



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας (I) Χημικών Επιστημών

Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας

Μικυλλιακή υγροχρωματογραφία παρουσία του ουδέτερου  
τασιενεργού Triton X-100: Μελέτη του μηχανισμού  
έκλυσης φαρμακομορίων κι εφαρμογή στην εκτίμηση  
φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων

---

Διπλωματική Εργασία

Κοντογιάννη Μαρία Θεοδώρα

Επιβλέπων:

Φώτιος Τσόπελας

Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Φεβρουάριος 2021



## Περιεχόμενα

---

Ευρετήριο πινάκων.....	6
Ευρετήριο εικόνων.....	7
Ευρετήριο διαγραμμάτων.....	8
Ευχαριστίες.....	9
Περίληψη.....	11
Abstract.....	13
1. Θεωρητικό μέρος .....	15
1.1. Εισαγωγή.....	15
1.1.1. Ιστορική αναδρομή .....	15
1.1.2. Από τη βασική έρευνα στο εγκεκριμένο φάρμακο.....	16
1.1.2.1. Ανακάλυψη ενώσεων – οδηγών.....	17
1.1.2.2. Προκλινικοί έλεγχοι.....	17
1.1.2.3. Κλινικοί έλεγχοι.....	18
1.2. Φαρμακοκινητική .....	20
1.2.1. Απορρόφηση.....	20
1.2.2. Κατανομή .....	21
1.2.3. Μεταβολισμός .....	22
1.2.4. Απέκκριση.....	23
1.2.5. Τοξικότητα.....	24
1.3. Φαρμακοδυναμική.....	25
1.3.1. Σχέση δόσης – απόκρισης.....	25
1.3.2. Αλληλεπιδράσεις φαρμάκων – υποδοχέων .....	26
1.4. Ιδιότητες φαρμακευτικών ενώσεων.....	28
1.4.1. Βαθμός ιοντισμού – Σταθερά ιοντισμού .....	28
1.4.2. Διαλυτότητα – Διαπερατότητα.....	29
1.4.2.1. Βιοφαρμακευτικό Σύστημα Ταξινόμησης.....	30
1.4.3. Διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.....	30
1.4.4. Ευκαμψία μορίου .....	31
1.4.5. Ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου .....	31
1.4.6. Λιποφιλία .....	31
1.4.6.1. Διττή φύση της λιποφιλίας .....	32
1.4.6.2. Αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας.....	32
1.4.6.3. Συντελεστής μερισμού (logP) .....	32
1.4.6.4. Συντελεστής κατανομής (logD).....	34

1.4.6.5. Λιποφιλία αμφολυτών .....	35
1.4.7. Μοριακό μέγεθος .....	37
1.4.8. Όγκος κατανομής.....	38
1.4.9. Πρωτεϊνική σύνδεση .....	38
1.5. Χρωματογραφία .....	39
1.5.1. Χρωματογραφικές έννοιες.....	40
1.5.2. Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	42
1.5.2.1. HPLC κανονικής φάσης.....	43
1.5.2.2. HPLC αντίστροφης φάσης.....	43
1.5.2.3. Οργανολογία.....	44
1.6. Βιομημητική χρωματογραφία.....	45
1.6.1. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών.....	46
1.6.1.1. Στατική φάση.....	46
1.6.1.2. Κινητή φάση.....	48
1.6.1.3. Μηχανισμός κατακράτησης.....	48
1.6.2. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος .....	49
1.6.2.1. Στατική φάση.....	50
1.6.2.2. Κινητή φάση.....	51
1.6.2.3. Μηχανισμός κατακράτησης.....	52
1.6.3. Μικυλλιακή υγροχρωματογραφία .....	52
1.6.3.1. Στατική φάση.....	53
1.6.3.2. Κινητή φάση.....	54
1.6.3.3. Μηχανισμός κατακράτησης.....	57
1.6.3.4. Εφαρμογές .....	58
2. Πειραματικό μέρος.....	59
2.1. Σκοπός.....	59
2.2. Φαρμακευτικές ενώσεις.....	59
2.3. Αντιδραστήρια.....	65
2.4. Οργανολογία.....	65
2.5. Στατική φάση.....	68
2.6. Κινητή φάση.....	68
2.7. Πειραματική διαδικασία.....	69
2.7.1. Παρασκευή κινητής φάσης.....	69
2.7.2. Χρωματογραφική διαδικασία.....	69
2.8. Βιβλιογραφικά δεδομένα.....	70
2.8.1. Δεδομένα λιποφιλίας.....	70

2.8.2. Δεδομένα κλασμάτων θετικού κι αρνητικού φορτίου μορίων.....	70
2.8.3. Δεδομένα μικυλλιακής υγροχρωματογραφίας.....	71
2.8.4. Δεδομένα χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών .....	73
2.8.5. Δεδομένα χρωματογραφίας ακινητοποιημένης HSA .....	74
2.8.6. Δεδομένα φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων .....	75
2.8.6.1. Δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης (Plasma Protein Binding, % <i>PPB</i> ) .....	76
2.8.6.2. Δεδομένα όγκου κατανομής, $V_d$ .....	76
2.8.6.3. Δεδομένα διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, $\log BBB$ .....	76
2.9. Στατιστική ανάλυση.....	78
3. Αποτελέσματα.....	79
3.1. Αποτελέσματα κι υπολογισμός συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση, $\log k_w^{Triton}$ .....	79
3.2. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με τους συντελεστές λιποφιλίας, $\log P$ και $\log D_{7,40}$ .....	80
3.2.1. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με τον συντελεστή μερισμού, $\log P$ .....	80
3.2.2. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με τον συντελεστή κατανομής, $\log D_{7,40}$ .....	82
3.3. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με συντελεστές κατακράτησης της μικυλλιακής υγροχρωματογραφίας (MLC).....	83
3.3.1. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό Brij-35, $\log k_w^{Brij-35}$ .....	83
3.3.2. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό Tween 20, $\log k_w^{Tween 20}$ .....	84
3.3.3. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό SDS, $\log k_w^{SDS}$ .....	86
3.4. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με συντελεστές κατακράτησης της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM), $\log k_w^{IAM.PC.DD2}$ .....	87
3.5. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με συντελεστές κατακράτησης της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης HSA, $\log k_w^{HSA}$ .....	89
3.6. Συμπεριφορά κατακράτησης σε pH 5,50.....	90
3.7. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με φαρμακοκινητικές ιδιότητες.....	92
3.7.1. Συσχέτιση με πρωτεϊνική σύνδεση, % <i>PPB</i> .....	92
3.7.2. Συσχέτιση με όγκο κατανομής, $V_d$ .....	95
3.7.3. Συσχέτιση με διέλευση από αιματοεγκεφαλικό φραγμό, $\log BBB$ .....	97
4. Συμπεράσματα.....	99
5. Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.....	101
Βιβλιογραφία .....	103

## Ευρετήριο πινάκων

<b>Πίνακας 1.</b> Τυπικά επιφανειοδραστικά συστατικά στην MLC.....	56
<b>Πίνακας 2.</b> Φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν και χαρακτηριστικά τους.....	59
<b>Πίνακας 3.</b> Δεδομένα συντελεστή μερισμού ( $\log P$ ), κλασμάτων θετικού ( $F^+, F_{zwit}^+$ ) κι αρνητικού ( $F^-, F_{zwit}^-$ ) φορτίου, σε pH 7,40, και συντελεστή κατανομής ( $\log D_{7,40}, \log D_{5,50}$ ), σε pH 7,40 και 5,50, για τις φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν.....	70
<b>Πίνακας 4.</b> Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της MLC με κινητή φάση ρυθμισμένη σε pH 7,40 και 5,50 και προσθήκη τασιενεργού Brij-35 (0,04 M), Tween 20 (0,6 mM) ή SDS (0,04 M).....	72
<b>Πίνακας 5.</b> Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της IAM με κινητή φάση (PBS) ρυθμισμένη σε pH 7,40 και 5,50 και στατική φάση τη στήλη IAM.PC.DD2.....	73
<b>Πίνακας 6.</b> Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης βιομμητικής χρωματογραφίας με κινητή φάση (PBS) ρυθμισμένη σε pH 7,00 και στατική φάση τη στήλη ακινητοποιημένης HSA.....	74
<b>Πίνακας 7.</b> Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης, $\log k_w^{Triton}$ , κλασμάτων θετικού, $F^+$ , κι αρνητικού φορτίου, $F^-$ , σε pH 7,40, ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης, % PPB, όγκου κατανομής, $V_d$ , και λογαρίθμου του λόγου συγκέντρωσης φαρμάκου στους ιστούς του εγκεφάλου προς τη συγκέντρωσή του στο αίμα, $\log BBB$ , για τις 87 φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν.....	76
<b>Πίνακας 8.</b> Συντελεστές κατακράτησης σε υδατική φάση, $\log k_w^{Triton}$ , σε τιμές pH 7,40 και 5,50.....	79
<b>Πίνακας 9.</b> Τιμές $\log k_w^{Triton}$ σε pH 5,50 και κινητή φάση με 3 διαφορετικές περιεκτικότητες ακετονιτριλίου (5%, 10% και 15% v/v).....	80
<b>Πίνακας 10.</b> Διαφορές στις τιμές συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση, $\log k_w$ , για MLC και IAM, και συντελεστή κατανομής, $\log D$ , μεταξύ τιμών pH 7,40 και 5,50.....	90
<b>Πίνακας 11.</b> Συντελεστές εξίσωσης [3.8α] και στατιστικά στοιχεία έπειτα από διαδοχική παλινδρόμηση.....	92
<b>Πίνακας 12.</b> Πειραματικές τιμές ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης, % PPB, και προβλεπόμενων από το μοντέλο [3.8β] τιμών.....	93
<b>Πίνακας 13.</b> Πειραματικές τιμές ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης, % PPB, και προβλεπόμενων μέσω του μοντέλου [3.9γ] τιμών.....	94
<b>Πίνακας 14.</b> Πειραματικές τιμές όγκου κατανομής, $V_d$ , και προβλεπόμενων από το μοντέλο [3.10β] τιμών.....	96
<b>Πίνακας 15.</b> Πειραματικές τιμές λόγου συγκέντρωσης φαρμάκου στους ιστούς του εγκεφάλου προς τη συγκέντρωσή του στο αίμα, $BBB$ , και προβλεπόμενων από το μοντέλο [3.11] τιμών.....	98

## Ευρετήριο εικόνων

---

<b>Εικόνα 1.</b> Λόγοι απόρριψης φαρμάκων πριν το 1985 σε σύγκριση με το 2000.....	17
<b>Εικόνα 2.</b> Η πορεία του φαρμάκου από τη βασική έρευνα έως την έγκριση για την κυκλοφορία του στην αγορά.....	19
<b>Εικόνα 3.</b> Απορρόφηση (Absorption), Κατανομή (Distribution), Μεταβολισμός (Metabolism), Απέκκριση (Excretion).....	24
<b>Εικόνα 4.</b> Κατηγοριοποίηση 200 <i>per os</i> χορηγούμενων φαρμάκων ανάλογα με τη διαλυτότητά τους με δεδομένα από τις λίστες των ΗΠΑ, της Μεγάλης Βρετανίας, της Ισπανίας, της Ιαπωνίας και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας.....	29
<b>Εικόνα 5.</b> Ισορροπίες κατά την κατανομή φαρμακευτικής ένωσης στο σύστημα οκτανόλης-νερού σε pH που συνυπάρχουν η αδιάστατη κι η ιοντισμένη μορφή.....	34
<b>Εικόνα 6.</b> Καμπύλη $\log D=f(\text{pH})$ κοινού αμφολύτη.....	36
<b>Εικόνα 7.</b> Κατανομή μικρομορφών αμφολύτη που υφίσταται ως διπολικό ιόν όταν η $\Delta\text{pK}_a$ έχει (α) μικρή, (β) μεγάλη τιμή.....	37
<b>Εικόνα 8.</b> Καμπύλη $\log D=f(\text{pH})$ αμφολύτη που υφίσταται ως διπολικό ιόν – (α) γενική περίπτωση, (β) περίπτωση που παρεμποδίζεται η αντιστάθμιση των φορτίων.....	37
<b>Εικόνα 9.</b> Χρωματογράφημα.....	41
<b>Εικόνα 10.</b> Οργανολογία τυπικού συστήματος HPLC.....	45
<b>Εικόνα 11.</b> Στατικές φάσεις IAM.PC.MG, IAM.PC.DD και IAM.PC.DD2.....	48
<b>Εικόνα 12.</b> Ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού (Human Serum Albumin, HSA).....	50
<b>Εικόνα 13.</b> $\alpha_1$ -Όξινη γλυκοπρωτεΐνη (Alpha-1-Acid Glycoprotein, AGP).....	51
<b>Εικόνα 14.</b> Επιφανειακή τάση σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης του επιφανειοδραστικού συστατικού.....	55
<b>Εικόνα 15.</b> Triton X-100.....	56
<b>Εικόνα 16.</b> Ισορροπίες στην MLC.....	58
<b>Εικόνα 17.</b> Επιμέρους όργανα συστήματος υδροχρωματογραφίας (Knauer).....	66
<b>Εικόνα 18.</b> Υδατόλουτρο (Biosan).....	67
<b>Εικόνα 19.</b> Βρόχος έγχυσης.....	67
<b>Εικόνα 20.</b> Στήλη αντίστροφης φάσης Discovery HS C18 (Supelco).....	68

## Ευρετήριο διαγραμμάτων

---

<b>Διάγραμμα 1.</b> Σύγκριση καμπυλών δόσης-απόκρισης τριών υποθετικών φαρμάκων X, Y και Z.....	26
<b>Διάγραμμα 2.</b> Γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_w^{Triton}$ με τον συντελεστή $\log P$ – εξίσωση [3.1].....	81
<b>Διάγραμμα 3.</b> Γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_w^{Triton}$ με τον συντελεστή $\log D_{7,40}$ – εξίσωση [3.2α].....	82
<b>Διάγραμμα 4.</b> Γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_w^{Triton}$ με τον συντελεστή $\log k_w^{Brij-35}$ – εξίσωση [3.3] .....	84
<b>Διάγραμμα 5.</b> Γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_w^{Triton}$ με τον συντελεστή $\log k_w^{Tween 20}$ – εξίσωση [3.4α].....	85
<b>Διάγραμμα 6.</b> Γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_w^{Triton}$ με τον συντελεστή $\log k_w^{SDS}$ – εξίσωση [3.5α].....	86
<b>Διάγραμμα 7.</b> Γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_w^{Triton}$ με τον συντελεστή $\log k_w^{IAM.PC.DD2}$ – εξίσωση [3.6α].....	88
<b>Διάγραμμα 8.</b> Γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_w^{Triton}$ με τον συντελεστή $\log k_w^{HSA}$ – εξίσωση [3.7α].....	89
<b>Διάγραμμα 9.</b> Γραφική παράσταση του λογαρίθμου του όγκου κατανομής του training set, $\log V_{d_{train}}$ , με τον συντελεστή $\log k_w^{Triton}$ .....	96
<b>Διάγραμμα 10.</b> Γραφική παράσταση του λογαρίθμου $\log BBB$ του training set, $\log BBB_{train}$ , με τον συντελεστή $\log k_w^{Triton}$ .....	97



## Ευχαριστίες

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Μικυλλιακή υδροχρωματογραφία παρουσία του ουδέτερου τασιενεργού Triton X-100: Μελέτη του μηχανισμού έκλουσης φαρμακομορίων κι εφαρμογή στην εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων» εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Ιουλίου 2020 – Ιανουαρίου 2021 στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα (I) Χημικών Επιστημών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Φώτιο Τσόπελα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να μελετήσω το συγκεκριμένο θέμα. Η καθοδήγησή του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά και κατά τη συγγραφή της εργασίας ήταν πολύ σημαντική.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Λαμπρινή – Αρετή Τσακανίκα, για τις πολύτιμες συμβουλές της στο εργαστήριο και την ουσιαστική βοήθειά της σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξη και την κατανόησή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Αθήνα, Φεβρουάριος 2021

Κοντογιάννη Μάρθα



## Περίληψη

---

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε διερεύνηση του μηχανισμού έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων από χρωματογραφική στήλη αντίστροφης φάσης παρουσία μικυλλίων (μικυλλιακή υδροχρωματογραφία, micellar liquid chromatography, MLC) και συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης με φαρμακοκινητικά μεγέθη.

Προσδιορίστηκαν οι συντελεστές κατακράτησης 49 φαρμακευτικών ενώσεων ποικίλης δομής και φαρμακολογικής δράσης. Ως διαλύτης έκλυσης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, ρυθμισμένο σε δύο τιμές pH (7,40 και 5,50) με προσθήκη NaCl σε συγκέντρωση 9,2 g/L και μη ιοντικού επιφανειοδραστικού συστατικού Triton X-100 σε συγκέντρωση 5,75 mM. Για τη μείωση του χρόνου έκλυσης των λιπόφιλων ενώσεων, στην κινητή φάση που ρυθμίστηκε σε pH 5,50, προστέθηκε ποσότητα ακετονιτριλίου, σε περιεκτικότητες 5-15%. Η χρωματογραφική στήλη τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 37 °C.

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των συντελεστών κατακράτησης με τους συντελεστές λιποφιλίας: τον συντελεστή μερισμού,  $\log P$ , και τον συντελεστή κατανομής,  $\log D$ . Παρατηρήθηκε ότι ο συντελεστής κατακράτησης συσχετίζεται καλύτερα με τον συντελεστή  $\log P$  ( $R^2=0,678$ ) σε σχέση με τον συντελεστή  $\log D$  ( $R^2=0,599$ ). Η προσθήκη των κλασμάτων θετικού κι αρνητικού φορτίου βελτίωσε σημαντικά τη συσχέτιση με τον συντελεστή  $\log D$  ( $R^2=0,744$ ) κι υπέδειξε την καταστολή του ιονισμού στο περιβάλλον της στήλης.

Ακόμη, οι συντελεστές κατακράτησης της μικυλλιακής υδροχρωματογραφίας παρουσία Triton X-100 συγκρίθηκαν με τους αντίστοιχους συντελεστές άλλων βιομημητικών χρωματογραφικών μεθόδων. Πιο συγκεκριμένα, στην MLC η συσχέτιση με τα μη ιοντικά τασιενεργά Brij-35 και Tween 20 ήταν εξαιρετικά ικανοποιητική ( $R^2=0,902$  και  $R^2=0,965$ , αντίστοιχα), ενώ με το ανιοντικό SDS ήταν μη ικανοποιητική ( $R^2=0,451$ ). Στην περίπτωση του Tween 20, η προσθήκη του κλάσματος αρνητικού φορτίου βελτίωσε περαιτέρω τα στατιστικά στοιχεία ( $R^2=0,974$ ), ενώ στην περίπτωση του SDS η προσθήκη των κλασμάτων θετικού κι αρνητικού φορτίου οδήγησε σε καλύτερη συσχέτιση ( $R^2=0,656$ ). Η σύγκριση με τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών για τη στήλη IAM.PC.DD2 ήταν μέτρια ικανοποιητική ( $R^2=0,574$ ), αλλά η προσθήκη του κλάσματος  $F_{zwitter}^+$  βελτίωσε τη συσχέτιση ( $R^2=0,705$ ). Η συσχέτιση με τους συντελεστές κατακράτησης της στήλης ακινητοποιημένης HSA ήταν επίσης μέτρια ικανοποιητική ( $R^2=0,634$ ) και βελτιώθηκε σημαντικά με την προσθήκη των κλασμάτων  $F_{zwitter}^+$  και  $F_{zwitter}^-$  ( $R^2=0,824$ ).

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η συμπεριφορά κατακράτησης 23 από των 49 φαρμακευτικών ενώσεων (κυρίως οξέων, αμφολυτών κι ενδεικτικά κάποιων βάσεων κι ουδέτερων) σε pH 5,50, τιμή που μιμείται την οξύτητα σε περιοχές κοντά στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου. Πράγματι, οι όξινες ενώσεις κυρίως κατακρατούνταν περισσότερο, ενώ οι βασικές λιγότερο στη στατική φάση. Οι αμφολύτες παρουσίασαν διττή συμπεριφορά, ενώ για τα ουδέτερα οι μικρές μεταβολές αποδόθηκαν σε πειραματικά σφάλματα.

Στο τελευταίο μέρος, αναπτύχθηκαν μοντέλα πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων με αξιοποίηση των συντελεστών κατακράτησης  $\log k_w^{Triton}$ . Για την πρωτεϊνική σύνδεση αναπτύχθηκαν δύο μοντέλα, ένα σιγμοειδές κι ένα της μορφής logit. Το δεύτερο κρίθηκε προτιμότερο (επιτυχία 16/22 φαρμακευτικές ενώσεις με 3 από τις 16 να είναι οριακά

εκτός ορίων) από το πρώτο (επιτυχία 15/22 με 2 από τις 15 να είναι οριακά εκτός ορίων). Η πρόβλεψη του όγκου κατανομής περιορίστηκε στις βάσεις κι οδήγησε σε καλή συμφωνία μεταξύ των 4 πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών. Τέλος, διερευνήθηκε η δυνατότητα πρόβλεψης της διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και το μοντέλο που προέκυψε είχε επιτυχία στο μικρό δείγμα φαρμακευτικών ενώσεων (3/5).

**Λέξεις - κλειδιά:** βιομηχανική χρωματογραφία, μικυλλιακή υγροχρωματογραφία, Triton X-100, συντελεστής κατακράτησης, λιποφιλία, πρωτεϊνική σύνδεση, όγκος κατανομής, αιματοεγκεφαλικός φραγμός

## Abstract

---

The aim of this diploma thesis is the investigation of the elution mechanism of pharmaceutical compounds on reversed-phase (RP) chromatographic column in presence of micelles (micellar liquid chromatography, MLC) and the correlation of the obtained retention factors with pharmacokinetic properties.

The retention factors of 49 structurally and pharmacologically diverse compounds were determined. Phosphate buffer, adjusted to two pH values (7,40 and 5,50) in presence of NaCl (9,2 g/L) and non-ionic surfactant Triton X-100 (5,75 mM) was used as eluent. In order to reduce the elution time of the lipophilic compounds, in the mobile phase adjusted at pH 5,50, an amount of acetonitrile was added, in a content of 5-15%. The chromatographic column was placed in a water bath at 37 °C.

The retention factors were compared with lipophilicity factors: partition coefficient,  $\log P$ , and distribution coefficient,  $\log D$ . Retention factors were found to be correlated better to  $\log P$  coefficient ( $R^2=0,678$ ) compared with  $\log D$  coefficient ( $R^2=0,599$ ). The inclusion of positively and negatively charged molecular fractions improved the correlation with the  $\log D$  coefficient ( $R^2=0,744$ ) and indicated the weaker effect of ionization in MLC environment.

Furthermore, the retention factors of MLC in the presence of Triton X-100 were compared with the corresponding coefficients of other biomimetic chromatographic methods. Specifically, in MLC, the correlation with the non-ionic surfactants Brij-35 and Tween 20 was extremely satisfactory ( $R^2=0,902$  and  $R^2=0,965$ , respectively), while with the anionic SDS was unsatisfactory ( $R^2=0,451$ ). In the case of Tween 20, the addition of negatively charged molecular fraction improved the statistics ( $R^2=0,974$ ), while in the case of SDS the addition of positively and negatively charged molecular fractions led to a better correlation ( $R^2=0,656$ ). The correlation with the IAM retention factors (IAM.PC.DD2 column) was moderately satisfactory ( $R^2=0,574$ ), but the addition of  $F_{zwitter}^+$  factor improved it ( $R^2=0,705$ ). The correlation with the HSA retention factors was also moderately satisfactory ( $R^2=0,634$ ) and significantly improved by the addition of  $F_{zwitter}^+$  and  $F_{zwitter}^-$  factors ( $R^2=0,824$ ).

In order to study the retention behavior at pH 5,50 (which mimics acidity in areas near the upper part of the small intestine), 23 of 49 pharmaceutical compounds were chosen (mainly acids and zwitterions and indicatively some bases and neutrals). The most acidic compounds were more retained, while the basic compounds were less retained in the stationary phase. The zwitterions showed dual behavior, while in the case of neutral compounds, the deviations were attributed to experimental error.

In the last part of the thesis, the retention factors  $\log k_w^{Triton}$  were used for the development of models for the prediction of pharmacokinetic properties. For the prediction of plasma protein binding (% PPB), two models were developed, one sigmoidal and one of the logit form model. The second one was considered preferable (success 16/22 of pharmaceutical compounds with 3 out of 16 being marginally out of acceptance criteria) than the first one (success 15/22 with 2 out of 15 being marginally out of acceptance criteria). The prediction of volume of distribution was limited to the bases and led to a good correlation between the 4 experimental and predicted values. Finally, the possibility of predicting the passage through the blood-brain barrier was investigated and

the resulting model was successful for the small sample of pharmaceutical compounds (3/5).

**Keywords:** biomimetic chromatography, micellar liquid chromatography, Triton X-100, retention factor, lipophilicity, plasma protein binding (% PPB), volume of distribution, blood-brain barrier

# 1. Θεωρητικό μέρος

---

## 1.1. Εισαγωγή

Ως φάρμακο ορίζεται οτιδήποτε προορίζεται για χρήση με σκοπό να διαγνώσει, να αντιμετωπίσει, να θεραπεύσει, να προλάβει, να μετριάσει τα συμπτώματα ασθενειών σε ανθρώπους και ζώα ή με σκοπό να επιδράσει στη δομή ή τις λειτουργίες του οργανισμού των ανθρώπων ή των ζώων. Το φάρμακο αποτελεί αναγκαίο κοινωνικό αγαθό που μελετήθηκε κι αναπτύχθηκε προκειμένου να προστατεύσει τη ζωή και την υγεία των ανθρώπων, καθώς και για να οδηγήσει σε μία όσο το δυνατόν μεγαλύτερη και ποιοτικότερη διάρκεια ζωής. [1, p. 25] Παρά την εξέλιξη της φαρμακευτικής χημείας, υπάρχουν ακόμη ασθένειες για τις οποίες δεν υπάρχει θεραπεία (π.χ. αλλεργίες, άσθμα, διαβήτης, σκολίωση και πολλές ακόμη), αλλά είναι εφικτός ο περιορισμός της εμφάνισης των συμπτωμάτων τους με κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή. [2]

### 1.1.1. Ιστορική αναδρομή

Η θέση του φαρμάκου έχει καθοριστεί από την αρχαιότητα και μέχρι σήμερα αποτελεί μέρος της ανάπτυξης των νέων τεχνολογιών στον τομέα της υγείας. Στην αρχαία Ελλάδα, χρησιμοποιούσαν για θεραπευτικούς σκοπούς μέρη φυτών (ρίζες, φύλλα, άνθη, καρπούς), ζωικά προϊόντα (μέρη του σώματος ή εκκρίματα ζώων), αλλά κι ανόργανες (ορυκτές) ουσίες, αφού πρώτα υποβάλλονταν σε σχετικά απλές επεξεργασίες (πολτοποίηση, ξήρανση, κονιοποίηση, βρασμό ή ανάμιξη με άλλες ουσίες). [1, p. 22]

Η ανάπτυξη της οργανικής χημείας και της χημικής ανάλυσης τον 19ο αιώνα επέτρεψε την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό πολυάριθμων φυτικών ενώσεων. Σημαντική ανακάλυψη για τη νέα γενιά φαρμάκων θεωρήθηκε η απομόνωση της μορφίνης από εκχύλισμα οπίου το 1806 από τον F. W. Sertürner. Η παπαβερίνη απομονώθηκε το 1848 από τον G. Merck, αλλά μέχρι το 1917 δεν είχαν ανακαλυφθεί οι αντισπασμωδικές ιδιότητές της. Το 1874 πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του σαλικυλικού οξέος από τον φλοιό της ιτιάς, που οδήγησε λίγα χρόνια αργότερα, το 1890, στη σύνθεση του ακετυλοσαλικυλικού οξέος και την κυκλοφορία της ασπιρίνης, του πρώτου συνθετικού φαρμάκου. Το 1938, οι E. Chain, H. Florey κι οι συνεργάτες τους επέλεξαν για περαιτέρω μελέτη την πενικιλίνη, η οποία ανακαλύφθηκε από τον A. Fleming το 1928. Η αποτελεσματικότητα κι η έλλειψη τοξικότητας της πενικιλίνης άνοιξαν την πόρτα σε μία νέα εποχή στη θεραπεία των βακτηριακών λοιμώξεων.

Ωστόσο, σημαντική στιγμή για τη φαρμακευτική έρευνα αποτέλεσε η εισαγωγή του όρου «υποδοχέας» από τον P. Ehrlich το 1900, κατά την προσπάθειά του να μελετήσει τον μηχανισμό δράσης των φαρμάκων. Ο Ehrlich κατέληξε στο συμπέρασμα ότι απαιτούνται εκλεκτικά φάρμακα με εξειδικευμένη συγγένεια για τα παθογόνα που δε θα επηρεάζουν τα κύτταρα του οργανισμού κι έτσι, συνόψισε την άποψη αυτή στη φράση «*corpora non agunt nisi fixata*», δηλαδή οι ενώσεις δε δρουν εκτός αν συνδεθούν. Η έννοια του υποδοχέα οδήγησε στην εισαγωγή της «φαρμακοφόρου δομής», που αποτελεί μέρος της ένωσης-οδηγού κι επιτρέπει τη σύνδεση με ένα συγκεκριμένο βιολογικό στόχο, ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό βιολογικό αποτέλεσμα. Ο σκοπός της σύγχρονης

φαρμακευτικής βιομηχανίας είναι η ανακάλυψη των κατάλληλων ενώσεων-οδηγών κι η βελτιστοποίησή τους για να καταστήσουν ασφαλές κι αποτελεσματικό το φάρμακο που θα κυκλοφορήσει στην αγορά. [3], [4, pp. 13–14], [5, pp. 11–15]

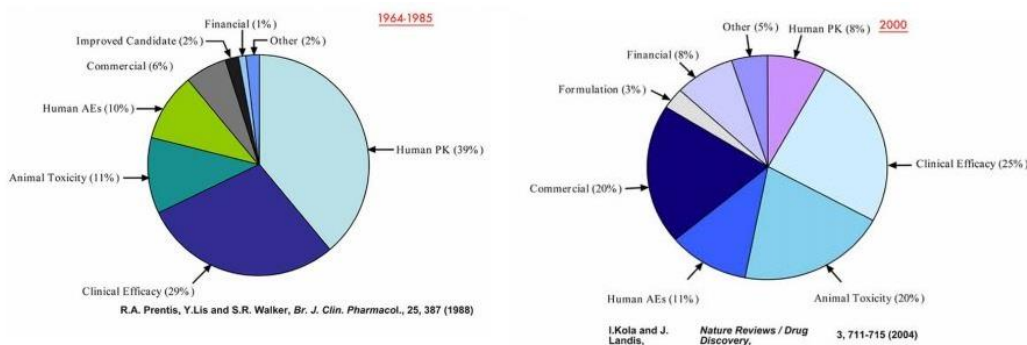
### 1.1.2. Από τη βασική έρευνα στο εγκεκριμένο φάρμακο

Οι ερευνητές προχωρούν στην ανακάλυψη φαρμάκων όταν έχουν νέες πληροφορίες για μία ασθένεια, που τους επιτρέπουν να σχεδιάσουν ένα προϊόν για να σταματήσουν ή να αντιστρέψουν τις επιπτώσεις της νόσου. Επιπλέον, οι δοκιμές μοριακών ενώσεων για την εύρεση ευεργετικών ιδιοτήτων έναντι μεγάλου αριθμού ασθενειών, οι υπάρχουσες θεραπείες με ανεπιθύμητα αποτελέσματα, καθώς κι οι νέες τεχνολογίες που παρέχουν καινούριους τρόπους στόχευσης των φαρμάκων στο σώμα, είναι λόγοι για την αναζήτηση νέων ενώσεων που θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη φαρμάκων. [6] Από τη στιγμή που θα εντοπιστεί ο βιολογικός στόχος έως τη στιγμή που θα δοθεί η έγκριση για την κυκλοφορία του φαρμάκου στην αγορά, μπορεί να μεσολαβήσουν 10-15 χρόνια, με το κόστος να ξεπερνά το 1 δισ. \$ (κατά μέσο όρο εκτιμάται στα 2,6 δισ. \$). Για τον λόγο αυτόν, κρίνεται απαραίτητη η έγκαιρη αναγνώριση των πιθανών κινδύνων, πριν επενδυθούν μεγάλα ποσά στην ανάπτυξη του φαρμακευτικού σκευάσματος. Η φράση «fail fast, fail cheap» αποδεικνύει την αναγκαιότητα της απόρριψής του στα πρώιμα στάδια ανάπτυξής του μέσω της βελτιστοποίησης των προκλινικών και κλινικών δοκιμών. [4, p. 17], [7, p. 651], [8]

Για να γίνει η επιλογή μίας ένωσης ως πιθανό φάρμακο, οι ερευνητές καλούνται να συγκεντρώσουν πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο που απορροφάται, κατανέμεται, μεταβολίζεται κι αποβάλλεται από τον οργανισμό, τα πιθανά οφέλη και τους μηχανισμούς δράσης της, την καλύτερη δοσολογία, τον τρόπο χορήγησης του μελλοντικού φαρμάκου, την τοξικότητά της, την αλληλεπίδρασή της με άλλα φάρμακα ή θεραπείες, αλλά και την αποτελεσματικότητά της συγκριτικά με παρόμοια φάρμακα. [6] Οι στατιστικές μελέτες δείχνουν ότι από τις 5000-20000 ενώσεις που δείχνουν υποσχόμενες, 250 θα επιλεγθούν για προκλινική έρευνα, 5 θα περάσουν σε κλινικές δοκιμές και μόνο μία τελικά θα κυκλοφορήσει ως εγκεκριμένο φάρμακο. [9, p. 6] Η έγκριση δίνεται από τον οργανισμό Food and Drug Administration (FDA) στις ΗΠΑ και τον οργανισμό European Medicines Agency (EMA) για χρήση στην ΕΕ. Στην Ελλάδα, η άδεια κυκλοφορίας μπορεί να δοθεί κι από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων (ΕΟΦ). [4, p. 15]

Τα υποψήφια μόρια πρέπει να έχουν φαρμακοκινητικές ιδιότητες που επιτρέπουν μία προβλέψιμη σχέση μεταξύ της δόσης του φαρμάκου που χορηγείται, της έκθεσής του στο σημείο δράσης και της δέσμευσής του στον θεραπευτικό στόχο. Οι προκλινικές και κλινικές μελέτες που απαιτούνται για τον καθορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων είναι εκτεταμένες και μάλιστα περίπλοκες για στόχους που αφορούν το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), λόγω της παρουσίας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (ΑΕΦ). Ευτυχώς, οι εξελίξεις στη φαρμακευτική χημεία έχουν μειώσει τον αριθμό των μορίων με μη ικανοποιητικά φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά που φτάνουν στις κλινικές μελέτες. Έως το 1985, οι ανεπιθύμητες φαρμακοκινητικές ιδιότητες (Human PK) αποτελούσαν τον βασικότερο λόγο απόρριψης φαρμάκων σε ποσοστό 39%, ενώ μέχρι το 2000 το ποσοστό μειώθηκε σημαντικά στο 8% (Εικόνα 1). [7, p. 653], [10, p. 189]





**Εικόνα 1.** Λόγοι απόρριψης φαρμάκων πριν το 1985 σε σύγκριση με το 2000 [10, p. 189]

### 1.1.2.1. Ανακάλυψη ενώσεων – οδηγών

Ένα από τα σημαντικότερα βήματα στην ανάπτυξη ενός φαρμάκου αποτελεί η αναγνώριση κι η επιλογή του μοριακού στόχου. Ως στόχοι μπορεί να επιλεγθούν διάφορα βιολογικά συστατικά, ανάμεσα στα οποία είναι πρωτεΐνες, γονίδια ή RNA. Τα μακρομόρια αυτά φέρουν καθορισμένο ενεργό κέντρο για τη σύνδεση των ενδογενών προσδεμάτων. Τα φαρμακομόρια στοχεύουν στο ενεργό κέντρο, αλλά υπάρχει πιθανότητα να συνδεθούν και σε άλλες θέσεις (αλλοστερικές θέσεις). Αξίζει να αναφερθεί ότι η χρήση της βιοπληροφορικής βοηθά τόσο στην επιλογή, όσο και στην ιεράρχηση των πιθανών στόχων, που έχουν συσχετισθεί με ασθένειες. Μετά την επιλογή του μοριακού στόχου ακολουθεί η ανακάλυψη μίας αρχικής βιοδραστικής οδηγού-δομής (hit). Υπάρχουν αρκετοί τρόποι διαλογής για την εύρεσή της, με έναν από αυτούς τη διαλογή υψηλής απόδοσης (High Throughput Screening, HTS), η οποία επιτρέπει την άμεση εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη δραστικότητα της εξεταζόμενης ένωσης σε συγκεκριμένη συγκέντρωση. Επόμενο βήμα είναι η βελτιστοποίηση της οδηγού-δομής, με στόχο να παραχθούν ενώσεις-οδηγοί (lead compounds), με βελτιωμένες φυσικοχημικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Όπως έχει αναφερθεί, η ένωση-οδηγός φέρει τη φαρμακοφόρο δομή, δηλαδή τα ηλεκτρονιακά και στερικά χαρακτηριστικά που είναι απαραίτητα για την επίτευξη των βέλτιστων υπερμοριακών αλληλεπιδράσεων με ένα συγκεκριμένο βιολογικό στόχο για την πρόκληση του επιθυμητού βιολογικού αποτελέσματος. Η παρουσία της φαρμακοφόρου δομής αποτελεί αναγκαία, αλλά μη ικανή συνθήκη, αφού απουσία της δε θα επιτευχθεί η επιθυμητή δράση, αλλά η ύπαρξή της δεν εγγυάται τη δράση αυτή. Οι ενώσεις-οδηγοί με τα ικανοποιητικά χαρακτηριστικά επιλέγονται για τις προκλινικές μελέτες. [4, pp. 18–19], [11, pp. 1242–1243]

### 1.1.2.2. Προκλινικοί έλεγχοι

Πριν ξεκινήσουν οι έλεγχοι σε ανθρώπους, οι ερευνητές οφείλουν να πραγματοποιήσουν προκλινικούς ελέγχους ώστε να κρίνουν την τοξικότητα του φαρμάκου και να καθορίσουν μία κατάλληλη κι ασφαλή αρχική δόση για τις κλινικές δοκιμές. Οι προκλινικοί έλεγχοι περιλαμβάνουν σειρά πειραμάτων που χρησιμοποιούν *in vitro*, *in vivo* και *in silico* μοντέλα κι αφορούν την τοξικότητα, τη φαρμακοδυναμική και τη φαρμακοκινητική. [12], [13]

Τα μοντέλα *in vitro* μελετούν το φάρμακο σε τρυβλία Petri, είναι σχετικά γρήγορα, απλά κι οικονομικά αποδοτικά. Χρησιμοποιούνται καλλιέργειες κυττάρων, ιστών κι οργάνων ή δίνεται βάση σε συγκεκριμένα κυτταρικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες ή άλλα βιολογικά μακρομόρια. Οι *in vitro* μελέτες επιτρέπουν τον αυστηρό έλεγχο και την παρακολούθηση των πειραματικών συνθηκών και συχνά παρέχουν στοιχεία για τον τρόπο δράσης της ένωσης που ερευνάται. Παρόλα αυτά, αποτελεί περιοριστικό παράγοντα το γεγονός ότι τα απομονωμένα κύτταρα ενδέχεται να μη συμπεριφέρονται στο τρυβλίο, όπως στον ανθρώπινο οργανισμό, όπου θα αλληλεπιδρούν με εκατομμύρια άλλα κύτταρα. Επομένως, απαιτούνται πιο εξελιγμένα προκλινικά μοντέλα για τον καθορισμό του προφίλ ασφαλείας της χορηγούμενης ένωσης, πριν τη μετάβαση σε κλινικό περιβάλλον.

Οι μελέτες *in vivo* αφορούν πειράματα σε ζώα, οπότε είναι απαραίτητη η άδεια από τους αρμόδιους φορείς, ώστε να διασφαλιστεί ότι δε θα έχουν επιβλαβείς συνέπειες στα πειραματόζωα. Η επιλογή του κατάλληλου πειραματόζωου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (οικονομικούς, νομοθετικούς, ηθικούς) κι απαιτεί την κατανόηση της φυσιολογίας και της ομοιότητας με το όργανο-στόχο και τις μεταβολικές οδούς. Συνήθως, οι *in vivo* μελέτες πραγματοποιούνται σε τρωκτικά (ποντίκια, ινδικά χοιρίδια, χάμστερ) και σκύλους ή σε πρωτεύοντα (μαϊμούδες, πιθήκους κλπ.) στην περίπτωση μεγαλύτερων μορίων. Στη φαρμακευτική, συνήθως εξετάζονται ποντίκια, καθώς το 99% των γονιδίων τους συμπίπτει με αυτά των ανθρώπων.

Η πρόοδος της βιοπληροφορικής τις τελευταίες δεκαετίες έχει καταστήσει ελκυστικές τις *in silico* μελέτες, οι οποίες βασίζονται σε προσομοιώσεις στον υπολογιστή. Οι μελέτες αυτές μπορούν να δώσουν πληροφορίες για το πώς θα συμπεριφερθεί μία ένωση σε μεταγενέστερα *in vitro* και *in vivo* πειράματα. Εκτός από τον τεχνολογικό εξοπλισμό που απαιτείται για τις προσομοιώσεις, είναι απαραίτητες οι ειδικές γνώσεις βιοχημείας και μοριακής βιολογίας.

Ο κατάλληλος σχεδιασμός των προκλινικών μελετών κι η προσεκτική επιλογή των μοντέλων είναι ζωτικής σημασίας για την εξαγωγή σχετικών αποτελεσμάτων, προκειμένου να εξασφαλιστεί η προστασία των ανθρώπων που θα συμμετάσχουν στις κλινικές δοκιμές. [9, pp. 7–8]

### 1.1.2.3. Κλινικοί έλεγχοι

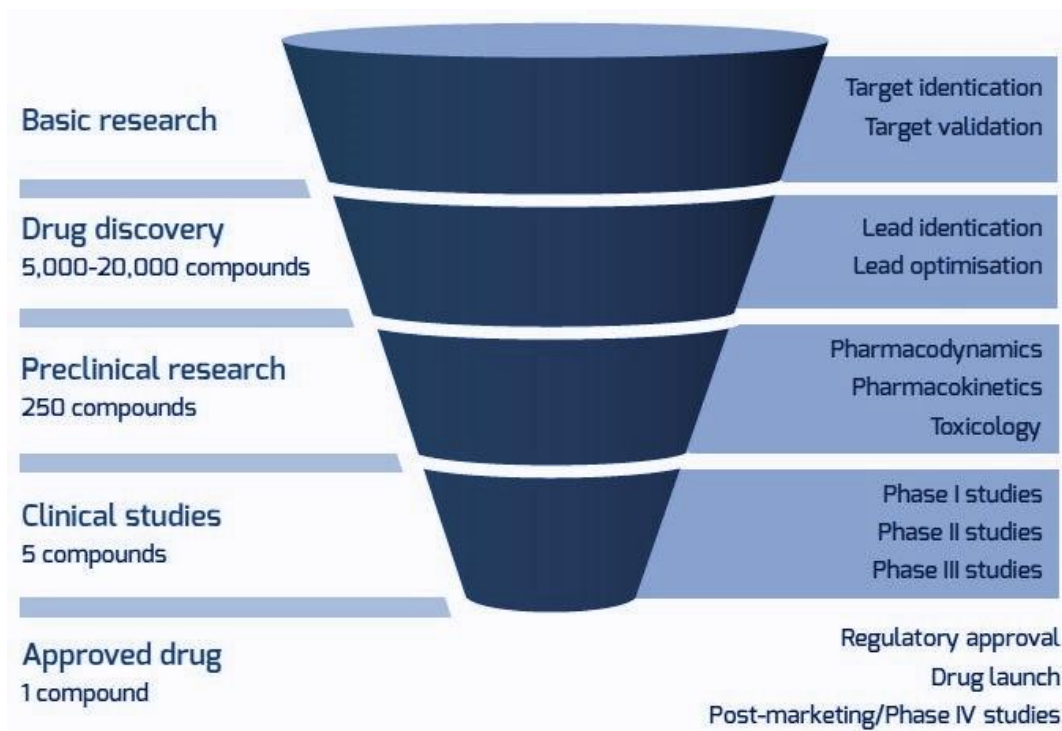
Έπειτα από την προκλινική έρευνα, ακολουθούν οι κλινικές μελέτες, που πραγματοποιούνται σε ανθρώπους και διακρίνονται σε 4 διαφορετικά στάδια (Φάσεις I-IV).

Στο πρώτο στάδιο (Φάση I), που μπορεί να διαρκέσει αρκετούς μήνες, 10-15 εθελοντές λαμβάνουν μία υπο-θεραπευτική δόση του φαρμάκου, ώστε να ληφθούν φαρμακοκινητικές πληροφορίες, χωρίς να ελεγχθεί η φαρμακολογική δράση του. Ο στόχος είναι να διερευνηθεί αν το υποψήφιο φάρμακο αποδίδει όπως αναμένεται από τις προκλινικές μελέτες. Αν ο έλεγχος κριθεί επιτυχής, πραγματοποιείται περαιτέρω έρευνα σχετικά με την ασφάλεια και την ανοχή του φαρμάκου στους ανθρώπους. Σε αυτήν συμμετέχουν 20-50 υγιείς εθελοντές, με σκοπό τον καθορισμό της βέλτιστης δόσης, όπου εμφανίζονται οι λιγότερες παρενέργειες. Στο σημείο αυτό εκτιμώνται κι οι συχνότερες και σοβαρότερες ανεπιθύμητες ενέργειες, καθώς κι οι φαρμακολογικές, φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητές του. Συνήθως, το 70% των ενώσεων εγκρίνεται για το επόμενο στάδιο.

Στο δεύτερο στάδιο (Φάση II) συμμετέχουν 100-500 ασθενείς εθελοντές και μελετάται η αποτελεσματικότητα κι οι πιθανές παρενέργειες του φαρμάκου. Οι πληροφορίες αυτές εξάγονται από τη σύγκριση της κατάστασης των ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία κι από την απόκριση των ασθενών που έλαβαν το υποψήφιο κι ένα εικονικό φάρμακο. Η Φάση II μπορεί να διαρκέσει αρκετούς μήνες έως και 2 χρόνια και περίπου το 33% των εξεταζόμενων φαρμάκων περνάει στο επόμενο στάδιο.

Στο τρίτο στάδιο (Φάση III) συμμετέχουν 300-3000 ασθενείς εθελοντές, με στόχο την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας και των ανεπιθύμητων ενεργειών του φαρμάκου, ώστε να εγκριθεί από τις αρμόδιες Ρυθμιστικές Αρχές. Λόγω της μεγάλης διάρκειας της φάσης αυτής (1-4 χρόνια), τα αποτελέσματα είναι πιθανότερο να δείξουν μακροπρόθεσμες ή σπάνιες παρενέργειες. Στο τελευταίο στάδιο των κλινικών δοκιμών εγκρίνεται περίπου το 25-30% των φαρμάκων.

Στο τελευταίο στάδιο (Φάση IV), που συνήθως πραγματοποιείται μετά την έγκριση του φαρμάκου από τον αρμόδιο οργανισμό, συμμετέχουν αρκετές χιλιάδες ασθενείς εθελοντές, με σκοπό να συγκεντρωθούν περισσότερες πληροφορίες για την ασφάλεια, την αποτελεσματικότητα και τις νέες ενδείξεις από τη λήψη του. Σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε απόσυρσή του από την αγορά ή περιορισμό του σε συγκεκριμένες χρήσεις. Ωστόσο, οι μελέτες στο τελικό στάδιο μπορεί να αποτελέσουν αφετηρία για νέες ιδέες στην ανάπτυξη των φαρμάκων. [8], [9, pp. 5–6], [14]



**Εικόνα 2.** Η πορεία του φαρμάκου από τη βασική έρευνα έως την έγκριση για την κυκλοφορία του στην αγορά [9, p. 6]

## 1.2. Φαρμακοκινητική

Τα φάρμακα χορηγούνται με πολλούς τρόπους στον οργανισμό: από το στόμα (*per os*), υπογλώσσια, από το ορθό, εισπνεόμενα, ενδοφλέβια, ενδομυϊκά, υποδόρια, διαδερμικά, ενδοοστικά ή τοπικά (π.χ. οφθαλμούς, αυτιά, δέρμα, κόλπο), με προτιμότερη τη χορήγηση από το στόμα. Η φαρμακοκινητική μελετά τους παράγοντες που σχετίζονται με τη διακίνηση ενός φαρμάκου. Συγκεκριμένα, επικεντρώνεται στο τι κάνει ο οργανισμός στο φάρμακο και τον τρόπο που αυτό απορροφάται στην κυκλοφορία του αίματος (Absorption), κατανέμεται στον οργανισμό (Distribution), μεταβολίζεται (Metabolism) και τελικά απεκκρίνεται (Excretion). Η πορεία αυτή αναφέρεται συχνά με τη συντομογραφία ADME από τα αρχικά των 4 αγγλικών όρων (Εικόνα 3). Στη βιβλιογραφία συναντάται κι ο όρος ADMET, όπου το T προέρχεται από την τοξικότητα (Toxicity). Η γνώση της φαρμακοκινητικής είναι ζωτικής σημασίας κατά την ανάπτυξη των φαρμάκων, τόσο για την ερμηνεία των προκλινικών τοξικολογικών και φαρμακολογικών δεδομένων, όσο και για την επιλογή κατάλληλου δοσολογικού σχήματος για τις κλινικές μελέτες. [15, p. 117], [16, pp. 69–70]

### 1.2.1. Απορρόφηση

Η απορρόφηση ορίζεται ως η δίοδος ενός φαρμάκου από τη θέση χορήγησής του προς το πλάσμα. Όταν χορηγείται από το στόμα ακολουθεί συγκεκριμένη πορεία, από τον οισοφάγο, το ισχυρά όξινο στομάχι, το λεπτό έντερο και το ήπαρ, ώστε να καταλήξει στην κυκλοφορία του αίματος. Τυπικά, περίπου το 75% ενός φαρμάκου που χορηγείται *per os* απορροφάται μέσα σε 1-3 ώρες, αλλά υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που μπορούν να μεταβάλουν τον χρόνο αυτό, όπως η κινητικότητα του γαστρεντερικού, η σπλαχνική ροή αίματος, το μέγεθος κι η μορφή των σωματιδίων και φυσικοχημικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκων. Στην περίπτωση αυτού του τρόπου χορήγησης (εντερική) παρατηρείται το φαινόμενο πρώτης διόδου, όπου μία σημαντική ποσότητα του φαρμάκου εξουδετερώνεται από ένζυμα του στομάχου, βακτηρίδια, ένζυμα του εντέρου κι ηπατικά κύτταρα, γεγονός που συνήθως οδηγεί στην απαίτηση μεγαλύτερης δόσης.

Το εξαιρετικά χαμηλό pH του στομάχου (περίπου ίσο με 1) επιτρέπει τη χημική διάσπαση των συστατικών των τροφών, ενώ δευτερεύουσα λειτουργία του οργάνου είναι η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών. Τα λιπόφιλα φάρμακα απορροφώνται ευκολότερα, ενώ η παρουσία τροφής στο στομάχι μπορεί να μεταβάλει τον ρυθμό απορρόφησης του φαρμάκου. Για τα περισσότερα φάρμακα αυτό σημαίνει αύξηση του ρυθμού, αλλά οι κλινικές δοκιμές πραγματοποιούνται σε ασθενείς με άδειο στομάχι. Το λεπτό έντερο εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα ως προς την απορρόφηση της δραστικής ουσίας στην κυκλοφορία του αίματος. Η διαφορά οφείλεται στον μεγαλύτερο χρόνο διέλευσης (συγκριτικά με το στομάχι), στο υψηλότερο pH (συχνά ευνοϊκότερο για την πλειοψηφία των φαρμάκων) και στην πολύ μεγάλη επιφάνειά του λόγω των πτυχώσεων και των προεκβολών τους. Στη συνέχεια, τα φάρμακα μέσω της πυλαίας φλέβας εισέρχονται στο ήπαρ, το οποίο αποτελεί εξαιρετικά αποτελεσματικό σύστημα άμυνας του οργανισμού κι από εκεί περνούν στην κυκλοφορία του αίματος. Σημειώνεται ότι στο ήπαρ εντοπίζεται το φαινόμενο πρώτης διόδου, άρα ουσίες επιρρεπείς σε αυτό εμφανίζουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα με χορήγηση *per os*. Η βιοδιαθεσιμότητα ενός

φαρμάκου ορίζεται ως το ποσοστό της δόσης του που εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος κι υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Βιοδιαθεσιμότητα} = \frac{\text{Ποσότητα φαρμάκου που εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος}}{\text{Χορηγούμενη ποσότητα φαρμάκου}} \quad [1.1]$$

Το 1997, ο C. A. Lipinski πρότεινε κάποια μη ευνοϊκά μοριακά χαρακτηριστικά για την απορρόφηση φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα. Επειδή όλοι οι όροι είναι πολλαπλάσιοι του 5, αναφέρεται ως Lipinski's Rule of Five. Πιο συγκεκριμένα, όταν μία ένωση έχει δύο τουλάχιστον από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά αναμένεται να εμφανίζει προβλήματα στην απορρόφηση, τη διαλυτότητα και τη βιοδιαθεσιμότητά της.

1. Μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 500
2. Τιμή υπολογιστικού logP (με το σύστημα θραυσμάτων Leo-Hansch) μεγαλύτερη από 5 (στην περίπτωση υπολογιστικής πρόβλεψης με τη βάση εξισώσεων-μοντέλων Moriguchi το όριο είναι 4,15)
3. Περισσότερες από 5 θέσεις δοτών πρωτονίου σε δεσμούς υδρογόνου, υπολογισμένες ως το άθροισμα όλων των ομάδων OH, NH στο μόριο
4. Περισσότερες από 10 θέσεις δεκτών πρωτονίου σε δεσμούς υδρογόνου, υπολογισμένες ως το άθροισμα όλων των ατόμων O, N στο μόριο

Η ενδοφλέβια χορήγηση (παρεντερική) μπορεί να γίνει με ένεση ή έγχυση. Στην πρώτη περίπτωση, χορηγείται μία δόση απευθείας στη φλέβα, ενώ στη δεύτερη χορηγείται από ενδοφλέβιο ορό σε προκαθορισμένο χρονικό διάστημα. Ο τρόπος αυτός επιτρέπει άμεση απορρόφηση της χορηγούμενης ουσίας στο κυκλοφορικό σύστημα κι η βιοδιαθεσιμότητα είναι ίση με 1. Άλλες περιπτώσεις με υψηλή βιοδιαθεσιμότητα, αλλά χαμηλότερη από της ενδοφλέβιας είναι η ενδομυϊκή (διάχυση φαρμάκου από τον περιβάλλοντα μυϊκό ιστό στην κυκλοφορία του αίματος) κι η υποδόρια χορήγηση (έγχυση κατευθείαν κάτω από το δέρμα). Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό απορρόφησης στο σημείο της ένεσης είναι η διάχυση μέσω των ιστών κι η απομάκρυνση από την τοπική αιματική ροή. Επιπλέον, μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα έχουν και τα φάρμακα που χορηγούνται διαδερμικά, καθώς κι υπογλώσσια ή τα εισπνεόμενα που οδηγούν σε άμεση είσοδο στη συστηματική κυκλοφορία. Τέλος, η χορήγηση από το ορθό, αν και θεωρείται εντερική οδός, η παρουσία του φαινομένου πρώτης διόδου είναι αμελητέα. Χρησιμοποιείται για φάρμακα που απαιτείται να δράσουν τοπικά ή να έχουν συστηματική δράση, αλλά δεν αποτελεί συχνή επιλογή, καθώς οι ασθενείς δεν είναι ιδιαίτερα δεκτικοί σε αυτόν τον τρόπο. [15, pp. 125–126], [16, pp. 70–73], [17, pp. 8–9]

### 1.2.2. Κατανομή

Έπειτα από την απορρόφηση της φαρμακευτικής ουσίας και την είσοδό της στο κυκλοφορικό σύστημα, η κατανομή της πραγματοποιείται πολύ σύντομα σε ολόκληρο το σώμα και καθορίζεται από τις μοριακές ιδιότητες και την πολικότητα του φαρμάκου, τη συγγένειά του με το πλάσμα των πρωτεϊνών και τον ρυθμό αιμάτωσης των ιστών. Η χορηγούμενη ουσία θα πρέπει να μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες είτε με παθητική διάχυση (μεταφορά από περιοχή υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης, διαπερνώντας τη μεμβράνη που διακρίνει τις δύο περιοχές, χωρίς την απαίτηση επιπλέον ενέργειας), είτε με ενεργητική μεταφορά (μεταφορά από ειδικές



πρωτεΐνες-μεταφορείς που καταλαμβάνουν όλο το πάχος της μεμβράνης, με απαίτηση ενέργειας που εξασφαλίζεται από την υδρόλυση του ATP). [9, p. 6], [16, p. 73]

Τα φάρμακα μπορούν να κινηθούν ανάμεσα στα κύτταρα, ώστε να φτάσουν στους ιστούς και τον στόχο τους. Αν αυτός βρίσκεται σε κάποιον υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης δρουν άμεσα. Στην περίπτωση, όμως, που στόχος είναι κάποιος ενδοκυτταρικός υποδοχέας, ένζυμο ή το DNA, είναι υποχρεωτικό να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. Όπως αναφέρθηκε, υπάρχουν δύο πιθανοί τρόποι να εισέλθουν τα φάρμακα στο κύτταρο· να είναι αρκετά λιπόφιλα ή να έχουν κατάλληλη δομή προκειμένου να μεταφερθούν από κάποια πρωτεΐνη-μεταφορέα.

Ιδιαίτερη σημασία δίνεται στις φαρμακευτικές ουσίες που προορίζονται για δράση στο ΚΝΣ. Τα τριχοειδή αγγεία του κυκλοφορικού συστήματος στον εγκέφαλο περιβάλλονται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (ΑΕΦ), μία μεμβράνη που εμποδίζει την παθητική διάχυση ανεπιθύμητων πολικών ενώσεων από την κυκλοφορία του αίματος. Η έννοια του φραγμού αυτού εισήχθη από τον P. Ehrlich (1885) για να ερμηνεύσει την παρατήρησή του ότι η ενδοφλέβια ένεση χρωστικής έβαψε τους περισσότερους ιστούς, αλλά ο εγκέφαλος παρέμεινε χωρίς χρωστική. Ωστόσο, μία φλεγμονή είναι ικανή να διαταράξει την ακεραιότητα του ΑΕΦ, επιτρέποντας την είσοδο στον εγκέφαλο φαρμάκων που φυσιολογικά δε θα διέρχονταν από τον φραγμό. Επομένως, οι φαρμακευτικές ενώσεις που στοχεύουν στο ΚΝΣ πρέπει να έχουν κατάλληλες ιδιότητες, ώστε να διαπεράσουν τον ΑΕΦ. [15, p. 129], [16, pp. 73–74]

### 1.2.3. Μεταβολισμός

Οι φαρμακευτικές ενώσεις υποβάλλονται σε τροποποιήσεις από πλήθος μεταβολικών ενζύμων που έχουν σκοπό την εύκολη αποβολή τους από το σώμα. Τα προϊόντα των μεταβολικών αντιδράσεων καλούνται μεταβολίτες. Συνήθως, χάνουν τη δραστικότητα του αρχικού φαρμάκου ή διατηρούν ένα ορισμένο επίπεδο δραστικότητας, ενώ, λιγότερο συχνά, μπορεί να είναι πιο δραστικοί. Κάποιοι από τους μεταβολίτες ενδέχεται να παρουσιάσουν διαφορετική δραστικότητα από το χορηγούμενο φάρμακο, με αποτέλεσμα παρενέργειες ή τοξικότητα. Ακόμη, υπάρχει πιθανότητα ο μεταβολισμός να επιτρέψει την ενεργοποίηση της δραστικής ουσίας στο σώμα, γεγονός στο οποίο βασίζονται τα προφάρμακα (ανενεργές, πρόδρομες ουσίες που μετατρέπονται σε δραστικές μέσω μεταβολικών αντιδράσεων). Αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν περιπτώσεις ενώσεων που δε μεταβολίζονται (όπως η μετφορμίνη). Κατά την ανάπτυξη ενός φαρμάκου, είναι υποχρεωτικός ο προσδιορισμός όλων των μεταβολιτών του, ώστε να δοθεί η έγκριση για την κυκλοφορία του στην αγορά.

Οι αντιδράσεις μεταβολισμού διακρίνονται στις αντιδράσεις Φάσης I και τις αντιδράσεις Φάσης II (συνήθως συμβαίνουν διαδοχικά) και τα προϊόντα τους είναι πιο υδατοδιαλυτά από τις αρχικές ενώσεις.

Οι βασικές αντιδράσεις Φάσης I είναι καταβολικές (οξειδωση, αναγωγή, υδρόλυση) κι η πραγματοποίησή τους εξαρτάται από τα διαθέσιμα ένζυμα, τις δραστικές ομάδες του φαρμάκου και τον ανθρακικό σκελετό του. Οι περισσότερες αντιδράσεις οξειδωσης λαμβάνουν χώρα στο ήπαρ, όπου βρίσκεται μία «υπεροικογένεια» ενζύμων, το κυτόχρωμα P450. Πιο συγκεκριμένα, από τα περισσότερα από 50 διαφορετικά ισόενζυμα της οικογένειας αυτής στον οργανισμό, το σημαντικότερο είναι το CYP3A4. Οι αντιδράσεις αναγωγής εντοπίζονται σπανιότερα κι οδηγούν σε αναγωγή μίας νιτρο-

ομάδας προς αμίνη ή μίας κετόνης προς αλκοόλη. Τέλος, από τις αντιδράσεις υδρόλυσης πιο χαρακτηριστικές είναι η υδρόλυση εστέρων προς οξέα κι αλκοόλες κι αμιδίων προς οξέα κι αμίνες. Επισημαίνεται ότι η πρόβλεψη των μεταβολικών αντιδράσεων είναι δύσκολη λόγω της ιδιαίτερης φύσης των βιολογικών συστημάτων.

Οι αντιδράσεις Φάσης II είναι συνθετικές (αναβολικές) και περιλαμβάνουν συζεύξεις (σύνδεση με μία ομάδα υποκατάστασης), που συνήθως παράγουν ανενεργά μόρια. Τις περισσότερες φορές πραγματοποιούνται στα προϊόντα των αντιδράσεων Φάσης I, στα οποία συνδέονται νέες πολικές ομάδες, προκειμένου να είναι πιο υδατοδιαλυτά τα μεταβολικά προϊόντα. Μεταξύ των πιο συχνών αντιδράσεων της δεύτερης φάσης βρίσκονται η ακετυλίωση, η σουλφονίωση κι η σύζευξη με αμινοξέα, γλυκουρονικό οξύ ή γλουταθειόνη.

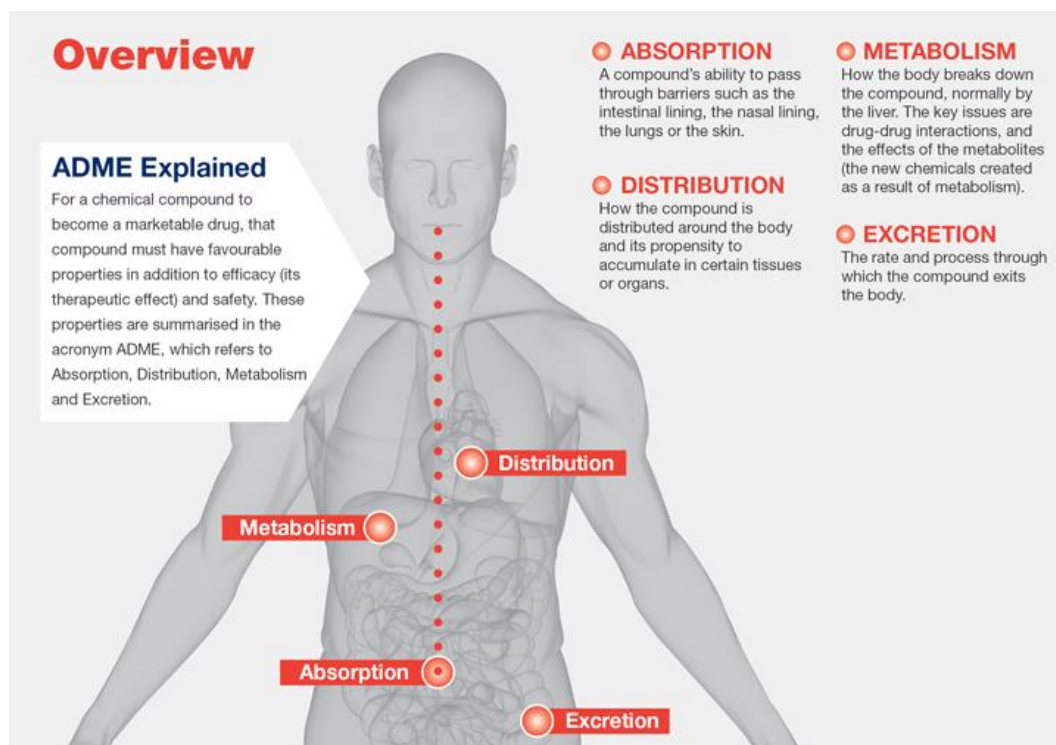
Αν ένα φάρμακο μεταβολίζεται γρήγορα μπορεί να απαιτείται πολλαπλή ημερήσια χορήγηση ή μεγαλύτερη δόση, ώστε να διατηρηθεί η συγκέντρωση στην κυκλοφορία του αίματος ή στο όργανο-στόχο, που είναι αναγκαία για να επιτευχθεί θεραπευτικό αποτέλεσμα. Ο σύντομος μεταβολισμός είναι ωφέλιμος στην περίπτωση των προφαρμάκων. Από την άλλη, ενώσεις που μεταβολίζονται πολύ αργά, δεν αποκλείεται να προκαλέσουν προβλήματα αν μείνουν στο σώμα για μεγάλα χρονικά διαστήματα, λόγω συσσώρευσης του φαρμάκου και πιθανής τοξικότητας. [15, pp. 133–135], [16, pp. 74–77], [18, p. 25], [19]

#### 1.2.4. Απέκκριση

Τα φάρμακα απομακρύνονται από τον οργανισμό είτε στην αρχική τους μορφή (χωρίς να έχουν μεταβολιστεί), είτε υπόκεινται σε μεταβολισμό κι απεκκρίνεται ο μεταβολίτης τους. Η κύρια οδός απέκκρισης είναι από τους νεφρούς, οι οποίοι πρώτα φιλτράρουν το αίμα και συγκρατούν τις άχρηστες χημικές ενώσεις, ώστε να τις αποβάλουν με τα ούρα. Λόγω της επίδρασης του pH, τα ασθενή οξέα απεκκρίνονται ταχύτερα σε αλκαλικά ούρα κι αντίστροφα. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στα ηλικιωμένα άτομα και τους ασθενείς με νεφρική νόσο, καθώς είναι πιθανόν τα φάρμακα που απομακρύνονται με νεφρική απέκκριση να έχουν τοξική δράση.

Τα ηπατοκύτταρα μεταφέρουν διάφορες ουσίες και μόρια φαρμάκων από το πλάσμα στη χολή μέσω συστημάτων μεταφοράς παρόμοιων με αυτά των νεφρικών σωληναρίων. Διάφορα συζευγμένα (ιδιαίτερα με γλυκουρονικό οξύ) υδρόφιλα φάρμακα συγκεντρώνονται στη χολή κι απεκκρίνονται στο δωδεκαδάκτυλο, όπου η γλυκουρονίδη υδρολύεται, απελευθερώνοντας το ενεργό φάρμακο, το οποίο μπορεί να απορροφηθεί εκ νέου κι ο κύκλος να επαναληφθεί, μία διαδικασία που ονομάζεται εντεροηπατική κυκλοφορία. Το αποτέλεσμα είναι μία «δεξαμενή» ανακυκλούμενου φαρμάκου, που αναλογεί περίπου στο 20% του συνολικού φαρμάκου στον οργανισμό και παρατείνει τη δράση του (σημαντικό για φάρμακα όπως η μορφίνη και η αιθινυλοιστραδιόλη). Αρκετές φαρμακευτικές ουσίες εκκρίνονται σε σημαντικά επίπεδα στη χολή. Το βεκουρόνιο αποτελεί παράδειγμα φαρμάκου που εκκρίνεται κυρίως αναλλοίωτο σε αυτήν. Ένα άλλο παράδειγμα είναι η ριφαμπικίνη που απορροφάται από το έντερο και σταδιακά αποακετυλιώνεται, διατηρώντας τη βιολογική δράση της. Κι οι δύο μορφές εκκρίνονται στη χολή, αλλά η αποακετυλιωμένη δεν απορροφάται ξανά, ώστε τελικά το μεγαλύτερο μέρος του φαρμάκου απεκκρίνεται από το σώμα σε αυτήν τη μορφή με τα κόπρανα.

Τα πτητικά ή αέρια φάρμακα απεκκρίνονται από τους πνεύμονες με τη διαδικασία της αναπνοής. Η μειοψηφία των φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα αποβάλλονται με τα κόπρανα. Τέλος, η απέκκριση μπορεί να γίνει με τον ιδρώτα ή το μητρικό γάλα. Στην τελευταία περίπτωση, επιλέγονται προσεκτικά τα φάρμακα που χορηγούνται, διότι ενδέχεται να προκαλέσουν παρενέργειες στα βρέφη. [15, pp. 133–141], [16, p. 78]



Εικόνα 3. Απορρόφηση (Absorption), Κατανομή (Distribution), Μεταβολισμός (Metabolism), Απέκκριση (Excretion) [18, p. 4]

### 1.2.5. Τοξικότητα

Η τοξικότητα θεωρείται πολύ σημαντική φαρμακευτική ιδιότητα. Το επιθυμητό φάρμακο πρέπει να έχει υψηλό θεραπευτικό δείκτη, δηλαδή το επίπεδο του πλάσματος που απαιτείται για να ασκήσει τοξική δράση πρέπει να είναι εξαιρετικά μεγαλύτερο από αυτό που απαιτείται για θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Για φαρμακευτικές ουσίες που χορηγούνται στον άνθρωπο, ο θεραπευτικός δείκτης (Therapeutic Index, TI) υπολογίζεται από τη σχέση:

$$TI = \frac{TD_{50}}{ED_{50}} \quad [1.2]$$

όπου:  $TD_{50}$ : εκτιμώμενη δόση στην οποία το 50% του πληθυσμού εμφανίζει τοξικές παρενέργειες  
 $ED_{50}$ : εκτιμώμενη δόση που προκαλεί μία συγκεκριμένη επίδραση (συνήθως επιθυμητή) στο 50% του πληθυσμού

Αν η τιμή του TI είναι χαμηλή (δηλαδή η διαφορά μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων είναι πολύ μικρή), το φάρμακο πρέπει να χορηγείται προσεκτικά και το άτομο που το λαμβάνει



να παρακολουθείται για τυχόν σημάδια τοξικότητας. Ο θεραπευτικός δείκτης αποκτά ενδιαφέρον μόνο ως ο λόγος της ελάχιστης τοξικής ( $TD_1$ ) προς τη μέγιστη αποτελεσματική δόση ( $ED_{99}$ ), δηλαδή πόσο μπορεί να αυξηθεί η δόση χωρίς πιθανή εμφάνιση τοξικών εκδηλώσεων (θεραπευτικό εύρος, Margin of Safety, MOS).

Η τοξικότητα παραμένει ιδιαίτερα απρόβλεπτη ιδιότητα, καθώς εξακολουθεί να εμφανίζεται στις κλινικές δοκιμές, ακόμη και σε υποψήφια φάρμακα που φαίνονταν ασφαλή στις προκλινικές μελέτες, με αποτέλεσμα να οδηγούνται σε περιορισμένη χρήση ή σε απόσυρση από την αγορά. [20, p. 363], [21], [22, p. 170], [23, pp. 31–32]

### 1.3. Φαρμακοδυναμική

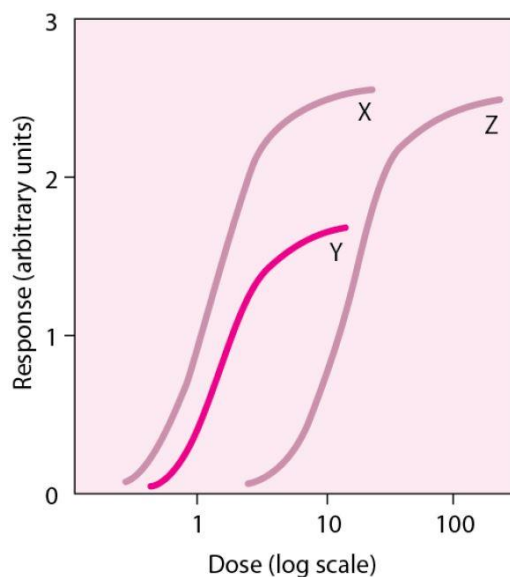
Η φαρμακοδυναμική μελετά τις βιοχημικές, φυσιολογικές και μοριακές επιπτώσεις των φαρμάκων στον οργανισμό και περιλαμβάνει τη σύνδεση σε υποδοχείς (και την ευαισθησία των υποδοχέων), τις επιδράσεις μετά από τη σύνδεση και τις χημικές αντιδράσεις. Η φαρμακοδυναμική, μαζί με τη φαρμακοκινητική, επιτρέπει την ερμηνεία της σχέσης δόσης-απόκρισης. Η φαρμακολογική απόκριση εξαρτάται από τη σύνδεση του φαρμάκου στον στόχο του. Οι φαρμακευτικές ενώσεις, όμως, δε μεταφέρονται μόνο στην περιοχή του στόχου τους, αλλά κατανέμονται σε ολόκληρο το σώμα όπου μπορεί να βρίσκονται πολλοί πιθανοί στόχοι. Αν και έχουν σχεδιαστεί να αλληλεπιδρούν με έναν βιολογικό στόχο, πολλές φορές αλληλεπιδρούν ασθενώς με πολλαπλούς στόχους. Στην περίπτωση αυτή, είναι πιθανή η εμφάνιση παρενεργειών. [16, p. 78], [24]

Η φαρμακοδυναμική ενός φαρμάκου μπορεί να επηρεαστεί από φυσιολογικές αλλαγές λόγω μίας διαταραχής ή μίας ασθένειας, της διαδικασίας της γήρανσης ή της παρουσίας άλλων φαρμάκων. Αναλυτικότερα, μεταξύ των διαταραχών και των ασθενειών αναφέρονται οι γενετικές μεταλλάξεις, η θυρεοτοξίκωση, η μυασθένεια Gravis, η κακή διατροφή, η νόσος Parkinson και μερικές μορφές σακχαρώδους διαβήτη ανθεκτικού στην ινσουλίνη. Όλες αυτές είναι ικανές να αλλάξουν τη σύνδεση των υποδοχέων και το επίπεδο των πρωτεϊνών σύνδεσης, αλλά και να μειώσουν την ευαισθησία του υποδοχέα. Η γήρανση φαίνεται να επηρεάζει τη φαρμακοδυναμική μέσω αλλαγών στη δέσμευση των υποδοχέων ή στην ευαισθησία των τελευταίων μετά τη δέσμευση. Τέλος, οι αλληλεπιδράσεις φαρμάκων οδηγούν σε ανταγωνισμό για τις θέσεις σύνδεσης με τον υποδοχέα ή μεταβάλλουν την απόκριση μετέπειτα της σύνδεσης. [24]

#### 1.3.1. Σχέση δόσης - απόκρισης

Ο πιο κοινός μηχανισμός αλληλεπίδρασης είναι αυτός του φαρμάκου με τους υποδοχείς των ιστών που βρίσκονται είτε σε κυτταρικές μεμβράνες, είτε στο ενδοκυττάριο υγρό. Η έκταση της ενεργοποίησης του υποδοχέα κι η επακόλουθη βιολογική απόκριση σχετίζονται με τη συγκέντρωση της χορηγούμενης ουσίας. Η σχέση αυτή αναπαρίσταται με την καμπύλη δόσης-απόκρισης, που απεικονίζει την επίδραση (στον άξονα  $y$ ) σε συνάρτηση με τη δόση (ή τη συγκέντρωση) της ουσίας που την προκαλεί, συνήθως σε λογαριθμική κλίμακα με βάση το 10 (στον άξονα  $x$ ). Σημειώνεται ότι η σχέση δόσης-απόκρισης απεικονίζεται στο γράφημα ανεξάρτητη του χρόνου. Μία υποθετική καμπύλη δόσης-απόκρισης παρουσιάζει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά μεταξύ των οποίων είναι η ισχύς (θέση καμπύλης κατά μήκος του άξονα  $x$ ), η μέγιστη αποτελεσματικότητα

(μέγιστη εφικτή απόκριση) κι η κλίση (μεταβολή απόκρισης ανά μονάδα δόσης). Η απεικόνιση της καμπύλης για διαφορετικά φάρμακα που μελετώνται υπό πανομοιότυπες συνθήκες επιτρέπει τη σύγκριση των φαρμακολογικών προφίλ τους κι επομένως βοηθά στον προσδιορισμό της δόσης που απαιτείται να χορηγηθεί για να επιτευχθεί συγκεκριμένο αποτέλεσμα. Στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 1) παρατίθεται η σύγκριση τριών υποθετικών φαρμάκων (X, Y, Z). Το φάρμακο X είναι πιο ισχυρό από τα άλλα δύο, αλλά έχει την ίδια αποτελεσματικότητα με το Z. Το Y είναι ισχυρότερο του Z, αλλά η μέγιστη αποτελεσματικότητά του είναι χαμηλότερη.



**Διάγραμμα 1.** Σύγκριση καμπυλών δόσης-απόκρισης τριών υποθετικών φαρμάκων X, Y και Z [25]

Η μελέτη της δόσης-απόκρισης που περιλαμβάνει αρχές φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής, καθορίζει την απαιτούμενη δόση και τη συχνότητα χορήγησης του φαρμάκου, αλλά και τον θεραπευτικό δείκτη του. Όπως έχει αναφερθεί, αύξηση της δόσης ενός σκευάσματος με χαμηλό θεραπευτικό δείκτη, αυξάνει τις πιθανότητες τοξικότητας ή αναποτελεσματικότητας. Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά αυτά διαφέρουν ανάλογα με τον οργανισμό κι εξαρτώνται από τον/την ασθενή (ενδεχόμενη εγκυμοσύνη, ηλικία, λειτουργία οργάνων). [25], [26]

### 1.3.2. Αλληλεπιδράσεις φαρμάκων - υποδοχέων

Η επίδραση ενός φαρμακευτικού σκευάσματος που φτάνει στη θέση δράσης του καθορίζεται από τη σύνδεσή του με τον υποδοχέα. Οι υποδοχείς μπορεί να βρίσκονται στους νευρώνες του ΚΝΣ για να καταστέλλουν την αίσθηση του πόνου, στον καρδιακό μυ ώστε να επηρεάζουν την ένταση της συστολής ή ακόμη και σε βακτήρια για να διαταράσσουν το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμά τους. Τις περισσότερες φορές, η συγκέντρωση στη θέση πρόσδεσης με τον υποδοχέα είναι καθοριστική για την ένταση της παρατηρούμενης απόκρισης. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που μπορεί να την επηρεάσουν, όπως η πυκνότητα των υποδοχέων στην επιφάνεια του

κυττάρου, ο μηχανισμός με τον οποίο ένα σήμα μεταδίδεται στο κύτταρο από δευτερεύοντες αγγελιοφόρους, αλλά κι οι ρυθμιστικοί παράγοντες που ελέγχουν τη μετάφραση των γονιδίων και την παραγωγή των πρωτεϊνών. [27, p. 2]

Οι υποδοχείς φαρμάκων εντοπίζονται σε δύο καταστάσεις διαμόρφωσης σε ισορροπία μεταξύ τους, μία ενεργή και μία ανενεργή κατάσταση. Ένα φάρμακο που τείνει να προσδεθεί στον ενεργό υποδοχέα, σταθεροποιεί την ενεργή διαμόρφωσή του και προκαλεί φαρμακολογικό αποτέλεσμα καλείται αγωνιστής. Αν, όμως, καθιστά ανενεργό έναν εγγενώς ενεργό υποδοχέα ονομάζεται αντίστροφος αγωνιστής. Μία φαρμακευτική ουσία που συνδέεται στην ενεργό θέση ενός υποδοχέα και παράγει τη μέγιστη δυνατή απόκριση, όταν καταλαμβάνονται όλοι οι υποδοχείς, λέγεται πλήρης αγωνιστής (full agonist). Μία ουσία που προκαλεί απόκριση μικρότερη της μέγιστης, ακόμη κι αν είναι κατελημμένοι όλοι οι υποδοχείς, καλείται μερικός αγωνιστής (partial agonist). Ένα φάρμακο που δρα ως μερικός αγωνιστής σε έναν ιστό, μπορεί να δρα ως πλήρης αγωνιστής σε κάποιον άλλον. Υπάρχει περίπτωση μία φαρμακευτική ένωση να αναστέλλει τη δράση ενός αγωνιστή, αλλά απουσία αυτού να μην έχει καμία απολύτως επίδραση κι αναφέρεται ως ανταγωνιστής. Οι ανταγωνιστές διακρίνονται ανάλογα με το αν δρουν στους υποδοχείς ή όχι (receptor και nonreceptor antagonists, αντίστοιχα).

Στην πρώτη περίπτωση, ο ανταγωνιστής προσδέεται στη θέση πρόσδεσης του αγωνιστή (εμποδίζοντας την πρόσδεση του αγωνιστή) ή σε μία αλλοστερική θέση στον υποδοχέα (μεταβάλλοντας τη συγγένεια του αγωνιστή με τη θέση πρόσδεσης ή παρεμποδίζοντας την αλλαγή διαμόρφωσης που απαιτείται για την ενεργοποίηση του υποδοχέα). Αυτού του είδους οι ανταγωνιστές μπορεί να είναι συναγωνιστικοί ή μη (competitive και noncompetitive antagonists, αντίστοιχα). Οι υψηλές συγκεντρώσεις ενός αγωνιστή μπορούν να ξεπεράσουν τους συναγωνιστικούς ανταγωνιστές, αλλά όχι και τους μη συναγωνιστικούς, διότι αυτοί συνδέονται ομοιοπολικά ή έχουν πολύ μεγάλη συγγένεια με τη θέση πρόσδεσης.

Στη δεύτερη περίπτωση, οι ανταγωνιστές αναστέλλουν τη λειτουργία των αγωνιστών με χημικά ή φυσιολογικά μέσα. Ένας χημικός ανταγωνιστής (chemical antagonist) αδρανοποιεί έναν αγωνιστή τροποποιώντας ή διασπώντας τον, προτού προλάβει να δράσει (π.χ. η πρωταμίνη συνδέεται με την ηπαρίνη, ένα αντιπηκτικό, και την απενεργοποιεί). Ένας φυσιολογικός ανταγωνιστής (physiologic antagonist) προκαλεί το αντίθετο αποτέλεσμα από αυτό ενός αγωνιστή (π.χ. η ισταμίνη επιδρά σε υποδοχείς των τοιχωματικών κυττάρων του γαστρικού βλεννογόνου και διεγείρει την έκκριση γαστρικού οξέος, ενώ η ομεπραζόλη εμποδίζει τη δράση αυτή γιατί αναστέλλει την αντλία πρωτονίων). [15, p. 18], [28], [29]

Συχνά παρατηρείται ότι η αποτελεσματικότητα μπορεί να μειωθεί με την εκτεταμένη χρήση, δηλαδή τα φάρμακα φαίνεται να έχουν συγκεκριμένη ανοχή. Η ανοχή επηρεάζεται από φαρμακοκινητικούς παράγοντες (όπως ο αυξημένος μεταβολισμός της ουσίας), αλλά και φαρμακοδυναμικούς (όταν η ίδια συγκέντρωση στη θέση πρόσδεσης προκαλεί μικρότερο αποτέλεσμα λόγω παρατεταμένης έκθεσης). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η λήψη οπιούχων για τη διαχείριση του χρόνιου πόνου, αφού πολλές φορές οι ασθενείς χρειάζονται μεγαλύτερες δόσεις με την πάροδο του χρόνου. [27]

## 1.4. Ιδιότητες φαρμακευτικών ενώσεων

Στην ενότητα αυτή αναφέρονται ορισμένες ιδιότητες των φαρμακευτικών ενώσεων που σχετίζονται άμεσα με τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά τους.

### 1.4.1. Βαθμός ιοντισμού – Σταθερά ιοντισμού

Η σταθερά ιοντισμού (εκφρασμένη ως  $pK_a$ ) πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στον σχεδιασμό φαρμάκων, λόγω των κέντρων ιοντισμού που φέρουν. Ουσιαστικά μόνο η μη ιοντισμένη (ουδέτερη) μορφή της φαρμακευτικής ουσίας διέρχεται από τις βιολογικές μεμβράνες, άρα ο βαθμός ιοντισμού καθορίζει την απορρόφησή της (υψηλή τιμή βαθμού ιοντισμού συνεπάγεται δυσκολία στην απορρόφηση). Με τους υποδοχείς αλληλεπιδρά η ιοντισμένη μορφή των ενώσεων, διότι συνήθως στο ενεργό κέντρο υπάρχουν φορτισμένες ομάδες. Επομένως, συχνά είναι αναγκαίος ο συμβιβασμός σχετικά με τη σταθερά ιοντισμού που ευνοεί την απορρόφηση και με αυτήν που ευνοεί τη σύνδεση με τον υποδοχέα.

Η σταθερά ιοντισμού μπορεί να υπολογιστεί από τη γενικευμένη σχέση:

$$\frac{C_{\text{βάσης}}}{C_{\text{οξέος}}} = 10^{pH-pK_a} \quad [1.3]$$

Ο βαθμός ιοντισμού υπολογίζεται από τις επόμενες σχέσεις, η πρώτη αφορά τα οξέα, ενώ η δεύτερη τις βάσεις.

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK_a-pH}} \quad (\text{οξέα}) \quad [1.4]$$

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pH-pK_a}} \quad (\text{βάσεις}) \quad [1.5]$$

Η τιμή  $\alpha$  που προκύπτει από τις παραπάνω σχέσεις πολλαπλασιασμένη με το 100 δίνει το ποσοστό % ιοντισμού.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η διαφορά  $pK_a - pH$  δίνει χρήσιμες πληροφορίες για το ποσοστό ιοντισμού. Όσον αφορά τα οξέα, όταν  $pK_a - pH = -2$  το ποσοστό ιοντισμού είναι 99%, ενώ για  $pK_a - pH = 2$  το ποσοστό είναι 1%, δηλαδή επικρατεί η αδιάστατη μορφή. Αντιθέτως, για τις βάσεις, η διαφορά  $pK_a - pH = -2$  συνεπάγεται 1% ιοντισμό κι η διαφορά  $pK_a - pH = 2$  υποδηλώνει 99% ιοντισμό. Σε κάθε περίπτωση, όταν  $pK_a - pH = 0$  παρατηρείται ιοντισμός σε ποσοστό 50%. Γνωρίζοντας την τιμή της διαφοράς  $pK_a - pH$  εκτιμάται η μορφή του φαρμάκου (αδιάστατη ή ιοντισμένη) που εντοπίζεται στα διάφορα διαμερίσματα του οργανισμού, ανάλογα με το pH που επικρατεί. [4, pp. 177-178] Ενδεικτικά αναφέρονται οι τιμές pH ορισμένων βιολογικών υγρών και διαμερισμάτων [30, p. 76]:

- δάκρυα: 7,4
- σάλιο: 6,4
- δωδεκαδάκτυλο: 5,5
- ιδρώτας: 5,4

### 1.4.2. Διαλυτότητα - Διαπερατότητα

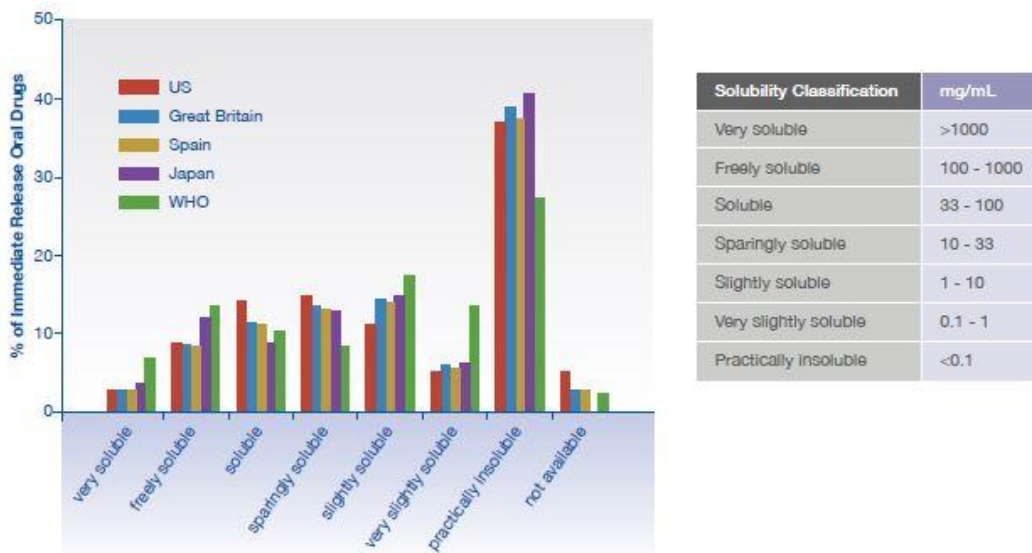
Η διαλυτότητα αποτελεί σημαντική ιδιότητα που λαμβάνεται υπόψη από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των φαρμάκων, διότι ο προτιμότερος τρόπος λήψης τους είναι από το στόμα. Η φαρμακευτική ένωση θα πρέπει να είναι αρκετά διαλυτή ώστε να απορροφάται μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα, να κυκλοφορεί στο αίμα υπό μορφή διαλύματος και να φτάνει στο σημείο δράσης της.

Μία ουσία θεωρείται ευδιάλυτη όταν η τιμή της διαλυτότητάς της ( $S$ ) είναι  $S > 0,1 M$  και δυσδιάλυτη όταν  $S < 0,01 M$ . Η φαινόμενη διαλυτότητα ( $S$ ) μίας ένωσης ισούται με τη συγκέντρωση κορεσμού όταν η διαλυμένη ένωση είναι σε ισορροπία με τη στερεή μορφή της. Στην περίπτωση των φαρμάκων, που ιονίζονται, η διαλυτότητα διακρίνεται σε φαινόμενη κι ενδογενή ( $S_0$ ), η οποία αφορά την αδιάστατη μορφή κι ισχύει γενικά ότι:  $S_0 < S$ . [4, pp. 141–143], [31, pp. 112–113] Τα δύο μεγέθη συνδέονται με τις ακόλουθες σχέσεις, οι οποίες αναφέρονται σε μονοπρωτικά ασθενή οξέα και βάσεις, αντίστοιχα [32, p. 315]:

$$S = S_0(1 + 10^{pH-pK_a}) \quad (\text{οξέα}) \quad [1.6]$$

$$S = S_0(1 + 10^{pK_a-pH}) \quad (\text{βάσεις}) \quad [1.7]$$

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι περίπου το 40% των φαρμάκων που κυκλοφορούν στην αγορά κι έως και το 75% των ενώσεων που βρίσκονται υπό ανάπτυξη είναι ελάχιστα υδατοδιαλυτά. Στην Εικόνα 4 σημειώνονται τα ποσοστά των φαρμακευτικών ουσιών σε κάθε κατηγορία διαλυτότητας που προκύπτουν από τη μελέτη 200 *per os* χορηγούμενων φαρμάκων. [18, p. 10]



**Εικόνα 4.** Κατηγοριοποίηση 200 *per os* χορηγούμενων φαρμάκων ανάλογα με τη διαλυτότητά τους με δεδομένα από τις λίστες των ΗΠΑ, της Μεγάλης Βρετανίας, της Ισπανίας, της Ιαπωνίας και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας [18, p. 10]

### 1.4.2.1. Βιοφαρμακευτικό Σύστημα Ταξινόμησης

Το Βιοφαρμακευτικό Σύστημα Ταξινόμησης (Biopharmaceutical Classification System, BCS) κατηγοριοποιεί τα φάρμακα σε 4 τάξεις ανάλογα με τη διαλυτότητα και τη διαπερατότητά τους. [33] Τα χαρακτηριστικά κάθε τάξης είναι τα ακόλουθα:

Τάξη I: υψηλή διαπερατότητα, υψηλή διαλυτότητα

Τάξη II: υψηλή διαπερατότητα, χαμηλή διαλυτότητα

Τάξη III: χαμηλή διαπερατότητα, υψηλή διαλυτότητα

Τάξη IV: χαμηλή διαπερατότητα, χαμηλή διαλυτότητα

Τα φάρμακα που εντάσσονται στην Τάξη I έχουν τις βέλτιστες ιδιότητες διαπερατότητας και διαλυτότητας για καλή βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα. Οι ιδιότητες των ενώσεων της Τάξης II μπορούν δυνητικά να βελτιωθούν με κατάλληλη μορφοποίησή τους, ενώ τις περισσότερες φορές, οι ενώσεις των Τάξεων III και IV χρειάζονται δομικές τροποποιήσεις. [18, p. 15]

Ενδεικτικά, αναφέρονται οι τάξεις στις οποίες κατανέμονται μερικά από τα φάρμακα που μελετώνται στην παρούσα εργασία. [4, p. 143], [18, p. 14], [32, p. 286]

- Τάξη I: Amitriptyline, Caffeine, Lidocaine, Metoprolol, Propranolol
- Τάξη II: Carbamazepine, Diclofenac
- Τάξη III: Acyclovir, Atenolol, Cimetidine, Nadolol
- Τάξη IV: Ciprofloxacin, Furosemide, Hydrochlorothiazide, Mebendazole

### 1.4.3. Διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (ΑΕΦ) αποτελεί έναν από τους πιο περίπλοκους και ευρέως μελετημένους βιολογικούς φραγμούς του οργανισμού με πολύ μεγάλη επιφάνεια, 12-18 m<sup>2</sup> για έναν μέσο ενήλικα. Η λειτουργία του είναι η διατήρηση της ακεραιότητας του εγκεφάλου των θηλαστικών έναντι πιθανών επιβλαβών ουσιών. Αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα, πολύ στενά προσκολλημένα, που σχηματίζουν στενές συνδέσεις, για να εμποδίσουν τη διέλευση διαλυτών και πιο συγκεκριμένα, να αποκλείσουν μόρια με διάμετρο μεγαλύτερη από 10-15 Å. Με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζεται πλήρως η ενεργητική διάχυση κι επομένως, οι φαρμακευτικές ενώσεις που προορίζονται για δράση στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) διαπερνούν τον ΑΕΦ μόνο μέσω της παθητικής διάχυσης διαμέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία εξαρτάται από την υδροφοβία, τον βαθμό ιοντισμού, το μοριακό βάρος, τους ιστούς του εγκεφάλου και τις συνδέσεις του πλάσματος. Η γνώση της διαπερατότητας του ΑΕΦ είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης ενός φαρμάκου.

Η ικανότητα μίας ουσίας να διεισδύει στον ΑΕΦ ορίζεται με το ακόλουθο μέγεθος:

$$\log BBB = \log \left( \frac{C_{brain}}{C_{blood}} \right) \quad [1.8]$$

όπου:  $C_{brain}$ : συγκέντρωση φαρμάκου στους ιστούς του εγκεφάλου  
 $C_{blood}$ : συγκέντρωση φαρμάκου στο αίμα

Η πειραματική μέτρηση του  $\log BBB$  συχνά περιλαμβάνει τη χρήση πειραματόζων, συνήθως τρωκτικών και δεν παρέχει μηχανιστικές πληροφορίες για τη φύση της διέλευσης από τον φραγμό. Εκτός αυτού, η μέθοδος είναι χρονοβόρα κι απασχολεί ηθικά ζητήματα. [34]–[36]

#### 1.4.4. Ευκαμψία μορίου

Η ευκαμψία των μορίων μπορεί να επηρεάσει τη διαπερατότητα και τη σύνδεση με τα μακρομόρια, άρα και τη βιολογική δράση στο επίπεδο του υποδοχέα κι εκτιμάται με τον αριθμό των περιστρεφόμενων δεσμών. Περιστρεφόμενος ονομάζεται κάθε απλός δεσμός (εκτός δακτυλίου) με ένα μη τερματικό άτομο εκτός του υδρογόνου (οι αμιδικοί δεσμοί C-N δε συμπεριλαμβάνονται). Ως προτεινόμενο όριο του αριθμού περιστρεφόμενων δεσμών ορίζεται το 10 ή ακόμη και το 7. Η Atenolol έχει 8 περιστρεφόμενους δεσμούς και παρουσιάζει 50% βιοδιαθεσιμότητα, ενώ η Propranolol με 6 περιστρεφόμενους δεσμούς 90%. Βέβαια, η διαφορά αυτή οφείλεται και στις αρκετά διαφορετικές τιμές λιποφιλίας των δύο ενώσεων ( $\log P$ : 0,16 και 2,98, αντίστοιχα). [4, p. 188]

#### 1.4.5. Ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου

Η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου επηρεάζει τη διαπερατότητα των βιολογικών φραγμών, αφού η διάχυση των ενώσεων μέσω των μεμβρανών γίνεται ευκολότερη με την εκδίωξη των μορίων του νερού. Από το γεγονός αυτό προκύπτει ότι η διαδικασία καθίσταται ενεργειακά λιγότερο ευνοϊκή όταν αυξάνεται η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου των μορίων. Για την ενίσχυση της διαπερατότητας, συχνά επιλέγεται η μείωση των δωτών ή των δεκτών δεσμού υδρογόνου στις φαρμακευτικές ενώσεις. Τέλος, η διαπερατότητα ευνοείται από τον σχηματισμό ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, που προστατεύουν από την έκθεση στα μόρια του νερού. [4, p. 183], [18, p. 43]

#### 1.4.6. Λιποφιλία

Η λιποφιλία εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου ή τμήματος μορίου με ένα λιπόφιλο περιβάλλον κι αποτελεί καθοριστικό χαρακτηριστικό για τη φαρμακοκινητική, τη φαρμακοδυναμική και την τοξικολογική συμπεριφορά των φαρμάκων. [18, p. 17] Η αυξημένη λιποφιλία δεν ευνοεί τη βιοδιαθεσιμότητα κι οδηγεί σε παρατεταμένη παραμονή της φαρμακευτικής ουσίας στον οργανισμό κι αποθήκευσή της στα ουδέτερα λίπη, γεγονός που συνεπάγεται εμφάνιση αθροιστικών φαινομένων και τοξικότητας. Επιπλέον, είναι πιθανή η επαγωγή των μικροσωμικών ενζύμων, με στόχο το λιπόφιλο μόριο να βιομετατραπεί σε περισσότερο υδρόφιλο και τελικά να απεκκριθεί. Τέλος, οι υψηλές τιμές λιποφιλίας μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα στη μορφοποίηση του τελικού σκευάσματος. [4, pp. 86, 146]



#### 1.4.6.1. Διττή φύση της λιποφιλίας

Η λιποφιλία παρουσιάζει διπλή φύση, καθώς αποτελείται από δύο συνιστώσες, την υδροφοβικότητα και την πολικότητα. Η υδροφοβικότητα αντιπροσωπεύει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και τις δυνάμεις διασποράς, ενώ η πολικότητα αντικατοπτρίζει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και τους δεσμούς υδρογόνου κι έχει αρνητική συνεισφορά στη λιποφιλία. Η διττή φύση της εκφράζεται από τη γενική σχέση [37], [38]:

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβικότητα} - \text{Πολικότητα} \quad [1.9]$$

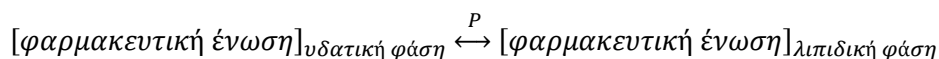
Οι δύο συνιστώσες περιγράφονται με θεμελιώδεις μοριακές παραμέτρους. Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη συνιστώσα (στερική) προσδιορίζεται με παραμέτρους που εκφράζουν όγκο, όπως ο μοριακός όγκος ή το εμβαδόν μοριακής επιφάνειας, το μοριακό βάρος κι η πολωσιμότητα ή η μοριακή διαθλασιμότητα. Η δεύτερη συνιστώσα εκτιμάται με τη διπολική ροπή, την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και με ηλεκτρονιακές παραμέτρους. [4, p. 156]

#### 1.4.6.2. Αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας

Οι C. Hansch et al. (1987) διατύπωσαν την αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας, δηλαδή ότι τα χορηγούμενα φάρμακα πρέπει να προκαλούν την επιθυμητή δράση, αλλά ταυτόχρονα να έχουν την ελάχιστη δυνατή λιποφιλία για να το πετύχουν. Η αρχή αυτή είναι εξίσου σημαντική για τις ενώσεις που δρουν στο ΚΝΣ και για εκείνες που είναι αναγκαίος ο αποκλεισμός τους από αυτό. Μελέτες δείχνουν ότι η βέλτιστη τιμή λιποφιλίας ( $\log P$  ή  $\log D_{7,40}$ ) για τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ισούται περίπου με 2. Όμως, ενώσεις με αυτές τις τιμές λιποφιλίας προκαλούν καταστολή στο ΚΝΣ. Έτσι, αν ο στόχος είναι η επίτευξη κεντρικής αναλγητικής δράσης, ο σχεδιασμός επικεντρώνεται σε ενώσεις με λιποφιλία χαμηλότερη από 2. Ως παράδειγμα αναφέρεται η μορφίνη που, αν και με χαμηλό συντελεστή κατανομής ( $\log D_{7,40} = 0,07$ ), έχει εξαιρετικά μεγάλη ενδογενή δραστηριότητα και κατά συνέπεια ισχυρή αναλγητική δράση. [4, p. 86]

#### 1.4.6.3. Συντελεστής μερισμού ( $\log P$ )

Ένας τρόπος έκφρασης της λιποφιλίας είναι ο συντελεστής μερισμού (Partition Coefficient),  $P$ , δηλαδή η σταθερά ισορροπίας όταν ένα φάρμακο (στη μη ιονισμένη μορφή του) κατανέμεται μεταξύ λιπιδικής κι υδατικής φάσης. Συνήθως, χρησιμοποιείται στη λογαριθμική μορφή,  $\log P$ . Η ισορροπία που εκφράζει την κατανομή του φαρμάκου είναι η ακόλουθη:



Η σταθερά  $P$  είναι μία θερμοδυναμική σταθερά (εξαρτάται από τη θερμοκρασία και τους διαλύτες μεταξύ των οποίων γίνεται η κατανομή) και προκύπτει από τον λόγο:

$$P = \frac{[\text{φαρμακευτική ένωση}]_{\text{λιπιδική φάση}}}{[\text{φαρμακευτική ένωση}]_{\text{υδατική φάση}}} \quad [1.10]$$



Οι λιπιδικές φάσεις του οργανισμού, όπως οι βιολογικές μεμβράνες και τα υδρόφοβα τμήματα των πρωτεϊνών, μπορούν να προσομοιωθούν με κατάλληλο διαλύτη, οπότε η παραπάνω σχέση μετατρέπεται στην ακόλουθη:

$$P = \frac{C_{οργ}}{C_{υδατ}} \quad [1.11]$$

Οι R. Collander (1951) και A. J. Leo (1972) μελέτησαν τους συντελεστές μερισμού ενώσεων σε διάφορα ζεύγη μη αναμίξιμων διαλυτών. Ο Collander διαπίστωσε ότι ο συντελεστής μερισμού σε ένα σύστημα διαλυτών ( $\log P_1$ ) συνδέεται γραμμικά με τον συντελεστή μερισμού σε ένα άλλο σύστημα διαλυτών ( $\log P_2$ ), όπως υποδηλώνεται από τη σχέση [4, pp. 146–147]:

$$\log P_1 = a \log P_2 + b \quad [1.12]$$

όπου:  $a, b$ : σταθερές (προκύπτουν από γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης)

Ο Leo, έπειτα από τη μελέτη περισσότερων από 300 ενώσεων σε πάνω από 30 συστήματα διαλυτών, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι εξισώσεις Collander είναι αξιόπιστες μόνο αν οι ενώσεις είναι παρόμοιες στη δομή (όλες δότες ή όλες δέκτες πρωτονίων) κι οι διαλύτες έχουν παρόμοια ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. [31, p. 53]

Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σύστημα για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας κατά την ανάπτυξη των φαρμάκων είναι το σύστημα n-οκτανόλης-νερού. Η επιλογή αυτή οφείλεται στο χαμηλό κόστος της n-οκτανόλης, στην ικανότητά της να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου ως δέκτης, αλλά κι ως δότης πρωτονίων, στο γεγονός ότι δεν απορροφά στο υπεριώδες, καθώς και στο ότι δεν είναι τοξική (αν και έχει δυσάρεστη γλυκερή οσμή). Ωστόσο, η επιλογή του συστήματος n-οκτανόλης-νερού δεν είναι κατάλληλη για όλες τις περιπτώσεις, όπως στη μοντελοποίηση της κατανομής στον ΑΕΦ. [4, pp. 146–147]

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υψηλή τιμή του συντελεστή  $\log P$  υποδηλώνει αυξημένη λιποφιλία, που επηρεάζει τη φαρμακοκινητική, φαρμακοδυναμική και τοξικολογική συμπεριφορά του φαρμάκου και για αυτόν τον λόγο έχουν καθιερωθεί ορισμένα εύρη τιμών, εντός των οποίων εξασφαλίζεται η επιθυμητή ιδιότητα. Αναλυτικότερα, επιτυγχάνεται καλύτερη διαλυτότητα όταν  $\log P < 3$  και βέλτιστη διαπερατότητα όταν  $-1 < \log P < 5,9$ . Επιπλέον, παρατηρείται μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα για τιμές  $0 < \log P < 3$ . Λαμβάνοντας υπόψη ότι η βιοδιαθεσιμότητα είναι μία σύνθετη παράμετρος, όταν εξετάζεται η διαλυτότητα κι η διαπερατότητα, η χρήση του συντελεστή κατανομής,  $\log D$  (όπως αναλύεται στην επόμενη ενότητα), κρίνεται πιο σχετική. Τέλος, μελέτη της Pfizer σε 245 υποψήφιες ενώσεις στις προκλινικές δοκιμές οδήγησε στο συμπέρασμα ότι φάρμακα με  $\log P > 3$  είναι 2,5 φορές πιθανότερο να είναι πιο τοξικά. Παρά τους περιορισμούς στις τιμές του συντελεστή μερισμού, υπάρχουν επιτυχημένες φαρμακευτικές ενώσεις για τις οποίες η τιμή  $\log P$  δε βρίσκεται εντός του προτεινόμενου εύρους. Είναι απαραίτητο να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στη χρήση των γενικών κανόνων που προαναφέρθηκαν, αφού αυτοί βασίζονται σε μεθόδους που προβλέπουν ή υπολογίζουν τον συντελεστή  $\log P$  με δικό τους σφάλμα η κάθε μία. [39]

#### 1.4.6.4. Συντελεστής κατανομής (logD)

Πολλές φαρμακευτικές ενώσεις διαθέτουν ιονιζόμενες ομάδες (καρβοξυλικές ομάδες, αμινοομάδες, φαινολικά υδροξύλια) με αποτέλεσμα ο βαθμός ιοντισμού τους να εξαρτάται από το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. Η λιποφιλία των ιοντισμένων ενώσεων εκφράζεται με τον συντελεστή κατανομής ή φαινόμενο συντελεστή μερισμού (Distribution ή Apparent Partition Coefficient), D, συχνότερα στη λογαριθμική μορφή, logD. Ο συντελεστής κατανομής υπολογίζεται από τη σχέση:

$$D = \frac{\sum C_{org}}{\sum C_{vd}} \quad [1.13]$$

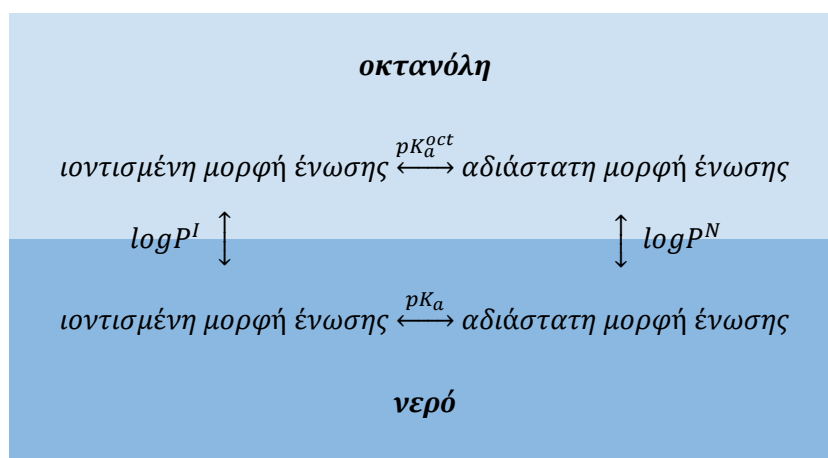
όπου:  $\sum$  : άθροισμα των συγκεντρώσεων των επιμέρους μορφών της ένωσης (ουδέτερη, ιοντισμένη) σε κάθε φάση

Πρακτικά θεωρείται ότι στην οργανική φάση κατανέμεται μόνο η αδιάστατη μορφή των φαρμακευτικών ενώσεων, διότι ο μερισμός των ιοντισμένων μορφών τους σε έναν οργανικό διαλύτη είναι κατά πολύ μικρότερος σε σχέση με τον μερισμό των αδιάστατων μορφών τους. Άρα, η παραπάνω σχέση μπορεί να απλοποιηθεί στην ακόλουθη:

$$D = \frac{C_{org}}{\sum C_{vd}} \quad [1.14]$$

Η κατανομή μίας ιοντιζόμενης ουσίας σε ένα διφασικό σύστημα, όπως αυτό της n-οκτανόλης-νερού, περιγράφεται από 4 σταθερές ισορροπίας (Εικόνα 5). Πιο συγκεκριμένα:

- $\log P^N$ : κατανομή αδιάστατης μορφής μεταξύ των 2 φάσεων
- $\log P^I$ : κατανομή ιοντισμένης μορφής μεταξύ των 2 φάσεων
- $pK_a$ : σταθερά ιοντισμού
- οκτανολικό  $pK_a^{oct}$ : pH υδατικής φάσης, στο οποίο συνυπάρχουν στην οκτανόλη ίσες συγκεντρώσεις αδιάστατης και ιοντισμένης μορφής



**Εικόνα 5.** Ισορροπίες κατά την κατανομή φαρμακευτικής ένωσης στο σύστημα οκτανόλης-νερού σε pH που συνυπάρχουν η αδιάστατη κι η ιοντισμένη μορφή (οκτανόλη στην άνω στιβάδα, καθώς έχει μικρότερο ειδικό βάρος από το νερό)

Σε ορισμένη τιμή pH η λογαριθμική μορφή του συντελεστή κατανομής, logD, υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\log D = \log \left[ f^N P^N + \sum (f^I P^I) \right] \quad [1.15]$$

όπου:  $f^N, f^I$ : κλάσματα ουδέτερης και ιοντισμένης μορφής, αντίστοιχα (συναρτήσει pH,  $pK_a$ )

$P^N, P^I$ : συντελεστές μερισμού ουδέτερης και ιοντισμένης μορφής, αντίστοιχα (θεωρώντας ότι η ένωση βρίσκεται σε μονομερείς μορφές)

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι συντελεστές μερισμού των ιοντισμένων μορφών είναι πολύ μικρότεροι από αυτόν της αδιάστατης μορφής και ότι στην οργανική φάση κατανέμεται μόνο η αδιάστατη μορφή, προκύπτει η γενική σχέση:

$$\log P = \log D + Q \quad [1.16]$$

όπου:  $Q$ : διορθωτικός παράγοντας που εξαρτάται από  $pK_a$  της ουσίας και pH του περιβάλλοντος

Ο συντελεστής κατανομής logD είναι πάντα μικρότερος από τον συντελεστή μερισμού logP και ο παράγοντας Q προκύπτει με βάση την εξίσωση Henderson-Hasselbalch για τον ιοντισμό. Στη συνέχεια, αναφέρονται οι σχέσεις υπολογισμού του Q σε διαφορετικές περιπτώσεις, με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει υψηλός βαθμός ιοντισμού ή πλήρης ιοντισμός. [4, pp. 148-149]

$$Q = \log(10^{pH-pK_a} + 1) \quad (\text{μονοπρωτικά οξέα}) \quad [1.17]$$

$$Q = \log(10^{pK_a-pH} + 1) \quad (\text{μονοπρωτικές βάσεις}) \quad [1.18]$$

$$Q = \log(10^{pH-pK_{a1}} + 10^{2pH-pK_{a1}-pK_{a2}} + 1), \text{ αν } pK_{a1} < pK_{a2} \quad (\text{διπρωτικά οξέα}) \quad [1.19]$$

$$Q = \log(10^{pK_{a1}-pH} + 10^{pK_{a1}-pK_{a2}-2pH} + 1), \text{ αν } pK_{a1} > pK_{a2} \quad (\text{διπρωτικές βάσεις}) \quad [1.20]$$

$$Q = \log(10^{pK_{a1}-pH} + 10^{pH-pK_{a2}} + 1), \text{ αν } pK_{a2}(\text{acid}) > pK_{a1}(\text{base}) \quad (\text{κοινοί αμφολύτες}) \quad [1.21]$$

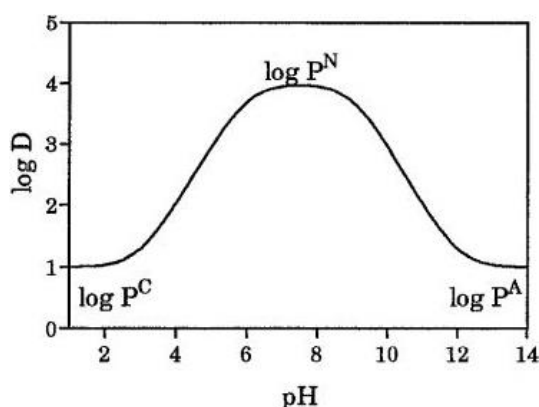
Στον συμβολισμό του συντελεστή κατανομής αναγράφεται και η τιμή pH στην οποία έχει υπολογιστεί. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν η τιμή του pH του αίματος (7,40) και μία ενδεικτική τιμή για τον γαστρεντερικό σωλήνα (5,50). Ως γενικός κανόνας, οι τιμές  $1 < \log D_{7,40} < 3$  κρίνονται ιδανικές για *per os* χορηγούμενα φάρμακα. Η διαπερατότητα εξαρτάται από το μοριακό βάρος και το κατώτατο όριο του επιθυμητού συντελεστή κατανομής μεταβάλλεται. Αναλυτικότερα, για ενώσεις με MB: 350-400 προτιμώνται τιμές  $\log D_{7,40} > 1,7$ , για MB: 400-450 επιλέγεται  $\log D_{7,40} > 3,1$ , για MB: 450-500 ιδανικά  $\log D_{7,40} > 3,4$ , ενώ για ενώσεις με MB > 500 προτιμάται  $\log D_{7,40} > 4,5$ . Τέλος, παρατηρείται χαμηλή διαλυτότητα για τιμές  $\log D_{7,40} > 3$ . [18, p. 20], [39]

#### 1.4.6.5. Λιποφιλία αμφολυτών

Ως αμφολύτες καλούνται οι χημικές ενώσεις που φέρουν μία ή περισσότερες όξινες και μία ή περισσότερες βασικές ομάδες. Στη φαρμακευτική έρευνα συναντώνται είτε ως φάρμακα, είτε ως μεταβολίτες τους. Στην περίπτωση των μεταβολιτών, η μεταβολική αντίδραση δημιουργεί μία επιπλέον ιοντιζόμενη ομάδα, που οδηγεί σε διαφορετική συμπεριφορά ιοντισμού. Οι αμφολύτες ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: τους κοινούς αμφολύτες (ordinary ampholytes) και τους αμφολύτες που υφίστανται ως διπολικό ιόν (zwitterionic ampholytes). Όλοι φέρουν όξινη και βασική ομάδα, αλλά

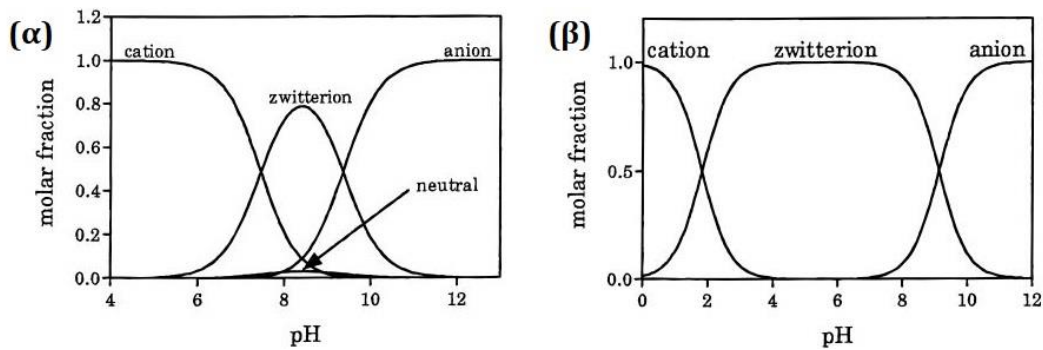
διαφέρουν ως προς τη σχετική οξύτητα των δύο λειτουργικών ομάδων τους. Οι δύο ομάδες των κοινών αμφολυτών δεν ιοντίζονται ταυτόχρονα, καθώς αυτοί εντοπίζονται μόνο σε ουδέτερη μορφή ή με ένα φορτίο (θετικό ή αρνητικό) κι ισχύει:  $pK_a (acidic) > pK_a (basic)$ . Αντιθέτως, τα διπολικά ιόντα μπορούν να σχηματίσουν εσωτερικό άλας, αφού η όξινη κι η βασική ομάδα μπορούν να ιοντιστούν ταυτόχρονα κι ισχύει:  $pK_a (acidic) < pK_a (basic)$ .

Στην περίπτωση των κοινών αμφολυτών, όταν  $\Delta pK_a = pK_a (acidic) - pK_a (basic) > 3$ , μόνο μία ομάδα μπορεί να ιοντιστεί σε αξιοσημείωτο ποσοστό κάθε φορά. Αν, όμως,  $\Delta pK_a < 3$ , μπορεί να παρατηρηθεί σχηματισμός εσωτερικού άλατος σε μικρό ποσοστό (σε σύγκριση με αυτό της ουδέτερης μορφής) εκατέρωθεν του ισοηλεκτρικού σημείου. Ο υπολογισμός του συντελεστή μερισμού  $\log P$  είναι εφικτός μόνο στους κοινούς αμφολύτες και μπορεί να εκτιμηθεί από το διάγραμμα  $\log D=f(pH)$  ως το μέγιστο της κωδωνοειδούς καμπύλης σε τιμές pH γύρω από το ισοηλεκτρικό σημείο (ΙΣ) (Εικόνα 6).



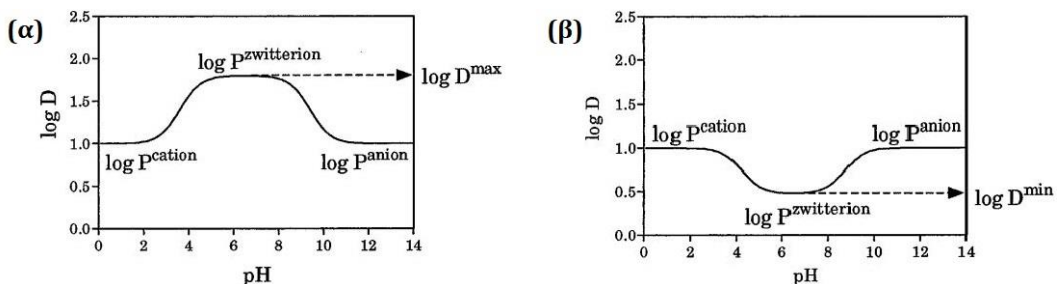
**Εικόνα 6.** Καμπύλη  $\log D=f(pH)$  κοινού αμφολύτη [40]

Στην περίπτωση των αμφολυτών ως διπολικά ιόντα, όταν η διαφορά  $\Delta pK_a$  είναι μικρή, δεν είναι απλό να αποφασιστεί ποια από τις δύο πρωτονιωμένες μορφές διαχωρίζεται πρώτη. Αυτού του είδους ο αμφολύτης, σε ένα διάλυμα μπορεί να βρίσκεται σε 4 διαφορετικές ηλεκτρικές καταστάσεις, ως: κατιόν, εσωτερικό άλας, αδιάστατη μορφή κι ανιόν (Εικόνα 7α). Για την έκφραση των ισορροπιών χρησιμοποιούνται μακροσταθερές (αναφέρονται στον στοιχειομετρικό ιοντισμό) και μικροσταθερές (αφορούν τον ιοντισμό των επιμέρους μορφών). Αν η διαφορά  $\Delta pK_a$  είναι μεγάλη, παρατηρούνται 3 μορφές της ένωσης: κατιοντική, εσωτερικό άλας, ανιοντική (Εικόνα 7β).



**Εικόνα 7.** Κατανομή μικρομορφών αμφολύτη που υφίσταται ως διπολικό ιόν όταν η  $\Delta pK_a$  έχει (α) μικρή, (β) μεγάλη τιμή [40]

Στο αντίστοιχο διάγραμμα  $\log D=f(\text{pH})$  παρατηρείται μία σταθεροποίηση των τιμών  $\log D_{\max}$  γύρω από το ΙΣ, δηλαδή η λιποφιλία δε μεταβάλλεται εντός ενός εύρους pH (Εικόνα 8α). Συνήθως οι αμφολύτες που σχηματίζουν εσωτερικά άλατα συμπεριφέρονται σαν «ρυθμιστικά λιποφιλίας» (lipophilicity buffers), κάτι που τους προσδίδει ιδιαίτερα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά. Σημειώνεται ότι υπάρχει περίπτωση στερεοχημικοί παράγοντες να μην επιτρέπουν την αντιστάθμιση του φορτίου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση U-καμπύλης στο διάγραμμα  $\log D=f(\text{pH})$  και ελάχιστης τιμής λιποφιλίας  $\log D_{\min}$  (Εικόνα 8β). [4, pp. 150–154], [40], [41]



**Εικόνα 8.** Καμπύλη  $\log D=f(\text{pH})$  αμφολύτη που υφίσταται ως διπολικό ιόν - (α) γενική περίπτωση, (β) περίπτωση που παρεμποδίζεται η αντιστάθμιση των φορτίων [40]

### 1.4.7. Μοριακό μέγεθος

Το μοριακό μέγεθος των φαρμακευτικών ενώσεων επηρεάζει τη διαπερατότητα και τη διαλυτότητά τους κι εκτιμάται με διαφορετικούς τρόπους, όπως τη μοριακή επιφάνεια, τον μοριακό όγκο και το μοριακό βάρος (MB).

Η μοριακή επιφάνεια ορίζεται ως η επιφάνεια Van der Waals του μορίου, θεωρώντας όλα τα άτομα ως σφαίρες ακτίνας Van der Waals. Ο μοριακός όγκος μπορεί να οριστεί όπως η μοριακή επιφάνεια (όγκος Van der Waals) ή να προσδιοριστεί πειραματικά μέσω του μοριακού βάρους, της πυκνότητας και του αριθμού Avogadro. [42, pp. 533–534]

Τα πολύ μικρά μόρια (με  $MB < 200$ ) έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν τις μεμβράνες διακυττάρια, επομένως εμφανίζουν αυξημένη διαπερατότητα. Οι ενώσεις με υψηλό MB παρουσιάζουν προβλήματα διαπερατότητας από τη λιπιδική διπλοστιβάδα και

βιοδιαθεσιμότητας όταν χορηγούνται από το στόμα, όπως υποδηλώνεται κι από τον μνημονικό κανόνα του 5. Όσον αφορά τη διαλυτότητα, παρατηρείται μείωσή της με την αύξηση του μοριακού βάρους. [4, p. 188], [18, p. 43]

#### 1.4.8. Όγκος κατανομής

Ο όγκος κατανομής ( $V_d$ ) είναι ένας σημαντικός δείκτης της έκτασης της κατανομής του φαρμάκου στα βιολογικά υγρά και τους ιστούς. Ο όγκος  $V_d$  συσχετίζει την ποσότητα φαρμάκου στο αίμα με τη μετρούμενη συγκέντρωση στο πλάσμα. Έτσι, ως όγκος κατανομής ορίζεται ο λόγος:

$$V_d = \frac{\text{ποσό φαρμάκου στο σώμα}}{\text{συγκέντρωση φαρμάκου στο πλάσμα}} \left( L \text{ ή } \frac{L}{kg \text{ σωματικού βάρους}} \right) \quad [1.22]$$

Υψηλή τιμή του όγκου κατανομής υποδηλώνει εκτεταμένη κατανομή του φαρμάκου στους ιστούς και τα βιολογικά υγρά, ενώ η χαμηλή τιμή ερμηνεύεται από περιορισμένη κατανομή. Η ελάχιστη τιμή που μπορεί να προκύψει είναι ίση με τον όγκο του πλάσματος. Ανάλογα με το πού βρίσκεται ο στόχος, οι φαρμακευτικές ενώσεις έχουν διαφορετικές τιμές  $V_d$ . Για ορισμένες θεραπευτικές περιοχές πρέπει να είναι χαμηλές (όταν ο στόχος βρίσκεται στο πλάσμα) και σε άλλες υψηλές (όταν ο στόχος είναι σε κάποιο «διαμέρισμα» ιστών, όπως ο εγκέφαλος). Ο όγκος κατανομής δείχνει την έκταση της κατανομής, αλλά όχι και τους ιστούς ή τα βιολογικά υγρά στα οποία κατανέμεται το φάρμακο. Δηλαδή, δύο φαρμακευτικές ενώσεις μπορεί να έχουν τον ίδιο  $V_d$  αλλά η μία να κατανέμεται κυρίως σε μυϊκούς ιστούς κι η δεύτερη σε λιπώδεις ιστούς. [27, p. 9], [31, p. 25]

Η τιμή του  $V_d$  χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της χορηγούμενης δόσης φαρμάκου, ώστε να επιτευχθεί σύντομα η απαιτούμενη θεραπευτική συγκέντρωση στο πλάσμα, λαμβάνοντας υπόψη ότι η επιτυχής θεραπεία συνδέεται με τη συγκέντρωση στο πλάσμα και εξασφαλίζοντας ότι δε θα υπάρξουν ανεπιθύμητες ενέργειες αν χορηγηθεί άμεσα μία αρκετά μεγάλη δόση. [43] Ενδεικτικά αναφέρονται οι τιμές του όγκου κατανομής για κάποια από τα φάρμακα που μελετώνται στην παρούσα εργασία:

- Amitriptyline: 16,8 L/kg
- Ibuprofen: 0,1 L/kg
- Metoclopramide: 3,3 L/kg

#### 1.4.9. Πρωτεϊνική σύνδεση

Στις περισσότερες περιπτώσεις, μόνο η ελεύθερη μορφή ενός φαρμάκου είναι διαθέσιμη για παθητική διάχυση, δεσμεύεται στον θεραπευτικό στόχο ή υποβάλλεται στις διεργασίες απέκκρισης. Η υπόθεση του ελεύθερου φαρμάκου θεωρεί ότι μόνο το ελεύθερο φάρμακο διαπερνά τις μεμβράνες, στη μόνιμη κατάσταση η συγκέντρωσή του είναι η ίδια και στις δύο πλευρές οποιασδήποτε βιολογικής μεμβράνης και στην περιοχή



του στόχου η ελεύθερη μορφή του φαρμάκου είναι αυτή που προκαλεί το φαρμακολογικό αποτέλεσμα. Οι κύριες εξαιρέσεις περιλαμβάνουν πιθανή ενεργή μεταφορά της φαρμακευτικής ένωσης, κακή παθητική διαπερατότητα ή φτωχή ροή αίματος προς τον ιστό.

Η σύνδεση των πρωτεϊνών του πλάσματος μπορεί να μεταβάλει τη θεραπευτική δράση και τη φαρμακοκινητική ενός φαρμάκου, λόγω της διατήρησής του στο «διαμέρισμα» του πλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να επηρεάσει τον όγκο κατανομής και την κατανομή στους ιστούς, να μειώσει τη μεταβολική διεργασία στο ήπαρ και να αυξήσει τον χρόνο ημιζωής, καθώς και να περιορίσει τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Ακόμη, έχει αντίκτυπο στην ικανότητα του φαρμάκου να φτάσει στον θεραπευτικό στόχο, συνήθως μειώνοντας την αποτελεσματικότητά του, ενώ μπορεί να οδηγήσει σε αναγκαία μεταβολή του σχήματος δοσολογίας, δηλαδή σε αύξηση της πρώτης χορηγούμενης δόσης κι έπειτα ελάττωση των επόμενων δόσεων. [18, p. 70]

## 1.5. Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως πανίσχυρη τεχνική διαχωρισμού, αφού βρίσκει εφαρμογή σε κάθε κλάδο της επιστήμης. Η εφευρεσή της πραγματοποιήθηκε από τον Ρώσο βοτανολόγο M. Tswett στις αρχές του 20ού αιώνα. Ο Tswett χρησιμοποίησε την τεχνική αυτή προκειμένου να διαχωρίσει διάφορες φυτικές χρωστικές (χλωροφύλλες, ξανθοφύλλες), με διαβίβαση διαλύματός τους από υάλινο σωλήνα, γεμάτο με εξαιρετικά λεπτό ανθρακικό ασβέστιο. Αυτό που παρατήρησε ήταν χρωματιστές ζώνες στη στήλη, λόγω των διαχωριζόμενων ουσιών κι έτσι, επέλεξε την ονομασία αυτή. Ο όρος χρωματογραφία αποδίδεται σε μεγάλη ομάδα μεθόδων, που στόχο έχουν τον διαχωρισμό ουσιών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μίγματα. Σε κάθε περίπτωση, το δείγμα διαλύεται σε μία κινητή φάση (mobile phase), που μπορεί να είναι αέριο, υγρό ή υπερκρίσιμο ρευστό. Η φάση αυτή εξαναγκάζεται να διέλθει από μία στατική φάση (stationary phase), υγρή ή συχνότερα στερεή, που βρίσκεται καθηλωμένη σε μία στήλη ή μία στερεή επιφάνεια. [44, pp. 873-874]

Η επιλογή των δύο φάσεων πρέπει να γίνεται προσεκτικά, ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ κινητής και στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Η συγγένεια μεταξύ των φάσεων ερμηνεύεται με την προσρόφηση και τη διαλυτότητα. Η προσρόφηση αναφέρεται στην έκταση της προσκόλλησης ενός συστατικού στη στατική φάση, ενώ η διαλυτότητα στην ικανότητα διάλυσης του συστατικού στην κινητή φάση. Όσο μεγαλύτερη είναι η προσρόφηση στη στατική φάση, τόσο καθυστερεί η έκλυση της ουσίας από τη στήλη. Αντίστροφα, όσο μεγαλύτερη είναι η διαλυτότητα στην κινητή φάση, τόσο πιο σύντομα εξέρχεται η ουσία. Το χαρακτηριστικό που διακρίνει τις διάφορες ενώσεις που αναλύονται στην ίδια κινητή και στατική φάση είναι η πολικότητά τους. Ανάλογα με το ποσοστό κατακράτησής τους, διαφοροποιείται ο χρόνος έκλυσης κατά τη ροή της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα οι ουσίες να διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας ξεχωριστές ζώνες και να είναι εφικτός ο ποιοτικός ή/και ποσοτικός προσδιορισμός τους. [44, pp. 873-874], [45]

Μερικές από τις εφαρμογές των χρωματογραφικών μεθόδων είναι η φαρμακευτική ανάλυση, η ανάλυση τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων κι η βιοχημική έρευνα. Η ποιοτική και ποσοτική μελέτη μπορεί να επιτευχθεί με σύζευξη της χρωματογραφίας με

κάποια τεχνική ανίχνευσης, με συνηθέστερες τις φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως UV/Vis, MS ή IR, κάτι που αποτελεί απαραίτητο στάδιο στην ανάπτυξη των φαρμάκων.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με 3 τρόπους. Ο πρώτος αφορά το είδος της στατικής φάσης που βρίσκεται σε επαφή με την κινητή και προκύπτει η διάκριση σε χρωματογραφία στήλης (η στατική φάση συγκρατείται σε στενή στήλη κι η κινητή φάση εξαναγκάζεται να διέλθει από αυτήν με εφαρμογή πίεσης) κι επίπεδη χρωματογραφία (η στατική φάση στηρίζεται σε μία επίπεδη πλάκα ή στους πόρους ενός χαρτιού κι η κινητή φάση κινείται μέσω της στατικής με τριχοειδή φαινόμενα ή με την επίδραση της βαρύτητας). Ο δεύτερος τρόπος περιλαμβάνει τη διάκριση ανάλογα με τη φύση της κινητής φάσης σε αέρια, υγρή κι υπερκρίσιμου ρευστού χρωματογραφία. Να σημειωθεί ότι μόνο η υγροχρωματογραφία μπορεί να εφαρμοστεί είτε σε στήλη, είτε σε επίπεδη επιφάνεια, ενώ οι άλλες δύο περιορίζονται σε στήλες. Ο τελευταίος τρόπος λαμβάνει υπόψη τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης μεταξύ των ουσιών προς διαχωρισμό και της στατικής φάσης κι οι τεχνικές διακρίνονται σε χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιοντοανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και χημικής συγγένειας. [44, pp. 873–874], [46, pp. 222–224]

Η χρωματογραφία τελικά ξεκίνησε να εξελίσσεται τη δεκαετία του 1940 με την ανάπτυξη της χρωματογραφίας κατανομής στήλης από τους Martin και Synge και την ανακάλυψη της χρωματογραφίας χάρτου (Paper Chromatography). Η πρώτη δημοσίευση σχετικά με την αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) πραγματοποιήθηκε το 1952 και μέχρι τα τέλη του 1960 ήταν ευρέως διαδεδομένη, χάρη στη χρησιμότητά της στην πετρελαϊκή βιομηχανία. Στα μέσα της ίδιας δεκαετίας, εδραιώθηκε κι η χρήση της υγροχρωματογραφίας (Liquid Chromatography, LC) και της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) καθιερώθηκε το 1962. [47, p. 476]

### 1.5.1. Χρωματογραφικές έννοιες

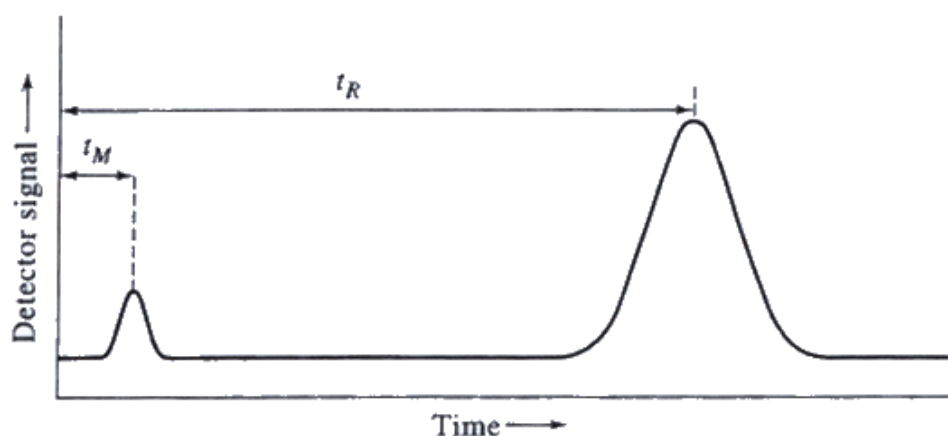
Μερικοί από τους όρους που χρησιμοποιούνται συχνά στα πλαίσια της χρωματογραφίας είναι οι ακόλουθοι [45]:

- κινητή φάση/ρευστό έκλουσης: ρευστό (αέριο/υγρό) που κινείται εντός της στήλης
- στατική φάση: ουσία που παραμένει σταθερή στο εσωτερικό της στήλης
- έκλουσμα: ρευστό που εξέρχεται από τη στήλη (απόβλητα)
- έκλυση: διαδικασία «έκπλυσης» μίας ένωσης μέσω στήλης με χρήση κατάλληλου διαλύτη
- αναλύτης: διάλυμα του οποίου τα επιμέρους συστατικά πρέπει να διαχωριστούν και να αναλυθούν

Η τοποθέτηση ανιχνευτή στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης δίνει τη δυνατότητα καταγραφής του σήματος συναρτήσει του χρόνου (ή του όγκου προστιθέμενης κινητής φάσης), ώστε τελικά προκύπτει ένα διάγραμμα που καλείται χρωματογράφημα (Εικόνα 9). Μεταξύ των πληροφοριών που αντλούνται από αυτό είναι ο χρόνος κατακράτησης ή



ανάσχεσης (retention time) των ουσιών ( $t_R$ ), δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται να φτάσει η ουσία στον ανιχνευτή από τη στιγμή έγχυσης, και το εμβαδόν κάθε κορυφής (ποσοτικό μέτρο για κάθε συστατικό). Στην Εικόνα 9 παρατηρείται επίσης ο νεκρός χρόνος,  $t_M$  ή  $t_0$ , δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται για μία μη κατακρατούμενη ουσία να φτάσει στον ανιχνευτή. Πολλές φορές οι μη κατακρατούμενες ουσίες περιέχονται στην κινητή φάση, σε αντίθετη περίπτωση, όμως, μπορούν να προστεθούν σκόπιμα για διευκόλυνση της ταυτοποίησης των κορυφών. Το χρωματογράφημα δίνει, ακόμη, πληροφορίες για το εύρος των κορυφών, τη διαχωριστική ικανότητα της στήλης, τον αριθμό των θεωρητικών πλάκων και το ύψος της θεωρητικής πλάκας, αλλά οι έννοιες αυτές δεν απασχολούν την παρούσα εργασία, καθώς αρκεί η γνώση του χρόνου ανάσχεσης των φαρμακευτικών ενώσεων.



Εικόνα 9. Χρωματογράφημα [48]

Η κατανομή μίας ουσίας του αναλύτη μεταξύ στατικής και κινητής φάσης περιγράφεται από σχετικά απλές εξισώσεις, όπως:

$$(ουσία)_{κινητή} \leftrightarrow (ουσία)_{στατική}$$

Η σταθερά ισορροπίας καλείται συντελεστής κατανομής και μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad [1.23]$$

όπου:  $C_s$ : συγκέντρωση ουσίας στη στατική φάση

$C_m$ : συγκέντρωση ουσίας στην κινητή φάση

Η σταθερά  $K$  αποτελεί χαρακτηριστικό μέγεθος για μία ουσία σε συγκεκριμένο συνδυασμό στατικής και κινητής φάσης κι ορισμένη θερμοκρασία.

Παρά τη θεμελιώδη σημασία του συντελεστή κατανομής, δεν είναι εύκολη η μέτρησή του. Για τον λόγο αυτόν, γίνεται χρήση του συντελεστή κατακράτησης (retention/capacity factor),  $k$ . Ο συντελεστής κατακράτησης μίας ουσίας παραμένει σταθερός για δεδομένο συνδυασμό αναλύτη, κινητής και στατικής φάσης (ανεξάρτητα από τη γεωμετρία της στήλης και τη ροή της κινητής φάσης) κι ορίζεται σύμφωνα με τη σχέση:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad [1.24]$$

Όταν οι τιμές  $k \ll 1$ , η έκλυση πραγματοποιείται ταχύτατα, δυσκολεύοντας τον σωστό υπολογισμό των χρόνων κατακράτησης. Για τιμές  $20 < k < 30$ , παρατηρούνται υπερβολικά μεγάλοι χρόνοι έκλυσης και πιθανά μη ικανοποιητικοί διαχωρισμοί. Το ιδανικό εύρος του συντελεστή κατακράτησης κυμαίνεται μεταξύ 1 και 10. Μεταβολή του  $k$  μπορεί να επιτευχθεί με μεταβολή της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης, της θερμοκρασίας της στήλης και του συστήματος διαλυτών, με στόχο την εξοικονόμηση χρόνου και ποσότητας διαλυτών, άρα τη μείωση του κόστους της ανάλυσης. [44, pp. 874–880], [46, pp. 234–241]

Συνήθως, γίνεται χρήση του δεκαδικού λογαρίθμου του συντελεστή κατακράτησης, δηλαδή:

$$\log k = \log \left( \frac{t_R - t_0}{t_0} \right) \quad [1.25]$$

Η γνώση της τιμής του  $k$  επιτρέπει τον υπολογισμό του συντελεστή κατανομής,  $K$ , αφού τα δύο μεγέθη συνδέονται μέσω της σχέσης [49]:

$$k = K \frac{V_s}{V_m} \Leftrightarrow \log K = \log k - \log \left( \frac{V_s}{V_m} \right) \quad [1.26]$$

όπου:  $V_s$ : όγκος στατικής φάσης  
 $V_m$ : όγκος κινητής φάσης

### 1.5.2. Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Οι πρώτες εφαρμογές της υγροχρωματογραφίας πραγματοποιούνταν σε υάλινες στήλες διαμέτρου 1-5 cm και μήκους 50-500 cm, πληρωμένες με στερεά σωματίδια (τυπικά διαμέτρου 150-200  $\mu\text{m}$ ) επικαλυμμένα με ένα προσροφημένο υγρό, ώστε να σχηματίζεται η στατική φάση. Οι ταχύτητες ροής ήταν μικρές (μερικά δέκατα του mL/min) κι οι χρόνοι διαχωρισμού πολύ μεγάλοι, γεγονός που δυσκόλευε τις αναλύσεις. Στα τέλη της δεκαετίας του 1960, με την ανάπτυξη της τεχνολογίας παραγωγής και χρήσης πληρωτικών υλικών με σωματίδια σημαντικά μικρότερης διαμέτρου (3-10  $\mu\text{m}$ ), έγινε δυνατή η καθιέρωση της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). [44, p. 936] Η βασική διαφορά της HPLC από την κοινή υγροχρωματογραφία είναι η απαραίτητη χρήση αντλίας κι υπερτερεί σε πολλά χαρακτηριστικά. Ανάμεσα σε αυτά σημειώνονται η ταχύτητα ανάλυσης, η μεγάλη ποικιλία σε στατικές φάσεις, η υψηλή ευαισθησία (με χρήση διάφορων ανιχνευτών) κι η εύκολη ανάκτηση του δείγματος (μικρότερος όγκος αποβλήτων). [47, p. 501]

Η HPLC είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική για την ποσοτική ανάλυση φαρμάκων, βιομορίων, πολυμερών κι άλλων οργανικών συστατικών. Οι περισσότερες φαρμακευτικές αναλύσεις είναι ισοκρατικές (isocratic elution), στις οποίες χρησιμοποιείται η ίδια κινητή φάση καθ'όλη τη διάρκεια της έκλυσης του δείγματος. Οι ισοκρατικές αναλύσεις επιλέγονται συχνότερα σε εφαρμογές ποιοτικού ελέγχου, αφού απαιτούν απλούστερο εξοπλισμό και προ-αναμεμιγμένες κινητές φάσεις. Μεταξύ των βασικών μειονεκτημάτων βρίσκονται η περιορισμένη μέγιστη χωρητικότητα (μέγιστος αριθμός κορυφών που μπορούν να αναπαρασταθούν στο χρωματογράφημα) και τα προβλήματα σχετικά με δείγματα που περιέχουν αναλύτες διαφορετικής πολικότητας.

Η βαθμιδωτή έκλυση (gradient elution), κατά την οποία μεταβάλλεται η ροή ή η σύσταση της κινητής φάσης κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, είναι κατάλληλη για

πολύπλοκα δείγματα που περιλαμβάνουν αναλύτες διαφορετικής πολικότητας. Η βαθμιδωτή ανάλυση προτιμάται για εφαρμογές διαλογής υψηλής απόδοσης και για τον έλεγχο ύπαρξης προσμίξεων. Στα μειονεκτήματά της αναφέρονται οι απαιτήσεις για πιο σύνθετη διάταξη, οι μεγαλύτερες δεξιότητες για την ανάπτυξη της μεθόδου κι οι δυσκολίες στη μεταφορά της. [50, p. 39]

Στις περισσότερες αναλύσεις εφαρμόζεται η χρωματογραφία προσρόφησης, η οποία ανάλογα με τη σχέση της πολικότητας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης διακρίνεται σε HPLC κανονικής φάσης και HPLC αντίστροφης φάσης.

### 1.5.2.1. HPLC κανονικής φάσης

Η HPLC κανονικής φάσης (Normal Phase HPLC) διερευνά τις διαφορές στην ισχύ των πολικών αλληλεπιδράσεων των αναλυτών σε μίγμα με τη στατική φάση. Όσο πιο ισχυρή είναι αυτή η αλληλεπίδραση, τόσο μεγαλύτερη είναι η κατακράτηση του αναλύτη. Η κινητή φάση αποτελείται κυρίως από μη πολικούς διαλύτες (όπως εξάνιο, επτάνιο, χλωροφόρμιο κ.ά.) με μικρή προσθήκη (ακόμη και 1% v/v) κάποιου πολικού τροποποιητή (όπως μεθανόλη, αιθανόλη κ.ά.). Η μεταβολή της συγκέντρωσης του τελευταίου επιτρέπει τον έλεγχο του χρόνου έκλουσης των πολικών ενώσεων. Ως στατική φάση χρησιμοποιείται πληρωτικό υλικό από πορώδη οξειδία, όπως σίλικα ( $\text{SiO}_2$ ) κι αλουμίνα ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Η επιφάνεια αυτών των στατικών φάσεων καλύπτεται από πυκνό πληθυσμό ομάδων OH, που την καθιστούν ιδιαίτερα πολική. Έτσι, οι πολικές ενώσεις αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την πολική στατική φάση, ενώ οι λιγότερο πολικές διασχίζουν συντομότερα τη στήλη κι εκλούνται νωρίτερα από αυτήν. Αυτού του είδους η HPLC επιλέγεται για εξαιρετικά υδρόφοβα συστατικά (που είναι αδιάλυτα σε πολικούς ή υδατικούς διαλύτες) και για τον διαχωρισμό ισομερών ουσιών. [46, pp. 229–230], [51, pp. 10–11]

### 1.5.2.2. HPLC αντίστροφης φάσης

Αντίθετα από την κανονικής φάσης, η HPLC αντίστροφης φάσης (Reversed Phase HPLC) βασίζεται κυρίως στις δυνάμεις διασποράς (υδρόφοβες ή Van der Waals αλληλεπιδράσεις). Στην περίπτωση αυτή, η επιφάνεια της στατικής φάσης είναι υδρόφοβη κι η κινητή φάση πολική (συνήθως υδατικά διαλύματα). Σχεδόν το 90% των αναλύσεων ενώσεων μικρού MB πραγματοποιούνται με HPLC αντίστροφης φάσης, χάρη στην ικανότητά της να διακρίνει παρόμοια συστατικά. Ως στατική φάση επιλέγονται πορώδη άκαμπτα υλικά με υδρόφοβες επιφάνειες. Όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνεια προσρόφησης, τόσο μεγαλύτερη είναι η κατακράτηση της ουσίας και τις περισσότερες φορές τόσο καλύτερος ο διαχωρισμός. Η πλειονότητα των πληρωτικών υλικών είναι οξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες (αλκύλια, φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.ά.). Η στήλη που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία είναι αντίστροφης φάσης C18, δηλαδή η επιφάνεια του προσροφητικού μέσου έχει τροποποιηθεί με την πρόσδεση υδρογονανθράκων 18 ατόμων άνθρακα. Ο διαλύτης έκλουσης είναι το σημαντικότερο «εργαλείο» για τον έλεγχο της κατακράτησης ουσιών σε αυτού του είδους τη χρωματογραφία. Μεταβολές στη σύστασή του, στον τύπο του οργανικού τροποποιητή, στο pH και στη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος παρέχουν ένα πλήθος μεταβλητών για επιτυχή ανάπτυξη της διαχωριστικής μεθόδου. Η

κινητή φάση μπορεί να αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό. Στην HPLC αντίστροφης φάσης, όσο πιο άπολη είναι μία ένωση, τόσο ισχυρότερα προσροφάται στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα, άρα καθυστερεί η έκλουσή της. [46, pp. 230–231], [47, p. 508], [51, pp. 11–12, 140]

Η ανάμιξη των υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων με μίγματα οργανικών διαλυτών οδηγεί στη μείωση της συγκράτησης των λιπόφιλων συστατικών, δηλαδή στη μείωση του χρόνου έκλουσής τους από τη στήλη. Ο συντελεστής κατακράτησης αυτών των συστατικών θα πρέπει να μετατραπεί σε αντίστοιχο συντελεστή που θα αναφέρεται στην υδατική φάση. Για τον λόγο αυτόν, χρησιμοποιείται η ακόλουθη σχέση [49]:

$$\log k = a \cdot \varphi + b \quad [1.27]$$

όπου:  $a$ : σταθερά (κλίση της ευθείας)  
 $\varphi$ : συγκέντρωση οργανικής φάσης  
 $b$ : σταθερά (αναφέρεται στην τιμή  $\log k_w$  στην υδατική φάση)

Η σχέση αυτή δεν είναι γραμμική για όλες τις συγκεντρώσεις οργανικού διαλύτη, αλλά αποτελεί ικανοποιητική προσέγγιση για  $-0,5 < \log k < 1,5$  κι η αναπαράστασή της είναι εφικτή με μέτρηση του  $\log k$  σε 3-5 διαφορετικές συγκεντρώσεις. [52]

### 1.5.2.3. Οργανολογία

Ένα τυπικό σύστημα HPLC αποτελείται από διάφορα τμήματα, τα οποία αναλύονται στη συνέχεια (Εικόνα 10).

Δοχεία κινητής φάσης – Σύστημα επεξεργασίας διαλυτών: Ένα ή περισσότερα υάλινα δοχεία τουλάχιστον των 500 mL χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση της κινητής φάσης. Συχνά μπορεί να είναι εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης διαλυμένων αερίων και σκόνης κι ειδικά φίλτρα για την απομόνωση του διαλύτη από το περιβάλλον. Αυτά δεν κρίνεται απαραίτητο να είναι ενσωματωμένα στο σύστημα. Επιπλέον, μπορεί να προηγηθεί επεξεργασία της κινητής φάσης με διήθηση μέσω μικροπορώδους φίλτρου με εφαρμογή κενού.

Αντλία: Εξασφαλίζει τη σταθερή και συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης στο σύστημα, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή. Πολλές σύγχρονες αντλίες επιτρέπουν την ελεγχόμενη ανάμιξη διαλυτών από διαφορετικούς περιέκτες.

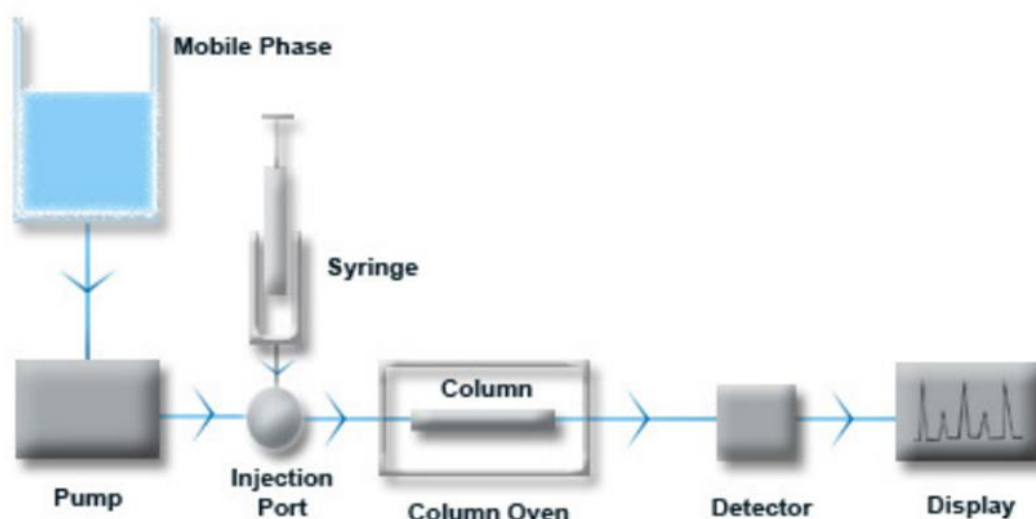
Σύστημα έγχυσης: Επιτρέπει την εισαγωγή (έγχυση) του μίγματος αναλυτών στη ροή της κινητής φάσης προτού εισέλθει στη στήλη. Ο όγκος έγχυσης κυμαίνεται μεταξύ μερικών δεκάδων  $\mu\text{L}$  έως 500  $\mu\text{L}$ . Ένας πιθανός τρόπος έγχυσης είναι με χρήση βρόχου τύπου βαλβίδας. Με τη βαλβίδα έγχυσης στη θέση LOAD, το δείγμα φέρεται με σύριγγα σε εξωτερικό βρόχο σταθερού όγκου. Ο διαλύτης ωστόσο ρέει από την αντλία στη στήλη σε υψηλή πίεση. Όταν η βαλβίδα περιστραφεί στη θέση INJECT, ο βρόχος γίνεται μέρος του ρεύματος ροής του διαλύτη και το δείγμα μεταφέρεται στη στήλη. Τα περισσότερα σύγχρονα συστήματα είναι αυτοματοποιημένα και δίνουν τη δυνατότητα για προγραμματισμένες ενέσεις διαφορετικών όγκων δειγμάτων που λαμβάνονται από φιαλίδια σε δίσκο αυτόματης δειγματοληψίας.

Στήλη: Κατασκευάζεται συνήθως από σωλήνες μικρής διαμέτρου από ανοξείδωτο χάλυβα. Πλέον είναι διαθέσιμες εκατοντάδες πληρωμένες στήλες με διαφορετικό

μέγεθος κι υλικό πλήρωσης με το κόστους τους να κυμαίνεται από 200 έως περισσότερα από 1000 \$. Η στήλη μπορεί να τοποθετηθεί σε υδατόλουτρο, που θα εξασφαλίζει τη ρύθμιση της θερμοκρασίας της.

**Ανιχνευτής:** Συσκευή για τη συνεχή καταγραφή ειδικών φυσικών (ή χημικών) ιδιοτήτων του διαλύτη που εκλύεται από τη στήλη με μετατροπή των μεταβολών της συγκέντρωσης σε ηλεκτρικά σήματα. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος στη φαρμακευτική ανάλυση είναι ο ανιχνευτής UV που εξασφαλίζει την καταγραφή της UV απορρόφησης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος ή σε ένα εύρος τιμών μήκους κύματος. Η παρουσία του αναλύτη προκαλεί αλλαγή στην απορρόφηση κι αν απορροφά περισσότερο από την κινητή φάση, λαμβάνεται θετικό σήμα στο χρωματογράφημα.

**Σύστημα ελέγχου κι απόκτησης δεδομένων:** Πρόγραμμα εγκατεστημένο σε Η/Υ που ελέγχει όλες τις παραμέτρους των οργάνων της HPLC, καταγράφει δεδομένα από τον ανιχνευτή και παρακολουθεί την απόδοση όλου του συστήματος. [44, pp. 938-942], [46, p. 232], [47, pp. 502-505], [51, pp. 9-10]



**Εικόνα 10.** Οργανολογία τυπικού συστήματος HPLC [53]

## 1.6. Βιομημική χρωματογραφία

Η ανάπτυξη των φαρμάκων είναι ήδη γνωστό ότι αποτελεί πολυετή κι εξαιρετικά δαπανηρή διαδικασία. Η μείωση του χρόνου της φαρμακευτικής έρευνας έχει ιδιαίτερη σημασία και μπορεί να προσεγγιστεί είτε με την έγκαιρη αναγνώριση κι απόρριψη φαρμακευτικών ενώσεων που θα δημιουργήσουν παρενέργειες πριν ή μετά την κυκλοφορία τους στην αγορά, είτε με την ανάλυση των μελετούμενων ουσιών ώστε να διασφαλιστούν σε ικανοποιητικό ποσοστό οι φαρμακοκινητικές ιδιότητές τους. Για τον σκοπό αυτόν, στον τομέα της φαρμακευτικής ανάλυσης εντάσσεται η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης, με την οποία μπορούν να μοντελοποιηθούν οι βιολογικές διαδικασίες.

Η πρώτη προσπάθεια που πραγματοποιήθηκε ήταν για την εκτίμηση της λιποφιλίας με HPLC αντίστροφης φάσης. Πλέον, η ανάπτυξη των βιομιμητικών χρωματογραφικών στηλών επιτρέπει την πειραματική αξιολόγηση των ιδιοτήτων ADMET στα πρώιμα στάδια της φαρμακευτικής μελέτης, συνδυάζοντας την προσομοίωση των βιολογικών μεμβρανών και την αμεσότητα των μετρήσεων. Η χρήση χρωματογραφικών δεικτών (όπως ο συντελεστής κατακράτησης) σαν μέτρο των βιολογικών διαδικασιών έχει συμβάλει στην ανάπτυξη ποσοτικών σχέσεων κατακράτησης-(βιολογικής) δράσης (Quantitative Retention-Activity Relationships, QRAR). Το σημαντικότερο πλεονέκτημα των QRAR είναι ότι δεν απαιτείται η γνώση της δομής της ένωσης για την πρόβλεψη του φαρμακοκινητικού ή τοξικολογικού προφίλ, όπως στις κλασικές μελέτες ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR), γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για τα μελετούμενα φαρμακευτικά μόρια.

Η βιομιμητική χρωματογραφία αποτελεί ιδανική εναλλακτική τεχνική που συνδυάζει τα υπάρχοντα πλεονεκτήματα των χρωματογραφικών τεχνικών με βιολογικά χαρακτηριστικά που ενσωματώνονται στις στατικές φάσεις ή με τη χρήση συγκεκριμένης κινητής φάσης. Στη φαρμακευτική έρευνα χρησιμοποιούνται 3 τύποι βιομιμητικής χρωματογραφίας: η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane, IAM), η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος (Immobilized Plasma Protein Chromatography) κι η μικυλλιακή υγροχρωματογραφία (Micellar Liquid Chromatography, MLC). Οι δύο πρώτες απαιτούν συγκεκριμένη στήλη, ενώ στην τρίτη επιλέγεται κινητή φάση με μικύλλια που προσομοιώνουν τις μεμβράνες του οργανισμού. Εκτός από την προσομοίωση του βιολογικού περιβάλλοντος που επιτυγχάνεται, η βιομιμητική χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιείται με υψηλή ταχύτητα, είναι οικονομική κι απαιτεί μικρή ποσότητα αναλύτη, χωρίς να είναι απαραίτητα εντελώς καθαρός. [54, p. 52], [55, p. 226]

### 1.6.1. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών

Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane Chromatography, IAM) αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και χαρακτηρίζεται ως πολλά υποσχόμενη τεχνική για την προσομοίωση του μερισμού λιποσώματος/νερού και της κυτταρικής διαπερατότητας. Τα φωσφολιπίδια αποτελούν σημαντικά συστατικά των βιολογικών ιστών. Ο Pidgeon κι οι συνεργάτες του σχεδίασαν και κατοχύρωσαν στατικές φάσεις που προσομοιώνουν τη λιπιδική διπλοστιβάδα των κυττάρων με ακινητοποιημένη φωσφατιδυλοχολίνη σε επιφάνεια πυριτίου. [49], [56]

Μερικές από τις εφαρμογές της χρωματογραφίας IAM είναι η μελέτη της εντερικής απορρόφησης (Human Intestinal/Oral Absorption), της διέλευσης από τον ΑΕΦ, της κατανομής των φαρμακευτικών ενώσεων στο δέρμα, του όγκου κατανομής και του κινδύνου φωσφολιπίδωσης.

#### 1.6.1.1. Στατική φάση

Οι στατικές φάσεις IAM αποτελούνται από μονοστιβάδες αμφίφιλων φωσφολιπιδίων ομοιοπολικά συνδεδεμένων σε σκελετό προπυλαμινο-πυριτίας με πόρους 300 Å για μηχανική υποστήριξη. Η πρώτη στήλη IAM (IAM.PC) αναπτύχθηκε από τον Pidgeon και

κατασκευάστηκε από την Regis Technologies. Η IAM.PC βασίστηκε στο επικρατέστερο λιπίδιο των μεμβρανών, τη φωσφατιδυλοχολίνη (PC). Τα μόρια PC αντιδρούν με τις ομάδες προπυλαμίνης-πυριτίας μέσω της ω-καρβοξυλικής ομάδας τους και της C2 αλυσίδας των λιπαρών οξέων. Στερεοχημικοί λόγοι έχουν ως αποτέλεσμα να μένουν ελεύθερες κάποιες ομάδες προπυλαμίνης στην επιφάνεια πυριτίου, δημιουργώντας μία υποεπιφάνεια με βασικές ιδιότητες, πράγμα που προκαλεί αύξηση της κατακράτησης των όξινων ενώσεων και μείωση αυτής των βασικών ενώσεων, αλλά και μείωση της χημικής σταθερότητας της δεσμευμένης φάσης της στήλης IAM.

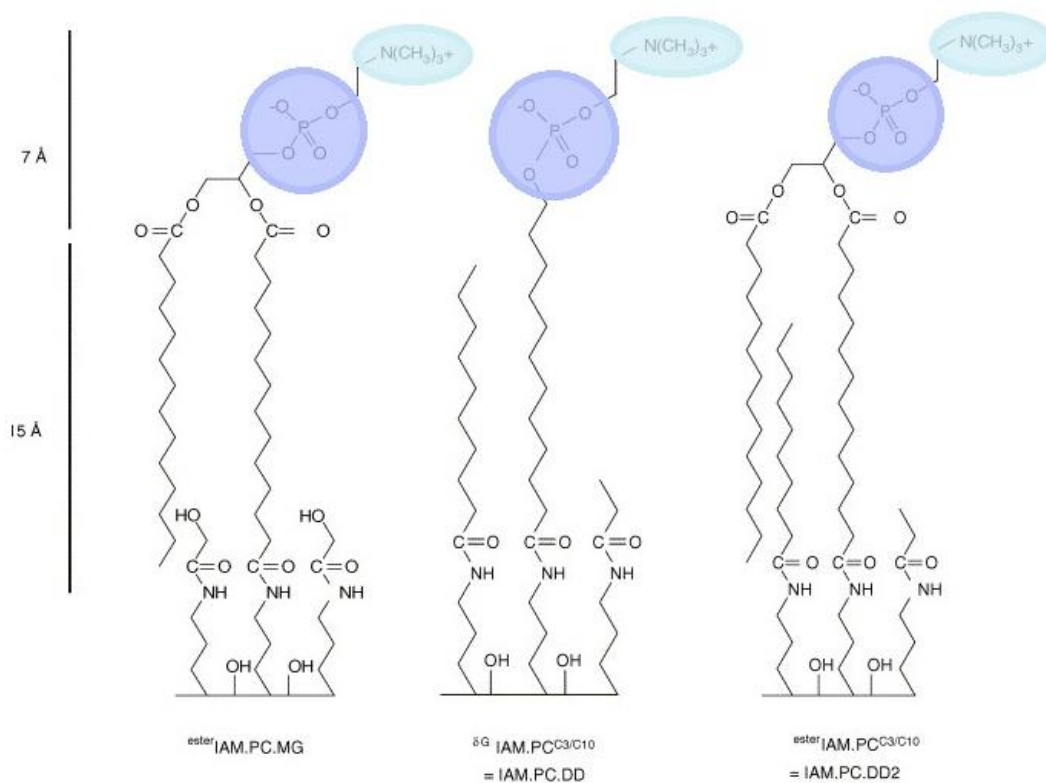
Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών, οι ελεύθερες προπυλαμινο-ομάδες μπορούν να απενεργοποιηθούν με μικρά μόρια, όπως η γλυκιδόλη και το μεθυλογλυκολικό οξύ (MG). Διαθέσιμες στήλες υπάρχουν μόνο για την κάλυψη με MG, οι IAM.PC.MG, που κατασκευάζονται από την Regis Technologies. Με αυτόν τον τρόπο, οι ελεύθερες αμίνες μετατρέπονται σε ουδέτερα αμίδια, όμως εισάγεται μία νέα υδροξυλομάδα στην υποεπιφάνεια. Η παρουσία ομάδων OH μπορεί να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις διαλυμένης ουσίας-επιφάνειας IAM, αν και μελέτες δείχνουν ότι δεν είναι εύκολα προσβάσιμες και δεν παρεμβαίνουν στον μηχανισμό κατακράτησης.

Εφόσον οι φυσικές βιολογικές μεμβράνες δεν περιλαμβάνουν ελεύθερες ομάδες OH κοντά στο κέντρο τους, αναπτύχθηκε νέα σειρά στηλών IAM με κάλυψη των αμινο-ομάδων σε δύο βήματα. Αρχικά, δεκανοϊκός ανυδρίτης μετατρέπει περίπου το 85% των ελεύθερων αμινο-ομάδων σε αμίδια κι έπειτα, οι υπολειπόμενες ομάδες καλύπτονται χρησιμοποιώντας προπιονικό ανυδρίτη. Επιπλέον, στον σκελετό προπυλαμίνης-πυριτίου προστίθεται μία μονή αλυσίδα φωσφατιδυλοχολίνης, προκειμένου να αυξηθεί η επιφανειακή πυκνότητα των φωσφολιπιδίων κι η σταθερότητα σε όξινες συνθήκες. Η στήλη αυτή κυκλοφόρησε με την ονομασία IAM.PC.DD (DD=Drug Discovery), ήταν πιο λιπόφιλη από άλλες IAM.PC επιφάνειες, αλλά αποσύρθηκε από την αγορά λόγω προβλημάτων που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια των φαρμακευτικών αναλύσεων.

Με στόχο την αύξηση της σταθερότητας και της υδροφοβικότητας της στατικής φάσης IAM, αναπτύχθηκε η στήλη IAM.PC.DD2, ως συνδυασμός των IAM.PC.MG και IAM.PC.DD. Η στατική φάση της IAM.PC.DD2 περιλαμβάνει διπλή αλυσίδα με κάλυψη από δεκανοϊκό και προπιονικό ανυδρίτη. Η στήλη αυτή είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στην ανάπτυξη των φαρμάκων και κατασκευάζεται επίσης από την Regis Technologies.

Στην Εικόνα 11 παρουσιάζονται οι στατικές φάσεις IAM.PC.MG, IAM.PC.DD και IAM.PC.DD2, όπου οι χρωματισμένες περιοχές είναι τα φορτισμένα κέντρα της πολικής κεφαλής της φωσφατιδυλοχολίνης (γαλάζια: θετικά, μπλε: αρνητικά), που τις διαφοροποιούν από τις παραδοσιακές στήλες αντίστροφης φάσης. [56] Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι στήλες IAM διπλής αλυσίδας προσομοιάζουν καλύτερα τα φυσικά φωσφολιπίδια και τα αποτελέσματα των χρωματογραφικών δεικτών συσχετίζονται καλύτερα με τα δεδομένα διαπερατότητας. [41]





**Εικόνα 11.** Στατικές φάσεις IAM.PC.MG, IAM.PC.DD και IAM.PC.DD2, όπου οι χρωματισμένες περιοχές είναι τα φορτισμένα κέντρα της πολικής κεφαλής της φωσφατιδυλοχολίνης (γαλάζια: θετικά, μπλε: αρνητικά)

### 1.6.1.2. Κινητή φάση

Οι μετρήσεις στην IAM συνήθως πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και η συνηθέστερη κινητή φάση είναι το φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline, PBS) για την προσομοίωση των φυσιολογικών συνθηκών. Η IAM μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση του ισοκρατικού χρόνου κατακράτησης σε pH 2,5-7,4. Στην περίπτωση ισχυρά κατακρατούμενων ενώσεων, για μείωση του χρόνου κατακράτησης είναι δυνατή η χρήση ακετονιτριλίου ως οργανικού τροποποιητή (προτιμάται σε συγκεντρώσεις έως 30%) και τελικά μετατροπή του  $\log k$  (με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης όπως έχει αναφερθεί στην ενότητα 1.5.2.2.) σε  $\log k_w$ . Η μεθανόλη αποφεύγεται στις στήλες IAM, καθώς επηρεάζει τη σταθερότητα της στήλης λόγω μεθανόλυσης των φωσφολιπιδίων. Η γήρανση της στήλης θα πρέπει να ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα με πρότυπες ενώσεις. [41], [49], [55]

### 1.6.1.3. Μηχανισμός κατακράτησης

Στη χρωματογραφία IAM, ο κύριος παράγοντας που διέπει τον μηχανισμό κατακράτησης είναι η υδροφοβικότητα. Ωστόσο, εμπλέκονται και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ως αποτέλεσμα σχηματισμού ιοντικών δεσμών, καθώς και αλληλεπιδράσεις λόγω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με τις ομάδες εστέρων γλυκερόλης. Η κατακράτηση



στην IAM μπορεί να προσομοιάσει οριακές περιπτώσεις μεταξύ παθητικής διάχυσης και δέσμευσης, οι οποίες περιγράφονται με τη φωσφολιποφιλία. [37]

$$\text{Φωσφολιποφιλία} = \text{Υδροφοβικότητα} \pm \text{Πολικότητα} + \text{Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις} \quad [1.28]$$

Το πρόσημο της πολικότητας μπορεί να είναι αρνητικό μειώνοντας τη φωσφολιποφιλία με τον ίδιο τρόπο που επιδρά στη λιποφιλία ή θετικό ως αποτέλεσμα του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου των φωσφολιπιδίων με τις ομάδες εστέρων της γλυκερόλης. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε αυξημένη κατακράτηση, αν και μπορεί να προκληθούν απωστικές δυνάμεις μεταξύ των διαλυμένων ανιόντων και των φωσφορικών ομάδων της στήλης. [55]

Όσον αφορά την έκλυση των συστατικών από τις στήλες IAM, οι βάσεις εμφανίζουν αυξημένη κατακράτηση στη στατική φάση λόγω των φωσφορικών ανιόντων και των ελκτικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων που δημιουργούνται. Τα ανιόντα που βρίσκονται στον σκελετό του υδρογονάνθρακα, είναι πιο εύκολο να αλληλεπιδράσουν με τα κατιόντα της διαλυμένης ουσίας, ενώ οι κεφαλές της χολίνης, στο εξωτερικό της επιφάνειας IAM, διαλύονται και τείνουν λιγότερο σε ανάλογες αλληλεπιδράσεις με τα ανιόντα της διαλυμένης ουσίας. [56]

### 1.6.2. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος

Η αλληλεπίδραση μικρών μορίων με τις πρωτεΐνες είναι σημαντική σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Ως παραδείγματα αναφέρονται η δράση των ενζύμων στα υποστρώματα κι η πρόσδεση των ορμονών στους υποδοχείς τους. Μία ακόμη διεργασία ιδιαίτερης σημασίας αποτελεί η σύνδεση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του ορού, αφού καθορίζει τη δραστηριότητα και την πορεία των ενώσεων μετά την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος. Ακόμη, ο άμεσος ή έμμεσος ανταγωνισμός δύο φαρμακευτικών ουσιών ή μίας φαρμακευτικής ουσίας κι ενός ενδογενούς συστατικού (π.χ. λιπαρού οξέος) για τις ίδιες πρωτεΐνες, μπορεί να οδηγήσει σε αλληλεπιδράσεις φαρμάκου-φαρμάκου ή σε φαινόμενα αντικατάστασης του φαρμάκου. Για όλους τους παραπάνω λόγους, είναι αναγκαία η κατανόηση της δέσμευσης των φαρμακευτικών ενώσεων στις πρωτεΐνες του ορού και πώς αυτή τελικά επηρεάζεται από άλλες ουσίες. Η γνώση της σύνδεσης φαρμάκου-πρωτεϊνών πλάσματος είναι καθοριστική για τη διαμόρφωση του φαρμακοκινητικού προφίλ (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, απέκκριση) των υποψήφιων φαρμάκων. Στις φαρμακευτικές μελέτες έχει εισαχθεί η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος (Immobilized Plasma Protein Chromatography), που αποτελεί είδος χρωματογραφίας συγγένειας υψηλής απόδοσης (High Performance Affinity Chromatography, HPAC). [57], [58] Η HPAC βασίζεται στην ακινητοποίηση μίας πρωτεΐνης σε ένα υπόστρωμα και την ένεση ενός φαρμάκου που θα αλληλεπιδράσει με αυτήν. Όσο μεγαλύτερη η συγγένεια της ένωσης με την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη, τόσο μεγαλύτερος ο χρόνος έκλουσής της από τη στήλη.

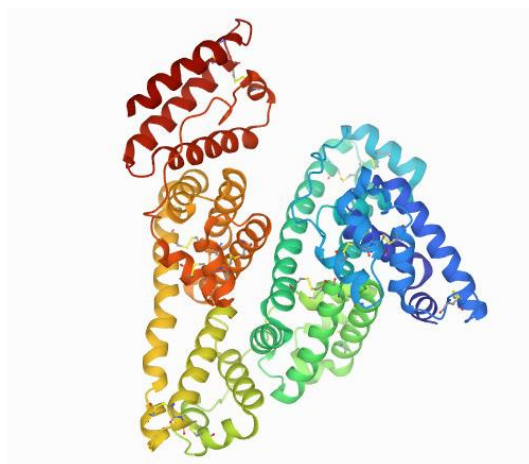
Δύο από τα βασικά πλεονεκτήματα της HPAC είναι η ευκολία αυτοματοποίησής της κι η ικανότητά της να απαιτεί μικρές ποσότητες πρωτεΐνης για μεγάλο αριθμό αναλύσεων. Επιπλέον, είναι εφικτή η μελέτη της συμπεριφοράς των εναντιομερών των χειρόμορφων

φαρμάκων. Ωστόσο, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην ακινητοποίηση της πρωτεΐνης στο υπόστρωμα και κατά συνέπεια στην έκταση που θα προσομοιάζει τη συμπεριφορά της ίδιας πρωτεΐνης στον οργανισμό (στη διαλυμένη μορφή της). Η ακινητοποίηση μπορεί να μεταβάλει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης, λόγω μετουσίωσης, ακατάλληλου προσανατολισμού ή στερεοχημικής παρεμπόδισης. Τέλος, υπάρχει περίπτωση αλληλεπίδρασης των προς ανάλυση ουσιών με τη στατική φάση, επηρεάζοντας τον χρόνο κατακράτησης. [59]

### 1.6.2.1. Στατική φάση

Αν και στο πλάσμα υπάρχουν πολλά συστατικά ικανά να δεσμεύουν φάρμακα, δύο πρωτεΐνες, η ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού (Human Serum Albumin, HSA) και η  $\alpha$ -όξινη γλυκοπρωτεΐνη (Alpha-1-Acid Glycoprotein, AGP), εντοπίζονται σε σχετικά μεγάλες ποσότητες και δεσμεύουν ποικιλία φαρμακευτικών ενώσεων. [59] Η HSA κι η AGP είναι οι κύριες πρωτεΐνες που ακινητοποιούνται στη στατική φάση (υψηλής ποιότητας αμινοπροπυλική πυριτική γέλη) σε αυτού του είδους τη χρωματογραφία. [60, p. 103]

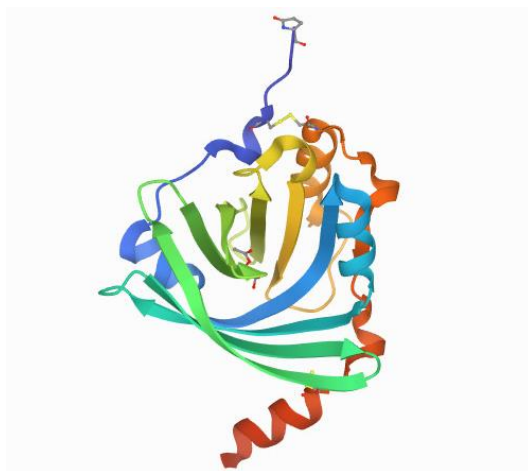
Η ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού (HSA) είναι μία πρωτεΐνη 585 αμινοξέων (MB 66500) που σταθεροποιείται με την παρουσία 17 εσωτερικών δισουλφιδικών δεσμών. Θεωρείται ότι έχει αρκετά καλά καθορισμένες θέσεις πρόσδεσης με τις διαλυμένες ουσίες (όπως λιπαρά οξέα, μεταλλικά ιόντα και πολλές μικρές οργανικές ενώσεις). Τα περισσότερα φάρμακα κι ορμόνες αλληλεπιδρούν με δύο σημαντικές θέσεις της HSA, γνωστές ως περιοχή βαρφαρίνης-αζαπροπαζόνης και περιοχή ινδόλης-βενζοδιαζεπίνης. [61], [62] Η HSA βρίσκεται σε συγκέντρωση 35-50 g/L στο πλάσμα (περίπου 50-60% των συνολικών πρωτεϊνών πλάσματος) και δεσμεύει κυρίως όξινα φάρμακα, αλλά κι ουδέτερα κι αρνητικά φορτισμένα υδρόφοβα συστατικά. [58], [63]



**Εικόνα 12.** Ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού (Human Serum Albumin, HSA) [64]

Η  $\alpha$ -όξινη γλυκοπρωτεΐνη (Alpha-1-Acid Glycoprotein, AGP) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη (MB 41000-43000) με υψηλό περιεχόμενο υδατανθράκων (περίπου 45% της μάζας της) και μεγάλο βαθμό ετερογένειας. Στο πλάσμα εντοπίζονται διαφορετικά ισομερή της AGP

ανάλογα με τον τύπο γλυκοζυλίωσης και των πολλαπλών υποκαταστάσεων αμινοξέων. Η AGP βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,4-1,0 g/L στο πλάσμα (περίπου 1-2% των συνολικών πρωτεϊνών πλάσματος) και λόγω του χαμηλού ισοηλεκτρικού σημείου της (περίπου 2,7) δεσμεύει κυρίως βασικά φάρμακα, αλλά κι ουδέτερα και μερικά όξινα. Ωστόσο, ο ρόλος της AGP στην πρόσδεση των φαρμάκων είναι ιδιαίτερα περίπλοκος κι επηρεάζεται από διάφορους κρίσιμους παράγοντες, όπως από το ότι μεταβάλλεται η συγκέντρωσή της στο πλάσμα ανάλογα με την κατάσταση της υγείας, την ηλικία και το φύλο του ατόμου, καθώς και κατά την εγκυμοσύνη. Τέλος, σημειώνεται ότι είναι περιορισμένος ο αριθμός των δημοσιεύσεων σχετικά με τη χρήση των στηλών AGP στις μελέτες πρόσδεσης φαρμάκων, ενώ χρησιμοποιούνται συχνότερα για διαχωρισμούς χειρόμορφων ενώσεων. [49], [60, p. 102], [65]



**Εικόνα 13.**  $\alpha_1$ -Όξινη γλυκοπρωτεΐνη (Alpha-1-Acid Glycoprotein, AGP) [66]

#### 1.6.2.2. Κινητή φάση

Ως κινητή φάση στη χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος συνήθως επιλέγονται υδατικά διαλύματα, όπως το φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) και το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου. Στην περίπτωση ισχυρά κατακρατούμενων ενώσεων (δηλαδή αυτών με ισχυρή πρωτεϊνική σύνδεση) προτιμάται η προσθήκη οργανικού τροποποιητή στην υδατική φάση προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος κατακράτησης. Συνήθως, για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο, 2-προπανόλη ή μεθανόλη (μόνο σε στήλες HSA) σε μέγιστη περιεκτικότητα 30% στις στήλες AGP και 10% στις στήλες HSA. Ωστόσο, η αύξηση της περιεκτικότητας έως 30% στις στήλες HSA φαίνεται να μην προκαλεί αναντίστροφες αλλαγές στη στατική φάση και να μην επηρεάζει την απόδοσή της. Στην περίπτωση προσθήκης οργανικού τροποποιητή, ο συντελεστής κατακράτησης  $\log k$  μετατρέπεται στον  $\log k_w$  με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (όπως έχει αναφερθεί στην ενότητα 1.5.2.2.).

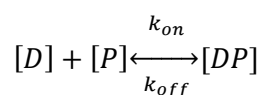
Όσον αφορά το pH της κινητής φάσης, υπάρχουν περιορισμοί για κάθε στήλη. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους κατασκευαστές, προτείνεται το εύρος pH 5-7 για τις στήλες HSA και 4-7 για τις στήλες AGP. Στις στήλες AGP, μείωση του pH προκαλεί μείωση του βαθμού του καθαρού αρνητικού φορτίου της πρωτεΐνης. Συνεπώς, οι βασικές

ενώσεις αναμένεται να εκλούνται νωρίτερα λόγω της μείωσης σχηματισμού ιοντικών δεσμών, ενώ ισχύει το αντίστροφο για τις όξινες ενώσεις. Στις HSA, επίσης, η μείωση του pH οδηγεί σε αύξηση του χρόνου κατακράτησης των όξινων ενώσεων. [60, p. 105]

### 1.6.2.3. Μηχανισμός κατακράτησης

Μεταξύ των αναλυτών και της στατικής φάσης μπορούν να αναπτυχθούν 3 τύποι αλληλεπιδράσεων: ιοντικοί δεσμοί (για ιονιζόμενες ενώσεις), υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου. [54, p. 70] Η σύνδεση ενός φαρμάκου σε μία πρωτεΐνη μπορεί να θεωρηθεί ως αναστρέψιμη κι άμεση διεργασία που διέπεται από τον νόμο δράσης των μαζών. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί κι η μη αναστρέψιμη σύνδεση φαρμακευτικών ουσιών στις πρωτεΐνες του πλάσματος.

Στην απλούστερη περίπτωση θεωρείται ότι υπάρχει μόνο μία θέση πρόσδεσης του φαρμάκου στην πρωτεΐνη κι η σύνδεση μπορεί να περιγραφεί από την ισορροπία:



όπου:  $[D], [P], [DP]$ : συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου, της ελεύθερης πρωτεΐνης, του συμπλέγματος φαρμάκου-πρωτεΐνης, αντίστοιχα

$k_{on}, k_{off}$ : σταθερά ρυθμού σύζευξης, διάστασης, αντίστοιχα

Στην ισορροπία, ο ρυθμός σύζευξης εξισώνεται με τον ρυθμό διάστασης. Η σταθερά σύζευξης ( $K_a$ ) ορίζεται ως εξής [59]:

$$K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[DP]}{[D][P]} \quad [1.29]$$

### 1.6.3. Μικυλλιακή υγροχρωματογραφία

Μία απλή κι αναπαραγωγίμη προσέγγιση αποτελεί η μικυλλιακή υγροχρωματογραφία (Micellar Liquid Chromatography, MLC) που αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1980 από τους Armstrong και Henry κι έχει εξελιχθεί σε εναλλακτική τεχνική έναντι των κλασικών μεθόδων χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης με υδατικά-οργανικά μίγματα, χάρη στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και πλεονεκτήματά της. Στην MLC χρησιμοποιείται αντίστροφη στατική φάση (μη πολική) κι ως κινητή φάση (πολική) υδατικό διάλυμα με επιφανειοδραστικό συστατικό σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από την κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (Critical Micellar Concentration, CMC) προκειμένου να σχηματιστούν μικύλλια. Η στατική φάση τροποποιείται με υδρόφοβη ή και σιλανόφιλη προσρόφηση επιφανειοδραστικών μονομερών και δομικά μοιάζει με τη διαταγμένη συστοιχία των υδρογονανθρακικών αλυσίδων των μεμβρανών. Ο υδρόφιλος/υδρόφοβος χαρακτήρας των προσροφημένων τασιενεργών προσομοιάζει τις πολικές περιοχές των μεμβρανών. Κατά συνέπεια, η στατική φάση περιέχει τόσο υδρόφοβες, όσο κι ηλεκτρονιακές θέσεις αλληλεπίδρασης, που μιμούνται τους βιολογικούς φραγμούς. Ακόμη, η κατακράτηση των φαρμάκων στην MLC, που εξαρτάται από τις υδρόφοβες, ηλεκτρονιακές και στερικές ιδιότητές τους, επιτυγχάνεται σε συνθήκες ροής με παρόμοιο τρόπο όπως τα φαινόμενα

απορρόφησης, μεταφοράς κι απέκκρισης των φαρμακευτικών ουσιών στο σώμα. Η ομοιότητα της MLC με το βιολογικό περιβάλλον οφείλεται στο γεγονός ότι τα φωσφολιπίδια, η χοληστερόλη, τα λιπαρά οξέα και τα τριγλυκερίδια που περιέχονται στα ενδοκυττάρια κι εξωκυττάρια υγρά, σχηματίζουν κι εκείνα μικύλλια με τις πρωτεΐνες (λιποπρωτεΐνες). [67]–[69]

Η ανησυχία για το περιβάλλον, καθιστά την MLC ως μία ενδιαφέρουσα τεχνική «πράσινης χημείας», αφού η κινητή φάση αποτελείται από τουλάχιστον 90% νερό. Η μικυλλιακή κινητή φάση έχει χαμηλή τοξικότητα και τα απόβλητα της μεθόδου δεν είναι επικίνδυνα. [69] Μεταξύ των πλεονεκτημάτων της MLC αναφέρονται, επίσης, ο ταυτόχρονος διαχωρισμός φορτισμένων και μη ενώσεων, η μοναδική επιλεκτικότητα διαχωρισμού των ουσιών, το χαμηλό κόστος κι η βιοαποικοδομησιμότητα των χρησιμοποιούμενων διαλυτών. [35] Επιπλέον, υπάρχει ευελιξία στην επιλογή στατικών φάσεων, λόγω του τύπου και της συγκέντρωσης των επιφανειοδραστικών ουσιών. [68] Ένα ακόμη ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της MLC είναι η δυνατότητα άμεσης έγχυσης φυσιολογικών υγρών (όπως ούρα, πλάσμα, ορός, γάλα) στο σύστημα χωρίς άλλη προεπεξεργασία, πέρα από τη διήθηση και χωρίς να παρατηρείται αύξηση της πίεσης του συστήματος ή αξιοσημείωτη βλάβη μετά από πολλαπλές εγχύσεις. [70]

Παρόλα αυτά, η MLC παρουσιάζει μερικά μειονεκτήματα, όπως όταν οι ενώσεις μεταφέρονται ενεργά ή μέσω της παρακυτταρικής οδού ή όταν εμπλέκονται μεταβολικές διεργασίες, καθώς δε λαμβάνει υπόψη τον ρόλο αυτών. Ακόμη, οι ισχυρά υδρόφοβες ουσίες παρουσιάζουν μεγάλη κατακράτηση, άρα αυξημένο χρόνο αναλύσεων, γεγονός που απαιτεί την προσθήκη μικρής ποσότητας οργανικών διαλυτών (χωρίς όμως να είναι πάντοτε μεγάλο το ποσοστό μείωσης του χρόνου έκλουσης σε σύγκριση με τις άλλες βιομηχανικές χρωματογραφικές μεθόδους). [71], [72]

### 1.6.3.1. Στατική φάση

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στατική φάση στην MLC είναι η στήλη αντιστρόφου φάσεως C18, ενώ άλλες πιθανές επιλογές είναι οι στήλες C8 ή Cyanopropyl. Οι στήλες τροποποιούνται με την παρουσία επιφανειοδραστικών ενώσεων στην κινητή φάση. Η προσρόφηση του τασιενεργού στην πορώδη επιφάνεια της στήλης αντιστρόφου φάσεως επηρεάζει δραστικά την κατακράτηση, λόγω της αλλαγής των διάφορων επιφανειακών ιδιοτήτων της στατικής φάσης (πολικότητα, δομή, όγκος πόρων, επιφάνεια). Τα επιφανειοδραστικά μόρια καλύπτουν τους πόρους της στατικής φάσης, μειώνοντας αισθητά τον όγκο τους.

Πολλές φορές, επιλέγεται η προσθήκη ιοντικών συστατικών στην κινητή φάση για ρύθμιση του pH και προσαρμογή της ιοντικής ισχύος. Η παρουσία αλάτων μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της ποσότητας του προσροφημένου ιοντικού τασιενεργού, λόγω μείωσης της ηλεκτροστατικής άπωσης, της συγκέντρωσης CMC, αλλά και της ενίσχυσης των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Η παρουσία οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση και κατά συνέπεια ο «ανταγωνισμός» μεταξύ αλκοολών κι επιφανειοδραστικών μορίων για προσρόφηση στη στατική φάση, εξηγεί τη γραμμική μείωση της ποσότητας προσροφημένου συστατικού με την αύξηση της συγκέντρωσης της αλκοόλης. Μάλιστα, κινητές φάσεις πλούσιες σε οργανικό διαλύτη μπορούν να απομακρύνουν πλήρως τα προσροφημένα μόρια από τη στατική φάση. [69]

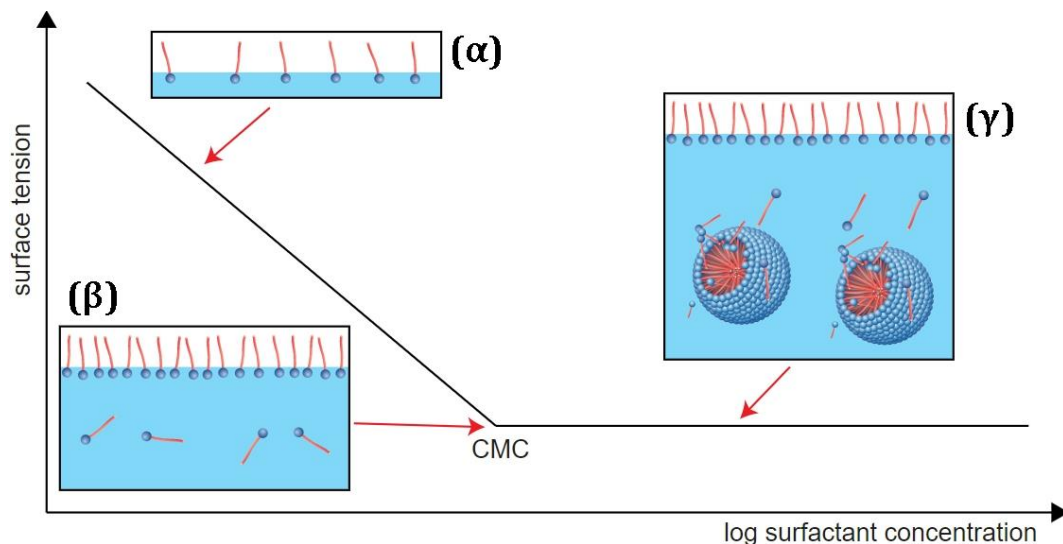
### 1.6.3.2. Κινητή φάση

Τα επιφανειοδραστικά μόρια (τασιενεργά) είναι αμφίφιλα και περιλαμβάνουν μία υδρόφοβη ουρά και μία πολική ή ιοντική κεφαλή. Η κατηγοριοποίησή τους στηρίζεται είτε στο φορτίο της κεφαλής (διάκριση σε μη ιοντικά, ανιοντικά, κατιοντικά, αμφίφιλα), είτε στη φύση της υδρόφοβης ουράς (υδρογονάνθρακες, χολικά άλατα, φθοράνθρακες). [73]

Τα τασιενεργά προσροφώνται κατά προτίμηση σε διεπιφάνειες όπου βρίσκουν τις ενεργειακά ευνοϊκότερες συνθήκες λόγω της «διπλής» δομής τους. Για παράδειγμα, σε μία επιφάνεια νερού, ταξινομούνται με τέτοιο τρόπο ώστε η υδρόφιλη κεφαλή να βρίσκεται στο νερό κι η υδρογονανθρακική αλυσίδα να κατευθύνεται προς την αέρια φάση (Εικόνα 14α). Η μείωση της επιφανειακής τάσης λόγω των επιφανειοδραστικών ουσιών γίνεται μεγαλύτερη όσο αυτές προσροφώνται στη διεπιφάνεια. Μόλις επιτευχθεί κορεσμός στη διεπιφάνεια, η προσθήκη περισσότερων μορίων δε θα μειώσει παραπάνω την επιφανειακή τάση (Εικόνα 14β). Το σημείο αυτό είναι η κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (CMC), από το οποίο κι έπειτα λαμβάνει χώρα η «αυτο-οργάνωση» των τασιενεργών κι ο σχηματισμός συσσωματωμάτων, που ονομάζονται μικύλλια, όπως είναι ήδη γνωστό (Εικόνα 14γ). Η ελαχιστοποίηση της ανεπιθύμητης επαφής μεταξύ μη πολικών αλυσίδων και πολικού διαλύτη αντισταθμίζει την απώλεια εντροπίας από τον σχηματισμό μικυλλίων. Σημειώνεται ότι είναι εφικτός κι ο σχηματισμός αντίστροφων μικυλλίων, που συσσωρεύουν τις πολικές κεφαλές και προσανατολίζουν τις υδρόφοβες ουρές προς μία μη πολική φάση. Ανάλογα με τη θερμοκρασία ή τη σύσταση του συστήματος, διαφέρει η μορφή των μικυλλίων (σφαιρική, επιμήκης, κυλινδρική κ.ά.). [74] Τα μικύλλια έχουν δυναμική δομή που είναι το αποτέλεσμα της άμεσης ανταλλαγής των επιφανειοδραστικών στα συσσωματώματα και τις μονομερείς μορφές. Ο αριθμός των μονομερών των τασιενεργών στο συσσωμάτωμα και το μέγεθος των μικυλλίων διαφέρει μεταξύ τασιενεργών. [73]

Η CMC μπορεί να καθοριστεί με μέτρηση της επιφανειακής τάσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για τιμές συγκεντρώσεων μικρότερες από τη CMC, η επιφανειακή τάση μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του τασιενεργού, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των τασιενεργών στη διεπιφάνεια. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τη CMC, η επιφανειακή τάση του διαλύματος παραμένει σταθερή, διότι η συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού στην επιφάνεια δε μεταβάλλεται περαιτέρω (Εικόνα 14). [74]





**Εικόνα 14.** Επιφανειακή τάση σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης του επιφανειοδραστικού συστατικού [74]

Τα μικύλλια παρουσιάζουν υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές (για ιοντικά επιφανειοδραστικά συστατικά) θέσεις αλληλεπίδρασης. Εντοπίζονται 3 θέσεις αλληλεπίδρασης: ο πυρήνας (υδρόφοβος), η επιφάνεια (υδρόφιλη) και η περιοχή μεταξύ των υδρόφοβων ουρών και των υδρόφιλων κεφαλών.

Σε συγκέντρωση μεγαλύτερη της CMC, μεταβολή της συγκέντρωσης του τασιενεργού μεταφράζεται σε αύξηση της συγκέντρωσης των μικυλλίων στο διάλυμα, ενώ ο αριθμός των μονομερών του επιφανειοδραστικού στην κινητή φάση παραμένει σταθερός. Παρατηρείται προσρόφηση μίας περίπου σταθερής ποσότητας μονομερών στη στατική φάση, γεγονός που καθιστά σταθερή την τροποποιημένη στήλη.

Παρόλο που είναι δυνατή η προσθήκη οργανικών τροποποιητών στην κινητή φάση (για μείωση του χρόνου έκλουσης), αποφεύγεται διότι σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγή ή καταστροφή των μικυλλίων. Η μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση εξαρτάται από τον τύπο του οργανικού διαλύτη και το επιφανειοδραστικό συστατικό. Ο χρόνος κατακράτησης μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης του τασιενεργού ή της ποσότητας του οργανικού διαλύτη (με τον περιορισμό που προαναφέρθηκε). [35], [69]

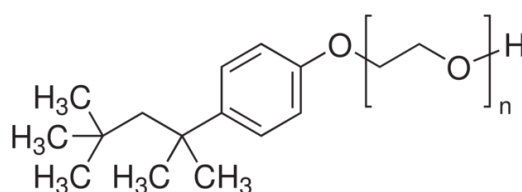
Συνήθως, στην MLC ως τασιενεργά επιλέγονται το ανιοντικό δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), το κατιοντικό βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο (Cetyltrimethylammonium Bromide, CTAB) και το μη ιοντικό Brij-35 (Polyoxyethylene (23) lauryl ether) λόγω της χαμηλής τιμής CMC. Στην περίπτωση χρήσης του Brij-35, η MLC καλείται μικυλλιακή χρωματογραφία βιοκατανομής (Biopartitioning Micellar Chromatography, BMC) και προσομοιώνει τους βιολογικούς φραγμούς και τα εξωκυττάρια υγρά. [75] Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται και άλλα επιφανειοδραστικά συστατικά που χρησιμοποιούνται, μαζί με τη CMC τους, ταξινομημένα ανάλογα με το φορτίο της κεφαλής. Εκτός από τα τασιενεργά του Πίνακα 1, σε μελέτες αναφέρεται και η χρήση της μιλτεφοσίνης (Miltefosine) και μιγμάτων χολικών αλάτων με λεκιθίνη. Η επιλογή ουδέτερων τασιενεργών κρίνεται ως καλύτερη λόγω των χαμηλότερων CMC, σαν αποτέλεσμα της έλλειψης ηλεκτροστατικών απωθήσεων μεταξύ ιοντικών

μονομερών. Επιπλέον, η ισχυρή σύνδεση μεταξύ μικυλλίων (από ιοντικά τασιενεργά) με ιοντικούς αναλύτες οδηγεί σε αυξημένους χρόνους έκλυσης. [68]

**Πίνακας 1.** Τυπικά επιφανειοδραστικά συστατικά στην MLC [73], [76]

Τύπος	Όνομα	CMC (mM)
Ανιοντικά	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	8,1
	Sodium tetradecyl sulfate	2,1
	Sodium dodecyl sulphonate	9,3
Κατιοντικά	Cetyl trimethylammonium bromide	0,92
	Cetyl trimethylammonium chloride	1,3
	Dodecyl trimethylammonium bromide (DTAB)	15
Μη ιοντικά	Polyoxyethylene (23) lauryl ether (Brij-35)	0,1
	Alkylphenol hydroxypolyethylene (Triton X-100)	0,24
	Polyoxyethylene (20)-sorbitane monooleate (Tween 80)	0,01
	Polyoxyethylene (20)-sorbitane monolaurate (Tween 20)	0,059
Αμφολύτες	Sulfobetain SB-12	3,3
	CHAPS	4,2-6,3

Στην παρούσα εργασία, επιλέγεται το υδατοδιαλυτό επιφανειοδραστικό Triton X-100 (μη ιοντικό). Το Triton X-100 είναι μία αιθοξυλιωμένη οκτυλοφαινόλη με κατά μέσο όρο 9-10 μόρια αιθυλενοξειδίου (Εικόνα 15). Η αλυσίδα αιθυλενοξειδίου είναι υδρόφιλη, ενώ ο αρωματικός υδρογονάνθρακας συνιστά την υδρόφοβη περιοχή. Το Triton X-100 βρίσκεται σε υγρή μορφή κι απορροφάει στο υπεριώδες (275 nm). Το ειδικό βάρος του ισούται περίπου με 1,07 g/mL (25 °C) και το μοριακό βάρος του με 250-625 g/mol, ενώ το ιξώδες του εκτιμάται στα 270 cP στους 25 °C. Η τιμή αυτή μειώνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες και πιο συγκεκριμένα, στους 50 °C υπολογίζεται στα 80 cP. Μεταξύ των βασικών χρήσεων του τασιενεργού αυτού αναφέρονται διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές, η παραγωγή ινών κι υφασμάτων, τα οικιακά απορρυπαντικά κι οι γαλακτωματοποιητές. [76]-[78]



**Εικόνα 15.** Triton X-100 (n=9-10) [76]

Η επιλογή του κατάλληλου επιφανειοδραστικού συστατικού επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες, οι οποίοι αναφέρονται παρακάτω:

1. Κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (CMC): Ένα τασιενεργό συστατικό κρίνεται κατάλληλο όταν έχει χαμηλή CMC. Μία υψηλή τιμή CMC οδηγεί στην απαίτηση υψηλής συγκέντρωσης επιφανειοδραστικού, που έχει ως αποτέλεσμα ιξώδη διαλύματα, τα οποία δημιουργούν ανεπιθύμητη υψηλή πίεση στο σύστημα και περιττό θόρυβο για τους UV ανιχνευτές. Η CMC μεταβάλλεται ανάλογα με τον διαλύτη.



2. Σημείο Krafft-Σημείο θόλωσης: Το σημείο Krafft ορίζεται για τα ιοντικά επιφανειοδραστικά ως η θερμοκρασία στην οποία η διαλυτότητα του μονομερούς επιφανειοδραστικού εξισώνεται με τη CMC. Σε θερμοκρασία χαμηλότερη από το σημείο αυτό, η διαλυτότητα είναι αρκετά χαμηλή και το διάλυμα φαίνεται να μην περιέχει μικύλλια. Επομένως, στη χρωματογραφική ανάλυση κρίνεται απαραίτητο η θερμοκρασία να είναι μεγαλύτερη από το σημείο Krafft, προκειμένου να αποφευχθεί η καθίζηση του τασιενεργού. Για τον λόγο αυτόν, προτιμώνται επιφανειοδραστικά με σημείο Krafft αρκετά χαμηλότερο από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για τα μη ιοντικά τασιενεργά ορίζεται, αντίστοιχα, το σημείο θόλωσης, θερμοκρασία πάνω από την οποία προκαλείται διαχωρισμός φάσεων, άρα επιλέγεται θερμοκρασία χαμηλότερη από το σημείο αυτό. Για το τασιενεργό που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία (Triton X-100) το σημείο θόλωσης είναι στους 64 °C.

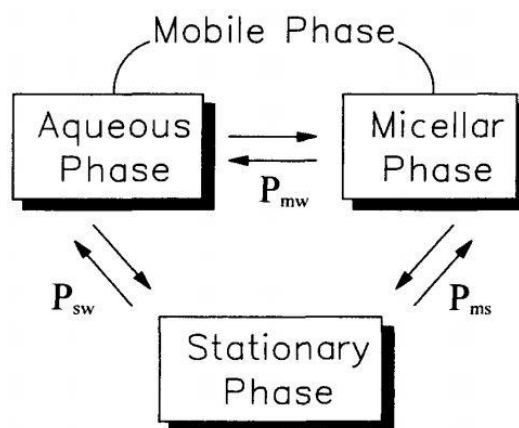
3. pH κινητής φάσης: Στην MLC το αποδεκτό εύρος pH κυμαίνεται μεταξύ 2,5 και 7,5. Η κατάλληλη τιμή pH εξαρτάται από τη φύση των αναλυτών και τη χρησιμοποιούμενη επιφανειοδραστική ουσία.

4. Οργανικοί διαλύτες: Η επιλογή του κατάλληλου οργανικού διαλύτη γίνεται αφού ληφθεί υπόψη η πολικότητα των αναλυτών. Για πολικά συστατικά προτιμώνται η 1-προπανόλη, η 2-προπανόλη ή το ακετονιτρίλιο σε συγκέντρωση έως 15%. Για μη πολικά ή συστατικά που έχουν υψηλή συγγένεια με το τασιενεργό που έχει προσροφηθεί στη στατική φάση, επιλέγονται ισχυρότεροι διαλύτες, όπως η 1-βουτανόλη ή η 1-πεντανόλη, σε συγκεντρώσεις έως 10% και 6%, αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι οι τελευταίοι δύο προκαλούν σχηματισμό μικρογαλακτώματος σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση. Όπως έχει αναφερθεί, δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητα του οργανικού διαλύτη, λόγω πιθανού διαχωρισμού των μικυλλίων, οπότε κι η κινητή φάση θα περιέχει μόνο ελεύθερα μόρια επιφανειοδραστικού. Βέβαια, η αναγκαστική χαμηλή συγκέντρωση οργανικών διαλυτών, καθιστά την MLC ως πιθανή τεχνική «πράσινης χημείας». Τέλος, η σταθεροποίηση του οργανικού τροποποιητή στα μικυλλιακά «μέσα» μειώνει τον κίνδυνο εξάτμισης, γεγονός που επιτρέπει τη διατήρηση της κινητής φάσης για μεγάλο χρονικό διάστημα στο εργαστήριο, χωρίς σημαντικές αλλαγές στη σύστασή της. [69]

Η μικυλλιακή χρωματογραφία δεν έχει προτυποποιηθεί ώστε να εφαρμόζεται σε συγκεκριμένες χρωματογραφικές συνθήκες. Η θερμοκρασία που επιλέγεται μπορεί να είναι 36,5 °C, 37 °C, 40 °C (για μίμηση της θερμοκρασίας του ανθρώπινου σώματος) ή ακόμη κι η θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C). Όσον αφορά την παρουσία ηλεκτρολυτών, στην κινητή φάση συνήθως προστίθενται 9,2 g/L NaCl για μίμηση της ωσμωτικής πίεσης των βιολογικών υγρών. [68]

### 1.6.3.3. Μηχανισμός κατακράτησης

Στη μικυλλιακή υδροχρωματογραφία η κατακράτηση των αναλυτών στηρίζεται σε 3 διαφορετικές ισορροπίες (Εικόνα 16): την κατανομή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ των μικυλλίων και της κινητής φάσης ( $P_{mw}$ ), την κατανομή μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης ( $P_{sw}$ ) και την άμεση μεταφορά των αναλυτών μεταξύ των μικυλλίων και της τροποποιημένης από το επιφανειοδραστικό συστατικό στατικής φάσης ( $P_{ms}$ ). Οι ισορροπίες επηρεάζονται από τη φύση και τη συγκέντρωση των τασιενεργών ουσιών, το pH και την ιοντική ισχύ της κινητής φάσης, αλλά κι από τη θερμοκρασία. [68], [79]



Εικόνα 16. Ισορροπίες στην MLC [73]

Η κατακράτηση ενός φαρμάκου στην MLC εξαρτάται από τον τύπο αλληλεπίδρασης (ηλεκτροστατικές ή/και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις) με τα μικύλλια και την τροποποιημένη στατική φάση. Οι μη ιοντικές ουσίες επηρεάζονται μόνο από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ενώ οι φορτισμένες από υδρόφοβες ή/κι ηλεκτροστατικές. Στην περίπτωση δομικά παρόμοιων ενώσεων με ίδιο καθαρό φορτίο, μπορεί να παρατηρηθούν διαφορές στην κατακράτησή τους λόγω διαφορών στην υδροφοβικότητά τους. [35]

#### 1.6.3.4. Εφαρμογές

Η μικυλλιακή υδροχρωματογραφία (MLC) αποτελεί πλέον συχνή επιλογή στη φαρμακευτική ανάλυση κι άλλους κλάδους. Στη συνέχεια αναφέρονται αρκετές από τις εφαρμογές της.

Η MLC έχει χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή κατάλληλων μοντέλων QRAR σε πολλές περιπτώσεις, όπως για τα βιοδραστικά υποκατεστημένων φαινολών, την αναισθητική ισχύ τοπικών αναισθητικών, την υπνωτική δράση των βαρβιτουρικών, την  $\alpha$ - και  $\beta$ -αδρενεργική δράση των κατεχολαμινών, την τοξικότητα και την αγχολυτική δράση των βενζοδιαζεπινών, την αντιψυχωτική δράση των φαινοθειαζινών, καθώς και τις βιολογικές αποκρίσεις των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών. [67] Επιπλέον, επιλέγεται για τη μελέτη βιολογικών διεργασιών, την πρόβλεψη του χρόνου ημιζωής, του όγκου κατανομής και της πρωτεϊνικής σύνδεσης. [68]

Ιδιαίτερα, η μικυλλιακή χρωματογραφία βιοκατανομής (BMC) αναφέρεται ως κατάλληλη μέθοδος για τη μελέτη της εντερικής και της διαδερμικής απορρόφησης, της διαπερατότητας από τον οφθαλμικό ιστό, αλλά και της διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. [36], [80] Τέλος, χρησιμοποιείται και σε ελέγχους τοξικότητας κι οικοτοξικότητας, με ένα παράδειγμα την ανάλυση 65 ανιλινών και φαινολών για την τοξικότητα σε χονδροκέφαλες τσίμες (Fathead minnows). [81]

## 2. Πειραματικό μέρος

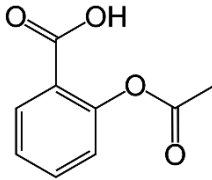
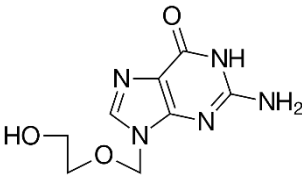
### 2.1. Σκοπός

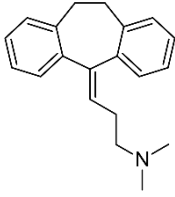
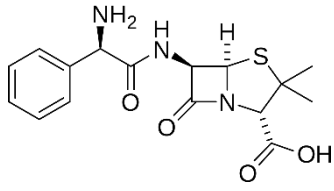
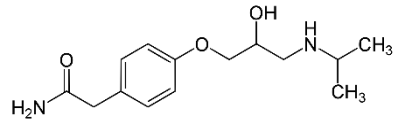
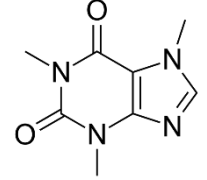
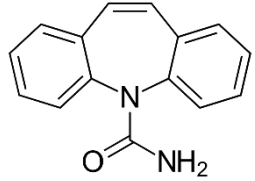
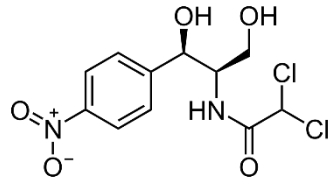
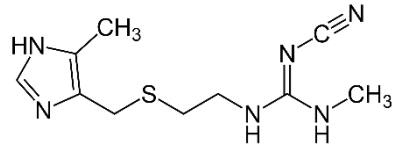
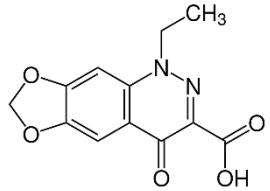
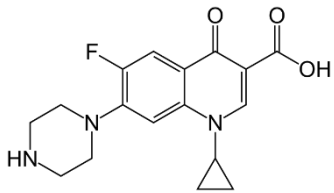
Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του μηχανισμού έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων με χρήση της μικυλλιακής υδροχρωματογραφίας παρουσία του επιφανειοδραστικού συστατικού Triton X-100 κι έπειτα, η αξιολόγηση της μεθόδου για την αποτελεσματικότητά της στην εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων. Πιο συγκεκριμένα, μελετάται η κατακράτηση ποικίλων φαρμακευτικών ουσιών σε διαφορετικές τιμές pH (7,40 και 5,50), προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα για την επίδραση της λιποφιλίας και των δευτερογενών αλληλεπιδράσεων στον μηχανισμό κατακράτησης των ουσιών αυτών από τη στήλη αντίστροφης φάσης της MLC. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται συσχετίσεις των συντελεστών κατακράτησης με τους αντίστοιχους συντελεστές που προκύπτουν από άλλες βιομημητικές χρωματογραφικές μεθόδους, ώστε να ελεγχθεί η επιτυχία της προσομοίωσης. Τέλος, αναπτύσσονται μοντέλα πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης και του όγκου κατανομής και διερευνάται η δυνατότητα πρόβλεψης της διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

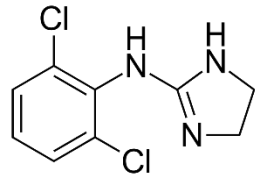
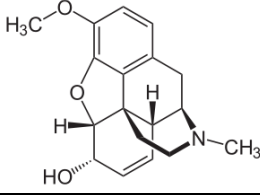
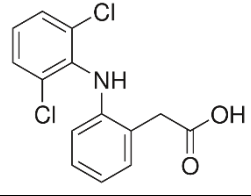
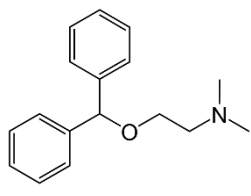
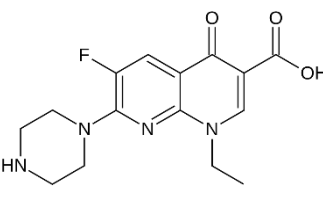
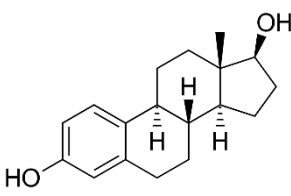
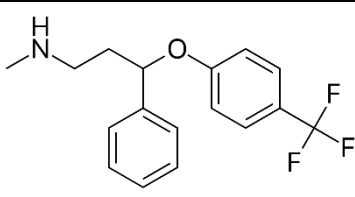
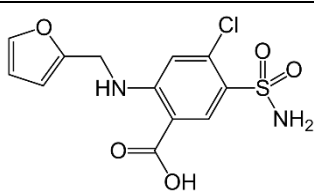
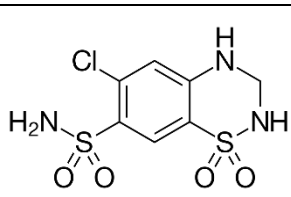
### 2.2. Φαρμακευτικές ενώσεις

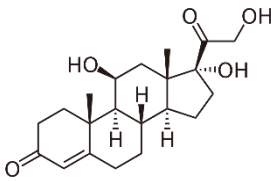
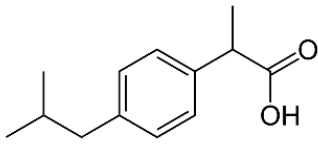
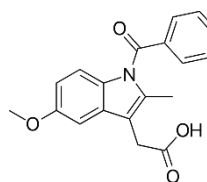
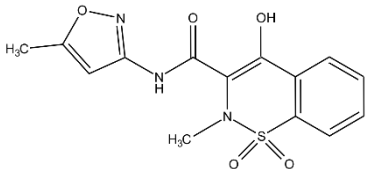
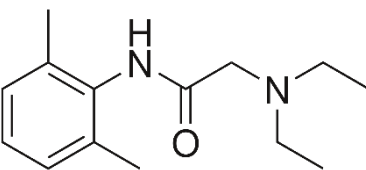
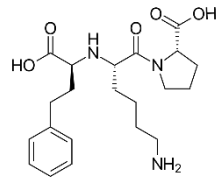
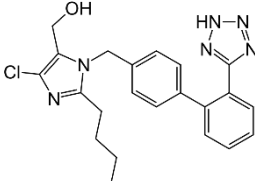
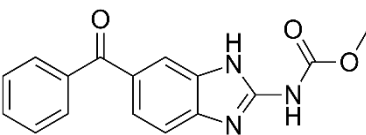
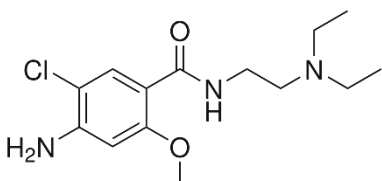
Οι φαρμακευτικές ενώσεις που μελετώνται στην παρούσα εργασία είναι συνολικά 49 και ποικίλουν ως προς τη δομή (οξέα, βάσεις, αμφολύτες, ουδέτερα), αλλά και τη φαρμακολογική δράση τους (αντιβιοτικά, καρδιολογικά, αντιφλεγμονώδη, αντικαταθλιπτικά κ.ά.). Οι ενώσεις αγοράστηκαν είτε ως πρότυπες, είτε ως φαρμακευτικά σκευάσματα από φαρμακεία. Στον Πίνακα 2 αναγράφονται: η κατηγορία στην οποία εντάσσονται (A για τα οξέα - Acid, B για τις βάσεις - Base, Z για τους αμφολύτες - Zwitterion και N για τα ουδέτερα - Neutral), η φαρμακολογική δράση τους [82], καθώς κι η δομή τους.

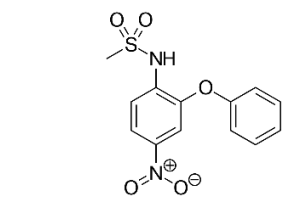
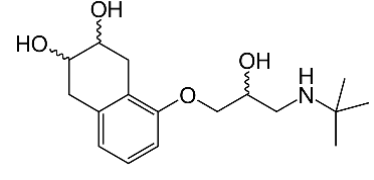
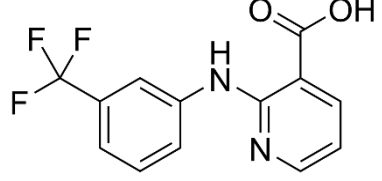
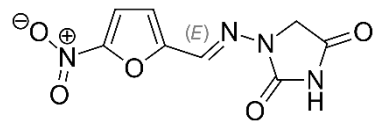
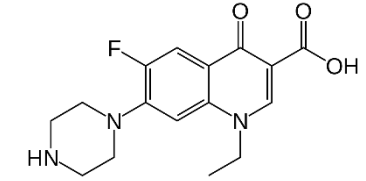
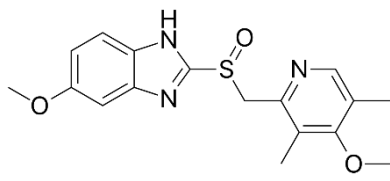
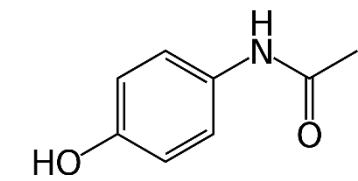
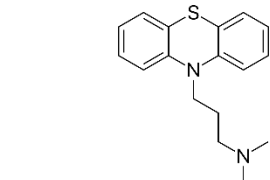
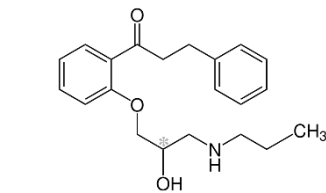
Πίνακας 2. Φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν και χαρακτηριστικά τους

α/α	Φαρμακευτικές ενώσεις	Κατηγορία	Φαρμακολογική δράση	Δομή
1	Acetylsalicylic acid	A	Αντιφλεγμονώδες	
2	Acyclovir	N	Αντι-ιικό	

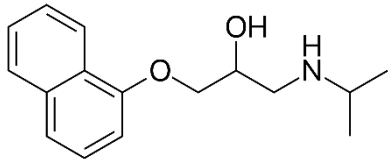
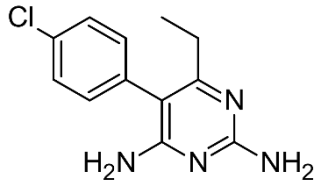
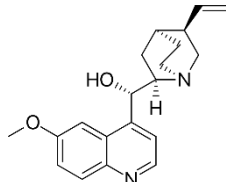
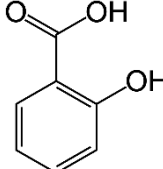
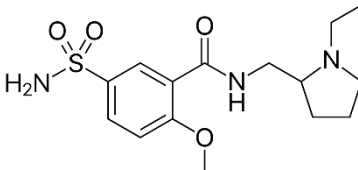
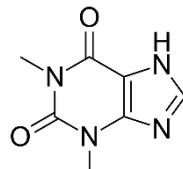
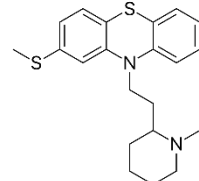
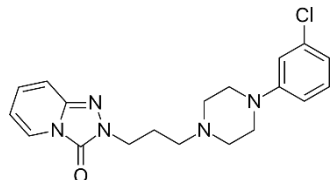
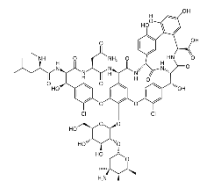
3	Amitriptyline	B	Αντικαταθλιπτικό	
4	Ampicillin	A	Αντιβιοτικό	
5	Atenolol	B	Καρδιολογικό (β-αναστολείς)	
6	Caffeine	N	Διεγερτικό ΚΝΣ	
7	Carbamazepine	N	Αντιεπιληπτικό	
8	Chloramphenicol	N	Αντιβιοτικό	
9	Cimetidine	B	Αντιόξινο (για τη θεραπεία του πεπτικού έλκους)	
10	Cinoxacin	A	Αντιβιοτικό	
11	Ciprofloxacin	Z	Αντιβιοτικό	

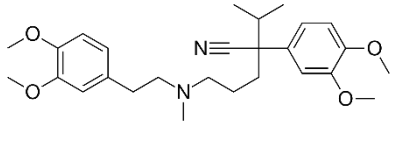
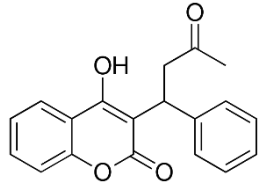
12	Clonidine	B	Αντιυπερτασικό (αναλγητικό, οφθαλμολογικό)	
13	Codeine	B	Αναλγητικό (αντιβηχικό)	
14	Diclofenac	A	Αντιφλεγμονώδες	
15	Diphenhydramine	B	Αντιισταμινικό	
16	Enoxacin	Z	Αντιβιοτικό	
17	β-Estradiol	N	Οιστρογόνο	
18	Fluoxetine	B	Αντικαταθλιπτικό	
19	Furosemide	A	Διουρητικό	
20	Hydrochlorothiazide	N	Διουρητικό	

21	Hydrocortisone	N	Κορτικοειδές	
22	Ibuprofen	A	Αντιφλεγμονώδες	
23	Indomethacin	A	Αντιφλεγμονώδες, καρδιολογικό	
24	Isoxicam	A	Αντιφλεγμονώδες	
25	Lidocaine	B	Αντιαρρυθμικό, αναισθητικό	
26	Lisinopril	Z	Αντιυπερτασικό	
27	Losartan	A	Αντιυπερτασικό	
28	Mebendazole	N	Αντιελμινθικό	
29	Metoclopramide	B	Αντιεμετικό	

30	Metoprolol	B	Καρδιολογικό	
31	Nadolol	B	Καρδιολογικό	
32	Niflumic acid	A	Αντιφλεγμονώδες	
33	Nitrofurantoin	A	Αντιβιοτικό	
34	Norfloxacin	Z	Αντιβιοτικό	
35	Omeprazole	N	Αντιόξινο (για τη θεραπεία του πεπτικού έλκους)	
36	Paracetamol	N	Αναλγητικό	
37	Promazine	B	Αντιψυχωσικό	
38	Propafenone	B	Αντιαρρυθμικό	



39	Propranolol	B	Καρδιολογικό	
40	Pyrimethamine	B	Αντιπαρασιτικό (εντομοκτόνο, εντομοαπωθητικό)	
41	Quinidine	B	Αντιαρρυθμικό	
42	Salicylic acid	A	Αντιφλεγμονώδες	
43	Sulpiride	B	Αντιψυχωσικό	
44	Theophylline	N	Βρογχοδιασταλτικό	
45	Thioridazine	B	Αντιψυχωσικό	
46	Trazodone	N	Αντικαταθλιπτικό	
47	Vancomycin	Z	Αντιβιοτικό	

48	Verapamil	B	Αντιαρρυθμικό	
49	Warfarin	A	Αντιπηκτικό	

### 2.3. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν αναλυτικής καθαρότητας.

Για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκαν:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $\geq 99,5\%$ , Chem Lab NV)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\geq 98,5-101\%$ , υπολογισμένο στη στερεή ουσία, Honeywell)
- $\text{NaCl}$  ( $\geq 99,5\%$ , Honeywell)
- Triton X-100 (MP Biomedicals, LLC)
- $\text{HCl}$  (30%, αραιωμένο με νερό υψηλής καθαρότητας για ρύθμιση του pH, Merck)
- $\text{NaOH}$  (50-52% σε  $\text{H}_2\text{O}$  κι επιπλέον αραιωμένο με νερό υψηλής καθαρότητας για ρύθμιση του pH, Sigma-Aldrich)
- Acetonitrile ( $\geq 99,9\%$ , Honeywell)
- Νερό υψηλής καθαρότητας (High Purity Water)

Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν απιονισμένο, που υπέστη περαιτέρω επεξεργασία μέσω συσκευής υπερκάθαρου ύδατος (Barnstead EasyPure II, Thermo Scientific), προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή καθαρότητα (υπερκάθαρο).

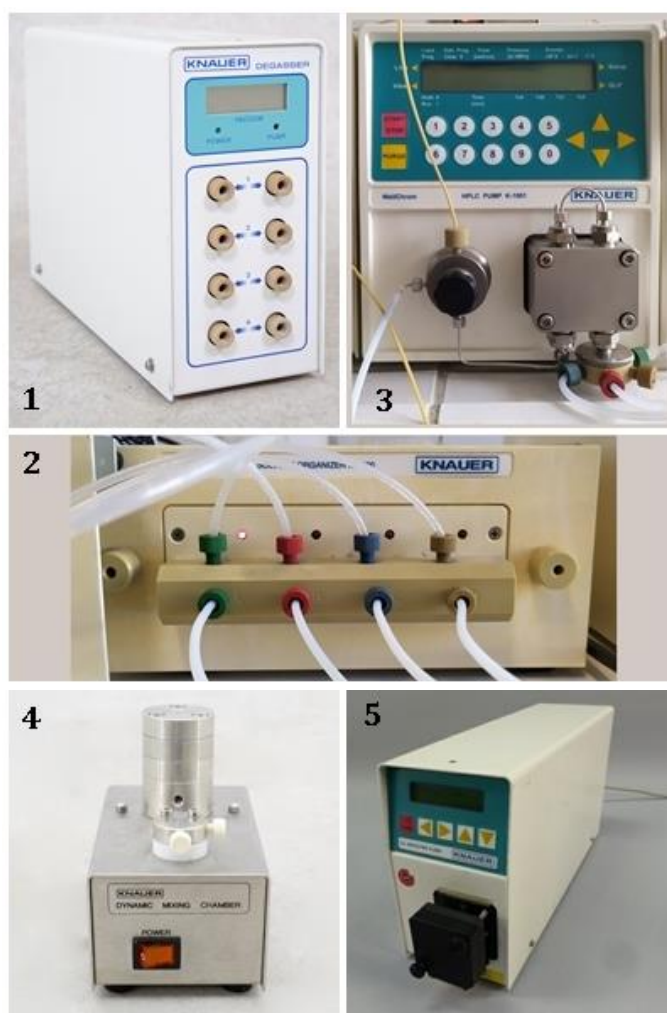
Ελάχιστη ποσότητα των φαρμακευτικών ενώσεων διαλυτοποιήθηκε σε μικρή ποσότητα (<15 mL) κινητής φάσης ή μεθανόλης ( $\geq 99,9\%$ , Honeywell) για τις πιο λιπόφιλες ενώσεις.

Για τη μέτρηση του νεκρού χρόνου ( $t_0$ ) επιλέχθηκε το κιτρικό νάτριο,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Mallinckrodt).

### 2.4. Οργανολογία

Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγροχρωματογραφίας της εταιρείας Knauer (Εικόνα 17) με τα ακόλουθα μέρη:

1. Απαερωτής, Vacuum Degasser: για την απομάκρυνση τυχόν φυσαλίδων, προκειμένου να μη φτάσουν στη στήλη και προκαλέσουν σοβαρό πρόβλημα στη λειτουργία της.
2. Διαχειριστής διαλύτη, Solvent Organiser K-1500: απαραίτητος στην περίπτωση ανάμιξης δύο ή περισσότερων διαλυτών, κάτι που δεν απαιτήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.
3. Αντλία, HPLC Pump K-1001: ρυθμισμένη σε ροή κινητής φάσης 1 mL/min για τις μετρήσεις και 0,5 mL/min για τον καθαρισμό της στήλης.
4. Dynamic Mixing Chamber: αναμίκτης διαλυτών τοποθετημένος πριν τη στήλη, απαραίτητος στην περίπτωση περισσότερων του ενός διαλυτών, όχι στην παρούσα εργασία.
5. Ανιχνευτής, UV Detector K-2501: τοποθετημένος μετά τη στήλη, ρυθμισμένος στα 220 nm και συνδεδεμένος με τον Η/Υ, ώστε να απεικονίζεται στο χρωματογράφημα το σήμα που ανιχνεύει.



**Εικόνα 17.** Επιμέρους όργανα συστήματος υγροχρωματογραφίας (Knaauer) – 1. Vacuum Degasser, 2. Solvent Organiser, 3. Pump, 4. Dynamic Mixing Chamber, 5. UV Detector

Η ρύθμιση της θερμοκρασίας της στήλης στους 37 °C (για μίμηση της θερμοκρασίας των 36,6 °C του ανθρώπινου σώματος) πραγματοποιήθηκε με υδατόλουτρο, Stirred Water Bath WB-4MS (Biosan) (Εικόνα 18).



**Εικόνα 18.** Υδατόλουτρο (Biosan)

Ο όγκος του βρόχου έγχυσης ήταν 20  $\mu$ L (Εικόνα 19).



**Εικόνα 19.** Βρόχος έγχυσης

Οι απαιτούμενες ποσότητες για την παρασκευή της κινητής φάσης ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων (Ohaus), ενώ το pH ρυθμίστηκε με τη βοήθεια πεχαμέτρου (MP125, Mettler Toledo).

Σημειώνεται ότι λόγω τεχνικών προβλημάτων που προέκυψαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων με τη λειτουργία του απαεριωτή, πριν την έναρξη των μετρήσεων, γινόταν διήθηση υπό κενό του διαλύτη με 47 mm Nylon Membrane 0,45  $\mu$ m (ALWSCI Group).

Για την καταγραφή των μετρήσεων ήταν απαραίτητη η χρήση του λογισμικού «EuroChrom 2000» στον Η/Υ.

## 2.5. Στατική φάση

Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη αντίστροφης φάσης Discovery HS C18 (Supelco) με μήκος 15 cm, εσωτερική διάμετρο 4,6 mm και μέγεθος σωματιδίων 5  $\mu\text{m}$  (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Στήλη αντίστροφης φάσης Discovery HS C18 (Supelco)

## 2.6. Κινητή φάση

Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διαλύτης έκλουσης που παρασκευάστηκε με  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$  (για μίμηση της ωσμωτικής πίεσης των βιολογικών υγρών), υπερκάρθαρο νερό και το τασιενεργό Triton X-100 (για τον σχηματισμό μικυλλίων) με ή χωρίς την προσθήκη ακετονιτριλίου. Η προσθήκη ακετονιτριλίου έγινε για τη μέτρηση των πιο λιπόφιλων φαρμάκων, με στόχο να μειωθεί ο χρόνος έκλουσής τους. Ο διαλύτης ρυθμίστηκε σε pH 7,40 (μίμηση του pH του αίματος) και 5,50 (μίμηση του pH των περιοχών κοντά στο λεπτό έντερο). Στο pH 7,40 μετρήθηκαν όλες οι φαρμακευτικές ενώσεις, ενώ στο 5,50 εκείνες με αμφολυτικό χαρακτήρα κι ενδεικτικά κάποιες όξινες, βασικές κι ουδέτερες.

Σε χαμηλό pH οι ελαφρώς όξινες φαρμακευτικές ενώσεις εμφανίζουν μειωμένο ιονισμό κι ευνοείται η ουδέτερη μορφή τους, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη λιποφιλία, ενίσχυση της συγγένειάς τους με τη στήλη και κατά συνέπεια αύξηση του χρόνου έκλουσής τους. Ο μειωμένος ιονισμός ενός φαρμάκου συνδέεται με την αύξηση της *per os* απορρόφησής του. Οι αμφολύτες δεν έχουν σταθερή συμπεριφορά κι έτσι, μελετώνται κι αυτοί στο pH 5,50. Οι ουδέτερες ενώσεις δεν επηρεάζονται από μεταβολές του pH, ενώ οι ελαφρώς βασικές εμφανίζουν μειωμένο ιονισμό σε μεγαλύτερες τιμές pH, άρα δεν είναι αναγκαία η μελέτη τους στο 5,50.

Οι κινητές φάσεις που παρασκευάστηκαν αναφέρονται στη συνέχεια:

- κινητή φάση ρυθμισμένη σε pH 7,40 χωρίς παρουσία ακετονιτριλίου
- κινητή φάση ρυθμισμένη σε pH 5,50 χωρίς παρουσία ακετονιτριλίου
- κινητή φάση ρυθμισμένη σε pH 5,50 περιεκτικότητας 5% v/v ακετονιτριλίου
- κινητή φάση ρυθμισμένη σε pH 5,50 περιεκτικότητας 10% v/v ακετονιτριλίου
- κινητή φάση ρυθμισμένη σε pH 5,50 περιεκτικότητας 15% v/v ακετονιτριλίου

## 2.7. Πειραματική διαδικασία

### 2.7.1. Παρασκευή κινητής φάσης

Η κινητή φάση έχει τελικό όγκο 500 mL. Αρχικά, ζυγίζονται 3,440 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,770 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  και 4,600 g  $\text{NaCl}$ , τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως των 500 mL και προστίθεται υπερκάθαρο νερό έως τα 350 mL περίπου. Για την υποβοήθηση της διάλυσης των στερεών στο νερό, χρησιμοποιείται πλάκα με μηχανικό αναδευτήρα (MR Hei-Tec, Heidolph) χωρίς θέρμανση κι ανάδευση με μαγνητάκι περίπου στις 420 rpm. Παράλληλα, ζυγίζονται 0,720 g Triton X-100 (5,75 mM) σε μικρό ποτήρι ζέσεως, προστίθεται μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού (<30 mL) κι ακολουθεί ανάδευση με μαγνητάκι περίπου στις 300 rpm σε πλάκα με μηχανικό αναδευτήρα (Carousel Tech, Radleys Tech) και θέρμανση περίπου στους 50 °C έως ότου ομογενοποιηθεί πλήρως. Αφού επιτευχθεί διάλυση των στερεών στο μεγάλο ποτήρι ζέσεως, πραγματοποιείται η ρύθμιση του pH του διαλύματος (με χρήση πεχαμέτρου) με προσθήκη αραιωμένου διαλύματος NaOH (για ρύθμιση pH στο 7,40) ή αραιωμένου διαλύματος HCl (για ρύθμιση pH στο 5,50). Στη συνέχεια, προστίθεται η διαλυμένη ποσότητα του τασιενεργού στο μεγάλο ποτήρι ζέσεως κι αφήνεται 5-10 min για ανάδευση. Τέλος, η ποσότητα του διαλύτη μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL και συμπληρώνεται υπερκάθαρο νερό έως τη χαραγή. Στο σημείο αυτό αναφέρεται ότι στις περιπτώσεις παρασκευής κινητής φάσης με ακετονιτρίλιο, γίνεται πρώτα η προσθήκη ακετονιτριλίου στην ογκομετρική φιάλη (25, 50, 75 mL για περιεκτικότητες 5%, 10%, 15% v/v σε ακετονιτρίλιο, αντίστοιχα) κι έπειτα η πλήρωση με υπερκάθαρο νερό έως τη χαραγή.

Λόγω των τεχνικών προβλημάτων που αναφέρθηκαν με τον απαεριωτή, ο διαλύτης έκλουσης διηθείται υπό κενό με χρήση φίλτρου Nylon προτού χρησιμοποιηθεί στο χρωματογραφικό σύστημα.

### 2.7.2. Χρωματογραφική διαδικασία

Πριν την έναρξη των πειραματικών μετρήσεων είναι απαραίτητος ο καθορισμός της χρωματογραφικής μεθόδου. Μέσω του λογισμικού «EuroChrom 2000» ρυθμίζεται η ροή της κινητής φάσης στο 1 mL/min και το μήκος κύματος που μετράει ο ανιχνευτής UV στα 220 nm. Η στήλη βυθίζεται πλήρως στο υδατόλουτρο, του οποίου η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 37 °C.

Το χρωματογραφικό σύστημα αφήνεται να λειτουργήσει για τουλάχιστον 25 min (Baseline) με ροή 1 mL/min έως ότου παρατηρηθεί ισορροπία μεταξύ κινητής και στατικής φάσης (σχεδόν σταθερή τιμή απορρόφησης στο χρωματογράφημα). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση του νεκρού χρόνου  $t_0$  με έγχυση κιτρικού νατρίου (διαλυμένου σε κινητή φάση) με τη βοήθεια σύριγγας 100  $\mu\text{L}$ . Ο χρόνος που προκύπτει κορυφή στο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο  $t_0$ . Οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται 3 φορές. Ακολουθούν οι μετρήσεις των φαρμακευτικών ενώσεων με τον ίδιο τρόπο, αφού πρώτα διαλυθούν σε κινητή φάση ή μεθανόλη. Για κάθε ένωση καταγράφεται ο χρόνος ανάσχεσης ( $t_R$ ) που αντιστοιχεί στην κύρια κορυφή του διαγράμματος. Όλες οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται 3 φορές, προκειμένου να υπολογιστεί ο παράγοντας ανάσχεσης ( $\log k$ ) από τη σχέση [1.25] και να ληφθεί ως τελική τιμή ο μέσος όρος των τριών  $\log k$ .

Τα φάρμακα με αυξημένη λιποφιλία (σε pH 5,50) μετρώνται με χρήση διαλύτη, στον οποίο έχει προστεθεί ακετονιτρίλιο. Στην περίπτωση αυτήν, προσδιορίζονται 3 διαφορετικές ισοκρατικές τιμές  $\log k$ , για κινητή φάση με 3 διαφορετικές περιεκτικότητες σε ακετονιτρίλιο (5%, 10% και 15% v/v) με τελικό σκοπό τον υπολογισμό του  $\log k_{w(\text{extr.})}$  από τη σχέση [1.27].

Αφού ολοκληρωθούν οι μετρήσεις κάθε ημέρας πειραμάτων, πραγματοποιούνται 3 ακόμη μετρήσεις για τον νεκρό χρόνο, ώστε να προκύψει η τιμή  $t_0$  από τον μέσο όρο των 6 τιμών που λήφθηκαν. Τέλος, γίνεται καθαρισμός της στήλης αρχικά με 100% υπερκάθαρο νερό με ροή 0,5 mL/min για τουλάχιστον 30 min κι έπειτα με διάλυμα μεθανόλης:υπερκάθαρου νερού (σε αναλογία περίπου 30:70) με την ίδια ροή και για τουλάχιστον τον ίδιο χρόνο.

## 2.8. Βιβλιογραφικά δεδομένα

### 2.8.1. Δεδομένα λιποφιλίας

Τα δεδομένα για τους συντελεστές μερισμού ( $\log P$ ) και κατανομής ( $\log D_{7,40}$ ,  $\log D_{5,50}$ ), σε pH 7,40 και 5,50, αντίστοιχα, λήφθηκαν μέσω του λογισμικού ADME Boxes 3.0 της εταιρείας Pharma Algorithms, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως παράμετροι κατά τη στατιστική ανάλυση των πειραματικών μετρήσεων. Οι τιμές αυτές αναγράφονται στον Πίνακα 3. Σημειώνονται μόνο οι τιμές  $\log D_{5,50}$  που απαιτούνται για τη μελέτη της συμπεριφοράς κατακράτησης σε pH 5,50 (ενότητα 3.6.).

### 2.8.2. Δεδομένα κλασμάτων θετικού κι αρνητικού φορτίου μορίων

Τα δεδομένα των κλασμάτων θετικού ( $F^+$ ,  $F_{zwitter}^+$ ) κι αρνητικού ( $F^-$ ,  $F_{zwitter}^-$ ) φορτίου των μορίων, σε pH 7,40, λήφθηκαν από το ίδιο λογισμικό, ADME Boxes 3.0, κι αναγράφονται επίσης στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3.** Δεδομένα συντελεστή μερισμού ( $\log P$ ), κλασμάτων θετικού ( $F^+$ ,  $F_{zwitter}^+$ ) κι αρνητικού ( $F^-$ ,  $F_{zwitter}^-$ ) φορτίου, σε pH 7,40, και συντελεστή κατανομής ( $\log D_{7,40}$ ,  $\log D_{5,50}$ ), σε pH 7,40 και 5,50, για τις φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν

α/α	Φαρμακευτικές ενώσεις	Κατηγορία	$\log P$	$\log D_{7,40}$	$\log D_{5,50}$	$F^+$ (7,40)	$F_{zwitter}^+$ (7,40)	$F^-$ (7,40)	$F_{zwitter}^-$ (7,40)
1	Acetylsalicylic acid	A	1,19	-2,50	-0,82	0,000	0,000	1,000	1,000
2	Acyclovir	N	-1,56	-1,56		0,000	0,000	0,009	0,009
3	Amitriptyline	B	5,04	2,50		0,982	0,982	0,000	0,000
4	Ampicillin	A	-1,13	-4,00	-3,67	0,000	0,470	0,530	1,000
5	Atenolol	B	0,16	-1,61	-2,90	0,994	0,994	0,000	0,000
6	Caffeine	N	-0,07	-0,07	-0,07	0,000	0,000	0,000	0,000
7	Carbamazepine	N	2,30	2,30		0,000	0,000	0,000	0,000
8	Chloramphenicol	N	1,14	1,14		0,000	0,000	0,000	0,000



9	Cimetidine	B	0,40	0,35		0,218	0,218	0,000	0,000
10	Cinoxacin	A	1,28	-1,16	-0,62	0,000	0,000	0,998	0,998
11	Ciprofloxacin	Z	-1,08	-1,11	-1,73	0,050	0,964	0,033	0,947
12	Clonidine	B	1,59	0,97	-0,73	0,779	0,779	0,000	0,000
13	Codeine	B	1,14	0,37		0,848	0,848	0,000	0,000
14	Diclofenac	A	4,04	1,15	3,17	0,000	0,000	0,999	0,999
15	Diphenhydramine	B	3,40	1,29		0,965	0,965	0,000	0,000
16	Enoxacin	Z	-1,02	-1,02	-1,68	0,051	0,965	0,033	0,947
17	$\beta$ -Estradiol	N	4,01	4,01		0,000	0,000	0,001	0,001
18	Fluoxetine	B	4,26	1,82		0,997	0,997	0,000	0,000
19	Furosemide	A	2,03	-0,69	0,03	0,000	0,000	1,000	1,000
20	Hydrochlorothiazide	N	-0,07	-0,08		0,000	0,000	0,028	0,028
21	Hydrocortisone	N	1,60	1,60		0,000	0,000	0,000	0,000
22	Ibuprofen	A	3,50	1,07		0,000	0,000	0,999	0,999
23	Indomethacin	A	4,27	1,03	2,79	0,000	0,000	0,998	0,998
24	Isoxicam	A	2,83	-0,32	1,31	0,000	0,000	1,000	1,000
25	Lidocaine	B	2,26	1,71		0,779	0,779	0,000	0,000
26	Lisinopril	Z	-1,01	-1,01	-1,01	0,000	0,999	0,001	1,000
27	Losartan	A	3,09	1,16	2,24	0,000	0,066	0,933	0,999
28	Mebendazole	N	2,83	2,83		0,004	0,004	0,002	0,002
29	Metoclopramide	B	2,64	0,64		0,989	0,989	0,000	0,000
30	Metoprolol	B	1,88	-0,37	-1,18	0,994	0,994	0,000	0,000
31	Nadolol	B	0,81	-1,16		0,991	0,991	0,000	0,000
32	Niflumic acid	A	4,81	0,80		0,000	0,003	0,997	1,000
33	Nitrofurantoin	A	-0,47	-0,77	-0,48	0,000	0,000	0,473	0,473
34	Norfloxacin	Z	-1,03	-1,03	-1,68	0,050	0,964	0,033	0,947
35	Omeprazole	N	2,30	2,30		0,001	0,001	0,054	0,054
36	Paracetamol	N	0,51	0,51	0,51	0,000	0,000	0,000	0,000
37	Promazine	B	4,55	2,58		0,991	0,991	0,000	0,000
38	Propafenone	B	3,20	1,81		0,992	0,992	0,000	0,000
39	Propranolol	B	2,98	1,26	0,35	0,994	0,994	0,000	0,000
40	Pyrimethamine	B	2,69	2,44		0,584	0,584	0,000	0,000
41	Quinidine	B	3,44	2,41		0,946	0,946	0,000	0,000
42	Salicylic acid	A	2,26	-1,67	-0,24	0,000	0,000	1,000	1,000
43	Sulpiride	B	0,62	-1,26	-2,40	0,984	0,988	0,000	0,004
44	Theophylline	N	-0,02	-0,02		0,000	0,000	0,000	0,000
45	Thioridazine	B	5,90	3,34		0,991	0,991	0,000	0,000
46	Trazodone	N	2,90	2,54		0,218	0,218	0,000	0,000
47	Vancomycin	Z	2,48	1,94	-1,00	0,000	0,875	0,125	1,000
48	Verapamil	B	3,83	2,57		0,982	0,982	0,000	0,000
49	Warfarin	A	2,60	0,01	1,82	0,000	0,000	0,997	0,997

### 2.8.3. Δεδομένα μικυλλιακής υγροχρωματογραφίας

Τα δεδομένα των συντελεστών κατακράτησης μικυλλιακής υγροχρωματογραφίας λήφθηκαν από τη δημοσίευση «Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes» [68], καθώς κι από αποτελέσματα πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.. [83]–[86] Πιο συγκεκριμένα, αφορούν πειράματα σε

θερμοκρασία 37 °C με κινητή φάση ρυθμισμένη σε pH 7,40 και 5,50 και προσθήκη Brij-35 (ουδέτερο τασιενεργό), Tween 20 (ουδέτερο τασιενεργό) ή SDS (ανιοντικό τασιενεργό). Όλα τα δεδομένα αναγράφονται στον Πίνακα 4, όπου τα κενά κελιά οφείλονται στην έλλειψη δεδομένων.

**Πίνακας 4.** Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της MLC με κινητή φάση ρυθμισμένη σε pH 7,40 και 5,50 και προσθήκη τασιενεργού Brij-35 (0,04 M), Tween 20 (0,6 mM) ή SDS (0,04 M)

α/α	Φαρμακευτικές ενώσεις	Κατηγορία	log <sub>k</sub> <sub>Brij-35</sub> (7,40)	log <sub>k</sub> <sub>Brij-35</sub> (5,50)	log <sub>k</sub> <sub>Tween 20</sub> (7,40)	log <sub>k</sub> <sub>Tween 20</sub> (5,50)	log <sub>k</sub> <sub>SDS</sub> (7,40)	log <sub>k</sub> <sub>SDS</sub> (5,50)
1	Acetylsalicylic acid	A	-0,42	-0,29	-0,81	0,38	-0,31	-0,04
2	Acyclovir	N	-0,54	-0,35	-0,46		-0,33	
3	Amitriptyline	B	1,86		2,18	1,48	2,13	1,83
4	Ampicillin	A	-0,30	-0,71	-0,66	-0,95	0,11	0,89
5	Atenolol	B	-0,27	-0,43	-0,55		1,21	1,06
6	Caffeine	N	0,10	0,08	0,05		0,66	
7	Carbamazepine	N	0,97	1,01	1,75		1,35	
8	Chloramphenicol	N	0,49		1,35		0,72	
9	Cimetidine	B	0,37	-0,13	0,34		1,23	
10	Cinoxacin	A	-0,57	-0,15	-0,83	-0,10	-0,72	0,64
11	Ciprofloxacin	Z	-0,23	0,17	-0,72	-0,14	-0,96	0,65
12	Clonidine	B					1,45	1,22
13	Codeine	B						
14	Diclofenac	A	1,15	1,42	1,47	1,82	0,84	1,70
15	Diphenhydramine	B	1,17		1,76			
16	Enoxacin	Z	-0,37	0,09	-0,94	-0,45	-1,17	0,91
17	β-Estradiol	N	1,22	1,20	2,01		1,22	
18	Fluoxetine	B	1,64		1,90		3,21	
19	Furosemide	A	0,86	0,87	1,37	1,67	-0,25	0,33
20	Hydrochlorothiazide	N	0,50	0,53	1,00			
21	Hydrocortisone	N	0,98		1,36		0,87	
22	Ibuprofen	A	1,01	1,61	1,19	1,50	0,85	1,50
23	Indomethacin	A	1,00	1,45	1,71	1,71	0,84	1,65
24	Isoxicam	A	0,84	0,91	1,40	1,50	-0,14	1,50
25	Lidocaine	B	0,85		1,39	-0,08	1,78	
26	Lisinopril	Z	-0,82	-1,16	-1,23	-0,26	-0,50	0,40
27	Losartan	A	0,97	1,04	1,48	1,55	0,29	1,09
28	Mebendazole	N	1,19		1,02		2,05	
29	Metoclopramide	B	0,57		0,78		1,85	
30	Metoprolol	B	0,51	0,15	0,46		1,82	
31	Nadolol	B	-0,37	-0,38	-0,33		1,56	1,49
32	Niflumic acid	A	1,14	1,28	1,52	1,79	0,70	1,69
33	Nitrofurantoin	A			0,14	0,50	0,01	0,41
34	Norfloxacin	Z	-0,16	0,17	-0,71	-0,17	-1,32	1,12
35	Omeprazole	N	1,13	1,10	1,48		1,53	
36	Paracetamol	N	0,46	0,45	0,30		-0,03	-0,11
37	Promazine	B			1,79	1,48	2,29	1,99
38	Propafenone	B	1,30				2,04	
39	Propranolol	B	1,22	0,87	1,73	1,20	2,27	
40	Pyrimethamine	B	1,36		1,96		1,90	
41	Quinidine	B	1,22				1,97	

42	Salicylic acid	A	0,34	0,40	0,15	0,32	-0,07	-0,03
43	Sulpiride	B	-0,19	-0,35	-0,01		0,86	
44	Theophylline	N	-0,11	0,05	-0,47		-0,24	
45	Thioridazine	B	1,85		2,22	1,55	1,40	
46	Trazodone	N	1,37		2,33		1,71	
47	Vancomycin	Z	-0,30	-0,53	-0,33	-0,74	0,12	-0,13
48	Verapamil	B	1,61	1,01	2,02		2,49	2,29
49	Warfarin	A	0,86	1,31	1,06	1,59	0,79	1,12

#### 2.8.4. Δεδομένα χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών

Τα δεδομένα των συντελεστών κατακράτησης χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM) λήφθηκαν από βιβλιογραφικά δεδομένα [87], [88], καθώς και από αποτελέσματα πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.. [89] Πιο συγκεκριμένα, στα πειράματα αυτά ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη IAM.PC.DD2, η κινητή φάση (PBS) ρυθμίστηκε σε pH 7,40 και 5,50 κι οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όλα τα δεδομένα αναγράφονται στον Πίνακα 5, όπου τα κενά κελιά οφείλονται στην έλλειψη δεδομένων.

**Πίνακας 5.** Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της IAM με κινητή φάση (PBS) ρυθμισμένη σε pH 7,40 και 5,50 και στατική φάση τη στήλη IAM.PC.DD2

α/α	Φαρμακευτικές ενώσεις	Κατηγορία	IAM.PC.DD2 (7,40)	IAM.PC.DD2 (5,50)
1	Acetylsalicylic acid	A	-0,81	-0,48
2	Acyclovir	N	-0,27	
3	Amitriptyline	B	2,99	
4	Ampicillin	A	0,04	0,07
5	Atenolol	B	0,51	
6	Caffeine	N	0,26	0,26
7	Carbamazepine	N	1,93	
8	Chloramphenicol	N	0,31	0,57
9	Cimetidine	B	0,84	0,46
10	Cinoxacin	A	-0,50	0,30
11	Ciprofloxacin	Z	1,31	1,29
12	Clonidine	B	1,12	
13	Codeine	B	0,95	
14	Diclofenac	A	2,46	2,92
15	Diphenhydramine	B	1,82	
16	Enoxacin	Z	0,55	1,25
17	β-Estradiol	N	2,59	
18	Fluoxetine	B	2,98	
19	Furosemide	A	1,32	1,60
20	Hydrochlorothiazide	N	0,91	0,70
21	Hydrocortisone	N	0,94	1,11
22	Ibuprofen	A	0,87	1,55
23	Indomethacin	A	2,41	2,93
24	Isoxicam	A	0,91	1,25

25	Lidocaine	B	1,27	
26	Lisinopril	Z	-0,57	-0,28
27	Losartan	A	2,47	2,58
28	Mebendazole	N	2,44	
29	Metoclopramide	B	1,63	1,65
30	Metoprolol	B	0,87	
31	Nadolol	B	1,26	1,10
32	Niflumic acid	A	1,52	1,64
33	Nitrofurantoin	A	0,31	0,41
34	Norfloxacin	Z	1,01	
35	Omeprazole	N	1,81	1,85
36	Paracetamol	N	0,18	-0,06
37	Promazine	B	3,05	
38	Propafenone	B	1,46	
39	Propranolol	B	2,33	
40	Pyrimethamine	B	1,87	
41	Quinidine	B	2,34	
42	Salicylic acid	A	-0,30	-0,12
43	Sulpiride	B	1,04	0,71
44	Theophylline	N	-0,08	-0,26
45	Thioridazine	B	3,98	
46	Trazodone	N	2,34	
47	Vancomycin	Z	1,23	1,18
48	Verapamil	B	2,76	
49	Warfarin	A	1,04	1,97

### 2.8.5. Δεδομένα χρωματογραφίας ακινητοποιημένης HSA

Τα δεδομένα των συντελεστών κατακράτησης χρωματογραφίας ακινητοποιημένης ανθρώπινης λευκωματίνης του ορού (HSA) λήφθηκαν από αποτελέσματα πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. [90], [91] Πιο συγκεκριμένα, στα πειράματα αυτά ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε στήλη ακινητοποιημένης HSA, η κινητή φάση (PBS) ρυθμίστηκε σε pH 7,00 κι οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σημειώνεται ότι οι κατασκευαστές της στήλης θέτουν ως ανώτατο όριο την τιμή αυτή, οπότε δεν είναι εφικτή η μέτρηση σε pH 7,40. Όλα τα δεδομένα αναγράφονται στον Πίνακα 6, όπου τα κενά κελιά οφείλονται στην έλλειψη δεδομένων.

**Πίνακας 6.** Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης βιομηχανικής χρωματογραφίας με κινητή φάση (PBS) ρυθμισμένη σε pH 7,00 και στατική φάση τη στήλη ακινητοποιημένης HSA

α/α	Φαρμακευτικές ενώσεις	Κατηγορία	HSA (7,00)
1	Acetylsalicylic acid	A	-0,70
2	Acyclovir	N	-0,64
3	Amitriptyline	B	
4	Ampicillin	A	-0,63
5	Atenolol	B	-0,21

6	Caffeine	N	
7	Carbamazepine	N	0,66
8	Chloramphenicol	N	0,10
9	Cimetidine	B	0,01
10	Cinoxacin	A	-0,12
11	Ciprofloxacin	Z	0,33
12	Clonidine	B	0,15
13	Codeine	B	
14	Diclofenac	A	
15	Diphenhydramine	B	
16	Enoxacin	Z	0,36
17	$\beta$ -Estradiol	N	1,70
18	Fluoxetine	B	1,16
19	Furosemide	A	0,98
20	Hydrochlorothiazide	N	0,30
21	Hydrocortisone	N	0,33
22	Ibuprofen	A	0,73
23	Indomethacin	A	1,53
24	Isoxicam	A	0,87
25	Lidocaine	B	-0,02
26	Lisinopril	Z	-0,82
27	Losartan	A	1,53
28	Mebendazole	N	
29	Metoclopramide	B	0,48
30	Metoprolol	B	0,05
31	Nadolol	B	-0,13
32	Niflumic acid	A	1,12
33	Nitrofurantoin	A	-0,21
34	Norfloxacin	Z	0,29
35	Omeprazole	N	0,65
36	Paracetamol	N	-0,33
37	Promazine	B	1,17
38	Propafenone	B	
39	Propranolol	B	0,79
40	Pyrimethamine	B	0,94
41	Quinidine	B	0,74
42	Salicylic acid	A	
43	Sulpiride	B	0,14
44	Theophylline	N	-0,28
45	Thioridazine	B	
46	Trazodone	N	
47	Vancomycin	Z	0,69
48	Verapamil	B	1,08
49	Warfarin	A	0,92

### 2.8.6. Δεδομένα φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων

Για τη συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης  $\log k_w^{Triton}$  με τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες χρησιμοποιούνται κι οι μετρήσεις του χρόνου έκλυσης 38 ακόμη φαρμακευτικών ενώσεων που πραγματοποιούνταν παράλληλα στο Εργαστήριο

Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.. [92] Στον Πίνακα 7 αναγράφονται όλες οι φαρμακευτικές ενώσεις και τα μεγέθη που απαιτούνται για τις συσχετίσεις που αναλύονται στην ενότητα 3.7.. Οι υπογραμμισμένες με γαλάζιο ενώσεις είναι αυτές που χρησιμοποιούνται ως test set, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.7.1.. Οι συντελεστές κατακράτησης των 49 μελετούμενων φαρμακευτικών ενώσεων αναγράφονται με το τυπικό τους σφάλμα στον Πίνακα 8.

### 2.8.6.1. Δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης (Plasma Protein Binding, % PPB)

Για τη συσχέτιση του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  με την πρωτεϊνική σύνδεση, εκφρασμένη ως % PPB, απαιτούνται τα κλάσματα αρνητικού φορτίου,  $F^-$ . Τα δεδομένα για τις 87 μελετούμενες φαρμακευτικές ενώσεις αναγράφονται στον Πίνακα 7, όπου τα κενά κελιά οφείλονται στην έλλειψη δεδομένων. [93]–[96]

### 2.8.6.2. Δεδομένα όγκου κατανομής, $V_d$

Για τη συσχέτιση του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  με τον όγκο κατανομής,  $V_d$ , απαιτούνται τα κλάσματα θετικού φορτίου,  $F^+$ . Τα δεδομένα για τις 87 μελετούμενες φαρμακευτικές ενώσεις αναγράφονται στον Πίνακα 7, όπου τα κενά κελιά οφείλονται στην έλλειψη δεδομένων. [93], [94], [96]

### 2.8.6.3. Δεδομένα διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, $\log BBB$

Για τη συσχέτιση του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  με τη διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, δηλαδή τον λογάριθμο του λόγου της συγκέντρωσης του φαρμάκου στους ιστούς του εγκεφάλου προς τη συγκέντρωσή του στο αίμα, ή αλλιώς  $\log BBB$ , απαιτούνται τα κλάσματα αρνητικού φορτίου,  $F^-$ . Τα δεδομένα για τις 87 μελετούμενες φαρμακευτικές ενώσεις αναγράφονται στον Πίνακα 7, όπου τα κενά κελιά οφείλονται στην έλλειψη δεδομένων.

**Πίνακας 7.** Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης,  $\log k_w^{Triton}$ , κλασμάτων θετικού,  $F^+$ , κι αρνητικού φορτίου,  $F^-$ , σε pH 7,40, ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης, % PPB, όγκου κατανομής,  $V_d$ , και λογαρίθμου του λόγου συγκέντρωσης φαρμάκου στους ιστούς του εγκεφάλου προς τη συγκέντρωσή του στο αίμα,  $\log BBB$ , για τις 87 φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν

$\alpha/\alpha$	Φαρμακευτικές ενώσεις	Κατηγορία	$\log k_w^{Triton}$ (7,40)	$F^+$ (7,40)	$F^-$ (7,40)	% PPB	$V_d$	$\log BBB$
1	Acetylsalicylic acid	A	-0,95	0,000	1,000	49,0	0,18	-0,700
2	Acyclovir	N	-0,69	0,000	0,009	18,8	0,70	
3	Albendazole	N	1,91	0,004	0,002	70,0		
4	Allopurinol	N	-0,20	0,000	0,010	5,0	0,86	
5	Amitriptyline	B	1,90	0,982	0,000	94,8	16,80	0,973
6	Amlodipine	B	1,27	0,994	0,000	95,8	19,33	
7	Amoxicillin	A	-1,22	0,000	0,531	19,2	0,21	

8	Ampicillin	A	-0,44	0,000	0,530	20,0	0,38	
9	Antipyrine	N	0,02	0,000	0,000	5,0		
10	Atenolol	B	-0,67	0,994	0,000	11,0	1,15	-1,040
11	Atropine	B	0,16	0,996	0,000	20,0	2,75	
12	Bromazepam	N	1,59	0,000	0,000	70,0	1,15	
13	Caffeine	N	-0,21	0,000	0,000	40,0	0,60	-0,037
14	Carbamazepine	N	1,63	0,000	0,000	72,3	1,33	-0,140
15	Ceftriaxone	Z	-0,82	0,000	0,221	95,0	0,14	
16	Chloramphenicol	N	1,23	0,000	0,000	54,0	0,96	
17	Chlorpheniramine	B	1,20	0,986	0,000	69,5	9,00	
18	Cimetidine	B	0,29	0,218	0,000	18,5	1,12	-1,420
19	Cinoxacin	A	-0,83	0,000	0,998	66,5	0,23	
20	Ciprofloxacin	Z	-0,94	0,050	0,033	40,0	2,45	
21	Clonidine	B	0,64	0,779	0,000	27,5	2,30	
22	Codeine	B	1,79	0,848	0,000	11,5	3,50	
23	Dexamethazone	N	1,55	0,000	0,000	70,8	0,58	
24	Diclofenac	A	1,89	0,000	0,999	99,5	0,16	-1,700
25	Diphenhydramine	B	1,61	0,965	0,000	81,5	4,27	1,200
26	Enalapril	A	0,33	0,000	0,986		1,70	
27	Enoxacin	Z	-1,28	0,051	0,033	40,0	2,75	
28	$\beta$ -Estradiol	N	2,19	0,000	0,001	95,0	12,00	
29	Fluoxetine	B	2,01	0,997	0,000	94,0	31,12	1,080
30	Furosemide	A	1,43	0,000	1,000	96,8	0,16	
31	Haloperidol	B	2,09	0,933	0,000	92,0	18,00	1,340
32	Hydrochlorothiazide	N	1,30	0,000	0,028	64,6		
33	Hydrocortisone	N	1,27	0,000	0,000	95,0	0,54	
34	Ibuprofen	A	1,20	0,000	0,999	99,0	0,12	-0,180
35	Indomethacin	A	1,83	0,000	0,998	90,0	0,80	-1,260
36	Isoxicam	A	1,29	0,000	1,000	96,0		
37	Ketoprofen	A	0,71	0,000	0,999	98,0	0,10	
38	Labetalol	B	1,77	0,552	0,022		8,95	
39	Levofloxacin	Z	-0,77	0,047	0,096	32,3	1,38	-0,700
40	Lidocaine	B	1,19	0,779	0,000	67,0	1,30	
41	Lisinopril	Z	-1,56	0,000	0,001	2,1	2,05	
42	Lornoxicam	A	1,69	0,000	0,993	99,0	0,20	
43	Losartan	A	1,78	0,000	0,933	99,2	0,45	
44	Mebendazole	N	0,98	0,004	0,002	92,5	1,30	
45	Mefenamic acid	A	1,64	0,000	0,999	90,0		
46	Meloxicam	A	1,73	0,000	0,999	99,3	10,00	
47	Metformin	B	-0,91	1,000	0,000	0,0	1,69	
48	Methylprednisolone	N	1,82	0,000	0,000	77,3	1,26	
49	Metoclopramide	B	0,57	0,989	0,000	33,3	3,30	0,080
50	Metoprolol	B	0,19	0,994	0,000	11,3	4,33	1,150
51	Minoxidil	N	0,67	0,002	0,000	0,0	2,86	
52	Nadolol	B	-0,55	0,991	0,000	30,0	2,00	
53	Nalidixic acid	A	-0,22	0,000	0,947	93,0	0,40	
54	Naproxen	A	0,90	0,000	0,999	99,7	0,16	-1,700
55	Nicotine	B	0,31	0,875	0,000	6,5	2,53	
56	Nifedipine	N	1,89	0,000	0,000	96,0		
57	Niflumic acid	A	2,12	0,000	0,997	90,0		
58	Nimesulide	A	1,78	0,000	0,966	97,5		
59	Nitrofurantoin	A	0,11	0,000	0,473	73,8	0,66	



60	Norfloxacin	Z	-0,93	0,050	0,033	13,8	2,80	-1,000
61	Ofloxacin	Z	-0,75	0,047	0,096	32,0	2,35	
62	Omeprazole	N	1,51	0,001	0,054	95,0	0,33	-0,820
63	Paracetamol	N	0,39	0,000	0,000	22,5	0,92	-0,495
64	Pindolol	B	0,33	0,994	0,000	40,0	1,86	0,300
65	Pipemidic acid	Z	-0,86	0,051	0,033	30,0		
66	Piperacillin	A	-0,49	0,000	1,000	19,0	1,35	
67	Piroxicam	A	1,30	0,000	1,000	99,0	0,13	
68	Prednisolone	N	1,76	0,000	0,000	92,5	0,44	
69	Primidone	N	0,76	0,000	0,000	38,0	0,64	
70	Promazine	B	2,11	0,991	0,000	94,0	8,38	
71	Propafenone	B	1,54	0,992	0,000	97,0	3,60	
72	Propranolol	B	1,39	0,994	0,000	87,0	4,00	0,695
73	Pyrimethamine	B	2,19	0,584	0,000	87,0	2,90	
74	Quinidine	B	1,34	0,946	0,000	87,0	2,50	-0,260
75	Ranitidine	B	-0,55	0,933	0,000	15,0	1,46	-1,230
76	Salicylic acid	A	0,33	0,000	1,000	95,0		-1,100
77	Sulfamethoxazole	A	0,14	0,000	0,978	53,0	0,24	
78	Sulpiride	B	-0,26	0,984	0,000	14,0	2,05	
79	Tenoxicam	A	1,28	0,000	1,000	98,5		
80	Terbutaline	B	-0,30	0,980	0,000	19,5	1,60	
81	Theophylline	N	-0,33	0,000	0,000	56,0	0,48	-0,315
82	Thioridazine	B	2,02	0,991	0,000	97,9	7,13	0,290
83	Trazodone	N	2,10	0,218	0,000	92,5	0,89	0,300
84	Trimethoprim	B	0,99	0,469	0,000	41,7	1,34	
85	Vancomycin	Z	-0,32	0,000	0,125	43,3	0,52	
86	Verapamil	B	2,15	0,982	0,000	90,0	4,80	-0,655
87	Warfarin	A	1,24	0,000	0,997	98,8	0,15	

## 2.9. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των πειραματικών μετρήσεων πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού IBM SPSS Statistics Subscription. Για την ερμηνεία των δεδομένων έγιναν πολλαπλές αναλύσεις παλινδρόμησης κι εξετάστηκαν οι εξισώσεις που προέκυψαν. Για κάθε πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης αναγράφεται ο αριθμός των δεδομένων (n), ο συντελεστής συσχέτισης ( $R^2$ ), η τυπική απόκλιση (s) και το F-test, για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Ακόμη, σημειώνεται ο συντελεστής παλινδρόμησης (Regression Coefficient) κάθε παραμέτρου παλινδρόμησης μαζί με το τυπικό σφάλμα σε παρένθεση. Πριν από την εξαγωγή κάθε τελικής εξίσωσης, πραγματοποιούταν έλεγχος της σημαντικότητας κάθε μεταβλητής με χρήση του Student t-test, για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, που πρέπει να ισχύει  $|t| \geq 2$  ώστε να είναι σημαντική η μεταβολή. Επίσης, γινόταν έλεγχος της τιμής της τελευταίας στήλης (Sig. - Significance) του πίνακα ANOVA που πρέπει να είναι  $p \leq 0,05$  για να είναι στατιστικά σημαντική η μεταβλητή. Στην περίπτωση μη στατιστικά σημαντικών μεταβλητών, αυτές αφαιρέθηκαν κι επαναλήφθηκε η πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης. Οι φαρμακευτικές ενώσεις χαρακτηρίζονται ως «outliers» στην περίπτωση που η διαφορά της υπολογιζόμενης από το μοντέλο τιμής από την πειραματική τιμή είναι μεγαλύτερη από το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης (s).

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1. Αποτελέσματα κι υπολογισμός συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση, $\log k_w^{\text{Triton}}$

Οι συντελεστές κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{\text{Triton}}$ , των 49 μελετούμενων φαρμάκων σε pH 7,40 και 5,50 παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Σε pH 5,50 μετρήθηκαν μόνο οι 23 από τις 49 φαρμακευτικές ενώσεις. Σημειώνεται ότι από αυτές, η Indomethacin κι η Losartan μετρήθηκαν με κινητή φάση με 3 διαφορετικές περιεκτικότητες ακετονιτριλίου (5%, 10% και 15% v/v) κι η τιμή του  $\log k_w^{\text{Triton}}$  εκτιμήθηκε με γραμμική προεκβολή (σχέση [1.27]), από τις 3 διαφορετικές ισοκρατικές τιμές  $\log k$  που αναγράφονται στον Πίνακα 9.

**Πίνακας 8.** Συντελεστές κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{\text{Triton}}$ , σε τιμές pH 7,40 και 5,50

α/α	Φαρμακευτικές ενώσεις	Κατηγορία	$\log k_w^{\text{Triton}}$ (7,40)	$\log k_w^{\text{Triton}}$ (5,50)
1	Acetylsalicylic acid	A	-0,95 ± 0,02	-0,71 ± 0,01
2	Acyclovir	N	-0,69 ± 0,01	
3	Amitriptyline	B	1,90 ± 0,02	
4	Ampicillin	A	-0,44 ± 0,02	-1,49 ± 0,06
5	Atenolol	B	-0,67 ± 0,01	-0,85 ± 0,02
6	Caffeine	N	-0,21 ± 0,01	-0,18 ± 0,01
7	Carbamazepine	N	1,63 ± 0,03	
8	Chloramphenicol	N	1,23 ± 0,01	
9	Cimetidine	B	0,29 ± 0,01	
10	Cinoxacin	A	-0,83 ± 0,02	-0,50 ± 0,01
11	Ciprofloxacin	Z	-0,94 ± 0,02	-0,23 ± 0,01
12	Clonidine	B	0,64 ± 0,01	0,00 ± 0,01
13	Codeine	B	1,79 ± 0,01	
14	Diclofenac	A	1,89 ± 0,01	1,95 ± 0,01
15	Diphenhydramine	B	1,61 ± 0,01	
16	Enoxacin	Z	-1,28 ± 0,01	-0,64 ± 0,01
17	β-Estradiol	N	2,19 ± 0,01	
18	Fluoxetine	B	2,01 ± 0,01	
19	Furosemide	A	1,43 ± 0,01	1,54 ± 0,01
20	Hydrochlorothiazide	N	1,30 ± 0,01	
21	Hydrocortisone	N	1,27 ± 0,01	
22	Ibuprofen	A	1,20 ± 0,01	
23	Indomethacin	A	1,83 ± 0,01	2,25 ± 0,01
24	Isoxicam	A	1,29 ± 0,01	1,36 ± 0,01
25	Lidocaine	B	1,19 ± 0,01	
26	Lisinopril	Z	-1,56 ± 0,10	-1,21 ± 0,04
27	Losartan	A	1,78 ± 0,01	1,99 ± 0,01
28	Mebendazole	N	0,98 ± 0,01	
29	Metoclopramide	B	0,57 ± 0,01	
30	Metoprolol	B	0,19 ± 0,01	-0,10 ± 0,01

31	Nadolol	B	-0,55 ± 0,01	
32	Niflumic acid	A	2,12 ± 0,01	
33	Nitrofurantoin	A	0,11 ± 0,05	0,36 ± 0,01
34	Norfloxacin	Z	-0,93 ± 0,01	-0,21 ± 0,01
35	Omeprazole	N	1,51 ± 0,01	
36	Paracetamol	N	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,01
37	Promazine	B	2,11 ± 0,01	
38	Propafenone	B	1,54 ± 0,01	
39	Propranolol	B	1,39 ± 0,01	1,24 ± 0,01
40	Pyrimethamine	B	2,19 ± 0,01	
41	Quinidine	B	1,34 ± 0,01	
42	Salicylic acid	A	0,33 ± 0,01	0,41 ± 0,01
43	Sulpiride	B	-0,26 ± 0,01	-0,41 ± 0,01
44	Theophylline	N	-0,33 ± 0,01	
45	Thioridazine	B	2,02 ± 0,01	
46	Trazodone	N	2,10 ± 0,01	
47	Vancomycin	Z	-0,32 ± 0,04	-1,28 ± 0,05
48	Verapamil	B	2,15 ± 0,01	
49	Warfarin	A	1,24 ± 0,02	1,93 ± 0,01

**Πίνακας 9.** Τιμές  $\log k^{Triton}$  σε pH 5,50 και κινητή φάση με 3 διαφορετικές περιεκτικότητες ακετονιτριλίου (5%, 10% και 15% v/v)

α/α	Φαρμακευτικές ενώσεις	Κατηγορία	$\log k^{Triton}$ (5% ACN) (5,50)	$\log k^{Triton}$ (10% ACN) (5,50)	$\log k^{Triton}$ (15% ACN) (5,50)	$\log k_w^{Triton}$ (5,50)
23	Indomethacin	A	2,16	1,97	1,93	2,25
27	Losartan	A	1,72	1,46	1,19	1,99

Όλες οι συσχετίσεις που ακολουθούν αναφέρονται σε τιμές pH 7,40. Εξαίρεση αποτελούν οι συντελεστές κατακράτησης της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης HSA,  $\log k_w^{HSA}$ , που έχουν προσδιορισθεί σε pH 7,00, λόγω περιορισμού στο εύρος pH λειτουργίας της στήλης HSA.

Στα διαγράμματα που παρατίθενται, οι φαρμακευτικές ενώσεις διαφοροποιούνται χρωματικά ανάλογα με την κατηγορία στην οποία εντάσσονται (με κόκκινο οι όξινες, με γαλάζιο οι βασικές, με πορτοκαλί οι αμφολυτικές και με πράσινο οι ουδέτερες).

### 3.2. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με τους συντελεστές λιποφιλίας, $\log P$ και $\log D_{7,40}$

#### 3.2.1. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με τον συντελεστή μερισμού, $\log P$

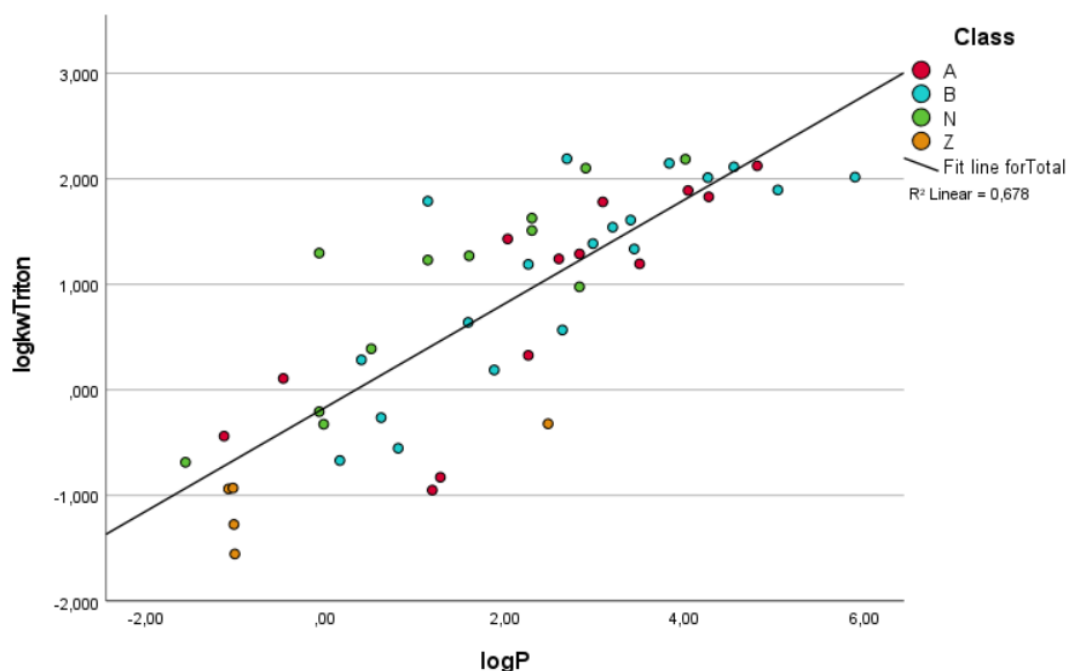
Η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{Triton}$ , με τον συντελεστή μερισμού,  $\log P$ , πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, όπου ως εξαρτημένη μεταβλητή ορίζεται ο συντελεστής  $\log k_w^{Triton}$  (δεδομένα από Πίνακα 8) κι ως

ανεξάρτητη ο συντελεστής  $\log P$  (δεδομένα από Πίνακα 3). Η εξίσωση που προκύπτει είναι η ακόλουθη:

$$\log k_w^{Triton} = 0,492 (\pm 0,049) \cdot \log P - 0,165 (\pm 0,133) \quad [3.1]$$

$$(n = 49, R^2 = 0,678, s = 0,639, F = 98,9)$$

Η εξίσωση [3.1] παριστάνεται γραφικά στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 2).



**Διάγραμμα 2.** Γραφική παράσταση του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  με τον συντελεστή  $\log P$  - εξίσωση [3.1]

Καμία από τις μελετούμενες ενώσεις δε χαρακτηρίζεται ως «outlier», αφού η πειραματική τιμή του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  δε διαφέρει από την υπολογιζόμενη μέσω της εξίσωσης [3.1] τιμής περισσότερο από το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης.

Στη συσχέτιση [3.1] εισάγονται ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα κλάσματα θετικού,  $F^+$ , κι αρνητικού,  $F^-$ , φορτίου (δεδομένα από Πίνακα 3). Παρατηρώντας τις τιμές Sig. του πίνακα ANOVA συμπεραίνεται ότι κανένα από τα δύο δε θεωρείται στατιστικά σημαντικό.

Η συσχέτιση μεταξύ του συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{Triton}$ , με τον συντελεστή μερισμού,  $\log P$  είναι ικανοποιητική ( $R^2 = 0,678$ ). Το γεγονός ότι η προσθήκη των κλασμάτων θετικού κι αρνητικού φορτίου δεν είναι στατιστικά σημαντική, οφείλεται στον μειωμένο ιοντισμό στο περιβάλλον της στήλης.

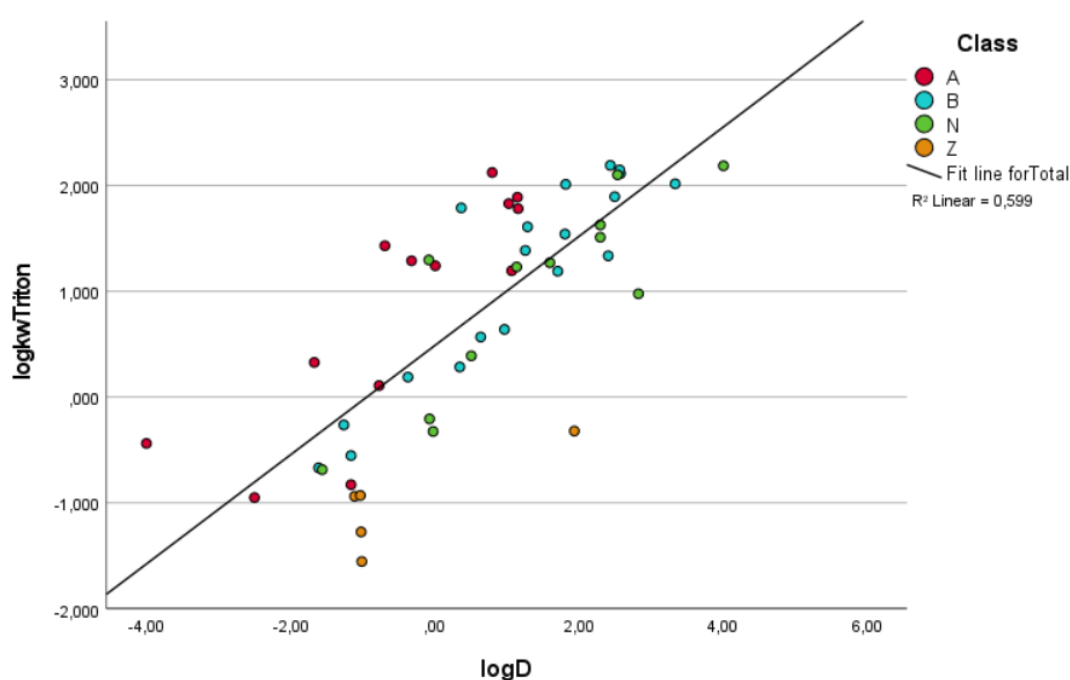
### 3.2.2. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με τον συντελεστή κατανομής, $\log D_{7,40}$

Η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{Triton}$ , με τον συντελεστή κατανομής,  $\log D_{7,40}$ , πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, όπου ως εξαρτημένη μεταβλητή ορίζεται ο συντελεστής  $\log k_w^{Triton}$  (δεδομένα από Πίνακα 8) κι ως ανεξάρτητη ο συντελεστής  $\log D_{7,40}$  (δεδομένα από Πίνακα 3). Η εξίσωση που προκύπτει είναι η ακόλουθη:

$$\log k_w^{Triton} = 0,516 (\pm 0,062) \cdot \log D_{7,40} + 0,486 (\pm 0,108) \quad [3.2\alpha]$$

$$(n = 49, R^2 = 0,599, s = 0,713, F = 70,2)$$

Η εξίσωση [3.2α] παριστάνεται γραφικά στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 3).



**Διάγραμμα 3.** Γραφική παράσταση του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  με τον συντελεστή  $\log D_{7,40}$  – εξίσωση [3.2α]

Καμία από τις μελετούμενες ενώσεις δε χαρακτηρίζεται ως «outlier», αφού η πειραματική τιμή του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  δε διαφέρει από την υπολογιζόμενη μέσω της εξίσωσης [3.2α] τιμής περισσότερο από το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης.

Στη συσχέτιση [3.2α] εισάγονται ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα κλάσματα θετικού,  $F^+$ , κι αρνητικού,  $F^-$ , φορτίου (δεδομένα από Πίνακα 3). Από τις τιμές Sig. του πίνακα ANOVA συμπεραίνεται ότι και τα δύο είναι στατιστικά σημαντικά (Sig. = 0,010 και <0,001, αντίστοιχα). Η εισαγωγή τους στην εξίσωση [3.2α] βελτιώνει επιπλέον τα στατιστικά στοιχεία κι η εξίσωση που προκύπτει είναι η εξής:

$$\log k_w^{Triton} = 0,570 (\pm 0,053) \cdot \log D_{7,40} + 0,575 (\pm 0,214) \cdot F^+ + 1,188 (\pm 0,236) \cdot F^- - 0,047 (\pm 0,146) \quad [3.2\beta]$$

$$(n = 49, R^2 = 0,744, s = 0,582, F = 43,7)$$

Παρατηρώντας τις εξισώσεις [3.1] και [3.2α] διαπιστώνεται ότι η συσχέτιση με τον συντελεστή κατανομής,  $\log D_{7,40}$ , έχει χειρότερα στατιστικά στοιχεία από αυτήν με τον συντελεστή μερισμού,  $\log P$ , επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι ο ιονισμός των φαρμακευτικών ενώσεων καταστέλλεται στη χρωματογραφική στήλη. Η προσθήκη των κλασμάτων θετικού κι αρνητικού φορτίου στη συσχέτιση του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  με τον συντελεστή  $\log D_{7,40}$  (εξίσωση [3.2β]) βελτιώνει σημαντικά τα στατιστικά στοιχεία, όπως αναφέρθηκε. Το θετικό πρόσημο των συντελεστών τους ερμηνεύει την ενίσχυση της κατακράτησης των διαλυμένων ουσιών παρουσία φορτισμένων ειδών κι επισημαίνει ότι ο ιονισμός των φαρμακευτικών ενώσεων εντός της στήλης είναι μικρότερος από αυτόν που προβλέπει ο συντελεστής κατανομής,  $\log D_{7,40}$ , για ένα υδατικό διάλυμα.

### 3.3. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με συντελεστές κατακράτησης της μικυλλιακής υδροχρωματογραφίας (MLC)

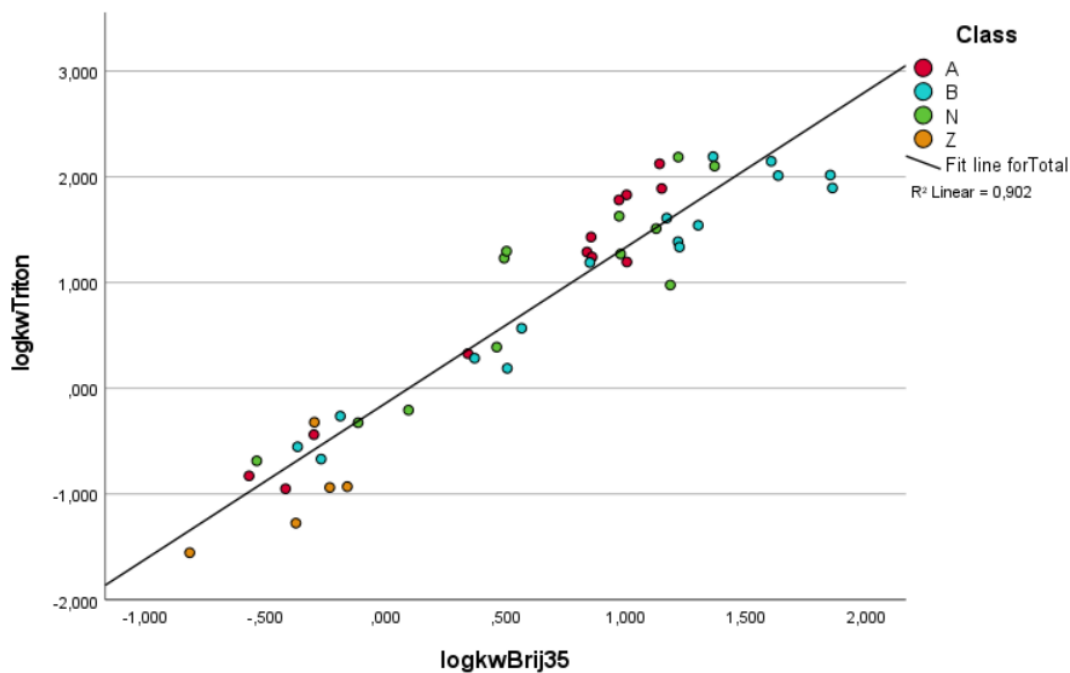
#### 3.3.1. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό Brij-35, $\log k_w^{Brij-35}$

Η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{Triton}$ , με τον συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{Brij-35}$ , της μικυλλιακής υδροχρωματογραφίας με προσθήκη τασιενεργού Triton X-100 και Brij-35, αντίστοιχα, πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, όπου ως εξαρτημένη μεταβλητή ορίζεται ο συντελεστής  $\log k_w^{Triton}$  (δεδομένα από Πίνακα 8) κι ως ανεξάρτητη ο συντελεστής  $\log k_w^{Brij-35}$  (δεδομένα από Πίνακα 4). Η εξίσωση που προκύπτει είναι η ακόλουθη:

$$\log k_w^{Triton} = 1,475 (\pm 0,074) \cdot \log k_w^{Brij-35} - 0,142 (\pm 0,070) \quad [3.3]$$

$$(n = 45, R^2 = 0,902, s = 0,358, F = 395,4)$$

Η εξίσωση [3.3] παριστάνεται γραφικά στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 4).



**Διάγραμμα 4.** Γραφική παράσταση του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  με τον συντελεστή  $\log k_w^{Brij-35}$  – εξίσωση [3.3]

Καμία από τις μελετούμενες ενώσεις δε χαρακτηρίζεται ως «outlier», αφού η πειραματική τιμή του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  δε διαφέρει από την υπολογιζόμενη μέσω της εξίσωσης [3.3] τιμής περισσότερο από το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης.

Στη συσχέτιση [3.3] εισάγονται ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα κλάσματα θετικού,  $F^+$ , και αρνητικού,  $F^-$ , φορτίου (δεδομένα από Πίνακα 3). Παρατηρώντας τις τιμές Sig. του πίνακα ANOVA συμπεραίνεται ότι κανένα από τα δύο δε θεωρείται στατιστικά σημαντικό (Sig. = 0,077 και 0,195 > 0,05, αντίστοιχα).

Η συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης παρουσία του τασιενεργού Triton X-100 και του τασιενεργού Brij-35 είναι εξαιρετικά ικανοποιητική ( $R^2 = 0,902$ ), αποτέλεσμα που αναμένεται καθώς και τα δύο επιφανειοδραστικά συστατικά είναι μη ιοντικά και τα φαρμακομόρια ακολουθούν παρόμοιο μηχανισμό έκλυσης.

Από τα δεδομένα των Πινάκων 4 και 8 φαίνεται ότι το εύρος των συντελεστών κατακράτησης  $\log k_w^{Triton}$  (-1,555 έως 2,191) είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο εύρος των συντελεστών κατακράτησης  $\log k_w^{Brij-35}$  (-0,815 έως 1,861), άρα με τη χρήση του Triton X-100 επιτυγχάνεται καλύτερη διάκριση μεταξύ των φαρμακευτικών ενώσεων κι η μελέτη τους καθίσταται ευκολότερη.

### 3.3.2. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό Tween 20, $\log k_w^{Tween 20}$

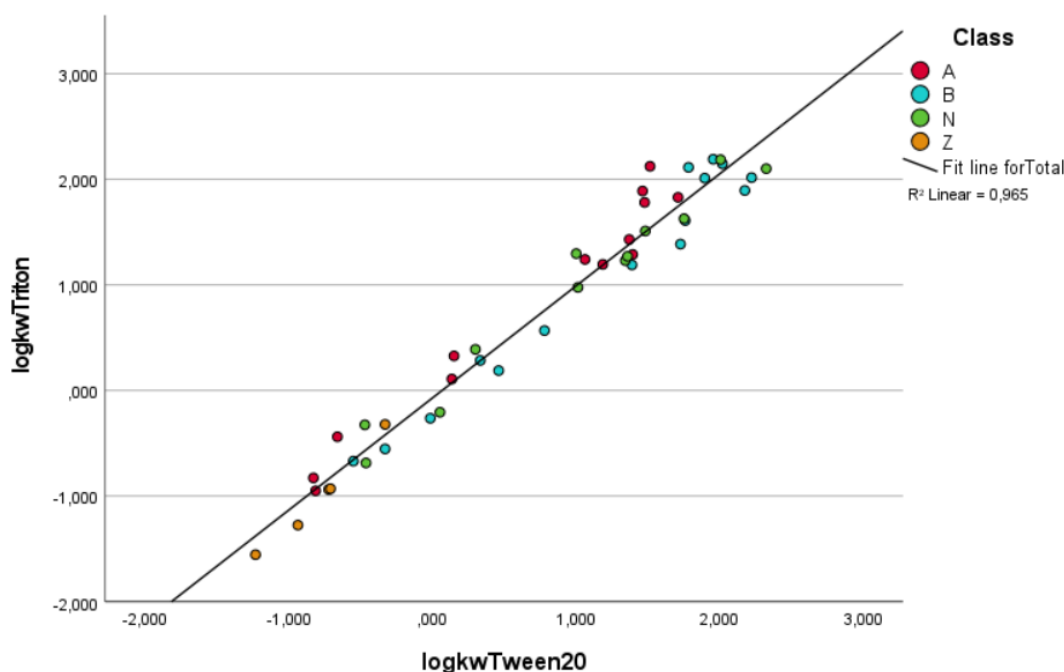
Η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{Triton}$ , με τον συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{Tween 20}$ , της μικυλλιακής υγροχρωματογραφίας με προσθήκη τασιενεργού Triton X-100 και Tween 20, αντίστοιχα,

πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, όπου ως εξαρτημένη μεταβλητή ορίζεται ο συντελεστής  $\log k_w^{Triton}$  (δεδομένα από Πίνακα 8) κι ως ανεξάρτητη ο συντελεστής  $\log k_w^{Tween 20}$  (δεδομένα από Πίνακα 4). Η εξίσωση που προκύπτει είναι η ακόλουθη:

$$\log k_w^{Triton} = 1,062 (\pm 0,031) \cdot \log k_w^{Tween 20} - 0,072 (\pm 0,040) \quad [3.4\alpha]$$

$$(n = 45, R^2 = 0,965, s = 0,216, F = 1193,3)$$

Η εξίσωση [3.4α] παριστάνεται γραφικά στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 5).



**Διάγραμμα 5.** Γραφική παράσταση του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  με τον συντελεστή  $\log k_w^{Tween 20}$  – εξίσωση [3.4α]

Καμία από τις μελετούμενες ενώσεις δε χαρακτηρίζεται ως «outlier», αφού η πειραματική τιμή του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  δε διαφέρει από την υπολογιζόμενη μέσω της εξίσωσης [3.4α] τιμής περισσότερο από το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης.

Στη συσχέτιση [3.4α] εισάγονται ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα κλάσματα θετικού,  $F^+$ , κι αρνητικού,  $F^-$ , φορτίου (δεδομένα από Πίνακα 3). Παρατηρώντας τις τιμές Sig. του πίνακα ANOVA συμπεραίνεται ότι μόνο το κλάσμα αρνητικού φορτίου είναι στατιστικά σημαντικό (Sig. = 0,011 < 0,05). Η εισαγωγή του στην εξίσωση [3.4α] βελτιώνει επιπλέον τα στατιστικά στοιχεία κι η εξίσωση που προκύπτει είναι η εξής:

$$\log k_w^{Triton} = 1,062 (\pm 0,027) \cdot \log k_w^{Tween 20} + 0,249 (\pm 0,067) \cdot F^- - 0,141 (\pm 0,039) \quad [3.4\beta]$$

$$(n = 45, R^2 = 0,974, s = 0,189, F = 783,7)$$

Η συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης παρουσία του τασιενεργού Triton X-100 και του τασιενεργού Tween 20 είναι εξαιρετικά ικανοποιητική ( $R^2 = 0,974$ ), γεγονός αναμενόμενο καθώς και τα δύο επιφανειοδραστικά συστατικά είναι μη ιοντικά. Η προσθήκη του κλάσματος αρνητικού φορτίου αποδίδεται στη διαφορά του ιονισμού



των οξέων, τα οποία είναι ιονισμένα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από τις βάσεις σε pH 7,40.

Από τα δεδομένα των Πινάκων 4 και 8 φαίνεται ότι το εύρος των συντελεστών κατακράτησης  $\log k_w^{Triton}$  (-1,555 έως 2,191) είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο εύρος των συντελεστών κατακράτησης  $\log k_w^{Tween 20}$  (-1,230 έως 2,326), αν κι είναι μεγαλύτερη η μέγιστη τιμή του συντελεστή κατακράτησης στη δεύτερη περίπτωση. Η χρήση του Triton X-100 εξασφαλίζει καλύτερη διάκριση μεταξύ των φαρμακευτικών ενώσεων κι η μελέτη τους καθίσταται ευκολότερη.

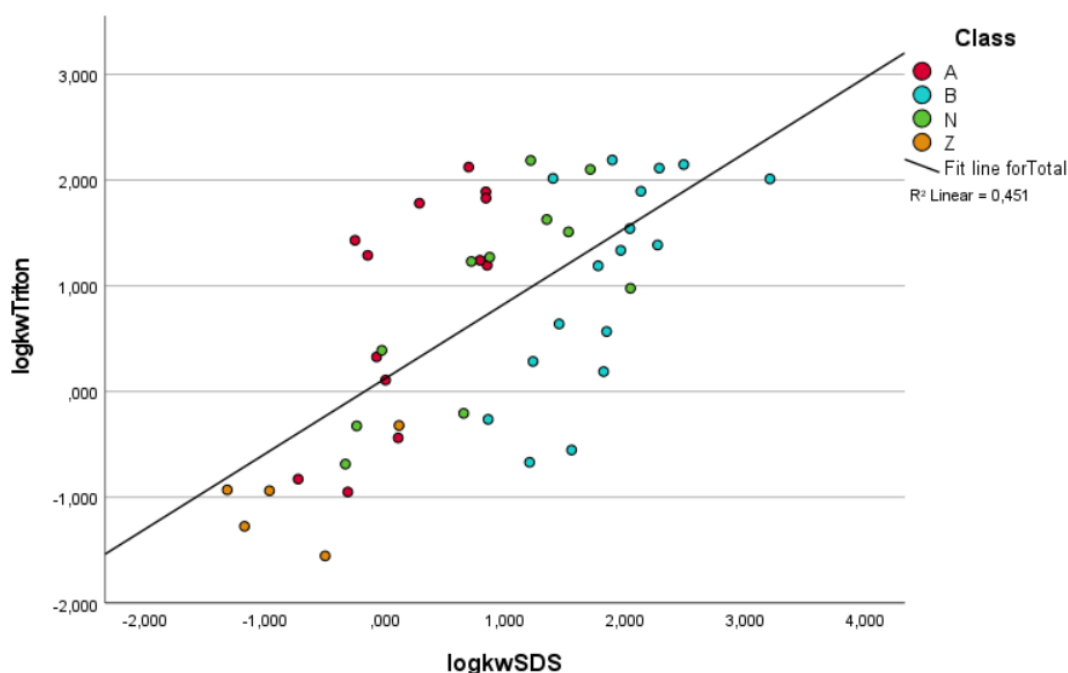
### 3.3.3. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό SDS, $\log k_w^{SDS}$

Η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{Triton}$ , με τον συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{SDS}$ , της κυκλικής υδροχρωματογραφίας με προσθήκη τασιενεργού Triton X-100 και SDS, αντίστοιχα, πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, όπου ως εξαρτημένη μεταβλητή ορίζεται ο συντελεστής  $\log k_w^{Triton}$  (δεδομένα από Πίνακα 8) κι ως ανεξάρτητη ο συντελεστής  $\log k_w^{SDS}$  (δεδομένα από Πίνακα 4). Η εξίσωση που προκύπτει είναι η ακόλουθη:

$$\log k_w^{Triton} = 0,711 (\pm 0,118) \cdot \log k_w^{SDS} + 0,122 (\pm 0,162) \quad [3.5\alpha]$$

$$(n = 46, R^2 = 0,451, s = 0,848, F = 36,1)$$

Η εξίσωση [3.5α] παριστάνεται γραφικά στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 6).



**Διάγραμμα 6.** Γραφική παράσταση του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  με τον συντελεστή  $\log k_w^{SDS}$  - εξίσωση [3.5α]

Καμία από τις μελετούμενες ενώσεις δε χαρακτηρίζεται ως «outlier», αφού η πειραματική τιμή του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  δε διαφέρει από την υπολογιζόμενη μέσω της εξίσωσης [3.5α] τιμής περισσότερο από το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης.

Στη συσχέτιση [3.5α] εισάγονται ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα κλάσματα θετικού,  $F^+$ , κι αρνητικού,  $F^-$ , φορτίου (δεδομένα από Πίνακα 3). Από τις τιμές Sig. του πίνακα ANOVA συμπεραίνεται ότι και τα δύο είναι στατιστικά σημαντικά (Sig. = 0,007 και  $0,005 < 0,05$ , αντίστοιχα). Η εισαγωγή τους στην εξίσωση [3.5α] βελτιώνει επιπλέον τα στατιστικά στοιχεία κι η εξίσωση που προκύπτει είναι η εξής:

$$\log k_w^{Triton} = 1,127 (\pm 0,137) \cdot \log k_w^{SDS} - 0,974 (\pm 0,343) \cdot F^+ + 0,821 (\pm 0,275) \cdot F^- - 0,129 (\pm 0,179) \quad [3.5\beta]$$

$$(n = 46, R^2 = 0,656, s = 0,687, F = 26,7)$$

Παρατηρώντας την εξίσωση [3.5α], η συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών  $\log k_w^{Triton}$  και  $\log k_w^{SDS}$  κρίνεται μη ικανοποιητική ( $R^2 = 0,451$ ). Η προσθήκη των κλασμάτων θετικού,  $F^+$ , κι αρνητικού,  $F^-$ , φορτίου πράγματι βελτιώνει σημαντικά τα στατιστικά στοιχεία ( $R^2 = 0,656$ ). Το επιφανειοδραστικό συστατικό SDS είναι ανιοντικό, οπότε είναι αναμενόμενες οι διαφορές των συντελεστών κατακράτησης σε σύγκριση με αυτούς που προκύπτουν με προσθήκη του μη ιοντικού τασιενεργού Triton X-100. Το Triton X-100 δεν αναπτύσσει ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις φαρμακευτικές ενώσεις, σε αντίθεση με το ανιοντικό SDS που κατακρατά περισσότερο τις βασικές ενώσεις μέσω δυνάμεων ηλεκτροστατικής φύσεως με τις πρωτονιωμένες βάσεις. Το χαρακτηριστικό αυτό επιβεβαιώνεται κι από το Διάγραμμα 6, όπου η πλειοψηφία των βασικών φαρμακευτικών ουσιών εντοπίζεται κάτω από τη γραμμή βάσης. Αντίθετα, η τροποποίηση της επιφάνειας της στήλης με αρνητικά φορτισμένα μονομερή του τασιενεργού είναι πιθανόν να απωθεί ηλεκτροστατικά τα αρνητικά φορτισμένα οξέα, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται αντίθετο πρόσημο στην περίπτωση των όξινων ενώσεων. Στο Διάγραμμα 6, η πλειοψηφία των όξινων φαρμακευτικών ουσιών εντοπίζεται πάνω από τη γραμμή βάσης.

Επιπλέον, από τα δεδομένα των Πινάκων 4 και 8 διαπιστώνεται ότι η χρήση του SDS οδηγεί σε μεγαλύτερο εύρος τιμών των συντελεστών κατακράτησης (-1,315 έως 3,210) σε σχέση με το αντίστοιχο εύρος από την προσθήκη Triton X-100 (-1,555 έως 2,191). Έτσι, μπορεί να θεωρηθεί πιο ικανοποιητικός ο διαχωρισμός των φαρμακευτικών ενώσεων στην πρώτη περίπτωση, αλλά είναι αναπόφευκτη η αύξηση του χρόνου έκλουσης της πλειοψηφίας των βασικών φαρμακευτικών ενώσεων.

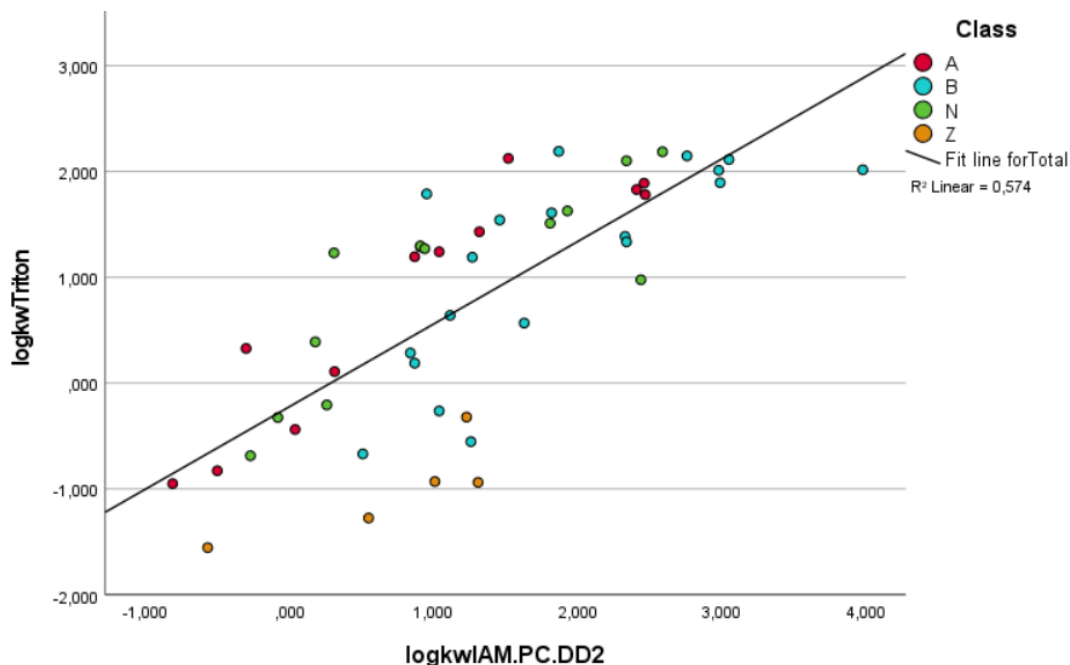
### 3.4. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με συντελεστές κατακράτησης της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM), $\log k_w^{IAM.PC.DD2}$

Η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{Triton}$ , της μικυλλιακής υδροχρωματογραφίας παρουσία Triton X-100 με τον συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{IAM.PC.DD2}$ , της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM) πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, όπου ως εξαρτημένη μεταβλητή ορίζεται ο συντελεστής  $\log k_w^{Triton}$  (δεδομένα από Πίνακα 8) κι ως ανεξάρτητη ο συντελεστής  $\log k_w^{IAM.PC.DD2}$  (δεδομένα από Πίνακα 5). Η εξίσωση που προκύπτει είναι η ακόλουθη:

$$\log k_w^{Triton} = 0,780 (\pm 0,098) \cdot \log k_w^{IAM.PC.DD2} - 0,223 (\pm 0,165) \quad [3.6\alpha]$$

$$(n = 49, R^2 = 0,574, s = 0,735, F = 63,4)$$

Η εξίσωση [3.6α] παριστάνεται γραφικά στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 7).



**Διάγραμμα 7.** Γραφική παράσταση του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  με τον συντελεστή  $\log k_w^{IAM.PC.DD2}$  – εξίσωση [3.6α]

Καμία από τις μελετούμενες ενώσεις δε χαρακτηρίζεται ως «outlier», αφού η πειραματική τιμή του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  δε διαφέρει από την υπολογιζόμενη μέσω της εξίσωσης [3.6α] τιμής περισσότερο από το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης.

Στη συσχέτιση [3.6α] εισάγονται ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα κλάσματα θετικού,  $F_{zwit}^+$ , κι αρνητικού,  $F^-$ , φορτίου (δεδομένα από Πίνακα 3). Από τις τιμές Sig. του πίνακα ANOVA συμπεραίνεται ότι μόνο το κλάσμα  $F_{zwit}^+ (= F^+ + F_{zwit})$  είναι στατιστικά σημαντικό (Sig. < 0,001 < 0,05). Η εισαγωγή του στην εξίσωση [3.6α] βελτιώνει επιπλέον τα στατιστικά στοιχεία κι η εξίσωση που προκύπτει είναι η εξής:

$$\log k_w^{Triton} = 0,897 (\pm 0,086) \cdot \log k_w^{IAM.PC.DD2} - 0,908 (\pm 0,201) \cdot F_{zwit}^+ + 0,043 (\pm 0,151) \quad [3.6\beta]$$

$$(n = 45, R^2 = 0,705, s = 0,618, F = 55,0)$$

Παρατηρώντας την εξίσωση [3.6α], η συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών  $\log k_w^{Triton}$  και  $\log k_w^{IAM.PC.DD2}$  μπορεί να χαρακτηριστεί ως μέτρια ικανοποιητική ( $R^2 = 0,574$ ). Η προσθήκη του  $F_{zwit}^+$  πράγματι βελτιώνει σημαντικά τα στατιστικά στοιχεία ( $R^2 = 0,705$ ). Η στατική φάση της στήλης IAM.PC.DD2 περιλαμβάνει αρνητικά φορτισμένα φωσφορικά ιόντα και θετικά φορτισμένες κεφαλές χολίνης κι ο μηχανισμός κατακράτησης είναι διαφορετικός από αυτόν που διακρίνει τις στήλες της μικυλλιακής υδροχρωματογραφίας. Τα φωσφορικά ανιόντα είναι υπεύθυνα για την αυξημένη κατακράτηση των βασικών φαρμακευτικών ενώσεων. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται

κι από το Διάγραμμα 7, όπου η πλειοψηφία των βασικών ενώσεων εντοπίζεται κάτω από τη γραμμή βάσης. Η θετικά φορτισμένη χολίνη δεν είναι εύκολα προσβάσιμη στα φαρμακομόρια και για αυτόν τον λόγο σε όλες τις μελέτες δεν παρουσιάζει ουσιαστική ανάπτυξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με αρνητικά φορτισμένα μόρια (έτσι ερμηνεύεται κι η απουσία του κλάσματος αρνητικού φορτίου από την εξίσωση [3.6β]).

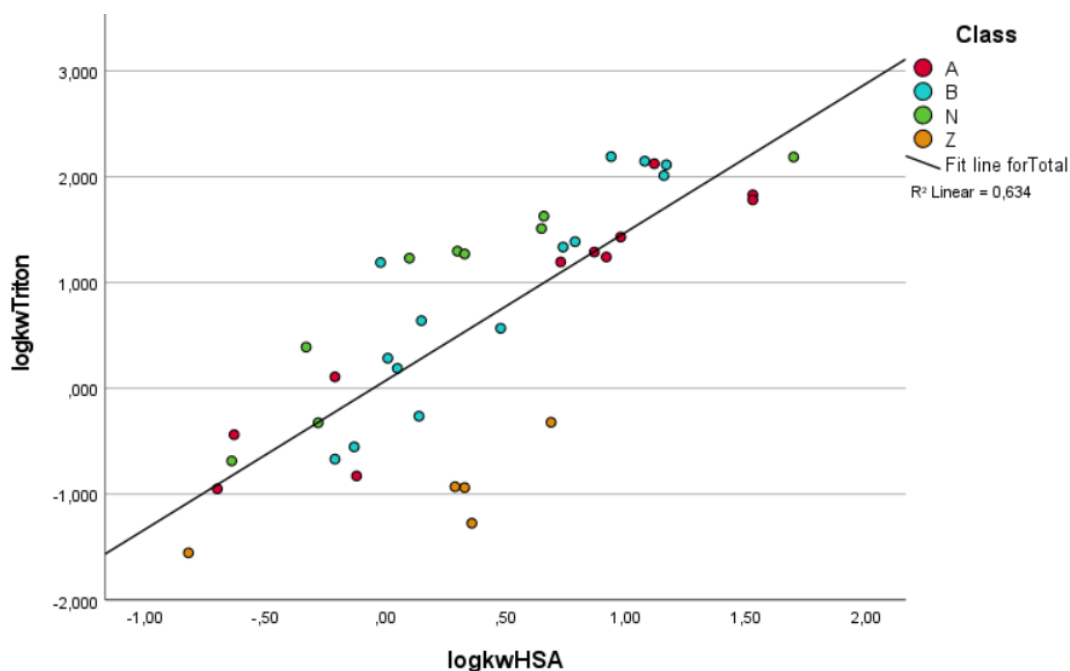
### 3.5. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με συντελεστές κατακράτησης της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης HSA, $\log k_w^{HSA}$

Η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{Triton}$ , της μικυλλιακής υδροχρωματογραφίας παρουσία Triton X-100 με τον συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w^{HSA}$ , της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης HSA, πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, όπου ως εξαρτημένη μεταβλητή ορίζεται ο συντελεστής  $\log k_w^{Triton}$  (δεδομένα από Πίνακα 8) κι ως ανεξάρτητη ο συντελεστής  $\log k_w^{HSA}$  (δεδομένα από Πίνακα 6). Η εξίσωση που προκύπτει είναι η ακόλουθη:

$$\log k_w^{Triton} = 1,403 (\pm 0,175) \cdot \log k_w^{HSA} + 0,072 (\pm 0,133) \quad [3.7\alpha]$$

$$(n = 39, R^2 = 0,634, s = 0,700, F = 64,0)$$

Η εξίσωση [3.7α] παριστάνεται γραφικά στο ακόλουθο διάγραμμα (Διάγραμμα 8).



**Διάγραμμα 8.** Γραφική παράσταση του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  με τον συντελεστή  $\log k_w^{HSA}$  – εξίσωση [3.7α]

Καμία από τις μελετούμενες ενώσεις δε χαρακτηρίζεται ως «outlier», αφού η πειραματική τιμή του συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$  δε διαφέρει από την υπολογιζόμενη μέσω της εξίσωσης [3.7α] τιμής περισσότερο από το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης.

Στη συσχέτιση [3.7α] εισάγονται ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα κλάσματα θετικού,  $F_{zwit}^+$ , κι αρνητικού,  $F_{zwit}^- (= F^- + F_{zwit}^-)$ , φορτίου (δεδομένα από Πίνακα 3). Από τις τιμές Sig. του πίνακα ANOVA συμπεραίνεται ότι και τα δύο είναι στατιστικά σημαντικά (Sig. < 0,001 < 0,05, και για τα δύο). Η εισαγωγή τους στην εξίσωση [3.7α] βελτιώνει επιπλέον τα στατιστικά στοιχεία κι η εξίσωση που προκύπτει είναι η εξής:

$$\log k_w^{Triton} = 1,417 (\pm 0,125) \cdot \log k_w^{HSA} - 0,715 (\pm 0,178) \cdot F_{zwit}^+ - 0,926 (\pm 0,172) \cdot F_{zwit}^- + 0,753 (\pm 0,149) \quad [3.7\beta]$$

$$(n = 39, R^2 = 0,824, s = 0,499, F = 54,6)$$

Παρατηρώντας την εξίσωση [3.7α], η συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών  $\log k_w^{Triton}$  και  $\log k_w^{HSA}$  μπορεί να χαρακτηριστεί ως μέτρια ικανοποιητική ( $R^2 = 0,634$ ). Η προσθήκη των κλασμάτων  $F_{zwit}^+$  και  $F_{zwit}^-$  πράγματι βελτιώνει σημαντικά τα στατιστικά στοιχεία ( $R^2 = 0,824$ ). Η στατική φάση της στήλης HSA δεσμεύει κυρίως όξινα φάρμακα. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 8, η πλειοψηφία των όξινων ενώσεων βρίσκεται κοντά ή κάτω από τη γραμμή βάσης. Αντίστροφα, οι περισσότερες βασικές ενώσεις εντοπίζονται πάνω από τη γραμμή βάσης. Οι δύο μέθοδοι βιομιμητικής χρωματογραφίας παρουσιάζουν διαφορετικούς μηχανισμούς κατακράτησης. Στη χρωματογραφία ακινητοποιημένης HSA αναπτύσσονται ιοντικοί δεσμοί (για ιονιζόμενες ουσίες), υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου, ενώ στη μικυλλιακή υγροχρωματογραφία με προσθήκη μη ιοντικού τασιενεργού επικρατούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

### 3.6. Συμπεριφορά κατακράτησης σε pH 5,50

Από τα δεδομένα των Πινάκων 3, 4, 5 και 8 μπορούν να υπολογιστούν οι διαφορές των συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w$ , για κάθε μέθοδο βιομιμητικής χρωματογραφίας (εξάιρεση αποτελεί η χρωματογραφία ακινητοποιημένης HSA, καθώς μελετάται μόνο σε pH 7,00, δηλαδή στην πλησιέστερη τιμή για προσομοίωση του pH του πλάσματος), καθώς κι οι διαφορές των τιμών του συντελεστή κατανομής,  $\log D$ , μεταξύ τιμών pH 7,40 και 5,50. Τα αποτελέσματα αναγράφονται στον Πίνακα 10, όπου τα κενά κελιά οφείλονται στην έλλειψη δεδομένων.

**Πίνακας 10.** Διαφορές στις τιμές συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση,  $\log k_w$ , για MLC και IAM, και συντελεστή κατανομής,  $\log D$ , μεταξύ τιμών pH 7,40 και 5,50

α/α	Φαρμακευτικές ενώσεις	Κατηγορία	$\Delta \log k_w (7,40-5,50)$					$\Delta \log D (7,40-5,50)$
			Triton	Brij-35	Tween 20	SDS	IAM	
1	Acetylsalicylic acid	A	-0,24	-0,12	-1,19	-0,27	-0,33	-1,68
4	Ampicillin	A	1,05	0,41	0,29	-0,78	-0,03	-0,33
5	Atenolol	B	0,18	0,16		0,15		1,29
6	Caffeine	N	-0,03	0,01			0,00	0,00
10	Cinoxacin	A	-0,33	-0,42	-0,73	-1,36	-0,80	-0,54
11	Ciprofloxacin	Z	-0,70	-0,41	-0,58	-1,61	0,02	0,62
12	Clonidine	B	0,64			0,23		1,70

14	Diclofenac	A	-0,06	-0,27	-0,35	-0,86	-0,46	-2,02
16	Enoxacin	Z	-0,64	-0,47	-0,49	-2,08	-0,70	0,66
19	Furosemide	A	-0,11	-0,02	-0,29	-0,58	-0,28	-0,72
23	Indomethacin	A	-0,42	-0,45	0,00	-0,81	-0,52	-1,76
24	Isoxicam	A	-0,08	-0,07	-0,11	-1,64	-0,34	-1,63
26	Lisinopril	Z	-0,35	0,34	-0,97	-0,90	-0,28	0,00
27	Losartan	A	-0,21	-0,07	-0,07	-0,81	-0,11	-1,08
30	Metoprolol	B	0,29	0,36				0,81
33	Nitrofurantoin	A	-0,26		-0,37	-0,41	-0,09	-0,29
34	Norfloxacin	Z	-0,73	-0,33	-0,54	-2,44		0,65
36	Paracetamol	N	-0,01	0,02		0,08	0,24	0,00
39	Propranolol	B	0,14	0,34	0,53			0,91
42	Salicylic acid	A	-0,08	-0,05	-0,17	-0,04	-0,18	-1,43
43	Sulpiride	B	0,15	0,17			0,33	1,14
47	Vancomycin	Z	0,96	0,24	0,41	0,25	0,05	2,94
49	Warfarin	A	-0,69	-0,45	-0,52	-0,33	-0,93	-1,81

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 10, σχεδόν όλες οι όξινες φαρμακευτικές ενώσεις έχουν αρνητική  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Triton}$ . Η αρνητική διαφορά οφείλεται στον υψηλότερο χρόνο κατακράτησης σε pH 5,50 σε σύγκριση με αυτόν σε pH 7,40. Σε χαμηλότερες τιμές pH δεν υπάρχει διάσταση του πρωτονίου της όξινης ομάδας κι επικρατεί η ουδέτερη μορφή της ένωσης. Η μη ιονισμένη μορφή είναι πιο λιπόφιλη από την αντίστοιχη ιονισμένη. Εξαιρείται η Ampicillin που παρουσιάζει μειωμένη τιμή  $\log k_w$  σε pH 5,50. Αυτό ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η Ampicillin σε pH 7,40 χαρακτηρίζεται κατά 53% ως οξύ και 47% ως αμφολύτης, ενώ σε pH 5,50 σχεδόν αποκλειστικά ως αμφολύτης (98%) και 2% ως οξύ. Η διαφορά  $\Delta \log D_{(7,40-5,50)}$  είναι αρνητική για όλες τις όξινες ενώσεις και μάλιστα, μεγαλύτερη κατά απόλυτη τιμή από τη διαφορά  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Triton}$  (με εξαίρεση την Ampicillin), εφόσον καταστέλλεται ο ιονισμός στο περιβάλλον της στήλης μικυλλιακής υδροχρωματογραφίας. Η διαφορά  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Triton}$  κυμαίνεται περίπου στα ίδια επίπεδα με τις διαφορές  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Brij-35}$  και  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Tween 20}$ , ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις είναι μικρότερη από τις διαφορές  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{SDS}$  και  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{IAM}$ .

Οι βασικές ενώσεις παρουσιάζουν θετική  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Triton}$ , δηλαδή μειωμένο χρόνο έκλουσης σε χαμηλότερο pH. Σε pH 5,50 φορτίζονται θετικά και κατακρατούνται λιγότερο στη στατική φάση. Η διαφορά  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Triton}$  είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με τις διαφορές  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Brij-35}$ ,  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Tween 20}$  και  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{SDS}$ . Στην περίπτωση της Sulpiride η διαφορά  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Triton}$  είναι μικρότερη από τη  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{IAM}$ . Τέλος η διαφορά  $\Delta \log D_{(7,40-5,50)}$  είναι θετική για όλες τις βασικές ενώσεις και μεγαλύτερη από τη  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Triton}$ .

Οι αμφολύτες (zwitterions) δεν έχουν σταθερή συμπεριφορά, όπως κι αναμένεται. Η Vancomycin εμφανίζει μειωμένο χρόνο κατακράτησης (θετική τιμή  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Triton}$ ), ενώ οι υπόλοιπες 4 ενώσεις κατακρατούνται περισσότερο στη στήλη σε χαμηλότερο pH (αρνητικές τιμές  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Triton}$ ). Συγκριτικά με τις άλλες βιομημητικές μεθόδους, παρατηρούνται ορισμένες διαφορές στη συμπεριφορά των αμφολυτών. Για παράδειγμα, η Ciprofloxacin εμφανίζει θετική  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{IAM}$  κι η Lisinopril θετική

$\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Brij-35}$ . Στις υπόλοιπες περιπτώσεις, δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές, τόσο ως προς το πρόσημο της διαφοράς, όσο κι ως προς την τάξη μεγέθους της. Η διαφορά  $\Delta \log D_{(7,40-5,50)}$  είναι θετική για τις 4 ενώσεις, ενώ μηδενική για τη Lisinopril.

Τέλος, οι 2 ουδέτερες ενώσεις που μελετήθηκαν ενδεικτικά, έχουν ελάχιστα αυξημένο χρόνο κατακράτησης, όπως υποδηλώνεται από τις αρνητικές  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{Triton}$ . Με τη χρήση των επιφανειοδραστικών συστατικών Brij-35 και SDS προκύπτουν μικρές θετικές διαφορές, ενώ στην περίπτωση της Paracetamol είναι  $\Delta \log k_{w(7,40-5,50)}^{IAM} = 0,240$ . Βέβαια, οι διαφορές αυτές μπορούν να αποδοθούν σε σφάλματα των μεθόδων, αφού οι ουδέτερες ενώσεις δεν αναμένεται να επηρεάζονται από μεταβολές του pH της κινητής φάσης, όπως υποδηλώνεται κι από τις μηδενικές τιμές  $\Delta \log D_{(7,40-5,50)}$ .

### 3.7. Συσχέτιση $\log k_w^{Triton}$ με φαρμακοκινητικές ιδιότητες

#### 3.7.1. Συσχέτιση με πρωτεϊνική σύνδεση, % PPB

Για τη συσχέτιση της πρωτεϊνικής σύνδεσης, εκφρασμένης ως % PPB με τους συντελεστές κατακράτησης  $\log k_w^{Triton}$ , οι 87 φαρμακευτικές ενώσεις που αναγράφονται στον Πίνακα 7, διαιρούνται σε δεδομένα εκμάθησης (training set), απαραίτητα για την ανάπτυξη του μοντέλου, και σε δεδομένα ελέγχου (test set), απαραίτητα για την επικύρωση του μοντέλου. Για λόγους σύγκρισης των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο test set των 22 φαρμακευτικών ενώσεων με παλαιότερες δημοσιεύσεις (υπογραμμισμένες με γαλάζιο στον Πίνακα 7). [68], [88] Οι υπόλοιπες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν ως training set.

Για την προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης έχουν προταθεί σιγμοειδή μοντέλα και μοντέλα που βασίζονται σε μορφή logit (όπως το δεύτερο μοντέλο που αναπτύσσεται στη συνέχεια).

Το πρώτο μοντέλο έχει την ακόλουθη μορφή:

$$\% PPB = \frac{100}{1 + 10^{-(a_0 + a_1 \cdot \log k_w^{Triton} + a_2 \cdot X_2 + \dots + a_n \cdot X_n)}} \quad [3.8\alpha]$$

όπου:  $X_2, \dots, X_n$ : πρόσθετες φυσικοχημικές ιδιότητες

$a_0, \dots, a_n$ : συντελεστές που προκύπτουν από μη γραμμική παλινδρόμηση

Έπειτα από διαδοχική παλινδρόμηση προκύπτουν τα ακόλουθα (Πίνακας 11):

**Πίνακας 11.** Συντελεστές εξίσωσης [3.8α] και στατιστικά στοιχεία έπειτα από διαδοχική παλινδρόμηση

$a_0$	$a_1 (\log k_w^{Triton})$	$a_2 (F^-)$	$n$	$R^2$	$S$
$-0,262 \pm 0,088$	$0,604 \pm 0,086$		63	0,644	
$-0,457 \pm 0,094$	$0,623 \pm 0,078$	$0,932 \pm 0,237$	63	0,757	17,2



Με βάση τους τελικούς συντελεστές, το μοντέλο που αναπτύσσεται είναι το εξής:

$$\% PPB = \frac{100}{1 + 10^{-(-0,457 (\pm 0,094) + 0,623 (\pm 0,078) \cdot \log k_w^{Triton} + 0,932 (\pm 0,237) \cdot F^-)}} \quad [3.8\beta]$$

Το θετικό πρόσημο του συντελεστή του κλάσματος αρνητικού φορτίου,  $F^-$ , αποδίδεται στην ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού (HSA) που αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη για τη δέσμευση των φαρμακευτικών ενώσεων στο πλάσμα. Σε pH 7,40 τα όξινα φάρμακα είναι αρνητικά φορτισμένα και παρουσιάζουν αυξημένη δέσμευση από την HSA.

Στον Πίνακα 12 αναγράφονται οι τιμές επικύρωσης του μοντέλου στα 22 φάρμακα του test set. Με γαλάζιο σημειώνονται οι αποτυχημένες προβλέψεις, αν θεωρηθεί βάση επιτυχίας η διαφορά 20% μεταξύ των δύο ποσοστών % PPB.

**Πίνακας 12.** Πειραματικές τιμές ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης, % PPB, και προβλεπόμενων από το μοντέλο [3.8β] τιμών

α/α	Φαρμακευτικές ενώσεις	% PPB Πειραματική τιμή	% PPB Τιμή που προβλέπει το μοντέλο [3.8β]
15	Ceftriaxone	95,0	14,8
16	Chloramphenicol	54,0	67,1
18	Cimetidine	18,5	34,4
19	Cinoxacin	66,5	47,5
33	Hydrocortisone	95,0	68,4
36	Isoxicam	96,0	95,0
39	Levofloxacin	32,3	12,4
42	Lornixicam	99,0	97,1
46	Meloxicam	99,3	97,3
48	Methylprednisolone	77,3	82,5
49	Metoclopramide	33,3	44,1
51	Minoxidil	0,0	47,6
52	Nadolol	30,0	13,6
53	Nalidixic acid	93,0	65,9
57	Niflumic acid	90,0	98,4
62	Omeprazole	95,0	77,4
65	Pipemidic acid	30,0	9,8
66	Piperacillin	19,0	59,6
76	Salicylic acid	95,0	82,7
78	Sulpiride	14,0	19,3
85	Vancomycin	43,3	22,4
87	Warfarin	98,8	94,6

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 12, το μοντέλο [3.8β] έχει ποσοστό επιτυχίας 15/22 (68,2%) με το Pipemidic acid και τη Vancomycin να είναι οριακά εκτός των ορίων.

Στο δεύτερο μοντέλο για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης, χρησιμοποιείται η φαινόμενη σταθερά συγγένειας σε λογαριθμική μορφή (logarithm of the apparent affinity constant),  $\log K$ , η οποία έχει προταθεί από την K. Valko και τους συνεργάτες της [97] και εκφράζεται από την εξίσωση:

$$\log K = \log \left( \frac{\% PPB}{101 - \% PPB} \right) \quad [3.9\alpha]$$

Ο αριθμός 101 στον παρονομαστή δικαιολογείται από την ανάγκη η εξίσωση να ισχύει ακόμη και στην περίπτωση φαρμακευτικών ενώσεων που παρουσιάζουν 100% πρωτεϊνική σύνδεση, διότι αν υπήρχε το 100 στον παρονομαστή, η διαφορά θα ήταν μηδενική.

Από τη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης προκύπτει ότι:

$$\log K = 0,638 (\pm 0,076) \cdot \log k_w^{Triton} - 0,168 (\pm 0,103) \quad [3.9\beta]$$

$$(n = 62, R^2 = 0,540, s = 0,637, F = 70,4)$$

Η εισαγωγή του κλάσματος αρνητικού φορτίου,  $F^-$ , ως πρόσθετη φυσικοχημική παράμετρο, κρίνεται στατιστικά σημαντική, οπότε η τελική σχέση είναι η ακόλουθη:

$$\log K = 0,617 (\pm 0,061) \cdot \log k_w^{Triton} + 0,953 (\pm 0,160) \cdot F^- - 0,376 (\pm 0,089) \quad [3.9\gamma]$$

$$(n = 62, R^2 = 0,712, s = 0,508, F = 73,0)$$

Από το μοντέλο [3.9γ] υπολογίζεται η φαινόμενη σταθερά συγγένειας,  $\log K$ , και στη συνέχεια το ποσοστό % PPB μέσω της σχέσης [3.9α]. Στον Πίνακα 13 αναγράφονται οι τιμές επικύρωσης του μοντέλου στα 22 φάρμακα του test set. Με γαλάζιο σημειώνονται οι αποτυχημένες προβλέψεις, αν θεωρηθεί βάση επιτυχίας η διαφορά 20% μεταξύ των δύο ποσοστών % PPB.

**Πίνακας 13.** Πειραματικές τιμές ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης, % PPB, και προβλεπόμενων μέσω του μοντέλου [3.9γ] τιμών

α/α	Φαρμακευτικές ενώσεις	% PPB Πειραματική τιμή	% PPB Τιμή που προβλέπεται μέσω του μοντέλου [3.9γ]
15	Ceftriaxone	95,0	17,9
16	Chloramphenicol	54,0	71,4
18	Cimetidine	18,5	39,1
19	Cinoxacin	66,5	54,3
33	Hydrocortisone	95,0	72,6
36	Isoxicam	96,0	96,9
39	Levofloxacin	32,3	14,9
42	Lornixicam	99,0	98,6
46	Meloxicam	99,3	98,7
48	Methylprednisolone	77,3	85,6
49	Metoclopramide	33,3	49,0
51	Minoxidil	0,0	52,5
52	Nadolol	30,0	16,3
53	Nalidixic acid	93,0	71,7
57	Niflumic acid	90,0	99,7
62	Omeprazole	95,0	81,0
65	Pipemidic acid	30,0	11,8
66	Piperacillin	19,0	65,9
76	Salicylic acid	95,0	86,6
78	Sulpiride	14,0	22,7

85	Vancomycin	43,3	26,3
87	Warfarin	98,8	96,6

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 13, το μοντέλο [3.9γ] έχει ποσοστό επιτυχίας 16/22 (72,7%) με την Cimetidine, την Hydrocortisone και το Nalidixic acid να είναι οριακά εκτός των ορίων.

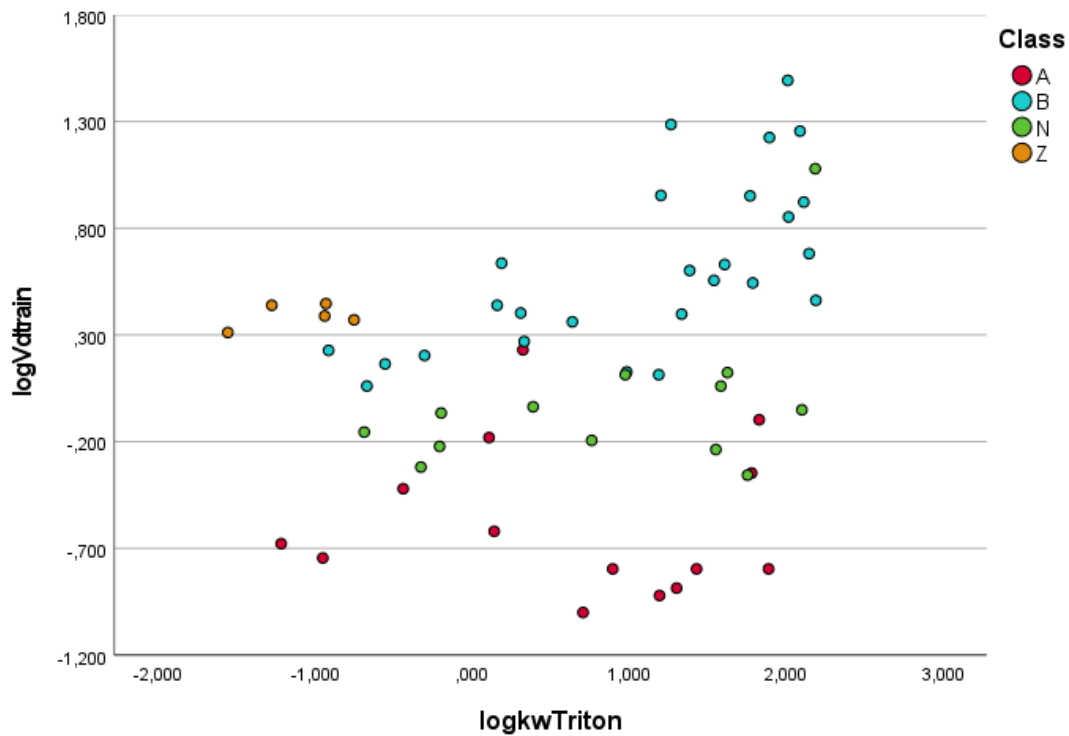
Παρατηρώντας τους Πίνακες 12 και 13, αξίζει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση της κεφαλοσπορίνης κεφτριαξόνης (Ceftriaxone) σημειώνεται μεγάλη απόκλιση μεταξύ πειραματικής και προβλεπόμενης από τα μοντέλα τιμής. Η συγκεκριμένη αποτυχία έχει αναφερθεί και με χρήση λιποφιλίας (logP, logD), καθώς και με άλλους τύπους βιομιμητικής χρωματογραφίας, ακόμη και με τη χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος, που θεωρείται ο πλέον κατάλληλος τύπος υγροχρωματογραφίας για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμακευτικών ενώσεων. Στην αλληλεπίδραση των κεφαλοσπορινών με τις πρωτεΐνες φαίνεται να εμπλέκονται κι άλλες αλληλεπιδράσεις (όπως πολικές κι ηλεκτροστατικές), που πιθανά είναι σημαντικότερες από τις υδρόφοβες.

Μεταξύ των παραγόντων που οδηγούν σε αποκλίσεις, εντάσσονται κι η μεταβολή της πρωτεϊνικής σύνδεσης ανάλογα με τον ανθρώπινο οργανισμό και την κατάσταση της υγείας του, καθώς και το γεγονός ότι το ποσοστό της πρωτεϊνικής σύνδεσης στη βιβλιογραφία συνήθως αναφέρεται σε εύρος τιμών κι όχι σε μία συγκεκριμένη.

Ανάμεσα στα δύο μοντέλα, το δεύτερο κρίνεται καταλληλότερο για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης (μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας στο test set). Γενικά, θεωρείται ότι είναι αρκετά καλό το ποσοστό επιτυχίας, οπότε η χρήση της μικυλλιακής υγροχρωματογραφίας με προσθήκη του μη ιοντικού Triton X-100, θα μπορούσε να προτιμηθεί έναντι της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος, λόγω του αυξημένου κόστους της στήλης που απαιτείται στην τελευταία.

### 3.7.2. Συσχέτιση με όγκο κατανομής, $V_d$

Η συσχέτιση των λογαρίθμων των όγκων κατανομής των φαρμακευτικών ενώσεων του training set (ίδιο με της ενότητας 3.7.1.) με τους συντελεστές κατακράτησης  $\log k_w^{\text{Triton}}$  απεικονίζεται στο Διάγραμμα 9.



**Διάγραμμα 9.** Γραφική παράσταση του λογαρίθμου του όγκου κατανομής του training set,  $\log V_{d_{train}}$ , με τον συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9, δεν υπάρχει συσχέτιση για τις όξινες, τις αμφολυτικές και τις ουδέτερες ενώσεις. Στην περίπτωση των βάσεων, έπειτα από γραμμική παλινδρόμηση προκύπτει η ακόλουθη συσχέτιση:

$$\log V_d = 0,276 (\pm 0,064) \cdot \log k_w^{Triton} + 0,314 (\pm 0,091) \quad [3.10\alpha]$$

$$(n = 26, R^2 = 0,435, s = 0,309, F = 18,5)$$

Με την προσθήκη του κλάσματος θετικού φορτίου, η τελική εξίσωση είναι η εξής:

$$\log V_d = 0,305 (\pm 0,059) \cdot \log k_w^{Triton} + 0,972 (\pm 0,373) \cdot F^+ - 0,596 (\pm 0,359) \quad [3.10\beta]$$

$$(n = 26, R^2 = 0,564, s = 0,277, F = 14,9)$$

Στον Πίνακα 14 αναγράφονται οι τιμές επικύρωσης του μοντέλου στα 4 βασικά φάρμακα του test set (ίδιο με της ενότητας 3.7.1.).

**Πίνακας 14.** Πειραματικές τιμές όγκου κατανομής,  $V_d$ , και προβλεπόμενων από το μοντέλο [3.10β] τιμών

$\alpha/\alpha$	Φαρμακευτικές ενώσεις	$V_d \left( \frac{L}{kg} \right)$ Πειραματική τιμή	$V_d \left( \frac{L}{kg} \right)$ Τιμή που προβλέπει το μοντέλο [3.10β]
18	Cimetidine	1,1	0,5
49	Metoclopramide	3,3	3,5

52	Nadolol	2,0	1,6
78	Sulpiride	2,1	1,9

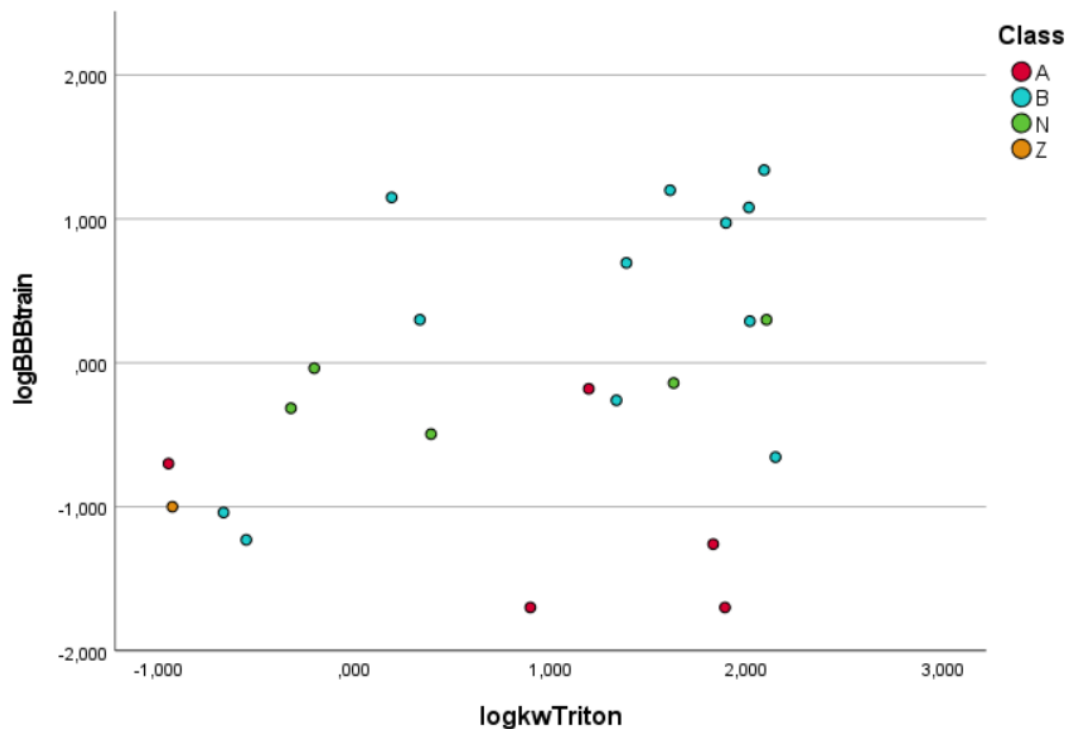
Σε γενικές γραμμές παρατηρείται καλή συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και των προβλεπόμενων τιμών. Βέβαια, λόγω του περιορισμού στις βασικές ενώσεις, τα δεδομένα ελέγχου είναι λίγα. Η επιλογή της MLC παρουσία Triton X-100 για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής των βασικών φαρμακευτικών ενώσεων θα μπορούσε να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

### 3.7.3. Συσχέτιση με διέλευση από αιματοεγκεφαλικό φραγμό, $\log BBB$

Η διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό εκφράζεται με τον λόγο:

$$\log BBB = \log \left( \frac{C_{brain}}{C_{blood}} \right) \quad [1.8]$$

Η συσχέτιση των λογαρίθμων  $\log BBB$  των φαρμακευτικών ενώσεων του training set (ίδιο με της ενότητας 3.7.1.) με τους συντελεστές κατακράτησης  $\log k_w^{Triton}$  απεικονίζεται στο Διάγραμμα 10.



**Διάγραμμα 10.** Γραφική παράσταση του λογαρίθμου  $\log BBB$  του training set,  $\log BBB_{train}$ , με τον συντελεστή  $\log k_w^{Triton}$

Στη συσχέτιση της διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, εκφρασμένης ως  $\log BBB$ , με τους συντελεστές κατακράτησης  $\log k_w^{Triton}$  λαμβάνεται υπόψη το κλάσμα αρνητικού φορτίου,  $F^-$ , και προκύπτει το ακόλουθο μοντέλο:

$$\log BBB = 0,312 (\pm 0,142) \cdot \log k_w^{Triton} - 1,253 (\pm 0,371) \cdot F^- - 0,162 (\pm 0,217) \quad [3.11]$$

$$(n = 23, R^2 = 0,444, s = 0,732, F = 8,0)$$

Στον Πίνακα 15 αναγράφονται οι τιμές επικύρωσης του μοντέλου στα 5 από τα 22 φάρμακα του test set (ίδιο με της ενότητας 3.7.1.), για τα οποία υπάρχει η πειραματική τιμή του λόγου  $BBB = \frac{C_{brain}}{C_{blood}}$ . Με γαλάζιο σημειώνονται οι αποτυχημένες προβλέψεις, αν θεωρηθεί βάση επιτυχίας η απόκλιση -50% έως +100% από τις πειραματικές τιμές  $BBB$ .

**Πίνακας 15.** Πειραματικές τιμές λόγου συγκέντρωσης φαρμάκου στους ιστούς του εγκεφάλου προς τη συγκέντρωσή του στο αίμα,  $BBB$ , και προβλεπόμενων από το μοντέλο [3.11] τιμών

α/α	Φαρμακευτικές ενώσεις	$BBB$ Πειραματική τιμή	$BBB$ Τιμή που προβλέπει το μοντέλο [3.11]
18	Cimetidine	0,04	0,85
39	Levofloxacin	0,20	0,30
49	Metoclopramide	1,20	1,04
62	Omeprazole	0,15	1,74
76	Salicylic acid	0,08	0,05

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 15, το μοντέλο [3.11] έχει ποσοστό επιτυχίας 3/5 (60%). Η πρόβλεψη της διέλευσης των φαρμακευτικών ενώσεων από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα δύσκολη και δεν υπάρχουν πολλές πειραματικές μετρήσεις (εδώ, μόνο 5 από τις 22 φαρμακευτικές ενώσεις του test set). Παρά τον μικρό αριθμό δείγματος των δεδομένων ελέγχου, το ποσοστό 60% αποτελεί ενθαρρυντικό βήμα για τη χρήση της μικυλλιακής υδροχρωματογραφίας παρουσία του μη ιοντικού επιφανειοδραστικού συστατικού Triton X-100 για την πρόβλεψη του λόγου  $\frac{C_{brain}}{C_{blood}}$ . Η πρόβλεψη της διέλευσης από τον ΑΕΦ είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη διάρκεια των προκλινικών ελέγχων, ιδιαίτερα στην περίπτωση φαρμακευτικών ενώσεων που πρόκειται να δράσουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Επίσης, είναι επιθυμητό για φάρμακα που δεν προορίζονται για δράση στο ΚΝΣ να μη διέρχονται από τον ΑΕΦ, καθώς αυτό μπορεί να συνδέεται με παρενέργειες στο ΚΝΣ.

## 4. Συμπεράσματα

Η μελέτη του μηχανισμού κατακράτησης των 49 ποικίλων φαρμακευτικών ενώσεων, καθώς κι η συσχέτιση με τα δεδομένα λιποφιλίας και τους συντελεστές κατακράτησης άλλων βιομηχανικών χρωματογραφικών μεθόδων, επιβεβαίωσε την υπερίσχυση των δρόφοβων αλληλεπιδράσεων στη μικυλλιακή υδροχρωματογραφία παρουσία μη ιοντικού τασιενεργού. Οι συντελεστές κατακράτησης με χρήση αντίστροφης στατικής φάσης και κινητής φάσης με προσθήκη του μη ιοντικού Triton X-100 παρουσίασαν εξαιρετική συσχέτιση με τους αντίστοιχους συντελεστές με κινητές φάσεις στις οποίες είχαν προστεθεί τα επιφανειοδραστικά Brij-35 ή Tween 20 (μη ιοντικά). Η συσχέτιση με τους συντελεστές μικυλλιακής υδροχρωματογραφίας με κινητή φάση, στην οποία υπήρχαν μικύλλια του ανιοντικού τασιενεργού SDS, ήταν μέτρια, λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που εντοπίζονται στην περίπτωση του SDS.

Το εύρος της κλίμακας των συντελεστών κατακράτησης  $\log k_w^{\text{Triton}}$  παρατηρήθηκε μεγαλύτερο από το εύρος των συντελεστών  $\log k_w^{\text{Brij-35}}$  και  $\log k_w^{\text{Tween 20}}$ . Το γεγονός αυτό επιτρέπει την καλύτερη διάκριση μεταξύ των μελετούμενων φαρμακευτικών ενώσεων. Όσον αφορά την περίπτωση του ανιοντικού SDS, οι συντελεστές  $\log k_w^{\text{SDS}}$  είχαν μεγαλύτερο εύρος και μεγαλύτερη μέγιστη τιμή του συντελεστή κατακράτησης. Ακριβώς οι ίδιες ήταν οι παρατηρήσεις και για τους συντελεστές  $\log k_w^{\text{IAM}}$  της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών. Επομένως, αν και στην MLC με χρήση SDS και στην IAM γίνεται ευκολότερη διάκριση των ενώσεων, αυξάνεται εξαιρετικά ο χρόνος κατακράτησης των αρκετά λιπόφιλων βασικών ουσιών, κάτι που απαιτεί μεγαλύτερους χρόνους ανάλυσης ή την προσθήκη οργανικών τροποποιητών.

Επιπλέον, η συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης  $\log k_w^{\text{Triton}}$  με τους συντελεστές λιποφιλίας, υπέδειξε την καταστολή του ιονισμού στο περιβάλλον της στήλης. Παρατηρήθηκε καλύτερη συσχέτιση με τον συντελεστή μερισμού,  $\log P$ , ενώ η συσχέτιση με τον συντελεστή κατανομής,  $\log D$ , βελτιώθηκε με την προσθήκη των κλασμάτων θετικού κι αρνητικού φορτίου των μορίων. Στο ίδιο συμπέρασμα οδήγησαν κι οι διαφορές των συντελεστών κατανομής μεταξύ pH 7,40 και 5,50,  $\Delta \log D_{(7,40-5,50)}$ , που ήταν κυρίως μεγαλύτερες των διαφορών  $\Delta \log k_w^{\text{Triton}}_{(7,40-5,50)}$ .

Η συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης  $\log k_w^{\text{Triton}}$  με το ποσοστό της πρωτεϊνικής σύνδεσης ήταν αρκετά ικανοποιητική, με επιτυχία 15/22 φαρμακευτικές ενώσεις του test set με το πρώτο μοντέλο και 16/22 με το δεύτερο μοντέλο. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι αυτού του είδους η μικυλλιακή χρωματογραφία μπορεί να αντικαταστήσει την ακριβότερη χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος.

Η συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης  $\log k_w^{\text{Triton}}$  με τον όγκο κατανομής περιορίστηκε στις βασικές ενώσεις, για τις οποίες προέκυψε καλή συμφωνία μεταξύ πειραματικών και προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών.

Τέλος, η συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης  $\log k_w^{\text{Triton}}$  με τη διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ήταν ικανοποιητική για το μικρό δείγμα των 5 φαρμακευτικών ενώσεων του test set, με επιτυχία 3/5. Η συσχέτιση αυτή θεωρείται αρκετά σημαντική, καθώς δεν εξασφαλίζεται συχνά με τις μεθόδους βιομηχανικής χρωματογραφίας κι είναι αναγκαία κατά την ανάπτυξη φαρμάκων που προορίζονται για δράση στο ΚΝΣ.



Όπως προκύπτει από όλες τις παραπάνω παρατηρήσεις, η χρήση του μη ιοντικού επιφανειοδραστικού συστατικού Triton X-100 στη μικυλλιακή υδροχρωματογραφία παρουσιάζει ιδιαίτερα πλεονεκτήματα και μπορεί να επιλεγθεί για τις προκλινικές μελέτες των νέων υποψήφιων φαρμάκων. Η γνώση της λιποφιλίας κι η ταυτόχρονη εκτίμηση διαφορετικών φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (πρωτεϊνική σύνδεση, όγκος κατανομής, διέλευση από τον ΑΕΦ) των ενώσεων, μπορεί να περιορίσει την απόρριψη των υποψήφιων φαρμάκων σε προχωρημένα στάδια της ανάπτυξής τους και να μειώσει σημαντικά το κόστος της συνολικής διαδικασίας.

## 5. Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

---

Από την παρούσα διπλωματική εργασία προέκυψαν οι ακόλουθες προτάσεις για περαιτέρω έρευνα:

1. Η δημιουργία μίας διευρυμένης βιβλιοθήκης τιμών συντελεστών κατακράτησης  $\log k_w^{Triton}$  με την ανάλυση πολυάριθμων φαρμακευτικών ενώσεων στις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες, προκειμένου να αξιοποιηθούν για βελτιωμένες συσχετίσεις με τους συντελεστές κατακράτησης άλλων βιομηματικών χρωματογραφικών μεθόδων, καθώς και για την ανάπτυξη αξιόπιστων μοντέλων πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων ή διάφορων δεικτών τοξικότητας (όπως ηπατοτοξικότητας, καρδιοτοξικότητας) ή οικοτοξικότητας.
2. Η διερεύνηση της ικανότητας πρόβλεψης άλλων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, όπως η διαδερμική απορρόφηση, η κυτταρική διαπερατότητα κι η γαστρεντερική απορρόφηση (απορρόφηση από το στόμα). Με την ανάλυση περισσότερων ενώσεων μπορεί να βελτιωθούν κι οι συσχετίσεις με τις ιδιότητες που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία.
3. Η διεύρυνση της βάσης δεδομένων φαρμάκων, η συλλογή δεδομένων πολλών τύπων βιομηματικής χρωματογραφίας (μικυλλιακής, IAM, ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος), και ταυτόχρονα φυσικοχημικών και τοπολογικών παραμέτρων (για παράδειγμα από το ελεύθερο λογισμικό Dragon) για εφαρμογή χημειομετρικών τεχνικών (όπως η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων) με τελικό στόχο την εκτίμηση της ικανότητας διέλευσης φαρμακομορίων από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.
4. Η ανάλυση των ίδιων φαρμακευτικών ενώσεων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή/και χωρίς την προσθήκη NaCl στην κινητή φάση, ώστε να εντοπιστούν πιθανές τροποποιήσεις στις συσχετίσεις των μοντέλων πρόβλεψης. Στην περίπτωση που δεν παρατηρηθούν αξιοσημείωτες στατιστικές διαφορές, κρίνονται προτιμότερες οι νέες συνθήκες, αφού δεν απαιτείται η χρήση του υδατόλουτρου (μείωση ενεργειακού κόστους) ή/και δεν επιβαρύνεται ο χρωματογραφικός εξοπλισμός από την παρουσία NaCl.
5. Η χρήση διαφορετικών επιφανειοδραστικών ουσιών (όπως ανιοντικά, κατιοντικά, αμφοτερικά) για τη μελέτη της επίδρασης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στους μηχανισμούς κατακράτησης και στην πρόβλεψη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, με τελικό στόχο να καθοριστεί το πιο κατάλληλο τασιενεργό για κάθε ιδιότητα.



## Βιβλιογραφία

---

- [1] Μ. Σιδηροπούλου, “Το φάρμακο ως κοινωνικό αγαθό, η θέση του και η συμβολή του στην προστασία της δημόσιας υγείας,” *Ιατρικός Σύλλογος Θεσσαλονίκης*, no. 61, 2011.
- [2] “List of Currently Incurable Diseases,” *Disabled World*. <https://www.disabled-world.com/definitions/lists/incurable.php> (accessed Nov. 21, 2020).
- [3] J. Drews, “Drug Discovery: A Historical Perspective,” *Science*, vol. 287, no. 5460, pp. 1960–1964, Mar. 2000, doi: 10.1126/science.287.5460.1960.
- [4] Β. Δημόπουλος and Α. Τσαντίλη-Κακουλίδου, *Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων*. Ζωγράφου: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015.
- [5] E. Raviña Rubira, *The evolution of drug discovery: from traditional medicines to modern drugs*. Weinheim: Wiley-VCH, 2011.
- [6] Office of the Commissioner, “Step 1: Discovery and Development,” *FDA*, Apr. 2019, Accessed: Nov. 19, 2020. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-1-discovery-and-development>.
- [7] R. C. Mohs and N. H. Greig, “Drug discovery and development: Role of basic biological research,” *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.*, vol. 3, no. 4, pp. 651–657, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.trci.2017.10.005.
- [8] “Pfizer: Το ταξίδι του φαρμάκου.” <https://www.medicine-journey.pfizer.gr/index.html> (accessed Jun. 18, 2020).
- [9] J. Honek, “Preclinical research in drug development,” *Med. Writ.*, vol. 26, no. 4, pp. 5–8, Dec. 2017.
- [10] J. Mckim, “Building a Tiered Approach to In Vitro Predictive Toxicity Screening: A Focus on Assays with In Vivo Relevance,” *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 13, pp. 188–206, Feb. 2010, doi: 10.2174/138620710790596736.
- [11] J. Hughes, S. Rees, S. Kalindjian, and K. Philpott, “Principles of early drug discovery,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 162, no. 6, pp. 1239–1249, Mar. 2011, doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
- [12] Office of the Commissioner, “Step 2: Preclinical Research,” *FDA*, Apr. 2019, Accessed: Nov. 19, 2020. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-2-preclinical-research>.
- [13] R. Ng, *Drugs: From Discovery to Approval*, 2nd ed. Hoboken, N.J: Wiley-Blackwell, 2008.
- [14] Office of the Commissioner, “Step 3: Clinical Research,” *FDA*, Apr. 2019, Accessed: Nov. 19, 2020. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-3-clinical-research>.
- [15] J. Ritter, R. J. Flower, G. Henderson, Y. K. Loke, D. J. MacEwan, and H. P. Rang, *Rang and Dale’s pharmacology*, 9th ed. 2020.
- [16] Γ.-Ι. Κόκοτος and Β. Μαγκριώτη, *Φαρμακοχημεία*. Εκδόσεις Κάλλιπος, 2015.
- [17] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Feeney, “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 23, no. 1, pp. 3–25, Jan. 1997, doi: 10.1016/S0169-409X(96)00423-1.
- [18] *Everything you need to know about ADME*, 4th ed. Cyprotex, 2020.
- [19] “Drug metabolism | Pharmacology Education Project.” /pharmacology/drug-metabolism (accessed Nov. 29, 2020).
- [20] A. P. Li, “Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery,” vol. 6, no. 7, pp. 357–366, 2001.
- [21] “ToxTutor - Determining the Safety of a Drug.” <https://toxxtutor.nlm.nih.gov/02-005.html> (accessed Nov. 29, 2020).

- [22] AIDS info, *Glossary of HIV/AIDS-Related Terms*, 9th ed. Rockville, MD, 2018.
- [23] Μ. Μαρσέλος, *Συνοπτική Φαρμακολογία - Τόμος Ι - Αρχές της φαρμακολογίας*. Ιωάννινα: Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2008.
- [24] "Overview of Pharmacodynamics - Clinical Pharmacology," *MSD Manual Professional Edition*. <https://www.msdmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacodynamics/overview-of-pharmacodynamics> (accessed Dec. 08, 2020).
- [25] "Dose-Response Relationships - Clinical Pharmacology," *MSD Manual Professional Edition*. <https://www.msdmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacodynamics/dose-response-relationships> (accessed Dec. 08, 2020).
- [26] "Pharmacodynamics | Pharmacology Education Project." [/pharmacology/pharmacodynamics](https://www.msdmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacodynamics) (accessed Dec. 01, 2020).
- [27] J. T. DiPiro, *Concepts in Clinical Pharmacokinetics*. ASHP, 2010.
- [28] "Pharmacodynamic Mechanisms | General Principles of Pharmacology | dentalcare.com." <https://www.dentalcare.com/en-us/professional-education/ce-courses/ce580/pharmacodynamic-mechanisms> (accessed Dec. 08, 2020).
- [29] "Drug-Receptor Interactions - Clinical Pharmacology," *MSD Manual Professional Edition*. <https://www.msdmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacodynamics/drug%E2%80%93receptor-interactions> (accessed Dec. 08, 2020).
- [30] A. T. Florence and D. Attwood, *Physicochemical Principles of Pharmacy*, 4th ed. London: Pharmaceutical Press, 2007.
- [31] K. Valkó, *Physicochemical and Biomimetic Properties in Drug Discovery*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2014.
- [32] A. Avdeef, "Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state)," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 1, no. 4, pp. 277–351, Sep. 2001, doi: 10.2174/1568026013395100.
- [33] G. Amidon, H. Lennernäs, V. Shah, and J. Crison, "A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability," *Pharm. Res.*, vol. 12, pp. 413–20, Apr. 1995, doi: 10.1023/A:1016212804288.
- [34] G. Russo, L. Grumetto, R. Szucs, F. Barbato, and F. Lynen, "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," *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 9, pp. 3739–3754, May 2017, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01811.
- [35] M. De Vrieze, P. Janssens, R. Szucs, J. Van der Eycken, and F. Lynen, "In vitro prediction of human intestinal absorption and blood–brain barrier partitioning: development of a lipid analog for micellar liquid chromatography," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, pp. 7453–7466, Aug. 2015, doi: 10.1007/s00216-015-8911-z.
- [36] L. Escuder-Gilabert, M. Molero-Monfort, R. M. Villanueva-Camañas, S. Sagrado, and M. J. Medina-Hernández, "Potential of biopartitioning micellar chromatography as an in vitro technique for predicting drug penetration across the blood–brain barrier," *J. Chromatogr. B*, vol. 807, no. 2, pp. 193–201, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.jchromb.2004.04.004.
- [37] F. Tsopeles, C. Giaginis, and A. Tsantili-Kakoulidou, "Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 12, no. 9, pp. 885–896, Sep. 2017, doi: 10.1080/17460441.2017.1344210.
- [38] T. Chmiel, A. Mieszkowska, D. Kempieńska-Kupczyk, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, and Z. Mazerska, "The impact of lipophilicity on environmental processes, drug delivery and bioavailability of food components," *Microchem. J.*, vol. 146, pp. 393–406, May 2019, doi: 10.1016/j.microc.2019.01.030.

- [39] J. A. Arnott and S. L. Planey, "The influence of lipophilicity in drug discovery and design," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 7, no. 10, pp. 863–875, Oct. 2012, doi: 10.1517/17460441.2012.714363.
- [40] A. Pagliara, P.-A. Carrupt, G. Caron, P. Gaillard, and B. Testa, "Lipophilicity Profiles of Ampholytes," *Chem. Rev.*, vol. 97, no. 8, pp. 3385–3400, Dec. 1997, doi: 10.1021/cr9601019.
- [41] C. Giaginis and A. Tsantili-Kakoulidou, "Alternative Measures of Lipophilicity: From Octanol–Water Partitioning to IAM Retention," *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, no. 8, pp. 2984–3004, Aug. 2008, doi: 10.1002/jps.21244.
- [42] S. Winiwarter, M. Ridderström, A.-L. Ungell, T. B. Andersson, and I. Zamora, "Use of Molecular Descriptors for Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Predictions," in *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Elsevier, 2007, pp. 531–554.
- [43] S. Padmanabhan, Ed., *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*, 1st ed. London: Academic Press, 2014.
- [44] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6th ed. Εκδόσεις Κωσταράκη, 2007.
- [45] "Principles of chromatography," *Khan Academy*.  
<https://www.khanacademy.org/science/class-11-chemistry-india/xfbb6cb8fc2bd00c8:in-in-organic-chemistry-some-basic-principles-and-techniques/xfbb6cb8fc2bd00c8:in-in-methods-of-purification-of-organic-compounds/a/principles-of-chromatography> (accessed Dec. 27, 2020).
- [46] P. Karkalousos *et al.*, *Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας*. Εκδόσεις Κάλλιπος, 2015.
- [47] S. S. Nielsen, Ed., *Food Analysis*, 4th ed. New York: Springer, 2010.
- [48] "CLU-IN | Gas Chromatography." <https://clu-in.org/characterization/technologies/gc.cfm> (accessed Dec. 29, 2020).
- [49] K. L. Valkó, "Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 130, pp. 35–54, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.jpba.2016.04.009.
- [50] S. Ahuja, Ed., *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. Amsterdam: Elsevier Acad. Press, 2005.
- [51] Y. Kazakevich and R. LoBrutto, Eds., *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007.
- [52] K. Valkó, "Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution," *J. Chromatogr. A*, vol. 1037, no. 1–2, pp. 299–310, May 2004, doi: 10.1016/j.chroma.2003.10.084.
- [53] "High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)," <http://mytutorial.srtcube.com>. <http://mytutorial.srtcube.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/environment-science/826-528> (accessed Dec. 28, 2020).
- [54] Μ. Χρυσανθακόπουλος, "Αξιολόγηση πειραματικών/υπολογιστικών παραμέτρων λιποφιλίας σε ποσοτικές σχέσεις δομής-δράσης και εκτίμηση φαρμακοκινητικών διεργασιών στη βάση βιοχρωματογραφικών δεικτών. Εφαρμογή σε όξινα παράγωγα του πυρρολίου, αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης,." Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2011.
- [55] F. Tsopeles, C. Stergiopoulos, and A. Tsantili-Kakoulidou, "Immobilized artificial membrane chromatography: from medicinal chemistry to environmental sciences," *ADMET DMPK*, vol. 6, no. 3, Art. no. 3, Sep. 2018, doi: 10.5599/admet.553.
- [56] F. Tsopeles, T. Vallianatou, and A. Tsantili-Kakoulidou, "Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 11, no. 5, pp. 473–488, May 2016, doi: 10.1517/17460441.2016.1160886.

- [57] D. S. Hage, "High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding," *J. Chromatogr. B*, vol. 768, no. 1, pp. 3–30, Feb. 2002, doi: 10.1016/S0378-4347(01)00482-0.
- [58] M. Salary and M. Hadjmohammadi, "Human serum albumin-mimetic chromatography based hexadecyltrimethylammonium bromide as a novel direct probe for protein binding of acidic drugs," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 114, pp. 1–7, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.04.040.
- [59] K. Vuignier, J. Schappler, J.-L. Veuthey, P.-A. Carrupt, and S. Martel, "Drug–protein binding: a critical review of analytical tools," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 1, pp. 53–66, Sep. 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3737-1.
- [60] E. Grushka and N. Grinberg, Eds., *Advances in Chromatography*, 1st ed., vol. 51. CRC Press, 2019.
- [61] D. S. Hage and J. Austin, "High-performance affinity chromatography and immobilized serum albumin as probes for drug- and hormone-protein binding," *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, vol. 739, no. 1, pp. 39–54, Feb. 2000, doi: 10.1016/S0378-4347(99)00445-4.
- [62] H. S. Kim and I. W. Wainer, "Rapid analysis of the interactions between drugs and human serum albumin (HSA) using high-performance affinity chromatography (HPAC)," *J. Chromatogr. B*, vol. 870, no. 1, pp. 22–26, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.jchromb.2008.05.029.
- [63] S. Choi, E. Y. Choi, D. J. Kim, J. H. Kim, T. S. Kim, and S. W. Oh, "A rapid, simple measurement of human albumin in whole blood using a fluorescence immunoassay (I)," *Clin. Chim. Acta*, vol. 339, no. 1–2, pp. 147–156, Jan. 2004, doi: 10.1016/j.cccn.2003.10.002.
- [64] R. P. D. Bank, "RCSB PDB - 1E78: Crystal structure of human serum albumin." <https://www.rcsb.org/structure/1E78> (accessed Jan. 06, 2021).
- [65] M. Chrysanthakopoulos, T. Vallianatou, C. Giaginis, and A. Tsantili-Kakoulidou, "Investigation of the retention behavior of structurally diverse drugs on alpha1 acid glycoprotein column: Insight on the molecular factors involved and correlation with protein binding data," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 60, pp. 24–31, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.ejps.2014.04.015.
- [66] R. P. D. Bank, "RCSB PDB - 3KQ0: Crystal structure of human alpha1-acid glycoprotein." <https://www.rcsb.org/structure/3KQ0> (accessed Jan. 06, 2021).
- [67] M. Molero-Monfort, Y. Martín-Biosca, S. Sagrado, R. M. Villanueva-Camañas, and M. J. Medina-Hernández, "Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport," *J. Chromatogr. A*, vol. 870, no. 1–2, pp. 1–11, Feb. 2000, doi: 10.1016/S0021-9673(99)01067-5.
- [68] F. Tsopeles, P. Danias, A. Pappa, and A. Tsantili-Kakoulidou, "Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes," *J. Chromatogr. A*, vol. 1621, pp. 1–14, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461027.
- [69] M. Rambla-Alegre, "Basic principles of MLC," *Chromatogr. Res. Int.*, vol. 2012, Mar. 2012, doi: 10.1155/2012/898520.
- [70] M. J. Ruiz-Angel and M. García-Álvarez-Coque, "Micellar liquid chromatography: How to start," *LC GC Eur.*, vol. 21, pp. 420–429, Sep. 2008, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.10970-9.
- [71] L. Escuder-Gilabert, R. M. Villanueva-Camañas, S. Sagrado, and M. J. Medina-Hernandez, "Permeability and toxicological profile estimation of organochlorine compounds by biopartitioning micellar chromatography," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 23, no. 4, pp. 382–389, 2009, doi: 10.1002/bmc.1126.
- [72] K. E. Stepnik and I. Malinowska, "The use of biopartitioning micellar chromatography and immobilized artificial membrane column for in silico and in vitro determination of blood–brain barrier penetration of phenols," *J. Chromatogr. A*, vol. 1286, pp. 127–136, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.02.071.



- [73] M. G. Khaledi, "Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective," *J. Chromatogr. A*, vol. 780, no. 1–2, pp. 3–40, Sep. 1997, doi: 10.1016/S0021-9673(97)00610-9.
- [74] "Surfactants & critical micelle concentration (CMC) - DataPhysics Instruments." <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/surfactants-cmc/> (accessed Jan. 09, 2021).
- [75] M. Molero-Monfort, L. Escuder-Gilabert, R. M. Villanueva-Camanas, S. Sagrado, and M. J. Medina-Hernandez, "Biopartitioning micellar chromatography: an in vitro technique for predicting human drug absorption," *J. Chromatogr. B*, vol. 753, pp. 225–236, 2001.
- [76] "Triton® X-100." <https://www.mpbio.com/au/tritonr-x-100> (accessed Jan. 10, 2021).
- [77] "Triton X-100 - Sigma Product Information Sheet." <https://www.snowpure.com/docs/triton-x-100-sigma.pdf> (accessed Jan. 10, 2021).
- [78] X. Liu, A. Li, B. Zhou, C. Qiu, and H. Ren, "Chemiluminescence determination of surfactant Triton X-100 in environmental water with luminol-hydrogen peroxide system," *Chem. Cent. J.*, vol. 3, no. 1, Jul. 2009, doi: 10.1186/1752-153X-3-7.
- [79] K. Ciura and S. Dziomba, "Application of separation methods for in vitro prediction of blood–brain barrier permeability—The state of the art," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 177, pp. 1–12, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.jpba.2019.112891.
- [80] J. J. Martínez-Pla, Y. Martín-Biosca, S. Sagrado, R. M. Villanueva-Camañas, and M. J. Medina-Hernández, "Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability: Biopartitioning micellar chromatography," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 17, no. 8, pp. 530–537, Dec. 2003, doi: 10.1002/bmc.281.
- [81] J. M. Bermúdez-Saldaña, L. Escuder-Gilabert, M. J. Medina-Hernández, R. M. Villanueva-Camañas, and S. Sagrado, "Biopartitioning micellar chromatography: An alternative high-throughput method for assessing the ecotoxicity of anilines and phenols," *J. Chromatogr. B*, vol. 852, no. 1–2, pp. 353–361, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.jchromb.2007.01.041.
- [82] "Γαληνός - Δραστικές ουσίες." <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/lists/substances> (accessed Dec. 23, 2020).
- [83] Κ. Βασιλείου, "Μελέτη έκλυσης φαρμακευτικών μορίων από υγροχρωματογραφία μικυλλίων παρουσία του επιφανειοδραστικού Tween 20 και εφαρμογή στη προσομοίωση βιολογικών διεργασιών," Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα, 2020.
- [84] Ε. Λεβεντάκη, "Εφαρμογή της μικυλλιακής χρωματογραφίας ως εργαλείο για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων υποψήφιων φαρμάκων," Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα, 2020.
- [85] Δ. Παπαηλιού, "Υγροχρωματογραφία μικυλλίων παρουσία του ανιοντικού τασενεργού SDS: Μελέτη μηχανισμού έκλυσης και εφαρμογή στην πρόβλεψη βιολογικών διαδικασιών," Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα, 2020.
- [86] Π. Νάστου, "Εφαρμογή μικυλλιακής χρωματογραφίας ως εργαλείο για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων υποψήφιων φαρμάκων," Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα, 2020.
- [87] F. Tsopeles *et al.*, "Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane chromatography using two stationary phases," *J. Chromatogr. A*, vol. 1396, pp. 25–33, May 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.03.060.
- [88] F. Tsopeles, T. Vallianatou, and A. Tsantili-Kakoulidou, "The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral

- absorption," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 81, pp. 82–93, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.ejps.2015.09.020.
- [89] Λ. Α. Φατούρου, "Συμβολή στη μελέτη φαρμακευτικών ενώσεων με χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών και εφαρμογή στην πρόβλεψη εντερικής απορρόφησης φαρμάκων," Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα, 2020.
- [90] Δ. Αναγνωστοπούλου, "Μελέτη του μηχανισμού έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων από στήλη ακινητοποιημένης ανθρώπινης λευκωματίνης του ορού (HSA) - Συσχέτιση με φαρμακοκινητικά μεγέθη," Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα, 2019.
- [91] Ε. Παρουσή, "Επίδραση του οργανικού διαλύτη στους βιοχρωματογραφικούς δείκτες φαρμάκων με χρήση χρωματογραφίας ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA)," Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα, 2019.
- [92] Α. Μπλάζου, "Υγροχρωματογραφία μικκυλίων παρουσία του μη ιοντικού τασενεργού Triton X-100: Μελέτη μηχανισμού έκλυσης και εφαρμογή στην πρόβλεψη βιολογικών διαδικασιών," Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα, 2021.
- [93] L. Brunton, B. Chabner, and B. Knollman, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12th edition. New York: McGraw-Hill Education / Medical, 2011.
- [94] "Browsing Drugs | DrugBank Online." <https://go.drugbank.com/drugs> (accessed Feb. 06, 2021).
- [95] "Drugs.com | Prescription Drug Information, Interactions & Side Effects," *Drugs.com*. <https://www.drugs.com/> (accessed Feb. 06, 2021).
- [96] "Drug Information System - DrugInfoSys.com." <http://druginfosys.com/> (accessed Feb. 06, 2021).
- [97] K. Valko, S. Nunhuck, C. Bevan, M. H. Abraham, and D. P. Reynolds, "Fast Gradient HPLC Method to Determine Compounds Binding to Human Serum Albumin. Relationships with Octanol/Water and Immobilized Artificial Membrane Lipophilicity," *J. Pharm. Sci.*, vol. 92, no. 11, pp. 2236–2248, Nov. 2003, doi: 10.1002/jps.10494.