



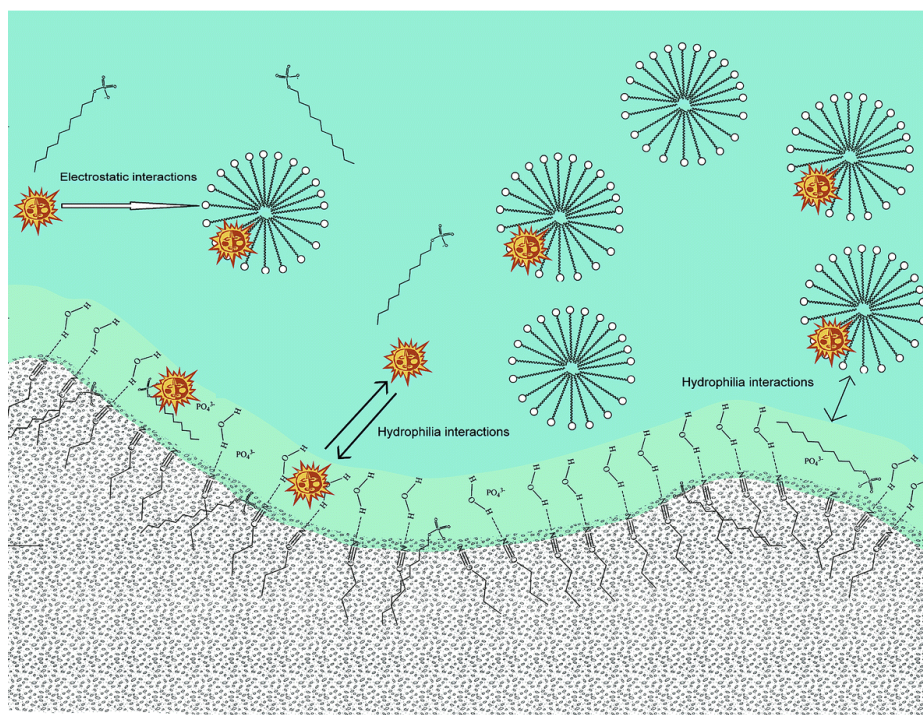
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ 1: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΙΚΚΥΛΙΑΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ
ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ»



Εμμανουέλα Λεβεντάκη

Αριθμός μητρώου: ch14521

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

ΑΘΗΝΑ 2020

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία με τίτλο «Εφαρμογή της μικκυλιακής χρωματογραφίας ως εργαλείο για την εκτίμηση της κατανομής υποψηφίων φαρμάκων στον ανθρώπινο οργανισμό» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα κ. Φ. Τσόπελα, Λέκτορα ΕΜΠ, για την ευκαιρία που μου έδωσε να υλοποιήσω την παρούσα μελέτη, καθώς και την πολύτιμη καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά την διάρκεια της εκπόνησής της. Ευχαριστώ επίσης τα μέλη του εργαστηρίου που με βοήθησαν με προθυμία σε ότι χρειάστηκα. Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένεια και τα κοντινά μου πρόσωπα για την στήριξή τους σε όλη την πορεία μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract	6
Θεωρητικό Μέρος	8
Εισαγωγή.....	8
Ανακάλυψη και ανάπτυξη.....	9
Προκλινική έρευνα.....	10
Κλινικές δοκιμές.....	11
Φαρμακοκινητικές ιδιότητες.....	12
Βιοφαρμακευτικό Σύστημα Ταξινόμησης (BCS)	14
Φυσιολογικοί φραγμοί.....	15
Γαστρεντερικός φραγμός	16
Αιματοεγκεφαλικός φραγμός (ΑΕΦ)	17
Λιποφιλία	18
Αρχή ελάχιστης λιποφιλίας	18
Κανόνας του 5	18
Διττή φύση λιποφιλίας.....	20
Συντελεστής μερισμού	20
Συντελεστής κατανομής	22
Χρωματογραφία.....	24
Συντελεστής κατακράτησης	25
Χρωματογραφία στην ανάπτυξη φαρμάκων.....	26
Βιομμητικές μέθοδοι εκτίμησης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων	27
Βιομμητική Χρωματογραφία.....	28
Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM).....	29
Χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης (HPAC)	31
Μικκυλιακή χρωματογραφία (MLC).....	32
Πειραματικό Μέρος	43
Σχεδιασμός Πειραματικής Διαδικασίας	43
Αντιδραστήρια	43
Οργανολογία	43
Πειραματική Διαδικασία	44
Αποτελέσματα	58

Αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων σε pH=7,4 συγκριτικά με άλλες παραμέτρους.....	58
Αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων σε pH=5,5 συγκριτικά με άλλες παραμέτρους.....	66
Συσχέτιση με φαρμακοκινητικές ιδιότητες	69
Συσχέτιση με την πρωτεϊνική σύνδεση φαρμάκων στο πλάσμα (%PPB).....	69
Συσχέτιση με τον όγκο κατανομής (Vd).....	74
Συμπερασματα	76
Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα	77
Βιβλιογραφία	78

Περίληψη

Το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιολόγηση της μικκυλιακής χρωματογραφίας ως μέθοδο για την εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε 46 υπάρχοντα φάρμακα με γνωστές φυσικοχημικές ιδιότητες και έγινε συσχέτιση των ιδιοτήτων αυτών με τα δεδομένα κατακράτησης. Οι πειραματικές συνθήκες ρυθμίστηκαν ώστε να προσομοιάζουν το βιολογικό περιβάλλον του ανθρώπινου οργανισμού. Στην κινητή φάση της χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε το τασιενεργό Tween 20 σε συγκέντρωση 0,74gr/L, ενώ προστέθηκε και NaCl, για να αναπαραχθεί το φαινόμενο της ώσμωσης. Ο διαλύτης έκλουσης παρασκευάστηκε σε δύο τιμές pH, 7,4, που είναι το pH του αίματος και 5,5, που επικρατεί σε περιοχές του εντέρου. Η θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης διατηρήθηκε σταθερή στους 37°C.

Οι συντελεστές κατακράτησης που προέκυψαν από τις μετρήσεις συγκρίθηκαν με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής των φαρμάκων, καθώς και με συντελεστές κατακράτησης μικκυλιακής χρωματογραφίας κατανομής με τασιενεργό Brij-35 (BMC) και χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM). Οι δύο εκδοχές μικκυλιακής χρωματογραφίας, με Tween και Brij-35 είναι παρόμοιες και επέδειξαν πολύ καλή συσχέτιση ($R^2=0,935$). Ωστόσο το Tween παρουσίασε πιο μεγάλο εύρος τιμών κατακράτησης. Με το συντελεστή μερισμού η συσχέτιση ήταν ικανοποιητική ($R^2=0,778$). Με τον συντελεστή κατανομής ήταν λίγο χαμηλότερη ($R^2=0,744$), αλλά βελτιώθηκε λαμβάνοντας υπόψη στη μεταξύ τους σχέση και τον βαθμό ιοντισμού των φαρμάκων (f^+ , f^-). Η χαμηλότερη συσχέτιση ήταν με την μέθοδο IAM ($R^2=0,621$), πιθανώς λόγω της πολύ διαφορετικών αλληλεπιδράσεων που επικρατούν στις δύο στήλες.

Στο pH 5,5 εξετάστηκαν 21 φάρμακα κυρίως όξινα και αμφολυτικά και υπολογίστηκε η διαφορά των συντελεστών κατακράτησης μεταξύ των δύο τιμών pH ($\Delta \log k = \log k^{7,4} - \log k^{5,5}$). Σχεδόν όλα τα όξινα φάρμακα είχαν αρνητικά $\Delta \log k$, που είναι αναμενόμενο, καθώς σε όξινο περιβάλλον βρίσκονται στην ουδέτερή τους μορφή, οπότε

κατακρατούνται περισσότερο από τη στήλη. Αντίστοιχα, τα βασικά φάρμακα είχαν θετικά $\Delta \log k$, που ανταποκρίνονται στην μικρότερη κατακράτησή τους λόγω ιοντισμού σε pH 5,5.

Τέλος μελετήθηκε η συσχέτιση της μεθόδου με δύο φαρμακοκινητικές ιδιότητες, την σύνδεση με πρωτεΐνες του πλάσματος και τον όγκο κατανομής. Συλλέχθηκαν μετρήσεις για 91 φάρμακα από αυτήν και μία άλλη έρευνα του ίδιου εργαστηρίου και συγκρίθηκαν με γνωστές παραμέτρους. Στην πρωτεϊνική σύνδεση χρησιμοποιήθηκαν 68 φάρμακα για την εξαγωγή του μοντέλου ($R^2=0,780$) το οποίο επικυρώθηκε από τα εναπομείναντα 22. Στον όγκο κατανομής καλύτερη συσχέτιση εμφάνισαν τα βασικά φάρμακα ($R^2= 0.604$).

Abstract

The aim of this thesis is the evaluation of micellar liquid chromatography as a method for the prediction of some pharmacokinetic properties of orally administered drugs. For this purpose, measurements were conducted on 46 existing drugs, with known physicochemical properties and then these properties were correlated with the retention data. The experimental conditions were adjusted to simulate the biological environment of the human organism. In the mobile phase of the chromatography the surfactant Tween 20 was used, at a concentration of 0,74gr/L and NaCl was also added to reproduce the osmosis effect. The eluent was prepared at two pH values, 7,4, which is the pH of the blood and 5,5, which corresponds to some areas of the small intestine. The temperature of the chromatographic column was kept stable at 37°C.

The retention factors that were obtained from the measurements were compared to the partition and distribution coefficients and also to the retention factors of biopartitioning micellar chromatography with the surfactant Brij-35 (BMC) and immobilized artificial membrane chromatography (IAM). The two versions of micellar chromatography, with Tween and Brij-35 are similar and showed very good correlation ($R^2=0,935$). However, Tween presented a more extended range of

retention values. The correlation with the partition coefficient was satisfactory ($R^2=0,778$). With the distribution coefficient it was a bit lower ($R^2=0,744$), but it improved after taking into account the drugs' ionization (f^+ , f^-) in their relationship. The lowest correlation was with the IAM method ($R^2=0,621$), perhaps due to the very different interactions that take place in the two columns.

At pH 5,5 21 drugs were examined, mostly acidic and zwitterion and the difference of their retention factors between the two pH values was computed ($\Delta\log k = \log k^{7,4-5,5}$). Almost all acidic drugs had negative $\Delta\log k$, which is as expected, since in an acidic environment they occur in their neutral form and therefore they get more retained in the column. Accordingly, the basic drugs had positive $\Delta\log k$, which correspond to their lower retention ratio, due to their ionization at pH 5.5.

Finally, the association of the method with two pharmacokinetic properties, plasma protein binding and volume distribution was studied. Measurements of 91 drugs were taken from this and another study from the same laboratory and compared with known parameters. Regarding the protein binding, 68 drugs were used to extract the model ($R^2 = 0.780$), which was validated by the remaining 22. The volume of distribution showed a good correlation only with the basic drugs ($R^2 = 0.604$).

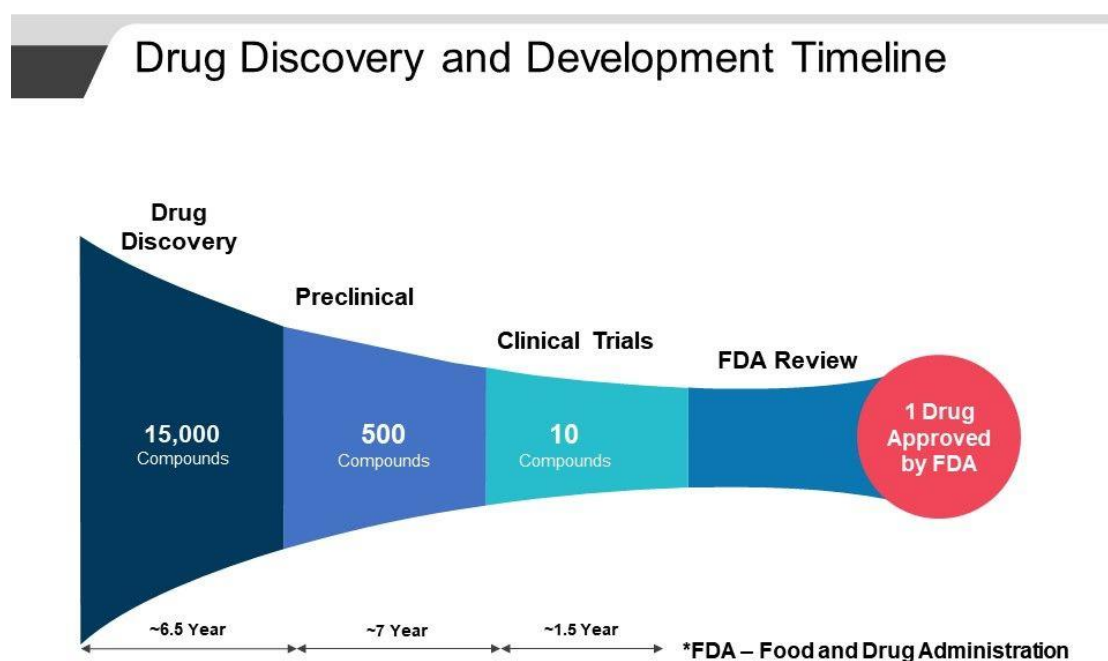
Θεωρητικό Μέρος

Εισαγωγή

Η δημιουργία νέων φαρμάκων βρίσκεται, εύλογα, στο επίκεντρο των επιστημονικών ερευνών δεδομένου ότι πραγματεύεται την πιο πολύτιμη κτήση του ανθρώπου, την υγεία. Τεράστια μερίδα επιστημονικού δυναμικού διατίθεται σε αυτό τον σκοπό, τόσο άμεσα, στην πολύπλοκη και χρονοβόρα διαδικασία της εύρεσης νέων θεραπευτικών ουσιών, όσο και έμμεσα, στην ανάπτυξη νέων τεχνικών και μεθόδων για την απλούστευση και βελτιστοποίηση της διαδικασίας αυτής. Έτσι, το προφίλ της φαρμακευτικής έρευνας εξελίσσεται συνεχώς με την εισαγωγή νέων ανακαλύψεων, που προσφέρουν καινούργιες δυνατότητες προς εκμετάλλευση και άλλες λίγο, άλλες πολύ διαμορφώνουν τα στάδια της ανάπτυξης φαρμάκων. Ένα παράδειγμα αυτού είναι η χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, ένα εγχείρημα σταθμό στην ιστορία της βιολογίας, που αύξησε πάνω από 50% τον αριθμό των νέων υποψηφίων φαρμάκων [1]. Παρά τα τεράστια βήματα προόδου που έχουν γίνει στη φαρμακευτική από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα, υπάρχουν πάντα περιθώρια βελτιστοποίησης, ώστε να καταστεί η δημιουργία φαρμάκων μια απολύτως ασφαλής, ταχεία και οικονομική διαδικασία.

Σήμερα, ακόμα, η ανάπτυξη φαρμάκων αποτελεί μια μακρά και κοστοβόρα προσπάθεια, κατά την οποία απαιτούνται περισσότερα από 12 χρόνια και κατά μέσο όρο 2,6 δισεκατομμύρια \$ για την κυκλοφορία ενός νέου φαρμάκου [2]. Η έκφραση “fail fast, fail cheap” αποτυπώνει την ανάγκη η αναπόφευκτη απόρριψη ακατάλληλων ενώσεων να είναι όσο το δυνατόν λιγότερο επιζήμια. Τα βασικά κριτήρια με τα οποία εξετάζονται οι υποψήφιος φαρμακευτικές ενώσεις είναι η ασφάλεια, η αποτελεσματικότητα και το χαμηλό κόστος. Στην κατεύθυνση αυτή, η διαδικασία σχεδιασμού φαρμάκων ακολουθεί μια σειρά σταδίων εξονυχιστικού ελέγχου και βελτιστοποίησης, ώστε το τελικό προϊόν να έχει τις επιθυμητές ιδιότητες

και να πληροί τις προϋποθέσεις που καθορίζονται από τους οργανισμούς φαρμάκων, όπως είναι ο FDA (Food and Drug Administration) στην Αμερική και ο EMA (European Medicines Agency) στην Ευρώπη. Τα στάδια αυτά είναι τα εξής: ανακάλυψη, ανάπτυξη, προκλινική έρευνα και κλινικές δοκιμές [3].



Εικόνα 1. Στάδια ανάπτυξης φαρμάκων.

Ανακάλυψη και ανάπτυξη

Η ανακάλυψη νέων ενώσεων με φαρμακευτικές ιδιότητες μπορεί να προκύψει με διάφορους τρόπους. Νέες πληροφορίες για τον μηχανισμό που ακολουθεί μια ασθένεια επιτρέπουν στους ερευνητές να σχεδιάσουν ένα προϊόν για να σταματήσουν ή να αντιστρέψουν την εκδήλωσή της. Οι νέες τεχνολογίες που αναφέρθηκαν παραπάνω δίνουν τη δυνατότητα της στόχευσης ιατρικών προϊόντων σε συγκεκριμένα σημεία εντός του σώματος ή της χειραγώγησης του γενετικού υλικού. Ένας άλλος τρόπος είναι η πραγματοποίηση πολλών δοκιμών σε μόρια για να βρεθούν πιθανά ευεργετικά αποτελέσματα έναντι οποιασδήποτε νόσου. Η τύχη

παίζει επίσης καμιά φορά ρόλο, όπως όταν υπάρχουντα φάρμακα εμφανίζουν απρόβλεπτες επιθυμητές επιδράσεις [3].

Αφετηρία του σταδίου της ανακάλυψης είναι η επιλογή ενός μοριακού στόχου, δηλαδή ενός βιολογικού μορίου στο οποίο θα στοχεύει το φάρμακο. Οι μοριακοί στόχοι είναι κυρίως πρωτεΐνες. Πολυσακχαρίτες, λιπίδια ή νουκλεϊκά οξέα ερευνώνται πιο σπάνια, λόγω έλλειψης γνώσεων για τον τρόπο που εμπλέκονται στους μηχανισμούς των νοσημάτων. Η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης-στόχου μπορεί να αποτυπωθεί με διάφορα μοντέλα προσομοίωσης *in silico* και με βάση αυτήν βρίσκεται ένας μεγάλος αριθμός βιοδραστικών οδηγών-δομών (hit). Ακολουθεί ο ταχύς βιολογικός έλεγχος/διαλογή υψηλής απόδοσης (High Throughput Screening, HTS), μια πλήρως αυτοματοποιημένη τεχνολογία που επιτρέπει την διεξαγωγή χιλιάδων πειραμάτων ταυτόχρονα για την αναγνώριση των ενώσεων-οδηγών (lead compounds). Η ένωση-οδηγός περιέχει την φαρμακοφόρο δομή, δηλαδή το σύνολο των χαρακτηριστικών που καθιστούν το μόριο ικανό να προσδεθεί στον βιολογικό στόχο και να τροποποιήσει την λειτουργία του. Παρότι η φαρμακοφόρος δομή είναι το απαιτούμενο διακριτικό του φαρμάκου, δεν είναι η μοναδική προϋπόθεση για την επιτυχή του δράση. Προκειμένου να είναι η φαρμακευτική δράση μιας ένωσης αξιοποιήσιμη πρέπει να της προσδοθούν οι κατάλληλες ιδιότητες, ώστε όταν εισέρχεται στον οργανισμό να φτάνει γρήγορα στον μοριακό της στόχο, χωρίς να εκδηλώνει ανεπιθύμητα αποτελέσματα [4].

Προκλινική έρευνα

Η μελέτη της μοριακής, βιοχημικής και φυσιολογικής δράσης ενός φαρμάκου στην οποία περιλαμβάνεται η σύνδεση με τον υποδοχέα-στόχο και οι χημικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται, ονομάζεται φαρμακοδυναμική [5]. Ένα υποψήφιο φάρμακο εξετάζεται, εκτός από τη φαρμακοδυναμική και ως προς την φαρμακοκινητική του συμπεριφορά, η οποία περιγράφει την επίδρασή του στον οργανισμό και αποτελείται από την απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμό και απέκκριση (absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME) και ως προς την

τοξικότητα ή ADMET, όπως αναφέρονται συνολικά. Η προκλινική έρευνα φαρμάκων αφιερώνεται αφενός στην ενίσχυση της φαρμακευτικής δράσης (φαρμακοδυναμικής) των ενώσεων-οδηγών και αφετέρου στον προσδιορισμό και την βελτιστοποίηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων τους. Έτσι στο στάδιο αυτό συλλέγονται πληροφορίες σχετικά με τα ADME χαρακτηριστικά του φαρμάκου, την εμφάνιση δυσμενών παρενεργειών, την αλληλεπίδραση αυτού με άλλες θεραπείες που μπορεί να συνεργούν στον οργανισμό, την δόση, τη μέθοδο χορήγησης, κ.α. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιούνται πειράματα *in vitro* και *in vivo* τα οποία πρέπει να συμμορφώνονται με το σύστημα ελέγχου καλής εργαστηριακής πρακτικής (Good Laboratory Practice, GLP) [6].

Οι δοκιμές *in vitro* χρησιμοποιούν κυτταρικές καλλιέργειες από ιστούς ή όργανα του σώματος, ή εστιάζουν σε βιολογικά μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες για να προσδιορίσουν την δράση των φαρμακευτικών ενώσεων, κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες. Ωστόσο η μελέτη που γίνεται σε μοντέλα μεμονωμένων βιολογικών συστημάτων, σε τρυβλία *petri* και σε ρυθμιζόμενο περιβάλλον δεν είναι αντιπροσωπευτική της συμπεριφοράς των ενώσεων σε έναν ζωντανό οργανισμό. Συνεπώς, υλοποιούνται περαιτέρω δοκιμές *in vivo*, σε πειραματόζωα. Τα ζώα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά γι' αυτό τον σκοπό είναι τα ποντίκια, τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με τον άνθρωπο, καθώς το γονιδίωμά τους συμπίπτει με του ανθρώπου κατά 99%. Γενικά, τα πιο τυπικά πειραματόζωα στην φαρμακευτική είναι τα τρωκτικά (ποντίκια, αρουραίοι, ινδικά χοιρίδια) και οι σκύλοι. Κατά την προκλινική μελέτη συντίθενται και εξετάζονται χιλιάδες διαφοροποιήσεις των ενώσεων-οδηγών, μόλις δε μια βελτιωμένη ένωση αναγνωριστεί, το ερευνώμενο φάρμακο (Investigational New Drug) γίνεται υποψήφιο για τις κλινικές δοκιμές.

Κλινικές δοκιμές

Τα φάρμακα που θα εμφανίσουν θετικά αποτελέσματα στις προκλινικές μελέτες θα εγκριθούν για να περάσουν στο επόμενο στάδιο, την δοκιμή σε ανθρώπους. Οι κλινικές δοκιμές είναι ιατρικά πειράματα, κατά τα οποία συγκεκριμένος αριθμός

εθελοντών δέχεται μια θεραπευτική αγωγή, για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά της. Πραγματοποιούνται επίσης και οι λεγόμενες στρατηγικές δοκιμές, με σκοπό να καθοριστούν οι καλύτεροι τρόποι χορήγησης ενός φαρμάκου σε συνδυασμό με άλλες ουσίες. Το στάδιο των κλινικών δοκιμών διεκπεραιώνεται σε διάφορες φάσεις, ξεκινώντας από ένα μικρό αριθμό υγιών ανθρώπων και καταλήγοντας σε μια μεγάλη ομάδα ασθενών. Οι φάσεις ακολουθούν τη σειρά από 0 έως IV. Στην φάση 0 συμμετέχουν περίπου 10 με 15 άτομα, στα οποία χορηγείται μικρή δόση του φαρμάκου, ώστε να παρατηρηθεί η φαρμακοκινητική του συμπεριφορά και να εξακριβωθεί η ασφάλειά του. Στην φάση I, μια ομάδα 15 έως 30 υποκειμένων λαμβάνει το φάρμακο σε διάφορες δόσεις, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη δόση, στην οποία εμφανίζονται οι λιγότερες παρενέργειες, χωρίς να ενδιαφέρει η θεραπευτική του δράση. Ακολουθεί η φάση II, όπου εξετάζεται τόσο η φαρμακοκινητική όσο και η φαρμακοδυναμική επίδραση του φαρμάκου, σε ένα μεγαλύτερο πλήθος υποκειμένων της τάξης των εκατοντάδων. Οι φάσεις II και III χαρακτηρίζονται ως ελεγχόμενες, διότι συγκρίνουν την αποτελεσματικότητα των δοκιμαζόμενων φαρμάκων έναντι κάποιων αγωγών που λειτουργούν ως αναφορά. Στην φάση III γίνεται τυχαία επιλογή των εθελοντών που λαμβάνουν το δοκιμαζόμενο φάρμακο και το φάρμακο αναφοράς, το οποίο μπορεί να είναι και placebo, χωρίς οι ίδιοι να γνωρίζουν σε ποια ομάδα ανήκουν (τυφλή δοκιμή), για να αποφευχθούν παράγοντες υποκειμενικότητας. Σκοπός της φάσης αυτής είναι να συγκριθεί το δοκιμαζόμενο φάρμακο με ήδη υπάρχοντα, που κυκλοφορούν στην αγορά και να διαπιστωθεί αν εμφανίζει καλύτερα χαρακτηριστικά. Τέλος, η φάση IV έπεται της έγκρισης και επίσημης κυκλοφορίας του φαρμάκου. Σε αυτήν, παρακολουθούνται οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις του φαρμάκου, καθώς και η δράση του σε ένα πολύ μεγαλύτερο πλήθος ασθενών [6], [7].

Φαρμακοκινητικές ιδιότητες

Το 40% των αποτυχιών στον σχεδιασμό φαρμάκων οφείλονται σε φαρμακοκινητικά αίτια, συνεπώς οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των υποψήφιων φαρμακευτικών

μορίων έχουν το ίδιο μεγάλη βαρύτητα με την φαρμακοδυναμική δράση αυτών [4]. Επομένως κατά το προκλινικό στάδιο διεξάγονται εκτενείς μελέτες και δοκιμές, ώστε να εξακριβωθεί το φυσικοχημικό προφίλ που θα πρέπει να πληροί ένα φάρμακο, τόσο για να έχει ενισχυμένη δράση ως προς τον φαρμακευτικό στόχο, όσο και για να είναι φιλικό και ασφαλές στην χρήση. Οι ιδιότητες που καθορίζουν την διαδρομή μιας ουσίας στον οργανισμό συνοψίζονται, όπως αναφέρθηκε, στον όρο ADME και εξαρτώνται από τα φυσικοχημικά και μοριακά χαρακτηριστικά αυτής [8]. Η απορροφησιμότητα αναφέρεται στην εισαγωγή της ουσίας στο σώμα, μέσω μιας από τις οδούς χορήγησης και ορίζεται από την διαλυτότητα και την διαπερατότητα αυτής. Η κατανομή αφορά την κίνησή της εντός του σώματος και ο μεταβολισμός τις αναπόφευκτες αλληλεπιδράσεις της με τα βιολογικά μόρια που την περιβάλλουν, με αποτέλεσμα την μετατροπή της σε άλλες ενώσεις. Τέλος, η απέκκριση δηλώνει την έξοδο της ουσίας από τον οργανισμό, μόλις αυτή έχει ολοκληρώσει την φαρμακευτική δράση της.

Πέραν αυτών στις φαρμακοκινητικές ιδιότητες ανήκουν και άλλα χαρακτηριστικά, όπως η βιοδιαθεσιμότητα, η τοξικότητα, η πρωτεϊνική σύνδεση και ο όγκος κατανομής. Η βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται ως το ποσοστό της δόσης ενός φαρμάκου που εισέρχεται στην συστηματική κυκλοφορία του αίματος και στην περίπτωση χορήγησης από το στόμα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον μεταβολισμό πρώτης διόδου, που πραγματοποιείται στο στομάχι [9]. Η τοξικότητα περιλαμβάνει οποιαδήποτε ανεπιθύμητη επίδραση μπορεί να εκδηλώνει το φάρμακο στον οργανισμό, εξαιτίας της επαγωγής αντιδράσεων που δεν εντάσσονται στην φαρμακευτική δράση αυτού [10].

Η σύνδεση των φαρμακευτικών μορίων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι μεταξύ των βασικότερων παραγόντων που επηρεάζουν την ADMET συμπεριφορά αυτών, καθώς έχει βρεθεί ότι περίπου το 43% των 1500 πιο κοινών φαρμάκων αναπτύσσουν δεσμούς με πρωτεΐνες πλάσματος σε βαθμό τουλάχιστον 90% [11]. Οι πρωτεΐνες πλάσματος του αίματος δεσμεύουν ένα μέρος της συνολικής ποσότητας του φαρμάκου που εισάγεται στον οργανισμό, περιορίζοντας έτσι το κλάσμα που μένει ελεύθερο να διασχίσει τις μεμβράνες, να διανεμηθεί στο σώμα και να εκδηλώσει την θεραπευτική δράση του. Το δεσμευμένο, όμως, φάρμακο χρησιμεύει ως απόθεμα το

οποίο αντλείται και αξιοποιείται, όταν το ελεύθερο κλάσμα ολοκληρώσει την πορεία του και αποβληθεί, αυξάνοντας έτσι τον χρόνο φαρμακοκινητικής ζωής του [12]. Επιπλέον, η σύνδεση με τις πρωτεΐνες του ορού αίματος μπορεί να ενισχύσει την διαλυτότητα υδρόφοβων φαρμάκων [11].

Ο όγκος κατανομής (Volume of distribution, V_d) είναι ένα θεωρητικό μέγεθος που αντιπροσωπεύει την τάση ενός φαρμάκου είτε να παραμείνει στο πλάσμα, είτε να ανακατανομηθεί σε άλλα τμήματα ιστών. Εξ ορισμού, ο V_d είναι μια σταθερά που συνδέει τη συνολική ποσότητα του φαρμάκου στο σώμα με τη συγκέντρωση αυτού στο πλάσμα. Η σχέση που τον εκφράζει είναι:

όγκος κατανομής (L) = ποσότητα φαρμάκου στο σώμα (mg) / συγκέντρωση φαρμάκου στο πλάσμα (mg/L).

Με βάση την παραπάνω εξίσωση ένα φάρμακο με υψηλό V_d έχει τάση να διαφύγει από το πλάσμα και να εισέλθει στις εξωαγγειακές περιοχές του σώματος, γεγονός που απαιτεί υψηλότερη δόση του φαρμάκου για να επιτευχθεί μια δεδομένη συγκέντρωση στο πλάσμα. Αντίθετα, ένα φάρμακο με χαμηλή V_d έχει τάση να παραμένει στο πλάσμα, με αποτέλεσμα να χρειάζεται μικρότερη δόση για να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση σε αυτό [13].

Βιοφαρμακευτικό Σύστημα Ταξινόμησης (BCS)

Η μεταφορά ενός φαρμακευτικού μορίου στον οργανισμό χωρίζεται σε δύο τύπους, την παθητική μεταφορά και την ενεργητική ή μεταφορά μέσω σύνδεσης με μακρομόρια. Η παθητική διάχυση είναι αυθόρμητο φαινόμενο που στηρίζεται στη διαφορά συγκέντρωσης του μορίου για την ροή αυτού προς μια κυτταρική περιοχή. Η ενεργητική διάχυση απαιτεί την συμμετοχή πρωτεϊνών και τη συνεισφορά ενέργειας με τη μορφή ATP προκειμένου το φάρμακο να φτάσει στον στόχο του. Η παθητική διάχυση, ανάλογα με το αν μια ένωση μεταφέρεται περνώντας διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης ή από τον χώρο που υπάρχει ανάμεσα στα κύτταρα, καλείται ενδοκυτταρική (transcellular) και παρακυτταρική (paracellular), αντίστοιχα.

Η παρακυτταρική οδός σε συστήματα επιθηλιακών φύλλων, όπου τα κύτταρα συσπειρώνονται σε πολύ σφιχτές δομές προϋποθέτει πολύ μικρό μέγεθος μορίων, δηλαδή μικρό μοριακό βάρος. Στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό δε -ένα από τα πιο στεγανά κυτταρικά φύλλα του οργανισμού- αποτελεί αμελητέα οδό διάχυσης, με αποτέλεσμα στόχοι εντός του κεντρικού νευρικού συστήματος να είναι προσιτοί μόνο μέσω της ενδοκυτταρικής οδού. Η ικανότητα μιας ένωσης να μεταφερθεί με παθητική διάχυση είτε ενδοκυτταρικά είτε παρακυτταρικά, εκφράζεται από την διαλυτότητα και την διαπερατότητα αυτής.

Αυτές οι δύο φυσικοχημικές ιδιότητες αποτέλεσαν τη βάση για την ανάπτυξη του Βιοφαρμακευτικού Συστήματος Ταξινόμησης, που σε συνδυασμό με την ταχύτητα διαλυτοποίησης των φαρμακευτικών προϊόντων συνθέτει την αποτύπωση των τριών παραγόντων που διέπουν τον ρυθμό και την έκταση της απορρόφησης per os στερεών φαρμάκων [14]. Το BCS κατηγοριοποιεί τα φάρμακα στις εξής τέσσερις τάξεις:

Τάξη I: υψηλή διαλυτότητα-υψηλή διαπερατότητα

Τάξη II: χαμηλή διαλυτότητα- υψηλή διαπερατότητα

Τάξη III: υψηλή διαλυτότητα- χαμηλή διαπερατότητα

Τάξη IV: χαμηλή διαλυτότητα- χαμηλή διαπερατότητα

Φυσιολογικοί φραγμοί

Ανάλογα με την οδό χορήγησης ενός φαρμάκου και την περιοχή του οργανισμού στην οποία στοχεύει, οι επιθυμητές φαρμακοκινητικές ιδιότητές του μπορεί να διαφέρουν. Η χορήγηση από του στόματος (per os) είναι η δημοφιλέστερη οδός χορήγησης, καθώς είναι η φιλικότερη για τους ασθενείς [4]. Τα κυριότερα εμπόδια που συναντούν τα φάρμακα στο σώμα είναι οι φυσιολογικοί φραγμοί, τους οποίους πρέπει να ξεπεράσουν προκειμένου να φτάσουν στην περιοχή της δράσης τους. Οι τρεις βασικοί φυσιολογικοί φραγμοί είναι το δέρμα, το γαστρεντερικό επιθήλιο

(intestinal epithelium) και ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (blood-brain barrier, BBB). Το δέρμα αποτελεί ζήτημα ενδιαφέροντος μόνο για τα φάρμακα που χορηγούνται διαδερμικά με επικόλληση έμπλαστρου ή για προϊόντα κοσμετολογίας, που δεν εξετάζονται στην παρούσα εργασία. Βασική προϋπόθεση για τα φάρμακα αυτά είναι η δυνατότητα εισχώρησης μέσω της πυκνής κεράτινης στοιβάδας του δέρματος [15].

Γαστρεντερικός φραγμός

Μόλις ένα φάρμακο εισέλθει από το στόμα στον οργανισμό έρχεται αντιμέτωπο με ένα σύστημα διαδοχικών φραγμών, που εκτείνεται σε όλη την πορεία της μεταφοράς του από τον γαστρεντερικό σωλήνα στο αίμα. Η μεμβράνη του λεπτού εντέρου αποτελείται από μια στοιβάδα βλεννογόνου που σχηματίζει πτυχώσεις, τις λεγόμενες λάχνες, στις οποίες συσπειρώνονται επιθηλιακά κύτταρα με δικές τους προεξοχές, τις μικρολάχνες. Οι πτυχώσεις αυτές αυξάνουν την επιφάνεια της μεμβράνης περίπου 600 φορές, γεγονός που καθιστά την μεμβράνη εξαιρετικό μέσο για την μετάβαση του φαρμάκου στο αίμα [15]. Ο ρυθμός και το ποσοστό της γαστρεντερικής απορρόφησης του φαρμάκου εξαρτάται από την επιφάνεια του επιθηλίου και την διαπερατότητα του φαρμάκου [16]. Η απορροφησιμότητα των ασθενώς όξινων ή βασικών φαρμάκων επηρεάζεται από τον βαθμό ιοντισμού τους, οπότε και από το pH της περιοχής. Συγκεκριμένα όσο χαμηλότερος είναι ο βαθμός ιοντισμού ενός φαρμάκου τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφησή του. Τα ασθενώς βασικά φάρμακα σε χαμηλό pH βρίσκονται στην ιονισμένη τους μορφή και συνεπώς στο όξινο περιβάλλον του στομάχου απορροφώνται πιο δύσκολα. Αντιθέτως η απορρόφηση των ασθενώς όξινων φαρμάκων είναι μέγιστη στο στομάχι, όπου επικρατεί η ουδέτερη μορφή τους [4].

Αιματοεγκεφαλικός φραγμός (ΑΕΦ)

Ο εγκέφαλος είναι ένα εξαιρετικά ευαίσθητο και εύθραυστο νευρωνικό σύστημα που εξασφαλίζει τη διατήρηση της ομοιόστασης και άλλων ζωτικών λειτουργιών, χρειάζεται δε τακτική παροχή θρεπτικών ουσιών. Ο ΑΕΦ αποτελεί την φυσική προστασία του οργάνου και ελέγχει την μεταφορά από και προς το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) κυττάρων και μορίων, όπως φαρμάκων, ορμονών, μεταβολιτών κ.ά.. Ο φραγμός αυτός αναστέλλει την παροχή θεραπευτικών παραγόντων στο ΚΝΣ και παρεμποδίζει την δίοδο μεγάλου αριθμού φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών, των αντινεοπλασματικών και των νευροπεπτιδίων [13]. Ο ΑΕΦ σχηματίζεται από μια στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία είναι πεπλατυσμένα επιθηλιακά κύτταρα με υψηλή εξειδίκευση, που έρχονται σε επαφή με το αίμα. Στον άνθρωπο η εκτιμώμενη επιφάνειά του είναι 12m². Το ενδοθήλιο του ΑΕΦ σχηματίζει μια πολύ πιο στενή διεπιφάνεια από το περιφερειακό ενδοθήλιο. Οι περισσότερες μικρές διαλυμένες ουσίες στην περιφέρεια μπορούν να διαχέονται μεταξύ των διακυτταρικών σχισμών πλάτους 50-200nm. Αντίθετα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα στο μεγαλύτερο μέρος του εγκεφάλου είναι πυκνά συγκροτημένα και περιορίζουν την διαπερατότητα στο ελάχιστο [15]. Ο μερισμός μιας ένωσης στον ΑΕΦ, δηλαδή ο βαθμός στον οποίο αυτή διαπερνά τον φραγμό και εισέρχεται στον εγκέφαλο ποσοτικοποιείται με το μέγεθος logBB, το οποίο ορίζεται ως [17], [18]:

$$\log BB = \frac{C_{\text{εγκέφαλος}}}{C_{\text{αίμα}}} \quad (1)$$

Όπου $C_{\text{εγκέφαλος}}$ είναι η συγκέντρωση της ένωσης στους εγκεφαλικούς ιστούς και $C_{\text{αίμα}}$ είναι η συγκέντρωσή της στο αίμα. Η μέθοδος που στηρίζεται σε αυτό τον τύπο απαιτεί την χρήση πειραματόζων, κυρίων τρωκτικών, για τον υπολογισμό του logBB, είναι δε χρονοβόρα και εγείρει ηθικό δίλημμα, ενώ οι πληροφορίες που δίνει για την οδό είναι περιορισμένες [17].

Λιποφιλία

Αρχή ελάχιστης λιποφιλίας

Τα χαρακτηριστικά εκείνα που προσδίδουν σε ένα φάρμακο επιθυμητές ιδιότητες και καθιστούν πρόσφορη τη χρήση του δεν είναι τυχαία, αλλά ακολουθούν κάποιες βασικές αρχές. Παρατηρήσεις ερευνητών έχουν οδηγήσει στην θέσπιση ορίων στις τιμές κάποιων φυσικοχημικών μεγεθών, εντός των οποίων οι φαρμακευτικές ενώσεις επιδεικνύουν επιθυμητή συμπεριφορά. Μια από τις βασικότερες ιδιότητες που καθορίζουν την συμπεριφορά των φαρμακευτικών ενώσεων είναι η λιποφιλία, όπως καθιερώθηκε από τον Hansch και τους συνεργάτες του το 1987 με την διατύπωση της αρχής ελάχιστης λιποφιλίας [19]. Η αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας αναφέρει ότι ο σχεδιασμός φαρμάκων πρέπει να στοχεύει στην καλύτερη δυνατή φαρμακευτική δράση με την μικρότερη δυνατή λιποφιλία.

Κανόνας του 5

Το 1996 ο χημικός Lipinski και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν ένα άρθρο με σκοπό να συσχετίσουν τα χημικά χαρακτηριστικά των φαρμακευτικών ουσιών που χορηγούνται από το στόμα με την διαλυτότητα και την διαπερατότητά τους [20]. Στο άρθρο αυτό αναφέρεται ότι η λιποφιλία, το μοριακό βάρος και η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου παίζουν καθοριστικό ρόλο στην φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική συμπεριφορά μιας ουσίας. Τα συμπεράσματα της έρευνας συνοψίστηκαν στον κανόνα των 5, κατά τον οποίο η χαμηλή απορροφησιμότητα ή διαπερατότητα είναι πιο πιθανό να παρατηρηθεί σε μια ένωση εάν γι' αυτήν ισχύουν τα εξής:

- Υπάρχουν περισσότεροι από 5 δότες δεσμού H (εκφρασμένοι ως το άθροισμα OH και NH).
- Το μοριακό βάρος της ξεπερνάει τα 500Da.

- Το logP αυτής είναι άνω του 5, και
- Υπάρχουν περισσότεροι από 10 δέκτες δεσμού υδρογόνου (εκφρασμένοι ως το άθροισμα των N και O).

Τάξεις ενώσεων που δρουν ως υποστρώματα βιολογικών μεταφορέων αποτελούν εξαίρεση σε αυτούς τους κανόνες.

Το μέγεθος logP ονομάζεται συντελεστής μερισμού και αποτελεί έκφραση της λιποφιλίας ενός μορίου, όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

Ενώσεις στις οποίες δύο ή περισσότερες από τις παραπάνω παραμέτρους συνάπτονται μπορεί να εμφανίζουν κακή απορροφησιμότητα ή διαπερατότητα. Ο κανόνας αυτός εκπορεύθηκε από την παρατήρηση και καταγραφή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων που προσδίδουν σε μόρια την φαρμακευτική τους συμπεριφορά και δεν προβλέπει την φαρμακευτική δράση που θα έχει μια οδηγός δομή με γνωστά χαρακτηριστικά. Η χρησιμότητα του κανόνα έγκειται στο ότι προσφέρει μια σειρά από ενδείξεις για την καταλληλότητα μιας ουσίας ως φάρμακο, καθώς και στο ότι υποδεικνύει ποιες είναι οι ιδιότητες στις οποίες θα πρέπει να δοθεί βαρύτητα για την βελτίωση του φαρμάκου.

Οι έρευνες των Hansch και Lipinski επισφράγισαν μια διατύπωση που είχε γίνει από πάρα πολλά χρόνια αντιληπτή και είχε αποτελέσει ζήτημα μελέτης: ότι η λιποφιλία έχει κυρίαρχη επίδραση στις ιδιότητες ADMET των φαρμακευτικών ενώσεων. Σήμερα η λιποφιλία συνεχίζει να αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας, καθώς εξελίξεις στην επιστήμη και την τεχνολογία προσφέρουν ασταμάτητα νέες δυνατότητες για τον ταχύ και ακριβή προσδιορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων χημικών ουσιών και συνεπώς την κατασκευή του φαρμακευτικού τους προφίλ. Η λιποφιλία έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την διαλυτότητα και την διαπερατότητα μέσω βιολογικών μεμβρανών, με την δραστικότητα, την εκλεκτικότητα και την αναμιξιμότητα, ενώ επίσης επηρεάζει τον μεταβολισμό και την τοξικότητα των φαρμάκων, ακόμα και την φαρμακοδυναμική τους δράση [21]. Χαμηλή λιποφιλία συνοδεύεται από μικρή διαπερατότητα ενώ, από την άλλη, πολύ υψηλή λιποφιλία, παρότι προσδίδει επιθυμητά χαρακτηριστικά στην ένωση μπορεί να προκαλέσει πολλά προβλήματα. Συγκεκριμένα, μπορεί να οδηγήσει σε παγίδευση της ένωσης στο υδρόφοβο

εσωτερικό των κυτταρικών διπλοστοιβάδων, σε εμφάνιση τοξικότητας, συσσώρευση του φαρμάκου στον οργανισμό και ανεξέλεγκτη διασπορά του φαρμάκου σε περιοχές του οργανισμού που δεν πρέπει να επηρεαστούν, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα [15], [22].

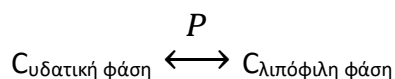
Διττή φύση λιποφιλίας

Η λιποφιλία εξ ορισμού εκφράζει την συγγένεια ενός μορίου ή μιας ρίζας προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον και πρακτικά αναφέρεται στην ικανότητα μιας ένωσης να διαλύεται σε λίπη, έλαια, λιπαρά και μη πολικούς διαλύτες [23], [22]. Χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ευκολία μετάβασης μιας ένωσης από ένα υδατικό περιβάλλον σε ένα λιπόφιλο. Η λιποφιλία πολλές φορές λανθασμένα συγχέεται με την υδροφοβικότητα, η οποία αφορά την αλληλεπίδραση ενός μορίου με το νερό. Στην πραγματικότητα έχει βρεθεί ότι η λιποφιλία έχει διττή φύση. Χαρακτηρίζεται αφενός από την υδροφοβικότητα στην οποία συγκαταλέγονται οι υδροφοβικές δυνάμεις και οι δυνάμεις διασποράς (London) και σχετίζεται με το μέγεθος της ένωσης και αφετέρου από την πολικότητα η οποία περιλαμβάνει τους δεσμούς υδρογόνου, τις διπολικές δυνάμεις και ηλεκτρονιακές παραμέτρους. Η λιποφιλία και Οι δύο αυτοί όροι της υπακούουν την παρακάτω εξίσωση 1.

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβικότητα} - \text{Πολικότητα} \quad (1)$$

Συντελεστής μερισμού

Μέτρο της λιποφιλίας είναι ο συντελεστής μερισμού (partition coefficient, P), ο οποίος ορίζεται ως η σταθερά της ισορροπίας μιας ένωσης μεταξύ δυο μη αναμίξιμων φάσεων, μιας υδατικής και μιας λιπόφιλης.



Δηλαδή το P εκφράζεται ως ο λόγος των συγκεντρώσεων της ένωσης στον λιπιδικό και υδατικό διαλύτη.

$$P = \frac{C_{\text{λιπόφιλη φάση}}}{C_{\text{υδατική φάση}}} \quad (2)$$

Ο δεκαδικός λογάριθμος του συντελεστή κατανομής, $\log P$, είναι μια σταθερά, χαρακτηριστική για κάθε ένωση που εξαρτάται μόνο από την θερμοκρασία και τους δύο διαλύτες και αποτελεί μέτρο της λιποφιλίας της ένωσης.

Η φυσική σημασία του $\log P$ είναι ότι εάν έχει αρνητική τιμή για μια ουσία, αυτή έχει μεγαλύτερη συγγένεια προς την υδατική φάση, αν έχει θετική τιμή δηλώνει μεγαλύτερη λιποφιλία, ενώ αν είναι ίση με μηδέν η ουσία είναι ισόποσα μερισμένη στους δύο διαλύτες. Η πιο συχνή μέτρηση του συντελεστή μερισμού γίνεται στο σύστημα νερό/οκτανόλη, $\log P_{\text{oct}}$. Η οκτανόλη, έχοντας μια πολική κεφαλή και μια ευλύγιστη, μη πολική ουρά, έχει ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και αμφιφιλικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των φωσφολιπιδίων και των πρωτεϊνών που βρίσκονται στις βιολογικές μεμβράνες. Ο Collander ανακάλυψε ότι οι λογάριθμοι των συντελεστών μερισμού δύο διαφορετικών συστημάτων διαλυτών σχετίζονται μεταξύ τους γραμμικά.

$$\log P_1 = a \log P_2 + b \quad (3)$$

Η εξίσωση (3) εφαρμόζεται με επιτυχία όταν τα P_1 και P_2 αφορούν παρόμοιους μη πολικούς διαλύτες, όπως οι αλκοόλες, οι εστέρες και οι αιθέρες οπότε καθίσταται δυνατή η γραμμική συσχέτιση του συστήματος οκτανόλης με ένα βιολογικό σύστημα.

Από έρευνες, έχει διαπιστωθεί ότι το σύστημα νερού/οκτανόλης αποδίδει τις πιο ακριβείς και συσχετίσιμες τιμές $\log P$ των φαρμάκων σε σχέση με άλλους οργανικούς διαλύτες, όπως το βενζόλιο και το δεκαεξάνιο. Ωστόσο αυτό δεν συμβαίνει πάντα, καθώς δεν είναι δυνατόν ένας μόνο διαλύτης να έχει τα ίδια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά με τις βιολογικές μεμβράνες, συνεπώς σε πολλές περιπτώσεις το σύστημα νερού/οκτανόλης είναι ακατάλληλο να προβλέψει τις ιδιότητες ενός βιολογικού περιβάλλοντος, όπως συμβαίνει στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Συντελεστής κατανομής

Ο συντελεστής μερισμού είναι πολύ χρήσιμο μέγεθος, αλλά η έκφρασή του περιορίζεται στην ουδέτερη μορφή ενός μορίου. Αντιθέτως, οι περισσότερες φαρμακευτικές ουσίες περιέχουν ιοντισμένες ομάδες των οποίων ο βαθμός ιοντισμού εξαρτάται από το pH του συστήματος και, καθώς ο ιοντισμός μειώνει την λιποφιλία μιας ουσίας, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπ' όψη κατά τη μέτρηση αυτής. Την έλλειψη αυτή ήρθε να καλύψει ο συντελεστής κατανομής, D , η εξαρτώμενη από το pH σταθερά ισορροπίας, που περιλαμβάνει το άθροισμα των συγκεντρώσεων των ιοντισμένων και μη μορφών μιας ουσίας. Με βάση αυτά ο συντελεστής κατανομής εκφράζεται από την παρακάτω σχέση.

$$D = \frac{C_{\text{λιπόφιλη φάση}}}{\sum C_{\text{υδατική φάση}}} \quad (4)$$

Για μια ένωση με μια ιονιζόμενη ομάδα, σε κάποιο pH, ισχύει η σχέση (5).

$$D = f_N \cdot P^N + f_I \cdot P^I \quad (5)$$

Και ο λογάριθμος αυτής είναι,

$$\log D = \log (f_N \cdot P^N + f_I \cdot P^I) \quad (6)$$

Όπου f_N και f_I είναι τα μοριακά κλάσματα της ουδέτερης και της ιοντισμένης μορφής, αντίστοιχα και P^N και P^I οι συντελεστές μερισμού αυτών.

Εφαρμόζοντας την εξίσωση Hendersson-Hasselbalch, μπορούν να εξαχθούν οι εξισώσεις που συσχετίζουν τον συντελεστή κατανομής με τον συντελεστή μερισμού, για διάφορα είδη ιοντισμού.

Για μονοπρωτικά οξέα:

$$\log D = \log P - \log (1 + 10^{pH-pKa}),$$

για μονοπρωτικές βάσεις:

$$\log D = \log P - \log (1 + 10^{pKa-pH}),$$

για διπρωτικά οξέα:

$$\log D = \log P - \log (1 + 10^{pH-pKa} + 10^{2pH-pKa1-pKa2}), \text{ με } pKa1 < pKa2$$

και για διπρωτικές βάσεις:

$$\log D = \log P - \log (1 + 10^{pKa-pH} + 10^{pKa1+pKa2-2pH})$$

Σε περίπτωση που το pH του διαλύματος προσεγγίζει την τιμή pKa+2 στα οξέα ή pKa-2 στις βάσεις, επικρατεί η παρουσία της ιονισμένης μορφής και επομένως οι παρακάτω εξισώσεις είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικές και λαμβάνουν υπ' όψη τη συνεισφορά αυτής στον συντελεστή κατανομής [24].

Για οξέα:

$$D = \frac{P^N + P^I \cdot Ka/[H^+]}{1 + Ka/[H^+]}$$

Για βάσεις:

$$D = \frac{P^N + P^I \cdot Ka/[H^+]}{1 + Ka/[H^+]}$$

Γενικά θεωρείται ότι στην οργανική φάση κατανέμεται μόνο η ουδέτερη μορφή μιας ουσίας, αν και πρακτικά η ιοντισμένη μορφή μπορεί μάλλον να κατανεμηθεί και στην οργανική φάση, εφόσον υπάρχουν και ιόντα αντίθετου φορτίου, αλλά σε περίπου τρεις φορές μικρότερη τάξη από την ουδέτερη φάση. Δηλαδή αν το $\log P_{\text{ουδέτερο}}$ στην λιπιδική φάση είναι 4 το $\log P_{\text{ιοντισμένο}}$ θα είναι κοντά στο 1. Ο συντελεστής μερισμού είναι πάντα μεγαλύτερος ή ίσος με το συντελεστή κατανομής, $\log P \geq \log D$, καθώς η συγκέντρωση των ιονιζόμενων ομάδων στην υδατική φάση είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της αδιάστατης μορφής. Δηλαδή, ο παρανομαστής του κλάσματος αυξάνεται και άρα το $\log D$ μειώνεται σε σχέση με την περίπτωση μόνο αδιάστατης μορφής.

Οι συντελεστές μερισμού και κατανομής μπορούν να θεωρηθούν ως μέτρα του διαχωρισμού μιας ένωσης μεταξύ της υδατικής φάσης και μιας κυτταρικής μεμβράνης και ως εκ τούτου της διαπερατότητας αυτής. Έχει διαπιστωθεί ότι η ουδέτερη μορφή των ενώσεων έχει τη μεγαλύτερη συμβολή στην διαπερατότητα, έναντι της ιονισμένης.

Χρωματογραφία

Μια από τις ευρέως καθιερωμένες μεθόδους χημικής ανάλυσης, που αποτελεί σχεδόν αναπόσπαστο μέρος της εργαστηριακής έρευνας είναι η χρωματογραφία. Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια πληθώρα αναλυτικών τεχνικών που βασίζονται στην αρχή του διαχωρισμού συστατικών από ένα μίγμα, εκμεταλλευόμενες την διαφοροποίησή τους, ως προς κάποιο χημικό χαρακτηριστικό. Έτσι, ανάλογα με το κριτήριο διαχωρισμού που μπορεί να εφαρμοστεί, οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται σε χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιονανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και χημικής συγγένειας. Η αρχή λειτουργίας της χρωματογραφίας έχει ως εξής: Διακρίνονται δύο φάσεις, η κινητή και η στατική. Η κινητή φάση ρέει μεταφέροντας το προς ανάλυση δείγμα στην στατική φάση. Ανάλογα με το είδος και την ισχύ των διαμοριακών δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων της φάσης με τα μόρια των ενώσεων του δείγματος η κάθε ένωση, παρασυρόμενη από την ροή της κινητής φάσης, θα εξέλθει από την στατική σε άλλο χρόνο. Η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως αέρια (Gas Chromatography, GC) ή υγρή (Liquid Chromatography, LC) ανάλογα με την φυσική κατάσταση της κινητής φάσης, ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι επίπεδη ή στήλη [25].

Μια βελτιωμένη εκδοχή της χρωματογραφίας στήλης είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), όπου η ροή της κινητής φάσης εξασφαλίζεται με μια αντλία, έναντι της επίδρασης της βαρύτητας που επιστρατευόταν πρωτύτερα. Στην έξοδο του συστήματος βρίσκεται φασματοσκοπικός ανιχνευτής, ο οποίος λαμβάνει συνεχώς ένα σήμα από το εξερχόμενο διάλυμα, παράγοντας έτσι ένα γράφημα απορρόφησης-χρόνου, γνωστό ως χρωματογράφημα. Σε αυτό η κάθε ένωση του προς εξέταση δείγματος απεικονίζεται με μια κορυφή, που το ύψος της δηλώνει την συγκέντρωση αυτής, ενώ ο χρόνος στον οποίο εμφανίζεται είναι χαρακτηριστικός για την ένωση. Η HPLC μπορεί να είναι κανονικής φάσης, όπου η στήλη περιέχει κάποιο πολικό πληρωτικό υλικό και η κινητή φάση είναι μη πολική, ή αντιστρόφου φάσεως, όπου η στατική φάση είναι μη πολική και ο διαλύτης πολικός (συνήθως νερό). Συνεπώς, στην χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως, πολικά μόρια του δείγματος

θα απωθούνται από το υλικό της στήλης και θα εκλούονται γρήγορα, ενώ μη πολικά μόρια θα αλληλεπιδρούν με τη στήλη σχηματίζοντας προσωρινούς δεσμούς, με αποτέλεσμα να καθυστερούν να εξέλθουν από αυτήν. Οι τεχνικές έκλυσης της κινητής φάσης είναι δύο, ισοκρατική έκλυση, στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης και βαθμιδωτή, όπου η σύσταση της κινητής φάσης είναι προγραμματισμένη να μεταβάλλεται κατά την ανάλυση με καθορισμένο τρόπο.

Συντελεστής κατακράτησης

Ο χρόνος που απαιτείται για μια ουσία να διασχίσει το σύστημα από την είσοδό της μέχρι τον ανιχνευτή, ονομάζεται χρόνος κατακράτησης ή ανάσχεσης (retention time, t_R) και είναι χαρακτηριστικός της ουσίας για συγκεκριμένες συνθήκες διεξαγωγής της μέτρησης. Οι συνθήκες που επηρεάζουν τη χρωματογραφία είναι η σύσταση της κινητής φάσης και η φύση της στατικής, η πίεση και η θερμοκρασία. Ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό που δεν κατακρατείται από την στήλη να διέλθει από το σύστημα ονομάζεται νεκρός χρόνος, t_0 και πρακτικά εκφράζει το χρόνο που αντιστοιχεί σε μια δεδομένη παροχή κατά μήκος της διαδρομής, εντός του χρωματογράφου, με απουσία χημικών αλληλεπιδράσεων. Με βάση αυτά τα μεγέθη προκύπτει ο συντελεστής κατακράτησης, k , ο οποίος αποτελεί έκφραση της μεταφοράς των διαλυμένων ουσιών εντός της στήλης και ποσοτικό μέτρο της τάσης αυτών να προσροφούνται στην στατική φάση. Παρέχει μια πιο ακριβή εκτίμηση της κατακράτησης μιας ένωσης σε σχέση με το t_R , διότι είναι, σε μεγάλο βαθμό, απαλλαγμένος από τη εξάρτηση με τις πειραματικές συνθήκες. Ορίζεται ως ο ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης μιας ένωσης προς τον νεκρό χρόνο της στήλης, όπως φαίνεται παρακάτω.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (7)$$

Αυτό το μέγεθος είναι κυρίαρχης σημασίας στις χρωματογραφικές τεχνικές, καθώς μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την ποιοτική ανάλυση ενός δείγματος ή την

αξιοπιστία μιας μεθόδου, ενώ μπορεί να χρησιμεύσει και σαν εργαλείο για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων ενώσεων. Αυτό σαν αποτέλεσμα ανοίγει τους δρόμους για την χρήση χρωματογραφικών τεχνικών σε πολλούς επιστημονικούς τομείς, από τα καύσιμα και τα απόβλητα μέχρι και την κλινική έρευνα και στην δική μας περίπτωση, στην εύρεση ενός μοντέλου περιγραφής των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων φαρμάτων.

Χρωματογραφία στην ανάπτυξη φαρμάκων

Σε πολλά στάδια του σχεδιασμού φαρμάκων χρησιμοποιούνται χρωματογραφικές μέθοδοι σε συνδυασμό και με άλλες αναλυτικές τεχνικές, κυρίως για τον χαρακτηρισμό και την απομόνωση ενώσεων. Στα πρώτα βήματα ανακάλυψης νέων φαρμάκων εφαρμόζεται η HPLC μαζί με φασματομετρία μάζας (Mass Spectroscopy, MS) στις νεοσυντιθέμενες υποψήφιες φαρμακευτικές ενώσεις, προκειμένου να ελεγχθεί η ταυτότητα και η καθαρότητά τους, πριν ξεκινήσουν οι δοκιμές για την δράση τους. Έπειτα, ο διαχωρισμός με χρήση υπερταχείας HPLC επιστρατεύεται συνεργατικά στην διαλογή υψηλής απόδοσης (HTS), ενώ σε μεταγενέστερες φάσεις η HPLC-MS εμφανίζεται ξανά για τον έλεγχο της συγκέντρωσης ουσιών σε βιολογικά μέσα, όπως αίμα ή ιστοί. Τεχνικές LC αξιοποιούνται καθ' όλη την πορεία βελτιστοποίησης της σύνθεσης των μορίων στο στάδιο της ανάπτυξης. Ο τελικός έλεγχος ποιότητας, καθαρότητας και σταθερότητας των ενώσεων, περιλαμβάνει επίσης τη χρήση HPLC. Σε αυτές τις περιπτώσεις η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ενώσεων που παρουσιάζουν πολύ στενή συγγένεια και χάρη στις ελάχιστες διαφορές στην αλληλεπίδρασή τους με την στάσιμη φάση του οργάνου, αποκτούν διαφορετική μεταναστευτική ταχύτητα, με αποτέλεσμα να εξέρχονται από το σύστημα σε διαφορετικούς χρόνους.

Η χρωματογραφία έχει εδραιωθεί ως παράπλευρο εργαλείο ποσοτικής και ποιοτικής ανάλυσης στην ανάπτυξη φαρμάκων, με ρόλο βοηθητικό στις κύριες διεργασίες σχεδιασμού των ενώσεων. Ωστόσο πρόσφατα έχει αναγνωριστεί η δυνατότητά της να προσφέρει μια ακριβή εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των

υποψήφιων ενώσεων, ανοίγοντας έτσι την προοπτική να αποκτήσει κύρια θέση στον σχεδιασμό φαρμάκων. Εντατική έρευνα πάνω σε αυτό το ζήτημα έχει αναδείξει ότι η σύνθεση ειδικών στατικών και κινητών φάσεων και η εφαρμογή κατάλληλων πειραματικών συνθηκών μπορεί να μετατρέψει την υγρή χρωματογραφία σε βιομιμητικό σύστημα, που προσομοιώνει με μεγάλη επιτυχία το είδος των σχέσεων που αναπτύσσει ένα φάρμακο από την εισαγωγή του στον οργανισμό, έως και την αποβολή του.

Οι αρχικές μελέτες που είχαν γίνει αφορούσαν την προσαρμογή του μοντέλου οκτανόλης-νερού στη χρωματογραφία, χρησιμοποιώντας οκτανόλη στη στατική φάση και κορεσμένο διάλυμα οκτανόλης σε νερό στην κινητή [26]. Με την εφαρμογή της κατάλληλης ογκομετρικής παροχής της κινητής φάσης, διαστάσεων της στήλης και την προσθήκη κάποιας επιπλέον οργανικής ένωσης στο υδατικό διάλυμα, η μέθοδος αυτή κατέστη ικανοποιητική για τον υπολογισμό ενός μεγάλου εύρους τιμών $\log P$. Το κορεσμένο σε οκτανόλη νερό της κινητής φάσης δεν βρίσκεται ομοιόμορφα διασκορπισμένο, αλλά οργανώνεται σε συμπλέγματα, που περιβάλλονται από περίπου 16 μόρια οκτανόλης, με τις πολικές υδροξυλομάδες τους στραμμένες προς το συσσωμάτωμα του νερού, συγκροτώντας ένα δίκτυο με δεσμούς υδρογόνου. Οι αλειφατικές ουρές σχηματίζουν μια υδρογονανθρακική περιοχή, που έχει ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του υδρόφοβου εσωτερικού των διπλοστοιβάδων. Παρά τις θετικές αυτές ενδείξεις το σύστημα οκτανόλης-νερού έχει χαρακτηριστεί ως υπεραπλουστευμένο και έχει αμφισβητηθεί έντονα ως προς την ικανότητά του να περιγράψει με αξιοπιστία την λιποφιλική συμπεριφορά των φαρμάκων, δεδομένου ότι δεν μπορεί να αναπαράξει την πολυπλοκότητα των βιολογικών μεμβρανών και των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ αυτών και των φαρμάκων.

Βιομιμητικές μέθοδοι εκτίμησης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων

Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ανισότροπες φάσεις, όπου τα φωσφολιπίδια είναι διαταγμένα στο χώρο και φέρουν ηλεκτρική φόρτηση, ενώ διάφορες πρωτεΐνες απαντώνται σε όλη την έκτασή τους και εισχωρούν είτε από την μια μόνο πλευρά,

είτε εξ ολοκλήρου διαμέσου της διπλοστοιβάδας [27]. Επομένως απαιτείται ένα σαφώς περιπλοκότερο μοντέλο από αυτό της οκτανόλης-νερού, που να προσεγγίζει ικανοποιητικά το βιολογικό περιβάλλον και να αποδίδει ακριβή δεδομένα για την συμπεριφορά των φαρμάκων σε αυτό. Για τον σκοπό αυτό διαμορφώθηκαν τεχνικές, όπως οι *in vitro* κυτταρικές σειρές Caco-2, MDCK (Madin-Darby canine kidney epithelial cell line), PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeation Assay) και οι βιομιμητικές χρωματογραφικές στήλες. Ανάλογα με τον τύπο του φραγμού που χρησιμοποιούν τα μοντέλα αυτά, για την εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων ενώσεων, μπορούν να χωριστούν σε κυτταρικά και μη κυτταρικά.

Οι σειρές Caco-2, που είναι οι πιο διαδεδομένες, συνίστανται από ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα, ενώ οι σειρές MDCK είναι επιθηλιακά κύτταρα νεφρών σκύλων. Οι διατάξεις με κυτταρικές σειρές εφαρμόζονται εντατικά στον σχεδιασμό φαρμάκων, καθώς παρουσιάζουν πολύ καλή εκτίμηση της απορροφησιμότητας των φαρμάκων [28]. Ωστόσο, το μεγάλο τους κόστος και η ανάγκη για εκτεταμένες χρονικές περιόδους καλλιέργειας, ωθούν προς την αναζήτηση νέων μεθόδων. Στο PAMPA το εμπόδιο που πρέπει να ξεπεράσουν τα μόρια του φαρμάκου αποτελείται από υποστηρίγματα φίλτρων εμποτισμένα (με εμφύσηση ή με ψεκασμό) με οργανικούς διαλύτες (δεκαεξάνιο / δωδεκάνιο) και ένα μικρό κλάσμα λιπιδίων. Το μοντέλο αυτό είναι ταχύτερο από τα κυτταρικά, αλλά ακόμα σχετικά κοστοβόρο [29].

Βιομιμητική Χρωματογραφία

Η εύστοχη εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων ενώσεων και η ταχύτητα, οικονομικότητα και επαναληψιμότητα των μετρήσεων συνδυάζονται στην βιομιμητική χρωματογραφία. Η μέθοδος αυτή αντικαθιστά τις παραμέτρους $\log P$ και $\log D$ με το μέγεθος $\log k$, για την έκφραση της λιποφιλίας και παρότι έχει επιδείξει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους, δεν είναι ακόμα αρκετά ωριμασμένη για να εφαρμοστεί ως τεχνική αναφοράς στο προκλινικό στάδιο. Υπάρχουν τρία είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας, που διαφοροποιούνται

πρωτίστως στο είδος της στατικής φάσης που χρησιμοποιείται: η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized artificial membrane, IAM), η χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης (High Performance Affinity Chromatography, HPAC) και η μικκυλιακή χρωματογραφία (Micellar Liquid Chromatography, MLC).

Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM)

Μια από τις αρχικές προτάσεις για την αντικατάσταση του συστήματος οκτανόλης-νερού στην μέτρηση της λιποφιλίας ήταν η χρήση φωσφολιπιδικών λιποσωμάτων, τα οποία σχηματίζουν διπλοστοιβάδες και παρουσιάζουν εμφανώς μεγαλύτερη φυσικοχημική συγγένεια με τις βιολογικές μεμβράνες. Ωστόσο η εφαρμογή τους δεν έχει συναντήσει επιτυχία εξαιτίας των δυσκολιών στην παρασκευή και τη σταθερότητά τους. Η χρωματογραφία IAM αναπτύχθηκε πάνω σε αυτή τη βάση, εισάγοντας τα φωσφολιπίδια στη στατική φάση του οργάνου. Η μέθοδος αναδείχθηκε σαν χρήσιμο εργαλείο στην ανάπτυξη φαρμάκων με την έρευνα του Ridgeon και των συνεργατών του, στα τέλη της δεκαετίας του 1980, αν και οι πρώτες προσπάθειες για την κατασκευή ακινητοποιημένων μεμβρανών, με τη χρήση φωσφολιπιδίων και διαφόρων οργανικών διαλυτών, είχαν ξεκινήσει ήδη από το 1962 [30]. Η στατική φάση της IAM περιλαμβάνει μονοστοιβάδες αμφιφιλικών φωσφολιπιδίων, τα οποία συγκρατούνται με ομοιοπολικούς δεσμούς σε έναν σκελετό πολυαμινικής πυριτίας.

Η πρώτη στήλη IAM που σχεδιάστηκε από τον Ridgeon και κατασκευάστηκε από την εταιρία Regis ήταν η IAM.PC, με μονομερή φωσφατιδυλοχολίνης (PC), η οποία προοριζόταν για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών. Η φωσφατιδυλοχολίνη σχηματίζει δεσμό με την πολυαμινική πυριτία της στήλης μεταξύ της ω-καρβοξυλικής ομάδας της και των C-2 αλυσίδων λιπαρών οξέων. Η Regis διαθέτει τις στήλες IAM.PC και IAM.PC.MG, με λιπίδια διπλής αλυσίδας, που καλύπτονται με μεθυλογλυκολική ομάδα (MG), με προτεινόμενη χρήση τον καθαρισμό μεμβρανικών πρωτεϊνών και την IAM.PC.DD2, η οποία προτείνεται για την ανακάλυψη φαρμάκων (Drug Discovery,

DD). Μέχρι πριν από μερικά χρόνια υπήρχε και η IAM.PC.DD -στην οποία βασίστηκε η DD2- αλλά αποσύρθηκε όταν διαπιστώθηκε ότι τα πειραματικά δεδομένα αυτής της στήλης δεν είχαν καλή συσχέτιση με την κατανομή στις βιομεμβράνες [24].

Ο δείκτης λιποφιλίας που λαμβάνεται από την χρωματογραφία είναι το $\log k_{IAM}$, σε υδατική φάση. Η κινητή φάση μπορεί να είναι αποκλειστικά ρυθμιστικό διάλυμα, χωρίς την προσθήκη οργανικού τροποποιητή. Για λιπόφιλες ενώσεις που έλκονται από την στατική φάση, προστίθεται ωστόσο μια ποσότητα ακετονιτριλίου, μέχρι και 30%. Στην περίπτωση αυτή γίνεται εξαγωγή των ανηγμένων τιμών $\log k$ (extrapolation), που για ισοκρατική έκλυση ακολουθεί την εξίσωση [15]:

$$\log k = S \cdot \phi + \log k_{IAMw} \quad (8)$$

όπου ϕ , το κλάσμα ακετονιτριλίου στην κινητή φάση και S , η κλίση της γραμμικής σχέσης μεταξύ $\log k$ και ϕ .

Οι στατικές φάσεις IAM φέρουν φορτισμένα κέντρα, τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες και το θετικά φορτισμένο άζωτο της χολίνης, τα οποία αναπτύσσουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές παίζουν δευτερεύοντα ρόλο στην συγκράτηση των ενώσεων, ενώ κυρίαρχο φαινόμενο για την κίνηση αυτών είναι η κατανομή τους στο υδρόφοβο περιβάλλον. Οι τιμές $\log k_{IAM}$ συσχετίζονται ικανοποιητικά με το $\log P$, ενώ για την συσχέτισή τους με το $\log D$ πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν η αντιστάθμιση του ιοντισμού, λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [4] [24]. Μια εναλλακτική για την ένδειξη της λιποφιλίας είναι ο χρωματογραφικός δείκτης υδροφοβίας (Chromatographic Hydrophobicity Index, CHI), ο οποίος αντιστοιχεί στο ποσοστό του οργανικού τροποποιητή με τον οποίο επιτυγχάνεται ίση κατανομή μεταξύ στατικής και κινητής φάσης ($\log k = 0$) και συνεπώς ισούται με $\phi_0 = \log k_w / S$ [31]. Ο δείκτης αυτός προκύπτει από την διεξαγωγή μετρήσεων σε ταχεία βαθμιδωτή έκλυση, όπου οι χρόνοι κατακράτησης συσχετίζονται γραμμικά με δείκτες CHI παρέχοντας ισοδύναμη κλίμακα λιποφιλίας με τους αντίστοιχους ισοκρατικούς παράγοντες κατακράτησης [24].

Χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης (HPAC)

Η χρωματογραφία HPAC αποτελεί ενδιαφέρουσα προσέγγιση στον έλεγχο της δέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών σε πρωτεΐνες πλάσματος (Plasma Protein Binding, PPB), που όπως αναφέρθηκε αποτελεί βασική φαρμακοκινητική ιδιότητα. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί γι' αυτό το σκοπό, με κυριότερες την διαπίδυση και την υπερδιήθηση, παρουσιάζει ταχύτητα, αναπαραγωγιμότητα και αυτοματοποίηση των μετρήσεων [11] [32].

Η HPAC στην στατική της φάση περιέχει ακινητοποιημένη κάποια πρωτεΐνη πλάσματος, συνήθως ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (Human Serum Albumin, HSA), ή όξινη γλυκοπρωτεΐνη (α_1 -acid glycoprotein, AGP) [12] [33] [34]. Η HSA είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη ορού στους ανθρώπους και έχει τυπική συγκέντρωση στο πλάσμα 35-50 g/L. Η μοριακή μάζα της είναι 66,5kDa και αποτελείται από μια απλή αλυσίδα 585 αμινοξέων που σταθεροποιείται από 17 δισουλφιδικές γέφυρες. Μια από τις λειτουργίες της HSA είναι να συμμετέχει στη δέσμευση και τη μεταφορά διαφόρων ουσιών σε όλο το σώμα, όπως οργανικά ανιόντα, λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και ορισμένες βιταμίνες. Η AGP περιέχει αλυσίδα 181 αμινοξέων και πέντε υδατανθρακικών ομάδων και έχει μοριακό βάρος περίπου 41kDa. Τα φυσιολογικά επίπεδα AGP στον ορό του αίματος είναι 0,5-1,0 g / L, αλλά η συγκέντρωσή της μπορεί να αυξηθεί κατά τη διάρκεια μιας ασθένειας. Παρόλο που η AGP έχει πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση από την HSA στο πλάσμα, μπορεί να είναι μια κύρια πρωτεΐνη δέσμευσης για βασικά ή ουδέτερα φάρμακα. Εκτός από τη χρήση τους σε μελέτες δέσμευσης φαρμάκων, οι AGP, HSA και άλλες σχετικές πρωτεΐνες έχουν χρησιμοποιηθεί στην HPAC για χειρόμορφους διαχωρισμούς φαρμάκων και άλλων διαλυμένων ουσιών [35].

Οι πιο συνήθεις τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην HPAC είναι η χρωματογραφία έκλουσης ζωνών (zonal elution) και η μετωπική (frontal analysis) [11]. Στην πρώτη, μικρή ποσότητα του δείγματος εισάγεται στην στήλη μια χρονική στιγμή και τα συστατικά αυτού εξέρχονται με διαφορετικές ταχύτητες. Στη μετωπική χρωματογραφία το διάλυμα του δείγματος εισάγεται στη στήλη συνεχώς και ο

διαλύτης δρα και ως κινητή φάση, έτσι τα συστατικά του δείγματος εξέρχονται από τη στήλη με τη μορφή μετώπων. Στη μέθοδο έκλουσης ζωνών ο συντελεστής κατακράτησης συνδέεται με την πρωτεϊνική σύνδεση ως εξής:

$$k = b/f \quad (9)$$

όπου b το κλάσμα του φαρμάκου που είναι δεσμευμένο στην ακινητοποιημένη πρωτεΐνη και f το κλάσμα που παραμένει ελεύθερο στην κινητή φάση.

Σύμφωνα με αυτή τη σχέση και δεδομένου ότι $b+f=1$, μπορεί να υπολογιστεί η τιμή των b και f .

Ο συντελεστής k μπορεί επίσης να συσχετισθεί με τον αριθμό των θέσεων σύνδεσης του φαρμάκου στη στήλη, καθώς και με τις σταθερές ισορροπίας στις θέσεις αυτές.

$$k = \frac{(K_{A1} \cdot n_1 + \dots + K_{An} \cdot n_n) \cdot m_L}{V_M} = \frac{K_A \cdot n \cdot m_L}{V_M} \quad (10)$$

Ο όρος m_L στην εξίσωση (10) είναι τα συνολικά γραμμομόρια όλων των θέσεων δέσμευσης του φαρμάκου στη στήλη και V_M είναι ο κενός όγκος της στήλης. Η σταθερά ισορροπίας σύνδεσης για το φάρμακο σε κάθε μια από τις θέσεις πρόσδεσής του στη στήλη δίνεται από τους όρους K_{A1} έως K_{An} . Το κλάσμα κάθε τύπου θέσης στη στήλη δίνεται από τους όρους n_1 έως n_n . Το άθροισμα των όρων $K_{A1} \cdot n_1$ έως $K_{An} \cdot n_n$ είναι γνωστό ως η σταθερά ισορροπίας σύνδεσης ($K_A \cdot n$) [35] [33].

Μικκυλιακή χρωματογραφία (MLC)

Το 1980, σε έρευνα των Daniel W. Armstrong και Susan J. Henry, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά μικκυλιακό σύστημα ως κινητή φάση, αναδεικνύοντας μια νέα μέθοδο διαχωρισμού ενώσεων, γνωστή ως μικκυλιακή χρωματογραφία (Micellar Liquid Chromatography, MLC) [36]. Έκτοτε η μέθοδος έχει διερευνηθεί εκτενώς και έχει καθιερωθεί ως ένα χρήσιμο εργαλείο στην αναλυτική χημεία, τη γεωργία και τα τρόφιμα, την ιατρική και τη φαρμακοβιομηχανία [37]. Η οικονομικότητα, ταχύτητα και αποτελεσματικότητά της την καθιστούν ενδιαφέρουσα προοπτική στο σχεδιασμό φαρμάκων, όπου έχει επιδείξει καλή συσχέτιση των χρωματογραφικών $\log k$ με τις

φαρμακοκινητικές ιδιότητες των φαρμάκων [38], [39]. Η MLC είναι μια αντίστροφης φάσης χρωματογραφία, που χρησιμοποιεί ως κινητή φάση, διάλυμα τασιενεργού ένωσης σε συγκέντρωση μεγαλύτερη της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσής της (Critical Micellar Concentration, CMC).

Ο διαλύτης έκλουσης περιλαμβάνει σε ισορροπία νερό, μικκύλια και μονομερή του τασιενεργού. Υπό αυτές τις συνθήκες, η σταθερή φάση τροποποιείται από την υδρόφοβη ή/και σιλανοφιλική προσρόφηση των επιφανειοδραστικών μονομερών σε αυτήν, με αποτέλεσμα να μιμείται δομικά τις διατεταγμένες σειρές των υδρογονανθρακικών αλυσίδων. Ο υδρόφιλος/υδρόφοβος χαρακτήρας των προσροφημένων επιφανειοδραστικών μορίων θυμίζει τις πολικές περιοχές μιας μεμβράνης. Κατά συνέπεια, η σταθερή φάση περιέχει σημεία τόσο υδρόφοβων, όσο και ηλεκτρονικών αλληλεπιδράσεων, ακριβώς όπως συμβαίνει και στους βιολογικούς φραγμούς. Επιπλέον η κατακράτηση των ενώσεων στην MLC, που καθορίζεται από τις υδροφοβικές, ηλεκτρονιακές και στερικές ιδιότητες αυτών, προσομοιάζει τις συνθήκες ροής που επικρατούν στην απορρόφηση, μεταφορά και απέκκριση των φαρμάκων στο σώμα [38].

Τασιενεγός ουσία

Ως τασιενεργή ορίζεται μια ένωση που έχει την ιδιότητα να προσροφάται στις διεπιφάνειες ενός συστήματος μεταβάλλοντας, ως ένα σημείο, την επιφανειακή τάση αυτών [40]. Τέτοιες ενώσεις παρουσιάζουν αμφιφιλική δομή, δηλαδή το μόριό τους αποτελείται από δυο στελέχη, μια υδρόφιλη κεφαλή και μια υδρόφοβη ουρά. Η δομή αυτή τους επιτρέπει, σε συγκεντρώσεις άνω της CMC να αυτό-οργανώνονται σχηματίζοντας τα μικκύλια, όπου σε ένα υδατικό διάλυμα οι υδρόφιλες κεφαλές θα βρίσκονται στο εξωτερικό του σχηματισμού, σε συνεχή επαφή με την υδατική φάση, ενώ οι λιπόφιλες αλυσίδες θα είναι συσπειρωμένες στο εσωτερικό του σχηματισμού, προστατευμένες από την υδατική φάση [37] [41]. Ανάλογα με το φορτίο της πολικής κεφαλής, τα τασιενεργά χαρακτηρίζονται ως μη-ιονικά, ανιονικά, κατιονικά και αμφοτερικά, όπως φαίνεται και στον πίνακα 1 [42]. Τα μικκύλια έχουν την ικανότητα

να βελτιώνουν την διαλυτότητα υδρόφοβων ενώσεων, που φυσιολογικά είναι αδιάλυτες στο νερό. Ωστόσο η χαρακτηριστική τους λειτουργία στο σύστημα MLC είναι η μικκυλιακή διαλυτοποίηση, που δεν πρέπει να συγχέεται με την διαλυτότητα σε μικκυλιακά διαλύματα. Η μικκυλιακή διαλυτοποίηση έχει να κάνει με την κατανομή των ενώσεων μεταξύ του υδατικού διαλύτη και των μικκυλίων και είναι αυτή που ελέγχει τον διαχωρισμό των ενώσεων [42].

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των πιο κοινών επιφανειοδραστικών ουσιών [42].

Type	Name	CMC (mM)
Anionic	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	8.1
	Sodium tetradecyl sulfate	2.1
	Sodium dodecyl sulphonate	9.3
	Lithium perfluorooctane sulphonate (LiPFOS)	6.72
Cationic	Cetyl trimethylammonium bromide	0.92
	Cetyl trimethylammonium chloride	1.3
	Dodecyl trimethylammonium bromide (DTAB)	15
Non-ionic	Polyoxyethylene (23) dodecanol (BRIJ 35)	0.1
	Polyoxyethylene [20]-sorbitane monooleate (Tween 80)	0.01
	Polyoxyethylene [20]-sorbitane monolaurate (Tween 20)	0.059
Zwitterionic	N-Dodecyl-N,N-dimethylammonio-3-propane sulfonate (Sulfobetain SB-12)	3.3
	3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-3-propane sulphonate (CHAPS)	4.2-6.3

Ο σχηματισμός μικκυλίων επηρεάζεται από την συγκέντρωση του τασιενεργού στο διάλυμα, την θερμοκρασία σε σχέση με τα σημεία Krafft και θόλωσης, και την ύπαρξη οργανικού τροποποιητή.

- Συγκέντρωση τασιενεργού

Πάνω από την CMC μιας ουσίας, τα μικκύλια συνυπάρχουν στο σύστημα με μονομερή μόρια αυτής. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσής της οδηγεί μόνο σε αύξηση των μικκυλίων, ενώ η συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα παραμένει σταθερή. Στην μικκυλιακή χρωματογραφία προτιμάται η χρήση ενώσεων με χαμηλή CMC, ώστε

να αποφεύγεται η ανάπτυξη υψηλής πίεσης και θορύβου που σχετίζονται με το μεγάλο ιξώδες ενός κολλοειδούς συστήματος υψηλής συγκέντρωσης.

- Σημείο Krafft

Το σημείο Krafft είναι ένα χαρακτηριστικό μέγεθος για ιονικά τασιενεργά [43], που ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία η διαλυτότητα της ουσίας ισούται με την CMC. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι κάτω του σημείου Krafft δεν υπάρχουν μικκύλια.

- Σημείο Θόλωσης

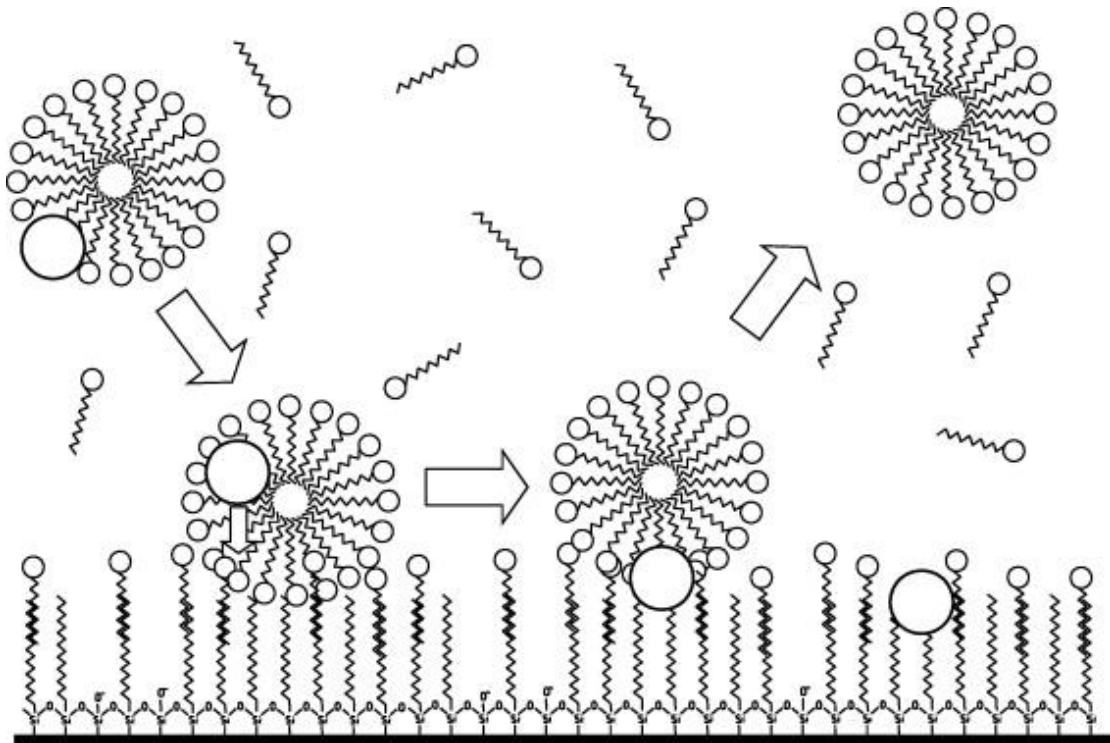
Το σημείο θόλωσης είναι η θερμοκρασία στην οποία ένα μη ιονικό τασιενεργό παύει να είναι διαλυτό στην υδατική φάση, οπότε το διάλυμα διαχωρίζεται σε δύο φάσεις, μια υδατική και μια πλούσια σε τασιενεργό [44].

- Οργανικός διαλύτης

Έχει βρεθεί ότι η ύπαρξη οργανικού διαλύτη, σε μικρή συγκέντρωση, στον διαλύτη έκλυσης μπορεί να ενισχύσει αισθητά την αποδοτικότητα της μεθόδου, παράγοντας πιο ευκρινείς κορυφές και μειώνοντας τους χρόνους παραμονής των προς εξέταση ουσιών. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται μερικώς στην μείωση της ποσότητας μονομερών του τασιενεργού που προσροφώνται στη στατική φάση της στήλης [45] [46], καθώς και στη μείωση της πολικότητας του διαλύτη έκλυσης [46]. Ωστόσο, σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού διαλύτη το μικκυλιακό σύστημα διαταράσσεται, ως αποτέλεσμα του εκφυλισμού των υδρόφοβων δυνάμεων που συγκρατούν το μικκυλιακό σχηματισμό, με αποτέλεσμα το σύστημα να καλείται πλέον υπομικκυλιακό, οπότε χαρακτηρίζεται από άλλες ιδιότητες και συνιστά άλλο είδος χρωματογραφίας [45] [46] [42] [47] [48]. Το επιτρεπτό ποσοστό οργανικού διαλύτη που μπορεί να προστεθεί στο διάλυμα ποικίλει ανάλογα με την οργανική ένωση και το τασιενεργό, αλλά σε γενικές γραμμές παραμένει κάτω του 15-20% (v/v) [42]. Συνήθεις οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται είναι οι 1- και 2- προπανόλη με σχετικά ασθενή εκλυστική ισχύ, οι 1-βουτανόλη και 1-πεντανόλη, που είναι πιο ισχυρές και η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο, που παρότι έχουν χαμηλή ισχύ εμφανίζουν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Ισορροπία φάσεων

Η ιδιαιτερότητα της κινητής φάσης της MLC είναι η μικροετερογένεια που παρουσιάζει, καθώς αποτελεί σύστημα τριών φάσεων, που βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία: τη στατική φάση, τον διαλύτη έκλουσης και την ψευδοφάση μικκυλίων. Η διαλυμένη ουσία κατανέμεται μεταξύ του διαλύτη και των μικκυλίων στην κινητή φάση και της επικαλυμμένης με τασιενεργό, στατικής φάσης. Για ενώσεις αδιάλυτες στο νερό ο διαχωρισμός μπορεί επίσης να συμβεί μέσω απευθείας μεταφοράς αυτών μεταξύ της μικυλλιακής ψευδοφάσης και της τροποποιημένης στατικής φάσης. Η ισορροπία κατανομής στο MLC μπορεί να περιγραφεί με τους εξής συντελεστές: P_{WS} , που εκφράζει τον διαχωρισμό μεταξύ υδατικού διαλύτη (P_W) και στατικής φάσης (P_S), P_{WM} , μεταξύ υδατικού διαλύτη και μικκυλίων (P_M) και P_{MS} , μεταξύ μικκυλίων και στατικής φάσης. Οι συντελεστές P_{WS} και P_{WM} αντιπροσωπεύουν τη συγγένεια της διαλυμένης ουσίας στη στατική φάση και τα μικκύλια, αντίστοιχα, και έχουν αντίθετα αποτελέσματα στην κατακράτηση διαλυμένης ουσίας. Καθώς αυξάνεται το P_{WS} η κατακράτηση αυξάνεται, ενώ με την αύξηση του P_{WM} η κατακράτηση μειώνεται, λόγω της ισχυρότερης αλληλεπίδρασης με τα μικύλια. Η κατακράτηση, επομένως, εξαρτάται από τους δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ της διαλυμένης ουσίας, της στατικής φάσης και των μικκυλίων [46] [37].



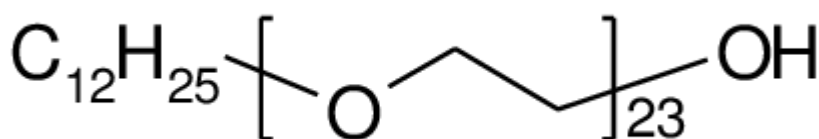
Εικόνα 2. Ισορροπία στατικής φάσης, διαλύτη έκλυσης και μικυλλίων στη μικυλλιακή χρωματογραφία και μεταφορά των διαλυμένων ουσιών μεταξύ των φάσεων [49].

Οι ουδέτερες φαρμακευτικές ενώσεις εκλύονται με μη ιοντικές και ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες, ενώ φορτισμένα φάρμακα (οξέα και βάσεις) που εκλύονται με μη ιοντικά επιφανειοδραστικά επηρεάζονται μόνο από αλληλεπιδράσεις μη πολικές, διπόλου-διπόλου, και δότη-δέκτη πρωτονίων. Πέραν αυτών οι φορτισμένες διαλυμένες ενώσεις θα αναπτύσσουν, επιπλέον, και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με ιονικά τασιενεργά, δηλαδή με το φορτισμένο επιφανειοδραστικό στρώμα στη στατική φάση και το φορτισμένο εξωτερικό στρώμα των μικυλλίων, ενώ ο στερικός παράγοντας μπορεί επίσης να είναι σημαντικός. Με ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες είναι δυνατό να υπάρχουν δύο καταστάσεις, ανάλογα με την φόρτιση της διαλυμένης και της επιφανειοδραστικής ουσίας: άπωση ή έλξη. Σε περίπτωση ηλεκτροστατικής άπωσης, οι φορτισμένες διαλυμένες ουσίες δε μπορούν να κατακρατηθούν από τη στατική φάση και εκλύονται γρήγορα, εκτός αν υπάρχει σημαντική υδρόφοβη αλληλεπίδραση με το τροποποιημένο στρώμα τασιενεργού. Αντίθετα, ο συνδυασμός ηλεκτροστατικής έλξης και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με την τροποποιημένη στατική φάση μπορεί να προκαλέσει

ισχυρή κατακράτηση. Στην περίπτωση των αμφοτερικών τασιενεργών, η στατική φάση έχει θετικό φορτίο σε κάποια σημεία και αρνητικό σε άλλα, με αποτέλεσμα τόσο όξινα όσο και βασικά φάρμακα να έλκονται σε αυτήν και να κατακρατούνται. Μίγματα πολικών και μη πολικών ενώσεων μπορούν επίσης να διαλυθούν με επιλογή του κατάλληλου επιφανειοδραστικού [46].

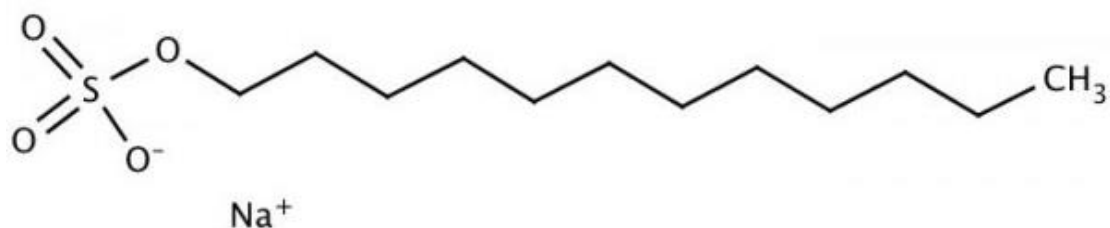
Μικκυλιακή Χρωματογραφία Κατανομής (BMC)

Η μικκυλιακή χρωματογραφία κατανομής (Biopartitioning Micellar Chromatography, BMC) είναι υποκατηγορία της MLC, που χρησιμοποιεί το τασιενεργό Brij-35 σε C18 στήλη αντιστρόφου φάσεως. Αυτό το είδος MLC έχει προσελκύσει έντονο ενδιαφέρον, καθώς η στατική φάση τροποποιημένη από το Brij-35 παρουσιάζει εξαιρετική δομική ομοιότητα με τις βιολογικές μεμβράνες. Η κατακράτηση ενός φαρμάκου σε αυτό το χρωματογραφικό σύστημα διέπεται κυρίως από τις υδρόφοβες, ηλεκτρονικές του ιδιότητες και σε μικρότερο βαθμό από τις στερικές. Αυτά τα χαρακτηριστικά των ενώσεων είναι που καθορίζουν και την παθητική τους διαπερατότητα μέσω των μεμβρανών [50]. Η BMC έχει αναδειχθεί ως μια αξιόπιστη μέθοδος χρωματογραφίας για την εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων φαρμάκων και την τοξικότητα αυτών. Έχει εμφανίσει καλές συσχετίσεις με τους συντελεστές κατανομής μεταξύ αίματος και πνευμόνων, ύπατος και δέρματος και έχει χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (Quantitative Retention-Activity Relationships, QRAR) για την απορρόφηση από το στόμα, όπως και για την διαπερατότητα από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [51].

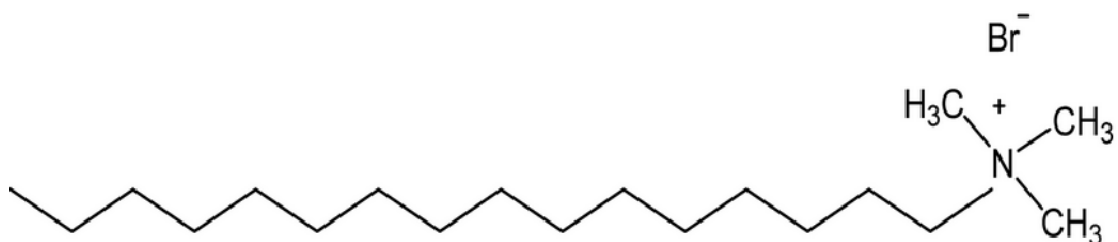


Εικόνα 3. Brij-35.

Άλλα τασιενεργά που έχουν χρησιμοποιηθεί στην MLC για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών χαρακτηριστικών είναι ανιονικές ενώσεις, όπως τα SDS, SDC (sodium deoxycholate) και τα κατιονικά CTAB (cetyltrimethyl-ammonium bromide) και DTAB (dodecyltrimethyl-ammonium bromide) [52], [39]. Η ύπαρξη κατιονικών τασιενεργών στη στατική φάση οδηγεί σε αύξηση της υδροφοβικότητας αυτής, εξαιτίας των σιλανοφιλικών δυνάμεων που αναπτύσσονται.



Εικόνα 4. SDS.

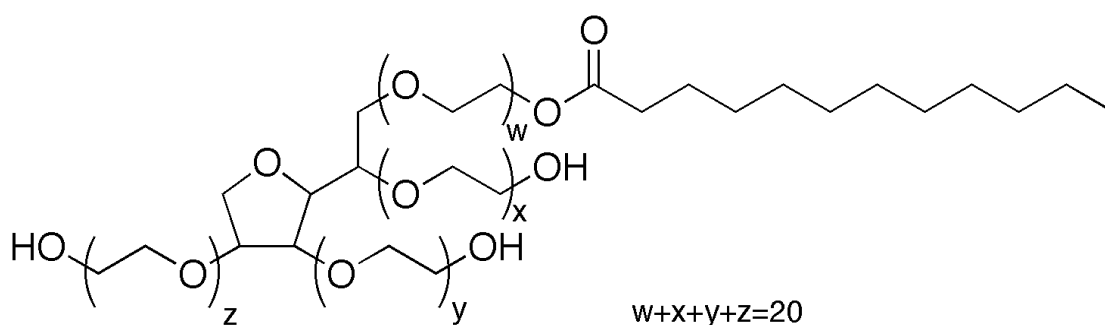


Εικόνα 5. CTAB.

Τασιενεργό Tween 20

Στην παρούσα εργασία θα εξεταστεί η χρήση του τασιενεργού Tween 20 στη μικκυλιακή χρωματογραφία. Το Tween 20 είναι ένας εστέρας πολυοξαιθυλενικής σορβιτόλης που ανήκει στην οικογένεια των πολυσορβικών. Είναι μη ιονικό, με

υδρόφιλες κεφαλές αιθυλενοξειδίου και υδρόφοβες υδρογονανθρακικές αλυσίδες και έχει μοριακό βάρος περίπου 1228 [53]. Η μικκυλιακή χρωματογραφία με Tween 20 έχει χρησιμοποιηθεί σε φαρμακολογικές έρευνες ως μέθοδος προκατεργασίας για την απομόνωση φαρμακευτικών ενώσεων από δείγμα [45], καθώς και τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό ενώσεων στο αίμα και άλλα βιολογικά υγρά [54], [55], [56]. Το Tween 20 είναι ουδέτερο, όπως και το Brij-35 και εξίσου οικονομικό, ενώ βρίσκεται σε υγρή μορφή, που καθιστά ευκολότερη την παρασκευή του διαλύτη έκλουσης. Στην παρούσα εργασία θα μελετηθεί η ικανότητα της MLC με αυτό το τασιενεργό να προσεγγίσει το περιβάλλον των βιολογικών συστημάτων και να εκτιμήσει τις ιδιότητες γνωστών φαρμακευτικών ουσιών. Πρέπει να αναφερθεί ότι αρχικά έγινε δοκιμή παρασκευής διαλύματος SDC για την κινητή φάση, το οποίο ωστόσο, απορρίφθηκε διότι η ένωση δεν διαλυόταν πλήρως στην υδατική φάση και έπειτα, λόγω εφαρμογής έντονων συνθηκών ανάδευσης προέκυψε ο σχηματισμός γέλης. Αντιθέτως η προσθήκη του Tween 20 οδηγεί σε αρκετά ευσταθή διαλύτη.



Εικόνα 6. Tween 20.

Εφαρμογές της MLC

Η μικκυλιακή χρωματογραφία έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την εκτίμηση διαφόρων φυσικοχημικών ιδιοτήτων φαρμάκων και την πρόβλεψη της συμπεριφοράς τους στον οργανισμό. Κάθε τέτοια έρευνα ακολουθεί περίπου την ίδια πορεία: Τα αποτελέσματα $\log k$ που προκύπτουν από τη μέτρηση των δραστικών ουσιών στο χρωματογράφο συγκρίνονται με τους αντίστοιχους συντελεστές της

εκάστοτε ιδιότητας που μελετάται και αξιολογείται με χρήση στατιστικών εργαλείων αναφορικά με τη σημασία της μεταξύ τους σχέσης. Η κατασκευή μοντέλων πρόβλεψης και περιγραφής της φαρμακολογικής απόκρισης των φαρμάκων με εφαρμογή χρωματογραφικών παραμέτρων κατακράτησης γίνεται με την ανάπτυξη σχέσεων QRAR.

1. Απορρόφηση από το στόμα και εντερική.

Οι κύριοι φραγμοί στην απορρόφηση *per os* είναι οι ρευστές κυτταρικές μεμβράνες. Γενικά τα φάρμακα απορροφώνται κυρίως μέσω παθητικής διάχυσης. Βρέθηκε ότι η χρήση ανιονικών και κατιονικών τασιενεργών δεν είναι κατάλληλη για το σκοπό αυτό, ενώ μη ιονικά τασιενεργά παράγουν αξιόπιστα μοντέλα QRAR. Ο διαλύτης έκλυσης ρυθμίζεται σε pH 7,4, που είναι η μέση τιμή pH του αίματος ή στο 6,5, που αντιστοιχεί στο pH του λεπτού εντέρου. Τα αποτελέσματα των ερευνών συχνά συγκρίνονται και με άλλες μεθόδους *in vitro*, που χρησιμοποιούν κυτταρικά και μη μοντέλα, όπως Caco-2 και PAMPA ή με άλλους τύπους βιομιμητικής χρωματογραφίας. Από έρευνες έχει προκύψει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των $\log k$ και της ποσοστιαίας απορρόφησης φαρμάκων από το στόμα (% oral drug absorption) και οι σχέσεις που συνδέουν τα δύο μεγέθη έχουν R^2 μεγαλύτερο του 0,7 [57], [51], [50].

2. Διαπερατότητα δια μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

Η βασική προϋπόθεση για τις φαρμακευτικές ενώσεις που προορίζονται για το κεντρικό νευρικό σύστημα είναι η ικανοποιητική μεταφορά μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Για την εκτίμηση αυτής της ικανότητας έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες MLC τόσο με Brij-35, όσο και με SDS. Οι μετρήσεις κατακράτησης του κάθε φαρμάκου χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μοντέλων για την πρόβλεψη της μεταφοράς μέσω του φραγμού, $\log BB$. Όλα τα δεδομένα συσχετίστηκαν με πειραματικές τιμές του $\log BB$ και η σχετική επίδοση των μοντέλων βρέθηκε ικανοποιητική. Τα μοντέλα βασισμένα στο SDS βρέθηκαν πιο κατάλληλα, με R^2 μεγαλύτερα και από τα αντίστοιχα που προέκυψαν από μέτρηση των ίδιων φαρμάκων με IAM [39], [17].

3. Διαπερατότητα από το δέρμα

Η μέθοδος BMC έχει εξεταστεί ως προς την δυνατότητα εκτίμησης της διαπερατότητας ενώσεων διαδερμικά. Τα μοντέλα που προέκυψαν έδειξαν μεγάλη συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών μετρήσεων και των δεδομένων διαπερατότητας [58].

4. Πρωτεϊνική σύνδεση

Η χρήση ορισμένων τασιενεργών στην μικκυλιακή χρωματογραφία οδηγεί στον σχηματισμό βιομιμητικών πρωτεϊνών, αντίστοιχων με τις ανθρώπινες πρωτεΐνες πλάσματος. Συγκεκριμένα το τασιενεργο SDS στην MLC προσομοιάζει την πρωτεΐνη AGP και μπορεί να αναπαράξει τις ιονικές και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ πρωτεΐνης και φαρμάκου, ενώ η μικκυλιακή φάση με το κατιονικό CTAB μιμείται την HSA. Έρευνες με αυτά τα τασιενεργά έχουν δώσει ικανοποιητικά μοντέλα με R^2 μεγαλύτερο του 0,8 και στις δύο περιπτώσεις, αποδεικνύοντας ότι η MLC έχει προοπτική και στην εκτίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμάκων [59], [60]. Βιβλιογραφικά έχει βρεθεί επίσης ότι υπάρχει ένας τύπος αμφοτερικών τασιενεργών τα οποία σχηματίζουν μικκύλια, που μοιάζουν με πρωτεΐνες. Ένα παράδειγμα τέτοιας ένωσης είναι το BS-12, το οποίο αποτελείται από μια ισχυρή ομάδα τεταρτοταγούς αμμωνίου και μια ασθενή ομάδα καρβοξυλικού οξέος. Όταν συσπειρώνεται σε μικκύλια σε υδατικό διάλυμα, οι υδρόφοβες ουρές συσσωματώνονται στο κέντρο και οι υδρόφιλες ομάδες βρίσκονται στο εξωτερικό, όπως η αμινομάδα και η καρβοξυλική ομάδα των πρωτεϊνών. Το BS-12 εμφάνισε καλή συσχέτιση με στήλη βόειας αλβουμίνης ορού [61].

Πειραματικό Μέρος

Σχεδιασμός Πειραματικής Διαδικασίας

Σκοπός

Η μελέτη του μηχανισμού έκλυσης φαρμακευτικών μορίων με χρήση της μικκυλιακής χρωματογραφίας με το τασιενεργό Tween 20, καθώς και η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου ως εργαλείο εκτίμησης των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων φαρμάκων.

Αντιδραστήρια

Για την Παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκαν KH_2PO_4 ($\geq 99,5\%$, Chem-Lab), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99,5\%$, Merck), NaCl ($\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich), Tween 20 (200g/L H_2O , Chem-Lab) και νερό υψηλής καθαρότητας (High Purity Water, HPW). Το HPW ελήφθη μέσω ενός συστήματος καθαρισμού νερού EASYpure II (Barnstead International, USA). Ως δείκτης νεκρού χρόνου της στήλης χρησιμοποιήθηκε κιτρικό νάτριο $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich) σε υδατικό διάλυμα.

Οργανολογία

Αντλία: HPLC Pump k-1001, της εταιρίας Knauer, ρυθμισμένη σε ροή 1mL/min.

Στήλη: Αντιστρόφου φάσεως Discovery HS C18, της εταιρίας Supelco, με διαστάσεις 15cm x 4,6mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm .

Ανιχνευτής: UV Detector K-2501, της εταιρίας Knauer, ρυθμισμένος στα 220nm. Είναι συνδεδεμένος απευθείας σε υπολογιστή, ο οποίος καταγράφει το σήμα που λαμβάνει ο ανιχνευτής από το εξέρχον διάλυμα και κατασκευάζει το χρωματογράφημα.

Απαερωτής: Vacuum Degasser, της Knauer. Ο απαερωτής αφαιρεί τον αέρα που τυχόν υπάρχει στον σωλήνα της κινητής φάσης, ώστε να ρέει σε αυτόν μόνο ο διαλύτης έκλουσης και να μην υπάρχουν εντός του φυσαλίδες αέρα, που θα προκαλέσουν σοβαρό πρόβλημα αν προχωρήσουν περαιτέρω στο σύστημα. Για τον σκοπό αυτό, ο απαερωτής είναι το πρώτο όργανο που ανοίγει στο σύστημα και λειτουργεί για μερικά λεπτά μέχρι να περνάει από το σωλήνα καθαρό υγρό.

Διαχειριστής διαλύτη: Solvent Organizer K-1500, της Knauer. Η συσκευή αυτή έχει σωλήνες που ξεκινούν από τα δοχεία των διαλυμάτων και καταλήγουν στον απαερωτή. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην ρύθμιση της κινητής φάσης όταν στο σύστημα εισάγονται περισσότερα του ενός διαλύματα. Ωστόσο στην περίπτωσή της παρούσας έρευνας, όπου ο διαλύτης έκλουσης είναι ένας, χρησιμοποιείται ένας μόνο σωλήνας για την ροή της κινητής φάσης.

Υδατόλουτρο: Stirred water bath WB-4MS, της Biosan, ρυθμισμένο στους 37°C. Το υδατόλουτρο δεν είναι μέρος του HPLC συστήματος, αλλά η στήλη βρίσκεται μόνιμα εντός αυτού προκειμένου να προσεγγίζει την θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος, που είναι φυσιολογικά 36,6°C, ώστε τα αποτελέσματα να αντικατοπτρίζουν την συμπεριφορά των φαρμάκων εντός του οργανισμού.

Πειραματική Διαδικασία

Η παρασκευή του διαλύτη έκλουσης γίνεται με προσθήκη 0,37gr Tween 20 στα 500mL διαλύματος, που είναι περίπου 12,5 φορές πάνω από την CMC του. Η ρύθμιση του pH γίνεται με υδατικό διάλυμα 0,77gr KH_2PO_4 και 3,44gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, στο 7,4 και 5,5. Για την προετοιμασία του διαλύματος, τα δύο συστατικά αυτά, καθώς και 4,6gr NaCl, που προστίθεται για να αναπαράξει την ωσμωτική πίεση του σώματος,

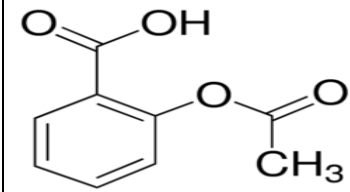
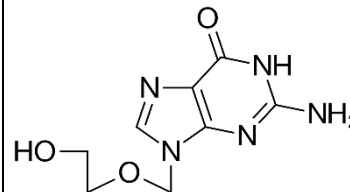
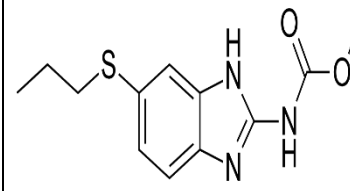
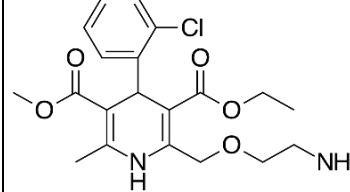
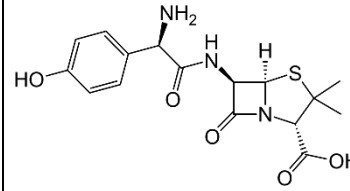
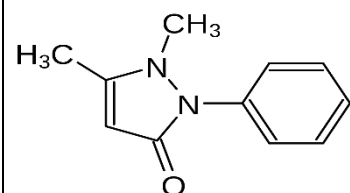
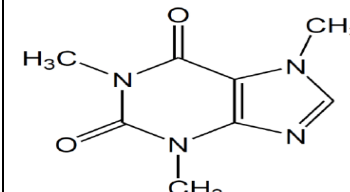
διαλύονται σε 400mL υπερκαθαρό νερό, με συνεχή ανάδευση. Το pH ρυθμίζεται στην επιθυμητή τιμή με προσθήκη στάγδην αραιωμένου διαλύματος NaOH ή HCl. Έπειτα στο διάλυμα αυτό προστίθεται το Tween 20 και τελικά το διάλυμα συμπληρώνεται με υπερκαθαρό νερό μέχρι τα 500mL. Για ορισμένα πολύ λιπόφιλα φάρμακα χρειάστηκε να παρασκευαστούν κινητές φάσεις με προσθήκη μεθανόλης σε ποσοστό 20, 25 και 30%.

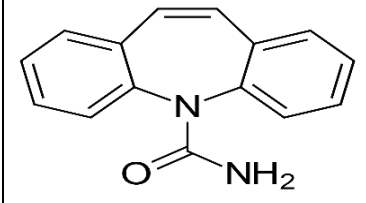
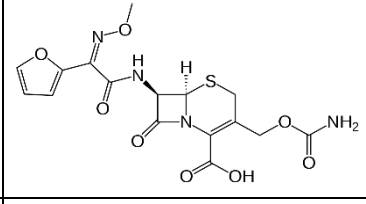
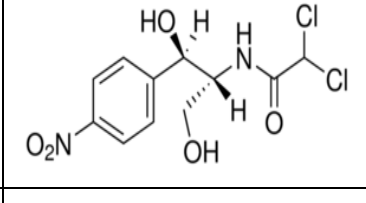
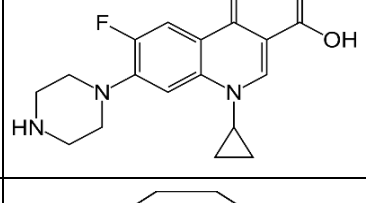
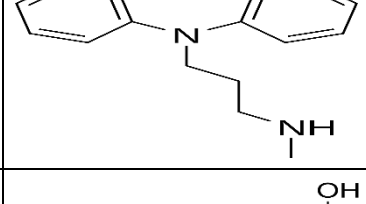
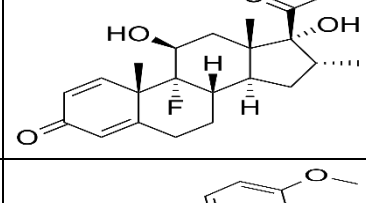
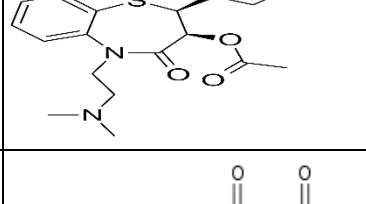
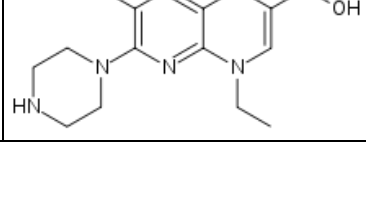
Για το κάθε φάρμακο το πείραμα επαναλαμβανόταν τρεις φορές, ή τέσσερις, αν οι χρόνοι κατακράτησης είχαν μεγάλες αποκλίσεις και λαμβανόταν ο μέσος όρος των μετρήσεων. Ο συντελεστής ανάσχεσης της κάθε ουσίας υπολογίστηκε από τη σχέση (7) και η αξιολόγηση έγινε επί των λογαριθμικών τιμών, $\log k$. Τα πολύ λιπόφιλα φάρμακα, που μελετήθηκαν με οργανικό διαλύτη, μετρήθηκαν και στις τρεις συγκεντρώσεις αυτού και έπειτα στα $\log k$ που προέκυψαν έγινε γραμμική παρεμβολή για να υπολογιστεί το $\log k$ σε καθαρά υδατική φάση.

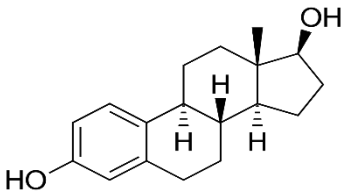
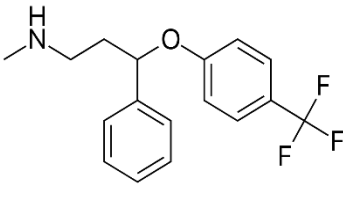
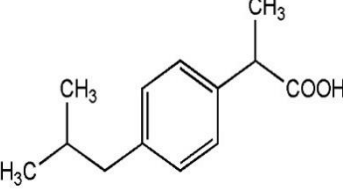
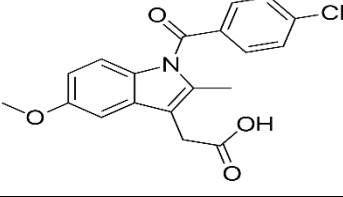
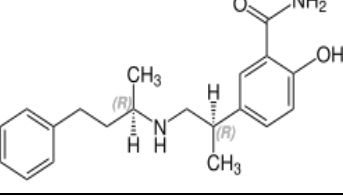
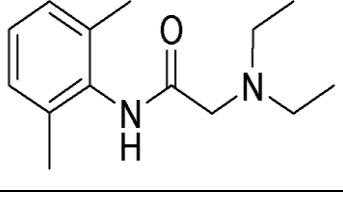
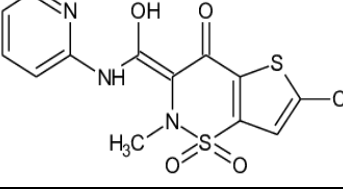
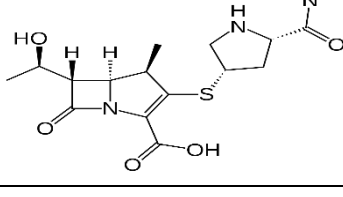
Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικές τιμές pH, στο 7,4, που είναι το pH του αίματος και στο 5,5, που αντιστοιχεί σε περιοχές κοντά στο λεπτό έντερο. Σε περιβάλλον με χαμηλό pH τα ελαφρώς όξινα φάρμακα εμφανίζουν μειωμένο ιονισμό και ευνοείται η ουδέτερη μορφή τους. Κατά συνέπεια έχουν αυξημένη λιποφιλία, η οποία ενισχύει την συγγένειά τους με την στήλη και άρα την κατακράτησή τους. Επομένως τέτοια φάρμακα αναμένεται να έχουν μεγαλύτερους χρόνους έκλουσης σε pH 5,5. Αντίστοιχα στον ανθρώπινο οργανισμό, ο μειωμένος ιονισμός ενός φαρμάκου συνεπάγεται μεγαλύτερη *per os* απορρόφηση. Γι' αυτό τον λόγο παρουσιάζει ενδιαφέρον η εξέταση των όξινων, αλλά και των αμφολυτικών φαρμάκων στο pH του λεπτού εντέρου, ώστε να διερευνηθεί η ικανότητα της μικκυλιακής χρωματογραφίας να περιγράψει την συμπεριφορά τους. Τα ουδέτερα φάρμακα δεν επηρεάζονται από τις αλλαγές του pH, ενώ τα ελαφρώς βασικά εμφανίζουν μειωμένο ιονισμό με αύξηση του pH, οπότε η μελέτη τους στο 5,5 δεν παρουσιάζει ενδιαφέρον.

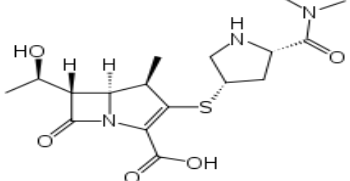
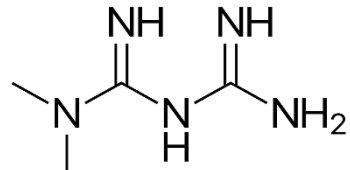
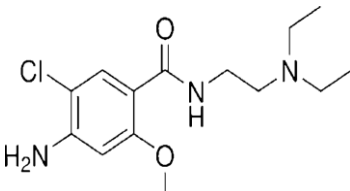
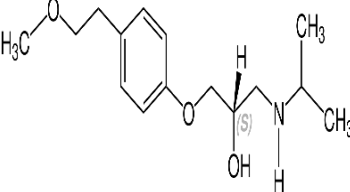
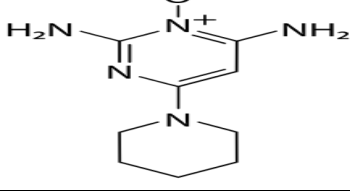
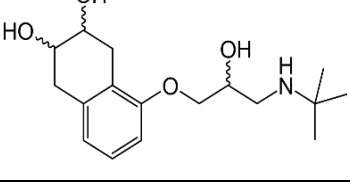
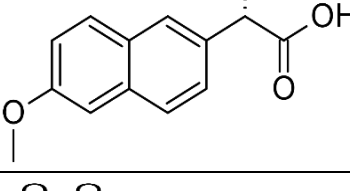
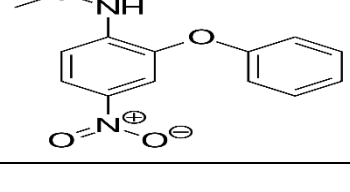
Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται όλα τα φάρμακα που μελετήθηκαν, καθώς και ο τύπος, η φαρμακολογική δράση και η δομή αυτών. Η στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS.

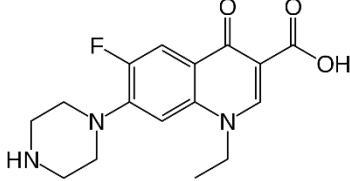
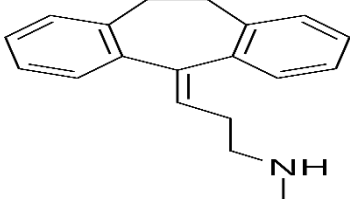
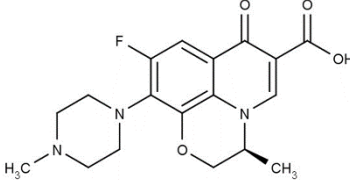
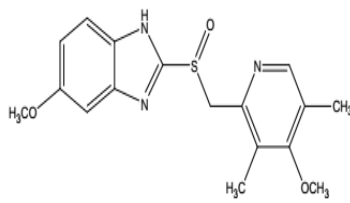
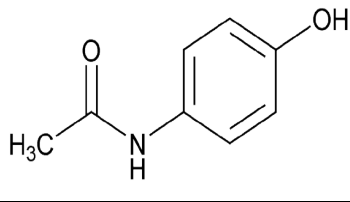
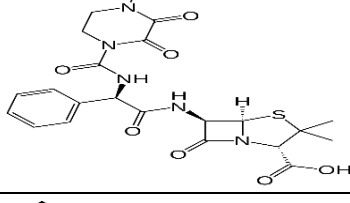
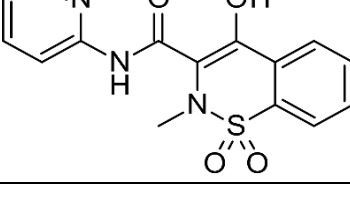
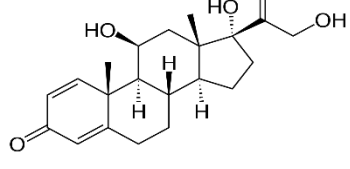
Πίνακας 2. Φάρμακα που μελετήθηκαν.

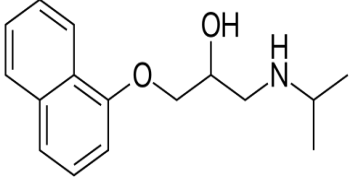
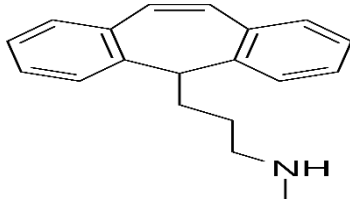
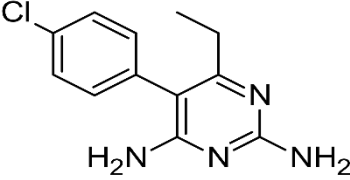
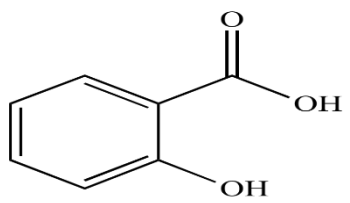
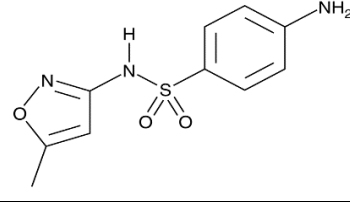
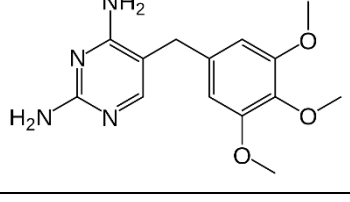
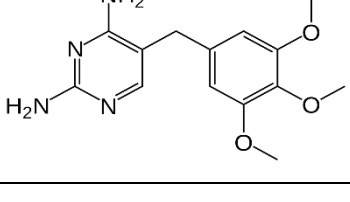
	Φάρμακο	Τύπος	Φαρμακολογική Δράση	Δομή
1	Acetylsalicylic acid	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
2	Acyclovir	Ουδέτερο	Αντι-ϊικό	
3	Albendazole	Ουδέτερο	Αντιπαρασιτικό	
4	Amlodipine	Βάση	Καρδιολογικό (Αντιυπερτασικό)	
5	Amoxicillin	Οξύ	Αντιβιοτικό	
6	Antipyrine	Ουδέτερο	Αναλγητικό	
7	Caffeine	Ουδέτερο	Διεγερτικό του ΚΝΣ	

8	Carbamazepine	Ουδέτερο	Αντιεπιληπτικό	
9	Cefuroxime	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	
10	Chloramphenicol	Ουδέτερο	Αντιβιοτικό	
11	Ciprofloxacin	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	
12	Desipramine	Βάση	Αντικαταθλιπτικό	
13	Dexamethazone	Ουδέτερο	Αντιφλεγμονώδες	
14	Diltiazem	Βάση	Καρδιολογικό (Αντιυπερτασικό)	
15	Enoxacin	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	

16	Estradiol	Ουδέτερο	Οιστρογόνο	
17	Fluoxetine	Βάση	Αντικαταθλιπτικό	
18	Ibuprofen	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
19	Indomethacin	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
20	Labetalol	Βάση	Αποκλειστής των β αδρενεργικών υποδοχέων	
21	Lidocaine	Βάση	Τοπικό αναισθητικό	
22	Lornoxicam	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
23	Losartan	οξύ	Καρδιολογικό (Αντιυπερτασικό)	

24	Meropenem	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	
25	Metformin	Βάση	Αντι-υπεργλυκαιμικό	
26	Metoclopramide	Βάση	Φάρμακα για λειτουργικές γαστρεντερικές διαταραχές	
27	Metoprolol	Βάση	Αποκλειστής των β αδρενεργικών υποδοχέων	
28	Minoxidil	Ουδέτερο	Αντιυπερτασικό	
29	Nadolol	Βάση	Αποκλειστής των β αδρενεργικών υποδοχέων	
30	Naproxen	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
31	Nimesulide	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες-αναλγητικό	

32	Norfloxacin	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	
33	Nortriptyline	Βάση	Αντικαταθλιπτικό	
34	Ofloxacin	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	
35	Omeprazole	Ουδέτερο	Φάρμακα παθήσεων πεπτικού συστήματος	
36	Paracetamol	Ουδέτερο	Αναλγητικό	
37	Piperacillin	Οξύ	Αντιβιοτικό	
38	Piroxicam	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
39	Prednisolone	Ουδέτερο	Κορτιζονούχο	

40	Promazine	Βάση	Αντιψυχωσικό	
41	Protriptyline	Βάση	Αντικαταθλιπτικό	
42	Pyrimethamine	Βάση	Αντιπαρασιτικό	
43	Salicylic acid	Οξύ	Αντιψωριασικό	
44	Sulfamethoxazole	Οξύ	Αντιβιοτικό	
45	Thioridazine	Βάση	Αντιψυχωσικό	
46	Trimethoprim	Βάση	Αντιβιοτικό	

Στους πίνακες 3 και 4 παραθέτονται για pH 7,4 και 5,5 οι συντελεστές μερισμού και κατανομής, καθώς και συντελεστές κατακράτησης σε υγροχρωματογραφία BMC και IAM (με στήλη IAM.DD2), που λήφθηκαν από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο ίδιο εργαστήριο και δεν περιλαμβάνουν όλα τα φάρμακα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία [62], [27]. Οι παράμετροι logP και logD αντλήθηκαν από το

λογισμικό ADME Boxes 3.0. Περιλαμβάνονται επίσης τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου (f^+ , f^- , f_{zw}^+ και f_{zw}^-) των φαρμάκων, τα οποία δηλώνουν το ποσοστό ιονισμού μιας ένωσης.

Πίνακας 3. Συντελεστές μερισμού και κατανομής των φαρμάκων και συντελεστές κατακράτησης χρωματογραφίας BMC και IAM.PC.DD2 σε pH=7,4.

Φάρμακο	logP	logD	f^+	f^-	log k_{BMC}	log $I_{IAM.DD2}$	f_{zw}^+	f_{zw}^-
Acetylsalicylic acid	1,19	-2,50	0	1	-0,42	-0,81	0	1
Acyclovir	-1,56	-1,56	0	0,009	-0,54	-1,15	0	0,009
Albendazole	3,29	3,29	0,004	0,002	1,36	2,08	0,004	0,002
Amlodipine	2,96	1,66	0,994	0	1,02	2,79	0,994	0
Amoxicillin	-1,71	-2,56	0	0,531	-0,78	-0,29	0,469	1
Antipyrine	0,38	0,54	0	0	-	-	0	0
Caffeine	-0,07	-0,07	0	0	0,10	0,26	0	0
Carbamazepine	2,30	2,30	0	0	0,97	1,39	0	0
Cefuroxime	-0,16	-4,14	0	1	-	-	-	-
Chloramphenicol	1,14	1,14	0	0	0,49	0,31	0	0
Ciprofloxacin	-1,08	-1,11	0,05	0,033	-0,23	1,31	0,964	0,947
Desipramine	4,90	2,28	0,999	0	-	-	0,999	0
Dexamethazone	1,83	1,83	0	0	1,16	1,56	0	0
Diltiazem	2,80	0,00	0,875	0	1,54	2,65	0,875	0
Enoxacin	-1,02	-1,02	0,051	0,033	-0,37	0,55	0,965	0,947
Estradiol	4,01	4,01	0	0,001	1,22	2,59	0	0,001
Fluoxetine	4,26	1,82	0,997	0	1,64	2,98	0,997	0
Ibuprofen	3,50	1,07	0	0,999	1,01	0,87	0	0,999
Indomethacin	4,27	1,03	0	0,998	1,00	2,41	0	0,998
Labetalol	3,09	1,63	0,552	0,022	1,10	-	0,946	0,416
Lidocaine	2,26	1,71	0,779	0	0,85	1,27	0,779	0
Lornoxicam	2,62	0,50	0	0,993	-	-	-	-
Losartan	3,09	1,16	0	0,933	0,97	2,47	0,066	0,999
Meropenem	0,05	-2,47	0	0,043	-	-	-	-
Metformin	-0,91	-3,91	1	0	-0,55	-0,37	1	0

Metoclopramide	2,64	0,64	0,989	0	0,57	1,63	0,989	0
Metoprolol	1,88	-0,37	0,994	0	0,51	0,87	0,994	0
Minoxidil	1,24	1,23	0,002	0	0,67	0,73	0,002	0
Nadolol	0,81	-1,16	0,991	0	-0,37	1,26	0,991	0
Naproxen	3,18	0,33	0	0,999	0,67	0,98	0	0,999
Nimesulide	2,60	1,35	0	0,966	1,20	1,57	0	0,966
Norfloxacin	-1,03	-1,03	0,05	0,033	-0,16	1,01	0,964	0,947
Nortriptyline	4,04	1,70	0,998	0	1,35	2,83	0,998	0
Ofloxacin	-0,39	-0,44	0,047	0,096	0,01	0,81	0,898	0,947
Omeprazole	2,30	2,30	0,001	0,054	1,13	1,81	0,001	0,054
Paracetamol	0,51	0,51	0	0	0,46	0,18	0	0
Piperacillin	0,50	-1,58	0	1	-0,28	0,6	0	1
Piroxicam	1,76	-0,05	0	1	0,78	1,35	0	1
Prednisolone	1,62	1,62	0	0	1,03	1,65	0	0
Promazine	4,55	2,58	0,991	0	-	-	0,991	0
Protriptyline	4,89	1,36	0,875	0	1,49	2,79	0,875	0
Pyrimethamine	2,69	2,44	0,584	0	1,36	1,87	0,584	0
Salicylic acid	2,26	-1,67	0	1	0,34	-0,3	0	1
Sulfamethoxazole	0,89	-0,76	0	0,978	0,40	-0,04	0	0,978
Thioridazine	5,90	3,34	0,991	0	1,85	3,98	0,991	0
Trimethoprim	0,91	0,74	0,469	0	0,71	1,05	0,469	0

Πίνακας 4. Συντελεστές μερισμού και κατανομής των φαρμάκων και συντελεστές κατακράτησης χρωματογραφίας BMC και IAM.PC.DD2 σε pH=5,5.

Φάρμακο	Τύπος	logP	logD	f ⁺	f ⁻	logk _{BMC}	log _{IAM.DD2}	f _{zw} ⁺	f _{zw} ⁻
Acetylsalicylic acid	A	1,19	-0,82	0	0,99	0,01	-0,48	0	0,99
Amoxicillin	Z	-1,71	-1,71	0,001	0,016	-0,93	-0,31	0,984	0,999
Ciprofloxacin	Z	-1,08	-1,73	0,793	0	0,05	1,29	0,999	0,206
Diltiazem	B	2,8	0,15	0,998	0	-	-	-	-
Enoxacin	Z	-1,02	-1,68	0,793	0	-0,30	1,25	0,999	0,206
Ibuprofen	A	3,5	2,15	0	0,943	1,70	1,55	0	0,943

Indomethacin	A	4,27	2,79	0	0,892	1,58	2,93	0	0,892
Lidocaine	B	2,26	-0,06	0,996	0	-	-	-	-
Lornoxicam	A	2,62	2,14	0	0,674	-	-	-	-
Losartan	A	3,09	2,24	0,073	0,156	1,11	2,58	0,829	0,912
Naproxen	A	3,18	1,95	0,00	0,94	1,32	1,71	0,00	0,94
Norfloxacin	Z	-1,03	-1,68	0,793	0	0,05	1,31	0,999	0,206
Ofloxacin	Z	-0,39	-1	0,792	0	-0,14	1,35	0,998	0,206
Paracetamol	N	0,51	0,51	0	0	0,41	-0,06	0	0
Piperacillin	A	0,5	-1	0	0,999	-0,22	1,13	0	0,999
Piroxicam	A	1,76	1,76	0	0,5	1,02	1,73	0,5	1
Promazine	B	4,55	1,52	1	0	-	-	-	-
Pyrimethamine	B	2,69	1,09	0,99	0	-	-	-	-
Salicylic acid	A	2,26	-0,24	0	0,997	0,59	-0,12	0	0,997
Sulfamethoxazole	A	0,89	0,65	0	0,395	0,96	0,91	0	0,395
Thioridazine	B	5,9	2,86	1	0	-	-	-	-

Στο εργαστήριο ανόργανης και αναλυτικής χημείας έχει πραγματοποιηθεί ξανά εφαρμογή της μεθόδου μικκυλιακής χρωματογραφίας με Tween 20 στις ίδιες πειραματικές συνθήκες για την μέτρηση 45 άλλων φαρμάκων. Οι συντελεστές κατακράτησης των φαρμάκων αυτών μαζί και με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αξιοποιούνται για την συσχέτισή τους με δύο φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες που μελετήθηκαν είναι η σύνδεση με τις πρωτεΐνες πλάσματος (PPB) και ο όγκος κατανομής των φαρμάκων (V_d), για τις οποίες λήφθηκαν δεδομένα από διάφορες ιστοσελίδες με βάσεις δεδομένων φαρμάκων [63], [64], [65], [66]. Τα δεδομένα κατακράτησης όλων των φαρμάκων στο Tween, καθώς και των φαρμακοκινητικών παραμέτρων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5. Συντελεστές κατακράτησης και φαρμακοκινητικές ιδιότητες (PPB, V_d) όλων των φαρμάκων που έχουν μετρηθεί με μικκυλιακή χρωματογραφία με Tween 20.

	Φάρμακο	Τύπος	$\log k_{\text{Tween}}$	f+	f-	%PPB	V_d
1	Acetylsalicylic acid	A	-0,812±0,08	0	1	49	0,18

2	Acyclovir	N	-0,461±0,08	0	0,009	18,75	0,7
3	Albendazole	N	2,066±0,02	0,004	0,002	70	-
4	Allopurinol	N	-0,25±0,08	0	0,01	5	0,86
5	Amitriptyline	B	2,177±0,02	0,982	0	94,8	16,8
6	Amlodipine	B	-0,546±0,08	0,994	0	95,75	19,33
7	Amoxicillin	A	-1,266±0,08	0	0,531	19,2	0,21
8	Ampicillin	A	-0,66±0,08	0	0,53	20	0,38
9	Antipyrine	N	-0,013±0,07	0	0	5	-
10	Atenolol	B	-0,549±0,08	0,994	0	11	1,15
11	Atropine	B	0,11±0,03	0,996	0	20	2,75
12	Bromazepam	N	1,296±0,02	0	0	70	1,15
13	Caffeine	N	0,054±0,03	0	0	40	0,6
14	Carbamazepine	N	1,754±0,02	0	0	72,3	1,33
15	Ceftriaxone	Z	-0,727±0,08	0	0,221	95	0,14
16	Chloramphenicol	N	1,345±0,02	0	0	54	0,96
17	Chlordiazepoxide	N	1,827±0,02	0,002	0	94	-
18	Chlorpromazine	B	2,282±0,02	0,991	0	96,5	20,5
19	Cimetidine	B	0,335±0,03	0,218	0	18,5	1,12
20	Cinoxacin	A	-0,827±0,08	0	0,998	66,5	0,23
21	Ciprofloxacin	Z	-0,721±0,08	0,05	0,033	40	2,45
22	Desipramine	B	2,49±0,02	0,999	0	86,25	22,5
23	Dexamethazone	N	1,624±0,02	0	0	70,75	0,58
24	Diclofenac	A	1,465±0,02	0	0,999	99,5	0,16
25	Diltiazem	B	2,002±0,02	0,875	0	78	5,09
26	Diphenhydramine	B	1,762±0,02	0,965	0	81,5	4,27
27	Enalapril	A	0,197±0,03	0	0,986	-	1,7
28	Enoxacin	Z	-0,935±0,08	0,051	0,033	40	2,75
29	Estradiol	N	2,008±0,02	0	0,001	95	12
30	Flunitrazepam	N	1,483±0,02	0	0	-	-
31	Fluoxetine	B	1,898±0,02	0,997	0	94	31,12
32	Fluphenazine	B	2,238±0,02	0,737	0	95	11
33	Furosemide	A	1,372±0,02	0	1	96,8	0,16
34	Haloperidol	B	1,883±0,02	0,933	0	92	18

35	Hydrochlorothiazide	N	1,003±0,02	0	0,028	64,6	-
36	Hydrocortisone	N	1,36±0,02	0	0	95	0,54
37	Ibuprofen	A	1,188±0,02	0	0,999	99	0,12
38	Imipramine	B	1,952±0,02	0,991	0	82,75	17,25
39	Indomethacin	A	1,712±0,02	0	0,998	90	0,8
40	Isoxicam	A	1,396±0,02	0	1	96	-
41	Ketoprofen	A	0,63±0,02	0	0,999	98	0,1
42	Labetalol	B	1,537±0,02	0,552	0,022	-	8,95
43	Levofloxacin	Z	-0,719±0,08	0,047	0,096	32,3	1,38
44	Lidocaine	B	1,391±0,02	0,779	0	67	1,3
45	Lisinopril	Z	-1,23±0,08	0	0,001	2,1	2,05
46	Lornixicam	A	1,498±0,02	0	0,993	99	0,2
47	Losartan	A	1,479±0,02	0	0,933	99,2	0,45
48	Mebendazole	N	1,015±0,02	0,004	0,002	92,5	1,3
49	Mefenamic acid	A	1,545±0,02	0	0,999	90	-
50	Meloxicam	A	1,422±0,02	0	0,999	99,3	10
51	Metformin	B	-0,634±0,08	1	0	0	1,69
52	Methylprednisolone	N	1,701±0,02	0	0	77,3	1,26
53	Metoclopramide	B	0,782±0,02	0,989	0	33,3	3,3
54	Metoprolol	B	0,463±0,03	0,994	0	11,3	4,33
55	Minoxidil	N	0,604±0,02	0,002	0	0	2,86
56	Nadolol	B	-0,328±0,08	0,991	0	30	2
57	Nalidixic acid	A	-0,494±0,08	0	0,947	93	0,4
58	Naproxen	A	0,714±0,02	0	0,999	99,7	0,16
59	Nicotine	B	0,41±0,03	0,875	0	6,5	2,53
60	Niflumic acid	A	1,517±0,02	0	0,997	90	-
61	Nimesulide	A	1,47±0,02	0	0,966	97,5	-
62	Nitrofurantoin	A	0,137±0,03	0	0,473	73,75	0,66
63	Norfloxacin	Z	-0,708±0,08	0,05	0,033	13,75	2,8
64	Nortriptyline	B	2,165±0,02	0,998	0	92,25	22,05
65	Ofloxacin	Z	-0,481±0,08	0,047	0,096	32	2,35
66	Omeprazole	N	1,484±0,02	0,001	0,054	95	0,33
67	Paracetamol	N	0,301±0,03	0	0	22,5	0,92

68	Pindolol	B	0,678±0,02	0,994	0	40	1,86
69	Pipemidic acid	Z	-1,02±0,08	0,051	0,033	30	-
70	Piperacillin	A	-0,282±0,08	0	1	19	1,35
71	Piroxicam	A	1,313±0,02	0	1	99	0,13
72	Prednisolone	N	1,264±0,02	0	0	92,5	0,44
73	Primidone	N	0,724±0,02	0	0	38	0,64
74	Promazine	B	1,785±0,02	0,991	0	94	-
75	Promethazine	B	2,22±0,02	0,989	0	93	13,4
76	Propranolol	B	1,729±0,02	0,994	0	87	4
77	Protriptyline	B	2,245±0,02	0,875	0	92	23
78	Pyrimethamine	B	1,957±0,02	0,584	0	87	2,9
79	Ranitidine	B	-0,368±0,08	0,933	0	15	1,46
80	Salicylic acid	A	0,152±0,03	0	1	95	-
81	Sulfamethoxazole	A	0,19±0,03	0	0,978	53	0,24
82	Sulpiride	B	-0,013±0,07	0,984	0	14	-
83	Tenoxicam	A	1,223±0,02	0	1	98,5	-
84	Terbutaline	B	-0,017±0,07	0,98	0	19,5	1,6
85	Theophylline	N	-0,469±0,08	0	0	56	0,48
86	Thioridazine	B	2,224±0,02	0,991	0	97,9	7,13
87	Trazodone	N	2,326±0,02	0,218	0	92,5	0,89
88	Trimethoprim	B	1,075±0,02	0,469	0	41,7	1,34
89	Vancomycin	Z	-0,328±0,08	0	0,125	43,3	0,52
90	Verapamil	B	2,021±0,02	0,982	0	90	4,8
91	Warfarin	A	1,064±0,02	0	0,997	98,75	0,15

Αποτελέσματα

Αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων σε pH=7,4 συγκριτικά με άλλες παραμέτρους.

Οι συντελεστές κατακράτησης $\log k_{\text{Tween}7,4}$ των φαρμάκων που μελετήθηκαν παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα που ακολουθεί. Τα φάρμακα albedazole, desipramine, diltiazem, fluoxetine, nortriptyline, promazine, protriptyline, pyrimethamine και thioridazine μετρήθηκαν με οργανικό διαλύτη για την εξαγωγή του $\log k$.

Πίνακας 4. Πειραματικές τιμές $\log k$ των φαρμάκων που μετρήθηκαν με το τυπικό σφάλμα τους.

Φάρμακο	$\log k_{\text{Tween} (7,4)}$
Acetylsalicylic acid	-0,812±0,08
Acyclovir	-0,461±0,08
Albendazole	2,066±0,02
Amlodipine	-0,546±0,08
Amoxicillin	-1,266±0,08
Antipyrine	-0,013±0,07
Caffeine	0,054±0,03
Carbamazepine	1,754±0,02
Cefuroxime	-0,333±0,08
Chloramphenicol	1,345±0,02
Ciprofloxacin	-0,721±0,08
Desipramine	2,490±0,02
Dexamethazone	1,624±0,02
Diltiazem	2,002±0,02
Enoxacin	-0,935±0,08
Estradiol	2,008±0,02
Fluoxetine	1,898±0,02

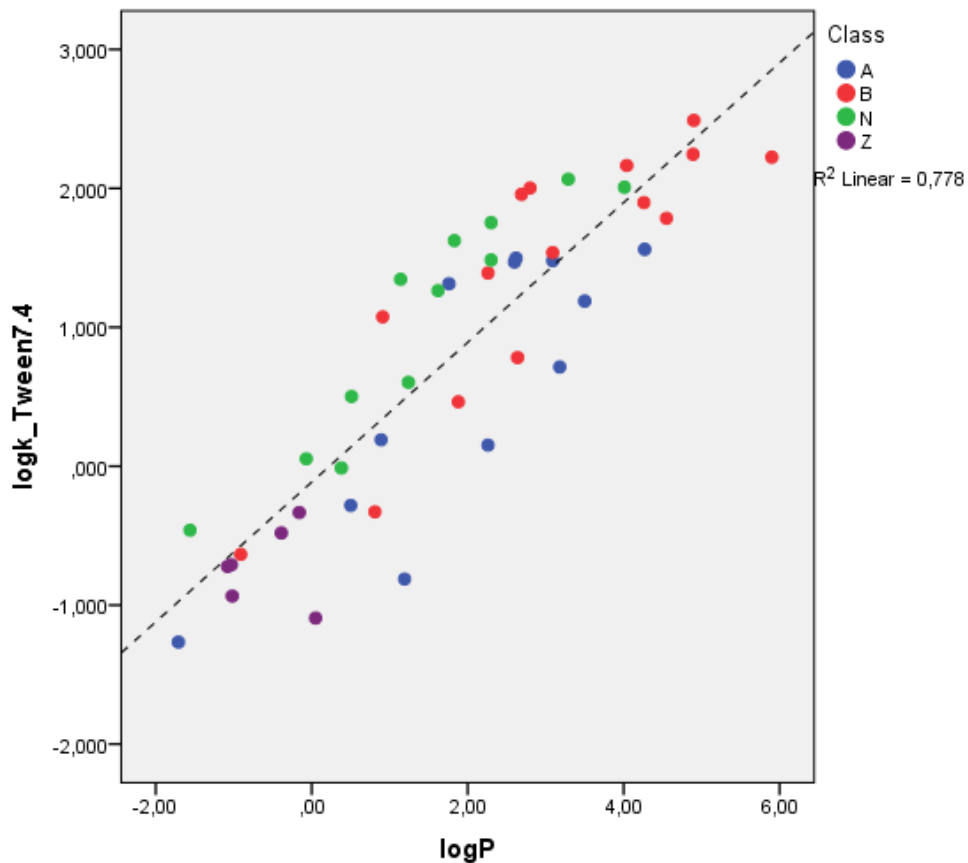
Ibuprofen	1,188±0,02
Indomethacin	1,561±0,02
Labetalol	1,537±0,02
Lidocaine	1,391±0,02
Lornoxicam	1,498±0,02
Losartan	1,479±0,02
Meropenem	-1,093±0,08
Metformin	-0,634±0,08
Metoclopramide	0,782±0,02
Metoprolol	0,463±0,03
Minoxidil	0,604±0,02
Nadolol	-0,328±0,08
Naproxen	0,714±0,02
Nimesulide	1,470±0,02
Norfloxacin	-0,708±0,08
Nortriptyline	2,165±0,02
Ofloxacin	-0,481±0,08
Omeprazole	1,484±0,02
Paracetamol	0,502±0,02
Piperacillin	-0,282±0,08
Piroxicam	1,313±0,02
Prednisolone	1,264±0,02
Promazine	1,785±0,02
Protriptyline	2,245±0,02
Pyrimethamine	1,957±0,02
Salicylic acid	0,152±0,03
Sulfamethoxazole	0,190±0,03
Thioridazine	2,224±0,02
Trimethoprim	1,075±0,02

Τα αποτελέσματα που πίνακα 4 αρχικά εξετάστηκαν ως προς τη συσχέτισή τους με τις τιμές logk που προέκυψαν από μικκυλιακή χρωματογραφία με τους συντελεστές

μερισμού και κατανομής αυτών, καθώς και με μικκυλιακή χρωματογραφία με Brij-35 και χρωματογραφία IAM.DD2. Το $\log k$ του amlodipine βρέθηκε να έχει σημαντική διαφορά σε σχέση με τις άλλες παραμέτρους, συνεπώς εξαιρέθηκε από την επεξεργασία, καθώς επηρέαζε σε μεγάλο βαθμό τα αποτελέσματα.

Συσχέτιση με το συντελεστή μερισμού οκτανόλης-νερού, $\log P$

Η αξιολόγηση της μικκυλιακής χρωματογραφίας με Tween 20 ως εργαλείο φαρμακολογικής εκτίμησης κρίνεται κυρίως από την συσχέτιση των αποτελεσμάτων της με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής. Ο συντελεστής προσδιορισμού της συσχέτισης των $\log k$ με τα $\log P$ βρέθηκε $R^2=0,778$, που είναι αρκετά ικανοποιητική τιμή. Τα φάρμακα, σε όλα τα διαγράμματα χωρίζονται με χρωματική διάκριση, ως προς τον τύπο τους, στις κατηγορίες οξύ (Acid, A), βάση (Base, B), ουδέτερο (Neutral, N) και αμφολύτης (Zwitterion, Z). Ωστόσο δεν παρουσίασαν ομαδοποίηση σύμφωνα με αυτό το χαρακτηριστικό.



Διάγραμμα 1. Συσχέτιση των $\log k_{\text{Tween}}$ με τους συντελεστές μερισμού σε pH 7,4.

Η εξίσωση που συνδέει τα αποτελέσματα της MLC με Tween με το $\log P$ είναι

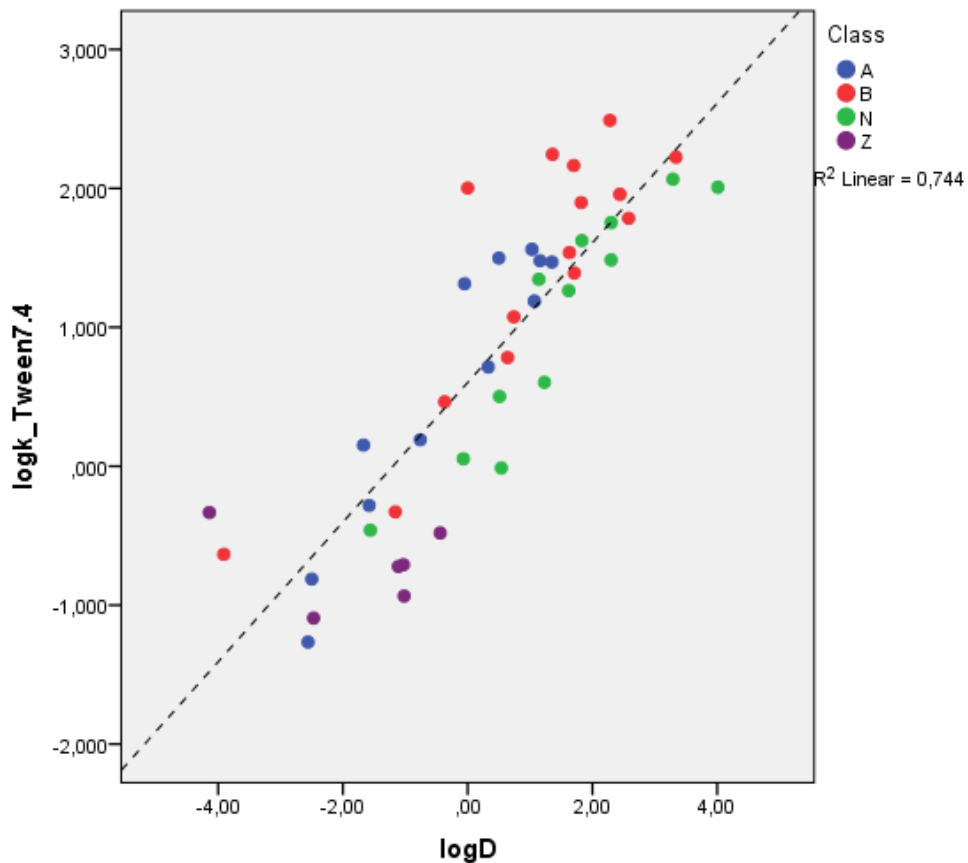
$$\log k_{\text{Tween}7,4} = 0,503(\pm 0,041) \cdot \log P - 0,114(\pm 0,108) \quad (11),$$

Με $N=45$, $R^2=0,778$, $F=150,7$ και $p<0,01$.

Συσχέτιση με το συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού, $\log D$

Ο συντελεστής κατανομής εμφάνισε επίσης ικανοποιητική συσχέτιση με τα αποτελέσματα του Tween, $R^2=0,744$, όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα.

Το $\log D$ αφορά την ιονισμένη μορφή των φαρμάκων, που εκφράζει ακριβέστερα την κατάσταση τους σε υδατικό διάλυμα.



Διάγραμμα 2. Συσχέτιση των $\log k_{\text{Tween}}$ με τους συντελεστές κατανομής σε pH 7,4.

Η εξίσωση που συνδέει τα αποτελέσματα της MLC με Tween με το $\log D$ είναι

$$\log k_{\text{Tween}7.4} = 0,503(\pm 0,045) \cdot \log D + 0,603(\pm 0,085) \quad (12),$$

Με $N=45$, $R^2=0,744$, $F=125,233$ και $p<0,01$.

Πραγματοποιήθηκε επιπλέον και μελέτη της επίδρασης που έχουν τα f^+ και f^- στην κατακράτηση, οπότε προέκυψε ο παρακάτω τύπος,

$$\log k_{\text{Tween}7.4} = 0,526(\pm 0,037) \cdot \log D + 0,829(\pm 0,173) \cdot f^+ + 0,755(\pm 0,175) \cdot f^- + 0,135(\pm 0,110) \quad (13),$$

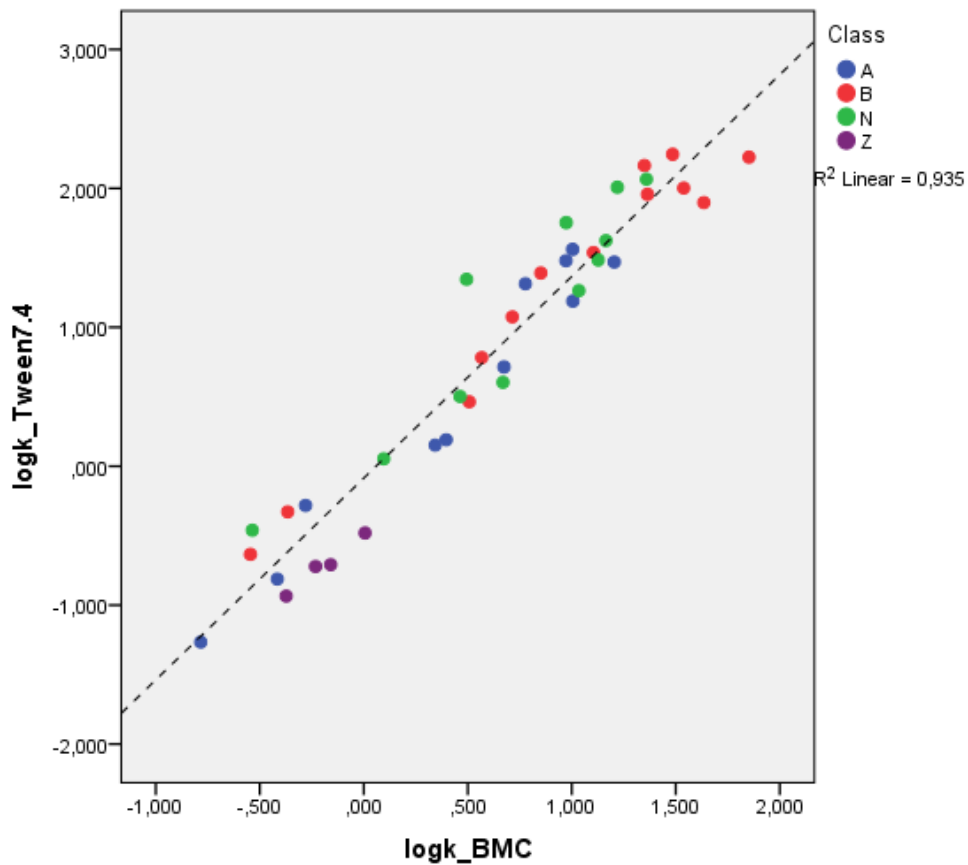
με $F= 77,991$, $R^2=0,851$ και $p<0,01$.

Οι θετικοί συντελεστές των f^+ και f^- αποτελούν διόρθωση στις τιμές $\log D$, καθώς ο ιονισμός των φαρμάκων εντός της στήλης είναι μικρότερος από αυτόν που δηλώνουν οι συντελεστές κατανομής. Οπότε με την προσθήκη των συντελεστών αυτών το R^2 βελτιώθηκε αισθητά.

Συσχέτιση με το Brij-35

Για την σύγκριση του Tween με το Brij-35 αξιοποιήθηκαν δεδομένα για 39 ενώσεις. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3 οι δύο στήλες εμφάνισαν πολύ μεγάλη συγγένεια αποτελεσμάτων, όπως είναι αναμενόμενο καθώς αποτελούν δύο διαφορετικές εκδοχές της ίδιας μεθόδου. Τα δύο τασιενεργά είναι μη ιονικά, συνεπώς μπορούμε να υποθέσουμε ότι ακολουθείται παρόμοιος μηχανισμός, που στηρίζεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Στο διάγραμμα φαίνεται ότι οι δύο μεταβλητές εμφανίζουν γραμμική σχέση με εξαιρετικό συντελεστή προσδιορισμού, $R^2=0,935$.

Το πλεονέκτημα του Tween έναντι του Brij είναι ότι μεγάλωσε αισθητά το εύρος των χρόνων κατακράτησης και κατά συνέπεια των $\log k$. Συγκρίνοντας τις οριακές τιμές $\log k$ των δύο μεθόδων φαίνεται ότι το εύρος τιμών του Brij ήταν από το -0,784 έως το 1,852, ενώ του Tween ήταν από το -1,266 έως το 2,490. Επομένως το Tween προσφέρει καλύτερη διάκριση μεταξύ των φαρμάκων, που διευκολύνει την μελέτη τους.



Διάγραμμα 3. Συσχέτιση των $\log k_{Tween}$ με τα $\log k_{Brij}$ σε pH 7,4.

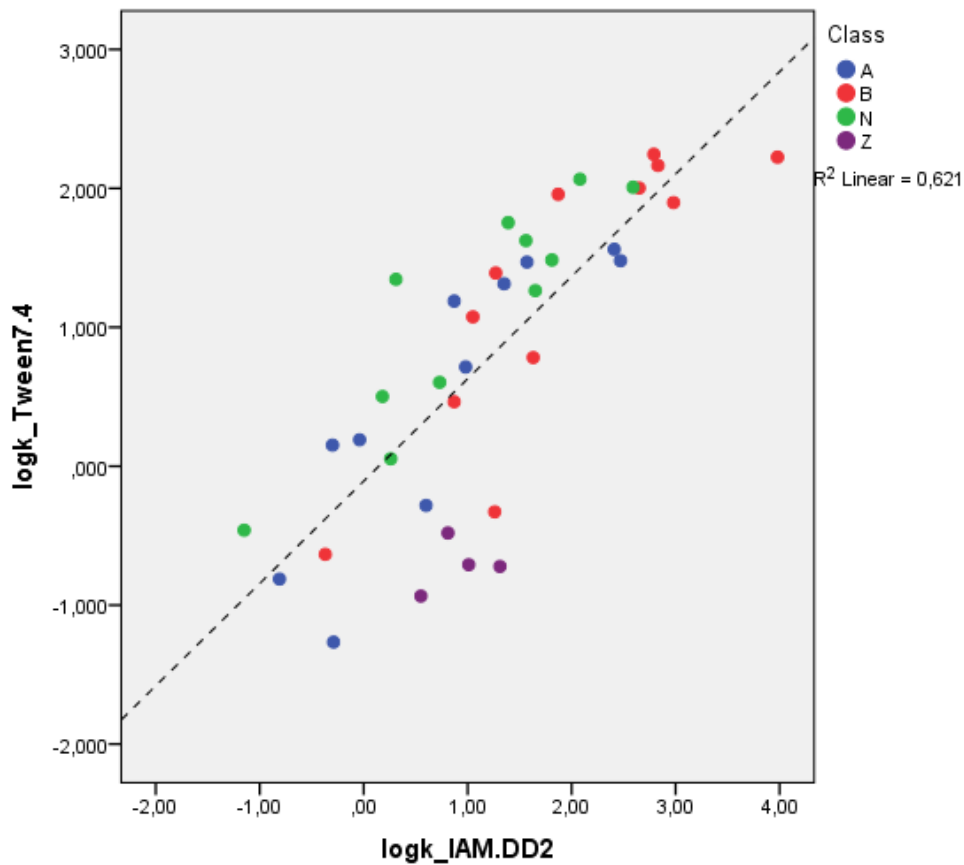
Η μεταξύ τους εξίσωση βρέθηκε

$$\log k_{Tween7,4} = 1,452(\pm 0,063) \cdot \log k_{BMC7,4} - 0,085(\pm 0,059) \quad (14),$$

Με $N=39$, $R^2=0,935$, $F=531,9$ και $p<0,01$.

Συσχέτιση με τη στήλη IAM.DD2

Για την σύγκριση με χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών αξιοποιήθηκαν αποτελέσματα από έρευνα σε στήλη IAM.DD2 για 38 φάρμακα. Η στατιστική επεξεργασία επέδειξε χαμηλή συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων, $R^2=0,621$, που μάλλον οφείλεται στον διαφορετικό μηχανισμό κατακράτησης των δύο στηλών.



Διάγραμμα 4. Συσχέτιση των $\log k_{\text{Tween}}$ με τα $\log k_{\text{IAM.DD2}}$ σε pH 7,4.

Η εξίσωση που συνδέει τους συντελεστές κατακράτησης των δύο μεθόδων είναι,

$$\log k_{\text{Tween}7,4} = 0,737(\pm 0,096) \cdot \log k_{\text{IAM}7,4} - 0,107(\pm 0,160) \quad (14),$$

Με $N=38$, $R^2=0,621$, $F=58,943$ και $p<0,01$.

Εισάγοντας στην συσχέτιση και τις παραμέτρους f_{zw}^+ και f_{zw}^- προκύπτει η παρακάτω εξίσωση,

$$\log k_{\text{Tween}7,4} = 0,772(\pm 0,068) \cdot \log k_{\text{IAM}7,4} - 1,000(\pm 0,167) \cdot f_{zw}^+ - 0,680(\pm 0,156) \cdot f_{zw}^- + 0,505(\pm 0,144) \quad (15),$$

Με $F= 61,341$, $R^2=0,844$ και $p<0,01$.

Υπολογίζοντας τον λόγο του συντελεστή προς το σφάλμα του για τις δύο παραμέτρους προκύπτει περίπου 6 για το f_{zw}^+ και 4,4 για το f_{zw}^- . Επομένως το f_{zw}^+ είναι πιο σημαντικό στην συσχέτιση, το οποίο είναι αναμενόμενο, καθώς η στήλη

IAM.DD2 περιέχει ομάδες φωσφορικών που δεσμεύουν τα θετικά φορτισμένα ιόντα, δηλαδή τις πρωτονιωμένες βάσεις.

Αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων σε pH=5,5 συγκριτικά με άλλες παραμέτρους.

Σε pH=5,5 πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για 21 φαρμακευτικές ενώσεις, ως επί το πλείστον όξινες και αμφολυτικές. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι συντελεστές κατακράτησης $\log k_{\text{Tween}5,5}$ των ενώσεων αυτών.

Πίνακας 6. Πειραματικές τιμές $\log k$ των φαρμάκων που μετρήθηκαν με το τυπικό σφάλμα τους.

Φάρμακο	$\log k_{\text{Tween} (5,5)}$
Acetylsalicylic acid	0,379±0,03
Amoxicillin	-1,042±0,08
Ciprofloxacin	-0,094±0,07
Diltiazem	0,907±0,02
Enoxacin	-0,250±0,08
Ibuprofen	1,496±0,02
Indomethacin	1,712±0,02
Lidocaine	-0,075±0,07
Lornoxicam	1,557±0,02
Losartan	1,549±0,02
Naproxen	1,385±0,02
Norfloxacin	-0,168±0,08
Ofloxacin	-0,374±0,08
Paracetamol	0,340±0,03
Piperacillin	-0,368±0,08
Piroxicam	1,578±0,02
Promazine	1,484±0,02
Pyrimethamine	1,497±0,02
Salicylic acid	0,318±0,03

Sulfamethoxazole	1,249±0,02
Thioridazine	1,547±0,02

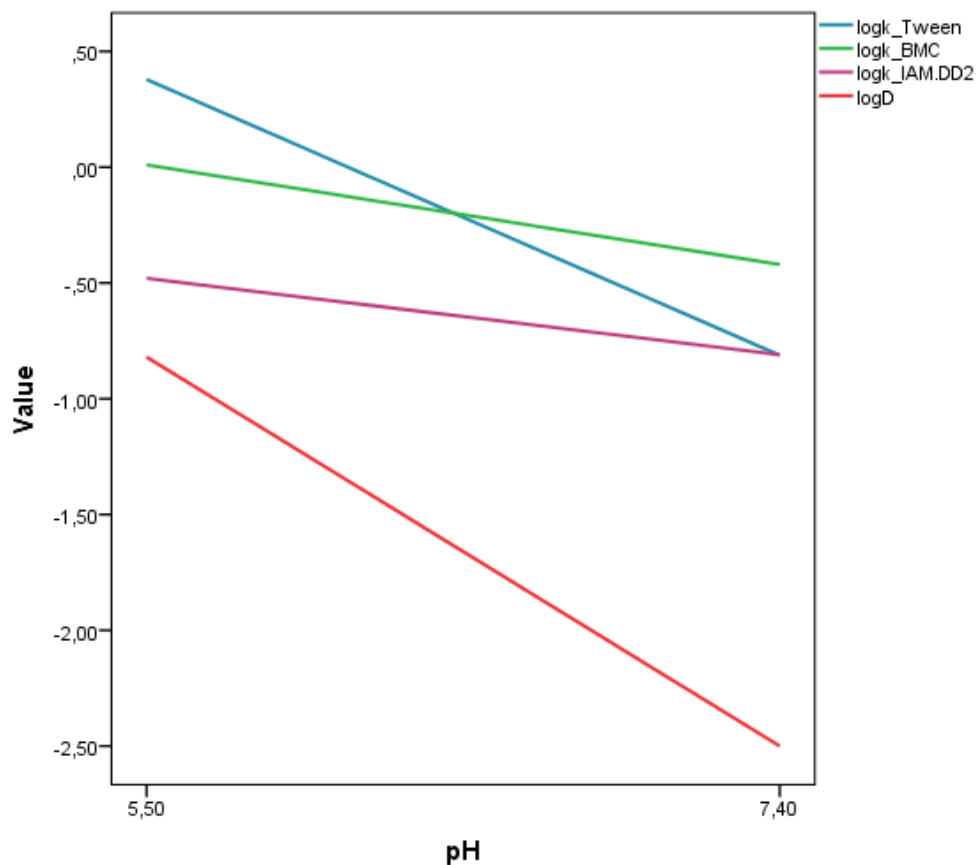
Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η διαφορά των τιμών $\log k$ μεταξύ των pH 7,4 και 5,5 για τις χρωματογραφικές στήλες MLC με Tween, BMC, IAM.PC.DD2 και τους συντελεστές κατανομής. Ο συντελεστής μερισμού αφορά την ουδέτερη μορφή των φαρμάκων, επομένως έχει μια τιμή για κάθε φάρμακο και δεν μεταβάλλεται σε διαφορετικά pH.

Πίνακας 7. Διαφορές συντελεστών κατακράτησης μεταξύ των pH 7,4 και 5,5 για MLC με Tween και Brij, IAM.PC.DD2 και $\log D$.

Φάρμακο	Τύπος	$\Delta \log k^{7.40-5.50}$	$\Delta \log k^{7.40-5.50}$	$\Delta \log k^{7.40-5.50}$	$\Delta \log D^{7.40-5.50}$
		Tween	BMC	IAM.PC.DD2	
Acetylsalicylic acid	A	-1,19	-0,42	-0,33	-1,68
Amoxicillin	Z	-0,22	0,15	0,02	-0,85
Ciprofloxacin	Z	-0,67	-0,28	0,02	0,62
Diltiazem	B	1,10	-	-	0,15
Enoxacin	Z	-0,69	-0,07	-0,70	0,66
Ibuprofen	A	-0,31	-0,70	-0,68	-1,08
Indomethacin	A	-0,15	-0,57	-0,52	-1,76
Lidocaine	B	1,47	-	-	1,77
Lornoxicam	A	-0,06	-	-	-1,05
Losartan	A	-0,07	-0,14	-0,11	-1,08
Naproxen	A	-0,67	-0,65	-0,73	-1,62
Norfloxacin	Z	-0,54	-0,21	0,30	0,65
Ofloxacin	Z	-0,11	0,15	-0,54	0,56
Paracetamol	N	0,16	0,06	0,24	0,00
Piperacillin	A	0,09	-0,06	-0,53	-0,58
Piroxicam	A	-0,27	-0,24	-0,38	-1,81
Promazine	B	0,21	-	-	1,06

Pyrimethamine	B	0,46	-	-	1,35
Salicylic acid	A	-0,17	-0,25	0,18	-1,43
Sulfamethoxazole	A	-1,059	-0,57	-0,95	-1,41
Thioridazine	B	0,68	-	-	0,48

Όπως φαίνεται στον πίνακα 6 τα περισσότερα φάρμακα στην χρωματογραφία με Tween είχαν την αναμενόμενη ανταπόκριση σε μειωμένο pH. Όλα τα οξέα πλην ενός, επέδειξαν αρνητικές τιμές $\Delta \log k^{7.40-5.50}$, δηλαδή μεγαλύτερο $\log k$ σε όξινο περιβάλλον και οι βάσεις θετικές τιμές, όπως προβλέπεται θεωρητικά να συμβαίνει σύμφωνα με τις αλληλεπιδράσεις τους στην στήλη. Το φάρμακο piperacillin έδωσε θετικό $\Delta \log k^{7.40-5.50}$, με μικρή τιμή όμως που αποδίδεται στο στατιστικό σφάλμα της μεθόδου. Όλοι οι αμφολύτες εμφάνισαν αρνητικό $\Delta \log k^{7.40-5.50}$ Tween, δηλαδή αυξημένη κατακράτηση σε pH=5,5, το οποίο όμως δεν συμβαδίζει με τις αντίστοιχες διαφορές $\log D$, που όλες πλην μιας, έχουν αντίθετο πρόσημο. Σε γενικές γραμμές τα $\Delta \log k^{7.40-5.50}$ του Tween προέκυψαν μεγαλύτερα σε σχέση με αυτά των άλλων χρωματογραφικών στηλών. Στο παρακάτω διάγραμμα δίνεται ενδεικτικά η μεταβολή των $\log k$ και $\log D$ για το acetylsalicylic acid. Όπως φαίνεται, οι στήλες BMC και IAM.DD2 παρουσίασαν πολύ μικρή πτώση $\log k$, που σημαίνει ότι η μεταβολή του pH άλλαξε ελάχιστα τον μηχανισμό κατακράτησης του φαρμάκου. Αντιθέτως το Tween, παρόλο που έδωσε τιμές $\log k$ παραπλήσιες με αυτές του Brij-35, επέδειξε πολύ μεγαλύτερη πτώση μεταξύ των δύο pH. Το $\log D$ παρουσίασε τις πιο χαμηλές τιμές και ιδιαίτερα μεγάλη πτώση. Η διαφορά αυτή μεταξύ των χρωματογραφικών στηλών και του συντελεστή κατανομής μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι εντός των στηλών τα φάρμακα βρίσκονται περισσότερο στην ουδέτερη μορφή τους και έχουν μικρότερο ιονισμό από ότι επικρατεί στο $\log D$.



Διάγραμμα 5. Μεταβολή των συντελεστών κατακράτησης και κατανομής συναρτήσει του pH, για το acetylsalicylic acid.

Συσχέτιση με φαρμακοκινητικές ιδιότητες

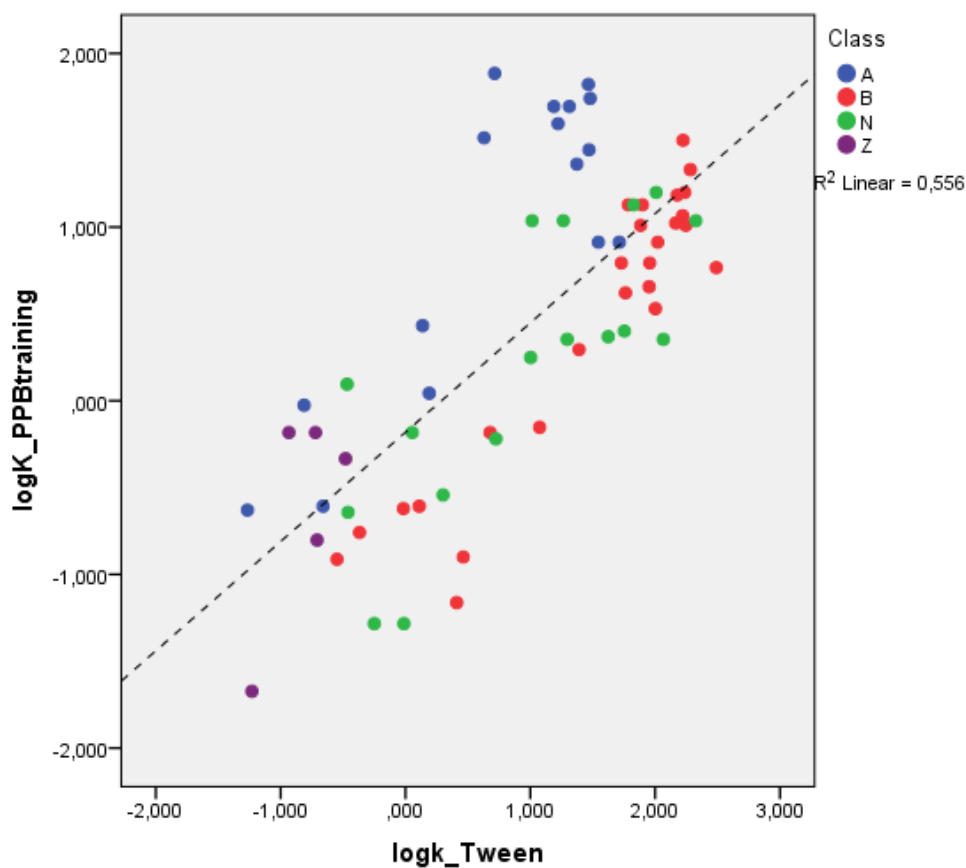
Συσχέτιση με την πρωτεϊνική σύνδεση φαρμάκων στο πλάσμα (%PPB)

Για την συσχέτιση της μεθόδου με την πρωτεϊνική σύνδεση τα πειραματικά δεδομένα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες το training set και το test set. Το training set περιλαμβάνει 68 φάρμακα και χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή της εξίσωσης που συνδέει τα logk του Tween με την πρωτεϊνική σύνδεση και το test set περιλαμβάνει 22 φάρμακα για την επικύρωση της εξίσωσης αυτής. Τα 22 φάρμακα του test set είναι τα ίδια που χρησιμοποιήθηκαν και σε μία δημοσίευση για την ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης της γαστρεντερικής απορρόφησης (%Human Oral Absorption ή % Human Intestinal Absorption) [67].

Για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης υπολογίζεται η φαινόμενη σταθερά συγγένειας (K) φαρμάκου, η οποία έχει προταθεί από την Valko [68]. Η σταθερά αυτή χρησιμοποιείται στην λογαριθμική της μορφή και ισούται με:

$$\log K = \log \left(\frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \right)$$

Όπου % PPB, το επί τοις εκατό ποσοστό της πρωτεϊνικής σύνδεσης του φαρμάκου στο πλάσμα. Το νούμερο 101 τοποθετείται στον παρονομαστή, ώστε ακόμα και για φάρμακα με πρωτεϊνική σύνδεση 100% να μην μηδενιστεί ο παρονομαστής (οπότε δεν ορίζεται το κλάσμα), επομένως ένα φάρμακο με 100% πρωτεϊνική σύνδεση θα έχει $\log K=2$. Η συσχέτιση των $\log k_{\text{Tween}}$ με τα $\log K_{\text{PPB,training}}$ έδωσε το παρακάτω διάγραμμα με $R^2= 0.556$.



Διάγραμμα 6. Συσχέτιση των $\log k_{\text{Tween}}$ με τα $\log K_{\text{PPB,training}}$.

Η εξίσωση της συσχέτισης είναι

$$\log K = 0,629(0,071) \cdot \log k_{Tween} - 0,181(\pm 0,103), \quad (16)$$

Με $N=64$, $F=77,5$, $R^2=0,556$ και $S=0,6077$.

Περιλαμβάνοντας και το κλάσμα αρνητικού φορτίου γίνεται

$$\log K = 0,657(0,051) \cdot \log k_{Tween} + 1,067(\pm 0,135) \cdot f^- - 0,453(\pm 0,081), \quad (17)$$

Με $F=108$, $R^2=0,780$ και $S=0,431$.

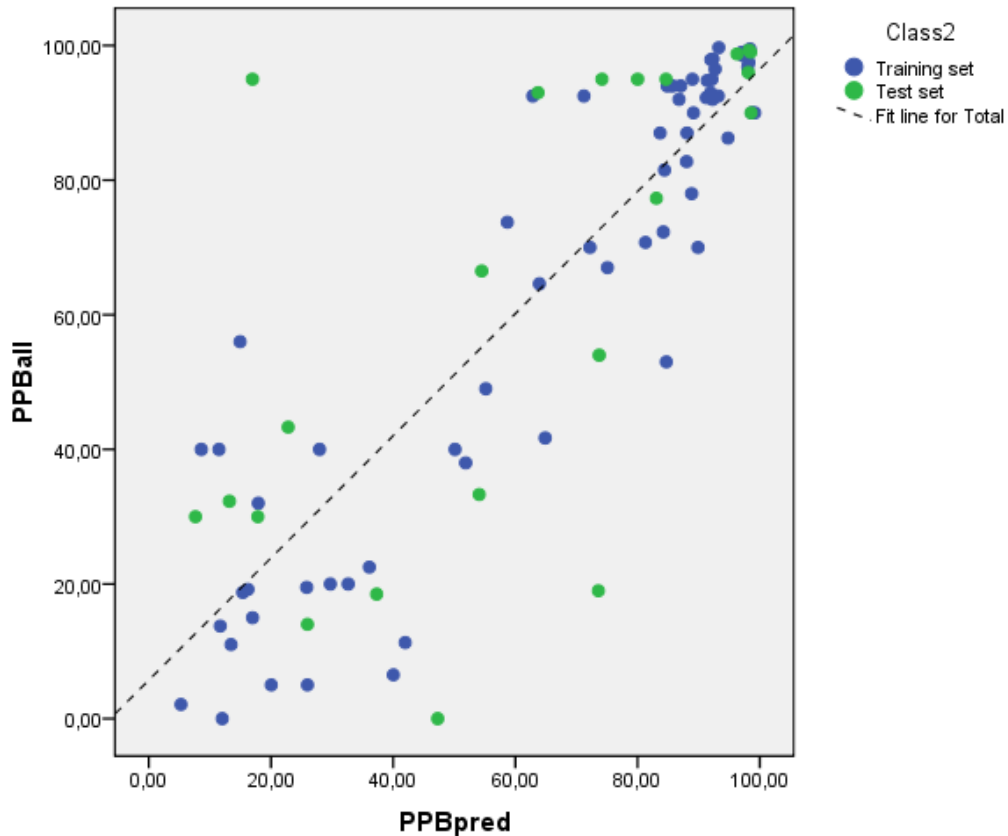
Η στατιστική σημαντικότητα της παραμέτρου f^- αποδίδεται στο γεγονός ότι η κύρια πρωτεΐνη που δεσμεύει τα φάρμακα στο πλάσμα είναι η ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA). Η HSA δείχνει αυξημένη ικανότητα δέσμευσης των όξινων φαρμάκων, τα οποία σε $pH=7.4$ έχουν αρνητική φόρτιση, οπότε η προσθήκη του όρου f^- βελτιώνει πολύ τη σχέση.

Για την αξιολόγηση του μοντέλου της εξίσωσης (17) χρησιμοποιήθηκε το test set. Υπολογίστηκε η %PPB του κάθε φαρμάκου από την εξίσωση και συγκρίθηκε με τις υπάρχουσες τιμές του πίνακα 5. Το κριτήριο των αποδεκτών αποτελεσμάτων ήταν η διαφορά της τιμής του μοντέλου (predicted) και της υπάρχουσας (observed) να είναι κάτω του 25%. Από τα 22 φάρμακα, τα 18 έδειξαν αποδεκτές τιμές %PPB από το μοντέλο, που είναι αρκετά ικανοποιητικό.

Φάρμακο	%PPB observed	% PPB predicted
Ceftriaxone	95.00	16.97
Chloramphenicol	54.00	73.72
Cimetidine	18.50	37.29
Cinoxacin	66.50	54.48
Hydrocortisone	95.00	74.16
Isoxicam	96.00	98.12

Levofloxacin	32.30	13.19
Lornoxicam	99.00	98.48
Meloxicam	99.30	98.22
Methylprednisolone	77.30	83.07
Metoclopramide	33.30	54.08
Minoxidil	0.00	47.27
Nadolol	30.00	17.85
Nalidixic acid	93.00	63.71
Niflumic acid	90.00	98.57
Omeprazole	95.00	80.00
Pipemidic acid	30.00	7.63
Piperacillin	19.00	73.58
Salicylic acid	95.00	84.65
Sulpiride	14.00	25.97
Vancomycin	43.30	22.81
Warfarin	98.75	96.29

Όλα τα δεδομένα των τιμών %PPB, τα παρατηρούμενα και τα προβλεπόμενα από το μοντέλο τοποθετήθηκαν στο παρακάτω διάγραμμα.

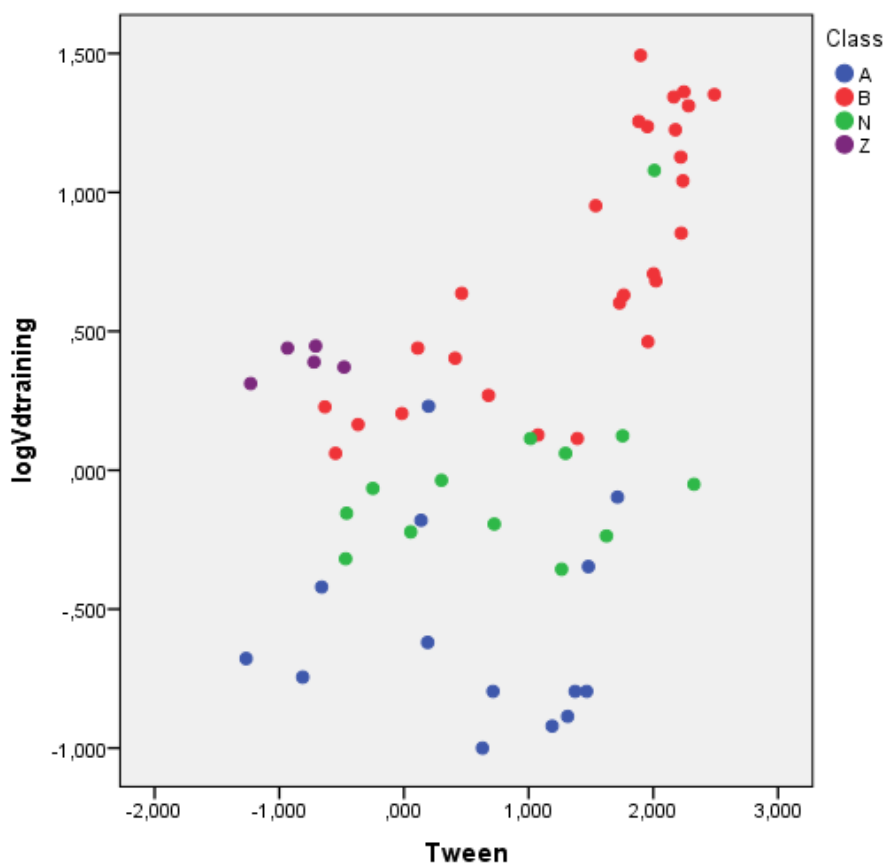


Διάγραμμα 7. Συσχέτιση μεταξύ παρατηρούμενων τιμών %PPB και προβλεπόμενων από το μοντέλο.

Η χρωματογραφική στήλη που θεωρείται η πλέον κατάλληλη για προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης είναι η HPAC με HSA, η οποία διαθέτει ακινητοποιημένη στην στήλη της την κύρια πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την δέσμευση των φαρμάκων στο πλάσμα. Ωστόσο, η στήλη αυτή έχει περίπου 10-πλάσιο κόστος (2000€) έναντι της απλής στήλης αντιστρόφου φάσεως που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (περίπου 200€), η οποία επέδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης. Η χειρότερη πρόβλεψη αφορά το φάρμακο ceftriaxone που ανήκει στις κεφαλοσπορίνες. Ωστόσο σε μελέτη πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης με χρωματογραφία HSA, διαπιστώθηκε επίσης πως οι κεφαλοσπορίνες δεν μπορούν να προβλεφθούν σωστά και εμφάνιζαν αντίστοιχες αποκλίσεις [69]. Το γεγονός αυτό μπορεί πιθανώς να αποδοθεί στο ότι λόγω της μεγάλης υδροφιλικότητας των κεφαλοσπορινών, η λιποφιλία, που μπορεί να εκφραστεί και με την κατακράτηση από μικκυλιακή χρωματογραφία, δεν παίζει ουσιαστικό ρόλο παρά μόνο οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου.

Συσχέτιση με τον όγκο κατανομής (Vd)

Η συσχέτιση του λογαρίθμου του όγκου κατανομής με τον λογάριθμο του συντελεστή κατακράτησης σε pH= 7.40 έδωσε το παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 8. Συσχέτιση αποτελεσμάτων με τον όγκο κατανομής.

Από την κατηγοριοποίηση των φαρμάκων προέκυψε ότι τα όξινα και ουδέτερα φάρμακα δεν εμφανίζουν συσχέτιση μεταξύ του όγκου κατανομής και του συντελεστή κατακράτησης. Τα οξέα εμφανίζουν χαμηλές τιμές Vd, που σχετίζεται και πάλι με το γεγονός ότι η ανθρώπινη αλβουμίνη ορού έχει μεγαλύτερη προτίμηση στα αρνητικά φορτισμένα ιόντα και άρα δεσμεύει λιγότερο τις βάσεις και περισσότερο τα οξέα. Αυτή η δέσμευση των οξέων δεν οφείλεται σε λιποφιλικά/υδρόφοβα φαινόμενα. Γι' αυτό τον λόγο μόνο οι βάσεις εμφανίζουν συσχέτιση με το Vd που περιγράφεται από την σχέση:

$$\log V_d = 0,239(\pm 0,101) + 0,370(\pm 0,060) \cdot \log k_{\text{Tween}}, \quad (18)$$

Με N=27, F= 38.2, R²= 0.604 και S= 0.301.

Η συσχέτιση αυτή βελτιώνεται με εισαγωγή του κλάσματος θετικού φορτίου των βάσεων:

$$\log V_d = 0,384(\pm 0,054) \cdot \log k_{T_{ween}} + 0,924(\pm 0,354) \cdot f^+ - 0,626(\pm 0,340), \quad (19)$$

Με $F = 26,9$, $R^2 = 0.692$ και $S = 0.271$.

Συνολικά υπάρχουν 31 βάσεις από τα φάρμακα που μελετήθηκαν εκ των οποίων τα 27 χρησιμοποιήθηκαν ως training set και τα υπόλοιπα 4 ανήκουν στο test set. Από αυτά τα 4, υπάρχουν δεδομένα όγκου κατανομής για τα τρία και η σύγκριση της παρατηρούμενης με την προβλεπόμενη τιμή φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Φάρμακο	V_d (L/kg) observed	V_d (L/kg) predicted
Cimetidine	1.12	0.52
Metoclopramide	3.30	3.96
Nadolol	2.00	1.49

Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- Το εύρος των τιμών $\log k$ της μικκυλιακής χρωματογραφίας με Tween 20 ήταν αρκετά μεγάλο, πλησιάζοντας των εύρος τιμών $\log k$ της στήλης IAM και του $\log D$. Μεγάλη κλίμακα τιμών $\log k$ οδηγεί σε καλύτερη κατανομή των φαρμάκων ως προς τις ιδιότητές τους, συνεπώς αυτό είναι ένα σημαντικό προτέρημα του Tween ως προς το Brij-35, που παρουσιάζει πιο περιορισμένο εύρος.
- Εξαιτίας της διεύρυνσης των $\log k$ που προσφέρει το Tween τα πολύ λιπόφιλα φάρμακα παρουσιάζουν ιδιαίτερα μεγάλους χρόνους κατακράτησης με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο χρόνος ανάλυσης. Το πρόβλημα αυτό λύνεται με τροποποίηση της κινητής φάσης με οργανικό διαλύτη, οπότε οι χρόνοι κατακράτησης και οι χρωματογραφικές κορυφές των λιπόφιλων φαρμάκων βελτιώνονται και τα $\log k$ τους υπολογίζονται πιο εύκολα και αξιόπιστα.
- Ο μηχανισμός έκλουσης των φαρμάκων από την χρωματογραφική στήλη στηρίζεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Καθώς το Tween είναι ουδέτερο τασιενεργό δεν ευνοεί τον ιοντισμό, οπότε δεν ευνοούνται και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις εντός της στήλης. Γι' αυτό τον λόγο οι τιμές $\log k$ παρουσίασαν καλύτερη συσχέτιση με το $\log P$ παρά με το $\log D$.
- Η συσχέτιση της μικκυλιακής χρωματογραφίας με την στήλη IAM.DD2 ήταν χαμηλότερη, πιθανώς λόγω του διαφορετικού μηχανισμού έκλουσης των δύο μεθόδων. Ειδικά οι ομάδες φωσφορικών της IAM προκαλούν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (έλξης) με πρωτονιωμένες βάσεις στην στατική φάση με αποτέλεσμα να αλλάζουν τα δεδομένα της κατακράτησης.
- Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και στις μετρήσεις που έγιναν σε pH 5,5. Από την μελέτη που πραγματοποιήθηκε ενδεικτικά προέκυψαν ικανοποιητικά δεδομένα ως προς την πρόβλεψη της συμπεριφοράς των φαρμάκων σε όξινο περιβάλλον.

- Η συσχέτιση της %PPB με τους συντελεστές κατακράτησης της μικκυλιακής χρωματογραφίας με το τασιενεργό Tween 20 ήταν ικανοποιητική και περαιτέρω βελτιώνονταν με την εισαγωγή του κλάσματος αρνητικού φορτίου που εκφράζει καλύτερα την αλληλεπίδραση των αρνητικά φορτισμένων ιόντων με την HSA. Από το test set 18/22 ενώσεις είχαν κοντινές τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης μεταξύ του μοντέλου και των βιβλιογραφικών αναφορών.
- Με τον όγκο κατανομής εμφάνισαν συσχέτιση μόνο τα βασικά φάρμακα. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι η HSA δεσμεύει εκλεκτικά όξινα και όχι βασικά φάρμακα, λόγω του αρνητικού ιονισμού τους γεγονός που δεν σχετίζεται με φαινόμενα λιποφιλίας/υδροφοβίας.

Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Παρακάτω παρατίθενται ορισμένες προτάσεις για έρευνα που μπορεί να γίνει στο μέλλον σχετικά με την παρούσα μελέτη.

- Είναι σημαντικό να εξεταστούν περισσότερα φάρμακα με την μικκυλιακή χρωματογραφία με Tween ώστε να διευρυνθούν τα δεδομένα κατακράτησης και να δημιουργηθεί μία βιβλιοθήκη συντελεστών $\log k$, που θα επιτρέψει την πιο ολοκληρωμένη και αξιόπιστη αξιολόγηση της μεθόδου.
- Αξίζει να διερευνηθεί η ικανότητα της μικκυλιακής χρωματογραφίας με Tween 20 για την εκτίμηση και άλλων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, όπως είναι, όπως η επαγωγή φωσφολιπίδωσης και η καρδιοτοξικότητα, καθώς και οικοτοξικότητας (π.χ. τιμές LC_{50} σε υδρόβιους οργανισμούς και LD_{50} σε χερσαίους οργανισμούς).

Βιβλιογραφία

- [1] L. Kang, B. G. Chung, R. Langer και A. Khademhosseini, «Microfluidics for drug discovery and development: From target selection to product lifecycle management.,» *Elsevier*, 2008.
- [2] R. C. Mohsa και N. H. Greig, «Drug discovery and development: Role of basic biological research,» *Elsevier*, pp. 651-657, 2017.
- [3] «U.S Food and Drug Administration,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>.
- [4] Β. Δημόπουλος και Ά. Τσαντίλη-Κακουλίδου, Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων, Αθήνα, 2015.
- [5] M. Marino και P. M. Zito, «NCBI,» 2019. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507791/>.
- [6] J. Honek, «Preclinical research in drug development,» *Medical Writing*, 2017.

- [7] «National Comprehensive Cancer Network,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.nccn.org/patients/resources/clinical_trials/phases.aspx.
- [8] M. P. Doogue και T. M. Polasek, «The ABCD of clinical pharmacokinetics,» *NCBI*, 2013.
- [9] K. Kwan, «Oral bioavailability and first-pass effects.,» *NCBI*, 1998.
- [10] T. A. Loomis και A. W. Hayes, «CHAPTER 7 - Classification of Harmful Effects of Chemicals,» σε *Loomis's Essentials of Toxicology*, 1996.
- [11] D. S. Hage, J. Anguizola, A. Jackson, R. Matsuda και E. E. Papastavros , «CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF DRUG INTERACTIONS IN THE SERUM PROTEOME,» *NCBI*, 2011.
- [12] K. Vuignier, D. Guillarme, J.-L. Veuthey, P.-A. Carrupt και J. Schappler, «High performance affinity chromatography (HPAC) as a high-throughput screening tool in drug discovery to study drug–plasma protein interactions,» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013.
- [13] A. Mansoor και N. Mahabadi, «NCBI,» 2019. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545280/>.
- [14] «Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System,» U.S. Department of Health and Human Services, FDA, 2017.
- [15] X. Liu, A. Fahr και B. Testa, «Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation,» *Springer Science*, pp. 962-977, 2010.
- [16] H. Engman, «Intestinal Barriers to Oral Drug Absorption,» 2003.
- [17] G. Russo, L. Grumetto, R. Szucs, F. Barbato και F. Lynen, «DETERMINATION OF IN VITRO AND IN SILICO INDEXES FOR THE MODELLING OF BLOOD-BRAIN BARRIER PARTITIONING OF DRUGS VIA MICELLAR AND IMMOBILIZED ARTIFICIAL MEMBRANE LIQUID CHROMATOGRAPHY.,» *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017.
- [18] M. De Vrieze, F. Lynen, K. Chen, R. Szucs και P. Sandra, «Predicting drug penetration across the blood–brain barrier: comparison of micellar liquid chromatography and immobilized artificial membrane liquid chromatography,» *Anal Bioanal Chem*, 2013.
- [19] C. Hansch, J. Bjorkroth και A. Leo, «Hydrophobicity and Central Nervous System Agents: On the Principle of Minimal Hydrophobicity in Drug Design,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 663-687, 1987.
- [20] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy και P. J. Feeney, «Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings,» *Elsevier*, pp. 3-25, 1996.
- [21] J. A. Arnott, R. Kumar και S. L. Planey, «Lipophilicity Indices for Drug Development,» *Journal of Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, pp. 31-36, 2013.

- [22] J. A. Arnott και S. L. Planey, «The influence of lipophilicity in drug discovery and design,» *Expert Opinion on Drug Discovery*, pp. 909-921, 2012.
- [23] «IUPAC Gold Book,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://goldbook.iupac.org/terms/view/LT06965>.
- [24] F. Barbato, «The Use of Immobilised Artificial Membrane (IAM) Chromatography for Determination of Lipophilicity,» *Current Computer-Aided Drug Design*, 2006.
- [25] Β. Σαμανίδου, «Χρωματογραφικές τεχνικές στη βιοανάλυση,» σε *Βιοαναλυτική χημεία*, 2015.
- [26] Κ. Valkó, «Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution.,» *Elsevier*, 2004.
- [27] F. Tsopeles, T. Vallianatou και Α. Tsantilli-Kakoulidou, «Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery.,» *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2016.
- [28] C. Aworte, P. Fasinu και Β. Rosenkranz, «Application of Caco-2 Cell Line in Herb-Drug Interaction Studies: Current Approaches and Challenges,» *NCBI*, 2015.
- [29] M. di Cagno, H. A. Bibi και Α. Bauer-Brandl, «New biomimetic barrier Permeapad™ for efficient investigation of passive permeability of drugs,» *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 29-34, 2015.
- [30] C. Pidgeon και U. V. Venkataram, «Immobilized Artificial Membrane Chromatography: Supports Composed of Membrane Lipids,» *Analytical Biochemistry*, 1989.
- [31] Κ. Valko, C. Du, C. Bevan, D. Reynolds και Μ. Abraham, «Rapid- gradient HPLC method for measuring drug interactions with immobilized artificial membrane: comparison with other lipophilicity measures.,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000.
- [32] Κ. Vuignier, J. Schappler, J. Veuthey, P. Carrupt και S. Martel, «Drug–protein binding: a critical review of analytical tools,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010.
- [33] Η. S. Kim και Ι. W. Wainer, «Rapid analysis of the interactions between drugs and human serum albumin (HSA) using high-performance affinity chromatography (HPAC),» *Journal of Chromatography B*, 2008.
- [34] Η. Xuan και D. S. Hage, «Immobilization of α1-acid glycoprotein for chromatographic studies of drug–protein binding,» *Analytical Biochemistry*, pp. 300-310, 2005.
- [35] D. S. Hage, J. Anguizola, O. S. Barnaby, Α. J. Jackson, Μ. J. Yoo και Ε. Ε. Papastavros, «Characterization Of Drug Interactions With Serum Proteins by Using High-Performance Affinity Chromatography,» *National Institutes of Health*, 2011.
- [36] D. W. Armstrong και S. J. Henry, «Use of an Aqueous Micellar Mobile Phase for Separation of Phenols and Polynuclear Aromatic Hydrocarbons via HPLC,» *JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY*, Washington, D.C., 1980.

- [37] A. P. Boichenko, L. P. Loginova και A. U. Kulikov, «Micellar liquid chromatography (Review). Part 1. Fundamentals, Retention models and optimization of separation,» ResearchGate, Kharkov, Ukraine, 2007.
- [38] M. Molero-Monfort, Y. Martin-Biosca, S. Sagrado, R. M. Villanueva-Camanas και M. J. Medina-Hernandez, «Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport,» *Journal of Chromatography*, pp. 1-11, 2000.
- [39] M. De Vrieze, F. Lynen, K. Chen, R. Szucs και P. Sandra, «Predicting drug penetration across the blood–brain barrier: comparison of micellar liquid chromatography and immobilized artificial membrane liquid chromatography,» *Anal Bioanal Chem*, p. 6029–6041, 2013.
- [40] M. J. Rosen, «Surfactants and interfacial phenomena,» New Jersey: Wiley, 2004.
- [41] A. Berthod και C. Garcia-Alvarez-Coque, «Micellar Liquid Chromatography,» Taylor and Francis Group, 2000.
- [42] M. G. Khaledi, «Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective.,» *Journal of Chromatography A*, North Carolina State University, USA, 1997.
- [43] F. Krafft και H. Wiglow, «BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT,» 1895.
- [44] W. N. Maclay, «FACTORS AFFECTING THE SOLUBILITY OF NONIONIC EMULSIFIERS,» *JOURNAL OF COLLOID SCIENCE*, Brecksville, Ohio, 1956.
- [45] U. Lovgren, M. Johansson, K. Kronkvist και L.-E. Edholm, «Biocompatible sample pretreatment for immunochemical techniques using micellar liquid chromatography for separation of corticosteroids.,» *Journal of Chromatography*, Lund, Sweden, 1995.
- [46] M. Rambla-Alegre, «Basic Principles of MLC,» Hindawi Publishing Corporation, Chromatography Research International, Castello, Spain, 2012.
- [47] M. C. García-Alvarez-Coque, M. J. Ruiz-Angel και S. Carda-Broch, «Micellar Liquid Chromatography: Method Development and Applications,» σε *Analytical Separation Science*, Wiley, 2015, pp. 407-460.
- [48] T. M. Kalyankar, P. D. Kulkarni, S. J. Wadher και S. S. Pekamwar, «Applications of Micellar Liquid Chromatography in Bioanalysis: A Review,» *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Maharashtra, India, 2014.
- [49] M. J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, J. R. Torres-Lapasio και M. C. Garcia-Alvarez-Coque, «Retention mechanisms in micellar liquid chromatography,» *Journal of Chromatography A*, pp. 1798-1814, 2009.

- [50] L. Escuder-Gilabert, J. J. Martínez-Pla και S. Sagrado, «Biopartitioning micellar separation methods: modelling drug absorption,» *Journal of Chromatography B*, pp. 21-35, 2003.
- [51] O. Čudina, B. Marković, K. Karljiković-Rajić και S. Vladimirov, «Biopartitioning Micellar Chromatography-Partition Coefficient Micelle/Water as a Potential Descriptor for Hydrophobicity in Prediction of Oral Drug Absorption.,» Taylor & Francis, 2012.
- [52] M. Cuenca-Benito, S. Sagrado, R. M. Villanueva-Camanas και M. J. Medina-Hernandez, «Quantitative retention–structure and retention–activity relationships of barbiturates by micellar liquid chromatography,» *Journal of Chromatography A*, pp. 121-132, 1998.
- [53] «PubChem,» [Ηλεκτρονικό]. Available:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polysorbate-20>.
- [54] M. C. Sharma, S. Sharma, D. Kohli και S. Chaturvedi, «Micellar Liquid Chromatographic Analytical Method Development and Validation of Determination of Atorvastatin Calcium and Pioglitazone in Tablet Dosage Form,» *Der Pharma Chemica*, pp. 273-280, 2010.
- [55] M. C. Sharma και S. Sharma, «Micellar Liquid Chromatographic Method Development for Determination and Stability Indicating of Nelfinavir Mesylate in Pharmaceutical Formulation,» *International Journal of PharmTech Research*, pp. 248-252, 2011.
- [56] S. Sharma και M. C. Sharma, «Conventional and Micellar Liquid Chromatography Method with Validation for Torsemide and Spironolactone in Tablet Combined Dosage Form,» *Der Pharmacia Lettre*, pp. 374-381, 2010.
- [57] M. Molero-Monfort, L. Escuder-Gilabert, R. M. Villanueva-Camanas και S. Sagrado, «Biopartitioning micellar chromatography: an in vitro technique for predicting human drug absorption,» *Journal of Chromatography B*, pp. 225-236, 2001.
- [58] J. J. Martínez-Pla, Y. Martín-Biosca, S. Sagrado, R. M. Villanueva-Camañas και M. J. Medina-Hernández, «Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability,» *Biomedical Chromatography*, p. 530–537, 2003.
- [59] M. Hadjmohammadi και M. Salary, «Biopartitioning micellar chromatography with sodium dodecyl sulfate as a pseudo α 1-acid glycoprotein to the prediction of protein–drug binding,» *Journal of Chromatography B*, pp. 50-55, 2013.
- [60] M. Salary και M. Hadjmohammadi, «Human serum albumin-mimetic chromatography based hexadecyltrimethylammonium bromide as a novel direct probe for protein binding of acidic drugs,» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, pp. 1-7, 2015.
- [61] J. Hongying, Y. Gengliang, L. Zhiwei, X. Peiyong, Z. Yu και C. Yi, «Micellar liquid chromatography with dodecyl dimethyl betaine as an in vitro method for prediction of protein-drug binding,» *Journal of Chromatography A*, p. 88–97, 2007.

- [62] F. Tsopelas, P. Danias, A. Pappa και A. Tsantili- Kakoulidou, «Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes». *Journal of Chromatography A*.
- [63] Goodman και Gilman, *The pharmacological basis of therapeutics*.
- [64] [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.drugbank.ca/>.
- [65] [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.druginfosys.com/>.
- [66] [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.drugs.com/>.
- [67] A. Tsantili- Kakoulidou, F. Tsopelas και T. Vallianatou, «The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption,» *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 81, pp. 82-93, 2016.
- [68] K. VALKO, S. NUNHUCK, C. BEVAN, M. H. ABRAHAM και D. P. REYNOLDS, «Fast Gradient HPLC Method to Determine Compounds Binding to Human Serum Albumin. Relationships with Octanol/Water and Immobilized Artificial Membrane Lipophilicity,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 92, pp. 2236-2248, 2003.