



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΥ ΦΑΣΕΩΣ
ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΙΚΥΛΛΙΩΝ – ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΕΓΕΘΗ»**



Θεοδώρα Σιάλδα

Αριθμός μητρώου: 05112727

Επιβλέπων: Φώτιος Τσόπελας, Λέκτορας Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία με τίτλο «Διερεύνηση του μηχανισμού έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων με Υγροχρωματογραφία Αντιστρόφου Φάσεως παρουσία μικυλλίων – Συσχέτιση με φαρμακοκινητικά μεγέθη» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα κ. Φ. Τσόπελα, Λέκτορα ΕΜΠ, για την ευκαιρία που μου έδωσε, ώστε να υλοποιήσω την παρούσα μελέτη, καθώς και για την εμπιστοσύνη του και τη βοήθειά του κατά το χρονικό διάστημα υλοποίησης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όσα άτομα της πολυτεχνειακής κοινότητας συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας με την πραγματοποίηση κάποιων αναλύσεων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου και όλους τους κοντινούς μου ανθρώπους που ήταν δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια της φοιτητικής μου σταδιοδρομίας, σε όλη την πορεία μου μέχρι εδώ, αλλά και σε όλες τις δυσκολίες που συνάντησα, αφού χάρις την υποστήριξη και τη συμπαράστασή τους έχω καταφέρει όλα αυτά μέχρι σήμερα και βρίσκω τη δύναμη και συνεχίζω.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
<i>Σχεδιασμός φαρμάκων</i>	8
<i>Λιποφιλία</i>	9
<i>Λιποφιλία αμφολυτών</i>	12
<i>Σύστημα οκτανόλης – νερού</i>	13
<i>Χρωματογραφία</i>	13
<i>Τρόποι με τους οποίους μπορούν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες να αξιολογηθούν</i>	16
<i>Βιομμητική Χρωματογραφία</i>	16
1. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM).....	17
2. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών.....	21
3. Μικυλλιακή χρωματογραφία βιοκατανομής (BMC)	23
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34
<i>Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας</i>	34
<i>Αντιδραστήρια</i>	41
<i>Οργανολογία</i>	42
<i>Πειραματική διαδικασία</i>	44
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
<i>A. Προσδιορισμός συντελεστών κατακράτησης σε pH=7.4 και σύγκριση τους με άλλες παραμέτρους</i>	46
<i>B. Προσδιορισμός συντελεστών κατακράτησης σε pH=5.5 και σύγκριση τους με άλλες παραμέτρους</i>	52
<i>Συσχέτιση με βιολογικά/ βιοφαρμακευτικά μεγέθη</i>	59
1. Συσχέτιση με κυτταρική διαπερατότητα, MDCK	59
2. Συσχέτιση με απορρόφηση από το στόμα (Human Oral Absorption, %HOA)	62
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	65
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑ	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η διερεύνηση του μηχανισμού έκλουσης φαρμακευτικών ενώσεων από χρωματογραφική στήλη αντιστρόφου φάσεως παρουσία μικυλλίων (μικυλλιακή χρωματογραφία βιοκατανομής) και η συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης με φαρμακοκινητικά μεγέθη. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν οι συντελεστές κατακράτησης 50 φαρμακευτικών ενώσεων ποικίλης δομής (οξέα, βάσεις, ουδέτερα, αμφολύτες) και φαρμακολογικής δράσης από στήλη Discovery Bio-Wide Pore C18. Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε δυο διαφορετικά pH (7.4 και 5.5), παρουσία του ουδέτερου επιφανειοδραστικού Brij-35 σε συγκέντρωση 0.04 M και NaCl σε συγκέντρωση 9.2 g/L. Τα δυο αυτά pH αντιστοιχούν στις τιμές μεταξύ των οποίων μεταβάλλεται το pH στο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα από την αρχή του λεπτού εντέρου (pH=5.5) έως το τέλος του παχέος εντέρου (pH=7.4), κατά μήκος του οποίου λαμβάνει χώρα η απορρόφηση των φαρμάκων. Η προσθήκη του NaCl στη συγκέντρωση των 9.2 g/L αποσκοπεί στη μίμηση της ωσμωτικότητας των βιολογικών υγρών. Για την καλύτερη προσομοίωση της διεργασίας κατανομής του φαρμάκου στον ανθρώπινο οργανισμό, η χρωματογραφική στήλη θερμοστατήθηκε στους 37°C (θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος).

Διαπιστώθηκε ότι η κλίμακα (μεγαλύτερη – μικρότερη τιμή) των συντελεστών κατακράτησης, $\log k_w$, από μικυλλιακή χρωματογραφία είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη κλίμακα που παρατηρήθηκε σε χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM) και κυρίως με την αντίστοιχη κλίμακα του συντελεστή κατανομής σε σύστημα οκτανόλης – νερού, $\log D$.

Εν συνεχεία, οι συντελεστές κατακράτησης $\log k_w$ συγκρίθηκαν με τις τιμές του συντελεστή μερισμού και του συντελεστή κατανομής οκτανόλης – νερού ($\log P$ και $\log D$, αντίστοιχα) και παρατηρήθηκε πως ο συντελεστής κατακράτησης συσχετίζεται καλύτερα με το $\log P$ (που αντιστοιχεί στην ουδέτερη ένωση) σε σχέση με το $\log D$ (που λαμβάνει υπόψη τον ιονισμό στις περιπτώσεις ιονιζόμενων μορίων), γεγονός που υποδηλώνει ότι στο περιβάλλον της χρωματογραφικής στήλης δεν ευνοείται ο ιονισμός. Για να επαληθευτεί η παρατήρηση αυτή συγκρίθηκαν οι μεταβολές των δεικτών κατακράτησης των ιονιζόμενων ενώσεων μεταξύ των τιμών pH 5.5 και 7.4 με τις αντίστοιχες του $\log D$, και διαπιστώθηκε ότι οι πρώτες είναι σημαντικά μικρότερες σε σχέση με τις δεύτερες.

Ακολούθως, οι συντελεστές κατακράτησης από υδροχρωματογραφία μικυλλίων συγκρίθηκαν με τους αντίστοιχους συντελεστές που είχαν προσδιορισθεί σε στήλες IAM και προέκυψε μια αρκετά ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των δύο χρωματογραφικών τεχνικών, γεγονός μάλλον αναμενόμενο καθώς και οι δύο

ακολουθούν μηχανισμό κατανομής με καταστολή του ιονισμού (στην περίπτωση των ιονιζόμενων ενώσεων) εντός της στήλης. Η συσχέτιση μεταξύ των δύο τεχνικών βελτιώνεται με την εισαγωγή στην εξίσωση του κλάσματος θετικού φορτίου του μορίου, αφού η κύρια διαφορά τους έγκειται στην επίδραση των φωσφορικών ομάδων των ακινητοποιημένων φωσφολιπιδίων των στηλών IAM, που αναπτύσσουν ηλεκτροστατικές έλξεις με τις θετικά φορτισμένες ομάδες των φαρμακευτικών μορίων.

Τέλος, οι συντελεστές κατακράτησης της μικυλλιακής χρωματογραφίας συγκρίθηκαν με τιμές κυτταρικής διαπερατότητας καθώς και με τιμές απορρόφησης μέσω του στόματος (% Human Oral Absorption, HOA). Όσον αφορά την κυτταρική διαπερατότητα, η συσχέτιση του δείκτη $\log k_w$ με τη διαπερατότητα μέσω των κυτταρικών σειρών MDCK φαίνεται να ακολουθεί γραμμική συσχέτιση, αλλά τα δεδομένα είναι πολύ λίγα προκειμένου να εξαχθεί ένα αξιόπιστο συμπέρασμα. Η απορρόφηση από το στόμα φαίνεται να ακολουθεί σιγμοειδή συσχέτιση με τον δείκτη $\log k_w$. Αντίστοιχη σιγμοειδής συσχέτιση αναφέρεται στη βιβλιογραφία τόσο με χρήση συντελεστών κατακράτησης χρωματογραφίας IAM, όσο και με τιμές λιποφιλίας $\log D$. Οι συντελεστές $\log k_w$ μικυλλιακής χρωματογραφίας προσαρμόζονται καλύτερα στο σιγμοειδές μοντέλο σε σχέση με την παράμετρο $\log D$. Ωστόσο, το σιγμοειδές μοντέλο που βασίζεται στις τιμές $\log D$ επιδέχεται μεγαλύτερη βελτίωση με την εισαγωγή επιπλέον φυσικοχημικών παραμέτρων.

ABSTRACT

The aim of this thesis is the investigation of the elution mechanism of pharmaceutical compounds on reversed-phase chromatographic column in presence of micelles (biopartitioning micellar chromatography, BMC) and the correlation of the obtained retention factors with pharmacokinetic parameters. For this purpose, retention factors of 50 structurally- diverse pharmaceutical compounds (acids, bases, neutrals, zwitterions) were measured using the Discovery Bio-Wide Pore C18 column. Mobile phase consisted of phosphate buffer adjusted at two different pH values (7.4 and 5.5) in presence of the neutral surfactant Brij-35 at a concentration of 0.04 M and NaCl at a concentration of 9.2 g/L. These two pH values correspond to the minimum (beginning of the small intestine) and maximum value (end of colon) of the gastrointestinal tract, along which the absorption of the drugs takes place. The addition of NaCl at a concentration of 9.2 g/L is expected to mimic the osmolality of biological fluids. For better simulation of the drug distribution process in the human body, the chromatographic column was thermostated at 37°C (temperature of the human body).

It was found that the scale (greater – lower value) of the retention factors, $\log k_w$, on micellar chromatography is significantly lower than the corresponding scale previously observed on Immobilized Artificial Membrane Chromatography (IAM) and mainly than the corresponding scale of the octanol/water distribution coefficient, $\log D$.

The retention factors, $\log k_w$, were further compared with octanol/water partition and distribution coefficient ($\log P$ and $\log D$, respectively). Retention factors were found to be better related to $\log P$ (which corresponds to the neutral compound) compared to $\log D$ (which takes into account the ionization in the case of ionized molecules), suggesting that ionization is not favored in the chromatographic environment. In order to confirm this observation, changes in the retention factors of the ionizable compounds between pH 5.5 and 7.4 were compared with those of $\log D$, and the first ones were found to be significantly lower than the second ones.

Subsequently, the retention factors on micellar liquid chromatography were compared with the corresponding factors reported on IAM columns and a quite satisfactory correlation is evident. This can be explained on the basis that both chromatographic processes follow a partition mechanism with a limited ionization of analytes (in the cases of ionizable compounds) within the column. The BMC/IAM correlation can be further improved by introducing the positively charged molecular fraction into the equation. This is attributed to the fact that the main difference lies in the electrostatic attraction of protonated bases with the negatively charged phosphate groups of the immobilized phospholipids on IAM stationary phases.

Finally, the retention factors of micellar chromatography were compared with cell permeability as well as human oral absorption (%HOA) values. Regarding cell permeability, the correlation of the $\log k_w$ with the permeability through Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cell lines appears to follow a linear correlation, but this is only indicative due to the limited data. Human oral absorption appears to follow a sigmoidal correlation with the maximum $\log k_w$ value measured at the two different pH, in accordance to previous findings using retention factors on IAM chromatography and $\log D$. The $\log k_w$ values measured in this work are better suited to the sigmoidal model than the $\log D$ parameter. However, the $\log D$ -based sigmoidal model can be further improved by introducing additional physicochemical parameters.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σχεδιασμός φαρμάκων

Έχει παρατηρηθεί ότι από τα 10000 υποψήφια φάρμακα που σχεδιάζονται και ελέγχονται στην προκλινική φάση, μόνο 1 είναι επιτυχές και τελικά εγκρίνεται. Η διαδικασία ανακάλυψης ενός νέου φαρμάκου, η ανάπτυξη και δοκιμή του, καθώς και η εισαγωγή του στα θεραπευτικά πρωτόκολλα μπορεί να διαρκέσει έως και 15 χρόνια, και στο τέλος το φάρμακο να αποτύχει λόγω παρενεργειών (π.χ. λόγω καρδιοτοξικότητας, ηπατοτοξικότητας) ή λόγω εισόδου στην αγορά κατά το διάστημα που μεσολάβησε άλλου φαρμάκου ανταγωνιστικής εταιρείας με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ή/ και λιγότερες παρενέργειες. Αυτό εκτός από χρόνο, σημαίνει και μεγάλο κόστος. Συγκεκριμένα, ανάλογα με τη νόσο, την εταιρεία που το αναπτύσσει και τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται, η ανάπτυξη ενός φαρμακευτικού προϊόντος κοστίζει από \$161 εκ. έως \$1.8 δις. [1]. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο δόγμα “fail fast, fail cheap”, δηλαδή ένα υποψήφιο φάρμακο που τελικά δεν θα φτάσει στην αγορά να αποκλείεται όσο το δυνατόν συντομότερα, κυρίως πριν προχωρήσει η ανάπτυξη του σε δαπανηρές κλινικές δοκιμές [2].

Τα συνολικά χαρακτηριστικά ενός φαρμάκου καθορίζονται τόσο από φαρμακοκινητικούς, όσο και από φαρμακοδυναμικούς παράγοντες [3]. Οι φαρμακοκινητικοί έχουν σχέση με την επίδραση του οργανισμού στο φάρμακο, ενώ αντίθετα οι φαρμακοδυναμικοί με την πορεία του φαρμάκου στον οργανισμό [2]. Η φαρμακοκινητική, γενικώς, εξετάζει τις μετακινήσεις του φαρμάκου μέσα στο σώμα στην πορεία του χρόνου, ενώ η φαρμακοδυναμική το μηχανισμό δράσης του φαρμάκου και τα αποτελέσματα της χορήγησής του [4].

Με την είσοδό του το φάρμακο στον οργανισμό θα υποστεί τις παρακάτω διεργασίες:

- ✓ **Absorption** (απορρόφηση από το σημείο χορήγησης. Στην περίπτωση φαρμάκου που χορηγείται από το στόμα, η απορρόφηση πραγματοποιείται από το γαστρεντερικό σωλήνα και σχετίζεται με την καλή διαλυτότητα και τη δυνατότητά του να διαπερνά τις μεμβράνες).
- ✓ **Distribution** (κατανομή στα επιμέρους διαμερίσματα του βιολογικού οργανισμού, προσπέλαση στο όργανο-στόχο. Για παράδειγμα ένα φάρμακο που δρα στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα θα πρέπει να διέρχεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (blood – brain barrier)).
- ✓ **Metabolism** (μεταβολισμός φαρμάκου).
- ✓ **Excretion** (απέκκριση, κυρίως μέσω των νεφρών).

Η όλη πορεία περιγράφεται συνοπτικά με το ακρωνύμιο **ADME [3]**. Οι ιδιότητες ADME σχετίζονται με την φαρμακοκινητική συμπεριφορά του φαρμάκου.

Καθώς το 40% των αποτυχιών οφείλονται σε φαρμακοκινητικούς λόγους, δημιουργείται η ανάγκη για γρήγορη εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων υποψήφιων φαρμάκων, έτσι ώστε μόνο οι "περισσότερο υποσχόμενες" νέες ενώσεις να εισάγονται στις δαπανηρές και χρονοβόρες βιολογικές μελέτες (πειραματόζωα και περαιτέρω σε κλινικές δοκιμές) [2]. Με δεδομένο τον μεγάλο αριθμό υποψήφιων φαρμάκων, υπάρχει αναγκαιότητα για ταχεία εξέταση και έλεγχο μεγάλων βιβλιοθηκών χημικών ενώσεων σε ένα πρώιμο στάδιο ανακάλυψης-ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Απαιτούνται, έτσι, μέθοδοι εκτίμησης των φαρμακοκινητικών μεγεθών με μεγάλη απόδοση για να επιτευχθεί αυτός ο σκοπός [5].

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό τα νέα μόρια να έχουν αποδεκτές φαρμακοκινητικές ιδιότητες και επιθυμητή βιοδιαθεσιμότητα κατά τη χορήγηση από το στόμα, αφού η μη ικανοποιητική απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα είναι ο κύριος λόγος για την αποτυχία των υποψήφιων φαρμάκων κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης ενός φαρμακομορίου. Η χορήγηση από το στόμα είναι η προτιμητέα οδός ώστε να ενθαρρύνεται η καλύτερη συμμόρφωση του ασθενούς με τη θεραπεία. Κατά συνέπεια, η φαρμακοκινητική συμπεριφορά πρέπει να ερευνάζεται παράλληλα με τη φαρμακοδυναμική, δηλαδή οι ιδιότητες ADME να αντιμετωπίζονται παράλληλα με τις προσπάθειες να ενισχυθεί η συγγένεια και η εκλεκτικότητα με τους επιθυμητούς υποδοχείς – στόχους [2][5].

Λιποφιλία

Η κυριότερη φυσικοχημική ιδιότητα των φαρμάκων που σχετίζεται άμεσα με τη φαρμακοκινητική/φαρμακοδυναμική συμπεριφορά των ενώσεων είναι η λιποφιλία, η οποία εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου ή τμήματος μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον [2].

Επικρατεί μια γενικότερη τάση ταύτισης της λιποφιλίας με την υδροφοβία, στην πραγματικότητα όμως οι δύο αυτοί όροι δεν είναι ταυτόσημοι, αλλά έννοιες που αλληλοσυμπληρώνονται [6]. Πιο συγκεκριμένα, η λιποφιλία είναι μια σύνθετη ιδιότητα, η οποία αποτελείται από δύο συνιστώσες, την υδροφοβία και την πολικότητα των ενώσεων [7].

Λιποφιλία = Υδροφοβία – Πολικότητα

Ο όρος λιποφιλία ορίζεται ως η ενεργητική κίνηση μιας ουσίας προς το περισσότερο λιπόφιλο περιβάλλον, ενώ ο όρος υδροφοβία αναφέρεται στην παθητική απομάκρυνση της ουσίας από το υδρόφιλο περιβάλλον [6].

Η λιποφιλία εκφράζεται ποσοτικά από το συντελεστή μερισμού P, δηλαδή το πηλίκο της συγκέντρωσης του φαρμάκου στη λιποειδική φάση ως προς τη συγκέντρωσή του στην υδατική φάση. Οι λιποειδικές φάσεις του οργανισμού (μεμβράνες και υδρόφοβα τμήματα πρωτεϊνών) μπορούν να προσομοιωθούν με κατάλληλο οργανικό διαλύτη [2], συνεπώς ισχύει η σχέση :

$$P = \frac{C_{οργ}}{C_{υδατ}} \quad (1)$$

Ο συντελεστής μερισμού συνήθως χρησιμοποιείται υπό λογαριθμική μορφή, οπότε έχουμε $\log P$.

Ο συντελεστής μερισμού αναφέρεται σε ουδέτερες ενώσεις, δηλαδή ενώσεις που έχουν μόνο αδιάστατη μορφή. Όμως, οι περισσότερες φαρμακευτικές ενώσεις φέρουν κέντρα ιοντισμού και έτσι βρίσκονται περισσότερο ή λιγότερο ιοντισμένες, ανάλογα με το pH, στο οποίο βρίσκονται. Στην περίπτωση αυτή, αναφερόμαστε στο συντελεστή κατανομής D, ο οποίος ισούται με τον λόγο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων αδιάστατης και ιοντισμένης μορφής στην οργανική και υδατική φάση αντίστοιχα [2].

$$D = \frac{\sum C_{οργ}}{\sum C_{υδατ}} = \frac{(C_{αδιαστ} + \sum C_{ιοντ})_{οργ}}{(C_{αδιαστ} + \sum C_{ιοντ})_{υδατ}} \quad (2)$$

Ο συντελεστής κατανομής, επίσης, χρησιμοποιείται συνήθως υπό λογαριθμική μορφή, $\log D$.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι έχουμε διαφορετικό συντελεστή κατανομής για κάθε διαφορετικό pH που χρησιμοποιούμε (στην περίπτωσή μας $\log D_{7.4}$ και $\log D_{5.5}$).

Ο συντελεστής μερισμού είναι πάντα μεγαλύτερος ή ίσος από το συντελεστή κατανομής, $\log P \geq \log D$, μιας και η συγκέντρωση των ιονιζόμενων ομάδων στην υδατική φάση είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της αδιάστατης μορφής, και συνεπώς ο παρανομαστής του κλάσματος αυξάνεται και έτσι το $\log D$ μειώνεται σε σχέση με το να είχαμε μόνο αδιάστατη μορφή ($\log P$).

Η σημασία της λιποφιλίας είναι καθοριστική για τη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική συμπεριφορά των φαρμάκων [2].

Γενικά, οι λιποδιαλυτές ουσίες διακινούνται ευκολότερα μέσα στον οργανισμό, ενώ οι υδατοδιαλυτές και οι μεγαλομοριακές ουσίες συναντούν δυσκολία [4]. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η τιμή της λιποφιλίας μιας ένωσης πρέπει να έχει μια σχετικά μεγάλη τιμή.

Ωστόσο, υπάρχει η γενικευμένη τάση να γίνεται μη ορθολογική αύξηση του λιπόφιλου χαρακτήρα των φαρμακομορίων κατά τα διαδοχικά στάδια της ανάπτυξης τους, προσβλέποντας με αυτό στην αύξηση της συγγένειας των μορίων με τον υποδοχέα, δηλαδή γενικά στη βελτιστοποίηση της βιοδραστικότητας τους. Το φαινόμενο αυτό ορίζεται ως μοριακή “παχυσαρκία” [8].

Διαπιστώθηκε όμως πως το γεγονός αυτό συνήθως συνοδεύεται από ανεπιθύμητες ενέργειες και οδηγεί σε πρόωρη διακοπή της περαιτέρω ανάπτυξης του συγκεκριμένου φαρμακομορίου. Επιπρόσθετα, όσο αυξάνεται η λιποφιλία, μειώνεται η διαπερατότητα, αλλά και η διαλυτότητα του μορίου στον οργανισμό, η οποία αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την απορρόφηση αλλά και για την τελική μορφοποίηση. Η χαμηλή διαλυτότητα ενός φαρμακομορίου αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην ανάπτυξη του ως φάρμακο [2].

Αυξημένη λιποφιλία οδηγεί συνήθως σε [9]:

- i. Αύξηση της τοξικότητας, αφού έχει διαπιστωθεί ότι η τοξικότητα σχετίζεται θετικά γραμμικά με τη λιποφιλία. Ο Richer είχε διατυπώσει ήδη από τα τέλη του 19ου αιώνα την άποψη ότι όσο λιγότερο διαλυτές είναι οι ουσίες τόσο είναι και περισσότερο τοξικές.
- ii. Παρατεταμένη παραμονή μιας ουσίας στον οργανισμό με αποτέλεσμα την εμφάνιση αθροιστικών φαινομένων.
- iii. Λόγω της τάσης του οργανισμού για άμυνα έναντι λιπόφιλων ουσιών, συμβαίνει επαγωγή των μικροσωμικών ενζύμων με απρόβλεπτες συνέπειες (δεδομένου ότι τα μικροσωμικά ένζυμα εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαρμάκων και άλλων ξενοβιοτικών).
- iv. Προβλήματα στη μορφοποίηση του τελικού προϊόντος.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, ο Hansch το 1987 διατύπωσε την “αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας”, σύμφωνα με την οποία ο σχεδιασμός των φαρμάκων πρέπει να στοχεύει σε ενώσεις που να μην προκαλούν την επιθυμητή δράση, έχουν όμως την ελάχιστη προς τούτο λιποφιλία [9].

Δέκα χρόνια μετά την διατύπωση της έννοιας της ελάχιστης λιποφιλίας από τον Hansch, ο Lipinski διατύπωσε τον κανόνα του πέντε (rule of five, Ro5) σε έναν απλό μνημονικό κανόνα πολλαπλασίων του 5 [10]. Ο κανόνας αυτός αφορά σε μη ευνοϊκά μοριακά χαρακτηριστικά για την απορρόφηση των φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα.

Οι παρακάτω οριακές τιμές αποτελούν μοριακά χαρακτηριστικά που πιθανώς να προσδώσουν στο φαρμακομόριο προβληματική απορρόφηση ή διαπερατότητα και είναι:

- a) Μοριακό βάρος > 500.
- b) Συντελεστής μερισμού $\log P > 5$.

- c) Περισσότερες από 5 θέσεις δότη πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου υπολογισμένες ως το άθροισμα όλων των ομάδων OH και NH στο μόριο.
- d) Περισσότερες από 10 θέσεις δέκτη πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου υπολογισμένες ως το άθροισμα όλων των ατόμων O και N στο μόριο.

Γενικά, ο κανόνας του πέντε του Lipinski εκτιμά ότι όταν μία ένωση έχει δυο τουλάχιστον από τα παραπάνω χαρακτηριστικά αναμένεται να εμφανίζει προβλήματα στην απορρόφησή της από το στόμα, στη διαλυτότητά της και γενικά στη βιοδιαθεσιμότητά της [9][10].

Οι τιμές του συντελεστή κατανομής σε φυσιολογικό pH ($\log D_{7.4}$) είναι βέλτιστες για ένα χορηγούμενο από το στόμα φαρμακομόριο όταν η συγκέντρωσή του στην οργανική φάση είναι 10 – 1000 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωσή του στην υδατική φάση. Έτσι, οι βέλτιστες τιμές του $\log D_{7.4}$ κυμαίνονται μεταξύ 1 και 3, όπως αναφέρει ο Shalaeva. Επιπλέον, οι περισσότερες από τις ενώσεις που έχουν συντελεστή κατανομής εντός αυτών των ορίων διέρχονται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και παρουσιάζουν χαμηλή μεταβολική ευαισθησία [10].

Λιποφιλία αμφολυτών

Οι αμφολύτες είναι χημικές ενώσεις που φέρουν μια ή περισσότερες όξινες και μια ή περισσότερες βασικές ομάδες και είναι δυνατόν να βρίσκονται ως εσωτερικά άλατα (zwitterions) σε εύρος pH εκατέρωθεν του ισοηλεκτρικού τους σημείου. Στα εσωτερικά άλατα παρατηρείται μερική εξουδετέρωση των αντιθέτων φορτίων του αμφολύτη. Η δυνατότητα σχηματισμού εσωτερικού άλατος εξαρτάται από τις τιμές pK_a της όξινης και βασικής ομάδας και τη δομή του μορίου.

Η λιποφιλία των αμφολυτών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ο υπολογισμός του $\log P$ είναι εφικτός μόνο όταν δεν συνυπάρχουν το θετικό και αρνητικό φορτίο στο μόριο, δηλαδή όταν δεν λαμβάνει χώρα σχηματισμός εσωτερικού άλατος (κοινοί αμφολύτες). Η απεικόνιση $\log D/pH$ στην περίπτωση των κοινών αμφολυτών ακολουθεί κωδωνοειδή (bell-shaped curve) καμπύλη με μέγιστο που αντιστοιχεί στο $\log P$ σε τιμές pH γύρω από το ισοηλεκτρικό σημείο (IS).

Στην περίπτωση αμφολυτών – εσωτερικών αλάτων δεν προσδιορίζεται τιμή $\log P$. Το μέγιστο της κωδωνοειδούς καμπύλης εκατέρωθεν του pH_{IS} αντιστοιχεί στη μέγιστη λιποφιλία $\log D_{max}$. Παρατηρείται σταθεροποίηση των τιμών $\log D_{max}$ σε εύρος pH γύρω από το ισοηλεκτρικό σημείο, δείχνοντας ότι πρακτικά, εντός ενός εύρους pH, δεν μεταβάλλεται η λιποφιλία. Για αυτό, ενώσεις που σχηματίζουν εσωτερικά άλατα έχουν χαρακτηριστεί ότι λειτουργούν ως “buffer” (“ρυθμιστές”) λιποφιλίας, συμπεριφορά που τους προσδίδει ιδιαίτερα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά [11].

Σύστημα οκτανόλης – νερού

Εδώ και κάποιες δεκαετίες, το κλασικό σύστημα για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας και γενικά για την πρόβλεψη φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων και τοξικής δράσης είναι το σύστημα οκτανόλης – νερού.

Τα κριτήρια επιλογής του συστήματος οκτανόλης – νερού ως συστήματος αναφοράς είναι ότι [2]:

- ✓ Είναι σχετικά εύκολος ο προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού, συγκριτικά με άλλα συστήματα διαλυτών.
- ✓ Η οκτανόλη έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου ως δέκτης και ως δότης, ιδιότητα που προσομοιάζει πολλά βιολογικά συστήματα (μεμβράνες, πρωτεΐνες).
- ✓ Η οκτανόλη δεν είναι τοξική.
- ✓ Η οκτανόλη δεν απορροφά στο υπερίωδες, γεγονός που διευκολύνει τον πειραματικό προσδιορισμό.
- ✓ Η οκτανόλη είναι φτηνή.

Υπάρχει στη βιβλιογραφία διαθέσιμος μεγάλος αριθμός τιμών logP και logD στο σύστημα οκτανόλης – νερού.

Το σύστημα οκτανόλης – νερού θεωρείται ότι προσομοιάζει ικανοποιητικά την πρωτεϊνική σύνδεση και τις βιολογικές μεμβράνες με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Παρ'όλα αυτά, για άλλους τύπους υποδοχέων ή μεμβρανών, άλλα συστήματα διαλυτών πιθανόν να είναι καταλληλότερα [2].

Χρωματογραφία

Ο όρος χρωματογραφία περιλαμβάνει ένα πλήθος αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται για το διαχωρισμό των συστατικών μιγμάτων ουσιών. Κάθε χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει μία κινητή φάση, η οποία ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες – συστατικά ενός μίγματος – μέσω μίας στατικής φάσης. Η κινητή φάση αποτελείται από ένα διαλύτη ή σύστημα διαλυτών, ενώ η στατική φάση από ένα πορώδες στερεό υλικό ή από ένα υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη χρωματογραφία βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από τη φυσικοχημική συγγένεια του συστατικού με την κάθε φάση. Έτσι, μία ουσία που αλληλεπιδρά ισχυρά με τη στατική φάση επιβραδύνεται σε σχέση με μία ουσία που κατανέμεται πιο σημαντικά στην κινητή φάση και παρασύρεται πιο γρήγορα από αυτή. Αποτέλεσμα αυτού είναι οι δύο ουσίες να διαχωρίζονται [12].

Τελευταία, η χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρύτατα στη φαρμακευτική ανάλυση και πιο συγκεκριμένα η χρωματογραφία HPLC (High Pressure Liquid Chromatography – ΥγροΧρωματογραφία Υψηλής Πίεσης). Σε αυτό το είδος χρωματογραφίας η κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή, γι' αυτό και ονομάζεται “Υγροχρωματογραφία”. Ο όρος “Υψηλής Πίεσης” οφείλεται στο γεγονός ότι αποτελεί εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση πλέον δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας (όπως στη χρωματογραφία στήλης), αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Συνεπώς, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό [12].

Ανάλογα με τη σχέση της πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας υψηλής πίεσης: HPLC κανονικής φάσης και HPLC αντίστροφης φάσης [13].

Στην HPLC κανονικής φάσης ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιείται κάποιο πολικό υλικό. Αντίθετα, η κινητή φάση είναι μειωμένης πολικότητας, ενώ δεν περιέχεται στην κινητή φάση νερό.

Στην HPLC αντίστροφης φάσης ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό τη ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια, φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες κ.ά., οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση ιδιαίτερα άπολο χαρακτήρα. Ουσιαστικά στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού βρίσκονται προσδεσμένες μακριές αλυσίδες υδρογονάνθρακα. Η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με νερό [12].

Γενικά, σε οποιοδήποτε διαχωρισμό, προπορεύονται τα μόρια ουσιών με πολικότητα αντίστοιχη της κινητής φάσης, ενώ καθυστερούν αυτά με πολικότητα αντίστοιχη της στατικής φάσης.

Έτσι, στην HPLC αντίστροφης φάσης, μη πολικά μόρια στο διαχωριζόμενο δείγμα προσροφούνται ισχυρά στις υδρογονάνθρακικές αλυσίδες, ενώ τα πολικά μόρια κινούνται γρηγορότερα διαμέσου της χρωματογραφικής στήλης και εκλούνται πιο νωρίς από αυτή.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές αντιστρόφου φάσεως χρησιμοποιούνται ευρέως στη φαρμακευτική ανάλυση, καθώς αποτελούν φιλικές και γρήγορες τεχνικές για τον έμμεσο προσδιορισμό του συντελεστή μερισμού ή κατανομής [12].

Πιο ειδικά, οι τεχνικές αυτές ανήκουν στην κατηγορία της χρωματογραφίας κατανομής. Ο όρος χρωματογραφία κατανομής οφείλεται στο γεγονός ότι ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα διέπεται κατά κύριο λόγο από τον τρόπο που κατανέμονται οι αναλυόμενες ουσίες μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης [2].

Η ανάλυση γίνεται στη χρωματογραφική στήλη, όπου μετριέται ο χρόνος κατακράτησης (ανάσχεσης ή έκλουσης) των ουσιών t_r , δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται, ώστε μία συγκεκριμένη ουσία να «ταξιδέψει» διαμέσου της στήλης, από την είσοδο της μέχρι τον ανιχνευτή. Ο χρόνος αυτός ισούται με το χρονικό διάστημα που περνάει από τη στιγμή που το δείγμα εισάγεται με ένεση στη στήλη μέχρι τη στιγμή που εμφανίζεται το μέγιστο της κορυφής έκλουσης μίας ουσίας.

Όταν αναφερόμαστε στο χρόνο που χρειάζεται μια μη κατακρατούμενη ουσία για να διασχίσει τη στήλη ή αλλιώς στο χρόνο κατακράτησης ενός συστατικού που δεν αλληλεπιδρά καθόλου με τη στατική φάση της στήλης, ονομάζουμε το χρόνο αυτό νεκρό χρόνο (t_0).

Φαίνεται από τα παραπάνω ότι ο καθαρός χρόνος παραμονής ενός συστατικού στη στατική φάση (για ένα συστατικό που αλληλεπιδρά σε κάποιο βαθμό με αυτήν) ισούται με τη διαφορά του νεκρού χρόνου από το χρόνο κατακράτησης, δηλαδή $t_r - t_0$.

Συντελεστής κατακράτησης k ονομάζεται ο λόγος του χρόνου που παραμένει μια ουσία στη στατική φάση προς το χρόνο που αυτή παραμένει στην κινητή φάση [12]:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (3)$$

Βέβαια, στα διάφορα πειράματα και αναλύσεις αυτός που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο είναι ο λογάριθμος του συντελεστή κατακράτησης:

$$\log k = \log \left(\frac{t_r - t_0}{t_0} \right) \quad (4)$$

Έτσι τελικά, ο έμμεσος προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού ή κατανομής, που αναφέραμε παραπάνω, βασίζεται στις γραμμικές σχέσεις που παρατηρούνται ανάμεσα στον λογάριθμο του συντελεστή μερισμού στο σύστημα οκτανόλης – νερού και στη χρωματογραφική συγκράτηση, εκφρασμένη ως $\log k$ (εξισώσεις τύπου Collander):

$$\log k = a \log P + b \quad (5)$$

όπου a και b σταθερές που προκύπτουν από γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης [14].

Τρόποι με τους οποίους μπορούν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες να αξιολογηθούν

i. *Με ζωικά μοντέλα* (animal models), τα οποία όμως αποτελούν πιθανή πηγή ηθικών ζητημάτων (αφού τα ζώα χρησιμοποιούνται ουσιαστικά σαν πειραματόζωα), αλλά είναι και μία χρονοβόρα διαδικασία, η οποία δεν παρέχει καμία μηχανιστική πληροφορία σχετικά με τη φύση των βιολογικών διεργασιών.

ii. *Καλλιεργημένες κυτταρικές σειρές* (cultured cell lines): Ορισμένες κυτταροκαλλιέργειες (π.χ. αστροκύτταρα) είναι δύσκολο να αναπτυχθούν, οι πειραματικές συνθήκες δεν είναι εύκολο να τυποποιηθούν, καθώς επίσης είναι δύσκολο και να συγκριθούν τα δεδομένα που προσδιορίζονται σε διαφορετικά εργαστήρια.

iii. *Μέθοδοι in silico* (μέθοδοι που πραγματοποιούνται με τη βοήθεια υπολογιστή ή μέσω προσομοίωσης σε υπολογιστή): Το πρόβλημα είναι ότι οι μέθοδοι αυτοί έχουν αρκετούς περιορισμούς και δεν μπορούν να λάβουν υπόψη όλα τα φαινόμενα που συμβαίνουν in vivo, δηλαδή στην πραγματικότητα, μέσα σε έναν οργανισμό.

iv. *Βιομιμητική χρωματογραφία* (Biomimetic chromatography): Είναι εύκολη στη χρήση, αναπαραγωγίσιμη – επαναλήψιμη και παρέχει κατανόηση σε βάθος των μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή. Συνεπώς, θα ασχοληθούμε εκτενέστερα με αυτή παρακάτω [5].

Βιομιμητική Χρωματογραφία

Η βιομιμητική χρωματογραφία (ή βιοχρωματογραφία) αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική τεχνική, η οποία συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των χρωματογραφικών τεχνικών με κάποιον βιολογικό παράγοντα, ο οποίος ενσωματώνεται στη στατική φάση (βιομιμητική στατική φάση) [6]. Ανάλογα με τον βιολογικό παράγοντα αυτόν, που προσομοιάζει τις βιολογικές διαδικασίες, η βιομιμητική χρωματογραφία διακρίνεται στις επιμέρους μορφές:

1. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane (IAM) Chromatography)

Η επιλογή του συστήματος οκτανόλης – νερού, που χρησιμοποιούταν αρχικά για τη διαμόρφωση μιας πρότυπης κλίμακας λιποφιλίας που προσομοιάζει τις βιολογικές μεμβράνες, έχει δεχτεί πολλές κριτικές και έχει οδηγήσει σε γενικότερο σκεπτικισμό ως προς τη δυνατότητα ενός διαλύτη να αποτελέσει ρεαλιστικό μοντέλο της διπλοστιβάδας των λιπιδίων, αφού οι μεμβράνες είναι ανισοτροπικές φάσεις με τα λιπίδια να τους προσδίδουν ηλεκτρική φόρτιση και τις πρωτεΐνες που τις διαπερνούν να τους προσθέτουν πολυπλοκότητα, ενώ αντίθετα η n-οκτανόλη είναι ουδέτερη και πολύ λιγότερο πολύπλοκη [15].

Η χρωματογραφία IAM από την άλλη, χρησιμοποιώντας στατικές φάσεις που περιέχουν φωσφολιπίδια, συνδυάζει τη δυνατότητα προσομοίωσης του αμφιφιλικού περιβάλλοντος των βιολογικών μεμβρανών με τη δυνατότητα για γρήγορες και επαναλήψιμες μετρήσεις, ενώ παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα της HPLC. Μιμείται το λιπιδικό περιβάλλον της ρευστής κυτταρικής μεμβράνης, που όλοι οι άνθρωποι έχουν στον οργανισμό τους [16][17].

Η ιστορία των τεχνητών μεμβρανών ξεκίνησε το 1962 όταν ο Mueller et al. έφτιαξε τις μαύρες λιπιδικές μεμβράνες (black lipid membranes – BLM), χρησιμοποιώντας φωσφολιπίδια και διάφορους οργανικούς υδρόφοβους διαλύτες [18]. Αυτή ήταν και η πρώτη απόπειρα δημιουργίας τεχνητών μεμβρανών, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ώστε να διερευνηθεί η συμπεριφορά και η διαπερατότητα της μεμβράνης [19].

Η πρόοδος στις IAM ακολούθησε δύο κατευθύνσεις. Η πρώτη κατεύθυνση επέκτεινε το μοντέλο BLM για την παραγωγή μοντέλων με βελτιωμένες ιδιότητες και σταθερότητα και η δεύτερη κατεύθυνση εξέτασε τα πλεονεκτήματα και τις εφαρμογές των χρωματογραφικών τεχνικών και έτσι γεννήθηκε η IAM και, με μια ευρύτερη έννοια, η βιομηχανική χρωματογραφία [20][21]. Έτσι, οι προσπάθειες προσανατολίστηκαν στην παρασκευή στατικών φάσεων, που περιείχαν ακινητοποιημένα φωσφολιπίδια δεσμευμένα ομοιοπολικά ή με μη αναστρέψιμη προσρόφηση σε πυκνότητες μεμβράνης σε στερεό υπόστρωμα [19].

Οι στατικές φάσεις IAM αποτελούνται από μονοστιβάδες φωσφολιπιδίων ομοιοπολικά συνδεδεμένων στο σκελετό του πηγματος οξειδίου του πυριτίου μέσω ομάδων προπυλαμίνης.

Η πρώτη στήλη IAM αναπτύχθηκε από τον Ridgeon [16] και προοριζόταν να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό πρωτεϊνών. Βασίστηκε στη φωσφατιδυλοχολίνη (PC), το επικρατούμενο μεμβρανικό λιπίδιο, γι' αυτό και ονομάστηκε IAM.PC. Για την παρασκευή της, τα μόρια PC αντιδρούν με τις ομάδες πυριτίας-προπυλαμίνης μέσω

της ω-καρβοξυλικής τους ομάδας στην αλυσίδα C2 των λιπαρών οξέων. Ωστόσο, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, κάποιες ομάδες προπυλαμίνης παραμένουν ελεύθερες στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου, δημιουργώντας μια υπόγεια επιφάνεια IAM.PC με βασικές ιδιότητες. Βέβαια, η ύπαρξη των ογκωδών ομάδων PC προστατεύουν τις υπολειπόμενες θέσεις αμίνης, αποτρέποντας οποιαδήποτε πιθανή αλληλεπίδραση με τα πρωτεϊνικά μόρια. Συνεπώς, δεν επηρεάζουν το διαχωρισμό των πρωτεϊνών.

Μπορούν, όμως, να επηρεάσουν τη χρωματογραφική συμπεριφορά των μικρών μορίων, αυξάνοντας την κατακράτηση των όξινων ενώσεων και μειώνοντας την κατακράτηση των βασικών ενώσεων [22], ενώ μπορεί να επιδράσουν και στη σταθερότητα της δεσμευμένης φάσης (bonded phase) της IAM [23][24].

Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά, οι υπόλοιπες ομάδες προπυλαμίνης απενεργοποιούνται με “τελική κάλυψη” (end-capping) με μικρά μόρια, όπως γλυκιδόλη (2,3-εποξυ-1-προπανόλη) ή μεθυλγλυκολικό (MG).

Οι στήλες IAM.PC με τελική κάλυψη με γλυκιδόλη δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες, ενώ οι στήλες IAM.PC.MG κατασκευάζονται από την Regis. Η τελική κάλυψη του γλυκολικού μεθυλίου μετατρέπει τις υπολειμματικές αμίνες σε ουδέτερα αμίδια, αλλά εισάγει μια υδροξυλομάδα στην υπόγεια επιφάνεια [21][25].

Εφόσον οι φυσικές βιολογικές μεμβράνες δεν περιέχουν ελεύθερες υδροξυλομάδες κοντά στο κέντρο τους, αναπτύχθηκε μία νέα γενιά στατικών φάσεων IAM, χωρίς ομάδες -OH, με την τελική κάλυψη των αμινομάδων της στήλης να συμβαίνει σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, χρησιμοποιείται δεκανοϊκός ανυδρίτης, ο οποίος μετατρέπει περίπου το 85% της προσβάσιμης υπολειμματικής αμίνης σε αμιδικές ομάδες, ενώ οι εναπομένουσες ομάδες αμίνης καλύπτονται στο δεύτερο στάδιο, όπου χρησιμοποιείται προπιονικός ανυδρίτης [21].

Έχοντας ως στόχο την αύξηση της πυκνότητας των φωσφολιπιδίων, αλλά και της σταθερότητας υπό όξινες συνθήκες, μια φωσφατιδυλοχολίνη μονής-αλυσίδας συνδέθηκε στο πλέγμα πυριτίας-προπυλαμίνης [17].

Η στατική φάση που περιγράφηκε παραπάνω είναι γνωστή ως στήλη IAM.PC.DD. Το DD σημαίνει “Drug Discovery” (“Ανακάλυψη φαρμάκων”), καθώς αυτός ο τύπος στήλης σχεδιάστηκε για τη μέτρηση της διαπερατότητας του φαρμάκου μέσω μεμβράνης [22].

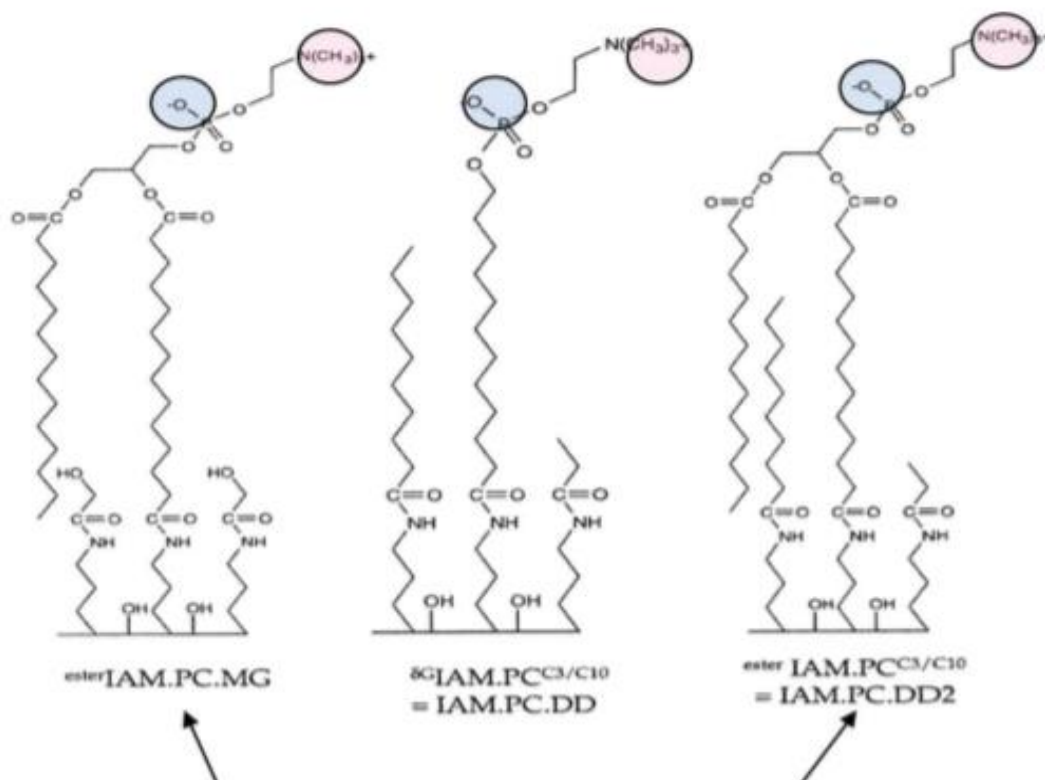
Ωστόσο, η στήλη αυτή παρουσίασε διάφορα προβλήματα, όπως η σημαντική διεύρυνση της κορυφής σε αρκετά χρωματογραφήματα και οι μειωμένοι χρόνοι κατακράτησης, ίσως ως αποτέλεσμα της απομάκρυνσης ακινητοποιημένων φωσφολιπιδίων εξαιτίας της υδατικής κινητής φάσης. Επιπρόσθετα, σε σύγκριση με την IAM.PC.MG, η κατακράτηση στην IAM.PC.DD βρέθηκε ότι δίνει σημαντικά χαμηλότερες συσχετίσεις τόσο με τους συντελεστές κατανομής οκτανόλης-νερού,

όσο και με τους παράγοντες συγκράτησης της C-18 HPLC, και με τους συντελεστές κατανομής λιποσώματος [26].

Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο στηλών είναι ότι η IAM.PC.DD στερείται της ραχοκοκαλιάς γλυκερόλης και συνεπώς και των εστερικών ομάδων που υπάρχουν στα φυσικά φωσfolιπίδια, οι οποίες συνδέουν την πολική κεφαλή με το λιπόφιλο μέρος. Βρέθηκε από τον Barbato et al. ότι ο ρόλος της γλυκερόλης στην κατακράτηση διαλυτής ουσίας είναι πολύ σημαντικός [27]. Έτσι, η απουσία των εστερικών ομάδων μπορεί να τροποποιεί τις ιδιότητες της επιφάνειας της IAM, ενώ η παρουσία μονής αλυσίδας στην IAM.PC.DD μπορεί να καταστήσει ευκολότερη την προσβασιμότητα σε υπολειμματικές ομάδες $-NH_2$ και σιλανόλης, που συνήθως υπάρχουν στις χρωματογραφικές φάσεις με βάση διοξείδιο του πυριτίου [19].

Προκειμένου να αυξηθεί τόσο η σταθερότητα όσο και η υδροφοβικότητα της στατικής φάσης της IAM, αναπτύχθηκε μια τρίτη επιφάνεια IAM.PC, σαν ένας συνδυασμός της IAM.PC.MG και της IAM. PC.DD. Παρασκευάσθηκε μια στατική φάση διπλής αλυσίδας, ενώ η τελική κάλυψη πραγματοποιήθηκε με δεκανοϊκό και προπιονικό ανυδρίτη. Αυτή η στήλη IAM νέας γενιάς διατίθεται στο εμπόριο ως IAM.PC.DD2 και είναι σήμερα η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη στατική φάση στον τομέα της ανακάλυψης φαρμάκων [22].

Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται οι τρεις στατικές φάσεις IAM με τελική κάλυψη.



Στήλες IAM με διπλή αλυσίδα

Σχήμα 1: Στήλες IAM με διπλή και μονή αλυσίδα. Με γαλάζιο και ροζ κύκλο φαίνονται τα αρνητικά και τα θετικά φορτισμένα κέντρα αντίστοιχα [19].

Ο μηχανισμός έκλουσης στη χρωματογραφία IAM έχει σχέση με την κατανομή των ουσιών μεταξύ των φάσεων και συνεπώς με τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται. Η ερευνητική ομάδα της Φαρμακευτικής Σχολής του ΕΚΠΑ [28][29] χρησιμοποίησε δύο διαφορετικά ρυθμιστικά (buffers) στην κινητή φάση (μαζί με καθαρό νερό) για να ερευνήσει την ισχύ των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ως αποτέλεσμα του βαθμού θωράκισης των φορτισμένων κέντρων στην επιφάνεια του IAM. Το πρώτο ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS), τα συστατικά του οποίου παρέχουν ένα βαθμό ηλεκτροστατικής θωράκισης, και το δεύτερο το μορφολινο-προπανοσουλφονικό οξύ (MOPS). Σε αντίθεση με το PBS, το MOPS ως αμφιτεριονικό ρυθμιστικό φάνηκε ότι δεν αλληλεπιδρά με τη στατική φάση, αφήνοντας τα φορτισμένα κέντρα εκτεθειμένα και έτσι παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της κατακράτησης στα βασικά φάρμακα, ως αποτέλεσμα των ενισχυμένων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τα φωσφορικά ανιόντα. Οι διαφορές ήταν ακόμη πιο έντονες όταν η κινητή φάση ήταν καθαρό νερό, όπου έτσι δεν υπάρχει καμία θωράκιση. Λιγότερο επηρεασμένη βρέθηκε η κατακράτηση των όξινων φαρμάκων, τα οποία με

την παρουσία του MOPS εκλούστηκαν ελαφρώς γρηγορότερα, λόγω των δυνάμεων απώθησης, που ασκούνται από τα λιγότερο θωρακισμένα φωσφορικά ανιόντα [29].

Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβανών μπορεί να προσομοιάσει διάφορα βιολογικά φαινόμενα, τα κυριότερα από τα οποία είναι:

- Η απορρόφηση από το στόμα, αφού η απορρόφηση στο γαστρεντερικό σωλήνα διέπεται από διαπερατότητα μέσω κυτταρικών μεμβρανών (διακυτταρική απορρόφηση) ή μέσω του διακυτταρικού χώρου μεταξύ κυττάρων του γαστρεντερικού βλεννογόνου (παρακυτταρική μεταφορά) [30].
- Η κατανομή στο δέρμα, μιας και η κατακράτηση στην IAM έχει μεγάλη ομοιότητα με την κατανομή του ανθρώπινου δέρματος [31], αντανακλώντας τις αλληλεπιδράσεις των διαλυμένων ουσιών με τις μεμβράνες.
- Η διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, όπως διαπιστώθηκε μετά από έρευνες [32][33][34].
- Η εκτίμηση άλλων βιολογικών και φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, όπως ο όγκος κατανομής του φαρμάκου και ο βαθμός πρόσδεσης των φαρμάκων σε πρωτεΐνες και ιστούς [35].

2. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών (Immobilized protein chromatography)

Όταν ένα φάρμακο εισέρχεται στον οργανισμό, κατανέμεται στα συστατικά του αίματος ή στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Δηλαδή το φάρμακο υπάρχει στο αίμα σε δύο μορφές: ελεύθερο και δεσμευμένο, κυρίως από πρωτεΐνες.

Η αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου μπορεί να επηρεαστεί από το βαθμό στον οποίο συνδέεται με τις πρωτεΐνες. Όσο λιγότερο δεσμευμένο είναι, δηλαδή όσο περισσότερο είναι το ελεύθερο μέρος του, τόσο πιο αποτελεσματικά μπορεί να διασχίσει τις κυτταρικές μεμβράνες ή να διαχυθεί σε διάφορα όργανα. Ανάλογα με τη συγγένεια ενός συγκεκριμένου φαρμάκου με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, ένα ποσοστό του θα προσδεθεί στις πρωτεΐνες αυτές και το υπόλοιπο θα παραμείνει ελεύθερο. Το ποσοστό αυτό εξαρτάται κυρίως από την υδροφοβικότητα, το ηλεκτρικό φορτίο, αλλά και από τη στερεοχημεία του φαρμάκου [36].

Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο αίμα (serum proteins) ευνοούν τη διαλυτότητα των φαρμάκων, αλλά επίσης παίζουν και ρόλο μεταφορικό, αφού δρουν ως φορείς του φαρμάκου στον ειδικό του στόχο. Δεδομένου ότι μόνο το ελεύθερο φάρμακο είναι ικανό να διαχυθεί στους ιστούς και στον τόπο δράσης του, να αλληλεπιδρά αποτελεσματικά με το στόχο, να παρουσιάζει φαρμακολογικά αποτελέσματα, να μεταβολίζεται και να απεκκρίνεται, η αλληλεπίδραση μεταξύ του φαρμάκου και του

φορέα (πρωτεΐνης) θα πρέπει να είναι αρκετά ισχυρή ώστε να διευκολύνει τη μεταφορά αλλά και αρκετά αδύναμη ώστε να απελευθερώσει το φάρμακο στο στόχο [37][38][39]. Ως εκ τούτου, οι δεσμοί που συμμετέχουν στην πρωτεϊνική σύνδεση είναι χαλαροί (όχι ομοιοπολικό), όπως για παράδειγμα Van der Waal's, δεσμοί υδρογόνου, ιονικοί, υδρόφοβοι.

Η έκταση της δέσμευσης πρωτεΐνης-φαρμάκου μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους, όπως το ποσοστό κάθαρσης (clearance rate) και ο όγκος της κατανομής (volume of distribution) [40]. Όγκος κατανομής ονομάζεται ο φαινομενικός όγκος στον οποίο κατανέμεται ένα φάρμακο στον οργανισμό, δηλαδή η συνολική ποσότητα του φαρμάκου στον οργανισμό προς τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα [40].

Το ανθρώπινο πλάσμα περιέχει περισσότερες από 60 διαφορετικές πρωτεΐνες, η πιο σημαντική από τις οποίες είναι η ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού ή ανθρώπινη λευκωματίνη ή αλβουμίνη (Human Serum Albumin, HSA), ακολουθούμενη από την α 1- όξινη γλυκοπρωτεΐνη (Alpha-1-acid glycoprotein, AGP) [6]. Άλλες πρωτεΐνες του αίματος στις οποίες συνήθως προσδένονται τα φάρμακα είναι η λιποπρωτεΐνη, η α 2-όξινη πρωτεΐνη (AAG) και οι α , β και γ σφαιρίνες.

Η αλβουμίνη είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 66300 που συντίθεται στο ήπαρ και έχει χρόνο ημιζωής δεκαεννιά ημέρες. Αποτελεί το 60% της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης του πλάσματος και παρουσιάζει τη δυνατότητα να δεσμεύει τόσο ανιοντικά όσο και κατιοντικά φάρμακα. Είναι υδατοδιαλυτή και εμφανίζει ισοηλεκτρικό σημείο σε $pH=4.8$, επομένως στο φυσιολογικό pH του πλάσματος είναι αρνητικά φορτισμένη και τα όξινα φάρμακα, που κυρίως δεσμεύει, δεσμεύονται στο αμινο-τελικό της άκρο [42].

Η α 1- όξινη γλυκοπρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 40000 και εμφανίζει όξινο χαρακτήρα, αφού έχει $pK_a=2.6$ και χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο (σε $pH=2.7$) [6]. Λόγω αυτού, δεσμεύει κυρίως βασικά ή ουδέτερα φάρμακα.

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η εκτίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων στο πλάσμα είναι πολύ σημαντική για την εκτίμηση της απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της απέκκρισης, των ιδιοτήτων ADME δηλαδή, και γενικά ολόκληρου του φαρμακοκινητικού προφίλ των υποψήφιων φαρμάκων [43].

Έτσι, για τον προσδιορισμό του ποσοστού δέσμευσης του φαρμάκου από τις πρωτεΐνες, μια ποικιλία χρωματογραφικών προσεγγίσεων έχουν χρησιμοποιηθεί, αφού οι μέθοδοι αυτές συνδυάζουν φιλικότητα και ταχύτητα με μεγαλύτερη ακρίβεια, και είναι ιδιαιτέρως χρήσιμες σε ότι αφορά την κατάταξη των ενώσεων, κυρίως σε περιοχές υψηλής πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Πολύ σημαντική είναι η ανάπτυξη στατικών φάσεων HPLC, οι οποίες περιέχουν πρωτεΐνες του πλάσματος χημικά ακινητοποιημένες σε ένα σκελετό πήγματος διοξειδίου του πυριτίου. Οι πρωτεΐνες που κυρίως ακινητοποιούνται είναι η ανθρώπινη λευκωματίνη και η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη. Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των πρωτεϊνών, δηλαδή της στατικής φάσης, και των ουσιών προς ανάλυση είναι ιοντικοί δεσμοί, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου. Οι βασικές ενώσεις αναπτύσσουν ιοντικούς δεσμούς, ενώ οι όξινες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου. Ανάλογα με το εύρος αυτών των δεσμών, η συγκράτηση των ενώσεων στη στατική φάση μπορεί να είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη [6][1].

3. Μικυλλιακή χρωματογραφία βιοκατανομής (Biopartitioning Micellar Chromatography, BMC)

Μικύλλιο

Το μικύλλιο είναι ένα σωματίδιο που σχηματίζεται συνήθως στο νερό από τη σύζευξη μορίων ή ιόντων, τα οποία έχουν ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο άκρο [44]. Το υδρόφοβο άκρο αποτελείται από μία ανθρακική αλυσίδα μεγάλου σχετικά μήκους και το υδρόφιλο συνήθως από μια πολική ομάδα. Λόγω της παρουσίας του υδρόφιλου και του υδρόφοβου τμήματος στο μόριο των ουσιών αυτών, οι ουσίες καλούνται αμφίφιλες [45].

Όταν τα αμφίφιλα μόρια αυτά βρεθούν σε υδατικά διαλύματα, έχουν την τάση να οργανώνονται ώστε να συνωστίζονται τις υδρόφοβες ανθρακικές αλυσίδες (ουρές) στο εσωτερικό των σφαιριδίων, στο κέντρο δηλαδή (και συνεπώς μακριά από το νερό), και τις πολικές ομάδες (κεφαλές) προς τα έξω ώστε ως υδρόφιλες, να είναι σε επαφή με το νερό. Οργανώνονται, έτσι, σε σφαιρικές δομές με έναν υδρόφοβο πυρήνα εσωτερικά και μία υδρόφιλη επιφάνεια εξωτερικά, και ονομάζονται αμφίφιλα συσσωματώματα ή αλλιώς μικύλλια κανονικής φάσης. Στο σχηματισμό των μικυλλίων οφείλεται και η απορρυπαντική δράση των σαπουνιών και άλλων υλικών [46].

Μια από τις σημαντικότερες φυσικές ιδιότητες του νερού είναι η μεγάλη επιφανειακή του τάση, ένα μέγεθος που εκφράζει την διάταξη των μορίων ενός υγρού ώστε να αντιστέκονται σε ένα εξωτερικό περιβάλλον, για παράδειγμα τον ατμοσφαιρικό αέρα, ή μια εξωτερική δύναμη. Είναι ο λόγος που ωθεί μια ομάδα μορίων νερού να οργανωθούν σε σφαιρική σταγόνα όταν βρίσκονται στον αέρα, αφού τα πολικά μόρια αυτά μαζεύονται σε μια διάταξη που εξασφαλίζει ότι έχουν τη μικρότερη δυνατή επιφάνεια επαφής με τον αέρα (ο οποίος αποτελείται από μη πολικά μόρια). Η επιφανειακή τάση συνεπώς είναι το μέγεθος που περιγράφει τη

συγκρότηση ενός δικτύου μορίων νερού κάτω από την επίδραση των δυνάμεων δεσμού υδρογόνου με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας σφαιρικής σταγόνας [46].

Η παρουσία αμφίφιλων ουσιών στο νερό οδηγεί σε μείωση της επιφανειακής τάσης, λόγω εξασθένησης των δυνάμεων μεταξύ των μορίων του διαλύτη. Τα μόρια αυτά, καθώς προστίθενται στο νερό, κατευθύνονται προς την επιφάνεια και προσανατολίζονται με το υδρόφιλο μέρος στο νερό, ενώ η υδρόφοβη αλυσίδα διαφεύγει προς την αέρια φάση, έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αυξημένης συγκέντρωσης στην επιφάνεια, η οποία ονομάζεται επιφανειακή ενεργότητα [45].

Ως εκ τούτου, για την περίπτωση μιας ποσότητας νερού και μιας λιπαρής ουσίας, όπως ένας ρύπος, τα μόρια του νερού αναγκάζονται να αποκτήσουν μια οργανωτική δομή που να μην αποφεύγει το λιπαρό περιβάλλον.

Με άλλα λόγια, οι αμφίφιλες ουσίες λειτουργούν ως «συνδετικός κρίκος» που εξασφαλίζουν καλύτερη επαφή μεταξύ αυτών των δύο (του νερού και της λιπαρής ουσίας).

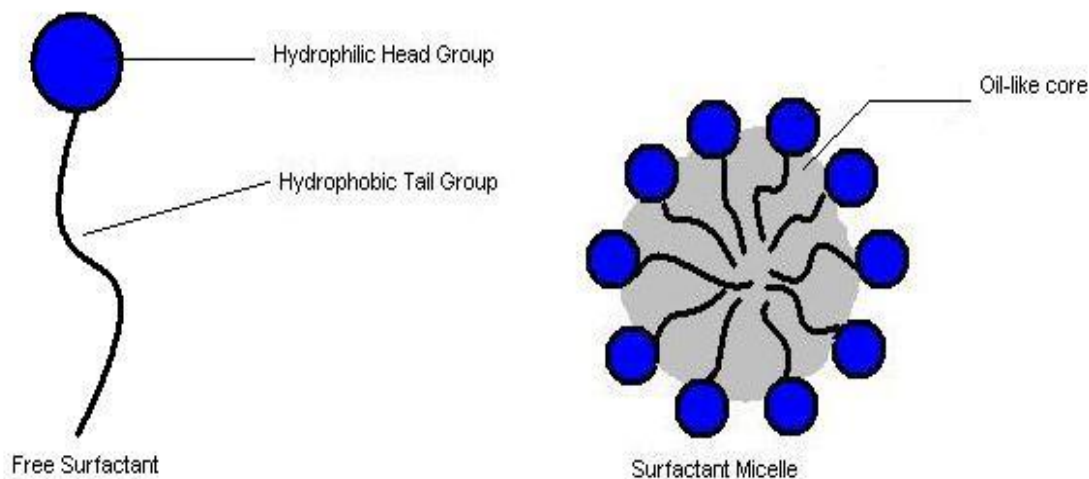
Τα αμφίφιλα μόρια και γενικά όλα τα υλικά που σχηματίζουν μικύλλια σε υδατικό περιβάλλον καλούνται επιφανειοδραστικά ή αλλιώς τασιενεργά υλικά, επειδή μεταβάλλουν την επιφανειακή τάση του νερού [46].

Ουσιαστικά τα μικύλλια προέρχονται από το σχηματισμό συσσωματωμάτων από τα μόρια μιας επιφανειοδραστικής (τασιενεργής) ουσίας, όταν η ουσία αυτή βρίσκεται σε συγκέντρωση πάνω από την κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλιοποίησης (critical micellar concentration, CMC), δηλαδή όταν $C_{\text{τασιεν}} > \text{CMC}$ [45].

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις του τασιενεργού σε ένα μέσο, τα αμφίφιλα μόρια υπάρχουν χωριστά και είναι πολύ μικρά. Κάτω από την CMC, η συγκέντρωση των αμφίφιλων που υφίστανται προσρόφηση στη διεπιφάνεια νερού-αέρα αυξάνεται καθώς η συνολική συγκέντρωση των αμφίφιλων αυξάνεται. Τελικά όταν η συγκέντρωσή τους φτάσει στη CMC, η διεπιφάνεια καθώς και η κινητή φάση είναι κορεσμένες σε μονομερή.

Οποιοδήποτε αμφίφιλο μόριο προστίθεται περαιτέρω, έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση μονομερών στην κινητή φάση, έτσι ώστε να μειώνεται η ελεύθερη ενέργεια του συστήματος, και τελικά το σχηματισμό των μικυλλίων [47][48].

Τα μικύλλια γενικά σχηματίζονται από 50-200 μονομερή τασιενεργού [49].



Σχήμα 2: Ελεύθερα μόρια επιφανειοδραστικών ουσιών (free surfactant) και μικύλλια που σχηματίζονται από αυτά (surfactant micelle) [45].

Μικυλλιακή χρωματογραφία

Η μικυλλιακή χρωματογραφία είναι ένα είδος χρωματογραφίας βιοκατανομής, που χρησιμοποιεί στήλη αντιστρόφου φάσεως C18 και μία κινητή φάση που αποτελείται από ένα διάλυμα επιφανειοδραστικής ουσίας. Η ουσία αυτή βρίσκεται σε συγκέντρωση πάνω από την κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλιοποίησης και έτσι σχηματίζονται μικύλλια. Τελικά, στην κινητή φάση υπάρχουν τόσο ελεύθερα μόρια (μονομερή) του τασιενεργού, όσο και μικύλλια.

Τα μικύλλια είναι δυναμικές δομές που βρίσκονται σε συνεχή ισορροπία με τα ελεύθερα μονομερή, τα οποία ανταλλάσσονται συνεχώς μεταξύ των μικυλλίων και του διαλύματος που υπάρχει ανάμεσα στα μικύλλια. Λόγω αυτής της συνεχούς κίνησης των μορίων ή του φαινομένου ανταλλαγής, τα επιφανειοδραστικά μόρια παραμένουν στη μορφή μικυλλίων για ορισμένο χρόνο, που ονομάζεται χρόνος παραμονής επιφανειοδραστικού [47].

Η στατική φάση (στήλη) αποτελείται από οξείδιο του πυριτίου και προσδεδεμένες μακριές αλυσίδες υδρογονάνθρακα. Οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες είναι υδρόφοβες και έτσι τα μονομερή του τασιενεργού πλησιάζουν και προσροφούνται από αυτές, από το υδρόφοβο τμήμα τους με υδρόφοβους δεσμούς, αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί, όλα τα υδρόφοβα άκρα επιθυμούν να έρχονται σε επαφή μεταξύ τους. Το υδρόφιλο τμήμα των μονομερών βρίσκεται προς την πλευρά της κινητής φάσης. Σαν αποτέλεσμα του φαινομένου αυτού, η στήλη είναι πλέον τροποποιημένη.

Όταν ένα φάρμακο (που αποτελεί τη διαλυμένη ουσία) εισέρχεται στην κινητή φάση, κάθε μόριο αυτού μπορεί να μετακινηθεί και να εισέλθει σε διάφορες περιοχές.

Είναι ευρέως γνωστό ότι «τα όμοια διαλύουν όμοια». Δηλαδή οι υδρόφιλες ομάδες διαλύονται από υδρόφιλα μόρια, ενώ οι υδρόφοβες από υδρόφοβα.

Αν το φάρμακο έχει υψηλή υδατοδιαλυτότητα, εάν δηλαδή έχει αρκετές πολικές ομάδες, μικρή αλυσίδα υδρογονανθράκων και επικρατεί κυρίως το υδρόφιλο τμήμα του, τότε παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με το νερό και για αυτό πάει κυρίως στην κινητή φάση και μεταφέρεται μαζί της προς την έξοδο της στήλης. Συνεπώς, βγαίνει σχετικά γρήγορα από τη στήλη (παρουσιάζει μικρό χρόνο έκλουσης).

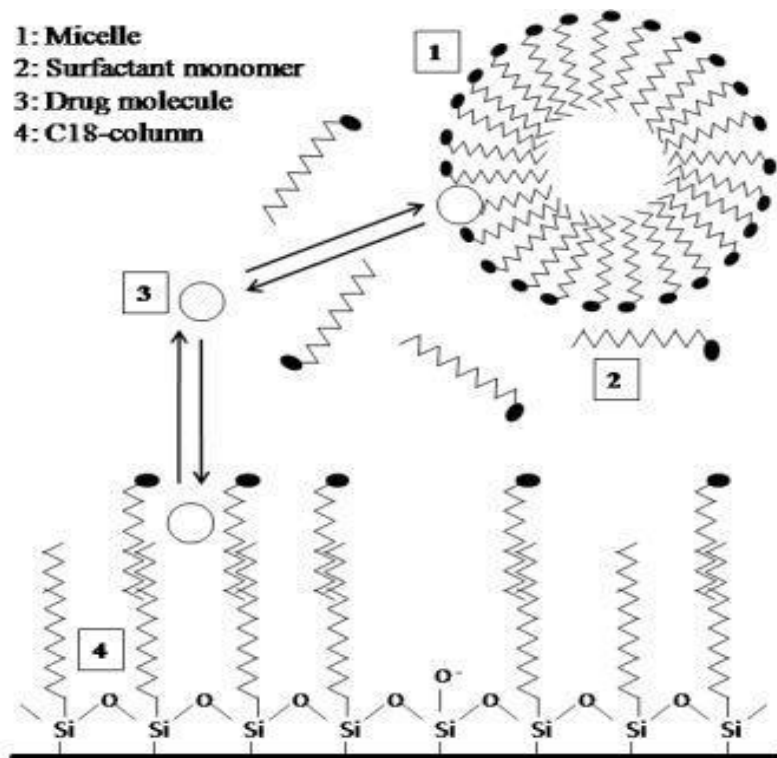
Αντίθετα, τα περισσότερα από τα φάρμακα με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, δηλαδή αυτά που είτε δεν έχουν πολικές ομάδες ή οι πολικές ομάδες τους είναι λίγες, αλλά έχουν μια μεγάλη υδρογονανθρακική αλυσίδα, έχουν διαφορετική συμπεριφορά, αφού επικρατεί κατά βάση το υδρόφοβο μέρος τους. Δεν συγγενεύουν ιδιαίτερα με την υδατική κινητή φάση, ενώ μπορούν εύκολα να εισέλθουν και να ενσωματωθούν στο εσωτερικό των μικυλλίων (που αποτελεί υδρόφοβη περιοχή) με υδρόφοβους δεσμούς, έτσι ώστε να ξεπεράσουν προβλήματα διαλυτότητας. Εκτός από το εσωτερικό των μικυλλίων, έχουν την τάση να προσροφούνται επίσης και από την τροποποιημένη στατική φάση με υδρόφοβους δεσμούς, στο σημείο όπου συνδέονται οι υδρογονανθρακικές ουρές (με 18 άτομα άνθρακα) της στήλης με αυτές των επιφανειοδραστικών μονομερών, δηλαδή στο υδρόφοβο μέρος. Τα μόρια του φαρμάκου βρίσκονται σε μια δυναμική ισορροπία μεταξύ αυτών των περιοχών και μετακινούνται διαρκώς από τη μία στην άλλη. Το γεγονός αυτό προκαλεί μια μεγαλύτερη κατακράτηση τους και μια καθυστέρηση στην έξοδο τους από τη στήλη, σε σύγκριση με τα υδρόφιλα φάρμακα.

Συνεπώς, ο μηχανισμός κατανομής περιλαμβάνει δύο ισορροπίες:

1^η ισορροπία: μεταξύ του φαρμάκου που υπάρχει στην κυρίως κινητή φάση (νερό) και αυτού που υπάρχει στα μικύλλια της κινητής φάσης.

2^η ισορροπία: μεταξύ του φαρμάκου που υπάρχει στην κινητή φάση και αυτού που υπάρχει στην τροποποιημένη (με μονομερή του επιφανειοδραστικού) στήλη.

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται αυτός ο μηχανισμός και οι δύο ισορροπίες και παραστατικά.



Σχήμα 3: Οι δύο ισορροπίες στις οποίες συμμετέχει ένα μόριο φαρμάκου [5].

Ο μηχανισμός που περιγράφηκε παραπάνω ισχύει για όλες τις κατηγορίες τασιενεργών.

Τα τασιενεργά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι:

- ανιοντικό π.χ. δωδέκυλο-θειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS),
- κατιοντικό π.χ. βρωμιούχο άλας του δεκαεξυλο-τριμεθυλαμμώνιου (hexadecyl-trimethylammonium bromide ή αλλιώς cetrimonium bromide, CTAB),
- μη ιοντικό (π.χ. Brij),
- αμφοτερικό.

Στην περίπτωση που το τασιενεργό που χρησιμοποιείται είναι μη ιοντικό (πχ. Brij που χρησιμοποιήσαμε και εμείς στο πείραμά μας), δηλαδή δεν έχει φορτισμένες ομάδες, η επιφάνεια της στατικής φάσης είναι ουδέτερη. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι δεν λαμβάνουν χώρα ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

Στην περίπτωση, όμως, που το τασιενεργό είναι ανιοντικό, κατιοντικό ή αμφοτερικό, λόγω της εμφάνισης αρνητικού, θετικού ή ταυτόχρονα θετικού και αρνητικού φορτίου (σε διαφορετικές περιοχές), αναπτύσσονται επιπλέον και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

Συγκεκριμένα, όταν το τασιενεργό είναι ανιοντικό, με την προσρόφηση του στη στατική φάση, μετατρέπει την επιφάνεια αυτής σε αρνητικά φορτισμένη και κατά

την εισαγωγή πρωτονιωμένων βασικών (BH^+) φαρμάκων στο χρωματογράφο, αυτές έλκονται με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις από τη στατική φάση και διατηρούνται για κάποιο χρονικό διάστημα σε αυτή. Απόρροια αυτού είναι η αύξηση του χρόνου κατακράτησης τους από την στήλη, σε σύγκριση την χρήση μη ιοντικού επιφανειοδραστικού. Τα ιονισμένα όξινα φάρμακα (A^-) εμφανίζουν ηλεκτροστατικές απώσεις.

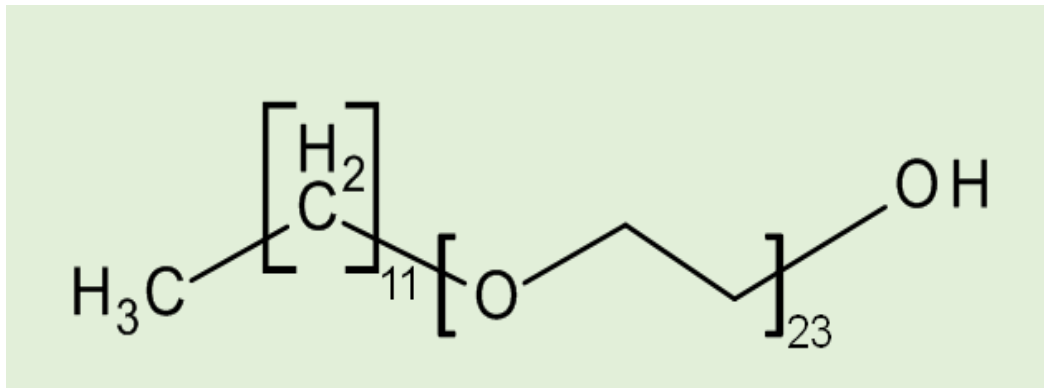
Το αντίθετο συμβαίνει όταν το τασιενεργό είναι κατιοντικό, όπου η επιφάνεια της στατικής φάσης μετατρέπεται σε θετικά φορτισμένη και τα ιονισμένα όξινα φάρμακα (A^-) συνδέονται σε αυτή λόγω των ηλεκτροστατικών έλξεων. Τα πρωτονιωμένα βασικά φάρμακα (BH^+) αντίθετα παρουσιάζουν ηλεκτροστατικές απώσεις.

Τέλος, όταν ένα αμφοτερικό τασιενεργό εισέρχεται στο χρωματογράφο, η στατική φάση καταλήγει να είναι θετικά φορτισμένη σε κάποια σημεία της και αρνητικά φορτισμένη σε κάποια άλλα, εξαιτίας του γεγονότος ότι το αμφοτερικό επιφανειοδραστικό περιλαμβάνει τόσο κατιοντικά όσο και ανιοντικά κέντρα. Συνέπεια του φαινομένου αυτού είναι η δυνατότητα τόσο όξινων όσο και βασικών φαρμάκων να έλκονται από τη στατική φάση και να παραμένουν συνδεδεμένα σε αυτή για ορισμένο χρονικό διάστημα. Σε κάθε περίπτωση, ο μηχανισμός κατακράτησης/έκλυσης των ιονισμένων φαρμάκων είναι περισσότερο πολύπλοκος σε σχέση με τους προηγούμενους.

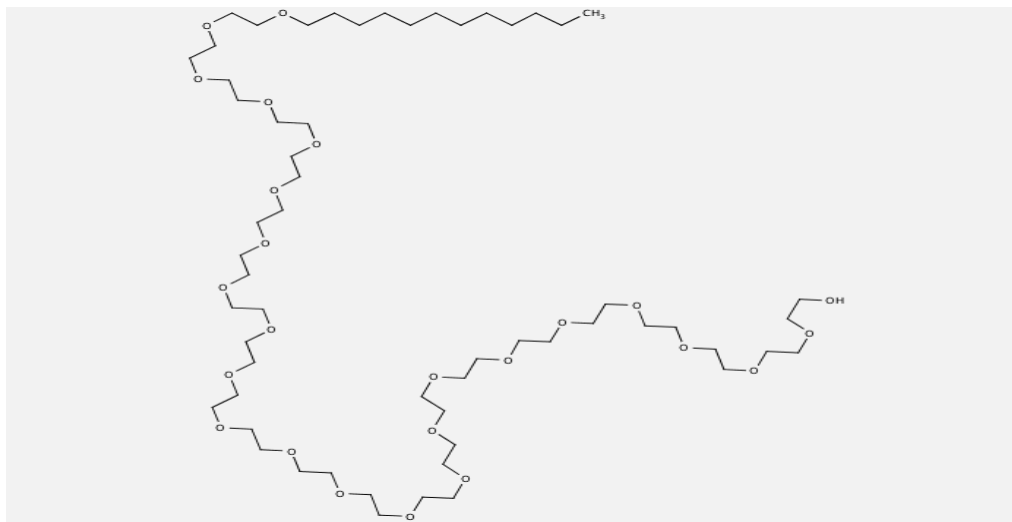
Είδη τασιενεργών

Στα μη ιοντικά τασιενεργά η πολική ομάδα δεν φέρει φορτίο. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα της κατηγορίας αυτής είναι τα τασιενεργά Brij. Η δομή τους γενικά αποτελείται από μια υδρόφοβη υδρογονανθρακική αλυσίδα, με διαφορετικά άτομα άνθρακα κάθε φορά ανάλογα με την κατηγορία του Brij (πχ. lauryl, stearyl, cetyl) και από ένα υδρόφιλο τμήμα, που απαρτίζεται από ένα πολυοξυαιθυλένιο (πολυαιθέρα), το οποίο συνδέεται τελικά με ένα άτομο υδροξυλίου.

Το πιο γνωστό θεωρείται το Brij-35: πολυοξυαιθυλένιο (23) λαουρυλο-αιθέρας (polyoxyethylene 23 laurylether), το οποίο απεικονίζεται παρακάτω σε δύο διαφορετικές μορφές.



Σχήμα 4: Brij-35

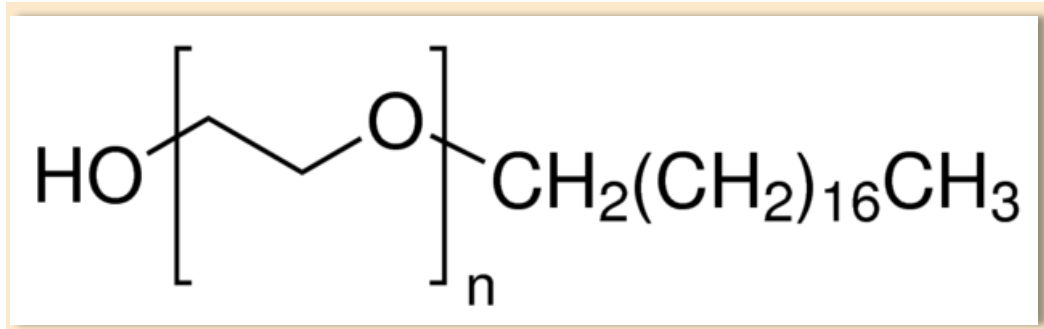


Σχήμα 5: Brij-35 σε άλλη μορφή.

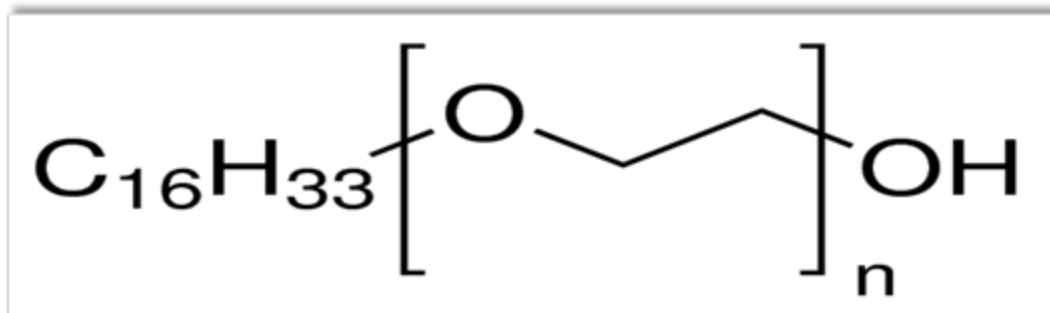
Άλλες κατηγορίες τασιενεργών Brij είναι τα Brij Sn, όπου το S υποδηλώνει τον όρο "stearyl" και το Brij Cn, όπου το C υποδηλώνει τον όρο "cetyl".

Ανάλογα με την τιμή του n, έχουμε και διαφορετικό Brij.

Δηλαδή, όταν για παράδειγμα $n \sim 2$, τότε έχουμε το Brij S2 (Polyoxyethylene (2) stearyl ether), ενώ όταν $n \sim 100$, τότε έχουμε το Brij S100 (Polyoxyethylene (100) stearyl ether).

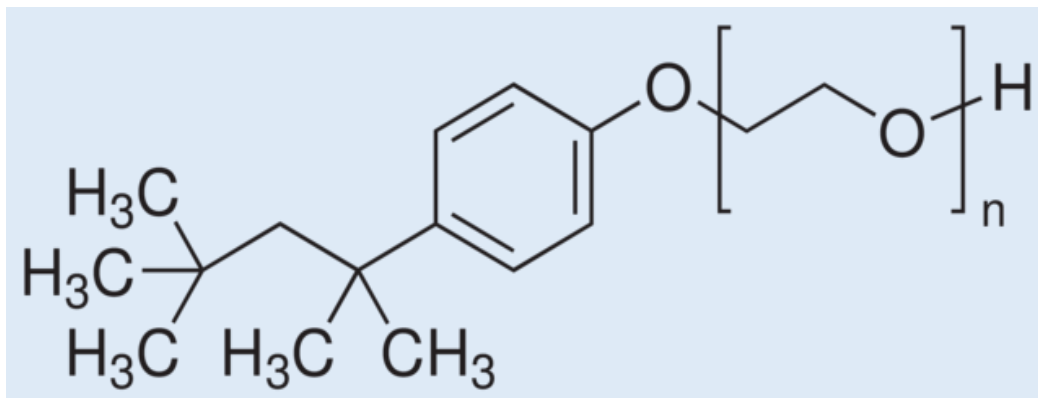


Σχήμα 6: Brij S2 (Polyethylene glycol octadecyl ether, Polyoxyethylene (2) stearyl ether)



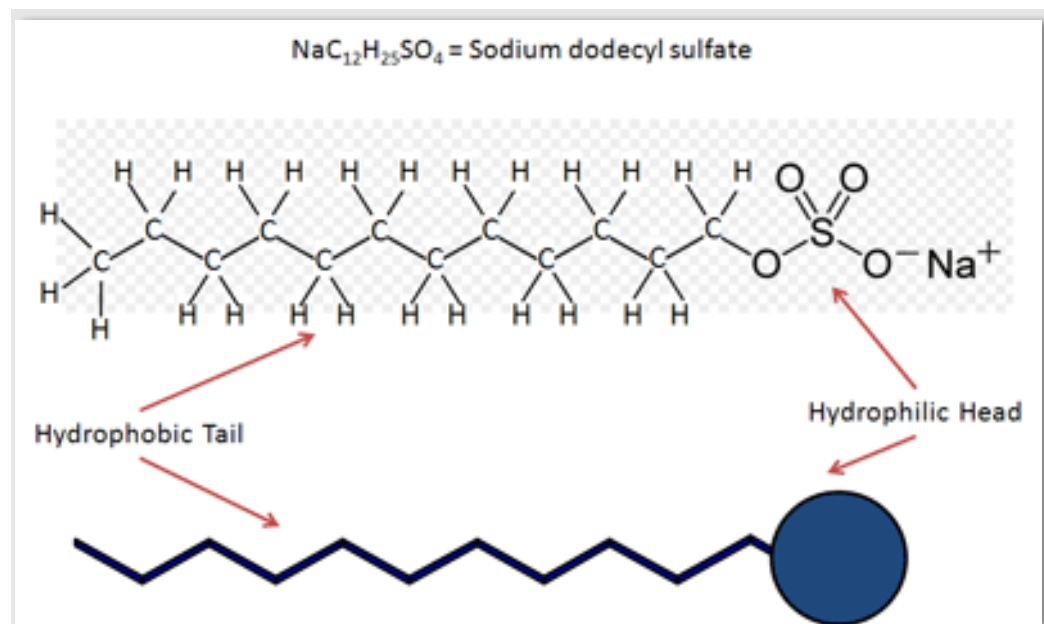
Σχήμα 7: Brij C10 (Polyethylene glycol hexadecyl ether, Polyoxyethylene (10) cetyl ether)

Ένα άλλο παράδειγμα μη ιοντικών τασιενεργών είναι τα τασιενεργά της σειράς Triton, στα οποία μια αλυσίδα πολυαιθυλενοξειδίου παίζει το ρόλο της υδρόφιλης-πολικής ομάδας και ένας αρωματικός υδρογονάνθρακας το ρόλο της υδρόφοβης ομάδας.



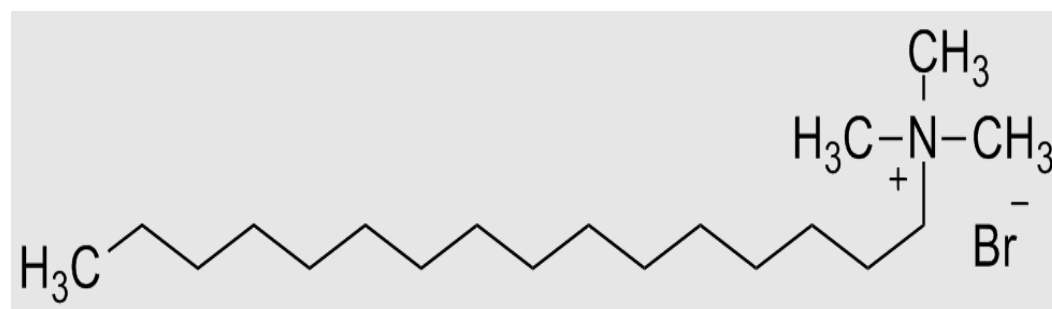
Σχήμα 8: Triton X-100

Από την κατηγορία των ανιοντικών τασιενεργών, το πιο γνωστό είναι το SDS (sodium dodecyl sulfate), η δομή του οποίου απεικονίζεται παρακάτω.



Σχήμα 9: Sodium dodecyl sulfate, SDS

Τέλος, το πιο γνωστό κατιοντικό τασιενεργό είναι το CTAB (Hexadecyl-trimethylammonium bromide), το οποίο φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα 10.



Σχήμα 10: Hexadecyl-trimethylammonium bromide, CTAB

Επομένως, υπάρχει η δυνατότητα να συμβούν πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί σε ένα χρωματογραφικό σύστημα και αυτό οδηγεί στο να επιτευχθεί διαφορετικός σκοπός κάθε φορά. Ο συνδυασμός αυτός συνίσταται στην διαφορετική χρωματογραφική στήλη, στο διαφορετικό τασιενεργό ή ακόμα και σε μείγματα τασιενεργών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Έναν επιπρόσθετο ρόλο παίζει και η συγκέντρωση του τασιενεργού, η οποία σε κάθε περίπτωση είναι πάνω από την κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλιοποίησης. Μια αύξηση της συγκέντρωσής του

σημαίνει αύξηση της συγκέντρωσης των μικυλλίων στην κινητή φάση και συνεπώς γρηγορότερη έκλυση του φαρμάκου.

Εφαρμογές

Η μικυλλιακή χρωματογραφία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη ως ένα “in vitro” σύστημα, το οποίο μπορεί να περιγράψει πολύ καλά τη βιοφαρμακευτική συμπεριφορά διαφόρων φαρμάκων.

Κατά καιρούς έχουν γίνει διάφορες έρευνες και πειράματα, μέσα από τα οποία έχει καταφέρει επιτυχώς να μιμηθεί πολλές βιολογικές διεργασίες και να προβλέψει διάφορες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, όπως:

α) *Η διαπερατότητα του δέρματος.* Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης των σταθερών διαπερατότητας μέσω του δέρματος, η οποία βασίζεται στην χρωματογραφική συγκράτηση μέσω της BMC σε συνδυασμό με τα σημεία τήξης για ένα ετερογενές σύνολο 43 ενώσεων [50].

β) *Η απορρόφηση από το στόμα - εντερική απορρόφηση.* Είναι γνωστό πως οι κύριοι φραγμοί στην απορρόφηση φαρμάκων από το στόμα είναι οι ρευστές κυτταρικές μεμβράνες και πως γενικά τα φάρμακα απορροφώνται κυρίως μέσω ενός παθητικού μηχανισμού διάχυσης. Η BMC χρησιμοποιείται παρουσία NaCl ώστε να μιμείται την ωσμωτικότητα των εξωκυττάρων υγρών. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η ανάπτυξη ενός υπερβολικού μοντέλου πρόβλεψης απορρόφησης από το στόμα, το οποίο βασίζεται σε 74 φάρμακα που απορροφώνται μέσω παθητικής διάχυσης [51].

γ) *Η διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό,* ο οποίος αποτελεί τον κύριο φραγμό για τη μεταφορά των φαρμάκων στο κεντρικό νευρικό σύστημα – ΚΝΣ. Η ίδια ερευνητική ομάδα με παραπάνω χρησιμοποίησε 44 φάρμακα ποικίλης δομής και ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένων κατιοντικών, ανιοντικών και ουδέτερων ενώσεων, και πρότεινε ένα μοντέλο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (MLR) που συνδέει τα δεδομένα των συντελεστών κατανομής εγκεφάλου/αίματος (BB) με τα δεδομένα κατακράτησης της BMC και με το συνολικό γραμμομοριακό φορτίο [52].

δ) *Η πρωτεϊνική σύνδεση,* μέσω της χρήσης ορισμένων τασιενεργών, τα οποία μπορούν να προσομοιάσουν κάποιες πρωτεΐνες. Έχει βρεθεί ότι η χρήση του SDS ως ανιοντικό τασιενεργό οδηγεί στο σχηματισμό μιας βιομιμητικής πρωτεΐνης παρόμοιας με την AGP και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μιμηθεί τόσο τις ιοντικές όσο και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης αυτής με βασικά φάρμακα. Αντίστοιχα, η χρήση του CTAB ως κατιοντικό τασιενεργό οδηγεί στο σχηματισμό μιας βιομιμητικής πρωτεΐνης παρόμοιας με την HSA και μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για να μιμηθεί τόσο τις ιοντικές όσο και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της HSA με όξινα φάρμακα. Σε δύο διαφορετικές έρευνες μελετήθηκαν οι σχέσεις μεταξύ των δεδομένων κατακράτησης της BMC ενός ετερογενούς συνόλου 14 βασικών και ουδέτερων φαρμάκων στην πρώτη [53] και 17 όξινων και ουδέτερων φαρμάκων στη δεύτερη [43] και της παραμέτρου δέσμευσης της πρωτεΐνης του πλάσματος, και λήφθηκαν πολυωνυμικά μοντέλα δεύτερης τάξης σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.07 και 0.09 M) SDS και CTAB, αντίστοιχα. Τα μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (MLR) που αναπτύχθηκαν χαρακτηρίστηκαν τόσο από περιγραφική όσο και από προγνωστική ικανότητα και πιο συγκεκριμένα εμφάνισαν $R^2=0.882$ και $R^2=0.840$ για 0.07 και 0.09 M SDS, αντίστοιχα, η πρώτη έρευνα και $R^2=0.885$ και $R^2=0.898$ για 0.07 και 0.09 M CTAB, αντίστοιχα, η δεύτερη έρευνα.

ε) *Η πρόβλεψη οικοτοξικότητας* (π.χ. τιμές LD_{50} , LC_{50}). Η BMC έχει χρησιμοποιηθεί και για την πρόβλεψη οικοτοξικολογικών δεικτών. Ως παράδειγμα, αναφέρεται μελέτη κατακράτησης 66 οργανικών ρυπαντών και αρκετών παραμέτρων οικοτοξικότητας (LC_{50} στα ψάρια και τα δάφνια, EC_{50} στα πράσινα φύκια και τα δάφνια, τιμές χρόνιας τοξικότητας στα ψάρια και τα πράσινα φύκια και παράγοντας βιοσυγκέντρωσης στα ψάρια). Σε όλες τις περιπτώσεις αναπτύχθηκαν πολυωνυμικά μοντέλα με ικανοποιητικούς συντελεστές συσχέτισης ($0.90 < R^2 < 0.96$), εκτός από το μοντέλο που αφορούσε τον παράγοντα βιοσυγκέντρωσης στα ψάρια, το οποίο έδωσε $R^2=0.78$ [54].

Τα πλεονεκτήματα της μικυλλιακής χρωματογραφίας εκτός του ότι μπορεί να παρέχει βασικές πληροφορίες σχετικά με τη βιολογική συμπεριφορά πολλών ειδών φαρμάκων, όπως αναπτύχθηκε και παραπάνω, είναι ότι η προετοιμασία του χρωματογραφικού συστήματος είναι απλή, γρήγορη και οικονομική, καθώς και ότι η αναπαραγωγιμότητα των δεδομένων κατακράτησης εντός της ίδιας ημέρας αλλά και μεταξύ των ημερών είναι πολύ υψηλή.

Σαν συμπέρασμα όλων όσων αναφέρθηκαν παραπάνω, η μικυλλιακή χρωματογραφία είναι πολύ χρήσιμη στη φαρμακευτική χημεία και έρευνα και αποτελεί τη μέθοδο με την οποία ασχοληθήκαμε στο πείραμά μας, ώστε να καταλήξουμε σε ορισμένα χρήσιμα αποτελέσματα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας

Σκοπός:

Η αξιολόγηση της μικυλλιακής χρωματογραφίας παρουσία τασιενεργού Brij ως εργαλείο εκτίμησης φαρμακοκινητικών μεγεθών, αλλά και η ταυτόχρονη μελέτη του μηχανισμού έκλυσης και η σύγκρισή του με το μηχανισμό έκλυσης από βιομιμητικές στήλες ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM).

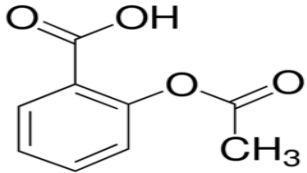
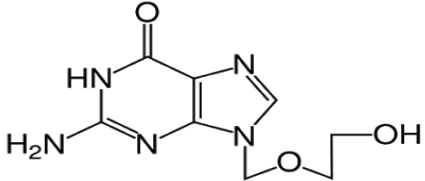
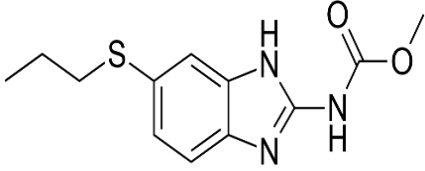
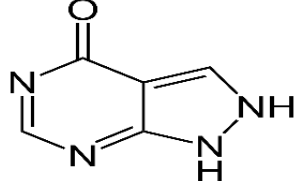

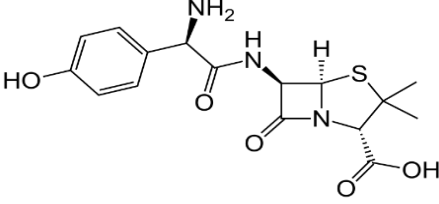
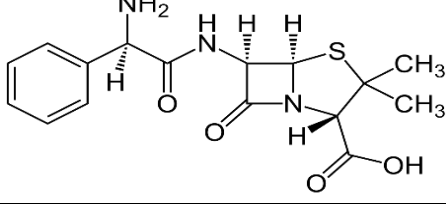
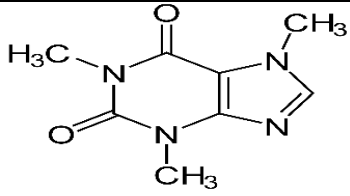
Μεθοδολογία:

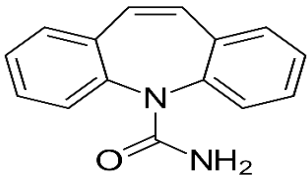
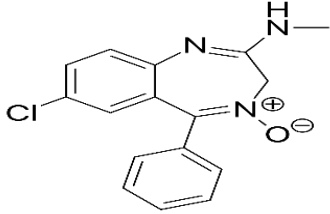
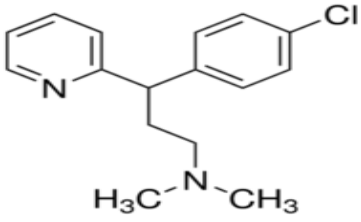
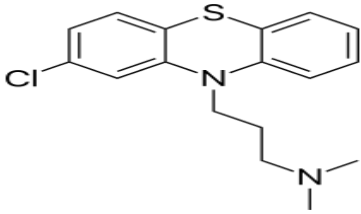
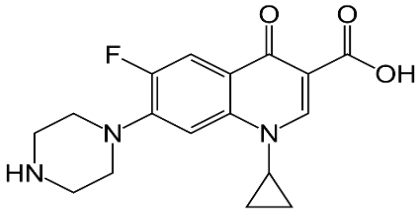
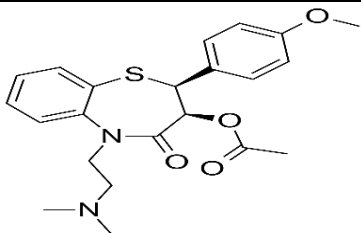
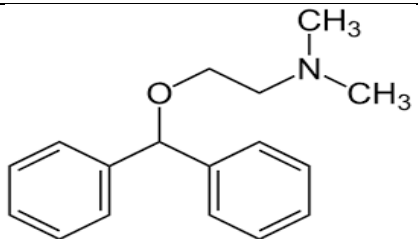
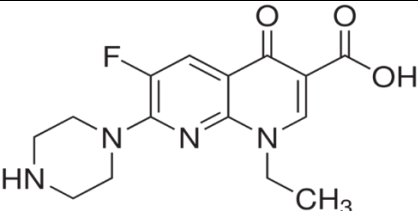
α) *Ως προς τα φάρμακα επιλογής:* Χρήση ενός ικανού αριθμού φαρμάκων (στην συγκεκριμένη εργασία 50) ποικίλης δομής (οξέα, βάσεις, αμφολύτες, ουδέτερα) και φαρμακολογικής δράσης (π.χ. αντιφλεγμονώδη, αντιβιοτικά, καρδιολογικά, φάρμακα ΚΝΣ) για τα οποία υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων.

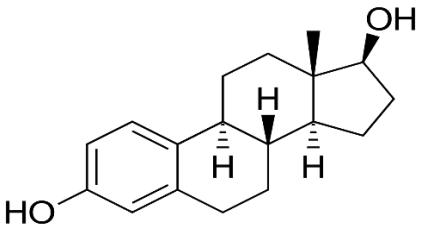
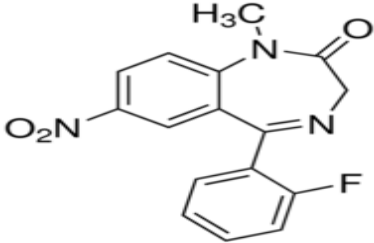
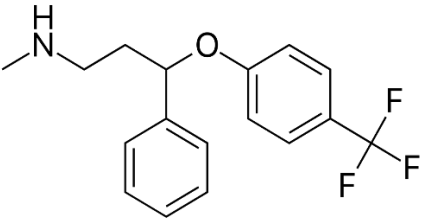
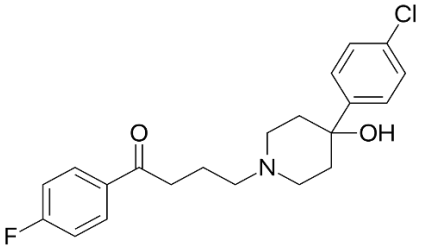
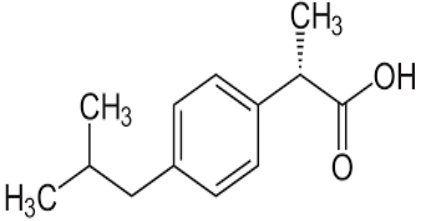
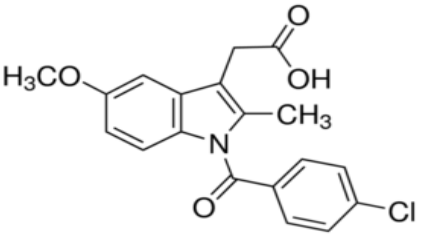
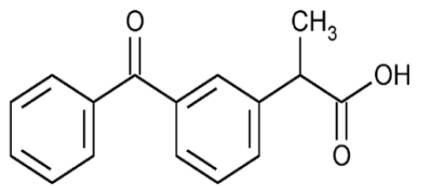
β) *Ως προς τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες:* Θα μελετηθούν 2 χαρακτηριστικές φαρμακοκινητικές/βιολογικές ιδιότητες: α) η κυτταρική διαπερατότητα και β) η απορρόφηση μέσω του στόματος (% Human Oral Absorption).

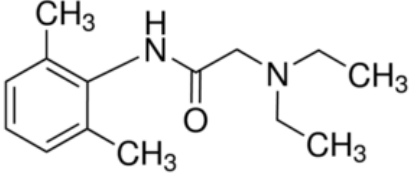
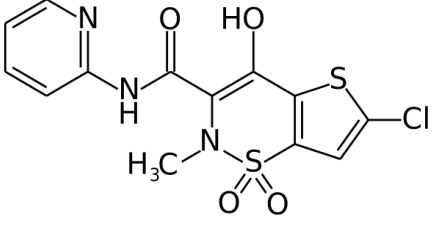
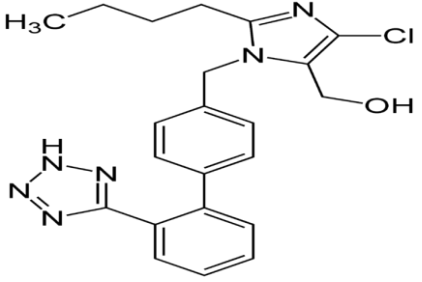
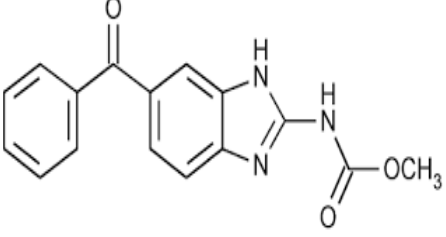
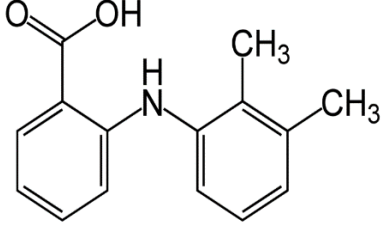
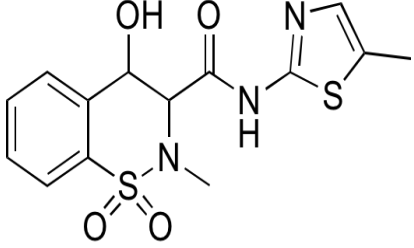
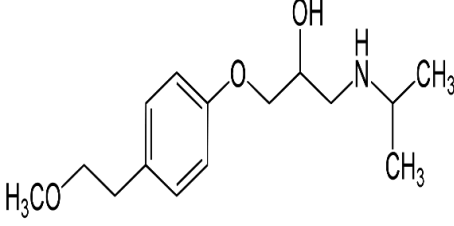
γ) *Ως προς τις χρωματογραφικές συνθήκες:* Επιλογή των βέλτιστων συνθηκών προσομοίωσης των δυο ιδιοτήτων: θερμοκρασία 37°C, ωσμωτικότητα βιολογικών υγρών (NaCl), χρήση δύο διαφορετικών pH για την περίπτωση προσομοίωσης του γαστρεντερικού σωλήνα κατά μήκος του οποίου παρουσιάζεται βαθμίδωση pH: μέτρηση σε ουδέτερο pH (7.4) που αντιστοιχεί στο pH του παχέος εντέρου και σε όξινο pH (5.5) που αντιστοιχεί σε περιοχές κοντά στο λεπτό έντερο.

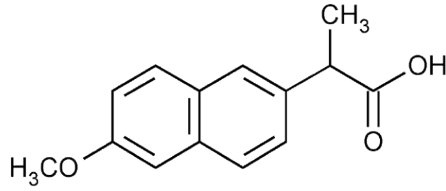
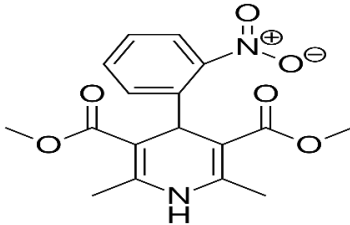
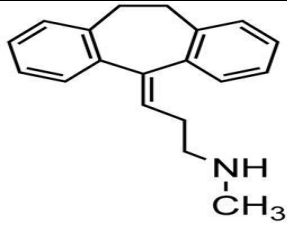
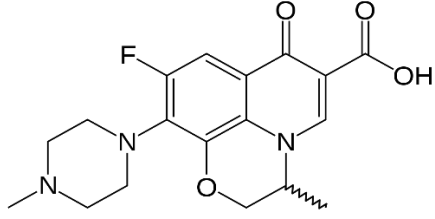
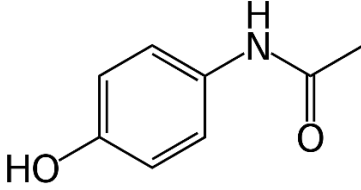
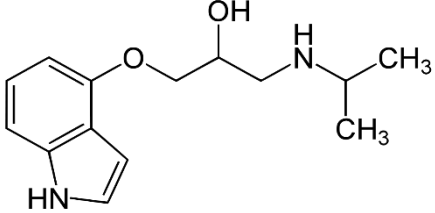
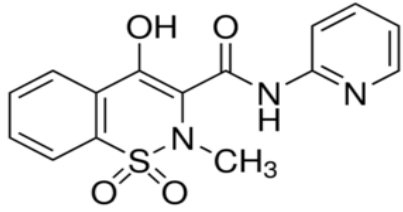
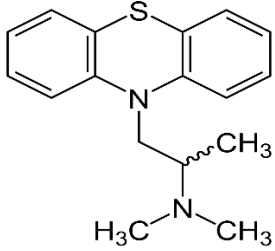
Πίνακας 1: Φάρμακα που μελετήθηκαν

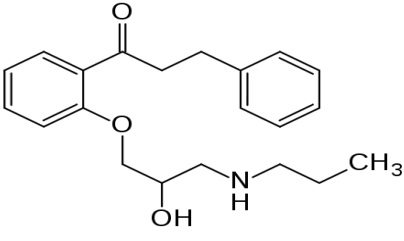
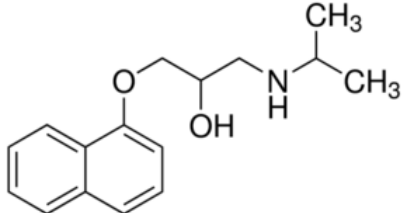
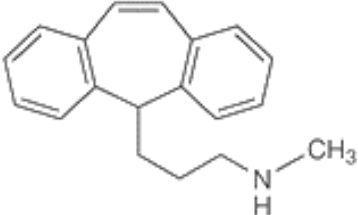
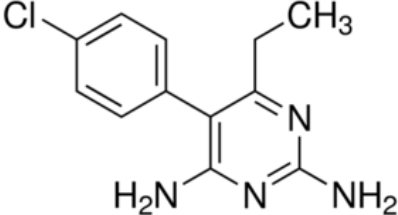
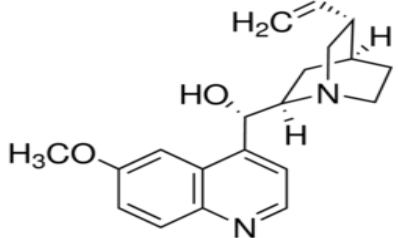
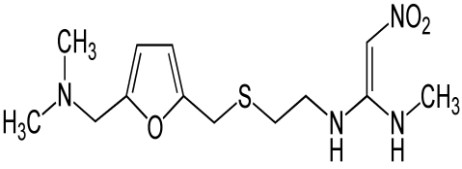
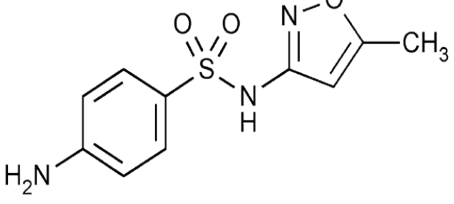
	Φάρμακο	Δομή	Φαρμακολογική Δράση	Δομή
1	Acetylsalicylic acid	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
2	Acyclovir	Ουδέτερο	Αντι-ικό	
3	Albendazole	Βάση	Αντιπαρασιτικό	
4	Allopurinol	Ουδέτερο	Φάρμακο για την ουρική αρθρίτιδα	
5	Amitriptyline	Βάση	Αντικαταθλιπτικό	
6	Amoxicillin	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	
7	Ampicillin	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	
8	Caffeine	Ουδέτερο	Διεγερτικό του ΚΝΣ	

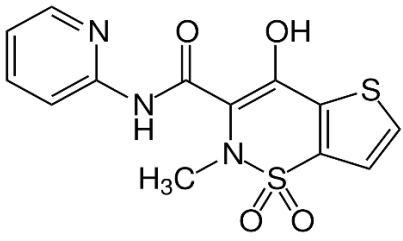
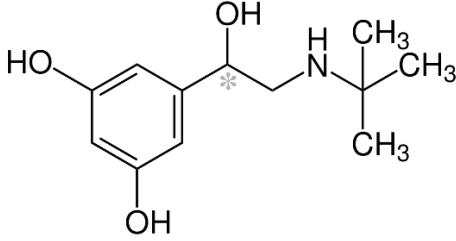
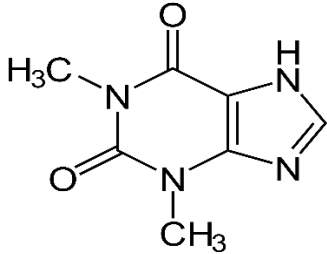
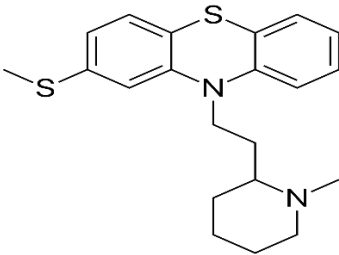
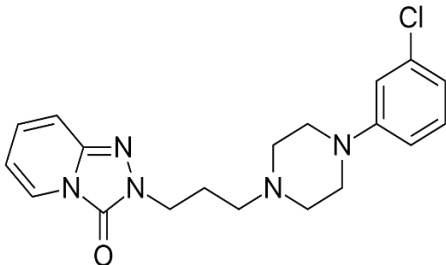
9	Carbamazepine	Ουδέτερο	Ανιεπιληπτικό	
10	Chlordiazepoxide	Ουδέτερο	Αγχολυτικό	
11	Chlorpheniramine	Βάση	Αντισταμινικό	
12	Chlorpromazine	Βάση	Αντιψυχωσικό	
13	Ciprofloxacin	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	
14	Diltiazem	Βάση	Καρδιολογικό (Αντιπυρετασικό)	
15	Diphenhydramine	Βάση	Αντισταμινικό	
16	Enoxacin	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	

17	Estradiol	Ουδέτερο	Οιστρογόνο	
18	Flunitrazepam	Ουδέτερο	Αγχολυτικό	
19	Fluoxetine	Βάση	Αντικαταθλιπτικό	
20	Haloperidol	Βάση	Δράση στο ΚΝΣ (Αντιψυχωσικό)	
21	Ibuprofen	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
22	Indomethacin	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
23	Ketoprofen	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	

24	Lidocaine	Βάση	Καρδιολογικό	
25	Lornoxicam	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
26	Losartan	Οξύ	Καρδιολογικό (Αντιυπερτασικό)	
27	Mebendazole	Βάση	Αντιπαρασιτικό	
28	Mefenamic acid	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
29	Meloxicam	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
30	Metoprolol	Βάση	Καρδιολογικό	

31	Naproxen	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
32	Nifedipine	Ουδέτερο	Καρδιολογικό (Αντιυπερτασικό)	
33	Nortriptyline	Βάση	Αντικαταθλιπτικό	
34	Ofloxacin	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	
35	Paracetamol	Ουδέτερο	Αναλγητικό	
36	Pindolol	Βάση	Καρδιολογικό (Αντιυπερτασικό)	
37	Piroxicam	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
38	Promethazine	Βάση	Αντιισταμινικό	

39	Propafenone	Βάση	Καρδιολογικό (Αντιαρρυθμικό)	
40	Propranolol	Βάση	Καρδιολογικό	
41	Protriptyline	Βάση	Αντικαταθλιπτικό	
42	Pyrimethamine	Βάση	Αντιπαρασιτικό	
43	Quinidine	Βάση	Καρδιολογικό (Αντιαρρυθμικό)	
44	Ranitidine	Βάση	Φάρμακο γαστρεντερικού (πρόληψη έκκρισης γαστρικού οξέος)	
45	Sulfamethoxazole	Οξύ	Αντιβιοτικό	

46	Tenoxicam	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
47	Terbutaline	Βάση	Αδρενεργικό (παθήσεων αναπνευστικού συστήματος)	
48	Theophylline	Ουδέτερο	Βρογχοδιασταλτικό (παθήσεων αναπνευστικού συστήματος)	
49	Thioridazine	Βάση	Δράση στο ΚΝΣ (Αντιψυχωσικό)	
50	Trazodone	Ουδέτερο	Δράση στο ΚΝΣ (Αντικαταθλιπτικό)	

Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας, εκτός αν αναφέρεται κάτι διαφορετικό. Για την παρασκευή κινητών φάσεων χρησιμοποιήθηκαν KH_2PO_4 ($\geq 99.5\%$, Merck), NaCl ($\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich), NaOH (50-52%, Sigma-Aldrich), Brij-35 (Sigma-Aldrich) και νερό υψηλής καθαρότητας (High Purity Water – HPW). Το HPW ελήφθη με τη βοήθεια ενός συστήματος καθαρισμού

νερού EASYpure II (Barnstead International, USA). Ως δείκτης νεκρού χρόνου της στήλης χρησιμοποιήθηκε κιτρικό νάτριο · 2H₂O (≥99.0%, Sigma-Aldrich).

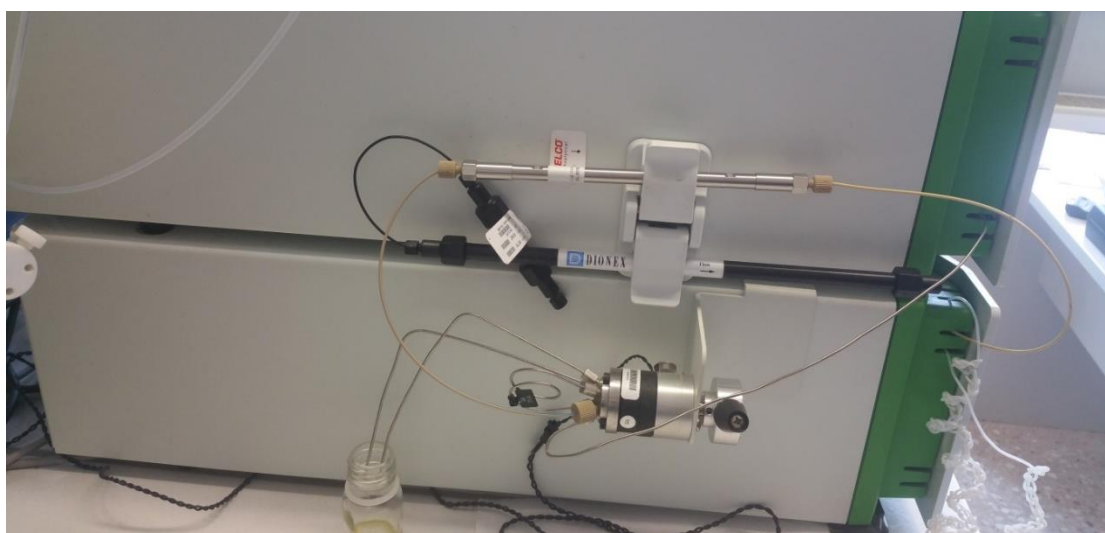
Οργανολογία

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας αποτελείται από μια αντλία Flexar (LC Pump) με έναν απαεριωτή (μοντέλο 5-CH) και ένα διαχειριστή διαλύτη (solvent manager), και από έναν ανιχνευτή Flexar UV-Vis (UV-Vis detector) (180-800 nm) (Perkin Elmer). Ως στατική φάση, χρησιμοποιήθηκε στήλη αντιστρόφου φάσεως Discovery Bio-Wide Pore C18 (Supelco, USA, 150 x 4.6 mm, με μέγεθος σωματιδίων 5 μm). Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ρυθμίσθηκε στα 0.5 mL·min⁻¹. Ο όγκος του βρόγχου έγχυσης ήταν 20 μL. Ο ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV detector) ρυθμίσθηκε στα 220 nm. Στα Σχήματα 11 και 12 παρουσιάζονται το χρωματογραφικό σύστημα HPLC και ο βρόγχος με την βαλβίδα έγχυσης του συστήματος. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Chromera v. 3.2.0 (Perkin Elmer).

Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία 37°C, που είναι η θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος, έτσι ώστε να γίνεται καλύτερη προσομοίωση των βιολογικών συνθηκών. Η αύξηση της θερμοκρασίας από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος στην επιθυμητή τιμή 37°C, έγινε με εισαγωγή της στήλης σε κατάλληλο θερμοστάτη. Ο θερμοστάτης αυτός αποτελεί ουσιαστικά αναδευόμενο υδατόλουτρο WB-4MS και παρέχει αυξημένη σταθεροποίηση της θερμοκρασίας (μέχρι 0.1°C) λόγω ενσωματωμένου μαγνητικού αναδευτήρα (ρυθμιζόμενη ταχύτητα 250-1000 rpm). Το υδατόλουτρο παρουσιάζεται στο Σχήμα 13.



Σχήμα 11: Χρωματογραφικό σύστημα HPLC (Perkin Elmer), όπου φαίνονται τα τμήματα του διαχειριστή διαλύτη (solvent manager), του ανιχνευτή Flexar UV-Vis (UV-Vis detector) και της αντλίας Flexar (LC Pump).



Σχήμα 12: Στήλη Discovery Bio-Wide Pore C18 (Supelco, USA), βαλβίδα και βρόγχος έγχυσης (injection loop), όπου γίνεται η ένεση της φαρμακευτικής ουσίας με τη σύριγγα.



Σχήμα 13: Υδατόλουτρο WB-4MS (bioSan).

Πειραματική διαδικασία

Για την παρασκευή κινητής φάσης τελικού όγκου 500 mL, 3.4 g KH_2PO_4 (0.05 M) και 4.6 g NaCl (9.2 g/L) διαλύονται σε περίπου 400 mL υπερκαθαρού νερού. Ακολούθως, το pH ρυθμίζεται στο 7.4 ή στο 5.5 με προσθήκη αραιωμένου διαλύματος NaOH. Εν συνεχεία, προστίθενται 23.96 g Brij-35 (0.04 M). Η διάλυση υποβοηθείται με ανάδευση και ελαφρά θέρμανση του διαλύματος (35-40°C) σε θερμαντική πλάκα που διαθέτει μηχανικό αναδευτήρα. Μετά την πλήρη διάλυση του Brij και την ψύξη του διαλύματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL και συμπληρώνεται η υπόλοιπη ποσότητα υπερκαθαρού νερού μέχρι την χαραγή. Στην περίπτωση που η κινητή φάση απαιτεί προσθήκη ακετονιτριλίου, ακολουθείται η ίδια διαδικασία με πριν, το ακετονιτρίλιο προστίθεται μετά την μεταφορά του διαλύματος στην ογκομετρική φιάλη και στο τέλος προστίθεται υπερκαθαρό νερό έως τη χαραγή.

Οι χρόνοι κατακράτησης προσδιορίστηκαν εις τριπλούν για κάθε φάρμακο σε κάθε χρωματογραφική συνθήκη και μετατράπηκαν στο λογάριθμο του παράγοντα συγκράτησης, δηλαδή σε τιμές $\log k$, με τη βοήθεια της εξίσωσης (4), που αναφέρθηκε και παραπάνω :

$$\log k = \log \left(\frac{t_r - t_0}{t_0} \right) \quad (4)$$

όπου t_r είναι ο χρόνος κατακράτησης του υπό εξέταση φαρμάκου και t_0 είναι ο νεκρός χρόνος της στήλης, ο οποίος μετρήθηκε με κιτρικό νάτριο στο αντίστοιχο κάθε φορά pH. Από τις 3 μετρήσεις, υπολογίζεται ο μέσος όρος και τελικά λαμβάνεται μία τιμή $\log k$ για το κάθε φάρμακο στην κάθε χρωματογραφική συνθήκη.

Όσον αφορά το **pH**, έλαβαν χώρα πειράματα σε δύο διαφορετικά pH, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω:

- pH=7.4 : στο παχύ έντερο
- pH=5.5 : σε περιοχές κοντά στο λεπτό έντερο

Η μη ιονισμένη/ουδέτερη μορφή των ενώσεων απορροφάται καλύτερα (πιο γρήγορα), λόγω του ότι η ιονισμένη μορφή ευνοεί περισσότερο τη συγκράτηση από τη στήλη εξαιτίας της μεγαλύτερης συγγένειας της με αυτήν. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται και από το γεγονός ότι και στο ανθρώπινο σώμα είναι πιο εύκολο για την ιονισμένη μορφή να αλληλεπιδράσει, είτε με δυνάμεις έλξης ή με δυνάμεις άπωσης, με τις διάφορες βιολογικές μεμβράνες.

Επειδή η μελέτη αφορά κυρίως απορρόφηση από το στόμα, αυτό που μας ενδιαφέρει είναι οι ενώσεις μας να έχουν όσο το δυνατόν λιγότερο ιονισμένη μορφή, ούτως ώστε να απορροφώνται καλύτερα.

Τα ασθενή οξέα έχουν μειωμένο ιονισμό σε μικρότερο pH, γι'αυτό και τα μελετάμε και στο pH=5.5.

Οι ασθενείς βάσεις, από την άλλη, έχουν μειωμένο καθώς αυξάνεται το pH, οπότε η μελέτη στο pH=5.5 δεν μας ενδιαφέρει.

Τα ουδέτερα δεν έχουν ιονιζόμενες ομάδες, συνεπώς δεν επηρεάζονται από την αλλαγή του pH και δεν χρειάζεται η μελέτη στο pH=5.5.

Τέλος, για τους αμφολύτες δεν είναι σταθερό αυτό που συμβαίνει και γι'αυτό μελετάμε και τα δύο pH και κρατάμε τελικά την τιμή που δίνει μεγαλύτερο $\log D$, που τη μια φορά μπορεί να είναι στο pH=7.4 και την άλλη στο pH=5.5.

Καταλήγουμε τελικά στη μελέτη των οξέων και των αμφολυτών και στο δύο pH 7.4/5.5, ενώ οι βάσεις και τα ουδέτερα μελετώνται μόνο στο 7.4.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Προσδιορισμός συντελεστών κατακράτησης σε pH=7.4 και σύγκριση τους με άλλες παραμέτρους

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι συντελεστές κατακράτησης των φαρμακευτικών μορίων χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης PBS σε pH=7.4. Για κάθε φαρμακευτικό μόριο έγιναν 3 διαδοχικοί προσδιορισμοί και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο λογάριθμος του μέσου όρου τους, που φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 2. Το μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης παρουσίασε η θειοριδαζίνη (150.5 min) και το μικρότερο η αμοξικιλίνη (2.0 min).

Πίνακας 2: Συντελεστής κατακράτησης φαρμακευτικών μορίων από μικυλλιακή υγροχρωματογραφία χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης PBS, pH=7.4

α/α	Φάρμακο	logk_w(7.4)
1.	Acetylsalicylic acid	-0.42 ± 0.02
2.	Acyclovir	-0.54 ± 0.02
3.	Albendazole	1.36 ± 0.02
4.	Allopurinol	-0.04 ± 0.02
5.	Amitriptyline	1.98 ± 0.02
6.	Amoxicillin	-0.78 ± 0.02
7.	Ampicillin	-0.30 ± 0.02
8.	Caffeine	0.10 ± 0.02
9.	Carbamazepine	0.97 ± 0.02
10.	Chlordiazepoxide	1.36 ± 0.02
11.	Chlorpheniramine	1.74 ± 0.02
12.	Chlorpromazine	1.93 ± 0.02
13.	Ciprofloxacin	-0.23 ± 0.02
14.	Diltiazem	1.54 ± 0.02
15.	Diphenhydramine	1.54 ± 0.02
16.	Enoxacin	-0.37 ± 0.02
17.	Estradiol	1.22 ± 0.02
18.	Flunitrazepam	1.25 ± 0.02
19.	Fluoxetine	1.64 ± 0.02
20.	Haloperidol	1.67 ± 0.02
21.	Ibuprofen	1.01 ± 0.02
22.	Indomethacin	1.00 ± 0.02
23.	Ketoprofen	0.64 ± 0.02
24.	Lidocaine	1.10 ± 0.02
25.	Lornoxicam	1.12 ± 0.02

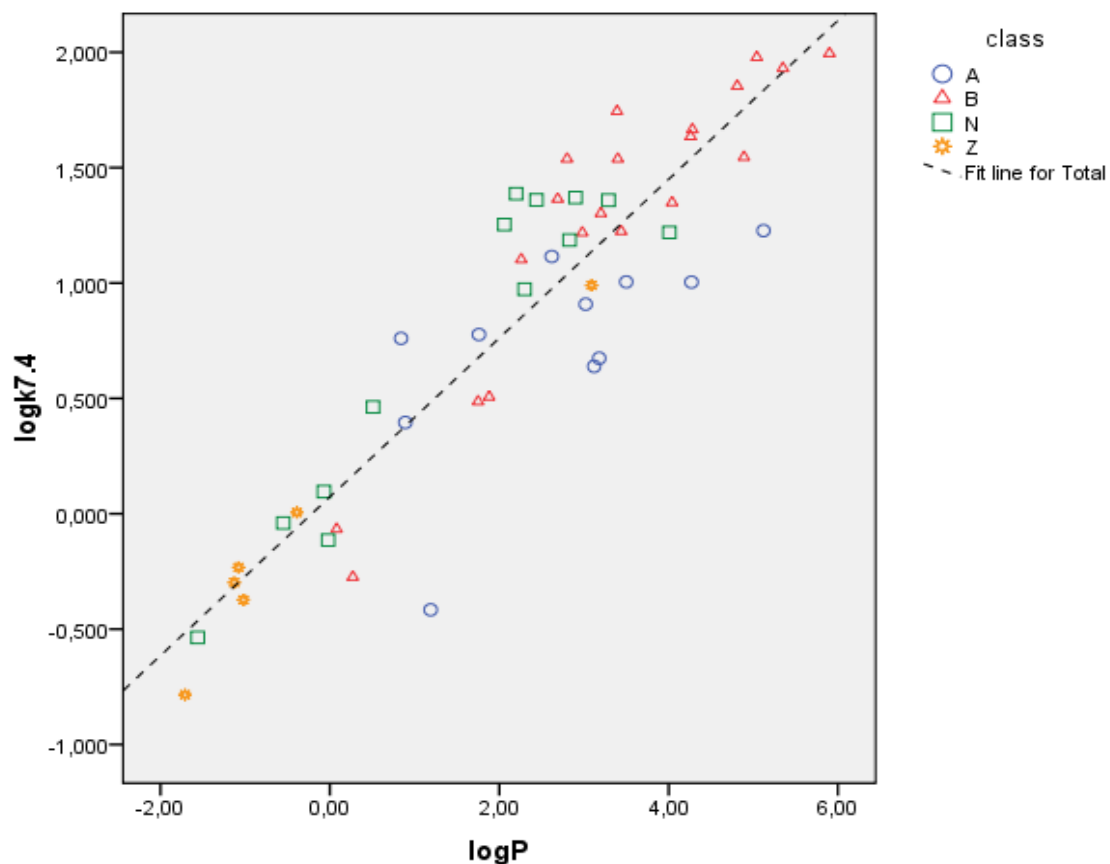
26.	Losartan	0.99 ± 0.02
27.	Mebendazole	1.19 ± 0.02
28.	Mefenamic acid	1.23 ± 0.02
29.	Meloxicam	0.91 ± 0.02
30.	Metoprolol	0.51 ± 0.02
31.	Naproxen	0.67 ± 0.02
32.	Nifedipine	1.39 ± 0.02
33.	Nortriptyline	1.35 ± 0.02
34.	Ofloxacin	0.01 ± 0.02
35.	Paracetamol	0.46 ± 0.02
36.	Pindolol	0.49 ± 0.02
37.	Piroxicam	0.78 ± 0.02
38.	Promethazine	1.85 ± 0.02
39.	Propafenone	1.30 ± 0.02
40.	Propranolol	1.22 ± 0.02
41.	Protriptyline	1.55 ± 0.02
42.	Pyrimethamine	1.36 ± 0.02
43.	Quinidine	1.22 ± 0.02
44.	Ranitidine	-0.27 ± 0.02
45.	Sulfamethoxazole	0.40 ± 0.02
46.	Tenoxicam	0.76 ± 0.02
47.	Terbutaline	-0.07 ± 0.02
48.	Theophylline	-0.11 ± 0.02
49.	Thioridazine	2.00 ± 0.02
50.	Trazodone	1.37 ± 0.02

Η τυπική απόκλιση αναφέρεται σε 3 διαδοχικές μετρήσεις.

Μια σημαντική πρώτη παρατήρηση είναι πως το εύρος μεταξύ ελάχιστης (-0.78) και μέγιστης (2.00) τιμής $\log k$ είναι σημαντικά μικρότερο σε σχέση με το αντίστοιχο εύρος που προέκυψε για τις ίδιες ενώσεις σε χρωματογραφία IAM (από -1.15 έως 3.98) [55][56], καθώς και με αυτό που προέκυψε από το συντελεστή κατανομής $\log D$ σε σύστημα οκτανόλης – νερού (από -4.00 έως 4.01).

Σύγκριση με το συντελεστή μερισμού οκτανόλης – νερού ($\log P_{7.4}$)

Για τη μελέτη του μηχανισμού έκλουσης των φαρμακευτικών μορίων από την υγροχρωματογραφία μικυλλίων, τα αποτελέσματα των συντελεστών κατακράτησης συγκρίθηκαν με τις τιμές του συντελεστή μερισμού οκτανόλης – νερού ($\log P$) και αποτυπώνονται στο Σχήμα 1. Για την παρατήρηση τυχόν διαφορετικής συμπεριφοράς κάποιας ομάδας (οξέα, βάσεις, αμφολύτες, ουδέτερα μόρια), χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό σύμβολο και χρώμα για κάθε ομάδα.



Σχήμα 14: Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης ($\log k_{7.4}$) με το συντελεστή μερισμού οκτανόλης – νερού ($\log P$) σε pH 7.4 για τα 50 υπό μελέτη φάρμακα.

Όπως προκύπτει από το παραπάνω Σχήμα 14, δεν εμφανίζεται διαφοροποίηση κάποιας ομάδας (οξύ, βάση, αμφολύτης, ουδέτερα) από την συσχέτιση $\log k_w / \log P$. Η συσχέτιση αυτή περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log k_w = 0.344 (\pm 0.023) \cdot \log P + 0.074 (\pm 0.068) \quad (6)$$

$$(N=50, R^2=0.828, s=0.312, F=230)$$

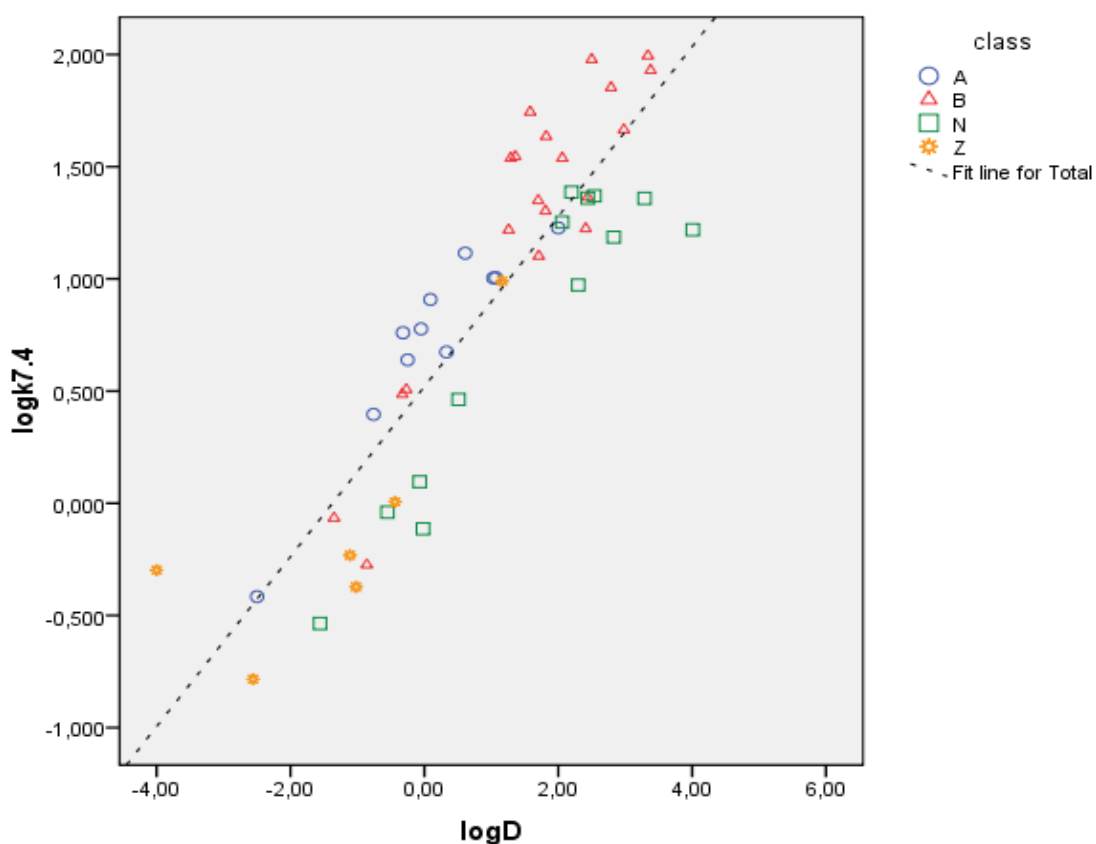
Αν από την παραπάνω συσχέτιση αφαιρεθεί η ασπιρίνη που παρουσιάζει μια ελαφρώς διαφοροποιημένη συμπεριφορά, η παραπάνω συσχέτιση βελτιώνεται σε:

$$\log k_w = 0.339 (\pm 0.021) \cdot \log P + 0.104 (\pm 0.063) \quad (7)$$

$$(N=49, R^2=0.849, s=0.286, F=264)$$

Σύγκριση με τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης – νερού ($\log D_{7.4}$)

Οι συντελεστές κατακράτησης συγκρίθηκαν επίσης με το συντελεστή κατανομής ($\log D$) σε σύστημα οκτανόλης – νερού. Για λόγους καλύτερης μελέτης, κάθε ομάδα (οξέα, βάσεις, αμφολύτες και ουδέτερα) αποδίδεται με διαφορετικό χρώμα και σχήμα.



Σχήμα 15: Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης ($\log k_{7.4}$) με το συντελεστή κατανομής οκτανόλης – νερού ($\log D$) σε pH 7.4 για τα 50 υπό μελέτη φάρμακα.

Από το παραπάνω Σχήμα 15 προκύπτει πως οι βάσεις και τα οξέα στην πλειοψηφία τους βρίσκονται πάνω από τη γραμμή τάσης. Αυτό υποδηλώνει πως ο ιονισμός τους, που εκφράζεται στο συντελεστή $\log D$, είναι ασθενέστερος στο περιβάλλον της χρωματογραφικής στήλης με αποτέλεσμα να παρατηρούνται μεγαλύτεροι συντελεστές κατακράτησης από ότι θα αναμενόταν αν υπήρχε ο ίδιος βαθμός ιονισμού και στο περιβάλλον της στήλης.

$$\log k_w = 0.379 (\pm 0.028) \cdot \log D + 0.520 (\pm 0.055) \quad (8)$$

$$(N=50, R^2=0.788, s=0.346, F=178)$$

Παρατηρείται πως η συσχέτιση $\log k_w / \log D$ εμφανίζει ελαφρώς χειρότερα στατιστικά μεγέθη (μικρότερο R^2 και F , μεγαλύτερο s) από την αντίστοιχη συσχέτιση $\log k_w / \log P$, γεγονός που ενισχύει τη θεώρηση πως ο ιονισμός των φαρμακευτικών μορίων καταστέλλεται στο περιβάλλον της στήλης και επομένως οι συντελεστές κατακράτησης συσχετίζονται καλύτερα με το συντελεστή μερισμού $\log P$, ο οποίος αναφέρεται στη μη ιονισμένη μορφή του φαρμάκου.

Η καταστολή του ιονισμού γίνεται ακόμα περισσότερο σαφής, αν στην παραπάνω συσχέτιση προστεθούν τα κλάσματα θετικού (F^+) και αρνητικού φορτίου (F^-) των μορίων, τα οποία είναι στατιστικώς σημαντικοί παράγοντες (τιμές t ίσες με 5.90 και 5.26, αντίστοιχα), αφού όπως φαίνεται και από την εξίσωση (9) βελτιώνουν σημαντικά τη συσχέτιση $\log k_w / \log D$.

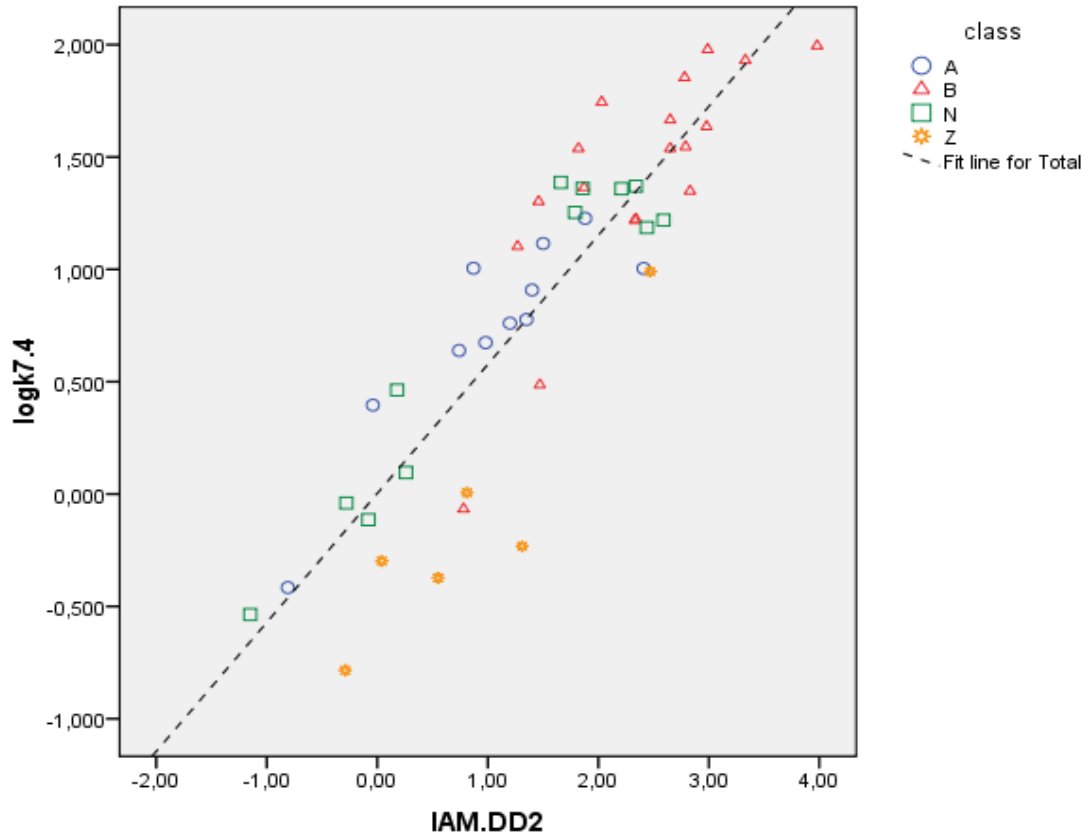
$$\log k_w = 0.380 (\pm 0.023) \cdot \log D + 0.545 (\pm 0.092) \cdot F^+ + 0.539 (\pm 0.102) \cdot F^- + 0.168 (\pm 0.068) \quad (9)$$

$$(N=50, R^2=0.890, s=0.254, F=254)$$

Οι θετικοί συντελεστές των F^+ και F^- στην παραπάνω εξίσωση αποτελούν «διόρθωση» της τιμής του συντελεστή κατακράτησης που αναμένεται ως συνάρτηση της τιμής $\log D$, καθώς ο ιονισμός τελικά των φαρμακευτικών μορίων εντός της χρωματογραφικής στήλης είναι μικρότερος σε σχέση με αυτόν που εκφράζεται στην τιμή του $\log D$ (που αφορά υδατικό διάλυμα).

Σύγκριση με το συντελεστή κατακράτησης από στήλη ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM)

Οι συντελεστές κατακράτησης από υδροχρωματογραφία μικυλλίων συγκρίθηκαν με τους αντίστοιχους συντελεστές που μετρήθηκαν σε στήλες ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane) τύπου IAM.PC.DD2 [29][55].



Σχήμα 16: Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης ($\log k_{7.4}$) από υγροχρωματογραφία μικυλλίων με τον αντιστοιχο από στήλη IAM (IAM.DD2) σε pH 7.4 για τα 47 υπό μελέτη φάρμακα.

$$\log k_w = 0.574 (\pm 0.044) \cdot \log k_{w(IAM)} + 0.004 (\pm 0.085) \quad (10)$$

$$(N=47, R^2=0.788, s=0.348, F=167)$$

Παρατηρείται μια ιδιαίτερα ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των δυο χρωματογραφικών συνθηκών, παρά τις διαφορές τους ως προς το είδος της στατικής και κινητής φάσης. Η ομοιότητα αυτή μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός πως α) ο κύριος μηχανισμός έκλουσης ενώσεων και από τις δυο στήλες είναι μηχανισμός κατανομής και β) ο ιονισμός των φαρμακευτικών μορίων δεν ευνοείται επίσης εντός της στήλης IAM [55].

B. Προσδιορισμός συντελεστών κατακράτησης σε pH=5.5 και σύγκριση τους με άλλες παραμέτρους

Ακολούθως, προσδιορίστηκαν και πάλι οι συντελεστές κατακράτησης των φαρμακευτικών μορίων χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης PBS, αλλά αυτή τη φορά σε pH=5.5. Για κάθε φαρμακευτικό μόριο έγιναν 3 διαδοχικοί προσδιορισμοί και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο λογάριθμος του μέσου όρου τους, που φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 3. Το μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης εμφάνισε η ιβουπροφαίνη (67.3 min) και το μικρότερο η αμοξυκιλλίνη (2.3 min).

Πίνακας 3: Συντελεστής κατακράτησης φαρμακευτικών μορίων από μικυλλιακή υγροχρωματογραφία χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης PBS, pH=5.5

α/α	Φάρμακο	logk_w(5.5)
1.	Acetylsalicylic acid	-0.29 ± 0.02
2.	Acyclovir	-0.35 ± 0.02
6.	Amoxicillin	-1.36 ± 0.02
7.	Ampicillin	-0.71 ± 0.02
8.	Caffeine	0.08 ± 0.02
9.	Carbamazepine	1.01 ± 0.02
13.	Ciprofloxacin	0.17 ± 0.02
16.	Enoxacin	0.09 ± 0.02
17.	Estradiol	1.20 ± 0.02
21.	Ibuprofen	1.61 ± 0.02
22.	Indomethacin	1.45 ± 0.02
23.	Ketoprofen	1.19 ± 0.02
25.	Lornoxicam	1.12 ± 0.02
26.	Losartan	1.04 ± 0.02
28.	Mefenamic acid	1.60 ± 0.02
29.	Meloxicam	0.98 ± 0.02
30.	Metoprolol	0.15 ± 0.02
31.	Naproxen	1.28 ± 0.02
33.	Nortriptyline	1.18 ± 0.02
34.	Ofloxacin	0.05 ± 0.02
35.	Paracetamol	0.45 ± 0.02
36.	Pindolol	0.37 ± 0.02
37.	Piroxicam	0.95 ± 0.02
40.	Propranolol	0.87 ± 0.02
41.	Protriptyline	1.11 ± 0.02

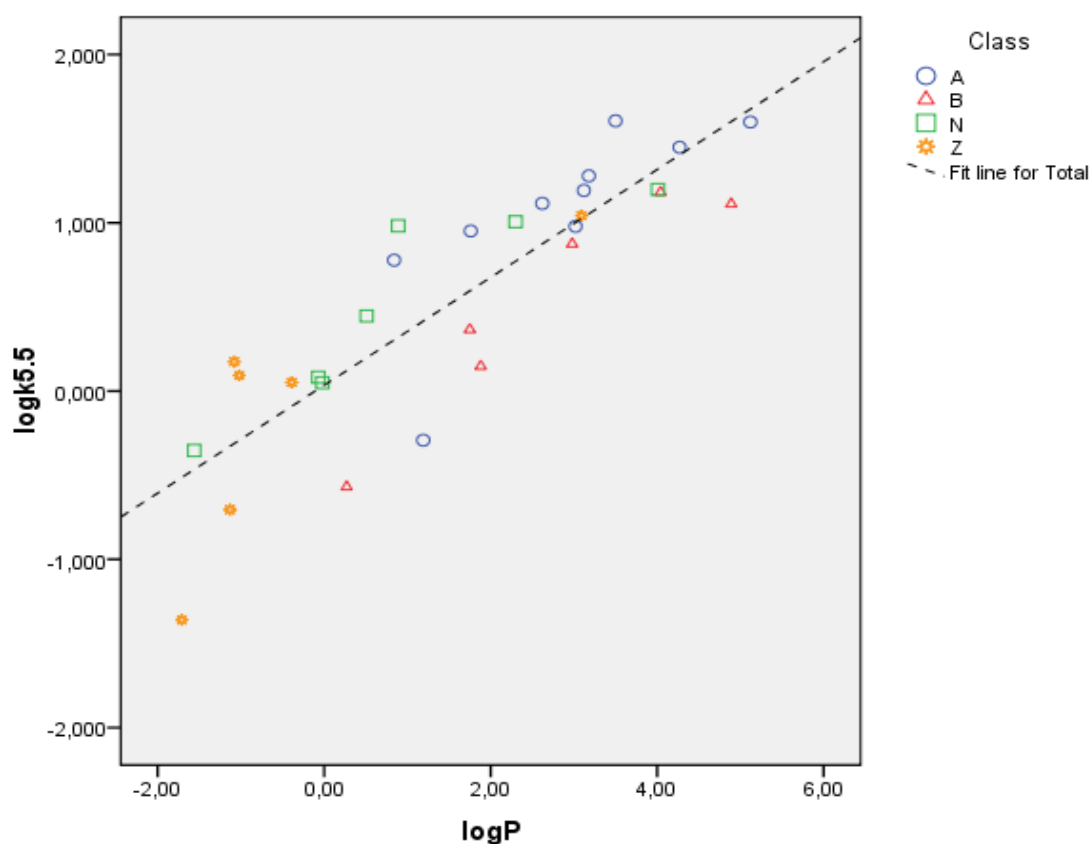
44.	Ranitidine	-0.57 ± 0.02
45.	Sulfamethoxazole	0.98 ± 0.02
46.	Tenoxicam	0.78 ± 0.02
48.	Theophylline	0.05 ± 0.02

Η τυπική απόκλιση αναφέρεται σε 3 διαδοχικούς προσδιορισμούς.

Όπως παρατηρήθηκε και σε pH=7.4, διαπιστώνεται σημαντικά μικρότερο εύρος τιμών $\log k$ (από -1.36 έως 1.61) για τις παραπάνω φαρμακευτικές ενώσεις σε σχέση με το αντίστοιχο εύρος που παρατηρήθηκε με χρωματογραφία IAM (από -1.37 έως 2.93) [55][56] και με το συντελεστή κατανομής $\log D$ (από -3.67 έως 4.01).

Σύγκριση με το συντελεστή μερισμού οκτανόλης – νερού ($\log P_{5.5}$)

Οι συντελεστές κατακράτησης που μετρήθηκαν σε pH=5.5 συγκρίθηκαν με το συντελεστή μερισμού σε σύστημα οκτανόλης – νερού.



Σχήμα 17: Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης ($\log k_{5.5}$) με το συντελεστή μερισμού οκτανόλης – νερού ($\log P$) σε pH 5.5 για τα 29 υπό μελέτη φάρμακα.

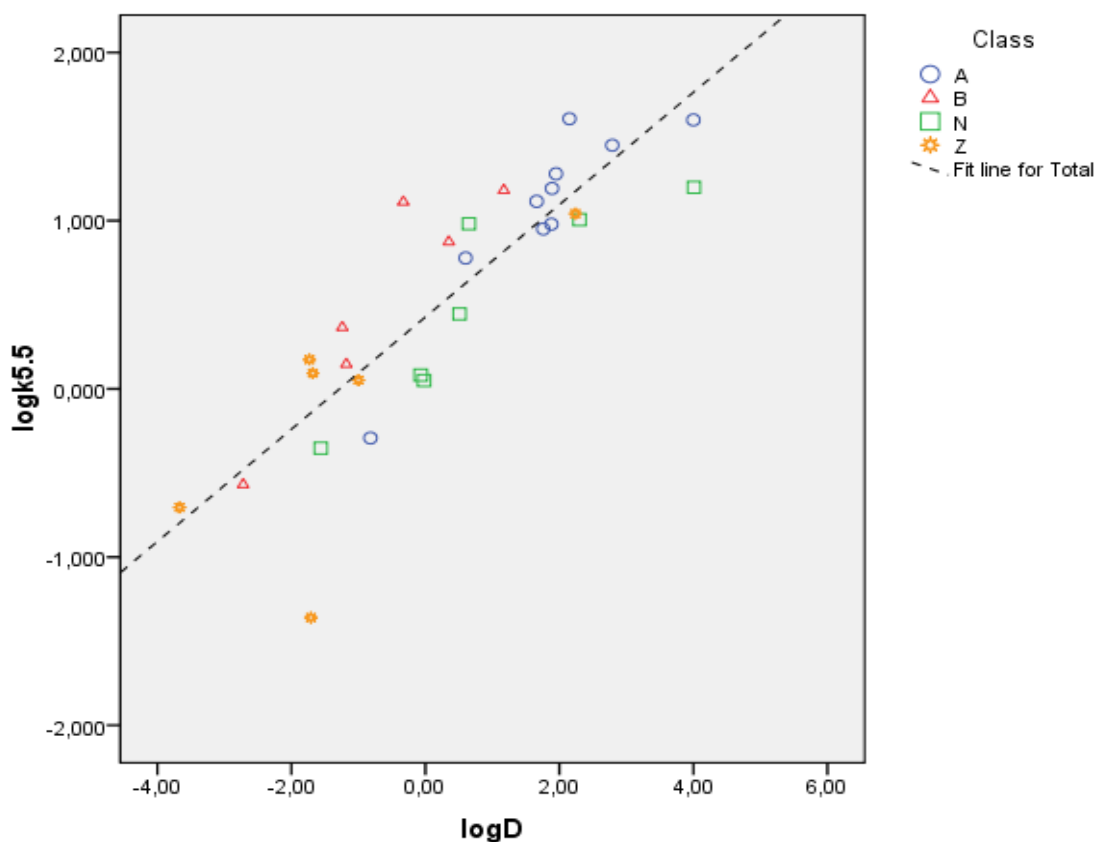
$$\log k_w = 0.320 (\pm 0.036) \cdot \log P + 0.035 (\pm 0.094) \quad (11)$$

$$(N=29, R^2=0.741, s=0.389, F=77)$$

Η παραπάνω σχέση είναι ουσιαστικά ίδια με τη σχέση (8) τόσο από την άποψη της κλίσης, όσο και από τον ουσιαστικά μηδενικό σταθερό όρο (σχέση $\log k_{7.4}/\log P$), η οποία αυτή τη φορά στηρίζεται σε μικρότερο αριθμό δεδομένων (N=29) σε σχέση με πριν. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως η συσχέτιση $\log k_w/\log P$ δεν επηρεάζεται από τη μεταβολή του pH της κινητής φάσης.

Σύγκριση με το συντελεστή κατανομής οκτανόλης – νερού ($\log D_{5.5}$)

Ακολούθως, οι συντελεστές κατακράτησης σε pH=5.5 συγκρίθηκαν με το συντελεστή κατανομής σε σύστημα οκτανόλης – νερού σε pH=5.5 ($\log D_{5.5}$).



Σχήμα 18: Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης ($\log k_{5.5}$) με το συντελεστή κατανομής οκτανόλης – νερού ($\log D$) σε pH 5.5 για τα 29 υπό μελέτη φάρμακα.

$$\log k_w = 0.334 (\pm 0.038) \cdot \log D + 0.428 (\pm 0.074) \quad (12)$$

$$(N=29, R^2=0.745, s=0.387, F=79)$$

Αν από το σετ δεδομένων αφαιρεθεί η αμοξικιλίνη, η οποία παρουσιάζει μια ελαφρώς διαφοροποιημένη συμπεριφορά, η παραπάνω συσχέτιση βελτιώνεται σε:

$$\log k_w = 0.307 (\pm 0.030) \cdot \log D + 0.484 (\pm 0.060) \quad (13)$$

$$(N=28, R^2=0.797, s=0.306, F=102)$$

Οι παραπάνω σχέσεις είναι ουσιαστικά όμοιες με αυτές των συσχετίσεων $\log k_w / \log D$ που ελήφθησαν σε $pH=7.4$, γεγονός που πιστοποιεί την ανθεκτικότητα των συσχετίσεων ανεξαρτήτως του pH της κινητής φάσης.

Τέλος, η καταστολή του ιονισμού στο εσωτερικό της στήλης αποδεικνύεται και από το θετικό πρόσημο των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου στη συσχέτιση $\log k_w / \log D$, που έχουν στατιστικώς σημαντικό ρόλο ($t > 2$), όπως φαίνεται και από την παρακάτω εξίσωση (14).

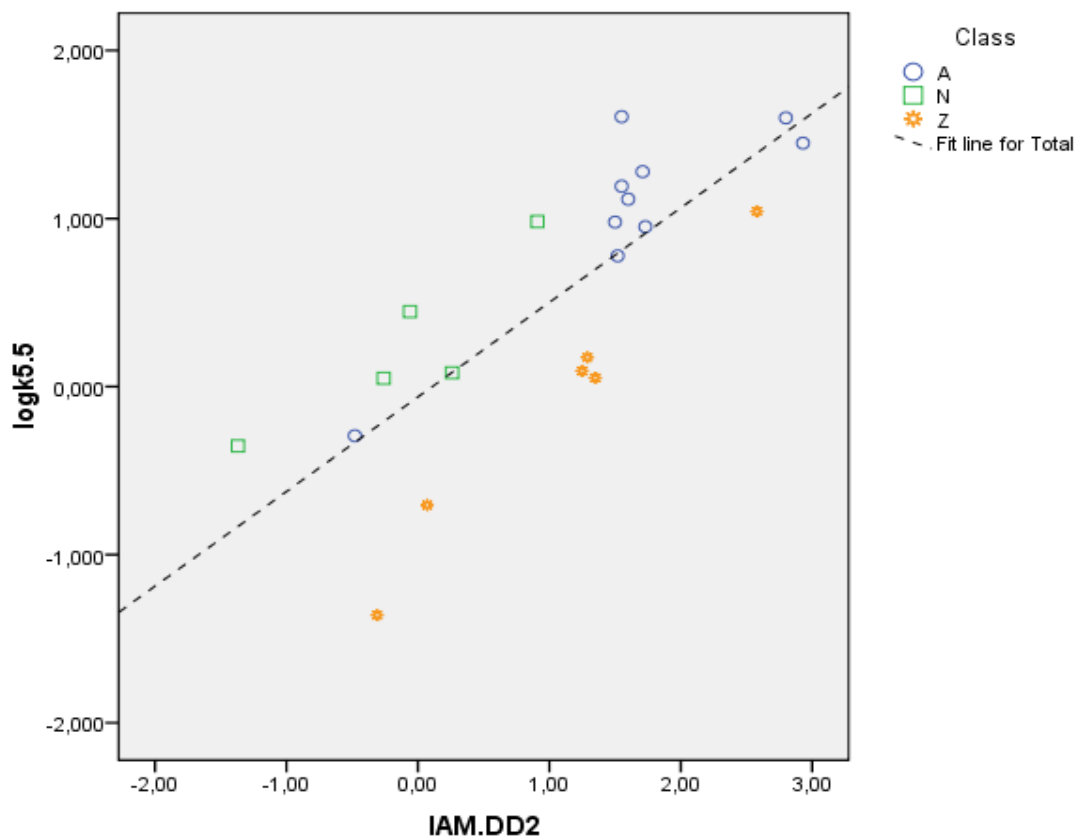
$$\log k_w = 0.357 (\pm 0.037) \cdot \log D + 0.639 (\pm 0.161) \cdot F^+ + 0.372 (\pm 0.183) \cdot F^- + 0.118 (\pm 0.103) \quad (14)$$

$$(N=29, R^2=0.845, s=0.313, F=45)$$

Σύγκριση με το συντελεστή κατακράτησης από στήλη ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM)

Οι συντελεστές κατακράτησης από υδροχρωματογραφία μικυλλίων συγκρίθηκαν με τους αντίστοιχους συντελεστές που μετρήθηκαν σε στήλες ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane) τύπου IAM.PC.DD2.

Η παρακάτω βέβαια συσχέτιση δεν περιλαμβάνει τις βάσεις, καθώς για αυτές δεν βρέθηκαν δεδομένα σε $pH=5.5$.



Σχήμα 19: Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης ($\log k_{5.5}$) από υγροχρωματογραφία μικυλλίων με τον αντίστοιχο από στήλη IAM (IAM.DD2) σε pH 5.5 για τα 21 υπό μελέτη φάρμακα.

$$\log k_w = 0.563 (\pm 0.098) \cdot \log k_{w(IAM)} - 0.061 (\pm 0.150) \quad (15)$$

$$(N=21, R^2=0.633, s=0.450, F=32.7)$$

Η παραπάνω συσχέτιση συνοδεύεται από ελαφρώς χειρότερα στατιστικά σε σχέση με την αντίστοιχη στο pH=7.4, για το οποίο υπάρχουν περισσότερες ενώσεις. Η συσχέτιση αυτή βελτιώνεται, όπως είναι αναμενόμενο, με την εισαγωγή του κλάσματος θετικού φορτίου F^+ .

$$\log k_w = 0.586 (\pm 0.088) \cdot \log k_{w(IAM)} - 0.860 (\pm 0.354) \cdot F^+ + 0.015 (\pm 0.138) \quad (16)$$

$$(N=21, R^2=0.724, s=0.446, F=23.5)$$

Η επιβεβαίωση της καταστολής του ιονισμού – στην περίπτωση των ιονιζόμενων ενώσεων – μπορεί επίσης να γίνει συγκρίνοντας τη μεταβολή των συντελεστών

κατακράτησης μεταξύ των τιμών pH 7.4-5.5 από μικυλλιακή χρωματογραφία σε σχέση με χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM) και κυρίως με την αντίστοιχη μεταβολή των συντελεστών κατανομής σε σύστημα οκτανόλης – νερού (logD), όπως φαίνεται από τον παρακάτω Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Διαφορές συντελεστών κατακράτησης μεταξύ τιμών pH 7.4-5.5 της υγροχρωματογραφίας μικυλλίων και σύγκριση αυτών με τις αντίστοιχες διαφορές της χρωματογραφίας IAM και με αυτές του συντελεστή κατανομής logD σε σύστημα οκτανόλης – νερού.

α/α	Φάρμακο	$\log k_{w7.4-}$ $\log k_{w5.5}$	$\log k_{w(IAM) 7.4-}$ $\log k_{w(IAM) 5.5}$	$\log D_{7.4-}$ $\log D_{5.5}$
1.	Acetylsalicylic acid	-0.12	-0.33	-1.68
2.	Acyclovir	-0.18	0.22	0.00
6.	Amoxicillin	0.58	0.02	-0.85
7.	Ampicillin	0.41	-0.03	-0.33
8.	Caffeine	0.01	0.00	0.00
9.	Carbamazepine	-0.03	-	0.00
13.	Ciprofloxacin	-0.41	0.02	0.62
16.	Enoxacin	-0.47	-0.70	0.66
17.	Estradiol	0.02	2.59	0.00
21.	Ibuprofen	-0.60	-0.68	-1.08
22.	Indomethacin	-0.45	-0.52	-1.76
23.	Ketoprofen	-0.55	-0.81	-2.14
25.	Lornoxicam	-0.00	-0.10	-1.05
26.	Losartan	-0.05	-0.11	-1.08
28.	Mefenamic acid	-0.37	-0.92	-2.00
29.	Meloxicam	-0.07	-0.10	-1.79
30.	Metoprolol	0.36	-	0.91
31.	Naproxen	-0.61	-0.73	-1.91
33.	Nortriptyline	0.17	0.71	0.53
34.	Ofloxacin	-0.05	-0.54	0.56
35.	Paracetamol	0.02	0.24	0.00
36.	Pindolol	0.12	0.74	0.91
37.	Piroxicam	-0.17	-0.38	-1.81
40.	Propranolol	0.34	0.70	0.91
41.	Protriptyline	0.43	0.59	1.69
44.	Ranitidine	0.30	-	1.86
45.	Sulfamethoxazole	-0.59	-0.95	-1.41

46.	Tenoxicam	-0.02	-0.32	-0.92
48.	Theophylline	-0.16	0.18	0.00

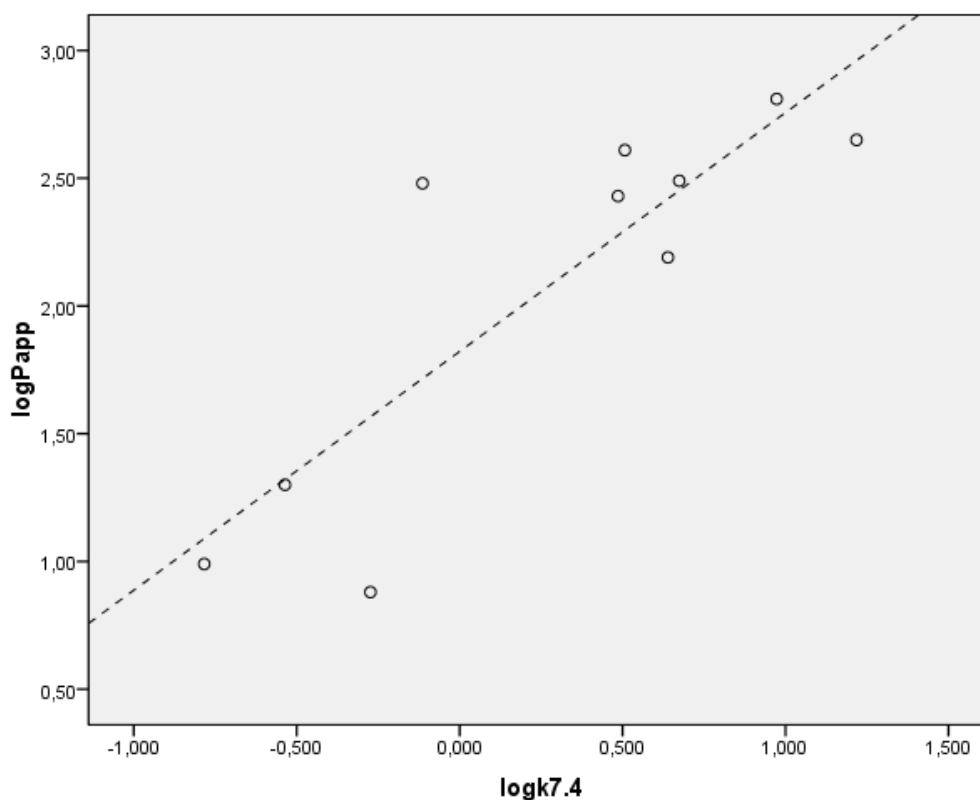
Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 4, οι μεταβολές του συντελεστή κατακράτησης από μικυλλιακή χρωματογραφία είναι κατά πολύ μικρότερες των αντίστοιχων μεταβολών του συντελεστή κατανομής σε σύστημα οκτανόλης – νερού (logD) και συγκρίσιμες ή και μικρότερες των μεταβολών των συντελεστών κατακράτησης από χρωματογραφία IAM. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί πως προηγούμενες δημοσιεύσεις έχουν ήδη επισημάνει την καταστολή του ιονισμού των ιονιζόμενων μορίων στο περιβάλλον της χρωματογραφίας IAM ως αποτέλεσμα ανάπτυξης ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων κυρίως από τις φωσφορικές ομάδες των φωσφολιπιδίων και το προτονιωμένο άζωτο της ομάδας της χολίνης [29][55][56]. Αυτό επιβεβαιώνει την καταστολή του ιονισμού και στην περίπτωση του περιβάλλοντος της μικυλλιακής χρωματογραφίας.

Συσχέτιση με βιολογικά/ βιοφαρμακευτικά μεγέθη

1. Συσχέτιση με κυτταρική διαπερατότητα, MDCK

A. Συσχέτιση με τη διαπερατότητα με κυτταρικές σειρές MDCK, pH=7.4

Οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν ελήφθησαν από μια μόνο βιβλιογραφική αναφορά [57] και συνεπώς τα δεδομένα ήταν λίγα. Γενικά δεν συνιστάται ο συνδυασμός δεδομένων από διαφορετικά εργαστήρια, καθώς τα δεδομένα κυτταρικών σειρών παρουσιάζουν μεγάλη διεργαστηριακή μεταβλητότητα. Σαν αποτέλεσμα, η παρακάτω συσχέτιση είναι ενδεικτική.

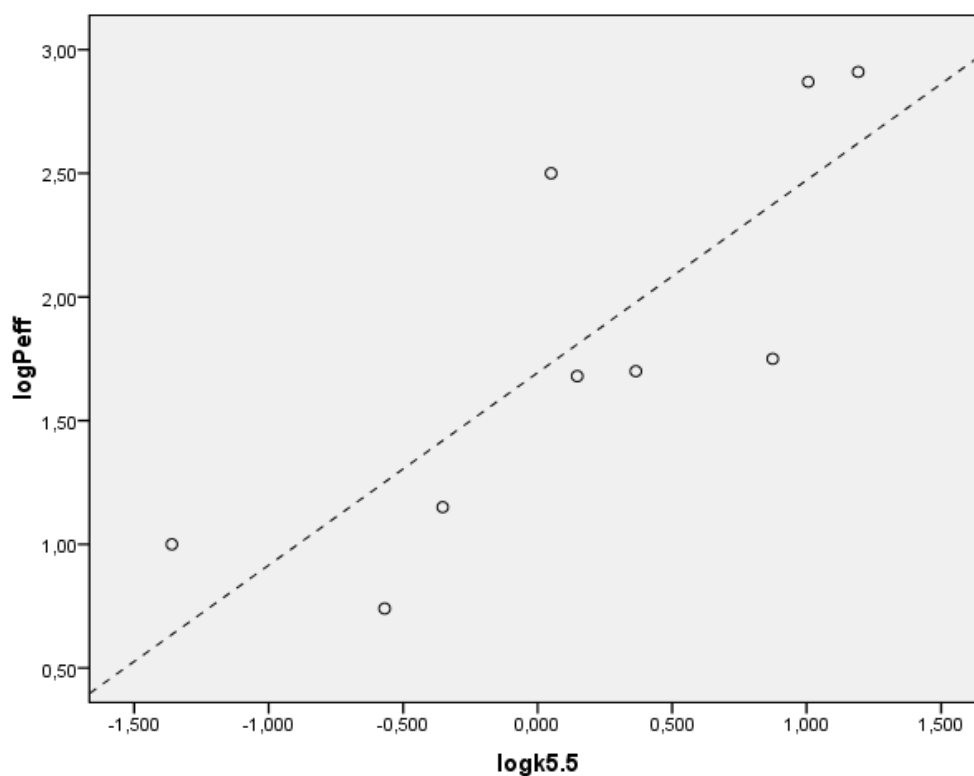


Σχήμα 20: Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης ($\log k_{7.4}$) με την κυτταρική διαπερατότητα ($\log P_{app}$) σε pH 7.4 για τα 10 υπό μελέτη φάρμακα.

$$\log P_{app (7.4)} = 0.935 (\pm 0.205) \cdot \log k_{w(7.4)} + 1.822 (\pm 0.142) \quad (17)$$

$$(N=10, R^2=0.722, s=0.410, F=20.8)$$

Β. Συσχέτιση με τη διαπερατότητα με κυτταρικές σειρές MDCK, pH=5.5



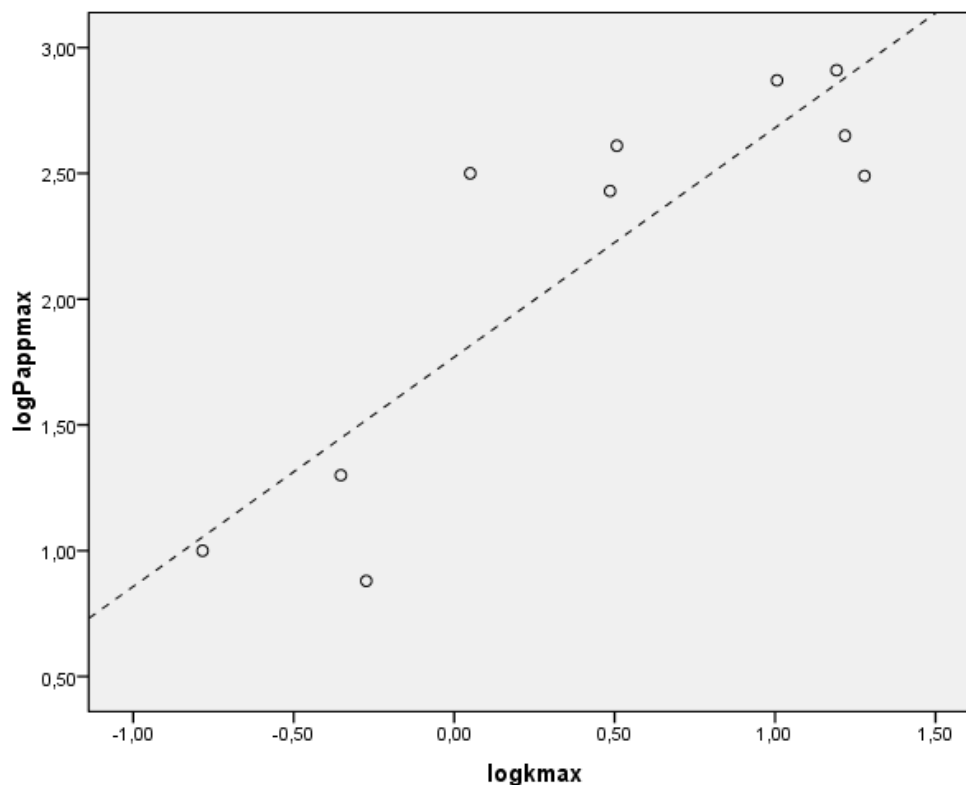
Σχήμα 21: Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης ($\log k_{5.5}$) με την κυτταρική διαπερατότητα ($\log P_{\text{eff}}$) σε pH 5.5 για τα 9 υπό μελέτη φάρμακα.

$$\log P_{\text{app}(5.5)} = 0.779 (\pm 0.216) \cdot \log k_{w(5.5)} + 1.694 (\pm 0.171) \quad (18)$$

$$(N=9, R^2=0.650, s=0.504, F=13.0)$$

Η εξίσωση που προκύπτει είναι αντίστοιχη με την παραπάνω εξίσωση (17) του pH=7.4, αλλά εμφανίζει ελαφρώς χειρότερα στατιστικά. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα δεδομένα ήταν λίγα και συνεπώς η συσχέτιση θεωρείται ενδεικτική.

Γ. Συσχέτιση μέγιστης κυτταρικής διαπερατότητας με μέγιστο συντελεστή κατακράτησης μεταξύ των τιμών pH 5.5 και 7.4



Σχήμα 22: Συσχέτιση μέγιστου συντελεστή κατακράτησης ($\log k_{\max}$) με μέγιστη κυτταρική διαπερατότητα ($\log P_{\text{app}(\max)}$) μεταξύ των τιμών pH 5.5 και 7.4 για τα 10 υπό μελέτη φάρμακα.

$$\log P_{\text{app}(\max)} = 0.912 (\pm 0.186) \cdot \log k_{\text{w}(\max)} + 1.769 (\pm 0.154) \quad (19)$$

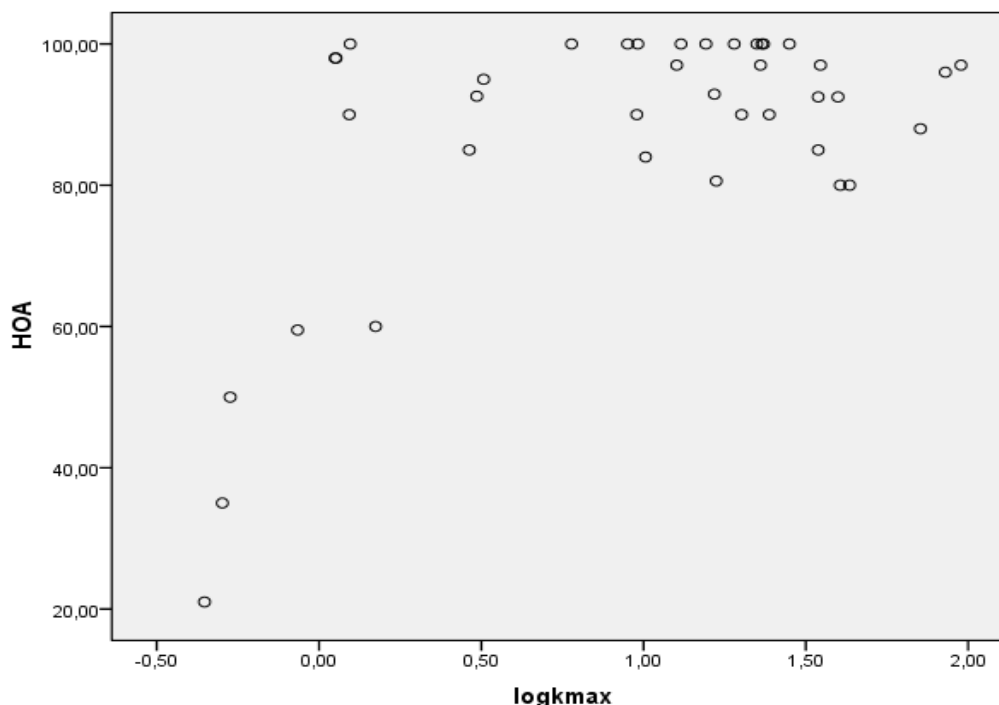
$$(N=10, R^2=0.750, s=0.415, F=24.0)$$

Η μέγιστη κυτταρική διαπερατότητα ενδιαφέρει επειδή η απορρόφηση των φαρμάκων από το στόμα ευνοείται σε τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα όπου τα φάρμακα παρουσιάζουν μέγιστη διαπερατότητα. Η συσχέτιση στην περίπτωση αυτή είναι καλύτερη.

2. Συσχέτιση με απορρόφηση από το στόμα (Human Oral Absorption, %HOA)

Εξετάσθηκε η δυνατότητα της μικυλλιακής χρωματογραφίας να προβλέψει την επί τοις εκατό απορρόφηση από το στόμα. Καθώς η απορρόφηση των φαρμάκων πραγματοποιείται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, ο οποίος παρουσιάζει μια διαβάθμιση pH (πολύ όξινο στο στομάχι, περίπου 5.5 στο λεπτό έντερο, περίπου 7 στο παχύ έντερο), και η απορρόφηση των φαρμάκων ευνοείται σε συγκεκριμένα σημεία στα οποία το φάρμακο βρίσκεται στη μη ιονισμένη του μορφή, θα πρέπει να ληφθεί η τιμή που αντιστοιχεί στη μέγιστη λιποφιλία/κατακράτηση από τη στήλη. Αυτή είναι μια πρακτική που ακολουθείται συνήθως σε τέτοιου είδους μελέτες [58]. Ως εκ τούτου, στα σχετικά διαγράμματα/εξισώσεις ελήφθη ο μέγιστος συντελεστής κατακράτησης μεταξύ των δύο τιμών που έχουν προκύψει από τα δύο διαφορετικά pH ($\log k_{w(max)}$).

Μετά την αφαίρεση φαρμάκων που παρουσιάζουν ιδιαιτερότητες ως προς το μηχανισμό απορρόφησης, όπως π.χ. η ασπιρίνη που λόγω μικρού μεγέθους ($MW < 200$) μπορεί να διέρχεται μέσω του παρακυτταρικού χώρου και φαρμάκων που μπορεί να είναι υποστρώματα/αναστολείς δέσμησης ATP (ATP binding cassette) η γραφική παράσταση της % απορρόφησης από το στόμα σε σχέση με το μέγιστο συντελεστή κατακράτησης έχει την παρακάτω μορφή [56].



Σχήμα 23: Συσχέτιση απορρόφησης από το στόμα (%HOA) με τη μέγιστη τιμή του συντελεστή κατακράτησης μεταξύ pH 5.5 και 7.4 ($\log k_{max}$) για τα 39 υπό μελέτη φάρμακα.

Η εξίσωση αυτή φαίνεται να ακολουθεί μια σιγμοειδή τάση σε συμφωνία με άλλες έρευνες που έχουν γίνει για χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών [58].

Ακριβώς επειδή η απορρόφηση από το στόμα αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία, πρόσθετες φυσικοχημικές παράμετροι θα πρέπει να εισαχθούν στην εξίσωση αυτή. Επομένως, η συνολική εξίσωση που εκφράζει το φαινόμενο περιγράφεται από την:

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(a_0 + a_1 \cdot \log k_{w(max)} + a_2 \cdot X_2 + a_3 \cdot X_3)}} \quad (20)$$

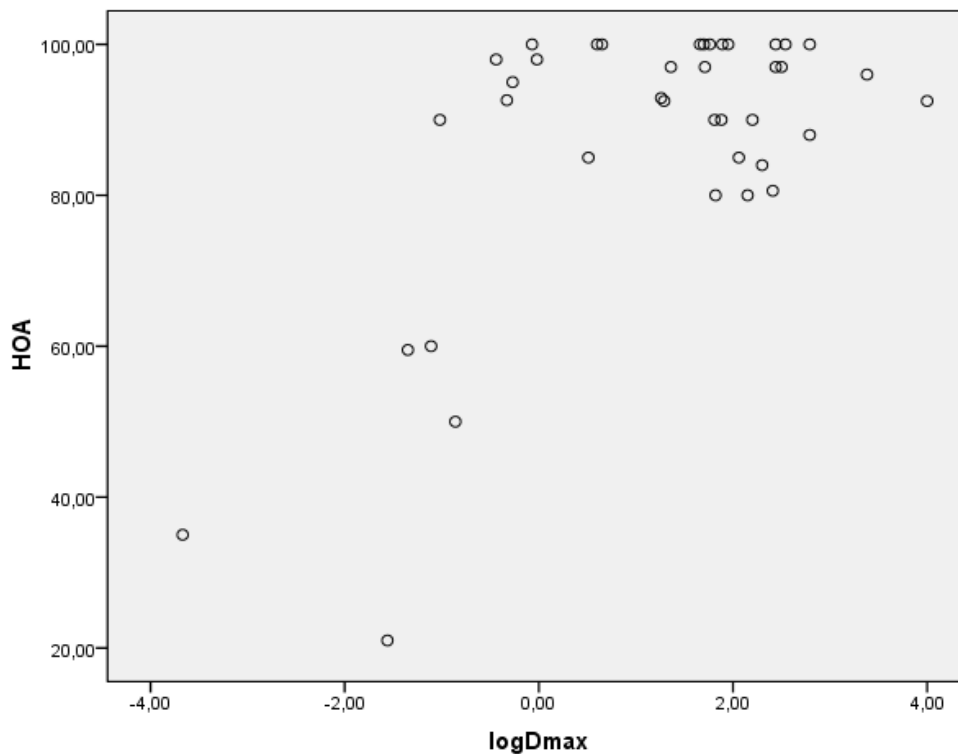
Όπου X_2 , X_3 είναι φυσικοχημικές ιδιότητες και a_2 , a_3 οι αντίστοιχες συντελεστές που προκύπτουν από μη γραμμική παλινδρόμηση.

Πίνακας 5: Ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης, %HOA/ $\log k_{w(max)}$

Μοντέλο	Όροι εξίσωσης			N	R ²
	a_0	a_1 ($\log k_{w(max)}$)	a_2 (A)		
1	0.605 ± 0.137	2.824 ± 0.561		39	0.656
2	0.863 ± 0.244	2.956 ± 0.612	-0.365 ± 0.233	39	0.679

Μόνο ο παράγοντας A είναι στατιστικά σημαντικός και οδηγεί σε ελαφρά βελτίωση του R². Θα πρέπει να σημειωθεί πως οι αντίστοιχες εξισώσεις %HOA/ $\log k$ σε δημοσιευμένες εργασίες έχουν αντίστοιχους R² (0.6 έως 0.85).

Η αντίστοιχη συσχέτιση με τη μέγιστη τιμή του συντελεστή κατανομής $\log D_{max}$ είναι:



Σχήμα 24: Συσχέτιση απορρόφησης από το στόμα (%HOA) με τη μέγιστη τιμή του συντελεστή κατανομής σε σύστημα οκτανόλης – νερού μεταξύ pH 5.5 και 7.4 ($\log D_{\max}$) για τα 39 υπό μελέτη φάρμακα.

Πίνακας 6: Ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης, %HOA/ $\log D_{\max}$

Μοντέλο	Όροι εξίσωσης				N	R ²
	α_0	a_1 ($\log k_{w(\max)}$)	a_2 (TPSA)	a_3 (F ⁻)		
1	0.783 ± 0.116	0.422 ± 0.091			39	0.564
2	2.619 ± 0.695	1.065 ± 0.347	-0.014 ± 0.005		39	0.653
3	2.229 ± 0.468	0.901 ± 0.270	-0.012 ± 0.004	4.711 ± 1.404	39	0.759

Στην περίπτωση χρήσης του παράγοντα λιποφιλίας $\log D$, η συσχέτιση με την απορρόφηση από το στόμα ξεκινά από χαμηλότερα στατιστικά μεγέθη ($R^2=0.564$) σε σχέση με το δείκτη μικυλλιακής χρωματογραφίας ($R^2=0.656$), αλλά επιδέχεται μεγαλύτερης βελτίωσης με εισαγωγή στην εξίσωση των φυσικοχημικών παραμέτρων της πολικής επιφάνειας TPSA και του κλάσματος αρνητικού φορτίου F⁻.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κύρια συμπεράσματα που προκύπτουν από την πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι τα ακόλουθα:

- Η κλίμακα των τιμών $\log k$ από μικυλλιακή χρωματογραφία για τις 50 εξεταζόμενες ενώσεις είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη κλίμακα (μεγαλύτερη – μικρότερη τιμή) που παρατηρήθηκε σε χρωματογραφία IAM και με την αντίστοιχη κλίμακα του συντελεστή κατανομής $\log D$. Αυτό μάλλον θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως αρνητικό, καθώς ένα μεγαλύτερο εύρος κλίμακας συνήθως οδηγεί σε καλύτερη κατάταξη φαρμάκων με βάση τις ιδιότητες που αναμένεται να παρουσιάζουν.
- Στο περιβάλλον της μικυλλιακής χρωματογραφίας παρουσία του επιφανειοδραστικού Brij γενικά δεν ευνοείται ο ιονισμός των ιονιζόμενων ενώσεων. Για το λόγο αυτό οι μεταβολές των δεικτών κατακράτησης ($\log k$) των ιονιζόμενων ενώσεων μεταξύ των τιμών pH 5.5 και 7.4 είναι σημαντικά μικρότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες μεταβολές του συντελεστή κατανομής σε σύστημα οκτανόλης – νερού, $\log D$, μεταξύ των ίδιων τιμών pH.
- Ο μηχανισμός έκλυσης των φαρμακευτικών ενώσεων από την μικυλλιακή χρωματογραφία είναι μηχανισμός κατανομής. Δεν αναμένονται ηλεκτροστατικές έλξεις καθώς το Brij είναι ουδέτερο και επιπλέον στο περιβάλλον της χρωματογραφικής στήλης δεν ευνοείται ο ιονισμός, όπως ήδη αναφέρθηκε. Για το λόγο αυτό ο συντελεστής κατακράτησης $\log k$ συσχετίζεται καλύτερα με το $\log P$ που αντιστοιχεί στην ουδέτερη ένωση σε σχέση με το $\log D$ που λαμβάνει υπόψη τον ιονισμό.
- Ο παραπάνω μηχανισμός έκλυσης ομοιάζει σε σημαντικό βαθμό με την χρωματογραφία IAM, καθώς επίσης ακολουθεί μηχανισμό κατανομής με περιορισμένο ιονισμό εντός της στήλης. Η κύρια διαφορά έγκειται στην επίδραση των φωσφορικών ομάδων των ακινητοποιημένων φωσφολιπιδίων στην περίπτωση των χρωματογραφικών στηλών IAM που αλληλεπιδρούν με τα θετικά φορτισμένα φαρμακευτικά μόρια με ηλεκτροστατικές έλξεις. Για το λόγο αυτό η συσχέτιση μεταξύ των δυο χρωματογραφικών τεχνικών βελτιώνεται με την εισαγωγή στην εξίσωση του κλάσματος θετικού φορτίου του μορίου.

- Η συσχέτιση του δείκτη $\log k$ της μικυλλιακής χρωματογραφίας με τη διαπερατότητα μέσω των κυτταρικών σειρών MDCK φαίνεται να ακολουθεί γραμμική συσχέτιση. Ωστόσο, τα δεδομένα είναι πολύ λίγα προκειμένου να εξαχθεί ένα αξιόπιστο συμπέρασμα.
- Η συσχέτιση του δείκτη $\log k$ με την απορρόφηση από το στόμα φαίνεται να ακολουθεί σιγμοειδή συσχέτιση κατά τα πρότυπα της χρωματογραφίας IAM και της λιποφιλίας $\log D$ που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Η μεμονωμένη συσχέτιση του δείκτη $\log k$ της μικυλλιακής χρωματογραφίας είναι καλύτερη σε σχέση με την παράμετρο λιποφιλίας, αλλά η τελευταία επιδέχεται μεγαλύτερη βελτίωση με την εισαγωγή επιπλέον φυσικοχημικών παραμέτρων.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑ

Στα πλαίσια της περαιτέρω μελέτης προτείνονται τα παρακάτω:

1. Διερεύνηση έκλυσης περαιτέρω φαρμακευτικών ενώσεων υπό τις ίδιες συνθήκες (Brij 0.04 M παρουσία NaCl, 37°C), ώστε να προκύψει μια «βιβλιοθήκη» τιμών $\log k_w$ ενός ικανού αριθμού φαρμακευτικών ενώσεων (πάνω από 100) που θα μπορούσε να οδηγήσει σε αξιόπιστα μοντέλα πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων. Περαιτέρω, με ένα μεγάλο αριθμό δεδομένων, θα μπορούσε να διαιρεθεί η βάση δεδομένων σε δεδομένα εκμάθησης (training set) για την ανάπτυξη του μοντέλου και σε δεδομένα επικύρωσης (περίπου 20-25% των δεδομένων, test set) για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας του μοντέλου. Θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν προχωρημένες τεχνικές ανάπτυξης μοντέλων, όπως machine learning. Ως φαρμακοκινητικά μεγέθη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν: α) Απορρόφηση από το στόμα, β) Πρωτεϊνική σύνδεση (σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος), γ) Διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, δ) Απορρόφηση/Κατανομή στο δέρμα, ε) Όγκος κατανομής. Τέλος, θα μπορούσαν να δοκιμασθούν συσχετίσεις με δεδομένα τοξικότητας (όπως η επαγωγή φωσφολιπίδωσης και η καρδιοτοξικότητα) και οικοτοξικότητας (π.χ. τιμές LC_{50} σε υδρόβιους οργανισμούς και LD_{50} σε χερσαίους οργανισμούς).
2. Διερεύνηση έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων χωρίς την παρουσία NaCl (προτείνεται από ορισμένους ερευνητές η αφαίρεση του NaCl από την κινητή φάση καθώς επιβαρύνει τη στήλη και την αντλία) και σύγκριση των συσχετίσεων με φαρμακοκινητικά μεγέθη σε σχέση με αυτές που προκύπτουν παρουσία NaCl στην κινητή φάση.
3. Διερεύνηση έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων με τα πειράματα να λαμβάνουν χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αντί για τη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος, και συσχέτιση με φαρμακοκινητικά μεγέθη. Αν οι συσχετίσεις με χρήση των δύο διαφορετικών θερμοκρασιών (περιβάλλοντος και 37°C) είναι ισοδύναμες στατιστικά, αποφεύγεται το στάδιο θερμοστάτησης της στήλης και η διαδικασία απλουστεύεται.
4. Χρήση διαφορετικής χρωματογραφικής στήλης αντιστρόφου φάσεως σε συνδυασμό με το Brij 35.

5. Διερεύνηση έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων παρουσία άλλων επιφανειοδραστικών (ανιοντικών όπως SDS, κατιοντικών όπως CTAB, αμφοτερικών όπως CAPB (Cocamidopropyl betaine)) και σύγκριση των συσχετίσεων που επιτυγχάνονται με φαρμακοκινητικά μεγέθη σε σχέση με αυτά που προκύπτουν με Brij, με σκοπό την αξιολόγηση του καλύτερου επιφανειοδραστικού για την προσομοίωση καθενός φαρμακοκινητικού μεγέθους.

6. Δοκιμή συνδυασμού χρωματογραφικών δεικτών για την πρόβλεψη φαρμακοκινητικών μεγεθών, δηλαδή ταυτόχρονη χρήση στις συσχετίσεις δυο δεικτών μικυλλιακής χρωματογραφίας που προέρχονται από δυο διαφορετικά επιφανειοδραστικά ή ενός δείκτη μικυλλιακής χρωματογραφίας με ένα δείκτη χρωματογραφίας IAM ή ακινητοποιημένων πρωτεϊνών (ανθρώπινης λευκωματίνης ορού- Human Serum Albumin ή α1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης, AGP).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]. Ζουμπουλάκης Π. (2012). «Το ταξίδι προς ένα νέο φάρμακο», Πρόγραμμα Μορφωτικών Εκδηλώσεων ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΟΙΝΩΝΙΑ – Νέοι ορίζοντες στην έρευνα για την Υγεία.
- [2]. Δημόπουλος Β, Τσαντίλη-Κακουλίδου Ά. (2015). «Βασικές αρχές σχεδιασμού και ανάπτυξης φαρμάκων». [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5881>.
- [3]. Καρίκας Γ, Ενότητα 2: «Σχέσεις Φαρμακοδυναμικής – Φαρμακοκινητικής», Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο ΤΕΙ Αθήνας, Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων. Διαθέσιμο στο: https://ocp.teiath.gr/modules/units/?course=TIE_UNDER104&id=417
- [4]. Μαρσέλος Μ. (2006). «Συνοπτική φαρμακολογία», Τόμος 1, εκδοσεις, Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Διαθέσιμο στο: http://anamorfosi.uoi.gr/latrikh/edumaterial/11/Synoptikh_farmakologia_tomos_1.pdf
- [5]. Danias P, Tsopeles F, Sialda T, Stergiopoulos C, Pappa A, Tsantili-Kakoulidou A, «The performance of biopartitioning micellar chromatography on a series of structurally - diverse drugs and its potential to model cell permeability», 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis- Modern Trends and Applications, IMA 2017, Heraklion Crete.
- [6]. Χρυσανθακόπουλος Μ. (2011). «Αξιολόγηση πειραματικών/υπολογιστικών παραμέτρων λιποφιλίας σε Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης και εκτίμηση φαρμακοκινητικών διεργασιών στη βάση βιοχρωματογραφικών δεικτών. Εφαρμογή σε όξινα παράγωγα του πυρρολίου, αναστολείς της Αναγωγής της Αλδόζης», Διδακτορική Διατριβή, Φαρμακευτική Σχολή ΕΚΠΑ.
- [7]. Testa B, Carrupt P. A, Gaillard P, Tsai R. S. (1996). «Intramolecular interactions encoded in lipophilicity: their nature and significance», in 'Lipophilicity in Drug Action and Toxicology', Eds. V. Pliska, B. Testa and H. van de Waterbeemd, VCH Publishers, Weinheim, 49-71.
- [8]. Hann M. M. (2011). «Molecular Obesity, Potency and Other Addictions in Drug Discovery», Med. Chem. Commun., 2, 349-355.
- [9]. Hansch C, Bjorkroth J. P, Leo A. (1987). «Hydrophobicity and central nervous system agents: On the principle of minimal hydrophobicity in drug design», J. Pharm. Sci., 76, 663-687.

- [10]. Lipinski C. A, Lombardo F, Dominy B. W, Feeney P. J. (1997). «Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings», *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 23, 3-25.
- [11]. Pagliara A, Carrupt P. A, Caron G, Gaillard P, Testa B. (1997). «Lipophilicity Profiles of Ampholytes», *Chem. Rev.*, 97, 3385-3400.
- [12]. Καρκαλούσος Π, Γεωργίου Ζ, Κρούπης Χ, Παπαϊωάννου Α, Πλαγεράς Π, Σπυρόπουλος Β, Τσότσου Γ, Φούντζουλα Χ. (2015), «Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας». [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5382>.
- [13]. Κοντογιάννης Χ, Ενόργανη Ανάλυση Ι, «Υγρή Χρωματογραφία», Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου Πατρών. Διαθέσιμο στο: <https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/PHA1610/%CE%91%CE%BD%CE%BF%CE%B9%CE%BA%CF%84%CE%AC%20%CE%9C%CE%B1%CE%B8%CE%AE%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B1/%CE%A5%CE%B3%CF%81%CE%AE%20%CF%81%CF%89%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CE%B3%CF%81%CE%B1%CF%86%CE%AF%CE%B1.pptx>
- [14]. Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. (2008). «The Current State of the Art in HPLC Methodology for Lipophilicity Assessment of Basic Drugs. A Review», *J. Liq. Chromatogr.*, 31, 79–96.
- [15]. Conradi R, Burton PS, Borschardt RT (1996). «Physico-chemical and biological factors that influence a drug's cellular permeability by passive diffusion», in 'Lipophilicity in drug action and toxicology', Eds. Pliska V, Testa B, van de Waterbeemd H, VCH Publishers, Weinheim, 233–252.
- [16]. Pidgeon C, Venkataram UV (1989). «Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids», *Anal. Biochem.*, 176, 36–47.
- [17]. Pidgeon C, Ong S, Liu H, et al. (1995), «IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability», *J. Med. Chem.*, 38, 590–594.
- [18]. Mueller P, Rudin DO, Tien HT, et al. (1962). «Reconstitution of excitable cell membrane structure in vitro», *Circulation.*, 26, 1167–1171.
- [19]. Tsopelas F, Vallianatou T, Tsantili-Kakoulidou A. (2016). «Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery», *Expert Opin. Drug Discov.*, 11(5), 473-88.

- [20]. Ries RS, Choi H, Blunck R, et al. (2004). «Black lipid membranes: visualizing the structure, dynamics, and substrate dependence of membranes», *J. Phys. Chem. B.*, 108, 16040–16049.
- [21]. Pidgeon C, Marcus C, Alvarez F. (2013). «Immobilized artificial membrane chromatography: surface chemistry and applications», in 'Applications of enzyme biotechnology', Eds. Kelly JW, Baldwin TO, New York (NY): Springer Science & Business Media, 201–220.
- [22]. Taillardat-Bertschinger A, Carrupt PA, Barbato F, et al. (2003). «Immobilized artificial membrane HPLC in drug research», *J. Med. Chem.*, 46, 655–665.
- [23]. Markovich RJ, Stevens JM, Pidgeon C. (1989). «Fourier transform infrared assay of membrane lipids immobilized to silica: leaching and stability of immobilized artificial membrane-bonded phases», *Anal. Biochem.*, 182, 237–244.
- [24]. Markovich RJ, Qiu X, Nichols DE, et al. (1991). «Silica subsurface amine effect on the chemical stability and chromatographic properties of endcapped immobilized artificial membrane surfaces», *Anal. Chem.*, 63, 1851–1860.
- [25]. Rhee D, Markovich R, Chae WG, et al. (1994). «Chromatographic surfaces prepared from lyso phosphatidylcholine ligands», *Anal. Chim. Acta.*, 297, 377–386.
- [26]. Caldwell GW, Masucci JA, Evangelisto M, et al. (1998). «Evaluation of the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine. Drug discovery column for high-performance liquid chromatographic screening of drug-membrane interactions», *J. Chromatogr. A.*, 800, 161–169.
- [27]. Barbato F. (2006). «The use of Immobilized Artificial Membrane (IAM) chromatography for determination of lipophilicity», *Curr. Comput. Aided Drug Des.*, 2, 341–352.
- [28]. Vrakas D, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. (2006). «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.*, 1116, 158–164.
- [29]. Vrakas D, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. (2008). «Electrostatic interactions and ionization effect in immobilized artificial membrane retention. A comparative study with octanol-water partitioning», *J. Chromatogr. A.*, 1187, 67–78.

- [30]. Balimane PV, Chong S, Morrison RA (2000). «Current methodologies for evaluation of intestinal permeability and absorption», *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.*, 44, 301–312.
- [31]. Lázaro E, Ràfols C, Abraham MH, et al. (2006). «Chromatographic estimation of drug disposition properties by means of immobilized artificial membranes (IAM) and C18 columns», *J. Med. Chem.*, 49, 4861–4870.
- [32]. Salminen T, Pulli A, Taskinen J. (1997). «Relationship between immobilised artificial membrane chromatographic retention and the brain penetration of structurally diverse drugs», *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15, 469–477.
- [33]. De Vrieze M, Lynen F, Chen K, et al. (2013). «Predicting drug penetration across the blood–brain barrier: comparison of micellar liquid chromatography and immobilized artificial membrane liquid chromatography», *Anal. Bioanal. Chem.*, 405, 6029–6041.
- [34]. De Vrieze M, Verzele D, Szucs R, et al. (2014). «Evaluation of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine-based immobilized artificial membrane liquid chromatography to predict drug penetration across the blood-brain barrier», *Anal. Bioanal. Chem.*, 406, 6179–6188.
- [35]. Kaliszan R, Nasal A, Bucinski A. (1994). «Chromatographic hydrophobicity parameter determined on an immobilized artificial membrane column: relationships to standard measures of hydrophobicity and bioactivity», *Eur. J. Med. Chem.*, 29, 163–170.
- [36]. Shargel L. (2005). «Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics». New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
- [37]. Herve F, Urien S, Albengres E, Duché J. C, Tillement J. P. (1994). «Drug binding in plasma. A summary of recent trends in the study of drug and hormone binding», *Clin. Pharmacokinet.*, 26, 44–58.
- [38]. Colmenarejo G. (2003). «In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin», *Med. Res. Rev.*, 23, 275–301.
- [39]. Valko K, Nunhuck S, Bevan C, Abraham M. H, Reynolds D. P. (2003). «Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity», *J. Pharm. Sci.*, 92, 2236–2248.
- [40]. Banker MJ, Clark TH (2008). «Plasma/serum protein binding determinations», *Curr. Drug Metab.*, 9(9), 854-859.
- [41]. Νιώπας Ι, Κλινική Φαρμακοκινητική, Διαφάνεια του μαθήματος: «Κατανομή Φαρμάκων», Τμήμα Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου.

Διαθέσιμο στο:

http://www.pharm.auth.gr/old_pharm/gr/anakoinoseis_mathimatwn/ClinicalPharmacokineticsPowerPoint/Distribution.ppt

- [42]. Θεοδωρίδης Γ, Γηρούση Σ, Ζαχαριάδης Γ, Ζώτου Α, Σαμανίδου Β. (2015). «Βιοαναλυτική Χημεία». [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/3667>.
- [43]. Salary M, Hadjmohammadi M. R. (2015). «Human serum albumin-mimetic chromatography based hexadecyltrimethylammonium bromide as a novel direct probe for protein binding of acidic drugs», J. Pharm. Biomed. Anal., 114, 1-7.
- [44]. Ebbing D, Gammon S. (2002). «Γενική Χημεία». Εκδόσεις ΤΡΑΥΛΟΣ, 1η έκδοση, Αθήνα.
- [45]. Εργαστήριο Φυσικοχημείας, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Εργαστηριακές Ασκήσεις Φυσικοχημείας, «Επιφανειακή Τάση», Διαθέσιμο στο: <http://jupiter.chem.uoa.gr/pchem/courses/405/guide-4.pdf> (προσπέλαση στις 30-4-2018).
- [46]. Μπογιατζής Σ, Εργαστηριακές Ασκήσεις Επιστήμης Υλικών ΙΙ, ΤΕΙ Αθηνών, Διαθέσιμο στο: http://users.teiath.gr/sboyatzis/pdf_edu/matersciII/EAR2014-15/Lab/7_detergency.pdf (προσπέλαση στις 30-4-2018).
- [47]. Zana R. (2005). «Introduction to surfactants and surfactant self-assemblies», in 'Dynamics of surfactant self-assemblies – micelles, microemulsions, vesicles, and lyotropic phases', Eds. Zana R, BocaRaton, FL: Taylor&Francis, 2–36.
- [48]. Moroi Y. (1992). «Dissolution of amphiphiles. In: Micelles: Theoretical and Applied Aspects», Plenum Press, New York, 25–40.
- [49]. Rangel-Yagui CO, Pessoa JA, Tavares LC. (2005). «Micellar solubilization of drugs», J. Pharm. and Pharmaceut. Sci., 8, 147–163.
- [50]. Martínez-Pla J. J, Martín-Biosca Y, Sagrado S, Villanueva-Camañas R. M, Medina-Hernández M. J. (2003). «Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability», Biomed. Chromatogr., 17, 530-537.
- [51]. Molero-Monfort M, Escuder-Gilabert L, Villanueva-Camañas R. M, Sagrado S, Medina-Hernández M. J. (2001). «Biopartitioning micellar chromatography: an in vitro technique for predicting human drug absorption», J. Chromatogr. B, 753, 225-236.
- [52]. Escuder-Gilabert L, Molero-Monfort M, Villanueva-Camañas R. M, Sagrado S, Medina-Hernández M. J. (2004). «Potential of biopartitioning micellar

- chromatography as an in vitro technique for predicting drug penetration across the blood-brain barrier», *J. Chromatogr. B*, 807, 193-201.
- [53]. Salary M, Hadjmohammadi M. R. (2013). «Biopartitioning micellar chromatography with sodium dodecyl sulfate as a pseudo α 1-acid glycoprotein to the prediction of protein–drug binding», *J. Chromatogr. B*, 912, 50-55.
- [54]. Escuder-Gilabert L, Martín-Biosca Y, Sagrado S, Villanueva-Camañas R. M, Medina-Hernández M. J. (2001). «Biopartitioning micellar chromatography to predict ecotoxicity», *Anal. Chim. Acta*, 448, 173-185.
- [55]. Tsopelas F, Malaki N, Vallianatou T, Chrysanthakopoulos M, Vrakas D, Ochsenkühn -Petropoulou M, Tsantili-Kakoulidou A. (2015). «Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane chromatography using two stationary phases», *J. Chromatogr. A*, 1396, 25-33.
- [56]. Tsopelas F, Vallianatou T, Tsantili-Kakoulidou A. (2016). «The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption», *Eur. J. Pharm. Sci.*, 81, 82-93.
- [57]. Thiel-Demby V, Humphreys J, Williams L, Ellens H, Shah N, Ayrton A, Polli J. (2008). «Biopharmaceutics Classification System: Validation and Learnings of an in Vitro Permeability Assay», *Mol. Pharm.*, 6(1), 11-18.
- [58]. Kotecha J, Shah S, Rathod I, Subbaiah G. (2008). «Prediction of oral absorption in humans by experimental immobilized artificial membrane chromatography indices and physicochemical descriptors», *Int. J. Pharm.*, 360, 96-106.