

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ 1: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Εφαρμογή Μικυλλιακής Χρωματογραφίας ως
Εργαλείο για την Εκτίμηση Φαρμακοκινητικών
Ιδιοτήτων Υποψηφίων Φαρμάκων**

ΠΕΡΣΕΦΟΝΗ ΝΑΣΤΟΥ

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΦΩΤΙΟΣ ΤΣΟΠΕΛΑΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Ε.Μ.Π**

Αθήνα, Ιούλιος 2020

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Μηχανικών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου κατά το χρονικό διάστημα Δεκεμβρίου 2019 – Ιουλίου 2020.

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα, πρωτίστως, να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου Δρ. Φώτιο Τσόπελα, τόσο για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος όσο και για τη συνεχή υποστήριξη και καθοδήγηση του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και τη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|-----------|
| Πρόλογος | 2 |
| Περιεχόμενα | 3 |
| Περίληψη | 5 |
| Λέξεις – Κλειδιά..... | 6 |
| Abstract | 7 |
| Keywords..... | 8 |
| Θεωρητικό Μέρος | 9 |
| Εισαγωγή | 9 |
| Φαρμακοκινητική (ιδιότητες ADMET)..... | 13 |
| Πρωτεϊνική Σύνδεση | 17 |
| Βασικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες | 22 |
| Δυνατότητα διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB) | 22 |
| Λιποφιλία..... | 24 |
| Συντελεστής Μερισμού | 24 |
| Συντελεστής Κατανομής..... | 26 |
| Αρχή Ελάχιστης Λιποφιλίας | 27 |
| Όγκος Κατανομής | 29 |
| Βιομημητική Χρωματογραφία | 30 |
| Χρωματογραφία | 30 |
| Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης | 31 |
| Χρωματογραφία στην Ανάπτυξη Φαρμάκων – Βιομημητική Χρωματογραφία..... | 32 |
| Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane)..... | 34 |
| Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Πρωτεϊνών | 34 |
| Βιομημητική Μικυλλιακή Χρωματογραφία (Biopartitioning Micellar Chromatography).... | 36 |
| Πειραματικό Μέρος..... | 39 |

| | |
|--|-----------|
| Σχεδιασμός Πειραματικής Διαδικασίας | 39 |
| Αντιδραστήρια | 39 |
| Οργανολογία..... | 39 |
| Πειραματική Διαδικασία | 41 |
| Αποτελέσματα | 54 |
| Επεξεργασία Αποτελεσμάτων | 57 |
| Συσχέτιση με τον συντελεστή μερισμού οκτανόλης-νερού (<i>logP</i>) | 58 |
| Συσχέτιση με τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού (<i>logD</i>) | 59 |
| Συσχέτιση με το Brij-35 | 61 |
| Συσχέτιση με το Tween..... | 62 |
| Συσχέτιση με τη στήλη IAM.DD2 | 64 |
| Αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων σε pH=5.5 συγκριτικά με άλλες παραμέτρους | 66 |
| Συσχέτιση με φαρμακοκινητικές ιδιότητες | 68 |
| Συσχέτιση με τον όγκο κατανομής (<i>Vd</i>) | 70 |
| Συσχέτιση με την απορρόφηση από το στόμα (Human Oral Absorption, %HOA)..... | 75 |
| Συμπεράσματα..... | 78 |
| Προτάσεις για μελλοντική έρευνα..... | 79 |
| Πηγές..... | 80 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε ο μηχανισμός έκλουσης φαρμακευτικών ενώσεων με υγρή μικυλλιακή χρωματογραφία και η συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης με φαρμακοκινητικά μεγέθη. Οι πειραματικές συνθήκες ρυθμίστηκαν ώστε να προσομοιάζουν το βιολογικό περιβάλλον του ανθρώπινου οργανισμού, δηλαδή η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 37.0 °C και ο διαλύτης έκλουσης παρασκευάστηκε σε pH 7.4 (αίματος) και pH 5.5 (αρχικό τμήμα λεπτού εντέρου) Το τασιενεργό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Μελετήθηκαν 44 φαρμακευτικές ενώσεις με διαφορετική δομή και φαρμακολογική δράση και υπολογίστηκαν οι συντελεστές κατακράτησής τους. Για τις ενώσεις, των οποίων οι συντελεστές κατακράτησης, $\log k$, δεν μπορούσαν να υπολογιστούν άμεσα δεν χρησιμοποιήθηκε 100% υδατική φάση αλλά προστέθηκε στην κινητή φάση μεθανόλη και οι συντελεστές κατακράτησης υπολογίστηκαν με γραμμική προεκβολή. Τα $\log k$ που προέκυψαν από τα πειραματικά δεδομένα συγκρίθηκαν με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής, οι οποίοι εκφράζουν τη λιποφιλία των φαρμακευτικών ενώσεων. Η συνεισφορά των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων της κατακράτησης των ενώσεων από τη στήλη διερευνήθηκε με την εισαγωγή των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου στις εξισώσεις με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής. Έπειτα, οι συντελεστές συσχετίστηκαν με άλλους βιομημητικούς χρωματογραφικούς δείκτες, μικυλλιακής χρωματογραφίας και ακινητοποιημένων μεμβρανών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αλληλεπιδράσεις λόγω των φορτίων της κάθε ένωσης επηρεάζουν σημαντικά τον μηχανισμό έκλουσης των φαρμάκων. Τέλος, οι συντελεστές κατακράτησης των 44 αυτών φαρμάκων συνδυάστηκαν με 45 ακόμα φαρμάκων που μετρήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης δύο βασικών φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων: του όγκου κατανομής και της απορρόφησης από το στόμα. Από τη μελέτη των μοντέλων προέκυψε πως η απορρόφηση από το στόμα μπορεί να προβλεφθεί επιτυχώς, ενώ η ικανότητα πρόβλεψης του όγκου κατανομής των φαρμάκων μπορεί να χαρακτηριστεί ως μέτρια.

ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ

Βιομιμητική χρωματογραφία, μικυλλιακή χρωματογραφία, φαρμακοκινητική, λιποφιλία, όγκος κατανομής, απορρόφηση από το στόμα

ABSTRACT

In the present thesis, the mechanism of elimination of pharmaceutical compounds with liquid micellar chromatography and the correlation of retention rates with pharmacokinetic quantities were investigated. The experimental conditions were adjusted to simulate the biological environment of the human body, ie the temperature was kept constant at 37.0 °C and the extract solvent was prepared at pH=7.4 (blood) and pH=5.5 (upper part of the small intestine). The surfactant used was *SDS* (Sodium Dodecyl Sulfate). In total, **44** pharmaceutical compounds with different structure and pharmacological action were studied, and their retention rates were calculated. For the compounds, the coefficients of which could not be calculated directly, a 100% aqueous phase was not used but methanol was added to the mobile phase and the retention rates were calculated by linear projection. Retention factors, *logk* obtained from the experimental data were compared with the partition and distribution coefficients, which express the lipophilicity of the pharmaceutical compounds. The contribution of electrostatic interactions in the retention mechanism of compounds by the column was investigated by the introduction of positive and negative charge fractions in equations with the coefficients of partition and distribution. Subsequently, the rates were correlated with other biomimetic chromatographic rates of micellar chromatography, and immobilized membranes' chromatography. The results showed that the interactions due to the charges of each compound had the greatest effect on the drug elimination mechanism. Finally, the retention rates of these 44 drugs, and another 45 from another study in the same laboratory, were used to develop models for predicting two key pharmacokinetic properties: the volume of distribution and human oral absorption. A constructed model with satisfactory predictive performance was evident for Human Oral Absorption, while the predictive performance of the model for the assessment of volume of distribution was rather moderate.

KEYWORDS

Biomimetic chromatography, micellar chromatography, pharmacokinetics, lipophilicity, volume of distribution, oral absorption

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φάρμακα είναι πολύτιμα για τον άνθρωπο καθώς με αυτά καθίσταται δυνατή η πρόληψη και η αντιμετώπιση ασθενειών στις οποίες μπορεί να εκτεθεί καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του. Τα πρώτα θεραπευτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήδη από την αρχαιότητα, προέρχονταν από φυτά μιας και θεωρούταν από πολλούς πολιτισμούς ότι δρόγες (μέρη του φυτού) που έμοιαζαν με διάφορα μέρη του ανθρώπινου σώματος, μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην ίαση των παθήσεων των μερών αυτών [1].

Στις μέρες μας, η φαρμακευτική έρευνα έχει παρουσιάσει αλματώδη εξέλιξη καταλήγοντας πλέον να χρησιμοποιούνται σύνθετες οργανικές ενώσεις ως φάρμακα. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) περιγράφεται συνοπτικά η εξέλιξη της φαρμακευτικής έρευνας ως προς τα υλικά αλλά και τα συστήματα ελέγχου δράσης [1].

Παλαιότερα, η ανακάλυψη φαρμάκων βασιζόταν στη δομή γνωστών δραστικών ενώσεων (ενδογενείς ή φυσικά προϊόντα) που αναγνωρίζονταν και τροποποιούνταν με τη μέθοδο δοκιμής και σφάλματος. Οι επιστήμονες απομόνωναν το ενεργό υλικό, αποκάλυπταν τη δομή και τον μηχανισμό της φαρμακολογικής δράσης και με αυτή τη γνώση τροποποιούσαν τη χημική δομή [2].

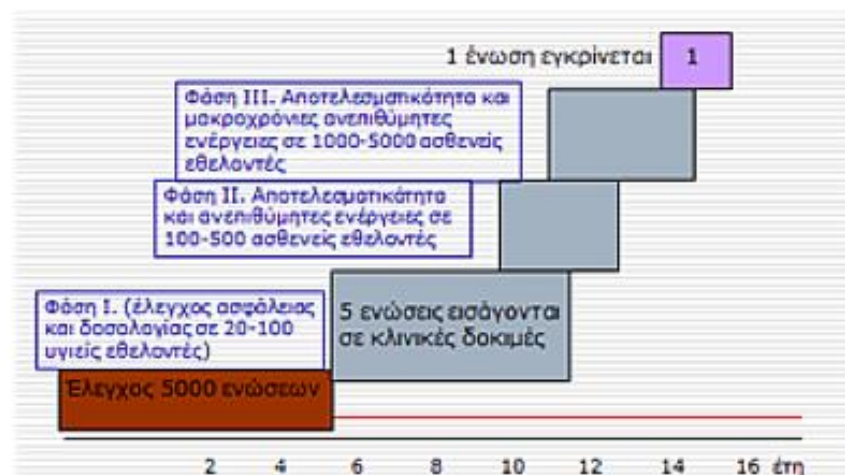
Σήμερα, η διαδικασία της ανακάλυψης φαρμάκων αξιοποιεί τις πρόσφατες εξελίξεις στη βιοχημεία και τη γενετική. Επιπλέον έχουν κατασκευαστεί βιβλιοθήκες ενώσεων και έχουν αναπτυχθεί πολύ εξελιγμένες μέθοδοι που βοηθούν στην ανακάλυψη φαρμάκων [1], [2].

Πίνακας 1: Εξέλιξη Φαρμακευτικής Έρευνας ως προς Υλικά και Συστήματα Ελέγχου

| Χρονολογία | Υλικά | Συστήματα Έλεγχου |
|------------|---|---|
| Αρχαιότητα | Φυτά, δηλητήρια, ορυκτά | Άνθρωπος |
| 1806 | μορφίνη | Άνθρωπος, ζώα |
| 1899 | ασπιρίνη | |
| 1920 | Συνθετικές ενώσεις | Ζώα, απομονωμένα όργανα |
| 1970 | | Ένζυμα, μεμβράνες |
| 1990 | Συνδυαστική Χημεία Βιβλιοθήκες ενώσεων Βιολογικά προϊόντα | Ανθρώπινες πρωτεΐνες, HTS, VS, χημειοπληροφορική, βιοπληροφορική |

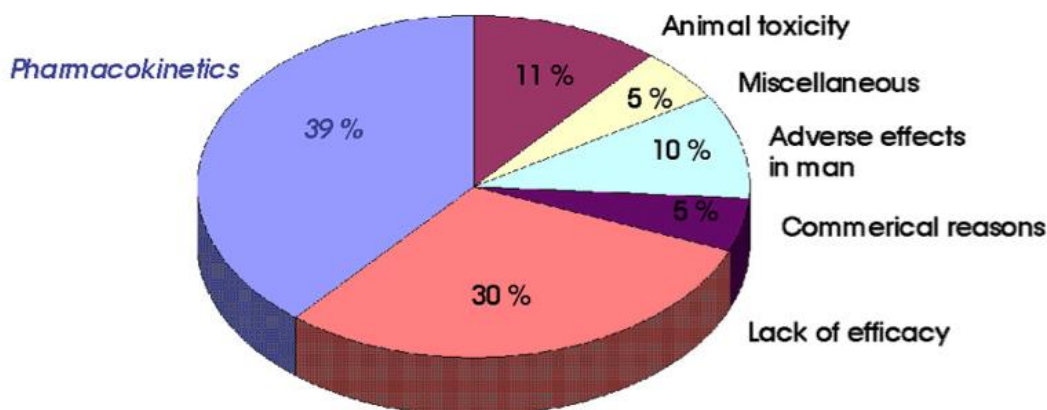
Παρά την εξέλιξη αυτή, που έχει παρουσιάσει η ανάπτυξη και ανακάλυψη φαρμάκων, δεν έχει πάψει να αποτελεί μία μη αποδοτική, επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία [3].

Στατιστικά στοιχεία δείχνουν ότι ανάμεσα σε 10000 ενώσεις που μελετώνται και συντίθενται, 1 τελικά θα αποτελέσει φάρμακο σε εκτιμώμενο διάστημα μελέτης των 15 ετών [5].



Εικόνα 1: Πορεία ανακάλυψης φαρμάκων [1]

Περισσότερο από το 1/3 των αποτυχιών οφείλεται σε μη ικανοποιητικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες, κυρίως στην απορρόφηση, τον μεταβολισμό και την τοξικότητα. Για τα φάρμακα που αφορούν το κεντρικό νευρικό σύστημα τα ποσοστά επιτυχίας είναι ακόμα χαμηλότερα [3].



Εικόνα 2: Κύριοι λόγοι απόρριψης νέων υποψηφίων φαρμάκων [6]

Για τον λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντικό η μελέτη και η διερεύνηση του φαρμακοκινητικού προφίλ των νέων φαρμάκων να γίνεται από τα πρώτα στάδια ανάπτυξής τους.

Σε αυτό, έχει συμβάλει η ανάπτυξη τεχνικών ταχείας εκτίμησης των φαρμακοκινητικών παραμέτρων ώστε να γίνεται εγκαίρως η απόρριψη υποψηφίων φαρμάκων που δεν έχουν τις επιθυμητές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, οι βασικοί παράγοντες οι οποίοι εξετάζονται στα πρώτα στάδια ανάπτυξης είναι η ασφάλεια, η αποτελεσματικότητα και η οικονομικότητα.

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν τα παραπάνω και να ανακαλυφθεί ένα φάρμακο ακολουθείται μία σειρά δοκιμασιών και ελέγχων που περιλαμβάνει

τα εξής στάδια: ανακάλυψη, ανάπτυξη, προκλινική έρευνα και κλινικές δοκιμές [7].

Η ανακάλυψη νέων υποψηφίων φαρμάκων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένων ερευνών που πραγματοποιούνται σε εργαστήρια, νέων δεδομένων σχετικά με τον μηχανισμό φράσης ασθενειών και ανάπτυξης νέων τεχνολογιών.

Αφετηρία για την ανακάλυψη ενός φαρμάκου αποτελεί η επιλογή του βιολογικού μορίου στο οποίο θα στοχεύσει το φάρμακο. Τα μόρια αυτά καλούνται ενώσεις-οδηγοί. Οι μοριακοί στόχοι είναι κυρίως πρωτεΐνες μιας και η κρυσταλλική τους δομή μπορεί να αποτυπωθεί με περισσότερους τρόπους και ευκολότερα σε σχέση με άλλα μόρια όπως τα νουκλεϊκά οξέα. Οι ενώσεις-οδηγοί περιλαμβάνουν τη φαρμακοφόρο δομή, η οποία καθιστά το μόριο ικανό να προσδεθεί στον βιολογικό στόχο. Η φαρμακοφόρος δομή είναι ικανή αλλά όχι αναγκαία συνθήκη ώστε το μόριο να εκδηλώσει τελικά φαρμακολογικό αποτέλεσμα [1].

Το επόμενο στάδιο είναι η προκλινική έρευνα. Στόχος της, είναι η ενίσχυση της φαρμακευτικής δράσης των ενώσεων-οδηγών αλλά και η βελτίωση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων τους (ADMET). Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιούνται δοκιμές *in vitro* με κυτταρικές καλλιέργειες από ιστούς και όργανα του σώματος αλλά αναπόφευκτα λόγω της μη αντιπροσωπευτικής συμπεριφοράς των ενώσεων αυτών εκτός του οργανισμού και *in vivo* με τη χρήση πειραματόζων. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι τα ποντίκια λόγω της ομοιότητας του γονιδιώματός του με το ανθρώπινο αλλά χρησιμοποιούνται και άλλα τρωκτικά αλλά και σκύλοι.

Στη συνέχεια, μόλις μία ένωση εμφανίσει θετικά αποτελέσματα περνάει στο στάδιο της κλινικής δοκιμής στο οποίο χορηγείται σε ανθρώπους. Η κλινική

δοκιμή πραγματοποιείται σε φάσεις. Στη φάση 0 το φάρμακο χορηγείται σε μία ομάδα 10-15 υγιών εθελοντών. Στη φάση I, 15 έως 30 άτομα λαμβάνουν το φάρμακο σε διάφορες δόσεις ώστε να εξακριβωθεί ποια είναι εκείνη η δόση στην οποία εμφανίζονται οι λιγότερες παρενέργειες. Ακολουθεί η φάση II, όπου συμμετέχει μεγαλύτερος αριθμός ασθενών (της τάξης των εκατοντάδων). Στην φάση III το φάρμακο λαμβάνεται μαζί με ένα φάρμακο αναφοράς από τυχαίους ασθενείς το οποίο εκείνοι δεν γνωρίζουν για να αποκλειστεί ο παράγοντας της υποκειμενικότητας. Η τελευταία φάση, φάση IV, είναι η φάση στην οποία μελετάται μακροπρόθεσμα το φάρμακο και σε πολύ μεγάλο πλήθος ασθενών μετά την έγκριση και κυκλοφορία του [8], [9].

ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ (ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ADMET)

Όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 2, το 40% των αποτυχιών στο σχεδιασμό φαρμάκων οφείλονται σε φαρμακοκινητικά αίτια. Για αυτό το λόγο, η μελέτη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων από τα πρώτα κίονας στάδια ανάπτυξης του φαρμάκου έχει ιδιαίτερη σημασία.

Οι φαρμακευτικές ουσίες εισέρχονται στο ανθρώπινο σώμα με πολλούς τρόπους, μιας και τα φάρμακα μπορούν να καταποθούν (χάπια, κάψουλες, σιρόπια), να εισαχθούν ενδοφλέβια ή και να εφαρμοστούν στο δέρμα (κρέμες). Η μέθοδος χορήγησης αποτελεί παράγοντα –μεταξύ άλλων- που καθορίζει την ταχύτητα έναρξης της δράσης του φαρμάκου.

Μέσα στο ανθρώπινο σώμα, αμέσως μετά την εισαγωγή τους, τα φάρμακα απορροφώνται και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και το κυκλοφορικό σύστημα τα κατανέμει σε όλο το σώμα. Στη συνέχεια, μεταβολίζονται από το σώμα και μαζί με τους μεταβολίτες τους απεκκρίνονται. Η διαδρομή που ακολουθεί δηλαδή το φάρμακο στο ανθρώπινο σώμα αποτελείται από τέσσερα στάδια:

1. Απορρόφηση (Absorption)
2. Κατανομή (Distribution)
3. Μεταβολισμός (Metabolism)
4. Απέκκριση (Excretion)

Η πορεία αυτή περιγράφεται από τα αρχικά των παραπάνω όρων ως **ADME**, ή και **ADMET** αν συμπεριληφθεί και μία ακόμα παράμετρος, η τοξικότητα (Toxicity).

Οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες ADMET σχετίζονται με διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμακευτικών μορίων και η κατανόησή τους είναι ιδιαίτερα σημαντική για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων, διότι για να έχει μία ένωση επιθυμητή βιολογική απόκριση πρέπει να είναι ικανή να φτάσει στον μοριακό στόχο, να έχει κατάλληλη συγκέντρωση και να μπορεί να παραμείνει διαθέσιμη για κατάλληλο χρονικό διάστημα [10], [11].

1. Απορρόφηση (Absorption)

Η απορρόφηση είναι η διαδικασία με την οποία τα μόρια ενός φαρμάκου εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος από τη θέση χορήγησής του. Ο ρυθμός απορρόφησης του φαρμάκου καθώς και ο βαθμός απορρόφησής του, εξαρτώνται από τον τρόπο χορήγησής του. Ανεξάρτητα από τον τρόπο χορήγησης ενός φαρμάκου, η καλή απορρόφηση αποτελεί σημαντική προϋπόθεση έτσι ώστε μια ουσία να είναι ικανή να παράγει φαρμακολογικό αποτέλεσμα.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι χορήγησης φαρμάκων που επηρεάζουν την απορρόφησή τους. Κυρίως διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες.

Η μία βασική κατηγορία αφορά τα φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα και κατά κανόνα καταπίνονται πριν να απορροφηθούν στο λεπτό έντερο ή και στο στομάχι. Στη συνέχεια, τα φάρμακα περνάνε από το συκώτι όπου συμβαίνει μεταβολισμός και χολική απέκκριση πριν το φάρμακο τελικά εισέλθει στο κυκλοφορικό σύστημα. Ορισμένα φάρμακα που εισάγονται στο πεπτικό σύστημα απορροφώνται απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος χωρίς να διέρχονται από το ήπαρ (π.χ. μέσω των στοματικών οδών) αποφεύγοντας έτσι τους δυνητικούς κινδύνους λόγω του γαστρικού οξέος, την πρόσδεση σε τρόφιμα και τον μεταβολισμό από το εντερικό τοίχωμα ή τα ηπατικά ένζυμα.

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει οποιαδήποτε οδό δεν περιλαμβάνει την απορρόφηση μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα όπως χορήγηση με ένεση, εισπνοή ή εφαρμογή στο δέρμα.

Η απορρόφηση από το στόμα είναι μια μακρά διαδικασία κατά τη διάρκεια της οποίας τα μόρια του φαρμάκου μπορεί να υποστούν βλάβη (π.χ. μετουσίωση από γαστρικό οξύ), να απομονωθούν, ή να τροποποιηθούν με μεταβολισμό πρώτης διέλευσης. Ως συνέπεια όλων αυτών των κινδύνων, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η απορρόφηση είναι συχνά ατελής μετά από χορήγηση από το στόμα. Η αναλογία μιας δόσης που φθάνει στη συστηματική κυκλοφορία χωρίς αλλοιώσεις είναι γνωστή ως βιοδιαθεσιμότητα (bioavailability) του φαρμάκου [13].

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, στον σύγχρονο σχεδιασμό φαρμάκων, η αποτυχία πολλών ενώσεων στο στάδιο της ανάπτυξης προκαλείται από τις ιδιότητες δυσμενούς απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού, απέκκρισης

και τοξικότητας (ADMET). Μεταξύ αυτών των ιδιοτήτων, η καλή βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα είναι μία από τις πλέον επιθυμητές ιδιότητες ενός νέου φαρμάκου. Σημαντική προσπάθεια γίνεται στην πρόβλεψη της ΗΙΑ (Human Intestinal Absorption). ΗΙΑ είναι η διαδικασία μέσω της οποίας τα από στόματος χορηγούμενα φάρμακα απορροφώνται από το έντερο στην κυκλοφορία του αίματος [14]. Έτσι, το πρώτο βήμα για την επίτευξη υψηλής από του στόματος βιοδιαθεσιμότητας είναι η επίτευξη μιας καλής από στόματος απορρόφησης (Human Oral Absorption) [44].

Πολλές φορές, κατά το σχεδιασμό ενός φαρμάκου, δίνεται μεγαλύτερη έμφαση στην βιοδιαθεσιμότητα παρά στην απορρόφηση [12].

Η **βιοδιαθεσιμότητα** αποτελεί μία σύνθετη ιδιότητα, που εξαρτάται από τη λιποφιλία, τον ιονισμό, την τοπολογική πολική επιφάνεια (Polar Surface Area, PSA) και τον αριθμό των περιστρεφόμενων δεσμών (rotatable bonds). Η τοπολογική πολική επιφάνεια είναι το άθροισμα των κλασματικών συνεισφορών της επιφάνειας των ατόμων οξυγόνου και αζώτου της ένωσης, στην ολική επιφάνεια της [15].

Η απορρόφηση συνδέεται με ιδιότητες όπως η διαλυτότητα ενός φαρμάκου (solubility) και η διαπερατότητά του μέσω των κυτταρικών μεμβρανών (permeability). Η διαλυτότητα ενός φαρμάκου εξαρτάται κυρίως από τη λιποφιλία (όσο χαμηλότερη είναι η λιποφιλία τόσο μεγαλύτερη θα είναι η διαλυτότητα) και το σημείο τήξης της ένωσης. Η διαπερατότητα επηρεάζεται από τη λιποφιλία, το μοριακό βάρος και την τοπολογική πολική επιφάνεια (αυξάνεται με την αύξηση της λιποφιλίας και τη μείωση του μεγέθους του (μοριακό βάρος, PSA)). Μία άλλη παράμετρος που επηρεάζει τη διαλυτότητα ενός φαρμάκου είναι ο ιονισμός του [15], [16].

2. Κατανομή (Distribution)

Μετά την απορρόφηση ακολουθεί η κατανομή, δηλαδή η κυκλοφορία του φαρμάκου σε όλο το σώμα. Αρχικά, το φάρμακο λαμβάνεται από όργανα όπως το ήπαρ, τα νεφρά και ο εγκέφαλος και στη συνέχεια, από τους μύς, το δέρμα και το λίπος. Ο βαθμός συσσώρευσης του φαρμάκου στους ιστούς εξαρτάται άμεσα από τη λιποφιλία και τη ροή του αίματος στους ιστούς [12], [17].

Ένα πολύ σημαντικό φαινόμενο κατανομής του φαρμάκου είναι η σύνδεσή του στις πρωτεΐνες του αίματος και σε άλλα μακρομόρια των ιστών.

ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ

Ο βαθμός σύνδεσης πρωτεϊνών είναι σημαντική παράμετρος στην αξιολόγηση των φαρμακολογικών και φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των πιθανών φαρμάκων. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η επίδραση ενός φαρμάκου σχετίζεται με την έκθεση ενός ασθενούς στην αδέσμευτη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα αντί της συνολικής συγκέντρωσής του [1], [19]. Η δέσμευση φαρμάκων στις πρωτεΐνες του πλάσματος, καθιστά δυνατή τη μεταφορά φαρμάκων μέσω του αίματος σε θέσεις δράσης σε όλο το σώμα. Εντούτοις, η ισχυρή δέσμευση (πάνω από 95%) εμποδίζει την ικανότητα των φαρμάκων να φθάσουν στο θεραπευτικό επίπεδο και μπορεί να προκαλέσει διάφορες ανεπιθύμητες ενέργειες χαμηλή διείσδυση στον εγκέφαλο [2], αλληλεπιδράσεις φαρμάκου-φαρμάκου, απώλεια αποτελεσματικότητας κ.λπ.). Επομένως, η έκταση της δέσμευσης πρωτεΐνης-φαρμάκου μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους όπως τα ποσοστά κάθαρσης και ο όγκος της κατανομής. Μεταξύ των πρωτεϊνών ορού, η ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού (HSA) και η 1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση πρωτεϊνών για πολλά φάρμακα, κάτι που είναι πολύ σημαντικό για την κατανομή φαρμάκων στο σώμα. Η HSA είναι η βασικότερη πρωτεΐνη του πλάσματος που έχει έντονη

συγγένεια με όξινες και ουδέτερες ενώσεις [20], [45], ενώ η AGP έχει έντονη συγγένεια με βασικά και ουδέτερα φάρμακα [15]. Αυτό συνεπάγεται το σχηματισμό ιοντικών δεσμών, αν και μη-συγκεκριμένες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις θεωρούνται πολύ σημαντικές στη σύνδεση [21]. Η υδροφοβικότητα της διαλυμένης ουσίας, όπως μετριέται με τη συμπεριφορά κατανομής της, μεταξύ οκτανόλης και νερού ($\log P_{ow}$), έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως πρόβλεψη για τη μοντελοποίηση της πρόσδεσης πρωτεϊνών [22], [23]. Παρόλα αυτά, ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης - νερού είναι δυστυχώς ένας αναξιόπιστος προγνωστικός παράγοντας για τη δέσμευση πρωτεϊνών πλάσματος, επειδή οι δυνάμεις αναγνώρισης όπως οι ιοντικοί δεσμοί δεν κωδικοποιούνται σε αυτό το διφασικό σύστημα [21], [23].

Η διεργασία της κατανομής του φάρμακου μπορεί να επηρεαστεί από φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως είναι η διαλυτότητά του, η σταθερότητά του, η βαθμίδωση του pH μεταξύ ιστών και αίματος, καθώς και από φυσιολογικούς παράγοντες του κάθε ασθενή. Η βαθμίδωση του pH δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τη κατανομή καθώς η διαφορά του pH μεταξύ ιστών και αίματος είναι μικρή. Από την άλλη, ιδιαίτερα καθοριστικός παράγοντας της κατανομής του φαρμάκου αποτελεί η σχετική δέσμευσή του από τις πρωτεΐνες του πλάσματος και τα φωσφολιπίδια [18], [25].

3. Μεταβολισμός (Metabolism)

Ο μεταβολισμός είναι η διαδικασία με την οποία τα φάρμακα μεταβάλλονται χημικά από μια λιποδιαλυτή μορφή κατάλληλη για απορρόφηση και κατανομή σε μια περισσότερο υδατοδιαλυτή και ασταθή μορφή, που είναι κατάλληλη για απέκκριση. Η διαδικασία εξαλείφει αποτελεσματικά το μητρικό φάρμακο [13].

Ο μεταβολισμός πραγματοποιείται σε διάφορα όργανα και ιστούς του σώματος, αλλά κυρίως στο τοίχωμα του εντέρου, στο νεφρό, στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και στο ήπαρ το οποίο αποτελεί την κύρια θέση του μεταβολισμού.

Οι μεταβολικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε δύο φάσεις: τη φάση I και τη φάση II. Στη φάση I ανήκουν οι αντιδράσεις που είτε εισάγουν, είτε αποκαλύπτουν μία δραστική ομάδα, που αποτελεί συχνά υπόστρωμα για τις αντιδράσεις της φάσης II [18], [25], [26], [27].

Κατά την φάση I, τα μόρια του φαρμάκου τροποποιούνται χημικά (με οξείδωση, αναγωγή ή υδρόλυση) για να γίνουν κατάλληλα για τις αντιδράσεις της δεύτερης φάσης ή για απέκκριση. Η οξείδωση είναι η συνηθέστερη αντίδραση της πρώτης φάσης του μεταβολισμού. Τα περισσότερα προϊόντα, είναι φαρμακολογικώς ανενεργά, αν και ορισμένα διατηρούν τη δραστηριότητά του φαρμάκου σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό, ενώ άλλα έχουν δραστηριότητα που το μητρικό φάρμακο δεν είχε. Έτσι, ενδέχεται οι μεταβολίτες ενός φαρμάκου να είναι ακόμα και τοξικοί ή καρκινογόνοι και να μεταβάλλουν λόγω αλληλεπίδρασης τον μεταβολισμό άλλων συγχωρηγούμενων φαρμάκων.

Στην φάση II, τα μόρια του μεταβολίτη της πρώτης φάσης (ή σε ορισμένες περιπτώσεις το αμετάβλητο φάρμακο) συνδυάζονται με ένα ενδογενές υπόστρωμα για να σχηματίσουν ένα ανενεργό συζυγές που είναι πολύ πιο υδατοδιαλυτό από τον μεταβολίτη. Οι αντιδράσεις δεύτερης φάσης μπορεί να περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων ακετυλίωση, μεθυλίωση κ.λ.π. [13], [29].

Ο μεταβολισμός επηρεάζει τόσο την αποτελεσματικότητα όσο και την ασφάλεια των φαρμάκων. Για αυτό το λόγο, είναι απαραίτητο να καθοριστεί πώς και με ποια ένζυμα μεταβολίζεται ένα πιθανό φάρμακο. Αυτή η γνώση

επιτρέπει την πρόβλεψη του κατά πόσο η ένωση μπορεί να προκαλέσει αλληλεπιδράσεις φαρμάκου – φαρμάκου ή να είναι ευαίσθητη σε έντονες διακυμάνσεις του μεταβολισμού λόγω γενετικών πολυμορφισμών. Παρόλα αυτά, ο μεταβολισμός είναι μία ιδιότητα που δύσκολα μπορεί να προβλεφθεί, μιας και ο ρυθμός μεταβολισμού φαρμάκων ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ατόμων, επηρεασμένος από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αυτός είναι ο κύριος λόγος στις διαφορές στη συγκέντρωση ορισμένων φαρμάκων στο πλάσμα μετά από μια τυπική δόση, η οποία οδηγεί σε μεγάλες διακυμάνσεις στην απόκριση του φαρμάκου [13], [22], [28].

4. Απέκκριση (Excretion)

Η απέκκριση είναι η διαδικασία με την οποία τα φάρμακα και οι μεταβολίτες τους αποβάλλονται από το σώμα. Μπορούν να φύγουν σε μορφή αποβαλλόμενου υγρού (κυρίως ούρα και χολή), στερεή (κόπρανα) ή αέρια (αποβαλλόμενος αέρας). Τα όργανα της απέκκρισης, με εξαίρεση τους πνεύμονες, εξαλείφουν αποτελεσματικότερα τις πολικές ενώσεις σε σχέση με ουσίες που εμφανίζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στα λιπίδια. Αυτό σημαίνει, ότι τα λιπόφιλα φάρμακα πρέπει πρώτα να μεταβολισθούν σε περισσότερο υδρόφιλα για να μπορέσουν να αποβληθούν εύκολα από τον οργανισμό.

Τα νεφρά αποτελούν τα πιο σημαντικά όργανα που συμμετέχουν στη διαδικασία της απέκκρισης, ενώ άλλα σημαντικά όργανα είναι το έντερο και οι πνεύμονες οι οποίοι συμβάλλουν στην απέκκριση αναισθητικών αερίων [18].

Πιο συγκεκριμένα, η απέκκριση ούρων είναι η συνηθισμένη οδός απομάκρυνσης για φάρμακα χαμηλού μοριακού βάρους που δεν μεταβολίζονται και είναι επαρκώς υδατοδιαλυτά για να αποφευχθεί η επαναπορρόφηση από το νεφρικό σωληνάριο. Μικροί υδατοδιαλυτοί μεταβολίτες που εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος μετά από

μεταβολισμό στο ήπαρ ή σε άλλα όργανα απεκκρίνονται επίσης μέσω αυτής της οδού.

Η απέκκριση των κοπράνων είναι η προτιμώμενη οδός αποβολής για φάρμακα μεγαλύτερου μοριακού βάρους, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που είναι συζευγμένα με γλυκουρονίδιο στο ήπαρ και οποιωνδήποτε φαρμάκων δεν απορροφώνται. Μόρια φαρμάκου ή μεταβολίτη που εισέρχονται στη χολή μετά από μεταβολισμό του ήπατος μεταφέρονται στον εντερικό αυλό, περνούν κάτω από το έντερο και εξαλείφονται στα κόπρανα. Εάν είναι ακόμα επαρκώς λιποδιαλυτά, μερικά μόρια αμετάβλητου φαρμάκου ή μεταβολίτη μπορεί να επαναρροφηθούν και να επανέλθουν στην πυλαία φλέβα. Αυτή η ανακύκλωση μεταξύ του ήπατος, της χολής, του εντέρου και της πυλαίας φλέβας είναι γνωστή ως η εντερο-ηπατική κυκλοφορία [13].

Τοξικότητα

Η τοξικότητα είναι μία σημαντική φαρμακοκινητική ιδιότητα. Στις 10.000 ενώσεις που συντίθενται για πιθανή φαρμακευτική δράση, μόνον 1-2 καταλήγουν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπευτική καθώς οι περισσότερες σταματούν στο βήμα των δοκιμασιών τοξικότητας.

Τοξικότητα μπορεί να εμφανίσουν τα ίδια τα φάρμακα ή οι μεταβολίτες τους [29].

Η τοξικότητα των φαρμάκων μπορεί να αναπτυχθεί σε φυσιολογικές θεραπευτικές δόσεις ενός φαρμάκου ή ως αποτέλεσμα οξείας υπερδοσολογίας. Σε μερικές περιπτώσεις, η τοξικότητα εμφανίζεται στην πλειονότητα των υπό θεραπεία ατόμων λόγω της φύσης του φαρμάκου (π.χ. κυτταροτοξικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για χημειοθεραπεία

καρκίνου), αλλά είναι σπάνια στην πλειονότητα των κοινώς συνταγογραφούμενων φαρμάκων όταν αυτά χρησιμοποιούνται στις συνιστώμενες δοσολογίες. Υπάρχει σημαντική μεταβλητότητα τόσο στη φύση όσο και στη σοβαρότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών και η τοξικότητα μπορεί να μειωθεί λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες που είναι γνωστό ότι αυξάνουν την ευαισθησία, όπως η ηλικία, η ταυτόχρονη ασθένεια ή το σωματικό βάρος, όταν επιλέγεται τόσο το φάρμακο όσο και η δόση. Οι γενετικοί παράγοντες μπορούν επίσης να ληφθούν υπόψη για ορισμένα φάρμακα [31].

Η δυσκολία ανάπτυξης μοντέλων που μπορούν να προβλέπουν την τοξικότητα οφείλεται στους ποικίλους μηχανισμούς που μπορούν να επιφέρουν τοξικά αποτελέσματα [15]. Πιο συγκεκριμένα, η τοξικότητα που προκαλείται είναι συνάρτηση τριών βασικών παραγόντων: της εγγενούς τοξικότητας που μπορεί να έχει μία χημική ουσία, της συγκέντρωσής της σε ένα συγκεκριμένο όργανο και της ικανότητας των συστημάτων άμυνας του ξενιστή [32].

ΒΑΣΙΚΕΣ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

[ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΙΜΑΤΟΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟ ΦΡΑΓΜΟ \(BBB\)](#)

Πριν φτάσει στην κυκλοφορία του αίματος, ένα φάρμακο διαχέεται μέσω των βιολογικών φραγμών που διαχωρίζουν το κυκλοφορούν αίμα από το υγρό που περιβάλλει τους ιστούς. Για τα στοματικώς χορηγούμενα φάρμακα, αυτό το εμπόδιο είναι το εντερικό επιθήλιο, ενώ η διέλευση φαρμάκων σχεδιασμένων να δράσουν στο επίπεδο του ΚΝΣ ρυθμίζεται περαιτέρω από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Blood-Brain-Barrier, BBB).

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός αποτελεί ένα από τα πιο σύνθετα και εκτενώς μελετημένα βιολογικά εμπόδια και η λειτουργία του συνίσταται στη διατήρηση της ακεραιότητας του εγκεφάλου έναντι πιθανών επιβλαβών ουσιών. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός αποτελείται από μία πυκνή διάταξη ενδοθηλιακών κύτταρων, τα οποία είναι στενά προσκολλημένα μεταξύ τους για να σχηματίσουν σφιχτά σημεία, περιορίζοντας τη διέλευση διαλυμένων ουσιών [3]. Επίσης, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός περιλαμβάνει και αντλίες εκροής (efflux pumps), όπως οι $P - \text{gp}$ - γλυκοπρωτεΐνες ($P - \text{gp}$), που αποτρέπουν την είσοδο μη χρήσιμων μορίων στον εγκέφαλο [15].

Πράγματι, η μεταφορά φαρμάκου περιορίζεται έντονα από αυτή την ιδιότυπη βιολογική δομή σε καθαρή παθητική διακυτταρική (transcellular) διάχυση. Στην πραγματικότητα, παρεμποδίζεται τελείως η παρακυττάρια (paracellular) μεταφορά ουσιών, δηλαδή η διέλευση δραστικών ουσιών διαμέσου των κενών μεταξύ κάθε ενδοθηλιακού κυττάρου. Συνεπώς, εκτός από τους ενεργούς μηχανισμούς μεταφοράς, των οποίων η εμφάνιση είναι δύσκολο να προβλεφθεί με βάση μόνο τη χημική δομή, τα φάρμακα μπορούν να διασχίσουν το BBB μόνο μέσω της παθητικής διακυτταρικής οδού [3].

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός επηρεάζεται από τη λιποφιλία. Αύξηση της λιποφιλίας μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της διείσδυσης μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η διείσδυση του ΚΝΣ εξαρτάται και από το μοριακό βάρος του φαρμάκου. Όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος μιας ένωσης, τόσο μειώνεται η ικανότητά της να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Οι δύο αυτές παράμετροι που επηρεάζουν τη διείσδυση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους [15].

Υπάρχουν πολλές *in vivo*, *ex vivo* και *in vitro* μέθοδοι για την εκτίμηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού των αναλυόμενων ουσιών. Ιστορικά, μια από τις πιο χρησιμοποιημένες και φημισμένες μεθόδους είναι ο προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής αίματος και εγκεφάλου, $\log BB$.

Το $\log BB$ ορίζεται ως:

$$\log BB = C_{Brain} / C_{Blood} \quad (1)$$

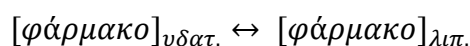
όπου C_{Brain} είναι η συγκέντρωση της ουσίας στους ιστούς του εγκεφάλου και C_{Blood} είναι η συγκέντρωσή της στο αίμα [15].

ΛΙΠΟΦΙΛΙΑ

Μία από τις πιο σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες που επηρεάζει τη βιολογική δράση ενός φαρμάκου είναι η λιποφιλία. Η ιδιότητά αυτή εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου ή ενός τμήματός του με ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Όπως ήδη προαναφέρθηκε, αποτελεί μία ιδιότητα που επηρεάζει πολλές ιδιότητες των φαρμάκων, όπως τη βιοδιαθεσιμότητα, τη διαλυτότητα, τη διαπερατότητα μέσω μεμβρανών και την υδρόφοβη σύνδεση του φαρμάκου με διάφορα μακρομόρια (π.χ. με υποδοχείς-στόχους, πρωτεΐνες του πλάσματος, μεταφορείς, ένζυμα του μεταβολισμού) με αποτέλεσμα να επηρεάζει τόσο τη φαρμακοκινητική όσο και το φαρμακοδυναμικό και τοξικολογικό προφίλ των φαρμακευτικών ενώσεων [1], [15], [20], [35].

ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΜΕΡΙΣΜΟΥ

Όταν ένα φάρμακο εισέλθει στον οργανισμό, κατανέμεται μεταξύ λιπιδικών και υδατικών φάσεων. Έτσι, η λιποφιλία μιας ένωσης ποσοτικοποιείται μετρώντας την έκταση της κατανομής του φαρμάκου μεταξύ μιας υδατικής φάσης και μιας λιπιδικής φάσης και περιγράφεται από την εξής ισορροπία:



Η σταθερά P καλείται συντελεστής μερισμού και εκφράζει το μέτρο της λιποφιλίας. Οι λιπιδικές φάσεις προσομοιώνονται με οργανικούς διαλύτες. Επομένως, ο συντελεστής μερισμού μπορεί να υπολογιστεί ως το πηλίκο της

συγκέντρωσης της αδιάστατης μονομερούς μορφής της ουσίας στην οργανική φάση ως προς την συγκέντρωσή της στο νερό:

$$P = \frac{C_{org}}{C_{υδατ}}$$

Στην πιο συνηθισμένη περίπτωση, χρησιμοποιείται ο λογάριθμος του συντελεστή μερισμού ($\log P$) και το σύστημα στο οποίο αναφέρεται είναι το σύστημα n-οκτανόλης-νερού. Αυτή η πειραματική τεχνική είναι γνωστή ως η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης (shake-flask method), και τα προκύπτοντα δεδομένα έχουν αποδειχθεί ότι παρέχουν μια χρήσιμη κλίμακα λιποφιλίας. Κατά τη διάρκεια της μεθόδου γίνεται διάλυση της ουσίας σε ένα μείγμα αμοιβαία προκορεσμένου ρυθμιστικού διαλύματος και οκτανόλης και ακολουθεί η επιλογή του κατάλληλου χρόνου μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων. Η κατανομή της ουσίας στις δύο φάσεις προσδιορίζεται με τη φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis Spectroscopy) [1], [34].

Η επιλογή του συγκεκριμένου συστήματος βασίστηκε στα παρακάτω κριτήρια [1], [20], [33]:

- Η n-οκτανόλη σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου ως δέκτης και ως δότης, ιδιότητα που προσομοιάζει σε πολλά βιολογικά συστήματα (μεμβράνες, πρωτεΐνες).
- Η n-οκτανόλη δεν απορροφά στο υπεριώδες, γεγονός που διευκολύνει τον πειραματικό προσδιορισμό.
- Είναι σχετικά εύκολος ο προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού, συγκριτικά με άλλα συστήματα διαλυτών.
- Η n-οκτανόλη δεν είναι τοξική, έχει ωστόσο δυσάρεστη γλυκερή οσμή.
- Η n-οκτανόλη είναι φτηνή.

Γενικά, μεγαλύτερες τιμές του $\log P$ αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη λιποφιλία. Εντούτοις, πολύ μεγάλες τιμές $\log P$ μπορεί να μην ευνοούν τη φαρμακολογική δράση. Για αυτό, στη βιβλιογραφία υπάρχουν επιθυμητά εύρη τιμών του $\log P$. Για παράδειγμα, για την βιοδιαθεσιμότητα, το βέλτιστο εύρος $\log P$ είναι μεταξύ 0 – 3. Για την επίτευξη καλής απορρόφησης έχει προταθεί εύρος $\log P$ -1 – 5.9, ενώ όταν οι τιμές του $\log P$ είναι μεγαλύτερες του 3 αυξάνεται η πιθανότητα μιας ουσίας να εμφανίσει τοξικότητα. Ωστόσο, υπάρχουν επιτυχημένες φαρμακευτικές ενώσεις που μπορεί να μην εμπίπτουν σε αυτά τα εύρη λιποφιλίας, με αποτέλεσμα να διαπιστώνεται πως τα εύρη λιποφιλίας αποτελούν προτάσεις και θα πρέπει να δίνεται προσοχή όταν χρησιμοποιούνται [15].

ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

Εντούτοις, ο συντελεστής μερισμού δεν λαμβάνει υπόψη τον ιονισμό των μορίων. Για ενώσεις που μπορούν να ιονιστούν, χρησιμοποιείται ο συντελεστής κατανομής (D), που εκφράζει την αναλογία της συγκέντρωσης ισορροπίας της μη ιονισμένης ένωσης στη φάση της *n*-οκτανόλης προς τη συνολική συγκέντρωση τόσο της ουδέτερης όσο και της ιονισμένης μορφής της ένωσης στην υδατική φάση σε ένα συγκεκριμένο pH. Είναι κοινή πρακτική η μέτρηση της D μιας ένωσης χρησιμοποιώντας μία υδατική φάση ρυθμισμένη σε pH 7.4, ίσο δηλαδή με του αίματος ($\log D_{7.4}$) [33].

$$D = C_{οργ} / \sum C_{υδατ}$$

Ο συντελεστής μερισμού είναι πάντα μεγαλύτερος ή ίσος από το συντελεστή κατανομής, δηλαδή $\log P \geq \log D$. Θεωρώντας ότι πρακτικά στην *n*-οκτανόλη κατανέμεται μόνο η αδιάστατη μορφή, ισχύει η σχέση:

$$\log P = \log D + Q$$

όπου Q είναι ένας διορθωτικός παράγοντας που εξαρτάται από το pK_a της ουσίας και το pH του περιβάλλοντος [1].

Όπως και στην περίπτωση του συντελεστή μερισμού, έχουν προταθεί ορισμένα εύρη $\log D$ έτσι ώστε μία φαρμακευτική ένωση να εμφανίζει επιθυμητές ιδιότητες. Η βέλτιστη περιοχή λιποφιλίας κυμαίνεται σε εύρος $\log D$ 1 – 3. Για την βιοδιαθεσιμότητα, το επιθυμητό εύρος του $\log D$ είναι πάλι μεταξύ 1 και 3. Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση του $\log P$, τα εύρη των τιμών $\log D$ αποτελούν απλά προτάσεις και κατά το σχεδιασμό των φαρμάκων θα πρέπει να δίνεται προσοχή στις τιμές λιποφιλίας τους [15].

ΑΡΧΗ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η λιποφιλία, εκτός της καθοριστικής σημασίας της για τη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική συμπεριφορά των φαρμάκων, σχετίζεται επίσης με ανεπιθύμητα φαινόμενα. Αυξημένη λιποφιλία μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενα όπως:

- I) Παρατεταμένη παραμονή μιας ουσίας στον οργανισμό, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αθροιστικών φαινομένων.
- II) Αύξηση της τοξικότητας, δεδομένου ότι η τοξικότητα σχετίζεται θετικώς γραμμικά με τη λιποφιλία.
- III) Επαγωγή των μικροσωμικών ενζύμων, λόγω της τάσης του οργανισμού για άμυνα έναντι λιπόφιλων ουσιών.
- IV) Προβλήματα στη μορφοποίηση του τελικού προϊόντος.

Με βάση τις παραπάνω διαπιστώσεις έχει διατυπωθεί η αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας, σύμφωνα με την οποία *“ο σχεδιασμός των φαρμάκων πρέπει να στοχεύει σε ενώσεις που ναι μεν προκαλούν την επιθυμητή δράση, έχουν όμως την ελάχιστη προς τούτο λιποφιλία”*.

Η αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας είναι σημαντική για ενώσεις που διέρχονται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δρουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η άριστη τιμή λιποφιλίας ($\log P$ ή $\log D_{7.4}$) για τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι περίπου ίση με 2 [1].

Αργότερα, ο Lipinski πρότεινε κάποιους σημαντικούς όρους που πρέπει να ισχύουν για να είναι μια ουσία ενεργή κατά τη χορήγηση της από το στόμα. Σύμφωνα με τον κανόνα των πέντε του Lipinski, μια ένωση για να είναι δραστική κατά τη χορήγηση της από το στόμα, θα πρέπει [1], [2]:

- Να έχει $MB < 500$
- Να μην έχει πάνω από 5 ομάδες δότες δεσμών υδρογόνου
- Να μην έχει πάνω από 10 ομάδες δέκτες δεσμών υδρογόνου
- Να έχει τιμή υπολογιστικού $\log P < 5$

Έχει αποδειχθεί πως η λιποφιλία αποτελεί μία σύνθετη ιδιότητα με διπλό χαρακτήρα. Η διπλή φύση της λιποφιλίας εκφράζεται μέσα από την παρακάτω σχέση [1], [36]:

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

Σύμφωνα, με την παραπάνω σχέση φαίνεται πως η λιποφιλία δεν αποτελεί ταυτόσημη έννοια με την υδροφοβία. Αντιθέτως, η υδροφοβία αποτελεί μία από της συνιστώσες της, που περιγράφει την ένωση των μη πολικών ομάδων ή μορίων σε ένα υδατικό περιβάλλον ως αποτέλεσμα της αμοιβαίας άπωσης τους από το νερό έτσι ώστε να καταλαμβάνουν τη μικρότερη δυνατή επιφάνεια [16].

Άλλη μία παράμετρος που μπορεί να έχει επίδραση στη λιποφιλία είναι η διαμόρφωση των μορίων, οπότε η παραπάνω εξίσωση διαμορφώνεται ως εξής [1]:

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

ΌΓΚΟΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

Ο όγκος κατανομής (V_d) είναι μια θεωρητική έννοια που συνδέει την ποσότητα του φαρμάκου στο σώμα (δόση, X) με τη συγκέντρωση (C) του φαρμάκου που μετριέται (στο αίμα). Ο όγκος κατανομής είναι ο όγκος του υγρού που απαιτείται ώστε η συγκέντρωση του φαρμάκου που υπάρχει στον οργανισμό να είναι ίση με την ποσότητα του φαρμάκου που βρίσκεται στο αίμα ή στο πλάσμα.

$$V_d = X / C$$

Ο όγκος κατανομής δεν αντιστοιχεί σε κάποιον υπαρκτό όγκο στον οργανισμό. Τα φάρμακα, όπως οι υδατοδιαλυτές ενώσεις, οι οποίες περιορίζονται ενδοαγγειακά, έχουν μικρό όγκο κατανομής (περίπου ίσο με τον ενδοαγγειακό όγκο), ενώ τα λιπόφιλα φάρμακα που κατανέμονται στους ιστούς έχουν μεγάλο όγκο κατανομής (που μπορεί να είναι τόσο μεγάλος ώστε να υπερβαίνει συνολικού νερού του σώματος). Η δέσμευση των φαρμάκων με την πρωτεΐνη του πλάσματος μειώνει τον φαινόμενο όγκο κατανομής και η δέσμευση ιστού αυξάνει τον φαινόμενο όγκο κατανομής.

Η πρακτική αξία της έννοιας του όγκου κατανομής έγκειται στον υπολογισμό της αρχικής δόσης φαρμάκου:

$$X = C \cdot V_d$$

Μία σημαντική συνέπεια της ανάπτυξης και των ωριαίων μεταβολών στη σύνθεση του σώματος, είναι οι διαφορές στον όγκο της κατανομής. Γενικά, τα νεογνά και τα βρέφη έχουν μεγαλύτερους όγκους κατανομής για υδατοδιαλυτά φάρμακα και μικρότερους όγκους για λιπόφιλα φάρμακα. Για παράδειγμα, ο όγκος κατανομής της γενταμικίνης είναι 0.5 έως 1.2 L / kg σε νεογνά και βρέφη σε σύγκριση με 0.2 έως 0.3 L / kg στους ενήλικες. Έτσι, ο όγκος κατανομής δεν μπορεί να προσδιοριστεί για τις υποψήφιες φαρμακευτικές ενώσεις, μιας και η τιμή του δεν είναι συγκεκριμένη και μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον βιολογικό στόχο [34], [36].

ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η χρωματογραφία είναι μια σημαντική τεχνική που επιτρέπει τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον καθαρισμό των συστατικών ενός μείγματος για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση.

Η χρωματογραφία βασίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μίας σταθερής και μίας κινητής. Οι παράγοντες που είναι αποτελεσματικοί σε αυτή τη διαδικασία διαχωρισμού περιλαμβάνουν τα μοριακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την προσρόφηση (υγρή-στερεή), την κατανομή (υγρή-στερεή) και τη συγγένεια ή τις διαφορές μεταξύ των μοριακών τους βαρών [1], [19]. Λόγω αυτών των διαφορών, ορισμένα συστατικά του μίγματος παραμένουν περισσότερο στην στατική φάση και κινούνται αργά στο σύστημα χρωματογραφίας, ενώ άλλα περνούν γρήγορα σε κινητή φάση και αφήνουν το σύστημα πιο γρήγορα [2].

Με βάση αυτή την προσέγγιση, τρία συστατικά αποτελούν τη βάση της

χρωματογραφίας:

- Σταθερή φάση: Η φάση αυτή αποτελείται πάντοτε από μια στερεή φάση ή από ένα στρώμα υγρού προσροφημένου στην επιφάνεια ενός στερεού.
- Κινητή φάση: Αυτή η φάση αποτελείται πάντα από υγρό ή αέριο συστατικό.
- Διαχωρισμένα μόρια

Ο τύπος αλληλεπίδρασης μεταξύ της στατικής φάσης, της κινητής φάσης και των ουσιών που περιέχονται στο μείγμα είναι το βασικό συστατικό για τον διαχωρισμό των μορίων. Οι μέθοδοι χρωματογραφίας που βασίζονται στην κατανομή είναι πολύ αποτελεσματικές στον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση μικρών μορίων όπως αμινοξέα, υδατάνθρακες και λιπαρά οξέα. Από την άλλη, οι χρωματογραφίες συγγένειας είναι πιο αποτελεσματικές στον διαχωρισμό μακρομορίων όπως νουκλεϊκά οξέα και των πρωτεϊνών.

Στην περίπτωση που η κινητή φάση είναι υγρή, ονομάζεται υγρή χρωματογραφία (LC), και αν είναι αέρια τότε ονομάζεται αέρια χρωματογραφία (GC). Η αέρια χρωματογραφία εφαρμόζεται για αέρια και μίγματα πτητικών υγρών και στερεά υλικά. Η υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιείται ειδικά για θερμικά ασταθή και μη πτητικά δείγματα [18], [20].

ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια δημοφιλής μέθοδος ανάλυσης επειδή είναι εύκολο να χρησιμοποιηθεί και δεν

περιορίζεται από την πτητικότητα ή τη σταθερότητα της ένωσης του δείγματος. Όπου διατίθενται πόροι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και πιο πολύπλοκες μέθοδοι όπως η HPLC η οποία διαχωρίζει τις βιταμίνες που είναι διαλυτές σε λιπαρά και υδατοδιαλυτά δείγματα τροφίμων, ακολουθούμενες από φασματοφωτομετρικές ή φθοριομετρικές μεθόδους. Η στατική φάση σε αυτή την περίπτωση είναι στερεή ή υγρή και η κινητή φάση είναι υγρή. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε σχέση με την απλή υγρή χρωματογραφία στο ότι η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας αυξάνοντας έτσι την αποδοτικότητα του διαχωρισμού [38].

Διακρίνεται σε δύο είδη: χρωματογραφία υψηλής απόδοσης κανονικής και αντιστρόφου φάσεως. Στην κανονικής φάσης χρησιμοποιείται ως πληρωτικό υλικό κάποιο πολικό υλικό και στην κινητή φάση κάποιος μη πολικός διαλύτης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μία πολική ένωση να αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τη στατική φάση και ο χρόνος έκλουσής της να είναι μεγαλύτερος από μία λιγότερο πολική. Αντίθετα, στην HPLC αντιστρόφου φάσεως τα λιγότερο πολικά μόρια εκλούνται αργότερα από τα πιο πολικά λόγω της προσρόφησής τους από την υδρόφοβη στατική φάση.

Η υγρή χρωματογραφία στηρίζεται στη δυναμική ισορροπία των χημικών ενώσεων του δείγματος μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης και ο χρόνος έκλουσης εκφράζει την κατανομή των ενώσεων μεταξύ των δύο φάσεων [5], [34].

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ – ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η χρωματογραφία χρησιμοποιείται σε αρκετά στάδια του σχεδιασμού φαρμάκων σε συνδυασμό και με άλλες τεχνικές. Στα πρώτα στάδια εφαρμόζεται σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας, προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των ενώσεων και να γίνει η ταυτοποίησή τους. Χρησιμοποιείται επίσης, σε μεταγενέστερα στάδια για τον έλεγχο της

συγκέντρωσης ουσιών στα βιολογικά υγρά. Τέλος, χρησιμοποιείται και στον τελικό έλεγχο ποιότητας, καθαρότητας και σταθερότητας των ενώσεων.

Πλέον, αποτελεί σημαντικό εργαλείο και για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων υποψηφίων ενώσεων. Η σύνθεση ειδικών στατικών και κινητών φάσεων και η εφαρμογή κατάλληλων πειραματικών συνθηκών (pH, θερμοκρασία) μπορεί να μετατρέψει τη χρωματογραφία σε βιομιμητικό σύστημα, προσομοιώνοντας την πορεία που ακολουθεί το φάρμακο στο εσωτερικό του ανθρώπινου οργανισμού. Η χρήση της ξεκίνησε τη δεκαετία του 1990 και η χρήση της στηρίζεται στην ομοιότητα χρωματογραφικών και βιολογικών διαδικασιών.

Η φιλοσοφία της είναι η εξής: πολλές φαρμακοκινητικές ιδιότητες είναι το αποτέλεσμα δυναμικής ισορροπίας μεταξύ υδατικών φάσεων (αίμα) και στατικών φάσεων (ιστοί, μεμβράνες). Αντίστοιχα, και η υδροχρωματογραφία στηρίζεται σε δυναμική ισορροπία μεταξύ χημικών ενώσεων του δείγματος μεταξύ στατικής και κινητής φάσης και ο χρόνος έκλουσης εκφράζει την κατανομή τους μεταξύ αυτών των φάσεων.

Για την μελέτη και την πρόβλεψη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων κάθε ένωσης προσδιορίζεται πειραματικά ο παράγοντας κατακράτησης K σε 100% υδατική φάση ο οποίος υπολογίζεται ως εξής:

$$\log k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (2)$$

όπου t_r ο χρόνος ανάσχεσης της ένωσης και t_0 ο χρόνος ανάσχεσης μιας μη κατακρατούμενης από την στήλη ουσίας (π.χ. κίτρινο νάτριο).

Συνήθως οι παράγοντες κατακράτησης χρησιμοποιούνται με την λογαριθμική τους μορφή, δηλαδή ως $\log K_w$ (όπου ο δείκτης w υποδηλώνει το νερό (water), δηλαδή 100% υδατική φάση) [5].

Έχουν αναπτυχθεί τρία βασικά είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας, τα οποία διαφέρουν ως προς την στατική φάση που χρησιμοποιείται: Χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών, Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών, μικυλλιακή Χρωματογραφία [5].

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ (IMMOBILIZED ARTIFICIAL MEMBRANE)

Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane) χρησιμοποιεί ως στήλες μονοστοιβάδες φωσφολιπιδίων συνδεδεμένων με ομοιοπολικό δεσμό σε μηχανικά σταθερό σκελετό πήγματος πυριτίας. Αρχικά, οι στήλες αυτές παρασκευάστηκαν με ακινητοποίηση της φωσφατιδυλοχολίνης σε υπόστρωμα πήγματος οξειδίου του πυριτίου και παρουσίαζαν θέματα χημικής σταθερότητας. Στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν μικρά μόρια που επικάλυπταν τις ομάδες που προκαλούσαν την αστάθεια και τις δευτερεύουσες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Τα μόρια αυτά ήταν αρχικά η γλυκιδόλη και το μεθυλογλυκολικό οξύ και αργότερα για την αύξηση της επιφανειακής πυκνότητας των φωσφολιπιδίων

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Με τη χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών γίνεται προσπάθεια προσομοίωσης της πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμάκων στο πλάσμα ή φαινομένων που επηρεάζονται από τη σύνδεση αυτή.

Γενικότερα είναι γνωστό ότι ένα φάρμακο στον οργανισμό δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες του αίματος. Ωστόσο, μόνο ένα ελεύθερο, «αδέσμευτο» φάρμακο μπορεί να διέλθει από τους βιολογικούς φραγμούς και να κατευθυνθεί στον ιστό-στόχο. Τα φαρμακευτικά μόρια, λοιπόν, που έχουν μεγάλη πρωτεϊνική σύνδεση μπορεί αφενός να εμποδίσουν την κατανομή στους ιστούς και το θεραπευτικό αποτέλεσμα και αφετέρου να προκαλέσουν πρόβλημα στον μεταβολισμό και την απέκκριση του φάρμακου.

Η κύρια πρωτεΐνη που μας αφορά στη μελέτη αυτού του φαινομένου είναι η ανθρώπινη λευκωματίνη (Human Serum Albumin, *HSA*) η οποία περιέχεται με αφθονία στο πλάσμα του αίματος και δεσμεύει κυρίως όξινες ενώσεις. Μία άλλη πολύ σημαντική πρωτεΐνη που βρίσκεται στο πλάσμα είναι η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (*AGP*) η οποία δεσμεύει πολλές ουδέτερες λιπόφιλες και βασικές ενώσεις.

Οι χρωματογραφικές στήλες ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος *HSA*, *AGP* μπορούν να προσομοιάσουν το φαινόμενο της πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμακευτικών μορίων. Η πρόβλεψη του φαινομένου αυτού στηρίζεται στο ότι η *HSA* σε υπόστρωμα πυριτίας μπορεί να διατηρήσει την ίδια διαμόρφωση και εξειδίκευση στην πρωτεϊνική σύνδεση όπως η φυσική *HSA* του πλάσματος. Για τον υπολογισμό του φαρμάκου που συνδέεται με την λευκωματίνη χρησιμοποιείται ο συντελεστής ανάσχεσης *K* που προκύπτει από την χρήση της χρωματογραφικής στήλης *HSA* σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% HSA = 100 \cdot \frac{k}{k+1} \quad (3)$$

Να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος τύπος, βέβαια, ισχύει για μη ειδική σύνδεση οπότε και ο χρόνος έκλουσης της ένωσης είναι ανεξάρτητος από την ποσότητά του στον χρωματογράφο.

Ως κινητή φάση στις εμπορικά διαθέσιμες στήλες *HSA*, *AGP* χρησιμοποιείται κυρίως διάλυμα φωσφορικών ιόντων. Για τις ενώσεις για τις οποίες υπάρχει ισχυρή κατακράτηση από τις στήλες μπορεί να προστεθεί στην κινητή φάση ισοπροπανόλη ή ακετονιτρίλιο.

Το εύρος pH των στηλών κυμαίνεται σε 5.2 – 7.0 για την στήλη *HSA* και μεταξύ 4.2 – 7.0 για την *AGP* [5].

ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΜΙΚΥΛΛΙΑΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (BIOPARTITIONING MICELLAR CHROMATOGRAPHY)

Η βιομιμητική μικυλλιακή υδροχρωματογραφία χρησιμοποιεί τις συμβατικές στήλες αντιστρόφου φάσεως που χρησιμοποιούνται και στην κανονική υδροχρωματογραφία. Η διαφορά έγκειται στο ότι η κινητή φάση σε αυτή την περίπτωση περιέχει μικύλλια σε ρυθμιστικό διάλυμα. Τα μικύλλια σχηματίζονται με την προσθήκη ενός τασιενεργού όταν η συγκέντρωση γίνει μεγαλύτερη από την κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (CMC, Critical Micellar Concentration). Τα μικύλλια δηλαδή αποτελούν συσσωματώματα τασιενεργών που ενώνονται τα υδρόφοβα τμήματα μεταξύ τους και έτσι, τα υδρόφιλα προσανατολίζονται προς τα έξω. Η προσθήκη του τασιενεργού τότε έχει ως αποτέλεσμα στην κινητή φάση να περιέχονται εκτός από τα μονομερή του, και τα μικύλλια, αυτά δηλαδή τα συσσωματώματα της επιφανειοδραστικής ουσίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μονομερή του τασιενεργού να τροποποιούν την επιφάνεια της χρωματογραφικής στήλης διότι προσροφούνται πάνω της είτε με υδρόφοβες είτε με σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις. Αντίστοιχα, και οι κυτταρικές μεμβράνες έχουν ένα υδρόφοβο κι ένα υδρόφιλο κομμάτι. Έτσι, η προσομοίωση που επιτυγχάνεται είναι αρκετά ικανοποιητική.

Από την άλλη, τα μικύλλια έχουν μία υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια που έρχεται σε επαφή με την υδατική φάση της κινητής φάσης κι ένα υδρόφοβο εσωτερικό εντός του οποίου μπορούν να εισέρχονται τα λιπόφιλα φάρμακα και έτσι, να αυξάνεται η κατανομή τους στην κινητή φάση. Η άλλη βιολογική προσομοίωση που επιτυγχάνεται λοιπόν είναι η προσομοίωση των ενδοκυττάρων και των εξωκυττάρων υγρών καθώς τα φωσφολιπίδια, η χοληστερόλη, τα λιπαρά οξέα και τα τριγλυκερίδια που υπάρχουν στα βιολογικά υγρά σχηματίζουν μικύλλια με τις πρωτεΐνες.

Ένα από τα συνηθισμένα τασιενεργά που χρησιμοποιούνται είναι το Brij – 35 (polyoxythelene (23) lauryl ether) το οποίο είναι μη ιοντικό. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί τα Tween - 20 (μη ιοντικό), SDS (sodium dodecyl sulfate) (ανιοντικό) και CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) (κατιοντικό).

Συνεπώς, είναι κατανοητό ότι η μικυλλιακή χρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της απορρόφησης φαρμάκων από το στόμα, της έκτασης της πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμάκων στο αίμα, του όγκου κατανομής, της διαπερατότητας φαρμάκων/ρυπαντών μέσω του δέρματος καθώς και της ικανότητας διέλευσης φαρμάκων μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [5].

Κάτι αξιοσημείωτο στη μέθοδο αυτή είναι ότι έχει βρεθεί ότι η ύπαρξη οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση, σε μικρή όμως συγκέντρωση, μπορεί να ενισχύσει κατά πολύ την αποδοτικότητα της μεθόδου, παράγοντας πιο ευκρινείς κορυφές και μειώνοντας τους χρόνους παραμονής των ενώσεων. Αυτό οφείλεται στη μείωση της πολικότητας του διαλύτη έκλουσης αλλά και στη μείωση της ποσότητας μονομερών του τασιενεργού που προσροφώνται στη στατική φάση της στήλης. Πολύ σημαντικό, είναι η συγκέντρωση αυτή να μην υπερβαίνει κάποιο όριο το οποίο ποικίλλει ανάλογα με το τασιενεργό και προκύπτει βάσει πειραματικών δεδομένων αλλά γενικά, δεν υπερβαίνει το 15 – 20 % v/v , καθώς το μικυλλιακό σύστημα διαταράσσεται και

χαρακτηρίζεται ως υπομικυλλιακό. Συνήθως, οι οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στο διαλύτη έκλουσης, είναι η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο αλλά και για πιο ισχυρή δράση οι 1 – βουτανόλη, 1 – πεντανόλη.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας πειραματικής διαδικασίας είναι η μελέτη του μηχανισμού έκλουσης φαρμακευτικών μορίων με χρήση της μικκυλιακής χρωματογραφίας με το τασενεργό *SDS*, καθώς και η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου ως εργαλείο εκτίμησης των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων φαρμάκων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκαν:

- KH_2PO_4 ($\geq 99.5\%$, Chem-Lab)
- $Na_2HPO_4 \cdot 2 \cdot H_2O$ ($\geq 99.5\%$, Merck)
- *SDS* (Chem-Lab) και
- νερό υψηλής καθαρότητας (High Purity Water, HPW)

Το HPW ελήφθη μέσω ενός συστήματος καθαρισμού νερού EASYpure II (Barnstead International, USA). Ως δείκτης νεκρού χρόνου της στήλης χρησιμοποιήθηκε κιτρικό νάτριο $\cdot 2 \cdot H_2O$ ($\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich).

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Αντλία: HPLC Pump k-1001, της εταιρίας Knauer, ρυθμισμένη σε ροή $1 \text{ mL}/\text{min}$.

Στήλη: Αντιστρόφου φάσεως Discovery HS C18, της εταιρίας Supelco, με διαστάσεις $15 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm}$ και μέγεθος σωματιδίων $5 \mu\text{m}$.

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

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

Διαχειριστής διαλύτη: Solvent Organizer K-1500, της Knauer. Η συσκευή αυτή έχει σωλήνες που ξεκινούν από τα δοχεία των διαλυμάτων και καταλήγουν στον απαερωτή. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην ρύθμιση της κινητής φάσης όταν στο σύστημα εισάγονται περισσότερα του ενός διαλύματα, αλλά στην περίπτωσή μας, που ο διαλύτης έκλουσης ήταν ένας μας ενδιέφερε η ροή ενός μόνο σωλήνα.

Υδατόλουτρο: Stirred water bath WB-4MS, της Biosan, ρυθμισμένο στους $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Το υδατόλουτρο δεν είναι μέρος του HPLC συστήματος, αλλά η στήλη βρίσκεται μόνιμα εντός αυτού προκειμένου να προσεγγίζει την θερμοκρασία

του ανθρωπίνου σώματος, που είναι φυσιολογικά 37.0 °C, ώστε τα αποτελέσματα να αντικατοπτρίζουν την συμπεριφορά των φαρμάκων εντός του οργανισμού.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η παρασκευή του διαλύτη έκλουσης γινόταν με προσθήκη 5.76 g *SDS* στα 500 mL διαλύματος. Η κρίσιμη τιμή μικυλλιοποίησης είναι 8.2 mM, επομένως, χρησιμοποιήθηκε 5 φορές η τιμή αυτή [50]. Η ρύθμιση του pH γινόταν με υδατικό διάλυμα 0.77 g KH_2PO_4 και 3.44 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 \cdot H_2O$, στο 7.4 και 5.5. Για την προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος, τα δύο συστατικά διαλύονταν σε 400 mL υπερκάθαρου νερού, με συνεχή ανάδευση και το pH ρυθμιζόταν στην επιθυμητή τιμή με προσθήκη στάγδην αραιωμένου διαλύματος HCl. Έπειτα στο διάλυμα αυτό προστίθονταν 5.76 g *SDS* και τελικά το διάλυμα συμπληρωνόταν με υπερκάθαρο νερό μέχρι τα 500mL.

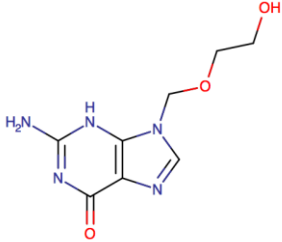
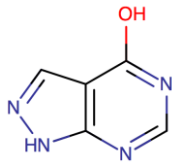
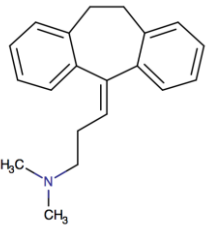
Για το κάθε φάρμακο το πείραμα επαναλαμβανόταν δύο ή τρεις φορές, αν οι χρόνοι κατακράτησης είχαν μεγάλες αποκλίσεις και λαμβανόταν ο μέσος όρος των μετρήσεων. Ο λογάριθμος του συντελεστή ανάσχεσης της κάθε ουσίας υπολογίστηκε από τη σχέση $logk = \frac{t_r - t_0}{t_0}$.

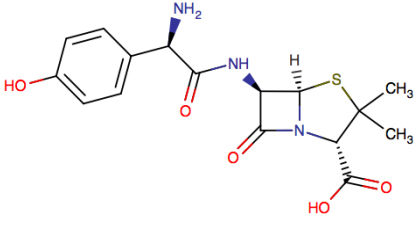
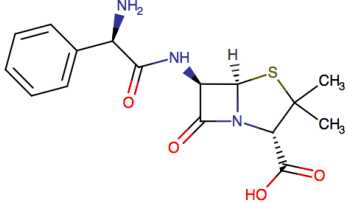
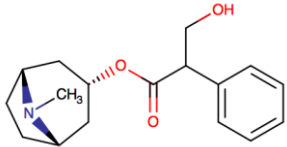
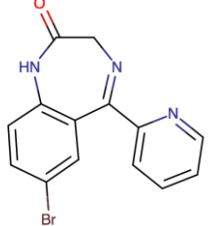
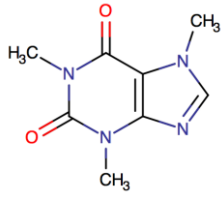
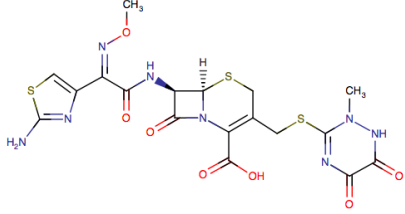
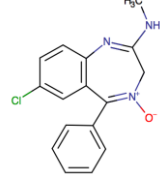
Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικές τιμές pH, στο 7.4, που είναι το pH του αίματος και στο 5.5, που αντιστοιχεί σε περιοχές κοντά στο λεπτό έντερο. Σε περιβάλλον με χαμηλό pH τα ελαφρώς όξινα φάρμακα εμφανίζουν μειωμένο ιονισμό και ευνοείται η ουδέτερη μορφή τους. Κατά συνέπεια έχουν αυξημένη λιποφιλία, η οποία ενισχύει την συγγένειά τους με την στήλη και άρα, την κατακράτησή τους. Επομένως τέτοια φάρμακα αναμένεται να έχουν μεγαλύτερους χρόνους έκλουσης σε pH 5.5. Αντίστοιχα

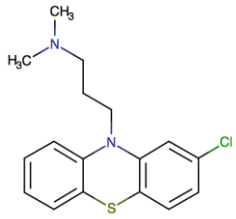
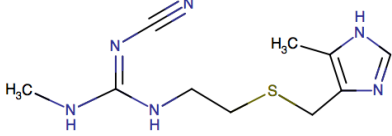
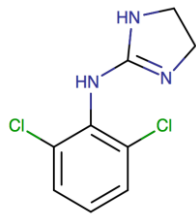
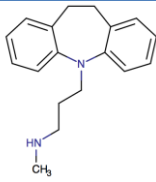
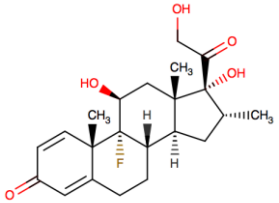
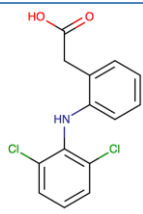
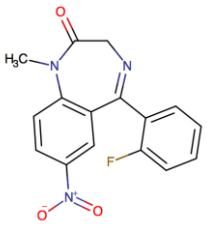
στον ανθρώπινο οργανισμό, ο μειωμένος ιονισμός ενός φαρμάκου συνεπάγεται μειωμένη απορροφησιμότητα $per os$. Γι' αυτό τον λόγο παρουσιάζει ενδιαφέρον η εξέταση των όξινων, αλλά και των αμφολυτικών φαρμάκων στο pH του λεπτού εντέρου, ώστε να διερευνηθεί η ικανότητα της μικκυλιακής χρωματογραφίας να περιγράψει την συμπεριφορά τους. Τα ουδέτερα φάρμακα δεν επηρεάζονται από τις αλλαγές του pH, ενώ τα ελαφρώς βασικά εμφανίζουν μειωμένο ιονισμό με αύξηση του pH, οπότε η μελέτη τους στο 5.5 ήταν περιττή.

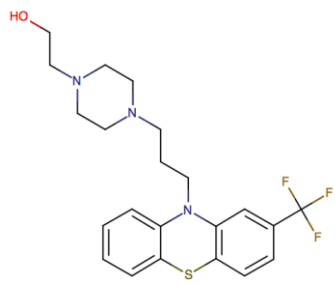
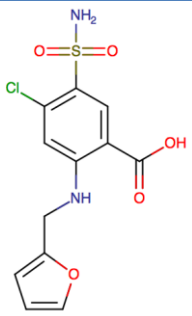
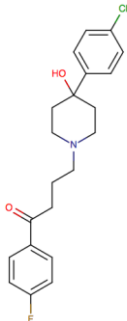
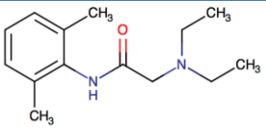
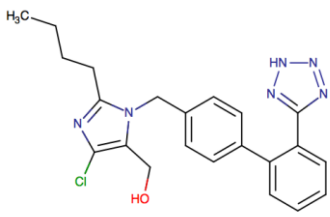
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα φάρμακα που μελετήθηκαν και συγκεκριμένα, ο τύπος τους, η φαρμακολογική τους δράση και η δομή τους.

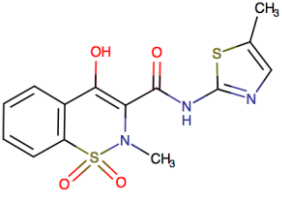
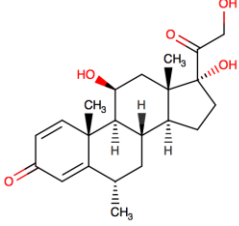
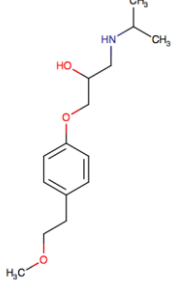
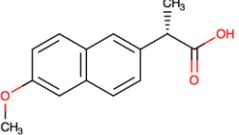
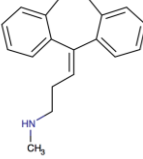
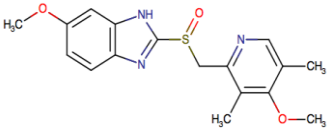
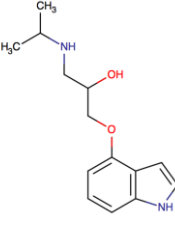
Πίνακας 2: Φάρμακα που μελετήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους [40]

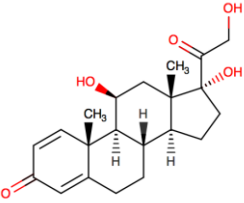
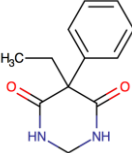
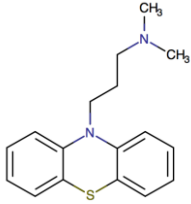
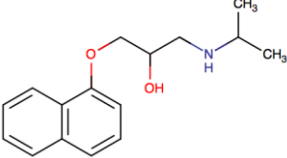
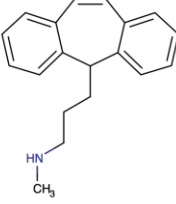
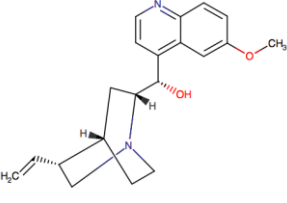
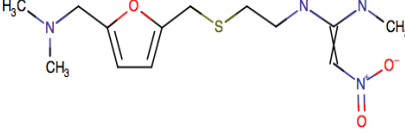
| Φάρμακο | Τύπος | Φαρμακολογική δράση | Δομή |
|----------------------|----------|-------------------------------------|---|
| Acyclovir | Ουδέτερο | Αντιικό |  |
| Allopurinol | Ουδέτερο | Φάρμακα κατά της ουρικής αρθρίτιδας |  |
| Amitriptyline | Βάση | Αντικαταθλιπτικό και αναλγητικό |  |

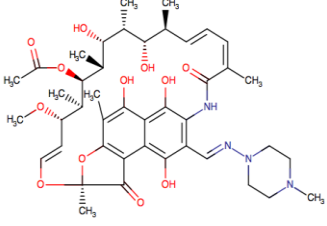
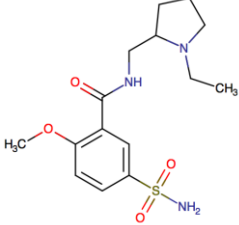
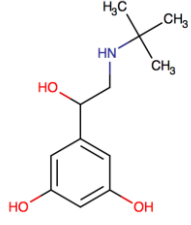
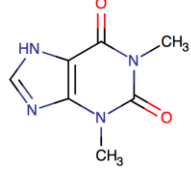
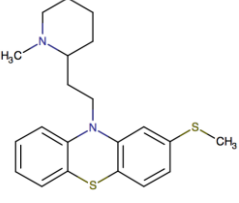
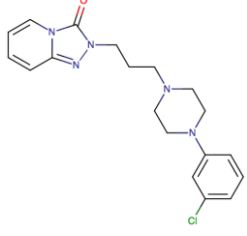
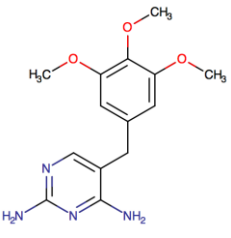
| | | | |
|-------------------------|---------------|---|---|
| Amoxicillin | Οξύ | Αντιβιοτικό |  |
| Ampicillin | Οξύ | Αντιβιοτικό |  |
| Atropine | Βάση | Φάρμακα για λειτουργικές γαστρεντερικές διαταραχές, οφθαλμολογικό |  |
| Bromazepam | Ουδέτερο | Αγχολυτικό |  |
| Caffeine | Ουδέτερο | Διεγερτικό του ΚΝΣ |  |
| Ceftriaxone | Αμφολύτη ς | Αντιβιοτικό |  |
| Chlordiazepoxide | Ουδέτερο | Αγχολυτικό |  |

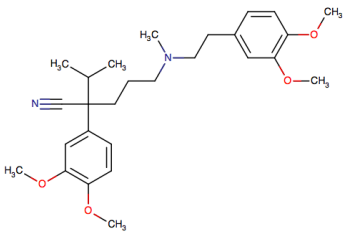
| | | | |
|-----------------------|----------|---|---|
| Chlorpromazine | Βάση | Αντιψυχωσικό |  |
| Cimetidine | Βάση | Αντιόξινο |  |
| Clonidine | Βάση | Αντιυπερτασικό |  |
| Desipramine | Βάση | Αντικαταθλιπτικό |  |
| Dexamethasone | Ουδέτερο | Κορτικοστεροειδές |  |
| Diclofenac | Οξύ | Δερματολογικό, αντιφλεγμονώδες και αντιρευματικό, οφθαλμολογικό |  |
| Flunitrazepam | Ουδέτερο | Αγχολυτικό |  |

| | | | |
|---------------------|------|--|---|
| Fluphenazine | Βάση | Αντιψυχωσικό |  |
| Furosemide | Οξύ | Διουρητικό |  |
| Haloperidol | Βάση | Αντιψυχωσικό |  |
| Lidocaine | Βάση | Φάρμακα για τη θεραπεία των καρδιακών παθήσεων, αγγειοπροστατευτικό , δερματολογικό, αναισθητικό |  |
| Losartan | Οξύ | Αντιυπερτασικό |  |

| | | | |
|---------------------------|----------|--------------------------------------|---|
| Meloxicam | Οξύ | Αντιφλεγμονώδες |  |
| Methylprednisolone | Ουδέτερο | Δερματολογικό, κορτικοστεροειδές |  |
| Metoprolol | Βάση | Αποκλειστής β αδρενεργικών υποδοχέων |  |
| Naproxen | Οξύ | Αντιφλεγμονώδες |  |
| Nortriptyline | Βάση | Αντικαταθλιπτικό |  |
| Omeprazole | Ουδέτερο | Αντιόξινο |  |
| Pindolol | Βάση | Αποκλειστής β αδρενεργικών υποδοχέων |  |

| | | | |
|----------------------|----------|--|---|
| Prednisolone | Ουδέτερο | Αντιδιαρροϊκό, αντιφλεγμονώδες, αγγειοπροστατευτικό , δερματολογικό, κορτικοστεροειδές |  |
| Primidone | Ουδέτερο | Ανιεπιληπτικό |  |
| Promazine | Βάση | Αντιψυχωσικό |  |
| Propranolol | Βάση | Αποκλειστής β αδρενεργικών υποδοχέων |  |
| Protriptyline | Βάση | Αντικαταθλιπτικό |  |
| Quinidine | Βάση | Φάρμακα για τη θεραπεία των καρδιακών παθήσεων, αντιαρρυθμικό |  |
| Ranitidine | Βάση | Αντιόξινο |  |

| | | | |
|---------------------|----------|--|---|
| Rifampicin | Βάση | Αντιμυκοβακτηριδιακό, αντιφυματικό |  |
| Sulpiride | Βάση | Αντιψυχωσικό |  |
| Terbutaline | Βάση | Φάρμακα για τις αποφρακτικές παθήσεις των αεροφόρων οδών |  |
| Theophylline | Ουδέτερο | Φάρμακα για τις αποφρακτικές παθήσεις των αεροφόρων οδών |  |
| Thioridazine | Βάση | Αντιψυχωσικό |  |
| Trazodone | Ουδέτερο | Αντικαταθλιπτικό |  |
| Trimethoprim | Βάση | Αντιβιοτικό |  |

| | | | |
|------------------|------|----------------------------------|--|
| Verapamil | Βάση | Αποκλειστής διαύλων ασβεστίου |  |
|------------------|------|----------------------------------|--|

Στους Πίνακες 3 και 4 υπάρχουν για pH 7.4 και 5.5 οι συντελεστές μερισμού και κατανομής, καθώς και οι συντελεστές κατακράτησης σε χρωματογραφικές στήλες BMC και IAM.DD2, που λήφθηκαν από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο ίδιο εργαστήριο και δημοσιευθεί και δεν περιλαμβάνουν όλα τα φάρμακα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία [41], [42], [43]. Οι παράμετροι $\log P$ και $\log D$ αντλήθηκαν από το λογισμικό ADME Boxes 3.0. Περιλαμβάνονται επίσης τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου (f^+ , f^- , f_{zw}^+ , f_{zw}^-) των φαρμάκων, τα οποία δηλώνουν το ποσοστό ιονισμού μιας ένωσης.

Πίνακας 3: Συντελεστές μερισμού και κατανομής και κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου σε pH=7.4

| Φάρμακο | Τύπος | $\log P$ | $\log D$ | f^+ | f^- | f_{zw}^+ | f_{zw}^- |
|--------------------|----------|----------|----------|-------|-------|------------|------------|
| Acyclovir | N | -1.56 | -1.56 | 0.000 | 0.009 | 0.000 | 0.009 |
| Allopurinol | N | -0.55 | -0.55 | 0.000 | 0.010 | 0.000 | 0.010 |
| Amoxicillin | A | -1.71 | -2.56 | 0.000 | 0.531 | 0.469 | 1.000 |
| Ampicillin | A | -1.13 | -4.00 | 0.000 | 0.530 | 0.470 | 1.000 |
| Atropine | B | 1.83 | -0.91 | 0.996 | 0.000 | 0.996 | 0.000 |
| Bromazepam | N | 1.65 | 1.65 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Caffeine | N | -0.07 | -0.07 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

| | | | | | | | |
|---------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ceftriaxone | Z | -0.46 | -3.08 | 0.000 | 0.221 | 0.779 | 1.000 |
| Chlordiazepoxide | N | 1.14 | 1.14 | 0.002 | 0.000 | 0.002 | 0.000 |
| Cimetidine | B | 0.40 | 0.35 | 0.218 | 0.000 | 0.218 | 0.000 |
| Clonidine | B | 1.59 | 0.97 | 0.779 | 0.000 | 0.779 | 0.000 |
| Dexamethasone | N | 1.83 | 1.83 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Diclofenac | A | 4.04 | 1.15 | 0.000 | 0.999 | 0.000 | 0.999 |
| Flunitrazepam | N | 2.06 | 2.06 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Furosemide | A | 2.03 | -0.69 | 0.000 | 1.000 | 0.000 | 1.000 |
| Haloperidol | B | 4.28 | 2.98 | 0.933 | 0.000 | 0.933 | 0.000 |
| Lidocaine | B | 2.26 | 1.71 | 0.779 | 0.000 | 0.779 | 0.000 |
| Losartan | A | 3.09 | 1.16 | 0.000 | 0.933 | 0.066 | 0.999 |
| Meloxicam | A | 3.02 | 0.09 | 0.000 | 0.999 | 0.000 | 0.999 |
| Methylprednisolone | N | 1.95 | 1.95 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Metoprolol | B | 1.80 | -0.37 | 0.994 | 0.000 | 0.994 | 0.000 |
| Naproxen | A | 3.18 | 0.33 | 0.000 | 0.999 | 0.000 | 0.999 |
| Nortriptyline | B | 4.04 | 1.70 | 0.998 | 0.000 | 0.998 | 0.000 |
| Omeprazole | N | 2.30 | 2.30 | 0.001 | 0.054 | 0.001 | 0.054 |
| Pindolol | B | 1.75 | -0.33 | 0.994 | 0.000 | 0.994 | 0.000 |
| Prednisolone | N | 1.62 | 1.62 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Primidone | N | 0.91 | 0.91 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Propranolol | B | 2.98 | 1.26 | 0.994 | 0.000 | 0.994 | 0.000 |
| Quinidine | B | 3.44 | 2.41 | 0.946 | 0.000 | 0.946 | 0.000 |
| Ranitidine | B | 0.27 | -0.86 | 0.933 | 0.000 | 0.933 | 0.000 |
| Rifampicin | B | 2.39 | 1.68 | 0.635 | 0.041 | 0.778 | 0.184 |

| | | | | | | | |
|---------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Sulpiride | B | 0.62 | -1.26 | 0.984 | 0.000 | 0.988 | 0.004 |
| Terbutaline | B | 0.08 | -1.35 | 0.980 | 0.000 | 0.980 | 0.000 |
| Theophylline | N | -0.02 | -0.02 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Thioridazine | B | 5.90 | 3.34 | 0.991 | 0.000 | 0.991 | 0.000 |
| Trazodone | N | 2.90 | 2.54 | 0.218 | 0.000 | 0.218 | 0.000 |
| Trimethoprim | B | 0.91 | 0.66 | 0.469 | 0.000 | 0.469 | 0.000 |

Πίνακας 4: Συντελεστές μερισμού και κατανομής και κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου σε
pH=7.4

| Φάρμακο | Τύπος | logP | logD | f+ | f- | fzw+ | fzw- |
|-----------------------|--------------|-------------|-------------|-----------|-----------|-------------|-------------|
| Amitriptyline | B | 5.04 | 2.06 | 1.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 |
| Ampicillin | A | -1.13 | -3.67 | 0.001 | 0.016 | 0.984 | 0.999 |
| Ceftriaxone | Z | -0.46 | -2.97 | 0.001 | 0.004 | 0.996 | 0.999 |
| Chlorpromazine | B | 5.35 | 2.25 | 1.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 |
| Clonidine | B | 1.59 | -0.73 | 0.996 | 0.000 | 0.996 | 0.000 |
| Desipramine | B | 4.90 | 1.82 | 1.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 |
| Diclofenac | A | 4.40 | 3.17 | 0.000 | 0.943 | 0.000 | 0.943 |
| Fluphenazine | B | 4.36 | 2.06 | 0.995 | 0.000 | 0.995 | 0.000 |

| | | | | | | | |
|----------------------|----------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Furosemide | A | 2.03 | 0.03 | 0.000 | 0.990 | 0.000 | 0.990 |
| Losartan | A | 3.09 | 3.34 | 0.073 | 0.156 | 0.829 | 0.912 |
| Meloxicam | A | 3.02 | 1.88 | 0.000 | 0.963 | 0.007 | 0.970 |
| Naproxen | A | 3.18 | 1.95 | 0.000 | 0.940 | 0.000 | 0.940 |
| Pindolol | B | 1.75 | -1.24 | 1.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 |
| Promazine | B | 4.55 | 1.52 | 1.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 |
| Protriptyline | B | 4.89 | -0.33 | 0.998 | 0.000 | 0.998 | 0.000 |
| Verapamil | B | 3.83 | 0.85 | 1.000 | 0.000 | 1.000 | 0.000 |

Όπως ήδη αναφέρθηκε, στο ίδιο εργαστήριο έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες που δεν περιλαμβάνουν όλα τα φάρμακα της παρούσας εργασίας, περιλαμβάνουν, ωστόσο, αρκετά από αυτά. Τα αποτελέσματα από αυτές τις έρευνες παρουσιάζονται (για όσα φάρμακα υπάρχουν) στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Συντελεστές κατακράτησης άλλων τύπων χρωματογραφιών (BMC, ακινητοποιημένων μεμβρανών)

| Φάρμακο | Τύπος | logKSDS | logKTween | logKBrij-35 | logKIAM.DD2 | f+ | f- |
|------------------|----------|---------|-----------|-------------|-------------|-------|-------|
| Acyclovir | N | -0.330 | -0.461 | -0.497 | -0.269 | 0.000 | 0.009 |

| | | | | | | | |
|---------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| Allopurinol | N | -0.213 | -0.250 | -0.017 | -0.280 | 0.000 | 0.010 |
| Amoxicillin | A | -1.554 | -1.266 | -0.817 | -0.290 | 0.000 | 0.531 |
| Ampicillin | A | 0.140 | -0.660 | -0.370 | 0.040 | 0.000 | 0.530 |
| Atropine | B | 1.447 | 0.110 | | 1.120 | 0.996 | 0.000 |
| Bromazepam | N | 1.303 | 1.296 | 1.117 | | 0.000 | 0.000 |
| Caffeine | N | 0.656 | 0.054 | 0.077 | 0.260 | 0.000 | 0.000 |
| Ceftriaxone | Z | -0.876 | -0.727 | -0.580 | -0.520 | 0.000 | 0.221 |
| Chlordiazepoxide | N | 0.433 | 1.827 | 1.347 | 1.860 | 0.002 | 0.000 |
| Cimetidine | B | 1.234 | 0.335 | 0.370 | 0.840 | 0.218 | 0.000 |
| Clonidine | B | 1.452 | | | 1.116 | 0.779 | 0.000 |
| Dexamethasone | N | 1.276 | 1.624 | 1.177 | | 0.000 | 0.000 |
| Diclofenac | A | 0.841 | 1.465 | 1.150 | 2.462 | 0.000 | 0.999 |
| Flunitrazepam | N | 1.815 | 1.483 | 1.260 | | 0.000 | 0.000 |
| Furosemide | A | -0.250 | 1.372 | 0.843 | 1.319 | 0.000 | 1.000 |
| Haloperidol | B | 1.673 | 1.883 | 1.700 | | 0.933 | 0.000 |
| Lidocaine | B | 1.777 | 1.391 | 0.860 | 1.270 | 0.779 | 0.000 |
| Losartan | A | 0.287 | 1.479 | 0.970 | | 0.000 | 0.933 |
| Meloxicam | A | 0.411 | 1.422 | 0.967 | 1.400 | 0.000 | 0.999 |
| Methylprednisolone | N | 1.401 | 1.701 | 1.193 | | 0.000 | 0.000 |
| Metoprolol | B | 1.823 | 0.463 | 0.367 | | 0.994 | 0.000 |
| Naproxen | A | 0.153 | 0.714 | 0.697 | | 0.000 | 0.999 |
| Nortriptyline | B | 2.291 | 2.165 | 1.410 | | 0.998 | 0.000 |

| | | | | | | | |
|---------------------|----------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| Omeprazole | N | 1.530 | 1.484 | 1.130 | | 0.001 | 0.054 |
| Pindolol | B | 1.303 | 0.678 | 0.390 | 1.470 | 0.994 | 0.000 |
| Prednisolone | N | 0.331 | 1.264 | 1.067 | | 0.000 | 0.000 |
| Primidone | N | 0.784 | 0.724 | | 0.656 | 0.000 | 0.000 |
| Propranolol | B | 2.273 | 1.729 | 1.210 | | 0.994 | 0.000 |
| Quinidine | B | 1.966 | | 1.237 | 2.340 | 0.946 | 0.000 |
| Ranitidine | B | 1.102 | -0.368 | -0.373 | | 0.933 | 0.000 |
| Rifampicin | B | 1.476 | | | 1.622 | 0.635 | 0.041 |
| Sulpiride | B | 0.860 | -0.013 | -0.237 | 1.040 | 0.984 | 0.000 |
| Terbutaline | B | 1.092 | -0.017 | -0.060 | 0.780 | 0.980 | 0.000 |
| Theophylline | N | -0.236 | -0.469 | -0.103 | -0.080 | 0.000 | 0.000 |
| Thioridazine | B | 1.401 | 2.224 | 1.827 | 3.980 | 0.991 | 0.000 |
| Trazodone | N | 1.712 | 2.326 | 1.430 | 2.340 | 0.218 | 0.000 |
| Trimethoprim | B | 1.365 | 1.075 | 0.733 | 1.494 | 0.469 | 0.000 |

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι συντελεστές κατακράτησης $\log K_{SDS}$ των φαρμάκων που μελετήθηκαν παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 6). Τα φάρμακα haloperidol, lidocaine, metoprolol, nortriptyline, omeprazole, propranolol, quinidine, verapamil μετρήθηκαν με οργανικό διαλύτη και η εξαγωγή του $\log k$ στη συνέχεια, έγινε με γραμμική παρεμβολή.

Πίνακας 6: Πειραματικοί συντελεστές κατακράτησης σε pH=7.4. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση 3 διαδοχικών προσδιορισμών

| Φάρμακο | Τύπος | logKSDS,7.4 |
|--------------------|-------|--------------|
| Acyclovir | N | -0.33 ± 0.05 |
| Allopurinol | N | -0.21 ± 0.04 |
| Amoxicillin | A | -1.55 ± 0.09 |
| Ampicillin | A | 0.14 ± 0.03 |
| Atropine | B | 1.45 ± 0.02 |
| Bromazepam | N | 1.30 ± 0.02 |
| Caffeine | N | 0.66 ± 0.02 |
| Ceftriaxone | Z | -0.88 ± 0.07 |
| Chlordiazepoxide | N | 0.43 ± 0.03 |
| Cimetidine | B | 1.23 ± 0.03 |
| Clonidine | B | 1.45 ± 0.02 |
| Dexamethasone | N | 1.28 ± 0.02 |
| Diclofenac | A | 0.84 ± 0.02 |
| Flunitrazepam | N | 1.82 ± 0.01 |
| Furosemide | A | -0.25 ± 0.04 |
| Haloperidol | B | 1.67 ± 0.03 |
| Lidocaine | B | 1.78 ± 0.02 |
| Losartan | A | 0.29 ± 0.04 |
| Meloxicam | A | 0.41 ± 0.03 |
| Methylprednisolone | N | 1.40 ± 0.02 |
| Metoprolol | B | 1.82 ± 0.02 |
| Naproxen | A | 0.15 ± 0.03 |
| Nortriptyline | B | 2.29 ± 0.04 |

| | | |
|---------------------|----------|--------------|
| Omeprazole | N | 1.53 ± 0.02 |
| Pindolol | B | 1.30 ± 0.02 |
| Prednisolone | N | 0.33 ± 0.04 |
| Primidone | N | 0.78 ± 0.02 |
| Propranolol | B | 2.27 ± 0.02 |
| Quinidine | B | 1.97 ± 0.01 |
| Ranitidine | B | 1.10 ± 0.02 |
| Rifampicin | B | 1.48 ± 0.02 |
| Sulpiride | B | 0.86 ± 0.02 |
| Terbutaline | B | 1.09 ± 0.02 |
| Theophylline | N | -0.24 ± 0.04 |
| Thioridazine | B | 1.40 ± 0.02 |
| Trazodone | N | 1.71 ± 0.02 |
| Trimethoprim | B | 1.36 ± 0.02 |

Πίνακας 7: Πειραματικοί συντελεστές κατακράτησης σε pH=5.5

| Φάρμακο | Τύπος | logKSDS,5.5 |
|-----------------------|--------------|--------------------|
| Amitriptyline | B | 1.83 ± 0.02 |
| Ampicillin | A | 0.71 ± 0.02 |
| Ceftriaxone | Z | -1.51 ± 0.09 |
| Chlorpromazine | B | 1.77 ± 0.02 |
| Clonidine | B | 1.22 ± 0.02 |

| | | |
|----------------------|----------|-------------|
| Desipramine | B | 1.90 ± 0.02 |
| Diclofenac | A | 1.70 ± 0.02 |
| Fluphenazine | B | 1.24 ± 0.02 |
| Furosemide | A | 0.33 ± 0.03 |
| Losartan | A | 1.09 ± 0.02 |
| Meloxicam | A | 1.65 ± 0.02 |
| Naproxen | A | 1.42 ± 0.02 |
| Pindolol | B | 1.06 ± 0.02 |
| Promazine | B | 1.99 ± 0.03 |
| Protriptyline | B | 1.85 ± 0.02 |
| Verapamil | B | 2.29 ± 0.04 |

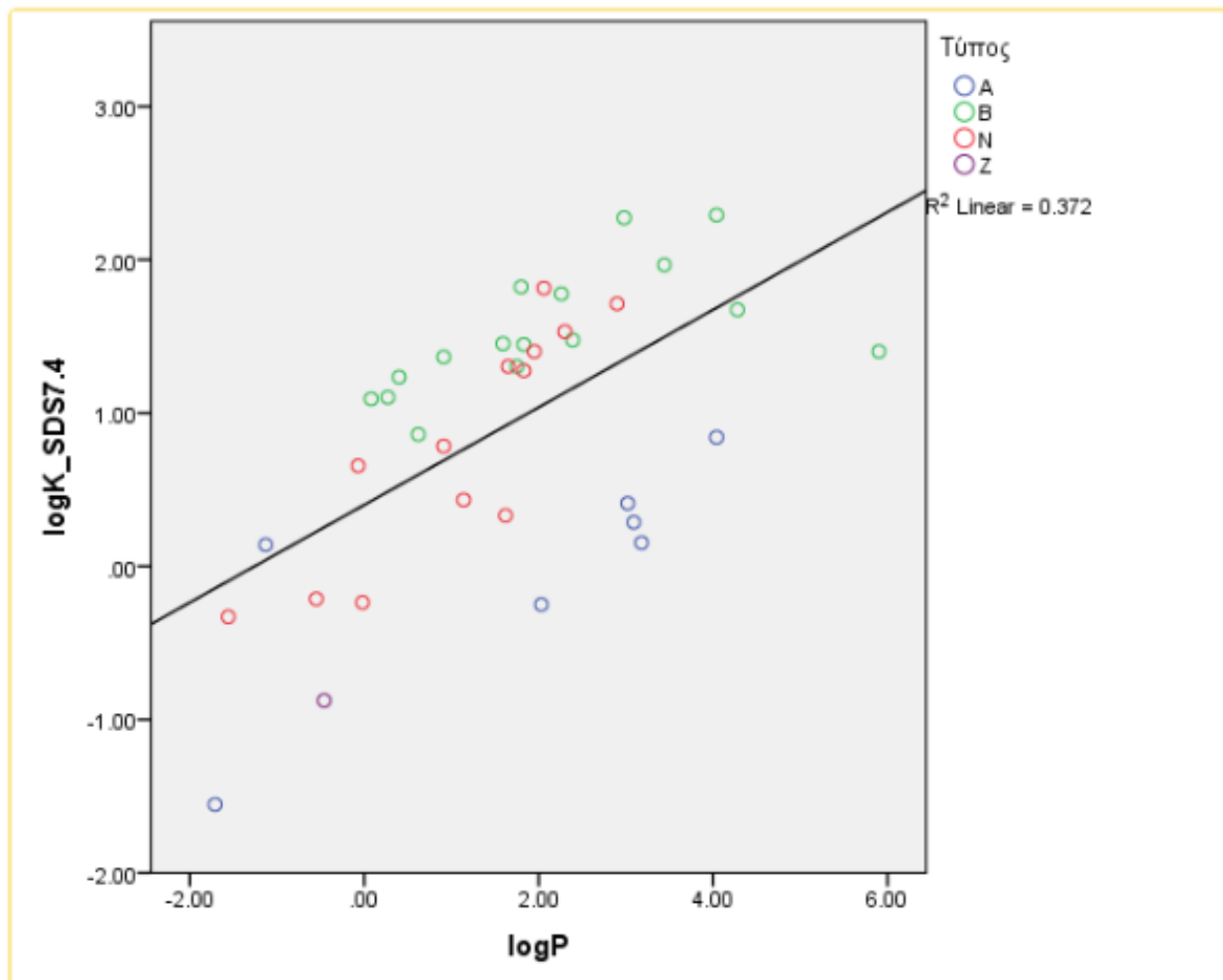
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα παραπάνω αποτελέσματα εξετάστηκαν ως προς την συσχέτισή τους με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής αυτών αλλά και με μικυλλιακή χρωματογραφία με Brij - 35, Tween - 20 και χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών IAM.DD2.

Η αξιολόγηση της μικυλλιακής χρωματογραφίας με *SDS* ως εργαλείο στην εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων γίνεται κυρίως από τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν, τα φάρμακα διαχωρίζονται χρωματικά ως εξής: Οξύ (A), Βάση (B), Ουδέτερο (N), αμφολύτης (Z).

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΜΕΡΙΣΜΟΥ ΟΚΤΑΝΟΛΗΣ-ΝΕΡΟΥ ($\log P$)



Διάγραμμα 1: Συσχέτιση των $\log K_{SDS}$ με τους συντελεστές μερισμού σε pH=7.4

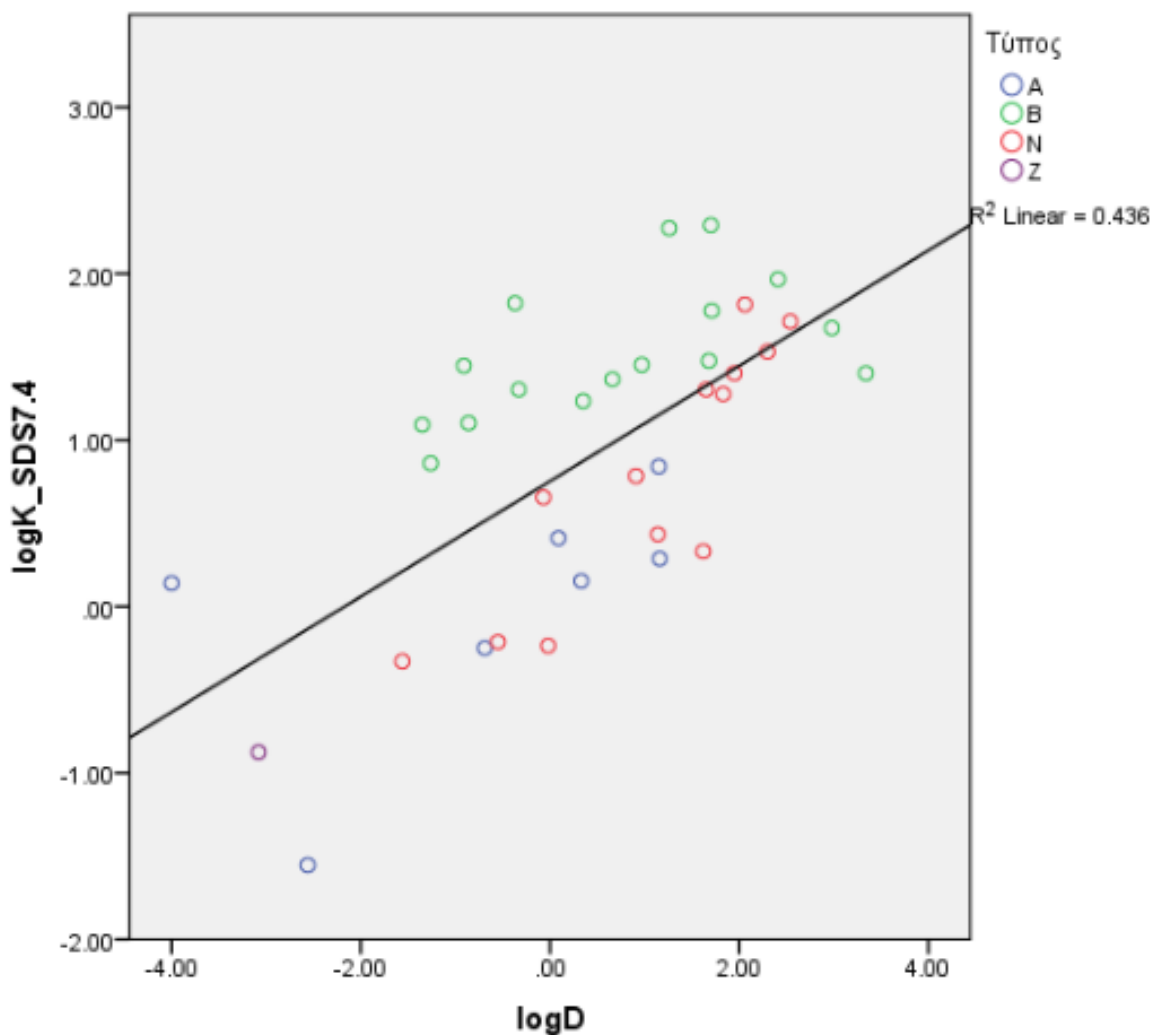
Η εξίσωση που προκύπτει από την γραμμική παλινδρόμηση είναι η εξής:

$$\log k_{SDS,7.4} = 0.318(\pm 0.070) \cdot \log P + 0.400(\pm 0.164) \quad (4)$$

με $R^2 = 0.372, N = 37, F = 20.732$

Η συσχέτιση δεν κρίνεται καθόλου ικανοποιητική μιας και το R^2 είναι πάρα πολύ μικρό. Παρατηρούμε, επίσης, ότι δεν υπάρχει ξεκάθαρη ομαδοποίηση οξέων και βάσεων.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΟΚΤΑΝΟΛΗΣ-ΝΕΡΟΥ ($\log D$)



Διάγραμμα 2: Συσχέτιση των $\log k_{SDS}$ με τους συντελεστές κατανομής σε pH=7.4

Η εξίσωση που προκύπτει από την γραμμική παλινδρόμηση είναι η εξής:

$$\log k_{SDS,7.4} = 0.347(\pm 0.067) \cdot \log D + 0.753(\pm 0.116) \quad (5)$$

με $R^2 = 0.436, N = 37, F = 27.065$

Η συσχέτιση είναι καλύτερη σε αυτή την περίπτωση, γεγονός που σχετίζεται με το ότι ο συντελεστής κατανομής λαμβάνει υπ'όψιν και τον ιονισμό των μορίων και εκφράζει ακριβέστερα την κατάστασή τους στο υδατικό διάλυμα. Επιπλέον, παρατηρείται μεγαλύτερη ομαδοποίηση οξέων – βάσεων γεγονός που οφείλεται στο ότι το τασιενεργό είναι ανιοντικό και αναπτύσσονται ηλεκτροστατικές δράσεις ανάλογα με το φορτίο της κάθε ένωσης.

Πιο αναλυτικά, εισάγοντας τους παράγοντες f^+, f^- οι οποίοι αποτελούν διόρθωση στις τιμές του συντελεστή μερισμού προκύπτουν τα ακόλουθα.

$$\log k_{SDS,7.4} = 0.296(\pm 0.049) \cdot \log D + 0.959(\pm 0.196) \cdot f^+ - 0.332(\pm 0.256) \cdot f^- + 0.475(\pm 0.130) \quad (6)$$

με $R^2 = 0.732, N = 37, F = 30.090$

Το f^- δεν είναι στατιστικώς σημαντικό σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% επομένως αφαιρώντας το, προκύπτει τελικά η εξίσωση:

$$\log k_{SDS,7.4} = 0.309(\pm 0.048) \cdot \log D + 1.059(\pm 0.181) \cdot f^+ + 0.375(\pm 0.105) \quad (7)$$

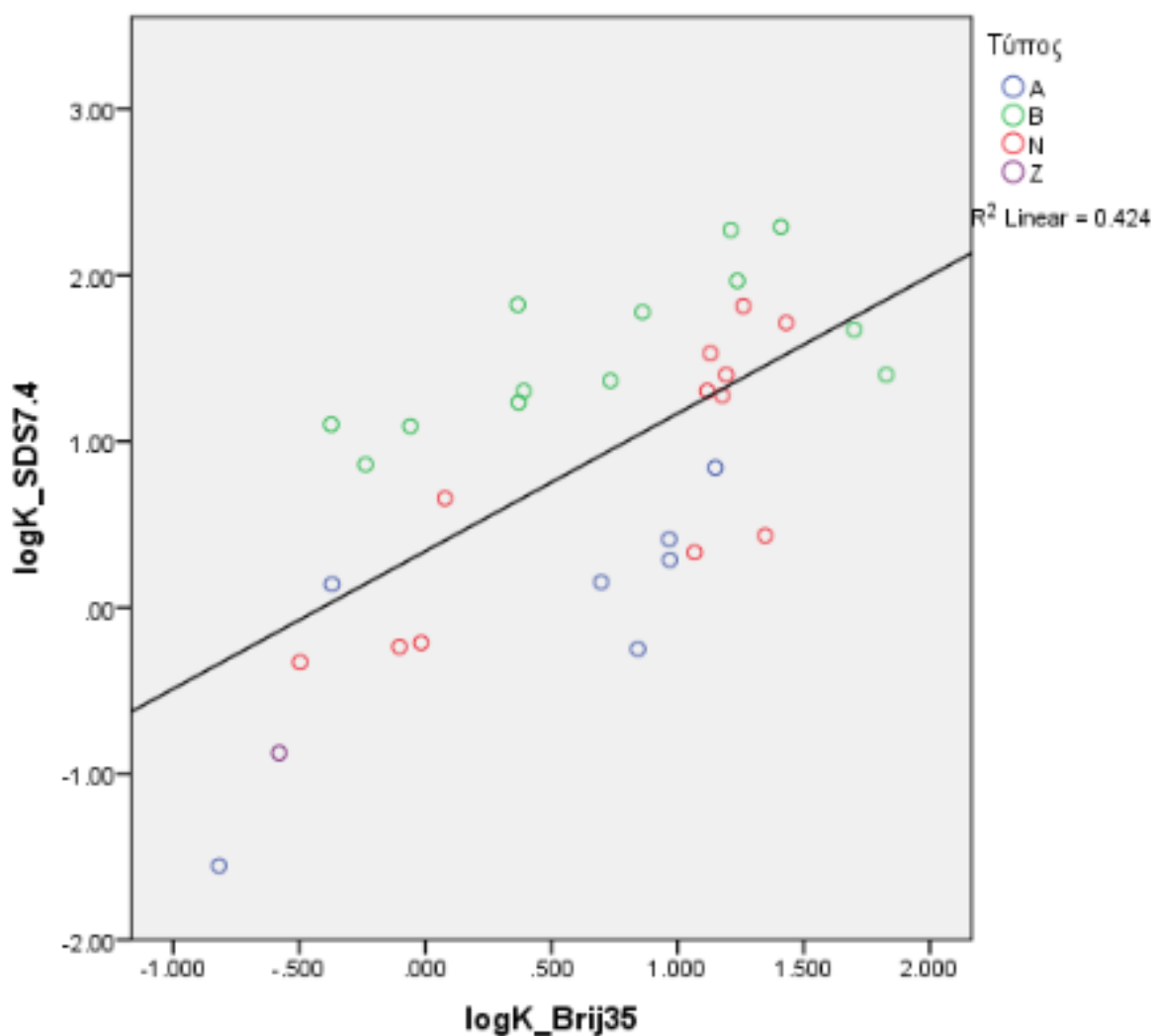
με $R^2 = 0.719, N = 37, F = 43.437$

Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 έχει βελτιωθεί σημαντικά, γεγονός αναμενόμενο γιατί εφόσον το τασιενεργό είναι ανιοντικό έχει πολύ μεγάλη αλληλεπίδραση

και συγκράτηση βάσεων που είναι θετικά φορτισμένες. Έτσι, ο παράγοντας f^+ είναι λογικό να βελτιώνει τόσο τη συσχέτιση και να είναι στατιστικά σημαντικός.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟ BRIJ-35

Για τη σύγκριση των δύο μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα του Πίνακα 5.



Διάγραμμα 3: Συσχέτιση των $\log K_{SDS}$ με το $\log K_{Brij-35}$ σε pH=7.4

Η εξίσωση που προκύπτει από την γραμμική παλινδρόμηση είναι η εξής:

$$\log K_{SDS7.4} = 0.829(\pm 0.174) \cdot \log K_{Brij-35} + 0.339(\pm 0.168) \quad (8)$$

με $R^2 = 0.424, N = 33, F = 22.797$

Η συσχέτιση κρίνεται μέτρια καθώς παρόλο που αποτελούν διαφορετικές εκδοχές της ίδιας μεθόδου, το Brij-35 είναι μη ιοντικό σε αντίθεση με το SDS.

Για αυτό τον λόγο, εισάγοντας τους παράγοντες f^+, f^- αναμένεται βελτίωση της συσχέτισης:

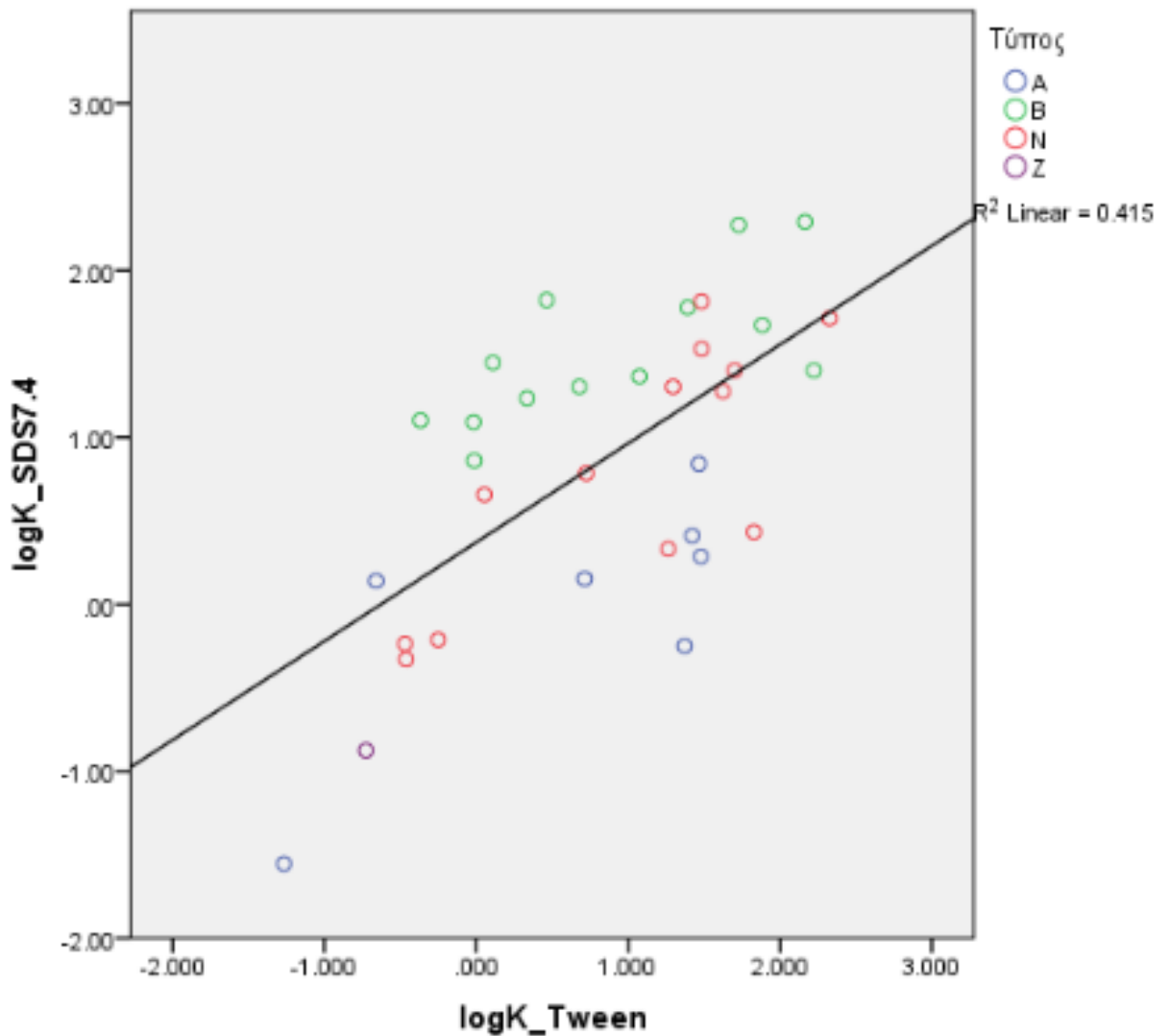
$$\log K_{SDS,7.4} = 0.755(\pm 0.116) \cdot \log K_{Brij-35} + 0.867(\pm 0.205) \cdot f^+ - 0.678(\pm 0.250) \cdot f^- + 0.216(\pm 0.145) \quad (9)$$

με $R^2 = 0.764, N = 33, F = 31.073$

Αξίζει να σημειωθεί ότι το SDS μεγαλώνει αισθητά το εύρος των χρόνων κατακράτησης (-1.554, 2.291) σε σχέση με το Brij-35 (-0.817, 1.827) γεγονός που προσφέρει καλύτερη διάκριση μεταξύ των φαρμάκων και διευκολύνει τη μελέτη τους.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟ TWEEN

Για τη σύγκριση των δύο μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα του Πίνακα 5.



Διάγραμμα 4: Συσχέτιση των $\log K_{SDS}$ με το $\log K_{Tween}$ σε pH=7.4

Η εξίσωση που προκύπτει από την γραμμική παλινδρόμηση είναι η εξής:

$$\log K_{SDS,7.4} = 0.592(\pm 0.124) \cdot \log K_{Tween} + 0.372(\pm 0.157) \quad (10)$$

με $R^2 = 0.415, N = 34, F = 22.717$

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, η συσχέτιση κρίνεται μέτρια καθώς παρόλο που αποτελούν διαφορετικές εκδοχές της ίδιας μεθόδου, το Tween όπως και το Brij-35 είναι μη ιονικό σε αντίθεση με το SDS.

Για αυτό τον λόγο, εισάγοντας τους παράγοντες f^+, f^- αναμένουμε βελτίωση της συσχέτισης:

$$\log K_{SDS7.4} = 0.557(\pm 0.082) \cdot \log K_{Tween} + 0.819(\pm 0.194) \cdot f^+ - 0.728(\pm 0.239) \cdot f^- + 0.259(\pm 0.134) \quad (11)$$

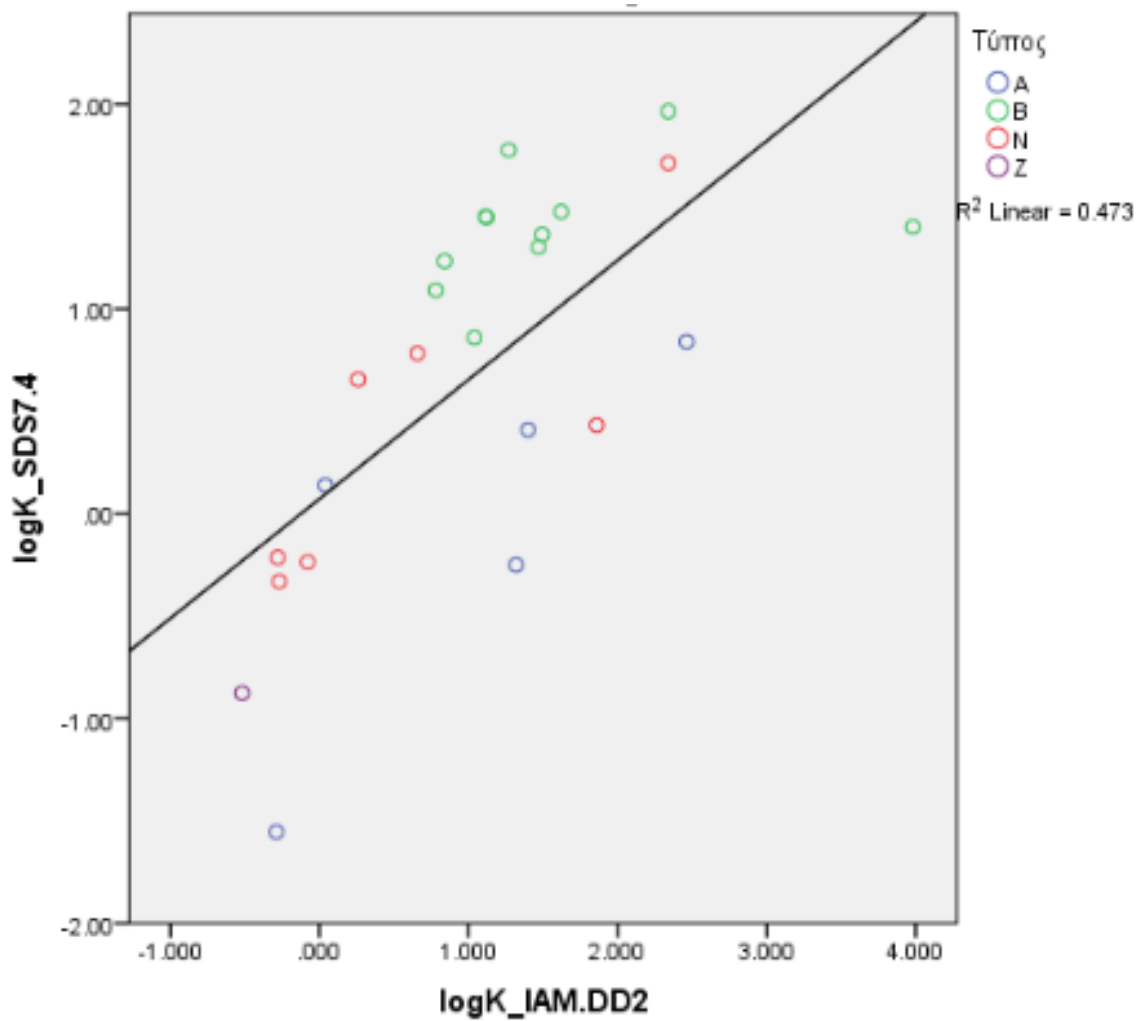
με $R^2 = 0.765, N = 34, F = 32.478$

Πράγματι, η συσχέτιση βελτιώθηκε αισθητά.

Όσον αφορά τα εύρη τιμών το Tween έχει $(-1.266, 2.165)$ που είναι μεγαλύτερο σε σχέση με το Brij-35 αλλά και πάλι υστερεί σε σχέση με το SDS.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΣΤΗΛΗ IAM.DD2

Για τη σύγκριση των δύο μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα του Πίνακα 5.



Διάγραμμα 5: Συσχέτιση των $\log K_{SDS}$ με το $\log K_{IAM.DD2}$ σε pH=7.4

Η εξίσωση που προκύπτει από την γραμμική παλινδρόμηση είναι η εξής:

$$\log K_{SDS,7.4} = 0.583(\pm 0.131) \cdot \log K_{IAM.DD2} + 0.073(\pm 0.198) \quad (12)$$

με $R^2 = 0.473, N = 24, F = 19.73$

Η συσχέτιση είναι μέτρια, γεγονός που εξηγείται από το διαφορετικό μηχανισμό κατακράτησης των δύο στηλών. Η στήλη IAM.DD2 περιέχει ομάδες φωσφορικών που δεσμεύουν τα θετικά φορτισμένα ιόντα, δηλαδή τις

πρωτονιομένες βάσεις. Έτσι, οι παράγοντες f^+, f^- δεν είναι στατιστικά σημαντικοί.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΡΗ=5.5 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

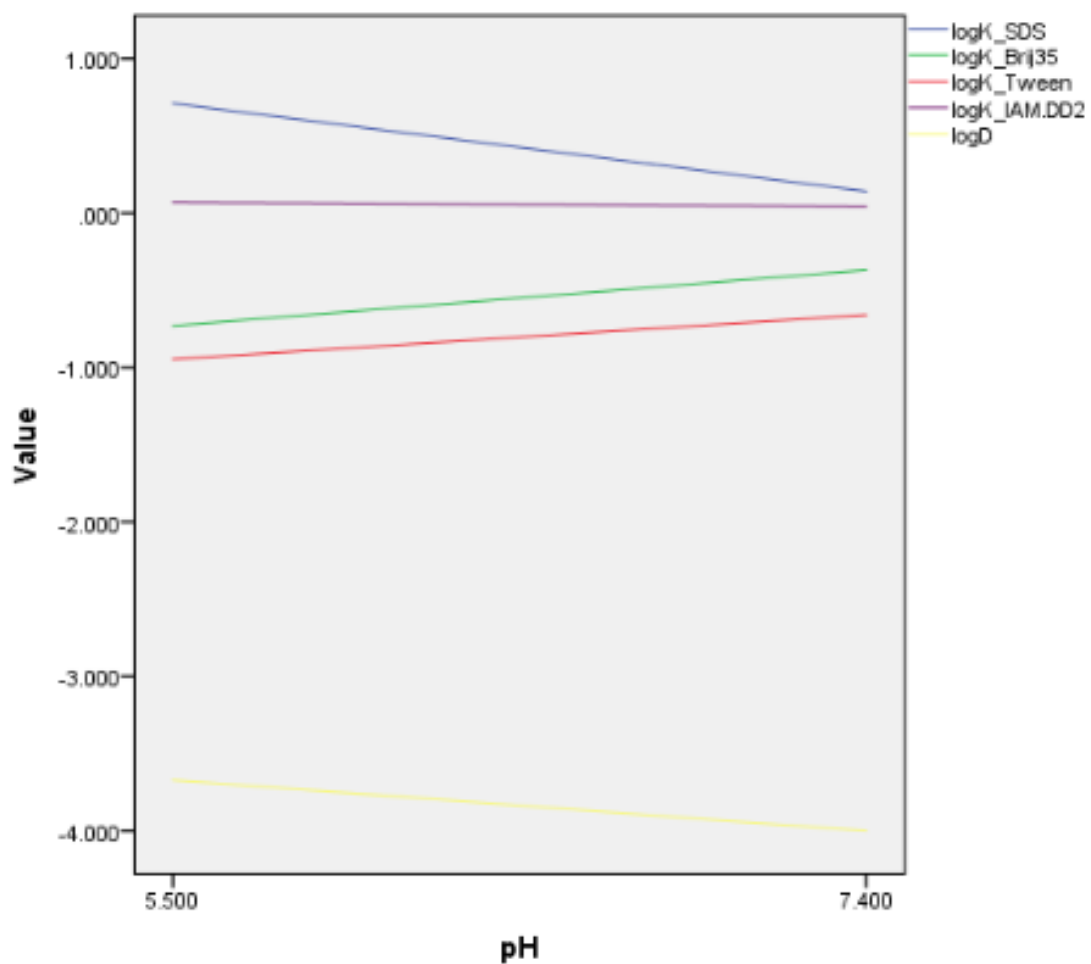
Οι συντελεστές κατακράτησης $\log K_{SDS,5.5}$ των φαρμάκων που μελετήθηκαν παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 7. Τα φάρμακα amitriptyline, chlorpromazine, desipramine, fluphenazine, promazine, protriptyline, thioridazine μετρήθηκαν με οργανικό διαλύτη και pH 5.5 λόγω της μεγάλης συγκράτησής τους μιας και το SDS είναι ανιοντικό και υπάρχει αυξημένη συγκράτηση βάσεων οι οποίες είναι φορτισμένες θετικά.

Για την επεξεργασία των παραπάνω αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η διαφορά των τιμών των συντελεστών κατακράτησης μεταξύ pH 5.5 και 7.4 για τα οποία υπήρχαν δεδομένα (Πίνακας 8) για τις χρωματογραφικές στήλες με τις οποίες έγινε συσχέτιση προηγουμένως και τους συντελεστές κατανομής. Ο συντελεστής μερισμού δεν μεταβάλλεται σε διαφορετικά pH διότι αφορά την ουδέτερη μορφή των φαρμάκων. Σε μειωμένο pH τα φάρμακα είχαν την αναμενόμενη ανταπόκριση, δηλαδή σε όξινο περιβάλλον τα οξέα εμφάνισαν μεγαλύτερο $\log K$ και οι βάσεις μικρότερο. Η κεφτριαξόνη, που είναι αμφολύτης, εμφάνισε μικρότερο pH σε όξινο περιβάλλον που δεν ήταν αναμενόμενο με βάση το φορτίο της (παράγοντες f^+, f^-), οφείλεται όμως στο στατιστικό σφάλμα της μεθόδου.

Πίνακας 8: Διαφορές συντελεστών κατακράτησης μεταξύ pH=7.4 – 5.5

| Φάρμακο | $\Delta \log K_{SDS}^{7.4-5.5}$ | $\Delta \log K_{Brij-35}^{7.4-5.5}$ | $\Delta \log K_{Tween}^{7.4-5.5}$ | $\Delta \log K_{IAM, DD2}^{7.4-5.5}$ | $\Delta \log D^{7.4-5.5}$ |
|--------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Ampicillin | -0.57 | 0.36 | 0.29 | -0.03 | -0.33 |
| Ceftriaxone | 0.63 | -0.08 | 0.08 | -0.41 | -0.11 |

| | | | | |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| Clonidine | 0.23 | | | 1.70 |
| Diclofenac | -0.86 | -0.38 | | -2.02 |
| Furosemide | -0.58 | -0.09 | -0.29 | -0.72 |
| Losartan | -0.80 | -0.12 | -0.07 | -2.18 |
| Meloxicam | -1.24 | -0.09 | 0.19 | -1.79 |
| Naproxen | -1.27 | -0.64 | -0.67 | -1.62 |
| Pindolol | 0.24 | 0.11 | | 0.91 |



Διάγραμμα 6: Μεταβολή των συντελεστών κατακράτησης και κατανομής συναρτήσει του pH για το φάρμακο **ampicillin**

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 6) που έγινε ενδεικτικά για το φάρμακο ampicillin οι μεγαλύτερες διαφορές συντελεστών κατακράτησης με μεταβολή pH εμφανίστηκαν χρησιμοποιώντας το SDS κάτι που είναι λογικό καθώς το SDS είναι ανιοντικό και επηρεάζεται πιο πολύ από τη μεταβολή του pH. Τα Brij-35, Tween τα οποία είναι μη ιοντικά εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά και τιμές. Η στήλη IAM.DD2 εμφανίζει πολύ μικρή πτώση συντελεστή κατακράτησης που σημαίνει ότι η μεταβολή του pH άλλαξε ελάχιστα τον μηχανισμό κατακράτησης του φαρμάκου. Τις πιο χαμηλές τιμές παρουσίασε το *logD* γεγονός που αποδίδεται στο ότι στην πραγματικότητα, τα φάρμακα μέσα στις στήλες βρίσκονται περισσότερο στην ουδέτερη μορφή τους κι έχουν μικρότερο ιονισμό.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Η συσχέτιση με τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες πραγματοποιήθηκε για 93 φάρμακα με βάση και άλλη έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί στο ίδιο εργαστήριο. Τα δεδομένα για τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες βρέθηκαν σε βάσεις δεδομένων [40], [46], [47].

Σε αυτή την ενότητα θα κατασκευαστεί ένα μοντέλο πρόβλεψης χρησιμοποιώντας ως δεδομένα εκμάθησης (training set) περίπου το 80% των ενώσεων βάσει των οποίων θα αναπτυχθεί το μοντέλο πρόβλεψης και ως δεδομένα ελέγχου (test set) περίπου το 20% των ενώσεων βάσει των οποίων θα επικυρωθεί το μοντέλο.

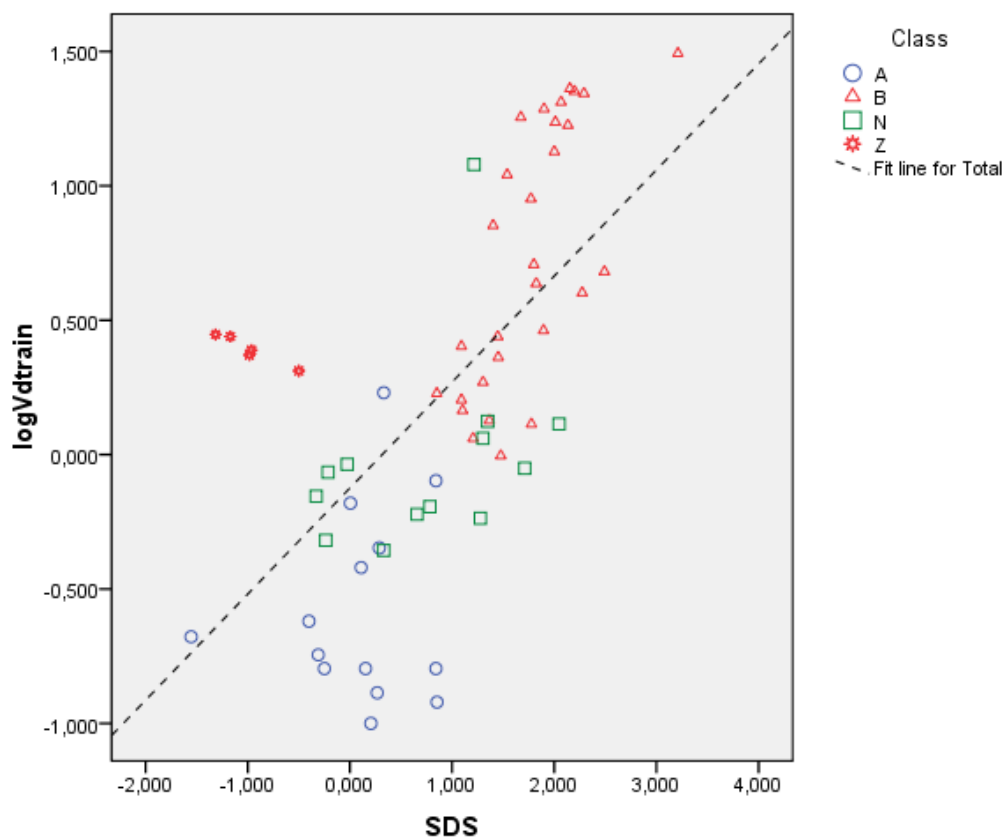
Ως test set χρησιμοποιήθηκαν τα φάρμακα που έχουν χρησιμοποιηθεί σε δύο δημοσιεύσεις της ερευνητικής μας ομάδας (Πίνακας 9) [42], [44].

Πίνακας 9: Test Set

| Φάρμακο | Τύπος | logKSD S,7.4 | logKSDS ,5.5 | fzw+ | fzw- | Απορρόφηση | Vdobserved |
|--------------------|-------|-----------------|-----------------|-------|-------|------------|------------|
| Ceftriaxone | Z | -0.876 | -1.508 | 0.779 | 1.000 | | 0.150 |
| Chloramphenicol | N | 0.716 | | 0.000 | 0.000 | 0.850 | 0.960 |
| Cimetidine | B | 1.234 | | 0.218 | 0.000 | 0.925 | 1.120 |
| Cinoxacin | A | -0.724 | 0.643 | 0.000 | 0.998 | 0.950 | 0.230 |
| Hydrocortisone | N | 0.873 | | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.540 |
| Isoxicam | A | -0.144 | 1.498 | 0.000 | 1.000 | | |
| Levofloxacin | Z | -1.318 | 0.914 | 0.000 | 0.986 | 0.990 | 1.360 |
| Lornoxicam | A | 0.470 | 1.507 | 0.047 | 0.096 | 0.950 | 0.200 |
| Meloxicam | A | 0.411 | 1.652 | 0.000 | 1.000 | 0.890 | 10.000 |
| Methylprednisolone | N | 1.401 | | 0.933 | 0.000 | 0.000 | 1.260 |
| Metoclopramide | B | 1.848 | | 0.989 | 0.000 | 0.650 | 3.300 |
| Minoxidil | N | 1.101 | | 0.000 | 0.000 | 0.900 | 2.860 |
| Nadolol | B | 1.556 | 1.490 | 0.991 | 0.000 | 0.300 | 2.000 |
| Nalidixic Acid | A | 0.861 | 1.106 | 0.000 | 0.947 | 0.925 | 0.40 |
| Niflumic Acid | A | 0.698 | 1.689 | 0.000 | 0.997 | | |
| Omeprazole | N | 1.530 | | 0.001 | 0.054 | 0.575 | 0.330 |
| Pipemidic Acid | Z | -0.389 | 0.902 | 0.051 | 0.033 | | |
| Piperacillin | A | -0.436 | -0.289 | 0.000 | 1.000 | 0.155 | 1.350 |
| Salicylic Acid | A | -0.075 | -0.029 | 0.000 | 1.000 | | |
| Sulpiride | B | 0.860 | | 0.984 | 0.000 | 0.325 | 1.030 |
| Vancomycin | Z | 0.117 | -0.125 | 0.000 | 0.125 | 0.355 | 0.600 |
| Warfarin | A | 0.792 | 1.120 | 0.000 | 0.997 | 0.965 | 0.150 |

Γενικά στα δεδομένα ελέγχου πρέπει να περιέχονται οξέα, βάσεις, ουδέτερα και αμοφολύτες. Πρέπει, επίσης, να είναι αντιπροσωπευτικά άρα, είναι χρήσιμο να περιλαμβάνονται ενώσεις από κατά το δυνατό τις περισσότερες φαρμακολογικές κατηγορίες και να εμφανίζουν μικρό, μεγάλο και μεσαίο όγκο κατανομής και για τη συνέχεια, απορρόφηση από το στόμα.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΟΓΚΟ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ (V_D)



Διάγραμμα 7: Συσχέτιση των $\log V_{d_{training}}$ με το $\log K_{SDS}$ σε pH=7.4

Η εξίσωση που προκύπτει από την γραμμική παλινδρόμηση για τα δεδομένα εκμάθησης είναι η εξής:

$$\log V_d = 0.395(\pm 0.064) \cdot \log K_{SDS7.4} - 0.124(\pm 0.091) \quad (13)$$

με $R^2 = 0.388, N = 61, F = 37.4, S = 0.533$

Η συσχέτιση είναι πολύ μικρή αλλά βελτιώνεται με εισαγωγή του παράγοντα f_{zw}^+ .

$$\log V_d = 0.253(\pm 0.052) \cdot \log K_{SDS7.4} + 0.855(\pm 0.122) \cdot f_{zw}^+ - 0.447(\pm 0.082) \quad (14)$$

με $R^2 = 0.670, N = 61, F = 58.8, S = 0.395$

Για την επικύρωση του μοντέλου χρησιμοποιείται το test set, υπολογίζεται ο όγκος κατανομής από την εξίσωση 14 και συγκρίνεται με τον όγκο κατανομής της βιβλιογραφίας. Το κριτήριο αποδοχής είναι: $0.5 < \frac{Vd_{\text{πειραματική}}}{Vd_{\text{μοντέλου}}} < 2$. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον Πίνακα 10.

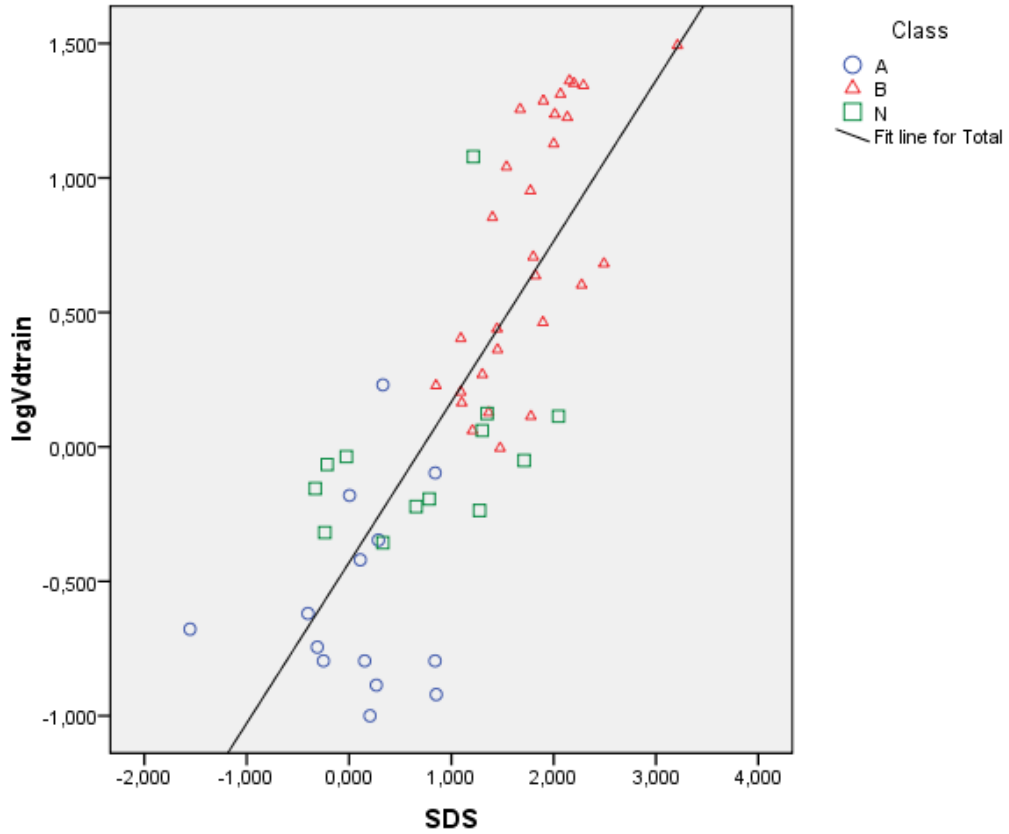
Φαίνεται ότι οι πιο πολλές ενώσεις (10/17) εμφανίζουν ουσιαστικές αποκλίσεις μεταξύ προβλεπόμενης και βιβλιογραφικής τιμής, που είναι λογικό καθώς το μοντέλο είχε μέτρια ικανότητα πρόβλεψης. Έτσι, οι συντελεστές κατακράτησης που προκύπτουν κρίνεται πως δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής.

Πίνακας 10: Εφαρμογή σε test set

| | Φάρμακο | Vd | |
|--|---------|------------------|---------------|
| | | Πειραματική τιμή | Τιμή μοντέλου |
| | | | |

| | | | |
|-----|--------------------|------|------|
| 1. | Ceftriaxone | 0.14 | 1.00 |
| 2. | Chloramphenicol | 0.96 | 0.54 |
| 3. | Cimetidine | 1.12 | 1.13 |
| 4. | Cinoxacin | 0.23 | 0.23 |
| 5. | Hydrocortisone | 0.54 | 0.59 |
| 6. | Isoxicam | | 0.33 |
| 7. | Levofloxacin | 1.38 | 0.97 |
| 8. | Lornoxicam | 0.20 | 0.47 |
| 9. | Meloxicam | 10.0 | 0.45 |
| 10. | Methylprednisolone | 1.26 | 0.81 |
| 11. | Metoclopramide | 3.30 | 7.35 |
| 12. | Minoxidil | 2.86 | 0.68 |
| 13. | Nadolol | 2.00 | 6.23 |
| 14. | Nalidixic acid | 0.40 | 0.59 |
| 15. | Niflumic acid | | 0.54 |
| 16. | Omeprazole | 0.33 | 0.87 |
| 17. | Pipemidic acid | | 1.91 |
| 18. | Piperacillin | 1.35 | 0.28 |
| 19. | Salicylic acid | | 0.34 |
| 20. | Sulpiride | | 4.13 |
| 21. | Vancomycin | 0.52 | 2.14 |
| 22. | Warfarin | 0.15 | 0.57 |

Βλέποντας στο Διάγραμμα 7 ότι τα Zwitterions (ciprofloxacin, enoxacin, ofloxacin, norfloxacin, lisinopril) απέχουν αρκετά από τα άλλα πειραματικά αποτελέσματα και εμφανίζουν ομαδοποίηση, γίνεται δοκιμή αφαίρεσής τους και επανάληψης της διαδικασίας.



Διάγραμμα 8: Συσχέτιση των $\log Vd_{training}$ με το $\log K_{SDS}$ σε pH=7.4

Η εξίσωση που προκύπτει από την γραμμική παλινδρόμηση για τα δεδομένα εκμάθησης είναι η εξής:

$$\log V_d = 0.597(\pm 0.063) \cdot \log K_{SDS7.4} - 0.430(\pm 0.091) \quad (13)$$

με $R^2 = 0.626$, $N = 56$, $F = 90.2$, $S = 0.435$

Η συσχέτιση είναι ικανοποιητική και μάλιστα, βελτιώνεται με εισαγωγή των παραγόντων f_{zw}^+ , f_{zw}^- .

$$\log V_d = 0.316(\pm 0.080) \cdot \log K_{SDS7.4} + 0.534(\pm 0.150) \cdot f_{zw}^+ - 0.382(\pm 0.151) f_{zw}^- - 0.286(\pm 0.118) \quad (14)$$

$\mu\epsilon R^2 = 0.740, N = 56, F = 48.2, S = 0.370$

Πίνακας 11: Εφαρμογή σε test set

| | Φάρμακο | Vd | |
|-----|--------------------|------------------|---------------|
| | | Πειραματική τιμή | Τιμή μοντέλου |
| 1. | Ceftriaxone | 0.14 | 0.30 |
| 2. | Chloramphenicol | 0.96 | 0.87 |
| 3. | Cimetidine | 1.12 | 1.66 |
| 4. | Cinoxacin | 0.23 | 0.13 |
| 5. | Hydrocortisone | 0.54 | 0.98 |
| 6. | Isoxicam | | 0.19 |
| 7. | Levofloxacin | 1.38 | 0.26 |
| 8. | Lornoxicam | 0.20 | 0.30 |
| 9. | Meloxicam | 10.0 | 0.29 |
| 10. | Methylprednisolone | 1.26 | 1.43 |
| 11. | Metoclopramide | 3.30 | 6.70 |
| 12. | Minoxidil | 2.86 | 1.16 |
| 13. | Nadolol | 2.00 | 5.43 |
| 14. | Nalidixic acid | 0.40 | 0.42 |
| 15. | Niflumic acid | | 0.36 |
| 16. | Omeprazole | 0.33 | 1.50 |
| 17. | Pipemidic acid | | 0.56 |
| 18. | Piperacillin | 1.35 | 0.16 |
| 19. | Salicylic acid | | 0.20 |
| 20. | Sulpiride | | 3.25 |
| 21. | Vancomycin | 0.52 | 0.69 |
| 22. | Warfarin | 0.15 | 0.38 |

Σε αυτή την περίπτωση η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου βελτιώνεται (9/17). Ωστόσο, και πάλι κρίνεται μέτρια.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ (HUMAN ORAL ABSORPTION, %HOA)

Εξετάστηκε η δυνατότητα της μικυλλιακής χρωματογραφίας να προβλέψει την επί τοις εκατό απορρόφηση από το στόμα. Η απορρόφηση των φαρμάκων πραγματοποιείται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, ο οποίος παρουσιάζει διαβάθμιση στο pH από 7.4 έως 5.5 στο λεπτό έντερο και πολύ όξινο στο στομάχι. Για αυτό τον λόγο θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η τιμή που αντιστοιχεί στη μέγιστη λιποφιλία/κατακράτηση από τη στήλη, πρακτική που χρησιμοποιείται συνήθως σε τέτοιες μελέτες [49].

Με τη χρήση των ίδιων training και test set (Πίνακας 9) έγινε η συσχέτιση απορρόφησης από το στόμα με τη μέγιστη τιμή του συντελεστή κατακράτησης και του συντελεστή κατανομής (Πίνακας 12).

Η συνολική εξίσωση που εκφράζει το φαινόμενο με βάση αντίστοιχες εργασίες [44], [49] είναι:

$$\%HOA = \frac{100}{1+10^{-(a_0+a_1 \log K_{max}+a_2 X_2+\dots+a_n X_n)}} \quad (15)$$

όπου X_2, \dots, X_n είναι φυσικοχημικές ιδιότητες και a_2, \dots, a_n οι αντίστοιχοι συντελεστές που προκύπτουν από μη γραμμική παλινδρόμηση.

Πίνακας 12: Συντελεστές μη γραμμικής παλινδρόμησης με χρήση $\log K_{max}$

| Μοντέλο | a_0 | $\log K_{max}$ | f_{zw}^+ | TPSA | N | R^2 |
|---------|-------|----------------|------------|------|---|-------|
|---------|-------|----------------|------------|------|---|-------|

| | | | | | | |
|---|---------------|---------------|----------------|----------------|----|-------|
| 1 | 1.125(±0.190) | 0.890(±0.177) | -1.103(±0.222) | -0.006(±0.002) | 60 | 0.576 |
|---|---------------|---------------|----------------|----------------|----|-------|

Ο συντελεστής συσχέτισης κρίνεται ικανοποιητικός. Στον Πίνακα 13 απεικονίζεται η εφαρμογή του μοντέλου στο test set.

Πίνακας 13: Εφαρμογή σε test set

| | Φάρμακο | % ΗΟΑ | |
|-----|--------------------|------------------|---------------|
| | | Πειραματική τιμή | Τιμή μοντέλου |
| 1. | Ceftriaxone | 1.0 | 0.1 |
| 2. | Chloramphenicol | 90.0 | 91.8 |
| 3. | Cimetidine | 80.0 | 95.1 |
| 4. | Cinoxacin | 95.0 | 93.5 |
| 5. | Hydrocortisone | 90.2 | 95.5 |
| 6. | Isoxicam | 100 | 98.2 |
| 7. | Levofloxacin | 99.0 | 71.1 |
| 8. | Lornoxicam | 100 | 97.8 |
| 9. | Meloxicam | 90.0 | 98.3 |
| 10. | Methylprednisolone | 86.0 | 98.4 |
| 11. | Metoclopramide | 77.0 | 94.8 |
| 12. | Minoxidil | 97.0 | 96.3 |
| 13. | Nadolol | 42.0 | 89.3 |
| 14. | Nalidixic acid | 98.0 | 97.8 |
| 15. | Niflumic acid | 95.0 | 99.2 |
| 16. | Omeprazole | 97.0 | 98.5 |
| 17. | Pipemidic acid | Καλή απορρόφηση | 62.8 |

| | | | |
|-----|----------------|------|------|
| 18. | Piperacillin | 15.5 | 36.8 |
| 19. | Salicylic acid | 100 | 84.9 |
| 20. | Sulpiride | 40.0 | 57.0 |
| 21. | Vancomycin | 35.5 | 0.1 |
| 22. | Warfarin | 98.5 | 98.2 |

Το κριτήριο αποδοχής σε αυτή την περίπτωση, είναι η διαφορά μεταξύ προβλεπόμενης και πραγματικής τιμής να μην ξεπερνάει το 25%. Με βάση αυτό, βγαίνει το συμπέρασμα ότι το μοντέλο είναι ικανοποιητικό μιας και 19/22 προβλέψεις ήταν σωστές.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Όσον αφορά τον μηχανισμό έκλουσης, το συμπέρασμα είναι ότι η κατανομή των φαρμάκων σχετίζεται με την λιποφιλία, αλλά επηρεάζεται ισχυρά από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις λόγω της παρουσίας του ανιοντικού SDS.
2. Το παραπάνω επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι το μοντέλο παρουσίαζε βελτιώσεις όταν λαμβάνονταν υπόψιν και τα φορτία των ενώσεων αλλά και από τα αποτελέσματα σύγκρισής τους με άλλες μεθόδους μικυλλιακής χρωματογραφίας οι οποίες διέφεραν μόνο ως προς αυτό (ουδέτερα vs ανιονικά τασενεργά).
3. Στο περιβάλλον της στήλης ο ιονισμός είναι ελαττωμένος, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τις μικρότερες διαφορές των $\log k$ σε σχέση με τα $\log D$.
4. Η ανάπτυξη του μοντέλου για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής δεν ήταν ιδιαίτερα επιτυχής. Το μοντέλο, ωστόσο, βελτιώνεται αν αφαιρεθούν οι αμφολύτες.
5. Η ανάπτυξη του μη γραμμικού μοντέλου για την πρόβλεψη του ποσοστού της απορρόφησης φαρμάκων μετά την χορήγησή τους από το στόμα ήταν πιο επιτυχής, καθώς από τα 22 φάρμακα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωσή του, έγινε σωστή πρόβλεψη για τα 19.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Από την παρούσα διπλωματική εργασία προέκυψαν προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.

Αρχικά, θα πρέπει να γίνει δοκιμή και άλλων τασενεργών (ουδέτερων, ανιοντικών, κατιοντικών και αμφοτερικών) και μελέτη συσχετίσεων με διάφορες φαρμακοκινητικές παραμέτρους.

Εφόσον συλλεχθεί ένας ικανός αριθμός φαρμάκων (100 – 150) με πολλά είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας θα πρέπει να ανπτυχθεί βάση δεδομένων και να γίνει χημειομετρική επεξεργασία δεδομένων σε σχέση με το ποιο είδος βιομιμητικής χρωματογραφίας είναι περισσότερο κατάλληλο για την πρόβλεψη κάθε φαρμακοκινητικής ιδιότητας.

Τέλος, μία πολύ σημαντική πρόταση μελλοντικής έρευνας, είναι η δοκιμή πρόβλεψης τοξικολογικών ιδιοτήτων (π.χ. φωσφολιπίδωση, καρδιοτοξικότητα) με χρήση βιομιμητικής χρωματογραφίας, κάτι που μπορεί να βοηθήσει ουσιαστικά στην διαλογή υποψηφίων φαρμάκων στα αρχικά στάδια ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ενώσεων που πρέπει να μειωθεί στο ελάχιστο η πιθανότητα εμφάνισης τοξικότητας των νέων φαρμάκων.

ΠΗΓΕΣ

1. Β. Δημόπουλος και Α. Τσαντίλη-Κακουλίδου, 2015, Αθήνα Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων
2. Valko Klara, 2014, Physicochemical and Biomimetic Properties in Drug Discovery: Chromatographic Techniques for Lead Optimisation, ed. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey
3. Giacomo Russo, Lucia Grumetto, Roman Szucs Francesco Barbato, Frederic Lynen, 2017, Determination of in Vitro and in Silico Indexes for the Modeling of Blood-Brain Barrier Partitioning of Drugs via Micellar and Immobilized Artificial Membrane Liquid Chromatography
4. Giacomo Russo, Lucia Grumetto, Roman Szuc, Francesco Barbato, Frederic Lynen, 2017, Determination of in Vitro and in Silico Indexes for the Modeling of Blood-Brain Barrier Partitioning of Drugs via Micellar and Immobilized Artificial Membrane Liquid Chromatography
5. Φώτιος Τσόπελας, 2019, Αθήνα, Εργαστηριακή Άσκηση 6 Φαρμακευτικής Χημείας και Τεχνολογίας [Εργαστηριακός οδηγός]:Χρήση Βιομιμητικής υγροχρωματογραφίας στην εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, Εφαρμογή της βιομιμητικής υγροχρωματογραφίας για την εκτίμηση της γαστρεντερικής απορρόφησης φαρμάκων
6. Presentation from The 18th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships & Molecular Modelling, workshop “Σχεδιασμός Φαρμάκου», Rodos, Greece 2010
7. «U.S Food and Drug Administration» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>.
8. J. Honek, , 2017, «Preclinical research in drug development,» *Medical Writing*
9. «National Comprehensive Cancer Network» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.nccn.org/patients/resources/clinical_trials/phases.aspx.
10. Stoner Chad L., Troutman D., Laverty Caroline E., 2008, Pharmacokinetics and ADME optimization in drug discovery, in Cancer Drug Design and Discovery, ed. Neidle Stephen, p. 131 – 153, Elsevier Inc.
11. «The Path Drugs Take Through the Body” [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://sunrisehouse.com/cause-effect/path-drugs-take-body/>
12. Buxton Iain L.O., 2006, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Action, and Elimination, in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th edition, ed. Lazo John S., Parker Keith L. Brunton Laurence L., p. 1-39, McGraw Hill
13. «Clinical Pharmacokinetics” [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.pharmacologyeducation.org/clinical-pharmacology/clinical-pharmacokinetics>

14. «Human Intestinal Absorption» [Ηλεκτρονικό]. Available:
<https://www.optibrium.com/technical-info/adme-properties/humanintestinalabsorption.htm>
15. Arnott John A., Planey Sonia Lobo, 2012, The influence of lipophilicity in drug discovery and design, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(10): 863-875
16. «Human Intestinal Absorption» [Ηλεκτρονικό]. Available:
<https://www.optibrium.com/technical-info/adme-properties/humanintestinalabsorption.htm>
17. Mannhold R., Kubinyi H., FolkersMolecular G., 2008, *Molecular Drug Properties: Methods and Principles in Medical Chemistry*, Volume 37, ed. Mannhold Raimud, WILEY –VCH
18. «Pharmacokinetics Basics – Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion» [Ηλεκτρονικό]. Available:
<https://pharmaxchange.info/2011/04/pharmacokinetics-basics-absorption-distribution-metabolism-and-excretion/>
19. D. S. Hage, J. Anguizola, A. Jackson, R. Matsuda και E. E. Papastavros, 2011, *Chromatographic Analysis of Drug Interactions in the Serum Proteome*
20. Rang H.P., Ritter J.M., Flower R.J., Henderson J., 2016, *Rang and Dale's Pharmacology*, 8th edition, ed. Elsevier
21. Tsopelas Fotios, Giaginis Konstantinos, Tsantili-Kakoulidou Anna, 2017, Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(9): 885-896
22. Chrysanthakopoulos Marios, Fotios Tsopelas, Tsantilh – Kakoulidou Anna, 2014, *Biomimetic Chromatography: A Useful Tool in The Drug Discovery Process*, in *Advances in Chromatography*, Volume 51, ed. Grushka Eli, Grinberg Nelu, p. 91 – 115, CRC Press
23. Russo Giacomo, Grumetto Lucia, Szucs Roman, Barbato Francesco, Lynen Frederic, 2017, Determination of In Vitro and In Silico Indexes for the Modeling of Blood-Brain Barrier Partitioning of Drugs via Micellar and Immobilized Artificial Membrane Liquid Chromatography, *Journal of Medicinal Chemistry*, 60: 3739-3754
24. Morgan Steve, Grootendorst Paul, Lexchin Joel, Cunningham Colleen, Greyson Devon, 2011, The cost of drug development: A systematic review, *Health Policy*, 100: 4-17
25. Mohammadreza Hadjmohammadi, Mina Salary, 2012, Biopartitioning Micellar Chromatography With Sodium Dodecyl Sulfate as a Pseudo $\alpha(1)$ -acid Glycoprotein to the Prediction of Protein-Drug Binding
26. X. Liu, A. Fahr και B. Testa, 2010, Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation, *Springer Science*, pp. 962-977, 2010.
27. K. Vuignier, D. Guillarme, J.-L. Veuthey, P.-A. Carrupt και J. Schappler, 2013, High performance affinity chromatography (HPAC) as a high-throughput screening tool in

- drug discovery to study drug–plasma protein interactions, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*
28. H. Engman, 2003, *Intestinal Barriers to Oral Drug Absorption*
 29. Gonzalez Frank J., Tukey Robert H., 2006, *Drug Metabolism*, in Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, ed. Lazo John S., Parker Keith L. Brunton Laurence L., p. 71-91, McGraw Hill
 30. Patil P. S., 2016, *Drug Discovery and ADMET process: A Review*, *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 3(7): 181-192
 31. Τζούλια Απτά – Πολίτου, *Δοκιμασίες Τοξικότητας για την Ανάπτυξη ενός Νέου Φαρμάκου*
 32. Derek G. Waller, Anthony P. Sampson, 2018, *Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth Edition)*
 33. Lin J, Sahakian D.C., Morais S.M.F., Xu J.J., Polzer R.J., Winter S.M., 2003, *The Role of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity in Drug Discovery*, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3: 1125-1154
 34. Mark C. Wenlock, Tim Potter, Patrick Barton, Rupert P. Austin, 2011, *A Method for Measuring the Lipophilicity of Compounds in Mixtures of 10*
 35. Valko Klara L., 2016, *Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130: 35-54
 36. Gao Y., Gesenberg C., Zheng W., 2017, *Oral Formulations for Preclinical Studies: Principle, Design, and Development Considerations*, in *Developing Solid Oral Dosage Forms*, p. 455 – 495, Elsevier Inc.
 37. Liu Xiangli, Testa Bernard, Fahr Alfred, 2010, *Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation*, *Pharmaceutical Research*, 28: 962-977
 38. Ozlem Coskun, 2016, *Separation techniques: Chromatography*
 39. Peter Berry Ottaway, 2008, *Food Fortification and Supplementation, Technological, Safety and Regulatory Aspects*, *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*
 40. Καρκαλούσος Π., Γεωργίου Ζ., Κρούπης Χ., Παπαϊωάννου Α., Πλαγεράς Π., Σπυρόπουλος Β., Τσότσου Γ., Φούντζουλα Χ., 2015, *Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας [ηλεκτρ. βιβλ.]*, Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5382>
 41. [Ηλεκτρονικό]. Available: «<https://www.drugbank.ca/>»
 42. Fotios Tsopelas, Panagiotis Danias, Athina Pappa, Anna Tsantili-Kakoulidou, 2020, Αθήνα, *Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes*
 43. Fotios Tsopelas, Niki Malaki, Theodosia Vallianatou, Marios Chrysanthakopoulos, Demetris Vrakas, Maria Ochsenkühn-Petropoulou, Anna Tsantili-Kakoulidou, 2015, Αθήνα, *Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane*

chromatography using two stationary phases

44. Fotios Tsopelas, Theodosia Vallianatou, Anna Tsantili-Kakoulidou, 2015, Αθήνα, The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption
45. Mike De Vrieze, Pieter Janssens, Roman Szucs, Johan Van der Eycken, Frédéric Lynen, 2016, In Vitro Prediction of Human Intestinal Absorption and Blood-Brain Barrier Partitioning: Development of a Lipid Analog for Micellar Liquid Chromatography
46. Suvarna V., 2010, Phase IV of Drug Development, *Perspect Clin Res*, 1(2): 57 – 60
47. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.druginfosys.com/>
48. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.drugs.com/>
49. Kotecha J, Shah S, Rathod I, Subbaiah G., 2008, Prediction of oral absorption in humans by experimental immobilized artificial membrane chromatography indices and physicochemical descriptors, *Int. J. Pharm.*, 360, 96-106
50. [Ηλεκτρονικό]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_dodecyl_sulfate