

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας Χημικών Επιστημών

Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη έκλυσης φαρμακευτικών  
ενώσεων από στήλη α1- όξινης  
γλυκοπρωτεΐνης και χρήση  
των συντελεστών κατακράτησης  
για την εκτίμηση του όγκου  
κατανομής και της πρωτεϊνικής  
σύνδεσης**

*Μελαμπιανάκη Ειρήνη*

Επιβλέπων: **Φώτιος Τσόπελας**, Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2020

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών (Τομέας Ι). Η ανάθεση και επίβλεψη της εργασίας έγινε από τον κ. Φώτιο Τσόπελα, Επίκουρο Καθηγητή της σχολής.

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα τον κ. Τσόπελα για την ανάθεση της εργασίας αυτής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση σε όλα τα στάδια της συγγραφής της εργασίας.

Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Λαμπρινή – Αρετή Τσακανίκα για την πολύτιμη βοήθεια της στο κομμάτι της διεξαγωγής των πειραματικών μετρήσεων και της διαχείρισης των όποιων κωλυμάτων προέκυψαν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου και με στήριζαν κατά τη συγγραφή της εργασίας και, αν και εκτός του αντικειμένου τους για κάποιους, κατάφεραν να τη διαβάσουν και να μου προσφέρουν πολύτιμες συμβουλές.

## Περιεχόμενα

Πρόλογος .....	2
Ευρετήριο Εικόνων .....	5
Ευρετήριο Πινάκων .....	5
Περίληψη .....	6
Abstract .....	7
Θεωρητικό Μέρος.....	8
Ιστορική αναδρομή .....	8
Σχεδιασμός νέων φαρμάκων .....	9
Φαρμακοκινητική .....	10
Απορρόφηση .....	11
Κατανομή.....	13
Μεταβολισμός και Απέκκριση .....	14
Ιδιότητες δραστικών ενώσεων .....	15
Λιποφιλία .....	16
Βαθμός ιοντισμού .....	18
Μοριακό Βάρος.....	19
Πρωτεϊνική Σύνδεση.....	19
Όγκος Κατανομής .....	20
Πρωτεΐνες του αίματος .....	21
Λευκωματίνη του ανθρώπινου ορού (HSA).....	21
Α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP).....	22
Χρωματογραφία.....	24
Χρωματογραφικοί διαχωρισμοί.....	24
Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	27
Βιομημητική Χρωματογραφία.....	30
Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM).....	30
Χρωματογραφία ακίνητοποιημένων πρωτεϊνών.....	31
Μικυλλιακή Χρωματογραφία.....	32
Πειραματικό Μέρος .....	34
Σκοπός.....	34
Χρωματογραφικό σύστημα.....	34

Πειραματική διαδικασία .....	35
Δραστικές ουσίες που αναλύθηκαν .....	38
Φυσικοχημικές ιδιότητες δραστικών ουσιών .....	41
Τιμές $\log k_w$ για διάφορα είδη βιομημητικής χρωματογραφίας .....	43
Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	46
Σύγκριση τιμών $\log k_w$ πειραματικό και $\log k_w$ γρ.προεκβολής.....	47
Συσχέτιση παράγοντα κατακράτησης $\log k_w$ με το συντελεστή μερισμού $\log P$ .....	49
Συσχέτιση παράγοντα κατακράτησης $\log k_w$ με το συντελεστή κατανομής $\log D$ ..	52
Συσχέτιση παράγοντα κατακράτησης μεταξύ διαφορετικών στηλών .....	54
Συσχέτιση με μικυλλιακή χρωματογραφία .....	56
Συσχέτιση με Φαρμακοκινητικά μεγέθη.....	58
Πρόβλεψη του Όγκου Κατανομής ( $V_D$ ) .....	58
Έκταση (ποσοστό) Πρωτεϊνικής Σύνδεσης.....	60
Συμπεράσματα .....	63
Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....	64
Βιβλιογραφία .....	66

## Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Στάδια ανάπτυξης νέων φαρμάκων. ....	10
Εικόνα 2: Δομή της λευκωματίνης του ανθρώπινου ορού. <sup>9</sup> .....	21
Εικόνα 3: Δομή της α1-όξινης γλοκοπρωτεΐνης. <sup>11</sup> .....	23
Εικόνα 4: Παράδειγμα χρωματογραφήματος διαχωρισμού οργανικών ενώσεων. ....	26
Εικόνα 5: Χρωματογραφικό σύστημα Flexar (PerkinElmer). <sup>19</sup> .....	34
Εικόνα 6: Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού EasyPure II. <sup>20</sup> .....	36
Εικόνα 7: Σύστημα εισαγωγής αναλυόμενου δείγματος. ....	37
Εικόνα 8: Γραφική απεικόνιση της συσχέτισης $\log k_w - \log P$ . ....	50
Εικόνα 9: Γραφική απεικόνιση της συσχέτισης $\log k_w 10\% - \log P$ . ....	51
Εικόνα 10: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w - \log D$ . ....	52
Εικόνα 11: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w 10\% - \log D$ . ....	53
Εικόνα 12: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w AGP - \log k_w IAM$ . ....	56
Εικόνα 13: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w AGP - \log k_w Brij$ . ....	57
Εικόνα 14: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w AGP - \log k_w Tween$ . ....	57

## Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Δραστικές ουσίες που αναλύθηκαν .....	38
Πίνακας 2: Φυσικοχημικές ιδιότητες των δραστικών ουσιών που αναλύθηκαν. ....	42
Πίνακας 3: Τιμές $\log k_w$ από διάφορα είδη βιομηχανικής χρωματογραφίας, για τις δραστικές ουσίες που αναλύθηκαν. ....	44
Πίνακας 4: Τιμές $\log k$ για τις διάφορες κινητές φάσεις. ....	46
Πίνακας 5: Διαφορά πειραματικού $\log k_w$ από το υπολογιζόμενο. ....	47
Πίνακας 6: Πίνακας σύγκρισης πειραματικών και υπολογιζόμενων όγκων κατανομής ( $V_d$ ) .....	59
Πίνακας 7: Πίνακας σύγκρισης πειραματικών και υπολογιζόμενων ποσοστών πρωτεϊνικής σύνδεσης.....	61

## Περίληψη

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η έκλυση φαρμακευτικών ενώσεων από χρωματογραφία ακινητοποιημένης α1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης (alpha-1 acid glycoprotein) και διερευνήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης μοντέλων πρόβλεψης ορισμένων φαρμακοκινητικών μεγεθών με βάση τους συντελεστές κατακράτησης. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν 36 φάρμακα ποικίλλης δομής και φαρμακολογικής δράσης και προσδιορίστηκαν οι συντελεστές κατακράτησης,  $\log k$ , χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών  $\text{pH}=7.0$  είτε σε αμιγώς υδατική φάση είτε παρουσία ακετονιτριλίου σε περιεκτικότητες 5%, 10% και 15%. Οι συντελεστές κατακράτησης που προέκυψαν συγκρίθηκαν με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής,  $\log P$  και  $\log D$  αντίστοιχα, σε σύστημα n-οκτανόλης- νερού. Προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις  $\log k / \log P$  και  $\log k / \log D$  που επιβεβαιώνουν τον ρόλο των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στην πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμακομορίων με την AGP, ενώ ως δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις προκύπτουν μεταξύ άλλων οι ηλεκροστατικές αλληλεπιδράσεις. Ακολούθως, οι τιμές  $\log k$  που προσδιορίστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας συνδυάστηκαν με αντίστοιχους συντελεστές  $\log k$  άλλων φαρμακομορίων που είχαν μετρηθεί κάτω από τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες σε προηγούμενες έρευνες του Εργαστηρίου προκειμένου να συγκεντρωθεί μια επαρκής βάση δεδομένων τιμών  $\log k$ . Με βάση την τελευταία, αναπτύχθηκαν δυο μοντέλα πρόβλεψης του όγκου κατανομής και του ποσοστού της πρωτεϊνικής σύνδεσης, δυο φαρμακοκινητικών παραμέτρων που συνδέονται με την κατανομή των φαρμακομορίων στον οργανισμό. Και στις δυο περιπτώσεις, ο συντελεστής κατακράτησης των φαρμακομορίων παρουσία 10% ακετονιτριλίου παρουσίασε καλύτερη συσχέτιση σε σχέση με τις τιμές  $\log k$  σε αμιγώς υδατική φάση. Ως πρόσθετοι φυσικοχημικοί παράγοντες στα μοντέλα πρόβλεψης χρησιμοποιήθηκαν τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου των φαρμακομορίων. Τα δυο μοντέλα επικυρώθηκαν χρησιμοποιώντας 22 φάρμακα ελέγχου (test set). Συνεπώς, η χρωματογραφία AGP μπορεί να θεωρηθεί ως μια υποσχόμενη τεχνική για την ταχεία αξιολόγηση του φαρμακοκινητικού προφίλ υποψηφίων φαρμακομορίων.

**Λέξεις κλειδιά:** α1 όξινη γλυκοπρωτεΐνη, βιομιμητική χρωματογραφία, όγκος κατανομής, πρωτεϊνική σύνδεση, λιποφιλία, φαρμακοκινητικές ιδιότητες

## Abstract

In the present diploma thesis the retention of pharmaceutical components was unraveled using liquid chromatography on an alpha-1-acid glycoprotein stationary column and the ability to develop mathematical models for the prediction of certain pharmacokinetic properties was probed, using the retention factors. More specifically, 36 diverse, in terms of structure and pharmacological activity, drugs were examined. The retention factors were determined using a mobile phase that consisted of phosphate buffer saline at pH=7.0, in purely aquatic phase and with 5%, 10% and 15% of acetonitrile. The resulting retention factors were then compared with n-octanol/water partition and distribution coefficients, logP and logD respectively. Statistically important correlation of logk/logP and logk/logD occurred which confirmed the role of the hydrophobic interactions in the protein binding among the drugs and AGP. While examining secondary interactions, electrostatic interaction occurred among others. Subsequently, the resulting values of logk from this diploma thesis were combined with logk values calculated for other drugs in previous studies of the laboratory, under the same chromatographic conditions, in order to create a sufficient data base. Using this data base, two mathematical models were developed for the prediction of the volume of distribution and the percentage of protein binding. These are pharmacokinetic parameters that are associated with the distribution of a pharmaceutical component in the human body. In both cases, the drug's retention factor obtained with the presence of 10% acetonitrile, resulted in better correlations rather than the retention factors of pure aquatic phase. As additional physicochemical parameters for these predictive models, the positively and negatively charged molecular fractions were used. The two models were validated by using 22 drugs as a test set. Therefore, AGP chromatography can be considered a promising technique for fast evaluation of the pharmacokinetic profile of potential pharmaceutical components.

**Key words:** alpha-1-acid glycoprotein, biomimetic chromatography, volume of distribution, protein binding, lipophilicity, pharmacokinetic

## Θεωρητικό Μέρος

### Ιστορική αναδρομή

Τα φάρμακα αποτελούν σημαντικό εργαλείο στην προσπάθεια του ανθρώπου για επιβίωση και αυτό ήταν κάτι που έγινε αντιληπτό πολλούς αιώνες πριν την ίδρυση των φαρμακοβιομηχανιών. Οι άνθρωποι της αρχαιότητας χρησιμοποιούσαν φυτά, ορυκτά και δηλητήρια ζώων ως θεραπευτικά μέσα, κυρίως για την καταπολέμηση του πόνου.

Παρόλο που υπάρχουν αναφορές για το όπιο ως αναλγητικό ήδη από τον Θεόφραστο τον 3<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ, το 1806 έγινε μια δημοσίευση που άλλαξε τα δεδομένα της εποχής. Ο Friedrich Sertürner απομόνωσε ένα κρυσταλλικό αλκαλοειδές από το όπιο, το οποίο σήμερα γνωρίζουμε ότι είναι η μορφίνη, το οποίο είχε δεκαπλάσια δράση από το όπιο. Επιπλέον το όπιο χωρίς το αλκαλοειδές αυτό δεν εμφάνιζε καθόλου δράση. Μερικές δεκαετίες μετά, το 1874, απομονώθηκε το σαλικυλικό οξύ από τα φύλλα της ιτιάς, που οδήγησε στην σύνθεση του ακετυλοσαλικυλικού οξέως και στην κυκλοφορία της ασπιρίνης, του πρώτου συνθετικού φαρμάκου.

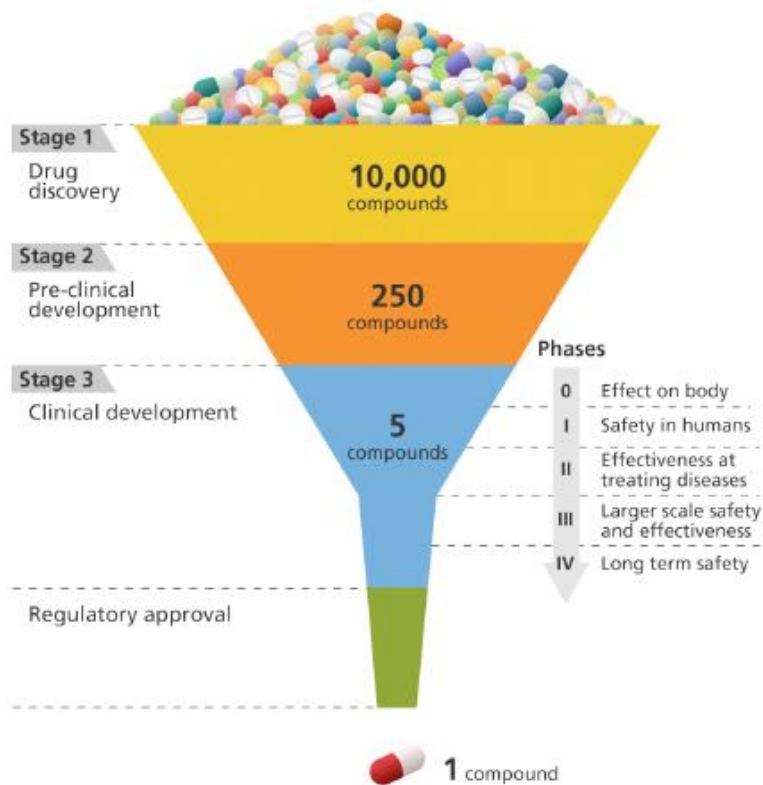
Η επόμενη καθοριστική στιγμή στην ιστορία της φαρμακευτικής επιστήμης έλαβε χώρα το 1900 όταν ο Νομπελίστας Paul Ehrlich εισήγαγε την έννοια του υποδοχέα. Ήταν τότε που οι βιολογικοί έλεγχοι μετέβησαν από το επίπεδο των οργανισμών και των οργάνων στον μικρόκοσμο και σε συγκεκριμένα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρά μια δραστική ουσία. Αποτέλεσμα της μετάβασης αυτής, ήταν η εισαγωγή της έννοιας της φαρμακοφόρου δομής, ότι μια υποψήφια δραστική ουσία δηλαδή, θα έπρεπε να έχει κάποιες συγκεκριμένες ομάδες στο μόριο της ώστε να μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον κατάλληλο υποδοχέα.<sup>1</sup> Συνδυάζοντας την ικανότητα μιας ουσίας να προσδέσνεται στον επιθυμητό υποδοχέα, αλλά και τις φυσικοχημικές της ιδιότητες, άρχισε να σκιαγραφείται η πορεία που ακολουθεί η βιομηχανία των φαρμάκων έως σήμερα. Ο σχεδιασμός λοιπόν νέων φαρμάκων υπαγορεύει την ανακάλυψη μιας ένωσης οδηγού, ή μιας δομής οδηγού, και την βελτιστοποίηση της.<sup>1</sup>



## Σχεδιασμός νέων φαρμάκων

Σήμερα οι δύο έννοιες που καθορίζουν την έρευνα των δραστικών ουσιών και το σχεδιασμό ενός μελλοντικού φαρμάκου, είναι αυτές της φαρμακοδυναμικής και της φαρμακοκινητικής. Φαρμακοδυναμική είναι η πορεία του φαρμάκου στον οργανισμό και η σύνδεση με τον υποδοχέα στόχο ενώ η φαρμακοκινητική είναι η επίδραση του οργανισμού στο φάρμακο, δηλαδή η απορρόφηση, η πρωτεϊνική σύνδεση, η κατανομή, η αποθήκευση σε ουδέτερα λίπη, ο μεταβολισμός και τελικά η απέκκριση. Η έρευνα αυτή στοχεύει στην ανακάλυψη ουσιών που δρουν αποτελεσματικά και χωρίς παρενέργειες ενώ παράλληλα είναι φθηνές και εύληπτες. Συγκεκριμένα προτιμώνται ουσίες που δεν απαιτούν μεγάλες δόσεις χορήγησης, έχουν χαμηλή τοξικότητα, είναι εκλεκτικές και δεν εμφανίζουν πολλές δευτερεύουσες δράσεις, έχουν ικανοποιητικό χρόνο παραμονής αν προορίζονται για αντιμετώπιση χρόνιων παθήσεων και έχουν επιθυμητή βιοδιαθεσιμότητα κατά τη χορήγηση δια του στόματος καθώς έτσι είναι πιθανότερο να συμμορφωθεί ο ασθενής με τη θεραπεία.<sup>1</sup>

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανάπτυξη ενός καινούριου φαρμάκου είναι δαπανηρή και πολυετής. Αρχικά, οι υποψήφιες ενώσεις μπορεί να είναι μέχρι και 10.000, οι οποίες μελετώνται εργαστηριακά για τουλάχιστον μια πενταετία καθώς μόνο 5 περίπου από αυτές, αυτές με τις κατάλληλες ιδιότητες και προοπτικές, μπορούν να περάσουν στη φάση των κλινικών δοκιμών. Οι κλινικές δοκιμές αποτελούνται από τρεις φάσεις με την πρώτη, και μεγαλύτερη σε διάρκεια, να εξετάζει την ασφάλεια και την κατάλληλη δοσολογία των δραστικών ουσιών σε ένα μικρό αριθμό υγείων εθελοντών. Στη συνέχεια, κατά τη δεύτερη φάση, οι δοκιμές γίνονται σε ένα μεγαλύτερο αριθμό εθελοντών, που ασθενούν αυτή τη φορά, με σκοπό να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα της ουσίας αλλά και οι ανεπιθύμητες παρενέργειες που μπορεί να εμφανίζει. Τέλος, η τρίτη φάση των κλινικών δοκιμών απευθύνεται σε μια μεγαλύτερη μερίδα ασθενών με σκοπό να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα και οι μακροχρόνιες παρενέργειες που μπορεί να έχει η χορήγηση της δραστικής ουσίας.<sup>1</sup>



Εικόνα 1: Στάδια ανάπτυξης νέων φαρμάκων.

Το αυξημένο κόστος της συνολικής διαδικασίας, επιβάλλει μια νοοτροπία που υπαγορεύει πως όποιες ουσίες τελικά θα αποτύχουν θα πρέπει να αποτύχουν νωρίς. Έτσι το ξεκαθάρισμα των ουσιών γίνεται γρηγορότερα και το συνολικό κόστος μειώνεται. Επιπλέον, στατιστικά υπολογίζεται ότι οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες μιας ουσίας αποτελούν συχνότερο λόγο για την αποτυχία της σε σχέση με τα ποσοστά αποτυχίας λόγω έλλειψης αποτελεσματικότητας. Ο συνδυασμός των δύο αυτών διαπιστώσεων δημιούργησε την ανάγκη για αποτελεσματικούς ελέγχους φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων ήδη από τα πολύ αρχικά στάδια, παράλληλα με τον έλεγχο της συγγένειας της ουσίας με τον επιθυμητό υποδοχέα.

### Φαρμακοκινητική

Η φαρμακοκινητική, όπως περιγράφηκε και παραπάνω, αφορά την απορρόφηση του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος, την κατανομή του στον οργανισμό, το μεταβολισμό του και στην απέκκριση του. Συχνά, χρησιμοποιείται το ακρωνύμιο ADME από τους αντίστοιχους αγγλικούς όρους για αυτές τις 4 διεργασίες (absorption, distribution, metabolism, elimination).

## Απορρόφηση

Η ταχύτητα και η αποδοτικότητα της απορρόφησης ενός φαρμάκου από τον οργανισμό εξαρτώνται αρχικά από την οδό από την οποία θα χορηγηθεί και συνεπώς την πορεία που πρέπει να ακολουθήσει για να φτάσει την κυκλοφορία του αίματος. Το μέγεθος που μπορεί να χαρακτηρίσει την αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου ως προς την απορρόφηση του ή ως προς την οδό που χορηγείται ονομάζεται βιοδιαθεσιμότητα και ορίζεται ως το πηλίκο της ποσότητας του φαρμάκου που εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος ως προς την χορηγούμενη ποσότητα φαρμάκου.

Η μέγιστη βιοδιαθεσιμότητα, δηλαδή η τιμή 1, εξασφαλίζεται με την ενδοφλέβια χορήγηση του φαρμάκου τόσο με την ένεση κατευθείαν στην φλέβα όσο και με την έγχυση, την χορήγηση δηλαδή από έναν ενδοφλέβιο ορό κατά τη διάρκεια προκαθορισμένου χρονικού διαστήματος. Άλλα είδη ενέσιμων χορηγήσεων είναι η ενδομυϊκή, όπου το φάρμακο ενίεται σε έναν μεγάλο μυ και φτάνει στο αίμα μέσω διάχυσης, και η υποδόρια κατά την οποία γίνεται έγχυση του φαρμάκου κάτω από το δέρμα. Η ενέσιμη χορήγηση ενός φαρμάκου λέγεται αλλιώς και παρεντερική καθώς δεν περνάει από το λεπτό έντερο και παρακάμπτονται τα προβλήματα πρώτης διόδου που θα περιγραφούν παρακάτω.

Ο πλέον αποδεκτός τρόπος λήψης ενός φαρμάκου, αν και ο πιο περίπλοκος ως προς την απορρόφηση του, είναι από την στοματική οδό. Το φάρμακο, αφού καταποθεί και φτάσει στο στομάχι διαλύεται στα υγρά του και ένα μέρος μπορεί να απορροφηθεί. Συγκεκριμένα, στο στομάχι απορροφώνται ευκολότερα τα λιπόφιλα σε όξινο περιβάλλον φάρμακα, καθώς το pH του στομάχου έχει ιδιαίτερα χαμηλές τιμές (έως και 1). Η παρουσία τροφής επηρεάζει την απορρόφηση στο στομάχι καθώς αυξάνει τον όγκο του, επιβραδύνει τον ρυθμό με τον οποίο η δραστική ουσία θα μεταφερθεί στο έντερο, και αυξάνει το pH του. Η χορήγηση πρέπει να γίνεται με άδειο ή γεμάτο στομάχι, ανάλογα με το είδος του φαρμάκου και τα χαρακτηριστικά του. Στη συνέχεια το φάρμακο περνάει στο λεπτό έντερο όπου και γίνεται το μεγαλύτερο μέρος της απορρόφησης. Λόγω των πτυχώσεων του εντέρου απαιτείται μεγάλος χρόνος διέλευσης με συνέπεια να αυξάνονται οι πιθανότητες απορρόφησης. Τελικά, τόσο το μέρος του φαρμάκου που έχει απορροφηθεί από το στομάχι, όσο και το μέρος που έχει απορροφηθεί από το λεπτό έντερο, εισέρχονται μέσω της πυλαίας

φλέβας στο ήπαρ. Το ήπαρ είναι ο αναγκαστικός ενδιάμεσος σταθμός πριν την κυκλοφορία του αίματος και μπορεί να μεταβολίσει μέρος του φαρμάκου ή ακόμα και τη συνολική ποσότητα του. Ο όρος **φαινόμενο της πρώτης διόδου**, αναφέρεται στις ποσότητες φαρμάκου που «χάνονται» και δεν εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος λόγω εξουδετέρωσης από ένζυμα του στομάχου, βακτήρια, ένζυμα του εντέρου ή μεταβολισμού στο ήπαρ.

Ο Lipinski, συγκρίνοντας τα χαρακτηριστικά διάφορων δραστικών ενώσεων, πρότεινε τον «κανόνα των 5 του Lipinski» για τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει μια ένωση για να μπορεί να απορροφηθεί ικανοποιητικά κατά την χορήγηση της από το στόμα. Ο κανόνας ονομάστηκε έτσι γιατί σχετίζεται με πολλαπλάσια του 5. Συγκεκριμένα αναφέρει ότι η δραστική ουσία πρέπει:

- να έχει μοριακό βάρος μικρότερο του 500
- να μην έχει πάνω από 5 ομάδες δοτών πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου
- να μην έχει πάνω από 10 ομάδες δεκτών πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου
- να έχει τιμή  $\log P$  μικρότερη του 5 (ο συντελεστής κατανομής P θα αναλυθεί παρακάτω).

Στους υπόλοιπους τρόπους με τους οποίους μπορεί να χορηγηθεί ένα φάρμακο συγκαταλέγεται η διαδερμική χορήγηση. Αυτή γίνεται μέσω ενός επιθέματος που τοποθετείται στο δέρμα το οποίο περιέχει ένα φιλμ του φαρμάκου και από αυτό μπορεί να χορηγηθεί στον οργανισμό. Με τον τρόπο αυτό η βιοδιαθεσιμότητα τείνει να είναι υψηλή, τα επιθέματα είναι εύκολα στην χρήση και είναι ικανά να διατηρούν σταθερή ποσότητα φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος. Βασικό τους μειονέκτημα αποτελεί η δυσκολία του φαρμάκου να διαπεράσει το δέρμα καθώς και τυχόν ερεθισμοί του δέρματος. Για τους λόγους αυτούς είναι ελάχιστα τα επιθέματα που κυκλοφορούν στην αγορά.

Ένα φάρμακο μπορεί επίσης να χορηγηθεί υπογλώσσια. Κάτω από την γλώσσα βρίσκονται μαλακοί ιστοί πλούσιοι σε αιμοφόρα αγγεία που μπορούν να απορροφήσουν το φάρμακο.

Πλούσιοι σε αιμοφόρα αγγεία είναι και οι πνεύμονες λόγω της αποστολής τους να απορροφούν οξυγόνο και να αποδεσμεύουν διοξείδιο του άνθρακα. Έτσι αν ένα φάρμακο είναι σε αέρια μορφή ή μορφή αερολύματος, μπορεί να χορηγηθεί εισπνεόμενο καθώς η απορρόφηση στους πνεύμονες είναι γρήγορη και δεν παρουσιάζει το φαινόμενο της πρώτης διόδου.

Τέλος, η χορήγηση από το ορθό είναι μια εντερική μέθοδος με σχετικά αμελητέο το φαινόμενο της πρώτης διόδου. Αν και το φάρμακο μπορεί να δράσει ταχύτατα σε σχέση με την χορήγηση από το στόμα, δεν αποτελεί συχνή επιλογή καθώς δεν προτιμάται από τους ασθενείς.<sup>2</sup>

### *Κατανομή*

Η κατανομή ξεκινάει από την στιγμή που η δραστική ουσία θα περάσει στην κυκλοφορία του αίματος και θεωρείται ότι είναι ταχύτατη. Οι ουσίες πρέπει να είναι ικανές να διαπερνούν κυτταρικές μεμβράνες, ειδικά αν η χορήγηση τους έχει γίνει από τη στοματική οδό. Σε αυτήν την περίπτωση η απορρόφηση από τα τοιχώματα του εντέρου γίνεται είτε με παθητική διάχυση είτε με ενεργητική μεταφορά. Στην πρώτη περίπτωση η δραστική ουσία μεταφέρεται μέσω των μεμβρανών, λόγω διαφοράς δυναμικού της συγκέντρωσης, με ενέργεια που εξασφαλίζεται από την κινητική ενέργεια των μορίων. Στην δεύτερη περίπτωση η ουσία μεταφέρεται από ειδικές πρωτεΐνες – μεταφορείς που βρίσκονται σε όλο το πάχος της μεμβράνης, με ενέργεια που εξασφαλίζεται από μονάδες ATP (οι μονάδες ATP είναι ο κύριος φορέας της χημικής ενέργειας στα κύτταρα<sup>21</sup>)

Με την είσοδο στην κυκλοφορία του αίματος η δραστική ουσία μετακινείται μέσω των αιμοφόρων αγγείων ψάχνοντας να βρει το στόχο της. Αν ο στόχος αυτός είναι υποδοχέας που βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των κυττάρων ή του κυτταρικού τοιχώματος, μπορεί να δράσει αμέσως. Αν όμως η δράση της ουσίας γίνεται ενδοκυτταρικά, πρέπει να βρει έναν τρόπο να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, στηριζόμενη στην λιποφιλία της ή χρησιμοποιώντας κάποια πρωτεΐνη - μεταφορέα. Οι μεμβράνες των κυττάρων αποτελούνται από μία διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων με πολικές κεφαλές -εσωτερικά και εξωτερικά του κυττάρου- και λιπιδικές αλυσίδες στο εσωτερικό της. Άρα ένα φάρμακο πρέπει να

είναι αρκετά λιπόφιλο ώστε να μπορεί να εισέλθει στην διπλοστοιβάδα, αλλά όχι τόσο ώστε να μην μπορεί στην συνέχεια να εξέλθει από την άλλη πλευρά.

Τέλος, υπάρχει ένα μέρος του οργανισμού με ακόμα μεγαλύτερη δυσκολία εισόδου για τις δραστικές ουσίες, το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Το ΚΝΣ προστατεύεται από τις ανεπιθύμητες πολικές ενώσεις που ταξιδεύουν μέσω του αίματος, με τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ο οποίος περικλείει τα τριχοειδή αγγεία που φτάνουν στον εγκέφαλο. Χαρακτηριστικά το οξυγόνο, η γλυκόζη και τα λευκά αιμοσφαίρια μπορούν να τον διαπερνούν, ενώ τα ερυθρά αιμοσφαίρια όχι. Έτσι ένα φάρμακο πρέπει να έχει την ικανότητα να περάσει την αιματοεγκεφαλικό φραγμό αν και μόνο αν πρέπει να δράσει στον εγκέφαλο.<sup>2</sup>

### *Μεταβολισμός και Απέκκριση*

Ο μεταβολισμός μιας ουσίας από τον οργανισμό έχει ως σκοπό να μετατρέψει την άγνωστη για τον οργανισμό δομή σε κάποια που μπορεί να αποβληθεί ευκολότερα. Το προϊόν μιας αντίδρασης μεταβολισμού ονομάζεται μεταβολίτης και είναι περισσότερο υδρόφιλο από την αρχική ένωση.

Η δράση των μεταβολικών ενζύμων πάνω σε μία ουσία που αποτελεί φάρμακο, μπορεί να έχει ποικίλες επιδράσεις. Αρχικά μπορεί να μειώσει ή και να εξαλείψει εντελώς τη δραστηριότητα της. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου ο μεταβολίτης μπορεί να παρουσιάσει μεγαλύτερη δραστηριότητα από την αρχική δραστική ουσία. Επίσης η χορηγούμενη ουσία μπορεί να μην είναι δραστική και να ενεργοποιείται μετά τον μεταβολισμό της. Αυτό όμως που κάνει τη μελέτη των μεταβολιτών σημαντική, είναι πως υπάρχει πιθανότητα να εμφανίζουν δραστηριότητα διαφορετική από αυτήν του αρχικού φαρμάκου και έτσι να δημιουργούν παρενέργειες ή και τοξικότητα στον οργανισμό.

Οι αντιδράσεις μεταβολισμού κατηγοριοποιούνται στις αντιδράσεις Φάσης Ι και στις αντιδράσεις Φάσης ΙΙ. Οι πρώτες δημιουργούν το υπόστρωμα για να γίνουν οι δεύτερες. Το τελικό προϊόν που προκύπτει από τις δύο αυτές φάσεις, είναι πολύ πιο υδατοδιαλυτό και μπορεί να απεκκριθεί ευκολότερα.

Η Φάση I αποτελείται κυρίως από αντιδράσεις οξείδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης. Ποια συγκεκριμένα θα γίνει, εξαρτάται από τα διαθέσιμα ένζυμα, τις δραστικές ομάδες του φαρμάκου και τον ανθρακικό του σκελετό. Οι αντιδράσεις οξείδωσης είναι οι σημαντικότερες και πραγματοποιούνται στο ήπαρ από μια υπεροξειγενεία ενζύμων, με σημαντικότερο το ισοένζυμο CYP3A4. Οι αντιδράσεις αυτές γίνονται σε άτομα άνθρακα, αζώτου, φωσφόρου ή θείου, κυρίως όταν αυτά είναι εκτεθειμένα ή ενεργοποιημένα λόγω των υποκαταστατών που φέρουν. Για παράδειγμα ένα μεθύλιο μπορεί να οξειδωθεί σε μια αλκοόλη και μια αλκοόλη σε ένα καρβοξυλικό οξύ. Αντίθετα οι αντιδράσεις αναγωγής είναι σπανιότερες με παράδειγμα τη μετατροπή μιας νίτρο ομάδας σε αμίνη ή μιας κετόνης σε αλκοόλη. Τέλος υδρόλυση μπορούν να υποστούν εστέρες και αμίδια, σπάζοντας έτσι σε ένα καρβοξυλικό οξύ και μια αλκοόλη ή μια αμίνη αντίστοιχα.

Οι αντιδράσεις της Φάσης II αξιοποιούν τα προϊόντα της Φάσης I και τους προσθέτουν επιπλέον πολικές ομάδες. Αυτό επιτυγχάνεται μέσα από αντιδράσεις ακετυλίωσης, σουλφονίωσης, σύζευξης με αμινοξέα, γλυκουρωνικό οξύ ή γλουταθιόνη.

Η απέκκριση μιας ουσίας από τον οργανισμό, εξαρτάται από τις ιδιότητες της. Έτσι, είτε μπορεί να μεταβολιστεί και να αποβληθεί με την μορφή του μεταβολίτη, είτε να αποβληθεί με την αρχική της μορφή, χωρίς καμία τροποποίηση. Αν και κυρίως τα φάρμακα απεκκρίνονται περνώντας από τα νεφρά και καταλήγοντας στα ούρα, μικρό ποσοστό φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα μπορεί να απεκκριθούν μέσω του παχέως εντέρου και των κοπράνων ενώ πτητικά και αέρια φάρμακα μπορεί να απεκκριθούν μέσω των πνευμόνων και της αναπνοής.<sup>2</sup>

## **Ιδιότητες δραστικών ενώσεων**

Οι ιδιότητες ενός μορίου καθορίζουν τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρά με τον οργανισμό, τόσο την φαρμακοκινητική όσο και την φαρμακοδυναμική. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να είναι παθητική, όπως η παθητική διάχυση και η διαπερατότητα μεμβρανών ή ενεργητική, όπως η σύνδεση με μακρομόρια. Οι κύριες ιδιότητες που καθορίζουν τη συμπεριφορά της δραστικής ουσίας είναι η λιποφιλία, ο βαθμός ιοντισμού, το μοριακό βάρος, η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, το σχήμα του μορίου, η κατανομή του φορτίου, η αμφιφιλία, η διαλυτότητα και το

σημείο τήξης. Στη συνέχεια αναλύονται οι ιδιότητες που απασχολούν την παρούσα εργασία.

### Λιποφιλία

Η λιποφιλία είναι η ιδιότητα που εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου με ένα λιπόφιλο περιβάλλον και έχει διπλό χαρακτήρα. Δεν ταυτίζεται με την υδροφοβία αν και αποτελεί μια από τις βασικές της συνιστώσες, καθώς σχετίζεται και με την πολικότητα και ισχύει:

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβία} - \text{Πολικότητα}$$

Αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα κατά το σχεδιασμό ενός νέου φαρμάκου καθώς επιδρά και στις παθητικές διαδικασίες όσο και στις διαδικασίες σύνδεσης. Χαμηλή τιμή λιποφιλίας δεν βοηθάει το μόριο να απορροφηθεί από τις διάφορες μεμβράνες του οργανισμού ενώ υψηλές τιμές οδηγούν σε συσσώρευση σε ουδέτερα λίπη. Συνεπώς εμφανίζονται φαινόμενα τοξικότητας αλλά και επαγωγής των μικροσωμικών ενζύμων με αποτέλεσμα το μεταβολισμό και την απέκκριση του φαρμάκου.

Ως μέτρο της λιποφιλίας έχει θεσπιστεί ο **συντελεστής μερισμού P**, που αποτελεί τη σταθερά ισορροπίας στο φαινόμενο κατανομής της ουσίας σε μια υδατική και μια λιποειδική φάση. Συγκεκριμένα ορίζεται ως το πηλίκο της συγκέντρωσης της αδιάστατης μονομερούς ουσίας στη λιποειδική φάση προς την αντίστοιχη συγκέντρωση της στην υδατική φάση.<sup>1</sup> Ο συντελεστής αυτός εξαρτάται μόνο από τη θερμοκρασία και το σύστημα των διαλυτών και συνεπώς αποτελεί μια θερμοδυναμική σταθερά για την ουσία και συνήθως χρησιμοποιείται στη λογαριθμική μορφή όπου και είναι ανάλογη της ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G$ ).

$$\log P = - \frac{\Delta G}{2.303RT} \quad (1)$$

Όπου R η παγκόσμια σταθερά των αερίων και T η απόλυτη θερμοκρασία.

Στην πραγματικότητα, οι περισσότερες φαρμακευτικές ουσίες έχουν κέντρα ιοντισμού και συνεπώς ανάλογα με το pH μπορεί να βρίσκονται σε περισσότερο ή λιγότερο ιοντισμένη μορφή. Σε αυτήν την περίπτωση, γίνεται λόγος για το



**συντελεστή κατανομής D** ο οποίος συμπεριλαμβάνει τις ιοντισμένες αυτές ποσότητες. Συγκεκριμένα, ορίζεται ως ο λόγος του αθροίσματος των συγκεντρώσεων ιοντισμένης/ων μορφής/ων και αδιάστατης μορφής στην οργανική φάση προς το άθροισμα των αντίστοιχων συγκεντρώσεων στην υδατική φάση. Προσδιορίζεται από 4 σταθερές ισορροπίας, αντί για μία που αποτελεί τον συντελεστή μερισμού, οι οποίες είναι: η σταθερά κατανομής της αδιάστατης μορφής στην οργανική και την υδατική φάση ( $\log P^N$ ), η σταθερά κατανομής της ιοντισμένης μορφής στις δύο φάσεις ( $\log P^I$ ), η σταθερά ιοντισμού ( $pK_a$ ) και η σταθερά που ισούται με το pH της υδατικής φάσης στο οποίο συνυπάρχουν στην οργανική φάση ίσες συγκεντρώσεις της αδιάστατης και της ιοντισμένης μορφής ( $pK_a^{oct}$ ).<sup>1</sup>

Οι δύο αυτές παράμετροι σχετίζονται στις λογαριθμικές τους μορφές με τη βοήθεια ενός συντελεστή διόρθωσης Q που εξαρτάται από το είδος της ουσίας. Έτσι,

$$\log P = \log D + Q \quad (2)$$

Συγκεκριμένα για τιμές pH που δεν δίνουν υψηλό βαθμό ιοντισμού, για μονοπρωτικά οξέα:  $Q = \log ( 1 + 10^{pH - pK_a} )$  ενώ για μονοπρωτικές βάσεις:  $Q = \log ( 1 + 10^{pK_a - pH} )$ . Στην βιβλιογραφία μπορούν να βρεθούν σχέσεις για τη διόρθωση διπρωτικών οξέων ή βάσεων, αμφολιτών κ.α.

Για τον πειραματικό προσδιορισμό του μέτρου της λιποφιλίας, χρησιμοποιείται ως σύστημα αναφοράς το σύστημα n-οκτανόλης – νερού καθώς εμφανίζει πληθώρα πλεονεκτημάτων. Αρχικά η n-οκτανόλη μπορεί να συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου και ως δέκτης και ως δότης κάτι που προσομοιάζει σε πολλά βιολογικά συστήματα, δεν απορροφά στο φάσμα του υπεριώδους και αυτό βοηθάει στον πειραματικό προσδιορισμό, είναι σχετικά εύκολος ο υπολογισμός του συντελεστή μερισμού, δεν είναι τοξική και είναι φθηνή.

Η n-οκτανόλη χρησιμοποιείται στην υγρή της μορφή, δηλαδή στη μορφή που είναι κορεσμένη σε νερό, για τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής. Στην περίπτωση αυτή η δομή της είναι αρκετά περίπλοκη καθώς το διαλελυμένο νερό δεν διασπείρεται ομοιόμορφα αλλά σχηματίζει συσσωματώματα τεσσάρων μορίων τα οποία περιβάλλονται από περίπου δεκαέξι μόρια οκτανόλης. Τα υδρόφιλα τμήματα της οκτανόλης, οι υδροξυλομάδες, είναι προσανατολισμένες προς τα μόρια του νερού και σχηματίζουν ένα πλέγμα δεσμών υδρογόνου, ενώ τα υδρόφοβα τμήματα

σχηματίζουν μια περιοχή που μπορεί να προσομοιάζει το εσωτερικό των λιπιδίων σε μία διπλοστοιβάδα.

Τελικά το σύστημα n-οκτανόλης – νερού προσομοιώνει ικανοποιητικά τη βιολογική σύνδεση και τις βιολογικές μεμβράνες με υψηλές ποσότητες πρωτεϊνών, όταν η λιποειδική φάση περιλαμβάνει αμφιπρωτικές ουσίες. Για διαφορετικούς τύπους μεμβρανών και υποδοχέων είναι καταλληλότερα άλλα συστήματα όπως το σύστημα αλκανίου - νερού για μεμβράνες και υποδοχείς χωρίς δέκτες και δότες πρωτονίων, το σύστημα χλωροφορμίου - νερού για μεμβράνες και υποδοχείς που περιέχουν κυρίως δότες πρωτονίων, το σύστημα διβουτυλαιθέρα - νερού για μεμβράνες και υποδοχείς που περιέχουν κυρίως δέκτες πρωτονίων.<sup>1</sup>

Σε περίπτωση που δεν δηλώνεται το είδος του συστήματος, το logP αναφέρεται σε συντελεστή μερισμού για σύστημα n-οκτανόλης - νερού.

### *Βαθμός ιοντισμού*

Η σταθερά ιοντισμού (pKa) διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο κατά τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη ενός φαρμάκου με κέντρο ιοντισμού. Μόνο η ουδέτερη μορφή μπορεί να διαπεράσει τις βιολογικές μεμβράνες, ενώ συνήθως η ιοντισμένη μορφή είναι αυτή που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα στόχο.

Σε περιβάλλον όπου το pH ισούται με το pKa, η ένωση βρίσκεται στην ιοντισμένη της μορφή σε ποσοστό 50%. Για τα οξέα, όταν  $pKa - pH = -2$  παρατηρείται ιοντισμός σε ποσοστό 99% ενώ για  $pKa - pH = 2$ , το ποσοστό μειώνεται στο 1%. Γίνεται αντιληπτό ότι όταν το pH είναι δύο μονάδες μεγαλύτερο από το pKa, η ουσία είναι πρακτικά πλήρως ιοντισμένη ενώ όταν είναι δύο μονάδες μικρότερο, είναι πρακτικά πλήρως στην αδιάστατη μορφή της. Το αντίστροφο ισχύει για τις βάσεις, όπου όταν  $pKa - pH = -2$  υπάρχει 1% ιοντισμός ενώ για  $pKa - pH = 2$  υπάρχει 99% ιοντισμός.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι ενώσεις απορροφώνται βέλτιστα στην ουδέτερη μορφή τους. Σύμφωνα με την παραπάνω ανάλυση, τα φάρμακα με όξινες ομάδες απορροφώνται καλύτερα στην περιοχή του στομάχου ή στην αρχή του εντέρου όπου

το pH είναι χαμηλότερο. Αντιθέτως τα φάρμακα που έχουν βασικές ομάδες απορροφώνται κυρίως στην υπόλοιπη διαδρομή του φαρμάκου δια μέσω του εντέρου.

Το pKa επηρεάζει συνεπώς τη λιποφιλία καθώς ορίζει τη μορφή της ένωσης στα διάφορα περιβάλλοντα και συνήθως δεν μελετάται ξεχωριστά ως παράμετρος καθώς συμπεριλαμβάνεται στον όρο logD.<sup>2</sup>

### *Μοριακό Βάρος*

Το μοριακό βάρος όταν έχει ακραίες τιμές, μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά του μορίου ως προς τη διαπερατότητα από τις βιολογικές μεμβράνες. Πολύ μικρά μόρια μπορεί να εμφανίζουν υψηλή διαπερατότητα αν και δεν αναμένεται από τη λιποφιλία τους, ενώ αντίθετα πολύ μεγάλα μόρια δυσκολεύονται να διαπεράσουν τις μεμβράνες. Αυτό εξηγείται με το ότι η διαπερατότητα δεν εξαρτάται μόνο από τον συντελεστή κατανομής στις μεμβράνες -που εκφράζεται μέσω της λιποφιλίας- αλλά και από τον συντελεστή διάχυσης. Ο συντελεστής διάχυσης είναι αντιστρόφως ανάλογος με το μοριακό βάρος συνεπώς μικρά μόρια διαχέονται ευκολότερα από τα μεγάλα.

Λόγω της σημαντικότητας του ως παράμετρος στην ανάπτυξη των φαρμάκων, το μοριακό βάρος αναφέρεται στον μνημονικό κανόνα των 5 του Lipinski όπως αναφέρθηκε παραπάνω.<sup>2</sup>

### *Πρωτεϊνική Σύνδεση*

Τα φάρμακα που εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται με τις πρωτεΐνες του αίματος και το φαινόμενο αυτό περιγράφεται ως πρωτεϊνική σύνδεση. Η πρωτεϊνική σύνδεση ενός φαρμάκου μπορεί να επηρεάσει την κατανομή και την απέκκριση του καθώς και την ένταση και τη διάρκεια της φαρμακολογικής του δράσης.<sup>5</sup> Μόνο το ελεύθερο στο αίμα φάρμακο μπορεί να διαπεράσει τις βιολογικές μεμβράνες και να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα στόχο.<sup>4</sup> Η σύνδεση αυτή είναι αντιστρεπτή και χαρακτηρίζεται από ισορροπία μεταξύ δεσμευμένου και ελεύθερου φαρμάκου.<sup>4</sup>

Το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεϊνικής σύνδεσης γίνεται από την αλβουμίνη, η οποία υπάρχει στο μεγαλύτερο ποσοστό στο πλάσμα του αίματος σε σχέση με άλλες πρωτεΐνες, και μπορεί να δεσμεύσει όξινα και ουδέτερα φάρμακα. Έπειτα η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη, αν και σε πολύ μικρότερο ποσοστό, συμβάλει στο φαινόμενο της πρωτεϊνικής σύνδεσης δεσμεύοντας βασικά και ουδέτερα φάρμακα. Υπολογίζεται ότι για αρκετά φάρμακα παραπάνω από το 90% της ποσότητας που υπάρχει στο πλάσμα, είναι συνδεδεμένο με κάποια πρωτεΐνη. Καθώς η σύνδεση αυτή δεν είναι εκλεκτική, φάρμακα με παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μπορεί να ανταγωνίζονται για τα σημεία πρόσδεσης μεταξύ τους και να επηρεάζει το ένα την δραστικότητα ή και την τοξικότητα του άλλου.<sup>4</sup>

Τέλος, ποσότητα των φαρμάκων μπορεί να συγκρατείται και από τους διάφορους ιστούς με αντιστρεπτή σύνδεση τους με διάφορες πρωτεΐνες ή φωσφολιπίδια. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να παραταθεί η δράση του φαρμάκου ή και να προκληθεί τοπική τοξικότητα στον συγκεκριμένο ιστό.

### *Όγκος Κατανομής*

Ο όγκος κατανομής ( $V_d$ ) είναι η ποσότητα που συσχετίζει τη χορηγούμενη στον οργανισμό δόση ενός φαρμάκου με τη συγκέντρωση που αυτό τελικά έχει στο πλάσμα του αίματος.<sup>6</sup> Συγκεκριμένα, αντιπροσωπεύει τον όγκο στον οποίο θα έπρεπε να διαλυθεί η χορηγούμενη δόση φαρμάκου ώστε να αποκτήσει τη συγκέντρωση που έχει τη δεδομένη στιγμή στο πλάσμα.<sup>4</sup> Έτσι υποδεικνύει την έκταση της δέσμευσης του φαρμάκου από τους ιστούς και καθώς τα λιπόφιλα φάρμακα εισέρχονται ευκολότερα στους ιστούς, παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές όγκου κατανομής. Υπολογίζεται ως η δόση που χορηγήθηκε προς την συγκέντρωση στο πλάσμα την χρονική στιγμή μηδέν.<sup>6</sup>

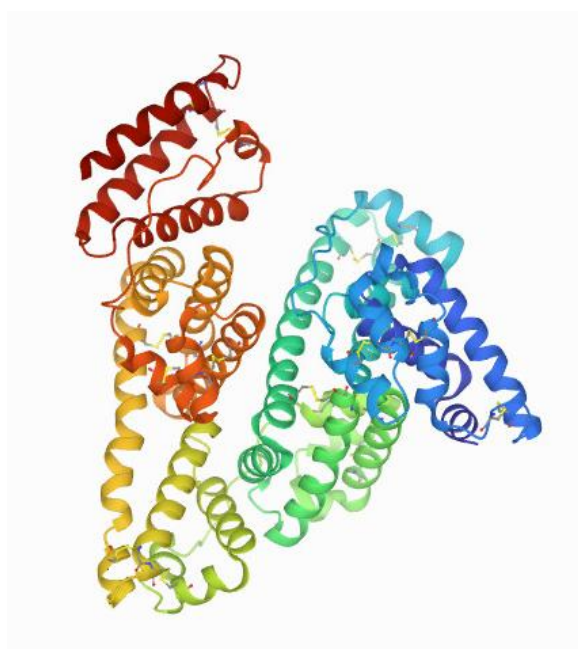
$$V_d = \frac{dose}{C_{p0}} \quad (3)$$

## Πρωτεΐνες του αίματος

Το ανθρώπινο αίμα αποτελείται από πληθώρα συστατικών μέσα στα οποία συμπεριλαμβάνονται και πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες. Πολλές από τις πρωτεΐνες αυτές έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν φαρμακευτικές ουσίες όμως οι σημαντικότερες από αυτές είναι η λευκωματίνη του ανθρώπινου ορού (Human Serum Albumin, HSA) ή αλλιώς ανθρώπινη αλβουμίνη και η  $\alpha$ 1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (alpha-1-acid glycoprotein, AGP) καθώς ο κύριος ρόλος τους είναι να μεταφέρουν και να αποθηκεύουν εξωγενείς και ενδογενείς ουσίες στην κυκλοφορία του αίματος.<sup>8</sup>

### Λευκωματίνη του ανθρώπινου ορού (HSA)

Η πρωτεΐνη HSA αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 585 αμινοξέων, μη γλυκοζυλιωμένη, η οποία συντίθεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ.<sup>7,8</sup> Έχει μοριακό βάρος 66.500 g/mol και είναι η πρωτεΐνη με την μεγαλύτερη παρουσία στο αίμα έναντι των άλλων πρωτεϊνών (60% των συνολικών πρωτεϊνών του αίματος).



Εικόνα 2: Δομή της λευκωματίνης του ανθρώπινου ορού.<sup>9</sup>

Στο μόριο της HSA υπάρχουν 17 δισουλφιδικές γέφυρες που του προσδίδουν ευλυγισία και σταθερότητα ενώ παράλληλα το διαμορφώνουν σε ένα σχήμα όμοιο με καρδιά. Παρουσιάζει μέχρι και 7 σημεία πρόσδεσης τα οποία σε συνδυασμό με την ευλυγισία του, του δίνουν την δυνατότητα να συνδέεται με ένα ευρύ φάσμα φαρμάκων.

Ο ρόλος της στο πλάσμα του αίματος συνίσταται στο ότι είναι το κύριο μόριο μεταφοράς και αποθήκευσης ενδογενών ουσιών, εξωγενών ουσιών καθώς και άλλων σημαντικών προσδεμάτων (ιόντα, βιταμίνες κ.α.) ενώ παράλληλα ρυθμίζει την κολλοειδή οσμωτική πίεση και διατηρεί το αίμα στο εσωτερικό των αγγείων.

### *A1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP)*

Η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP), επίσης γνωστή ως ορομουκοειδής (ORM), περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1950 και ήταν μια πρωτεΐνη που προκάλεσε εντύπωση λόγω του χαμηλού ισοηλεκτρικού της σημείου και του υψηλού ποσοστού της σε υδατάνθρακα. Η AGP είναι μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη που αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 181 αμινοξέων με μοριακό βάρος περίπου 40.000 g/mol, η οποία συντίθεται στο ήπαρ.<sup>7,8</sup> Έχουν παρατηρηθεί δύο είδη AGP πρωτεϊνών με διαφορές σε 22 από τα 181 αμινοξέα, τα οποία κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια στον ίδιο οργανισμό. Ο χρόνος ημιζωής της AGP είναι περίπου 2-3 ημέρες και η ποσότητα της στο πλάσμα εξαρτάται από την ηλικία και το φύλο. Η δευτεροταγής δομή της AGP διατηρείται σταθερή λόγω 2 δισουλφιδικών δεσμών και αποτελείται κατά 15% από α-έλικες και κατά 41% από β-πτυχωτά φύλλα.<sup>10</sup>



*Εικόνα 3: Δομή της α1-όξινης γλοκοπρωτεΐνης.<sup>11</sup>*

Το υδατανθρακικό κομμάτι της AGP αποτελεί περίπου το 45% του μοριακού της βάρους και είναι συνδεδεμένο με το πολυπεπτίδιο σε πέντε περίπλοκες αλυσίδες μορίων γλυκάνης. Εξαρτάται ποιοτικά από τη φυσιολογία του οργανισμού και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η μορφή του μπορεί να επηρεάσει τόσο την ικανότητα της πρωτεΐνης να δεσμεύει ουσίες, όσο και το χρόνο ημιζωής της ή τον καταβολισμό της, ενώ παράλληλα συμβάλει στη σταθερότητα του μορίου, στη διαλυτότητα του, και στην ικανότητα του να αλληλεπιδρά με μεμβράνες και υποδοχείς.<sup>8</sup> Συγκεκριμένα, 12-20 διαφορετικά γλυκοζυλιωμένες μορφές της AGP μπορούν να εντοπιστούν στο πλάσμα του ανθρώπινου αίματος. Οι διαφορετικές αυτές μορφές μπορεί να οφείλονται σε κάποια οξεία φλεγμονώδη κατάσταση ή σε εγκυμοσύνη, ρευματοειδή αρθρίτιδα, κύρωση του ήπατος κ.α.<sup>10</sup>

Η βιολογική της δράση δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή, θεωρείται όμως ότι δρα ως φυσικός αντιφλεγμονώδης και ανοσοτροποποιητικός παράγοντας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης.<sup>8</sup> Η ικανότητα της αυτή σχετίζεται άμεσα με το είδος της γλυκοζυλίωσης της. Επίσης έχει προταθεί ότι η ύπαρξη της AGP είναι απαραίτητη για να διατηρείται η διαπερατότητα των τριχοειδών, καθώς αυξάνει την εκλεκτικότητα του πολυανιονικού φορτίου του ενδοθηλιακού φραγμού. Επιπλέον έχει σημαντικό ρόλο στην μεταφορά ενδογενών και εξωγενών ουσιών. Τελικά, κρίνεται ότι έχει πολύ σημαντικό ρόλο συνολικά στην ομοίωση του οργανισμού.<sup>10</sup>

Μαζί με την HSA αποτελούν τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες για το φαινόμενο της πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμάκων στο αίμα και μπορούν να επηρεάσουν τα φαρμακοκινητική τους. Η AGP δεσμεύει κυρίως βασικά και ουδέτερα φάρμακα καθώς και κάποια όξινα. Ήδη από το 1960 έχει παρατηρηθεί η ικανότητα της να δεσμεύει και να μεταφέρει στεροειδή. Αν και βρίσκεται σε μικρό ποσοστό στο αίμα σε σχέση με την HSA, μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου αν αυτό είναι βασικό ή αν λόγω κάποιας ασθένειας έχει αυξηθεί πολύ το ποσοστό της στο πλάσμα.

Η σύνδεση των φαρμάκων με την AGP πιστεύεται ότι γίνεται σε ένα σημείο<sup>7</sup> και στηρίζεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της περιοχής του σημείου πρόσδεσης. Η ικανότητα πρόσδεσης εξαρτάται από τη διαμόρφωση που έχει η AGP, από την πολικότητα του προσδέματος, το pH και τη θερμοκρασία, ενώ διάφορα δεδομένα υποδεικνύουν ότι υπάρχουν και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και στερεοεκλεκτικότητα..<sup>10</sup>

## Χρωματογραφία

### *Χρωματογραφικοί διαχωρισμοί*

Η χρωματογραφία αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού που χρησιμοποιείται ευρέως και εφευρέθηκε στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα από τον ρώσο βοτανολόγο Mikhail Tswett. Ο Tswett χρησιμοποίησε αυτή τη μέθοδο για να διαχωρίσει διάφορες φυτικές χρωστικές περνώντας ένα διάλυμα τους από ένα γυάλινο σωλήνα ο οποίος ήταν πληρωμένος με εξαιρετικά λεπτό ανθρακικό ασβέστιο. Οι χρωστικές οργανώθηκαν σε χρωματιστές ζώνες μέσα στο σωλήνα και έτσι αποδόθηκε ο τίτλος **χρωματογραφία** στην τεχνική.

Η χρωματογραφία έχει ως βασικό στόχο το διαχωρισμό των συστατικών που βρίσκονται σε ένα μίγμα. Η βασική αρχή της, επιβάλλει τη διάλυση του μίγματος σε μια κινητή φάση η οποία εξαναγκάζεται να διέλθει από μία στατική φάση. Η επιλογή των φάσεων γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε οι διάφορες ουσίες να κατανέμονται μεταξύ τους σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά που κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται με μικρότερη ταχύτητα ενώ αυτά που



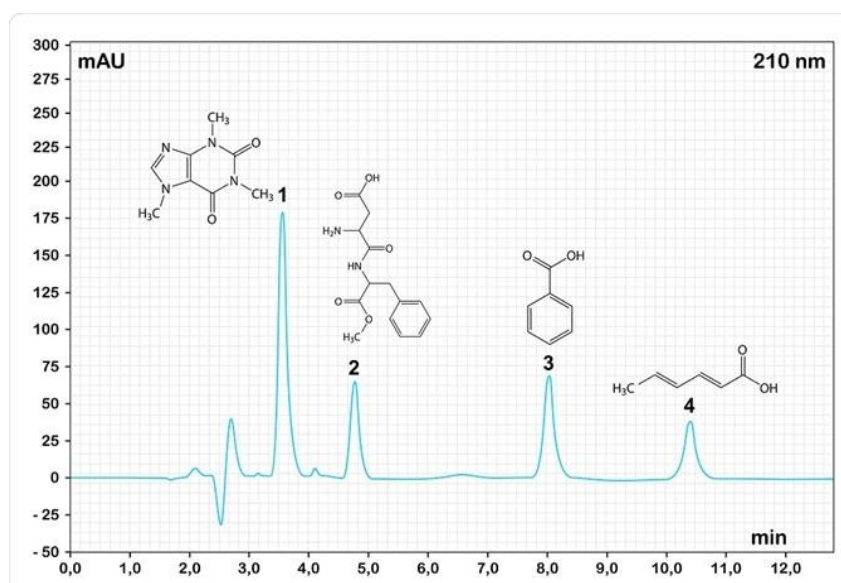
κατακρατούνται ασθενέστερα, με μεγαλύτερη. Έτσι τα διάφορα συστατικά σχηματίζουν ξεχωριστές ζώνες και μπορούν στη συνέχεια να αναλυθούν ποσοτικά ή ποιοτικά.

Υπάρχουν πολλά είδη χρωματογραφικών τεχνικών, ανάλογα με τον τύπο και το είδος των στατικών και κινητών φάσεων. Αρχικά γίνεται διάκριση μεταξύ χρωματογραφίας στήλης και επιπεδικής χρωματογραφίας. Στη χρωματογραφία στήλης, η στατική φάση βρίσκεται στο εσωτερικό μιας στήλης και η κινητή φάση διέρχεται μέσω αυτής με εφαρμογή πίεσης. Στην επιπεδική χρωματογραφία η στατική φάση βρίσκεται σε μια επίπεδη πλάκα ή στους πόρους ενός χαρτιού και η κινητή φάση διέρχεται μέσω αυτής είτε λόγω τριχοειδών φαινομένων είτε λόγω της επίδρασης της βαρύτητας. Το πλέον διαδεδομένο είδος χρωματογραφίας και αυτό για το οποίο γίνεται λόγος σε όλη την έκταση της παρούσας εργασίας, είναι η χρωματογραφία στήλης.

Όσον αφορά τον τύπο των κινητών και στατικών φάσεων, οι χρωματογραφίες κατηγοριοποιούνται σε υδροχρωματογραφία (LC), αεριοχρωματογραφία (GC) και χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (SFC). Το όνομα κάθε κατηγορίας υποδηλώνει το είδος της κινητής φάσης που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση. Υγρό, αέριο ή κάποιο υπερκρίσιμο ρευστό αντίστοιχα. Σε κάθε μια από τις παραπάνω περιπτώσεις, η στατική φάση μπορεί να είναι σε υγρή μορφή συνδεδεμένη σε κάποια επιφάνεια, ή σε στερεή μορφή.

Στις χρωματογραφίες στήλης η κινητή φάση με το μίγμα των προς διαχωρισμό συστατικών εισάγονται στην στήλη. Στη συνέχεια με κάποια αντλία ή με εφαρμογή πίεσης, χορηγείται καθαρός διαλύτης που εξαναγκάζει τις ουσίες να κινηθούν κατά μήκος της στήλης. Η διαφορετική ταχύτητα με την οποία κινείται κάθε συστατικό τη διαχωρίζει από τις υπόλοιπες. Αφού περαστεί αρκετή ποσότητα διαλύτη, μπορεί τελικά κάθε ουσία να ανιχνευθεί και να συλλεχθεί ξεχωριστά από τις υπόλοιπες, από το κάτω μέρος της στήλης. Η διαδικασία εξόδου μιας ουσίας από την στήλη ονομάζεται **έκλυση**.

Στην έξοδο της στήλης υπάρχει πάντα κάποιου είδους ανιχνευτής που παράγει ένα σήμα ανάλογο της συγκέντρωσης της εκλουόμενης κάθε φορά ουσίας. Το γράφημα στο οποίο αποτυπώνεται μια σειρά κορυφών, μια για κάθε ουσία, συναρτήσει του χρόνου, ονομάζεται χρωματογράφημα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για ποιοτική όσο και για ποσοτική ανάλυση. Όσον αφορά τη μορφή των καμπυλών των διάφορων συστατικών, συνήθως μοιάζουν με καμπύλες Gauss. Θεωρώντας ότι ένα μόριο κάνει χιλιάδες μεταφορές από την κινητή στη στατική φάση μέχρι να εκλουσθεί, ο χρόνος παραμονής σε κάθε φάση είναι ακανόνιστος και τυχαίος. Από το συνδυασμό αυτών των τυχαίων διεργασιών προκύπτει μία συμμετρική διασπορά των ταχυτήτων έκλουσης των μορίων μιας ουσίας, με τη μέση τιμή να αποδίδεται ως η μέση συμπεριφορά των μορίων. Όσο ταχύτερα κινείται μια ουσία προς την έξοδο της στήλης, τόσο λιγότερο χρόνο έχει για να εκδηλώσει αυτή τη διεύρυνση και συνεπώς, ο χρόνος παραμονής είναι ανάλογος ως προς το εύρος της ζώνης ενώ η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης είναι αντιστρόφως ανάλογη.



Εικόνα 4: Παράδειγμα χρωματογραφήματος διαχωρισμού οργανικών ενώσεων.

Ένα χρωματογράφημα μπορεί να δώσει και ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες. Ως προς την ταυτοποίηση μιας ουσίας, η χρωματογραφία μπορεί να αποτελέσει ισχυρή ένδειξη για την απουσία μιας ουσίας από το αναλυόμενο δείγμα αν δεν υπάρχει καμπύλη στον χρόνο που θα αναμενόταν. Δεν μπορεί όμως να εξασφαλίσει την ύπαρξη της καθώς ένας χρόνος έκλουσης μπορεί να είναι κοινός για παραπάνω από μια ενώσεις. Για να γίνει ποσοτική ανάλυση, το ύψος της καμπύλης ή

το εμβαδόν της, συγκρίνεται αντίστοιχα με το ύψος ή το εμβαδόν μιας καμπύλης κάποιας πρότυπης ουσίας που έχει εγχυθεί σε γνωστή ποσότητα.

Η πειραματική ποσότητα που χρησιμοποιείται για την περιγραφή της μετανάστευσης των διαλελυμένων ουσιών στις στήλες, ονομάζεται παράγοντας κατακράτησης ( $k$ ) και δεν εξαρτάται από τη γεωμετρία της στήλης ή από τον ογκομετρικό ρυθμό ροής της κινητής φάσης. Με τη χρήση αυτού μπορούν να συγκριθούν αποτελέσματα του ίδιου αναλύτη, στην ίδια κινητή και στατική φάση που έχουν γίνει σε στήλες διαφορετικής γεωμετρίας ή με διαφορετικό ρυθμό ροής. Για να υπολογισθεί ο παράγοντας αυτός, αρχικά πρέπει να καταγραφεί ο χρόνος ανάσχεσης του αναλύτη ( $t_R$ ), δηλαδή ο χρόνος που χρειάζεται από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος, μέχρι την στιγμή που η κορυφή του αναλύτη φτάσει στον ανιχνευτή. Επιπλέον χρειάζεται να υπολογισθεί ο νεκρός χρόνος ( $t_M$ ). Ο χρόνος αυτός υπολογίζεται εγχέοντας στο χρωματογραφικό σύστημα μια ουσία που δεν κατακρατείται από τη στήλη και καταγράφοντας το χρόνο που χρειάζεται για να φτάσει στον ανιχνευτή. Τελικά, ο παράγοντας κατακράτησης υπολογίζεται ως:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (4)$$

Συνήθως χρησιμοποιείται στην λογαριθμική μορφή, δηλαδή:

$$\log k = \log \left( \frac{t_R - t_M}{t_M} \right) \quad (5)$$

### *Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)*

Αρχικά στην υγρή χρωματογραφία (LC) χρησιμοποιούνταν στήλες και σωματίδια μεγαλύτερων διαμέτρων από ότι χρησιμοποιούνται σήμερα και η ροή της κινητής φάσης γινόταν λόγω των βαρυτικών δυνάμεων. Σήμερα στην υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιείται πίεση για την επίτευξη ροής και για αυτό ονομάζεται υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high performance liquid chromatography, HPLC). Αποτελεί μια από τις πιο διαδομένες αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού και αυτό οφείλεται στην υψηλή ευαισθησία, στην εύκολη προσαρμογή σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς και στην ικανότητα να διαχωρίζει μη πτητικά ή θερμοευαίσθητα συστατικά

Οργανολογικά τα μέρη μιας HPLC συσκευής είναι πολυπλοκότερα και πιο δαπανηρά από άλλα είδη χρωματογραφίας λόγω των υψηλών πιέσεων που πρέπει να αντέχουν. Συγκεκριμένα αποτελείται από τα εξής μέρη:

- Δοχεία διαλυτών
- Αντλία
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Στήλη
- Ανιχνευτής

**Δοχεία διαλυτών** Το πρώτο από τα τμήματα ενός τέτοιου χρωματογράφου, είναι το δοχείο που περιλαμβάνει την κινητή φάση, δηλαδή κάποιον διαλύτη. Τα δοχεία αυτά πρέπει να εξασφαλίζουν ότι μόνο καθαρός διαλύτης θα διαπερνάει τη στήλη και για αυτό συχνά είναι εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης σκόνης και αερίων. Όταν σε όλη διάρκεια της έκλυσης χρησιμοποιείται διαλύτης συγκεκριμένης σύστασης, η έκλυση ονομάζεται ισοκρατική. Πολλές φορές είναι απαραίτητο να αυξηθεί η απόδοση του διαχωρισμού οπότε χρησιμοποιούνται δύο ή και περισσότερα συστήματα διαλυτών που διαφέρουν ως προς την πολικότητα. Σε αυτήν την περίπτωση η έκλυση καλείται βαθμιδωτή.

**Αντλία** Ως προς την άσκηση πίεσης στην κινητή φάση, χρησιμοποιούνται αντλίες που πληρούν αυστηρά κριτήρια. Μια τέτοια αντλία πρέπει να αναπτύσσει πιέσεις μέχρι 6000psi (414 bar), να αποδίδει ροή απαλλαγμένη από παλμούς, ταχύτητες ροής από 0,1 έως 10 mL/min, να εξασφαλίζει έλεγχο και επαναληψιμότητα της ροής και να αποτελείται από τμήματα ανθεκτικά στη διάβρωση. Σημειώνεται ότι οι υψηλές πιέσεις που αναπτύσσονται δεν δημιουργούν κίνδυνο έκρηξης καθώς τα υγρά που χρησιμοποιούνται δεν είναι ιδιαίτερα συμπιεσιμα. Μια ρήξη σε κάποιο τμήμα του συστήματος μπορεί να οδηγήσει απλώς σε διαρροή.

**Σύστημα εισαγωγής δείγματος** Είναι ένα από τα σημαντικότερα μέρη του συστήματος καθότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Το δείγμα πρέπει να εισάγεται σε πολύ μικρή ποσότητα (10-500μL) ώστε να αποφεύγεται η διεύρυνση των κορυφών και να μην προκαλείται αποσυμπίεση του συστήματος. Η πλέον συνήθης επιλογή είναι η χρήση βρόχων εισαγωγής οι οποίοι μεταφέρουν την καθορισμένη ποσότητα δείγματος προς τη στήλη, ενώ αποβάλουν

την περίσσεια ποσότητα. Σήμερα η εισαγωγή του δείγματος γίνεται και με αυτόματη έγχυση, όπου μια αντλία τύπου σύριγγας μπορεί να πάρει την απαραίτητη ποσότητα δείγματος από φιαλίδιο που βρίσκεται σε ένα περιστρεφόμενο δίσκο και να το προωθήσει στο βρόχο εισαγωγής.

**Στήλη** Το κυριότερο ίσως μέρος του χρωματογραφικού συστήματος, που ορίζει το είδος του διαχωρισμού, είναι η στήλη που περιέχει τη στατική φάση. Οι στήλες είναι σωλήνες μικρής διαμέτρου κατασκευασμένες από ανοξείδωτο χάλυβα, από παχύτοιχο ύαλο ή από κάποιο πολυμερές. Το μήκος του κυμαίνεται συνήθως από 5 έως 25cm, η διάμετρος του από 3 έως 5 mm και η διάμετρος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης από 3 έως 5  $\mu\text{m}$ . Τα πληρωτικό υλικό μίας στήλης μπορεί να αποτελείται είτε από επιφανειακώς καλυπτόμενα σωματίδια είτε από πορώδη σωματίδια. Στην πρώτη περίπτωση, τα σφαιρικά μη πορώδη σωματίδια από ύαλο ή κάποιο πολυμερές έχουν στην επιφάνεια τους λεπτό πορώδες στρώμα από  $\text{SiO}_2$ , αλούμινα, συνθετική ρητίνη ή ιοντοανταλλακτική ρητίνη. Στη δεύτερη περίπτωση τα ίδια υλικά αποτελούν ολόκληρο το πληρωτικό υλικό της στήλης.

Για την αύξηση της ζωής της αναλυτικής στήλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια μικρότερη προστατευτική στήλη, η οποία αφαιρεί τα αιωρούμενα σωματίδια αλλά και κατακρατά συστατικά που συνδέονται με την στατική φάση αναντίστρεπτα. Η προστατευτική αυτή στήλη ονομάζεται προστήλη. Η προστήλη εσωτερικά αποτελείται από παρόμοια υλικά με την αναλυτική στήλη, με μέγεθος σωματιδίων συνήθως μεγαλύτερο. Η προστήλη θυσιάζεται για να προστατέψει την κύρια στήλη που είναι ακριβότερη.

**Ανιχνευτής** Οι ανιχνευτές στην υγρή χρωματογραφία είναι παραδοσιακά αναλυτικά όργανα προσαρμοσμένα σε κυψελίδες ροής. Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχουν είναι: η ικανοποιητική ευαισθησία, η σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, η γραμμική απόκριση επεκτεινόμενη σε περιοχή αρκετών τάξεων μεγέθους, σύντομοι χρόνοι απόκρισης, αξιοπιστία και ευκολία στην χρήση, παρόμοια απόκριση προς όλες τις διαχωριζόμενες ουσίες και να μην καταστρέφει την αναλυόμενη ουσία κατά την ανίχνευση της. Οι συνηθέστεροι ανιχνευτές της HPLC είναι φασματοφωτόμετρα υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας, ανιχνευτές φθορισμού, δείκτη διάθλασης, ηλεκτροχημικοί ή ακόμα και ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών.

## Βιομημητική Χρωματογραφία

Η βιομημητική χρωματογραφία είναι η χρήση της HPLC με στόχο την προσομοίωση βιολογικών διεργασιών και η χρήση των χρωματογραφικών δεικτών για τον υπολογισμό βιολογικών παραμέτρων. Η αρχή της HPLC με βάση την οποία μια ουσία παρουσιάζει μια δυναμική ισορροπία μεταξύ της κινητής και στατικής φάσης, χρησιμοποιείται για να προσομοιάσει τη δυναμική ισορροπία που έχει μια δραστική ουσία στον οργανισμό μεταξύ του αίματος και των ιστών. Αρχικά η βιομημητική χρωματογραφία αναπτύχθηκε σε μια προσπάθεια υπολογισμού της λιποφιλίας των δραστικών ενώσεων και με την πάροδο του χρόνου έχει αποδειχτεί πολύτιμο εργαλείο λόγω του μικρού χρόνου ανάλυσης, της επαναληψιμότητας και της ελάχιστης ποσότητας της ουσίας που απαιτείται για την ανάλυση.

### *Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM)*

Το πρώτο είδος βιομημητικής χρωματογραφίας που μελετήθηκε, ήταν αυτό των Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (Immobilized Artificial Membranes, IAM) που προσομοιώνει το λιπιδικό περιβάλλον μιας ρευστής κυτταρικής μεμβράνης. Οι στήλες IAM έχουν μια στιβάδα ακίνητοποιημένης φωσφατιδυλοχολίνης σε πυριτία που φέρει ομάδες προπυλαμίνης.<sup>12</sup> Η διαδικασία που ακολουθείται μοιάζει με τη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως και η έκλυση των ουσιών γίνεται ισοκρατικά σε pH από 2,5 έως 7,4 ώστε να προσομοιωθεί όλη η πορεία του φαρμάκου από το στομάχι μέχρι την κυκλοφορία του αίματος. Συνήθως, στην κινητή φάση χρησιμοποιείται και κάποιο ποσοστό οργανικού διαλύτη, όπως το ακετονιτρίλιο, για τις ουσίες που δεσμεύονται ισχυρά από την στήλη όπου ο παράγοντας κατακράτησης  $\log k_w$  για την υδατική φάση υπολογίζεται με γραμμική προέκταση των αποτελεσμάτων.

Η κύρια παράμετρος βάσει της οποίας κατανέμονται οι ουσίες στην κινητή και την στατική φάση, είναι η υδροφοβία. Σημαντικό επίσης ρόλο παίζουν και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Τα μοντέλα που προκύπτουν από τεχνικές διαχωρισμού, όπως η χρωματογραφία IAM, μπορούν να συσχετιστούν καλύτερα με βιολογικές διεργασίες με χρήση περισσότερων παραμέτρων όπως το μοριακό βάρος, η πολικότητα, η ικανότητα

σύναψης δεσμών υδρογόνου και το κλάσμα θετικού ή και αρνητικού φορτίου.<sup>13</sup> Ενώ χρησιμοποιείται για να προσομοιώσει την κυτταρική διαπερατότητα η χρωματογραφία IAM μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την προσομοίωση της διαπερατότητας ουσιών από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό<sup>12</sup> (με τη χρήση επιπλέον παραμέτρων) και την απορρόφηση φαρμάκων που χορηγούνται από την στοματική οδό<sup>14</sup>.

### *Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πρωτεϊνική σύνδεση των δραστικών ουσιών έχει πολύ μεγάλη επίδραση στην κατανομή και τη δράση τους. Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής σύνδεσης με μεγαλύτερη ακρίβεια, σε σύγκριση με παραδοσιακές τεχνικές. Οι δύο πρωτεΐνες που διαδραματίζουν το μεγαλύτερο ρόλο στην πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων στο αίμα, η λευκωματίνη του ανθρώπινου ορού και η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη έχουν επιτυχώς ακινητοποιηθεί πάνω σε επιφάνεια πυριτίας, δημιουργώντας έτσι στήλες για υγρή χρωματογραφία HSA και AGP αντίστοιχα.

Η στήλες HSA χρησιμοποιούνται για την μελέτη της πρωτεϊνικής σύνδεσης κυρίως για όξινα και ουδέτερα φάρμακα. Για τις ουσίες εκείνες που εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια με τη στατική φάση και συνδέονται πολύ ισχυρά με αυτήν, γίνεται έκλυση με ποσότητα 2-προπανόλης ή ακετονιτριλίου. Η 2-προπανόλη φαίνεται να μπορεί να προσομοιώσει το φαινόμενο με αρκετά καλή συσχέτιση αποτελεσμάτων ενώ το ακετονιτρίλιο έχει ικανοποιητική συσχέτιση μόνο αν χρησιμοποιηθεί σε χαμηλό ποσοστό. Το ποσοστό της πρωτεϊνικής σύνδεσης από τη λευκωματίνη μπορεί να υπολογισθεί από τον παράγοντα κατακράτησης σε στήλη HSA μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$\%PPB = 100 * \frac{k}{k + 1} \quad (6)^{15}$$

Η δεύτερη πρωτεΐνη που έχει ακινητοποιηθεί πάνω σε πυριτία για την κατασκευή στηλών χρωματογραφίας είναι η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη η οποία λόγω του χαμηλού της ισοηλεκτρικού σημείου, δεσμεύει κυρίως βασικά φάρμακα, ενώ μπορεί να δεσμεύσει και κάποια ουδέτερα και όξινα.<sup>16</sup> Για την έκλυση φαρμάκων με

ισχυρή σύνδεση στη στήλη, προτείνεται η χρήση τόσο 2-προπανόλης όσο και ακετονιτριλίου.

Όσον αφορά την πρωτεϊνική σύνδεση στην α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη, υπάρχει λιγότερη έρευνα σχετικά με τη συσχέτιση του φαινομένου αυτού και της στήλης AGP. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη AGP παρουσιάζει μια ποικιλομορφία στον οργανισμό η οποία δεν ακολουθεί το ίδιο μοτίβο σε όλη τη διάρκεια της ζωής του. Επιπλέον υπάρχουν και πρακτικά θέματα σύμφωνα με τα οποία κατά την ακινητοποίηση της πρωτεΐνης στην πυριτία, μπορεί να επηρεάζεται η ικανότητα της να δρα όπως όταν κυκλοφορεί στο αίμα και έτσι τα αποτελέσματα δεν εγγυώνται τη συσχέτιση με βιβλιογραφικά δεδομένα. Τέλος, δεν υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία γύρω από το φαινόμενο της πρωτεϊνικής σύνδεσης της AGP με δραστικές ουσίες, συνεπώς είναι ακόμα δυσκολότερο να γίνουν συσχετίσεις.<sup>12</sup>

Έως σήμερα, οι στήλες AGP έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως για το διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων και λιγότερο για τον υπολογισμό δεδομένων για την πρωτεϊνική σύνδεση.<sup>16</sup> Έτσι υπάρχει αρκετός χώρος για μελέτη της AGP ως προς την πρωτεϊνική σύνδεση δραστικών ενώσεων αλλά και ως προς τη διέλευση τους από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, σε συνδυασμό με την χρωματογραφία IAM.

### *Μικυλλιακή Χρωματογραφία*

Η μικυλλιακή χρωματογραφία, ή αλλιώς χρωματογραφία βιοκατανομής, μιμείται τη συμπεριφορά βιολογικών φραγμών και τη συμπεριφορά των δραστικών ενώσεων στο ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο υγρό. Το κομμάτι στο οποίο γίνεται η τροποποίηση για να επιτευχθεί η διαδικασία της «μίμησης» δεν είναι η στατική, όπως στα προηγούμενα δύο είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας, αλλά η κινητή φάση.

Για τη μικυλλιακή χρωματογραφία χρησιμοποιείται μια στήλη αντιστρόφου φάσεως και μια κινητή φάση στην οποία έχουν σχηματιστεί μικύλλια. Το μικύλλιο είναι ένα σωματίδιο σε μέγεθος κολλοειδούς, το οποίο σχηματίζεται στο νερό από τη σύζευξη μορίων ή ιόντων που έχουν ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο άκρο.<sup>17</sup> Για το σχηματισμό των μικυλλίων χρησιμοποιείται κάποια επιφανειοδραστική ένωση πάνω από την κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλιοποίησης (Critical Micellar Concentration, CMC) όπως είναι το Brij 35 (polyoxyethylene (23) lauryl ether) ή το Tween 20



(polysorbate 80) και χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικούς διαλύτες. Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως επιφανειοδραστικά είναι ανιονικές, κατιονικές ή μη ιονικές.

Το επιφανειοδραστικό αναμιγνύεται κατά την παρασκευή της κινητής φάσης. Όταν αυτή ξεκινήσει να ρέει δια μέσου της στήλης, τα μικύλλια απορροφώνται στην επιφάνεια της μη πολικής στήλης. Εν συνεχεία τα μονομερή που ρέουν με την κινητή φάση, ενσωματώνονται στα συμπλέγματα των ροφημένων μικυλλίων. Δημιουργούνται έτσι πολλές αλληλεπιδράσεις και ο μηχανισμός με τον οποίο συγκρατούνται οι αναλυόμενες ουσίες, καταλήγει περίπλοκος.<sup>18</sup> Η αναλυόμενη ουσία βρίσκεται σε ισορροπία ανάμεσα στον κυρίως διαλύτη και τη στατική φάση, ενώ παράλληλα βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ του κυρίως διαλύτη και των μικυλλίων της κινητής φάσης. Οι ιδιότητες της ένωσης που διέπουν το πως αυτή θα κατακρατηθεί τελικά από το σύστημα, είναι η λιποφιλία και τα ηλεκτρονιακά και στεροχημικά χαρακτηριστικά της.

Χαρακτηριστικό αυτού τους είδους χρωματογραφίας είναι η μικρή τοξικότητα των χρησιμοποιούμενων συστατικών/διαλυτών, το χαμηλό κόστος (χρησιμοποιείται μια συμβατική στήλη αντιστρόφου φάσεως εύκολα διαθέσιμη σε όλα τα αναλυτικά εργαστήρια) και η ταυτόχρονη συσχέτιση διαφόρων φαρμακοκινητικών μεγεθών όπως η απορρόφηση από το στόμα, ο όγκος κατανομής και η έκταση της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

## Πειραματικό Μέρος

### Σκοπός

Ο σκοπός του παρόντος πειραματικού μέρους, και ολόκληρης της εργασίας, είναι διπλός. Αναλύεται αρχικά η επίδραση της σύστασης του διαλύτη σε ακετονιτρίλιο (ACN) στην έκλυση των διάφορων δραστικών ουσιών και το κατά πόσο μπορεί να προβλεφθεί ο παράγοντας κατακράτησης σε αμιγώς υδατικό διαλύτη με γραμμική προέκταση των αποτελεσμάτων σε ακετονιτρίλιο. Γίνεται στη συνέχεια προσπάθεια συσχέτισης του παράγοντα κατακράτησης με διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες και διάφορα φαρμακοκινητικά μεγέθη των δραστικών ουσιών.

### Χρωματογραφικό σύστημα

Το πειραματικό μέρος της εργασίας έλαβε χώρα στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών (I) της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Ο υγροχρωματογράφος του εργαστηρίου στον οποίο έγιναν οι μετρήσεις, είναι ο Flexar της PerkinElmer ο οποίος αποτελείται από τρία διακριτά μέρη. Στην κορυφή του συστήματος βρίσκεται το μέρος που διαχειρίζεται τους διαλύτες έκλυσης, την κινητή δηλαδή φάση του συστήματος. Ένα επίπεδο κάτω βρίσκεται η αντλία η οποία προωθεί την κινητή φάση στην στήλη και ήταν ρυθμισμένη στο 1mL/min.



Εικόνα 5: Χρωματογραφικό σύστημα Flexar (PerkinElmer).<sup>19</sup>

Για την εισαγωγή του δείγματος επιλέχθηκε βρόχος 20μL. Στο τελευταίο επίπεδο βρίσκεται ο ανιχνευτής ο οποίος είναι ένα φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού (UV – Vis) ρυθμισμένο να ανιχνεύει στα 220nm.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για να μιμηθεί τη δέσμευση των δραστικών ουσιών με την α1 – όξινη γλυκοπρωτεΐνη του ανθρώπινου αίματος, ήταν η CHIRAL AGP της ChromTech με διαστάσεις 50x4 mm και διάμετρο σωματιδίων 5μm. Στις στήλες AGP η α1 όξινη γλυκοπρωτεΐνη βρίσκεται ακινητοποιημένη σε ένα στρώμα πυριτίας.

Το πρόγραμμα με το οποίο έγιναν οι ρυθμίσεις του χρωματογραφικού συστήματος για την πειραματική διαδικασία και στο οποίο καταγράφηκαν τα γραφήματα με τους διάφορους χρόνους έκλουσης, ήταν το Chromera v. 3.2.0 της PerkinElmer.

### Πειραματική διαδικασία

Το πρώτο βήμα για την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας είναι η παρασκευή της κινητής φάσης. Η κινητή φάση αποτελείται από ένα υδατικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων αναμιγμένο με διάφορες ποσότητες ακετονιτριλίου. Αρχικά ζυγίζονται:

- 0,77g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρείας Chembiotin)
- 3,44g  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρείας Merck)
- 4g  $\text{NaCl}$  (αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρείας Sigma-Aldrich)
- 0,1g  $\text{KCl}$  (αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρείας Merck)

Τα άλατα αυτά αραιώνονται σε 500mL υπερκάθαρου νερού και αναδεύονται με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι να διαλυτοποιηθούν πλήρως. Στη συνέχεια γίνεται η ρύθμιση του pH στην τιμή 7. Παρόλο που το pH του αίματος έχει τιμή 7,4 και θα έπρεπε σε αυτήν την τιμή να γίνονται οι μετρήσεις, η στήλη AGP που χρησιμοποιήθηκε έχει ως ανώτατο όριο pH κινητής φάσης το 7 το οποίο και επέβαλε στην πειραματική διαδικασία.

Το νερό που χρησιμοποιείται σε ένα υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης, πρέπει να είναι υπερκάθαρο, δηλαδή πρέπει να έχει μικρότερη αγωγιμότητα και από

το απιονισμένο νερό. Το νερό αντίστροφης όσμωσης που φτάνει στο εργαστήριο, περνάει αρχικά από φίλτρα στα οποία καθαρίζεται, μειώνεται η αγωγιμότητα του, και είναι πλέον απιονισμένο. Στην συνέχεια το απιονισμένο νερό προωθείται σε μια συσκευή καθαρισμού Thermo Scientific Barnstead Easypure II από την οποία εξέρχεται με αγωγιμότητα  $1 / 18,2 = 0.055 \mu\text{S}/\text{cm}$ , όντας πλέον υπερκάθαρο.



*Εικόνα 6: Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού Easypure II.<sup>20</sup>*

Αφού έχει παρασκευαστεί το υδατικό μέρος του διαλύτη και έχει ρυθμιστεί το pH του, αναμιγνύεται με ακετονιτρίλιο σε ογκομετρική φιάλη των 500mL ( $\geq 99.9\%$ , LC gradient grade, Merck). Οι μετρήσεις έγιναν σε κινητή φάση τεσσάρων διαφορετικών συστάσεων, αμιγώς υδατική κινητή φάση ή αναμιγμένη με 5%, 10% και 15% ACN. Για την παρασκευή των διαλυτών με τα παραπάνω ποσοστά ACN, αρχικά μετρούνται 25, 50 και 75mL αντίστοιχα και τοποθετούνται στην ογκομετρική φιάλη η οποία πληρώνεται με το υδατικό διάλυμα φωσφορικών μέχρι την χαραγή.

Ο έτοιμος πλέον διαλύτης μεταφέρεται σε μια από τις φιάλες του χρωματογράφου, με εξαίρεση μια μικρή ποσότητα που κρατείται για να διαλυτοποιήσει στην συνέχεια τις δραστικές ουσίες. Αφού γίνει η απαερίωση για τυχόν φυσαλίδες αέρα που έχουν περάσει στα σωληνάκια της αντλίας, ενεργοποιείται η αντλία και έτσι η κινητή φάση ρέει μέσα από τη στήλη. Αφήνεται ένα χρονικό διάστημα για να σταθεροποιηθούν οι συνθήκες και το σύστημα να είναι έτοιμο για χρήση.

Κάθε ουσία που χορηγείται στο χρωματογραφικό σύστημα διαλύεται σε έναν μικρό όγκο διαλύτη της κινητής φάσης και στη συνέχεια μια ποσότητα του διαλύματος αυτού χορηγείται χειροκίνητα στο σύστημα εισαγωγής του χρωματογράφου με τη βοήθεια μια σύριγγας. Η ποσότητα που εισάγεται στο σύστημα πρέπει σε κάθε περίπτωση να είναι ίση ή μεγαλύτερη από την ποσότητα που τελικά ο βρόχος οδηγεί προς την στήλη (20μL), καθώς η περίσσεια αποβάλλεται.



*Εικόνα 7: Σύστημα εισαγωγής αναλύμενου δείγματος.*

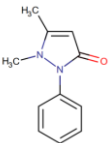
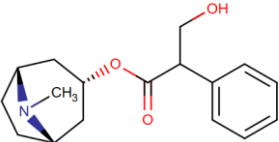
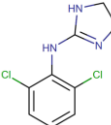
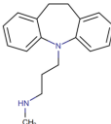
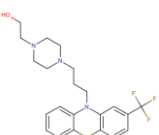
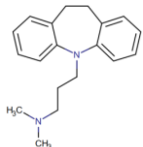
Στην αρχή κάθε μέρας η πρώτη ουσία που αναλύεται είναι το κιτρικό νάτριο το οποίο δεν αλληλεπιδρά με τη στήλη, έτσι ώστε να καταγραφεί ο νεκρός χρόνος. Όλες οι ουσίες που αναλύονται και το κιτρικό νάτριο, εισάγονται τρεις φορές έτσι ώστε να καταγραφούν τρεις χρόνοι ανάσχεσης και να χρησιμοποιηθεί τελικά ο μέσος όρος τους στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

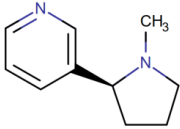
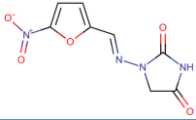
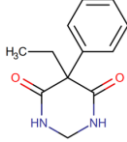
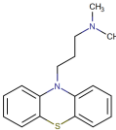
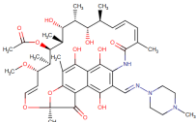
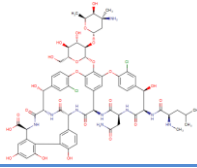
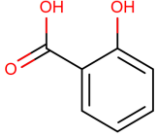
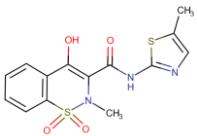
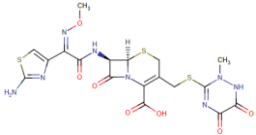
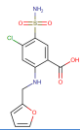
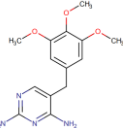
Όλες οι δραστικές ουσίες αναλύθηκαν σε τρεις κινητές φάσεις με σύσταση σε ACN 5%, 10% και 15%. Οι ουσίες εκείνες που κατακρατούνταν λιγότερα ισχυρά από τη στήλη, αναλύθηκαν και σε υδατικό διαλύτη. Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, ουσίες που κατακρατούνται για μεγάλους χρόνους παραμονής, εμφανίζουν πολύ διευρυμένες κορυφές κατά την έξοδο τους. Συνεπώς έχουν χρόνους ανάσχεσης με μεγάλο εύρος σφάλματος ή ακόμα, η καμπύλη τους είναι τόσο διευρυμένη που δύσκολα ανιχνεύεται. Έτσι σε υδατικό διαλύτη αναλύθηκαν μόνο οι ουσίες που μπορούσαν να δώσουν αξιόπιστα αποτελέσματα.

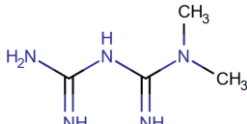
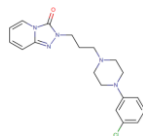
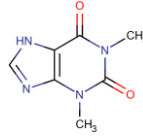
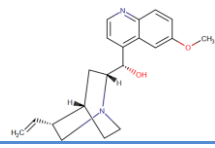
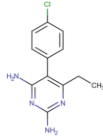
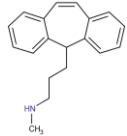
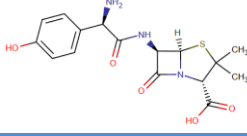
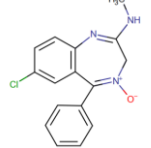
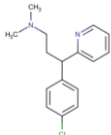
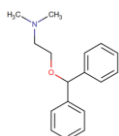
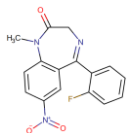
## Δραστικές ουσίες που αναλύθηκαν

Με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω αναλύθηκαν 36 φάρμακα. Τα φάρμακα αυτά αναλύθηκαν είτε σε καθαρή μορφή, έχοντας αγοραστεί ως πρότυπες ενώσεις από την Sigma-Aldrich, είτε σε συνδυασμό με διάφορα έκδοχα, έχοντας αγοραστεί σε μορφή φαρμακευτικών σκευασμάτων. Οι ουσίες που αναλύθηκαν καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα τόσο ως προς την δράση τους, όσο και ως προς το μέγεθος τους. Τα φάρμακα που αναλύθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

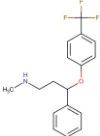
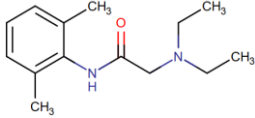
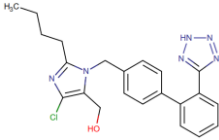
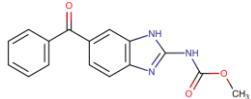
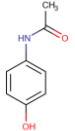
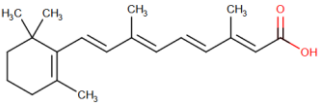
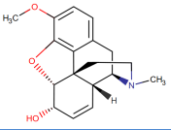
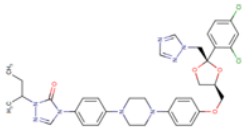
Πίνακας 1: Δραστικές ουσίες που αναλύθηκαν

Δραστική ουσία	Φαρμακολογική Δράση	Δομή
Antipyrene (Αντιπυρίνη)	Αναλγητικό / Αντιπυρετικό	
Atropine (Ατροπίνη)	Αντιχολινεργικό	
Clonidine (Κλονιδίνη)	Αντιεπιληπτικό	
Desipramine (Δεσιπραμίνη)	Αντικαταθλιπτικό	
Fluphenazine (Φλουφαιναζίνη)	Αντιψυχωσικό	
Imipramine (Ιμιπραμίνη)	Αντικαταθλιπτικό	

Nicotine (Νικοτίνη)	Διεγερτικό του ΚΝΣ	
Nitrofurantoin (Νιτροφουραντοΐνη)	Αντιβιοτικό	
Primidone (Πριμιδόνη)	Αντισπασμωδικό	
Promazine (Προμαζίνη)	Αντιψυχωσικό	
Rifampicin (Ριφαμπικίνη)	Αντιβιοτικό	
Vancomycin (Βανκομυκίνη)	Αντιβιοτικό	
Salicylic acid (Σαλικυλικό Οξύ)	Αντιφλεγμονώδες	
Meloxicam (Μελοξικάμη)	Αντιφλεγμονώδες	
Ceftriaxone (Κεφτριαζόνη)	Αντιβιοτικό	
Furosemide (Φουροσεμίδα)	Διουρητικό	
Trimethoprim (Τριμεθοπρίμη)	Αντιβακτηριδιακό	

Metformin (Μετφορμίνη)	Αντιδιαβητικό	
Trazodone (Τραζοδόνη)	Αντικαταθλιπτικό	
Theophylline (Θεοφυλλίνη)	Βρογχοδιασταλτικό	
Quinidine (Κινιδίνη)	Αντιαρρυθμιακό	
Pyrimethamine (Πυριμεθαμίνη)	Ανθελονοσιακό	
Protriptyline (Προτριπτυλίνη)	Αντικαταθλιπτικό	
Amoxicillin (Αμοξικιλίνη)	Αντιβιοτικό	
Chlordiazepoxide (Χλωροδιαζεποξείδη)	Αγχολυτικό	
Chlorpheniramine (Χλωροφαιναμίνη)	Αντιισταμινικό	
Diphenhydramine (Διφαινυδραμίνη)	Αντιισταμινικό	
Flunitrazepam (Φλουνιτραζεπάμη)	Αγχολυτικό	



Fluoxetine (Φλουοξετίνη)	Αντικαταθλιπτικό	
Lidocaine (Λιδοκαΐνη)	Τοπικό αναισθητικό	
Losartan (Λοσαρτάνη)	Αντιυπερτασικό	
Mebendazole (Μεμπενδαζόλη)	Αντιελμινθικό	
Paracetamol (Παρακεταμόλη)	Αναλγητικό	
Retinoic Acid (Ρετινοϊκό οξύ)	Δράση κατά της ακμής	
Codein (Κωδεΐνη)	Αναλγητικό	
Itraconazole (Ιτρακοναζόλη)	Αντιμυκητιακό	

### Φυσικοχημικές ιδιότητες δραστικών ουσιών

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται βιβλιογραφικά δεδομένα που βρέθηκαν για τις δραστικές ουσίες που αναλύθηκαν. Για κάθε ουσία έχει καταγραφεί η φύση της (αν είναι οξύ: A, βάση: B, ουδέτερη ένωση: N ή αμφολύτης: Z), το μοριακό της βάρος (σε g/mol), ο συντελεστής μερισμού και κατανομής (logP και logD) και τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου ( $F^+$  και  $F^-$ ). Σημειώνεται ότι οι

τρεις τελευταίες ιδιότητες που εξαρτώνται από το pH, έχουν ληφθεί για τιμή pH ίση με 7.4. Τα δεδομένα αυτά συλλέχθηκαν με την βοήθεια του λογισμικού ADME Boxes v.3.0., της εταιρείας Pharma Algorithms Inc.

*Πίνακας 2: Φυσικοχημικές ιδιότητες των δραστικών ουσιών που αναλύθηκαν.*

Δραστική Ουσία	Φύση	M.B.	logP	logD	F <sup>+</sup>	F <sup>-</sup>
Antipyrine	N	188.2	0.38	0.38	0	0
Atropine	B	289.4	1.83	-0.41	0.996	0
Clonidine	B	230.1	1.59	0.97	0.779	0
Desipramine	B	266.4	4.9	2.28	0.999	0
Fluphenazine	B	437.5	4.36	3.82	0.737	0
Imipramine	B	280.4	4.8	2.83	0.991	0
Nicotine	B	162.2	1.13	0.26	0.875	0
Nitrofurantoin	A	238.2	-0.47	-0.77	0	0.473
Primidone	N	218.3	0.91	0.91	0	0
Promazine	B	284.4	4.55	2.58	0.991	0
Rifampicin	B	822.9	2.7	1.99	0.635	0.041
Vancomycin	Z	1449.3	2.48	1.94	0	0.125
Salicylic acid	A	138.1	2.26	-1.67	0	1
Meloxicam	A	351.4	3.02	0.09	0	0.999
Ceftriaxone	Z	554.6	-0.46	-3.08	0	0.221
Furosemide	A	330.7	2.03	-0.69	0	1
Trimethoprim	B	290.3	0.91	0.74	0.469	0
Metformin	B	129.2	-0.91	-3.91	1	0
Trazodone	N	371.9	2.9	2.54	0.218	0
Theophylline	N	180.2	-0.02	-0.02	0	0
Quinidine	B	324.4	3.44	2.41	0.946	0

Pyrimethamine	B	248.7	2.69	2.44	0.584	0
Protriptyline	B	263.4	4.89	1.36	0.875	0
Amoxicillin	A	365.4	-1.71	-2.56	0	0.531
Chlordiazepoxide	N	299.8	2.44	2.44	0.002	0
Chlorpheniramine	B	274.8	3.39	1.58	0.986	0
Diphenhydramine	B	255.4	3.4	1.29	0.965	0
Flunitrazepam	N	313.3	2.06	2.06	0	0
Fluoxetine	B	309.3	4.26	1.82	0.997	0
Lidocaine	B	234.3	2.26	1.71	0.779	0
Losartan	A	422.9	3.09	1.16	0	0.933
Mebendazole	N	295.3	2.83	2.83	0.004	0.002
Paracetamol	N	151.2	0.51	0.51	0	0
Retinoic Acid	A	300.4	6.3	4.2	0	0.999
Codein	B	299.7	1.14	0.37	0.848	0
Itraconazole	N	705.6	5.66	5.66	0.011	0

### Τιμές logkw για διάφορα είδη βιομημητικής χρωματογραφίας

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές logkw για χρωματογραφία ακινητοποιημένης ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA), ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM) και μικυλλιακής χρωματογραφίας με χρήση του Brij 35 και του Tween 20 ως επιφανειοδραστικό αντίστοιχα. Τα δεδομένα για τη χρωματογραφία IAM, λήφθηκαν από τις δημοσιεύσεις 23, 24 και 14 καθώς και από δεδομένα του εργαστηρίου που δεν έχουν δημοσιευτεί ακόμα. Για τη χρωματογραφία HSA τα δεδομένα προήλθαν από την δημοσίευση 25 και από δεδομένα του εργαστηρίου που δεν έχουν δημοσιευτεί ακόμα. Για την μικυλλιακή χρωματογραφία με το Brij 35, τα δεδομένα λήφθηκαν από την δημοσίευση 22 ενώ για την χρωματογραφία με το Tween 20, από τις διπλωματικές εργασίες 26 και 27.

Πίνακας 3: Τιμές  $\log k_w$  από διάφορα είδη βιομημητικής χρωματογραφίας, για τις δραστικές ουσίες που αναλύθηκαν.

Δραστική Ουσία	$\log k_{w_{HSA}}$	$\log k_{w_{HSA}^{10\%}}$	$\log k_{w_{IAM}}$	$\log k_{w_{Brij}}$	$\log k_{w_{Tween}}$
Antipyrine	-	-	-	-	-0.013
Atropine	-	-	-	-	0.11
Clonidine	-	-	-	-	-
Desipramine	-	-	-	-	2.49
Fluphenazine	-	-	-	-	2.238
Imipramine	-	-	-	-	1.952
Nicotine	-	-	-	-	0.41
Nitrofurantoin	-	-	-	-	0.137
Primidone	-	-	-	-	0.724
Promazine	-	-	-	-	1.785
Rifampicin	-	-	-	-	-
Vancomycin	-	-	1.23	-0.296	-0.328
Salicylic acid	1.13	0.34	-0.3	0.343	0.152
Meloxicam	-	-	1.4	0.908	1.422
Ceftriaxone	-	-	-0.52	-0.624	-0.727
Furosemide	-	-	-	0.856	1.372
Trimethoprim	0.51	-0.19	1.05	0.714	1.075
Metformin	-	-	-0.37	-0.545	-0.634
Trazodone	2.02	0.82	2.34	1.37	2.326
Theophylline	-	-	-0.08	-0.114	-0.469
Quinidine	1	0.29	2.34	1.224	-
Pyrimethamine	1.72	0.78	1.87	1.364	1.957
Protriptyline	1.57	0.84	2.79	1.485	2.245
Amoxicillin	-	-	-0.29	-0.784	-1.266

Chlordiazepoxide	-	-	1.86	1.36	1.827
Chlorpheniramine	1	0.27	2.03	1.226	-
Diphenhydramine	0.7	0.14	1.82	1.171	1.762
Flunitrazepam	1.34	0.26	1.79	1.253	1.483
Fluoxetine	1.65	1.13	2.98	1.635	1.898
Lidocaine	-	-	1.27	0.851	1.391
Losartan	-	-	2.47	0.972	1.479
Mebendazole	1.81	0.69	2.44	1.186	1.015
Paracetamol	-0.2	-0.56	0.18	0.463	0.301
Retinoic Acid	-	-	-	-	-
Codein	-	-	-	-	-
Itraconazole	-	-	-	-	-

## Αποτελέσματα - Συζήτηση

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές του παράγοντα κατακράτησης για τις διάφορες κινητές φάσεις όπως υπολογίσθηκαν από τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας.

*Πίνακας 4: Τιμές logk για τις διάφορες κινητές φάσεις.*

Φάρμακα	logk			logkw	
	5% ACN	10% ACN	15% ACN	Υδατική φάση	
				Απευθείας Μέτρηση	Γραμμική Προεκβολή
Antipyrine	-0.142 ±0.01	-0.421 ±0.02	-0.577 ±0.03	0.348 ±0.02	0.055 ±0.01
Atropine	0.166 ±0.01	-0.025 ±0.01	-0.221 ±0.01	0.531 ±0.03	0.360 ±0.02
Clonidine	0.389 ±0.02	0.169 ±0.01	0.051 ±0.01	0.746 ±0.04	0.540 ±0.03
Desipramine	1.360 ±0.07	0.940 ±0.05	0.547 ±0.03	-	1.762 ±0.09
Fluphenazine	1.994 ±0.10	1.394 ±0.07	0.881 ±0.04	-	2.536 ±0.13
Imipramine	1.451 ±0.07	0.938 ±0.05	0.605 ±0.03	-	1.845 ±0.09
Nicotine	-0.210 ±0.01	-0.240 ±0.01	-0.383 ±0.02	-0.088 ±0.01	-0.104 ±0.01
Nitrofurantoin	-0.460 ±0.02	-0.499 ±0.02	-0.686 ±0.03	-0.351 ±0.02	-0.322 ±0.02
Primidone	-0.208 ±0.01	-0.332 ±0.02	-0.533 ±0.03	0.290 ±0.01	-0.033 ±0.00
Promazine	1.551 ±0.08	1.124 ±0.06	0.670 ±0.03	-	1.997 ±0.10
Rifampicin	0.285 ±0.01	-0.076 ±0.01	-0.339 ±0.02	0.955 ±0.05	0.581 ±0.03
Vancomycin	0.580 ±0.03	0.383 ±0.02	0.085 ±0.01	0.900 ±0.05	0.846 ±0.04
Salicylic acid	-0.619 ±0.03	-0.774 ±0.04	-0.856 ±0.04	-0.408 ±0.02	-0.513 ±0.03
Meloxicam	0.593 ±0.03	0.167 ±0.01	-0.261 ±0.01	1.266 ±0.06	1.021 ±0.05
Ceftriaxone	-0.842 ±0.04	-1.028 ±0.05	-1.121 ±0.06	-0.788 ±0.04	-0.718 ±0.04
Furosemide	0.017 ±0.01	-0.144 ±0.01	-0.487 ±0.02	0.471 ±0.02	0.299 ±0.01
Trimethoprim	0.157 ±0.01	-0.033 ±0.01	-0.299 ±0.01	0.651 ±0.03	0.397 ±0.02
Metformin	-0.474 ±0.02	-0.485 ±0.02	-0.514 ±0.03	-0.422 ±0.02	-0.451 ±0.02
Trazodone	1.065 ±0.05	0.659 ±0.03	0.173 ±0.01	-	1.525 ±0.08
Theophylline	-0.831 ±0.04	-0.878 ±0.04	-0.861 ±0.04	-0.694 ±0.03	-0.827 ±0.04

Quinidine	0.904 ±0.05	0.552 ±0.03	0.260 ±0.01	-	1.217 ±0.06
Pyrimethamine	0.720 ±0.04	0.482 ±0.02	0.186 ±0.01	1.157 ±0.06	0.997 ±0.05
Protriptyline	1.220 ±0.06	0.865 ±0.04	0.545 ±0.03	-	1.551 ±0.08
Amoxicillin	-1.284 ±0.06	-1.703 ±0.09	-1.891 ±0.09	-1.477 ±0.07	-1.020 ±0.05
Chlordiazepoxide	1.064 ±0.05	0.632 ±0.03	0.169 ±0.01	-	1.517 ±0.08
Chlorpheniramine	0.799 ±0.04	0.434 ±0.02	0.165 ±0.01	-	1.100 ±0.06
Diphenhydramine	0.871 ±0.04	0.439 ±0.02	0.188 ±0.01	1.698 ±0.08	1.183 ±0.06
Flunitrazepam	0.620 ±0.03	0.229 ±0.01	-0.058 ±0.01	1.122 ±0.06	0.942 ±0.05
Fluoxetine	1.181 ±0.06	0.821 ±0.04	0.449 ±0.02	-	1.549 ±0.08
Lidocaine	0.705 ±0.04	0.225 ±0.01	-0.003 ±0.01	1.564 ±0.08	1.017 ±0.05
Losartan	1.408 ±0.07	0.603 ±0.03	-0.011 ±0.01	-	2.086 ±0.10
Mebendazole	0.796 ±0.04	0.483 ±0.02	0.206 ±0.01	1.389 ±0.07	1.086 ±0.05
Paracetamol	-0.499 ±0.02	-0.483 ±0.02	-0.623 ±0.03	-0.345 ±0.02	-0.412 ±0.02
Retinoic Acid	-0.434 ±0.02	-0.484 ±0.02	-0.575 ±0.03	-0.362 ±0.02	-0.357 ±0.02
Codein	0.228 ±0.01	0.005 ±0.01	-0.134 ±0.01	0.612 ±0.03	0.395 ±0.02
Itraconazole	1.746 ±0.09	1.184 ±0.06	0.603 ±0.03	-	2.320 ±0.12

Για τις δραστικές ουσίες που δεν έγινε μέτρηση με υδατική φάση, παρουσιάζεται τιμή υδατική φάσης που έχει υπολογισθεί από γραμμική προεκβολή ενώ για αυτές που έγινε μέτρηση παρουσιάζεται και η τιμή που προέκυψε από την μέτρηση και αυτή από την γραμμική προεκβολή.

### Σύγκριση τιμών $\log k_{w\text{πειραματικό}}$ και $\log k_{w\text{γρ.προεκβολής}}$

Για τα φάρμακα που υπάρχουν και οι δύο τιμές, βρέθηκε το μέγεθος της απόκλισης της υπολογιζόμενης τιμής από την πειραματική.

*Πίνακας 5: Διαφορά πειραματικού  $\log k_w$  από το υπολογιζόμενο.*

Φάρμακα	Διαφορά
Antipyrine	0.293
Atropine	0.171

Clonidine	0.205
Nicotine	0.016
Nitrofurantoin	-0.029
Primidone	0.323
Rifampicin	0.375
Vancomycin	0.054
Salicylic acid	0.105
Meloxicam	0.245
Ceftriaxone	-0.069
Furosemide	0.173
Trimethoprim	0.253
Metformin	0.029
Theophylline	0.132
Pyrimethamine	0.161
Amoxicillin	-0.458
Diphenhydramine	0.515
Flunitrazepam	0.180
Lidocaine	0.545
Mebendazole	0.303
Paracetamol	0.067
Retinoic Acid	-0.005
Codein	0.217

Στον πίνακα 5 φαίνεται ότι η απόκλιση από την πειραματική τιμή είναι συνήθως θετική, καθώς έχει θετικό πρόσημο για 20 από τα 24 φάρμακα, δηλαδή για το 83.3% του δείγματος. Προκύπτει έτσι το συμπέρασμα ότι χρησιμοποιώντας τη γραμμική προέκταση είναι πιο πιθανό να υπολογιστεί μικρότερος παράγοντας κατακράτησης από τον πραγματικό.



Όσον αφορά το μέγεθος της απόκλισης παρατηρούνται τρία φάρμακα με ακραία απόκλιση σε σχέση με τα υπόλοιπα, η αμοξικιλίνη (-0.458), η διφαινυδραμίνη (0.515) και η λιδοκαΐνη (0,545). Για τα υπόλοιπα φάρμακα των οποίων οι αποκλίσεις είναι πλησιέστερες, παρατηρείται μέσο όρο απόκλισης, 0.152 από την πραγματική τιμή.

## Συσχέτιση παράγοντα κατακράτηση $\log_{kw}$ με το συντελεστή μερισμού $\log P$

Η συσχέτιση των παραμέτρων  $\log_{kw}$  και  $\log P$ , όπως και όλες οι συσχετίσεις που γίνονται παρακάτω, έγιναν με την βοήθεια του λογισμικού SPSS Statistics 17.0 και ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης. Σε κάθε ανάλυση καταγράφεται η εξίσωση που προκύπτει και σημειώνονται οι εξής παράμετροι:

- N: αριθμός των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν
- $R^2$ : ο συντελεστής συσχέτισης
- s: η τυπική απόκλιση
- F-test

Για κάθε συσχέτιση ελέγχεται αν υπάρχουν δεδομένα “outliers”, δηλαδή δεδομένα που η πραγματική τιμή της παραμέτρου τους και η τιμή που υπολογίζεται από το μοντέλο, είναι μεγαλύτερη από μια ορισμένη τιμή. Αυτή η τιμή ορίζεται ως  $3s$ , δηλαδή το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης. Τότε, το μοντέλο υπολογίζεται ξανά, χωρίς αυτές τις ακραίες τιμές. Αυτό γίνεται για να μην επηρεαστεί το τελικό αποτέλεσμα από τιμές που έχουν ληφθεί με τυχόν λανθασμένη μέτρηση κατά την πειραματική διαδικασία ή από ουσίες που έχουν ένα διαφορετικό προφίλ και δεν υπακούουν στο μοντέλο.

Εφαρμόζοντας την ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης για όλα τα δεδομένα, ορίστηκε εξαρτημένη μεταβλητή το  $\log_{kw}$  το πειραματικό, για τις ουσίες που υπάρχει, και το  $\log_{kw}$  από την γραμμική προεκβολή, για τις ουσίες που δεν μετρήθηκε πειραματικά και ανεξάρτητη μεταβλητή το  $\log P$ . Έτσι προέκυψε η παρακάτω εξίσωση:

$$\log_{kw} = 0.383 (\pm 0.058) \log P - 0.084 (\pm 0.177) \quad (7)$$

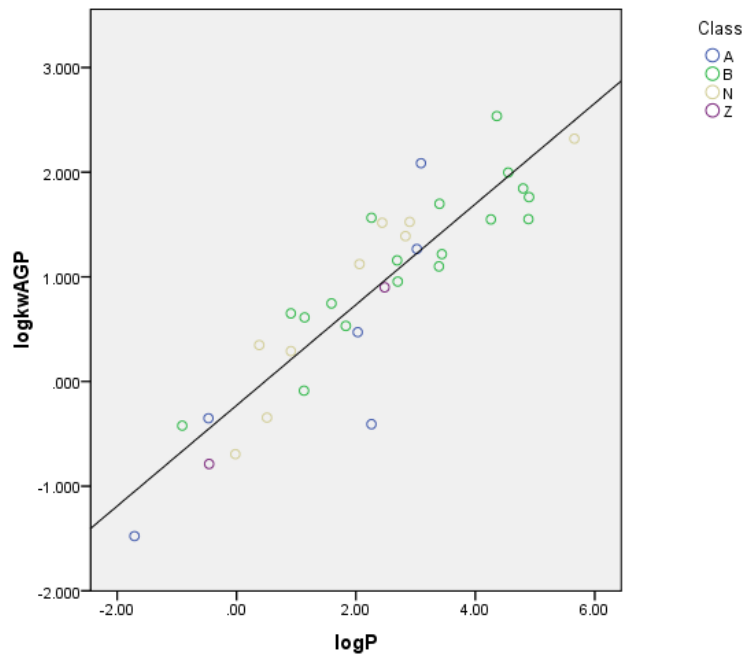
$$(N = 36, R^2 = 0.559, s = 0.658, F = 43.2)$$

Για το μοντέλο αυτό επισημάνθηκε ως έκτροπη τιμή (outlier) το ρετινοϊκό οξύ και συνεπώς η ανάλυση γίνεται ξανά, χωρίς αυτό. Έτσι η τελική μορφή του μοντέλου είναι:

$$\log kw = 0.481 (\pm 0.041) \log P - 0.228 (\pm 0.118) \quad (8)$$

$$(N = 35, R^2 = 0.806, s = 0.433, F = 137)$$

Στην *Εικόνα 8*, απεικονίζεται γραφικά η συσχέτιση των  $\log kw$  και  $\log P$  με τις διάφορες κατηγορίες φαρμάκων (όξινα: A, βασικά: B, ουδέτερα: N, αμφολύτες: Z) να έχουν καταγραφεί με διαφορετικό χρώμα. Το ρετινοϊκό οξύ δεν συμπεριλαμβάνεται στην απεικόνιση.



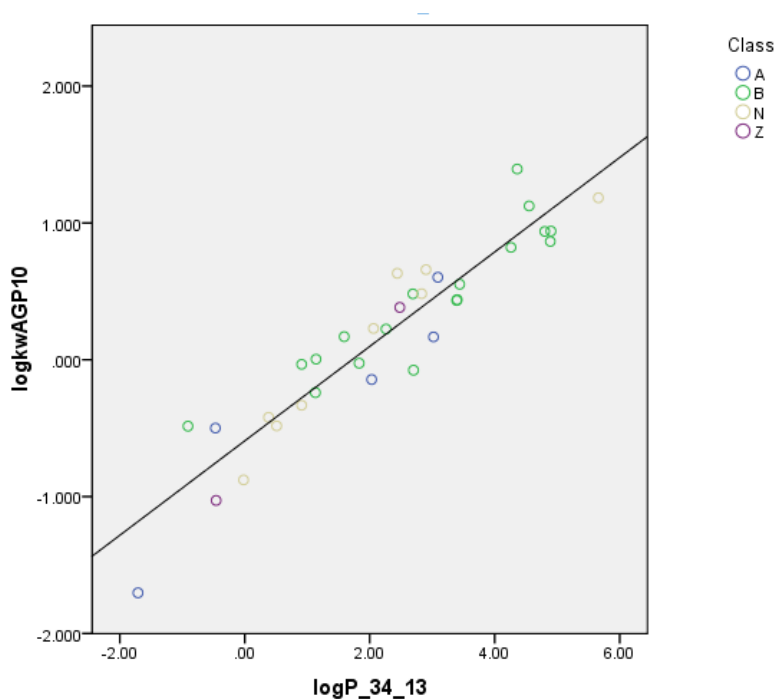
*Εικόνα 8: Γραφική απεικόνιση της συσχέτισης  $\log kw - \log P$ .*

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια βελτίωσης του παραπάνω μοντέλου, ορίζοντας ως επιπλέον εξαρτημένες μεταβλητές τα  $F^+$  και  $F^-$ , τα κλάσματα δηλαδή θετικού και αρνητικού φορτίου. Και οι δύο όμως μεταβλητές δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές, δίνοντας  $\text{sig} > 0.05$ . Για να θεωρηθεί μια παράμετρος στατιστικά σημαντική θα πρέπει  $\text{sig} \leq 0.05$ , για επίπεδο σημαντικότητας 95%. Τότε θεωρείται ότι υπάρχει μικρότερη πιθανότητα από 5% η μεταβλητή να λάβει μια τυχαία τιμή.

Τέλος, δοκιμάστηκε η συσχέτιση του παράγοντα κατακράτησης της στήλης AGP, αυτή τη φορά σε περιβάλλον με 10% ακετονιτρίλιο, με το συντελεστή  $\log P$ . Και σε αυτήν την περίπτωση το ρετινοϊκό οξύ ήταν εκτός ορίων. Αφαιρώντας το από το αναλυόμενο δείγμα δεδομένων, βρίσκεται εκτός ορίων και το σαλικυλικό οξύ. Έτσι παρουσιάζεται η συσχέτιση χωρίς αυτά στην εξίσωση (9).

$$\log k^{10\%} = 0.345 (\pm 0.023) \log P - 0.592 (\pm 0.066) \quad (9)$$

$$(N = 34, R^2 = 0.877, s = 0.241, F = 228)$$



Εικόνα 9: Γραφική απεικόνιση της συσχέτισης  $\log k^{10\%} - \log P$ .

Στην συσχέτιση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική η προσθήκη των όρων  $F^+$  και  $F^-$ .

Συγκρίνοντας τα δύο τελικά μοντέλα σε κάθε περίπτωση, προκύπτουν δύο συμπεράσματα: Οι παράμετροι  $F^+$  και  $F^-$  δεν μπορούν σε καμία περίπτωση να βελτιώσουν τις συσχετίσεις και χρησιμοποιώντας τις τιμές κατακράτησης σε περιβάλλον με 10% ACN, μπορεί να προκύψει μοντέλο με καλύτερο συντελεστή συσχέτισης από ότι αν χρησιμοποιηθούν οι τιμές από αμιγώς υδατικό περιβάλλον.

### Συσχέτιση παράγοντα κατακράτησης $\log kw$ με το συντελεστή κατανομής $\log D$

Εφαρμόζοντας την πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης για τη συσχέτιση του  $\log kw$  και του  $\log D$  αρχικά χρησιμοποιήθηκαν όλα τα δεδομένα. Έτσι προέκυψε η παρακάτω εξίσωση.

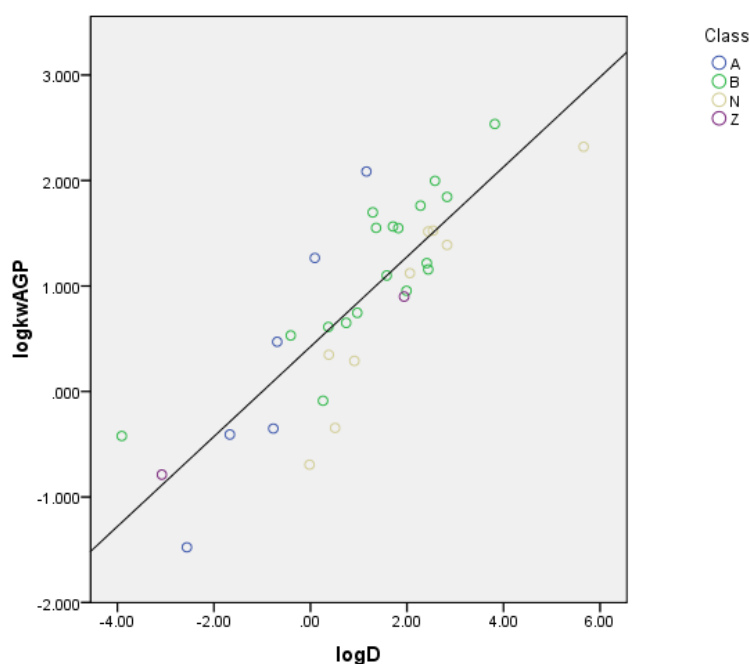
$$\log kw = 0.367 (\pm 0.057) \log D + 0.419 (\pm 0.128) \quad (10)$$

$$(N = 36, R^2 = 0.546, s = 0.668, F = 41,0)$$

Και σε αυτήν την περίπτωση το ρετινοϊκό οξύ επισημάνθηκε ως έκτροπη τιμή και συνεπώς το μοντέλο επιχειρείται ξανά, χωρίς αυτό. Έτσι:

$$\log kw = 0.426 (\pm 0.047) \log D + 0.425 (\pm 0.101) \quad (11)$$

$$(N = 35, R^2 = 0.713, s = 0.528, F = 81.9)$$



Εικόνα 10: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log kw - \log D$ .

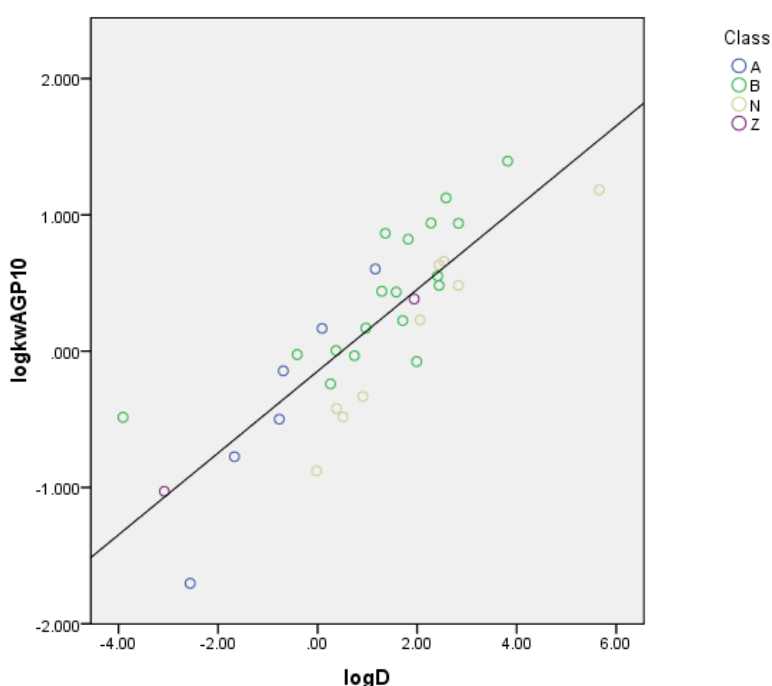
Σύμφωνα με το συντελεστή συσχέτισης  $R^2$ , προκύπτει ότι για τα 35 από τα 36 φάρμακα που αναλύθηκαν γίνεται καλύτερη συσχέτιση για 100% υδατικό περιβάλλον με την παράμετρο  $\log P$  από ότι με τη  $\log D$ .

Και σε αυτήν την περίπτωση έγινε προσπάθεια βελτίωσης του μοντέλου εισάγοντας τις παραμέτρους  $F^+$  και  $F^-$  οι οποίες όμως αποδείχτηκαν στατιστικά μη σημαντικές.

Στη συνέχεια, δοκιμάστηκε ξανά η συσχέτιση των δεδομένων σε 10% ACN με το συντελεστή  $\log D$ . Το ρετινοϊκό οξύ δεν χρησιμοποιήθηκε στο μοντέλο καθώς κρίθηκε outlier. Έτσι, προέκυψε η εξίσωση:

$$\log k^{10\%} = 0.300 (\pm 0.033) \log D - 0.147 (\pm 0.072) \quad (12)$$

$$(N = 35, R^2 = 0.710, s = 0.375, F = 80.6)$$



Εικόνα 11: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log k^{10\%} - \log D$ .

Παρατηρείται ότι ο συντελεστής συσχέτισης έχει πολύ μικρές διαφορές για τις εξισώσεις (11) και (12). Έτσι, στην περίπτωση του συντελεστή κατανομής  $\log D$ , δεν υπάρχει διαφορά αν τα δεδομένα είναι από υδατική φάση ή από κινητή φάση με 10% ACN.

Η προσθήκη των παραμέτρων  $F^+$  και  $F^-$  δε βοήθησαν στη βελτιστοποίηση του μοντέλου καθώς δεν έδωσαν στατιστικά σημαντικές τροποποιήσεις στην εξίσωση.

Τέλος, εξετάζοντας συνολικά τη συσχέτιση των χρωματογραφικών αποτελεσμάτων με δεδομένα λιποφιλίας και συγκρίνοντας τις συσχετίσεις των εξισώσεων (8), (9), (11) και (12) φαίνεται ότι καλύτερη συσχέτιση έχουν τα αποτελέσματα σε περιβάλλον 10% ACN όταν συσχετίζονται με το συντελεστή μερισμού  $\log P$ .

## Συσχέτιση παράγοντα κατακράτησης μεταξύ διαφορετικών στηλών

### Συσχέτιση με χρωματογραφία HSA

Η πρώτη συσχέτιση αφορά τον παράγοντα κατακράτησης από τη στήλη AGP και τον παράγοντα κατακράτησης από στήλη HSA σε 100% υδατική φάση, όπως βρέθηκε βιβλιογραφικά. Έτσι, προέκυψε η εξίσωση:

$$\log kw_{AGP} = 0.682 (\pm 0.279) \log kw_{HSA} + 0.207 (\pm 0.372) \quad (13)$$

$$(N = 12, R^2 = 0.374, s = 0.588, F = 5.97)$$

Σε αυτήν την περίπτωση είναι προφανές ότι δεν γίνεται καλή συσχέτιση μεταξύ των δεδομένων καθώς η τιμή του  $R^2$  είναι πολύ χαμηλή. Επίσης, λόγω ελλιπών βιβλιογραφικών δεδομένων, είναι πολύ μικρός ο αριθμός του δείγματος που αναλύεται και αυτό δυσχεραίνει την μοντελοποίηση των παραμέτρων. Προσθέτοντας του όρους  $F^-$  και  $F^+$ , προκύπτει η σχέση (13) με πολύ καλύτερο συντελεστή συσχέτισης. Ο όρος  $F^+$  θεωρείται στατιστικά μη σημαντικός και παραλείπεται από την εξίσωση.

$$\log kw_{AGP} = 0.667 (\pm 0.196) \log kw_{HSA} - 1.505 (\pm 0.432) F^- + 0.344 (\pm 0.271) \quad (14)$$

$$(N = 12, R^2 = 0.755, s = 0.411, F = 8.22)$$

Σε μια προσπάθεια βελτίωσης της συσχέτισης των αποτελεσμάτων των δύο στηλών, αναλύονται με την ίδια μέθοδο τα αποτελέσματα σε περιβάλλον 10% ACN

και για τις δύο περιπτώσεις. Όντως, σε σχέση με την εξίσωση 13, προκύπτει εξίσωση με λίγο καλύτερη συσχέτιση.

$$\log k_{AGP}^{10\%} = 0.731 (\pm 0.237) \log k_{HSA}^{10\%} + 0.013 (\pm 0.145) \quad (15)$$

$$(N = 12, R^2 = 0.487, s = 0.377, F = 9.48)$$

Τέλος, προστίθενται οι όροι  $F^-$  και  $F^+$  και η ανάλυση γίνεται ξανά. Ο όρος  $F^+$  θεωρείται στατιστικά μη σημαντικός και παραλείπεται από την εξίσωση.

$$\begin{aligned} \log k_{AGP}^{10\%} = & 0.712 (\pm 0.108) \log k_{HSA}^{10\%} - 1.119 (\pm 0.179) F^- \\ & + 0.103 (\pm 0.070) \quad (16) \end{aligned}$$

$$(N = 12, R^2 = 0.916, s = 0.170, F = 29.3)$$

Προκύπτει έτσι μια εξίσωση με πολύ καλό συντελεστή συσχέτισης. Έτσι, κρίνεται σκόπιμο να τονιστεί ότι η σύγκριση και συσχέτιση αποτελεσμάτων από χρωματογραφικές στήλες AGP και HSA γίνεται καλύτερα με δεδομένα σε 10% ACN και συμπεριλαμβάνοντας τον παράγοντα  $F^-$ , το κλάσμα δηλαδή αρνητικού φορτίου.

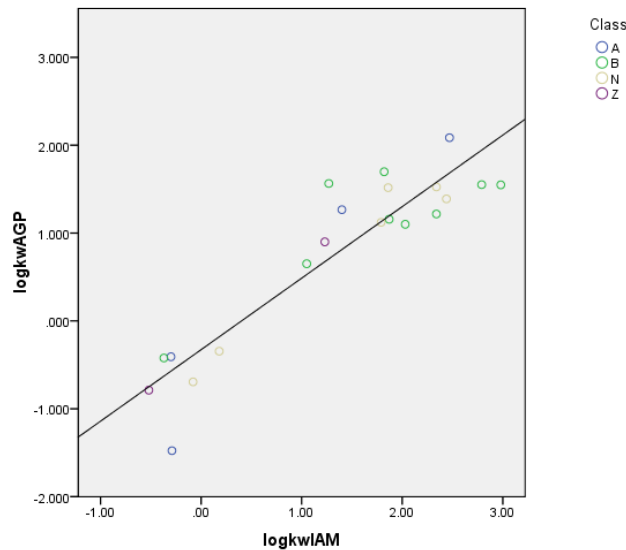
### *Συσχέτιση με χρωματογραφία IAM*

Στην περίπτωση της χρωματογραφίας IAM (αποτελέσματα σε 100% υδατική φάση), η συσχέτιση είναι καλύτερη για 100% υδατική κινητή φάση της χρωματογραφίας AGP και αυτό φαίνεται από τους συντελεστές που συνοδεύουν την εξίσωση (17).

$$\log kw_{AGP} = 0.814 (\pm 0.082) \log kw_{IAM} - 0.327 (\pm 0.143) \quad (17)$$

$$(N = 21, R^2 = 0.838, s = 0.417, F = 98.5)$$

Η παραπάνω συσχέτιση απεικονίζεται γραμμικά στην *Εικόνα 12*.



Εικόνα 12: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log kw_{AGP} - \log kw_{IAM}$

Η προσθήκη των παραμέτρων  $F^+$  και  $F^-$  δεν βοήθησαν στη βελτιστοποίηση του μοντέλου καθώς δεν έδωσαν στατιστικά σημαντικές τροποποιήσεις στην εξίσωση.

### Συσχέτιση με μικυλλιακή χρωματογραφία

Για τη μικυλλιακή χρωματογραφία έγιναν δύο διαφορετικές συσχετίσεις, μια για τα δεδομένα από μικυλλιακή χρωματογραφία με το Brij 35 ως επιφανειοδραστικό και μια για τα δεδομένα με χρήση του Tween 20 ως επιφανειοδραστικό.

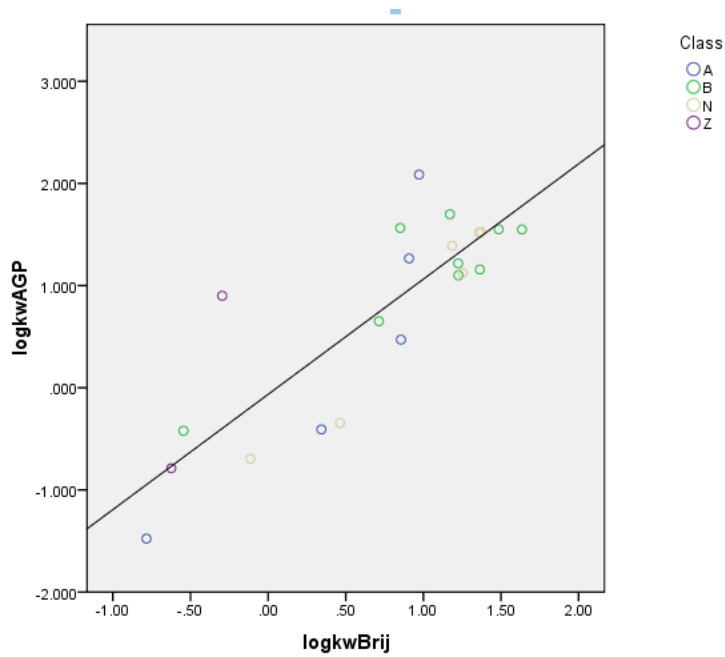
Όσον αφορά τη σύγκριση των δεδομένων  $\log kw$  της χρωματογραφίας AGP και των αντίστοιχων δεδομένων σε 100% υδατική φάση από χρωματογραφία με επιφανειοδραστικό το Brij 35, προέκυψε η εξίσωση (18).

$$\log kw_{AGP} = 1.128(\pm 0.158)\log kw_{Brij} - 0.065(\pm 0.162) \quad (18)$$

$$(N = 22, R^2 = 0.719, s = 0.538, F = 51.1)$$

Οι παράμετροι  $F^+$  και  $F^-$  δεν είχαν στατιστικά σημαντική συνεισφορά στην διαμόρφωση της εξίσωσης.





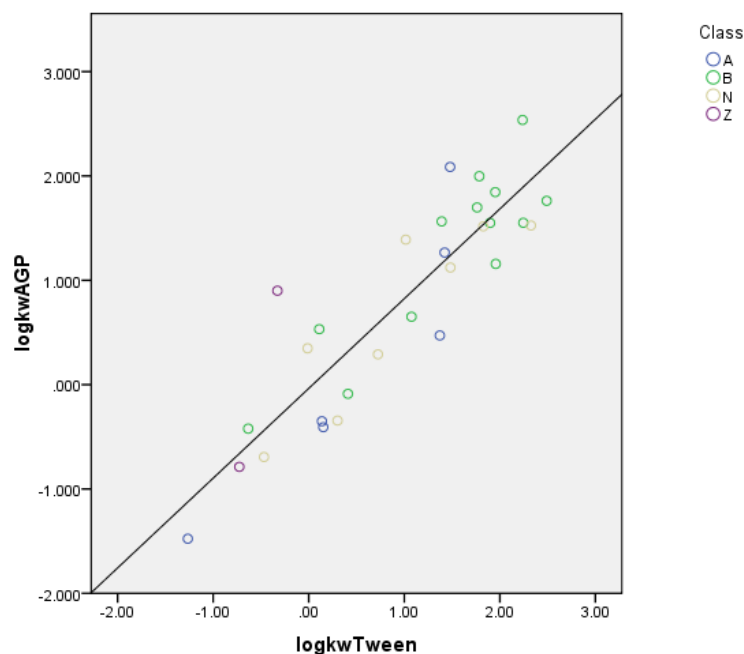
Εικόνα 13: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log kw_{AGP} - \log kw_{Brij}$ .

Στην συνέχεια έγινε η συσχέτιση των παραγόντων κατακράτησης από τη στήλη AGP και την μικυλλιακή χρωματογραφία με τη χρήση του Tween 20 ως επιφανειοδραστικό. Σε αυτήν την περίπτωση η συσχέτιση ήταν ελαφρώς καλύτερη.

$$\log kw_{AGP} = 0.860 (\pm 0.086) \log kw_{Tween} - 0.034 (\pm 0.122) \quad (19)$$

$$(N = 29, R^2 = 0.788, s = 0.418, F = 100)$$

Ακολουθεί η γραφική παράσταση της εξίσωσης στην Εικόνα 14.



Εικόνα 14: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log kw_{AGP} - \log kw_{Tween}$ .

Και σε αυτήν την περίπτωση, οι παράμετροι  $F^+$  και  $F^-$  δεν είχαν στατιστικά σημαντική συνεισφορά στην διαμόρφωση της εξίσωσης.

## Συσχέτιση με Φαρμακοκινητικά μεγέθη

### Πρόβλεψη του Όγκου Κατανομής ( $V_D$ )

Η συσχέτιση μεταξύ όγκου κατανομής και χρωματογραφικών αποτελεσμάτων είναι πιθανότερο να γίνει με ένα μεγαλύτερο δείγμα δεδομένων από τα 36 φάρμακα που αναλύθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Έτσι, οι μετρήσεις συνδυάστηκαν με προηγούμενες μετρήσεις που έγιναν στο εργαστήριο.<sup>28</sup>

Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η τιμή του  $\log k$  παρουσία 10% ακετονιτριλίου επειδή για αυτή την τιμή υπήρχαν περισσότερα δεδομένα από προηγούμενη διπλωματική εργασία.<sup>28</sup>

Επειδή η AGP βρίσκεται σε σχετικά μικρό ποσοστό στο πλάσμα και δεσμεύει ουδέτερα φάρμακα και βάσεις, τέθηκε αυθαίρετα η τιμή  $\log k=0$  για οξέα και για αμφολύτες επειδή αυτά δεν αναμένεται να συγκρατούνται από την AGP. Για βάσεις και ουδέτερα χρησιμοποιήθηκε η πειραματική τους τιμή.

Τα δεδομένα διαιρέθηκαν σε δύο κατηγορίες.

- Τα φάρμακα που θα χρησιμοποιηθούν ως δεδομένα εκμάθησης (training set) για την ανάπτυξη του μοντέλου (περίπου 70-80% των συνολικών φαρμάκων).
- Τα φάρμακα που θα χρησιμοποιηθούν ως δεδομένα ελέγχου (test set). Αυτά δεν θα υπεισέλθουν στο μοντέλο και θα χρησιμοποιηθούν για την επικύρωση το μοντέλου, μέσω σύγκρισης της τιμής που προβλέπει το μοντέλο με την πραγματική τιμή.

Ως δεδομένα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα 22 φάρμακα που είχαν χρησιμοποιηθεί στη δημοσίευση 14 .

Για το τελικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μεταβλητές: ο δείκτης AGP ( $\log k$  παρουσία 10% ακετονιτριλίου) με τιμή 0 για οξέα και αμφολύτες, το κλάσμα θετικού φορτίου  $F^+$  και το κλάσμα αρνητικού φορτίου  $F^-$ .

$$\log V_d = 0.634 (\pm 0.092) \log k_{AGP}^{10\%} + 0.342 (\pm 0.119) F^+ - 0.762 (\pm 0.122) F^- + 0.119 (\pm 0.075) \quad (20)$$

$$(N = 61, R^2 = 0.803, s = 0.308, F = 77.6)$$

Για την επικύρωση του μοντέλου με τα 22 φάρμακα του test σετ, συγκρίθηκε η πραγματική τιμή όπως έχει προσδιοριστεί<sup>14</sup>, με την τιμή που προβλέπεται από το μοντέλο και την εξίσωση 20.

*Πίνακας 6: Πίνακας σύγκρισης πειραματικών και υπολογιζόμενων όγκων κατανομής (Vd)*

Drug	Observed % Vd (L/kg)	Predicted
Ceftriaxone	0,14	0,89
Chloramphenicol	0,96	0,95
Cimetidine	1,12	1,00
Cinoxacin	0,23	0,23
Hydrocortisone	0,54	2,52
Isoxicam		0,23
Levofloxacin	1,38	1,15
Lornoxicam	0,20	0,23
Meloxicam	10,00	0,23
Methylprednisolone	1,26	1,55
Metoclopramide	3,30	3,52
Minoxidil	2,86	1,01
Nadolol	2,00	2,56
Nalidixic acid	0,40	0,25

Niflumic acid		0,23
Omeprazole	0,33	1,85
Pipemidic acid		1,29
Piperacillin	1,35	0,23
Salicylic acid		0,23
Sulpiride		2,09
Vancomycin	0,52	1,06
Warfarin	0,15	0,23

Ως κριτήριο αποδοχής μοντέλου ορίστηκε:

$$0.5 \leq \frac{Vd_{\text{πραγματικό}}}{Vd_{\text{προβλεπόμενο}}} \leq 2$$

Με κόκκινο επισημαίνονται οι μη επιτυχείς προβλέψεις και τελικά σημειώνεται επιτυχία μοντέλου: 12/18 (66.7%)

### Έκταση (ποσοστό) Πρωτεϊνικής Σύνδεσης

Για τη μοντελοποίηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε η φαινόμενη σταθερά συγγένειας φαρμάκου με τις πρωτεΐνες η οποία έχει προταθεί από τη Valkó και συνδέεται με το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης (%PPB) με τη σχέση:

$$\%PPB = 100 * \frac{k}{k + 1} \quad (6)^{15}$$

$$\log k = \log \frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \quad (21)$$

Πάλι από τη βάση δεδομένων, τα 22 φάρμακα που αναφέρθηκαν παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα ελέγχου για την επικύρωση του μοντέλου.

Το τελικό μοντέλο χρησιμοποίησε τις εξής μεταβλητές: τη  $\log k_w$  από τη στήλη HSA, τη  $\log k$  από τη στήλη AGP παρουσία 10% ακετονιτριλίου αφού πρώτα μηδενιστούν τα  $\log k$  για οξέα και αμφολύτες και το κλάσμα αρνητικού φορτίου  $F^-$ .

$$\log k_{PPB} = 0.866 (\pm 0.178) \log k_{AGP}^{10\%} + 0.438 (\pm 0.128) \log k_{HSA} + 1.163 (\pm 0.199) F^- - 0.306 (\pm 0.098) \quad (22)$$

$$(N = 55, R^2 = 0.655, s = 0.542, F = 32.3)$$

Για την επικύρωση του μοντέλου με τα 22 φάρμακα του test σετ, συγκρίθηκε η πραγματική τιμή όπως έχει προσδιοριστεί<sup>14</sup>, με την τιμή που προβλέπεται από το μοντέλο και την εξίσωση 22.

*Πίνακας 7: Πίνακας σύγκρισης πειραματικών και υπολογιζόμενων ποσοστών πρωτεϊνικής σύνδεσης*

Drug	Observed % PPB	Predicted
Ceftriaxone	95,00	45,12
Chloramphenicol	54,00	26,10
Cimetidine	18,50	21,55
Cinoxacin	66,50	87,26
Hydrocortisone	95,00	63,17
Isoxicam	96,00	95,45
Levofloxacin	32,30	46,91
Lornoxicam	99,00	87,43
Meloxicam	99,30	97,80
Methylprednisolone	77,30	51,68
Metoclopramide	33,30	51,89
Minoxidil	0,00	31,81
Nadolol	30,00	27,34
Nalidixic acid	93,00	89,29

Niflumic acid	90,00	96,61
Omeprazole	95,00	65,96
Pipemidic acid	30,00	35,58
Piperacillin	19,00	84,89
Salicylic acid	95,00	87,28
Sulpiride	14,00	27,44
Vancomycin	43,30	52,81
Warfarin	98,75	95,43

Ως κριτήριο αποδοχής του μοντέλου ορίστηκε: Απόκλιση < 25% και τελικά, σημειώνεται επιτυχία μοντέλου: 15/22 (68.2%).

## Συμπεράσματα

- Εφαρμόζοντας την ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης βρέθηκε ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών  $\log k_w$  και των  $\log P$  και  $\log D$ . Το γεγονός ότι ο παράγοντας κατακράτησης σχετίζεται με τη λιποφιλία, υποδεικνύει ότι η βασική αλληλεπίδραση των φαρμακευτικών ενώσεων με την AGP οφείλεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.
- Εξετάζοντας τα αποτελέσματα της συσχέτισης των παραγόντων κατακράτησης από τις στήλες HSA και AGP, φαίνεται ότι υπάρχει κάποια κοινή βάση στις δύο περιπτώσεις πρωτεϊνικής σύνδεσης. Η καλή μεταξύ τους συσχέτιση υποδεικνύει ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις έχουν σημαντικό ρόλο και στις δύο περιπτώσεις. Βέβαια πρέπει να σημειωθεί ότι το δείγμα που αναλύθηκε ήταν περιορισμένο ( $N=12$ ) και συνεπώς τα αποτελέσματα δεν μπορεί να μην είναι αξιόπιστα.
- Όσον αφορά τον όγκο κατανομής, προκύπτει το συμπέρασμα ότι υπάρχει πάρα πολύ καλή συσχέτιση με τον παράγοντα κατακράτησης για περιβάλλον με 10% ACN ( $R^2=0.803$ ) όταν στην εξίσωση συμμετέχουν τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου. Το μοντέλο επικυρώθηκε από την βάση δεδομένων. Συνεπώς η χρωματογραφία με AGP στήλες έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής.
- Η τελευταία συσχέτιση έγινε μεταξύ του παράγοντα κατακράτησης και του ποσοστού της πρωτεϊνικής σύνδεσης, εκφρασμένο ως προς την φαινόμενη σταθερά συγγένειας. Η συσχέτιση που προέκυψε ήταν ικανοποιητική ( $R^2=0.655$ ) και υποδεικνύει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της σταθεράς συγγένειας και του παράγοντα κατακράτησης σε περιβάλλον με 10% ACN, όταν τα δεδομένα αυτά συνδυάζονται με δεδομένα συγκράτησης από στήλη HSA και του κλάσματος αρνητικού φορτίου. Το μοντέλο που δημιουργήθηκε, επικυρώθηκε από την βάση δεδομένων.

## Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η βιομιμητική χρωματογραφία με στήλες AGP έχει μελετηθεί ελάχιστα και συνεπώς είναι υπάρχουν διάφορες προτάσεις για θέματα που μπορούν να διερευνηθούν μελλοντικά.

Μια παράμετρος για την οποία δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα είναι η επίδραση της θερμοκρασίας στην έκλυση των ουσιών από τις στήλες AGP. Προς το παρόν όλα τα δεδομένα αναφέρονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αν και αυτή απέχει από την θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος (37°C). Θα μπορούσε λοιπόν μελλοντικά να γίνει χρήση θερμοστατούμενων στηλών για να διερευνηθεί αν η θερμοκρασία επηρεάζει την έκλυση των ουσιών και αν τελικά η μέτρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για λόγους ευκολίας της πειραματικής διαδικασίας γίνεται εις βάρος των μετρήσεων.

Έπειτα μπορεί να μελετηθεί η επίδραση της σύστασης του ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης. Η επιλογή των συστατικών του ρυθμιστικού διαλύματος στηρίζεται στο ότι τα φωσφορικά ιόντα μπορούν να διατηρούν το pH του διαλύματος σταθερό ενώ το χλωριούχο νάτριο (NaCl) και το χλωριούχο κάλλιο (KCl) χρησιμοποιούνται για να μιμηθούν την ωσμωτικότητα του ανθρώπινου αίματος. Καθώς ένα υδροχρωματογραφικό σύστημα (αντλία, στήλη) επιβαρύνεται από την παρουσία αλάτων στην κινητή φάση, κρίνεται σκόπιμο να εξεταστεί εάν η παράλειψη προσθήκης NaCl/ KCl στην κινητή φάση επηρεάζει τις τιμές  $\log k$  και, συνακόλουθα την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Εάν οι λαμβανόμενες συσχετίσεις και το εξαγόμενο μοντέλο πρόβλεψης δεν επηρεάζονται, η σημαντική μείωση των αλάτων στην κινητή φάση οδηγεί σε μεγαλύτερη διάρκεια ζωής της στήλης και την ελαχιστοποίηση αποθέσεων αλάτων/ διαβρώσεις στα επιμέρους τμήματα του υδροχρωματογραφικού συστήματος

Τέλος οι χρωματογραφικοί δείκτες των στηλών AGP, HSA και IAM μπορούν να εξεταστούν συνδυαστικά. Χρησιμοποιώντας μια στατιστική ανάλυση όπως η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS (Partial Least Squares), μπορεί να γίνει γραμμική συσχέτιση πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα, οι οποίες δεν χρειάζεται να είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους καθώς η τεχνική PLS μειώνει το αρχικό πλήθος μεταβλητών σε ένα περιορισμένο αριθμό νέων μεταβλητών. Έτσι η ταυτόχρονη



ανάλυση πολλών χρωματογραφικών δεικτών μπορεί να κάνει δυνατό τον υπολογισμό περίπλοκων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (όπως η διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό) που δεν μπορούν να προσεγγιστούν από τα αποτελέσματα της κάθε στήλης ξεχωριστά.

## Βιβλιογραφία

1. Δημόπουλος, Β. & Τσαντίλη-Κακουλίδου, Α. *Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων*. (Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015)
2. Κόκοτος, Γ. & Μγκριώτη, Β. *Φαρμακοχημεία*. (Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015)
3. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Grouch, S.R. *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* (Κωσταράκη, 2007)
4. Alsanosi, S. M. M., Skiffington, C. & Padmanabhan S. Chapter 17 - Pharmacokinetic Pharmacogenomics. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*, 341-364 (2014)
5. Jusko, W. J. & Gretch, M. Plasma and Tissue Protein Binding of Drugs in Pharmacokinetics. *Drug Metabolism Reviews*, 43-140 (1976)
6. Diasio, R. B., Chapter 28 – Principals of Drug Therapy. *Goldman's Cecil Medicine (Twenty-Fourth Edition)*, 124-132 (2012)
7. Olson, R. E. & Christ, D. D., Chapter 33. Plasma Protein Binding of Drugs. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 31, 327-336 (1996)
8. Bteich, M., An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. *Heliyon*. 5 (2019)
9. <https://www.rcsb.org/structure/1E78>
10. Fournier, T., Medjoubi-N., N. & Porquet, D. Review Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1482, 157-171 (2000)
11. <https://www.rcsb.org/structure/3kq0>

12. Tsopelas, F., Giaginis, C. & Tsantili-Kakoulidou, Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 12(9), 885-896 (2017)
13. Tsopelas F, Vallianatou T, Tsantili-Kakoulidou, A. Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery. *Expert Opinion Drug Discovery* 11(5), 473–488 (2016)
14. Tsopelas, F., Vallianatou, T. & Tsantili-Kakoulidou, A. The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 81, 82-93 (2016)
15. Valkó, K. L. Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2016)
16. Chrysanthakopoulos, M., Vallianatou, T., Giaginis, C. & Tsantili-Kakoulidou. Investigation of the retention behavior of structurally diverse drugs on alpha acid glycoprotein column: Insight on the molecular factors involved and correlation with protein binding data. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 60, 24-31 (2014)
17. Ebbing, D. & Gammon, S. *Γενική Χημεία*. (Τραυλός, 2002)
18. Ke, J., Duan, X. Y., Liu, X. F. & Dong, Y. M. Isocratic micellar liquid chromatography using mixed anionic and non-ionic surfactants as mobile phase additives for separation of 17 free amino acids. *Chemical Papers*. 73, 2417-2426 (2019)
19. <https://en.oelcheck.com/analyses/test-methods/furan/>
20. <https://www.fishersci.se/shop/products/barnstead-easypure-ii/p-4531548>
21. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. *Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας*. (Π. X. Πασχαλίδης, 2016)
22. F. Tsopelas, P. Danias, A. Pappa & 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* 1621 (2020) 461027
23. F. Tsopelas, N. Malaki, Th. Vallianatou, M. Chrysanthakopoulos, D. Vrakas, M. Ochsenkühn- Petropoulou & A. Tsantili- Kakoulidou, Insight into the retention mechanism on Immobilized Artificial Membrane Chromatography

- using two stationary phases. *Journal of Chromatography A* 1396 (2015) 25-33.
24. D. Vrakas, C. Giaginis & A. Tsantili- Kakoulidou, Electrostatic interactions and ionization effect in immobilized artificial membrane retention. A comparative study with octanol-water partitioning, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 67-78.
25. M. Chrysanthakopoulos, C. Giaginis, A. Tsantili- Kakoulidou, Retention of structurally diverse drugs in human serum albumin chromatography and its potential to simulate plasma protein binding, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5761-5768
26. Λεβεντάκη, Ε., *Εφαρμογή της μικλλιιακής χρωματογραφίας ως εργαλείο για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων υποψηφίων φαρμάκων.* (Φεβρουάριος 2020)
27. Βασιλείου, Κ., *Μελέτη έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων από υδροχρωματογραφία μικκυλίων παρουσία του επιφανειοδραστικού Tween 20 και εφαρμογή στην προσομοίωση βιολογικών διεργασιών.* (Ιούλιος 2020)
28. Νοτάρη, Ε., *Αξιολόγηση της υδροχρωματογραφίας ακινητοποιημένης α1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης για την ταχεία εκτίμηση φαρμακοκινητικών παραμέτρων φαρμακευτικών μορίων,* (Ιούλιος 2019)