



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Ι: Χημικών Επιστημών

Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας

<<Συμβολή στη μελέτη φαρμακευτικών μορίων με μικκυλιακή υγροχρωματογραφία παρουσία του ουδέτερου τασιενεργού Tween-20: Σύγκριση με πρωτόκολλα κυτταρικής διαπερατότητας και φαρμακοκινητικές παραμέτρους>>

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Στύλλος Στυλιανός

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

ΑΘΗΝΑ 2022

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική μου εργασία με τίτλο, *Συμβολή στη μελέτη φαρμακευτικών μορίων με μικκυλιακή υδροχρωματογραφία παρουσία του ουδέτερου τασιενεργού Tween-20: Σύγκριση με πρωτόκολλα κυτταρικής διαπερατότητας και φαρμακοκινητικές παραμέτρους*, εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το χρονικό διάστημα Οκτωβρίου 2021 – Ιουνίου 2022.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Τσόπελα Φώτιο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα της εργασίας, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Η καθοδήγηση κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας, ήταν πολύ σημαντικά για εμένα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Λαμπρινή – Αρετή Τσακανίκα για τις χρήσιμες υποδείξεις της και τη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για όλη τη στήριξη και τη συμπαράστασή τους, κατά τη διάρκεια των φοιτητικών σπουδών μου.

Στυλιανός Στύλλος
Αθήνα, Ιούνιος 2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, έγινε μελέτη του μηχανισμού έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων χρησιμοποιώντας υδροχρωματογραφία μικκυλίων και το μη ιοντικό τασιενεργό Tween-20, καθώς και αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης που προκύπτουν και των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων.

Συνολικά μελετήθηκαν 25 φαρμακευτικές ενώσεις με διαφορετικές δομές και φαρμακολογικές δράσεις. Τα φάρμακα αυτά ήταν κυρίως βασικά και ορισμένα όξινα και αμφολυτικά. Για τον υπολογισμό των συντελεστών κατακράτησης των ενώσεων έγινε χρήση μίας στήλης αντιστρόφου φάσεως και του μη ιοντικού επιφανειοδραστικού Tween-20, στις τιμές pH 7.40 και 5.5, εκ των οποίων η πρώτη αντιστοιχεί στο αίμα και το παχύ έντερο και η δεύτερη στο pH του λεπτού εντέρου. Τα όξινα και αμφολυτικά φάρμακα μετρώνται και σε pH 5.5, διότι σε αυτή την τιμή αναμένεται να παρουσιάσουν μεγαλύτερη κυτταρική διαπερατότητα λόγω μειωμένου ιοντισμού. Τα πειράματα υλοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 37°C, για να επιτυγχάνεται προσομοίωση με τον ανθρώπινο οργανισμό. Χρησιμοποιώντας τους χρόνους ανάσχεσης που προέκυψαν για κάθε ουσία κατά τη διενέργεια των πειραμάτων, υπολογίστηκαν οι συντελεστές κατακράτησης ($\log k$). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση αυτών με συντελεστές που προέκυψαν από τη μικκυλιακή χρωματογραφία με τα τασιενεργά Brij-35, SDS και TritonX-100, όπως και με τους συντελεστές της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM). Επιπλέον, έγιναν αντίστοιχες συσχετίσεις με τους συντελεστές μερισμού ($\log P$) και κατανομής ($\log D$), οι οποίοι αντιπροσωπεύουν την λιποφιλία των ενώσεων. Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας αποδείχθηκε πόσο καθοριστική είναι η λιποφιλία των ενώσεων σχετικά με την εκλουστική τους συμπεριφορά, καθώς οι περισσότερο λιπόφιλες ουσίες είχαν εμφανώς μεγαλύτερο χρόνο ανάσχεσης.

Έπειτα, έγινε μελέτη της επίδρασης της μεταβολής του pH για τα 7 από τα 25 φάρμακα που μελετήθηκαν σε pH 5.5 τόσο για το Tween-20, όσο και για τα υπόλοιπα τασιενεργά. Παρατηρήθηκε ότι σε όλα σχεδόν τα όξινα φάρμακα με τη μείωση του pH αυξάνεται ο συντελεστής κατακράτησης, με αποτέλεσμα να είναι αρνητική η τιμή $\Delta \log k^{7.40-5.50}$. Οι αμφολυτικές ενώσεις είχαν ιδιαίτερη συμπεριφορά, καθώς ανάλογα αν τα θετικά και αρνητικά τους κέντρα μπορούν να αλληλεπιδράσουν ενδομοριακά, το οποίο εξαρτάται από τη διαμόρφωση του υφιστάμενου μορίου.

Τέλος, οι συντελεστές $\log k_{\text{Tween-20}}$ που μετρήθηκαν πειραματικά, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης ορισμένων βασικών φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων και έγινε

συσχέτιση με την κυτταρική διαπερατότητα μέσω των επιθηλιακών κυτταρικών σειρών εντέρου, Caco-2 και με τη διαπερατότητα μέσω των σειρών τεχνητών μεμβρανών, PAMPA. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν μοντέλα για την πρωτεϊνική σύνδεση (% PPB) και τον όγκο κατανομής (V_d) με το δεύτερο να κρίνεται πιο ικανοποιητικό.

Λέξεις-Κλειδιά: βιομημητική χρωματογραφία, Tween-20, λιποφιλία, συντελεστής κατακράτησης, όγκος κατανομής, κυτταρική διαπερατότητα.

ABSTRACT

In the present diploma thesis, the elution mechanism of various pharmaceutical substances was studied using the method of micellar liquid chromatography and the non-ionic surfactant Tween-20 and there was also an assessment of the correlation between the retention factors and the pharmacokinetic qualities.

In total, 25 drugs were studied with different structures and pharmacological actions. Most of them were alkaline, while some were acidic and zwitterionic. A reversed-phase column and the non-ionic surfactant Tween-20 were used to calculate the retention factors of the compounds to two different pH values, 7.4 and 5.5. 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. Acidic and zwitterionic drugs should be also measured at pH 5.5, because higher cell permeability is anticipated for acidic and perhaps for zwitterionic drugs as a result of reduced ionization. The experiments were implemented in a constant temperature of 37°C, to achieve a simulation of the human body's temperature. Based on the retention times that occurred during the experimental procedure for each of the substances studied, the retention coefficients ($\log k$) were calculated. Then, these coefficients were correlated with the retention coefficients obtained from micellar chromatography in the presence of the surfactants Brij-35, SDS and Triton X-100, as well as the immobilized membrane chromatography (IAM) coefficients. Moreover, corresponding correlations were made with the partition coefficients ($\log P$) and distribution coefficients ($\log D$), which express the lipophilicity of the compounds. At the end of the experimental procedure, it was established how crucial the lipophilicity of the compounds is, in relation to their eluting behavior, since most lipophilic substances had significantly bigger retention times.

The effect of pH change was then studied for 7 of the 25 drugs at pH 5.5, for Tween-20 and the other surfactants. In the majority of the acidic compounds, it was observed that the reduction of the pH value led to higher retention factors, which in turn meant negative $\Delta \log k^{7.40-5.50}$ values. Ampholytes showed a distinct behavior, depending on whether their positive and negative centers can interact intramolecularly, which depends on the configuration of each molecule.

Finally, the retention coefficients $\log k_{\text{Tween-20}}$ that were experimentally calculated, were used to develop models to predict some basic pharmacokinetic qualities and also, a correlation was made with cell permeability through the intestinal epithelial cell lines, Caco-2 and with permeability

through the artificial membrane series, PAMPA. Specifically, models for protein binding (% PPB) and volume of distribution (V_d) were developed, with the second being considered satisfactory.

Keywords: biomimetic chromatography, Tween-20, lipophilicity, retention factor, volume of distribution, cell permeability.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|------|
| Ευχαριστίες | i |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | iii |
| ABSTRACT | v |
| ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ | xi |
| ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ | xii |
| ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ | xiii |
| 1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ | 1 |
| 1.1 Ορισμός φαρμάκου | 1 |
| 1.2 Ιστορική αναδρομή | 1 |
| 1.3 Ο τομέας της Φαρμακευτικής Χημείας | 2 |
| 1.4 Κατηγορίες φαρμάκων | 2 |
| 1.4.1 Μη συνταγογραφούμενα | 2 |
| 1.4.2 Συνταγογραφούμενα | 3 |
| 1.4.3 Συμπληρωματικά | 3 |
| 1.5 Ανακάλυψη, ανάπτυξη και πηγές νέων φαρμάκων | 4 |
| 1.5.1 Ανακάλυψη | 4 |
| 1.5.1.1 Τυχαίο screening | 4 |
| 1.5.1.2 Μη τυχαίο screening | 4 |
| 1.5.1.3 Μελέτη μεταβολιτών | 5 |
| 1.5.1.4 Κλινικές μελέτες | 5 |
| 1.5.1.5 Ορθολογικός σχεδιασμός | 5 |

| | |
|--|----|
| 1.5.2 Ανάπτυξη | 5 |
| 1.5.2.1 Ανίχνευση φαρμακοφόρου τμήματος | 5 |
| 1.5.2.2 Τροποποίηση χαρακτηριστικών ομάδων | 6 |
| 1.5.2.3 Σχέση δομής-δραστικότητας | 6 |
| 1.5.3 Πηγές νέων φαρμάκων..... | 6 |
| 1.5.3.1 Φυσικά προϊόντα | 6 |
| 1.5.3.2 Υπάρχοντα φάρμακα | 6 |
| 1.5.3.3 Μοντέλα ασθενειών και screening | 7 |
| 1.5.3.4 Φυσιολογικοί μηχανισμοί | 7 |
| 1.6 Βασικές έννοιες Φαρμακολογίας | 7 |
| 1.7 Προκλινική έρευνα | 9 |
| 1.8 Κλινική έρευνα | 9 |
| 1.8.1 Φάση 1 | 10 |
| 1.8.2 Φάση 2 | 10 |
| 1.8.3 Φάση 3 | 10 |
| 1.8.4 Φάση 4 | 11 |
| 1.9 Χορήγηση φαρμάκων | 11 |
| 1.9.1 Στοματική οδός | 11 |
| 1.9.2 Υπογλώσσια χορήγηση | 12 |
| 1.9.3 Υπόθετα | 12 |
| 1.9.4 Ενδοδερμική χορήγηση | 12 |
| 1.9.5 Υποδόρια χορήγηση | 12 |
| 1.9.6 Ενδομυϊκή χορήγηση | 13 |
| 1.9.7 Ενδοφλέβια χορήγηση | 13 |
| 1.9.8 Ενδορρινική χορήγηση | 13 |
| 1.9.9 Εισπνεόμενα φάρμακα | 14 |
| 1.10 Φαρμακοτεχνικές μορφές | 14 |

| | |
|--|----|
| 1.11 Φαρμακοκινητική | 15 |
| 1.11.1 Απορρόφηση | 16 |
| 1.11.2 Κατανομή | 17 |
| 1.11.3 Μεταβολισμός | 18 |
| 1.11.4 Απέκκριση | 20 |
| 1.11.5 Τοξικότητα | 22 |
| 1.12 Βασικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες | 23 |
| 1.12.1 Λιποφιλία | 24 |
| 1.12.2 Συντελεστής μερισμού P | 24 |
| 1.12.3 Συντελεστής κατανομής D | 26 |
| 1.13 Φαρμακοδυναμική | 27 |
| 2. ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ | 28 |
| 2.1 Εισαγωγή στη χρωματογραφία | 28 |
| 2.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης | 29 |
| 2.3 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM) | 30 |
| 2.4 Μικκυλιακή Χρωματογραφία (MLC) | 31 |
| 2.4.1 Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων (IPC) και η γέννηση της υγροχρωματογραφίας μικκυλίων | 32 |
| 2.4.2 Επιφανειοδραστικές ουσίες | 34 |
| 2.4.3 Στατική φάση | 37 |
| 2.4.4 Κινητή φάση | 38 |
| 2.4.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της MLC | 39 |
| 2.4.6 Εφαρμογές MLC | 40 |
| 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 41 |
| 3.1 Σκοπός | 41 |
| 3.2 Αντιδραστήρια | 41 |
| 3.3 Οργανολογία | 41 |

| | |
|---|----|
| 3.4 Πειραματική διαδικασία | 43 |
| 3.4.1 Στατική φάση | 43 |
| 3.4.2 Παρασκευή κινητής φάσης | 43 |
| 3.4.3 Προετοιμασία δειγμάτων | 44 |
| 3.4.4 Διεξαγωγή μετρήσεων | 44 |
| 3.5 Φάρμακα που μελετήθηκαν | 45 |
| 3.6 Στατιστική ανάλυση μετρήσεων | 50 |
| 4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ | 51 |
| 4.1 Δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου | 51 |
| 4.2 Δεδομένα MLC | 52 |
| 4.3 Δεδομένα IAM | 53 |
| 4.4 Δεδομένα κυτταρικής διαπερατότητας μέσω επιθηλιακών σειρών εντέρου Caco-2, διαπερατότητας μέσω σειρών τεχνητών μεμβρανών, PAMPA και φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (%PPB, V_d) | 54 |
| 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 58 |
| 5.1 Συντελεστές κατακράτησης σε pH 7.4 και 5.5 ($\log k_{\text{Tween}}$) | 58 |
| 5.2 Συσχέτιση $\log k_{\text{Tween}}$ με συντελεστές λιποφιλίας | 59 |
| 5.2.1 Συσχέτιση $\log k_{\text{Tween}}$ με το συντελεστή μερισμού $\log P$ | 59 |
| 5.2.2 Συσχέτιση $\log k_{\text{Tween}}$ με το συντελεστή κατανομής $\log D$ | 61 |
| 5.3 Συσχέτιση με άλλα είδη μικκυλιακής χρωματογραφίας | 62 |
| 5.3.1 Συσχέτιση $\log k_{\text{Tween-20}}$ με τους συντελεστές $\log_{\text{Brij-35}}$ | 62 |
| 5.3.2 Συσχέτιση $\log k_{\text{Tween-20}}$ με τους συντελεστές \log_{SDS} | 63 |
| 5.3.3 Συσχέτιση $\log k_{\text{Tween-20}}$ με τους συντελεστές $\log_{\text{TritonX-100}}$ | 65 |
| 5.3.4 Συσχέτιση $\log k_{\text{Tween-20}}$ με τους συντελεστές $\log_{\text{IAM-DD2}}$ | 66 |
| 5.4 Μελέτη επίδρασης του pH στον ιοντισμό | 67 |
| 5.5 Συσχέτιση με φαρμακοκινητικές ιδιότητες | 68 |
| 5.5.1 Συσχέτιση με την κυτταρική διαπερατότητα μέσω των επιθηλιακών κυτταρικών σειρών του εντέρου, Caco-2 | 68 |

| | |
|---|----|
| 5.5.2 Συσχέτιση με τη διαπερατότητα μέσω των σειρών τεχνητών μεμβρανών, PAMPA | 70 |
| 5.5.3 Συσχέτιση με πρωτεϊνική σύνδεση | 71 |
| 5.5.4 Συσχέτιση με τον όγκο κατανομής (V_d) | 76 |
| 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 79 |
| 7. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ | 81 |
| 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 82 |

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

| | |
|---|----|
| Πίνακας 1. Φάρμακα που μελετήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους | 46 |
| Πίνακας 2. Δεδομένα συντελεστών μερισμού $\log P$, συντελεστών κατανομής $\log D$ και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου των φαρμάκων που μελετήθηκαν | 51 |
| Πίνακας 3. Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης MLC για τα τασιενεργά Brij-35, SDS και Triton X-100 | 52 |
| Πίνακας 4. Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της IAM | 53 |
| Πίνακας 5. Δεδομένα διαπερατότητας Caco-2, PAMPA και %PPB, V_d | 54 |
| Πίνακας 6. Συντελεστές κατακράτησης σε pH 7.4 και 5.5 ($\log k_{\text{tween}}$)..... | 58 |
| Πίνακας 7. Διαφορά $\log k^{7.4-5.5}$ για τα Tween20, CTAB, τη στήλη IAM.DD2 και το συντελεστή κατανομής $\log D$ | 67 |
| Πίνακας 8. Πειραματικές τιμές % <i>PPB</i> και τιμές προβλεπόμενες από το μοντέλο 1 | 73 |
| Πίνακας 9. Πειραματικές τιμές % <i>PPB</i> και τιμές προβλεπόμενες από το μοντέλο 2 | 74 |
| Πίνακας 10. Πειραματικές τιμές όγκου κατανομής, V_d και τιμές προβλεπόμενες από το μοντέλο | 77 |

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

| | |
|--|----|
| Εικόνα 1. Νόμος του Fick | 17 |
| Εικόνα 2. Υπολογισμός φαινομενικού όγκου κατανομής | 17 |
| Εικόνα 3. Υπολογισμός της κάθαρσης | 21 |
| Εικόνα 4. Ηρωίνη και κοκαΐνη | 23 |
| Εικόνα 5. Οι ισορροπίες κατά την κατανομή της προπρανολόλης στο σύστημα οκτανόλης-νερού σε συνθήκες pH όπου συνυπάρχουν η αδιάστατη και η ιοντισμένη μορφή (η άνω στιβάδα είναι η η-οκτανόλη γιατί έχει μικρότερο ειδικό βάρος) | 26 |
| Εικόνα 6. Διάγραμμα εργαστηριακής διάταξης υγρής χρωματογραφίας HPLC | 30 |
| Εικόνα 7. Η στήλη IAM.PC.DD2 χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της μεμβρανικής διαπερατότητας από τα φάρμακα | 31 |
| Εικόνα 8. Απορροφούμενη ποσότητα τασιενεργού σε μία στατική φάση C8 με πυρίτιο χρησιμοποιώντας μίγμα ακετονιτριλίου-νερού (20% ακετονιτρίλιο) | 33 |
| Εικόνα 9. Απορροφούμενη ποσότητα τασιενεργού σε μία στατική φάση C8 με πυρίτιο χρησιμοποιώντας οργανικό διαλύτη στην κινητή φάση (0,01M τασιενεργό) | 34 |
| Εικόνα 10. Η χημική δομή γνωστών τασιενεργών ουσιών | 34 |
| Εικόνα 11. Η χημική δομή του Tween 20 | 35 |
| Εικόνα 12. Τμήμα μικκυλίου πολυοξαιθυλιωμένου τασιενεργού | 36 |
| Εικόνα 13. Σημείο θόλωσης μερικών πλουρωτικών μη ιοντικών τασιενεργών σε °C | 37 |
| Εικόνα 14. Χρωματογραφική διάταξη | 42 |
| Εικόνα 15. Ανάδευση κινητής φάσης | 44 |

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

| | |
|--|----|
| Διάγραμμα 1. Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με το συντελεστή μερισμού $\log P$ | 60 |
| Διάγραμμα 2. Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με το συντελεστή κατανομής $\log D$ | 61 |
| Διάγραμμα 3. Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με $\log_{\text{Brij-35}}$ | 63 |
| Διάγραμμα 4. Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με \log_{SDS} | 64 |
| Διάγραμμα 5. Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με $\log_{\text{TritonX-100}}$ | 65 |
| Διάγραμμα 6. Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με $\log_{\text{IAM.DD2}}$ | 66 |
| Διάγραμμα 7. Συσχέτιση κυτταρικής διαπερατότητας Caco-2 με τους συντελεστές κατακράτησης $\log k_{\text{tween}}$ | 69 |
| Διάγραμμα 8. Συσχέτιση διαπερατότητας PAMPA με τους συντελεστές κατακράτησης $\log k_{\text{tween}}$ | 70 |
| Διάγραμμα 9. Συσχέτιση πρωτεϊνικής σύνδεσης ($\log K$) με τους συντελεστές κατακράτησης $\log k_{\text{tween}}$ | 72 |
| Διάγραμμα 10. Συσχέτιση $\log V_d$ του training set με $\log k_{\text{tween}}$ | 76 |

1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

1.1 Ορισμός φαρμάκου

Φάρμακο είναι κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών, που εμφανίζεται ότι έχει θεραπευτικές ή προφυλακτικές ιδιότητες για τις ασθένειες των ανθρώπων ή των ζώων.

Ως φάρμακο θεωρείται επίσης κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών που μπορεί να χορηγηθεί σε ανθρώπους ή ζώα για ιατρική διάγνωση ή για να αποκατασταθούν, βελτιωθούν ή τροποποιηθούν οργανικές λειτουργίες σε ανθρώπους ή ζώα.

Φαρμακευτικό προϊόν είναι κάθε φάρμακο παρασκευασμένο εκ των προτέρων σε μία φαρμακευτική μορφή που τίθεται σε κυκλοφορία υπό ειδική ονομασία και σε ειδική συσκευασία.^[1]

1.2 Ιστορική αναδρομή

Τα φάρμακα αποτελούν πολύτιμα αγαθά για την πρόληψη και την αντιμετώπιση των ασθενειών από τις οποίες απειλείται συνεχώς ο άνθρωπος. Από τα αρχαία χρόνια, τα φυτά χρησιμοποιήθηκαν ως φαρμακευτικά μέσα για την καταπράυνση του πόνου.

Το 1806 ο Friedrich Sertürner ανέφερε σε μία δημοσίευσή του, ότι αφαιρώντας από το όπιο ένα αλκαλοειδές που περιέχει, το όπιο έχανε τη δραστικότητά του. Ταυτόχρονα, η δράση του αλκαλοειδούς δεκαπλασιαζόταν. Το αλκαλοειδές αυτό ήταν η μορφίνη, η οποία χρησιμοποιείται και σήμερα ως ισχυρό αναλγητικό φάρμακο. Το 1874 απομονώθηκε το σαλικυλικό οξύ από τον φλοιό της ιτιάς, πάνω στο οποίο βασίστηκε η δημιουργία του πρώτου συνθετικού φαρμάκου, της ασπιρίνης. Περίπου το 1930 δημιουργήθηκε η πρώτη σύγχρονη φαρμακευτική βιομηχανία, ώστε να επιταχυνθεί η σύνθεση οργανικών ενώσεων ως πιθανά υποψήφια φάρμακα.

Τα πειράματα για τη φαρμακολογική δράση ξεκίνησαν αρχικά σε ζώα και καθώς εξελίχθηκε η βιολογία συνεχίστηκαν σε απομονωμένα όργανα, κυτταροκαλιέργειες, ένζυμα και μεμβράνες, προτού ένα υποψήφιο φάρμακο χρησιμοποιηθεί για κλινικές μελέτες στον άνθρωπο. Η τεχνολογική ανάπτυξη τα επόμενα χρόνια (φασματομετρία μάζας, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης), σε συνδυασμό με την εξέλιξη της πληροφορικής συντέλεσαν στην έρευνα νέων χημικών μορίων με θεραπευτική δράση.

Το 1900 ο Paul Ehrlich εγκαινίασε τον όρο *υποδοχέας* κατά τη μελέτη του για το μηχανισμό δράσης των φαρμάκων. Μαζί με το συνεργάτη του Kiyoshi Shiga, συνέθεσαν εκατοντάδες ενώσεις καθιερώνοντας την πειραματική φαρμακολογία και ταυτόχρονα αναπτύσσοντας τη θεωρία, ότι υπάρχει ανάγκη για φάρμακα συγγενή στα παθογόνα και ακίνδυνα για τα κύτταρα

του οργανισμού. Ο Ehrlich είχε την άποψη ότι χρειάζονται συγκεκριμένες ομάδες στα μόρια για να συνδεθούν με τον υποδοχέα και έτσι εισήγαγε την έννοια της *φαρμακοφόρου δομής*. Το 1907 παρασκεύασε στο εργαστήριό του το διαμινοδιοξυβενζόλιο, το οποίο δρα κατά της σπειροχαίτης και υπήρξε κομβικό σημείο για τη χημειοθεραπεία της σύφιλης και την ανάπτυξη των αντιβιοτικών. Επιπλέον, ο Ehrlich διατύπωσε την έννοια του *χημειοθεραπευτικού δείκτη*, ως το πηλίκο της ελάχιστης δόσης προς τη μέγιστη θεραπευτική δόση, ανακαλύπτοντας ότι οι μικροοργανισμοί μπορούν να αποκτήσουν ανοχή. Τέλος, οι Ehrlich και Langley χρησιμοποίησαν την έννοια του *χημειο-υποδοχέα* για την εξήγηση της αλληλεπίδρασης των φαρμάκων με τα κύτταρα και αυτό αποτέλεσε τη βάση για να θεωρηθεί ο υποδοχέας ως βιο-μακρομόριο του οποίου το ενεργό κέντρο λειτουργεί ως θέση σύνδεσης μικρών μορίων. Όλα τα ευρήματα συγκλίνουν στο ότι απαιτείται η δημιουργία νέων δραστικών ενώσεων, δηλαδή η εύρεση μίας ένωσης-οδηγού και η βελτιστοποίησή της.^[2]

1.3 Ο τομέας της Φαρμακευτικής Χημείας

Ο φαρμακοχημικός επιχειρεί να σχεδιάσει και να συνθέσει έναν φαρμακευτικό παράγοντα, ο οποίος θα έχει μία επιθυμητή βιολογική επίδραση στον ανθρώπινο ή σε άλλο ζωντανό οργανισμό.^[3] Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει μία ομάδα επιστημόνων, ποικίλων επιστημονικών κλάδων όπως Χημεία, Βιολογία, Ιατρική, Φαρμακολογία και Πληροφορική.

Η ανακάλυψη ενός νέου φαρμάκου απαιτεί επίσης μία μέθοδο χορήγησης, την ανάπτυξη τεστ και διαδικασιών για να καθιερωθεί πως λειτουργεί μέσα στο σώμα και μία αποτίμηση ασφάλειας. Επιπρόσθετα, ίσως χρειαστεί θεμελιώδης έρευνα για τη βιολογική και χημική φύση της νοσούσας κατάστασης. Αυτές και άλλες όψεις του σχεδιασμού και σύνθεσης φαρμάκων, απαιτούν τη συνεισφορά ειδικών από άλλους τομείς, έτσι ώστε οι φαρμακοχημικοί να έχουν σε γενικές γραμμές γνώση των αντίστοιχων πεδίων.^[4]

1.4 Κατηγορίες φαρμάκων

Υπάρχουν διάφορες κατηγοριοποιήσεις των φαρμάκων. Μία από αυτές αφορά την προσβασιμότητα σε αυτά και διαχωρίζονται σε μη συνταγογραφούμενα, συνταγογραφούμενα και συμπληρωματικά.

1.4.1 Μη συνταγογραφούμενα

Πρόκειται για φάρμακα που μπορούν να αγοραστούν σε φαρμακεία και δεν απαιτούν συνταγογράφηση από αντίστοιχο ιατρό. Συμπεριλαμβάνεται η παρακεταμόλη, καθώς και άλλα αναλγητικά, καθαρτικά, αλλεργίας και κρυολογήματος.

Πολλά από αυτά θεραπεύουν πολλαπλά συμπτώματα. Για παράδειγμα, τα αντιισταμινικά είναι δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση αλλεργιών και συμπτωμάτων κρυολογήματος.

Οι βιταμίνες, τα βότανα και τα συμπληρώματα διατροφής θεωρούνται τρόφιμα από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων.

1.4.2 Συνταγογραφούμενα

Στην κατηγορία αυτή τα φάρμακα τείνουν προς την θεραπεία διαφορετικών ασθενειών, όπως χαμηλή ή υπερυψωμένη πίεση του αίματος, καθώς και ένα εύρος επικίνδυνων χρόνιων νόσων, όπως διαβήτης και καρκίνος. Σε αυτήν την περίπτωση απαιτείται συνταγογράφηση από γιατρό.

1.4.3 Συμπληρωματικά

Σε αυτά περιλαμβάνονται τα ιχνοστοιχεία, οι βιταμίνες, η αρωματοθεραπεία και τα ομοιοπαθητικά προϊόντα. Έχουν γίνει λιγότερες δοκιμές στα συμπληρωματικά φάρμακα σε σχέση με τα υπόλοιπα και σε κάποιες περιπτώσεις έχουν ανεπιθύμητες παρενέργειες όταν αναμειχθούν με φάρμακα από τις άλλες κατηγορίες, οπότε δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη χρήση τους και αναζήτηση συμβουλής από επαγγελματία υγείας.^{[5][6]}

Τα φάρμακα μπορούν επίσης να διαχωριστούν σε πρωτότυπα και γενόσημα. Τα πρώτα είναι καινοτόμα φάρμακα που δημιουργούνται έπειτα από διεξοδική εργαστηριακή και κλινική έρευνα. Υποβάλλονται σε αυστηρούς ρυθμιστικούς κανόνες, ώστε να εξασφαλιστεί η ποιότητα και αποτελεσματικότητά τους. Το νέο, πρωτότυπο φάρμακο βρίσκεται υπό τη διαφύλαξη του διπλώματος ευρεσιτεχνίας για είκοσι χρόνια, από τη στιγμή που κατοχυρώνεται η δραστική ουσία και όταν λήξει η πατέντα του, παρατηρείται και ισχυρή μείωση της τιμής του. Αυτό συμβαίνει γιατί πλέον έχουν το δικαίωμα και άλλες φαρμακευτικές εταιρίες να παράξουν όμοια φάρμακα, χρησιμοποιώντας ως πεδίο αναφοράς τα πρωτότυπα.

Τα όμοια αυτά φάρμακα ονομάζονται γενόσημα. Περιέχουν την ίδια δραστική ουσία με τα πρωτότυπα, επομένως έχουν και τα ίδια θεραπευτικά αποτελέσματα. Χρησιμοποιούνται από τα συστήματα υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο, λόγω του χαμηλότερου κόστους, καθώς δεν έχουν

δαπανηθεί χρήματα για την έρευνα και τις κλινικές μελέτες και στηρίζονται σε δοκιμασμένη τεχνολογία. Για να κυκλοφορήσει ένα επώνυμο γενόσημο φάρμακο στην ελληνική αγορά, θα πρέπει να αποδείξει την ασφάλειά του και την βιοϊσοδυναμία του, προσκομίζοντας σχετικές μελέτες στον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκου.^[20]

1.5 Ανακάλυψη, ανάπτυξη και πηγές νέων φαρμάκων

1.5.1 Ανακάλυψη

Η ανακάλυψη φαρμάκων αποτελεί επακόλουθο μεθοδικών μελετών και έρευνας. Με το πέρας πολλών διαδικασιών ανακαλύπτεται η ένωση-οδηγός, μία ένωση με την επιθυμητή φαρμακολογική δράση αλλά και με ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως προβλήματα μεταβολισμού και υψηλή τοξικότητα. Τα προβλήματα αυτά αντιμετωπίζονται με επεξεργασία της ένωσης-οδηγού.

Οι διάφορες ενώσεις που είναι υποψήφια φάρμακα ή ενώσεις-οδηγοί, εξετάζονται σε *in vivo* και συνηθέστερα *in vitro* διαδικασίες, για να διαπιστωθεί το φαρμακολογικό τους αποτέλεσμα και η ισχύς τους συγκριτικά με μία ένωση αναφοράς.

Η ανακάλυψη της πενικιλίνης αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ανακάλυψης φαρμάκου χωρίς την ύπαρξη ένωσης-οδηγού, η οποία πραγματοποιήθηκε το 1928 από τον Alexander Fleming. Πρόκειται για τυχαίο συμβάν, καθώς άφησε εκτός ψυγείου μία καλλιέργεια βακτηρίων και παρατήρησε την ανάπτυξη πράσινης μούχλας.

Η πενικιλίνη στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως ένωση-οδηγός για τη δημιουργία πολλών αντιβακτηριακών. Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το Librium, που οδήγησε στην ανακάλυψη του Valium, το οποίο είναι δέκα φορές πιο δραστικό από την ένωση-οδηγό του.

1.5.1.1 Τυχαίο Screening

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τον έλεγχο ενώσεων ως προς τη δραστηρότητά τους, χωρίς να υπολογίζεται η δομή τους. Μέχρι το 1935 αποτελούσε τη μοναδική προσέγγιση, αλλά λόγω του ότι δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική, χρησιμοποιείται ελάχιστα πλέον.

1.5.1.2 Μη τυχαίο screening

Σε αυτή τη δοκιμασία επιλέγονται ενώσεις με δομικές αναλογίες ως προς μία ένωση με χαμηλή δραστικότητα. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται το κόστος και ο χρόνος διεξαγωγής και δίνεται η δυνατότητα για τροποποίηση και επέκταση του screening.

1.5.1.3 Μελέτη μεταβολιτών

Κατά τη διάρκεια της in vivo διάσπασης ενός φαρμάκου, μελετώνται οι μεταβολίτες του για να διαπιστωθεί αν σε κάποιον από αυτούς οφείλεται η δραστικότητα του φαρμάκου. Για παράδειγμα, το prontosil βρέθηκε ότι βοηθά στην εξουδετέρωση του στρεπτόκοκκου, μόνο όταν μεταβολιζόταν αναγωγικά προς τον μεταβολίτη σουλφανιλαμίδιο.

1.5.1.4 Κλινικές μελέτες

Με τη διενέργεια μελετών και κλινικών δοκιμών σε πειραματόζωα, συχνά γίνεται αντιληπτό ότι μία ένωση μπορεί να έχει παραπάνω από μία φαρμακολογική δράση. Παραδείγματος χάρη, η δραμαμίνη χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση της ναυτίας κατά τη διάρκεια ενός ταξιδιού και ταυτόχρονα βοηθά ως αντισταμινικό κατά των αλλεργιών.

1.5.1.5 Ορθολογικός σχεδιασμός

Αυτή είναι η προσέγγιση που χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον σήμερα. Αρχικά ανιχνεύεται το αίτιο μίας ασθένειας, που δεν είναι πάντα εφικτό. Αφού εντοπιστεί ο λόγος που αναταράχθηκε η ισορροπία, γίνονται προσπάθειες να σχεδιαστούν ενώσεις που να εστιάζουν σε αυτόν.

1.5.2 Ανάπτυξη

1.5.2.1 Ανίχνευση φαρμακοφόρου τμήματος

Επιτρέπει τη δομική επεξεργασία της ένωσης-οδηγού και ως συνέπεια γίνονται πιο αποτελεσματικές οι ιδιότητές της. Για παράδειγμα, αν αφαιρεθεί ο δακτύλιος διυδροφουρανίου και στη συνέχεια το προϊόν υποστεί υδροξυλίωση, προκύπτει η levorphanol, η οποία είναι 3-4

φορές πιο ισχυρή από τη μορφίνη. Η etorphine που έχει έναν επιπλέον υποκαταστάτη από την μορφίνη, είναι 1000 φορές πιο ισχυρή από τη δεύτερη.

1.5.2.2 Τροποποίηση χαρακτηριστικών ομάδων

Υπάρχει μία σχέση μεταξύ της δομής μίας ένωσης και της δραστικότητάς της, καθώς κάθε χαρακτηριστική ομάδα επιφέρει διαφορετικό αποτέλεσμα. Η ακετυλίωση και των δύο ελεύθερων υδροξυλίων της μορφίνης τη μετατρέπει στο ναρκωτικό ηρωίνη.

1.5.2.3 Σχέση δομής-δραστικότητας

Μικρές τροποποιήσεις στη δομή των φαρμάκων επηρεάζουν τη δραστικότητα και την ισχύ τους. Η θεωρία αυτή αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1860 για τα αμμωνιακά άλατα κουραρίου και τις ιδιότητες μυϊκής παράλυσης που κατέχει.

Οι δομικές αλλαγές που μπορούν να διεκπαιρευθούν είναι ομαλοποίηση και διακλάδωση αλυσίδας, τροποποίηση δακτυλίων και βιοϊσοστερισμός.

1.5.3 Πηγές νέων φαρμάκων

Διακρίνονται τέσσερις κατηγορίες πηγών.

1.5.3.1 Φυσικά προϊόντα

Τα φυσικά προϊόντα ανήκουν στις πιο σημαντικές πηγές νέων φαρμάκων. Η πενικιλίνη έδωσε το έναυσμα στους μικροβιολόγους να ψάξουν πολλά χρήσιμα αντιβιοτικά, όπως η νεομυκίνη. Διάφορες τοξίνες που απελευθερώνουν τα ζώα για να προστατεύσουν τον εαυτό τους, αποτελούν επίσης κέντρο μελέτης για την ισχυρή φαρμακολογική δράση τους και γίνονται προσπάθειες απομόνωσής τους από τους ζωντανούς οργανισμούς.

1.5.3.2 Υπάρχοντα φάρμακα

Πραγματοποιείται μελέτη υπαρκτών φαρμάκων για να βελτιωθούν οι ιδιότητές τους, να μειωθούν οι ανεπιθύμητες παρενέργειες, αλλά και για να ελεγχθεί αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άλλη περίπτωση. Τα αντισταμινικά, εκτός από την αντιμετώπιση της αλλεργίας προκαλούν και υπνηλία, γεγονός που οδήγησε σε σύνθεση νέων αντισταμινικών χωρίς αυτή την παρενέργεια, όπως το astemizole.

1.5.3.3 Μοντέλα ασθενειών και screening

Για τις ασθένειες που δεν προκαλούνται από εξωτερικά αίτια π.χ. καρκίνος, αλλεργία, οι δοκιμασίες που γίνονται στοχεύουν εκλεκτικά στον ίδιο τον οργανισμό. Χρησιμοποιούνται πειραματόζωα και παρομοιάζεται η ασθένεια με τα ίδια συμπτώματα. Η προσέγγιση αυτή δεν είναι πάντα ακριβής, αλλά έχει επιφέρει θετικά αποτελέσματα, όπως η ανάπτυξη μη στεροειδών αντιφλεγμονώδων φαρμάκων.

1.5.3.4 Φυσιολογικοί μηχανισμοί

Αποτελεί το μέλλον για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, στηρίζεται στην ανάπτυξη της κυτταρικής βιοχημείας και βιολογίας και στην αντίληψη των μηχανισμών σε μοριακό επίπεδο. Υπάρχουν πέντε κύρια σημεία δραστηριότητας των φαρμάκων: ένζυμα (παράγονται νέα μόρια), υποδοχείς (δρουν ως αγγελιοφόροι), συστήματα μεταφοράς (επιτρέπουν πρόσβαση από και προς το κύτταρο), αναδιπλασιασμός κυττάρων και πρωτεϊνοσύνθεση (DNA,RNA) και θέσεις αποθήκευσης (αποθήκευση μορίων για μελλοντική χρήση, π.χ. αιμοπετάλια).^[7]

1.6 Βασικές έννοιες Φαρμακολογίας

Δραστική ουσία: Το ενεργό συστατικό (π.χ. χημική σύνθεση ή φυσική ένωση) του φαρμάκου, το οποίο έχει φαρμακολογική δράση βάσει του θεραπευτικού αποτελέσματος.

Έκδοχα: Βοηθητικές, φαρμακολογικά αδρανείς ουσίες που συνδράμουν στην κατασκευή, χορήγηση και διατήρηση της δραστικής ουσίας.^[8]

Απορρόφηση: Πρόκειται για το πέρασμα του φαρμάκου από το σημείο χορήγησης στην κυκλοφορία του αίματος. Η ταχύτητα απορρόφησης εξαρτάται από την οδό χορήγησης, τη δόση φαρμάκου, την ικανότητα διάλυσής του κ.α. .

Κατανομή: Ο διασκορπισμός του φαρμάκου στους ιστούς και το όργανο-στόχο, ο οποίος σχετίζεται με την κυκλοφορία του αίματος, τη διαπερατότητα των μεμβρανών και την αποτελεσματική σύνδεση του φαρμάκου με τις πρωτεΐνες του πλάσματος.

Αιματοεγκεφαλικός φραγμός: Ένα προστατευτικό στοιχείο που προφυλάσσει τον εγκέφαλο από βλαβερές και ξένες ουσίες.^[9] Τα μόρια που μπορούν να διασχίσουν το φραγμό είναι μικρά, λιποδιαλυτά και έχουν μικρό ηλεκτρικό φορτίο.^[10]

Μεταβολισμός: Μετασηματισμός φαρμάκου σε μία λιγότερο δραστική μορφή για ευκολότερη απέκκριση. Συνήθως λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, αλλά και σε όργανα όπως τα νεφρά, οι πνεύμονες και ο εντερικός βλεννογόμος.

Απέκκριση: Η έξοδος του φαρμάκου από τον οργανισμό μέσω διαφόρων οργάνων, όπως οι εξωκρινείς αδένες και το ήπαρ.

Διάρκεια δράσης: Ο χρόνος κατά τον οποίο το φάρμακο βρίσκεται σε κάποια συγκέντρωση στο αίμα και έχει θεραπευτική δράση.

Φαρμακευτική αντοχή: Ελαττούμενη ευαισθησία σε κάποια ουσία λόγω συνεχούς λήψης (π.χ. μορφίνη).

Ανεπιθύμητες ενέργειες: Ακούσια γεγονότα που συμβαίνουν κατά τη σωστή λήψη φαρμάκων. Ανάλογα με την ευαισθησία κάθε οργανισμού, διακρίνονται σε ήπια, μέτρια ή σοβαρά, κάποιες φορές είναι προβλέψιμα και μπορεί να βασίζονται στη δοσολογία. Η έλλειψη γνώσης από γιατρό αποτελεί επίσης πιθανό αίτιό τους.

Παρενέργειες: Προσδοκώμενα συμβάντα, ανεξάρτητα της δόσης του φαρμάκου, για τα οποία ο ασθενής ενημερώνεται.

Βιοδιαθεσιμότητα: Η ποσότητα του χορηγούμενου φαρμάκου που φτάνει αναλλοίωτη στη συστηματική κυκλοφορία. Εξαρτάται από την απορρόφηση, δηλαδή την οδό χορήγησης, τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου και το μεταβολισμό.

Βιομετατροπή: Η χημική επεξεργασία των φαρμάκων που διεξάγεται από τον οργανισμό. Τις περισσότερες φορές πραγματοποιείται στο ήπαρ και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας των φαρμάκων στα βιολογικά υγρά και την ομαλή αφαίρεσή τους από τον οργανισμό.

Βιοϊσοδυναμία: Η ομοιότητα ανάμεσα σε ένα προϊόν δοκιμής και το πρωτότυπο, σχετικά με το ρυθμό και την έκταση απορρόφησης της δραστικής ουσίας μετά τη λήψη ίδιας δόσης από τα δύο αυτά φαρμακευτικά σκευάσματα.

Μελέτη βιοϊσοδυναμίας: Κλινική μελέτη αξιολόγησης και σύγκρισης της θεραπευτικής ισοδυναμίας δύο φαρμάκων με την ίδια δόση δραστικής ουσίας. Συγκρίνεται ο ρυθμός και η έκταση απορρόφησης της ουσίας σε υγιείς εθελοντές με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.

Μέση αποτελεσματική δόση (ED₅₀): Η δόση που επιφέρει επιθυμητό φαρμακολογικό αποτέλεσμα στο 50% των ατόμων που ελέγχονται και καθορίζει την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου.

Θεραπευτικός δείκτης: Το πηλίκο της μέσης αποτελεσματικής προς τη μέση θανατηφόρο δράση. Όσο μεγαλύτερος είναι, τόσο πιο ασφαλές είναι το φάρμακο, δηλαδή αποτελεί το όριο ασφάλειας χρήσης κάποιας ουσίας.^[20]

1.7 Προκλινική έρευνα

Είναι το επόμενο βήμα μετά την ανακάλυψη και την ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου. Στη φάση αυτή, εξετάζονται οι φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες του φαρμάκου. Η μελέτη της φαρμακοκινητικής των υπό μελέτη ουσιών, καθορίζει την περαιτέρω ή όχι ανάπτυξή τους. Αυτά υποβάλλονται σε εργαστηριακές δοκιμές και δοκιμές σε ζώα εργαστηρίου, ώστε να προκύψουν δεδομένα που θα υποδεικνύουν αν τα νέα αυτά φάρμακα είναι ασφαλή για χρήση, δηλαδή να εξασφαλιστεί ότι οι δόσεις χορήγησης δεν είναι τοξικές για τον άνθρωπο. Οι δύο τύποι έρευνας που χρησιμοποιούνται για την διαπίστωση της τοξικότητας ενός φαρμάκου πριν δοκιμασθεί σε ανθρώπους, είναι *in vivo* και *in vitro*. Για να εκτιμηθεί επιτυχώς ένα νέο σκεύασμα, είναι απαραίτητο να υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες, εργαλεία τεχνολογίας και στοιχεία από προηγούμενες μελέτες ανάπτυξης φαρμάκων.^{[20][21]}

1.8 Κλινική έρευνα

Αναφέρεται σε μελέτες ή δοκιμές που γίνονται σε ανθρώπους για τη διαλεύκανση των τρόπων αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με τον ανθρώπινο οργανισμό. Μερικές φορές, προκαλούνται τοξικά φαινόμενα στις κλινικές μελέτες, που ίσως δεν είχαν σοβαρές συνέπειες σε προκλινικό στάδιο. Αυτό συμβαίνει, διότι οι επιδράσεις κάθε ουσίας είναι διαφορετικές στον άνθρωπο από ότι σε πειραματόζωα. Στις πιθανές παρενέργειες συγκαταλέγονται ο ίλιγγος, οι διαταραχές λόγου κ.α. . Για το λόγο αυτό χρειάζεται η διεξαγωγή του βήματος αυτού.^{[20][21]}

Για να ξεκινήσει η κλινική έρευνα, η βιομηχανία θα πρέπει να υποβάλλει αίτηση στον FDA και να εγκριθεί. Στην αίτηση πρέπει να περιλαμβάνονται δεδομένα μελέτης σε ζώα και δεδομένα τοξικότητας, πληροφορίες για την παρασκευή, κλινικά πρωτόκολλα για τις μελέτες που θα πραγματοποιηθούν, δεδομένα από προηγούμενες έρευνες σε ανθρώπους και πληροφορίες για τον ερευνητή. Στη συνέχεια διεξάγονται κλινικές δοκιμές από τους ερευνητές, οι οποίες ακολουθούν μία τυπική σειρά από φάσεις.^[20]

1.8.1 Φάση 1

Στην πρώτη φάση συμμετέχουν 20-100 υγιή άτομα, στους οποίους χορηγείται μία σχετικά μικρή δόση του φαρμάκου. Διαρκεί για αρκετούς μήνες, με στόχο τον καθορισμό μίας ασφαλούς δοσολογίας και τον προσδιορισμό ανεπιθύμητων ενεργειών. Μελετάται η συγκέντρωση της ουσίας στο αίμα από διαφορετικές οδούς χορήγησης, η κατανομή της στους ιστούς, η απέκκρισή της και σημειώνεται οποιαδήποτε επίδραση έχει στον άνθρωπο. Παράλληλα, ανακτούνται πληροφορίες σχετικά με τις επιπτώσεις αυξανόμενης δοσολογίας και τη μέγιστη δόση που μπορεί να ανεχθεί το σώμα. Περίπου το 70% των εξεταζόμενων φαρμάκων συνεχίζουν στο επόμενο βήμα.^{[20][21]}

1.8.2 Φάση 2

Σε αυτό το στάδιο, το φάρμακο χορηγείται σε μερικές εκατοντάδες ασθενών που πάσχουν από τη νόσο για την οποία αναπτύσσεται το φάρμακο. Μπορεί να διαρκέσει από αρκετούς μήνες έως δύο χρόνια και εξετάζονται οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες του φαρμάκου, η απορρόφησή του, η κατανομή του και η απέκκρισή του. Κάποιες από αυτές διαφέρουν σε σύγκριση με τους ασθενείς της πρώτης φάσης. Το φάρμακο παρομοιάζεται με ένα εικονικό (placebo), ή με ένα φάρμακο αναφοράς που κυκλοφορεί ήδη στην φαρμακευτική αγορά και έτσι καθορίζεται η κατάλληλη δοσολογία χορήγησής του για μέγιστη αποτελεσματικότητα και όσο το δυνατόν λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Μόνο το 30% των εξεταζόμενων φαρμάκων περνούν στην τρίτη φάση, γιατί σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζονται σοβαρές παρενέργειες, μικρή αποτελεσματικότητα, μεγάλο κόστος παραγωγής του φαρμάκου, ή συνδυασμός των παραπάνω λόγων.^{[20][21]}

1.8.3 Φάση 3

Τα φάρμακα που αποφασίζεται από τις φαρμακευτικές εταιρίες να αναπτυχθούν λόγω θετικών αποτελεσμάτων από την προηγούμενη φάση, χορηγούνται σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών (300 έως 3000) και η διαδικασία διαρκεί από ένα έως τέσσερα χρόνια. Οι μελέτες σε αυτό το βήμα παρέχουν τις περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα δεδομένα ασφάλειας, διότι υπάρχει μεγάλος αριθμός συμμετεχόντων και έτσι ανακαλύπτονται λιγότερο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες. Επιπρόσθετα, μελετάται η αποτελεσματικότητα της ουσίας σε μία συγκεκριμένη πάθηση και η ανεκτικότητα της. Οι αδυναμίες αυτής της κλινικής δοκιμής είναι το υψηλό κόστος, η μεγάλη διάρκεια και το σύννηθες φαινόμενο πρόωρης απόσυρσης των συμμετεχόντων από τη μελέτη. Στο τέλος της τρίτης φάσης και εφόσον το εξεταζόμενο φάρμακο

έχει θετικά αποτελέσματα, κατατίθεται ολοκληρωμένος φάκελος σχετικά με το φάρμακο στις αρμόδιες αρχές υγείας, ώστε το φάρμακο να αποκτήσει άδεια κυκλοφορίας στην αγορά. Περίπου το 25-30% των υπό δοκιμή φαρμάκων περνούν στο επόμενο στάδιο.^{[20][21]}

1.8.4 Φάση 4

Οι δοκιμές αυτής της φάσης γίνονται σε αρκετές χιλιάδες εθελοντές, όπου γίνεται έλεγχος ασφάλειας μετά τη διάθεση και κυκλοφορία του φαρμάκου στην αγορά. Ο ιατρικός κύκλος εξοικειώνεται με το σκεύασμα και διαδίδεται η χρήση του περισσότερο στην καθημερινή πράξη, με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι πωλήσεις του. Ακόμα, εξάγονται παραπάνω δεδομένα για την ασφάλεια και αποτελεσματικότητά του και ίσως παρατηρηθούν επιπλέον δράσεις.^{[20][21]}

1.9 Χορήγηση φαρμάκων

Οι οδοί χορήγησης κάθε φαρμάκου εξαρτώνται από τις φαρμακευτικές ιδιότητές του και τα ζητούμενα θεραπευτικά αποτελέσματα. Για την επιλογή του καταλληλότερου ιδιοσκευάσματος, πρέπει να αναλογιστούν η ταχύτητα εμφάνισης φαρμακολογικού αποτελέσματος και η συνολική διάρκεια δράσης. Γενικά προτιμώνται οι ανώδυνοι τρόποι χορήγησης. Η πιο κοινή οδός χορήγησης είναι το πεπτικό σύστημα, αποσκοπώντας στην εντερική απορρόφηση ή στην απευθείας είσοδο στην κυκλοφορία του αίματος, ή στον βλεννογόνο του ορθού. Η παρεντερική οδός αφορά κατά βάση την ενδομυϊκή, ενδοφλέβια και υποδόρια ένεση, όπως και την τοπική εφαρμογή φαρμάκου στο δέρμα. Η χορήγηση από το πεπτικό σύστημα είναι γενικά ανώδυνη και εύκολη. Ο ρυθμός απορρόφησης μεταβάλλεται ανάλογα με τη φαρμακοτεχνική μορφή και λόγω του μεταβλητού pH κατά μήκος της πεπτικής οδού, το περιβάλλον είναι κατάλληλο για την απορρόφηση σχεδόν όλων των φαρμάκων. Ο ταχύτερος ρυθμός απορρόφησης είναι 20-30 λεπτά μετά την χορήγηση, οπότε μπορεί να γίνει παρέμβαση αν χρειαστεί. Ωστόσο, ουσίες όπως η αδρεναλίνη και η ισταμίνη διασπώνται από τα πεπτικά υγρά, ενώ σε άλλες περιπτώσεις αδρανοποιούνται από ένζυμα της μικροβιακής χλωρίδας, του εντερικού επιθηλίου και του ήπατος. Επιπλέον, η τροφή ίσως μειώσει το ρυθμό απορρόφησης και η ταυτόχρονη χορήγηση με άλλα φάρμακα μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της απορρόφησης.^[24]

1.9.1 Στοματική οδός

Είναι η συχνότερη οδός χορήγησης και η απορρόφηση των φαρμάκων γίνεται στο στομάχι και το λεπτό έντερο. Στο τελευταίο, η ποσότητα της φαρμακευτικής ουσίας που απορροφά το επιθήλιο του εντέρου επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου. Επιπλέον, σημαντικός είναι ο έλεγχος του μεταβολισμού στο ήπαρ, καθώς έτσι μειώνεται η συγκέντρωση του φαρμάκου πριν φτάσει στην κυκλοφορία του αίματος. Τα σκευάσματα είναι στερεής ή υγρής μορφής. Οι ταμπλέτες επικαλύπτονται από επιφάνειες ώστε να μην απορροφηθεί η δραστική ουσία πριν φτάσει στο στομάχι και για αυτό το λόγο δεν πρέπει να συνθλίβονται ή να μασιούνται στο στόμα. Τα υγρά λαμβάνονται είτε από κύπελλο είτε μέσω πλαστικής σύριγγας στα ούλα.

1.9.2 Υπογλώσσια χορήγηση

Σε αυτήν την περίπτωση, το φάρμακο απορροφάται πιο γρήγορα, διότι στην περιοχή βρίσκονται πολλά αιμοφόρα αγγεία. Υφίσταται μία παθητική διάχυση διαμέσω του φλεβικού αίματος στη στοματική κοιλότητα και έτσι παρακάμπτεται την ηπατική φλεβική πύλη και ρέει στην ανώτερη κοίλη φλέβα.

1.9.3 Υπόθετα

Τοποθετούνται στο ορθό και απορροφώνται αποτελεσματικά από τις κάτω αιμορροϊδικές φλέβες. Όπως και τα υπογλώσσια φάρμακα, αποφεύγουν το φαινόμενο της αρχικής διάβασης και υπόκεινται σε παθητική διάχυση. Μόνο το μισό περίπου του χορηγούμενου φαρμάκου φτάνει από το ορθό στο ήπαρ.^[12]

1.9.4 Ενδοδερμική χορήγηση

Παρέχει τη δυνατότητα να χορηγηθούν πιο εύκολα, μικρά μόρια, βιολογικά φάρμακα και εμβόλια, επιτρέποντας βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος έχει περιορισμένη χρήση, καθώς υπάρχουν τεχνικά προβλήματα στην εκτέλεση των ενέσεων που απαιτούν ειδική εκπαίδευση. Στα πλεονεκτήματα συμπεριλαμβάνονται επίσης το χαμηλότερο κόστος σε σχέση με άλλες οδούς και οι μικρότερες απαιτούμενες δοσολογίες.^[13]

1.9.5 Υποδόρια χορήγηση

Η χορήγηση γίνεται στην ενδιάμεση περιοχή, κάτω από το χόριο του δέρματος. Οι ενέσεις γίνονται στην εξωτερική επιφάνεια του κάτω βραχίονα, στην πρόσθια επιφάνεια του μηρού, στο κατώτερο τμήμα της κοιλιάς και την πλάτη. Οι ποσότητες φαρμάκων είναι στα 1-2 mL. Χρησιμοποιείται συνήθως για την παράκαμψη της χαμηλής στοματικής βιοδιαθεσιμότητας, όταν δεν είναι ανεκτή η δοσολογία μέσω στόματος και σε μερικές περιπτώσεις για να τροποποιήσει ή να επεκτείνει τα χαρακτηριστικά απελευθέρωσης, ώστε να επεκταθεί η συστηματική έκθεση.^[14]

1.9.6 Ενδομυϊκή χορήγηση

Οι ενδομυϊκές ενέσεις πραγματοποιούνται με βελόνα που διαπερνά το δέρμα και το υποδόριο στρώμα λίπους και φτάνει στον υποκείμενο σκελετικό μυ. Σύμφωνα με μελέτες, τα ενδομυϊκώς χορηγούμενα φάρμακα φτάνουν κατά κύριο λόγο στην εξωκυττάρια μήτρα (δέσμες μυϊκών ινών καλυπτόμενες με πρωτεϊνικό υλικό) και όχι μέσα στα μυϊκά κύτταρα. Οι μυϊκοί ιστοί έχουν ελάχιστες νευρικές απολήξεις και πολλά αγγεία, οπότε η οδός αυτή χρησιμοποιείται για φάρμακα που ερεθίζουν και γρήγορη απορρόφηση. Αντίθετα, δεν ενδείκνυται σε αιμορροφιλικούς και δε συνδυάζεται με αντιπηκτική θεραπεία.^[15]

1.9.7 Ενδοφλέβια χορήγηση

Είναι η ταχύτερη και συνηθέστερη παρεντερική οδός χορήγησης φαρμάκων και παρακάμπτει το μεταβολισμό πρώτης διόδου στο ήπαρ. Η απορρόφηση του φαρμάκου είναι ταχεία και μπορούν να εισαχθούν μεγάλες ποσότητες. Ενώ η δράση του φαρμάκου είναι άμεση, πρόκειται για την πιο επικίνδυνη οδό. Προβλήματα που ίσως προκύψουν είναι υπερευαισθησία, μικροβιακή μόλυνση, αιωρούμενα σωματίδια και λάθος τεχνική στην ένεση.^{[16][18]}

1.9.8 Ενδορρινική χορήγηση

Σε γενικό πλαίσιο, οι κύριοι στόχοι για ενδορρινική χορήγηση είναι φαρμακολογικά δραστικές ενώσεις με χαμηλή σταθερότητα στα γαστροεντερικά υγρά, χαμηλή εντερική απορρόφηση και έντονο μεταβολισμό πρώτης διόδου στο ήπαρ, όπως τα πεπτίδια. Αποφεύγοντας τον ηπατικό και γαστροεντερικό μεταβολισμό, ενισχύεται η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου. Επίσης, επιτυγχάνεται η προσπέραση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, επιτρέποντας σε φάρμακα να δράσουν απευθείας στο κεντρικό νευρικό σύστημα.^[17]

1.9.9 Εισπνεόμενα φάρμακα

Τα φάρμακα αυτά μεταφέρονται με την αναπνοή απευθείας στους πνεύμονες και συνδράμουν στην ίαση χρόνιων πνευμονικών ασθενειών.^[19] Αρχικά, μεταφέρονται στο επιθήλιο της αναπνευστικής οδού και μέσω της πνευμονικής φλέβας καταλήγουν στην κυκλοφορία του αίματος, όπου παρακάμπτουν το μεταβολισμό πρώτης διόδου. Το μέγεθος των εισπνεόμενων σωματιδίων κυμαίνεται από 1 έως 10μm. Η αποτελεσματικότητα της οδού αυτής εξαρτάται από το μέγεθος και τη μορφολογία των σωματιδίων του φαρμάκου, αλλά και από την αναπνευστική φυσιολογία του ασθενούς.^[11]

1.10 Φαρμακοτεχνικές μορφές

Τα περισσότερα φάρμακα είναι μίγματα δραστικών συστατικών και αδρανών εκδόχων, τα οποία ονομάζονται φαρμακοτεχνικά σκευάσματα. Το ίδιο δραστικό συστατικό μπορεί να βρεθεί σε πολλές εμπορικές μορφές, που ονομάζονται ιδιοσκευάσματα.^[24] Οι πιο κοινές φαρμακοτεχνικές μορφές είναι οι παρακάτω:

Εκχυλίσματα. Είναι το αποτέλεσμα ανάμειξης μίας δρόγης με ένα διαλύτη. Στη συνέχεια το μίγμα διηθείται και παραλαμβάνεται το εκχύλισμα. Μία τεχνική εκχύλισης είναι με τη συσκευή Soxhlet, χρησιμοποιώντας θερμό οργανικό διαλύτη. Το εκχύλισμα συμπυκνώνεται και προκύπτει ένα παχύρρευστο υγρό ή στερεό υπόλειμμα.

Βάμματα. Πρόκειται για υγρά διαλύματα, συνήθως αλκοολικά, η σύνθεση των οποίων γίνεται από φυτικές ή χημικές ουσίες. Είναι αραιά διαλύματα και έχουν μικρή περιεκτικότητα σε δραστικά συστατικά. Τα πυκνότερα ονομάζονται ρώδη εκχυλίσματα.

Σιρόπια. Είναι παχύρρευστα, πόσιμα διαλύματα σακχάρου με μικρή ή καθόλου ποσότητα αλκοόλης. Περιέχουν κοινή ζάχαρη ή και τεχνητές γλυκαντικές ύλες. Τα πιο γνωστά φάρμακα σε αυτή τη μορφή είναι τα αντιβηχικά και τα αντιισταμινικά. Άλλα πιθανά πρόσθετα είναι σταθεροποιητές, βελτιωτικά οσμής και γεύσης και χρωστικές ουσίες. Ένας τρόπος παρασκευής σιροπιών είναι με διάλυση υπό θέρμανση.

Εναιωρήματα. Περιέχουν μία ή περισσότερες στερεές φαρμακευτικές ουσίες, με τη μορφή μικρών σωματιδίων μέσα σε ένα υγρό έκδοχο. Ο σχηματισμός της στερεής φάσης γίνεται με καθίζηση ή διασπορά.

Γαλακτώματα. Είναι ετερογενή συστήματα αποτελούμενα από δύο μη αναμίξιμες υγρές φάσεις. Ελαιώδη προϊόντα έχουν καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα με τη μορφή γαλακτώματος, γιατί απλώνονται πιο εύκολα στο δέρμα και εμφανίζουν μεγαλύτερη διεισδυτικότητα.

Οφθαλμικά σκευάσματα. Είναι αποστειρωμένα προϊόντα που χορηγούνται στον οφθαλμό αναισθησία, μυδρίαση κλπ. Τα οφθαλμικά σκευάσματα έχουν διάφορες μορφές, όπως αλοιφές, υδατικά ή ελαϊκά διαλύματα (κολλύρια) και εναιωρήματα.

Αλοιφές. Πρόκειται για ημιστερεά σκευάσματα που απλώνονται στο δέρμα με επάλειψη ή εντριβή. Μπορεί να περιέχουν δραστικές ουσίες ή να χρησιμοποιούνται σαν μαλακτικά και προστατευτικά του δέρματος.

Κρέμες. Ημιστερεά γαλακτώματα συνήθως ελαίου σε νερό. Κατά την επάλειψή τους στο δέρμα το νερό εξατμίζεται και δημιουργείται μία ημιπερατή μεμβράνη. Χρησιμοποιούνται ως μαλακτικά και καθαριστικά, αλλά και ως βάσεις φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Υπόθετα. Έχουν στερεή ή μαλακή σύσταση, με μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες και αδρανή υλικά που τήκονται στη θερμοκρασία του σώματος. Προορίζονται για τοπική δράση, όπως αντιβιοτικά και τοπικά αναισθητικά, ή για γενική, π.χ. ηρεμιστικά και αγγειοσυσταλτικά.

Δισκία. Είναι στερεά σκευάσματα διαφόρων σχημάτων, και προκύπτουν από τη συμπίεση μιγμάτων σκονών ή κόκκων. Περιέχουν έκδοχα, αναγκαία για την παρασκευή και αποσάρθρωση των δισκίων και τα οποία τους παρέχουν ιδιότητες όπως σταθερότητα και επιθυμητό ρυθμό αποδέσμευσης του φαρμάκου.

Κάψουλες. Είναι στερεής μορφής και το φάρμακο βρίσκεται σε ένα διαλυτό περίβλημα ζελατίνης. Η χορήγηση γίνεται από το στόμα ή το ορθό. Διακρίνονται σε ένθετες και σφαιροειδείς. Σε μικροσκοπικό μέγεθος ονομάζονται μικροκάψουλες, όπου η δραστική ουσία περιβάλλεται από ένα πολυμερές.^[25]

1.11 Φαρμακοκινητική (ADME/ADMET)

Ο σκοπός της φαρμακοκινητικής είναι να μελετήσει τη χρονική πορεία των συγκεντρώσεων των φαρμάκων και των μεταβολιτών σε βιολογικά υγρά, ιστούς και απεκκρίματα και να κατασκευάσει κατάλληλα μοντέλα για την ερμηνεία αυτών των δεδομένων. Στη συνέχεια, αυτά αναλύονται χρησιμοποιώντας μία μαθηματική αναπαράσταση ενός ολόκληρου οργανισμού ή μέρος αυτού. Με τον τρόπο αυτό προβλέπονται τα αποτελέσματα μελλοντικών πειραμάτων, τα οποία θα ήταν χρονοβόρα ή υψηλού κόστους.^[22] Στη φαρμακοκινητική συμπεριλαμβάνονται η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός, η απέκκριση και η τοξικότητα (ADMET).^[23]

1.11.1 Απορρόφηση

Η μελέτη του ρυθμού απορρόφησης των φαρμάκων είναι καίριας σημασίας, καθώς γρηγορότερη απορρόφηση οδηγεί σε ταχύτερη έναρξη του φαρμακολογικού αποτελέσματος, μία απαραίτητη προϋπόθεση για τη θεραπεία οξείων παθήσεων και επειγουσών καταστάσεων. Ωστόσο η γρήγορη απορρόφηση δεν είναι πάντα επιθυμητή. Όταν γίνονται πολλαπλές χορηγήσεις φαρμάκων για την καταπολέμηση χρόνιων ασθενειών, όπως υπέρταση ή διαβήτης, είναι καταλληλότερη η χρήση φαρμακευτικών προϊόντων με βραδύτερο ρυθμό απορρόφησης, διότι έτσι υπάρχουν μικρές διακυμάνσεις στη συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα και το θεραπευτικό αποτέλεσμα παραμένει σταθερό.^[23]

Ανεξάρτητα από την οδό χορήγησης, η είσοδος του φαρμάκου στην κυκλοφορία και η αποχώρησή του από τον οργανισμό, εξαρτώνται από τη διέλευση διαφόρων φραγμών, κυρίως βιολογικών μεμβρανών. Οι μηχανισμοί διάβασης των μεμβρανών διακρίνονται σε ενεργητικούς και παθητικούς. Στους πρώτους ανήκουν η διευκολυνόμενη διάχυση, η ενεργητική μεταφορά και η ενδοκύττωση. Η διευκολυνόμενη διάχυση αφορά κυρίως υδατάνθρακες και αμινοξέα, καθώς και φάρμακα που έχουν ως βάση αυτά. Η ενεργητική μεταφορά απαιτεί ενέργεια. Για την υλοποίησή της χρειάζεται η ύπαρξη λιποδιαλυτού μορίου στη μεμβράνη, που δρα ως φορέας και ως υποδοχέας για το φάρμακο. Αφού φτάσει στην εσωτερική επιφάνεια του κυττάρου, ο ελεύθερος φορέας επιστρέφει στην εξωτερική επιφάνεια για να παραλάβει νέο μόριο φαρμάκου. Η ενδοκύττωση είναι πολύπλοκος μηχανισμός που επίσης απαιτεί ενέργεια και συμμετέχει πρωτίστως στην απορρόφηση πρωτεϊνικών μορίων.

Στους παθητικούς μηχανισμούς ανήκουν η διήθηση και η διάχυση. Οι βιολογικές μεμβράνες έχουν χαρακτηριστικά βασικής λιπιδικής δομής, όπου συνυπάρχουν πόροι με υδρόφιλο τοίχωμα. Κατά τη διήθηση, πραγματοποιείται διέλευση των υδατοδιαλυτών ουσιών μέσα από τους πόρους, λόγω υδροστατικής ή οσμωτικής πίεσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το τοίχωμα του νεφρικού σπειράματος, το οποίο περνούν το νερό, η ουρία, η λευκωματίνη (εν μέρει) και πολλά φάρμακα. Σε ιστούς με μεγάλη διάθεση νερού, το νερό μεταφέρεται μέσω ειδικών πόρων, τις υδροπορίνες. Η διάχυση είναι ο συνηθέστερος τρόπος κυκλοφορίας μορίων μέσω κυτταρικών μεμβρανών και δεν απαιτεί ενέργεια. Ακολουθεί το νόμο του Fick:

$$D = K \frac{A (C_1 - C_2)}{d}$$

όπου:

- D = ο βαθμός διάχυσης
- A = η επιφάνεια της μεμβράνης που συμμετέχει στη διάχυση
- $C_1 - C_2$ = η διαφορά συγκέντρωσης της ουσίας στα από τη μεμβράνη οριζόμενα διαμερίσματα
- d = το πάχος της μεμβράνης

Εικόνα 1: Νόμος του Fick

Η σταθερά διάχυσης της ουσίας (K) εξαρτάται από το μοριακό βάρος, τη μοριακή δομή, τη λιποδιαλυτότητα και το βαθμό ιονισμού.^[24]

1.11.2 Κατανομή

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη συστηματική δράση ενός φαρμάκου είναι να εισέλθει αρχικά στο αίμα. Μέσα από την υδάτινη φάση του πλάσματος του αίματος φτάνει στους ιστούς, με ταχύτητα ανάλογη το κάθε όργανο και την ευκολία του φαρμάκου να διαπεράσει το τοίχωμα των τριχοειδών και τις πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων. Στους ιστούς δρα μόνο ένα μικρό ποσοστό του φαρμάκου που αρχικά χορηγήθηκε στον οργανισμό. Το υπόλοιπο διαλύεται σε λιπώδη ιστό ή παραμένει στα διαμερίσματα υγρών του οργανισμού, το ενδοκυττάριο, το μεσοκυττάριο και το ενδαγγειακό. Ο όρος <<κατανομή>> σημαίνει καταμερισμός του φαρμάκου σε αυτά τα διαμερίσματα και διακρίνεται σε πρωτογενή και δευτερογενή. Η πρώτη αναφέρεται στη μεταφορά του φαρμάκου στα όργανα μέσω του αίματος και η δεύτερη στο ποσό του φαρμάκου που ανακατανέμεται στα διάφορα όργανα, λόγω χημικής συγγένειας προς τους ιστούς.

Το ποσό του φαρμάκου που συνδέεται με πρωτεΐνες έχει αξιοσημείωτη επίδραση στην κατανομή, καθώς αναστέλλει την έξοδο του φαρμάκου από τον ενδαγγειακό στον μεσοκυττάριο χώρο. Άλλος σημαντικός παράγοντας είναι η υφή των οργάνων, αν δηλαδή έχουν μεγάλη ή μικρή διαβατότητα. Η επέκταση της κατανομής του φαρμάκου στα διάφορα διαμερίσματα υγρών εξαρτάται και από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μορίου του φαρμάκου. Ο όγκος αυτός των υγρών που έχει διανεμηθεί το φάρμακο ονομάζεται φαινομενικός όγκος κατανομής (V_d). Ο υπολογισμός του σε μία ενδοφλέβια χορήγηση με γνωστή ποσότητα φαρμάκου μπορεί να γίνει λαμβάνοντας δείγματα αίματος για τη μέτρηση της πυκνότητας του φαρμάκου.

| | |
|---------------------|---|
| $V_d = \frac{X}{c}$ | <p>όπου:</p> <ul style="list-style-type: none">• x = το ποσό της ουσίας που χορηγήθηκε, και• c = η πυκνότητα στο αίμα μετά την κατανομή στον οργανισμό |
|---------------------|---|

Εικόνα 2: Υπολογισμός φαινομενικού όγκου κατανομής

Ο παραπάνω τύπος ισχύει σε ιδανικές συνθήκες κατανομής, κάτι που δεν αφορά την πλειονότητα των φαρμάκων, καθώς συνδέονται με πρωτεΐνες του οργανισμού, αποθηκεύονται σε διάφορους ιστούς, μεταβολίζονται και απεκκρίνονται. Αυτό σημαίνει ότι ο όγκος κατανομής εκτιμάται και δεν υπολογίζεται ακριβώς.

Η σύνδεση με τις πρωτεΐνες γίνεται στον ενδαγγειακό χώρο και οι λευκωματίνες του πλάσματος αποτελούν περίπου το 50% του συνολικού ποσού αυτών των πρωτεϊνών. Στο pH του αίματος (7,4) κυριαρχούν σε μεγάλο αριθμό τα αρνητικά φορτία του μορίου της λευκωματίνης, αλλά είναι ελάχιστα τα μόρια του φαρμάκου που συνδέονται με τις πρωτεΐνες. Οι δυνάμεις που δημιουργούνται μεταξύ τους έχουν παρόμοιο χαρακτήρα με τις δυνάμεις VanderWaals και τη γέφυρα υδρογόνου και η σύνδεση μπορεί να αναστραφεί αν δεν μεταβληθεί η τριτοταγής δομή του πρωτεϊνικού μορίου.

Αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου έχει ως αποτέλεσμα μέγιστη σύνδεση με το φάρμακο. Αυτό είναι αποτέλεσμα της χημικής συγγένειας ανάμεσα στις πρωτεΐνες και το φάρμακο, διότι όταν είναι πολύ μεγάλη, το συνολικό ποσό φαρμάκου που υπάρχει στο αίμα συνδέεται με τις πρωτεΐνες. Η σύνδεση αυτή επιφέρει διευκόλυνση στην απορρόφηση φαρμάκων με διάχυση, ενδεχόμενη αλληλεπίδραση φαρμάκων και ενδογενών ουσιών, μεταβολή στη δευτερογενή κατανομή στους ιστούς και στην αφαίρεση του φαρμάκου από τον οργανισμό (πιθανός κίνδυνος τοξικότητας).^[24]

1.11.3 Μεταβολισμός

Υπάρχουν διάφορα ενζυμικά συστήματα στον ανθρώπινο οργανισμό για τον εκτοπισμό ξένων ως προς το διάμεσο μεταβολισμό ουσιών. Σε αυτές ανήκουν και τα φάρμακα, διότι δεν αποτελούν μέρος του μεταβολισμού των κυττάρων για να παράξουν ενέργεια.

Το ήπαρ αποτελεί το βασικότερο σημείο μεταβολισμού των φαρμάκων. Άλλοι σημαντικοί ιστοί είναι ο εντερικός βλεννογόνο, οι νεφροί, οι πνεύμονες, το δέρμα, ο πλακούντας και το αίμα. Με το πέρας του μεταβολισμού, τα παράγωγα γίνονται πιο υδατοδιαλυτά, λόγω περισσότερων ιονιζόμενων μονάδων στο μόριό τους. Ως αποτέλεσμα, οι μεταβολίτες διαχέονται μόνο ενεργητικά και δεν επαναροφώνται από το πρόουρο.

Ο βιομετασχηματισμός ενός φαρμάκου μπορεί να γίνει με τέσσερις τρόπους:

A) Μετατροπή ενεργού φαρμάκου σε αδρανή προϊόντα, π.χ. φαινοβαρβιτάλη → αδρανής υδροξυ-βαρβιτάλη.

B) Μετατροπή ενεργού φαρμάκου σε ενεργό μεταβολίτη, π.χ. ακετυλοσαλικυλικό οξύ → σαλικυλικό οξύ.

Γ) Μετατροπή ανενεργού φαρμάκου σε ενεργό μεταβολίτη, π.χ. κυκλοφωσφαμίδη → ακρολεΐνη.

Δ) Μετατροπή ενεργού φαρμάκου σε τοξικό μεταβολίτη, π.χ. παρακεταμόλη σε υψηλές δόσεις → N-υδροξυαμιδο-ακεταμινοφαίνη → ηπατοτοξική ενδιάμεση ένωση.

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος στη βιομετατροπή των φαρμάκων χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- i. Οξειδώσεις, αναγωγές και υδρολύσεις (Φάση 1)
- ii. Συζεύξεις ή συνθετικές αντιδράσεις (Φάση 2)

Οι βασικότερες αντιδράσεις οξείδωσης και σύζευξης γίνονται στα μικροσωμάτια των ηπατικών κυττάρων, κυρίως λόγω της λιπιδικής φύσεώς τους, με αποτέλεσμα να εγκλωβίζονται οι λιποδιαλυτές ουσίες κατά τη διέλευσή τους από το ήπαρ. Πολλές αντιδράσεις επιτελούνται επίσης στο ηπατικό κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια, τον πυρήνα και τα λυσοσωμάτια.

Ο μεταβολισμός των φαρμάκων μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες. Η χημική δομή ορίζει την πιθανότερη μεταβολική οδό, την ταχύτητα αδρανοποίησης και αποβολής. Σημαντικό ρόλο έχουν και η δόση και συχνότητα χορήγησης, η οδός χορήγησης, ατομικοί παράγοντες, όπως ασθένειες και ηλικία και περιβαλλοντικοί παράγοντες, π.χ. ποιότητα τροφής και επιβάρυνση του οργανισμού με ξένες ουσίες.

Ανεπάρκεια του ήπατος οδηγεί σε ελαττούμενη πρωτεϊνοσύνθεση (ένζυμα) και άρα μειωμένο μεταβολισμό φαρμάκων. Για να πραγματοποιηθεί μία ενζυμική αντίδραση θα πρέπει να συνδεθεί το ένζυμο με το υπόστρωμα. Πρόκειται για «συναγωνιστική αναστολή», όταν ο παράγοντας που μειώνει το ρυθμό της αντίδρασης είναι μία ουσία που αποτελεί η ίδια υπόστρωμα της αντίδρασης (π.χ. η μεταχολίνη ανταγωνίζεται την ακετυλχολίνη για το ενεργό κέντρο της χολινεστεράσης) ή συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου λόγω χημικής δομής, χωρίς να μεταβολίζεται από αυτό (π.χ. η αμφεταμίνη συνδέεται με τη μονοαμινοξειδάση, χωρίς να μεταβολίζεται από αυτήν.) Μεγάλη συγκέντρωση υποστρώματος απομακρύνει τον αναστολέα, σύμφωνα με το νόμο δράσης των μαζών. Σε κάποιες περιπτώσεις, όπως τα βαρέα μέταλλα και τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, ο αναστολέας δεν έχει κοινά χαρακτηριστικά με το υπόστρωμα, επομένως η σύνδεση με το ενζυμικό μόριο δε λαμβάνει χώρα στο ενεργό κέντρο. Πρόκειται για «μη συναγωνιστική αναστολή» και για να αποκατασταθεί η ενζυμική δραστηριότητα, είναι απαραίτητη η σύνθεση νέας ενζυμικής πρωτεΐνης.

Για να ξεκινήσει η ενζυμική δραστηριότητα, το υπόστρωμα θα πρέπει να φτάσει στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η ρευστότητα και άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες της μεμβράνης των μικροσωμάτων τροποποιούνται από ουσίες που επηρεάζουν το μεταβολισμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η προαδιφαίνη που αναβάλλει τις περισσότερες καταλυόμενες αντιδράσεις από τα μικροσωμιακά ένζυμα.

Υπάρχουν φάρμακα που προκαλούν την επαγωγή ενζύμων στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενζυμική δραστηριότητα. Σημαντικοί επαγωγείς είναι η φαινοβαρβιτάλη και οι καρκινογόνοι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες, όπως το βενζοπυρένιο που προκαλεί αύξηση του κυτοχρώματος P-450 και συνεπώς επιταχύνει τις αντιδράσεις

υδροξυλίωσης. Όταν σταματήσει να χορηγείται ο επαγωγέας, τα ενζυμικά επίπεδα επιστρέφουν στις φυσιολογικές τιμές τους σε διάστημα 3-4 ημερών. Εξαιρεση αποτελούν οι πολύ λιποδιαλυτές ουσίες σαν το εντομοκτόνο DDT, διότι μικρά ποσά του απελευθερώνονται στο αίμα και η επίδρασή του διαρκεί για εβδομάδες. Επιπλέον, η επαγωγή μικροσωματικών ενζύμων επιφέρει αλλαγές στην αποτελεσματικότητα ή τοξικότητα ενός φαρμάκου όταν αυτή βασίζεται στη δημιουργία ενός μεταβολίτη.

Ο μεταβολισμός μπορεί επίσης να επηρεαστεί από περιβαλλοντικές ουσίες όπως η αιθανόλη, που προσδίδει αντοχή σε αντιδιαβητικά και ηρεμιστικά φάρμακα και διάφοροι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες που περιέχονται στα τσιγάρα, οι οποίοι προκαλούν την έκφραση των ενζύμων υδροξυλίωσης του πλακούντα.

Όπως αναφέρθηκε, στη μεταβολική φάση 1 περιλαμβάνονται οι αντιδράσεις υδρόλυσης, οξειδωσης και αναγωγής. Με τις αντιδράσεις αυτές αυξάνεται η υδροφιλικότητα του φαρμάκου με την εισχώρηση πολικών ομάδων στο μόριό του, οι οποίες είναι κατά βάση τα σημεία δράσης της μεταβολικής φάσης 2. Οι συνηθέστεροι καταλύτες για τις αντιδράσεις υδρόλυσης είναι οι εστεράσες των καρβοξυλίων, οι πεπτιδάσες και οι υδρολάσες των εποξειδίων. Πολλά μέταλλα και φάρμακα με αλδεϋδικές, κετονικές, δισουλφδικές, σουλφοξειδικές, κινονικές, αζω- και νιτρο-ομάδες συχνά ανάγονται *in vitro*. Κάποιες από αυτές τις ομάδες μπορούν και να οξειδωθούν, όπως οι αλδεϋδες που ανάγονται σε αλκοόλες και οξειδώνονται σε καρβοξυλικά οξέα. Οι αλκοόλες, αλδεϋδες και κετόνες οξειδώνονται και ανάγονται από ένζυμα στα οποία συμπεριλαμβάνονται η αλκοολική και η αλδεϋδική αφυδρογονάση, η αλδεϋδική οξειδάση και η καρβονυλική αναγωγάση.

Στη μεταβολική φάση 2 ανήκουν οι αντιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την προσθήκη ενός φυσιολογικού υδατοδιαλυτού μορίου. Κάποιες από τις αντιδράσεις σύζευξης είναι η προσθήκη γλυκουρονικού οξέος,θειικού οξέος, αμινοξέων και μεθυλίου. Η σύζευξη των ενώσεων αυτών με το μόριο του φαρμάκου θα γίνει αν το τελευταίο περιέχει ένα από τα ακόλουθα: υδροξύλιο, καρβοξύλιο, πρωτοταγή ή δευτεροταγή αμινομάδα και σουλφυδρύλιο. Φάρμακα με μία ή παραπάνω από αυτές τις ομάδες εισέρχονται απευθείας στη δεύτερη μεταβολική φάση. Κατά κύριο λόγο, οι αντιδράσεις αυτές αδρανοποιούν το φάρμακο και το καθιστούν λιγότερο λιποδιαλυτό.^[26]

1.11.4 Απέκκριση

Είναι ο τερματισμός της φαρμακολογικής ενέργειας, καθώς τα φάρμακα απομακρύνονται από το σημείο στο οποίο δρουν. Η απέκκριση γίνεται από τους νεφρούς, το χοληφόρο σύστημα, το έντερο και τους πνεύμονες.

Η νεφρική απέκκριση είναι η βασικότερη οδός. Τα φάρμακα έχουν $M.B.<69000$ ($M.B.$ λευκωματινών) και επομένως διηθούνται με ευκολία στα ούρα. Η ενέργεια αυτή εξαρτάται μόνο

από τη σύνδεση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Τα νεφρικά σωληνάκια κατέχουν μηχανισμούς ενεργητικής μεταφοράς ουσιών από το πρόουρο προς το μεσοκυττάριο υγρό του νεφρού και αντίστροφα, τους οποίους χρησιμοποιούν για την απέκκριση των φαρμάκων. Το σύστημα αυτό εμφανίζει εκλεκτικότητα και ευαισθησία σε μεταβολικούς αναστολείς.

Το ποσοστό του φαρμάκου που αποβάλλεται στα ούρα είναι το αποτέλεσμα τριών λειτουργιών, της σπειραματικής διήθησης, της σωληναριακής απέκκρισης και της σωληναριακής επαναρρόφησης. Για τη σπειραματική διήθηση σημασία έχει το αδέσμευτο φάρμακο που βρίσκεται στο πλάσμα, ενώ η σπειραματική απέκκριση εξαρτάται από τη συνολική συγκέντρωση φαρμάκου στο πλάσμα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την επαναρρόφηση προς τον μεσοκυττάριο χώρο είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου στο πρόουρο, η λιποδιαλυτότητα και ο βαθμός ιονισμού του. Η νεφρική λειτουργία υπολογίζεται με τη μελέτη της κάθαρσης μιας ουσίας από το πλάσμα. *Νεφρική κάθαρση του πλάσματος (clearance)* ορίζεται ως ο όγκος του πλάσματος που περιέχει το ποσό εκείνο της ουσίας που αποβάλλεται στα ούρα σε ένα λεπτό.

| | |
|--|--|
| $\text{Κάθαρση (ml/min)} = \frac{K \times V}{P}$ | <p>Όπου:</p> <ul style="list-style-type: none"> • K = η συγκέντρωση ουσίας στα ούρα, • V = ο όγκος ούρων που απεκκρίνεται σε ένα λεπτό, και • P = η συγκέντρωση της ουσίας στο πλάσμα |
|--|--|

Εικόνα 3: Υπολογισμός της κάθαρσης

Η απέκκριση ενός φαρμάκου μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί από τα ηπατοκύτταρα στα χοληφόρα τριχοειδή και να οδηγηθεί έτσι στον εντερικό αυλό. Αν προτιμάται η εντερική απορρόφηση λόγω των ιδιοτήτων του μορίου, το φάρμακο θα εισέλθει στην εντεροηπατική κυκλοφορία, όπου θα απεκκρίνεται και θα απορροφάται εκ νέου μέχρι να απομακρυνθεί με τα ούρα. Τα πολικά μόρια με M.B.>300 απεκκρίνονται σχεδόν πάντα από τη χολή. Η ενεργητική απέκκριση στη χολή εμπεριέχει και φυσιολογικά συστατικά του οργανισμού, όπως χολικά οξέα και στεροειδή και δεν εξαρτάται από τη σύνδεση του φαρμάκου με πρωτεΐνες, εάν είναι αναστρέψιμη. Ο έλεγχος της ηπατικής απεκκριτικής ικανότητας γίνεται με ουσίες όπως η χρωστική βρωμοσουλφοφθαλεΐνη και στα φυσιολογικά άτομα, μετά από ενδοφλέβια δόση 5mg/kg, το 90-100% της ουσίας απομακρύνεται από το αίμα σε 30 λεπτά.

Η βασικότερη οδός για ουσίες πτητικές στη θερμοκρασία του σώματος είναι οι πνεύμονες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η παραλδεΐδη που χορηγείται ως υπνωτικό φάρμακο και η αιθανόλη, η αποβολή της οποίας συνεισφέρει στον έλεγχο του βαθμού μέθης των οδηγών.

Αξιοσημείωτες οδοί αποβολής είναι και οι σωματικές εκκρίσεις, όπως ο ιδρώτας, τα δάκρυα, ο σίελος, οι ρινικές εκκρίσεις και το γάλα. Η συμβολή τους ωστόσο είναι ελάχιστη και χωρίς ιδιαίτερη πρακτική σημασία.^[24]

1.11.5 Τοξικότητα

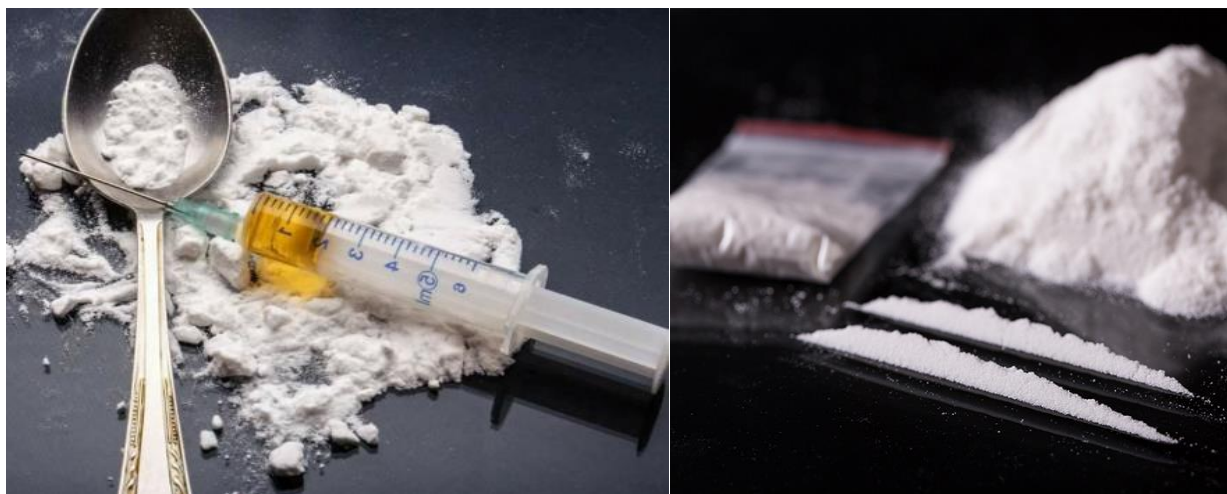
Κατά τη χορήγηση ενός φαρμάκου, εμφανίζονται δευτερεύουσες ενέργειες που δεν αντιστοιχούν στο επιθυμητό αποτέλεσμα και ονομάζονται ανεπιθύμητες ενέργειες ή παρενέργειες. Η ασφάλεια χρήσης ενός φαρμάκου και η τοξικότητά του καθορίζονται από την έκταση των ανεπιθύμητων ενεργειών. Συμπτώματα που πιθανώς εμφανιστούν και χωρίς να χορηγηθεί λάθος δοσολογία είναι ναυτία, ζάλη, πονοκέφαλος, έμετοι κ.α. . Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν απαιτούν τη διακοπή χρήσης του φαρμάκου, καθώς δεν επιφέρουν σημαντικό κίνδυνο.

Οξεία τοξικότητα ονομάζεται η σύντομη δηλητηρίαση από υπέρβαση της κατάλληλης δόσης φαρμάκου, ενώ η χρόνια τοξικότητα μπορεί να εμφανιστεί μετά από μεγάλο διάστημα συνεχών χορηγήσεων του φαρμάκου. Στην πρώτη περίπτωση εντάσσονται οι ανεπιθύμητες ενέργειες τύπου Α και στη δεύτερη περίπτωση οι ανεπιθύμητες ενέργειες τύπου Β.

Επιπλέον, κατά τη χορήγηση ενός φαρμάκου είναι πιθανό να προκύψει μία αλλεργική αντίδραση, εφόσον ο οργανισμός έχει ήδη ευαισθητοποιηθεί σε αυτό το φάρμακο ή σε μεταβολίτη του. Η δράση της ξένης ουσίας είναι παρόμοια με αυτή ενός αντιγόνου που οδηγεί τα πλασματοκύτταρα να συνθέσουν IgE αντισώματα. Τα μη πρωτεϊνικά μόρια (απτίνες) συνδέονται με ενδογενείς πρωτεΐνες και μετουσιώνονται με αποτέλεσμα να καθίστανται μη φυσιολογικές για τον οργανισμό. Η εμφάνιση της αλλεργικής αντίδρασης είναι ανεξάρτητη του ποσού του αλλεργιογόνου. Σε ουσίες με παρόμοια χημική δομή συχνά παρατηρείται «διασταυρούμενη αλλεργία», όπου τα φάρμακα οδηγούν στη σύνθεση αντισωμάτων που δεν είναι ειδικά για αυτά καθεαυτά. Όταν η ίδια ή παρόμοια ουσία καταλήξει ξανά στον οργανισμό, απελευθερώνονται ορμόνες π.χ. ισταμίνη, σεροτονίνη και βραδυκινίνη από τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα λευκοκύτταρα. Η φαρμακευτική αλλεργία δεν αποτελεί σύνθετο φαινόμενο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ασπιρίνη που προκαλεί αλλεργία σε ποσοστό μόνο 0.2%.

Πολλά φάρμακα που δρουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα προκαλούν εξάρτηση και όταν η μακροχρόνια χρήση τους συνδυάζεται με αύξηση της αντοχής, οδηγούν σε αδιάκοπη αύξηση της δοσολογίας. Η απότομη αναστολή χρήσης αυτής της ουσίας έχει ως συνέπεια το σύνδρομο στέρησης, δηλαδή ψυχολογική ή σωματική εξάρτηση. Το σύνδρομο στέρησης εμφανίζεται κυρίως με τη δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος, καθώς και με ψυχικές και κινητικές διαταραχές. Η πλειονότητα των εξαρτησιογόνων ουσιών χωρίζεται στις παρακάτω κατηγορίες:

- i. Κατασταλτικά του Κ.Ν.Σ.: Αιθανόλη, αιθέρας, βαρβιτουρικά, βενζοδιαζεπίνες (π.χ. λοραζεπάμη), πτητικές οργανικές ενώσεις κ.α. . Αναπτύσσεται σωματική και ψυχολογική εξάρτηση και εμφανίζονται έντονα συμπτώματα, όπως επιληπτοειδείς σπασμοί των χρόνιων αλκοολικών.
- ii. Ναρκωτικά αναλγητικά: Ηρωίνη, κωδεΐνη, μεθαδόνη, μορφίνη κ.α. . Έχουν ισχυρή εξαρτησιογόνο δύναμη και το σύνδρομο στέρησης διαρκεί 5-7 μέρες.
- iii. Διεγερτικά του Κ.Ν.Σ.: Αμφεταμίνες, κοκαΐνη κ.α. . Έχουν ήπιο σύνδρομο στέρησης, κυρίως υπνηλία, αλλά εμφανίζουν έντονη ψυχολογική εξάρτηση.
- iv. Άλλες ουσίες: Διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (LSD), κανναβινοειδή, νικοτίνη κ.α. . Πρόκειται για ήπια συμπτώματα στέρησης και υπάρχει ψυχολογική εξάρτηση.



Εικόνα 4: Ηρωίνη και κοκαΐνη

Αξιοσημείωτη είναι επίσης η ικανότητα μίας χημικής ένωσης να αλληλεπιδρά με το DNA και τις πυρηνικές πρωτεΐνες και να αποτελεί έτσι ένα μεταλλαξιγόνο παράγοντα (γονοτοξικότητα). Οι γονοτοξικές μεταβολές μπορούν να γίνουν σε δύο επίπεδα, στο μοριακό του DNA και στο οργανιδιακό των χρωμοσωμάτων. Όσον αφορά το πρώτο, οι συνηθέστερες αλλαγές αφορούν ζεύγη βάσεων μέσω υδροξυλίωσης ή απαμίνωσης μίας βάσης. Με τον τρόπο αυτό μεταβάλλεται η μεταγραφή ορισμένων γονιδίων και μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση, π.χ. μέσω ελάττωσης της έκφρασης μίας ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης. Σε οργανιδιακό επίπεδο, οι μεταλλαξιγόνοι παράγοντες μειώνουν σημαντικά τον ανασυνδυασμό και συνεπώς προκύπτουν ασύνδετα τμήματα χρωμοσωμάτων. Εφόσον αυτό συμβαίνει στους γαμέτες, οι μεταβολές αυτές κληρονομούνται. Ουσίες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι η αιθανόλη, η φαινόλη, η κουμαρίνη κ.α. .^[27]

1.12 Βασικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες

1.12.1 Λιποφιλία

Η λιποφιλία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους στις σχέσεις δομής και δραστηριότητας και η πιο κατατοπιστική φυσικοχημική ιδιότητα στη Φαρμακοχημεία. Η μελέτη αυτής της ιδιότητας έχει αποκαλύψει πληθώρα πληροφοριών σχετικά με τις ενδομοριακές δυνάμεις και αλληλεπιδράσεις και τη μοριακή δομή γενικότερα. Επιπλέον, εκφράζει μία ισορροπία μεταξύ ενδομοριακών δυνάμεων και αλληλεπιδράσεων. Ο υπολογισμός της λιποφιλίας μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας δύο όρους: την υδροφοβία που αντιπροσωπεύει τις υδροφοβικές δυνάμεις και τις δυνάμεις διασποράς, και την πολικότητα που αφορά τους δεσμούς υδρογόνου και τις δυνάμεις επαγωγής.

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

Οι ενδομοριακές δυνάμεις έχουν μεγάλη επίδραση στη λιποφιλία και οι ίδιες εξαρτώνται από δομικούς παράγοντες. Οι ενδομοριακές δυνάμεις μπορούν να καταταχθούν ως εξής:

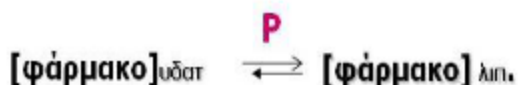
- Ηλεκτρονιακές συζεύξεις σε αρωματικά συστήματα και τμήματα αλειφατικών ενώσεων.
- Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολικών ομάδων (εσωτερικοί δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, εσωτερικοί ιοντικοί δεσμοί κ.α.)
- Στερεοχημικά/Υδρόφοβα αποτελέσματα, όπως προφύλαξη πολικών ομάδων, υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και υδρόφοβη κατάρρευση.

Οι δομικοί παράγοντες που επηρεάζουν τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις ταξινομούνται ως εξής:

- Ισομέρεια θέσης
- Στερεοϊσομέρεια
- Ιονισμός
- Μοριακό μέγεθος (τύλιγμα λόγω υδροφοβικής κατάρρευσης ή/και υδρόφιλης αναδίπλωσης)^[28]

1.12.2 Συντελεστής μερισμού P

Η κατανομή του φαρμάκου μεταξύ λιπιδικής και υδατικής φάσης εκφράζεται από την ισορροπία:



όπου P η σταθερά ισορροπίας, που ισοδυναμεί με το πηλίκο της συγκέντρωσης του φαρμάκου στη λιπιδική φάση, ως προς τη συγκέντρωσή του στην υδατική φάση:

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

Η σταθερά αυτή ονομάζεται συντελεστής μερισμού (partition coefficient) και αποτελεί μέτρο της λιποφιλίας. Χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες, μας δίνεται η δυνατότητα να προσομοιάσουμε τις λιπιδικές φάσεις του οργανισμού, δηλαδή τις μεμβράνες και τα υδρόφοβα τμήματα πρωτεϊνών, οπότε ισχύει:

$$P = \frac{c_{\text{οργ}}}{c_{\text{υδατ}}}$$

Ο νόμος του Nernst για την κατανομή αναφέρει ότι, αν μία ουσία βρίσκεται με την ίδια μοριακή μορφή σε δύο μη αναμειγνυόμενες φάσεις και η θερμοκρασία παραμένει αμετάβλητη, ο λόγος των συγκεντρώσεων της ανάμεσα σε αυτές τις δύο φάσεις είναι σταθερός. Για να ισχύει αυτή η διατύπωση, ο συντελεστής μερισμού ορίζεται ως το πηλίκο της συγκέντρωσης της αδιάστατης μονομερούς μορφής της ουσίας στην οργανική φάση, ως προς τη συγκέντρωση στο νερό. Ακόμα, αποτελεί θερμοδυναμική σταθερά, μοναδική για κάθε ένωση και η οποία εξαρτάται από τους διαλύτες και τη θερμοκρασία. Πιο συχνά χρησιμοποιείται με την παρακάτω λογαριθμική μορφή, ώστε να έχει γραμμική σχέση με την ελεύθερη ενέργεια:

$$\log P = \frac{-\Delta G}{2,303RT}$$

R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων και T η απόλυτη θερμοκρασία.

Το σύστημα αναφοράς που εφαρμόζεται πλέον στο σχεδιασμό φαρμάκων για τον υπολογισμό της λιποφιλίας είναι το σύστημα n-οκτανόλης-νερού:

$$\log P_{\text{bio}} = a \log P_{\text{octanol}} + b$$

όπου $\log P_{\text{bio}}$ ο συντελεστής μερισμού στο βιολογικό σύστημα.^[29]

1.12.3 Συντελεστής κατανομής D

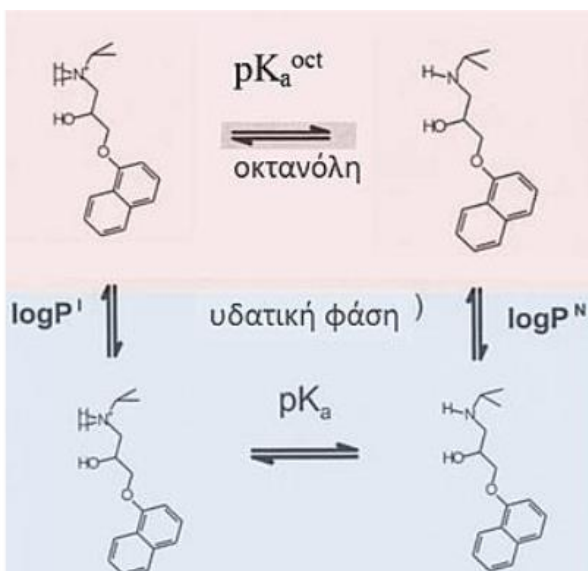
Τα περισσότερα φάρμακα ανάλογα με το pH είναι λιγότερο ή περισσότερο ιοντισμένα και στην περίπτωση αυτή αναφερόμαστε στο συντελεστή κατανομής (ή φαινόμενο συντελεστή μερισμού P'). Αυτός ισούται με το πηλίκο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων των ιοντισμένων μορφών και αδιάστατης μορφής στην οργανική και υδατική φάση αντίστοιχα.

$$D(P') = \frac{\sum c_{\text{οργ}}}{\sum c_{\text{υδατ}}}$$

Όταν έχουμε ιοντιζόμενες ουσίες, η κατανομή σε ένα διφασικό σύστημα (οκτανόλη/νερό) εξαρτάται από τις παρακάτω σταθερές ισορροπίας:

- $\log P^N$, που αντιστοιχεί στην κατανομή της αδιάστατης μορφής ανάμεσα στις δύο φάσεις
- $\log P^I$, που αντιστοιχεί στην κατανομή της ιοντισμένης μορφής $\log P^I$
- pK_a που είναι η σταθερά ιοντισμού
- οκτανολικό pK_a^{oct} που αποτελεί σχετική σταθερά και ορίζεται ως το pH της υδατικής φάσης και όπου υπάρχουν στην οκτανόλη ίσες συγκεντρώσεις αδιάστατης και ιοντισμένης μορφής.

Για παράδειγμα στην προπρανολόλη οι τέσσερις ισορροπίες είναι οι παρακάτω:



Εικόνα 5: Οι ισορροπίες κατά την κατανομή της προπρανολόλης στο σύστημα οκτανόλης-νερού σε συνθήκες pH όπου συνυπάρχουν η αδιάστατη και η ιοντισμένη μορφή (η άνω στιβάδα είναι η n-οκτανόλη γιατί έχει μικρότερο ειδικό βάρος)

Οι συντελεστές μερισμού είναι πολύ μικρότεροι σε σχέση με το συντελεστή αδιάστατης μορφής, οπότε ο $\log D$ υπολογίζεται ως εξής:

$$\log D = \log(f^N P^N) = \log(f^N P)$$

όπου f^N τα κλάσματα ουδέτερης μορφής και P^N ο συντελεστής μερισμού της αδιάστατης μορφής.

Γενικότερα ισχύει:

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

όπου Q διόρθωση η οποία εξαρτάται από την pK_a και το pH του περιβάλλοντος.^[29]

1.13 Φαρμακοδυναμική

Φαρμακοδυναμική είναι η μελέτη των βιοχημικών, φυσιολογικών και μοριακών αποτελεσμάτων που επιφέρουν τα φάρμακα στον οργανισμό και περιλαμβάνει δέσμευση υποδοχέων και χημικές αλληλεπιδράσεις. Η φαρμακοδυναμική μαζί με τη φαρμακοκινητική βοηθούν στην εξήγηση της σχέσης μεταξύ της δοσολογίας και της απόκρισης του οργανισμού, δηλαδή τη φαρμακολογική ενέργεια, η οποία εξαρτάται από τη δέσμευση του φαρμάκου στους αντίστοιχους στόχους. Η φαρμακοδυναμική ενός φαρμάκου μπορεί να επηρεαστεί από ασθένειες ή διαταραχές, τη γήρανση ή από την επίδραση άλλων φαρμάκων.

Στις διαταραχές που μεταβάλλουν τη φαρμακοδυναμική ανήκουν οι γενετικές μεταλλάξεις, η θυρεοτοξίκωση, η νόσος του Πάρκινσον κ.α. . Η γήρανση μεταβάλλει τη δέσμευση στους υποδοχείς, ενώ οι αλληλεπιδράσεις περισσοτέρων του ενός φαρμάκων οδηγούν σε ανταγωνισμό για τις θέσεις δέσμευσης σε υποδοχείς.^[30]

2. ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

2.1 Εισαγωγή στη χρωματογραφία

Η χρωματογραφία είναι μία φυσική μέθοδος διαχωρισμού, στην οποία τα συστατικά που πρόκειται να διαχωριστούν διανέμονται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η μία είναι στατική (στατική φάση), ενώ η άλλη διαχέεται μέσα από αυτήν προς μία ορισμένη κατεύθυνση (κινητή φάση). Η χρωματογραφική διαδικασία είναι το αποτέλεσμα επαναλαμβανόμενων ροφήσεων/εκροφήσεων κατά τη διάρκεια κίνησης των συστατικών του αρχικού δείγματος κατά μήκος της στατικής κλίνης, και ο διαχωρισμός οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των σταθερών κατανομής των δύο συστατικών.

Με βάση τις ιδιότητες της κινητής φάσης, υπάρχουν τρία διαφορετικά είδη χρωματογραφίας. Στην αέρια χρωματογραφία η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο, στην υπερκρίσιμη είναι πυκνό ρευστό που βρίσκεται πάνω από τις κρίσιμες τιμές πίεσης και θερμοκρασίας, και στην υγρή είναι υγρό με μικρό ιξώδες. Η στατική φάση είναι συνήθως μία πορώδης κοκκώδης σκόνη υπό τη μορφή μίας πυκνής ομογενούς κλίνης σε μία στήλη που αντέχει τις πιέσεις λειτουργίας που συνήθως χρησιμοποιούνται. Οι ροφητικές ουσίες είναι συνήθως πορώδη στερεά υψηλής επιφάνειας επαφής, διαφορετικά η κινητή φάση μπορεί να διανεμηθεί σαν ένα λεπτό φιλμ στο τοίχος ενός ανοιχτού σωλήνα τριχοειδών διαστάσεων, αφήνοντας στο κέντρο της στήλης ένα ανοιχτό πέρασμα.

Οι πληροφορίες που ανακτώνται από ένα χρωματογραφικό πείραμα περιέχονται στο χρωματογράφημα, ένα διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις ή οι μάζες των συστατικών του δείγματος συναρτήσει του χρόνου. Μία από τις πληροφορίες που εξάγονται εύκολα από το χρωματογράφημα είναι μία ένδειξη της πολυπλοκότητας του δείγματος, βασιζόμενη στον αριθμό των παρατηρούμενων κορυφών, στην ταυτοποίηση των συστατικών σε κάθε κορυφή, στην ποσοτική εκτίμηση της κάθε συγκέντρωσης και σε μία ένδειξη της απόδοσης της στήλης.

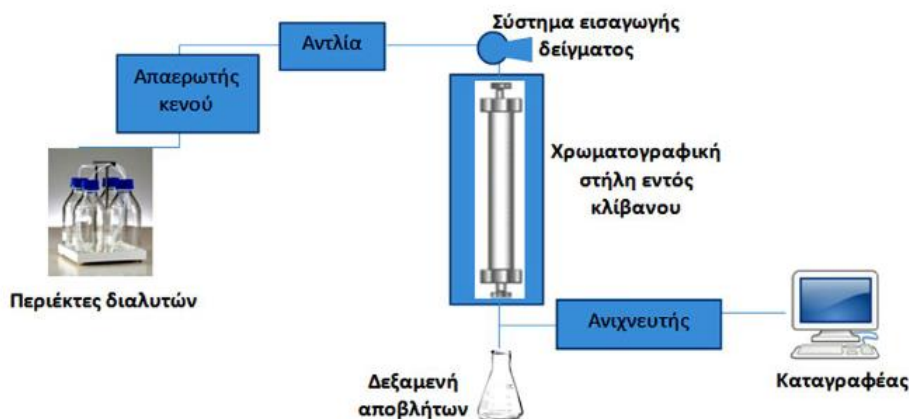
Κατά τη διέλευσή τους μέσα από τη στήλη, τα μόρια του δείγματος μένουν για ένα χρονικό διάστημα σε καθμία από τις δύο φάσεις. Ο χρόνος αυτός είναι ίδιος για όλα τα μόρια όσον αφορά την κινητή φάση και ονομάζεται νεκρός χρόνος t_m . Ισοδυναμεί με το χρόνο που απαιτείται ώστε μία διαλυμένη ουσία που δεν κατακρατείται να φτάσει στον ανιχνευτή από το σημείο έγχυσής της. Ο χρόνος κατακράτησης μίας ουσίας είναι ο χρόνος μεταξύ της στιγμιαίας εισαγωγής του δείγματος και της στιγμής που ανιχνεύεται και εμφανίζεται σε μία κορυφή t_R . Ο καθαρός χρόνος παραμονής ενός συστατικού ισούται με τη διαφορά των δύο αυτών τιμών, δηλαδή: $t_R' = t_R - t_m$.

Για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού, γίνεται χρήση του λόγου του καθαρού χρόνου παραμονής προς το νεκρό χρόνο και ονομάζεται συντελεστής κατανομής: $k = \frac{tR'}{t_m}$.^[31]

2.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Η χρωματογραφία HPLC (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography) είναι μία προηγμένη μορφή χρωματογραφίας στήλης, όπου χρησιμοποιείται αντλία για τη ροή της κινητής φάσης. Με αυτό τον τρόπο καθίσταται δυνατή η χρήση σωματιδίων υλικού πλήρωσης με μικρό μέγεθος, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το εμβαδόν επιφάνειας της στατικής φάσης και να είναι περισσότερες οι αλληλεπιδράσεις με τα μόρια της κινητής φάσης.

Η σχέση πολικότητας μεταξύ των δύο φάσεων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα δύο διαφορετικά είδη χρωματογραφίας υψηλής πίεσης: κανονικής φάσης και αντίστροφης φάσης. Στην πρώτη περίπτωση ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιείται κάποιο πολικό υλικό, όπως οξείδιο του πυριτίου, ενώ η κινητή φάση είναι μειωμένης πολικότητας, όπως εξάνιο ή χλωροφόρμιο. Έτσι, υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των πολικών ενώσεων του διαχωριζόμενου δείγματος και της στατικής φάσης και συνεπώς εκλούνται βραδύτερα από τις μη πολικές ενώσεις. Αυξάνοντας την πολικότητα της κινητής φάσης, μόρια διαλύτη προσροφώνται από τη στατική φάση και εκλούνται εκλεκτικά τα προσροφημένα πολικά μόρια της ουσίας. Στην HPLC αντίστροφης φάσης, ο διαχωρισμός γίνεται λόγω της προσρόφησης υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση με κινητή φάση υψηλής πολικότητας. Πρόκειται για άπολη στατική φάση από οξείδιο πυριτίου και ομάδες όπως αλκύλια και διόλες. Η κινητή φάση είναι μείγματα οργανικών διαλυτών με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό. Προσθέτοντας οργανικό διαλύτη μειώνεται η πολικότητα της κινητής φάσης και έτσι εκλούνται τα προσροφημένα μόρια. Είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή της HPLC.^[32]



Εικόνα 6: Διάγραμμα εργαστηριακής διάταξης υγρής χρωματογραφίας HPLC.^[32]

2.3 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM)

Το ρευστό μοντέλο των κυτταρικών μεμβρανών είναι ο κύριος φραγμός για την απορρόφηση φαρμάκων, όταν η διάχυση περιορίζει την πρόσληψη. Οι ακίνητοποιημένες τεχνητές μεμβράνες είναι μοντέλα ρευστών μεμβρανών σε στερεά μήτρα, οι οποίες προέβλεψαν τη διαπερατότητα φαρμάκων στα Caco-2 κύτταρα, που συσχετίζεται με τη στοματική απορρόφηση φαρμάκων στους ανθρώπους. Συνεπώς, οι ακίνητοποιημένες τεχνητές μεμβράνες μπορούν επίσης να επιδείξουν την απορρόφηση φαρμάκων στους ανθρώπους και τη βιοδιαθεσιμότητα.^[33] Οι στήλες ακίνητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών δημιουργούνται μέσω ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ μίας μονοστιβάδας φωσφολιπιδίων και μορίων πυριτίου.

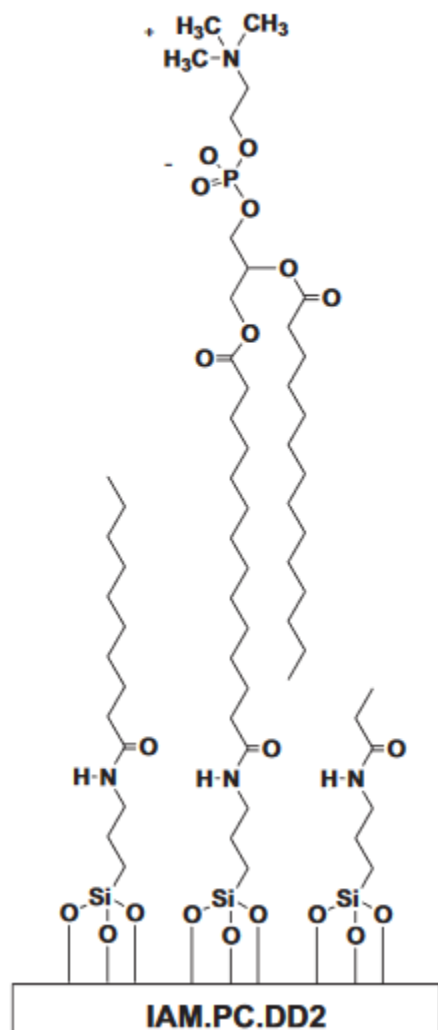
Η διαπερατότητα και η διαλυτότητα καθορίζουν τη στοματική απορρόφηση μικρομορίων. Η λιποειδής παθητική διάχυση είναι ένας από τους πιο επίκαιρους μηχανισμούς διαπέρασης των βιολογικών μεμβρανών από τα μόρια φαρμάκων. Η παθητική διάχυση περιλαμβάνει εκτενείς μοριακές αλληλεπιδράσεις των υποψήφιων φαρμάκων με τον γαστροεντερικό φραγμό, οι οποίες βασίζονται στις φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμακευτικών ουσιών. Επομένως, κρίνεται αναγκαίο να ταυτοποιηθούν οι πιο επιδρώντες φυσικοχημικές ιδιότητες που θα ιδρύσουν τη σχέση δομής-ιδιοτήτων για χημική βελτιστοποίηση. Έτσι, οι βιομημητικές ιδιότητες που μετρούνται με την HPLC, μπορούν να έχουν καθοριστικό ρόλο στη στρατηγική ανακάλυψης φαρμάκων.

Ωστόσο, είναι καίριας σημασίας να υπάρχει γνώση της ισορροπίας των ενδομοριακών δυνάμεων που διέπουν τους μηχανισμούς κατακράτησης στις ακίνητοποιημένες τεχνητές μεμβράνες. Η κατακράτηση αυτή χαρακτηρίζεται από τα δύο συνήθη συστατικά της λιποφιλίας (υδροφοβία και πολαρικότητα) και από επιπρόσθετες δυνάμεις, όπως ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις όταν διαλυμένες ουσίες είναι εν μέρει ή εξ ολοκλήρου ιονισμένες.^[34]

Η στοματική απορρόφηση είναι ένα περίπλοκο φαινόμενο, καθώς πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στο κλάσμα της χορηγούμενης δόσης που φτάνει στο αίμα, όπως ανεπαρκής διάλυση της ουσίας και ο μεταβολισμός πρώτης διόδου στα εντερικά κύτταρα και το συκώτι. Επομένως είναι πρακτικά αδύνατο να ενσωματωθούν όλοι οι παράγοντες σε ένα μόνο μοντέλο, για την πρόβλεψη της στοματικής απορρόφησης. Ένα ιδανικό σημείο εκκίνησης είναι η χρησιμοποίηση ενώσεων με την προοπτική μεταφοράς μέσα στη στήλη. Μερικές φορές χρησιμεύει να αναγνωρισθεί ποια ένωση μίας ομόλογης σειράς έχει τη μεγαλύτερη πιθανότητα να απορροφηθεί. Κατά αυτόν τον τρόπο, ο ρόλος αυτού του είδους χρωματογραφίας αφορά αρχικά τη διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων, διότι η διχοτόμησή τους στις IAM στήλες μπορεί να προβλέψει αν μία ένωση έχει επιθυμητές ιδιότητες μεταφοράς. Σε περίπτωση που κάποια ένωση μεταφερθεί μέσω ενός παρακυττάρου περάσματος, γίνεται εξάγνιση πρωτεϊνικών

μεμβρανών, υπεύθυνων για τη μεταφορά πεπτιδίων από τα εντερικά κύτταρα, ώστε να ακινητοποιηθούν αυτές οι πρωτεΐνες στις επιφάνειες των IAM για έλεγχο.^[33]

Μία συνήθης στήλη IAM είναι η IAM.PC.DD2:



Εικόνα 7: Η στήλη IAM.PC.DD2 χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της μεμβρανικής διαπερατότητας από τα φάρμακα.^[35]

2.4 Μικκυλιακή Χρωματογραφία (MLC)

Η υγροχρωματογραφία μικκυλίων είναι μία από τις μεθόδους Υγρής Χρωματογραφίας Αντιστρόφου Φάσεως (RPLC), στην οποία οι κινητές φάσεις είναι υδατικά διαλύματα επιφανειοδραστικών ουσιών σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από την κρίσιμη μικκυλιακή

συγκέντρωση. Τα τελευταία χρόνια, η δημοτικότητα της μεθόδου αυτής αυξήθηκε ραγδαία. Τα μικκύλια έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα άλλων τεχνικών διαχωρισμού, όπως ηλεκτροκινητική χρωματογραφία και υπερδιήθηση.^[36] Το πλήθος των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαλυμένων ουσιών, των μικκυλίων και της στατικής φάσης προσδίδει μία μεγάλη ευελιξία στην τεχνική αυτή και την καθιστά κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα αναλύσεων διαλυμένων ουσιών. Αυτή η προσαρμοστικότητα είναι πιθανώς το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της μικκυλιακής χρωματογραφίας.

Ακόμα ένα πλεονέκτημα της χρήσης μικκυλιακών διαλυμάτων ως κινητή φάση είναι η διαλυτοποίηση των μη πολικών μορίων. Χρησιμοποιούνται μικρές ποσότητες οργανικού διαλύτη στις μικκυλιακές φάσεις, γεγονός που επιφέρει μείωση στην τοξικότητα, στην ευφλεκτότητα, έχει μικρότερο περιβαλλοντικό αντίκτυπο και κόστος.

Έχουν εμφανιστεί ωστόσο κάποια προβλήματα σχετικά με την εκτενή χρήση της MLC. Αρχικά, η χρωματογραφική απόδοση είναι αρκετά χαμηλότερη συγκριτικά με παρόμοιες στήλες στη συμβατική RPLC. Επιπλέον, η εκλουστική ισχύς των μικκυλιακών διαλυμάτων μπορεί να είναι εξαιρετικά αδύναμη. Τα προβλήματα αυτά αποκαθίστανται με την προσθήκη ενός οργανικού τροποποιητή, όπως μία αλκοόλη. Με τον τρόπο αυτό γίνεται ακριβής πρόβλεψη της κατακράτησης κάθε ένωσης του μίγματος.

Η θέση και το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών εξαρτάται από τη φύση και τη συγκέντρωση του τασιενεργού και του τροποποιητή, αλλά και από το pH της κινητής φάσης, τη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ. Όλες αυτές οι παράμετροι μπορούν να βελτιστοποιηθούν για να παρέχουν έναν επαρκή διαχωρισμό του μίγματος των διαλυμένων ουσιών.

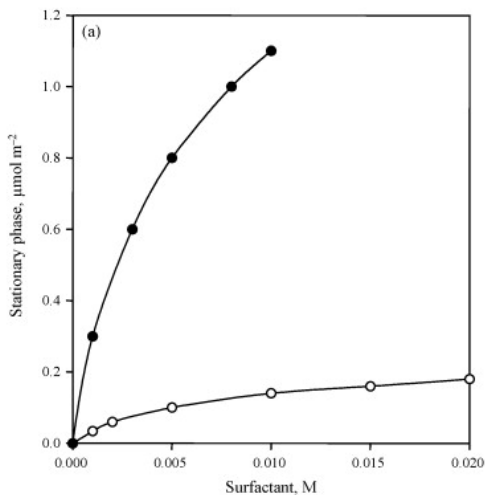
Η κύρια χρήση της τεχνικής αυτής είναι η ανάλυση φυσιολογικών ρευστών. Οι κινητές φάσεις μικκυλίων έχουν τη δυνατότητα να διατηρούν τις πρωτεΐνες διαλυμένες, δηλαδή επιτρέπουν την άμεση έγχυση βιολογικών δειγμάτων σε MLC συστήματα. Για τη σωστή χρήση των μικκυλιακών φάσεων απαιτείται η γνώση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους.^[37]

Στις συμβατικές RPLC αναλύσεις οι υδρο-οργανικές κινητές φάσεις είναι ομογενείς, ενώ τα μικκυλιακά διαλύματα είναι μικροσκοπικά ετερογενή, συγκροτούμενα από δύο ξεχωριστά μέσα: τα αμφίφιλα μικκυλιακά σύνολα και το περιβάλλον νερό ή υδατο-οργανικός διαλύτης που περιέχει μονομερή του τασιενεργού σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση.

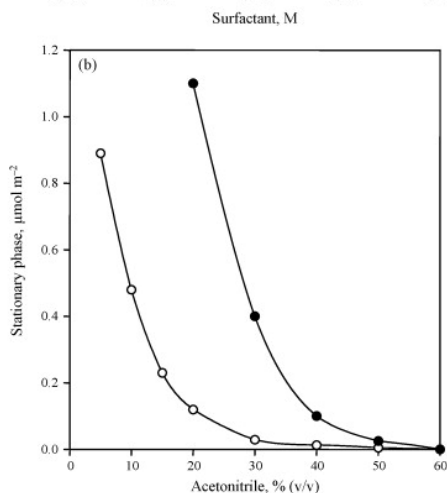
Πρόσφατα προέκυψε μία νέα μέθοδος μικκυλιακής χρωματογραφίας (υπομικκυλιακή χρωματογραφία), όπου η επιφανειοδραστική ουσία σχηματίζει μικκύλια και υπάρχει υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό διαλύτη. Συνεπώς, δημιουργούνται νέες πιθανότητες εφαρμογών με αυτή τη χρωματογραφική τεχνική.^[38]

2.4.1 Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων (IPC) και η γέννηση της υγροχρωματογραφίας μικκυλίων

Το 1976, οι Κνοκ και Laird ανέπτυξαν την χρωματογραφία ζεύγους ιόντων προσθέτοντας μία μικρή ποσότητα ιοντικού τασιενεργού στην πολική υδρο-οργανική κινητή φάση της RPLC. Σε αυτή την κατάσταση η επιφανειοδραστική ουσία απορροφάται από τη στατική φάση και έρχεται σε επαφή με διαλυμένες ουσίες αντίθετου φορτίου. Στην IPC, οι συντελεστές κατακράτησης είναι ανάλογοι της ποσότητας των αντίθετων ιόντων που απορροφώνται από τη στατική φάση. Η στατική φάση, η φύση και συγκέντρωση του ιοντικού τασιενεργού και του οργανικού διαλύτη, η ιοντική ισχύς και το pH είναι οι κύριοι παράγοντες που επιδρούν στη συμπεριφορά κατακράτησης. Η μεθανόλη, η προπανόλη και το ακετονιτρίλιο είναι οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες σε ανάμειξη με νερό. Η απορροφούμενη ποσότητα του ιοντικού τασιενεργού αυξάνεται με τη συγκέντρωσή του στην κινητή φάση και μειώνεται δραστικά από τους οργανικούς διαλύτες, λόγω της αυξημένης εκλουστικής ισχύος με αποτέλεσμα να εκροφείται από τη στατική φάση.^[39]



Εικόνα 8: Απορροφούμενη ποσότητα τασιενεργού σε μία στατική φάση C8 με πυρίτιο χρησιμοποιώντας μίγμα ακετονιτρίλιου-νερού (20% ακετονιτρίλιο).^[39]

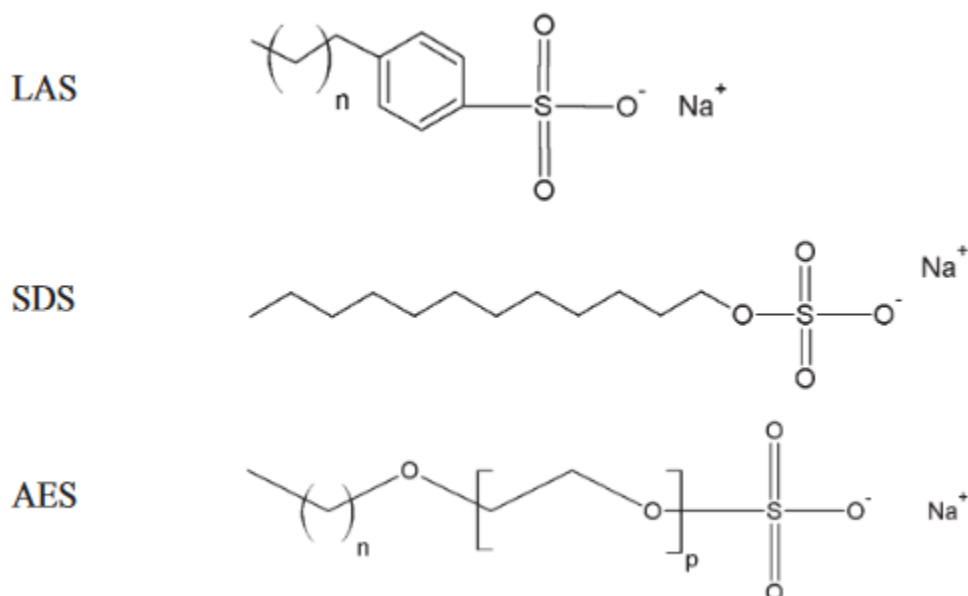


Εικόνα 9: Απορροφούμενη ποσότητα τασιενεργού σε μία στατική φάση C8 με πυρίτιο χρησιμοποιώντας οργανικό διαλύτη στην κινητή φάση (0,01M τασιενεργό).^[39]

2.4.2 Επιφανειοδραστικές ουσίες

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες (ή αλλιώς τασιενεργές) είναι αμφίφιλα μόρια, τα οποία αποτελούνται από ένα μη πολαρικό υδρόφοβο τμήμα, συνήθως έναν σε σειρά ή διακλαδισμένο υδρογονάνθρακα ή μία φθορανθρακική αλυσίδα που περιέχει 8-18 άτομα άνθρακα, προσκολλημένα σε ένα πολαρικό ή ιοντικό τμήμα (υδρόφιλο). Η υδρογονανθρακική αλυσίδα αλληλεπιδρά ελάχιστα με τα μόρια νερού σε ένα υδάτινο περιβάλλον, ενώ το πολαρικό ή ιοντικό τμήμα αλληλεπιδρά πιο ισχυρά μέσω δεσμών ιόντος-διπόλου, καθιστώντας το τασιενεργό διαλυτό σε νερό. Η προσρόφηση μορίων τασιενεργού στη διεπιφάνεια μειώνει την επιφανειακή τάση και η μείωση αυτή είναι ανάλογη της προσρόφησης του τασιενεργού. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες αθροίζονται μέσα σε διαλύματα δημιουργώντας μικκύλια, λόγω της μειωμένης επαφής μεταξύ της υδρογονανθρακικής αλυσίδας και του νερού, που συνάδει μείωση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος.^[40]

Μερικές από τις πιο γνωστές τασιενεργές ουσίες είναι το Linear alkylbenzene sulphonic acid (LAS), Sodium dodecyl sulphate (SDS) και το Alkyl ethoxysulphate (AES), τα οποία είναι ανιοντικά.^[41]



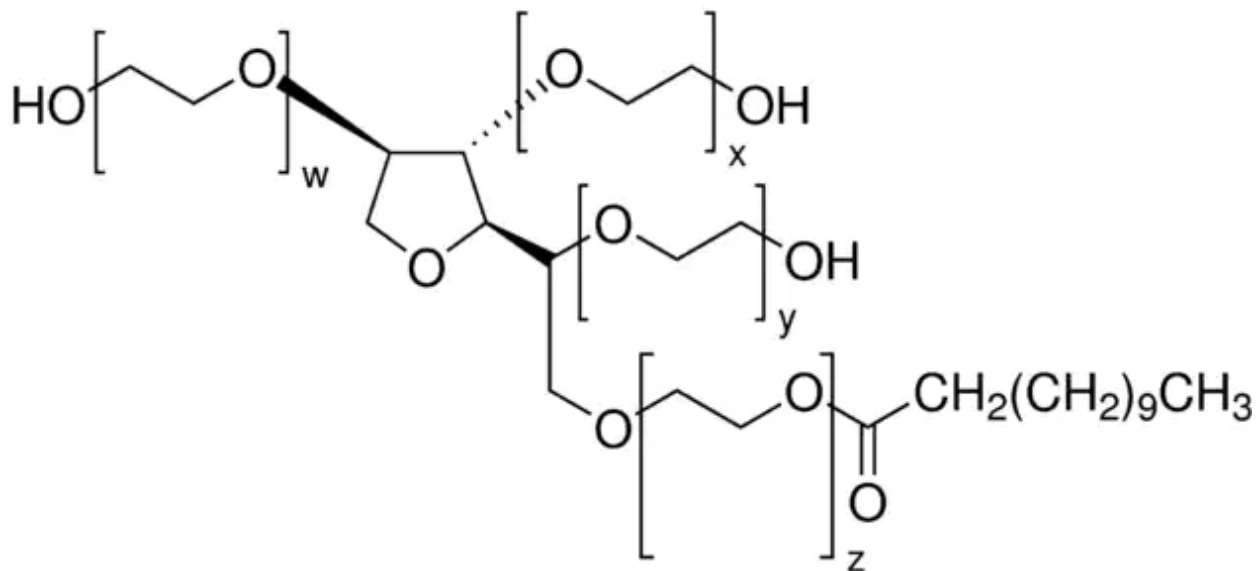
Εικόνα 10: Η χημική δομή γνωστών τασιενεργών ουσιών^[41]

Tween 20

Οι εστέρες λιπαρών οξέων της σορβιτάνης και τα αιθοξυλιωμένα παράγωγά τους (tweens) είναι μία από τις πιο γνωστές κατηγορίες μη ιονικών τασιενεργών. Οι εστέρες αυτοί παράγονται από την αντίδραση σορβιτάνης με ένα λιπαρό οξύ σε υψηλή θερμοκρασία (>200 °C). Η σορβιτόλη αφυδατώνεται στην 1,4-σορβιτάνη και στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η εστεροποίηση. Εάν αντιδράσει ένα mole λιπαρού οξέος με ένα mole σορβιτόλης, το προϊόν θα είναι ένας μονοεστέρας και θα παραχθεί ένας διεστέρας ως υποπροϊόν.

Τα tweens παράγονται από την αντίδραση οξειδίου του αιθυλενίου με οποιαδήποτε υδροξυλική ομάδα παραμένει στην εστερική ομάδα της σορβιτάνης μετά την αρχική αντίδραση. Εναλλακτικά, η σορβιτόλη πρώτα αιθοξυλιώνεται και έπειτα εστεροποιείται. Ωστόσο, το τελικό προϊόν θα έχει διαφορετικές επιφανειοδραστικές ιδιότητες σε σχέση με τα tweens.

Ένα από τα tweens είναι το Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate – Tween 20. Είναι γενικά διαλυτό στο νερό και έχει σχετικά υψηλή τιμή HLB (Hydrophilic-lipophilic balance). Έχει μοριακό βάρος περίπου 1228 και ένα από τα πλεονεκτήματά του είναι η έγκρισή του ως πρόσθετο τροφίμων. Έχει πολλές βιοχημικές εφαρμογές, μία εκ των οποίων είναι ως γαλακτωματοποιητής για την προετοιμασία σταθερού γαλακτώματος ελαίου σε νερό. Επιπλέον, χρησιμοποιείται στην προεξαγωγή μεμβρανών για την αφαίρεση περιφερειακών πρωτεϊνών.^{[40][42]}



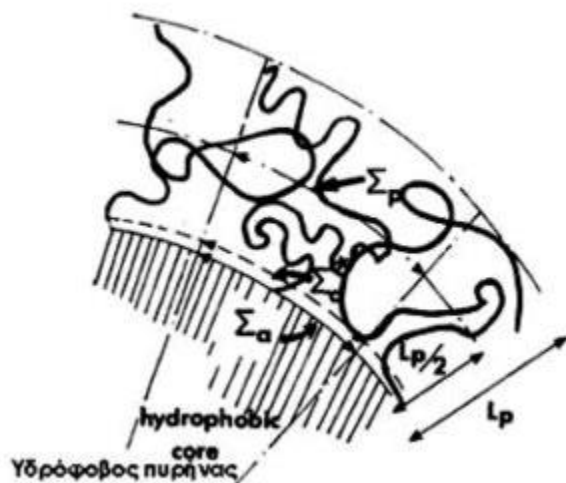
Εικόνα 11: Η χημική δομή του Tween 20^[42]

Συγκέντρωση τασιενεργού

Η συσσωμάτωση των μορίων του τασιενεργού ή ιόντων σε μικκύλια πραγματοποιείται αυστηρά σε ένα ορισμένο εύρος συγκέντρωσης, χαρακτηριστικής για κάθε τασιενεργό, η οποία ονομάζεται κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίου ή ΚΣΜ. Τα μικκύλια έχουν μία δυναμική δομή, ως

αποτέλεσμα της ταχύτατης εναλλαγής τασιενεργών ανάμεσα στη συγκεντρωτική και μονομερή μορφή τους. Ο μέσος αριθμός συσσωμάτωσης των τασιενεργών και το μέγεθός τους διαφέρουν ανάλογα την επιφανειοδραστική ουσία. Η κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση και ο μέσος αριθμός συσσωμάτωσης εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως η ιοντική ισχύς, η παρουσία συν-διαλύτη και η θερμοκρασία. Ένα κατάλληλο τασιενεργό θα πρέπει να έχει χαμηλή κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση, καθώς σε υψηλές τιμές χρειάζονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τασιενεργού. Σε αυτή την περίπτωση τα διαλύματα γίνονται πιο ιξώδη, γεγονός που αυξάνει την πίεση του συστήματος σε μη επιθυμητά επίπεδα και τον θόρυβο βάθους στους ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας. Η εκλεκτικότητα είναι περιορισμένη στις εξής επιφανειοδραστικές ουσίες: το ανιονικό SDS, το κατιοντικό CTAB και το μη ιονικό Brij-35.

Για τα πολυοξυαιθυλιωμένα μη ιοντικά τασιενεργά, οι όγκοι του πολικού και μη πολικού τμήματος είναι περίπου ίσοι, με την πολική ομάδα να υπερτερεί της μη πολικής. Η ΚΣΜ μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας. Τα μικκύλια αυτής της κατηγορίας είναι τυπικά σφαιρικά.^{[36][43]}



Εικόνα 12: Τμήμα μικκυλίου πολυοξυαιθυλιωμένου τασιενεργού^[43]

Επίδραση θερμοκρασίας

Το 1895, ο Krafft παρατήρησε ότι η διαλυτότητα των ιοντικών τασιενεργών αυξανόταν εμφανώς πάνω από μία συγκεκριμένη θερμοκρασία. Για παράδειγμα, το SDS έχει διαλυτότητα χαμηλότερη του 0.2% w/w κάτω από τους 15°C, ενώ στους 19°C είναι μεγαλύτερη του 4% w/w. Η αύξηση αυτή οφείλεται στη δημιουργία των μικυλίων. Ως σημείο Krafft, ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία εμφανίζονται μικκύλια με την ελάχιστη συγκέντρωση τασιενεργού. Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από το σημείο Krafft, η κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση των περισσότερων ιοντικών τασιενεργών αυξάνεται ελαφρώς.

Στα μη ιοντικά τασιενεργά δεν εμφανίζεται το φαινόμενο Krafft. Ωστόσο, ένα μη ιοντικό μικκυλιακό διάλυμα γίνεται θολό και χωρίζεται σε δύο φάσεις με την αύξηση της θερμοκρασίας (φαινόμενο θολώματος). Η πολυοξαιθυλιωμένη αλυσίδα σταδιακά αφυδατώνεται και χάνοντας μόρια νερού γίνεται λιγότερο πολική, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα θόλωμα. Η θερμοκρασία αυτή ονομάζεται σημείο θολώματος των μη ιοντικών τασιενεργών διαλυμάτων. Πάνω από το σημείο αυτό, το μη ιοντικό μικκυλιακό διάλυμα χωρίζεται σε μία υδατική φάση, κορεσμένη από το μη ιοντικό τασιενεργό και σε μία οργανική φάση, κορεσμένη από νερό και η οποία εμπεριέχει το μεγαλύτερο μέρος του τασιενεργού.

Το σημείο θολώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του τασιενεργού και αυξάνεται σημαντικά με το μήκος της πολυοξαιθυλιωμένης αλυσίδας, αλλά ελάχιστα από το μήκος της πολαρκικής αλυσίδας.^[37]

| Surfactant Code | Ethylene oxide units ^b | 1% Solution | 10% Solution |
|-----------------|-----------------------------------|-------------|--------------|
| L31 | 4 | 37 | 29 |
| L61 | 6 | 24 | 17 |
| L81 | 5.4 | 20 | 16 |
| L101 | 8 | 15 | 11 |
| L121 | 12 | 14 | 10 |
| L35 | 22 | 77 | 80 |
| P65 | 40 | 82 | 82 |
| P75 | 46 | 82 | 86 |
| P85 | 50 | 85 | 86 |
| P105 | 74 | 91 | 90 |
| F38 | 90 | >100 | >100 |
| F68 | 160 | >100 | >100 |
| F88 | 200 | >100 | >100 |
| F108 | 300 | >100 | >100 |

Εικόνα 13: Σημείο θολώσης μερικών πλουρωνικών μη ιοντικών τασιενεργών σε °C.^[37]

2.4.3 Στατική φάση

Ο συνδεδεμένος με αλκύλια C-18 είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη στατική φάση στη μικκυλιακή υδροχρωματογραφία. Αυτές οι στήλες τροποποιούνται έντονα όταν το SDS, CTAB ή το Brij-35 ενσωματώνονται στην κινητή φάση.

Η απορρόφηση του τασιενεργού από το πορώδες RPLC πληρωτικό υλικό επηρεάζει δραστικά την χρωματογραφική κατακράτηση, γεγονός που οφείλεται στη μεταβολή διάφορων επιφανειακών ιδιοτήτων της στατικής φάσης (π.χ. πολαρικότητα, δομή, ο όγκος των πόρων κ.α.). Τα μόρια της επιφανειοδραστικής ουσίας καλύπτουν τους πόρους της στατικής φάσης, μειώνοντας αισθητά τον όγκο τους.

Ιοντικές ενώσεις συχνά προστίθενται στις μικκυλιακές κινητές φάσεις για ρύθμιση του pH και εν τέλει για τη ρύθμιση της ιοντικής ισχύος. Η προσθήκη αλάτων ίσως αλλάξει την ποσότητα του απορροφούμενου ιοντικού τασιενεργού, εξαιτίας της μείωσης της ηλεκτροστατικής απώθησης, της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης του τασιενεργού και της ενίσχυσης των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων.^[38]

Η έλλειψη ισχύος από κινητές φάσεις που περιέχουν μόνο μικκύλια, σχετίζεται με τον αποκλεισμό των μικκυλίων από τους πόρους στους οποίους βρίσκεται πάνω από το 99% της στατικής φάσης. Εφόσον αυτά τα μικκύλια δεν έχουν απευθείας πρόσβαση στους διαλύτες που σχετίζονται με την στατική φάση, ακόμα και υψηλές συγκεντρώσεις τους δεν επαρκούν για την έκλυση ενώσεων μέτριας έως υψηλής υδροφοβικότητας. Στα μη ιοντικά τασιενεργά αυτό ίσως οφείλεται σε στερεοχημικούς λόγους (μικροί πόροι), ενώ στα ιοντικά συμπεριλαμβάνονται και ηλεκτροστατικοί λόγοι.

Για να καθοριστεί αν το μέγεθος των πόρων ήταν το πρόβλημα για την έλλειψη απόδοσης, διεξάχθηκε έρευνα για τις κινητές φάσεις των Brij-22, SDS και DTAB. Η αύξηση του μεγέθους των πόρων σε ένα πορώδες υλικό επιφέρει μείωση στην ειδική επιφάνεια, οπότε μειώνεται και ο όγκος της δεσμευμένης στατικής φάσης. Για αυτό το λόγο, έγινε σύγκριση της συμπεριφοράς διαλυτών διαφόρων φύσεων μεταξύ υδροοργανικών και μικκυλιακών κινητών φάσεων και βρέθηκε ότι στις στήλες με μεγαλύτερους πόρους πραγματοποιείται καλύτερη διείσδυση των μικκυλίων στους πόρους, δηλαδή έρχονται σε επαφή με τις διαλυμένες ουσίες στην εσωτερική επιφάνεια της στατικής φάσης πιο εύκολα και τους εκλύουν γρηγορότερα.^[39]

2.4.4 Κινητή φάση

Στα μικκύλια υπάρχουν τρεις χώροι διαλυτοποίησης: ο πυρήνας (υδρόφοβος), η επιφάνεια (υδρόφιλη) και η περιοχή μεταξύ του πυρήνα και των ομάδων κεφαλής του τασιενεργού. Οι διαλυμένες ουσίες που συσχετίζονται με μικκύλια, βιώνουν ένα διαφορετικό μικροπεριβάλλον από αυτό του κύριου όγκου του διαλύτη, το οποίο οφείλεται σε διαταραχές που προκαλούν τα μικκύλια στις φυσικοχημικές ιδιότητες των διαλυμένων ουσιών.

Στους περισσότερους διαχωρισμούς της μικκυλιακής υγροχρωματογραφίας, χρησιμοποιούνται υβριδικές κινητές φάσεις που περιέχουν οργανικό διαλύτη. Αυτός μειώνει την πολαρικότητα του υδατικού διαλύματος και τροποποιεί την μικκυλιακή δομή. Επιπλέον, επιφέρει αλλαγές σε μικκυλιακές παραμέτρους, όπως είναι η κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση και ο μέσος αριθμός

συσσωμάτωσης. Η μέγιστη συγκέντρωση οργανικού διαλύτη εξαρτάται από το είδος του και από το τασιενεργό. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη σχετίζεται με την πολαρικότητα των αναλυτών. Για πολικές ενώσεις, μικροί χρόνοι κατακράτησης επιτυγχάνονται με 1-προπανόλη, 2-προπανόλη ή ακετονιτρίλιο. Στις μη πολαλικές ενώσεις χρησιμοποιούνται η 1-βουτανόλη και η 1-πεντανόλη. Επειδή σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού διαλύτη τα μικκύλια χωρίζονται, τα ανώτατα όρια είναι 15% για προπανόλη και ακετονιτρίλιο, 10% για βουτανόλη και 6% για πεντανόλη. Τα ποσοστά αυτά είναι μικρότερα σε σχέση με την κλασική RPLC, οπότε πρόκειται για μειωμένο κόστος και τοξικότητα και η σταθεροποίηση του οργανικού διαλύτη μειώνει τον κίνδυνο εξάτμισης (οι κινητές φάσεις αποθηκεύονται για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα χωρίς σημαντικές αλλαγές στη σύσταση). Ο ανταγωνισμός μεταξύ των αλκοολών και των μορίων του τασιενεργού εξηγεί τη γραμμική ελάττωση της ποσότητας του απορροφημένου τασιενεργού όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της αλκοόλης στην κινητή φάση.

Το εύρος του pH στη στήλη κυμαίνεται από 2.5 έως 7.5. Η κατάλληλη τιμή βασίζεται στη φύση των αναλυτών και στο επιλεγμένο τασιενεργό. Το pH της κινητής φάσης συνήθως διορθώνεται με φωσφορικά ή κιτρικού οξέος ρυθμιστικά διαλύματα.^[38]

2.4.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της MLC

Η μικκυλιακή υδροχρωματογραφία χρησιμοποιεί τον ίδιο εξοπλισμό (αντλίες, εγχυτήρες, σωλήνες, ανιχνευτές κ.α.) με την κλασική RPLC μαζί με μίγματα οργανικού διαλύτη-νερού). Τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα της MLC έναντι της κλασικής RPLC είναι τα εξής:

- Ικανότητα προσαρμογής σε διαφορετικές χρήσεις, λόγω των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων διαλυμένης ουσίας-μικκυλίου και διαλυμένης ουσίας-τροποποιημένης στατικής φάσης.
- Αλλαγή στην εκλεκτικότητα.
- Καταστολή της αφαίρεσης των κορυφών για βασικά φάρμακα χρωματογραφημένα με συμβατικές στήλες.
- Ανάλυση δειγμάτων που περιέχουν ενώσεις σε ένα μεγάλο εύρος πολαρικότητας χρησιμοποιώντας ισοκρατική έκλυση.
- Απευθείας έγχυση φυσιολογικών υγρών, αποφεύγοντας την προεπεξεργασία που απαιτείται στην κλασική RPLC.

Παρόλα τα πλεονεκτήματα της μεθόδου, η εφαρμοστικότητα της τεχνικής είναι περιορισμένη στα αναλυτικά εργαστήρια. Αυτό εν μέρει οφείλεται στην μικρή εκλουστική ισχύ και χαμηλή αποδοτικότητα των καθαρά μικκυλιακών κινητών φάσεων. Ανά τα χρόνια έχουν προταθεί λύσεις για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί, όπως η προσθήκη μικρών ποσοτήτων

αλκοόλης και η χρήση στατικών φάσεων με μεγαλύτερους πόρους, αλλά χωρίς να επεκταθεί η χρήση της τεχνικής. Ο πιο επικαιροποιημένος περιορισμός της μεθόδου σχετίζεται με τη φασματομετρική ανίχνευση μάζας, διότι η απευθείας σύνδεση με την MLC παρεμποδίζεται από την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων τασιενεργού στην κινητή φάση.^[44]

2.4.6 Εφαρμογές MLC

Η δημοτικότητα των εφαρμογών αυτής της μεθόδου στον προσδιορισμό διαφόρων ενώσεων σε φαρμακευτικά προϊόντα, βιολογικά υγρά, δείγματα τροφίμων και περιβαλλοντικά δείγματα, έχει αυξηθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια. Τα πειράματα που διεξάχθηκαν σε διαφορετικές μήτρες αφορούσαν κυρίως υβριδικές μικκυλιακές κινητές φάσεις, αποτελούμενες από ένα υδατικό διάλυμα τασιενεργού και έναν μικρό όγκο οργανικών τροποποιητών.

Σχετικά με τον προσδιορισμό καθαρών φαρμακευτικών ουσιών, στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται υβριδικές κινητές φάσεις που έχουν σαν τασιενεργό το Tween-20, το SDS και το Brij-35. Σε μελέτη που έγινε αναφορικά με το μη ιοντικό Brij-35 για την επιλεκτικότητά του στο διαχωρισμό ισομερών θέσης, παρατηρήθηκε ότι αλληλεπιδρά διαφορετικά από ότι τα ιοντικά τασιενεργά. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε διπόλωση, πλεονάζουσα μοριακή διάθλαση και βασικότητα. Επιπλέον, αναπτύχθηκαν μέθοδοι υπόδειξης της σταθερότητας ορισμένων φαρμακευτικών ενώσεων (flavoxate HCl κ.α.). Ο El-Shaheny ανέπτυξε μία τέτοια μέθοδο για τον προσδιορισμό ενώσεων σε περίπλοκες μητρικές διαμορφώσεις, συμπεριλαμβάνοντας υπόθετα και γέλες, με απευθείας έγχυση των δειγμάτων, χωρίς να προηγηθεί προεπεξεργασία που δεν ανήκει στην αραιώση ή τη διήθηση.

Μία ακόμα καίρια εφαρμογή της MLC είναι απευθείας έγχυση βιολογικών δειγμάτων στη στήλη, λόγω της ικανότητας των μικκυλιακών συσσωματωμάτων να διαλύουν πρωτεϊνικά δείγματα και άλλες ενώσεις. Σε αυτά τα δείγματα ανήκουν το πλάσμα, ο ορός αίματος, τα ούρα, το γαστρικό υγρό και το εντερικό υγρό. Σχεδόν σε κάθε περίπτωση υπάρχει οργανικός τροποποιητής.

Πρόσφατα η MLC χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση μεταβολιτών του πλάσματος βραχύβιων ραδιενεργών προσδετών, λόγω της ελαχιστοποίησης του χρόνου επεξεργασίας της μεθόδου. Αυτό συνεπάγεται λιγότερη ραδιενεργή διάσπαση των ραδιονουκλιδίων και πιο ακριβή προσδιορισμό.^[36]

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Σκοπός

Η μελέτη του μηχανισμού έκλυσης μίας σειράς φαρμάκων χρησιμοποιώντας τη μικκυλιακή υγροχρωματογραφία παρουσία του μη ιοντικού τασιενεργού Tween-20, καθώς επίσης και η αξιολόγηση της μεθόδου ως εργαλείο για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων φαρμακολογικών μορίων και την πρόβλεψη βιολογικών διαδικασιών.

3.2 Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκαν:

- KH_2PO_4 ($\geq 99.5\%$, ChemLab)
- Na_2HPO_4 ($\geq 98.5\%$, Honeywell)
- NaCl ($\geq 99.5\%$, Honeywell)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich)
- Νερό υψηλής καθαρότητας (High Purity Water, HPW). Ελήφθη μέσω συστήματος καθαρισμού νερού EASYpure II (Barnstead International, USA).

Για τον υπολογισμό του νεκρού χρόνου της στήλης χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο ($\geq 99.5\%$, Honeywell), μεθανόλη ($\geq 99.9\%$, Honeywell), αιθανόλη και τετραϋδροφουράνιο. Η ρύθμιση του pH στο 7.4 γινόταν με τη βοήθεια αραιού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου και στο 5.5 με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 37%.

3.3 Οργανολογία

Η χρωματογραφική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων στην παρούσα διπλωματική εργασία, 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 έκλουσης 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 έκλουσης 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 τη 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 14: Χρωματογραφική διάταξη

Η ζύγιση των αντιδραστηρίων για την παρασκευή της κινητής φάσης έγινε σε ζυγό ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων (Ohaus), ενώ η ρύθμιση του pH έγινε με τη χρήση πεχαμέτρου (MP125, Mettler Toledo). Για τη διεξαγωγή και καταγραφή των μετρήσεων έγινε χρήση του λογισμικού «EuroChrom 2000» στον Η/Υ που ήταν συνδεδεμένος με το χρωματογραφικό σύστημα.

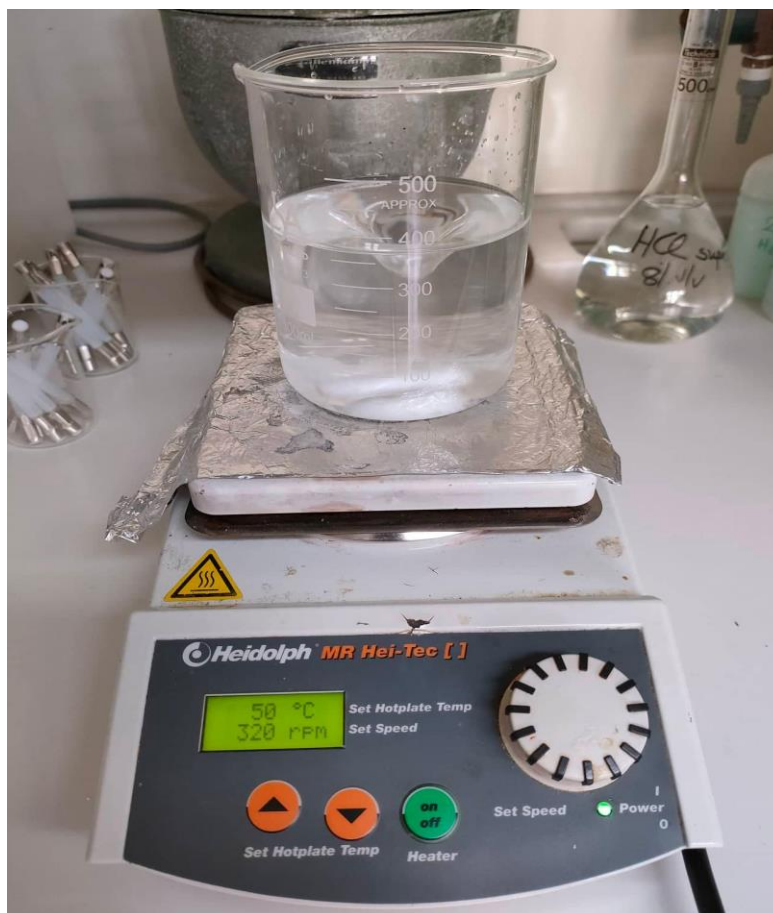
3.4 Πειραματική διαδικασία

3.4.1 Στατική φάση

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

3.4.2 Παρασκευή κινητής φάσης

Για την παρασκευή 500 mL κινητής φάσης, 3.44g Na_2HPO_4 , 0.77g KH_2PO_4 και 4.60g NaCl διαλύονται σε 300-400mL υπερκάθαρο νερό. Ακολουθεί ανάδευση με ρυθμό 300-350 rpm και ρύθμιση του διαλύματος σε $\text{pH}=7.4$. Η ρύθμιση στο 7.4 γίνεται με αραιωμένο διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) 0.1M. Το αρχικό pH του διαλύματος είναι περίπου ίσο με 7.10, γι' αυτό και απαιτείται βασικό διάλυμα για τη ρύθμιση στο 7.4. Μετά τη ρύθμιση του διαλύματος, προστίθενται σε αυτό 0.37g του τασιενεργού Tween 20 με συνεχή ανάδευση, καθώς το Tween 20 είναι σχετικά δυσδιάλυτο στο υδατικό διάλυμα που έχει παρασκευαστεί. Στη συνέχεια, γίνεται μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη των 500mL και προσθήκη υπερκάθολου νερού μέχρι τη χαραγή της.



Εικόνα 15: Ανάδευση κινητής φάσης

3.4.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα βρίσκονταν σε μορφή σκόνης, αμπούλας ή δισκίου. Δε χρειαζόταν προκατεργασία για τις δύο πρώτες περιπτώσεις, ενώ τα δισκία υπόκειντο λειοτρίβιση με χειρονακτικό τρόπο, για να μετατραπούν σε σκόνη. Πριν από την εισαγωγή τους στη στήλη, τα φάρμακα διαλύονταν σε μικρή ποσότητα κινητής φάσης ή οργανικών διαλυτών, όπως μεθανόλη και αιθανόλη, ανάλογα τη διαλυτότητά τους. Το δείγμα ήταν μία μικρή ποσότητα για τις καθαρές ουσίες και λίγο μεγαλύτερη στις περιπτώσεις δισκίων, καθώς αυτά περιέχουν έκδοχα.

3.4.4 Διεξαγωγή μετρήσεων

Αρχικά, γίνεται ενεργοποίηση των συσκευών του χρωματογραφικού συστήματος και αναμονή μερικών λεπτών, ώστε να σταθεροποιηθούν οι συνθήκες λειτουργίας του. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται απαέρωση του διαλύματος της κινητής φάσης για 30-40 λεπτά, αφήνοντάς τον να περάσει από τη στήλη, ώστε να σταθεροποιηθεί η βάση γραμμής (baseline) του συστήματος. Πριν τις μετρήσεις σε δείγματα φαρμάκων και μετά το πέρας αυτών, λαμβάνονται 3 μετρήσεις για το νεκρό χρόνο χρησιμοποιώντας κιτρικό νάτριο αραιωμένο σε ποσότητα κινητής φάσης (περίπου 1:1). Η εισαγωγή των δειγμάτων γίνεται με σύριγγα των 100μL. Στο τέλος των μετρήσεων γίνεται εκ νέου απαέρωση για 2 λεπτά και καθαρισμός της στήλης με διάλυμα νερού-μεθανόλης 50:50, το οποίο διέρχεται από τη στήλη για 40-45 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα φαρμάκων και οργανικές ουσίες που έχουν συκρατηθεί από αυτήν.

Για τα φάρμακα που είχαν μικρό χρόνο κατακράτησης (2-5') έγιναν 3 μετρήσεις. Για τα φάρμακα με χρόνο κατακράτησης 5-40' έγιναν 2 μετρήσεις, ενώ για μεγαλύτερους χρόνους πραγματοποιήθηκε μόνο μία μέτρηση. Οι μετρήσεις έγιναν με τη χρήση του λογισμικού Eurochrom 2000.

Ο νεκρός χρόνος και ο χρόνος κατακράτησης προέκυψαν από το μέσο όρο των μετρήσεων. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο συντελεστής κατανομής και η αξιολόγηση έγινε επί των λογαριθμικών τιμών $\log k$.

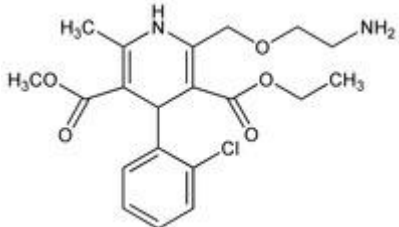
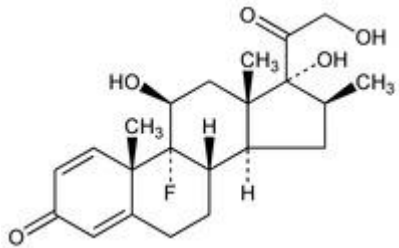
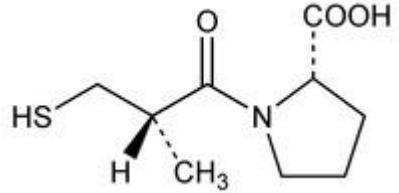
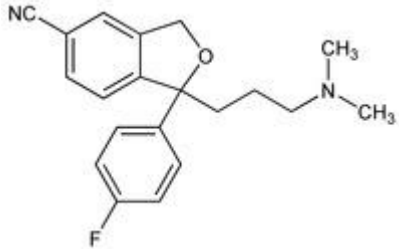
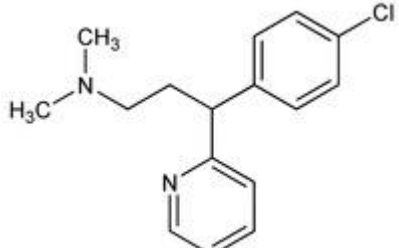
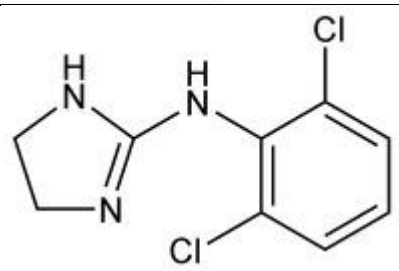
3.5 Φάρμακα που μελετήθηκαν

Μελετήθηκαν συνολικά 25 φάρμακα σε $pH = 7.4$, και 7 εξ'αυτών μελετήθηκαν στο 5.5. Στο 5.5 μελετήθηκαν όλα τα όξινα και αμφολυτικά φάρμακα, καθώς και μία βάση, ενδεικτικά. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικά pH , για λόγους προσομοίωσης της συμπεριφοράς του ανθρώπινου οργανισμού. Το 7.4 είναι η τιμή του pH του αίματος, ενώ το 5.5 αντιστοιχεί σε περιοχές κοντά στο λεπτό έντερο. Τα ουδέτερα φάρμακα δεν επηρεάζονται από αλλαγές του pH , ενώ τα βασικά αναμένεται να εκλουστούν γρηγορότερα. Η κατηγοριοποίηση των φαρμάκων βάσει του ιοντισμού τους είναι η εξής:


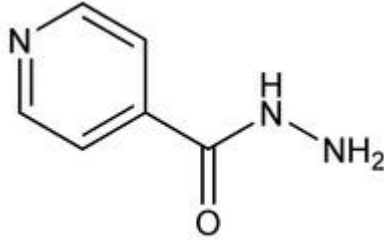
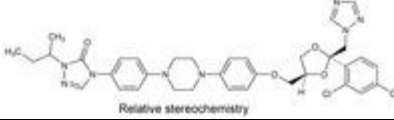
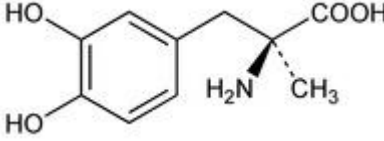
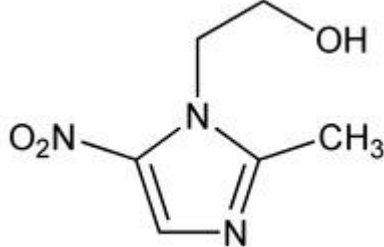
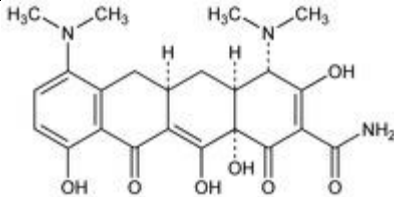
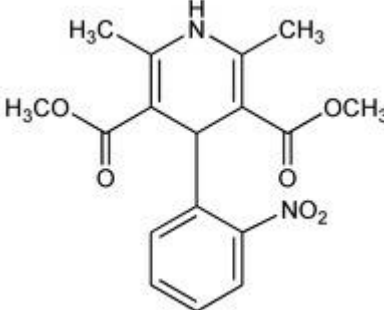
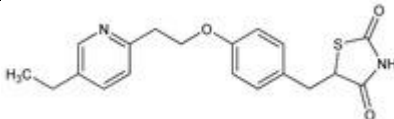
- A: Οξέα (Acids)
- B: Βάσεις (Bases)
- N: Ουδέτερα (Neutrals)
- Z: Αμφολύτες (Zwitterions)

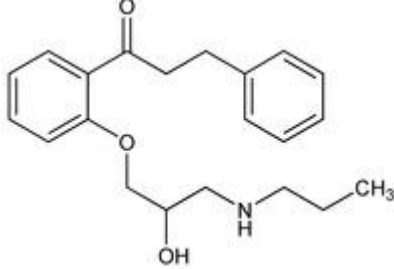
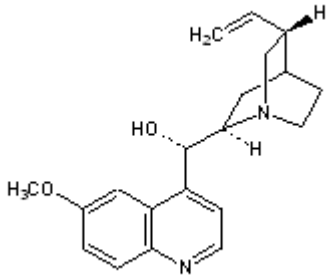
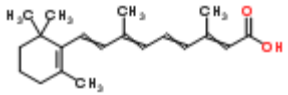
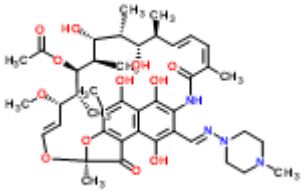
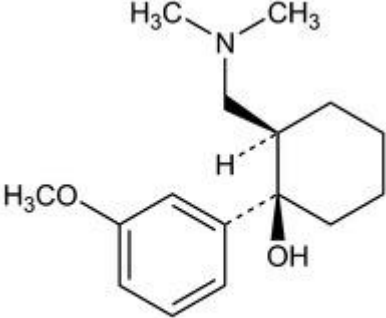
Στον ακόλουθο πίνακα δίνονται όλα τα φάρμακα που μελετήθηκαν, καθώς και ο τύπος, η φαρμακολογική δράση και η δομή τους.

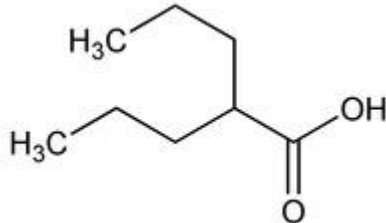
Πίνακας 1: Φάρμακα που μελετήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους^{[45][46]}

| A/A | Φάρμακο | Τύπος | Φαρμακολογική δράση | Δομή |
|-----|------------------|-------|---|--|
| 1 | Amlodipine | B | Φάρμακο κατά της στεφανιαίας νόσου (αντιυπερτασικό) |  |
| 2 | Betamethasone | N | Αντιφλεγμονώδες |  |
| 3 | Captopril | A | Αντιυπερτασικό |  |
| 4 | Citalopram | B | Αντικαταθλιπτικό |  |
| 5 | Chlorpheniramine | B | Αντιισταμινικό |  |
| 6 | Clonidine | B | Αντιυπερτασικό |  |

| | | | | |
|----|--------------|---|-------------------------------------|--|
| 7 | Codeine | B | Οπιοειδές αναλγητικό | |
| 8 | Colchicine | N | Φάρμακο κατά της ουρικής αρθρίτιδας | |
| 9 | Doxycycline | Z | Αντιβιοτικό | |
| 10 | Erythromycin | B | Αντιβιοτικό | |
| 11 | Fentanyl | B | Οπιοειδές αναλγητικό | |

| | | | | |
|----|---------------|---|-----------------|--|
| 12 | Fluconazole | N | Αντιμυκητιασικό |  |
| 13 | Isoniazid | N | Αντιφυματικό |  |
| 14 | Itraconazole | N | Αντιμυκητιασικό |  |
| 15 | Methyldopa | Z | Αντιυπερτασικό |  |
| 16 | Metronidazole | N | Αντιβιοτικό |  |
| 17 | Minocycline | Z | Αντιβιοτικό |  |
| 18 | Nifedipine | N | Καρδιολογικό |  |
| 19 | Pioglitazone | Z | Αντιδιαβητικό |  |

| | | | | |
|----|---------------|---|---|---|
| 20 | Propafenone | B | Αντιαρρυθμικό |  |
| 21 | Quinidine | B | Φάρμακο για τη θεραπεία καρδιακών παθήσεων, Αντιαρρυθμικό |  |
| 22 | Retinoic acid | A | Φάρμακο κατά της ακμής |  |
| 23 | Rifampicin | B | Αντιβιοτικό |  |
| 24 | Tramadol | B | Οπιοειδές αναλγητικό |  <p data-bbox="914 1791 1222 1822">Relative stereochemistry</p> |

| | | | | |
|----|---------------|---|----------------|--|
| 25 | Valproic acid | A | Αντιεπιληπτικό |  |
|----|---------------|---|----------------|--|

3.6 Στατιστική ανάλυση μετρήσεων

Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων έγινε με χρήση του λογισμικού IBM SPSS Statistics. Για τη διεξαγωγή διαφόρων συσχετίσεων και των αντίστοιχων εξισώσεων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης. Σε κάθε περίπτωση 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 εξάγεται και ο συντελεστής παλινδρόμησης μαζί με το τυπικό σφάλμα. Επιπρόσθετα, ελέγχεται η σημαντικότητα των μεταβλητών που εμφανίζονται σε κάθε εξίσωση με χρήση του πίνακα Student για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Οι μεταβλητές που δεν είναι στατιστικά σημαντικές αφαιρούνται και επαναλαμβάνονται οι αναλύσεις παλινδρόμησης.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Για τη διεξαγωγή της στατιστικής ανάλυσης των πειραματικών μετρήσεων αξιοποιήθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα που αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων του Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 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.

4.1 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^+ , $F_{z_{wit}^+}$) και αρνητικού (F^- , $F_{z_{wit}^-}$) φορτίου όλων των φαρμάκων που μελετήθηκαν σε pH 7.4 και 5.5. 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 $\log D$ και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου των φαρμάκων που μελετήθηκαν

| A/A | Φάρμακο | M.B. | $\log P$ | $\log D$ | F^+ | F^- | $F_{z_{wit}^+}$ | $F_{z_{wit}^-}$ |
|-----|------------------|--------|----------|----------|-------|-------|-----------------|-----------------|
| 1 | Amlodipine | 408,87 | 2,96 | 1,66 | 0,994 | 0 | 0,994 | 0 |
| 2 | Betamethasone | 392,46 | 1,94 | 1,94 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | Captopril | 217,29 | -0,05 | -4,43 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 4 | Citalopram | 324,39 | 3,41 | 1,44 | 0,991 | 0 | 0,991 | 0 |
| 5 | Chlorpheniramine | 274,79 | 3,39 | 1,58 | 0,986 | 0 | 0,986 | 0 |
| 6 | Clonidine | 230,09 | 1,59 | 0,97 | 0,779 | 0 | 0,779 | 0 |
| 7 | Codeine | 299,36 | 1,14 | 0,37 | 0,848 | 0 | 0,848 | 0 |
| 8 | Colchicine | 399,44 | 1,03 | 1,03 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | Doxycycline | 444,43 | -0,02 | -2,53 | 0 | 0,014 | 0,986 | 1 |
| 10 | Erythromycin | 733,92 | 2,54 | 1,32 | 0,946 | 0 | 0,946 | 0 |
| 11 | Fentanyl | 336,47 | 4,05 | 3,27 | 0,848 | 0 | 0,848 | 0 |
| 12 | Fluconazole | 306,27 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | Isoniazid | 137,14 | -0,7 | -0,92 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | Itraconazole | 705,63 | 5,66 | 5,66 | 0,011 | 0 | 0,011 | 0 |
| 15 | Methyldopa | 211,21 | -2,74 | -2,75 | 0 | 0,018 | 0,982 | 1 |

| | | | | | | | | |
|----|---------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 16 | Metronidazole | 171,15 | -0,02 | -0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | Minocycline | 457,48 | 0,05 | -2,95 | 0 | 0,014 | 0,986 | 1 |
| 18 | Nifedipine | 346,33 | 2,2 | 2,2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | Pioglitazone | 356,44 | 2,94 | 1,98 | 0,001 | 0,867 | 0,011 | 0,877 |
| 20 | Propafenone | 341,44 | 3,2 | 1,81 | 0,992 | 0 | 0,992 | 0 |
| 21 | Quinidine | 324,42 | 3,44 | 2,41 | 0,946 | 0 | 0,946 | 0 |
| 22 | Retinoic acid | 300,43 | 6,3 | 3,33 | 0 | 0,999 | 0 | 0,999 |
| 23 | Rifampicin | 822,94 | 2,7 | 1,99 | 0,635 | 0,041 | 0,778 | 0,184 |
| 24 | Tramadol | 263,37 | | | 0,998 | 0 | 0,998 | 0 |
| 25 | Valproic acid | 144,21 | 2,75 | 0,26 | 0 | 0,996 | 0 | 0,996 |

4.2 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 τριών ακόμη διαφορετικών τασιενεργών. 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*»^[47]. Οι μελέτες έγιναν σε ίδιες συνθήκες pH (7.4 και 5.5), μήκους κύματος του ανιχνευτή (220 nm), 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), 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 Tween-20. Δε θα γίνει συσχέτιση των συντελεστών σε pH 5.5, καθώς τα δεδομένα είναι ελάχιστα και μια τέτοια συσχέτιση θα στερούνταν στατιστικής σημασίας. Για τα κελιά που είναι κενά δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα.

Πίνακας 3: Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης MLC για τα τασιενεργά Brij-35, SDS και Triton X-100

| A/A | Φάρμακο | $\log k_{\text{Brij-35}}$ | $\log k_{\text{SDS}}$ | $\log k_{\text{TritonX-100}}$ |
|-----|------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| 1 | Amlodipine | 1,021 | 1,9 | 1,268 |
| 2 | Betamethasone | | | 1,163 |
| 3 | Captopril | -1,718 | | 0,266 |
| 4 | Citalopram | | | 1,071 |
| 5 | Chlorpheniramine | 1,226 | 1,561 | 1,204 |

| | | | | |
|----|---------------|-------|-------|--------|
| 6 | Clonidine | 0,645 | 1,452 | 0,64 |
| 7 | Codeine | | | 1,789 |
| 8 | Colchicine | | | |
| 9 | Doxycycline | | | |
| 10 | Erythromycin | | | 0,136 |
| 11 | Fentanyl | 1,606 | | 1,727 |
| 12 | Fluconazole | 0,604 | | 0,389 |
| 13 | Isoniazid | -0,17 | | -0,477 |
| 14 | Itraconazole | | | |
| 15 | Methyldopa | | | 0,035 |
| 16 | Metronidazole | | | -0,107 |
| 17 | Minocycline | | | -0,125 |
| 18 | Nifedipine | 1,387 | | 1,891 |
| 19 | Pioglitazone | | | 1,707 |
| 20 | Propafenone | 1,302 | 2,042 | 1,518 |
| 21 | Quinidine | 1,224 | 1,966 | 1,336 |
| 22 | Retinoic acid | 2,296 | | 1,98 |
| 23 | Rifampicin | 1,428 | 1,476 | 0,955 |
| 24 | Tramadol | 0,705 | | 1,274 |
| 25 | Valproic acid | | | 1,504 |

4.3 Δεδομένα IAM

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα δεδομένα των συντελεστών κατακράτησης για τη Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM). Τα δεδομένα αντλήθηκαν από προγενέστερη έρευνα του εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη IAM.PC.DD2. Για τα κενά κελιά δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα.

Πίνακας 4: Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης της IAM

| A/A | Φάρμακο | IAM.PC.DD2 |
|-----|------------------|------------|
| 1 | Amlodipine | 3,4 |
| 2 | Betamethasone | |
| 3 | Captopril | |
| 4 | Citalopram | 2,569 |
| 5 | Chlorpheniramine | 2,03 |
| 6 | Clonidine | 1,116 |
| 7 | Codeine | 0,953 |

| | | |
|----|---------------|--------|
| 8 | Colchicine | 1,98 |
| 9 | Doxycycline | |
| 10 | Erythromycin | |
| 11 | Fentanyl | |
| 12 | Fluconazole | |
| 13 | Isoniazid | -0,598 |
| 14 | Itraconazole | |
| 15 | Methyldopa | -0,517 |
| 16 | Metronidazole | |
| 17 | Minocycline | 0,168 |
| 18 | Nifedipine | 1,66 |
| 19 | Pioglitazone | 2,896 |
| 20 | Propafenone | 1,46 |
| 21 | Quinidine | 2,34 |
| 22 | Retinoic acid | 4,585 |
| 23 | Rifampicin | 1,615 |
| 24 | Tramadol | |
| 25 | Valproic acid | 1,756 |

4.4 Δεδομένα κυτταρικής διαπερατότητας μέσω επιθηλιακών σειρών εντέρου Caco-2, διαπερατότητας μέσω σειρών τεχνητών μεμβρανών, PAMPA και φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (%PPB, V_d)

Τα δεδομένα κυτταρικής διαπερατότητας μέσω των επιθηλιακών σειρών εντέρου, διαπερατότητας μέσω των σειρών τεχνητών μεμβρανών, PAMPA, και των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 5: Δεδομένα διαπερατότητας Caco-2, PAMPA και %PPB, V_d

| | logPapp(Caco-2) | logPapp(PAMPA) | % Plasma Protein Binding | V_d (L/Kg) |
|----------------------|-----------------|----------------|--------------------------|--------------|
| Acetylsalicylic acid | | | 49 | 0,18 |
| Albendazole | | | 70 | 10,6 |
| Allopurinol | | | 5 | 0,86 |
| Amitriptyline | | | 94,8 | 16,8 |
| Amoxicillin | | | 19,2 | 0,21 |
| Ampicillin | | | 20 | 0,38 |
| Caffeine | | -5,796 | 40 | 0,6 |

| | | | | |
|------------------|-------|--------|-------|-------|
| Chlordiazepoxide | | | 94 | 3,3 |
| Chlorpheniramine | | | 69,5 | 9 |
| Chlorpromazine | | -5,26 | 96,5 | 20,5 |
| Ciprofloxacin | -5,61 | | 40 | 2,45 |
| Diphenhydramine | | | 81,5 | 4,27 |
| Diltiazem | | -4,759 | 78 | 5,09 |
| Enoxacin | | | 40 | 2,75 |
| Estradiol | | | 95 | 12 |
| Flunitrazepam | | | 78 | 4 |
| Fluoxetine | | | 94 | 31,12 |
| Haloperidol | | | 92 | 18 |
| Ibuprofen | | -5,569 | 99 | 0,12 |
| Indomethacin | | | 90 | 0,8 |
| Ketoprofen | -4,73 | -7,301 | 98 | 0,1 |
| Lidocaine | | | 67 | 1,3 |
| Losartan | | | 99,2 | 0,45 |
| Mebendazole | | | 92,5 | 1,3 |
| Mefenamic acid | | | 90 | 1,06 |
| Nifedipine | -4,49 | | 96 | 1,81 |
| Nortriptyline | | | 92,25 | 22,05 |
| Ofloxacin | | | 32 | 2,35 |
| Paracetamol | | -9 | 22,5 | 0,92 |
| Pentazocine | | | 61,5 | 5,6 |
| Phenobarbital | | | 51 | 0,61 |
| Pindolol | -4,91 | | 40 | 1,86 |
| Piroxicam | | -5,658 | 99 | 0,13 |
| Promethazine | | -5,137 | 93 | 13,4 |
| Propafenone | | | 97 | 3,6 |
| Propranolol | -4,67 | -5 | 87 | 4 |
| Protriptyline | | | 92 | 23 |
| Pyrimethamine | | | 87 | 2,9 |
| Quinidine | -4,88 | | 87 | 2,5 |
| Sulfamethoxazole | | | 53 | 0,24 |
| Tenoxicam | | | 98,5 | 11 |
| Terbutaline | -5,62 | -7,398 | 19,5 | 1,6 |
| Theophylline | | -7,398 | 56 | 0,48 |
| Thioridazine | | | 97,9 | 7,13 |
| Trazodone | | | 92,5 | 0,89 |
| Acyclovir | | | 18,75 | 0,7 |
| Amlodipine | | | 95,75 | 19,33 |
| Atenolol | -5,79 | | 11 | 1,15 |

| | | | | |
|---------------------|-------|--------|-------|------|
| Bromazepam | -4,4 | | 70 | 1,15 |
| Enalapril | | | | 1,7 |
| Metformin | -5,11 | | 0 | 1,69 |
| Naproxen | -4,51 | -6,481 | 99,7 | 0,16 |
| Nimesulide | | | 97,5 | 0,29 |
| Norfloxacin | -5,63 | | 13,75 | 2,8 |
| Trimethoprim | -4,76 | | 41,7 | 1,34 |
| Verapamil | -4,64 | -5,013 | 90 | 4,8 |
| Carbamazepine | -4,38 | -5,149 | 72,3 | 1,33 |
| Dexamethazone | -5,27 | | 70,75 | 0,58 |
| Diclofenac | | | 99,5 | 0,16 |
| Furosemide | -5,89 | -7,699 | 96,8 | 0,16 |
| Hydrochlorothiazide | -5,74 | -8 | 64,6 | 5,7 |
| Lisinopril | -6,18 | | 2,1 | 2,05 |
| Metoprolol | -4,75 | -6,161 | 11,3 | 4,33 |
| Ranitidine | -5,6 | -8,046 | 15 | 1,46 |
| Labetalol | | | 50 | 8,95 |
| Prednisolone | | | 92,5 | 0,44 |
| Ceftriaxone | | | 95 | 0,14 |
| Chloramphenicol | -4,97 | | 54 | 0,96 |
| Cimetidine | -5,79 | | 18,5 | 1,12 |
| Cinoxacin | | | 66,5 | 0,23 |
| Hydrocortisone | | | 95 | 0,54 |
| Isoxicam | | | 96 | |
| Levofloxacin | | | 32,3 | 1,38 |
| Lornixicam | | | 99 | 0,2 |
| Meloxicam | | | 99,3 | 10 |
| Methylprednisolone | -5,25 | | 77,3 | 1,26 |
| Metoclopramide | | | 33,3 | 3,3 |
| Minoxidil | | | 0 | 2,86 |
| Nadolol | -5,91 | | 30 | 2 |
| Nalidixic acid | | | 93 | 0,4 |
| Niflumic acid | | | 90 | 0,12 |
| Omeprazole | -4,3 | | 95 | 0,33 |
| Pipemidic acid | | | 30 | 1,9 |
| Piperacillin | | | 19 | 1,35 |
| Salicylic acid | | -8,222 | 95 | 0,15 |
| Sulpiride | | -8 | 14 | 2,05 |
| Vancomycin | | | 43,3 | 0,52 |
| Warfarin | -4,38 | | 98,75 | 0,15 |
| Antipyrine | | -6,15 | 5 | 0,6 |

| | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|-------|
| Atropine | | | 20 | 2,75 |
| Clonidine | -4,46 | | 27,5 | 2,3 |
| Desipramine | | -4,91 | 86,25 | 22,5 |
| Fluphenazine | | | 95 | 11 |
| Imipramine | -4,66 | -4,95 | 82,75 | 17,25 |
| Nicotine | | | 6,5 | 2,53 |
| Nitrofurantoin | | | 73,75 | 0,66 |
| Primidone | | | 38 | 0,64 |
| Promazine | | | 94 | 8,38 |
| Rifampicin | | | 78 | 0,99 |
| Citalopram | | | 80 | 12 |
| Codeine | -4,64 | | 11,5 | 3,55 |
| Colchicine | -5,89 | | 39 | 6,5 |
| Fenofibrate | | | 99,5 | 0,89 |
| Isoniazide | | | 2,5 | 0,67 |
| Methyldopa | | | 0 | 1,9 |
| Minocycline | | | 76 | 1,3 |
| Phenytoin | | | 89,5 | 0,7 |
| Pioglitazone | | | 99,5 | 0,63 |
| Pyrazinamide | | | 10 | 0,57 |
| Retinoic acid | | | 97,5 | |
| Valproic acid | | | 93 | 0,27 |
| Fentanyl | | | 83,25 | 4 |
| Tramadol | | | 20 | 2,72 |
| Betamethasone | | | | |
| Captopril | | | 27,5 | |
| Erythromycine | -6,48 | | 85,25 | 0,78 |
| Fluconazole | | | 11,25 | 0,62 |
| Metronidazole | | | 11 | 0,78 |

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Συντελεστές κατακράτησης σε pH 7.4 και 5.5 ($\log k_{\text{tween}}$)

Πίνακας 6: Συντελεστές κατακράτησης σε pH 7.4 και 5.5 ($\log k_{\text{tween}}$)

Στον πίνακα παρουσιάζονται οι συντελεστές κατακράτησης των 25 φαρμάκων που μετρήθηκαν σε pH 7.4 και 7 εξ'αυτών σε pH 5.5. Για τα φάρμακα για τα οποία έγιναν δύο ή τρεις μετρήσεις,

| A/A | Φάρμακο | $\log k_{\text{tween}}(7.4)$ | $\log k_{\text{tween}}(5.5)$ |
|-----|------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1 | Amlodipine | 0,391 | |
| 2 | Betamethasone | 1,762 | |
| 3 | Captopril | 0,517 | -1,33 |
| 4 | Citalopram | 1,523 | |
| 5 | Chlorpheniramine | 1,75 | |
| 6 | Clonidine | 1,134 | |
| 7 | Codeine | 0,544 | |
| 8 | Colchicine | 1,799 | |
| 9 | Doxycycline | -0,525 | -0,72 |
| 10 | Erythromycin | -0,893 | |
| 11 | Fentanyl | 1,583 | |
| 12 | Fluconazole | 0,92 | |
| 13 | Isoniazid | 0,09 | |
| 14 | Itraconazole | 0,811 | |
| 15 | Methyldopa | -0,764 | -0,71 |
| 16 | Metronidazole | 0,426 | |
| 17 | Minocycline | 0,958 | 0,90 |
| 18 | Nifedipine | 1,641 | |
| 19 | Pioglitazone | 1,773 | 1,79 |
| 20 | Propafenone | 1,775 | |
| 21 | Quinidine | 1,726 | |
| 22 | Retinoic acid | 1,977 | 1,91 |
| 23 | Rifampicin | 1,668 | |
| 24 | Tramadol | 0,563 | |
| 25 | Valproic acid | 1,29 | 1,65 |

ο συντελεστής $\log k$ προέκυψε από το μέσο όρο των μετρήσεων. Ο συντελεστής k υπολογίστηκε από τη σχέση $k = \frac{tR'}{t_m}$ και παρουσιάζεται στη λογαριθμική μορφή του. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100% υδατική, οπότε δε χρειάστηκε προσαρμογή των τιμών του $\log k$.

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 Retinoic acid, με $\log k = 1,977$ και χρόνο ανάσχεσης περίπου 95 min. Η μικρότερη τιμή $\log k = -0,893$ παρατηρείται στην ουσία Erythromycin με χρόνο ανάσχεσης 1,42 min. Από τις ουσίες που μελετήθηκαν σε pH 5.5, το μεγαλύτερο συντελεστή κατανομής είχε η ουσία Retinoic acid ($\log k=1,919$), η οποία εκλούστηκε από τη στήλη στα 86 min, ενώ το μικρότερο $\log k$ ίσο με $-1,339$ είχε σε αυτήν την περίπτωση η ουσία Captopril με χρόνο κατακράτησης 1,07 min.

5.2 Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με συντελεστές λιποφιλίας

Σε όλα τα είδη μικκυλιακής χρωματογραφίας υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ της κατακράτησης των ουσιών από τη στήλη και της λιποφιλίας. Διαφορετικές συνθήκες οδηγούν σε διαφορετική συμπεριφορά των ίδιων ενώσεων. Επίσης, κάθε τασιενεργό επιδρά διαφορετικά στην κατακράτηση ουσιών, καθώς τα ιοντισμένα ασθενή οξέα παρουσιάζουν πρόσθετες ελκτικές δυνάμεις με τα ιοντικά τασιενεργά.

Οι συσχετίσεις των συντελεστών κατακράτησης για το Tween-20 με τους συντελεστές λιποφιλίας έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού IBM SPSS Statistics για φάρμακα για τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα. Γίνεται διαφοροποίηση των φαρμάκων ανάλογα με την κατηγορία στην οποία ανήκουν, η οποία αναπαρίσταται με διαφορετικό χρωματισμό για κάθε ομάδα στα διαγράμματα (μπλε: 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.

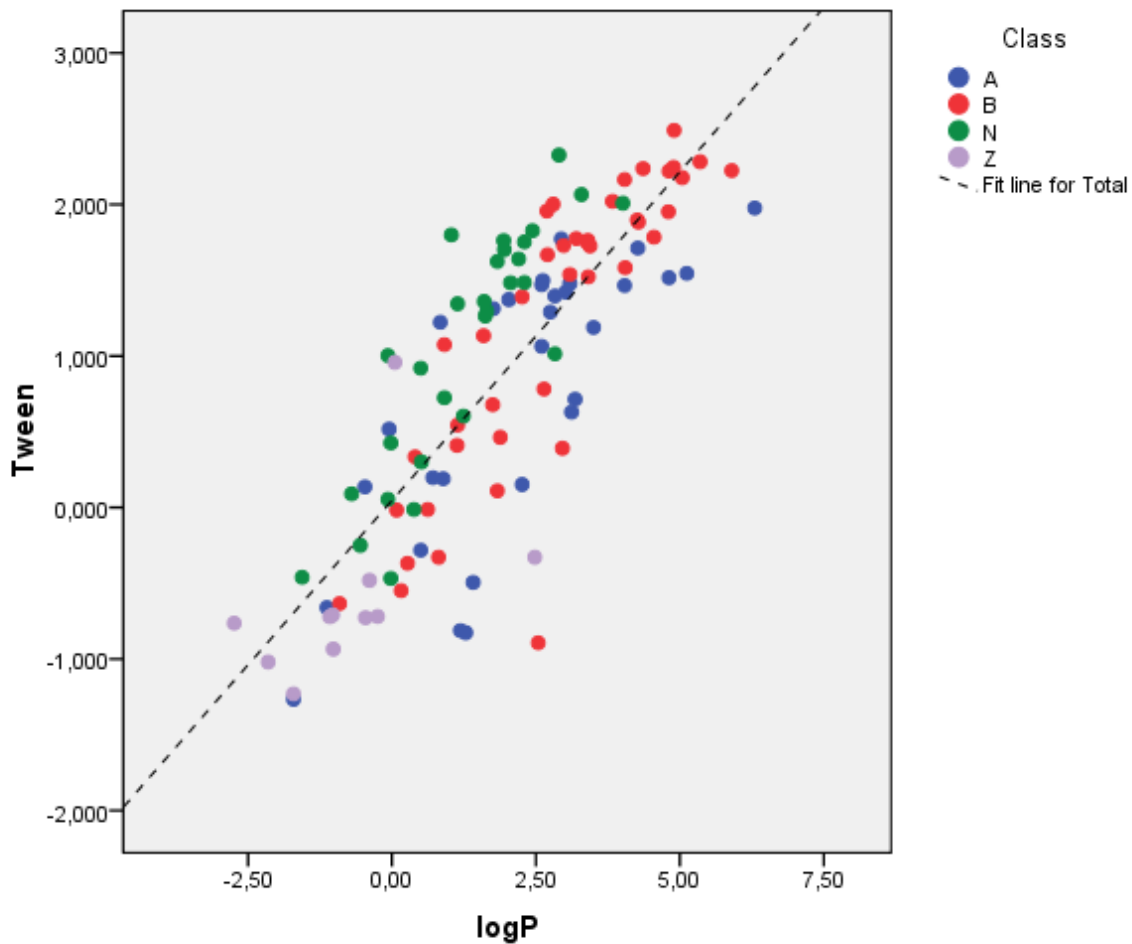
5.2.1 Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με το συντελεστή μερισμού $\log P$

Ο συντελεστής μερισμού εκφράζει τη λιποφιλία της μη ιοντισμένης μορφής ενός φαρμάκου. Η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης $\log k_{\text{tween}}$ με το συντελεστή μερισμού $\log P$ σε pH 7.4 γίνεται με γραμμική παλινδρόμηση, με εξαρτημένη μεταβλητή το συντελεστή $\log k_{\text{tween}}$ και ανεξάρτητη μεταβλητή το συντελεστή $\log P$. Η εξίσωση που προκύπτει από τη συσχέτιση είναι η εξής:

$$\log k_{w(\text{Tween})} = 0.434(\pm 0.029) \cdot \log P + 0.046(\pm 0.078)$$

$$(N= 112, R= 0.818, R^2= 0.669, s= 0.585, F= 222.7)$$

Η εξίσωση προέκυψε από τις μετρήσεις που διεξήχθησαν σε συνδυασμό με μετρήσεις από προηγούμενες έρευνες. Η συσχέτιση παριστάνεται γραφικά στο ακόλουθο διάγραμμα:



Διάγραμμα 1: Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με το συντελεστή μερισμού $\log P$

Παρατηρώντας το διάγραμμα υπάρχει επίδραση από τον ιοντισμό, οπότε γίνεται εισαγωγή των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου στην παραπάνω συσχέτιση και ελέγχεται αν είναι στατιστικά σημαντικό.

Κατόπιν εισαγωγής του θετικού (F^+) και αρνητικού (F^-) φορτίου ως ανεξάρτητες μεταβλητές στη γραμμική παλινδρόμηση, προκύπτει η βελτιωμένη εξίσωση:

$$\log k_{w(\text{Tween})} = 0.507(\pm 0.031) \cdot \log P - 0.582(\pm 0.150) \cdot F^+ - 0.711(\pm 0.148) \cdot F^- + 0.290(\pm 0.087)$$

$$(N = 112, R = 0.855, R^2 = 0.732, s = 0.532, F = 98.2)$$

Τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου έχουν αρνητικό συντελεστή, το οποίο σημαίνει ότι ο ιοντισμός μειώνει τη συγκράτηση καθώς μειώνεται η λιποφιλία.

5.2.2 Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με το συντελεστή κατανομής $\log D$

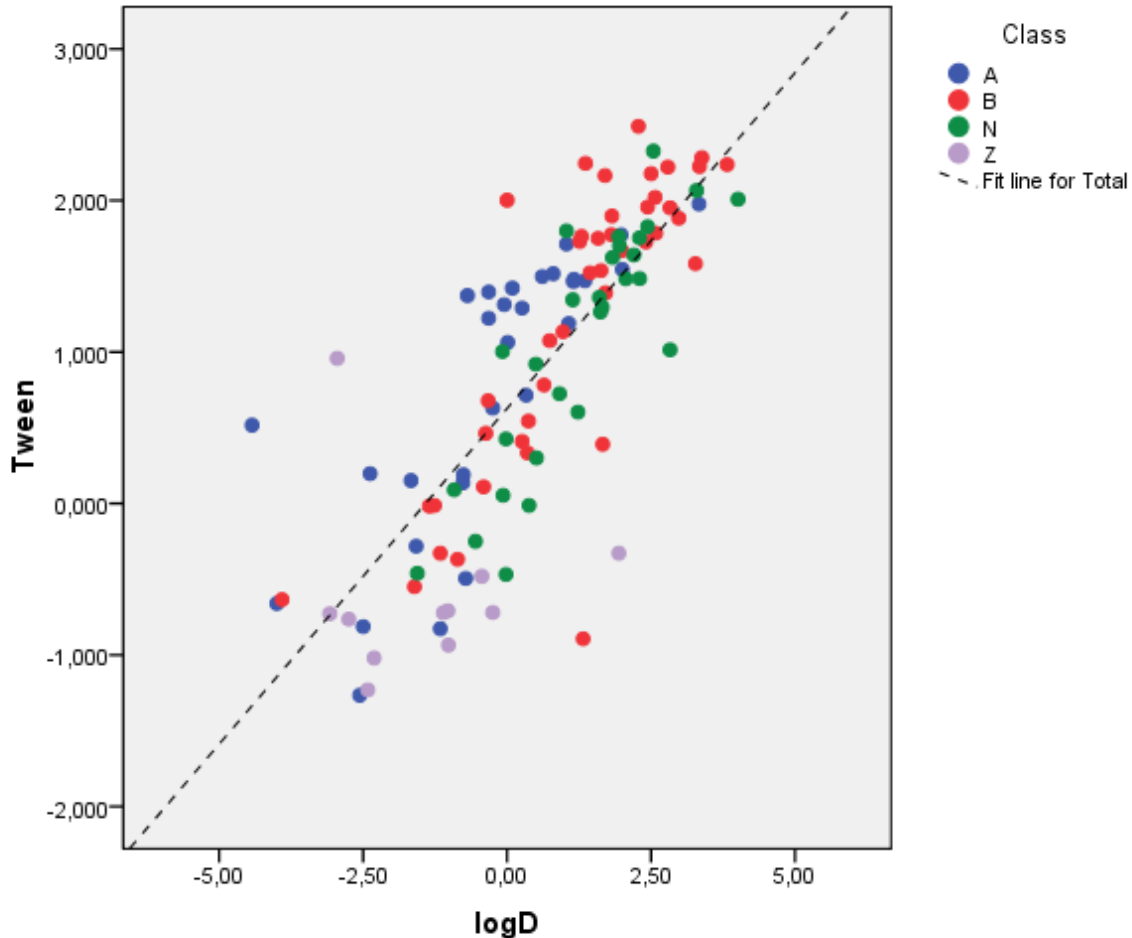
Ο συντελεστής κατανομής $\log D$ εκφράζει τη λιποφιλία λαμβάνοντας υπόψιν τον ιοντισμό του κάθε φαρμάκου σε δεδομένο pH. Η συσχέτιση γίνεται για τα φάρμακα για τα οποία υπάρχουν δεδομένα σε pH 7.4. Ο ιοντισμός μέσα στη στήλη είναι λίγο μικρότερος από τον ιοντισμό σε υδατικό διάλυμα του ίδιου pH, καθώς αλλάζει η διηλεκτρική σταθερά.

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

$$\log k_{w(\text{Tween})} = 0.443(\pm 0.033) \cdot \log D + 0.628(\pm 0.062)$$

$$(N = 112, R = 0.790, R^2 = 0.624, s = 0.624, F = 182.7)$$

Η εξίσωση παριστάνεται γραφικά παρακάτω:



Διάγραμμα 2: Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με το συντελεστή κατανομής $\log D$

Η συσχέτιση σε αυτήν την περίπτωση είναι λιγότερο ικανοποιητική ($R^2=0.624$) σε σύγκριση με αυτή του $\log P$, επιβεβαιώνοντας ότι ο ιοντισμός των ενώσεων καταστέλλεται εντός της χρωματογραφικής στήλης.

Κατόπιν εισαγωγής του θετικού (F^+) και αρνητικού (F^-) φορτίου ως ανεξάρτητες μεταβλητές στη γραμμική παλινδρόμηση, προκύπτει η βελτιωμένη εξίσωση:

$$\log k_{w(\text{Tween})} = 0.457(\pm 0.032) \cdot \log P + 0.364(\pm 0.144) \cdot F^+ + 0.589(\pm 0.153) \cdot F^- + 0.344(\pm 0.095)$$

($N=112$, $R=0.820$, $R^2=0.672$, $s=0.589$, $F=73.7$)

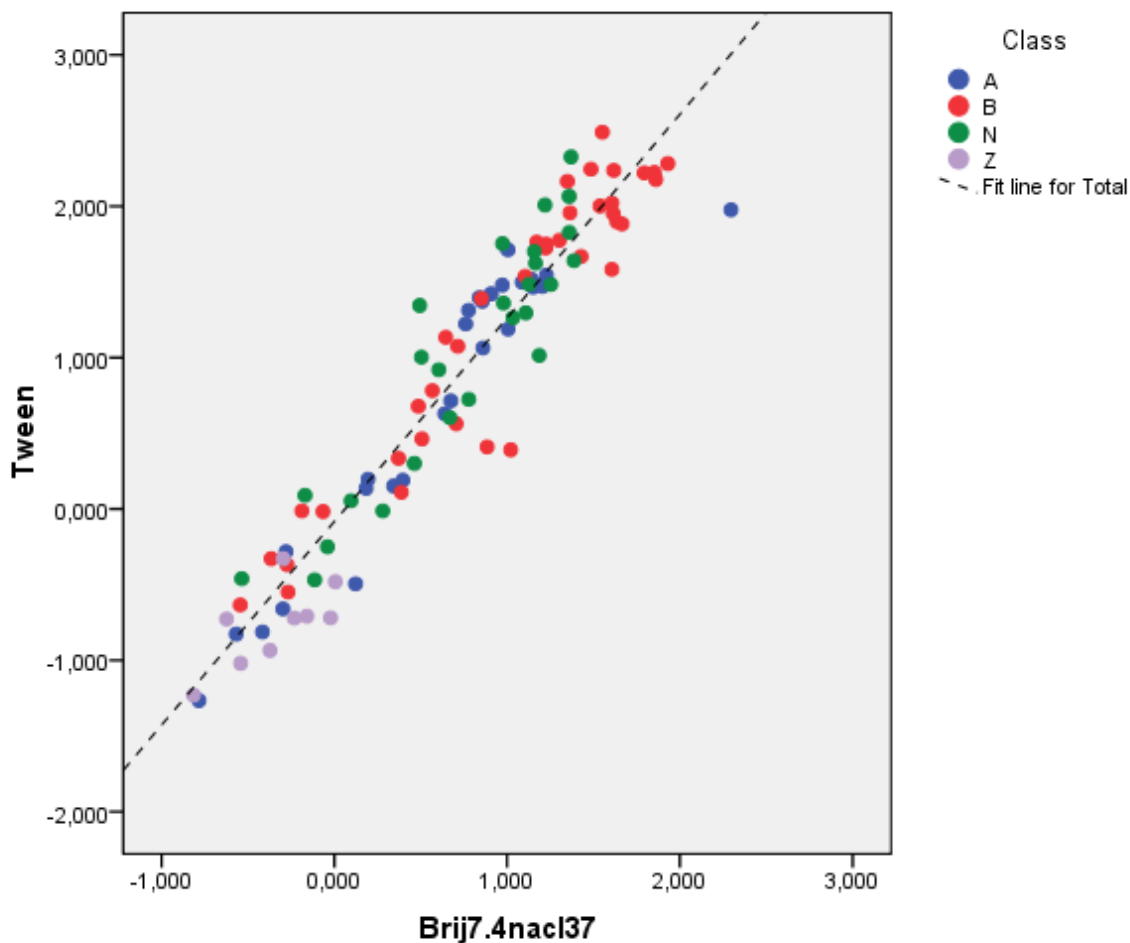
Τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου έχουν αρνητικό συντελεστή, το οποίο σημαίνει ότι ο ιοντισμός μέσα στη στήλη είναι μικρότερος σε σχέση με το νερό, καθώς αλλάζει η διηλεκτρική σταθερά.

5.3 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 Tween-20 σε σύγκριση με τους αντίστοιχους συντελεστές για τα τασιενεργά Brij-35, SDS, Triton X-100, καθώς και για τη χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών με στήλη IAM.DD2.

5.3.1 Συσχέτιση $\log_{\text{Tween-20}}$ με τους συντελεστές $\log_{\text{Brij-35}}$

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η συσχέτιση των $\log_{\text{Tween-20}}$ με τους αντίστοιχους συντελεστές για το μη ιοντικό τασιενεργό Brij-35.



Διάγραμμα 3: Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με $\log_{\text{Brij-35}}$

Η συσχέτιση των συντελεστών μεταξύ των δύο τασιενεργών θεωρείται πολύ ικανοποιητική ($R^2=0.908$). Αν στη συσχέτιση συμπεριληφθούν και τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, η εξίσωση διαμορφώνεται ως εξής:

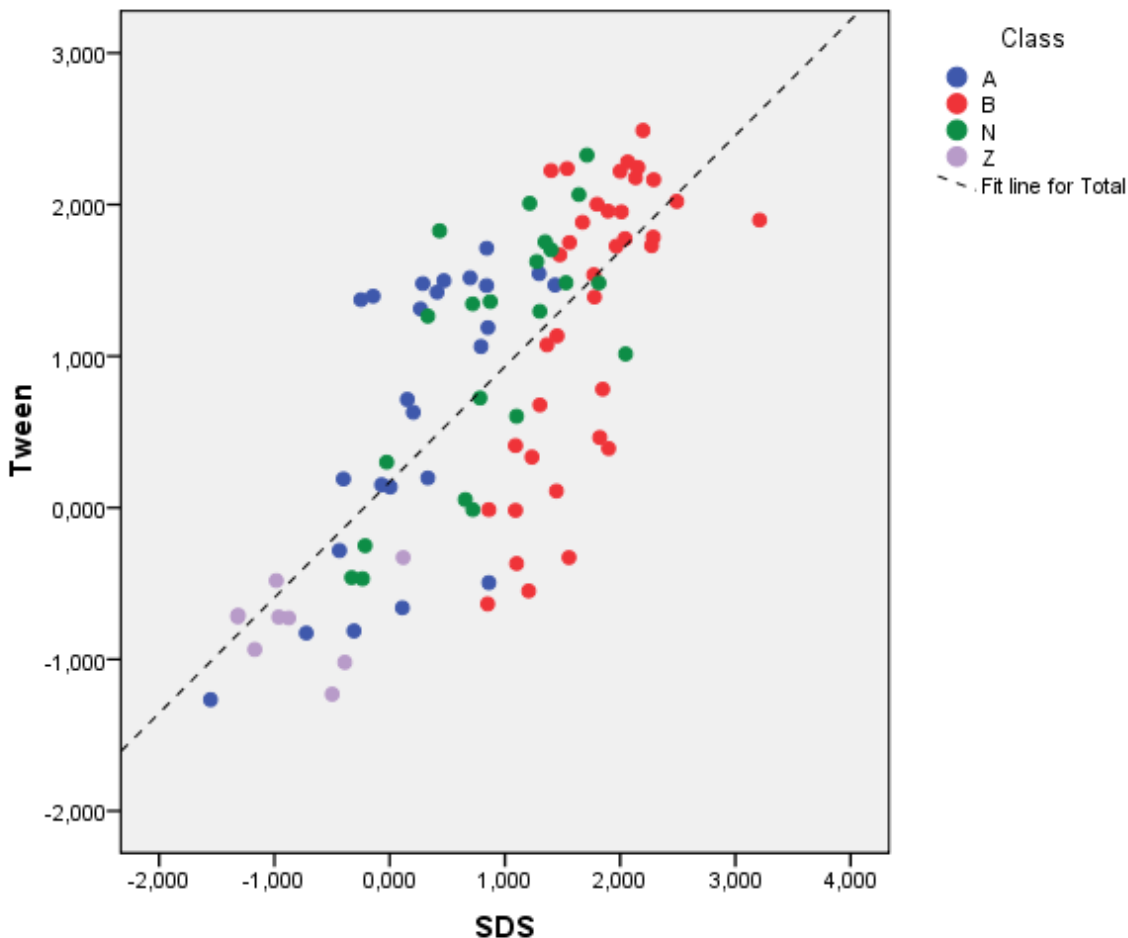
$$\log k_{w(\text{Tween})} = 1.345(\pm 0.043) \cdot \log k_{w(\text{Brij-35})} - 0.083(\pm 0.043)$$

($N=101$, $R=0.953$, $R^2=0.908$, $s=0.311$, $F=975.9$)

Η κλίση είναι 1.345, δηλαδή παρουσία του τασιενεργού Tween-20 οδηγούμαστε σε μεγαλύτερο εύρος τιμών $\log k_w$. Πρόκειται για ένα επιθυμητό αποτέλεσμα, διότι το μεγαλύτερο εύρος τιμών οδηγεί συνήθως σε καλύτερη διάκριση των ενώσεων σύμφωνα με τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες που αναμένεται να παρουσιάζουν.

5.3.2 Συσχέτιση $\log_{\text{Tween-20}}$ με τους συντελεστές \log_{SDS}

Η συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης για το Tween-20 με αυτούς του ανιοντικού τασιενεργού SDS παρουσιάζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 4: Συσχέτιση $\log k_{\text{tween}}$ με $\log k_{\text{SDS}}$

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4, η συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών των δύο τασιενεργών δεν είναι καθόλου ικανοποιητική. Η εικόνα που προκύπτει είναι συγκεχυμένη. Η αρχική εξίσωση που προκύπτει είναι η εξής:

$$\log k_{w(\text{Tween})} = 0.762(\pm 0.073) \cdot \log k_{w(\text{SDS})} + 0.170(\pm 0.098)$$

$$(N= 93, R= 0.738, R^2= 0.545, s= 0.710, F= 109.1)$$

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

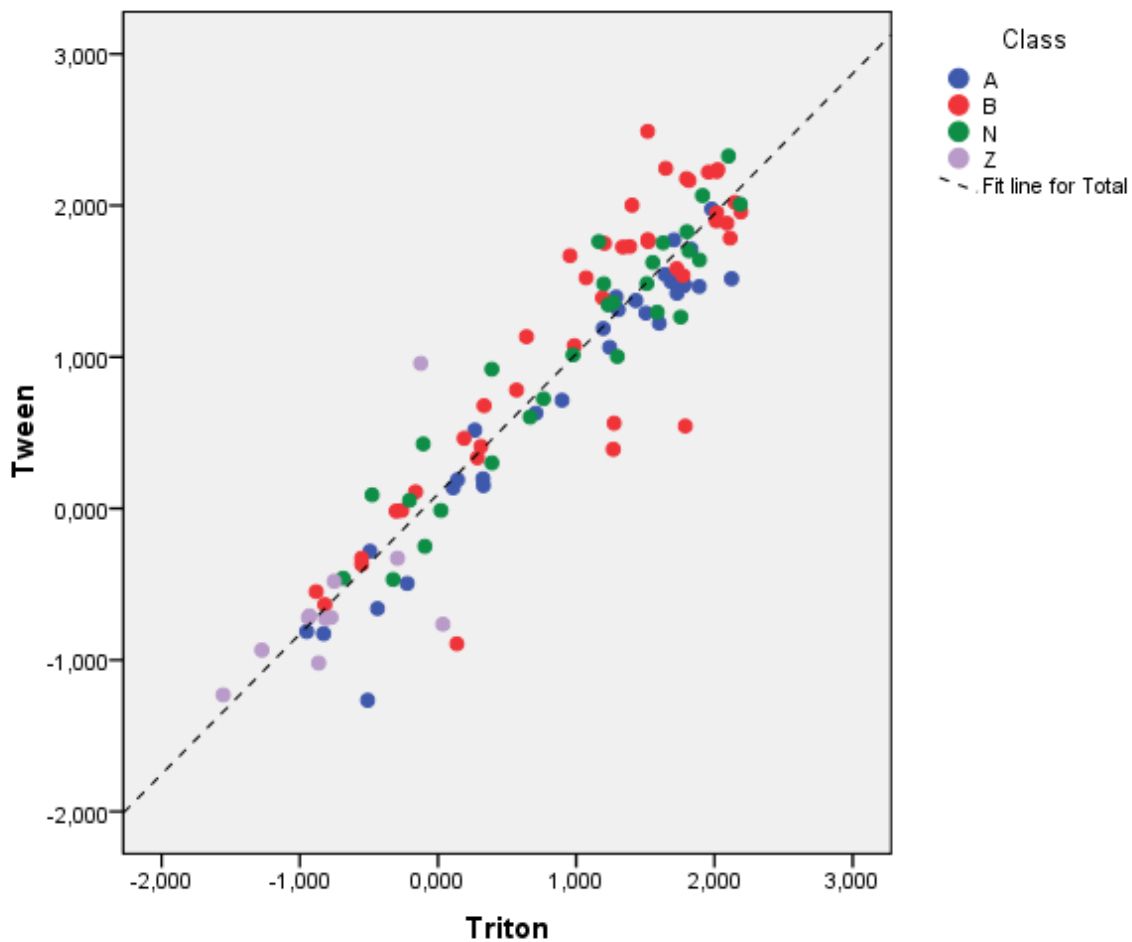
$$\log k_{w(\text{Tween})} = 0.999(\pm 0.092) \cdot \log k_{w(\text{SDS})} - 0.798(\pm 0.207) \cdot F^+ + 0.246(\pm 0.094)$$

$$(N= 93, R= 0.781, R^2= 0.610, s= 0.661, F= 70.2)$$

Η συσχέτιση βελτιώνεται με την εισαγωγή του κλάσματος θετικού φορτίου που έχει αρνητικό πρόσημο, καθώς το αρνητικό φορτίο ευνοεί την κατακράτηση παρουσία του τασιενεργού SDS. Αυτό είναι λογικό, επειδή η συγκράτηση των φαρμάκων στην τροποποιημένη με μονομερή του SDS στήλη, εμπεριέχει εκτός του μηχανισμού κατανομής και ηλεκτροστατικές έλξεις μεταξύ πρωτονιωμένων βάσεων και αρνητικών κέντρων του SDS.

5.3.3 Συσχέτιση $\log_{\text{Tween-20}}$ με τους συντελεστές $\log_{\text{TritonX-100}}$

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



Διάγραμμα 5: Συσχέτιση \log_{tween} με $\log_{\text{TritonX-100}}$

Η εξίσωση που προκύπτει είναι η εξής:

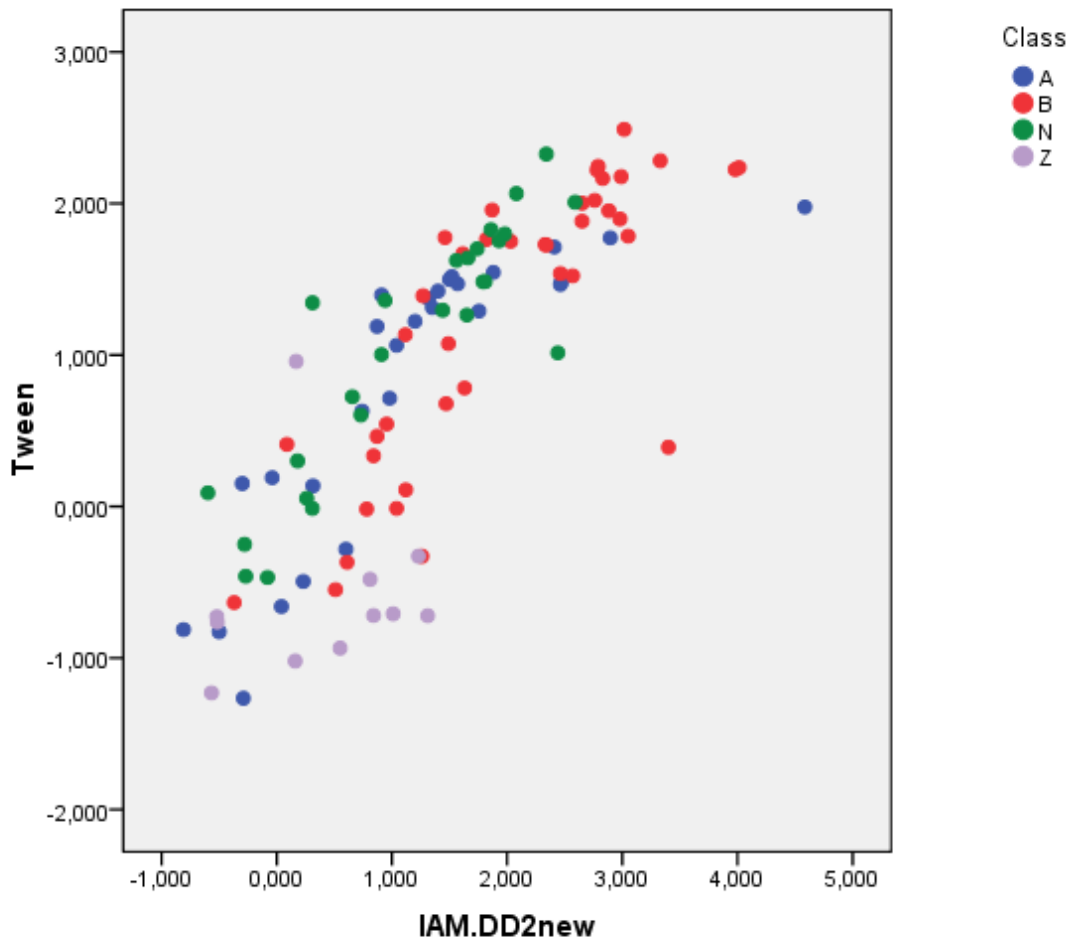
$$\log k_{w(\text{Tween})} = 0.925(\pm 0.034) \cdot \log k_{w(\text{Triton})} + 0.096(\pm 0.044)$$

(N= 111, R= 0.933, R²= 0.871, s= 0.363, F= 737.6)

Η συσχέτιση μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητική εφόσον R²= 0.871. Η κλίση είναι 0.925, οπότε η εξίσωση είναι σχεδόν 1:1. Το σημείο τομής άξονα τεταγμένης είναι σχεδόν μηδενικό, το οποίο σημαίνει ότι υπάρχει σημαντική ομοιότητα ως προς το μηχανισμό έκλυσης των φαρμάκων με χρήση των δύο ουδέτερων τασιενεργών.

5.3.4 Συσχέτιση log_{Tween-20} με τους συντελεστές log_{IAM.DD2}

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



Διάγραμμα 6: Συσχέτιση log_{k_{tween}} με log_{IAM.DD2}

Οι πιο λιπόφιλες ενώσεις, όπως προαναφέρθηκε, κατακρατούνται περισσότερο από τη στήλη, ενώ συγχρόνως αναπτύσσονται πρόσθετες ηλεκτροστατικές δυνάμεις στις ασθενείς βάσεις που είναι ιοντισμένες. Παρατηρείται μία γραμμικότητα για την πλειονότητα των ενώσεων, αλλά για πολύ λιπόφιλες ενώσεις η μικκυλιακή χρωματογραφία γενικότερα τείνει να δώσει ένα πλατώ σε σχέση με την IAM.

5.4 Μελέτη επίδρασης του pH στον ιοντισμό

Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 4, καθώς και από τα αποτελέσματα των μετρήσεων $\log k_{\text{tween}}$, υπολογίζονται οι διαφορές των συντελεστών κατακράτησης σε υδατική φάση για κάθε μέθοδο βιομιμητικής χρωματογραφίας. Επιπλέον, προστέθηκαν δεδομένα για το τασιενεργό CTAB, διότι για αυτό έχουμε περισσότερα γνωστά δεδομένα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και αφορούν τα 7 φάρμακα που μελετήθηκαν σε pH 5.5 στα πλαίσια της παρούσας έρευνας. Τα κενά κελιά οφείλονται σε έλλειψη δεδομένων.

Πίνακας 7: Διαφορά $\log k^{7.4-5.5}$ για τα Tween20, CTAB, τη στήλη IAM.DD2 και το συντελεστή κατανομής $\log D$

| | $\Delta \log k_{(\text{Tween})}$ | $\Delta \log k_{(\text{IAM.DD2})}$ | $\Delta \log k_{(\text{CTAB})}$ | $\Delta \log D$ |
|---------------|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Captopril | 1,85 | | 0,06 | -1,77 |
| Doxycycline | 0,198 | | | -0,01 |
| Methyldopa | -0,052 | 0,055 | | -0,01 |
| Minocycline | -0,056 | 1,118 | | 0,00 |
| Pioglitazone | 0,02 | 0,27 | | -0,66 |
| Retinoic acid | -0,058 | 0,513 | 0,02 | -1,84 |
| Valproic acid | 0,36 | 0,044 | -0,10 | -1,79 |

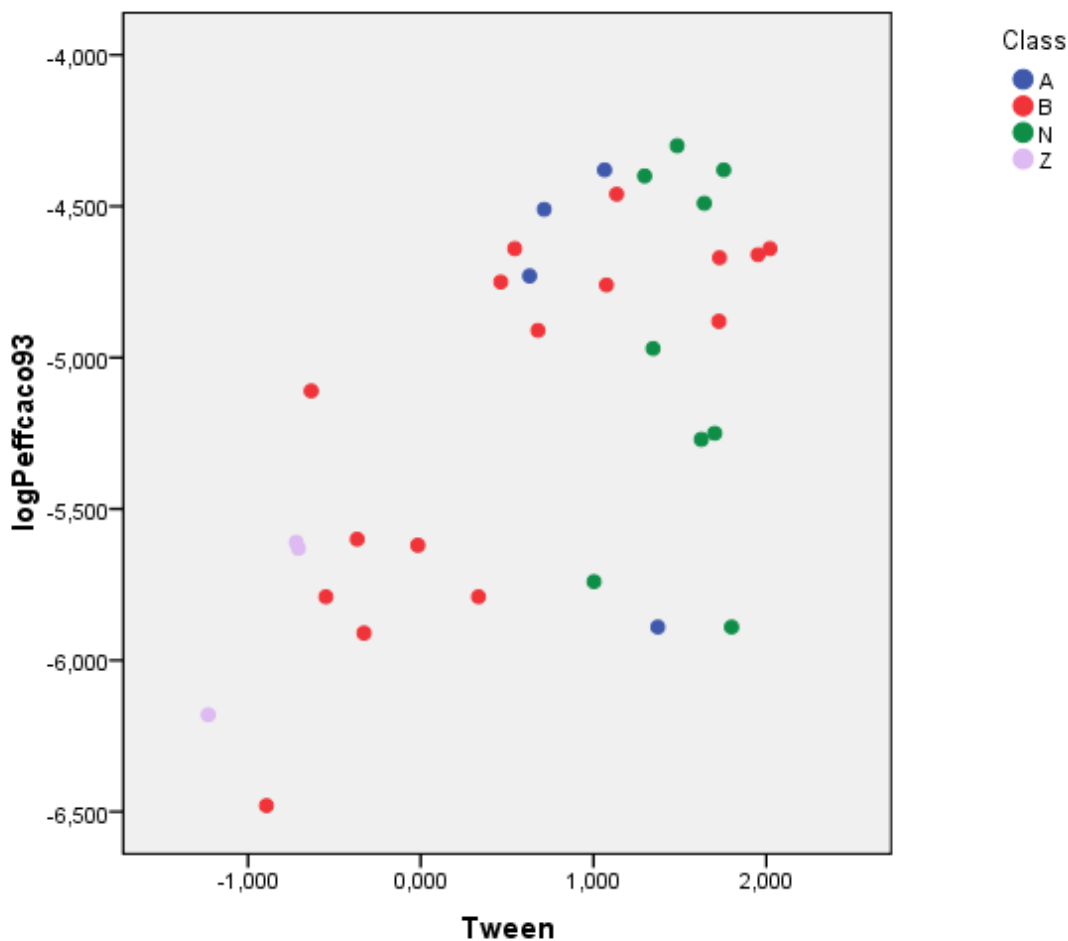
Παρατηρείται ότι, σχεδόν όλες οι όξινες φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά ως προς τη μεταβολή του $\log k$ από pH 7.4 σε pH 5.5 για όλες τις χρωματογραφικές τεχνικές. Συγκεκριμένα, η διαφορά $\Delta \log k$ είναι αρνητική, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε συνθήκες όξινου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

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 $\Delta \log k$.

5.5 Συσχέτιση με φαρμακοκινητικές ιδιότητες

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

Η μελέτη της κυτταρικής διαπερατότητας μέσω κυττάρων Caco-2 (κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου) αποτελεί ένα πολύ δημοφιλές πρωτόκολλο για την αξιολόγηση της γαστρεντερικής απορρόφησης. Με δεδομένο πως οι συντελεστές κατακράτησης μπορούν να προσομοιώσουν την κυτταρική διαπερατότητα, τα δεδομένα $\log k_{\text{Tween}}$ συγκρίθηκαν με την φαινόμενη (apparent) διαπερατότητα μέσω κυτταρικών σειρών Caco-2, $\log P_{\text{app(Caco-2)}}$. Θα πρέπει να σημειωθεί πως τα πειράματα με κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν μεγάλη διεργαστηριακή μεταβλητότητα και για τον λόγο αυτό δεν συνιστάται να συνδυάζονται αποτελέσματα που έχουν ληφθεί από διαφορετικά εργαστήρια. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που προέρχονται από μια μόνο βιβλιογραφική πηγή^[48], στην οποία είχε μελετηθεί η κυτταρική διαπερατότητα 93 συνολικά φαρμάκων, 32 εκ των οποίων είναι κοινά με τα φάρμακα που μελετήθηκαν στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας.



Διάγραμμα 7: Συσχέτιση κυτταρικής διαπερατότητας Caco-2 με τους συντελεστές κατακράτησης $\log k_{\text{Tween}}$

Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνεται ότι η συσχέτιση της φαινόμενης διαπερατότητας μέσω κυτταρικών σειρών Caco-2 με τις τιμές $\log k$ είναι η εξής:

$$\log P_{\text{app(Caco-2)}} = 0.393(\pm 0.092) \cdot \log k_{\text{w(Tween)}} - 5.424(\pm 0.111)$$

(N=32, R= 0.615, R²= 0.378, s= 0.498, F= 18.26)

Με την εισαγωγή της τοπολογικής πολικής επιφάνειας TPSA και των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου στην παραπάνω εξίσωση διαπιστώνεται ότι τα δύο τελευταία δεν είναι στατιστικά σημαντικά. Άρα, μόνο με την προσθήκη της πολικής επιφάνειας TPSA, η εξίσωση βελτιώνεται σημαντικά και συγκεκριμένα:

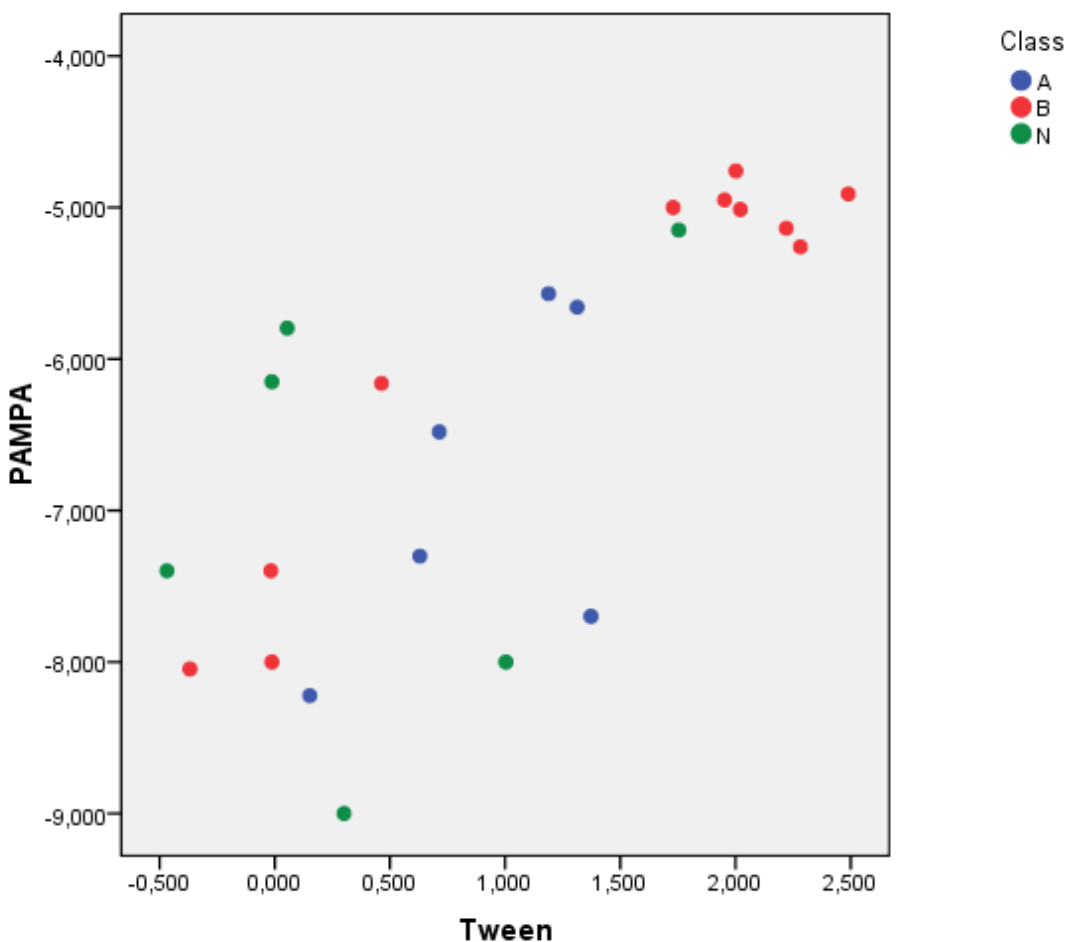
$$\log P_{\text{app(Caco-2)}} = 0.274(\pm 0.080) \cdot \log k_{\text{w(Tween)}} - 0.008(\pm 0.002) \cdot \text{TPSA} - 4.652(\pm 0.209)$$

(N=32, R= 0.779, R²= 0.606, s= 0.403, F= 22.33)

Συγκρίνοντας την παραπάνω συσχέτιση ($R^2 = 0.606$), με αντίστοιχες από τη μικκυλιακή χρωματογραφία με επιφανειοδραστικά τα Brij-35 ($R^2 = 0.908$), TritonX-100 ($R^2 = 0.933$) και SDS ($R^2 = 0.610$), διαπιστώνεται ότι η συσχέτιση των τελευταίων είναι ελαφρώς πιο ικανοποιητική, με καλύτερη εκείνη του TritonX-100.

5.5.2 Συσχέτιση με τη διαπερατότητα μέσω των σειρών τεχνητών μεμβρανών, PAMPA

Η συσχέτιση μέσω σειρών τεχνητών μεμβρανών, PAMPA, αποτελεί ένα δημοφιλές πρωτόκολλο στον σχεδιασμό φαρμάκων για την πρόβλεψη της κυτταρικής διαπερατότητας φαρμάκων. Η μέθοδος αυτή αναφέρεται στην αξιολόγηση της κυτταρικής διαπερατότητας μόνο με παθητική διάχυση. Τα αποτελέσματα της μεθόδου εκφράζονται σε cm/s. Χρησιμοποιήθηκαν 20 κοινά δεδομένα PAMPA από τη δημοσίευση του Andeef και των συνεργατών του^[49] και το αντίστοιχο διάγραμμα παρουσιάζεται παρακάτω:



Διάγραμμα 8: Συσχέτιση διαπερατότητας PAMPA με τους συντελεστές κατακράτησης $\log_{10} \text{Tween}$

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται μία γραμμική τάση $\log P_{app(PAMPA)}/\log k_{w(Tween)}$, η οποία περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log P_{app(PAMPA)} = 1.064(\pm 0.207) \cdot \log k_{w(Tween)} - 7.447(\pm 0.280)$$

(N=23, R= 0.746, R²= 0.557, s= 0.913, F= 26.36)

Η συσχέτιση βελτιώνεται σημαντικά με την εισαγωγή της παραμέτρου A (οξύτητα δεσμού υδρογόνου) του Abraham:

$$\log P_{app(PAMPA)} = 0.773(\pm 0.159) \cdot \log k_{w(Tween)} - 1.626(\pm 0.346) \cdot A - 6.437(\pm 0.292)$$

(N=23, R= 0.888, R²= 0.789, s= 0.645, F= 37.46)

Συγκρίνοντας την παραπάνω συσχέτιση (R² = 0.789), με αντίστοιχες από τη μικκυλιακή χρωματογραφία με επιφανειοδραστικά τα Brij-35 (R² = 0.908), TritonX-100 (R² = 0.933) και SDS (R²= 0.610), διαπιστώνεται ότι είναι πιο ικανοποιητική μόνο αναφορικά με το SDS.

5.5.3 Συσχέτιση με πρωτεϊνική σύνδεση

Κάθε φαρμακοκινητικό μοντέλο που αναπτύσσεται, θα πρέπει να επικυρώνεται χρησιμοποιώντας μια εξωτερική βάση δεδομένων (external test set), που δεν έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη του μοντέλου για την αξιολόγηση προβλεπτικής ικανότητας μοντέλου σε άγνωστα φάρμακα.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, περίπου το 20-30% των δεδομένων (φαρμάκων) χρησιμοποιούνται για λόγους επικύρωσης και τα υπόλοιπα για την ανάπτυξη του μοντέλου.

Στην παρούσα εργασία (και για λόγους σύγκρισης με παλαιότερα αποτελέσματα) χρησιμοποιούνται ως δεδομένα επικύρωσης/ ελέγχου (test set) τα ίδια 22 φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν και στις δημοσιεύσεις “The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption”^[50] και F. Tsopelas, P. Danias, A. Pappa, A. Tsantili- Kakoulidou, Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes, Journal of Chromatography A 1621 (2020) 461027.^[47]

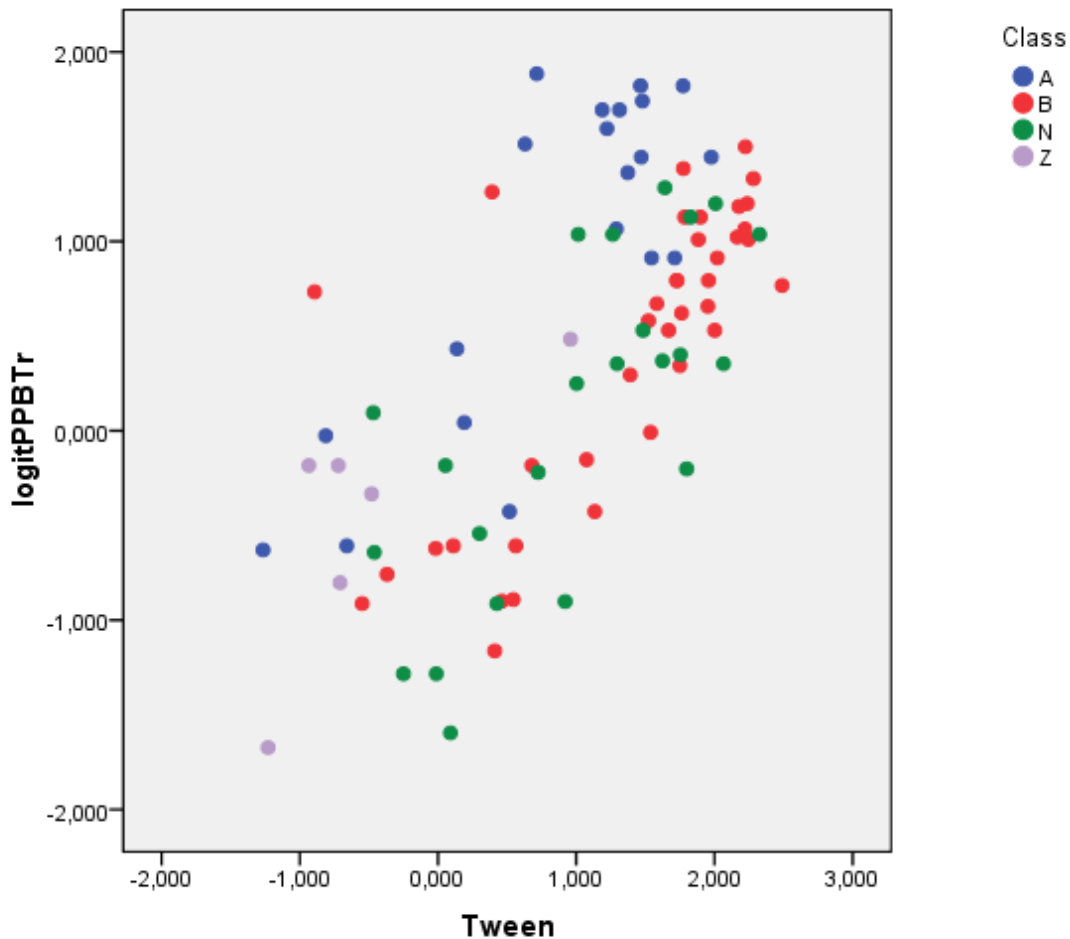
Για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης υπολογίζεται η φαινόμενη σταθερά συγγένειας (K) φαρμάκου, η οποία έχει προταθεί από την Valko^[51]. Η σταθερά αυτή χρησιμοποιείται στην λογαριθμική της μορφή και ισούται με:

$$\log K = \log \left(\frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \right),$$

όπου % PPB, το επί τοις εκατό ποσοστό της πρωτεϊνικής σύνδεσης του φαρμάκου στο πλάσμα. Το νούμερο 101 τοποθετείται στον παρονομαστή, ώστε ακόμα και για φάρμακα με πρωτεϊνική σύνδεση 100% να μη μηδενιστεί ο παρονομαστής (οπότε δεν ορίζεται το κλάσμα).

Για τη συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης $\log k_{\text{Tween}}$ με τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες χρησιμοποιούνται οι μετρήσεις για τις 25 ενώσεις της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αλλά και επιπλέον μετρήσεις που αφορούν ενώσεις που μελετήθηκαν παράλληλα στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας. 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) και όγκου κατανομής (V_d) αντλήθηκαν από το λογισμικό Adme Boxes 3.0.



Διάγραμμα 9: Συσχέτιση πρωτεϊνικής σύνδεσης ($\log K$) με τους συντελεστές κατακράτησης $\log k_{\text{Tween}}$

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται μία φυσική διασπορά, η οποία περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log K = 0.617(\pm 0.073) \cdot \log k_{w(\text{Tween})} - 0.230(\pm 0.103)$$

$$(N=87, R=0.676, R^2=0.457, s=0.669, F=71.49)$$

Για την προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης έχουν προταθεί δύο μοντέλα τα οποία προκύπτουν από διαδοχική εισαγωγή του κλάσματος αρνητικού φορτίου των φαρμάκων και του MB.

Μοντέλο 1

Πίνακας 8: Πειραματικές τιμές % PPB και τιμές προβλεπόμενες από το μοντέλο 1

| | %PPB observed | % PPB predicted |
|---------------------------|----------------------|------------------------|
| Ceftriaxone | 95.0 | 16.9 |
| Chloramphenicol | 54.0 | 72.0 |
| Cimetidine | 18.5 | 36.8 |
| Cinoxacin | 66.5 | 50.4 |
| Hydrocortisone | 95.0 | 72.5 |
| Isoxicam | 96.0 | 97.1 |
| Levofloxacin | 32.3 | 13.5 |
| Lornixicam | 99.0 | 97.6 |
| Meloxicam | 99.3 | 97.2 |
| Methylprednisolone | 77.3 | 81.4 |
| Metoclopramide | 33.3 | 52.9 |
| Minoxidil | 0.0 | 46.4 |
| Nadolol | 30.0 | 18.2 |
| Nalidixic acid | 93.0 | 59.6 |
| Niflumic acid | 90.0 | 97.7 |

| | | |
|-----------------------|------|------|
| Omeprazole | 95.0 | 78.2 |
| Pipemidic acid | 30.0 | 8.0 |
| Piperacillin | 19.0 | 69.4 |
| Salicylic acid | 95.0 | 81.3 |
| Sulpiride | 14.0 | 26.0 |
| Vancomycin | 43.3 | 22.7 |
| Warfarin | 98.7 | 94.8 |

Με ανοχή $\pm 25\%$, 18 από τα 22 φάρμακα παρουσιάζουν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

$$\log K = 0.630(\pm 0.060) \cdot \log k_{w(\text{Tween})} + 0.972(\pm 0.151) \cdot F - 0.451(\pm 0.091)$$

(N=87, R= 0.798, R²= 0.636, s= 0.550, F= 73.54)

Μοντέλο 2

Πίνακας 9: Πειραματικές τιμές % PPB και τιμές προβλεπόμενες από το μοντέλο 2

| | %PPB observed | % PPB predicted |
|------------------------|----------------------|------------------------|
| Ceftriaxone | 95.0 | 41.8 |
| Chloramphenicol | 54.0 | 73.1 |
| Cimetidine | 18.5 | 31.9 |
| Cinoxacin | 66.5 | 50.5 |
| Hydrocortisone | 95.0 | 76.9 |
| Isoxicam | 96.0 | 97.8 |
| Levofloxacin | 32.3 | 18.2 |
| Lornixicam | 99.0 | 98.6 |
| Meloxicam | 99.3 | 98.1 |

| | | |
|---------------------------|------|------|
| Methylprednisolone | 77.3 | 85.3 |
| Metoclopramide | 33.3 | 52.3 |
| Minoxidil | 0.0 | 35.9 |
| Nadolol | 30.0 | 19.4 |
| Nalidixic acid | 93.0 | 55.7 |
| Niflumic acid | 90.0 | 97.6 |
| Omeprazole | 95.0 | 80.8 |
| Pipemidic acid | 30.0 | 8.8 |
| Piperacillin | 19.0 | 88.2 |
| Salicylic acid | 95.0 | 69.7 |
| Sulpiride | 14.0 | 30.3 |
| Vancomycin | 43.3 | 99.3 |
| Warfarin | 98.7 | 95.4 |

Με ανοχή $\pm 25\%$, 16 από τα 22 φάρμακα παρουσιάζουν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Παρά το ότι η εισαγωγή του MB βελτιώνει την συσχέτιση, η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου 2 σε άγνωστα φάρμακα φαίνεται να είναι ελαφρώς χειρότερη.

$$\log K = 0.605(\pm 0.056) \cdot \log k_{w(\text{Tween})} + 1.020(\pm 0.141) \cdot F^- + 0.002(\pm 0.001) \cdot MW - 1.040(\pm 0.181)$$

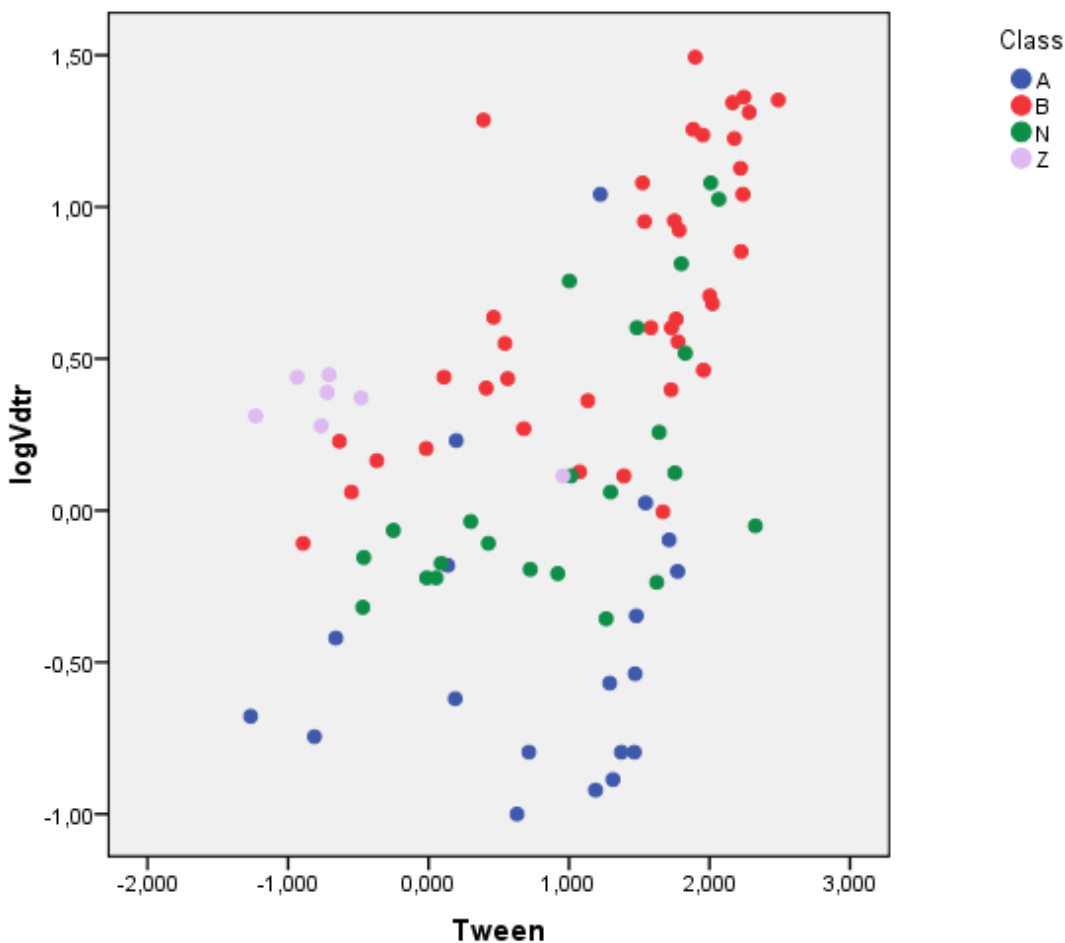
(N=87, R= 0.829, R²= 0.687, s= 0.513, F= 60.86)

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 παρατηρείται και σε 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 1, καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας. Γενικά, το ποσοστό αυτό θεωρείται ικανοποιητικό και συνεπώς, η μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία του τασιενεργού Tween-20 θα μπορούσε να αποτελέσει μια πιθανή μέθοδο για την πρόβλεψη της συγκεκριμένης φαρμακοκινητικής ιδιότητας.

5.5.4 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 $\log k_{\text{tween}}$ φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 10: Συσχέτιση $\log V_d$ του training set με $\log k_{\text{tween}}$

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

Πίνακας 10: Πειραματικές τιμές όγκου κατανομής, V_d και τιμές προβλεπόμενες από το μοντέλο

| | Vd observed (L/Kg) | Vd (predicted) (L/Kg) |
|--------------------|--------------------|-----------------------|
| Ceftriaxone | 0.14 | 0.55 |
| Chloramphenicol | 0.96 | 2.02 |
| Cimetidine | 1.12 | 1.60 |
| Cinoxacin | 0.23 | 0.15 |
| Hydrocortisone | 0.54 | 2.04 |
| Isoxicam | - | 0.42 |
| Levofloxacin | 1.38 | 0.71 |
| Lornoxicam | 0.20 | 0.45 |
| Meloxicam | 10.0 | 0.43 |
| Methylprednisolone | 1.26 | 2.38 |
| Metoclopramide | 3.30 | 4.42 |
| Minoxidil | 2.86 | 1.44 |
| Nadolol | 2.00 | 2.66 |
| Nalidixic acid | 0.40 | 0.19 |
| Niflumic acid | 0.12 | 0.45 |
| Omeprazole | 0.33 | 1.98 |
| Pipemidic acid | 1.90 | 0.68 |
| Piperacillin | 1.35 | 0.20 |
| Salicylic acid | 0.15 | 0.24 |
| Sulpiride | 2.05 | 3.05 |
| Vancomycin | 0.52 | 0.77 |

| | | |
|-----------------|------|------|
| Warfarin | 0.15 | 0.36 |
|-----------------|------|------|

Με ανοχή $0.5 \cdot V_d \leq V_d \text{ predicted} \leq 2 \cdot V_d$, το ποσοστό επιτυχίας του μοντέλου είναι 10/21.

Η συσχέτιση βελτιώνεται με την εισαγωγή των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου και εξάγεται η εξίσωση:

$$\log V_d = 0.200(\pm 0.044) \cdot \log k_w(\text{Tween}) - 0.690(\pm 0.127) \cdot F^- + 0.457(\pm 0.111) \cdot F^+ + 0.037(\pm 0.077)$$

(N=88, R= 0.788, R²= 0.605, s= 0.399, F= 42.90)

Η μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία του Tween-20 θα μπορούσε να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής. Σημειώνεται ότι, η πρόβλεψη του όγκου κατανομής θεωρείται μια δύσκολα προβλέψιμη φαρμακοκινητική παράμετρος.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη μελέτη του μηχανισμού έκλουσης των 25 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 ($\log k_{\text{Tween}}$) 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, καθώς προκύπτουν αρκετά ικανοποιητικές συσχετίσεις με βάση το συντελεστή συσχέτισης R^2 , ο οποίος προσδιορίστηκε 0.732 για τη συσχέτιση με το συντελεστή μερισμού και 0.672 με το συντελεστή κατανομής.

Η πιο ικανοποιητική συσχέτιση εντοπίστηκε στη συσχέτιση με τη μικκυλιακή χρωματογραφία με τασενεργό το Brij-35, κάτι το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι ο μηχανισμός έκλουσης είναι παρόμοιος και στηρίζεται σε μεγάλο ποσοστό σε μηχανισμό κατανομής χωρίς την ανάπτυξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων αφού και στις δυο περιπτώσεις το τασενεργό είναι μη ιονικό ($R^2 = 0.908$).

Ακόμα, κατά τη μελέτη ορισμένων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, και συγκεκριμένα της πρωτεϊνικής σύνδεσης αναπτύχθηκαν δύο μοντέλα. Η επικύρωση των μοντέλων έλαβε χώρα χρησιμοποιώντας τα ίδια δεδομένα ελέγχου (test set) που είχαν χρησιμοποιηθεί για την επικύρωση προηγούμενου μοντέλου που είχε αναπτύξει το Εργαστήριο με βάση την IAM. Προέκυψε ότι τα δύο αυτά μοντέλα είναι αρκετά ικανοποιητικά με 18/22 και 16/22 επιτυχημένες προβλέψεις, με μικρή διαφορά διαπιστώθηκε ότι το Μοντέλο 1 είναι πιο ικανοποιητικό συγκριτικά με το Μοντέλο 2. Το ποσοστό επιτυχίας είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικό και είναι εμφανές ότι η μικκυλιακή χρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Κατά τη μελέτη της διαπερατότητας μέσω των επιθηλιακών κυτταρικών σειρών του εντέρου, Caco-2 διαπιστώθηκε ότι η συσχέτισή της με τη μικκυλιακή χρωματογραφία με το Tween-20 είναι αρκετά ικανοποιητική. Σε σύγκριση με τη διαπερατότητα Caco-2 της μικκυλιακής χρωματογραφίας με τασενεργά το Brij-35, το TritonX-100 και το SDS, τα αποτελέσματα είναι σχεδόν όμοια, με το TritonX-100 να είναι ελαφρώς πιο ικανοποιητικό. Αντιθέτως, όμως, η συσχέτιση της χρωματογραφίας με τη διαπερατότητα μέσω των σειρών τεχνητών μεμβρανών, PAMPA, δεν είναι καθόλου ικανοποιητική, κάτι το οποίο αποδεικνύεται και με την αντίστοιχη συσχέτιση με το Brij-35 και το TritonX-100, τα οποία εμφανίζουν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Η συσχέτιση με τον όγκο κατανομής δε θεωρείται ιδιαίτερα ικανοποιητική, καθώς έχει επιτυχία 47.6%.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, η μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία του μη ιοντικού τασενεργού Tween-20 εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την βελτίωση της ανάπτυξης και του σχεδιασμού νέων φαρμακευτικών προϊόντων, ειδικά κατά τα αρχικά στάδια της πορείας, ώστε να συνεισφέρει στην εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των ενώσεων, όπως η πρωτεϊνική σύνδεση και η διαπερατότητα μέσω των επιθηλιακών κυτταρικών σειρών του εντέρου, Caco-2.

7. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Μετά το πέρας της παρούσας διπλωματικής εργασίας και με σκοπό την εξέλιξη της επιστήμης, προκύπτουν κάποιες προτάσεις για περαιτέρω έρευνα. Αρχικά, προτείνεται διεύρυνση των φαρμακευτικών ενώσεων που εκλούνται παρουσία του τασιενεργού Tween-20 με τη μέθοδο της μικκυλλιακής χρωματογραφίας υπό τις ίδιες συνθήκες, προκειμένου να προκύψει μία βιβλιοθήκη τιμών $\log k$ ενός ικανού αριθμού φαρμακευτικών ουσιών. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε βελτιωμένες συσχετίσεις μεταξύ των μικκυλλιακών χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης διαφόρων τασιενεργών, αλλά και μεταξύ άλλων χρωματογραφικών μεθόδων καθώς και στην ανάπτυξη αξιόπιστων μοντέλων πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων. Επίσης, με ένα μεγάλο αριθμό δεδομένων, θα μπορούσε να διαιρεθεί η βάση δεδομένων σε δεδομένα εκμάθησης (training set) για την ανάπτυξη του μοντέλου και σε δεδομένα επικύρωσης (test set), σε ποσοστό δεδομένων περίπου 20-25%, με σκοπό την αξιολόγηση της αξιοπιστίας του μοντέλου. Ως φαρμακοκινητικά μεγέθη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν: α) η απορρόφηση μέσω της γαστρεντερικής οδού για τα φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα, β) η πρωτεϊνική σύνδεση, γ) διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, δ) απορρόφηση και κατανομή στο δέρμα και ε) όγκο κατανομής. Θα μπορούσαν να δοκιμαστούν συσχετίσεις με δεδομένα τοξικότητας, τα οποία θα ήταν πολύτιμα εργαλεία για τη διαλογή υποψήφιων μορίων στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών προϊόντων, όπου είναι απαραίτητη η μείωση στο ελάχιστο των πιθανοτήτων εμφάνισης τοξικότητας και κατ'επέκταση απόρριψης του προϊόντος. Στη συνέχεια, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η μελέτη φαρμακευτικών ενώσεων με τη μέθοδο της μικκυλλιακής χρωματογραφίας δοκιμάζοντας άλλα τιασενεργά, ανιοντικά, κατιοντικά, αμφοτερικά, με σκοπό την έκφραση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, καθώς και δοκιμές για συσχέτιση με φαρμακοκινητικές παραμέτρους.

Επιπρόσθετα, προτείνεται η διερεύνηση της έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων χωρίς την παρουσία NaCl στην κινητή φάση και η σύγκριση των συσχετίσεων με φαρμακοκινητικά μεγέθη σε σχέση με εκείνες που προκύπτουν παρουσία NaCl. Ακόμα, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν πειραματικές μετρήσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) αντί για τη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος (37°C) και συσχέτιση των αποτελεσμάτων από τις δύο αυτές συνθήκες.

Τέλος, όλα τα μοντέλα πρόβλεψης που έχουν αναφερθεί παραπάνω θα μπορούσαν να αναπτυχθούν με πιο σύνθετες τεχνικές επεξεργασίας, για μεγάλο όγκο δεδομένων, από διάφορες βιομιμητικές χρωματογραφικές τεχνικές και άλλους βιομιμητικούς δείκτες ώστε να αυξηθεί η αξιοπιστία τους και το εύρος περιπτώσεων που καλύπτουν.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Κουππάρης, Μ., 2015, «Έλεγχος Ποιότητας Φαρμάκων». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2015.
- [2] Dimopoulos, V., Tsantili-Kakoulidou, A. (2015). *Βασικές αρχές σχεδιασμού και ανάπτυξης φαρμάκων* [Undergraduate textbook]. Athens: Kallipos, Open Academic Editions.
- [3] L. Patrick, G., "An introduction to Medicinal Chemistry", 5th edition (2013).
- [4] Thomas, G., "Medicinal Chemistry: An introduction", 2nd edition (2007).
- [5] www.nps.org.au, "Complementary medicines explained" (2021) [Online] [Cited: April 2, 2022]
- [6] www.tuftsmedicarepreferred.org, "Understanding Types of Medicines" (2022). [Online] [Cited: April 2, 2022]
- [7] Kokotos, G., & Magkrioti, V. (2015). *Ανακάλυψη, Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Φαρμάκων* [Chapter]. In Kokotos, G., & Magkrioti, V. 2015. *Φαρμακοχημεία* [Undergraduate textbook]. Kallipos, Open Academic Editions. chapter 1.
- [8] Phillipe Leger, Υπόθεση C-431/04, 24 Νοεμβρίου 2005.
- [9] www.healthyliving.gr, "Τι είναι ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός" (2021). [Online] [Cited: April 5, 2022]
- [10] <https://el.thpanorama.com>, "Δομή, λειτουργίες και ασθένειες των αιματοεγκεφαλικών φραγμών" (2022). [Online] [Cited: April 7, 2022]
- [11] Kim J, De Jesus O. Medication Routes of Administration. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2021. PMID: 33760436.
- [12] Τζιάφκου, Ε., 2019. Πτυχιακή εργασία. Ιωάννινα: Τ.Ε.Ι. Ηπείρου. Σχολή Επαγγελματιών Υγείας & Πρόνοιας. Τμήμα Νοσηλευτικής.
- [13] Stoeber, B., Ranamukha, S. & St. Clair, R., (2018). INTRADERMAL DELIVERY – New Technology Brings Simplicity & Scalability to Intradermal Drug Delivery. <https://drug-dev.com>.
- [14] Danielle N. McLennan, Christopher J.H. Porter, Susan A. Charman, Subcutaneous drug delivery and the role of the lymphatics, Drug Discovery Today: Technologies, Volume 2, Issue 1, 2005, Pages 89-96, ISSN 1740-6749.

- [15] Adam J.S. McCartan, David W. Curran, Randall J. Mersny, Evaluating parameters affecting drug fate at the intramuscular injection site, *Journal of Controlled Release*, Volume 336, 2021, Pages 322-335, ISSN 0168-3659.
- [16] Yalkowsky, S. H., J. F. Krzyzaniak, and G. H. Ward. "Formulation-related problems associated with intravenous drug delivery." *Journal of pharmaceutical sciences* 87.7 (1998): 787-796.
- [17] Pires, Anaísa, et al. "Intranasal drug delivery: how, why and what for?." *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 12.3 (2009): 288-311.
- [18] <http://elearning.venizeleio.gr>, "Βασικές Αρχές Χορήγησης Φαρμάκων". [Online] [Cited: April 10, 2022]
- [19] www.nationaljewish.org, "Devices for inhaled Medications" (2018). [Online] [Cited: April 10, 2022]
- [20] Hamilakis, S.. (2022). *Synthetic medicines* [Chapter]. In Hamilakis, S. 2022. *Natural Product* [Undergraduate textbook]. Athens: Kallipos, Open Academic Editions. chapter 2.
- [21] Νταχάμπρε, Χάϊδω. *Οργάνωση κλινικής μελέτης & συμβολή των κλινικών μελετών στην οικονομία*. MS thesis. Πανεπιστήμιο Πειραιώς, 2014.
- [22] Wagner, John G. "History of pharmacokinetics." *Pharmacology & therapeutics* 12.3 (1981): 537-562.
- [23] Hedaya, Mohsen A. *Basic pharmacokinetics*. CRC Press, 2012
- [24] Marselos, M.. (2015). *PHARMACOKINETICS* [Chapter]. In Marselos, M., Leondaritis, G., Antoniou, A., Konstanti, M., Manolopoulos, E., Pappas, P., Harkitis, P. 2015. *Βιοχημική φαρμακολογία* [Undergraduate textbook]. Athens: Kallipos, Open Academic Editions. chapter 8.
- [25] Μπελτέ, Ο., "Φαρμακευτική Τεχνολογία I&II" (2015).
- [26] Pappas, P. (2015). *ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ* [Chapter]. In Marselos, M., Leondaritis, G., Antoniou, A., Konstanti, M., Manolopoulos, E., Pappas, P., Harkitis, P. 2015. *Βιοχημική φαρμακολογία* [Undergraduate textbook]. Athens: Kallipos, Open Academic Editions. chapter 9.
- [27] Marselos, M. (2015). *TOXICITY OF PHARMACEUTICAL PRODUCTS* [Chapter]. In Marselos, M., Leondaritis, G., Antoniou, A., Konstanti, M., Manolopoulos, E., Pappas, P., Harkitis, P. 2015. *Βιοχημική φαρμακολογία* [Undergraduate textbook]. Athens: Kallipos, Open Academic Editions. chapter 1.
- [28] Testa, Bernard, et al. "The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples." *Perspectives in Drug Discovery and Design* 19.1 (2000): 179-211.

- [29] Dimopoulos, V., Tsantili-Kakoulidou, A. (2015). *Φυσικοχημικές Ιδιότητες και Μεταφορά Φαρμακομορίων* [Chapter]. In Dimopoulos, V., Tsantili-Kakoulidou, A. 2015. *Βασικές αρχές σχεδιασμού και ανάπτυξης φαρμάκων* [Undergraduate textbook]. Athens: Kallipos, Open Academic Editions. chapter 4.
- [30] www.msmanuals.com, "Overview of Pharmacodynamics" (2021). [Online] [Cited: April 15, 2022]
- [31] Poole, Colin F., and Salwa K. Poole. *Chromatography today*. Elsevier, 2012.
- [32] Karkalousos, P., Zoi, G., Kroupis, C., Papaioannou, A., Plageras, P., Spyropoulos, V., Tsotsou, G., Fountzoula, C. (2015). *Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα*. [Chapter]. In Karkalousos, P., Zoi, G., Kroupis, C., Papaioannou, A., Plageras, P., Spyropoulos, V., Tsotsou, G., Fountzoula, C. 2015. *Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας* [Laboratory Guide]. Kallipos, Open Academic Editions. chapter 6.
- [33] Pidgeon, Charles, et al. "IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability." *Journal of medicinal chemistry* 38.4 (1995): 590-594.
- [34] Ermondi, Giuseppe, Maura Vallaro, and Giulia Caron. "Learning how to use IAM chromatography for predicting permeability." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 114 (2018): 385-390.
- [35] www.obrnutafaza.hr, "IAM-Chromatography". [Online] [Cited: April 20, 2022]
- [36] El-Shaheny, Rania N., Mahmoud H. El-Maghrabey, and Fathalla F. Belal. "Micellar liquid chromatography from green analysis perspective." *Open Chemistry* 13.1 (2015).
- [37] Berthod, Alain, and Celia Garcia-Alvarez-Coque, eds. *Micellar liquid chromatography*. CRC Press, 2000.
- [38] Maria Rambla-Alegre, "Basic Principles of MLC", *Chromatography Research International*, vol. 2012, Article ID 898520, 6 pages, 2012.
- [39] Ruiz-Angel, M. J., et al. "Retention mechanisms in micellar liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* 1216.10 (2009): 1798-1814.
- [40] Tadros, Tharwat F. *Applied surfactants: principles and applications*. John Wiley & Sons, 2006.
- [41] Ivanković, T. i Hrenović, J. (2010). Surfactants in the Environment. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 61 (1), 95-109.
- [42] www.sigmaaldrich.com, P1379: Tween 20. [Online] [Cited: April 23, 2022]
- [43] Ξιάρχος, Ιωάννης. *Συμβολή στον χαρακτηρισμό των μεμβρανών: εκτίμηση της υδροφοβικότητας με χρησιμοποίηση διαλυμάτων επιφανειακά ενεργών ουσιών*. Diss. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ). Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2006.

[44] M.J. Ruiz Ángel & M.C. García-Álvarez-Coque, *Micellar Liquid Chromatography: How to Start*, LCGC Europe-09-01-2008, Volume 21, Issue 9, Pages: 420–429.

[45] <https://www.chemspider.com>. [Online] [Cited: April 28, 2022]

[46] <https://www.galinos.gr>. [Online] [Cited: April 28, 2022]

[47] 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.

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

[49] A. Avdeef, *Absorption and drug development*, John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 2003, pp. 164-165

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

[51] K. Valko, S. Nunhuck, C. Bevan, M.H. Abraham, D.P. Reynolds, Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 2236-2248.