Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας Ι: Χημικών Επιστημών

Διπλωματική εργασία

Συμβολή στη μελέτη φαρμακευτικών ενώσεων με χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών και εφαρμογή στην πρόβλεψη εντερικής απορρόφησης φαρμάκων

Φατούρου Λεμονιά – Αγγελική

Επιβλέπων καθηγητής

Τσόπελας Φώτιος

Αθήνα, 2020

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες i
Περίληψη ii
Abstract iv
Ευρετήριο εικόνων – διαγραμμάτων vi
Ευρετήριο πινάκων vii
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1
1.1 Πορεία ανακάλυψης νέων φαρμακευτικών προϊόντων 1
1.2 Φαρμακοκινητική: Απορρόφηση, Κατανομή, Μεταβολισμός, Απέκκριση, Τοξικότητα (ADMET) 8
1.2.1 Απορρόφηση 8
1.2.2 Κατανομή 11
1.2.3 Μεταβολισμός 12
1.2.4 Απέκκριση 14
1.2.5 Τοξικότητα 15
1.3 Ο ρόλος της λιποφιλίας στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ενώσεων 16
1.3.1 Συντελεστής μερισμού P 20
1.3.2 Συντελεστής κατανομής D 22
1.3.3 Λιποφιλία αμφολυτών 25
1.3.4 Πειραματικός προσδιορισμός των συντελεστών μερισμού, logP, και κατανομής, logD 26
1.3.4.1 Άμεσες μέθοδοι προσδιορισμού 26
1.3.4.2 Έμμεσες μέθοδοι προσδιορισμού 28
1.3.5 Υπολογιστικές μέθοδοι εκτίμησης των συντελεστών μερισμού, logP, και κατανομής, logD 29
1.4 Η έννοια της χρωματογραφίας 31
1.5 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) 33
1.6 Βιομιμητική χρωματογραφία 37
1.6.1 Μικκυλιακή Χρωματογραφία (Micellar Liquid Chromatography, MLC) 39
1.6.1.1 Μικκυλιακή χρωματογραφία βιοκατανομής (Biopartitioning Micellar Chromatography, BMC) 41
1.6.2 Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων πρωτεϊνών (Immobilized Protein Chromatography) 42
1.6.3 Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane Chromatography) 44
1.6.3.1 Στατικές φάσεις 46

1.6.3.2 Κινητές φάσεις 50
1.6.3.3 Μηχανισμός κατακράτησης στις χρωματογραφικές στήλες IAM 51
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 53
2.1 Σκοπός 53
2.2 Φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν 53
2.3 Αντιδραστήρια 60
2.4 Οργανολογία 60
2.5 Στατική φάση 61
2.6 Κινητή φάση 61
2.7 Πειραματική διαδικασία 62
2.7.1 Παρασκευή κινητής φάσης 62
2.7.2 Χρωματογραφική διαδικασία 63
2.8 Βιβλιογραφικά δεδομένα 64
2.8.1 Δεδομένα λιποφιλίας 64
2.8.2 Δεδομένα κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου μορίων 64
2.8.3 Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών σε υδατική φάση, λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου 66
2.8.4 Δεδομένα μικυλλιακής χρωματογραφίας 69
2.8.5 Δεδομένα απορρόφησης κατά τη χορήγηση φαρμάκων από το στόμα (%HOA) 72
2.9 Στατιστική ανάλυση 76
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 78
3.1 Αποτελέσματα και υπολογισμός συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση, $\log k_w^{IAM}$ 78
3.2 Συσχέτιση του $\log k_w^{IAM}$ με τους συντελεστές λιποφιλίας (logP, logD) 82
3.2.1 Συσχέτιση του $\log k_w^{IAM}$ με το συντελεστή λιποφιλίας logP 83
3.2.2 Συσχέτιση του $\log k_w^{IAM}$ με το συντελεστή λιποφιλίας $\log D_{(7.40)}$ 88
3.3 Συμπεριφορά κατακράτησης σε pH 5.50 93
3.4 Συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών της στήλης IAM με τους χρωματογραφικούς συντελεστές της μικκυλιακής χρωματογραφίας 95
3.4.1 Συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών της στήλης IAM με τους χρωματογραφικούς συντελεστές μικκυλιακής χρωματογραφίας με τασιενεργό Brij-35 95
3.4.2 Συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών της στήλης IAM με τους χρωματογραφικούς συντελεστές μικκυλιακής χρωματογραφίας με τασιενεργό Tween-20 98
3.4.3 Συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών της στήλης IAM με τους χρωματογραφικούς συντελεστές μικκυλιακής χρωματογραφίας με τασιενεργό SDS 100
3.5 Πρόβλεψη απορρόφησης για φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα (%HOA) 102
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 112

5.ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑ 114
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 116

Ευχαριστίες

Η διπλωματική εργασία με τίτλο “Συμβολή στη μελέτη φαρμακευτικών ενώσεων με χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών και εφαρμογή στην πρόβλεψη της εντερικής απορρόφησης φαρμάκων” εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Δεκεμβρίου 2019 – Σεπτεμβρίου 2020 στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών (Τομέας Ι) της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Σε αυτό το σημείο, με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με τον τρόπο τους στην εκπόνηση της. Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου Δρ. Φώτιο Τσόπελα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα. Η επιστημονική του καθοδήγηση κατά την διεξαγωγή των πειραματικών μετρήσεων και τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας, οι υποδείξεις του και ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος ήταν πολύτιμα για εμένα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Λαμπρινή – Αρετή Τσακανίκα για τις εποικοδομητικές της υποδείξεις και την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου και τους φίλους μου για όλη την στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόηση τους, καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε ο μηχανισμός έκλουσης φαρμακευτικών ενώσεων μέσω της βιομιμητικής χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM – Immobilized Artificial Membranes). Επιπλέον, έγινε συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης με φαρμακοκινητικά μεγέθη.

Συνολικά εξετάστηκαν 35 φαρμακευτικές ενώσεις, ποικίλης δομής και φαρμακολογικής δράσης. Οι συντελεστές κατακράτησης αυτών των φαρμακευτικών ενώσεων προσδιορίστηκαν με τη χρήση στατικής φάσης ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών τύπου IAM.PC.DD2 και κινητής φάσης PBS (αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων) σε δύο τιμές pH, 5.50 και 7.40. Η κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε και ως 100% υδατική φάση, αλλά και με την προσθήκη ακετονιτριλίου, ως οργανικού τροποποιητή, σε συγκεντρώσεις 10–40%.

Αρχικά, προσδιορίσθηκαν οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k_w$ με απευθείας μέτρηση σε αμειγώς υδατική κινητή φάση. Για τις ενώσεις που δεν ήταν εφικτό να πραγματοποιηθούν μετρήσεις σε υδατική φάση λόγω της ισχυρής τους συγκράτησης από την στήλη, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του συντελεστή κατακράτησης, logk, με διαφορετικές περιεκτικότητες ακετονιτριλίου στην κινητή φάση. Ακολούθως, οι τιμές $\log k_w$ υπολογίσθηκαν με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης και γραμμική προεκβολή (extrapolation) $\log k_{w(extr.)}$. Οι συντελεστές $\log k_w$ και που υπολογίστηκαν με απευθείας μέτρηση (actual), και προεκβολή (extrapolated) συσχετίστηκαν με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής σε σύστημα n-οκτανόλης – νερού, logP και logD, αντίστοιχα, που εκφράζουν τη λιποφιλία των φαρμακευτικών ενώσεων. Επιπλέον, μέσω της εισαγωγής των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- αντίστοιχα, στις παραπάνω συσχετίσεις, διερευνήθηκε η συμβολή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, που αναπτύσσονται μεταξύ της στατικής φάσης και των ενώσεων που μελετώνται, στο μηχανισμό κατακράτησης της στήλης IAM. Οι σχέσεις που προέκυψαν επιβεβαίωσαν πως ο κύριος μηχανισμός έκλουσης των φαρμακευτικών ενώσεων στη χρωματογραφία IAM είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ενώ οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις κατέχουν δευτερεύοντα ρόλο και οφείλονται κυρίως στις φωσφορικές ομάδες των φωσφολιπιδίων. Επιπλέον, εξετάστηκε η συμπεριφορά κατακράτησης ενός μέρους των φαρμακευτικών ενώσεων σε pH 5.50 (κυρίως για τις όξινες και αμφολυτικές ενώσεις που παρουσίαζαν ενδιαφέρον), που αντιστοιχεί στην οξύτητα του ανώτερου τμήματος του λεπτού εντέρου.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών της IAM με άλλους βιομιμητικούς χρωματογραφικούς συντελεστές, συγκεκριμένα μικκυλιακής χρωματογραφίας με παρουσία τριών διαφορετικών επιφανειοδραστικών παραγόντων (Brij-35, Tween-20, SDS). Καλύτερη συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ IAM και Brij-35.

Τέλος, οι συντελεστές κατακράτησης της χρωματογραφίας IAM στη λογαριθμική και μη μορφή τους, $\log k_w$ και k_w αντίστοιχα, αξιοποιήθηκαν για την ανάπτυξη δύο μοντέλων πρόβλεψης της γαστρεντερικής απορρόφησης των φαρμακευτικών ενώσεων (%HOA). Από τη μελέτη των μοντέλων που αναπτύχθηκαν, προκύπτει πως το μοντέλο με τη σιγμοειδή εξίσωση που έχει ως βάση τη μεταβλητή $\log k_w$ έχει μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας στην πρόβλεψη της εντερικής απορρόφησης των φαρμακευτικών ενώσεων.

Λέξεις – κλειδιά: ακινητοποιημένες τεχνητές μεμβράνες, συντελεστής κατακράτησης, βιομιμητική χρωματογραφία, λιποφιλία, γαστρεντερική απορρόφηση

Abstract

The aim of this diploma thesis is the investigation of the elution mechanism of pharmaceutical compounds by biomimetic liquid chromatography using an Immobilized Artificial Membrane (IAM), type IAM.PC.DD2, stationary phase. Furthermore, the correlation between retention factors on IAM.PC.DD2 column and pharmacokinetic properties was explored.

For this purpose, 35 structurally- diverse drugs were studied. Retention factors were measured using Phosphate Buffered Saline (PBS) at two different pH values, 5.50 and 7.40, using 100% aqueous phase or in presence of acetonitrile in fractions between 10 and 40%. Initially, retention factors, $\log k_w$, were measured using pure aqueous phase. For drugs strongly retained on the IAM.PC.DD2 stationary phase, retention factors, logk, were measured in presence of different fractions of acetonitrile in the mobile phase and $\log k_w$ values were obtained by linear extrapolation.

The $\log k_w$ factors (both actual and extrapolated) were correlated with the partition and distribution coefficients, logP and logD, in the n-octanol – water system, expressing lipophilicity. Additionally, in order to study the role of electrostatic interactions in retention, positively and negatively charged molecular fractions, F^+ and F^- respectively, were included in the aforementioned correlations. The results confirmed that the main factor affecting the retention of pharmaceutical compounds is hydrophobicity, whereas electrostatic interactions play a secondary role and are mostly attributed to the phosphoric anions of the immobilized phospholipids of IAM stationary phase. The retention behavior at a pH value of 5.50, corresponding to the acidity of the upper part of the small intestine, was studied in the case of acidic and zwitterionic pharmaceutical compounds.

The IAM retention factors were also correlated with other biomimetic retention factors, specifically with retention factors derived from micellar chromatography using three different surfactants (Brij-35, Tween-20, SDS). The best statistical data was obtained in the case of Brij-35.

Finally, the IAM retention factors, (both in their logarithmic and non-logarithmic form, $\log k_w$ and k_w respectively) were utilized for the development of two separate models for the prediction of gastrointestinal absorption of the pharmaceutical compounds (%HOA). After testing these models, it turns out that the one using a sigmoidal equation and the variable $\log k_w$ is the one with the

greater percentage of success in predicting the level of intestinal absorption of pharmaceutical compounds.

Keywords: immobilized artificial membranes, retention factor, biomimetic chromatography, lipophilicity, gastrointestinal absorption

Ευρετήριο εικόνων – διαγραμμάτων

Εικόνα 1: Τα στάδια της διαδικασίας ανακάλυψης και ανάπτυξης ενός νέου φαρμακευτικού προϊόντος[4, p. 8] 2
Εικόνα 2: Απαιτήσεις σε δραστική ουσία ανά στάδιο στην πορεία της ανακάλυψης νέων φαρμάκων [6, p. 3] 4
Εικόνα 3: Βασικές αιτίες απόρριψης φαρμάκων και σύγκριση για τα έτη 1991 και 2000 (PK = Φαρμακοκινητική)[9] 5
Εικόνα 4: Οι ισορροπίες κατά την κατανομή μιας ουσίας στο σύστημα οκτανόλης - νερού σε συνθήκες pH όπου συνυπάρχουν η αδιάστατη και η ιοντισμένη μορφή (η n-οκτανόλη αποτελεί την πάνω στοιβάδα καθώς έχει βάρος μικρότερο από του νερού) 23
Εικόνα 5: Ταξινόμηση των μεθόδων χρωματογραφίας [47] 32
Εικόνα 6: Γενική μορφή χρωματογραφήματος (response = σήμα του ανιχνευτή, time = χρόνος)[48] 33
Εικόνα 7: Στατικές φάσεις IAM, μονής και διπλής αλυσίδας, με τελική κάλυψη. Οι κυκλωμένες περιοχές αντιστοιχούν στα φορτισμένα κέντρα [64] 49
Εικόνα 8: Υγροχρωματογραφικό σύστημα HPLC 61

Διάγραμμα 1: Γραφική παράσταση $\log k_w^{IAM}$ προς logP 83
Διάγραμμα 2: Γραφική παράσταση $\log k_w^{IAM}$ προς logP με κυκλωμένα τα outliers 85
Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση $\log k_w^{IAM}$ προς logP μετά την αφαίρεση των outliers 86
Διάγραμμα 4: Γραφική παράσταση $\log k_w^{IAM}$ προς $\log D_{7.40}$ 88
Διάγραμμα 5: Γραφική παράσταση $\log k_w^{IAM}$ προς $\log D_{7.40}$ με κυκλωμένα τα outliers 90
Διάγραμμα 6: Γραφική παράσταση $\log k_w^{IAM}$ προς $\log D_{7.40}$ μετά την αφαίρεση των outliers 91
Διάγραμμα 7: Γραφική παράσταση $\log k_w^{IAM}$ προς $\log k_w^{Brij-35}$ με κυκλωμένα τα outliers 96
Διάγραμμα 8: Γραφική παράσταση $\log k_w^{IAM}$ προς $\log k_w^{Brij-35}$ μετά την αφαίρεση των outliers 97
Διάγραμμα 9: Γραφική παράσταση $\log k_{wIAM}$ προς $\log k_w^{Tween20}$ με κυκλωμένα τα outliers 98
Διάγραμμα 10: Γραφική παράσταση $\log k_w^{IAM}$ προς $\log k_w^{Tween20}$ μετά την αφαίρεση των outliers 99
Διάγραμμα 11: Γραφική παράσταση $\log k_w^{IAM}$ προς $\log k_w^{SDS}$ με κυκλωμένα τα outliers 101
Διάγραμμα 12: Γραφική παράσταση $\log k_w^{IAM}$ προς $\log k_w^{SDS}$ μετά την αφαίρεση των outliers 102
Διάγραμμα 13: Γραφική παράσταση %HOA προς $\log k_w^{IAM}$(best) (χωρίς outliers) 104

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1: Φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους 54
Πίνακας 2: Δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου για τις φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν 64
Πίνακας 3: Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση από χρωματογραφία IAM, δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου 66
Πίνακας 4: Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από μικυλλιακή χρωματογραφία για τρεις τύπους επιφανειοδραστικών (Brij-35, Tween-20, SDS) 69
Πίνακας 5: Δεδομένα απορρόφησης από το στόμα σε ποσοστό επί τοις εκατό (%HOA) 73
Πίνακας 6: Συντελεστές κατακράτησης, logk, για τις διάφορες συγκεντρώσεις ακετονιτριλίου στην κινητή φάση με pH 7.40 και συντελεστής κατακράτησης υπολογισμένος μέσω γραμμικής παρεμβολής, $logk^{IAM}_{w(extr.)}$ 79
Πίνακας 7: Συντελεστές κατακράτησης, logk, για τις διάφορες συγκεντρώσεις ακετονιτριλίου στην κινητή φάση με pH 5.50 και συντελεστής κατακράτησης υπολογισμένος μέσω γραμμικής παρεμβολής, logkIAMw(extr.) 81
Πίνακας 8: Διαφορές στις τιμές συντελεστών κατακράτησης και logD για τις τιμές pH 5.50 και 7.40 94
Πίνακας 9: Δεδομένα Εκμάθησης (Training Set) 105
Πίνακας 10: Δεδομένα Ελέγχου (Test Set) 106
Πίνακας 11: Βιβλιογραφικές και προβλεπόμενες τιμές εντερικής απορρόφησης για τα δεδομένα ελέγχου 109

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Πορεία ανακάλυψης νέων φαρμακευτικών προϊόντων

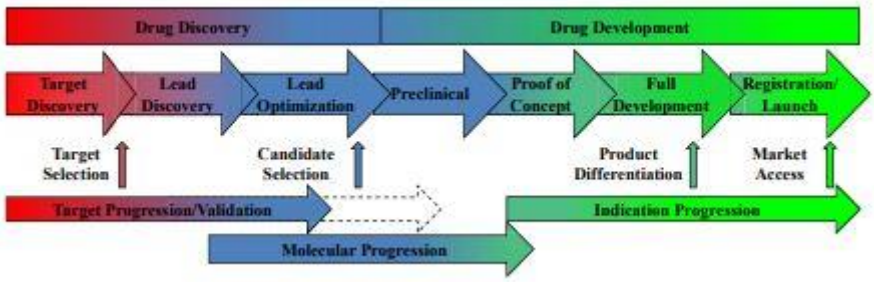
Τα φάρμακα αποτελούν πολύτιμα αγαθά για την πρόληψη και την αντιμετώπιση ασθενειών από τις οποίες απειλείται διαρκώς ο άνθρωπος στη διάρκεια της ζωής του. [1, p. 13] Το φάρμακο ορίζεται ως μια χημική ουσία, η οποία όταν χορηγείται σε έναν ζωντανό οργανισμό, παράγει ένα βιολογικό αποτέλεσμα. Τα φάρμακα μπορεί να είναι συνθετικά, να είναι χημικές ουσίες που λαμβάνονται από φυτά ή ζώα ή προϊόντα γενετικής μηχανικής. Ένα φαρμακευτικό σκεύασμα συνήθως περιέχει μία ή περισσότερες δραστικές φαρμακευτικές ουσίες και χορηγείται με σκοπό να παράγει ένα θεραπευτικό αποτέλεσμα. Τα φαρμακευτικά σκευάσματα μπορεί να περιέχουν κι άλλες ουσίες όπως έκδοχα, σταθεροποιητές, διαλύτες κλπ. ώστε να γίνουν πιο εύχρηστα. Για να θεωρηθεί μια χημική ουσία φάρμακο, πρέπει να χορηγείται ως έχει, όχι να απελευθερώνεται από φυσικούς μηχανισμούς. Ορισμένες ουσίες, π.χ. ινσουλίνη, είναι ενδογενείς ορμόνες αλλά όταν χορηγηθούν σκόπιμα μπορούν να θεωρηθούν φάρμακα.[2, p. 1]

Η πορεία ανακάλυψης και σχεδιασμού νέων φαρμακευτικών προϊόντων σήμερα διαφέρει σημαντικά από την πορεία που ακολουθούταν 30-50 χρόνια πριν, η πρόοδος που έχει σημειωθεί είναι αδιαμφισβήτητη. Στο παρελθόν, η διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμάκων βασιζόταν στη δομή ήδη γνωστών δραστικών ενώσεων, οι οποίες μπορεί να ήταν ενδογενή προϊόντα (αδρεναλίνη, στεροειδείς ορμόνες, κτλ.) ή φυσικά προϊόντα (μορφίνη, ατροπίνη, κτλ.) και οι δομές τους ταυτοποιούνταν και τροποποιούνταν μέσω της μεθόδου δοκιμής και σφάλματος. Η δραστική ουσία απομονωνόταν, προσδιοριζόταν η δομή της και ο μηχανισμός της φαρμακολογικής της δράσης και με τη βοήθεια αυτών των γνώσεων τροποποιούταν κατάλληλα η δομή της ένωσης ώστε να αυξηθούν η δραστικότητα της και ο χρόνος δράσης της ουσίας και να μειωθεί η τοξικότητα της.[3, p. 1] Σήμερα, η φαρμακοβιομηχανία αξιοποιεί τεχνολογίες όπως η μοριακή μοντελοποίηση, οι μελέτες βιοδεικτών, η μέθοδος ταχείας διαλογής υψηλής απόδοσης (HTS – High Throughput Screening) από βιβλιοθήκες ενώσεων που έχουν κατασκευαστεί, ενώ παράλληλα απαιτεί το συνδυασμό γνώσεων από διάφορα επιστημονικά πεδία όπως η βιοχημεία, η γενετική, η φαρμακευτική χημεία, η in vitro βιολογία, η φαρμακολογία στα ζώα, η κλινική έρευνα κ.ά.[4, p. 6]

Η ανακάλυψη και η ανάπτυξη φαρμάκων είναι μια πολύπλοκη και χρονοβόρα διαδικασία που πάσχει από υψηλά ποσοστά αποτυχίας και απόρριψης των υποψήφιων ενώσεων σε όλα τα

στάδια της διαδικασίας. Η μακρά αυτή διαδικασία μπορεί να διαρκέσει έως και 15 χρόνια και το κόστος της μπορεί να φτάσει μερικές εκατοντάδες εκατομμύρια δολάρια. [5] Επιπλέον, κάθε υποψήφιο φάρμακο χρειάζεται να ικανοποιεί όλο και πιο αυστηρούς κανονισμούς, παράλληλα με τα υψηλά ποσοστά απορρίψεων, με αποτέλεσμα ο διαθέσιμος χρόνος εντός του παραθύρου που καλύπτεται από το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για την ανάπτυξη του και την πώληση του τελικού προϊόντος να είναι σημαντικά περιορισμένος. Όλα τα παραπάνω όμως, πρέπει να παραβλεφθούν, καθώς η ανάπτυξη νέων φαρμάκων είναι απαραίτητη για την κάλυψη ιατρικών αναγκών για τις οποίες δεν υπάρχει ακόμη θεραπεία και για την βελτίωση θεραπειών όπου τα φάρμακα έχουν αποδειχθεί αναποτελεσματικά ή εμφάνισαν τοξικές παρενέργειες ή έχουν δείξει ασυμβατότητα με άλλα φάρμακα. Φυσικά, νέες παθολογικές καταστάσεις και ασθένειες αποκαλύπτονται συνεχώς, επομένως απαιτείται η ανάπτυξη φαρμάκων για την αποτελεσματική θεραπεία τους.[6, p. 2]

Ευτυχώς, όπως οι περισσότερες πολύπλοκες διαδικασίες, έτσι και η ανάπτυξη και ο σχεδιασμός νέων φαρμάκων μπορεί να χωριστεί σε επιμέρους βήματα, τα οποία είναι πιο εύκολα διαχειρήσιμα. Σε ένα πρώτο επίπεδο, η διαδικασία μπορεί να διαιρεθεί σε δύο στάδια, την ανακάλυψη ενός νέου φαρμάκου και την ανάπτυξη του φαρμάκου αυτού. Όσον αφορά το πρώτο στάδιο, της ανακάλυψης, αυτό μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω στην ανακάλυψη του βιολογικού στόχου (target discovery), την ανακάλυψη μιας ένωσης – οδηγού (lead discovery) και την βελτιστοποίηση της ένωσης – οδηγού (lead optimization). Το στάδιο της ανάπτυξης του φαρμάκου περιλαμβάνει τον προ-κλινικό έλεγχο, τις τρεις κλινικές φάσεις και τέλος την κυκλοφορία του φαρμάκου στην αγορά, αλλά υπό συνεχή παρακολούθηση. Ακολουθεί εικόνα στην οποία φαίνονται συγκεντρωτικά τα στάδια της διαδικασίας ανακάλυψης και ανάπτυξης μιας νέας φαρμακευτικής ουσίας.[4, p. 8]



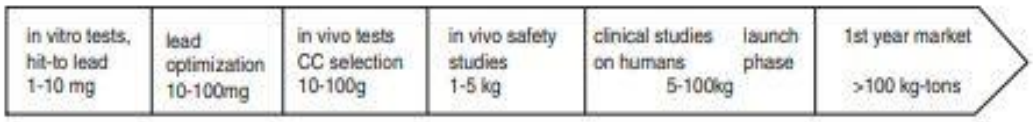
Εικόνα 1 *Τα στάδια της διαδικασίας ανακάλυψης και ανάπτυξης ενός νέου φαρμακευτικού προϊόντος[4, p. 8]*

Πιο αναλυτικά, το πρώτο βήμα για την ανακάλυψη ενός φαρμάκου είναι η ταυτοποίηση της ασθένειας και η ανακάλυψη του μορίου- στόχου στο οποίο θα δράσει η φαρμακευτική ένωση (target discovery). Ο βιολογικός στόχος μπορεί να είναι ένα ένζυμο ή ένας υποδοχέας, όπως υποδοχείς συζευγμένοι με G – πρωτεΐνη, υποδοχείς ορμονών, κινάσες και κανάλια ιόντων. Ακολουθεί η ανακάλυψη μιας ένωσης – οδηγού η οποία θα αλληλεπιδρά με το μόριο – στόχο για την επίτευξη της επιθυμητής βιολογικής δραστηριότητας, για το σκοπό αυτό προσδιορίζονται σύνολα δομικά σχετικών ενώσεων, μέσω μεθόδου διαλογής από ένα μεγάλο αριθμό ενώσεων (lead discovery). Μόλις προσδιοριστεί μια υποψήφια σειρά, ξεκινά η φάση βελτιστοποίησης της ένωσης – οδηγού (lead optimization).[4, p. 8] Σε αυτή τη φάση, οι ενώσεις – οδηγοί υφίστανται μια σειρά δομικών τροποποιήσεων, μέσω των οποίων οι ερευνητές μπορούν να εντοπίσουν το μέρος του μορίου που είναι απαραίτητο για να έχει την επιθυμητή βιολογική δράση. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, συχνά προκύπτουν πολύ πιο ενεργά ανάλογα σε σχέση με την αρχική ένωση – οδηγό. Σε αυτό το σημείο, μπορεί να διαπιστωθεί και εάν οι ενώσεις που έχουν επιλεγεί εμφανίζουν ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά μέσω μετρήσεων διαλυτότητας, διαπερατότητας, πρωτεϊνικής σύνδεσης, κτλ. Η διαδικασία της βελτιστοποίησης μπορεί να διαρκέσει έως και 2 χρόνια (ή και ακόμα περισσότερο) και περιλαμβάνει in vitro δοκιμές για την αξιολόγηση της επιλεκτικότητας των ενώσεων και της μικροσωμικής σταθερότητας τους. Για μικρότερο αριθμό δυνητικά υποσχόμενων ενώσεων διεξάγονται μελέτες σε ζώα, φαρμακοκινητικές και βιοδιαθεσιμότητας. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να βρεθεί και η κατάλληλη δόση για την αποτελεσματική in vivo φαρμακολογική δραστηριότητα. Είναι σημαντικό να αποδειχθεί ότι η παρατηρούμενη φαρμακολογική δραστηριότητα είναι συνέπεια της πρόσδεσης της ένωσης που εξετάζεται με τον βιολογικό στόχο. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιούνται και οι πρώτες τοξικολογικές μελέτες. Εάν στο τέλος αυτής της διαδικασίας το μόριο επιδείξει επιθυμητή ισχύ, ικανοποιητική βιοδιαθεσιμότητα και αποδεκτές φαρμακοκινητικές ιδιότητες, δηλώνεται ως υποψήφιο και προωθείται στο επόμενο στάδιο, τη μακρά διαδικασία της ανάπτυξης του φαρμάκου.[3, pp. 3–4]

Τα φάρμακα που εισέρχονται στο στάδιο της ανάπτυξης του φαρμάκου, αρχικά περνούν τον προκλινικό έλεγχο, ο οποίος αποτελείται από εργαστηριακούς ελέγχους και ελέγχους σε πειραματόζωα.[5], [7, pp. 31–32] Από τις 5000 – 10000 ενώσεις που συντίθενται και ελέγχονται στην προκλινική φάση, μόνο 5 εισέρχονται στις κλινικές δοκιμές, οι οποίες περιλαμβάνουν τρεις φάσεις. Στη Φάση I γίνεται έλεγχος της ασφάλειας και δοσολογίας σε μικρό αριθμό (20 – 100) υγειών εθελοντών. Στη Φάση II, ελέγχεται η αποτελεσματικότητα και οι ανεπιθύμητες ενέργειες

σε ένα μεγαλύτερο δείγμα (500) ασθενών εθελοντών, ενώ στη Φάση III ελέγχεται η αποτελεσματικότητα και οι μακροχρόνιες ανεπιθύμητες ενέργειες σε ακόμη μεγαλύτερο αριθμό (5000) ασθενών εθελοντών.[1, p. 15] Μετά την ολοκλήρωση και της τρίτης φάσης, το νέο φάρμακο μπορεί πλέον να εισαχθεί στην αγορά, αφού εγκριθεί από τον αρμόδιο οργανισμό. Ωστόσο, η έγκριση αυτή δεν σηματοδοτεί ακόμα το τέλος των κλινικών δοκιμών. Σε πολλές περιπτώσεις, οι αρμόδιοι οργανισμοί απαιτούν πρόσθετες μελέτες παρακολούθησης, που συχνά αναφέρονται ως δοκιμές της Φάσης IV ή επιτήρηση μετά την κυκλοφορία (post-marketing surveillance). Οι μελέτες αυτές έχουν σχεδιαστεί για να ανιχνεύουν σπάνιες ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου που μπορεί να βρίσκονταν εκτός του πεδίου ελέγχου κατά τη διάρκεια της Φάσης III. Ο αντίκτυπος των μελετών της Φάσης IV μπορεί να περιλαμβάνει αλλαγές στην ετικέτα και το φύλλο οδηγιών χρήσης του φαρμάκου, οι οποίες θα βασίζονται στα αποτελέσματα ασφάλειας, μπορεί να είναι αντενδείξεις για τη χρήση του νέου φαρμάκου σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα ή μπορεί ακόμη και να ανακληθεί η έγκριση κυκλοφορίας του φαρμάκου, αν τα ευρήματα είναι αρκετά σοβαρά.[4, pp. 10–11] Να σημειωθεί πως, από τις ενώσεις που φτάνουν στο στάδιο των κλινικών ελέγχων, μόνο το 10% καταφέρνει να εισαχθεί στην αγορά ως αποτελεσματικό φάρμακο, αποδεικνύοντας ότι η συνολική διαδικασία ανάπτυξης φαρμάκων εξακολουθεί να είναι μακριά από το ιδανικό.[8] Μάλιστα, σύμφωνα με άλλες πηγές, μία στις τέσσερις ενώσεις που περνούν όλες τις φάσεις των κλινικών ελέγχων και ετοιμάζονται να εισαχθούν στην αγορά, τελικά αποτυγχάνουν με αποτέλεσμα το κεφάλαιο και ο χρόνος που καταναλώθηκε για όλη τη διαδικασία ανάπτυξης τους να μην δίνουν κανένα αποτέλεσμα.[9]

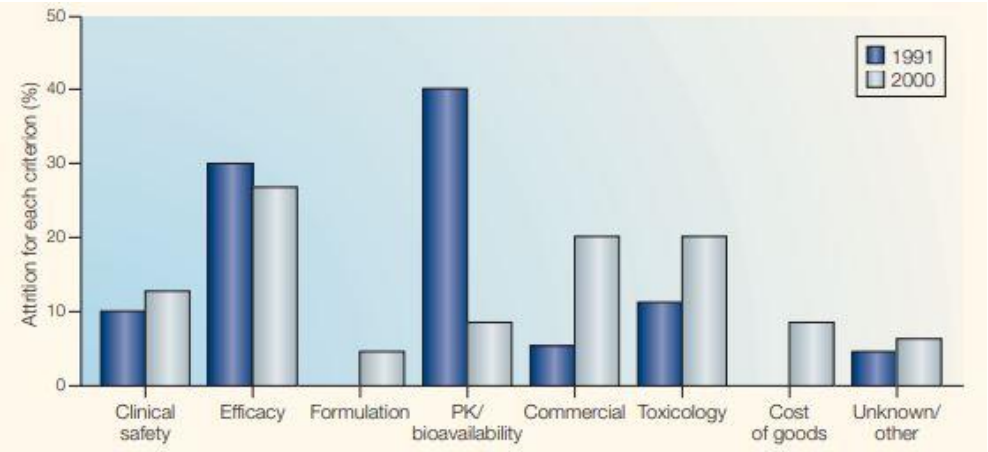
Μια άλλη πληροφορία που παρουσιάζει ενδιαφέρον και αφορά την πορεία ανακάλυψης νέων φαρμακευτικών προϊόντων, είναι οι απαιτήσεις σε δραστική ουσία ανά στάδιο. Όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί, το κρίσιμο στάδιο της διαδικασίας βρίσκεται μεταξύ της επιλογής της κατάλληλης ένωσης – οδηγού και της κλινικά υποψήφιας ουσίας, καθώς εκεί γίνεται η μετάβαση από τα μερικά mg στα μερικά Kg. Φυσικά, κατά την Φάση IV, που το φάρμακο έχει κυκλοφορήσει στην αγορά και παρακολουθείτε η πορεία του, η ποσότητα της δραστικής ουσίας εκτοξεύεται και φτάνει την τάξει τον τόνων (tons).



Εικόνα 2 *Απαιτήσεις σε δραστική ουσία ανά στάδιο στην πορεία της ανακάλυψης νέων φαρμάκων [6, p. 3]*

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το κόστος για την ανάπτυξη και τον σχεδιασμό ενός νέου φαρμακευτικού προϊόντος κυμαίνεται μεταξύ μερικών εκατοντάδων εκατομμυρίων και μερικών δισεκατομμυρίων. Πιο συγκεκριμένα, το μέσο κόστος για μια εταιρία που θέλει να φέρει ένα νέο φάρμακο στην αγορά εκτιμάται σε περίπου 1.8 δισεκατομμύρια δολάρια. Προφανώς ο κλάδος των φαρμακοβιομηχανιών αναζητά τρόπους για να μειώσει αυτό το κόστος. Μια προσέγγιση για τη μείωση των δαπανών των φαρμακοβιομηχανιών περιγράφεται από την έκφραση “fail fast, fail cheap”. Ουσιαστικά, η πρόταση αυτή σημαίνει πως προτιμάτε η αβεβαιότητα να μειώνεται πριν από τα ακριβά στάδια ανάπτυξης (Φάση II και III) μέσω της καθιέρωσης του Proof-of-Concept (POC). Αυτή η μέθοδος έχει ως αποτέλεσμα λιγότερες ενώσεις να προχωρούν προς τις φάσεις II και III, όμως οι ενώσεις αυτές που τα καταφέρνουν έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να επιτύχουν. Τα χρηματικά ποσά που θα εξοικονομούνται με αυτό τον τρόπο, θα μπορούν να επανεπενδύονται στα τμήματα Έρευνας και Ανάπτυξης των φαρμακοβιομηχανιών ώστε να αυξάνεται η παραγωγικότητα τους. [10]

Μια μελέτη των αιτιών απόρριψης των φαρμακευτικών προϊόντων που αναπτύσσονται μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα διδακτική και να βοηθήσει στην κατάστρωση στρατηγικών για τη μείωση αυτών των ποσοστών και τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων. Ακολουθεί εικόνα στην οποία παρουσιάζονται οι κυριότερες αιτίες απόρριψης των φαρμακευτικών ενώσεων και πως αυτές άλλαξαν με την πάροδο των χρόνων (από το 1991 στο 2000).



Εικόνα 3 *Βασικές αιτίες απόρριψης φαρμάκων και σύγκριση για τα έτη 1991 και 2000 (PK = Φαρμακοκινητική)[9]*

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3, το 1991 η πιο σημαντική αιτία απόρριψης των νέων φαρμάκων

ήταν το ανεπιθύμητο φαρμακοκινητικό προφίλ και η ανεπαρκής βιοδιαθεσιμότητα, σε ποσοστό 40% του συνολικού δείγματος. Μέχρι το 2000, αυτοί οι παράγοντες μειώθηκαν δραματικά, σε ποσοστό μικρότερο του 10%. Αυτά τα δεδομένα είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρα καθώς αποδεικνύουν πως η φαρμακοβιομηχανία είναι ικανή να εντοπίσει και να διορθώσει τα αδύναμα σημεία της πορείας ανάπτυξης φαρμάκων. Φυσικά, υπάρχει και η άλλη όψη στην ερμηνεία αυτής της μείωσης. Θα μπορούσε η μείωση να μην λύνει το πρόβλημα της απόρριψης των ενώσεων, αλλά να το μεταφέρει χρονικά σε μεταγενέστερα στάδια της διαδικασίας. Δηλαδή, ένα φάρμακο με αστοχίες φαρμακοκινητικής και βιοδιαθεσιμότητας θα απορριπτόταν στη Φάση Ι, ενώ αν ξεπεραστούν οι αστοχίες αυτές και η υποψήφια ένωση προωθηθεί στα επόμενα στάδια, μπορεί τελικά να απορριφθεί στη Φάση ΙΙ ή ΙΙΙ για διαφορετικούς λόγους και με μεγαλύτερο κόστος. Το 2000, οι κύριες αιτίες απόρριψης ήταν η περιορισμένη αποτελεσματικότητα (σε ποσοστό 30%) και η έλλειψη ασφάλειας του φαρμάκου (κλινική ασφάλεια και τοξικότητα συνδυαστικά φτάνουν το 30%). [9]

Οι δύο κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα ενός υποψήφιου φαρμάκου είναι το φαρμακοκινητικό και το φαρμακοδυναμικό του προφίλ. Μάλιστα, αυτοί οι δύο παράγοντες αλληλοεπηρεάζονται. Όσον αφορά τη φαρμακοδυναμική, αυτή αναφέρεται στην αλληλεπίδραση του φαρμάκου με το βιολογικό σύστημα για την έκφραση της φαρμακολογικής ή τοξικής δράσης του. Η φαρμακοκινητική αντιθέτως, αναφέρεται στις διεργασίες που υφίσταται το φάρμακο όταν εισέρχεται σε έναν οργανισμό, δηλαδή στην απορρόφηση του, την κατανομή του, τον μεταβολισμό και την αποβολή του, διεργασίες που αποτελούν το σύνολο ADME, το οποίο αναλύεται στην επόμενη παράγραφο.[11, pp. 91–92]

Η αποτυχία φαρμάκων που στηρίζεται σε ελλιπή αποτελεσματικότητα και ασφάλεια φανερώνουν την ανάγκη ανάπτυξης καλύτερων προγνωστικών μοντέλων που θα βασίζονται σε πειράματα με ζώα, όπου είναι εφικτό, και πιο σημαντικά, την ανάγκη για ανάπτυξη πειραματικών ιατρικών παραδειγμάτων με καλή προγνωστική ικανότητα και δυνατότητα χρήσης πολύ νωρίτερα κατά τη διαδικασία ανάπτυξης και σχεδιασμού ενός νέου φαρμακευτικού προϊόντος.[9] Επιπλέον, για τη μείωση των αποτυχιών στα αρχικά στάδια και άρα την αποφυγή διακοπών στα τελικά στάδια της διαδικασίας, η έρευνα μείωσης αβεβαιοτήτων θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη την κατάλληλη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική καθώς και την ασφάλεια και τις ανεπιθύμητες αντιδράσεις που μπορεί να συμβούν παράλληλα με τη συγγένεια των υποψήφιων ενώσεων με

τους υποδοχείς - στόχους.[5]

Για την επίτευξη αυτού του στόχου, έχουν αναπτυχθεί πολυπαραμετρικές προσεγγίσεις βελτιστοποίησης, οι οποίες μπορεί να εντοπιστούν και ως προσεγγίσεις βελτιστοποίησης πολλαπλών - στόχων (MOO – Multi – Objective Optimization). Οι μέθοδοι αυτές έχουν εισαχθεί στην πορεία ανακάλυψης και σχεδιασμού φαρμάκων και κερδίζουν σταθερά έδαφος. Στις MOO κατέχουν κεντρικό ρόλο οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υποψήφιων ενώσεων αλλά και οι ιδιότητες ADME. Η εκτίμηση αυτών των ιδιοτήτων στα αρχικά στάδια της διαδικασίας αυξάνει τις πιθανότητες ενός υποψηφίου φαρμάκου να εγκριθεί και να κυκλοφορήσει στο εμπόριο.[5] Οι MOO έχουν χρησιμοποιηθεί στην μοντελοποίηση QSAR (Quantitive Structure Activity Reletionships) για την εξέταση πολλών αντικρουόμενων στόχων, συμπεριλαμβανομένης της πολυπλοκότητας και της ακρίβειας του μοντέλου. Οι QSAR είναι ποσοτικές σχέσεις που συσχετίζουν τη δομή με τη βιολογική δράση, αντλώντας και αξιοποιώντας όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες με χρήση λιγότερων πειραμάτων. Επιπλέον, τα μοντέλα QSAR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ερμηνεία και τον προσδιορισμό των σχέσεων δομής – δράσης σε υπάρχοντα δεδομένα, αλλά και ως προγνωστικά μοντέλα. Μπορούν να προβλέψουν τις βιολογικές ιδιότητες μιας νέας ένωσης, τις φαρμακοκινητικές της ιδιότητες αλλά και παραμέτρους σχετικές με την ασφάλεια και την τοξικότητα της. Ποσοτικές σχέσεις μπορούν να εξαχθούν και για επιμέρους βιολογικές διαδικασίες, όπως συγκεκριμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιείται ο όρος «Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Ιδιοτήτων» (QSPR – Quantitive Structure – Property Relationships).[1, pp. 109–112], [12]

Μεταξύ των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, η λιποφιλία, η οποία εκφράζεται συνήθως ως logP, κατέχει ηγετική θέση με σημαντικό αντίκτυπο στη διαπερατότητα των μεμβρανών και την υδρόφοβη σύνδεση με μακρομόρια, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα – στόχου και άλλων πρωτεϊνών, όπως πρωτεΐνες πλάσματος ή μεταφορείς ή μεταβολικά ένζυμα. Το logP μπορεί να υπολογιστεί ή να προσδιοριστεί πειραματικά, αν και τα πειράματα κατανομής έχουν χαμηλές αποδόσεις.[5]

Από την άλλη πλευρά, η ανάπτυξη της βιομιμητικής χρωματογραφίας έχει οδηγήσει σε σημαντική πρόοδο στις πειραματικές εκτιμήσεις των ιδιοτήτων ADME στα αρχικά στάδια της διαδικασίας

ανάπτυξης και σχεδιασμού νέων φαρμακευτικών προϊόντων, συνδυάζοντας την προσομοίωση βιολογικών διεργασιών με ταχείες μετρήσεις.[5], [13]

1.2 Φαρμακοκινητική: Απορρόφηση, Κατανομή, Μεταβολισμός, Απέκκριση, Τοξικότητα (ADMET)

Η φαρμακοκινητική αφορά τις διεργασίες που υφίσταται ένα φάρμακο όταν εισέρχεται σε έναν οργανισμό.[14] Οι διεργασίες αυτές είναι: η απορρόφηση (Absorption), η κατανομή (Distribution), ο μεταβολισμός (Metabolism) και η απέκκριση (Excretion). Συνήθως, όταν γίνεται αναφορά στις διεργασίες αυτές χρησιμοποιείται ο όρος ADME, ο οποίος προκύπτει από τα αρχικά των αντίστοιχων αγγλικών όρων. Στο ADME προστίθεται και ένα T (ADMET), το οποίο αντιστοιχεί στην τοξικότητα (Toxicity) και αποτελεί άλλη μία σημαντική παράμετρο για μια φαρμακευτική ένωση. [8]

Μπορεί να θεωρηθεί πως η φαρμακοκινητική αποτελεί τον πιο αδύναμο κρίκο στην ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου καθώς μια “κακή” φαρμακοκινητική είναι η κύρια αιτία αποτυχίας υποψήφιων ενώσεων. Η “κακή” φαρμακοκινητική είναι ένας υποκειμενικός όρος και καθορίζεται κάθε φορά από το επιθυμητό προφίλ της τελικής ένωσης, αλλά συνήθως αναφέρεται στην χαμηλή και μεταβλητή βιοδιαθεσιμότητα μιας ένωσης και στην αδυναμία της να φτάσει στο μοριακό στόχο έχοντας την κατάλληλη συγκέντρωση. Επομένως, η κατανόηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων μιας υποψήφιας ένωσης είναι απαραίτητη για την πρόοδο της ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ενώσεων και είναι ιδιαίτερα σημαντικό η γνώση των ιδιοτήτων αυτών να υπάρχει από τα αρχικά στάδια της διαδικασίας ώστε να αξιοποιηθεί για το σχεδιασμό νέων ενώσεων και τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου έναντι του βιολογικού στόχου. [15], [16]

Οι διεργασίες που αποτελούν το ADMET συνδέονται άμεσα και με ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων των φαρμακευτικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, οι κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμακευτικών μορίων είναι η λιποφιλία του μορίου, το μοριακό του βάρος, η πολική του επιφάνεια και το σχήμα του μορίου.[17]

1.2.1 Απορρόφηση

Οι φαρμακευτικές ουσίες έχουν την ικανότητα να εκδηλώνουν τη φαρμακολογική τους δράση ή να εμφανίζουν τοξικότητα σε έναν οργανισμό εξαιτίας της απορρόφησης τους και μετέπειτα της

κατανομής τους στο σώμα. Η απορρόφηση ως έννοια αντιστοιχεί στην μετακίνηση μιας χημικής ουσίας από το σημείο χορήγησης προς τη συστηματική κυκλοφορία (κυκλοφορία του αίματος).[18] Τα κύρια σημεία στα οποία απορροφάται μια φαρμακευτική ένωση είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας και το δέρμα. Η απορρόφηση των φαρμάκων μπορεί να γίνει και σε άλλα σημεία του σώματος, ανάλογα με τη μέθοδο χορήγησης τους. Η αναπνευστική οδός είναι επίσης πολύ σημαντική για την απορρόφηση φαρμάκων όταν αυτά βρίσκονται σε μορφή αερολύματος.[19], [20]

Μια «ιδανική» φαρμακευτική ένωση υφίσταται ταχεία και πλήρη απορρόφηση. Η ταχύτητα και η απόδοση της απορρόφησης εξαρτάται από τη μέθοδο χορήγησης. Ανεξάρτητα, όμως, από τη μέθοδο χορήγησης, η απορρόφηση μιας χημικής ουσίας περιλαμβάνει απαραιτήτως τη διέλευση της από τις κυτταρικές μεμβράνες. Να σημειωθεί ότι στην περίπτωση που το φάρμακο χορηγείται με στερεά μορφή, απαιτείται πρώτα η διάλυση του δισκίου ή της κάψουλας ώστε να βρεθεί το φάρμακο σε ελεύθερη μορφή και να μπορέσει να απορροφηθεί (το μη διαλυτοποιημένο φάρμακο δεν απορροφάται).[21, p. 4] Η απορρόφηση μιας φαρμακευτικής ουσίας αποτελείται από τις ακόλουθες διαδικασίες:

- Διέλευση της ουσίας από τις κυτταρικές μεμβράνες που συνθέτουν την επιφάνεια του σημείου στο οποίο γίνεται η χορήγηση (π.χ. επιφάνεια του δέρματος, εσωτερικά τοιχώματα του γαστρεντερικού σωλήνα, κυψελίδες των πνευμόνων).
- Είσοδος στο κυτταρόπλασμα.
- Διέλευση από το κυτταρόπλασμα προς τα τμήματα των κυτταρικών μεμβρανών που συνδέονται με τα τριχοειδή αγγεία (αυτά οδηγούν τελικά την ουσία στην συστηματική κυκλοφορία).
- Διέλευση από τις μεμβράνες των κυττάρων που συνθέτουν τα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων και είσοδος στην κυκλοφορία του αίματος.[18], [22]

Η διέλευση των φαρμακευτικών μορίων από τις κυτταρικές μεμβράνες μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι η παθητική διάχυση, η οποία προκαλείται από τη διαφορά συγκέντρωσης στις δύο πλευρές της μεμβράνης και αφορά λιπόφιλα μόρια με μικρό μέγεθος (τα λιπόφιλα μόρια έχουν μικρότερη διαλυτότητα αλλά καλή διαπερατότητα ως προς τις κυτταρικές μεμβράνες). Επομένως, η μεταφορά αυτή είναι ευθέως ανάλογη της βαθμίδωσης της συγκέντρωσης κατά μήκος της μεμβράνης και του συντελεστή μερισμού του φαρμάκου. Η

παθητική διάχυση αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό για την διέλευση ουδέτερων φαρμακευτικών ενώσεων από τις κυτταρικές μεμβράνες. Ο δεύτερος τρόπος, αφορά τα μεγαλύτερα μόρια που φέρουν φορτίο ή είναι πολύ πολικά (αυτά εμφανίζουν και μεγαλύτερη διαλυτότητα). Τα μόρια αυτά δεν μπορούν να διασχίσουν τις κυτταρικές μεμβράνες με απλή διάχυση και γι' αυτό το λόγο εξαρτώνται από τη μεσολάβηση ενός μορίου – μεταφορέα και τον μηχανισμό της ενεργητικής διάχυσης (ενεργός/διευκολυνόμενη μεταφορά). Η ενεργητική διάχυση χαρακτηρίζεται από άμεση απαίτηση ενέργειας, υψηλή εκλεκτικότητα, κορεσμός και κίνηση ενάντια στην ηλεκτροχημική κλίση.[19], [23]

Όσον αφορά την επίδραση του pH και της pKa στην απορρόφηση ενός φαρμάκου, αυτή αξίζει να εξεταστεί ειδικά για την απορρόφηση στο γαστρεντερικό σωλήνα. Τα περισσότερα φάρμακα είναι ασθενή οξέα ή ασθενείς βάσεις και μπορούν να υπάρχουν σε διαλύματα είτε σε ιονισμένη είτε σε μη – ιονισμένη μορφή. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα μη ιονισμένα μόρια τείνουν να είναι λιποδιαλυτά ενώ τα ιονισμένα όχι. Η κατανομή των ασθενών αυτών ηλεκτρολυτών στις μεμβράνες είναι συνάρτηση της pKa της ένωσης και της διαβάθμισης του pH κατά μήκος της μεμβράνης. Το χαμηλό pH του στομαχιού ευνοεί την απορρόφηση των φαρμακευτικών ενώσεων που είναι ασθενή οξέα, αφού σε αυτό το περιβάλλον οι ασθενείς βάσεις ιονίζονται και άρα δεν απορροφώνται από το στομάχι. Στο έντερο η απορρόφηση είναι γρήγορη τόσο για τα ασθενή οξέα (pK > 3) όσο και για τις ασθενείς βάσεις (pK < 7.8). Ο μεγαλύτερος χρόνος διέλευσης και η αυξημένη επιφάνεια του εντέρου σημαίνει ότι για την πλειονότητα των φαρμάκων, η εντερική απορρόφηση είναι ποσοτικά πιο σημαντική παρόλο που θα θεωρούταν λιγότερο ευνοϊκή λόγο pH.[19]

Η διεργασία της απορρόφησης ενός φαρμάκου συνδέεται άρρηκτα με την έννοια της βιοδιαθεσιμότητας. Ως βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται το κλάσμα της χορηγούμενης δόσης του φαρμάκου το οποίο εμφανίζεται στη συστηματική κυκλοφορία του αίματος. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα στο οποίο διαφαίνεται η σύνδεση της διεργασίας της απορρόφησης με την βιοδιαθεσιμότητα είναι η χορήγηση ενός φαρμάκου από το στόμα. Όταν ένα φάρμακο χορηγείται από το στόμα απορροφάται πρώτα από το στομάχι και το έντερο, η απορρόφηση όμως αυτή μπορεί να είναι περιορισμένη εξαιτίας των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του φαρμάκου ή της μορφής της δοσολογίας. Έπειτα το φάρμακο περνά από το ήπαρ όπου μπορεί να πραγματοποιηθεί μεταβολισμός πρώτης διόδου ή χολική απέκκριση πριν το φάρμακο προλάβει να εισέλθει στην συστηματική κυκλοφορία. Κατά συνέπεια, ένα μέρος της χορηγούμενης δόσης

του φαρμάκου θα απενεργοποιηθεί ή θα αποβληθεί από τον οργανισμό προτού να φτάσει στο επιθυμητό σημείο δράσης του. Μάλιστα, ο μεταβολισμός ή η απέκκριση του από το ήπαρ μπορεί να είναι υψηλά, με αποτέλεσμα η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου να μειωθεί σημαντικά. Η βιοδιαθεσιμότητα μπορεί βέβαια να επηρεαστεί και από άλλους παράγοντες, όπως η ανατομία, η φυσιολογία και η παθολογική κατάσταση του ασθενούς. Οι παράγοντες αυτοί θα πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά καθώς καθορίζουν το ποια θα είναι η καταλληλότερη οδός χορήγησης του φαρμάκου.[21, p. 4]

1.2.2 Κατανομή

Η κατανομή των φαρμάκων περιγράφει την μετακίνηση μιας φαρμακευτικής ουσίας από τη συστηματική κυκλοφορία στην μικρή κυκλοφορία προς τους ιστούς και τα όργανα. Είναι δυνατόν να διακριθούν δύο φάσεις στη διεργασία της κατανομής ενός φαρμάκου. Κατά την πρώτη φάση το ήπαρ, τα νεφρά, ο εγκέφαλος λαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της ουσίας και σε δεύτερη φάση ακολουθεί η κατανομή της στους μυς, τα υπόλοιπα όργανα, το δέρμα και το λίπος, με πιο αργό ρυθμό. Είναι προφανές ότι η δεύτερη φάση περιλαμβάνει πολύ μεγαλύτερο κλάσμα της σωματικής μάζας, σε σύγκριση με την πρώτη φάση, και είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο μέρος της κατανομής προς τους ιστούς και τα όργανα.[21, p. 7]

Η διεργασία της κατανομής ελέγχεται από την αιμοδυναμική των ιστών, την παθητική διάχυση των λιπιδικών μεμβρανών, την σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος στο αίμα (ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού και α1 όξινη γλυκοπρωτεΐνη), τη σύνδεση με μακρομόρια των ιστών και την ενεργή διάχυση με τη βοήθεια μορίου-μεταφορέα που αναγνωρίζει την ξενοβιοτική ένωση (φαρμακευτική ένωση).[19] Η κατανομή των φαρμάκων είναι σε γενικές γραμμές μια γρήγορη διεργασία. Τα μικρά λιπόφιλα μόρια μπορούν να διαπεράσουν τις λιπιδικές μεμβράνες με ευκολία χάρη στην παθητική διάχυση, ενώ μεγαλύτερα ή περισσότερο πολικά μόρια απαιτούν ειδικούς μεταφορείς για να εισέλθουν στους ιστούς. Τα φάρμακα που μεταφέρονται στους ιστούς μέσω ενεργητικής διάχυσης εμφανίζουν πολύ υψηλότερη συγκέντρωση στον ιστό σε σχέση με το πλάσμα.[20] Η συσσώρευση και δέσμευση ενός φαρμάκου στους ιστούς μπορεί να χρησιμεύσει ως «δεξαμενή» που παρατείνει τη δράση του φαρμάκου, μια τέτοια δέσμευση είναι συνήθως αναστρέψιμη. Ωστόσο, η συσσώρευση των φαρμάκων στους ιστούς μπορεί να οδηγήσει σε τοπική τοξικότητα. Ένα παράδειγμα είναι το αμινογλυκοσιδικό αντιβιοτικό γενταμυκίνη, το οποίο όταν συσσωρεύεται μπορεί να προκαλέσει τοπική τοξικότητα στα νεφρά και την αίθουσα του έσω - αυτιού.[23]

Να σημειωθεί ότι, τα φάρμακα μέσω της κατανομής μπορούν να φτάσουν στους ιστούς – στόχους όπου και δρουν (όπως ο εγκέφαλος, το δέρμα, όγκοι και άλλα όργανα) αλλά είναι δυνατόν να οδηγηθούν και προς όργανα αποβολής (το ήπαρ και τα νεφρά) από όπου τα φάρμακα αποβάλλονται από τον οργανισμό.[20]

Η κατανομή ενός φαρμάκου μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, κυρίως από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου που εξετάζεται καθώς και από φυσιολογικούς παράγοντες των μεμονωμένων ασθενών. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου που χρειάζεται να λαμβάνονται υπόψιν κατά τη μελέτη της κατανομής του είναι η διαλυτότητα του και η σταθερότητα του. Οι φυσιολογικοί παράγοντες μπορεί να περιλαμβάνουν την καρδιακή παροχή, την περιφερική ροή του αίματος, την διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων και τον όγκο των ιστών. Οι παραπάνω παράγοντες επηρεάζουν το ρυθμό της κατανομής και τη συνολική ποσότητα του φαρμάκου που κατανέμεται τελικά στους ιστούς. Το pH και η βαθμίδωση του δεν είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή ενός φαρμάκου καθώς η διαφορά του pH μεταξύ ιστών (pH 7.00) και αίματος (pH 7.40) είναι μικρή.[21, p. 7], [23]

1.2.3 Μεταβολισμός

Όταν ένα φάρμακο εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό αντιμετωπίζεται ως ξένη ουσία και μεταβολίζεται.[23] Ο μεταβολισμός περιλαμβάνει ένζυμα για τη βιομετατροπή του φαρμάκου και αποτελεί τη διαδικασία μέσω της οποίας το φάρμακο μετατρέπει χημικά στο σώμα σε μεταβολίτη. Οι ξενοβιοτικές ενώσεις (φάρμακα) που είναι πολύ λιπόφιλες για να απεκκριθούν από τα νεφρά, μεταβολίζονται άμεσα από τον οργανισμό σε ενώσεις με μεγαλύτερη υδροφιλία (μεταβολίτες) ώστε να μπορούν να απεκκριθούν από τα νεφρά ή να απορροφηθούν εκ νέου από το κυκλοφορικό σύστημα.[20]

Σκοπός του μεταβολισμού είναι η διευκόλυνση της απέκκρισης των φαρμακευτικών ουσιών από τον οργανισμό καθώς και ο τερματισμός της βιολογικής και φαρμακολογικής τους δραστηριότητας. Τα ενζυματικά συστήματα που εμπλέκονται στη βιομετατροπή των φαρμάκων εντοπίζονται κυρίως στο ήπαρ, αν και κάθε ιστός που εξετάζεται διαθέτει κάποια μεταβολική δραστηριότητα. Άλλα όργανα με σημαντική μεταβολική δραστηριότητα είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας, τα νεφρά και οι πνεύμονες. Μετά από τη χορήγηση ενός φαρμάκου από το στόμα, ένα μέρος της δόσης μπορεί να απενεργοποιηθεί μεταβολικά είτε στο επιθήλιο του εντέρου είτε στο ήπαρ πριν προλάβει να φτάσει στο κυκλοφορικό σύστημα. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται

μεταβολισμός πρώτης διόδου και περιορίζει σημαντικά την διαθεσιμότητα φαρμάκων με υψηλό μεταβολισμό. Όσον αφορά το μεταβολισμό εντός ενός συγκεκριμένου κυττάρου, η περισσότερη μεταβολική δραστηριότητα εντοπίζεται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και το κυτταρόπλασμα, αν και βιομετατροπές φαρμάκων μπορούν να συμβούν και στα μιτοχόνδρια και την πυρηνική μεμβράνη. [21, p. 11]

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από τα μεταβολικά ένζυμα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, τις αντιδράσεις της Φάσης I και τις αντιδράσεις της Φάσης II. Οι μεταβολικές αντιδράσεις που ανήκουν στη Φάση I έχουν ως βασικό τους στόχο την αύξηση της υδροφιλίας του μορίου και είναι αντιδράσεις οξείδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης. Η φαρμακολογική δράση των μεταβολιτών που προκύπτουν μπορεί να είναι ίδια, μικρότερη ή μεγαλύτερη από την φαρμακολογική δράση των αρχικών μορίων. Η πιο σημαντική οικογένεια ενζύμων που συμμετέχει στη Φάση I είναι το σύστημα P-450. Τα ενζυμικά συστήματα που εμπλέκονται στις αντιδράσεις της Φάσης I βρίσκονται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο.[20], [21, pp. 72–77], [24] Σχετικά με τη Φάση II, οι αντιδράσεις που εντάσσονται σε αυτήν είναι κυρίως αντιδράσεις σύζευξης κατά τις οποίες ένα πολικό υπόστρωμα (γλυκουρονικό οξύ, θειικό οξύ, οξικό οξύ, αμινοξύ) συνδέεται είτε με το αρχικό μόριο, είτε με τον μεταβολίτη που έχει προκύψει από τη Φάση I. Το προϊόν της σύζευξης είναι φαρμακολογικά αδρανές και περισσότερο πολικό από το αρχικό με αποτέλεσμα να μπορεί να απεκκριθεί ευκολότερα από τα ούρα ή τη χολή. Τα ενζυμικά συστήματα που συμμετέχουν στη Φάση II βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα.[20], [21, pp. 72–77]

Οι μεταβολίτες ενός φαρμάκου μπορεί να είναι τοξικοί, να έχουν νέες ιδιότητες αποτελεσματικότητας ή/και να μεταβάλλουν το μεταβολισμό άλλων συν-χορηγούμενων φαρμάκων με τα οποία αλληλεπιδρούν. Επομένως, οι ανεπιθύμητες ενέργειες ενός φαρμάκου μπορεί να σχετίζονται είτε με τους τοξικούς μεταβολίτες του, είτε με την αλληλεπίδραση του με τα συν-χορηγούμενα φάρμακα. Για να αξιολογηθεί το προφίλ ασφάλειας ενός φαρμάκου καθώς και η φαρμακοκινητική του, είναι απαραίτητες in vitro μελέτες του μεταβολισμού του.[25]

Ο μεταβολισμός ενός φαρμάκου μπορεί να γίνει πριν ή αφού αυτό φτάσει στις περιοχές δράσης του. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ο μεταβολισμός σχετίζεται με αλλοιωμένη φαρμακολογική δράση, όπως συμβαίνει με τα προ-φάρμακα. Τα προ-φάρμακα είναι φαρμακολογικά αδρανείς ενώσεις σχεδιασμένες ώστε να μεγιστοποιούν την ποσότητα της δραστικής ουσίας που φτάνει στον επιθυμητό τόπο δράσης. Έτσι τα αδρανή προ-φάρμακα μέσω της διαδικασίας του μεταβολισμού

μετατρέπονται σε βιολογικά ενεργούς μεταβολίτες (συχνά με υδρόλυση ενός εστέρα).[21, pp. 72–77] Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι για χειρόμορφα φάρμακα, ένα εναντιομερές μπορεί να μεταβολιστεί σε μεγαλύτερο βαθμό από ό, τι το άλλο λόγω της στερεοεπιλεκτικότητας των χειρομορφικών ενζύμων μεταβολισμού.[23]

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο μεταβολισμός μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια ενός φαρμάκου. Επομένως, είναι ιδιαίτερης σημασίας η κατανόηση της διεργασίας και η γνώση των ενζύμων τα οποία μεταβολίζουν ένα νέο φάρμακο. Ο μεταβολισμός όμως, δεν μπορεί να προβλεφθεί εύκολα και για τον λόγο αυτό η ανάπτυξη νέων φαρμάκων καθίσταται χρονοβόρα και δαπανηρή. Μερικοί από τους λόγους για τους οποίους είναι δύσκολη πρόβλεψη του μεταβολικού προφίλ ενός φαρμάκου είναι οι εξής:

a) υπάρχουν διαφορές από άτομο σε άτομο σχετικά με την ικανότητα τους να μεταβολίσουν ένα φάρμακο
b) ένα φάρμακο μπορεί να αλληλεπιδρά με κάποιο άλλο φάρμακο που χορηγείται ταυτόχρονα
c) διαφορετικά είδη μπορεί να εμφανίζουν διαφορές στην έκφραση των ενζύμων που μεταβολίζουν τα φάρμακα.

Μάλιστα, εξαιτίας της τελευταίας περίπτωσης περιορίζεται η δυνατότητα χρήσης ζωικών μοντέλων για την μελέτη του μεταβολισμού κατά το σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ουσιών.[21, p. 71]

1.2.4 Απέκκριση

Η απέκκριση αναφέρεται στην αναντίστρεπτη αφαίρεση ενός φαρμάκου από το σώμα, με αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης της φαρμακευτικής ουσίας στο σημείο δράσης της. Επομένως, για την διατήρηση της θεραπευτικής δράσης μιας ένωσης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, απαιτείται αργή διαδικασία απέκκρισης ώστε να επιτυγχάνεται το επιθυμητό επίπεδο συγκέντρωσης της. Τα φάρμακα απεκκρίνονται είτε αμετάβλητα (η ένωση διατηρεί την αρχική της μορφή, αυτή με την οποία εισήλθε στον οργανισμό), είτε ως μεταβολίτες (δομικά διαφορετικές ενώσεις που προκύπτουν από τη διαδικασία του μεταβολισμού). [23]

Τα σημαντικότερα όργανα του ανθρώπινου σώματος για τη διαδικασία της απέκκρισης είναι τα νεφρά. Στα νεφρά, οι φαρμακευτικές ενώσεις και οι μεταβολίτες τους απεκκρίνονται μέσω των ούρων. Ορισμένα φάρμακα απεκκρίνονται από το έντερο μέσω των κοπράνων, αυτά κατά κύριο

λόγο είναι όσα δεν απορροφήθηκαν κατά την πρόσληψη τους από το στόμα ή οι μεταβολίτες φαρμάκων που εκκρίνονται στην εντερική οδό και δεν απορροφώνται ξανά. Οι πνεύμονες συμβάλλουν επίσης στην απέκκριση φαρμάκων, κυρίως των αναισθητικών αερίων. Το μητρικό γάλα μπορεί να αποτελέσει και αυτό με τη σειρά του οδό απέκκρισης φαρμάκων και μάλιστα απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή καθώς τα φάρμακα που απεκκρίνονται είναι πιθανό να έχουν ανεπιθύμητη φαρμακολογική επίδραση στο βρέφος που θηλάζει, παρ' όλο που η συγκέντρωση τους είναι χαμηλή.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως τα όργανα που συμμετέχουν στην διαδικασία της απέκκρισης, με εξαίρεση του πνεύμονες, είναι περισσότερο αποτελεσματικά κατά την απέκκριση πολικών από ότι λιποδιαλυτών ενώσεων. Δηλαδή, μια λιποδιαλυτή φαρμακευτική ένωση δεν απεκκρίνεται εύκολα εάν δεν έχει μεταβολιστεί πρώτα σε μια πιο πολική ένωση.[21, p. 10]

1.2.5 Τοξικότητα

Η τοξικότητα είναι μια φαρμακευτική ιδιότητα, η οποία αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που οδηγούν στην απόρριψη υποψήφιων φαρμάκων κατά την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών.[26] Μάλιστα, το 40% των υποψήφιων φαρμάκων που βρίσκονται στην προ-κλινική φάση απορρίπτονται λόγω εμφάνισης τοξικότητας σε ζώα.[25] Ορισμένα φάρμακα έχουν αποσυρθεί μετά την κυκλοφορία τους στην αγορά λόγω εμφάνισης τοξικότητας και ανεπιθύμητων παρενεργειών, γεγονός που συνοδεύεται από μεγάλο οικονομικό κόστος.[27] Επιπλέον, εκτός από την ίδια την φαρμακευτική ουσία, τοξικότητα μπορεί να εμφανίζει και κάποιος μεταβολίτης της, με αποτέλεσμα η πρόβλεψη της ιδιότητας αυτής να γίνεται δύσκολη.[20] Με βάση όλα τα παραπάνω, η τοξικότητα είναι μια ιδιότητα ιδιαίτερης σημασίας για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών.

Η σοβαρότητα της χημικής τοξικότητας μιας φαρμακευτικής ουσίας για τον ανθρώπινο οργανισμό, προκύπτει ως συνδυασμός τριών βασικών παραγόντων. Ο πρώτος παράγοντας αφορά την ίδια την χημική ουσία, η οποία μπορεί εξ αρχής να είναι τοξική εξαιτίας της δομής της. Ο παράγοντας αυτός, εφόσον έχει προσδιοριστεί η δομή της ένωσης, μπορεί να θεωρηθεί σταθερός και να μετρηθεί πειραματικά μελετώντας την επίδραση της ένωσης σε μια συγκεκριμένη κυτταρική λειτουργία (π.χ. διάσπαση λιπιδίων, μεταφορά χολικών οξέων, κλπ.). Ο δεύτερος παράγοντας αφορά την συγκέντρωση της φαρμακευτικής ουσίας τοπικά, σε συγκεκριμένο όργανο. Γίνεται κατανοητό πως η τιμή της συγκέντρωσης αυτής, μπορεί να επηρεαστεί από

επιμέρους παράγοντες όπως η δοσολογία, ιδιαιτερότητες του συγκεκριμένου ιστού, μεμονωμένοι πολυμορφισμοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες (οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν την ταυτόχρονη λήψη από τον ασθενή άλλων φαρμάκων, τροφών και βοτάνων). Ο τρίτος και τελευταίος παράγοντας που εξετάζεται αφορά τον ξενιστή, τον οργανισμό δηλαδή στον οποίο εισάγεται η φαρμακευτική ουσία. Πιο συγκεκριμένα, η τοξικότητα ή μη ενός φαρμάκου επηρεάζεται και από την ικανότητα των συστημάτων άμυνας του ξενιστή να αποτοξινώσουν τη χημική ουσία και να αντιμετωπίσουν πιθανές βλάβες. Τα συστήματα άμυνας ενός ξενιστή είναι δυνατόν να ενεργοποιούνται και να καταστέλλονται με διαφορετικό τρόπο σε κάθε οργανισμό εξαιτίας των μοναδικών ιδιομορφιών και περιβαλλοντικών συνθηκών τους. Συνεπώς, η πρόβλεψη της τοξικότητας μιας φαρμακευτικής ουσίας για έναν οργανισμό είναι ένα πολύπλευρο πρόβλημα που απαιτεί το συνδυασμό ερευνητικών αποτελεσμάτων από διαφορετικά επιστημονικά πεδία.[20]

1.3 Ο ρόλος της λιποφιλίας στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ενώσεων

Ανάμεσα στις φυσικοχημικές ιδιότητες μιας φαρμακευτικής ένωσης, η λιποφιλία έχει αναγνωριστεί ως ο πιο σημαντικός παράγοντας για την επιτυχή μετάβαση ενός φαρμάκου από τις κλινικές δοκιμές στην αγορά. Η λιποφιλία εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου ή τμήματος του μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον και αναφέρεται στην ικανότητα μιας ένωσης να διαλυθεί σε λίπη, έλαια, λιπίδια και πολικούς διαλύτες (π.χ. τολουόλιο, εξάνιο). Επομένως, σε in vivo καταστάσεις, η λιποφιλία έχει σημαντικό αντίκτυπο τόσο στην διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών από τις φαρμακευτικές ενώσεις, όσο και στην υδρόφοβη σύνδεση τους με μακρομόρια, συμπεριλαμβανομένου και του υποδοχέα – στόχου αλλά και άλλων πρωτεϊνών όπως πρωτεΐνες του πλάσματος, μεταφορείς (για ενεργητική διάχυση) και ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό. [1, p. 146], [5], [8]

Εδώ και πολλά χρόνια, η λιποφιλία αναγνωρίζεται ως σημαντική παράμετρος για τις σχέσεις δομής–φαρμακολογικής δράσης και τις σχέσεις δομής-ιδιοτήτων ADME. Επιπλέον, στον κλάδο της ιατρικής χημείας, πρόκειται για την ιδιότητα που μπορεί να δώσει τις περισσότερες πληροφορίες για μια ένωση και με τη μεγαλύτερη επιτυχία. Εκτός από την πολύτιμη συνεισφορά της στις ποσοτικές σχέσεις δομής-δραστηριότητας (QSARs) και τις ποσοτικές σχέσεις δομής-φαρμακοκινητικής (QSPkRs), η λιποφιλία μπορεί να δώσει πληθώρα πληροφοριών σχετικά με τις διαμοριακές δυνάμεις, τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις και τη μοριακή δομή με την ευρύτερη έννοια. Ιδιαίτερη είναι η σημασία της και για τις ιδιότητες ADME, δηλαδή τις διεργασίες της

απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της απέκκρισης. Η λιποφιλία συμβάλει στην διαλυτότητα των φαρμακευτικών ενώσεων, την διαπερατότητα τους μέσω μεμβρανών, την ισχύ τους, την επιλεκτικότητα τους, ενώ επηρεάζει και την φαρμακοκινητική τους, τον μεταβολισμό τους, αλλά και το φαρμακοδυναμικό και τοξικολογικό προφίλ τους.[8], [28], [29]

Η άμεση σχέση μεταξύ της διαλυτότητας των φαρμακευτικών ενώσεων στις λιπιδικές μεμβράνες και τη βιολογική τους δράση έχει αποδειχθεί ήδη από τις αρχές του 20ου αιώνα, όταν οι Meyer και Overton ξεκίνησαν να ερευνούν το ρόλο των φυσικοχημικών ιδιοτήτων στη δράση των φαρμάκων. Ωστόσο, η έρευνα για τη λιποφιλία συστηματοποιήθηκε χάρη στο πρωτοποριακό έργο των Hansch, Fujita και Leo, οι οποίοι συσχέτισαν αυτή την ιδιότητα τόσο με τη δυνατότητα που έχουν οι φαρμακευτικές ενώσεις να φτάσουν στο επιθυμητό σημείο δράσης, ακολουθώντας μια «τυχαία διαδρομή» μέσα στον οργανισμό, όσο και με την υδροφοβική σύνδεση του φαρμάκου με τις πρωτεΐνες του πλάσματος.[5]

Η λιποφιλία μπορεί να εκφραστεί ποσοτικά μέσω των συντελεστών μερισμού (logP) και κατανομής (logD), για τους οποίους γίνεται αναλυτική αναφορά στις παραγράφους που ακολουθούν.[30]

Αν και ο σημαντικός ρόλος της λιποφιλίας στη διαπερατότητα ενός φαρμάκου μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και στις αλληλεπιδράσεις υποδοχέα – φαρμάκου είναι αδιαμφισβήτητος, υψηλές τιμές logP συνδέονται με ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά φαρμάκων όπως ο εκτεταμένος και απρόβλεπτος μεταβολισμός, η υψηλή δέσμευση πρωτεϊνών στο πλάσμα, η συσσώρευση στους ιστούς, η κακή διαλυτότητα και η ανεπαρκής απορρόφηση. Συγκεκριμένα, η υδρόφοβη δέσμευση, ως μη ειδική αλληλεπίδραση, μειώνει την εκλεκτικότητα των φαρμακευτικών ουσιών, αυξάνει τις πιθανότητες σύνδεσης τους εκτός στόχου, τον κίνδυνο ασυμβατότητας και την μη ειδική τοξικότητα τους. Η πρώτη αναφορά στις αρνητικές επιδράσεις της υψηλής λιποφιλίας έγινε από τους Hansch et al., το 1987. Οι συγγραφείς της εν λόγω δημοσίευσης υπογράμμισαν πως η αναζήτηση για πιο δραστικές ενώσεις πρέπει να επικεντρωθεί στην υψηλή συγγένεια τους με την πρωτεΐνη – υποδοχέα και στην επίτευξη της με την ελάχιστη δυνατή λιποφιλία. Η ιδέα για την ελάχιστη δυνατή λιποφιλία κατά την ανάπτυξη και τον σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών προϊόντων των Hansch et al. βρίσκεται σε συμφωνία με τον «κανόνα των 5» του Lipinski, ο οποίος το 1997 πρότεινε ανώτατα όρια για τις τιμές logP. [5], [31]

Ο Lipinski και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν την πρώτη υπολογιστική ανάλυση υπολογισμένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων για ένα πολύ μεγάλο αριθμό ενώσεων. Συγκεκριμένα, για την επιλογή των ενώσεων που μελετήθηκαν, χρησιμοποίησαν τη βάση δεδομένων World Drug Index, η οποία περιέχει συνολικά περισσότερες από 50000 ενώσεις. Από αυτές επέλεξαν ένα υποσύνολο 2245 ενώσεων που απορροφώνται από το στόμα και δεν είναι πεπτίδια, πολυμερή ή φάρμακα που περιέχουν ασυνήθιστες λειτουργικές ομάδες. Μέσω της ανάλυσης των 2245 ενώσεων παρατήρησαν πως περίπου το 90% των φαρμακευτικών μορίων που χορηγούνται από το στόμα διαθέτουν περιορισμένο εύρος τιμών στις υπολογισμένες ιδιότητες τους. Με βάση τα ευρήματα της ανάλυσης, διατύπωσαν τον «κανόνα των πέντε», σύμφωνα με τον οποίο η κακή απορρόφηση ή διαλυτότητα, ή γενικότερα η κακή βιοδιαθεσιμότητα, είναι πιο πιθανή όταν το εξεταζόμενο φαρμακευτικό μόριο πληροί δύο ή περισσότερες από τις παρακάτω προϋποθέσεις:

1. Υπάρχουν περισσότερες από πέντε ομάδες δοτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου (άθροισμα ομάδων OH και NH) στο μόριο.
2. Το μοριακό βάρος είναι μεγαλύτερο από 500.
3. Ο υπολογισμένος συντελεστής μερισμού logP, στο σύστημα n-οκτανόλης – νερού, είναι μεγαλύτερος του 5.
4. Υπάρχουν περισσότερες από 10 ομάδες δεκτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου (άθροισμα N και O του μορίου) στο μόριο.
5. Οι ενώσεις που αποτελούν υποστρώματα για βιολογικούς μεταφορείς εξαιρούνται από τον κανόνα των πέντε.

Κατά την εφαρμογή του «κανόνα των πέντε» πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν πως η ανάλυση βασίζεται στις υπολογισμένες ιδιότητες μερικών χιλιάδων φαρμάκων, επομένως εξ ορισμού, ορισμένα φάρμακα θα βρίσκονται εκτός των παραμέτρων αποκοπής του κανόνα. Βέβαια, τα φάρμακα που βρίσκονται εκτός των ορίων του κανόνα αντιστοιχούν σε μικρό αριθμό θεραπευτικών κατηγοριών. Οι ενώσεις που εμφανίζουν ικανοποιητικά χαρακτηριστικά όταν χορηγούνται από το στόμα, αλλά δεν πληρούν τις προϋποθέσεις του «κανόνα των πέντε» είναι συνήθως αντιβιοτικά, αντιμυκητιασικά, βιταμίνες και καρδιακές γλυκοσίδες. Οι ενώσεις που ανήκουν σε αυτές τις κατηγορίες διαθέτουν δομικά χαρακτηριστικά που τους επιτρέπουν να λειτουργούν ως υποστρώματα για φυσικούς μεταφορείς και άρα αποτελούν εξαιρέσεις του κανόνα. Η δημοσίευση των Lipinski et al. έχει αναφερθεί σε περισσότερες από 5000 επιστημονικές εργασίες και βιβλία και έχει τεράστιο αντίκτυπο στην φαρμακευτική χημεία από τότε. [3, p. 215], [32]

Από τα παραπάνω, προκύπτει πως υψηλές τιμές λιποφιλίας, όπου είναι δυνατόν, πρέπει να αποφεύγονται κατά την ανάπτυξη και τον σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών ενώσεων. Επιπλέον, η λιποφιλία μπορεί να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη για την τελική επιτυχία μιας νέας ένωσης όταν αυτή βρίσκεται στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης της. Αν τα δεδομένα λιποφιλίας αποθηκευτούν σε μια βάση δεδομένων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύγκριση και την κατάταξη ενώσεων στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Πιο γενικά, η κατανόηση της λιποφιλίας μιας ένωσης και του πως αυτή διαμορφώνεται είναι απαραίτητη για την ανακάλυψη φαρμάκων και τη διαδικασία σχεδιασμού, καθώς η αξία και η επίδραση της λιποφιλίας σε αυτήν είναι αδιαμφισβήτητη.[8], [33]

Παρόλο που ο όρος «υδροφοβία» χρησιμοποιείται συχνά αντί του όρου «λιποφιλία» αυτοί οι όροι δεν είναι οι ίδιοι. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι σιλικόνες και οι φθοράνθρακες, οι ενώσεις αυτές είναι υδρόφοβες αλλά όχι λιπόφιλες.[8] Για την ακρίβεια, η λιποφιλία, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αντιπροσωπεύει τη συγγένεια ενός μορίου ή ενός τμήματος προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον, ενώ η υδροφοβία μετρά τη σύνδεση μη πολικών ομάδων ή μορίων σε ένα υδατικό περιβάλλον, η οποία προκύπτει από την τάση του νερού να αποφεύγει μη πολικά μόρια.[3, p. 52] Η υδροφοβία, όμως, αποτελεί συνιστώσα της λιποφιλίας (τη βασικότερη, αντιπροσωπεύει υδρόφοβες δυνάμεις και δυνάμεις διασποράς) και η δεύτερη συνιστώσα της είναι η πολικότητα (αντιπροσωπεύει δεσμούς υδρογόνου, προσανατολισμού και επαγωγής). Η διπλή φύση της λιποφιλίας μπορεί να εκφραστεί μέσω της γενικής σχέσης[1, pp. 155–156], [30, pp. 184–185], [34, p. 55]:

$$\Upsilon\delta\rho o\varphi\iota\lambda\acute{\iota}\alpha \;=\; \Upsilon\delta\rho o\varphi o\beta\acute{\iota}\alpha \;+\; \Pi o\lambda\iota\kappa\acute{o}\tau\eta\tau\alpha \quad [1.1]$$

Οι συνιστώσες της λιποφιλίας, όπως φαίνονται στην σχέση [1.1], μπορούν να περιγραφούν με θεμελιώδεις μοριακές παραμέτρους. Η υδροφοβία (στερική συνιστώσα) μπορεί να εκτιμηθεί με παραμέτρους που εκφράζουν όγκο, όπως ο μοριακός όγκος ή το εμβαδόν μοριακής επιφάνειας, το μοριακό βάρος και η πολωσιμότητα ή η μοριακή διαθλασιμότητα. Η σημαντική συμβολή του όγκου στη λιποφιλία έχει ως αποτέλεσμα την σχετικά ισχυρή συσχέτιση του συντελεστή κατανομής με τις αντίστοιχες παραμέτρους, ιδιαίτερα στην περίπτωση μη πολικών μορίων. Η πολικότητα εκφράζεται με τη διπολική ροή, την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου καθώς και με ηλεκτρονιακές παραμέτρους.[1, pp. 155–156]

Ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, που προωθούνται από ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά, όπως υποκαταστάτες σε αρωματικά ή ετεροκυκλικά συστήματα, παρουσία συζευγμένων συστημάτων στα μόρια, και εσωτερικοί δεσμοί υδρογόνου, επηρεάζουν επίσης την λιποφιλία.[5]

Το πλέον καθιερωμένο σύστημα αναφοράς για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας μιας ένωσης είναι το σύστημα n-οκτανόλης – νερού. Η επιλογή αυτού του συστήματος βασίστηκε στα εξής χαρακτηριστικά:

- Η n-οκτανόλη έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου ως δέκτης και ως δότης, προσομοιάζοντας με αυτό τον τρόπο πολλά βιολογικά συστήματα (μεμβράνες, πρωτεϊνες).
- Η n-οκτανόλη δεν απορροφά στο υπεριώδες, διευκολύνοντας έτσι τον πειραματικό προσδιορισμό.
- Η n-οκτανόλη δεν είναι τοξική (έχει ωστόσο δυσάρεστη, γλυκερή οσμή).
- Το σύστημα n-οκτανόλης – νερού, σε σχέση με άλλα συστήματα διαλυτών, δίνει πιο έυκολα αποτελέσματα για το συντελεστή μερισμού.[1, p. 147]

Ανεξάρτητα από το πόσο ευρεία είναι η χρήση αυτού του συστήματος, πολλές ερευνητικές προσπάθειες έχουν προσανατολιστεί προς την ανάπτυξη περισσότερο αντιπροσωπευτικών μοντέλων μεμβρανών, όπως τα λιποσώματα. Ωστόσο, οι δυσκολίες που σχετίζονται με την παρασκευή πρότυπων λιποσωμάτων, την σταθερότητα τους και τα πειράματα κατανομής (επίπονη διαδικασία με μικρή επαναληψιμότητα), έχουν περιορίσει την διάδοση τους ως εναλλακτική λύση έναντι της n-οκτανόλης. Η ανάπτυξη της χρωματογραφίας IAM (Immobilized Artificial Membranes) είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση, η οποία συνδυάζει την προσομοίωση του περιβάλλοντος των βιολογικών μεμβρανών με ταχύτατες μετρήσεις.[5]

1.3.1 Συντελεστής μερισμού P

Ο συντελεστής μερισμού P αποτελεί μέτρο της λιποφιλίας και αντιστοιχεί στην σταθερά ισορροπίας που περιγράφει την ισορροπία στην κατανομή μιας φαρμακευτικής ουσίας μεταξύ λιπιδικής και υδατικής φάσης ως εξής:

$$[\text{φαρμακευτική ουσία}]_{\text{υδατική φάση}} \overset{P}{\leftrightarrows} [\text{φαρμακευτική ουσία}]_{\text{λιπιδική φάση}}$$

όπου P η σταθερά ισορροπίας, η οποία εκφράζεται ως το πηλίκο της συγκέντρωσης του φαρμάκου στην λιπιδική φάση ως προς την συγκέντρωση του φαρμάκου στην υδατική φάση, όπως φαίνεται από την εξίσωση [1.2]:

$$P = \frac{[\varphi\alpha\rho\mu\alpha\kappa\varepsilon\upsilon\tau\iota\kappa\acute{\eta}\ \acute{\varepsilon}\nu\omega\sigma\eta]_{\lambda\iota\pi}}{[\varphi\alpha\rho\mu\alpha\kappa\varepsilon\upsilon\tau\iota\kappa\acute{\eta}\ \acute{\varepsilon}\nu\omega\sigma\eta]_{\upsilon\delta}} \quad [1.2]$$

Να σημειωθεί πως οι λιπιδικές φάσεις ενός οργανισμού (μεμβράνες, υδρόφοβα τμήματα πρωτεϊνών) μπορούν να προσομοιωθούν με τη χρήση κατάλληλου οργανικού διαλύτη, οπότε η σχέση (#.#) μετατρέπεται σε [1, pp. 146–148]:

$$P = \frac{[\varphi\alpha\rho\mu\alpha\kappa\varepsilon\upsilon\tau\iota\kappa\acute{\eta}\ \acute{\varepsilon}\nu\omega\sigma\eta]_{o\rho\gamma}}{[\varphi\alpha\rho\mu\alpha\kappa\varepsilon\upsilon\tau\iota\kappa\acute{\eta}\ \acute{\varepsilon}\nu\omega\sigma\eta]_{\upsilon\delta}} \quad [1.3]$$

Επιπλέον, πρέπει να γίνει σαφές πως ο συντελεστής μερισμού P περιγράφει την ισορροπία στην κατανομή μιας μη ιονισμένης διαλυμένης ουσίας μεταξύ υδατικής φάσης και ενός μη αναμίξιμου οργανικού διαλύτη. Σε περίπτωση που η φαρμακευτική ένωση βρίσκεται σε ιονισμένη μορφή, για την περιγραφή της ισορροπίας μεταξύ των δύο φάσεων χρησιμοποιείται ο συντελεστής κατανομής D, στον οποίο γίνεται αναφορά στην επόμενη ενότητα του κεφαλαίου.[8]

Ως σύστημα αναφοράς για τον σχεδιασμό φαρμάκων έχει καθιερωθεί το σύστημα n-οκτανόλης – νερού, για τον λόγο αυτό εάν δεν γίνεται ιδιαίτερη αναφορά, ο συντελεστής μερισμού αντιστοιχεί στο σύστημα n-οκτανόλης – νερού και χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά στην λογαριθμική μορφή του, logP.[1, pp. 146–148]

Ο συντελεστής μερισμού μπορεί να βρεθεί υπολογιστικά ή να προσδιοριστεί πειραματικά. [5] Όσον αφορά την ερμηνεία της τιμής του συντελεστή logP, όσο μεγαλύτερη τιμή έχει τόσο πιο λιπόφιλη είναι η φαρμακευτική ουσία στην οποία αναφέρεται. Σε γενικές γραμμές, η λιποφιλία παίζει σημαντικό ρόλο στην διαπερατότητα του φαρμάκου και τις αλληλεπιδράσεις υποδοχέα – φαρμάκου, όμως πολύ μεγάλες τιμές logP συνδέονται με προβληματικά χαρακτηριστικά των φαρμακευτικών ουσιών, όπως εκτεταμένο και απρόβλεπτο μεταβολισμό, υψηλή δέσμευση πρωτεϊνών στο πλάσμα ή συσσώρευση στους ιστούς, μείωση της εκλεκτικότητας του φαρμάκου και τοξικότητα. Με τη βοήθεια της βιβλιογραφίας έχουν οριστεί επιθυμητά εύρη τιμών για το

συντελεστή logP, καθώς αυτός συνδέεται με τις ιδιότητες ADMET των φαρμακευτικών ουσιών. Πιο συγκεκριμένα, μια φαρμακευτική ουσία εμφανίζει καλύτερη διαλυτότητα όταν η τιμή του συντελεστή μερισμού logP είναι μικρότερη του 3 (logP < 3), ενώ για τη βιοδιαθεσιμότητα η βέλτιστη τιμή του logP βρίσκεται εντός του εύρους 0 έως 3 (0 < logP < 3). Το εύρος αυτό συνάδει και με το εύρος της λιποφιλίας εντός του οποίου μπορεί κανείς να επιτύχει μια καλή ισορροπία μεταξύ διαλυτότητας και διαπερατότητας. Σχετικά με την απορρόφηση της φαρμακευτικής ουσίας, οι επιθυμητές τιμές του συντελεστή logP βρίσκονται στο διάστημα -1 έως 5.9 (-1 < logP < 5.9). [8] Τέλος, η τιμή του συντελεστή μερισμού μπορεί να συσχετιστεί και με την τοξικότητα του φαρμάκου. Δηλαδή, ένα φάρμακο με συντελεστή μερισμού μεγαλύτερο του 3 (logP > 3) είναι 2.5 φορές πιο πιθανό να εμφανίσει τοξικότητα σε σύγκριση με ένα φάρμακο το οποίο διαθέτει logP μικρότερο του 3 (logP < 3).[35] Ο σχεδιασμός ενός φαρμάκου βέβαια, δεν πρέπει να βασιστεί αποκλειστικά σε μία παράμετρο, όπως η τιμή του logP, αλλά σε ένα σύνολο ιδιοτήτων, φυσικοχημικών και φαρμακοκινητικών και να προσαρμοστεί σε μεμονωμένους στόχους. Απόδειξη για το παραπάνω αποτελεί η ύπαρξη επιτυχημένων φαρμάκων των οποίων οι τιμές logP δεν εμπίπτουν στα εύρη που παρατέθηκαν προηγουμένως ως τα βέλτιστα. Συμπληρωματικά, είναι σημαντικό, κατά το σχεδιασμό μιας φαρμακευτικής ένωσης, να λαμβάνεται υπόψιν πως τα εύρη που παρουσιάστηκαν έχουν προκύψει συνδυάζοντας διάφορες μεθοδολογίες που είτε προβλέπουν, είτε υπολογίζουν το συντελεστή logP, με το δικό της σφάλμα η κάθε μία. Επομένως, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη χρήση των γενικών αυτών κανόνων. [8]

1.3.2 Συντελεστής κατανομής D

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, όταν μια φαρμακευτική ουσία βρίσκεται στην αδιάστατη μορφή της, η λιποφιλία της μπορεί να αποδοθεί μέσω του συντελεστή μερισμού logP. Στην περίπτωση όμως που η ένωση διαθέτει κέντρα ιοντισμού, τότε ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται, μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο ιοντισμένη. Για την έκφραση της λιποφιλίας μιας ιοντισμένης ένωσης αντί του logP χρησιμοποιείται ο συντελεστής κατανομής D, ο οποίος χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά με την λογαριθμική του μορφή, logD, όπως συμβαίνει και με τον συντελεστή μερισμού.[5]

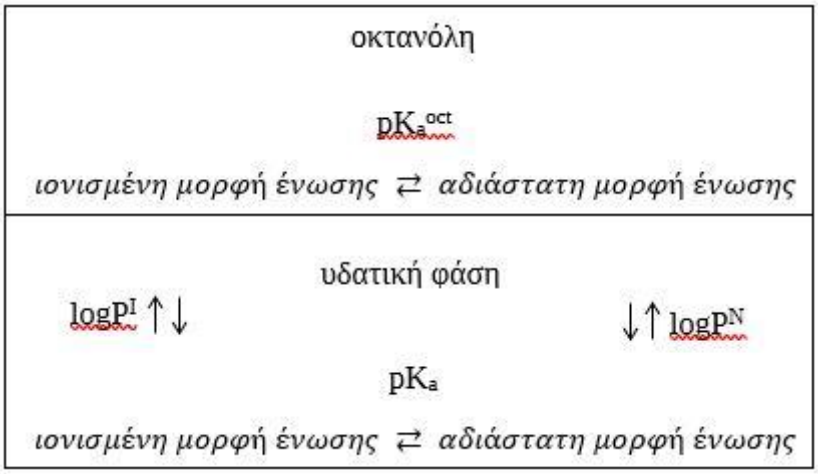
Ο συντελεστής κατανομής D ισούται με το πηλίκο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων όλων των μορφών της ένωσης (ιοντισμένων και αδιάστατης) στην οργανική φάση προς το αντίστοιχο άθροισμα στην υδατική φάση, δηλαδή [8]:

$$D = \frac{\sum c_{o\rho\gamma}}{\sum c_{\upsilon\delta}} \quad [1.4]$$

Οι σταθερές ισορροπίας που περιγράφουν την κατανομή μιας ιονισμένης ουσίας σε ένα διφασικό σύστημα, όπως το σύστημα οκτανόλης – νερού που είναι το σύστημα αναφοράς για την εξέταση της λιποφιλίας μιας ένωσης, περιγράφεται από τις παρακάτω σταθερές ισορροπίας:

- $\log P^N$: σχετίζεται με την κατανομή της αδιάστατης μορφής μεταξύ των δύο φάσεων
- $\log P^I$: σχετίζεται με την κατανομή της ιοντισμένης μορφής μεταξύ των δύο φάσεων
- pKa: η σταθερά ιοντισμού
- οκτανολικό pKa^{oct}: πρόκειται για μια σχετική σταθερά, που ορίζεται ως το pH της υδατικής φάσης, στο οποίο συνυπάρχουν στην οκτανόλη ίσες συγκεντρώσεις της αδιάστατης και της ιοντισμένης μορφής.

Οι τέσσερις ισορροπίες που περιεγράφηκαν παραπάνω από τις σταθερές τους συνοψίζονται στην Εικόνα 4, για μια φαρμακευτική ένωση στο σύστημα οκτανόλης – νερού.



Εικόνα 4 *Οι ισορροπίες κατά την κατανομή μιας ουσίας στο σύστημα οκτανόλης - νερού σε συνθήκες pH όπου συνυπάρχουν η αδιάστατη και η ιοντισμένη μορφή (η n-οκτανόλη αποτελεί την πάνω στοιβάδα καθώς έχει βάρος μικρότερο από του νερού)*

Όπως φαίνεται και από την εξίσωση [1.4], ο συντελεστής κατανομής D λαμβάνει υπόψιν του την ενδογενή λιποφιλία όλων των μορφών της ένωσης που εμφανίζονται στο διφασικό σύστημα (ιοντισμένες μορφές και αδιάστατη μορφή) και των σχετικών τους συγκεντρώσεων. Για δεδομένο pH, ο λογάριθμος logD εκφράζεται από τη σχέση:

$$logD = \log[\, f^N P^N + \sum(f^I P^I)] \quad [1.5]$$

όπου:

f^N και f^I είναι τα κλάσματα της ουδέτερης και της ιοντισμένης μορφής αντίστοιχα, τα οποία αποτελούν συνάρτηση της pKa.

P^N και P^I είναι οι συντελεστές μερισμού της αδιάστατης και της ιοντισμένης φάσης αντίστοιχα (θεωρώντας ότι η ουσία βρίσκεται σε μονομερείς μορφές).

Ο συντελεστής κατανομής logD είναι πάντοτε μικρότερος από τον συντελεστή μερισμού logP και θεωρώντας ότι πρακτικά στην οργανική φάση κατανέμεται μόνο η αδιάστατη φάση προκύπτει η παρακάτω σχέση:

$$logP = logD + Q \quad [1.6]$$

όπου Q διορθωτικός παράγοντας, ο οποίος εξαρτάται από την pKa της ουσίας και το pH του περιβάλλοντος. Με χρήση της σχέσης [1.6] μπορούν να μετατραπούν οι τιμές logD σε τιμές logP.[1, p. 149]

Κατά τη διαδικασία σχεδιασμού και ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ενώσεων, η τιμή του συντελεστή κατανομής logD που παρουσιάζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι αυτή που έχει υπολογιστεί στο φυσιολογικό pH του αίματος, δηλαδή για pH 7.40. Παρόμοιο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι τιμές logD που έχουν υπολογιστεί για pH 5.50, ως ενδεικτική τιμή pH του γαστρεντερικού συστήματος. [21]

Όσον αφορά τις τιμές του συντελεστή logD, όπως συμβαίνει και με τον συντελεστή logP, έτσι κι εδώ υπάρχουν ορισμένα εύρη τιμών που θεωρείται ότι ευνοούν την έκφραση κάποιων από τις επιθυμητές ιδιότητες των ενώσεων που εξετάζονται. Πιο συγκεκριμένα, η βιοδιαθεσιμότητα μιας ένωσης είναι καλύτερη όταν ο συντελεστής κατανομής παίρνει τιμές από 1 έως 3 ($1 < logD < 3$), τότε επιτυγχάνεται παράλληλα και καλή ισορροπία μεταξύ της διαλυτότητας και της διαπερατότητας.[8] Για την διαπερατότητα των μεμβρανών ο συντελεστής logD συνδυάζεται με το μοριακό βάρος της ένωσης για να δώσει τα βέλτιστα αποτελέσματα κάθε φορά, καθώς η ιδιότητα αυτή εξαρτάται και από τη λιποφιλία της ένωσης αλλά και από το μοριακό της βάρος. Έτσι, για ενώσεις με μοριακό βάρος από 350 έως 400 προτιμώνται τιμές logD μεγαλύτερες του 1.7 ($logD > 1.7$), για ενώσεις με μοριακό βάρος από 400 έως 450 προτιμώνται $logD > 3.1$, για μοριακό βάρος από 450 έως 500 προτιμώνται $logD > 3.4$ και για ενώσεις με μοριακό βάρος μεγαλύτερο

από 500 χρειάζονται logD > 4.5.[36] Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, έχει προταθεί πως η βέλτιστη λιποφιλία κινείται εντός του στενού εύρους 1 – 3 για τις τιμές του logD.[8] Βέβαια, όλα τα παραπάνω πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν ως προτάσεις κατά τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ενώσεων, να δίνεται προσοχή στις τιμές της λιποφιλίας των ενώσεων και να μη θεωρούνται ως απόλυτοι κανόνες.

1.3.3 Λιποφιλία αμφολυτών

Αμφολύτες ονομάζονται οι ενώσεις οι οποίες φέρουν μία ή περισσότερες όξινες ομάδες και μία ή περισσότερες βασικές ομάδες ταυτόχρονα. [1, p. 150] Οι αμφολύτες συναντώνται στην έρευνα στον τομέα της φαρμακευτικής είτε ως φαρμακευτικές ουσίες είτε ως μεταβολίτες φαρμακευτικών ουσιών. Στην δεύτερη περίπτωση, μια μεταβολική αντίδραση δημιουργεί μια επιπλέον ιονίζουσα ομάδα στο μόριο, με αποτέλεσμα μια διαφορετική συμπεριφορά ιονισμού.[37] Σχεδόν το 15% των ιονιζόμενων φαρμάκων είναι αμφολύτες. Η συνύπαρξη αντίθετων φορτίων μπορεί να συμβαίνει σε ορισμένα pH, οπότε οι αμφολύτες παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες φυσικοχημικές ιδιότητες. Η μελέτη των μοτίβων ιονισμού των αμφολυτών και των προφίλ λιποφιλίας τους μπορούν να βελτιώσουν την κατανόηση της φαρμακοκινητικής συμπεριφοράς των ενώσεων αυτών. [38]

Οι αμφολύτες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, στους κανονικούς αμφολύτες (ordinary ampholytes) και στους αμφολύτες που υφίστανται ως διπολικό ιόν (zwitterionic ampholytes). Οι αμφολύτες και των δύο κατηγοριών διαθέτουν μια όξινη και μια βασική ομάδα, όμως αυτό που διαχωρίζει τις δύο κατηγορίες είναι η σχετική οξύτητα των λειτουργικών ομάδων τους. Οι κανονικοί αμφολύτες μπορούν να βρίσκονται σε αδιάστατη μορφή ή να φέρουν μόνο ένα φορτίο, δηλαδή είτε είναι θετικά φορτισμένοι είτε αρνητικά, το θετικό και το αρνητικό φορτίο δεν μπορούν να συνυπάρξουν. Γι’ αυτό το λόγο δεν έχουν την δυνατότητα να σχηματίσουν εσωτερικό άλας και ισχύει η σχέση $pKa_{acidic} > pKa_{basic}$. Αντιθέτως, στους αμφολύτες που υφίστανται ως διπολικό ιόν είναι δυνατόν τα δύο φορτία να συνυπάρξουν στο μόριο της ένωσης και με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται εσωτερικό άλας. Για αυτή την κατηγορία αμφολυτών, η σχέση των pKa μετατρέπεται σε $pKa_{acidic} < pKa_{basic}$.[37], [38]

Όπως προαναφέρθηκε, η λιποφιλία των αμφολυτών εμφανίζει ιδιαιτερότητες και παρουσιάζει ενδιαφέρον. Για τους κανονικούς αμφολύτες, εξακολουθεί να ισχύει πως η λιποφιλία των ουδέτερων μορφών μιας ένωσης είναι μεγαλύτερη από αυτή των αντίστοιχων κατιόντων ή

ανιόντων.[37] Επιπλέον είναι δυνατόν να υπολογιστεί η τιμή logP για αυτή την κατηγορία αμφολυτών. Από την απεικόνιση σε διάγραμμα των logD προς τα pH προκύπτει μια κωδωνοειδής καμπύλη, το μέγιστο σημείο αυτής της καμπύλης αποτελεί το logP της ένωσης και αντιστοιχεί σε τιμές pH γύρω από το ισοηλεκτρικό σημείο.[1, p. 154], [39] Για τα zwitterions, σύμφωνα με μερικούς συγγραφείς η λιποφιλία τους είναι πολύ χαμηλή, ενώ για άλλους αξίζει να αναφέρεται. Γενικά, κάθε ιονισμένο είδος διαθέτει συγγένεια, όσο μικρή κι αν είναι αυτή, με την οργανική φάση. Το ζήτημα είναι πότε μπορεί να παραλειφθεί ο μερισμός ενός zwitterion και πότε όχι.[37] Στην πραγματικότητα, για τους αμφολύτες που υφίστανται ως διπολικά ιόντα δεν υπολογίζεται logP, αλλά η τιμή $logD_{max}$. Η τιμή αυτή προκύπτει από το μέγιστο σημείο της κωδωνοειδούς καμπύλης του logD προς το pH. Μάλιστα, σε ένα εύρος pH γύρω από το ισοηλεκτρικό σημείο παρατηρείται σταθεροποίηση των τιμών $logD_{max}$ υποδεικνύοντας πως εντός αυτού του εύρους η λιποφιλία των ενώσεων που μελετώνται δεν μεταβάλλεται.[1, p. 154] Για το λόγο αυτό, οι ενώσεις που έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν εσωτερικά άλατα θεωρείται ότι συμπεριφέρονται ως «ρυθμιστικά λιποφιλίας» (lipophilicity buffers).[40] Να σημειωθεί πως σε ορισμένες ενώσεις, η στερεοχημεία τους οδηγεί σε καμπύλη logD/pH σχήματος U, οπότε αντί για $logD_{max}$ η τιμή που λαμβάνεται είναι η $logD_{min}$, εκατέρωθεν του ισοηλεκτρικού σημείου του αμφολύτη. [37]

1.3.4 Πειραματικός προσδιορισμός των συντελεστών μερισμού, logP, και κατανομής, logD

Η λιποφιλία, όπως αυτή εκφράζεται μέσω των συντελεστών μερισμού και κατανομής, αποτελεί μια φυσικοχημική παράμετρο ζωτικής σημασίας κατά τον σχεδιασμό και την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών, καθώς συνδέεται αδιάρρηκτα με τις ιδιότητες ADMET του φαρμάκου. Συμπερασματικά, χρειάζεται οι συντελεστές αυτοί να προσδιορίζονται όσο το δυνατόν νωρίτερα στην πορεία ανάπτυξης νέων φαρμάκων και να είναι όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστες οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται.

Σε γενικές γραμμές, οι μέθοδοι προσδιορισμού των συντελεστών logP και logD διακρίνονται σε πειραματικές και υπολογιστικές. Οι πειρατικές μέθοδοι μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω σε άμεσες και έμμεσες.[41]

1.3.4.1 Άμεσες μέθοδοι προσδιορισμού

Οι πλέον διαδεδομένες άμεσες πειραματικές μέθοδοι προσδιορισμού των συντελεστών μερισμού και κατανομής, logP και logD αντίστοιχα, είναι η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης (Shake-Flask

method) και η ποτενσιομετρική μέθοδος (Potentiometric Titration). Οι δύο αυτές μέθοδοι θεωρούνται κλασικές, αλλά είναι αρκετά χρονοβόρες και αποτελούνται από πολλά βήματα που απαιτούν ακριβή ρύθμιση συνθηκών. [1, pp. 156–158], [5]

Ξεκινώντας με την μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης, αυτή αξιοποιεί τη μέτρια ικανότητα κορεσμού της οκτανόλης σε νερό ώστε να διευκολύνονται οι πειραματικοί προσδιορισμοί. Οι συντελεστές logP και logD προσδιορίζονται μέσω της κατανομής της διαλυμένης ουσίας μεταξύ των δύο φάσεων.[1, p. 156] Πιο αναλυτικά, η μέθοδος συνίσταται στη διάλυση της εξεταζόμενης φαρμακευτικής ουσίας σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών κορεσμένο σε οκτανόλη και την τοποθέτηση αυτού του διαλύματος σε φιάλη μαζί με οκτανόλη κορεσμένη με το ρυθμιστικό διάλυμα. Η επιλογή της αναλογίας των όγκων των δύο φάσεων πρέπει να γίνει έτσι ώστε να κατανέμεται ικανοποιητικά η ουσία στις δύο φάσεις. Δηλαδή, αν η ουσία είναι λιπόφιλη τότε χρησιμοποιείται μικρός όγκος οκτανόλης, ενώ εάν η ουσία είναι υδρόφιλη απαιτείται μεγαλύτερος όγκος οκτανόλης. Έπειτα, η φιάλη ανακινείται έως ότου επιτευχθεί ισορροπία και γίνεται προσεκτικά ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Ακολουθεί η μέτρηση της διαλυμένης ουσίας τόσο στην υδατική φάση πριν την ανάδευση (ρυθμιστικό διάλυμα με τη διαλυμένη ουσία), όσο και στην υδατική φάση όπως αυτή διαχωρίστηκε μετά την ανάδευση. Η μέτρηση της διαλυμένης ουσίας στα δύο διαλύματα γίνεται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου UV-Vis και τελικά υπολογίζεται η τιμή logD ως εξής:

$$D = \frac{A_{\alpha\rho\chi} - A_{\tau\varepsilon\lambda}}{A_{\tau\varepsilon\lambda}} \cdot \frac{V_{\upsilon\delta\alpha\tau}}{V_{o\kappa\tau}} \quad [1.7]$$

όπου:

$A_{\alpha\rho\chi}$, $A_{\tau\varepsilon\lambda}$ οι απορροφήσεις στην υδατική φάση πριν και μετά την ανάδευση, αντίστοιχα.

$V_{\upsilon\delta}$, $V_{o\kappa\tau}$ οι όγκοι της υδατικής φάσης και της οκτανόλης, αντίστοιχα. [1, p. 156], [8]

Όσον αφορά την ποτενσιομετρική μέθοδο, αυτή χρησιμοποιείται όταν υπάρχουν κέντρα ιοντισμού στο εξεταζόμενο μόριο και επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της pKa και του συντελεστή μερισμού P. Η μέθοδος εκμεταλλεύεται τη μεταβολή της κατανομής μιας ιοντιζόμενης ουσίας συναρτήσει του pH και τη διαφοροποίηση της pKa, παρουσία οργανικού διαλύτη. Η πρώτη τιτλοδότηση που γίνεται είναι αλκαλιμετρική σε υδατική φάση και έχει ως στόχο τον προσδιορισμό της τιμής pKa. Έπειτα γίνεται επανατιτλοδότηση, οξυμετρική αυτή τη φορά, με

παρουσία οργανικού διαλύτη, ο οποίος είναι η οκτανόλη, και η κατανομή της διαλυμένης ουσίας γίνεται πλέον σε δύο φάσης, ενώ παράλληλα η pKa μετατοπίζεται προς την φαινόμενη p_oKa. Για την επίτευξη ικανοποιητικής ανάδευσης και ομοιογενούς φάσης (αφού η οκτανόλη δεν αναμιγνύεται με το νερό) η συσκευή ποτενσιομετρίας διαθέτει ισχυρό σύστημα ανάδευσης. Επιπλέον, οι τιτλοδοτήσεις πραγματοποιούνται παρουσία αραιού διαλύματος KCl ή NaCl ώστε να μην επηρεάζεται η μέτρηση από την αλλαγή της ιοντικής ισχύος. Τελικά, από τη διαφορά μεταξύ των τιμών των pKa και p_oKa και τους όγκους των δύο φάσεων προσδιορίζεται η τιμή του συντελεστή μερισμού logP. Για μονοπρωτικό ασθενές οξύ, ο συντελεστής μερισμού P υπολογίζεται ως εξής:

$$P = (10^{poKa-pKa} - 1) \cdot \frac{V_{\upsilon\delta}}{V_{o\rho\gamma}} \quad [1.8]$$

Στην περίπτωση ασθενούς βάσης η παραπάνω σχέση τροποποιείται ως εξής:

$$P = \left(10^{-(poKa-pKa)} - 1\right) \cdot \frac{V_{\upsilon\delta}}{V_{o\rho\gamma}} \quad [1.9]$$

όπου $V_{\upsilon\delta}$ και $V_{o\rho\gamma}$ οι όγκοι της υδατικής και της οργανικής φάσης, αντίστοιχα. [1, p. 157], [8], [42]

Οι δύο μέθοδοι που αναλύθηκαν παραπάνω προσδιορίζουν εξίσου ικανοποιητικά τη λιποφιλία μιας ένωσης, ειδικά αν ο συντελεστής logP κυμαίνεται από -2 έως 4, αλλά δεν είναι χωρίς τα μειονεκτήματα τους. Η πρώτη μέθοδος είναι ακατάλληλη για αποικοδομήσιμες ενώσεις και δεν επιδέχεται αυτοματοποίηση, ενώ η δεύτερη μέθοδος απαιτεί η εξεταζόμενη ένωση να διαθέτει κέντρα ιονισμού.[8] Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, και οι δύο μέθοδοι είναι χρονοβόρες, απαιτούν κόπο για να διεξαχθούν σωστά και για ενώσεις με logP μεγαλύτερο του 4 υπάρχει πιθανότητα να περιοριστεί η αποτελεσματικότητα τους από τη δυναμική περιοχή του ανιχνευτή ή από το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της διαλυμένης ουσίας σε οποιαδήποτε από τις δύο φάσεις. [13]

1.3.4.2 Έμμεσες μέθοδοι προσδιορισμού

Αν και οι άμεσες μέθοδοι προσδιορισμού των logP και logD δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα για τη λιποφιλία μιας ένωσης, η ανάγκη για μεγαλύτερη ταχύτητα και χρήση μικρότερης ποσότητας της εξεταζόμενης ένωσης οδήγησε στην ανάπτυξη εναλλακτικών προσεγγίσεων. Οι

έμμεσες μέθοδοι προσδιορισμού των συντελεστών λιποφιλίας βασίζονται στην χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως. Στην χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως η στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση είναι πολική και ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα διέπεται κατά κύριο λόγο από την κατανομή των ουσιών μεταξύ των δύο φάσεων.[8]

Η χρωματογραφική μέθοδος με την ευρύτερη εφαρμογή είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC). Ο υγροχρωματογράφος συνδυάζεται με φασματομετρία υπεριώδους – ορατού (UV-Vis) ή φασματομετρία μάζας για την ανίχνευση των αναλυόμενων ουσιών.[43]

Τα πλεονεκτήματα της RP-HPLC (RP: Reverse Phase) είναι η μεγάλη ταχύτητα, η πολύ καλή αναπαραγωγιμότητα, το γεγονός ότι δεν επηρεάζεται από την παρουσία ακαθαρσιών ή προϊόντων αποικοδόμησης καθώς αυτά διαχωρίζονται από κύρια ένωση, η απαίτηση πολύ μικρής ποσότητας της αναλυόμενης ένωσης, το μεγάλο δυναμικό εύρος, η ανίχνευση on-line και η ευκολία αυτοματοποίησης της μεθόδου. Οι χρόνοι συγκράτησης των ενώσεων είναι συνήθως οι μόνες παράμετροι που λαμβάνονται με μεθόδους RP-HPLC.[41]

Η RP-HPLC πέρα από τη χρησιμότητα της στον υπολογισμό των συντελεστών κατανομής και μερισμού, αποτελεί τη βάση της βιομιμητικής χρωματογραφίας για την περιγραφή διαφόρων βιολογικών φαινομένων. Αναλυτικότερη αναφορά στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης και στη Βιομιμητική Χρωματογραφία γίνεται στις παραγράφους 1.5 και 1.6 που ακολουθούν.[33]

1.3.5 Υπολογιστικές μέθοδοι εκτίμησης των συντελεστών μερισμού, logP, και κατανομής, logD

Παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί στην απόδοση των πειραματικών μεθόδων προσδιορισμού των συντελεστών logP και logD, ο σχεδιασμός βιβλιοθηκών ενώσεων και η διαλογή ενώσεων από τις βιβλιοθήκες αυτές για το σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών ουσιών, βασίζονται σε τιμές λιποφιλίας που έχουν εκτιμηθεί υπολογιστικά.[12]

Σήμερα, υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων για προβλέψεις του συντελεστή logP, οι οποίες βασίζονται σε γραμμικές ή μη γραμμικές ποσοτικές σχέσεις δομής – λιποφιλίας. Τα υπολογιστικά αυτά συστήματα αποτελούν ημι-εμπειρικές προσεγγίσεις και στηρίζονται στο προσθετικό και συντακτικό χαρακτήρα του συντελεστή μερισμού. Οι πιο δημοφιλείς γραμμικές μέθοδοι βασίζονται στο σύστημα θραυσμάτων και εντοπίζονται στα λογισμικά: ClogP, ACD / logP,

KOWWIN, Sf-SYBYL και AB / logP PrologPCDR. Μια δημοφιλής γραμμική μέθοδος που χρησιμοποιεί την προσέγγιση ολόκληρων μορίων είναι αυτή του Klopman (Klog P). Μια απλή διαδικασία υπολογισμού είναι αυτή του Moriguchi. Το MlogP βασίζεται στο άθροισμα των λιπόφιλων ατόμων (άνθρακες και αλογόνα) και το άθροισμα των υδρόφιλων ατόμων (άζωτο και οξυγόνο) ως 2 βασικοί παράγοντες και διαθέτει άλλους 11 διορθωτικούς παράγοντες για την ανάπτυξη του μοντέλου. [5]

Ορισμένα από τα λογισμικά που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του logP αποτυγχάνουν να δώσουν ακριβή πρόβλεψη για κάποιες ενώσεις. Αυτή η αξιοπιστία μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την ανάπτυξη των μοντέλων αυτών χρησιμοποιούνται κυρίως μικρά οργανικά μόρια, τα οποία διαφέρουν σημαντικά από τις φαρμακευτικές ενώσεις και τα μόρια-οδηγούς που χρησιμοποιεί η φαρμακευτική βιομηχανία κατά το σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ενώσεων. Οι ανακρίβειες που μπορεί να προκύψουν από τα λογισμικά αυτά είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην απόρριψη δυνητικά υποσχόμενων υποψήφιων ενώσεων ή/και στην έγκριση δυνητικά «ελαττωματικών» ενώσεων οι οποίες θα απορρίπτονταν σε μεταγενέστερο στάδιο με μεγαλύτερο οικονομικό κόστος.[8], [44] Ένα ακόμη μειονέκτημα των υπολογιστικών μεθόδων είναι πως δεν μπορούν να λάβουν υπόψιν όλα τα φαινόμενα που συμβαίνουν in vivo, στον ανθρώπινο οργανισμό και να τα συμπεριλάβουν στους υπολογισμούς που πραγματοποιούν.[33]

Όσον αφορά το συντελεστή κατανομής logD, υπάρχουν πρόσθετες δυσκολίες που χρειάζεται να αντιμετωπιστούν για την εκτίμηση του υπολογιστικά. Οι δυσκολίες αυτές έχουν να κάνουν με το γεγονός ότι προκύπτουν σφάλματα και κατά την εκτίμηση των τιμών pKa αλλά και εξαιτίας της επίδρασης των ανιόντων και των κατιόντων που μπορεί να υπάρχουν στο διάλυμα. Βέβαια, για την περιγραφή ορισμένων χημικών και βιολογικών συστημάτων που μπορεί να χαρακτηρίζονται από διαφορετικές τιμές pH είναι απαραίτητη η χρήση του συντελεστή logD. Προκειμένου να μπορέσουν να γίνουν προβλέψεις για τα logD σε οποιοδήποτε pH αναπτύχθηκε το πρόσθετο πρόγραμμα PrologD13-15 ως μέρος του προγράμματος Pallas. Με το πρόσθετο αυτό, γίνεται μια εκτίμηση των τιμών των συντελεστών logD από τη δισδιάστατη δομή των μικροσυστημάτων των ενώσεων.[5], [45]

Είναι προφανές ότι παρά την πληθώρα των υπολογιστικών συστημάτων, η αξιοπιστία των τιμών logP και logD που προκύπτουν δεν είναι πάντα ικανοποιητική. Ο υπολογισμός της λιποφιλίας

εξακολουθεί να αποτελεί ένα πεδίο συνεχούς έρευνας τόσο για την επικαιροποίηση και τη βελτίωση των ήδη υπάρχοντων συστημάτων όσο και για την ανάπτυξη νέων. [1]

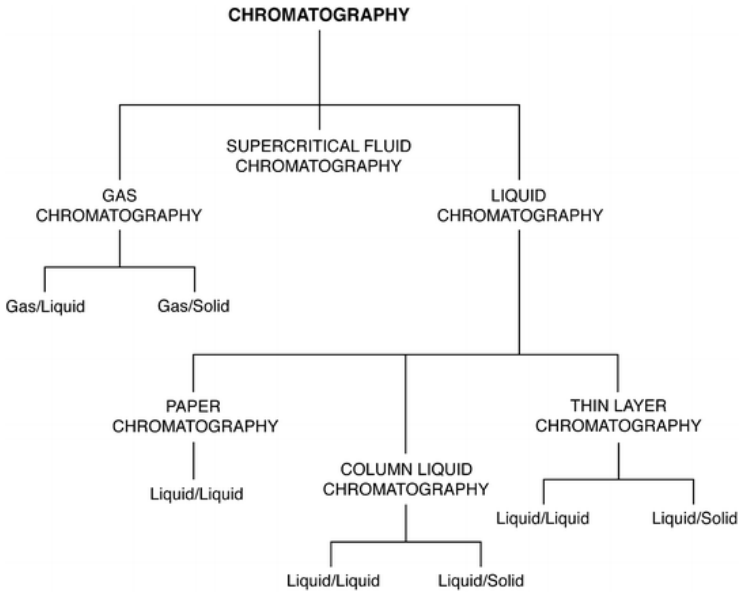
1.4 Η έννοια της χρωματογραφίας

Η χρωματογραφία περιγράφει μια ομάδα τεχνικών με μεγάλο αντίκτυπο σε όλους τους τομείς ανάλυσης και στην πρόοδο της επιστήμης γενικότερα, καθώς καθιστά δυνατούς διαχωρισμούς ουσιών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μίγματα (πολλοί από τους οποίους θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθούν με άλλο τρόπο). Διαφέρει από τις άλλες μεθόδους διαχωρισμού στο ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεγάλη ποικιλία υλικών, εξοπλισμού και τεχνικών.[46, pp. 873–876], [47]

Όλες οι χρωματογραφικές τεχνικές βασίζονται στον μερισμό ή την κατανομή ενός δείγματος μεταξύ μιας κινητής και μιας στατικής φάσης. Το δείγμα διαλύεται σε μια κινητή φάση, η οποία μπορεί να είναι αέρια, υγρή ή υπερκρίσιμο ρευστό. Στη συνέχεια, η κινητή φάση εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω μιας στατικής φάσης, η οποία μπορεί να βρίσκεται εντός μιας στήλης ή σε μια στερεά επιφάνεια. Οι δύο φάσεις επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται με διαφορετικό τρόπο μεταξύ τους και η σχετική αλληλεπίδραση της διαλυμένης ουσίας με τις δύο αυτές φάσεις μπορεί να περιγραφεί από το συντελεστή μερισμού (P) ή από το συντελεστή κατανομής (D). Ορισμένα συστατικά του δείγματος συγκρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση και άρα κινούνται με αργότερο ρυθμό κατά τη ροή της κινητής φάσης, ενώ το αντίθετο συμβαίνει για όσα συστατικά συγκρατούνται ασθενέστερα. Το αποτέλεσμα αυτής της διαφοράς στην ταχύτητα των διαφόρων συστατικών είναι κάθε ένα από αυτά να καταλαμβάνει μια ξεχωριστή ζώνη και μπορεί έπειτα να γίνει ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός τους.[46, pp. 873–876], [47]

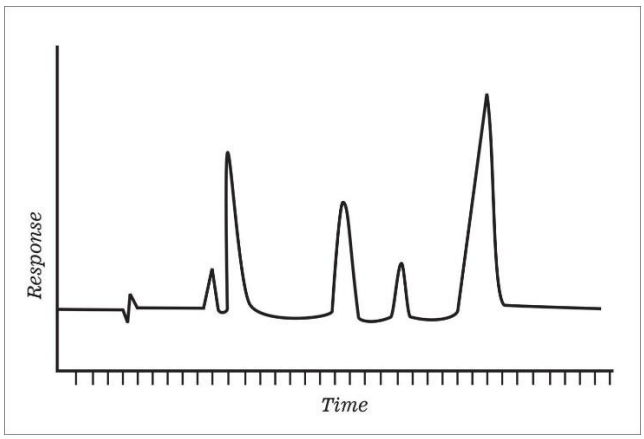
Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος βασίζεται στο είδος των στατικών φάσεων, οπότε προκύπτουν δύο κατηγορίες, η χρωματογραφία στήλης και η επιπεδική χρωματογραφία. Στη χρωματογραφία στήλης η στατική φάση συγκρατείται σε μια στενή στήλη (όπως υποδηλώνει και το όνομα της) και η διέλευση της κινητής φάσης μέσω αυτής γίνεται με την εφαρμογή πίεσης. Στην επιπεδική χρωματογραφία, η στατική φάση στηρίζεται σε μια επίπεδη πλάκα ή στους πόρους ενός χαρτιού και η κινητή φάση περνά μέσω αυτής λόγω της επίδρασης της βαρύτητας ή τριχοειδών φαινομένων. Μεταξύ των δύο κατηγοριών, η χρωματογραφία στήλης είναι περισσότερο διαδεδομένη. Ο δεύτερος τρόπος

ταξινόμησης των χρωματογραφικών τεχνικών βασίζεται στο είδος της κινητής φάσης, οπότε προκύπτουν τρεις γενικές κατηγορίες χρωματογραφιών: η υγροχρωματογραφία (LC), η αεριοχρωματογραφία (GC) και η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (SFC). Από αυτές τις κατηγορίες, μόνο η υγροχρωματογραφία μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε στήλες όσο και σε επίπεδες επιφάνειες. Η αεριοχρωματογραφία και η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού περιορίζονται σε διαδικασίες στηλών.[46, pp. 873–876] Ακολουθεί εικόνα στην οποία συνοψίζονται οι υποκατηγορίες του πεδίου της χρωματογραφίας.



Εικόνα 5 *Ταξινόμηση των μεθόδων χρωματογραφίας [47]*

Ειδικά για την χρωματογραφία στήλης, μπορεί να τοποθετηθεί στην έξοδο της στήλης ανιχνευτής (συνήθως ανιχνευτής Uv-Vis ή φασματομετρία μάζας – MS), ο οποίος αποκρίνεται στη συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών και το σήμα του καταγράφεται ως συνάρτηση του χρόνου, οπότε λαμβάνεται μια σειρά κορυφών, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5. Το διάγραμμα αυτό ονομάζεται χρωματογράφημα και χρησιμεύει τόσο στην ποιοτική όσο και στην ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων. Ο ποιοτικός προσδιορισμός γίνεται με βάση τη θέση της κάθε κορυφής επάνω στον άξονα του χρόνου, ενώ το εμβαδόν της κάθε κορυφής αποτελεί το ποσοτικό μέτρο κάθε συστατικού.[46, pp. 873–876]



Εικόνα 6 *Γενική μορφή χρωματογραφήματος (response = σήμα του ανιχνευτή, time = χρόνος)[48]*

1.5 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC – High Performance Liquid Chromatography)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) αποτελεί την εξέλιξη της απλής Υγρής Χρωματογραφίας (LC). Αρχικά, η υγροχρωματογραφία βασιζόταν σε μια υάλινη στήλη (διαμέτρου 1 έως 5cm, μήκους 50 έως 500cm), πακεταρισμένη με στερεά σωματίδια επικαλυμένα με ένα προσροφημένο υγρό που σχημάτιζε τη στατική φάση. Η διάμετρος αυτών των σωματιδίων ήταν συνήθως από 150 έως 200μm. Οι ταχύτητες ροής σε αυτά τα συστήματα ήταν πολύ μικρές και ο χρόνος του διαχωρισμού μπορούσε να φτάνει και τις μερικές ώρες. Για τη βελτίωση της αποδοτικότητας της στήλης διαπιστώθηκε πως χρειάζεται να μικρύνει το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Στο τέλος της δεκαετίας του 1960 υπήρχε πλέον η δυνατότητα παραγωγής και χρήσης πληρωτικών υλικών με διάμετρο σωματιδίων 3 έως 10μm. Το νέο σύστημα όμως απαιτούσε υψηλές πιέσεις, κάτι που ήταν αδύνατο να επιτευχθεί με τις υάλινες στήλες και τη βαρυτική ροή. Η HPLC λοιπόν, ως νεότερη τεχνική, δεν στηρίζεται στη βαρυτική ροή αλλά χαρακτηρίζεται από τη χρήση αντλιών υψηλής πίεσης για ταχύτερο διαχωρισμό, επαναχρησιμοποιήσιμες και πιο αποτελεσματικές στήλες για βελτιωμένο διαχωρισμό και καλύτερο έλεγχο της συνολικής διαδικασίας για πιο ακριβή αποτελέσματα με καλύτερη αναπαραγωγιμότητα.[46, p. 936], [48, pp. 2–4]

Η HPLC είναι η πιο διαδεδομένη από όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού. Οι λόγοι αυτής της αποδοχής της τεχνικής είναι η ευαισθησία της (αξιοσημείωτη ακρίβεια ανάλυσης, ±0.5% ή και καλύτερη σε πολλές περιπτώσεις), η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητα της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως, η δυνατότητα εφαρμογής της σε προσδιορισμούς ουσιών βιομηχανικού ενδιαφέροντος και σε πολλά επιστημονικά πεδία (έχει σχεδόν καθολική εφαρμογή, πολύ λίγοι

τύποι δειγμάτων εξαιρούνται). [46, p. 936], [48, p. 2]

Με βάση τη σχέση πολικότητας ανάμεσα στην κινητή και τη στατική φάση μπορούν να διακριθούν δύο κύρια είδη HPLC: HPLC κανονικής φάσης (Normal Phase HPLC – NP-HPLC) και HPLC αντιστρόφου φάσεως (Reversed Phase HPLC – RP-HPLC).

Στην περίπτωση της HPLC κανονικής φάσης, η πολικότητα της στατικής φάση είναι υψηλότερη από την πολικότητα της κινητής φάσης. Αυτό συμβαίνει, για παράδειγμα, όταν χρησιμοποιείται ως στατική φάση το οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) σε χρωματογραφία προσρόφησης. Η κινητή φάση μπορεί να αποτελείται από ένα μίγμα λιγότερο πολικών οργανικών διαλυτών (όπως το εξάνιο και το μεθυλενοχλωρίδιο). Η HPLC κανονικής φάσης χρησιμοποιείται κυρίως για δείγματα τα οποία είναι αδιάλυτα στο νερό ή για το διαχωρισμό ισομερών ή και ως προπαρασκευαστική τεχνική. Όσον αφορά τη σειρά έκλουσης των συστατικών του δείγματος, πρώτες εκλούονται οι λιγότερες πολικές ενώσεις (καθώς εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με την κινητή φάση) και τελευταίες οι περισσότερο πολικές ενώσεις, αφού αυτές αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με τη στατική φάση. Για την αύξηση της κατακράτησης των διαλυμένων ουσιών χρειάζεται να μειωθεί η πολικότητα της κινητής φάσης περαιτέρω.[48, p. 22], [49, p. 87]

Για την HPLC αντιστρόφου φάσεως, η πολικότητα της στατικής φάσης είναι μικρότερη από αυτή της κινητής φάσης. Η στατική φάση σε αυτή την περίπτωση αποτελείται από ένα σκελετό οξειδίου του πυριτίου, ο οποίος όμως είναι συζευγμένος με μια μη πολική επίστρωση ώστε να αποκτά έναν ιδιαίτερα άπολο χαρακτήρα. Η κινητή φάση αποτελείται συνήθως από ένα πολικό μίγμα νερού ή υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος με κάποιον οργανικό διαλύτη (π.χ. ακετονιτρίλιο). Σε αντίθεση με την HPLC κανονικής φάσης, πρώτα εκλούονται τα πιο πολικά συστατικά του δείγματος (τα λιγότερο πολικά / υδρόφοβα συστατικά προσροφώνται ισχυρότερα από την υδρόφοβη στατική φάση και άρα εμφανίζουν εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη σε μεγαλύτερο χρόνο). Για την αύξηση του χρόνου κατακράτησης των διαλυμένων ουσιών απαιτείται η αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης, επομένως χρειάζεται να μειωθεί η ποσότητα του οργανικού διαλύτη – τροποποιητή που χρησιμοποιείται.[48, p. 22], [49, p. 87]

Το 75% των διαχωρισμών με HPLC πραγματοποιούνται με στήλες αντίστροφης φάσης. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι υπάρχει η δυνατότητα χρήσης νερού ως κινητή φάση, κάτι που σημαίνει πολύ χαμηλό κόστος, διαπερατότητα από την υπεριώδη ακτινοβολία και συμβατότητα

με βιολογικές ουσίες. Γενικότερα, η HPLC βασίζεται στις δυναμικές ισορροπίες που επιτυγχάνονται διαρκώς όταν οι διαλυμένες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης και αποκτούν μια μέση ταχύτητα μέσω του συστήματος. Οι πληροφορίες αυτές αξιοποιούνται από το χρωματογραφικό σύστημα, με αποτέλεσμα να είναι δυνατός ο προσδιορισμός συντελεστών κατανομής και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων. Η HPLC αντιστρόφου φάσεως θεωρείται ως κατάλληλη για την εκτίμηση της λιποφιλίας και την προσομοίωση βιολογικών συστημάτων, αφού στα βιολογικά συστήματα η κατανομή, παραδείγματος χάριν, μιας φαρμακευτικής ένωσης μεταξύ της κυκλοφορίας του αίματος και των διάφορων ιστών βασίζεται σε διαδικασίες δυναμικής ισορροπίας παρόμοιες με αυτές της χρωματογραφικής κατανομής.[33], [46, p. 951]

Όπως αναφέρεται και στην προηγούμενη ενότητα (1.4), η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων που εισάγονται στο χρωματογραφικό σύστημα βασίζεται στην ερμηνεία του χρωματογραφήματος. Δύο χρονικές παράμετροι, ο χρόνος κατακράτησης (t_R) και ο νεκρός χρόνος (t_0), ανήκουν στις σημαντικότερες παραμέτρους που λαμβάνονται από το χρωματογράφημα για την ταυτοποίηση των συστατικών ενός δείγματος.[48, p. 26]

Ξεκινώντας με το χρόνο κατακράτησης (t_R), αυτός αντιστοιχεί στο χρόνο που απαιτείται από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος στο χρωματογραφικό σύστημα μέχρι και τη στιγμή που η κορυφή του εκάστοτε συστατικού φθάνει στον ανιχνευτή. Ο χρόνος αυτός οφείλεται στην παραμονή των διαλυμένων ουσιών στην στατική φάση εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα. Ο χρόνος κατακράτησης ονομάζεται και χρόνος ανάσχεσης.[46, p. 878]

Ορισμένες φορές, το δείγμα ή η κινητή φάση περιέχουν ουσίες μη κατακρατούμενες από τη στατική φάση. Μάλιστα, αν δεν υπάρχει κάποια ουσία με αυτή τη συμπεριφορά, τότε προστίθεται σκοπίμως στο δείγμα ώστε να διευκολυνθεί έπειτα η ταυτοποίηση των κορυφών του χρωματογραφήματος. Ο χρόνος που χρειάζεται μια μη κατακρατούμενη ουσία για να φθάσει στον ανιχνευτή καλείται συνήθως νεκρός χρόνος (t_0) και αντιστοιχεί σε μια πολύ μικρή κορυφή, η οποία εμφανίζεται στα αριστερά του χρωματογραφήματος πολύ σύντομα μετά την ένεση του δείγματος. Ο νεκρός χρόνος αποτελεί μέτρο του μέσου ρυθμού μετανάστευσης της κινητής φάσης.[46, p. 877]

Ο χρόνος κατακράτησης και ο νεκρός χρόνος χρησιμεύουν για τον υπολογισμό του παράγοντα

κατακράτησης k. Ο παράγοντας k είναι μια σημαντική πειραματική ποσότητα που χρησιμοποιείται ευρύτατα για την περιγραφή της μετανάστευσης των διαλυμένων ουσιών στις στήλες. Ο λόγος για τη χρησιμότητα του είναι ότι δεν εξαρτάται από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης ή τον ογκομετρικό ρυθμό ροής. Πρακτικά αυτό σημαίνει πως για δεδομένα συνδυασμό διαλυμένης ουσίας, κινητής φάσης και στατικής φάσης, κάθε στήλη οποιασδήποτε γεωμετρίας και με οποιοδήποτε ρυθμό ροής κινητής φάσης θα δώσει τον ίδιο παράγοντα κατακράτησης. Ο παράγοντας κατακράτησης k μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad [1.10]$$

όπου:

t_R ο χρόνος κατακράτησης της διαλυμένης ουσίας και

t_0 ο νεκρός χρόνος.[46, p. 879]

Εφόσον οι ποσότητες t_R και t_0 μπορούν εύκολα να υπολογιστούν από το προκύπτον χρωματογράφημα, μπορεί στη συνέχεια με χρήση της παραπάνω εξίσωσης να υπολογιστεί και ο παράγοντας k. Ιδανικά, οι διαχωρισμοί θα πρέπει να διενεργούνται κάτω από συνθήκες που εξασφαλίζουν τιμές παραγόντων κατακράτησης μεταξύ του 1 και του 10. Συνήθως, ο παράγοντας k χρησιμοποιείται με τη λογαριθμική μορφή του (logk), οπότε η εξίσωση [1.10] μπορεί να τροποποιηθεί ως εξής[33], [46, p. 879]:

$$logk = \log\left(\frac{t_R - t_0}{t_0}\right) \quad [1.11]$$

Ο συντελεστής κατακράτησης k μιας ένωσης σε συγκεκριμένη χρωματογραφική στήλη, μπορεί να συσχετιστεί με το συντελεστή χρωματογραφικής κατανομής (K) της ένωσης μεταξύ των δύο φάσεων. Για τη σύνδεση των δύο συντελεστών αξιοποιείται ο λόγος του όγκου της στατικής φάσης (V_s) προς τον όγκο της κινητής φάσης (V_m), οπότε προκύπτει η εξίσωση:

$$logK = logk - \frac{V_s}{V_m} \quad [1.12]$$

Ο συντελεστής κατανομής K αποτελεί σταθερά για το συγκεκριμένο χρωματογραφικό σύστημα που μελετάται. [33]

Συνήθως, στις μετρήσεις που πραγματοποιούνται σε HPLC, η κινητή φάση διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων σταθερή, δηλαδή με σταθερή σύσταση. Όταν ένα σύνολο ενώσεων με ευρύ φάσμα λιποφιλιών χρειάζεται να μετρηθεί σε HPLC απαιτούνται διαφορετικές συνθέσεις της κινητής φάσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις λοιπόν, πρέπει να αλλάζει η σύνθεση της κινητής φάσης και να αναμιγνύεται με διάφορες συγκεντρώσεις αναμίξιμων οργανικών διαλυτών (όπως το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη). Ειδικά για την HPLC αντιστρόφου φάσεως, που είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη και αυτή που εμφανίζει ενδιαφέρον για τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, η αύξηση της συγκέντρωσης της οργανικής φάσης στην κινητή φάση έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου κατακράτησης των περισσότερο λιπόφιλων ενώσεων. Για την αξιοποίηση του συνόλου των μετρήσεων, είναι απαραίτητο τα ληφθέντα δεδομένα κατακράτησης να τροποποιηθούν έτσι ώστε να αντιστοιχούν τελικά σε κινητή φάση με ίδια σύνθεση (συνήθως σε καθαρή υδατική κινητή φάση). Για να επιτευχθεί αυτό, έχουν αναλυθεί εκτενώς οι σχέσεις μεταξύ της κατακράτησης στο σύστημα RP-HPLC και τη συγκέντρωση του οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση έχουν αναλυθεί εκτενώς. Η απαιτούμενη παρεκβολή μπορεί να γίνει μέσω γραμμικής σχέσης (linear extrapolation) μεταξύ του συντελεστή κατακράτησης (k) και της συγκέντρωσης του οργανικού διαλύτη σε ποσοστό όγκου στην κινητή φάση (φ) :

$$logk = a \cdot \varphi + b \quad [1.13]$$

όπου a και b, οι σταθερές που προκύπτουν από το γραμμικό τμήμα της συνάρτησης, το οποίο μπορεί να κατασκευαστεί πραγματοποιώντας 3 με 5 μετρήσεις του συντελεστή λιποφιλίας logk για διαφορετική ποσότητα οργανικού διαλύτη κάθε φορά. Η τιμή logk που προκύπτει από την παραπάνω παρεκβολή ισούται με τη σταθερά b, αφού το φ παίρνει τιμή 0 για απουσία οργανικής φάσης, ενώ η σταθερά a αντιστοιχεί στην κλίση της ευθείας που κατασκευάστηκε. Ο συντελεστής logk που προκύπτει από την παρεκβολή και αντιστοιχεί στην καθαρή υδατική φάση συμβολίζεται $logk_w$ και έχει προταθεί από τους αρμόδιους οργανισμούς ως κατάλληλος για δείκτης λιποφιλίας. Κατά την εφαρμογή των παραπάνω, απαιτείται προσοχή στη διατήρηση της γραμμικότητας της σχέσης [1.13]. Συνήθως παρατηρείται ικανοποιητική γραμμικότητα μέχρι και ποσοστό οργανικού τροποποιητή ίσο με 30%.[33]

1.6 Βιομιμητική χρωματογραφία

Η ανακάλυψη και η ανάπτυξη φαρμάκων είναι μια πολύπλοκη και μακροχρόνια διαδικασία με υψηλά επίπεδα αποτυχίας σε όλα τα στάδια της. Όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 1.1

αναλυτικότερα, η πορεία για την ανακάλυψη και την ανάπτυξη ενός φαρμάκου μπορεί να διαρκέσει έως και 15 χρόνια και να κοστίσει μερικές εκατοντάδες εκατομμύρια δολάρια.

Η μείωση των ποσοστών αποτυχίας σε προχωρημένα στάδια της διαδικασίας αυτής σε συνδυασμό με τη μείωση της χρονικής διάρκειας των επιμέρους σταδίων αποτελούν βασικές απαιτήσεις για τη βελτίωση της παραγωγικότητας των τμημάτων Έρευνας και Ανάπτυξης (R&D) των φαρμακοβιομηχανιών.[10] Για να περιοριστεί το φαινόμενο της απόρριψης υποψήφιων ενώσεων σε προχωρημένα στάδια της ανάπτυξης ενός φαρμάκου είναι σημαντικό να γίνεται εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των ενώσεων στα αρχικά στάδια σχεδιασμού νέων φαρμάκων και με ικανοποιητική ακρίβεια.

Σημαντική πρόοδος στην πειραματική εκτίμηση των ιδιοτήτων ADME (παράγραφος 1.2), σε αρχικά στάδια του σχεδιασμού νέων φαρμάκων, παρατηρήθηκε με την ανάπτυξη βιομιμητικών χρωματογραφικών στηλών καθώς η βιομιμητική χρωματογραφία καταφέρνει να συνδυάσει την προσομοίωση βιολογικών διεργασιών με γρήγορες μετρήσεις. Η βιομιμητική χρωματογραφία αποτελεί υποκατηγορία της υγρής χρωματογραφίας, με την ιδιαιτερότητα πως στη στατική της φάση ενσωματώνει ακινητοποιημένα βιομόρια ώστε να προσομοιωθεί ο καταμερισμός των διαλυμένων ενώσεων (φάρμακα) στους ιστούς και η αλληλεπίδραση τους με πρωτεΐνες.

Για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ενώσεων χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο 2 τύποι στηλών που διατίθενται στο εμπόριο: α) στήλες με ακινητοποιημένες τεχνητές μεμβράνες (IAM), που χρησιμοποιούνται για την προσομοίωση της διαπερατότητας των φαρμάκων μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες και β) στήλες με ακινητοποιημένες πρωτεΐνες πλάσματος, που χρησιμοποιούνται για την προσομοίωση της σύνδεσης των φαρμακευτικών ενώσεων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Με βάση τη στήλη που χρησιμοποιείται, δηλαδή τη στατική φάση, ονομάζεται και η χρωματογραφία ως Βιομιμητική Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών και Ακινητοποιημένων Πρωτεϊνών αντίστοιχα. [12]

Υπάρχει ένα ακόμη είδος βιομιμητικής χρωματογραφίας, η μικκυλιακή χρωματογραφία. Η χρωματογραφία αυτή, όπως διαφαίνεται και από την ονομασία, της διαθέτει μικκύλια στην κινητή της φάσης, τα οποία μπορούν να προσομοιώσουν τις μεμβράνες του οργανισμού.[50]

1.6.1 Μικκυλιακή Χρωματογραφία (Micellar Liquid Chromatography, MLC)

Η μικκυλιακή χρωματογραφία αποτελεί μια εναλλακτική έναντι της συμβατικής υγροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσης (RP-HPLC) με υδατικές – οργανικές κινητές φάσεις. Συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των μικκυλίων με την διαχωριστική ικανότητα της LC. Οι κινητές φάσης στην μικκυλιακή χρωματογραφία είναι διαλύματα ενός τασιενεργού, το οποίο βρίσκεται σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από την κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (cmc – critical micellar concentration) ώστε να σχηματίζονται μικκύλια και να εμφανίζονται στην κινητή φάση. Η ποικιλία των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαλυμένων ουσιών, των μικκυλίων και της στατικής φάσης, προσδίδουν μεγάλη ευελιξία στη μέθοδο και την καθιστούν κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα αναλύσεων διαλυμένων ουσιών. Υπάρχει, επιπλέον, δυνατότητα για διαχωρισμό υδρόφοβων και υδρόφιλων ενώσεων στον ίδιο κύκλο μετρήσεων. Αυτή η προσαρμοστικότητα είναι ίσως το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μικκυλιακής χρωματογραφίας.[51, p. 2]

Η χρήση διαλυμάτων μικκυλίων οδηγεί στην προσρόφηση μονομερών του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη στατική φάση, παρέχοντας έτσι υδρόφοβες θέσεις αλληλεπίδρασης αλλά και θέσεις ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Ο υδρόφιλος/υδρόφοβος χαρακτήρας των επιφανειοδραστικών που προσροφώνται στη στατική φάση, παρέχει στο σύστημα τη δυνατότητα διαλυτοποίησης μη πολικών μορίων. Ένα ακόμα πλεονέκτημα της MLC είναι η μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη που απαιτείται για τη σύνθεση της κινητής φάσης, καθώς μειώνεται η τοξικότητα, η ευφλεκτότητα, το αντίκτυπο στο περιβάλλον και φυσικά το κόστος παρασκευής τους.[51, p. 2], [52]

Στην MLC μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι τασιενεργών ουσιών, όπως ιοντικές (ανιοντικές και κατιοντικές), μη – ιοντικές και αμφολύτες. Έχει αποδειχθεί ότι η προσρόφηση επιφανειοδραστικού οδηγεί σε ξεχωριστές αλλαγές στην επιλεκτικότητα των στατικών φάσεων. Η υδρόφοβη προσρόφηση των επιφανειοδραστικών μονομερών SDS (ανιοντικό) στη στατική φάση οδηγεί στο σχηματισμό ενός ανιονικού υδρόφιλου επιφανειακού στρώματος, η στατική φάση γίνεται πιο υδρόφιλη. Αντιθέτως, για τα κατιονικά τασιενεργά (δηλ. CTAB ή DTAB) λαμβάνει χώρα όχι μόνο υδρόφοβη προσρόφηση αλλά και σιλανόφιλη προσρόφηση, οδηγώντας σε αύξηση της υδροφοβίας της στατικής φάσης και στο σχηματισμό ενός κατιονικού υδρόφιλου επιφανειακού στρώματος.[22], [52]

Παρά το πολλά πλεονεκτήματα της, η MLC εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα τα οποία

συνδέονται με την κινητή φάση της και επιβραδύνουν την ανάπτυξη της μεθόδου και την καθιέρωση της. Αρχικά, η αποτελεσματικότητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι συνήθως πολύ χαμηλότερη από εκείνη που παρατηρείται με παρόμοιες στήλες στη συμβατική RP-LC. Επιπλέον, η ικανότητα έκλουσης των μικκυλιακών διαλυμάτων είναι ιδιαίτερα ασθενής. Βέβαια, και τα δύο παραπάνω προβλήματα μπορούν να λυθούν με την προσθήκη στον διαλύτη έκλουσης ενός οργανικού τροποποιητή, όπως μια αλκοόλη (μικρής ανθρακικής αλυσίδας). Η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς από μια τιμή της και πάνω μπορεί να μειωθεί η απορρόφηση των μονομερών του τασιενεργού από τη στατική φάση.[51, p. 3], [53]

Σε τέτοια συστήματα, η κατακράτηση των διαλυμένων ουσιών διέπεται από τρεις διαφορετικές ισορροπίες. Η πρώτη αφορά την κατανομή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ των μικκυλίων και του νερού, η δεύτερη αφορά την κατανομή τους μεταξύ της στατικής φάσης και του νερού και η τρίτη ισορροπία αφορά την άμεση μεταφορά μεταξύ των μικκυλίων και της τροποποιημένης από τον επιφανειοδραστικό παράγοντα στατικής φάσης. Η τελευταία ισορροπία μπορεί να παραληφθεί στις περισσότερες καταστάσεις, αλλά είναι σημαντική για εξαιρετικά μη πολικές (αδιάλυτες στο νερό) ουσίες, οι οποίες εμφανίζουν συγγένεια τόσο με τη στατική φάση όσο και με τα μικκύλια. Η μείωση του χρόνου κατακράτησης είναι συνήθως αποτέλεσμα της αύξησης της συγκέντρωσης των μικκυλίων ή της αύξησης της συγκέντρωσης του οργανικού τροποποιητή. Ωστόσο, τα διάφορα συστατικά ενός δείγματος μπορεί να αντιδρούν με διαφορετικό τρόπο στην αλλαγή της συγκέντρωσης του οργανικού τροποποιητή ή/και του επιφανειοδραστικού παράγοντα με αποτέλεσμα αλλαγές στην ανάλυση.[53]

Η θέση (κατακράτηση) και το σχήμα (αποδοτικότητα) των χρωματογραφικών κορυφών εξαρτώνται από τη φύση και τη συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα και του οργανικού τροποποιητή, αλλά μπορεί επίσης να εξαρτώνται και από το pH της κινητής φάσης, τη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ. Όλες αυτές οι παράμετροι, όταν λαμβάνονται υπόψιν ταυτόχρονα, μπορούν να μοντελοποιηθούν και να βελτιστοποιηθούν για την επιτυχή πρόβλεψη των χρόνων κατακράτησης των ουσιών από τη χρωματογραφική στήλη και για την επίτευξη επαρκούς διαχωρισμού των συστατικών ενός δείγματος. Με τη μεταβολή μόνο ενός από τους παραπάνω παράγοντες κάθε φορά και τη βελτιστοποίηση των υπολοίπων σε δεύτερο χρόνο, είναι πολύ πιθανό η αποτελεσματικότητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού να μειωθεί.[51, p. 3], [53]

Η κύρια χρήση του συστήματος της MLC είναι η ανάλυση βιολογικών υγρών. Η επιλογή της φύσης της επιφανειοδραστικής ουσίας και της σύστασης της κινητής φάσης αποτελεί ένα σημείο κλειδί για τη προσομοίωση βιολογικών διαδικασιών. Οι κινητές μικκυλιακές φάσεις έχουν την ικανότητα να συγκρατούν πρωτεΐνες σε ένα διάλυμα. Επιτρέπεται λοιπόν, η άμεση έγχυση βιολογικών δειγμάτων στην MLC και το πρωτόκολλο της ανάλυσης είναι εξαιρετικά απλοποιημένο.[22], [51, p. 3]

1.6.1.1 Μικκυλιακή χρωματογραφία βιοκατανομής (Biopartitioning Micellar Chromatography, BMC)

Η μικκυλιακή χρωματογραφία βιοκατανομής (BMC) είναι μια περίπτωση μικκυλιακής χρωματογραφίας που χρησιμοποιεί ως κινητή φάση τον επιφανειοδραστικό παράγοντα Brij-35 και ως στατική φάση τη στήλη C-18 (στήλη αντιστρόφου φάσεως), υπό κατάλληλες πειραματικές συνθήκες.

Η μικκυλιακή χρωματογραφία βιοκατανομής (BMC) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή διάφορων ειδών οργανικών ενώσεων και να μιμηθεί πολλές βιολογικές διεργασίες. Συγκεκριμένα, η BMC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη:

- της απορρόφησης φαρμάκων όταν αυτά χορηγούνται από το στόμα,
- της διαπερατότητας των φαρμάκων μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού,
- της διαπερατότητας των φαρμάκων μέσω του δέρματος και
- της κατανομής των φαρμάκων σε διάφορα βιολογικά συστήματα.[22], [54], [55]

Η χρησιμότητα της BMC στην περιγραφή της συμπεριφοράς των φαρμάκων στα διάφορα βιολογικά συστήματα μπορεί να αποδοθεί σε δύο κύρια αίτια. Πρώτον, τα χαρακτηριστικά ενός συστήματος BMC είναι όμοια με αυτά των βιολογικών εμποδίων και των εξωκυττάριων υγρών (που βασικά αποτελούνται από νερό, άλατα, γλυκόζη, αμινοξέα, χοληστερόλη, φωσφολιπίδια, λιπαρά οξέα και πρωτεΐνες). Η στατική της φάση, η οποία έχει τροποποιηθεί λόγω της υδρόφοβης προσρόφησης μονομερών του Brij-35 μοιάζει δομικά με την οργανωμένη σειρά των υδρογονανθρακικών αλυσίδων των μεμβρανών. Ακόμα, ο υδρόφιλος/υδρόφοβος χαρακτήρας των προσροφημένων επιφανειοδραστικών μονομερών προσομοιάζει τις πολικές περιοχές της μεμβράνης. Στη μίμηση του περιβάλλοντος της βιολογικής κατανομής των φαρμάκων συμβάλουν και οι κινητές φάσεις της BMC όταν έχουν παρασκευαστεί σε συγκεκριμένες συνθήκες. Η δεύτερη

αιτία για τη χρησιμότητα της BMC σχετίζεται με το μηχανισμό κατακράτησης των φαρμάκων. Στο σύστημα αυτό, η κατακράτηση των φαρμάκων βασίζεται στις υδρόφοβες, ηλεκτροστατικές και στερεοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου, αντικατοπτρίζοντας ικανοποιητικά τη διαδικασία της βιοκατανομής.[22], [54]

Το κύριο μειονέκτημα του συστήματος BMC είναι ότι ο ρυθμός ανάλυσης των ισχυρά υδρόφοβων διαλυμένων ουσιών μπορεί να είναι αργός και συνήθως πρέπει να προστεθεί μια μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη.[55]

1.6.2 Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων πρωτεϊνών (Immobilized Protein Chromatography)

Η δέσμευση ενός φαρμακευτικού μορίου από τις πρωτεΐνες του αίματος είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της τελικής δραστηριότητας και της τύχης των φαρμάκων που μόλις έχουν εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος. Οι αλληλεπιδράσεις των φαρμακευτικών μορίων με την πρωτεΐνες αυτές βοηθούν στον έλεγχο της κατανομής, του ρυθμού απέκκρισης και της τοξικότητας των φαρμάκων στον οργανισμό και σχετίζονται άμεσα με τις ιδιότητες ADME της φαρμακευτικής ένωσης (μεταφορά, κατανομή, μεταβολισμός, απέκκριση). Επιπλέον, η παρουσία έμμεσου ή άμεσου ανταγωνισμού μεταξύ δύο φαρμάκων ή ενός φαρμάκου και μιας ενδογενούς ένωσης (π.χ ένα λιπαρό οξύ) για τις ίδιες δεσμευτικές πρωτεΐνες, μπορεί να είναι μια σημαντική πηγή αλληλεπιδράσεων φαρμάκου – φαρμάκου ή επιδράσεων από τη μετατόπιση ενός φαρμάκου από το σημείο σύνδεσης του. Για όλους αυτούς τους λόγους είναι σημαντικό να κατανοηθεί πλήρως η σύνδεση των φαρμακευτικών παραγόντων με τις πρωτεΐνες του ορού του αίματος και πως αυτή επηρεάζεται από τις αλληλεπιδράσεις των φαρμακευτικών ενώσεων με άλλες ουσίες. [56], [57]

Ο ποσοτικός χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φαρμακευτικών ενώσεων και των πρωτεϊνών του πλάσματος εκτελείται συνήθως ως μέρος της διαδικασίας ανακάλυψης και σχεδιασμού νέων φαρμακευτικών προϊόντων. Μια τεχνική για τον προσδιορισμό της σταθεράς σύνδεσης μεταξύ φαρμάκων και πρωτεϊνών είναι η Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Πρωτεϊνών, η οποία ανήκει στην ομάδα Χρωματογραφιών Συγγένειας Υψηλής Απόδοσης (HPAC – High Performance Affinity Chromatography).[58]

Ο όρος Χρωματογραφία Συγγένειας Υψηλής Απόδοσης συνδέεται με στατικές φάσεις που περιέχουν ακινητοποιημένες πρωτεΐνες και βασίζεται ικανότητα της διαλυμένης ουσίας, που εγχύεται στο χρωματογραφικό σύστημα, να αλληλεπιδράσει με την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη.

Φάρμακα που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη θα εμφανίζουν υψηλότερους χρόνους έκλουσης σε σχέση με φάρμακα που παρουσιάζουν λιγότερη ή και καθόλου πρωτεϊνική σύνδεση.[5], [59]

Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται συχνότερα στις στατικές φάσεις της HPAC είναι η HSA και η AGP. Η ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού (HSA – Human Serum Albumin), είναι η πρωτεΐνη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο πλάσμα και συνήθως η σύνδεση με πρωτεΐνες του πλάσματος αναφέρεται στην HSA. Η HSA δεσμεύει κυρίως ουδέτερα και όξινα φάρμακα και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι οι υπεύθυνες δυνάμεις για τις συνδέσεις αυτές. Η HSA σχετίζεται με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων και τις αλληλεπιδράσεις φαρμάκου – φαρμάκου. Μια άλλη σημαντική πρωτεΐνη είναι η α1 - όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP - Alpha1 Acid Glycoprotein). Η συγκέντρωση της AGP στο αίμα είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή της HSA και η δεσμευτική της ικανότητα είναι επίσης χαμηλότερη, ωστόσο, λόγω του χαμηλότερου ισοηλεκτρικού της σημείου εμφανίζει υψηλή συγγένεια με αλκαλικά φάρμακα (ορισμένα όξινα και ουδέτερα φάρμακα μπορούν επίσης να συνδεθούν με την AGP. Ένα άλλο πλεονέκτημα της AGP είναι πως μπορεί να διακρίνει την εναντιοεκλεκτικότητα εάν οι ενώσεις διαθέτουν δύο ομάδες δέσμευσης υδρογόνου και μια άκαμπτη ή ογκώδη δομή κοντά σε ένα χειραλικό κέντρο. Με αυτόν τον τρόπο, η AGP μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική συμπεριφορά τόσο των βασικών όσο και των ουδέτερων φαρμάκων. Βέβαια, δεν είναι γνωστές όλες οι ιδιότητες των θέσεων δέσμευσης της AGP. Για την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών στη στατική φάση της HPAC χρησιμοποιείται υψηλής ποιότητας αμυνοπροπυλικό πυριτικό πήκτωμα [5], [11, pp. 101–103], [56]

Οι στατικές φάσεις με ακινητοποιημένες πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν με υδατική κινητή φάση. Συνήθως χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) ή διάλυμα οξικού αμμωνίου. Στην περίπτωση ενώσεων που συνδέονται ισχυρά με τη στατική φάση χρειάζεται στην κινητή φάση να προστεθεί κάποιος οργανικός τροποποιητής (ακετονιτρίλιο ή 2-προπανόλη) ώστε να μειωθεί ο χρόνος συγκράτησης της ένωσης. Γενικά, υπάρχει καλή γραμμικότητα μεταξύ του συντελεστή κατακράτησης logk και του ποσοστού του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται, οπότε οι τιμές του logkw που αντιστοιχούν σε 100% υδατική φάση μπορούν να ληφθούν μέσω γραμμικής παρεκβολής (extrapolation). Προτείνεται, από τους κατασκευαστές των στηλών, η χρήση των οργανικών τροποποιητών να μην υπερβαίνει το 30% για στήλες AGP και 10% για στήλες HSA, παρόλα αυτά έχει βρεθεί ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις δεν προκαλούν μη

αναστρέψιμες αλλαγές στις στήλες και δεν επηρεάζουν την απόδοση τους.[11, p. 105]

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής έναντι των παραδοσιακών τεχνικών (υπερδιήθηση - ultrafiltration, διάλυση ισορροπίας – equilibrium dialysis) είναι η υψηλή ακρίβεια, η ευκολία αυτοματοποίησης και η ταχύτητα. Επιπλέον, η HPAC διαθέτει την πολύτιμη ικανότητα να χρησιμοποιεί μόνο ελάχιστες ποσότητες πρωτεϊνών για μεγάλο αριθμό μετρήσεων, αφού η ίδια ακινητοποιημένη πρωτεΐνη μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για πολλαπλά πειράματα. Αυτό ελαχιστοποιεί τις διαφορές και τα σφάλματα από μέτρηση σε μέτρηση. Για παράδειγμα, στήλες που περιέχουν HSA ακινητοποιημένη σε σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για 500-1000 ενέσεις. Μέσω της HPAC είναι δυνατή και η μελέτη της συμπεριφοράς των δύο εναντιομερών ενός χειρόμορφου φαρμάκου.[58], [59]

Παρά τα αδιαμφισβήτητα πλεονεκτήματα της HPAC υπάρχουν και ορισμένα σημεία τα οποία χρήζουν διερεύνησης. Το κύριο σημείο που πρέπει να εξεταστεί περαιτέρω αφορά την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών στο υλικό στήριξης στη στατική φάση, δηλαδή πρέπει να εξεταστεί σε τι έκταση προσομοιάζει αυτό το σύστημα την πρωτεϊνική σύνδεση στο πλάσμα του αίματος, όπου οι πρωτεΐνες δεν είναι ακινητοποιημένες αλλά σε μορφή διαλύματος. Η διαδικασία της ακινητοποίησης είναι εξαιρετικής σημασίας, καθώς μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών λόγω μετουσίωσης τους, ακατάλληλου προσανατολισμού ή στερεοχημικής παρεμπόδισης στις περιοχές δέσμευσης που μελετώνται. Τέλος, μπορεί ορισμένες ενώσεις να αλληλεπιδρούν και με τα υπόλοιπα συστατικά της στατικής φάσης με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ο χρόνος κατακράτησης τους από την στήλη.[59]

1.6.3 Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane Chromatography)

Οι βιολογικές μεμβράνες καθορίζουν τα όρια μεταξύ ή εντός των κυττάρων και των οργανιδίων και αποτελούν τα εμπόδια που πρέπει ένα φάρμακο να διασχίσει ώστε να φτάσει στο μοριακό στόχο του και να ασκήσει τελικά τη φαρμακολογική δράση του. Επομένως, η διαπερατότητα ενός φαρμάκου μέσω των μεμβρανών αυτών και κατά συνέπεια η λιποφιλία, είναι ιδιότητες εξαιρετικής σημασίας κατά το σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών προϊόντων. Ως σύστημα αναφοράς για τη μελέτη του μερισμού των φαρμάκων στις βιολογικές μεμβράνες έχει καθιερωθεί το σύστημα n-οκτανόλης – νερού.[60]

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.3, παρά την ευρεία χρήση του συστήματος n-οκτανόλης – νερού, έχει δεχτεί έντονη κριτική ως επιφανειακή και υπεραπλουστευμένη προσέγγιση των βιολογικών μεμβρανών. Σε αντίθεση με τις μεμβράνες, η n-οκτανόλη είναι ουδέτερη και πολύ λιγότερο σύνθετη. Μάλιστα, η λιποφιλία που υπολογίζεται από το σύστημα αυτό με το συντελεστή μερισμού logP, δεν είναι σε θέση να μεταφράσει τους ιοντικούς δεσμούς, οι οποίοι έχουν ιδιαίτερη σημασία στην περίπτωση των ιονισμένων ενώσεων. [5], [60]

Τις τελευταίες δεκαετίες, γίνονται προσπάθειες για την ανάπτυξη πιο αντιπροσωπευτικών μοντέλων για την προσομοίωση των βιολογικών μεμβρανών. Οι προσπάθειες αυτές είχαν προσανατολιστεί προς τα λιποσώματα, όμως οι δυσκολίες που σχετίζονται με την παρασκευή τους και τη σταθερότητα τους εμπόδισαν την καθιέρωση τους ως εναλλακτική λύση για το σύστημα n-οκτανόλης – νερού. Η ανάπτυξη της Χρωματογραφίας Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών αποτέλεσε μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση, συνδυάζοντας την καλύτερη προσομοίωση των βιολογικών μεμβρανών με την υψηλή ταχύτητα μετρήσεων. Το κύριο χαρακτηριστικό που διακρίνει την χρωματογραφία IAM από το σύστημα n-οκτανόλης – νερού είναι η συμβολή τόσο των λιπόφιλων όσο και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στο μηχανισμό κατακράτησης των διαλυμένων ουσιών, λόγω της παρουσίας μιας μονοστοιβάδας φωσφολιπιδίων.[11, p. 93], [60]

Η χρωματογραφία IAM έχει αναπτυχθεί ως ένα γρήγορο εργαλείο για την εκτίμηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών από ένα φάρμακο και στηρίζεται στην παραδοχή πως η μεταφορά του φαρμάκου γίνεται μόνο μέσω παθητικής διάχυσης. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, όπως προσεγγίσεις με λιποσώματα, ή οι κυτταρικές προσεγγίσεις (Caco-2 και MDCK), οι χρωματογραφικές τεχνικές όπως η χρωματογραφία IAM είναι ικανές να ανταπεξέλθουν σε δείγματα με προσμίξεις και να τις διαχωρίσουν από την φαρμακευτική ένωση που μελετάται. Επιπλέον, η χρωματογραφία IAM δίνει πολύ καλή αναπαραγωγιμότητα μετρήσεων, όταν αυτές πραγματοποιούνται κάτω από παρόμοιες πειραματικές συνθήκες, ακόμη και διεργαστηριακά και μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί.[60]

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει καλές συσχετίσεις των συντελεστών κατακράτησης της χρωματογραφίας IAM με την Caco-2 διαπερατότητα και την διαπερατότητα PAMPA για ενώσεις με όμοια δομικά στοιχεία. Μάλιστα, η συσχέτιση αυτή μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω με την ενσωμάτωση της μεταβλητής του μοριακού βάρους των φαρμακευτικών ενώσεων στο μοντέλο

που αναπτύσσεται ή της πολικότητας τους. Η χρωματογραφία IAM μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον υπολογισμό του ποσοστού απορρόφησης ενός φαρμάκου που έχει χορηγηθεί από το στόμα (%HOA – Human Oral Absorption), αφού η απορρόφηση στο γαστρεντερικό σωλήνα διέπεται από τη διαπερατότητα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών ή μέσω του ενδοκυτταρικού χώρου (μεταξύ των κυττάρων του γαστρεντερικού βλεννογόνου). Στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί πολλά μοντέλα για τον προσδιορισμό του %HOA με χρήση της χρωματογραφίας IAM. Ένα άλλο πεδίο στο οποίο η χρωματογραφία IAM μπορεί να συμβάλλει και για το οποίο θεωρείται πολλά υποσχόμενο εργαλείο, είναι η πρόβλεψη της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης φαρμάκων. Οι συντελεστές κατακράτησης που προκύπτουν από τη χρωματογραφία IAM μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της διαπερατότητας του ανθρώπινου δέρματος για ουσίες που δεν ιονίζονται σε φυσιολογικό pH (π.χ. στεροειδείς ορμόνες). [60]

1.6.3.1 Στατικές φάσεις

Οι στατικές φάσεις στην χρωματογραφία IAM αποτελούνται από μονοστιβάδες αμφίφιλων φωσφολιπιδίων δεσμευμένων ομοιοπολικά σε ένα σκελετό πήγματος διοξειδίου του πυριτίου, μέσω ομάδων προπυλαμίνης. Οι περισσότερες εμπορικά διαθέσιμες στήλες IAM βασίζονται στο επικρατέστερο μεμβρανικό λιπίδιο, φωσφατιδυλοχολίνη (PC). Για την παρασκευή τους, τα μόρια PC αντιδρούν με τις ομάδες πυριτίας - προπυλαμίνης μέσω της ω-καρβοξυλικής ομάδας τους στη C2 αλυσίδα των λιπαρών οξέων. Ωστόσο, για στερεοχημικούς λόγους ορισμένες υπολειμματικές ομάδες προπυλαμίνης παραμένουν ελεύθερες στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου, δημιουργώντας μια υποεπιφάνεια IAM.PC με βασικές ιδιότητες. Αυτές οι ελεύθερες αμινο-ομάδες μπορούν να οδηγήσουν σε ανεπιθύμητη λειτουργία του σκελετού πυριτίας. Πιο συγκεκριμένα, μειώνουν την χημική σταθερότητα της δεσμευμένης φάσης της στήλης IAM, αυξάνουν την συγκράτηση όξινων ενώσεων και μειώνουν την συγκράτηση των βασικών.[11, p. 94] Μπορεί, βέβαια, να θεωρηθεί ότι οι ογκώδης ομάδες PC καλύπτουν τα σημεία στα οποία υπάρχει η εναπομένουσα αμίνη.[60] Μια άλλη λύση για το πρόβλημα των ελεύθερων αμινο-ομάδων, είναι η απενεργοποίηση τους με μικρά μόρια όπως η γλυκιδόλη ή το γλυκολικό μεθύλιο (MG). Συγκεκριμένα, η αντίδραση του MG με τις ελεύθερες αμίνες τις μετατρέπει σε χημικά ουδέτερα αμίδια, αλλά εισάγεται μια νέα υδροξυλομάδα στην υποεπιφάνεια. Η επιφάνεια IAM.PC με τελική κάλυψη MG είναι εμπορικά διαθέσιμη και γνωστή ως στατική φάση IAM.PC.MG.[11, p. 94]

Οι υδροξυλομάδες που υπάρχουν στην επιφάνεια της στατικής φάσης IAM.PC.MG είναι πιθανό

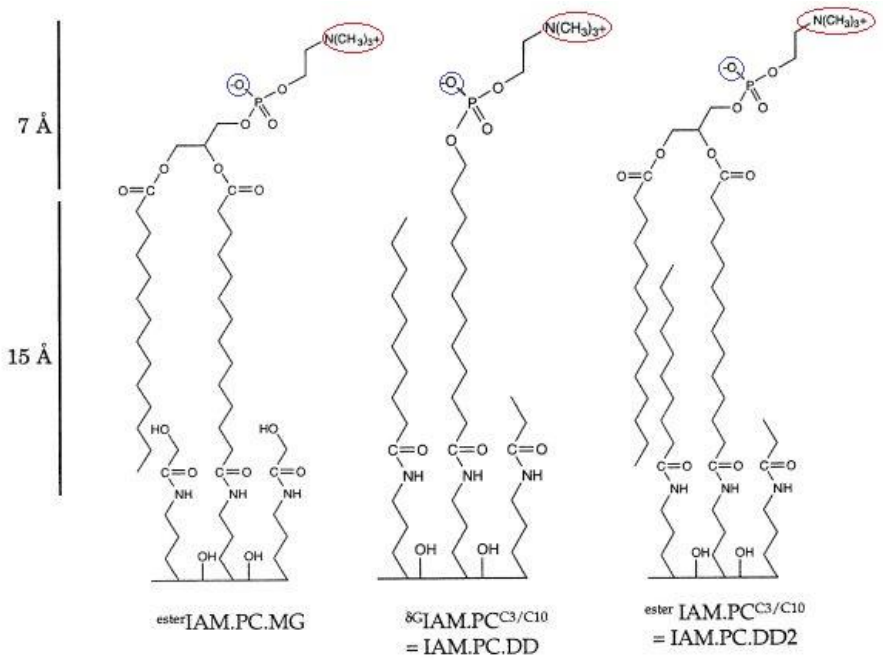
να επηρεάσουν τις αλληλεπιδράσεις της επιφάνειας της στήλης με τα διάφορα χημικά είδη. Για το λόγο αυτό και για το γεγονός ότι οι φυσικές βιολογικές μεμβράνες δεν διαθέτουν ελεύθερα -OH κοντά στο κέντρο τους, δημιουργήθηκε η ανάγκη για την ανάπτυξη μιας νέας στατικής φάσης για την χρωματογραφία IAM. Η νέα στατική φάση έχει ως τελική κάλυψη δεκανοϊκό και προπιονικό ανυδρίτη ώστε να αποφευχθεί η ύπαρξη ελεύθερων -OH στον λιπόφιλο πυρήνα της ακινητοποιημένης μεμβράνης. Η διαδικασία της τελικής κάλυψης γίνεται σε δύο στάδια, πρώτα χρησιμοποιείται ο δεκανοϊκός ανυδρίτης (ο οποίος μετατρέπει το 85% των ελεύθερων αμινο-ομάδων σε αμίδια) και έπειτα ο προπιονικός ανυδρίτης. Επιπλέον, προστίθεται μια μονοστιβάδα φωσφατιδυλοχολίνης (IAM.PC) στο σκελετό πυριτίας – προπυλαμίνης, ώστε να βελτιωθεί η σταθερότητα της στήλης όταν αυτή βρίσκεται υπό όξινες συνθήκες και να αυξηθεί η επιφανειακή πυκνότητα των φωσφολιπιδίων. Η στήλη που περιεγράφηκε είναι γνωστή ως IAM.PC.DD και είναι πιο υδρόφιλη από άλλες στήλες IAM.PC εξαιτίας του μονο-ακυλιωμένου PC. Χάρη στην υψηλή υδροφιλία της, η στήλη αυτή προτείνετε για ενώσεις με μικρούς χρόνους έκλουσης. Τα γράμματα DD στο εμπορικό όνομα της στήλης αντιστοιχούν στις λέξεις Drug Discovery, καθώς η στήλη αυτή σχεδιάστηκε για μέτρηση της διαπερατότητας των μεμβρανών από φαρμακευτικές ενώσεις.[11, p. 94], [60]

Η στήλη IAM.PC.DD εμφάνισε πρόωρες βλάβες και προβλήματα όπως η σημαντική διεύρυνση των κορυφών και η αύξηση των χρόνων συγκράτησης (σε σύγκριση με τους αρχικούς), πιθανά λόγω απομάκρυνσης των ακινητοποιημένων φωσφολιπιδίων από την κινητή φάση ή λόγω διάλυσης του σκελετού πυριτίας.[61] Μάλιστα, η στήλη αυτή αποσύρθηκε από την αγορά. Επομένως, προέκυψε η ανάγκη ανάπτυξης ενός τρίτου τύπου στατικής φάσης IAM, με αυξημένη σταθερότητα και υδροφοβία. Η νέα στήλη αποτελεί ένα συνδυασμό των IAM.PC.MG και IAM.PC.DD, δηλαδή η στατική φάση αποτελείται από μια διπλή αλυσίδα (που προκύπτει από την ακινητοποίηση δι-ακυλιωμένου PC) και έχει τελική κάλυψη από δεκανοϊκό και προπιονικό ανυδρίτη. Η στήλη αυτή κυκλοφορεί στο εμπόριο ως IAM.PC.DD2 και είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για την προσομοίωση. Πρέπει να σημειωθεί ωστόσο, ότι η δεύτερη αλυσίδα λιπαρών οξέων, η οποία κινείται ελεύθερα, τόσο στην στατική φάση IAM.PC.MG όσο και την IAM.PC.DD2, δεν αποτρέπει τις ιονισμένες διαλυμένες ουσίες από το να αλληλεπιδρούν με την υπολειμματική σιλανόλη ή/και τις ελεύθερες αμινο-ομάδες. Έχει αποδειχθεί ότι η συγκεκριμένη στήλη προσομοιάζει καλύτερα τα φυσικά φωσφολιπίδια και οι χρωματογραφικοί δείκτες που προκύπτουν είναι οι καταλληλότεροι για συσχετίσεις με δεδομένα διαπερατότητας μεμβρανών.[11], [60, pp. 94–95]

Στο εμπόριο είναι διαθέσιμες όλες οι παραπάνω στήλες από την εταιρία Regis, με εξαίρεση την στήλη IAM.PC.DD. Οι στατικές φάσεις IAM.PC και IAM.PC.MG είναι διαθέσιμες σε δύο μήκη (3 και 15cm) και ταξινομούνται ως στατικές φάσεις κατάλληλες για τον καθαρισμό πρωτεϊνών. Η στήλη IAM.PC.DD2 διατίθεται σε τρία μήκη (3, 10, 15cm) και προτείνεται για την ανακάλυψη και τον σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών προϊόντων. Όλες οι στατικές φάσεις που αναφέρθηκαν έχουν εσωτερική διάμετρο 4.6mm.[60], [62]

Κυκλοφορεί μια ακόμη στατική φάση, η IAM Fast-Screen Mini Column, η οποία έχει διαστάσεις 1cm x 3mm και είναι ειδικά σχεδιασμένη για την λήψη ταχύτατων εκτιμήσεων διαπερατότητας φαρμάκων σε προγράμματα διαλογής υψηλής απόδοσης. Όπως κάθε στήλη μικρού μήκους, η IAM Fast-Screen Mini διαθέτει μόνο το 5% των θεωρητικών στιβάδων μιας συμβατικής αναλυτικής στήλης και είναι λιγότερο αποτελεσματική για δείγματα πολλαπλών συστατικών. Παρόλα αυτά, δίνει ακριβείς χρόνους συγκράτησης των ουσιών και με καλή αναπαραγωγισιμότητα όταν χρησιμοποιείται για μεμονωμένα συστατικά, επομένως, μπορεί να αξιοποιηθεί στην μελέτη διαπερατότητας των φαρμάκων. Αξίζει να σημειωθεί, πως για μελέτες διαπερατότητας, εξακολουθεί να χρησιμοποιείται και η IAM.PC.MG, η οποία παρά τις μικρές διαφορές που εμφανίζει στο μηχανισμό συγκράτησης των διαλυμένων ουσιών σε σχέση με την IAM.PC.DD2, έχει ανάλογη απόδοση με την δεύτερη και οι δύο στήλες δείχνουν καλή συσχέτιση σε συγκριτικές μελέτες.[60], [62]

Ακολουθεί εικόνα στην οποία παρουσιάζονται οι τρεις στατικές φάσεις που αναλύθηκαν παραπάνω. Τα κυκλωμένα τμήματα αντιστοιχούν στα φορτισμένα κέντρα που εντοπίζονται στην πολική κεφαλή της φωσφατιδυλοχολίνης. Αυτά τα φορτισμένα κέντρα αποτελούν το βασικό χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί τις στήλες IAM από τις παραδοσιακές στήλες αντιστρόφου φάσης.[60]



Εικόνα 7 *Στατικές φάσεις IAM, μονής και διπλής αλυσίδας, με τελική κάλυψη. Οι κυκλωμένες περιοχές αντιστοιχούν στα φορτισμένα κέντρα [64]*

Όσες στατικές φάσεις αναλύθηκαν παραπάνω περιλάμβαναν μόνο τη φωσφατιδυλοχολίνη ως ακινητοποιημένο φωσφολιπίδιο. Αυτό δεν αντικατοπτρίζει απόλυτα τις φυσικές βιολογικές μεμβράνες, καθώς οι βιολογικές μεμβράνες αποτελούνται από πολλά παραπάνω είδη φωσφολιπιδίων. Για το λόγο αυτό έχουν γίνει ερευνητικές προσπάθειες, από την ερευνητική ομάδα του Pidgeon, για την ανάπτυξη στατικών φάσεων IAM, που έχουν πάλι ως βασικό φωσφολιπίδιο το PC, αλλά διαθέτουν και δευτερεύοντα προσδέματα, όπως φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, φωσφατιδυλογλυκερόλη ή φωσφατιδικό οξύ. Οι στατικές φάσεις που αναπτύχθηκαν διαθέτουν μια επιπλέον λειτουργία σε σχέση με τις στήλες που περιέχουν μόνο PC. Πιο συγκεκριμένα, ενώ διατηρούν την ικανότητα να προσομοιώσουν τις αλληλεπιδράσεις μιας φαρμακευτικής ένωσης με τις βιολογικές μεμβράνες και να προσομοιώσουν τις ιδιότητες μεταφοράς της ένωσης μέσω των «βιολογικών εμποδίων», επιτρέπουν επιπλέον την ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμων μέσω των λειτουργικών ομάδων των δευτερογενών φωσφολιπιδίων, με αποτέλεσμα να μπορούν να αξιοποιηθούν για τη μελέτη των μηχανισμών αναστολής της δράσης των ενζύμων. Οι στατικές φάσεις που αναπτύχθηκαν εμφανίζουν εξαιρετική μηχανική και χημική σταθερότητα, τόσο σε υδατικούς όσο και σε οργανικούς διαλύτες. [60], [63]

Μια ακόμη επιτυχής προσπάθεια για την προσομοίωση του περιβάλλοντος των κυτταρικών

μεμβρανών είναι η Χρωματογραφία Κυτταρικών Μεμβρανών (CMC – Cell Membrane Chromatography), η οποία ως στατική φάση χρησιμοποιεί ακινητοποιημένες φυσικές κυτταρικές μεμβράνες πάνω σε μια βάση πυριτίας. Οι κυτταρικές μεμβράνες, που ακινητοποιούνται πάνω σε φορείς πυριτίας, προέρχονται από κύτταρα ιστών ή καλλιεργημένες κυτταρικές σειρές που εκφράζουν υψηλά επίπεδα συγκεκριμένων υποδοχέων. Η ακινητοποίηση επιτυγχάνεται λόγω της ισχυρής πολικότητας των ομάδων σιλανόλης που μπορούν να προσροφούν μη αναστρέψιμα βιοπολυμερή, διατηρώντας τα βιολογικά χαρακτηριστικά τους. Η στατική φάση που προκύπτει διαθέτει μια διπλή στιβάδα φωσφολιπιδίων στην οποία εμφανίζονται ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολικών κεφαλών των μεμβρανών και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων άνθρακα. Οι στήλες CMC μπορούν να προετοιμαστούν στο εκάστοτε εργαστήριο και να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων φαρμάκου – υποδοχέα καθώς και για τη διαλογή δραστικών ουσιών από σύνθετα μίγματα φυτικών φαρμάκων. Η χρωματογραφία CMC έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί αξιόπιστη βιοαναλυτική μέθοδο [60], [64]

1.6.3.2 Κινητές φάσεις

Στην περίπτωση που μελετάται, δηλαδή για στατική φάση που αποτελείται από ακινητοποιημένες τεχνητές μεμβράνες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατική κινητή φάση, χωρίς την προσθήκη οργανικού τροποποιητή. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτει απευθείας ο συντελεστής κατακράτησης $\log k_w$ της ένωσης , χωρίς να υπάρχει ανάγκη γραμμικής παρεμβολής. Αυτό αποτελεί και ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των στηλών IAM, ιδιαίτερα όταν πρόκειται να γίνει πειραματική μέτρηση με ένωση η οποία εμφανίζει ασθενή συγγένεια με την επιφάνεια της στήλης.

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη κινητή φάση είναι το ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (PBS – Phosphate Buffer Saline) καθώς προσομοιάζει ικανοποιητικά τις βιολογικές συνθήκες. Μετρήσεις μπορούν να γίνουν και με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου ή με ρυθμιστικό διάλυμα MOPS (3-μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ).[65]

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί ως κινητή φάση, καθώς και η ιοντική ισχύς του διαλύματος επηρεάζουν το χρόνο κατακράτησης των διαλυμένων ενώσεων που μελετώνται και κατ' επέκταση τις συσχετίσεις των συντελεστών κατακράτησης με τις βιολογικές παραμέτρους ενδιαφέροντος.

Όσον αφορά το pH της κινητής φάσης, αυτό μπορεί να κυμαίνεται από 2.5 έως 7.4 (το εύρος αυτό επιτρέπει την προσομοίωση της διαβάθμισης του pH στο γαστρεντερικό σωλήνα). Το όριο αυτό δίνεται από τους κατασκευαστές της στήλης. Με την αλλαγή του pH της κινητής φάσης επηρεάζονται οι χρόνοι κατακράτησης των διαλυμένων ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, με μείωση του pH αυξάνεται ο χρόνος κατακράτησης των όξινων ενώσεων (δεν υπάρχει διάσταση του πρωτονίου από την όξινη ομάδα, είναι πιο λιπόφιλες), ενώ η αύξηση του χρόνου κατακράτησης των βασικών ενώσεων προκύπτει με αύξηση του pH (οι θετικά φορτισμένες βάσεις χάνουν το φορτίο τους και γίνονται πιο λιπόφιλες). Συνολικά, ισχύει πως η μη-ιονισμένη μορφή ενός μορίου είναι πολύ πιο λιπόφιλη από την αντίστοιχη ιονισμένη μορφή. [5], [33]

Συχνά είναι απαραίτητη η χρήση κάποιου οργανικού τροποποιητή ώστε να μειωθεί ο χρόνος κατακράτησης ενώσεων που εμφανίζουν ισχυρή σύνδεση με τη στατική φάση. Ο οργανικός τροποποιητής στην περίπτωση της στήλης IAM είναι το ακετονιτρίλιο και μπορεί να προστεθεί στην κινητή φάση σε διάφορες ποσότητες. Η μέγιστη προτεινόμενη περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε ακετονιτρίλιο είναι 30% καθώς όταν αυτό το όριο ξεπεραστεί διαταράσσεται η δομή του νερού.[38]

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως δεν πρέπει να χρησιμοποιείται μεθανόλη ως οργανικός τροποποιητής σε στήλες IAM, διότι γίνεται μεθανόλυση των φωσφολιπιδίων της στατικής φάσης και διαταράσσεται η ισορροπία της στήλης. Σε κάθε περίπτωση, η γήρανση της στήλης πρέπει να ελέγχεται κατά καιρούς χρησιμοποιώντας πρότυπες ενώσεις.[60], [66]

1.6.3.3 Μηχανισμός κατακράτησης στις χρωματογραφικές στήλες IAM

Η κατακράτηση των ενώσεων στη στατική φάση της χρωματογραφίας IAM διέπεται κυρίως από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ενώ στην περίπτωση φορτισμένων μορίων αναμένονται επίσης ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τα αντίθετα φορτισμένα κέντρα των φωσφολιπιδίων. Ο ρόλος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων έχει διερευνηθεί εκτενώς.[60]

Χάρη σε αυτές τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και το σχηματισμό ιοντικών δεσμών η κατακράτηση των ενώσεων στη στατική φάση IAM μπορεί να προσομοιάζει, έστω και μερικώς, τα δεσμευτικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα στα βιολογικά συστήματα. Η κατανομή των ενώσεων στις IAM αντικατοπτρίζει οριακές περιπτώσεις μεταξύ παθητικής διάχυσης και δέσμευσης. Οι περιπτώσεις αυτές μπορούν να περιγραφούν από τη φωσφολιποφιλικότητα, η

οποία δίνεται από τη σχέση:

$$\Phi\omega\sigma\varphi o\lambda\iota\pi o\varphi\iota\lambda\iota\kappa\acute{o}\tau\eta\tau\alpha = \Upsilon\delta\rho o\varphi o\beta\acute{\iota}\alpha \pm \Pi o\lambda\iota\kappa\acute{o}\tau\eta\tau\alpha + I o\nu\tau\iota\kappa o\acute{\iota}\ \Delta\varepsilon\sigma\mu o\acute{\iota} \quad [1.14]$$

Το πρόσημο ± της πολικότητας υποδεικνύει πως ορισμένες πολικές επιδράσεις μπορούν να ενισχύσουν τη φωσφολιποφιλικότητα, συμβάλλοντας στο στοιχείο της δέσμευσης.[60]

Η κατακράτηση των βασικών ενώσεων είναι ισχυρότερη από την κατακράτηση των όξινων ενώσεων και αυτό μπορεί να αποδοθεί στα φωσφορικά ανιόντα. Οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των φωσφορικών ανιόντων και των πρωτονιωμένων βάσεων ενισχύουν τη συγγένεια των βάσεων με τη στατική φάση της χρωματογραφίας IAM. Τα φωσφορικά ανιόντα βρίσκονται κοντά στον υδρογονανθρακικό σκελετό και αλληλεπιδρούν ευκολότερα με τα κατιόντα των διαλυμένων ουσιών. Αντιθέτως, οι θετικά φορτισμένες ομάδες χολίνης βρίσκονται στο εξωτερικό τμήμα της επιφάνειας IAM, όπου η επίδραση του διαλύτη είναι έντονη, με αποτέλεσμα να μην είναι το ίδιο ισχυρές οι συνδέσεις τις με ανιόντα των διαλυμένων φαρμακευτικών ενώσεων.[60], [65], [67]

Επιπλέον, ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να γίνει για την κατακράτηση των αμφολυτικών ενώσεων, καθώς κατά την επαφή τους με την στατική φάση IAM φαίνεται να διαταράσσεται η μερική εξουδετέρωση του φορτίου τους.[13]

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας λαμβάνει χώρα προσδιορισμός των συντελεστών κατακράτησης μιας σειράς φαρμακευτικών ενώσεων με τη χρήση υγροχρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM). Για τη διεξαγωγή των πειραματικών μετρήσεων χρησιμοποιείται βιομιμητική χρωματογραφία συγγένειας με στατική φάση που αποτελείται από ακινητοποιημένες τεχνητές μεμβράνες. Τα δεδομένα που προέκυψαν συνδυάζονται με αντίστοιχα δεδομένα άλλων φαρμάκων που διερευνήθηκαν στο εργαστήριο κατά το παρελθόν, προς διεύρυνση της βάσης δεδομένων του εργαστηρίου και εξέταση συσχετίσεων με άλλα χρωματογραφικά δεδομένα.

Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών προσομοιάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων (αλλά και οποιουδήποτε χημικού είδους) με τις κυτταρικές μεμβράνες και έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη συσχετίσεων με την γαστρεντερική απορρόφηση ή την κυτταρική διαπερατότητα. Ωστόσο, ο κύριος όγκος της βιβλιογραφίας αναφέρεται σε περιορισμένο αριθμό δεδομένων, ενώ λείπουν συγκριτικές μελέτες με άλλα είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας όπως για παράδειγμα την μικκυλιακή χρωματογραφία.

Οι στόχοι της μελέτης είναι:

- η μελέτη του μηχανισμού κατακράτησης των φαρμακευτικών ενώσεων από τη στήλη IAM και η διερεύνηση της συμβολής της λιποφιλίας και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στον μηχανισμό συγκράτησης των ενώσεων αυτών από τη στήλη IAM
- η ανάπτυξη συσχετίσεων μεταξύ των χρωματογραφικών συντελεστών της IAM με χρωματογραφικούς συντελεστές από άλλες στήλες για να ελεγχθεί η επιτυχία της προσομοίωσης που επιτυγχάνεται
- η ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης απορρόφησης των φαρμακευτικών ενώσεων κατά την από του στόματος χορήγηση τους

2.2 Φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν

Οι φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν για τους σκοπούς της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι συνολικά 35. Οι ενώσεις αυτές ποικίλουν ως προς τη δομή τους (οξέα, βάσεις, αμφολύτες, ουδέτερα), αλλά και ως προς την φαρμακολογική τους δράση (καρδιολογικά,

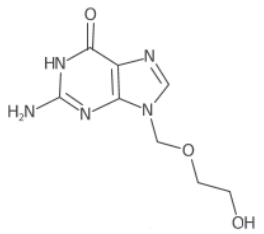
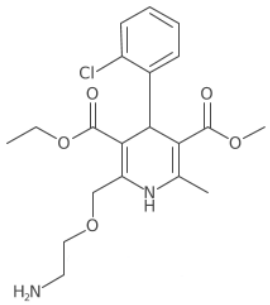
αντικαταθλιπτικά, αντιφλεγμονώδη, κτλ.). Τα απαραίτητα δεδομένα φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων αυτών των ενώσεων είναι διαθέσιμα βιβλιογραφικά.

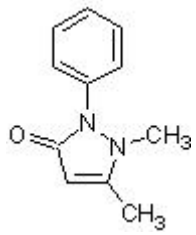
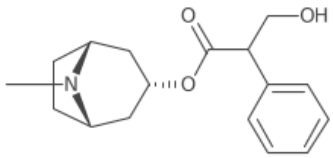
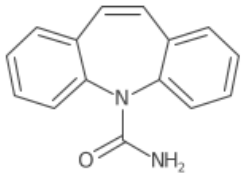
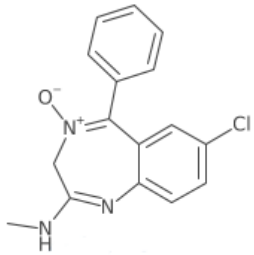
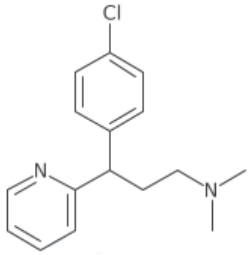
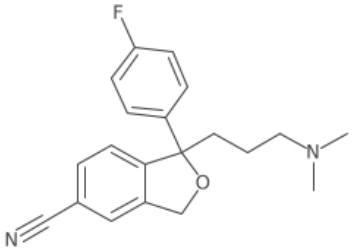
Οι φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν αγοράστηκαν είτε ως πρότυπες ενώσεις από την εταιρία Sigma – Aldrich, είτε ως φαρμακευτικά σκευάσματα από φαρμακεία.

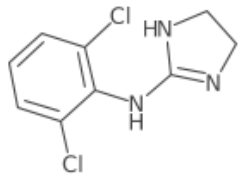
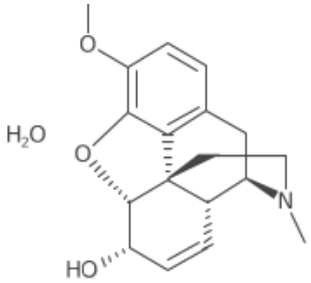
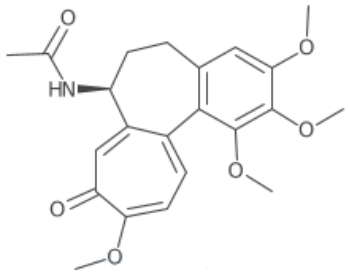
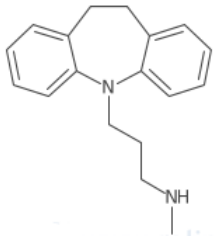
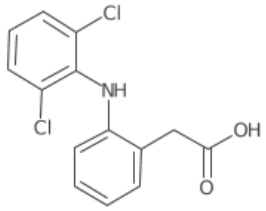
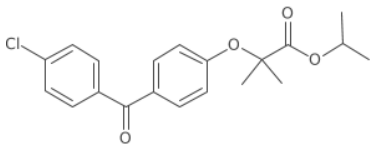
Ακολουθεί πίνακας στον οποίο παρουσιάζονται αναλυτικά οι φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν. Για κάθε φαρμακευτική ένωση δίνονται η δομή της, η φαρμακολογική της δράση, η κατηγορία στην οποία ανήκει (οξέα, βάσεις, αμφολύτες, ουδέτερα) και η μορφή με την οποία αγοράστηκε (πρότυπη ένωση ή φαρμακευτικό σκεύασμα). Τα οξέα συμβολίζονται με A (Acid), οι βάσεις με B (Base), τα ουδέτερα με N (Neutral) και οι αμφολύτες Z (Zwitterion).

Πίνακας 1

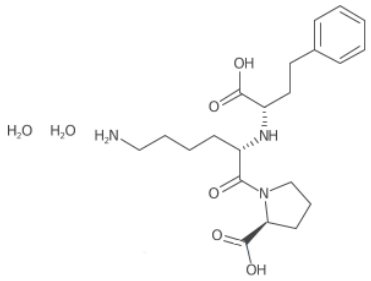
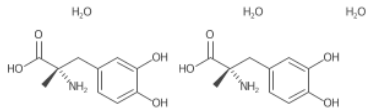
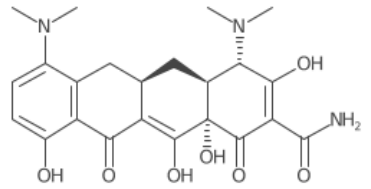
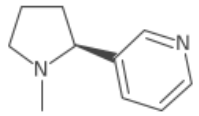
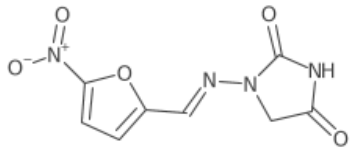
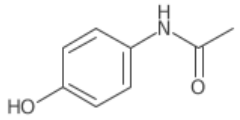
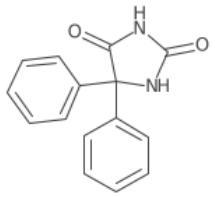
Φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους

Α/Α	Φαρμακευτική ένωση	Μορφή αγοράς	Κατηγορία (A, B, Z, N)	Φαρμακευτική δράση	Δομή
1	Acyclovir	Πρότυπη ένωση	N	Ιοστατική	
2	Amlodpine	Πρότυπη ένωση	B	Αντιυπερτασική (ανταγωνιστής ασβεστίου)	

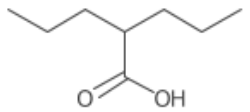
3	Antipyrine	Πρότυπη ένωση	N	Αναλγητική – Αντιπυρετική	
4	Atropine	Πρότυπη ένωση	B	Αντιχολινεργική	
5	Carbamazepine	Πρότυπη ένωση	N	Αντιεπιληπτική – Προφύλαξη της διπολικής διαταραχής	
6	Chlordiazepoxide	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Librax tab.)	N	Αγχολυτική	
7	Chlorpheniramine	Πρότυπη ένωση	B	Αντιισταμινική	
8	Citalopram	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Citalopram tab.)	B	Αντικαταθλιπτική	

9	Clonidine	Πρότυπη ένωση	B	Αντιυπερτασική	
10	Codeine	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Lonarid tab.)	B	Αντιδιαρροϊκή – Αντιβηχική – Αναλγητική (οπιοειδές)	
11	Colchicine	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Colchicina tab.)	N	Κατά της ουρικής αρθρίτιδας	
12	Desipramine	Πρότυπη ένωση	B	Αντικαταθλιπτική	
13	Diclofenac	Πρότυπη ένωση	A	Αντιφλεγμονώδης (μη στεροειδές)	
14	Fenofibrate	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Lipidil tab.)	N	Αντιλιπιδαιμικός παράγοντας	

15	Fluphenazine	Πρότυπη ένωση	B	Αντιψυχωσική	
16	Furosemide	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Lasix inj.)	A	Διουρητική	
17	Hydrochlorothiazide	Πρότυπη ένωση	N	Αντιαρρυθμική	
18	Imipramine	Πρότυπη ένωση	B	Αντικαταθλιπτική	
19	Isoniazid	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Dianicotyl tab.)	N	Αντιφυματική	
20	Labetalol	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Trandate inj.)	B	Αντιυπερτασική (β-αδρενεργικός αποκλειστής)	

21	Lisinopril	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Zestril tab.)	Z	Αντιυπερτασική	
22	Methyldopa	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Aldomet tab.)	Z	Αντιυπερτασική	
23	Minocycline	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Minocin caps.)	Z	Αντιμικροβιακή	
24	Nicotine	Πρότυπη ένωση	B	Αντιμετώπιση εξάρτησης από νικοτίνη	
25	Nitrofurantoin	Πρότυπη ένωση	A	Αντιμικροβιακή	
26	Paracetamol	Πρότυπη ένωση	N	Αντιφλεγμονώδης (μη στεροειδές)	
27	Phenytoin	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Epanutin caps.)	A	Αντιαρρυθμική - Αντιεπιληπτική	

28	Pioglitazone	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Pioglitazone tab.)	Z	Αντιδιαβητική	
29	Primidone	Πρότυπη ένωση	N	Αντιεπιληπτική	
30	Promazine	Πρότυπη ένωση	B	Αντιψυχωσική	
31	Pyrazinamide	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Pyrazinamide tab.)	N	Αντιφυματική	
32	Retinoic acid	Πρότυπη ένωση	A	Κατά της ακμής	
33	Rifampicin	Πρότυπη ένωση	Z	Αντιφυματική	
34	Trimethoprim	Πρότυπη ένωση	B	Αντιμικροβιακή	

35	Valproic acid	Φαρμακευτικό σκεύασμα (Depakine tab.)	A	Αντιεπιληπτική	

[68]

2.3 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, ήταν όλα αναλυτικής καθαρότητας.

Για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκαν:

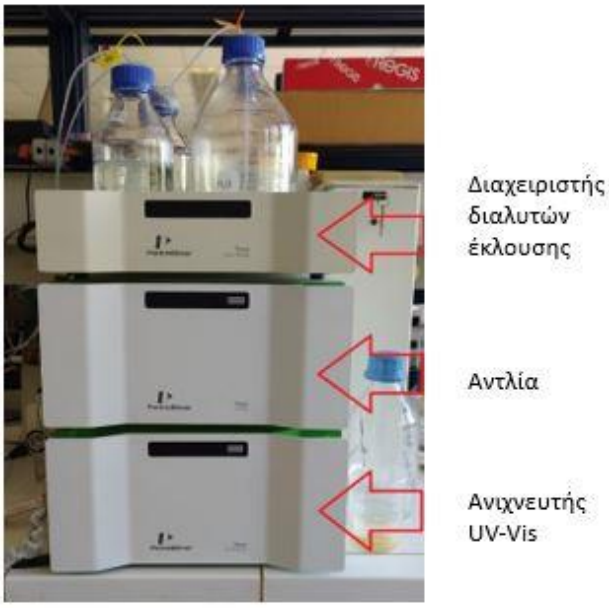
- KH_2PO_4 (≥99,5%, Chem-Lab NV)
- NaCl (≥99,8%, Sigma - Aldrich)
- KCl (≥99,5%, Riedel-de Haen)
- $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (≥99,5%, Merck)
- $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ (Mallinckrodt)
- Ακετονιτρίλιο (≥99,9%, HPLC Grade, Honeywell)
- HCl (Panreac)
- NaOH (solution – 50-52% in H_2O, suitable for chromatography, Sigma - Aldrich)
- Νερό υψηλής καθαρότητας (High Purity Water)

Το νερό που χρησιμοποιήθηκε είναι απιονισμένο νερό, το οποίο υπέστη περαιτέρω επεξεργασία μέσω συσκευής υπερκάθαρου ύδατος (Barnstead EasyPure II της Thermo Scientific) ώστε να φτάσει στην επιθυμητή καθαρότητα (υπερ-καθαρό).

2.4 Οργανολογία

Οι πειραματικές μετρήσεις διεξήχθησαν σε υγροχρωματογραφικό σύστημα (Flexar Perkin Elmer). Το σύστημα αυτό διαθέτει τρία μέρη. Πιο αναλυτικά, αποτελείται από ένα διαχειριστή διαλυτών έκλουσης (Flexar Solvent Manager), μία αντλία (Flexar LC Pump) και έναν ανιχνευτή UV-Vis (Flexar UV-Vis Detector, Perkin Elmer). Συγκεκριμένα για τον ανιχνευτή UV-Vis, διαθέτει εύρος μήκους κύματος 180-800nm. Για τις ανάγκες όμως της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε μόνο η λάμπα δευτερίου του ανιχνευτή, η οποία λειτουργεί εντός του εύρους 180-390nm. Ο όγκος του βρόγχου έγχυσης είναι 20μL. Τέλος, η καταγραφή των

χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού Chromera v.3.2.0 (Perkin Elmer).



Εικόνα 8 *Υγροχρωματογραφικό σύστημα HPLC*

2.5 Στατική φάση

Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε στήλη ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών IAM.PC.DD2 (3cm x 4.6mm) της εταιρίας Regis Technologies.

2.6 Κινητή φάση

Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διαλύτης έκλουσης, ο οποίος παρασκευάστηκε με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS – Phosphate Buffered Saline) με ή χωρίς την παρουσία ακετονιτριλίου ως οργανικού τροποποιητή. Ο διαλύτης έκλουσης παρασκευάστηκε σε 2 διαφορετικές τιμές pH. Αρχικά παρασκευάστηκε σε pH 7.40 (στο οποίο μετρήθηκαν όλες οι φαρμακευτικές ενώσεις που απαριθμούνται στην ενότητα 2.2) και έπειτα σε pH 5.50 (στο οποίο μετρήθηκαν εκλεκτικά οι φαρμακευτικές ενώσεις που είχαν όξινο ή αμφολυτικό χαρακτήρα).

Οι κινητές φάσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- PBS ρυθμισμένο σε pH 7.40 χωρίς παρουσία ακετονιτριλίου
- PBS ρυθμισμένο σε pH 7.40 περιεκτικότητας 10% σε ακετονιτρίλιο
- PBS ρυθμισμένο σε pH 7.40 περιεκτικότητας 15% σε ακετονιτρίλιο

- PBS ρυθμισμένο σε pH 7.40 περιεκτικότητας 20% σε ακετονιτρίλιο
- PBS ρυθμισμένο σε pH 7.40 περιεκτικότητας 25% σε ακετονιτρίλιο
- PBS ρυθμισμένο σε pH 7.40 περιεκτικότητας 30% σε ακετονιτρίλιο
- PBS ρυθμισμένο σε pH 5.50 χωρίς παρουσία ακετονιτριλίου
- PBS ρυθμισμένο σε pH 5.50 περιεκτικότητας 10% σε ακετονιτρίλιο
- PBS ρυθμισμένο σε pH 5.50 περιεκτικότητας 15% σε ακετονιτρίλιο
- PBS ρυθμισμένο σε pH 5.50 περιεκτικότητας 20% σε ακετονιτρίλιο
- PBS ρυθμισμένο σε pH 5.50 περιεκτικότητας 25% σε ακετονιτρίλιο
- PBS ρυθμισμένο σε pH 5.50 περιεκτικότητας 30% σε ακετονιτρίλιο
- PBS ρυθμισμένο σε pH 5.50 περιεκτικότητας 35% σε ακετονιτρίλιο
- PBS ρυθμισμένο σε pH 5.50 περιεκτικότητας 40% σε ακετονιτρίλιο

2.7 Πειραματική διαδικασία

2.7.1 Παρασκευή κινητής φάσης

Η κινητή φάση παρασκευάζεται προς τελικό όγκο 500mL. Αρχικά, ζυγίζονται 0.77g KH_2PO_4, 3,44g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 4g NaCl και 0.1g KCl σε ζυγό ακριβείας τριών δεκαδικών (OHAUS). Οι ποσότητες αυτές τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως των 500mL και διαλύονται σε περίπου 400mL υπερκάθαρου νερού. Για την υποβοήθηση της διάλυσης των στερεών στο υπερκάθαρο νερό, χρησιμοποιείται πλάκα με μηχανικό αναδευτήρα (Heidolph) χωρίς θέρμανση και με ανάδευση στα 600rpm κατά προσέγγιση. Αφού ολοκληρωθεί πλήρως η διάλυση των στερεών, ρυθμίζεται το pH του διαλύματος. Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.6, το pH του διαλύτη έκλουσης ρυθμίζεται σε δύο διαφορετικές τιμές, 7.40 και 5.50, με προσθήκη αραιού διαλύματος NaOH ή αραιού διαλύματος HCl, αντίστοιχα. Η ρύθμιση του pH γίνεται με τη βοήθεια πεχαμέτρου (Mettler Toledo).

Στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 500mL και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με υπερκάθαρο νερό. Στην περίπτωση που παρασκευάζεται PBS με συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε ακετονιτρίλιο, αντί για την προσθήκη υπερκάθαρου ως την χαραγή, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα ακετονιτριλίου ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή περιεκτικότητα (και επιπλέον υπερκάθαρο μέχρι την χαραγή εάν είναι απαραίτητο). Για PBS με περιεκτικότητα σε ακετονιτρίλιο 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% προστίθενται 50mL, 75mL, 100mL, 125mL, 150mL, 175mL και 200mL αντίστοιχα.

2.7.2 Χρωματογραφική διαδικασία

Για την έναρξη των πειραματικών μετρήσεων στον υγροχρωματογράφο, απαιτείται ο καθορισμός της χρωματογραφικής μεθόδου που θα ακολουθηθεί. Πιο συγκεκριμένα, μέσω του λογισμικού Chromera v.3.2.0 (Perkin Elmer) ρυθμίζεται η ροή του διαλύτη έκλουσης (κινητή φάση) στο 1.00mL/min καθώς και το μήκος κύματος στο οποίο θα μετράει ο ανιχνευτής UV-Vis, στα 220nm. Οι πειραματικές μετρήσεις διεξάγονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 22 ± 2 ^{O}C.

Αφού τεθεί σε λειτουργία ο χρωματογράφος, γίνεται απαερίωση του διαλύτη έκλουσης και αφήνεται το χρωματογραφικό σύστημα να λειτουργήσει για τουλάχιστον 30min με την προεπιλεγμένη ροή της κινητής φάσης, ώστε να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης.

Μετά την επίτευξη ισορροπίας, γίνεται μέτρηση του νεκρού χρόνου του συστήματος. Η μέτρηση γίνεται με έγχυση κιτρικού νατρίου και ο χρόνος συγκράτησης του από το χρωματογραφικό σύστημα αντιστοιχεί στον νεκρό χρόνο (t_0).

Ακολουθεί η έναρξη των μετρήσεων των φαρμακευτικών ενώσεων. Κάθε φαρμακευτική ουσία διαλύεται σε διαλύτη έκλουσης (ή σε αιθανόλη στην περίπτωση του ρετινοϊκού οξέος) και εγχύεται στο σύστημα. Για κάθε ένωση καταγράφεται ο χρόνος ανάσχεσης (t_r) που προκύπτει από την κύρια κορυφή του χρωματογραφήματος.

Κάθε μέτρηση, είτε αυτή αφορά το νεκρό χρόνο του συστήματος, είτε κάποια φαρμακευτική ένωση, επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Ο υπολογισμός του παράγοντα ανάσχεσης (logk) γίνεται για κάθε τιμή χρόνου ανάσχεσης (t_r) και λαμβάνεται ως τελική τιμή ο μέσος όρος τριών logk που υπολογίζονται με εφαρμογή της σχέσης [1.11].

Οι φαρμακευτικές ενώσεις με έντονη λιποφιλία μετρώνται με χρήση διαλύτη έκλουσης με προσθήκη ακετονιτριλίου. Για κάθε τέτοια ένωση προσδιορίζονται τρεις διαφορετικές ισοκρατικές τιμές logk, οι οποίες αντιστοιχούν σε PBS με τρεις διαφορετικές περιεκτικότητες ακετονιτριλίου ([x]%, [x+5]%, [x+10]%). Οι μετρήσεις αυτές γίνονται ώστε να βρεθεί η ανηγμένη τιμή του παράγοντα $logk_{w(extr.)}$ μέσω της εξίσωσης [1.13].

Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας καθαρίζεται η στήλη των ακινητοποιημένων τεχνητών

μεμβρανών χρησιμοποιώντας κινητή φάση με σύσταση 50% ακετονιτρίλιο και 50% υπερκάθαρο νερό για τουλάχιστον 60min.

2.8 Βιβλιογραφικά δεδομένα

2.8.1 Δεδομένα λιποφιλίας

Δεδομένα για τους συντελεστές μερισμού (logP) και κατανομής (logD), σε pH 7.40 και 5.50, λήφθηκαν μέσω του λογισμικού ADME Boxes 3.0 της εταιρίας Pharma Algorithms με σκοπό τη χρήση τους ως παραμέτρους κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών μετρήσεων. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 2 που ακολουθεί.

2.8.2 Δεδομένα κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου μορίων

Δεδομένα για τα κλάσματα θετικού (F^+) και αρνητικού (F^-) φορτίου μορίων, για pH 7.40, λήφθηκαν από το λογισμικό ADME Boxes 3.0 της εταιρίας Pharma Algorithms με σκοπό τη χρήση τους ως παραμέτρους κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών μετρήσεων. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 2 που ακολουθεί.

Πίνακας 2

Δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου για τις φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν

Α/Α	Φαρμακευτικές ενώσεις	logP	logD (7.40)	logD (5.50)	F^+ (7.40)	F^- (7.40)
1	Acyclovir	-1.56	-1.57	-1.56	0.00	0.01
2	Amlodpine	3.17	0.96	-0.88	0.99	0.00
3	Antipyrine	0.38	0.38	0.38	0.00	0.00
4	Atropine	1.83	-0.41	-1.24	1.00	0.00
5	Carbamazepine	2.30	2.30	2.30	0.00	0.00
6	Chlordiazepoxide	2.44	2.44	2.39	0.00	0.00
7	Chlorpheniramine	3.39	1.58	-0.29	0.99	0.00
8	Citalopram	3.41	1.44	0.37	0.99	0.00
9	Clonidine	1.59	0.97	-0.73	0.78	0.00

10	Codeine	1.14	0.37	-1.33	0.85	0.00
11	Colchicine	1.03	1.03	1.03	0.00	0.00
12	Desipramine	4.90	2.28	1.82	1.00	0.00
13	Diclofenac	4.40	1.34	3.17	0.00	1.00
14	Fenofibrate	4.38	4.38	4.38	0.00	0.00
15	Fluphenazine	4.36	3.82	2.06	0.74	0.00
16	Furosemide	2.03	-1.83	0.03	0.00	0.00
17	Hydrochlorothiazide	-0.07	-0.08	-0.07	0.00	0.03
18	Imipramine	4.80	2.83	1.77	0.99	0.00
19	Isoniazid	-0.70	-0.70	-0.70	0.00	0.00
20	Labetalol	3.09	1.63	0.30	0.55	0.02
21	Lisinopril	-1.22	-1.22	-1.22	0.00	0.00
22	Methyldopa	-1.99	-2.00	-1.99	0.00	0.02
23	Minocycline	0.05	-2.95	-2.95	0.00	0.01
24	Nicotine	1.17	0.30	-1.53	0.88	0.00
25	Nitrofurantoin	-0.47	-0.77	-0.48	0.00	0.47
26	Paracetamol	0.46	0.46	0.46	0.00	0.00
27	Phenytoin	2.47	2.41	2.46	0.00	0.10
28	Pioglitazone	2.94	1.98	2.64	0.00	0.87
29	Primidone	0.91	0.91	0.91	0.00	0.00
30	Promazine	4.55	2.58	1.52	0.99	0.00
31	Pyrazinamide	-0.55	-0.55	-0.55	0.00	0.00
32	Retinoic acid	6.30	3.33	5.17	0.00	1.00
33	Rifampicin	2.39	1.68	0.00	0.64	0.04
34	Trimethoprim	0.91	0.66	-0.87	0.47	0.00
35	Valproic acid	2.75	0.26	2.05	0.00	1.00

2.8.3 Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών σε υδατική φάση, λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου

Λαμβάνονται επιπλέον δεδομένα συντελεστών κατακράτησης χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών, για στήλη IAM.PC.DD2. Τα δεδομένα αυτά, μαζί με τους συντελεστές λιποφιλίας (logP και $logD_{(7.40)}$) και τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου για pH 7.40, προέρχονται από τη βιβλιογραφία και παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί. [13], [67], [69] Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιούνται αρχικά για τον εμπλουτισμό των εξισώσεων συσχέτισης των συντελεστών κατακράτησης $logk_w^{IAM}$ με τους συντελεστές λιποφιλίας, logP και logD, και έπειτα για τη συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης $logk_w^{IAM}$ με τους αντίστοιχους συντελεστές για άλλες στήλες (μικκυλιακή χρωματογραφία με επιφανειοδραστικούς παράγοντες Tween-20, Brij-35 και SDS). Τέλος, τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη του ποσοστού απορρόφησης μιας φαρμακευτικής ένωσης όταν αυτή χορηγείται από το στόμα (%HOA).

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα μπορούν να συνδυαστούν με τις πειραματικές μετρήσεις της παρούσας εργασίας, καθώς έχουν προέλθει χρησιμοποιώντας τις ίδιες πειραματικές παραμέτρους και την ίδια χρωματογραφική στήλη, επομένως δεν υπεισέρχονται διεργαστηριακά σφάλματα κατά την επεξεργασία του συνόλου των δεδομένων.

Πίνακας 3

Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση από χρωματογραφία IAM, δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου

Α/Α	Φαρμακευτική ένωση	Κατηγορία (A,B,Z,N)	$logk_w^{IAM}$ (7.40)	$logk_w^{IAM}$ (5.50)	logP	logD (7.40)	F^+ (7.40)	F^- (7.40)
36	Acetylsalicylic acid	A	-0.81	-0.48	1.19	-2.50	0.000	1.000
37	Albendazole	N	2.21		3.29	3.29	0.004	0.002
38	Allopurinol	N	-0.28	-0.32	-0.55	-0.55	0.000	0.010
39	Amitriptyline	B	2.99		5.04	2.50	0.982	0.000
40	Amoxicillin	A	-0.29	-0.31	-1.71	-2.56	0.000	0.531
41	Ampicillin	A	0.04	0.07	-1.13	-4.00	0.000	0.530
42	Caffeine	N	0.26	0.26	-0.07	-0.07	0.000	0.000
43	Candesartan	A	0.96		3.36	-1.35	0.000	0.995

44	Candesartan cilexitil	A	4.51		5.31	2.44	0.000	0.0994
45	Ceforanide sodium	Z	-0.13		-3.70	-3.70	0.000	0.007
46	Cefoxitin sodium	A	-0.00		-0.02	-1.27	0.000	1.000
47	Ceftriaxone	Z	-0.52	-0.11	-0.46	-3.08	0.000	0.221
48	Chloramphenicol	N	0.31	0.57	1.14	1.14	0.000	0.000
49	Chlorpromazine	B	3.33		5.35	3.38	0.991	0.000
50	Cimetidine	B	0.84	0.46	0.40	0.35	0.218	0.000
51	Cinoxacin	A	-0.50	0.30	1.28	-1.16	0.000	0.998
52	Ciprofloxacin	Z	1.31	1.29	-1.08	-1.11	0.050	0.033
53	Diltiazem	B	2.65		2.80	2.06	0.875	0.000
54	Diphenhydramine	B	1.82		3.40	1.29	0.965	0.000
55	Enoxacin	Z	0.55	1.25	-1.02	-1.02	0.051	0.033
56	Ephedrine	B	0.53		1.13	-0.77	0.986	0.000
57	Estradiol	N	2.59		4.01	4.01	0.000	0.001
58	Exp-3174	A	1.44		3.54	-0.53	0.000	1.000
59	Fludiazepam	N	2.26		2.75	2.75	0.000	0.000
60	Flufenamic acid	A	2.33		5.25	2.02	0.000	0.999
61	Flunitrazepam	N	1.79		2.06	2.06	0.000	0.000
62	Fluoxetine	B	2.98		4.26	1.82	0.997	0.000
63	Haloperidol	B	2.65		4.28	2.98	0.933	0.000
64	Hydrocortisone	N	0.94	1.11	1.60	1.60	0.000	0.000
65	4-Hydroxycoumarin	A	2.58		1.21	-0.20	0.000	0.998
66	Ibuprofen	A	0.87	1.55	3.50	1.07	0.000	0.999
67	Indomethacin	A	2.41	2.93	4.27	1.03	0.000	0.998
68	Isoxicam	A	0.91	1.25	2.83	-0.32	0.000	1.000
69	Ketoprofen	A	0.74	1.55	3.12	-0.25	0.000	0.999
70	Levofloxacin	Z	0.84	1.59	-0.25	-0.25	0.047	0.096
71	Lidocaine	B	1.27		2.26	1.71	0.779	0.000
72	Lornoxicam	A	1.50	1.60	2.62	0.61	0.000	0.993
73	Losartan	A	2.47		3.09	1.16	0.000	0.933
74	Mebendazole	N	2.44		2.83	2.83	0.004	0.002
75	Mefenamic acid	A	1.88	2.80	5.12	2.00	0.000	0.999

76	Meloxicam	A	1.40	1.50	3.02	0.09	0.000	0.999
77	Methylprednisolone	N	1.74	1.93	1.95	1.95	0.000	0.000
78	Metoclopramide	B	1.63	1.65	2.64	0.64	0.989	0.000
79	Minoxidil	N	0.73	0.85	1.24	1.23	0.002	0.000
80	Nadolol	B	1.26	1.10	0.81	-1.16	0.991	0.000
81	Nalidixic acid	A	0.23	1.24	1.41	-0.72	0.000	0.947
82	Nifedipine	N	1.66		2.20	2.20	0.000	0.000
83	Niflumic acid	A	1.52	1.24	4.81	0.80	0.000	0.997
84	Nortriptyline	B	2.83		4.04	1.70	0.998	0.000
85	Ofloxacin	Z	0.81	1.35	-0.39	-0.44	0.047	0.096
86	Omeprazole	N	1.81	1.85	2.30	2.30	0.001	0.054
87	Pentazocine	B	2.06	1.70	4.64	4.02	0.778	0.000
88	Phenacetin	N	1.03		1.58	1.58	0.000	0.000
89	Phenobarbital	N	0.28	0.71	1.47	1.14	0.000	0.416
90	Pindolol	B	1.47		1.75	-0.33	0.994	0.000
91	Pipemidic acid	Z	0.16	1.04	-2.15	-2.31	0.051	0.033
92	Piperacillin	A	0.60	1.13	0.50	-1.58	0.000	1.000
93	Piroxicam	A	1.35	1.73	1.76	-0.05	0.000	1.000
94	Promethazine	B	2.78		4.81	2.79	0.989	0.000
95	Propafenone	B	1.46		3.20	1.81	0.992	0.000
96	Propranolol	B	2.33		2.98	1.26	0.994	0.000
97	Protriptylline	B	2.79		4.89	1.36	0.875	0.000
98	Pyrimethamine	B	1.87		2.69	2.44	0.584	0.000
99	Quinidine	B	2.34		3.44	2.41	0.946	0.000
100	Risperidone	B	2.49		2.50	1.71	0.875	0.000
101	Salicylic acid	A	-0.30	-0.12	2.26	-1.67	0.000	1.000
102	Sulfamethoxazole	A	-0.04	0.91	0.89	-0.76	0.000	0.978
103	Sulpiride	B	1.04	0.71	0.62	-1.26	0.984	0.000
104	Tenoxicam	A	1.20	1.52	0.84	-0.32	0.000	1.000
105	Terbutaline	B	0.78		0.08	-1.35	0.980	0.000
106	Theophylline	N	-0.08	-0.26	-0.02	-0.02	0.000	0.000
107	Thioridazine	B	3.98		5.90	3.34	0.991	0.000

108	Tioconazole	N	3.86		4.29	4.26	0.150	0.000
109	Tolfenamic acid	A	2.35		5.17	2.10	0.000	0.999
110	Trazodone	N	2.34		2.90	2.54	0.218	0.000
111	Valsatran	A	1.36	1.90	3.78	-1.36	0.000	1.000
112	Vancomycin	Z	1.23	1.18	2.48	1.94	0.000	0.125
113	Warfarin	A	1.04	1.97	2.60	0.01	0.000	0.997

2.8.4 Δεδομένα μικυλλιακής χρωματογραφίας

Τα δεδομένα των συντελεστών κατακράτησης μικυλλιακής χρωματογραφίας λήφθηκαν από αποτελέσματα πειραμάτων που διεξήχθηκαν από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. και δεν έχουν δημοσιευθεί ακόμα. Τα πειράματα της μικκυλιακής χρωματογραφίας πραγματοποιήθηκαν με διαλύτη polyoxyethylene (23) lauryl ether, ή αλλιώς Brij-35, μια ουδέτερη τασιενεργό ουσία. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί, στη στήλη $\log k_w^{Brij}$ (7.4 NaCl 37). Ο δείκτης 7.4 υποδηλώνει το pH στο οποίο έγιναν οι μετρήσεις, ενώ ο δείκτης 37 υποδηλώνει τη θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις. Εκτός από τα δεδομένα μετρήσεων με διαλύτη Brij-35, λήφθηκαν και δεδομένα από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με Tween-20, ένα μη ιονικό επιφανειοδραστικό πολυσορβικού τύπου, και δεδομένα από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με SDS (θειικό δωδεκύλιο νάτριο), ένα ανιονικό τασιενεργό.

Για όσα φάρμακα δεν υπάρχουν δεδομένα, τα αντίστοιχα κελιά τους στον πίνακα είναι κενά.

Πίνακας 4

Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από μικυλλιακή χρωματογραφία για τρεις τύπους επιφανειοδραστικών (Brij-35, Tween-20, SDS)

Α/Α	Φαρμακευτική ένωση	logkw Brij-35 (7.40, NaCl, 37)	logkw Tween-20	logkw SDS (7.40)
1	Acyclovir	-0.536	-0.461	-0.330
2	Amlodpine	1.021		1.900
3	Antipyrine		-0.013	0.721
4	Atropine		0.110	1.447
5	Carbamazepine	0.973	1.754	1.349

6	Chlordiazepoxide	1.360	1.827	0.433
7	Chlorpheniramine	1.226		1.561
9	Clonidine			1.452
12	Desipramine		2.490	2.198
13	Diclofenac	1.150	1.465	0.841
15	Fluphenazine		2.238	1.540
16	Furosemide	0.856	1.372	-0.250
17	Hydrochlorothiazide	0.504	1.003	
18	Imipramine		1.952	2.011
20	Labetalol	1.104	1.537	1.772
21	Lisinopril	-0.815	-1.230	-0.499
24	Nicotine		0.410	1.092
25	Nitrofurantoin		0.137	0.005
26	Paracetamol	0.463	0.301	-0.026
29	Primidone		0.724	0.784
30	Promazine		1.785	2.287
33	Rifampicin			1.476
34	Trimethoprim	0.714	1.075	1.365
36	Acetylsalicylic acid	-0.416	-0.812	-0.310
37	Albendazole	1.359	2.066	1.642
38	Allopurinol	-0.040	-0.250	-0.213
39	Amitriptyline	1.861	2.177	2.134
40	Amoxicillin	-0.784	-1.266	-1.554
41	Ampicillin	-0.298	-0.660	0.110
42	Caffeine	0.096	0.054	0.656
47	Ceftriaxone	-0.624	-0.727	-0.876
48	Chloramphenicol	0.494	1.345	0.720
49	Chlorpromazine	1.930	2.282	2.066
50	Cimetidine	0.371	0.335	1.234
51	Cinoxacin	-0.568	-0.827	-0.724
52	Ciprofloxacin	-0.232	-0.721	-0.963
53	Diltiazem	1.538	2.002	1.80

54	Diphenhydramine	1.171	1.762	
55	Enoxacin	-0.373	-0.935	-1.171
57	Estradiol	1.219	2.008	1.215
61	Flunitrazepam	1.253	1.483	1.815
62	Fluoxetine	1.635	1.898	3.210
63	Haloperidol	1.665	1.883	1.673
64	Hydrocortisone	0.979	1.360	0.873
66	Ibuprofen	1.005	1.188	0.852
67	Indomethacin	1.004	1.712	0.842
68	Isoxicam	0.839	1.396	-0.144
69	Ketoprofen	0.639	0.630	0.205
70	Levofloxacin	-0.022	-0.719	-1.318
71	Lidocaine	0.851	1.391	1.777
72	Lornoxicam	1.087	1.498	0.470
73	Losartan	0.972	1.479	0.287
74	Mebendazole	1.186	1.015	2.047
75	Mefenamic acid	1.227	1.545	1.297
76	Meloxicam	0.908	1.422	0.411
77	Methylprednisolone	1.157	1.701	1.401
78	Metoclopramide	0.567	0.782	1.848
79	Minoxidil	0.669	0.604	1.101
80	Nadolol	-0.366	-0.328	1.556
81	Nalidixic acid	0.123	-0.494	0.861
82	Nifedipine	1.387		
83	Niflumic acid	1.141	1.517	0.698
84	Nortriptyline	1.349	2.165	2.291
85	Ofloxacin	0.006	-0.481	-0.984
86	Omeprazole	1.127	1.484	1.530
87	Pentazocine	1.208		
89	Phenobarbital	1.044		
90	Pindolol	0.486	0.678	1.303
91	Pipemidic acid	-0.543	-1.020	-0.389

92	Piperacillin	-0.280	-0.282	-0.436
93	Piroxicam	0.777	1.313	0.267
94	Promethazine	1.794	2.220	2.001
95	Propafenone	1.302		2.042
96	Propranolol	1.218	1.729	2.273
97	Protriptylline	1.485	2.245	2.154
98	Pyrimethamine	1.364	1.957	1.895
99	Quinidine	1.224		1.966
101	Salicylic acid	0.343	0.152	-0.070
102	Sulfamethoxazole	0.396	0.190	-0.401
103	Sulpiride	-0.188	-0.013	0.860
104	Tenoxicam	0.760	1.223	
105	Terbutaline	-0.066	-0.017	1.092
106	Theophylline	-0.114	-0.469	-0.236
107	Thioridazine	1.852	2.224	1.401
110	Trazodone	1.370	2.326	1.712
112	Vancomycin	-0.296	-0.328	0.117
113	Warfarin	0.860	1.064	0.792

2.8.5 Δεδομένα απορρόφησης κατά τη χορήγηση φαρμάκων από το στόμα (%HOA)

Τα δεδομένα απορρόφησης από το στόμα σε ποσοστιαία μορφή λήφθηκαν από τη βιβλιογραφία [21], [70]–[82] και παρατίθενται στον πίνακα 5 για τα φάρμακα που μελετήθηκαν κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, τα φάρμακα που έχουν απαριθμηθεί στις ενότητες 2.8.3 - 2.8.4 και ένα επιπλέον set φαρμάκων το οποίο λαμβάνεται επίσης από τη βιβλιογραφία [71], [83] για την ανάπτυξη του μοντέλου πρόβλεψης της εντερικής απορρόφησης.

Για όσα φάρμακα βρέθηκαν στη βιβλιογραφία περισσότερες από μία τιμές για την %HOA, βρέθηκε και χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος τους.

Στον ίδιο πίνακα προστίθενται οι στήλες $\log k_w^{IAM}$ (best), MW (Molecular Weight – Μοριακό Βάρος), TPSA, F^+, F^-, F^+zwit και F^-zwit, τα δεδομένα των οποίων θα χρησιμοποιηθούν για την

ανάπτυξη του μοντέλου πρόβλεψης της εντερικής απορρόφησης των φαρμακευτικών ενώσεων.

Σχετικά με την στήλη $logk_w^{IAM}$ (best), αυτή αναφέρεται στους συντελεστές κατακράτησης των φαρμακευτικών ενώσεων από τη στατική φάση IAM και πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για τη μεγαλύτερη τιμή $logk_w^{IAM}$ μεταξύ των δύο που έχουν υπολογιστεί για pH 5.50 και 7.40. Η χρήση της μεταβλητής $logk_w^{IAM}$ (best) έχει προταθεί στη βιβλιογραφία.[69]

Όσον αφορά τις τιμές MW, TPSA, F^+, F^-, F^+zwit και F^-zwit, αυτές λήφθηκαν από το λογισμικό ADME Boxes 3.0 της εταιρίας Pharma Algorithms. Οι μεταβλητές F^+zwit και F^-zwit αντιστοιχούν στα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- αντίστοιχα, στα οποία έχουν προστεθεί τα κλάσματα αμφολυτικού φορτίου (zwitterionic fractions).

Πίνακας 5

Δεδομένα απορρόφησης από το στόμα σε ποσοστό επί τοις εκατό (%HOA)

Α/Α	Φαρμακευτική ένωση	%HOA	$logk_w^{IAM}$ best	MW	TPSA	F^+	F^-	F^+zwit.	F^-zwit.
1	Acyclovir	21.00	-0.269	225.20	114.76	0.000	0.009	0.000	0.009
2	Amlodipine	80.00	3.399	408.87	99.88	0.994	0.000	0.994	0.000
3	Antipyrine	100.00	0.309	188.23	23.55	0.000	0.000	0.000	0.000
4	Atropine	92.50	1.120	289.37	49.77	0.996	0.000	0.996	0.000
5	Carbamazepine	84.00	1.933	236.27	46.33	0.000	0.000	0.000	0.000
6	Chlordiazepoxide	97.00	2.159	299.75	44.47	0.002	0.000	0.002	0.000
8	Citalopram	90.00	2.569	324.39	36.26	0.991	0.000	0.991	0.000
9	Clonidine	98.00	1.116	230.09	36.42	0.779	0.000	0.779	0.000
10	Codeine	95.00	0.953	299.36	41.93	0.848	0.000	0.848	0.000
12	Desipramine	92.50	3.016	266.38	15.27	0.999	0.000	0.999	0.000
13	Diclofenac	100.00	2.921	296.15	49.33	0.000	0.943	0.000	0.943
16	Furosemide	61.00	1.599	330.74	131.01	0.000	0.990	0.000	0.990
17	Hydrochlorothiazide	69.00	0.909	297.74	135.12	0.000	0.000	0.000	0.000
18	Imipramine	97.00	2.883	280.41	6.48	0.991	0.000	0.991	0.000
20	Labetalol	95.00	2.463	328.40	95.58	0.552	0.020	0.950	0.420
21	Lisinopril	25.00	-0.284	405.49	132.96	0.000	0.000	1.000	1.000

22	Methyldopa	50.00	-0.517	211.21	103.78	0.000	0.018	0.982	1.000
23	Minocycline	100.00	1.286	457.48	164.63	0.006	0.000	1.000	0.994
25	Nitrofurantoin	92.50	0.408	238.16	123.74	0.000	0.013	0.000	0.013
26	Paracetamol	85.00	0.323	151.16	49.33	0.000	0.000	0.000	0.000
27	Phenytoin	90.00	2.056	252.27	58.20	0.000	0.102	0.000	0.102
29	Primidone	86.50	0.656	218.25	58.20	0.000	0.000	0.000	0.000
33	Rifampicin	87.50	1.615	822.94	220.15	0.635	0.041	0.778	0.184
34	Trimethoprim	97.00	1.494	290.32	105.51	0.469	0.000	0.469	0.000
35	Valproic acid	100	1.800	144.21	37.30	0.000	0.805	0.000	0.805
39	Amitriptyline	97.00	2.990	277.40	3.24	0.982	0.000	0.982	0.000
41	Ampicillin	35.00	0.072	349.40	138.03	0.000	0.020	0.980	1.000
42	Caffeine	100.00	0.260	194.19	58.44	0.000	0.000	0.000	0.000
47	Ceftriaxone	1.00	-0.106	554.58	287.82	0.001	0.004	0.996	0.999
48	Chloramphenicol	90.00	0.570	323.13	118.39	0.000	0.000	0.000	0.000
49	Chlorpromazine	96.00	3.330	318.86	31.78	0.991	0.000	0.991	0.000
50	Cimetidine	80.00	0.843	252.34	114.19	0.218	0.000	0.218	0.000
51	Cinoxacin	95.00	0.304	262.22	88.43	0.000	0.867	0.000	0.867
52	Ciprofloxacin	60.00	1.310	331.34	72.88	0.050	0.030	1.000	0.210
53	Diltiazem	85.00	2.650	414.52	84.38	0.875	0.000	0.875	0.000
54	Diphenhydramine	92.50	1.820	255.35	12.47	0.965	0.000	0.965	0.000
55	Enoxacin	90.00	1.250	320.32	85.77	0.050	0.030	1.000	0.210
56	Ephedrine	85.00	0.530	165.23	32.26	0.986	0.000	0.986	0.000
62	Fluoxetine	80.00	2.980	309.33	21.26	0.997	0.000	0.997	0.000
64	Hydrocortisone	90.20	1.110	326.46	94.83	0.000	0.000	0.000	0.000
66	Ibuprofen	80.00	1.549	206.28	37.30	0.000	0.943	0.000	0.943
67	Indomethacin	100.00	2.930	357.79	68.53	0.000	0.892	0.000	0.892
68	Isoxicam	100.00	1.250	335.34	121.12	0.000	0.970	0.000	0.970
69	Ketoprofen	100.00	1.550	254.28	54.37	0.000	0.940	0.000	0.940
70	Levofloxacin	99.00	1.590	361.37	73.32	0.792	0.000	0.998	0.206
71	Lidocaine	97.00	1.270	234.34	32.34	0.779	0.000	0.779	0.000
72	Lornoxicam	100.00	1.597	371.82	136.22	0.000	0.674	0.000	0.674
75	Mefenamic acid	92.50	2.800	241.28	49.33	0.000	0.940	0.000	0.940

76	Meloxicam	90.00	1.504	351.40	136.22	0.000	0.963	0.007	0.970
77	Methylprednisolone	86.00	1.931	374.47	94.83	0.000	0.000	0.000	0.000
78	Metoclopramide	77.00	1.649	299.80	67.59	1.000	0.000	1.000	0.000
79	Minoxidil	97.00	0.850	209.25	93.63	0.108	0.000	0.108	0.000
80	Nadolol	42.00	1.260	309.40	81.95	0.991	0.000	0.991	0.000
81	Nalidixic acid	98.00	1.243	232.23	70.50	0.019	0.202	0.024	0.207
82	Nifedipine	90.00	1.660	346.33	113.46	0.000	0.000	0.000	0.000
83	Niflumic acid	95.00	1.640	282.22	62.22	0.000	0.838	0.161	0.999
84	Nortriptyline	100.00	2.830	263.38	12.03	0.998	0.000	0.998	0.000
85	Ofloxacin	98.00	1.352	361.37	73.32	0.050	0.030	1.000	0.210
86	Omeprazole	97.00	1.852	345.42	96.31	0.071	0.000	0.071	0.000
87	Pentazocine	95.00	2.060	285.42	23.47	0.778	0.00	0.778	0.00
89	Phenobarbital	92.50	0.710	232.23	75.27	0.000	0.010	0.000	0.010
90	Pindolol	92.60	1.470	248.32	57.28	0.994	0.000	0.994	0.000
91	Pipemidic acid	Well absorbed	1.043	303.32	98.66	0.793	0.000	0.999	0.206
92	Piperacillin	15.50	1.129	517.55	181.73	0.000	0.999	0.000	0.999
93	Piroxicam	100.00	1.730	331.35	107.98	0.000	0.670	0.000	0.670
94	Promethazine	88.00	2.780	284.42	31.78	0.989	0.000	0.989	0.000
95	Propafenone	90.00	1.459	341.44	58.56	0.992	0.000	0.992	0.000
96	Propranolol	92.90	2.330	259.34	41.49	0.994	0.000	0.994	0.000
97	Protriptylline	97.00	2.790	263.38	12.03	0.875	0.000	0.875	0.000
98	Pyrimethamine	100.00	1.870	248.71	77.82	0.584	0.000	0.584	0.000
99	Quinidine	80.60	2.340	324.42	45.59	0.946	0.000	0.946	0.000
101	Salicylic acid	100.00	-0.121	138.12	57.53	0.000	0.997	0.000	0.997
102	Sulfamethoxazole	100.00	0.910	253.28	106.60	0.000	0.395	0.000	0.395
103	Sulpiride	40.00	1.036	341.43	110.11	0.984	0.000	0.998	0.004
104	Tenoxicam	100.00	1.520	337.38	136.22	0.000	0.670	0.000	0.670
105	Terbutaline	59.50	0.780	225.28	72.72	0.980	0.000	0.990	0.010
106	Theophylline	98.00	-0.080	180.16	69.30	0.000	0.000	0.000	0.000
110	Trazodone	100.00	2.340	371.89	42.39	0.218	0.000	0.218	0.000
112	Vancomycin	35.50	1.230	1449.25	530.49	0.000	0.125	0.875	1.000

113	Warfarin	98.50	1.970	308.33	63.60	0.000	0.838	0.000	0.838
114	Amiloride	50.00	0.862	229.63	156.79	0.978	0.000	0.978	0.000
115	Atenolol	48.00	0.510	266.34	84.58	0.994	0.000	0.994	0.000
116	Bretylium	23.00	-0.326	243.16	0.00	1.000	0.000	1.000	0.000
117	Bromazepam	84.00	1.440	316.15	54.35	0.000	0.000	0.000	0.000
118	Chlorthalidone	65.00	1.370	338.77	117.87	0.000	0.000	0.000	0.000
119	Dexamethasone	85.00	1.560	392.46	94.83	0.000	0.000	0.000	0.000
120	Diazepam	100.00	2.120	284.74	32.67	0.000	0.000	0.000	0.000
121	Enalapril	63.00	-0.340	376.45	95.94	0.000	0.500	0.490	1.000
122	Famotidine	39.00	0.559	337.45	237.75	0.260	0.000	0.260	0.000
123	Ganciclovir	4.00	-1.560	255.23	134.99	0.000	0.000	0.000	0.000
124	Ketolorac	95.00	1.477	255.27	59.30	0.000	0.970	0.000	0.970
125	Lorazepam	95.00	2.030	321.16	61.69	0.000	0.000	0.000	0.000
126	Metolazone	64.00	1.684	365.83	100.88	0.000	0.000	0.000	0.000
127	Metoprolol	95.00	0.873	267.36	50.72	0.994	0.000	0.994	0.000
128	Naproxen	100.00	1.710	230.26	46.53	0.000	0.943	0.000	0.943
129	Nimesulide	100.00	2.110	308.31	112.61	0.000	0.290	0.000	0.290
130	Norfloxacin	68.00	1.310	319.33	72.88	0.050	0.100	1.000	0.210
131	Oxprenolol	94.00	1.470	265.35	50.72	0.994	0.000	0.994	0.000
132	Prednisolone	99.00	1.648	360.44	94.83	0.000	0.000	0.000	0.000
133	Ranitidine	50.00	0.613	314.40	114.57	0.933	0.000	0.933	0.000
134	Scopolamine	95.00	1.150	303.35	71.53	0.689	0.000	0.689	0.000
135	Sulindac	90.00	1.438	356.41	73.58	0.000	0.976	0.000	0.976
136	Timolol	90.00	0.796	316.42	107.98	0.991	0.000	0.991	0.000
137	Verapamil	95.00	2.760	454.60	63.95	0.982	0.000	0.982	0.000

2.9 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των πειραματικών μετρήσεων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού IBM SPSS Statistics 23. Για την ερμηνεία των πειραματικών δεδομένων έγιναν πολλαπλές αναλύσεις παλινδρόμησης και εξετάστηκαν οι εξισώσεις που προέκυψαν. Για κάθε πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης σημειώνεται ο αριθμός των δεδομένων (n), ο συντελεστής συσχέτισης (R^2), η τυπική απόκλιση (s – Standard error of estimate) και το F-test, για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Επιπλέον, για κάθε παράμετρο της παλινδρόμησης, ο συντελεστή της παλινδρόμησης (Regression Coefficient) δίνεται μαζί με ένα τυπικό σφάλμα σε παρένθεση. Τέλος, πριν την κατασκευή της τελικής εξίσωσης, εξετάζεται η σημαντικότητα της κάθε μεταβλητής με χρήση του student t-test, το οποίο πρέπει να έχει απόλυτη τιμή μεγαλύτερη ή ίση του δύο ώστε να είναι σημαντική η μεταβλητή ($|t| \geq 2$), και παρατηρώντας την τιμή της τελευταίας στήλης του πίνακα ANOVA (Sig. - Significance), η οποία πρέπει να έχει τιμή μικρότερη ή ίση του 0.05 ώστε να είναι σημαντική η μεταβλητή ($p \leq 0.05$). Στην περίπτωση που κάποια μεταβλητή δεν ήταν σημαντική στατιστικά, αυτή αφαιρέθηκε και επαναλήφθηκε η πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα και υπολογισμός συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση, $logk_w^{IAM}$

Το πρώτο βήμα για την επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων είναι ο υπολογισμός των συντελεστών κατακράτησης logk των φαρμακευτικών ενώσεων που μελετήθηκαν. Ο υπολογισμός αυτός γίνεται για τις φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν με PBS (pH 5.50 ή 7.40) χωρίς παρουσία ακετονιτριλίου, αλλά και για αυτές που μετρήθηκαν παρουσία κάποιας συγκέντρωσης ακετονιτριλίου, με χρήση της εξίσωσης [1.11].

Όσες ενώσεις μελετήθηκαν με PBS με παρουσία ακετονιτριλίου (οποιασδήποτε περιεκτικότητας) δεν μελετήθηκαν σε 100% υδατική φάση, καθώς οι χρόνοι έκλουσης τους στην υδατική φάση θα ήταν πολύ μεγάλοι (θα εμφάνιζαν ισχυρή συγκράτηση από τη χρωματογραφική στήλη).

Στην περίπτωση των ενώσεων που μετρήθηκαν μόνο σε 100% υδατική φάση, οι τιμές των συντελεστών συγκράτησης συμβολίζονται ως $logk^{IAM}_{w(act.)}$. Για τις φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν σε τρεις διαφορετικές περιεκτικότητες ακετονιτριλίου υπολογίζεται η ανηγμένη τιμή του logk, δηλαδή η τιμή του logk που θα αντιστοιχούσε σε 100% υδατική φάση και η οποία προκύπτει από γραμμική παρεμβολή, χρησιμοποιώντας την εξίσωση [1.13]. Ο ανηγμένος συντελεστής συγκράτησης που υπολογίζεται συμβολίζεται ως $logk^{IAM}_{w(extr.)}$.

Ακολουθούν δύο πίνακες στους οποίους παρουσιάζονται αναλυτικά οι πειραματικές τιμές των logk για τις δύο τιμές pH της κινητής φάσης. Εντός των παρενθέσεων για όλες τις τιμές logk, εκτός από τα $logk^{IAM}_{w(extr.)}$, βρίσκεται η τυπική απόκλιση (standard deviation) που προκύπτει από τις τρεις διαφορετικές τιμές που έχουν υπολογιστεί, μια για κάθε επανάληψη της πειραματικής μέτρησης και κυμαίνεται από ±0.00 έως ±0.06. Όσον αφορά το $logk^{IAM}_{w(extr.)}$, εντός των παρενθέσεων εμφανίζεται το σφάλμα του σταθερού όρου (standard error of the intercept) της γραμμικής παλινδρόμησης, που έγινε για την εύρεση του $logk^{IAM}_{w(extr.)}$ στην υδατική φάση με παρεκβολή (extrapolation) και βρίσκεται για τις περισσότερες ενώσεις κάτω από το ±0.15 (εξαιρέσεις αποτελούν η Chlorpheniramine, η Desipramine και η Imipramine) .

Πίνακας 6

Συντελεστές κατακράτησης, logk, για τις διάφορες συγκεντρώσεις ακετονιτριλίου στην κινητή φάση με pH 7.40 και συντελεστής κατακράτησης υπολογισμένος μέσω γραμμικής παρεμβολής, $logk^{IAM}_{w(extr.)}$

Α/Α	Φαρμακευτική ένωση	$logk^{IAM}_{w(act.)}$	$logk^{IAM}_{10}$	$logk^{IAM}_{15}$	$logk^{IAM}_{20}$	$logk^{IAM}_{25}$	$logk^{IAM}_{30}$	$logk^{IAM}_{w(extr.)}$
1	Acyclovir	-0.269 (±0.00)						
2	Amlodpine			2.203 (±0.02)	1.781 (±0.01)	1.401 (±0.01)		3.399 (±0.05)
3	Antipyrine	0.309 (±0.00)						
4	Atropine	1.120 (±0.01)						
5	Carbamazepine	1.933 (±0.00)						
6	Chlordiazepoxide			1.156 (±0.00)	0.859 (±0.01)	0.495 (±0.01)		2.159 (±0.08)
7	Chlorpheniramine			1.223 (±0.01)	1.005 (±0.00)	0.599 (±0.03)		2.190 (±0.22)
8	Citalopram			1.575 (±0.00)	1.172 (±0.02)	0.898 (±0.00)		2.569 (±0.15)
9	Clonidine	1.116 (±0.01)						
10	Codeine	0.953 (±0.01)						
11	Colchicine	1.980 (±0.01)						
12	Desipramine			2.049 (±0.01)	1.636 (±0.01)	1.386 (±0.01)		3.016 (±0.19)
13	Diclofenac		1.565	1.197	0.691			2.462

			(±0.01)	(±0.01)	(±0.01)			(±0.12)
14	Fenofibrate				2.382 (±0.00)	1.905 (±0.02)	1.402 (±0.01)	4.346 (±0.04)
15	Fluphenazine				2.293 (±0.00)	1.828 (±0.01)	1.386 (±0.02)	4.103 (±0.03)
16	Furosemide	1.319 (±0.01)						
17	Hydrochlorothiazide	0.909 (±0.00)						
18	Imipramine			1.920 (±0.01)	1.728 (±0.00)	1.304 (±0.00)		2.883 (±0.27)
19	Isoniazid	-0.598 (±0.01)						
20	Labetalol		1.810 (±0.00)	1.502 (±0.01)	1.162 (±0.00)			2.463 (±0.03)
21	Lisinopril	-0.567 (±0.01)						
22	Methyldopa	-0.517 (±0.06)						
23	Minocycline	0.168 (±0.01)						
24	Nicotine	0.088 (±0.02)						
25	Nitrofurantoin	0.314 (±0.01)						
26	Paracetamol	0.323 (±0.00)						
27	Phenytoin			1.089 (±0.01)	0.786 (±0.01)	0.448 (±0.01)		2.056 (±0.04)

28	Pioglitazone			1.444 (±0.00)	0.979 (±0.01)	0.480 (±0.00)		2.896 (±0.04)
29	Primidone	0.656 (±0.00)						
30	Promazine			2.052 (±0.01)	1.754 (±0.00)	1.393 (±0.00)		3.051 (±0.07)
31	Pyrazinamide	-0.503 (±0.05)						
32	Retinoic acid				2.443 (±0.02)	1.939 (±0.01)	1.377 (±0.01)	4.585 (±0.09)
33	Rifampicin	1.615 (±0.00)						
34	Trimethoprim	1.494 (±0.01)						
35	Valproic acid			0.963 (±0.01)	0.737 (±0.01)	0.442 (±0.01)		1.756 (±0.08)

Πίνακας 7

Συντελεστές κατακράτησης, logk, για τις διάφορες συγκεντρώσεις ακετονιτριλίου στην κινητή φάση με pH 5.50 και συντελεστής κατακράτησης υπολογισμένος μέσω γραμμικής παρεμβολής, logkIAMw(extr.)

Α/Α	Φαρμακευτική ένωση	$logk^{IAM}_{w(act.)}$	$logk^{IAM}_{10}$	$logk^{IAM}_{15}$	$logk^{IAM}_{20}$	$logk^{IAM}_{25}$	$logk^{IAM}_{30}$	$logk^{IAM}_{35}$	$logk^{IAM}_{40}$	$logk^{IAM}_{w(extr.)}$
2	Amlodipine			1.770 (±0.01)	1.330 (±0.00)	0.839 (±0.00)				3.175 (±0.06)
13	Diclofenac		2.165 (±0.01)	1.763 (±0.02)	1.402 (±0.01)					2.921 (±0.04)
16	Furosemide	1.599 (±0.01)								
17	Hydrochlorothiazide	0.704 (±0.00)								

20	Labetalol		1.301 (±0.00)	0.960 (±0.01)	0.596 (±0.01)					2.010 (±0.02)
21	Lisinopril	-0.284 (±0.03)								
22	Methyldopa	-0.572 (±0.01)								
23	Minocyclin	1.286 (±0.00)								
25	Nitrofurantoin	0.408 (±0.01)								
27	Phenytoin			1.033 (±0.01)	0.732 (±0.01)	0.399 (±0.01)				1.989 (±0.04)
28	Pioglitazone			1.867 (±0.00)	1.450 (±0.01)	1.004 (±0.01)				3.166 (±0.03)
32	Retinoic acid						2.474 (±0.01)	2.024 (±0.01)	1.598 (±0.01)	5.098 (±0.05)
35	Valproic acid			0.979 (±0.01)	0.738 (±0.01)	0.438 (±0.00)				1.800 (±0.07)

Σχετικά με τις τιμές $\log k^{IAM}_{w(extr.)}$, όπως αναφέρεται και παραπάνω, αυτές υπολογίζονται με τη χρήση γραμμικής παρεμβολής, με βάση την εξίσωση [1.13]. Για τις περισσότερες φαρμακευτικές ενώσεις, και για τις δύο τιμές pH της κινητής φάσης, οι συντελεστές συσχέτισης R^2 έχουν τιμή μεγαλύτερη από 0.9990.

3.2 Συσχέτιση του $\log k_w^{IAM}$ με τους συντελεστές λιποφιλίας (logP, logD)

Αναμένεται οι συντελεστής κατακράτησης της στήλης IAM ($\log k_w^{IAM}$) να συσχετίζεται με τα μεγέθη που εκφράζουν τη λιποφιλία των φαρμακευτικών ενώσεων, δηλαδή τους συντελεστές μερισμού και κατανομής, logP και logD, αντίστοιχα. Για όλα τα είδη χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως ισχύει πως διέπονται από τη λιποφιλία, ή πιο σωστά από την υδροφοβία.[3, p. 58] Επιπλέον, εξετάζεται και η συνεισφορά των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στις παραπάνω συσχετίσεις, εισάγοντας τις ανεξάρτητες μεταβλητές F^+, F^- (θετικό και αρνητικό φορτίο, αντίστοιχα) στις γραμμικές παλινδρομήσεις που εκτελούνται μεταξύ των $\log k_w^{IAM}$ και logP και των $\log k_w^{IAM}$ και logD.

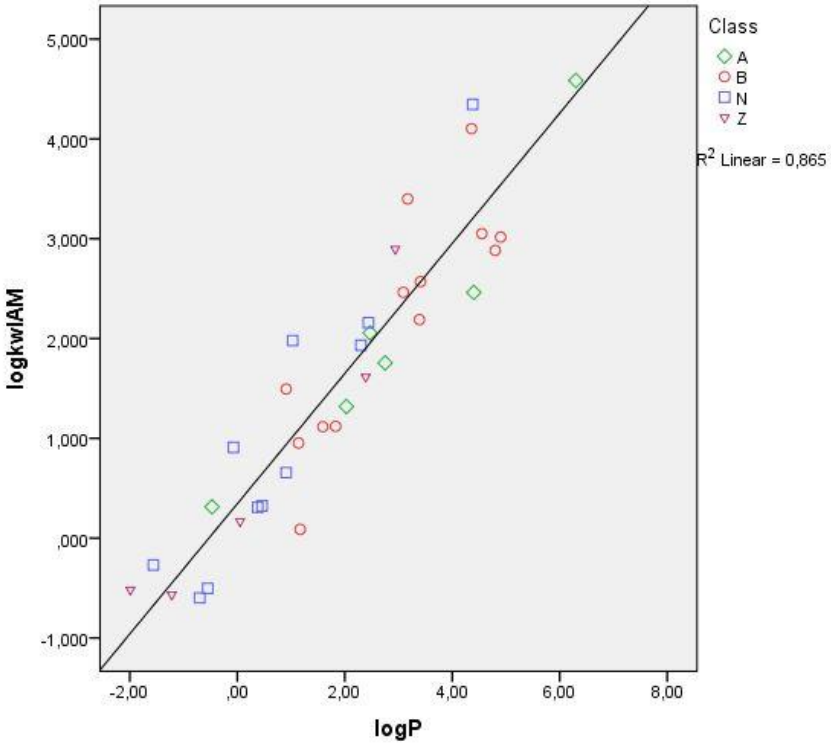
3.2.1 Συσχέτιση του $logk_w^{IAM}$ με το συντελεστή λιποφιλίας logP

Η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατανομής $logk_w^{IAM}$ με το συντελεστή μερισμού logP γίνεται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, όπου ως εξαρτημένη μεταβλητή τίθεται ο συντελεστής $logk_w^{IAM}$ και ως ανεξάρτητη ο συντελεστής logP. Η εξίσωση που προέκυψε είναι η ακόλουθη:

$$logk_w^{IAM} = 0.652\ (\pm 0.045) \cdot logP + 0.345\ (\pm 0.125) \quad [3.1]$$

(n = 35, R^2 = 0.865, s = 0.537, F = 211.9)

Το αποτέλεσμα της παραπάνω συσχέτισης παριστάνεται και γραφικά:



Διάγραμμα 1 *Γραφική παράσταση $logk_w^{IAM}$ προς logP*

Τα στατιστικά στοιχεία της εξίσωσης [3.1] είναι αρκετά ικανοποιητικά και γίνεται εμφανές πως η κατακράτηση των ενώσεων από τη χρωματογραφική στήλη οφείλεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Με την εισαγωγή του θετικού και του αρνητικού φορτίου (F^+ και F^-, αντίστοιχα), ως ανεξάρτητες μεταβλητές, στην παραπάνω γραμμική παλινδρόμηση, προέκυψε πως οι μεταβλητές αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Τα κριτήρια με βάση τα οποία έγινε αυτή η διαπίστωση είναι το

student t-test, το οποίο πρέπει να έχει απόλυτη τιμή μεγαλύτερη ή ίση του δύο ώστε να είναι σημαντική η μεταβλητή (|t| ≥ 2), και η τιμή Significance, η οποία πρέπει να έχει τιμή μικρότερη ή ίση του 0.05 ώστε να είναι σημαντική η μεταβλητή ($p \leq 0.05$). Εφόσον οι μεταβλητές αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές, αφαιρέθηκαν και διατηρείται η σχέση [3.1] για τη συσχέτιση του $\log k_w^{IAM}$ με το logP.

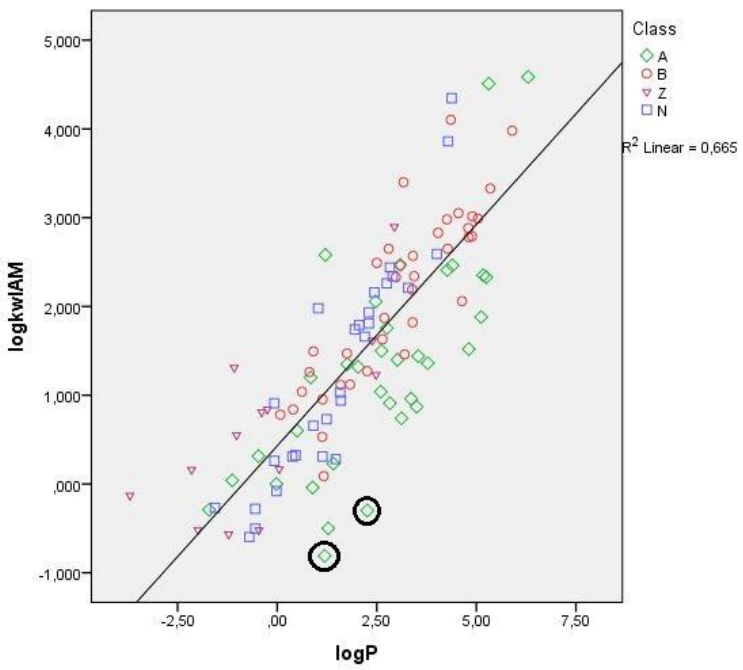
Αφού ολοκληρώθηκε η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή $\log k_w^{IAM}$ με το συντελεστή μερισμού logP για τα 35 φάρμακα που μελετήθηκαν κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, η συσχέτιση αυτή επαναλαμβάνεται για ένα σύνολο 113 φαρμάκων. Το σύνολο αυτό, αποτελείται από τα εν λόγω 35 φάρμακα και τα φάρμακα που έχουν μελετηθεί στο παρελθόν, και υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για τους χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης τους. Οι συντελεστές $\log k_w^{IAM}$ για τα επιπλέον φάρμακα αντλήθηκαν από τον Πίνακα 3.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ακριβώς ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε παραπάνω για τη συσχέτιση του συντελεστή $\log k_w^{IAM}$ με το συντελεστή μερισμού logP. Η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης έδωσε την παρακάτω εξίσωση:

$$logk_w^{IAM} = 0.499\ (\pm 0.034) \cdot logP + 0.430\ (\pm 0.098) \quad [3.2]$$

(n = 113, R^2 = 0.665, s = 0.715, F = 220.5)

Το αποτέλεσμα της παραπάνω συσχέτισης παριστάνεται και γραφικά:



Διάγραμμα 2 *Γραφική παράσταση $logk_w^{IAM}$ προς logP με κυκλωμένα τα outliers*

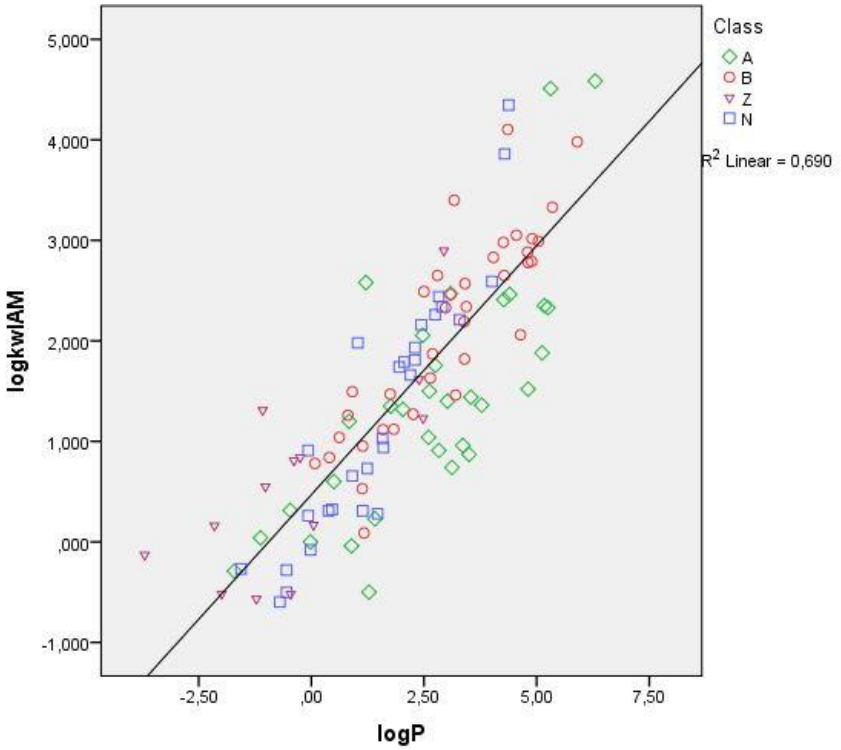
Από το παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 2), γίνεται εμφανές πως ορισμένες φαρμακευτικές ενώσεις αποκλίνουν σημαντικά από την ευθεία του μοντέλου που αναπτύχθηκε. Οι ενώσεις αυτές είναι το σαλικυλικό οξύ και το ακετυλοσαλικυλικό οξύ και εμφανίζονται στο διάγραμμα εντός των μαύρων κύκλων. Για αυτές τις φαρμακευτικές ενώσεις βρέθηκε πως η διαφορά της υπολογιζόμενης από το μοντέλο τιμής με την πειραματική τιμή του συντελεστή $logk_w^{IAM}$ απέχουν περισσότερο από το διπλάσιο της τυπικής απόκλισης (s). Η συμπεριφορά αυτή του σαλικυλικού και του ακετυλοσαλικυλικού οξέος μπορεί να δικαιολογηθεί λόγω του πολύ μικρού μοριακού βάρους τους (μικρά μόρια, 135 και 180 g/mol, αντίστοιχα), ενώ επιπλέον, στο pH που εξετάζεται (7.40) τα μόρια των δύο φαρμακευτικών ενώσεων είναι πλήρως φορτισμένα, με αποτέλεσμα να είναι πιθανό ο ιονισμός να υπερισχύει της υδροφοβίας. Με βάση όσα αναφέρθηκαν, οι δύο ενώσεις θεωρούνται outliers και αφαιρούνται από το σύνολο των μετρήσεων ώστε να αναπτυχθεί εκ νέου το μοντέλο για τη συσχέτιση του $logk_w^{IAM}$ με το logP.

Μετά την αφαίρεση των outliers, η συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών $logk_w^{IAM}$ και logP δίνεται από την εξίσωση:

$$logk_w^{IAM} = 0.496\ (\pm 0.032) \cdot logP + 0.470\ (\pm 0.093) \quad [3.3]$$

(n = 111, R^2 = 0.690, s = 0.676, F = 243.1)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί δίνεται η γραφική παράσταση για τη συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών $logk_w^{IAM}$ και logP, που αντιστοιχεί στην εξίσωση [3.3].



Διάγραμμα 3 *Γραφική παράσταση $logk_w^{IAM}$ προς logP μετά την αφαίρεση των outliers*

Τα στατιστικά στοιχεία της εξίσωσης [3.3] είναι ικανοποιητικά και βελτιωμένα σε σχέση με την εξίσωση [3.2] μετά την αφαίρεση των outliers. Γίνεται εμφανές πως η κατακράτηση των ενώσεων από τη χρωματογραφική στήλη οφείλεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Στην συσχέτιση που αναπτύχθηκε εισάγονται και τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^-, αντίστοιχα. Με βάση τα κριτήρια που έχουν αναφερθεί παραπάνω, προέκυψε πως το θετικό φορτίο F^+ δεν διαθέτει στατιστική σημαντικότητα, επομένως η συσχέτιση γίνεται μόνο με την προσθήκη του αρνητικού φορτίου στις ανεξάρτητες μεταβλητές. Με την εισαγωγή του αρνητικού φορτίου, F^-, τα στατιστικά στοιχεία βελτιώνονται και η εξίσωση που προκύπτει είναι:

$$logk_w^{IAM} = 0.519\ (\pm 0.030) \cdot logP - 0.651\ (\pm 0.143) \cdot F^- + 0.594\ (\pm 0.090) \quad [3.4]$$

(n = 111, R^2 = 0.740, s = 0.622, F = 153.9)

Με βάση τις εξισώσεις [3.1] – [3.4], προκύπτουν οι εξής παρατηρήσεις:

- Η κατακράτηση των φαρμακευτικών ενώσεων οφείλεται κυρίως στις υδρόφοβες

αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ αυτών και των τεχνητών ακινητοποιημένων μεμβρανών εντός της χρωματογραφικής στήλης. Εκτός από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, στην κατακράτηση των ενώσεων συμβάλλουν και οι ηλεκτροστατικές αλληλελπιδράσεις, αλλά με δευτερεύοντα ρόλο. Αυτό γίνεται εμφανές μέσω της σύγκρισης των εξισώσεων [3.3] και [3.4], αφού η [3.4], στην οποία έχει εισαχθεί το κλάσμα αρνητικού φορτίου F^-, έχει βελτιωμένα στατιστικά στοιχεία σε σχέση με την [3.3].

- Για την εξίσωση [3.1], τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου δεν είναι στατιστικά σημαντικά. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στα 35 φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για τη συσχέτιση 11 είναι ουδέτερα και 13 είναι βάσεις που πιθανώς δεν είναι ιονισμένες στο pH 7.40, άρα οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις υπερκαλύπτονται από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις όσον αφορά την κατακράτηση των φαρμακευτικών ενώσεων μέσα στη στήλη.
- Μεταβαίνοντας από την εξίσωση [3.1] στην εξίσωση [3.4] προσθέτοντας 78 φαρμακευτικές ενώσεις από τη βιβλιογραφία στις συσχετίσεις που εξετάζονται, παρατηρείται πως πλέον το κλάσμα αρνητικού φορτίου είναι στατιστικά σημαντικό. Αυξάνοντας το σύνολο των ενώσεων που μελετώνται αυξήθηκε και η ποικιλία σε οξέα, βάσεις, ουδέτερες ενώσεις και zwitterions με αποτέλεσμα η συμβολή των ηλεκτροστατικών δυνάμεων στην κατακράτηση των ενώσεων από τη χρωματογραφική στήλη να γίνεται περισσότερο αισθητή.
- Μέσω των κριτηρίων t-test και Significance, για διάστημα εμποστοσύνης 95%, εξετάζεται η σημαντικότητα των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου για τις εξισώσεις [3.1] και [3.3]. Ως στατιστικά σημαντικό βρίσκεται μόνο το F^- για την συσχέτιση που αντιστοιχεί στην εξίσωση [3.3] και οι δείκτες στατιστικής σημαντικότητας είναι: $|t_{F-}|= 4.553$ και $p = 0.000$.
- Παρατηρείται επίσης, πως για την εξίσωση [3.4], μόνο το κλάσμα του αρνητικού φορτίου F^- είναι στατιστικά σημαντικό και με αρνητικό πρόσημο, ενώ το κλάσμα του θετικού φορτίου F^+ δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Αυτό υποδεικνύει πως ο ιονισμός των οξέων αντισταθμίζεται μόνο εν μέρει από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Το γεγονός ότι το κλάσμα θετικού φορτίου F^+ δεν είναι στατιστικά σημαντικό υποστηρίζει περαιτέρω πως οι ισχυρότερες ελκτικές δυνάμεις παράγονται μεταξύ των πρωτονιωμένων βάσεων και των φωσφορικών ανιόντων της στήλης IAM. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Μάλιστα, η εξίσωση [3.4] πλησιάζει κατά πολύ την αντίστοιχη εξίσωση που βρέθηκε στη βιβλιογραφία (F. Tsopelas et. al - 2015 [13], από την δημοσίευση αυτή έχουν

ληφθεί τα στοιχεία για 60 από τις ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των συσχετίσεων στην παρούσα διπλωματική εργασία) και εμφανίζει και ελαφρώς βελτιωμένα στατιστικά στοιχεία. Το ίδιο ισχύει και για την εξίσωση [3.3]

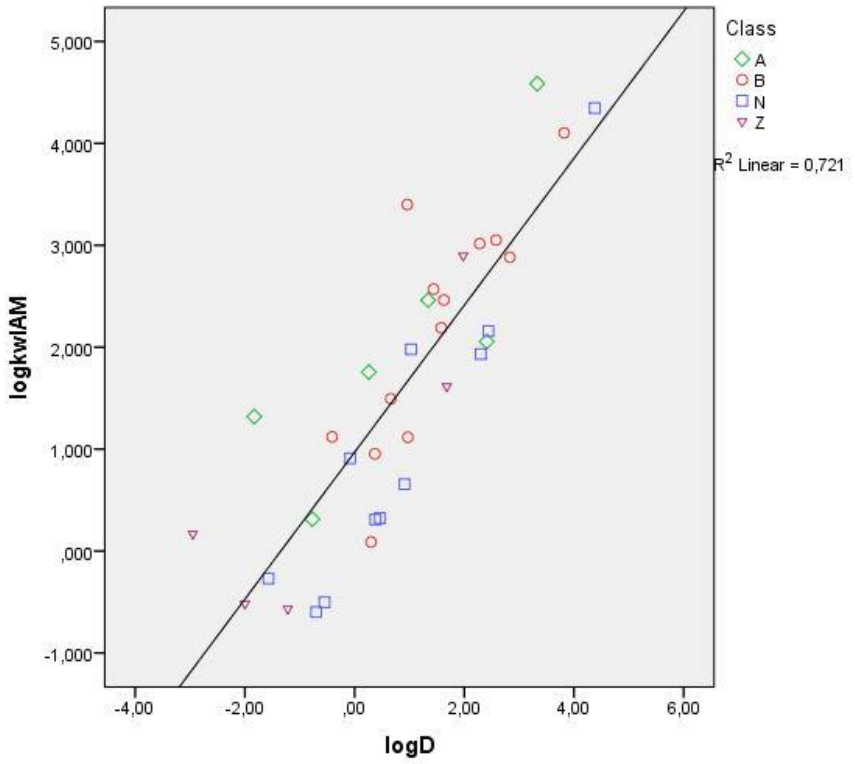
3.2.2 Συσχέτιση του $logk_w^{IAM}$ με το συντελεστή λιποφιλίας $logD_{(7.40)}$

Η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατανομής $logk_w^{IAM}$ με το συντελεστή κατανομής logD γίνεται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, όπου ως εξαρτημένη μεταβλητή τίθεται ο συντελεστής $logk_w^{IAM}$ και ως ανεξάρτητη ο συντελεστής logD σε pH 7.40. Η εξίσωση που προέκυψε είναι η ακόλουθη:

$$logk_w^{IAM} = 0.721\ (\pm 0.078) \cdot logD_{7.40} + 0.971\ (\pm 0.147) \quad [3.5]$$

(n = 35, R^2 = 0.721, s = 0.772, F = 85.2)

Το αποτέλεσμα της παραπάνω συσχέτισης παριστάνεται και γραφικά:



Διάγραμμα 4 *Γραφική παράσταση $logk_w^{IAM}$ προς $logD_{7.40}$*

Τα στατιστικά στοιχεία της εξίσωσης [3.5] είναι ικανοποιητικά και γίνεται εμφανές πως η κατακράτηση των ενώσεων από τη χρωματογραφική στήλη οφείλεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Με την εισαγωγή του θετικού και του αρνητικού φορτίου (F^+ και F^-, αντίστοιχα), ως ανεξάρτητες μεταβλητές, στην παραπάνω γραμμική παλινδρόμηση, προέκυψε πως μόνο το αρνητικό φορτίο είναι στατιστικά σημαντικό. Επομένως, το θετικό φορτίο αφαιρέθηκε και η γραμμική παλινδρόμηση επαναλήφθηκε. Μετά την επανάληψη της παλινδρόμησης με ανεξάρτητες μεταβλητές το συντελεστή $logD_{7.40}$ και το αρνητικό φορτίο F^-, οι τιμές των κριτηρίων στατιστικής σημαντικότητας για το φορτίο F^- βρίσκονται εκτός των ορίων που έχουν τεθεί, επομένως ούτε το αρνητικό φορτίο μπορεί να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική μεταβλητή για τη συσχέτιση και η εξίσωση [3.5] παραμένει ως έχει.

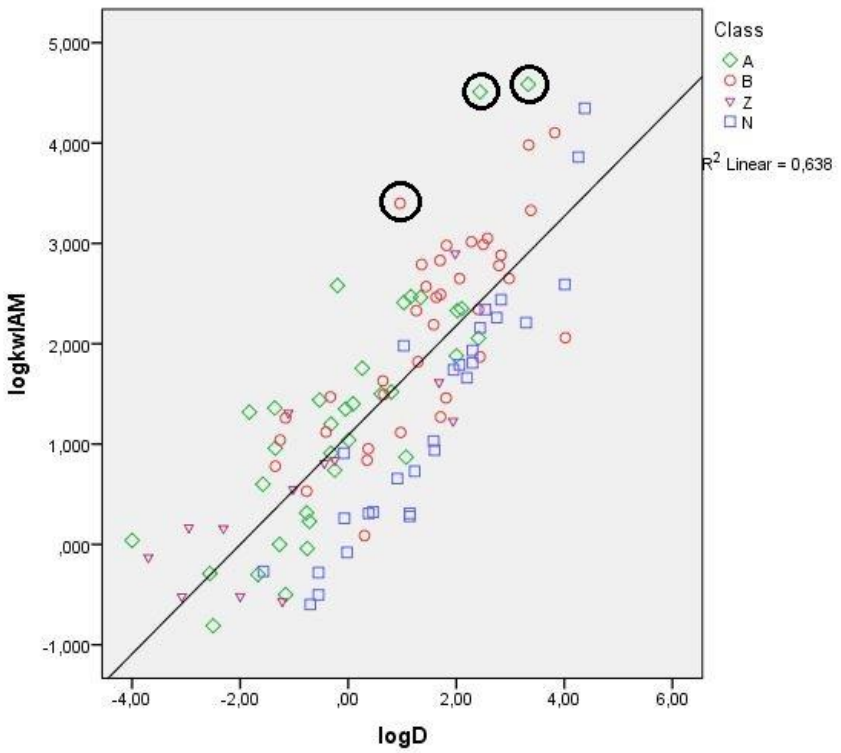
Όπως έγινε και στην περίπτωση της συσχέτισης με το logP, αφού ολοκληρώθηκε η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή $logk_w^{IAM}$ με το συντελεστή μερισμού $logD_{7.40}$ για τα 35 φάρμακα που μελετήθηκαν κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, η συσχέτιση αυτή επαναλαμβάνεται για ένα σύνολο 113 φαρμάκων. Το σύνολο αυτό, αποτελείται από τα εν λόγω 35 φάρμακα και τα φάρμακα που έχουν μελετηθεί στο παρελθόν, και υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για τους χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης τους. Οι συντελεστές $logk_w^{IAM}$ για τα επιπλέον φάρμακα αντλήθηκαν από τον πίνακα 3.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ακριβώς ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε παραπάνω για τη συσχέτιση του συντελεστή $logk_w^{IAM}$ με το συντελεστή μερισμού $logD_{7.40}$. Η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης έδωσε την παρακάτω εξίσωση:

$$logk_w^{IAM} = 0.545\ (\pm 0.039) \cdot logD_{7.40} + 1.090\ (\pm 0.075) \quad [3.6]$$

(n = 113, R^2 = 0.638, s = 0.743, F = 195.6)

Το αποτέλεσμα της παραπάνω συσχέτισης παριστάνεται και γραφικά:



Διάγραμμα 5 *Γραφική παράσταση* $logk_w^{IAM}$ *προς* $logD_{7.40}$ *με κυκλωμένα τα outliers*

Από το παραπάνω διάγραμμα (διάγραμμα 5), γίνεται εμφανές πως ορισμένες φαρμακευτικές ενώσεις αποκλίνουν σημαντικά από την ευθεία του μοντέλου που αναπτύχθηκε. Η ένωση με τη μεγαλύτερη απόκλιση είναι το Candesartan Cilexitil και ακολουθούν η Amlodipine και το Retinoic acid, οι ενώσεις αυτές εμφανίζονται στο διάγραμμα εντός των μαύρων κύκλων. Για αυτές τις φαρμακευτικές ενώσεις βρέθηκε πως η διαφορά της υπολογιζόμενης από το μοντέλο τιμής με την πειραματική τιμή του συντελεστή $logk_w^{IAM}$ απέχει περισσότερο από το διπλάσιο της τυπικής απόκλισης (s), μάλιστα, στην περίπτωση του Candesartan Cilexitil απέχει σχεδόν όσο το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης.

Η απόκλιση αυτών των ενώσεων μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι λόγω της υψηλής λιποφιλίας τους χρησιμοποιήθηκε μεγάλη ποσότητα οργανικού τροποποιητή κατά τις πειραματικές μετρήσεις με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πιθανότητα διατάραξης της γραμμικότητας στη σχέση logk με το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή και τελικά να αυξάνεται και το σφάλμα στις τιμές που έχουν προέλθει από extrapolation από αυτή τη σχέση. Επιπλέον, υπάρχει πιθανότητα η τιμή logD που έχει ληφθεί από τη βιβλιογραφία να αποκλίνει από την πραγματική τιμή (συχνά οι τιμές logD δεν είναι πειραματικές, αλλά προκύπτουν

υπολογιστικά λαμβάνοντας υπόψιν τα logP και pKa των ενώσεων, επομένως στις τιμές logD υπεισέρχεται το θέμα της αξιοπιστίας).

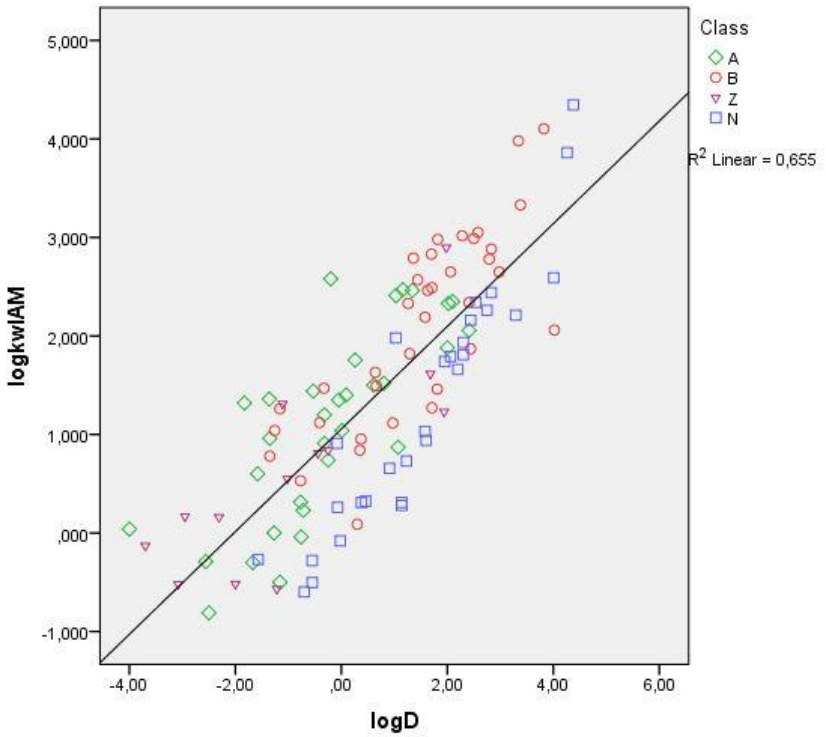
Με βάση όλα τα παραπάνω, οι τρεις ενώσεις θεωρούνται outliers και αφαιρούνται από το σύνολο των μετρήσεων ώστε να αναπτυχθεί εκ νέου το μοντέλο για τη συσχέτιση του $logk_w^{IAM}$ με το $logD_{7.40}$.

Μετά την αφαίρεση των outliers, η συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών $logk_w^{IAM}$ και $logD_{7.40}$ δίνεται από την εξίσωση:

$$logk_w^{IAM} = 0.521\ (\pm 0.036) \cdot logD_{7.40} + 1.056\ (\pm 0.070) \quad [3.7]$$

(n = 110, R^2 = 0.655, s = 0.684, F = 205.3)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί δίνεται η γραφική παράσταση για τη συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών $logk_w^{IAM}$ και logP, που αντιστοιχεί στην εξίσωση [3.7].



Διάγραμμα 6 *Γραφική παράσταση $logk_w^{IAM}$ προς $logD_{7.40}$ μετά την αφαίρεση των outliers*

Τα στατιστικά στοιχεία της εξίσωσης [3.7] είναι ικανοποιητικά και βελτιωμένα σε σχέση με την

εξίσωση [3.6] μετά την αφαίρεση των outliers. Γίνεται εμφανές πως η κατακράτηση των ενώσεων από τη χρωματογραφική στήλη οφείλεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Στην συσχέτιση που αναπτύχθηκε εισάγονται και τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^-, αντίστοιχα. Με βάση τα κριτήρια που έχουν αναφερθεί παραπάνω, προέκυψε πως και τα κλάσματα θετικού φορτίου (F^+), αλλά και του αρνητικού φορτίου (F^-), είναι στατιστικά σημαντικά. Με την εισαγωγή των F^+ και F^-, τα στατιστικά στοιχεία βελτιώνονται και η εξίσωση που προκύπτει είναι:

$$logk_w^{IAM} = 0.502\ (\pm 0.035) \cdot logD_{7.40} + 0.778\ (\pm 0.159) \cdot F^+ + 0.553\ (\pm 0.158) \cdot F^- + 0.681 (\pm 0.099)$$

[3.8]

(n = 110, R^2 = 0.724, s = 0.617, F = 92.8)

Με βάση τις εξισώσεις [3.5] – [3.8], προκύπτουν οι εξής παρατηρήσεις:

- Συγκρίνοντας τις εξισώσεις [3.5] – [3.8] με τις εξισώσεις [3.1] – [3.4], παρατηρείται πως η συσχετίσεις του συντελεστή κατακράτησης $logk_w^{IAM}$ με το συντελεστή μερισμού, logP, οδηγεί σε καλύτερα στατιστικά στοιχεία από ότι οι συσχετίσεις με το συντελεστή κατανομής $logD_{7.40}$. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο ιονισμός που παρατηρείται εντός της στήλης είναι μικρότερος από αυτόν που επικρατεί σε ένα υδατικό διάλυμα. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις εντός της στατικής φάσης IAM μπορεί να οδηγήσουν σε μερική αντιστάθμιση του φαινομένου του ιονισμού στην κατακράτηση των ενώσεων. Είναι αρκετά συνηθισμένο λοιπόν, οι συντελεστές κατακράτησης μιας στήλης IAM να συσχετίζονται καλύτερα με τους συντελεστές μερισμού logP από ότι με τους συντελεστές κατανομής logD.*[60]*
- Για την εξίσωση [3.5], όπου για τη συσχέτιση λαμβάνονται υπόψιν μόνο τα 35 πρώτα φάρμακα, τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου δεν είναι στατιστικά σημαντικά (όπως παρατηρήθηκε και για την εξίσωση [3.1], όπου λήφθηκαν υπόψιν τα ίδια 35 φάρμακα για τη συσχέτιση $logk_w^{IAM}$ με logP).
- Μέσω των κριτηρίων t-test και Significance, για διάστημα εμποστοσύνης 95%, εξετάζεται η σημαντικότητα των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου για τις εξισώσεις [3.5] και [3.7]. Τα F^+ και F^- βρίσκονται στατιστικά σημαντικά μόνο στην περίπτωση της συσχέτισης [3.7], οπότε προκύπτει η νέα εξίσωση [3.8]. Οι δείκτες στατιστικής σημαντικότητας για το κλάσμα θετικού φορτίου είναι $|t_{F+}|$= 4.878 και p = 0.000 και για το κλάσμα αρνητικού

φορτίου είναι $|t_{F^-}| = 3.499$ και $p = 0.001$.

- Παρατηρείται επίσης, πως στην εξίσωση [3.8] τα πρόσημα για το κλάσμα θετικού και αρνητικού φορτίου είναι κατά δύο θετικά, με το F^+ να εμφανίζει μεγαλύτερο συντελεστή από το F^-. Το γεγονός ότι και οι δύο μεταβλητές είναι στατιστικά σημαντικές και έχουν θετικό πρόσημο στην εξίσωση που προέκυψε, αντικατοπτρίζει την αύξηση της κατακράτησης των διαλυμένων ουσιών παρουσία φορτισμένων ειδών. Ο μεγαλύτερος συντελεστής του όρου F^+ στην εξίσωση, αλλά και η μεγαλύτερη τιμή του t-test για το F^+ είναι σε συμφωνία με τη διαφοροποίηση μεταξύ της έκτασης των ελκτικών δυνάμεων των κατιόντων και των ανιόντων στα αντίθετα φορτισμένα κέντρα. Επιπλέον, η σχέση [3.8] πλησιάζει κατά πολύ την αντίστοιχη βιβλιογραφική σχέση που έχει αναπτυχθεί για 60 από το 110 φάρμακα που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα διπλωματική εργασία και εμφανίζει παρόμοια στατιστικά στοιχεία. [13]
- Τέλος, όπως φαίνεται από το διάγραμμα 6, σχεδόν όλες οι ουδέτερες ενώσεις βρίσκονται κάτω από τη γραμμή βάσης. Αντιθέτως, οι περισσότερες βασικές ενώσεις βρίσκονται πάνω από τη γραμμή βάσης, τα zwitterions πολύ κοντά σε αυτήν και για τα οξέα δεν υπάρχει μια σαφής εικόνα, αν και τα περισσότερα βρίσκονται είτε πάνω από τη γραμμή βάσης, είτε κάτω από αυτήν αλλά σε μικρή απόσταση.

3.3 Συμπεριφορά κατακράτησης σε pH 5.50

Όπως ήταν αναμενόμενο, οι χρόνοι έκλουσης των όξινων ενώσεων αυξήθηκαν με τη μείωση του pH στο 5.50. Η αύξηση του χρόνου έκλουσης οφείλεται στο γεγονός ότι δεν υπάρχει διάσταση του πρωτονίου της όξινης ομάδας και άρα επικρατεί η ουδέτερη μορφή του μορίου. Κατά κανόνα, η μη ιονισμένη μορφή ενός μορίου είναι πιο λιπόφιλη από την αντίστοιχη ιονισμένη. Το σύνολο των όξινων ενώσεων, ως αποτέλεσμα του περιορισμένου ιονισμού τους, δίνουν αρνητικές τιμές για τις υπολογιζόμενες διαφορές $difflogk_{w(7.40-5.50)}$ και $difflogD_{(7.40-5.50)}$, αφού οι συντελεστές κατακράτησης logk και οι συντελεστές κατανομής logD έχουν μεγαλύτερες τιμές στο pH 5.50. Μάλιστα, παρατηρείται πως οι τιμές $difflogD_{(7.40-5.50)}$ είναι μεγαλύτερες κατά απόλυτη τιμή από τις αντίστοιχες τιμές $difflogk_{w(7.40-5.50)}$. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η ένωση Phenytoin, η οποία είναι ασθενές οξύ και εμφανίζει θετική τιμή $difflogk_{w(7.40-5.50)}$, αλλά αρνητική τιμή $difflogD_{(7.40-5.50)}$.

Όσον αφορά τις βασικές ενώσεις, οι χρόνοι έκλουσης τους μειώθηκαν με τη μείωση του pH στο 5.50. Η μείωση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι οι βασικές ενώσεις φορτίζονται θετικά στο όξινο

pH της κινητής φάσης. Το φαινόμενο αυτό αντικατοπτρίζεται και στους συντελεστές κατακράτησης και κατανομής, επομένως οι τιμές των $difflogk_{w(7.40-5.50)}$ και $difflogD_{(7.40-5.50)}$ είναι θετικές, με τις τιμές $difflogD_{(7.40-5.50)}$ να είναι εμφανώς μεγαλύτερες από τις πρώτες.

Τέλος, τα zwitterions δεν εμφανίζουν μια σταθερή συμπεριφορά, γεγονός που είναι αναμενόμενο. Όπως αναφέρεται και στην ενότητα 1.3.3, τα zwitterions διαφέρουν από τις υπόλοιπες ενώσεις ως προς τον υπολογισμό του συντελεστή κατανομής logD. Ο προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής προκύπτει από την κωδωνοειδή καμπύλη του logD προς το pH και αντιστοιχεί στο μέγιστο της καμπύλης γύρω από το ισοηλεκτρικό σημείο. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ανάλογα με την στερεοχημεία της ένωσης, η καμπύλη αυτή μπορεί να έχει σχήμα U και άρα το logD προκύπτει από το ελάχιστο της καμπύλης, γύρω από το ισοηλεκτρικό σημείο.

Πίνακας 8

Διαφορές στις τιμές συντελεστών κατακράτησης και logD για τις τιμές pH 5.50 και 7.40

Α/Α	Φαρμακευτική ένωση	Κατηγορία (A, B, Z, N)	$difflogk_{w(7.40-5.50)}$	$difflogD_{(7.40-5.50)}$
2	Amlodipine	B	0.22	1.84
13	Diclofenac	A	-0.46	-1.83
16	Furosemide	A	-0.28	-1.86
20	Labetalol	B	0.45	1.33
21	Lisinopril	Z	-0.28	0.00
22	Methyldopa	Z	0.06	-0.01
23	Minocyclin	Z	-1.12	0.00
25	Nitrofurantoin	A	-0.09	-0.29
27	Phenytoin	A	0.07	-0.05
28	Pioglitazone	Z	-0.27	-0.66
32	Retinoic acid	A	-0.51	-1.84
35	Valproic acid	A	-0.04	-1.79

3.4 Συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών της στήλης IAM με τους χρωματογραφικούς συντελεστές της μικκυλιακής χρωματογραφίας

Πραγματοποιήθηκε συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή $\log k_w^{IAM}$ με τους αντίστοιχους συντελεστές μικκυλιακής χρωματογραφίας για τρία διαφορετικά τασιενεργά που έχουν χρησιμοποιηθεί, στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π, για την παρασκευή κινητών φάσεων. Συγκεκριμένα, εξετάζονται οι συντελεστές κατακράτησης που προκύπτουν από μικκυλιακή χρωματογραφία με συνθήκες Brij-35 (37°C , NaCl), Tween-20 και SDS. Όλες οι μετρήσεις που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή αυτής της συσχέτισης έχουν πραγματοποιηθεί σε pH 7.40.

3.4.1 Συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών της στήλης IAM με τους χρωματογραφικούς συντελεστές μικκυλιακής χρωματογραφίας με τασιενεργό Brij-35

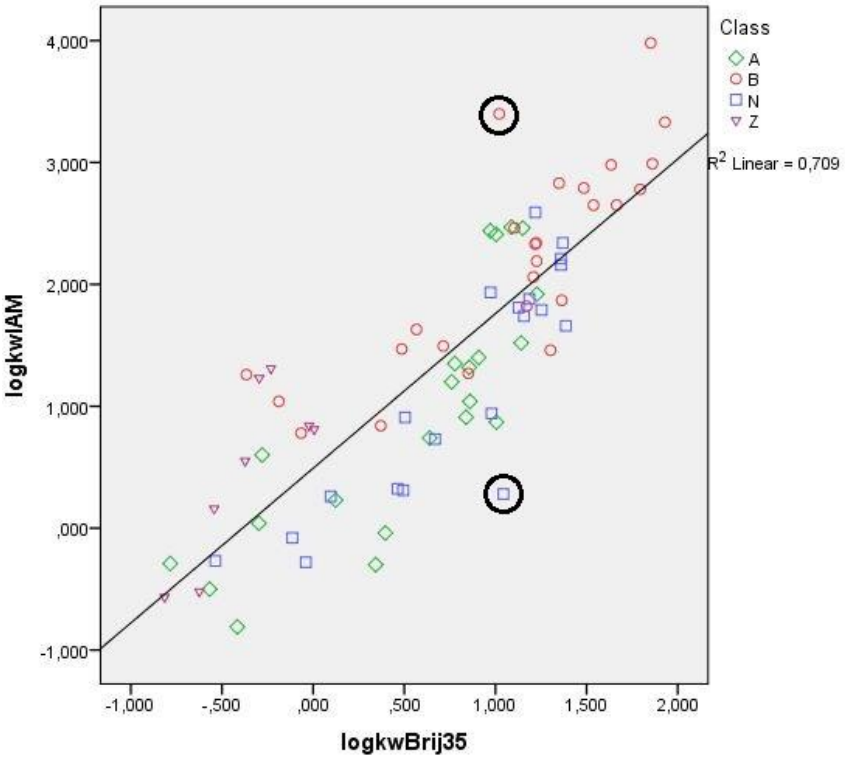
Αρχικά θα γίνει η συσχέτιση του $\log k_w^{IAM}$ με το συντελεστή $\log k_w^{Brij\text{-}35}$, ο οποίος αντιστοιχεί στο συντελεστή κατακράτησης για μικκυλιακή χρωματογραφία με επιφανειοδραστικό παράγοντα το Brij-35. Αξίζει να σημειωθεί πως το Brij-35 είναι ουδέτερο τασιενεργό. Οι χρωματογραφικοί συντελεστές $\log k_w^{Brij\text{-}35}$ λαμβάνονται από τον Πίνακα 4.

Η εξίσωση που προέκυψε από την συσχέτιση των δύο συντελεστών είναι η εξής:

$$logk_w^{IAM} = 1.269\ (\pm 0.094) \cdot logk_w^{Brij-35} + 0.491\ (\pm 0.094) \quad [3.9]$$

(n = 76, R^2 = 0.709, s = 0.589, F = 180.5)

Το αποτέλεσμα της παραπάνω συσχέτισης παριστάνεται και γραφικά:



Διάγραμμα 7 *Γραφική παράσταση $logk_w^{IAM}$ προς $logk_w^{Brij-35}$ με κυκλωμένα τα outliers*

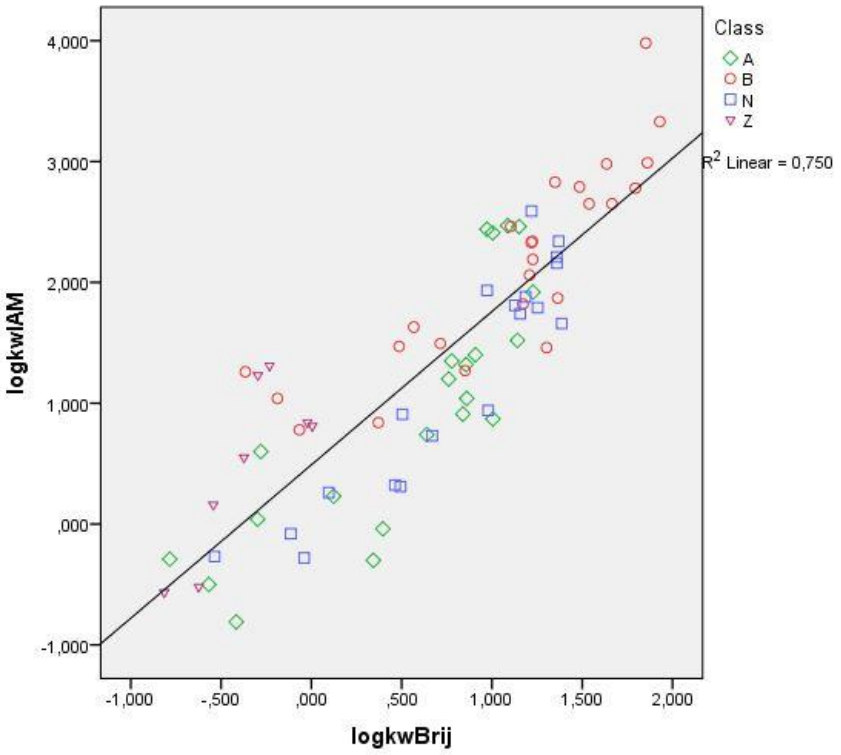
Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, ορισμένες φαρμακευτικές ενώσεις αποκλίνουν σημαντικά από την ευθεία του μοντέλου που αναπτύχθηκε. Οι ενώσεις αυτές είναι η Amlodipine και το Phenobarbital και εμφανίζονται στο διάγραμμα εντός των μαύρων κύκλων. Για αυτές τις φαρμακευτικές ενώσεις βρέθηκε πως η διαφορά της υπολογιζόμενης από το μοντέλο τιμής με την πειραματική τιμή του συντελεστή $logk_w^{IAM}$ απέχει περισσότερο από το διπλάσιο της τυπικής απόκλισης (s), επομένως ως outliers θα αφαιρεθούν από το σύνολο των μετρήσεων και θα επαναληφθεί η συσχέτιση των $logk_w^{IAM}$ και $logk_w^{Brij-35}$.

Η νέα εξίσωση για τη συσχέτιση των δύο συντελεστών είναι:

$$logk_w^{IAM} = 1.269\ (\pm 0.086) \cdot logk_w^{Brij-35} + 0.490\ (\pm 0.086) \quad [3.10]$$

(n = 74, R^2 = 0.750, s = 0.536, F = 216.5)

Ακολουθεί το διάγραμμα που αντιστοιχεί στην εξίσωση [3.10]:



Διάγραμμα 8 *Γραφική παράσταση $logk_w^{IAM}$ προς $logk_w^{Brij-35}$ μετά την αφαίρεση των outliers*

Μετά την αφαίρεση των outliers βελτιώνονται τα στατιστικά στοιχεία της συσχέτισης του $logk_w^{IAM}$ με το συντελεστή $logk_w^{Brij-35}$ χωρίς να τροποποιούνται αισθητά οι συντελεστές της εξίσωσης που εκφράζει τη συσχέτιση αυτή.

Στη συσχέτιση εισάγονται ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^-, αντίστοιχα. Με βάση τα κριτήρια που έχουν αναφερθεί παραπάνω, προέκυψε πως το κλάσμα του αρνητικού φορτίου (F^-) δεν είναι στατιστικά σημαντικό, ενώ το κλάσμα θετικού φορτίου (F^+) είναι. Με την εισαγωγή του F^+, τα στατιστικά στοιχεία βελτιώνονται περαιτέρω και η εξίσωση που προκύπτει είναι:

$$logk_w^{IAM} = 1.132\ (\pm 0.086) \cdot logk_w^{Brij-35} + 0.572\ (\pm 0.146) \cdot F^+ + 0.412(\pm 0.081) \quad [3.11]$$

(n = 74, R^2 = 0.795, s = 0.490, F = 137.3)

Συνολικά, προκύπτει πως οι δύο συντελεστές εμφανίζουν πολύ καλή συσχέτιση (είναι εμφανές και από το διάγραμμα 8). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι και στις δύο χρωματογραφικές μεθόδους τον πρωταρχικό ρόλο στον μηχανισμό κατακράτησης τον κατέχουν οι

υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (στη μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία Brij-35 δεν υπάρχουν φορτισμένα κέντρα).

3.4.2 Συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών της στήλης IAM με τους χρωματογραφικούς συντελεστές μικκυλιακής χρωματογραφίας με τασιενεργό Tween-20

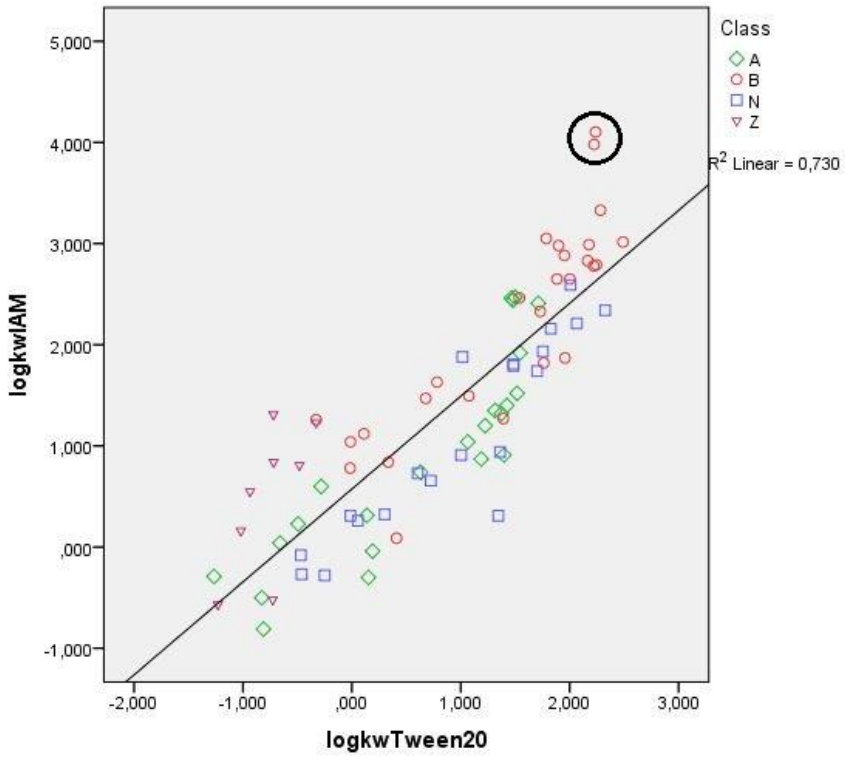
Ακολουθεί η συσχέτιση του $logk_w^{IAM}$ με το συντελεστή $logk_w^{Tween20}$, ο οποίος αντιστοιχεί στο συντελεστή κατακράτησης για μικκυλιακή χρωματογραφία με επιφανειοδραστικό παράγοντα το Tween-20. Αξίζει να σημειωθεί πως το Tween-20 είναι ουδέτερο τασιενεργό. Οι χρωματογραφικοί συντελεστές $logk_w^{Tween20}$ λαμβάνονται από τον Πίνακα 4.

Η εξίσωση που προέκυψε από την συσχέτιση των δύο συντελεστών είναι η εξής:

$$logk_w^{IAM} = 0.918\ (\pm 0.064) \cdot logk_w^{Tween20} + 0.574\ (\pm 0.088) \quad [3.12]$$

(n = 78, R^2 = 0.730, s = 0.598, F = 205.3)

Το αποτέλεσμα της παραπάνω συσχέτισης παριστάνεται και γραφικά:



Διάγραμμα 9 *Γραφική παράσταση $logk_{wIAM}$ προς $logk_w^{Tween20}$ με κυκλωμένα τα outliers*

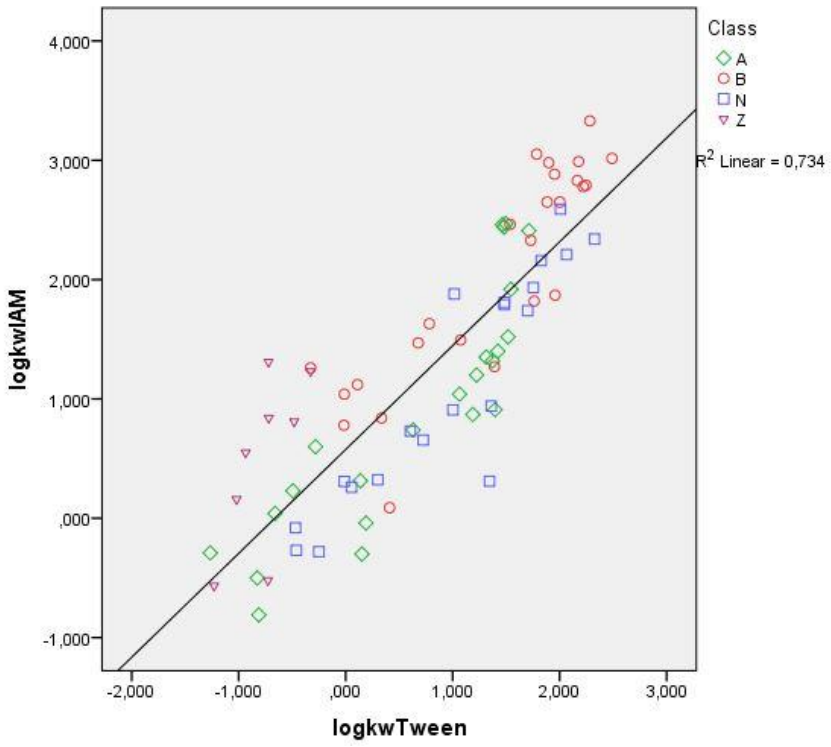
Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, δύο φαρμακευτικές ενώσεις αποκλίνουν σημαντικά από την ευθεία του μοντέλου που αναπτύχθηκε. Οι ενώσεις αυτές είναι οι Fluphenazine και Thioridazine και εμφανίζονται στο διάγραμμα εντός του μαύρου κύκλου. Για αυτές τις φαρμακευτικές ενώσεις βρέθηκε πως η διαφορά της υπολογιζόμενης από το μοντέλο τιμής με την πειραματική τιμή του συντελεστή $logk_w^{IAM}$ απέχει περισσότερο από το διπλάσιο της τυπικής απόκλισης (s), επομένως ως outliers θα αφαιρεθούν από το σύνολο των μετρήσεων και θα επαναληφθεί η συσχέτιση των $logk_w^{IAM}$ και $logk_w^{Tween20}$.

Η νέα εξίσωση για τη συσχέτιση των δύο συντελεστών είναι:

$$logk_w^{IAM} = 0.870\ (\pm 0.061) \cdot logk_w^{Tween20} + 0.576\ (\pm 0.081) \quad [3.13]$$

(n = 76, R^2 = 0.734, s = 0.555, F = 204.3)

Ακολουθεί το διάγραμμα που αντιστοιχεί στην εξίσωση [3.15]:



Διάγραμμα 10 *Γραφική παράσταση $logk_w^{IAM}$ προς $logk_w^{Tween20}$ μετά την αφαίρεση των outliers*

Μετά την αφαίρεση των outliers βελτιώνονται ελαφρώς τα στατιστικά στοιχεία της συσχέτισης του $logk_w^{IAM}$ με το συντελεστή $logk_w^{Tween20}$ χωρίς να τροποποιούνται αισθητά οι συντελεστές της

εξίσωσης που εκφράζει τη συσχέτιση αυτή.

Στη συσχέτιση εισάγονται ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^-, αντίστοιχα. Με βάση τα κριτήρια που έχουν αναφερθεί παραπάνω, προέκυψε πως το κλάσμα του αρνητικού φορτίου (F^-) δεν είναι στατιστικά σημαντικό, ενώ το κλάσμα θετικού φορτίου (F^+) είναι. Με την εισαγωγή του F^+, τα στατιστικά στοιχεία βελτιώνονται περαιτέρω και η εξίσωση που προκύπτει είναι:

$$logk_w^{IAM} = 0.779\ (\pm 0.060) \cdot logk_w^{Tween20} + 0.602\ (\pm 0.146) \cdot F^+ + 0.474(\pm 0.078) \quad [3.14]$$

(n = 76, R^2 = 0.784, s = 0.504, F = 132.7)

Συνολικά, προκύπτει πως οι δύο συντελεστές εμφανίζουν πολύ καλή συσχέτιση (είναι εμφανές και από το διάγραμμα 10). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι και στις δύο χρωματογραφικές μεθόδους τον πρωταρχικό ρόλο στον μηχανισμό κατακράτησης τον κατέχουν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (στη μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία Tween-20 δεν υπάρχουν φορτισμένα κέντρα).

3.4.3 Συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών της στήλης IAM με τους χρωματογραφικούς συντελεστές μικκυλιακής χρωματογραφίας με τασιενεργό SDS

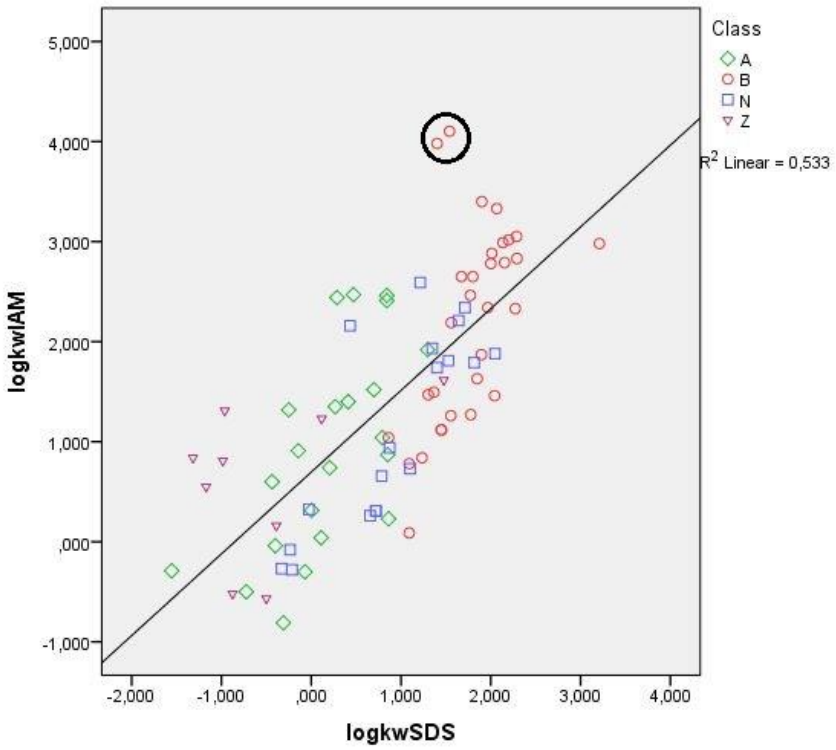
Τέλος, γίνεται η συσχέτιση του $logk_w^{IAM}$ με το συντελεστή $logk_w^{SDS}$, ο οποίος αντιστοιχεί στο συντελεστή κατακράτησης για μικκυλιακή χρωματογραφία με επιφανειοδραστικό παράγοντα το SDS. Αξίζει να σημειωθεί πως το SDS είναι ανιοντικό τασιενεργό. Οι χρωματογραφικοί συντελεστές $logk_w^{SDS}$ λαμβάνονται από τον Πίνακα 4.

Η εξίσωση που προέκυψε από την συσχέτιση των δύο συντελεστών είναι η εξής:

$$logk_w^{IAM} = 0.817\ (\pm 0.086) \cdot logk_w^{SDS} + 0.696\ (\pm 0.116) \quad [3.15]$$

(n = 81, R^2 = 0.533, s = 0.791, F = 90.1)

Το αποτέλεσμα της παραπάνω συσχέτισης παριστάνεται και γραφικά:



Διάγραμμα 11 *Γραφική παράσταση $logk_w^{IAM}$ προς $logk_w^{SDS}$ με κυκλωμένα τα outliers*

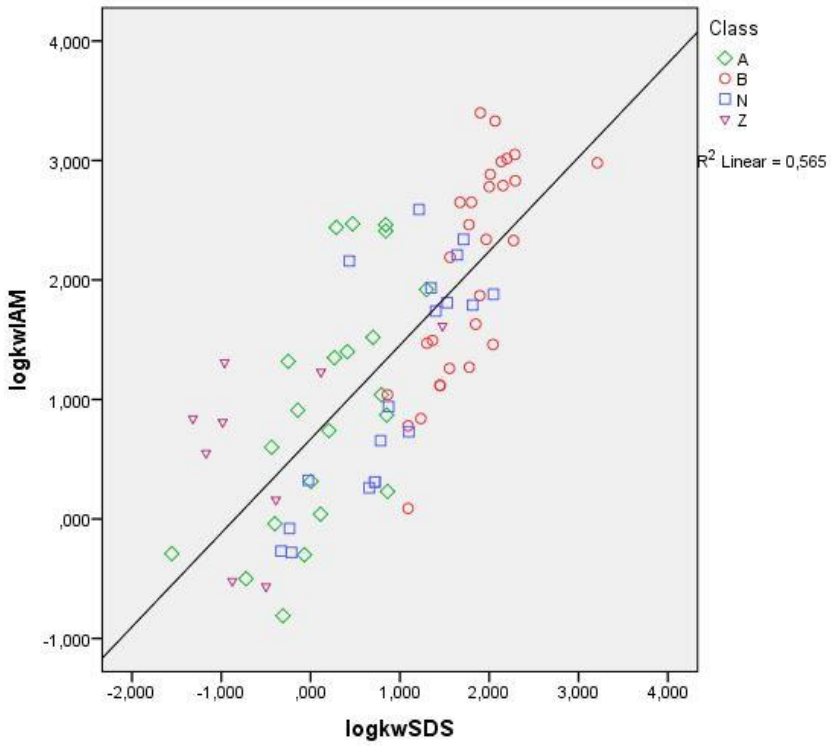
Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, δύο φαρμακευτικές ενώσεις αποκλίνουν σημαντικά από την ευθεία του μοντέλου που αναπτύχθηκε. Πρόκειται για την Fluphenazine και τη Thioridazine, οι οποίες εμφανίζονται στο διάγραμμα εντός του μαύρου κύκλου. Για αυτές τις φαρμακευτικές ενώσεις βρέθηκε πως η διαφορά της υπολογιζόμενης από το μοντέλο τιμής με την πειραματική τιμή του συντελεστή $logk_w^{IAM}$ απέχει περισσότερο από το διπλάσιο της τυπικής απόκλισης (s), επομένως ως outliers θα αφαιρεθούν από το σύνολο των μετρήσεων και θα επαναληφθεί η συσχέτιση των $logk_w^{IAM}$ και $logk_w^{SDS}$.

Η νέα εξίσωση για τη συσχέτιση των δύο συντελεστών είναι:

$$logk_w^{IAM} = 0.786\ (\pm 0.079) \cdot logk_w^{SDS} + 0.669\ (\pm 0.106) \quad [3.16]$$

(n = 79, R^2 = 0.565, s = 0.720, F = 99.9)

Ακολουθεί το διάγραμμα που αντιστοιχεί στην εξίσωση [3.16]:



Διάγραμμα 12 *Γραφική παράσταση $logk_w^{IAM}$ προς $logk_w^{SDS}$ μετά την αφαίρεση των outliers*

Μετά την αφαίρεση των outliers βελτιώνονται ελαφρώς τα στατιστικά στοιχεία της συσχέτισης του $logk_w^{IAM}$ με το συντελεστή $logk_w^{SDS}$.

Στη συσχέτιση εισάγονται ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^-, αντίστοιχα. Με βάση τα κριτήρια που έχουν αναφερθεί παραπάνω, προέκυψε πως κανένα από τα δύο δεν είναι στατιστικά σημαντικό.

Συνολικά, προκύπτει πως οι δύο συντελεστές δεν εμφανίζουν αρκετά ικανοποιητική συσχέτιση. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με το θεωρητικά αναμενόμενο αποτέλεσμα της συγκεκριμένης συσχέτισης. Λόγω της ανιοντικής φύσης του SDS αναμενόταν καλύτερο αποτέλεσμα για τη συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης των δύο χρωματογραφικών μεθόδων, αφού και στη χρωματογραφία με στατική φάση IAM τα φωσφορικά ανιόντα του υδρογονανθρακικού σκελετού συμμετέχουν στο μηχανισμό κατακράτησης, αναπτύσσοντας δεσμούς με τα κατιόντα των φαρμακευτικών ενώσεων.

3.5 Πρόβλεψη απορρόφησης για φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα (%HOA)

Για την ανάπτυξη του μοντέλου πρόβλεψης της εντερικής απορρόφησης των φαρμακευτικών ενώσεων που χορηγούνται από το στόμα χρησιμοποιούνται 82 από τα 124 φάρμακα που έχουν

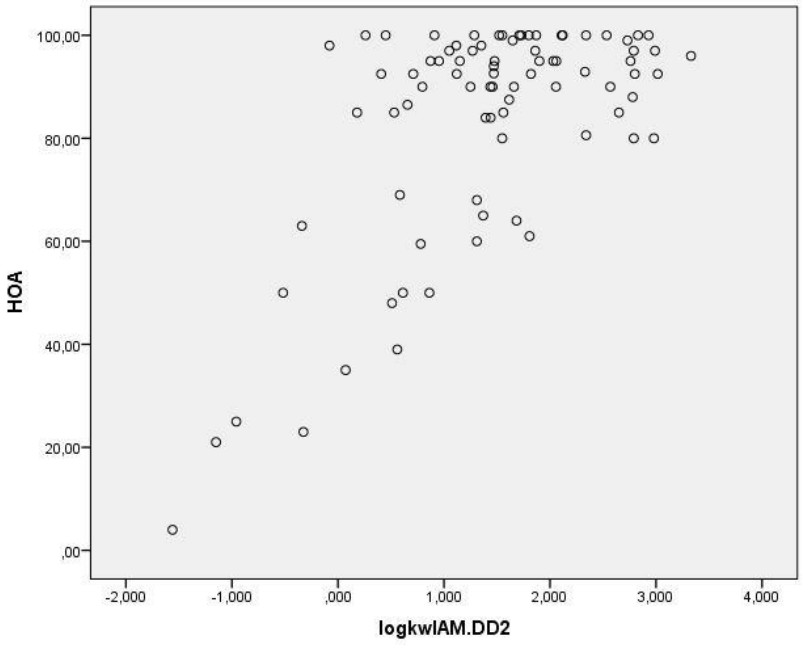
εξεταστεί κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ή έχουν ληφθεί από τη βιβλιογραφία. Οι 82 φαρμακευτικές ενώσεις που έχουν επιλεγεί αποτελούν το “Training Set” για το μοντέλο. Πληροφορίες για τις μοριακές ιδιότητες τους, το ποσοστό εντερικής απορρόφησης (%HOA - Human Oral Absorption) και τους συντελεστές κατακράτησης τους από τη χρωματογραφική στήλη IAM βρίσκονται στον Πίνακα 5, ενώ ο κατάλογος των 82 φαρμάκων που αποτελούν τα δεδομένα εκμάθησης του μοντέλου υπάρχει στον Πίνακα 9 που ακολουθεί.

Επιπλέον, από τα 42 φάρμακα που απομένουν, τα 22 θα χρησιμοποιηθούν ως “Test Set” για τον έλεγχο της επιτυχίας του μοντέλου. Αυτά τα 22 φάρμακα παρουσιάζονται στον Πίνακα 10 που ακολουθεί και έχουν επιλεγεί με βάση παλαιότερη δημοσίευση στην οποία εξεταζόταν η ικανότητα πρόβλεψης της εντερικής απορρόφησης με χρήση στατικής φάσης IAM. [69] Τα φάρμακα που αποτελούν το Test Set έχουν επιλεχθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να ποικίλουν δομικά, δηλαδή στο σύνολο των 22 φαρμάκων υπάρχουν όξινες, βασικές, ουδέτερες και αμφολυτικές ενώσεις. Επιπλέον, είναι σημαντικό οι ενώσεις αυτές να ποικίλουν και ως προς τη φαρμακολογική τους δράση (π.χ. αντιβιοτικά, αντιφλεγμονώδη, κτλ.) ώστε το Test Set να είναι όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικό και να ελεγχθεί ικανοποιητικά η ακρίβεια του μοντέλου που αναπτύχθηκε. Τέλος, οι ενώσεις αυτές πρέπει να καλύπτουν όλο το εύρος απορροφήσεων, άρα χρειάζεται στο Test Set να υπάρχουν ενώσεις με χαμηλή, μεσαία ή υψηλή εντερική απορρόφηση κατά την από του στόματος χορήγηση τους. Με τον ίδιο τρόπο έχει γίνει και η επιλογή των φαρμάκων που αποτελούν τα δεδομένα εκμάθησης του μοντέλου.

Οι υπόλοιπες φαρμακευτικές ενώσεις, που δεν έχουν συμπεριληφθεί στα training και test sets, έχουν απορριφθεί με βάση την συμπεριφορά τους, η οποία παρατηρήθηκε από τη γραφική παράσταση της εντερικής απορρόφησης (%HOA) προς το συντελεστή κατακράτησης $\log k_w^{IAM}$(best). Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες ενώσεις εμφανίζουν ελλιπή απορρόφηση αλλά υψηλή κατακράτηση από τη χρωματογραφική στήλη με αποτέλεσμα να αποκλίνουν από το σύνολο. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ενώσεις Albendazole, Chlorpheniramine, Estradiol, Haloperidol, Losartan, Mebendazole, Thioridazine, Valsatran. Η συμπεριφορά αυτών των ενώσεων μπορεί να σχετίζεται με ορισμένους μηχανισμούς απομάκρυνσης τους καθώς τα περισσότερα από αυτά τα φάρμακα είναι υποστρώματα ή αναστολείς των μεταφορέων ABC (ATP – Binding Cassette). Μια άλλη ομάδα ενώσεων που παραλείφθηκαν από την ανάπτυξη του μοντέλου είναι οι ενώσεις με πολύ υψηλά ποσοστά απορρόφησης και μειωμένη κατακράτηση. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι ενώσεις Acetylsalicylic acid, Allopurinol και Amoxicillin, οι οποίες πιθανώς

χρησιμοποιούν άλλους μηχανισμούς μεταφοράς. Μάλιστα, το ακετυλοσαλικυλικό οξύ (και ορισμένα ακόμη από τα φάρμακα που απορρίφθηκαν) έχει μοριακό βάρος μικρότερο από 200, πρόκειται δηλαδή για έναν μικρό μόριο, το οποίο μπορεί να διεισδύσει και μέσω της παρακυττάριας οδού. Αυτές οι ενώσεις, καθώς και ενώσεις που έχουν παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά αλλά έντονες διαφορές στην απορρόφηση τους (π.χ. αμπικιλλίνη και αμοξικιλλίνη), απαιτούν πιο λεπτομερή έρευνα.

Ακολουθεί η γραφική παράσταση του ποσοστού εντερικής απορρόφησης συναρτήσει του συντελεστή κατακράτησης $logk_w^{IAM}$(best) μετά την αφαίρεση των ενώσεων με ιδιαίτερη συμπεριφορά. Η μεταβλητή $logk_w^{IAM}$(best) έχει προταθεί από τη βιβλιογραφία.[69] Όπως έχει αναφερθεί και στην παράγραφο 2.8.5, ο όρος $logk_w^{IAM}$(best) αναφέρεται στους συντελεστές κατακράτησης των φαρμακευτικών ενώσεων από τη στατική φάση IAM και πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για τη μεγαλύτερη τιμή $logk_w^{IAM}$ μεταξύ των δύο που έχουν υπολογιστεί για pH 5.50 και 7.40. προφανώς για όσες ενώσεις είναι όξινες οι τιμές $logk_w^{IAM}$(best) αντιστοιχούν στα $logk_w^{IAM}$ που έχουν υπολογιστεί σε pH 5.50. Αντίστοιχα, για τις βασικές ενώσεις, οι τιμές $logk_w^{IAM}$(best) αντιστοιχούν στα $logk_w^{IAM}$ που έχουν υπολογιστεί σε pH 7.40. Όσον αφορά τις ουδέτερες ενώσεις, αυτές όπως είναι αναμενόμενο δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς την τιμή του $logk_w^{IAM}$ για τις δύο τιμές pH. Τέλος, για τις αμφολυτικές ενώσεις δεν υπάρχει κοινή συμπεριφορά (η pKa και η στερεοχημεία της κάθε ένωσης καθορίζουν τη συμπεριφορά της).



Διάγραμμα 13 *Γραφική παράσταση %HOA προς $logk_w^{IAM}$(best) (χωρίς outliers)*

Ακολουθούν δύο πίνακες στους οποίους παρουσιάζονται τα σύνολα των φαρμακευτικών ενώσεων που συγκροτούν τα Training και Test Sets.

Πίνακας 9

Δεδομένα Εκμάθησης (Training Set)

Α/Α	Φαρμακευτικές ενώσεις	Α/Α	Φαρμακευτικές ενώσεις
1	Acyclovir	26	Amitriptyline
2	Amlodipine	27	Ampicillin
3	Antipyrine	28	Caffeine
4	Atropine	29	Chlorpromazine
5	Carbamazepine	30	Ciprofloxacin
6	Chlordiazepoxide	31	Diltiazem
7	Citalopram	32	Diphenhydramine
8	Clonidine	33	Enoxacin
9	Codeine	34	Ephedrine
10	Desipramine	35	Fluoxetine
11	Diclofenac	36	Ibuprofen
12	Furosemide	37	Indomethacin
13	Hydrochlorothiazide	38	Ketoprofen
14	Imipramine	39	Lidocaine
15	Labetalol	40	Mefenamic acid
16	Lisinopril	41	Nifedipine
17	Methyldopa	42	Nortriptyline
18	Minocycline	43	Ofloxacin
19	Nitrofurantoin	44	Pentazocine
20	Paracetamol	45	Phenobarbital
21	Phenytoin	46	Pindolol
22	Primidone	47	Piroxicam
23	Rifampicin	48	Promethazine
24	Trimethoprim	49	Propafenone
25	Valproic acid	50	Propranolol

51	Protriptylline	67	Famotidine
52	Pyrimethamine	68	Ganciclovir
53	Quinidine	69	Ketolorac
54	Sulfamethoxazole	70	Lorazepam
55	Tenoxicam	71	Metolazone
56	Terbutaline	72	Metoprolol
57	Theophylline	73	Naproxen
58	Trazodone	74	Nimesulide
59	Amiloride	75	Norfloxacin
60	Atenolol	76	Oxprenolol
61	Bretylium	77	Prednisolone
62	Bromazepam	78	Ranitidine
63	Chlorthalidone	79	Scopolamine
64	Dexamethasone	80	Sulindac
65	Diazepam	81	Timolol
66	Enalapril	82	Verapamil

Πίνακας 10

Δεδομένα Ελέγχου (Test Set)

Α/Α	Φαρμακευτική ένωση
1	Ceftriaxone
2	Chloramphenicol
3	Cimetidine
4	Cinoxacin
5	Hydrocortisone
6	Isoxicam
7	Levofloxacin
8	Lornoxicam
9	Meloxicam
10	Methylprednisolone
11	Metoclopramide

12	Minoxidil
13	Nadolol
14	Nalidixic acid
15	Niflumic acid
16	Omeprazole
17	Pipemidic acid
18	Piperacillin
19	Salicylic acid
20	Sulpiride
21	Vancomycin
22	Warfarin

Η πρόβλεψη της εντερικής απορρόφησης των φαρμάκων θα γίνει με δύο τρόπους. Αρχικά θα χρησιμοποιηθεί ως βάση η μεταβλητή $\log k_w^{IAM}$(best) και έπειτα θα αναπτυχθεί ένα δεύτερο μοντέλο στο οποίο βασική μεταβλητή θα είναι η k_w^{IAM}(best), δηλαδή ο ίδιος συντελεστής κατακράτησης απλώς χωρίς να βρίσκεται στη λογαριθμική μορφή του. Όπως και στην περίπτωση του $\log k_w^{IAM}$(best) έτσι και οι τιμές k_w^{IAM}(best) αντιστοιχούν στη μεγαλύτερη τιμή μεταξύ των δύο που έχουν υπολογιστεί για pH 5.50 και 7.40.[69], [84]

Η εξίσωση που θα χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη του μοντέλου με τη μεταβλητή $\log k_w^{IAM}$(best) είναι μη γραμμική (σιγμοειδής) και έχει προταθεί από τους Kotecha et al και Tsopelas et al.[69], [71] Η γενική μορφή της εξίσωσης είναι:

$$\%HOA = \frac{100}{1+10^{-(a_0+a_1 \cdot X_1+a_2 \cdot X_2+\cdots a_n \cdot X_n)}} \quad [3.17]$$

Όπου:

α_0, α_1, α_2, … α_n είναι σταθερές που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της μη γραμμικής παλινδρόμησης,

X_1 η μεταβλητή $\log k_w^{IAM}$ (best) και

X_2, X_3 ... X_n άλλες φυσικοχημικές παράμετροι που χρησιμοποιούνται για την βελτίωση του μοντέλου.

Η εξίσωση που προέκυψε με βάση τα δεδομένα εκμάθησης του Πίνακα 9 και εμφανίζει τα πιο ικανοποιητικά στοιχεία είναι η εξής:

$$\%HOA = \frac{100}{1+10^{-(a_0+a_1 \cdot logk_w^{IAM}(best)+a_2 \cdot TPSA+a_3 \cdot F^{+*}+a_4 \cdot F^{-*})}} \quad [3.18]$$

(n = 82, R^2 = 0.684, s = 11.24)

Όπου:

TPSA (Topological Polar Surface Area) το τοπολογικό εμβαδόν πολικής επιφάνειας της ένωσης και F^{+*}, F^{-*} τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, αντίστοιχα, στα οποία έχει προστεθεί το κλάσμα αμφολυτικού φορτίου (zwitterionic fraction).

Οι τιμές των συντελεστών α_0, α_1, α_2, α_3, α_4 όπως προέκυψαν από τη μη γραμμική παλινδρόμηση είναι οι ακόλουθες:

$$a_0 = 0.928\ (\pm 0.178)$$
$$a_1 = 0.753\ (\pm 0.100)$$
$$a_2 = -0.005\ (\pm 0.001)$$
$$a_3 = -0.763\ (\pm 0.171)$$
$$a_4 = 0.492\ (\pm 0.171)$$

Η εξίσωση που θα χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη του μοντέλου με τη μεταβλητή k_w^{IAM}(best) είναι επίσης μη γραμμική και έχει προταθεί από τους Tsopelas et al.[84] Η γενική μορφή της εξίσωσης είναι:

$$\%HOA = \frac{100 \cdot X_1}{a_0+a_1 \cdot X_1+a_2 \cdot X_2+\cdots+a_n \cdot X_n} \quad [3.19]$$

Όπου:

α_0, α_1, α_2, … α_n είναι σταθερές που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της μη γραμμικής παλινδρόμησης,

X_1 η μεταβλητή k_w^{IAM} (best) και

X_2, X_3 ... X_n άλλες φυσικοχημικές παράμετροι που χρησιμοποιούνται για την βελτίωση του μοντέλου.

Η εξίσωση που προέκυψε με βάση τα δεδομένα εκμάθησης του Πίνακα 9 και εμφανίζει τα πιο

ικανοποιητικά στοιχεία είναι η εξής:

$$\%HOA = \frac{100 \cdot k_w^{IAM}(best)}{a_0 + a_1 \cdot k_w^{IAM}(best) + a_2 \cdot F^{+*} + a_3 \cdot F^{-*} + a_4 \cdot TPSA + a_5 \cdot MW} \quad [3.20]$$

(n = 82, R^2 = 0.728, s = 11.30)

Όπου:

TPSA (Topological Polar Surface Area) το τοπολογικό εμβαδόν πολικής επιφάνειας της ένωσης,

MW (Molecular Weight) το μοριακό βάρος των ενώσεων και

F^{+*}, F^{-*} τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, αντίστοιχα, στα οποία έχει προστεθεί το κλάσμα αμφολυτικού φορτίου (zwitterionic fraction).

Οι τιμές των συντελεστών α_0, α_1, α_2, α_3, α_4 όπως προέκυψαν από τη μη γραμμική παλινδρόμηση είναι οι ακόλουθες:

$$a_0 = -1.126\ (\pm 0.287)$$
$$a_1 = 1.081\ (\pm 0.019)$$
$$a_2 = 1.290\ (\pm 0.280)$$
$$a_3 = -1.364\ (\pm 0.321)$$
$$a_4 = 0.008\ (\pm 0.003)$$
$$a_5 = 0.004\ (\pm 0.001)$$

Μέσω των εξισώσεων [3.18] και [3.20] υπολογίστηκαν απευθείας οι προβλεπόμενες τιμές εντερικής απορρόφησης (%HOA predicted) για τις ενώσεις που αποτελούν το Test Set. Οι τιμές αυτές, και για τα δύο μοντέλα, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα σε αντιπαράθεση με τις βιβλιογραφικές τιμές εντερικής απορρόφησης των ενώσεων (%HOA observed) οι οποίες λαμβάνονται από τον πίνακα 5.

Πίνακας 11

Βιβλιογραφικές και προβλεπόμενες τιμές εντερικής απορρόφησης για τα δεδομένα ελέγχου

Α/Α	Φαρμακευτική ένωση	% HOA (observed)	%HOA (predicted)	
			Μη γραμμική εξίσωση με $\log k_w^{IAM}$(best)	Μη γραμμική εξίσωση με k_w^{IAM}(best)
1	Ceftriaxone	1.00	12.15	18.75

2	Chloramphenicol	90.00	85.35	72.44
3	Cimetidine	80.00	87.00	80.93
4	Cinoxacin	95.00	93.26	100.00
5	Hydrocortisone	90.20	95.12	85.83
6	Isoxicam	100.00	98.22	93.18
7	Levofloxacin	99.00	92.62	88.48
8	Lornoxicam	100.00	98.37	91.37
9	Meloxicam	90.00	98.61	92.36
10	Methylprednisolone	86.00	98.78	91.39
11	Metoclopramide	77.00	92.14	88.99
12	Minoxidil	97.00	91.24	85.79
13	Nadolol	42.00	83.71	83.79
14	Nalidixic acid	98.00	97.52	91.95
15	Niflumic acid	95.00	99.40	93.81
16	Omeprazole	97.00	98.39	91.18
17	Pipemidic acid	Well absorbed	78.37	79.89
18	Piperacillin	15.50	95.83	86.36
19	Salicylic acid	100.00	91.64	0
20	Sulpiride	40.00	71.43	76.79
21	Vancomycin	35.50	9.60	62.81
22	Warfarin	98.50	99.69	92.99

Ως επιτυχημένη πρόβλεψη θεωρείται κάθε πρόβλεψη η οποία απέχει το πολύ ±20% από τη βιβλιογραφική τιμή. Οι τιμές που αποκλίνουν περισσότερο από ±20% βρίσκονται εντός των γκρι κελιών του Πίνακα 11. Προκύπτει πως στην περίπτωση του μοντέλου που αντιστοιχεί στην εξίσωση [3.18] επιτυχημένες ήταν 18/22 προβλέψεις, ενώ στην περίπτωση του μοντέλου που αντιστοιχεί στην εξίσωση [3.20] οι επιτυχημένες προβλέψεις ήταν 17/22. Επομένως, το μοντέλο που χρησιμοποιεί ως βασική μεταβλητή το συντελεστή κατακράτησης στη λογαριθμική μορφή του ($\log k_w^{IAM}$ best) έχει ποσοστό επιτυχίας 81.82%, ενώ το μοντέλο που χρησιμοποιεί το συντελστή κατακράτησης ως έχει (k_w^{IAM} best) είναι λιγότερο αποδοτικό, με ποσοστό επιτυχίας 77.27%.

Οι ενώσεις Nadolol, Piperacillin, Sulpiride και Vancomycin εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση μεταξύ της βιβλιογραφικής τιμής εντερικής απορρόφησης και της προβλεπόμενης από τα δύο μοντέλα τιμής. Όσον αφορά τις ενώσεις Piperacillin και Vancomycin, το γεγονός αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, καθώς και σε προηγούμενη δημοσίευση στην οποία καταστρώθηκε μοντέλο πρόβλεψης της εντερικής απορρόφησης για στατική φάση IAM, οι ενώσεις αυτές εμφάνιζαν αντίστοιχη απόκλιση μεταξύ των δύο τιμών.[69]

Πέρα από όσα αναφέρονται παραπάνω, οι μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ της παρατηρούμενης και της προβλεπόμενης από τα μοντέλα τιμής της εντερικής απορρόφησης μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι η εντερική απορρόφηση μιας φαρμακευτικής ένωσης μπορεί να διαφέρει από άνθρωπο σε άνθρωπο και ανάλογα με τις συνθήκες της ασθένειας για την οποία χορηγείται το εκάστοτε φάρμακο. Αυτό γίνεται κατανοητό και από το γεγονός ότι για πολλές ενώσεις στη βιβλιογραφία εντοπίζονται τιμές εντερικής απορρόφησης με αποκλίσεις από τη μια δημοσίευση στην άλλη (για τους σκοπούς της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας έχει αναφερθεί πως έχει χρησιμοποιηθεί ο μέσος όρος αυτών των τιμών).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέσω της μελέτης του μηχανισμού έκλουσης των 35 φαρμακευτικών ενώσεων που πραγματοποιήθηκε για τους σκοπούς της παρούσας διπλωματικής εργασίας και τον συνδυασμό των δεδομένων που προέκυψαν με βιβλιογραφικά δεδομένα, επιβεβαιώθηκε πως ο μηχανισμός κατακράτησης των φαρμακευτικών ενώσεων από τη χρωματογραφική στήλη IAM εξαρτάται κυρίως από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από τις συσχετίσεις που αναπτύχθηκαν μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης, $\log k_w^{IAM}$, και των συντελεστών μερισμού και κατανομής, logP και logD, που εκφράζουν τη λιποφιλία των φαρμακευτικών ενώσεων. Μια άλλη ένδειξη για την υποστήριξη της σημασίας των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στο μηχανισμό έκλουσης των ενώσεων σε στατική φάση IAM είναι η καλή συσχέτιση που προέκυψε μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης $\log k_w$ αυτής της στατικής φάσης με τους αντίστοιχους συντελεστές για μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία των τασιενεργών Brij-35 και Tween-20 (τα οποία είναι ουδέτερα).

Επιπλέον, εισάγοντας τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- αντίστοιχα, στις συσχετίσεις που αναπτύχθηκαν μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης της στήλης IAM και των μεγεθών λιποφιλίας, επιβεβαιώνεται και η συμβολή των ηλεκτροστατικών δυνάμεων, ως δευτερεύον παράγοντας, στον μηχανισμό έκλουσης. Μάλιστα, μελετώντας τη μορφή των εξισώσεων που προκύπτουν για αυτές τις συσχετίσεις, διαπιστώνεται η αυξημένη κατακράτηση των θετικά φορτισμένων ενώσεων από τη χρωματογραφική στήλη IAM, η οποία οφείλεται στα φωσφορικά ανιόντα που εντοπίζονται στο εσωτερικό της στήλης.

Ένα άλλο συμπέρασμα που προκύπτει από τη σύγκριση των συσχετίσεων των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_w^{IAM}$ με το συντελεστή μερισμού, logP, και το συντελεστή κατανομής, logD, είναι πως οι συσχετίσεις με τον πρώτο είναι καλύτερες από ότι με τον δεύτερο. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις εντός της στατικής φάσης IAM μπορεί να οδηγήσουν σε μερική αντιστάθμιση του φαινομένου του ιονισμού στην κατακράτηση των ενώσεων και ο ιονισμός εντός της στήλης να είναι μικρότερος από αυτόν που θα αναμενόταν σε ένα υδατικό διάλυμα. Επομένως, η καλύτερη συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης της στήλης με το συντελεστή logP που παρατηρήθηκε, επιβεβαιώνεται και θεωρητικά.

Τέλος, η ανάπτυξη των δύο μοντέλων πρόβλεψης της εντερικής απορρόφησης των φαρμακευτικών ενώσεων που έχουν χορηγηθεί από το στόμα ελέγχθηκε με τη χρήση ενός Test

Set και προέκυψε πως είναι αρκετά επιτυχημένη. Τα δύο μοντέλα έδωσαν εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα, αλλά διαπιστώθηκε πως το μοντέλο που βασίζεται στη λογαριθμική μορφή του συντελεστή κατακράτησης της χρωματογραφικής στήλης IAM, $\log k_w$, είναι το καλύτερο μεταξύ των δύο και διαθέτει ποσοστό επιτυχίας 18/22 ενώσεις. Το ποσοστό αυτό είναι ικανό και είναι εμφανές πως η χρωματογραφία IAM μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της εντερικής απορρόφησης των φαρμακευτικών ενώσεων.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, η βιομιμητική χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών IAM εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την βελτίωση της ανάπτυξης και του σχεδιασμού νέων φαρμακευτικών προϊόντων, ειδικά κατά τα αρχικά στάδια της πορείας ώστε να συνεισφέρει στην εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των ενώσεων, όπως η απορρόφηση τους από το γαστρεντερικό σύστημα (%HOA). Μάλιστα, η IAM-HPLC μπορεί να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη για την μελέτη βασικών και ουδέτερων ενώσεων, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την καταλληλότητα και την αποτελεσματικότητα τους.

5.ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑ

Αρχικά, η διερεύνηση του μηχανισμού έκλουσης για ακόμη περισσότερες φαρμακευτικές ενώσεις και η δημιουργία μιας βάσης δεδομένων με τιμές συντελεστών κατακράτησης, $\log k_w$, και σε διάφορες τιμές pH, ώστε να καλύπτεται το εύρος των τιμών που εμφανίζεται φυσιολογικά στα βιολογικά συστήματα, για τις ενώσεις αυτές, θα μπορούσε να βελτιώσει όσες συσχετίσεις έχουν ήδη πραγματοποιηθεί (μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης για τη στατική φάση IAM και άλλων βιομιμητικών δεικτών) και να βοηθήσει στην αποτελεσματικότερη και πιο αξιόπιστη πρόβλεψη φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων.

Επιπλέον, η βιομιμητική χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της διαπερατότητας των φαρμακευτικών ενώσεων από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Blood – Brain Barrier). Ένα μοντέλο πρόβλεψης με ικανοποιητική αξιοπιστία, το οποίο θα αναπτυσσόταν αξιοποιώντας τους συντελεστές κατακράτησης από μια στήλη IAM σε συνδυασμό με πρόσθετες φυσικοχημικές ή μοριακές παραμέτρους, θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών προϊόντων που πρόκειται να έχουν δράση στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Ένα άλλο μοντέλο το οποίο θα μπορούσε να αναπτυχθεί αξιοποιώντας τη βάση δεδομένων, με τους συντελεστές κατακράτησης των διάφορων φαρμακευτικών ενώσεων, αφορά την πρόβλεψη της τοξικότητας τους (ηπατοτοξικότητα, καρδιοτοξικότητα, νευροτοξικότητα). Η τοξικότητα των φαρμάκων αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες απόρριψης υποψήφιων ενώσεων, επομένως, ένα τέτοιο μοντέλο, με την εφαρμογή του στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών προϊόντων, θα ήταν ένα πολύτιμο εργαλείο για τη διασφάλιση της καταλληλότητας μιας ένωσης να προχωρήσει στα επόμενα στάδια της διαδικασίας (προ-κλινικές και κλινικές δοκιμές).

Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM), χάρη στην ικανοποιητική προσομοίωση των βιολογικών μεμβρανών και της παθητικής διάχυσης και δέσμευσης των φαρμακευτικών ενώσεων από αυτές θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων των φαρμάκων, της συσσώρευσης τους ή της συγκράτησης τους από τα κύτταρα. Οι ιδιότητες αυτές είναι καθοριστικές για την αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου και άρα η γνώση τους και η ικανότητα πρόβλεψης τους στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ενώσεων μπορεί να αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο για τους ερευνητές.

Τέλος, όλα τα μοντέλα πρόβλεψης που έχουν αναφερθεί παραπάνω θα μπορούσαν να αναπτυχθούν με πιο σύνθετες τεχνικές επεξεργασίας, για μεγάλο όγκο δεδομένων, από διάφορες βιομιμητικές χρωματογραφικές τεχνικές και άλλους βιομιμητικούς δείκτες ώστε να αυξηθεί η αξιοπιστία τους και το εύρος περιπτώσεων που καλύπτουν.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] Τσαντίλη - Κακουλίδου Α. , Δημόπουλος Β., *Βασικές αρχές σχεδιασμού και ανάπτυξης φαρμάκων [ηλεκτ. βιβλίο]*. Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015.

[2] H. P. Rang, J. M. Ritter, R. J. Flower, and G. Henderson, *Rang & Dale's Pharmacology*, 8th ed. Elsevier, 2016.

[3] K. L. Valkó, *Physicochemical and Biomimetic Properties in Drug Discovery: Chromatographic Techniques for Lead Optimisation*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2014.

[4] B. Blass, *Basic Principles of Drug Discovery and Development*. Philadelphia, USA: Elsevier, 2015.

[5] F. Tsopelas, C. Giaginis, and A. Tsantili-Kakoulidou, "Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 12, no. 9, pp. 885–896, Sep. 2017, doi: 10.1080/17460441.2017.1344210.

[6] V. Sunjic and M. J. Parnham, *Signposts to Chiral Drugs*. Springer Basel, 2011.

[7] C. Han, C. B. Davis, and B. Wang, *Evaluation of Drug Candidates for Preclinical Development: Pharmacokinetics, Metabolism, Pharmaceutics, and Toxicology*. John Wiley & Sons, 2010.

[8] J. A. Arnott and S. L. Planey, "The influence of lipophilicity in drug discovery and design," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 7, no. 10, pp. 863–875, Oct. 2012, doi: 10.1517/17460441.2012.714363.

[9] I. Kola and J. Landis, "Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 3, p. 5, Aug. 2004, doi: 10.1038/nrd1470.

[10] S. M. Paul *et al.*, "How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, no. 3, pp. 203–214, Mar. 2010, doi: 10.1038/nrd3078.

[11] E. Grushka and N. Grinberg, *Advances in Chromatography*. CRC Press, 2013.

[12] C. A. Nicolaou and N. Brown, "Multi-objective optimization methods in drug design," *Drug Discov. Today Technol.*, vol. 10, no. 3, pp. e427–e435, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.ddtec.2013.02.001.

[13] F. Tsopelas *et al.*, "Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane chromatography using two stationary phases," *J. Chromatogr. A*, vol. 1396, pp. 25–33, May 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.03.060.

[14] D. W. Nebert and G. Zhang, "16 - Pharmacogenomics," in *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics (Seventh Edition)*, R. E. Pyeritz, B. R. Korf, and W. W. Grody, Eds. Academic Press, 2019, pp. 445–486.

[15] P. J. Eddershaw, A. P. Beresford, and M. K. Bayliss, "ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery," *Drug Discov. Today*, vol. 5, no. 9, pp. 409–414, Sep. 2000, doi: 10.1016/S1359-6446(00)01540-3.

[16] D. B. Kassel, "Applications of high-throughput ADME in drug discovery," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 3, pp. 339–345, Jun. 2004, doi: 10.1016/j.cbpa.2004.04.015.

[17] D. A. Smith, *Metabolism, Pharmacokinetics, and Toxicity of Functional Groups: Impact of the Building Blocks of Medicinal Chemistry in ADMET*. Royal Society of Chemistry, 2010.

[18] S. C. De Vito, "Absorption through cellular membranes," in *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals*, R. S. Boethling and D. Mackay, Eds. Boca Raton, 2000, pp. 283–300.

[19] J. Caldwell, I. Gardner, and N. Swales, "An Introduction to Drug Disposition: The Basic Principles of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion," *Toxicol. Pathol.*, vol. 23, no. 2, pp. 102–114, Mar. 1995, doi: 10.1177/019262339502300202.

[20] J. Lin, D. Sahakian, S. de Morais, J. Xu, R. Polzer, and S. Winter, "The Role of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity in Drug Discovery," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 3, no. 10, pp. 1125–1154, May 2003, doi: 10.2174/1568026033452096.

[21] L. S. Goodman, A. Gilman, L. L. Brunton, J. S. Lazo, and K. L. Parker, Eds., *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

[22] L. Escuder-Gilabert, J. J. Martínez-Pla, S. Sagrado, R. M. Villanueva-Camañas, and M. J.

Medina-Hernández, “Biopartitioning micellar separation methods: modelling drug absorption,” *J. Chromatogr. B*, vol. 797, no. 1–2, pp. 21–35, Nov. 2003, doi: 10.1016/S1570-0232(03)00606-8.

[23] H. A. Zhong, “ADMET Properties: Overview and Current Topics,” in *Drug Design: Principles and Applications*, A. Grover, Ed. Singapore: Springer Singapore, 2017, pp. 113–133.

[24] F. P. Guengerich, “Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity,” p. 11.

[25] Preeti Sagar Patil, “Drug Discovery and ADMET process: A Review,” *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, vol. 3, no. 7, pp. 181–192, 2016.

[26] P. Workman and I. Collins, “Modern cancer drug discovery: integrating targets, technologies and treatments,” in *Cancer Drug Design and Discovery*, Elsevier, 2008, pp. 3–38.

[27] I. J. Onakpoya, C. J. Heneghan, and J. K. Aronson, “Worldwide withdrawal of medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review and analysis,” *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 46, no. 6, pp. 477–489, Jul. 2016, doi: 10.3109/10408444.2016.1149452.

[28] F. Lombardo, M. Y. Shalaeva, K. A. Tupper, and F. Gao, “ElogDoct : A Tool for Lipophilicity Determination in Drug Discovery. 2. Basic and Neutral Compounds,” *J. Med. Chem.*, vol. 44, no. 15, pp. 2490–2497, Jul. 2001, doi: 10.1021/jm0100990.

[29] X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, and H. Chuman, “Determination of lipophilicity by reversed-phase high-performance liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1091, no. 1–2, pp. 51–59, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.chroma.2005.07.029.

[30] B. Testa, P. Crivori, M. Reist, and P.-A. Carrupt, “The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples,” p. 33.

[31] H. van de Waterbeemd, D. A. Smith, K. Beaumont, and D. K. Walker, “Property-Based Design: Optimization of Drug Absorption and Pharmacokinetics,” *J. Med. Chem.*, vol. 44, no. 9, pp. 1313–1333, Apr. 2001, doi: 10.1021/jm000407e.

[32] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Feeney, “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 23, no. 1, pp. 3–25, Jan. 1997, doi: 10.1016/S0169-409X(96)00423-1.

[33] K. L. Valkó, “Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 130, pp. 35–54, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.jpba.2016.04.009.

[34] V. Pliška, B. Testa, and H. van de Waterbeemd, Eds., *Lipophilicity in drug action and toxicology*. Weinheim ; New York: VCH, 1996.

[35] J. D. Hughes *et al.*, “Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 17, pp. 4872–4875, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.bmcl.2008.07.071.

[36] M. J. Waring, “Defining optimum lipophilicity and molecular weight ranges for drug candidates—Molecular weight dependent lower logD limits based on permeability,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 10, pp. 2844–2851, May 2009, doi: 10.1016/j.bmcl.2009.03.109.

[37] A. Pagliara, P.-A. Carrupt, G. Caron, P. Gaillard, and B. Testa, “Lipophilicity Profiles of Ampholytes,” *Chem. Rev.*, vol. 97, no. 8, pp. 3385–3400, Dec. 1997, doi: 10.1021/cr9601019.

[38] B. Testa, H. van de Waterbeemd, G. Folkers, and R. Guy, *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies*. John Wiley & Sons, 2001.

[39] K. Takács-Novák, M. Józan, and G. Szász, “Lipophilicity of amphoteric molecules expressed by the true partition coefficient,” *Int. J. Pharm.*, vol. 113, no. 1, pp. 47–55, Jan. 1995, doi: 10.1016/0378-5173(94)00176-6.

[40] C. Giaginis and A. Tsantili-Kakoulidou, “Alternative Measures of Lipophilicity: From Octanol–Water Partitioning to IAM Retention,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, no. 8, pp. 2984–3004, Aug. 2008,

doi: 10.1002/jps.21244.
[41] C. Liang and H. Lian, “Recent advances in lipophilicity measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 68, pp. 28–36, May 2015, doi: 10.1016/j.trac.2015.02.009.
[42] C. Barzanti *et al.*, “Potentiometric determination of octanol–water and liposome–water partition coefficients (logP) of ionizable organic compounds,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 48, no. 19, pp. 3337–3341, May 2007, doi: 10.1016/j.tetlet.2007.03.085.
[43] C. Giaginis, S. Theocharis, and A. Tsantili-Kakoulidou, “Contribution to the standardization of the chromatographic conditions for the lipophilicity assessment of neutral and basic drugs,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 573–574, pp. 311–318, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.aca.2006.03.074.
[44] R. Mannhold, G. I. Poda, C. Ostermann, and I. V. Tetko, “Calculation of Molecular Lipophilicity: State-of-the-Art and Comparison of LogP Methods on more than 96,000 Compounds,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 3, pp. 861–893, Mar. 2009, doi: 10.1002/jps.21494.
[45] F. Csizmadia, A. Tsantili-Kakoulidou, I. Panderi, and F. Darvas, “Prediction of Distribution Coefficient from Structure. 1. Estimation Method,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 86, no. 7, pp. 865–871, Jul. 1997, doi: 10.1021/js960177k.
[46] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, 6th ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007.
[47] B. Ismail and S. S. Nielsen, “Basic Principles of Chromatography,” in *Food Analysis*, S. S. Nielsen, Ed. Boston, MA: Springer US, 2010, pp. 473–498.
[48] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, 2011.
[49] S. Lindsay, *High Performance Liquid Chromatography (Analytical Chemistry by Open Learning)*, 1st ed. Great Britain: John Wiley & Sons, 1987.
[50] J. J. Martínez-Pla, Y. Martín-Biosca, S. Sagrado, R. M. Villanueva-Camañas, and M. J. Medina-Hernández, “Evaluation of the pH effect of formulations on the skin permeability of drugs by biopartitioning micellar chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1047, no. 2, pp. 255–262, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.chroma.2004.07.011.
[51] A. Berthod and C. Garcia - Alvarez - Coque, *Micellar Liquid Chromatography*, 1st ed., vol. 83. New York: Marcel Dekker Inc., 2000.
[52] M. Cuenca - Benito, S. Sagrado, R. M. Villanueva-Camañas, and M. J. Medina-Hernández, “Quantitative retention–structure and retention–activity relationships of barbiturates by micellar liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 814, no. 1–2, pp. 121–132, Jul. 1998, doi: 10.1016/S0021-9673(98)00375-6.
[53] M. C. García-Alvarez-Coque, J. R. Torres-Lapasió, and J. J. Baeza-Baeza, “Modelling of retention behaviour of solutes in micellar liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 780, no. 1–2, pp. 129–148, Sep. 1997, doi: 10.1016/S0021-9673(97)00051-4.
[54] L. Escuder-Gilabert, M. Molero-Monfort, R. M. Villanueva-Camañas, S. Sagrado, and M. J. Medina-Hernández, “Potential of biopartitioning micellar chromatography as an in vitro technique for predicting drug penetration across the blood–brain barrier,” *J. Chromatogr. B*, vol. 807, no. 2, pp. 193–201, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.jchromb.2004.04.004.
[55] K. E. Stępnik and I. Malinowska, “The use of biopartitioning micellar chromatography and immobilized artificial membrane column for in silico and in vitro determination of blood–brain barrier penetration of phenols,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1286, pp. 127–136, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.02.071.
[56] D. S. Hage, “High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding,” *J. Chromatogr. B*, vol. 768, no. 1, pp. 3–30, Feb. 2002, doi: 10.1016/S0378-4347(01)00482-0.
[57] D. S. Hage and J. Austin, “High-performance affinity chromatography and immobilized serum

albumin as probes for drug- and hormone-protein binding," *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, vol. 739, no. 1, pp. 39–54, Feb. 2000, doi: 10.1016/S0378-4347(99)00445-4.

[58] H. S. Kim and I. W. Wainer, "Rapid analysis of the interactions between drugs and human serum albumin (HSA) using high-performance affinity chromatography (HPAC)," *J. Chromatogr. B*, vol. 870, no. 1, pp. 22–26, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.jchromb.2008.05.029.

[59] K. Vuignier, J. Schappler, J.-L. Veuthey, P.-A. Carrupt, and S. Martel, "Drug–protein binding: a critical review of analytical tools," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 1, pp. 53–66, Sep. 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3737-1.

[60] F. Tsopelas, T. Vallianatou, and A. Tsantili-Kakoulidou, "Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 11, no. 5, pp. 473–488, May 2016, doi: 10.1517/17460441.2016.1160886.

[61] G. W. Caldwell, J. A. Masucci, M. Evangelisto, and R. White, "Evaluation of the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine: Drug discovery column for high-performance liquid chromatographic screening of drug–membrane interactions," *J. Chromatogr. A*, vol. 800, no. 2, pp. 161–169, Mar. 1998, doi: 10.1016/S0021-9673(97)01143-6.

[62] "IAM Chromatography Columns," *Regis Technologies*. https://www.registech.com/immobilized-artificial-membrane-iam-chromatography/ (accessed Sep. 15, 2020).

[63] Charles. Pidgeon, Shaowei. Ong, Heesung. Choi, and Hanlan. Liu, "Preparation of Mixed Ligand Immobilized Artificial Membranes for Predicting Drug Binding to Membranes," *Anal. Chem.*, vol. 66, no. 17, pp. 2701–2709, Sep. 1994, doi: 10.1021/ac00089a017.

[64] D. Wang *et al.*, "Activity ranking of synthetic analogs targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 by an integrated cell membrane chromatography system: Liquid Chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 38, no. 24, pp. 4159–4165, Dec. 2015, doi: 10.1002/jssc.201500857.

[65] D. Vrakas, C. Giaginis, and A. Tsantili-Kakoulidou, "Different retention behavior of structurally diverse basic and neutral drugs in immobilized artificial membrane and reversed-phase high performance liquid chromatography: Comparison with octanol–water partitioning," *J. Chromatogr. A*, vol. 1116, no. 1–2, pp. 158–164, May 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.03.058.

[66] A. Taillardat-Bertschinger, P.-A. Carrupt, F. Barbato, and B. Testa, "Immobilized Artificial Membrane HPLC in Drug Research," *J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 5, pp. 655–665, Feb. 2003, doi: 10.1021/jm020265j.

[67] D. Vrakas, C. Giaginis, and A. Tsantili-Kakoulidou, "Electrostatic interactions and ionization effect in immobilized artificial membrane retention," *J. Chromatogr. A*, vol. 1187, no. 1–2, pp. 67–78, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.01.079.

[68] "Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων - Αναζήτηση προϊόντων ανθρώπινης χρήσης." http://www.eof.gr/web/guest/search (accessed Sep. 01, 2020).

[69] F. Tsopelas, T. Vallianatou, and A. Tsantili-Kakoulidou, "The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 81, pp. 82–93, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.ejps.2015.09.020.

[70] V. E. Thiel-Demby *et al.*, "Biopharmaceutics Classification System: Validation and Learnings of an in Vitro Permeability Assay," *Mol. Pharm.*, vol. 6, no. 1, pp. 11–18, Feb. 2009, doi: 10.1021/mp800122b.

[71] J. Kotecha, S. Shah, I. Rathod, and G. Subbaiah, "Prediction of oral absorption in humans by experimental immobilized artificial membrane chromatography indices and physicochemical descriptors," *Int. J. Pharm.*, vol. 360, no. 1, pp. 96–106, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.04.025.

[72] E. Deconinck, T. Hancock, D. Coomans, D. L. Massart, and Y. V. Heyden, "Classification of drugs

in absorption classes using the classification and regression trees (CART) methodology," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 39, no. 1, pp. 91–103, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.jpba.2005.03.008.

[73] K. Sugano, Y. Nabuchi, M. Machida, and Y. Aso, "Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability," *Int. J. Pharm.*, vol. 257, no. 1, pp. 245–251, May 2003, doi: 10.1016/S0378-5173(03)00161-3.

[74] Y. H. Zhao *et al.*, "Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure–activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors," *J. Pharm. Sci.*, vol. 90, no. 6, pp. 749–784, Jun. 2001, doi: 10.1002/jps.1031.

[75] J. A. H. Forrest, J. A. Clements, and L. F. Prescott, "Clinical Pharmacokinetics of Paracetamol:," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 7, no. 2, pp. 93–107, 1982, doi: 10.2165/00003088-198207020-00001.

[76] P. A. Meredith and H. L. Elliott, "Clinical Pharmacokinetics of Amlodipine:," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 22, no. 1, pp. 22–31, Jan. 1992, doi: 10.2165/00003088-199222010-00003.

[77] D. S. Wishart *et al.*, "DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018," *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. D1, pp. D1074–D1082, Jan. 2018, doi: 10.1093/nar/gkx1037.

[78] K. Sugano, "5.19 - Artificial Membrane Technologies to Assess Transfer and Permeation of Drugs in Drug Discovery," in *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, J. B. Taylor and D. J. Triggle, Eds. Oxford: Elsevier, 2007, pp. 453–487.

[79] A. Dahan *et al.*, "Biowaiver Monographs for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Codeine Phosphate," *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no. 6, pp. 1592–1600, Jun. 2014, doi: 10.1002/jps.23977.

[80] "Drugs.com | Prescription Drug Information, Interactions & Side Effects," *Drugs.com*. https://www.drugs.com/ (accessed Sep. 25, 2020).

[81] "Drug Information System - DrugInfoSys.com." http://druginfosys.com/ (accessed Sep. 25, 2020).

[82] G. Stein and G. Wilkinson, *Seminars in general adult psychiatry*, 2nd ed. UK: Royal College of Psychiatrists, 2007.

[83] D. Vrakas, C. Giaginis, and A. Tsantili-Kakoulidou, "Electrostatic interactions and ionization effect in immobilized artificial membrane retention: A comparative study with octanol–water partitioning," *J. Chromatogr. A*, vol. 1187, no. 1, pp. 67–78, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.01.079.

[84] F. Tsopelas, P. Danias, A. Pappa, and A. Tsantili-Kakoulidou, "Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes," *J. Chromatogr. A*, vol. 1621, p. 461027, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461027.