



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**ΤΟΜΕΑΣ 1: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Επίδραση του οργανικού διαλύτη στην έκλυση  
φαρμακευτικών ενώσεων από στήλη α1-όξινης  
γλυκοπρωτεΐνης**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Καλαμιώτης Σωτήριος**

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

Αθήνα, Ιούλιος 2021

## Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η έκλυση φαρμακευτικών ενώσεων μέσω υγρής χρωματογραφίας ακινητοποιημένης  $\alpha_1$ -όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP). Η κινητή φάση αποτελούνταν από υδατικό αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Phosphate Buffered Saline, PBS) ανεμιγμένο με ποσότητες 2-προπανόλης σε συγκεντρώσεις 5%, 10% και 15%. Το pH της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στην τιμή 7.0. Από την πειραματική διαδικασία προέκυψαν χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης,  $\log k$  για τις 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις της 2-προπανόλης (5%,10%,15%) ενώ για 100% υδατική φάση (0% 2-προπανόλη) αντλήθηκαν πειραματικές τιμές από την βιβλιογραφία. Για όσες ενώσεις δεν βρέθηκαν πειραματικές τιμές ο συντελεστής κατακράτησης σε 100% υδατική φάση υπολογίστηκε μέσω γραμμικής προεκβολής. Έπειτα, οι χρωματογραφικοί συντελεστές συγκρίθηκαν με δεδομένα λιποφιλίας των δραστικών ενώσεων, τον συντελεστή μερισμού  $\log P$  και τον συντελεστή κατανομής  $\log D$  σε σύστημα οκτανόλης/νερού. Η συνεισφορά των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στην κατακράτηση των ενώσεων από την στήλη AGP εξετάσθηκε με την εισαγωγή των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου,  $F^+$  και  $F^-$  αντίστοιχα, στις εξισώσεις με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής. Συμπληρωματικά, πραγματοποιήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ παραγόντων κατακράτησης από δεδομένα οργανικού τροποποιητή, την 2-προπανόλη και το ακετονιτρίλιο. Στην συνέχεια οι χρωματογραφικοί συντελεστές συσχετίσθηκαν με δείκτες από άλλα είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας όπως η χρωματογραφία ακινητοποιημένης ανθρώπινης αλβουμίνης (HSA) και η μικκυλιακή χρωματογραφία. Τέλος, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μοντέλου πρόβλεψης του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης %PPB και του όγκου κατανομής  $V_d$ . Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα κι από άλλες διπλωματικές εργασίες και επιστημονικές δημοσιεύσεις προκειμένου η βάση δεδομένων να είναι μεγαλύτερη ώστε να προκύψει όσο το δυνατό πιο αξιόπιστο μοντέλο. Οι επιτυχημένες προβλέψεις των μοντέλων που σχηματίστηκαν ξεπερνούν το 50%.

**Λέξεις-κλειδιά:** βιομιμητική χρωματογραφία,  $\alpha_1$ -όξινη γλυκοπρωτεΐνη, λιποφιλία, πρωτεϊνική σύνδεση, όγκος κατανομής

## Abstract

In the present diploma thesis the elution of drug compounds was investigated by liquid chromatography on an immobilized  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AGP) stationary phase. The mobile phase consisted of phosphate buffered saline (PBS) mixed with 2-propanol at concentrations of 5%, 10% and 15%. The pH of the mobile phase was adjusted to 7.0. From the experimental process chromatographic retention factors,  $\log k$  were obtained for the 3 different concentrations of 2-propanol (5%, 10%, 15%) while for 100% actual aqueous phase (0% 2-propanol) experimental values were obtained from the literature. For those compounds that  $\log k$  for 100% aqueous phase were not found experimentally, the retention factor was calculated by linear extrapolation. Then, the chromatographic factors were compared with lipophilicity data of the pharmaceutical compounds, the n-octanol/water partition coefficient ( $\log P$ ) and the distribution coefficient ( $\log D$ ). The contribution of electrostatic interactions in the retention mechanism of compounds by the AGP column was examined by introducing the positive and negative charge fractions,  $F^+$  and  $F^-$ , respectively, into the equations with the partition and distribution coefficients. In addition, correlations constructed between retention factors from organic modifier data, 2-propanol and acetonitrile Chromatographic factors were then correlated with retention factors from other types of biomimetic chromatography such as immobilized human serum albumin (HSA) chromatography and micellar chromatography. Finally, an attempt was made to develop a model for predicting the percentage of protein binding %PPB and the volume of distribution  $V_d$ . For this reason, data from other diploma thesis and scientific publications were used in order to have plenty database and obtain the most possible reliable model. The successful predictions of the formed models exceed 50%.

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

## Ευρετήριο Εικόνων

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Εικόνα 1: Χρωματογράφημα σήματος συναρτήσει χρόνου .....                                                                    | 21 |
| Εικόνα 2: Δομή αλβουμίνης του ανθρώπινου ορού <sup>26</sup> .....                                                           | 27 |
| Εικόνα 3: Δομή α1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης <sup>27</sup> .....                                                                 | 29 |
| Εικόνα 4: Αλληλεπιδράσεις στατικής-κινητής φάσης σε χρωματογραφία μικκυλίων <sup>28</sup> .....                             | 31 |
| Εικόνα 5: Χρωματογράφος Flexar PerkinElmer .....                                                                            | 34 |
| Εικόνα 6: Συσκευή καθαρισμού νερού Thermo Scientific Barnstead Easypure II <sup>29</sup> .....                              | 35 |
| Εικόνα 7: Βρόγχος εισαγωγής δειγμάτων .....                                                                                 | 36 |
| Εικόνα 8: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w - \log P$ .....                                                           | 46 |
| Εικόνα 9: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w - \log P$ χωρίς έκτροπες τιμές .....                                      | 47 |
| Εικόνα 10: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_{10\%} - \log P$ .....                                                     | 49 |
| Εικόνα 11: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w - \log D$ .....                                                          | 50 |
| Εικόνα 12: Γραφική απεικόνιση $\log k_{10\%} - \log D$ .....                                                                | 51 |
| Εικόνα 13: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_{10\%} IP - \log k_{10\%} CAN$ .....                                       | 53 |
| Εικόνα 14: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w \text{ extr. IP} - \log k_w \text{ extr. ACN}$ .....                     | 54 |
| Εικόνα 15: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w \text{ actual} - \log k_w \text{ extr. IP}$ .....                        | 56 |
| Εικόνα 16: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w \text{ actual} - \log k_w \text{ extr. IP}$ χωρίς ορ. έκτροπη τιμή ..... | 57 |
| Εικόνα 17: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w \text{ actual} - \log k_w \text{ extr. ACN}$ .....                       | 58 |
| Εικόνα 18: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w \text{ AGP extr. IP} - \log k_w \text{ HSA}$ .....                       | 59 |
| Εικόνα 19: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w \text{ AGP extr. IP} - \log k_w \text{ Brij}$ .....                      | 61 |
| Εικόνα 20: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w \text{ AGP extr. IP} - \log k_w \text{ Tween}$ .....                     | 62 |
| Εικόνα 21: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης $\log k_w \text{ AGP extr. IP} - \log k_w \text{ SDS}$ .....                       | 63 |

## Ευρετήριο Πινάκων

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Πίνακας 1: Δραστικές ενώσεις που αναλύθηκαν.....                                                     | 37 |
| Πίνακας 2: Φυσικοχημικές ιδιότητες δραστικών ενώσεων .....                                           | 41 |
| Πίνακας 3: Τιμές $\log k_w$ για άλλα είδη βιομηχανικής χρωματογραφίας.....                           | 42 |
| Πίνακας 4: Πειραματικές τιμές $\log k$ .....                                                         | 44 |
| Πίνακας 5: Συντελεστές και στατιστικά στοιχεία μοντέλου (No.1) πρωτεϊνικής σύνδεσης ...              | 65 |
| Πίνακας 6: Σύγκριση πειραματικού-υπολογιζόμενου ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης<br>(μοντέλο No.1)..... | 65 |
| Πίνακας 7: Σύγκριση πειραματικού-υπολογιζόμενου ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης<br>(μοντέλο No.2)..... | 67 |
| Πίνακας 8: Σύγκριση πειραματικής-υπολογιζόμενης τιμής όγκου κατανομής.....                           | 68 |

# Περιεχόμενα

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....                                                                         | 8  |
| <b>1.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ</b> .....                                                         | 8  |
| <b>1.2 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ</b> .....                                                            | 9  |
| 1.2.1 Απορρόφηση .....                                                                                 | 9  |
| 1.2.2 Κατανομή.....                                                                                    | 11 |
| 1.2.3 Μεταβολισμός και Απέκκριση.....                                                                  | 12 |
| <b>1.3 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ</b> .....                                                           | 13 |
| 1.3.1 Λιποφιλία.....                                                                                   | 13 |
| 1.3.2 Βαθμός Ιοντισμού.....                                                                            | 15 |
| 1.3.3 Ικανότητα σχηματισμού δεσμού υδρογόνου.....                                                      | 16 |
| 1.3.4 Μοριακό βάρος .....                                                                              | 17 |
| 1.3.5 Πρωτεϊνική σύνδεση .....                                                                         | 17 |
| 1.3.6 Όγκος κατανομής .....                                                                            | 18 |
| <b>1.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....                                                                         | 18 |
| 1.4.1 Εισαγωγή.....                                                                                    | 18 |
| 1.4.2 Χρωματογραφία στήλης .....                                                                       | 19 |
| 1.4.3 Περιγραφή εννοιών χρωματογραφικής ανάλυσης.....                                                  | 20 |
| 1.4.4 Υγρή Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....                                                   | 22 |
| <b>1.5 ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....                                                             | 25 |
| 1.5.1 Ο ρόλος της στην γρήγορη εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων .....                               | 25 |
| 1.5.2 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM).....                                     | 25 |
| 1.5.3 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος (HSA,AGP).....                                | 26 |
| 1.5.4 Χρωματογραφία μικκυλίων.....                                                                     | 30 |
| <b>2.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....                                                                       | 33 |
| <b>2.1 ΣΚΟΠΟΣ</b> .....                                                                                | 33 |
| <b>2.2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ</b> .....                                                                | 33 |
| <b>2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ</b> .....                                                                | 34 |
| <b>2.4 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ</b> .....                                                                     | 37 |
| <b>2.5 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ</b> .....                                             | 40 |
| <b>2.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ <math>\log k_w</math> ΑΛΛΩΝ ΕΙΔΩΝ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ</b> ..... | 42 |
| <b>3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....                                                                            | 44 |
| <b>3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ <math>\log k</math></b> .....                                                | 44 |

|                                                                                                                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ <math>\log k_w</math> , <math>\log k^{10\%}</math> ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΜΕΡΙΣΜΟΥ <math>\log P</math> .....</b>                                                             | <b>45</b> |
| <b>3.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ <math>\log k_w</math>, <math>\log k^{10\%}</math> ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ <math>\log D</math> .....</b>                                                             | <b>50</b> |
| <b>3.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ <math>\log k^{10\%}</math> ΜΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ <math>\log k^{10\%}</math> ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΗ .....</b>                                                                | <b>52</b> |
| <b>3.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ <math>\log k_w</math> ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΠΡΟΕΚΒΟΛΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΔΥΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΩΝ .....</b>                                                                 | <b>53</b> |
| <b>3.6 ΣΥΓΚΡΙΣΗ <math>\log k_{w \text{ extr. IP}}</math> και <math>\log k_{w \text{ extr. ACN}}</math> ΜΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ <math>\log k_w</math> ΑΠΟ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΕ 100% ΥΔΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ .....</b> | <b>55</b> |
| <b>3.6.1 Σύγκριση <math>\log k_w</math> γραμμικής προεκβολής (2-προπανόλη)–πειραματικής μέτρησης .....</b>                                                                                                  | <b>55</b> |
| <b>3.6.2 Σύγκριση <math>\log k_w</math> γραμμικής προεκβολής (ακετονιτρίλιο)–πειραματικής μέτρησης .....</b>                                                                                                | <b>57</b> |
| <b>3.7 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ <math>\log k_w</math> ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ .....</b>                                                                               | <b>59</b> |
| <b>3.7.1 Συσχέτιση με χρωματογραφία HSA .....</b>                                                                                                                                                           | <b>59</b> |
| <b>3.7.2 Συσχέτιση με μικκυλιακή χρωματογραφία .....</b>                                                                                                                                                    | <b>61</b> |
| <b>3.8 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΕΓΕΘΗ .....</b>                                                                                                                                                        | <b>63</b> |
| <b>3.8.1 Πρωτεϊνική σύνδεση (%Plasma Protein Binding, %PPB) .....</b>                                                                                                                                       | <b>64</b> |
| <b>3.8.2 Όγκος κατανομής (<math>V_d</math>) .....</b>                                                                                                                                                       | <b>68</b> |
| <b>4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>                                                                                                                                                                                | <b>70</b> |
| <b>5. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ .....</b>                                                                                                                                                             | <b>71</b> |
| <b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>                                                                                                                                                                                | <b>72</b> |

# 1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Τα φάρμακα αποτελούν πολύτιμα αγαθά και ορίζονται ως οι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και αντιμετώπιση/θεραπεία των ασθενειών από τις οποίες απειλείται διαρκώς ο άνθρωπος, τα ζώα και τα φυτά στη διάρκεια της ζωής τους. Κατά την διάρκεια της εξέλιξης της ανθρωπότητας οι αυξανόμενες γνώσεις σχετικά με την πορεία του φαρμάκου στον οργανισμό αλλά και την επίδραση του οργανισμού στο φάρμακο, όπως καθορίζονται από την φαρμακοδυναμική και τη φαρμακοκινητική αντίστοιχα, διαμόρφωσαν τις αντιλήψεις για τις υψηλές προδιαγραφές των φαρμάκων και επηρέασαν αντίστοιχα τον προσανατολισμό της έρευνας.<sup>5</sup> Ακόμη και αν ανακαλυφθεί μία νέα ένωση με σημαντική βιολογική δραστηριότητα, η βελτιστοποίηση της και η ανάπτυξη της σε φάρμακο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί κλινικά είναι μία δύσκολη, δαπανηρή και αβέβαιη διαδικασία. Τα στοιχεία δείχνουν ότι λιγότερες από μία ένωση ανάμεσα σε χιλιάδες ενώσεις που ανακαλύπτονται να παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα δράση, φτάνει τελικά στην κυκλοφορία ως φάρμακο. Και αν τελικά αυτό επιτευχθεί, απαιτούνται περίπου 10 χρόνια έρευνας και κόστος που ανέρχεται σε 250 εκατομμύρια δολάρια.<sup>2</sup>

Σε ένα πλήθος 5.000-10.000 ενώσεων που παρουσιάζουν μία φαρμακολογική και βιολογική δράση, μόνο 5 εισέρχονται στις κλινικές δοκιμές που αποτελούνται από 3 φάσεις. Στην πρώτη φάση γίνεται έλεγχος ασφάλειας και δοσολογίας σε αριθμό μερικών δεκάδων υγιών εθελοντών. Στην δεύτερη φάση ελέγχεται η αποτελεσματικότητα και οι ανεπιθύμητες ενέργειες σε ένα μεγαλύτερο δείγμα μερικών εκατοντάδων ασθενών πλέον εθελοντών ενώ στην τρίτη φάση ελέγχεται η αποτελεσματικότητα και οι μακροχρόνιες ανεπιθύμητες ενέργειες σε ακόμα μεγαλύτερο αριθμό εθελοντών της τάξης των 5.000. Εφόσον λοιπόν κάποια ένωση μετά την ανακάλυψη της, την προκλινική μελέτη και τα στάδια των τριών φάσεων εγκριθεί τότε εισέρχεται στην κυκλοφορία.<sup>5</sup>

Όμως, το μεγαλύτερο ποσοστό των φαρμακολογικών ενώσεων δεν περνάει επιτυχώς όλα τα παραπάνω στάδια και η κυκλοφορία του απορρίπεται ή χρειάζεται τροποποιήσεις ώστε να ελεγχθεί ξανά. Οι κύριοι λόγοι αποκλεισμού των υποψήφιων φαρμάκων από την κλινική ανάπτυξη αποδίδονται σε φαρμακοκινητικούς λόγους και σε έλλειψη αποτελεσματικότητας εκπροσωπώντας το 70% σύμφωνα με στατιστικές μελέτες της δεκαετίας του '90. Το υπόλοιπο ποσοστό αποδίδεται σε ανεπιθύμητες ενέργειες στον άνθρωπο, σε τοξικότητα σε ζώα, σε εμπορικούς και διάφορους άλλους λόγους. Σημαντικό να αναφερθεί είναι ότι η αποτυχία και ο αποκλεισμός ενός φαρμάκου πρέπει να διαπιστωθεί στα πρώτα στάδια της μελέτης ώστε να αποφευχθούν οι χρονοβόρες και δαπανηρές κλινικές δοκιμές.<sup>5</sup>



Είναι κατανοητό λοιπόν πως το μεγάλο αυτό ποσοστό απόρριψης εξαιτίας φαρμακοκινητικών λόγων ήταν αναγκαίο να μειωθεί. Ήδη μετά το πέρας της δεκαετίας τους '90 η ενδεδειγμένη μελέτη των ιδιοτήτων Απορρόφησης, Κατανομής, Μεταβολισμού και Απέκκρισης σε συνδυασμό με την εξέταση της συγγένειας των φαρμακευτικών μορίων με τον υποδεχέα-στόχο μείωσαν κατά πολύ τα ποσοστά των φαρμακευτικών λόγων και λιγό λιγότερο το ποσοστό που οφείλεται στην αποτελεσματικότητα.<sup>5</sup>

## 1.2 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Η φαρμακοκινητική μελετά την απορρόφηση (absorption) του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος, την κατανομή (distribution) του στον οργανισμό, τον μεταβολισμό (metabolism) του και τέλος την απέκκριση (excretion) του. Τα στάδια αυτά αναφέρονται και ως ιδιότητες ADME από τα αρχικά γράμματα των αγγλικών όρων. Η φαρμακοκινητική ουσιαστικά αναλύει τον τρόπο που ένας οργανισμός χειρίζεται ένα φάρμακο από τη στιγμή που χορηγείται μέχρι να βρει το βιολογικό του στόχο.<sup>2</sup>

### 1.2.1 Απορρόφηση

Η διάλυση και η απορρόφηση των δραστικών συστατικών ενός φαρμακευτικού προϊόντος είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την εμφάνιση κάποιας συστηματικής φαρμακολογικής δράσης.<sup>1</sup>

Η χορήγηση ενός φαρμακευτικού προϊόντος στον οργανισμό συνήθως πραγματοποιείται από το στόμα ή την είσοδο στην κυκλοφορία του αίματος από τον βλεννογόνο του στόματος (υπογλώσσια δισκία) ή την είσοδο από το ορθόν . Δυστυχώς η χορήγηση δια μέσου του στόματος είναι ο πιο περίπλοκος τρόπος για να μελετηθεί για ένα φάρμακο. Άλλος τρόπος χορήγησης φαρμάκων είναι ο παρεντερικός όπως για παράδειγμα η ενδοφλέβια, ενδομυϊκή και υποδόρια ένεση. Ως παρεντερική χορήγηση θεωρείται επίσης και η τοπική εφαρμογή φαρμάκων στο δέρμα (διαδερμική) και τους βλεννογόνους με εξαίρεση του πεπτικού συστήματος. Παρεντερικός τρόπος χορήγησης ονομάζεται αυτός στον οποίο παρακάμπτεται ο γαστρεντερικός σωλήνας και δεν παρουσιάζεται το πρόβλημα που προκύπτει στο **φαινόμενο της πρώτης διόδου (first-pass effect)**, όπως αυτό θα περιγραφεί παρακάτω.<sup>1,2</sup>

Όταν το φάρμακο εισέλθει στον οργανισμό το μέγεθος που θα χαρακτηρίσει την αποτελεσματικότητά του είναι η **βιοδιαθεσιμότητα** που ορίζεται ως το πηλίκο της ποσότητας του φαρμάκου που εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος ως προς τη χορηγούμενη ποσότητα φαρμάκου. Με άλλα λόγια είναι το ποσοστό της δόσης ενός φαρμάκου που τελικά θα εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος. Η έννοια αυτή έχει σημασία για την χορήγηση μέσω του στόματος διότι με την ενδοφλέβια

χορήγηση για παράδειγμα η ποσότητα του φαρμάκου που θα εισέλθει στο αίμα είναι η συνολική (βιοδιαθεσιμότητα=1).

Ο πιο αποδεκτός τρόπος χορήγησης ενός φαρμάκου είναι μέσω του στόματος. Ταυτόχρονα όμως είναι και ο πιο περίπλοκος μηχανισμός για να μελετηθεί. Όταν το φάρμακο καταποθεί μετακινείται μέσα στον οργανισμό από τον οισοφάγο και καταλήγει στο στομάχι. Εκεί το ισχυρά όξινο περιβάλλον λόγω του γαστρικού οξέος διαλύει το φάρμακο στα υγρά του. Το pH του στομάχου μπορεί να διαφέρει με την παρουσία τροφής ή όχι. Η παρουσία τροφής αυξάνει το pH και τον όγκο του στομαχιού αλλά ελαττώνει την το ρυθμό μετακίνησης της φαρμακευτικής ένωσης στο λεπτό έντερο. Γι'αυτό το λόγο επηρεάζεται ο ρυθμός απορρόφησης του φαρμάκου στο στομάχι εάν σε αυτό υπάρχει τροφή. Σε ένα άδειο στομάχι τα λιπόφιλα φάρμακα στο όξινο περιβάλλον απορροφούνται ευκολότερα.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το φάρμακο μετά το στομάχι ακολουθεί την οδό του λεπτού εντέρου όπου πραγματοποιείται το μεγαλύτερο μέρος της απορρόφησης. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας των πτυχώσεων και των προεκβολών του λεπτού εντέρου που οδηγούν σε μεγαλύτερο χρόνο διέλευσης άρα και μεγαλύτερη πιθανότητα απορρόφησης. Στο λεπτό έντερο συνεχίζεται η χημική διάσπαση που ξεκίνησε στο στομάχι καταλήγοντας στο γεγονός τα μέρη του φαρμάκου που απορροφήθηκαν είτε στο στομάχι είτε στο έντερο να εισέρχονται στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας.

Το ήπαρ αποτελεί την τελευταία στάση του φαρμάκου πριν από την είσοδο του στην κυκλοφορία του αίματος. Τίποτα δεν μπορεί να εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος από το πεπτικό σύστημα αν δε διέλθει πρώτα από το ήπαρ. Εκεί μεταβολίζεται μέρος ή η συνολική ποσότητα του φαρμάκου. Ένζυμα του στομάχου, βακτηρίδια και ένζυμα του εντέρου και ηπατικά κύτταρα εξουδετερώνουν σημαντικές ποσότητες του χορηγούμενου φαρμάκου. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **φαινόμενο πρώτης διόδου** και στην ουσία περιγράφει την απωλεσθείσα ποσότητα που δεν εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος.

Η δραστικότητα ενός φαρμάκου στην δια στόματος χορήγηση περιγράφεται από τον κανόνα των πέντε του Lipinski. Ο Lipinski μίλησε για τέσσερις όρους που ευνοούν την δραστικότητα της φαρμακευτικής ουσίας όταν αυτή χορηγείται από το στόμα. Σύμφωνα με τους όρους αυτούς μία ένωση πρέπει να έχει μοριακό βάρος μικρότερο του 500, να μην έχει πάνω από 5 ομάδες δότες δεσμών υδρογόνου, να μην έχει πάνω από 10 ομάδες δέκτες δεσμών υδρογόνου και να έχει τιμή υπολογιστικού logP μικρότερη του 5.

Εκτός από την δια στόματος χορήγηση, συναντώνται και οι ενέσεις (ενδοφλέβια, ενδομυϊκή, υποδόρια). Στην ενδοφλέβια χορήγηση η βιοδιαθεσιμότητα

είναι 1 ενώ και στην ενδομυϊκή και στην υποδόρια, η τιμή της βιοδιαθεσιμότητας είναι αρκετά υψηλή.

Άλλος τρόπος χορήγησης είναι ο διαδερμικός. Πραγματοποιείται με την τοποθέτηση επιθέματος στο δέρμα. Το φάρμακο περιέχεται σε ένα φιλμ, διαχέεται μέσα στο δέρμα και εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος. Γίνεται κατανοητό πως κι σε αυτή την περίπτωση η βιοδιαθεσιμότητα είναι υψηλή και θεωρείται ως ένας εύκολος τρόπος χορήγησης. Ωστόσο υπάρχει δυσκολία στην διάχυση του φαρμάκου μέσα στο δέρμα και μειονέκτημα επίσης αποτελεί ο τυχόν ερεθισμός του δέρματος των ασθενών.

Ένα φάρμακο χορηγείται επίσης από τον βλεννογόνο του στόματος (υπογλώσσια). Κάτω από την γλώσσα υπάρχουν μαλακοί ιστοί που απορροφούν γρήγορα το φαρμακευτικό προϊόν. Όσα έχουν δυσάρεστη γεύση δεν συνιστώνται για αυτού του είδους την χορήγηση.

Οι πνεύμονες είναι άλλη μία περιοχή του οργανισμού όπου γίνεται απορρόφηση φαρμάκου. Τα αιμοφόρα αγγεία που συναντώνται εκεί είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση του οξυγόνου και την αποδέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα. Τα φάρμακα σε αέρια μορφή είναι εισπνεόμενα και πλεονεκτούν στην αποφυγή του φαινομένου της πρώτης διόδου.

Τέλος, η χορήγηση ενός φαρμάκου από του ορθόν είναι μια εντερική μέθοδος αλλά το φαινόμενο πρώτης διόδου είναι αμελητέο. Αυτό συμβαίνει διότι το ορθό είναι μια αρκετά απορροφητική περιοχή. Όμως η χορήγηση ορθικών υποθέτων δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη και αποδεκτή.<sup>2</sup>

### 1.2.2 Κατανομή

Η κατανομή της φαρμακευτικής ουσίας ξεκινά όταν αυτή εγκαταλείπει το ήπαρ και εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος, μια διαδικασία που είναι ταχύτατη. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στα τοιχώματα του εντέρου πραγματοποιείται το μεγαλύτερο μέρος της απορρόφησης είτε με παθητική διάχυση είτε πιο σπάνια με ενεργητική μεταφορά. Οι ουσίες, κυρίως αυτές που χορηγούνται μέσω του στόματος, πρέπει να έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες. Στην περίπτωση της παθητικής διάχυσης τα μόρια της δραστικής ουσίας με την κινητική τους ενέργεια καλύπτουν τις ενεργειακές ανάγκες για την μεταφορά τους, μέσω μεμβράνης, από μία περιοχή υψηλής σε μία περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης. Στην περίπτωση της ενεργητικής μεταφοράς η δραστική ουσία μεταφέρεται από πρωτεΐνες-μεταφορείς που βρίσκονται σε όλο το πάχος της μεμβράνης. Η μεταφορά απαιτεί ενέργεια που εξασφαλίζεται μέσω της υδρόλυσης μονάδων ATP. ATP είναι η σύντηξη της ένωσης 5'-αδενοσινο-τριφωσφορικό οξύ.<sup>39</sup> Το ATP είναι μια βιοχημική ουσία πρωταρχικής σημασίας. Κατά την αντίδραση σχηματισμού του, το ATP

παραλαμβάνει ενέργεια την οποία αποδίδει όταν διασπάται μετέχοντας σε μία άλλη αντίδραση, στην προκειμένη περίπτωση την υδρόλυση του.<sup>2,3</sup>

Τα φάρμακα δεν παραμένουν στην κυκλοφορία του αίματος αλλά μέσω των αιμοφόρων αγγείων αναζητούν τους ιστούς και τα κύτταρα όπου θα εφαρμόσουν την δράση τους. Οι στόχοι των φαρμάκων μπορεί να είναι υποδοχείς στα κυτταρικά τοιχώματα και τις κυτταρικές μεμβράνες ή κάποιοι ενδοκυτταρικοί υποδοχείς. Στην πρώτη περίπτωση το φάρμακο μπορεί να δράσει άμεσα. Αντίθετα, στην δεύτερη περίπτωση το φάρμακο θα πρέπει να εισέλθει στο κύτταρο ώστε να εντοπίσει τον στόχο του. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει να είναι αρκετά λιπόφιλο ή να χρησιμοποιήσει κάποια πρωτεΐνη-μεταφορέα ώστε να το μεταφέρει στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι μεμβράνες των κυττάρων αποτελούνται από λιπιδικές διπλοστοιβάδες οι οποίες έχουν πολικές κεφαλές στο εσωτερικό και το εξωτερικό των κυττάρων και λιπιδικές αλυσίδες στο εσωτερικό τους.

Στον οργανισμό υπάρχει μία μεμβράνη που δεν επιτρέπει εύκολα την μεταφορά δραστικών ουσιών δια μέσου αυτής. Η μεμβράνη αυτή ονομάζεται αιματοεγκεφαλικός φραγμός και συναντάται στο κεντρικό νευρικό σύστημα προστατεύοντας τον εγκέφαλο από την παθητική διάχυση ανεπιθύμητων ενώσεων από το κυκλοφορικό. Οι φαρμακευτικές ουσίες που στοχεύουν το κεντρικό νευρικό σύστημα θα πρέπει να είναι ικανές να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό προκειμένου να εφαρμόσουν την δράση τους.<sup>2</sup>

### 1.2.3 Μεταβολισμός και Απέκκριση

Κάθε ουσία που εισέρχεται στον οργανισμό και είναι ξένη δομή για αυτόν μεταβολίζεται από ειδικά ένζυμα προκειμένου να αποβληθεί ευκολότερα. Μία μεταβολική αντίδραση δίνει προϊόντα γνωστά ως μεταβολίτες όπως συμβαίνει και στην περίπτωση των φαρμάκων.

Οι μεταβολίτες των φαρμακευτικών ουσιών μπορεί να έχουν διαφορετικές ιδιότητες. Συνήθως το φάρμακο μετά τον μεταβολισμό του χάνει την δραστηριότητα του ή διατηρεί ένα μέρος της, σε ορισμένες όμως περιπτώσεις ο μεταβολίτης μπορεί να είναι πιο δραστικός από το αρχικό φάρμακο, ενώ παρατηρείται και μία τρίτη περίπτωση όπου η χορηγούμενη ουσία παρουσιάζει διαφορετική δραστηριότητα προκαλώντας παρενέργειες και τοξικότητα στον οργανισμό.

Οι αντιδράσεις του μεταβολισμού διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις **αντιδράσεις Φάσης I** και τις **αντιδράσεις Φάσης II**. Οι αντιδράσεις της πρώτης φάσης δημιουργούν ένα υπόστρωμα για τις αντιδράσεις της δεύτερης φάσης. Τα προϊόντα μετά το πέρας και των δύο φάσεων είναι υδατοδιαλυτά και απεκκρίνονται ευκολότερα είτε μέσω των ούρων είτε των κοπράνων.

Οι σημαντικότερες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την **Φάση I** είναι η οξειδωση, η αναγωγή και η υδρόλυση. Το ποιά αντίδραση θα πραγματοποιηθεί

φυσικά εξαρτάται από τα διαθέσιμα ένζυμα, τις δραστικές ομάδες του φαρμάκου και τον ανθρακικό του σκελετό. Η οξειδωση είναι η σπουδαιότερη αντίδραση και πραγματοποιείται στο ήπαρ από μία υπεροικογένεια ενζύμων με ονομασία κυτόχρωμα C450. Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχει ποικιλία 50 διαφορετικών ισοενζύμων κυτοχρώματος C450 με σημαντικότερο το ισοένζυμο CYP3A4 που μεταβολίζει τα περισσότερα φάρμακα. Οι οξειδώσεις που πραγματοποιούνται από το κυτόχρωμα C450 είναι σε άτομα άνθρακα, αζώτου, φωσφόρου, θείου και άλλων ατόμων όταν αυτά είναι εκτεθειμένα ή ενεργοποιημένα λόγω των υποκαταστατών τους. Η αναγωγή πραγματοποιείται σπανιότερα συνήθως όταν μια νίτρο ομάδα ανάγεται προς την αντίστοιχη αμίνη ή μία κετόνη προς της αντίστοιχη αλκοόλη. Τέλος, στις υδρολύσεις οι εστέρες και τα αμίδια μετατρέπονται σε οξέα και αλκοόλες ή αμίνες αντίστοιχα.

Οι **αντιδράσεις Φάσης II** έχουν ως στόχο να μετατρέψουν τα προϊόντα της Φάσης I, συνδεόντας πολικές ομάδες, σε υδατοδιαλυτές ενώσεις. Οι κυριότερες αντιδράσεις είναι η ακετυλίωση, η σουλφονίωση, η σύζευξη με αμινοξέα, γλυκουρονικό οξύ ή γλουταθιόνη. Στο τέλος των αντιδράσεων Φάσης II οι φαρμακευτικές ουσίες πρέπει να είναι αρκετά πολικές ώστε να απεκκριθούν.

Η απέκκριση μίας φαρμακευτικής ουσίας από τον οργανισμό μπορεί να πραγματοποιηθεί απευθείας, δηλαδή να μην έχει υποστεί καμία μεταβολική αντίδραση ή να απεκκριθεί το προϊόν των αντιδράσεων των δύο φάσεων, δηλαδή ο μεταβολίτης της αρχικής ουσίας. Η απέκκριση πραγματοποιείται κυρίως μέσω των νεφρών τα οποία συγκρατούν τις άχρηστες ενώσεις και τις αποβάλλουν με τα ούρα. Υπάρχουν και φάρμακα που αποβάλλονται μέσω παχέος εντέρου με τα κόπρανα αλλά και με την αναπνοή μέσω των πνευμόνων όπως στην περίπτωση των αέριων φαρμάκων. Τέλος, άλλα μέσα απέκκρισης φαρμάκων αποτελούν ο ιδρώτας και το μητρικό γάλα.<sup>2</sup>

## 1.3 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

### 1.3.1 Λιποφιλία

Καθώς το φάρμακο εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος αναζητά τους στόχους του για να δράσει. Όπως αναφέρθηκε στην κατανομή μίας φαρμακευτικής ουσίας ο στόχος μπορεί να είναι κάποιος ενδοκυτταρικός υποδοχέας. Μία από τις απαραίτητες προϋποθέσεις για να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη είναι η λιποφιλία της ουσίας.

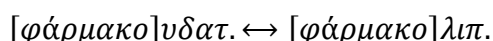
Η λιποφιλία εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου ή τμήματος μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Η λιποφιλία δεν ταυτίζεται με την υδροφοβία, η οποία είναι η συσσωμάτωση μη-πολικών ομάδων ή μορίων σε υδατικό περιβάλλον και η

οποία οφείλεται στην τάση των μορίων του νερού να αποφεύγουν τα μη πολικά μόρια. Η λιποφιλία είναι μια σύνθετη ιδιότητα, αποτελούμενη από δυο συνιστώσες, την υδροφοβία και την πολικότητα των ενώσεων, όπως φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση<sup>4</sup>:

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβία} - \text{Πολικότητα} \quad [1]$$

Η λιποφιλία αποτελεί φυσικοχημική ιδιότητα υψηλής σημασίας για τη βιολογική δράση, διότι υπεισέρχεται τόσο στις παθητικές διαδικασίες όσο και στις διαδικασίες σύνδεσης, επηρεάζοντας έτσι τη φαρμακοκινητική αλλά και τη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά. Χαμηλές τιμές λιποφιλίας οδηγούν λοιπόν σε χαμηλές και φτωχές φαρμακοκινητικές ιδιότητες ενώ αντίθετα πολύ υψηλές τιμές λιποφιλίας δεν ευνοούν την βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου, οδηγούν σε απρόβλεπτη πορεία την διεργασία του μεταβολισμού, παρατεταμένη παραμονή στον οργανισμό με αποτέλεσμα την συσσώρευση σε ουδέτερα λίπη και τοξικότητα.<sup>5</sup>

Η λιποφιλία εκφράζεται ποσοτικά μέσω του **συντελεστή μερισμού P**. Ο συντελεστής αυτός αποτελεί την σταθερά ισορροπίας P μεταξύ της λιποειδικής και υδατικής φάσης στην κατανομή ενός φαρμάκου όπως φαίνεται από την παρακάτω ισορροπία:



Δηλαδή,

$$P = \frac{[\text{φάρμακο}]_{\text{λιπ}}}{[\text{φάρμακο}]_{\text{υδατ}}} \quad [2]$$

Ο συντελεστής μερισμού P εξαρτάται μόνο από την θερμοκρασία και το σύστημα των διαλυτών άρα αποτελεί μια θερμοδυναμική σταθερά. Κυρίως συναντάται σε λογαριθμική μορφή ώστε να είναι σε γραμμική σχέση με την ελεύθερη ενέργεια ΔG όπως φαίνεται παρακάτω:

$$\log P = \frac{-\Delta G}{2,303 \cdot R \cdot T} \quad [3]$$

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

Ενώ ο συντελεστής μερισμού P αποτελεί την σταθερά ισορροπίας μεταξύ λιποειδικής και υδατικής φάσης ενός φαρμάκου, στην πραγματικότητα οι περισσότερες φαρμακευτικές ενώσεις έχουν ιοντισμένα κέντρα οπότε στην συγκεκριμένη περίπτωση εισάγεται νέος συντελεστής, ο **συντελεστής κατανομής D**.

Ο συντελεστής κατανομής D ορίζεται ως το πηλίκο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων ιοντισμένης και αδιάστατης μορφής στην οργανική φάση προς το άθροισμα των συγκεντρώσεων ιοντισμένης και αδιάστατης μορφής στην υδατική

φάση. Ανάλογα το pH οι φαρμακευτικές ενώσεις μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο ιοντισμένες. Ο συντελεστής αυτός είναι πιο περίπλοκος σε σχέση με τον συντελεστή μερισμού P κι προσδιορίζεται από 4 διαφορετικές σταθερές ισορροπίας. Αυτές είναι,

- η σταθερά κατανομής της αδιάστατης μορφής μεταξύ οργανικής και υδατικής φάσης ( $\log P^N$ ),
- η σταθερά κατανομής ιοντισμένης μορφής μεταξύ οργανικής και υδατικής φάσης ( $\log P^I$ ),
- η σταθερά ιοντισμού ( $pK_a$ ),
- η σταθερά που ισούται με το pH της υδατικής φάσης όταν στην οργανική φάση υπάρχουν ίσες συγκεντρώσεις αδιάστατης και ιοντισμένης μορφής ( $pK_a^{org}$ ).<sup>5</sup>

Η λιποφιλία επομένως εξετάζεται καλύτερα με τον συντελεστή κατανομής D διότι αφορά τις ενώσεις που φέρουν κέντρα ιοντισμού (όπως δηλαδή οι περισσότερες φαρμακευτικές ενώσεις). Ο συντελεστής κατανομής D αναφέρεται στη λιποφιλία του μίγματος (οργανική και υδατική φάση) όλων των υφιστάμενων ηλεκτρονιακών μορφών (ιοντισμένη και αδιάστατη) της ένωσης σε συγκεκριμένο pH.<sup>6</sup>

Οι δύο συντελεστές που αναφέρθηκαν παραπάνω σχετίζονται με την παρακάτω σχέση:

$$\log P = \log D + Q \quad [4]$$

Όπου Q συντελεστής διόρθωσης που εξαρτάται από το  $pK_a$  της ουσίας και το pH του περιβάλλοντος.

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν σχέσεις για τον υπολογισμό του συντελεστή διόρθωσης Q για μονοπρωτικά, διπρωτικά οξέα και βάσεις καθώς και για αμφολίτες, με την προϋπόθεση τιμών pH που δεν δίνουν υψηλό βαθμό ιοντισμού. Στην περίπτωση υψηλού βαθμού ιοντισμού οι σχέσεις παύουν να ισχύουν.<sup>5</sup>

### 1.3.2 Βαθμός Ιοντισμού

Ο σχεδιασμός μίας φαρμακευτικής ουσίας που φέρει κέντρα ιοντισμού καθιστά απαραίτητη την μελέτη της σταθεράς ιοντισμού της ( $pK_a$ ). Η ουδέτερη μορφή ενός φαρμάκου είναι αυτή που θα διαπεράσει οποιαδήποτε βιολογική μεμβράνη αλλά η ιοντισμένη μορφή είναι αυτή που αλληλεπιδρά με τον ενδοκυτταρικό υποδοχέα. Είναι κατανοητό πως ο βαθμός ιοντισμού πρέπει να είναι συγκεκριμένος και συμβιβαστικός ώστε να πραγματοποιούνται με επιτυχία και η απορρόφηση αλλά και η αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα.

Ο βαθμός ιοντισμού υπολογίζεται σύμφωνα με τις παρακάτω σχέσεις που προκύπτουν από την εξίσωση Henderson-Hasselbach,

Για οξέα:

$$pKa = pH - \log \frac{[\beta\acute{\alpha}\sigma\eta]}{[\alpha\xi\acute{\upsilon}]} \quad [5]$$

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pKa-pH}} \quad [6]$$

Για βάσεις:

$$pKa = pH - \log \frac{[\alpha\xi\acute{\upsilon}]}{[\beta\acute{\alpha}\sigma\eta]} \quad [7]$$

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pH-pKa}} \quad [8]$$

Όπως παρατηρείται από τις παραπάνω σχέσεις η διαφορά pKa-pH έχει ιδιαίτερη σημασία. Στην περίπτωση των οξέων, για μία διαφορά pKa-pH=-2 προκύπτει ιοντισμός περίπου 99% ενώ για pKa-pH=2 ο ιοντισμός είναι 1% δηλαδή σχεδόν αδιάστατη μορφή. Το αντίστροφο ακριβώς συμβαίνει στην περίπτωση των βάσεων, δηλαδή pKa-pH=-2 προκύπτει ιοντισμός περίπου 1% ενώ για pKa-pH=2 ο ιοντισμός είναι 99%. Για την διαφορά pKa-pH=0 υπάρχει 50% ιοντισμένη και 50% αδιάστατη μορφή. Το συμπέρασμα που εξάγεται από αυτή την ανάλυση είναι πως γνωρίζοντας το pKa της φαρμακευτικής ένωσης που μας ενδιαφέρει αλλά και το pH της περιοχής που βρίσκεται ανά πάσα στιγμή μπορεί να προβλεφθεί ποιά μορφή επικρατεί (ιοντισμένη ή αδιάστατη) και επομένως αν ευνοείται ή όχι η απορρόφηση.

Παραπάνω αναφέρθηκε πως η ουδέτερη μορφή ενός φαρμάκου είναι αυτή που ευνοεί την απορρόφηση. Για να συμβαίνει αυτό ο βαθμός ιοντισμού πρέπει να είναι χαμηλός. Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα δεδομένα λοιπόν, για τα οξέα, καλύτερη απορρόφηση συναντάται στις περιοχές του στομάχου και της αρχής του λεπτού εντέρου όπου το pH είναι χαμηλό ενώ για τις βάσεις συναντάται στην υπόλοιπη διαδρομή του φαρμάκου όπως αυτή έχει αναλυθεί στην παρούσα θεωρία.

Συνδυάζοντας τα παραπάνω, η σταθερά ιοντισμού (pKa) επηρεάζει την λιποφιλία αλλά είναι μία παράμετρος που δεν εξετάζεται ξεχωριστά αφού εμπεριέχεται στον υπολογισμό του συντελεστή κατανομής (logD).<sup>5</sup>

### 1.3.3 Ικανότητα σχηματισμού δεσμού υδρογόνου

Πολλές φορές όπως έχει τονιστεί στην παρούσα εργασία ο στόχος μίας φαρμακευτικής ένωσης μπορεί να είναι ενδοκυτταρικός και να απαιτείται η διέλευση



μέσω βιολογικής μεμβράνης. Η αύξηση της ικανότητας σχηματισμού δεσμού υδρογόνου μεταξύ μορίων δυσχεραίνει την διέλευση μέσω των μεμβρανών.

Ο δεσμός υδρογόνου είναι οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ μορίων που περιέχουν τους δεσμούς H-F, H-O, H-N. Είναι ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του H και των F,O,N. Οι δεσμοί υδρογόνου παίζουν σημαντικό ρόλο σε χημικά και βιολογικά συστήματα. Ενώ ο σχηματισμός του δεσμού μεταξύ μορίων δεν ευνοεί ενεργειακά την διάχυση μέσω των μεμβρανών, αντίθετα ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου προστατεύει την έκθεση σε μόρια νερού και συμβάλει στην διαπερατότητα.

Η ικανότητα σχηματισμού δεσμού υδρογόνου περιγράφεται και στον κανόνα των πέντε του Lipinski για την δια στόματος χορήγηση. Όπως αναφέρθηκε, μία ένωση πρέπει να μην έχει πάνω από 5 ομάδες δότες δεσμών υδρογόνου και πάνω από 10 ομάδες δέκτες δεσμών υδρογόνου.

Υπάρχουν αναλύσεις που προσδιορίζουν την ικανότητα σχηματισμού δεσμού υδρογόνου πα'όλα αυτά δεν απασχολούν την συγκεκριμένη εργασία και δεν αναλύονται.<sup>5</sup>

#### 1.3.4 Μοριακό βάρος

Η διαπερατότητα από τις βιολογικές μεμβράνες εκτός από τους δεσμούς υδρογόνου επηρεάζεται και από το μοριακό βάρος της ένωσης. Μόρια μικρά σε μέγεθος με μικρό μοριακό βάρος ( $MB < 200$ ) εμφανίζουν μεγάλη διαπερατότητα ενώ μεγάλα μόρια συναντούν δυσκολία. Έχει αναφερθεί ότι η λιποφιλία μίας ένωσης ευνοεί την διαπερατότητα ωστόσο αυτή δεν εξαρτάται μόνο από τον συντελεστή κατανομής D που εξετάζει την λιποφιλία. Η διαπερατότητα εξαρτάται κι από τον συντελεστή διάχυσης που είναι αντιστρόφος ανάλογος του μοριακού βάρους οπότε τα μικρότερα μόρια διευκολύνονται κατά την διάχυση τους.

Το μοριακό βάρος επίσης αναφέρεται κι αυτό στον κανόνα των πέντε του Lipinski για την χορήγηση του φαρμάκου από το στόμα όπου μία ένωση πρέπει να έχει μοριακό βάρος 500 δηλαδή να είναι μικρή σε μέγεθος.<sup>5</sup>

#### 1.3.5 Πρωτεϊνική σύνδεση

Η πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων είναι η αναστρέψιμη αλληλεπίδραση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Τα φάρμακα συνδέονται με τις πρωτεΐνες κατά την είσοδο τους στον ενδαγγειακό χώρο. Η σύνδεση αυτή επηρεάζει την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση τους αλλά και την διάρκεια της δράσης τους.<sup>7</sup>

Στην κυκλοφορία του αίματος τα φάρμακα συναντώνται στην ελεύθερη (μη δεσμευμένη) και δεσμευμένη μορφή με πρωτεΐνες. Το ελεύθερο μόνο φάρμακο μπορεί να διέλθει της μεμβράνης του πλάσματος και να συνδεθεί αντιστρεπτά με τον

υποδοχέα στόχο.<sup>8</sup> Όταν η συγκέντρωση του φαρμάκου αυξάνεται, τα σημεία σύνδεσης των πρωτεϊνών καλύπτονται και επιτυγχάνεται η μέγιστη σύνδεση του φαρμάκου. Το ποσοστό του συνδεδεμένου φαρμάκου ελαττώνεται σε σχέση με το ολικό ποσό. Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση του φαρμάκου ελαττώνεται, το ποσοστό αυτό αυξάνεται. Η σύνδεση πρωτεΐνης-φαρμάκου δεν είναι εκλεκτική επομένως δύο ή περισσότερα φάρμακα μπορούν να ανταγωνίζονται τα ίδια σημεία σύνδεσης του πρωτεϊνικού μορίου. Όταν η σύνδεση είναι ισχυρή δυστυχώς παρατηρούνται φαινόμενα τοξικότητας στον οργανισμό.<sup>7</sup>

Οι κύριες πρωτεΐνες σύνδεσης φαρμάκου είναι οι λευκωματίνες, οι α1-όξινης γλυκοπρωτεΐνες και οι λιποπρωτεΐνες. Στο αίμα σε μεγαλύτερο ποσοστό (περίπου 60%) συναντάται η αλβουμίνη του ανθρώπινου ορού (HSA). Η αλβουμίνη αλληλεπιδρά κυρίως με όξινα μόρια. Σε μικρότερο ποσοστό συναντάται η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη η οποία δεσμεύει βασικά και ουδέτερα φάρμακα.<sup>9</sup>

### 1.3.6 Όγκος κατανομής

Ο όγκος κατανομής ( $V_d$ ) είναι μία θεωρητική έννοια και δίνει την συσχέτιση της χορηγούμενης ποσότητας φαρμάκου στο σώμα (δόση) με την συγκέντρωση (C) του φαρμάκου που μετριέται στο πλάσμα.<sup>10</sup> Αντιπροσωπεύει δηλαδή τον φαινόμενο όγκο στον οποίο κατανέμεται το φάρμακο για να έχει την ίδια συγκέντρωση με την συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα την δεδομένη στιγμή. Έτσι ο όγκος κατανομής αντικατοπτρίζει την έκταση στην οποία το φάρμακο υπάρχει στους εξωαγγειακούς ιστούς αλλά όχι στο πλάσμα. Η λιποφιλία μπορεί να επηρεάσει τον όγκο κατανομής αφού τα λιπόφιλα φάρμακα εισέρχονται ευκολότερα στα κύτταρα με αποτέλεσμα ο όγκος κατανομής να αυξάνεται.<sup>11</sup> Αντίθετα, υδατοδιαλυτά φάρμακα συγκρατούνται ενδοαγγειακά και έχουν μικρό όγκο κατανομής.<sup>10</sup> Τέλος, η σχέση υπολογισμού του όγκου κατανομής είναι η χορηγούμενη δόση φαρμάκου ως προς την συγκέντρωση στο πλάσμα την στιγμή μηδέν όπως φαίνεται παρακάτω,

$$Vd = \frac{dose}{Co} [9]$$

## 1.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

### 1.4.1 Εισαγωγή

Η χρωματογραφία είναι μία τεχνική διαχωρισμού η οποία βρίσκει εφαρμογές σε κάθε κλάδο της επιστήμης όπως η φαρμακευτική ανάλυση, η ανάλυση τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων, η βιοχημική έρευνα. Ο όρος χρωματογραφία αποδίδεται σε ένα σημαντικό πλήθος μεθόδων οι οποίες βοηθούν τον επιστήμονα να διαχωρίσει ουσίες με παρόμοιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μίγματα. Εφαρμόζονται δηλαδή για την διαπίστωση της παρουσίας ή μη συστατικών σε

μίγματα τα οποία περιέχουν ένα περιορισμένο αριθμό άλλων ουσιών/προσμίξεων γωστής, ως επί το πλείστον, ταυτότητας. Σε όλους τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα διαλύεται σε μια κινητή φάση που μπορεί να είναι ένα αέριο, ένα υγρό ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Η κινητή φάση διέρχεται μέσω μίας στατικής φάσης η οποία είναι καθηλωμένη σε μία στήλη ή σε μία στερεά επιφάνεια. Η επιλογή των φάσεων γίνεται ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά που κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης ενώ όσα κατακρατούνται ασθενέστερα κινούνται ταχύτερα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα συστατικά του δείγματος να διαχωρίζονται και να προσδιορίζονται ποιοτικά ή/και ποσοτικά. Ο διαχωρισμός των συστατικών βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις. Κάθε μόριο μίας ουσίας μετακινείται πάρα πολλές φορές μεταξύ της κινητής φάσης (όπου διαλύεται) και της στατικής φάσης (όπου προσροφάται ή κατανέμεται ή δεσμεύεται) και αντίστροφα.<sup>12,13</sup>

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορα κριτήρια. Το πρώτο κριτήριο αφορά το είδος των στατικών και κινητών φάσεων που βρίσκονται σε επαφή. Στη **χρωματογραφία στήλης**, η στατική φάση συγκρατείται σε μία στήλη μέσω της οποίας διέρχεται η κινητή φάση με εφαρμογή πίεσης. Στην **επίπεδη χρωματογραφία**, η στατική φάση στηρίζεται σε μία επίπεδη πλάκα ή στους πόρους ενός χαρτιού. Ένα άλλο κριτήριο ταξινόμησης στηρίζεται στον τύπο των κινητών και στατικών φάσεων και στο είδος των ισορροπιών, οι οποίες εμπλέκονται στην ανταλλαγή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ των φάσεων όπως αναφέρθηκε και παράπανω. Σε αυτή την κατηγορία διακρίνονται η **υγρή χρωματογραφία** (liquid chromatography, LC), η **αέρια χρωματογραφία** (gas chromatography, GC) και η **χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού** (supercritical fluid chromatography, SFC). Οι ονομασίες αυτές προκύπτουν από το είδος της κινητής φάσης δηλαδή υγρή κινητή φάση, αέρια, η κινητή φάση με υπερκρίσιμα ρευστά. Τέλος, ανάλογα με τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης που επικρατεί ανάμεσα στις ουσίες προς διαχωρισμό και την στατική φάση, οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται σε **χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιονοανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και χημικής συγγένειας**.<sup>12,13</sup>

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση υγρό διαλύτη επομένως παρακάτω θα αναλυθούν στοιχεία για την χρωματογραφία στήλης και την υγρή χρωματογραφία.

#### 1.4.2 Χρωματογραφία στήλης

Στη χρωματογραφία στήλης (column chromatography) η στατική φάση βρίσκεται ως πληρωτικό υλικό ακινητοποιημένη στο εσωτερικό στήλης, κατασκευασμένης από αδρανές υλικό που αποτελείται από σωλήνα στενού

ανοίγματος. Η κινητή φάση καταλαμβάνει τα κενά ενδιάμεσα στο πληρωτικό υλικό το οποίο είναι λεπτόκοκκη αδρανής στερεά ουσία. Η διέλευση της κινητής φάσης γίνεται είτε λόγω βαρύτητας είτε υπό υψηλή πίεση που επιτυγχάνεται με τη χρήση αντλίας. Το δείγμα εισέρχεται στην κορυφή της στήλης και τα επιμέρους συστατικά του δείγματος υφίστανται διαδοχικές κατανομές μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Το κλάσμα κάθε συστατικού, που βρίσκεται κάθε στιγμή στην κινητή φάση, μετακινείται υπό τη συνεχή ροή της κινητής φάσης. Για το κάθε μόριο κάθε στιγμή επέρχεται νέος καταμερισμός μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Οι διαφορές ταχύτητας διαχωρίζουν τα συστατικά σε ταινίες ή ζώνες κατα μήκος της στήλης. Η συνεχής ροή της κινητής φάσης οδηγεί τα συστατικά του δείγματος στην έξοδο της στήλης σε μια διαδικασία που ονομάζεται έκλυση. Στην έξοδο κάθε χρωματογραφικής στήλης συναντάται πάντα κάποιου είδους ανιχνευτής.<sup>12,13</sup>

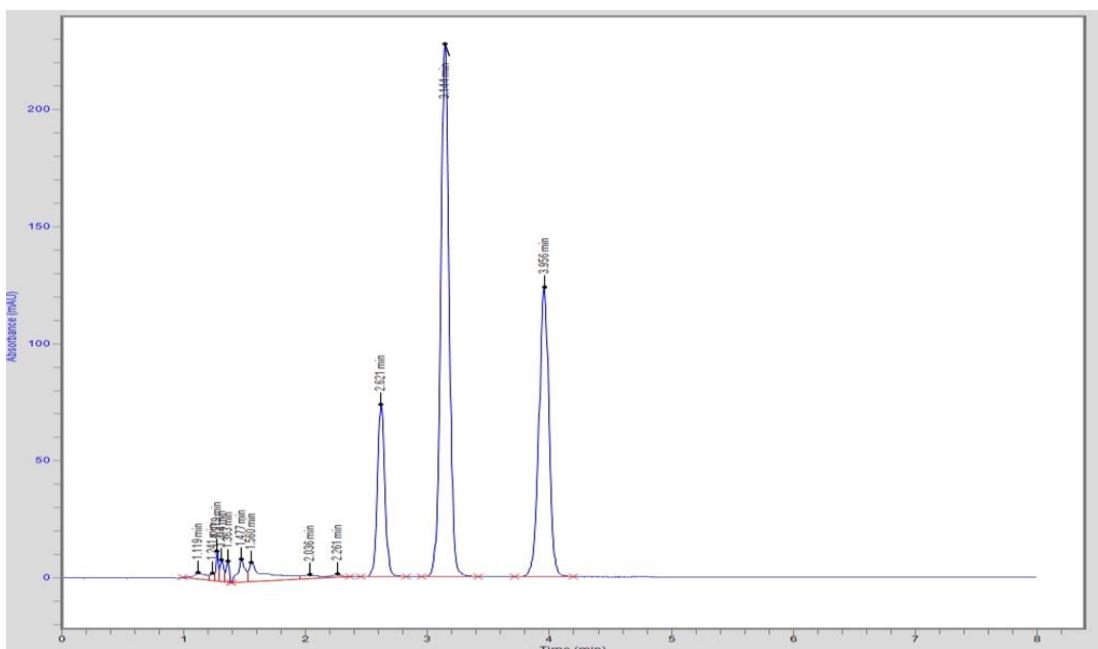
### 1.4.3 Περιγραφή εννοιών χρωματογραφικής ανάλυσης

#### Χρωματογράφημα

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω μια ουσία ενός δείγματος κατανέμεται μεταξύ στατικής και κινητής φάσης ενώ ταυτόχρονα κινείται προς την έξοδο της στήλης υπό τη συνεχή ροή της κινητής φάσης. Οι ζώνες κάθε συστατικού που σχηματίζονται ανιχνεύονται στην έξοδο της στήλης από ανιχνευτή. Η καταγραφή αυτών των ζωνών γίνεται μέσω κορυφών σε μία γραφική παράσταση που ονομάζεται χρωματογράφημα. Σε ένα χρωματογράφημα απεικονίζονται σειρές κορυφών σε συνάρτηση με τον χρόνο οι οποίες αρχίζουν να σχηματίζονται μετά την εισαγωγή του δείγματος στην στήλη. Οι θέσεις αυτών των κορυφών σε σχέση με τον άξονα του χρόνου χρησιμεύουν ως προς την ταυτοποίηση των συστατικών του δείγματος. Κάθε ουσία έχει έναν αναμενόμενο χρόνο που θα εξέλθει από μία στήλη με συγκεκριμένες συνθήκες ωστόσο αυτό δεν αποτελεί απόδειξη για την παρουσία της μιας και είναι πιθανό δύο ουσίες να έχουν ίδιο χρόνο έκλυσης.

Αναλύοντας περισσότερο, κάθε μόριο ενός δείγματος μέσα σε μία χρωματογραφική στήλη κατανέμεται συνεχώς μεταξύ κινητής και στατικής φάσης όπου διαλύεται και προσροφάται αντίστοιχα. Μόρια της ίδιας ουσίας κινούνται με μικρές διαφορές στην ταχύτητα τους διότι τυχαίνει να ξοδεύουν περισσότερο χρόνο στην κινητή φάση από τον μέσο χρόνο παραμονής αλλά και λόγω της πολλαπλότητας των διαδρομών που μπορεί να ακολουθήσει ένα μόριο μέσα στην στήλη. Η στατική φάση είναι ένα πληρωτικό υλικό στο εσωτερικό της στήλης επομένως κάθε μόριο μπορεί να ακολουθήσει μεγαλύτερη ή μικρότερη σε μήκος διαδρομή από ένα άλλο μόριο της ίδιας ουσίας. Το γεγονός αυτό δημιουργεί μία μέση τιμή ταχύτητας έκλυσης από το πλήθος των ταχυτήτων κάθε μορίου της ίδιας ουσίας και αντιπροσωπεύει την μέση συμπεριφορά του μορίου μέσα στην στήλη. Το σύνολο των μορίων κάθε διαχωριζόμενης ουσίας εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη σε μικρό εύρος χρόνων, δίνοντας διευρυμένες κωδωνοειδείς κορυφές με κατανομή

κατά Gauss. Ενώ η θέση της κάθε κορυφής σε σχέση με τον άξονα του χρόνου αποτελεί ποιοτικό δεδομένο και βοηθά στην ταυτοποίηση της ένωσης, το εμβαδόν της κορυφής αποτελεί το ποσοτικό μέτρο κάθε συστατικού.



Εικόνα 1: Χρωματογράφημα σήματος συναρτήσει χρόνου

### Χρόνος κατακράτησης

Ο χρόνος κατακράτησης ή χρόνος ανάσχεσης,  $t_R$ , είναι ο χρόνος που απαιτείται ώστε μια ουσία να διανύσει όλη την έκταση της στήλης από την στιγμή της έγχυσης του δείγματος στην χρωματογραφική στήλη έως ότου εξέλθει απ'αυτή και φτάσει στον ανιχνευτή. Πιο συγκεκριμένα, χρόνος κατακράτησης είναι η χρονική διάρκεια από την ένεση μιας ουσίας μέσα στην χρωματογραφική στήλη έως ότου το μέγιστο της κορυφής έκλουσης της. Πολλές φορές υπάρχουν ουσίες μέσα σε ένα δείγμα που δεν κατακρατούνται από την στήλη και ο χρόνος που χρειάζονται για να φθάσουν στον ανιχνευτή ονομάζεται νεκρός χρόνος,  $t_M$  δηλαδή με άλλα λόγια είναι ο χρόνος ενός συστατικού που δεν αλληλεπιδρά με την στατική φάση της στήλης. Ένα μη κατακρατούμενο συστατικό λοιπόν «ταξιδεύει» με την ίδια ταχύτητα με αυτή της κινητής φάσης και σε ένα χρωματογράφημα εμφανίζεται ως μια κορυφή που αντιστοιχεί σε χρόνο πολύ μικρό από την στιγμή της έγχυσης του δείγματος. Αντίθετα, οι κατακρατούμενες από την στήλη ουσίες παραμένουν έναν επιπλέον χρόνο  $t_S$  ο οποίος αντιστοιχεί στον χρόνο παραμονής στην στατική φάση. Καταλήγοντας ο χρόνος κατακράτησης για μία ουσία είναι,

$$t_R = t_S + t_M [10]$$

### Παράγοντας κατακράτησης

Ο παράγοντας κατακράτησης,  $k$ , αποτελεί πειραματικό μέτρο και περιγράφει την μετανάστευση των διαλυμένων ουσιών στις χρωματογραφικές στήλες.<sup>13</sup> Συγκεκριμένα, είναι το μέτρο του μέσου χρόνου μιας χημικής ουσίας που βρίσκεται στην στατική φάση έναντι του χρόνου που ξοδεύει στην κινητή φάση.<sup>14</sup> Η σχέση που δίνει τον παράγοντα κατακράτησης είναι η παρακάτω εξίσωση η οποία συνήθως χρησιμοποιείται σε λογαριθμική μορφή( $\log k$ ).

$$k = \left( \frac{t_R - t_M}{t_M} \right) \quad [11]$$

Η χρήση του προτιμάται αρκετές φορές αντί του χρόνου κατακράτησης διότι δεν εξαρτάται από την γεωμετρία και το μέγεθος της στήλης ή από τον ρυθμό ροής της κινητής φάσης.<sup>12</sup> Ο παράγοντας κατακράτησης είναι ένα μέγεθος χωρίς μονάδες όπου η αριθμητική τιμή μηδέν υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ μιας χημικής ουσίας και της στατικής φάσης δηλαδή μιάς ουσίας μη κατακρατούμενης από την στήλη που εκλούεται σε χρόνο ίσο με τον νεκρό χρόνο. Όσο η ουσία θα υφίσταται μεγαλύτερες αλληλεπιδράσεις με την στατική φάση της στήλης, τόσο θα αυξάνεται η κατακράτηση άρα και η τιμή του παράγοντα  $k$ . Στην πράξη, επιθυμητές τιμές για το  $k$  είναι μεταξύ 1 και 10 ώστε να επιτυγχάνονται ιδανικοί διαχωρισμοί μεταξύ των ενώσεων χωρίς την ανάγκη πολύ μεγάλων χρόνων έκλουσης. Οι μεγάλοι χρόνοι έκλουσης συναντώνται για τιμές  $k$  μεγαλύτερες από 20-30.<sup>14</sup>

#### **1.4.4 Υγρή Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)**

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης όπου η κινητή φάση δεν ρέει πλέον υπό την επίδραση της βαρύτητας αλλά με την άσκηση πίεσης με την βοήθεια αντλίας. Είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική διαχωρισμού λόγω της ευαισθησίας της μεθόδου, της εύκολης προσαρμογής σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς και της εφαρμογής της σε προσδιορισμούς ουσιών βιομηχανικού ενδιαφέροντος.<sup>12,13</sup>

Αρχικά, οι σύγχρονες **αναλυτικές στήλες** της υγρής χρωματογραφίας κατασκευάζονται από σωλήνες μικρής εσωτερικής διαμέτρου (3 έως 5 mm) και μήκους από 5 έως 25 cm. Το υλικό κατασκευής τους είναι συνήθως ανοξείδωτος χάλυβας ενώ συναντώνται στήλες από ύαλο ή πολυμερές. Οι στήλες αυτές πληρώνονται (πακεταρίζονται) με στερεά σωματίδια. Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι υλικών πλήρωσης, τα επιφανειακά καλυπτόμενα σωματίδια και τα πορώδη σωματίδια. Τα πρώτα αποτελούνται από σφαιρικά, μη πορώδη σωματίδια στην επιφάνεια των οποίων αποτίθεται λεπτό πορώδες στρώμα. Οι επιστήμονες κατανοήσαν ότι η αύξηση της αποδοτικότητας της στήλης θα επιτυγχανόταν με

πακεταρισμένες στήλες μικρού μεγέθους σωματιδίων (διαμέτρου 3 έως 10  $\mu\text{m}$ ) κάτι που θα ήταν εφικτό σε λειτουργία των στηλών σε υψηλές πιέσεις. Την λύση σε αυτό έδωσε η χρήση της αντλίας στο χρωματογραφικό σύστημα έναντι των παλαιότερων στηλών που χρησιμοποιούσαν τις βαρυτικές δυνάμεις για τον διαχωρισμό των συστατικών. Η χρήση του μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης και κατα συνέπεια βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων.<sup>12,13</sup>

Πολλές φορές για να αυξηθεί ο χρόνος ζωής των στηλών χρησιμοποιούνται προστατευτικές στήλες ή αλλιώς **προστήλες** οι οποίες απομακρύνουν τυχόν προσμίξεις του διαλύτη αλλά και συστατικά του δείγματος που συνδέονται ισχυρά, κατα μη αντιστρεπτό τρόπο, με τη στατική φάση της εκάστοτε στήλης. Όταν η προστήλη ρυπαίνεται αντικαθίσταται και θυσιάζεται για την προστασία της κύριας στήλης που είναι πιο δαπανηρή.<sup>12,13</sup>

Συνεχίζοντας την οργανολογία ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας εκτός από τις στήλες και τις προστήλες συναντώνται και τα **δοχεία κινητής φάσης**. Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση βρίσκονται αποθηκευμένοι σε ειδικές υάλινες φιάλες που περιέχουν από 500 mL ή και περισσότερο. Είναι απαραίτητο τα δοχεία αυτά να είναι εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων και σκόνης που θα επηρεάσουν αρνητικά την ανάλυση και θα μειώσουν τον χρόνο ζωής των στηλών. Αν ένα τέτοιο σύστημα δεν είναι ενσωματωμένο στην διάταξη τότε οι διαλύτες θα πρέπει να επεξεργάζονται πριν την εισαγωγή τους στα δοχεία όπως για παράδειγμα μέσω της διήθησης τους. Επίσης συχνά χρησιμοποιούνται **απαερωτές κενού** εξασφαλίζοντας την απαερίωση της κινητής φάσης ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στην στήλη. Όταν η χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιεί έναν διαλύτη σταθερής σύστασης καλείται ισοκρατική έκλουση ενώ με δύο ή περισσότερους διαλύτες ονομάζεται βαθμιδωτή έκλουση.<sup>12,13</sup>

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα σύγχρονα χρωματογραφικά συστήματα περιέχουν συστήματα άντλησης. Οι **αντλίες** εξασφαλίζουν την συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συστήματος από τα δοχεία αποθήκευσης των διαλυτών έως το δοχείο αποβλήτων της διάταξης, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή. Είναι φανερό ότι οι αντλίες πρέπει να αντέχουν σε υψηλές πιέσεις (έως 6000 psi), να υπάρχει ροή απαλλαγμένη από παλμούς και να φτάνει σε υψηλές ταχύτητες (έως 10 ml/min) καθώς και να εξασφαλίζουν έλεγχο και επαναληψιμότητα ροής. Στα σύγχρονα εμπορικά όργανα θα συναντήσει κανείς τις παλινδρομικές αντλίες και τις αντλίες εκτόπισης.<sup>12,13</sup>

Η ανίχνευση των ουσιών πραγματοποιείται με την συμβολή αναλυτικών οργάνων προσαρμοσμένων σε κυψελίδες ροής για να μετρούν χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών σε υγρά ρεύματα. Ιδανικά ένας **ανιχνευτής** της HPLC θα



πρέπει να διαθέτει υψηλή ευαισθησία, σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα, γραμμική απόκριση επεκτεινόμενη σε περιοχή αρκετών τάξεων μεγέθους, μικροί χρόνοι απόκρισης ανεξαρτήτου ταχύτητας ροής, αξιοπιστία και όσο το δυνατόν ίδια απόκριση προς όλες τις διαχωριζόμενες ουσίες. Οι ανιχνευτές που κυρίως χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία βασίζονται στην απορρόφηση υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας (ανιχνευτές UV/Vis) αλλά διαθέσιμοι είναι και ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων, αγωγιμομετρικοί, ανιχνευτές δείκτη διάθλασης, φασματογράφοι μάζας, ηλεκτροχημικοί και φθορισμομετρικοί ανιχνευτές.<sup>12,13</sup>

Απραίτητο να αναφερθεί είναι στο σύστημα έγχυσης του δείγματος το οποίο θα ακολουθήσει όλη αυτή την διαδρομή των οργάνων που μόλις περιγράφηκε. Το δείγμα θα εισαχθεί στην ανάλυση μέσω βρόγχου μεταβλητού ή σταθερού όγκου που βρίσκεται πριν την χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του στη ροή της κινητής φάσης. Συγκεκριμένα, στον βρόγχο υπάρχει χειρολαβή δύο θέσεων όπου στην πρώτη θέση γίνεται η φόρτιση του δείγματος με σύριγγα και η κινητή φάση ρέει από την αντλία προς την στήλη. Όταν η χειρολαβή τοποθετηθεί στην δεύτερη θέση, ο βρόγχος παρεμβάλλεται μεταξύ αντλίας και στήλης οπότε η κινητή φάση μεταφέρει το δείγμα προς την στήλη. Σήμερα, οι περισσότεροι χρωματογράφοι διαθέτουν αυτόματο σύστημα εισαγωγής δείγματος όπου αντλούν συγκεκριμένες ποσότητες του από φιαλίδια.<sup>12,13</sup>

Όσα αναλύθηκαν μέχρι τώρα σ'αυτή την ενότητα αφορούν την οργανολογία της HPLC ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη είναι η υγρή χρωματογραφία προσρόφησης. Ανάλογα με την σχέση της πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης υψηλής απόδοσης, η HPLC κανονικής και αντιστρόφου φάσεως. Στην κανονικής φάσεως χρησιμοποιείται πολικό πληρωτικό υλικό, ενώ οι διαλύτες στην κινητή φάση είναι μη πολικοί και δεν περιέχεται νερό. Οι πολικές ενώσεις του δείγματος αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την πολική στατική φάση, ταυτόχρονα, οι άπολες ή λιγότερο πολικές ενώσεις διασχίζουν την στήλη γρηγορότερα και εκκλύονται νωρίτερα. Για να γίνει έκλυση των πολικών ενώσεων με το πέρασ του χρόνου αυξάνεται πολικότητα της κινητής φάσης κατά την πορεία της ανάλυσης. Στην αντιστρόφου φάσεως HPLC γίνεται όπως λέει και το όνομα της, το αντίστροφο. Εδώ ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση. Η κινητή φάση είναι αυξημένης πολικότητας κυρίως μειγμάτων οργανικών διαλυτών με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα. Η έκλυση των προσροφημένων μορίων πραγματοποιείται με την αύξηση της ποσότητας του οργανικού διαλύτη ο οποίος θα μειώσει την πολικότητα της κινητής φάσης.<sup>13</sup>



## 1.5 ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

### 1.5.1 Ο ρόλος της στην γρήγορη εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων

Τα φάρμακα καθώς εισέλθουν στον οργανισμό θα αναζητήσουν τους στόχους τους για να εφαρμόσουν την δράση τους. Οι στόχοι τους μπορεί να είναι εξωκυτταρικοί αλλά και ενδοκυτταρικοί υποδοχείς. Στην κυκλοφορία του αίματος, η οποία είναι υπεύθυνη για την μεταφορά των φαρμάκων προς τους ιστούς και τους στόχους τους, αυτά συναντώνται στην ελεύθερη και δεσμευμένη μορφή τους. Η δεσμευμένη μορφή αφορά την σύνδεση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, μία αναστρέψιμη αλληλεπίδραση ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις μόνο το ελεύθερο φάρμακο θα εισέλθει στο κύτταρο ώστε να συνδεθεί με τον ενδοκυτταρικό υποδοχέα. Σε γενικές γραμμές υπάρχει ισορροπία μεταξύ δεσμευμένων και ελεύθερων μοριακών μορφών του φαρμάκου.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική που βασίζεται στην μετανάστευση των ενώσεων μέσω ενός χρωματογραφικού συστήματος που περιέχει μια κινητή και μία στατική φάση. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στην δυναμική ισορροπία κατανομής των ενώσεων μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Όπως γίνεται αντιληπτό με όσα αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, η βιολογική κατανομή των μορίων του φαρμάκου μεταξύ της κυκλοφορίας του αίματος και των ιστών βασίζεται επίσης σε διαδικασίες δυναμικής ισορροπίας. Αυτό το χαρακτηριστικό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί εργαστηριακά ώστε να βοηθήσει την δημιουργία βιολογικών μοντέλων, να εξετάσει την φαρμακοκινητική και να συμβάλει στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων όπως συμβαίνει στην περίπτωση της βιομιμητικής χρωματογραφίας.<sup>15</sup>

Η βιομιμητική χρωματογραφία όπως αποκαλύπτει και το όνομα της μιμείται την συμπεριφορά των βιολογικών μεμβρανών ή των πρωτεϊνών του πλάσματος. Πρόκειται για ένα είδος υγρής χρωματογραφία υψηλής απόδοσης όπου η στατική φάση στις χρωματογραφικές στήλες αποτελείται από φωσφολιπίδια ή πρωτεΐνες του αίματος προσομοιώνοντας την σύνδεση των φαρμάκων στον οργανισμό. Η μέθοδος παρουσιάζει ταχύτητα στην ανάλυση, καλή επαναληψιμότητα και μικρή ποσότητα δείγματος για ανάλυση. Παρακάτω θα αναλυθούν διάφορα είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας όπως ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM), ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος (HSA, AGP) και μικκυλιακή χρωματογραφία.

### 1.5.2 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM)

Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM chromatography, Immobilized Artificial Membrane Chromatography) είναι μία τεχνολογία που αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του '80 και θεωρήθηκε ως μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση, συνδυάζοντας την προσομοίωση ενός αμφίφιλου περιβάλλοντος των βιολογικών μεμβρανών και τις ταχείες μετρήσεις.

Πρόκειται για ένα είδος χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως, όπου η στατική φάση αποτελείται από μονοστοιβάδα φωσφατιδυλοχολίνης ομοιοπολικά δεσμευμένη σε πυριτία με ομάδες προπυλαμίνης και θεωρείται ότι προσομοιάζει την λιπιδική διπλοστοιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών.<sup>16</sup> Ωστόσο, οι σύγχρονες στήλες χρωματογραφίας IAM περιέχουν διπλές στοιβάδες γιατί έχουν αποδειχθεί καταλληλότερες για την προσομοίωση βιολογικών μεμβρανών.<sup>17</sup> Η μεγάλη ταχύτητα των μετρήσεων οφείλεται στο γεγονός ότι η στατική φάση πακεταρίζεται σε μικρού μέγεθους στήλες που ευνοούν τον χρόνο ανάλυσης των φαρμακευτικών ενώσεων.<sup>15</sup> Η χρωματογραφία IAM μπορεί να εφαρμοσθεί για τον προσδιορισμό ισοκρατικών παραγόντων (logk) σε εύρος pH από 2,5 έως 7,4 προσομοιώντας έτσι το pH στην διαδρομή του φαρμάκου κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, από το στομάχι έως την κυκλοφορία του αίματος. Για τις ενώσεις που κατακρατούνται ισχυρά από την στήλη χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης στην κινητή φάση, όπως το ακετονιτρίλιο.<sup>16</sup>

Η αρχή της χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως στηρίζει τον διαχωρισμό των ενώσεων της ανάλυσης στην προσρόφηση των μορίων σε μία υδρόφοβη στατική φάση την στιγμή που η κινητή φάση είναι αυξημένης πολικότητας λόγω των μιγμάτων οργανικών διαλυτών με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα. Ομοίως, στην χρωματογραφία IAM η υδροφοβία είναι ο κύριος παράγοντας που διέπει τον μηχανισμό συγκράτησης των ενώσεων στην στατική φάση της στήλης. Ωστόσο, εδώ συναντώνται και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ως αποτέλεσμα σχηματισμού ιοντικών δεσμών καθώς επίσης και δεσμών υδρογόνου.<sup>16</sup> Έχει αποδειχθεί ότι η χρωματογραφία IAM χρησιμοποιείται επιτυχώς για την εκτίμηση της διαπερατότητας στην περιοχή του εντέρου αλλά και την διείσδυση στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό συνήθως σε συνδυασμό με επιπλέον φυσικοχημικές και μοριακές παραμέτρους.<sup>18</sup>

### **1.5.3 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος (HSA,AGP)**

Η αλβουμίνη του ανθρώπινου ορού (Human Serum Albumin,HSA) είναι μία ελικοειδής πρωτεΐνη που αποτελείται από 585 αμινοξέα και έχει τρεις δομικά παρόμοιους τομείς (I, II και III) καθένας απ'αυτούς σχηματίζεται από δύο υποτομείς (A και B). Αντιπροσωπεύει περίπου το 60% της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες στον ορό του αίματος. Η κύρια λειτουργία της HSA είναι η ρύθμιση της κολοειδούς ωσμωτικής πίεσης ενώ άλλες λειτουργίες της περιλαμβάνουν την σύνδεση και την μεταφορά μορίων. Έχει την δυνατότητα να δεσμεύει αδιάλυτες ουσίες όπως λιπαρά οξέα, πορφυρίνες και μία μεγάλη ποικιλία φαρμάκων των οποίων η φαρμακοκινητική και η φαρμακοδυναμική εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αλληλεπίδραση τους με την πρωτεΐνη αυτή. Στην HSA υπάρχουν δύο κύρια

σημεία πρόσδεσης των ουσιών όπου το πρώτο βρίσκεται στον υποτομέα IIA ενώ το δεύτερο στον υποτομέα IIIA.<sup>19</sup>



Εικόνα 2: Δομή αλβουμίνης του ανθρώπινου ορού<sup>26</sup>

Εκτός από την αλβουμίνη του ανθρώπινου ορού στο αίμα συναντάται επίσης και η  $\alpha 1$ -όξινη γλυκοπρωτεΐνη που απασχολεί την παρούσα διπλωματική εργασία.

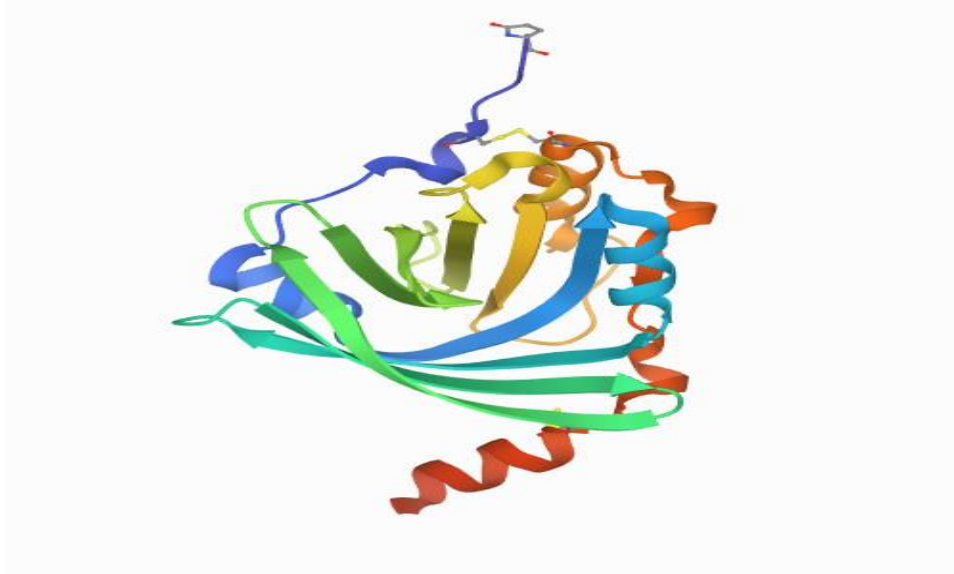
Η  $\alpha 1$ -όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP) ονομάζεται επίσης και ορομουκοειδές (ORM) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1950 και αποδείχθηκε μία πολύ ασυνήθιστη πρωτεΐνη κυρίως για το πολύ χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο (2,8-3,8) και για την υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (45%). Για περίπου 30 χρόνια η AGP θεωρούνταν ως η πρωτεΐνη με το μεγαλύτερο περιεχόμενο σε υδατάνθρακες, η άποψη αυτή όμως αναθεωρήθηκε το 1980 λόγω της γαλακτογλυκοπρωτεΐνης με με περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες ίση με 76%.<sup>20</sup>

Η AGP είναι μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 183 αμινοξέων, έχει μοριακό βάρος περίπου 41.000-43.000 g/mol και συντίθεται στο ήπαρ ενώ παράλληλα έχει καταγραφεί και εξωηπατική σύνθεση της με πρώτη απόδειξη σε άτομα που έπασχαν από καρκίνο. Έχει ασυνήθιστα υψηλή διαλυτότητα στο νερό και σε πολλούς άλλους πολικούς οργανικούς διαλύτες, κρυσταλλώνεται με την μορφή εξαγωνικής διπυραμίδας και συναντάται στο πλάσμα σε διαφορετικές μορφές ανάλογα με τον τύπο της γλυκοζυλίωσης και των πολλαπλών υποκαταστάσεων των αμινοξέων. Έχει παρατηρηθεί επίσης μια διαφορά 22 αμινοξέων μεταξύ δύο παραλλαγών της AGP (ORM1 και ORM2) που κωδικοποιείται από δύο διαφορετικά γονίδια. Το υδατανθρακικό τμήμα της AGP είναι συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη σε πέντε αλυσίδες γλυκάνης και παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανοσορυθμιστική δραστηριότητα. Στο πλάσμα μόνο 12-20 γλυκοζυλιωμένες μορφές της AGP μπορούν

να ανιχνευθούν με αυτή την μικροετερογένεια να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Οι αλλαγές στην γλυκοζυλίωση της AGP μπορεί να εμφανιστούν σε περιπτώσεις όπως σε οξεία φλεγμονώδη κατάσταση, στην εγκυμοσύνη, στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, στην αλκοολική κίρρωση του ήπατος και στην ηπατίτιδα.<sup>20</sup>

Η βιολογική λειτουργία της α1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης δεν είναι ξεκάθαρη ωστόσο θεωρείται ως φυσικό αντιφλεγμονώδες και ανοσορυθμιστικός παράγοντας κάτι που εξαρτάται από την γλυκοζυλίωση της. Έχει προταθεί ότι απαιτείται η ύπαρξη της ώστε να διατηρείται η διαπερατότητα των τριχοειδών μιας και αυξάνει την εκλεκτικότητα του πολυανικού φορτίου του ενδοθηλιακού φραγμού.<sup>20</sup> Άλλες δράσεις της που έχουν περιγραφεί αφορούν στην θεραπεία οξείας ηπατικής και νεφρικής ανεπάρκειας, προστατευτική δράση κατά της σήψης και των ενδοτοξινών που προέρχονται από λοιμώξεις αλλά και οι υψηλές τιμές της AGP στο πλάσμα κατώ από παθολογικές συνθήκες έχουν δείξει ότι διευκολύνουν την διέλευση των ερυθρών κυττάρων μέσω τριχοειδών αγγείων.<sup>21</sup> Συνολικά έχει κριθεί ότι έχει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης και τα επίπεδα της στο πλάσμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικό, διαγνωστικό και κατά την διάρκεια κλινικής θεραπείας.<sup>20</sup>

Η AGP έχει επίσης μία άλλη σημαντική ικανότητα, αυτή του να δεσμεύει και να μεταφέρει πολλά βασικά και ουδέτερα λιπόφιλα φάρμακα από ενδογενή, όπως στεροειδείς ορμόνες, αλλά και εξωγενής προέλευσης. Θεωρείται ότι στο πλάσμα τα όξινα φάρμακα συνδέονται κυρίως με την πρωτεΐνη HSA αλλά η δέσμευση με την AGP συμβάλλει σημαντικά στην συνολική δέσμευση αυτών των φαρμάκων στο πλάσμα ειδικά στις ασθένειες στις οποίες αυξάνεται η συγκέντρωση της AGP και/ή της HSA μειώνεται. Στο μόριο της πρωτεΐνης AGP υπάρχει μόνο μία θέση πρόσδεσης για όξινα φάρμακα με εξαίρεση την φαινοβαρβιτάλη η οποία έχει δύο σημεία πρόσδεσης. Η φύση της σύνδεσης φαρμάκων-AGP είναι κυρίως υδρόφοβη εξαιτίας των υδρόφοβων τμημάτων της πρωτεΐνης κοντά στα σημεία πρόσδεσης, όμως, εξαρτάται και από την διαμόρφωση της πρωτεΐνης, το pH, την θερμοκρασία και την πολικότητα της ένωσης που θα προσδεθεί ενώ υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και στερεοεκλεκτικότητα ειδικά στην περίπτωση βασικών φαρμάκων.<sup>20</sup> Τα φάρμακα που συνδέονται με την πρωτεΐνη αυτή ενσωματώνονται στα κύτταρα των οργάνων και των ιστών μέσω αλληλεπιδράσεων με την μεμβράνη. Η αλληλεπίδραση αυτή της πρωτεΐνης με την μεμβράνη προκαλεί μία δομική αλλαγή στην AGP που μειώνει την ικανότητα δέσμευσης νέων φαρμάκων ενώ ακολουθεί απελευθέρωση του φαρμάκου.<sup>21</sup>



Εικόνα 3: Δομή  $\alpha$ 1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης<sup>27</sup>

Είναι κατανοητό πως και οι δύο πρωτεΐνες (HSA,AGP) έχουν σημαντικό ρόλο στην σύνδεση και την μεταφορά φαρμάκων στον οργανισμό και αυτός είναι ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν ως υλικά πλήρωσης σε χρωματογραφικές στήλες και αποτελούν ένα είδος βιομιμητικής χρωματογραφίας. Η χρήση στατικών φάσεων πρωτεϊνικής φύσεως προσφέρει μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση για την μελέτη δέσμευσης φαρμάκων σε πρωτεΐνες.

Όσον αφορά την υγρή χρωματογραφία αλβουμίνης του ανθρώπινου ορού (HSA chromatography), χρησιμοποιούνται στήλες με στατική φάση την πρωτεΐνη ακινητοποιημένη σε επιφάνεια πυριτίας που λειτουργούν σε pH 5.0-7.0. Η HSA χρωματογραφία είναι κατάλληλη κυρίως για την μελέτη όξινων και ουδέτερων φαρμάκων λόγω της υψηλής συγγένειας της πρωτεΐνης με τις ενώσεις αυτές.<sup>22</sup> Στην κινητή φάση χρησιμοποιείται αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων ενώ στις ενώσεις που κατακρατούνται ισχυρά από την στήλη μπορεί να προστεθεί οργανικός τροποποιητής είτε η 2-προπανόλη είτε το ακετονιτρίλιο. Βιβλιογραφικά αναφέρεται πως η 2-προπανόλη είναι αυτή που προτείνεται για την έκλουση των ισχυρά κατακρατούμενων ενώσεων ενώ το ακετονιτρίλιο αποδίδει καλύτερα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, της τάξης του 10% (90% υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα).<sup>15</sup>

Ομοίως στην υγρή χρωματογραφία  $\alpha$ 1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP chromatography), οι στήλες είναι πακεταρισμένες με στατική φάση την AGP ακινητοποιημένη σε επιφάνεια πυριτίας, λειτουργώντας σε pH 4.2-7.0. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, η πρωτεΐνη δεσμεύει κυρίως βασικά φάρμακα λόγω του χαμηλού ισοηλεκτρικού σημείου αλλά και ουδέτερα ενώ λιγότερο τα όξινα. Και σε αυτή την περίπτωση χρωματογραφίας έχει καταγραφεί η χρήση 2-προπανόλης και ακετονιτρίλιου ως οργανικοί τροποποιητές στην κινητή φάση.<sup>22</sup> Ο βιολογικός ρόλος της AGP δεν είναι τόσο ξεκάθαρος και η χρωματογραφία με αυτές τις στήλες δεν

μπορεί να δώσει ασφαλή δεδομένα και συμπεράσματα για την φαρμακοκινητική σε έναν οργανισμό. Η συγκέντρωση της AGP μπορεί να ποικίλλει σε κατάσταση ασθένειας, ανάλογα το φύλο, την ηλικία, την εγκυμοσύνη. Η φλεγμονή, ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι λοιμώξεις και οι τραυματισμοί μπορεί να προκαλέσουν αύξηση της πρωτεΐνης στο πλάσμα και να επηρεάσουν έτσι την δέσμευση των φαρμάκων και την διαθέσιμη ελεύθερη μορφή τους για την θεραπεία μίας νόσου.<sup>15</sup>

Στην πραγματικότητα, υπάρχει περιορισμένος αριθμός ερευνών σχετικά με την χρήση της AGP χρωματογραφίας ως αντικείμενο μελέτης δέσμευσης φαρμάκων και κυρίως έχει χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος διαχωρισμού χειρόμορφων ενώσεων. Επιστημονικές δημοσιεύσεις έχουν οδηγήσει σε αμφιλεγόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τις δυνατότητες δέσμευσης ενώσεων από την πρωτεΐνη που βρίσκεται ακινητοποιημένη σε μία χρωματογραφική στήλη και κατά πόσο μπορεί αυτή να διατηρήσει τις ιδιότητες της σε αντιπαράθεση με την πρωτεΐνη που βρίσκεται σε ένα διάλυμα και κατ'έξοχήν σε έναν οργανισμό.<sup>22</sup>

Συγκεντρωτικά και στις δύο χρωματογραφίες ακινητοποιημένων πρωτεϊνών (HSA, AGP) μπορεί να προκύψουν ορισμένα προβλήματα στις στήλες που θα επηρεάσουν την δυνατότητα δέσμευσης φαρμακευτικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, όταν οι πρωτεΐνες ακινητοποιούνται στην στήλη μπορεί να υποστούν μετουσίωση, να τοποθετηθούν με ακατάλληλο προσανατολισμό ή να παρεμποδίζουν στερεοχημικά την δέσμευση μορίων. Η προσθήκη, επίσης, οργανικού τροποποιητή για την έκλυση των ισχυρά κατακρατούμενων ενώσεων από την στήλη μπορεί να επηρεάσει την διαμόρφωση της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης και να διακόψει τις μη πολικές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-φαρμάκου.<sup>23</sup>

Τέλος, το ποσοστό της πρωτεϊνικής σύνδεσης ενός φαρμάκου (%PPB) σε μία χρωματογραφική στήλη υπολογίζεται από τον παράγοντα κατακράτησης του φαρμάκου ( $k$ ) σύμφωνα με την εξίσωση<sup>15</sup>:

$$\%PPB = 100 * \frac{k}{1 + k} \quad [12]$$

#### 1.5.4 Χρωματογραφία μικκυλίων

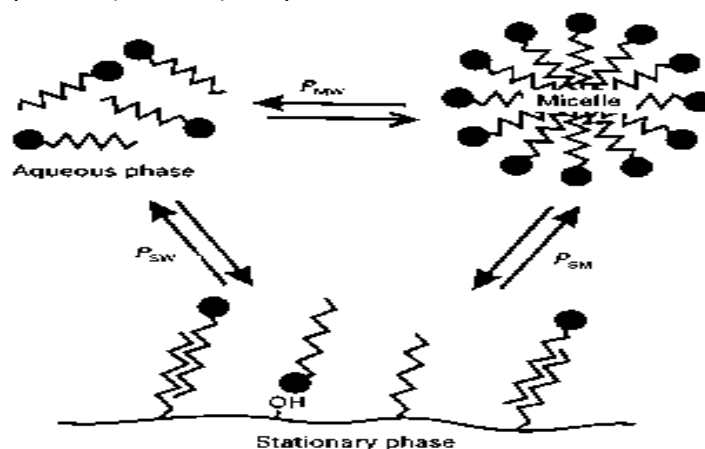
Η χρωματογραφία μικκυλίων (Micellar Chromatography) είναι μία τεχνική διαχωρισμού αντιστρόφου φάσεως η οποία χρησιμοποιεί ως κινητή φάση έναν υδατικό-οργανικό διαλύτη που περιέχει ένα τασιενεργό σε συγκέντρωση μεγαλύτερη της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης (critical micellar concentration, c.m.c).<sup>24</sup>

Πιο συγκεκριμένα, τασιενεργά είναι τα μόρια που αποτελούνται από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο μέρος και συναντώνται ως μονομερή όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε ένα διάλυμα ενώ πάνω από την c.m.c δημιουργούν συσσωματώματα που ονομάζονται μικκύλια. Τα μικκύλια δηλαδή αποτελούν

συσσωματώματα τασιενεργών όπου οι υδρόφοβες αλυσίδες τους ενώνονται σχηματίζοντας τον πυρήνα των μικκυλίων και οι υδρόφιλες κεφαλές δημιουργούν ένα τείχος προσανατολισμένο προς το υδατικό διάλυμα. Η κινητή φάση λοιπόν περιέχει και τα μονομερή τασιενεργά αλλά και τα μικκύλια, δηλαδή τα συσσωματώματα του. Τα πιο συνηθισμένα τασιενεργά που χρησιμοποιούνται είναι το SDS (sodium dodecyl sulfate), το CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) και το Brij-35 (polyoxyethylene (23) lauryl ether).<sup>24</sup>

Η κινητή φάση εκτός από το τασιενεργό περιέχει και μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη που επιταχύνει την έκλουση μειώνοντας τους χρόνους παραμονής, ενισχύει τις χρωματογραφικές κορυφές στο χρωματογράφημα και μετατρέπει την μέθοδο σε πιο αποδοτική. Οι συνηθισμένοι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην μικκυλιακή χρωματογραφία είναι οι n-αλκόολες (μεθανόλη έως 1-εξανόλη), το ακετονιτρίλιο και το τετραϋδροφουράνιο σε ποσοότητες συνήθως μικρότερες από 20% (v/v). Η παρουσία οργανικού διαλύτη μειώνει την ποσότητα μονομερούς τασιενεργού που είναι προσροφημένο στην στατική φάση, αλλάζει την ισχύ της έκλουσης, την c.m.c καθώς και τον αριθμό συσσωμάτωσης των μικκυλίων. Έαν η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη είναι πολύ υψηλή τότε ο σχηματισμός μικκυλίων δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί.<sup>24</sup>

Σε μία στήλη χρωματογραφίας μικκυλίων πραγματοποιείται μία μεγάλη ποικιλία αλληλεπιδράσεων μετατρέποντας την σε μία πιο πολύπλοκη διαδικασία από την απλή χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως. Τα μονομερή τασιενεργά προσροφώνται στην στατική φάση της στήλης είτε με υδρόφοβες είτε με σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις. Όσο η κινητή φάση ρέει κατά μήκος της στήλης συναντώνται τρία είδη ισορροπιών στα οποία μπορεί να βρεθεί η αναλυόμενη ουσία. Το πρώτο είδος είναι μεταξύ του κύριου όγκου κινητής φάσης (διαλύτης) και της κινητής ψευδοφάσης μικκυλίων, το δεύτερο είδος είναι μεταξύ της στατικής φάσης και της κινητής ψευδοφάσης μικκυλίων και το τρίτο είδος μεταξύ στατικής φάσης και κινητής φάσης, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.<sup>25</sup>



Εικόνα 4: Αλληλεπιδράσεις στατικής-κινητής φάσης σε χρωματογραφία μικκυλίων<sup>28</sup>

Η χρωματογραφία μικκυλίων προσομοιάζει την συμπεριφορά βιολογικών φραγμών αλλά και των δραστικών ενώσεων στο ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο υγρό γι'αυτό ανήκει και στα είδη της βιομιμητικής χρωματογραφίας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μεμβράνες των κυττάρων αποτελούνται από λιπιδικές διπλοστοιβάδες οι οποίες έχουν πολικές κεφαλές στο εσωτερικό και το εξωτερικό των κυττάρων (ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο υγρό) και λιπιδικές αλυσίδες στο εσωτερικό τους. Μία φαρμακευτική ουσία που χορηγείται κυρίως μέσω του στόματος πρέπει να έχει την ικανότητα να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες, κάτι που μπορεί να προσομοιαστεί σε μία χρωματογραφία μικκυλίων μεταξύ κινητής και στατικής φάσης σύμφωνα με τις αλληλεπιδράσεις που ήδη αναλύθηκαν.



## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πειραματικής διαδικασίας είναι η μελέτη του μηχανισμού έκλουσης φαρμακευτικών ενώσεων από στήλη α1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP) και η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου ως εργαλείο εκτίμησης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των φαρμάκων.

### 2.2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών (Τομέας Ι) της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου στα πλαίσια του μαθήματος Ενόργανη Χημική Ανάλυση.

Η χρωματογραφική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε κατά την διάρκεια των πειραμάτων αποτελείται από ένα σύνολο οργάνων και βοηθητικών μερών όπως αναγράφονται και εικονίζονται παρακάτω.

- Δοχεία κινητής φάσης: Πρόκειται για δοχεία αποθήκευσης διαλυτών τα οποία βρίσκονται στην κορυφή της διάταξης και από εκεί με ειδικά σωληνάκια αντλείται η κινητή φάση που ρέει διαμέσου της χρωματογραφικής στήλης.
- Αντλία: Το σύστημα άντλησης των διαλυτών βρίσκεται ένα επίπεδο κάτω από τα δοχεία της κινητής φάσης. Ρυθμίστηκε ώστε να αντλεί και να προωθεί στο σύστημα τον διαλύτη με ροή 1ml/min, 0,5 ml/min και 0,3 ml/min.
- Ανιχνευτής: Ο ανιχνευτής της διάταξης είναι φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και βρίσκεται κάτω από την αντλία, στο κατώτερο μέρος του οργάνου. Η ανίχνευση ήταν ρυθμισμένη στα 220 nm.
- Σύστημα έγχυσης δείγματος: Πρόκειται για βρόγχο ο οποίος εισάγει 20 μL δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.
- Χρωματογραφική στήλη: Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η CHIRAL AGP της ChromTech με διαστάσεις 50 x 4 mm και διάμετρο σωματιδίων 5 μm. Η στατική φάση αποτελείται από α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη ακινητοποιημένη σε στρώμα πυριτίας.

Ο υγροχρωματογράφος στον οποίο έγιναν οι μετρήσεις είναι ο Flexar της PerkinElmer και χρησιμοποιήθηκε με την βοήθεια Η/Υ. Το πρόγραμμα που έγιναν οι ρυθμίσεις του συστήματος, καταγράφηκαν τα χρωματογραφήματα και οι χρόνοι έκλουσης είναι το Chromera Manager v. 3.2.0 της PerkinElmer.



Εικόνα 5: Χρωματογράφος Flexar PerkinElmer

### 2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το πρώτο βήμα κατά την πειραματική διαδικασία είναι η παρασκευή της κινητής φάσης. Πρόκειται για ένα υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Phosphate Buffered Saline, PBS) ανεμιγμένο με ποσότητες 2-προπανόλης.

Ξεκινώντας, ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό τα εξής άλατα: 0,77g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Potassium dihydrogen phosphate) της εταιρίας Chembiotin, 3,44g  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sodium phosphate dibasic dehydrate) της εταιρίας Honeywell Fluka, 4,00g NaCl (Sodium Chloride) της εταιρίας Honeywell Fluka και τέλος 0,10g KCl (Potassium Chloride) της εταιρίας Riedel-de Haen. Τα άλατα αυτά εισάγονται σε ποτήρι ζέσεως, αραιώνονται σε 500 mL υπερκάθαρου νερού και αναδεύονται με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή τους. Έπειτα, μετριέται με πεχάμετρο το pH του διαλύματος και ρυθμίζεται στην τιμή 7. Αν και το pH του αίματος είναι 7,4 η στήλη AGP που χρησιμοποιείται έχει ως ανώτατο όριο pH κινητής φάσης την τιμή 7 οπότε καθίσταται και υποχρεωτικό. Η ρύθμιση του pH γίνεται με την βοήθεια διαλυμάτων 0,1 M HCl και 0,1 M NaOH τα οποία προστίθενται στάγδην μέχρι το διάλυμα να φτάσει την επιθυμητή τιμή.

Όταν πραγματοποιηθούν όλα τα παραπάνω βήματα το υδατικό μέρος της κινητής φάσης είναι πλέον έτοιμο. Στην συνέχεια, σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml αναμειγνύονται ποσότητα 2-προπανόλης της εταιρίας Honeywell και ποσότητα του υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν χωρισμένες σε τρία μέρη. Το πρώτο μέρος αποτελούνταν από 5% (των 500 mL) 2-προπανόλης, το δεύτερο από 10% και το τρίτο από 15%. Άρα, στο πρώτο μέρος μετρήσεων εισάγονταν στην ογκομετρική φιάλη 25 mL 2-προπανόλης και στην συνέχεια προστίθενται το υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα έως την χαραγή ώστε να συμπληρωθούν τα 500 ml κινητής φάσης. Στο δεύτερο και στο τρίτο μέρος ακολουθείται η ακριβώς ίδια διαδικασία αυτή την φορά όμως με προσθήκη 50 και 75 mL 2-προπανόλης αντίστοιχα.

Προηγουμένως έγινε αναφορά στην αραίωση των αλάτων σε υπερκάθαρο νερό. Για την παρασκευή του υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος που θα διέλθει μέσω της στήλης είναι απαραίτητο να γίνει χρήση υπερκάθαρου και όχι απιονισμένου νερού. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης απαιτεί νερό υψηλής καθαρότητας που συνεπάγεται μικρότερη αγωγιμότητα από το απιονισμένο νερό. Τα άλατα του νερού επηρεάζουν τις μετρήσεις και μπορεί να προκαλέσουν βλάβες στο χρωματογραφικό σύστημα επομένως το υπερκάθαρο νερό που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από την συσκευή καθαρισμού Thermo Scientific Barnstead Easypure II απ' όπου εξέρχεται με αγωγιμότητα  $1/18,2=0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$ .



*Εικόνα 6: Συσκευή καθαρισμού νερού Thermo Scientific Barnstead Easypure II<sup>29</sup>*

Το επόμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιείται στην οργανολογία που αναφέρεται στην προηγούμενη ενότητα. Η κινητή φάση που

παρασκευάστηκε στην ογκομετρική φιάλη τοποθετείται σε ένα από τα δοχεία στο επάνω μέρος της διάταξης. Νωρίτερα όμως, σε ένα μικρό ποτήρι ζέσεως κρατείται μικρή ποσότητα ,των μερικών mL, της κινητής φάσης που θα χρησιμοποιηθεί για την διαλυτοποίηση των φαρμακευτικών ενώσεων. Το σύστημα οργάνων ενεργοποιείται και αρχικά πραγματοποιείται απαερίωση που θα αφαιρέσει τυχόν φυσαλίδες στα σωληνάκια των δοχείων. Κατά δεύτερον, ενεργοποιείται η αντλία και ο ανιχνευτής του συστήματος και ξεκινά η ροή της κινητής φάσης δια μέσου της στήλης. Για χρονικό διάστημα περίπου 20 min και μέχρι οι συνθήκες να σταθεροποιηθούν μέσα από την στήλη εισέρχεται μόνο η ποσότητα της κινητής φάσης με την ρυθμιζόμενη κάθε φορά ροή.

Κάθε ουσία που πρόκειται να αναλυθεί διαλύεται σε μικρή ποσότητα της κινητής φάσης που έχει κρατηθεί στο μικρό ποτήρι ζέσεως. Ποσότητα των 20  $\mu$ L ή παραπάνω εγχύεται χειροκίνητα στον βρόγχο του συστήματος με την βοήθεια μιας σύριγγας των 100  $\mu$ L. Όπως αναγράφηκε και παραπάνω ο βρόγχος εισάγει μόνο 20  $\mu$ L στην ροή της κινητής φάσης επομένως τυχόν περίσσεια ποσότητα αποβάλλεται αυτόματα σε δοχείο αποβλήτων. Κάθε αναλυόμενη ουσία εισάγεται 3 φορές, αποθηκεύονται οι χρόνοι έκλουσης και η πειραματική τιμή που καταγράφεται είναι ο μέσος όρος των τριών αυτών μετρήσεων. Για να υπολογιστεί ο νεκρός χρόνος κάθε εργαστηριακής ημέρας η αναλυόμενη ουσία που διέρχεται μέσω της στήλης είναι το κιτρικό νάτριο (Sodium Citrate) της εταιρίας Mallinckrodt. Το κιτρικό νάτριο δεν κατακρατείται από την στατική φάση της στήλης, δεν αλληλεπιδρά και «ταξιδεύει» με την ίδια ταχύτητα με αυτή της κινητής φάσης. Για τον νεκρό χρόνο ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τα δείγματα, 3 φορές εισαγωγή και καταγραφή του μέσου όρου των χρόνων έκλουσης.



Εικόνα 7: Βρόγχος εισαγωγής δειγμάτων

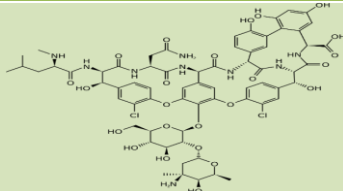
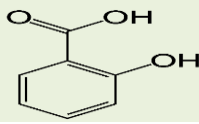
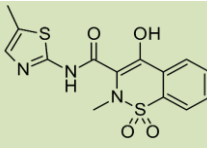
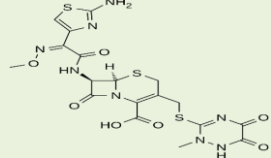
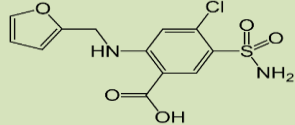
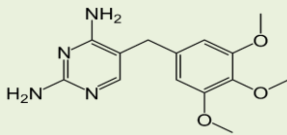
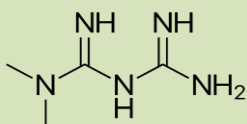
Στο τέλος της εργαστηριακής ημέρας και αφού αναλύθηκαν οι δραστικές ενώσεις πρέπει να γίνει καθαρισμός της στήλης για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα. Η κινητή φάση σταματά να διέρχεται μέσω της στήλης και από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή ρυθμίζεται ώστε να περνά διάλυμα 50% υπερκάθαρο νερό και 50% ακετονιτρίλιο με ροή 1 ml/min, τα οποία βρίσκονται αποθηκευμένα σε

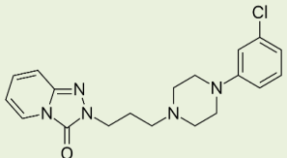
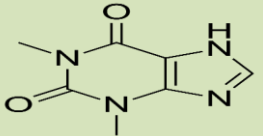
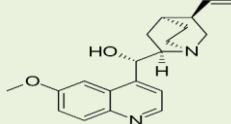
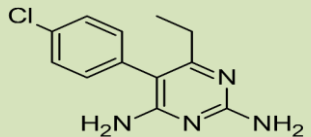
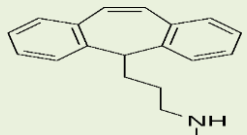
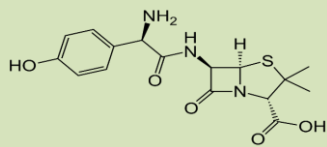
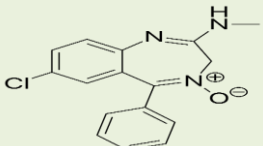
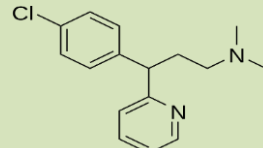
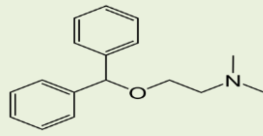
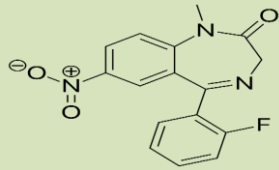
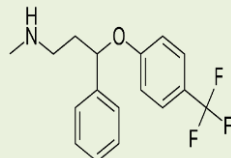
δοχεία διαλυτών στο πάνω μέρος της διάταξης. Η διαδικασία του καθαρισμού διαρκεί 60 min.

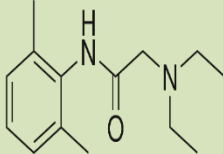
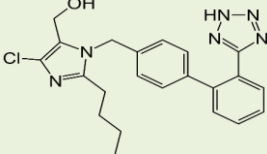
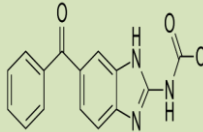
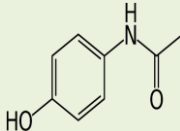
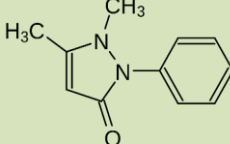
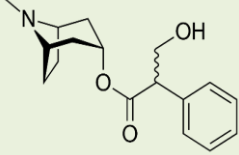
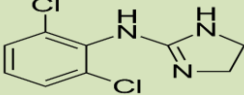
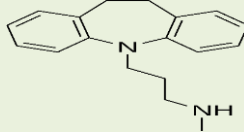
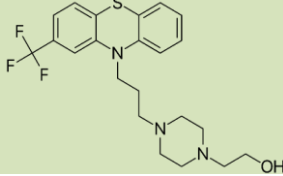
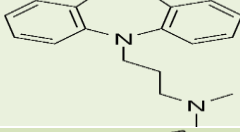
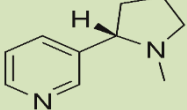
## 2.4 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

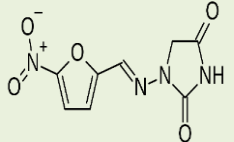
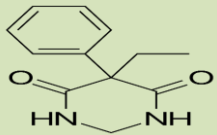
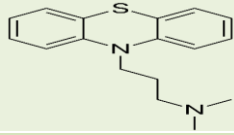
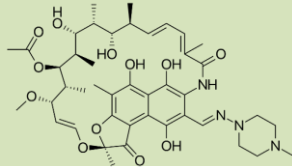
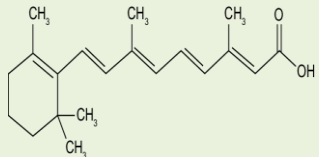
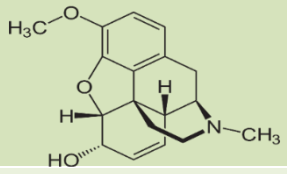
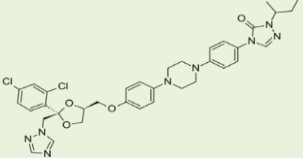
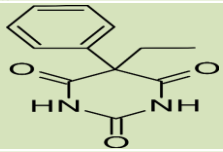
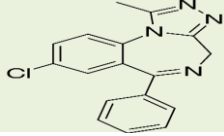
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι 38 δραστικές ενώσεις που αναλύθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία. Τα φάρμακα αυτά είτε ήταν σε καθαρή μορφή είτε κυριαρχούσαν σε φαρμακευτικά σκευάσματα τα οποία περιείχαν και έκδοχα. Στον πίνακα αναγράφεται το όνομα του φαρμάκου, ο τύπος του (A:acid-οξύ, B:base-βάση, N:neutral-ουδέτερο, Z:zwitterion-αμφολύτης), η δράση του καθώς και η χημική δομή του.

Πίνακας 1: Δραστικές ενώσεις που αναλύθηκαν

| Δραστική ένωση                    | Τύπος | Φαρμακολογική Δράση                             | Δομή                                                                                  |
|-----------------------------------|-------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Vancomycin,<br>Βανκομυκίνη        | Z     | Αντιβιοτικό                                     |   |
| Salicylic acid,<br>Σαλικυλικό οξύ | A     | Αντιφλεγμονώδες                                 |  |
| Meloxicam,<br>Μελοξικάμη          | A     | Αντιφλεγμονώδες-<br>Αναλγητικό-<br>Αντιπυρετικό |  |
| Ceftriaxone,<br>Κεφτριαζόνη       | Z     | Αντιβιοτικό                                     |  |
| Furosemide,<br>Φουροσεμίδη        | A     | Διουρητικό                                      |  |
| Trimethoprim,<br>Τριμεθοπρίμη     | B     | Αντιβιοτικό                                     |  |
| Metformin,<br>Μετφορμίνη          | B     | Αντιδιαβητικό                                   |  |

|                                        |   |                                    |                                                                                       |
|----------------------------------------|---|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Trazodone,<br>Τραζοδόνη                | N | Αντικαταθλιπτικό                   |    |
| Theophylline,<br>Θεοφυλλίνη            | N | Βρογχοδιασταλτικό                  |    |
| Quinidine, Κινιδίνη                    | B | Αντιαρρυθμικό                      |    |
| Pyrimethamine,<br>Πυριμεθαμίνη         | B | Αντιπαρασιτικό-<br>Ανθελονοσιακό   |    |
| Protriptyline,<br>Προτριπτυλίνη        | B | Αντικαταθλιπτικό                   |    |
| Amoxicillin,<br>Αμοξικιλίνη            | A | Αντιβιοτικό                        |   |
| Chlordiazepoxide,<br>Χλωροδιαζεποξείδη | N | Αγχολυτικό                         |  |
| Chlorpheniramine,<br>Χλωροφαιναμίνη    | B | Αντιισταμινικό-<br>Αντιχολινεργικό |  |
| Diphenhydramine,<br>Διφαινυδραμίνη     | B | Αντιισταμινικό                     |  |
| Flunitrazepam,<br>Φλουνιτραζεπάμη      | N | Αγχολυτικό-<br>Υπνωτικό            |  |
| Fluoxetine,<br>Φλουοξετίνη             | B | Αντικαταθλιπτικό                   |  |

|                               |   |                                 |                                                                                       |
|-------------------------------|---|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Lidocaine,<br>Λιδοκαΐνη       | B | Τοπικό<br>αναισθητικό           |    |
| Losartan,<br>Λοσαρτάνη        | A | Αντιυπερτασικό                  |    |
| Mebendazole,<br>Μεμπενδαζόλη  | N | Ανθελμινθικό-<br>Αντιπαρασιτικό |    |
| Paracetamol,<br>Παρακεταμόλη  | N | Αναλγητικό-<br>Αντιπυρετικό     |    |
| Antipyryne,<br>Αντιπυρίνη     | N | Αναλγητικό-<br>Αντιπυρετικό     |   |
| Atropine, Ατροπίνη            | B | Αντιχολινεργικό                 |  |
| Clonidine,<br>Κλονιδίνη       | B | Αντιυπερτασικό                  |  |
| Desipramine,<br>Δεσιπραμίνη   | B | Αντικαταθλιπτικό                |  |
| Fluphenazine,<br>Φλουφεναζίνη | B | Αντιψυχωσικό                    |  |
| Imipramine,<br>Ιμιπραμίνη     | B | Αντικαταθλιπτικό                |  |
| Nicotine, Νικοτίνη            | B | Διεργετικό του ΚΝΣ              |  |

|                                     |   |                           |                                                                                       |
|-------------------------------------|---|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Nitrofurantoin,<br>Νιτροφουραντοΐνη | A | Αντιμικροβιακό            |    |
| Primidone,<br>Πριμιδόνη             | N | Αντιεπιληπτικό            |    |
| Promazine,<br>Προμαζίνη             | B | Αντιψυχωσικό              |    |
| Rifampicin,<br>Ριφαμπικίνη          | B | Αντιφυματικό              |    |
| Retinoic acid,<br>Ρετινοϊκό οξύ     | A | Δράση κατά της<br>ακμής   |    |
| Codein, Κωδεΐνη                     | B | Αναλγητικό<br>(οπιοειδές) |  |
| Itraconazole,<br>Ιτρακοναζόλη       | N | Αντιμυκητιακό             |  |
| Phenobarbital,<br>Φαινοβαρβιτάλη    | N | Αντιεπιληπτικό            |  |
| Alprazolam,<br>Αλπραζολάμη          | N | Αγχολυτικό-<br>Υπνωτικό   |  |

## 2.5 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται δεδομένα για τις 38 δραστικές ενώσεις που αναλύθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία. Αυτά είναι το μοριακό βάρος (g/mol), δεδομένα λιποφιλίας (συντελεστής μερισμού logP, συντελεστής κατανομής logD) για pH 7.4 καθώς και τα δεδομένα κλασμάτων θετικού και



αρνητικού φορτίου των φαρμάκων (F<sup>+</sup> και F<sup>-</sup>) ομοίως για pH 7.4. Τα δεδομένα αντλήθηκαν από το λογισμικό ADME Boxes v.3.0 της εταιρίας Pharma Algorithms Inc.

Πίνακας 2: Φυσικοχημικές ιδιότητες δραστικών ενώσεων

| Δραστική ένωση   | Μοριακό Βάρος | logP  | logD  | F <sup>+</sup> | F <sup>-</sup> |
|------------------|---------------|-------|-------|----------------|----------------|
| Vancomycin       | 1449,25       | 2,48  | 1,94  | 0,000          | 0,125          |
| Salicylic acid   | 138,12        | 2,26  | -1,67 | 0,000          | 1,000          |
| Meloxicam        | 351,40        | 3,02  | 0,09  | 0,000          | 0,999          |
| Ceftriaxone      | 554,58        | -0,46 | -3,08 | 0,000          | 0,221          |
| Furosemide       | 330,74        | 2,03  | -0,69 | 0,000          | 1,000          |
| Trimethoprim     | 290,32        | 0,91  | 0,74  | 0,469          | 0,000          |
| Metformin        | 129,16        | -0,91 | -3,91 | 1,000          | 0,000          |
| Trazodone        | 371,86        | 2,90  | 2,54  | 0,218          | 0,000          |
| Theophylline     | 180,16        | -0,02 | -0,02 | 0,000          | 0,000          |
| Quinidine        | 324,42        | 3,44  | 2,41  | 0,946          | 0,000          |
| Pyrimethamine    | 248,71        | 2,69  | 2,44  | 0,584          | 0,000          |
| Protriptyline    | 263,38        | 4,89  | 1,36  | 0,875          | 0,000          |
| Amoxicillin      | 365,4         | -1,71 | -2,56 | 0,000          | 0,531          |
| Chlordiazepoxide | 299,75        | 2,44  | 2,44  | 0,002          | 0,000          |
| Chlorpheniramine | 274,79        | 3,39  | 1,58  | 0,986          | 0,000          |
| Diphenhydramine  | 255,35        | 3,40  | 1,29  | 0,965          | 0,000          |
| Flunitrazepam    | 313,28        | 2,06  | 2,06  | 0,000          | 0,000          |
| Fluoxetine       | 309,33        | 4,26  | 1,82  | 0,997          | 0,000          |
| Lidocaine        | 234,34        | 2,26  | 1,71  | 0,779          | 0,000          |
| Losartan         | 422,91        | 3,09  | 1,16  | 0,000          | 0,933          |
| Mebendazole      | 295,29        | 2,83  | 2,83  | 0,004          | 0,002          |
| Paracetamol      | 151,16        | 0,51  | 0,51  | 0,000          | 0,000          |
| Antipyrine       | 188,23        | 0,38  | 0,38  | 0,000          | 0,000          |
| Atropine         | 289,37        | 1,83  | -0,41 | 0,996          | 0,000          |
| Clonidine        | 230,09        | 1,59  | 0,97  | 0,779          | 0,000          |
| Desipramine      | 266,38        | 4,90  | 2,28  | 0,999          | 0,000          |
| Fluphenazine     | 437,52        | 4,36  | 3,82  | 0,737          | 0,000          |
| Imipramine       | 280,41        | 4,80  | 2,83  | 0,991          | 0,000          |
| Nicotine         | 162,23        | 1,13  | 0,26  | 0,875          | 0,000          |
| Nitrofurantoin   | 238,16        | -0,47 | -0,77 | 0,000          | 0,473          |
| Primidone        | 218,25        | 0,91  | 0,91  | 0,000          | 0,000          |
| Promazine        | 284,42        | 4,55  | 2,58  | 0,991          | 0,000          |
| Rifampicin       | 822,94        | 2,70  | 1,99  | 0,635          | 0,041          |
| Retinoic acid    | 300,43        | 6,30  | 3,33  | 0,000          | 0,999          |
| Codein           | 299,36        | 1,14  | 0,37  | 0,848          | 0,000          |
| Itraconazole     | 705,63        | 5,66  | 5,66  | 0,011          | 0,000          |
| Phenobarbital    | 232,23        | 1,47  | 1,14  | 0,000          | 0,416          |
| Alprazolam       | 308,76        | 2,12  | 2,12  | 0,000          | 0,000          |

## 2.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ $\log k_w$ ΑΛΛΩΝ ΕΙΔΩΝ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Ο πίνακας που ακολουθεί περιέχει τιμές  $\log k_w$  για άλλα είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας. Τα δεδομένα αυτά προήλθαν από το αρχείο του εργαστηρίου της Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας. Για την χρωματογραφία ακινητοποιημένης ανθρώπινης αλβουμίνης (HSA) υπάρχουν τιμές για περιβάλλον 100% υδατική φάση και για την μικκυλιακή χρωματογραφία παρατίθενται τιμές για 3 τασιενεργά, το Brij 7.4 NaCl35, το Tween και το SDS

Πίνακας 3: Τιμές  $\log k_w$  για άλλα είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας

| Δραστική ένωση   | $\log k$     |                 |        |        |
|------------------|--------------|-----------------|--------|--------|
|                  | HSA          | Μικκυλιακή      |        |        |
|                  | 100% υδατική | Brij 7.4 NaCl35 | Tween  | SDS    |
| Vancomycin       | 0,69         | -0,296          | -0,328 | 0,117  |
| Salicylic acid   | –            | 0,343           | 0,152  | -0,070 |
| Meloxicam        | 1,44         | 0,908           | 1,422  | 0,411  |
| Ceftriaxone      | -0,10        | -0,624          | -0,727 | -0,876 |
| Furosemide       | 0,98         | 0,856           | 1,372  | -0,250 |
| Trimethoprim     | 0,46         | 0,714           | 1,075  | 1,365  |
| Metformin        | -0,52        | -0,545          | -0,634 | 0,850  |
| Trazodone        | –            | 1,370           | 2,326  | 1,712  |
| Theophylline     | -0,28        | -0,114          | -0,469 | -0,236 |
| Quinidine        | 0,74         | 1,224           | –      | 1,966  |
| Pyrimethamine    | 0,94         | 1,364           | 1,957  | 1,895  |
| Protriptyline    | 1,25         | 1,485           | 2,245  | 2,154  |
| Amoxicillin      | -1,06        | -0,784          | -1,266 | -1,554 |
| Chlordiazepoxide | 0,77         | 1,360           | 1,827  | 0,433  |
| Chlorpheniramine | –            | 1,226           | –      | 1,561  |
| Diphenhydramine  | –            | 1,171           | 1,762  | –      |
| Flunitrazepam    | –            | 1,253           | 1,483  | 1,815  |
| Fluoxetine       | 1,16         | 1,635           | 1,898  | 3,210  |
| Lidocaine        | -0,02        | 0,851           | 1,391  | 1,777  |
| Losartan         | 1,53         | 0,972           | 1,479  | 0,287  |
| Mebendazole      | –            | 1,186           | 1,015  | 2,047  |
| Paracetamol      | -0,33        | 0,463           | 0,301  | -0,026 |
| Antipyrine       | -0,18        | –               | -0,013 | 0,721  |
| Atropine         | 0,00         | –               | 0,110  | 1,447  |
| Clonidine        | 0,15         | –               | –      | 1,452  |
| Desipramine      | 1,18         | –               | 2,490  | 2,198  |
| Fluphenazine     | 1,61         | –               | 2,238  | 1,540  |
| Imipramine       | 1,05         | –               | 1,952  | 2,011  |
| Nicotine         | -0,24        | –               | 0,410  | 1,092  |
| Nitrofurantoin   | -0,21        | –               | 0,137  | 0,005  |
| Primidone        | -0,19        | –               | 0,724  | 0,784  |
| Promazine        | 1,17         | –               | 1,785  | 2,287  |
| Rifampicin       | 0,96         | –               | –      | 1,476  |

|               |   |       |   |   |
|---------------|---|-------|---|---|
| Retinoic acid | - | -     | - | - |
| Codein        | - | -     | - | - |
| Itraconazole  | - | -     | - | - |
| Phenobarbital | - | 1,044 | - | - |
| Alprazolam    | - | -     | - | - |

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ $\log k$

Όπως περιγράφηκε και στην πειραματική διαδικασία (ενότητα 2.3) κάθε αναλυόμενη ουσία εισήχθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα 3 φορές. Η τιμή του χρόνου έκλουσης,  $t_R$ , προκύπτει ως ο μέσος όρος των 3 αυτών χρόνων έκλουσης και η πειραματική τιμή  $\log k$  προκύπτει σύμφωνα με την Εξίσωση [11]. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές των  $\log k$  κάθε δραστικής ένωσης για τις 3 διαφορετικές περιεκτικότητες του οργανικού διαλύτη 2-προπανόλης στην κινητή φάση (5%, 10%, 15%).

Πίνακας 4: Πειραματικές τιμές  $\log k$

| Δραστική ένωση   | $\log k$      |                |                | $\log k_w$ (υδατική φάση) |                  |
|------------------|---------------|----------------|----------------|---------------------------|------------------|
|                  | 5% 2-propanol | 10% 2-propanol | 15% 2-propanol | Γραμμική προεκβολή        | Πειραματική τιμή |
| Vancomycin       | 0,758         | 0,677          | 0,659          | 0,797                     | 0,900            |
| Salicylic acid   | -0,613        | -0,737         | -0,957         | -0,425                    | -0,408           |
| Meloxicam        | 0,557         | 0,139          | -0,191         | 0,662                     | 1,266            |
| Ceftriaxone      | -0,944        | -1,299         | -1,355         | -0,788                    | -0,788           |
| Furosemide       | -0,003        | -0,206         | -0,351         | 0,161                     | 0,471            |
| Trimethoprim     | 0,149         | -0,171         | -0,070         | 0,188                     | 0,651            |
| Metformin        | -0,513        | -0,520         | -0,306         | -0,653                    | -0,422           |
| Trazodone        | 0,856         | 0,417          | –              | 1,295                     | –                |
| Theophylline     | –             | –              | –              | –                         | -0,694           |
| Quinidine        | 0,699         | 0,418          | –              | 0,980                     | –                |
| Pyrimethamine    | –             | 0,290          | –              | –                         | 1,157            |
| Protriptyline    | 1,250         | 0,804          | –              | 1,696                     | –                |
| Amoxicillin      | -1,001        | –              | -1,054         | -1,140                    | -1,477           |
| Chlordiazepoxide | 0,769         | 0,361          | –              | 1,177                     | –                |
| Chlorpheniramine | 0,668         | 0,331          | –              | 1,005                     | –                |
| Diphenhydramine  | 0,614         | 0,383          | –              | 0,845                     | 1,698            |
| Flunitrazepam    | –             | 0,339          | –              | –                         | 1,122            |
| Fluoxetine       | 1,177         | 0,842          | –              | 1,512                     | –                |
| Lidocaine        | 0,248         | -0,115         | –              | 0,611                     | 1,564            |
| Losartan         | 0,309         | 0,333          | –              | 0,285                     | –                |
| Mebendazole      | –             | 0,418          | –              | –                         | 1,389            |
| Paracetamol      | -0,360        | –              | -0,680         | -0,200                    | -0,345           |
| Antipyrine       | -0,360        | -0,688         | –              | -0,032                    | 0,348            |
| Atropine         | 0,052         | -0,088         | –              | 0,192                     | 0,531            |
| Clonidine        | 0,192         | -0,005         | –              | 0,389                     | 0,746            |
| Desipramine      | 1,126         | 0,757          | –              | 1,495                     | –                |
| Fluphenazine     | 1,200         | 1,250          | –              | –                         | –                |
| Imipramine       | 1,170         | 0,745          | –              | 1,595                     | –                |
| Nicotine         | -0,234        | -0,299         | -0,156         | -0,308                    | -0,088           |
| Nitrofurantoin   | -0,441        | -0,634         | –              | -0,248                    | -0,351           |
| Primidone        | -0,461        | -0,779         | –              | -0,143                    | 0,290            |

|               |        |        |        |        |        |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Promazine     | 0,866  | 1,049  | –      | –      | –      |
| Rifampicin    | 0,252  | -0,075 | -0,204 | 0,447  | 0,955  |
| Retinoic acid | -0,121 | -0,557 | –      | 0,315  | -0,362 |
| Codein        | 0,136  | -0,269 | –      | 0,541  | 0,612  |
| Itraconazole  | –      | 0,847  | –      | –      | –      |
| Phenobarbital | -0,147 | -0,212 | -0,283 | -0,078 | –      |
| Alprazolam    | 0,457  | 0,192  | –      | 0,722  | –      |

Για κάθε αναλύομενη ουσία πραγματοποιήθηκε γραμμική προεκβολή (linear extrapolation) των συντελεστών κατακράτησης ώστε να υπολογιστεί ο συντελεστής κατακράτησης σε 100% υδατική φάση (0% συγκέντρωση 2-προπανόλης). Ο συντελεστής κατακράτησης σε 100% υδατική φάση συμβολίζεται ως  $\log k_w$  και δίνεται από την παρακάτω σχέση<sup>15</sup>

$$\log k = -S \cdot \varphi + \log k_w \quad [13]$$

Στην τελευταία στήλη παρουσιάζονται πειραματικές μετρήσεις του συντελεστή κατακράτησης για 100% υδατική φάση (0% συγκέντρωση 2-προπανόλης) σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα για τις ίδιες αναλυόμενες ενώσεις.<sup>30</sup>

Τέλος, τα κενά κελιά του Πίνακα 3 οφείλονται στο γεγονός ότι δεν πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για τις συγκεκριμένες περιεκτικότητες (κυρίως για 15% 2-προπανόλη) ή δεν προέκυψαν κορυφές στο χρωματογράφημα λόγω ισχυρής κατακράτησης από την στήλη AGP.

### 3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ $\log k_w$ , $\log k^{10\%}$ ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΜΕΡΙΣΜΟΥ $\log P$

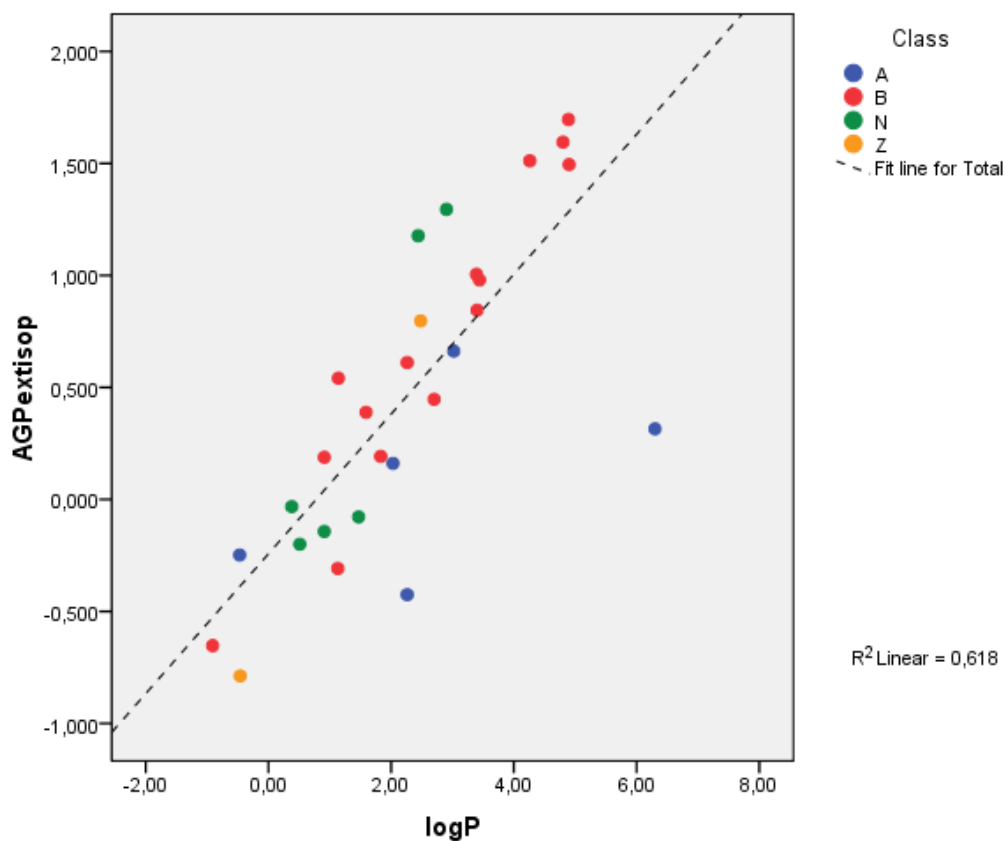
Η συσχέτιση του παράγοντα κατακράτησης  $\log k_w$  με τον συντελεστή μερισμού  $\log P$  και όλες οι υπόλοιπες συσχετίσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω της πολλαπλής ανάλυσης παλινδρόμησης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το περιβάλλον του λογισμικού IBM SPSS Statistics 28.0.0.0 από το οποίο καταγράφονται η προκύπτουσα εξίσωση, ο αριθμός δεδομένων/ενώσεων (n), ο συντελεστής συσχέτισης ( $R^2$ ), η τυπική απόκλιση (s) και το F-test για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Στις συσχετίσεις ελέγχεται η ύπαρξη έκτροπων τιμών/outliers, δηλαδή τιμών στις οποίες η διαφορά πραγματικής-υπολογιζόμενης από το μοντέλο είναι μεγαλύτερη του 3·s (τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης).

Για την πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης ορίστηκε ως εξαρτημένη μεταβλητή το  $\log k_w$  από την γραμμική προεκβολή ενώ ανεξάρτητη μεταβλητή ορίστηκε ο συντελεστής μερισμού  $\log P$ .

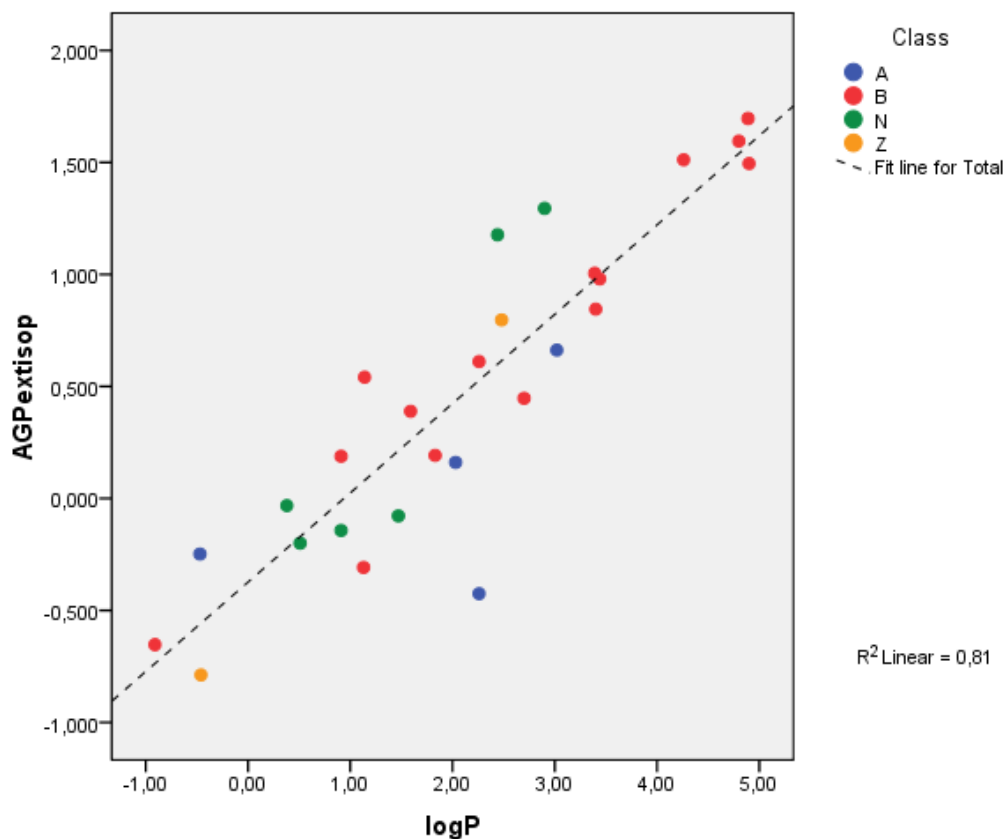
Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται γραφικά η συσχέτιση μεταξύ  $\log k_w$  και δεδομένων  $\log P$ . Ανάλογα με τον χαρακτήρα κάθε ένωσης (οξύ, βάση, ουδέτερο, αμφολύτης) υπάρχει και χρωματική διαφοροποίηση.

(A): acid, (B): base, (N): neutral, (Z): zwitterion



Εικόνα 8: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log k_w$ - $\log P$

Στο διάγραμμα αυτό υπάρχει μια έκτροπη τιμή (outlier με υπόλοιπο,  $\text{residual}=3,2 \cdot S$ ) που αντιστοιχεί στο ρετινοϊκό οξύ που είναι μια ένωση με πολύ υψηλή λιποφιλία ( $\log P=6,30$ ). Αφαιρώντας το σημείο αυτό η συσχέτιση βελτιώνεται στην μορφή:



Εικόνα 9: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log k_w - \log P$  χωρίς έκτροπες τιμές

Η προκύπτουσα εξίσωση είναι της μορφής:

$$\log k_w = 0,399(\pm 0,039)\log P - 0,374(\pm 0,102) \quad [14]$$

$$(n=27, R^2=0,810, s=0,318, F=106,7)$$

Η συσχέτιση αυτή είναι αναμενόμενη καθώς η έκλυση ενώσεων από μία στήλη ακινητοποιημένων πρωτεϊνών όπως είναι η στήλη AGP στηρίζεται σε σημαντικό ποσοστό στην λιποφιλία (υπάρχουν όμως και δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις, π.χ ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου).

Για να ελεγχθεί αν βελτιώνεται η ποιότητα της προκύπτουσας εξίσωσης εισάγονται περισσότερες ανεξάρτητες μεταβλητές στην πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης. Αυτές είναι τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου,  $F^+$  και  $F^-$  αντίστοιχα. Η εισαγωγή αυτών των μεταβλητών στο μοντέλο θα πραγματοποιηθεί μόνο στην περίπτωση που βρεθούν στατιστικά σημαντικές δηλαδή  $\text{sig} \leq 0,05$  για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση μόνο ο παράγοντας  $F^-$  βρέθηκε στατιστικά σημαντικός ενώ ο παράγοντας  $F^+$  μη σημαντικός. Επομένως η Εξίσωση [14] βελτιώνεται και είναι της μορφής:

$$\log k_w = 0,391(\pm 0,032)\log P - 0,508(\pm 0,165)F^- - 0,277(\pm 0,094) \quad [15]$$

$$(n=27, R^2=0,864, s=0,275, F=76.1)$$

Να σημειωθεί ότι το  $\log P$  αναφέρεται στην μη ιοντισμένη μορφή των ενώσεων. Στην πραγματικότητα υπάρχει ιοντισμός των ενώσεων, δηλαδή η λιποφιλία όλων των ιοντισμένων φαρμακευτικών μορίων είναι μικρότερη από αυτή που εκφράζει το  $\log P$ . Επομένως, στην βάση αυτή είναι λογική η εισαγωγή των  $F^+$  και  $F^-$  με αρνητικό πρόσημο. Ωστόσο, το αρνητικό πρόσημο στην περίπτωση των (θετικά φορτισμένων) βάσεων εξισορροπείται από το γεγονός πως υπάρχουν (ελκτικές) ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ βάσεων και AGP.

Εξετάζεται επίσης η συσχέτιση του παράγοντα κατακράτησης  $\log k^{10\%}$ , για περιεκτικότητα 10% 2-προπανόλη στην κινητή φάση, με τον συντελεστή μερισμού  $\log P$ . Η εξίσωση που προκύπτει είναι η εξής:

$$\log k^{10\%} = 0,225(\pm 0,041)\log P - 0,521(\pm 0,120) \quad [16]$$

$$(n=32, R^2=0,506, s=0,399, F=30,7)$$

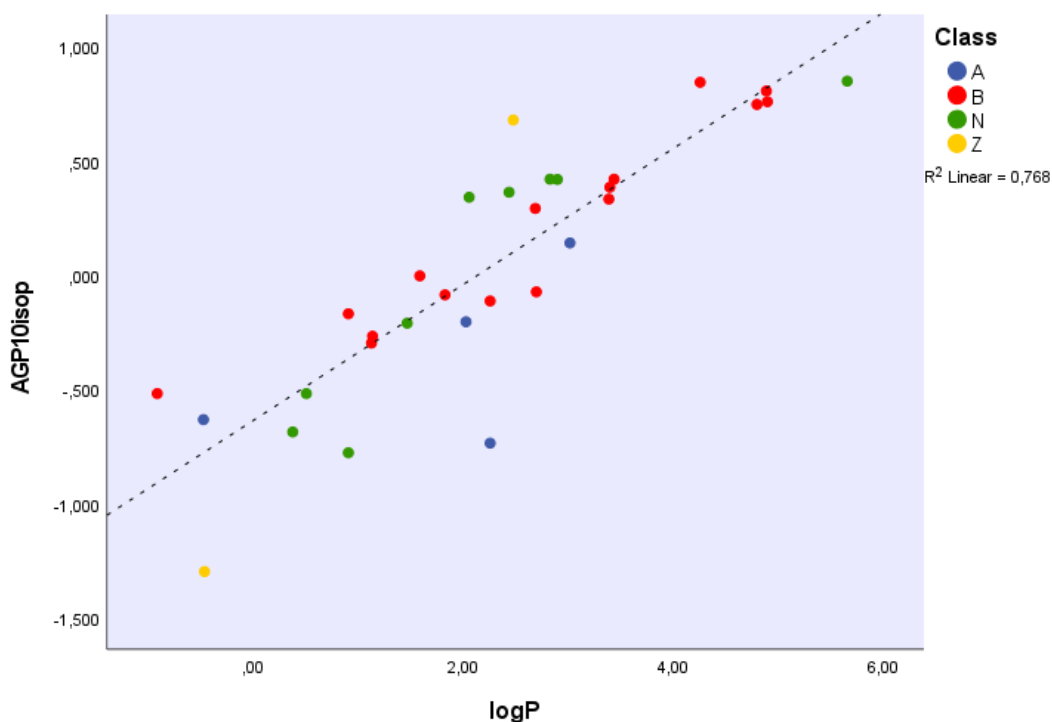
Και σ'αυτή την περίπτωση το ρετινοϊκό οξύ επισημαίνεται ως έκτροπη τιμή (outlier) λόγω της υψηλής λιποφιλίας του συνεπώς η ανάλυση πραγματοποιείται ξανά χωρίς αυτό. Έτσι η εξίσωση που προκύπτει είναι:

$$\log k^{10\%} = 0,298(\pm 0,030)\log P - 0,639(\pm 0,085) \quad [17]$$

$$(n=31, R^2=0,768, s=0,273, F=95,8)$$

Η Εικόνα 10 που ακολουθεί παρουσιάζει την γραφική απεικόνιση της Εξίσωσης [17] από την οποία απουσιάζει το ρετινοϊκό οξύ και παρατηρείται πως ο συντελεστής συσχέτισης είναι αισθητά βελτιωμένος σε σύγκριση με την Εξίσωση [16].





Εικόνα 10: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log k_{10\%}$ - $\log P$

Με την εισαγωγή των παραμέτρων  $F^+$ ,  $F^-$  το ρετινοϊκό οξύ δεν παρουσιάζεται ως έκτροπη τιμή στην ανάλυση ισώς επειδή τα νέα μεγέθη (κλάσμα θετικού και αρνητικού φορτίου) που προστίθενται να διορθώνουν την απόκλιση που εμφάνιζε νωρίτερα η συγκεκριμένη ένωση. Τα στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν δεν παρουσίασαν καλύτερες τιμές επομένως κρίθηκε σκόπιμο να μην αναφερθούν μιάς και το μοντέλο της Εξίσωσης [16] έχει καλύτερη συσχέτιση μεταξύ  $\log k^{10\%}$  και  $\log P$ .

Τελευταίο στάδιο της ανάλυσης μεταξύ συσχετίσεων  $\log k_w$  και συντελεστή μερισμού  $\log P$  είναι η σύγκριση του μοντέλου της Εξίσωσης [14] με το μοντέλο που προκύπτει από την συσχέτιση δεδομένων  $\log k_w$  γραμμικής προεκβολής χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις ακετονιτριλίου<sup>30</sup> με το  $\log P$ . Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα<sup>30</sup> το μοντέλο που προκύπτει είναι:

$$\log k_w = 0,473(\pm 0,039)\log P - 0,319(\pm 0,111) \quad [18]$$

$$(n=35, R^2=0,820, s=0,406, F=150,8)$$

Οι δύο συσχετίσεις (Εξίσωση [14] και [18]) έχουν παρόμοια στατιστικά μεγέθη. Ωστόσο, στην συσχέτιση της Εξίσωσης [18] το κλάσμα αρνητικού φορτίου δεν είναι στατιστικά σημαντικό, πιθανόν λόγω ηπιότερου ιοντισμού εξαιτίας της παρουσίας ακετονιτριλίου σε σχέση με την 2-προπανόλη (αλλάζει η διηλεκτρική σταθερά).

### 3.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ $\log k_w$ , $\log k^{10\%}$ ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ $\log D$

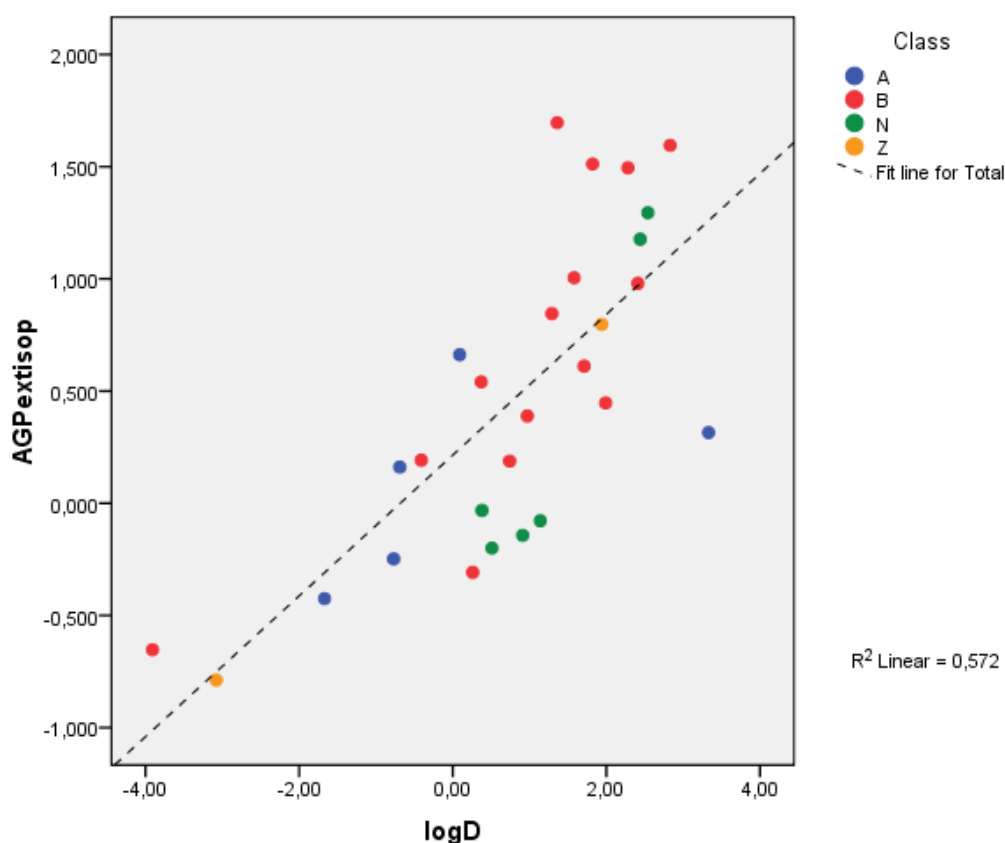
Όπως ακριβώς και στις παραπάνω συσχετίσεις μεταξύ  $\log k_w$ ,  $\log k^{10\%}$  και  $\log k_P$  έτσι ακριβώς πραγματοποιείται κι εδώ πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή το  $\log k_w$  και ανεξάρτητη μεταβλητή το συντελεστή κατανομής  $\log D$ . Η εξίσωση και τα στατιστικά δεδομένα που προκύπτουν παρουσιάζονται παρακάτω.

$$\log k_w = 0,314 (\pm 0,039) \log D + 0,215 (\pm 0,098) \quad [19]$$

$$(n=28, R^2=0,572, s=0,496, F=34,7)$$

Στην Εικόνα 11 απεικονίζεται η γραφική παράσταση του συντελεστή  $\log k_w$  συναρτήσεως του συντελεστή κατανομής  $\log D$ . Ανάλογα με τον χαρακτήρα κάθε ένωσης (οξύ, βάση, ουδέτερο, αμφολύτης) υπάρχει και χρωματική διαφοροποίηση.

A): acid, (B): base, (N): neutral, (Z): zwitterion



Εικόνα 11: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log k_w$ - $\log D$

Η εισαγωγή των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου ( $F^+$ ,  $F^-$ ) στην Εξίσωση [19] βελτίωσε την συσχέτιση. Το κλάσμα αρνητικού φορτίου βρέθηκε στατιστικά μη σημαντικό ενώ το κλάσμα θετικού φορτίου που εισάγεται στην εξίσωση υποδηλώνει μεγαλύτερη συγγένεια των πρωτονιωμένων βάσεων για την AGP.

$$\log k_w = 0,294(\pm 0,047)\log D + 0,520(\pm 0,178)F^+ - 0,017(\pm 0,117) \quad [20]$$

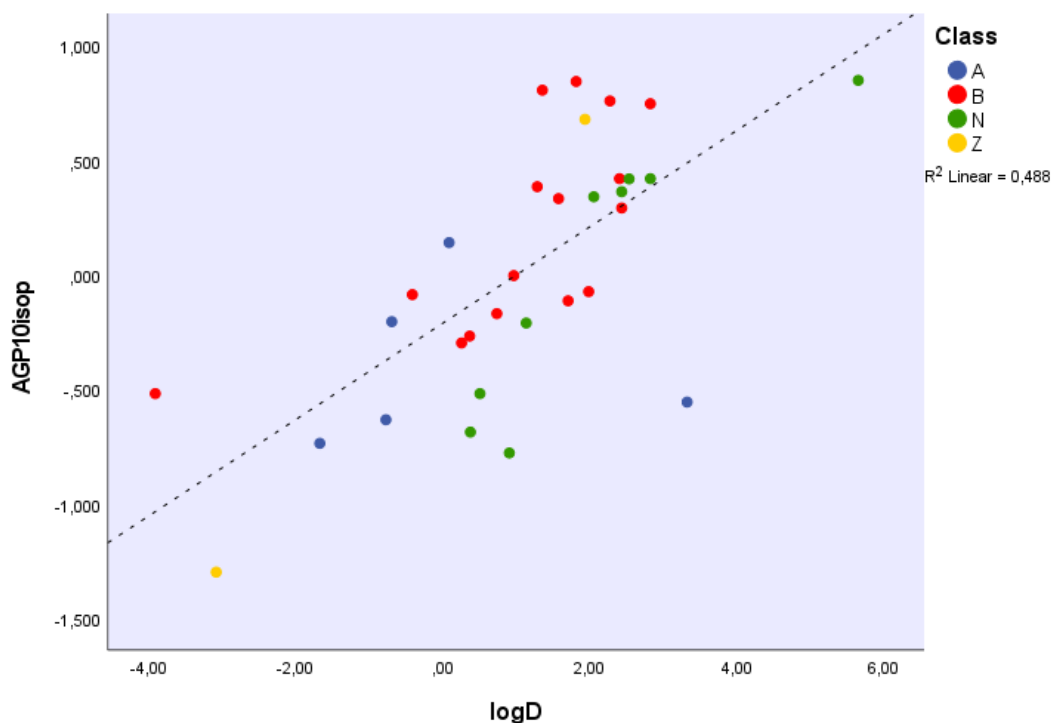
$$(n=28, R^2=0,681, s=0,413, F=26,7)$$

Παρατηρείται πως η συσχέτιση  $\log k_w$  είναι καλύτερη με τον συντελεστή μερισμού  $\log P$  (που αντιστοιχεί στην μη ιοντισμένη μορφή της ένωσης) παρά με το συντελεστή κατανομής  $\log D$  (που εκφράζει τον ιοντισμό στο δεδομένο pH), γεγονός που υποδηλώνει πως ο ιοντισμός στο περιβάλλον της στήλης είναι μάλλον ελαττωμένος.

Επόμενη συσχέτιση όπως και στην Ενότητα 3.2 θα είναι μεταξύ παράγοντα κατακράτησης  $\log k^{10\%}$  (περιβάλλον 10% 2-προπανόλη) και συντελεστή κατανομής  $\log D$ . Η Εικόνα 12 απεικονίζει και γραφικά την συσχέτιση.

$$\log k^{10\%} = 0,210(\pm 0,039)\log D - 0,214(\pm 0,084) \quad [21]$$

$$(n=32, R^2= 0,488, s=0,406, F=28,7)$$



Εικόνα 12: Γραφική απεικόνιση  $\log k^{10\%}$ - $\log D$

Όπως ακριβώς και στην προηγούμενη συσχέτιση μεταξύ  $\log k_w$  και  $\log D$  έτσι κι εδώ έγινε εισαγωγή των μεταβλητών  $F^+$  και  $F^-$  δίνοντας την παρακάτω εξίσωση. Η μεταβλητή  $F^-$  δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική.

$$\log k^{10\%} = 0,213(\pm 0,036)\log D + 0,479(\pm 0,167)F^+ - 0,430(\pm 0,130) \quad [22]$$

$$(n=32, R^2=0,629, s=0,358, F=15,8)$$

Τέλος, γίνονται οι αντίστοιχες συσχετίσεις μεταξύ  $\log k_w$ - $\log D$  για τις τιμές του παράγοντα κατακράτησης που προήλθαν από την γραμμική προεκβολή που είχαν μετρηθεί παρουσία ακετονιτριλίου<sup>30</sup>.

$$\log k_w = 0,374(\pm 0,055)\log D + 0,314(\pm 0,120) \quad [23]$$

$$(n=36, R^2=0,581, s=0,624, F=47,1)$$

$$\log k_w = 0,359(\pm 0,051)\log D + 0,582(\pm 0,220)F^+ + 0,077(\pm 0,142) \quad [24]$$

$$(n=36, R^2=0,654, s=0,575, F=31,2)$$

Οι συσχετίσεις των Εξισώσεων [19] και [20] παρουσιάζουν υψηλότερα στατιστικά στοιχεία σε σύγκριση με τις συσχετίσεις των Εξισώσεων [23] και [24] αντίστοιχα, που προέρχονται μέσω γραμμικής προεκβολής από τιμές που μετρήθηκαν παρουσία ακετονιτριλίου<sup>30</sup>.

Εξετάζοντας τις εξισώσεις ([19] έως [22]) αυτής της ενότητας προκύπτει πως καλύτερο συντελεστή συσχέτισης,  $R^2$  δίνει το μοντέλο συσχέτισης  $\log k_w$ - $\log D$  βελτιωμένο με τον παράγοντα  $F^+$  ενώ καλύτερη τυπική απόκλιση,  $s$  δίνει το μοντέλο συσχέτισης  $\log k^{10\%}$ - $\log D$  βελτιωμένο με το  $F^+$ . Αυτό σημαίνει πως ο παράγοντας κατακράτησης συσχετίζεται καλύτερα με τον συντελεστή κατανομής σε δεδομένα 100% υδατικής φάσης υπολογισμένα μέσω γραμμικής προεκβολής ενώ σε δεδομένα παρουσία 10% 2-προπανόλης τα  $\log k$  πλησιάζουν περισσότερο την δειγματική μέση τιμή, τείνουν δηλαδή να είναι κοντά στο μέσο όρο.

### 3.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ $\log k^{10\%}$ ΜΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ $\log k^{10\%}$ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΗ

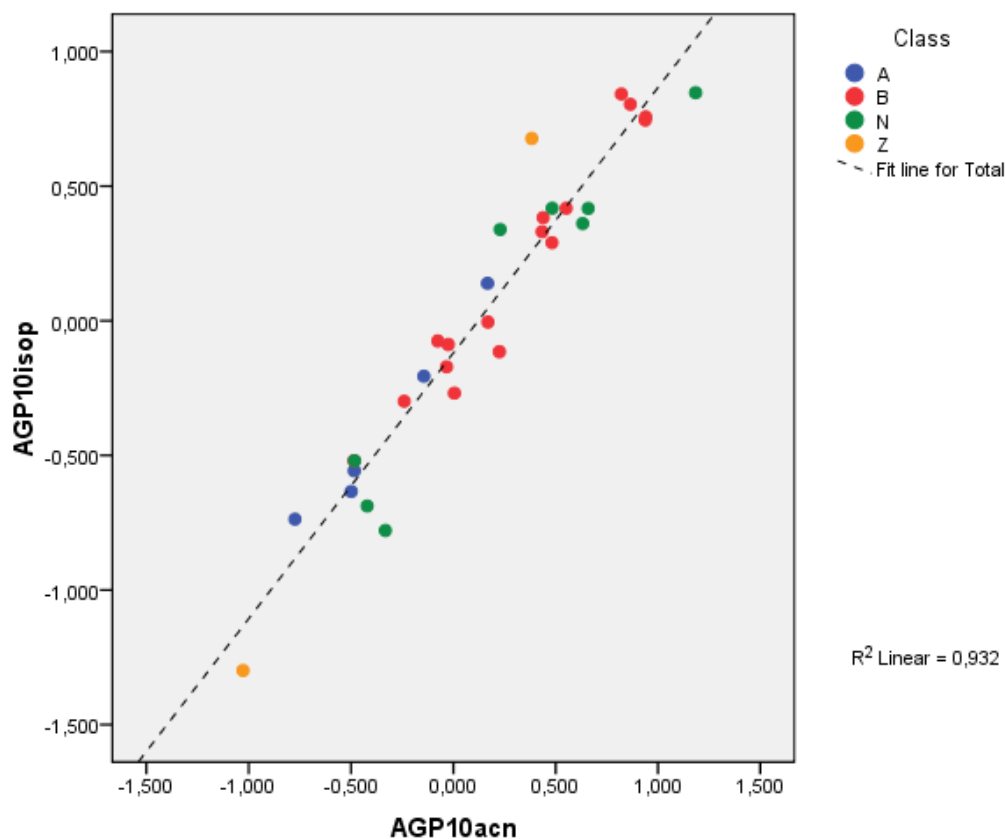
Σ'αυτή την ενότητα θα γίνει σύγκριση μεταξύ των παραγόντων κατακράτησης παρουσία 10% 2-προπανόλης που υπολογίστηκαν πειραματικά στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας και των παραγόντων κατακράτησης παρουσία 10% ακετονιτριλίου που υπολογίστηκαν στα πλαίσια διαφορετικής διπλωματικής εργασίας<sup>30</sup>.

Η συσχέτιση είναι της μορφής:

$$\log k_{AGP\ 10\% IP} = 0,987(\pm 0,050)\log k_{AGP\ 10\% ACN} - 0,120(\pm 0,028) \quad [25]$$

(n=31, R<sup>2</sup>=0,932, s=0,150, F=396,2)

Η Εικόνα 13 απεικονίζει γραφικά την παραπάνω συσχέτιση της Εξίσωσης [25].



Εικόνα 13:Γραφική απεικόνιση συσχέτισης logk10% IP-logk10% CAN

Προκύπτει πως η παρουσία της 2-προπανόλης οδηγεί σε ελαφρώς μικρότερους συντελεστές κατακράτησης, λόγω του γεγονότος πως η 2-προπανόλη έχει μεγαλύτερη εκλουστική ισχύ από το ακετονιτρίλιο (μεγαλύτερη ανθρακική αλυσίδα). Προφανώς ο μηχανισμός έκλουσης είναι ακριβώς ο ίδιος και έτσι το R<sup>2</sup> τείνει στην μονάδα.

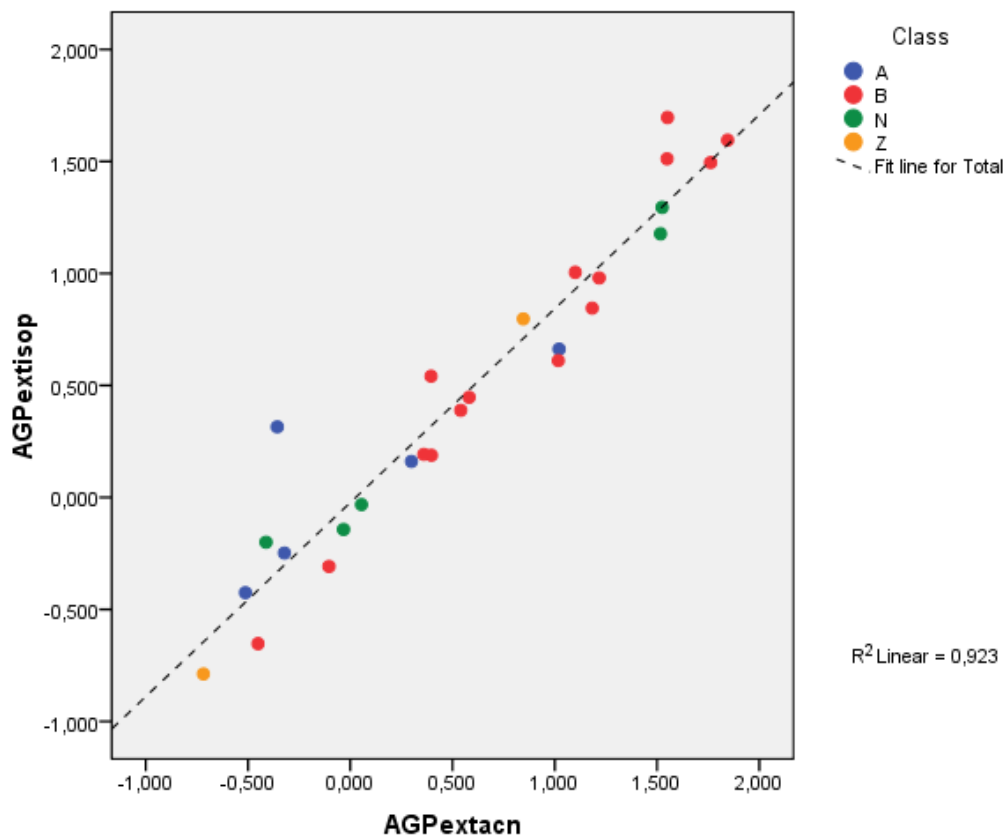
### 3.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ logk<sub>w</sub> ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΠΡΟΕΚΒΟΛΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΔΥΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΩΝ

Η συσχέτιση που φαίνεται παρακάτω πραγματοποιήθηκε για τους παράγοντες κατακράτησης logk<sub>w</sub> που υπολογίστηκαν μέσω γραμμικής προεκβολής από τα δεδομένα της παρούσας διπλωματικής ( οργ. τροποποιητής 2-προπανόλη) και από τα δεδομένα διαφορετικής διπλωματικής<sup>30</sup> ( οργ. τροποποιητής ακετονιτρίλιο).

$$\log k_{wAGP \text{ extr.IP}} = 0,866(\pm 0,050)\log k_{wAGP \text{ extr.ACN}} - 0,023(\pm 0,048) \quad [26]$$

$$(n=27, R^2=0,923, s=0,200, F=300,7)$$

Η συσχέτιση φαίνεται και γραφικά στην Εικόνα 14 που ακολουθεί



Εικόνα 14: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log k_{wAGP \text{ extr.IP}} - \log k_{wAGP \text{ extr.ACN}}$

Αφαιρώντας το ρετινοϊκό οξύ (έκτροπη τιμή/outlier με υπόλοιπο, residual=3,2·s) μία ένωση με πολύ υψηλή λιποφιλία, η παραπάνω συσχέτιση μετατρέπεται ως εξής:

$$\log k_{wAGP \text{ extr.IP}} = 0,908(\pm 0,039)\log k_{wAGP \text{ extr.ACN}} - 0,074(\pm 0,038) \quad [27]$$

$$(n=27, R^2=0,958, s=0,150, F=554,1)$$

Κανονικά οι τιμές αυτές θα έπρεπε να είναι ίδιες, αφού ανεξαρτήτως του τι οργανικός διαλύτης χρησιμοποιείται η γραμμική προεκβολή αναφέρεται σε 100% υδατική φάση, δηλαδή σε απουσία οποιουδήποτε οργανικού τροποποιητή.

Ωστόσο, όπως προκύπτει από την παραπάνω εξίσωση οι τιμές  $\log k_{w(AGP)}$  που υπολογίζονται με γραμμική προεκβολή χρησιμοποιώντας 2-προπανόλη είναι ελαφρά

αλλά σταθερά κατώτερες σε σχέση με τις τιμές που υπολογίζονται όταν η γραμμική προεκβολή γίνει χρησιμοποιώντας συντελεστές έκλυσης που έχουν υπολογιστεί με διαφορετικά κλάσματα ακετονιτριλίου.

Το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε διαφορές γραμμικότητας  $\log k_w$ / κλάσματος οργανικού διαλύτη. Με άλλα λόγια, η γραμμική προεκβολή γίνεται θεωρώντας πως υπάρχει γραμμικότητα σε όλη την έκταση των χρησιμοποιούμενων κλασμάτων οργανικού διαλύτη (που κυμαίνονται μεταξύ 5 και 15%), αλλά στην πράξη παρατηρούνται αποκλίσεις από την γραμμικότητα.

Η μικρή διαφοροποίηση των τιμών  $\log k_w$  που υπολογίζονται στην στήλη AGP χρησιμοποιώντας γραμμική προεκβολή και για διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες έχει περιγραφεί στο παρελθόν και από άλλους ερευνητές.<sup>22</sup>

### **3.6 ΣΥΓΚΡΙΣΗ $\log k_{w \text{ extr.IP}}$ και $\log k_{w \text{ extr.ACN}}$ ΜΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ $\log k_w$ ΑΠΟ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΕ 100% ΥΔΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ**

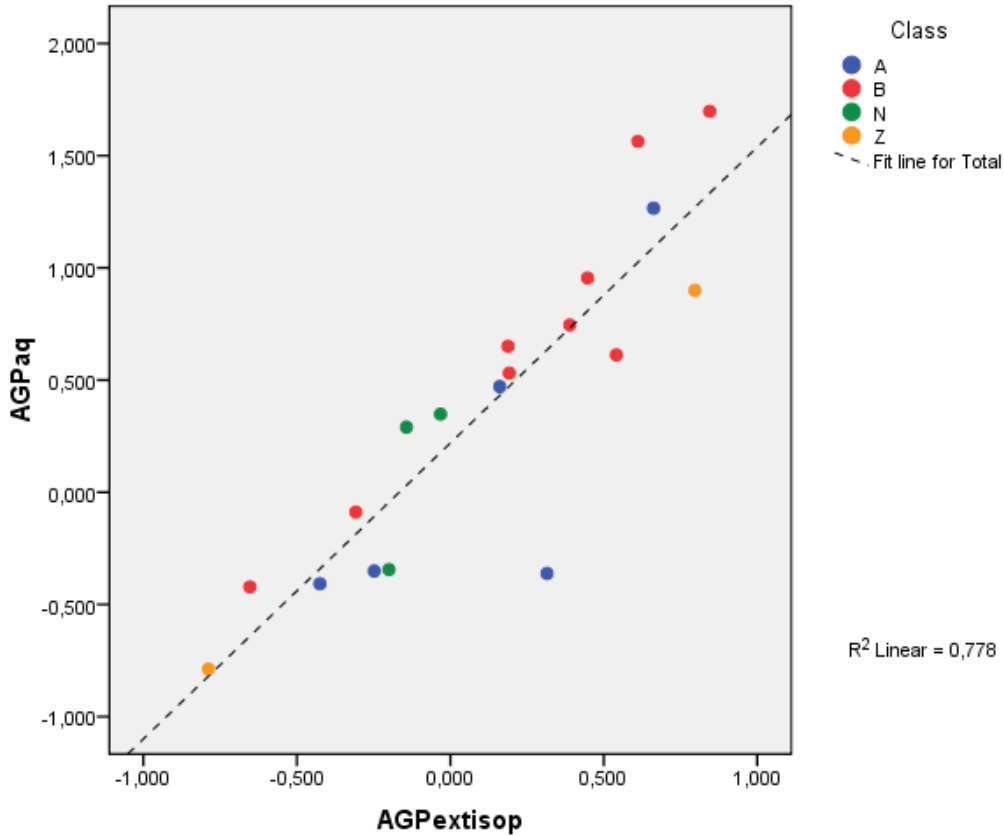
Οι παράγοντες κατακράτησης που υπολογίστηκαν μέσω γραμμικής προεκβολής από δεδομένα οργανικών τροποποιητών 2-προπανόλη και ακετονιτρίλιο ( $\log k_{w \text{ extr.IP}}$  και  $\log k_{w \text{ extr.ACN}}$  αντίστοιχα) θα συγκριθούν με παράγοντα κατακράτησης  $\log k_{w \text{ actual}}$  που αποτελεί πειραματική μέτρηση σε 100% υδατική φάση<sup>30</sup>.

#### **3.6.1 Σύγκριση $\log k_w$ γραμμικής προεκβολής (2-προπανόλη)-πειραματικής μέτρησης**

Η συσχέτιση που προκύπτει είναι:

$$\log k_{wAGP \text{ actual}} = 1,319(\pm 0,171)\log k_{wAGP \text{ extr.IP}} + 0,219(\pm 0,083) \quad [28]$$

$$(n=19, R^2=0,778, s=0,348, F=59,7)$$



Εικόνα 15: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log k_w \text{ actual} - \log k_w \text{ extr.IP}$

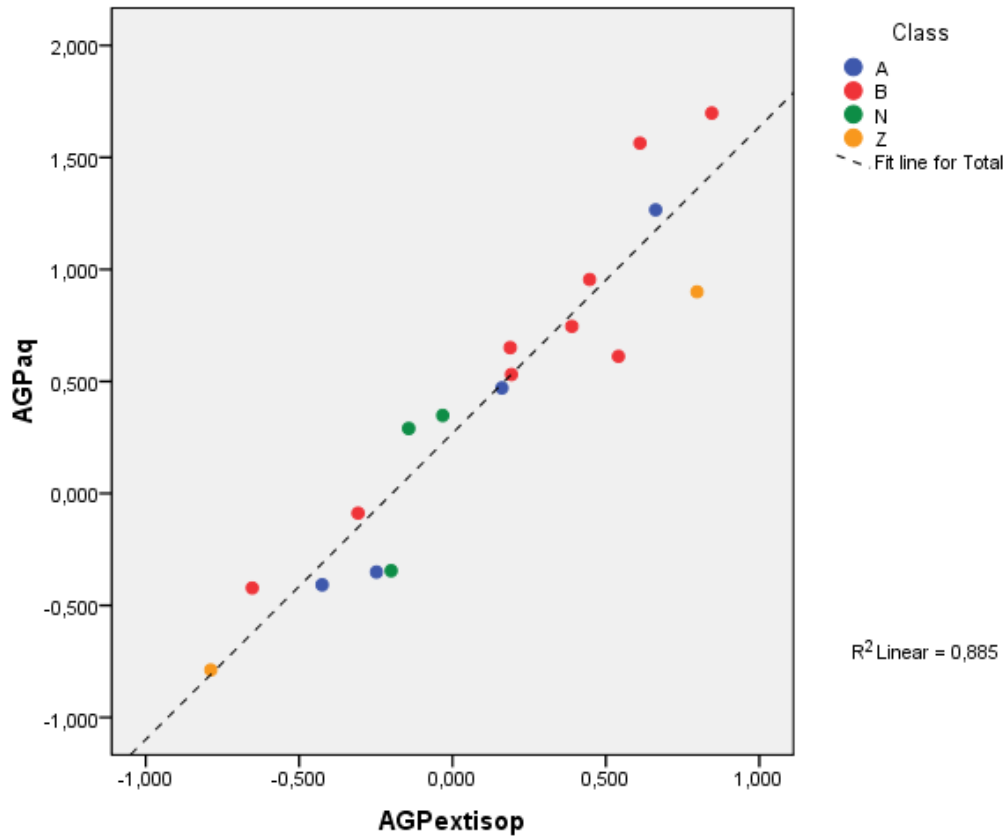
Στην Εξίσωση [28] το ρετινοϊκό οξύ εντάσσεται οριακά στην συσχέτιση ( $\text{residual} = 2,9 \cdot S$ ). Αφαιρώντας το από τα δεδομένα η συσχέτιση βελτιώνεται σημαντικά:

$$\log k_{wAGP \text{ actual}} = 1,367(\pm 0,123) \log k_{wAGP \text{ extr.IP}} + 0,269(\pm 0,060) \quad [29]$$

$$(n=18, R^2=0,885, s=0,250, F=123,4)$$

Από την παραπάνω συσχέτιση είναι σαφές πως οι μετρήσεις σε απευθείας 100% υδατική φάση δίνουν μεγαλύτερες τιμές  $\log k_w$  απ'ότι η γραμμική προεκβολή (συντελεστής μεγαλύτερος της μονάδας και σταθερός όρος στατιστικά σημαντικός). Προφανώς, υπάρχει καμπύλωση της συσχέτισης  $\log k$ /ποσοστό 2-προπανόλης γεγονός που υποτιμά την τελική τιμή του  $\log k_{w(AGP)}$ .





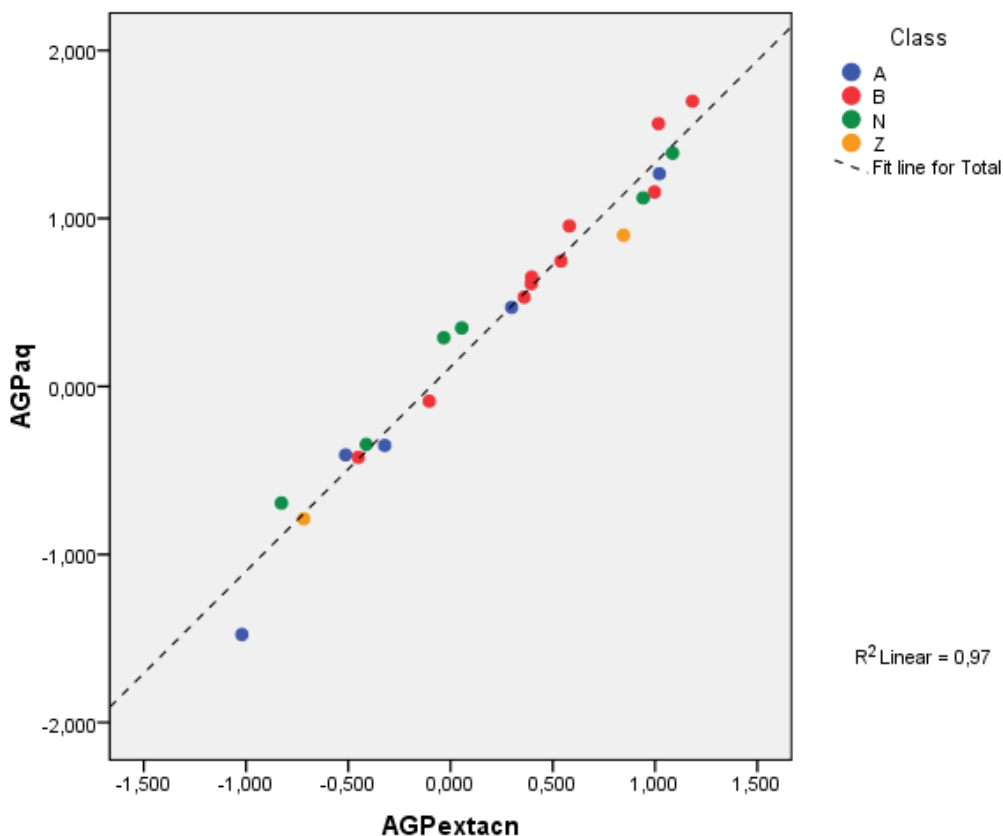
Εικόνα 16: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log k_w \text{ actual} - \log k_w \text{ extr.IP}$  χωρίς ορ.έκτροση τιμή

### 3.6.2 Σύγκριση $\log k_w$ γραμμικής προεκβολής (ακετονιτρίλιο)-πειραματικής μέτρησης

Η συσχέτιση είναι η:

$$\log k_{wAGP \text{ actual}} = 1,215(\pm 0,047) \log k_{wAGP \text{ extr.ACN}} + 0,116(\pm 0,033) \quad [30]$$

$$(n=23, R^2=0,970, s=0,149, F=676,8)$$



Εικόνα 17: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log k_w$  actual- $\log k_w$  extr.ACN

Από την παραπάνω συσχέτιση είναι σαφές πως οι μετρήσεις σε απευθείας 100% υδατική φάση (για όσα φάρμακα είναι εφικτό) δίνουν επίσης μεγαλύτερες τιμές  $\log k_w$  από ότι η γραμμική προεκβολή με ακετονιτρίλιο (συντελεστής μεγαλύτερος της μονάδας και σταθερός όρος στατιστικά σημαντικός). Προφανώς και εδώ υπάρχει καμπύλωση της συσχέτισης  $\log k_w$ / ποσοστό ακετονιτρίλιου γεγονός που υποτιμά την τελική τιμή  $\log k_w$ (AGP). Ωστόσο, παρουσία ακετονιτρίλιου η διαφορά είναι μικρότερη (λίγο μικρότερος συντελεστής και λίγο μικρότερος σταθερός όρος σε σχέση με την 2-προπανόλη).

Συμπερασματικά, η γραμμική προεκβολή δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα (συγκρινόμενη με τις απευθείας μετρήσεις σε 100% υδατική φάση) είτε παρουσία 2-προπανόλης είτε παρουσία ακετονιτρίλιου. Ωστόσο, παρουσία 2-προπανόλης φαίνεται να οδηγεί σε ελαφρώς μεγαλύτερες αποκλίσεις.

### 3.7 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ $\log k_w$ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Σ'αυτή την ενότητα θα πραγματοποιηθούν συσχετίσεις μεταξύ παραγόντων κατακράτησης της χρωματογραφίας AGP που εξετάσθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία και παραγόντων κατακράτησης άλλων ειδών βιομιμητικής χρωματογραφίας με ποικίλες στήλες.

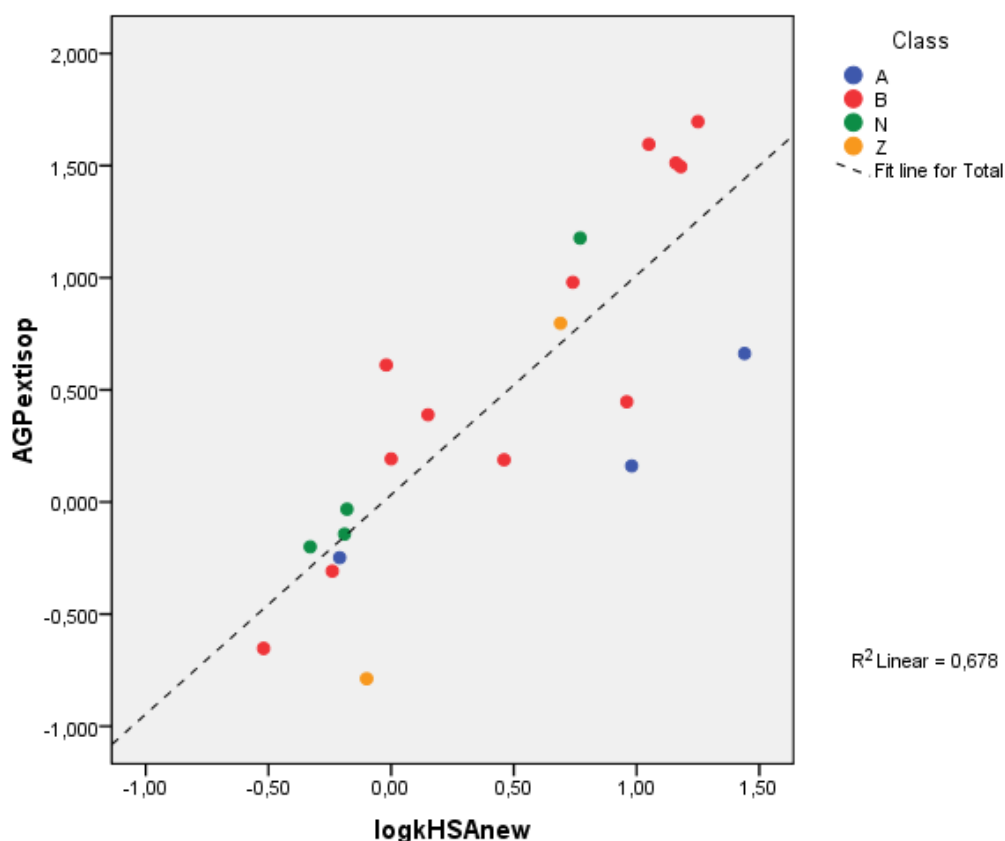
#### 3.7.1 Συσχέτιση με χρωματογραφία HSA

Η πρώτη περίπτωση βιομιμητικής χρωματογραφίας που θα συσχετισθεί με την χρωματογραφία AGP είναι αυτή της HSA. Τα δεδομένα και για τις δύο χρωματογραφίες αφορούν 100% υδατική φάση δηλαδή θα εξετασθούν οι παράγοντες κατακράτησης  $\log k_w$ . Για την στήλη AGP οι τιμές  $\log k_w$  προέρχονται από γραμμική προεκβολή δεδομένων 2-προπανόλης. Η εξίσωση που προκύπτει είναι:

$$\log k_{wAGP \text{ extr.IP}} = 0,978(\pm 0,155)\log k_{wHSA} + 0,033(\pm 0,116) \quad [31]$$

$$(n=21, R^2=0,678, s=0,434, F=40,0)$$

Η παρακάτω εικόνα αποτυπώνει γραφικά την συσχέτιση της Εξίσωσης [31]



Εικόνα 18: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log k_{wAGP \text{ extr.IP}} - \log k_{wHSA}$

Όπως φαίνεται στο γράφημα της Εικόνας 18 στο οι όξινες ενώσεις (μπλε χρώμα) είναι «τραβηγμένες» προς την πλευρά του άξονα HSA. Αυτό συμβαίνει επειδή η στήλη χρωματογραφίας με ακινητοποιημένη HSA ευνοεί την συγκράτηση των όξινων ενώσεων σε αντίθεση με την στήλη AGP που δεσμεύει κυρίως βασικές και ουδέτρες ενώσεις. Βέβαια οι όξινες ενώσεις που υπάρχουν σαν δεδομένα στην παραπάνω συσχέτιση και στις δυο στήλες είναι μόνο τρεις και αυτό είναι μόνο μια ενδεικτική παρατήρηση που ίσως να μην αποτελεί και τον κανόνα.

Επιπλέον, η συσχέτιση είναι σχετικά καλή και αποδίδεται στο γεγονός πως υπάρχει μια κοινή βάση στον μηχανισμό έκλουσης των ενώσεων από τις δυο στήλες (μηχανισμός κατανομής όπου η λιποφιλία παίζει βασικό ρόλο). Ωστόσο υπάρχουν διαφοροποιήσεις ως προς δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις που υπεισέρχονται στον μηχανισμό έκλουσης όπως π.χ. ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου.

Η παραπάνω συσχέτιση βελτιώνεται με την εισαγωγή του κλάσματος αρνητικού φορτίου, που έχει αρνητικό πρόσημο καθώς τα φορτισμένα οξέα (ανιόντα) συγκρατούνται ισχυρότερα από την HSA. Έτσι προκύπτει,

$$\begin{aligned} \log k_{wAGP \text{ extr.IP}} &= 1,138(\pm 0,114) \log k_{wHSA} - 1,056(\pm 0,232) F^- \\ &+ 0,108(\pm 0,083) \quad [32] \\ (n=21, R^2=0,850, s=,304, F=51,1) \end{aligned}$$

Στην συνέχεια, γίνονται οι αντίστοιχες συσχετίσεις χρησιμοποιώντας ως  $\log k_{w(AGP)}$  τις τιμές που προκύπτουν από την γραμμική προεκβολή σε περιβάλλον ακετονιτριλίου<sup>30</sup>. Η εξίσωση είναι,

$$\begin{aligned} \log k_{wAGP \text{ extr.ACN}} &= 1,190(\pm 0,123) \log k_{wHSA} + 0,106(\pm 0,106) \quad [33] \\ (n=27, R^2=0,840, s=0,408, F=63,1) \end{aligned}$$

Και,

$$\begin{aligned} \log k_{wAGP \text{ extr.ACN}} &= 1,251(\pm 0,112) \log k_{wHSA} - 0,694(\pm 0,251) F^- \\ &+ 0,188(\pm 0,099) \quad [33] \\ (n=27, R^2=0,840, s=0,408, F=63,1) \end{aligned}$$

Παρατηρείται πως υπάρχει μία καλύτερη αρχική συσχέτιση των τιμών HSA/AGP όταν ως τιμές της AGP χρησιμοποιούνται αυτές που έχουν προκύψει με γραμμική προεκβολή με ακετονιτρίλιο. Ωστόσο, με την εισαγωγή του κλάσματος αρνητικού φορτίου οι συσχετίσεις είναι σχεδόν παρόμοιες.

### 3.7.2 Συσχέτιση με μικκυλιακή χρωματογραφία

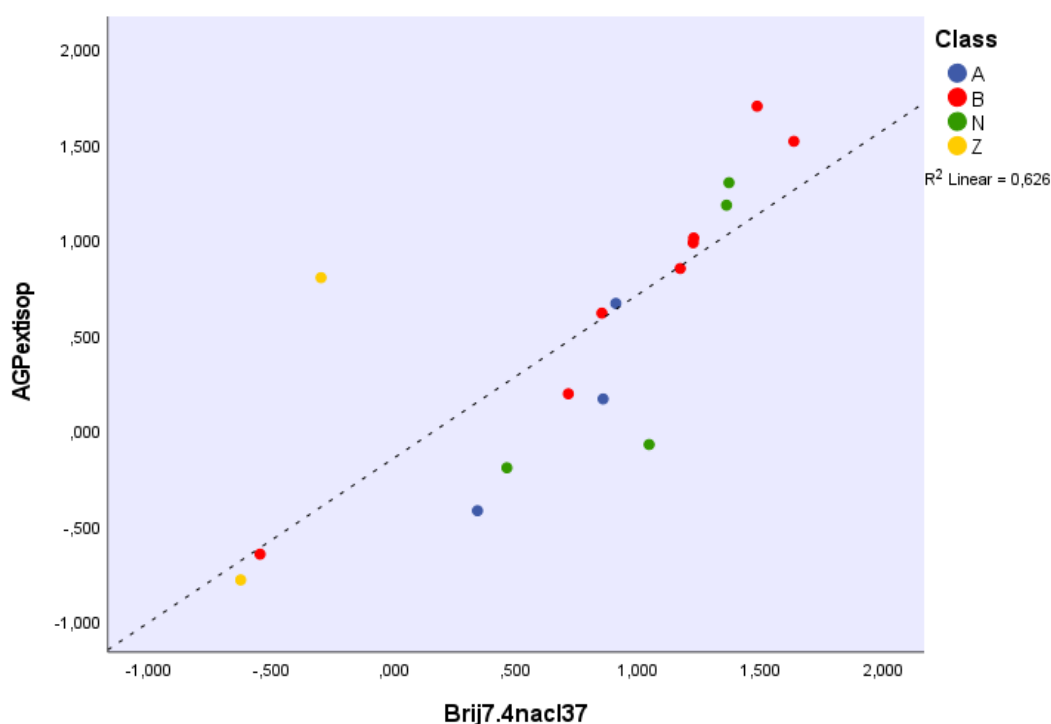
Όσον αφορά την μικκυλιακή χρωματογραφία θα πραγματοποιηθούν τρεις συσχετίσεις. Η πρώτη θα αφορά δεδομένα με τασιενεργό το Brij 7.4 NaCl37, η δεύτερη με το Tween και η τρίτη με το τασιενεργό SDS . Οι συσχετίσεις θα γίνουν για τιμές  $\log k_w$  100% υδατικής φάσης μεταξύ δεδομένων γραμμικής προεκβολής παρουσία 2-προπανόλης και δεδομένων από τα διαφορετικά τασιενεργά που αναφέρθηκαν.

Για τα δεδομένα του Brij 7.4 NaCl37 η εξίσωση που προκύπτει είναι η εξής:

$$\log k_{wAGP \text{ extr.IP}} = 0,860(\pm 0,172)\log k_{wBrij} - 0,151(\pm 0,177) \quad [34]$$

$$(n=17, R^2=0,626, s=0,478, F=25,1)$$

Οι παράμετροι F+ και F- δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικοί επομένως δεν μπορούσαν να βελτιώσουν το μοντέλο συσχέτισης. Η παρακάτω εικόνα απεικονίζει γραφικά την Εξίσωση [34].

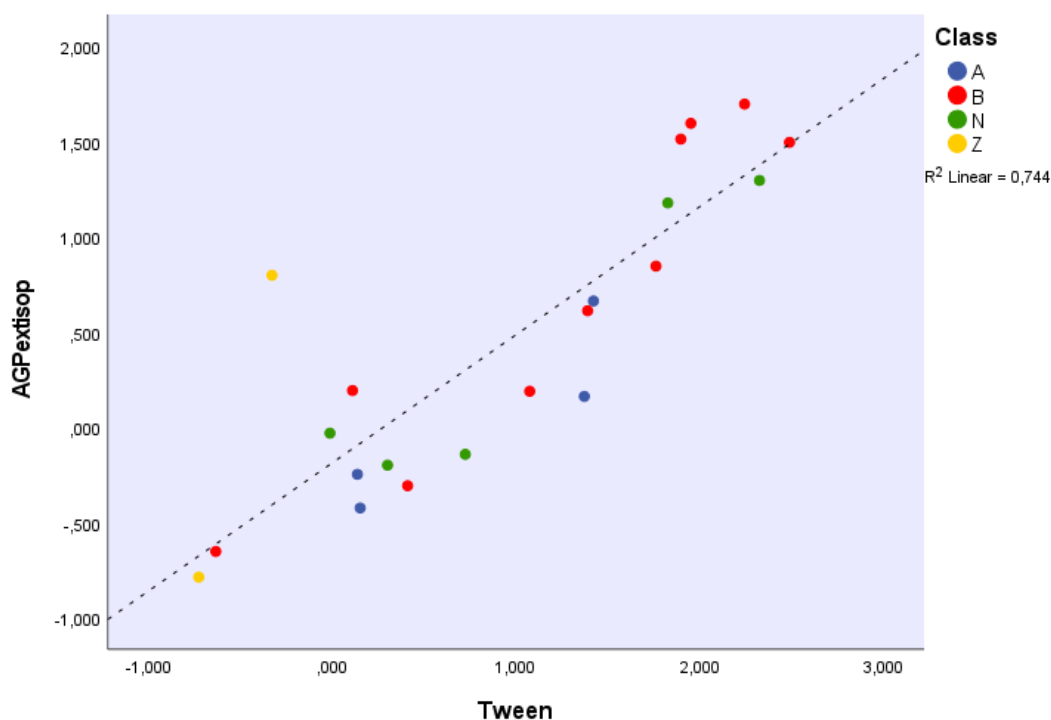


Εικόνα 19: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log k_{wAGP \text{ extr.IP}} - \log k_{wBrij}$

Παρομοίως ακολουθεί η συσχέτιση του παράγοντα κατακράτησης  $\log k_w$  χρωματογραφίας AGP και χρωματογραφίας μικκυλίων με τασιενεργό το Tween.

$$\log k_{wAGP \text{ extr.IP}} = 0,672(\pm 0,090)\log k_{wTween} - 0,188(\pm 0,124) \quad [35]$$

$$(n=21, R^2=0,744, s=0,410, F=55,2)$$



Εικόνα 20: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log k_{wAGP \text{ extr.IP}} - \log k_w \text{ Tween}$

Στην γραφική απεικόνιση της Εικόνας 20 παρατηρείται πως η κίτρινη κουκίδα πάνω αριστερά που αντιστοιχεί στην ένωση βανκομυκίνη ίσως αποτελεί έκτροπη τιμή/outlier. Πράγματι πρόκειται για οριακή έκτροπη τιμή (με υπόλοιπο, residual=2,9·S). Αφαιρώντας την προκύπτει η παρακάτω συσχέτιση με αρκετά βελτιωμένο συντελεστή συσχέτισης,  $R^2$ .

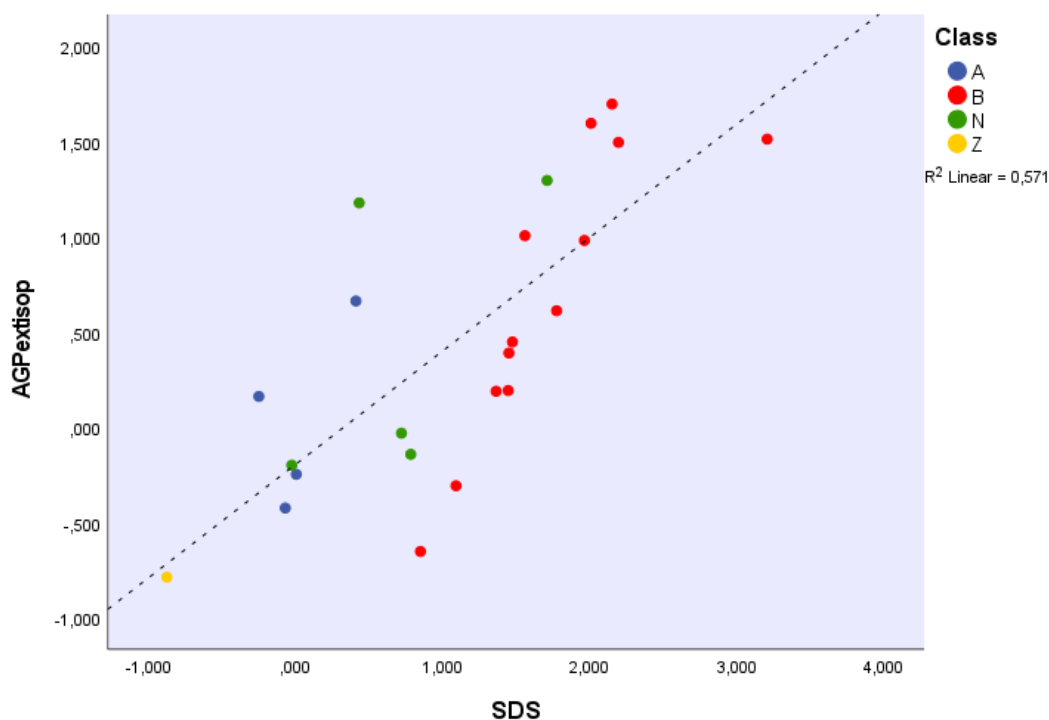
$$\log k_{wAGP \text{ extr.IP}} = 0,758(\pm 0,067)\log k_{w \text{ Tween}} - 0,335(\pm 0,094) \quad [36]$$

$$(n=20, R^2=0,876, s=0,291, F=127,4)$$

Τέλος, η τρίτη συσχέτιση αφορά το τασιενεργό SDS. Η εξίσωση και η γραφική παράσταση ακολουθούν.

$$\log k_{wAGP \text{ extr.IP}} = 0,595(\pm 0,112)\log k_{w \text{ SDS}} - 0,196(\pm 0,164) \quad [37]$$

$$(n=23, R^2=0,571, s=0,511, F=28,0)$$



Εικόνα 21: Γραφική απεικόνιση συσχέτισης  $\log_{kw}AGP \text{ extr. IP} - \log_{kw} SDS$

Παρατηρείται πως μεταξύ των τριών διαφορετικών συσχετίσεων καλύτερο συντελεστή συσχέτισης έχει η Εξίσωση [36] που αφορά το τασιενεργό Tween. Στην στήλη AGP πρωταρχικό ρόλο στον μηχανισμό έκλυσης έχει η λιποφιλία και δευτερευόντως οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ή οι δεσμοί υδρογόνου. Το Tween πρόκειται για ένα μη ιοντικό, ουδέτερο τασιενεργό όπου στην χρωματογραφία παρουσία του δεν υπάρχουν φορτισμένα κέντρα σε αντίθεση με το SDS το οποίο είναι ανιοντικό και έχει φορτισμένα κέντρα. Γίνεται κατανοητό λοιπόν πως η καλύτερη συσχέτιση AGP/Tween είναι απόρροια της μη ή δευτεροντως ύπαρξης ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και ο μηχανισμός έκλυσης οφείλεται κυρίως στην λιποφιλία (χρωματογραφία AGP) και στον μηχανισμό κατανομής με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (μικκυλιακή χρωματογραφία Tween).

### 3.8 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΕΓΕΘΗ

Οι συσχετίσεις που θα πραγματοποιηθούν σ' αυτή την ενότητα αφορούν την πρωτεϊνική σύνδεση και τον όγκο κατανομής. Για να προκύψει αξιόπιστο μοντέλο πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων θα πρέπει να υπάρχουν όσο το δυνατό περισσότερα δεδομένα. Για το λόγο αυτό θα συνδυαστούν τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής με τις μετρήσεις σε στήλες HSA και AGP που έχουν πραγματοποιηθεί στα πλαίσια διαφορετικών διπλωματικών εργασιών<sup>30, 31, 32, 33</sup> καθώς και με προηγούμενες επιστημονικές δημοσιεύσεις<sup>22, 34</sup>.

Για την ανάπτυξη και την αξιολόγηση ενός μοντέλου διαιρούμε την βάση δεδομένων σε δεδομένα εκμάθησης/training set (χρειάζονται για την ανάπτυξη του μοντέλου) και σε δεδομένα ελέγχου/ test set (για την επικύρωση του μοντέλου).

### 3.8.1 Πρωτεϊνική σύνδεση (%Plasma Protein Binding, %PPB)

Στην περίπτωση της AGP υπήρχαν στην βάση δεδομένων του Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας πολλά δεδομένα για χρήση ακετονιτριλίου ως οργανικού τροποποιητή (πάνω από 80 ενώσεις), οπότε δεν δοκιμάστηκαν τα δεδομένα αυτής της διπλωματικής που έχουν ληφθεί παρουσία διαλύτη 2-προπανόλης (τα 30 περίπου δεδομένα δεν είναι αρκετά για την ανάπτυξη και επικύρωση μοντέλου). Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως training set.

Ως δεδομένα ελέγχου/test set για την επικύρωση του μοντέλου και την σύγκριση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε test set 22 φαρμάκων ίδιο με παλαιότερες δημοσιεύσεις<sup>17, 35</sup>.

#### Μοντέλο No.1

Για την προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης έχουν προταθεί μεταξύ άλλων σιγμοειδή μοντέλα, που βασίζονται στην σχέση:

$$\%PPB = \frac{100}{1 + 10^{-(a_0 + a_1 \cdot \log k_{HSA} + a_2 \cdot \log k_{AGP} + \dots + a_n \cdot X_n)}} \quad [38]$$

Όπου,  $X_1, X_2, \dots, X_n$  πρόσθετες φυσικοχημικές ιδιότητες και  $a_0, a_1, \dots, a_n$  οι συντελεστές που προκύπτουν από μη γραμμική παλινδρόμηση.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ανθρώπινη αλβουμίνη (λευκωματίνη) του ορού είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του αίματος (σε ποσοστό 60%) και στην οποία οφείλεται κυρίως η δέσμευση όλων των φαρμάκων. Η  $\alpha_1$ -όξινη γλυκοπρωτεΐνη έχει πολύ μικρότερη παρουσία στο ανθρώπινο πλάσμα και επιπλέον έχει την τάση να δεσμεύει κυρίως βάσεις και δευτερευόντως ουδέτερες ενώσεις. Επομένως, με βάση αυτά μπορεί να γίνει κατανοητό πως η AGP έχει επικουρικό ρόλο στην δέσμευση βασικών και πιθανόν και ουδέτερων ενώσεων στο πλάσμα.

Για τον λόγο αυτό, στην ανάπτυξη του μοντέλου πρωτεϊνικής σύνδεσης ορίζεται η τιμή του  $\log k_{AGP}$  ίσο με το μηδέν για τα οξέα και τους αμφολύτες και για τις βάσεις ορίζεται η τιμή που έχει μετρηθεί. Με τον τρόπο αυτό μηδενίζεται η συμμετοχή της AGP στην πρωτεϊνική σύνδεση όξινων και αμφολυτικών ενώσεων, γεγονός που ισχύει. Για τις ουδέτερες ενώσεις δοκιμάζεται είτε να οριστεί  $\log k_{AGP}=0$  (δηλαδή να θεωρηθεί ως μηδενική η συμβολή της AGP στην δέσμευσή τους) είτε να τοποθετηθεί η τιμή που μετρήθηκε.



Δοκιμάζοντας ως τιμές της AGP τις τιμές για 100% υδατική φάση αλλά και παρουσία 5% και 10% ακετονιτριλίου (στην βιβλιογραφία εμφανίζεται αμφιβολία ως προς ποια είναι η τιμή που οδηγεί σε καλύτερες συσχετίσεις) είτε θεωρώντας ως μηδενική την συνεισφορά της AGP για ουδέτερες ενώσεις είτε όχι, το μοντέλο πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης χρησιμοποιεί ως πρόσθετο όρο την μέτρηση ΜΟΝΟ ΒΑΣΕΩΝ παρουσία 10% ακετονιτριλίου (οι υπόλοιπες ενώσεις θεωρούνται ως μηδενικές) και είναι το παρακάτω:

Πίνακας 5: Συντελεστές και στατιστικά στοιχεία μοντέλου (No.1) πρωτεϊνικής σύνδεσης

| $a_0$                    | $a_1$ ( $\log k_{HSA}$ ) | $a_2$ ( $\log k_{AGP}$ παρουσία 10% ACN μόνο για βάσεις, μηδέν στα υπόλοιπα) | $a_3$ (F <sup>-</sup> ) |      |                         |
|--------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------|-------------------------|
| $a_0 = -0,300 \pm 0,069$ | $a_1 = 0,777 \pm 0,132$  | $a_2 = 0,665 \pm 0,304$                                                      | $a_3 = 0,695 \pm 0,195$ | N=57 | $R^2 = 0,783$<br>S=15,8 |

Το τελικό μοντέλο δηλαδή είναι:

$$\%PPB = \frac{100}{1 + 10^{-(-0,300(\pm 0,069) + 0,777(\pm 0,132) \cdot \log k_{HSA} + 0,665(\pm 0,304) \cdot \log k_{AGP} + 0,695(\pm 0,195) \cdot F^-)}} \quad [39]$$

Στον παρακάτω πίνακα συγκρίνεται η πραγματική τιμή του test set των 22 φαρμάκων όπως έχει προσδιοριστεί<sup>35</sup> και η τιμή που προβλέπεται σύμφωνα με την Εξίσωση [39].

Πίνακας 6: Σύγκριση πειραματικού-υπολογιζόμενου ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης (μοντέλο No.1)

|    | Δραστική ένωση  | Πειραματική τιμή (%) | Τιμή που προβλέπει το μοντέλο |
|----|-----------------|----------------------|-------------------------------|
| 1. | Ceftriaxone     | 95,0                 | 37,4                          |
| 2. | Chloramphenicol | 54,0                 | 37,3                          |
| 3. | Cimetidine      | 18,5                 | 24,2                          |
| 4. | Cinoxacin       | 66,5                 | 66,6                          |

|     |                    |      |      |
|-----|--------------------|------|------|
| 5.  | Hydrocortisone     | 95,0 | 47,5 |
| 6.  | Isoxicam           | 96,0 | 92,2 |
| 7.  | Levofloxacin       | 32,3 | 51,7 |
| 8.  | Lornixicam         | 99,0 |      |
| 9.  | Meloxicam          | 99,3 | 97,0 |
| 10. | Methylprednisolone | 77,3 | 57,9 |
| 11. | Metoclopramide     | 33,3 | 59,5 |
| 12. | Minoxidil          | 0,0  | 45,7 |
| 13. | Nadolol            | 30,0 | 26,1 |
| 14. | Nalidixic acid     | 93,0 | 76,5 |
| 15. | Niflumic acid      | 90,0 | 94,8 |
| 16. | Omeprazole         | 95,0 | 63,6 |
| 17. | Pipemidic acid     | 30,0 | 37,4 |
| 18. | Piperacillin       | 19,0 | 58,8 |
| 19. | Salicylic acid     | 95,0 |      |
| 20. | Sulpiride          | 14,0 | 31,7 |
| 21. | Vancomycin         | 43,3 | 67,8 |
| 22. | Warfarin           | 98,8 | 92,8 |

Αν θεωρηθεί βάση επιτυχίας μία διαφορά 20% μεταξύ των δυο ποσοστών οι αποτυχημένες προβλέψεις έχουν επισημανθεί με κόκκινο χρώμα.

**Επιτυχημένες προβλέψεις: 13/20 (65%)**

### Μοντέλο Νο.2

Μία δεύτερη προσέγγιση χρησιμοποιεί τον λογάριθμο της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας (logarithm of the apparent affinity constant),  $\log K$ , η οποία έχει προταθεί από την Klara Valko και τους συνεργάτες της<sup>36</sup> και εκφράζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\log K = \log \frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \quad [40]$$

Ο αριθμός 101 στον παρονομαστή δικαιολογείται από το γεγονός πως η εξίσωση θα πρέπει να μπορεί να χρησιμοποιείται ακόμα και για φάρμακα που παρουσιάζουν 100% πρωτεϊνική σύνδεση (αν ήταν το 100 στον παρονομαστή αυτός θα μηδενίζονταν για φάρμακα που παρουσιάζουν 100% πρωτεϊνική σύνδεση).

Χρησιμοποιώντας τις ίδιες τρεις παραμέτρους με το προηγούμενο μοντέλο, λαμβάνουμε την τελική σχέση:

$$\log K = 0,864(\pm 0,105)\log k_{HSA} + 0,369(\pm 0,183)\log k_{AGP\ b,5\%} + 0,835(\pm 0,167)F^- - 0,377(\pm 0,078) \quad [41]$$

$$(n=55, R^2= 0,761, s=0,431, F=54,2)$$

Για τις 22 δραστικές ενώσεις του test set:

Πίνακας 7: Σύγκριση πειραματικού-υπολογιζόμενου ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης (μοντέλο No.2)

|     | Δραστική ένωση     | Πειραματική τιμή (%) | Τιμή που προβλέπει το μοντέλο |
|-----|--------------------|----------------------|-------------------------------|
| 1.  | Ceftriaxone        | 95,0                 | 34,8                          |
| 2.  | Chloramphenicol    | 54,0                 | 34,1                          |
| 3.  | Cimetidine         | 18,5                 | 25,1                          |
| 4.  | Cinoxacin          | 66,5                 | 70,0                          |
| 5.  | Hydrocortisone     | 95,0                 | 45,2                          |
| 6.  | Isoxicam           | 96,0                 | 95,1                          |
| 7.  | Levofloxacin       | 32,3                 | 51,4                          |
| 8.  | Lornixicam         | 99,0                 |                               |
| 9.  | Meloxicam          | 99,3                 | 99,0                          |
| 10. | Methylprednisolone | 77,3                 | 55,7                          |
| 11. | Metoclopramide     | 33,3                 | 55,8                          |
| 12. | Minoxidil          | 0,0                  | 43,2                          |
| 13. | Nadolol            | 30,0                 | 23,5                          |
| 14. | Nalidixic acid     | 93,0                 | 80,2                          |
| 15. | Niflumic acid      | 90,0                 | 97,3                          |
| 16. | Omeprazole         | 95,0                 | 63,6                          |
| 17. | Pipemidic acid     | 30,0                 | 34,3                          |
| 18. | Piperacillin       | 19,0                 | 61,4                          |
| 19. | Salicylic acid     | 95,0                 |                               |
| 20. | Sulpiride          | 14,0                 | 32,0                          |
| 21. | Vancomycin         | 43,3                 | 68,5                          |

|     |          |      |      |
|-----|----------|------|------|
| 22. | Warfarin | 98,8 | 95,6 |
|-----|----------|------|------|

Αν θεωρηθεί βάση επιτυχίας μία διαφορά 20% μεταξύ των δυο ποσοστών οι αποτυχημένες προβλέψεις έχουν επισημανθεί με κόκκινο χρώμα.

### Επιτυχημένες προβλέψεις: 12/20 (60%)

Το μοντέλο No.1 παρουσιάζει ελαφρώς καλύτερες επιτυχημένες προβλέψεις όσον αφορά το test set των 22 φαρμάκων.

### 3.8.2 Όγκος κατανομής ( $V_d$ )

Ο όγκος κατανομής είναι μια πολύ δύσκολη φαρμακοκινητική παράμετρος στην εκτίμηση της. Το μοντέλο που αναπτύχθηκε είναι το:

$$\log V_d = 0,340(\pm 0,092)\log k_{HSA} + 0,455(\pm 0,159)\log k_{AGP\ b,5\%} - 0,805(\pm 0,146)F^- + 0,207(\pm 0,067) \quad [42]$$

$$(n=56, R^2=0,651, s=0,380, F=32,3)$$

Η σύγκριση για τις 22 ενώσεις του test set παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8: Σύγκριση πειραματικής-υπολογιζόμενης τιμής όγκου κατανομής

|    | Δραστική ένωση  | Πειραματική τιμή (%) | Τιμή που προβλέπει το μοντέλο |
|----|-----------------|----------------------|-------------------------------|
| 1. | Ceftriaxone     | 0,14                 | 0,99                          |
| 2. | Chloramphenicol | 0,96                 | 1,74                          |
| 3. | Cimetidine      | 1,12                 | 1,18                          |
| 4. | Cinoxacin       | 0,23                 | 0,23                          |
| 5. | Hydrocortisone  | 0,54                 | 2,09                          |
| 6. | Isoxicam        |                      | 0,50                          |
| 7. | Levofloxacin    | 1,38                 | 1,79                          |
| 8. | Lornoxicam      | 0,20                 |                               |
| 9. | Meloxicam       | 10,00                | 0,78                          |

|     |                    |      |      |
|-----|--------------------|------|------|
| 10. | Methylprednisolone | 1,26 | 2,46 |
| 11. | Metoclopramide     | 3,30 | 2,72 |
| 12. | Minoxidil          | 2,86 | 2,02 |
| 13. | Nadolol            | 2,00 | 1,34 |
| 14. | Nalidixic acid     | 0,40 | 0,33 |
| 15. | Niflumic acid      | 0,12 | 0,61 |
| 16. | Omeprazole         | 0,33 | 2,43 |
| 17. | Pipemidic acid     | 1,90 | 1,60 |
| 18. | Piperacillin       | 1,35 | 0,20 |
| 19. | Salicylic acid     | 0,15 |      |
| 20. | Sulpiride          | 2,05 | 1,44 |
| 21. | Vancomycin         | 0,52 | 2,19 |
| 22. | Warfarin           | 0,15 | 0,52 |

Ως βάση επιτυχίας θεωρείται η τιμή του όγκου κατανομής,  $V_d$  να είναι από μισή έως διπλάσια της τιμής από τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι αποτυχημένες προβλέψεις.

**Επιτυχημένες προβλέψεις 11/19 (57,9%)**

#### 4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αναλύθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα.

- Ο οργανικός διαλύτης έχει επίδραση όχι μόνο στις τιμές  $\log k$  που προσδιορίζονται παρουσία του αλλά και στις τιμές  $\log k_w$  που προσδιορίζονται με γραμμική προεκβολή και αντιστοιχούν σε 100% υδατική φάση για ενώσεις που δεν μπορούν να μετρηθούν απευθείας χρησιμοποιώντας 100% υδατική φάση. Αυτό προφανώς οφείλεται σε αποκλίσεις από την γραμμικότητα της συνάρτησης  $\log k=f(\% \text{ οργανικού διαλύτη})$ .
- Φαίνεται πως οι πραγματικές τιμές  $\log k_w$  που μετρώνται απευθείας είναι περισσότερο κοντά στις τιμές γραμμικής προεκβολής που υπολογίζονται χρησιμοποιώντας οργανικό διαλύτη το ακετονιτρίλιο παρά την 2-προπανόλη.
- Οι συσχετίσεις που αφορούν την λιποφιλία και τους συντελεστές κατακράτησης άλλων χρωματογραφικών στηλών παρουσιάζουν μικρές διαφορές μεταξύ των δεδομένων των οργανικών τροποποιητών ακετονιτρίλιου και 2-προπανόλης. Στα μοντέλα που προέκυψαν συναντώνται σχεδόν παρόμοιοι συντελεστές συσχέτισης, ειδικότερα όταν εισάγονται στις εξισώσεις τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου επιτρέποντας έτσι την εύκολη χρήση τους ανεξαρτήτως δεδομένων οργανικού διαλύτη.
- Δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα προκειμένου να συγκριθούν τα φαρμακοκινητικά μοντέλα που στηρίζονται σε παρουσία 5% και 10% ακετονιτρίλιου ή 2-προπανόλης, 100% υδατικής φάσης (απευθείας μέτρηση) και 100% υδατικής φάσης που υπολογίζεται με γραμμική προεκβολή χρησιμοποιώντας δεδομένα που έχουν ληφθεί παρουσία ακετονιτρίλιου και 2-προπανόλης. Να σημειωθεί πως η στήλη AGP είναι η λιγότερο μελετημένη από όλες τις βιομιμητικές στατικές φάσεις και δεν υπάρχουν σαφείς οδηγίες για το ποιος είναι ο καλύτερος χρωματογραφικός δείκτης της AGP για βιομίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης ή του όγκου κατανομής.

## **5.ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ**

Αρχικά, προτείνεται η επέκταση των μετρήσεων σε όσο το δυνατόν περισσότερες φαρμακευτικές ενώσεις για τον προσδιορισμό των παραπάνω χρωματογραφικών δεικτών και την χρήση τους σε μοντέλα πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης, του όγκου κατανομής και της διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό προκειμένου να βρεθεί ποιός είναι ο πλέον κατάλληλος δείκτης για τις τρεις αυτές φαρμακοκινητικές παραμέτρους.

Επίσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί και μελέτη με την χρωματογραφική στήλη βυθισμένη σε υδατόλουτρο στους 37 °C αντι της θερμοκρασίας περιβάλλοντος για να γίνει ξεκάθαρο κατά πόσο οι (αναμενόμενες μικρές) διαφορές μπορούν να οδηγήσουν σε ελαφρώς καλύτερες συσχετίσεις.

## 6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μαρσέλος, Μ. *Συνοπτική Φαρμακολογία* (Ιωάννινα 2006)
2. Κόκοτος, Γ. & Μγκριώτη, Β. *Φαρμακοχημεία*. (Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015)
3. Langen P, Hucho F: "*Karl Lohmann and the Discovery of ATP*", *Angew Chem Int Ed Engl.* 47(10):1824-1827 (2008)
4. Καρίκας, Γ. *Φαρμακοκινητική* (Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα,ΤΕΙ Αθήνας)
5. Δημόπουλος, Β. & Τσαντίλη-Κακουλίδου, Α. *Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων*. (Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015)
6. Δημόπουλος, Β. *Επισημάνσεις της Χημικής Βιολογίας στη Φαρμακοχημεία* (Θεσσαλονίκη 2013)
7. Μαρσέλος,Μ. & Αντωνίου, Αικ. & Κωνσταντή,Μ. & Λεονταρίτης,Γ. & Μανωλόπουλος,Ευ. & Παππάς,Π. & Χαρκίτης,Π. *ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ,Μηχανισμοί δράσης των φαρμάκων* (Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015)
8. Dasgupta,A. *Monitoring Free Drug Concentration: Clinical Usefulness and Analytical Challenges* (2016)
9. Zsila,F. & Iwao,Y. *The drug binding site of human α1-acid glycoprotein:Insight from induced circular dichroism an electronic absorption spectra*, (2007)
10. Davis, P. J., Bosenberg, A., Davidson, A., Jimenez, N., Kharasch, E., Lynn, A. M., Tofovic, S. P. & Woefel, S. Chapter 7- *Pharmacology of Pediatric Anesthesia* (2011)
11. Alsanosi, S. M. M., Skiffington, C. & Padmanabhan, S. Chapter 17- *Pharmacokinetic Pharmacogenomics* (2014)
12. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Grouch, S.R. *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* (Κωσταράκη, 2007)
13. Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ. Ε. & Φούντζουλα, Χ. *Υγρή Χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία.Βασικές αρχές και παραδείγματα*.(Εκδόσεις Κάλλιπος,2015)
14. Hage, D. S. *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry-Chromatography*, 1-32 (2018)
15. Valko, K. L. *Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2016)
16. Tsopeles, F., Giaginis, C. & Tsantili-Kakoulidou, A. *Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery*. *Expert Opinion on Drug Discovery* 12:9, 885-896 (2017)



17. Tsopelas, F., Vallianatou, T. & Tsantili-Kakoulidou, A. *The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption*. European Journal of Pharmaceutical Sciences 81,82-93 (2016)
18. Tsopelas, F., Vallianatou, T. & Tsantili-Kakoulidou, A. *Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery*. Expert Opinion on Drug Discovery (2016)
19. Guizado, T. R. G. *Analysis of the structure and dynamics of human serum albumin*, Journal of Molecular Modeling (2014)
20. Fournier, T., Medjoubi-N, N. & Porquet, D. *Alpha-1 acid glycoprotein*, Biochimica et Biophysica Acta 1482,157-171 (2000)
21. Taguchi, K., Nishi, K., Chuang, V. T. G., Maruyama, T. & Otagiri, M. Chapter 6- *Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein-Structure and Function*, IntechOpen (2013)
22. Chrysanthakopoulos, M., Vallianatou, T., Giaginis, C. & Tsantili-Kakoulidou, A. *Investigation of the retention behavior of structurally diverse drugs on alpha<sub>1</sub> acid glycoprotein column: Insight on the molecular factors involved and correlation with protein binding data*, European Journal of Pharmaceutical Sciences 60, 24-31 (2014)
23. Vuignier, K., Schappler, J., Veuthey, J. L., Carrupt, P. A. & Martel, S. *Drug-protein binding: a critical review of analytical tools*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 398, 53-66 (2010)
24. Poole, C. F. Chapter 4-*The Column in Liquid Chromatography. The Essence of Chromatography*, 267-429 (2003)
25. Marina, M. L. & Garcia, M. A. *CHROMATOGRAPHY: LIQUID | Micellar Liquid Chromatography*, Encyclopedia of Separation Science, 726-737 (2000)
26. <https://www.rcsb.org/structure/1E78>
27. <https://www.rcsb.org/structure/3kq0>
28. Marina, M. L. & Garcia, M.A. *Evaluation of distribution coefficients in micellar liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, 780, 103-116 (1997)
29. <https://www.fishersci.fi/shop/products/barnstead-easypure-ii/p-4531548>
30. Μελαμπιανάκη, Ε. *Μελέτη έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων από στήλη α<sub>1</sub>-όξινης γλυκοπρωτεΐνης και χρήση της στην εκτίμηση του όγκου κατανομής και της πρωτεϊνικής σύνδεσης*, (Σεπτέμβριος 2020)
31. Νοτάρη, Ε. *Αξιολόγηση της υγροχρωματογραφίας ακινητοποιημένης α<sub>1</sub>-όξινης γλυκοπρωτεΐνης για την ταχεία εκτίμηση φαρμακοκινητικών παραμέτρων φαρμακευτικών μορίων*, (Ιούλιος 2019)
32. Αναγνωστοπούλου, Δ. *Μελέτη του μηχανισμού έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων από στήλη ακινητοποιημένης ανθρώπινης λευκωματίνης του ορού (HSA)-Συσχέτιση με φαρμακοκινητικά μεγέθη*, (Σεπτέμβριος 2019)

33. Παρουσή, Ε. *Επίδραση του οργανικού διαλύτη στους βιοχρωματογραφικούς δείκτες φαρμάκων με χρήση χρωματογραφίας ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA)*, (Σεπτέμβριος 2019)
34. Chrysanthakopoulos, M., Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A. *Retention of structurally diverse drugs in human serum albumin chromatography and its potential to simulate plasma protein binding*, Journal Of Chromatography A 1217,5761-5768 (2010)
35. Tsopeles, F., Danias, P., Pappa, A., Tsantili-Kakoulidou, A. *Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes*, Journal of Chromatography A 1621, 461027 (2020)
36. Valko, K., Nunhuck, S., Bevan, C., Abraham, M.H., Reynolds, D.P. *Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity*, J.Pharm. Sci 92, 2236-2248 (2003)
37. Kamble, S., Loadman, P., Abraham, M. H., Liu, X. *Structural properties governing drug-plasma protein binding determined by high-performance liquid chromatography method*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 149, 16-21 (2018)
38. Barbato, F., Martino di, G., Grumetto, L., Rotonda, M. I. L. *Retention of quinolones of human serum albumin and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein HPLC columns: Relationships with different scales of lipophilicity*, European Journal of Pharmaceutical Sciences 30, 211-219 (2007)
39. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. *Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας* (Π. Χ Πασχαλίδης, 2016)
40. Tsopeles, F., Malaki, N., Vallianatou, T., Chrysanthakopoulos, M., Vrakas, D., Ochsenkühn-Petropoulou, M. & Tsantili-Kakoulidou, A. *Insight into the retention mechanism on Immobilized Artificial Membrane Chromatography using two stationary phases*. Journal of Chromatography A 1396,25-33 (2015)