



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Ι: Χημικών Επιστημών

Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής  
Χημείας

***«Υγροχρωματογραφία μικκυλίων παρουσία του  
κατιοντικού τασιενεργού CTAB: Μελέτη μηχανισμού  
έκλουσης και εφαρμογή στην πρόβλεψη βιολογικών  
διαδικασιών»***

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τσιώμου Ολυμπία

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

ΑΘΗΝΑ 2021



## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Ι της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Ε.Μ.Π., Φώτιου Τσόπελα, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Πρωτίστως, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Φώτιο Τσόπελα, Επίκουρο Καθηγητή Ε.Μ.Π., για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα. Τον ευχαριστώ για το χρόνο που διέθεσε για την παρακολούθηση της προόδου μου τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας, καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή της συνεργασίας μας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κ. Λαμπρινή-Αρετή Τσακανίκα, μέλος του Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (ΕΔΙΠ), για τις υποδείξεις και την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συμφοιτήριά μου Μελίνα Μαζαράκη για την άψογη συνεργασία μας στα πλαίσια των πειραμάτων, την αμοιβαία βοήθεια και τη συμπαράσταση.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην παιδική μου φίλη και συμφοιτήτρια, Αγάπη, για την ουσιαστική βοήθεια, τις συμβουλές και την υποστήριξή της. Τέλος, ευχαριστώ πολύ τους γονείς μου, Χρήστο και Ειρήνη, και τα αδέρφια μου, Γιάννη και Αγαθή, για την αμέριστη στήριξη και την κατανόησή τους, καθώς και όλους τους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου στη διάρκεια των σπουδών μου.

Ολυμπία Τσιώμου

Αθήνα, Ιούνιος 2021



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανάπτυξη νέων φαρμάκων είναι μια ατέρμονη διαδικασία που επηρεάζεται σημαντικά από περιβαλλοντικούς παράγοντες, από την εμφάνιση νέων ασθενειών, καθώς επίσης και από την εξέλιξη των επιστημών και της τεχνολογίας. Πρόκειται για μια ιδιαίτερα χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει πολυάριθμα στάδια μέχρι να υλοποιηθεί. Η πορεία προς την ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου ξεκινά από προκλινικές μελέτες, συνεχίζεται με κλινικές δοκιμές και καταλήγει στην κυκλοφορία του φαρμάκου στην αγορά, εφόσον όλα τα στάδια της διαδικασίας έχουν ολοκληρωθεί με επιτυχία και έχει ληφθεί η απαραίτητη έγκριση από τους αρμόδιους ρυθμιστικούς φορείς. Καθοριστική στην ανάπτυξη μιας φαρμακευτικής ένωσης είναι η μελέτη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων της (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, απέκκριση), της τοξικότητάς της, των δεδομένων λιποφιλίας της, αλλά και των φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων, οι οποίες αφορούν τη δράση της ουσίας αφότου φτάσει στο μόριο-στόχο της. Πολύτιμο εργαλείο στη μελέτη των εν λόγω ιδιοτήτων συνιστούν οι διάφορες τεχνικές βιομimetικής χρωματογραφίας, οι οποίες χρησιμοποιούν βασικές αρχές της υγρής χρωματογραφίας. Τέτοιες τεχνικές είναι η χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης (HPAC), η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM) και η υγροχρωματογραφία μικκυλίων (MLC), με την τελευταία να πλεονεκτεί ως προς το διαχωρισμό των ενώσεων και να συναντά ευρύ φάσμα εφαρμογών στη Φαρμακευτική Χημεία.

Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματεύεται τη μελέτη του μηχανισμού έκλυσης μιας σειράς φαρμακευτικών ενώσεων με τη μέθοδο της υγροχρωματογραφίας μικκυλίων και τη συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησής τους με φαρμακοκινητικά μεγέθη. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν οι συντελεστές κατακράτησης 47 φαρμακευτικών ενώσεων ποικίλης δομής και φαρμακολογικής δράσης. Ως κινητή φάση, χρησιμοποιήθηκε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS) παρουσία του κατιοντικού τασιενεργού Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100% υδατική και ρυθμίστηκε σε δύο διαφορετικές τιμές pH, 7.4 και 5.5. Η ρύθμιση στις δύο συγκεκριμένες τιμές pH έγινε με σκοπό την προσομοίωση του περιβάλλοντος του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς η τιμή 7.4 αντιπροσωπεύει το pH του αίματος και του παχέος εντέρου, ενώ η τιμή 5.5 αντιστοιχεί στο pH του λεπτού εντέρου. Η μέτρηση σε pH 5.5 έχει σημασία για όξινα και πιθανώς για αμφολυτικά φάρμακα, τα οποία σε αυτό το pH αναμένεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη κυτταρική διαπερατότητα λόγω μειωμένου ιοντισμού. Η στήλη κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων παρέμεινε βυθισμένη σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C, ώστε να προσομοιάζεται η θερμοκρασία του ανθρώπινου οργανισμού. Με βάση τους χρόνους ανάσχεσης που προέκυψαν κατά την πειραματική διαδικασία για καθεμία από τις ουσίες που μελετήθηκαν υπολογίστηκαν οι συντελεστές κατακράτησης ( $\log k$ ). Οι συντελεστές αυτοί συσχετίστηκαν με τους συντελεστές κατακράτησης που προέκυψαν από τη μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία των τασιενεργών Brij-35, Tween20, SDS και Triton X-100, καθώς επίσης και με τους συντελεστές της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM). Αντίστοιχες συσχετίσεις πραγματοποιήθηκαν και με τους συντελεστές μερισμού ( $\log P$ ) και κατανομής ( $\log D$ ), οι οποίοι εκφράζουν τη

λιποφιλία των ενώσεων. Τα αποτελέσματα των συσχετίσεων επιβεβαίωσαν τον καθοριστικό ρόλο της λιποφιλίας στην εκλουστική συμπεριφορά των ενώσεων, καθώς και την ιδιότητα του CTAB, ως θετικά φορτισμένου τασιενεργού, να αλληλεπιδρά με ηλεκτροστατικές δυνάμεις με τα ιοντισμένα οξέα, τα οποία και συγκρατούνται περισσότερο από στη στήλη. Στη συνέχεια, έγινε μελέτη της επίδρασης της μεταβολής του pH για τα 22 από τα 47 φάρμακα που μελετήθηκαν σε pH 5.5 τόσο για το CTAB, όσο και για τα υπόλοιπα τέσσερα τασιενεργά. Όπως αναμενόταν, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη κατακράτηση των όξινων ενώσεων και μικρότερη των βασικών σε όξινο pH. Τα ουδέτερα παρουσίασαν αμελητέες μεταβολές, ενώ οι αμφολύτες διττή συμπεριφορά. Τέλος, οι συντελεστές  $\log k_{CTAB}$  που μετρήθηκαν πειραματικά χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης ορισμένων βασικών φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν μοντέλα για την πρωτεϊνική σύνδεση (% PPB), τον όγκο κατανομής ( $V_d$ ) και τη διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB), με τα δύο πρώτα να κρίνονται ικανοποιητικά.

**Λέξεις-Κλειδιά:** βιομμητική χρωματογραφία, CTAB, λιποφιλία, συντελεστής κατακράτησης, πρωτεϊνική σύνδεση, όγκος κατανομής, αιματοεγκεφαλικός φραγμός

## ABSTRACT

The development of new drugs is an endless process that is significantly influenced by environmental factors, the emergence of new diseases, as well as the evolution of science and technology. It is a very time consuming and expensive process, which involves numerous stages until it is implemented. The process of developing a new drug starts with pre-clinical studies, continues with clinical trials and ends with the release of the drug on the market, provided that all stages of the process have been successfully completed and the necessary approval has been obtained from the relevant regulatory bodies. Crucial to the development of a pharmaceutical compound is the study of its pharmacokinetic properties (absorption, distribution, metabolism, excretion), as well as toxicity, its lipophilicity data, but also the pharmacodynamic properties, which relate to the action of the substance after reaching its target molecule. The various biomimetic chromatography techniques, which use basic principles of liquid chromatography, are a valuable tool in the study of these properties. Such techniques are High Performance Affinity Chromatography (HPAC), Immobilized Artificial Membrane Chromatography (IAM) and Micellar Liquid Chromatography (MLC), the latter having the advantage of separating compounds and meeting a wide range of applications in Pharmaceutical Chemistry.

In this context, the present diploma thesis deals with the study of the elution mechanism of a number of drug compounds by the method of micellar liquid chromatography and the correlation of their retention factors with pharmacokinetic quantities. For this purpose, the retention factors of 47 pharmaceutical compounds of various structure and pharmacological activity were measured. As the mobile phase, phosphate buffer saline (PBS) in the presence of the cationic surfactant Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was used. The mobile phase used was 100% aqueous and was adjusted to two different pH values, 7.4 and 5.5. Measurement at pH 5.5 should be performed for acidic and zwitterionic drugs because higher cell permeability is anticipated for acidic and perhaps for zwitterionic drugs as a result of reduced ionization. The adjustment to the two specific pH values was made in order to simulate the environment of the human body, as the value 7.4 represents the pH of the blood and the colon, while the value 5.5 corresponds to the pH of the small intestine. The column was immersed in a 37 ° C water bath during the experiments to simulate the temperature of the human body. Based on the retention times that occurred during the experimental procedure for each of the substances studied, the retention coefficients ( $\log k$ ) were calculated. These coefficients were correlated with the retention coefficients obtained from micellar chromatography in the presence of the surfactants Brij-35, Tween20, SDS and Triton X-100, as well as the immobilized membrane chromatography (IAM) coefficients. Corresponding correlations were made with partition coefficient ( $\log P$ ) and distribution coefficient ( $\log D$ ), which express the lipophilicity of the compounds. The results of the correlations confirmed the crucial role of lipophilicity in the eluting behavior of the compounds, as well as the property of CTAB, as a positively charged surfactant, to interact with electrostatic forces with ionic acids, which are more retained in the column. The effect of pH change was then studied for 22 of the 47 drugs studied at pH 5.5 for both CTAB and the other four surfactants. As expected, greater retention of

acidic compounds and lower retention of bases was observed at acidic pH. Neutrals showed negligible changes, while ampholytes showed dual behavior. Finally, the  $\log k_{\text{CTAB}}$  coefficients measured experimentally were used to develop prediction models for some basic pharmacokinetic properties. Specifically, models for protein binding (% PPB), volume of distribution (Vd) and blood-brain barrier (BBB) were developed, with the first two being considered satisfactory.

**Keywords:** biomimetic chromatography, CTAB, lipophilicity, retention factor, protein binding, volume of distribution, blood-brain barrier



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες .....	ii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	iv
ABSTRACT.....	vi
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xi
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	xii
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	xii
1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ .....	1
1.1 Εισαγωγή .....	1
1.1.1 Η επιστήμη της φαρμακοχημείας .....	1
1.1.2 Κατηγοριοποίηση φαρμάκων .....	1
1.2 Διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμάκων .....	2
1.2.1 Αναγκαιότητα ανάπτυξης νέων φαρμάκων .....	2
1.2.2 Η πορεία προς την ανακάλυψη νέων φαρμάκων .....	3
1.3 Προκλινική έρευνα.....	3
1.3.1 Στόχος δράσης των φαρμάκων .....	3
1.3.2 Ο ρόλος της γενετικής.....	4
1.3.3 Οικονομικοί παράγοντες στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων .....	5
1.4 Κλινικές δοκιμές.....	6
1.4.1 Φάσεις κλινικών δοκιμών .....	6
1.4.2 Ρυθμιστικοί φορείς.....	9
2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	12
2.1 Φαρμακοκινητική – ADME (ADMET).....	12
2.1.1 Απορρόφηση (Absorption) .....	12
2.1.2 Κατανομή (Distribution).....	15
2.1.3 Μεταβολισμός (Metabolism) .....	19
2.1.4 Απέκκριση (Excretion) .....	20
2.1.5 Τοξικότητα (Toxicity) .....	20
2.2 Βασικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες .....	21
2.2.1 Λιποφιλία .....	21
2.2.2 Συντελεστής μερισμού (P).....	22
2.2.3 Συντελεστής κατανομής (D) .....	23
2.3 Φαρμακοδυναμική .....	24
3. ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ .....	26
3.1 Βασικές έννοιες της χρωματογραφικής ανάλυσης .....	26

3.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) .....	26
3.3 Χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης (HPAC) .....	27
3.3.1 Βασικές αρχές της HPAC .....	27
3.3.2 Η HPAC στην ανάλυση φαρμάκων.....	28
3.4 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM).....	29
3.5 Μικκυλιακή Χρωματογραφία (MLC).....	31
3.5.1 Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων (IPC) και MLC .....	32
3.5.2 Τασιενεργές ουσίες.....	32
3.5.3 Στατική και κινητή φάση στην MLC.....	35
3.5.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα MLC .....	38
3.5.5 Εφαρμογές MLC .....	39
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	41
4.1 Σκοπός.....	41
4.2 Αντιδραστήρια .....	41
4.3 Οργανολογία.....	41
4.4 Πειραματική διαδικασία.....	43
4.4.1 Στατική φάση .....	43
4.4.2 Παρασκευή κινητής φάσης .....	43
4.4.3 Προετοιμασία δειγμάτων .....	44
4.4.4 Διεξαγωγή Μετρήσεων.....	44
4.5 Φάρμακα που μελετήθηκαν.....	45
4.6 Στατιστική ανάλυση μετρήσεων.....	53
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ .....	54
5.1 Δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου .....	54
5.2 Δεδομένα MLC.....	56
5.3 Δεδομένα IAM.....	58
5.4 Δεδομένα φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (%PPB, $V_d$ , logBBB) .....	60
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	63
6.1 Συντελεστές κατακράτησης σε pH 7.4 και 5.5 (log $k_{CTAB}$ ).....	63
6.2 Σύγκριση εύρους log $k_{CTAB}$ με άλλα τασιενεργά σε pH 7.4.....	65
6.3 Συσχέτιση log $k_{CTAB}$ με συντελεστές λιποφιλίας.....	65
6.3.1 Συσχέτιση log $k_{CTAB}$ με το συντελεστή μερισμού logP.....	66
6.3.2 Συσχέτιση log $k_{CTAB}$ με το συντελεστή κατανομής logD.....	67
6.4 Συσχέτιση με άλλα είδη μικκυλιακής χρωματογραφίας .....	69
6.4.1 Συσχέτιση log $k_{CTAB}$ με τους συντελεστές log $k_{Brij-35}$ .....	69

6.4.2	Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με τους συντελεστές $\log k_{Tween20}$ .....	70
6.4.3	Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με τους συντελεστές $\log k_{TritonX-100}$ .....	72
6.4.4	Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με τους συντελεστές $\log k_{SDS}$ .....	73
6.4.5	Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με τους συντελεστές $\log k_{IAM.DD2}$ .....	74
6.5	Μελέτη επίδρασης του pH στον ιοντισμό .....	75
6.6	Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με φαρμακοκινητικές ιδιότητες .....	77
6.6.1	Συσχέτιση με πρωτεϊνική σύνδεση (% PPB) .....	77
6.6.2	Συσχέτιση με τον όγκο κατανομής ( $V_d$ ) .....	81
6.6.3	Συσχέτιση με διέλευση από αιματοεγκεφαλικό φραγμό ( $\log BBB$ ) .....	83
7.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	86
8.	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑ .....	89
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	91

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.</b> Φάρμακα που μελετήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους .....	46
<b>Πίνακας 2.</b> Δεδομένα συντελεστών μερισμού $\log P$ , συντελεστών κατανομής $\log D_{7.4}$ , $\log D_{5.5}$ και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου των φαρμάκων που μελετήθηκαν .....	54
<b>Πίνακας 3.</b> Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης MLC για τα τασιενεργά Brij-35, Tween20, SDS και Triton x-100.....	56
<b>Πίνακας 4.</b> Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της IAM.....	58
<b>Πίνακας 5.</b> Δεδομένα $\log k_{CTAB}$ , $F^+$ , $F^-$ σε pH 7,40, %PPB, $V_d$ και $\log BBB$ , για τις 92 φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν .....	60
<b>Πίνακας 6.</b> Συντελεστές κατακράτησης σε pH 7.4 και 5.5 ( $\log k_{CTAB}$ ) .....	63
<b>Πίνακας 7.</b> Σύγκριση εύρους τιμών του $\log k$ για τα διάφορα τασιενεργά και τη στήλη IAM.DD2.....	65
<b>Πίνακας 8.</b> Διαφορά $\log k^{7.4-5.5}$ για τα CTAB, Brij-35, Tween20, Triton X-100, τη στήλη IAM.DD2 και το συντελεστή κατανομής $\log D$ .....	75
<b>Πίνακας 9.</b> Συντελεστές εξίσωσης μοντέλου % PPB και στατιστικά στοιχεία πολλαπλής παλινδρόμησης.....	77
<b>Πίνακας 10.</b> Πειραματικές τιμές % PPB και τιμές προβλεπόμενες από το μοντέλο Νο1 .....	78
<b>Πίνακας 11.</b> Πειραματικές τιμές % PPB και τιμές προβλεπόμενες από το μοντέλο Νο2 .....	80
<b>Πίνακας 12.</b> Πειραματικές τιμές όγκου κατανομής, $V_d$ και τιμές προβλεπόμενες από το μοντέλο.....	83
<b>Πίνακας 13.</b> Πειραματικές τιμές $BBB$ και προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές ...	85

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η πορεία προς την κυκλοφορία ενός φαρμάκου .....	7
Εικόνα 2. Οι 4 φάσεις των κλινικών δοκιμών .....	9
Εικόνα 3. Κατάσταση παγκόσμιας αγοράς φαρμάκων .....	11
Εικόνα 4. Οι 4 κλάσεις του Βιοφαρμακευτικού Συστήματος Ταξινόμησης .....	14
Εικόνα 5. Δομή της HSA .....	17
Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) .....	18
Εικόνα 7. Τυπικό HPLC σύστημα .....	27
Εικόνα 8. Δομή των φάσεων της IAM .....	30
Εικόνα 9. Χημική δομή SDS .....	33
Εικόνα 10. Χημική δομή Brij-35 .....	33
Εικόνα 11. Χημική δομή CTAB .....	33
Εικόνα 12. (a) δομή μικκυλίου, (b) δομή αντίστροφου μικκυλίου .....	34
Εικόνα 13. Τα πιο κοινά τασιενεργά στην MLC και τα χαρακτηριστικά τους .....	35
Εικόνα 14. Ισορροπία φάσεων στην MLC .....	37
Εικόνα 15. Χρωματογραφική διάταξη.....	42
Εικόνα 16. Στήλη αντιστρόφου φάσεως HS C18 Supelco .....	43
Εικόνα 17. Παρασκευή κινητής φάσης: (a) ανάδευση, (b) διήθηση.....	44

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με το συντελεστή $\log P$ .....	67
Διάγραμμα 2. Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με το συντελεστή κατανομής $\log D_{7.4}$ .....	68
Διάγραμμα 3. Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με $\log k_{Brij-35}$ .....	70
Διάγραμμα 4. Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με $\log k_{Tween20}$ .....	71
Διάγραμμα 5. Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με $\log k_{Triton X-100}$ .....	72
Διάγραμμα 6. Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με $\log k_{SDS}$ .....	73
Διάγραμμα 7. Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με $\log k_{IAM.DD2}$ .....	74
Διάγραμμα 8. Συσχέτιση $\log V_d$ του training set με $\log k_{CTAB}$ .....	81
Διάγραμμα 9. Συσχέτιση $\log V_d$ του training set με $\log k_{CTAB}$ των βάσεων .....	82
Διάγραμμα 10. Συσχέτιση $\log BBB$ του training set με το συντελεστή $\log k_{CTAB}$ ....	84



# 1.ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

## 1.1 Εισαγωγή

Τα φάρμακα αναμφισβήτητα αποτελούν πολύτιμα αγαθά για τον άνθρωπο και η ανάγκη για συνεχή εξέλιξή τους είναι αλληλένδετη με την ανθρώπινη εξέλιξη. Ο ρόλος τους είναι καθοριστικός για την πρόληψη και την αντιμετώπιση των ασθενειών με τις οποίες μπορεί να έρθει αντιμέτωπος ο άνθρωπος στη διάρκεια της ζωής του. Τα φάρμακα έκαναν την εμφάνισή τους από την αρχαιότητα στην πρώιμη μορφή των φυτών με θεραπευτικές ιδιότητες και δράσεις έναντι του ανθρώπινου πόνου. Στην πορεία μέχρι τη σύγχρονη εποχή η εξέλιξη των φαρμάκων ήταν ραγδαία. Αξιοσημείωτες, όμως, υπήρξαν και οι μεταβολές στην ανάγκη για ανακάλυψη νέων φαρμάκων, καθώς ολοένα και περισσότερες ασθένειες έκαναν την εμφάνισή τους κατά την πάροδο του χρόνου. Το γεγονός αυτό γέννησε την ανάγκη για την ανάπτυξη της σύγχρονης φαρμακευτικής βιομηχανίας από την αρχική της μορφή μέχρι το προηγμένο στάδιο στο οποίο βρίσκεται σήμερα. (1)

### 1.1.1 Η επιστήμη της φαρμακοχημείας

Το βασικό αντικείμενο της Φαρμακοχημείας είναι η ανακάλυψη νέων ενώσεων οι οποίες λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα. Στα πλαίσια της σύνθεσης και της ανάπτυξης των εν λόγω ενώσεων η Φαρμακοχημεία επεκτείνεται και σε άλλα αντικείμενα. Συγκεκριμένα, ασχολείται με τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων που παρατηρούνται στις νέες ενώσεις με τους υποδοχείς τους (μόρια-στόχους), τις μεταβολικές ιδιότητες των ουσιών, καθώς και με τις ιδιότητες απορρόφησης και κατανομής. Η Φαρμακοχημεία είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με διάφορες επιστήμες, διότι για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων απαιτούνται συνδυασμένες γνώσεις από διάφορους επιστημονικούς κλάδους, όπως αυτοί της Χημείας, της Βιολογίας και της Ιατρικής. (2)

### 1.1.2 Κατηγοριοποίηση φαρμάκων

Τα φάρμακα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με διάφορους τρόπους. Ένας από αυτούς είναι με βάση τη θεραπευτική δράση για την οποία προορίζονται. Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικές από τις βασικότερες κατηγορίες φαρμάκων και περιγράφεται συνοπτικά ο μηχανισμός δράσης τους.

#### **Αναλγητικά, Κατασταλτικά, Μυοχαλαρωτικά**

Πρόκειται κυρίως για ισχυρά φάρμακα που χορηγούνται για την καταπολέμηση του πόνου, τα οποία, ιδίως στην περίπτωση των οπιοειδών, δρουν μέσω της διέγερσης των μ-υποδοχέων του κεντρικού νευρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Συχνά, η χορήγησή τους οδηγεί στην απελευθέρωση ισταμίνης, με συνήθεις παρενέργειες την

περιφερική αγγειοδιαστολή, το βρογχόσπασμο και τον κνησμό. Άλλες σοβαρές παρενέργειές τους είναι η καταστολή του αναπνευστικού συστήματος, η υπόταση, η βραδυκαρδία κ.α. Ακόμη, τα κατασταλτικά φάρμακα είναι κυρίως βενζοδιαζεπίνες που διεγείρουν τους ανασταλτικούς υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (Gamma AminoButyric Acid, GABA) στον εγκέφαλο και προκαλούν αγχώλυση, ύπνο, αμνησία, ενώ έχουν και αντιεπιληπτική δράση. (3)

### **Αντιβιοτικά**

Τα αντιβιοτικά είναι ουσίες που δρουν αναστέλλοντας την ανάπτυξη συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Κάθε ομάδα αντιβιοτικών έχει συγκεκριμένο στόχο και μοναδικά φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, κάθε αντιβιοτικό δρα εκλεκτικά ως προς συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών. Σημαντικός παράγοντας στην ορθή χορήγηση των εν λόγω φαρμάκων είναι να πραγματοποιείται όταν υπάρχει λοίμωξη από κάποιο μικρόβιο και να μην γίνεται αλόγιστη χρήση τους. (4)

### **Αντιφλεγμονώδη**

Η θεραπευτική δράση των αντιφλεγμονωδών φαρμάκων βασίζεται στην κατάποση κυκλοοξυγενάσης (COX), ενός ενζύμου που παράγει προσταγλαδίνες (PGs). Οι παρενέργειες που προκαλούν τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα οφείλονται σε γαστρική και νεφρική τοξικότητα. (5)

### **Αντικαταθλιπτικά – Αντιψυχωσικά**

Ο μηχανισμός δράσης της συγκεκριμένης κατηγορίας φαρμάκων δεν είναι μέχρι και σήμερα απόλυτα κατανοητός, καθώς είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος. Η δράση των αντικαταθλιπτικών και αντιψυχωσικών φαρμάκων είναι παρεμφερής και οφείλεται σε παράγοντες, όπως την καταστολή των νευροδιαβιβαστικών υποδοχέων εκτός της ντοπαμίνης και τον αποκλεισμό νευροδιαβιβαστών μονοαμίνης. Προκαλούν επιδράσεις στον ύπνο, μειώνουν τα επίπεδα κορτιζόλης και αυξάνουν τους νευροτροφικούς παράγοντες. Τα συγκεκριμένα φάρμακα θα πρέπει να χορηγούνται στην ελάχιστη επιτρεπτή δόση λόγω των ισχυρών παρενεργειών τους, ενώ η συνεχής παρακολούθηση των ασθενών που βρίσκονται υπό αγωγή με φάρμακα αυτής της κατηγορίας κρίνεται αναγκαία. (6)

## **1.2 Διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμάκων**

### **1.2.1 Αναγκαιότητα ανάπτυξης νέων φαρμάκων**

Ένα φάρμακό ορίζεται ως μια χημική ένωση που χρησιμοποιείται για την πρόληψη ή τη θεραπεία κάποιας ασθένειας είτε στον άνθρωπο, είτε σε ζώα ή φυτά. Στη σύγχρονη εποχή η ανάγκη ανακάλυψης νέων φαρμάκων είναι επιτακτική, καθώς υπάρχουν ασθένειες, οι οποίες μέχρι και σήμερα δεν μπορούν να αντιμετωπισθούν φαρμακευτικά σε βαθμό πλήρους θεραπείας του ασθενή. Για παράδειγμα, μία τέτοια ασθένεια που έκανε την εμφάνισή της τη δεκαετία του 1980 είναι το σύνδρομο της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS). Σήμερα, κατόπιν πολυετούς επιστημονικής



έρευνας, υπάρχει σημαντική πρόοδος στην βελτίωση της ποιότητας ζωής των ατόμων με AIDS, όμως δεν έχει βρεθεί θεραπεία της νόσου. Ακόμα, υπάρχουν ασθένειες η φαρμακευτική αντιμετώπιση των οποίων χρίζει βελτίωσης ή και ολικής αναθεώρησης, διότι με την εξέλιξη της επιστήμης συνεχώς προκύπτουν νέα δεδομένα για την εξέλιξη της κάθε νόσου. Τέλος, είναι γνωστό ότι υπάρχουν και ασθένειες που πρόσφατα έχουν εμφανισθεί και οι μελέτες αντιμετώπισής τους βρίσκονται ακόμη σε αρχικό στάδιο. Αυτό αποτελεί μεγαλύτερη πρόκληση για τους ειδικούς, ενώ συνάμα επιβάλλει μεγαλύτερες απαιτήσεις για την άμεση ανάπτυξη της αντίστοιχης θεραπείας. Χαρακτηριστικό και επίκαιρο παράδειγμα νέας ασθένειας που μαστίζει τη σύγχρονη ανθρωπότητα αποτελεί η πανδημία του νέου κορωνοϊού, η οποία προκαλεί εκδηλώσεις της νόσου COVID-19. Οι εκδηλώσεις αυτές συχνά είναι ασυμπτωματικές ή ήπια συμπτωματικές, ωστόσο σε ένα σημαντικό ποσοστό των νοσούντων προκαλούν σοβαρή λοίμωξη του αναπνευστικού που μπορεί να επιφέρει ακόμα και θάνατο. (2), (7)

Γίνεται, λοιπόν, σαφές ότι εξαιτίας της εμφάνισης τέτοιων ασθενειών σε συνδυασμό με των ήδη υπαρχόντων, η αναγκαιότητα ανάπτυξης ενώσεων με αποτελεσματικές θεραπευτικές ιδιότητες γίνεται ολοένα και μεγαλύτερη.

## **1.2.2 Η πορεία προς την ανακάλυψη νέων φαρμάκων**

Η ανακάλυψη νέων φαρμάκων στο παρελθόν βασιζόταν κατά κύριο λόγο στην παρατήρηση των δράσεων μεμονωμένων χημικών ουσιών ή φυτικών εκχυλισμάτων σε ζώα ή στον άνθρωπο. Σήμερα, η αντίστοιχη προσέγγιση έχει ως αφετηρία την παρακολούθηση του τρόπου δράσης βιοδραστικών μορίων σε μεγάλη κλίμακα. Στοιχεία για τις διάφορες ενώσεις που μελετώνται αντλούνται από βιβλιοθήκες που περιέχουν πληροφορίες για εκατοντάδες χιλιάδες ενώσεις. Κριτήριο επιλογής για την καταλληλότητα της υπό έλεγχο ένωσης αποτελεί η ικανότητά της να προκαλεί μια συγκεκριμένη βιολογική δράση ή να αλληλεπιδρά με κάποιο μόριο-στόχο. Τα μόρια-στόχοι είναι επιθυμητό να είναι ανθρώπινης προέλευσης, ώστε η πιθανότητα ταυτοποίησης των υποψηφίων φαρμάκων κατά τον έλεγχο να είναι μεγαλύτερη. Συνήθως δε χρησιμοποιούνται καθεαυτά τα αρχικά βιοδραστικά μόρια, αλλά παράγωγα αυτών, με σκοπό τη αύξηση της απόδοσής τους ως προς την αλληλεπίδραση με το στόχο καθώς και την βελτιστοποίηση των φαρμακολογικών ιδιοτήτων τους. (8)

## **1.3 Προκλινική έρευνα**

### **1.3.1 Στόχος δράσης των φαρμάκων**

Σύμφωνα με τη σύγχρονη προσέγγιση σχετικά με την ανάπτυξη φαρμάκων, αρχικά γίνεται η υπόθεση ότι η παθογένεια μιας ασθένειας οφείλεται σε μια ορισμένη πρωτεΐνη (μόριο-στόχος). Στη συνέχεια, μελετάται με ποιον τρόπο θα ήταν εφικτό να μεταβληθεί η δραστηριότητα της εν λόγω πρωτεΐνης με σκοπό να καταστεί

αποτελεσματική κατά της ασθένειας. Κατόπιν, αξιολογείται η φαρμακοδεκτικότητα του στόχου ανάλογα με το είδος του και κρίνεται ικανοποιητική όταν στο μόριο-στόχο υπάρχει θέση δέσμευσης συμβατή με το φάρμακο και εκλεκτική ως προς αυτό. Σε περίπτωση που ο στόχος είναι είτε κάποιο ένζυμο είτε κάποια πρωτεΐνη με γνωστά στοιχεία εκλεκτικότητας ως προς κάποιες ουσίες, τότε οι πιθανότητες το φάρμακο να δρα επιθυμητά εναντίον του στόχου του είναι μεγαλύτερες. Αντίθετα, όταν πρόκειται για μεγάλα πεπτίδια ή πρωτεΐνες με πολλές θέσεις υποδοχής το έργο των ερευνητών είναι δυσκολότερο. (8)

Η δυσκολία του σταδίου αξιολόγησης του στόχου των υποψήφιων φαρμάκων έγκειται στο γεγονός ότι προορίζονται για τον ανθρώπινο οργανισμό, ο οποίος αποτελεί ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο βιολογικό σύστημα. (8) Η δράση των φαρμάκων βασίζεται στην εμπλοκή τους σε μια συγκεκριμένη βιολογική πορεία. Υπάρχει, όμως, το ενδεχόμενο ένα φάρμακο να προκαλεί μεταβολές και σε άλλες βιολογικές πορείες του ανθρώπινου οργανισμού πέραν της επιθυμητής επιφέροντας παρενέργειες. Επιπλέον, σημαντικό είναι να καθορίζεται η μέγιστη επιτρεπτή ποσότητα λήψης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος, αφού η υπερβολική δόση μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα που διαφέρουν ανάλογα με τη δραστική ουσία του κάθε φαρμάκου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ασπιρίνη, που σε υποβολικές δόσεις είναι υπεύθυνη για σοβαρά γαστρεντερικά προβλήματα και αιμορραγία, και η παρακεταμόλη, η υπέρμετρη χρήση της οποίας μπορεί να οδηγήσει σε κώμα ή και θάνατο. (2) Ακόμα, υπάρχει πιθανότητα ο οργανισμός να αναιρέσει το αποτέλεσμα που θα επέφερε το φάρμακο τροποποιώντας τα στοιχεία που ρυθμίζονται από αυτό. Η πιθανότητα αυτή αυξάνεται όσο πιο πολύπλοκο είναι το σύστημα στη ρύθμιση του οποίου αποσκοπεί το υποψήφιο φάρμακο. Ωστόσο, η σύγχρονη μοριακή βιολογία προσφέρει λύσεις ως προς την αντιμετώπιση των παραπάνω δυσκολιών παρέχοντας πειραματικά μοντέλα που προσομοιάζουν αξιόπιστα τις βιολογικές δράσεις του ανθρώπινου οργανισμού. (8) Τέλος, οι γνώσεις σχετικά με την πορεία των φαρμάκων στον ανθρώπινο οργανισμό, που προκύπτουν τόσο από τη φαρμακοκινητική όσο και από τη φαρμακοδυναμική, ολοένα και αυξάνονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτει η ανάγκη για προσανατολισμό της έρευνας στην δημιουργία φαρμάκων με υψηλές προδιαγραφές, ώστε να είναι αποτελεσματικά ως προς το στόχο τους και ασφαλή για τον άνθρωπο. (1) Όσον αφορά στο κομμάτι της ασφάλειας τα εν δυνάμει φάρμακα ελέγχονται για μεγάλες χρονικές περιόδους, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα ως προς την τοξικότητά τους και τις πιθανότητες καρκινογόνου δράσης, γονιδιοτοξικότητας και τερατογένεσης. Οι έλεγχοι αυτοί πραγματοποιούνται κατά κύριο λόγο σε πειραματόζωα σε προκλινικό στάδιο με σκοπό να εγκριθούν μελλοντικά για πραγματικές κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους. (8)

### **1.3.2 Ο ρόλος της γενετικής**

Το γεγονός ότι η ανακάλυψη φαρμάκων είναι μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία αποδεικνύεται απ' το ότι μόνο περίπου το 50% των ενώσεων που οδηγούνται σε προηγμένα προκλινικά στάδια εγκρίνονται για την εφαρμογή σε πραγματικές κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους. Ο κύριος λόγος στον οποίο οφείλεται το σημαντικό αυτό

ποσοστό αποτυχίας είναι κατά βάση η ελλιπής γνώση και κατανόηση της βιολογίας του ανθρώπινου οργανισμού. Λύση ως προς τη βελτίωση της υφιστάμενης κατάστασης και απαντήσεις σε πιθανά ζητήματα που προκύπτουν στα προκλινικά στάδια μπορεί να δώσει σε πολλές περιπτώσεις η επιστήμη της γενετικής. (9)

Όπως προαναφέρθηκε, η επιλογή ενός στόχου αποτελεί την αφετηρία για την προκλινική πορεία ενός υποψήφιου φαρμάκου. Σύμφωνα με τη γενετική, κατά την επιλογή του στόχου και τη λήψη αποφάσεων σχετικά με την καταλληλότητά του πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα διαθέσιμα γενετικά στοιχεία. Οι γενετικές πληροφορίες που έχουν οι ειδικοί στη διαθεσή τους είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς, όπως έχει παρατηρηθεί, οι φαρμακευτικές ουσίες που προορίζονται για μόρια-στόχους ασθενειών που οφείλονται πιθανώς σε γενετικά χαρακτηριστικά, είναι πιθανότερο να εγκριθούν μέχρι το τελικό στάδιο. (9)

Οι ασθένειες που προκαλούνται από γενετικά χαρακτηριστικά ομαδοποιούνται σε διάφορες κατηγορίες. Μία από αυτές περιλαμβάνει τις ασθένειες που οφείλονται σε γενετικές μεταλλάξεις, όπως είναι η δρεπανοκυτταρική αναιμία που οφείλεται σε μετάλλαξη του έκτου αμινοξέος της β-πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Μια άλλη κατηγορία είναι οι ασθένειες που σχετίζονται με κληρονομικά χαρακτηριστικά και εγκυμονούν παράγοντες κινδύνου και πιθανή αλληλεπίδραση των παραγόντων αυτών με το περιβάλλον. Σε αυτού του είδους τις ασθένειες περιλαμβάνονται διαταραχές του αυτιστικού φάσματος, οι διάφοροι τύποι διαβήτη, καθώς και ορισμένες μορφές καρκίνου. Παρόλο που για πολλές από τις χρόνιες ασθένειες δεν έχει εντοπιστεί ο ακριβής γενετικός παράγοντας που τις προκαλεί, υπάρχουν θεραπείες που χρησιμοποιούν ως στόχους γενετικούς μηχανισμούς και έχουν αποδειχθεί κατάλληλες για τη βελτίωση της κατάστασης του ασθενούς. (3), (10)

Γενικά, οι προκλήσεις που αντιμετωπίζει η γενετική ως προς την εύρεση του εκάστοτε στόχου είναι πολλές. Τα διαθέσιμα δεδομένα για το ανθρώπινο γονιδίωμα είναι σύνθετα τόσο ως προς τη μελέτη όσο και ως προς την κατανόησή τους. Επιπλέον, συχνά οι ασθένειες εξελίσσονται εξαιτίας περιβαλλοντικών ή άλλων παραγόντων δημιουργώντας έτσι την ανάγκη εντοπισμού νέων στόχων για τα φάρμακα που πρόκειται να αναπτυχθούν. Τέλος, χρήσιμο θα ήταν να αναφερθεί ότι οι γενετικές θεραπείες εκτός από την πολυπλοκότητα που παρουσιάζουν στο στάδιο της ανάπτυξης και υλοποίησής τους, είναι και ιδιαίτερα δαπανηρές, γεγονός που δυσχεραίνει την ευρεία προσβασιμότητα και εφαρμογή τους. (9)

### **1.3.3 Οικονομικοί παράγοντες στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων**

Η φαρμακευτική έρευνα επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από οικονομικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι καθοριστικοί για τον προσανατολισμό και την πορεία της. Ένας από αυτούς είναι τα κονδύλια που παρέχονται για την ανάπτυξη φαρμάκων από το κράτος και κατά πόσο αυτά ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των εκάστοτε συνθηκών. Επιπλέον, καθοριστικός είναι και ο ρόλος των φαρμακευτικών εταιρειών, οι οποίες χρηματοδοτούνται από μετόχους. Τα κίνητρα για την έναρξη μιας φαρμακευτικής έρευνας ποικίλουν και επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη σχέση

μεταξύ κόστους και οφέλους. Είναι γεγονός ότι οι δαπάνες για έρευνα και ανάπτυξη φαρμάκων για μια συχνή ασθένεια είναι πιθανότερο να επιφέρουν καρπούς σε μια φαρμακοβιομηχανία, καθώς απευθύνονται σε ευρύτερο αγοραστικό κοινό. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο επενδύονται περισσότερα χρήματα στην αντιμετώπιση τέτοιου είδους ασθενειών. Συχνά θεωρείται οικονομικά ασφαλής η έρευνα και βελτίωση ήδη υπαρχόντων φαρμάκων, ώστε τα περιθώρια αποτυχίας να είναι μικρότερα. Αντίθετα, η έρευνα για τη φαρμακευτική αντιμετώπιση σπάνιων ασθενειών ή ασθενειών που πλήττουν κυρίως τις αναπτυσσόμενες χώρες δεν βρίσκεται στο πλαίσιο του ενδιαφέροντος των εν λόγω εταιρειών, καθώς πιθανότατα το εν δυνάμει προϊόν δε θα επιφέρει ικανό κέρδος για τη βιωσιμότητα της εταιρείας. (8), (11)

## **1.4 Κλινικές δοκιμές**

Από τη διενέργεια κλινικών δοκιμών σε φάρμακα αντλούνται πληροφορίες σχετικά με τις φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες του υποψήφιου φαρμάκου, το οποίο προορίζεται για χορήγηση σε ανθρώπους. Προκειμένου να δοθεί η επίσημη άδεια για την έναρξη μιας κλινικής δοκιμής πρέπει να ικανοποιούνται ορισμένες προϋποθέσεις. Εκτός της επιστημονικής εγκυρότητας που θεωρείται δεδομένη, θα πρέπει να τηρείται αμερόληπτη επιλογή των συμμετεχόντων, πλήρης ενημέρωσή τους για τη διαδικασία, σεβασμός ως προς αυτούς και διαρκής εποπτεία της όλης διαδικασίας. (8), (12)

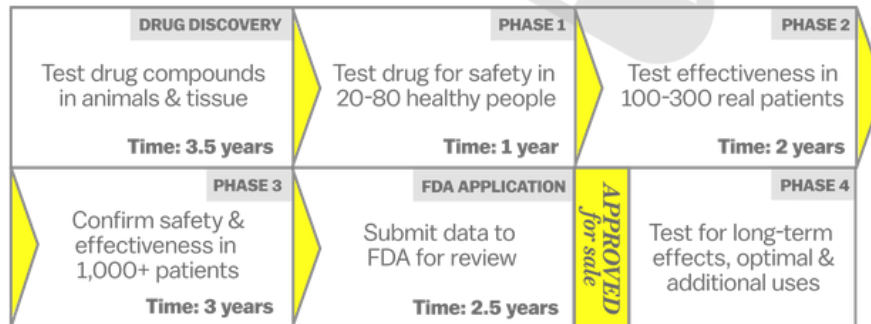
### **1.4.1 Φάσεις κλινικών δοκιμών**

Η πορεία ενός φαρμάκου από τα αρχικά εργαστηριακά στάδια μέχρι τη διάθεση του στην αγορά είναι μια ιδιαίτερα χρονοβόρα διαδικασία. Μόνο ένα σχετικά μικρό ποσοστό από τα φάρμακα που εισέρχονται σε κλινικές δοκιμές παίρνει τελικά την τελική έγκριση για να κυκλοφορήσει στην αγορά. Η κάθε φάση μιας κλινικής έρευνας εξαρτάται άμεσα από την προηγούμενη. Σχηματικά, η πορεία προς την άδεια κυκλοφορίας ενός φαρμάκου φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα.

## From the lab to the pharmacy

V

The FDA's drug-approval process (on average)



Total cost: \$100 million to \$1 billion Total time: Approximately 12 years

Success rate: Five of 5,000 compounds reach human tests; One is approved

Εικόνα 1: Η πορεία προς την κυκλοφορία ενός φαρμάκου (13)

Οι κλινικές δοκιμές συνήθως διεξάγονται σε 4 φάσεις. Οι τρεις πρώτες φάσεις πραγματοποιούνται με τρόπο ώστε να επιβεβαιώνουν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Η τέταρτη και τελική φάση παρέχει κυρίως κάποιες επιπρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τυχόν κινδύνους, νέες ενδείξεις και τη συνιστώμενη δοσολογία. (8)

### ΦΑΣΗ I

Στην πρώτη φάση μιας κλινικής δοκιμής γίνεται χορήγηση του φαρμάκου για πρώτη φορά σε άνθρωπο. Το υπό έρευνα φαρμακευτικό προϊόν δεν είναι γνωστό στην παρούσα φάση αν μπορεί να επωφελήσει θεραπευτικά τους συμμετέχοντες. Στη φάση αυτή συμμετέχουν περίπου 20-80 άτομα. Συνήθως πρόκειται για υγιείς εθελοντές ή περιστασιακά ασθενείς με προχωρημένη ή σπάνια νόσο. Η φάση αυτή διαρκεί από μερικούς μήνες έως και 1 έτος και στη διάρκειά της λαμβάνονται δεδομένα για την ανεκτικότητα του φαρμάκου στον άνθρωπο. Ακόμα, εξάγονται συμπεράσματα σχετικά με την ασφάλεια του φαρμακευτικού σκευάσματος, την επιτρεπόμενη δοσολογία, τη διαδικασία απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης του φαρμάκου και συλλέγονται ενδείξεις για τυχόν ανεπιθύμητες παρενέργειες. Η δόση έναρξης σε υγιείς εθελοντές πρέπει να είναι χαμηλότερη από τη μέγιστη επιτρεπτή, όπως έχει καθοριστεί από τα προκλινικά στάδια. Υψηλότερη δόση χορηγείται μόνο σε περιπτώσεις που υπάρχει επιστημονική γνώμη αρκετά ισχυρή, ώστε να επιτρέψει μια τέτοια ενέργεια, ενώ οποιαδήποτε μεταβολή διενεργείται βάσει πρωτοκόλλου. Οι πιθανοί κίνδυνοι στην προκειμένη περίπτωση σχετίζονται με φαρμακοδυναμικά χαρακτηριστικά που μπορεί να οδηγήσουν πιθανώς σε μη αναστρέψιμες ή μακροχρόνιες καταστάσεις. (8), (14)

Ωστόσο, η πραγματική μέγιστη ανεκτή δόση καθορίζεται στα πλαίσια της πρώτης φάσης και μπορεί να διαφέρει από την αρχική, καθώς μέσω της εφαρμογής σε ανθρώπους δημιουργείται σαφέστερη εικόνα για την ποσότητα που μπορεί να προσληφθεί. (15)

Το ποσοστό των φαρμάκων της Φάσης I που περνούν στην επόμενη φάση των κλινικών δοκιμών ανέρχεται περίπου στο 50%. Το κόστος σε αυτό το στάδιο ανέρχεται στις Η.Π.Α. κατά προσέγγιση σε 10 εκατομμύρια δολάρια (US\$). (8)

## **ΦΑΣΗ II**

Στη δεύτερη φάση γίνεται για πρώτη φορά χορήγηση του φαρμάκου σε ασθενείς. Ο αριθμός συμμετεχόντων εθελοντών κυμαίνεται στους 100-300. Πρόκειται για ασθενείς, οι οποίοι επιλέγονται από τους ειδικούς εφόσον πληρούν τα αυστηρά κριτήρια που τίθενται από την αρχή της διαδικασίας. Η φάση αυτή μπορεί να διαρκέσει από 1 έως 2 έτη και στη διάρκειά της διαπιστώνεται η αποτελεσματικότητα της ουσίας, ενώ επιβεβαιώνονται τα στοιχεία που ορίστηκαν από τη Φάση I σχετικά με το δοσολογικό φάσμα του φαρμάκου και τις φαρμακοκινητικές του ιδιότητες. Τα αποτελέσματα της δράσης του φαρμάκου συγκρίνονται με αυτά κάποιου εικονικού φαρμάκου. (8), (14)

Το ποσοστό επιτυχίας στο εν λόγω στάδιο των δοκιμών προσεγγίζει το 30%. Αυτό το ποσοστό αφορά φάρμακα τα οποία θα περάσουν στο επόμενο στάδιο δοκιμών, δηλαδή στη Φάση III. Το κόστος σε αυτή την περίπτωση υπολογίζεται περί τα 20 εκατομμύρια δολάρια (US\$). (8)

## **ΦΑΣΗ III**

Στην τρίτη φάση των δοκιμών συμμετέχουν λίγες εκατοντάδες έως λίγες χιλιάδες άτομα, τα οποία είναι ασθενείς που λαμβάνουν ένα πειραματικό φάρμακο. Η συγκεκριμένη φάση αποτελεί το τελικό στάδιο αξιολόγησης του φαρμάκου πριν εγκριθεί από τον αρμόδιο κρατικό μηχανισμό. Σκοπός του σταδίου αυτού είναι η επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας και των θεραπευτικών οφελών του υπό δοκιμή φαρμάκου σε μεγαλύτερο πληθυσμό. Η δράση του φαρμάκου συγκρίνεται με ήδη υπάρχουσες θεραπείες, ώστε να εξαχθεί το τελικό συμπέρασμα για την ασφάλεια και το ποσοστό αποτελεσματικότητάς του.

Η Φάση III συνιστά μια πολυκεντρική μελέτη η οποία χρονικά διαρκεί 3-5 έτη. Η συνολική οικονομική επιβάρυνση εταιρειών και κρατικών μηχανισμών ανέρχεται κατ'εκτίμηση σε 50-100 εκατομμύρια (US\$). Όπως γίνεται αντιληπτό, πρόκειται για το στάδιο των κλινικών δοκιμών με το υψηλότερο κόστος. Το κόστος αυτό αυξάνεται όταν οι δοκιμές αφορούν σκευάσματα για την καταπολέμηση συχνών και χρόνιων ασθενειών. Τα φάρμακα που περνούν με επιτυχία και την τρίτη φάση των κλινικών δοκιμών, κατόπιν αίτησης του εκάστοτε χορηγού στον αρμόδιο φορέα, λαμβάνουν έγκριση κυκλοφορίας. (8), (16)

## **ΦΑΣΗ IV**

Η τέταρτη και τελική φάση αποτελεί το στάδιο μετεγκριτικής επαγρύπνισης. Οι συμμετέχοντες πλέον είναι πολλές χιλιάδες και είναι ασθενείς, οι οποίοι βρίσκονται υπό αγωγή με το εγκεκριμένο φάρμακο. Στόχος σε αυτή τη φάση είναι να εντοπισθούν και να αξιολογηθούν πιθανά μακροπρόθεσμα αποτελέσματα του σκευάσματος, καθώς και τυχόν σπάνιες ή ανεπιθύμητες, σοβαρές ή μη, παρενέργειες. (8) Η εποπτεία του φαρμάκου δεν έχει ορισμένη χρονική διάρκεια εφόσον έχει κυκλοφορήσει στην αγορά και χρησιμοποιείται από πολύ μεγαλύτερο αριθμό ασθενών σε σχέση με τις τρεις

πρώτες φάσεις. Διενεργείται τόσο από τους αρμόδιους κρατικούς φορείς όσο και από διάφορες φαρμακευτικές εταιρείες για λόγους ασφάλειας αλλά και ανταγωνισμού. Σε περιπτώσεις που επιβεβαιώνονται μη επιθυμητά αποτελέσματα σε μεγάλη μερίδα πληθυσμού, έπειτα από τις ανάλογες διαδικασίες, είναι πιθανός ο περιορισμός διάθεσης του προϊόντος ή ακόμα και η αφαίρεση της άδειας κυκλοφορίας του. (16)

Οι φάσεις που αναλύθηκαν παραπάνω παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω:



Εικόνα 2. Οι 4 φάσεις των κλινικών δοκιμών (17)

#### 1.4.2 Ρυθμιστικοί φορείς

##### Ο ρόλος του FDA

Ο FDA (U.S. Food and Drug Administration) είναι ρυθμιστικός φορέας του Υπουργείου Υγείας των Η.Π.Α., ο οποίος είναι αρμόδιος για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας. Συγκεκριμένα, ο FDA εγγυάται την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των ανθρώπινων και κτηνιατρικών φαρμάκων που εγκρίνει, καθώς και άλλων βιολογικών προϊόντων, καλλυντικών κ.α. Στις αρμοδιότητες του ρυθμιστικού φορέα εντάσσεται, ακόμα, και η προώθηση της δημόσιας υγείας, δηλαδή ο ρυθμός εξέλιξης της ποιότητας φαρμακευτικών και άλλων σκευασμάτων, με σκοπό να γίνουν όσο το δυνατόν πιο αποτελεσματικά, ασφαλέστερα και οικονομικότερα για τον άνθρωπο. Επιπλέον, ο FDA φέρει ευθύνη για την προστασία των ανθρώπων από φάρμακα με πιθανά επιβλαβή αποτελέσματα για την υγεία τους, ενώ αντίθετα έχει την υποχρέωση να επισπεύει τις διαδικασίες έγκρισης για την κυκλοφορία φαρμάκων με αποδεδειγμένες θεραπευτικές και ευεργετικές ιδιότητες. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση ο ανάλογος φορέας είναι ο EMA (European Medicines Agency) και στην Ελλάδα ο ΕΟΦ (Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων). (8)

## Διαδικασία έγκρισης

### Η.Π.Α.

Όταν έχουν ολοκληρωθεί οι τρεις πρώτες φάσεις της κλινικής δοκιμής ενός υποψήφιου φαρμάκου με επιτυχία, τότε ο χορηγός (συνήθως κάποια φαρμακευτική εταιρεία) μπορεί να αιτηθεί στον FDA την έγκριση κυκλοφορίας του. Η αίτηση αυτή καλείται Έγκριση Νέου Φαρμάκου (NDA: New Drug Application) ή Αίτηση Άδειας Βιολογικού Προϊόντος (BLA: Biologics License Application). Η κάθε αίτηση περιλαμβάνει όλες τις σχετικές πληροφορίες που απαιτούνται από το ρυθμιστικό φορέα, όπως είναι τα δεδομένα που καταγράφηκαν για κάθε ένα από τα εκατοντάδες ή χιλιάδες άτομα που έλαβαν το φάρμακο στη διάρκεια της Φάσης III. Οι αιτήσεις εξετάζονται από ομάδες ειδικών, ενώ πλέον οι χορηγοί συνεισφέρουν οικονομικά στον FDA μέσω της καταβολής τελών κατά την υποβολή της αίτησης. Συνήθως, η εξέταση κάθε αίτησης διαρκεί ένα χρόνο, εκτός από περιπτώσεις στις οποίες η ανάγκη κυκλοφορίας του φαρμάκου κρίνεται επιτακτική, οπότε επισπεύδονται οι διαδικασίες ακόμα και στους 6 μήνες. (8) Στη φάση της τελικής έγκρισης η εταιρεία και ο FDA πρέπει να έρθουν σε συμφωνία ως προς τις πληροφορίες που θα αναγράφονται στην ετικέτα του προϊόντος και στο «φύλλο οδηγιών χρήσης». Οι πληροφορίες αυτές αφορούν τη συνταγογράφηση, τον τρόπο χορήγησης, το κοινό στο οποίο απευθύνεται το φάρμακο, το ακριβές περιεχόμενο του σκευάσματος και ειδοποιήσεις για επιπλέον ασφάλεια και προφυλάξεις. (18)

### Ευρωπαϊκή Ένωση (E.E.)

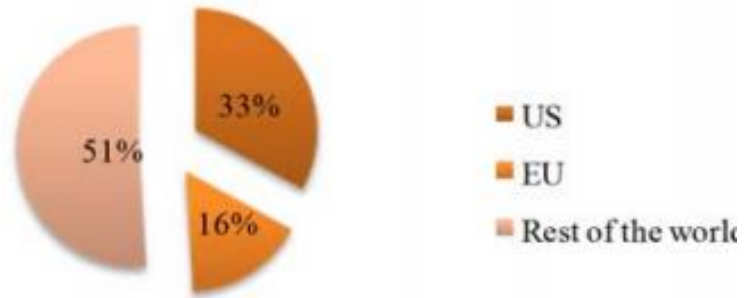
Ο αρμόδιος φορέας για την έγκριση κυκλοφορίας ενός φαρμάκου στην Ευρωπαϊκή Ένωση είναι ο EMA (European Medicines Agency). Για να υποβάλει αίτηση για την άδεια κυκλοφορίας φαρμάκου κάποιος χορηγός υποχρεούται να υποβάλλει στον EMA όλα τα απαραίτητα έγγραφα σχετικά με το υποψήφιο φάρμακο. Τα έγγραφα αυτά πρέπει να περιλαμβάνουν στοιχεία για την αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια, την τοξικότητα και όλα τα στατιστικά δεδομένα που προέκυψαν από το στάδιο των δοκιμών. Όλες αυτές οι πληροφορίες είναι παρόμοιες με αυτές που απαιτούνται και από τον FDA στο παρόν στάδιο. Στην περίπτωση της E.E. κατά την υποβολή της αίτησης τα τέλη που πρέπει να καταβληθούν είναι ελάχιστα έως μηδενικά. Η αίτηση εξετάζεται από ομάδα ειδικών, η οποία έχει στη διάθεσή της περίπου 210 μέρες προκειμένου να προβεί σε επιστημονική εκτίμηση, την οποία θα παραδώσει στον EMA. Έπειτα, ο EMA μέσα σε διάστημα ακόμα 67 ημερών δίνει την τελική έγκριση ή απόρριψη αντίστοιχα. Σε περιπτώσεις που απαιτείται άμεση έγκριση κάποιου φαρμάκου, κατόπιν αιτήματος του χορηγού και εφόσον αυτό γίνει αποδεκτό, επιταχύνεται το στάδιο της επιστημονικής αξιολόγησης σε 150 μέρες. (18)

Η βασική διαφορά στις διαδικασίες που ακολουθούνται στο στάδιο της έγκρισης από τους δύο φορείς είναι η εξής: Ο FDA ζητά από τους χορηγούς πρόσβαση σε όλα τα δεδομένα προ της επεξεργασίας τους από τα αρχικά στάδια μέχρι το τέλος των κλινικών δοκιμών, διότι διεξάγει εκ νέου δικές του αναλύσεις από ομάδα ειδικών. Αντίθετα ο EMA αρκείται στις πληροφορίες που λαμβάνει κατά την υποβολή της αίτησης σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων και αποφαινεται



ανάλογα. (18) Ωστόσο, οι δύο φορείς είναι οι πιο απαιτητικοί παγκοσμίως ως προς τις προϋποθέσεις που θέτουν για την άδεια κυκλοφορίας ενός φαρμάκου. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, η πλειοψηφία των φαρμάκων που εγκρίνονται παγκοσμίως και διατίθενται στην αγορά περνάει από την έγκριση των δύο αυτών φορέων.

### Pharma Market Share



**Εικόνα 3.** Κατάσταση παγκόσμιας αγοράς φαρμάκων (19)

## 2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

### 2.1 Φαρμακοκινητική – ADME (ADMET)

Ένα φάρμακο μπορεί να χορηγηθεί με τους εξής τρόπους:

- από το στόμα
- ενδοφλέβια
- ενδομυϊκά
- υποδόρια
- διαδερμικά
- υπογλώσσια
- από το ορθό
- εισπνεόμενα κλπ.

Ο τρόπος χορήγησης μιας φαρμακευτικής ουσίας καθορίζει ιδιότητες όπως το πώς απελευθερώνεται η δραστική ουσία, πώς κατανέμεται στον οργανισμό αλλά και τον τρόπο με τον οποίο μεταβολίζεται.

Η δράση ενός φαρμάκου χαρακτηρίζεται από τρεις φάσεις. Η πρώτη από αυτές είναι η φαρμακευτική και αφορά την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας του σκευάσματος στον οργανισμό έπειτα από τη χορήγησή του. Η δεύτερη φάση καλείται φαρμακοκινητική και σχετίζεται με την απορρόφηση του φαρμάκου, την κατανομή, το μεταβολισμό και την απέκκριση. Η φαρμακοδυναμική αποτελεί την τελική φάση δράσης ενός φαρμάκου και υποδεικνύει τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρά η δραστική ουσία του φαρμάκου με το μόριο στόχο.

Ιδιαίτερη αναφορά στα πλαίσια της παρούσας εργασίας είναι χρήσιμο να γίνει στη φαρμακοκινητική δράση των φαρμάκων. Η φαρμακοκινητική μελετά τα εξής χαρακτηριστικά: την Απορρόφηση (Absorption), την Κατανομή (Distribution), το Μεταβολισμό (Metabolism) και την Απέκκριση (Excretion), συχνά αναφερόμενα και ως ADME ή ADMET, αν συμπεριληφθεί και η τοξικότητα (Toxicity). (2)

#### 2.1.1 Απορρόφηση (Absorption)

Η απορρόφηση ενός φαρμάκου στον ανθρώπινο οργανισμό γίνεται είτε εντερικά είτε παρεντερικά. Εντερική είναι η απορρόφηση στις περιπτώσεις χορήγησης του φαρμάκου από το στόμα ή από το ορθό. Παρεντερική είναι η απορρόφηση όταν το φάρμακο χορηγείται ενδοφλέβια, ενδομυϊκά και γενικά με τρόπο τέτοιο ώστε να παρακάμπτεται ο γαστρεντερικός σωλήνας. Η από στόματος λήψη φαρμάκου, παρότι αποτελεί τον πιο ευρέως αποδεκτό τρόπο χορήγησης, συνιστά το δυσκολότερο για μελέτη τρόπο απορρόφησης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι λαμβανόμενο από το στόμα το φάρμακο ακολουθεί μια πορεία από τον οισοφάγο προς το στομάχι και καταλήγει στο λεπτό έντερο και το ήπαρ («φαινόμενο πρώτης διόδου»). Στη διάρκεια αυτής της πορείας ποσότητα του φαρμάκου εξουδετερώνεται από τα οξέα του

στομάχου, τα βακτηρίδια και τα ένζυμα του εντέρου και τα κύτταρα του ήπατος. Για την αντιστάθμιση των δυσκολιών που προκύπτουν από την απώλεια μέρους της ουσίας συνήθως συνίσταται μεγαλύτερη ποσότητα χορήγησης. Ο μόνος τρόπος χορήγησης ουσίας που δεν απαιτεί απορρόφηση στην κυκλοφορία του αίματος, παρά μόνο παραμονή και τοπική δράση, είναι η τοπική χορήγηση. (2)

### **Βιοφαρμακευτικό Σύστημα Ταξινόμησης (BCS)**

Η διαλυτότητα και η διαπερατότητα των φαρμάκων είναι καθοριστικοί παράγοντες για τη διαδικασία της απορρόφησής τους. Τα δεδομένα σχετικά με αυτές τις δύο παραμέτρους δεν είναι εύκολο να αξιολογηθούν και πρέπει πάντα να λαμβάνονται υπόψη κατά τη διεξαγωγή *in vitro* δοκιμών. Αυτό είναι απαραίτητο, καθώς μη επαρκής διαλυτότητα ουσιών στο στάδιο των δοκιμών μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα σχετικά με τη συνιστώμενη δόση και την *in vivo* αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα δεδομένα είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την καλύτερη κατανόηση των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων των φαρμάκων. (20)

Η κατηγοριοποίηση των φαρμάκων βάσει της διαλυτότητας και της διαπερατότητας γίνεται με το Βιοφαρμακευτικό Σύστημα Ταξινόμησης (BCS: The Biopharmaceutics Classification System). Η εφαρμογή του συγκεκριμένου συστήματος ταξινόμησης ξεκίνησε να χρησιμοποιείται από το 1995 και αποδείχθηκε αξιοσημείωτα χρήσιμο για τον φαρμακευτικό κλάδο σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι φαρμακευτικές εταιρείες χρησιμοποιούν το εν λόγω σύστημα για την συλλογή δεδομένων βιοδιαθεσιμότητας σε περίπτωση που αποσκοπούν στην άμεση κυκλοφορία κάποιου από στόματος χορηγούμενου σκευάσματος. Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί ότι τα από στόματος χορηγούμενα φάρμακα που έχουν εγκριθεί κατόπιν κλινικής δοκιμής βασισμένης στο BCS διασφαλίζονται καλύτερα μέσω *in vitro* τεστ διαλυτότητας, παρά από *in vivo* εμπειρικές δοκιμές σε ανθρώπους. Γενικά, το BSC είναι αναγνωρισμένο από τους μεγαλύτερους φαρμακευτικούς φορείς παγκοσμίως, όπως είναι ο FDA, ο EMA και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), και χρησιμοποιείται ευρέως για τη διευκόλυνση της ανάπτυξης νέων φαρμάκων. (21)

Το BCS κατηγοριοποιεί τα φάρμακα σε τέσσερις κλάσεις ανάλογα με τα χαρακτηριστικά διαλυτότητάς τους στο νερό και διαπερατότητας των μεμβρανών τους. Ο τρόπος κατηγοριοποίησης σε κλάσεις παρουσιάζεται σχηματικά παρακάτω:

	High Solubility	Low Solubility
High Permeability	<b>Class 1</b> High Solubility High Permeability (Rapid Dissolution for Biowaiver)	<b>Class 2</b> Low Solubility High Permeability
Low Permeability	<b>Class 3</b> High Solubility Low Permeability	<b>Class 4</b> Low Solubility Low Permeability

**Εικόνα 4.** Οι 4 κλάσεις του Βιοφαρμακευτικού Συστήματος Ταξινόμησης (22)

Όπως προκύπτει από το σχήμα, οι ουσίες των κατηγοριών 1 και 2, που χαρακτηρίζονται από υψηλή διαπερατότητα, εξαλείφονται κυρίως μέσω μεταβολισμού. Αντίθετα, οι ουσίες των κατηγοριών 3 και 4 απομακρύνονται αμετάβλητες στα ούρα και στη χολή. (22)

### Από στόματος χορήγηση

Κατά την από στόματος χορήγηση φαρμάκου, είναι πιθανό μικρή ποσότητά του να απορροφηθεί από το στόμα αν μείνει σε αυτό για ορισμένο χρονικό διάστημα. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να παρατηρηθεί στη χορήγηση από το στόμα αλλά και στην υπογλώσσια χορήγηση, καθώς οι δύο συγκεκριμένες μέθοδοι επιβάλλουν την παρατεταμένη διατήρηση του φαρμάκου μέσα στη στοματική κοιλότητα. Κατά τη διάρκεια παραμονής του φαρμάκου στο στόμα, αυτό απορροφάται από τις μεμβράνες του σώματος προς τα τριχοειδή αγγεία. (23)

Μετά την κατάποση ενός φαρμάκου και αφού περάσει από τον οισοφάγο, καταλήγει στο στομάχι. Το περιβάλλον του στομάχου είναι αρκετά όξινο με το pH του να επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία τροφής, η οποία αυξάνει το pH και επιβραδύνει το ρυθμό μετακίνησης των φαρμάκων στις επόμενες οδούς (λεπτό έντερο, ήπαρ). Γενικά, το όξινο περιβάλλον του στομάχου ευνοεί τις πιο λιπόφιλες ουσίες, με αποτέλεσμα αυτές να απορροφώνται ευκολότερα. (2) Η απορρόφηση των περισσότερων φαρμάκων από το στομάχι είναι περιορισμένη, διότι η επιφάνειά του είναι σχετικά μικρή. Επιπλέον, ο χρόνος παραμονής μιας ουσίας στο στομάχι δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλος, γεγονός που δε διευκολύνει τη διαδικασία της απορρόφησης. (23)

Η πορεία του φαρμάκου συνεχίζεται στο λεπτό έντερο που πλεονεκτεί ως προς την απορρόφηση, καθώς η ουσία παραμένει για αρκετό χρόνο μέσα σε αυτό. Επιπλέον, το pH του λεπτού εντέρου είναι υψηλότερο, γεγονός που επιτρέπει την απορρόφηση περισσότερων ουσιών. Τέλος, ιδιαίτερα βοηθητικό είναι το σχήμα του, διότι τα

μορφολογικά χαρακτηριστικά που διαθέτει δημιουργούν μεγαλύτερη διαθέσιμη επιφάνεια για την απορρόφηση. Κατά μήκος της εντερικής κοιλότητας υπάρχουν πτυχωσεις και λάχνες με ένα στρώμα επιθηλιακών κυττάρων που συνεισφέρουν στην άυξηση της διαθέσιμης επιφάνειας. (2), (23)

Υπάρχουν φάρμακα τα οποία μεταβολίζονται στο ήπαρ συνήθως λόγω του φαινομένου της πρώτης διόδου που προαναφέρθηκε. Τα φάρμακα αυτά παρουσιάζουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα λαμβανόμενα από το στόμα. (2)

Ως βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται, με βάση τον FDA, ο ρυθμός και ο βαθμός στον οποίο η δραστική ουσία ενός φαρμάκου απορροφάται από τον οργανισμό και γίνεται διαθέσιμη στη θέση δράσης του φαρμάκου. (24)

### **Ενέσιμη χορήγηση**

Η ενέσιμη χορήγηση φαρμάκου έχει καλύτερα αποτελέσματα ως προς την ταχύτητα απορρόφησης και την προσέγγιση του στόχου. Επίσης, παρέχει μεγαλύτερη ακρίβεια στην επιθυμητή δοσολογία, αφού το φάρμακο χορηγείται απευθείας στη φλέβα, ώστε να περάσει στην κυκλοφορία του αίματος. Η ενδοφλέβια χορήγηση γίνεται είτε με ένεση, όπου χορηγείται δόση φαρμάκου απευθείας στη φλεβα, είτε με έγχυση, όπου το φάρμακο χορηγείται με ορό σε ορισμένη χρονική διάρκεια. Η ενδοφλέβια χορήγηση είναι ο πιο άμεσος τρόπος απορρόφησης. (2)

### **Άλλοι τρόποι χορήγησης**

Η ενδομυϊκή, η υποδόρια, η διαδερμική και η υπογλώσσια χορήγηση έχουν επίσης πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα, διότι καταλήγουν γρήγορα στην κυκλοφορία του αίματος. Εξίσου ικανοποιητικά είναι και τα αποτελέσματα της χορήγησης από το ορθό, παρόλο που γίνεται μέσω της εντερικής οδού, καθώς το ορθικό περιβάλλον είναι αρκετά απορροφητικό και δεν παρατηρείται το φαινόμενο της απώλειας μεγάλου μέρους του φαρμάκου στην πορεία μετά τη χορήγησή του. (2)

### **2.1.2 Κατανομή (Distribution)**

Η ποσότητα και ο τρόπος κατανομής των φαρμάκων στον οργανισμό υπολογίζεται κατά κύριο λόγο από τα δεδομένα ύπαρξής τους στην κυκλοφορία του αίματος, αλλά ακόμα και απ' τη μέτρησή τους μέσα στους ιστούς. Η έννοια που εκφράζει ακριβέστερα την κατανομή είναι ο **όγκος κατανομής (V<sub>d</sub>)** ενός φαρμάκου. Πρόκειται για ένα θεωρητικό αριθμό που καθορίζει τον όγκο του ιστού (ή της μάζας) που απαιτείται για ένα φάρμακο, εφόσον θεωρηθεί ότι η συγκέντρωση ενός φαρμάκου στην κυκλοφορία και στον ιστό είναι ίση. Ο αριθμός αυτός υπολογίζεται αν διαιρεθεί η ποσότητα του φαρμάκου που χορηγείται με το πλάσμα ή τη συγκέντρωση του αίματος. Ο υπολογισμός του όγκου κατανομής βοηθά στην εξαγωγή συμπερασμάτων ως προς τη χημική συγγένεια των ιστών, χωρίς όμως το αποτέλεσμα που προκύπτει να είναι απόλυτα καθοριστικό. Για παράδειγμα, ένας μέτριος όγκος κατανομής μπορεί να

αντιστοιχεί σε μέτριες συγκεντρώσεις σε ορισμένους ιστούς και μεγαλύτερες σε άλλους. (25)

## **Ιστοί**

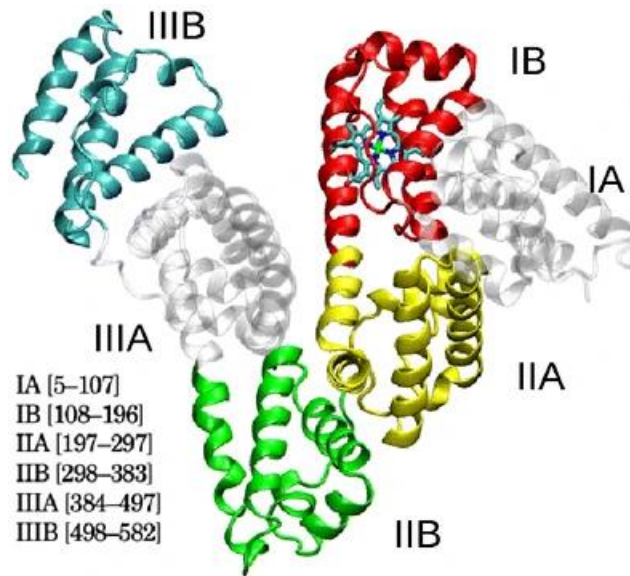
Αφού απορροφηθεί η δραστική ουσία του φαρμάκου, ακολουθεί η κατανομή της στο σώμα στο διάμεσο και το ενδοκυττάριο υγρό ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητές της. Ο σκοπός της κατανομής είναι το χορηγούμενο φάρμακο να φτάσει στο σημείο όπου βρίσκεται ο στόχος του. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μετακίνησή του προς τους ιστούς και τα κύτταρα μέσω των αιμοφόρων αγγείων. Η κατανομή πραγματοποιείται σε δύο φάσεις. Η μεγαλύτερη ποσότητα του φαρμάκου προσλαμβάνεται αρχικά από τα όργανα με πλούσια αιμάτωση, όπως είναι το ήπαρ, οι νεφροί και ο εγκέφαλος. Μικρότερη ποσότητα και με βραδύτερο ρυθμό κατανέμεται σε δεύτερη φάση στο δέρμα, στο λίπος και στα σπλάχνα. Η κατανομή του φαρμάκου στους ιστούς εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τον τρόπο κατανομής του μεταξύ του αίματος και του εκάστοτε ιστού. (2), (8)

Τα φάρμακα έχουν την ικανότητα να κινούνται ανάμεσα στα κύτταρα, οπότε συχνά φτάνουν στα όργανα και τους ιστούς χωρίς να χρειαστεί να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες. Σε περίπτωση που οι υποδοχείς του στόχου βρίσκονται πάνω στο κυτταρικό τοίχωμα το φάρμακο δρα άμεσα. Αντίθετα, αν ο στόχος εντοπίζεται ενδοκυτταρικά, το φάρμακο θα πρέπει να είναι αρκετά λιπόφιλο ώστε να καταφέρει να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να προσεγγίσει το στόχο του. Η λιποφιλία στην προκειμένη περίπτωση είναι καθοριστικής σημασίας, αφού οι κυτταρικές μεμβράνες αποτελούνται κατά βάση από λιπίδια, χοληστερόλη και πρωτεΐνες. (2), (8)

## **Πρωτεϊνική σύνδεση - HSA**

Πολλά φάρμακα που περνούν στην κυκλοφορία του αίματος είναι δεσμευμένα σε πρωτεΐνες του πλάσματος. Ενδεικτικά, η λευκωματίνη (HSA) αποτελεί κύριο φορέα των όξινων φαρμάκων, ενώ η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη φέρει βασικά φάρμακα. Η δέσμευση από τις πρωτεΐνες του πλάσματος περιορίζει την κατανομή στους ιστούς και στο σημείο δράσης, καθώς μειώνει την ποσότητα του αδέσμευτου φαρμάκου. (2), (8)

Η λευκωματίνη ή Human Serum Albumin (HSA) είναι μια ελικοειδής πρωτεΐνη μοριακού βάρους 66.5 kDa, που αποτελείται από τρεις παρόμοιους δομικούς κλάδους (I, II και III), καθένας από τους οποίους αποτελείται από δύο υποκλάδους (A και B). Η HSA συνιστά περίπου το 60% από το συνολικό περιεχόμενο πρωτεϊνών στο πλάσμα του αίματος.

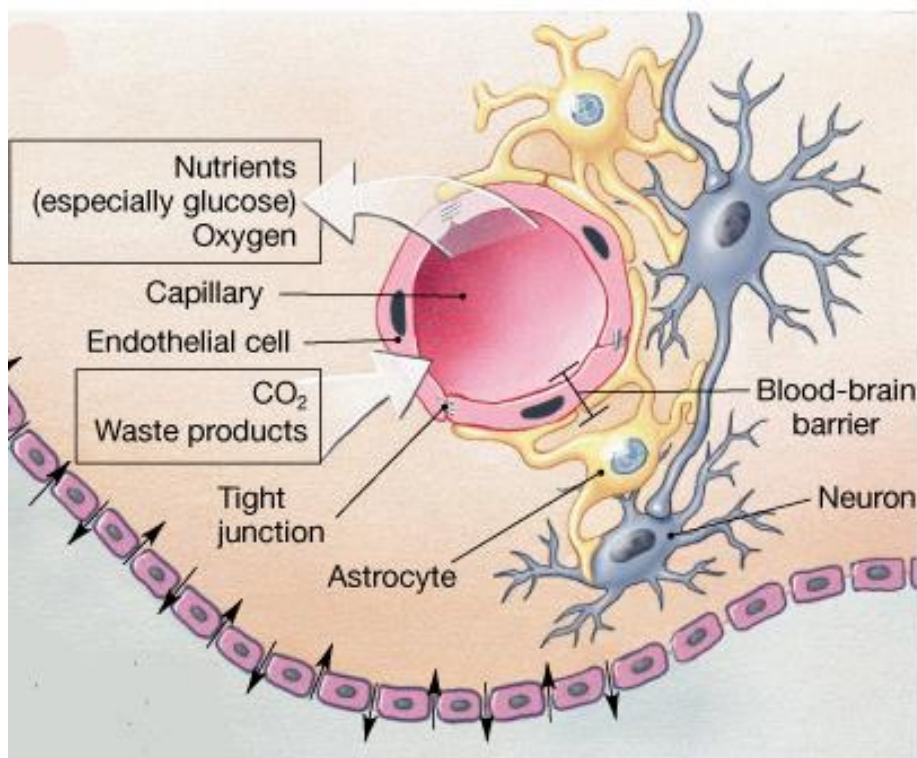


**Εικόνα 5.** Δομή της HSA (26)

Η κύρια λειτουργία της HSA είναι η ρύθμιση της κολλοειδούς οσμωτικής πίεσης. Άλλες φυσιολογικές λειτουργίες της περιλαμβάνουν τη δέσμευση και μεταφορά μορίων, καθώς και αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Η HSA έχει την ικανότητα να δεσμεύει αδιάλυτες ουσίες όπως λιπαρά οξέα, πορφυρίνες και μεγάλη ποικιλία φαρμάκων. Η φαρμακοκινητική και η φαρμακοδυναμική οποιουδήποτε φαρμάκου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αλληλεπίδρασή του με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. (26)

### **Αιματοεγκεφαλικός φραγμός (BBB) και Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό**

Η διείσδυση ενός φαρμάκου στον εγκέφαλο εξαρτάται κυρίως από τη διακυτταρική μεταφορά. Η μεμβράνη που κατέχει κυρίαρχο ρόλο σε αυτή την περίπτωση είναι ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (BBB: blood–brain barrier), ο οποίος συνίσταται από τα χαρακτηριστικά των ενδοθηλιακών κυττάρων των εγκεφαλικών τριχοειδών και περιτριχοειδών νευρογλοιακών κυττάρων. Ο ρόλος του είναι σημαντικός, αφού αποτρέπει την παθητική διάχυση ανεπιθύμητων ουσιών από την κυκλοφορία του αίματος. Παράλληλα, όμως, καθιστά δυσκολότερη τη μεταφορά του φαρμάκου στο ΚΝΣ. Ένας ακόμη αντίστοιχος φραγμός είναι το εγκεφαλονωτιαίο υγρό που αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα. Η πρόσληψη ενός φαρμάκου από τον εγκέφαλο εξαρτάται από τη λιποδιαλυτότητά του. Συγκεκριμένα, όσο πιο λιπόφιλο είναι ένα φάρμακο, τόσο μεγαλύτερες πιθανότητες έχει να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. (2), (8)



**Εικόνα 6.** Σχηματική απεικόνιση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) (27)

Ειδική μνεία αξίζει να γίνει στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB), καθώς αποτελεί βασικό σημείο προσοχής κατά την ανάπτυξη φαρμάκων. Συγκεκριμένα, ανάλογα με το είδος του εν δυνάμει φαρμάκου εξετάζεται αν αυτό έχει την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και αν αυτή η ιδιότητα είναι επιθυμητή στην υπό εξέταση περίπτωση. Για τα φάρμακα που στοχεύουν στη θεραπεία κάποιας νευρολογικής διαταραχής αυτή η ιδιότητα είναι απαραίτητη και καθοριστική για την αντιμετώπιση της νόσου. Ωστόσο, το κόστος της θεραπείας τέτοιων ασθενειών έγκειται στις σοβαρές παρενέργειες που είναι πιθανό να προκληθούν. Προκειμένου να μετριαστούν τυχόν ανεπιθύμητες δράσεις τέτοιου είδους φαρμάκων έχουν αναπτυχθεί διάφοροι αλγόριθμοι, οι οποίοι βασίζονται στις φυσικοχημικές ιδιότητες των διάφορων φαρμακευτικών ουσιών. Ένας από τους δημοφιλέστερους αλγόριθμους είναι «ο κανόνας του 5», ο οποίος εισήχθη από τον Lipinski, και καθορίζει την καταλληλότητα των υποψήφιων φαρμάκων βάσει ορισμένων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον «κανόνα του 5» τα υποψήφια φάρμακα θα πρέπει να διαθέτουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- MW < 500 Da
- log P < 5
- HBD < 5
- HBA < 10

Με τον όρο MW (Molecular Weight) νοείται το μοριακό βάρος της ουσίας. Ο όρος logP αναφέρεται στο συντελεστή κατανομής του συστήματος n-οκτανόλης-νερού και θα αναλυθεί σε επόμενη ενότητα. Το HBD (Hydrogen Bond Donors) αντιστοιχεί στους



δότες δεσμών υδρογόνου (άτομα αζώτου ή οξυγόνου με ένα ή περισσότερα άτομα υδρογόνου). Τα αρχικά HBA (Hydrogen Bond Acceptors) αντιστοιχούν στους δέκτες δεσμών υδρογόνου (άτομα αζώτου ή οξυγόνου)

Η κατανομή μιας ουσίας στον αιματοεγκεφλικό φραγμό υπολογίζεται από τη σχέση:

$$BBB = \frac{\text{συγκέντρωση στον εγκέφαλο}}{\text{συγκέντρωση στο αίμα}} \quad [2.1]$$

Συνήθως χρησιμοποιείται η λογαριθμική μορφή της σχέσης, η οποία είναι η εξής:

$$\log BBB = \log \left( \frac{\text{συγκέντρωση στον εγκέφαλο}}{\text{συγκέντρωση στο αίμα}} \right) \quad [2.2]$$

(28)

### 2.1.3 Μεταβολισμός (Metabolism)

Η μελέτη του μεταβολισμού των φαρμάκων βασίζεται στις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στη διάρκειά του. Πρόκειται για αντιδράσεις οξείδωσης, υδρόλυσης, αναγωγής, σύζευξης και συμπύκνωσης. (29) Ο μεταβολισμός των φαρμάκων προς τους υδρόφιλους μεταβολίτες είναι απαραίτητος για την απομακρυσή τους από το σώμα αλλά και για τον τερματισμό της φαρμακολογικής και βιολογικής δράσης τους. Οι αδρανείς μεταβολίτες απεκκρίνονται ευκολότερα από το σώμα και προκύπτουν μέσω των αντιδράσεων βιομετατροπής. Δεν είναι απίθανη, όμως, και η δημιουργία μεταβολιτών με ισχυρή βιολογική δραστηριότητα ή ακόμα και αυξημένη τοξικότητα. (8)

Ο μεταβολισμός των φαρμάκων μέσα από τη διαδικασία της βιομετατροπής οφείλεται σε ενζυμικά συστήματα, τα οποία εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ. Γενικά, ο μεταβολισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί σε όργανα όπως οι νεφροί και οι πνεύμονες, αλλά και σε όργανα της γαστρεντερικής οδού, όπως το ήπαρ, το λεπτό και το παχύ έντερο. Ειδικότερα, το ήπαρ αποτελεί κέντρο μεταβολισμού για ενδογενείς χημικές ουσίες, όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα λιπαρά οξέα, αλλά και για ξενοβιοτικές. Το λεπτό έντερο μεταβολίζει κυρίως τα φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα, απορροφώνται από το έντερο και μεταφέρονται στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας. Τα ένζυμα που βρίσκονται στη γαστρεντερική οδό και μεταβολίζουν ξενοβιοτικά είναι υπεύθυνα για την εκκίνηση της μεταβολικής πορείας των περισσότερων από τα από στόματος χορηγούμενων φαρμάκων. Συνήθως, μέρος του φαρμάκου διαφεύγει τον αρχικό μεταβολισμό σε κάποιο από τα προαναφερθέντα όργανα της πυλαίας κυκλοφορίας και περνά στη συστηματική κυκλοφορία. Εκεί επαναλαμβάνεται η ίδια πορεία μέχρι τελικής απομάκρυνσης του φαρμάκου. Τέλος, πιθανά όργανα μεταβολισμού φαρμάκων αποτελούν και οι ιστοί του ρινικού βλεννογόνου και του πνεύμονα, που συμμετέχουν στη μεταβολική διαδικασία, όταν το χορηγούμενο φάρμακο είναι σε μορφή αερολύματος. (8)

## Φάσεις μεταβολικών αντιδράσεων

Οι αντιδράσεις που παρατηρούνται στη διάρκεια του μεταβολισμού των φαρμάκων ταξινομούνται σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση ανήκουν οι αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης. Τα ένζυμα που προκαλούν οξειδωση έχουν την ιδιότητα να εκθέτουν μια λειτουργική ομάδα του φαρμάκου, ώστε τα προϊόντα της οξειδωσης να λειτουργούν ως υποστρώματα των ενζύμων της δεύτερης φάσης. Από τη φάση 1 προκύπτουν λειτουργικές ομάδες, όπως -OH, -COOH, NH<sub>2</sub> κ.α., η προσθήκη των οποίων προκαλεί σημαντικές μεταβολές στις ιδιότητες του φαρμάκου. Τα κυριότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην πρώτη φάση είναι τα CYPs και τα FMOs, που συνιστούν κατηγορίες ενζύμων με πολλαπλά γονίδια, και οι εποξειδικές υδρολάσες (EHs). Μετά το πέρας της πρώτης φάσης συνήθως έχει γίνει αδρανοποίηση του φαρμάκου. Υπάρχουν, όμως, περιπτώσεις στις οποίες πραγματοποιείται βιοενεργοποίηση του φαρμάκου και μετατροπή του σε προφάρμακο, δηλαδή σε αδρανή ουσία που έχει υποστεί μεταβολισμό προς δραστική. Στη δεύτερη φάση κατατάσσονται οι αντιδράσεις σύζευξης του ενζύμου με το υπόστρωμα. Τα βασικά συζευκτικά ένζυμα σε αυτήν την περίπτωση είναι οι S-τρανσφεράσες γλουταθειόνης (GSTs), οι UDP-γλυκουρονοζυλοτρανσφεράσες (UGTs), οι θειοτρανσφεράσες (SULTs) κ.α. (8), (29)

### 2.1.4 Απέκκριση (Excretion)

Τα φάρμακα μπορούν να απομακρυνθούν από το σώμα είτε αναλλοίωτα είτε αφότου έχουν υποστεί μεταβολισμό, οπότε και απεκκρίνονται ως μεταβολίτες. Οι συνήθειες οδοί απέκκρισης είναι από τα ούρα, τα κόπρανα, την αναπνοή, τον ιδρώτα και το μητρικό γάλα. (30) Οι νεφροί κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην απέκκριση των φαρμάκων και των μεταβολιτών τους, καθώς συνιστούν την κύρια οδό απέκκρισης για το 25-30% των χορηγούμενων σε ανθρώπους φαρμάκων. Η νεφρική απέκκριση γίνεται μέσω της αποβολής των άχρηστων χημικών ουσιών από τα ούρα. Η απέκκριση από τα κόπρανα αφορά κατά κύριο λόγο φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα και μέρος τους δεν έχει απορροφηθεί ή μεταβολίτες φαρμάκων που απεκκρίνονται από τη χολή στη γαστρεντερική οδό. Τα αέρια και πτητικά φάρμακα, όπως είναι τα αναισθητικά, απεκκρίνονται με την αναπνοή μέσω των πνευμόνων. Η απέκκριση ουσιών από το μητρικό γάλα, παρόλο που δεν αφορά μεγάλες ποσότητες φαρμάκων, είναι υψίστης σημασίας, αφού τα απεκκρινόμενα φάρμακα μπορούν σε κάποιο βαθμό να περάσουν στο βρέφος μέσω του θηλασμού. Τέλος, η απέκκριση στον ιδρώτα, τον σίελο, τις τρίχες και τα δάκρυα θεωρείται ποσοτικά αμελητέα. (2), (8)

### 2.1.5 Τοξικότητα (Toxicity)

Η τοξικότητα δεν αποτελεί φαρμακοκινητική παράμετρο, όμως συνήθως μελετάται παράλληλα με τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες ADME, όπως αυτές αναλύθηκαν παραπάνω. Η τοξικότητα των φαρμάκων εκτιμάται ότι ευθύνεται για την απόρριψη περίπου του 1/3 των υποψήφιων φαρμάκων. Είναι ένας παράγοντας που ανεβάζει κατά πολύ το κόστος της διαδικασίας ανακάλυψης νέων φαρμάκων, ιδίως όταν

ανακαλύπτεται στα τελικά στάδια των κλινικών δοκιμών ή και έπειτα από την κυκλοφορία του φαρμάκου στην αγορά. (31)

Η τοξικότητα ενός φαρμάκου μπορεί να αποτελεί χρήσιμη ιδιότητα για τη φαρμακευτική του δράση, όμως πιθανόν να υποβόσκει κινδύνους τόσο για τους ανθρώπινους ιστούς όσο και για τα όργανα. Για παράδειγμα, η συσσώρευση ανοσοκατασταλτικών φάρμακων στον οργανισμό, που χαρακτηρίζονται από σημαντική τοξικότητα, μπορεί να προκαλέσει νεφρική ή και οργανική ανεπάρκεια. Ακόμη, στην ίδια κατηγορία τοξικότητας υπάγονται τα αντισπασμωδικά και αντιψυχωτικά φάρμακα, η υπέρμετρη χρήση των οποίων προκαλεί παρενέργειες, όπως σύγχυση και υπνηλία. Η εκτεταμένη χρήση αντισταμινικών έχει αντίστοιχα ως παρενέργεια τις καρδιακές αρρυθμίες. Έχει παρατηρηθεί ότι τα αποτελέσματα και οι πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες της τοξικότητας των φαρμάκων συμβαίνουν συνήθως άμεσα μέσα σε διάστημα μερικών ωρών από τη χορήγηση. (32)

Η τοξικότητα ενός φαρμάκου μπορεί να αποτελεί χρήσιμη ιδιότητα για τη φαρμακευτική του δράση, όμως πιθανόν να υποβόσκει κινδύνους τόσο για τους ανθρώπινους ιστούς όσο και για τα όργανα. Για παράδειγμα, η συσσώρευση ανοσοκατασταλτικών φάρμακων στον οργανισμό, που χαρακτηρίζονται από σημαντική τοξικότητα, μπορεί να προκαλέσει νεφρική ή και οργανική ανεπάρκεια. Ακόμη, στην ίδια κατηγορία τοξικότητας υπάγονται τα αντισπασμωδικά και αντιψυχωτικά φάρμακα, η υπέρμετρη χρήση των οποίων προκαλεί παρενέργειες, όπως σύγχυση και υπνηλία. Η εκτεταμένη χρήση αντισταμινικών έχει αντίστοιχα ως παρενέργεια τις καρδιακές αρρυθμίες. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι τα αποτελέσματα και οι πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες της τοξικότητας των φαρμάκων συμβαίνουν συνήθως άμεσα μέσα σε διάστημα μερικών ωρών από τη χορήγηση. (32)

## 2.2 Βασικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες

### 2.2.1 Λιποφιλία

Η λιποφιλία είναι μία από τις σημαντικότερες φυσικοχημικές παραμέτρους που εξετάζονται στη Φαρμακοχημεία, καθώς καθορίζει τις σχέσεις μεταξύ δομής και δράσης των φαρμακευτικών ενώσεων (QSARs). Η λιποφιλία εκφράζει την ισορροπία των ενδομοριακών δυνάμεων και αλληλεπιδράσεων και της μοριακής δομής του φαρμάκου. Μπορεί να αναλυθεί σε δύο σύνολα όρων: την υδροφοβικότητα, που αντιπροσωπεύει τις υδροφοβικές δυνάμεις και τις δυνάμεις διασποράς, και την πολικότητα, που περιλαμβάνει τους δεσμούς υδρογόνου και τις δυνάμεις επαγωγής. Η διττή αυτή φύση της λιποφιλίας εκφράζεται ως εξής:

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβία} - \text{Πολικότητα} \quad (33)$$

Οι ενδομοριακές δυνάμεις επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη λιποφιλία, ενώ οι ίδιες επηρεάζονται από δομικούς παράγοντες. Οι ενδομοριακές δυνάμεις μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής:

- Ηλεκτρονιακές συζεύξεις σε αρωματικά συστήματα και τμήματα αλειφατικών ενώσεων
- Αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν πολικές ομάδες (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου κ.α.)
- Στερεοχημικά και Υδροφοβα αποτελέσματα (θωράκιση πολικών ομάδων, υδροφοβες αλληλεπιδράσεις κ.α.)

Αντίστοιχα, η ταξινόμηση των δομικών παραγόντων γίνεται ως εξής:

- Ισομέρεια θέσης
- Στερεοϊσομέρεια
- Ιονισμός
- Μοριακό μέγεθος και αναδιάταξη μορίου (π.χ. αναδίπλωση) (33)

### 2.2.2 Συντελεστής μερισμού (P)

Ο συντελεστής μερισμού P (partition coefficient) είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη παράμετρος, για την οποία έχουν δημοσιευτεί δεδομένα με ποικίλλες τιμές σχετικά με την τιμή που μπορεί να λάβει ο όρος  $\log P$ . Πρόκειται για μία σταθερά ισορροπίας, η οποία αποτελεί μέτρο για τη λιποφιλία και είναι καθοριστικής σημασίας για τον έλεγχο της βιολογικής δράσης των ξενοβιοτικών στον ανθρώπινο οργανισμό.

Ο τρόπος με τον οποίο κατανέμεται το φάρμακο μεταξύ της λιποειδικής και της υδατικής φάσης αναπαρίσταται από την ισορροπία που φαίνεται παρακάτω:



όπου P είναι ο συντελεστής ισορροπίας, οποίος υπολογίζεται από το λόγο της συγκέντρωσης του φαρμάκου στη λιποειδική φάση προς τη συγκέντρωσή του στην υδατική φάση και εκφράζεται από τη σχέση:

$$P = \frac{\text{φάρμακο}_{\text{λιπ.}}}{\text{φάρμακο}_{\text{υδατ.}}} \quad [2.3]$$

Η σχέση μεταξύ της ενθαλπίας και του  $\log P$  σε περίπτωση που ο συντελεστής P διαφέρει μεταξύ δύο θερμοκρασιών δίνεται από την εξίσωση Van't Hoff:

$$\log\left(\frac{P_2}{P_1}\right) = \frac{\Delta H^0 (T_2 - T_1)}{2.303RT_1T_2} \quad [2.4]$$

Ο συντελεστής μερισμού αποτελεί μοναδική θερμοδυναμική σταθερά για κάθε ένωση και εξαρτάται τόσο από τους διαλύτες όσο και από τη θερμοκρασία. Με βάση το νόμο του Nernst για την κατανομή ο λόγος P των συγκεντρώσεων για μια ουσία μεταξύ δύο μη αναμειγνυόμενων φάσεων είναι σταθερός για δεδομένη θερμοκρασία, όταν η ουσία βρίσκεται στην ίδια μοριακή μορφή και στις δύο φάσεις. Συνεπώς, η παραπάνω σχέση απλοποιείται στην ακόλουθη:

$$\log P = \frac{-\Delta G}{2.303RT} \quad [2.5]$$

όπου T: η απόλυτη θερμοκρασία, ΔG: η ελεύθερη ενέργεια και R: η παγκόσμια σταθερά των αερίων. (1), (34)

Στη διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμάκων το πλέον χρησιμοποιούμενο σύστημα για τη μελέτη και τον προσδιορισμό της λιποφιλίας είναι το σύστημα «n-οκτανόλης-νερού». Ο υπολογισμός του συντελεστή μερισμού βάσει του συγκεκριμένου συστήματος έχει ευρεία εφαρμογή σε διάφορους τομείς. Σχετίζεται με τη διαλυτότητα ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους και οργανικών υγρών στο νερό, ενώ χρησιμεύει ακόμα και σε περιβαλλοντικές μελέτες. Ο υπολογισμός του logP με βάση το σύστημα «n-οκτανόλης-νερού» περιγράφεται από τη σχέση:

$$\log P_{\text{bio}} = a \log P_{\text{octanol}} + b \quad [2.6],$$

όπου  $\log P_{\text{bio}}$ : ο συντελεστής μερισμού στο βιολογικό σύστημα,  $\log P_{\text{octanol}}$ : ο συντελεστής μερισμού της οκτανόλης-νερού και a,b: σταθερές.

Ο συντελεστής μερισμού μετράται σε σταθερή θερμοκρασία. Ο λόγος για τον οποίο αυτό κρίνεται απαραίτητο είναι ότι η διαλυτότητα του νερού στην οκτανόλη αυξάνεται όταν η θερμοκρασία υπερβαίνει το όριο της συνήθους θερμοκρασίας σε εργαστηριακές συνθήκες (25°C). Ακριβώς η αντίθετη ιδιότητα παρατηρείται στη διάλυση της οκτανόλης σε νερό. Σε περίπτωση που δεν τηρηθεί η προϋπόθεση για σταθερή θερμοκρασία, μπορεί να παρουσιαστούν προβλήματα στη διαύγεια του διαλύματος και στον κορεσμό του.

Η προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης με βάση το εν λόγω σύστημα θεωρείται ικανοποιητική κυρίως για τις βιολογικές μεμβράνες με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Οι λόγοι που οδήγησαν στην καθιέρωση του συστήματος «n-οκτανόλης-νερού» αφορούν συγκεκριμένες ιδιότητες της οκτανόλης, όπως την ικανότητά της να συμμετέχει στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και να απορροφά στο φάσμα του υπεριώδους εξυπηρετώντας τον πειραματικό προσδιορισμό του συντελεστή logP. Επιπλέον, ο υπολογισμός του συντελεστή μερισμού της οκτανόλης είναι αρκετά εύκολος και τέλος, η οκτανόλη εκτός από φθηνή είναι και μη τοξική. (1), (33), (35)

### 2.2.3 Συντελεστής κατανομής (D)

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.2.2., ο συντελεστής μερισμού εκφράζει τον τρόπο με τον οποίο κατανέμεται η μη ιοντισμένη ή ουδέτερη μορφή του φαρμάκου μεταξύ λιποειδικής και υδατικής φάσης. Αντίθετα, ο συντελεστής κατανομής D αναφέρεται στην κατανομή τόσο της ιοντισμένης όσο και της μη ιοντισμένης μορφής μεταξύ των δύο φάσεων σε συγκεκριμένη τιμή pH. Για τον υπολογισμό του συντελεστή κατανομής παίζει ρόλο η ενδογενής λιποφιλία των ουδέτερων, ιοντισμένων και μη μορφών, καθώς επίσης και η συγκέντρωσή τους στο διάλυμα.

Η συσχέτιση μεταξύ του εξαρτούμενου από το pH συντελεστή κατανομής logD και του συντελεστή μερισμού logP γίνεται μέσω της σταθεράς ιονισμού pKa. Πολλά μόρια φαρμάκων περιέχουν ομάδες που μπορούν να ιοντιστούν και κατά συνέπεια να βρεθούν στους πόρους των κυτταρικών μεμβρανών μέσω των εξαρτώμενων από την pKa μηχανισμών ενεργητικής μεταφοράς.

Ο υπολογισμός του logD μπορεί να γίνει με βάση τις προβλεπόμενες τιμές για τα logP και pKa των ιοντισμένων μορφών σε συγκριμένο pH σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\log D_{(pH)} = \log P - \log[1 + 10^{(pH-pK_a)}] \quad [2.7] \text{ για τα οξέα και}$$

$$\log D_{(pH)} = \log P - \log[1 + 10^{(pK_a-pH)}] \quad [2.8] \text{ για τις βάσεις. (36), (37)}$$

Ένας εναλλακτικός τρόπος υπολογισμού του λογαρίθμου logD είναι ο ακόλουθος:

$$\log D = \log[f^N P^N + \Sigma(f^I P^I)] \quad [2.9]$$

όπου:

- $f^N, f^I$ : τα κλάσματα της ουδέτερης και της ιοντισμένης μορφής αντίστοιχα, τα οποία εξαρτώνται από το pH και την pKa.
- $P^N$  and  $P^I$ : οι συντελεστές μερισμού της αδιάστατης και της ιοντισμένης μορφής αντίστοιχα.

Ο συντελεστής μερισμού της ιοντισμένης μορφής είναι πολύ μικρότερος σε σύγκριση με το συντελεστή μερισμού της αδιάστατης μορφής, οπότε, αν θεωρηθεί πρακτικά αμελητέος, προκύπτει ότι η παραπάνω μορφή απλοποιείται ως εξής:

$$\log D = \log(f^N P^N) \quad [2.10]$$

Ισχύει, επίσης, η γενική εξίσωση:

$$\log P = \log D + Q \quad [2.11]$$

όπου Q: διόρθωση εξαρτώμενη από την pKa της ουσίας και το pH του περιβάλλοντος.  
(1)

### 2.3 Φαρμακοδυναμική

Η γνώση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων είναι απαραίτητο να συνδυάζεται με τη φαρμακοδυναμική από τα αρχικά στάδια της ανακάλυψης νέων φαρμάκων. Όπως προαναφέρθηκε, τα φάρμακα έπειτα από την απορρόφηση στην κυκλοφορία του αίματος φτάνουν στους ιστούς και συγκεκριμένα στο σημείο του βιολογικού τους στόχου. Αντικείμενο της φαρμακοδυναμικής είναι η μελέτη της φαρμακολογικής απόκρισης που συντελείται παρουσία ενός φαρμάκου στο αντίστοιχο μόριο-στόχο του. Εξετάζει, δηλαδή, κατά πόσο το εκάστοτε φάρμακο δρα αποτελεσματικά έναντι του στόχου του και τι επιπτώσεις έχει σε αυτόν. Επιπλέον, μελετά το ενδεχόμενο κάποιο φάρμακο να μεταφέρεται και σε άλλες περιοχές του σώματος βρίσκοντας νέους στόχους και προκαλώντας παρενέργειες. Η γνώση των φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων ενός φαρμάκου είναι απαραίτητη προκειμένου να γίνει ακριβής συσχέτιση της συγκέντρωσής του στον οργανισμό και του ανάλογου αποτελέσματος. (2), (38)

## **Φαρμακολογική απόκριση**

Φαρμακολογική απόκριση θεωρείται κάθε φυσιολογική δράση του οργανισμού που αποδίδεται στην παρουσία κάποιου φαρμάκου μέσα σε αυτόν. Αυτή η απόκριση μπορεί να επιφέρει θετικά αποτελέσματα, όπως είναι η θεραπευτική δράση, αλλά και ανεπιθύμητα, όπως είναι η τοξικολογική απόκριση. Η μεταβολή της δόσης του εκάστοτε φαρμάκου συχνά βελτιώνει την κλινική απόκρισή του και επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα, ωστόσο δεν αποτελεί πάντα λύση στα προβλήματα που προκύπτουν. Συνήθως, σημαντικότερος είναι ο ρόλος της συγκέντρωσης, καθώς παρατηρείται καλύτερη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του φαρμάκου που κυκλοφορεί στο πλάσμα του αίματος και του αποτελέσματος που επιφέρει. Βασικές προϋποθέσεις για την καλύτερη κατανόηση της φαρμακοδυναμικής είναι οι εξής: η απόκριση να έχει νόημα σε κλινικό επίπεδο και να μετράται με αξιόπιστο τρόπο.

Η απόκριση ενός φαρμάκου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Ένας από τους κυριότερους είναι το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η ασθένεια, διότι ο παράγοντας αυτός επιδρά στη λειτουργία των οργάνων του ασθενούς. Στην απόκριση επιδρούν άμεσα, επίσης, οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες του φαρμάκου που σχετίζονται με το μεταβολισμό και την σύνδεση με το υπόστρωμα του στόχου, καθώς και άλλοι βιοχημικοί και φυσιολογικοί μηχανισμοί του οργανισμού. (38)

### 3. ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

#### 3.1 Βασικές έννοιες της χρωματογραφικής ανάλυσης

Η χρωματογραφία είναι μια αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει πλήθος επιμέρους τεχνικών και εφαρμόζεται για το διαχωρισμό των συστατικών σε υπό ανάλυση δείγματα ουσιών. Κάθε χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει μία κινητή φάση, η οποία μεταφέρει τις διαχωριζόμενες ουσίες μέσω μίας στατικής φάσης. Σε κάθε χρωματογραφικό διαχωρισμό η διαχωριζόμενη ουσία κατανέμεται μεταξύ στατικής και κινητής φάσης. Στη διάρκεια του διαχωρισμού δημιουργούνται μετακινούμενες ζώνες μέσα στη στήλη, οι οποίες ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή κατά την έξοδό τους και καταγράφονται ως διακριτές κορυφές. Η γραφική παράσταση του μετρούμενου από τον ανιχνευτή μεγέθους προς το χρόνο μετά την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη καλείται **χρωματογράφημα**.

Ένα από τα χαρακτηριστικά μεγέθη για την υπό ανάλυση ουσία στη χρωματογραφία είναι ο **χρόνος κατακράτησης (retention time)  $t_R$** . Πρόκειται για το χρόνο που απαιτείται ώστε μία ουσία να φτάσει στον ανιχνευτή από τη στιγμή που θα εισαχθεί με ένεση στη στήλη. Ο χρόνος κατακράτησης λαμβάνεται στο χρονικό διάστημα μετά την ένεση και μέχρι το μέγιστο της κορυφής έκλουσης. Αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά για κάθε ουσία και εξαρτάται από την πίεση της στήλης, την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, τη φύση της στατικής φάσης, τη σύσταση της κινητής φάσης και τη θερμοκρασία της στήλης.

Ο χρόνος παραμονής των μορίων ενός δείγματος στην κινητή φάση καλείται νεκρός χρόνος και είναι ο ίδιος για όλα τα συστατικά. Συγκεκριμένα, ο **νεκρός χρόνος  $t_0$**  είναι ο χρόνος που απαιτείται για ένα μη κατακρατούμενο από τη στατική φάση συστατικό να διέλθει από τη στήλη. Σε ένα χρωματογράφημα ο νεκρός χρόνος αποτυπώνεται ως μία κορυφή που εμφανίζεται πολύ σύντομα μετά την ένεση του δείγματος στη στήλη.

Ο καθαρός χρόνος παραμονής ενός συστατικού ή αλλιώς **ανηγμένος χρόνος κατακράτησης  $t_R'$**  ισούται με τη διαφορά του χρόνου κατακράτησης και του νεκρού χρόνου, δηλαδή:  $t_R' = t_R - t_0$ . (39)

Η κατανομή της ουσίας μεταξύ των δύο φάσεων εκφράζεται από το συντελεστή κατανομής  $k$  (ή  $k'$ ) και υπολογίζεται από τη σχέση:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad [3.1] \quad (40)$$

#### 3.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography) είναι μια εξελιγμένη μορφή χρωματογραφίας στήλης, η κινητή φάση της οποίας ρέει με τη βοήθεια αντλίας. Η ταχύτητα ανάλυσης της HPLC είναι μεγάλη



και είναι μια μέθοδος που επιτρέπει τη χρήση στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων πληρωτικού υλικού. Έτσι, αυξάνεται το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης που είναι διαθέσιμο για αλληλεπίδραση με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Ο διαχωρισμός των αναλυόμενων ουσιών είναι καλύτερος σε σχέση με την απλή χρωματογραφία στήλης και το μέγεθος της στήλης που απαιτείται είναι μικρότερο. Η HPLC μπορεί να είναι είτε κανονικής είτε αντιστρόφου φάσεως. Στην HPLC κανονικής φάσης ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιείται κάποιο πολικό υλικό, ενώ η κινητή φάση έχει μη πολικούς διαλύτες και δεν περιέχει νερό. Συνεπώς, οι λιγότερο πολικές ενώσεις διέρχονται από τη στήλη ταχύτερα και εκλύονται από αυτήν νωρίτερα. Η HPLC αντίστροφης φάσης (reversed phase HPLC) είναι το αντίστροφο της HPLC κανονικής, δηλαδή ο διαχωρισμός σε αυτήν την περίπτωση οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό την ροή πολικής κινητής φάσης, η οποία αποτελείται από οργανικούς διαλύτες και νερό. (39)



Εικόνα 7. Τυπικό HPLC σύστημα (41)

### 3.3 Χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης (HPAC)

#### 3.3.1 Βασικές αρχές της HPAC

Όπως προκύπτει από τον ορισμό της χρωματογραφίας συγγένειας (HPAC: high-performance affinity chromatography), πρόκειται για μια κατηγορία υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιεί ως στατική φάση βιολογικά σχετιζόμενους παράγοντες για την ανάλυση των συστατικών σε διάφορα δείγματα. Η κατακράτηση των ουσιών σε αυτή τη μέθοδο βασίζεται στον ίδιο τύπο συγκεκριμένων και αντιστρέψιμων αλληλεπιδράσεων σε βιολογικά συστήματα, όπως είναι η σύνδεση ενός ενζύμου με ένα υπόστρωμα ή ενός αντισώματος με ένα αντιγόνο. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές αξιοποιούνται από τη χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιώντας ένα ζεύγος αλληλεπιδρώντων μορίων σε ένα σταθερό στήριγμα που χρησιμοποιείται ως στατική φάση. Το ακινητοποιημένο μόριο ονομάζεται και δεσμός συγγένειας και δίνει τη δυνατότητα σε μια στήλη συγγένειας να δεσμεύει συγκεκριμένα συστατικά από κάποιο δείγμα.

Εκτός του δεσμού συγγένειας, ενός ακόμη σημαντικός παράγοντας στη χρωματογραφία συγγένειας είναι το υλικό που χρησιμοποιείται για τη συγκράτηση του δεσμού μέσα στη στήλη. Ιδανικά, η δέσμευση αυτή πρέπει να είναι χαμηλή για τα

συστατικά του δείγματος, εύκολα τροποποιήσιμη και να παραμένει σταθερή υπό τις συνθήκες ρυθμού ροής, πίεσης και διαλύτη που εφαρμόζονται στο σύστημα. Στη χρωματογραφία συγγένειας χαμηλής απόδοσης, χρησιμοποιείται συνήθως κάποιο εύκαμπτο υλικό μεγάλης διαμέτρου, όπως κάποια γέλη ανθρακικής βάσης ή συγκεκριμένα συνθετικά πολυμερή οργανικής βάσης. Οι χαμηλές πιέσεις που παράγονται από αυτά τα στηρίγματα τα καθιστούν ικανά να λειτουργούν υπό τη ροή της βαρύτητας ή με περισταλτική αντλία. Είναι, επίσης, φθηνά ως προς τη χρήση και τη συντήρησή τους και έχουν χαμηλές απαιτήσεις ως προς την προκατεργασία των δειγμάτων. Ωστόσο, μειονεκτούν ως προς τη σταθερότητα σε υψηλούς ρυθμούς ροής και τις ιδιότητες μεταφοράς μάζας, με αποτέλεσμα η χρήση τους σε αναλυτικές εφαρμογές να είναι περιορισμένη. Η χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης χαρακτηρίζεται από στηρίγματα που αποτελούνται από μικρά, άκαμπτα μόρια, που μπορούν να ανταπεξέλθουν σε συνθήκες υψηλού ρυθμού ροής και πίεσης. Το υλικό κατασκευής τους είναι τροποποιημένο διοξείδιο του πυριτίου ή γυαλί, σφαιρίδια αζαλακτόζης και υδροξυλιωμένο πολυστυρένιο. Η σταθερότητα και η αποτελεσματικότητα σε αυτήν την περίπτωση είναι υψηλότερες και τα στηρίγματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τυπικά HPLC συστήματα. Αν και η συγκεκριμένη μέθοδος έχει υψηλότερο κόστος σχεδιασμού και εφαρμογής, προτιμάται σε αναλυτικές εφαρμογές έναντι της χρωματογραφίας συγγένειας χαμηλής απόδοσης.

Κατά τη διεξαγωγή των μετρήσεων στην HPAC, η εκάστοτε πρωτεΐνη χρησιμοποιείται ως ακινητοποιημένος σύνδεσμος και γίνεται ένεση του αναλύτη στη στήλη παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ή κάποιου ανταγωνιστικού παράγοντα. Εξετάζοντας το χρόνο έκλουσης ή τον όγκο του αναλύτη αφού περάσει από τη στήλη, αντλούνται πληροφορίες για τις σταθερές ισορροπίας που περιγράφουν τη σύνδεση του αναλύτη με το δεσμό συγγένειας. Ακόμα, το σχήμα της καμπύλης έκλουσης του αναλύτη μπορεί να δώσει επιπρόσθετες πληροφορίες σχετικά με το ρυθμό της διαδικασίας σύνδεσης. (42)

### **3.3.2 Η HPAC στην ανάλυση φαρμάκων**

Κατά τη διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στον ποιοτικό χαρακτηρισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων των φαρμάκων και των πρωτεϊνών (π.χ. HSA) με τη χρήση των ανάλογων σταθερών συσχέτισης. Μια τεχνική που δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς τις σταθερές σύνδεσης μεταξύ φαρμακομορίων και πρωτεϊνών είναι η χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης. Η HPAC είναι μια μέθοδος κατά την οποία, όπως αναφέρθηκε, κάποιο βιολογικά σχετιζόμενο σύμπλοκο χρησιμοποιείται ως στατική φάση σε ένα σύστημα HPLC. Η HPAC μπορεί να απομονώσει εκλεκτικά τις ουσίες πολύπλοκων δειγμάτων, ενώ εφαρμόζεται ευρέως για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων σε βιολογικά συστήματα. Κατά τα τελευταία έτη, η εν λόγω τεχνική βρίσκει εφαρμογή στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φαρμάκων, των ορμονών και άλλων ουσιών που συνδέονται με πρωτεΐνες του πλάσματος. Η συγκεκριμένη μέθοδος πλεονεκτεί έναντι των κλασικών μεθόδων ανάλυσης, καθώς παρουσιάζει υψηλή ακρίβεια, αυτοματοποιημένο τρόπο διεξαγωγής των μετρήσεων και μεγάλη ταχύτητα ανάλυσης.

Επιπλέον, ικανοποιητική είναι και η συσχέτισή της με άλλες παρόμοιες τεχνικές ανάλυσης. (42), (43)

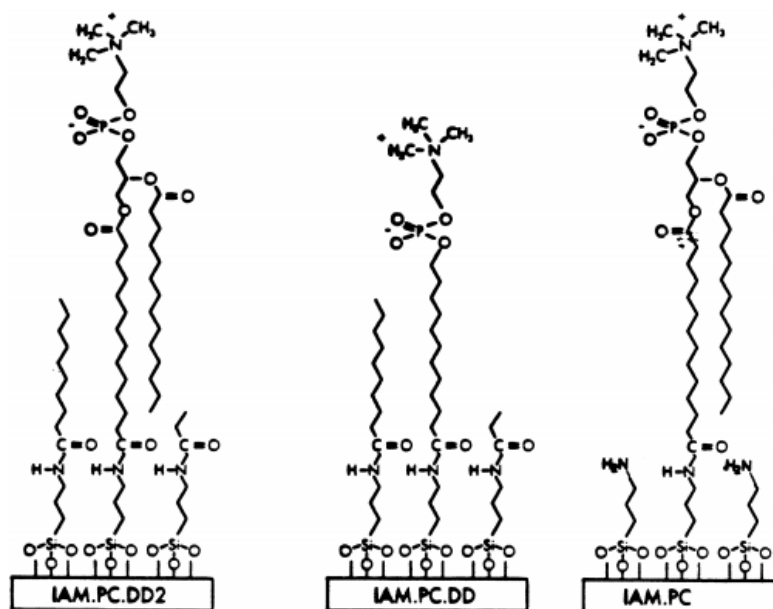
Η ΗΡΑC βασίζεται στη μελέτη της κατακράτησης και της ανταγωνιστικότητας των διαλυμένων ουσιών (φαρμάκων), καθώς αυτές διέρχονται από την ακινητοποιημένη στήλη ΗSΑ. Για τον υπολογισμό των σταθερών σύνδεσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο εμπρόσθιες όσο και ζωνικές χρωματογραφικές τεχνικές. Η εμπρόσθια χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιείται με συνεχή εφαρμογή καθαρού διαλύτη γνωστής συγκέντρωσης σε μια στήλη που περιέχει συγκεκριμένο ποσό κάποιου ακινητοποιημένου συμπλόκου. Όσο αυξάνεται η ποσότητα της δεσμευμένης ουσίας στη στήλη, ξεκινά να εμποτίζεται το σύμπλοκο και να σχηματίζει μια προοδευτική καμπύλη. Στη ζωνική έκλουση, ποσότητα κάποιου ανταγωνιστικού παράγοντα γνωστής συγκέντρωσης εφαρμόζεται διαρκώς στην κινητή φάση σε μια στήλη που περιέχει κάποιο ακινητοποιημένο σύμπλοκο. Παράλληλα, γίνεται ένεση μικρών ποσοτήτων του αναλύτη στη στήλη. Η σταθερά σύνδεσης σε αυτήν την περίπτωση υπολογίζεται από τη μεταβολή του παράγοντα κατακράτησης στον αναλύτη που έχει εισαχθεί στη στήλη. Παρόλο που η καθεμία από τις τεχνικές μεμονωμένα μπορεί να δώσει αποτελεσματικές συσχετίσεις σχετικά με τις σταθερές σύνδεσης στην ΗΡΑC, ο συνδυασμός τους μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω βελτίωση των αποτελεσμάτων της μεθόδου. (43)

### **3.4 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM)**

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 2, η από στόματος χορήγηση φαρμάκων συνιστά τον ευκολότερο και πιο κοινό τρόπο λήψης. Η απορρόφηση μετά από τη στοματική χορήγηση φαρμάκου γίνεται μέσω της γαστρεντερικής οδού και κατά κύριο λόγο στο λεπτό έντερο. Για το λόγο αυτό η μεμβρανική διαπερατότητα αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα των φαρμάκων για τον τομέα της φαρμακευτικής χημείας και πρέπει να μελετάται και να λαμβάνεται υπόψιν από τα αρχικά στάδια του σχεδιασμού φαρμάκων. Είναι γεγονός ότι τα προβλήματα απορρόφησης και, κατά συνέπεια, βιοδιαθεσιμότητας αποτελούν από τους βασικότερους παράγοντες για την απόρριψη υποψήφιων φαρμάκων. (44)

Η IAM (Immobilized Artificial Membrane Chromatography) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χρωματογραφική μέθοδος για τον υπολογισμό της διαπερατότητας των μεμβρανών μικρομοριακών φαρμάκων. Οι συννηθέστερες στήλες IAM είναι οι: IAM.PC, IAM.PC.DD και IAM.PC.DD2. Ένα φάρμακο για να μπορεί να απορροφηθεί από τη γαστρεντερική οδό κατόπιν στοματικής χορήγησης πρέπει να μπορεί να κινηθεί μεταξύ των κυτταρικών μεμβρανών (διακυτταρική απορρόφηση) ή ανάμεσα στα κενά που δημιουργούνται μεταξύ των κυττάρων των γαστρεντερικών βλεννογόνων (παρακυτταρική απορρόφηση). Τόσο η διακυτταρική όσο και η παρακυτταρική απορρόφηση εξαρτώνται από ιδιότητες των φαρμακομορίων, όπως το μοριακό βάρος, η πολικότητα και η λιποφιλία. Οι μεμβράνες της γαστρεντερικής οδού είναι φυσιολογικοί φραγμοί που λειτουργούν εκλεκτικά ως προς τα μόρια στα οποία επιτρέπουν να περάσουν. Αποτελούνται από βιομοριακές λιπιδικές μήτρες, οι οποίες περιέχουν κατά κύριο λόγο φωσφολιπίδια και χοληστερόλη. Η γαστρεντερική

απορρόφη, καθώς επίσης και η διείσδυση από άλλους φραγμούς, μπορεί να είναι είτε ενεργητική είτε παθητική. Η ενεργητική απορρόφηση εξαρτάται από την πρόσδεση ενός μορίου σε συγκεκριμένη θέση κάποιας πρωτεΐνης-μεταφορέα, ενώ η παθητική απορρόφηση βασίζεται στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εκάστοτε μορίου. (45)



Εικόνα 8. Δομή των φάσεων της IAM (46)

Οι ακινητοποιημένες τεχνητές μεμβράνες είναι χρωματογραφικές επιφάνειες που παρασκευάζονται με την ακινητοποίηση των κυτταρικών μεμβρανών φωσφολιπιδίων σε στερεές επιφάνειες μονοστιβάδων πυκνότητας. Δεδομένου ότι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) αποτελεί το κύριο φωσφολιπίδιο των κυτταρικών μεμβρανών, οι επιφάνειες IAM που παρασκευάζονται από ανάλογα PC παρουσιάζουν όμοιο φωσφολιπιδικό περιβάλλον με αυτό των φωσφολιπιδίων που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες. Επιπλέον, προσομοιώνουν την υδρόφιλη και υδρόφοβη συνεισφορά του διαχωρισμού μεταξύ φαρμάκου και μεμβράνης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της απορρόφησης των φαρμάκων. Ωστόσο, η διαπερατότητα των μεμβρανών μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες όπως είναι η σύνθεση, το μέγεθος και η υδροφοβικότητα των φαρμακομορίων. Πληροφορίες σχετικά με αυτές τις ιδιότητες λαμβάνονται από τη μελέτη της χημικής δομής των φαρμάκων και της συγγένειάς τους με τους φορείς του ολιγοπεπτιδίου του λεπτού εντέρου. (45)

### 3.5 Μικκυλιακή Χρωματογραφία (MLC)

Η υδροχρωματογραφία μικκυλίων είναι μια εναλλακτική μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Αντιστρόφου Φάσεως (RPLC) με υδατοοργανική κινητή φάση, η οποία συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των μικκυλιακών μέσων με τη διαχωριστική ικανότητα της Υγρής Χρωματογραφίας (LC). Στη συμβατική υδροχρωματογραφία η στατική φάση βρίσκεται ακινητοποιημένη μέσα στη στήλη, ενώ η κινητή φάση διαχέεται μέσα στο στατικό υπόστρωμα. Το δείγμα προστίθεται στην κορυφή της στήλης και τα συστατικά του κατανέμονται μεταξύ στατικής και κινητής φάσης με ρυθμό ανάλογο του συντελεστή χωρητικότητας, ενώ η κινητή φάση ρέει διαρκώς κατά μήκος της στήλης. Η σχετική κίνηση μεταξύ των δύο φάσεων, στις οποίες διαλύεται το δείγμα, επηρεάζει την απόδοση του χρωματογραφικού διαχωρισμού. (47)

Η μικκυλιακή χρωματογραφία γίνεται ολοένα και δημοφιλέστερη, καθώς η προσθήκη χημικών μετατροπών στην κινητή φάση μπορεί να επιφέρει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα. Η συγκράτηση των ουσιών στην υγρή χρωματογραφία καθορίζεται πρωτίστως από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαλύτη και διαλυμένης ουσίας και δευτερευόντως από τη συνεισφορά των αλληλεπιδράσεων μεταξύ κινητής φάσης και διαλυμένης ουσίας. Ο σκοπός είναι να μεταβληθούν οι αλληλεπιδράσεις διαλύτη-διαλυμένης ουσίας με τρόπο ώστε να αποτραπεί η συγκράτηση από δεσμούς αλληλοεπικάλυψης. Σε ορισμένες περιπτώσεις η εκλεκτικότητα του χρωματογραφικού συστήματος μπορεί να μεταβληθεί με την αλλαγή της εκκλουστικής ισχύος ή με τη μεταβολή των αναλογιών της υδροοργανικής κινητής φάσης. Ωστόσο, η βελτίωση της εκλεκτικότητας πραγματοποιείται συνήθως με παράλληλες αλλαγές στη συγκράτηση όλων των συστατικών ενός δείγματος και στη σχετική κατακράτηση. Η μεταβολή της εκλεκτικότητας είναι επιθυμητό να γίνεται με όσο το δυνατόν λιγότερο δραστικές αλλαγές στην εκκλουστική ισχύ του χρωματογραφικού συστήματος. Ένας τρόπος να επιτευχθεί αυτό, ιδίως στην περίπτωση μη οργανικών διαλυμένων ουσιών, είναι η προσθήκη ιοντικού τασιενεργού. Η αντίθετη φόρτιση της επιφανειοδραστικής ουσίας προκαλεί αλληλεπίδραση με τη διαλυμένη ουσία ικανή να μεταβάλλει δραστικά τα χαρακτηριστικά συγκράτησης της τελευταίας. Η εφαρμογή της μικκυλιακής χρωματογραφίας θα ήταν ακόμα περισσότερο διαδεδομένη εάν δεν υστερούσε σε αποδοτικότητα συγκριτικά με τη συμβατική υδροχρωματογραφία. (48), (49)

Η θέση των χρωματογραφικών κορυφών αντιστοιχεί στη συγκράτησή τους από τη στήλη, ενώ το σχήμα τους προκύπτει με βάση την απόδοσή τους. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά των κορυφών εξαρτώνται από τη φύση του τασιενεργού, καθώς επίσης και από το pH της κινητής φάσης, τη θερμοκρασία και τις ιοντικές δυνάμεις. Όπως κάθε άλλη μέθοδος, η εφαρμογή της μικκυλιακής χρωματογραφίας απαιτεί τις απαραίτητες γνώσεις σχετικά με την τεχνική και με τη σωστή παρασκευή και χρήση του διαλύματος τασιενεργού. Σε αντίθετη περίπτωση, τα αποτελέσματα μπορεί να είναι επιβλαβή τόσο για τη στήλη όσο και για ολόκληρο το χρωματογραφικό σύστημα. Επιπλέον, προκειμένου να χρησιμοποιούνται σωστά οι τασιενεργές ουσίες απαιτείται η γνώση των φυσικοχημικών τους παραμέτρων. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης, εάν δεν ληφθούν υπόψιν οι συγκεκριμένες ιδιότητες, μπορεί να είναι αναξιόπιστα. (49)

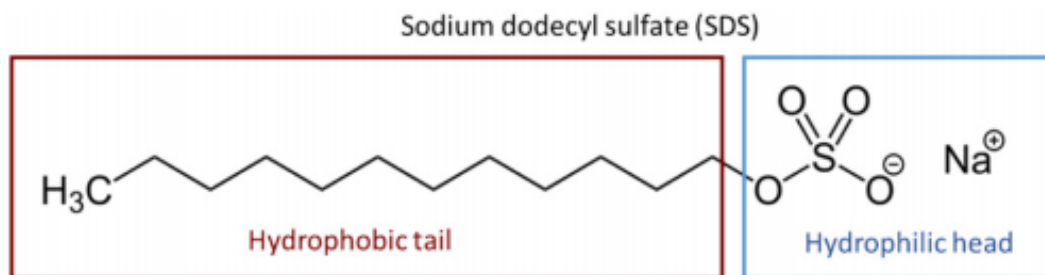
### 3.5.1 Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων (IPC) και MLC

Η ανάπτυξη της μικκυλιακής χρωματογραφίας επηρεάστηκε σε κάποιο βαθμό από την προγενέστερη και παρεμφερή χρωματογραφική μέθοδο IPC (Ion Pair Chromatography). Η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων αναπτύχθηκε το 1976 από τους Knox και Laird με την προσθήκη μιας μικρής ποσότητας ιοντικού τασιενεργού στην πολική υδατοοργανική κινητή φάση της υγροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως (RPLC). Υπό αυτές τις συνθήκες, το τασιενεργό προσροφάται από τη στατική φάση και συνδέεται με τη διαλυμένη ουσία, με την οποία έχει αντίθετη φόρτιση, καθορίζοντας παράγοντες όπως το συντελεστή κατακράτησης ( $k$ ). Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τις ιδιότητες συγκράτησης σε αυτή τη μέθοδο είναι η κινητή φάση, η φύση και η συγκέντρωση του ιοντικού τασιενεργού και του οργανικού διαλύτη, η ιοντική ισχύς και το pH. Οι διαλύτες στην ICP είναι οι ίδιοι με αυτούς που χρησιμοποιούνται στην MLC με τους πιο κοινούς να είναι η μεθανόλη, η προπανόλη και το ακετονιτρίλιο. Οι ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες που επιλέγονται συνήθως έχουν από 6 έως 16 μεθυλομάδες. Το ποσό του τασιενεργού που προσροφάται αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσής του στην κινητή φάση, αλλά και με τον αριθμό των ανθράκων της αλκυλικής αλυσίδας. Αντίθετα, η προσροφόμενη ποσότητα μειώνεται δραστικά με την προσθήκη οργανικών διαλυτών εξαιτίας της αυξημένης εκλουστικής ισχύος τους και της εκρόφησης ποσότητας του τασιενεργού από τη στατική φάση. Η εφαρμογή της ICP προϋποθέτει την σταθερότητα της στήλης, ώστε τα αποτελέσματα να είναι αναπαραγωγίσιμα. Ακόμα, θα πρέπει να αποφεύγεται η αύξηση της συγκέντρωσης της επιφανειοδραστικής ουσίας σε επίπεδα που υπερβαίνουν την κρίσιμη μικκυλιακή, καθώς οι ιδιότητες συγκράτησης μεταβάλλονται άρδην με τη δημιουργία μικκυλίων. Παρότι οι εισηγητές των δύο χρωματογραφικών τεχνικών δεν είναι οι ίδιοι, οι ομοιότητες μεταξύ των ICP και MLC είναι προφανείς. (50)

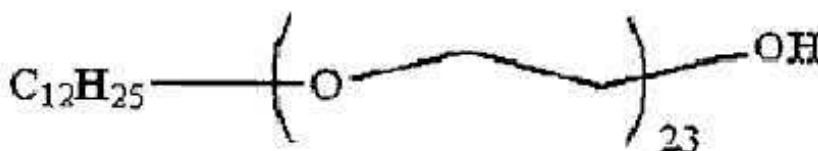
### 3.5.2 Τασιενεργές ουσίες

Ο όρος τασιενεργή ουσία ή αλλιώς επιφανειοδραστική ουσία υποδηλώνει ουσιαστικά τη βασική ιδιότητά των εν λόγω ουσιών, που είναι η ικανότητά τους να απορροφούν σε κάθε διεπιφάνεια μεταβάλλοντας την επιφανειακή τάση. Οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν αμφιφιλική δομή, δηλαδή το μόριό τους αποτελείται από δύο στελέχη, μια υδρόφιλη κεφαλή και μια υδρόφοβη ουρά. (49)

Οι πιο κοινές επιφανειοδραστικές ουσίες είναι το ανιονικό Sodium Dodecyl Sulphate (SDS), το κατιοντικό Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) και το μη ιονικό dodecyl-poly(ethylene oxide-23) ether (Brij-35). (50)



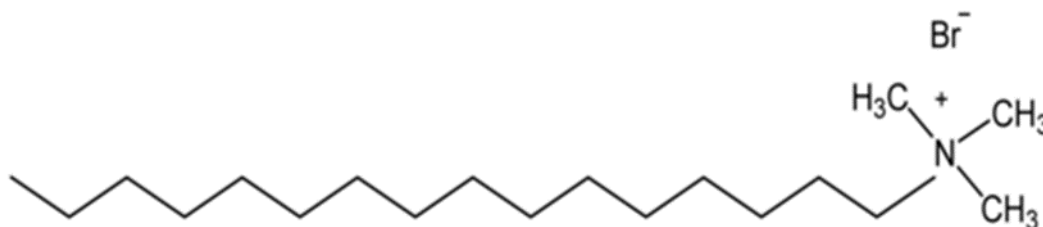
Εικόνα 9. Χημική δομή SDS (51)



Εικόνα 10. Χημική δομή Brij-35 (52)

### Το τασιενεργό CTAB

Το Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) είναι το τασιενεργό που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας και γι' αυτό γίνεται ειδική αναφορά σε αυτό. Πρόκειται για ένα κατιοντικό τασιενεργό το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στη μικκυλιακή χρωματογραφία. Το μοριακό του βάρος είναι 464,4 g/mol και ο συντακτικός του τύπος είναι ο εξής:  $C_{19}H_{42}BrN$ . (53) Χρησιμοποιείται για διάφορους σκοπούς στη φαρμακοβιομηχανία, καθώς έχει αντισηπτικές, αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές και άλλες ιδιότητες. Η χρήση του CTAB στη χρωματογραφία επιφέρει τόσο υδρόφοβη όσο και σιλανόφιλη προσρόφηση αυξάνοντας την υδροφοβία της στατικής φάσης και δημιουργώντας ένα κατιοντικό υδρόφιλο επιφανειακό στρώμα. (54)



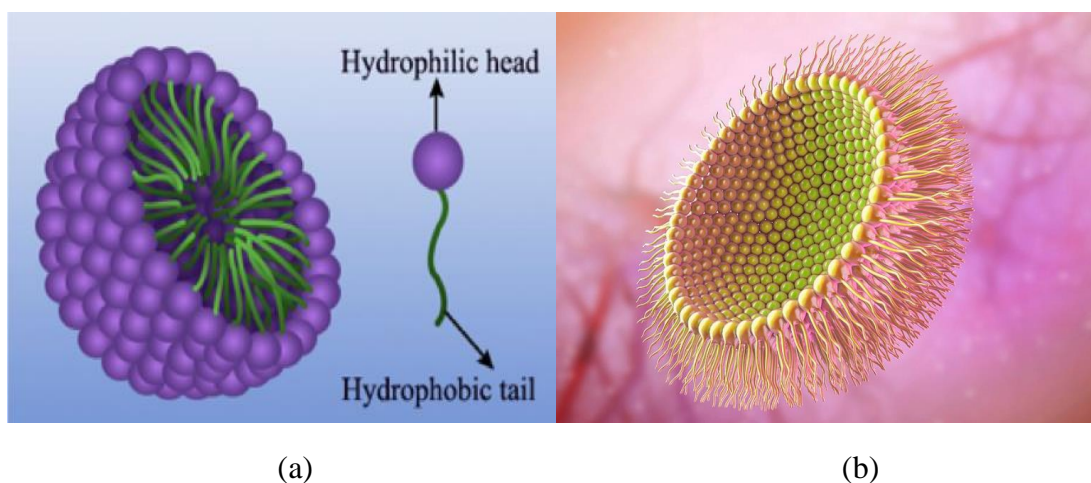
Εικόνα 11. Χημική δομή CTAB (55)

Αντίστοιχα, οι πιο συνθισμένοι οργανικοί διαλύτες είναι αλκοόλες μικρής ή μεσαίας αλυσίδας και το ακετονιτρίλιο. Η παρουσία των μικκυλίων συνεισφέρει στη διατήρηση των οργανικών διαλυτών μέσα στο διάλυμα σε συγκεντρώσεις υψηλότερες της διαλυτότητάς τους στο νερό και αποτρέπει την εξάτμισή τους. (50)

### Συγκέντρωση τασιενεργού

Μέχρι πρότινος οι συγκεντρώσεις τασιενεργού που χρησιμοποιούνταν ήταν χαμηλές και σκόπιμα παρέμεναν κάτω από την **κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (cmc)**. Η εισήγηση για υψηλότερες συγκεντρώσεις τασιενεργού έγινε το 1986 από τους Armstrong και Henry, οι οποίοι απέδειξαν τη χρησιμότητα της υψηλότερης συγκέντρωσης σε κινητές φάσεις αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφίας. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του τασιενεργού θα πρέπει να υπερβαίνει την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση, ώστε σχηματίζονται μικκύλια που αλληλεπιδρούν με την κινητή φάση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί κάποιου οργανικού μετατροπέα. Έκτοτε, ακολούθησαν και άλλες έρευνες και εφαρμογές που απέδειξαν τα πλεονεκτήματα του σχηματισμού μικκυλίων τόσο σε επίπεδο οικονομίας της μεθόδου όσο και σε επίπεδο εκλεκτικότητας. Η ιδέα της χρήσης καθαρά μικκυλιακών κινητών φάσεων γίνεται ακόμα πιο ελκυστική αν αναλογιστεί κανείς τη χαμηλή τοξικότητά τους και τον μειωμένο περιβαλλοντικό αντίκτυπο. (48), (49), (50)

Όταν η συγκέντρωση του τασιενεργού υπερβαίνει την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (cmc), ευνοείται η ανάπτυξη μικκυλίων, με αποτέλεσμα το τασιενεργό διάλυμα να μετατρέπεται σε μικκυλιακό. Πάνω από την cmc, κάθε μεταβολή της συγκέντρωσης του τασιενεργού οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης των μικκυλίων στη διαλυμένη ουσία, ενώ ο αριθμός των μονομερών του τασιενεργού στην κινητή φάση παραμένει σταθερός. Ένα συγκεκριμένο ποσό των μονομερών προσροφάται στη στατική φάση προσδίδοντας σταθερότητα στη στήλη και ομοιόμορφη συμπεριφορά ως προς τη συγκράτηση των ουσιών. (50)



**Εικόνα 12.** (a) δομή μικκυλίου, (b) δομή αντίστροφου μικκυλίου (56), (57)



## Ρύθμιση pH της κινητής φάσης

Για το διαχωρισμό ασθενών οξέων και βάσεων με τη χρήση μικκυλιακών κινητών φάσεων γίνεται ρύθμιση του pH σε κάποια προκαθορισμένη τιμή. Έτσι, μεταβάλλεται μόνο η συγκέντρωση του τασιενεργού και του διαλύτη. Αντίθετα, η ανάλυση μιγμάτων που περιέχουν ένα ή περισσότερα συστατικά που μπορούν να ιοντιστούν απαιτεί μεταβολές στην τιμή του pH, ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός. Το μειονέκτημα σε αυτήν την περίπτωση είναι ότι η δυσκολία της βελτίωσης του διαχωρισμού αυξάνεται, καθώς οι αλλαγές της συγκέντρωσης του οργανικού διαλύτη και του τασιενεργού επηρεάζουν τη βασική ή όξινη συμπεριφορά των διαλυμένων ουσιών. (58)

## Σημείο Krafft

Το σημείο Krafft αφορά τα ιοντικά τασιενεργά και είναι η θερμοκρασία στην οποία η διαλυτότητα των μονομερών της επιφανειοδραστικής ουσίας γίνεται ίση με την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (cmc). Σε θερμοκρασίες κάτω από το σημείο Krafft η διαλυτότητα μειώνεται και το διάλυμα δεν περιέχει μικκύλια. Οι χρωματογραφικές αναλύσεις πρέπει να πραγματοποιούνται σε θερμοκρασίες πάνω από το σημείο Krafft. Αυτό σημαίνει ότι το σημείο Krafft βρίσκεται κάτω από τη συνήθη θερμοκρασία. (59)

Compound	Name	Abbr.	CMC, mM	Aggregat. number	Kraft point, °C	Molar volume, mol L <sup>-1</sup>
C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> Na	Sodium dodecyl sulfate; SDS sodium lauryl sulfate		8.1	62	16	0.246
C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br	Cetyltrimethylammonium bromide	CTAB	0.83	90	26	0.364
C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>23</sub> OH	Polyoxyethylene 23 dodecyl ether	Brij 35	0.06	41	100>**	1.12
C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>9.5</sub>	p-Octylbenzene polyoxyethylene 9.5 alcohol	Triton X-100	0.3	140	67**	0.743

Εικόνα 13. Τα πιο κοινά τασιενεργά στην MLC και τα χαρακτηριστικά τους (60)

### 3.5.3 Στατική και κινητή φάση στην MLC

Τα βασικά συστατικά των δύο φάσεων στην MLC ταυτίζονται με αυτά της RPLC. Η στατική φάση είναι μη πολική, ενώ η κινητή φάση είναι υδατική πολική. Ωστόσο, στη συμβατική RPLC οι υδροοργανικές φάσεις είναι ομογενείς, ενώ τα μικκυλιακά διαλύματα στην MLC είναι ετερογενή, αφού αποτελούνται από δύο διακριτές φάσεις: τα μικκυλιακά συσσωματώματα (ψευδοφάση μικκυλίων) και υδροοργανικά μίγματα που περιέχουν μονομερή του τασιενεργού σε συγκέντρωση ίση με την κρίσιμη

μικκυλιακή. Επιπλέον, η στατική φάση τροποποιείται από την προσρόφιση των μονομερών του τασιενεργού, δημιουργώντας μια δομή παρόμοια με ένα ανοιχτό μικκύλιο.

Η μειωμένη εκλουστική ισχύς των καθαρά μικκυλιακών κινητών φάσεων, δηλαδή των κινητών φάσεων στις οποίες δεν προστίθεται οργανικός διαλύτης, αποδίδεται στον αποκλεισμό των μικκυλίων από τους πόρους μέσα στους οποίους βρίσκεται το μεγαλύτερο μέρος της στατικής φάσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μικκύλια να μην έχουν άμεση πρόσβαση στις διαλυμένες ουσίες, εκτός αν αυτές έχουν διαχυθεί εκτός των πόρων. Κατά συνέπεια, ακόμα και η ύπαρξη μικκυλίων σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν είναι επαρκής, ώστε να εκλουστούν μέτρια έως υψηλά υδροφοβικές ενώσεις.

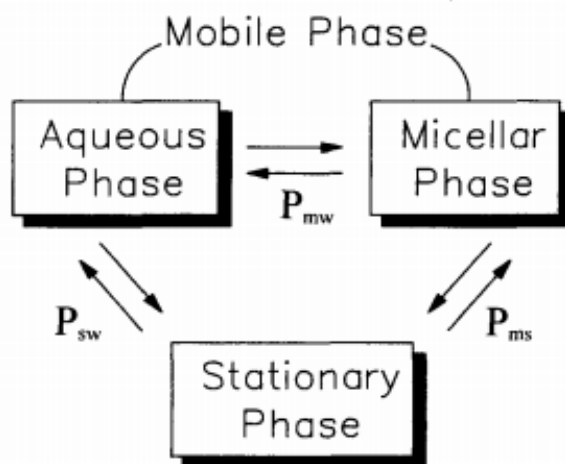
Η κινητή φάση είναι υδατικό διάλυμα κάποιου τασιενεργού με συγκέντρωση μεγαλύτερη της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης (cmc), η οποία αποτελεί προϋπόθεση για την ύπαρξή τους. Μέσα στα μικκύλια διακρίνονται τρεις περιοχές διαλυτοποίησης: ο πυρήνας που είναι υδροφοβικός, η επιφάνεια που είναι υδρόφιλη και το στρώμα που βρίσκεται μεταξύ των ομάδων της κεφαλής και του πυρήνα. Το μικροπεριβάλλον των μικκυλίων είναι διαφορετικό από αυτό του ελεύθερου διαλύτη, με αποτέλεσμα να προκαλούνται διαταραχές στις φυσικοχημικές ιδιότητες της διαλυμένης ουσίας, όπως μεταβολές στη διαλυτότητα, στην οξύτητα, στις φωτοφυσικές ιδιότητες και στους ρυθμούς αντίδρασης. Οι απλούστερες κινητές φάσεις, οι οποίες παρασκευάζονται με τη διάλυση του τασιενεργού σε νερό, χαρακτηρίζονται συνήθως από χαμηλή εκλουστική ισχύ. (61)

### Ισορροπία φάσεων

Στην MLC η ισορροπία των φάσεων περιγράφεται από τους κολουθους συντελεστές:

- $P_{ws}$ : συντελεστής διαχωρισμού μεταξύ υδατικού διαλύτη ( $P_w$ ) και στατικής φάσης ( $P_s$ )
- $P_{wm}$ : συντελεστής διαχωρισμού μεταξύ υδατικού διαλύτη ( $P_w$ ) και μικκυλίων ( $P_m$ )
- $P_{ms}$ : συντελεστής διαχωρισμού μεταξύ μικκυλίων ( $P_m$ ) και στατικής φάσης ( $P_s$ )

Οι τρεις συντελεστές συνδέονται μεταξύ τους με τη σχέση:  $P_{ms} = \frac{P_{ws}}{P_{mw}}$  [3.2]. (61)



Εικόνα 14. Ισορροπία φάσεων στην MLC (62)

### Προσθήκη οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση

Αν στην κινητή φάση προστεθεί σε μικρό ποσοστό και κάποιος οργανικός διαλύτης, όπως μια αλκοόλη, η εκλουστική ικανότητα και η αποδοτικότητα της στήλης βελτιώνονται. Οι χρωματογραφικές κορυφές γίνονται πιο οξείες και ο χρόνος κατακράτησης των ουσιών μειώνεται. Εκτός αυτού, μπορεί να προβλεφθεί ικανοποιητικά η κατακράτηση κάθε ουσίας στο διάλυμα. Η ιδιότητα αυτή είναι χρήσιμη, διότι η MLC συνήθως χαρακτηρίζεται από ευρείες χρωματογραφικές κορυφές. Η θετική επίδραση των οργανικών διαλυτών και η συμμετοχή τους στα μικκυλιακά συσσωματώματα αυξάνεται ανάλογα με την υδροφοβικότητά τους. Οι διαλύτες μπορεί να βρίσκονται είτε εντός είτε εκτός των μικκυλίων, ή ακόμα και μέσα στον πυρήνα. Με αυτόν τον τρόπο ευνοείται ο σχηματισμός μικκυλίων και αυξάνεται η ποσότητα του οργανικού διαλύτη μέσα στα μικκύλια. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην ποσότητα του οργανικού διαλύτη, ο οποίος είναι απαραίτητο να προστίθεται σε μικρό ποσοστό, καθώς η προσθήκη του σε μεγάλα ποσοστά μπορεί να αλλοιώσει τη μικκυλιακή δομή και τη μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση μικκυλίων. (49), (50)

Οι μεταβολές που παρατηρούνται κατόπιν προσθήκης οργανικών διαλυτών διαφέρουν ανάλογα με τη φύση και τις ιδιότητες του εκάστοτε διαλύτη. Οι αλκοόλες με μικρές ανθρακικές αλυσίδες παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες συμπεριφορές σε περίπτωση που προστεθούν σε μια ιοντική μικκυλιακή κινητή φάση. Η μεθανόλη, για παράδειγμα, που έχει τη μικρότερη ανθρακική αλυσίδα, είναι πιο πολική και περισσότερο διαλυτή σε σύγκριση με άλλες αλκοόλες. Μπορεί να διαλυτοποιήσει ευκολότερα τα μονομερή του τασιενεργού, ιδιότητα που δημιουργεί την ανάγκη για προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης τασιενεργού στην κινητή φάση και κατά συνέπεια, αύξηση της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης (cmc). Αντίθετα, η αιθανόλη και η μεθανόλη παρουσιάζουν τελείως διαφορετική συμπεριφορά. Οι δύο αυτές αλκοόλες παραμένουν κυρίως εκτός των μικκυλίων, δηλαδή στο υπόλοιπο διάλυμα της κινητής φάσης, αντιδρούν με τη μικκυλιακή επιφάνεια και μειώνουν την απόθεση των ιοντικών κορυφών των μικκυλιακών μονομερών. Η συμπεριφορά αυτή ευνοεί το σχηματισμό

μικκυλίων και μειώνει την cmc. Ενδιαφέρουσα είναι και η συμπεριφορά τόσο της βουτανόλης όσο και της πεντανόλης, καθώς εισέρχονται στο μικκυλιακό μηχανισμό χάρη στη δομή τους. Οι εν λόγω αλκοόλες παρουσιάζουν παρόμοια δομή με τα μόρια του τασιενεργού, εφόσον συνδυάζουν μια πολική ομάδα με μια μη πολική αλυσίδα. Ευθυγραμμίζονται με τα επιφανειοδραστικά μόρια και προκαλούν τη δημιουργία διογκωμένων μικκυλίων. Τέλος, η επίδραση του ακετονιτριλίου στη cmc είναι παρόμοια με αυτή της μεθανόλης με τη διαφορά ότι η δομή και οι πολικότητες δεν είναι ίδιες στις δύο περιπτώσεις. (50)

### 3.5.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα MLC

#### Πλεονεκτήματα MLC

Η μικκυλιακή χρωματογραφία συνιστά μια τεχνική που χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη ευελιξία ως προς το πλήθος των αναλύσεων στις οποίες μπορεί να εφαρμοστεί. Αυτό οφείλεται στο πλήθος των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ της διαλυμένης ουσίας, των μικκυλίων και της κινητής φάσης. Η προσαρμοστικότητα της μεθόδου αποτελεί το κυριότερο από τα πλεονεκτήματά της. Ένα επιπλέον σημαντικό πλεονέκτημα είναι η ικανότητα της μεθόδου να διαλυτοποιεί μη πολικά μόρια χάρη στη χρήση μικκυλιακού διαλύματος ως κινητής φάσης. (49)

Συγκεντρωτικά, τα πλεονεκτήματα της MLC που οφείλονται στη μικκυλιακή φύση της κινητής φάσης είναι τα εξής:

- Η ποικιλία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαλυμένων ουσιών, στατικής φάσης, υδροοργανικής φάσης και μικκυλίων.
- Η δυνατότητα διαχωρισμού φορτισμένων και ουδέτερων διαλυμάτων με μία μόνο εκτέλεση της μεθόδου και η διάλυση ουσιών με ευρύ φάσμα πολικότητας και περιορισμένη συγκράτηση.
- Σε περίπτωση που απαιτείται βαθμιαία έκλυση ουσιών οι χρόνοι κατακράτησης είναι μικρότεροι σε σχέση με τη συμβατική RPLC.
- Η υψηλή ικανότητα διαλυτοποίησης των μικκυλίων, η οποία εξοικονομεί χρόνο στην προετοιμασία και προκατεργασία του δείγματος πριν από την ένεσή του στη στήλη.
- Οι απαιτήσεις σε ποσότητα οργανικού διαλύτη είναι μικρότερες σε σχέση με τη συμβατική RPLC, ειδικά για μη πολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα το κόστος να είναι χαμηλότερο, η τοξικότητα να είναι χαμηλή και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις περιορισμένες.
- Οι οργανικοί διαλύτες κατακρατώνται ισχυρά στα μικκύλια με αποτέλεσμα να μειώνεται ο κίνδυνος εξάτμισης της κινητής φάσης, η οποία παραμένει σταθερή για μεγάλο χρονικό διάστημα. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα για την κατακράτηση των ουσιών είναι αναπαραγωγίσιμα και οι προβλεπόμενοι χρόνοι και οι συνθήκες κατακράτησης μπορούν να μοντελοποιηθούν ακριβέστερα. (58), (63)

## **Μειονεκτήματα MLC**

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου οφείλονται κυρίως στη φύση της κινητής φάσης και επιβραδύνουν την ανάπτυξη και την ευρεία χρήση της μικκυλιακής χρωματογραφίας. Το κυριότερο μειονέκτημα είναι ότι η απόδοση της MLC είναι συνήθως αρκετά χαμηλότερη σε σύγκριση με τη συμβατική υγροχρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως (RPLC). Αυτό οφείλεται στην αντίσταση που παρουσιάζει η μέθοδος στη μεταφορά μάζας κατά τη διαδικασία συμπεριλαμβανομένων των μικκυλίων και της στατικής φάσης. Η ιδιότητα αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς η αύξηση της μικκυλιακής συγκέντρωσης προκαλεί μεταβολές στην αποδοτικότητα της μεθόδου. Ακόμα, η εκλουστική ισχύς των μικκυλιακών μέσων είναι αρκετά αδύναμη. Τα δύο αυτά προβλήματα μπορούν να αντιμετωπιστούν ικανοποιητικά με την προσθήκη κάποιου οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση. Σε περαιτέρω βελτίωση της αποδοτικότητας μπορεί να οδηγήσει η μεταβολή παραμέτρων, όπως είναι το pH και η θερμοκρασία. Χρήσιμη θα ήταν, επίσης, η μελέτη της προβλεπόμενης αποτελεσματικότητας και του σχήματος των κορυφών στο χρωματογράφημα με τη χρήση των αντίστοιχων μαθηματικών μοντέλων και εξισώσεων, ώστε η ποιότητα της μεθόδου να μπορεί να προβλεφθεί ικανοποιητικά σε κάθε πιθανή περίπτωση. (49), (64)

### **3.5.5 Εφαρμογές MLC**

#### **Βιολογικοί διαχωρισμοί**

Η κύρια και πιο διαδεδομένη εφαρμογή της εν λόγω μεθόδου είναι στην ανάλυση φυσιολογικών υγρών, καθώς η μικκυλιακή κινητή φάση έχει την ιδιότητα να δεσμεύει τις πρωτεΐνες καθιστώντας εφικτούς τους βιολογικούς διαχωρισμούς. Στα μικκυλιακά συστήματα μπορεί να γίνει απευθείας ένεση βιολογικών δειγμάτων και το πρωτόκολλο της συγκεκριμένης ανάλυσης είναι ιδιαίτερα απλοποιημένο. (49) Μια ειδική περίπτωση της συγκεκριμένης εφαρμογής αποτελεί ο εντοπισμός βιολογικά ενεργών συστατικών στα υγρά του ανθρώπινου σώματος. Η MLC μπορεί, δηλαδή, να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό φαρμάκων, απαγορευμένων ουσιών και μεταβολιτών τους στο αίμα, τα ούρα το σάλιο, τον ιδρώτα και σε άλλα βιολογικά υγρά των αθλητών. (65)

#### **Ανάλυση φαρμάκων**

Η MLC ενδείκνυται για την ανάλυση φαρμάκων, διότι η ένεση των δειγμάτων μπορεί να γίνει απευθείας στο χρωματογραφικό σύστημα χωρίς να απαιτείται προκατεργασία του δείγματος. Παρόλο που τα έκδοχα των σκευασμάτων συνήθως δεν είναι διαλυτά στο μικκυλιακό μέσο, τα φάρμακα αποσπώνται εύκολα όταν έρχονται σε επαφή με το μικκυλιακό διάλυμα. Όπως προαναφέρθηκε, για τη βελτίωση της διαλυτότητας των φαρμάκων μπορεί να προστεθεί στο μικκυλιακό μέσο μικρό ποσοστό αλκκοόλης (μεθανόλης ή αιθανόλης). Το χρωματογράφημα σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να παρουσιάζει κάποιες επιπλέον κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στα έκδοχα. Η προετοιμασία του δείγματος εξαρτάται από τη μορφή στην οποία βρίσκεται. Τα δείγματα μπορεί να είναι στερεά (κάψουλες, ταμπλέτες, χάπια, σκόνη), υγρά (σταγόνες, διαλύματα, σπρέι) ή σε μορφή κρέμας. Για τη διεξαγωγή της ανάλυσης

μέρος του εκάστοτε δείγματος διαλύεται σε ποσότητα της μικκυλιακής κινητής φάσης. Σε περίπτωση δυσδιάλυτων δειγμάτων, όπως είναι οι κρέμες, η διαλυτοποίηση μπορεί να διευκολυνθεί με μηχανική ανάδευση και με τη χρήση λουτρών υπερήχου. (58)

### **Υδροφοβικότητα και ποιοτικές σχέσεις δομής - συγκράτησης (QSRR)**

Ο συντελεστής διαχωρισμού στη μικκυλιακή χρωματογραφία μπορεί να συσχετιστεί με την υδροφοβικότητα του μικκυλιακού διαλύματος. Η συσχέτιση αυτή παρέχει χρήσιμα δεδομένα για QSRR (Quantitative Structure Retention Relationship) μελέτες. Από τις μελέτες αυτές προκύπτουν δεδομένα για τους χρόνους κατακράτησης ( $t_R$ ) διαφόρων ουσιών και εφαρμόζονται σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Για τη διεξαγωγή QSRR αναλύσεων είναι απαραίτητη η συλλογή δεδομένων σχετικά με την κατακράτηση των υπό ανάλυση ουσιών, καθώς επίσης και η γνώση όλων των παραγόντων που αφορούν τη δομή και τις ιδιότητές τους. Αυτό που επιτυγχάνεται με τη διεξαγωγή τέτοιων αναλύσεων είναι η συσχέτιση των ιδιοτήτων των μορίων με τη μοριακή δομή τους με τη χρήση μαθηματικών μοντέλων. Εκτός από την πρόβλεψη των τιμών  $t_R$ , τα μοντέλα QSRR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση των μηχανισμών διαχωρισμού και για την αξιολόγηση πολύπλοκων φυσικοχημικών ιδιοτήτων, όπως είναι η λιποφιλία. (61)

## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1 Σκοπός

Η μελέτη του μηχανισμού έκλυσης μιας σειράς φαρμάκων με τη χρήση μικκυλιακής χρωματογραφίας παρουσία του κατιοντικού τασιενεργού CTAB, καθώς επίσης και η αξιολόγηση της μεθόδου ως εργαλείο για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων φαρμακομορίων και την πρόβλεψη βιολογικών διαδικασιών.

### 4.2 Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκαν:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $\geq 99,5\%$ , ChemLab)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\geq 98,5\%$ , Honeywell)
- $\text{NaCl}$  ( $\geq 99,5\%$ , Honeywell)
- CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich)
- Νερό υψηλής καθαρότητας (High Purity Water, HPW). Το HPW ελήφθη μέσω συστήματος καθαρισμού νερού EASYpure II (Barnstead International, USA).

Ως δείκτης νεκρού χρόνου της στήλης χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο ( $\geq 99,5\%$ , Honeywell). Για τη διάλυση ορισμένων φαρμάκων χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη ( $\geq 99,9\%$ , Honeywell). Η ρύθμιση του pH στο 5.5 έγινε με τη βοήθεια πυκνού υδροχλωρικού οξέος (Hydrochloric acid 30%, Merck).

### 4.3 Οργανολογία

Η χρωματογραφική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής έρευνας αποτελείται από τα ακόλουθα επιμέρους όργανα:

- **Αντλία:** HPLC Pump k-1001, της εταιρείας Knauer, ρυθμισμένη σε ροή 1mL/min.
- **Στήλη:** Αντιστρόφου φάσεως Discovery HS C18, της εταιρείας Supelco, με διαστάσεις 15cm x 4,6mm και μέγεθος σωματιδίων 5μm.
- **Ανιχνευτής:** UV Detector K-2501, της εταιρείας Knauer, ρυθμισμένος στα 220nm. Ο ανιχνευτής συνδέεται απευθείας σε υπολογιστή, ο οποίος καταγράφει το σήμα που λαμβάνει ο ανιχνευτής από το εξέρχον διάλυμα και κατασκευάζει το χρωματογράφημα.

- **Απαερωτής:** Vacuum Degasser, της εταιρείας Knauer. Ο απαερωτής αφαιρεί τυχόν φυσαλίδες αέρα από το σωλήνα της κινητής φάσης, ώστε να ρέει σε αυτόν μόνο ο διαλύτης έκλυσης και να μην υπάρχει αέρας, που θα προκαλεί προβλήματα στο σύστημα και κατά συνέπεια στα αποτελέσματα των μετρήσεων.
- **Διαχειριστής διαλύτη:** Solvent Organizer K-1500, της Knauer. Η συσκευή αυτή αποτελείται από σωλήνες που ξεκινούν από τα δοχεία των διαλυμάτων και καταλήγουν στον απαερωτή. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη ρύθμιση της κινητής φάσης όταν στο σύστημα εισάγονται περισσότερα του ενός διαλύματα. Στην παρούσα έρευνα, όμως, ο διαλύτης έκλυσης είναι ένας, γι' αυτό και χρησιμοποιείται ένας μόνο σωλήνας για την ροή της κινητής φάσης.
- **Υδατόλουτρο:** Stirred water bath WB-4MS, της εταιρείας Biosan, ρυθμισμένο στους 37°C. Το υδατόλουτρο δεν είναι μέρος του HPLC συστήματος, αλλά η στήλη βρίσκεται μόνιμα εντός αυτού προκειμένου να προσεγγίζει την θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος, που είναι φυσιολογικά 36,6°C. Η ρύθμιση σε αυτή τη θερμοκρασία κρίνεται απαραίτητη, καθώς επιθυμείται η προσομοίωση της συμπεριφοράς των φαρμάκων στις συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού.



**Εικόνα 15.** Χρωματογραφική διάταξη

Τα αντιδραστήρια για την παρασκευή της κινητής φάσης ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων (Ohaus), ενώ η ρύθμιση του pH έγινε με τη χρήση πεχαμέτρου (MP125, Mettler Toledo). Για τη διήθηση του διαλύτη υπό κενό χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα 47 mm Nylon Membrane 0,45 μm (ALWSCI Group). Για τη διεξαγωγή και καταγραφή των μετρήσεων έγινε χρήση του λογισμικού «EuroChrom 2000» στον Η/Υ που ήταν συνδεδεμένος με το χρωματογραφικό σύστημα.



## 4.4 Πειραματική διαδικασία

### 4.4.1 Στατική φάση

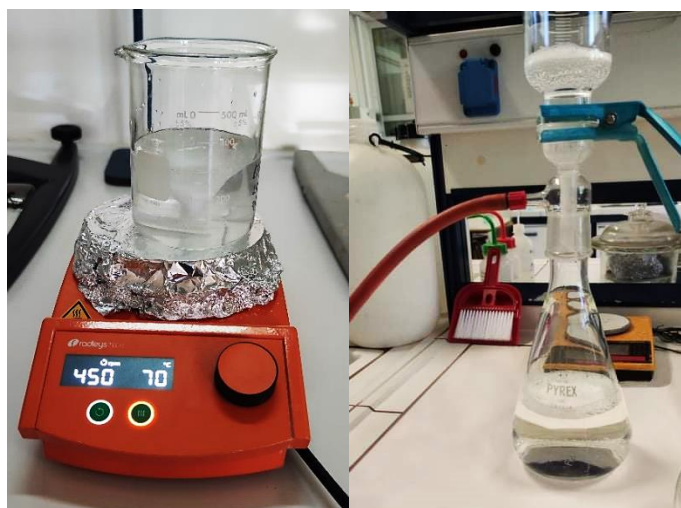
Ως στατική φάση λειτουργεί η στήλη αντιστρόφου φάσεως Discovery HS C18 της Supelco με με διαστάσεις 15cm x 4,6mm και μέγεθος σωματιδίων 5μm.



Εικόνα 16. Στήλη αντιστρόφου φάσεως HS C18 Supelco

### 4.4.2 Παρασκευή κινητής φάσης

Για την παρασκευή 500mL διαλύτη έκλουσης (κινητής φάσης), 3,44g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,77g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  και 4,60g  $\text{NaCl}$  διαλύονται σε 300-400mL υπερκάθαρο νερό. Ακολουθεί ανάδευση με ρυθμό 400-500rpm και ρύθμιση του διαλύματος σε pH=7,4 ή pH=5,5. Η ρύθμιση στο 7,4 γίνεται με αραιωμένο διάλυμα καυστικού νατρίου ( $\text{NaOH}$ ) 0,1M, ενώ για τη ρύθμιση του διαλύματος σε pH=5,5 χρησιμοποιείται διάλυμα υδροχλωρίου ( $\text{HCl}$ ) 0,1M. Το αρχικό pH του διαλύματος είναι περίπου ίσο με 7,08, γι' αυτό και απαιτείται βασικό διάλυμα για τη ρύθμιση στο 7,4 και όξινο διάλυμα για τη ρύθμιση στο 5,5. Μετά τη ρύθμιση του διαλύματος, προστίθενται σε αυτό 1,676g του τασιενεργού CTAB με συνεχή ανάδευση. Σε αυτό το στάδιο πέραν της ανάδευσης γίνεται παράλληλα και θέρμανση του διαλύματος σε θερμοκρασία 70°C. Η προσθήκη του CTAB γίνεται σταδιακά. Τόσο η σταδιακή προσθήκη όσο και η ανάδευση υπό θέρμανση κρίνονται απαραίτητες, καθώς το CTAB είναι σχετικά δυσδιάλυτο στο υδατικό διάλυμα που έχει παρασκευαστεί και η απευθείας προσθήκη ολόκληρης της ποσότητας που απαιτείται θα οδηγούσε σε ανομοιόμορφο και μη διαυγές διάλυμα. Αφού το CTAB διαλυθεί πλήρως και το διάλυμα γίνει διαυγές, γίνεται μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη των 500mL, όπου συμπληρώνεται υπερκάθαρο νερό μέχρι τη χαραγή της. Στη συνέχεια, ακολουθεί διήθηση του διαλύματος υπό κενό σε πυρίμαχη συσκευή διήθησης με τη χρήση φίλτρου Nylon. Σημειώνεται ότι η διήθηση του διαλύτη έκλουσης πριν την εισαγωγή του στο χρωματογραφικό σύστημα κρίθηκε απαραίτητη λόγω τεχνικού προβλήματος στη λειτουργία του απαερωτή.



(a)

(b)

**Εικόνα 17.** Παρασκευή κινητής φάσης: (a) ανάδευση, (b) διήθηση

#### 4.4.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων βρίσκονται είτε σε μορφή σκόνης ή αμπούλας, που δε χρειάζεται προκατεργασία, είτε σε μορφή δισκίου, που απαιτεί λειοτριβίση. Η λειοτριβίση γίνεται εύκολα με χειρονακτικό τρόπο, ώστε τα φάρμακα να βρίσκονται σε μορφή σκόνης. Τα φάρμακα πριν από την εισαγωγή τους στη στήλη διαλύονται σε μικρή ποσότητα κινητής φάσης ή σε ποσότητα μεθανόλης, ανάλογα με το πόσο ευδιάλυτα είναι. Η ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιείται είναι πολύ μικρή, όταν πρόκειται για καθαρές ουσίες, και ελαφρώς μεγαλύτερη για φάρμακα που περιέχουν έκδοχα.

#### 4.4.4 Διεξαγωγή Μετρήσεων

Πριν πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε μέτρηση, γίνεται αρχικά ενεργοποίηση των συσκευών του χρωματογραφικού συστήματος και αναμονή μερικών λεπτών μέχρι σταθεροποίησης των συνθηκών λειτουργίας του (πίεση, μήκος κύματος, ροή). Στη συνέχεια, γίνεται απαέρωση του διαλύματος της κινητής φάσης και για 30-40 min αφήνεται να περάσει από τη στήλη, ώστε να σταθεροποιηθεί η γραμμή βάσης (Baseline) του συστήματος. Πριν την εκκίνηση των μετρήσεων σε δείγματα φαρμάκων και μετά το πέρας αυτών λαμβάνονται από 3 μετρήσεις για το νεκρό χρόνο, για τον υπολογισμό του οποίου χρησιμοποιούνταν ακετονιτρίλιο αραιωμένο σε ποσότητα κινητής φάσης (αναλογία περίπου 50:50). Η εισαγωγή κάθε δείγματος στη στήλη γίνεται με σύριγγα των 100μL. Στη στήλη περνούν μόνο 20μL της ουσίας, ενώ πιθανόν περιττή ποσότητα δείγματος απορρίπτεται από το σύστημα. Στο τέλος των μετρήσεων, γίνεται εκ νέου απαέρωση για 2-3 λεπτά και καθαρισμός της στήλης με διάλυμα νερού-μεθανόλης (70:30), το οποίο διέρχεται από τη στήλη για 40-50 λεπτά, ώστε να

απομακρυνθούν τα υπολείμματα φαρμάκων και τυχόν οργανικές ουσίες που έχουν συκρατηθεί από αυτή.

Για τα φάρμακα με μικρούς χρόνους κατακράτησης από τη στήλη (1-5 λεπτά) ελήφθησαν 3 μετρήσεις. Για τα φάρμακα με λίγο μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης (5-25 λεπτά) ελήφθησαν δύο μετρήσεις, ενώ για τα φάρμακα που εξέρχονται ακόμη πιο αργά από τη στήλη έγινε μία μόνο μέτρηση. Οι μετρήσεις έγιναν με τη χρήση του λογισμικού Eurochrom 2000.

Τόσο για το νεκρό χρόνο ( $t_0$ ) όσο και για τις μετρήσεις του χρόνου κατακράτησης ( $t_R$ ) των φαρμάκων, η τελική τιμή προέκυψε απ' το μέσο όρο των μετρήσεων. Ο συντελεστής κατανομής της κάθε ουσίας υπολογίστηκε από τη σχέση [3.1] και η αξιολόγηση έγινε επί των λογαριθμικών τιμών  $\log k$ .

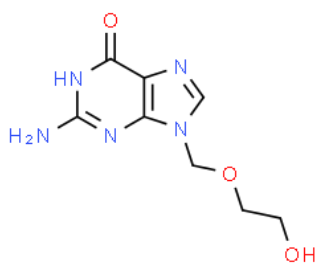
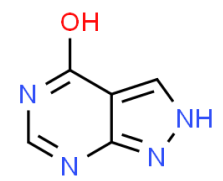
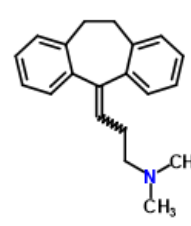
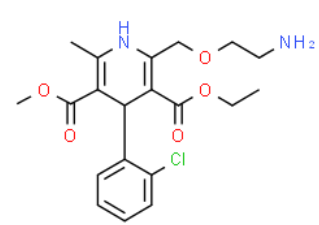
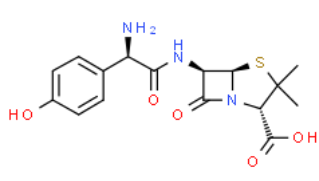
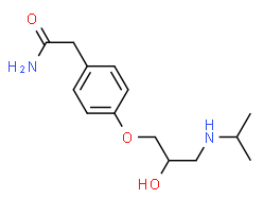
#### 4.5 Φάρμακα που μελετήθηκαν

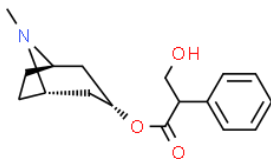
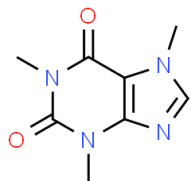
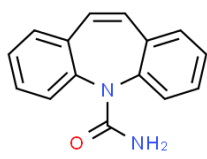
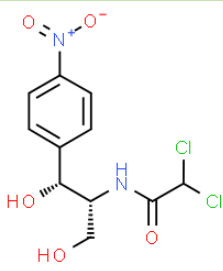
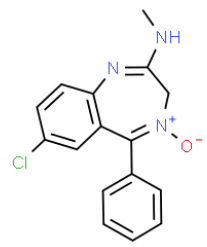
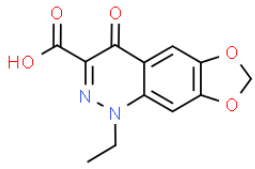
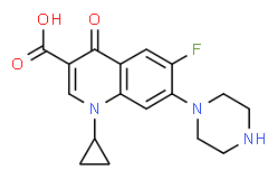
Σε  $pH=7,4$  μετρήθηκαν 47 φάρμακα, ενώ στο 5,5 μετρήθηκαν 22 εξ' αυτών. Στο 5,5 μετρήθηκαν όλα τα όξινα και αμφολυτικά φάρμακα, καθώς επίσης και ενδεικτικά κάποιες βάσεις και ουδέτερα. Η διεξαγωγή των πειραμάτων σε δύο διαφορετικά  $pH$  γίνεται για λόγους προσομοίωσης της συμπεριφοράς του ανθρώπινου οργανισμού. Συγκεκριμένα, το 7,4 είναι η τιμή του  $pH$  του αίματος, ενώ το  $pH=5,5$  αντιστοιχεί σε περιοχές κοντά στο λεπτό έντερο. Σε περιβάλλον με χαμηλό  $pH$  τα ελαφρώς όξινα φάρμακα παρουσιάζουν μειωμένο ιοντισμό και ευνοείται η ουδέτερη μορφή τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της λιποφιλίας τους και την ενίσχυση της συγγενείας τους με την στήλη. Επομένως, τα όξινα φάρμακα αναμένεται να έχουν μεγαλύτερους χρόνους έκλουσης σε  $pH=5,5$ . Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη των αμφολυτικών φαρμάκων στο  $pH$  του λεπτού εντέρου, καθώς δεν μπορεί να γίνει κάποια πρόβλεψη σχετικά με το χρόνο έκλουσής τους από τη στήλη. Τα ουδέτερα φάρμακα δεν επηρεάζονται από αλλαγές του  $pH$ , ενώ τα βασικά αναμένεται να εκλουστούν γρηγορότερα από τη στήλη. Η κατηγοριοποίηση των φαρμάκων βάσει του ιοντισμού τους είναι η εξής:

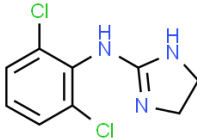
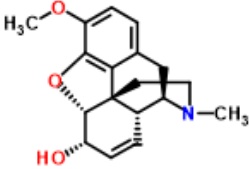
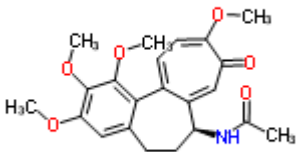
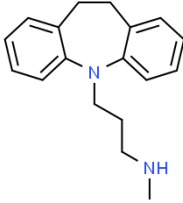
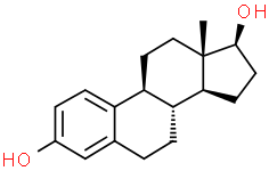
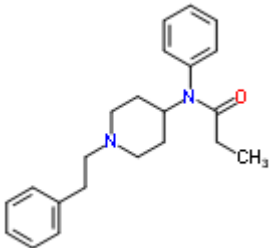
- A: Οξέα – Acids
- B: Βάσεις – Bases
- N: Ουδέτερα – Neutrals
- Z: Αμφολύτες – Zwitterions

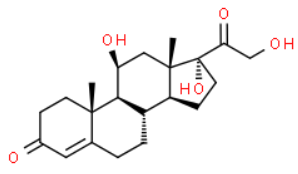
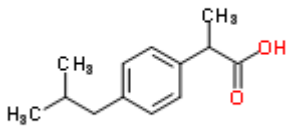
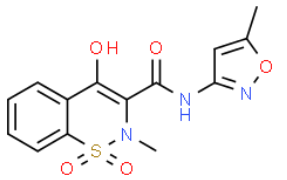
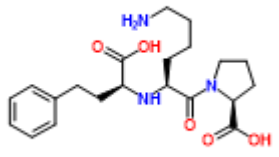
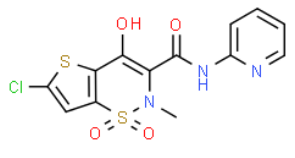
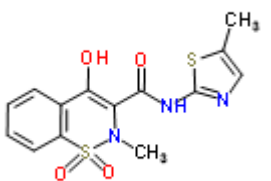
Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται όλα τα φάρμακα που μελετήθηκαν, καθώς και ο τύπος, η φαρμακολογική δράση και η δομή αυτών. (66)

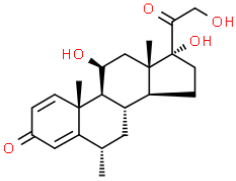
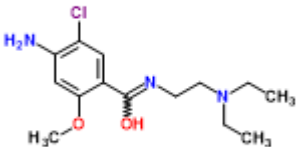
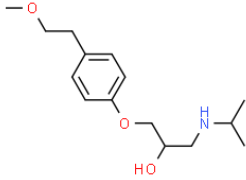

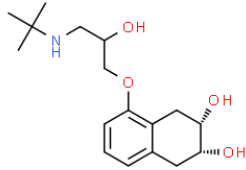
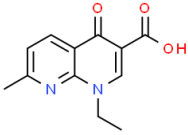
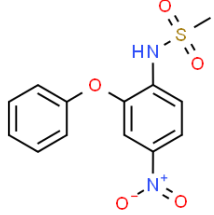
**Πίνακας 1.** Φάρμακα που μελετήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους

A/A	Φάρμακο	Τύπος	Φαρμακολογική δράση	Δομή
1	Acyclovir	N	Αντιικό	
2	Allopurinol	N	Φάρμακο κατά της ουρικής αρθρίτιδας	
3	Amitriptyline	B	Αντικαταθλιπτικό	
4	Amlodipine	B	Φάρμακο κατά της στεφανιαίας νόσου (αντιυπερτασικό)	
5	Amoxicillin	A	Αντιβιοτικό	
6	Atenolol	B	Αντιυπερτασικό	


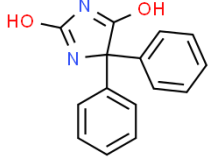
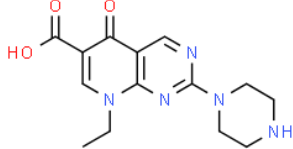

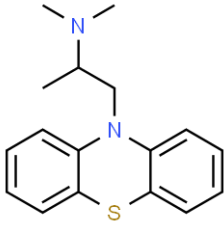
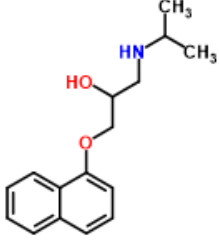
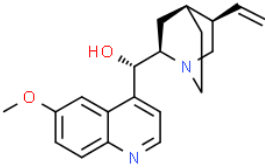
7	Atropine	B	Αντιχολινεργικό (παρασυμπαθολυτικό)	
8	Caffeine	N	Διεγερτικό του ΚΝΣ	
9	Carbamazepine	N	Αντιεπιληπτικό	
10	Chloramphenicol	N	Αντιβιοτικό	
11	Chlordiazepoxide	N	Αγχολυτικό	
12	Cinoxacin	A	Αντιβιοτικό	
13	Ciprofloxacin	Z	Αντιβιοτικό	

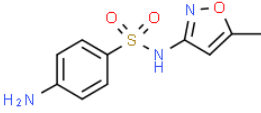
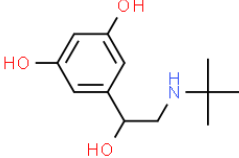
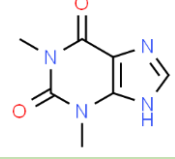
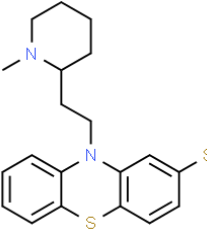
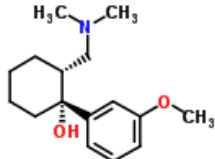
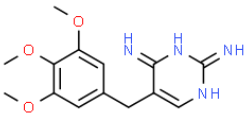
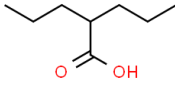
14	Clonidine	B	Αντιυπερτασικό	
15	Codeine	B	Οπιοειδές αναλγητικό	
16	Colchicine	N	Φάρμακο κατά της ουρικής αρθρίτιδας	
17	Desipramine	B	Αντικαταθλιπτικό	
18	Estradiol	N	Οιστρογόνο	
19	Fentanyl	B	Οπιοειδές αναλγητικό	

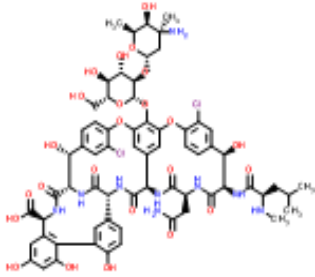
20	Hydrocortisone	N	Κορτικοστεροειδές	
21	Ibuprofen	A	Αντιφλεγμονώδες, Αναλγητικό	
22	Isoxicam	A	Αντιφλεγμονώδες	
23	Lisinopril	Z	Αντιυπερτασικό	
24	Lornoxicam	A	Αντιφλεγμονώδες	
25	Meloxicam	A	Αντιφλεγμονώδες	

26	Methylprednisolone	N	Κορτικοστεροειδές, Αντιφλεγμονώδες	
27	Metoclopramide	B	Αντιεμετικό	
28	Metoprolol	B	β αποκλειστής, Αντιυπερτασικό	
29	Minoxidil	N	Αντιυπερτασικό, Αγγειοδιασταλτικό	
30	Nadolol	B	β αποκλειστής, Αντιυπερτασικό	
31	Nalidixic acid	A	Αντιβιοτικό	
32	Nimesulide	A	Αντιφλεγμονώδες, Αναλγητικό	



33	Paracetamol	N	Αναλγητικό	
34	Phenytoin	A	Αντιεπιληπτικό	
35	Pipemidic acid	Z	Αντιβιοτικό	
36	Primidone	N	Αντιεπιληπτικό	
37	Promethazine	B	Αντιισταμινικό	
38	Propranolol	B	β αποκλειστής, Αντιυπερτασικό	
39	Quinidine	B	Φάρμακο για τη θεραπεία καρδιακών παθήσεων, Αντιαρρυθμικό	

40	Sulfamethoxazole	A	Αντιβιοτικό	
41	Terbutaline	B	Φάρμακο για τις αποφρακτικές παθήσεις των αεροφόρων οδών	
42	Theophylline	N	Βρογχοδιασταλτικό	
43	Thioridazine	B	Αντιψυχωσικό	
44	Tramadol	B	Οπιοειδές αναλγητικό	
45	Trimethoprim	B	Αντιβιοτικό	
46	Valproic acid	A	Αντιεπιληπτικό	

47	Vancomycin	Z	Αντιβιοτικό	
----	------------	---	-------------	---

#### 4.6 Στατιστική ανάλυση μετρήσεων

Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων έγινε με χρήση του λογισμικού IBM SPSS Statistics. Η εξαγωγή των διάφορων συσχετίσεων και των αντίστοιχων εξισώσεων έγινε με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης. Για κάθε ανάλυση παλινδρόμησης αναγράφεται ο αριθμός των δεδομένων (N), ο συντελεστής συσχέτισης ( $R^2$ ), η τυπική απόκλιση (S) και το F-test, για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Από τις εξισώσεις που προκύπτουν εξάγεται και ο συντελεστής παλινδρόμησης μαζί με το τυπικό σφάλμα. Επιπλέον, γίνεται έλεγχος της σημαντικότητας των μεταβλητών που εμφανίζονται σε κάθε εξίσωση με χρήση του πίνακα Student για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Για να θεωρηθεί κάποια μεταβλητή στατιστικά σημαντική θα πρέπει:  $|t| \geq 2$  και  $p \leq 0,05$ . Οι μεταβλητές που δεν είναι στατιστικά σημαντικές αφαιρούνται και επαναλαμβάνονται οι αναλύσεις παλινδρόμησης. Οι οριακές τιμές για τη σημαντικότητα των μεταβλητών (π.χ.  $|t| = 1.9$ ) διατηρούνται για λόγους ευκολίας.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Για τη διεξαγωγή της στατιστικής ανάλυσης των πειραματικών μετρήσεων που θα ακολουθήσει αξιοποιήθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα που αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων του Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας. Συγκεκριμένα, αντλήθηκαν δεδομένα από πρόσφατες διπλωματικές έρευνες, καθώς επίσης και από το λογισμικό ADME Boxes 3.0 της εταιρείας Pharma Algorithms. Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά όλα τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν.

### 5.1 Δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου

Παρακάτω παρουσιάζονται τα δεδομένα των συντελεστών μερισμού ( $\log P$ ), των συντελεστών κατανομής ( $\log D$ ), καθώς επίσης και τα κλάσματα θετικού ( $F^+$ ,  $F_{zwit}^+$ ) και αρνητικού ( $F^-$ ,  $F_{zwit}^-$ ) φορτίου όλων των φαρμάκων που μελετήθηκαν σε pH 7.4 και 5.5. Για pH 5.5 δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για όλα τα φάρμακα. Τα δεδομένα αντλήθηκαν από το λογισμικό ADME Boxes 3.0, προκειμένου να αξιοποιηθούν ως παράμετροι της στατιστικής ανάλυσης των μετρήσεων.

**Πίνακας 2.** Δεδομένα συντελεστών μερισμού  $\log P$ , συντελεστών κατανομής  $\log D_{7.4}$ ,  $\log D_{5.5}$  και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου των φαρμάκων που μελετήθηκαν

A/A	Φάρμακο	M.B.	$\log P$ (7.4)	$\log D$ (7.4)	$\log D$ (5.5)	$F^+$	$F^-$	$F_{zw}^+$	$F_{zw}^-$
1	Acyclovir	225,20	-1,56	-1,56		0,000	0,009	0,000	0,009
2	Allopurinol	136,11	-0,55	-0,55	-0,55	0,000	0,010	0,000	0,010
3	Amitriptyline	277,40	5,04	2,50		0,982	0,000	0,982	0,000
4	Amlodipine	408,87	2,96	1,66	1,66	0,994	0,000	0,994	0,000
5	Amoxicillin	365,40	-1,71	-2,56	-1,71	0,000	0,531	0,496	1,000
6	Atenolol	266,34	0,16	-1,61	-2,90	0,994	0,000	0,994	0,000
7	Atropine	289,37	1,83	-0,41	-1,24	0,996	0,000	0,996	0,000
8	Caffeine	194,19	-0,07	-0,07	-0,07	0,000	0,000	0,000	0,000
9	Carbamazepine	236,27	2,30	2,30		0,000	0,000	0,000	0,000
10	Chloramphenicol	323,13	1,14	1,14		0,000	0,000	0,000	0,000
11	Chlordiazepoxide	299,75	2,44	2,44		0,002	0,000	0,002	0,000
12	Cinoxacin	262,22	1,28	-1,16	-0,62	0,000	0,998	0,000	0,998
13	Ciprofloxacin	331,34	-1,08	-1,11	-1,73	0,050	0,033	0,964	0,947
14	Clonidine	230,09	1,59	0,97	-0,73	0,779	0,000	0,779	0,000

15	Codeine	230,09	1,14	0,37		0,848	0,000	0,848	0,000
16	Colchicine	399,44	1,03	1,03	1,03	0,000	0,000	0,000	0,000
17	Desipramine	266,38	4,90	2,28		0,999	0,000	0,999	0,000
18	Estradiol	272,38	4,01	4,01		0,000	0,001	0,000	0,001
19	Fentanyl	336,47	4,05	3,27	1,57	0,848	0,000	0,848	0,000
20	Hydrocortisone	362,46	1,60	1,60		0,000	0,000	0,000	0,000
21	Ibuprofen	206,28	3,50	1,07		0,000	0,999	0,000	0,999
22	Isoxicam	335,34	2,83	-0,32	1,31	0,000	1,000	0,000	1,000
23	Lisinopril	405,49	-1,71	-2,42	-1,01	0,000	0,001	0,999	1,000
24	Lornoxicam	371,82	2,62	0,61	1,66	0,000	0,993	0,000	0,993
25	Meloxicam	351,40	3,02	0,09	1,88	0,000	0,999	0,000	0,999
26	Methylprednisolone	374,47	1,95	1,95	1,95	0,000	0,000	0,000	0,000
27	Metoclopramide	299,80	2,64	0,64		0,000	0,989	0,000	0,989
28	Metoprolol	267,36	1,88	-0,37	-1,18	0,994	0,000	0,000	0,994
29	Minoxidil	209,25	1,24	1,23	1,23	0,002	0,000	0,002	0,000
30	Nadolol	309,40	0,81	-1,16		0,991	0,000	0,991	0,000
31	Nalidixic acid	232,23	1,41	-0,72		0,000	0,947	0,000	0,947
32	Nimesulide	308,31	2,60	1,35	2,45	0,000	0,996	0,000	0,966
33	Paracetamol	151,16	0,51	0,51	0,51	0,000	0,000	0,000	0,000
34	Phenytoin	252,27	2,47	2,41	2,46	0,000	0,102	0,000	0,102
35	Pipemidic acid	303,32	-2,15	-2,31	-2,97	0,051	0,033	0,965	0,947
36	Primidone	218,25	0,91	0,91	0,91	0,000	0,000	0,000	0,000
37	Promethazine	284,42	4,81	2,79		0,989	0,000	0,989	0,000
38	Propranolol	259,34	2,98	1,26	0,35	0,994	0,000	0,994	0,000
39	Quinidine	324,42	3,44	2,41		0,946	0,000	0,946	0,000
40	Sulfamethoxazole	253,28	0,89	-0,76	0,65	0,000	0,978	0,000	0,978
41	Terbutaline	225,28	0,08	-1,35	-2,48	0,980	0,000	0,980	0,000
42	Theophylline	180,16	-0,02	-0,02		0,000	0,000	0,000	0,000
43	Thioridazine	370,58	5,90	3,34		0,991	0,000	0,991	0,000
44	Tramadol	263,37	2,63	0,15	-0,45	0,998	0,000	0,998	0,000
45	Trimethoprim	290,32	0,91	0,74	-0,87	0,469	0,000	0,469	0,000

46	Valproic acid	144,21	2,75	0,26		0,000	0,996	0,000	0,996
47	Vancomycin	1449,25	2,48	1,94	-1,00	0000	0,125	0,875	1,000

## 5.2 Δεδομένα MLC

Στα πλαίσια διπλωματικών εργασιών που διεξήχθησαν στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, μελετήθηκαν τα περισσότερα από τα φάρμακα που μελετήθηκαν και στην παρούσα διπλωματική εργασία με τη χρήση τεσσάρων ακόμη διαφορετικών τασιενεργών. (67) (68) (69) (70) (71) (72) Δεδομένα, επίσης, αντλήθηκαν και από τη δημοσίευση «Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes» (73). Οι μελέτες έγιναν σε ίδιες συνθήκες pH (7.4 και 5.5), μήκους κύματος του ανιχνευτή (220nm), ρυθμού ροής της κινητής φάσης (1mL/min) και θερμοκρασίας υδατόλουτρου (37°C). Τα τασιενεργά που μελετήθηκαν στις διπλωματικές εργασίες που επιλέχθηκαν προς άντληση δεδομένων και σύγκριση αποτελεσμάτων είναι τα εξής: Brij-35 (μη ιοντικό), Tween20 (μη ιοντικό), SDS (ανιοντικό) και Triton X-100 (μη ιοντικό). Τα δεδομένα που θα παρουσιαστούν στη συγκεκριμένη ενότητα αφορούν τους συντελεστές κατακράτησης των φαρμάκων ( $\log k$ ) σε pH 7.4, ώστε να γίνει συσχέτισή τους με τους αντίστοιχους συντελεστές για το CTAB. Δε θα γίνει συσχέτιση των συντελεστών σε pH 5.5, καθώς τα δεδομένα είναι ελάχιστα και μια τέτοια συσχέτιση θα στερούσαν στατιστικής σημασίας. Για τα κελιά που είναι κενά δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα.

**Πίνακας 3.** Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης MLC για τα τασιενεργά Brij-35, Tween20, SDS και Triton x-100

A/A	Φάρμακο	$\log k_{\text{Brij-35}}$	$\log k_{\text{Tween20}}$	$\text{Log} k_{\text{SDS}}$	$\text{Log} k_{\text{Triton X-100}}$
1	Acyclovir	-0,536	-0,461	-0,330	-0,686
2	Allopurinol	-0,040	-0,250	-0,213	
3	Amitriptyline	1,861	2,177	2,134	1,798
4	Amlodipine	1,021		1,900	1,268
5	Amoxicillin	-0,784	-1,266	-1,554	
6	Atenolol	-0,268	-0,549	1,206	-0,882
7	Atropine		0,110	1,449	
8	Caffeine	0,096	0,054	0,656	-0,206
9	Carbamazepine	0,973	1,754	1,349	1,628
10	Chloramphenicol	0,494	1,345	0,720	1,231
11	Chlordiazepoxide	1,360	1,827	0,433	

12	Cinoxacin	-0,568	-0,827	-0,724	-0,828
13	Ciprofloxacin	-0,232	-0,721	-0,963	-0,938
14	Clonidine			1,452	0,640
15	Codeine				1,789
16	Colchicine				
17	Desipramine		2,490	2,198	
18	Estradiol	1,219	2,008	1,215	2,187
19	Fentanyl				
20	Hydrocortisone	0,979	1,360	0,873	1,271
21	Ibuprofen	1,005	1,188	0,852	1,195
22	Isoxicam	0,839	1,396	-0,144	1,289
23	Lisinopril	-0,815	-1,230	-0,499	-1,555
24	Lornoxicam	1,087	1,498	0,470	1,686
25	Meloxicam	0,908	1,422	0,411	1,729
26	Methylprednisolone	1,157	1,701	1,401	1,815
27	Metoclopramide	0,567	0,782	1,848	0,568
28	Metoprolol	0,507	0,463	1,823	0,189
29	Minoxidil	0,669	0,604	1,101	0,666
30	Nadolol	-0,366	-0,328	1,556	-0,553
31	Nalidixic acid	0,123	-0,494	0,861	-0,223
32	Nimesulide	1,204	1,470	1,434	1,777
33	Paracetamol	0,463	0,301	-0,026	0,390
34	Phenytoin				
35	Pipemidic acid	-0,543	-1,020	-0,389	-0,864
36	Primidone		0,724	0,784	0,763
37	Promethazine	1,794	2,220	2,001	
38	Propranolol	1,218	1,729	2,273	1,387
39	Quinidine	1,224		1,966	1,336
40	Sulfamethoxazole	0,396	0,190	-0,401	0,142
41	Terbutaline	-0,066	-0,017	1,092	-0,302
42	Theophylline	-0,114	-0,469	-0,236	-0,325
43	Thioridazine	1,852	2,224	1,401	2,017
44	Tramadol				
45	Trimethoprim	0,714	1,075	1,365	0,986

46	Valproic acid				
47	Vancomycin	-0,296	-0,328	0,117	

### 5.3 Δεδομένα IAM

Στον **Πίνακα 4** παρουσιάζονται τα δεδομένα των συντελεστών κατακράτησης για τη Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM). Τα δεδομένα αντλήθηκαν από βιβλιογραφικές πηγές (44), (74) , καθώς και από προγενέστερη έρευνα του εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας. (75) Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη IAM.PC.DD2. Η ρύθμιση της κινητής φάσης (PBS) έγινε σε pH 7,40 και 5,50 και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για τα κενά κελιά δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα.

**Πίνακας 4.** Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της IAM

A/A	Φάρμακο	IAM.PC.DD2 (7,40)	IAM.PC.DD2 (5,50)
1	Acyclovir	-0,270	
2	Allopurinol	-0,280	-0.32
3	Amitriptyline	2,990	
4	Amlodipine	3,400	3.175
5	Amoxicillin	-0,290	-0.31
6	Atenolol	0,510	
7	Atropine	1,120	
8	Caffeine	0,260	0,26
9	Carbamazepine	1,930	
10	Chloramphenicol	0,310	0,57
11	Chlordiazepoxide	1,860	
12	Cinoxacin	-0,500	0,30
13	Ciprofloxacin	1,310	1,29
14	Clonidine	1,116	
15	Codeine	0,953	
16	Colchicine	1,980	
17	Desipramine	3,016	
18	Estradiol	2,590	
19	Fentanyl		



20	Hydrocortisone	0,940	1,11
21	Ibuprofen	0,870	1,55
22	Isoxicam	0,910	1,25
23	Lisinopril	-0,567	-0,28
24	Lornoxicam	1,500	1.60
25	Meloxicam	1,400	1.50
26	Methylprednisolone	1,740	1.93
27	Metoclopramide	1,630	1,65
28	Metoprolol	0,870	
29	Minoxidil	0,730	0.85
30	Nadolol	1,260	1,10
31	Nalidixic acid	0,230	1.24
32	Nimesulide	1,570	
33	Paracetamol	0,180	-0,06
34	Phenytoin	2,056	
35	Pipemidic acid	0,160	1.04
36	Primidone	0,656	
37	Promethazine	2,780	
38	Propranolol	2,330	
39	Quinidine	2,340	
40	Sulfamethoxazole	-0,040	0.91
41	Terbutaline	0,780	
42	Theophylline	-0,080	-0,26
43	Thioridazine	3,980	
44	Tramadol		
45	Trimethoprim	1,490	
46	Valproic acid	1,756	
47	Vancomycin	1,230	1,18

## 5.4 Δεδομένα φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (%PPB, $V_d$ , logBBB)

Για τη συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης  $\log k_{CTAB}$  με τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες χρησιμοποιούνται οι μετρήσεις για τις 47 ενώσεις της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αλλά και 45 επιπλέον μετρήσεις που αφορούν σε ενώσεις που μελετήθηκαν παράλληλα στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας. (76) Ο συνδυασμός όλων των δεδομένων κρίνεται απαραίτητος, καθώς για να προκύψει αξιόπιστο μοντέλο πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων θα πρέπει να υπάρχουν όσο το δυνατόν περισσότερα διαθέσιμα δεδομένα.

Τα δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης (Plasma Protein Binding %PPB), όγκου κατανομής ( $V_d$ ), διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (logBBB) και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου ( $F^+$ ,  $F^-$ ) αντλήθηκαν από το λογισμικό Adme Boxes 3.0.

Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα ελέγχου (test set), όπως περιγράφεται στην υποενότητα 6.6.1, φαίνονται με μπλε χρώμα.

Στον **Πίνακα 5** αναγράφονται όλα τα δεδομένα για κάθε μία από τις ενώσεις που είναι απαραίτητα για τις συσχετίσεις της ενότητας 6.6. Τα κενά κελιά οφείλονται στην έλλειψη δεδομένων.

**Πίνακας 5.** Δεδομένα  $\log k_{CTAB}$ ,  $F^+$ ,  $F^-$  σε pH 7,40, %PPB,  $V_d$  και logBBB, για τις 92 φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν

A/A	Φάρμακο	Τύπος	$\log k_{CTAB}$ (7.4)	$F^+$ (7.4)	$F^-$ (7.4)	%PPB	$V_d$	logBBB
1	Acetylsalicylic acid	A	-0,172	0,000	1,000	49,00	0,18	-0,70
2	Acyclovir	N	-0,943	0,000	0,009	18,75	0,70	-0,155
3	Albendazole	N	1,510	0,004	0,002	70,00	10,60	
4	Allopurinol	N	-0,847	0,000	0,010	5,00	0,86	
5	Amitriptyline	B	2,181	0,982	0,000	94,80	16,80	0,97
6	Amlodipine	B	1,292	0,994	0,000	95,75	19,33	
7	Amoxicillin	A	-0,579	0,000	0,531	19,20	0,21	
8	Ampicillin	A	-0,508	0,000	0,530	20,00	0,38	
9	Antipyrine	N	0,241	0,000	0,000	5,00	0,60	
10	Atenolol	B	-1,088	0,994	0,000	11,00	1,15	-1,04
11	Atropine	B	-0,883	0,996	0,000	20,00	2,75	
12	Bromazepam	N	0,979	0,000	0,000	70,00	1,15	
13	Caffeine	N	0,039	0,000	0,000	40,00	0,60	-0,04
14	Carbamazepine	N	1,627	0,000	0,000	72,30	1,33	-0,14
15	Ceftriaxone	Z	-0,259	0,000	0,221	95,00	0,14	
16	Chloramphenicol	N	0,817	0,000	0,000	54,00	0,96	
17	Chlordiazepoxide	N	1,806	0,002	0,000	94,00	3,30	
18	Chlorpheniramine	B	1,129	0,986	0,000	69,50	9,00	

19	Cimetidine	B	0,846	0,218	0,000	18,50	1,12	-1,42
20	Cinoxacin	A	0,514	0,000	0,998	66,50	0,23	
21	Ciprofloxacin	Z	0,040	0,050	0,033	40,00	2,45	
22	Citalopram	B	1,620	0,991	0,000	80,00	12,00	
23	Clonidine	B	0,652	0,779	0,000	27,50	2,30	
24	Codeine	B	1,675	0,848	0,000	11,50	3,50	
25	Colchicine	N	1,994	0,000	0,000	39,00	6,50	
26	Desipramine	B	1,548	0,999	0,000	27,50	2,30	
27	Dexamethazone	N	1,625	0,000	0,000	70,75	0,58	
28	Diltiazem	B	1,652	0,875	0,000	78,00	5,09	
29	Enalapril	A	0,71	0,000	0,986	60,00	1,70	
30	Enoxacin	Z	-0,146	0,051	0,033	40,00	2,75	
31	Estradiol	N	1,617	0,000	0,001	95,00	12,00	
32	Fentanyl	B	1,834	0,848	0,000	83,00	4,00	
33	Fluoxetine	B	1,828	0,997	0,000	94,00	31,12	1,08
34	Fluphenazine	B	2,058	0,737	0,000	95,00	11,00	
35	Furosemide	A	1,295	0,000	1,000	96,80	0,16	
36	Hydrochlorothiazide	N	0,775	0,000	0,028	64,60	5,70	
37	Hydrocortisone	N	1,395	0,000	0,000	95,00	0,54	
38	Ibuprofen	A	1,375	0,000	0,999	99,00	0,12	-0,18
39	Imipramine	B	2,020	0,991	0,000	82,75	17,25	
40	Isoniazide	N	-1,285	0,000	0,000	2,50	0,67	
41	Isoxicam	A	1,292	0,000	1,000	96,00		
42	Ketoprofen	A	0,735	0,000	0,999	98,00	0,10	
43	Labetalol	B	1,691	0,552	0,022	50,00	8,95	
44	Levofloxacin	Z	-0,260	0,047	0,096	32,30	1,38	-0,70
45	Lidocaine	B	1,017	0,779	0,000	67,00	1,30	
46	Lisinopril	Z	-1,047	0,000	0,001	2,10	2,05	
47	Lornoxicam	A	1,225	0,000	0,993	99,00	0,20	
48	Losartan	A	1,751	0,000	0,933	99,20	0,45	
49	Mefenamic acid	A	1,258	0,000	0,999	90,00	1,06	
50	Meloxicam	A	1,471	0,000	0,999	99,30	10,00	
51	Metformin	B	-0,411	1,000	0,000	0,00	1,69	
52	Methylprednisolone	N	1,773	0,000	0,000	77,30	1,26	
53	Metoclopramide	B	1,658	0,000	0,989	33,30	3,30	0,08
54	Metoprolol	B	0,386	0,994	0,000	11,30	4,33	1,15
55	Minoxidil	N	0,753	0,002	0,000	0,00	2,86	
56	Nadolol	B	0,067	0,991	0,000	30,00	2,00	
57	Nalidixic acid	A	-0,282	0,000	0,947	93,00	0,40	

58	Naproxen	A	0,768	0,000	0,999	99,70	0,16	-1,70
59	Nifedipine	N	1,782	0,000	0,000	96,00	1,81	
60	Niflumic acid	A	1,371	0,000	0,997	90,00	0,12	
61	Nicotine	B	0,539	0,875	0,000	6,50	2,53	
62	Nimesulide	A	1,761	0,000	0,996	97,50	0,29	
63	Nitrofurantoin	A	-0,211	0,000	0,473	73,75	0,66	
64	Norfloxacin	Z	-0,638	0,050	0,033	13,75	2,80	-1,00
65	Nortriptyline	B	1,662	0,998	0,000	92,25	22,05	1,04
66	Ofloxacin	Z	-0,382	0,047	0,096	32,00	2,35	
67	Omeprazole	N	0,739	0,001	0,054	95,00	0,33	-0,82
68	Paracetamol	N	-0,214	0,000	0,000	22,50	0,92	-0,50
69	Phenytoin	A	2,034	0,000	0,102	90,00	0,65	
70	Pindolol	B	0,735	0,994	0,000	40,00	1,86	0,30
71	Pipemidic acid	Z	-0,448	0,051	0,033	30,00	1,90	
72	Piperacillin	A	-0,407	0,000	1,000	19,00	1,35	
73	Prednisolone	N	1,382	0,000	0,000	92,50	0,44	
74	Primidone	N	0,758	0,000	0,000	38,00	0,64	
75	Promazine	B	1,956	0,991	0,000	94,00	8,38	
76	Promethazine	B	2,062	0,989	0,000	93,00	13,40	1,30
77	Propafenone	B	1,548	0,992	0,000	97,00	3,60	
78	Propranolol	B	1,62	0,994	0,000	87,00	4,00	0,70
79	Protriptylline	B	1,488	0,875	0,000	92,00	23,00	
80	Quinidine	B	1,599	0,946	0,000	87,00	2,50	-0,26
81	Retinoic acid	A	1,964	0,000	0,999	95,300	1,00	
82	Sulfamethoxazole	A	1,255	0,000	0,978	53,00	0,24	
83	Sulpiride	B	0,063	0,984	0,000		2,05	
84	Tenoxicam	A	1,033	0,000	1,000	98,50	11,00	
85	Terbutaline	B	-0,188	0,980	0,000	19,50	1,60	
86	Theophylline	N	-0,911	0,000	0,000	56,00	0,48	-0,32
87	Thioridazine	B	2,039	0,991	0,000	97,90	7,13	0,29
88	Tramadol	B	0,951	0,998	0,000	20,00	2,75	
89	Trimethoprim	B	1,129	0,469	0,000	41,70	1,34	
90	Valproic acid	A	1,846	0,000	0,996	93,00	0,22	
91	Vancomycin	Z	0,188	0,000	0,125	43,30	0,52	
92	Warfarin	A	1,137	0,000	0,997	98,75	0,15	

## 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 6.1 Συντελεστές κατακράτησης σε pH 7.4 και 5.5 ( $\log k_{CTAB}$ )

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι συντελεστές κατακράτησης των 47 φαρμάκων που μετρήθηκαν σε pH 7.4 και των 22 εξ' αυτών που μετρήθηκαν σε pH 5.5. Για τα φάρμακα για τα οποία έγιναν δύο ή τρεις μετρήσεις ο συντελεστής  $\log k$  προέκυψε από το μέσο όρο των μετρήσεων. Ο συντελεστής  $k$  υπολογίστηκε από τη σχέση [3.1] και παρουσιάζεται στη λογαριθμική μορφή του. Τα αποτελέσματα αναγράφονται σε κάθε περίπτωση μαζί με το τυπικό σφάλμα των μετρήσεων. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε στη διάρκεια των πειραμάτων ήταν 100% υδατική, οπότε δε χρειάστηκε προσαρμογή των τιμών του  $\log k$ .

Πίνακας 6. Συντελεστές κατακράτησης σε pH 7.4 και 5.5 ( $\log k_{CTAB}$ )

A/A	Φάρμακο	Τύπος	$\log k_{CTAB}$ (7.4)	$\log k_{CTAB}$ (5.5)
1	Acyclovir	N	-0,943±0,001	
2	Allopurinol	N	-0,847±0,007	
3	Amitriptyline	B	2,181±0,001	
4	Amlodipine	B	1,292±0,001	
5	Amoxicillin	A	-0,579±0,021	-0,132±0,098
6	Atenolol	B	-1,088±0,003	-1,378±0,004
7	Atropine	B	-0,883±0,019	
8	Caffeine	N	0,039±0,042	0,0392±0,005
9	Carbamazepine	N	1,627±0,001	
10	Chloramphenicol	N	0,817±0,013	
11	Chlordiazepoxide	N	1,806±0,001	
12	Cinoxacin	A	0,514±0,051	0,69±0,033
13	Ciprofloxacin	Z	0,04±0,002	0,693±0,059
14	Clonidine	B	0,652±0,028	
15	Codeine	B	1,675±0,001	
16	Colchicine	N	1,994±0,001	
17	Desipramine	B	1,548±0,001	
18	Estradiol	N	1,617±0,001	
19	Fentanyl	B	1,834±0,001	
20	Hydrocortisone	N	1,395±0,001	

21	Ibuprofen	A	1,375±0,001	1,469±0,001
22	Isoxicam	A	1,292±0,001	1,356±0,001
23	Lisinopril	Z	-1,047±0,091	-0,734±0,084
24	Lornoxicam	A	1,225±0,001	1,536±0,001
25	Meloxicam	A	1,471±0,001	1,576±0,001
26	Methylprednisolone	N	1,773±0,001	
27	Metoclopramide	B	1,658±0,001	
28	Metoprolol	B	0,386±0,001	-0,485±0,020
29	Minoxidil	N	0,753±0,017	0,7±0,017
30	Nadolol	B	0,067±0,004	-0,698±0,042
31	Nalidixic acid	A	-0,282±0,094	0,685±0,015
32	Nimesulide	A	1,761±0,001	1,801±0,001
33	Paracetamol	N	-0,214±0,041	
34	Phenytoin	A	2,034±0,001	2,048±0,001
35	Pipemidic acid	Z	-0,448±0,001	-0,357±0,033
36	Primidone	N	0,758±0,125	
37	Promethazine	B	2,062±0,001	
38	Propranolol	B	1,62±0,001	1,076±0,001
39	Quinidine	B	1,599±0,001	
40	Sulfamethoxazole	A	1,255±0,001	1,413±0,001
41	Terbutaline	B	-0,188±0,008	
42	Theophylline	N	-0,911±0,010	
43	Thioridazine	B	2,039±0,001	
44	Tramadol	B	0,951±0,028	
45	Trimethoprim	B	1,129±0,001	0,368±0,046
46	Valproic acid	A	1,846±0,001	1,941±0,001
47	Vancomycin	Z	0,188±0,014	-0,266±0,019

Με βάση τα αποτελέσματα που παρατέθηκαν παραπάνω παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη τιμή  $\log k$  σε pH 7.4 για την παρούσα έρευνα παρουσίασε η ουσία Amitriptyline, με  $\log k = 2,181 \pm 0,001$  και χρόνο ανάλυσης περίπου 245 min. Η μικρότερη τιμή  $\log k = -1,088 \pm 0,003$  παρατηρείται στην ουσία Atenolol με χρόνο ανάλυσης 1,678 min. Από τις ουσίες που μελετήθηκαν σε pH 5.5 το μεγαλύτερο συντελεστή κατανομής είχε η ουσία Phenytoin ( $\log k = 2,048 \pm 0,001$ ), η οποία εκλούστηκε από τη στήλη στα 176 min, ενώ το μικρότερο  $\log k$  ίσο με  $-1,378 \pm 0,004$  είχε και σε αυτήν την περίπτωση η ατενολόλη με χρόνο κατακράτησης 1,628 min.

## 6.2 Σύγκριση εύρους $\log k_{CTAB}$ με άλλα τασιενεργά σε pH 7.4

Βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων του Κεφαλαίου 5 παρουσιάζονται οι μεγαλύτερες και οι μικρότερες τιμές του συντελεστή κατακράτησης μόνο για τα κοινά με την παρούσα μελέτη φάρμακα, που μετρήθηκαν παρουσία των τασιενεργών Brij-35, Tween20, SDS και Triton X-100 και της στήλης IAM.DD2. Η σύγκριση των τιμών του  $\log k$  αφορά μόνο τη μελέτη σε pH 7.4, καθώς, όπως προαναφέρθηκε, τα δεδομένα για το 5.5 είναι ελλιπή και η μελέτη τους ως προς την ιδιότητα του εύρους τιμών δεν παρουσιάζει ενδιαφέρον. Στον πίνακα των τιμών συμπεριλαμβάνονται ξανά οι αντίστοιχες τιμές για το CTAB για λόγους σύγκρισης. Για κάθε τασιενεργό αναγράφονται η μεγαλύτερη και η μικρότερη τιμή για το  $\log k$ , καθώς επίσης και η δραστική ουσία στην οποία αντιστοιχεί.

**Πίνακας 7.** Σύγκριση εύρους τιμών του  $\log k$  για τα διάφορα τασιενεργά και τη στήλη IAM.DD2

Τασιενεργό	Μικρότερη τιμή $\log k$	Μεγαλύτερη τιμή $\log k$	Εύρος (range)
CTAB	-1,088 (Atenolol)	2,181 (Amitriptyline)	3,269
Brij-35	-0,815 (Lisinopril)	1,861 (Amitriptyline)	2,630
Tween20	-1,266 (Amoxicillin)	2,224 (Thioridazine)	3,490
SDS	-1,554 (Amoxicillin)	2,273 (Propranolol)	3,827
Triton X-100	-0,938 (Ciprofloxacin)	2,187 (Estradiol)	3,125
IAM.DD2	-0,567 (Lisinopril)	3,980 (Thioridazine)	4,547

Παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο εύρος τιμών  $\log k$  για το συγκεκριμένο σετ των 47 φαρμάκων έχει η χρωματογραφική ανάλυση με τη στήλη IAM.DD2. Για τα τασιενεργά CTAB, Tween20, SDS και Triton X-100 το εύρος είναι παρόμοιο, ενώ μικρότερο εύρος παρουσιάζει το Brij-35. Για τη χρωματογραφική ανάλυση των ουσιών που μελετήθηκαν είναι επιθυμητό το εύρος τιμών να είναι μεγάλο, προκειμένου η ταξινόμησή τους να είναι καλύτερη, ιδίως σε περιπτώσεις φαρμάκων με πολύ κοντινές τιμές  $\log k$ . Το εύρος τιμών που παρατηρείται για το CTAB θεωρείται ικανοποιητικό σε σύγκριση με αυτό των υπόλοιπων μελετών και τα αποτελέσματα μπορούν να θεωρηθούν ως ένα βαθμό αξιόπιστα.

## 6.3 Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με συντελεστές λιποφιλίας

Για όλα τα είδη μικκυλιακής χρωματογραφίας η συγκράτηση των ουσιών από τη στήλη εξαρτάται άμεσα από τη λιποφιλία. Η διαφοροποίηση των συνθηκών της χρωματογραφίας μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετική συμπεριφορά των ίδιων ενώσεων. Επιπλέον, κάθε ένα από τα τασιενεργά επιδρά διαφορετικά στην

κατακράτηση των ουσιών μέσω των αλληλεπιδράσεών του με αυτές, με τα ασθενή οξέα που είναι ιοντισμένα να παρουσιάζουν πρόσθετες ελκτικές δυνάμεις με τα ιοντικά τασιενερά.

Εφόσον το CTAB είναι θετικά φορτισμένο, τα μονομερή του προσροφώνται από τη στατική φάση με υδρόφοβους δεσμούς. Τα τμήματα του τασιενεργού που είναι θετικά φορτισμένα μένουν προς τα έξω. Έτσι, ευνοείται ο σχηματισμός ηλεκτροστατικών ελκτικών δεσμών με ανιόντα, δηλαδή στην προκειμένη περίπτωση με τις φορτισμένες όξινες φαρμακευτικές ενώσεις.

Οι συσχετίσεις των συντελεστών κατακράτησης για το CTAB με τους συντελεστές λιποφιλίας έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού IBM SPSS Statistics για φάρμακα για τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα. Σε αυτό το στάδιο της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων γίνεται διαφοροποίηση των φαρμάκων ανάλογα με την κατηγορία στην οποία ανήκουν, η οποία αναπαρίσταται με διαφορετικό χρωματισμό για κάθε ομάδα στα διαγράμματα (μωβ: οξέα, κόκκινο: βάσεις, πράσινο: ουδέτερα, κίτρινο: αμφολύτες). Επιπλέον, εξετάζεται η συνεισφορά των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στις παραπάνω συσχετίσεις, η οποία πραγματοποιείται με εισαγωγή των ανεξάρτητων μεταβλητών  $F^+$ ,  $F^-$  στη γραμμική παλινδρόμηση που εκτελείται σε κάθε περίπτωση.

### 6.3.1 Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με το συντελεστή μερισμού $\log P$

Ο συντελεστής μερισμού εκφράζει τη λιποφιλία της μη ιοντισμένης μορφής ενός φαρμάκου. Καθώς μέσα στήλη στην περίπτωση του CTAB υπάρχει ιοντισμός, αναμένεται στην εξίσωση της παλινδρόμησης τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου να έχουν αρνητικό πρόσημο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αύξηση του ιοντισμού επιφέρει μείωση της λιποφιλίας και κατά συνέπεια, μείωση του χρόνου συγκράτησης της ουσίας από τη στήλη. Τυχόν αποκλίσεις από την αναμενόμενη προσέγγιση των  $F^+$  και  $F^-$  οφείλονται σε επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των μορίων. Συγκεκριμένα, για τις πρωτονιωμένες βάσεις προκύπτει αρνητικό πρόσημο για το  $F^+$ , ενώ για τα οξέα το  $F^-$  δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αύξηση του ιοντισμού στα οξέα, ενώ προκαλεί μείωση της λιποφιλίας, αυξάνει συγχρόνως τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις συγκράτησης, με αποτέλεσμα την αντιστάθμιση των δύο φαινομένων.

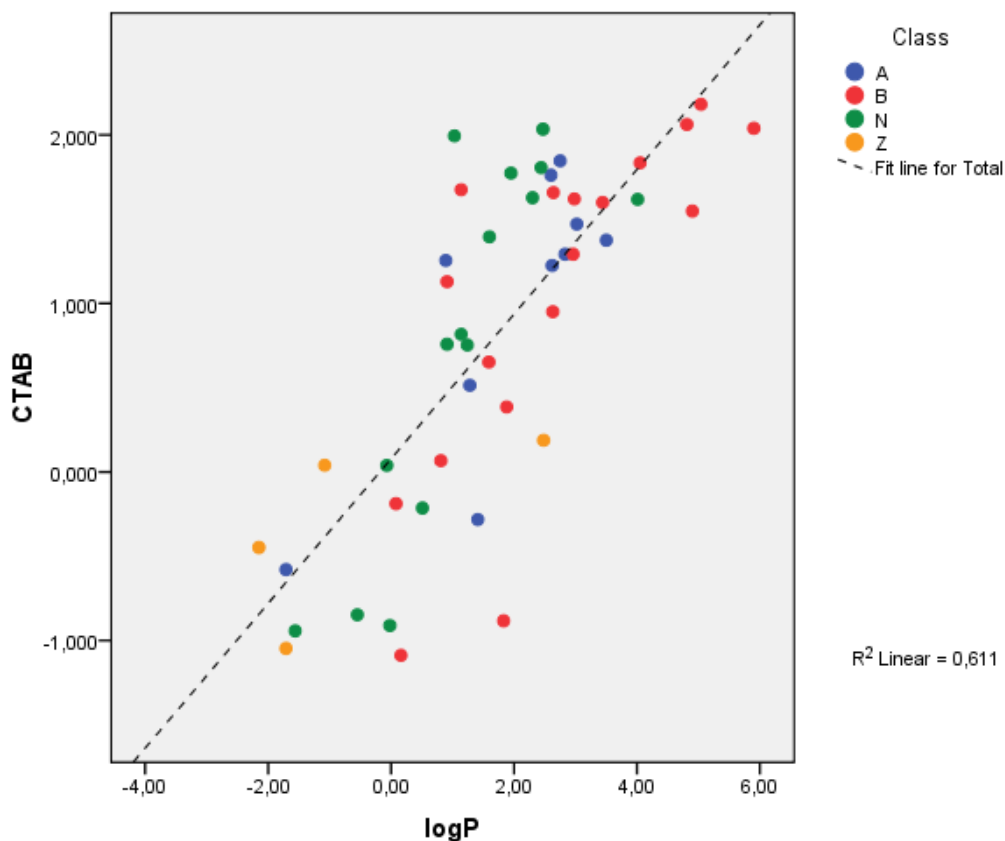
Η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης  $\log k_{CTAB}$  με το συντελεστή μερισμού  $\log P$  σε pH 7.4 γίνεται με γραμμική παλινδρόμηση, με εξαρτημένη μεταβλητή το συντελεστή  $\log k_{CTAB}$  και ανεξάρτητη μεταβλητή το συντελεστή  $\log P$ . Η εξίσωση που προκύπτει από τη συσχέτιση είναι η εξής:

$$\log k_{CTAB} = 0.429(\pm 0.051) \cdot \log P + 0.079(\pm 0.129) \quad [6.1a]$$

$$N = 47, R = 0.782, R^2 = 0.611, s = 0.640, F = 70.7$$

Η συσχέτιση παριστάνεται γραφικά στο ακόλουθο διάγραμμα:





**Διάγραμμα 1.** Συσχέτιση  $\log k_{CTAB}$  με το συντελεστή  $\log P$

Παρατηρώντας το διάγραμμα δε διακρίνεται ξεχωριστή συμπεριφορά σε κάποια από τις τέσσερις ομάδες (A,B,N,Z), ενώ η συσχέτιση θεωρείται ικανοποιητική ( $R^2 = 0.611$ ).

Κατόπιν εισαγωγής του του θετικού ( $F^+$ ) και αρνητικού ( $F^-$ ) φορτίου ως ανεξάρτητες μεταβλητές στη γραμμική παλινδρόμηση προκύπτει ότι το κλάσμα θετικού φορτίου είναι στατιστικά σημαντικό με αρνητικό πρόσημο ( $|t| > 2$ ,  $s < 0.05$ ). Η παραπάνω εξίσωση βελτιώνεται ως εξής:

$$\log k_{CTAB} = 0.476(\pm 0.054) \cdot \log P - 0.462(\pm 0.214) \cdot F^+ + 0.162(\pm 0.130) \quad [6.1\beta]$$

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

όπου  $F^+$ : κλάσμα θετικού φορτίου

Σημειώνεται ότι το θετικό κλάσμα υπολογίζεται από το πρόγραμμα ADME Boxes 3.0 με βάση τις τιμές  $pK_a$ .

### 6.3.2 Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με το συντελεστή κατανομής $\log D$

Ο συντελεστής κατανομής  $\log D$  εκφράζει τη λιποφιλία λαμβάνοντας υπόψιν τον ιοντισμό του κάθε φαρμάκου σε δεδομένο pH. Η συσχέτιση γίνεται για τα φάρμακα

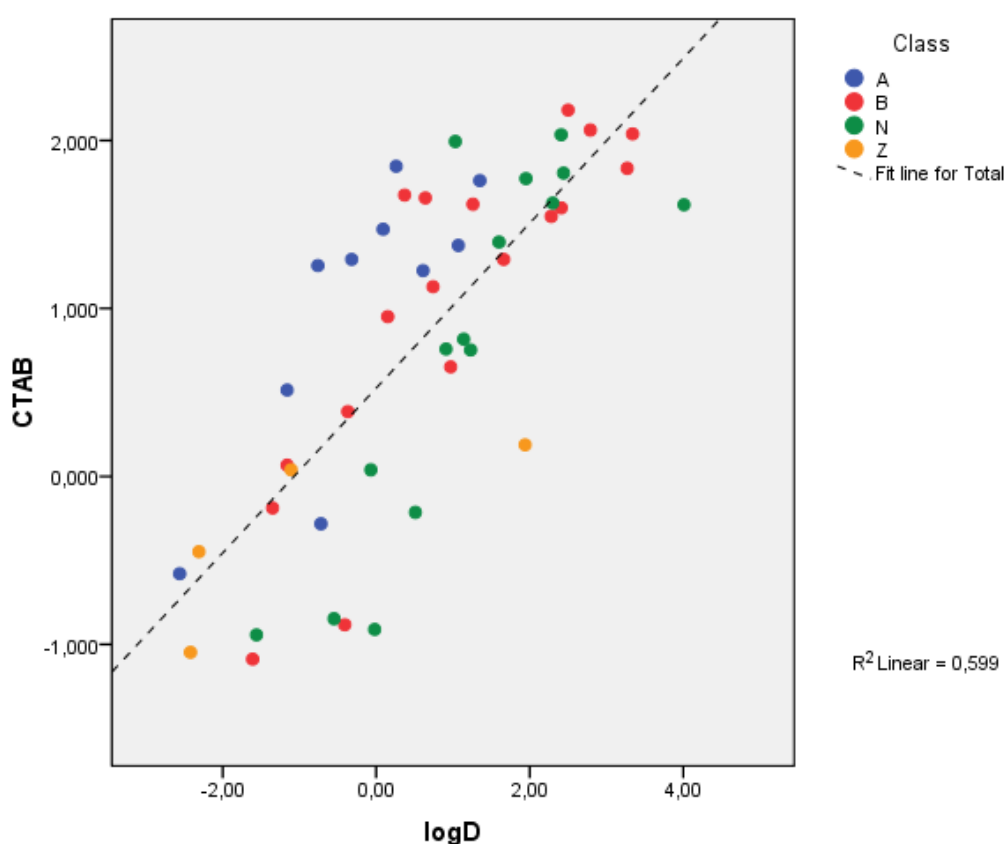
για τα οποία υπάρχουν δεδομένα σε pH 7.4. Όπως προαναφέρθηκε, ο ιοντισμός μιας ουσίας μειώνει τη λιποφιλία της. Ο ιοντισμός μέσα στη στήλη είναι λίγο μικρότερος από τον ιοντισμό σε υδατικό διάλυμα του ίδιου pH, καθώς αλλάζει η διηλεκτρική σταθερά. Αν δεν υπήρχαν πρόσθετες ηλεκτροστατικές δυνάμεις, θα αναμενόταν η εξίσωση παλινδρόμησης να δίνει θετικές τιμές για  $F^+$  και  $F^-$ , καθώς η λιποφιλία είναι λίγο μεγαλύτερη εντός της στήλης σε σχέση με τον υπολογισμό του  $\log D$ .

Η εξίσωση που προέκυψε από τη γραμμική παλινδρόμηση είναι η ακόλουθη:

$$\log k_{CTAB} = 0.491(\pm 0.060) \cdot \log D + 0.526(\pm 0.102) \quad [6.2a]$$

$$N = 47, R = 0.774, R^2 = 0.599, s = 0.650, F = 67.1$$

Η εξίσωση παριστάνεται γραφικά παρακάτω:



**Διάγραμμα 2.** Συσχέτιση  $\log k_{CTAB}$  με το συντελεστή κατανομής  $\log D_{7.4}$

Η συσχέτιση σε αυτήν την περίπτωση είναι λιγότερο ικανοποιητική ( $R^2=0.599$ ) σε σύγκριση με αυτή του  $\log P$ , επιβεβαιώνοντας ότι ο ιοντισμός των ενώσεων καταστέλλεται εντός της χρωματογραφικής στήλης.

Το  $F^+$  έχει μεν θετικό πρόσημο αλλά είναι οριακό ως προς την στατιστική σημαντικότητά του ( $t=1.9$ ). Αντίθετα, το  $F^-$  είναι σαφώς μεγαλύτερο. Αυτό οφείλεται στην ιδιότητα των αρνητικά φορτισμένων κέντρων να αλληλεπιδρούν με τα θετικά

φορτισμένα κέντρα της τροποποιημένης κινητής φάσης μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγκράτησή τους από τη στήλη.

Εφόσον το κλάσμα αρνητικού φορτίου είναι στατιστικά σημαντικό με αρνητικό πρόσημο, η παραπάνω εξίσωση βελτιώνεται ως εξής:

$$\log k_{\text{CTAB}} = 0.536(\pm 0.055) \cdot \log D + 0.811(\pm 0.223) \cdot F^- + 0.331(\pm 0.105) \quad [6.2\beta]$$

$$N = 47, R = 0.832, R^2 = 0.692, s = 0.576, F = 49.3$$

Όπου  $F^-$ : κλάσμα αρνητικού φορτίου (υπολογίζεται από το πρόγραμμα ADME Boxes 3.0 με βάση τις τιμές  $pK_a$ ).

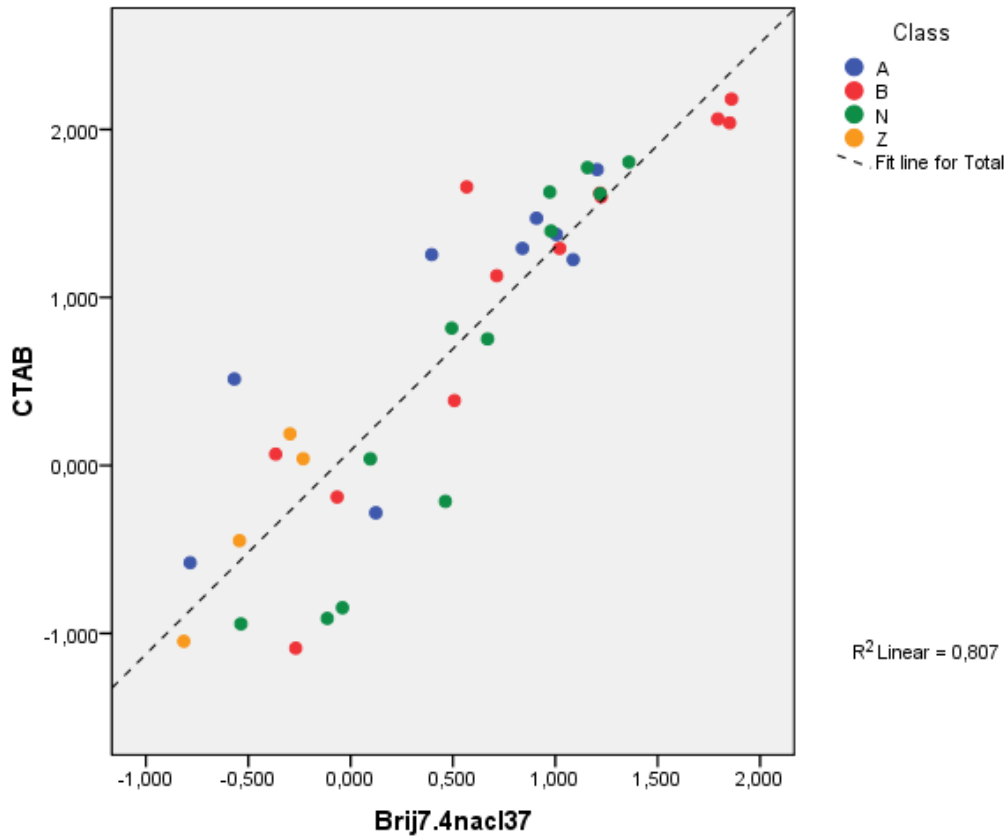
Παρατηρείται ότι η προσθήκη των κλασμάτων θετικού κι αρνητικού φορτίου στη συσχέτιση βελτιώνει σημαντικά την εξίσωση ( $R^2 = 0.692$ ). Επισημαίνεται, όμως, ότι ο ιοντισμός των ενώσεων εντός της στήλης είναι μικρότερος από τον αναμενόμενο για υδατικό διάλυμα στις υπό ανάλυση χρωματογραφικές συνθήκες.

## 6.4 Συσχέτιση με άλλα είδη μικκυλιακής χρωματογραφίας

Για τη χρωματογραφική ανάλυση των φαρμάκων στις ίδιες συνθήκες και σε pH 7.4 πραγματοποιούνται συσχετίσεις του συντελεστή κατακράτησης  $\log k$  για το CTAB σε σύγκριση με τους αντίστοιχους συντελεστές για τα τασιενεργά Brij-35, Tween20, SDS και Triton X-100, καθώς και για τη χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών με στήλη IAM.DD2.

### 6.4.1 Συσχέτιση $\log k_{\text{CTAB}}$ με τους συντελεστές $\log k_{\text{Brij-35}}$

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η συσχέτιση των  $\log k_{\text{CTAB}}$  με τους αντίστοιχους συντελεστές για το μη ιοντικό τασιενεργό Brij-35.



**Διάγραμμα 3.** Συσχέτιση  $\log k_{\text{CTAB}}$  με  $\log k_{\text{Brij-35}}$

Η συσχέτιση των συντελεστών μεταξύ των δύο τασιενεργών θεωρείται πολύ ικανοποιητική ( $R^2=0.807$ ). Αν στη συσχέτιση συμπεριληφθούν και τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, η εξίσωση διαμορφώνεται ως εξής:

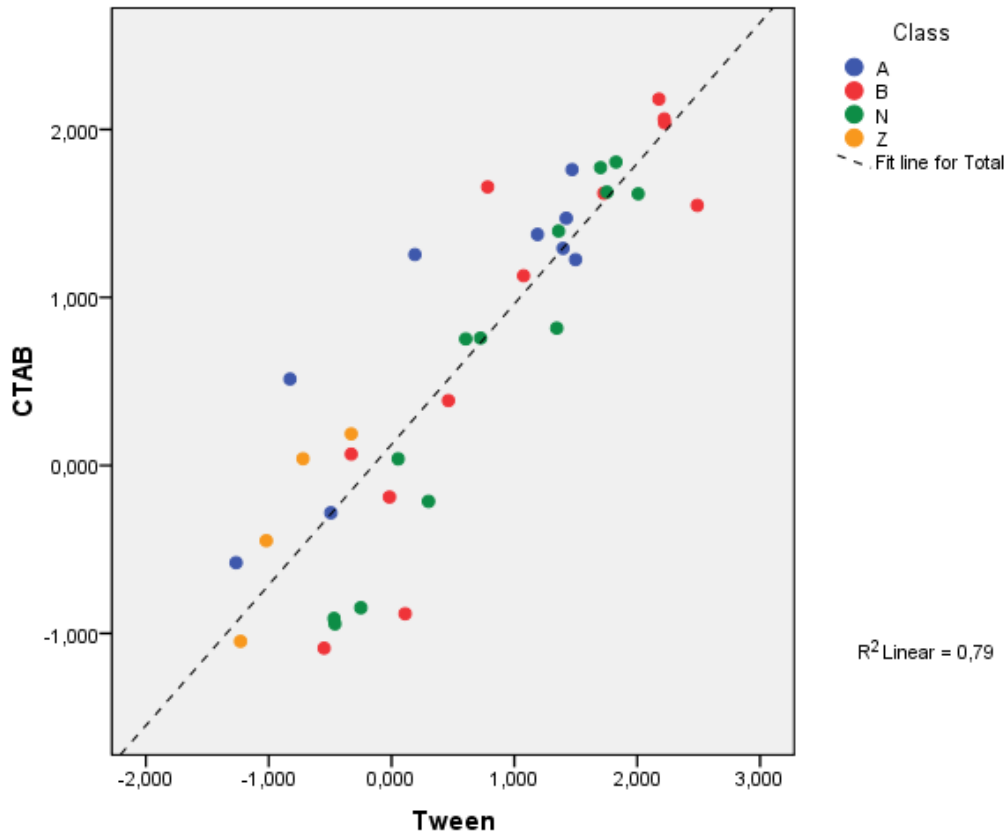
$$\log k_{\text{CTAB}} = 1.212(\pm 0.100) \cdot \log k_{\text{Brij}} + 0.089(\pm 0.091) \quad [6.3]$$

$$N = 37, R = 0.898, R^2 = 0.807, s = 0.456, F = 146.4$$

Παρόλο που η συσχέτιση θεωρείται ικανοποιητική, σημειώνεται ότι το  $F^-$  είναι οριακό ( $t=1.9$ ).

#### 6.4.2 Συσχέτιση $\log k_{\text{CTAB}}$ με τους συντελεστές $\log k_{\text{Tween20}}$

Στο ακόλουθο διάγραμμα φαίνεται η συσχέτιση των  $\log k_{\text{CTAB}}$  με τους αντίστοιχους συντελεστές για το μη ιοντικό τασιενεργό Tween20.



**Διάγραμμα 4.** Συσχέτιση  $\log k_{CTAB}$  με  $\log k_{Tween20}$

Η συσχέτιση και σε αυτήν την περίπτωση κρίνεται ικανοποιητική ( $R^2=0.790$ ). Με την προσθήκη των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου στην εξίσωση παλινδρόμησης προκύπτει η βελτιωμένη εξίσωση:

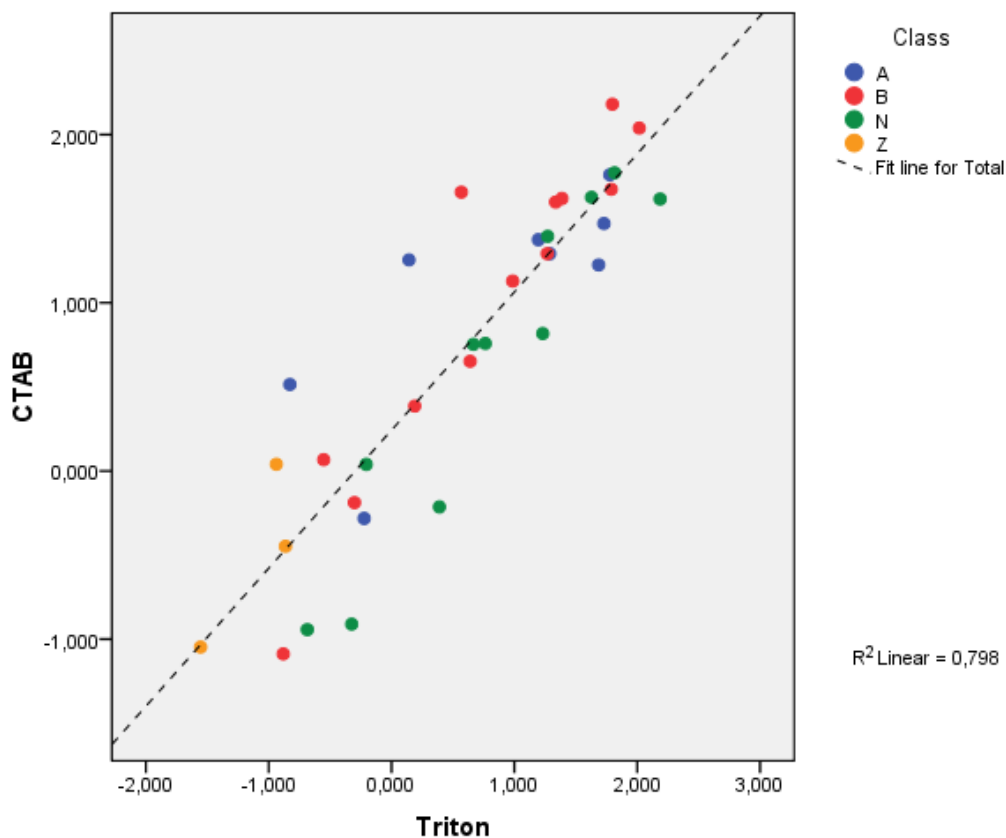
$$\log k_{CTAB} = 0.842(\pm 0.067) \cdot \log k_{Tween} + 0.479(\pm 0.181) \cdot F^- + 0.013(\pm 0.094) \quad [6.4]$$

$$N = 38, R = 0.908, R^2 = 0.925, s = 0.446, F = 82.4$$

Όπως φαίνεται στην εξίσωση, το κλάσμα αρνητικού φορτίου είναι στατιστικά σημαντικό, γεγονός που οφείλεται στην επιπλέον συγκράτηση των ιοντισμένων οξέων λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

### 6.4.3 Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με τους συντελεστές $\log k_{TritonX-100}$

Η συσχέτιση αυτή αφορά και πάλι μη ιοντικό τασιενεργό και συγκεκριμένα το Triton X-100.



**Διάγραμμα 5.** Συσχέτιση  $\log k_{CTAB}$  με  $\log k_{Triton X-100}$

Η συσχέτιση μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητική εφόσον  $R^2=0.798$ . Η διορθωμένη εξίσωση που προκύπτει είναι η εξής:

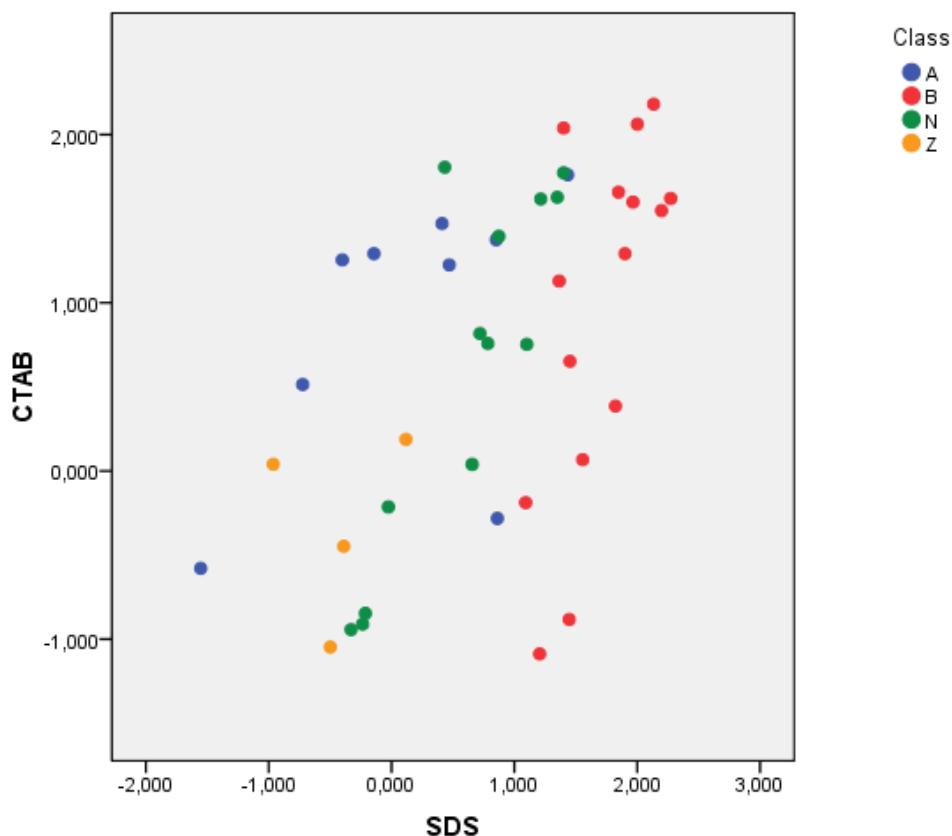
$$\log k_{CTAB} = 0.821(\pm 0.072) \cdot \log k_{Triton} + 0.243(\pm 0.087) \quad [6.5]$$

$$N = 35, R = 0.893, R^2 = 0.798, s = 0.437, F = 130.3$$

Σημειώνεται ότι το κλάσμα αρνητικού φορτίου  $F^-$  είναι οριακό ( $t=1.9$ ) για την παραπάνω συσχέτιση.

#### 6.4.4 Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με τους συντελεστές $\log k_{SDS}$

Η συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης για το CTAB με αυτούς του ανιοντικού τασιενεργού SDS παρουσιάζεται παρακάτω.



**Διάγραμμα 6.** Συσχέτιση  $\log k_{CTAB}$  με  $\log k_{SDS}$

Όπως φαίνεται και στο **Διάγραμμα 6**, η συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών των δύο τασιενεργών δεν είναι καθόλου ικανοποιητική. Η εικόνα που προκύπτει είναι συγκεχυμένη. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς πρόκειται για δύο αντίθετα φορτισμένες επιφανειοδραστικές ουσίες. Συγκεκριμένα, το SDS ως ανιοντικό τασιενεργό (αρνητικά φορτισμένο) ενισχύει τη συγκράτηση των βάσεων, ενώ αντίθετα το CTAB ως κατιοντικό τασιενεργό (θετικά φορτισμένο) ενισχύει τη συγκράτηση των οξέων από τη στήλη. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει και από την παρατήρηση του τρόπου με τον οποίο είναι κατανομημένες οι βάσεις και τα οξέα στο γράφημα (οξέα προς τον άξονα του  $\log k_{CTAB}$ , βάσεις προς τον άξονα του  $\log k_{SDS}$ ). Η κατανομή αυτή παρατηρείται για τις περισσότερες από τις ενώσεις των συγκεκριμένων κατηγοριών.

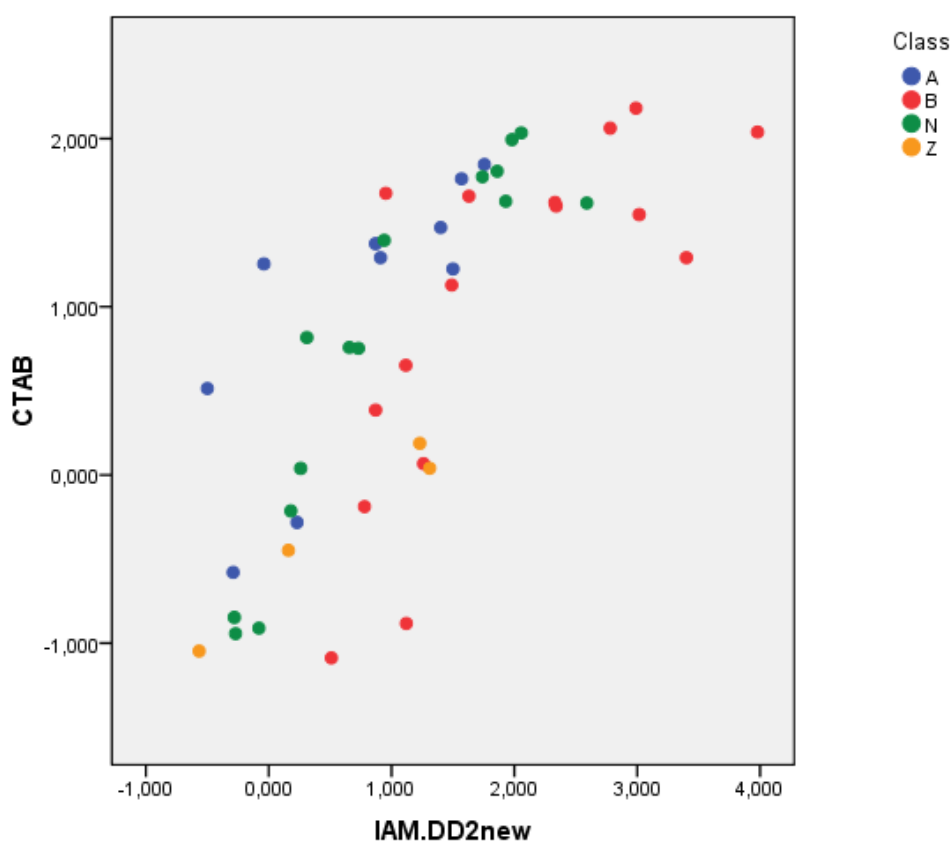
Τα κλάσματα  $F^+$  και  $F^-$  είναι στατιστικά σημαντικά και η εξίσωση κατόπιν προσθήκης τους στην εξίσωση παλινδρόμησης ως ανεξάρτητες μεταβλητές είναι η ακόλουθη:

$$\log k_{CTAB} = 0.966(\pm 0.179) \cdot \log k_{SDS} + 0.758(\pm 0.331) \cdot F^- - 0.807(\pm 0.384) \cdot F^+ + 0.041(\pm 0.193) \quad [6.6]$$

$$N = 41, R = 0.697, R^2 = 0.486, s = 0.755, F = 11.6$$

#### 6.4.5 Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με τους συντελεστές $\log k_{IAM.DD2}$

Η συσχέτιση με τα δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών, τύπου DD2 (IAM.PC.DD2) φαίνεται παρακάτω.



**Διάγραμμα 7.** Συσχέτιση  $\log k_{CTAB}$  με  $\log k_{IAM.DD2}$

Το φαινόμενο συγκεκριμένης συμπεριφοράς των οξέων και των βάσεων σε αυτήν τη συσχέτιση είναι πιο έντονο με τις όξιες ενώσεις (μωβ κουκκίδες) να τείνουν προς τον άξονα του CTAB και τις βασικές ενώσεις (κόκκινες κουκκίδες) να βρίσκονται προς τον άξονα της IAM. Η συμπεριφορά αυτή είναι λογική, καθώς στη χρωματογραφία με στήλη IAM οι ελεύθερες φωσφορικές ομάδες, οι οποίες είναι αρνητικά φορτισμένες είναι προσβάσιμες για ανάπτυξη ηλεκτροστατικών δυνάμεων με πρωτονιομένες βάσεις (θετικά φορτισμένες). Οι πιο λιπόφιλες ενώσεις, όπως προαναφέρθηκε,



κατακρατούνται περισσότερο από τη στήλη, ενώ συγχρόνως αναπτύσσονται πρόσθετες ηλεκτροστατικές δυνάμεις στις ασθενείς βάσεις που είναι ιοντισμένες. Συνεπώς, οι μεν όξινες ενώσεις συγκρατούνται περισσότερο στη μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία CTAB, οι δε βασικές ενώσεις στην IAM. Αυτό καθίσταται σαφές και από την παρακάτω εξίσωση, όπου τα πρόσημα των  $F^+$  και  $F^-$  είναι αντίθετα.

$$\log k_{CTAB} = 0.865(\pm 0.096) \cdot \log k_{IAM} + 0.594(\pm 0.247) \cdot F^- - 0.538(\pm 0.242) \cdot F^+ - 0.199(\pm 0.159) \quad [6.7]$$

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

Η συσχέτιση μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητική.

## 6.5 Μελέτη επίδρασης του pH στον ιοντισμό

Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 5, καθώς και από τα αποτελέσματα των μετρήσεων  $\log k_{CTAB}$ , υπολογίζονται οι διαφορές των συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση για κάθε μέθοδο βιομιμητικής χρωματογραφίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και αφορούν τα 22 φάρμακα που μελετήθηκαν σε pH 5.5 στα πλαίσια της παρούσας έρευνας. Τα κενά κελιά οφείλονται στην έλλειψη δεδομένων.

**Πίνακας 8.** Διαφορά  $\log k^{7.4-5.5}$  για τα CTAB, Brij-35, Tween20, Triton X-100, τη στήλη IAM.DD2 και το συντελεστή κατανομής  $\log D$

Φάρμακο	$\log k^{7.4-5.5}$						$\Delta \log D^{7.40-5.50}$
	CTAB	Brij-35	Tween20	SDS	Triton X-100	IAM.DD2	
<b>ΟΞΕΑ</b>							
Amoxicillin	-0,45	0,58	-0,22		0,10	0,02	-0,85
Cinoxacin	-0,18	-0,42	-0,73	-1,36	-0,33		-1,78
Ibuprofen	-0,09	-0,60	-0,31			-0,68	-1,08
Isoxicam	-0,06	-0,07	-0,10	-1,64	-0,08	-0,34	-1,87
Lornoxicam	-0,31	-0,03	-0,06			-0,10	-1,05
Meloxicam	-0,11	-0,07	-0,09			-0,10	-1,79
Nalidixic acid	-0,97	-0,72	-1,54		-1,34	-1,01	-1,34
Nimesulide	-0,04	-0,20				-0,54	-1,10
Sulfamethoxazole	-0,16	-0,59	-1,06		-0,27	-0,95	-1,41
Vluproic acid	-0,10						-1,79
<b>ΒΑΣΕΙΣ</b>							
Atenolol	0,29	0,16		0,15	0,18	0,71	1,29

Metoprolol	0,87	0,36			0,29		0,81
Minoxidil	0,05	0,01				-0,12	0,05
Nadolol	0,76	0,02				0,16	1,06
Propranolol	0,54	0,34	0,50		0,14		0,91
Trimethoprim	0,76	0,27			0,50	0,31	1,61
<b>ΟΥΔΕΤΕΡΑ</b>							
Caffeine	0,00	0,01		0,00	-0,03	0,00	0,00
Phenytoin	-0,01						-0,05
<b>ΑΜΦΟΛΥΤΕΣ</b>							
Ciprofloxacin	-0,65	-0,41	-0,58	-1,61	-0,70	0,01	0,62
Lisinopril	-0,31	0,34	-0,97	-0,90	-0,35		0,00
Pipemidic acid	-0,12		-0,56		-0,34	-0,88	0,66
Vancomycin	0,45		0,41	0,25	0,96	0,05	0,71

Παρατηρείται ότι όλες οι όξινες φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά ως προς τη μεταβολή του  $\log k$  από pH 7.4 pH 5.5 για όλες τις χρωματογραφικές τεχνικές. Εξαιρεση αποτελεί η μεταβολή του  $\log D$ , η οποία είναι σαφώς μεγαλύτερη συγκριτικά με τις μεταβολές του  $\log k$ . Συγκεκριμένα, η διαφορά  $\Delta \log k$  είναι αρνητική, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε συνθήκες όξινου περιβάλλοντος τα οξέα κατακρατώνται περισσότερο από τη χρωματογραφική στήλη, με αποτέλεσμα να εκλύονται πιο αργά σε σύγκριση με το χρόνο έκλουσής τους στο βασικό pH 7.4.

Παρόμοια είναι και η συμπεριφορά κατακράτησης των βασικών ενώσεων σε όλα τα είδη μικκυλιακής χρωματογραφίας, καθώς η διαφορά  $\Delta \log k$  είναι θετική για την πλειοψηφία αυτών. Αυτό είναι λογικό, διότι για τις βάσεις η μείωση του pH οδηγεί σε αύξηση του ιοντισμού και, κατά συνέπεια, σε μικρή κατακράτηση από τη στήλη. Για το κατιοντικό τασιενεργό CTAB παρατηρείται μια λίγο μεγαλύτερη επίδραση του όξινου pH στον ιοντισμό των βάσεων, η οποία αποδίδεται με μεγαλύτερη μεταβολή στις τιμές  $\log k$  μεταξύ των δύο συνθηκών pH.

Για τις ουδέτερες ενώσεις, όπως είναι αναμενόμενο, παρατηρείται μηδενική ή πολύ μικρή διαφορά μεταξύ των συντελεστών  $\log k_{7.4}$  και  $\log k_{5.5}$  για όλες τις τεχνικές μικκυλιακής χρωματογραφίας.

Οι αμφολύτες δεν παρουσιάζουν σταθερή συμπεριφορά ως προς την κατακράτησή τους σε διαφορετικές συνθήκες pH, επομένως είναι λογικό να παρατηρούνται τόσο θετικές όσο και αρνητικές τιμές για τη διαφορά  $\Delta \log k$ . Όσον αφορά τη μελέτη παρουσία του τασιενεργού CTAB, οι αμφολύτες στην πλειοψηφία τους παρουσιάζουν αρνητική μεταβολή μεταξύ των  $\log k_{7.4}$  και  $\log k_{5.5}$ , που σημαίνει πως κατακρατούνται λίγο περισσότερο σε όξινο περιβάλλον. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η ένωση Vancomycin,

η οποία τόσο για το CTAB όσο και για τα υπόλοιπα τασιενεργά έχει θετική μεταβολή  $\log k^{7.4-5.5}$ .

Οι μεταβολές στις τιμές του  $\log k$  για τη μικκυλιακή χρωματογραφία είναι αρκετά μικρότερες σε σχέση με τις μεταβολές του  $\log D$ . Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι εντός της στήλης υπάρχει μικρότερος ιοντισμός σε σχέση με ένα υδατικό διάλυμα, καθώς αλλάζει η διηλεκτρική σταθερά του μέσου.

## 6.6 Συσχέτιση $\log k_{CTAB}$ με φαρμακοκινητικές ιδιότητες

### 6.6.1 Συσχέτιση με πρωτεϊνική σύνδεση (% PPB)

Για τη συσχέτιση της πρωτεϊνικής σύνδεσης, εκφρασμένης ως % PPB με τους συντελεστές κατακράτησης  $\log k_{CTAB}$ , οι 92 φαρμακευτικές ενώσεις διαιρούνται σε δεδομένα εκμάθησης (training set), που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη του μοντέλου, και σε δεδομένα ελέγχου (test set), που χρησιμοποιούνται για την επικύρωση του μοντέλου. Για λόγους σύγκρισης των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο test set των 22 φαρμακευτικών ενώσεων με παλαιότερες δημοσιεύσεις (44), (73), ενώ όλες οι υπόλοιπες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν ως training set.

Για την προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης έχουν προταθεί σιγμοειδή μοντέλα και μοντέλα που βασίζονται σε μορφή logit (όπως το μοντέλο 2 που θα αναπτυχθεί).

#### Μοντέλο Νο 1

Το πρώτο μοντέλο έχει την ακόλουθη μορφή:

$$\%PPB = \frac{100}{1 + 10^{-(a_0 + a_1 \cdot \log k_{CTAB} + a_2 \cdot X_2 + \dots + a_n \cdot X_n)}} \quad [6.8a]$$

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.

Κατόπιν διαδοχικής παλινδρόμησης προκύπτουν τα εξής:

**Πίνακας 9.** Συντελεστές εξίσωσης μοντέλου % PPB και στατιστικά στοιχεία πολλαπλής παλινδρόμησης

$a_0$	$a_1 (\log k_{CTAB})$	$a_2 (F^-)$	N	$R^2$	S
-0.274±0.087	0.561 ± 0.079		72	0.597	
-0.486± 0.102	0.625 ± 0.081	0.783±0.216	72	0.698	18.7

Το τελικό μοντέλο δηλαδή είναι:

$$\%PPB = \frac{100}{1 + 10^{-(-0.486 (\pm 0.102) + 0.625 (\pm 0.081) \cdot \log k_{CTAB} + 0.783 (\pm 0.216) \cdot F^-)}} \quad [6.8\beta]$$

Παρακάτω φαίνονται οι τιμές επικύρωσης του μοντέλου στα 22 φάρμακα. Αν θεωρηθεί βάση επιτυχίας μια διαφορά 20% μεταξύ των δύο ποσοστών, οι αποτυχημένες προβλέψεις έχουν επισημανθεί με κόκκινο χρώμα.

**Πίνακας 10.** Πειραματικές τιμές % PPB και τιμές προβλεπόμενες από το μοντέλο Νο1

A/A	Φάρμακο	Πειραματική τιμή (%PPB)	Τιμή που προβλέπει το μοντέλο (%PPB)
1	Ceftriaxone	95.0	25.1
2	Chloramphenicol	54.0	51.4
3	Cimetidine	18.5	52.4
4	Cinoxacin	66.5	80.6
5	Hydrocortisone	95.0	70.9
6	Isoxicam	96.0	92.7
7	Levofloxacin	32.3	21.1
8	Lornixicam	99.0	92.0
9	Meloxicam	99.3	94.3
10	Methylprednisolone	77.3	80.7
11	Metoclopramide	33.3	78.0
12	Minoxidil	0.0	49.1
13	Nadolol	30.0	26.4
14	Nalidixic acid	93.0	54.6
15	Niflumic acid	90.0	93.4
16	Omeprazole	95.0	51.0
17	Pipemidic acid	30.0	15.4
18	Piperacillin	19.0	52.5
19	Salicylic acid	95.0	
20	Sulpiride	14.0	26.3

<b>21</b>	Vancomycin	43.3	34.9
<b>22</b>	Warfarin	98.8	91.0

Όπως φαίνεται παραπάνω, το ποσοστό επιτυχίας του μοντέλου είναι 13/21, δηλαδή 61,90%.

### Μοντέλο Νο 2

Στο δεύτερο μοντέλο χρησιμοποιείται ο λογάριθμος της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας (logarithm of the apparent affinity constant), logK, η οποία έχει προταθεί από την Klara Valko και τους συνεργάτες της (77) και εκφράζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\log K = \log \left( \frac{\% \text{ PPB}}{101 - \% \text{ PPB}} \right) \quad [6.9]$$

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 το 100 ήταν στον παρονομαστή, αυτός θα μηδενίζονταν για φάρμακα που παρουσιάζουν 100% πρωτεϊνική σύνδεση.

Από τη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης προκύπτει η εξίσωση:

$$\log K = 0.658(\pm 0.075) \cdot \log k_{\text{CTAB}} - 0.267(\pm 0.100) \quad [6.10\alpha]$$

(N=70, R<sup>2</sup>= 0.534, s= 0.616, F= 77.9)

Με την εισαγωγή του F<sup>-</sup> ως πρόσθετης φυσικοχημικής παραμέτρου λαμβάνεται η τελική σχέση:

$$\log K = 0.647(\pm 0.064) \cdot \log k_{\text{CTAB}} + 0.822(\pm 0.164) \cdot F^- - 0.431(\pm 0.092) \quad [6.10\beta]$$

(N=70, R= 0.813, R<sup>2</sup>= 0.661, s= 0.651, F= 65.3)

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές επικύρωσης του μοντέλου στα 22 φάρμακα. Οι αποτυχημένες προβλέψεις επισημαίνονται και πάλι με κόκκινο χρώμα, με βάση επιτυχίας μια διαφορά της τάξης του 20%.

**Πίνακας 11.** Πειραματικές τιμές % PPB και τιμές προβλεπόμενες από το μοντέλο Νο2

A/A	Φάρμακο	Πειραματική τιμή (%PPB)	Τιμή που προβλέπει το μοντέλο (%PPB)
1	Ceftriaxone	95.0	28.0
2	Chloramphenicol	54.0	56.2
3	Cimetidine	18.5	57.3
4	Cinoxacin	66.5	84.9
5	Hydrocortisone	95.0	75.5
6	Isoxicam	96.0	95.4
7	Levofloxacin	32.3	23.4
8	Lornixicam	99.0	94.7
9	Meloxicam	99.3	96.6
10	Methylprednisolone	77.3	84.7
11	Metoclopramide	33.3	82.3
12	Minoxidil	0.0	53.8
13	Nadolol	30.0	29.4
14	Nalidixic acid	93.0	60.0
15	Niflumic acid	90.0	95.9
16	Omeprazole	95.0	55.8
17	Pipemidic acid	30.0	17.0
18	Piperacillin	19.0	57.9
19	Salicylic acid	95.0	
20	Sulpiride	14.0	29.2
21	Vancomycin	43.3	38.7
22	Warfarin	98.8	94.0

Το ποσοστό επιτυχίας του μοντέλου είναι 14/21, δηλαδή 66,67% και είναι λίγο καλύτερο σε σύγκριση με το Μοντέλο Νο1.

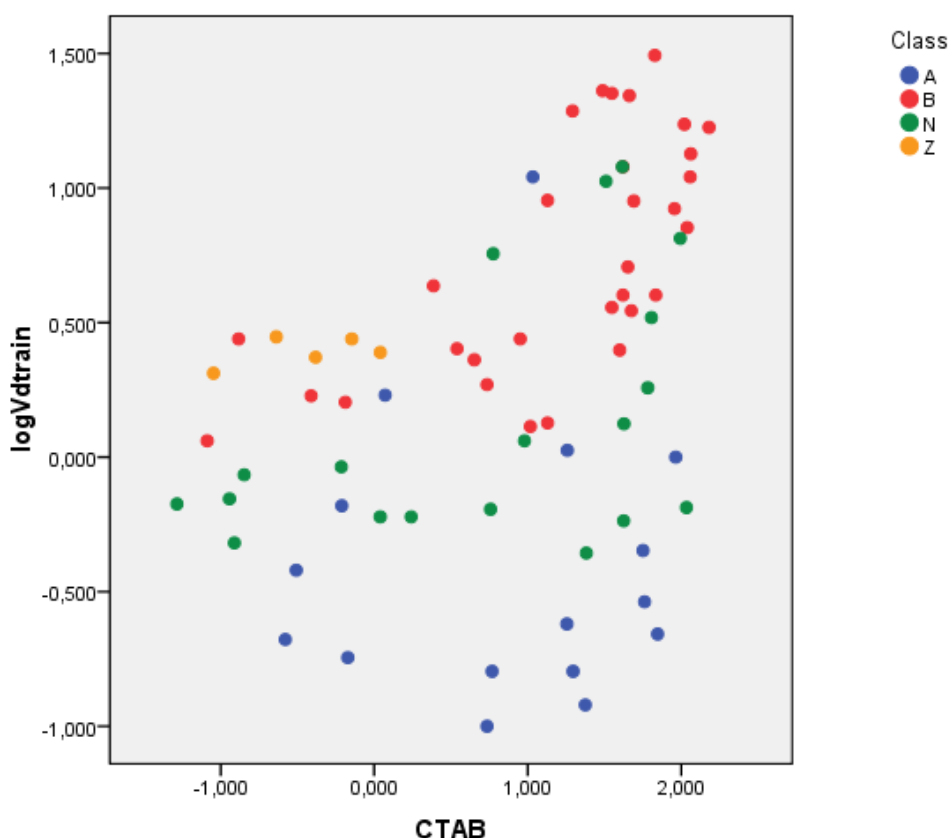
Σημειώνεται ότι στην περίπτωση της κεφτριαξόνης (Ceftriaxone), η οποία ανήκει στην κατηγορία των κεφαλοσπορινών, παρατηρείται μεγάλη απόκλιση μεταξύ της πειραματικής τιμής και τιμής που προβλέπουν τα μοντέλα. Αυτή η αποτυχία έχει παρατηρηθεί και με άλλους τύπους χρωματογραφίας, όπως η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος, που θεωρείται ως η πλέον κατάλληλη

μέθοδος υγροχρωματογραφίας για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων. Το κύριο αίτιο της αποτυχίας είναι ότι στην αλληλεπίδραση μεταξύ κεφαλοσπορινών και πρωτεϊνών εμπλέκονται και άλλες αλληλεπιδράσεις (π.χ. πολικές, ηλεκτροστατικές), οι οποίες φαίνεται να είναι σημαντικότερες από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Μεταξύ των δύο μοντέλων, καταλληλότερο για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης κρίνεται το Μοντέλο 2, καθώς παρουσιάζει ελαφρώς μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας. Γενικά, το ποσοστό αυτό (66,67%) θεωρείται ικανοποιητικό και συνεπώς, η μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία του τασιενεργού CTAB θα μπορούσε να αποτελέσει μια πιθανή μέθοδο για την πρόβλεψη της συγκεκριμένης φαρμακοκινητικής ιδιότητας.

### 6.6.2 Συσχέτιση με τον όγκο κατανομής ( $V_d$ )

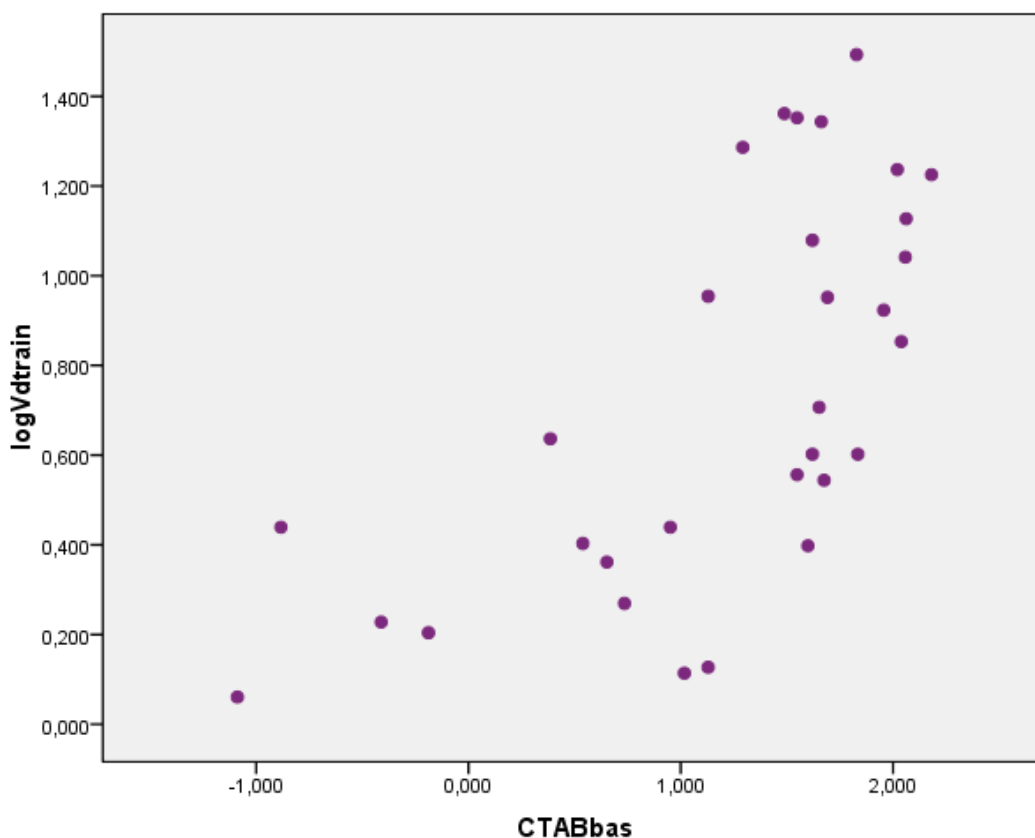
Η συσχέτιση του λογαρίθμου των όγκων κατανομής ( $\log V_d$ ) των φαρμάκων του training set με τους συντελεστές κατακράτησης  $\log k_{CTAB}$  φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 8. Συσχέτιση  $\log V_d$  του training set με  $\log k_{CTAB}$

Μεταξύ των δεδομένων δεν εντοπίζεται κάποια συσχέτιση, γεγονός που αποδεικνύεται από τη συγκεχυμένη εικόνα του παραπάνω διαγράμματος.

Ωστόσο, παρατηρείται μια συσχέτιση μόνο στην περίπτωση των βάσεων, η οποία παρουσιάζεται στο ακόλουθο διάγραμμα:



**Διάγραμμα 9.** Συσχέτιση  $\log V_d$  του training set με  $\log k_{CTAB}$  των βάσεων

Η συσχέτιση βελτιώνεται με την εισαγωγή του κλάσματος θετικού φορτίου ( $F^+$ ) ως πρόσθετης φυσικοχημικής ιδιότητας και εξάγεται η εξίσωση:

$$\log V_d = 0.345(\pm 0.065) \log k_{CTAB} + 1.027(\pm 0.427) \cdot F^+ - 0.618(\pm 0.412) \quad [6.11]$$

$$N=31, R= 0.724, R^2=0.525, s= 0.309, F= 15.5$$

Στον **Πίνακα 12** παρουσιάζονται οι τιμές επικύρωσης του μοντέλου για τις 4 βασικές ενώσεις του test set σε σύγκριση με τον όγκο κατανομής που αναφέρεται στη βιβλιογραφία.



**Πίνακας 12.** Πειραματικές τιμές όγκου κατανομής,  $V_d$  και τιμές προβλεπόμενες από το μοντέλο

A/A	Φάρμακο	Βιβλιογραφικός όγκος κατανομής (L/kg)	Όγκος κατανομής που προβλέπει το μοντέλο (L/kg)
1	Cimetidine	1,12	0,79
2	Metoclopramide	3,30	9,32
3	Nadolol	2,00	2,65
4	Sulpiride	2,05	2,59

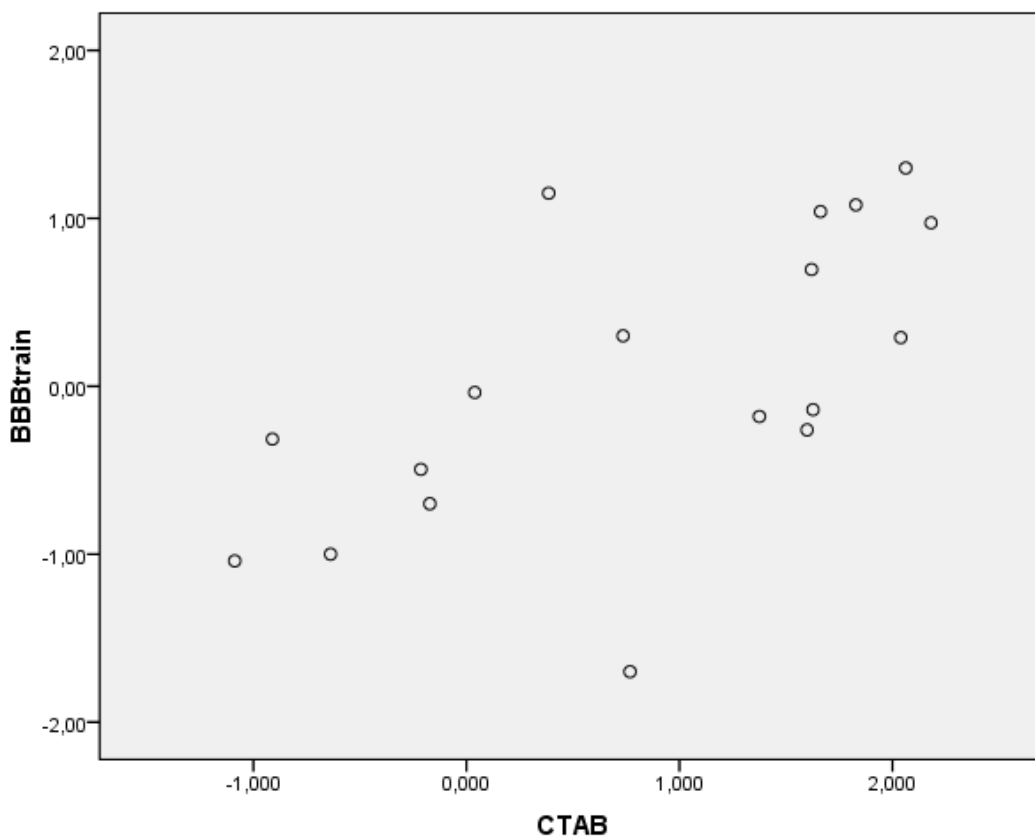
Κριτήριο για την επιτυχία μιας πρόβλεψης είναι ο όγκος κατανομής που προβλέπει το μοντέλο να είναι από μισός έως διπλάσιος του βιβλιογραφικού. Το ποσοστό επιτυχίας του συγκεκριμένου μοντέλου είναι 3/4, δηλαδή 75%. Αυτό είναι ένα πολύ ικανοποιητικό ποσοστό, ωστόσο θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι οι βασικές ενώσεις του συγκεκριμένου test set είναι λίγες. Συμπερασματικά, η μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία του CTAB θα μπορούσε να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής μόνο για τις βασικές ενώσεις. Σημειώνεται ότι η πρόβλεψη του όγκου κατανομής θεωρείται μια δύσκολα προβλέψιμη φαρμακοκινητική παράμετρος.

### 6.6.3 Συσχέτιση με διέλευση από αιματοεγκεφαλικό φραγμό (logBBB)

Η διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό εκφράζεται από τη σχέση:

$$\log\text{BBB} = \log\left(\frac{C_{\text{brain}}}{C_{\text{blood}}}\right) \quad [6.12]$$

και συσχετίζεται με το συντελεστή  $\log k_{\text{CTAB}}$  ως εξής:



**Διάγραμμα 10.** Συσχέτιση  $\log BBB$  του training set με το συντελεστή  $\log k_{CTAB}$

Αν ληφθεί υπόψιν το κλάσμα αρνητικού φορτίου ( $F^-$ ), η βελτιωμένη εξίσωση που προκύπτει είναι η εξής:

$$\log BBB = 0.470(\pm 0.130) \cdot \log k_{CTAB} - 1.009(\pm 0.373) \cdot F^- - 0.166(\pm 0.189) \quad [6.13]$$

$$(N=18, R= 0.772, R^2= 0.595, s= 0.586, F= 11.0)$$

Η προσθήκη του  $F^-$  υποδηλώνει πως τα οξέα δεσμεύονται περισσότερο κάτι που είναι λογικό επειδή συνδέονται στην human serum albumin (HSA), που είναι, όπως έχει αναφερθεί, η πιο άφθονη πρωτεΐνη στο πλάσμα και η οποία είναι γνωστό πως δεσμεύει κυρίως όξινες ενώσεις.

Παρακάτω αναγράφονται οι τιμές επικύρωσης του μοντέλου στα 5 από τα 22 φάρμακα του test set, για τα οποία υπάρχει διαθέσιμη πειραματική τιμή του λόγου  $BBB = \frac{C_{brain}}{C_{blood}}$ .

Με κόκκινο σημειώνονται οι αποτυχημένες προβλέψεις. Ως βάση επιτυχίας θεωρείται η απόκλιση -50% έως +100% από τις πειραματικές τιμές.

**Πίνακας 13.** Πειραματικές τιμές *BBB* και προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές

		<b>Πειραματική τιμή BBB</b>	<b>Τιμή BBB που προβλέπει το μοντέλο</b>
3	Cimetidine	0.04	1.71
7	Levofloxacin	0.20	0.40
11	Metoclopramide	1.20	4.11
16	Omeprazole	0.15	1.34
19	Salicylic acid	0.08	

Το ποσοστό επιτυχίας του συγκεκριμένου μοντέλου είναι 1/4, δηλαδή 25%. Η διέλευση μιας ουσίας από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό αποτελεί μια ιδιαίτερα σύνθετη διαδικασία. Εκτός του μεγάλου ποσοστού αποτυχίας του μοντέλου, λίγες θεωρούνται και οι ενώσεις για τις οποίες υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για τις τιμές *BBB* στο test set των 22 φαρμάκων. Συνεπώς, το συγκεκριμένο μοντέλο δε θεωρείται επιτυχές και η μικκυλιακή χρωματογραφία με τη χρήση CTAB δεν ενδείκνυται για την πρόβλεψη της διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

## 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη μελέτη του μηχανισμού έκλυσης των 47 φαρμακευτικών ενώσεων που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής έρευνας, επιβεβαιώθηκε πως ο κύριος μηχανισμός που επηρεάζει την κατακράτηση των ενώσεων από τη στήλη στη μικκυλιακή χρωματογραφία είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Αυτό αποδεικνύεται και από τις καλές συσχετίσεις των συντελεστών κατακράτησης ( $\log k_{CTAB}$ ) με τους συντελεστές λιποφιλίας ( $\log P$ ) και ( $\log D$ ). Επιπλέον, ιδιαίτερα σημαντικός είναι και ο ρόλος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη σημαντική βελτίωση των εν λόγω συσχετίσεων, κατόπιν εισαγωγής των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου ως ανεξάρτητων μεταβλητών στις εξισώσεις παλινδρόμησης.

Μεταξύ όλων των τεχνικών που συσχετίστηκαν με την υπό μελέτη τεχνική, μεγαλύτερο εύρος τιμών  $\log k$  παρουσίασε η χρωματογραφία IAM. Το CTAB παρουσίασε παρόμοιο εύρος τιμών με τα Tween20, SDS και Triton X-100, ενώ μικρότερο ήταν το εύρος για το Brij-35. Το εύρος τιμών είναι σημαντικό να είναι μεγάλο, ώστε η ταξινόμηση των ουσιών να είναι καλύτερη και να υπάρχει διάκριση μεταξύ των πολύ κοντινών τιμών  $\log k$ . Σε αυτό φαίνεται να πλεονεκτεί η IAM, ωστόσο θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι το μεγάλο εύρος τιμών της υποδηλώνει αρκετά μεγάλους χρόνους κατακράτησης, που απαιτούν μεγάλες ποσότητες διαλύτη έκλυσης ή και χημικούς τροποποιητές προκειμένου να διαχωριστούν τα ισχυρά κατακρατούμενα από τη στήλη φάρμακα. Μπορεί να θεωρηθεί, δηλαδή, πως η IAM δε συνιστά την καλύτερη επιλογή στην προκειμένη περίπτωση παρά το μεγάλο εύρος τιμών της. Η μικκυλιακή χρωματογραφία έχει πολύ ικανοποιητικά εύρη τιμών και μπορεί να προτιμηθεί έναντι της IAM δεδομένων των όσων προαναφέρθηκαν.

Επιπρόσθετα, αποδείχθηκε πως το CTAB, ως θετικά φορτισμένο τασιενεργό, έχει την ιδιότητα να δεσμεύει κυρίως όξινες ενώσεις. Το συγκεκριμένο φαινόμενο γίνεται ακόμα πιο έντονο, όπως φάνηκε από τις πειραματικές μετρήσεις, σε συνθήκες όξινου pH. Με τη μείωση του pH του διαλύτη έκλυσης στο 5.5 τα οξέα κατακρατούνται περισσότερο, ενώ οι βάσεις εκλύονται αρκετά πιο γρήγορα.

Όσον αφορά στη συσχέτιση του CTAB με τα υπόλοιπα τασιενεργά, ικανοποιητικές ήταν οι συσχετίσεις με τα μη ιοντικά Brij-35, Tween20 και Triton X-100, ενώ η συσχέτιση με το SDS δεν ήταν καθόλου ικανοποιητική. Αυτό σημαίνει πως το CTAB παρουσιάζει αρκετά παρεμφερή συμπεριφορά με τα μη ιοντικά τασιενεργά. Η συμπεριφορά αυτή είναι λογική, διότι τα ουδέτερα τασιενεργά δεν αλληλεπιδρούν με κάποιο συγκεκριμένο τρόπο ως προς τις διαφορετικές κατηγορίες ενώσεων (βάσεις, οξέα, ουδέτερα, αμφολύτες). Η κακή συσχέτιση με το ανιοντικό SDS οφείλεται στο ότι είναι αντίθετα φορτισμένα και κατά συνέπεια, παρουσιάζουν αντίθετη συμπεριφορά. Το SDS, σε αντίθεση με το CTAB, φαίνεται να κατακρατά περισσότερο τις βασικές ενώσεις. Παρόμοια συσχέτιση παρουσιάζεται και μεταξύ μικκυλιακής χρωματογραφίας με CTAB και χρωματογραφίας IAM. Η συσχέτιση δεν είναι καθόλου ικανοποιητική και ο διαχωρισμός της συμπεριφοράς συγκράτησης βάσεων και οξέων σε αυτήν την περίπτωση είναι πιο έντονος. Συγκεκριμένα, στην IAM η συγκράτηση

των βάσεων είναι μεγαλύτερη λόγω των ηλεκτροστατικών δυνάμεων που αναπτύσσονται.

Ακόμα, από τη μελέτη της επίδρασης του pH στον ιοντισμό των ενώσεων, προέκυψε το συμπέρασμα πως παρουσία του CTAB η επίδραση του pH στον ιοντισμό των βάσεων είναι λίγο μεγαλύτερη. Σε όλες τις περιπτώσεις τασιενεργών οι βάσεις εκλύονται γρηγορότερα σε όξινο pH (5.5), ωστόσο παρουσία του CTAB οι χρόνοι ανάσχεσης μειώνονται σημαντικά. Για τις υπόλοιπες κατηγορίες ενώσεων (οξέα, ουδέτερα, αμφολύτες) οι διαφορές  $\Delta \log k_{(7.4-5.5)}$  ήταν παρόμοιες για όλα τα τασιενεργα. Εξαίρεση αποτελούν μόνο οι αντίστοιχες μεταβολές του  $\log D$ , οι οποίες είναι αρκετά μεγαλύτερες λόγω της αλλαγής της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου σε υδατικό διάλυμα.

Ακόμα, για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης αναπτύχθηκαν δύο μοντέλα, μεταξύ των οποίων το δεύτερο αποδείχθηκε πιο ικανοποιητικό (ποσοστό επιτυχίας 66,67%). Μπορεί να θεωρηθεί, συνεπώς, ότι η υδροχρωματογραφία μικκυλίων παρουσία του CTAB αποτελεί κατάλληλη μέθοδο για την πρόβλεψη της εν λόγω ιδιότητας και μπορεί να αντικαταστήσει άλλες τεχνικές, όπως την IAM, που είναι ακριβότερη μέθοδος. Η συσχέτιση των  $\log k_{CTAB}$  με τον όγκο κατανομής έδωσε αποτέλεσμα μόνο για τις βασικές ενώσεις, με το αντίστοιχο μοντέλο να παρουσιάζει επιτυχία 75%. Τονίζεται πως η πρόβλεψη του όγκου κατανομής θεωρείται ιδιαίτερα δύσκολη, άρα γίνεται σαφές ότι το ποσοστό αυτό είναι πολύ ικανοποιητικό και η ανάπτυξη μοντέλου για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής των ουσιών με τη μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία του CTAB θα έδινε αξιόπιστα αποτελέσματα στην περίπτωση των βάσεων. Η επιτυχία του μοντέλου για τις συγκεκριμένες ουσίες είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντική, καθώς το μεγαλύτερο μέρος των φαρμάκων (περίπου το 70%) είναι βασικές ενώσεις. Τέλος, η συσχέτιση των  $\log k_{CTAB}$  με τα δεδομένα διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό δεν ήταν καθόλου ικανοποιητική, καθώς το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσίασε μεγάλο ποσοστό αποτυχίας (75%). Οι βιομιμητικές μέθοδοι χρωματογραφίας δεν εξασφαλίζουν συχνά ικανοποιητικά μοντέλα για την πρόβλεψη της συγκεκριμένης ιδιότητας. Η μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία του CTAB δεν θα αποτελούσε, βάσει των αποτελεσμάτων του μοντέλου, μια καλή επιλογή για την πρόβλεψη της διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα, τα φάρμακα που διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό είναι κυρίως αυτά που προορίζονται για δράση στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Είναι, λοιπόν, απαραίτητο τα μοντέλα πρόβλεψης της συγκεκριμένης ιδιότητας να είναι όσο το δυνατό πιο αξιόπιστα, προκειμένου να προβλέπονται έγκαιρα αλλά και έγκυρα τυχόν αρνητικές επιδράσεις των συγκεκριμένων φαρμάκων, ώστε να λαμβάνονται οι απαραίτητες δράσεις. Συνεπώς, η χρήση κάποιας άλλης τεχνικής για τη μελέτη της συγκεκριμένης ιδιότητας θα αποτελούσε πιθανότατα πιο ασφαλή επιλογή.

Συνοψίζοντας τα προαναφερθέντα, η χρήση του κατιοντικού τασιενεργού CTAB στη μικκυλιακή υδροχρωματογραφία παρουσιάζει πολυάριθμα πλεονεκτήματα και μπορεί να αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο για τις μελέτες υποψήφιων φαρμάκων σε προκλινικό στάδιο. Οι γνώσεις των ιδιοτήτων λιποφιλίας αλλά και η πρόβλεψη της συμπεριφοράς των φαρμάκων ως προς ορισμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, που μπορεί να προσφέρει η συγκεκριμένη τεχνική, είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς μπορούν να

μειώσουν σημαντικά τις πιθανότητες απόρριψης υποψήφιων φαρμάκων σε μεταγενέστερα στάδια αλλά και το απαιτούμενο κόστος. Συγκεκριμένα, με την MLC καθίσταται εφικτή η ταυτόχρονη εκτίμηση, με μία μόνο μέτρηση, σημαντικών φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, όπως η πρωτεϊνική σύνδεση, ο όγκος κατανομής των βασικών ενώσεων και η απορρόφηση από το στόμα. Η τελευταία ιδιότητα δε μελετήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής έρευνας. Σημειώνεται, επιπλέον, ότι η συγκεκριμένη μέθοδος απαιτεί τη χρήση μιας συμβατικής στήλης αντιστρόφου φάσεως, η οποία είναι φθηνή και διαθέσιμη σε κάθε αναλυτικό εργαστήριο που χρησιμοποιεί HPLC. Αντίθετα, οι πρωτεϊνικές στήλες HSA και AGP, αλλά και η στήλη IAM είναι πολύ πιο ακριβές και όχι πάντα διαθέσιμες σε κάθε εργαστήριο. Ακόμα, πρόκειται για μια ευέλικτη μέθοδο με υψηλή ανεκτικότητα στις μεταβολές των συνθηκών ανάλυσης. Τέλος, η MLC μπορεί να θεωρηθεί φιλική προς το περιβάλλον, καθώς απαιτεί μηδενική ή μικρή ποσότητα οργανικών διαλυτών.

## 8. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΕΡΕΥΝΑ

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής μελέτης προτείνονται οι ακόλουθες προτάσεις για μελλοντική έρευνα:

- Η δημιουργία μιας διευρυμένης βιβλιοθήκης τιμών για τους συντελεστές κατακράτησης  $\log k$  που έχουν μελετηθεί παρουσία του τασιενεργού CTAB, η οποία θα περιλαμβάνει πολυάριθμες φαρμακευτικές ενώσεις. Η μελέτη θα ήταν χρήσιμο να γίνει στις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες, ώστε να μπορεί να γίνει καλύτερη συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης με αυτούς άλλων μεθόδων βιομιμητικής χρωματογραφίας. Επιπλέον, η βελτίωση της εγκυρότητας των τιμών  $\log k$  θα βοηθούσε σημαντικά στην αξιοποίησή τους για την ανάπτυξη αξιόπιστων μοντέλων πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων.
- Η διεύρυνση της βάσης δεδομένων των φαρμάκων για τα οποία υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες με την εισαγωγή νέων φαρμακευτικών ενώσεων για τις οποίες δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα. Για παράδειγμα, στα πλαίσια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής έρευνας εισήχθησαν στη λίστα φαρμάκων που μελετήθηκαν 4 νέα φάρμακα, τα οποία δεν είχαν μελετηθεί σε προγενέστερες διπλωματικές έρευνες του Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Συγκεκριμένα, πρόκειται για τις ουσίες: Colchicine, Fentanyl, Phenytoin και Tramadol. Προτείνεται, λοιπόν, η μελέτη των συγκεκριμένων ενώσεων και με άλλες βιομιμητικές χρωματογραφικές τεχνικές (π.χ. IAM) ή και παρουσία των υπολοίπων τασιενεργών (π.χ. SDS, Brij-35), καθώς επίσης και η μελέτη κι άλλων φαρμάκων για τα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμα έρευνα στο συγκεκριμένο εργαστήριο.
- Η μελέτη φαρμάκων με μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία του τασιενεργού CTAB με την προσθήκη οργανικού διαλύτη σε διάφορες περιεκτικότητες στην κινητή φάση. Στη συγκεκριμένη διπλωματική έρευνα όλα τα φάρμακα μετρήθηκαν με κινητή φάση 100% υδατική. Η προσθήκη οργανικού διαλύτη ενδεχομένως θα βελτιώνει το διαχωρισμό και θα έδινε καλύτερη εικόνα γραφημάτων σε ορισμένα φάρμακα που δεν έδωσαν πολύ καλά αποτελέσματα. Θα απαιτούνταν, βέβαια, και η ανάλογη προσαρμογή του συντελεστή κατακράτησης σε 100% υδατική φάση μέσω γραμμικής προεκβολής.
- Η χρωματογραφική ανάλυση των φαρμάκων με τασιενεργά διαφορετικού τύπου (ανιοντικά, κατιοντικά, μη ιοντικά), με σκοπό την εξαγωγή σαφούς εικόνας ως προς τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις κάθε κατηγορίας τασιενεργών αλλά και μεμονωμένα ως προς τους μηχανισμούς κατακράτησης καθενός από αυτά. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών επιφανειοδραστικών ουσιών θα είχε νοήμα και στην πρόβλεψη των διάφορων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, με σκοπό να προσδιοριστεί ποιο είναι το κατάλληλο τασιενεργό για τη μελέτη της εκάστοτε ιδιότητας.

- Η ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης της τοξικότητας (ηπατοτοξικότητα, καρδιοτοξικότητα, νευροτοξικότητα) των φαρμάκων κατόπιν συλλογής επαρκών δεδομένων για κάθε φαρμακευτική ένωση. Τα μοντέλα τοξικότητας συνιστούν πολύτιμο εργαλείο για την έγκριση ή απόρριψη υποψήφιων φαρμάκων στα αρχικά στάδια της διαδικασίας ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Η ανάπτυξη αξιόπιστων μοντέλων τοξικότητας είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, η τοξικότητα αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες για την απόρριψη υποψήφιων φαρμάκων.
- Η προσθήκη δεδομένων για περισσότερες ουσίες στα μοντέλα που αναπτύχθηκαν για το CTAB, ώστε να μελετηθεί αν και σε τι βαθμό μπορούν να βελτιωθούν.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Δημόπουλος Β., Τσαντίλη-Κακουλίδου Ά. *Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων*. Αθήνα : Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα [www.kallipos.gr](http://www.kallipos.gr), 2015 .
2. Κόκοτος Γ.Ι., Μαγκριώτη Β. *Φαρμακοχημεία [ηλεκτρ. βιβλ.]*. Αθήνα : Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015.
3. Μ. Ντάγανου, Ά Κυριακούδη. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΝΑΛΓΗΣΙΑΣ, ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ ΚΑΙ ΜΥΟΧΑΛΑΣΗΣ ΣΤΗ ΜΟΝΑΔΑ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ. *Βασικές αρχές εντατικής θεραπείας*. s.l. : Εκδόσεις Κάλλιπος, 2015.
4. *Η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά. Ένα σημαντικό άγνωστο πρόβλημα της δημόσιας υγείας*. Βατόπουλος Α. s.l. : ΚΟΙΝΩΝΙΑ & ΥΓΕΙΑ , 2004, Vol. 3.
5. *Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action*. J. R. Vane, R. M. Botting. s.l. : Inflammation Research, 1998, Vol. 47. 78–87.
6. *ANTIPSYCHOTICS AS ANTIDEPRESSANTS:WHAT IS THE MECHANISM?* M. Šagud, A. Mihaljević-Peleš, D. Begić et al. 3, s.l. : Psychiatria Danubina, 2011, Vol. 23. 302-307.
7. Αναστασοπούλου Κ., Γκιζαριώτη Ζ., Τσακρής Α. Γενετική βάση της ετερογένειας της συμπτωματολογίας του ανθρώπου-ξενιστή στη νόσο CoViD-19. *Εξατομικευμένη Ιατρική*. 2, 2020, Vol. 2.
8. Hilal-Dandan R., Brunton L.L. *Goodman & Gilman's Η φαρμακολογική βάση της θεραπευτικής*. Κύπρος : Broken Hill Publishers LTD, 2016.
9. Hubaud A., Singh A.P. Genetics in Drug Discovery. *Trends in Genetics* . 2021, Science & Society.
10. *Sickle-cell disease* . D.C. Rees, T.N. Williams, M.T. Gladwin. 9757, s.l. : The Lancet [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com) , 2010, Vol. 376.
11. *Interactions of Science, Economics and Politics in Drug Discovery, Development & Delivery*. Cavallito C. J. , s.l. : Drug Development Communications, 2008, Vol. 1. 259-285.
12. Rutger M. van den Bora, Grobbee D.E. et al. Predicting enrollment performance of investigational centers in phase III multi-center clinical trials. *Contemporary Clinical Trials Communications*. 2017, Vol. 7.
13. Vox. [Online] [Cited: June 8, 2021.] <https://www.vox.com>.
14. (CHMP), Committee for Medicinal Products for Human Use. *Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human and early clinical trials with investigational medicinal products*. s.l. : European Medicines Agency, 2017.
15. *Design and Analysis of Phase I Clinical Trials*. Storer Barry E., s.l. : Biometrics, 1989, Vol. 45. 925-937.

16. Davis B.R., Baraniuk S. 18 Definitive Phase III and Phase IV Clinical Trials. *Handbook of Statistics* . 2007, Vol. 27.
17. MS Research Australia Clinical Trials Network. [Online] [Cited: June 8, 2021.] <https://mstrials.org.au>.
18. Senderowicz A.M., Pfaff O. Similarities and Differences in the Oncology Drug Approval Process between FDA and European Union with Emphasis on In Vitro Companion Diagnostics. *CCR FOCUS*. 2014, Vol. 20, 6.
19. *Comparison of drug approval process in United States & Europe*. U.N. Kashyap, V. Gupta, H.V. Raghunandan. 6, s.l. : J. Pharm. Sci. & Res, 2013, Vol. 5. 131 - 136 .
20. J. Wang, L. Urban. The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy. *Drug Discovery World*. 2004.
21. *Prediction of Solubility and Permeability Class Membership: Provisional BCS Classification of the World's Top Oral Drugs*. Arik Dahan, Jonathan M. Miller & Gordon L. Amidon. s.l. : The AAPS Journal, 2009, Vol. 11. 740-746.
22. *Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics DrugDisposition Classification System*. Chi-Yuan W., Leslie Z. Benet., s.l. : Pharmaceutical Research, 2005, Vol. 22. 11-23.
23. L. Di, E.H. Kerns. *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*. s.l. : Academic Press, 2015.
24. *Bioavailability: A Pharmaceutical Review*. Allam A.N., El Gamal S.S., Naggar V.F. 1, s.l. : J Novel Drug Deliv Tech, 2011, Vol. 1. 77-93.
25. *Design of drugs involving the concepts and theories of drug metabolism and pharmacokinetics*. Smith D.A., Jones B.C., Walker D.K. 3, s.l. : Medicinal Research Reviews, 1996, Vol. 16. 243-266.
26. *Analysis of the structure and dynamics of human serum albumin*. Guizado, T.R. Cuya. s.l. : Journal of Molecular Modeling, 2014, Vol. 20.
27. Notes for Principles of Human Physiology: Chapter 15. [Online] [Cited: June 9, 2021.] <http://droualb.faculty.mjc.edu>.
28. *A concise review of applications of micellar liquid chromatography to study biologically active compounds*. Stepnik, K.E. s.l. : Biomedical Chromatography, 2016, Vol. 31.
29. G.G. Gibson, P. Skett. *Introduction to Drug Metabolism*. s.l. : Springer-Science+Business Media, B.V., 2013.
30. *Managing efficacy and toxicity of drugs: Targeted delivery and excretion*. P. Kundu, S. Das, N. Chattopadhyay. s.l. : International Journal of Pharmaceutics, 2019, Vol. 565. 378-390.

31. *Mechanisms of Drug Toxicity and Relevance to Pharmaceutical Development*. Guengerich, F.P. 1, s.l. : J-STAGE, 2010, Vol. 26.
32. Coleman, Michael D. *Human Drug Metabolism An Introduction*. s.l. : John Wiley & Sons, Ltd., 2010.
33. *The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples*. B. Testa, P. Crivori, M. Reist, P.A. Carrupt, s.l. : Perspectives in Drug Discovery and Design, 2000, Vol. 19. 179-211.
34. *The Measurement of Partition Coefficients*. J.C. Dearden, G.M. Bresnen. 3, s.l. : Wiley Online Library, 1988, Vol. 7. 133-144.
35. *Water Solubility and Octanol/Water Partition Coefficients of Organics. Limitations of the Solubility-Partition Coefficient Correlation*. Sujit Banerjee, Samuel H. Yalkowsky, Shri C. Valvani. 10, s.l. : ACS Publications, 1980, Vol. 14. 1227-1229.
36. *Optimised method to estimate octanol water distribution coefficient (logD) in a high throughput format*. Ying Wei (Ivan)Low, Francesca Blasco, Prakash Vachaspati. s.l. : European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, Vol. 92. 110-116.
37. *Novel Methods for the Prediction of logP, pKa, and logD*. Li Xing, Robert C. Glen. 4, s.l. : J. Chem. Inf. Comput. Sci., 2002, Vol. 42. 796–805.
38. Neal R. Cutler, John J. Sramek, Prem K. Narang. *Pharmacodynamics and Drug Development: Perspectives in Clinical Pharmacology*. s.l. : John Wiley & Sons Ltd, 1994.
39. Καρκαλούσος Π., Γεωργίου Ζ., Κρούπης Χ. *Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας*. Αθήνα : Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών [ηλεκτρ. βιβλ.] , 2015.
40. W.J. Lough, I.W. Wainer. *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice*. Glasgow : Blackie Academic & Professional, 1995.
41. [Online] [Cited: June 27, 2021.] <https://polymer.ustc.edu>.
42. *High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding*. D.S.Hage. 1, s.l. : Journal of Chromatography B, 2002, Vol. 768. 3-30.
43. *Rapid analysis of the interactions between drugs and human serum albumin (HSA) using high-performance affinity chromatography (HPAC)*. H.S. Kim, I.W.Wainer. 1, s.l. : Journal of Chromatography B, 2008, Vol. 870. 22-26.
44. *The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption*. F. Tsopelas, T. Vallianatou, A. Tsantili-Kakoulidou. Athens : Pharmaceutical Sciences, 2016, Vol. 81. 82-93.
45. *Prediction of drug absorption based on immobilized artificial membrane (IAM) chromatography separation and calculated molecular descriptors*. T.E.Yen,

S.Agatonovic-Kustrin, A.M. Evans, R.L. Nation, J. Ryand. 3, s.l. : Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, Vol. 38. 472-478.

46. *Retention characteristics of an immobilized artificial membrane column in reversed-phase liquid chromatography.* C. Lepont, C.F. Poole. 1-2, s.l. : Journal of Chromatography A, 2002, Vol. 946. 107-124.

47. *Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary.* S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando. 4, s.l. : ACS Publications, 1985, Vol. 57. 834–841.

48. *Efficiency Enhancement in Micellar Liquid Chromatography.* J.G. Dorsey, M.T. DeEchegaray, J.S. Landy. 6, s.l. : ACS Publications, 1983, Vol. 55. 924-928.

49. A Berthod, C Garcia-Alvarez-Coque. *Micellar Liquid Chromatography.* s.l. : CRC Press, 2000.

50. *Retention mechanisms in micellar liquid chromatography.* M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Brochb, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque. 10, s.l. : Journal of Chromatography A, 2009, Vol. 1216. 1798-1814.

51. *Study of surface properties of aqueous solutions of sodium dodecyl sulfate in the presence of hydrochloric acid and heavy metal ions.* A. Wołowicz, K. Staszak. s.l. : Journal of Molecular Liquids, 2020, Vol. 299.

52. *UV-vis investigation of (CTC/Orthodox/Green) tea in presence of Brij 35/Water system.* A. Bhattarai, J.N. Mitruka, S.K. Chapagain, P.K. Shrestha. 1, s.l. : BIBECHANA, 2014, Vol. 11. 40-45.

53. PubChem. [Online] [Cited: June 10, 2021.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5974>.

54. *Quantitative retention–structure and retention–activity relationships of barbiturates by micellar liquid chromatography.* M. Cuenca-Benito, S. Sagrado, R.M. Villanueva-Camañas, M.J. Medina-Hernández. 1-2, s.l. : Journal of Chromatography A, 1998, Vol. 814. 121-132.

55. *Experimental Investigation and Performance Evaluation of Modified Viscoelastic Surfactant (VES) as a New Thickening Fracturing Fluid.* Z. H. Chieng, M.E. Mohyaldinn, A.M. Hassan, H. Bruining. 7, s.l. : Polymers, 2020, Vol. 12.

56. Saruchera, G. Drug-Eluting NanoPolymers. *Open wet ware.* [Online] [Cited: June 9, 2021.] <https://openwetware.org>.

57. DeAngelis, M. *Inverse Micelle.* Science Photo Library, s.l. : 2018.

58. *Micellar Liquid Chromatography: Method Development and Applications.* M.C. García-Alvarez-Coque, M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch. 1, s.l. : Wiley Online Library, 2015, Vol. 2. 407-459.

59. *Micellar Liquid Chromatography.* B. Kanakaiah, S. Bhargavi, M. Naresh, D.K. Sowmya et al. 4, s.l. : International Journal of Bio-Pharma Research, 2013, Vol. 2. 117-122.

60. *Micellar liquid chromatography (Review). Part 1. Fundamentals, retention models and optimization of separation.* A.P. Boichenko, L.P. Loginova, , A. U. Kulikov. 2, s.l. : ResearchGate, 2007, Vol. 2. 92-116.
61. *Quantitative structure-retention relationship for chromatographic behaviour of anthraquinone derivatives through considering organic modifier features in micellar liquid chromatography.* A.M. Ramezani, S. Yousefinejad, A. Shahsavari, A. Mohajeri, G. Absalan. s.l. : Journal of Chromatography A, 2019, Vol. 1599. 46-54.
62. *Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective.* Khaledi, M.G. 1-2, s.l. : Journal of Chromatography A, 1997, Vol. 780. 3-40.
63. *New Insights and Recent Developments in Micellar Liquid Chromatography.* M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque, A. Berthod. 1, s.l. : Separation & Purification Reviews, 2009, Vol. 38. 45-96.
64. *Simultaneous optimization of variables influencing selectivity and elution strength in micellar liquid chromatography : Effect of organic modifier and micelle concentration.* J.K. Strasters, E.D. Breyer, A.H. Rodgers, M.G. Khaledi. s.l. : Journal of Chromatography, 1990, Vol. 511. 17-33.
65. Chase, Y. *Introduction to Choosing MLC Capacitors.* s.l. : AVX Corporation, 2004.
66. ChemSpider. [Online] [Cited: June 19, 2021.] <https://www.chemspider.com/>.
67. Α. Μπλάζου. *Υδροχρωματογραφία μικκυλίων παρουσία του μη ιοντικού τασενεργού Triton X-100: Μελέτη μηχανισμού έκλυσης και εφαρμογή στην πρόβλεψη βιολογικών διαδικασιών.* Αθήνα : Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2021.
68. Δ. Παπαηλιού. *Υδροχρωματογραφία μικκυλίων παρουσία του ανιοντικού τασενεργού SDS: Μελέτη μηχανισμού έκλυσης και εφαρμογή στην πρόβλεψη βιολογικών διαδικασιών.* Αθήνα : Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2020.
69. Ε. Λεβεντάκη. *Εφαρμογή της μικυλλιακής χρωματογραφίας ως εργαλείο για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων υποψήφιων φαρμάκων.* Αθήνα : Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2020.
70. Κ. Βασιλείου. *Μελέτη έκλυσης φαρμακευτικών μορίων από υδροχρωματογραφία μικυλίων παρουσία του επιφανειοδραστικού Tween 20 και εφαρμογή στην προσομοίωση βιολογικών διεργασιών.* Αθήνα : Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2020.
71. Μ.Θ. Κοντογιάννη. *Μικυλλιακή υδροχρωματογραφία παρουσία του ουδέτερου τασενεργού Triton X-100: Μελέτη του μηχανισμού έκλυσης φαρμακομορίων και εφαρμογή στην εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων.* Αθήνα : Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2021.

72. Π. Νάστου. *Εφαρμογή μικυλλιακής χρωματογραφίας ως εργαλείο για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων υποψήφιων φαρμάκων*. Αθήνα : Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2020.
73. *Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes*. F. Tsopelas, P. Danias, A. Pappa, and A. Tsantili-Kakoulidou. s.l. : Journal of Chromatography A, 2020, Vol. 1621. 1–14.
74. *Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane chromatography using two stationary phases*. al., F. Tsopelas et. s.l. : Journal of Chromatography A, 2015, Vol. 1396. 25-33.
75. Λ.Α. Φατούρου. *Συμβολή στη μελέτη φαρμακευτικών ενώσεων με χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών και εφαρμογή στην πρόβλεψη εντερικής απορρόφησης φαρμάκων*. Αθήνα : Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2020.
76. Μ.Ε. Μαζαράκη. *Εφαρμογή Μικκυλλιακής Χρωματογραφίας παρουσία του τασιενεργού CTAB ως Εργαλείο για την Εκτίμηση Ιδιοτήτων Υποψήφιων Φαρμάκων*. Αθήνα : Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2021.
77. *Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity*. K. Valko, S. Nunhuck, C. Bevan, M.H Abraham, D.P. Reynolds. 11, s.l. : J Pharm Sci, 2003, Vol. 92. 2236-2248.
78. *The Blood–Brain Barrier (BBB) Score*. Mayuri Gupta, Hyeok Jun Lee, Christopher J. Barden, Donald F. Weaver. s.l. : Journal of Medicinal Chemistry, 2019, Vol. 62. 9824-9836.