico-químics o biològics). Una distància inferior a

0.25 ens indica que un determinat sistema pot ser ben modelat per aquell amb qui s'ha comparat. De totes maneres, la bona correlació que finalment s'obtingui entre ambdós paràmetres no només depèn de la distància entre els sistemes, sinó també de les desviacions estàndard de les dades originals. Com pitjor sigui la precisió de les dades, pitjor serà la correlació amb un altre paràmetre.

7. La columna IAM no és sempre la millor elecció per a l'estimació de propietats biològiques. En el cas de la permeació a través de la pell humana s'ha demostrat que les columnes XTerra MSC18 i XTerra RP18 haurien d'estimar molt millor aquest paràmetre que no la columna IAM. De totes maneres pot ser útil per a l'estimació d'altres paràmetres, com la partició octanol-aigua, la narcosi en cap-grossos, la partició a la pell humana i la permeació a través de la barrera hematoencefàlica.
8. L'assaig de permeabilitat a través d'una membrana artificial (PAMPA) és utilitzat normalment per a determinar la permeabilitat passiva de fàrmacs, però s'ha demostrat en aquell treball que també pot ser una eina útil en la determinació de la constant d'enllaç albúmina-fàrmac. L'assaig està dissenyat per utilitzar l'hexadecà com a membrana artificial líquida, però també es pot fer servir octanol com alternativa per a aquells compostos molt poc permeables en hexadecà i que presentin un fort enllaç a la proteïna. Els compostos poden quedar retinguts en part a la membrana o adsorbits a les parets dels compartiments, però aquest fenomen queda recollit a les equacions del model i per tant, es té en compte en la mesura de la constant d'enllaç.
9. L'assaig PAMPA-HSA és una bona alternativa a la tècnica clàssica de determinació de la constant d'enllaç albúmina-fàrmac, la diàlisi. És una

aproximació més ràpida, perquè no s'ha d'esperar a que s'arribi a l'equilibri. No s'ha de fer correcció de volum perquè la membrana d'hexadecà no és permeable a l'aigua. La possible pèrdua de compost es té en compte al model, pel que no es necessari fer balanç de masses. I és una tècnica fàcilment automatitzable perquè la membrana no requereix cap tipus de pretractament.

10. Els liposomes poden ser utilitzats per a l'estimació de la interacció de diferents compostos amb les membranes cel·lulars a partir d'estudis calorimètrics. Derivats de l'epicatequina, amb diferents substituents sulfurats, mostraven interaccions diferents amb les membranes. Tots aquests compostos van ser injectats a la columna IAM obtenint conclusions similars a les que proporcionava l'estudi dels liposomes, encara que la columna IAM és incapaç de diferenciar entre interacció hidrofòbica i polar, mentre que el model del liposoma sí que ho fa.

Referències

Referències

1. Wiechers, J. W. The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs. *Pharm. Weekbl. Sci.* **1989**, *11*, 185-198.
2. Van Bree, J. B.; De Boer, A. G.; Danhof, M.; Breimer, D. D. Drug transport across the blood-brain barrier. III. Mechanisms and methods to improve drug delivery to the central nervous system. *Pharm. World Sci.* **1993**, *15*, 2-9.
3. Pauletti, G. M.; Gangwar, S.; Knipp, G. T.; Nerurkar, M. M.; Okumu, F. W.; Tamura, K.; Siahaan, T. J.; Borchardt, R. T. Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs. *J. Control. Release* **1996**, *41*, 3-17.
4. Smith, R. N.; Hansch, C.; Ames, M. M. Selection of a reference partitioning system for drug design work. *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 599-606.

5. Camenisch, G.; Folkers, G.; van de Waterbeemd, H. Review of theoretical passive drug absorption models: historical background, recent developments and limitations. *Pharm. Acta Helv.* **1996**, *71*, 309-327.
6. Mason, R. P.; Rhodes, D. G.; Herbette, L. G. Reevaluating equilibrium and kinetic binding parameters for lipophilic drugs based on a structural model for drug interaction with biological membranes. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 869-877.
7. Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1007-1010.
8. Wohnsland, F.; Faller, B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 923-930.
9. Sugano, K.; Nabuchi, Y.; Machida, M.; Aso, Y. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *Int. J. Pharm.* **2003**, *257*, 245-251.
10. Avdeef, A.; Bendels, S.; Di, L.; Faller, B.; Kansy, M.; Sugano, K.; Yamauchi, Y. PAMPA--critical factors for better predictions of absorption. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 2893-2909.
11. Betageri, G. V.; Rogers, J. A. Correlation of partitioning of nitroimidazoles in the n-octanol/saline and liposome systems with pharmacokinetic parameters and quantitative structure-activity relationships (QSAR). *Pharm. Res.* **1989**, *6*, 399-403.

12. Choi, Y. W.; Rogers, J. A. The liposome as a model membrane in correlations of partitioning with α -adrenoceptor agonist activities. *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 508-512.
13. Rogers, J. A.; Choi, Y. W. The liposome partitioning system for correlating biological activities of imidazolidine derivatives. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 913-917.
14. Pidgeon, C.; Venkataram, U. V. Immobilized artificial membrane chromatography: Supports composed of membrane lipids. *Anal. Biochem.* **1989**, *176*, 36-47.
15. Taillardat-Bertschinger, A.; Carrupt, P. A.; Barbato, F.; Testa, B. Immobilized artificial membrane HPLC in drug research. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 655-665.
16. Pidgeon, C.; Ong, S.; Liu, H.; Qiu, X.; Pidgeon, M.; Dantzig, A. H.; Munroe, J.; Hornback, W. J.; Kasher, J. S.; Glunz, L.; Szczerba, T. IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 590-594.
17. Genty, M.; Gonzalez, G.; Clere, C.; Desangle-Gouty, V.; Legendre, J. Y. Determination of the passive absorption through the rat intestine using chromatographic indices and molar volume. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *12*, 223-229.
18. Nasal, A.; Sznitowska, M.; Bucinski, A.; Kaliszan, R. Hydrophobicity parameter from high-performance liquid chromatography on an immobilized artificial membrane column and its relationship to bioactivity. *J. Chromatogr. A* **1995**, *692*, 83-89.

19. Abraham, M. H.; Martins, F. Human skin permeation and partition: general linear free-energy relationship analyses. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1508-1523.
20. Salminen, T.; Pulli, A.; Taskinen, J. Relationship between immobilised artificial membrane chromatographic retention and the brain penetration of structurally diverse drugs. *J. Pharm. Biom. Anal.* **1997**, *15*, 469-477.
21. Reichel, A.; Begley, D. J. Potential of immobilized artificial membranes for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1270-1274.
22. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principios de Análisis Instrumental*; Fernández, C., Ed.; McGraw-Hill: Madrid, 2001; pàg. 730-736.
23. Cox, G. B. The influence of silica structure on reversed-phase retention. *J. Chromatogr. A* **1993**, *656*, 353-367.
24. Sander, L. C.; Wise, S. A.; Lochmüller, C. H. Recent advances in bonded phases for liquid chromatography. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* **1987**, *18*, 299-417.
25. Dorsey, J. G.; Cooper, W. T. Retention mechanisms of bonded-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 857A-867A.
26. Neue, U. D. *HPLC columns. Theory, technology, and practice*; Wiley-VCH: New York, 1997.
27. Méndez, A.; Bosch, E.; Rosés, M.; Neue, U. D. Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns. *J. Chromatogr. A* **2003**, *986*, 33-44.

28. Herrero-Martínez, J. M.; Méndez, A.; Bosch, E.; Rosés, M. Characterization of the acidity of residual silanol groups in microparticulate and monolithic reversed-phase columns. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1060*, 135-145.
29. Rogers, S. D.; Dorsey, J. G. Chromatographic silanol activity test procedures: the quest for a universal test. *J. Chromatogr. A* **2000**, *892*, 57-65.
30. McCalley, D. V. Comparison of the performance of conventional C18 phases with others of alternative functionality for the analysis of basic compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1999**, *844*, 23-38.
31. Brereton, R. G.; McCalley, D. V. Procrustes analysis for the comparison of test methods in reversed-phase high performance liquid chromatography of basic compounds. *Analyst* **1999**, *124*, 227-238.
32. Johnson, B. P.; Khaledi, M. G.; Dorsey, J. G. Solvatochromic solvent polarity measurements and retention in reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2354-2365.
33. Rosés, M.; Bosch, E. Linear solvation energy relationships in reversed-phase liquid chromatography. Prediction of retention from a single solvent and a single solute parameter. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *274*, 147-162.
34. Bosch, E.; Bou, P.; Rosés, M. Linear description of solute retention in reversed-phase liquid chromatography by a new mobile phase polarity parameter. *Anal. Chim. Acta* **1994**, *299*, 219-229.
35. Canals, I.; Portal, J.; Rosés, M.; Bosch, E. Retention of ionizable compounds on HPLC. Modelling retention in reversed-phase liquid

chromatography as a function of pH and solvent composition with methanol-water mobile phases. *Chromatographia* **2002**, *55*, 565-571.

36. Espinosa, S.; Bosch, E.; Rosés, M. Retention of ionizable compounds in high-performance liquid chromatography. IX. Modelling retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition with acetonitrile-water mobile phases. *J. Chromatogr. A* **2002**, *947*, 47-58.

37. Torres-Lapasió, J. R.; García-Álvarez-Coque, M. C.; Rosés, M.; Bosch, E. Prediction of the retention in reversed-phase liquid chromatography using solute-mobile phase-stationary phase polarity parameters. *J. Chromatogr. A* **2002**, *955*, 19-34.

38. Abraham, M. H. Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes. *Chem. Soc. Rev.* **1993**, *22*, 73-83.

39. Abraham, M. H.; Chadha, H. S.; Whiting, G. S.; Mitchell, R. C. Hydrogen bonding. 32. An analysis of water-octanol and water-alkane partitioning and the delta log P parameter of seiler. *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 1085-1100.

40. Abraham, M. H.; Chadha, H. S.; Martins, F.; Mitchell, R. C.; Bradbury, M. W.; Gratton, J. A. Hydrogen bonding part 46: A review of the correlation and prediction of transport properties by an LFER method: physicochemical properties, brain penetration and skin permeability. *Pestic. Sci.* **1999**, *55*, 78-88.

41. Abraham, M. H.; Rosés, M.; Poole, C. F.; Poole, S. K. Hydrogen bonding. 42. Characterization of reversed-phase high-performance liquid

chromatographic C₁₈ stationary phases. *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, *10*, 358-368.

42. Abraham, M. H.; McGowan, J. The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia* **1987**, *23*, 243-246.

43. Abraham, M. H.; Whiting, G. S.; Doherty, R. M.; Shuely, W. J. Hydrogen bonding. Part 13. A new method for the characterisation of GLC stationary phases—the Laffort data set. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 1451-1460.

44. Abraham, M. H.; Whiting, G. S.; Doherty, R. M.; Shuely, W. J. Hydrogen bonding. XVI: A new solute solvation parameter, π^H_2 , from gas chromatographic data. *J. Chromatogr.* **1991**, *587*, 213-228.

45. Abraham, M. H.; Grellier, P. L.; Prior, D. V.; Morris, J. J.; Taylor, P. J. Hydrogen bonding. X, A scale of solute hydrogen-bond basicity using log K values for complexation in tetrachloromethane. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 521-529.

46. Abraham, M. H.; Ibrahim, A.; Zissimos, A. M. Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1037*, 29-47.

47. Abraham, M. H.; Le, J. The correlation and prediction of the solubility of compounds in water using an amended solvation energy relationship. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 868-880.

48. Platts, J. A.; Butina, D.; Abraham, M. H.; Hersey, A. Estimation of molecular linear free energy relation descriptors using a group contribution approach. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, *39*, 835-845.
49. Wang, A.; Tan, L. C.; Carr, P. W. Global linear solvation energy relationships for retention prediction in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1999**, *848*, 21-37.
50. Green, C. E.; Abraham, M. H.; Acree, W. E., Jr; Fina, K. M. D.; Sharp, T. L. Solvation descriptors for pesticides from the solubility of solids: diuron as an example. *Pest Manag. Sci.* **2000**, *56*, 1043-1053.
51. Abraham, M. H.; Rosés, M. Hydrogen bonding. 38. Effect of solute structure and mobile phase composition on reversed-phase high-performance liquid chromatographic capacity factors. *J. Phys. Org. Chem.* **1994**, *7*, 672-684.
52. Lepont, C.; Poole, C. F. Retention characteristics of an immobilized artificial membrane column in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *946*, 107-124.
53. Burns, S. T.; Khaledi, M. G. Rapid determination of liposome-water partition coefficients (K_{lw}) using liposome electrokinetic chromatography (LEKC). *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1601-1612.
54. Trone, M. D.; Leonard, M. S.; Khaledi, M. G. Congeneric behavior in estimations of octanol-water partition coefficients by micellar electrokinetic chromatography. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1228-1235.
55. Abraham, M. H.; Ràfols, C. Factors that influence tadpole narcosis. An LFER analysis. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 1843-1851.

56. Platts, J. A.; Abraham, M. H.; Zhao, Y. H.; Hersey, A.; Ijaz, L.; Butina, D. Correlation and prediction of a large blood-brain distribution data set--an LFER study. *European Journal Of Medicinal Chemistry* **2001**, *36*, 719-730.
57. Abraham, M. H.; Zhao, Y. H.; Le, J.; Hersey, A.; Luscombe, C. N.; Reynolds, D. P.; Beck, G.; Sherborne, B.; Cooper, I. On the mechanism of human intestinal absorption. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 595-605.
58. Ishihama, Y.; Asakawa, N. Characterization of lipophilicity scales using vectors from solvation energy descriptors. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 1305-1312.
59. Abraham, M. H. Can we identify models for intestinal absorption, blood-brain barrier distribution and intestinal absorption? *EuroQSAR 2002. Designing drugs and crop protectants: Processes, problems and solutions*; Ford, M., Livingstone, D., Dearden, J., Van de Waterbeemd, H., Eds.; Blackwell: Oxford, U.K., 2003; pàg. 5-7.
60. Kurz, H.; Trunk, H.; Weitz, B. Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs. Equilibrium dialysis, ultrafiltration, ultracentrifugation, gel filtration. *Arzneimittelforschung* **1977**, *27*, 1373-1380.
61. Bowers, W. F.; Fulton, S.; Thompson, J. Ultrafiltration vs equilibrium dialysis for determination of free fraction. *Clin. Pharmacokinet.* **1984**, *9*, 49-60.
62. Seville, B.; Zini, R.; Madjar, C. V.; Thuaud, N.; Tillement, J. P. Separation procedures used to reveal and follow drug-protein binding. *J. Chromatogr. A* **1990**, *531*, 51-77.

63. Hartmann, T.; Schmitt, J.; Rohring, C.; Nimptsch, D.; Noller, J.; Mohr, C. ADME related profiling in 96 and 384 well plate format--a novel and robust HT-assay for the determination of lipophilicity and serum albumin binding. *Curr. Drug Deliv.* **2006**, *3*, 181-192.
64. Hollosy, F.; Valko, K.; Hersey, A.; Nunhuck, S.; Keri, G.; Bevan, C. Estimation of volume of distribution in humans from high throughput HPLC-based measurements of human serum albumin binding and immobilized artificial membrane partitioning. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6958-6971.
65. Valko, K.; Nunhuck, S.; Bevan, C.; Abraham, M. H.; Reynolds, D. P. Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 2236-2248.
66. Berkeley Madonna. <http://www.berkeleymadonna.com/>.
67. Busquets, M. A.; Alsina, M. A.; Haro, I. Peptides and liposomes: from biophysical to immunogenic studies. *Curr. Drug Targets* **2003**, *4*, 633-642.
68. Ohtake, S.; Schebor, C.; de Pablo, J. J. Effects of trehalose on the phase behavior of DPPC-cholesterol unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 65-73.
69. Pignatello, R.; Intravaia, V. D.; Puglisi, G. A calorimetric evaluation of the interaction of amphiphilic prodrugs of idebenone with a biomembrane model. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *299*, 626-635.
70. Boija, E.; Johansson, G. Interactions between model membranes and lignin-related compounds studied by immobilized liposome chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 620-626.

71. New, R. R. C., Ed. *Liposomes: a practical approach*; Oxford University Press, Cop.: 1990.
72. Mantsch, H. H.; Martin, A.; Cameron, D. G. Characterization by infrared spectroscopy of the bilayer to nonbilayer phase transition of phosphatidylethanolamines. *Biochemistry* **1981**, *20*, 3138-3145.
73. Lo, Y. L.; Rahman, Y. E. Protein location in liposomes, a drug carrier: a prediction by differential scanning calorimetry. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 805-814.
74. Pedersen, T. B.; Sabra, M. C.; Frokjaer, S.; Mouritsen, O. G.; Jorgensen, K. Association of acylated cationic decapeptides with dipalmitoylphosphatidylserine-dipalmitoylphosphatidylcholine lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* **2001**, *113*, 83-95.
75. Castillo, J. A.; Pinazo, A.; Carilla, J.; Infante, M. R.; Alsina, M. A.; Haro, I.; Clapes, P. Interaction of antimicrobial arginine-based cationic surfactants with liposomes and lipid monolayers. *Langmuir* **2004**, *20*, 3379-3387.
76. Rosés, M.; Bosch, E. Influence of mobile phase acid-base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds. *J. Chromatogr. A* **2002**, *982*, 1-30.
77. Canals, I.; Oumada, F. Z.; Rosés, M.; Bosch, E. Retention of ionizable compounds on HPLC. 6. pH measurements with the glass electrode in methanol-water mixtures. *J. Chromatogr. A* **2001**, *911*, 191-202.
78. Canals, I.; Portal, J. A.; Bosch, E.; Rosés, M. Retention of ionizable compounds on HPLC. 4. Mobile-phase pH measurement in methanol/water. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1802-1809.

79. Boggs, J. M. Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *906*, 353-404.
80. Moncelli, M. R.; Becucci, L.; Guidelli, R. The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes. *Biophys. J.* **1994**, *66*, 1969-1980.
81. Fuguet, E.; Ràfols, C.; Bosch, E.; Abraham, M. H.; Rosés, M. Solute-solvent interactions in micellar electrokinetic chromatography: III. Characterization of the selectivity of micellar electrokinetic chromatography systems. *J. Chromatogr. A* **2002**, *942*, 237-248.
82. Espinosa, S.; Bosch, E.; Rosés, M. Retention of ionizable compounds on high-performance liquid chromatography XI. Global linear solvation energy relationships for neutral and ionizable compounds. *J. Chromatogr. A* **2002**, *945*, 83-96.
83. Valko, K.; Du, C. M.; Bevan, C. D.; Reynolds, D. P.; Abraham, M. H. Rapid-gradient HPLC method for measuring drug interactions with immobilized artificial membrane: Comparison with other lipophilicity measures. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1085-1096.
84. Reichardt, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319-2358.
85. Müller, P. Glossary of terms used in physical organic chemistry. *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 1077-1184.

86. Izquierdo, P.; Rosés, M.; Bosch, E. Polarity parameters of the Symmetry C18 and Chromolith Performance RP-18 monolithic chromatographic columns. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1107*, 96-103.
87. Bosque, R.; Sales, J.; Bosch, E.; Rosés, M.; García-Álvarez-Coque, M. C.; Torres-Lapasió, J. R. A QSPR study of the ρ solute polarity parameter to estimate retention in HPLC. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 1240-1247.
88. Abraham, M. H. *University College London Database* **1997**.
89. Abraham, M. H.; Ibrahim, A.; Zhao, Y.; Acree, W. E., Jr. A data base for partition of volatile organic compounds and drugs from blood/plasma/serum to brain, and an LFER analysis of the data. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 2091-2100.
90. Abraham, M. H.; Ibrahim, A.; Acree, W. E., Jr. Air to brain, blood to brain and plasma to brain distribution of volatile organic compounds: linear free energy analyses. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 494-502.
91. Gratton, J. A.; Abraham, M. H.; Bradbury, M. W.; Chadha, H. S. Molecular factors influencing drug transfer across the blood-brain barrier. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 1211-1216.
92. Ràfols, C.; Poza, A.; Fuguet, E.; Rosés, M.; Bosch, E. Solute-solvent interactions in micellar electrokinetic chromatography: V. Factors that produce peak splitting. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2408-2416.
93. Du, C. M.; Valko, K.; Bevan, C.; Reynolds, D.; Abraham, M. H. Rapid gradient RP-HPLC method for lipophilicity determination: A solvation equation based comparison with isocratic methods. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4228-4234.

94. Du, C. M.; Valko, K.; Bevan, C.; Reynolds, D.; Abraham, M. H. Rapid method for estimating octanol-water partition coefficient ($\log P_{\text{oct}}$) from isocratic RP-HPLC and a hydrogen bond acidity term (A). *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, *24*, 635-649.
95. Lombardo, F.; Shalaeva, M. Y.; Tupper, K. A.; Gao, F.; Abraham, M. H. ElogP_{oct}: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2922-2928.
96. Valko, K.; Du, C. M.; Bevan, C.; Reynolds, D. P.; Abraham, M. H. Rapid method for the estimation of octanol/water partition coefficient ($\log P_{\text{oct}}$) from gradient RP-HPLC retention and a hydrogen bond acidity term ($\Sigma\alpha_2^{\text{H}}$). *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1137-1146.
97. Poole, S. K.; Poole, C. Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients. *J. Chromatogr. B* **2003**, *797*, 3-19.
98. Kratochwil, N. A.; Huber, W.; Müller, F.; Kansy, M.; Gerber, P. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 1355-1374.
99. Brodersen, R.; Sjodin, T.; Sjöholm, I. Independent binding of ligands to human serum albumin. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 5067-5072.
100. Gabay, S.; Huang, P. C. The binding behavior of phenothiazines and structurally related compounds to albumin from several species. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **1974**, *9*, 175-189.
101. Zaton, A. M.; Ferrer, J. M.; Ruiz de Gordo, J. C.; Marquinez, M. A. Binding of coumarins to site I of human serum albumin. Effect of the fatty acids. *Chem. Biol. Interact.* **1995**, *97*, 169-174.

102. Kragh-Hansen, U. Evidence for a large and flexible region of human serum albumin possessing high affinity binding sites for salicylate, warfarin, and other ligands. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 160-171.
103. Kragh-Hansen, U. Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin. *Biochem. J.* **1985**, *225*, 629-638.
104. Sengupta, A.; Hage, D. S. Characterization of minor site probes for human serum albumin by high-performance affinity chromatography. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3821-3827.
105. Vestberg, K.; Galliano, M.; Minchiotti, L.; Kragh-Hansen, U. High-affinity binding of warfarin, salicylate and diazepam to natural mutants of human serum albumin modified in the C-terminal end. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 1515-1521.
106. Brown, K. F.; Crooks, M. J. Displacement of tolbutamide, glibencalmide and chlorpropamide from serum albumin by anionic drugs. *Biochem. Pharmacol.* **1976**, *25*, 1175-1178.
107. Chattopadhyay, A.; Tian, T.; Kortum, L.; Hage, D. S. Development of tryptophan-modified human serum albumin columns for site-specific studies of drug-protein interactions by high-performance affinity chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1998**, *715*, 183-190.
108. Paubel, J. P.; Niviere, P. La liaison des molécules organiques thérapeutiques avec les protéines: Cas de la quinine. *Eur. J. Med. Chem.* **1974**, *9*, 508-512.

109. Sharples, D. Competition for plasma protein binding sites between phenothiazine tranquilizers and iminodibenzyl antidepressants. *J. Pharm. Pharmacol.* **1975**, *27*, 379-381.
110. Szymura-Oleksiak, J.; Wyska, E.; Wasieczko, A. Pharmacokinetic interaction between imipramine and carbamazepine in patients with major depression. *Psychopharmacology (Berlin)* **2001**, *154*, 38-42.
111. Honore, B.; Brodersen, R. Albumin binding of anti-inflammatory drugs. Utility of a site-oriented versus a stoichiometric analysis. *Mol. Pharmacol.* **1984**, *25*, 137-150.
112. Huang, P. C.; Gabay, S. Examination of phenothiazine-albumin interaction by ultraviolet difference spectrophotometry. *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *23*, 957-972.
113. Larsen, C. G.; Larsen, F. G.; Jakobsen, P.; Brodersen, R. Multiple cobinding of two ligands to serum albumin: a stoichiometric description of binding equilibria. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *239*, 74-86.
114. Nambu, N.; Nagai, T. Binding of phenothiazines to bovine serum albumin and related phenomena. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1972**, *20*, 2463-2470.
115. Romer, J.; Bickel, M. H. A method to estimate binding constants at variable protein concentrations. *J. Pharm. Pharmacol.* **1979**, *31*, 7-11.
116. Bagatolli, L. A.; Kivatinitz, S. C.; Fidelio, G. D. Interaction of small ligands with human serum albumin IIIA subdomain. How to determine the affinity constant using an easy steady state fluorescent method. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1131-1132.

117. Wilting, J.; Hart, B. J.; De Gier, J. J. The role of albumin conformation in the binding of diazepam to human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *626*, 291-298.
118. Viani, A.; Cappiello, M.; Pacifici, G. M. Binding of diazepam, salicylic acid and digitoxin to albumin isolated from fetal and adult serum. *Dev. Pharmacol. Ther.* **1991**, *17*, 100-108.
119. Lucas, D.; Menez, J. F.; Daniel, J. Y.; Bardou, L. G.; Floch, H. H. Acetaldehyde adducts with serum proteins: effect on diazepam and phenytoin binding. *Pharmacology* **1986**, *32*, 134-140.
120. Kober, A.; Ekman, B.; Sjöholm, I. Direct and indirect determination of binding constants of drug-protein complexes with microparticles. *J. Pharm. Sci.* **1978**, *67*, 107-109.
121. Müller, W.; Wollert, U. Characterization of the binding of benzodiazepines to human serum albumin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1973**, *280*, 229-237.
122. Chamouard, J. M.; Barre, J.; Urien, S.; Houin, G.; Tillement, J. P. Diclofenac binding to albumin and lipoproteins in human serum. *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 1695-1700.
123. Epps, D. E.; Raub, T. J.; Kezdy, F. J. A general, wide-range spectrofluorometric method for measuring the site-specific affinities of drugs toward human serum albumin. *Anal. Biochem.* **1995**, *227*, 342-350.
124. Zini, R. *Les modes de fixation des médicaments sur les protéines plasmatiques humaines et leurs conséquences pharmacologiques*. UER de Sciences de l'Université Paris XII, France, Dissertation, **1984**.

125. Zini, R.; d'Athis, P.; Hoareau, A.; Tillement, J. P. Binding of four sulphonamides to human albumin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1976**, *10*, 139-145.
126. Tanaka, M.; Asahi, Y.; Masuda, S.; Minagawa, K. Binding position of tolbutamide to human serum albumin. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1998**, *46*, 817-821.
127. Judis, J. Binding of sulfonyleureas to serum proteins. *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61*, 89-93.
128. Jakoby, M. G., 4th; Covey, D. F.; Cistola, D. P. Localization of tolbutamide binding sites on human serum albumin using titration calorimetry and heteronuclear 2-D NMR. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8780-8787.
129. Koizumi, K.; Ikeda, C.; Ito, M.; Suzuki, J.; Kinoshita, T.; Yasukawa, K.; Hanai, T. Influence of glycosylation on the drug binding of human serum albumin. *Biomed. Chromatogr.* **1998**, *12*, 203-210.
130. Ding, Y.; Zhu, X.; Lin, B. Study of interaction between drug enantiomers and serum albumin by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 1890-1894.
131. Manach, C.; Mazur, A.; Scalbert, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* **2005**, *16*, 77-84.
132. Nichenametla, S. N.; Taruscio, T. G.; Barney, D. L.; Exon, J. H. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2006**, *46*, 161-183.

133. Torres, J. L.; Bobet, R. New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4627-4634.
134. Torres, J. L.; Lozano, C.; Julia, L.; Sánchez-Baeza, F. J.; Anglada, J. M.; Centelles, J. J.; Cascante, M. Cysteinyl-flavan-3-ol conjugates from grape procyanidins. Antioxidant and antiproliferative properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2497-2509.
135. Alonso, C.; Notario, J.; Ramón, E.; Lozano, C.; Parra, J. L.; Torres, J. L.; Coderch, L. Percutaneous absorption of flavan-3-ol conjugates from plant procyanidins. *Drug. Exp. Clin. Res.* **2004**, *30*, 1-10.
136. Caturla, N.; Vera-Samper, E.; Villalain, J.; Mateo, C. R.; Micol, V. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *34*, 648-662.
137. Saija, A.; Bonina, F.; Trombetta, D.; Tomaino, A.; Montenegro, L.; Smeriglio, P.; Castelli, F. Flavonoid-biomembrane interactions: A calorimetric study on dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. *Int. J. Pharm.* **1995**, *124*, 1-8.
138. Ramaswami, V.; Haaseth, R. C.; Matsunaga, T. O.; Hruby, V. J.; O'Brien, D. F. Opioid peptide interactions with lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1109*, 195-202.
139. Sospedra, P.; Mestres, C.; Haro, I.; Muñoz, M.; Busquets, M. A. Effect of amino acid sequence change on peptide-membrane interaction. *Langmuir* **2002**, *18*, 1231-1237.

140. Ong, S.; Liu, H.; Pidgeon, C. Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. *J. Chromatogr. A* **1996**, *728*, 113-128.
141. Taillardat-Bertschinger, A.; Martinet, C. A.; Carrupt, P. A.; Reist, M.; Caron, G.; Fruttero, R.; Testa, B. Molecular factors influencing retention on immobilized artificial membranes (IAM) compared to partitioning in liposomes and n-octanol. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 729-737.

