



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας (I) Χημικών Επιστημών

Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΙΑ**

Εφαρμογή Μικυλλιακής Χρωματογραφίας παρουσία του τασιενεργού CTAB ως Εργαλείο για την Εκτίμηση Φαρμακοκινητικών Ιδιοτήτων Υποψήφιων Φαρμάκων

ΜΑΡΙΑ ΕΛΕΝΗ ΜΑΖΑΡΑΚΗ

Επιβλέπων:

Φώτιος Τσόπελας

Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούλιος 2021

Περιεχόμενα

Ευρετήριο Εικόνων	4
Ευρετήριο Πινάκων	5
Ευρετήριο Διαγραμμάτων	6
Ευχαριστίες	7
Περίληψη	8
Abstract	10
1. Θεωρητικό Μέρος	12
1.1 Εισαγωγή	12
Βήμα 1: Ανακάλυψη και ανάπτυξη	14
Βήμα 2: Προκλινική έρευνα	16
Βήμα 3: Κλινική ανάπτυξη	20
1.2 Εισαγωγικά για την Χρωματογραφία	23
1.3 Φαρμακοκινητική - Ιδιότητες ADME	24
1.3.1.1 Απορρόφηση	25
1.3.1.2 Διανομή	26
1.3.1.3 Μεταβολισμός	26
1.3.1.4 Απέκκριση	26
1.3.2 Εντερική απορρόφηση και Μεταβολισμός φαρμάκων	27
1.3.3. Βιοδιαθεσιμότητα	28
Παράδειγμα: Μορφίνη	29
Αιτίες χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας	29
1.4 Πρωτεϊνική Σύνδεση	30
1.5 Αιματοεγκεφαλικός Φραγμός	31
1.5.1 Διαμεμβρανική διάχυση	32
1.5.2 Κορεσμένα συστήματα μεταφοράς	32
1.6 Γαστρεντερικός Φραγμός	34
1.7 Απορρόφηση Φαρμάκου από το Στόμα	34
1.8 Λιποφιλία & Αρχή ελάχιστης λιποφιλίας	35
1.8.1 LogP & LogD	36
1.8.2 Lipinski's Rule of 5	39

1.8.3 Όγκος Κατανομής	39
1.9 Χρωματογραφία & Χρησιμότητα	41
1.9.1 Υγρή Χρωματογραφία και Φαρμακευτικές Ουσίες	42
1.10 Βιομιμητική Χρωματογραφία	43
1.10.1 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM)	44
1.10.2 Χρωματογραφία ακίνητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος	45
1.10.3 Βιομιμητική Μικυλλιακή Χρωματογραφία	46
1.10.3.1 Τασιενεργά	47
2. Πειραματικό Μέρος	50
2.1 Σκοπός	50
2.2 Φαρμακευτικές Ενώσεις	50
2.3 Αντιδραστήρια	61
2.4 Οργανολογία	62
2.5 Πειραματική Διαδικασία	64
2.5.1 Κινητή φάση	64
2.5.2 Χρωματογραφική Διαδικασία	64
2.8 Βιβλιογραφικά Δεδομένα	65
2.8.1 Δεδομένα λιποφιλίας & κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου μορίων	65
2.8.2 Δεδομένα Μικυλλιακής Υγροχρωματογραφίας	67
2.8.3 Δεδομένα Χρωματογραφίας Ακίνητοποιημένων Μεμβρανών	69
2.9 Δεδομένα φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων	71
2.9.1 Δεδομένα κυτταρικής διαπερατότητας μέσω επιθηλιακών σειρών εντέρου Caco-2 .	71
2.9.2 Δεδομένα διαπερατότητας μέσω σειρών τεχνητών μεμβρανών, PAMPA	72
2.9.3 Δεδομένα απορρόφησης μέσω της γαστρεντερικής οδού κατά τη χορήγηση από το στόμα (%HOA)	73
2.10 Στατιστική Ανάλυση	75
3. Αποτελέσματα	76
3.1 Αποτελέσματα και υπολογισμός συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση, $\log k_w^{CTAB}$	76
3.2 Συσχέτιση $\log k_w^{CTAB}$ με συντελεστές λιποφιλίας, $\log P$ και $\log D_{7,4}$	78
3.2.1. Συσχέτιση $\log k_w^{CTAB}$ με τον συντελεστή μερισμού, $\log P$	78
3.2.2. Συσχέτιση $\log k_w^{CTAB}$ με τον συντελεστή κατανομής, $\log D_{7,4}$	81

3.3. Συσχέτιση $\log k^{CTAB}$ με συντελεστές κατακράτησης της μικυλλιακής υγροχρωματογραφίας (MLC) διαφορετικών τασιενεργών.....	84
3.3.1 Συσχέτιση $\log k^{CTAB}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό Brij-35, $\log k^{Brij-35}$	84
3.3.2 Συσχέτιση $\log k^{CTAB}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό Tween 20, $\log k^{Tween}$	86
3.3.3 Συσχέτιση $\log k^{CTAB}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό Triton X100, $\log k^{TritonX100}$	87
3.3.4 Συσχέτιση $\log k^{CTAB}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό SDS, $\log k^{SDS}$	88
3.4. Συσχέτιση $\log k^{CTAB}$ με συντελεστές κατακράτησης όπως χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM), $\log k^{IAM-PC-DD2}$.....	89
3.5 Συμπεριφορά κατακράτησης σε pH 5,5	91
3.6 Συσχέτιση με φαρμακοκινητικές ιδιότητες.....	93
3.6.1 Συσχέτιση με την κυτταρική διαπερατότητα μέσω των επιθηλιακών κυτταρικών σειρών του εντέρου, Caco-2.....	93
3.6.2 Συσχέτιση με τη διαπερατότητα μέσω των σειρών τεχνητών μεμβρανών, PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay).....	95
3.6.3 Συσχέτιση με την απορρόφηση μέσω της γαστρεντερικής οδού (Human Oral Absorption, %HOA).....	97
Μοντέλο No 1.....	100
Μοντέλο No 2.....	102
4.Συμπεράσματα	104
5. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	106
Βιβλιογραφία	107

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Η πορεία ανακάλυψης φαρμάκων [67]	13
Εικόνα 2: Η πορεία μελέτης ενώσεων στόχο ως την βελτιστοποίηση τους [66]	14
Εικόνα 3: Σύνοψη της ανακάλυψης του φαρμάκου από την βασική έρευνα μέχρι την τελική έγκριση του [4]	22
Εικόνα 4: Τα κύρια όργανα στα οποία πραγματοποιούνται οι ιδιότητες ADME. [11]	25
Εικόνα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της βιοδιαθεσιμότητας, για ουσίες που δεν έχουν χορηγηθεί με ένεση. [17]	29
Εικόνα 6: Αιματοεγκεφαλικός φραγμός και τρόποι με τους οποίους οι ουσίες τον διασχίζουν [26]	33
Εικόνα 7: Η συμπεριφορά λιπόφιλων μορίων στις μεμβράνες οργανισμών [38]	35
Εικόνα 8: Το σύστημα διαλυτών οκτανόλης - νερού και οι εξισώσεις υπολογισμού των $\log P$ και $\log D$ [42]	37
Εικόνα 9: Η διαδικασία υπολογισμού της λιποφιλίας με την μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης [38]	38
Εικόνα 10: Παράδειγμα για τον υπολογισμό του όγκου κατανομής [48]	40
Εικόνα 11: Παράδειγμα ουσιών και πρωτεϊνών για χρήση ως στατική φάση [52]	43
Εικόνα 12: Η αλληλεπίδραση των διαφορετικών ειδών τασιενεργών με υδρόφοβη μεμβράνη [61]	48
Εικόνα 13: Το χρωματογραφικό σύστημα της Knauer	62
Εικόνα 14: Η στήλη αντιστρόφου φάσεως	63

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Συνήθη μη ιοντικά επιφανειοδραστικά και χρήσεις τους.....	49
Πίνακας 2: Οι φαρμακευτικές ουσίες που μελετήθηκαν	50
Πίνακας 3: Δεδομένα συντελεστή μερισμού ($\log P$), κλασμάτων θετικού (F^+ , F_{zwit}^+) κι αρνητικού (F^- , F_{zwit}^-) φορτίου, σε pH 7,4, και συντελεστή κατανομής ($\log D_{7,4}$, $\log D_{5,5}$), σε pH 7,4 και 5,5.	65
Πίνακας 4: Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της MLC με κινητή φάση ρυθμισμένη σε pH 7,40 και 5,50 και προσθήκη τασιενεργού Brij-35, Tween 20, SDS και TritonX100.	67
Πίνακας 5: Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της IAM με κινητή φάση (PBS σε pH 7,4 και 5,5 και στατική φάση τη στήλη IAM.PC.DD2.....	69
Πίνακας 6: Δεδομένα κυτταρικής διαπερατότητας Caco-2.....	71
Πίνακας 7: Δεδομένα διαπερατότητας PAMPA.....	72
Πίνακας 8: Δεδομένα απορρόφησης μέσω γαστρεντερικής οδού	73
Πίνακας 9: Συντελεστές κατακράτησης σε υδατική φάση, $\log k^{CTAB}$, σε τιμές pH 7,4 και 5,5	76
Πίνακας 10: Μέγιστα και ελάχιστα $\log k$ για άλλες χρωματογραφίες.....	77
Πίνακας 11: Διαφορές στις τιμές συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση, $\log k_w$, για MLC και IAM, και συντελεστή κατανομής, $\log D$, μεταξύ τιμών pH 7,4 και 5,5... ..	91
Πίνακας 12: Φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στο training set	97
Πίνακας 13: Φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στο test set.....	98
Πίνακας 14: Συντελεστές μη γραμμικής παλινδρόμησης με χρήση $\log k^{CTAB Best}$	100
Πίνακας 15: Πειραματικές και προβλεπόμενες τιμές %HOA (Μοντέλο 1)	101
Πίνακας 16: Συντελεστές μη γραμμικής παλινδρόμησης με χρήση $\log k_{max}$	102
Πίνακας 17: Πειραματικές και προβλεπόμενες τιμές %HOA (Μοντέλο 2)	103

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log kw^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log P$.	79
Διάγραμμα 2: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log kw^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log D_{7,4}$. Έκτροπη τιμή: ισονιαζίδιο (πράσινη τιμή κάτω)	82
Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log kw^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log D_{7,4}$.	83
Διάγραμμα 4: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log kw^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log k^{Brij-35}$.	85
Διάγραμμα 5: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log kw^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log k^{Tween}$.	86
Διάγραμμα 6: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log kw^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log k^{Triton}$.	87
Διάγραμμα 7: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log kw^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log k^{SDS}$.	88
Διάγραμμα 8: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log kw^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log k^{IAM.PC.DD2}$	90
Διάγραμμα 9: Συσχέτιση κυτταρικής διαπερατότητας Caco-2 με τους συντελεστές κατακράτησης $\log k^{CTAB}$	93
Διάγραμμα 10: Συσχέτιση διαπερατότητας Caco-2 με τους συντελεστές κατακράτησης $\log k^{CTAB}$	95
Διάγραμμα 11: Συσχέτιση απορρόφησης %HOA με τη μέγιστη τιμή $\log k^{CTAB Best}$	99

Ευχαριστίες

Η διπλωματική μου εργασία, με τίτλο “ Εφαρμογή Μικυλλιακής Χρωματογραφίας παρουσία του τασιενεργού CTAB ως Εργαλείο για την Εκτίμηση Φαρμακοκινητικών Ιδιοτήτων Υποψήφιων Φαρμάκων”, εκπονήθηκε το διάστημα Φεβρουαρίου 2021- Ιουλίου 2021 στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα 1 Χημικών Επιστημών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, Δρ. Φώτιο Τσόπελα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα εργασίας, καθώς και για την συνεργασία που είχαμε τόσο κατά το χρονικό διάστημα των πειραμάτων, όσο και έπειτα κατά την τελική συγγραφή της εργασίας. Μέσα από τις συμβουλές, τις καθοδηγήσεις και τις διορθώσεις του, ολοκλήρωσα την παρούσα εργασία βρίσκοντας πραγματικό ενδιαφέρον στο θέμα μελέτης μου.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Λαμπρινή – Αρετή Τσακανίκα, για την πρακτική βοήθεια που μου προσέφερε τις ώρες του πειράματος, βοηθώντας με να εξοικειωθώ με την καθημερινότητα σε ένα εργαστήριο και με τα ζητήματα που μπορεί να προκύψουν σε αυτό.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την συμφοιτήτρια μου Ολυμπία Τσιώμου για την συνεργασία, συμπαράσταση και κατανόηση που είχαμε καθ’ όλο το διάστημα της εκπόνησης της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου, για τον τρόπο που ο καθένας τους με βοήθησε και μου στάθηκε αυτά τα φοιτητικά χρόνια.

Μαζαράκη Μαρία Ελένη
Αθήνα, Ιούλιος 2021

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε αρχικά ο μηχανισμός έκλυσης φαρμακευτικών δραστικών ουσιών, με την μέθοδο της υγροχρωματογραφίας παρουσία μικυλλίων και χρησιμοποιώντας το κατιοντικό τασιενεργό CTAB. Στην συνέχεια, ο συντελεστής κατακράτησης του κάθε φαρμάκου που προέκυψε πειραματικά, συσχετίστηκε με ορισμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, χρήσιμες εν γένει για την ανάπτυξη και αξιολόγηση νέων φαρμάκων.

Οι δραστικές ενώσεις που μελετήθηκαν ήταν 45 στο σύνολο, ποικίλλης δομής και φαρμακολογικής δράσης. Για τον προσδιορισμό των συντελεστών κατακράτησης, χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση μια συμβατική στήλη αντιστρόφου φάσεως (C18), τοποθετημένη σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C, ενώ ως διαλύτης έκλυσης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ρυθμισμένο σε pH 7,4 παρουσία του κατιοντικού τασιενεργού CTAB. Δεδομένου πως η κυτταρική διαπερατότητα ενδιαφέρει και σε χαμηλότερες τιμές pH κατά την προσομοίωση της απορρόφησης των φαρμάκων μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα, 22 από αυτές τις ενώσεις, κυρίως όξινες και αμφολυτικές, μελετήθηκαν με την χρήση του ίδιου διαλύματος ρυθμισμένο σε pH 5,5.

Όσον αφορά τις συσχετίσεις που πραγματοποιήθηκαν, αρχικά οι συντελεστές κατακράτησης που προέκυψαν ($\log k^{CTAB}$) συσχετίστηκαν τόσο με τον συντελεστή μερισμού, όσο και με τον συντελεστή κατανομής, εξάγοντας και οι δύο, αρκετά επιτυχημένα αποτελέσματα συσχέτισης. Στην συνέχεια, οι ίδιοι συντελεστές κατακράτησης συσχετίστηκαν με τους αντίστοιχους που είχαν προκύψει σε παρόμοια πειράματα με την χρήση διαφορετικών τασιενεργών, αλλά και με τους συντελεστές χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών IAM. Συμπεραίνεται, ότι η συσχέτιση με το μη ιοντικό τασιενεργό Tween 20 ήταν σχεδόν άριστη.

Έπειτα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε η παρατήρηση των διαφορών των συντελεστών κατανομής $\log D$ και κατακράτησης $\log k^{CTAB}$ ανάμεσα στις δύο τιμές pH που μελετήθηκαν, τόσο μεταξύ όλων των τασιενεργών για τα οποία υπήρχαν πειραματικά δεδομένα, όσο και για τη χρωματογραφία IAM. Μιας και το όξινο pH προσομοιάζει την οξύτητα του λεπτού εντέρου, προέκυψε ότι η κατακράτηση των όξινων ουσιών ήταν αυξημένη σε αυτό το pH, ενώ αντίθετα των βασικών μειωμένη. Οι αμφολυτικές ουσίες όπως ήταν αναμενόμενο παρουσίασαν διττή συμπεριφορά, ενώ οι ουδέτερες είχαν ελάχιστες μεταβολές.

Εν τέλει, μελετήθηκε η συσχέτιση με ορισμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Ενδεικτικά, τόσο η συσχέτιση με την κυτταρική διαπερατότητα μέσω επιθηλιακών κυτταρικών σειρών εντέρου Caco-2, όσο και εκείνη με την διαπερατότητα μέσω τεχνητών σειρών

μεμβρανών, PAMPA, ήταν μετρίως ικανοποιητική. Παράλληλα, αναπτύχθηκαν δύο μη γραμμικά μοντέλα για την μοντελοποίηση της γαστρεντερικής απορρόφησης φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα, με το δεύτερο μοντέλο να εξάγει πιο ελπιδοφόρα αποτελέσματα.

Λέξεις Κλειδιά: Βιομημητική Χρωματογραφία, Μικυλλιακή Χρωματογραφία, Υγροχρωματογραφία, CTAB, Λιποφιλία, Φαρμακοκινητική, Κυτταρική διαπερατότητα, γαστρεντερική απορρόφηση, per os απορρόφηση

Abstract

The aim of this diploma thesis was the investigation of the elution mechanism of elution of pharmaceutical active substances, by micellar liquid chromatography, in presence of the cationic surfactant CTAB. Subsequently, the experimentally measured retention factor of each drug, was correlated with certain pharmacokinetic properties, which are generally useful during the development and evaluation of new drugs.

The active compounds which were studied, were 45 in total, varying in both structure and pharmacological activity. For the determination of the retention coefficients, a reverse phase stationary phase was used as the static phase placed in a water bath at 37°C, while the eluent was a phosphate buffer at pH= 7.4 in presence of the cationic surfactant CTAB. However, given the scientific interest, 22 of these compounds, mainly acidic and zwitterions, were also studied at pH= 5.5, considering the interest of cell permeability at lower pH for the modeling of gastrointestinal absorption occurring along the gastrointestinal tract.

Initially, the resulting retention coefficients ($\log k^{\text{CTAB}}$) were correlated with both n-octanol/ water partition and distribution coefficients and the correlations established were followed by good statistics. Retention factors were further correlated with those obtained on micellar chromatography using different surfactants, as well as with retention factors measured on immobilized artificial membrane (IAM) chromatography. It should be noted that the correlation with the non – ionic surfactant Tween 20 was almost excellent.

The effect of ionization was studied by considering differences in $\log k^{\text{CTAB}}$ values between pH 7.4 and 5.5 and comparing results with the corresponding differences in retention factors observed in micellar chromatography using different surfacants, IAM chromatography and logD values. Since the acidic pH mimics the acidity of the small intestine, it turned out that the retention of acidic substances was increased at this pH, while in contrast to the basic ones, decreased. Zwitterions showed dual behavior as expected, and neutrals had minimum changes.

Finally, the correlation between $\log k^{\text{CTAB}}$ values with certain pharmacokinetic properties was studied. Indicatively, the correlation of retention factors in presence of CTAB and cell permeability through intestinal epithelial Caco-2 cell lines, as well as the permeability through artificial membrane lines, PAMPA, were moderately satisfactory. At the same time, two models were constructed in order to model the best correlation for predicting the gastrointestinal absorption of drugs, orally administrated, with the second model generating more promising results

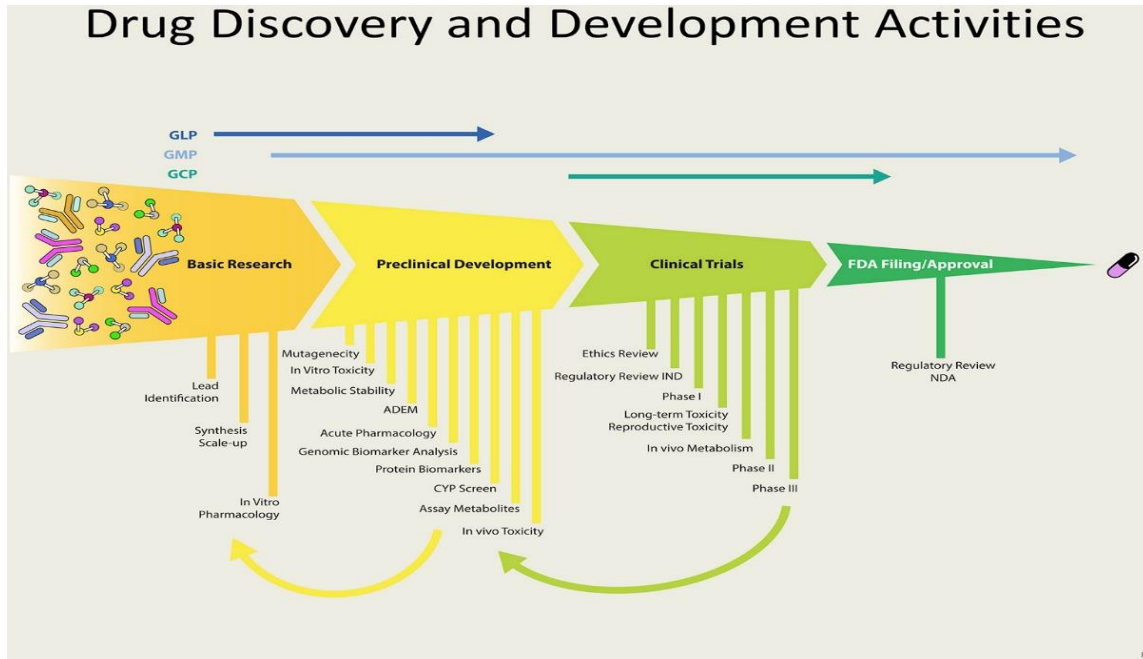
Key words: Biomimetic Chromatography, Micellar Chromatography, Liquid Chromatography, CTAB, Lipophilia, Pharmacokinetics, Cell Permeability, Gastrointestinal Absorption, Per os Absorption

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1 Εισαγωγή

Η ανακάλυψη και δημιουργία νέων φαρμάκων αποτελεί μια πολύτιμη διαδικασία, μιας και αποσκοπεί στην βελτίωση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου και στην καλή του υγεία. Αρκετά συχνά, η ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου ξεκινάει με την ανακάλυψη κάποιου νέου βιολογικού στόχου, όπως για παράδειγμα ενός υποδοχέα που εμπλέκεται σε κάποια βιολογική διαδικασία, δημιουργώντας δυσλειτουργία στον οργανισμό. Τα τελευταία 40 χρόνια η πολυπλοκότητα για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων έχει πολλαπλασιαστεί. Η διαδικασία απαιτεί προκλινικές δοκιμές, διερευνητικές εφαρμογές νέων φαρμάκων και την επιτυχή ολοκλήρωση κλινικών δοκιμών πριν από την έγκριση του καθενός. Ο γενικός στόχος είναι η παροχή αποτελεσματικών και ασφαλών θεραπειών στους ασθενείς, σε σύντομο χρονικό διάστημα, έπειτα από ενδελεχή ιατρική αξιολόγηση. Παράλληλα, έχουν σημειωθεί σημαντικές ανακαλύψεις στον φαρμακευτικό κλάδο ως αποτέλεσμα της καλύτερης κατανόησης της παθολογίας και των βλαβών που ευθύνονται για διάφορες ασθένειες. Έτσι, πλήθος επιστημόνων και ερευνητών αλλά και πολλές άλλες ειδικότητες, απασχολούνται στον συγκεκριμένο κλάδο. Η φαρμακευτική έρευνα εξελίσσεται μονίμως δεδομένων των νέων τεχνολογικών και επιστημονικών ανακαλύψεων, προσφέροντας καινούριες δυνατότητες και ευκαιρίες στον τομέα. Η διαδικασία κατά την οποία επιχειρείται να δημιουργηθεί ένα νέο φάρμακο, αποτελείται από πολλά στάδια, τα οποία προφανώς όχι μόνο πρέπει να χρηματοδοτηθούν αλλά και εκτελούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα μέχρι να ολοκληρωθούν. Οι φαρμακευτικές ενώσεις εξετάζονται ως προς πολλά χαρακτηριστικά τους, όπως η ασφάλεια, η απόδοση, το κόστος και η αποτελεσματικότητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκτέλεση πολλών δοκιμασιών και ιδιαίτερα εντατικών ελέγχων προκειμένου να εξασφαλιστούν οι απαιτούμενες προδιαγραφές. Έχει εκτιμηθεί ότι σχεδόν το 50% των φαρμάκων αποτυγχάνουν λόγω της κακής αποτελεσματικότητάς τους, η οποία περιλαμβάνει ως επί το πλείστον μέτρια βιοδιαθεσιμότητα. Επιπλέον, έως και 40% των υποψηφίων φαρμάκων έχουν αποτύχει στο παρελθόν λόγω ζητημάτων ασφάλειας. Οι περισσότερες αναλύσεις υποδεικνύουν ότι η ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου, από το να προσδιοριστεί ο βιολογικός στόχος μέχρι να εγκριθεί σαν σκεύασμα στο εμπόριο, διαρκεί περισσότερο από 12 χρόνια. Το κόστος στην περίπτωση ανάπτυξης μίας νέας ένωσης μικρού μορίου, ή ενός νέου βιολογικού στόχου, όπως ενός αντισώματος ή μίας πρωτεΐνης εκτιμάται από 1 δισεκατομμύριο έως 2,6 δισεκατομμύρια δολάρια. Γενικά, η διαδικασία ανάπτυξης τους είναι κατά τέτοιον τρόπο συγκροτημένη πλέον, ώστε να αποτυγχάνει γρήγορα και έτσι να μειώνονται τα χρήματα που θα δαπανηθούν για μία μη κερδοφόρα περαιτέρω μελέτη, ή μία δαπανηρή επένδυση στα τελικά στάδια. Έτσι θεωρείται απαραίτητη η βελτιστοποίηση κάθε τμήματος του προκλινικού ελέγχου στην διαδικασία ανάπτυξης

φαρμάκων. Ουσιαστικά, η έγκριση ενός φαρμάκου απαιτεί μεγάλη δέσμευση και την επιλογή κατάλληλου προσωπικού, ώστε να αποφευχθούν λάθος βήματα και να προσεγγίσουν την διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων επιτυχώς.



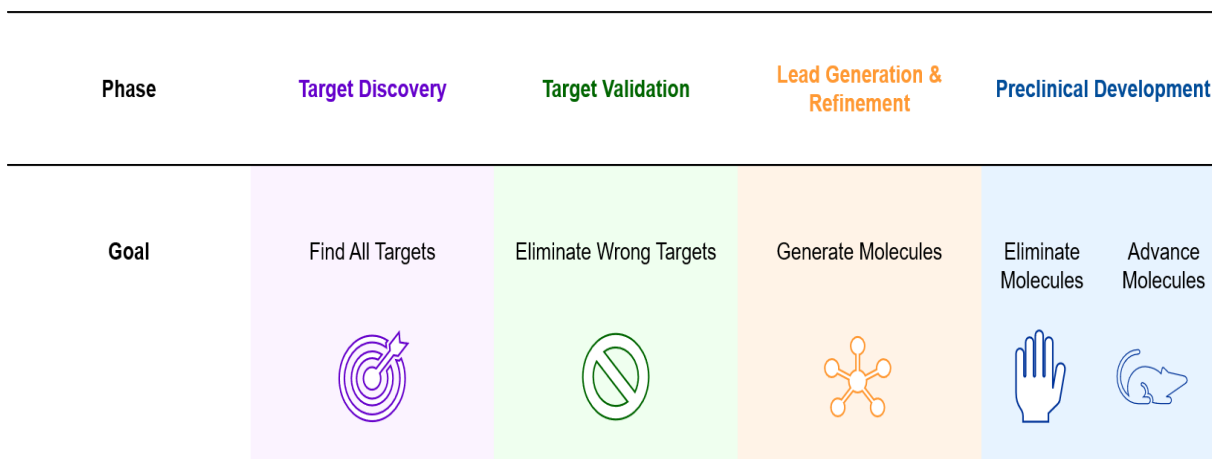
Εικόνα 1: Η πορεία ανακάλυψης φαρμάκων [67]

Φάρμακα, για παράδειγμα, που στοχεύουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) έχουν χαμηλότερα ποσοστά επιτυχίας και απαιτούν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό επιτυχίας που εμφανίζουν τα υποψήφια νευροψυχιατρικά φάρμακα, αφότου εισέλθουν στο στάδιο δοκιμής σε ανθρώπους μέχρι να εγκριθούν στο εμπόριο, είναι χαμηλότερο (περίπου 8,2%) απ’ ότι για όλα τα άλλα φάρμακα αθροιστικά (περίπου 15%). Επιπλέον, ο μέσος όρος κλινικής ανάπτυξης για αυτά τα φάρμακα είναι περίπου 8,7 έτη, σε αντίθεση με τα αντιβιοτικά, των οποίων οι μελέτες διαρκούν περίπου 5,9 έτη. Λαμβάνοντας εν τω μεταξύ υπόψιν και τον χρόνο που χρειάζονται τα φάρμακα κατά την διάρκεια της προκλινικής φάσης ανάπτυξης, τα νευρολογικά φάρμακα μπορεί να διαρκέσουν μέχρι και 18 χρόνια από την αρχική εργαστηριακή αξιολόγηση μέχρι και την τελική έγκριση. [10] [34] [66] [67]

Συνοπτικά, τα βήματα που ακολουθεί η φαρμακοβιομηχανία είναι ως εξής:

Βήμα 1: Ανακάλυψη και ανάπτυξη

Ιστορικά, τα φάρμακα αρχικά ανακαλύπτονταν εντοπίζοντας δραστικές ουσίες άλλων φαρμάκων ή τυχαία. Έπειτα, μέσω της κλασικής φαρμακολογίας και της διερεύνησης χημικών βιβλιοθηκών, καθώς και μελετώντας μικρά μόρια, φυσικά προϊόντα και φυτικά εκχυλίσματα και εντοπίζοντας τα φαρμακευτικά τους αποτελέσματα. Παράλληλα, από την αλληλούχιση του ανθρώπινου DNA, έχουν εντοπιστεί θεραπείες για υπάρχουσες ασθένειες μέσω δοκιμών. Ο κύκλος μίας ασθένειας, οι δοκιμές διάφορων μοριακών ενώσεων, διάφορες υπάρχουσες θεραπείες με απρόβλεπτα αποτελέσματα και νέες τεχνολογίες, αποτελούν κίνητρο για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων συνοπτικά μέσω της παρακάτω πορείας.



Εικόνα 2: Η πορεία μελέτης ενώσεων στόχο ως την βελτιστοποίησή τους [66]

Αναγνώριση στόχου και επικύρωση

Αρχικά, εντοπίζεται ένα γονίδιο ή μία πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο για την ασθένεια. Πρωτίστως, όταν εντοπιστούν, καταγράφονται τα θεραπευτικά χαρακτηριστικά. Ελέγχεται αν είναι αποτελεσματικά, ασφαλείς και αν γίνεται να χρησιμοποιηθούν σαν φάρμακα, ικανοποιώντας κλινικές και εμπορικές απαιτήσεις. Αφότου επικυρωθεί ο στόχος, αναπτύσσονται δοκιμασίες σύνθετου ελέγχου.

Ανάπτυξη και έλεγχος ανάλυσης

Σε αυτές τις δοκιμασίες, το φάρμακο υπόκειται σε δοκιμές προς αξιολόγηση των επιδράσεων του σε κυτταρικό, μοριακό και βιοχημικό επίπεδο.

Έλεγχος υψηλής απόδοσης

Το High Throughput Screening (HTS) χρησιμοποιεί εργαλεία ρομποτικής, λογισμικά επεξεργασίας και ελέγχου δεδομένων, συσκευές χειρισμού ουσιών και ευαίσθητους ανιχνευτές για την γρήγορη διεξαγωγή φαρμακολογικών, χημικών και γενετικών δοκιμών, μειώνοντας έτσι τις ώρες που ο επιστήμονας θα αφιέρωνε για να τις εκτελέσει. Το HTS αναγνωρίζει δραστικές ενώσεις, γονίδια, ή αντισώματα που επηρεάζουν ανθρώπινα μόρια.

Hit 2 Lead

Κατά την διαδικασία Heat to Lead (H2L) αξιολογούνται τα μικρά μόρια που εντοπίστηκαν επιτυχώς και βελτιστοποιούνται, ώστε να γίνουν ακόμα πιο αποδοτικά, μέσω χημικών τροποποιήσεων.

Βελτιστοποίηση ενώσεων οδηγών

Στην διαδικασία βελτιστοποίησης ενώσεων οδηγών, οι ενώσεις που ανακαλύφθηκαν στην προηγούμενη διαδικασία συντίθενται και τροποποιούνται προκειμένου να αυξηθεί η ισχύς τους και να μειωθούν παράλληλα οι παρενέργειες τους. Αυτό καθίσταται εφικτό μέσω πειραματικών δοκιμών χρησιμοποιώντας μοντέλα αποτελεσματικότητας in vivo καθώς και εργαλεία ADME, προς περεταίρω αξιοποίηση της ένωσης οδηγού.

Ενεργή δραστική ουσία

Η ενεργή δραστική ουσία είναι κάποιο ενεργό βιολογικό συστατικό στο υποψήφιο φάρμακο που θα επιφέρει το φαρμακολογικό αποτέλεσμα. Όλα τα φάρμακα αποτελούνται από αυτή την ουσία και τα έκδοχα. Τα τελευταία είναι ανενεργές από χημική άποψη ουσίες που βελτιστοποιούν ορισμένες από τις ιδιότητες του φαρμάκου. Οι δραστικές ουσίες συνήθως είναι μόρια που έχουν μεγάλη δραστηριότητα σε μικρή δοσολογία. Ταξινομούνται αναφορικά με την τοξικότητα τους, την φαρμακολογική δραστηριότητα και χρησιμοποιούνται για σύνθετη ανάπτυξη φαρμάκων για παραπάνω από δέκα στάδια.

Η διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων θα τελειώσει όταν βρεθεί μία ένωση οδηγός για ένα υποψήφιο φάρμακο και τότε θα ξεκινήσει η ανάπτυξη του. [65] [66]

Βήμα 2: Προκλινική έρευνα

Μόλις βρεθεί μία ένωση οδηγός, η ανάπτυξη του φαρμάκου θα ξεκινήσει με την προκλινική έρευνα ώστε να καθοριστεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του. Γενικά, η διαδικασία που ακολουθεί ένα φάρμακο από τον σχεδιασμό του ως τις κλινικές δοκιμές διαρκεί 10 με 12 περίπου χρόνια.

Στην προκλινική έρευνα, οι επιστήμονες ελέγχουν μέσω πειραμάτων στο εργαστήριο ή σε ζώα τις νέες βιοϊατρικές στρατηγικές τους, αυτό το βήμα περιλαμβάνει όσα συμβαίνουν προτού εξεταστεί το φάρμακο σε ανθρώπους. Αντιθέτως, η κλινική έρευνα αναφέρεται σε δοκιμές σε ανθρώπους. Αρχικά στην προκλινική έρευνα, οι επιστήμονες θα διαπιστώσουν αν η ιδέα τους είναι υποσχόμενη. Υπό την προϋπόθεση ότι θα υπάρξουν θετικές ενδείξεις για την πειραματική λειτουργία σε πειράματα *in vitro*, θα ακολουθήσουν *in vivo* πειράματα για περεταίρω πληροφορίες, αναφορικά με την ασφάλεια, την τοξικότητα και την στρατηγική δοσολογίας του υποψήφιου φαρμάκου. Ανάλογα την στρατηγική που θα ακολουθηθεί στην προκλινική μελέτη, τίθενται και τα αντίστοιχα ερωτήματα. Παραδείγματος χάριν, μελέτες εμβολίων αναζητούν ανοσοαποκρίσεις στο αίμα ζώων. Μελέτες μικροβιοκτόνων αναζητούν τυχόν ερεθισμούς σε ορθικά ή κοιλικά στρώματα ζώων, ενώ μελέτες σε πρωτεύοντα εκτός του ανθρώπου μπορεί να δώσουν μια αρχική εικόνα για το αν το υποψήφιο φάρμακο μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο από μια μόλυνση ενδεχομένως.

Οι δύο τύποι προκλινικής έρευνας είναι:

- In Vitro
- In Vivo

Ο FDA (Food and Drug Administration) απαιτεί από τους ερευνητές την χρήση καλών εργαστηριακών πρακτικών (GLP), όπως αυτές έχουν οριστεί από τους κανονισμούς ανάπτυξης ιατρικών προϊόντων, για προκλινικές εργαστηριακές μελέτες. Συγκεκριμένα, οι κανονισμοί αυτοί καλύπτουν τις ελάχιστες βασικές απαιτήσεις για παραμέτρους όπως τις μελέτες συμπεριφοράς, τις εγκαταστάσεις, τον εξοπλισμό, τα γραπτά πρωτόκολλα, τις λειτουργικές διαδικασίες, τις εκθέσεις μελετών καθώς και σύστημα εποπτείας για την διασφάλιση της ποιότητας ούτως ώστε να εξασφαλιστεί η ασφάλεια του εκάστοτε προϊόντος.

Στόχος των προκλινικών μελετών είναι να παρέχουν λεπτομερείς πληροφορίες αναφορικά με τα επίπεδα δοσολογίας και τοξικότητας του φαρμάκου. Αφότου τελειώσουν οι προκλινικές δοκιμές, οι ερευνητές είναι σε θέση να αποφασίσουν αν το φάρμακο δύναται να δοκιμαστεί σε ανθρώπους.

Μέσω των ερευνών διαπιστώνονται τα παρακάτω στοιχεία:

- Πληροφορίες για την απορρόφηση, την κατανομή τον μεταβολισμό και την απέκκριση του φαρμάκου
- Πιθανά οφέλη και μηχανισμοί δράσης του
- Βέλτιστη δοσολογία και τρόπος χορήγησης
- Παρενέργειες και ανεπιθύμητες ενέργειες
- Επιδράσεις που εξαρτώνται από το φύλο και άλλους παράγοντες
- Αλληλεπίδραση με άλλες θεραπείες
- Αποτελεσματικότητα συγκριτικά με παρόμοια φάρμακα

Κατά την διάρκεια των προκλινικών δοκιμών, το φάρμακο θα εξεταστεί πειραματικά σχετικά με την αποτελεσματικότητα, την τοξικότητα και τις φαρμακοκινητικές του ιδιότητες. Οι προκλινικές μελέτες συνεπώς δίνουν στον ερευνητή πληροφορίες αναφορικά με όσα αναφέρθηκαν, αλλά και για την ασφάλεια του φαρμάκου. Συγκεκριμένα, μεγάλες δόσεις φαρμάκου δοκιμάζονται μέσω πειραμάτων *in vitro* και *in vivo*, βέβαια είναι πιθανή και η χρήση μοντέλων υπολογιστών των αλληλεπιδράσεων φαρμάκου – στόχου. Ο στόχος αυτών των μελετών είναι η μετάβαση στο κλινικό στάδιο δοκιμών.

- **Κλινική δοκιμή φάσης 0**

Η μηδενική φάση των δοκιμών περιλαμβάνει μελέτες μικρής δοσολογίας σε ανθρώπους χορηγώντας υποθεραπευτικές δόσεις σε 10-15 άτομα και αποδίδουν φαρμακοκινητικά δεδομένα ή ενισχύουν την απεικόνιση ειδικών στόχων, στερούμενα φαρμακολογικών αποτελεσμάτων. Έτσι, η φαρμακευτική εταιρία αποφασίζει ποια υποψήφια φάρμακα έχουν τις καλύτερες φαρμακοκινητικές παραμέτρους.

- **Φάση I**

Οι δοκιμές σε αυτή τη φάση γίνονται σε μικρό αριθμό υγιών ανθρώπων. Σχεδιάζονται κυρίως για την εκτίμηση της ασφάλειας και της ανεκτικότητας ενός φαρμάκου, δυνητικά μετρείται παράλληλα η φαρμακοκινητική και η φαρμακοδυναμική του φαρμάκου. Τυπικά, αρχικά τα άτομα χωρίζονται σε μικρές ομάδες, κάθε μέλος της οποίας λαμβάνει μία μόνο δόση του φαρμάκου που μελετάται ή ενός placebo. Στην πρώτη ομάδα χορηγείται πολύ μικρή δόση, η οποία αυξάνεται ανά ομάδα, συναρτήσει της ασφάλειας και της ανεκτικότητας. Αυτή η κλιμάκωση της δόσης, σταματά όταν επιτευχθεί η μέγιστη ανεκτικότητα ή έκθεση. Αυτή η ρύθμιση πολλαπλών δόσεων, δίνει τις πρώτες πληροφορίες για τις φαρμακοδυναμικές επιδράσεις. Σε αυτή την φάση μπορεί να διεξαχθούν και

μελέτες για την επίδραση της διατροφής στο φάρμακο και τις πιθανές επιπτώσεις της στην απορρόφηση του.

- **Φάση II**

Οι δοκιμές αυτής της φάσης εκτελούνται σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών και στοχεύουν στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου, παράλληλα, βοηθούν στον καθορισμό της θεραπευτικής δόσης για τις μελέτες της Φάσης III μεγαλύτερης κλίμακας. Η πορεία της δεύτερης φάσης εξαρτάται κυρίως από τον μηχανισμό δράσης της ένωσης.

- **Φάση III**

Οι πληροφορίες που λαμβάνονται σε αυτή τη φάση αφορούν κυρίως τα περισσότερα από τα μακροπρόθεσμα δεδομένα ασφάλειας και είναι τυχαίες ελεγχόμενες πολυκεντρικές δοκιμές. Σε αυτό το στάδιο γίνεται διερεύνηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας του νέου φαρμάκου για διάστημα άνω των 6 ως 12 μηνών ή και περισσότερο, σε μεγάλο πληθυσμό ασθενών (αρκετών εκατοντάδων) σε συνθήκες που αντικατοπτρίζουν την καθημερινή ζωή. Λόγω του μεγέθους τους και της συγκριτικά μεγάλης διάρκειας τους, το κόστος των δοκιμών αυτών είναι πιο υψηλό. Ακόμη, είναι πιο χρονοβόρες και δύσκολες όσον αφορά τον σχεδιασμό τους και την εκτέλεση τους. Συνεπώς, τα φάρμακα που δεν παρουσιάζουν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στην Φάση II, συνήθως δεν προχωράνε σε αυτή την φάση, τελικά αυτό το ποσοστό αφορά περίπου το 25-30% των φαρμάκων.

- **Φάση IV**

Οι δοκιμές αυτής της φάσης παρακολουθούν το φάρμακο μετά την κυκλοφορία του και περιλαμβάνουν την φαρμακοεπαγρύπνηση καθώς και συνεχή τεχνική υποστήριξη μετά την έγκριση. Γενικά, υπάρχουν πολλαπλά σχέδια παρατήρησης και αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας, της ασφάλειας και της σχέσης κόστους- αποτελεσματικότητας στις πραγματικές συνθήκες. Στην τέταρτη φάση ενδέχεται να γίνουν δοκιμές του φαρμάκου σε έναν νέο πληθυσμό, όπως για παράδειγμα σε έγκυες γυναίκες. Αυτό το στάδιο έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει τυχόν σπάνιες ή μακροπρόθεσμες ανεπιθύμητες ενέργειες σε πολύ μεγαλύτερο πληθυσμό και για μεγαλύτερο χρόνο.

Απορρόφηση, διανομή, διάθεση, μεταβολισμός και απέκκριση

Η απορρόφηση, η κατανομή, η διάθεση, ο μεταβολισμός και η απέκκριση, δηλαδή οι ADME ιδιότητες είναι μία διαδικασία ελέγχων ώστε να διαπιστωθεί πώς το φάρμακο θα κινηθεί στον οργανισμό.

In Vivo, In Vitro & Ex Vivo Assays

Αυτές οι τρεις δοκιμές διεξάγονται σε ζωντανούς οργανισμούς ή κύτταρα, μεταξύ των οποίων τα ζώα και οι άνθρωποι, αλλά και σε μη ζωντανούς οργανισμούς ή εκχυλίσματα ιστών. Οι ζωντανοί οργανισμοί μπορεί να περιλαμβάνουν μοντέλα ποντικών, αρουραίων και άλλων. Η in vitro έρευνα αφορά αποκλειστικά αυτή που διεξάγεται στο εργαστήριο. Οι ex vivo έρευνες χρησιμοποιούν ζωικά κύτταρα ή ιστούς από ένα μη ζωντανό ζώο.

Silico Assays

Αυτές οι δοκιμές αφορούν προσδιορισμούς σε πυρίτιο, ή βιολογικά πειράματα που εκτελούνται σε υπολογιστή μέσω προσομοιώσεων. Αναμένεται η αύξηση της χρήσης τους καθώς όλο και βελτιώνεται η υπολογιστική ισχύς τους και η βαθιά γνώση της μοριακής και κυτταρικής βιολογίας.

Χορήγηση φαρμάκων

Η χορήγηση του φαρμάκου είναι συνήθως από το στόμα, τοπική, μέσω μεμβρανών, ενδοφλέβια αλλά και μέσω εισπνοής. Το σύστημα επιλέγεται αναφορικά με το πόσο στοχευμένη είναι η χορήγηση του και η απελευθέρωση του. Πολλές φορές οι φυσιολογικοί φραγμοί είναι πιθανό να εμποδίσουν την στοχευμένη μεταφορά του. Ο στόχος είναι να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση του φαρμάκου με υγιείς ιστούς ενώ εξακολουθεί να διατηρεί την δραστηρότητά του.

1. Χορήγηση μέσω στόματος

Αυτός ο τρόπος χορήγησης είναι αξιόπιστος και οικονομικός. Ενώ η δοσολογία που θα φτάσει στον στόχο, δεν είναι πάντα απόλυτα ακριβής και μπορεί η δράση να εμφανιστεί κάπως αργά, είναι η πιο προτιμητέα μέθοδος από τους ασθενείς.

2. Τοπική χορήγηση

Η τοπική χορήγηση φαρμάκων περιλαμβάνει σκευάσματα όπως αλοιφές, κρέμες, λοσιόν καθώς και διαδερμικά έμπλαστρα. Αυτού του είδους η χορήγηση είναι χρησιμότερη για μυϊκές παθήσεις και προτιμάται λόγω του ότι ο ασθενής μπορεί να την χορηγήσει στον εαυτό του εύκολα.

3. Παρεντερική & Ενδοφλέβια

Στην παρεντερική χορήγηση του φαρμάκου χρησιμοποιούνται σωματικές μεμβράνες, αποφεύγοντας τα επιθηλιακά εμπόδια που τυχάνει να διασχίζουν τα φάρμακα.

Η ενδοφλέβια ένεση αποτελεί μία ταχύτατη μέθοδο απορρόφησης και χορήγησης του φαρμάκου. Η ένεση εξασφαλίζει ότι το 100% της δόσης θα εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος και είναι αποτελεσματικότερη από την παρεντερική ένεση μεμβρανών που προαναφέρθηκε.

Βελτιστοποίηση και βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η διαμόρφωση του φαρμάκου σε προκλινικό και κλινικό στάδιο, πρέπει να διασφαλιστεί ότι το φάρμακο παραδίδεται στον σωστό υποδοχέα σε συγκεκριμένο χρόνο.

Ένα μικρό ποσοστό φαρμάκων που πέρασαν την προκλινική αξιολόγηση οδηγούν σε προϊόν που διατίθεται στο εμπόριο. Συνεπώς, τίθεται ζήτημα βελτιστοποίησης του τρέχοντος προτύπου μελετών, προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη μίμηση στην πολυπλοκότητα των μηχανισμών. [1] – [5] [65] [66]

Βήμα 3: Κλινική ανάπτυξη

Μόλις οι ερευνητές ολοκληρώσουν την προκλινική έρευνα, ακολουθεί το στάδιο των κλινικών δοκιμών και των εθελοντικών μελετών για την βελτιστοποίηση του φαρμάκου.

Πολυπλοκότητα σχεδιασμού μελέτης, συναφή ζητήματα κόστους και υλοποίησης

Οι κλινικές δοκιμές και ο σχεδιασμός τους ενέχουν ορισμένα πολύπλοκα στάδια, λαμβάνοντας επίσης και τα ανάλογα έξοδα καθώς και τα ζητήματα εφαρμογής, έτσι μπορεί να επηρεαστούν οι δοκιμές σε αυτό το στάδιο. Για να ολοκληρωθούν, θα πρέπει να είναι ασφαλείς, να έχουν αποτελεσματικότητα και να ολοκληρώνονται σύμφωνα με το οικονομικό πλάνο που έχει τεθεί για την ανάπτυξη του αντίστοιχου φαρμάκου.

Κλινικές δοκιμές - Μελέτες κλιμάκωσης δόσης, μεμονωμένης ανόδου και πολλαπλών δόσεων

Η αποτελεσματικότητα της φαρμακευτικής αγωγής θα κριθεί μεταξύ άλλων και από την δοσολογία. Κατά την διάρκεια της κλινικής δοκιμής, εξετάζονται οι ποσότητες της κάθε

δόσης, καθώς και οι πολλαπλές δόσεις για να προσδιοριστεί η βέλτιστη που θα επιφέρει το ικανοποιητικό αποτέλεσμα στον ασθενή.

Συλλογή, αποθήκευση & αποστολή βιολογικών δειγμάτων

Τα δείγματα από τις κλινικές δοκιμές συλλέγονται, αποθηκεύονται και αποστέλλονται σύμφωνα με παγκόσμια πρότυπα και κανονισμούς. Είναι σημαντικό να διατηρηθεί η θερμοκρασία τους σύμφωνα με τα πρότυπα και φυσικά την εκάστοτε απαίτηση που τυχόν έχουν.

Φαρμακοκινητική ανάλυση

Η φαρμακοκινητική ανάλυση αφορά πειραματικές δοκιμές που θα δώσουν μία εικόνα του πώς συμπεριφέρεται το φάρμακο στο ανθρώπινο σώμα. Ο όγκος κατανομής όπως και ο τελικός χρόνος ημιζωής καθορίζονται με διάφορα κριτήρια μοντελοποίησης.

Ανάπτυξη και επικύρωση βιοαναλυτικών μεθόδων

Σε μία βιοαναλυτική μέθοδο ανιχνεύονται μεταβολίτες όπως οι δραστικές ουσίες σε βιολογικά ή ανθρώπινα δείγματα, ώστε να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του φαρμάκου. Ένας τέτοιος πλήρης έλεγχος ξεκινάει με την συλλογή δειγμάτων, τον καθαρισμό τους, την ανάλυση τους και την ανίχνευση της δραστικής ουσίας.

Σταθερότητα φαρμάκων και αναλυτών σε βιολογικά δείγματα

Η σταθερότητα είναι απαραίτητη προκειμένου να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και για αυτό χρειάζονται τα βιολογικά δείγματα. Ο μεταβολίτης του κάθε φαρμάκου τείνει να αποικοδομείται γρήγορα, έτσι η συγκέντρωση του φαρμάκου μπορεί να μειωθεί κατά την πορεία του στον οργανισμό.

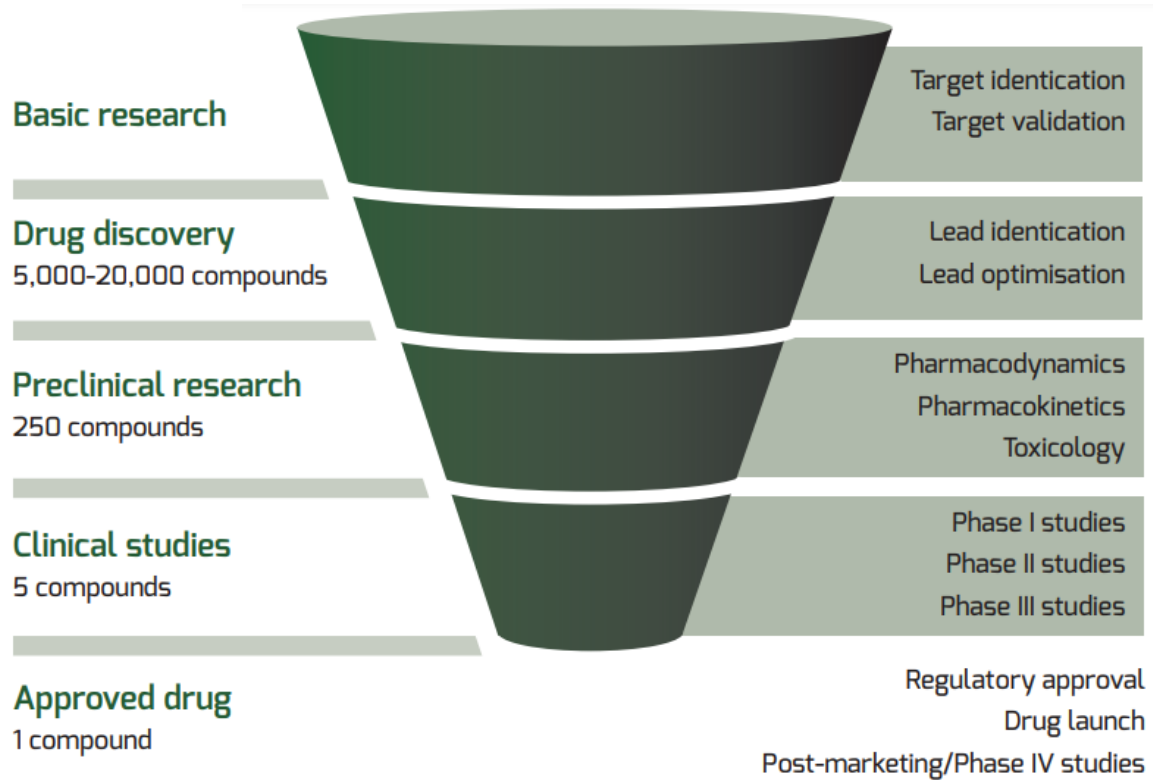
Ανάλυση βιολογικών δειγμάτων για φάρμακα και μεταβολίτες

Ορισμένα από τα βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιούνται για κλινικές δοκιμές είναι το αίμα, τα ούρα, το πλάσμα και τα περιττώματα ώστε να προσδιοριστούν και να αναλυθούν οι ιδιότητες και οι επιδράσεις του φαρμάκου αλλά και των μεταβολιτών του στον οργανισμό.

Προστασία ασθενούς - GCP, HIPAA και αναφορά ανεπιθύμητων συμβάντων

Ο ασθενής πρέπει να είναι προστατευμένος κατά την διάρκεια κλινικών δοκιμών. Συνεπώς οι καλές κλινικές πρακτικές (GCP), νόμοι λογοδοσίας για την ασφάλιση υγείας

καθώς και η αναφορά ανεπιθύμητων περιστατικών στους αρμόδιους για κάθε κράτος φορείς, διασφαλίζει την μέγιστη ασφάλεια τους. [65] [66]



Εικόνα 3: Σύνοψη της ανακάλυψης του φαρμάκου από την βασική έρευνα μέχρι την τελική έγκριση του [4]

1.2 Εισαγωγικά για την Χρωματογραφία

Κατά την διάρκεια ανακάλυψης φαρμάκων, στόχος του επιστήμονα είναι να λάβει τις περισσότερες πληροφορίες για όσες περισσότερες ενώσεις ενδιαφέροντος γίνεται, στον βέλτιστο χρόνο. Η λήψη πειραματικών δεδομένων φαρμακοκινητικής αρχικά από πειραματόζωα παρέχει κρίσιμα δεδομένα για την αξιολόγηση του φαρμάκου. Μία γρήγορη αναλυτική μέθοδος για την μέτρηση της συγκέντρωσης μίας ένωσης στο πλάσμα ή στους ιστούς, θα αποτελούσε πρωταρχικό βήμα για την εξακρίβωση ορισμένων φαρμακοκινητικών παραμέτρων της. Μια αρκετά αξιόπιστη βιοαναλυτική μέθοδος είναι η εφαρμογή τα υγρής χρωματογραφίας συνδυαστικά με φασματομετρικές μάζας, προκειμένου να εκτελεστούν τα *in vivo* πειράματα. Ο αναλυτής οφείλει να είναι σε θέση να επιλέξει την κινητή φάση της HPLC, την σωστή στήλη, καθώς και διάφορες στρατηγικές προετοιμασίας του εκάστοτε δείγματος. [68]

Η υγρή χρωματογραφία τα τελευταία δέκα χρόνια, έχει καταφέρει να αντικαταστήσει πολλές φασματοσκοπικές μεθόδους, αλλά ακόμα και την αέρια χρωματογραφία, σε μεγάλο ποσοστό, κατά τις δοκιμές και τους ελέγχους νέων φαρμακευτικών προϊόντων. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι η υγρή χρωματογραφία θα μπορούσε να λειτουργεί συμπληρωματικά με την αέρια σε ποσοτικές και ποιοτικές αναλύσεις. Ωστόσο πλέον την έχει αντικαταστήσει σχεδόν ολοκληρωτικά. Η υγρή κινητή φάση που έχει την δυνατότητα να τροποποιηθεί ανάλογα την πολικότητα κατά την διάρκεια της χρωματογραφίας, αλλά και όλες οι υπόλοιπες τροποποιήσεις που μπορεί να υποστεί, αναλόγως τα χαρακτηριστικά της ουσίας προς δοκιμή, είναι μεγάλο πλεονέκτημα κατά την διαδικασία του διαχωρισμού, συγκριτικά με άλλες αναλυτικές μεθόδους. Η σωστή επιλογή της στατικής φάσης είναι επίσης ένας παράγοντας που επιδρά στην ποιότητα του διαχωρισμού. Σκοπός της κάθε χρωματογραφίας είναι η επιβεβαίωση της ταυτότητας του κάθε φαρμάκου, η εξαγωγή ποσοτικών αποτελεσμάτων καθώς και η εξέλιξη της προόδου της θεραπείας μίας ασθένειας.

Μια από τις πιο κοινές χρήσεις της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αφορά τις αναλύσεις σε βιολογικά υγρά, ιδιαιτέρως στο πλάσμα, στον ορό ή στα ούρα. Ειδικότερα το αίμα, το πλάσμα και ο ορός είναι ενώσεις που συχνά υπάρχουν σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του αναλύτη. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των φαρμάκων και των ενδογενών ενώσεων, οι δομικές διαφορές είναι πολύ μικρές. Επίσης, μπορεί η δραστική ουσία να συνδεθεί με την πρωτεΐνη του πλάσματος, και έτσι η ποσότητα της ελεύθερης ένωσης που θα μετρηθεί να είναι χαμηλότερη. Ο αναλυτής λοιπόν αντιμετωπίζει διάφορα ζητήματα αναφορικά με την απομόνωση του φαρμάκου αλλά και την επιλογή των κατάλληλων παραμέτρων, ώστε να έχει όσο το δυνατόν καλύτερα αποτελέσματα. Στην υγρή χρωματογραφία, ορισμένα συστατικά μπορεί επίσης να απορροφούν πολύ ήπια στις υπεριώδεις ακτίνες.

Στην υγρή χρωματογραφία μικκυλίων χρησιμοποιείται κινητή φάση που περιέχει μικκύλια, σε αντίστροφη φάση. Οι ηλεκτροστατικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της διαλυμένης ουσίας και της κινητής και στατικής φάσης είναι που επιτρέπουν τον αποτελεσματικό διαχωρισμό τους, σε δείγματα διαφορετικής φύσης. Αυτό το είδος χρωματογραφίας πλεονεκτεί λόγω του χαμηλού του κόστους, της τοξικότητας του, της ικανότητας βιοαποικοδόμησης του διαλύτη και της εύκολης διάλυσης αναλυτικών δειγμάτων. [65]

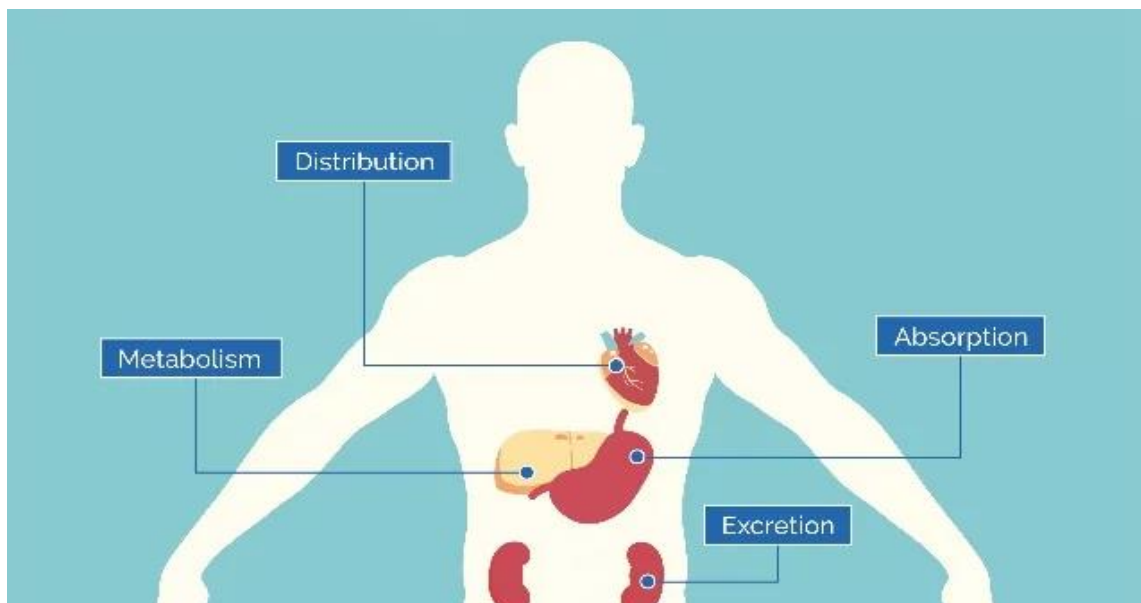
1.3 Φαρμακοκινητική - Ιδιότητες ADME

Τα χαρακτηριστικά ADME παίζουν βασικό ρόλο στην ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Το υποψήφιο φάρμακο δεν πρέπει μόνο να έχει επαρκή αποτελεσματικότητα αναφορικά με τον θεραπευτικό στόχο, αλλά να συνδυάζει επιπλέον και κατάλληλες ιδιότητες ADME στην θεραπευτική δόση. Οι μελέτες αυτές σχεδιάζονται για να διερευνήσουν τον τρόπο που ο ανθρώπινος οργανισμός θα επεξεργαστεί μια χημική ουσία. Οι ανεπαρκείς ADME ιδιότητες πιθανώς να είναι καταστροφικές για την κατά τα άλλα καλή δραστηριότητα των φαρμάκων.

Οι μελέτες ADME απαντούν στις εξής βασικές ερωτήσεις:

1. Απορρόφηση: Πόσο απορροφάται το φάρμακο και πόσο γρήγορα;
2. Κατανομή: Που διανέμεται το φάρμακο στο ανθρώπινο σώμα; Σε τι ποσοστό και έκταση;
3. Μεταβολισμός: Πόσο γρήγορα μεταβολίζεται το φάρμακο; Με τι μηχανισμό δράσης; Από τους μεταβολίτες που σχηματίζονται ποιοι είναι τοξικοί και ποιοι ενεργοί;
4. Αποβολή: Πώς και με ποια ταχύτητα απεκκρίνεται το φάρμακο;
5. Τοξικότητα: Υπάρχει ενδεχόμενο το φάρμακο να έχει τοξική επίδραση στον οργανισμό;

Υπολογίζεται, ότι περίπου 50% των υποψήφιων φαρμάκων αποτυγχάνουν λόγω κακής αποτελεσματικότητας, αλλά και ένα 40% λόγω τοξικότητας. Είναι γνωστό ότι οι μελέτες ADME διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία του φαρμάκου και λόγω αυτού του αντίκτυπου που έχουν στην τελική έγκριση του, ξεκινούν πολύ νωρίς στην διαδικασία ανακάλυψης του. [6] [7] [12]



Εικόνα 4: Τα κύρια όργανα στα οποία πραγματοποιούνται οι ιδιότητες ADME. [11]

Οι μελέτες ADME αποτελούν συντομογραφία της απορρόφησης, διανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης και αφορούν το υποψήφιο φάρμακο. Εάν προστεθούν και οι τοξικολογικές δοκιμές σε αυτή την διαδικασία, οι μελέτες ονομάζονται ADMET.

1.3.1.1 Απορρόφηση

Η απορρόφηση, περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο μια χημική ουσία θα εισέλθει στο σώμα, και αφορά την μετακίνηση της από το σημείο χορήγησης της στην κυκλοφορία του αίματος που είναι και το ζητούμενο. Από τους 4 διαθέσιμους τρόπους χορήγησης του φαρμάκου, δηλαδή μέσω της κατάποσης, της εισπνοής, της δερματικής χορήγησης και της ενδοφλέβιας, μόνο η τελευταία μέθοδος επιτρέπει στο φάρμακο να φτάσει απευθείας στο κυκλοφορικό σύστημα. Σε κάθε άλλη περίπτωση, πρέπει να διασχίσει μία μεμβράνη προκειμένου να φτάσει στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτό θα συμβεί με 4 τρόπους.

1. Παθητική διάχυση: Η μετακίνηση του φαρμακομορίου από περιοχή υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχή χαμηλής, που αποτελεί και τον πιο συνηθισμένο τρόπο απορρόφησης του.
2. Διευκόλυνση διάχυσης: Η μετακίνηση του μορίου από περιοχή υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχή χαμηλής, βοηθούμενη από τις πρωτεΐνες φορέα στη μεμβράνη.
3. Ενεργή διάχυση: Διαδικασία κατά την οποία το φαρμακομόριο απαιτεί ενέργεια υπό μορφή ATP, προκειμένου να διασχίσει την μεμβράνη.
4. Ενδοκυττάρωση: Η μεταφορά ενός μεγαλύτερου φαρμάκου μέσω μεμβράνης, μέσω εμβολιασμού της μεμβράνης.

1.3.1.2 Διανομή

Αφότου απορροφηθεί το φάρμακο, θα μετακινηθεί από την θέση που βρισκόταν, στους ιστούς. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, ή από κύτταρο σε κύτταρο. Η κίνηση της κάθε ουσίας και η έκταση της κατανομής εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως η ροή του αίματος, η λιποφιλία, η σύνδεση των ιστών και το μοριακό μέγεθος του φαρμάκου.

1.3.1.3 Μεταβολισμός

Ο μεταβολισμός του φαρμάκου αφορά κυρίως την βιομετατροπή του από όργανα ή ιστούς, προκειμένου να μπορέσει να απεκκριθεί. Η ένωση, γίνεται πιο υδατοδιαλυτή, ούτως ώστε να διευκολυνθεί η απομάκρυνση του μέσω των περιττωμάτων ή των ούρων. Σε αυτό το σημείο ο μεταβολισμός μπορεί να δημιουργήσει τοξικούς μεταβολίτες. Αυτά τα δεδομένα παρέχουν στους ερευνητές πληροφορίες προκειμένου να προσδιορίσουν την ασφάλεια ή την ενδεχόμενη τοξικότητα του νέου φαρμάκου και είναι απαραίτητα για την ασφαλή φαρμακευτική ανάπτυξη.

1.3.1.4 Απέκκριση

Στο τελικό αυτό στάδιο η ένωση που έχει μεταβολιστεί αποβάλλεται από το σώμα. Είναι χρήσιμο να γνωρίζουμε πόσο γρήγορα απεκκρίνεται το φάρμακο καθώς και την πορεία που θα ακολουθήσει. Η οδός απέκκρισης του φαρμάκου έχει να κάνει συνήθως με το μοριακό του μέγεθος και το φορτίο του. Η κακή απέκκριση των μεταβολικών προϊόντων μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση τους και σε δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό.

Τα δεδομένα που θα συλλεγούν κατά την διάρκεια των ADME μελετών θα βοηθήσουν τον επιστήμονα να διαπιστώσει αν το υποψήφιο φάρμακο είναι βιώσιμο και πληροί τους στόχους για μελλοντική έρευνα και ανάπτυξη. Το ενδεχόμενο να χαρακτηριστεί ακατάλληλο ένα φάρμακο στα τελευταία στάδια μελέτης του μπορεί να είναι πολύ δαπανηρό, οπότε οι κακές φαρμακοκινητικές ιδιότητες του είναι ένας σημαντικός λόγος για την έγκαιρη απόρριψη του στις κλινικές δοκιμές.

Επί του παρόντος, σχεδόν όλες οι δοκιμασίες που σχετίζονται με τις ADME ιδιότητες πραγματοποιούνται από διαθέσιμες αυτοματοποιημένες πλατφόρμες τεχνολογίας σε συνδυασμό με υψηλής ανάλυσης υγρή χρωματογραφία ή και φασματομετρίες μάζας (LC/MS), όπου έχουν επιταχύνει σημαντικά τη δημιουργία δεδομένων ADME για λήψη αποφάσεων κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του φαρμάκου. [8] [11] [13] [14]

1.3.2 Εντερική απορρόφηση και Μεταβολισμός φαρμάκων

Εντερική Απορρόφηση

Η στοματική χορήγηση είναι συνήθως η πιο επιθυμητή οδός για το φάρμακο. Επομένως, είναι σημαντικό να αναπτύσσονται φάρμακα των οποίων η απορρόφηση να γίνεται αποτελεσματικά μέσω του εντερικού επιθήλιου.

Οι λιπόφιλες ενώσεις μπορούν να διασχίσουν ευκολότερα την μεμβράνη του πλάσματος και έτσι μεταφέρονται διακυτταρικά. Αντιθέτως, οι υδρόφιλες ενώσεις είναι συνήθως αδιαπέραστες κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι μεταφέρονται συνήθως παρακυτταρικά. Πέραν της παθητικής διάχυσης ορισμένες ουσίες όπως τα αμινοξέα και η γλυκόζη μεταφέρονται ενεργά από ορισμένους μεταφορείς, διεργασία ιδιαίτερα δαπανηρή.

Μεταβολισμός φαρμάκων

Το υποψήφιο φάρμακο που θα απορροφηθεί από το στόμα θα μεταφερθεί αρχικά μέσω της πυλαίας φλέβας στο ήπαρ, ούτως ώστε να υποβληθεί σε ηπατικό μεταβολισμό και έπειτα να αποβληθεί ως χολή ή μέσω των νεφρών. Ο μεταβολισμός των φαρμάκων αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για πολλές σημαντικές ιδιότητες του φαρμάκου.

- **Μεταβολική σταθερότητα:** Το φάρμακο που μεταβολίζεται γρήγορα απαιτεί μεγαλύτερη ημερήσια δόση ή συνεχή έγχυση προκειμένου να διατηρηθεί το επαρκές θεραπευτικό επίπεδο στο πλάσμα. Από την άλλη, ένα φάρμακο που δεν μεταβολίζεται γρήγορα, θα μπορούσε να έχει παρατεταμένο χρόνο ημιζωής, γεγονός που επηρεάζει την ασφάλεια του.
- **Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ναρκωτικών και φαρμάκων:** συνήθως η βασική αιτία για την οποία αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι η παρεμβολή του μεταβολισμού του ενός στον μεταβολισμό του άλλου, λόγω συγχορηγούμενων φαρμάκων
- **Τοξικότητα στα φάρμακα:** ένα φάρμακο μπορεί να θεωρηθεί μη τοξικό ή αρκετά τοξικό από τον μεταβολισμό.

Συνεπώς, συνήθως η αδυναμία των επιστημόνων να προβλέψουν τις ιδιότητες ενός φαρμάκου σε ανθρώπους, κάνοντας χρήση των δεδομένων που έχουν λάβει από μελέτες σε εργαστηριακά ζώα, σχετίζονται με τις διαφορές των ειδών στον μεταβολισμό των φαρμάκων. [16]

1.3.3. Βιοδιαθεσιμότητα

Τα φαρμακοκινητικά δεδομένα, ένα από τα οποία είναι και η βιοδιαθεσιμότητα, σχετίζονται με την βέλτιστη προσαρμογή της δοσολογίας που θα χορηγηθεί στον ασθενή, προκειμένου να επιτευχθεί το καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα χωρίς να υπάρξουν παρενέργειες.

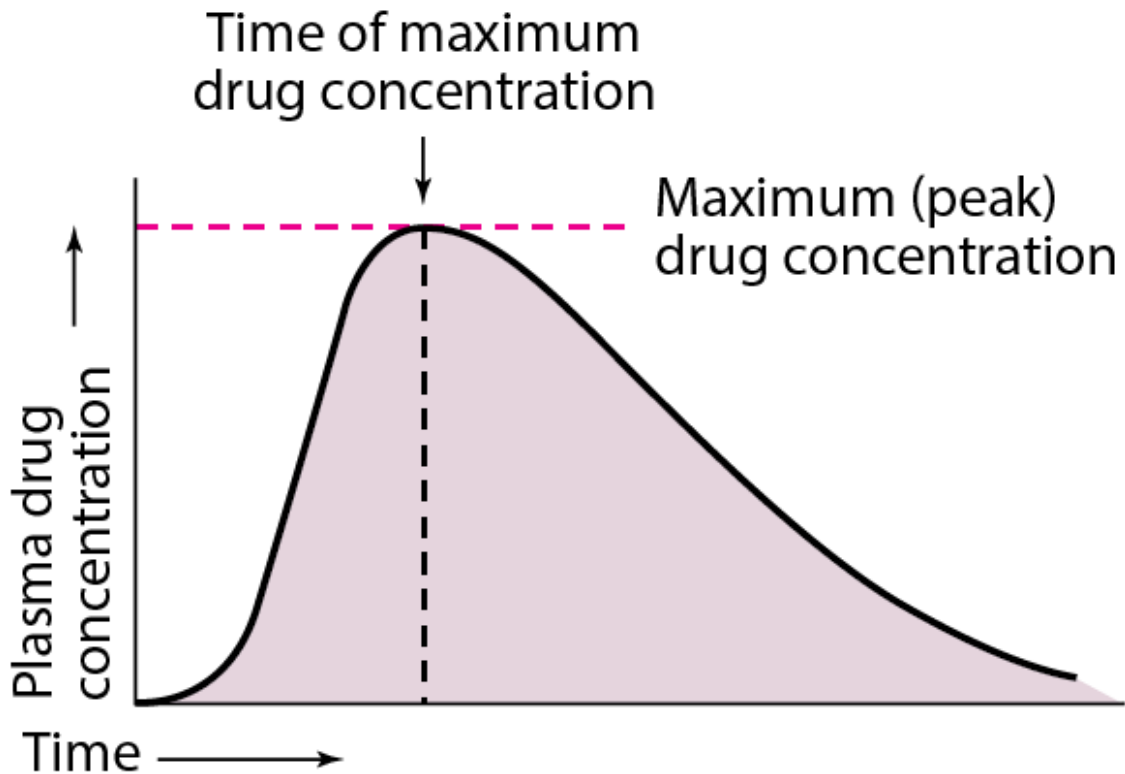
Η βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται στο ποσοστό του φαρμάκου που καθίσταται πλήρως διαθέσιμο στον βιολογικό του στόχο. Είναι ουσιαστικά, μέτρο του ρυθμού του κλάσματος της αρχικής δόσης του φαρμάκου που θα φτάσει επιτυχώς στον στόχο, ο οποίος μπορεί να είναι το σημείο δράσης ή ένα τμήμα σωματικού υγρού. Συνεπώς, η βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται ως το κλάσμα της δραστικής μορφής του φαρμάκου που θα φτάσει αμετάβλητο στην κυκλοφορία. Τονίζεται εδώ, ότι η βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων που δεν απαιτούν πρόσβαση στην κυκλοφορία του αίματος για να δράσουν, μετράται με διαφορετικές παραμέτρους.

Επίσης, αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της μελέτης της φαρμακοκινητικής. Η οδός χορήγησης και η δόση του φαρμάκου θα έχουν σημαντική επίδραση στον ρυθμό και την έκταση της βιοδιαθεσιμότητας. Είναι καλό να γνωρίζουμε ότι ένα φάρμακο με χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα απαιτεί μεγαλύτερη δόση ούτως ώστε να υπερβεί το ελάχιστο όριο βιοδιαθεσιμότητας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η δοσολογία του φαρμάκου είναι έμμεσα ανάλογη με την βιοδιαθεσιμότητα του.

Αναφέρεται επιπλέον, ότι η βιοδιαθεσιμότητα σε ένα φάρμακο που χορηγείται ενδοφλέβια αναμένεται 100%, ενώ για τα φάρμακα που χορηγούνται με διαφορετικό τρόπο μπορεί να εκτιμηθεί διαιρώντας την μάζα του φαρμάκου που θα φτάσει στο πλάσμα με την συνολική μάζα του χορηγούμενου φαρμάκου.

Ανάλογα με το πόσο αποτελεσματικά διασχίζει το φάρμακο τις διάφορες βιολογικές μεμβράνες όπως του δέρματος ή του στομάχου, ή αν οι ιστοί και τα όργανα που θα διασχίσει η ουσία την μεταβολίσουν, η βιοδιαθεσιμότητα λαμβάνει αντίστοιχες τιμές. Καταλήγοντας, το φαρμακοκινητικό αυτό μέγεθος μετράται σε συνεχές εύρος από το 0 ως το 1, αλλά μπορεί να αναπαρασταθεί επίσης και ως ποσοστό.

Οι θεραπευτικές φαρμακευτικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμές βιοδιαθεσιμότητας, ούτως ώστε να διασφαλιστεί αξιόπιστη δοσολογία κατά την διάρκεια της θεραπείας. Η δοσολογία είναι παράγοντας που επηρεάζει την βιοδιαθεσιμότητα. Επίσης, το να γνωρίζουμε αν τα διάφορα σκευάσματα φαρμάκων είναι ισοδύναμα είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την επιλογή της εκάστοτε φαρμακευτικής αγωγής. [17] – [20]



Εικόνα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της βιοδιαθεσιμότητας, για ουσίες που δεν έχουν χορηγηθεί με ένεση. [17]

Παράδειγμα: Μορφίνη

Η χορήγηση της μορφίνης per os έχει περίπου 25% βιοδιαθεσιμότητα, λόγω του μεταβολισμού πρώτης διόδου στο ήπαρ. Συνεπώς, η δόση που θα χορηγηθεί με αυτόν τον τρόπο θα πρέπει να είναι περίπου 3 με 5 φορές μεγαλύτερη, συγκριτικά με την ενδοφλέβια δόση μορφίνης.

Η συνήθης μέθοδος μέτρησης της βιοδιαθεσιμότητας, ενός σκευάσματος που προορίζεται για χορήγηση από το στόμα, αποτελείται αρχικά από την ενδοφλέβια χορήγηση του φαρμάκου σε ομάδα εθελοντών. [21]

Αιτίες χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας

Τα φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα, διέρχονται από το εντερικό τοίχωμα, στην κυκλοφορία και έπειτα στο ήπαρ. Αυτές οι θέσεις αποτελούν ταυτόχρονα θέσεις που

μεταβολίζεται ένα φάρμακο προτού περάσει στην κυκλοφορία του αίματος. Επομένως είναι πιθανό διάφορα φάρμακα να μεταβολιστούν πριν επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση τους στο πλάσμα. Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα λοιπόν, είναι συχνότερη στην *per os* απορρόφηση του φαρμάκου, ειδικότερα σε υδατοδιαλυτές μορφές αργά απορροφούμενων φαρμάκων.

Παράλληλα, άλλες αιτίες χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας θα μπορούσαν να είναι η αργή απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα, η ικανότητα του φαρμάκου να διεισδύσει στην επιθηλιακή μεμβράνη, η πολικότητα του και η φόρτιση του. Τέλος, διάφορες χημικές αντιδράσεις που μειώνουν στην απορρόφηση τείνουν να μειώνουν και την βιοδιαθεσιμότητα. Αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν τον σχηματισμό ενός συμπλόκου, υδρόλυση από το γαστρικό οξύ, σύζευξη στο εντερικό τοίχωμα, καθώς και προσρόφηση σε άλλα φάρμακα. [17]

1.4 Πρωτεϊνική Σύνδεση

Η δέσμευση φαρμάκων στο πλάσμα και στις πρωτεΐνες είναι σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την φαρμακοκινητική και την φαρμακοδυναμική του. Ως γνωστόν η ελεύθερη μορφή του φαρμάκου είναι εκείνη που μπορεί να ασκήσει φαρμακολογική δραστηριότητα, ενώ η δεσμευμένη είναι κυρίως ανενεργή. Πολλά φάρμακα όταν συνδέονται με τις πρωτεΐνες δημιουργούν σύμπλοκα, ενώ η σύνδεση είναι συνήθως αναστρέψιμη και η μη δεσμευμένη μορφή του φαρμάκου ισορροπεί με την δεσμευμένη. Στην πλειοψηφία τους, τα φάρμακα συνδέονται με πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη, οι γλυκοπρωτεΐνες, οι λιποπρωτεΐνες και βιολογικά τμήματα όπως τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Η δέσμευση του φαρμάκου στις πρωτεΐνες μπορεί γενικά να ενισχύσει ή να μειώσει την αποδοτικότητα του. Συγκεκριμένα, οι ουσίες που είναι σε μικρό ποσοστό συνδεδεμένες με πρωτεΐνες, θα διεισδύσουν στους ιστούς καλύτερα από αυτές που είναι σε μεγάλο βαθμό δεσμευμένες. Μεταξύ των φαρμάκων που δεσμεύονται σε ποσοστό μικρότερο του 80-85%, οι κλινικές διαφορές δεν έχουν μεγάλη σημασία. Οι ουσίες όμως που θα δεσμευτούν υπερβολικά, μπορεί να διαφέρουν σημαντικά στην διείσδυση ιστών και στον χρόνο ημιζωής, από αυτές που θα έχουν δεσμευτεί ελάχιστα. Στην περίπτωση που το ποσοστό του δεσμευμένου φαρμάκου είναι μεγαλύτερο στο ανθρώπινο αίμα, απ' ότι σε διάλυμα λευκωματίνης, υπάρχει ενδεχόμενο η ουσία να δεσμεύεται *in vivo* σε κάποια από τις άλλες πρωτεΐνες πλάσματος και όχι στην αλβουμίνη.

Η αναστρέψιμη σύνδεση φαρμάκου - πρωτεΐνης επηρεάζει φαρμακοκινητικές παραμέτρους όπως ο όγκος κατανομής. Ο όγκος που αποκτά το σύμπλοκο αυτό, περιορίζει την ικανότητα του να εγκαταλείψει τον αγγειακό χώρο και να εισέλθει στα

κύτταρα, μειώνοντας έτσι την κατανομή του. Επίσης το σύμπλοκο αυτό είναι πολύ μεγάλο για να φιλτραριστεί και να αποβληθεί από τα νεφρά. Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου το σύμπλοκο δεν θα είναι διαθέσιμο για μεταβολισμό, μπορεί να συσσωρευτεί στον οργανισμό με τοξικές συνέπειες. Καταστάσεις όπως η νεφρική ή η ηπατική ανεπάρκεια και η εγκυμοσύνη μπορούν να μεταβάλλουν το ποσοστό δέσμευσης των πρωτεϊνών και κατ' επέκταση την θεραπευτική δόση του φαρμάκου. Παράλληλα, η δέσμευση των πρωτεϊνών μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις φαρμάκων όταν αυτά στοχεύουν στο ίδιο ένζυμο ή υποδοχέα. Προκειμένου να διαχωριστεί το δεσμευμένο και το μη δεσμευμένο κλάσμα φαρμάκου από δείγμα πλάσματος, χρησιμοποιούνται μέθοδοι όπως η υπερδιήθηση, η υπερφυγοκέντρωση και η αιμοκάθαρση ισορροπίας.

Κάθε πρόγραμμα ανάπτυξης φαρμάκων θα πρέπει να λαμβάνει υπόψιν του την δέσμευση πρωτεϊνών πλάσματος, ώστε να διασφαλίζει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του. [22] - [24]

1.5 Αιματοεγκεφαλικός Φραγμός

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός αποτελεί ένα κυτταρικό φράγμα που ελέγχει αυστηρά το μικροπεριβάλλον του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψιν στην δημιουργία φαρμάκων για διάφορες νευρολογικές ασθένειες, τόσο επειδή η βλάβη του θα μπορούσε να οδηγήσει σε σοβαρά προβλήματα υγείας, όσο και επειδή η διέλευση του BBB (Blood Brain Barrier) είναι απαραίτητο φαινόμενο για την επίτευξη θεραπευτικής δράσης σε προβλήματα που σχετίζονται με το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός σχηματίζεται από μία μονοαστοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων μεταξύ του αίματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος, προκειμένου να διατηρείται η δομική και η λειτουργική ομοιότητα του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, ρυθμίζει την είσοδο μακρομορίων, ιόντων αλλά και νευροδιαβιβαστών από το αίμα στον εγκέφαλο, περιορίζοντας παράλληλα την είσοδο νευροτοξικών ουσιών και διατηρώντας ένα σταθερό περιβάλλον για την καλύτερη λειτουργία των νευρώνων, αλλά και για την πρόληψη κρίσιμων προβλημάτων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Αυτό το εξαιρετικά επιλεκτικό διαπερατό φράγμα, διευκολύνει την παθητική διάχυση ορισμένων αερίων, νερού και λιποδιαλυτών μορίων, απαραίτητων για την αποτελεσματική νευρική λειτουργία.

Η ύπαρξη του φραγμού αυτού αφορά την προστασία του εγκεφάλου από τοξίνες ή παθογόνους μικροοργανισμούς που θα μπορούσαν να προκαλέσουν εγκεφαλικές

λοιμώξεις, ενώ παράλληλα επιτρέπει στα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά να προσεγγίσουν τον εγκέφαλο. Ένας άλλος ρόλος του, είναι να διατηρεί σχετικά σταθερά τα επίπεδα ορμονών, θρεπτικών ουσιών και νερού στον εγκέφαλο.

Μια βακτηριακή λοίμωξη, θα μπορούσε να επηρεάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Για παράδειγμα, τα μηνιγγιτιδοκοκκικά βακτήρια, προσκολλώνται στο ενδοθηλιακό τοίχωμα, προκαλώντας ελαφρώς ανοιχτούς κόμβους, με αποτέλεσμα το φράγμα να γίνεται πιο πορώδες, επιτρέποντας σε άλλα βακτήρια και τοξίνες να μολύνουν τον εγκεφαλικό ιστό. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε σοβαρή φλεγμονή αλλά και θάνατο.

Οι ουσίες είναι σε θέση να διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσω διάφορων μηχανισμών. Αυτοί αποτελούνται από την διαμεμβρανική διάχυση, την κορεσμένη μεταφορά, την προσροφητική ενδοκύτωση και τις εξωκυτταρικές οδούς.

1.5.1 Διαμεμβρανική διάχυση

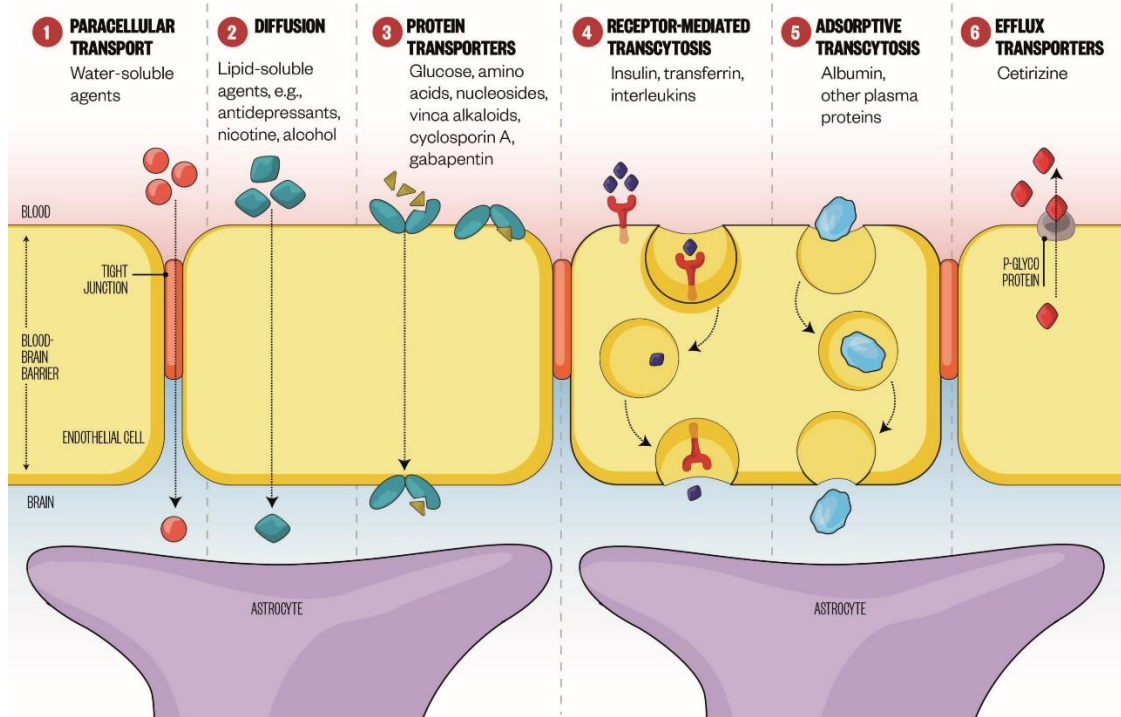
Τα περισσότερα φάρμακα διασχίζουν το BBB με διαμεμβρανική διάχυση. Αυτός ο μηχανισμός εξαρτάται από την τήξη του φαρμάκου στην κυτταρική μεμβράνη, φάρμακα με χαμηλό μοριακό βάρος και υψηλή διαλυτότητα ευνοούνται κατά την διέλευση. Το φάρμακο θα πρέπει στη συνέχεια να χωριστεί στο υγρό του εγκεφάλου προκειμένου να έχει αποτέλεσμα. Παράλληλα, εκτός από την διαλυτότητα, παίζουν ρόλο στην διάχυση εντός του BBB το φορτίο, η τριτογενής δομή και ο βαθμός δέσμευσης στις πρωτεΐνες. Κύριος όμως παράγοντας είναι το μοριακό βάρος. Σε αυτό το σημείο ο κανόνας του Lipinski αποδεικνύεται ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο προκειμένου να προβλεφθούν ιδιότητες μίας ένωσης που είναι ευνοϊκές ως προς το αν διασχίζουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ή όχι. Η μεγαλύτερη ουσία που έχει βρεθεί και παρατηρηθεί ότι μπορεί να διασχίσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσω της διαμεμβρανικής διάχυσης είναι η CINC-1 στα 7.800 Daltons.

1.5.2 Κορεσμένα συστήματα μεταφοράς

Ορισμένα φάρμακα και ουσίες διαπερνούν το ΚΝΣ χρησιμοποιώντας ορισμένα συστήματα μεταφοράς. Η L- Dopa και η καφεΐνη είναι τέτοια παραδείγματα. Πολλοί από τους μεταφορείς όπως τα πεπτίδια και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες, λαμβάνονται επιλεκτικά από ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου.

Όταν μια ασθένεια επηρεάζει το BBB ή το ίδιο εξασθενεί, τότε καθίσταται θεραπευτικός στόχος. Για παράδειγμα, στη σκλήρυνση κατά πλάκας ο φραγμός παθαίνει διαρροή και επιτρέπει την είσοδο ανοσοκυττάρων στο ΚΝΣ.

Η παράκαμψη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού θα μπορούσε να αποτελέσει μία νέα στρατηγική, στοχευμένη σε συγκεκριμένες καταστάσεις. Η ενδορραχιαία χορήγηση του φαρμάκου στον εγκέφαλο δεν θα ήταν τόσο αποτελεσματική για μικρά, λιποειδή και διαλυτά φάρμακα, αλλά για μεγάλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Επιπλέον, η ενδορινική χορήγηση υπήρξε πολλά υποσχόμενη στη θεραπεία του Αλτσχάιμερ.



Εικόνα 6: Αιματοεγκεφαλικός φραγμός και τρόποι με τους οποίους οι ουσίες τον διασχίζουν [26]

Η κατάχρηση ναρκωτικών αυξάνει την διαπερατότητα του blood brain barrier (BBB), γεγονός που αυξάνει την εισροή των περιφερειακών τοξινών στον εγκέφαλο.

Σύμφωνα με μελέτες, τα φάρμακα που θα στοχεύσουν το ΚΝΣ χρειάζονται παραπάνω από ένα χρόνο να αναπτυχθούν συγκριτικά με τα υπόλοιπα, και έχουν τις μισές πιθανότητες να λάβουν τις απαιτούμενες εγκρίσεις. [25] - [29]

1.6 Γαστρεντερικός Φραγμός

Το ανθρώπινο σώμα έχει πολλαπλά βλεννογονικά επιθήλια που σχηματίζουν εμπόδια μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού του ξενιστή. Η γαστρεντερική οδός ανήκει σε ένα από αυτά και παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και στην υγεία. Ο βλεννογόνος του γαστρεντερικού συστήματος δρα ως ημιπερατός φραγμός επιτρέποντας την απορρόφηση θρεπτικών ουσιών, περιορίζοντας την μεταφορά δυνητικά επιβλαβών αντιγόνων και μικροοργανισμών.

Η πρόκληση είναι να επιτραπεί αποτελεσματικά η μεταφορά θρεπτικών ουσιών σε όλο το επιθήλιο, αποκλείοντας την διέλευση επιβλαβών μορίων και οργανισμών. Οι ιδιότητες του γαστρικού και του εντερικού βλεννογόνου, αναφέρονται ως γαστρεντερικός φραγμός. [32] [33]

1.7 Απορρόφηση Φαρμάκου από το Στόμα

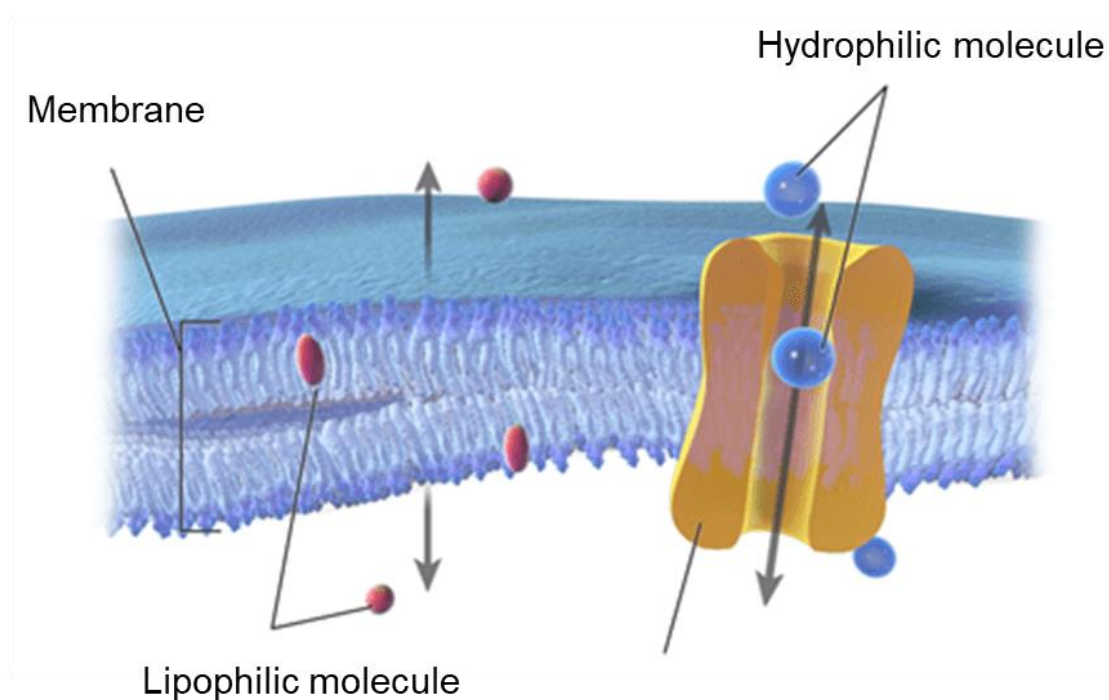
Η απορρόφηση του φαρμάκου από το στόμα, αφορά την μετακίνηση του από το σημείο που χορηγήθηκε, στο γαστρεντερικό και από εκεί στην κυκλοφορία του αίματος. Η απορρόφηση *per os* ελέγχεται κυρίως από τον ρυθμό διάλυσης και την διαλυτότητα του φαρμάκου, που θα καθορίσουν εν τέλει πόσο γρήγορα το φάρμακο θα φτάσει στην κυκλοφορία.

Για να απορροφηθεί ένα χορηγούμενο από το στόμα φάρμακο, θα πρέπει να επιβιώσει από πιθανά χαμηλά pH και τις εκκρίσεις του γαστρεντερικού. Τα πεπτιδικά φάρμακα όπως για παράδειγμα η ινσουλίνη, είναι αρκετά ευαίσθητα για μία τέτοια χορήγηση και αποικοδομούνται εύκολα σε αυτή την περίπτωση.

Όσον αφορά τον στοματικό βλεννογόνο, το φάρμακο που τοποθετείται μεταξύ των ούλων και του μάγουλου, μέσω στοματικής ή υπογλώσσιας χορήγησης, διατηρείται περισσότερο και έτσι η απορρόφηση μέσω του λεπτού επιθήλιου ευνοείται. Το στομάχι είναι τις περισσότερες φορές το πρώτο όργανο με το οποίο το φάρμακο θα έχει έντονη επαφή. Παρά την μεγάλη του επιθηλιακή επιφάνεια, το παχύ στρώμα του βλεννογόνου και ο σύντομος χρόνος διέλευσης περιορίζουν κάπως την απορρόφηση του φαρμάκου. Γενικά, η απορρόφηση συμβαίνει σε μεγαλύτερο ποσοστό στο λεπτό έντερο, το οποίο έχει την μεγαλύτερη επιφάνεια, κατάλληλη ώστε να απορροφηθούν τα φάρμακα στον γαστρεντερικό σωλήνα και οι μεμβράνες του είναι αρκετά πιο διαπερατές από του στομάχου. Ωστόσο, η μικροχλωρίδα του εντέρου μπορεί να περιορίσει την απορρόφηση του φαρμάκου. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι ανάλογα το φαρμακευτικό σκεύασμα, ο ρυθμός διάλυσης μπορεί να μεταβληθεί και έτσι να αλλάξει η συνολική απορρόφηση της δραστικής ουσίας. [30][31]

1.8 Λιποφιλία & Αρχή ελάχιστης λιποφιλίας

Η λιποφιλία είναι μια κύρια ιδιότητα που επηρεάζει τόσο τις φυσικοχημικές όσο και τις βιοχημικές ιδιότητες μίας ουσίας, αφορά την δραστικότητα μίας ένωσης, καθώς και την διανομή και αποβολή της από το σώμα. Καθώς καμία άλλη φυσική ιδιότητα δεν μπορεί να επηρεάσει τόσες βιολογικές ιδιότητες όσο η λιποφιλία, αποτελεί μία χρησιμοποιούμενη παράμετρο σε μελέτες ανακάλυψης φαρμάκων.



Εικόνα 7: Η συμπεριφορά λιπόφιλων μορίων στις μεμβράνες οργανισμών [38]

Η λιποφιλία, μπορεί να προσδιοριστεί και να μετρηθεί σχετικά εύκολα και παράλληλα, συσχετίζεται με άλλες ιδιότητες όπως η διαλυτότητα, η διαπερατότητα και η τοξικότητα. Η μέτρηση της συχνά γίνεται με την κατανομή μίας ουσίας μεταξύ της οργανικής φάσης, η οποία είναι συνήθως n-οκτανόλη κορεσμένη με νερό, και η υδατική φάση, η οποία είναι γενικά νερό κορεσμένο με n-οκτανόλη. Ο συντελεστής κατανομής ($\log P$) αναφέρεται τελικά, ως ο λόγος των συγκεντρώσεων ισορροπίας της διαλυμένης ένωσης σε ένα σύστημα δύο φάσεων που αποτελείται από n-οκτανόλη και νερό.

Η λιποφιλία αποτελεί αρκετά συχνά οδηγό, για την τροποποίηση της δομής μίας ένωσης, ούτως ώστε να βελτιωθούν οι ιδιότητες της. Η έννοια της φαρμακοφόρου δομής αρχικά, αποτελεί πολύ σημαντικό όρο κατά την ανακάλυψη φαρμάκων, και ταυτόχρονα παίζει κρίσιμο ρόλο στην επιτυχία μεθόδων όπως η εικονική διαλογή και οι μελέτες 3D-QSAR. Στην αξιοπιστία τέτοιων μετρήσεων, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο οι φυσικοχημικές

ιδιότητες των προς μελέτη ενώσεων. Η λιποφιλία λοιπόν, είναι καθοριστικής σημασίας για την αλληλεπίδραση φαρμάκου – ξενιστή, αλλά και για την συγγένεια και την δέσμευση στο πρόσδεμα εντός του οργανισμού. Βέβαια, πολλές φορές μπορεί η αύξηση της διαπερατότητας να αυξήσει και την λιποφιλία, μειώνοντας όμως την διαλυτότητα της ουσίας και την μεταβολική της σταθερότητα. [35] - [38]

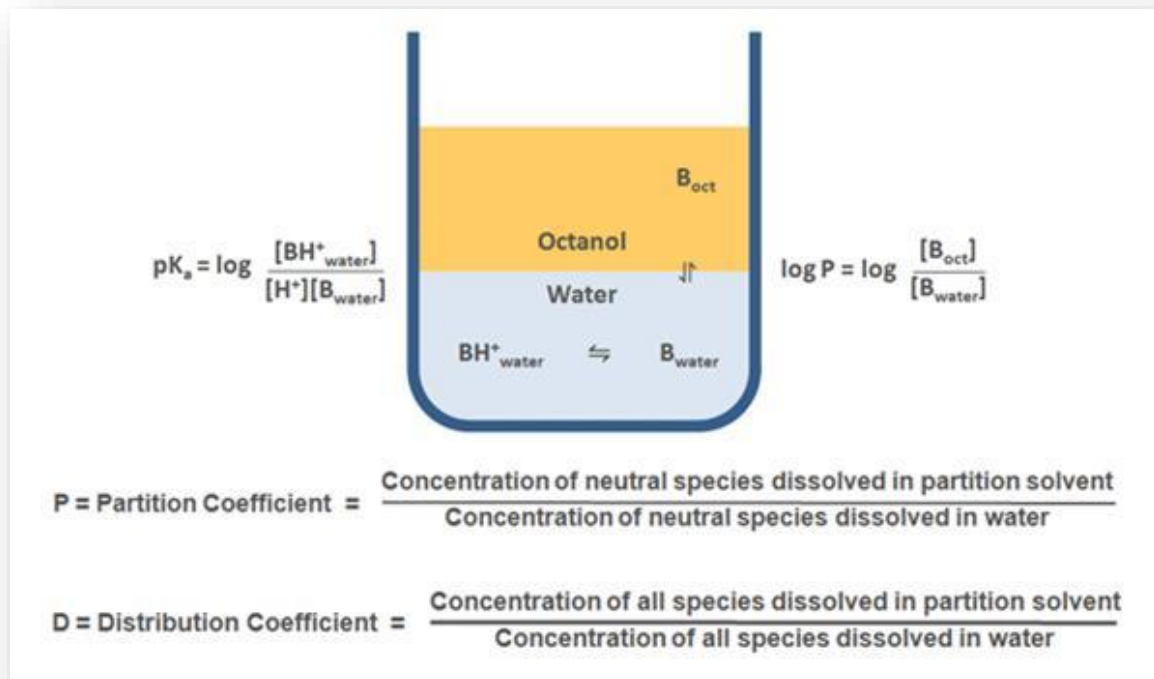
1.8.1 LogP & LogD

Ο συντελεστής κατανομής P είναι ένα μέτρο της διαφορετικής διαλυτότητας που θα έχει μία ένωση σε δύο αναμίξιμους διαλύτες. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα διαλυτών είναι αυτό της οκτανόλης/νερού. Ο συντελεστής κατανομής περιγράφει την λιποφιλία για ουδέτερες ενώσεις ή γενικά όπου η ένωση υφίσταται σε μία μόνο μορφή. Για ιοντισμένες διαλυτές ουσίες, ο κατάλληλος όρος είναι ο συντελεστής κατανομής D, μιας και αποτελεί ένα μέτρο της διαλυτότητας των ειδών στο σύστημα οκτανόλης νερού, που εξαρτάται από το pH.

Συνήθως χρησιμοποιείται η λογαριθμική μορφή logP και logD των συντελεστών κατανομής. Συνεπώς, ενώ τα logP και logD περιγράφουν και τα δύο την λιποφιλία, το πρώτο αφορά μόνο ουδέτερες ενώσεις, ενώ το τελευταίο είναι κατάλληλο για ιοντισμένες επειδή εξηγεί την εξάρτηση του μορίου από το pH σε υδατικό διάλυμα.

Ένα υποψήφιο φάρμακο απαιτεί συνήθως μία ορισμένη ισορροπία λιπόφιλης και υδρόφοβης φύσης. Η διαλυτότητα του στο νερό είναι απαραίτητη για την διάλυση του στο πλάσμα και στα υπόλοιπα υδατικά βιολογικά υγρά, ενώ η λιποφιλία ενισχύει την διείσδυση μέσω βιολογικών μεμβρανών και παίζει ρόλο στις ενώσεις που πρόκειται να χορηγηθούν από το στόμα.

Η μέτρηση του logP μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους, ο πιο συνηθισμένος από αυτούς όμως είναι η μέθοδος της φιάλης ανακίνησης. Σε αυτή την τεχνική, τμήμα της διαλυμένης ουσίας, διαλύεται σε ορισμένο όγκο οκτανόλης και νερού, ανακινείται για κάποιο χρονικό διάστημα και στην συνέχεια μετράται η συγκέντρωση της ουσίας σε καθέναν από τους διαλύτες.



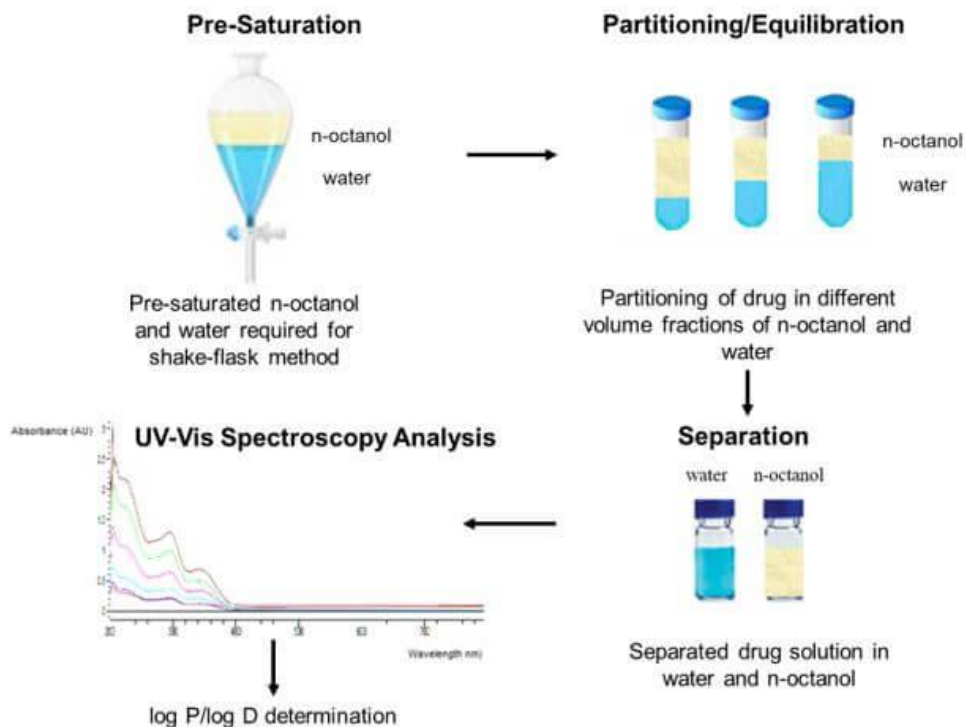
Εικόνα 8: Το σύστημα διαλυτών οκτανόλης - νερού και οι εξισώσεις υπολογισμού των $\log P$ και $\log D$ [42]

Οι εξισώσεις στις οποίες θα βασιστούν εν τέλει οι υπολογισμοί θα είναι οι εξής:

$$\log P_{oct/wat} = \log \left(\frac{[solute]_{octanol}}{[solute]_{water}^{un-ionized}} \right)$$

$$\log D_{oct/wat} = \log \left(\frac{[solute]_{octanol}}{[solute]_{water}^{ionized} + [solute]_{water}^{neutral}} \right)$$

Μια ταχύτερη μέθοδος προσδιορισμού του $\log P$ χρησιμοποιεί υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Εν τέλει, το $\log P$ της διαλυμένης ουσίας μπορεί να προσδιοριστεί συσχετίζοντας τον χρόνο κατακράτησης του με παρόμοιες ενώσεις με γνωστή τιμή $\log P$.



Εικόνα 9: Η διαδικασία υπολογισμού της λιποφιλίας με την μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης [38]

Παρόλα αυτά, η πλειοψηφία των γνωστών φαρμάκων περιέχει ιοντισμένες ομάδες και κατά συνέπεια η χρήση του logP δεν ενδείκνυται. Κατά την μέτρηση του logD, η υδατική φάση ρυθμίζεται σε ένα συγκεκριμένο pH χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα. Κατά συνέπεια, το logD θα εξαρτάται από το pH, το οποίο και θα πρέπει να προσδιοριστεί κατά την διάρκεια του πειράματος. Το logP χρησιμοποιείται κυρίως στην χημειοπληροφορική και αποτελεί παράμετρο του κανόνα των 5 του Lipinski. Για μη ιοντισμένες ενώσεις θα ισχύει $\text{LogP} = \text{LogD}$ σε όλο το εύρος των pH. [39] - [42]

1.8.2 Lipinski's Rule of 5

Ο κανόνας των 5 του Lipinski είναι ένα πρότυπο που βοηθάει να προσδιοριστεί εάν μία βιολογική δραστική χημική ουσία είναι πιθανό να έχει τις κατάλληλες φυσικοχημικές ιδιότητες ώστε να αποτελεί καλό υποψήφιο φάρμακο. Βασίζεται στις φαρμακοκινητικές ιδιότητες του φαρμάκου όπως η απορρόφηση, η κατανομή ο μεταβολισμός και η απέκκριση και επισημαίνει τα παρακάτω χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχει το υποψήφιο μόριο για να αναμένεται να παρουσιάζει καλή *per os* βιοδιαθεσιμότητα:

- Όχι περισσότερους από 5 δότες δεσμών υδρογόνου
- Όχι περισσότερους από 10 δέκτες δεσμών υδρογόνου
- Μοριακό βάρος μικρότερο των 500 Daltons
- Συντελεστής κατανομής (logP) μικρότερος από 5

Συνήθως, η παραβίαση 2 ή περισσότερων από τους παραπάνω κανόνες θα μπορούσε να είναι λόγος απόρριψης ενός υποψηφίου φαρμάκου, τουλάχιστον για χορήγηση από το στόμα. [44]

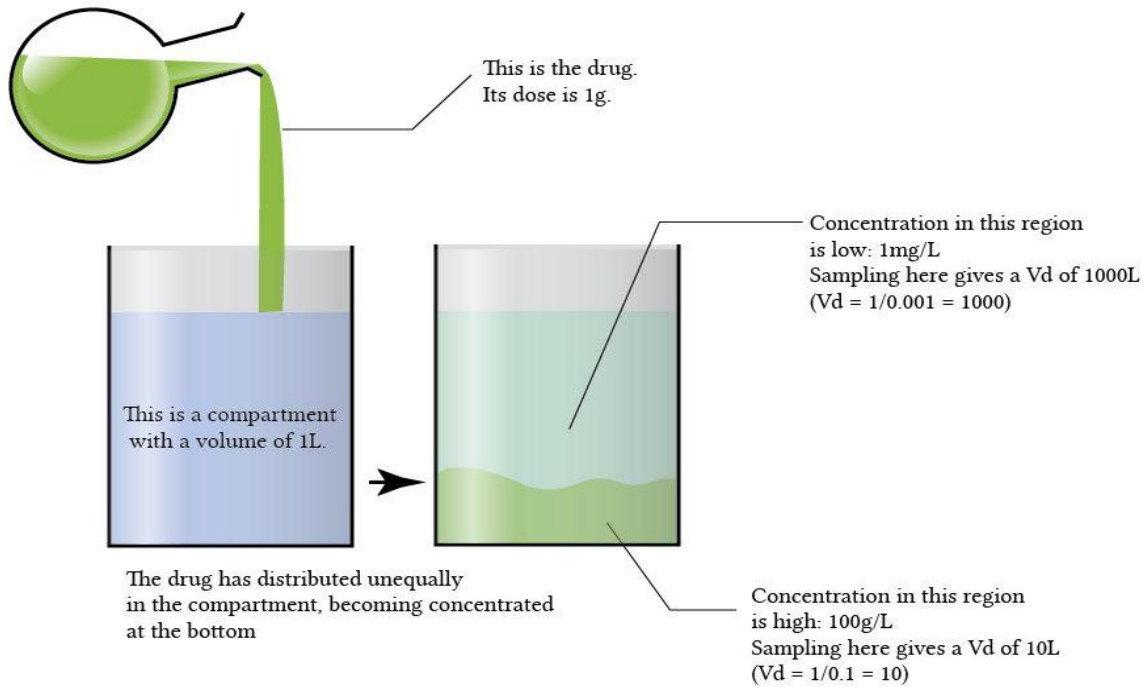
1.8.3 Όγκος Κατανομής

Ο όγκος κατανομής είναι μία φαρμακοκινητική παράμετρος που υποδεικνύει την τάση ενός φαρμάκου είτε να παραμένει στο πλάσμα του αίματος είτε να διανέμεται σε άλλα διαμερίσματα ιστών. Αποτελεί μία σταθερά αναλογίας που συσχετίζει την συνολική ποσότητα φαρμάκου στο σώμα με αυτή στο πλάσμα για ορισμένο χρόνο. Δηλαδή: $Vd = \text{Ποσότητα φαρμάκου στο σώμα (mg)} / \text{Συγκέντρωση φαρμάκου στο πλάσμα (mg/L)}$

Κατά συνέπεια, φάρμακα με υψηλό όγκο κατανομής έχουν την τάση να εγκαταλείπουν το πλάσμα γρήγορα και να κατευθύνονται προς τους ιστούς, ενώ χαμηλός όγκος κατανομής υποδεικνύει την τάση του φαρμάκου να παραμένει στο πλάσμα, οπότε και θα πρέπει να χορηγηθεί μικρότερη ποσότητα για δεδομένη συγκέντρωση φαρμάκου στο πλάσμα.

Ορισμένα φάρμακα έχουν όγκο τιμών κατανομής μεγαλύτερο των 10.000 L. Αυτό σημαίνει πως το μεγαλύτερο μέρος του φαρμάκου θα βρίσκεται στους ιστούς και ελάχιστο θα κυκλοφορεί στο πλάσμα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο όγκος κατανομής είναι μόνο παράγοντας αναλογίας και αποσκοπεί στην συσχέτιση της ποσότητας του φαρμάκου με την μετρούμενη συγκέντρωση.

Ο όγκος κατανομής συνήθως δεν ελέγχεται εύκολα κατά την διάρκεια μελετών όπως για παράδειγμα SAR, γεγονός που ίσως οφείλεται στο ότι η βελτιστοποίηση των φαρμακευτικών μορίων μέσω τροποποίησης του όγκου κατανομής είναι σχετικά ασαφής. Αυτό συμβαίνει επειδή είναι κάπως αόριστος ο προσδιορισμός ενός καλού ή κακού όγκου κατανομής. Παράλληλα, είναι δύσκολο να βελτιστοποιηθεί ο όγκος κατανομής αφήνοντας ανεπηρέαστες άλλες ιδιότητες. [45] - [48]



Εικόνα 10: Παράδειγμα για τον υπολογισμό του όγκου κατανομής [48]

1.9 Χρωματογραφία & Χρησιμότητα

Ο έλεγχος των φαρμάκων τα τελευταία δέκα χρόνια, βασίζεται πλέον σε μεγάλο βαθμό στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, η οποία έχει αντικαταστήσει πολλές φασματομετρικές μεθόδους. Ταυτόχρονα, τελευταία χρόνια έχει αντικαταστήσει στο μεγαλύτερο ποσοστό την αέρια χρωματογραφία όσον αφορά τους ελέγχους σε φαρμακευτικές ουσίες. Οι φαρμακευτικές εταιρίες είναι υποχρεωμένες να ελέγχουν την ποιότητα των προϊόντων τους χρησιμοποιώντας την HPLC προτού κυκλοφορήσουν το φάρμακο στην αγορά. Η αποσαφήνιση της δομής της χημικής ένωσης καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός των προσμίξεων που υπάρχουν σε ένα μίγμα ουσιών αποτελεί ορισμένα από τα πλεονεκτήματα στην χρήση της HPLC.

Η ανάλυση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης των φαρμάκων είναι η ανίχνευση χαρακτηριστικών του φαρμάκου, καθώς και η παροχή ποσοτικών αποτελεσμάτων. Επίσης, είναι δυνατό να ληφθούν πληροφορίες για την πρόοδο μίας θεραπείας νόσου, αλλά και για την περεταίρω κατανόηση της πορείας της νόσου στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω βιοπληροφορικής και θεραπευτικής έρευνας, προτού χορηγηθούν τα φάρμακα. Η διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων επιταχύνεται όταν λαμβάνεται το χρωματογραφικό τους προφίλ, μετρώντας την δέσμευση τους σε πρωτεΐνες και λιπίδια και στην συνέχεια στην in vivo μοντελοποίηση κατανομής. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιείται ευρέως στην διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων.

Μία από τις πιο απαιτητικές χρήσεις της υγρής χρωματογραφίας είναι οι αναλύσεις φαρμάκων αλλά και μεταβολιτών τους στα διάφορα βιολογικά υγρά όπως το πλάσμα ή τα ούρα. Ωστόσο, υπάρχουν διάφορα ζητήματα που θα αντιμετωπίσει ο αναλυτής κατά την διάρκεια της υγρής χρωματογραφίας. Γενικά τα φάρμακα, πριν εισέλθουν στην στήλη για ανάλυση θα πρέπει να έχουν απομονωθεί με τεχνικές εκχύλισης ή διαχωρισμού, ούτως ώστε το σύστημα να είναι ικανό να διακρίνει τις ουσίες ενδιαφέροντος. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό θα πρέπει να έχουν επιλεγεί καλοί ανιχνευτές, κατάλληλες στατικές φάσεις, καθώς και το σωστό πρόγραμμα. Ανιχνευτές όπως οι UV/VIS είναι πιο ευέλικτοι, αλλά όχι πάντα ιδανικοί, καθώς ο αναλυτής θα πρέπει να έχει την ικανότητα να εξειδικεύει τα αποτελέσματα που λαμβάνει. Η χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας, είναι συνήθως προτιμότερη, μιας και προσφέρει πολύ καλή γραμμικότητα και ταχείες ποσοτικές αναλύσεις.

Η υγρή χρωματογραφία αποτελεί μια αναλυτική τεχνική που είναι εύχρηστη στην φαρμακευτική βιομηχανία. Η ασφάλεια και η υψηλή ποιότητα είναι απαραίτητα χαρακτηριστικά του φαρμάκου και έτσι πρέπει να διασφαλίζεται ο μικρότερος κίνδυνος για τον ασθενή. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, θα πρέπει να πληρούνται ορισμένα

πρότυπα, επομένως οι αναλυτές χρησιμοποιούν ορισμένες μεθόδους και αναλυτικές τεχνικές, συμπεριλαμβανομένης της υγρής χρωματογραφίας.

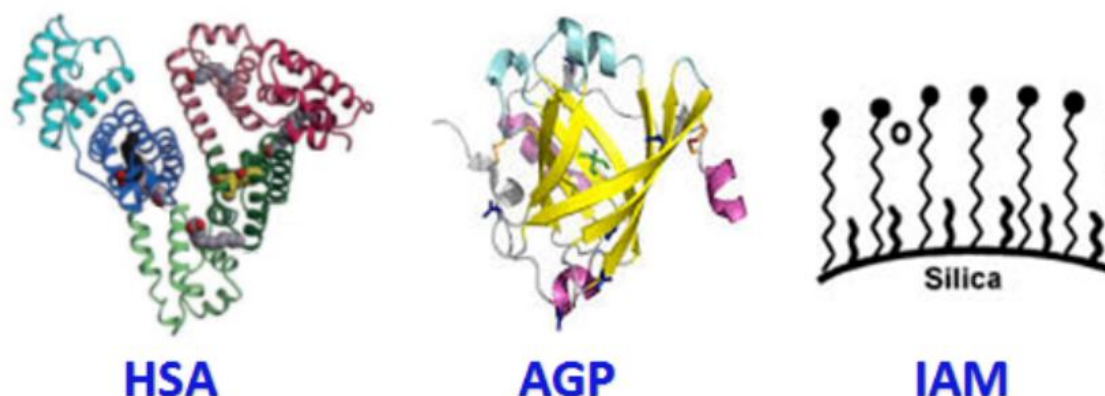
Η υγρή χρωματογραφία ουσιαστικά, επιτυγχάνει τον διαχωρισμό συγκεκριμένου δείγματος στα επιμέρους συστατικά του. Αυτό συμβαίνει όταν το προς ανάλυση δείγμα αλληλεπιδράσει κατάλληλα με την υγρή κινητή φάση και την στατική φάση. Η πολικότητα των διάφορων ουσιών είναι το χαρακτηριστικό που επιτρέπει τον τελικό διαχωρισμό που οφείλεται στα διαφορετικά επίπεδα συγγένειας στήλης και κινητής φάσης. Η ουσία προς διαχωρισμό θα τοποθετηθεί στην κορυφή της στήλης της στατικής φάσης, που συνήθως είναι ένα προσροφητικό στερεό υλικό. Η παρουσία φυσαλίδων αέρα θα μπορούσε να επηρεάσει τον ομοιόμορφο καταμερισμό της ουσίας, οπότε καλό είναι να αποφεύγεται. Καθώς η κινητή φάση διασχίζει την στήλη, χωρίζεται σε ζώνες. Η τεχνική λειτουργεί από την στιγμή που τα συστατικά του μίγματος που θα διαχωριστεί προσροφώνται στην επιφάνεια της στήλης βάσει της πολικότητας τους. Έτσι, μία ουσία με υψηλή συνάφεια με την στατική φάση θα κινηθεί πιο αργά στην στήλη, από μία ουσία με μεγαλύτερη συγγένεια με την κινητή φάση. Η πιο κοινή μορφή υγρής χρωματογραφίας είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης.

1.9.1 Υγρή Χρωματογραφία και Φαρμακευτικές Ουσίες

Η πιο διαδεδομένη μορφή υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται στην φαρμακοβιομηχανία είναι η HPLC, και αυτό διότι παρέχει την απαιτούμενη ακρίβεια. Η γενική διαδικασία έχει να κάνει με την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, μέσω του διαχωρισμού, της ποσοτικοποίησης και της ταυτοποίησης των συστατικών του εκάστοτε φαρμακευτικού σκευάσματος. Βασικό πλεονέκτημα της HPLC είναι ο καθορισμός της δομής και της ποσότητας ξένων ενώσεων στα φάρμακα. Η HPLC εφαρμόζεται πολύ ικανοποιητικά σε ενώσεις που δεν είναι ιδιαίτερα πτητικές και με υψηλά μοριακά βάρη. Μπορεί εν τέλει να ποσοτικοποιήσει εύκολα φάρμακα στην καθαρή τους μορφή. Άλλες μορφές HPLC που χρησιμοποιούνται ευρέως στην φαρμακευτική βιομηχανία περιλαμβάνουν την υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης, και αυτή των ακινητοποιημένων ενζύμων. Ωστόσο, η βαθμονόμηση που απαιτείται για την ακριβή χρήση της HPLC μπορεί να αποτελέσει μειονέκτημα της, λόγω κόστους. [49] - [51]

1.10 Βιομημική Χρωματογραφία

Στην βιομημική χρωματογραφία γίνεται χρήση των ανθρώπινων πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων για την μοντελοποίηση της in vivo κατανομής των ενώσεων. Υπάρχουν διαθέσιμες στήλες HPLC στο εμπόριο που περιέχουν ακινητοποιημένη αλβουμίνη του ανθρώπινου ορού, ακινητοποιημένη τεχνητή μεμβράνη IAM και ακινητοποιημένη άλφα-1-οξύ-γλυκοπρωτεΐνη (AGP) που δρουν ως στατικές φάσεις. Όταν οι ενώσεις, διασχίζουν την στήλη, ο χρόνος που αυτές θα κατακρατούνται είναι αντίστοιχος της συγγένειας με την στατική φάση που έχει επιλεγεί. Τα συμπεράσματα που εξάγονται αναφορικά με τους χρόνους κατακράτησης δίνουν στον αναλυτή μία εικόνα για την συγγένεια της ένωσης και την αναμενόμενη in vivo κατανομή της.



Εικόνα 11: Παράδειγμα ουσιών και πρωτεϊνών για χρήση ως στατική φάση [52]

Τα τελικά στάδια για την έγκριση ενός φαρμάκου, αφορούν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της ένωσης. Αυτό θα μπορούσε να σχετίζεται άμεσα με την λιποφιλία της ένωσης και την πιθανή σύνδεση της με ανεπιθύμητους στόχους. Συνήθως η βασική αιτία που θα προκαλούσε κάτι τέτοιο, είναι η σύνδεση της ένωσης σε ιστούς που περιέχουν φωσφολιπίδια μεμβράνης. Επομένως το ελεύθερο διαθέσιμο φάρμακο μειώνεται και αυξάνεται η ποσότητα του που είναι δεσμευμένο στους ιστούς.

Γενικά όταν η βιομημική χρωματογραφία εφαρμοστεί σε πρώιμο στάδιο επιτρέπει τον χαρακτηρισμό πολλών ενώσεων και προβλέπει εγκαίρως την συμπεριφορά τους εντός του οργανισμού σε αρκετά αρχικό στάδιο. Η χρήση αυτού του είδους της χρωματογραφίας θα βοηθήσει στην εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν τις ιδιότητες απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης (ADME) του

φαρμάκου. Παράλληλα, με την χρήση της βιομιμητικής χρωματογραφίας, η μέτρηση των κινητικών παραμέτρων της δέσμευσης της φαρμακευτικής ένωσης με τις πρωτεΐνες και άλλους υποδοχείς, θα εκτιμάται αρκετά νωρίς και θα επιτρέπει τον σχεδιασμό ενώσεων με πιο προβλέψιμα κινητικά προφίλ. [52] [53]

1.10.1 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM)

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για την IAM χρωματογραφία (Immobilized Artificial Membranes) κατά την διάρκεια ανακάλυψης φαρμάκων αυξάνεται. Η στήλες της συγκεκριμένης χρωματογραφίας λόγω της κατασκευής τους, μιμούνται το περιβάλλον λιπιδίων μίας μεμβράνης.

Προκειμένου να γίνει ξεκάθαρη η εφαρμογή της IAM χρωματογραφίας στην διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων, είναι σημαντική η εξακρίβωση της ισορροπίας των διαμοριακών δυνάμεων που θα διέπουν τους μηχανισμούς κατακράτησης στη στήλη. Γενικά, οι επιστήμονες καταλήγουν ότι η κατακράτηση εν τέλει θα χαρακτηρίζεται κυρίως από την λιποφιλία, δηλαδή τον συνδυασμό υδροφοβίας και πολικότητας, αλλά και από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που υφίστανται όταν οι διαλυμένες ουσίες ιονίζονται μερικώς ή πλήρως. Η IAM χρωματογραφία είναι μία εφαρμόσιμη μέθοδος για την μέτρηση της προσρόφησης των φαρμάκων, παράλληλα είναι χαμηλή σε κόστος και αρκετά γρήγορη. Χρησιμοποιείται αρκετά για την πρόβλεψη της μεταφοράς του φαρμάκου μέσω κυτταρικών μεμβρανών καθώς και για την πρόβλεψη της διαπερατότητας του φαρμάκου στον οργανισμό.

Οι στήλες ακίνητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών είναι ένα ιδανικό εργαλείο, προκειμένου να προβλεφθεί με υψηλή απόδοση η διαπερατότητα μεμβρανών και φαρμάκου. Η φωσφατιδυλοχολίνη είναι και το βασικότερο φωσφολιπίδιο που βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Οι φάσεις σε αυτή την χρωματογραφία που παρασκευάζονται από αντίστοιχα φωσφολιπίδια μιμούνται την επιφάνεια μίας βιολογικής κυτταρικής μεμβράνης. Συνεπώς, οι φάσεις της IAM θα εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με τις πρωτεΐνες των μεμβρανών, έτσι εξάγονται συμπεράσματα για τον τρόπο που αλληλεπιδρά το φάρμακο με την μεμβράνη. [54] - [56]

1.10.2 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το μη δεσμευμένο τμήμα του φαρμάκου είναι σε θέση να ασκήσει φαρμακολογικό αποτέλεσμα, διαχεόμενο στους ιστούς και εν τέλει στο σημείο δράσης του. Πολλοί παράγοντες όπως η υδροφοβικότητα και το φορτίο του καθορίζουν αυτή την κίνηση. Οι πρωτεΐνες ορού του οργανισμού συνεισφέρουν στην καλύτερη διάλυση του φαρμάκου, αλλά και στην μετακίνηση του στο σημείο δράσης του. Αν ωστόσο αυτή η σύνδεση με την πρωτεΐνη είναι ιδιαίτερα ισχυρή, το φάρμακο δεν θα καταφέρει να αποδεσμευτεί ώστε να δράσει στον οργανισμό. Έτσι, οι φαρμακοκινητικές παράμετροι, καθορίζονται εν μέρει και από το ποσοστό δέσμευσης πρωτεΐνης φαρμάκου. Μία από τις πιο σημαντικές και σε μεγαλύτερη αφθονία πρωτεΐνες του ανθρώπινου οργανισμού είναι η αλβουμίνη ανθρώπινου ορού (Human Serum Albumin, HSA).

Προκειμένου ο ερευνητής να ανιχνεύει γρήγορα και αποτελεσματικά το ποσοστό σύνδεσης του φαρμάκου με την παραπάνω κυρίως πρωτεΐνη, αναπτύχθηκαν στήλες ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος. Οι βασικότερες από αυτές αφορούν την HSA αλλά και ακινητοποιημένης AGP, στις οποίες οι παραπάνω πρωτεΐνες ακινητοποιούνται σε αμινοπροπυλοπυριτικής πήκτης, ώστε να αναπτυχθεί η σταθερή φάση της HPLC. Αυτό το είδος χρωματογραφίας μπορεί να εφαρμοστεί είτε μέσω ζωνικής έκλουσης, όπου μικρός όγκος διαλυμένης ουσίας εγχέεται στην στήλη και υπολογίζεται ο χρόνος έκλουσης όλων των διαφορετικών συστατικών, είτε μέσω μετωπικής ανάλυσης όπου η ουσία εγχέεται συνεχώς και εντοπίζεται ο χρόνος στον οποίο αυτή θα βγει από την στήλη. Καθένας από τους δύο αυτούς τρόπους μπορεί να χρησιμοποιηθεί, ώστε να γίνει η εκτίμηση της σύνδεσης πρωτεΐνης – φαρμάκου. [58]

1.10.3 Βιομημητική Μικυλλιακή Χρωματογραφία

Η Biopartitioning Micellar Chromatography (BMC) είναι ένα είδος υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιεί στατικές και κινητές φάσεις υπό τέτοιες πειραματικές συνθήκες, ούτως ώστε να επιτευχθεί η μίμηση της ανθρώπινης απορρόφησης φαρμάκων, της κατανομής του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ή και διάφορων διαδικασιών διαμερισμού του φαρμάκου σε βιολογικά συστήματα και μεμβράνες. Τα χαρακτηριστικά αυτής της χρωματογραφίας προσομοιάζονται ικανοποιητικά με διάφορα βιολογικά φράγματα και εξωκυττάρια υγρά, συνεπώς παρέχει πολύ χρήσιμα μοντέλα πρόβλεψης.

Η μικυλλιακή υγρή χρωματογραφία περιλαμβάνει μία κινητή φάση που αποτελείται από ένα υδατικό διάλυμα επιφανειοδραστικής ουσίας, σε συγκέντρωση μεγαλύτερη της κρίσιμης συγκέντρωσης μικυλλιοποίησης. Η στατική φάση της χρωματογραφίας αυτής τροποποιείται με υδρόφοβη προσρόφηση τασιενεργών, προκειμένου να προσομοιάζει δομικά την ταξινομημένη σειρά των μεμβρανών αλυσίδων υδρογονανθράκων. Παράλληλα, ο χαρακτήρας των προσροφημένων επιφανειοδραστικών μονομερών όσον αφορά την υδροφιλία ή την υδροφοβία τους, μιμείται τις περιοχές αντίστοιχων πολικών μεμβρανών. Επίσης, οι μικροκυτταρικές φάσεις του τασιενεργού που παρασκευάζεται σε φυσιολογικές συνθήκες, έχουν ως σκοπό να μιμηθούν το περιβάλλον του βιολογικού διαχωρισμού που υφίστανται τα φάρμακα. Τόσο τα εξωκυττάρια, όσο και τα ενδοκυττάρια υγρά έχουν ως βασικά τους συστατικά νερό, άλατα, γλυκόζη, αμινοξέα, χοληστερόλη, φωσφολιπίδια, λιπαρά οξέα και πρωτεΐνες. Τα λιπίδια που προαναφέρθηκαν έχουν την τάση να σχηματίζουν μικροκύτταρα σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες.

Η χρήση κινητών φάσεων που περιέχουν μικκύλια, είναι πολύ ελκυστική λόγω του χαμηλού κόστους και των μειωμένων περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Για την βελτίωση της μέγιστης απόδοσης και ανάλυσης, προστίθεται πρακτικά μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη στο μικυλλιακό διάλυμα. Μερικά από τα πιο συνηθισμένα τασιενεργά είναι το ανιοντικό δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), το κατιοντικό βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο (CTAB) καθώς και το μη ανιονικό Brij-35. Αρκετοί οργανικοί διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί για τροποποίηση, ενώ οι αλκοόλες βραχείας και μέσης αλυσίδας, όπως και το ακετονιτρίλιο καθίστανται οι πιο κατάλληλοι. Η παρουσία των μικκυλίων εξασφαλίζει την διατήρηση του διαλύματος σε συγκεντρώσεις αρκετά μεγαλύτερες από την διαλυτότητα τους στο νερό, μειώνοντας παράλληλα και την εξάτμιση. Πάνω από το κρίσιμο σημείο μικυλλιοποίησης, όταν μεταβληθεί η συγκέντρωση του τασιενεργού, θα αυξηθεί και η συγκέντρωση των μικκυλίων στο διάλυμα. Παράλληλα, προσροφάται σταθερή ποσότητα επιφανειοδραστικού μονομερούς στην στάσιμη φάση, εξασφαλίζοντας μια σταθερή τροποποιημένη στήλη

και την αναμενόμενη συμπεριφορά κατακράτησης. Στο συγκεκριμένο είδος χρωματογραφίας δημιουργούνται 2 είδη ισορροπίας. Η πρωταρχική ισορροπία αφορά τον διαχωρισμό διαλυμένης ουσίας τόσο με τον διαλύτη όσο και με την στατική φάση, ενώ η δευτερεύουσα ισορροπία δημιουργείται με τα μικύλλια στην κινητή φάση. Πολλοί παράγοντες τείνουν να επηρεάσουν αυτές τις δύο ισορροπίες, όπως η συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού και των αλάτων ή οργανικών διαλυτών που προστίθενται, την θερμοκρασία, την ιοντική ισχύ αλλά και το pH. Συνεπώς η πολυπλοκότητα της MLC αυξάνεται συγκριτικά με άλλα είδη υγρής χρωματογραφίας.

Η μικυλλιακή υγρή χρωματογραφία (MLC) αποτελεί έναν παγιωμένο κλάδο της σύγχρονης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των περισσότερων φαρμακευτικών ουσιών σε φαρμακευτικά σκευάσματα, δείγματα ορού καθώς και ούρων. [59] [60] [62] - [64]

1.10.3.1 Τασιενεργά

Τα επιφανειοδραστικά είναι υλικά που μειώνουν την επιφανειακή τάση (ή διεπιφανειακή τάση) μεταξύ δύο υγρών ουσιών ή μεταξύ υγρών και στερεών. Οποιοδήποτε υλικό που μπορεί να επηρεάσει την επιφανειακή τάση έχει τον χαρακτηρισμό του επιφανειοδραστικού, αλλά πρακτικά, μπορούν να δράσουν ως παράγοντες διαβροχής, γαλακτωματοποιητές, παράγοντες αφρισμού κ.α. Η λέξη surfactants αποτελεί μία σύμπτυξη των λέξεων surface, active, agents. Τα τελευταία χρόνια γίνεται έρευνα σε νέες χημικές ουσίες που μπορούν να παίξουν αυτόν το ρόλο. Τα τασιενεργά χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα σε προϊόντα όπως τα χρώματα, συγκολλητικά γαλακτωμάτων, μελάνια, απολυμαντικά, σαμπουάν, οδοντόκρεμες, αφροί, απορρυπαντικά, εντομοκτόνα κλπ.

Η γρήγορη προσρόφηση των επιφανειοδραστικών ουσιών έχει μεγάλη σημασία λόγω των γρήγορων φυσαλίδων και σταγόνων που δημιουργούνται και πρέπει να σταθεροποιηθούν. Με το που έρθουν σε επαφή οι ουσίες, η προσρόφηση εμποδίζεται από την διάχυση του επιφανειοδραστικού, και έτσι η κινητική πιθανώς να μειωθεί. Στην υδατική φάση, τα τασιενεργά σχηματίζουν μάζες όπως τα μικύλλια, στα οποία οι υδρόφοβες ουρές αποτελούν τον πυρήνα και οι υδρόφιλες κεφαλές βυθίζονται στο εξωτερικό υγρό. Υπάρχουν επίσης και άλλα είδη δομών, όπως τα σφαιρικά μικύλλια και οι λιπιδικές διπλοστιβάδες. Ανάλογα την ισορροπία και το μέγεθος μεταξύ της υδρόφιλης κεφαλής και της υδρόφοβης ουράς, τα μικύλλια θα λάβουν διαφορετική διαμόρφωση στον χώρο.

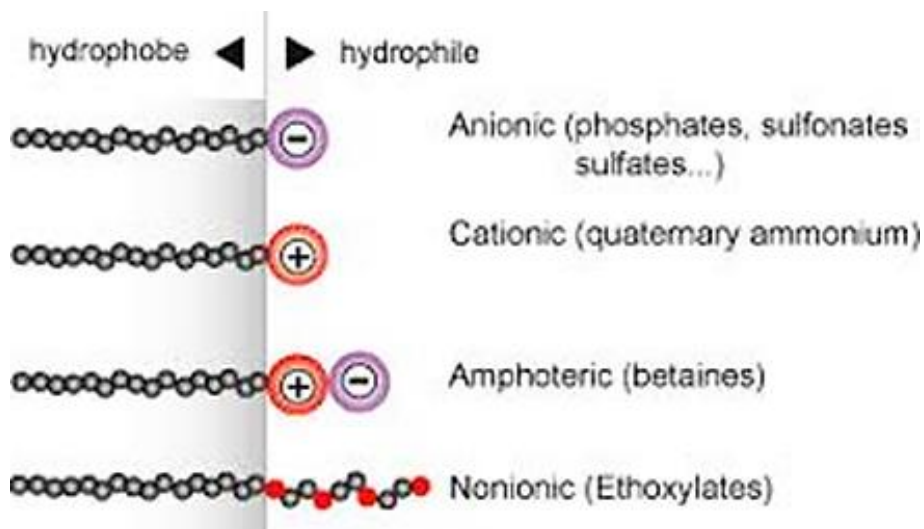
Οι ουρές των περισσότερων επιφανειοδραστικών είναι παρόμοιες, αποτελούμενες από αλυσίδα υδρογονανθράκων, που μπορεί να είναι είτε διακλαδισμένη, είτε γραμμική είτε

και αρωματική. Πρόσφατες τεχνολογίες, αναπτύσσουν μικτές αλυσίδες και σύνθετες δομές αυτών.

Υπάρχουν 4 τύποι επιφανειοδραστικών, που βασίζονται στην σύνθεση της πολικότητας της κεφαλής τους:

- Μη Ιοντικά
- Ανιοντικά
- Κατιοντικά
- Αμφότερικά

Ένα μη ιοντικό τασιενεργό δεν θα φέρει ομάδες φορτίου στην κεφαλή του, ενώ ένα ιοντικό θα φέρει καθαρό φορτίο. Εάν αυτό είναι αρνητικό, το επιφανειοδραστικό θεωρείται ανιοντικό και αν είναι φορτισμένο θετικά, κατιοντικό. Σε περίπτωση που το τασιενεργό φέρει κεφαλή με δύο αντίθετα φορτισμένες ομάδες, θα ονομάζεται αμφιτεριονικό.



Εικόνα 12: Η αλληλεπίδραση των διαφορετικών ειδών τασιενεργών με υδρόφοβη μεμβράνη [61]

Ανιονικό τασιενεργό

Τα συγκεκριμένα τασιενεργά θα περιέχουν στην κεφαλή τους ανιοντικές λειτουργικές ομάδες, όπως για παράδειγμα το σουλφονικό, το φωσφορικό, το θειικό και τα καρβοξυλικά. Τα πιο συνηθισμένα τασιενεργά περιλαμβάνουν τα αλκυλοκαρβοξυλικά

(σαπούνια) όπως στεατικό νάτριο, τα οποία καλύπτουν παραπάνω από το 50% της παγκόσμιας χρήσης τασιενεργών.

Μη ιονικό επιφανειοδραστικό

Ορισμένες αλκοόλες με μακρά αλυσίδα εμφανίζουν ορισμένες επιφανειοδραστικές ιδιότητες.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ορισμένα από τα πιο εύχρηστα.

Πίνακας 1: Συνήθη μη ιοντικά επιφανειοδραστικά και χρήσεις τους

Εμπορική ονομασία	Χρήση
Triton X-100	Παράγοντας διαβροχής
Nonoxynol-9	Σπερματοκτόνο
Polysorbate	Συστατικό τροφών
Span	Βερνίκια, καθαριστικά
Plooxamers	Ποικίλες χρήσεις

Αμφοτερικά επιφανειοδραστικά

Τα αμφοτερικά τασιενεργά έχουν τον ίδιο αριθμό ανιοντικών και κατιοντικών κέντρων συνδεδεμένα στο ίδιο μόριο. Το ανιοντικό μέρος μπορεί να μεταβάλλεται και να περιλαμβάνει σουλφονικά άλατα. Το κατιοντικό μέρος βασίζεται σε πρωτοταγείς δευτερογενείς ή τριτοταγείς αμίνες ή κατιόντα τεταρτοταγούς αμμωνίου. Αυτό το είδος τασιενεργών είναι συνήθως ευαίσθητο στο pH και αναμένεται να συμπεριφέρεται ανιοντικά ή κατιονικά ανάλογα το pH του περιβάλλοντος.

Κατιονικό τασιενεργό

Τα κατιοντικά τασιενεργά έχουν θετικά φορτισμένη κεφαλή. Οι χρήσεις τους ποικίλλουν από αντιμικροβιακά μέχρι οικιακά και βιομηχανικά καθαριστικά. Η κατιοντική τους φύση διαταράσσει τις κυτταρικές μεμβράνες βακτηρίων και ιών. Κάποια από τα πιο γνωστά κατιόντα τεταρτοταγούς δομής αμμωνίου περιλαμβάνουν τα άλατα αλκυλοτριμεθυλαμμωνίου, το βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο (CTAB) και το χλωριούχο τριμεθυλαμμώνιο (CTAC). [61]

2. Πειραματικό Μέρος

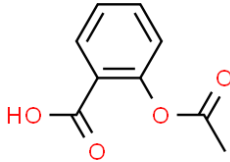
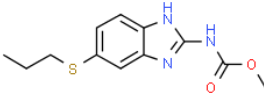
2.1 Σκοπός

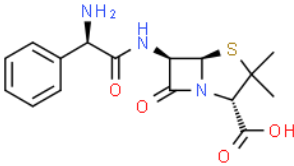
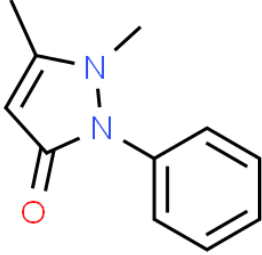
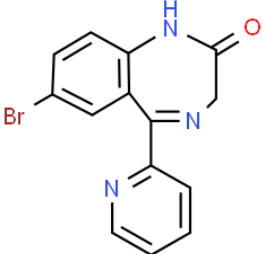
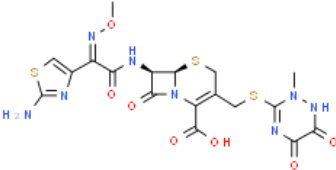
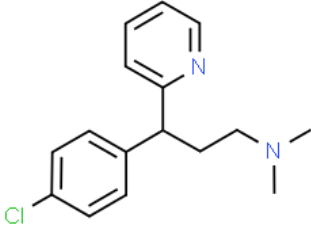
Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη του μηχανισμού έκλυσης φαρμακευτικών δραστικών ουσιών χρησιμοποιώντας μικυλλιακή υγρή χρωματογραφία παρουσία του τασιενεργού CTAB, όπως επίσης και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ως προς την ικανότητα της μεθόδου εκτίμησης ορισμένων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των δραστικών ουσιών.

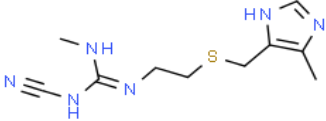
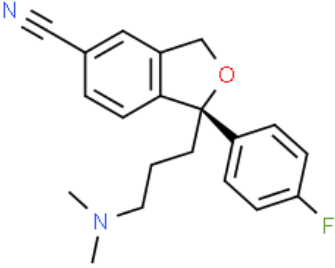
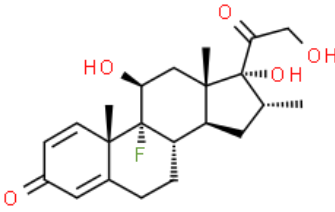
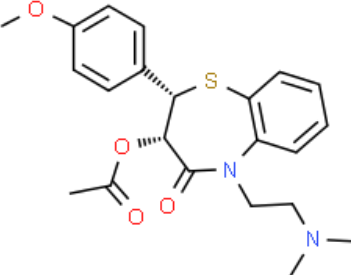
2.2 Φαρμακευτικές Ενώσεις

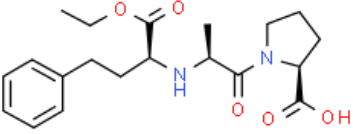
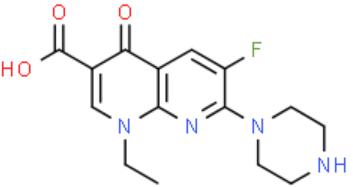
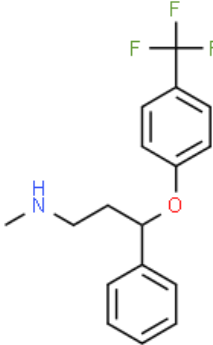
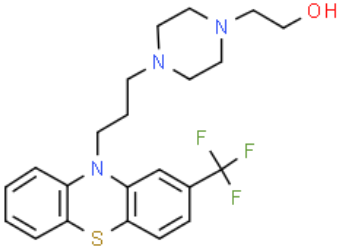
Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 45 φαρμακευτικές ενώσεις που παρουσιάζονται παρακάτω σύμφωνα με την δομή και την φαρμακολογική δράση τους. Οι συγκεκριμένες δραστικές προμηθεύτηκαν είτε ως πρότυπες, είτε ως φαρμακευτικά σκευάσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφεται η ονομασία τους, η φαρμακολογική τους δράση καθώς και η δομή τους.

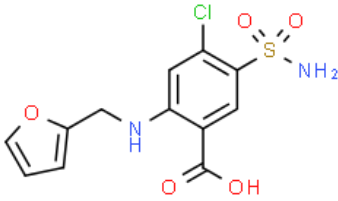
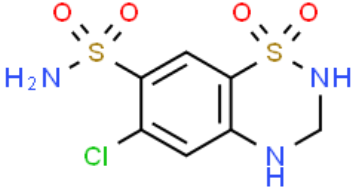
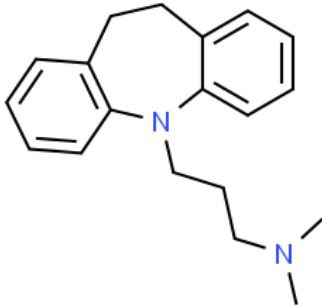
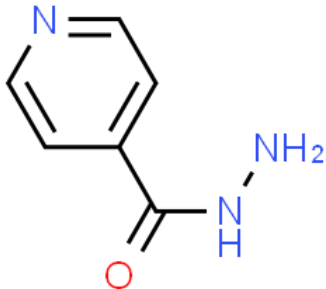
Πίνακας 2: Οι φαρμακευτικές ουσίες που μελετήθηκαν

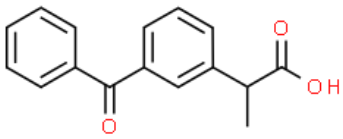
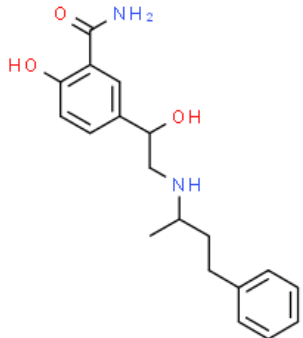
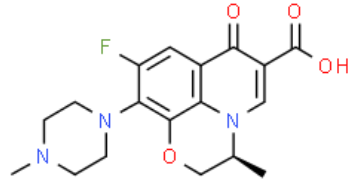
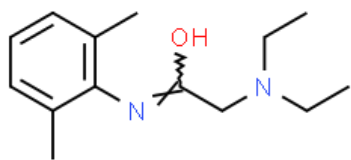
α/α	Φαρμακευτική Ένωση	Φαρμακολογική Δράση	Δομή
1	Acetylsalicylic Acid	Αντιφλεγμονώδες	
2	Albendazole	Ανθελμινθικό	

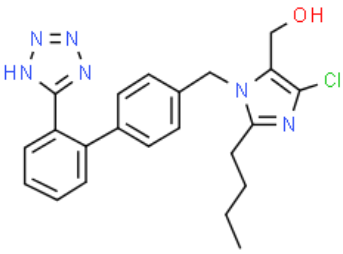
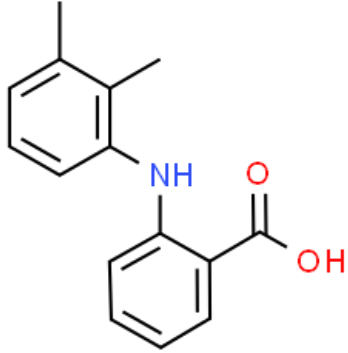
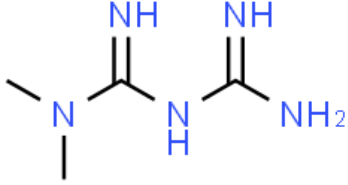
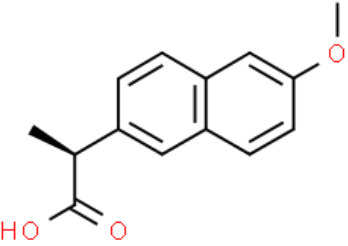
3	Ampicillin	Αντιβιοτικό	 <p>The chemical structure of Ampicillin is a penicillin derivative. It features a central beta-lactam ring fused to a five-membered thiazolidine ring. Attached to the thiazolidine ring are a phenylacetamido group (NH₂ and a phenyl ring), a methyl group, and a propionic acid side chain (CH₂CH₂COOH).</p>
4	Antipyrine	Αναλγητικό	 <p>The chemical structure of Antipyrine is a pyridone derivative. It consists of a six-membered pyridone ring with a methyl group at the 2-position and a phenyl ring at the 4-position.</p>
5	Bromazepam	Αγχολυτικό	 <p>The chemical structure of Bromazepam is a benzodiazepine. It features a seven-membered benzodiazepine ring system with a bromine atom at the 5-position, a phenyl ring at the 1-position, and a carbonyl group at the 2-position.</p>
6	Ceftriaxone	Αντιβιοτικό	 <p>The chemical structure of Ceftriaxone is a third-generation cephalosporin. It features a central six-membered beta-lactam ring fused to a five-membered dihydrothiazine ring. The structure is highly substituted with various side chains, including a phenylacetamido group, a methyl group, and a propionic acid side chain.</p>
7	Chlorpheniramine	Αντιισταμινικό	 <p>The chemical structure of Chlorpheniramine is an antihistamine. It consists of a central carbon atom bonded to a 4-chlorophenyl ring, a 2-pyridyl ring, and a propyl chain ending in a dimethylamino group (N(CH₃)₂).</p>

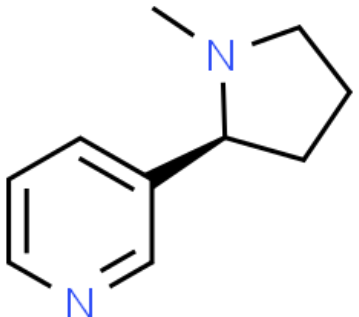
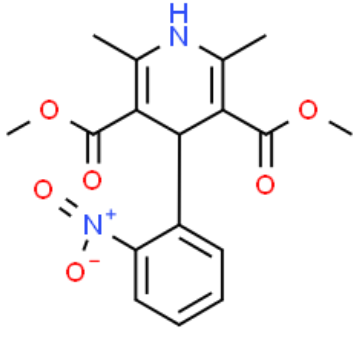
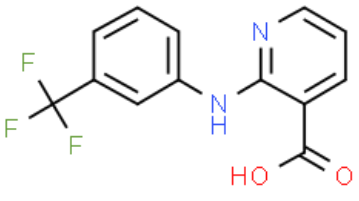
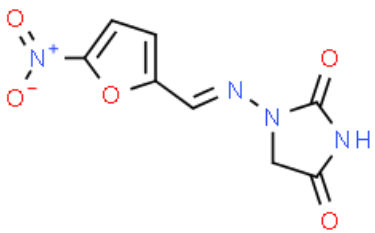
8	Cimetidine	Αντιόξινο (για τη θεραπεία του πεπτικού έλκους)	
9	Citalopram	Αντικαταθλιπτικό	
10	Dexamethasone	Αντιφλεγμονώδες	
11	Diltiazem	Αντιυπερτασικό	

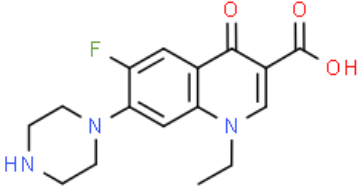
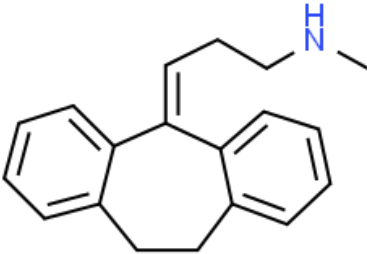
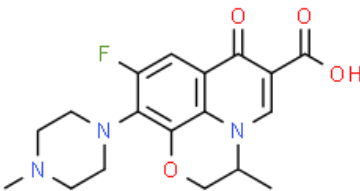
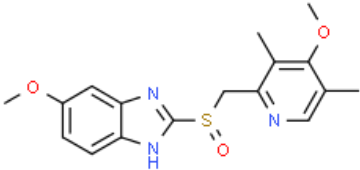
12	Enalapril	Αντιυπερτασικό	 <p>The chemical structure of Enalapril is a complex molecule. It features a central proline ring (a five-membered ring with one nitrogen and one oxygen atom). Attached to this ring are a carboxylic acid group (-COOH) and a side chain. The side chain consists of a chiral center bonded to a hydrogen atom, a propanoic acid group (-CH2-CH2-COOEt), and a propanoic acid group (-CH2-CH2-COOH). The propanoic acid group is further substituted with a phenyl ring.</p>
13	Enoxacin	Αντιβιοτικό	 <p>The chemical structure of Enoxacin is a quinolone derivative. It consists of a fused bicyclic system: a pyridine ring fused to a pyrimidine ring. The pyridine ring has a carboxylic acid group (-COOH) at the 2-position and a piperazine ring at the 8-position. The pyrimidine ring has a fluorine atom at the 6-position and a piperazine ring at the 7-position.</p>
14	Fluoxetine	Αντικαταθλιπτικό	 <p>The chemical structure of Fluoxetine is a serotonin reuptake inhibitor. It features a central carbon atom bonded to a hydrogen atom, a methylamino group (-NHCH3), a phenyl ring, and a piperazine ring. The piperazine ring is further substituted with a trifluoromethyl group (-CF3) and a phenoxy group (-O-C6H4-).</p>
15	Fluphenazine	Αντιψυχωσικό	 <p>The chemical structure of Fluphenazine is a phenothiazine derivative. It consists of a phenothiazine core (a benzene ring fused to two thiophene rings). The phenothiazine core is substituted with a trifluoromethyl group (-CF3) and a piperazine ring. The piperazine ring is further substituted with a hydroxyethyl group (-CH2-CH2-OH).</p>

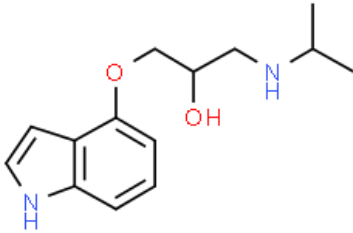
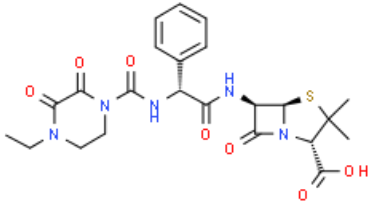
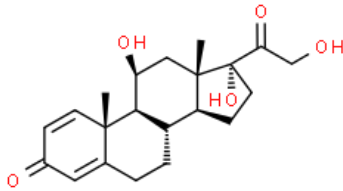
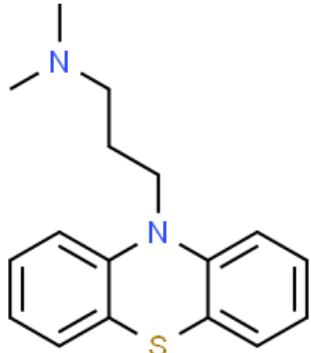
16	Furosemide	Διουρητικό	
17	Hydrochlorothiazide	Διουρητικό	
18	Imipramine	Αντικαταθλιπτικό	
19	Isoniazid	Αντιφυματικό	

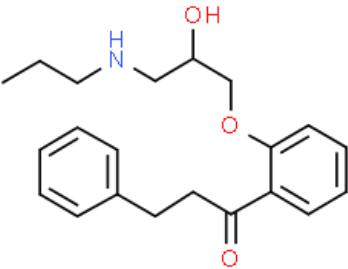
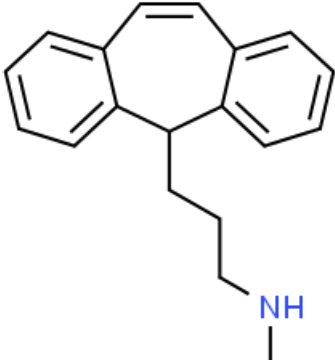
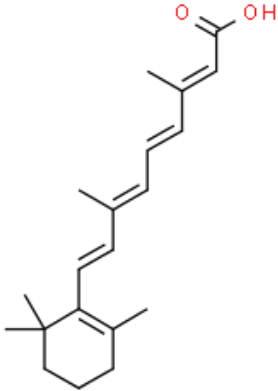
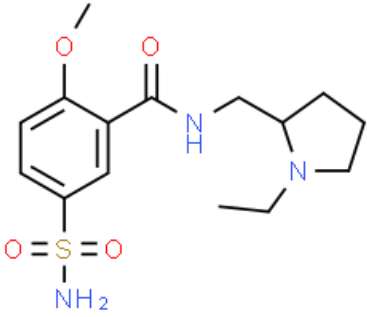
20	Ketoprofen	Αντιφλεγμονώδες	
21	Labetalol	Αντιυπερτασικό-αντισηθαιτικό	
22	Levofloxacin	Αντιβιοτικό	
23	Lidocaine	Ανταρρυθμικό, Αναισθητικό	

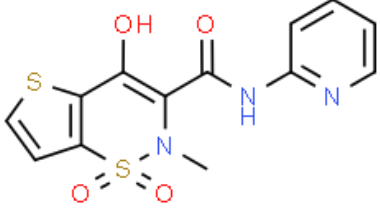
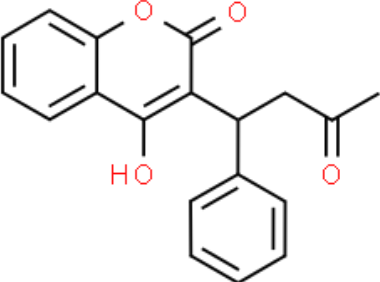
24	Losartan	Αντιυπερτασικό	 <p>The chemical structure of Losartan consists of a central biphenyl core. One phenyl ring is substituted with a tetrazole ring (N=N-NH) at the para position. The other phenyl ring is substituted with a 5-pyrroline ring at the para position. The 5-pyrroline ring has a hydroxyl group (OH) and a chlorine atom (Cl) at the 2-position, and a butyl chain at the 3-position.</p>
25	Mefenamic Acid	Αντιφλεγμονώδες	 <p>The chemical structure of Mefenamic Acid features a central benzene ring. It is substituted with a methyl group at the 2-position, a methyl group at the 3-position, and an amino group (NH) at the 4-position. A propionic acid group (-CH2-CH2-COOH) is attached to the 1-position of the benzene ring.</p>
26	Metformin	Αντιδιαβητικό	 <p>The chemical structure of Metformin is a symmetrical biguanide derivative. It consists of a central carbon atom double-bonded to two nitrogen atoms (NH) and single-bonded to a third nitrogen atom (NH). The central carbon is also bonded to a methyl group (CH3) and a methylamino group (NH-CH3).</p>
27	Naproxen	Αντιφλεγμονώδες	 <p>The chemical structure of Naproxen is a naphthalene derivative. It features a naphthalene core with a propionic acid group (-CH2-CH2-COOH) at the 1-position and a methoxy group (-OCH3) at the 6-position.</p>

28	Nicotine	Αγωνιστής υποδοχέων νικοτίνης στο ΚΝΣ	
29	Nifedipine	Αντιυπερτασικό-αντιστηθαγικό	
30	Niflumic Acid	Αντιφλεγμονώδες	
31	Nitrofurantoin	Αντιβιοτικό	

32	Norfloxacin	Αντιβιοτικό	 <p>The chemical structure of Norfloxacin is a quinolone derivative. It features a central quinolone ring system with a piperazine ring attached at the 7-position, a fluorine atom at the 6-position, and a carboxylic acid group at the 3-position. The 8-position is substituted with an ethyl group.</p>
33	Nortriptyline	Ψυχοαναληπτικό	 <p>The chemical structure of Nortriptyline is a tricyclic antidepressant. It consists of a central seven-membered ring fused to two benzene rings. A dimethylaminoethyl side chain is attached to the central ring via a double bond.</p>
34	Ofloxacin	Αντιβιοτικό	 <p>The chemical structure of Ofloxacin is a quinolone derivative. It features a central quinolone ring system with a piperazine ring attached at the 7-position, a fluorine atom at the 6-position, and a carboxylic acid group at the 3-position. The 8-position is substituted with an isopropylethoxy group.</p>
35	Omeprazole	Αντιόξινο (για τη θεραπεία του πεπτικού έλκους)	 <p>The chemical structure of Omeprazole is a proton pump inhibitor. It consists of a benzimidazole ring system with a methoxy group at the 5-position and a sulfinyl group at the 2-position. The sulfinyl group is further substituted with a 2,4,6-trimethyl-5-methoxyphenyl group.</p>

36	Pindolol	Αντιυπερτασικό-αντιστηθαγικό	 <p>The chemical structure of Pindolol consists of an indole ring system. At the 3-position of the indole, there is a phenoxy group. This phenoxy group is further substituted at the para position with a side chain: -CH₂-CH(OH)-CH₂-NH-CH(CH₃)₂. The nitrogen atom in the side chain is highlighted in blue.</p>
37	Piperacillin	Αντιβιοτικό	 <p>The chemical structure of Piperacillin is a beta-lactam antibiotic. It features a piperazine ring system fused to a beta-lactam ring. The piperazine ring has an ethyl group on one nitrogen and a piperonyl group on the other. The beta-lactam ring is substituted with a phenyl group and a side chain containing a sulfur atom and a carboxylic acid group. The carbonyl oxygen of the beta-lactam ring is highlighted in blue.</p>
38	Prednisolone	Αντιφλεγμονώδες	 <p>The chemical structure of Prednisolone is a corticosteroid. It features a four-ring steroid nucleus. The A-ring has a ketone group at the 3-position. The B-ring has a double bond between C4 and C5. The D-ring has a hydroxyl group at C11 and a side chain at C17 consisting of a hydroxyl group and a carboxylic acid group. The hydroxyl group at C11 is highlighted in red.</p>
39	Promazine	Αντιψυχωσικό	 <p>The chemical structure of Promazine is a phenothiazine derivative. It consists of a central nitrogen atom bonded to three phenyl rings. One of the phenyl rings is substituted with a propyl chain that ends in a dimethylamino group (-N(CH₃)₂). The nitrogen atom in the propyl chain is highlighted in blue, and the sulfur atom in the phenothiazine system is highlighted in yellow.</p>

40	Propafenone	Αντιαρρυθμικό	
41	Protriptyline	Αντικαταθλιπτικό	
42	Retinoic Acid	Κατά δερματολογικών παθήσεων	
43	Sulpiride	Αντιψυχωσικό	

44	Tenoxicam	Αντιφλεγμονώδες	
45	Warfarin	Αντιπηκτικό	

2.3 Αντιδραστήρια

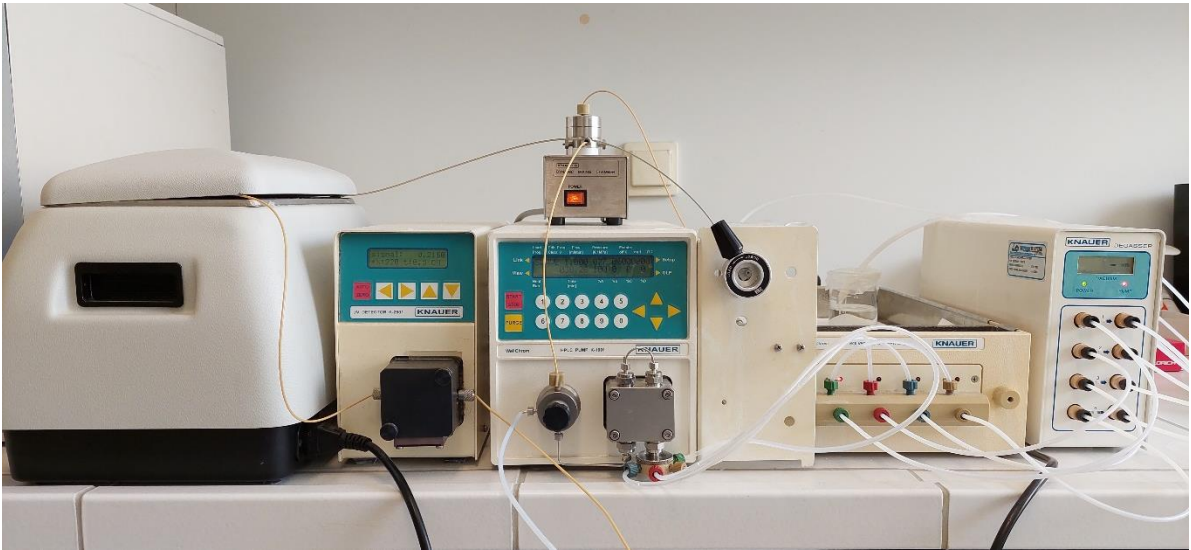
Για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκαν:

- KH_2PO_4 ($\geq 99,5\%$, Chem-Lab)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99,5\%$, Merck)
- NaCl ($\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich)
- CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromide) ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich)
- MeOH ($\geq 99,9\%$, Honeywell)
- Νερό υψηλής καθαρότητας (High Purity Water)

Το νερό υψηλής καθαρότητας ελήφθη μέσω ενός συστήματος καθαρισμού νερού EasyPure II (Barnstead International, USA), ενώ για τον υπολογισμό του νεκρού χρόνου της στήλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ακετονιτριλίου και κινητής φάσης, σε αναλογία 50:50.

2.4 Οργανολογία

Οι πειραματικές μετρήσεις έγιναν με την χρήση συστήματος χρωματογραφίας Knauer, τα μέρη του οποίου αναλύονται παρακάτω.



Εικόνα 13: Το χρωματογραφικό σύστημα της Knauer

- **Αντλία** HPLC Pump k-1001, Knauer, με ροή 1mL/min
- **Στήλη αντιστρόφου φάσεως** Discovery HS C18, Supelco, διαστάσεων 15cm x 4,6mm x 5μm

- **Ανιχνευτής UV Detector K-2501**, Knauer, ρυθμισμένος στα 200nm. Ο ανιχνευτής βρίσκεται συνδεδεμένος με υπολογιστή, ούτως ώστε το σήμα του ανιχνευτή από το εξέρχον διάλυμα να καταγραφεί από τον υπολογιστή και να μετατραπεί σε χρωματογράφημα
- **Απαερωτής Vacuum Degasser**, Knauer. Ρόλος του είναι η αφαίρεση του αέρα που ενδεχομένως υπάρχει στο σωληνάκι της κινητής φάσης. Δεν πρέπει να υπάρξουν φυσαλίδες αέρα στον διαλύτη έκλουσης, διαφορετικά θα δημιουργηθεί πρόβλημα στο σύστημα. Συνεπώς ο απαερωτής είναι το πρώτο όργανο που θα ανοίξει στο σύστημα, μέχρι να περνάει από το σωληνάκι καθαρό υγρό
- **Διαχειριστής Διαλύτη Solvent Organiser K-1500**, Knauer. Στο συγκεκριμένο πείραμα, όπου υπάρχει ένας διαλύτης έκλουσης, χρησιμοποιείται ένας μόνο σωλήνας για την ροή της κινητής φάσης. Διαφορετικά αν εισέρχονταν περισσότερα διαλύματα, σκοπός της συσκευής αυτής θα ήταν η ρύθμιση της κινητής φάσης
- **Υδατόλουτρο Stirred water bath WB-4MS**, Biosan στους 37 °C. Το υδατόλουτρο δεν αποτελεί μέρος του συστήματος, ωστόσο η στήλη είναι τοποθετημένη εκεί μόνιμα, προκειμένου τα αποτελέσματα να έχουν μετρηθεί βάσει της θερμοκρασίας του ανθρώπινου σώματος



Εικόνα 14: Η στήλη αντιστρόφου φάσεως

Κατά την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε ζυγός ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων (Ohaus) και η ρύθμιση του pH έγινε με πεχάμετρο (Mettler Toledo). Για την λήψη του χρωματογραφήματος χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό EuroChrom 2000.

2.5 Πειραματική Διαδικασία

2.5.1 Κινητή φάση

Αρχικά, για τον διαλύτη έκλουσης χρησιμοποιούνται 1,676 g CTAB σε 500 ml διαλύματος αλάτων. Το διάλυμα των αλάτων προετοιμάζεται αναμιγνύοντας υπό ανάδευση σε περίπου 400ml υπερκάρθρο νερό, 0,77g KH_2PO_4 , 3,44g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ και 4,6g NaCl, το τελευταίο από τα οποία προστίθεται προκειμένου να προσομοιάσει την ωσμωτική πίεση του σώματος. Το pH ρυθμίζεται με αραιωμένο διάλυμα NaOH στο 7,4 και αραιωμένου HCl στο 5,5.

Σε αυτό το σημείο προστίθεται η παραπάνω ποσότητα CTAB υπό ανάδευση με θέρμανση για περίπου 15 λεπτά, και όταν το τασιενεργό διαλυθεί εντελώς στο διάλυμα, συμπληρώνεται υπερκάρθρο νερό ως τα 500ml σε ογκομετρική φιάλη. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό μία φορά χρησιμοποιώντας φίλτρο Nylon.

2.5.2 Χρωματογραφική Διαδικασία

Αρχικά, υπολογίζονται 3-4 τιμές νεκρού χρόνου με την χρήση διαλύματος ακετονιτριλίου όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Προκειμένου να υπολογιστεί ο μέσος όρος του νεκρού χρόνου κάθε ημέρας πειραμάτων, στο τέλος γίνονται άλλες 3 μετρήσεις νεκρού χρόνου, ώστε να αυξηθεί η ακρίβεια.

Ανάλογα το φάρμακο και την ακρίβεια των μετρήσεων, το πείραμα λάμβανε χώρα από μία ως και τέσσερις ή πέντε φορές, προκειμένου να μην υπάρχει μεγάλη απόκλιση και εν τέλει υπολογιζόταν ο μέσος όρος των αντίστοιχων χρόνων. Στην συνέχεια υπολογίστηκε ο συντελεστής ανάσχεσης της κάθε δραστικής ουσίας βάσει της σχέσης

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}, \text{ και λογαριθμίζοντας την, έγινε η αξιολόγηση της κάθε τιμής.}$$

Ορισμένα πειράματα έλαβαν χώρα όχι μόνο στην τιμή pH 7,4 αλλά και για 5,5, που αντιστοιχεί στο pH του λεπτού εντέρου στο ανθρώπινο σώμα. Τα ελαφρώς όξινα φάρμακα λόγω του μειωμένου ιονισμού τους σε χαμηλά pH, εμφανίζουν αυξημένη λιποφιλία, με αποτέλεσμα να κατακρατούνται στην στήλη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, σε σχέση με το ουδέτερο pH. Λαμβάνοντας αυτό υπόψιν, μελετώνται στο παρόν πείραμα, όλα τα φάρμακα που είναι όξινα ή αμφολυτικά, ώστε να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της μικκυλιακής χρωματογραφίας υπό τέτοιες συνθήκες. Όταν υπάρχει μειωμένος ιονισμός στο φάρμακο, αναμένεται μεγαλύτερη απορρόφηση όσον αφορά την χορήγηση από το στόμα. Από την άλλη, τα ουδέτερα φάρμακα δεν

επηρεάζονται από τις διακυμάνσεις του pH, ενώ τα βασικά έχουν μειωμένο ιονισμό αυξάνοντας το, επομένως η μελέτη τους δεν παρουσιάζει ιδιαίτερο εργαστηριακό ενδιαφέρον. Το λογισμικό SPSS χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

2.8 Βιβλιογραφικά Δεδομένα

2.8.1 Δεδομένα λιποφιλίας & κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου μορίων

Με την χρήση του λογισμικού ADME Boxes 3.0 της εταιρίας Pharma Algorithms, υπολογίστηκαν οι συντελεστές μερισμού και κατανομής και για τα δύο pH στα οποία πραγματοποιήθηκε το πείραμα. Βάσει αυτών των παραμέτρων θα πραγματοποιηθεί η στατιστική ανάλυση των πειραματικών μετρήσεων. Επιπλέον, τα αντίστοιχα δεδομένα για τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου των μορίων στο pH 7,4 υπολογισμένα επίσης από το ίδιο λογισμικό παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 3: Δεδομένα συντελεστή μερισμού ($\log P$), κλασμάτων θετικού (F^+ , $F_{zwitter}^+$) κι αρνητικού (F^- , $F_{zwitter}^-$) φορτίου, σε pH 7,4, και συντελεστή κατανομής ($\log D_{7,4}$, $\log D_{5,5}$), σε pH 7,4 και 5,5.

α/α	Φαρμακευτική Ένωση	$\log P$	$\log D_{7,4}$	$\log D_{5,5}$	$F^+_{7,4}$	$F^-_{7,4}$	$F_{zwitter}^+_{7,4}$	$F_{zwitter}^-_{7,4}$
1	Acetylsalicylic Acid	1,19	-2,50	-0,82	-	1,000	-	1,000
2	Albendazole	3,29	3,29	3,12	0,004	0,002	0,004	0,002
3	Ampicillin	-1,13	-4,00	-3,67	-	0,530	0,470	1,000
4	Antipyrine	0,38	0,38	0,38	-	-	-	-
5	Bromazepam	1,65	1,65	1,64	-	-	-	-
6	Ceftriaxone	-0,46	-3,08	-2,97	-	0,221	0,779	1,000
7	Chlorpheniramine	3,39	1,58	-0,29	0,986	-	0,986	-
8	Cimetidine	0,40	0,35		0,218	-	0,218	-
9	Citalopram	3,41	1,44		0,991	-	0,991	-
10	Dexamethazone	1,83	1,83	1,83	-	-	-	-
11	Diltiazem	2,80	0,00	0,15	0,875	-	0,875	-
12	Enalapril	0,71	-2,38	-1,05	-	0,986	0,014	1,000

13	Enoxacin	-1,02	-1,02	-1,68	0,051	0,033	0,965	0,947
14	Fluoxetine	4,26	1,82		0,997	-	0,997	-
15	Fluphenazine	4,36	3,82	2,06	0,737	-	0,737	-
16	Furosemide	2,03	-0,69	0,03	-	1,000	-	1,000
17	Hydrochlorothiazide	-0,07	-0,08		-	0,028	-	0,028
18	Imipramine	4,80	2,83		0,991	-	0,991	-
19	Isoniazid	-0,70	-0,92		-	-	-	-
20	Ketoprofen	3,12	-0,25	1,89	-	0,999	-	0,999
21	Labetalol	3,09	1,63		0,552	0,022	0,946	0,416
22	Levofloxacin	-0,25	-0,25	-0,88	0,047	0,096	0,898	0,947
23	Lidocaine	2,26	1,71	-0,06	0,779	-	0,779	-
24	Losartan	3,09	1,16	2,24	-	0,933	0,066	0,999
25	Mefenamic Acid	5,12	2,00	4,00	-	0,999	-	0,999
26	Metformin	-0,91	-3,91	1,88	1,000	-	1,000	-
27	Naproxen	3,18	0,33	1,95	-	0,999	-	0,999
28	Nicotine	1,13	0,26	-1,57	0,875	-	0,875	-
29	Nifedipine	2,20	2,20	2,20	-	-	-	-
30	Niflumic Acid	4,81	0,80		-	0,997	0,003	1,000
31	Nitrofurantoin	-0,47	-0,77	-0,48	-	0,473	-	0,473
32	Norfloxacin	-1,03	-1,03	-1,68	0,050	0,033	0,964	0,947
33	Nortriptyline	4,04	1,70		0,998	-	0,998	-
34	Ofloxacin	-0,39	-0,44	-1,00	0,047	0,096	0,898	0,947
35	Omeprazole	2,30	2,30		0,001	0,054	0,001	0,054
36	Pindolol	1,75	-0,33	-1,24	0,994	-	0,994	-
37	Piperacillin	0,50	-1,58	-1,00	-	1,000	-	1,000
38	Prednisolone	1,62	1,62	1,62	-	-	-	-
39	Promazine	4,55	2,58	1,52	0,991	-	0,991	-
40	Propafenone	3,20	1,81	0,90	0,992	-	0,992	-
41	Protriptyline	4,89	1,36	-0,33	0,875	-	0,875	-
42	Retinoic Acid	6,30	3,33		-	0,999	-	0,999
43	Sulpiride	0,62	-1,26	-2,40	0,984	-	0,988	0,004
44	Tenoxicam	0,84	-0,32	0,60	-	1,000	-	1,000
45	Warfarin	2,60	0,01	1,82	-	0,997	-	0,997

2.8.2 Δεδομένα Μικυλλιακής Υγροχρωματογραφίας

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα διαφορετικών συντελεστών κατακράτησης μικυλλιακής χρωματογραφίας, από την δημοσίευση «Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes» [69], αλλά και από τα πειράματα της ερευνητικής ομάδας του Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. [70]-[74]. Τα πειράματα αυτά έγιναν σε θερμοκρασία 37 °C, ενώ η κινητή φάση ήταν ρυθμισμένη σε pH 7,4 και 5,5. Αναφορικά με τα τασιενεργά, τα πειράματα εκτελέστηκαν με Brij-35 (ουδέτερο), Tween 20 (ουδέτερο), SDS (ανιοντικό) και Triton X-100 (ουδέτερο).

Πίνακας 4: Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της MLC με κινητή φάση ρυθμισμένη σε pH 7,40 και 5,50 και προσθήκη τασιενεργού Brij-35, Tween 20, SDS και TritonX100.

α/α	Φαρμακευτική-Ένωση	Logk _{Brij-}	Logk _{Brij-}	Logk _{Tween-}	logk _{Tween-}	Logk _{SDS-}	Logk _{SDS-}	Logk _{Triton-}	Logk _{Triton-}
		7,4	5,5	7,4	5,5	7,4	5,5	7,4	5,5
1	Acetylsalicylic-Acid	-0,42	-0,29	-0,81	0,38	-0,31	-0,04	-0,95	-0,71
2	Albendazole	1,36		-0,46		1,64		1,91	
3	Ampicillin	-0,30	-0,71	-0,66	-0,95	0,14	0,89	-0,44	-1,49
4	Antipyrine			-0,01		0,72		0,02	
5	Bromazepam	1,12		1,3		1,30		1,59	
6	Ceftriaxone	-0,58	-0,50	-0,73	0,80	-0,87	-1,51	-0,82	
7	Chlorpheniramine	1,24				1,56		1,20	
8	Cimetidine	0,37	-0,13	0,33		1,23		0,29	
9	Citalopram								
10	Dexamethazone	1,18		1,62		1,27		1,55	
11	Diltiazem	1,51		2,00	0,91	1,80			
12	Enalapril	0,22	0,18	0,2	0,24	0,33	0,37	0,33	
13	Enoxacin	-0,37	0,09	-0,94	0,25	-1,17	0,91	-1,28	-0,64
14	Fluoxetine	1,64		1,89		3,21		2,01	
15	Fluphenazine			2,24			1,24		
16	Furosemide	0,86	0,87	1,37	1,67	-0,25	0,33	1,43	1,54
17	Hydrochlorothiazide	0,50	0,53	1,00				1,30	
18	Imipramine			1,95		2,01			
19	Isoniazid								
20	Ketoprofen	0,67	1,26	0,63	1,65	0,21	1,32	0,71	
21	Labetalol	1,14	0,97	1,57		1,77	1,50	1,77	
22	Levofloxacin	-0,03	-0,02	-0,72	-0,33	-1,32	0,91	-0,77	

23	Lidocaine	0,85		1,39	-0,08	1,78		1,19	
24	Losartan	0,97	1,04	1,48	1,55	0,29	1,09	1,78	1,99
25	Mefenamic-Acid	1,21	1,67			1,30	2,15	1,64	
26	Metformin	-0,53		-0,63		0,85			
27	Naproxen	0,70	1,34	0,71	1,39	0,15	1,42	0,89	
28	Nicotine			0,41		1,09		0,31	
29	Nifedipine	1,39						1,89	
30	Niflumic-Acid	1,14	1,28	1,52	1,79	0,70	1,69	2,12	
31	Nitrofurantoin			1,79	0,50	0,01	0,41	0,11	0,36
32	Norfloxacin	-0,16	-0,17	-0,71	-0,17	-1,32	1,12	-0,93	-0,21
33	Nortriptyline	1,41	1,18	2,17		2,29			
34	Ofloxacin	-0,02	0,01	-0,48	-0,37	-0,98	0,76	-0,75	
35	Omeprazole	1,13	1,10	1,48		1,53		1,51	
36	Pindolol	0,39	0,28	0,14		1,30	1,07	0,33	
37	Piperacillin	-0,25	-0,22	-0,28	-0,37	-0,44	-0,29	-0,49	
38	Prednisolone	1,07		1,26		0,33		1,76	
39	Promazine			1,79	1,48		1,99		
40	Propafenone	1,30				2,04		1,52	
41	Protriptyline	1,46	1,11	2,25			1,85		
42	Retinoic-Acid								
43	Sulpiride	-0,19	-0,35	-0,37		0,86		-0,26	-0,41
44	Tenoxicam	0,77	0,81	-0,01	1,30				
45	Warfarin	0,86	1,31	2,02	1,59	0,79	1,12	1,24	1,93

2.8.3 Δεδομένα Χρωματογραφίας Ακίνητοποιημένων Μεμβρανών

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται δεδομένα συντελεστών κατακράτησης ακίνητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών τόσο από βιβλιογραφικά δεδομένα [75] [76], όσο και από πειράματα στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας Ε.Μ.Π [77]. Αναφορικά με τα πειράματα, χρησιμοποιήθηκε η στήλη IAM.PC.DD2, καθώς και η κινητή φάση PBS, ρυθμισμένη στα δύο pH ενδιαφέροντος.

Πίνακας 5: Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της IAM με κινητή φάση (PBS σε pH 7,4 και 5,5 και στατική φάση τη στήλη IAM.PC.DD2

α/α	Φαρμακευτική Ένωση	IAM,DD2 _{7,4}	IAM,DD2 _{5,5}
1	Acetylsalicylic Acid	-0,81	-0,48
2	Albendazole	2,08	
3	Ampicillin	0,04	0,07
4	Antipyrine	0,31	
5	Bromazepam	1,44	
6	Ceftriaxone	-0,52	-0.11
7	Chlorpheniramine	2,03	
8	Cimetidine	0,84	0,46
9	Citalopram	2,57	
10	Dexamethazone	1,56	
11	Diltiazem	2,65	
12	Enalapril		
13	Enoxacin	0,55	1,25
14	Fluoxetine	2,98	
15	Fluphenazine	4,01	
16	Furosemide	1,32	1,60
17	Hydrochlorothiazide	0,91	0,70
18	Imipramine	2,88	
19	Isoniazid	-0,60	
20	Ketoprofen	0,74	1.55
21	Labetalol	2,46	2.01
22	Levofloxacin	0,84	1.59
23	Lidocaine	1,27	
24	Losartan	2,47	2,58
25	Mefenamic Acid	1,88	2.80
26	Metformin	-0,37	
27	Naproxen	0,98	
28	Nicotine	0,09	

29	Nifedipine	1,66	
30	Niflumic Acid	1,52	1,64
31	Nitrofurantoin	0,31	0,41
32	Norfloxacin	1,01	
33	Nortriptyline	2,83	
34	Ofloxacin	0,81	1.35
35	Omeprazole	1,81	1,85
36	Pindolol	1,47	
37	Piperacillin	0,60	1.13
38	Prednisolone	1,65	
39	Promazine	3,05	
40	Propafenone	1,46	
41	Protriptyline	2,79	
42	Retinoic Acid	4,59	
43	Sulpiride	1,04	0,71
44	Tenoxicam	1,20	1.52
45	Warfarin	1,04	1,97

2.9 Δεδομένα φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων

Προκειμένου να συσχετιστούν οι συντελεστές κατακράτησης $\log k_{CTAB}$ με ορισμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, οι παρούσες μετρήσεις θα συνδυαστούν και με ακόμα 47 μετρήσεις που έλαβαν χώρα την ίδια περίοδο στο εργαστήριο του Ε.Μ.Π. ώστε να υπάρχει επαρκές εύρος δεδομένων. Τα φάρμακα επομένως που θα χρησιμοποιηθούν στα κεφάλαια 2.9 και 3.6 είναι συνδυασμός τόσο αυτών που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία αλλά και στην εργασία της Ολυμπίας Τσιώμου [86]

2.9.1 Δεδομένα κυτταρικής διαπερατότητας μέσω επιθηλιακών σειρών εντέρου Caco-2

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα δεδομένα κυτταρικής διαπερατότητας μέσω των επιθηλιακών σειρών εντέρου, Caco-2, για τα φάρμακα που μελετήθηκαν. [87]

Πίνακας 6: Δεδομένα κυτταρικής διαπερατότητας Caco-2

α/α	Φαρμακευτική Ένωση	$\log k^{CTAB}$	$\log P_{\text{effCaco-2}}$	TPSA
1	Atenolol	-1,088	-5,790	84,58
2	Bromazepam	0,979	-4,400	54,35
3	Carbamazepine	1,627	-4,380	46,33
4	Chloramphenicol	0,817	-4,970	118,39
5	Cimetidine	0,846	-5,790	114,19
6	Ciprofloxacin	0,040	-5,610	72,88
7	Clonidine	0,652	-4,460	36,42
8	Codeine	1,675	-4,640	41,93
9	Colchicine	-5,886	83,09	1,994
10	Dexamethazone	1,625	-5,270	94,83
11	Furosemide	1,295	-5,890	131,01
12	Hydrochlorothiazide	0,775	-5,740	135,12
13	Imipramine	2,020	-4,660	6,48
14	Ketoprofen	0,735	-4,730	54,37
15	Lisinopril	-1,047	-6,180	132,96
16	Metformin	-0,411	-5,110	88,99
17	Methylprednisolone	1,773	-5,250	94,83
18	Metoprolol	0,386	-4,750	50,72
19	Nadolol	0,067	-5,910	81,95
20	Naproxen	0,768	-4,510	46,53
21	Nifedipine	1,782	-4,490	113,46

22	Norfloxacin	-0,638	-5,630	72,88
23	Omeprazole	0,739	-4,300	96,31
24	Pindolol	0,735	-4,910	57,28
25	Propranolol	1,620	-4,670	41,49
26	Quinidine	1,599	-4,880	45,59
27	Terbutaline	-0,188	-5,620	72,72
28	Trimethoprim	1,129	-4,760	105,51
29	Warfarin	1,137	-4,380	63,60

2.9.2 Δεδομένα διαπερατότητας μέσω σειρών τεχνητών μεμβρανών, PAMPA

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα δεδομένα διαπερατότητας μέσω των σειρών τεχνητών μεμβρανών PAMPA, για τα αντίστοιχα φάρμακα που μελετήθηκαν. [87]

Πίνακας 7: Δεδομένα διαπερατότητας PAMPA

α/α	Φαρμακευτική Ένωση	log _k ^{CTAB}	PAMPA	TPSA
1	Antipyrine	0,241	-6,154	23,55
2	Caffeine	0,039	-5,796	58,44
3	Carbamazepine	1,627	-5,149	46,33
4	Desipramine	1,548	-4,910	15,27
5	Diltiazem	1,652	-4,759	84,38
6	Furosemide	1,295	-7,699	131,01
7	Hydrochlorothiazide	0,775	-8,000	135,12
8	Ibuprofen	1,375	-5,569	37,30
9	Imipramine	2,020	-4,955	6,48
10	Ketoprofen	0,735	-7,301	54,37
11	Metoprolol	0,386	-6,161	50,72
12	Naproxen	0,768	-6,481	46,53
13	Paracetamol	-0,214	-9,000	49,33
14	Promethazine	2,062	-5,137	31,78
15	Propranolol	1,620	-5,000	41,49
16	Sulpiride	0,063	-8,000	110,11
17	Terbutaline	-0,188	-7,398	72,72
18	Theophylline	-0,911	-7,398	69,30

2.9.3 Δεδομένα απορρόφησης μέσω της γαστρεντερικής οδού κατά τη χορήγηση από το στόμα (%HOA)

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα δεδομένα απορρόφησης μέσω της γαστρεντερικής οδού, για τα φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα. Τα δεδομένα έχουν εκφραστεί σε ποσοστιαία μορφή.

Τα προς μελέτη φάρμακα αποτελούνται από τα ίδια φάρμακα (ίδιο test set) που μελετήθηκαν σε παλαιότερες δημοσιεύσεις, ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις χρησιμοποιούνται σαν training set. Επισημαίνεται ότι τα μοριακά βάρη καθώς και οι τιμές TPSA έχουν ληφθεί από το λογισμικό ADME Boxes Software. [87]

Πίνακας 8: Δεδομένα απορρόφησης μέσω γαστρεντερικής οδού

α/α	Φαρμακευτική Ένωση	logk _{best}	%HOA	MW	TPSA
1	Acetylsalicylic acid	-0,145	100,00	180,16	63,60
2	Acyclovir	-0,943	21,00	225,20	114,76
3	Allopurinol	-0,847	90,00	136,11	70,14
4	Amitriptyline	2,181	97,00	277,40	3,24
5	Amlodipine	1,292	80,00	408,87	99,88
6	Ampicillin	-0,286	35,00	349,40	138,03
7	Antipyrine	0,241	100,00	188,23	23,55
8	Atenolol	-1,088	48,00	266,34	84,58
9	Atropine	-0,883	92,50	289,37	49,77
10	Bromazepam	0,979	84,00	316,15	54,35
11	Caffeine	0,039	100,00	194,19	58,44
12	Carbamazepine	1,627	84,00	236,27	46,33
13	Chlordiazepoxide	1,806	97,00	299,75	44,47
14	Ciprofloxacin	0,693	60,00	331,34	72,88
15	Clonidine	0,652	98,00	230,09	36,42
16	Desipramine	1,548	92,50	266,38	15,27
17	Dexamethasone	1,625	85,00	392,46	94,83
18	Diltiazem	1,652	85,00	414,52	84,38
19	Enalapril	0,071	63,00	376,45	95,94
20	Enoxacin	-0,146	90,00	320,32	85,77
21	Fluoxetine	1,828	80,00	309,33	21,26
22	Furosemide	1,295	61,00	330,74	131,01
23	Hydrochlorothiazide	0,775	69,00	297,74	135,12
24	Ibuprofen	1,469	80,00	206,28	37,30
25	Imipramine	2,020	97,00	280,41	6,48

26	Ketoprofen	1,480	100,00	254,28	54,37
27	Labetalol	1,691	95,00	328,40	95,58
28	Lidocaine	1,017	97,00	234,34	32,34
29	Lisinopril	-0,734	25,00	405,49	132,96
30	Mefenamic	1,458	92,50	241,28	49,33
31	Metoprolol	0,386	95,00	267,36	50,72
32	Naproxen	1,110	100,00	230,26	46,53
33	Nicotine	0,539	100,00	162,23	16,13
34	Nifedipine	1,782	90,00	346,33	113,46
35	Nimesulide	1,801	100,00	308,31	112,61
36	Nitrofurantoin	-0,211	95,00	238,16	123,74
37	Norfloxacin	0,420	68,00	319,33	72,88
38	Nortriptyline	1,662	100,00	263,38	12,03
39	Ofloxacin	-0,048	98,00	361,37	73,32
40	Paracetamol	-0,214	85,00	151,16	49,33
41	Phenytoin	2,048	100,00	252,27	58,20
42	Pindolol	0,735	92,60	248,32	57,28
43	Prednisolone	1,382	99,00	360,44	94,83
44	Primidone	0,758	86,50	218,25	58,20
45	Promethazine	2,062	88,00	284,42	31,78
46	Propafenone	1,548	90,00	341,44	58,56
47	Propranolol	1,620	92,90	259,34	41,49
48	Protriptyline	1,488	97,00	263,38	12,03
49	Quinidine	1,599	80,60	324,42	45,59
50	Sulfamethoxazole	1,413	100,00	253,28	106,60
51	Tenoxicam	1,147	100,00	337,38	136,22
52	Terbutaline	-0,188	59,50	225,28	72,72
53	Theophylline	-0,911	98,00	180,16	69,30
54	Tramadol	0,951	100,00	263,37	32,70
55	Trimethoprim	1,129	97,00	290,32	105,51

2.10 Στατιστική Ανάλυση

Για το τμήμα της στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό IBM SPSS Statistics Subscription. Μέσω πολλαπλών αναλύσεων παλινδρόμησης εξετάστηκαν οι εξισώσεις που δημιουργήθηκαν. Αναφορικά με τις πολλαπλές αναλύσεις παλινδρόμησης αναφέρεται ο αριθμός των δεδομένων (n), ο συντελεστής συσχέτισης (R^2), η τυπική απόκλιση (s) και το F-Test, για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Ο συντελεστής παλινδρόμησης (Regression Coefficient) της κάθε παραμέτρου, καθώς και το τυπικό σφάλμα αναγράφονται σε παρένθεση. Προκειμένου να εξαχθεί η τελική εξίσωση γινόταν τόσο έλεγχος σημαντικότητας κάθε μεταβλητής μέσω του Student-test για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, όσο και έλεγχος της τελευταίας στήλης του πίνακα ANOVA ώστε να ισχύει $p \leq 0,05$ ούτως ώστε η μεταβολή να είναι στατιστικά σημαντική. Οι μη στατιστικά σημαντικές μεταβλητές αφαιρέθηκαν και επαναλήφθηκε πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης. Σε περίπτωση που η διαφορά της υπολογιζόμενης από το μοντέλο τιμής από την πειραματική τιμή ήταν μεγαλύτερη από το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης, η συγκεκριμένη ένωση χαρακτηριζόταν outlier.

3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα και υπολογισμός συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση, $\log k_w^{CTAB}$

Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας με τα δεδομένα των συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση για καθένα από τα 45 φάρμακα που μελετήθηκαν πειραματικά στα pH 7,4 και 5,5, με διαλύτη κινητής φάσης το CTAB. Στο όξινο pH μελετήθηκαν μόνο 22 ενώσεις που παρουσίαζαν αντίστοιχο ενδιαφέρον.

Πίνακας 9: Συντελεστές κατακράτησης σε υδατική φάση, $\log k^{CTAB}$, σε τιμές pH 7,4 και 5,5

α/α	Φάρμακο	$\log k_{w7,4}$	$\log k_{w5,5}$
1	Acetylsalicylic Acid	-0,172	-0,145
2	Albendazole	1,510	-
3	Ampicillin	-0,508	-0,286
4	Antipyrine	0,241	0,215
5	Bromazepam	0,979	-
6	Ceftriaxone	-0,259	-0,286
7	Chlorpheniramine	1,129	-
8	Cimetidine	0,846	-
9	Citalopram	1,620	-
10	Dexamethazone	1,625	-
11	Diltiazem	1,652	-
12	Enalapril	0,071	-0,213
13	Enoxacin	-0,146	-0,177
14	Fluoxetine	1,828	-
15	Fluphenazine	2,058	-
16	Furosemide	1,295	1,119
17	Hydrochlorothiazide	0,775	-
18	Imipramine	2,020	-
19	Isoniazid	-1,285	-
20	Ketoprofen	0,735	1,479
21	Labetalol	1,691	-
22	Levofloxacin	-0,260	0,261
23	Lidocaine	1,017	-
24	Losartan	1,751	1,355
25	Mefenamic Acid	1,258	1,458

26	Metformin	-0,411	-
27	Naproxen	0,768	1,110
28	Nicotine	0,539	-
29	Nifedipine	1,782	-
30	Niflumic Acid	1,371	1,496
31	Nitrofurantoin	-0,211	-0,225
32	Norfloxacin	-0,639	0,420
33	Nortriptyline	1,662	-
34	Ofloxacin	-0,382	-0,047
35	Omeprazole	0,738	1,020
36	Pindolol	0,735	-
37	Piperacillin	-0,407	-0,497
38	Prednisolone	1,382	-
39	Promazine	1,956	-
40	Propafenone	1,548	-
41	Protriptyline	1,488	-
42	Retinoic Acid	1,964	1,946
43	Sulpiride	0,063	-0,819
44	Tenoxicam	1,033	1,147
45	Warfarin	1,137	1,291

Συμπεραίνεται από τον Πίνακα, ότι σε φυσιολογικό pH 7,4 η μεγαλύτερη τιμή $\log k=2,058$ αντιστοιχεί στην Flurphenazine, ενώ η μικρότερη τιμή $\log k=-1,285$ στο ισονιαζίδιο. Αναφορικά με τα αντίστοιχα σετ αποτελεσμάτων για τα υπόλοιπα τασιενεργά που έχουν μελετηθεί ισχύουν τα παρακάτω.

Πίνακας 10: Μέγιστα και ελάχιστα $\log k$ για άλλες χρωματογραφίες

Χρωματογραφία	Μικρότερο $\log k$	Μεγαλύτερο $\log k$
Brij-35	-0,624 (ceftriaxone)	1,635 (fluoxetine)
Triton X-100	-1,275 (enoxacin)	2,124 (niflumic acid)
Tween	-0,935 (enoxacin)	2,245 (protriptyline)
SDS	-1,318 (levofloxacin)	3,210 (fluoxetine)
IAM,DD2	-0,810 (acetylsalicylic acid)	4,585 (retinoic acid)

Σχολιάζεται, ότι το εύρος τιμών του CTAB είναι αρκετά ικανοποιητικό, μιας και όσο μεγαλύτερο είναι, τόσο πιο ακριβείς στατιστικές εκτιμήσεις θα πραγματοποιηθούν. Παρόλα αυτά το εύρος της IAM χρωματογραφίας παραμένει μεγαλύτερο. Όσον αφορά την χρήση τασιενεργών μεγαλύτερο εύρος παρατηρείται χρησιμοποιώντας το SDS, ενώ μικρότερο με την χρήση του Brij-35.

Στα ακόλουθα διαγράμματα του υπόλοιπου κεφαλαίου, η κατηγοριοποίηση των φαρμάκων έχει γίνει χρωματικά ως εξής: οι όξινες ενώσεις κόκκινες, οι βασικές γαλάζιες, οι αμφολυτικές πορτοκαλί και οι ουδέτερες πράσινες.

3.2 Συσχέτιση $\log k_w^{CTAB}$ με συντελεστές λιποφιλίας, $\log P$ και $\log D_{7,4}$

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

Η συσχέτιση των δύο αυτών συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση δηλαδή του $\log k_w^{CTAB}$ και $\log P$ πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης. Η εξαρτημένη μεταβλητή είναι ο συντελεστής $\log k_w^{CTAB}$ ενώ η ανεξάρτητη ο συντελεστής $\log P$. Στις ακόλουθες συσχετίσεις, γίνεται χρήση και των μεταβλητών F^+ και F^- προκειμένου να διαπιστωθεί αν και πότε η συνεισφορά τους έχει θετική επίδραση στο R^2 της εξίσωσης που εξάγεται. Προκύπτει λοιπόν η παρακάτω εξίσωση.

$$\log k^{CTAB} = 0,382 (\pm 0,035) \cdot \log P + 0,078 (\pm 0,098) \quad [3.1.1]$$

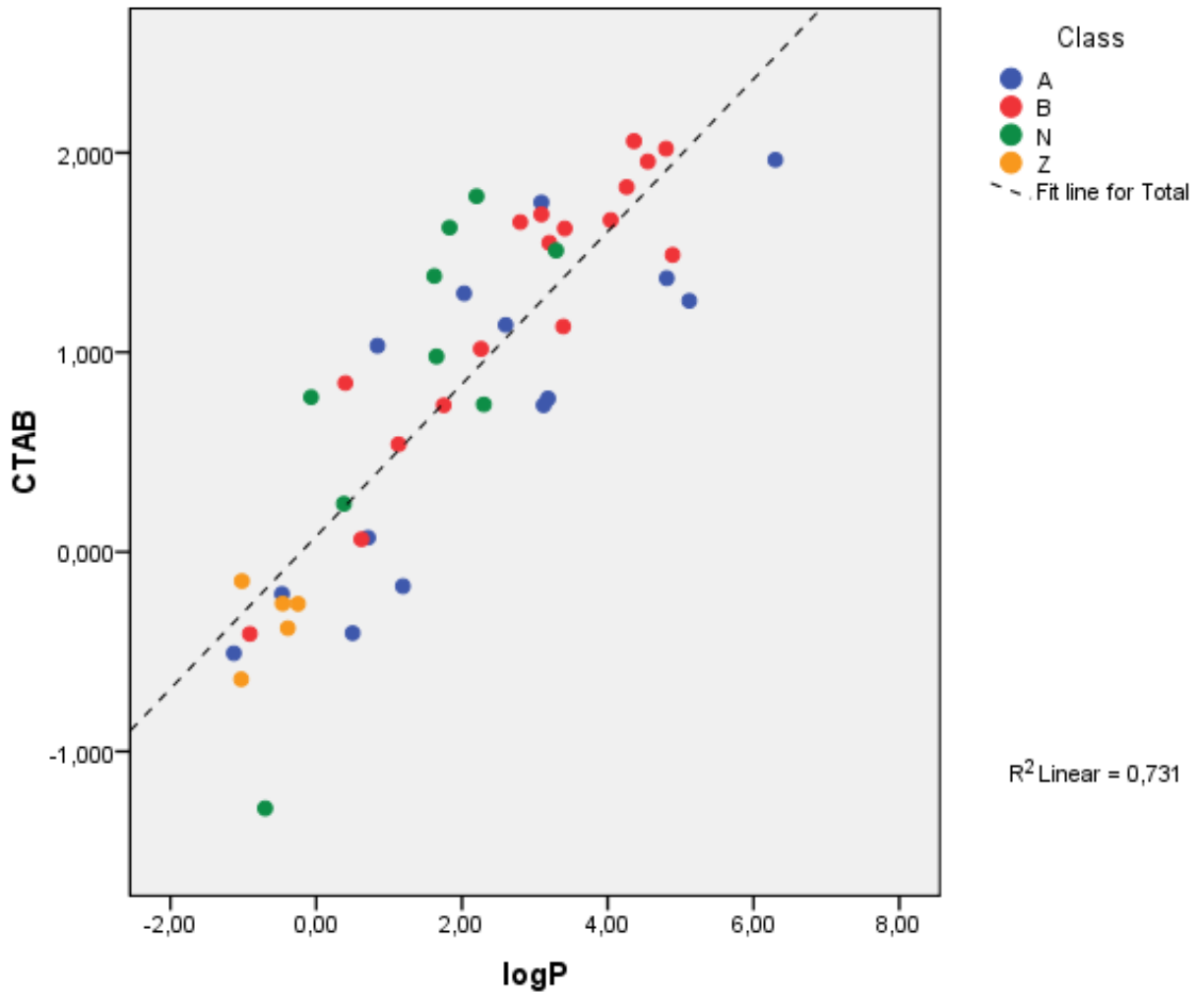
$$(N= 45, R= 0.855, R^2= 0.731, s= 0.463, F= 117.1)$$

Σε αυτή την εξίσωση το κλάσμα θετικού φορτίου είναι στατιστικά σημαντικό, έτσι η εξίσωση βελτιώνεται ως εξής και επισυνάπτεται το αντίστοιχο διάγραμμα:

$$\log k^{CTAB} = 0,476 (\pm 0,054) \cdot \log P - 0,462 (\pm 0,214) \cdot F^+ + 0,162 (\pm 0,130) \quad [3.1.2]$$

$$(N= 47, R= 0.805, R^2= 0.648, s= 0.632, F= 40.5)$$

Όπου F^+ : το κλάσμα θετικού φορτίου (υπολογίζεται από το πρόγραμμα ADME Boxes με βάση τις τιμές pKa).



Διάγραμμα 1: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log k_w^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log P$.

Σχολιάζεται ότι καμία από τις ενώσεις δεν θεωρείται outlier, μιας και η πειραματική τιμή του συντελεστή $\log k_w^{CTAB}$ δε διαφέρει από την τιμή που λήφθηκε μέσω της εξίσωσης [3.1.2]. Δηλαδή δεν διακρίνεται ξεχωριστή συμπεριφορά για κάποια από τις 4 ομάδες φαρμάκων.

Η συσχέτιση μεταξύ του συντελεστή $\log k_w^{CTAB}$ με τον συντελεστή μερισμού $\log P$ είναι ικανοποιητική μιας και ισχύει $R^2 = 0,713$

Αξίζει να αναφερθεί ότι για τα κατιοντικά τασιενεργά γίνεται προσρόφηση των μονομερών τους στην στατική φάση με υδρόφοβους δεσμούς, αφήνοντας προς τα έξω ορισμένα τμήματα του τασιενεργού που είναι θετικά φορτισμένα. Κατά αυτόν τον τρόπο μπορούν να σχηματίσουν ηλεκτροστατικούς (ελκτικούς) δεσμούς με ανιόντα, δηλαδή με φορτισμένες όξινες φαρμακευτικές ενώσεις. Επίσης, η συγκράτηση στην στήλη σχετίζεται άμεσα με την λιποφιλία αλλά και με πρόσθετες ελκτικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις ειδικότερα για τα ασθενή οξέα που βρίσκονται ιοντισμένα.

Είναι ήδη γνωστό ότι το $\log P$ εκφράζει την λιποφιλία της μη ιοντισμένης μορφής του φαρμάκου, ενώ ο ιοντισμός της την μειώνει. Ο ιοντισμός που υφίσταται μέσα στην στήλη με την απουσία πρόσθετων ηλεκτροστατικών δυνάμεων, θα έθετε αρνητικό πρόσημο στα F^+ και τα F^- , μιας και η αύξηση του ιοντισμού μεταφράζεται με μείωση της λιποφιλίας άρα και μείωση του χρόνου συγκράτησης. Όσον αφορά τις πρωτονιωμένες βάσεις μιας και το F^+ έχει αρνητικό πρόσημο, ισχύει το ίδιο με παραπάνω, όχι όμως και για τα οξέα όπου το F^- δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Η αύξηση του ιοντισμού στα οξέα να μεν προκαλεί μείωση της λιποφιλίας τους αλλά και αύξηση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων συγκράτησης με τα θετικά κέντρα. Έτσι, τα δύο αυτά φαινόμενα αντισταθμίζονται.

3.2.2. Συσχέτιση $\log k_w^{CTAB}$ με τον συντελεστή κατανομής, $\log D_{7,4}$

Για την παρακάτω συσχέτιση πραγματοποιείται εκ νέου γραμμική παλινδρόμηση με εξαρτημένη μεταβλητή τον συντελεστή $\log k_w^{CTAB}$ και ανεξάρτητη τον συντελεστή $\log D_{7,4}$. Προκύπτουν λοιπόν οι παρακάτω εξισώσεις και τα αντίστοιχα διαγράμματα:

$$\log k^{CTAB} = 0,388 (\pm 0,042) \cdot \log D + 0,672 (\pm 0,079) \quad [3.2.1]$$

$$(N= 45, R= 0.815, R^2= 0.664, s= 0.517, F= 85.1)$$

Ενώ αφαιρώντας το ισονιαζίδιο που είναι τιμή outlier προκύπτει εκ νέου η εξίσωση:

$$\log k^{CTAB} = 0,373 (\pm 0,038) \cdot \log D + 0,715 (\pm 0,071) \quad [3.2.2]$$

$$(N= 44, R= 0.838, R^2= 0.702, s= 0.459, F= 98.7)$$

Ωστόσο το κλάσμα του αρνητικού φορτίου είναι στατιστικά σημαντικό με αρνητικό πρόσημο, με αποτέλεσμα η παραπάνω εξίσωση να βελτιώνεται ως εξής:

$$\log k^{CTAB} = 0,390 (\pm 0,037) \cdot \log D + 0,674 (\pm 0,178) \cdot F^+ + 0,660 (\pm 0,182) \cdot F^- + 0,248 (\pm 0,120) \quad [3.2.3]$$

$$(N= 45, R= 0,877, R^2= 0,768, s= 0,440, F= 45,3)$$

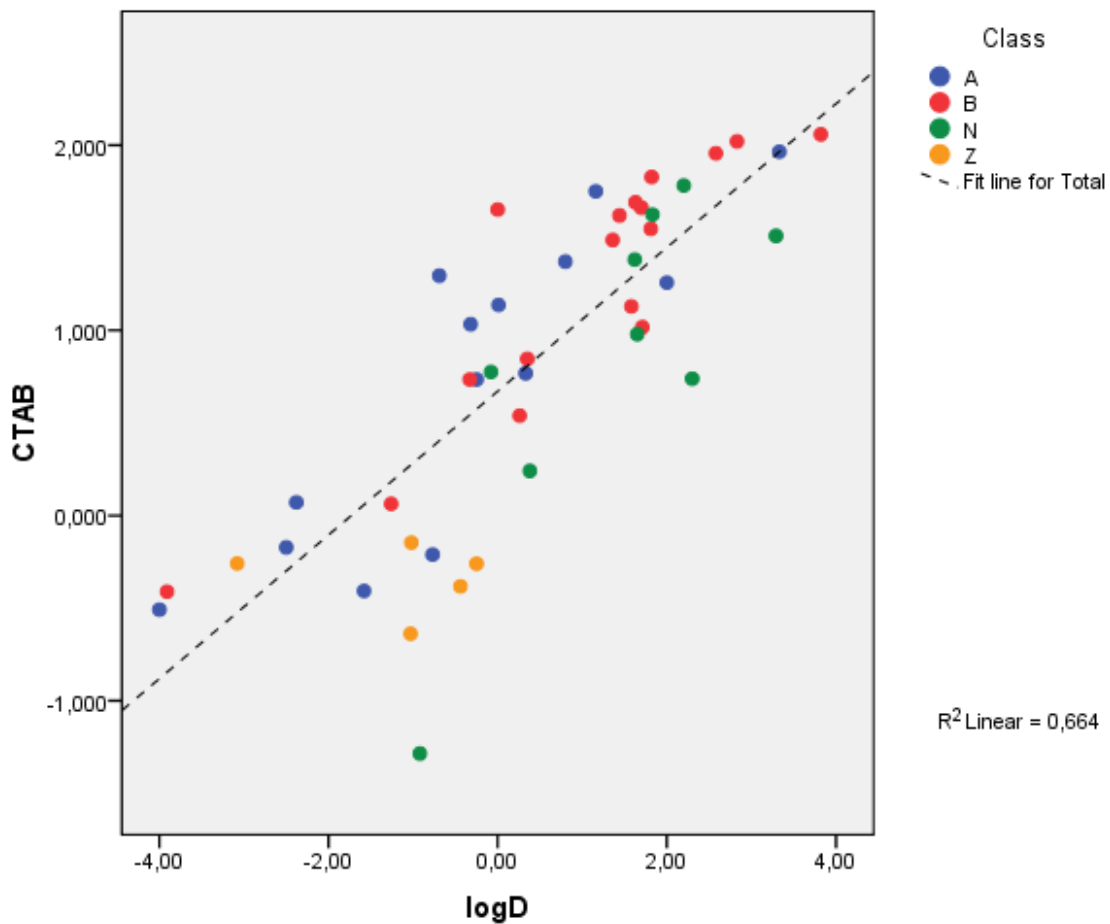
Αφαιρώντας το ισονιαζίδιο τελικά λαμβάνουμε:

$$\log k^{CTAB} = 0,378 (\pm 0,114) \cdot \log D + 0,579 (\pm 0,165) \cdot F^+ + 0,549 (\pm 0,169) \cdot F^- + 0,347 (\pm 0,114) \quad [3.2.4]$$

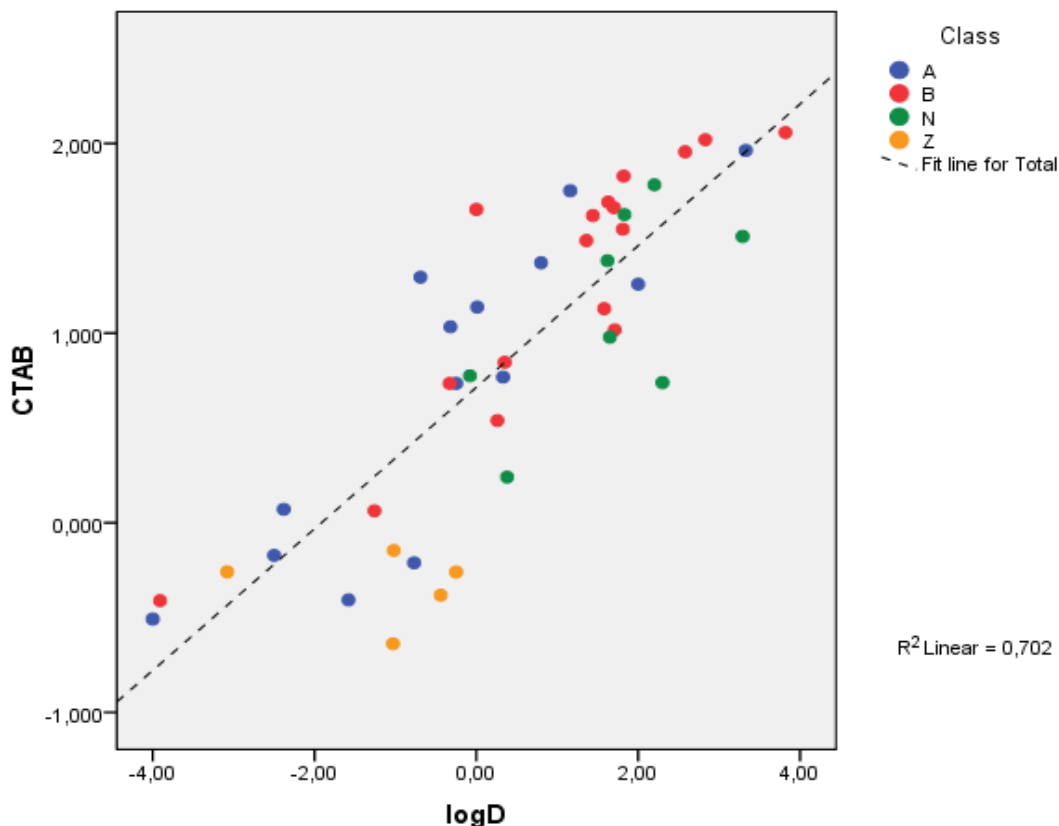
$$(N= 44, R= 0,885, R^2= 0,783, s= 0,401, F= 48,2)$$

Όπου F^+ και F^- : κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου (υπολογίζονται από το πρόγραμμα ADME Boxes με βάση τις τιμές pKa).

Συμπεραίνεται ότι οι συσχετίσεις του συντελεστή κατακράτησης $\log k^{CTAB}$ με τον συντελεστή κατανομής $\log D$ είναι λίγο καλύτερες από ότι εκείνες με τον συντελεστή μερισμού $\log P$, επιπλέον η κατακράτηση των φαρμακευτικών ενώσεων οφείλεται κυρίως στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ αυτών και της στατικής φάσης.



Διάγραμμα 2: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log k^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log D_{7,4}$. Έκτροπη τιμή: ισονιαζίδιο (πράσινη τιμή κάτω)



Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log kw^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log D_{7,4}$.

Στην προκειμένη περίπτωση το ισονιαζίδιο, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί τιμή outlier και για αυτό και έχει αφαιρεθεί από το παραπάνω διάγραμμα. Το R^2 της τελικής εξίσωσης που προκύπτει είναι αρκετά ικανοποιητικό, επομένως η κατακράτηση των ενώσεων από την χρωματογραφική στήλη αντιστρόφου φάσεως όντως οφείλεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα.

Θεωρητικά, ο συντελεστής $\log D$ εκφράζει την λιποφιλία λαμβάνοντας όμως υπόψιν και τον ιοντισμό του φαρμάκου για το κάθε pH. Όπως έχει αναφερθεί, ο ιοντισμός μειώνει την λιποφιλία, ωστόσο επειδή ο ιοντισμός στην στήλη είναι λίγο χαμηλότερος από αυτόν σε ένα υδατικό διάλυμα ίδιου pH, αναμένεται εξίσωση κατά την οποία τα F^+ και F^- θα έχουν θετικό πρόσημο. Παρ' όλα αυτά θα έπρεπε το F^- να είναι μεγαλύτερο λόγω των ηλεκτροστατικών έλξεων των αρνητικά φορτισμένων όξινων φαρμακευτικών ενώσεων με τα θετικά κέντρα (λόγω της χρήσης του CTAB) της τροποποιημένης στατικής φάσης, κάτι που αναμένεται να αυξήσει την συγκράτησή τους. Ωστόσο εν τέλει, στο παρόν σετ δεδομένων δεν παρατηρείται κάτι τέτοιο.

3.3. Συσχέτιση $\log k^{CTAB}$ με συντελεστές κατακράτησης της μικυλλιακής υδροχρωματογραφίας (MLC) διαφορετικών τασιενεργών

3.3.1 Συσχέτιση $\log k^{CTAB}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό Brij-35, $\log k^{Brij-35}$

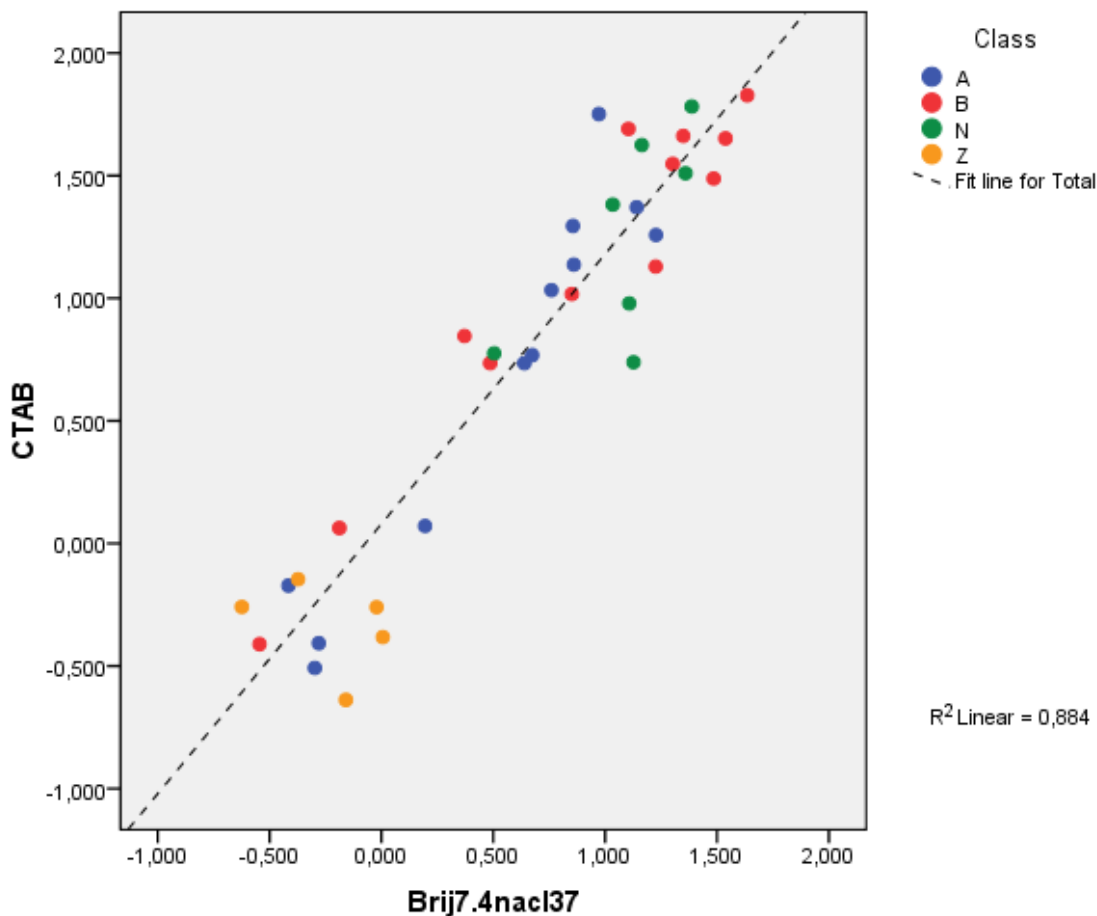
Η συσχέτιση του συντελεστή κατανομής σε υδατική φάση $\log k^{CTAB}$ με τον συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση $\log k^{Brij-35}$ της μικυλλιακής υδροχρωματογραφίας, πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, με εξαρτημένη μεταβλητή τον συντελεστή $\log k^{CTAB}$ και ανεξάρτητη τον συντελεστή $\log k^{Brij-35}$. Η εξίσωση που προκύπτει και το αντίστοιχο διάγραμμα παρουσιάζονται παρακάτω.

$$\log k^{CTAB} = 1,181 (\pm 0,076) \cdot \log k^{Brij} + 0,002 (\pm 0,001) \cdot TPSA - 0,153 (\pm 0,126)$$

[3.3.1]

$$(N = 36, R = 0,948, R^2 = 0,898, s = 0,262, F = 145,2)$$

Το F είναι οριακό (t=1,9) για την παραπάνω συσχέτιση.



Διάγραμμα 4: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log k_w^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log k_w^{Brij-35}$.

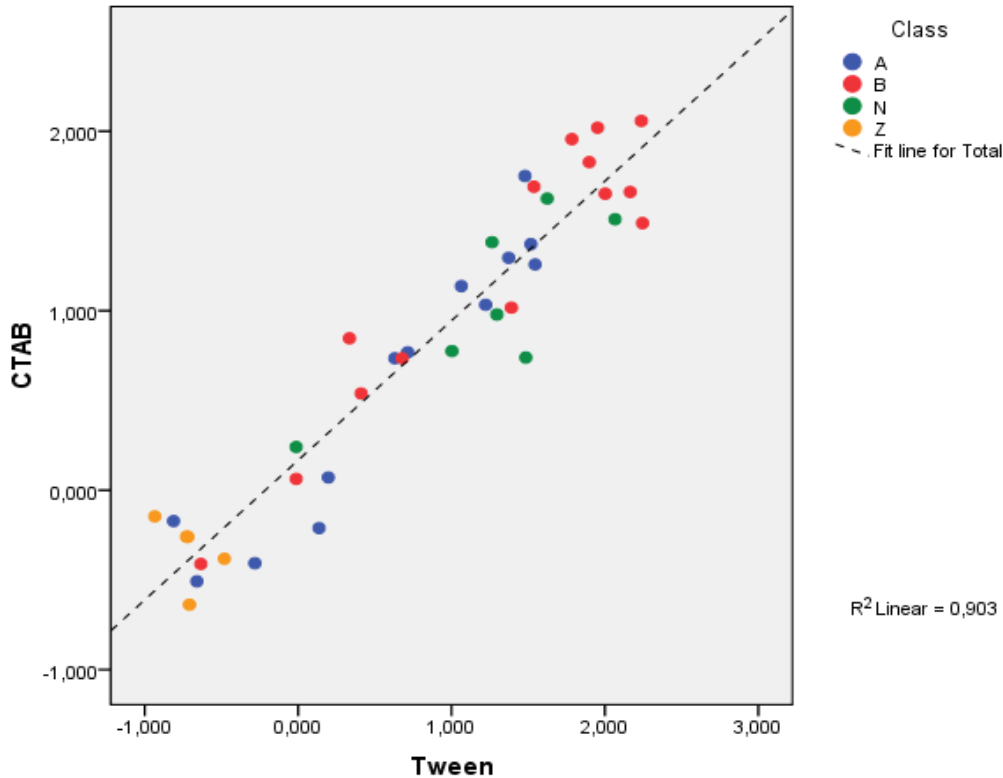
Παρατηρείται ότι η συσχέτιση βελτιώνεται ελαφρώς με την εισαγωγή του όρου της πολικής επιφάνειας TPSA, καθώς οι πολικές αλληλεπιδράσεις είναι περισσότερο σημαντικές στην έκλυση των φαρμακευτικών ενώσεων παρουσία του τασιενεργού CTAB σε σχέση με το Brij-35. Σχολιάζεται ότι η συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης παρουσία του CTAB και του Brij-35 είναι αρκετά ικανοποιητική, αφού ισχύει $R^2=0,884$, παρόλο που το Brij είναι μη ιοντικό τασιενεργό σε αντίθεση με το CTAB που είναι κατιοντικό.

3.3.2 Συσχέτιση $\log k^{CTAB}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό Tween 20, $\log k^{Tween}$

Η συσχέτιση του συντελεστή κατανομής σε υδατική φάση $\log k^{CTAB}$ με τον συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση $\log k^{Tween}$ της μικυλλιακής υγροχρωματογραφίας πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, με εξαρτημένη μεταβλητή τον συντελεστή $\log k^{CTAB}$ και ανεξάρτητη τον συντελεστή $\log k^{Tween}$. Η εξίσωση που προκύπτει και το αντίστοιχο διάγραμμα παρουσιάζονται παρακάτω.

$$\log k^{CTAB} = 0,778 (\pm 0,042) \cdot \log k^{Tween} + 0,167 (\pm 0,054) \quad [3.3.2]$$

$$(N= 39, R= 0,950, R^2= 0,903, s= 0,263, F= 343,3)$$



Διάγραμμα 5: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log k^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log k^{Tween}$.

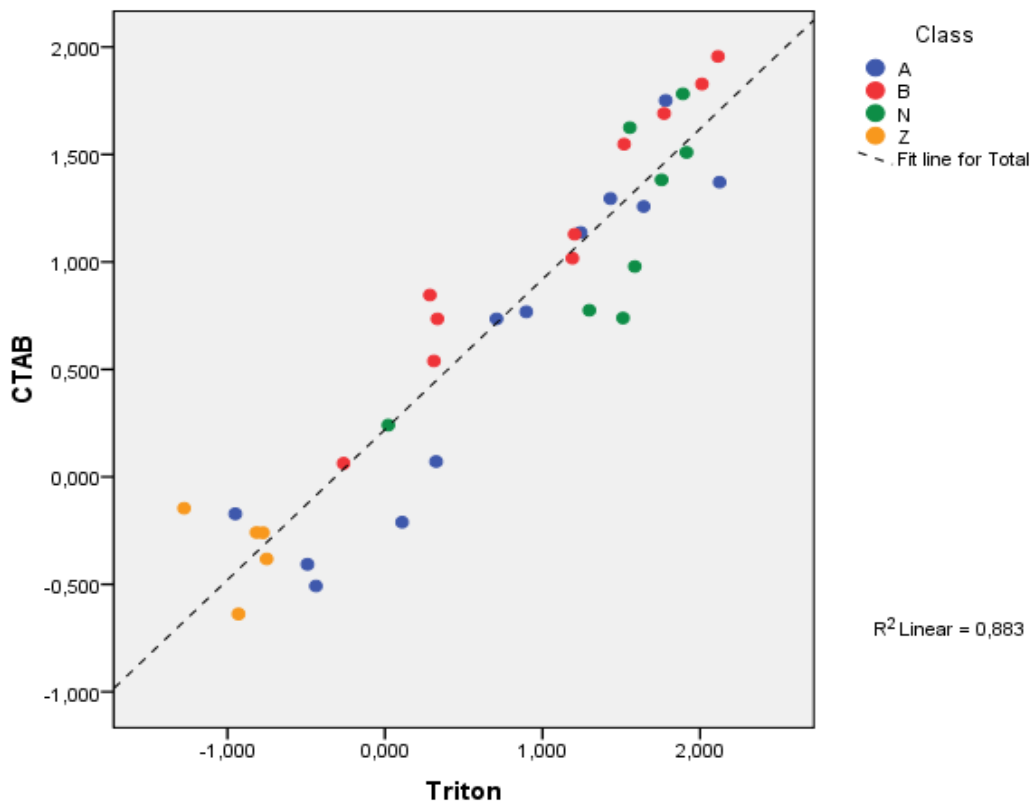
Ο συντελεστής συσχέτισης $R^2 = 0,9$, υποδηλώνει την μεγάλη ομοιότητα του μηχανισμού έκλουσης μεταξύ των δύο ειδών μικυλλιακής χρωματογραφίας. Δεν είναι σαφής η διαφοροποίηση λόγω των ηλεκτροστατικών έλξεων των ανιόντων, ο πιθανότερος λόγος για αυτό είναι ενδεχομένως η φύση των ενώσεων των ανιόντων που χρησιμοποιήθηκαν.

3.3.3 Συσχέτιση $\log k^{CTAB}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό Triton X100, $\log k^{TritonX100}$

Η συσχέτιση του συντελεστή κατανομής σε υδατική φάση $\log k^{CTAB}$ με τον συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση $\log k^{Triton}$ της μικυλλιακής υγροχρωματογραφίας πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, με εξαρτημένη μεταβλητή τον συντελεστή $\log k^{CTAB}$ και ανεξάρτητη τον συντελεστή $\log k^{Triton}$. Η εξίσωση που προκύπτει και το αντίστοιχο διάγραμμα παρουσιάζονται παρακάτω.

$$\log k^{CTAB} = 0.700 (\pm 0.044) \cdot \log k^{Triton} + 0.220 (\pm 0.057) \quad [3.3.3]$$

$$(N= 35, R= 0.933, R^2= 0.883, s= 0.275, F= 248.2)$$



Διάγραμμα 6: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log k^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log k^{Triton}$.

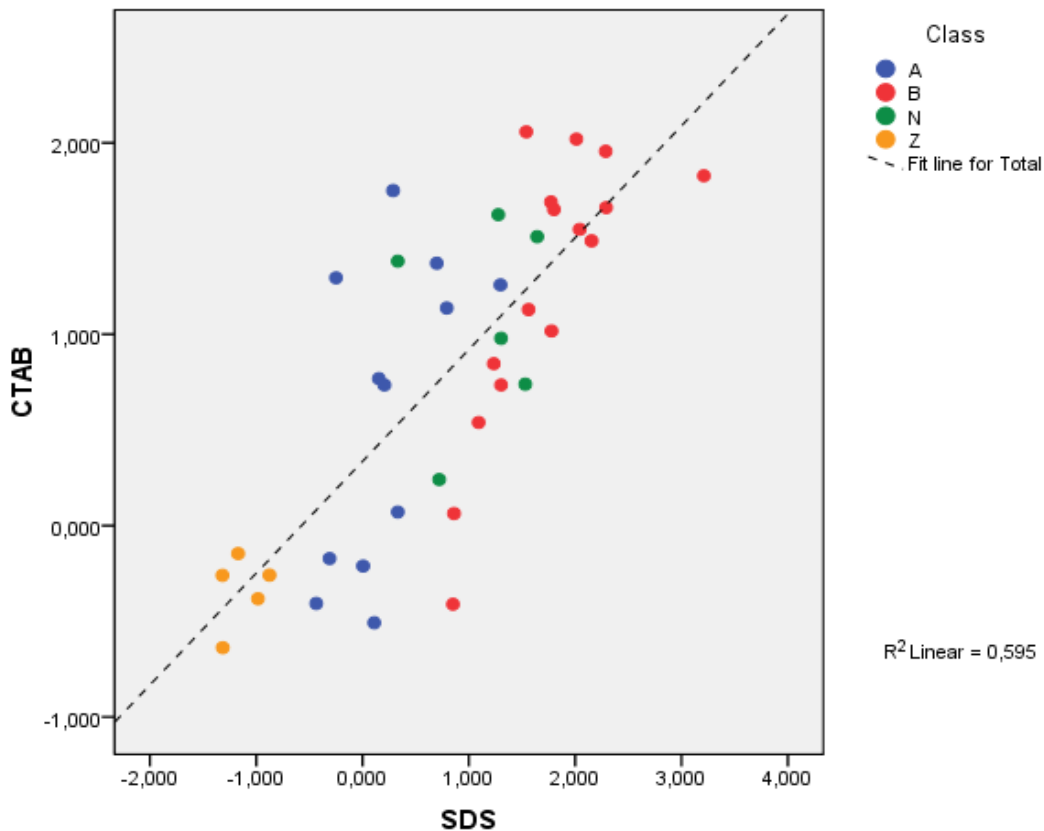
Παρατηρείται και με την χρήση αυτού του τασιενεργού παρόμοιος μηχανισμός έκλυσης των 35 ενώσεων που εξετάστηκαν με τα δύο τασιενεργά όπως παραπάνω, και σχεδόν εξίσου καλή συσχέτιση όπως αυτή που εντοπίστηκε με την χρήση των δύο παραπάνω τασιενεργών.

3.3.4 Συσχέτιση $\log k^{CTAB}$ με συντελεστές κατακράτησης της MLC με τασιενεργό SDS, $\log k^{SDS}$

Η συσχέτιση του συντελεστή κατανομής σε υδατική φάση $\log k^{CTAB}$ με τον συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση $\log k^{SDS}$ της μικυλλιακής υγροχρωματογραφίας πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, με εξαρτημένη μεταβλητή τον συντελεστή $\log k^{CTAB}$ και ανεξάρτητη τον συντελεστή $\log k^{SDS}$. Η εξίσωση που προκύπτει και το αντίστοιχο διάγραμμα παρουσιάζονται παρακάτω.

$$\text{Log}k^{CTAB} = 0.584 (\pm 0.079) \cdot \log k^{SDS} + 0.036 (\pm 0.108) \quad [3.3.4]$$

$$(N = 39, R = 0.771, R^2 = 0.595, s = 0.453, F = 54.3)$$



Διάγραμμα 7: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log k^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log k^{SDS}$.

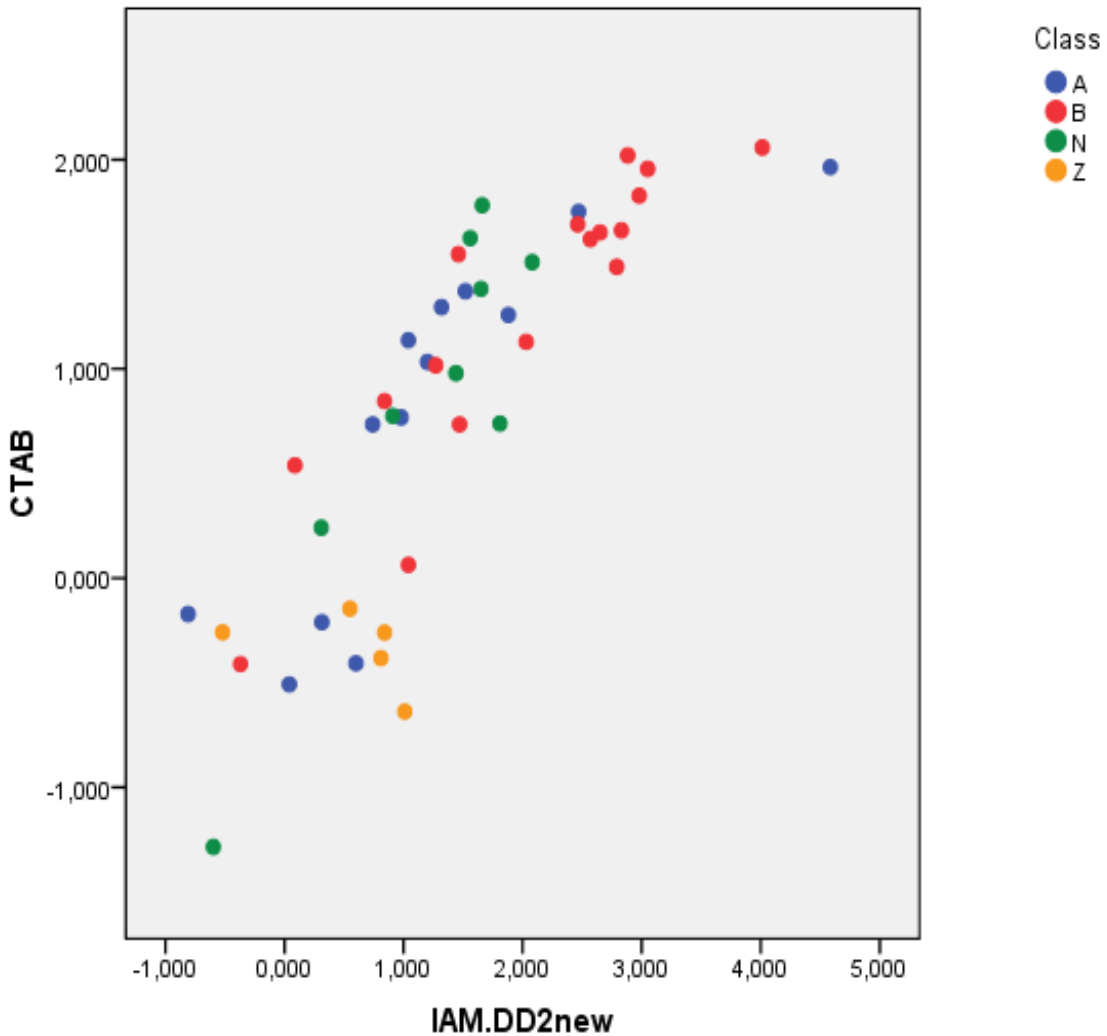
Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει σαφής ομαδοποίηση στην συμπεριφορά των οξέων και των βάσεων, συνεπώς δεν μπορεί να προκύψει κάποια ξεκάθαρη εικόνα για το αν το τασιενεργό SDS ενισχύει την κατακράτηση βάσεων, ενώ το CTAB των οξέων. Το επιφανειοδραστικό συστατικό SDS είναι ανιοντικό, οπότε είναι δεδομένες οι διαφορές στους συντελεστές κατακράτησης.

3.4. Συσχέτιση $\log k^{CTAB}$ με συντελεστές κατακράτησης όπως χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM), $\log k^{IAM.PC.DD2}$

Εν συνεχεία, παρατίθεται η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση $\log k^{CTAB}$ μικκυλιακής υγροχρωματογραφίας με τον συντελεστή κατακράτησης σε υδατική φάση $\log k^{IAM.PC.DD2}$, χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM) που πραγματοποιείται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης. Η εξαρτημένη μεταβλητή σε αυτή την συσχέτιση είναι ο συντελεστής $\log k^{CTAB}$, ενώ η ανεξάρτητη ο συντελεστής $\log k^{IAM.PC.DD2}$. Έτσι, δημιουργείται η παρακάτω εξίσωση και το αντίστοιχο διάγραμμα.

$$\log k^{CTAB} = 0.865 (\pm 0.096) \cdot \log k^{IAM} + 0.594 (\pm 0.247) \cdot F^- - 0.538 (\pm 0.242) \cdot F^+ - 0.199 (\pm 0.159) \quad [3.4.1]$$

$$(N= 45, R= 0.827, R^2= 0.684, s= 0.597, F= 29.6)$$



Διάγραμμα 8: Γραφική παράσταση του συντελεστή κατακράτησης $\log k_w^{CTAB}$ με τον συντελεστή $\log k^{IAM.PC.DD2}$

Στο παραπάνω διάγραμμα οι (μπλε) όξινες ενώσεις είναι τραβηγμένες από την πλευρά του CTAB (εξαιρουμένου του ρετινοϊκού οξέος), ενώ οι (κόκκινες) βασικές ενώσεις είναι τραβηγμένες από την πλευρά όπως IAM.

Όπως είναι γνωστό στις στήλες IAM υπάρχουν ελεύθερες φωσφορικές ομάδες (αρνητικά φορτισμένες) που είναι προσβάσιμες προς ανάπτυξη ηλεκτροστατικών δεσμών με πρωτονιωμένες βάσεις, δηλαδή βάσεις θετικά φορτισμένες. Συνεπώς, οι μεν όξινες ενώσεις συγκρατούνται περισσότερο στην μικυλλιακή παρουσία του CTAB, ενώ οι βασικές στην IAM. Το γεγονός αυτό ερμηνεύει και τα αντίθετα πρόσημα των F^+ και F^- .

3.5 Συμπεριφορά κατακράτησης σε pH 5,5

Σε αυτό το σημείο υπολογίζονται οι διαφορές των συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση $\log k_w$, για κάθε μέθοδο βιομημητικής χρωματογραφίας, όπως και οι διαφορές των τιμών του συντελεστή κατανομής $\log D$ ανάμεσα στα pH 7,4 και 5,5. Το όξινο pH παρουσιάζει επιστημονικό ενδιαφέρον δεδομένου ότι στον οργανισμό εντοπίζεται στην αρχή του λεπτού εντέρου. Έτσι, δημιουργείται ο παρακάτω πίνακας.

Πίνακας 11: Διαφορές στις τιμές συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση, $\log k_w$, για MLC και IAM, και συντελεστή κατανομής, $\log D$, μεταξύ τιμών pH 7,4 και 5,5

α/α	Φαρμακευτική Ένωση	$\Delta \log k_w(7,4-5,5)$						$\Delta \log D(7,4-5,5)$
		Brij-35	Tween 20	SDS	Triton	CTAB	IAM	
1	Acetylsalicylic Acid	-0,13	-1,19	-0,27	-0,24	-0,03	-0,33	-1,68
2	Albendazole	1,36	-0,46	1,64	1,91	1,51	2,08	0,17
3	Ampicillin	0,41	0,29	-0,75	1,05	-0,22	-0,03	-0,33
4	Antipyrine		-0,01	0,72	0,02	0,03	0,31	0
5	Bromazepam	1,12	1,3	1,3	1,59	0,98	1,44	0,01
6	Ceftriaxone	-0,08	-1,53	0,64	-0,82	0,03	-0,41	-0,11
7	Chlorpheniramine	1,24		1,56	1,2	1,13	2,03	1,87
8	Cimetidine	0,5	0,33	1,23	0,29	0,85	0,38	0,35
9	Citalopram					1,62	2,57	1,44
10	Dexamethazone	1,18	1,62	1,27	1,55	1,62	1,56	0
11	Diltiazem	1,51	1,09	1,8		1,65	2,65	-0,15
12	Enalapril	0,04	-0,04	-0,04	0,33	0,28	0	-1,33
13	Enoxacin	-0,46	-1,19	-2,08	-0,64	0,03	-0,7	0,66
14	Fluoxetine	1,64	1,89	3,21	2,01	1,83	2,98	1,82
15	Fluphenazine		2,24	-1,24		2,06	4,01	1,76
16	Furosemide	-0,01	-0,3	-0,58	-0,11	0,18	-0,28	-0,72
17	Hydrochlorothiazide	-0,03	1		1,3	0,78	0,21	-0,08
18	Imipramine		1,95	2,01		2,02	2,88	2,83
19	Isoniazid					-1,28	-0,6	-0,92
20	Ketoprofen	-0,59	-1,02	-1,11	0,71	-0,74	-0,81	-2,14
21	Labetalol	0,17	1,57	0,27	1,77	1,69	0,45	1,63
22	Levofloxacin	-0,01	-0,39	-2,23	-0,77	-0,52	-0,75	0,63
23	Lidocaine	0,85	1,47	1,78	1,19	1,02	1,27	1,77
24	Losartan	-0,07	-0,07	-0,8	-0,21	0,40	-0,11	-1,08
25	Mefenamic Acid	-0,46		-0,85	1,64	-0,20	-0,92	-2

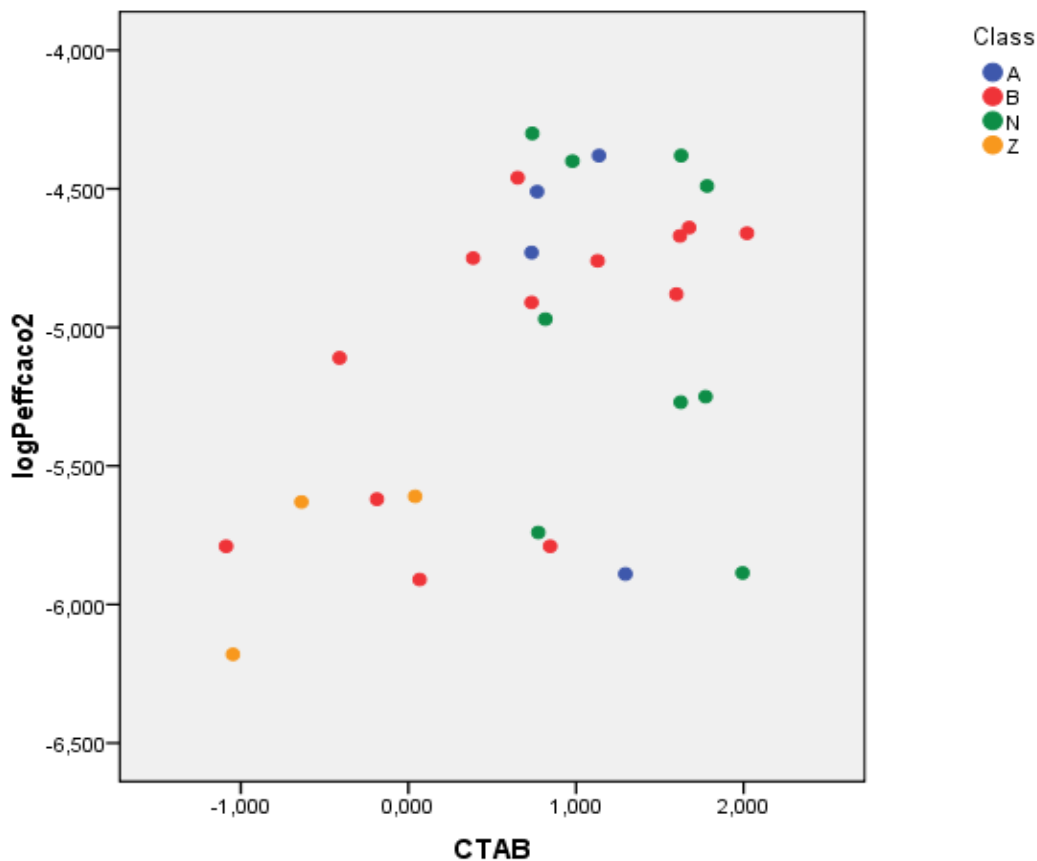
26	Metformin	-0,53	-0,63	0,85		-0,41	-0,37	-5,79
27	Naproxen	-0,64	-0,68	-1,27	0,89	-0,34	0,98	-1,62
28	Nicotine		0,41	1,09	0,31	0,54	0,09	1,83
29	Nifedipine	1,39			1,89	1,78	1,66	0
30	Niflumic Acid	-0,14	-0,27	-0,99	2,12	-0,12	-0,12	0,8
31	Nitrofurantoin		1,29	-0,4	-0,25	0,01	-0,1	-0,29
32	Norfloxacin	0,01	-0,54	-2,44	-0,72	-1,06	1,01	0,65
33	Nortriptyline	0,23	2,17	2,29		1,66	2,83	1,7
34	Ofloxacin	-0,03	-0,11	-1,74	-0,75	-0,33	-0,54	0,56
35	Omeprazole	0,03	1,48	1,53	1,51	-0,28	-0,04	2,3
36	Pindolol	0,11	0,14	0,23	0,33	0,73	1,47	0,91
37	Piperacillin	-0,03	0,09	-0,15	-0,49	0,09	-0,53	-0,58
38	Prednisolone	1,07	1,26	0,33	1,76	1,38	1,65	0
39	Promazine		0,31	-1,99		1,96	3,05	1,06
40	Propafenone	1,3		2,04	1,52	1,55	1,46	0,91
41	Protriptyline	0,35	2,25	-1,85		1,49	2,79	1,69
42	Retinoic Acid					0,02	4,59	3,33
43	Sulpiride	0,16	-0,37	0,86	0,15	0,88	0,33	1,14
44	Tenoxicam	-0,04	-1,31			-0,11	-0,32	-0,92
45	Warfarin	-0,45	0,43	-0,33	-0,69	-0,15	-0,93	-1,81

Με την χρήση του τασιενεργού CTAB επιτυγχάνεται λίγο μεγαλύτερη μεταβολή των τιμών του συντελεστή κατακράτησης $\log k$ συγκριτικά με τα υπόλοιπα τασιενεργά, που μεταφράζεται σε μεγαλύτερη επίδραση του pH στον ιοντισμό των βάσεων. Όσον αφορά τις υπόλοιπες τιμές, οι μεταβολές που παρατηρούνται είναι αντίστοιχες των υπόλοιπων ειδών μικυλλιακής χρωματογραφίας και σαφώς μικρότερες αναφορικά με τις μεταβολές που παρουσιάζει ο συντελεστής κατακράτησης $\log D$. Ισχύει ότι εντός της χρωματογραφικής στήλης υπάρχει μικρότερος ιοντισμός συγκριτικά με ένα υδατικό διάλυμα, δηλαδή αλλάζει η διηλεκτρική σταθερά του μέσου.

3.6 Συσχέτιση με φαρμακοκινητικές ιδιότητες

3.6.1 Συσχέτιση με την κυτταρική διαπερατότητα μέσω των επιθηλιακών κυτταρικών σειρών του εντέρου, Caco-2

Η διαπερατότητα μέσω των επιθηλιακών κυτταρικών σειρών του εντέρου, Caco-2 αποτελεί ένα δημοφιλές πρωτόκολλο για την πρόβλεψη της διαπερατότητας φαρμάκων διαμέσου του γαστρεντερικού σωλήνα. Για τον λόγο αυτό στα πλαίσια της παρούσας εργασίας θεωρήθηκε ενδιαφέρον να συγκριθεί η φαινόμενη διαπερατότητα μέσω των κυτταρικών σειρών Caco-2 $\log P_{\text{app}}(\text{Caco-2})$ με τους συντελεστές κατακράτησης που έχουν προκύψει από την μικυλλιακή χρωματογραφία. Λόγω της μεγάλης διεργαστηριακής μεταβλητότητας, επιλέχθηκε να συλλεγούν δεδομένα μόνο από μία βιβλιογραφική πηγή και συγκεκριμένα από πείραμα που διερεύνησε 93 διαφορετικά φάρμακα χρησιμοποιώντας pH 7,4 και 37 °C. [80] Δημιουργείται επομένως το ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 9: Συσχέτιση κυτταρικής διαπερατότητας Caco-2 με τους συντελεστές κατακράτησης $\log k^{\text{CTAB}}$

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει η συσχέτιση της φαινόμενης διαπερατότητας μέσω των κυτταρικών σειρών Caco-2 με τις τιμές $\log k^{CTAB}$ και καταστρώνεται η παρακάτω εξίσωση.

$$\log P^{Caco-2} = 0,233 (\pm 0,101) \cdot \log k^{CTAB} - 0,009 (\pm 0,003) \cdot TPSA - 4,605 (\pm 0,256)$$

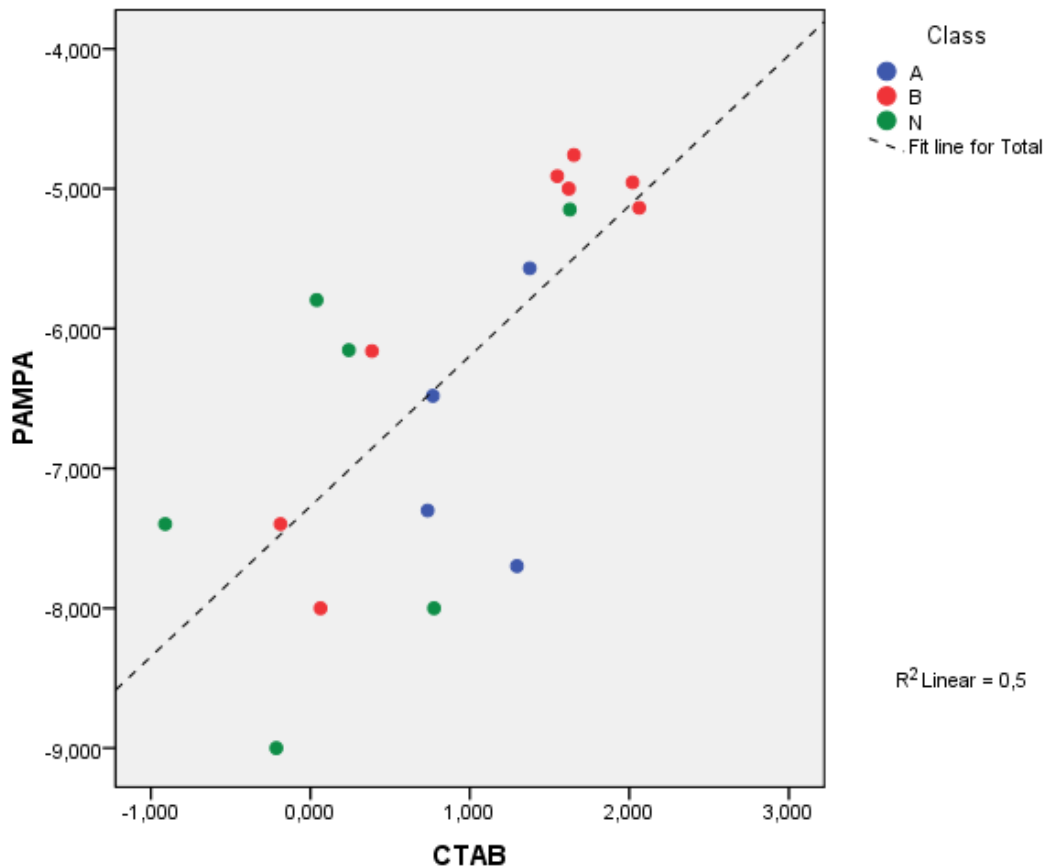
[3.6.1]

$$(N= 29, R= 0,664, R^2= 0,441, s= 0,455, F= 10,3)$$

Σχολιάζεται ότι η σχετικά ασθενής συσχέτιση της φαινόμενης διαπερατότητας μέσω κυτταρικών σειρών Caco-2 με τις τιμές $\log k^{CTAB}$ βελτιώνεται όταν σε αυτή εισαχθεί η τιμή της πολικής επιφάνειας των μορίων (TPSA).

3.6.2 Συσχέτιση με τη διαπερατότητα μέσω των σειρών τεχνητών μεμβρανών, PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay)

Η συσχέτιση μέσω σειρών τεχνητών μεμβρανών PAMPA, αποτελεί ένα δημοφιλές πρωτόκολλο στον σχεδιασμό φαρμάκων για την πρόβλεψη της κυτταρικής διαπερατότητας φαρμάκων. Τα δεδομένα PAMPA που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την ακόλουθη βιβλιογραφία [81] και δημιουργείται το ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 10: Συσχέτιση διαπερατότητας Caco-2 με τους συντελεστές κατακράτησης $\log k^{CTAB}$

Παρατηρείται μια σχετικά ασθενής συσχέτιση, που εκφράζεται από την παρακάτω εξίσωση.

$$\log^{Peff} (PAMPA) = 1,075 (\pm 0,269) \cdot \log k^{CTAB} - 7,271 (\pm 0,318) \quad [3.6.2.1]$$

$$(N= 18, R= 0,707, R^2= 0,500, s= 0,963, F= 16,0)$$

Ωστόσο μετά την βελτίωση της συσχέτισης εισάγοντας την πολική επιφάνεια του μορίου (TPSA) καταστρώνεται η νέα εξίσωση συσχέτισης.

$$\log^{P_{eff}}(PAMPA) = 0,889 (\pm 0,230) \cdot \log k^{CTAB} - 0,016 (\pm 0,006) \cdot TPSA - 6,163 (\pm 0,460) \quad [3.6.2.2]$$

$$(N= 18, R= 0,826, R^2= 0,682, s= 0,793, F= 16,1)$$

Σχολιάζεται ότι η διαπερατότητα μέσω τεχνητών σειρών μεμβρανών έχει αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα $R^2= 0,682$, οπότε στην προκειμένη περίπτωση η συγκεκριμένη μικυλλιακή υδροχρωματογραφία αποτελεί πολυτιμότερο εργαλείο, από ότι για την εκτίμηση της κυτταρικής διαπερατότητας.

3.6.3 Συσχέτιση με την απορρόφηση μέσω της γαστρεντερικής οδού (Human Oral Absorption, %HOA)

Σε αυτό το σημείο, μελετάται η δυνατότητα πρόβλεψης της επί τοις εκατό απορρόφησης μέσω της γαστρεντερικής οδού για τα φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα, βάσει των δεδομένων της μικκυλλιακής υδροχρωματογραφίας, με χρήση του τασιενεργού CTAB.

Για να προκύψει ένα αξιόπιστο μοντέλο θα πρέπει να υπάρχουν όσο το δυνατόν περισσότερα δεδομένα, για αυτόν τον λόγο σε αυτό το σημείο τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής συνδυάζονται με της μετρήσεις άλλης διπλωματικής που έλαβε χώρα την ίδια περίοδο στο Εργαστήριο Αναλυτικής και Ενόργανης Χημείας του Ε.Μ.Π. κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες. [86] Προκειμένου να αναπτυχθεί και να αξιολογηθεί ένα μοντέλο, η βάση των δεδομένων διαιρείται σε δεδομένα εκμάθησης (training set), που είναι χρήσιμα για την ανάπτυξη του μοντέλου, αλλά και σε δεδομένα ελέγχου (test set), χρήσιμα για την επικύρωση του μοντέλου. Για λόγους σύγκρισης των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο test set των 22 φαρμάκων με παλαιότερες δημοσιεύσεις. [82] [83] Όλες οι υπόλοιπες ενώσεις λοιπόν χρησιμοποιήθηκαν ως training set.

Αξίζει να σημειωθεί πως επειδή ο γαστρεντερικός σωλήνας παρουσιάζει διαβάθμιση στο pH του, το οποίο κυμαίνεται από πολύ όξινο στο στομάχι, ως και 7-8 στο παχύ έντερο, θεωρείται σωστότερο για την προσομοίωση της γαστρεντερικής απορρόφησης να χρησιμοποιηθεί η μέγιστη τιμή logk σε ένα αντίστοιχο εύρος pH, ώστε να προσομοιωθεί η θέση της μέγιστης απορρόφησης. [84]

Πίνακας 12: Φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στο training set

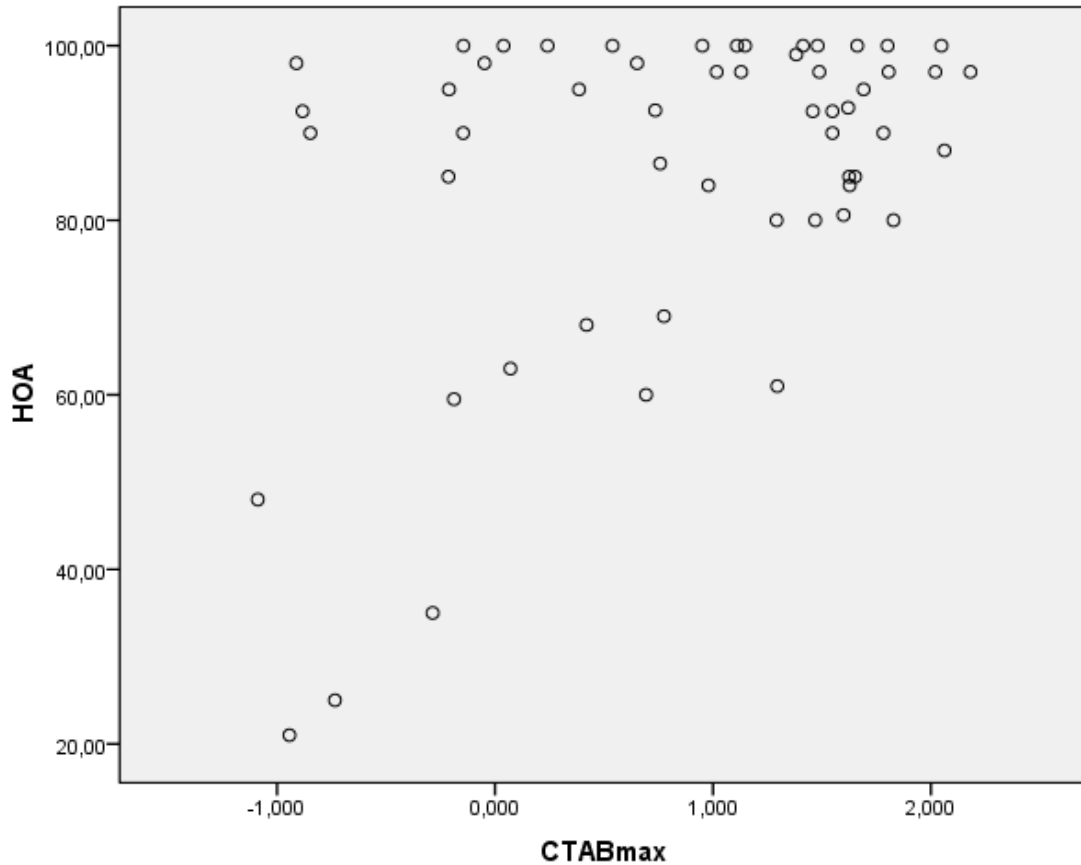
α/α	Φαρμακευτική Ένωση	α/α	Φαρμακευτική Ένωση
1	Acetylsalicylic Acid	37	Ketoprofen
2	Acyclovir	38	Labetalol
3	Albendazole	39	Lidocaine
4	Allopurinol	40	Lisinopril
5	Amitriptyline	41	Losartan
6	Amlodipine	42	Mefenamic
7	Amoxicillin	43	Metformin
8	Ampicillin	44	Metoprolol
9	Antipyrine	45	Naproxen
10	Atenolol	46	Nicotine

11	Atropin	47	Nifedipine
12	Bromazepam	48	Nimesulide
13	Caffeine	49	Nitrofurantoin
14	Carbamazepine	50	Norfloxacin
15	Chlordiazepoxide	51	Nortriptyline
16	Chlorpheniramine	52	Ofloxacin
17	Ciprofloxacin	53	Paracetamole
18	Citalopram	54	Phenytoin
19	Clonidine	55	Pindolol
20	Codeine	56	Prednisolone
21	Colchicine	57	Primidone
22	Desipramine	58	Promazine
23	Dexamethazone	59	Promethazine
24	Diltiazem	60	Propafenone
25	Enalapril	61	Propranolol
26	Enoxacin	62	Protriptyline
27	Estradiol	63	Quinidine
28	Fentanyl	64	Retinoic Acid
29	Fluoxetine	65	Sulfamethoxazole
30	Fluphenazine	66	Tenoxicam
31	Furosemide	67	Terbutaline
32	Hydrochlorothiazide	68	Theophylline
33	Hydrocortisone	69	Thioridazine
34	Ibuprofen	70	Tramadol
35	Imipramine	71	Trimethoprim
36	Isoniazid	72	Valproic Acid

Πίνακας 13: Φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στο test set

Φαρμακευτική Ένωση	Είδος	Φαρμακευτική Ένωση	Είδος
Ceftriaxone	Z	Minoxidil	N
Chloramphenicol	N	Nadolol	B
Cimetidine	B	Nalidixic acid	A
Cinoxacin	A	Niflumic acid	A
Hydrocortisone	N	Omeprazole	N
Isoxicam	A	Pipemidic acid	Z
Levofloxacin	Z	Piperacillin	A
Lornoxicam	A	Sulpiride	B
Meloxicam	A	Vancomycin	Z
Methylprednisolone	N	Warfarin	A
Metoclopramide	B		

Κατά αυτόν τον τρόπο δημιουργείται το παρακάτω διάγραμμα που απεικονίζει τα δεδομένα της %HOA συναρτήσει της μέγιστης τιμής $\log k^{CTAB\ Best}$, για τις δύο τιμές pH 7,4 και 5,5.



Διάγραμμα 11: Συσχέτιση απορρόφησης %HOA με τη μέγιστη τιμή $\log k^{CTAB\ Best}$

Προκειμένου να γίνει η προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης έχουν προταθεί σιγμοειδή μοντέλα (μοντέλο 1) και μοντέλα που βασίζονται σε μορφή logit (μοντέλο 2 που θα αναπτυχθεί).

Το διάγραμμα 8 κάνει σαφές το ότι η μορφή της εξίσωσης δεν ακολουθεί κάποια συγκεκριμένη τάση. Αυτό το γεγονός οφείλεται στο ότι η απορρόφηση από το στόμα είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία, για την οποία θα έπρεπε να εισαχθούν και επιπλέον φυσικοχημικές παράμετροι στην εξίσωση, ώστε η προσομοίωση να εμφανίσει ακριβέστερα αποτελέσματα.

Μοντέλο Νο 1

Η συνολική εξίσωση που εκφράζει το φαινόμενο που μελετάται με βάση το πρώτο μοντέλο είναι η παρακάτω

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(a_0 + a_1 \cdot \log k_{CTAB} + a_2 \cdot X_2 + \dots + a_n \cdot X_n)}} \quad [3.6.3.1]$$

Όπου X_2, X_3, \dots οι πρόσθετες φυσικοχημικές ιδιότητες και a_0, a_1, \dots οι συντελεστές που θα προκύψουν από μη γραμμική παλινδρόμηση.

Οι πρόσθετες φυσικοχημικές ιδιότητες, εκτός της κατακράτησης μέσω μικυλλιακής χρωματογραφίας, δικαιολογούνται όπως προαναφέρθηκε λόγω του είδους της μελέτης.

Με διαδοχική παλινδρόμηση θα προκύψουν τα εξής:

Πίνακας 14: Συντελεστές μη γραμμικής παλινδρόμησης με χρήση $\log k^{CTAB \text{ Best}}$

a_0	$a_1 (\log k^{CTAB})$	$a_2 (TPSA)$	N	R^2	s
$1,613 \pm 0,268$	$0,388 \pm 0,087$	$-0,012 \pm 0,002$	56	0,504	13,3

Το τελικό μοντέλο λοιπόν θα έχει ως εξής:

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(1.613(\pm 0.268) + 0.388(\pm 0.087)\log k_{CTAB} - 0.012(\pm 0.002) \cdot TPSA)}} \quad [3.6.3.2]$$

Σε αυτό το σημείο γίνεται επικύρωση του μοντέλου για τα 22 φάρμακα που αναφέρθηκαν στον Πίνακα 7. Προκειμένου η απορρόφηση κάποιου φαρμάκου να αξιολογηθεί ως ανεπαρκής, θα πρέπει η προβλεπόμενη τιμή να απέχει πάνω από 20% από την υπολογισμένη τιμή. Οι ανεπιτυχείς προβλέψεις υπογραμμίζονται κόκκινες στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 15: Πειραματικές και προβλεπόμενες τιμές %ΗΟΑ (Μοντέλο 1)

α/α	Φάρμακο	Πειραματική τιμή (%)	Τιμή που προβλέπει το μοντέλο
1.	Ceftriaxone	1.0	1.5
2.	Chloramphenicol	90.0	78.4
3.	Cimetidine	80.0	80.6
4.	Cinoxacin	95.0	87.8
5.	Hydrocortisone	90.2	91.9
6.	Isoxicam	100.0	84.5
7.	Levofloxacin	99.0	88.0
8.	Lornoxicam	100.0	81.1
9.	Meloxicam	90.0	81.6
10.	Methylprednisolone	86.0	94.1
11.	Metoclopramide	77.0	96.8
12.	Minoxidil	97.0	86.9
13.	Nadolol	42.0	83,1
14.	Nalidixic acid	98.0	92.0
15.	Niflumic acid	95.0	96.7
16.	Omeprazole	97.0	88.7
17.	Pipemidic acid	Καλή απορρόφηση	68.2
18.	Piperacillin	15.5	18.3
19.	Salicylic acid	100.0	
20.	Sulpiride	40.0	69.7
21.	Vancomycin	35.5	0.0
22.	Warfarin	98.5	96.0

Επομένως 19 από τα 22 φάρμακα αυτού του σετ παρουσιάζουν ικανοποιητική %ΗΟΑ, αξίζει να σχολιασθεί πως παρά το γεγονός ότι το μοντέλο δεν έχει ιδιαίτερα ικανοποιητικό R^2 , η εφαρμογή του σε άγνωστη βάση δεδομένων, στην προκειμένη περίπτωση φαρμάκων, απέδωσε πολύ καλά.

Μοντέλο Νο 2

Σε αυτό το σημείο θα γίνει χρήση του μοντέλου 2 που είχε χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενη δημοσίευση της ερευνητικής ομάδας [85] και εκφράζεται με την παρακάτω εξίσωση.

$$\%HOA = \frac{100 \cdot k_w^{best}}{a_0 + a_1 \cdot k_w^{best} + a_2 \cdot X_2 + \dots + a_n \cdot X_n} \quad [3.6.3.3]$$

Όπου X_2, X_3, \dots οι πρόσθετες φυσικοχημικές ιδιότητες και a_0, a_1, \dots οι συντελεστές που θα προκύψουν από μη γραμμική παλινδρόμηση.

Έτσι, με διαδοχική παλινδρόμηση θα προκύψουν τα εξής:

Πίνακας 16: Συντελεστές μη γραμμικής παλινδρόμησης με χρήση $\log k_{max}$

a_0	a_1 ($\log k^{CTAB}$)	a_2 (TPSA)	F^+	N	R^2	s
$-0,182 \pm 0,046$	$1,108 \pm 0,025$	$0,003 \pm 0,001$		56	0,532	13,1
$-0,355 \pm 0,081$	$1,116 \pm 0,023$	$0,005 \pm 0,001$	$0,097 \pm 0,031$	56	0,610	12,0

Ακολουθεί η επικύρωση του μοντέλου για τα 22 φάρμακα και οι ανεπιτυχείς προβλέψεις υπογραμμίζονται εκ νέου κόκκινες στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 17: Πειραματικές και προβλεπόμενες τιμές %HOA (Μοντέλο 2)

α/α	Φάρμακο	Πειραματική τιμή (%)	Τιμή που προβλέπει το μοντέλο
1.	Ceftriaxone	1.0	32.1
2.	Chloramphenicol	90.0	86.7
3.	Cimetidine	80.0	86.9
4.	Cinoxacin	95.0	88.1
5.	Hydrocortisone	90.2	89.2
6.	Isoxicam	100.0	88.7
7.	Levofloxacin	99.0	85.7
8.	Lornoxicam	100.0	88.8
9.	Meloxicam	90.0	88.9
10.	Methylprednisolone	86.0	89.4
11.	Metoclopramide	77.0	89.5
12.	Minoxidil	97.0	87.8
13.	Nadolol	42.0	80.0
14.	Nalidixic acid	98.0	89.5
15.	Niflumic acid	95.0	89.7
16.	Omeprazole	97.0	88.5
17.	Pipemidic acid	Καλή απορρόφηση	61.7
18.	Piperacillin	15.5	39.1
19.	Salicylic acid	100.0	
20.	Sulpiride	40.0	72.8
21.	Vancomycin	35.5	38.0
22.	Warfarin	98.5	89.7

Επομένως βάσει του δεύτερου μοντέλου 18 από τα 22 φάρμακα αυτού του σετ παρουσιάζουν ικανοποιητική %HOA. Αναφορικά με την αποδοτικότητα των μοντέλων το 1^ο από τα δύο υπερσχύει, κατά ένα πιο πετυχημένο φάρμακο από τα 22.

4. Συμπεράσματα

Μελετώντας τον μηχανισμό κατακράτησης 45 φαρμακευτικών ουσιών, αλλά και συσχετίζοντας τους συντελεστές κατακράτησης τους με δεδομένα λιποφιλίας και άλλους συντελεστές κατακράτησης διαφορετικών βιομιμητικών μεθόδων, επαληθεύεται ότι ο μηχανισμός αυτός αποτελεί μηχανισμό κατανομής, καθώς και ότι η κατακράτηση του κάθε μορίου γίνεται κυρίως συναρτήσει της λιποφιλίας του. Όσον αφορά το εύρος της κλίμακας των συντελεστών κατακράτησης $\log k^{\text{CTAB}}$, σχολιάζεται ότι είναι πολύ ικανοποιητικό, αναφορικά με την μέγιστη και ελάχιστη τιμή του, δίνοντας την ευκαιρία στον αναλυτή να διακρίνει καλύτερα και αποδοτικότερα τις προς μελέτη φαρμακευτικές ενώσεις.

Επιπλέον, παρατηρείται πιο ισχυρή συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης $\log k^{\text{CTAB}}$ με τον συντελεστή μερισμού $\log P$, απ' ότι με τον συντελεστή κατανομής $\log D$, υποδεικνύοντας την καταστολή του ιονισμού στο χρωματογραφικό περιβάλλον. Στην περίπτωση του συντελεστή κατανομής, εντοπίστηκε το ισονιαζίδιο ως έκτροπη τιμή (outlier), και σχολιάζεται ότι το κλάσμα του αρνητικού φορτίου είχε στατιστική βαρύτητα με αποτέλεσμα η πρόσθεση του να επιφέρει βελτίωση του τελικού συντελεστή. Παρομοίως, με την προσθήκη του κλάσματος θετικού φορτίου, βελτιώθηκε και ο συντελεστής μερισμού. Αναφορικά με τις διαφορές των συντελεστών κατανομής ανάμεσα στα δύο pH, στο σύνολο τους παρουσιάζουν αρκετά μικρότερες αποκλίσεις, συγκριτικά με την αντίστοιχη διαφορά των συντελεστών κατακράτησης $\log D$, ενισχύοντας το παραπάνω συμπέρασμα. Παράλληλα, η συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης του παρόντος πειράματος, δηλαδή χρησιμοποιώντας το κατιοντικό τασιενεργό CTAB, με αυτούς του μη ιοντικού τασιενεργού Tween 20, είναι πολύ καλή. Σχεδόν εξίσου καλή ήταν η συσχέτιση και με τα άλλα δύο μη ιοντικά τασιενεργά για τα οποία υπήρχαν πειραματικά δεδομένα, το Triton X100 και το Brij-35, ενώ αντίθετα μέτρια συσχέτιση επιτεύχθηκε με το ανιοντικό τασιενεργό SDS, κυρίως λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται.

Εν συνεχεία, μελετήθηκαν τρεις φαρμακοκινητικές παράμετροι. Πρώτον η διαπερατότητα μέσω επιθηλιακών κυτταρικών σειρών του εντέρου, Caco-2, κατά την μελέτη της οποίας, προσθέτοντας την τιμή της πολικής επιφάνειας των μορίων, εξάχθηκε μία σχετικά ασθενής συσχέτιση ($R^2 = 0,441$). Ωστόσο, πιο ελπιδοφόρα αποτελέσματα προέκυψαν στην διερεύνηση της διαπερατότητας μέσω σειρών τεχνητών μεμβρανών, όπου και πάλι προσθέτοντας στην εξίσωση την πολική μοριακή επιφάνεια λαμβάνουμε $R^2 = 0,682$. Τέλος, διερευνήθηκαν δύο μοντέλα, προκειμένου να εξακριβωθεί η ικανότητα απορρόφησης μέσω της ανθρώπινης γαστρεντερικής οδού. Το πρώτο γίνεται συναρτήσει του συντελεστή $\log k^{\text{CTAB}}$, ενώ το δεύτερο συναρτήσει του k_w^{BEST} . Παρόλο που

τα R^2 , δεν προέκυψαν ιδιαίτερα ικανοποιητικά όμως, τόσο στο πρώτο όσο και στο δεύτερο μοντέλο απορρίπτονται ελάχιστα φάρμακα λόγω του ποσοστού γαστρεντερικής απορρόφησης τους, που δεν πληροί τις κατάλληλες προϋποθέσεις (συγκεκριμένα 3 φάρμακα χρησιμοποιώντας το πρώτο μοντέλο και 4 χρησιμοποιώντας το δεύτερο). Συμπερασματικά, η μικυλλιακή χρωματογραφία θα μπορούσε να αποτελεί ισχυρό εργαλείο των αναλυτών για την πρόβλεψη της γαστρεντερικής απορρόφησης.

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, η χρήση μικυλλιακής χρωματογραφίας και συγκεκριμένα έχοντας διαλύτη έκλουσης με κατιοντικό τασιενεργό CTAB, θα μπορούσε να ενισχύσει σημαντικά την έρευνα που λαμβάνει χώρα πάνω στην εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων νέων δραστικών ουσιών, επιφέροντας πολύτιμες γνώσεις γύρω από τα ποσοστά γαστρεντερικής τους απορρόφησης, που αποτελεί βασικό γνώμονα για την απόρριψη ή αποδοχή τους κατά την διάρκεια των ερευνών σε πρώιμα στάδια. Σε ένα επόμενο επίπεδο, βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής, και η διαπερατότητα μέσω σειρών τεχνητών μεμβρανών θα μπορούσε να εκτιμάται με μεγαλύτερη σαφήνεια, χρησιμοποιώντας την συγκεκριμένη μικυλλιακή χρωματογραφία, μειώνοντας έτσι το κόστος των ερευνών που είναι και βασικό ζητούμενο.

5. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Παρακάτω, προτείνονται ορισμένες ιδέες, σύμφωνα με τις οποίες η έρευνα αυτής της διπλωματικής θα μπορούσε να προχωρήσει.

1. Δεδομένου ότι η χρήση τασιενεργών είναι μια απαραίτητη προσθήκη ώστε να διαπιστωθούν οι δυνατότητες της μικυλλιακής χρωματογραφίας, η διερεύνηση πολλών και διαφορετικών, ως προς το φορτίο, τασιενεργών, καθώς και η παράλληλη σύγκριση των αποτελεσμάτων των συντελεστών κατακράτησης τους, θα μπορούσε να οδηγήσει σε συμπεράσματα αναφορικά με την καταλληλότητα του κάθε τασιενεργού για την εκάστοτε φαρμακοκινητική ιδιότητα.
2. Συγκεκριμένα για το CTAB, θα ήταν χρήσιμη η μελέτη ακόμα περισσότερων φαρμακευτικών ενώσεων χρησιμοποιώντας το στον διαλύτη έκλουσης, προκειμένου να δημιουργηθεί εν τέλει μία βάση δεδομένων για πολλές δραστικές ουσίες, ώστε η έρευνα σε στατιστικό επίπεδο να εξελιχθεί ακόμα περισσότερο και να απαλειφθούν τυχόν στατιστικά σφάλματα.
3. Στην έρευνα των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, θα μπορούσαν να προστεθούν η πρωτεϊνική σύνδεση, η διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, η απορρόφηση και κατανομή του φαρμάκου στο δέρμα καθώς και ο όγκος κατανομής. Έχοντας σαφή εικόνα για όλες τις παραπάνω ιδιότητες, ο αναλυτής θα μπορέσει να κρίνει σε ποιες από αυτές εφαρμόζεται ικανοποιητικά η μέθοδος της μικυλλιακής χρωματογραφίας με το συγκεκριμένο τασιενεργό.
4. Τα μοντέλα πρόβλεψης που προαναφέρθηκαν θα μπορούσαν να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας πιο σύνθετες τεχνικές, ούτως ώστε να διευρυνθεί ο όγκος δεδομένων λόγω της ποικιλίας βιομημητικών χρωματογραφικών τεχνικών, αλλά και οι περιπτώσεις που καθένα από αυτά καλύπτει.
5. Παράλληλα, θα μπορούσαν να γίνουν διάφορες τροποποιήσεις στις πειραματικές συνθήκες και στην σύνθεση του διαλύτη έκλουσης, προκειμένου να διαπιστωθεί ποιες από αυτές είναι αναγκαίες και ποιες όχι. Κατά αυτόν τον τρόπο, θα μπορούσε το τελικό κόστος του πειράματος να μειωθεί σημαντικά αφαιρώντας κάποιο όργανο ή αντιδραστήριο.

Βιβλιογραφία

- [1] U.S Food and Drug Administration "The drug development process"
<https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-2-preclinical-research>
- [2] Profil Answers for Diabetes "Trial Stages of clinical Research", 2018
https://www.profil.com/knowledge-center/trial-stages_#phase3
- [3] Avac Global Advocacy for HIV Prevention "Preclinical Research"
<https://www.avac.org/preclinical-research>
- [4] Jennifer Honek, "Preclinical research in drug development", Medical Writing, vol. 26, no. 4, pp. 5–8, Dec. 2017
- [5] Brodniewicz, Teresa M. "Preclinical evaluation of new chemical entity."
- [6] Guan, Longfei et al. "ADMET-score - a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness." MedChemComm vol. 10,1 148-157. 30 Nov. 2018
- [7] ThermoFischer Scientific "The Role of ADME & Toxicology Studies in Drug Discovery & Development" 03.10.2020
- [8] Wan, Hong, "What ADME Tests Should Be Conducted for Preclinical Studies?" Admet & Dmpk, 1, no, 3, 2013, doi:10.5599/admet,1,3,9,
- [9] Kennedy, Tony, "Managing the Drug Discovery/Development Interface," Drug Discovery Today, vol, 2, no, 10, 1997, pp, 436–444,, doi:10.1016/s1359-6446(97)01099-4,
- [10] Li, Albert P, "Screening for Human ADME/Tox Drug Properties in Drug Discovery," Drug Discovery Today, 6, no, 7, 2001, pp, 357–366,, doi:10.1016/s1359-6446(01)01712-3,
- [11] Nicole Gleichmann Technology Networks Drug Discovery "What is ADME?" June 26 2020 <https://www.technologynetworks.com/drug-discovery/articles/what-is-adme-336683>
- [12] Science Direct "ADME- An overview"
<https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/adme>
- [13] Science Direct "Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion Study"
- [14] Christel A. S. Bergström Dr. "Prediction of ADMET Properties", 2006
- [15] Ileson, M., Hersey, A., Montanari, D. et al. Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters. Nat Rev Drug Discov 10, 197–208 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrd3367>
- [16] Albert P Li, Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery, Drug Discovery Today, Volume 6, Issue 7, 2001, Pages 357-366, ISSN 1359-6446, [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)01712-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)01712-3). [ADME extra]
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644697010994>

- [17] Jennifer Le , "Drug Bioavailability", Oct 2020
- [18] Price G, Patel DA. Drug Bioavailability. [Updated 2020 Oct 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557852/>
- [19] Science Direct, Green Chemistry and Engineering, "Bioavailability", 2007 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012386454300419X>
- [20] P Ballard, P Brassil, K H Bui, H Dolgos, C Petersson, A Tunek, P J H Webborn Chapter 10 - Metabolism and pharmacokinetic optimization strategies in drug discovery, Editor(s): RG Hill, HP Rang, Drug Discovery and Development (Second Edition), Churchill Livingstone, 2013, Pages 135-155, ISBN 9780702042997, <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4299-7.00010-X>.
- [21] Koen Boussey, Frans M. Belpaire, Johan Van de Voorde, Chapter 23 - Physiological Aspects Determining the Pharmacokinetic Properties of Drugs, Editor(s): Camille Georges Wermuth, David Aldous, Pierre Raboisson, Didier Rognan, The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition), Academic Press, 2008, Pages 539-559, ISBN 9780124172050, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00023-7>.
- [22] Scheife RT. Protein binding: what does it mean? DICP. 1989 Jul-Aug;23(7-8 Suppl):S27-31. doi: 10.1177/106002808902300706. PMID: 2669380.
- [23] Pran Kishore Deb, Omar Al-Attaqchi, Mailavaram Raghu Prasad, Rakesh K. Tekade, Chapter 11 - Protein and Tissue Binding: Implication on Pharmacokinetic Parameters, Editor(s): Rakesh K. Tekade, In Advances in Pharmaceutical Product Development and Research, Dosage Form Design Considerations, Academic Press, 2018, Pages 371-399, ISBN 9780128144237, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814423-7.00011-3>.
- [24] Brigitte Buscher, Sirpa Laakso, Hermann Mascher, Klaus Pusecker, Mira Doig, Lieve Dillen, Winfried Wagner-Redeker, Thomas Pfeifer, Pascal Delrat & Philip Timmerman, Bioanalysis for plasma protein binding studies in drug discovery and drug development: views and recommendations of the European Bioanalysis Forum, 2014
- [25] Pimentel Emely, Sivalingam Kalaiselvi, Doke Mayur, Samikkannu Thangavel, " Effects of Drugs of Abuse on the Blood-Brain Barrier: A Brief Overview", Frontiers in Neuroscience, 2020
- [26] Rachel Brazil, The Pharmaceutical Journal, A barrier to progress: getting drugs to the brain, 2017
- [27] Banks, W.A. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. BMC Neurol 9, S3 (2009). <https://doi.org/10.1186/1471-2377-9-S1-S3>
- [28] Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7(1):a020412. Published 2015 Jan 5. doi:10.1101/cshperspect.a020412
- [29] Jürgen Götz, The University of Queensland Australia, " What is the blood-brain

barrier?", 2020

- [30] Y. Yang, Y. Zhao, A. Yu, D. Sun, L.X. Yu, Chapter 12 - Oral Drug Absorption: Evaluation and Prediction, Editor(s): Yihong Qiu, Yisheng Chen, Geoff G.Z. Zhang, Lawrence Yu, Rao V. Mantri, *Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition)*, Academic Press, 2017, Pages 331-354, ISBN 9780128024478, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802447-8.00012-1>.
- [31] Jennifer Le, "Drug Absorption", 2020
- [32] Richard Bowen, "The Gastrointestinal Barrier", 2018
- [33] Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(9):821-834. doi:10.1080/17474124.2017.1343143
- [34] Gardner C.R. (1985) Gastrointestinal Barrier to Oral Drug Delivery. In: Borchardt R.T., Repta A.J., Stella V.J. (eds) *Directed Drug Delivery. Experimental Biology and Medicine*, vol 7. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5186-6_5
- [35] D.A. Smith, L. Cucurull-Sanchez, *The Adaptive In Combo Strategy*, Editor(s): John B. Taylor, David J. Trigg, *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Elsevier, 2007, Pages 957-969, ISBN 9780080450445, <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00160-7>.
- [36]
- [37] Tiziana Ginex, Javier Vazquez, Enric Gilbert, Enric Herrero & Francisco J Luque, "Lipophilicity in drug design: an overview of lipophilicity descriptors in 3D-QSAR studies", 2019
- [38] Eney Pharma, "Drug Lipophilicity and Absorption: The Continuous Challenge in Drug Discovery", 2017
- [39] Consuelo Guerri, María Pascual, Chapter 24 - Effects of Alcohol on Embryo/Fetal Development, Editor(s): Ramesh C. Gupta, *Reproductive and Developmental Toxicology (Second Edition)*, Academic Press, 2017, Pages 431-445, ISBN 9780128042397, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00024-X>.
- [40] Sanjivanjit K. Bha, "Lipophilicity Descriptors: Understanding When to Use LogP & LogD", 2019
- [41] Cambridge MedChem Consulting, "Lipophilicity", 2019
- [42] Bienta Enamine Biology Services, "LogD/LogP", 2020
- [43] Benet LZ, Hosey CM, Ursu O, Oprea TI. BDDCS, the Rule of 5 and drugability. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;101:89-98. doi:10.1016/j.addr.2016.05.007
- [44] DrugBank, "Lipinski's rule of five", 2019
- [45] Mansoor A, Mahabadi N. Volume of Distribution. [Updated 2020 Jul 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545280/>
- [46] Dennis A. Smith, Kevin Beaumont, Tristan S. Maurer, and Li Di, "Volume of Distribution in Drug Design", *Journal of Medicinal Chemistry*, 2015 58 (15), 5691-5698,

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00201

[47] Nathan Teuscher, " Understanding Volume of Distribution", 2021

[48] Alex Yartsev , " Volume of distribution", 2021

[49] Nikolin B, Imamović B, Medanhodžić-Vuk S, Sober M. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. *Bosn J Basic Med Sci.* 2004 May;4(2):5-9. doi: 10.17305/bjbms.2004.3405. PMID: 15629016; PMCID: PMC7250120.

[50] Victoria Rees, " How is liquid chromatography used in the pharmaceutical industry?", 2020

[51] Bassam Abdul Rasool Hassan, " HPLC Uses and Importance in the Pharmaceutical Analysis and Industrial Field", 2012

[52] Biomimetic Chromatography Consultancy, " WHAT IS BIOMIMETIC CHROMATOGRAPHY ? ", 2020

[53] Klara L Valko, " Application of biomimetic HPLC to estimate in vivo behavior of early drug discovery compounds", 2019, <https://doi.org/10.4155/fdd-2019-0004>

[54] Maryam Mahdi, " Immobilized Artificial Membrane (IAM) Chromatography", 2019

[55] Regis Technologies, INC, " Immobilized Artificial Membrane (IAM) Chromatography", 2018

[56] Giuseppe Ermondi, Maura Vallaro, Giulia Caron, Learning how to use IAM chromatography for predicting permeability, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 114, 2018, Pages 385-390, ISSN 0928-0987, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.001>.

[57] Regis Technologies, "IAM Chromatography", 2000

[58] Φώτης Τσόπελας, "Εργαστηριακός Οδηγός Φαρμακευτικής Χημείας και Τεχνολογίας, Εφαρμογή της βιομιμητικής χρωματογραφίας για την εκτίμηση της γαστρεντερικής απορρόφησης φαρμάκων (Χρήση βιομιμητικής χρωματογραφίας στην εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων)."

[59] Stępnik KE, Malinowska I. 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.* 2013 Apr 19;1286:127-36. doi: 10.1016/j.chroma.2013.02.071. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23506703.

[60] M. Molero-Monfort, L. Escuder-Gilabert, R.M. Villanueva-Camañas, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernández, Biopartitioning micellar chromatography: an in vitro technique for predicting human drug absorption, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Volume 753, Issue 2, 2001, Pages 225-236, ISSN 0378-4347, [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00546-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00546-6)

[61] Mark Hirsch, " Lowering surface tension – Surfactants in coating materials", 2021

[62] M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, Retention mechanisms in micellar liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*,

Volume 1216, Issue 10, 2009, Pages 1798-1814, ISSN 0021-9673,
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.053>.

[63] Alai Berthod, Celia Garthia- Alvarez- Coque, "Micellar Liquid Chromatography",

[64] Josep Esteve-Romero, Samuel Carda-Broch, Mayte Gil-Agustí, Maria-Elisa Capella-Peiró, Devasish Bose, Micellar liquid chromatography for the determination of drug materials in pharmaceutical preparations and biological samples, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 24, Issue 2, 2005, Pages 75-91, ISSN 0165-9936,
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.003>.

[65] Nikolin B, Imamović B, Medanhodžić-Vuk S, Sober M. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. *Bosn J Basic Med Sci.* 2004 May;4(2):5-9. doi: 10.17305/bjbms.2004.3405. PMID: 15629016; PMCID: PMC7250120.

[66] Abhay Pandey, North East Biolab, " Drug Discovery and Development Process", 2020

[67] Richard C. Mohs, Nigel H. Greig, *Drug discovery and development: Role of basic biological research, Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, Volume 3, Issue 4, 2017, Pages 651-657, ISSN 2352-8737,
<https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.10.005>.

[68] Xiaoying Xu, 11 HPLC method development for drug discovery LC-MS assays in rapid PK applications, Editor(s): Satinder Ahuja, Henrik Rasmussen, *Separation Science and Technology*, Academic Press, Volume 8, 2007, Pages 317-351, ISSN 1877-1718, ISBN 9780123705402, [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(07\)80017-1](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(07)80017-1).

[69] 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.

[70] Κ. Βασιλείου. "Μελέτη έκλουσης φαρμακευτικών μορίων από υγροχρωματογραφία μικυλλίων παρουσία του επιφανειοδραστικού Tween 20 και εφαρμογή στη προσομοίωση βιολογικών διεργασιών." Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή Χημικών Μηχανικών. Αθήνα. 2020

[71] Ε. Λεβεντάκη. "Εφαρμογή της μικυλλιακής χρωματογραφίας ως εργαλείο για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων υποψήφιων φαρμάκων." Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή Χημικών Μηχανικών. Αθήνα. 2020.

[72] Δ. Παπαηλιού. "Υγροχρωματογραφία μικκυλίων παρουσία του ανιοντικού τασενεργού SDS: Μελέτη μηχανισμού έκλουσης και εφαρμογή στην πρόβλεψη βιολογικών διαδικασιών." Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή Χημικών Μηχανικών. Αθήνα. 2020.

[73] Π. Νάστου. "Εφαρμογή μικυλλιακής χρωματογραφίας ως εργαλείο για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων υποψήφιων φαρμάκων." Εθνικό Μετσόβιο

Πολυτεχνείο. Σχολή Χημικών Μηχανικών. Αθήνα. 2020

[74] Κοντογιάννη Μαρία Θεοδώρα, “ Μικυλλιακή υγροχρωματογραφία παρουσία του ουδέτερου τασιενεργού Triton X-100: Μελέτη του μηχανισμού έκλουσης φαρμακομορίων κι εφαρμογή στην εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων” .” Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή Χημικών Μηχανικών. Αθήνα. 2021

[75] 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]

[76] F. Tsopeles. T. Vallianatou. and A. Tsantili-Kakoulidou. “The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral 108 absorption.” Eur. J. Pharm. Sci.. vol. 81. pp. 82–93. Jan. 2016. doi: 10.1016/j.ejps.2015.09.020.

[77] 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.

[78] Δ. Αναγνωστοπούλου. “Μελέτη του μηχανισμού έκλουσης φαρμακευτικών ενώσεων από στήλη ακινητοποιημένης ανθρώπινης λευκωματίνης του ορού (HSA) - Συσχέτιση με φαρμακοκινητικά μεγέθη.” Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή Χημικών Μηχανικών. Αθήνα. 2019.

[79] Ε. Παρουτσή. “Επίδραση του οργανικού διαλύτη στους βιοχρωματογραφικούς δείκτες φαρμάκων με χρήση χρωματογραφίας ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA).” Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή Χημικών Μηχανικών. Αθήνα. 2019.

[80] S. Skolnik. X. Lin. J. Wang. X.-H. Chen. T. He. B. Zhang. Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96- well Caco-2 assay. J. Pharm. Sci. 99 (2010) 3246–3265].

[81] A. Avdeef . in: Absorption and Drug Development. John Wiley & Sons. New Jersey. USA. 2003. pp. 164–165].

[82] F. Tsopeles. Th. Vallianatou. A. Tsantili- Kakoulidou. “The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption”. European Journal of Pharmaceutical Sciences 81 (2016) 82-93.

[83] F. Tsopeles. P. Danias. A. Pappa. A. Tsantili-Kakoulidou. Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes. Journal of Chromatography A 1621 (2020) 461027.

[84] J. Kotecha. S. Shah. I. Rathod. G. Subbaiah. International Journal of Pharmaceutics 360 (2008) 96–106).

[85] F. Tsopeles. P. Danias. A. Pappa. A. Tsantili-Kakoulidou. Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and

the potential to model biological processes. *Journal of Chromatography A* 1621 (2020) 461027

[86] Ολυμπία Τσιώμου “Υγροχρωματογραφία μικκυλίων παρουσία του κατιοντικού τασιενεργού CTAB: Μελέτη μηχανισμού έκλουσης και εφαρμογή στην πρόβλεψη βιολογικών διαδικασιών”, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα, 2021

[87] 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