



ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
SCHOOL OF PHARMACY

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ/ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΣΕ ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ
ΔΟΜΗΣ-ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΩΝ
ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΣΤΗ ΒΑΣΗ ΒΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ.
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΟΞΙΝΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ,
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΔΟΖΗΣ.**

ΧΡΥΣΑΝΘΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΜΑΡΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2011

“Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Φαρμακευτικό Τμήμα του Πανεπιστημίου
Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα”
(Ν.5343/1932, αρθρ.202)

HGW XX/7
gewidmet,
in Dankbarkeit.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Α. ΤΣΑΝΤΙΛΗ-ΚΑΚΟΥΛΙΔΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε.Κ.Π.Α. (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

Β. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α.Π.Θ.

Ε. ΠΑΝΤΕΡΗ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Α. ΤΣΑΝΤΙΛΗ-ΚΑΚΟΥΛΙΔΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε.Κ.Π.Α.

Β. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α.Π.Θ.

Ε. ΠΑΝΤΕΡΗ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε.Κ.Π.Α.

Μ. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.

Ι. ΚΟΥΝΤΟΥΡΕΛΛΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α.Π.Θ.

Γ. ΒΑΛΣΑΜΗ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε.Κ.Π.Α.

Ε. ΓΚΙΚΑΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες:

προς την Καθηγήτρια κα. Άννα Τσαντίλη-Κακουλίδου, τόσο για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική καθοδήγηση κατά τη διεξαγωγή της διατριβής, όσο και για τη φιλική και ανθρώπινη στάση της στο διάστημα αυτό.

προς τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Δημόπουλο, για τη διάθεση των παραγώγων του πυρρολίου που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή και τις εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις.

προς την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Ειρήνη Παντερή για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε σε επιστημονικό επίπεδο.

προς τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τους Καθηγητές κ. Μιχαήλ Κουμπάρη και κ. Ιωάννη Κουντουρέλλη, την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Γεωργία Βαλσαμή και το Λέκτορα κ. Ευάγγελο Γκίκα για τις υποδείξεις τους για τη βελτίωση της παρούσης διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την απλόχερη στήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
SUMMARY	6
I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ADME.....	11
1.1 Εισαγωγή.....	11
1.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες και βιολογική δράση. Ο ρόλος της λιποφιλίας	12
1.3 Η διπλή φύση της λιποφιλίας-Μοριακές συνιστώσες της λιποφιλίας.....	14
1.4 Αυξημένη Λιποφιλία-Όχι ευχαριστώ!	15
1.5 Επίδραση του ιονισμού στην κατανομή.....	17
1.6 Υπολογισμός του συντελεστή μερισμού/κατανομής.....	19
1.7 Έλεγχος αξιοπιστίας των υπολογιστικών συστημάτων	23
1.8 Υπολογισμός του συντελεστή κατανομής logD.....	26
2. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΥ ΦΑΣΕΩΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΩΣ ΤΑΧΕΙΑΣ ΚΑΙ ΦΙΛΙΚΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ..	29
2.1 Προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού/κατανομής.....	29
2.2 Χρωματογραφικά συστήματα αντιστρόφου φάσεως ως συστήματα κατανομής	29
2.3 Στατικές φάσεις στην RP-HPLC για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας	31
2.3.1 Στατικές φάσεις σιλανοποιημένου πηγματος διοξειδίου του πυριτίου και σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις.....	31
2.3.2 Άλλες στατικές φάσεις αντιστρόφου φάσεως στην HPLC	34
2.4 Στατικές φάσεις στην RP-TLC.....	35
2.5 Κινητές φάσεις στην RP-HPLC	36
2.6 Κινητές φάσεις στην RP-TLC	39
2.7 Επίδραση του οργανικού τροποποιητή στη συγκράτηση	39
2.8 Δείκτες λιποφιλίας που προσδιορίζονται με χρωματογραφικές τεχνικές αντιστρόφου φάσεως	41
2.9 Επίδραση του ιονισμού στη χρωματογραφική συγκράτηση.....	43
2.10 Επίδραση της διαμόρφωσης στη χρωματογραφική συγκράτηση.....	44

2.11 Προτυποποίηση χρωματογραφικών συνθηκών για τον προσδιορισμό δεικτών λιποφιλίας	45
2.11.1 Προτυποποίηση στην RP-HPLC	46
2.11.2 Προτυποποίηση στην RP-TLC	50
3. ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	51
3.1 Εισαγωγή.....	51
3.2 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM).....	52
3.3 Στατικές φάσεις στη χρωματογραφία IAM.....	53
3.4 Σταθερότητα των στηλών IAM	56
3.5 Κινητές φάσεις στη χρωματογραφία IAM.....	57
3.6 Σχέση χρωματογραφικών δεικτών IAM με παραδοσιακά μεγέθη της λιποφιλίας.....	58
3.7 Σχέση των χρωματογραφικών δεικτών IAM με τη διαπερατότητα, τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά και τη βιολογική δράση	60
3.8 Η πρωτεϊνική σύνδεση στο σχεδιασμό των φαρμάκων	63
3.9 Ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού (human serum albumin, HSA).....	65
3.10 α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (α ₁ -acid glycoprotein, AGP).....	66
3.11 Βιομιμητική χρωματογραφία ως τεχνική προσδιορισμού της πρωτεϊνικής σύνδεσης	67
3.12 Στατικές φάσεις που περιέχουν ακίνητοποιημένες πρωτεΐνες	68
3.13 Κινητές φάσεις στη χρωματογραφία AGP και HSA	70
3.14 Επίδραση χρωματογραφικών συνθηκών στη συγκράτηση και το διαχωρισμό.....	70
3.15 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκράτηση στις στήλες HSA και AGP.	72
3.16 Συσχέτιση βιομιμητικών χρωματογραφικών δεικτών με την πρωτεϊνική σύνδεση.....	75
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	77
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	78
ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ.....	81
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ, ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΔΟΖΗΣ. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ/ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΣΕ ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΔΟΜΗΣ-ΔΡΑΣΗΣ	81

A. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΤΙΜΩΝ logP ΚΑΙ logD ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	82
1. Εισαγωγή-Δομικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες των υπό μελέτη ενώσεων .	82
2. Προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού/κατανομής	85
2.1 Υλικά και μέθοδοι	86
2.1.1 Οργανολογία.....	86
2.1.2 Αντιδραστήρια.....	87
2.1.3 Πειραματική διαδικασία.....	87
2.2 Υπολογισμός του συντελεστή μερισμού.....	89
2.3 Υπολογισμός άλλων μοριακών ιδιοτήτων	92
2.4 Στατιστική ανάλυση.....	92
2.5 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	93
2.5.1 Σύγκριση μεταξύ υπολογιστικών και πειραματικών τιμών	94
2.5.2 Εφαρμογή Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών (PCA) στις υπολογιστικές-πειραματικές τιμές logP και logD	99
2.5.3 Σχέση λιποφιλίας με την ανασταλτική δράση επί της αναγωγάσης της αλδόζης. Εφαρμογή υπολογιστικών ή πειραματικών τιμών;.....	101
3. Συμπεράσματα.....	105
B. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ RP-HPLC ΚΑΙ RP-TLC	106
1. Εισαγωγή.....	106
2. Προσδιορισμός δεικτών λιποφιλίας με RP-HPLC	107
2.1 Υλικά και μέθοδοι	107
2.1.1 Οργανολογία.....	107
2.1.2 Αντιδραστήρια.....	107
2.1.3 Χρωματογραφικές συνθήκες.....	108
2.1.4 Χρωματογραφική διαδικασία	108
2.1.5 Προσδιορισμός ανηγμένων τιμών logk _w	109
2.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	109
2.2.1 Επίδραση της συγκέντρωσης της οκτανόλης στο προφίλ logk/φ.....	113
2.2.2 Συσχέτιση μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών.....	117
2.2.3 Σχέσεις των χρωματογραφικών δεικτών με τους συντελεστές κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού	120

3. Προσδιορισμός δεικτών λιποφιλίας με RP-TLC.....	123
3.1 Υλικά και μέθοδοι	123
3.1.1 Οργανολογία.....	123
3.1.2 Αντιδραστήρια.....	123
3.1.3 Χρωματογραφικές συνθήκες.....	123
3.1.4 Χρωματογραφική διαδικασία	124
3.1.5 Προσδιορισμός ανηγμένων τιμών R_{Mw}	124
3.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	125
3.2.1 Σχέσεις με τη λιποφιλία	127
3.2.2 Σχέσεις μεταξύ RP-TLC και RP-HPLC.....	128
4. Σύγκριση των χρωματογραφικών δεικτών με τη βιολογική δράση	129
5. Συμπεράσματα.....	133
ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ	135
Η ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΩΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ.....	135
Εισαγωγή.....	136
A. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ IAM.....	137
1. Προσδιορισμός χρωματογραφικών δεικτών IAM των παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος	137
1.1 Εισαγωγή.....	137
1.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	137
1.2.1 Οργανολογία.....	137
1.2.2 Αντιδραστήρια.....	137
1.2.3 Χρωματογραφικές συνθήκες.....	138
1.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	138
1.3.1 Σχέση μεταξύ ανηγμένων τιμών $\log k_w^{IAM}$ και τιμών $\log k_w^{IAM}_{(act)}$	139
1.3.2 Σχέση μεταξύ τιμών $\log k_w^{IAM}$ και κλίσεων S.....	141
1.3.3 Σύγκριση της χρωματογραφίας IAM με παραμέτρους λιποφιλίας.....	142
1.3.4 Σύγκριση της χρωματογραφίας IAM με τη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως.....	148
1.4 Επίδραση του pH στη συγκράτηση IAM. Σύγκριση του προφίλ $\log k_w^{IAM}/pH$ με τα αντίστοιχα προφίλ στην αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία και στο σύστημα οκτανόλης-νερού	155

1.4.1 Οργανολογία.....	156
1.4.2 Αντιδραστήρια.....	156
1.4.3 Χρωματογραφικές συνθήκες.....	157
1.4.4 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	157
2. Σύγκριση χρωματογραφικών μεγεθών IAM με δεδομένα διαπερατότητας-Εξαγωγή μοντέλου για τη γαστρεντερική απορρόφηση.....	167
2.1 Σειρά εργασίας.....	167
2.1.2 Σύγκριση τιμών $\log k_w^{IAM}$ και $\log D$ με δεδομένα διαπερατότητας MDCK.....	170
2.1.3 Σύγκριση των δεδομένων IAM, $\log D$ και Perm με τις τιμές %HOA.....	173
B. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ.....	181
1. Συγκράτηση δομικά μη συγγενών φαρμακευτικών μορίων στη στατική φάση HSA.....	181
1.1 Εισαγωγή.....	181
1.2 Σειρά εργασίας.....	181
1.3 Προσδιορισμός χρωματογραφικών δεικτών HSA.....	185
1.3.1 Οργανολογία.....	185
1.3.2 Αντιδραστήρια.....	185
1.3.3 Χρωματογραφικές συνθήκες.....	186
1.4 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	186
1.4.1 Επίδραση του οργανικού τροποποιητή.....	189
1.4.2 Σχέση μεταξύ των ανηγμένων τιμών $\log k_w^{HSA}$ και των τιμών $\log k_w^{HSA}_{(act)}$	190
1.4.3 Σχέση μεταξύ τιμών $\log k_w^{HSA}$ και κλίσεων S.....	191
1.4.4 Συσχέτιση των χρωματογραφικών δεικτών HSA με την πρωτεϊνική σύνδεση στο πλάσμα.....	191
1.4.5 Αξιολόγηση της εξίσωσης αναφοράς.....	195
1.4.6 Σχέση της χρωματογραφίας HSA με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού.....	197
1.4.7 Σολβατοχρωμική ανάλυση.....	199
2. Συγκράτηση δομικά μη συγγενών φαρμακευτικών μορίων στη στατική φάση AGP.....	201
2.2 Προσδιορισμός χρωματογραφικών δεικτών AGP.....	202

2.2.1 Οργανολογία.....	202
2.2.2 Αντιδραστήρια.....	202
2.2.3 Χρωματογραφικές συνθήκες.....	202
2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	203
2.3.1 Επίδραση του οργανικού τροποποιητή.....	205
2.3.2 Σχέση μεταξύ των ανηγμένων τιμών $\log k_w^{AGP}$ και των τιμών $\log k_w^{AGP(Act)}$	205
2.3.3 Σχέση μεταξύ τιμών $\log k_w^{AGP}$ και κλίσεων S.....	206
2.3.4 Συσχέτιση των χρωματογραφικών δεικτών AGP με τη σύνδεση στην α- όξινη γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος.....	206
2.3.5 Σχέση της χρωματογραφίας AGP με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού.....	215
2.3.6 Σολβατοχρωμική ανάλυση.....	219
3. Διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ των βιομημητικών χρωματογραφικών δεικτών HSA, AGP και IAM.....	221
3.1 Σχέση της χρωματογραφίας HSA με τη χρωματογραφία AGP.....	222
3.2 Σύγκριση της συγκράτησης στις στήλες HSA και AGP με τη συγκράτηση στη στήλη IAM.....	224
3.3 Εφαρμογή Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών (PCA) στους βιομημητικούς χρωματογραφικούς δείκτες και στις παραμέτρους λιποφιλίας.....	227
4. Συμπεράσματα.....	229
Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HSA ΚΑΙ AGP ΟΕΙΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ.....	231
1.1 Εισαγωγή.....	231
1.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	231
1.3.1 Επίδραση του οργανικού τροποποιητή.....	234
1.3.2 Σχέση μεταξύ ανηγμένων τιμών $\log k_w$ και τιμών $\log k_w^{(act)}$	237
1.3.3 Σχέση μεταξύ τιμών $\log k_w^{HSA}$, $\log k_w^{AGP}$ και κλίσεων S.....	238
1.3.4 Επίδραση του ιονισμού στη χρωματογραφία HSA.....	239
1.3.5 Σύγκριση της συγκράτησης στη χρωματογραφία HSA και AGP.....	240
1.3.6 Σύγκριση της συγκράτησης στις στήλες HSA και AGP με τη συγκράτηση στη στήλη IAM.....	241

1.3.7 Σχέση των χρωματογραφιών HSA και AGP με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού	243
1.3.8 Σύγκριση της συγκράτησης στη χρωματογραφία HSA και AGP με τη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως.....	249
1.4 Εφαρμογή Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών (PCA) στους χρωματογραφικούς δείκτες και στις παραμέτρους λιποφιλίας	252
Δ. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΣΥΝΟΛΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ	256
ΣΥΝΟΨΗ-ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	260
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	264
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	274

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή αποτελείται από δυο ενότητες:

Στην πρώτη ενότητα πραγματοποιήθηκε διεξοδική μελέτη της λιποφιλίας σειράς υποκατεστημένων παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος, τα οποία εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι της αναγωγάσης της αλδόζης. Προσδιορίστηκαν οι συντελεστές μερισμού/κατανομής των παραγώγων αυτών σε pH 3,0 και 7,4 με την κλασική μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης στο σύστημα οκτανόλης-νερού και συγκρίθηκαν με τιμές που προέκυψαν χρησιμοποιώντας διάφορα υπολογιστικά συστήματα. Διαπιστώθηκαν αποκλίσεις των τιμών μεταξύ των διαφορετικών υπολογιστικών συστημάτων και χαμηλή αξιοπιστία ως προς τις πειραματικές τιμές $\log P$, η οποία μειώθηκε περαιτέρω κατά τη σύγκριση των τιμών $\log D_{7,4}$ που αφορούν στις ιονισμένες μορφές των ενώσεων.

Η εφαρμογή υπολογιστικών τιμών οδήγησε σε απόκρυψη της σχέσης της ανασταλτικής δράσης επί της αναγωγάσης της αλδόζης με τη λιποφιλία και στην αδυναμία εξαγωγής ικανοποιητικών Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης. Αντίθετα οι πειραματικές τιμές αποδείχθηκαν καταλληλότερες για τη συσχέτιση της βιολογικής δράσης, ιδιαίτερα αν συνδυαστούν με όρους που εκφράζουν την πολικότητα ή ηλεκτρονιακές ιδιότητες.

Για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας χρησιμοποιήθηκαν επίσης η αντιστρόφου φάσεως υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) και η αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (RP-TLC), οι οποίες αποτελούν γρήγορες και φιλικές προς το χρήστη εναλλακτικές τεχνικές. Στην περίπτωση της RP-HPLC ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε στήλη ABZ⁺, η οποία θεωρείται ότι εμφανίζει μειωμένες σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις. Οι τιμές $\log k_w$, προσδιορίστηκαν σε pH 3,0 και 7,4, υπό διαφορετικές χρωματογραφικές συνθήκες κινητής φάσης στην προσπάθεια βελτίωσης της προσομοίωσης με το σύστημα οκτανόλης-νερού. Η προσθήκη μικρής ποσότητας οκτανόλης στη μεθανόλη αποδείχθηκε κρίσιμος παράγοντας προς αυτή την κατεύθυνση. Τα επιμέρους μοντέλα αν και με μέτρια στατιστικά στοιχεία αποδείχθηκαν περισσότερο αξιόπιστα στην πρόβλεψη των συντελεστών κατανομής των παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος συγκριτικά με τις γενικές εξισώσεις αναφοράς. Οι τιμές $\log k_w$ των αδιάστατων μορφών που προσδιορίστηκαν παρουσία 0,05% οκτανόλης στην κινητή φάση σε pH 3,0

αποδείχτηκαν καταλληλότερες για να αντικαταστήσουν τις τιμές $\log P$ στις συσχετίσεις με την αναστολή της αναγωγής της αλδόζης. Ωστόσο διαφοροποιήσεις ως προς το συντελεστή παλινδρόμησης και τις ενώσεις με αποκλίνουσα συμπεριφορά υποδηλώνουν ότι το πληροφοριακό περιεχόμενο των χρωματογραφικών δεικτών δεν είναι απόλυτα ταυτόσημο με αυτό των τιμών $\log P$.

Η μελέτη της λιποφιλίας με RP-TLC εστιάστηκε στη διερεύνηση της επίδρασης της στατικής φάσης στη συγκράτηση. Οι τιμές R_{Mw} προσδιορίστηκαν σε pH 7,4. Αποδείχθηκε ότι ο ιονισμός επηρεάζει τη συγκράτηση στην περίπτωση των πυρρολυλ-καρβοξυλικών οξέων και η στατική φάση σιλανοποιημένη με οκτώ άτομα άνθρακα (RP-C8) αποτελεί καταλληλότερη επιλογή συγκριτικά με την RP-C18 στατική φάση τόσο όσον αφορά στην προσομοίωση της λιποφιλίας όσο και στη συσχέτιση με τη βιολογική δράση. Παρόλα αυτά αν οι τιμές $R_{Mw(C8)}$ και $R_{Mw(C18)}$ συνδυαστούν με επιπλέον παραμέτρους συσχετίζονται εξίσου ικανοποιητικά με τη βιολογική δράση και τους χρωματογραφικούς δείκτες.

Η δεύτερη ενότητα εστιάζεται στη βιομημητική χρωματογραφία και τη χρωματογραφία συγγένειας, χρησιμοποιώντας στατικές φάσεις IAM, HSA και AGP.

Η μελέτη των παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος και παραγώγων διφθοροφαινόλης επεκτείνεται χρησιμοποιώντας χρωματογραφία IAM σε pH 3,0 και 7,4. Οι χρωματογραφικοί δείκτες IAM συγκρίνονται με τις συμβατικές παραμέτρους λιποφιλίας και εξάγονται οι επιμέρους συσχετίσεις. Επιπλέον τα παράγωγα του πυρρολίου χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου για την πρότυπη εξίσωση πρόβλεψης δεικτών IAM με βάση τις τιμές $\log D$. Διαπιστώθηκε καλή προσαρμογή των νέων παραγώγων στην πρότυπη εξίσωση, η οποία ωστόσο συμπληρώνεται με την παράμετρο-δείκτη I για την παρουσία των καρβοξυλικών ανιόντων, ενώ δεν μεταβάλλονται οι όροι και οι συντελεστές της εξίσωσης. Οι χρωματογραφικοί δείκτες IAM των παραγώγων του πυρρολίου συγκρίθηκαν επιπλέον με τους αντίστοιχους δείκτες στην αντιστρόφου φάσεως HPLC και TLC.

Διερευνήθηκε το προφίλ της συγκράτησης αντιπροσωπευτικών ενώσεων στη στήλη IAM συναρτήσεως του pH (σε εύρος από 2,5 έως 7,4) και συγκρίθηκε με το αντίστοιχο προφίλ που λαμβάνεται στην αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία και στην κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Παρατηρήθηκε σταθεροποίηση των τιμών $\log k_w^{ABZ}$ σε pH > 5 σε αρκετά υψηλότερες τιμές από τις αντίστοιχες τιμές $\log D$. Στη χρωματογραφία IAM τα προφίλ $\log k_w^{IAM}/pH$ είχαν γραμμική μορφή βρισκόμενα

χαμηλότερα από τα αντίστοιχα προφίλ στη στήλη ABZ⁺ εμφανίζοντας μικρή καμπύλωση σε pH 7,4.

Για την εξαγωγή μοντέλων/προτύπων εξισώσεων με στόχο την εκτίμηση της γαστρεντερικής απορρόφησης αξιοποιήθηκαν βιβλιογραφικές τιμές $\log k_w^{IAM}$ δομικώς διαφορετικών ενώσεων, τιμές λιποφιλίας (logD) και τιμές διαπερατότητας σε κυτταρικές σειρές MDCK (logPerm). Διαπιστώθηκε καμπύλη κορεσμού μεταξύ των τιμών %HOA και των τιμών $\log k_w^{IAM}$, logD και logPerm, σύμφωνα με την οποία πάνω από κάποια όρια τιμών η %HOA είναι πρακτικά 100%. Τα μοντέλα βελτιώνονται με την εισαγωγή της βασικότητας σε δεσμούς υδρογόνου και του μοριακού κλάσματος F⁺, ως έκφρασης των ηλεκτροστατικών επιδράσεων. Διαπιστώθηκε ότι οι αλληλεπιδράσεις αυτές υπερεκφράζονται στη στατική φάση IAM, ενώ εκφράζονται μερικώς στη διαπερατότητα από τις κυτταρικές σειρές MDCK. Η συμβολή ωστόσο των αλληλεπιδράσεων αυτών στη γαστρεντερική απορρόφηση οδηγεί στη σημαντικότητα του όρου F⁺ στο μοντέλο που εξάγεται με τις τιμές logD, όπου συμμετέχει με θετικό πρόσημο.

Όσον αφορά στη χρωματογραφία συγγένειας μελετήθηκε διεξοδικά η συγκράτηση σειράς δομικώς διαφορετικών ενώσεων σε στατικές φάσεις που ενσωματώνουν την ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού και την α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος (στήλες HSA και AGP) υπό διαφορετικές συνθήκες όσον αφορά στο pH και στον οργανικό τροποποιητή, χρησιμοποιώντας ακετονιτρίλιο και ισοπροπανόλη. Διαπιστώθηκε μεγαλύτερη επίδραση της φύσης και του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή στη στατική φάση AGP, γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Επιπλέον εφαρμόστηκε σολβατοχρωμική ανάλυση για τη διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν τη συγκράτηση. Αντίστοιχα μελετήθηκαν και τα παράγωγα του πυρρολίου.

Σε ότι αφορά τη χρωματογραφία HSA οι ισοκρατικές τιμές $\log k_{10}^{HSA}_{(ACN)}$ αποδείχθηκαν ως οι πλέον κατάλληλες για την εκτίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης και χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή εξίσωσης αναφοράς. Η εξίσωση αναφοράς αξιολογήθηκε στη συνέχεια επιτυχώς με σειρά ελέγχου. Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές $\log k_{10}^{HSA}_{(ACN)} > 1,85$ οδηγούν σε τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης πρακτικά 100%.

Οι χρωματογραφικοί δείκτες AGP συσχετίστηκαν με σταθερές σύνδεσης σε δυο παραλλαγές της α-όξινης γλυκοπρωτεΐνης (παραλλαγή A και μίγμα F1*S). Δεν

ελήφθησαν ικανοποιητικές συσχετίσεις, παρατηρήθηκαν δε διαφοροποιήσεις των εξισώσεων που ελήφθησαν με διαφορετικούς χρωματογραφικούς δείκτες AGP.

Για την περαιτέρω διερεύνηση των ομοιοτήτων/ανομοιοτήτων μεταξύ των διαφορετικών χρωματογραφικών συστημάτων συγκριτικά και με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού χρησιμοποιήθηκε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA), η οποία εφαρμόστηκε διαδοχικά στη σειρά δομικώς διαφορετικώς ενώσεων, στα παράγωγα του πυρρολίου και στο σύνολο των ενώσεων. Η διαφοροποίηση μεταξύ των μοντέλων PCA αντανακλά την ισχυρή επίδραση της διαφορετικής συμπεριφοράς των καρβοξυλικών ανιόντων στην περίπτωση των παραγώγων του πυρρολ-οξικού οξέος, η οποία οδηγεί σε αντιστροφή των θέσεων των δεικτών HSA και AGP στο διάγραμμα των φορτίων.

Τέλος, οι βιοχρωματογραφικοί δείκτες που προσδιορίστηκαν για τα παράγωγα του πυρρολίου χρησιμοποιήθηκαν με βάση τις προτεινόμενες πρότυπες εξισώσεις για την εκτίμηση της γαστρεντερικής απορρόφησης, της πρωτεϊνικής σύνδεσης και του όγκου κατανομής. Εκτιμήθηκαν τιμές %HOA μεγαλύτερες από το προτεινόμενο όριο του 90% για τα καλώς απορροφούμενα φάρμακα μετά από του στόματος χορήγηση. Αντίστοιχα, η πρωτεϊνική σύνδεση κυμαίνεται από 66-99%, ενώ οι προβλεπόμενοι όγκοι κατανομής εμφανίζουν μικρές τιμές. Τα στοιχεία αυτά αποτελούν χρήσιμες πληροφορίες για την περαιτέρω έρευνα ανάλογων χημειοτύπων, σε συνδυασμό με την ανασταλτική δράση επί της αναγωγής της αλδόζης.

Δημοσιεύσεις:

1. M. Chrysanthakopoulos, A. Koletsou, I. Nicolaou, V.J. Demopoulos, A. Tsantili-Kakoulidou, Lipophilicity Studies on Pyrrolyl-Acetic Acid Derivatives. Experimental Versus Predicted logP Values in Relationship with Aldose Reductase Inhibitory Activity, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 28, **2009**, 551-560.
2. M. Chrysanthakopoulos, I. Nicolaou, V.J. Demopoulos, A. Tsantili-Kakoulidou, HPLC-based lipophilicity of pyrrolyl-acetic acid ARIs: Relationships with biological activity, *J. Chromatogr. B*, 878, **2010**, 61-67.
3. M. Chrysanthakopoulos, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, Retention of structurally diverse drugs in human serum albumin chromatography and its

potential to simulate plasma protein binding, *J. Chromatogr. A*, 1217, **2010**, 5761-5768.

4. M. Chrysanthakopoulos, I. Nicolaou, V.J. Demopoulos, A. Tsantili-Kakoulidou, The efficiency of RP-TLC for lipophilicity assessment. A comparative study on a series of pyrrolyl-acetic acid derivatives, inhibitors of aldose reductase, *J. Planar Chromatogr.*, **2011**, (submitted).

SUMMARY

The present thesis consists of two sections:

In the first section the lipophilicity of a series of pyrrolyl-acetic acid derivatives, inhibitors of the aldose reductase enzyme was assessed by direct partitioning experiments in the n-octanol-water system at pH 3.0 and 7.4. Distribution coefficients concerning both the neutral and the anionic species were compared to calculated values generated by commonly used software. The consistency of the predictions was evaluated, as well as the reliability between experimental and predicted logP or logD values. Divergences in values provided by the different calculation systems and rather low predictivity in respect to the experimental values were observed.

The application of calculated values to relationships with aldose reductase inhibitory activity did not show any tendency of the data, while the experimental logP values proved more suitable for correlation with biological activity, and combined with polarity or electronic terms succeeded in satisfactory QSAR equations.

Taken into consideration the necessity of experimental lipophilicity data, reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and reversed phase thin layer chromatography (RP-TLC) were also used as rapid and friendly techniques. In the case of RP-HPLC an ABZ⁺ column was used as a stationary phase, which is considered to show reduced silanophilic interactions. Extrapolated retention factors, log_wk_w, were assessed at pH 3.0 and 7.4 under different mobile phase conditions in order to improve the simulation of the octanol-water system. The addition of a small amount of n-octanol to the volume of methanol proved a crucial factor in this direction. The individual models for the log_wk_w/logP or logD correlation, although with moderate statistics proved to be more reliable in predicting the logP (or logD) values of the pyrrolyl-acetic acid derivatives compared to the general reference equation established for structurally different acidic drugs. The log_wk_w values determined at pH 3.0 in presence of 0.05% octanol in the mobile phase proved more suitable to replace the logP parameter in correlation with aldose reductase inhibitory activity. However variations in the regression coefficients and in respect to outliers indicate that the information content of chromatographic indices is not strictly identical to that of logP values.

The study of lipophilicity by RP-TLC has focused on investigating the effect of stationary phase using RP-C18 and RP-C8 plates. R_{Mw} values were assessed at pH 7.4. It turned out that the ionization affects the retention in case of pyrrolyl-carboxylic acids despite opposite references in literature and the RP-C8 stationary phase is a more appropriate choice compared to the most commonly used RP-C18 stationary phase both in the simulation of lipophilicity and the relationship with the biological activity. However combination of $R_{Mw(C8)}$ και $R_{Mw(C18)}$ with additional parameters correlate equally well with the biological activity.

The second part of the thesis focuses on biomimetic chromatography and affinity chromatography using stationary phases IAM, HSA and AGP.

The study of derivatives of pyrrolyl-acetic acid and difluorophenol derivatives was extended using IAM chromatography at pH 3.0 and 7.4. IAM chromatographic indices were compared with the conventional parameters of lipophilicity and relevant correlations were established. In addition, the pyrrole derivatives were used as test set for the validation of a standard equation suggested for the prediction of IAM indices based on their logD values. A good fit of the new derivatives was found, while the model equation was further improved by the introduction of the indicator variable I for the presence of carboxylic anion. The IAM indices of the pyrrole derivatives were also compared with the corresponding reversed phase HPLC and TLC retention factors.

The retention profile of representative derivatives in IAM column as a function of pH (in the range from 2.5 to 7.4) was investigated and compared with the corresponding profiles obtained by HPLC and octanol-water partition system.

In order to generate standard equations/models for estimating the gastrointestinal absorption $\log k_w^{IAM}$ of structurally diverse compounds, lipophilicity data (logD) and permeability values in MDCK cell lines (logPerm) taken from literature were utilized. A saturation curve was found between %HOA values and $\log k_w^{IAM}$, logD and logPerm values, whereas certain lower limits values could be defined above which %HOA is practically 100%. The models were improved upon introduction of the hydrogen bond basicity parameter of Abraham and molecular fraction F^+ , as an expression of the electrostatic effects. It was found that such electrostatic interactions are overexpressed in the IAM stationary phase, while they are partially expressed in the permeability of the cell line MDCK. Nevertheless, the contribution of these

interactions in gastrointestinal absorption is advocated by the statistical significance and the positive sign of the term F^+ in the corresponding model established using the $\log D$ values.

With regard to affinity chromatography the retention behavior of structurally diverse drugs was determined on stationary phases which incorporate immobilized human plasma albumin and alpha-acid glycoprotein (columns HSA and AGP). Different conditions in respect of pH and organic modifier were tried, using acetonitrile and 2-propanol. A significant influence of the nature and percentage of organic modifier in AGP retention was observed, and further investigation is necessary to clarify the retention mechanism. To this direction solvatochromic analysis was applied in order to investigate the factors that affect retention on both HSA and AGP columns. HSA and AGP chromatography was further used to study the retention behavior of the pyrrole derivatives. A strong affinity of the pyrrolyl-acetic acid derivatives for the HSA column was observed in analogy with their behavior in reversed phase ABZ⁺ stationary phase

HSA chromatographic indices were used to simulate plasma protein binding data. The isocratic $\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$ values proved to be most suitable for estimating %PPB and were used to establish a reference equation. The reference equation was successfully validated with a test set. It was further observed that $\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$ values $>1,85$ lead to practically 100% protein binding.

Less successful was the correlation of the AGP chromatographic indices with association constants on two variants of alpha-acid glycoprotein (variant A and mix F1*S), while variations in the equations obtained with different AGP chromatographic indices were observed, as a consequence of the effect of organic modifier in AGP retention.

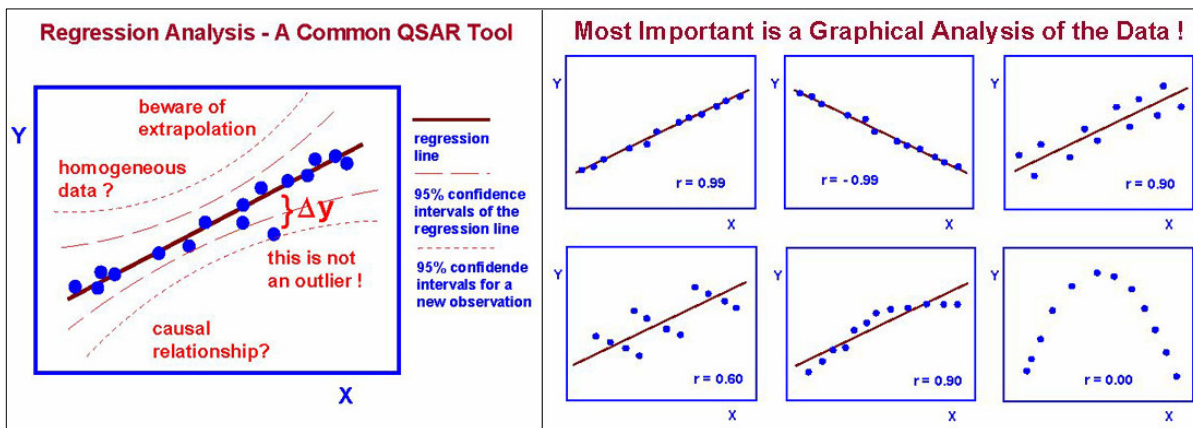
In order to further investigate the similarities/dissimilarities between the different chromatographic systems and the octanol-water partition system Principal Component Analysis (PCA) was performed successively on the structurally diverse drugs, the pyrrole derivatives and the combined set of compounds. The difference between PCA models reflects the strong influence of the distinct behavior of the pyrrolyl-acetic acid derivatives, which leads to reversal positions of the HSA and AGP variables in the loading plot.

Finally, the biochromatographic indices of the pyrrole derivatives were introduced in the proposed standard equations for estimating their intestinal absorption, their protein binding and their volume distribution. %HOA values higher than the proposed limit of 90% for well-absorbed drugs after oral administration were assessed. Similarly, the protein binding ranges from 66-99% while the estimated volumes of distribution have small values. These data provide useful information to be considered in the further investigation of similar chemotypes, in combination with the aldose reductase inhibitory activity.

Publications:

1. M. Chrysanthakopoulos, A. Koletsou, I. Nicolaou, V.J. Demopoulos, A. Tsantili-Kakoulidou, Lipophilicity Studies on Pyrrolyl-Acetic Acid Derivatives. Experimental Versus Predicted logP Values in Relationship with Aldose Reductase Inhibitory Activity, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 28, **2009**, 551-560.
2. M. Chrysanthakopoulos, I. Nicolaou, V.J. Demopoulos, A. Tsantili-Kakoulidou, HPLC-based lipophilicity of pyrrolyl-acetic acid ARIs: Relationships with biological activity, *J. Chromatogr. B*, 878, **2010**, 61-67.
3. M. Chrysanthakopoulos, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, Retention of structurally diverse drugs in human serum albumin chromatography and its potential to simulate plasma protein binding, *J. Chromatogr. A*, 1217, **2010**, 5761-5768.
4. M. Chrysanthakopoulos, I. Nicolaou, V.J. Demopoulos, A. Tsantili-Kakoulidou, The efficiency of RP-TLC for lipophilicity assessment. A comparative study on a series of pyrrolyl-acetic acid derivatives, inhibitors of aldose reductase., *J. Planar Chromatogr.*, **2011**, (submitted).

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ADME

1.1 Εισαγωγή

Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία που αφορούν την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, ο αριθμός των νέων πιθανών φαρμακομορίων υπολογίζεται σε 10^{62} , εκ των οποίων έχει διερευνηθεί μόνο το 10^7 . Το ποσοστό αποτυχίας κατά την ανάπτυξη ξεπερνάει το 80%, ενώ ο χρόνος ανάπτυξης υπερβαίνει τα 10 έτη¹. Καθώς οι απαιτήσεις της σύγχρονης εποχής για ανακάλυψη νέων φαρμακομορίων είναι ολοένα αυξανόμενες, οι φαρμακοβιομηχανίες αναζητούν διαδικασίες ταχύτερης εκτίμησης των παραγόντων που αποτελούν επιβραδυντικούς ή ανασταλτικούς παράγοντες σε ότι αφορά την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, ώστε μόρια που πρόκειται ν' αποτύχουν ν' αποκλείονται όσο το δυνατόν ταχύτερα από την περαιτέρω έρευνα (δόγμα "fail fast-fail cheap")^{2,3}. Η επίδραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων στη βιολογική δράση είχε διαπιστωθεί ήδη στα τέλη του 19^{ου} αιώνα από τους Meyer και Overton^{4,5} και αργότερα από τον Ferguson⁶, οι οποίοι διερεύνησαν την επίδραση της λιποφιλίας και της διαλυτότητας αντίστοιχα στη γενική αναισθητική δράση. Τομή ωστόσο στον τρόπο σκέψης για το σχεδιασμό νέων φαρμακολογικά δραστικών ενώσεων αποτέλεσε το 1964 η δημοσίευση των Hansch και Fujita⁷ με τίτλο "ρ-σ-π Analysis" στο περιοδικό JACS, όπου για πρώτη φορά χρησιμοποιώντας στατιστική ανάλυση διατυπωνόταν η άποψη για την επίδραση τριών κατηγοριών ιδιοτήτων, της λιποφιλίας, των ηλεκτρονιακών και των στερεικών ιδιοτήτων, στη βιολογική δράση:

$$\text{Βιολογική δράση} = f(\text{λιποφιλία} + \text{ηλεκτρονιακές ιδιότητες} + \text{στερεικές ιδιότητες}) \quad (\text{I-1})$$

Η ανάλυση Hansch άνοιξε το δρόμο για την ανάπτυξη των ενός νέου επιστημονικού πεδίου, των Ποσοτικών Σχέσεων Δομής Δράσης (QSAR: Quantitative Structure Activity Relationships)^{8,9}. Από το σημείο αυτό και έπειτα οι εξελίξεις ήταν ραγδαίες οδηγώντας από το 2D-QSAR, στο 3D-QSAR, στη Χημειοπληροφορική (Cheminformatics) και στη διαχείριση της γνώσης (Knowledge Management),

ενσωματώνοντας τις αναπτυσσόμενες νέες υψηλές τεχνολογίες τόσο σε πειραματικό όσο και σε *in silico* επίπεδο¹⁰.

1.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες και βιολογική δράση. Ο ρόλος της λιποφιλίας

Σήμερα υπάρχει δυνατότητα υπολογισμού πολύ μεγάλου αριθμού παραμέτρων που περιγράφουν τη δομή (περιγραφικές μεταβλητές), οι οποίες εφαρμόζονται σε σχέσεις QSAR. Συχνά ανακύπτουν προβλήματα ως προς την προβλεπτική ικανότητα πολύπλοκων μοντέλων με μεταβλητές που είναι δύσκολο να ερμηνευτούν. Διαπιστώνεται η ανάγκη για επιστροφή σε λίγες, εύκολα κατανοητές από τον φαρμακοχημικό, παραμέτρους και απλούστερες προσεγγίσεις. Μέσα σε αυτούς τους κλυδωνισμούς ο συντελεστής μερισμού στο σύστημα οκτανόλης-νερού υπό τη λογαριθμική του μορφή $\log P$, ως μέτρο της λιποφιλίας όπως καθιερώθηκε από τον Hansch παραμένει πρωταρχική παράμετρος, τόσο για την περιγραφή και πρόβλεψη παθητικών φαινομένων (διαπερατότητα), όσο και φαινομένων σύνδεσης με μακρομόρια, είτε πρόκειται για υποδοχείς, είτε για πρωτεΐνες του πλάσματος και των ιστών, πρωτεΐνες-μεταφορείς ή μεταβολικά ένζυμα¹¹. Εξάλλου, η λιποφιλία (συνήθως εκφρασμένη ως $C\log P$) περιλαμβάνεται στους κανόνες που έχουν διατυπωθεί για τα φαρμακομοριακά χαρακτηριστικά όπως ο μνημονικός κανόνας του 5 του Lipinski¹², ο κανόνας του 3 για τα χαρακτηριστικά θραυσμάτων κλπ¹³.

Για τη σχέση της λιποφιλίας με τη διαπερατότητα έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα με επικρατέστερα το παραβολικό μοντέλο του Hansch¹⁴ και το διγραμμικό του Kubinyi¹⁵ (βλ. Σχήματα I-1 και I-2). Οι εξισώσεις που εκφράζουν τα αντίστοιχα μοντέλα είναι:

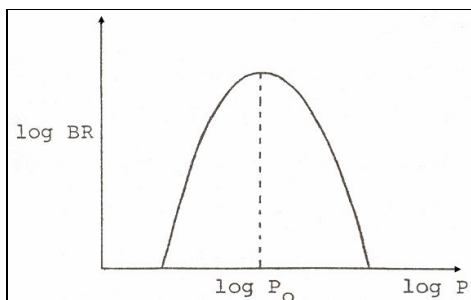
$$\log BR = -a(\log P)^2 + b\log P + c \quad (I-2)$$

$$\log BR = a\log P - b\log(\beta P + 1) + c \quad (I-3)$$

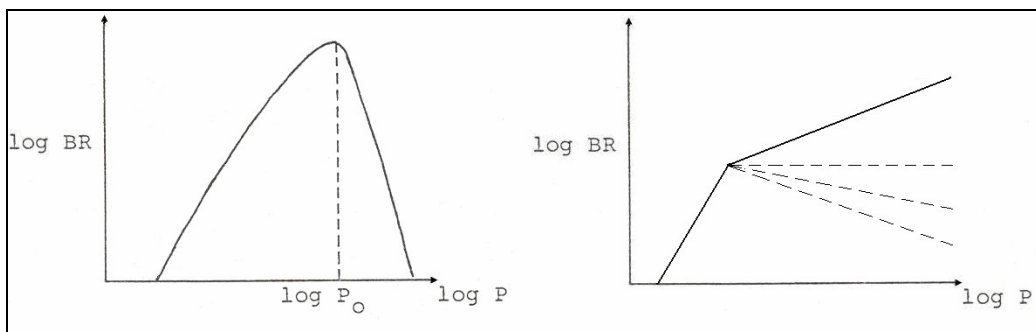
όπου BR (biological response) η βιολογική δράση με την ευρύτερη έννοια.

Στο διγραμμικό μοντέλο ανάλογα με τις τιμές των συντελεστών a και b η μορφή της καμπύλης μπορεί να πλησιάζει την παραβολική (διαφορετικό πρόσημο στην κλίση

των δυο ευθειών) ή να παίρνει οποιαδήποτε άλλη διγραμμική μορφή διαφορετικών κλίσεων, περνώντας και από την καμπύλη κορεσμού (Σχήμα I-2). Στις σχέσεις αυτές, οι οποίες είναι δυνατόν να αναλύουν δομικώς διαφορετικές ενώσεις η λιποφιλία εκφράζεται με το φαινόμενο συντελεστή μερισμού ή κατανομής $\log D$, που συμπεριλαμβάνει τον ιονισμό των μορίων και εξαρτάται από το pH.

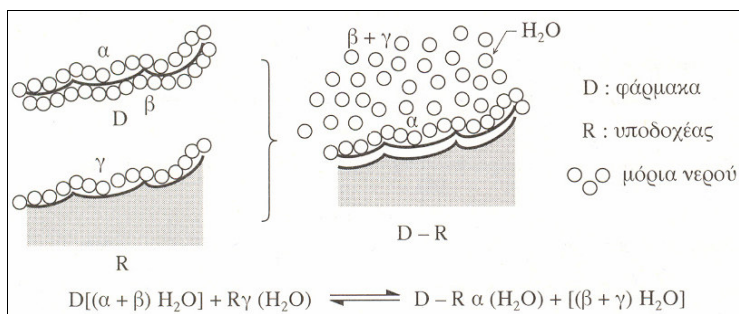


Σχήμα I-1. Παραβολικό Μοντέλο.



Σχήμα I-2. Διγραμμικό Μοντέλο.

Η σύνδεση με τα μακρομόρια ακολουθεί συνήθως γραμμική σχέση με τη λιποφιλία, η οποία εκφράζεται ως $\log P$, ακόμη και στην περίπτωση που είναι γνωστό ότι η ιονισμένη μορφή συνδέεται με τον υποδοχέα (ή το μακρομόριο γενικότερα). Αυτό μπορεί να αποδοθεί αφενός στο γεγονός ότι στην περίπτωση ανάλυσης της συγγένειας μορίων με τον υποδοχέα μελετώνται δομικά συγγενείς ενώσεις, οπότε συνήθως ο ιονισμός δεν μεταβάλλεται ή στο γεγονός ότι η υδρόφοβη σύνδεση ως αποτέλεσμα της τάσης των μορίων του νερού να αποφύγουν τις υδρόφοβες επιφάνειες μικρομορίου-μακρομορίου καθορίζεται από τα αντίστοιχα μη πολικά τμήματα. Η υδρόφοβη σύνδεση μικρομορίου-μακρομορίου φαίνεται στο Σχήμα I-3:



Σχήμα I-3. Σχηματική απεικόνιση της υδρόφοβης σύνδεσης.

Λόγω της μεγάλης της σημασίας η λιποφιλία έχει αποτελέσει ιδιαίτερο αντικείμενο έρευνας τόσο όσον αφορά στον προσδιορισμό όσο και στον υπολογισμό της. Σε αντίθεση με άλλες μοριακές παραμέτρους που υπολογίζονται είτε από τη δισδιάστατη (M.B., περιστρεφόμενοι δεσμοί, θέσεις δοτών/δεκτών πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου κλπ) ή την τρισδιάστατη δομή (μεγέθη όγκου, ενέργειας, μερικά φορτία κλπ) ο συντελεστής μερισμού ως θερμοδυναμική ή σταθερά ισορροπίας απαιτεί πειραματικούς προσδιορισμούς. Σε πειραματικές τιμές άλλωστε βασίζονται και τα υπολογιστικά συστήματα, τα οποία αποτελούν ημι-εμπειρικές προσεγγίσεις. Η βάση δεδομένων MedChem Project, η οποία αρχικά δημιουργήθηκε από το Pomona College και αργότερα πέρασε στη Daylight περιλαμβάνει σήμερα πάνω από 53000 τιμές logP και ανανεώνεται ανά εξάμηνο¹⁶. Το σύστημα οκτανόλης-νερού παρά τις κριτικές που κατά καιρούς διατυπώνονται, παραμένει το σύστημα αναφοράς για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας. Στο σύστημα αυτό έχει βασιστεί πληθώρα σχέσεων QSAR και έχουν εξαχθεί άριστες τιμές logP_o για τη διαπερατότητα από συγκεκριμένους βιολογικούς φραγμούς^{17,18,19}. Εξάλλου στη βάση πειραματικών τιμών στο σύστημα οκτανόλης-νερού έχουν αναπτυχθεί και όλα τα υπολογιστικά συστήματα και αυτή η πραγματικότητα είναι πολύ δύσκολο να αλλάξει. Ως εκ τούτου όλες οι εναλλακτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας συγκρίνονται τελικά με το σύστημα οκτανόλης-νερού.

1.3 Η διπλή φύση της λιποφιλίας-Μοριακές συνιστώσες της λιποφιλίας

Όπως έχει προκύψει από μοριακά μοντέλα^{20,21} η λιποφιλία είναι μια σύνθετη ιδιότητα, αποτελούμενη από δυο συνιστώσες, την υδροφοβία (που κατά κανόνα υπακούει στην προσθετικότητα) και την πολικότητα των ενώσεων²².

Λιποφιλία = Υδροφοβία - Πολικότητα (I-4)

Κατά συνέπεια οι δύο αυτοί όροι δεν είναι ταυτόσημοι, αλλά έννοιες που αλληλοσυμπληρώνονται. Ο όρος λιποφιλία αναφέρεται στην ενεργητική κίνηση μιας ουσίας προς το περισσότερο λιπόφιλο περιβάλλον, ενώ η υδροφοβία ορίζεται ως η παθητική απομάκρυνση της ουσίας από το υδρόφιλο περιβάλλον. Υδροφοβία είναι το φαινόμενο κατά το οποίο μόρια μη πολικών ουσιών όταν βρεθούν μέσα σε υδατικό περιβάλλον προσεγγίζουν μεταξύ τους ως αποτέλεσμα της αμοιβαίας άπωσής τους από το νερό έτσι ώστε να καταλαμβάνουν τη μικρότερη δυνατή επιφάνεια.

Η υδροφοβία (στερική συνιστώσα) μπορεί να εκτιμηθεί με παραμέτρους μοριακού όγκου, εμβαδού μοριακής επιφάνειας, το μοριακό βάρος και την πολωσιμότητα ή τη μοριακή διαθλασιμότητα, ενώ η πολικότητα εκφράζεται με τη διπολική ροπή, την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, τη λιπόφοβη παράμετρο Λ και με ηλεκτρονιακές παραμέτρους^{22,23,23,24}.

Η διαμόρφωση των μορίων έχει διαπιστωθεί ότι είναι δυνατόν να επηρεάσει επίσης την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Η επίδραση αυτή είναι θετική ή αρνητική, ανάλογα αν στο εσωτερικό του μορίου "κρύβονται" πολικές ή υδρόφοβες ομάδες με αποτέλεσμα "υδρόφιλη ή υδρόφοβη κατάρρευση" και "χαμολεοντική" συμπεριφορά του μορίου ανάλογα με το περιβάλλον^{23,25,26}.

1.4 Αυξημένη Λιποφιλία-Όχι ευχαριστώ!

Όπως αναφέρθηκε (§1.2) η λιποφιλία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στις βιολογικές διαδικασίες. Ωστόσο έγκαιρα διαπιστώθηκε ότι πολύ υψηλή λιποφιλία παρόλο που συχνά συμβάλλει θετικά στη συγγένεια των μορίων με τον υποδοχέα, αφενός δεν ευνοεί τη διαπερατότητα (παραβολικό-διγραμμικό μοντέλο), αφετέρου οδηγεί σε ανεπιθύμητα φαινόμενα και συγκεκριμένα σε:

α) εμφάνιση αθροιστικών φαινομένων λόγω παρατεταμένης παραμονής μιας ουσίας στον οργανισμό

β) αύξηση της τοξικότητας (όπως διαπίστωσε ο Richet ήδη από το 1893 όσο λιγότερο διαλυτές είναι οι ουσίες, δηλαδή όσο περισσότερο λιπόφιλες, τόσο περισσότερο τοξικές είναι: "le plus soluble, le moins toxique")

γ) επαγωγή μικροσωμικών ενζύμων λόγω της τάσης του οργανισμού για άμυνα στις λιπόφιλες ουσίες, γεγονός που διαταράσσει την ισορροπία των βιομετατροπών με απρόβλεπτες συνέπειες

δ) προβλήματα μορφοποίησης στο τελικό προϊόν

Τα ανωτέρω οδήγησαν στη διατύπωση της "αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας" από τον Hansch το 1987¹⁸. Σύμφωνα με την αρχή αυτή η λιποφιλία των μορίων πρέπει να περιορίζεται σε αυτήν που είναι απαραίτητη για τη δράση, η δε δράση να καθορίζεται μέσω καλύτερης συγγένειας με τον υποδοχέα και όχι μέσω αποτελεσματικότερης διαπερατότητας. Δέκα χρόνια μετά τον Hansch ο Lipinski διαπιστώνοντας την τάση σύνθεσης όλο και μεγαλύτερων μορίων κυρίως μέσω της τεχνικής της Συνδυαστικής Χημείας (Combinatorial Chemistry) και θέλοντας ν'αντιμετωπίσει προβλήματα απορρόφησης από το στόμα, διατύπωσε το μνημονικό κανόνα του 5 (Ro5) που θέτει ανώτατες τιμές σε συγκεκριμένα μοριακά χαρακτηριστικά, μεταξύ αυτών και της λιποφιλίας¹²: Σύμφωνα με τον Lipinski οι κατωτέρω οριακές τιμές αποτελούν μη ευνοϊκά φαρμακομοριακά χαρακτηριστικά για την από του στόματος απορρόφηση:

- 1) μοριακό βάρος > 500
- 2) ClogP > 5 (υπολογιστική τιμή για ποσοτικοποίηση της λιποφιλίας)
- 3) περισσότερες από 5 θέσεις δότη πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου στο μόριο
- 4) περισσότερες από 10 θέσεις δέκτη πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου στο μόριο

Ενώσεις που παραβιάζουν δυο τουλάχιστον φορές τον κανόνα του Lipinski αναμένεται να παρουσιάσουν προβλήματα βιοδιαθεσιμότητας.

Ο μνημονικός κανόνας του 5 διευρύνθηκε αργότερα με επιπλέον δομικά χαρακτηριστικά (εμβαδόν ολικής επιφάνειας, αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών). Επιπλέον διατυπώθηκε ο κανόνας του 3 που καθορίζει χαρακτηριστικά θραυσμάτων (fragment-based lead), οι οποίες πρέπει να είναι μικρότερες σε μέγεθος, λιγότερο λιπόφιλες και να διαθέτουν λιγότερες ομάδες που να συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου από τις τελικές δραστικές ενώσεις^{13,27,28,29}:

- 1) μοριακό βάρος < 300Da
- 2) logP < 3
- 3) λιγότερες από 3 θέσεις δότη πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου στο μόριο
- 4) λιγότερες από 6 θέσεις δέκτη πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου στο μόριο

Αντίστοιχα όρια έχουν προταθεί και για τις προδιαγραφές των ενώσεων που εμφανίζουν δράση στο ΚΝΣ (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα) (CNS-likeness) και των θραυσμάτων. Μια σύνοψη των ανώτατων τιμών των φαρμακομοριακών χαρακτηριστικών δίνεται στον Πίνακα I-1.

Πίνακας I-1. Ανώτατες τιμές ιδιοτήτων για ενώσεις-οδηγούς και φαρμακομόρια.

Ιδιότητα	Χαρακτηριστικά μορίων			
	φάρμακα (drugs)	δράση στο ΚΝΣ (CNS-drugs)	ενώσεις-οδηγοί (leads)	θραύσματα (fragments)
Μοριακό βάρος (Da)	<500	<450	<400	<300
logP ^(α)	<5	0 έως 4	<4	<3
logD _{7,4} ^(β)	-1 έως 3	1 έως 4	-1 έως 4	
PSA(Å ²) ^(γ)	<140	<80	<120	<60
HD ^(δ)	<5	-	<4	<3
HA ^(ε)	<10	-	<8	<3

^(α)υπολογιστική τιμή της λιποφιλίας σύμφωνα με το λογισμικό ClogP.

^(β)αντίστοιχη υπολογιστική τιμή της λιποφιλίας σε pH 7,4.

^(γ)εμβαδόν πολικής επιφάνειας: άτομα αζώτου και οξυγόνου και τα συνδεδεμένα με αυτά υδρογόνα.

^(δ)αριθμός θέσεων δότη πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου.

^(ε)αριθμός θέσεων δέκτη πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου.

1.5 Επίδραση του ιονισμού στην κατανομή

Ο συντελεστής μερισμού αναφέρεται στη μονομερή και αδιάστατη μορφή του μορίου. Όμως τα περισσότερα φαρμακευτικά μόρια περιέχουν ένα ή και περισσότερα κέντρα ιονισμού με αποτέλεσμα η κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού να προσδιορίζεται από τέσσερις σταθερές ισορροπίας:

1) logP^N, αφορά στην κατανομή της αδιάστατης μορφής μεταξύ των δυο φάσεων

2) logP^I, αφορά στην κατανομή της ιονισμένης μορφής logP^I

3) pK_a, αποτελεί τη σταθερά ιονισμού

4) pK_a^{oct}, οκτανολικό pK_a.

Το pK_a^{oct} έχει προταθεί από τον Scherrer³⁰ και αποτελεί σχετική σταθερά που ορίζεται ως το pH της υδατικής φάσης στο οποίο συνυπάρχουν στην οκτανόλη ίσες συγκεντρώσεις της αδιάστατης και της ιονισμένης μορφής. Καθώς η μετάβαση της ιονικής μορφής μιας ουσίας στον οργανικό διαλύτη πραγματοποιείται κυρίως υπό

μορφή ιοντικών ζευγών (ion pair) το οκτανολικό pK_a σχετίζεται με το σχηματισμό ιοντικών ζευγών και εξαρτάται από την ιονική ισχύ.

Το τελικό αποτέλεσμα των ισορροπιών αυτών αναφέρεται ως συντελεστής μερισμού ή συντελεστής κατανομής D, ο οποίος επίσης χρησιμοποιείται υπό τη λογαριθμική του μορφή ($\log D$). Ο συντελεστής κατανομής είναι πάντοτε μικρότερος από το συντελεστή μερισμού όπως φαίνεται από τη σχέση που τους συνδέει:

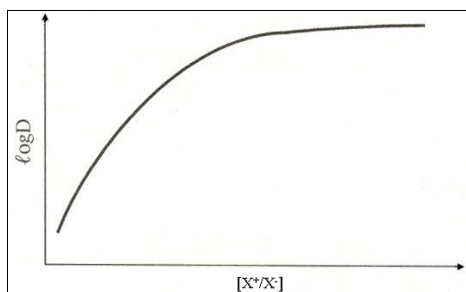
$$\log P = \log D + Q \quad (I-5)$$

όπου Q η διόρθωση η οποία εξαρτάται από το pK_a της ουσίας και το pH του περιβάλλοντος και προκύπτει από την εξίσωση Henderson-Hasselbach με βάση την παραδοχή ότι στην οργανική φάση κατανέμεται μόνο η αδιάστατη μορφή. Οι διορθώσεις που απαιτούνται στην περίπτωση μονοπρωτικών-διπρωτικών οξέων και βάσεων, καθώς και αμφολυτών φαίνονται στον Πίνακα I-2.

Πίνακας I-2. Διορθώσεις Q λόγω ιονισμού.

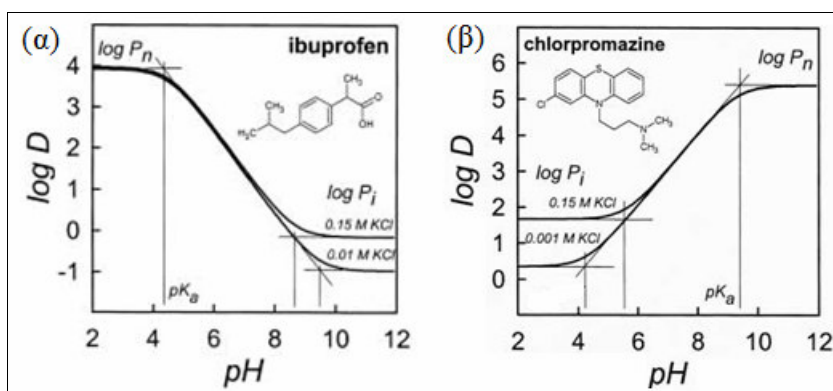
	Q	εξ.
μονοπρωτικά οξέα	$\log(1+10^{pH-pK_a})$	(I-6)
μονοπρωτικές βάσεις	$\log(1+10^{pK_a-pH})$	(I-7)
διπρωτικά οξέα	$\log(1+10^{pH-pK_{a1}}+10^{pH-pK_{a1}-pK_{a2}})$ εάν $pK_{a1} < pK_{a2}$	(I-8)
διπρωτικές βάσεις	$\log(1+10^{pK_{a1}-pH}+10^{pK_{a1}+pK_{a2}-2pH})$ εάν $pK_{a1} > pK_{a2}$	(I-9)
αμφολύτες	$\log(1+10^{pK_{a1}-pH}+10^{pH-pK_{a2}})$ εάν $pK_{a2}(\text{οξύ}) > pK_{a1}(\text{βάση})$	(I-10)

Ωστόσο σε pH όπου ο ιονισμός είναι πολύ εκτεταμένος, είναι δυνατόν να κατανεμηθεί στην οργανική φάση και η ιονισμένη μορφή ως ιοντικό ζεύγος με τα αντισταθμιστικά ιόντα του περιβάλλοντος. Σε αυτές τις περιπτώσεις στο συντελεστή διόρθωσης υπεισέρχονται επίσης η φύση και η συγκέντρωση των αντισταθμιστικών ιόντων. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αντισταθμιστικού ιόντος, αυξάνεται ο συντελεστής κατανομής ακολουθώντας καμπύλη κορεσμού, Σχήμα I-4:



Σχήμα I-4. Σχέση $\log D$ /συγκέντρωσης του αντισταθμιστικού ιόντος.

Ο προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού της ιονισμένης μορφής μιας ουσίας συνιστάται να γίνεται παρουσία 0,15M KCl/NaCl, τιμή που αντιστοιχεί σε φυσιολογικές συνθήκες στον ανθρώπινο οργανισμό και βρίσκεται στην περιοχή όπου παρατηρείται σταθεροποίηση του συντελεστή κατανομής (plateau). Η ικανότητα σχηματισμού ιοντικών ζευγών εξαρτάται από το είδος του ιόντος. Τα φωσφορικά ανιόντα θεωρείται ότι δεν σχηματίζουν σε μεγάλο βαθμό ιοντικά ζεύγη, σε αντίθεση με τα ιόντα Cl^- και K^+/Na^+ , τα οποία σχηματίζουν ιοντικά ζεύγη με πρωτονιωμένες βάσεις και ανιόντα οξέων αντίστοιχα με αποτέλεσμα να αυξάνει η κατανομή στην οκτανόλη. Στο Σχήμα I-5 απεικονίζεται η σχέση $\log D/\text{pH}$ απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων KCl για μια όξινη και μια βασική ένωση:



Σχήμα I-5. Σχέση $\log D/\text{pH}$ για την όξινη ένωση ιβουπροφαίνιο (α) και για τη βασική ένωση χλωροπρομαζίνη (β) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων KCl.

1.6 Υπολογισμός του συντελεστή μερισμού/κατανομής

Η ανάγκη για γρήγορη εκτίμηση της λιποφιλίας προς όφελος του ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων και της πρόβλεψης της βιολογικής δράσης οδήγησαν στην

ανάπτυξη πληθώρας υπολογιστικών συστημάτων, η οποία χρονολογείται ήδη από τη δεκαετία του '60³¹. Τα συστήματα αυτά αποτελούν ημι-εμπειρικές προσεγγίσεις και βασίζονται στον προσθετικό και συντακτικό χαρακτήρα του συντελεστή μερισμού. Σύμφωνα με την αρχή της προσθετικότητας ο κάθε υποκαταστάτης χαρακτηρίζεται από σταθερό ποσό λιποφιλίας με το οποίο συμβάλλει στη συνολική λιποφιλία του μορίου στο οποίο συμμετέχει, ενώ τυχόν αποκλίσεις οφείλονται στο συντακτικό χαρακτήρα του συντελεστή μερισμού και σχετίζονται κυρίως με φαινόμενα ηλεκτρονιακής φύσης ή αλληλεπικάλυψης των σφαιρών ενυδάτωσης. Το πρώτο σύστημα που προτάθηκε ήταν το σύστημα της υδρόφοβης σταθεράς π του Hansch, το οποίο στηρίχθηκε σε γραμμικές σχέσεις ελεύθερης ενέργειας κατά το πρότυπο εξαγωγής της ηλεκτρονιακής σταθεράς σ του Hammett³², προσέγγιση η οποία δεν χρησιμοποιείται πλέον για τον υπολογισμό του $\log P$ ολοκλήρου του μορίου. Αντιθέτως, η υδρόφοβη σταθερά π ή το άθροισμα $\Sigma\pi$ χρησιμοποιούνται ως παράμετροι σε σχέσεις QSAR. Εξάλλου η προσέγγιση της υδρόφοβης σταθεράς π προσφέρεται και για τη διερεύνηση αποκλίσεων από την προσθετικότητα οι οποίες δεν συμπεριλαμβάνονται στους προτεινόμενους διορθωτικούς κανόνες κατά την αξιολόγηση των τιμών $\log P$ στα πλαίσια δομικά συγγενών ενώσεων, ιδιαίτερα στην περίπτωση αρωματικών ή ετεροκυκλικών συστημάτων^{33,34,35,36}.

Σήμερα υπάρχουν διαθέσιμα πολλά συστήματα υπολογισμού του συντελεστή μερισμού τα οποία αποτελούν κυρίως υπο-δομικές προσεγγίσεις και κωδικοποιούνται σε αντίστοιχα λογισμικά προγράμματα.

Σύμφωνα με τις υπο-δομικές προσεγγίσεις το μόριο τεμαχίζεται σε θραύσματα (μέθοδοι θραυσματοποίησης) ή στο επίπεδο ενός απλού ατόμου σε συνδυασμό με το γειτονικό του δομικό περιβάλλον (μέθοδοι ατομικών συνεισφορών). Ο συντελεστής μερισμού υπολογίζεται ως το άθροισμα αυτών των θραυσμάτων ή τύπων ατόμων. Στην πρώτη περίπτωση (μέθοδοι θραυσματοποίησης) απαιτούνται επιπλέον διορθωτικοί παράγοντες, οι οποίοι σχετίζονται με τη σύνδεση των θραυσμάτων στα μόρια και άλλα δομικά χαρακτηριστικά του μορίου (συμπύκνωση πυρήνων, συζυγία πυρήνων, διακλαδώσεις κλπ). Κατά συνέπεια ο συντελεστής μερισμού υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$\log P = \sum a_n f_n + \sum Q \quad (I-11)$$

όπου f_n η υδρόφοβη σταθερά του θραύσματος, a_n αριθμός που υποδηλώνει πόσες φορές το θραύσμα η απαντά στο μόριο και Q οι διορθωτικοί παράγοντες, οι οποίοι αντισταθμίζουν τις αποκλίσεις από την προσθετικότητα.

Αντίθετα, οι μέθοδοι ατομικών συνεισφορών δεν περιλαμβάνουν διορθωτικούς παράγοντες δεδομένου ότι οι τύποι ατόμων έχουν καθοριστεί λαμβάνοντας υπόψη το δομικό περιβάλλον, οπότε χρησιμοποιείται η σχέση (I-12):

$$\log P = \sum a_i \alpha_i \quad (I-12)$$

όπου a η ατομική συνεισφορά του ατόμου τύπου i και α αριθμός που υποδηλώνει πόσες φορές απαντά στο μόριο το άτομο τύπου i .

Με τα συστήματα ατομικών συνεισφορών αντιμετωπίζονται και διάφορες αδυναμίες που παρατηρούνται στα συστήματα θραυσμάτων, όπως η αποτυχία διάκρισης ισομερών θέσεως και των ταυτομερών^{37,38}.

Τα συστήματα θραυσμάτων είναι δυο: του Rekker^{39,40,41} και των Leo-Hansch^{42,43,44}, ενώ τα κυριότερα συστήματα ατομικών συνεισφορών είναι του Broto⁴⁵, των Ghose Crippen⁴⁶, του Moriguchi⁴⁷, των Klopman-Wang⁴⁸ και των Suzuki-Kudo⁴⁹. Τα συστήματα ατομικών συνεισφορών διαφέρουν ως προς τον καθορισμό των τύπων ατόμων και την αρχική σειρά πειραματικών τιμών $\log P$ που έχει χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή τους. Το σύστημα των Meylan-Howard⁵⁰ αποτελεί συνδυασμό συστήματος θραυσμάτων και ατομικών συνεισφορών περιέχει δε στην εξίσωση για τον υπολογισμό του $\log P$ και σταθερό όρο. Με εξαίρεση το σύστημα θραυσμάτων των Leo-Hansch το οποίο έχει οικοδομηθεί με συστηματικό προσδιορισμό των συντελεστών μερισμού μικρών μορίων, τα υπόλοιπα συστήματα έχουν αναπτυχθεί με στατιστική επεξεργασία εφαρμόζοντας Πολλαπλή Γραμμική Ανάλυση Παλινδρόμησης (MLRA: Multiple Linear Regression Analysis).

Μια διαφορετική προσέγγιση για τον υπολογισμό του συντελεστή μερισμού βασίζεται στη θεώρηση ολόκληρων των μορίων στη βάση περιγραφικών μεταβλητών της δομής και την εξαγωγή μοντέλων και πάλι μέσω MLRA. Τα μοντέλα αυτά προσπαθούν να αντιμετωπίσουν τις αδυναμίες των υπο-δομικών προσεγγίσεων, όπως η υπεραπλούστευση των ηλεκτρονικών και στερικών επιδράσεων, η αποτυχία υπολογισμού του $\log P$ λόγω έλλειψης αντίστοιχου τύπου ατόμων ή η έλλειψη

διαφοροποίησης μεταξύ δομικών ισομερών. Οι περιγραφικές μεταβλητές μπορεί να είναι:

α) μοριακές ιδιότητες όπως η πυκνότητα φορτίου, το εμβαδόν επιφάνειας, ο όγκος και το ηλεκτροστατικό δυναμικό και άλλα κβαντοχημικά μεγέθη που προκύπτουν από μοριακή προσομοίωση μετά από ελαχιστοποίηση της ενέργειας⁵¹.

β) ηλεκτροτοπολογικοί δείκτες⁵², οι οποίοι έχουν το πλεονέκτημα ότι εμπεριέχουν τόσο γεωμετρικά όσο και ηλεκτρονιακά χαρακτηριστικά των ατόμων στο μόριο.

Στην κατηγορία αυτή ανήκει και η μέθοδος LSER (Linear Solvation Energy Relationships) του Abraham, όπου οι μοριακές ιδιότητες εκφράζονται με τις σολβατοχρωμικές παραμέτρους⁵³.

Οι αλγόριθμοι και τα μοντέλα που περιγράφηκαν ανωτέρω αποτελούν γραμμικές προσεγγίσεις για τον υπολογισμό του συντελεστή μερισμού. Η πολυπλοκότητα της φύσης της λιποφιλίας ωστόσο οδήγησε και στην ανάπτυξη μη γραμμικών μοντέλων στη βάση κατασκευής Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων (ANN: Artificial Neural Networks)^{54,55}.

Τέλος είναι δυνατόν η αρχική τιμή logP που προκύπτει από ένα από τα παραπάνω συστήματα μπορεί να βελτιωθεί στη βάση κανόνων ομοιότητας με παρόμοια μόρια των οποίων είναι γνωστές οι τιμές logP και τα οποία περιλαμβάνονται σε "βιβλιοθήκες διορθώσεων" (correction libraries). Η προσέγγιση αυτή εφαρμόζεται στον αλγόριθμο ABlogP, ο οποίος είναι ενσωματωμένος στο λογισμικό πρόγραμμα Pharma Algorithms).

Το μοριακό δυναμικό λιποφιλίας (MLP: Molecular Lipophilicity Potential)⁵⁶, το οποίο αποτελεί μια προσέγγιση υπολογισμού της λιποφιλίας των μορίων στα πλαίσια πλέγματος τριών διαστάσεων, κατάλληλο να αποδώσει διαφορές στο συντελεστή μερισμού σε συνάρτηση με τη διαμόρφωση. Ο υπολογισμός βασίζεται σε σύστημα θραυσμάτων ή ατομικών συνεισφορών στο οποίο υπεισέρχεται επιπλέον μια συνάρτηση για την απόσταση από το σημείο του υδρόφοβου ιχνηθέτη (probe) στο πλέγμα. Τα συστήματα υπολογισμού του συντελεστή μερισμού είναι κωδικοποιημένα σε λογισμικά προγράμματα και συνοψίζονται στον Πίνακα I-3⁵⁷.

Πίνακας I-3. Συστήματα υπολογισμού του logP/λογισμικά προγράμματα.

υπο-δομικές προσεγγίσεις		
σύστημα υπολογισμού		λογισμικό πρόγραμμα
συστήματα θραυσμάτων (fragmental systems)	Rekker	PALLAS PrologP(CDR) (Compudrug) ^{58,59} Σf-SYBYL, SANALOGP_ER (Tripos)
	Leo-Hansch	ClogP (Daylight, Biobyte) ^{60,61,62}
συστήματα ατομικών συνεισφορών (atomic contribution systems)	Ghose-Crippen	PALLAS PrologP(Atomic) (Compudrug) ^{58,59} MOLCAD (Tripos) ⁶³ TSAR, ALOGP (Accelrys)
	Broto	PALLAS PrologP(Atomic) (Compudrug) ^{58,59} MOLCAD (Tripos) ⁶³
	Klopman-Wang	KLOGP (Multicase) ⁶⁴ XLOGP (Luhua Lai) ⁶⁵
	Suzuki-Kudo	CHEMICALC
συνδυασμός συστήματος θραυσμάτων και συστημάτων ατομικών συνεισφορών	Meylan-Howard	KOWWIN, LOGKOW (Syracuse Res. Corp.) ⁵⁰
συνδυασμός θραυσμάτων Leo-Hansch, "υπερ-θραυσμάτων" και μεγάλου αριθμού διορθωτικών παραγόντων		ACD/LogP (Advanced Chemistry Development) ^{66,67}
συνδυασμός θραυσμάτων Leo-Hansch, διορθωτικών παραγόντων και κανόνων ομοιότητας		ADME boxes ABlogP (Advanced Pharma Algorithms) ^{52,68}
προσεγγίσεις ολόκληρου του μορίου		
δεδομένα εισαγωγής		λογισμικό πρόγραμμα
ηλεκτροτοπολογικοί δείκτες		MLOGP ⁴⁷ , VLOGP ⁶⁹ , T-LOGP ⁷⁰ , AUTOLOGP ⁷¹ , CSLogP
μοριακές ιδιότητες		BLOGP ⁴⁸ , QLOGP ⁷² , Absolv ⁷³
3-D υπολογισμός		
μοριακό δυναμικό λιποφιλίας		CLIP ⁵⁶ , HINT (EduSoft) ⁷⁴ , VEGA

1.7 Έλεγχος αξιοπιστίας των υπολογιστικών συστημάτων

Η αξιοπιστία των υπολογιστικών συστημάτων ελέγχεται:

- 1) με τη συσχέτιση των υπολογιζόμενων με τις πειραματικές τιμές σε σειρά ελέγχου. Λαμβάνονται υπόψη τα στατιστικά στοιχεία της εξίσωσης, η οποία προφανώς πρέπει να αποτελεί 1:1 συσχέτιση, δηλαδή να έχει κλίση περίπου ίση με τη μονάδα και να περνάει από την αρχή των αξόνων.
- 2) με βάση τις απόλυτες τιμές των διαφορών Δ μεταξύ υπολογιζόμενων/πειραματικών τιμών. Γενικά θεωρείται ότι για $\Delta \leq 0,49$ η πρόβλεψη είναι επιτυχής, για $0,5 \leq \Delta \leq 1$ αποδεκτή και για $\Delta > 1$ μη αποδεκτή²⁵.

Στον Πίνακα I-4 φαίνονται τα στατιστικά στοιχεία για διάφορα υπολογιστικά συστήματα.

Πίνακας I-4. Στατιστικά στοιχεία για την αξιοπιστία των υπολογιστικών συστημάτων.

υπολογιστικό σύστημα	n	r	s
σύστημα Leo-Hansch	8000	0,970	0,398
σύστημα Meylan-Howard	2351	0,991	0,216*
σύστημα Ghose-Crippen	830	0,964	0,470
σύστημα Klopman-Wang	935	0,965	0,383
σύστημα Broto	1868	-	0,400
σύστημα Suzuki-Kudo	1465	-	0,350**

*δεν χρησιμοποιήθηκε σειρά ελέγχου.

**η τιμή αντιστοιχεί στο μέσο απόλυτο σφάλμα.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα I-4, παρά τις καλές συσχετίσεις που προκύπτουν η τυπική απόκλιση είναι σχετικά μεγάλη για τα υπολογιστικά συστήματα, γεγονός που οδηγεί σε υψηλή τιμή ορίου ανοχής σφάλματος (περίπου μια λογαριθμική μονάδα μονάδα. Εξάλλου, οι καλές συσχετίσεις που προκύπτουν για το μεγάλο αριθμό των δομικώς διαφορετικών ενώσεων που απαρτίζουν τα γενικά μοντέλα (global models) δεν εγγυώνται πάντα αντίστοιχες καλές συσχετίσεις στην περίπτωση μικρού αριθμού δομικώς συγγενών μορίων που σχεδιάζονται και συντίθενται για πιθανή βιολογική δράση σε συγκεκριμένους στόχους (επιμέρους μοντέλα, local models). Η συχνή αναντιστοιχία μεταξύ γενικών και επιμέρους μοντέλων αποτελεί τα τελευταία χρόνια αντικείμενο γενικότερης διερεύνησης στις σχέσεις QSAR. Επιπλέον η πληθώρα των υπολογιστικών συστημάτων συχνά οδηγεί και σε αντίστοιχη πληθώρα διαφορετικών προβλέψεων για το ίδιο μόριο με αποτέλεσμα ο φαρμακοχημικός να μην είναι τελικά σε θέση να εκτιμήσει με ασφάλεια τη λιποφιλία των μορίων που μελετάει.

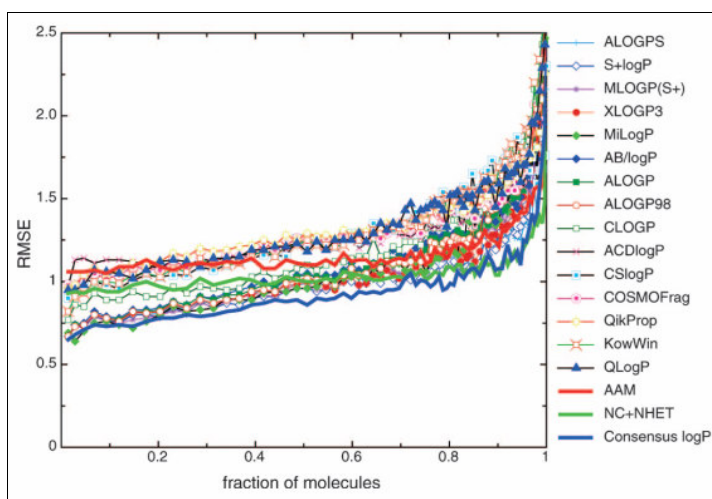
Πρόσφατα ο Tetko⁷⁵ σύγκρινε 18 συστήματα υπολογισμού logP για περίπου 96000 ενώσεις από τη βάση δεδομένων της Pfizer και 800 από τη βάση δεδομένων της Nycomed. Διαπιστώθηκε χαμηλή αξιοπιστία με τυπικό σφάλμα που υπέρβαινε τη μια λογαριθμική μονάδα. Επιπλέον μόνο οι μισές από τις ενώσεις εμφάνιζαν τυπικό σφάλμα μικρότερο από το αυθαίρετο "πρότυπο" του αριθμητικού μέσου όρου (AAM: Arithmetic Average Model), ο οποίος για τις ενώσεις της Pfizer ήταν 2,92 και για τις ενώσεις της Nycomed 3,18. Τα τυπικά σφάλματα των διαφόρων συστημάτων είναι επίσης ανάλογα με αυτά που προκύπτουν αν ο υπολογισμός του logP βασιστεί απλώς

στον αριθμό των ατόμων άνθρακα NC και τον αριθμό των ετεροατόμων στο μόριο NHET σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\log P = 1,46(0,02) + 0,11(\pm 0,0001)NC - 0,11(\pm 0,001)NHET \quad (I-13)$$

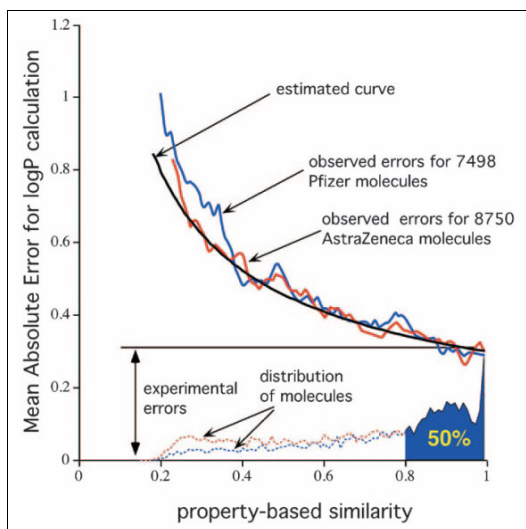
$$n = 95809, r^2 = 0,20, RMSE = 1,04$$

όπου RMSE (Root Mean Squared Error). Στο Σχήμα I-6 παριστάνονται γραφικά τα υπολογιστικά -με βάση την εξίσωση (I-13)- και πειραματικά σφάλματα -μεταξύ των διαφόρων συστημάτων και των πειραματικών τιμών- ως μοριακά κλάσματα:



Σχήμα I-6. Απεικόνιση των υπολογιστικών και πειραματικών σφαλμάτων.

Με βάση τα ανωτέρω προκύπτει ότι ο μεγάλος αριθμός ενώσεων σε ένα γενικό μοντέλο δεν αποτελεί το μόνο παράγοντα για τον καθορισμό του πεδίου εφαρμοσιμότητας (applicability domain) του μοντέλου. Μια πολύ σημαντική ιδιότητα της σειράς εκμάθησης ενός μοντέλου αποτελεί η χημική ποικιλότητα των δομών και η κάλυψη μεγάλης ετερογένειας στο χημικό χώρο. Η ομοιότητα στη βάση ιδιοτήτων (property based similarity) των μορίων συγκριτικά με αυτά που απαρτίζουν την ομάδα εκμάθησης συσχετίζεται με την ακρίβεια στις προβλέψεις. Μέτρο της ομοιότητας αυτής αποτελεί το μέγιστο του τετραγώνου του συντελεστή συσχέτισης ενός συνόλου ιδιοτήτων. Σύμφωνα με μελέτη του Tetko⁷⁵ μόρια με ομοιότητα μεγαλύτερη του 0,8 προβλέπονται με τυπικό σφάλμα περίπου 0,30-0,35, ανάλογο με το πειραματικό σφάλμα. Η εξάρτηση της ακρίβειας των προβλέψεων από την ομοιότητα ήταν ανάλογη τόσο για ενώσεις τόσο της Pfizer όσο και της Astra Zeneca:



Σχήμα I-7. Ακρίβεια των προβλέψεων σε σχέση με την ομοιότητα στη βάση ιδιοτήτων.

Με βάση τα ανωτέρω και με δεδομένο ότι ο σχεδιασμός των φαρμάκων συχνά εστιάζεται σε νέους χημειοτύπους ατόμων η δημιουργία επιμέρους μοντέλων αποκτά ιδιαίτερη σημασία τόσο για τη σωστή εκτίμηση της λιποφιλίας στα πλαίσια σειράς δομικά συγγενών ενώσεων που σχεδιάζονται για συγκεκριμένο στόχο όσο και για την επανατροφοδότηση των ολικών μοντέλων και αποτελεί ένα από τα ζητήματα που εξετάζονται στην παρούσα διατριβή.

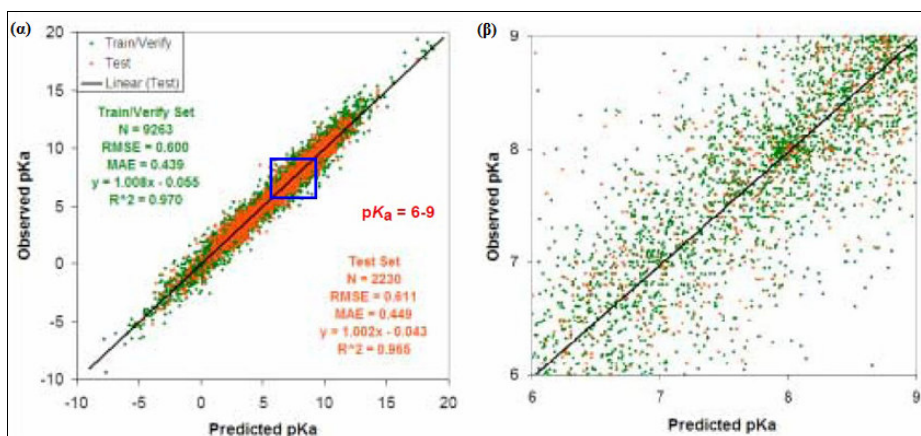
1.8 Υπολογισμός του συντελεστή κατανομής logD

Τα περισσότερα συστήματα έχουν αναπτυχθεί για τον υπολογισμό του συντελεστή μερισμού της αδιάστατης μορφής των μορίων. Αν και χρησιμοποιούνται οι τιμές logP, ο υπολογισμός του συντελεστή κατανομής ενδιαφέρει επίσης ιδιαίτερα για την εκτίμηση της διαπερατότητας βιολογικών φραγμών. Στην περίπτωση αυτή ωστόσο υπάρχουν πολύ λιγότερες επιλογές.

Οι μέθοδοι προσδιορισμού του logD βασίζονται κυρίως στον υπολογισμό του logP από κάποιο ήδη διαθέσιμο λογισμικό πρόγραμμα, τον υπολογισμό του pK_a της ουσίας και τον υπολογισμό του logP_i της ιονισμένης μορφής (συνήθως παρουσία 0,15M KCl). Ο υπολογισμός του pK_a βασίζεται στις εξισώσεις τύπου Hammett ή σε αντίστοιχες σχέσεις ελεύθερης ενέργειας που αναλύουν πειραματικές τιμές pK_a μεγάλου αριθμού ενώσεων στη βάση διαφορετικών σταθερών σ . Για τον υπολογισμό

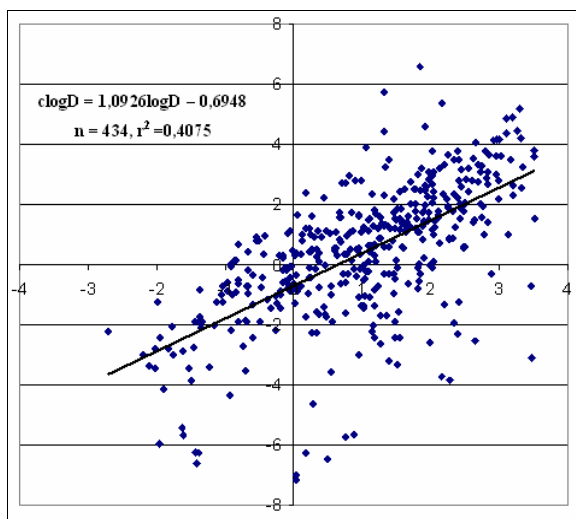
του συντελεστή κατανομής της ιονισμένης μορφής λαμβάνεται η παραδοχή ότι η διαφορά $\log P_1 - \log P$ παρουσία 0,15M KCl είναι περίπου 3 ή 4 λογαριθμικές μονάδες για βάσεις και οξέα αντίστοιχα^{76,77}. Το πρόγραμμα pKalc αντιθέτως επιτρέπει τον υπολογισμό των τιμών $\log D$ παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων K^+/Na^+ και Cl^- . Σε συστηματική μελέτη εφαρμογής του προγράμματος PALLAS PrologD (CompuDrug) το οποίο ενσωματώνει περισσότερες επιλογές για τον υπολογισμό του $\log P$ διαπιστώθηκε ότι η μεγαλύτερη πηγή σφαλμάτων στον υπολογισμό του $\log D$ προήρχετο από κακή εκτίμηση των τιμών pK_a ενώ αποδιδόταν σωστά η επίδραση των αντισταθμιστικών ιόντων⁷⁸.

Ο υπολογισμός των τιμών pK_a αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα αναντιστοιχίας μεταξύ πολύ επιτυχούς γενικού μοντέλου (global model) έναντι επιμέρους μοντέλων (local models). Στην περίπτωση αυτή η αιτία της αναντιστοιχίας οφείλεται στο μεγάλο εύρος τιμών pK_a που απαρτίζουν το γενικό μοντέλο έναντι του περιορισμένου εύρους τιμών pK_a που ενδιαφέρουν στο σχεδιασμό φαρμάκων, όπως φαίνεται και στο Σχήμα I-8α, όπου απεικονίζονται οι πειραματικές ως προς τις υπολογιστικές τιμές pK_a με βάση το λογισμικό της Simulation Plus⁷⁹. Το μοντέλο έχει προκύψει από ένα πολύ μεγάλο αριθμό ενώσεων ($n=9263$) και έχει ελεγχθεί επίσης από ομάδα ελέγχου με μεγάλο αριθμό ενώσεων ($n=2230$). Είναι φανερό ωστόσο ότι η απομόνωση μιας μικρής περιοχής επί της γραμμής παλινδρόμησης που αφορά σε τιμές pK_a 6 έως 9 οι οποίες ενδιαφέρουν πρωτίστως στο σχεδιασμό των φαρμάκων (εντός του τετραγώνου στο Σχήμα I-8α) οδηγεί σε πολύ φτωχότερη συσχέτιση, Σχήμα I-8β.



Σχήμα I-8. α) Συσχέτιση πειραματικών/υπολογιστικών τιμών pK_a ($n=9263$). Στο τετράγωνο περιλαμβάνονται οι τιμές pK_a 6-9 β) Η αντίστοιχη συσχέτιση για τις τιμές που περιέχονται εντός του τετραγώνου.

Κατά συνέπεια η αδυναμία στον υπολογισμό των τιμών pK_a οδηγεί σε ακόμη λιγότερο αξιόπιστες τιμές $\log D$ συγκριτικά με τις προβλέψεις των τιμών $\log P$. Χαρακτηριστικά στο Σχήμα I-9 απεικονίζονται οι πειραματικές ($\log D$) ως προς τις υπολογιστικές τιμές ($C\log D$) που προκύπτουν από το λογισμικό πρόγραμμα $C\log P$ μετά από διόρθωση στη βάση υπολογιστικών τιμών pK_a ⁸⁰. Ο συντελεστής συσχέτισης είναι $r=0,638$. Αν και ο αριθμός των ενώσεων κατά την αξιολόγηση του $C\log P$ είναι πολύ μεγαλύτερος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο συντελεστής συσχέτισης σε αυτή την περίπτωση είναι $r=0,970$. Εξάλλου είναι φανερό από το Σχήμα I-9 ότι για ορισμένες ενώσεις οι αποκλίσεις είναι πάρα πολύ μεγάλες:



Σχήμα I-9. Συσχέτιση πειραματικών/υπολογιστικών τιμών $\log D$ σε pH 7,4.

Τέλος, εκτός από την αδυναμία στον ακριβή υπολογισμό των τιμών pK_a έχουν επίσης διατυπωθεί και ερωτήματα κατά πόσον οι κανόνες προσθετικότητας που εφαρμόζονται για τον υπολογισμό των τιμών $\log P$ ισχύουν απόλυτα και στην περίπτωση φορτισμένων μορίων⁸¹ θέτοντας περαιτέρω εν αμφιβόλω τις προβλέψεις των τιμών $\log D$.

2. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΥ ΦΑΣΕΩΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΩΣ ΤΑΧΕΙΑΣ ΚΑΙ ΦΙΛΙΚΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ

2.1 Προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού/κατανομής

Ο συντελεστής μερισμού/κατανομής προσδιορίζεται είτε με άμεσες μεθόδους όπως: η κλασική μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης (shake-flask method)^{8,82}, η ποτενσιομετρική μέθοδος^{83,84} (προκειμένου για ενώσεις που έχουν ιονιζόμενα κέντρα) και η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (CPC: Centrifugal Partition Chromatography)^{85,86}, είτε με έμμεσες μεθόδους όπως είναι οι αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφικές τεχνικές. Η κλασική μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης αποτελεί χρονοβόρα και επίπονη μέθοδο, ενώ εμφανίζει περιορισμούς ως προς τα όρια των τιμών που μπορούν να προσδιοριστούν. Αναλυτικές λεπτομέρειες της μεθόδου έχουν αναφερθεί σε πολλές δημοσιεύσεις^{87,88}. Ο ποτενσιομετρικός προσδιορισμός επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του συντελεστή μερισμού logP και της σταθεράς ιονισμού pK_a. Εμφανίζει μεγάλο εύρος των προσδιοριζόμενων τιμών (μπορούν να προσδιοριστούν τιμές logP από -2 έως 7 και τιμές pK_a από 0,6 έως 13), όμως βρίσκει εφαρμογή μόνο όταν υπάρχουν κέντρα ιονισμού στο μόριο, ενώ απαιτείται ειδική συσκευή. Οι άμεσοι μέθοδοι προσδιορισμού του συντελεστή μερισμού εξακολουθούν να αποτελούν μεθόδους αναφοράς. Ωστόσο οι χρωματογραφικές τεχνικές προσφέρονται για γρήγορες μετρήσεις και ως εκ τούτου συγκεντρώνουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και θα αναπτυχθούν εκτενέστερα στην επόμενη ενότητα.

2.2 Χρωματογραφικά συστήματα αντιστρόφου φάσεως ως συστήματα κατανομής

Οι αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφικές τεχνικές: αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (RP-HPLC: Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography)⁸⁹ και αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (RP-TLC: Reversed Phase Thin Layer Chromatography)⁹⁰ αποτελούν εναλλακτικές

μεθόδους προσδιορισμού της λιποφιλικότητας. Η χρήση των τεχνικών αυτών χρονολογείται από τις αρχές της δεκαετίας του '70^{91,92} και από τις πρώτες μελέτες των Martin, Synge και Consden^{93,94} κατέστη σαφές ότι η χρωματογραφία κατανομής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξάγει ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με τη λιποφιλικότητα των μορίων.

Οι τεχνικές αυτές εμφανίζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων⁹⁵, όπως: υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, γρήγορη εκτίμηση των δεικτών λιποφιλικότητας, πολύ μεγάλο εύρος προσδιοριζόμενων τιμών (προς την περιοχή των πολύ λιπόφιλων τιμών), υψηλή ευχρηστία-δυνατότητα αυτοματοποίησης και απαίτηση πολύ μικρών ποσοτήτων των υπό προσδιορισμό ουσιών. Οι υπό προσδιορισμό ουσίες δεν χρειάζεται να είναι απόλυτα καθαρές, καθώς προσμίξεις από προϊόντα αποικοδόμησης αυτών ή άλλες ανεπιθύμητες ουσίες διαχωρίζονται κατά τη χρωματογραφική διαδικασία, οπότε δεν υπεισέρχεται σφάλμα κατά τον προσδιορισμό των δεικτών λιποφιλικότητας. Ωστόσο οι χρωματογραφικοί δείκτες αποτελούν σχετικούς δείκτες λιποφιλικότητας, εξαρτώμενοι από τις χρωματογραφικές συνθήκες και πρέπει να συγκρίνονται με τις τιμές logP, ώστε να εξασφαλίζεται πάντοτε η αντιστοιχία με το σύστημα οκτανόλης-νερού. Προϋπόθεση για τη χρήση των χρωματογραφικών τεχνικών αντιστρόφου φάσεως είναι να διέπεται η χρωματογραφική διαδικασία από μηχανισμό κατανομής⁹⁶. Η στατική φάση είναι μη πολική προσομοιώνοντας την οκτανόλη, ενώ η κινητή φάση είναι πολική προσομοιώνοντας το νερό.

Αν και οι πρώτες μελέτες λιποφιλικότητας με αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία αφορούσαν σε αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, σήμερα η "καθαρότητα" και φιλικότητα της υγρής χρωματογραφίας καθιστούν την τεχνική αυτή τεχνική επιλογής. Η RP-TLC αν και περισσότερο ευέλικτη μέθοδος ως προς την εφαρμογή της ως αναλυτική τεχνική φαίνεται να υπόκειται σε περισσότερους περιορισμούς όσον αφορά στην επιλογή κατάλληλων χρωματογραφικών συνθηκών για τον προσδιορισμό της λιποφιλικότητας. Δεδομένου ότι οι δυο τεχνικές εμφανίζουν πολλές ομοιότητες θα περιγραφούν από κοινού στις επόμενες ενότητες και θα επισημαίνονται οι διαφορές όπου είναι αναγκαίο.

2.3 Στατικές φάσεις στην RP-HPLC για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας

2.3.1 Στατικές φάσεις σιλανοποιημένου πήγματος διοξειδίου του πυριτίου και σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις

Οι στατικές αυτές φάσεις φέρουν υδρογονανθρακικές αλυσίδες δεκαοκτώ ατόμων άνθρακα (C-18) (ODS, Octadecylsilane), χημικά συνδεδεμένες στα υδροξύλια του πήγματος διοξειδίου του πυριτίου (silica gel)⁹⁶ και αποτελούν τις πλέον διαδεδομένες στατικές φάσεις στην RP-HPLC. Παρότι επιδιώκεται πλήρης σιλανοποίηση, πρακτικά ένα ποσοστό ομάδων σιλανόλης παραμένει ελεύθερο στην επιφάνεια της πυριτίας (silica, SiO₂) λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων κατά την αντίδραση σιλανοποίησης. Η ύπαρξη των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης (Si-OH) οδηγεί σε σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις (Silanophilic Effect) μεταξύ των ελευθέρων υδροξυλίων και των υπό ανάλυση ουσιών, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται αποκλίσεις από το μηχανισμό κατανομής και αύξηση της συγκράτησης των υπό προσδιορισμό ουσιών^{97,98,99,100}. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να είναι:

- α) αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου με πολικά μόρια
- β) δεσμοί υδρογόνου με μόρια που συμπεριφέρονται κυρίως ως δέκτες πρωτονίων
- γ) ηλεκτροστατικές δυνάμεις με θετικά φορτισμένα μόρια ιδιαίτερα σε υψηλότερες τιμές pH λόγω του όξινου χαρακτήρα των υδρογόνων των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης.

Οι σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται ιδιαίτερα ισχυρές στην περίπτωση πρωτονιωμένων βασικών ενώσεων και ενώσεων που φέρουν ομάδες ισχυρούς δέκτες πρωτονίων^{89,101,102}, μειώνονται σε όξινο pH (δεδομένου ότι μειώνεται ο ιονισμός των ομάδων σιλανόλης) και προκαλούν ασυμμετρία στις χρωματογραφικές κορυφές (tailing).

Το πρόβλημα των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τους ερευνητές και τους κατασκευαστές στηλών και έχουν καταβληθεί προσπάθειες για τον περιορισμό τους. Οι τρόποι περιορισμού τους είναι οι εξής:

- α) με προσθήκη στην κινητή φάση διαφόρων παραγόντων επικάλυψης (masking agents), οι οποίοι συνήθως είναι υδρόφοβες αλειφατικές αμίνες όπως η n-δεκυλαμίνη, η διαιθυλαμίνη και η N,N-διμεθυλοκυτταμίνη και οι οποίες στην πρωτονιωμένη τους

μορφή αλληλεπιδρούν με τα ελεύθερα υδροξύλια του πηγματος διοξειδίου του πυριτίου¹⁰⁰. Η μέθοδος αυτή περιορίζεται σε βάσεις και ουδέτερα μόρια. Στην περίπτωση των οξέων η παρουσία υδρόφοβων αμινών οδηγεί σε σχηματισμό ιοντικών ζευγών και περαιτέρω αύξηση της συγκράτησης¹⁰³. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις εξασθενούν σε κινητές φάσεις πλούσιες σε νερό, καθώς το ίδιο το νερό λειτουργεί εν μέρει ως παράγοντας επικάλυψης¹⁰⁰.

β) με παρασκευή στατικών φάσεων με πολύ περιορισμένο αριθμό ελευθέρων ή προσβάσιμων υδροξυλίων. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται ως εξής:

i) με πρόσθετη σιλανοποίηση και δέσμευση των υδροξυλίων που δεν αντιδρούν με πολύ μικρά αλκύλια (στήλες "endcapped", όπως η BDS (Base Deactivated Silica)¹⁰⁴. Οι στήλες BDS χρησιμοποιούνται ευρέως στον προσδιορισμό της λιποφιλικής ενώ αποτελούν και στήλες επιλογής σε αναλυτικούς διαχωρισμούς, δεδομένου ότι οδηγούν σε συμμετρικές κορυφές.

ii) με παρεμβολή αμιδικών δεσμών, οι οποίοι προστατεύουν ηλεκτροστατικά τις ελεύθερες ομάδες σιλανόλης από τους υψηλής πολικότητας αναλύτες (στήλες "polar-embedded", όπως η ABZ⁺)^{104,105}.

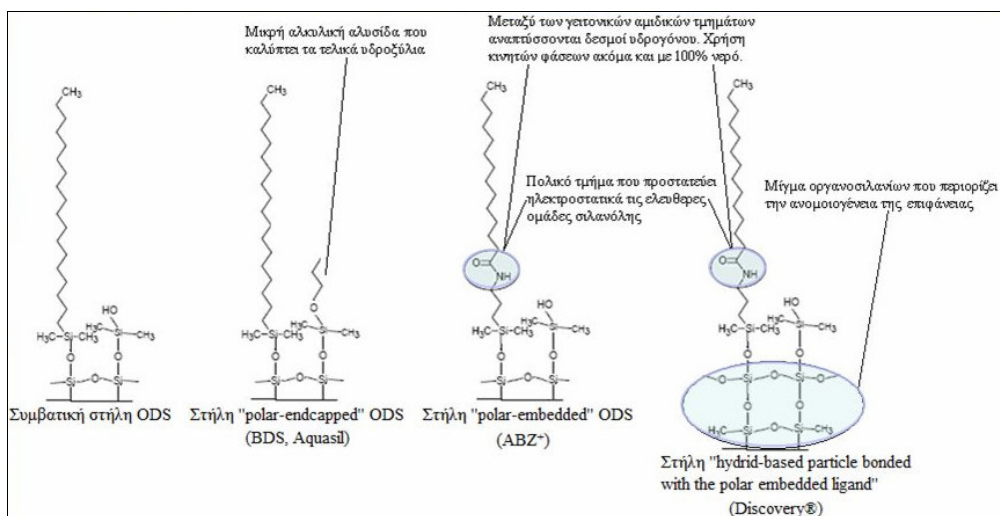
iii) με παρασκευή των στηλών "polar-endcapped" με επιπλέον επεξεργασία έναντι των συμβατικών φάσεων κατά την οποία μικρές αλκυλικές αλυσίδες (C3-C4) με ένα πολικό τμήμα αντιδρούν με τις ελεύθερες ομάδες σιλανόλης. Τα πολικά τμήματα των μικρών αλκυλίων αυξάνουν την πολικότητα κοντά στην επιφάνεια της πυριτίας, επιτρέποντας έτσι την καλύτερη διείσδυση κινητών φάσεων με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό στο εσωτερικό των υδρογονανθρακικών αλυσίδων, ενώ παράλληλα προσδίνουν πιο εκτεταμένη διαμόρφωση στις αλυσίδες.

Οι στήλες "polar-embedded" περιέχουν στη βάση της υδρογονανθρακικής αλυσίδας ένα πολικό τμήμα, συνήθως αμίδιο ή καρβαμίδιο. Μεταξύ των γειτονικών αμιδικών τμημάτων αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η πρόσβαση του αναλύτη στα ελεύθερα υδροξύλια της σιλανόλης, τα οποία κατά αυτόν τον τρόπο δεν είναι εκτεθειμένα στην επιφάνεια της στατικής φάσης, αλλά εγκλωβίζονται στο εσωτερικό της. Οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες σταθεροποιούνται σε μια πιο εκτεταμένη διαμόρφωση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των προβλημάτων που προκύπτουν κατά την χρήση κινητών φάσεων πλούσιων σε νερό. Οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες στις συμβατικές στήλες ODS

BDS είναι κατά κανόνα διπλωμένες με συνέπεια να μειώνεται η λειτουργική τους επιφάνεια¹⁰⁶, όταν χρησιμοποιούνται κινητές φάσεις με αυξημένα ποσοστά ύδατος, ενώ η χρήση κινητής φάσης αποτελούμενη μόνο από νερό οδηγεί σε "υδρόφοβη κατάρρευση"^{105,107}. Αντίθετα οι στήλες "polar-embedded" και "polar endcapped" επιτρέπουν τη χρήση νερού ως κινητή φάση και ως εκ τούτου αυξάνουν τα όρια προσδιορισμού της λιποφιλίας προς την κατεύθυνση των υδρόφιλων μορίων.

Σε μια επιπλέον προσπάθεια ελέγχου της ετερογένειας της επιφάνειας των σωματιδίων του πήγματος του διοξειδίου του πυριτίου η εταιρεία Waters παρασκεύασε στατική φάση από μείγμα οργανοσιλανίων, δημιουργώντας τμήματα σιλοξάνης και μεθυλοσιλοξάνης. Οι στήλες αυτές εμφανίζουν παρεμφερή χαρακτηριστικά με αυτά των στηλών "polar-embedded" και χαρακτηρίζονται ως στήλες "hydrid-based particle bonded with the polar embedded ligand". Στις στήλες αυτές υπάγεται και η Discovery®-RP-Amide-C16^{104,105,106}. Η δομή των προαναφερθέντων στηλών αναπαρίσταται στο Σχήμα I-10.

Παρόλα όσα αναφέρθηκαν για τις στήλες "polar-endcapped" και "polar-embedded", είναι δυνατόν το υλικό πλήρωσης να εμφανίσει πολικές αλληλεπιδράσεις με τις υπό ανάλυση ουσίες, όπως π.χ. ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμιδίων και αναλυτών που φέρουν φαινολική ή άλλη ομάδα που να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου¹⁰⁸. Οι στήλες που περιγράφηκαν εμφανίζουν περιορισμούς ως προς το pH, συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται σε εύρος pH από 2,0 έως 7,5.



Σχήμα I-10. Σχηματική απεικόνιση των στηλών ODS, BDS, ABZ⁺ και Discovery καθώς και του τρόπου με τον οποίο περιορίζουν τις σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις.

2.3.2 Άλλες στατικές φάσεις αντιστρόφου φάσεως στην HPLC

Για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας χρησιμοποιούνται επίσης στατικές φάσεις που φέρουν πολυμερές οκταδεκυλιωμένης πολυβινυλαλκοόλης (ODP: Octadecylpoly(vinyl alcohol))^{100,109}. Οι στήλες αυτές εμφανίζουν εύρος pH από 2 έως 13¹¹⁰ και είναι απαλλαγμένες από σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις, διότι δεν έχουν ως υλικό στήριξης πήγμα διοξειδίου του πυριτίου. Μειονεκτούν στο γεγονός ότι λόγω της υψηλής υδροφοβίας τους, απαιτείται μεγάλος χρόνος για τη σταθεροποίηση της στήλης, ενώ οι χρόνοι συγκράτησης είναι μεγαλύτεροι σε σχέση με αυτούς που λαμβάνονται με τις στήλες ODS. Τα προβλήματα αυτά γίνονται εντονότερα εάν η κινητή φάση περιέχει μεγάλο ποσοστό νερού και περιορίζονται με τη χρήση μικρότερης στήλης. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι ο μηχανισμός συγκράτησης σε αυτές τις στήλες διέπεται από διαφορετικό ενεργειακό ισοζύγιο σε σχέση με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού, με αποτέλεσμα ν'αμφισβητείται η αντιστοιχία των χρωματογραφικών δεικτών ODP με τις τιμές logP/logD¹¹¹.

Σε μια προσπάθεια καλύτερης προσομοίωσης του συστήματος οκτανόλης-νερού προτάθηκαν στήλες εμποτισμένες με οκτανόλη¹¹². Οι στατικές φάσεις αυτού του είδους εμφάνισαν σοβαρά μειονεκτήματα, καθώς η οκτανόλη λόγω του ότι δεν είναι χημικά συνδεδεμένη με το πήγμα διοξειδίου του πυριτίου, απομακρύνεται σταδιακά από τη στήλη, με αποτέλεσμα έλλειψη σταθερότητας της στήλης και κακή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων (φαινόμενο bleeding)¹¹³. Τα τελευταία χρόνια, με τη χρήση των αναγεννώμενων στατικών φάσεων οκτανόλης, με κατάλληλες διαδικασίες αποφεύγεται το φαινόμενο της αποβολής μέρους της στατικής φάσης κατά τη χρωματογραφική διαδικασία¹¹⁴. Η σταθερότητα της στήλης ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα και εφόσον διαπιστωθεί πρόβλημα εισάγεται στη στήλη κινητή φάση κορεσμένη σε οκτανόλη, ώστε να αποκατασταθεί η πιθανή απώλειά της από τη στατική φάση. Ωστόσο τα αποτελέσματα από τη χρήση των εμποτισμένων στηλών με οκτανόλη δεν είναι περισσότερο ικανοποιητικά σε σύγκριση με τις προαναφερθείσες στήλες. Κατά συνέπεια, η χρήση τους είναι περιορισμένη.

Πρόσφατα, κατασκευάστηκαν στήλες υβριδικής τεχνολογίας οι οποίες περιέχουν μια γέφυρα προπυλενίου (όπως η Zorbax-extend C₁₈) καθώς και στήλες με επιφάνεια τροποποιημένης πυριτίας (όπως η XTerra C₁₈), όπου οι οργανικές χαρακτηριστικές

ομάδες έχουν καταστεί συστατικά του πληρωτικού υλικού του πήγματος διοξειδίου του πυριτίου, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό τη χρήση κινητών φάσεων με pH έως 12¹¹⁵. Μέχρι στιγμής η καταλληλότητα των στηλών αυτών για προσδιορισμούς λιποφιλίας δεν έχει διερευνηθεί συστηματικά.

2.4 Στατικές φάσεις στην RP-TLC

Οι στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως στην RP-TLC αποτελούνται είτε από πήγμα διοξειδίου του πυριτίου εμποτισμένο με μη πολικούς παράγοντες, είτε από σιλανοποιημένο πήγμα διοξειδίου του πυριτίου (χημικά τροποποιημένες στατικές φάσεις, C8, C18). Οι εμποτισμένες στατικές φάσεις λαμβάνονται με εμβάπτιση ή συνεχή ανάπτυξη σε διάλυμα ενός ισχυρά μη πολικού παράγοντα εντός ενός πτητικού οργανικού διαλύτη και ξήρανση. Έχουν τα πλεονέκτημα ότι ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να επιλέξει το πόσο υδρόφοβη απαιτείται να είναι η στατική φάση¹¹⁶ χρησιμοποιώντας διαλύματα του μη πολικού παράγοντα σε ποσοστά που κυμαίνονται από 2,5% έως 5%. Ως μη πολικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται συνήθως το έλαιο σιλικόνης και το παραφινέλαιο. Έχει δοκιμαστεί επίσης και οκτανόλη με μέτρια όμως αποτελέσματα. Τα τελευταία χρόνια η χρήση τους έχει περιοριστεί κυρίως λόγω της μειωμένης ομοιογένειας της πλάκας, λόγω του τρόπου παρασκευής αλλά και λόγω σταδιακής απομάκρυνσης του μη πολικού παράγοντα με την κίνηση της κινητής φάσης.

Οι χημικά τροποποιημένες στατικές φάσεις αποτελούν τις πλέον χρησιμοποιούμενες στατικές φάσεις για την εξαγωγή δεικτών λιποφιλίας τα τελευταία χρόνια. Ως υλικό επίστρωσης χρησιμοποιείται το οκτυλιωμένο πήγμα διοξειδίου του πυριτίου (RP-C8) ή συνηθέστερα το οκταδεκυλιωμένο πήγμα διοξειδίου του πυριτίου (RP-C18)^{117,118}. Οι σιλανόφιλες ομάδες του πηγματος του διοξειδίου του πυριτίου είναι χημικά συνδεδεμένες σε ένα σχετικά μεγάλο ποσοστό με υδρογονανθρακικές αλυσίδες 8 και 18 ατόμων άνθρακα, αντίστοιχα.

Γενικότερα, το ποσοστό σιλανοποίησης σύμφωνα με τις κατασκευάστριες εταιρίες κυμαίνεται από 22 έως 100%. Ακόμα όμως και στην περίπτωση 100% ποσοστού σιλανοποίησης, πρακτικά αποδεικνύεται ότι εξακολουθούν να υπάρχουν κάποια ελεύθερα υδροξύλια. Η ύπαρξη των ελεύθερων αυτών υδροξυλίων στη στατική φάση

έχει αποτέλεσμα την ανάπτυξη σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων, οι οποίες προκαλούν σημαντική απόκλιση από το μηχανισμό κατανομής και οδηγούν σε εσφαλμένη εκτίμηση της λιποφιλίας μέσω των τιμών R_M , κυρίως στην περίπτωση πρωτονιωμένων βασικών ενώσεων. Επιπλέον, τα αυξημένα ποσοστά σιλανοποίησης στις αντιστρόφου φάσεως στατικές φάσεις οδηγούν σε προβλήματα διαβροχής των πλακών από κινητές φάσεις πλούσιες σε νερό. Ειδικότερα το πρόβλημα διαβροχής εμφανίζεται κατά τη χρήση κινητών φάσεων που περιέχουν άνω του 50% νερό και γίνεται εντονότερο με τη σταδιακή αύξηση του τελευταίου.

Το μεγάλο πλεονέκτημα των στατικών φάσεων στην RP-TLC είναι ότι είναι αναλώσιμες, κατά συνέπεια δεν υπάρχουν περιορισμοί ως προς το pH.

2.5 Κινητές φάσεις στην RP-HPLC

Οι κινητές φάσεις στην RP-HPLC είναι μίγματα νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος με οργανικό διαλύτη (οργανικό τροποποιητή). Το νερό έχει τη μικρότερη εκλουστική ισχύ από όλους τους διαλύτες, διότι δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις υδρόφοβες αλκυλομάδες που φέρει η χημικά συνδεδεμένη στατική φάση. Κατά συνέπεια, όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό του νερού στην κινητή φάση, τόσο μεγαλύτεροι είναι οι χρόνοι συγκράτησης που παρατηρούνται. Οι στήλες νέας γενιάς επιτρέπουν τη χρήση και αποκλειστικά υδατικών κινητών φάσεων, ενώ δεν χρησιμοποιείται οργανικός τροποποιητής και στις στήλες εμποτισμένες με οκτανόλη, στις οποίες η κινητή φάση αποτελείται αποκλειστικά από νερό κορεσμένο με οκτανόλη.

Ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος οργανικός τροποποιητής είναι η μεθανόλη, δεδομένου ότι τα μόριά της λόγω του μικρού τους μεγέθους και της σχετικής ομοιότητας με το νερό δεν διαταράσσουν πολύ τη συντακτική δομή των μορίων του νερού. Επιπλέον, λόγω του υδροξυλίου που διαθέτουν τα μόρια της μεθανόλης παρουσιάζουν την ικανότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου τόσο ως δέκτες όσο και ως δότες πρωτονίων. Κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης τα μόρια της μεθανόλης συνδέονται με τη στατική φάση δημιουργώντας μια μονοστοιβάδα, η οποία εξασφαλίζει ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου σε καλύτερη συμφωνία με την οκτανόλη¹¹⁹. Η μεθανόλη εμφανίζεται ως ασθενέστερος δότης και ελαφρώς ισχυρότερος δέκτης πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου σε σχέση με το νερό.

Τα προβλήματα που εμφανίζονται όταν χρησιμοποιείται μεθανόλη ως οργανικός τροποποιητής είναι οι σχετικά μεγάλοι χρόνοι συγκράτησης λόγω της χαμηλής της λιποφιλίας. Επίσης, η μεθανόλη οδηγεί σε αύξηση του ιξώδους της κινητής φάσης με αποτέλεσμα αύξηση της πίεσης στην κορυφή της στήλης, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να επιταχυνθεί η έκλουση με αύξηση του ρυθμού ροής¹²⁰.

Εναλλακτικοί οργανικοί τροποποιητές, κυρίως στην περίπτωση ιδιαίτερα λιπόφιλων ουσιών, είναι το ακετονιτρίλιο και το τετραϋδροφουράνιο (THF). Οι δύο αυτοί διαλύτες είναι πιο υδρόφοβοι με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση των χρόνων συγκράτησης των ουσιών, αλλά ταυτόχρονα και μεγαλύτερη διατάραξη της διάταξης των μορίων του νερού. Το ακετονιτρίλιο βρέθηκε να παράγει τις πλέον ασύμμετρες κορυφές σε σχέση με τη μεθανόλη και το THF, γεγονός που αποδόθηκε στην ανικανότητά του να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τις ελεύθερες ομάδες σιλανόλης¹²¹. Το THF και το ακετονιτρίλιο συμπεριφέρονται ως ισχυρός και ασθενής δέκτης πρωτονίων αντίστοιχα, συνεπώς αμφότερα δεν εμφανίζουν ιδιότητες δότη πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου. Το ακετονιτρίλιο λόγω της μεγάλης διπολικής ροπής που διαθέτει εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς τα μόρια ουσιών που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, ενώ δεν χρησιμοποιείται στις στήλες ODP, διότι απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι για τη σταθεροποίηση της στήλης και λαμβάνονται χρόνοι με σχετικά μειωμένη επαναληψιμότητα¹⁰⁰.

Το ρυθμιστικό διάλυμα της υδατικής συνιστώσας είναι δυνατόν να επηρεάζει τη συγκράτηση εάν τα ιόντα που διαθέτει ευνοούν το σχηματισμό ιοντικών ζευγών, ιδιαίτερα σε αυξημένα ποσοστά ιονισμού των ουσιών. Τέτοιου είδους ρυθμιστικά διαλύματα είναι κυρίως αυτά των φωσφορικών (phosphate buffers) και ειδικότερα ρυθμιστικά διαλύματα με υψηλή συγκέντρωση ηλεκτρολυτών, όπως το ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer saline, PBS). Το PBS προσομοιώνει τις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού ($[K^+]+[Na^+]=0,157M$), ενώ η αυξημένη ιονική ισχύς του δημιουργεί σταθερές συνθήκες ως προς το σχηματισμό ιοντικών ζευγών. Ο σχηματισμός ιοντικών ζευγών αποφεύγεται με τη χρήση αμφολυτικών ρυθμιστικών διαλυμάτων (ampholytic buffers), τα οποία δεν αλληλεπιδρούν με τις υπό ανάλυση ουσίες και τη στατική φάση, δεδομένου ότι σχηματίζουν εσωτερικά άλατα. Το συνηθέστερα

χρησιμοποιούμενο αμφολυτικό ρυθμιστικό διάλυμα στην RP-HPLC είναι το διάλυμα 3-(N-μορφολινο)-προπανοσουλφονικού οξέος (MOPS)⁸⁹.

Έχει ήδη αναφερθεί (βλ. §2.3.1) η προσθήκη στην κινητή φάση παραγόντων επικάλυψης (masking agents) με σκοπό τη μείωση των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων, ιδιαίτερα στην περίπτωση βασικών ενώσεων. Οι παράγοντες επικάλυψης προστίθενται στο ρυθμιστικό διάλυμα πριν την ρύθμιση του pH και την ανάμιξή του με τον οργανικό τροποποιητή για την παρασκευή της κινητής φάσης. Για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας με RP-HPLC συνήθως χρησιμοποιείται η n-δεκυλαμίνη. Οι τιμές που εξάγονται παρουσία δεκυλαμίνης οδηγούν γενικά σε καλύτερες συσχετίσεις με τις τιμές logP. Η προσθήκη δεκυλαμίνης στην περίπτωση βασικών ενώσεων είναι επιβεβλημένη και κατά τη χρήση νέας γενιάς στηλών. Η επίδραση της δεκυλαμίνης στη συγκράτηση εξαρτάται επίσης και από τον οργανικό τροποποιητή, καθώς παρουσία ακετονιτριλίου η βελτίωση της συσχέτισης $\log k_w / \log P$ μετά από προσθήκη δεκυλαμίνης είναι πολύ μικρότερη συγκριτικά με τη βελτίωση που παρατηρείται παρουσία μεθανόλης. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στη μικρότερη προσέλκυση νερού στη στατική φάση λόγω της ασθενέστερης ικανότητας του ακετονιτριλίου να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου, με αποτέλεσμα τη μικρότερη προσέλκυση δεκυλαμίνης στη στατική φάση, δεδομένου ότι η τελευταία βρίσκεται στην κινητή φάση με την πρωτονιωμένη της μορφή¹⁰⁰.

Τα τελευταία χρόνια προτείνεται επίσης η χρήση της οκτανόλης ως προσθετικού παράγοντα στην κινητή φάση, ώστε να επιτευχθεί καλύτερη προσομοίωση του χρωματογραφικού συστήματος με το σύστημα οκτανόλης-νερού^{122,123,124}. Η επίδραση της οκτανόλης στη συγκράτηση δεν έχει διευκρινιστεί απόλυτα, αν και σε γενικές γραμμές παρουσία οκτανόλης λαμβάνονται μικρότεροι χρόνοι συγκράτησης. Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η οκτανόλη δρα εν μέρει ως παράγοντας επικάλυψης των ελεύθερων σιλανόφιλων θέσεων, ενώ προσδίδει στη στατική φάση ανάλογη ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου⁹⁹. Η προσθήκη οκτανόλης στην κινητή φάση θεωρείται κρίσιμος παράγοντας για την προσομοίωση των χρωματογραφικών δεικτών με τις τιμές logP και ο ρόλος της στην προτυποποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών θα αναπτυχθεί εκτενέστερα στην ενότητα §2.11.

Έχει δοκιμαστεί επίσης η χρήση ιοντικών υγρών (ionic liquids) προς αντικατάσταση της δεκυλαμίνης ως φιλικότερων προς το περιβάλλον παραγόντων, όμως

διαπιστώθηκε ότι η αποτελεσματικότητα τους ως παράγοντες επικάλυψης είναι μειωμένη¹²⁵.

2.6 Κινητές φάσεις στην RP-TLC

Οι κινητές φάσεις που χρησιμοποιούνται στην RP-TLC είναι αντίστοιχες με αυτές της RP-HPLC. Συχνότερα χρησιμοποιούνται η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο και η ακετόνη, ενώ σπανιότερα χρησιμοποιείται το τετραϋδροφουράνιο και το διοξάνιο^{90,116}. Ωστόσο, η επίδραση του pH της υδατικής συνιστώσας είναι σημαντικά μειωμένη, ενώ οι προσθετικοί παράγοντες δεν επηρεάζουν πρακτικά καθόλου τη συγκράτηση. Ορισμένοι συγγραφείς προτείνουν τη χρήση νερού αντί ρυθμιστικού διαλύματος ως υδατική συνιστώσα της κινητής φάσης^{126,127}. Ωστόσο σε πρόσφατη μελέτη έχει διαπιστωθεί ότι το νερό ως υδατική συνιστώσας οδηγεί σε λιγότερο σταθερές χρωματογραφικές συνθήκες¹²⁸. Η μειωμένη έκφραση του ιονισμού στις πλάκες αντιστρόφου φάσεως αποδίδεται στη μη πλήρη εξισορρόπηση στατικής-κινητής φάσης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται συνθήκες βαθμιδωτής ανάπτυξης ως προς το pH, καθώς επίσης και στην παρουσία των ενώσεων στην πλάκα υπό στερεά μορφή^{128,129,130}.

2.7 Επίδραση του οργανικού τροποποιητή στη συγκράτηση

Εκτός από τη φύση του οργανικού τροποποιητή, η τιμή του παράγοντα χωρητικότητας (ή της παραμέτρου R_M) επηρεάζεται και από την συγκέντρωσή του στην κινητή φάση. Σύμφωνα με τον Schoenmakers οι συναρτήσεις $\log k(R_M)=f(\varphi)$ είναι μη γραμμικές¹³¹:

$$\log k = A\varphi^2 + B\varphi + E\sqrt{\varphi} + C \quad (I-14)$$

όπου φ το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή, A , B , E και C σταθερές που προκύπτουν από πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης. Ο όρος $A\varphi^2$ αντιστοιχεί στην καμπύλωση που παρατηρείται σε υψηλά ποσοστά οργανικού τροποποιητή ($\varphi > 0,8$) λόγω αυξημένων σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων, ενώ ο όρος

Ενφ αντιστοιχεί στην καμπύλωση που παρατηρείται σε χαμηλά ποσοστά οργανικού τροποποιητή ($\varphi < 0,2$). Σε ορισμένη περιοχή ποσοστού οργανικού τροποποιητή οι συντελεστές A και E δεν είναι στατιστικά σημαντικοί και η σχέση λαμβάνει τη γραμμική της μορφή¹³²:

$$\log k = -S\varphi + \log k_w \quad (I-15)$$

όπου $\log k_w$ η τιμή του παράγοντα χωρητικότητας που αντιστοιχεί σε κινητή φάση 100% ρυθμιστικό διάλυμα και S η κλίση της ευθείας.

Η εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης για την εξαγωγή ανηγμένων τιμών παραγόντων συγκράτησης $\log k_w$ δεν συνιστάται διότι είναι δυνατόν να οδηγήσει σε σημαντικά σφάλματα¹³³, οπότε επιλέγεται το γραμμικό τμήμα των σχέσεων. Το εύρος οργανικού τροποποιητή για το οποίο ισχύει η γραμμικότητα εξαρτάται από τη φύση του διαλύτη και τη δομή των αναλυόμενων ενώσεων. Όταν χρησιμοποιείται η μεθανόλη ως οργανικός τροποποιητής και η κατασκευή της καμπύλης γίνεται με τιμές του παράγοντα χωρητικότητας που βρίσκονται μέσα στα όρια $1 < k < 10$, ο υπολογισμός της τιμής της παραμέτρου $\log k_w$ γίνεται συνήθως με μεγάλη αξιοπιστία¹³². Τα όρια αυτά είναι αυστηρότερα όταν χρησιμοποιούνται ως οργανικοί τροποποιητές το ακετονιτρίλιο ή το τετραϋδροφουράνιο¹⁰³. Η γραμμικότητα εξαρτάται επίσης και από τη φύση των υπό μελέτη ουσιών, αφού είναι δυνατόν ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη ουσιών (κυρίως ομάδες δέκτες πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου) να ευνοούν την εμφάνιση σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων, φαινόμενο το οποίο συμβάλλει στη λήψη μη γραμμικών σχέσεων^{134,135}.

Η κλίση S των εξισώσεων του τύπου (I-15) συγκεντρώνει επίσης το ερευνητικό ενδιαφέρον δεδομένου ότι αποτελεί υδρόφοβη παράμετρο και σχετίζεται με την ειδική υδρόφοβη επιφάνεια (Specific Hydrophobic Surface Area) των μορίων¹³⁶. Επιπλέον η ύπαρξη καλής γραμμικής συσχέτισης μεταξύ των παραμέτρων S και $\log k_w$ αποτελεί ενδεικτικό κριτήριο για τον ομοιόμορφο μηχανισμό κατανομής των ενώσεων, ενώ αποκλίσεις από τη γραμμικότητα αποδίδονται στην παρουσία δευτερευουσών ισορροπιών ιδιαίτερα όσο αφορά στη συμμετοχή σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, κατά την αλληλεπίδραση των ουσιών με τη στατική φάση¹³⁷.

Διερεύνηση της κλίσης S για σειρά υποκατεστημένων κουμαρινών χρησιμοποιώντας Πολυμεταβλητή Ανάλυση Δεδομένων (MVDA: Multivariate Data Analysis) στη

βάση μοριακών παραμέτρων έδειξε να εξαρτάται αποκλειστικά από παραμέτρους όγκου, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται περισσότερο για υδρόφοβο δείκτη¹³⁸.

2.8 Δείκτες λιποφιλίας που προσδιορίζονται με χρωματογραφικές τεχνικές αντιστρόφου φάσεως

α) Ισοκρατικές τιμές logk και R_M

Χρησιμοποιείται η τιμή του παράγοντα χωρητικότητας (logk) ή της παραμέτρου R_M που προκύπτει για μια συγκεκριμένη αναλογία οργανικού τροποποιητή. Συνήθως χρησιμοποιείται ο παράγοντας χωρητικότητας σε κινητή φάση αποτελούμενη από 50% οργανικό τροποποιητή (logk₅₀ ή R_{M50})¹³⁹. Για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη λιποφιλία των μορίων είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπύλης αναφοράς προσδιορίζοντας τις τιμές logk ουσιών με γνωστή τιμή συντελεστή μερισμού στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Είναι προτιμότερο να κατασκευάζονται περισσότερες από μια καμπύλες αναφοράς με διαφορετικές χρωματογραφικές συνθήκες ώστε να λαμβάνεται ο μέσος όρος των υπολογιζόμενων τιμών¹⁴⁰.

Οι ισοκρατικές τιμές εμφανίζουν αρκετά μειονεκτήματα. Είναι σχετικοί δείκτες λιποφιλίας με τιμές πολύ χαμηλότερες από αυτές των συντελεστών μερισμού και εξαρτώνται από το ποσοστό και τη φύση του οργανικού τροποποιητή που χρησιμοποιήθηκε, ενώ περιορίζονται σε ενώσεις που καλύπτουν σχετικά μικρό εύρος λιποφιλίας. Η εξαγωγή δεικτών λιποφιλίας με βάση τις ισοκρατικές τιμές εμπεριέχει την πιθανότητα σφαλμάτων λόγω του φαινομένου της αναστροφής της λιποφιλίας. Αυτό είναι πιθανό να συμβεί στην περίπτωση που οι υπό μελέτη ουσίες εμφανίζουν ισοεκλουστικό σημείο λόγω διαφοροποίησης στις κλίσεις των σχέσεων logk(R_M)=f(φ). Ως ισοεκλουστικό σημείο ορίζεται το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή για το οποίο δύο ή περισσότερες ουσίες εμφανίζουν την ίδια τιμή logk και συνεπώς ίδια λιποφιλία.

β) ανηγμένες τιμές logk_w και R_{Mw}

Οι ανηγμένες τιμές αποτελούν περισσότερο αντικειμενικούς δείκτες λιποφιλίας. Αντιστοιχούν σε κινητή φάση χωρίς οργανικό τροποποιητή και εξάγονται από περισσότερες ισοκρατικές τιμές με ανάλυση παλινδρόμησης λαμβάνοντας υπόψη το

γραμμικό τμήμα της εξίσωσης Schoenmakers. Όπως και οι ισοκρατικές τιμές, οι ανηγμένες τιμές συσχετίζονται με το συντελεστή μερισμού μέσω εξισώσεων τύπου Collander¹⁴¹. Ο απευθείας πειραματικός προσδιορισμός των παραμέτρων $\log k_w$ και R_{Mw} είναι δυνατός για περιορισμένο αριθμό ενώσεων, διότι η χρήση 100% νερού σαν κινητή φάση οδηγεί σε πολύ μεγάλους χρόνους συγκράτησης (ή σε πολύ μικρές τιμές R_f). Εξάλλου, πολλοί τύποι στηλών (BDS, ODS) δεν επιτρέπουν τη χρήση αποκλειστικά νερού ως κινητή φάση.

Οι ανηγμένες τιμές πλεονεκτούν έναντι των ισοκρατικών στο γεγονός ότι είναι θεωρητικά ανεξάρτητες των χρωματογραφικών συνθηκών, ενώ αποφεύγονται σφάλματα λόγω αναστροφής της λιποφιλίας σε διαφορετικά ποσοστά οργανικού τροποποιητή. Θεωρητικά οι ανηγμένες τιμές είναι ανεξάρτητες του παράγοντα χωρητικότητας. Ωστόσο έχουν παρατηρηθεί σχετικές αποκλίσεις που αντανακλούν την επίδραση του οργανικού τροποποιητή. Οι αποκλίσεις αυτές κυρίως σχετίζονται με διαφορετικής έκτασης σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις, ενώ η υδροφοβία και η διπολική ροπή του διαλύτη φαίνεται επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο^{100,142}. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα των ανηγμένων τιμών είναι ότι επιτρέπουν αμεσότερη σύγκριση με τις τιμές $\log P$, αφού αντιπροσωπεύουν τιμές της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτές. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες οι τιμές των παραμέτρων $\log k_w$ και R_{Mw} είναι πολύ κοντά στις τιμές $\log P$ στο σύστημα οκτανόλης-νερού έτσι ώστε οι όροι της εξίσωσης παίρνουν τιμές 1 και 0 αντίστοιχα.

γ) η παράμετρος ϕ_0

Η παράμετρος ϕ_0 , αποτελεί επίσης υδρόφοβη παράμετρο και ορίζεται ως το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή για το οποίο η τιμή του $\log k$ (ή του R_M) γίνεται ίση με μηδέν (ίση μοριακή κατανομή μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης)¹⁴³. Η τιμή της εξαρτάται από τον οργανικό τροποποιητή που χρησιμοποιείται, ενώ οι τιμές που προκύπτουν από διαφορετικούς οργανικούς τροποποιητές βρίσκονται σε καλή συσχέτιση μεταξύ τους. Ωστόσο η παράμετρος ϕ_0 δεν συσχετίζεται ικανοποιητικά με τις τιμές $\log P$ και αποτελεί ξεχωριστή κλίμακα λιποφιλίας.

Τελευταία έχει γίνει προσπάθεια γρήγορου αυτοματοποιημένου προσδιορισμού της παραμέτρου αυτής με χρωματογραφία βαθμιδωτής έκλουσης. Προσδιορίζεται ισοκρατικά η παράμετρος ϕ_0 (η οποία αποκαλείται και CHI: Chromatographic

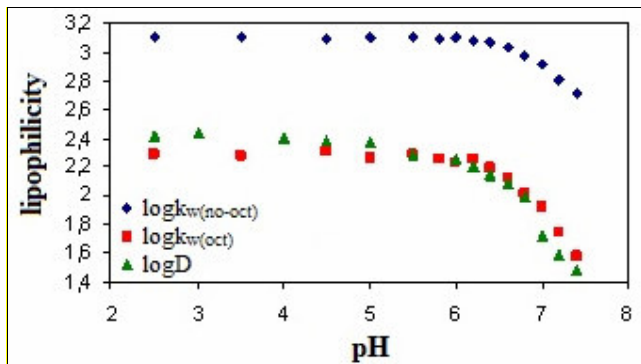
Hydrophobicity Index)¹⁴⁴ για σειρά δομικά μη συγγενών ενώσεων και συσχετίζεται με τους χρόνους συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης t_g . Ακολούθως προσδιορίζονται οι χρόνοι συγκράτησης των υπό μελέτη ουσιών οι οποίες μετατρέπονται σε τιμές παραμέτρου CHI μέσω της καμπύλης αναφοράς. Η παράμετρος CHI έχει διαπιστωθεί ότι συσχετίζεται ικανοποιητικά με τιμές $\log P$, για σειρά όξινων και ουδέτερων ενώσεων χρησιμοποιώντας ακετονιτρίλιο ως οργανικό τροποποιητή, οξικό αμμώνιο ως ρυθμιστικό διάλυμα και χωρίς την προσθήκη παραγόντων επικάλυψης¹⁴⁵, ενώ χρησιμοποιώντας Πολυμεταβλητή Ανάλυση Δεδομένων στη βάση μοριακών παραμέτρων έχει διαπιστωθεί ότι η παράμετρος ϕ_0 δεν περιέχει το ίδιο πληροφοριακό περιεχόμενο με τις τιμές $\log P$ για την περίπτωση συγγενών κουμαρινικών παραγώγων¹³⁸.

2.9 Επίδραση του ιονισμού στη χρωματογραφική συγκράτηση

Στην περίπτωση που οι υπό μελέτη ενώσεις φέρουν κέντρα ιονισμού, το pH της κινητής φάσης διαφοροποιεί το βαθμό συγκράτησής τους. Συγκεκριμένα, αύξηση του βαθμού ιονισμού των υπό μελέτη ενώσεων προκαλεί τη μείωση των αντίστοιχων χρόνων συγκράτησής τους. Γενικά θεωρείται ότι η καμπύλη $\log k/pH$ είναι αντίστοιχη της καμπύλης $\log D/pH$ και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν οι αντίστοιχες διορθώσεις για τον ιονισμό στη βάση της εξίσωσης Henderson-Hasselbach και στην περίπτωση των ανηγμένων τιμών $\log k_w$. Ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι ο ενεργητικός ρόλος της στατικής φάσης στη συγκράτηση, ιδιαίτερα λόγω της παρουσίας ελεύθερων ομάδων σιλανόλης¹⁴⁶ ενδέχεται να οδηγεί σε επιπλέον ισορροπίες που επηρεάζουν την έκφραση του ιονισμού. Στη βιβλιογραφία δεν αναφέρονται πολλές συστηματικές μελέτες σύγκρισης ολόκληρου του προφίλ $\log k/pH$ και $\log D/pH$ και το ζήτημα αυτό απασχόλησε και στα πλαίσια της παρούσης διατριβής.

Μια σχετική μελέτη αφορούσε το ασθενές οξύ νιμεσουλίδιο¹⁴⁷ για το οποίο διερευνήθηκε η συγκράτηση και η κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού σε μεγάλο εύρος pH. Το νιμεσουλίδιο είναι μερικώς ιονισμένο σε pH 7,4, καθώς εμφανίζει pK_a 6,5. Παρατηρήθηκε αυξημένη συγκράτηση σε όλο το εύρος του pH με αποτέλεσμα οι τιμές $\log k_w$ να είναι πολύ μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές $\log D$. Η αυξημένη συγκράτηση αποδόθηκε σε σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες

παρουσία σουλφονυλομάδων έχειδειχθεί και παλαιότερα ότι είναι ιδιαίτερα ισχυρές. Η προσθήκη ωστόσο μικρού ποσοστού οκτανόλης στη μεθανόλη της κινητής φάσης οδήγησε σε άρση των αποκλίσεων από το μηχανισμό κατανομής και πολύ καλή συμφωνία μεταξύ $\log k_w$ και $\log D$. Στο Σχήμα I-11 φαίνονται οι απεικονίσεις της σχέσης λιποφιλίας-pH απουσία και παρουσία οκτανόλης:



Σχήμα I-11. Απεικόνιση της σχέσης λιποφιλίας-pH για το νιμεσουλίδιο.

Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν σε ένα καταρχήν συμπέρασμα ότι η οκτανόλη πιθανώς δρα ως παράγοντας επικάλυψης των σιλανόφιλων θέσεων. Ο ρόλος της οκτανόλης ως προσθετικού στην κινητή φάση συζητείται στην παράγραφο που αφορά στην προτυποποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών (§2.11).

Στην RP-TLC, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο (§2.6), παρατηρείται μειωμένη έκφραση του ιονισμού ενώ οι αναφορές για την επίδραση του pH και της ιονικής ισχύος της κινητής φάσης στη συγκράτηση συχνά παρουσιάζουν αντιφάσεις¹²⁸. Λόγω της μικρής επίδρασης του pH στη συγκράτηση ορισμένοι ερευνητές χρησιμοποιούν νερό αντί για ρυθμιστικό διάλυμα.

2.10 Επίδραση της διαμόρφωσης στη χρωματογραφική συγκράτηση

Αν και κρυσταλλογραφικές μελέτες υγρής οκτανόλης έχουν καταδείξει την παρουσία περιορισμένου βαθμού ανισοτροπίας, η οκτανόλη αποτελεί ουσιαστικά ισότροπο σύστημα¹⁴⁸. Οι στατικές φάσεις στη χρωματογραφία είναι ωστόσο περισσότερο ανισότροπες, με αποτέλεσμα ο μηχανισμός να μην είναι "τοπογραφικά" ομοιόμορφος. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οδηγήσει σε μεγαλύτερη επίδραση της

διαμόρφωσης κατά τη συγκράτηση και σε δυσκολίες ερμηνείας των αποτελεσμάτων στα πλαίσια μιας σειράς ενώσεων. Σε σχετική έρευνα που αφορούσε ετεροκυκλικούς πυρήνες συνδεδεμένους με κουμαρινικό σκελετό διαπιστώθηκε ότι οι ενώσεις με εκτεταμένη ή επίπεδη διαμόρφωση (άρα και αυξημένη έκθεση του φαινολικού δακτυλίου στο υδρόφοβο περιβάλλον της στατικής φάσης) εμφανίζουν ισχυρότερη συγκράτηση τόσο σε HPLC όσο και σε RP-TLC συγκριτικά με ενώσεις που έχουν διπλωμένη διαμόρφωση¹³⁸.

2.11 Προτυποποίηση χρωματογραφικών συνθηκών για τον προσδιορισμό δεικτών λιποφιλίας

Το γεγονός ότι οι χρωματογραφικές τεχνικές προσφέρουν τη μεγαλύτερη δυνατότητα να αυτοματοποιηθούν, χωρίς την προσθήκη επιπλέον οργανολογικών διατάξεων, αποτέλεσε μια πρόκληση για την ανάπτυξη γρήγορων μεθόδων, υψηλής απόδοσης και με δυνατότητα αυτοματοποίησης, ώστε αυτές να ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις που προκύπτουν από την κατασκευή βιβλιοθηκών ενώσεων στο σύγχρονο σχεδιασμό φαρμάκων. Υπάρχουν δυο προσεγγίσεις προς αυτήν την κατεύθυνση:

α) ανάπτυξη των υδρόφοβων χρωματογραφικών δεικτών. Όπως ήδη αναφέρθηκε (§2.8), προκειμένου για δομικά συγγενείς ενώσεις οι παράμετροι CHI οδηγούν σε σωστή κατάταξη ως προς τη λιποφιλία, ωστόσο αποτελούν ξεχωριστή κλίμακα λιποφιλίας.

β) προτυποποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών, έτσι ώστε να αναπτυχθεί μια γενική εξίσωση αναφοράς, η οποία να εκφράζει ένα γενικό μοντέλο προσομοίωσης της κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού μέσω χρωματογραφικών δεικτών και η οποία να επιτρέπει απευθείας τον υπολογισμό των τιμών logP ή logD. Ακολουθεί μια σύντομη αναφορά στις προσπάθειες που έχουν καταβληθεί σε αυτό το ερευνητικό πεδίο. Στο σημείο αυτό βέβαια ανακύπτει και πάλι η ικανότητα ενός γενικού μοντέλου για επιτυχείς προβλέψεις στα πλαίσια σειράς δομικώς συγγενών ενώσεων. Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε το ζήτημα αυτό σε σειρά όξινων ενώσεων, παραγώγων του πυρρολίου.

2.11.1 Προτυποποίηση στην RP-HPLC

α) Ουδέτερες-βασικές ενώσεις

Ο ρόλος της οκτανόλης ως προσθετικού παράγοντα στις χρωματογραφικές συνθήκες έχει απασχολήσει από τα μέσα της δεκαετίας του '70 πολλούς ερευνητές^{112,149}. Αρχικά είχε επιχειρηθεί εμποτισμός της στατικής φάσης με οκτανόλη, αλλά τα σοβαρά μειονεκτήματα που εμφανίστηκαν (φαινόμενο bleeding)¹⁰³ δεν επέτρεψαν την ευρύτερη χρησιμοποίηση των στατικών φάσεων εμποτισμένων με οκτανόλη. Εν συνεχεία, οι Minick και συν¹⁵⁰ μελετώντας βασικές ενώσεις σε διαφορετικές στήλες αντιστρόφου φάσεως κατέληξε στη χρήση σιλανοποιημένων στηλών C-8, μεθανόλης στην οποία προστέθηκε 0,25% οκτανόλη επί του όγκου της μεθανόλης ως οργανικό τροποποιητή και MOPS παρουσία δεκυλαμίνης ως ρυθμιστικό διάλυμα. Βασιζόμενος σ' αυτά τα ευρήματα, οι Lombardo και συν προτυποποίησαν τις χρωματογραφικές συνθήκες αρχικά σε ουδέτερες ενώσεις, αναπτύσσοντας τη μέθοδο ElogP¹⁵¹ με τη χρήση στήλης Supelcosil ABZ⁺. Η έρευνα επεκτάθηκε σε ουδέτερες και βασικές ενώσεις σε pH 7,4 (μέθοδος ElogD_{7,4})¹²², ενώ σε μια προσπάθεια περαιτέρω γενίκευσης της μεθόδου προέκυψε η εξίσωση (I-16)¹⁴¹:

$$\log D_{\text{oct}} = 1,08(\pm 0,02)\log k_w + 0,20(\pm 0,04) \quad (\text{I-16})$$

$n = 163, r^2 = 0,949, s = 0,369, F = 3000$

Η συσχέτιση είναι πολύ καλή, με κλίση πλησίον της μονάδας και σταθερό όρο κοντά στο μηδέν. Η εξίσωση (I-16) χρησιμοποιείται περαιτέρω ως εξίσωση αναφοράς για τον υπολογισμό των τιμών logD, ενώ είναι ενσωματωμένη σε κατάλληλο λογισμικό. Η ανάγκη της προσθήκης δεκυλαμίνης στην περίπτωση των βασικών ενώσεων υποδεικνύει την ύπαρξη σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων και στη στήλη ABZ⁺. Προς όφελος της ταχύτητας και αυτοματοποίησης της μεθόδου οι τιμές logk_w προκύπτουν από τρεις μόνο ισοκρατικές τιμές. Προτείνονται συγκεκριμένα ποσοστά μεθανόλης ανάλογα με την αναμενόμενη λιποφιλία των ενώσεων. Η χρήση ωστόσο τριών μόνο ποσοστών μεθανόλης περιέχει τον κίνδυνο σημαντικών σφαλμάτων αν οι ισοκρατικές τιμές που προσδιορίζονται δεν βρίσκονται στο αυστηρά γραμμικό τμήμα της σχέσης logk/φ.

Σε μια αντίστοιχη απόπειρα προτυποποίησης οι Γιαγκίνης και συν¹²⁴ μελέτησαν 40 βασικές και 24 ουδέτερες ενώσεις, ενώ χρησιμοποιήθηκε η συμβατική στήλη BDS Hypersil, η οποία είναι φθηνότερη και γενικότερης εφαρμογής. Η εξίσωση που προέκυψε αντιστοιχεί και σε αυτή την περίπτωση πρακτικά σε 1:1 συσχέτιση μεταξύ των τιμών $\log D_{7,4}$ και $\log k_w$:

$$\log D_{\text{oct}} = 1,03(\pm 0,03)\log k_w + 0,14(\pm 0,07) \quad (\text{I-17})$$

$$n = 64, r^2 = 0,937, s = 0,288, F = 908$$

Η κλίση είναι πλησιέστερα στη μονάδα, η τομή πλησιέστερα στο μηδέν και η τυπική απόκλιση είναι αρκετά χαμηλότερη από τις αντίστοιχες εξισώσεις του Lombardo, ενώ αναλύοντας ξεχωριστά τις βασικές ενώσεις προέκυψε η εξίσωση (I-18) με αντίστοιχα στατιστικά στοιχεία, γεγονός που υποδηλώνει την ανθεκτικότητα (robustness) της μεθόδου:

$$\log D_{\text{oct}} = 1,07(\pm 0,04)\log k_w + 0,00(\pm 0,09) \quad (\text{I-18})$$

$$n = 40, r^2 = 0,943, s = 0,278, F = 632$$

Διαπιστώθηκε επίσης ότι απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τον εντοπισμό της γραμμικής περιοχής και την εξαγωγή των τιμών $\log k_w$ παρουσία οκτανόλης, δεδομένου ότι συχνά παρατηρείται καμπύλωση σε χαμηλά ποσοστά οργανικού τροποποιητή. Συνεπώς, η στήλη BDS είναι εξίσου αποτελεσματική για την προτυποποίηση χρωματογραφικών συνθηκών στην RP-HPLC, με μειονέκτημα ωστόσο τη μη δυνατότητα χρήσης 100% νερού ως κινητή φάση.

Αξίζει να σημειωθεί και μια πρόσφατη έρευνα η οποία αφορούσε 40 βασικές ενώσεις, οι οποίες μετρήθηκαν με τη χρήση υβριδικής στήλης Zorbax-extend C₁₈ σε pH 10,5 όπου βρίσκονται υπο την αδιάστατη μορφή, χωρίς προσθήκη κάποιου παράγοντα επικάλυψης και όπου διαπιστώθηκε 1:1 συσχέτιση μεταξύ $\log k_w$ και $\log P$ ¹⁵².

β) Όξινες ενώσεις

Οι συνθήκες που περιγράφηκαν αφορούν ουδέτερες και βασικές ενώσεις, οι οποίες αποτελούν και την πλειοψηφία των φαρμακευτικών ενώσεων. Ωστόσο, συχνά όξινης

ομάδες αποτελούν στοιχεία του φαρμακοφόρου (μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, αναστολείς της αναγωγάσης της αλδόζης), ενώ πολλά φαρμακευτικά μόρια αποτελούν αμφολύτες (φθοροκινολόνες, οξικάμες) φέροντας όξινη και βασική ομάδα. Στις περιπτώσεις αυτές δεν είναι δυνατόν να εφαρμοστούν οι προαναφερθείσες συνθήκες, δεδομένου ότι η δεκυλαμίνη ως παράγοντας επικάλυψης των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων σχηματίζει ιοντικά ζεύγη με τα ανιόντα των μορίων. Η συμπεριφορά των οξέων σε συνθήκες RP-HPLC συχνά παρουσιάζει αποκλίσεις από το μηχανισμό κατανομής, ιδιαίτερα όταν ο προσδιορισμός γίνεται σε pH 7,4 όπου επικρατεί η ανιονική μορφή. Στην περίπτωση αυτή λαμβάνονται αρκετά υψηλότερες από τις αναμενόμενες τιμές συγκράτησης, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται εν μέρει σε διαφοροποίηση του βαθμού ιονισμού στο ανισότροπο περιβάλλον της στατικής φάσης ή/και σε δευτερεύουσες μη υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση. Επιπλέον η αυξημένη συγγένεια των καρβοξυλικών ανιόντων με τη στατική φάση είναι δυνατόν να αποδοθεί σε αλληλεπίδραση με ίχνη μετάλλων που υπάρχουν στο υλικό της πυριτίας. Τελευταία γίνονται προσπάθειες προτυποποίησης των χρωματογραφικών συνθηκών και για την περίπτωση των οξέων. Ο ρόλος της οκτανόλης ως προσθετικού παράγοντα στη κινητή φάση φαίνεται να είναι καθοριστικός και σε αυτή την περίπτωση.

Σχετικά πρόσφατα οι Liu και συν¹²³ χρησιμοποιώντας στήλη Supelcosil Discovery-RP-Amide-C16, μεθανόλη οποία προστέθηκε 0,25% οκτανόλη επί του όγκου της ως οργανικό τροποποιητή και PB σε pH 2,5 για την μελέτη 46 δομικά διαφορετικών ουδέτερων και όξινων φαρμακευτικών ενώσεων με τις τελευταίες στην αδιάστατη πάντα μορφή τους. Όπως φαίνεται και από την εξίσωση (I-19) διαπιστώθηκε καλή συσχέτιση μεταξύ των τιμών logP και logk_w:

$$\log P_{\text{oct}} = 1,09(\pm 0,05)\log k_w + 0,42(\pm 0,13) \quad (\text{I-19})$$

$$n = 46, r^2 = 0,98, s = 0,28$$

Η κλίση της εξίσωσης είναι κοντά στη μονάδα, ωστόσο ο σταθερός όρος είναι στατιστικά σημαντικός. Η αντίστοιχη συσχέτιση απουσία οκτανόλης έχει φτωχότερα στατιστικά στοιχεία, ενώ εμφανίζει σημαντικά αυξημένη κλίση και αρνητικό σταθερό όρο.

Σε παρόμοια έρευνα οι Γιαγκίνης και συν μελέτησαν 45 δομικά διαφορετικά όξινα φαρμακευτικά μόρια, χρησιμοποιώντας εκ νέου τη συμβατική στήλη BDS Hypersil¹⁵³. Διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών ποσοστών οκτανόλης στην κινητή φάση και διαπιστώθηκε ότι η οκτανόλη ενδέχεται να δρα ως ένας ασθενής παράγοντας επικάλυψης, μειώνοντας τις σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις (επιδρώντας κυρίως στο σχηματισμό των δεσμών υδρογόνου) ακόμα και όταν η συγκέντρωσή της περιορίζεται στο επίπεδο ενός ρυθμιστικού διαλύματος κορεσμένου με οκτανόλη. Η δράση αυτή είναι περισσότερο εμφανή στην περίπτωση των ισχυρών οξέων. Επιπλέον, για ενώσεις με $\log P > 2$, η επίδραση της οκτανόλης φαίνεται να εξασθενεί με την αύξηση της λιποφιλίας. Σε χαμηλά pH (όπου οι όξινες ενώσεις είναι αδιάστατες) η χρήση απλώς κορεσμένου ρυθμιστικού διαλύματος ως υδατική συνιστώσα οδήγησε σε 1:1 συσχέτιση μεταξύ $\log P$ και $\log k_{w[0]}$:

$$\log P = 1,02(\pm 0,03)\log k_{w[0]} + 0,05(\pm 0,08) \quad (I-20)$$

$$n = 43, r = 0,983, s = 0,311$$

Η διαπίστωση αυτή είναι πολύ σημαντική, δεδομένου ότι η χρήση τόσο μικρής ποσότητας οκτανόλης επιβαρύνει στο ελάχιστο τη στήλη. Εν αντιθέσει, στο pH 7,4 ενδείκνυται η προσθήκη ποσοστού 0,25% οκτανόλης επί του όγκου της μεθανόλης, λόγω της προαναφερθείσης υψηλής συγγένειας των ανιόντων με τη στατική φάση¹⁵⁴. Προκειμένου για ασθενή οξέα, παρατηρήθηκε 1:1 συσχέτιση μεταξύ των τιμών $\log D_{7,4}$ και $\log k_{w(0,25)}$:

$$\log D_{7,4} = 1,04(\pm 0,05)\log k_{w(0,25)} + 0,09(\pm 0,09) \quad (I-21)$$

$$n = 22, r = 0,980, s = 0,238$$

Ωστόσο υπό τις ίδιες συνθήκες για οξέα με αυξημένη οξύτητα προέκυψε επίσης εξαιρετική συσχέτιση, η οποία όμως εμφανίζει υψηλό αρνητικό όρο και κλίση που απέχει από τη μονάδα:

$$\log D_{7,4} = 0,85(\pm 0,04)\log k_{w(0,25)} - 0,91(\pm 0,08) \quad (I-22)$$

$$n = 21, r = 0,976, s = 0,266$$

Όπως γίνεται κατανοητό, η προτυποποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών για την εξαγωγή δεικτών λιποφιλίας στην RP-HPLC εξακολουθεί να συγκεντρώνει έντονα το ερευνητικό ενδιαφέρον κυρίως σε ότι αφορά την περίπτωση όξινων μορίων, ιδιαίτερα σε pH 7,4, όπου δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα συστηματικές μελέτες. Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε σειρά όξινων ενώσεων, χρησιμοποιώντας στήλη Supelcosil ABZ⁺ και εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες προτυποποίησης που έχουν προταθεί για όξινες ενώσεις.

2.11.2 Προτυποποίηση στην RP-TLC

Η ανάπτυξη στηλών με βελτιωμένα τεχνικά χαρακτηριστικά και οι επιτυχείς προσπάθειες στον τομέα της προτυποποίησης των χρωματογραφικών συνθηκών στην RP-HPLC (ιδιαίτερα σε ότι αφορά ουδέτερες και βασικές ενώσεις) μοιραία ελάττωσε τη χρήση της RP-TLC. Παρότι θεωρείται ότι και οι δυο αυτές αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφικές τεχνικές διέπονται από ανάλογο μηχανισμό συγκράτησης, με αποτέλεσμα οι χρωματογραφικοί δείκτες τιμές να είναι άμεσα συγκρίσιμοι μεταξύ τους, οι προσπάθειες προτυποποίησης οδήγησαν σε λιγότερο εντυπωσιακά τα αποτελέσματα.

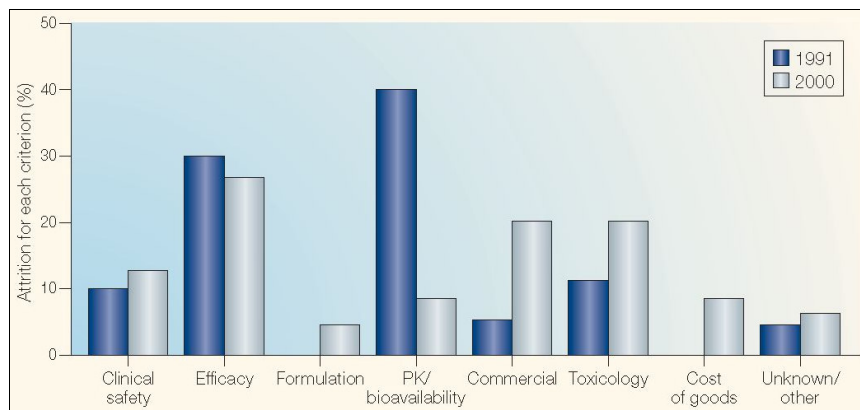
Σε μελέτες που έχουν γίνει παρατηρήθηκε ότι η παρουσία προσθετικών για τη μείωση των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων πρακτικά δεν επιδρά στη συγκράτηση, γεγονός που μειώνει την ευελιξία της μεθόδου ως προς τη δυνατότητα διαφορετικών κινητών φάσεων με στόχο τη βελτιστοποίηση των συνθηκών. Από την άλλη η χρήση διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων φαίνεται να επηρεάζει τη συγκράτηση, ωστόσο σε καμία από τις διαφορετικές συνθήκες κινητής φάσης δεν οδήγησε σε 1:1 συσχέτιση με τις τιμές logP ή logD ενώ προτείνονται ξεχωριστές καμπύλες αναφοράς για βασικές και ουδέτερες ενώσεις. Ωστόσο ο περιορισμένος αριθμός των ενώσεων που μελετήθηκαν δεν τεκμηριώνει γενικό μοντέλο προσομοίωσης.

Στην παρούσα διατριβή επεκτάθηκε η μελέτη των χρωματογραφικών συνθηκών στην RP-TLC σε σειρά όξινων ενώσεων διερευνώντας περισσότερο την επίδραση της στατικής φάσης στη συγκράτηση.

3. ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

3.1 Εισαγωγή

Όπως ήδη αναφέρθηκε (§1.1) εξαιτίας του υψηλού ρυθμού αποτυχίας στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης των φαρμάκων, η μελέτη της απορρόφησης/κατανομής και των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των μορίων λαμβάνεται πλέον υπόψη στα πρώιμα στάδια της διαδικασίας ανακάλυψης-ανάπτυξης νέων φαρμάκων^{155,156,157}. Σύμφωνα με στατιστικές μελέτες μέχρι τη δεκαετία του 1990 το 40% του ποσοστού αποτυχίας αποδίδετο σε προβλήματα βιοδιαθεσιμότητας. Η στροφή της έρευνας για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων ήδη κατά τα πρώτα στάδια στη διερεύνηση του προφίλ των φυσικοχημικών/φαρμακοκινητικών διεργασιών παράλληλα με τις προσπάθειες αύξησης της συγγένειας των ενώσεων στον υποδοχέα, μείωσε μέσα σε μια δεκαετία αυτό το ποσοστό αποτυχίας στο 10%, όπως φαίνεται στο Σχήμα I-12¹⁵⁸.



Σχήμα I-12. Λόγοι αποκλεισμού υποψηφίων φαρμάκων από την κλινική ανάπτυξη.

Συνεπώς, είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, των αλληλεπιδράσεων με τις μεμβράνες και της πρωτεϊνικής σύνδεσης στο πλάσμα με γρήγορες τεχνικές HTS (High ThroughPut Screening), αν και δεν είναι απαραίτητη σε αυτό το στάδιο η ακριβής μέτρηση αυτών των ιδιοτήτων. Παρόλα αυτά, είναι πολύ σημαντικό οι τιμές που θα μετρηθούν να εξασφαλίζουν μια κατάταξη των ενώσεων. Αυτή η προσέγγιση, ενδεχομένως να κάνει εφικτή την ανάπτυξη Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Ιδιοτήτων (QSPR: Quantitative Structure Property Relationships) οι οποίες θα

βοηθήσουν στην τροποποίηση της δομής, χωρίς να μειώνουν την πρωτογενή δράση των μορίων στο συγκεκριμένο στόχο¹⁵⁹.

Η βιομιμητική χρωματογραφία αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική τεχνική, συνδυάζοντας τα πλεονεκτήματα των χρωματογραφικών τεχνικών με βιολογικά χαρακτηριστικά τα οποία ενσωματώνονται στις στατικές φάσεις (βιομιμητικές στατικές φάσεις). Οι εμπορικά διαθέσιμες βιομιμητικές στατικές φάσεις προσομοιώνουν μεμβράνες ή πρωτεΐνες του πλάσματος. Στη δεύτερη περίπτωση η χρωματογραφία είναι γνωστή και ως χρωματογραφία συγγένειας. Μέχρι στιγμής περισσότερο έχουν μελετηθεί οι στήλες ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane, IAM)¹⁶⁰, οι οποίες περιέχουν ενσωματωμένα φωσφολιπίδια ακινητοποιημένα σε πήγμα διοξειδίου του πυριτίου και οι οποίες προσομοιώνουν το λιπιδικό περιβάλλον της κυτταρικής μεμβράνης και ενδεχομένως της διαπερατότητας. Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί στήλες που ενσωματώνουν πρωτεΐνες του πλάσματος, χημικά ακινητοποιημένες σε έναν σκελετό πήγματος διοξειδίου του πυριτίου, όπως η ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού (human serum albumin, HSA) και η α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος (α₁-acid glycoprotein, AGP)¹⁶¹. Η εφαρμογή των προαναφερθέντων βιομιμητικών χρωματογραφικών συστημάτων διερευνήθηκαν συστηματικά στην παρούσα διατριβή. Ως εκ τούτου θα αναφερθούν εκτενώς στη συνέχεια.

3.2 Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM)

Το σύστημα οκτανόλης-νερού είναι γενικά αποδεκτό για την ικανότητα να προσομοιώνει την υδρόφοβη σύνδεση, έχει ωστόσο συχνά υποστεί κριτική ως προς την ικανότητά του να προσομοιώνει τη διαπερατότητα μέσω των βιολογικών μεμβρανών. Αν και ο ισότροπος χαρακτήρας της "υγρής" οκτανόλης έχει αμφισβητηθεί σύμφωνα με σχετικά πρόσφατες φασματοσκοπικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες^{149,162}, το σύστημα αυτό στερείται ωστόσο της δυνατότητας έκφρασης ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Αντίθετα η παρουσία φορτισμένων ομάδων στις μεμβράνες, συνηγορεί για την ανάπτυξη ιοντικών δεσμών. Από την άλλη πλευρά, τα λιποσώματα, τα οποία θεωρείται ότι αποτελούν αμεσότερα μοντέλα των βιολογικών μεμβρανών, δεν προσφέρονται για ευρεία εφαρμογή δεδομένου ότι υπάρχουν προβλήματα στην τυποποίηση της παρασκευής τους, ενώ

και τα πειράματα κατανομής σε συστήματα λιποσωμάτων-νερού εμφανίζουν μάλλον χαμηλή επαναληψιμότητα^{163,164,165}.

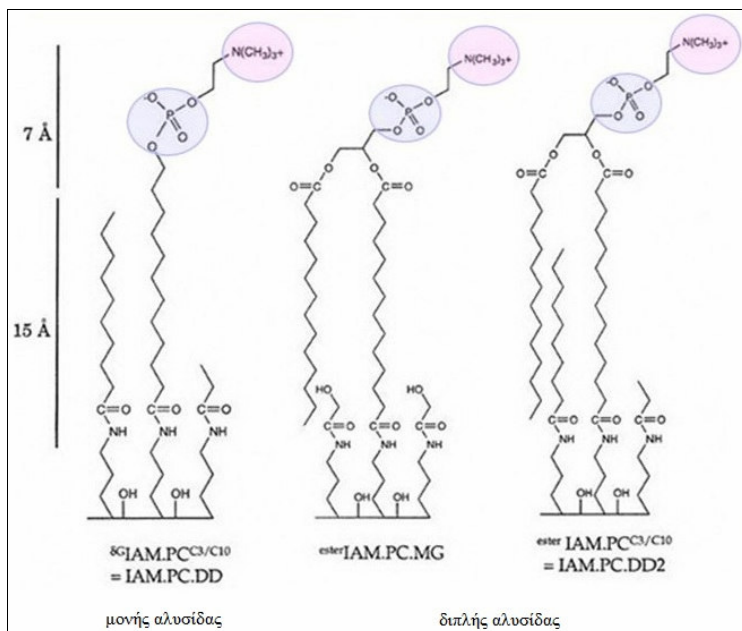
Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane Chromatography, IAMC) συνδυάζει την κατανομή σε μεμβράνες με τα πλεονεκτήματα των χρωματογραφικών τεχνικών παρακάμπτοντας με αυτόν τον τρόπο τις δυσκολίες που σχετίζονται με άλλες *in vitro* μεθόδους, όπως η κατανομή σε λιποσώματα^{166,167,168,169,170,171}. Η τεχνική αυτή προσελκύει όλο και περισσότερο το ερευνητικό ενδιαφέρον, με αποτέλεσμα την ύπαρξη συσχετίσεων των χρωματογραφικών δεδομένων που προκύπτουν με τους συντελεστές κατανομής σε λιποσώματα φωσφατιδυλοχολίνης και με μεγέθη διαπερατότητας-φαρμακοκινητικές παραμέτρους^{172,173,174,175}. Ωστόσο δεν έχει γίνει ακόμα σαφής ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά τη συγκράτηση και οι ομοιότητες/ανομοιότητες με τα συμβατικά συστήματα προσδιορισμού της λιποφιλίας (μέθοδος ανακινούμενης φιάλης, αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφικές τεχνικές).

3.3 Στατικές φάσεις στη χρωματογραφία IAM

Δεδομένου ότι η φωσφατιδυλοχολίνη είναι το κυριότερο φωσφολιπίδιο που απαντάται στις κυτταρικές μεμβράνες, η πλειοψηφία των στηλών IAM φέρουν φωσφατιδυλοχολίνη, ενώ είναι δυνατόν να φέρουν φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, σφιγκομυελίνη ή χοληστερόλη. Η συγκράτηση σε αυτού του είδους τις στήλες ενδέχεται να προσομοιώνει την πρωτεϊνική σύνδεση, η οποία έχει ιδιαίτερη σημασία στην κατανομή και δράση των φαρμάκων. Πολλές στήλες IAM είναι εμπορικά διαθέσιμες από την εταιρία Regis Technologies¹⁷⁶. Η πρώτη στατική φάση IAM παρασκευάστηκε με ομοιοπολική σύνδεση διακυλο-φωσφατιδυλοχολίνης σε υπόστρωμα πήγματος οξειδίου του πυριτίου μέσω ομάδας προπυλαμίνης¹⁶⁶. Οι στατικές φάσεις αυτού του είδους αναφέρονται ως IAM.PC. Ωστόσο λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης μόνο το ένα τρίτο των ομάδων προπυλαμίνης αντιδρούν με τα φωσφολιπίδια με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα δεύτερο επίπεδο επιφάνειας με βασικές ιδιότητες. Η παρουσία υπολειπόμενων μορίων προπυλαμίνης προκαλεί μείωση τη χημικής σταθερότητας της στατικής φάσης και επηρεάζει τη χρωματογραφική συμπεριφορά, αυξάνοντας τη συγκράτηση όξινων μορίων και μειώνοντας τη συγκράτηση βασικών ενώσεων¹⁷⁷. Η επικάλυψη των ομάδων αυτών

μέσω χημικής αντίδρασης με μικρά μόρια φαίνεται να λύνει τα προβλήματα σταθερότητας και τις δευτερεύουσες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Για την επικάλυψη αρχικά χρησιμοποιήθηκε 2,3-επόξυ-1-προπανόλη (οξιρανυλομεθανόλη, glycidol) και μεθυλο-γλυκολικό οξύ (MG) το οποίο σχηματίζει χημικώς ουδέτερα αμίδια. Η εμπορικά διαθέσιμη στατική φάση αυτού του τύπου είναι η IAM.PC.MG. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας επικάλυψης δημιουργούνται ομάδες υδροξυλίου κάτω από τις ακινητοποιημένες πολικές κεφαλές της φωσφατιδυλοχολίνης¹⁷⁸. Άλλες τεχνητές και βιολογικές μεμβράνες ωστόσο δεν περιέχουν υδροξύλια κοντά στο κέντρο της μεμβράνης. Συνεπώς αναμένεται διαφοροποίηση ως προς την εκλεκτικότητα και η χρωματογραφική συμπεριφορά στη στήλη IAM.PC.MG μπορεί να μην ταυτίζεται με αυτή σε μεταγενέστερες στήλες.

Για να αυξηθεί η επιφανειακή πυκνότητα των φωσφολιπιδίων και κυρίως η πυκνότητα των πολικών κεφαλών και η σταθερότητα της στήλης σε όξινες συνθήκες παρασκευάστηκε μια απλή αλυσίδα φωσφατιδυλοχολίνης από την οποία απουσίαζε ο σκελετός της γλυκερόλης (IAM.PC, 11-carboxyundecyl phosphocholine) και συνδέθηκε με την προπυλαμίνη της πυριτίας. Για την αποφυγή δημιουργίας ομάδων υδροξυλίου στο λιπόφιλο κορμό η επικάλυψη των ελευθέρων αμινικών άκρων της προπυλαμίνης που δεν αντέδρασαν γίνεται με ακυλίωση με δεκανοϊκό και προπιονικό ανυδρίτη^{179,180} αν και ανάλυση με φασματοφωτομετρία IR έδειξε ότι περίπου 30% υπολειπόμενων αμινομάδων παραμένουν σε μικρές πτυχές της επιφάνειας της πυριτίας¹⁷⁷. Η εμπορικά διαθέσιμη στήλη αυτού του τύπου είναι η IAM.PC.DD (Drug Discovery), γνωστή και ως ^δIAM.PCC10/C3. Η στήλη IAM.PC.DD συνιστάται ιδιαίτερα για τη μελέτη υδρόφιλων μορίων που έχουν μικρούς χρόνους κατακράτησης, καθώς λόγω της παρουσίας μονοακυλιωμένης φωσφατιδυλοχολίνης, αντί της δις-ακυλιωμένης αλυσίδας που φέρουν οι στατικές φάσεις IAM.PC.MG αποτελεί μια περισσότερο υδρόφιλη στατική φάση. Η πρόωρη γήρανση που σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές^{177,178} παρουσιάζουν οι στήλες IAM.PC.DD οδήγησε στην ανάπτυξη ενός τρίτου είδους στατικής φάσης της IAM.PC.DD2. Αυτή η στατική φάση αποτελεί συνδυασμό των προηγούμενων δύο στο βαθμό που επί της προπυλαμίνης της πυριτίας ακινητοποιείται δις-ακυλιωμένη φωσφατιδυλοχολίνη, η δε επικάλυψη των αμινικών ομάδων που δεν αντέδρασαν γίνεται με ακυλίωσή τους χρησιμοποιώντας δεκανοϊκό και προπιονικό ανυδρίτη. Στο Σχήμα I-13 φαίνονται οι προαναφερθείσες εμπορικά διαθέσιμες στατικές φάσεις IAM:



Σχήμα I-13. Οι δομές των στατικών φάσεων στις εμπορικά διαθέσιμες στήλες IAM.PC.MG, IAM.PC.DD και IAM.PC.DD2.

Εκτός από τις υπολειπόμενες αμινομάδες, στις στατικές φάσεις IAM ενδέχεται να παραμένουν και ομάδες σιλανόλης, παρά τις αντιδράσεις επικάλυψης. Οι ομάδες αυτές συνήθως υπάρχουν σε χρωματογραφικά υλικά βασισμένα στο πήγμα οξειδίου του πυριτίου. Οι αμιδικοί δεσμοί ωστόσο που δημιουργούνται κατά την επικάλυψη της προπυλαμίνης θεωρείται ότι δημιουργούν μια ηλεκτροστατική θωράκιση αντίστοιχη με αυτή που παρατηρείται στις αντιστρόφου φάσεως στήλες νέας γενιάς (ABZ⁺, Discovery-RP-Amide-C16, βλ. §2.3.1). Συγκριτικές μελέτες για τις τρεις στατικές φάσεις έδειξαν ότι αυτές εμφανίζουν ανάλογη συμπεριφορά, με τους εξαγόμενους παράγοντες χωρητικότητας να έχουν πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ τους, να αποκλίνουν όμως από την ένα προς ένα συσχέτιση λόγω του διαφορετικού υδρόφοβου χαρακτήρα των στηλών^{169,175}. Συγκεκριμένα ο υδρόφοβος χαρακτήρας των τριών στατικών φάσεων ακολουθεί την εξής αύξουσα σειρά: IAM.PC.DD < IAM.PC.MG < IAM.PC.DD2. Οι χρωματογραφικοί δείκτες οι οποίοι προσδιορίζονται με την διπλής αλυσίδας στατική φάση IAM.PC.MG διαπιστώθηκε ότι δίνουν καλύτερες συσχετίσεις με βιολογικά δεδομένα συγκριτικά με τους χρωματογραφικούς δείκτες που προσδιορίζονται με την απλής αλυσίδας στατική φάση IAM.PC.DD^{177,181}. Ως εκ τούτου θεωρήθηκε ότι η διπλή αλυσίδα προσομοιώνει

καλύτερα τη δομή των φυσικών φωσφολιπιδίων. Δεν υπάρχουν ωστόσο αντίστοιχες πληροφορίες για τις στήλες IAM.PC.DD2.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μικρές διαστάσεις των στηλών IAM και το μεγάλο μέγεθος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού ($\approx 10\mu\text{m}$) επιτρέπουν την εφαρμογή μεγαλύτερης ροής στο χρωματογραφικό σύστημα χωρίς να παρατηρείται ιδιαίτερη αύξηση στην πίεση του συστήματος. Η δυνατότητα αυτή επιτρέπει την περαιτέρω μείωση του χρόνου, που απαιτείται για τον πειραματικό προσδιορισμό.

3.4 Σταθερότητα των στηλών IAM

Στις στατικές φάσεις IAM, υπάρχουν πολλές θέσεις όπου μπορούν να λάβουν χώρα αντιδράσεις υδρόλυσης, οδηγώντας έτσι σε πρόωρη γήρανση της στατικής φάσης¹⁸².

Τέτοιες θέσεις αποτελούν:

- α) οι δεσμοί σιλοξανίου οι οποίοι συνδέουν τις υδρογονανθρακικές αλυσίδες φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια του υποστρώματος της πυριτίας.
- β) οι αμιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ των ομάδων προπυλαμίνης του υποστρώματος και των ακινητοποιημένων φωσφολιπιδίων.
- γ) οι εστερικοί δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ των λιπαρών οξέων και των μορίων γλυκερόλης στην περίπτωση των δις-ακυλιωμένων στατικών φάσεων.

Ο βαθμός υδρόλυσης των αμιδικών δεσμών και των δεσμών σιλοξανίου περιορίζεται με επικάλυψη των ελευθέρων αμινικών άκρων της προπυλαμίνης όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο (§3.3).

Η σταθερότητα των στατικών φάσεων IAM εξαρτάται από τον τύπο και την καθαρότητα του υποστρώματος οξειδίου του πυριτίου καθώς και από τη σύσταση των κινητών φάσεων που χρησιμοποιούνται. Χρήση μεθανόλης ως οργανικού τροποποιητή είναι δυνατό να προκαλέσει μεθανόλυση στη στατική φάση συμβάλλοντας έτσι στη μείωση του χρόνου ζωής της στήλης^{183,184}.

Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι παρουσιάζεται μεγάλη διαφοροποίηση του ρυθμού γήρανσης των στηλών IAM ακόμα και για στήλες που ανήκουν στην ίδια παρτίδα παραγωγής με αποτέλεσμα μεγάλη διακύμανση των προσδιοριζόμενων παραγόντων χωρητικότητας σε διαφορετικές στήλες IAM.PC.DD που σε μερικές περιπτώσεις υπερέβαινε το 10%^{179,185}. Παραπλήσια συμπεράσματα προέκυψαν από αντίστοιχη

μελέτη που αφορούσε σε στήλες IAM.PC.DD2. Η μεγάλη διακύμανση που παρουσιάζουν οι στήλες IAM καθιστά αναγκαίο τον τακτικό τους έλεγχο και όταν πρόκειται να συγκριθούν αποτελέσματα που προέρχονται από διαφορετικές στήλες συνιστάται η διόρθωση των προσδιοριζόμενων παραγόντων χωρητικότητας με βάση τη γήρανση των στηλών¹⁸¹.

3.5 Κινητές φάσεις στη χρωματογραφία IAM

Σε αντίθεση με την RP-HPLC, στη χρωματογραφία IAM υπάρχει η δυνατότητα σε πολλές περιπτώσεις να χρησιμοποιηθούν αποκλειστικά υδατικές κινητές φάσεις, χωρίς την προσθήκη οργανικού τροποποιητή. Η δυνατότητα αυτή αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα της χρωματογραφίας IAM, διότι αφενός δεν απαιτείται αναγωγή των ισοκρατικών τιμών $\log k$ σε 100% νερό (με αποτέλεσμα να μειώνεται κατά πολύ ο χρόνος που απαιτείται για τους προσδιορισμούς) και αφετέρου αποκλείεται η πιθανή επίδραση του οργανικού τροποποιητή στη συγκράτηση. Για ιονιζόμενες ενώσεις συνήθως το pH ρυθμίζεται με PBS.

Προκειμένου για ενώσεις με μεγάλη συγγένεια ως προς τη στατική φάση IAM είναι αναγκαία η προσθήκη οργανικού τροποποιητή και η εξαγωγή ανηγμένων τιμών $\log k_w$. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο οργανικός τροποποιητής που επιλέγεται είναι το ακετονιτρίλιο, σε αντίθεση με τη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως όπου συνιστάται η χρήση μεθανόλης (βλ. §2.5). Στη χρωματογραφία IAM η μεθανόλη αποφεύγεται διότι όπως αναφέρθηκε (βλ. §3.4) είναι δυνατό να προκαλέσει μεθανόλυση της στατικής φάσης, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό το χρόνο ζωής της στήλης. Ωστόσο ορισμένοι ερευνητές χρησιμοποιούν μεθανόλη ως οργανικό τροποποιητή στη χρωματογραφία IAM, λόγω της μεγαλύτερης ομοιότητάς της με το νερό¹⁸⁰. Το ακετονιτρίλιο είναι πιο υδρόφοβο από τη μεθανόλη, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση των χρόνων συγκράτησης των ουσιών, ενώ δεν απαιτούνται μεγάλα ποσοστά. Εάν το ποσοστό του ακετονιτρίλιου δεν υπερβαίνει το 30% της σύστασης της κινητής φάσης θεωρείται ότι δεν προκαλεί σημαντική διατάραξη της διάταξης των μορίων του νερού¹⁸⁶. Από την άλλη, το ακετονιτρίλιο λόγω της μεγάλης διπολικής ροπής που διαθέτει εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς τα μόρια ουσιών που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν αλληλεπιδράσεις τύπου διπόλου-διπόλου. Το

ακετονιτρίλιο δεν εμφανίζει ιδιότητες δότου πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου και συμπεριφέρεται ως ασθενής δέκτης πρωτονίων. Παρά τις διαφορές αυτές το τελικό αποτέλεσμα της συγκράτησης με ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη ως οργανικό τροποποιητή δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά, αν και δεν υπάρχουν πολλές σχετικές αναφορές, ενώ λιγότερο ακόμη έχει μελετηθεί η επίδραση του οργανικού τροποποιητή στο τελικό αποτέλεσμα της συγκράτησης σε σύγκριση με τη συγκράτηση που προσδιορίζεται απουσία οργανικού τροποποιητή. Τέτοιου είδους σύγκριση είναι σημαντική έτσι ώστε να είναι δυνατή η εφαρμογή σε συσχετίσεις δεδομένων που αφορούν σε ενώσεις με μεγάλη διαφορά ως προς τη συγγένεια με τη στήλη IAM.

3.6 Σχέση χρωματογραφικών δεικτών IAM με παραδοσιακά μεγέθη της λιποφιλίας

Μέτρο της συγκράτησης στη χρωματογραφία IAM αποτελεί ο λογάριθμος του παράγοντα χωρητικότητας $\log k_w$ παρουσία υδατικής φάσης, ο οποίος είναι δυνατόν να προσδιοριστεί άμεσα ή στην περίπτωση ενώσεων με αυξημένη συγκράτηση να ληφθεί με αναγωγή ισοκρατικών τιμών. Στην περίπτωση ουδέτερων ενώσεων είναι δυνατόν να ληφθούν πολύ καλές συσχετίσεις των τιμών $\log k_w^{IAM}$ με τις τιμές $\log P$. Στις περισσότερες από αυτές τις συσχετίσεις η κλίση είναι $\sim 0,5$, υποδηλώνοντας ότι οι τιμές $\log k_w$ λιπόφιλων ενώσεων είναι γενικά μικρότερες των τιμών $\log P$, με τη διαφορά να αυξάνει όσο αυξάνει η λιποφιλία, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση υδρόφιλων ενώσεων. Η συμπεριφορά αυτή υποδεικνύει μειωμένο υδρόφοβο περιβάλλον στη στήλη IAM. Ωστόσο στην περίπτωση δομικώς συγγενών ενώσεων είναι δυνατόν να ληφθούν συσχετίσεις με συνήθως με κλίση κοντά στη μονάδα και αρνητικό σταθερό όρο, όπως αναφέρεται σε μελέτη κουμαρινικών παραγώγων¹⁸⁷. Η κλίση πρακτικά ίση με τη μονάδα συντελεστή παλινδρόμησης ίσο με τη μονάδα υποδηλώνει ανάλογη συμμετοχή των υποκαταστατών στον κοινό κουμαρινικό σκελετό κατά τη συγκράτηση στη στήλη IAM και την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού και κατά συνέπεια ανάλογο ενεργειακό ισοζύγιο. Σε αντίθεση, η σύγκριση των τιμών $\log k_w^{IAM}$ των κουμαρινικών παραγώγων με τους παράγοντες συγκράτησης που προέκυψαν από χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως

($\log k_w$ και R_{Mw}) κατέδειξε διαφορές στο μηχανισμό συγκράτησης, με κλίση αποκλίνουσα από τη μονάδα, πιθανόν λόγω ανάπτυξης σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων στην περίπτωση της αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφίας.

Διαφορετική αναμένεται να είναι η συμπεριφορά ιονισμένων ενώσεων στη χρωματογραφία IAM συγκριτικά με την κατανομή τους στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Η ύπαρξη φορτισμένων ομάδων στα φωσφολιπίδια της επιφάνειας IAM δημιουργεί ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με ιονισμένες ενώσεις, σε αντίθεση με το σύστημα οκτανόλης-νερού. Επιπλέον, το περιβάλλον των στηλών IAM είναι λιγότερο υδρόφοβο. Συνεπώς οι χρωματογραφικοί δείκτες που προσδιορίζονται στις στήλες IAM αποτελούν διαφορετική κλίμακα λιποφιλίας και δε συσχετίζονται άμεσα με το σύστημα οκτανόλης-νερού.

Σύγκριση της συγκράτησης στη χρωματογραφία IAM με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού για σειρά β-αναστολέων και π-μεθυλοβενζυλο-αλκυλαμινών έδωσε εξισώσεις με πολύ καλά στατιστικά στοιχεία και στις δυο περιπτώσεις¹⁸³. Οι πολύ καλές συσχετίσεις που προέκυψαν υποδηλώνουν ότι η ισορροπία μεταξύ υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στη χρωματογραφία IAM είναι ανάλογη με την αντίστοιχη ισορροπία στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Ωστόσο οι διαδικασίες συγκράτησης και κατανομής δεν είναι ομοενεργειακές δεδομένου ότι οι εξισώσεις έχουν κλίση διαφορετική από τη μονάδα. Ο Demare¹⁸⁸ διαπίστωσε ελαφρά καλύτερη συσχέτιση των τιμών $\log k_w^{IAM}$ σε pH 7,0 για 13 αντιφλεγμονώδη και αναλγητικά φάρμακα (6 όξινα, 4 βασικά και 3 αμφολυτικά παράγωγα) με τις τιμές $\log D_{oct}$ συγκριτικά με την αντίστοιχη συσχέτιση με τις τιμές $\log P_{oct}$. Αντίθετα, άλλοι ερευνητές διαπίστωσαν για 16 μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα καλύτερη συσχέτιση των τιμών $\log k_w^{IAM}$ σε pH 7,0 με τις τιμές $\log P_{oct}$ της αδιάστατης μορφής σε σχέση με τις διορθωμένες για τον ιονισμό τιμές $\log D_{oct}$ ¹⁸⁹. Από την άλλη πλευρά, σε μελέτη για σειρά β-αναστολέων οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ σε pH 7,0 συσχετίστηκαν πολύ καλά με τις τιμές $\log D_{oct}$, αν και θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι τιμές pK_a στα πλαίσια της σειράς δεν διέφεραν σημαντικά και ως εκ τούτου υπήρχε αλληλοσυσχέτιση μεταξύ $\log P_{oct}/\log D_{oct}$. Εξάλλου, για μικρή σειρά δομικώς διαφορετικών ενώσεων δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ $\log P_{oct}/\log D_{oct}$, ωστόσο διαπιστώθηκε αυξημένη συγγένεια για τη στατική φάση IAM ιονισμένων ενώσεων, η οποία συνηγορεί για την ανάπτυξη μεταξύ άλλων και ηλεκτροστατικών δυνάμεων¹⁸². Ωστόσο σε άλλη μελέτη που αφορούσε δομικά διαφορετικά ουδέτερα, βασικά και

όξινα φαρμακευτικά μόρια διαπιστώθηκε μικρή συμμετοχή σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων στην περίπτωση πρωτονιωμένων βασικών ενώσεων κυρίως σε pH 7,4¹⁹⁰. Ιδιαίτερα σημαντική αποδείχτηκε η συμμετοχή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ειδικότερα με τα φωσφορικά ανιόντα της στατικής φάσης. Λαμβάνοντας υπόψη τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις υπο τη μορφή των κλασμάτων θετικώς και αρνητικώς φορτισμένων μοριακών μορφών, οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ οδήγησαν σε πολύ ικανοποιητικές συσχετίσεις με τους συντελεστές κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Στον Πίνακα I-5 συνοψίζονται οι δυνάμεις αναγνώρισης (recognition forces) στα ισότροπα (διφασικό σύστημα οκτανόλης-νερού, αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία) και ανισότροπα συστήματα (λιποσώματα, επιφάνειες IAM):

Πίνακας I-5. Δυνάμεις αναγνώρισης στα διαφορετικά συστήματα λιποφιλίας-φωσφολιποφιλίας.

Δυνάμεις αναγνώρισης		Λιποφιλία	Φωσφολιποφιλία
		Σύστημα οκτανόλης-νερού RP-HPLC,RP-TLC	Λιποσώματα, IAM
Δυνάμεις μεταφοράς φορτίου Αλληλεπιδράσεις αρυλίου/αρυλίου Ιοντικοί δεσμοί			
Δεσμοί ιόντος-διπόλου Ενισχυμένοι δεσμοί υδρογόνου Δεσμοί υδρογόνου		Πολικότητα	Πολικότητα
Δυνάμεις van der Waals	Δυνάμεις προσανατολισμού μεταξύ μονίμων διπόλων Επαγωγικές δυνάμεις		
	Δυνάμεις διασποράς		
Υδροφοβες αλληλεπιδράσεις			

3.7 Σχέση των χρωματογραφικών δεικτών IAM με τη διαπερατότητα, τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά και τη βιολογική δράση

Οι αναφορές που υπάρχουν για τη σχέση χρωματογραφικών δεικτών IAM με τη διαπερατότητα αφορούν συσχετίσεις μικρού αριθμού δομικά συγγενών ενώσεων με τη διαπερατότητα σε κύτταρα Caco-2. Οι μελέτες αυτές αφορούν κυρίως δεδομένα που έχουν προσδιοριστεί σε στήλες IAM.PC.MG και IAM.PC.DD, ενώ για τις στήλες IAM.PC.DD2 υπάρχουν πολύ λιγότερες πληροφορίες.

Οι Osterberg και συν¹⁹¹ συσχέτισαν τους χρωματογραφικούς δείκτες IAM με τη διαπερατότητα σε κύτταρα Caco-2 για 6 β-αναστολείς με άλλα μεγέθη λιποφιλίας ($\log P_{\text{oct}}$, $\log D_{\text{oct}}$, κατανομή σε λιποσώματα) και εξήγαγαν παραβολικές σχέσεις μεταξύ των διαφόρων μεγεθών λιποφιλίας και των δεδομένων Caco-2 με ανάλογα στατιστικά στοιχεία και σχεδόν την ίδια προβλεπτική ικανότητα. Σε άλλη μελέτη που αφορούσε 9 αναστολείς της πρωτεάσης του HIV οι Stewart και συν¹⁹² παρατήρησαν ότι η συσχέτιση των δεικτών IAM με τη διαπερατότητα βελτιώθηκε σημαντικά με την εισαγωγή του μοριακού βάρους και της ικανότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Εφαρμογή τιμών $\log D_{\text{oct}}$ ή αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφικών δεικτών οδήγησε σε καλή συσχέτιση σε συνδυασμό με το μοριακό βάρος, ενώ η παράμετρος της ικανότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Οι Genty και συν¹⁹³ μελετώντας την ικανότητα των χρωματογραφικών δεικτών να προσομοιώνουν την παθητική εντερική απορρόφηση σε επίμυες (Pa) για 12 δομικώς διαφορετικές ενώσεις, εισήγαγαν το μοριακό βάρος ως ανεξάρτητη μεταβλητή, βελτιώνοντας τη συσχέτιση.

Οι Barbato και συν¹⁸¹ εξέτασαν τις πιθανές σχέσεις μεταξύ διαφόρων φαρμακοκινητικών παραμέτρων με τους χρωματογραφικούς δείκτες που προσδιορίστηκαν σε στήλες IAM.PC.MG και IAM.PC.DD για 8 β-αναστολείς. Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι ήταν το συνδεδεμένο κλάσμα στο πλάσμα, το συνδεδεμένο κλάσμα στους ιστούς, η σύνδεση με αλβουμίνη, ο πραγματικός συντελεστής κατανομής σε ερυθροκύτταρα, ο όγκος κατανομής σε σταθεροποιημένη κατάσταση, ο συντελεστής κατανομής στις πρωτεΐνες του πλάσματος προς το νερό του πλάσματος και ο λόγος της μη νεφρικής απέκκρισης προς τη νεφρική απέκκριση. Σε όλες τις περιπτώσεις οι δείκτες που προσδιορίστηκαν σε IAM.PC.MG έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα, γεγονός που ερμηνεύτηκε με βάση τη διπλή αλυσίδα που υπάρχει στις στήλες IAM.PC.MG, η οποία θεωρήθηκε ότι δημιουργεί καλύτερο μοντέλο προσομοίωσης¹⁹⁴.

Επίσης, έχει ερευνηθεί η καταλληλότητα των χρωματογραφικών δεικτών IAM ως προς την ικανότητά τους να συσχετιστούν με τη διαπερατότητα του ΑΕΦ^{173,195,196,197}, όπου και διαπιστώθηκε καλύτερη συσχέτιση με τις τιμές $\log k_w^{\text{IAM}}$ σε σχέση με άλλα μεγέθη λιποφιλίας. Σε πρόσφατη μελέτη¹⁹⁸, η διαπερατότητα του ΑΕΦ μπορεί να ταξινομηθεί χρησιμοποιώντας την παράμετρο $\log k_w^{\text{IAM}}$ και το μοριακό βάρος:

Πίνακας I-6. Ταξινόμηση της διαπερατότητας του ΑΕΦ.

διαπερατότητα ΑΕΦ	$\frac{k_{IAM}}{Mw^4} 10^{10}$	
	pH 5,0	pH 7,4
υψηλή	>1,01	>0,85
απροσδιόριστη	0,65-1,00	-
χαμηλή	<0,64	<0,84

Οι χρωματογραφικοί δείκτες IAM έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης για την εξαγωγή μοντέλων που προσομοιώνουν την από του στόματος απορρόφηση. Από πολλούς ερευνητές^{199,200,201,202} έχει διαπιστωθεί σιγμοειδής συνάρτηση της από του στόματος απορρόφησης (HOA, Human Oral Absorption) με φυσικοχημικές παραμέτρους μεταξύ αυτών και της συγκράτησης $\log k_{IAM}$ που συνοψίζεται στη γενική εξίσωση²⁰³:

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + (A2X))}} \quad (I-23)$$

όπου: Y η %HOA σειράς ενώσεων, X η ανεξάρτητη μεταβλητή (π.χ. $\log k_{IAM}$), A1 και A2 οι συντελεστές παλινδρόμησης που προέκυψαν με τη χρήση μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης.

Οι Kotecha και συν¹⁹⁴ προτείνουν τον προσδιορισμό των τιμών $\log k_{IAM}$ σε εύρος pH 4,5 έως 7,4 ώστε να προσομοιώνεται όλη η διαδρομή στο γαστρεντερικό σωλήνα και τη χρήση στις εξισώσεις της υψηλότερης τιμής $\log k_{IAM}$. Επιπλέον εισάγουν στη σχέση %HOA/ $\log k_{IAM}$ την τιμή $\log k_{IAM50\%}$ η οποία αντιστοιχεί σε 50% %HOA και προτείνουν την εξίσωση (I-24):

$$\%HOA = \frac{100}{(1 + (10^{\log k_{IAM50\%} / 10^{\log k_{IAM}}})^{slope})} \quad (I-24)$$

Πρόσφατα οι Pétourcq και συν²⁰⁴ μελέτησαν τη διάχυση σειράς αρυλο-προπιονικών οξέων (μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, διαπιστώνοντας πολύ καλή παραβολική σχέση με τους χρωματογραφικούς δείκτες IAM, η οποία βελτιώθηκε περαιτέρω με την εισαγωγή του μοριακού βάρους ως δεύτερης παραμέτρου στην εξίσωση. Η ίδια ομάδα διερεύνησε τη σχέση των δεικτών IAM με διάφορες φαρμακοκινητικές παραμέτρους, τον όγκο κατανομής, το χρόνο ημιζωής

και την πρωτεϊνική σύνδεση για την ίδια ομάδα μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων και έδειξε ότι μπορούν να οδηγήσουν σε ικανοποιητικά μοντέλα²⁰⁵.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν επίσης αναφορές για συσχετίσεις της παραμέτρου $\log k_w^{IAM}$ με τη βιολογική δράση. Για 23 παράγωγα 2,4,δι-υδροξυθειοβενζανιλίδια ελήφθη ικανοποιητική συσχέτιση με τη βακτηριοστατική τους δράση²⁰⁶, ενώ οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ συσχετίστηκαν ικανοποιητικά με την ανθελμινθική δράση 15 παραγώγων 6,7,διαρυλοπτεριδίνης²⁰⁷.

3.8 Η πρωτεϊνική σύνδεση στο σχεδιασμό των φαρμάκων

Ο όρος πρωτεϊνική σύνδεση αναφέρεται στην αντιστρέψιμη σχέση ενός φαρμάκου με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, λόγω ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Ένα φάρμακο που συνδέεται αντιστρεπτά θα βρίσκεται σε ισορροπία με την αδέσμευτη μορφή, με την ποσότητα της σύνδεσης να εξαρτάται από τη συγγένεια του φαρμάκου με τις διάφορες πρωτεΐνες και τη δεσμευτική χωρητικότητα της κάθε πρωτεΐνης. Καθώς τα φάρμακα εισέρχονται στο πλάσμα, η πλειοψηφία τους συνδέεται ταχύτατα στις πρωτεΐνες του με μη-ειδικούς μηχανισμούς, βασισμένους στην κατανομή.

Η μέτρηση της έκτασης της δεσμευμένης πρωτεΐνης στο πλάσμα και η κατανόηση των μοριακών ιδιοτήτων που καθορίζουν την πρωτεϊνική σύνδεση είναι μείζονος σημασίας στην πορεία ανακάλυψης-ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Ισχυρή πρωτεϊνική σύνδεση (πάνω από 95%) ενδέχεται να προκαλέσει προβλήματα ασφάλειας²⁰⁸ του φαρμάκου καθώς και μη-επιθυμητά φαινόμενα^{209,210,211} όπως:

- α) μείωση της αποτελεσματικότητας
- β) χαμηλή διαπερατότητα του ΑΕΦ
- γ) χαμηλή κάθαρση
- δ) αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων
- ε) τοξικότητα

Έχει διαπιστωθεί ότι εκτός από την ισορροπία της σύνδεσης και ο ρυθμός της εξισορρόπησης είναι δυνατόν να επηρεάσει σημαντικά τη διαπερατότητα/κατανομή των ενώσεων, ενώ μπορούν να προκύψουν ειδικές αλληλεπιδράσεις στο επίπεδο δομής των πρωτεϊνών, οι οποίες είναι ικανές να αναγνωρίσουν εναντιομερή.

Το ανθρώπινο πλάσμα περιέχει περισσότερες από 60 διαφορετικές πρωτεΐνες, η σημαντικότερη από τις οποίες είναι η ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού (human serum albumin, HSA) που αποτελεί περίπου το 60% της ολικής πρωτεΐνης του πλάσματος, ακολουθούμενη από την α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (α₁-acid glycoprotein, AGP). Όπως φαίνεται στον Πίνακα I-7 η πρωτεϊνική σύνδεση στο πλάσμα (%PPB, plasma protein binding) χαρακτηρίζεται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμακευτικού μορίου και από τις εμπλεκόμενες πρωτεΐνες²¹². Δεδομένου ότι στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η σύνδεση στην HSA και την AGP, θα αναφερθούν σύντομα τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών αυτών σε επόμενες παραγράφους (§3.9 και §3.10). Σε γενικές γραμμές, πάνω στις HSA και AGP συνδέονται όξινα^{213,214} και βασικά²¹⁵ φαρμακευτικά μόρια αντίστοιχα. Κάτι τέτοιο υποδηλώνει το σχηματισμό ιονικών δεσμών, παρότι η ύπαρξη μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων θεωρείται απαραίτητη για τη δέσμευση, ενώ ενδέχεται να λάβουν χώρα και ειδικές αλληλεπιδράσεις στο επίπεδο της δομής των πρωτεϊνών^{216,217,218}. Τα ουδέτερα λιπόφιλα μόρια μπορούν να συνδεθούν τόσο στην HSA, στην AGP, όσο και στις υπόλοιπες πρωτεΐνες του πλάσματος.

Πίνακας I-7. Πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης στο πλάσμα βάσει των βασικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μορίων.

Οξύτητα ή/και βασικότητα ^(α)	Βαθμός λιποφιλίας ^(β)	Εμπλεκόμενες πρωτεΐνες	%PPB	Παραδείγματα
απροσδιόριστη	0	καμία	0,0	καφεΐνη, κεταμίνη
ασθενή οξέα	+	HSA	2,0-70,0	φαινοβαρβιτάλη
αμφολύτες, εσωτερικά άλατα	+	HSA, AGP	50,0-95,0	κετιριζίνη
βάσεις	+	AGP	50,0-95,0	λιδοκαΐνη, μεθαδόνη
οξέα (I)	+	HSA	80,0-95,0	βαλπροϊκό οξύ, ασπιρίνη
βάσεις	++	AGP, HSA, λιποπρωτεΐνες	80,0-95,0	προπρανολόλη, ιμιπραμίνη
οξέα (II)	++	HSA	95,0-99,9	βαρφαρίνη, πιροξικάμη
ασθενείς βάσεις	+++	AGP, HSA, λιποπρωτεΐνες	95,0-99,9	νικαρδιπίνη, διαζεπάμη
ουδέτερη	++++	λιποπρωτεΐνες	99,0-99,9	προβουκόλη, ετρενιτάτη

^(α)ασθενή οξέα: $pK_a > 6$, διπολικά ιόντα: σε pH 7,4 κυρίως ιονισμένα, βάσεις: $pK_a > 7$, οξέα (I): $pK_a < 6$, οξέα (II): $pK_a < 5$, ασθενείς βάσεις: $pK_a < 7$,

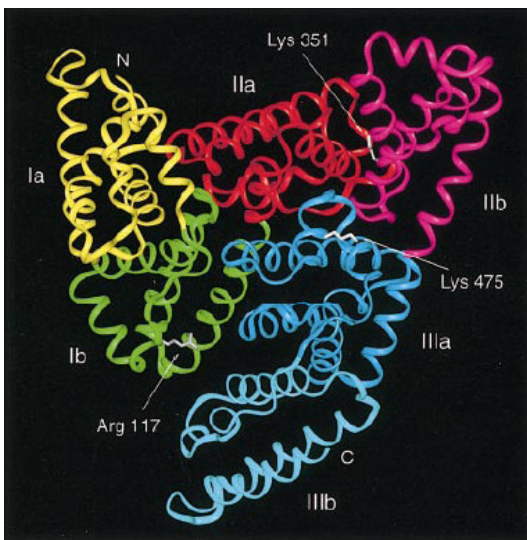
^(β)0: υψηλή διαλυτότητα στο νερό, +: μέτρια λιποφιλία, ++: αξιοσημείωτη λιποφιλία, +++: υψηλή λιποφιλία, ++++: πολύ υψηλή λιποφιλία.

3.9 Ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού (human serum albumin, HSA)

Η HSA είναι ένα πολυπεπίδιο με μοριακό βάρος 69000, 585 κατάλοιπα αμινοξέων, ισοηλεκτρικό σημείο 4,8 και είναι η πρωτεΐνη με την υψηλότερη συγκέντρωση στο πλάσμα. Σύμφωνα με κρυσταλλογραφικές μελέτες²¹⁹ η πρωτεΐνη αποτελείται από τρεις ομόλογες περιοχές (I-III), ενώ η κάθε μια από αυτές διαιρείται σε δυο υποπεριοχές (A και B). Διαπιστώθηκε η ύπαρξη δυο θέσεων οι οποίες δεσμεύουν εναντιοεκλεκτικά φαρμακευτικά μόρια μέσω υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με αρκετά υψηλές τιμές σταθερών σύνδεσης:

- α) η "θέση I", η οποία δεσμεύει τη βαρφαρίνη και την αζαπροπαζόνη και βρίσκεται στην υποπεριοχή IIΑ,
- β) η "θέση II", η οποία δεσμεύει ινδολο-παράγωγα και βενζοδιαζεπίνες και βρίσκεται στην υποπεριοχή IIIΑ.

Η κρυσταλλογραφική δομή της HSA απεικονίζεται στο Σχήμα I-14²²⁰.



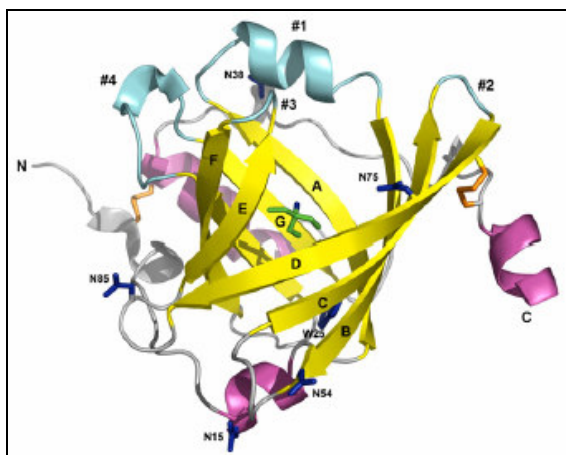
Σχήμα I-14. Κρυσταλλογραφική απεικόνιση της HSA.

Όπως γίνεται κατανοητό, δικαρβοξυλικά οξέα και ογκώδεις ετεροκυκλικές ενώσεις θα συνδέονται κυρίως στη "θέση I", ενώ τα μικρού μεγέθους αρωματικά καρβοξυλικά οξέα θα συνδέονται κατά προτίμηση στη "θέση II". Αυτές οι περιοχές δέσμευσης είναι επιμηκυνόμενες υδρόφοβες κοιλοότητες που περιέχουν κατιοντικά κατάλοιπα αμινοξέων κοντά στις εισόδους τους. Συνεπώς, στο pH του πλάσματος η πρωτεΐνη είναι αρνητικά φορτισμένη, αλλά οι θέσεις δέσμευσης είναι θετικά φορτισμένες

δεσμεύοντας ανιοντικά μόρια. Περαιτέρω κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν ότι η διαμόρφωση της κοιλότητας της "θέσης I" μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη σύνδεση λιπαρών οξέων, καθώς οι υδρόφοβες κοιλότητες δεσμεύονται από την πολική πλευρά των αλυσίδων των οξέων. Σύμφωνα με άλλες μελέτες υπάρχουν και άλλες εναντιοεκλεκτικές περιοχές δέσμευσης²²¹.

3.10 α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (α_1 -acid glycoprotein, AGP)

Η AGP είναι ένα πολυπεπτίδιο με 183 κατάλοιπα αμινοξέων και 40 κατάλοιπα σιαλικού οξέος. Αποτελείται από 45% υδατάνθρακες και έχει MB 40000. Εμφανίζει όξινο χαρακτήρα, καθώς έχει pK_a 2,6 και ισοηλεκτρικό σημείο 2,7. Είναι μια πολύ σταθερή πρωτεΐνη έχοντας δυο δισουλφιδικές γέφυρες και μπορεί να συνδεθεί ομοιοπολικά στην επιφάνεια της πυριτίας παράγοντας μια στήλη αντιστρόφου φάσεως²²². Κρυσταλλογραφικές μελέτες²²³ έδειξαν ότι στην κοιλότητα της πρωτεΐνης υπάρχουν τρεις ευδιάκριτοι λοβοί. Ο βαθύτερος και κυριότερος λοβός (λοβός I) είναι μεγάλου μεγέθους και συνολικά μη πολικός, εξασφαλίζοντας επαρκή χώρο και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις για να προσαρμοστεί ο υποκαταστάτης. Σε κάθε πλευρά του υπάρχουν μικρότεροι λοβοί (λοβοί II και III), αμφότεροι αρνητικά φορτισμένοι. Αυτή η πολύπλοκη γεωμετρία της κοιλότητας σε συνδυασμό με την ευκαμψία του βρόχου στην είσοδό του εξηγεί το ευρύ φάσμα των βασικών και ουδέτερων ενώσεων που μπορούν να συνδεθούν σε αυτήν. Η κρυσταλλογραφική δομή της AGP απεικονίζεται στο Σχήμα I-15.



Σχήμα I-15. Κρυσταλλογραφική απεικόνιση της AGP.

Η AGP υπάρχει στο πλάσμα ως μίγμα τριών γενετικών παραλλαγών (genetic variants)^{224,225}. Ο πολυμορφισμός αυτός εξηγείται από την παρουσία δυο διαφορετικών γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν την AGP²²⁶, εκ των οποίων το γονίδιο AAG-A κωδικοποιεί τις παραλλαγές F1 και S και το γονίδιο AAG-B/B' κωδικοποιεί την παραλλαγή A²²⁷. Τα δύο αυτά γονίδια διαφέρουν για 22 υποκατεστημένες βάσεις, συνεπώς κατ'αντιστοιχία η παραλλαγή A και οι παραλλαγές F1*S αναμένεται να διαφέρουν στην αλληλουχία των αμινοξέων κατά (τουλάχιστον) 22 κατάλοιπα²²⁸, ενώ οι παραλλαγές F1 και S πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους το πολύ κατά πέντε αμινοξέα²²⁶.

3.11 Βιομimetική χρωματογραφία ως τεχνική προσδιορισμού της πρωτεϊνικής σύνδεσης

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής σύνδεσης χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές όπως ισορροπία διάλυσης, υπερδιήθηση, μικροδιάλυση, δυναμική διάλυση, υπερφυγοκέντρωση, μετωπική ανάλυση και κινητικές μέθοδοι σύνδεσης ενεργού άνθρακα. Χρησιμοποιείται επίσης μεγάλος αριθμός φασματοσκοπικών τεχνικών όπως φθορισμομετρία, φασματοσκοπία UV, κυκλικός διχρωϊσμός και φασματοσκοπία NMR. Οι τεχνικές αυτές ωστόσο είναι επίπονες και χρονοβόρες και οδηγούν σε στενωπό (bottleneck) στα αρχικά στάδια ανακάλυψης νέων φαρμακομορίων που απαιτούν γρήγορους ελέγχους μεγάλου αριθμού ενώσεων. Η συνεχιζόμενη αυτή αύξηση των απαιτήσεων για γρήγορες και αξιόπιστες μετρήσεις οδήγησαν στην ανάπτυξη στατικών φάσεων HPLC οι οποίες ενσωματώνουν πρωτεΐνες του πλάσματος χημικά ακινητοποιημένες σε έναν σκελετό πηγματος διοξειδίου του πυριτίου. Αρχικά οι στήλες αυτές αναπτύχθηκαν ως χειρόμορφες στατικές φάσεις με σκοπό την εφαρμογή τους στο διαχωρισμό εναντιομερών¹⁶¹, ακολούθως ωστόσο άρχισαν να δοκιμάζονται και για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής σύνδεσης. Ως γνωστό, οι χρωματογραφικοί παράγοντες χωρητικότητας k σχετίζονται άμεσα με την αναλογία του αριθμού των μορίων στη στατική φάση και την κινητή φάση. Η αναλογία αυτή μπορεί να μετατραπεί σε % ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης στο πλάσμα (%PPB, plasma protein binding) σύμφωνα με τη σχέση²²⁹:

$$\%PPB = 100 \left(\frac{k}{k+1} \right) \quad (I-25)$$


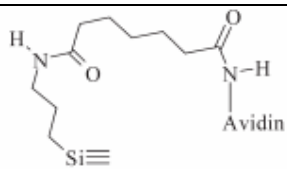
Οι χρωματογραφικές μέθοδοι συνδυάζουν ταχύτητα και φιλικότητα με μεγαλύτερη ακρίβεια, και έστω και αν προσομοιώνουν κατά προσέγγιση την πρωτεϊνική σύνδεση *in vivo*, είναι ιδιαίτερα χρήσιμες σε ότι αφορά την κατάταξη των ενώσεων, κυρίως σε περιοχές υψηλής πρωτεϊνικής σύνδεσης^{230,231,232}. Η αξιοποίηση τέτοιου είδους δεδομένων αποτελεί πολύτιμη συνεισφορά στα πρώιμα στάδια σχεδιασμού νέων υποψηφίων φαρμακομορίων.

Η χρωματογραφία HSA χρησιμοποιείται επίσης σε πειράματα αντικατάστασης (displacement experiments) για τη διαπίστωση της θέσης σύνδεσης των μορίων στην πρωτεΐνη. Στις περιπτώσεις αυτές αναλύεται πρότυπη ένωση, π.χ. βαρφαρίνη με γνωστά χαρακτηριστικά ως προς την πρωτεϊνική σύνδεση παρουσία και απουσία της υπο μελέτη ένωσης ως προσθετικού στην κινητή φάση²³³.

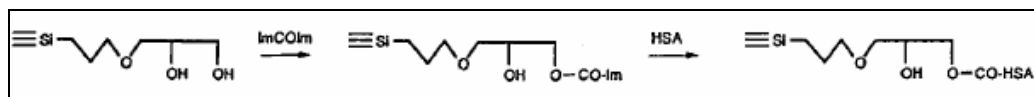
3.12 Στατικές φάσεις που περιέχουν ακινητοποιημένες πρωτεΐνες

Οι στατικές αυτές φάσεις διαφέρουν ως προς την πρωτεΐνη που περιέχουν και ως προς τον τρόπο ακινητοποίησης. Οι στήλες αυτού του είδους βρίσκουν σημαντική εφαρμογή στη χειρόμορφη χρωματογραφία, για το λόγο αυτό στη βιβλιογραφία αναφέρονται ως χειρόμορφες στατικές φάσεις (Chiral Stationary Phases, CSPs). Η πλειοψηφία των χειρόμορφων στατικών φάσεων κατασκευάζεται με ακινητοποίησή ανθρώπινης αλβουμίνης του ορού (HSA) και α-όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP) του πλάσματος. Άλλες πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή χειρόμορφων στατικών φάσεων είναι η κελλοβιοϋδρολάση (Cellobiohydrolase, CBH), η βόειος αλβουμίνη του ορού (Bovine Serum Albumin, BSA), η αλβουμίνη ορού μύων (Mouse Serum Albumin, MSA), η αλβουμίνη ορού επιμύων (Rat Serum Albumin, RSA), η αλβουμίνη ορού κυνών (Dog Serum Albumin, DSA), η ωοειδής μυκοπρωτεΐνη (Ovomucoid Protein, OV) και η αβιδίνη (Avidin, AV). Μια ενδεικτική λίστα των εμπορικά διαθέσιμων στατικών φάσεων που περιέχουν πρωτεΐνες φαίνεται στον Πίνακα I-8¹⁶¹.

Πίνακας I-8. Εμπορικά διαθέσιμες στατικές φάσεις που περιέχουν πρωτεΐνες.

Εμπορικό όνομα	Δομή	Επιλογέας
Chiral-HSA	$\equiv\text{Si-HSA}$	ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού ακινητοποιημένη σε πυριτία
Chiral-AGP EnantioPac AGP	$\equiv\text{Si-AGP}$	α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη ακινητοποιημένη σε πυριτία
Chiral-CBH	$\equiv\text{Si-CBH}$	κελλοβιοϋδρολάση ακινητοποιημένη σε πυριτία
Resolvosil BSA	$\equiv\text{Si-BSA}$	βόειος αλβουμίνη του ορού ακινητοποιημένη σε πυριτία
Chiral-MSA	$\equiv\text{Si-MSA}$	αλβουμίνη ορού μυών ακινητοποιημένη σε πυριτία
Chiral-RSA	$\equiv\text{Si-RSA}$	αλβουμίνη ορού επιμύων ακινητοποιημένη σε πυριτία
Chiral-DSA	$\equiv\text{Si-DSA}$	αλβουμίνη ορού κυνών ακινητοποιημένη σε πυριτία
Ultron-ES-OVM		ωοειδής μυκοπρωτεΐνη συζευγμένη σε αμινοπροπυλική πυριτία
Bioptic AV-I		αβιδίνη συζευγμένη με αμινο-προπυλ πυριτία
Herapin-5PW	Heparine-Resine	εραπίνη ακινητοποιημένη σε συμπολυμερές στυρενίου-διβινυλβενζενίου

Ένας ενδεικτικός τρόπος ακινητοποίησης για την παρασκευή στήλης HSA, ο οποίος αναπτύχθηκε από τους Domenici και συν²³⁴ φαίνεται στο Σχήμα I-16. Αρχικά μια εμπορικά διαθέσιμη στήλη διόλης ενεργοποιείται με τη χρήση 1,1-καρβονυλοδιμιδαζολίου (ImCOIm) και στη συνέχεια η πρωτεΐνη διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών εξισσοροπείται πάνω από το ενεργοποιημένο υπόστρωμα.



Σχήμα I-16. Σύνθεση χειρόμορφης στατικής φάσης HSA από μια στήλη διόλης.

3.13 Κινητές φάσεις στη χρωματογραφία AGP και HSA

Όπως και στη χρωματογραφία IAM, στις στήλες AGP και HSA υπάρχει η δυνατότητα χρησιμοποίησης 100% υδατικής κινητής φάσης, με τα πλεονεκτήματα που ήδη αναφέρθηκαν (βλ. §3.5). Για ενώσεις με αυξημένη συγκράτηση οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι οργανικοί τροποποιητές είναι το ακετονιτρίλιο και η ισοπροπανόλη, ενώ χρησιμοποιούνται επίσης η μεθανόλη, η αιθανόλη και η προπανόλη. Η φύση του οργανικού τροποποιητή μπορεί να επηρεάσει τη συγκράτηση ιδιαίτερα λόγω διαφοροποίησης στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Γενικά συνιστάται να μη χρησιμοποιούνται ποσοστά >20% οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης φορτισμένοι τροποποιητές όπως το οκτανοϊκό οξύ σε συγκεντρώσεις 1-5μM. Στην περίπτωση της χρήσης οκτανοϊκού οξέος η στήλη δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί εκ νέου με άλλο μη φορτισμένο τροποποιητή στην κινητή φάση, διότι το οκτανοϊκό οξύ δεν μπορεί ν'απομακρυνθεί πλήρως από τη στήλη²³⁵.

Οι στήλες AGP και HSA χρησιμοποιούνται σε εύρος pH 4,0-7,0 και 5,0-7,0 αντίστοιχα. Για τη ρύθμιση του pH συνήθως χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών (παρουσία Na⁺ ή/και K⁺) και οξικών (παρουσία K⁺ ή/και NH₄⁺). Άλλα ρυθμιστικά διαλύματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι μυρμηκικά και κιτρικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι προκειμένου για βιοαναλυτικούς προσδιορισμούς συνιστάται η χρήση προστήλης, ώστε να προστατευτεί η στήλη από προσμίξεις με αιωρούμενα σωματίδια και από προσμίξεις με υψηλή συγγένεια.

3.14 Επίδραση χρωματογραφικών συνθηκών στη συγκράτηση και το διαχωρισμό

Μεταξύ των αναλυτών και των χειρόμορφων στατικών φάσεων είναι δυνατόν ν'αναπτυχθούν τρεις τύποι αλληλεπιδράσεων:

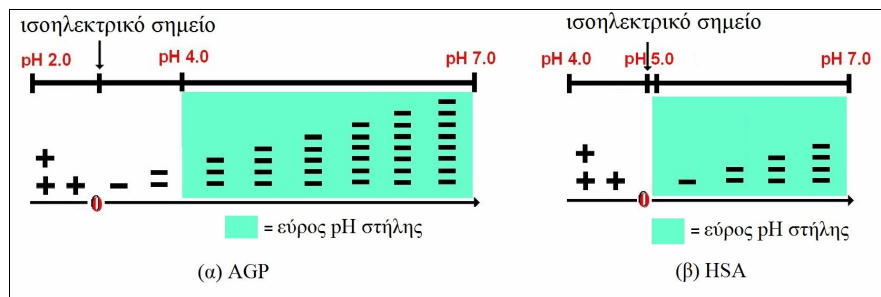
- α) ιοντικοί δεσμοί (στην περίπτωση ιονιζόμενων ενώσεων)
- β) υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις
- γ) δεσμοί υδρογόνου

Αντίστοιχα η συγκράτηση και ο διαχωρισμός είναι δυνατόν να επηρεαστούν από τους εξής παράγοντες:

- 1) το pH της κινητής φάσης
- 2) τη φύση και τη συγκέντρωση του οργανικού τροποποιητή
- 3) τη φύση και τη συγκέντρωση της υδατικής συνιστώσας

α) Επίδραση του pH της κινητής φάσης

Καθώς τα ισοηλεκτρικά σημεία (το οποίο αντιστοιχεί σε μηδενική τιμή συνολικού ηλεκτρικού φορτίου) των στηλών AGP και HSA είναι 2,7 και 4,8 αντίστοιχα με την αύξηση του pH της κινητής φάσης, αυξάνεται το ποσοστό του καθαρού αρνητικού φορτίου της πρωτεΐνης, ενώ μειώνοντας το pH προς το ισοηλεκτρικό σημείο, μειώνεται το καθαρό αρνητικό φορτίο της στατικής φάσης. Το φαινόμενο αυτό απεικονίζεται στο Σχήμα I-17. Λόγω του χαμηλότερου ισοηλεκτρικού σημείου της AGP καθίσταται δυνατή η σύνδεση βασικών ενώσεων στην πρωτεΐνη.



Σχήμα I-17. Κατανομή του καθαρού φορτίου των AGP, HSA σε συνάρτηση με το pH.

Για ενώσεις με βασικό χαρακτήρα σε pH 7,0 η συγκράτηση είναι υψηλή λόγω των ιοντικών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ του υψηλού ποσοστού των αρνητικών φορτίων της πρωτεΐνης και των θετικά φορτισμένων ιόντων της βάσης. Σε pH 4,0 όπου το ποσοστό του αρνητικού φορτίου της πρωτεΐνης μειώνεται, ελαττώνονται οι ιοντικοί δεσμοί και κατά συνέπεια και η συγκράτηση. Στην περίπτωση ενός ισχυρού οξέος, σε pH 7,0 αυτό είναι πλήρως αρνητικά φορτισμένο. Μειώνοντας το pH, ελαττώνεται το ποσοστό του αρνητικού φορτίου, με αποτέλεσμα να παρατηρείται υψηλότερη συγκράτηση λόγω αύξησης της συγγένειας με τη στατική φάση, εκφρασμένης μέσω δεσμών υδρογόνου και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Προκειμένου για όξινες ενώσεις, μείωση του pH έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη συγκράτηση και αυξημένο διαχωρισμό των εναντιομερών.

β) Επίδραση του οργανικού τροποποιητή

Η παρουσία υψηλών ποσοστών οργανικού τροποποιητή μειώνει τη συγκράτηση. Κατά κανόνα το ίδιο συμβαίνει και ως προς την εναντιοεκλεκτικότητα, αν και για συγκεκριμένα οξέα έχουν παρατηρηθεί αποκλίσεις²²⁹. Ο βαθμός διαχωρισμού μπορεί να επηρεαστεί ισχυρά από τη φύση και τη συγκέντρωση του οργανικού τροποποιητή. Η χρήση διαλυτών με διαφορετικές ιδιότητες ως προς το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου (π.χ. το ακετονιτρίλιο συμπεριφέρεται ως δέκτης πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου, ενώ η ισοπροπανόλη εμφανίζει ιδιότητες δότη-δέκτη πρωτονίων) πιθανότατα να επηρεάσει την εναντιοεκλεκτικότητα. Ωστόσο δεν έχει διερευνηθεί η συστηματική επίδραση της φύσης του οργανικού τροποποιητή στη συγκράτηση.

γ) Σταθερότητα των στηλών

Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες, που χρησιμοποιούνται για την ακινητοποίηση στην πυριτία είναι πολύ σταθερές, οι στήλες που παρασκευάζονται δεν αντιμετωπίζουν προβλήματα σταθερότητας. Η χρήση των στηλών για μεγάλο χρονικό διάστημα εκτός του εύρους λειτουργίας pH πιθανόν να ελαττώσει το χρόνο ζωής τους, λόγω αποσύνθεσης της πυριτίας²³⁴. Οι κατασκευαστές των στηλών γενικά συνιστούν τη χρήση χαμηλών ποσοστών οργανικού τροποποιητή. Έχουν πάντως χρησιμοποιηθεί και ποσοστά >30% και δεν έχει παρατηρηθεί πρόβλημα στην απόδοση της στήλης²²⁹.

3.15 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκράτηση στις στήλες HSA και AGP

Η επίδραση της λιποφιλίας έχει μελετηθεί ήδη από τη δεκαετία του '70 και ουσιαστικά οι πρώτες αυτές μελέτες συνέβαλαν στην καθιέρωση του συστήματος οκτανόλης-νερού ως σύστημα αναφοράς⁸. Σε Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Ιδιοτήτων (QSPR) που αφορούν στην πρωτεϊνική σύνδεση έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης χρωματογραφικοί δείκτες λιποφιλίας^{236,237,238,239}. Δεδομένου ωστόσο ότι οι υπόλοιπες δυνάμεις αναγνώρισης όπως οι ιονικοί δεσμοί δεν κωδικοποιούνται στα ισότροπα διφασικά συστήματα και στα χρωματογραφικά συστήματα αντιστρόφου φάσεως, οι συσχετίσεις αυτές περιορίζονται σε δομικά συγγενείς ενώσεις.

Οι Ashton και συν²²⁸ μελετώντας σειρά ινδολοκαρβαζολικών παραγώγων διαπίστωσαν ότι τα παράγωγα αυτά εμφάνισαν πολύ ισχυρή δέσμευση στη στήλη HSA, η οποία συσχετίστηκε με τον υδρόφοβο και τον όξινο χαρακτήρα των ενώσεων. Προέκυψε εξίσωση με δυο παραμέτρους: τη λιποφιλία εκφρασμένη με υπολογιστικές τιμές logP ή με τη συγκράτηση σε αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία, logk^{RP} και τις τιμές pK_a:

$$\log k_w^{\text{HSA}} = 0,30(\pm 0,12)\log P - 0,11(\pm 0,03)pK_a + 2,41 \quad (\text{I-26})$$

$$n = 6, r = 0,958, s = 0,118, F = 16,5$$

$$\log k_w^{\text{HSA}} = 0,40(\pm 0,14)\log k^{\text{RP}} - 0,09(\pm 0,03)pK_a + 1,62 \quad (\text{I-27})$$

$$n = 6, r = 0,962, s = 0,111, F = 18,5$$

Οι εξισώσεις (I-26) και (I-27) θα πρέπει να θεωρηθούν απλώς ενδεικτικές λόγω του πολύ μικρού αριθμού των ενώσεων που αναλύουν.

Σε ανάλογη εξίσωση κατέληξαν και οι Šoškić και συν²⁴⁰ για μεγαλύτερη σειρά παραγώγων του ινδολο-3-οξικού οξέος, χρησιμοποιώντας ως μόνη παράμετρο τη συγκράτηση σε αντιστρόφου φάσεως HPLC (logk^{ow}):

$$\log k_w^{\text{HSA}} = 0,47(\pm 0,12)\log k^{\text{ow}} - 0,56(\pm 0,28) \quad (\text{I-28})$$

$$n = 30, r = 0,842, s = 0,221, F = 68,2$$

Προκειμένου για δομικά μη συγγενείς ενώσεις ωστόσο, η λιποφιλία από μόνη της φαίνεται ότι δεν επαρκεί για την έκφραση της πρωτεϊνικής σύνδεσης^{241,242,243}.

Οι Saiakhon και συν²⁴⁴ αναφέρουν για ευρεία σειράς δομικώς μη συγγενών φαρμάκων φτωχή συσχέτιση της συγγένειας με τις πρωτεΐνες του πλάσματος με το συντελεστή μερισμού στο σύστημα οκτανόλης-νερού, ωστόσο ελήφθησαν πολύ καλές επιμέρους QSPR εξισώσεις. Οι ερευνητές ερμήνευσαν τα αποτελέσματά τους θεωρώντας ότι οι διαφορετικές θέσεις σύνδεσης διαφοροποιούνται ως προς τις απαιτήσεις λιποφιλίας.

Σε μια εμπειριστατωμένη μελέτη δομικώς μη συγγενών φαρμάκων που περιλαμβάνουν ουδέτερες, όξινες, βασικές και αμφολυτικές ενώσεις οι Valkó και συν²⁴⁵ διαπίστωσαν ότι λαμβάνονται καλύτερες συσχετίσεις της πρωτεϊνικής

σύνδεσης, η οποία έχει προσδιοριστεί είτε με άμεσες τεχνικές είτε ως συγκράτηση σε στήλη HSA, με το συντελεστή μερισμού $\log P$ της αδιάστατης μορφής, ως αποτέλεσμα της ύπαρξης φορτισμένων κέντρων στις πρωτεΐνες που ευνοούν την αλληλεπίδραση με αντιθέτως φορτισμένα κέντρα στα μόρια των φαρμάκων. Οι ερευνητές αυτοί υποστηρίζουν ότι μπορεί να προβλεφτεί καταρχήν η "ελάχιστη" πρωτεϊνική σύνδεση με βάση τη λιποφιλία. Ισχυρότερη σύνδεση από την προβλεπόμενη μπορεί να λαμβάνει χώρα ωστόσο εάν το φάρμακο εμφανίζει πολύ καλή προσαρμογή σε κάποια ειδική κοιλότητα σύνδεσης της πρωτεΐνης.

Σολβατοχρωμική ανάλυση στη βάση των παραμέτρων του Abraham²⁴⁶ οδήγησε στην εξίσωση:

$$\begin{aligned} \log K_{\text{HSA}} = & 0,18(\pm 0,14)A - 1,97(\pm 0,15)B - 0,36(\pm 0,15)S + 0,82(\pm 0,15)E \\ & + 1,62(\pm 0,21)V - 1,28 \end{aligned} \quad (\text{I-29})$$

$n = 52, r = 0,91, s = 0,33, F = 44$

όπου A και B η οξύτητα και η βασικότητα αντίστοιχα ως προς το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, S η διπολικότητα/πολωσιμότητα, E η πλεονάζουσα μοριακή διάθλαση και V ο μοριακός όγκος McGowan.

Ας σημειωθεί ότι οι συντελεστές των παραμέτρων είναι παρόμοιοι με αυτούς όπου προκύπτουν από την αντίστοιχη ανάλυση των τιμών $\log P$. Η εξίσωση (I-29) περιλαμβάνεται στο λογισμικό Pharma Algorithms^{57,58} και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης. Η σολβατοχρωμική ανάλυση εφαρμόστηκε και στην παρούσα διατριβή δεδομένου ότι αποτελεί μια χρήσιμη μέθοδο για τη σύγκριση φαινομένων που λαμβάνουν χώρα σε συμπυκνωμένη φάση, όπως η κατανομή, η χρωματογραφική συγκράτηση κλπ.

Οι Barbato και συν συνέκριναν τη συγκράτηση σε στήλες HSA και AGP με διαφορετικές κλίμακες λιποφιλίας ($\log P, \log D$) και δεδομένα συγκράτησης σε στήλες IAM με αντικρουόμενα αποτελέσματα^{232,247}. Οι ερευνητές θεώρησαν καταλληλότερα τα χρωματογραφικά δεδομένα IAM, δεδομένου ότι εκφράζουν πέρα των υδρόφοβων και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Στη μελέτη που αφορούσε οκτώ ανταγωνιστές ασβεστίου, παράγωγα της διυδροπυριδίνης (dihydropyridine, DHP) έδειξαν πως η συγγένεια των ουδέτερων αναλόγων για την HSA και την AGP είναι στενά συνδεδεμένη με τη λιποφιλία εκφρασμένη ως $\log P$, ενώ δεν συσχετίζεται με τους

χρωματογραφικούς δείκτες IAM²⁴⁷. Αντιθέτως, για οκτώ παράγωγα όξινων και αμφολυτικών κινολονών δεν βρέθηκαν καλές συσχετίσεις της πρωτεϊνικής σύνδεσης με τις τιμές logP και logD, ενώ η συγκράτηση ειδικότερα σε στήλη AGP έδωσε καλύτερες συσχετίσεις με τα δεδομένα IAM. Από την άλλη για τα ίδια παράγωγα παρατηρήθηκε ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της συγκράτησης στη στήλη AGP και HSA²³¹:

$$\log k_w^{AGP} = 1,22(\pm 0,23)\log k_w^{HSA} - 0,33(\pm 0,15) \quad (I-30)$$

$$n = 9, r = 0,898, s = 0,194$$

Η ύπαρξη καλής συσχέτισης αποτελεί ένδειξη ότι οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις αλληλεπιδράσεις στην HSA και την AGP είναι παρόμοιοι, αν και ο μικρός αριθμός των ενώσεων δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Αντίστοιχη καλή συσχέτιση μεταξύ $\log k_w^{HSA}$ και $\log k_w^{AGP}$ έχει επίσης αναφερθεί στην περίπτωση 8 παραγώγων σεληνίου, ορισμένα από τα οποία έχουν βασικές ή αμφολυτικές ιδιότητες²⁴⁸.

3.16 Συσχέτιση βιομιμητικών χρωματογραφικών δεικτών με την πρωτεϊνική σύνδεση

Η συσχέτιση των χρωματογραφικών δεδομένων με την πρωτεϊνική σύνδεση έχει τεκμηριωθεί με αρκετές σχετικές μελέτες^{229,238,249}, αν και δεν έχουν προταθεί οι βέλτιστες συνθήκες για την καλύτερη προσομοίωση των βιολογικών διεργασιών. Οι χρωματογραφικοί δείκτες HSA έχουν δώσει αρκετά καλές συσχετίσεις με την πρωτεϊνική σύνδεση όπως προσδιορίζεται με τις συμβατικές μεθόδους, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτείται και η εισαγωγή επιπλέον παραμέτρων για τη βελτίωση της συσχέτισης. Οι Beaudry και συν²⁵⁰ μελέτησαν τη συγκράτηση σε στήλη HSA 40 δομικά διαφορετικών ενώσεων με μεγάλο εύρος συγγένειας ως προς την πρωτεΐνη. Η άμεση συσχέτιση του παράγοντα χωρητικότητας k με τις τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης στο πλάσμα (%PPB) από άμεσα πειράματα προσδιορισμού οδήγησε στην εξίσωση (I-31), η οποία βελτιώθηκε ακόμα περαιτέρω με την εισαγωγή του κανονικοποιημένου εύρους κορυφής ως δεύτερης ανεξάρτητης μεταβλητής μεταξύ της και των τιμών %PPB, βλ. εξίσωση (I-32):

$$\frac{k}{k+1} = 0,01\%PPB + 0,08 \quad (I-31)$$

$$n = 40, r = 0,894$$

$$\%PPB = 45,88\left(\frac{k}{k+1}\right) + 51,13D + 2,79 \quad (I-32)$$

$$n = 40, r = 0,908$$

όπου: $D = \frac{w/wref}{(w/wref) + 1}$, w το εύρος κορυφής και wref το εύρος κορυφής πρότυπης ένωσης.

Οι Valkó και συν²⁴⁵ ανέπτυξαν περαιτέρω μια αυτοματοποιημένη μέθοδο HPLC για τον προσδιορισμό της σύνδεσης των μορίων σε HSA, στηριζόμενοι στην παράμετρο CHI, την οποία οι ίδιοι ερευνητές έχουν προτείνει για την αντιστροφή φάσεως χρωματογραφία¹⁴⁵ (βλ. §2.8).

Οι Reilly και συν²⁵¹ χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία της Valkó²⁴⁵ κατασκεύασαν καμπύλες αναφοράς με 11 πρότυπες φαρμακευτικές ενώσεις για τη σύνδεση σε HSA ($r^2=0,984$) και RSA ($r^2=0,973$), τις οποίες ακολούθως εφάρμοσαν στη βιβλιοθήκη ενώσεων της Novartis για μαζικό screening και κατάταξη των ενώσεων ως προς την πρωτεϊνική σύνδεση.

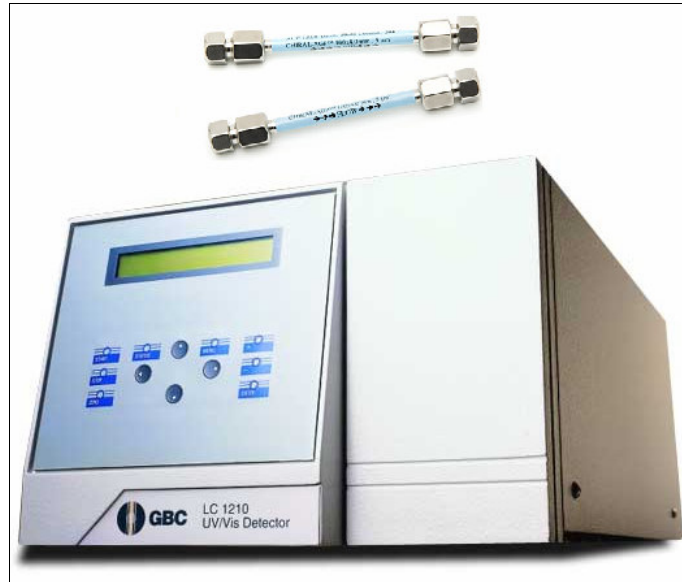
Για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής (VD) έχει προταθεί συνδυασμός της χρωματογραφίας HSA με τα χρωματογραφία IAM, δεδομένου ότι η φαρμακοκινητική αυτή παράμετρος καθορίζεται από τη διαπερατότητα των βιολογικών μεμβρανών και από την πρωτεϊνική σύνδεση. Στη βιβλιογραφία²⁵² αναφέρεται η εξίσωση (I-33) η οποία περιλαμβάνει επίσης τα όξινα και βασικά pK_a των ενώσεων:

$$\log VD = 0,30(\pm 0,03)\log K^{IAM} - 0,12(\pm 0,02)\log K^{HSA} + 0,08(\pm 0,01)pK_a^{acid\ class} + 0,02(\pm 0,01)pK_a^{base\ class} - 0,45 \quad (I-33)$$

$$n = 179, r^2 = 0,80, s = 0,30, F = 177$$

Η διερεύνηση της συγκράτησης σε βιομιμητικές στήλες και η εφαρμογή των δεδομένων για την εκτίμηση των αντίστοιχων βιολογικών διεργασιών συγκεντρώνει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον και απασχόλησε και τμήμα της παρούσης διατριβής.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν στο Θεωρητικό Μέρος παρά την πληθώρα υπολογιστικών συστημάτων για την εκτίμηση της λιποφιλίας, στην περίπτωση ανάπτυξης νέων χημειοτύπων στο σχεδιασμό των φαρμάκων οι προβλέψεις δεν είναι επιτυχείς δεδομένου ότι η ιδιότητα αυτή αποτελεί το αποτέλεσμα των ενδο- και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, που είναι δύσκολο να κωδικοποιηθούν με αξιοπιστία. Ως εκ τούτου συχνά ο φαρμακοχημικός αντιμετωπίζει το φαινόμενο τα διάφορα υπολογιστικά συστήματα να οδηγούν σε διαφορετικές τιμές $\log P$ για μια σειρά ενώσεων^{24,36}. Στην περίπτωση της πρόβλεψης του $\log D$ επιπλέον πηγές σφαλμάτων (όπως ο βαθμός ιονισμού και η επίδραση των ιοντικών ζευγών με τα αντισταθμιστικά ιόντα των ρυθμιστικών διαλυμάτων) καθιστούν τις προβλέψεις ακόμα πιο αμφισβητήσιμες, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις υψηλού ιονισμού. Εξάλλου τίθεται το ερώτημα εάν οι ισχύοντες προσθετικοί κανόνες της λιποφιλίας για τις ουδέτερες ενώσεις μπορούν να εφαρμοστούν και στην περίπτωση ιονιζόμενων μορφών²⁵³. Για το λόγο αυτό είναι σημαντική η δημιουργία επιμέρους μοντέλων (local models) στα πλαίσια σειράς δομικά συγγενών ενώσεων που αποτελούν νέους χημειότυπους, τα οποία μοντέλα θα ανταποκρίνονται στα επιμέρους δομικά χαρακτηριστικά και επιπλέον μπορούν να επανατροφοδοτήσουν και τα υπάρχοντα υπολογιστικά συστήματα.

Αντίστοιχα, η προσομοίωση της κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού με χρωματογραφικές μεθόδους ως εναλλακτικές τεχνικές για το γρήγορο προσδιορισμό της λιποφιλίας, παρά τις προσπάθειες προτυποποίησης των χρωματογραφικών συνθηκών, επίσης δεν είναι πάντα ικανοποιητική στην περίπτωση δομικά συγγενών ενώσεων με σκελετό που βασίζεται σε νέους χημειότυπους. Και σε αυτήν την περίπτωση τα γενικά μοντέλα δεν είναι πάντα κατάλληλα για να αντιμετωπίσουν προβλήματα που ανακύπτουν από την παρουσία συγκεκριμένων δομικών χαρακτηριστικών.

Τα προβλήματα αυτά απασχολούν την πρώτη ενότητα της παρούσης διατριβής, η οποία αφορά στη διερεύνηση της λιποφιλίας σειράς υποκατεστημένων παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος, τα οποία εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι της αναγωγής της αλδόζης. Σκοπός της μελέτης είναι:

1) ο έλεγχος της αξιοπιστίας των υπολογιστικών συστημάτων και η αποτελεσματικότητά τους έναντι των πειραματικών τιμών κατά την εφαρμογή τους σε επιμέρους μοντέλα Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (QSAR) και

2) η εύρεση των καταλληλότερων χρωματογραφικών συνθηκών για τον προσδιορισμό δεικτών λιποφιλίας στα πλαίσια των συγκεκριμένων ενώσεων και η σύγκριση με τις πρότυπες συνθήκες που προτείνονται στη βάση γενικότερων μοντέλων προσομοίωσης της κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού με χρωματογραφικές τεχνικές.

Πέραν της λιποφιλίας, η εφαρμογή χρωματογραφικών τεχνικών αποτελεί γενικότερα μια υποσχόμενη προοπτική για τη γρήγορη εκτίμηση ιδιοτήτων ADME. Οι υπάρχουσες μελέτες είναι λιγότερο συστηματικές και αφορούν κυρίως στη διαπερατότητα μέσω της χρωματογραφίας IAM, ενώ αντίστοιχη έρευνα στρέφεται τελευταία και ως προς την εκτίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης μέσω χρωματογραφίας συγγένειας.

Η δεύτερη ενότητα της διατριβής εστιάζεται στη βιομιμητική χρωματογραφία. Η μελέτη των παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος επεκτείνεται χρησιμοποιώντας χρωματογραφία IAM, οι χρωματογραφικοί δείκτες IAM συγκρίνονται με τις συμβατικές παραμέτρους λιποφιλίας και εξάγονται οι επιμέρους συσχετίσεις. Επιπλέον τα παράγωγα του πυρρολίου χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου γενικότερων μοντέλων που προτείνονται για τη σχέση της συγκράτησης σε στατική φάση IAM με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού.

Ακολουθεί η εφαρμογή της βιομιμητικής χρωματογραφίας IAM για την εξαγωγή μοντέλων διαπερατότητας και την εκτίμηση της από του στόματος απορρόφησης χρησιμοποιώντας χρωματογραφικά δεδομένα προηγούμενων μελετών που αφορούν σε δομικά διαφορετικές φαρμακευτικές ενώσεις. Η χρωματογραφία IAM ως εναλλακτική τεχνική για την προσομοίωση της από του στόματος απορρόφησης αξιολογήθηκε συγκριτικά με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού και με διατάξεις κυτταρικών σειρών MDCK (δεδομένα από τη βιβλιογραφία). Το τελικό μοντέλο εφαρμόστηκε στη σειρά των ενώσεων του πυρρολυλ-οξικού οξέος και αντίστοιχων βιοισοστερών παραγώγων της διφθοροφαινόλης για την εκτίμηση της από του στόματος απορρόφησης.

Για την προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε βιομιμητική χρωματογραφία συγγένειας με στατικές φάσεις που ενσωματώνουν την ανθρώπινη

αλβουμίνη του ορού και την α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος (στήλες HSA και AGP). Δεδομένου ότι στην περίπτωση των στηλών αυτών δεν υπάρχει συστηματική έρευνα ως προς τις συνθήκες που οδηγούν σε βέλτιστη προσομοίωση μελετήθηκε σειρά δομικά μη συγγενών φαρμακευτικών μορίων με γνωστή % πρωτεϊνική σύνδεση, εφαρμόζοντας διαφορετικές συνθήκες κινητής φάσης. Οι πρότυπες εξισώσεις αναφοράς εφαρμόστηκαν περαιτέρω για την εκτίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης των παραγώγων του πυρρολίου σε μια περισσότερο ολιστική προσέγγιση του φυσικοχημικού/βιολογικού προφίλ των ενώσεων.

ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ, ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΔΟΖΗΣ. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ/ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΣΕ ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΔΟΜΗΣ-ΔΡΑΣΗΣ

Α. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΤΙΜΩΝ logP ΚΑΙ logD ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

1. Εισαγωγή-Δομικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες των υπό μελέτη ενώσεων

Ο διαβήτης αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας στη σύγχρονη εποχή, καθώς η εξάπλωσή του έχει τριπλασιαστεί τα τελευταία 25 χρόνια^{254,255,256}. Η αναγωγή της αλδόζης (Aldose Reductase, AR) αποτελεί ένα ένζυμο-στόχο για την ανάπτυξη ενώσεων, οι οποίες είναι δυνατόν να δράσουν θεραπευτικά στην αντιμετώπιση των χρόνιων επιπλοκών του σακχαρώδους διαβήτη, όπως νευροπάθεια, νεφροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια και αγγειακά νοσήματα. Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μεταβολική ασθένεια, χαρακτηριζόμενη από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης ή παντελούς έλλειψης έκκρισης ινσουλίνης, είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυτάρων του σώματος στην ινσουλίνη.

Η αναγωγή της αλδόζης αποτελείται από 316 αμινοξέα (MB=36kDa), ενώ ύστερα από μελέτες της κρυσταλλογραφικής της δομής διαπιστώθηκε ότι αποτελείται από ένα α/β barrel μοτίβο με πυρήνα 8 παράλληλων β -πτυχωτών ελασμάτων τα οποία συνδέονται με 8 περιφερειακά α -ελικοειδή τμήματα. Το ενεργό κέντρο της εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο των β -πτυχωτών ελασμάτων. Εξάλλου, σύμφωνα με κρυσταλλογραφικές μελέτες και πειράματα μοριακής προσομοίωσης των συμπλόκων των αναστολέων της αναγωγής της αλδόζης, τα απαραίτητα δομικά στοιχεία των αναστολέων της είναι^{257,258}:

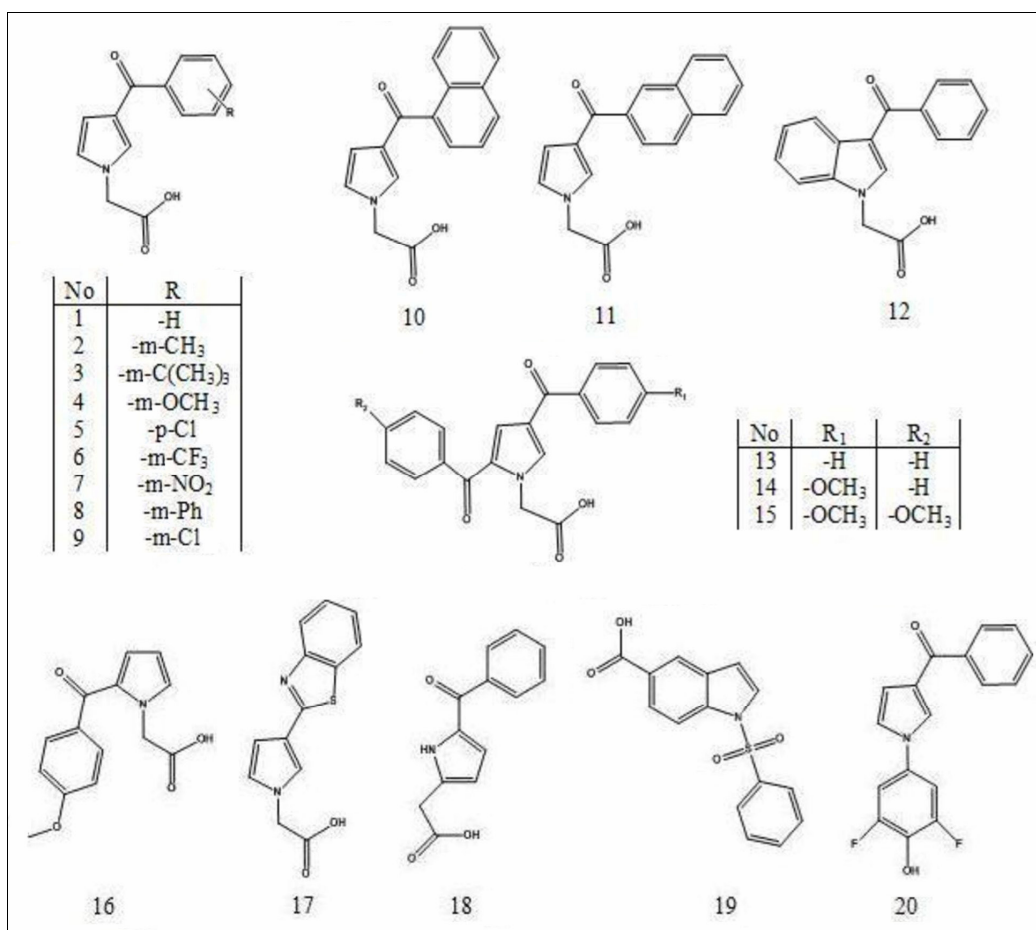
- α) ένα αρωματικό σύστημα δακτυλίων για το σχηματισμό υδρόφοβων ή π - π αλληλεπιδράσεων με τα υδρόφοβα αμινοξέα του ενεργού κέντρου,
- β) μια ιονιζόμενη ομάδα, όπως η καρβοξυλική και το κυκλικό ιμίδιο, που μπορεί να προσδεθεί στην ανιονική περιοχή.

Ένα πεδίο προς διερεύνηση αποτελεί η ευκαμψία του υποδοχέα, καθώς έχουν παρατηρηθεί περισσότερες διαμορφώσεις κατά τη σύνδεση των ενώσεων στον υποδοχέα²⁵⁹. Η περιοχή σύνδεσης των διαφόρων προσδεμάτων της αναγωγής της αλδόζης φαίνεται πως αποτελείται από μια περιοχή που η διαμόρφωσή της διατηρείται σχεδόν πάντα σταθερή και μια άλλη που εμφανίζει ιδιαίτερη ευκαμψία ως

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
 Α. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΤΙΜΩΝ logP ΚΑΙ logD
 ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

προς τη διαμόρφωσή της στο χώρο, οδηγώντας σε αμφισβητήσεις όσον αφορά την αξιοπιστία των 3D μελετών docking²⁶⁰.

Η σειρά των ενώσεων που μελετήθηκε περιλαμβάνει: 16 υποκατεστημένα παράγωγα του πυρρολ-1-υλ-οξικού οξέος (ενώσεις 1 έως 11 και 13 έως 17), ένα παράγωγο του πυρρολ-2-υλ-οξικού οξέος (ένωση 18), δυο παράγωγα του ινδολίου (ενώσεις 12 και 19) και ένα παράγωγο του πυρρολίου, το οποίο στη θέση του οξικού οξέος φέρει τη βιοϊσοστερή ομάδα της διφθοροφαινόλης (ένωση 20). Οι ενώσεις αυτές, οι οποίες θα αναφέρονται ως σειρά ενώσεων I, παρασκευάστηκαν και ταυτοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και η δομή τους απεικονίζεται στο Σχήμα ΠΑ-1^{261,262,263,264}.



Σχήμα ΠΑ-1. Σειρά ενώσεων I.

Οι ενώσεις αυτές περιλαμβάνουν τα προαναφερθέντα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά και έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν ενδιαφέρουσα ανασταλτική

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
Α. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΤΙΜΩΝ logP ΚΑΙ logD
ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

δράση έναντι της αναγωγής της αλδόζης σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις^{265,266}. Περισσότερο δραστικές εμφανίζονται οι ενώσεις 14 και 15, με δράση ανάλογη με γνωστούς αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης όπως η επαλρεστάτη, η τολρεστάτη, η ζοπολρεστάτη, η ποναλρεστάτη, η σορβινίλη, η ιμιρεστάτη και η φινταρεστάτη. Το νιτροπαράγωγο (ένωση 7) εμφανίζει τη μικρότερη δραστικότητα, ενώ οι ενώσεις 10 και 11 παρότι είναι ισομερή θέσεως εμφανίζουν σημαντική διαφορά σε ότι αφορά τη δραστικότητά τους, Η ένωση 20, η οποία περιέχει αντί καρβοξυλίου την επίσης όξινη βιοϊσοστερή ομάδα διφθοροφαινόλης, εμφανίζει αρκετά υψηλή δραστικότητα, όπως άλλωστε και η ένωση 17, πιθανόν ως αποτέλεσμα της αντικατάστασης της κετο-καρβονυλομάδας με την ομάδα θειαζολίου²⁶⁷. Η βιολογική δράση που προκαλείται από συγκέντρωση των ενώσεων 10^{-6} M στους φακούς επίμυων εκφρασμένη ως % αναστολή και οι αντίστοιχες τιμές logit (βλ. §2.5.3) αναφέρονται στον Πίνακα ΠΑ-1.

Πίνακας ΠΑ-1. Ποσοστό δραστικότητας αναστολής της αναγωγής της αλδόζης σε συγκέντρωση 10^{-6} M και τιμές logit.

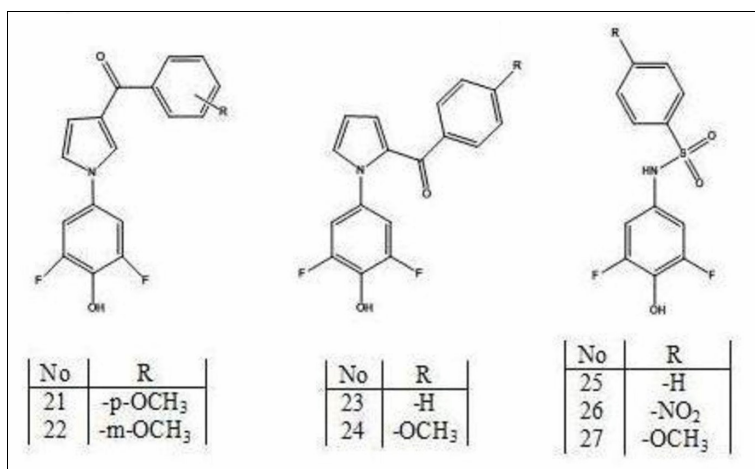
No	% αναστολή	logit
1	27(±2,0)	-0,432
2	46(±2,5)	-0,070
3	41(±4,3)	-0,158
4	72(±6,5)	0,410
5	41(±3,5)	-0,158
6	47(±6,0)	-0,052
7	18(±5,6)	-0,658
8	76(±0,5)	0,501
9	44(±3,0)	-0,105
10	58(±2,5)	0,140
11	79(±5,5)	0,575
12	38(±3,8)	-0,213
13	82(±1,5)	0,658
14	93(±7,0)	1,123
15	96(±0,5)	1,380
16	-	-0,389
17	80(±4,0)	0,602
18	-	1,380
20	68(±0,5)	0,327

Οι ανωτέρω ενώσεις μελετήθηκαν διεξοδικά ως προς τη λιποφιλία τους χρησιμοποιώντας υπολογιστικές και πειραματικές μεθόδους. Οι δείκτες λιποφιλίας

αξιολογήθηκαν ως προς την καταλληλότητά τους να συσχετιστούν με την ανασταλτική δράση ως προς την αναγωγή της αλδόζης.

Οι ίδιες ενώσεις καθώς και επτά επιπλέον παράγωγα της διφθοροφαινόλης, τα οποία θα αναφέρονται ως σειρά ενώσεων II, μελετήθηκαν επίσης χρησιμοποιώντας βιομιμητική χρωματογραφία. Τα αποτελέσματα της βιομιμητικής χρωματογραφίας των σειρών ενώσεων I και II εφαρμόστηκαν περαιτέρω για την εκτίμηση της διαπερατότητας και πρωτεϊνικής σύνδεσης στη βάση μοντέλων που εξήχθησαν χρησιμοποιώντας δομικώς μη συγγενή φάρμακα με γνωστές τιμές % απορρόφησης και % πρωτεϊνικής σύνδεσης (βλ. δεύτερη ενότητα).

Η σειρά ενώσεων II περιλαμβάνει τέσσερα παράγωγα του πυρρολίου, τα οποία φέρουν τη βιοϊσοστερή ως προς το καρβοξύλιο ομάδα της διφθοροφαινόλης (ενώσεις 21 έως 24) και τρία βενζολοσουλφοναμίδια, τα οποία επίσης φέρουν την ομάδα της διφθοροφαινόλης (ενώσεις 25 έως 27). Οι ενώσεις αυτές παρασκευάστηκαν και ταυτοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης ως αναστολείς της αναγωγής της αλδόζης και η δομή τους απεικονίζεται στο Σχήμα ΠΑ-2^{264,265}.



Σχήμα ΠΑ-2. Σειρά ενώσεων II.

2. Προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού/κατανομής

Τα υπό μελέτη παράγωγα του πυρρολυλ-οξικού οξέος (ενώσεις 1 έως 18) διαθέτουν μια κετο-καρβονυλομάδα, η οποία προσδένεται στον πυρρολικό πυρήνα ως γέφυρα

με τον υποκατεστημένο φαινολικό δακτύλιο, δημιουργώντας ένα συζυγιακό σύστημα. Θεωρώντας πως ένα τέτοιο δομικό περιβάλλον συνηγορεί για ενδεχόμενες σημαντικές ηλεκτρονιακές επιδράσεις στη λιποφιλία, οι οποίες δεν λαμβάνονται υπόψη στα διαφορά υπολογιστικά συστήματα, θεωρήθηκε ενδιαφέρον να προσδιοριστεί πειραματικά η τιμή των συντελεστών μερισμού ($\log P$) και κατανομής σε pH 7,4 ($\log D_{7,4}$) και να συγκριθούν με τις αντίστοιχες υπολογιστικές τιμές που προκύπτουν από διάφορα ευρέως χρησιμοποιούμενα λογισμικά. Τα πειράματα κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού έγιναν με τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης.

2.1 Υλικά και μέθοδοι

2.1.1 Οργανολογία

Η ανακίνηση πραγματοποιήθηκε σε ειδικά θερμοστατούμενα φιαλίδια χωρητικότητας 50ml προσαρμοσμένα σε μηχανική διάταξη έτσι ώστε να υποβάλλονται σε εκκρεμοειδή κίνηση. Η θερμοκρασία του συστήματος διατηρείτο σταθερή στους 25°C με τη βοήθεια κυκλοφορητή ύδατος. Για τη διάλυση των ουσιών χρησιμοποιήθηκε λουτρό υπερήχων Transsonic 460 της εταιρίας Elma. Η φυγοκέντρηση των δειγμάτων έγινε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο της εταιρίας Hettich μοντέλο Universal 32R. Για την ανάλυση της υδατικής φάσης χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC που αποτελείτο από μία αντλία GBC μοντέλο 1126 και σύστημα έγχυσης Rheodyne 7725i, στο οποίο συνδέθηκε βρόχος εισαγωγής δείγματος όγκου 5μl. Ο ανιχνευτής ήταν υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) GBC μοντέλο LC 1210 και ρυθμίστηκε στα 254nm. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα WinChrom v.1.3 junior. Για την απαέρωση της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε σύστημα απαέρωσης Millipore (Waters) και φίλτρα με μέγεθος πόρων 0,2μm. Για την ανάδευση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε συσκευή Vortex της εταιρίας Velp Scientifica.

2.1.2 Αντιδραστήρια

Η οκτανόλη ήταν καθαρότητας αναλυτικού βαθμού (analytical-grade) της εταιρίας PANREAC, ενώ η μεθανόλη ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC-grade) της εταιρίας Lab-Scan. Το νερό ήταν απιονισμένο και καθαρισμένο μέσω του συστήματος παραγωγής νερού Milli-Q Plus (Millipore). Ως υδατική φάση χρησιμοποιήθηκαν τριών ειδών ρυθμιστικά διαλύματα, τα οποία αναφέρονται παρακάτω μαζί με τις μεθόδους παρασκευής τους, οι οποίοι λήφθηκαν από την Ελληνική Φαρμακοποιία²⁶⁸:

α) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 3,0 (phosphate buffer, PB_{3,0}):

Ζυγίστηκαν 3,40g KH_2PO_4 τα οποία διαλύθηκαν σε 900ml νερού. Ακολούθησε ρύθμιση του pH με προσθήκη διαλύματος H_3PO_4 μέχρι το pH 3,0 και στη συνέχεια αραιώση στα 1000ml με προσθήκη νερού.

β) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (phosphate buffer, PB_{7,4}):

Σε 500ml KH_2PO_4 0,1M προστέθηκαν 391ml διαλύματος NaOH 0,1M και ακολούθησε αραιώση στα 1000ml με νερό. Το διάλυμα KH_2PO_4 0,1M παρασκευάστηκε με διάλυση 13,61g KH_2PO_4 σε 1000ml νερού.

γ) ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (phosphate buffer saline, PBS_{7,4}):

Παρασκευάστηκε κατά τον ίδιο τρόπο με το PB_{7,4} με επιπλέον προσθήκη 2,01g KCl και 8,02g NaCl, ώστε η συγκέντρωση τους στον τελικό όγκο κινητής φάσης να είναι 0,027M και 0,137M αντίστοιχα.

2.1.3 Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού σε pH 3,0 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση PB ως υδατική φάση, ενώ ο προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής σε pH 7,4 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση: α) PB, όπου $[\text{K}^+] + [\text{Na}^+] = 0,058\text{M}$ και β) PBS, όπου $[\text{K}^+] + [\text{Na}^+] = 0,157\text{M}$ ως υδατική φάση, αντίστοιχα.

Η οκτανόλη και το ρυθμιστικό διάλυμα αλληλοκορέννεται σε διαχωριστική χοάνη με ελαφρά ανατάραξη, προς αποφυγή σχηματισμού μικκυλίων και αφήνονται σε ηρεμία για 24 ώρες. Ελέγχεται η διαύγεια των δύο φάσεων και παραλαμβάνονται οι δυο φάσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την περαιτέρω εργασία. Παρασκευάζεται διάλυμα παρακαταθήκης $1,00 \times 10^{-5}\text{M}$ της κάθε ουσίας στο ρυθμιστικό διάλυμα

κορεσμένο σε οκτανόλη. Στην περίπτωση που παρατηρήθηκε ίζημα σε pH 3,0 ελήφθη το υπερκείμενο διάλυμα. Με κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάζονται τα διαλύματα εργασίας Α, Β, Γ και Δ ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεων περίπου $1,00 \times 10^{-6}$ M (Α), $2,00 \times 10^{-6}$ M (Β), $3,00 \times 10^{-6}$ M (Γ) και $4,00 \times 10^{-6}$ M (Δ). Οι κατάλληλες αναλογίες όγκων υδατικής φάσης/οκτανόλης επιλέγονται με βάση την αναμενόμενη τιμή του συντελεστή μερισμού/κατανομής Σε pH 3,0 (όπου οι ενώσεις είναι πρακτικά αδιάστατες) χρησιμοποιήθηκε αναλογία όγκων $V_{\text{υδατ}}/V_{\text{οργ}}=40/0,3$, ενώ σε pH 7,4 (όπου λόγω του ιονισμού οι ουσίες είναι υδρόφιλες) η αναλογία ήταν $V_{\text{υδατ}}/V_{\text{οργ}}=10/15$. Η μηχανική ανακίνηση διαρκούσε 90min. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 2500g/min για 15min.

Αναλύθηκε η υδατική φάση πριν και μετά την ανακίνηση με RP-HPLC. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε στήλη Thermo Hypersil-Keystone BDS 5 μ m (250x4,6mm i.d.). Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν μίγματα μεθανόλης-PB_{7,4} με περιεκτικότητα σε μεθανόλη από 60 έως 70%, ανάλογα με τη λιποφιλία της υπό μελέτη ένωσης. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στο 1,0ml/min. Κάθε δείγμα ενίεται εις τριπλούν και μετρείται το εμβαδόν της κυρίας κορυφής. Η διαφορά στα εμβαδά ήταν της τάξεως του 0,001%. Ο συντελεστής μερισμού/κατανομής για την κάθε ένωση υπολογίζεται μέσω της σχέσης (IIA-1) και μετατρέπεται στη λογαριθμική του μορφή:

$$P(D) = \left(\frac{A_{\text{αρχ}} - A_{\text{τελ}}}{A_{\text{τελ}}} \right) \frac{V_{\text{υδατ}}}{V_{\text{οργ}}} \quad (\text{IIA-1})$$

όπου $A_{\text{αρχ}}$ το εμβαδόν της κορυφής στο χρωματογράφημα πριν την ανακίνηση, $A_{\text{τελ}}$ το εμβαδόν της κορυφής στο χρωματογράφημα μετά την ανακίνηση, $V_{\text{υδατ}}$ ο όγκος της υδατικής φάσης και $V_{\text{οργ}}$ ο όγκος της οργανικής φάσης. Για κάθε ένωση και κάθε pH πραγματοποιήθηκαν τρεις τουλάχιστον προσδιορισμοί και λήφθηκαν οι μέσοι όροι. Οι τιμές των συντελεστών μερισμού-κατανομής αναφέρονται στον Πίνακα IIA-2.

Πίνακας ΠΑ-2. Πειραματικές τιμές logP και logD_{7,4}.

No	logP	logD _{7,4(PB)}	logD _{7,4(PBS)}
1	0,92	-1,71	-0,85
2	1,27	-0,81	-0,19
3	2,60	-0,05	0,00
4	1,57	-1,76	-0,96
5	1,95	-0,65	-0,29
6	2,00	-0,28	-0,05
7	0,93	-1,43	-0,72
8	2,54	-0,72	-0,33
9	1,97	-0,58	-0,39
10	1,97	-0,74	-0,24
11	2,27	-0,73	-0,23
12	2,57	-0,72	-0,10
13	2,12	-0,63	-0,51
14	2,59	-0,13	0,12
15	3,15	0,17	0,39
16	1,65	-1,51	-0,87
17	2,22	-0,81	-0,35
18	1,87	-1,16	-0,67

2.2 Υπολογισμός του συντελεστή μερισμού

Για τον υπολογισμό των συντελεστών μερισμού χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά προγράμματα τα οποία αναφέρονται στη συνέχεια μαζί με τα συστήματα που κωδικοποιούν:

1) Λογισμικό πρόγραμμα ClogP 4.0 της εταιρίας Biobyte: σύστημα θραυσμάτων του Leo-Hansch.

2) Λογισμικό πακέτο PALLAS 3.3.2.4 της εταιρίας CompuDrug, στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εφαρμογές:

α) PrologP(CDR): σύστημα θραυσμάτων του Rekker,

β) PrologP(Atomic6): σύστημα ατομικών συνεισφορών των Ghose-Crippen,

γ) PrologP(Atomic): σύστημα ατομικών συνεισφορών του Broto,

δ) PrologP(ANN): επιλογή Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων με δεδομένα εισαγωγής το σύστημα ατομικών συνεισφορών των Ghose-Crippen.

ε) PrologP(ANN₀₅): επικαιροποιημένο μοντέλο Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων.

3) Λογισμικό πακέτο ADME Boxes 3.0 της εταιρίας Pharma Algorithms: εφαρμογή ABlogP, η οποία αποτελεί συνδυασμό θραυσμάτων Leo-Hansch, διορθωτικών παραγόντων και κανόνων ομοιότητας.

4) Σύστημα AlogPs 2.1: εφαρμογή Συσχετιζόμενων Νευρωνικών Δικτύων με δεδομένα εισαγωγής ηλεκτροτοπολογικούς δείκτες, η οποία είναι διαθέσιμη στο διαδίκτυο στη διεύθυνση <http://146.107.217.178/lab/alogsps/index.html> από το Virtual Computational Chemistry Laboratory.

Για τον υπολογισμό του logD_{7,4} χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά πακέτα PALLAS 3.3.2.4 και ADME Boxes 3.0. Ο υπολογισμός βασίζεται στον υπολογισμό του logP και pK_a, ενώ λαμβάνεται υπόψη και ο σχηματισμός ιοντικών ζευγών. Στην περίπτωση του λογισμικού πακέτου PALLAS η επιλογή PrologD ενσωματώνει αλγόριθμο που βασίζεται σε εξισώσεις γραμμικών σχέσεων ελεύθερης ενέργειας (Linear Free Energy Relationships, LFER) και επιτρέπει τον υπολογισμό του logD για διαφορετικές συγκεντρώσεις των αντισταθμιστικών ιόντων [K⁺/Na⁺] και [Cl⁻]²⁶⁹. Η τιμή [K⁺/Na⁺] ρυθμίστηκε σε 0,057 και 0,157M για την προσομοίωση των ρυθμιστικών διαλυμάτων PB_{7,4} και PBS_{7,4} αντίστοιχα. Στο λογισμικό ADME Boxes θεωρείται σταθερή συγκέντρωση KCl ίση με 0,157M. Οι υπολογιστικές τιμές των συντελεστών μερισμού logP και κατανομής logD_{7,4} που προέκυψαν από τα διαφορετικά λογισμικά προγράμματα αναφέρονται στους Πίνακες ΠΑ-3 έως ΠΑ-5.

Πίνακας ΠΑ-3. Υπολογιστικές τιμές logP.

No	CDR	AT	AT6	ANN	ANN ₀₅	ClogP	ABlogP	AlogPs
1	1,15	1,99	1,99	1,28	1,40	1,82	0,35	2,37
2	1,67	2,41	2,61	1,53	2,18	2,32	0,76	2,70
3	3,23	3,87	3,69	3,29	3,41	3,64	1,98	4,05
4	1,22	2,12	2,07	1,37	1,77	1,93	0,36	2,44
5	1,89	2,61	2,68	2,07	2,32	2,55	0,98	3,00
6	2,30	2,97	2,87	2,55	2,71	2,78	1,31	3,43
7	0,89	1,95	1,96	1,58	1,89	1,67	0,16	2,15
8	3,10	3,90	3,97	3,19	3,00	3,71	2,04	3,97
9	1,89	2,61	2,67	1,89	2,14	2,55	1,02	3,00
10	2,42	3,11	3,21	2,34	2,24	2,99	1,60	3,52
11	2,42	3,11	3,21	2,34	2,24	2,99	1,60	3,52
12	2,55	3,11	3,25	1,97	2,54	3,20	1,60	3,40
13	2,42	3,01	3,53	1,73	3,22	3,02	2,17	3,39
14	2,49	3,14	3,60	2,09	3,46	3,09	2,18	3,27
15	2,56	3,27	3,67	2,42	3,79	3,15	2,19	3,05
16	1,22	1,85	2,10	1,44	2,22	1,93	1,59	2,26
17	1,76	0,45	2,32	2,12	2,77	2,68	1,87	2,80
18	1,44	1,50	2,21	2,07	1,87	1,47	1,47	2,18

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
Α. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΤΙΜΩΝ $\log P$ ΚΑΙ $\log D$
ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Πίνακας ΠΑ-4. Υπολογιστικές τιμές $\log D_{7,4}$ για $[K^+/Na^+]=0,058M$.

No	CDR	AT	AT6	ANN	ANN ₀₅
1	-1,99	-1,30	-1,16	-1,56	-1,89
2	-1,49	-0,88	-0,56	-1,62	-1,11
3	0,04	0,58	0,51	0,10	0,13
4	-1,94	-1,18	-1,11	-1,79	-1,53
5	-1,30	-0,71	-0,53	-1,12	-1,00
6	-0,90	-0,36	-0,35	-0,66	-0,62
7	-2,30	-1,40	-1,26	-1,62	-1,46
8	-0,09	0,67	0,70	0,01	-0,29
9	-1,30	-0,71	-0,54	-1,31	-1,18
10	-0,76	-0,19	0,02	-0,84	-1,06
11	-0,76	-0,19	0,02	-0,84	-1,06
12	-0,63	-0,18	0,06	-1,20	-0,76
13	-0,93	-0,51	0,16	-1,60	-0,29
14	-0,86	-0,39	0,24	-1,23	-0,06
15	-0,78	-0,24	0,32	-0,89	0,29
16	-0,88	-2,37	-0,58	-2,26	-3,29
17	-1,37	-2,80	-0,82	-1,02	-0,48
18	-1,91	-2,01	-1,13	-0,70	-1,23

Πίνακας ΠΑ-5 . Υπολογιστικές τιμές $\log D_{7,4}$ για $[K^+/Na^+]=0,157M$

No	CDR	AT	AT6	ANN	ANN ₀₅	ABlogD
1	-1,95	-1,16	-1,13	-1,52	-1,74	-2,93
2	-1,45	-0,75	-0,53	-1,58	-0,98	-2,52
3	0,08	0,68	0,54	0,14	0,23	-1,30
4	-1,89	-1,04	-1,07	-1,74	-1,38	-2,92
5	-1,25	-0,58	-0,49	-1,08	-0,87	-2,50
6	-0,86	-0,23	-0,31	-0,62	-0,49	-1,97
7	-2,25	-1,24	-1,21	-1,57	-1,30	-3,12
8	-0,06	0,77	-0,73	0,03	-0,18	-1,24
9	-1,25	-0,58	-0,50	-1,26	-1,04	-2,26
10	-0,72	-0,07	0,05	-0,80	-0,93	-1,68
11	-0,72	-0,07	0,05	-0,80	-0,93	-1,68
12	-0,59	-0,07	0,09	-1,16	-0,63	-1,68
13	-0,87	-0,33	0,21	-1,54	-0,12	-1,11
14	-0,81	-0,21	0,29	-1,17	0,10	-1,10
15	-0,73	-0,07	0,37	-0,84	0,44	-1,09
16	-0,82	-1,93	-0,52	-2,20	-2,80	0,04
17	-1,84	-2,64	-1,07	-0,64	-0,37	-1,81
18	-1,33	-1,76	-0,78	-0,98	-1,01	-1,31

2.3 Υπολογισμός άλλων μοριακών ιδιοτήτων

Για τον υπολογισμό του pK_a των ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά πακέτα PALLAS 3.3.2.4 (εφαρμογή pKalc) και ADME Boxes 3.0.

Το τοπολογικό εμβαδόν πολικής επιφάνειας (Topological Polar Surface Area, TPSA) υπολογίστηκε με το λογισμικό πακέτο PALLAS 3.3.2.4.

Η οξύτητα και η βασικότητα ως προς το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου του Abraham (A και B) υπολογίστηκαν με την επιλογή Absolv του λογισμικού πακέτου ADME Boxes 3.0.

Οι θέσεις δεκτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου υπολογίστηκαν ως το σύνολο των ατόμων οξυγόνου και αζώτου στο μόριο.

Οι τιμές των ηλεκτρονιακών σταθερών σ του Hammett για τους υποκαταστάτες του φαινολικού δακτυλίου λήφθηκαν από πίνακες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία¹⁷.

Στον Πίνακα 1 στο Παράρτημα περιλαμβάνονται μόνο οι τιμές των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν σε τελικά μοντέλα.

2.4 Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση παλινδρόμησης στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο STATISTICA 7.1 της εταιρίας StatSoft. Οι εξισώσεις αξιολογούνται ως προς το συντελεστή συσχέτισης r , την τυπική απόκλιση s και το Fischer test F . Όπου χρειάζεται αναφέρεται η σημαντικότητα των παραμέτρων χρησιμοποιώντας το Student test t . Ως όριο ανοχής σφάλματος του υπολογισμού των εξισώσεων θεωρήθηκε το διπλάσιο της τυπικής απόκλισης ($2s$).

Στις περιπτώσεις που οι εξισώσεις περιλαμβάνουν περισσότερες από μια παραμέτρους στα στατιστικά στοιχεία περιλαμβάνεται και το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης προσαρμοσμένου ως προς τους βαθμούς ελευθερίας (r_{adj}^2).

Στις συσχετίσεις με τη βιολογική δράση αναφέρεται επίσης ο διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης (cross-validated correlation coefficient, r_{cv}^2) ο οποίος προέκυψε με τη μέθοδο εξαίρεσης μίας ένωσης τη φορά (leave one out).

Για την Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SIMCA-P 10.5 της εταιρίας Umetrics

AB. Ως στατιστικά στοιχεία ελήφθησαν ο συνολικός συντελεστής συσχέτισης (cumulative correlation coefficient, R^2) και ο διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης Q^2 ο οποίος προκύπτει με την εξαίρεση 7 ενώσεων τη φορά. Για την επισκόπηση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το διάγραμμα των συντεταγμένων (score plot) των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών και για τη σύγκριση των μεταβλητών το αντίστοιχο διάγραμμα των φορτίων (loading plot).

2.5 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Οι τιμές pK_a της καρβοξυλικής ομάδας υπολογίστηκε κοντά στην τιμή 4 και από τις δυο εφαρμογές που χρησιμοποιήθηκαν (βλ. Πίνακας 1, Παράρτημα). Συνεπώς, σε pH 3,0 ο ιονισμός είναι πρακτικά αμελητέος, ενώ σε pH 7,4 οι ενώσεις είναι πλήρως ιονισμένες. Στη δεύτερη περίπτωση η κατανομή αναμένεται να επηρεάζεται σημαντικά από τη συγκέντρωση των αντισταθμιστικών ιόντων. Για το λόγο αυτό σε pH 7,4 χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικής ιονικής ισχύος (PB και PBS).

Οι τιμές logP συσχετίστηκαν με τις τιμές $\log D_{7,4}$. Αν και οι διαφορές στις τιμές pK_a είναι μικρές και όλες οι ενώσεις αναμένεται να είναι πλήρως ιονισμένες σε pH 7,4 με σταθερή ως εκ τούτου μείωση της λιποφιλίας, η συσχέτιση μεταξύ των τιμών logP και $\log D_{7,4(PB)}$ είναι μέτρια, ενώ είναι ακόμη χαμηλότερη μεταξύ logP και $\log D_{7,4(PBS)}$, βλ. εξισώσεις (IIA-2) και (IIA-3):

$$\log D_{7,4(PB)} = 0,75(\pm 0,14)\log P - 2,29(\pm 0,29) \quad (\text{IIA-2})$$

$$n = 18, r = 0,804, s = 0,337$$

$$\log D_{7,4(PBS)} = 0,47(\pm 0,10)\log P - 1,29(\pm 0,21) \quad (\text{IIA-3})$$

$$n = 18, r = 0,764, s = 0,242$$

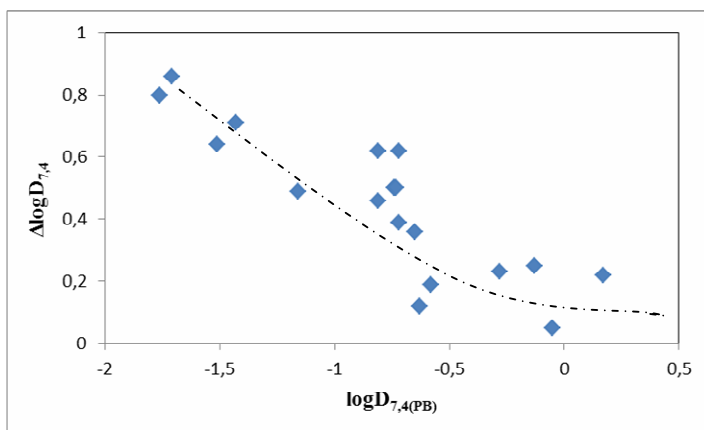
Οι μέτριες έως χαμηλές συσχετίσεις αποδόθηκαν σε μη συστηματική επίδραση του σχηματισμού ιοντικών ζευγών στην κατανομή των ενώσεων. Περαιτέρω ένδειξη της υπόθεσης αυτής αποτελεί η συσχέτιση των τιμών $\log D_{7,4(PBS)}$ έναντι των τιμών

$\log D_{7,4(PB)}$, η οποία οδηγεί στην εξίσωση (IIA-4) με ικανοποιητικά στατιστικά στοιχεία, αλλά με κλίση σημαντικά διαφορετική από τη μονάδα.

$$\log D_{7,4(PBS)} = 0,63(\pm 0,05)\log D_{7,4(PB)} + 0,15(\pm 0,05) \quad (\text{IIA-4})$$

$$n = 18, r = 0,946, s = 0,122$$

Η επίδραση της συγκέντρωσης των αντισταθμιστικών ιόντων στην κατανομή μπορεί να ελεγχθεί περαιτέρω κατασκευάζοντας το διάγραμμα των διαφορών $\Delta \log D_{7,4}$ [$\log D_{7,4(PBS)} - \log D_{7,4(PB)}$] έναντι των τιμών $\log D_{7,4(PB)}$. Σύμφωνα με το Σχήμα IIA-3, παρατηρείται μια τάση μείωσης της διαφοράς $\Delta \log D_{7,4}$ με την αύξηση των τιμών $\log D_{7,4(PB)}$. Αυτή η συμπεριφορά δείχνει ότι για τα περισσότερα λιπόφιλα ανιόντα, ο σχηματισμός ιοντικών ζευγών είναι σημαντικός ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις $[K^+/Na^+]$, με αποτέλεσμα οι τιμές $\log D_{7,4}$ να βρίσκονται ήδη στο πλατώ της καμπύλης κορεσμού (βλ. Σχήμα I-4) και η προσθήκη ηλεκτρολυτών να μην επιφέρει περαιτέρω επίδραση στην κατανομή.



Σχήμα IIA-3. Διάγραμμα των διαφορών $\Delta \log D_{7,4}$ έναντι των τιμών $\log D_{7,4(PB)}$.

2.5.1 Σύγκριση μεταξύ υπολογιστικών και πειραματικών τιμών

Προκειμένου να αποτιμηθεί η ικανότητα των διάφορων αλγόριθμων για τη σωστή πρόβλεψη των τιμών λιποφιλίας, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής κριτήρια ελέγχου αξιοπιστίας των υπολογιστικών συστημάτων:

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
 Α. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΤΙΜΩΝ logP ΚΑΙ logD
 ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

1) τα στατιστικά στοιχεία της εξίσωσης συσχέτισης μεταξύ των θεωρητικών και των πειραματικών τιμών: υψηλός συντελεστής συσχέτισης, κλίση κοντά στη μονάδα, σταθερός όρος κοντά στο μηδέν και χαμηλή τιμή τυπικής απόκλισης.

2) οι απόλυτες τιμές Δ των διαφορών μεταξύ υπολογιζόμενων/πειραματικών τιμών: για $\Delta \leq 0,49$ η πρόβλεψη κρίνεται επιτυχής, για $0,5 \leq \Delta \leq 1$ αποδεκτή και για $\Delta > 1$ αποτυχούσα²⁵.

Οι εξισώσεις και τα στατιστικά στοιχεία των συσχετίσεων μεταξύ πειραματικών και υπολογιστικών τιμών logP για τα διάφορα λογισμικά προγράμματα παρουσιάζονται στον Πίνακα ΠΑ-6.

Πίνακας ΠΑ-6. Συσχετίσεις μεταξύ πειραματικών/υπολογιστικών τιμών logP (n=18).

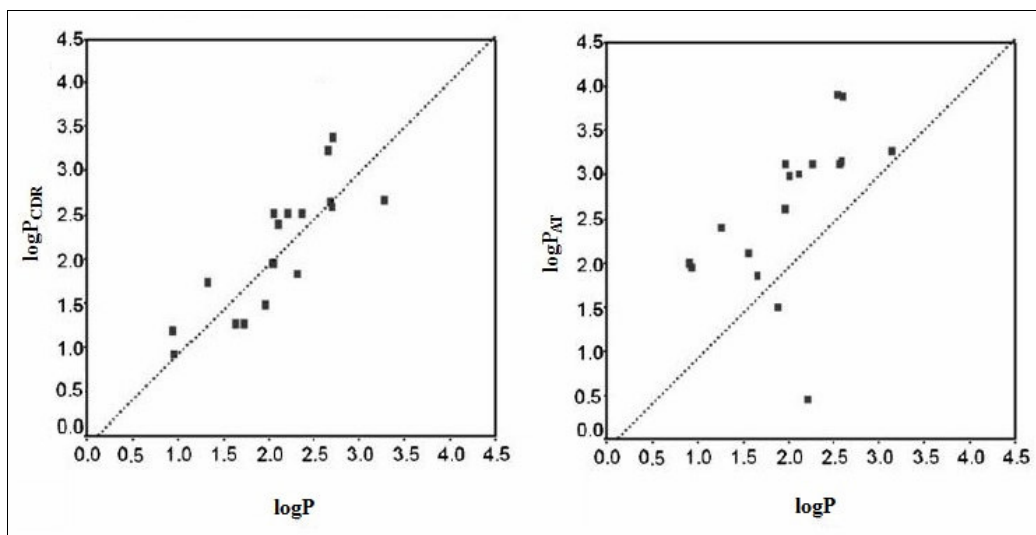
$\log P_{(exp)} = a \log P_{(calc)} + b$	a	b	r	s	F	εξ.
CDR	0,73(±0,12)	0,53(±0,26)	0,835	0,336	36,8	(ΠΑ-5)
AT	0,37(±0,14)	1,05(±0,39)	0,537	0,515	6,5	(ΠΑ-6)
AT6	0,73(±0,13)	-0,08(±0,37)	0,822	0,348	33,3	(ΠΑ-7)
ANN	0,74(±0,18)	0,48(±0,40)	0,707	0,431	16,0	(ΠΑ-8)
ANN ₀₅	0,76(±0,12)	0,09(±0,31)	0,844	0,327	39,5	(ΠΑ-9)
ClogP	0,72(±0,13)	0,11(±0,36)	0,805	0,362	29,5	(ΠΑ-10)
ABlogP	0,77(±0,11)	0,92(±0,17)	0,866	0,305	47,8	(ΠΑ-11)
AlogPs	0,70(±0,18)	-0,10(±0,55)	0,696	0,438	15,1	(ΠΑ-12)

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα ΠΑ-6 οι συσχετίσεις εμφάνισαν μέτρια στατιστικά στοιχεία, κλίσεις περίπου ίσες με 0,7 και σημαντικούς σταθερούς όρους. Ως εκ τούτου δεν πληρούν ικανοποιητικά το πρώτο κριτήριο ελέγχου. Ειδικότερα η μεγάλη τιμή της τυπικής απόκλισης υποδηλώνει ανοχή σφάλματος μεγαλύτερη από 0,6 λογαριθμικές μονάδες. Η εξίσωση (ΠΑ-11) παρότι είναι η καλύτερη από πλευράς συντελεστή συσχέτισης και τυπικής απόκλισης, εμφανίζει υψηλό θετικό σταθερό όρο που αντανακλά σε συστηματική υποτίμηση της λιποφιλίας των υπό μελέτη ενώσεων από την εφαρμογή ABlogP, ενώ και σε αυτήν την περίπτωση το διπλάσιο της τυπικής απόκλισης εμφανίζει τιμή υψηλότερη από 0,6 λογαριθμικές μονάδες. Η επιλογή ατομικών συνεισφορών του Broto (AT) στο λογισμικό πακέτο PALLAS και το λογισμικό AlogPs οδηγούν στις φτωχότερες συσχετίσεις.

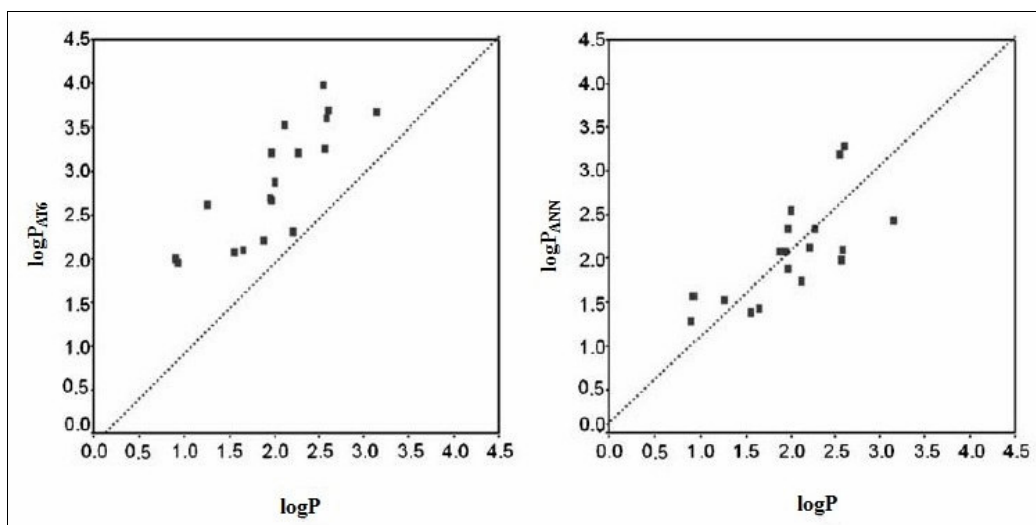
Για την καλύτερη εκτίμηση των υπολογιστικών συστημάτων κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα που απεικονίζουν τις συσχετίσεις των πειραματικών με τις υπολογιστικές τιμές (Σχήματα ΠΑ-4α έως ΠΑ-4δ). Η διαγώνια γραμμή αντιστοιχεί

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
Α. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΤΙΜΩΝ $\log P$ ΚΑΙ $\log D$
ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

στην ιδανική 1:1 συσχέτιση. Τα σημεία που βρίσκονται αριστερά της διαγωνίου αντιστοιχούν σε υποτιμημένες, ενώ τα σημεία στα δεξιά σε υπερτιμημένες τιμές ως προς τις πειραματικές. Χαρακτηριστικά, στα διαγράμματα $\log P_{\text{CDR}}/\log P$ και $\log P_{\text{ANN}}/\log P$, τα σημεία αν και εμφανίζουν σημαντική διασπορά, βρίσκονται εκατέρωθεν της διαγώνιας γραμμής, οδηγώντας σε μια πιο εξισορροπημένη εικόνα συγκριτικά με τα διαγράμματα που προέκυψαν από τα υπόλοιπα υπολογιστικά συστήματα.

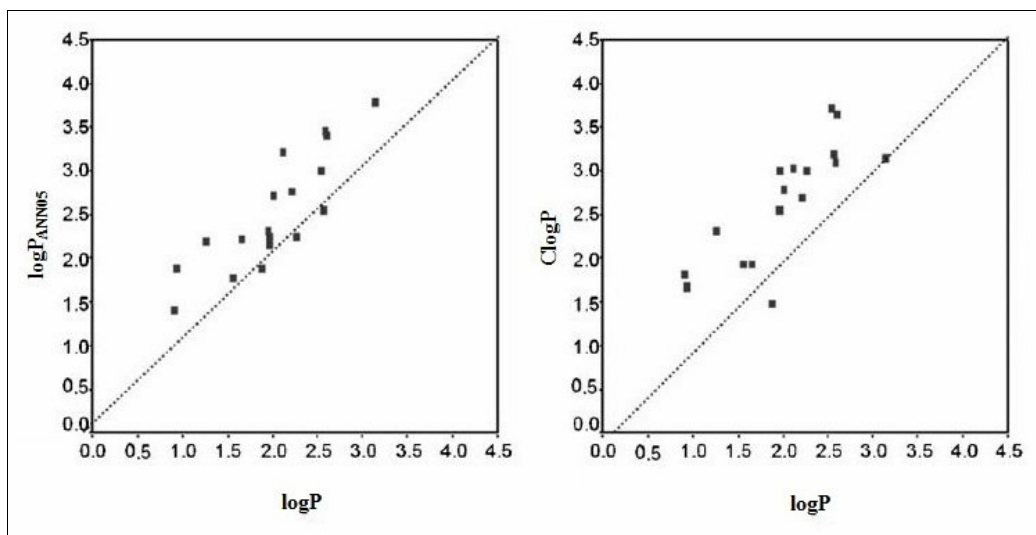


Σχήμα ΠΑ-4α. Γραφική απεικόνιση των συσχετίσεων των υπολογιστικών τιμών $\log P_{\text{CDR}}$ και $\log P_{\text{AT}}$ ως προς τις πειραματικές.

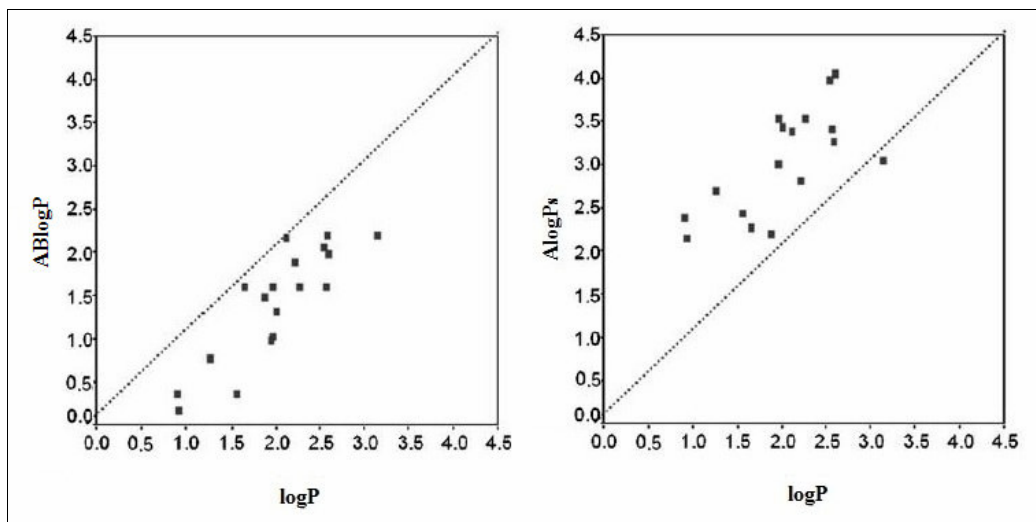


Σχήμα ΠΑ-4β. Γραφική απεικόνιση των συσχετίσεων των υπολογιστικών τιμών $\log P_{\text{AT6}}$ και $\log P_{\text{ANN}}$ ως προς τις πειραματικές.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
Α. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΤΙΜΩΝ $\log P$ ΚΑΙ $\log D$
ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ



Σχήμα ΠΑ-4γ. Γραφική απεικόνιση των συσχετίσεων των υπολογιστικών τιμών $\log P_{ANN05}$ και $C\log P$ ως προς τις πειραματικές.



Σχήμα ΠΑ-4δ. Γραφική απεικόνιση των συσχετίσεων των υπολογιστικών τιμών $ABlogP$ και $AlogPs$ ως προς τις πειραματικές.

Στον Πίνακα ΠΑ-7 εμφανίζεται ο αριθμός των επιτυχών, αποδεκτών και μη αποδεκτών προβλέψεων με βάση τις απόλυτες διαφορές πειραματικών-υπολογιστικών τιμών μαζί με το μέσο απόλυτο σφάλμα (Mean Average Error, MAE) για κάθε υπολογιστικό σύστημα. Με βάση το δεύτερο αυτό κριτήριο ελέγχου της αξιοπιστίας, το τροποποιημένο σύστημα θραυσμάτων του Rekker ($\log P_{CDR}$) εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή μέσου απόλυτου σφάλματος και έχει 15 επιτυχείς προβλέψεις, ακολουθούμενο από τους αλγόριθμους των μη-γραμμικών συστημάτων

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
Α. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΤΙΜΩΝ logP ΚΑΙ logD
ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

νευρωνικών δικτύων logP_{ANN} και logP_{ANN05}. Η απόδοση των συστημάτων ABlogP και ClogP ήταν μέτρια, με τις περισσότερες προβλέψεις να βρίσκονται απλώς στο αποδεκτό επίπεδο.

Πίνακας ΠΑ-7. Αριθμός των προβλέψεων στα όρια των διαφορών σε σχέση με τις τιμές logP και μέσο απόλυτο σφάλμα για κάθε σύστημα.

Δ	CDR	AT	AT6	ANN	ANN ₀₅	ClogP	ABlogP	AlogPs
Δ≤0,49	15	3	3	11	9	5	6	2
0,5≤Δ≤1	3	8	7	7	8	9	11	5
Δ>1	0	7	8	0	1	4	1	11
MAE	0,31	0,84	0,86	0,37	0,51	0,67	0,61	1,03

Ανάλογη ανάλυση πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση των προβλέψεων των τιμών logD_{7,4} από τα διαφορετικά υπολογιστικά συστήματα. Η εφαρμογή PrologD, με εισαγωγή διαφορετικών συγκεντρώσεων [K⁺/Na⁺] οδήγησε σε μικρές μόνο διαφορές στις τιμές logD_{7,4}, καταδεικνύοντας ότι σύμφωνα με τον αλγόριθμο, το πλατώ στη σχέση logD/[K⁺/Na⁺] έχει σχεδόν επιτευχθεί ήδη σε συγκέντρωση [K⁺/Na⁺]=0,058M. Οι εξισώσεις συσχέτισης υπολογιστικών/πειραματικών τιμών logD_{7,4} εμφάνισαν σημαντικά φτωχότερα στατιστικά στοιχεία συγκρινόμενες με αυτές που εξήχθησαν για τις τιμές logP (r<0,7). Η καλύτερη εξίσωση παρατηρήθηκε στη συσχέτιση logD_{7,4(PB)}/logD_{7,4(ANN05)}}, η οποία είναι συγκρίσιμη με την αντίστοιχη εξίσωση στην περίπτωση της αδιάστατης μορφής (logP/logP_{ANN05}}), δείχνοντας τη σταθερότητα του συγκεκριμένου αλγόριθμου, βλ. εξίσωση (ΠΑ-13):}

$$\log D_{7,4(PB)} = 0,75(\pm 0,11)\log D_{7,4(ANN05)} - 0,20(\pm 0,11) \quad (\text{ΠΑ-13})$$

$$n = 18, r = 0,852, s = 0,296$$

Σε όλες τις περιπτώσεις, οι υπολογιστικές τιμές logD_{7,4} συσχετίζονται καλύτερα με τις πειραματικές τιμές logD_{7,4(PB)}} παρά με τις τιμές logD_{7,4(PBS)}}.

Παρά τη χαμηλή συσχέτιση μεταξύ πειραματικών και υπολογιστικών τιμών logD_{7,4(PBS)}}, το κριτήριο των διαφορών (Πίνακας ΠΑ-8) δείχνει σχετικά ικανοποιητική απόδοση στις προβλέψεις και σχετικά χαμηλές τιμές μέσου απόλυτου σφάλματος για όλα τα συστήματα της εφαρμογής PrologD και κυρίως για το σύστημα

ANN₀₅. Αντίθετα το σύστημα ABlogD οδήγησε στην πλειοψηφία των περιπτώσεων σε μη αποδεκτές προβλέψεις.

Πίνακας ΠΑ-8. Αριθμός προβλέψεων στα όρια των διαφορών σε σχέση με τις τιμές logD_{7,4(PBS)} και μέσο απόλυτο σφάλμα για κάθε υπολογιστικό σύστημα.

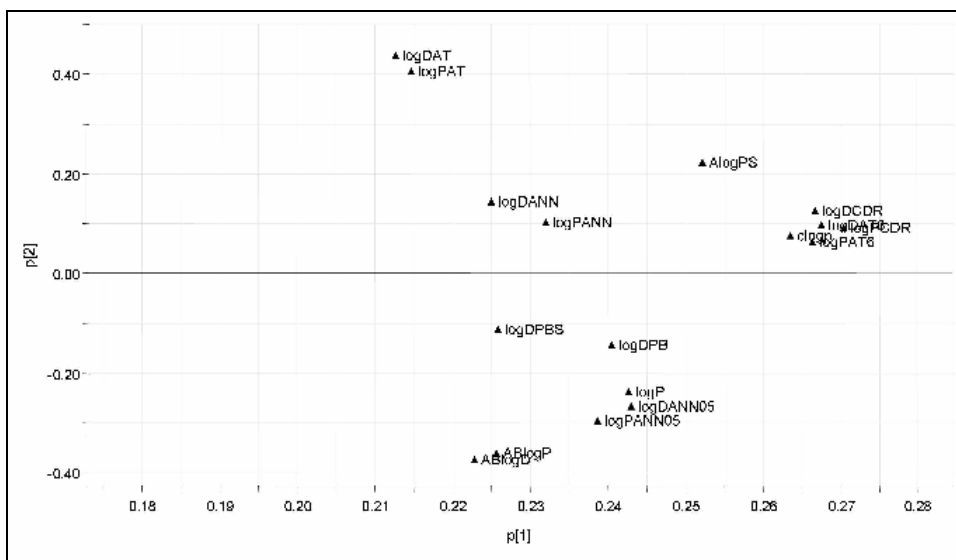
Δ	CDR	AT	AT6	ANN	ANN ₀₅	ABlogD
Δ≤0,49	8	9	10	12	15	2
0,5≤Δ≤1	10	7	7	4	3	7
Δ>1	0	2	1	2	0	9
MAE	0,47	0,50	0,44	0,43	0,29	1,09

2.5.2 Εφαρμογή Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών (PCA) στις υπολογιστικές-πειραματικές τιμές logP και logD

Προκειμένου να διερευνηθούν εκτενέστερα οι ομοιότητες/ανομοιότητες των διαφορετικών αλγόριθμων και των πειραματικών τιμών logP/logD_{7,4}, εφαρμόστηκε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA). Όλα τα δεδομένα λιποφιλίας χρησιμοποιήθηκαν ως περιγραφικές μεταβλητές X. Εξήχθη μοντέλο με δυο κύριες συνιστώσες με συνολικό συντελεστή συσχέτισης R²=0,875 και διασταυρούμενο συντελεστή συσχέτισης Q²=0,760. Η πρώτη κύρια συνιστώσα ερμηνεύει το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης (R²=0,776) με τη δεύτερη να ερμηνεύει λιγότερο από το 10%.

Το διάγραμμα των φορτίων (loadings) των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών, δηλαδή το συνημίτονο της γωνίας που σχηματίζουν οι κύριες συνιστώσες ως προς τις αρχικές μεταβλητές X, χρησιμοποιήθηκε για να αποτιμήσει τις ομοιότητες/ανομοιότητες μεταξύ των διαφορετικών υπολογιστικών συστημάτων και των πειραματικών τιμών λιποφιλίας (Σχήμα ΠΑ-5). Όσο πλησιέστερα βρίσκονται οι μεταβλητές στο διάγραμμα των φορτίων τόσο μεγαλύτερη ομοιότητα έχουν μεταξύ τους. Όλες οι παράμετροι λιποφιλίας εμφανίζουν παρόμοιες τιμές φορτίων στην πρώτη κύρια συνιστώσα (εύρος των φορτίων p[1]: 0,21 έως 0,27), εμφανίζουν όμως διαφορές στις τιμές των φορτίων στη δεύτερη κύρια συνιστώσα (εύρος των φορτίων p[2]: -0,37 έως 0,44).

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
Α. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΤΙΜΩΝ $\log P$ ΚΑΙ $\log D$
ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ



Σχήμα ΠΑ-5. Διάγραμμα των φορτίων των δυο κυρίων συνιστωσών.

Σύμφωνα με το Σχήμα ΠΑ-5 οι υπολογιστικές τιμές $\log P$ βρίσκονται πλησιέστερα στις αντίστοιχες υπολογιστικές τιμές $\log D_{7,4}$, ως αποτέλεσμα των συστηματικών διορθώσεων λόγω ιονισμού που ενσωματώνουν οι αλγόριθμοι. Αντίθετα, οι πειραματικές τιμές $\log D_{7,4(PBS)}$ -και σε μικρότερο βαθμό οι τιμές $\log D_{7,4(PB)}$ -εμφανίζουν μεγαλύτερη απόκλιση σε σχέση με τις τιμές $\log P$. Αυτή η διαφοροποίηση ενισχύει την άποψη ότι είναι πιθανό να υπάρχουν αποκλίσεις από τους κανόνες προσθετικότητας που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της λιποφιλίας των ουδέτερων μορίων, ιδιαίτερα όσον αφορά στην επίδραση ιοντικών ζευγών. Όσον αφορά στα διαφορετικά υπολογιστικά συστήματα το διάγραμμα των φορτίων εμφάνισε στενή ομοιότητα μεταξύ των πειραματικών τιμών $\log P$ και $\log P_{ANN05}$, δείχνοντας ότι το μη γραμμικό μοντέλο ANN_{05} κωδικοποιεί με μεγαλύτερη συνέπεια τα δομικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στη λιποφιλία των υπό μελέτη ενώσεων. Οι εφαρμογές $ABlogP/ABlogD$ βρίσκονται επίσης κοντά στις αντίστοιχες πειραματικές τιμές, ένδειξη ότι οι κανόνες ομοιότητας που εφαρμόζονται σε αυτό το σύστημα οδηγούν τις προβλέψεις σε περισσότερο ρεαλιστική κατεύθυνση και οι αποκλίσεις που παρατηρούνται μάλλον είναι το αποτέλεσμα συστηματικών σφαλμάτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η εφαρμογή CDR , παρότι εμφάνισε την καλύτερη επίδοση σύμφωνα με το κριτήριο των διαφορών, βρίσκεται μακριά από τις πειραματικές τιμές $\log P$, δείχνοντας ότι οι επιτυχείς προβλέψεις δεν σημαίνουν απαραίτητα συνέπεια και αξιοπιστία του αλγόριθμου.

2.5.3 Σχέση λιποφιλίας με την ανασταλτική δράση επί της αναγωγής της αλδόζης. Εφαρμογή υπολογιστικών ή πειραματικών τιμών;

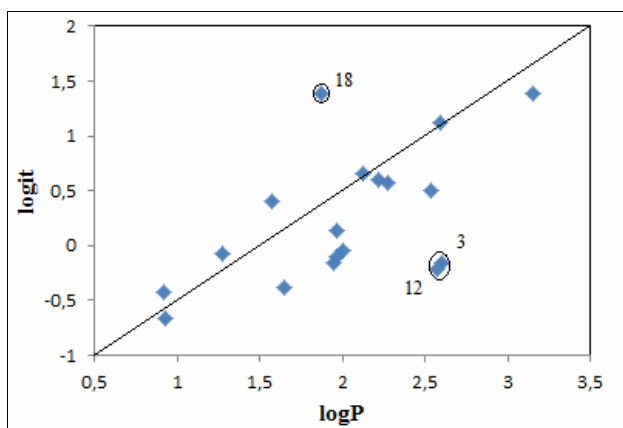
Όπως προαναφέρθηκε (§1) η ευκαμψία του ενεργού κέντρου της αναγωγής της αλδόζης έχει οδηγήσει στη διατύπωση αμφιβολιών όσον αφορά στην αξιοπιστία των 3D μελετών docking²⁷⁰. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι κλασικές Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη βελτιστοποίηση στα πλαίσια μιας σειράς ενώσεων.

Η ανασταλτική δράση επί της αναγωγής της αλδόζης 23 παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος (συμπεριλαμβανομένων των ενώσεων 1 έως 15) έχει αναλυθεί με Πολυμεταβλητή Ανάλυση Δεδομένων (MVDA: Multivariate Data Analysis) στη βάση υπολογιστικών μοριακών παραμέτρων και έχει εξαχθεί μοντέλο QSAR. Η λιποφιλία, η οποία εκφράστηκε ως ClogP, δεν ήταν στατιστικά σημαντική παράμετρος, με αποτέλεσμα να μην συμπεριληφθεί στο τελικό μοντέλο²⁷¹. Μετά από τη διαπίστωση της χαμηλής αξιοπιστίας των υπολογιστικών συστημάτων για την εκτίμηση της λιποφιλίας των παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος θεωρήθηκε ενδιαφέρον να διερευνηθεί εκ νέου ο ρόλος της λιποφιλίας στην αναστολή της δράσης επί της αναγωγής της αλδόζης αξιολογώντας τόσο τις υπολογιστικές όσο και τις πειραματικές τιμές logP και logD_{7,4} για τις ενώσεις 1 έως 18, οι οποίες παρουσιάζουν μεγαλύτερη δομική συγγένεια σε σχέση με τα 23 παράγωγα της αρχικής ανάλυσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές logit οι οποίες προέκυψαν από την % αναστολή σύμφωνα με την εξίσωση (IIA-14) και απεικονίζονται στον Πίνακα IIA-1. Ο μετασχηματισμός αυτός επιτρέπει καλύτερη κατανομή των δεδομένων ιδιαίτερα όσο αφορά στις υψηλότερες (και ως εκ τούτου πιο ενδιαφέρουσες) τιμές της % αναστολής και δεν επηρεάζει την αξιοπιστία της κλίμακας των δεδομένων²⁷².

$$\text{logit} = \log \left(\frac{\% \text{ αναστολή}}{100 - \% \text{ αναστολή}} \right) \quad (\text{IIA-14})$$

Στο Σχήμα 6 παρουσιάζεται η απεικόνιση των τιμών logit έναντι των πειραματικών τιμών logP. Σύμφωνα με το διάγραμμα αυτό παρατηρείται μια σαφής τάση αύξησης

της βιολογικής δράσης με αύξηση της λιποφιλίας, αν και οι ενώσεις 3 (με υποκαταστάτη το τεταρτοταγές βουτύλιο), 12 (παράγωγο του ινδολίου) και 18 (με ελεύθερο υδρογόνο στο άζωτο του πυρρολίου) επέδειξαν αποκλίνουσα συμπεριφορά. Οι ενώσεις αυτές σημειώνονται με κύκλο στο Σχήμα ΠΑ-6.



Σχήμα ΠΑ-6. Γραφική απεικόνιση των τιμών logit έναντι των τιμών logP.

Εξαιρώντας αυτές τις τρεις ενώσεις, λήφθηκε η εξίσωση (ΠΑ-15) με σχετικά ικανοποιητικά στατιστικά στοιχεία:

$$\text{logit} = 0,82(\pm 0,13)\text{logP} - 1,36(\pm 0,27) \quad (\text{ΠΑ-15})$$

$$n = 15, r = 0,864, r^2_{cv} = 0,683, s = 0,303$$

Η συσχέτιση των τιμών logit με τις τιμές $\text{logD}_{7,4}$ έδωσε φτωγά αποτελέσματα, γεγονός που δείχνει ότι αν και η δέσμευση στην αναγωγή της αλδόζης λαμβάνει χώρα μέσω της ανιονικής μορφής, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις εκφράζονται καλύτερα μέσω του συντελεστή μερισμού της αδιάστατης μορφής.

Για την περαιτέρω βελτίωση της εξίσωσης (ΠΑ-15) εισήχθησαν στην ανάλυση παλινδρόμησης ηλεκτρονιακές παράμετροι και παράμετροι πολικότητας, λαμβάνοντας υπόψη το προηγούμενο μοντέλο QSAR²⁷¹ και την ύπαρξη μιας πολικής και μιας μη-πολικής περιοχής στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου (εκφρασμένη με τη σολβατοχρωμική παράμετρο B του Abraham) και η ηλεκτρονιακή σταθερά σ των υποκαταστατών του φαινολικού δακτυλίου δείχνουν να συνεισφέρουν σημαντικά στη βιολογική δράση εάν εισαχθούν

ξεχωριστά στην εξίσωση παλινδρόμησης, βελτιώνοντας την αρχική συσχέτιση, όπως φαίνεται και από τις εξισώσεις (IIA-16) και (IIA-17):

$$\text{logit} = 0,62(\pm 0,14)\text{logP} + 0,80(\pm 0,33)\text{B} - 1,87(\pm 0,31) \quad (\text{IIA-16})$$

$$n = 15, r = 0,896, r^2_{cv} = 0,745, s = 0,258$$

$$\text{logit} = 0,69(\pm 0,13)\text{logP} - 0,54(\pm 0,22)\sigma - 1,09(\pm 0,26) \quad (\text{IIA-17})$$

$$n = 15, r = 0,893, r^2_{cv} = 0,736, s = 0,259$$

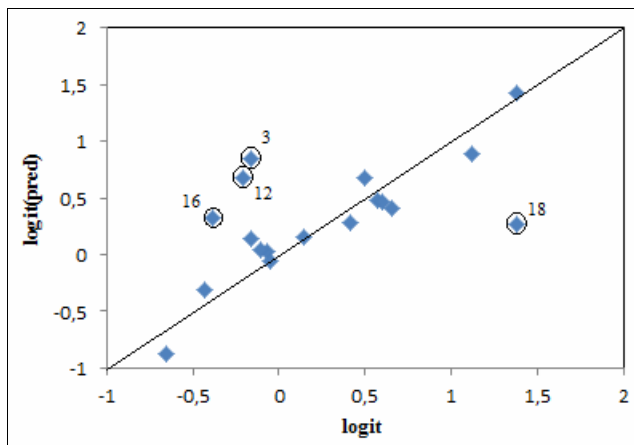
Η ένωση 16, με διαφορά μεταξύ υπολογιζόμενων-πειραματικών τιμών $\text{logit} > 2s$ αποτέλεσε έκτροπη τιμή (outlier).

Εξαίρεση της ένωσης 16 από την εξίσωση (IIA-17) οδήγησε στην εξίσωση (IIA-18) με εμφανώς βελτιωμένα στατιστικά στοιχεία και αναβαθμισμένη την επίδραση της ηλεκτρονιακής σταθεράς σ στη βιολογική δράση.

$$\text{logit} = 0,60(\pm 0,10)\text{logP} - 0,74(\pm 0,18)\sigma - 0,86(\pm 0,20) \quad (\text{IIA-18})$$

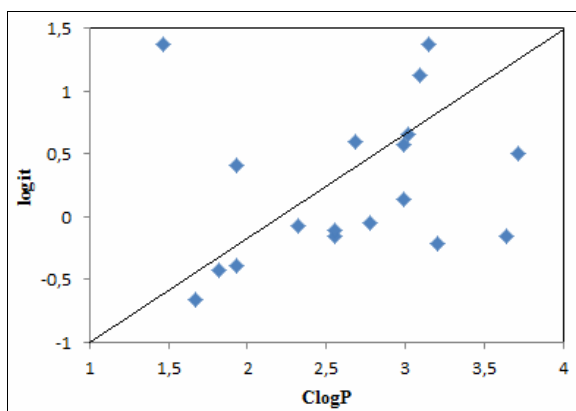
$$n = 14, r = 0,943, r^2_{cv} = 0,847, s = 0,191$$

Στο Σχήμα IIA-7 απεικονίζεται η σχέση των προβλεπόμενων με βάση την εξίσωση (IIA-18) έναντι των πειραματικών τιμών logit.

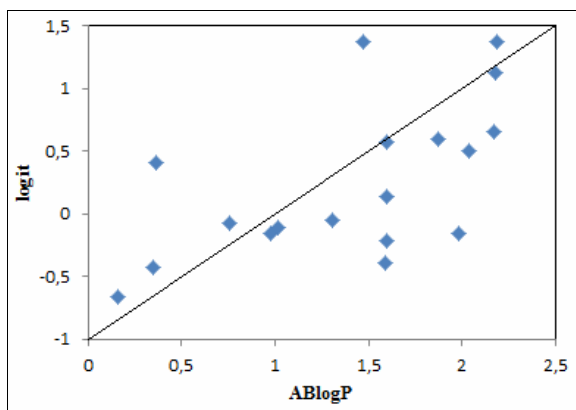


Σχήμα IIA-7. Γραφική απεικόνιση των προβλεπόμενων έναντι των πειραματικών τιμών logit.

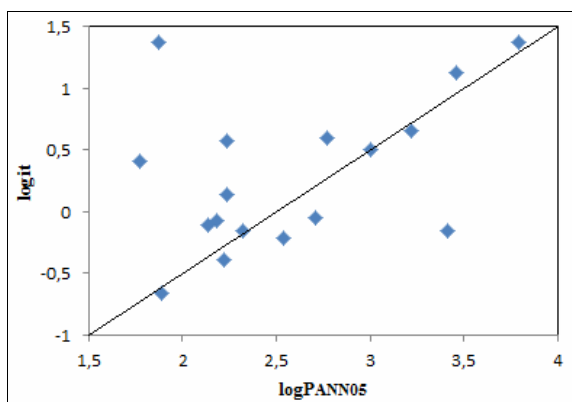
Στη συνέχεια, εξετάστηκε η δυνατότητα των υπολογιστικών τιμών logP να περιγράψουν την επίδραση της λιποφιλίας στην αναστολή της δράσης επί της αναγωγής της αλδόζης. Οι τιμές logP_{ANN05} και ABlogP οδηγούν στην εμφάνιση κάποιας τάσης αύξησης της βιολογικής δράσης με αύξηση της λιποφιλίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παραγράφου 2.5.1 η επιλογή ANN₀₅ αποδείχτηκε περισσότερο συνεπής στην εκτίμηση της λιποφιλίας, ενώ η υποτίμηση της λιποφιλίας από τις τιμές ABlogP είναι συστηματική στα πλαίσια των ενώσεων. Ωστόσο, αντικατάσταση των πειραματικών τιμών logP με τις τιμές logP_{ANN05} ή ABlogP στις εξισώσεις (IIA-16) και (IIA-18) οδήγησε σε εξισώσεις με φτωχότερα στατιστικά στοιχεία. Οι υπόλοιποι αλγόριθμοι (συμπεριλαμβανομένου του ClogP) αποτυγχάνουν να εμφανίσουν παρόμοια τάση της λιποφιλίας ως προς τη βιολογική δράση. Στα Σχήματα IIA-8 έως IIA-10 απεικονίζονται ενδεικτικά οι σχέσεις των τιμών logit με τα υπολογιστικά προγράμματα ClogP, ABlogP και logP_{ANN05}.



Σχήμα IIA-8. Γραφική απεικόνιση των τιμών logit έναντι των τιμών ClogP.



Σχήμα IIA-9. Γραφική απεικόνιση των τιμών logit έναντι των τιμών ABlogP.



Σχήμα ΠΑ-10. Γραφική απεικόνιση των τιμών \log_{it} έναντι των τιμών $\log P_{ANN05}$.

3. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, τα ανωτέρω αποτελέσματα καταδεικνύουν τις δυσκολίες που αφορούν στην επιλογή του κατάλληλου αλγόριθμου για τον υπολογισμό του $\log P$ προκειμένου για δομικώς συγγενή σειρά νέων χημειοτύπων. Διαπιστώθηκε ότι το μη-γραμμικό μοντέλο Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων ANN_{05} εκφράζει με μεγαλύτερη συνέπεια τα χαρακτηριστικά που εμπλέκονται στη διαδικασία κατανομής των υπό μελέτη παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος. Η εφαρμογή υπολογιστικών τιμών οδήγησε σε απόκρυψη της σχέσης της ανασταλτικής δράσης επί της αναγωγάσης της αλδόξης με τη λιποφιλία και στην αδυναμία εξαγωγής απλών Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης. Αντίθετα οι πειραματικές τιμές αποδείχθηκαν καταλληλότερες για τη συσχέτιση της βιολογικής δράσης, ενώ συνδυαζόμενες με όρους που εκφράζουν την πολικότητα ή ηλεκτρονιακές ιδιότητες, οδήγησαν σε ικανοποιητικές εξισώσεις QSAR. Οι εξισώσεις που περιλαμβάνουν την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου (εκφρασμένη μέσω της σολβατοχρωμικής παραμέτρου B του Abraham) και την ηλεκτρονιακή σταθερά σ των υποκαταστατών του φαινολικού δακτυλίου αντιπροσωπεύουν απλές σχέσεις οι οποίες δεν μπορούν να θεωρηθούν γενικά μοντέλα δεδομένου ότι προκύπτουν από περιορισμένο αριθμό ενώσεων. Μπορούν ωστόσο να αποδειχθούν χρήσιμα επιμέρους μοντέλα για την καθοδήγηση της περαιτέρω σύνθεσης στα πλαίσια της συγκεκριμένης σειράς ενώσεων.

B. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ RP-HPLC ΚΑΙ RP-TLC

1. Εισαγωγή

Με βάση τη διαπίστωση για την αδυναμία των υπολογιστικών συστημάτων να δώσουν αξιόπιστες προβλέψεις του συντελεστή μερισμού στην περίπτωση νέων χημειοτύπων, ο πειραματικός προσδιορισμός παραμένει αναγκαίος. Η ανάγκη για γρήγορες και ακριβείς μετρήσεις έχει οδηγήσει στη χρησιμοποίηση των χρωματογραφικών τεχνικών αντιστροφής φάσεως, RP-HPLC και RP-TLC, ως εναλλακτικών επιλογών στα χρονοβόρα πειράματα κατανομής²⁷³. Όπως αναφέρθηκε στο Θεωρητικό Μέρος η προτυποποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών έχει οδηγήσει σε 1:1 συσχετίσεις μεταξύ χρωματογραφικών δεικτών και συντελεστών κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού για βασικές και ουδέτερες ενώσεις. Η αντίστοιχη προτυποποίηση στην περίπτωση όξινων ενώσεων εμφανίζει ωστόσο περισσότερες δυσκολίες. Υπό αυτό το πρίσμα, η μελέτη της λιποφιλίας των όξινων παραγώγων του πυρρολίου επεκτάθηκε χρησιμοποιώντας RP-HPLC και RP-TLC.

Στην περίπτωση της RP-HPLC λήφθηκαν υπόψη οι προσεγγίσεις που αναφέρθηκαν για την προτυποποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών (βλ. §2.11.1). Θεωρώντας ωστόσο ότι οι πρότυπες συνθήκες που οδηγούν σε ένα πολύ καλό γενικό μοντέλο (global model) συσχέτισης χρωματογραφικών δεικτών με τιμές logP σε σειρά δομικώς διαφορετικών ενώσεων δεν εξασφαλίζουν την αντίστοιχη καλή συσχέτιση σε επιμέρους μοντέλα (local models) δομικώς συγγενών ενώσεων, δοκιμάστηκαν περισσότερες συνθήκες όσον αφορά το ρυθμιστικό διάλυμα και την παρουσία διαφορετικών ποσοστών οκτανόλης ως προσθετικών παραγόντων στην κινητή φάση. Διερευνήθηκαν δυο τιμές pH 3,0 και 7,4, όπως και στα πειράματα κατανομής.

Η RP-TLC εμφανίζει μικρότερη ευελιξία ως προς τις συνθήκες που προσομοιώνουν το σύστημα οκτανόλης-νερού, δεδομένου ότι η επίδραση του pH είναι περιορισμένη και η επίδραση προσθετικών παραγόντων αμελητέα. Ως εκ τούτου η μελέτη εστιάστηκε στη διερεύνηση της επίδρασης της στατικής φάσης στη συγκράτηση. Τα

χρωματογραφικά δεδομένα δοκιμάστηκαν σε συσχετίσεις με τη βιολογική δράση και αξιολογήθηκε η συμβολή τους συγκριτικά με τις τιμές logP.

2. Προσδιορισμός δεικτών λιποφιλίας με RP-HPLC

2.1 Υλικά και μέθοδοι

2.1.1 Οργανολογία

Το σύστημα HPLC περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.1 στο Κεφάλαιο Α.

2.1.2 Αντιδραστήρια

Η μεθανόλη ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC-grade), της εταιρίας Lab-Scan, ενώ η οκτανόλη ήταν καθαρότητας αναλυτικού βαθμού (analytical-grade) της εταιρίας PANREAC. Το νερό ήταν απιονισμένο και καθαρισμένο μέσω του συστήματος παραγωγής νερού Milli-Q Plus (Millipore). Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ρυθμιστικά διαλύματα:

α) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 3,0 (phosphate buffer, PB_{3,0})

(βλ. §2.1.2 στο Κεφάλαιο Α).

β) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (phosphate buffer, PB_{7,4})

(βλ. §2.1.2 στο Κεφάλαιο Α).

γ) διάλυμα 3-(N-μορφολινο)-προπανοσουλφονικού οξέος pH 3,0 (MOPS_{3,0})

Κατάλληλη ποσότητα MOPS διαλύθηκε σε νερό, ώστε η συγκέντρωση του MOPS στον τελικό όγκο κινητής φάσης να είναι 0,02M. Το pH ρυθμίζεται στο 3,0 με προσθήκη διαλύματος H₃PO₄.

δ) διάλυμα 3-(N-μορφολινο)-προπανοσουλφονικού οξέος pH 7,4 (MOPS_{7,4})

Παρασκευάστηκε κατά τον ίδιο τρόπο με το MOPS σε pH 3,0 με τη διαφορά ότι το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με προσθήκη διαλύματος NaOH 0,1M.

2.1.3 Χρωματογραφικές συνθήκες

Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε στήλη Supelcosil ABZ⁺ 5 μ m (15x4,6 μ m i.d.). Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν μίγματα μεθανόλης-ρυθμιστικού διαλύματος σε διάφορες αναλογίες και συγκεκριμένα με περιεκτικότητα σε μεθανόλη από 10-70% και βήμα 5%. Ως προσθετικός παράγοντας στην κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε η οκτανόλη. Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα κορεσμένα με οκτανόλη. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στο 1 ml/min. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνδυασμοί:

1) pH 3,0

α) μεθανόλη-PB

β) μεθανόλη+0,05% οκτανόλη-PB κορεσμένο με οκτανόλη

γ) μεθανόλη+0,25% οκτανόλη-PB κορεσμένο με οκτανόλη

δ) μεθανόλη+0,25% οκτανόλη-MOPS κορεσμένο με οκτανόλη

2) pH 7,4

α) μεθανόλη-PB

β) μεθανόλη+0,05% οκτανόλη-PB κορεσμένο με οκτανόλη

γ) μεθανόλη+0,25% οκτανόλη-PB κορεσμένο με οκτανόλη

δ) μεθανόλη-MOPS

ε) μεθανόλη+0,05% οκτανόλη-MOPS κορεσμένο με οκτανόλη

στ) μεθανόλη+0,25% οκτανόλη-MOPS κορεσμένο με οκτανόλη

Το ποσοστό της προστιθέμενης οκτανόλης αντιστοιχεί στον όγκο της μεθανόλης.

2.1.4 Χρωματογραφική διαδικασία

Η κινητή φάση απαερώνεται με διήθηση υπό κενό στο σύστημα απαέρωσης Millipore (Waters). Για την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης αφήνεται το χρωματογραφικό σύστημα να λειτουργήσει για τουλάχιστον 30min με ροή κινητής φάσης 1ml/min. Παρουσία οκτανόλης ως προσθετικού παράγοντα απαιτήθηκε περισσότερος χρόνος για την εξισορρόπηση (τουλάχιστον 90min). Στη συνέχεια ενίεται χωριστά το διάλυμα της κάθε ουσίας σε μεθανόλη, μετράται ο χρόνος

συγκράτησης (t_r) που αντιστοιχεί στην κύρια κορυφή και μετατρέπεται στο λογάριθμο του παράγοντα χωρητικότητας ($\log k$) σύμφωνα με τη σχέση (IIA-19):

$$\log k = \log \left(\frac{t_r - t_0}{t_0} \right) \quad (\text{IIA-19})$$

όπου t_0 ο νεκρός χρόνος που λαμβάνεται ως ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνιση της κορυφής της μεθανόλης. Το κάθε πείραμα επαναλαμβάνεται τουλάχιστον εις τριπλούν. Ακολουθώς αλλάζει η κινητή φάση και επαναλαμβάνεται η διαδικασία εξισορρόπησης με τη στήλη πριν την ένεση των δειγμάτων.

2.1.5 Προσδιορισμός ανηγμένων τιμών $\log k_w$

Η παράμετρος $\log k_w$ υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το γραμμικό τμήμα της εξίσωσης Schoenmakers με χρήση γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης σύμφωνα με τη σχέση (I-15) που αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.7 στο Θεωρητικό Μέρος¹³¹:

$$\log k = -S\phi + \log k_w \quad (\text{I-15})$$

όπου $\log k_w$ η τιμή του παράγοντα χωρητικότητας που αντιστοιχεί σε κινητή φάση 100% ρυθμιστικό διάλυμα και S η κλίση της ευθείας.

2.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Στην κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα PB κατ'αναλογία με τα πειράματα κατανομής. Έχει αναφερθεί ωστόσο ότι στην περίπτωση αυτή ο σχηματισμός ιοντικών ζευγών ενδέχεται να επηρεάζει σημαντικά τη συγκράτηση. Ως εκ τούτου έχει προταθεί για τον προσδιορισμό χρωματογραφικών δεικτών λιποφιλίας ως ρυθμιστικό διάλυμα επιλογής το 3-(N-μορφολινο)-προπανοσουλφονικό οξύ (MOPS), το οποίο λόγω του αμφολυτικού του χαρακτήρα θεωρείται ότι δεν παρεμβαίνει σε αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση ή τις υπό ανάλυση ενώσεις (βλ. §2.5 στο Θεωρητικό Μέρος). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μικρή μόνο διαφοροποίηση των τιμών που ελήφθησαν με τα δυο ρυθμιστικά διαλύματα PB και

MOPS. Θα πρέπει να σημειωθεί ωστόσο ότι η χρήση του MOPS στην RP-HPLC αναφέρεται κυρίως στην περίπτωση βασικών ενώσεων.

Οι τιμές $\log k_w$ και οι κλίσεις S που προέκυψαν για όλες τις πειραματικές συνθήκες αναφέρονται στους Πίνακες ΠΑ-9 και ΠΑ-10. Οι συντελεστές συσχέτισης r έχουν τιμή $>0,995$, ενώ τα σταθερά σφάλματα των τιμών $\log k_w$ και των κλίσεων S ήταν $\pm 0,13$ και $\pm 0,20$ αντίστοιχα. Στις περισσότερες περιπτώσεις η γραμμικότητα στη σχέση $\log k/\phi$ ήταν πολύ καλή για μεγάλο εύρος ποσοστών μεθανόλης. Παρόλα αυτά για συγκεκριμένες ενώσεις σε υψηλά ποσοστά μεθανόλης παρατηρήθηκε καμπύλωση σε pH 3,0 και 7,4 απουσία οκτανόλης. Καμπύλωση παρατηρήθηκε επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσία οκτανόλης 0,05% σε pH 3,0. Σε pH 7,4 παρατηρήθηκε κυρτή καμπύλωση παρουσία οκτανόλης σε χαμηλά ποσοστά μεθανόλης. Οι ισοκρατικές αυτές τιμές δεν ελήφθησαν υπόψη για την εξαγωγή των τιμών $\log k_w$. Οι ενώσεις που εμφανίζουν καμπύλωση είναι σημειωμένες με αστερίσκο στους Πίνακες ΠΑ-9 και ΠΑ-10.

Παρουσία οκτανόλης παρατηρήθηκαν γενικά χαμηλότερες τιμές $\log k_w$ σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές¹⁵³ συνοδευόμενες ωστόσο από αξιοσημείωτη μείωση των κλίσεων. Διαπιστώθηκε ότι η επίδραση της οκτανόλης ήταν μεγαλύτερη στη συγκράτηση των περισσότερο λιπόφιλων παραγώγων (ενώσεις 3, 5, 6, 14 και 15) όταν αυτά βρίσκονται στην αδιάστατη μορφή τους (pH 3,0), σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις προηγούμενων μελετών που αφορούν σε δομικά διαφορετικές ενώσεις και αναφέρουν εντονότερη επίδραση της οκτανόλης στις υδρόφιλες ενώσεις^{123,153}.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
B. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ
ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ RP-HLPC ΚΑΙ RP-TLC

Πίνακας ΠΑ-9. Τιμές $\log k_w$ σε pH 3,0 και κλίσεις S για όλες τις πειραματικές συνθήκες.

No	[no-oct]		[0,05%]		[0,25%]			
	PB		PB		PB		MOPS	
	$\log k_w$	Sx100	$\log k_w$	Sx100	$\log k_w$	Sx100	$\log k_w$	Sx100
1	2,20	4,48	1,70	3,03	1,63	3,11	1,63	4,04
2	2,63	4,70	2,15	3,39	1,94	4,57	1,89	5,44
3	4,02	6,66	2,52	4,23	2,42	5,26	2,39	6,34
4	2,13*	4,39	1,85*	2,93	1,71	3,63	1,70	4,08
5	4,03	6,54	2,74	4,14	2,51	4,44	2,47	4,44
6	4,01	7,36	2,72	4,16	2,49	5,09	2,47	5,77
7	2,60	4,91	1,77	2,83	1,72	3,64	1,69	3,46
8	3,38	5,46	2,80	3,97	2,63	4,68	2,65	4,73
9	3,16*	5,80	2,54*	3,75	2,40	4,46	2,33	4,32
10	3,16	6,76	2,64	3,91	2,37	4,29	2,28	4,70
11	3,58*	5,47	2,83*	3,09	2,39	4,38	2,25	4,60
12	2,91*	5,13	2,43*	3,52	2,36	4,73	2,39	5,01
13	3,97	6,44	3,00	4,29	2,87	5,69	2,84	5,10
14	4,12	7,44	3,14	4,42	2,95	5,84	2,91	5,15
15	4,32*	6,64	3,34*	4,70	3,05	6,06	2,95	5,15
16	2,75	5,14	2,18	3,40	2,01	4,06	1,99	2,86
17	3,74	6,93	2,64	3,98	2,27	4,60	2,29	4,61
18	3,01	5,13	2,23	3,61	1,82	3,32	1,88	3,80
19	3,81	7,12	3,40	4,70	3,23	4,54	3,18	4,68

*εμφάνισαν καμπύλωση σε υψηλά ποσοστά μεθανόλης.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
 Β. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ
 ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΘΕΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ RP-HLPC ΚΑΙ RP-TLC

Πίνακας ΠΑ-10. Τιμές $\log k_w$ σε pH 7,4 και κλίσεις S για όλες τις πειραματικές συνθήκες.

No	[no-oct]				[0,05%]				[0,25%]			
	PB		MOPS		PB		MOPS		PB		MOPS	
	$\log k_w$	Sx100	$\log k_w$	Sx100	$\log k_w$	Sx100	$\log k_w$	Sx100	$\log k_w$	Sx100	$\log k_w$	Sx100
1	1,59	3,30	1,65	4,52	1,29	3,20	1,28	3,13	0,92*	2,39	0,88	2,46
2	2,07	3,61	2,14	4,94	1,52	3,16	1,59	4,12	1,30*	2,66	1,31	3,02
3	3,46*	6,07	3,43	5,82	2,73	4,96	2,63	4,26	2,35	4,86	2,32	4,27
4	2,00	5,26	2,14	4,49	1,77	4,29	1,52	3,51	1,17	2,49	1,21	2,71
5	2,41	4,18	2,53	4,74	1,64	3,19	1,80*	4,19	1,38	2,83	1,41	2,92
6	3,34	5,83	3,31	5,99	2,61**	4,69	2,53	4,37	2,30	4,69	2,36	4,31
7	1,82	3,37	1,86	4,62	1,15	2,68	1,24	3,76	1,11	2,17	1,15	2,25
8	2,77	6,02	2,77	5,19	1,93	3,35	2,04*	4,07	1,31	2,90	1,40	3,43
9	2,63	5,28	2,50*	5,25	1,71	3,43	1,85	4,29	1,41	2,86	1,37	2,79
10	2,55	5,43	2,58*	5,24	1,86	4,41	1,87	3,74	1,52	3,66	1,56	3,78
11	2,63*	5,49	2,62	5,66	1,93	3,45	1,90	4,49	1,57	3,20	1,57	3,25
12	2,00	3,39	2,20	4,56	1,51	3,00	1,54	3,54	1,21	2,56	1,21	2,55
13	3,42*	6,27	3,47	8,06	2,28	4,51	2,25*	3,92	2,13	4,44	2,10	3,89
14	3,55	6,33	3,58	6,22	2,37	4,53	2,34	3,97	2,24	4,02	2,25	4,05
15	3,61	6,30	3,60*	7,15	2,39	4,97	2,42	3,92	2,34	4,58	2,36	3,73
16	1,75	3,70	1,82	3,86	1,05	2,54	1,11	2,53	0,99	2,13	1,00	2,45
17	2,52	3,97	2,86	5,52	1,94**	3,39	2,16	4,05	1,73	2,94	1,82	3,07
18	2,23	4,92	1,96	4,56	1,40	2,96	1,24	3,34	1,26	2,25	1,19*	2,31
19	2,84	5,97	2,81	7,06	2,09	4,33	2,11	3,66	2,01	4,32	2,02	3,78

*εμφάνισαν καμπύλωση σε υψηλά ποσοστά μεθανόλης.

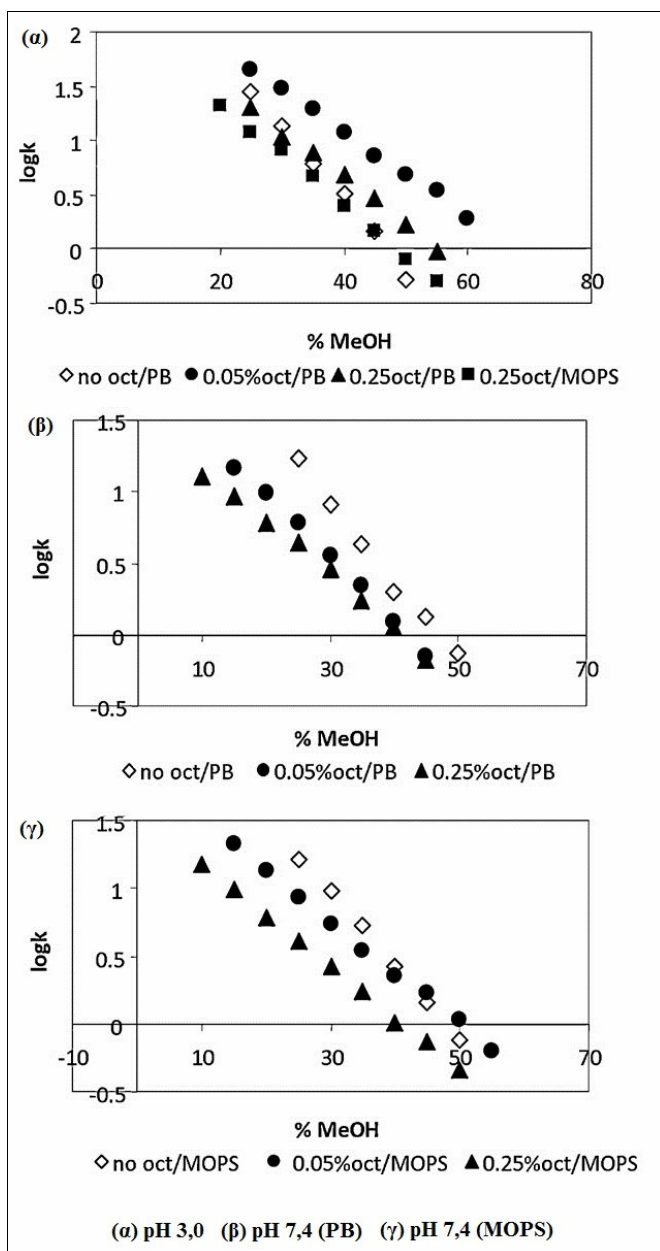
**εμφάνισαν καμπύλωση σε χαμηλά ποσοστά μεθανόλης.

2.2.1 Επίδραση της συγκέντρωσης της οκτανόλης στο προφίλ $\log k/\phi$

Σε προηγούμενη μελέτη διερεύνηση του ποσοστού της οκτανόλης που απαιτείται για την καλύτερη προσομοίωση της κατανομής έχει δείξει ότι για όξινες ενώσεις σε pH όπου επικρατεί η αδιάστατη μορφή απλά η χρήση κορεσμένου με οκτανόλη ρυθμιστικού διαλύματος οδηγεί σε 1:1 συσχέτιση μεταξύ $\log k_w$ και $\log P$ ¹⁴². Σε pH 7,4 ωστόσο απαιτείται προσθήκη ποσοστού οκτανόλης 0,25% επί του όγκου της μεθανόλης και 1:1 συσχέτιση λαμβάνεται μόνο για τις ασθενώς όξινες ενώσεις^{122,124}. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ποσοστό 0,05% οκτανόλης, δεδομένου ότι το ποσοστό αυτό προκαλεί μικρότερη μεταβολή στην ολική συγκέντρωση της οκτανόλης που τελικά προκύπτει κατά την παρασκευή των διαφορετικών κινητών φάσεων¹⁵³. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ποσοστό 0,25% οκτανόλης δεδομένου ότι το ποσοστό αυτό έχει ευρύτερη εφαρμογή.

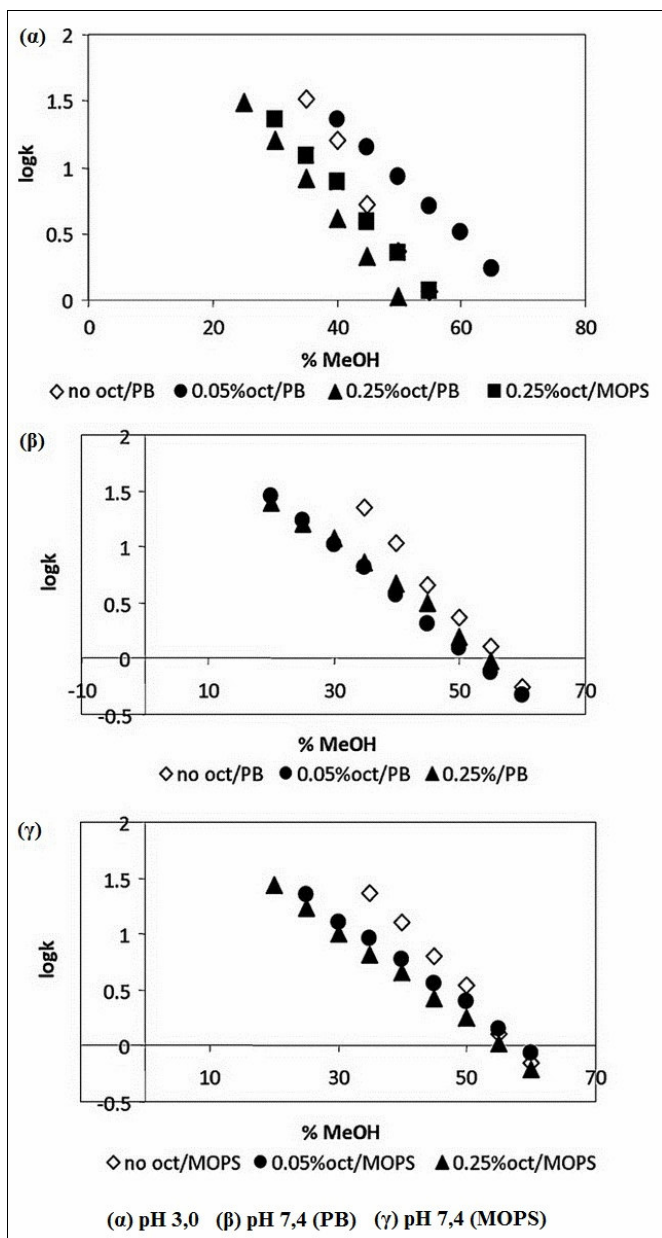
Παρατηρήθηκε ότι η μείωση των τιμών $\log k_w$ παρουσία οκτανόλης οφείλεται κυρίως στη σημαντική μείωση των κλίσεων S. Θεωρώντας ότι οι κλίσεις εκφράζουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ουσιών και της κινητής φάσης, η παρουσία της οκτανόλης δείχνει να διευκολύνει το σχηματισμό κοιλότητας στο διαλύτη. Αυτό ωστόσο δεν οδηγεί κατ'ανάγκη σε ταχύτερη έκλυση των ουσιών αν ο καθοριστικός παράγοντας είναι η αλληλεπίδραση με τη στατική φάση. Ως εκ τούτου διερευνήθηκε η επίδραση της οκτανόλης και στις ισοκρατικές τιμές. Παρατηρήθηκε ότι σε ορισμένες περιπτώσεις οι ισοκρατικές τιμές $\log k$ είναι υψηλότερες παρουσία οκτανόλης υποδηλώνοντας ενίσχυση της αλληλεπίδρασης με τη στατική φάση. Η διαπίστωση είναι σε αντίθεση με τη γενική θεώρηση για το ρόλο της οκτανόλης ως παράγοντα επικάλυψης των σιλανόφιλων θέσεων. Η αντιστροφή αυτή στη συγκράτηση φαίνεται να εξαρτάται από τη δομή των ενώσεων, τη συγκέντρωση της οκτανόλης στην κινητή φάση καθώς και από το pH, τη σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος και το ποσοστό της μεθανόλης. Τη συμπεριφορά αυτή εμφανίζουν περισσότερο ογκώδεις ενώσεις σε pH 3,0 παρουσία 0,05% οκτανόλης. Επιπλέον η αντιστροφή στη συγκράτηση παρατηρείται κυρίως σε υψηλά ποσοστά μεθανόλης. Σε pH 7,4 η αντιστροφή παρατηρήθηκε για μικρό αριθμό ενώσεων παρουσία MOPS. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά η επίδραση της οκτανόλης φαίνεται ότι είναι περισσότερο πολύπλοκη απ'ότι είχε αρχικά υποθεθεί, καθώς σχετίζεται με τις

αλληλεπιδράσεις των αναλυτών τόσο με τη στατική, όσο και με την κινητή φάση^{123,153}. Στα Σχήματα ΠΑ-11 έως ΠΑ-13 απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές σχέσεις $\log k/\varphi$ για τις ενώσεις 10, 14 και 19 στις διάφορες χρωματογραφικές συνθήκες.



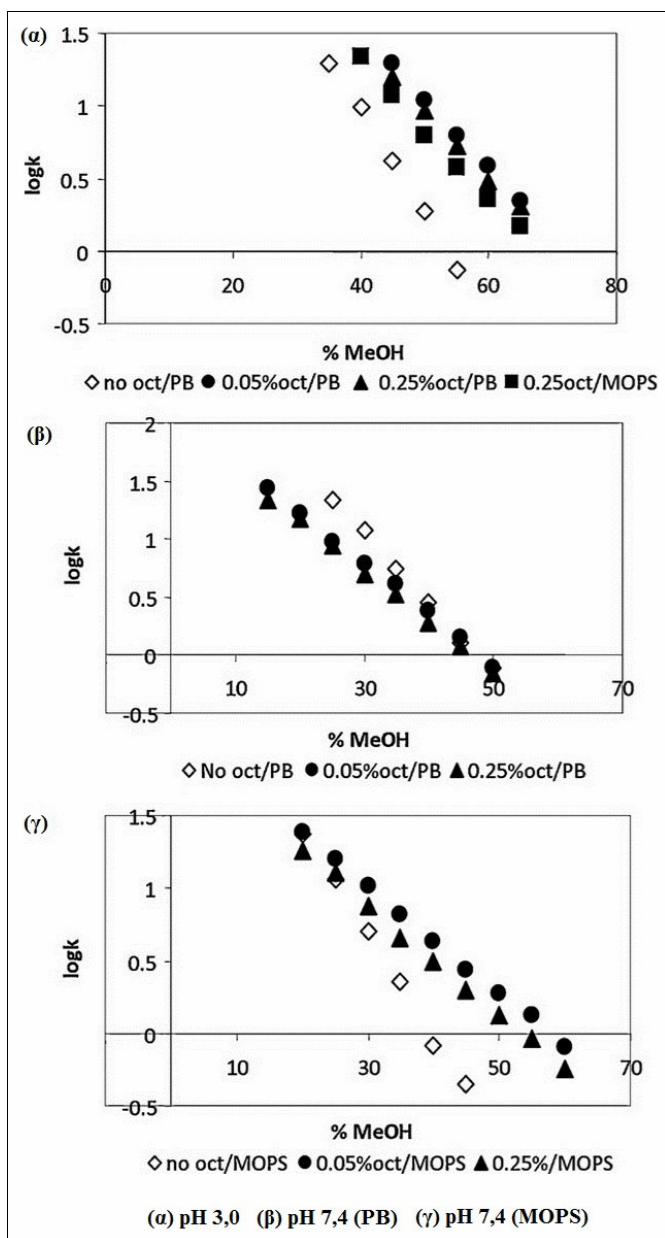
Σχήμα ΠΑ-11. Σχέσεις $\log k/\varphi$ για την ένωση 10 στις διάφορες χρωματογραφικές συνθήκες.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
 Β. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ
 ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ RP-HPLC ΚΑΙ RP-TLC



Σχήμα ΠΑ-12. Σχέσεις $\log k/\varphi$ για την ένωση 14 στις διάφορες χρωματογραφικές συνθήκες.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
 Β. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ
 ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ RP-HPLC ΚΑΙ RP-TLC



Σχήμα ΠΑ-13. Σχέσεις $\log k/\varphi$ για την ένωση 19 στις διάφορες χρωματογραφικές συνθήκες.

2.2.2 Συσχέτιση μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών

Οι συσχετίσεις μεταξύ των χρωματογραφικών μεγεθών συνοψίζονται στους πίνακες συσχετίσεων (correlation matrix) οι οποίοι περιλαμβάνουν τις τιμές $\log k_w$ και τις κλίσεις S στις διάφορες πειραματικές συνθήκες (Πίνακες ΠΑ-11 και ΠΑ-12) Όπως έχει αναφερθεί ήδη (§2.7 στο Θεωρητικό Μέρος), η κλίση S της εξίσωσης Schoenmakers αποτελεί υδρόφοβη παράμετρο και θεωρείται ότι σχετίζεται με την ειδική υδρόφοβη επιφάνεια (Specific Hydrophobic Surface Area) των μορίων και παρέχει σημαντικές πληροφορίες, για την καταλληλότητα του χρωματογραφικού συστήματος. Καλές συσχετίσεις μεταξύ $\log k_w$ και S αποτελούν ένδειξη ομοιομορφίας του μηχανισμού συγκράτησης. Οι Πίνακες ΠΑ-11 και ΠΑ-12 περιλαμβάνουν επίσης τις παραμέτρους $\log P$ ($\log D_{7,4}$) και logit ώστε να υπάρχει άμεση εικόνα των συσχετίσεων των διαφόρων χρωματογραφικών δεικτών με τα μεγέθη αυτά. Οι καλύτερες συσχετίσεις έχουν επισημανθεί με μαύρα στοιχεία.

Πίνακας ΠΑ-11. Πίνακας συσχετίσεων μεταξύ $\log k_w$ με τις κλίσεις S για όλες τις πειραματικές συνθήκες σε pH 3,0.

	$\log k_w$ (PB)	S (PB)	$\log k_w$ 0,05 (PB)	S 0,05 (PB)	$\log k_w$ 0,25 (PB)	S 0,25 (PB)	$\log k_w$ 0,25 (MOPS)	S 0,25 (MOPS)	$\log P$	logit
$\log k_w$ (PB)	1									
S (PB)	0,887	1								
$\log k_w$ 0,05 (PB)	0,880	0,802	1							
S 0,05 (PB)	0,868	0,865	0,876	1						
$\log k_w$ 0,25 (PB)	0,849	0,788	0,974	0,890	1					
S 0,25 (PB)	0,816	0,701	0,784	0,772	0,819	1				
$\log k_w$ 0,25 (MOPS)	0,845	0,787	0,965	0,906	0,995	0,811	1			
S 0,25 (MOPS)	0,591	0,537	0,482	0,560	0,508	0,704	0,506	1		
$\log P$	0,753	0,653	0,881	0,798	0,871	0,702	0,880	0,495	1	
logit	0,457	0,329	0,602	0,488	0,478	0,398	0,493	0,175	0,591	1

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ
 Β. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ
 ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΥΛ-ΘΕΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ RP-HLPC ΚΑΙ RP-TLC

Πίνακας ΠΑ-12. Πίνακας συσχετίσεων μεταξύ $\log k_w$ με τις κλίσεις S για όλες τις πειραματικές συνθήκες σε pH 7,4.

	$\log k_w$ (PB)	S (PB)	$\log k_w$ (MOPS)	S (MOPS)	$\log k_w$ (PB)	S (PB)	$\log k_w$ (MOPS)	S (MOPS)	$\log k_w$ (PB)	S (PB)	$\log k_w$ (MOPS)	S (MOPS)	$\log k_w$ (PB)	S (PB)	$\log k_w$ (MOPS)	S (MOPS)	$\log D_{7,4}$	logit
$\log k_w$ (PB)	1																	
S (PB)	0,874	1																
$\log k_w$ (MOPS)	0,981	0,813	1															
S (MOPS)	0,834	0,736	0,833	1														
$\log k_w$ 0,05 (PB)	0,935	0,830	0,942	0,762	1													
S0,05 (PB)	0,828	0,817	0,827	0,739	0,905	1												
$\log k_w$ 0,05 (MOPS)	0,936	0,768	0,961	0,773	0,972	0,830	1											
S0,05 (MOPS)	0,590	0,443	0,595	0,438	0,628	0,399	0,690	1										
$\log k_w$ 0,25 (PB)	0,953	0,770	0,953	0,844	0,940	0,857	0,932	0,536	1									
S0,25 (PB)	0,915	0,789	0,908	0,847	0,935	0,909	0,916	0,490	0,956	1								
$\log k_w$ 0,25 (MOPS)	0,950	0,764	0,960	0,834	0,944	0,854	0,945	0,551	0,996	0,951	1							
S0,25 (MOPS)	0,896	0,803	0,901	0,757	0,935	0,873	0,926	0,544	0,901	0,948	0,910	1						
$\log D_{7,4}$	0,867	0,667	0,854	0,727	0,801	0,658	0,858	0,609	0,864	0,835	0,861	0,798	1					
logit	0,538	0,619	0,499	0,519	0,419	0,405	0,365	0,153	0,460	0,327	0,450	0,307	0,391	1				

Σε pH 3,0 οι χρωματογραφικοί δείκτες που έχουν προσδιοριστεί παρουσία οκτανόλης συσχετίζονται πολύ καλά μεταξύ τους, ανεξάρτητα από το ποσοστό της οκτανόλης και το ρυθμιστικό διάλυμα. Αντίθετα, οι τιμές $\log k_w$ παρουσία οκτανόλης δίνουν μέτριες συσχετίσεις με τις τιμές $\log k_w$ παρουσία οκτανόλης. Οι συσχετίσεις $\log k_w/S$ είναι μέτριες σε όλες τις περιπτώσεις, ένδειξη ότι οι υποκαταστάτες στο σκελετό του πυρρολίου επηρεάζουν το μηχανισμό κατανομής.

Σε pH 7,4 αν και οι τιμές $\log k_w$ εμφανίζουν σημαντικότερη μείωση παρουσία οκτανόλης, οι συσχετίσεις μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών είναι γενικά καλύτερες και δεν επηρεάζονται από την παρουσία του προσθετικού παράγοντα. Οι συσχετίσεις μεταξύ $\log k_w/S$ είναι ικανοποιητικές όταν χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα PB. Επίσης καλή συσχέτιση $\log k_w/S$ λαμβάνεται παρουσία MOPS και 0,25% οκτανόλης. Αντίθετα σε ποσοστό 0,05% οκτανόλης στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε MOPS ως ρυθμιστικό διάλυμα λαμβάνεται φτωχή συσχέτιση $\log k_w/S$, ένδειξη ανομοιόμορφου μηχανισμού συγκράτησης. Οι κλίσεις S συσχετίζονται ικανοποιητικά μεταξύ τους μόνο υπό αυστηρά παρόμοιες συνθήκες. Στον Πίνακα ΠΑ-13 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές συσχετίσεις μεταξύ των διαφόρων τιμών $\log k_w$.

Πίνακας ΠΑ-13. Συσχετίσεις μεταξύ των τιμών $\log k_w$ (n=19).

		$\log k_{w(I)} = a \log k_{w(II)} + b$						
		(I)	(II)	a	b	r	s	εξ.
pH 3,0	PB _{0,25%}	PB _{no-oct}	0,58(±0,09)	0,41(±0,30)	0,849	0,254	(ΠΑ-20)	
	MOPS _{0,25%}	PB _{0,25%}	0,96(±0,02)	0,06(±0,06)	0,995	0,046	(ΠΑ-21)	
pH 7,4	PB _{0,25%}	PB _{no-oct}	0,72(±0,06)	-0,27(±0,15)	0,953	0,151	(ΠΑ-22)	
	MOPS _{0,25%}	MOPS _{no-oct}	0,75(±0,05)	-0,36(±0,14)	0,960	0,141	(ΠΑ-23)	
	MOPS _{0,25%}	PB _{0,25%}	1,00(±0,02)	0,01(±0,04)	0,996	0,044	(ΠΑ-24)	

Παρατηρήθηκε πρακτικά 1:1 συσχέτιση μεταξύ των τιμών που προέκυψαν στο ίδιο pH, προσθέτοντας την ίδια ποσότητα οκτανόλης ανεξάρτητα από το ρυθμιστικό διάλυμα, βλ. εξισώσεις (ΠΑ-21) και (ΠΑ-24), γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι σχηματισμός ζεύγους ιόντων μεταξύ των καρβοξυλικών ανιόντων και των κατιόντων K^+/Na^+ στο ρυθμιστικό διάλυμα PB είναι αμελητέος. Η διαφοροποίηση των κλίσεων στις εξισώσεις (ΠΑ-20), (ΠΑ-22) και (ΠΑ-23) ενισχύει την άποψη ότι η προσθήκη της οκτανόλης οδηγεί σε μη συστηματική επίδραση στη συγκράτηση, μεταβάλλοντας το ενεργειακό ισοζύγιο.

2.2.3 Σχέσεις των χρωματογραφικών δεικτών με τους συντελεστές κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού

Η σύγκριση μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών με τα μεγέθη λιποφιλίας στο σύστημα οκτανόλης-νερού δείχνει πως οι τιμές $\log P$ και $\log D_{7,4}$ είναι κατά πολύ χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές $\log k_w$. Οι διαφορές αυτές είναι μεγαλύτερες σε pH 7,4 όπου οι ενώσεις είναι ιονισμένες. Η προσθήκη της οκτανόλης αποτελεί ευνοϊκό παράγοντα, καθώς οδηγεί σε χαμηλότερες τιμές $\log k_w$ μειώνοντας κατ'αυτόν τον τρόπο τις διαφορές μεταξύ των τιμών $\log k_w$ και $\log P$ ή $\log D_{7,4}$. Στον Πίνακα ΠΑ-14 παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών $\log k_w$ και $\log P$.

Πίνακας ΠΑ-14. Συσχετίσεις μεταξύ $\log k_w$ και $\log P$ (n=19).

$\log P = a \log k_w(I) + b$					
(I)	a	b	r	s	εξ.
PB _{no-oct}	0,70(±0,15)	-0,27(±0,51)	0,753	0,429	(ΠΑ-25)
PB _{0,05%}	1,13(±0,15)	-0,83(±0,38)	0,881	0,308	(ΠΑ-26)
PB _{0,25%}	1,18(±0,16)	-0,71(±0,39)	0,871	0,320	(ΠΑ-27)
MOPS _{0,25%}	1,23(±0,16)	-0,80(±0,38)	0,880	0,309	(ΠΑ-28)

*για την ένωση 19: $\log P=3,16$.

Παρουσία οκτανόλης λαμβάνονται καλύτερες συσχετίσεις μεταξύ των τιμών $\log P/\log k_w$ αν και οι συντελεστές συσχέτισης παραμένουν μέτριοι. Επιπλέον οι κλίσεις των εξισώσεων είναι πλησιέστερες στη μονάδα υποδηλώνοντας σχετική αναλογία στο ενεργειακό ισοζύγιο που διέπει τη συγκράτηση και την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Το ποσοστό της προστιθέμενης οκτανόλης στην κινητή φάση δεν φαίνεται να επηρεάζει τη συσχέτιση με τις τιμές $\log P$, επιβεβαιώνοντας προηγούμενες μελέτες μας σύμφωνα με τις οποίες η προσομοίωση του χρωματογραφικού συστήματος με το σύστημα οκτανόλης-νερού μπορεί να επιτευχθεί και με μικρότερες ποσότητες οκτανόλης¹⁵³. Ωστόσο οι εξισώσεις που προκύπτουν δεν αντιστοιχούν σε 1:1 συσχετίσεις παρόλο που οι συγκεκριμένες χρωματογραφικές συνθήκες προτείνονται ως πρότυπες για τον προσδιορισμό τιμών $\log k_w$ όξινων ενώσεων που πρακτικά αντιστοιχούν σε τιμές $\log P$. Διαπιστώνεται ως εκ τούτου εκ νέου ότι γενικά μοντέλα που αφορούν σε δομικά διαφορετικές ενώσεις δεν μπορούν να εφαρμοστούν.

Για να ελεγχθεί η σχέση μεταξύ γενικών και επιμέρους μοντέλων εισήχθησαν οι υπό μελέτη ενώσεις στην εξίσωση αναφοράς, βλ. εξίσωση (IIA-29), η οποία προκύπτει υπό τις ίδιες συνθήκες για 45 όξινης ενώσεις και προτείνεται από τους Γιαγκίνη και συν¹⁵³. Διαπιστώθηκε μικρή μόνο μείωση του συντελεστή συσχέτισης χωρίς σημαντική διαφοροποίηση των συντελεστών της εξίσωσης, βλ. εξίσωση (IIA-30). Θα πρέπει ωστόσο να ληφθεί υπόψη η αρκετά μεγάλη αύξηση της τυπικής απόκλισης, η οποία αντιστοιχεί σε όριο ανοχής σφάλματος ~0,87, έτσι ώστε να μπορούν να προσαρμοστούν στην εξίσωση τα παράγωγα του πυρρολίου.

$$\log P = 0,99(\pm 0,03)\log k_{w[0,05\%]} + 0,23(\pm 0,07) \quad (\text{IIA-29})$$

$$n = 45, r = 0,986, s = 0,283, F = 1412$$

$$\log P = 0,96(\pm 0,04)\log k_{w[0,05\%]} + 0,08 (\pm 0,10) \quad (\text{IIA-30})$$

$$n = 64, r = 0,953, s = 0,437, F = 591$$

Αντίστοιχη αδυναμία των πρότυπων χρωματογραφικών συνθηκών να δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα για τις υπό μελέτη ενώσεις παρατηρήθηκε και σε pH 7,4. Οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών $\log k_w$ και $\log D_{7,4}$ περιλαμβάνονται στον Πίνακα IIA-15.

Πίνακας IIA-15. Συσχετίσεις μεταξύ $\log k_w$ και $\log D_{7,4}$ (n=19).

$\log D_{7,4} = a \log k_{w(I)} + b$					
(I)	a	b	r	s	εξ.
PB _{no-oct}	0,75(±0,10)	-2,70(±0,28)	0,867	0,287	(IIA-31)
MOPS _{no-oct}	0,76(±0,11)	-2,75(±0,30)	0,854	0,301	(IIA-32)
PB _{0,05%}	0,94(±0,17)	-2,49(±0,33)	0,801	0,346	(IIA-33)
MOPS _{0,05%}	1,04(±0,15)	-2,68(±0,29)	0,858	0,296	(IIA-34)
PB _{0,25%}	0,99(±0,14)	-2,33(±0,23)	0,864	0,291	(IIA-35)
MOPS _{0,25%}	0,98(±0,14)	-2,33(±0,24)	0,861	0,294	(IIA-36)

*για την ένωση 19: $\log D_{7,4} = -0,04$.

Σε pH 7,4 η προσθήκη οκτανόλης στην κινητή φάση δεν βελτιώνει τις συσχετίσεις $\log k_w / \log D_{7,4}$. Ωστόσο παρουσία οκτανόλης οι κλίσεις πρακτικά είναι ίσες με τη μονάδα, ενώ μειώνεται ο αρνητικός σταθερός όρος. Εξάλλου, δεν διαπιστώθηκε σημαντική επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος και του ποσοστού της οκτανόλης.

Αν και στην περίπτωση των καρβοξυλικών οξέων οι προσπάθειες προτυποποίησης των χρωματογραφικών συνθηκών σε pH 7,4 δεν έχουν οδηγήσει σε 1:1 συσχέτιση προτείνεται στη βιβλιογραφία από τους Γιαγκίνη και συν¹⁵³ πρότυπη εξίσωση, βλ. εξίσωση (I-22) στο Θεωρητικό Μέρος, για τη σχέση $\log D_{7,4} / \log k_{w(MOPS)[0,25\%]}$ η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό των τιμών $\log D_{7,4}$. Η εξίσωση έχει προκύψει από δομικώς διαφορετικά καρβοξυλικά οξέα αν και ο αριθμός των ενώσεων είναι περιορισμένος.

$$\log D_{7,4} = 0,85(\pm 0,04) \log k_{w(MOPS)[0,25\%]} - 0,91(\pm 0,08) \quad (I-22)$$

$$n = 21, r = 0,976, s = 0,266, F = 373$$

Η πρότυπη εξίσωση αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τα υπό μελέτη παράγωγα του πυρρολίου ως τυφλή σειρά ελέγχου. Οι τιμές $\log D_{7,4(pred)}$ που υπολογίστηκαν από την πρότυπη εξίσωση συγκρίθηκαν με αυτές που προβλέπονται από τις εξισώσεις (IIA-34) και (IIA-36). Οι τιμές αυτές αναφέρονται στον Πίνακα IIA-16 μαζί με τις πειραματικές τιμές $\log D_{7,4}$.

Πίνακας IIA-16. Πειραματικές και υπολογιζόμενες τιμές $\log D_{7,4}$.

No	$\log D_{7,4(PB)}$	$\log D_{7,4(εξ. IIA-22)}$	$\log D_{7,4(εξ. IIA-34)}$	$\log D_{7,4(εξ. IIA-36)}$
1	-1,71	-0,16	-1,35	-1,46
2	-0,81	0,20	-1,03	-1,05
3	-0,05	1,06	0,06	-0,06
4	-1,76	0,12	-1,10	-1,14
5	-0,65	0,29	-0,81	-0,95
6	-0,28	1,10	-0,05	-0,02
7	-1,43	0,07	-1,39	-1,20
8	-0,72	0,28	-0,56	-0,96
9	-0,58	0,25	-0,76	-0,99
10	-0,74	0,42	-0,74	-0,80
11	-0,73	0,42	-0,71	-0,79
12	-0,72	0,12	-1,08	-1,14
13	-0,63	0,88	-0,34	-0,27
14	-0,13	1,00	-0,25	-0,13
15	0,17	1,10	-0,16	-0,02
16	-1,51	-0,06	-1,53	-1,35
17	-0,81	0,64	-0,43	-0,55
18	-1,16	0,10	-1,39	-1,16

Όπως φαίνεται στον Πίνακα ΠΑ-16 οι προβλέψεις της πρότυπης εξίσωσης, οδηγούν σε συστηματική υπερτίμηση, ενώ οι τιμές που προβλέπονται από τις εξισώσεις (ΠΑ-34) και (ΠΑ-36) δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους και βρίσκονται κοντά στις πειραματικές τιμές.

3. Προσδιορισμός δεικτών λιποφιλίας με RP-TLC

3.1 Υλικά και μέθοδοι

3.1.1 Οργανολογία

Χρησιμοποιήθηκαν υάλινοι κώδωνες αναπτύξεως εφοδιασμένοι με ειδικά άγκιστρα συγκράτησης των πλακών. Οι θάλαμοι ήταν της εταιρίας Alltech με διαστάσεις 30x28x10cm. Για την τοποθέτηση των κηλίδων χρησιμοποιήθηκαν μικροπιπέτες των 5μl. Για την εμφάνιση των κηλίδων χρησιμοποιήθηκε λάμπα υπεριώδους της εταιρίας Vilber Lourmat με ακτινοβολία στα 254nm.

3.1.2 Αντιδραστήρια

Η μεθανόλη ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC-grade) της εταιρίας Lab-Scan. Το νερό ήταν απιονισμένο και καθαρισμένο μέσω του συστήματος παραγωγής νερού Milli-Q Plus (Millipore). Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε MOPS_{7,4} (βλ. §1.1.2).

3.1.3 Χρωματογραφικές συνθήκες

Ως στατικές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αντιστρόφου φάσεως της εταιρίας Merck, 20x20 cm, RP-8F254S και RP-18F254S με υλικό επιστρώσεως της πλάκας σιλανοποιημένο πήγμα οξειδίου του πυριτίου με υδρογονανθρακικές αλυσίδες 8 και 18 ατόμων άνθρακα αντίστοιχα. Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν μίγματα

μεθανόλης-MOPS σε διάφορες αναλογίες και συγκεκριμένα με περιεκτικότητα σε μεθανόλη από 30-55% και βήμα 5%, σε pH 7,4.

3.1.4 Χρωματογραφική διαδικασία

Μικρή ποσότητα από κάθε ουσία της τάξεως των λίγων mg μεταφέρεται σε erpendorf όπου προστίθενται 1-1,5ml μεθανόλης. Τα δείγματα τοποθετούνται στις πλάκες με τη βοήθεια μικροπιπέτων των 5μl σε απόσταση 1cm από την αρχή της πλάκας και 1,5cm μεταξύ τους, Τα δείγματα τοποθετούνται με τυχαία σειρά προς αποφυγή τυχόν αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ουσιών καθώς και ανομοιομορφιών ως προς την κατασκευή της πλάκας. Μετά την τοποθέτηση των κηλίδων, οι πλάκες μεταφέρονται στο θάλαμο ανάπτυξης, στη βάση του οποίου έχει τοποθετηθεί ποσότητα κινητής φάσης. Οι πλάκες κρατούνται μακριά από την κινητή φάση με τη βοήθεια των ειδικών αγκίστρων για 45min-1h, όπου θεωρητικά ο διαλύτης ανάπτυξης έχει κορέσει το χώρο του θαλάμου. Ακολουθεί η ανάπτυξη μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να διανύσει 12-14cm. Η διάρκεια της ανάπτυξης κυμαινόταν μεταξύ μιας και τριών ωρών, ανάλογα με το ποσοστό του νερού στην κινητή φάση. Η ανίχνευση των κηλίδων γίνεται με υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 254nm και μετρώνται οι τιμές του παράγοντα επιβράδυνσης R_f . Προσδιορίστηκαν τουλάχιστον τρεις τιμές της παραμέτρου R_f και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Οι τιμές R_f μετατρέπονται στην παράμετρο R_M σύμφωνα με τη σχέση (IIA-37):

$$R_M = \log \left[\left(\frac{1}{R_f} \right) - 1 \right] \quad (\text{IIA-37})$$

3.1.5 Προσδιορισμός ανηγμένων τιμών R_{Mw}

Η παράμετρος R_{Mw} υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το γραμμικό τμήμα της εξίσωσης Schoenmakers με χρήση γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης σύμφωνα με τη σχέση (IIA-38):

$$R_M = -S\varphi + R_{Mw} \quad (\text{IIA-38})$$

όπου R_{Mw} η τιμή του παράγοντα χωρητικότητας που αντιστοιχεί σε κινητή φάση 100% ρυθμιστικό διάλυμα και S η κλίση της ευθείας.

3.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές στατικές φάσεις C8 και C18 με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση της περιεκτικότητας σε άνθρακα στη συγκράτηση. Οι τιμές R_{Mw} και οι κλίσεις S που προέκυψαν για όλες τις πειραματικές συνθήκες μαζί με τις διαφορές τους αναφέρονται στον Πίνακα ΠΑ-17. Οι συντελεστές συσχέτισης r είχαν τιμή υψηλότερη από 0,992, ενώ τα σταθερά σφάλματα των τιμών R_{Mw} και των κλίσεων S ήταν χαμηλότερα από $\pm 0,37$ και $\pm 0,81$ αντίστοιχα. Οι τιμές $R_{Mw(C8)}$ ήταν σημαντικά χαμηλότερες από τις τιμές $R_{Mw(C18)}$ με ακραίες διαφορές 0,45 και 1,61 για το παράγωγο της διφθοροφαινόλης (ένωση 20), και το παράγωγο του πυρρολ-2-υλ-οξικού οξέος (ένωση 18).

Πίνακας ΠΑ-17. Τιμές R_{Mw} , κλίσεις S και οι διαφορές τους.

No	$R_{Mw(C18)}$	$Sx100_{C18}$	$R_{Mw(C8)}$	$Sx100_{C8}$	ΔR_{Mw}	$\Delta Sx100$
1	1,42	3,35	0,64	1,98	0,78	1,37
2	2,14	4,59	1,22	2,90	0,92	1,69
3	3,74	6,82	2,14	3,80	1,60	3,02
5	2,18	4,46	0,79	1,65	1,39	2,81
6	3,31	5,56	2,09	3,76	1,22	1,80
7	1,26	2,96	0,47	1,49	0,79	1,47
8	2,19	4,17	1,37	2,78	0,82	1,39
9	2,05	4,20	0,83	1,80	1,22	2,40
10	2,45	4,87	1,13	2,39	1,32	2,48
11	2,97	5,47	1,72	3,33	1,25	2,14
12	1,83	3,49	0,91	1,81	0,92	1,68
13	3,46	6,00	2,13	3,82	1,33	2,18
14	3,87	6,51	2,56	4,56	1,31	1,95
15	3,34	4,67	2,27	5,52	1,07	-0,85
17	2,80	4,72	1,74	3,43	1,06	1,29
18	2,83	5,44	1,22	2,32	1,61	3,12
19	3,78	5,56	3,27	5,13	0,51	0,43
20	4,01	5,65	3,56	6,89	0,45	-1,24

*δεν μετρήθηκαν τιμές για τις ενώσεις 4 και 16 λόγω έλλειψης δειγμάτων.

Η συσχέτιση μεταξύ των τιμών $R_{Mw(C8)}$ and $R_{Mw(C18)}$ οδήγησε στην εξίσωση (ΠΑ-39), με ικανοποιητικά στατιστικά στοιχεία. Η κλίση της εξίσωσης βρίσκεται κοντά στη

μονάδα, ενώ η υψηλή αρνητική τομή αποδίδεται στην υψηλότερη υδροφοβία των πλακών C18.

$$R_{Mw(C8)} = 0,95(\pm 0,10)R_{Mw(C18)} - 0,96(\pm 0,28) \quad (\text{IIA-39})$$

$$n = 18, r = 0,927, s = 0,343, F = 97,05$$

Οι κλίσεις S επίσης διαφοροποιούνται δείχνοντας ότι δεν εξαρτώνται μόνο από τον οργανικό τροποποιητή^{274,275}, αλλά και από τη στατική φάση. Οι τιμές S_{C18} ήταν σημαντικά υψηλότερες από τις τιμές S_{C8} με εξαίρεση τις ενώσεις 15 και 20. Η συσχέτιση μεταξύ $S_{(C18)}$ και $S_{(C8)}$ εμφάνισε ικανοποιητική γραμμικότητα, με τρεις ενώσεις (15, 19 και 20) ν'αποκλίνουν από τη γραμμή παλινδρόμησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ενώσεις 19 και 20 είναι δομικά διαφορετικές από τις υπόλοιπες. Η ένωση 15, δις-υποκατεστημένο-(p-μεθοξυβενζοΐλ)-παράγωγο, εμφανίζει ιδιαίτερη συμπεριφορά με τιμές R_{Mw} χαμηλότερες από τις τιμές των αντίστοιχων μη υποκατεστημένων και μονοϋποκατεστημένων παραγώγων (ενώσεις 13 και 14 αντίστοιχα). Ωστόσο οι αντίστοιχες τιμές στις κλίσεις $S_{(C8)}$ αυξάνονται με την αντίστροφη σειρά $S_{15} > S_{14} > S_{13}$, κατ'αντιστοιχία με την αύξηση του μοριακού όγκου. Στην περίπτωση των τιμών $S_{(C18)}$ ωστόσο ακολουθείται η ίδια αυξητική σειρά στις κλίσεις όπως και στις τιμές $R_{Mw(C18)}$, δηλ. $S_{13} > S_{14} > S_{15}$). Εξαιρώντας τις τρεις αυτές ενώσεις, ελήφθη η εξίσωση (IIA-40) με κλίση ίση με τη μονάδα και υψηλό σταθερό όρο, καταδεικνύοντας πως η υδροφοβία της στατικής φάσης οδηγεί σε συστηματική αύξηση στις τιμές των κλίσεων.

$$S_{(C18)} = 1,00(\pm 0,18)S_{(C8)} + 2,05(\pm 0,52) \quad (\text{IIA-40})$$

$$n=15, r=0,845, s=0,629, F=32,43$$

Οι εξισώσεις (IIA-41) και (IIA-42) εκφράζουν το βαθμό γραμμικότητας μεταξύ των τιμών R_{Mw} και των κλίσεων S ως μέτρο ομοιομορφίας του μηχανισμού συγκράτησης.

$$S_{(C8)} = 1,62(\pm 0,12)R_{Mw(C8)} + 0,59(\pm 0,23) \quad (\text{IIA-41})$$

$$n=18, r=0,959, s=0,438, F=181,7$$

$$S_{(C18)} = 1,12(\pm 0,13)R_{Mw(C18)} + 1,81(\pm 0,37) \quad (\text{IIA-42})$$

n=18, r=0,911, s=0,449, F=78,67

Πολύ καλή γραμμικότητα παρατηρήθηκε στην περίπτωση της στατικής φάσης C8. Η συσχέτιση βελτιώνεται περαιτέρω με εξαίρεση των ίδιων ενώσεων οι οποίες ήταν έκτροπες στις συσχετίσεις $S_{(C18)}/S_{(C8)}$ (ενώσεις 15, 19 και 20) βλ. εξίσωση (IIA-43):

$$S_{(C18)} = 1,38(\pm 0,08)R_{Mw(C18)} + 1,30(\pm 0,23) \quad (\text{IIA-43})$$

n = 15, r = 0,977, s = 0,253, F = 268,55

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο μηχανισμός συγκράτησης στις στατικές φάσεις C8 είναι λιγότερο ευαίσθητος σε δομικές αποκλίσεις σε σχέση με τις στατικές φάσεις C18.

3.2.1 Σχέσεις με τη λιποφιλία

Η σύγκριση μεταξύ των τιμών R_{Mw} και $\log P(D)$ κατέδειξε ότι οι χρωματογραφικοί δείκτες είναι κατά πολύ υψηλότεροι από τους συντελεστές μερισμού/κατανομής. Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές $R_{Mw(C8)}$ εμφάνισαν καλύτερα στατιστικά στοιχεία στις συσχετίσεις με τα δεδομένα λιποφιλίας, απ'ότι οι τιμές $R_{Mw(C18)}$, γεγονός το οποίο αποτελεί ένδειξη ότι το λιγότερο υδρόφοβο περιβάλλον των πλακών C-8 προσομοιώνει καλύτερα το σύστημα οκτανόλης-νερού στην περίπτωση των υπό μελέτη όξινων ενώσεων. Γενικά οι τιμές R_{Mw} συσχετίστηκαν καλύτερα με τις τιμές $\log D_{7,4}$ απ'ότι με τις τιμές $\log P$. Οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών R_{Mw} και $\log P$ ή $\log D_{7,4}$ παρουσιάζονται στον Πίνακα IIA-18.

Πίνακας IIA-18. Συσχετίσεις μεταξύ R_{Mw} και $\log P/\log D_{7,4}$ (n=18).

$\log P(D) = aR_{Mw(I)} + b$							
$\log P(D)$	(I)	a	b	r	s	F	εξ.
$\log P$	C ₈	0,67(±0,12)	1,09(±0,23)	0,814	0,438	31,34	(IIA-44)
$\log D_{7,4}$	C ₈	0,57 (±0,09)	-1,52(±0,17)	0,851	0,322	42,10	(IIA-45)
$\log P$	C ₁₈	0,65(±0,14)	0,43(±0,40)	0,759	0,491	21,73	(IIA-46)
$\log D_{7,4}$	C ₁₈	0,57(±0,10)	-2,12(±0,29)	0,815	0,356	31,65	(IIA-47)

*για την ένωση 20: $\log P=3,70$ και $\log D_{7,4}=0,86$.

Συσχέτιση με τις τιμές logP σε συνδυασμό με τη διόρθωση λόγω ιονισμού Q οδήγησε στις εξισώσεις (IIA-48) και (IIA-49), οι οποίες πρακτικά δεν διαφέρουν συγκριτικά με τις εξισώσεις (IIA-45) και (IIA-47) ως προς τους συντελεστές παλινδρόμησης των χρωματογραφικών δεικτών και τους σταθερούς όρους και εμφανίζουν βελτιωμένα στατιστικά στοιχεία. Ο παράγοντας Q ήταν στατιστικά σημαντικός ($|t|=3,62$ και $3,68$ αντίστοιχα) με συντελεστές παλινδρόμησης πλησίον της μονάδας.

$$\log P = 0,59(\pm 0,09)R_{Mw(C8)} + 0,89(\pm 0,25)Q - 1,24(\pm 0,67) \quad (\text{IIA-48})$$

$$n = 18, r = 0,892, r^2 = 0,795, s = 0,331, F = 34,04$$

$$\log P = 0,57(\pm 0,11)R_{Mw(C18)} + 0,99(\pm 0,27)Q - 2,11(\pm 0,75) \quad (\text{IIA-49})$$

$$n = 18, r = 0,864, r^2 = 0,747, s = 0,368, F = 26,12$$

Οι εξισώσεις (IIA-48) και (IIA-49) συγκρίθηκαν με την εξίσωση (IIA-50) που αναφέρεται για δομικά διαφορετικές βασικές και ουδέτερες ενώσεις υπό ανάλογες συνθήκες κινητής φάσης και πλάκες RP-C18²⁷⁶.

$$\log P = 1,12(\pm 0,10)R_{Mw} + 0,86(\pm 0,10)Q - 1,28(\pm 0,32) \quad (\text{IIA-50})$$

$$n = 26, r = 0,944, s = 0,571, F = 97,4$$

Η εξίσωση (IIA-50) έχει πολύ καλύτερο συντελεστή συσχέτισης μεγαλύτερη ωστόσο τυπική απόκλιση. Ο συντελεστής του όρου Q δεν διαφέρει σημαντικά, ενώ η κλίση του όρου R_{Mw} είναι ελαφρώς μεγαλύτερη από τη μονάδα σε αντίθεση με τις αντίστοιχες κλίσεις στις εξισώσεις (IIA-48) και (IIA-49).

3.2.2 Σχέσεις μεταξύ RP-TLC και RP-HPLC

Οι τιμές R_{Mw} συσχετίστηκαν καταρχήν με τις τιμές $\log k_w$ σε pH 7,4 απουσία και παρουσία οκτανόλης στην κινητή φάση. Οι συσχετίσεις αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα IIA-19.

Πίνακας ΠΑ-19. Συσχετίσεις μεταξύ R_{Mw} και $\log k_w$ σε pH 7,4 (n=18).

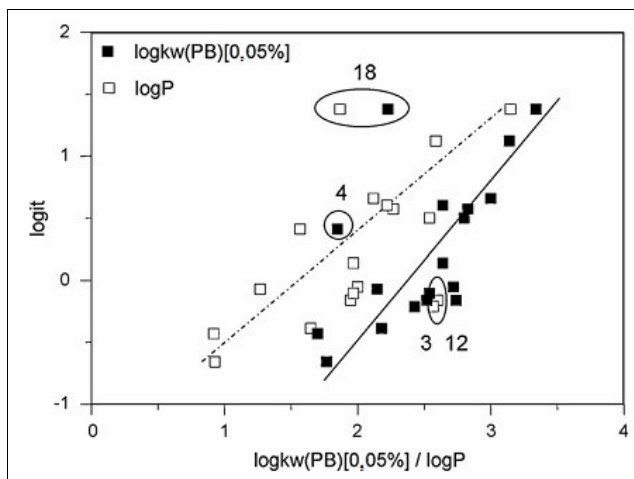
$\log k_{w(I)} = aR_{Mw(II)} + b$							
(I)	(II)	a	b	r	s	F	εξ.
MOPS _{no-oct}	C ₈	0,47(±0,13)	1,93(±0,23)	0,682	0,454	13,92	(ΠΑ-51)
MOPS _{no-oct}	C ₁₈	0,56(±0,11)	1,16(±0,30)	0,643	0,371	28,84	(ΠΑ-52)
MOPS _{0,05%}	C ₈	0,41(±0,08)	1,29(±0,15)	0,785	0,291	25,68	(ΠΑ-53)
MOPS _{0,05%}	C ₁₈	0,44(±0,08)	0,75(±0,22)	0,827	0,264	34,74	(ΠΑ-54)
MOPS _{0,25%}	C ₈	0,51(±0,07)	0,86(±0,13)	0,876	0,258	52,70	(ΠΑ-55)
MOPS _{0,25%}	C ₁₈	0,55(±0,06)	0,21(±0,18)	0,907	0,225	74,23	(ΠΑ-56)

*για την ένωση 20: $\log k_w=2,85$, $\log k_{w[0,05\%]}=2,59$, $\log k_{w[0,25\%]}=2,59$.

Οι συσχετίσεις είναι φτωχές απουσία οκτανόλης, ενώ βελτιώνονται με αύξηση του ποσοστού της οκτανόλης στην κινητή φάση. Σε όλες τις περιπτώσεις οι κλίσεις των εξισώσεων είναι κοντά στο 0,5. Ο σταθερός όρος μειώνεται με την αύξηση του ποσοστού της οκτανόλης στην κινητή φάση και είναι στατιστικά μη σημαντικός στην εξίσωση (ΠΑ-56). Η εξίσωση (ΠΑ-56) αποτελεί την καλύτερη συσχέτιση, γεγονός που υποδηλώνει μικρότερη επίδραση των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων στην RP-TLC απ'ότι στην RP-HLPC.

4. Σύγκριση των χρωματογραφικών δεικτών με τη βιολογική δράση

Οι τιμές $\log k_w$ και R_{Mw} χρησιμοποιήθηκαν ως παράμετροι λιποφιλίας για τη συσχέτιση της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων επί της αναγωγής της αλδόζης. Με βάση τους Πίνακες ΠΑ-11 και ΠΑ-12 προκύπτει πως οι τιμές $\log k_{w(PB)[0,05\%]}$ που προσδιορίστηκαν σε pH 3,0 είναι καταλληλότερες για τη συσχέτιση των τιμών logit. Στο Σχήμα ΠΑ-14 απεικονίζεται γραφικά η σχέση των τιμών logit ως προς τις τιμές $\log k_{w(PB)[0,05\%]}$ συγκριτικά με τις τιμές logP.



Σχήμα ΠΑ-14. Απεικόνιση των τιμών logit έναντι των τιμών $\log k_{w(PB)[0,05\%]}$ και $\log P$.

Η ένωση 18 η οποία διαθέτει ένα ελεύθερο υδρογόνο στο άζωτο του πυρρολίου εμφανίζει εμφανώς αποκλίνουσα συμπεριφορά και στις δυο περιπτώσεις. Οι ενώσεις 3 και 12 οι οποίες αποτελούν έκτροπες τιμές στη σχέση $\logit/\log P$, προσαρμόζονται ικανοποιητικά στη σχέση $\logit/\log k_{w(PB)[0,05\%]}$. Αντίθετα έκτροπη τιμή παρατηρείται για την ένωση 4 (μεθόξυ παράγωγο), η οποία ωστόσο προσαρμόζεται στη σχέση $\logit/\log P$. Ας σημειωθεί ότι η ένωση αυτή εμφανίζει αποκλίνουσα συμπεριφορά και στη σχέση $\log k_w/\log P$. Αφαιρώντας τις ενώσεις 4 και 18 εξήχθη η εξίσωση (ΠΑ-57):

$$\logit = 1,17(\pm 0,17)\log k_{w(PB)[0,05\%]} - 2,70(\pm 0,44) \quad (\text{ΠΑ-57})$$

$$n = 16, r = 0,872, r^2_{cv} = 0,673, s = 0,314, F = 18,47$$

Εισάγωντας τη σολβατοχρωμική παράμετρο B του Abraham ή την ηλεκτρονιακή σταθερά σ ως έναν επιπλέον όρο, λαμβάνονται οι εξισώσεις (ΠΑ-58) και (ΠΑ-59) αντίστοιχα με βελτιωμένα στατιστικά στοιχεία.

$$\logit = 0,88(\pm 0,18)\log k_{w(PB)[0,05\%]} + 0,73(\pm 0,32)B - 2,90(\pm 0,39) \quad (\text{ΠΑ-58})$$

$$n = 16, r = 0,896, r^2_{cv} = 0,763, s = 0,256, F = 31,53, \text{Itl}B = 2,28$$

$$\logit = 0,98(\pm 0,17)\log k_{w(PB)[0,05\%]} - 0,45(\pm 0,22)\sigma - 2,35(\pm 0,42) \quad (\text{ΠΑ-59})$$

$$n = 16, r = 0,887, r^2_{cv} = 0,689, s = 0,270, F = 28,6, \text{Itl}\sigma = 1,94$$

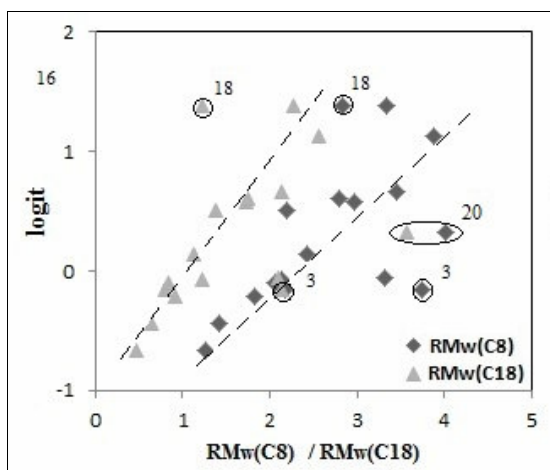
Η εξίσωση (IIA-59) βελτιώνεται σημαντικά αν εισαχθεί επιπροσθέτως το τοπολογικό εμβαδόν πολικής επιφάνειας χωρίς να μεταβάλλονται οι συντελεστές των όρων $\log k_{w(PB)[0,05\%]}$ και σ .

$$\text{logit} = 0,94(\pm 0,14)\log k_{w(PB)[0,05\%]} - 0,50(\pm 0,19)\sigma + 0,0096(\pm 0,004)\text{TPSA} - 2,90(\pm 0,42)$$

$$n = 16, r = 0,923, r^2_{cv} = 0,741, s = 0,222, F = 29,8, \text{lt}\sigma = 2,60, \text{lt}\text{TPSA} = 2,61 \text{ (IIA-60)}$$

Στις εξισώσεις (IIA-59) και (IIA-60) ο συντελεστής της παραμέτρου $\log k_{w(PB)[0,05\%]}$ είναι κοντά στη μονάδα. Επιπλέον η διαφορά όσον αφορά στις ενώσεις με αποκλίνουσα συμπεριφορά σε συνδυασμό με τις μέτριες συσχετίσεις $\log k_w/\log P$ οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι χρωματογραφικοί δείκτες $\log k_w$ δεν αποτελούν παραμέτρους με το ίδιο πληροφοριακό περιεχόμενο με τις τιμές $\log P$. Οι δείκτες $\log k_w$ πιθανόν να απεικονίζουν καλύτερα τη δυναμική ισορροπία κατά την αλληλεπίδραση φαρμάκων-υποδοχέα έναντι των τιμών $\log P$ που προκύπτουν από την κατανομή σε σύστημα διαλυτών.

Από την απεικόνιση των τιμών logit έναντι των τιμών R_{Mw} (Σχήμα IIA-15) διαπιστώνεται ότι οι ενώσεις 3 και 18 εμφανίζουν αποκλίνουσα συμπεριφορά σε συμφωνία με την αντίστοιχη απεικόνιση έναντι των τιμών $\log P$, ενώ η ένωση 12 προσαρμόζεται στη γενική τάση. Η ένωση 20 η οποία αποτελεί παράγωγο της διφθοροφαινόλης επίσης δεν προσαρμόζεται στην ευθεία παλινδρόμησης. Οι αποκλίνουσες ενώσεις σημειώνονται με κύκλο στο Σχήμα IIA-15.



Σχήμα IIA-15. Απεικόνιση των τιμών logit έναντι των τιμών R_{Mw} .

Αφαιρώντας τις προαναφερθείσες ενώσεις εξήχθησαν οι εξισώσεις:

$$\text{logit} = 0,76(\pm 0,13)R_{Mw(C8)} - 0,85(\pm 0,20) \quad (\text{IIA-61})$$

$$n = 14, r = 0,867, s = 0,305, F = 36,44$$

$$\text{logit} = 0,62(\pm 0,12)R_{Mw(C18)} - 1,33(\pm 0,31) \quad (\text{IIA-62})$$

$$n = 14, r = 0,836, s = 0,242, F = 27,81$$

Εισαγωγή της παραμέτρου B του Abraham ή της σταθεράς σ βελτίωσε τις συσχετίσεις και οδήγησε στις εξισώσεις (IIA-63) έως (IIA-66):

$$\text{logit} = 0,56(\pm 0,14)R_{Mw(C8)} + 0,81(\pm 0,34)B - 1,46(\pm 0,30) \quad (\text{IIA-63})$$

$$n = 14, r = 0,899, r^2 = 0,808, s = 0,258, F = 28,40$$

$$\text{logit} = 0,44(\pm 0,12)R_{Mw(C18)} + 0,93(\pm 0,34)B - 1,91(\pm 0,33) \quad (\text{IIA-64})$$

$$n = 14, r = 0,889, r^2 = 0,790, s = 0,269, F = 25,46$$

$$\text{logit} = 0,58(\pm 0,12)R_{Mw(C8)} - 0,70(\pm 0,23)\sigma - 0,53(\pm 0,19) \quad (\text{IIA-65})$$

$$n = 14, r = 0,916, r^2 = 0,839, s = 0,236, F = 34,94$$

$$\text{logit} = 0,47(\pm 0,09)R_{Mw(C18)} - 0,81(\pm 0,22)\sigma - 0,87(\pm 0,25) \quad (\text{IIA-66})$$

$$n = 14, r = 0,917, r^2 = 0,841, s = 0,234, F = 35,43$$

Επιπλέον εισαγωγή του τοπολογικού εμβαδού πολικής επιφάνειας οδήγησε σε στατιστικά σημαντική εξίσωση μόνο στην περίπτωση των τιμών $R_{Mw(C18)}$:

$$\text{logit} = 0,44(\pm 0,08)R_{Mw(C18)} - 0,84(\pm 0,20)\sigma + 0,007(\pm 0,004)TPSA - 1,28(\pm 0,31) \quad (\text{IIA-67})$$

$$n = 14, r = 0,933, r^2 = 0,871, s = 0,211, F = 30,29$$

Κατά συνέπεια, οι διαφορές στη συγκράτηση ανάμεσα στις δυο πλάκες δεν επιδρούν στην ικανότητά τους να εκφράσουν τη λιποφιλία στις σχέσεις με τη βιολογική δράση αν οι τιμές $R_{Mw(C8)}$ και $R_{Mw(C18)}$ συνδυαστούν με επιπλέον παραμέτρους.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι τιμές R_{Mw} προσδιορίστηκαν σε pH 7,4 και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις εκφράζονται καλύτερα μέσω των τιμών $\log P$ των αδιάστατων μορφών, εισήχθη στις σχέσεις η διόρθωση λόγω ιονισμού Q. Εξήχθησαν οι εξισώσεις (IIA-68) και (IIA-69):

$$\text{logit} = 0,72(\pm 0,11)R_{Mw(C8)} + 0,51(\pm 0,20)Q - 2,17(\pm 0,55) \quad (\text{IIA-68})$$

$$n = 14, r = 0,903, r^2 = 0,816, s = 0,252, F = 29,7$$

$$\text{logit} = 0,59(\pm 0,10)R_{Mw(C18)} + 0,58(\pm 0,21)Q - 2,83(\pm 0,61) \quad (\text{IIA-69})$$

$$n = 14, r = 0,887, r^2 = 0,786, s = 0,272, F = 24,9$$

Ο όρος Q είναι στατιστικά σημαντικός (με τιμές $|t|=2,54$ και $2,70$ αντίστοιχα) και εμφανίζει θετικό πρόσημο, γεγονός που υποδηλώνει τη συνεισφορά της οξύτητας στη βιολογική δράση.

Ταυτόχρονη εισαγωγή της παραμέτρου B του Abraham και του όρου Q οδήγησε στις εξισώσεις (IIA-70) και (IIA-71):

$$\text{logit} = 0,55(\pm 0,11)R_{Mw(C8)} + 0,44(\pm 0,17)Q + 0,68(\pm 0,28)B - 2,50(\pm 0,47) \quad (\text{IIA-70})$$

$$n = 14, r = 0,935, r^2 = 0,874, s = 0,208, F = 31,15$$

$$\text{logit} = 0,44(\pm 0,09)R_{Mw(C18)} + 0,48(\pm 0,17)Q + 0,77(\pm 0,27)B - 3,05(\pm 0,48) \quad (\text{IIA-71})$$

$$n = 14, r = 0,933, r^2 = 0,871, s = 0,211, F = 30,23$$

5. Συμπεράσματα

Η μελέτη της λιποφιλίας των παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος με RP-HPLC επιβεβαίωσε το ρόλο της οκτανόλης ως προσθετικού παράγοντα στην κινητή φάση για την καλύτερη προσομοίωση του συστήματος οκτανόλης-νερού. Οι επιμέρους συσχετίσεις των τιμών $\log P$ και $\log D$ με τους παράγοντες συγκράτησης $\log k_w$ στις διάφορες χρωματογραφικές συνθήκες απείχαν συγκριτικά με τις εξισώσεις αναφοράς που προτείνονται στη βάση γενικότερων μοντέλων, ενώ σε καμία περίπτωση δεν ελήφθη 1:1 συσχέτιση. Τα επιμέρους μοντέλα παρότι εμφάνισαν μέτρια στατιστικά

στοιχεία αποδείχτηκαν περισσότερο αξιόπιστα στην πρόβλεψη των συντελεστών κατανομής στα πλαίσια των συγκεκριμένων ενώσεων σε σχέση με τις γενικές εξισώσεις αναφοράς. Οι τιμές $\log k_w$ που προσδιορίστηκαν παρουσία 0,05% οκτανόλης στην κινητή φάση σε pH 3,0 αποδείχτηκαν οι καταλληλότερες για να αντικαταστήσουν τις τιμές $\log P$ στις συσχετίσεις με την αναστολή της αναγωγής της αλδόζης. Ωστόσο διαφοροποιήσεις ως προς το συντελεστή παλινδρόμησης και τις ενώσεις με αποκλίνουσα συμπεριφορά υποδηλώνουν ότι το πληροφοριακό περιεχόμενο των χρωματογραφικών δεικτών δεν είναι απόλυτα ταυτόσημο με αυτό των τιμών $\log P$.

Η μελέτη της λιποφιλίας με RP-TLC έδειξε ότι παρά τις αντικρουόμενες αναφορές στη βιβλιογραφία ο ιονισμός επηρεάζει τη συγκράτηση στην περίπτωση των πυρρολυλ-καρβοξυλικών οξέων. Σημαντική επίσης είναι η διαπίστωση ότι η στατική φάση σιλανοποιημένη με οκτώ άτομα άνθρακα (RP-C8) αποτελεί καταλληλότερη επιλογή συγκριτικά με τη συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη RP-C18 στατική φάση τόσο όσον αφορά στην προσομοίωση της λιποφιλίας όσο και στη συσχέτιση με τη βιολογική δράση. Παρόλα αυτά αν οι τιμές $R_{Mw(C8)}$ και $R_{Mw(C18)}$ συνδυαστούν με επιπλέον παραμέτρους συσχετίζονται εξίσου ικανοποιητικά με τη βιολογική δράση και τους χρωματογραφικούς δείκτες. Η πρακτικά αμελητέα επίδραση των προσθετικών παραγόντων στην RP-TLC δεν αποτελεί σημαντικό πρόβλημα δεδομένου ότι οι δείκτες R_{Mw} συσχετίζονται καλύτερα με τιμές $\log k_w$ που έχουν προσδιοριστεί παρουσία οκτανόλης.

Και οι δυο χρωματογραφικές τεχνικές υπό συγκεκριμένες συνθήκες αποτελούν κατάλληλη μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας ενώ οι μετρούμενοι δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας ως παράμετροι σε μοντέλα πρόβλεψης της βιολογικής δράσης με σαφές πλεονέκτημα την ταχύτητα και φιλικότητα που διαθέτουν. Ειδικότερα οι δείκτες $\log k_w$ είναι δυνατόν να εκφράζουν καλύτερα τη δυναμική ισορροπία κατά την αλληλεπίδραση φαρμάκων-υποδοχέα και κατά συνέπεια τη βιολογική δράση.

ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ

**Η ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΩΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ ΓΙΑ
ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ**

Εισαγωγή

Η δεύτερη ενότητα της παρούσης διατριβής διακρίνεται σε δυο υποενότητες:

Η πρώτη αποτελεί συνέχεια της πρώτης ενότητας και αφορά σε διεξοδική μελέτη της συμπεριφοράς των παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος στη βιομιμητική χρωματογραφία IAM σε σύγκριση με τα παραδοσιακά συστήματα κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού και την αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία. Οι επιμέρους συσχετίσεις αξιολογήθηκαν σε σχέση με τις προτεινόμενες πρότυπες εξισώσεις. Δεδομένης της διαφοροποίησης του pH κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα διερευνήθηκε το προφίλ της συγκράτησης αντιπροσωπευτικών ενώσεων στη στήλη IAM συναρτήσει του pH και συγκρίθηκε με το αντίστοιχο προφίλ που λαμβάνεται στην αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία και στην κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού.

Η δεύτερη υποενότητα περιλαμβάνει:

α) την αξιοποίηση διαθέσιμων τιμών $\log k_w^{IAM}$ από προηγούμενες μελέτες^{187,190} για την εξαγωγή μοντέλων/προτύπων εξισώσεων με στόχο την προσομοίωση της διαπερατότητας χρησιμοποιώντας δεδομένα της βιβλιογραφίας. Η εφαρμογή των χρωματογραφικών δεικτών IAM στα μοντέλα αξιολογήθηκε σε σύγκριση με δεδομένα σε κυτταρικές σειρές MDCK και τους συντελεστές κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Τα τελικά μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της γαστρεντερικής απορρόφησης των όξινων παραγώγων του πυρρολίου.

β) τη διεξοδική μελέτη της συγκράτησης φαρμακευτικών μορίων διαφορετικής δομής σε βιομιμητική χρωματογραφία συγγενείας. Χρησιμοποιήθηκε στήλη ανθρώπινης αλβουμίνης του ορού (HSA) και στήλη α-όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP) υπό διαφορετικές συνθήκες κινητής φάσης με στόχο την καλύτερη προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης. Επιπλέον διερευνήθηκαν οι ομοιότητες/ανομοιότητες των βιομιμητικών στηλών μεταξύ τους και συγκριτικά με τις στήλες αντιστρόφου φάσεως και το σύστημα οκτανόλης-νερού.

γ) τη μελέτη της συγκράτησης των όξινων παραγώγων του πυρρολίου στις στατικές φάσεις HSA και AGP και την εφαρμογή των πρότυπων εξισώσεων/μοντέλων για την εκτίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

A. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ

1. Προσδιορισμός χρωματογραφικών δεικτών ΙΑΜ των παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος

1.1 Εισαγωγή

Προσδιορίστηκε η συγκράτηση των παραγώγων του πυρρολίου σε δυο τιμές pH (3,0 και 7,4) και τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τις τιμές λιποφιλίας στο σύστημα οκτανόλης-νερού και τους χρωματογραφικούς δείκτες αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφίας. Για ορισμένα αντιπροσωπευτικά παράγωγα προσδιορίστηκε το προφίλ της συγκράτησης στις στήλες ΙΑΜ και ΑΒΖ⁺ σε μεγάλο εύρος pH για την διερεύνηση των δευτερευουσών αλληλεπιδράσεων σε συνδυασμό με την επίδραση του ιονισμού.

1.2 Υλικά και Μέθοδοι

1.2.1 Οργανολογία

Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή HPLC που περιγράφηκε στην 1^η ενότητα (Κεφάλαιο Α, §2.1.1).

1.2.2 Αντιδραστήρια

Το ακετονιτρίλιο ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC-grade), της εταιρίας Lab-Scan. Το νερό ήταν απιονισμένο και καθαρισμένο μέσω του συστήματος παραγωγής νερού Milli-Q Plus (Millipore). Χρησιμοποιήθηκαν τα ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία αναφέρονται παρακάτω μαζί με τον τρόπο παρασκευής τους:

α) PBS pH 3,0 (phosphate buffer saline, PBS_{3,0}):

Παρασκευάστηκε κατά τον ίδιο τρόπο με το PB σε pH 3,0 (βλ. 1^η ενότητα, Κεφάλαιο Α, §2.1.2). Επιπλέον, έγινε προσθήκη 2,01g KCl και 8,02g NaCl, ώστε η

συγκέντρωση τους στον τελικό όγκο κινητής φάσης να είναι 0,027M και 0,137M αντίστοιχα.

β) PBS pH 7,4 (phosphate buffer saline, PBS_{7,4}):
(βλ. 1^η ενότητα, Κεφάλαιο Α, §2.1.2).

1.2.3 Χρωματογραφικές συνθήκες

Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε στήλη Regis Technologies, IAM.PC.DD2. Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν μίγματα ακετονιτριλίου-PBS σε διάφορες αναλογίες και συγκεκριμένα με περιεκτικότητα σε ακετονιτρίλιο από 5-30% και βήμα 5%, σε pH 3,0 και pH 7,4. Όπου ήταν δυνατό η κινητή φάση αποτελείτο από 100% ρυθμιστικό διάλυμα. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στο 1 ή 2 ml/min. Η χρωματογραφική διαδικασία και ο προσδιορισμός των ανηγμένων τιμών $\log k_w$ αναφέρθηκαν στην 1^η ενότητα (Κεφάλαιο Β, §2.1.4 και 2.15).

1.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Οι ανηγμένες τιμές $\log k_w^{IAM}$ και οι κλίσεις S που προέκυψαν για όλες τις πειραματικές συνθήκες αναφέρονται στον Πίνακα ΠΒ-1. Οι συντελεστές συσχέτισης r είχαν τιμή υψηλότερη από 0,992, ενώ τα σταθερά σφάλματα των τιμών $\log k_w$ και των κλίσεων S ήταν χαμηλότερα από $\pm 0,13$ και $\pm 0,01$ αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο της καμπύλωσης που αναφέρεται υπό ορισμένες συνθήκες στην RP-HPLC, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε καλή γραμμικότητα στη σχέση $\log k/\phi$ σε ολόκληρο το εύρος ποσοστών ακετονιτριλίου.

Πίνακας ΠΒ-1. Τιμές $\log k_w^{IAM}$, διαφορές τους και κλίσεις S*.

No	pH 3,0		pH 7,4		$\Delta \log k_w^{IAM}$
	$\log k_w^{IAM}$	Sx100	$\log k_w^{IAM}$	Sx100	
1	1,11	5,43	0,00	4,64	0,83
2	1,54	5,96	0,71	7,00	1,02
3	2,63	7,42	1,61	6,83	0,93
5	1,74	5,62	0,81	5,29	0,96
6	2,99	8,05	2,03	7,66	0,68
7	1,22	4,69	0,54	7,05	0,90
8	1,89	5,67	0,99	5,49	0,91
9	1,67	5,40	0,76	5,10	0,88
10	2,03	6,39	1,15	6,54	0,87
11	2,33	6,84	1,46	7,01	0,79
12	2,09	6,23	1,30	7,93	0,69
13	2,57	7,33	1,88	8,59	0,77
14	2,85	8,12	2,08	8,45	0,47
15	2,89	7,96	2,42	9,40	0,68
16	1,37	5,28	0,69	6,51	0,43
17	1,81	5,54	1,38	6,85	1,20
18	1,61	5,94	0,41	5,08	1,15
19	2,75	6,92	1,60	7,93	1,11

*δεν μετρήθηκαν τιμές για την ένωση 4 λόγω έλλειψης δείγματος.

Αν και οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ σε pH 7,4 είναι σαφώς μικρότερες από τις αντίστοιχες τιμές σε pH 3,0 οι διαφορές τους στις περισσότερες περιπτώσεις δεν υπερβαίνουν την 1 λογαριθμική μονάδα.

1.3.1 Σχέση μεταξύ ανηγμένων τιμών $\log k_w^{IAM}$ και τιμών $\log k_w^{IAM}_{(act)}$

Εξετάστηκε η συνέπεια μεταξύ των ανηγμένων τιμών $\log k_w^{IAM}$ και των τιμών που προέκυψαν χρησιμοποιώντας 100% ρυθμιστικό διάλυμα για τις ενώσεις οι οποίες μπορούσαν να μετρηθούν χωρίς τη χρήση οργανικού τροποποιητή (άμεσες τιμές). Στον Πίνακα ΠΒ-2 εμφανίζονται οι άμεσες τιμές $\log k_w^{IAM}_{(act)}$ και οι διαφορές τους από τις ανηγμένες τιμές $\log k_w^{IAM}$. Οι διαφορές δεν υπερέβαιναν την τιμή 0,19 και 0,15 για pH 3,0 και 7,4 αντίστοιχα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ανηγμένες τιμές εμφανίζονται γενικά ελαφρώς υπερτιμημένες χωρίς ωστόσο η υπερτίμηση αυτή να είναι συστηματική. Οι συσχετίσεις άμεσων-ανηγμένων τιμών σε pH 3,0 και 7,4 εκφράζονται από τις εξισώσεις (ΠΒ-1) και (ΠΒ-2) με καλά στατιστικά στοιχεία και

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ IAM

τυπικές αποκλίσεις που επιτρέπουν όριο ανοχής σφάλματος της τάξεως των 0,16 και 0,12 λογαριθμικών μονάδων αντίστοιχα:

$$\log k_w^{IAM}(\text{act}) = 1,14(\pm 0,08) \log k_w^{IAM} - 0,36(\pm 0,14) \quad (\text{IIB-1})$$

$$n = 11, r = 0,978, s = 0,082, F = 193,5$$

$$\log k_w^{IAM}(\text{act}) = 0,92(\pm 0,03) \log k_w^{IAM} + 0,00(\pm 0,04) \quad (\text{IIB-2})$$

$$n = 16, r = 0,993, s = 0,062, F = 1050,7$$

Οι εξισώσεις (IIB-1) και (IIB-2) χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των τιμών $\log k_w^{IAM}$ για τις ισχυρά συγκρατούμενες ενώσεις, οι οποίες δεν ήταν δυνατόν να μετρηθούν χρησιμοποιώντας 100% ρυθμιστικό διάλυμα. Οι κανονικοποιημένες τιμές $\log k_w^{IAM}(\text{act})$ περιλαμβάνονται επίσης στον Πίνακα IIΒ-2 σημειωμένες με αστερίσκο.

Πίνακας IIΒ-2. Τιμές $\log k_w^{IAM}(\text{act})$ και διαφορές $\log k_w^{IAM}(\text{act}) - \log k_w^{IAM}$.

No	pH 3,0		pH 7,4	
	$\log k_w^{IAM}(\text{act})$	Δ	$\log k_w^{IAM}(\text{act})$	Δ
1	0,95	-0,16	0,13	0,13
2	1,39	-0,15	0,57	-0,14
3	2,64*		1,48	-0,13
5	1,55	-0,19	0,73	-0,08
6	3,05*		1,94	-0,09
7	1,11	-0,11	0,39	-0,15
8	1,70	-0,19	0,86	-0,13
9	1,56	-0,11	0,74	-0,02
10	1,97	-0,06	1,07	-0,08
11	2,30*		1,39	-0,07
12	2,19	0,10	1,17	-0,13
13	2,57*		1,77	-0,11
14	2,89*		1,92*	
15	2,94*		2,24*	
16	1,19	-0,18	0,64	-0,05
17	1,70	-0,11	1,31	-0,07
18	1,38	-0,23	0,42	0,01
19	2,78*		1,43	-0,17

*κανονικοποιημένες τιμές $\log k_w^{IAM}(\text{act})$ με βάση τις εξισώσεις (IIB-1) και (IIB-2).

1.3.2 Σχέση μεταξύ τιμών $\log k_w^{IAM}$ και κλίσεων S

Οι συσχετίσεις μεταξύ των ανηγμένων τιμών $\log k_w^{IAM}$ και των κλίσεων S για pH 3,0 και 7,4 παρουσιάζονται στις εξισώσεις (ΠB-3) και (ΠB-4) αντίστοιχα:

$$\log k_w^{IAM[pH\ 3,0]} = 0,54(\pm 0,05)S - 1,40(\pm 0,30) \quad (\text{ΠB-3})$$

$$n = 18, r = 0,946, s = 0,202, F = 137,64$$

$$\log k_w^{IAM[pH\ 7,4]} = 0,41(\pm 0,06)S - 1,61(\pm 0,45) \quad (\text{ΠB-4})$$

$$n = 18, r = 0,847, s = 0,357, F = 40,79$$

Οι συντελεστές των όρων στις εξισώσεις (ΠB-3) και (ΠB-4) δεν διαφοροποιούνται σημαντικά. Ωστόσο, η εξίσωση (ΠB-4) έχει σημαντικά κατώτερα στατιστικά στοιχεία συγκριτικά με την εξίσωση (ΠB-3), ένδειξη ότι ο μηχανισμός συγκράτησης σε pH 7,4 είναι λιγότερο ομοιόμορφος λόγω πιθανής παρεμβολής δευτερευουσών αλληλεπιδράσεων. Η παρουσία σιλανόφιλων επιδράσεων ιδιαίτερα σε αυξημένο pH έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία^{187,190}. Η εξίσωση (ΠB-4) συγκρίθηκε με την εξίσωση (ΠB-5) που αναφέρεται στη βιβλιογραφία²⁷⁷ για τα παράγωγα της διφθοροφαινόλης:

$$\log k_w^{IAM[pH\ 7,4]} = 0,40(\pm 0,09)S - 1,30(\pm 0,65) \quad (\text{ΠB-5})$$

$$n = 8, r = 0,91, s = 0,38, F = 29,35$$

Οι εξισώσεις (ΠB-4) και (ΠB-5) εμφανίζουν παρόμοια τιμή στις κλίσεις, ενώ οι σταθεροί όροι διαφέρουν περίπου κατά 0,3 λογαριθμικές μονάδες. Σε αντίστοιχη μελέτη²⁷⁸ όξινων φαρμάκων διαφορετικής δομής υπό παρόμοιες συνθήκες προέκυψε η εξίσωση (ΠB-6):

$$\log k_w^{IAM[pH\ 7,4]} = 0,38(\pm 0,06)S - 0,50(\pm 0,36) \quad (\text{ΠB-6})$$

$$n = 8, r = 0,930, s = 0,239, F = 38,28$$

Αν και οι σταθεροί όροι της εξίσωσης (ΠB-6) διαφέρει περίπου κατά μια λογαριθμική μονάδα από το σταθερό όρο των εξισώσεων (ΠB-4) και (ΠB-5), οι

κλίσεις εμφανίζουν παρόμοια τιμή (~0,4). Η τιμή αυτή φαίνεται ότι αποτελεί χαρακτηριστικό μέγεθος για το σύστημα IAM/ACN στην περίπτωση όξινων ενώσεων. Εξάλλου η ελαφρώς χαμηλότερη κλίση στην εξίσωση (ΠB-3) είναι σε συμφωνία με την τιμή 0,5 που έχει αναφερθεί για ουδέτερα και βασικά μόρια σε pH 5,0 και 7,4^{187,279}.

1.3.3 Σύγκριση της χρωματογραφίας IAM με παραμέτρους λιποφιλίας

Η σειρά των ενώσεων επεκτάθηκε και στα παράγωγα της διφθοροφαινόλης (σειρά ενώσεων II), χρησιμοποιώντας τιμές διαθέσιμες τιμές $\log P$, $\log D_{7,4}$ και $\log k_w^{IAM}$ από τη βιβλιογραφία²⁷⁷ (Πίνακας 2 στο Παράρτημα). Οι τρεις κατηγορίες ενώσεων που περιλαμβάνονται στη συνολική σειρά, δηλ. τα παράγωγα του πυρρολ-υλ-οξικού οξέος (ενώσεις 1 έως 19), τα παράγωγα του πυρρολίου με ομάδα διφθοροφαινόλης (ενώσεις 20 έως 24) και τα βενζολοσουλφοναμίδια με ομάδα διφθοροφαινόλης (ενώσεις 25 έως 27) απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα.

Το περιβάλλον της στήλης IAM θεωρείται ότι είναι λιγότερο υδρόφοβο από το σύστημα οκτανόλης-νερού με αποτέλεσμα οι δείκτες IAM λιπόφιλων ενώσεων να είναι κατά κανόνα μικρότεροι από τις αντίστοιχες τιμές $\log P$. Οι διαφορές μειώνονται με αύξηση της πολικότητας των ενώσεων και αντιστροφή των διαφορών για ενώσεις με τιμές $\log P$ κοντά ή μικρότερες του μηδενός^{186,187}. Ωστόσο στην περίπτωση όξινων ενώσεων οι διαφορές εμφανίζονται συχνά μικρότερες και μη συστηματικές²⁷⁸. Στον Πίνακα ΠB-3 φαίνονται οι διαφορές μεταξύ των τιμών $\log k_w^{IAM}$ και των τιμών $\log P$ και $\log D_{7,4}$ για το σύνολο των ενώσεων.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ

Πίνακας ΠΙΒ-3. Διαφορές $\log P - \log k_w^{IAM[pH\ 3,0]}$ και $\log D_{7,4} - \log k_w^{IAM[pH\ 7,4]}$.

No	$\Delta(\log P)$	$\Delta(\log D_{7,4})$
1	0,19	1,71
2	0,27	1,52
3	0,03	1,66
5	-0,21	1,46
6	0,99	2,31
7	0,29	1,97
8	-0,65	1,71
9	-0,30	1,34
10	0,06	1,89
11	0,06	2,19
12	-0,48	2,02
13	0,45	2,51
14	0,26	2,21
15	-0,26	2,25
16	-0,28	2,2
17	-0,41	2,19
18	-0,26	1,57
19	-0,41	1,64
20	-1,04	-0,47
21	-0,20	0,19
22	-0,88	0,13
23	-0,56	-0,03
24	-0,47	0,02
25	-0,64	-0,30
26	-0,75	0,22
27	-0,84	-0,13

Παρατηρούνται μικρές διαφορές μεταξύ των τιμών $\log k_w^{IAM[pH\ 3,0]}$ και $\log P$. Οι διαφορές αυτές σε αντίθεση με τη γενικότερη διαπίστωση είναι θετικές για τις λιγότερο λιπόφιλες ενώσεις και αρνητικές για τις περισσότερο λιπόφιλες αν και η εικόνα δεν είναι απολύτως σαφής. Σε pH 7,4 όπου οι ενώσεις είναι ιονισμένες παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες τιμές $\log k_w^{IAM}$ συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{7,4}$, δείχνοντας σχετικά αυξημένη συγκράτηση των καρβοξυλικών ανιόντων στη στήλη ΙΑΜ.

Η συσχέτιση των τιμών $\log k_w^{IAM[pH\ 3,0]}$ με τις τιμές $\log P$ οδήγησε στην εξίσωση (ΠΙΒ-7) με μέτρια στατιστικά στοιχεία:

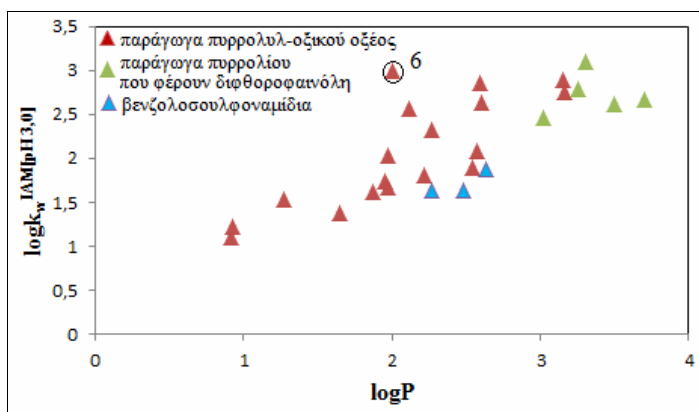
$$\log k_w^{IAM[pH\ 3,0]} = 0,62(\pm 0,10)\log P + 0,66(\pm 0,26) \quad (\text{ΠΙΒ-7})$$

$$n = 26, r = 0,770, s = 0,387, F = 35,11$$

Η ένωση 6 με τριφθοροϋποκαταστάτη εμφανίζει αρκετά ισχυρότερη συγκράτηση συγκριτικά με την τιμή $\log P$ (βλ. Σχήμα IIΒ-1). Εξαιρέσή της από την ανάλυση οδήγησε στην εξίσωση (IIΒ-8) με βελτιωμένα στατιστικά στοιχεία

$$\log k_w^{\text{IAM}[\text{pH } 3,0]} = 0,66(\pm 0,09)\log P + 0,54(\pm 0,22) \quad (\text{IIΒ-8})$$

$$n = 25, r = 0,841, s = 0,321, F = 55,84$$

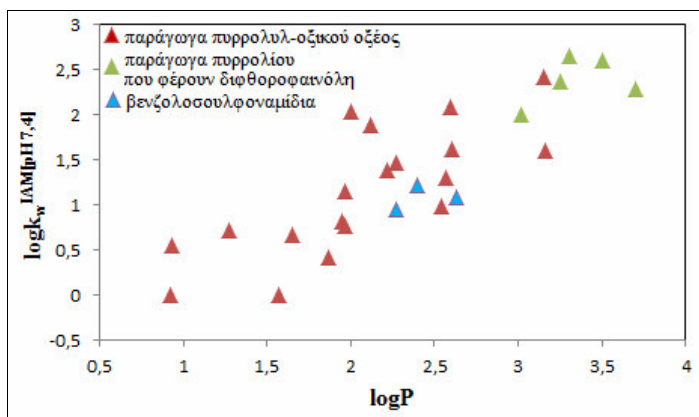


Σχήμα IIΒ-1. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{\text{IAM}[\text{pH } 3,0]}$ και $\log P$.

Συσχετίζοντας τις τιμές $\log k_w^{\text{IAM}[\text{pH } 7,4]}$ με τις τιμές $\log P$ προέκυψε η εξίσωση (IIΒ-9) με μέτρια στατιστικά στοιχεία και κλίση αρκετά κοντά στη μονάδα (Σχήμα IIΒ-2):

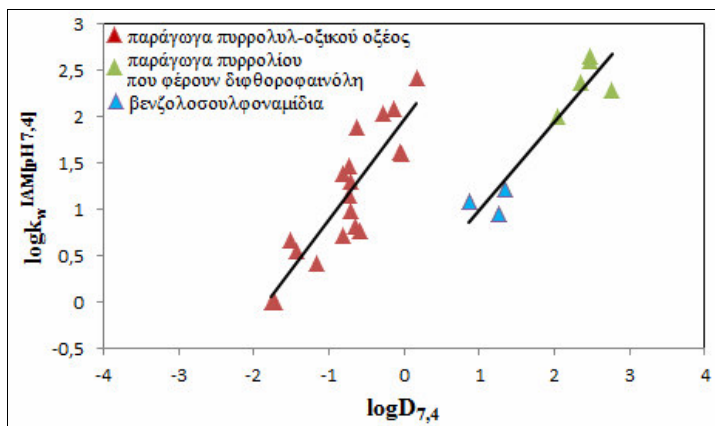
$$\log k_w^{\text{IAM}[\text{pH } 7,4]} = 0,84(\pm 0,11)\log P - 0,57(\pm 0,27) \quad (\text{IIΒ-9})$$

$$n = 26, r = 0,840, s = 0,405, F = 57,60$$



Σχήμα IIΒ-2. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{\text{IAM}[\text{pH } 7,4]}$ και $\log P$.

Η αντίστοιχη απεικόνιση των τιμών $\log k_w^{IAM[pH\ 7,4]}$ ως προς τις τιμές $\log D_{7,4}$ (Σχήμα ΠΒ-3) κατέδειξε ότι τα παράγωγα του πυρρολ-υλ-οξικού οξέος και οι υπόλοιπες ενώσεις ομαδοποιούνται σε δυο παράλληλες ευθείες.



Σχήμα ΠΒ-3. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{IAM[pH\ 7,4]}$ και $\log D_{7,4}$.

Η στατιστική ανάλυση για τα παράγωγα του πυρρολ-υλ-οξικού οξέος οδήγησε στην εξίσωση (ΠΒ-10) με κλίση 1 και σημαντικό θετικό σταθερό όρο.

$$\log k_w^{IAM[pH\ 7,4]} = 1,08(\pm 0,16)\log D_{7,4} + 1,96(\pm 0,14) \quad (\text{ΠΒ-10})$$

$n = 18, r = 0,856, s = 0,349, F = 43,72$

Η αντίστοιχη εξίσωση για τα παράγωγα που φέρουν την ομάδα της διφθοροφαινόλης στη θέση του οξικού οξέος εμφανίζει επίσης κλίση κοντά στη μονάδα, αλλά μη σημαντικό σταθερό όρο:

$$\log k_w^{IAM[pH\ 7,4]} = 0,95(\pm 0,14)\log D_{7,4} + 0,05(\pm 0,29) \quad (\text{ΠΒ-11})$$

$n = 8, r = 0,940, s = 0,260, F = 45,79$

Η διαφορά ως προς το σταθερό όρο των εξισώσεων (ΠΒ-10) και (ΠΒ-11) εκφράζει την σημαντικά ισχυρότερη συγκράτηση των παραγώγων του οξικού οξέος. Η ισχυρή αυτή συγκράτηση δεν θα μπορούσε να αποδοθεί μόνο στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των καρβοξυλικών ανιόντων με το φορτισμένο άζωτο της χολίνης, δεδομένου ότι και τα παράγωγα της διφθοροφαινόλης με $pK_a \sim 6$ βρίσκονται

ιονισμένα σε υψηλά ποσοστά. Αντίθετα από τα ανωτέρω αποτελέσματα προκύπτει ότι παρά την επικάλυψη του σκελετού της πυριτίας από τις αλυσίδες της φωσφατιδυλογολίνης και τα υπόλοιπα μορίων προπυλαμίνης, τα καρβοξυλικά ανιόντα διατηρούν την προσβασιμότητα στην επιφάνεια της πυριτίας και τη δυνατότητα σχηματισμού συμπλόκων με ίχνη μετάλλου όπως έχει αναφερθεί και για τις στήλες αντιστρόφου φάσεως. Η εισαγωγή παραμέτρου-δείκτη I για την παρουσία καρβοξυλίου και του μοριακού κλάσματος της αρνητικά φορτισμένης μοριακής μορφής F⁻ κατέδειξε στατιστικά σημαντική παράμετρο μόνο την παράμετρο I, εξίσωση (ΠB-12):

$$\log k_w^{IAM[pH 7,4]} = 1,02(\pm 0,11)\log D_{7,4} + 2,01(\pm 0,33)I - 0,09(\pm 0,25) \quad (\text{ΠB-12})$$

$$n = 26, r = 0,897, r^2 = 0,804, s = 0,323, t_{III}=6,06, F = 52,37$$

Η κλίση ~1 των εξισώσεων (ΠB-10) και (ΠB-11) είναι σε συμφωνία με ανάλογη αναφορά στην περίπτωση δομικώς συγγενών κουμαρινικών παραγώγων¹⁸⁷. Συμπεραίνεται ως εκ τούτου ότι η συμβολή στη συγκράτηση IAM των υποκαταστατών σε κοινό δομικό σκελετό καθορίζεται από τους ίδιους παράγοντες που διέπουν την αντίστοιχη συμβολή στην κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Ωστόσο στις περισσότερες συσχετίσεις που αφορούν δομικώς διαφορετικές ενώσεις ο συντελεστής παλινδρόμησης των όρων logP ή logD διαμορφώνεται μικρότερος της μονάδας με τιμή ~0,6^{187,279}.

Για τη σχέση των χρωματογραφικών δεικτών IAM με τη λιποφιλία έχει προταθεί πρότυπη εξίσωση που αφορά σε 56 ουδέτερες, βασικές και όξιμες φαρμακευτικές ενώσεις διαφορετικής δομής, όπου λαμβάνονται υπόψη και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των μορίων με τις φορτισμένες ομάδες της επιφάνειας IAM εκφραζόμενες με τα κλάσματα των θετικά και αρνητικά φορτισμένων μοριακών μορφών F⁺ και F⁻ αντίστοιχα¹⁹⁰:

$$\log k_w^{IAM} = 0,62(\pm 0,04)\log D_{7,4} + 1,14(\pm 0,13)F^+ + 0,48(\pm 0,16)F^- + 0,31(\pm 0,12) \quad (\text{ΠB-13})$$

$$n = 56, r = 0,938, s = 0,413, F = 126,7$$

Σύμφωνα με την εξίσωση (ΠB-13) οι αλληλεπιδράσεις με τις ιονισμένες φωσφορικές ομάδες της στατικής φάσης είναι σημαντικότερες από τις αντίστοιχες

αλληλεπιδράσεις με το φορτισμένο άζωτο της χολίνης, γεγονός που έχει αποδοθεί στο ότι το άζωτο αυτό το οποίο βρίσκεται στο εξωτερικό άκρο της επιφάνειας IAM υφίσταται εκτεταμένη ενυδάτωση, ενώ βρίσκεται μακριά από τον υδρόφοβο κορμό.

Θεωρήθηκε ενδιαφέρον να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητα της εξίσωσης (IIB-13) ενσωματώνοντας σε αυτήν τα όξινα παράγωγα του πυρρολίου (σειρά ενώσεων I και II). Για τα παράγωγα του οξικού οξέος, τα οποία σε pH 7,4 είναι πλήρως ιονισμένα θεωρήθηκε τιμή F^- ίση με τη μονάδα, ενώ για τα παράγωγα της διφθοροφαινόλης $F^- = 0,9$. Η τιμή F^+ ήταν μηδέν για όλα τα παράγωγα. Ενσωμάτωση της σειράς ενώσεων I (παράγωγα του οξικού οξέος) οδήγησε στην εξίσωση (IIB-14):

$$\log k_w^{IAM} = 0,56(\pm 0,04)\log D_{7,4} + 1,05(\pm 0,16)F^+ + 0,77(\pm 0,17)F^- + 0,46(\pm 0,15) \quad (\text{IIB-14})$$

$n = 74, r = 0,883, r^2 = 0,779, s = 0,506, F = 86,91, |t|F^+ = 6,61, |t|F^- = 4,44$

Η εξίσωση (IIB-14) είναι ελαφρώς υποβαθμισμένη ως προς τα στατιστικά στοιχεία, οι όροι της ωστόσο δεν διαφοροποιούνται σημαντικά εκτός του συντελεστή παλινδρόμησης της παραμέτρου F^- , ο οποίος είναι αυξημένος. Η αύξηση αυτή πιθανόν υποδηλώνει σχετικά μεγαλύτερη αλληλεπίδραση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων των αρνητικά φορτισμένων μοριακών μορφών με το θετικά φορτισμένο άζωτο της χολίνης ή οφείλεται στην αυξημένη συγγένεια των καρβοξυλικών ανιόντων με το σκελετό της πυριτίας. Η δεύτερη άποψη φαίνεται να είναι περισσότερο ισχυρή δεδομένου ότι η ενσωμάτωση της σειράς ενώσεων II (παράγωγα της διφθοροφαινόλης και βενζολοσουλφοναμίδια) οδήγησε στην εξίσωση (IIB-15) όπου δεν παρατηρείται μεταβολή των συντελεστών παλινδρόμησης:

$$\log k_w^{IAM} = 0,62(\pm 0,03)\log D_{7,4} + 1,19(\pm 0,12)F^+ + 0,51(\pm 0,13)F^- + 0,29(\pm 0,11) \quad (\text{IIB-15})$$

$n = 64, r = 0,938, r^2 = 0,880, s = 0,384, F = 154,73, |t|F^+ = 9,72, |t|F^- = 3,85$

Τέλος, ενσωμάτωση και των δυο σειρών ενώσεων I και II του πυρρολίου οδήγησε στην εξίσωση (IIB-16) στην οποία συμπεριλαμβάνεται και η παράμετρος-δείκτης I για την παρουσία της καρβοξυλικής ομάδας ως στατιστικά σημαντικός όρος:

$$\log k_w^{IAM} = 0,61(\pm 0,04)\log D_{7,4} + 1,04(\pm 0,14)F^+ + 0,40(\pm 0,19)F^- + 0,59(\pm 0,18)I + 0,39(\pm 0,13) \quad (\text{IIB-16})$$

$n = 82, r = 0,902, r^2 = 0,814, s = 0,452, F = 89,61, |t|F^+ = 7,33, |t|F^- = 2,11, |t|I = 3,34$

Η σύγκριση των εξισώσεων (ΠΒ-13) και (ΠΒ-16) καταδεικνύει την καλή ανθεκτικότητα της πρότυπης εξίσωσης, η οποία συμπληρώνεται με το δείκτη I για την παρουσία των καρβοξυλικών ανιόντων.

1.3.4 Σύγκριση της χρωματογραφίας IAM με τη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως

Οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ των παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος συγκρίθηκαν με τους αντίστοιχους χρωματογραφικούς δείκτες που προσδιορίστηκαν με αντιστρόφου φάσεως HPLC και TLC και αναφέρονται στην 1^η ενότητα.

Κατά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν και οι διαθέσιμες από τη βιβλιογραφία²⁷⁷ τιμές $\log k_w^{ABZ}$ για τις ενώσεις 20 έως 27 και οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 στο Παράρτημα.

Οι διαφορές $\log k_w^{ABZ} - \log k_w^{IAM}$ για τις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες αναφέρονται στους Πίνακες ΠΒ-4 και ΠΒ-5.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ

Πίνακας ΠΙΒ-4. Διαφορές $\log k_w^{ABZ} - \log k_w^{IAM}$ σε pH 3,0.

	PB	PB	PB	MOPS
No	$\Delta_{[no-oct]}$	$\Delta_{[0,05\%]}$	$\Delta_{[0,25\%]}$	$\Delta_{[0,25\%]}$
1	1,09	0,59	0,52	0,52
2	1,09	0,61	0,40	0,35
3	1,39	-0,11	-0,21	-0,24
5	2,29	1,00	0,77	0,73
6	1,02	-0,27	-0,50	-0,52
7	1,38	0,55	0,50	0,47
8	1,49	0,91	0,74	0,76
9	1,49	0,87	0,73	0,66
10	1,13	0,61	0,34	0,25
11	1,25	0,50	0,06	-0,08
12	0,82	0,34	0,27	0,30
13	1,40	0,43	0,30	0,27
14	1,27	0,29	0,10	0,06
15	1,43	0,45	0,16	0,06
16	1,38	0,81	0,64	0,62
17	1,93	0,83	0,46	0,48
18	1,40	0,62	0,21	0,27
19	1,06	0,65	0,48	0,43
20	*	*	*	0,47
21	*	*	*	0,05
22	*	*	*	0,71
23	*	*	*	0,27
24	*	*	*	0,23
25	*	*	*	0,56
26	*	*	*	0,33
27	*	*	*	0,57

*δεν υπήρχαν διαθέσιμες βιβλιογραφικές τιμές $\log k_w^{ABZ}$.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ

Πίνακας ΠΒ-5. Διαφορές $\log k_w^{ABZ} - \log k_w^{IAM}$ σε pH 7,4.

No	PB	MOPS	PB	MOPS	PB	MOPS
	$\Delta_{[no-oct]}$	$\Delta_{[no-oct]}$	$\Delta_{[0,05\%]}$	$\Delta_{[0,05\%]}$	$\Delta_{[0,25\%]}$	$\Delta_{[0,25\%]}$
1	1,59	1,65	1,29	1,28	0,92	0,88
2	1,36	1,43	0,81	0,88	0,59	0,60
3	1,85	1,82	1,12	1,02	0,74	0,71
5	1,60	1,72	0,83	0,99	0,57	0,60
6	1,31	1,28	0,58	0,50	0,27	0,33
7	1,28	1,32	0,61	0,70	0,57	0,61
8	1,78	1,78	0,94	1,05	0,32	0,41
9	1,87	1,74	0,95	1,09	0,65	0,61
10	1,40	1,43	0,71	0,72	0,37	0,41
11	1,17	1,16	0,47	0,44	0,11	0,11
12	0,70	0,90	0,21	0,24	-0,09	-0,09
13	1,54	1,59	0,40	0,37	0,25	0,22
14	1,47	1,50	0,29	0,26	0,16	0,17
15	1,19	1,18	-0,03	0,00	-0,08	-0,06
16	1,06	1,13	0,36	0,42	0,3	0,31
17	1,14	1,48	0,56	0,78	0,35	0,44
18	1,82	1,55	0,99	0,83	0,85	0,78
19	1,24	1,21	0,49	0,51	0,41	0,42
20	*	0,56	*	0,30	*	0,30
21	*	0,24	*	-0,05	*	-0,08
22	*	0,41	*	0,09	*	-0,24
23	*	0,95	*	0,72	*	0,51
24	*	0,76	*	0,47	*	0,23
25	*	0,62	*	0,28	*	0,20
26	*	0,60	*	0,13	*	0,06
27	*	0,69	*	0,21	*	0,06

*δεν υπήρχαν διαθέσιμες βιβλιογραφικές τιμές $\log k_w^{ABZ}$.

Οι χρωματογραφικοί δείκτες IAM είναι γενικά μικρότεροι από τις τιμές $\log k_w^{ABZ}$ ως αποτέλεσμα του μειωμένου υδρόφοβου περιβάλλοντος της στήλης IAM, αλλά και των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων στη στήλη ABZ[†]. Πράγματι οι διαφορές μειώνονται παρουσία οκτανόλης σε ορισμένες δε περιπτώσεις (ενώσεις 3, 6, 11 σε pH 3,0 και 12, 15, 21 και 22 σε pH 7,4) οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ είναι μεγαλύτερες των τιμών $\log k_w^{ABZ}$. Οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών $\log k_w^{IAM}$ και $\log k_w^{ABZ}$ στις διάφορες χρωματογραφικές συνθήκες παρουσιάζονται στον Πίνακα ΠΒ-6.

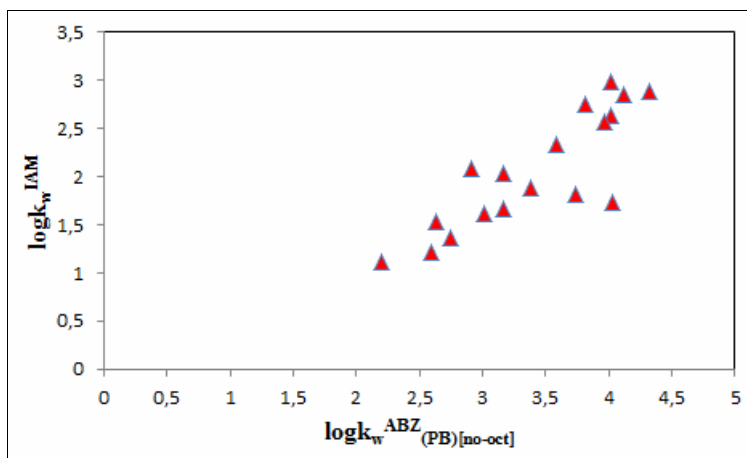
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ

Πίνακας ΠΙΒ-6. Συσχετίσεις μεταξύ των τιμών $\log k_w^{IAM}$ και $\log k_w^{ABZ}$.

		$\log k_w^{IAM} = a \log k_w^{ABZ} + b$							
		(I)	a	b	r	n	s	F	εξ.
pH 3,0	PB _{no-oct}	0,82(±0,13)	-0,72(±0,44)	0,851	18	0,328	41,88	(ΠΒ-17)	
	PB _{0,05%}	1,07(±0,17)	-0,72(±0,46)	0,840	18	0,338	38,39	(ΠΒ-18)	
	PB _{0,25%}	1,12(±0,18)	-0,62(±0,44)	0,840	18	0,338	38,38	(ΠΒ-19)	
	MOPS _{0,25%}	1,07(±0,13)	-0,50(±0,33)	0,857	26*	0,312	66,61	(ΠΒ-20)	
pH 7,4	PB _{no-oct}	0,89(±0,12)	-1,12(±0,32)	0,884	18	0,314	57,42	(ΠΒ-21)	
	PB _{0,05%}	1,14(±0,17)	-0,90(±0,33)	0,858	18	0,345	44,79	(ΠΒ-22)	
	PB _{0,25%}	1,21(±0,14)	-0,75(±0,23)	0,911	18	0,277	78,25	(ΠΒ-23)	
	MOPS _{no-oct}	0,90(±0,15)	-0,92(±0,39)	0,781	26*	0,466	37,45	(ΠΒ-24)	
	MOPS _{0,05%}	1,13(±0,13)	-0,80(±0,26)	0,870	26*	0,367	75,01	(ΠΒ-25)	
	MOPS _{0,25%}	1,12(±0,10)	-0,52(±0,18)	0,920	26*	0,294	130,76	(ΠΒ-26)	

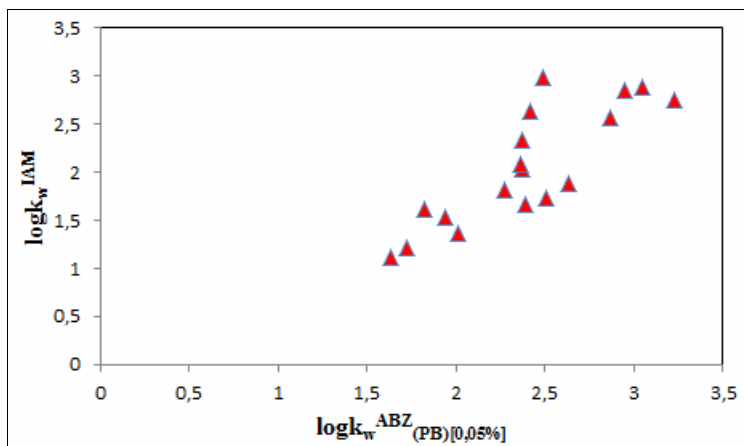
*περιλαμβάνονται και τα παράγωγα της διφθοροφαινόλης.

Σε pH 3,0 οι συσχετίσεις είναι μέτριες και η προσθήκη της οκτανόλης στην κινητή φάση δεν βελτιώνει τα στατιστικά στοιχεία αν και μετατοπίζει την κλίση πλησιέστερα στη μονάδα. Σε όλες τις περιπτώσεις οι εξισώσεις συνοδεύονται από αρνητικό σταθερό όρο. Στα Σχήματα ΠΙΒ-4 και ΠΙΒ-5 απεικονίζονται αντιπροσωπευτικά οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ έναντι των τιμών $\log k_w^{(PB)}$ απουσία οκτανόλης και παρουσία 0,05% οκτανόλης, βλ. εξισώσεις (ΠΒ-17) και (ΠΒ-18) αντίστοιχα.



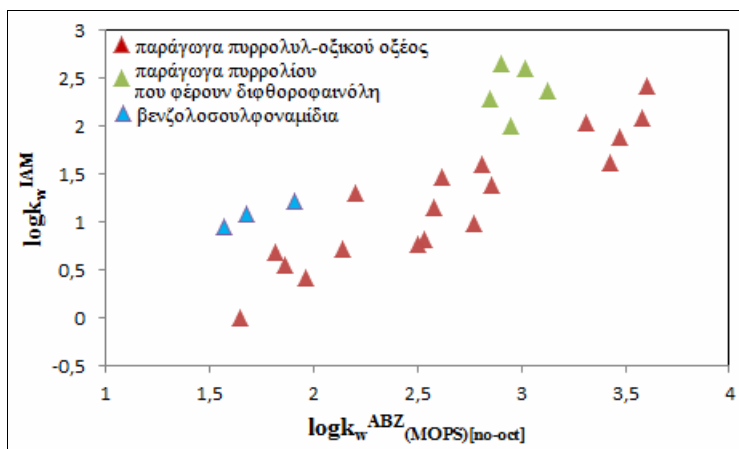
Σχήμα ΠΙΒ-4. Απεικόνιση της σχέσης $\log k_w^{IAM} / \log k_w^{ABZ}_{(PB)[no-oct]}$ σε pH 3,0.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ



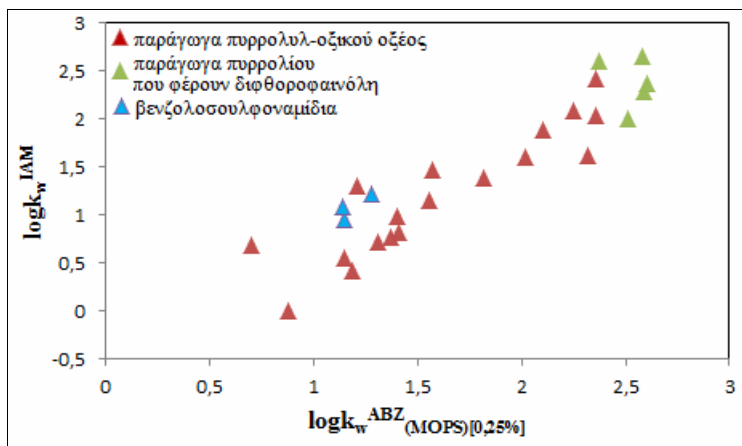
Σχήμα II-B-5. Απεικόνιση της σχέσης $\log k_w^{IAM} / \log k_w^{ABZ} (PB)[0,05\%]$ σε pH 3,0.

Σε pH 7,4 η κλίση ήταν πλησίον της μονάδας σε όλες τις περιπτώσεις και ο αρνητικός σταθερός είναι ελαφρώς μεγαλύτερος απουσία οκτανόλης, ενώ είναι εμφανής η βελτίωση των συσχετίσεων παρουσία 0,25 % οκτανόλης, βλ. εξισώσεις (II-B-23) και (II-B-26). Η βελτίωση των συσχετίσεων φαίνεται και στα Σχήματα II-B-6 και II-B-7 όπου απεικονίζονται οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ έναντι των τιμών $\log k_w^{(MOPS)}$ απουσία οκτανόλης και παρουσία 0,25% οκτανόλης.



Σχήμα II-B-6. Απεικόνιση της σχέσης $\log k_w^{IAM} / \log k_w^{ABZ} (MOPS)$ σε pH 7,4.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ



Σχήμα ΙΙΒ-7. Απεικόνιση της σχέσης $\log k_w^{IAM} / \log k_w^{ABZ}_{(MOPS)[0,25\%]}$ σε pH 7,4.

Οι ανηγμένες τιμές $\log k_w^{IAM}$ οι οποίες προσδιορίστηκαν σε pH 7,4 συγκρίθηκαν ακολούθως με τις τιμές R_{Mw} που προέκυψαν από RP-TLC. Στον Πίνακα ΙΙΒ-7 φαίνονται οι διαφορές μεταξύ των τιμών $\log k_w^{IAM}$ και των τιμών $R_{Mw(C18)}$ και $R_{Mw(C8)}$.

Πίνακας ΙΙΒ-7. Διαφορές $R_{Mw} - \log k_w^{IAM}$.

No	$\Delta_{(C18)}$	$\Delta_{(C8)}$
1	1,42	0,64
2	1,43	0,51
3	2,13	0,53
5	1,37	-0,02
6	1,28	0,06
7	0,72	-0,07
8	1,20	0,38
9	1,29	0,07
10	1,30	-0,02
11	1,51	0,26
12	0,53	-0,39
13	1,58	0,25
14	1,79	0,48
15	0,92	-0,15
16	1,42	0,36
17	2,42	0,81
18	2,18	1,67
19	1,42	0,64

Οι τιμές $R_{Mw(18)}$ είναι σημαντικά μεγαλύτερες των τιμών $\log k_w^{IAM}$, στην περίπτωση ωστόσο των τιμών $R_{Mw(8)}$ οι διαφορές μειώνονται, ενώ για τις ενώσεις 5, 7, 10, 12 και 15 οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ είναι μικρότερες. Οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών $\log k_w^{IAM}$ και

R_{Mw} , οδηγούν στις εξισώσεις (ΠΒ-27) και (ΠΒ-28) με μέτρια στατιστικά στοιχεία και κλίσεις χαμηλότερες από τη μονάδα.

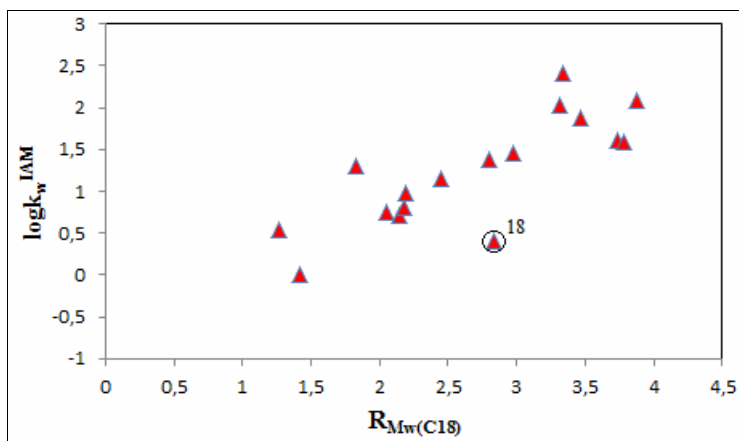
$$\log k_w^{IAM} = 0,64(\pm 0,12)R_{Mw(C18)} - 0,48(\pm 0,35) \quad (\text{ΠΒ-27})$$

$$n = 17, r = 0,802, s = 0,407, F = 27,03$$

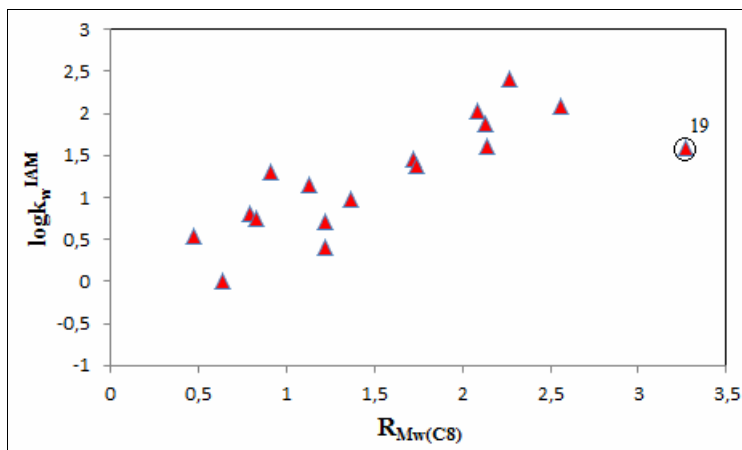
$$\log k_w^{IAM} = 0,68(\pm 0,13)R_{Mw(C8)} - 0,18(\pm 0,23) \quad (\text{ΠΒ-28})$$

$$n = 17, r = 0,795, s = 0,413, F = 25,72$$

Από την απεικόνιση των εξισώσεων (ΠΒ-27) και (ΠΒ-28) (Σχήματα ΠΒ-8 και ΠΒ-9) διαπιστώνεται ότι η ένωση 18 (παράγωγο του πυρρολ-2-υλ-οξικού οξέος με ένα ελεύθερο υδρογόνο στο άζωτο του πυρρολίου) εμφανίζει αποκλίνουσα συμπεριφορά στην περίπτωση των τιμών $R_{Mw(18)}$. Αντίθετα στη σχέση $\log k_w^{IAM}/R_{Mw(C8)}$ παρατηρείται έκτροπη τιμή για την ένωση 19 (σουλφονυλοπαράγωγο). Οι αποκλίνουσες ενώσεις σημειώνονται με κύκλο στα Σχήματα ΠΒ-8 και ΠΒ-9.



Σχήμα ΠΒ-8. Απεικόνιση της σχέσης $\log k_w^{IAM}/R_{Mw(C18)}$ σε pH 7,4.



Σχήμα II-B- 9. Απεικόνιση της σχέσης $\log k_w^{IAM}/R_{Mw(C8)}$ σε pH 7,4.

Αφαιρώντας τις προαναφερθείσες ενώσεις εξήχθησαν οι εξισώσεις (II-B-29) και (II-B-30) αντίστοιχα:

$$\log k_w^{IAM} = 0,65(\pm 0,10)R_{Mw(C18)} - 0,46(\pm 0,28) \quad (\text{II-B-29})$$

$$n = 16, r = 0,865, s = 0,335, F = 41,55$$

$$\log k_w^{IAM} = 0,91(\pm 0,13)R_{Mw(C8)} - 0,11(\pm 0,21) \quad (\text{II-B-30})$$

$$n = 16, r = 0,881, s = 0,330, F = 48,55$$

Η κλίση στην εξίσωση (II-B-30) είναι πολύ κοντά στη μονάδα και ο σταθερός όρος αρκετά κοντά στο μηδέν.

1.4 Επίδραση του pH στη συγκράτηση ΙΑΜ. Σύγκριση του προφίλ $\log k_w^{IAM}/\text{pH}$ με τα αντίστοιχα προφίλ στην αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία και στο σύστημα οκτανόλης-νερού

Η χρωματογραφία ΙΑΜ, αλλά και η κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού και κατ'επέκταση η αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία στοχεύουν μεταξύ άλλων στην προσομοίωση ή τη συσχέτιση της διαπερατότητας του γαστρεντερικού σωλήνα κατά μήκος του οποίου υπάρχει διαφοροποίηση του pH. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή (βλ. §2.9), αν και θεωρείται ότι ο ιονισμός επηρεάζει τη συγκράτηση στη RP-HPLC

κατ'άναλογο τρόπο με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού, δεν υπάρχουν συστηματικές μελέτες για το προφίλ $\log k_w/pH$. Λιγότερο μελετημένη είναι η επίδραση του ιονισμού στο περιβάλλον των στηλών IAM, όπου η συμμετοχή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων εξισορροπεί ως ένα βαθμό την επίδραση του ιονισμού στη συγκράτηση. Ως εκ τούτου διαπιστώθηκε μικρή μόνο διαφορά των τιμών $\log k_w^{IAM}$ σε pH 3,0 και 7,4. Με βάση τα ανωτέρω κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η συγκράτηση σε μεγάλο εύρος pH (2,5 έως 7,4), τόσο στην RP-HPLC όσο και στην IAM για ορισμένες αντιπροσωπευτικές ενώσεις, επιλέγοντας εκείνες οι οποίες στη χρωματογραφία IAM ήταν δυνατόν να αναλυθούν απουσία οργανικού τροποποιητή. Στην RP-HPLC για την αντίστοιχη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ως κινητή φάση μείγματα μεθανόλης/MOPS παρουσία 0,05 και 0,25% οκτανόλης ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις.

Για λόγους σύγκρισης με το σύστημα οκτανόλης-νερού κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα $\log D/pH$ χρησιμοποιώντας για τον υπολογισμό του $\log P$ το μη-γραμμικό μοντέλο Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων ($\log P_{ANN05}$), το οποίο σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παραγράφου 2.5.1 (1^η ενότητα, Κεφάλαιο Α) καταδείχτηκε ως το πλέον αξιόπιστο σύστημα για την εκτίμηση της λιποφιλίας των υπό μελέτη παραγώγων του πυρρολίου. Εξάλλου οποιοδήποτε σφάλμα των τιμών $\log D$ συναρτήσει του pH είναι συστηματικό χωρίς να μεταβάλλει τη μορφή του προφίλ.

1.4.1 Οργανολογία

Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή HPLC που περιγράφηκε στην 1^η ενότητα (Κεφάλαιο Α, §2.1.1).

1.4.2 Αντιδραστήρια

Το ακετονιτρίλιο ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC-grade), της εταιρίας Lab-Scan. Το νερό ήταν απιονισμένο και καθαρισμένο μέσω του συστήματος παραγωγής νερού Milli-Q Plus (Millipore).

1.4.3 Χρωματογραφικές συνθήκες

Στη χρωματογραφία IAM χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση στήλη IAM.PC.DD2 και κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα PBS με κατάλληλη ρύθμιση στο επιθυμητό pH (βλ. 1^η ενότητα, Κεφάλαιο Α, §2.1.2).

Στην RP-HPLC χρησιμοποιήθηκε στήλη ABZ⁺ και μείγματα μεθανόλης/MOPS με ανάλογη ρύθμιση του pH και προσθήκη 0,05 ή 0,25% οκτανόλης στον όγκο της μεθανόλης (1^η ενότητα, Κεφάλαιο Β, §2.1.3). Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στο 1 ή 2 ml/min για τη χρωματογραφία IAM και στο 1 ml/min για την αντιστροφή φάσεως HPLC. Η χρωματογραφική διαδικασία και ο προσδιορισμός των ανηγμένων τιμών $\log k_w$ αναφέρθηκαν στην 1^η ενότητα (Κεφάλαιο Β, §2.1.4 και 2.15).

1.4.4 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Οι τιμές $\log k_w^{ABZ}$ και $\log k_w^{IAM}$ που προέκυψαν για όλες τις πειραματικές συνθήκες αναφέρονται στους Πίνακες ΠΒ-8 έως ΠΒ-10.

Πίνακας ΠΒ-8. Τιμές $\log k_w^{IAM}$ σε διάφορες τιμές pH.

No	pH										
	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,4
1	1,00	0,95	0,88	0,80	0,63	0,59	0,45	0,37	0,23	0,16	0,13
2	1,44	1,39	1,23	1,22	1,05	1,00	0,86	0,78	0,65	0,58	0,57
5	1,60	1,55	1,46	1,38	1,22	1,17	1,03	0,94	0,82	0,75	0,73
7	1,17	1,11	1,02	0,94	0,80	0,77	0,65	0,55	0,45	0,38	0,39
8	1,75	1,70	1,60	1,51	1,35	1,29	1,16	1,06	0,94	0,87	0,86
9	1,61	1,56	1,47	1,38	1,23	1,17	1,04	0,93	0,82	0,75	0,74
10	*	1,97	1,85	1,76	1,60	1,54	1,39	1,28	1,15	1,07	1,07
12	*	2,19	1,95	1,88	1,72	1,65	1,51	1,39	1,26	1,18	1,17
17	1,43	1,70	1,83	1,90	1,78	1,72	1,60	1,49	1,38	1,32	1,31
18	1,40	1,38	1,37	1,29	1,07	0,94	0,75	0,62	0,50	0,43	0,42

*δεν προσδιορίστηκαν λόγω αυξημένης συγκράτησης.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ

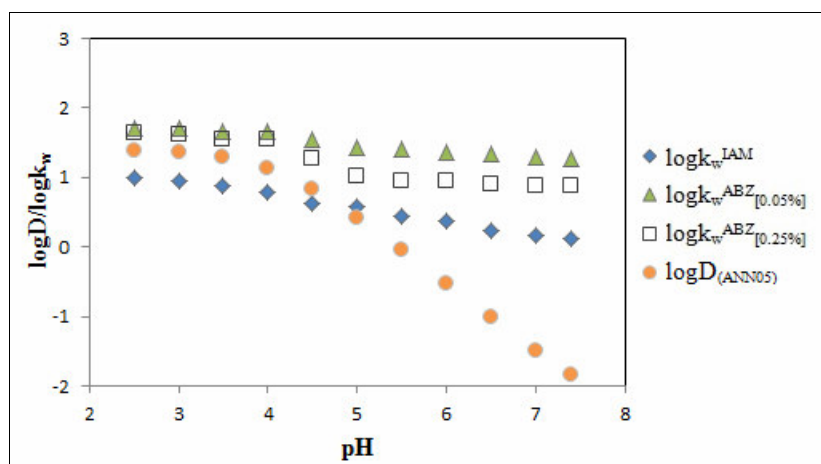
Πίνακας ΠΙΒ-9. Τιμές $\log k_w^{ABZ}_{[0,05\%]}$ σε διάφορες τιμές pH.

No	pH										
	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,4
1	1,72	1,71	1,67	1,66	1,56	1,43	1,41	1,37	1,33	1,30	1,28
2	2,14	2,13	2,03	1,92	1,74	1,66	1,64	1,62	1,61	1,60	1,59
5	2,72	2,69	2,67	2,61	2,39	2,13	2,00	1,94	1,83	1,82	1,80
7	1,75	1,75	1,64	1,53	1,46	1,41	1,35	1,32	1,29	1,26	1,24
8	2,79	2,78	2,66	2,56	2,43	2,36	2,27	2,22	2,10	2,06	2,04
9	2,56	2,54	2,48	2,37	2,27	2,19	2,08	2,01	1,89	1,86	1,85
10	2,64	2,63	2,58	2,36	2,23	2,11	2,01	1,95	1,91	1,88	1,87
12	2,58	2,59	2,43	2,34	2,23	1,94	1,78	1,67	1,61	1,56	1,54
17	2,65	2,63	2,56	2,52	2,43	2,39	2,34	2,28	2,24	2,18	2,16
18	2,23	2,22	2,05	1,85	1,67	1,57	1,39	1,31	1,28	1,27	1,24

Πίνακας ΠΙΒ-10. Τιμές $\log k_w^{ABZ}_{[0,25\%]}$ σε διάφορες τιμές pH.

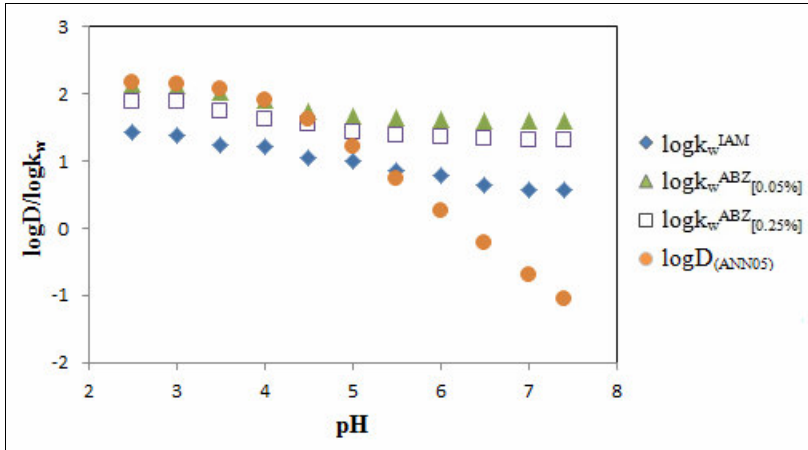
No	pH										
	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,4
1	1,62	1,63	1,56	1,54	1,27	1,02	0,96	0,94	0,91	0,89	0,88
2	1,88	1,89	1,72	1,62	1,56	1,43	1,38	1,36	1,33	1,32	1,31
5	2,47	2,47	2,32	2,11	1,92	1,59	1,51	1,47	1,44	1,43	1,41
7	1,70	1,69	1,58	1,47	1,44	1,33	1,27	1,23	1,20	1,17	1,15
8	2,68	2,65	2,41	2,18	1,93	1,69	1,51	1,46	1,43	1,41	1,40
9	2,32	2,33	2,16	1,94	1,74	1,54	1,50	1,44	1,42	1,38	1,37
10	2,31	2,28	2,17	2,03	1,92	1,81	1,67	1,63	1,61	1,59	1,56
12	2,43	2,39	2,32	2,19	1,93	1,77	1,46	1,31	1,28	1,24	1,21
17	2,30	2,29	2,20	2,15	2,12	2,02	1,94	1,90	1,89	1,86	1,82
18	1,90	1,88	1,74	1,65	1,56	1,45	1,35	1,28	1,25	1,21	1,19

Κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα $\log k_w/\text{pH}$ και $\log D/\text{pH}$ τα οποία φαίνονται στα Σχήματα ΠΙΒ-10 έως ΠΙΒ-19.

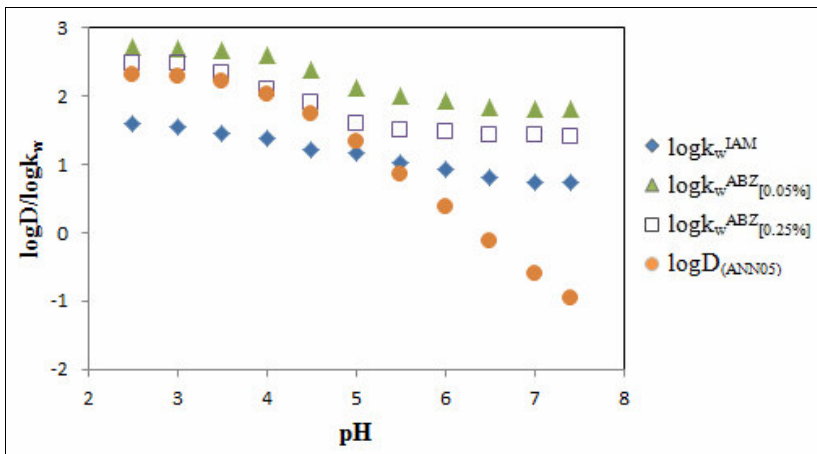


Σχήμα ΠΙΒ-10. Διάγραμμα $\log D/\text{pH}$ και $\log k_w/\text{pH}$ για την ένωση 1.

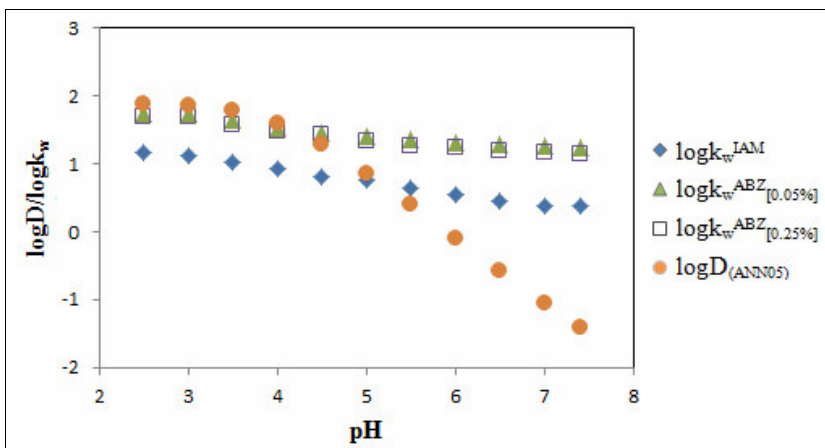
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ



Σχήμα ΠΒ-11. Διάγραμμα $\log D / \text{pH}$ και $\log k_w / \text{pH}$ για την ένωση 2.

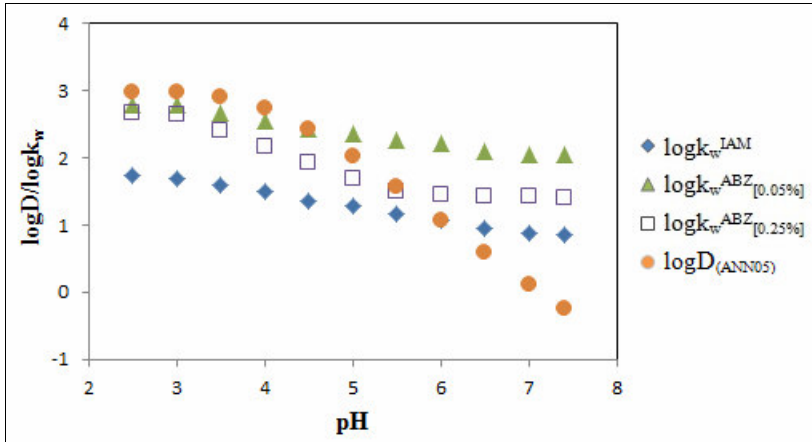


Σχήμα ΠΒ-12. Διάγραμμα $\log D / \text{pH}$ και $\log k_w / \text{pH}$ για την ένωση 5.

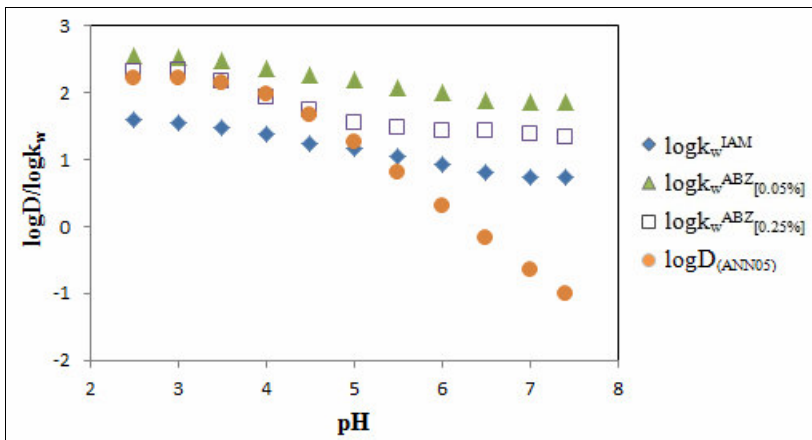


Σχήμα ΠΒ-13. Διάγραμμα $\log D / \text{pH}$ και $\log k_w / \text{pH}$ για την ένωση 7.

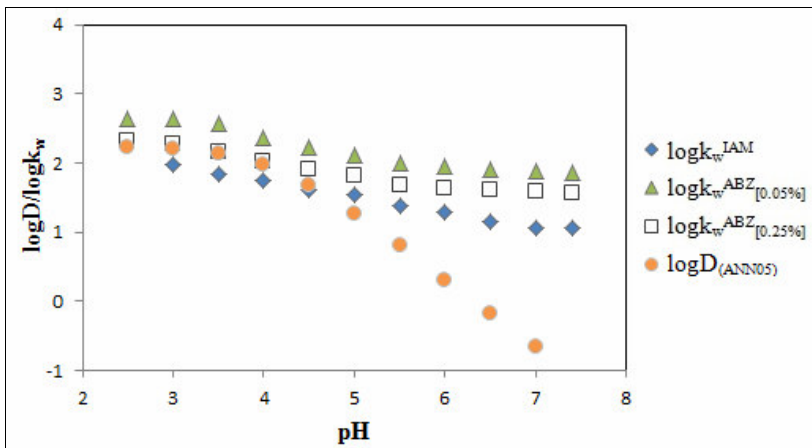
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ



Σχήμα ΠΒ-14. Διάγραμμα logD/pH και logkw/pH για την ένωση 8.

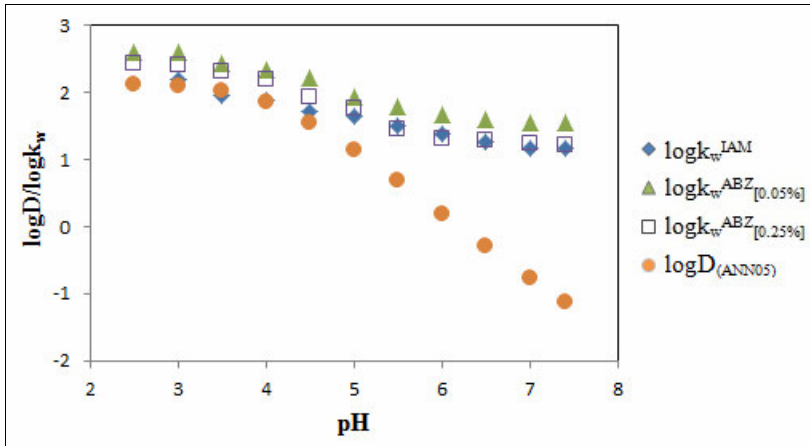


Σχήμα ΠΒ-15. Διάγραμμα logD/pH και logkw/pH για την ένωση 9.

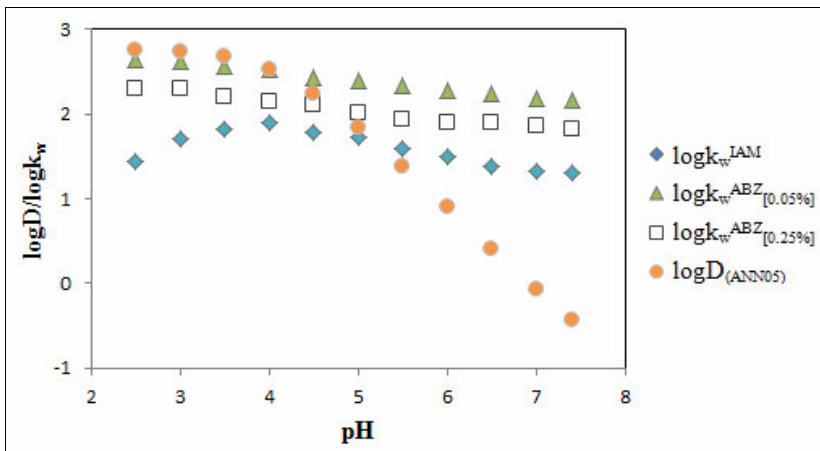


Σχήμα ΠΒ-16. Διάγραμμα logD/pH και logkw/pH για την ένωση 10.

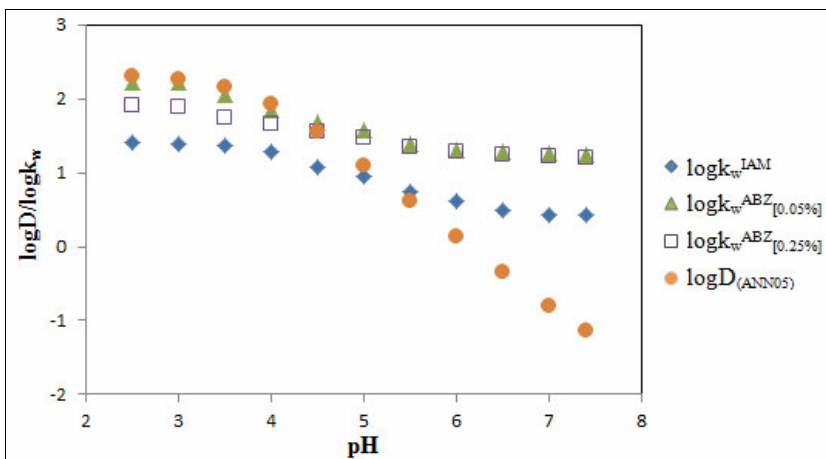
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ



Σχήμα 11B-17. Διάγραμμα $\log D / \log k_w$ και $\log k_w / \text{pH}$ για την ένωση 12.



Σχήμα 11B-18. Διάγραμμα $\log D / \log k_w$ και $\log k_w / \text{pH}$ για την ένωση 17.



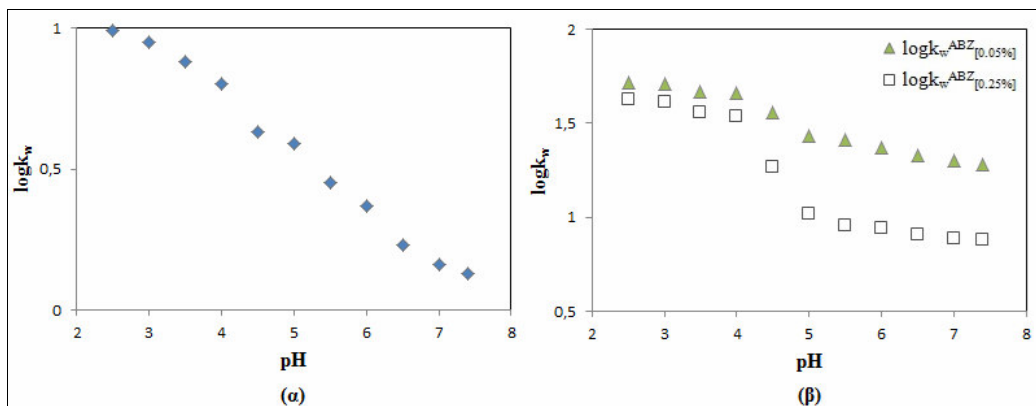
Σχήμα 11B-19. Διάγραμμα $\log D / \log k_w$ και $\log k_w / \text{pH}$ για την ένωση 18.

Το προφίλ $\log D/pH$ παρουσιάζει σημείο καμπής σε $pH \sim 4,0$ που αντιστοιχεί στην τιμή pK_a (βλ. Πίνακας 1 στο Παράρτημα) και ακολούθως διαμορφώνεται το γραμμικό τμήμα της καμπύλης με κλίση ~ 1 . Το δεύτερο σημείο καμπής το οποίο αντιστοιχεί στο οκτανολικό pK_a (βλ. §1.5 στο Θεωρητικό Μέρος) και οδηγεί στο χαμηλό πλατώ του προφίλ δεν εμφανίζεται μέχρι την τιμή $pH 7,4$. Αντίθετα στην αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία παρατηρείται σταθεροποίηση των τιμών $\log k_w^{ABZ}$ σε $pH > 5$ σε τιμές αρκετά υψηλότερες των αντίστοιχων τιμών $\log D$. Όσον αφορά στη χρωματογραφία IAM τα προφίλ $\log k_w^{IAM}/pH$ αποτελούν ως επί το πλείστον ευθείες γραμμές και βρίσκονται γενικά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα προφίλ στη στήλη ABZ^+ . Η διαφοροποίηση του προφίλ $\log k_w^{IAM}/pH$ ως προς το αντίστοιχο προφίλ για την αντιστρόφου φάσεως HPLC ωστόσο δεν είναι συστηματική. Ειδικότερα το προφίλ $\log k_w^{IAM}/pH$ της ένωσης 10 (βλ. Σχήμα IIB-16) εμφανίζει πολύ μικρή διαφοροποίηση, ενώ για την ένωση 12 (βλ. Σχήμα IIB-17) σε υψηλές τιμές pH παρατηρείται σύμπτωση της συγκράτησης στη στήλη IAM και ABZ^+ παρουσία 0,25% οκτανόλης στην κινητή φάση. Οι ενώσεις αυτές αφενός αποτελούν ογκώδη μόρια, αφετέρου είναι λιγότερο εύκαμπτες λόγω του συμπυκνωμένου συστήματος δακτυλίων.

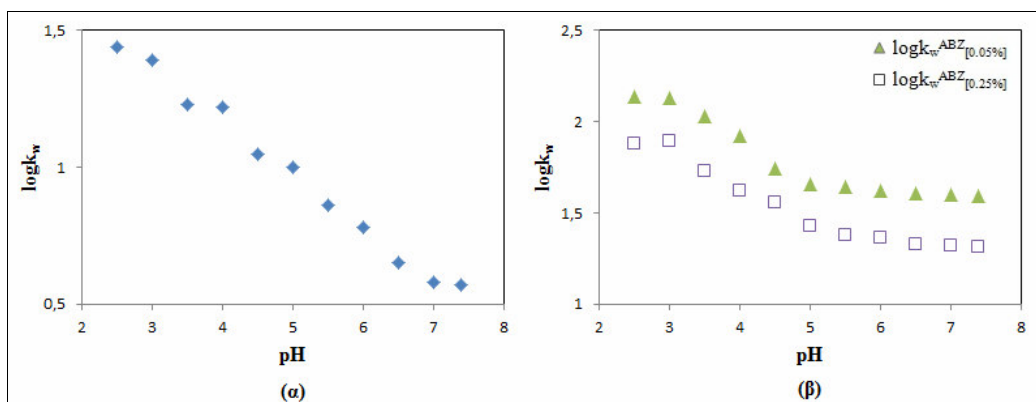
Ιδιαίτερη συμπεριφορά εμφανίζει η ένωση 17 στη στήλη IAM (βλ. Σχήμα IIB-18). Η ένωση 17 που αποτελεί παράγωγο του βενζοθειαζολίου έχει πέραν της όξινης ομάδας και ασθενές βασικό κέντρο, το οποίο σύμφωνα με λογισμικό πακέτο ADME Boxes έχει $pK_b=2,40$ (βλ. Πίνακας 1 στο Παράρτημα) και εμφανίζει ισοηλεκτρικό σημείο πλησίον του 3. Αντίθετα η εφαρμογή pK_{alc} υπολογίζει πρακτικά αμελητέα τιμή pK_a , ως εκ τούτου στην περίπτωση αυτή δεν παρατηρείται διαφοροποίηση του προφίλ $\log D/pH$. Η αναμενόμενη πρωτονίωση σε χαμηλές τιμές pH δεν επηρεάζει τη συγκράτηση στην αντιστρόφου φάσεως στήλη ABZ^+ , λόγω ενδεχομένως των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων. Στη στήλη IAM ωστόσο παρατηρείται μείωση της συγκράτησης σε χαμηλό pH , δεδομένου ότι οι φωσφορικές ομάδες της στατικής φάσης δεν είναι ιονισμένες με αποτέλεσμα να μην αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με την πρωτονιωμένη ομάδα του βενζοθειαζολίου.

Για να είναι σαφέστερη η απεικόνιση του προφίλ $\log k_w/pH$ κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα χωριστά για την χρωματογραφία IAM και την αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία (Σχήματα IIB-20 έως IIB-29).

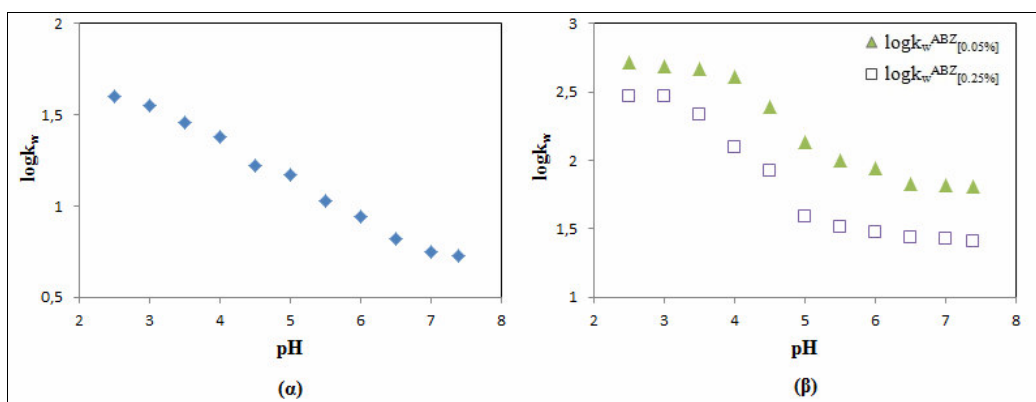
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ



Σχήμα II-B-20. Χρωματογραφικό προφίλ για την ένωση 1: (α) στατική φάση ΙΑΜ, (β) στατική φάση ABZ⁺.

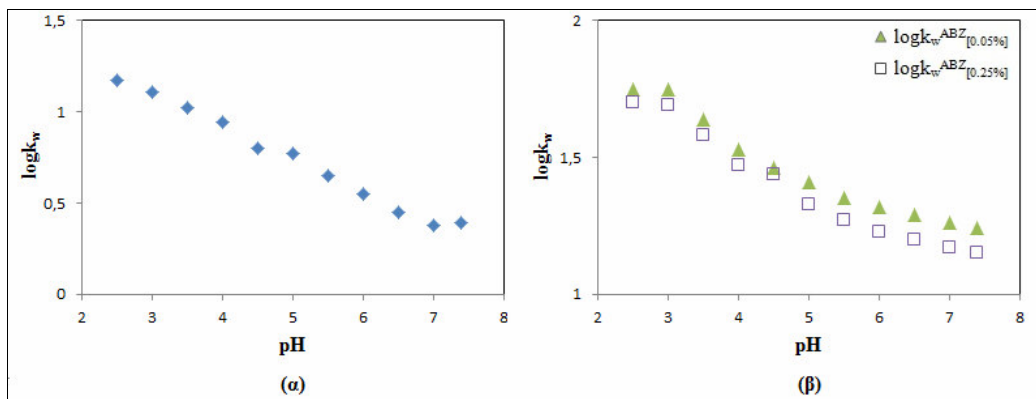


Σχήμα II-B-21. Χρωματογραφικό προφίλ για την ένωση 2: (α) στατική φάση ΙΑΜ, (β) στατική φάση ABZ⁺.

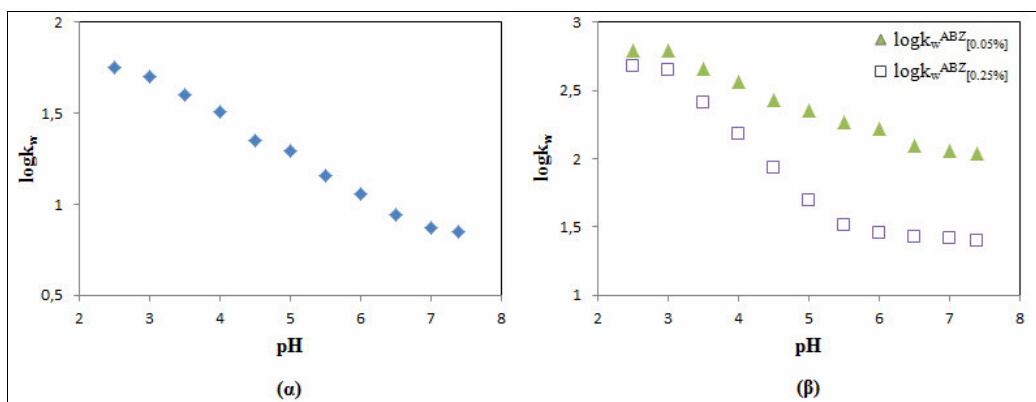


Σχήμα II-B-22. Χρωματογραφικό προφίλ για την ένωση 5: (α) στατική φάση ΙΑΜ, (β) στατική φάση ABZ⁺.

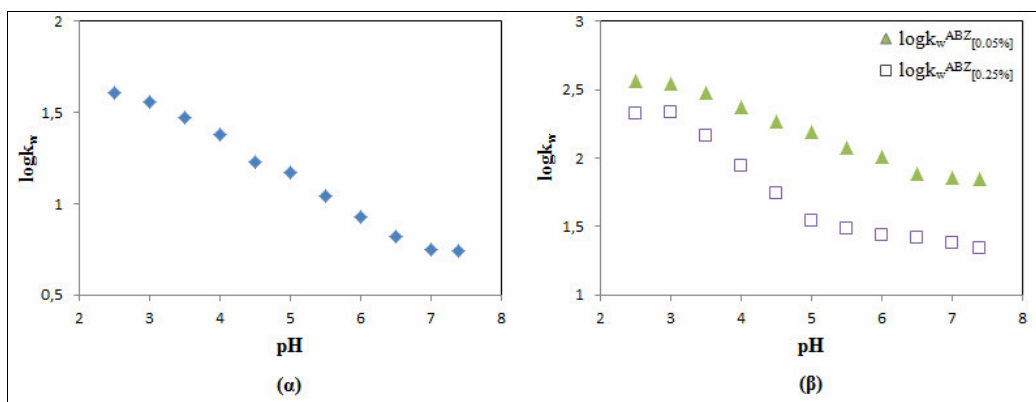
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ



Σχήμα II-B-23. Χρωματογραφικό προφίλ για την ένωση 7: (α) στατική φάση ΙΑΜ, (β) στατική φάση ABZ⁺.

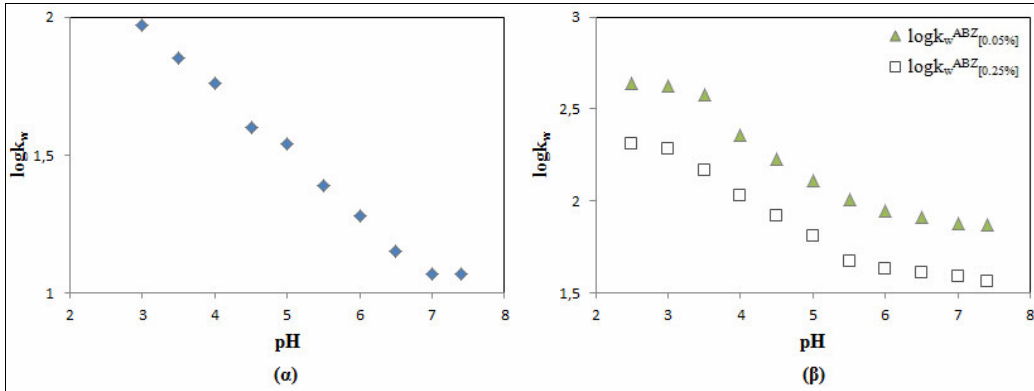


Σχήμα II-B-24. Χρωματογραφικό προφίλ για την ένωση 8: (α) στατική φάση ΙΑΜ, (β) στατική φάση ABZ⁺.

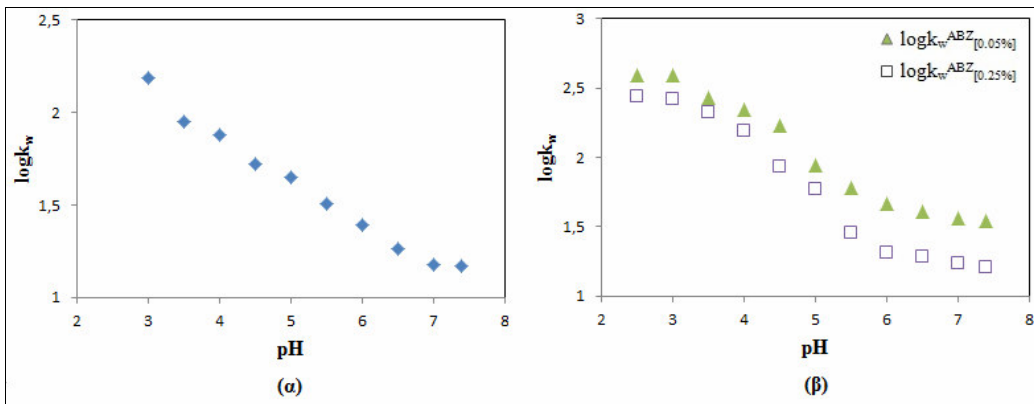


Σχήμα II-B-25. Χρωματογραφικό προφίλ για την ένωση 9: (α) στατική φάση ΙΑΜ, (β) στατική φάση ABZ⁺.

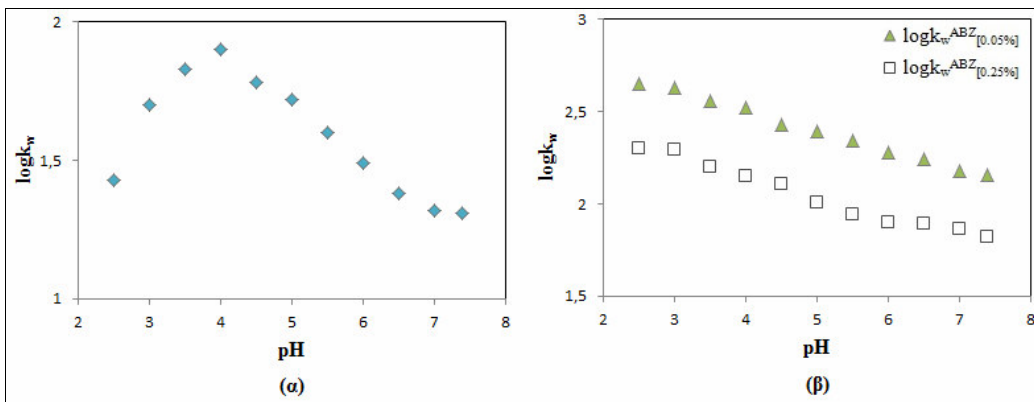
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ



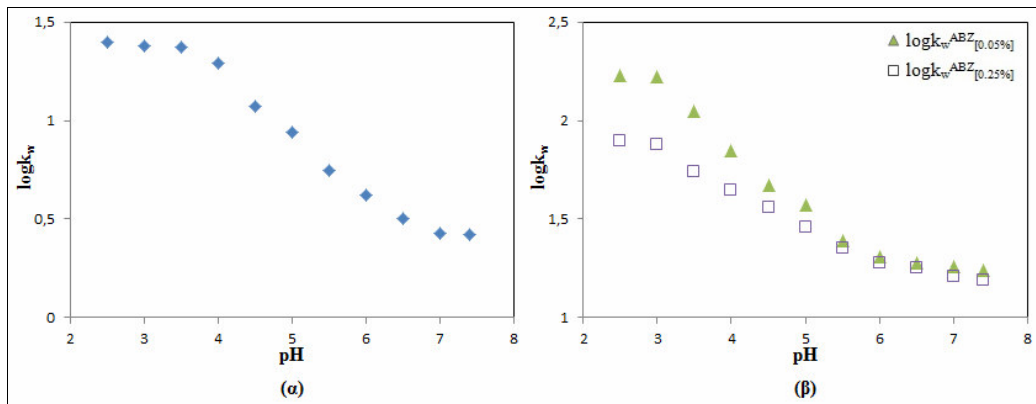
Σχήμα ΠB-26. Χρωματογραφικό προφίλ για την ένωση 10: (α) στατική φάση ΙΑΜ, (β) στατική φάση ABZ⁺.



Σχήμα ΠB-27. Χρωματογραφικό προφίλ για την ένωση 12: (α) στατική φάση ΙΑΜ, (β) στατική φάση ABZ⁺.



Σχήμα ΠB-28. Χρωματογραφικό προφίλ για την ένωση 17: (α) στατική φάση ΙΑΜ, (β) στατική φάση ABZ⁺.



Σχήμα ΠΒ-29. Χρωματογραφικό προφίλ για την ένωση 18: (α) στατική φάση ΙΑΜ, (β) στατική φάση ABZ⁺.

Στα Σχήματα ΠΒ-20 έως ΠΒ-29 απεικονίζεται σαφέστερα το προφίλ της συγκράτησης στη χρωματογραφία ΙΑΜ και στην αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία παρουσία των διαφορετικών ποσοστών οκτανόλης. Η επίδραση της οκτανόλης δεν είναι συστηματική για όλες τις ενώσεις. Ωστόσο παρουσία 0,25% οκτανόλης είναι σαφώς ευκρινέστερα τα σημεία καμπής, σε αναλογία με το προφίλ $\log D/pH$, η κλίση όμως στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης είναι πολύ μικρή κυμαινόμενη μεταξύ των τιμών -0,5 και -0,2 σε αντίθεση με την κλίση -1 που παρατηρείται στις διαδικασίες κατανομής. Εξάλλου προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση:

$$\log k_w = \log k_{w(\text{neutral})} - \log(1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}) \quad (\text{ΠΒ-31})$$

οδηγεί σε τιμές φαινόμενου pK_a που κυμαίνονται από 5 έως 8. Στη χρωματογραφία ΙΑΜ η συγκράτηση ακολουθεί περίπου γραμμική σχέση ως προς το pH, με μικρή καμπύλωση σε pH 7,4. Η διαφοροποίηση του χρωματογραφικού προφίλ είναι αποτέλεσμα των δευτερευουσών αλληλεπιδράσεων, ένα μέρος των οποίων αφορά στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τις σιλανόφιλες θέσεις, ενώ η παρουσία ιχθών μετάλλου στο σκελετό της πυριτίας οδηγεί σε σύμπλοκα με τα καρβοξυλικά ανιόντα^{280,281}. Η προσθήκη οκτανόλης αποτελεί κατάλληλο παράγοντα επικάλυψης για την αντιμετώπιση των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων-τύπου δεσμών υδρογόνου, δεν είναι ωστόσο αποτελεσματική στην επικάλυψη των ιχθών μετάλλου, η επίδραση των οποίων αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα στην περίπτωση των καρβοξυλικών

ανιόντων. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται περαιτέρω από ανάλογη μελέτη του προφίλ $\log k_w/pH$ του ασθενώς όξινου νιμεσουλιδίου όπου η παρουσία οκτανόλης οδήγησε σε πολύ καλή αντιστοιχία με το προφίλ $\log D/pH$ ¹⁴⁷ (βλ. και §2.9 στο Θεωρητικό Μέρος). Η παρουσία οκτανόλης δεν είναι επίσης από μόνη της ικανή να εξουδετερώσει ηλεκτροστατικού τύπου σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις. Ως εκ τούτου δεν παρατηρείται μείωση της συγκράτησης σε χαμηλές τιμές pH στην περίπτωση της αμφολυτικής ένωσης 17. Οι δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις στη στατική φάση IAM είναι δυνατόν να αφορούν σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των καρβοξυλικών ανιόντων με το φορτισμένο άζωτο της χολίνης, αλλά και στο σχηματισμό συμπλόκων από την πιθανή παρουσία ιχθών μετάλλων. Από την άλλη η απουσία ηλεκτροστατικού τύπου σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων είναι εμφανής στη συγκράτηση της ένωσης 17, όπου όπως προαναφέρθηκε παρατηρείται κωδωνοειδής καμπύλη.

2. Σύγκριση χρωματογραφικών μεγεθών IAM με δεδομένα διαπερατότητας-Εξαγωγή μοντέλου για τη γαστρεντερική απορρόφηση

2.1 Σειρά εργασίας

Χρωματογραφικοί δείκτες IAM

Τη σειρά εργασίας αποτέλεσαν 29 δομικά διαφορετικές ενώσεις οι οποίες παρουσιάζονται στο Σχήμα 1 στο Παράρτημα. Οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ σε pH 5,0 και 7,4 για τις 26 ενώσεις ελήφθησαν από προηγούμενες δημοσιεύσεις του εργαστηρίου^{187,190}. Οι τιμές για τη ρανιτιδίνη, τη λαβηταλόλη και το υδροχλωροθειαζίδιο ελήφθησαν από άλλες πηγές^{194,203,282,283}. Όλες οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ αναφέρονται στον Πίνακα 4 στο Παράρτημα.

Δεδομένου ότι η γαστρεντερική απορρόφηση όξινων/βασικών μορίων εξαρτάται από το pH το οποίο διαφοροποιείται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, για την εξαγωγή των μοντέλων θεωρήθηκε η μεγαλύτερη τιμή $\log k_w^{IAM}$ ως βέλτιστη τιμή $\log k_w^{IAM}_{best}$. Κατά συνέπεια για μεν τα οξέα ελήφθησαν οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ σε pH 5,0 για δε τις βάσεις σε pH 7,4. Οι τιμές $\log k_w^{IAM}_{best}$ περιλαμβάνονται στον Πίνακα ΠΒ-11.

Δεδομένα λιποφιλίας

Οι τιμές $\log D$ σε pH 5,0 και 7,4 ελήφθησαν από τις ίδιες δημοσιεύσεις που αναφέρονται στην προηγούμενη παράγραφο^{187,190,203,284,285} και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4 στο Παράρτημα.

Όπως και στην περίπτωση των τιμών $\log k_w^{IAM}$ για την εξαγωγή μοντέλων θεωρήθηκε ως βέλτιστη τιμή $\log D_{best}$ η μεγαλύτερη εκ των δυο τιμών. Οι τιμές $\log D_{best}$ αναφέρονται στον Πίνακα ΠB-11.

Τιμές διαπερατότητας (Perm)

Ελήφθησαν τιμές από την ίδια βιβλιογραφική πηγή²⁸⁶, οι οποίες αφορούν διαπερατότητα σε κυτταρικές σειρές MDCK (Madin-Darby canine kidney) σε pH 5,5 και 7,4.

Οι κυτταρικές αυτές σειρές αποτελούν νεφρικές κυτταρικές σειρές και έχει διαπιστωθεί ότι δίνουν παρόμοια αποτελέσματα με τις κυτταρικές σειρές Caco-2 για ενώσεις που μεταφέρονται διακυττάρια μέσω παθητικής διάχυσης προσομοιώνοντας τη διαπερατότητα. Στις κυτταρικές σειρές MDCK όπως και στις σειρές Caco-2 εκφράζεται επιπλέον η p-γλυκοπρωτεΐνη, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε φαινόμενο εκροής από τις μεμβράνες (efflux). Συστήματα τεχνητών μεμβρανών όπως η χρωματογραφία IAM ή το σύστημα PAMPA αδυνατούν να εκφράσουν τον παράγοντα αυτόν.

Τα δεδομένα διαπερατότητας στις σειρές MDCK (Perm) σε pH 5,5 και 7,4 εκφρασμένα σε nm/s μετατράπηκαν σε m/s και ακολούθως στη λογαριθμική τους μορφή ($\log Perm$) και περιλαμβάνονται στον Πίνακα 5 στο Παράρτημα. Και σε αυτήν την περίπτωση για την εξαγωγή μοντέλου για τη γαστρεντερική απορρόφηση θεωρήθηκε ως βέλτιστη τιμή $\log Perm_{best}$ η μεγαλύτερη τιμή. Συνεπώς, για τα οξέα ελήφθησαν οι τιμές $\log Perm$ σε pH 5,5 και για τις βάσεις οι τιμές σε pH 7,4. Στον Πίνακα ΠB-11 αναφέρονται οι τιμές $Perm_{best}$.

Τιμές %HOA

Για την ανθρώπινη από του στόματος απορρόφηση (HOA, Human Oral Absorption) ελήφθησαν τιμές από τη βιβλιογραφία. Κατεβλήθη προσπάθεια τα δεδομένα να ληφθούν κατά το δυνατόν από ενιαία βιβλιογραφική πηγή^{287,288,289}. Όπου αυτό δεν

ήταν δυνατόν θεωρήθηκε ο μέσος όρος διαφορετικών τιμών της βιβλιογραφίας. Οι τιμές %HOA φαίνονται στον Πίνακα ΠΒ-11.

Οξεοβασικές ιδιότητες

Τα κλάσματα των μοριακών μορφών υπολογίστηκαν από το λογισμικό πακέτο ADME Boxes 3.0 και συμβολίζονται ως F^+ (κλάσμα κατιόντων), F^- (κλάσμα ανιόντων) και F^z (κλάσμα που αντιστοιχεί σε εσωτερικό άλας). Για την πιροξικάμη και την τενοξικάμη τα αντίστοιχα κλάσματα υπολογίστηκαν με βάση τις πειραματικές τιμές pK_a της βιβλιογραφίας²⁹⁰ σύμφωνα με τις οποίες τα φάρμακα αυτά έχουν αμφολυτικό χαρακτήρα. Οι τιμές F^+ , F^- και F^z περιλαμβάνονται στον Πίνακα 6 στο Παράρτημα.

Υπολογισμός άλλων μοριακών παραμέτρων

Το τοπολογικό εμβαδόν πολικής επιφάνειας (Topological Polar Surface Area, TPSA) υπολογίστηκε με το λογισμικό πακέτο PALLAS 3.3.2.4

Η οξύτητα και η βασικότητα ως προς το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου του Abraham (A και B) υπολογίστηκαν με την επιλογή Absolv του λογισμικού πακέτου ADME Boxes 3.0.

Οι θέσεις δεκτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου υπολογίστηκαν ως το σύνολο των ατόμων οξυγόνου και αζώτου στο μόριο.

Στον Πίνακα 6 στο Παράρτημα περιλαμβάνονται μόνο οι τιμές B που χρησιμοποιήθηκαν στο τελικό μοντέλο.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ

Πίνακας ΠΒ-11. Τιμές $\log k_w^{IAM}_{best}$, $\log D_{best}$, $\log Perm_{best}$ και %HOA της σειράς εργασίας.

No	Ένωση	$\log k_w^{IAM}_{best}$	$\log D_{best}$	$\log Perm_{best}$	%HOA
1	Ακεταμινοφαίνη	0,18 ^(β)	0,51 ^(β)	-	80,00 ^(ζ)
2	Ακυκλοβίρη	-1,15 ^(β)	-1,56 ^(β)	-7,70 ^(στ)	17,00 ^(ζ)
3	Ατενολόλη	0,51 ^(β)	-1,61 ^(α)	-7,93 ^(στ)	44,00 ^(ζ)
4	Βεναζεπρίλη	1,80 ^(β)	1,48 ^(β)	-	37,00 ^(θ)
5	Βρωμαζεπάμη	1,44 ^(β)	1,65 ^(β)	-	84,00 ^(ζ)
6	Καπτοπρίλη	* ^(β)	-1,48 ^(β)	-	71,00 ^(ζ)
7	Χλωροπρομαζίνη	3,33 ^(β)	3,38 ^(β)	-	96,00 ^(θ)
8	Χλωροθαλιδόνη	1,37 ^(β)	1,12 ^(β)	-	65,00 ^(θ)
9	Κυπροφλοξακίνη	1,31 ^(β)	-1,11 ^(β)	-	67,00 ^(ζ)
10	Διαζεπάμη	2,12 ^(β)	2,79 ^(β)	-	100,0 ^(ζ)
11	Διλτιαζέμη	2,65 ^(β)	2,06 ^(α)	-	90,00 ^(η)
12	Εναλαπρίλη	-0,34 ^(β)	1,64 ^(β)	-	60,00 ^(ζ)
13	Υδροχλωροθειαζίδιο	0,58 ^(γ)	-0,07 ^(γ)	-7,96 ^(στ)	70,00 ^(ζ)
14	Ιμιπραμίνη	2,73 ^(β)	2,40 ^(α)	-	100,00 ^(ζ)
15	Κετοπροφαίνιο	1,55 ^(β)	1,77 ^(β)	-6,09 ^(στ)	100,00 ^(ζ)
16	Λαβηταλόλη	1,90 ^(δ)	1,15 ^(ε)	-6,70 ^(στ)	95,00 ^(ζ)
17	Ναπροξένιο	1,71 ^(β)	2,24 ^(β)	-5,95 ^(στ)	100,00 ^(ζ)
18	Νιφεδιπίνη	1,66 ^(β)	2,20 ^(β)	-	90,00 ^(θ)
19	Νορφλοξακίνη	1,31 ^(β)	-1,03 ^(β)	-	65,00 ^(ζ)
20	Οξπρενολόλη	1,47 ^(β)	0,32 ^(β)	-	90,00 ^(ζ)
21	Πινδολόλη	1,47 ^(β)	-0,21 ^(β)	-6,57 ^(στ)	90,00 ^(ζ)
22	Πιροξικάμη	1,73 ^(β)	2,18 ^(β)	-	100,00 ^(ζ)
23	Προπρανολόλη	2,33 ^(β)	1,26 ^(α)	-6,35 ^(στ)	95,00 ^(ζ)
24	Ρανιτιδίνη	0,98 ^(δ)	-0,29 ^(στ)	-8,12 ^(στ)	50,00 ^(ζ)
25	Σκοπολαμίνη	1,15 ^(β)	-0,23 ^(α)	-	90,00 ^(ζ)
26	Τενοξικάμη	1,52 ^(β)	1,75 ^(α)	-	100,00 ^(ζ)
27	Θεοφυλλίνη	-0,08 ^(β)	-0,02 ^(β)	-6,50 ^(στ)	96,00 ^(ζ)
28	Τριμεθοπρίμη	1,05 ^(β)	0,74 ^(α)	-6,78 ^(στ)	97,00 ^(ζ)
29	Βεραπαμίλη	2,76 ^(β)	2,57 ^(α)	-6,58 ^(στ)	90,00 ^(ζ)

^(α)από την παραπομπή (187), ^(β)από την παραπομπή (190), ^(γ)από την παραπομπή (203), ^(δ)από την παραπομπή (282), ^(ε)από την παραπομπή (284), ^(στ)από την παραπομπή (286), ^(ζ)από την παραπομπή (287), ^(η)από την παραπομπή (288), ^(θ)από την παραπομπή (289), *δεν εκλούστηκε.

2.1.2 Σύγκριση τιμών $\log k_w^{IAM}$ και $\log D$ με δεδομένα διαπερατότητας MDCK

Αρχικά έγινε χωριστή σύγκριση των τιμών $\log Perm$ και $\log k_w^{IAM}$ που αφορούν σε pH 5,5 και 7,4. Οι εξισώσεις που προέκυψαν εμφάνισαν φτωχά στατιστικά στοιχεία με συντελεστές συσχέτισης $r=0,428$ και $0,508$ αντίστοιχα. Η εισαγωγή του ποσοστού

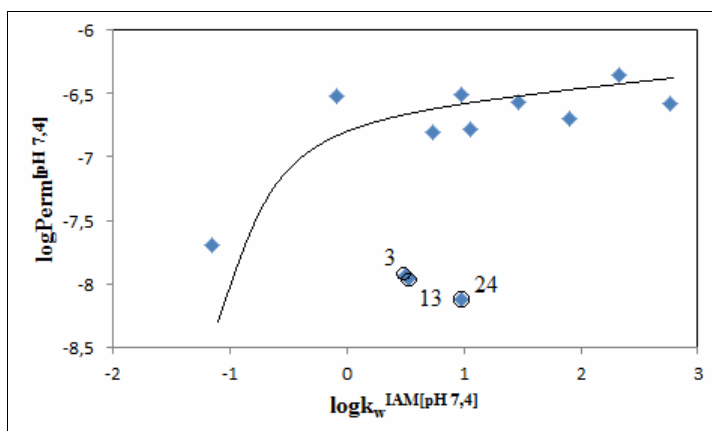
πρωτονίωσης F^+ ως επιπλέον παραμέτρου στη σχέση $\log \text{Perm}^{[\text{pH } 5,5]} / \log k_w^{\text{IAM}[\text{pH } 5,0]}$ βελτίωσε την αρχική συσχέτιση και οδήγησε στην εξίσωση (ΠB-32):

$$\log \text{Perm}^{[\text{pH } 5,5]} = 0,49(\pm 0,10) \log k_w^{\text{IAM}[\text{pH } 5,0]} - 1,09(\pm 0,22) F^+ - 6,80(\pm 0,16) \quad (\text{ΠB-32})$$

$$n = 8, r = 0,902, r^2 = 0,814, s = 0,318, F = 18,5$$

Στην εξίσωση (ΠB-32) δεν περιλαμβάνονται η ατενολόλη (No 3) και το υδροχλωροθειαζίδιο (No 13), οι οποίες παρουσίασαν αποκλίνουσα συμπεριφορά, καθώς και η ρανιτιδίνη και η λαβηταλόλη για τις οποίες δεν υπήρχαν διαθέσιμες τιμές $\log k_w^{\text{IAM}[\text{pH } 5,0]}$. Το αρνητικό πρόσημο του όρου F^+ υποδηλώνει την υπερέκφραση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων των πρωτονιωμένων ομάδων με τα φωσφορικά ανιόντα στη στατική φάση IAM σε pH 5,0 συγκριτικά με την αντίστοιχη επίδραση στη διαπερατότητα από τις κυτταρικές σειρές MDCK.

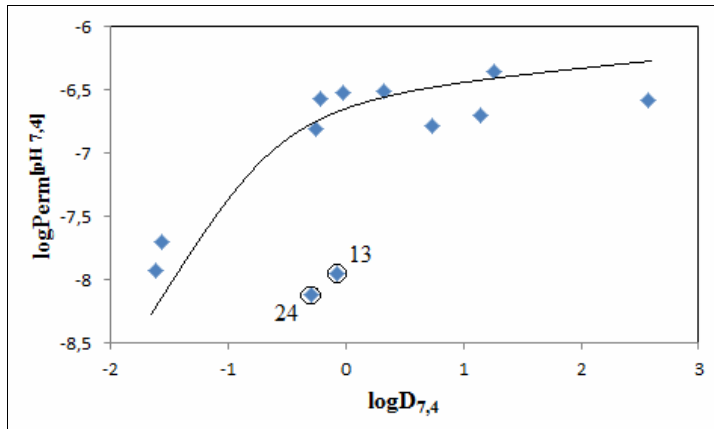
Σε pH 7,4 για τις ίδιες ενώσεις δεν ήταν δυνατόν να ληφθεί αντίστοιχη ικανοποιητική συσχέτιση. Η απεικόνιση των τιμών $\log \text{Perm}^{[\text{pH } 7,4]}$ ως προς τις αντίστοιχες τιμές $\log k_w^{\text{IAM}, 7,4}$ οδήγησε σε καμπύλη κορεσμού με την πλειοψηφία των δεδομένων να βρίσκονται στην περιοχή του πλατώ και ως εκ τούτου να είναι ανεξάρτητα των τιμών $\log k_w^{\text{IAM}, 7,4}$, Σχήμα ΠB-30:



Σχήμα ΠB-30. Απεικόνιση των τιμών $\log \text{Perm}^{[\text{pH } 7,4]}$ έναντι των τιμών $\log k_w^{\text{IAM}[\text{pH } 7,4]}$.

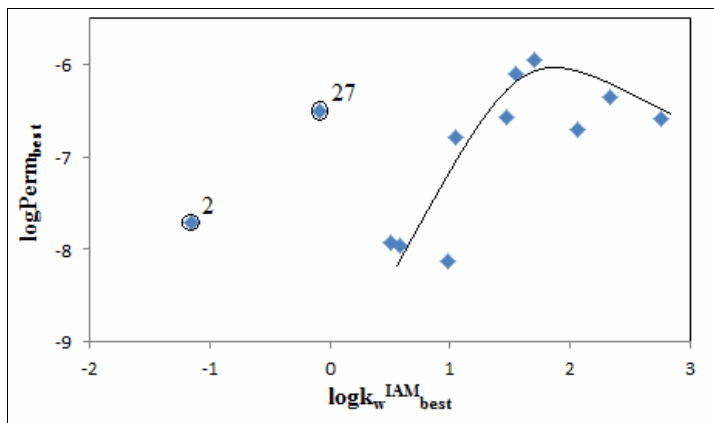
Η ατενολόλη (No 3), το υδροχλωροθειαζίδιο (No 13) και η ρανιτιδίνη (No 24), οι οποίες έχουν σημειωθεί με κύκλο στο Σχήμα ΠB-30, δεν προσαρμόζονται στην καμπύλη κορεσμού.

Ανάλογη είναι και η καμπύλη όπου λαμβάνεται αν οι τιμές διαπερατότητας συγκριθούν με τις τιμές $\log D_{7,4}$. Στην περίπτωση αυτή η ατενολόλη δεν αποτελεί έκτροπη τιμή, Σχήμα ΠΒ-31:



Σχήμα ΠΒ-31. Απεικόνιση των τιμών $\log \text{Perm}^{\text{pH } 7,4}$ έναντι των τιμών $\log D_{7,4}$.

Ακολούθως συγκρίθηκαν οι τιμές $\log \text{Perm}_{\text{best}}$ με τις τιμές $\log k_w^{\text{IAM}_{\text{best}}}$. Με την ακυκλοβίρη (No 2) και τη θεοφυλλίνη (No 27) να εμφανίζουν αποκλίνουσα συμπεριφορά, οι τιμές $\log \text{Perm}_{\text{best}}$ ακολουθούν παραβολική σχέση ως προς τη συγκράτηση στη στήλη ΙΑΜ (Σχήμα ΠΒ-32), η οποία εκφράζεται με την εξίσωση (ΠΒ-33).



Σχήμα ΠΒ-32. Απεικόνιση των τιμών $\log \text{Perm}_{\text{best}}$ έναντι των τιμών $\log k_w^{\text{IAM}_{\text{best}}}$.

$$\log \text{Perm}_{\text{best}} = -0,77(\pm 0,29)[\log k_w^{\text{IAM}_{\text{best}}}]^2 + 3,21(\pm 0,93)\log k_w^{\text{IAM}_{\text{best}}} - 9,60(\pm 0,66) \quad (\text{ΠΒ-33})$$

$$n = 10, r = 0,832, r^2 = 0,692, s = 0,444, F = 11,12$$

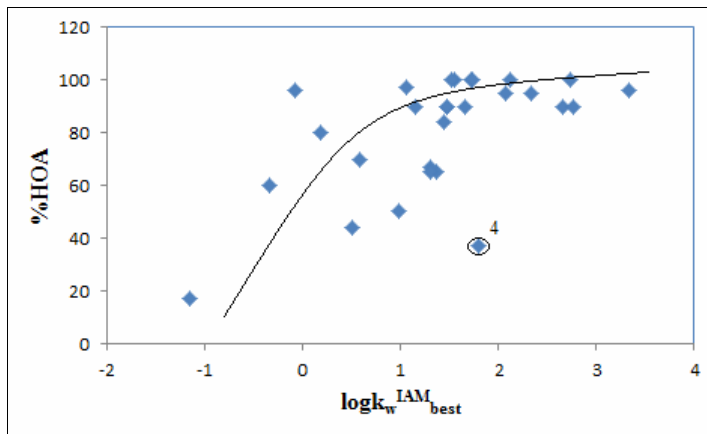
Ικανοποιητική εξίσωση προέκυψε επίσης εάν οι τιμές $\log k_w^{IAM}_{best}$ συνδυαστούν με την παράμετρο βασικότητας B του Abraham:

$$\log Perm_{best} = 0,61(\pm 0,14)\log k_w^{IAM}_{best} - 1,15(\pm 0,23)B - 6,04(\pm 0,46) \quad (II\text{-}34)$$

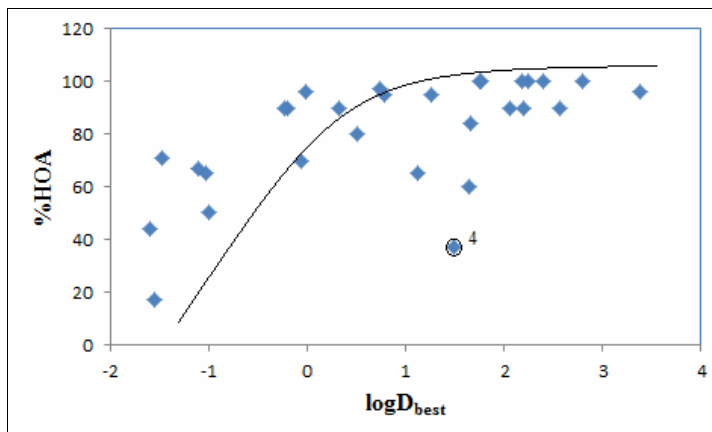
$$n = 10, r = 0,931, r^2 = 0,866, s = 0,293, F = 30,12$$

2.1.3 Σύγκριση των δεδομένων ΙΑΜ, logD και Perm με τις τιμές %HOA

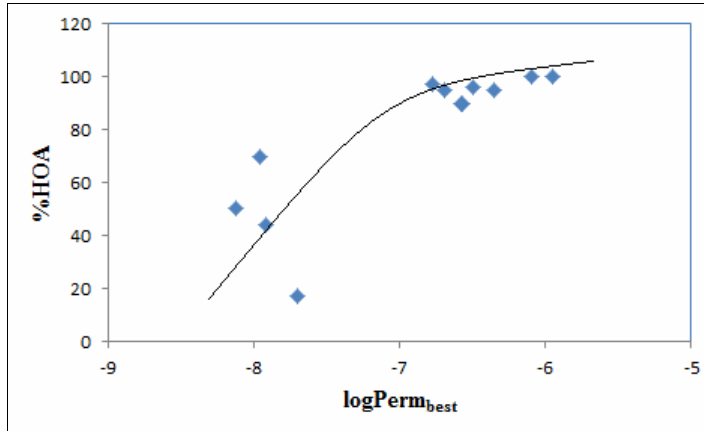
Η σύγκριση με τις τιμές %HOA έγινε χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες τιμές $\log k_w^{IAM}_{best}$, $\log D_{best}$ και $\log Perm_{best}$. Στα Σχήματα IIΒ-33 έως IIΒ-35 φαίνονται οι απεικονίσεις των τιμών %HOA ως προς τα δεδομένα στα τρία διαφορετικά συστήματα.



Σχήμα IIΒ-33. Απεικόνιση των τιμών %HOA έναντι των τιμών $\log k_w^{IAM}_{best}$.



Σχήμα IIΒ-34. Απεικόνιση των τιμών %HOA έναντι των τιμών $\log D_{best}$.



Σχήμα II-B-35. Απεικόνιση των τιμών %HOA έναντι των τιμών logPerm_{best}.

Διαπιστώνεται σε όλες τις περιπτώσεις μια τάση για καμπύλη κορεσμού, σύμφωνα με την οποία πάνω από κάποια όρια τιμών η %HOA είναι πρακτικά 100%. Τα όρια αυτά είναι $\log k_w^{IAM} \sim 1,0$, $\log D \sim 0,3$ και $\log Perm \sim -7,0$, τιμή η οποία παρατηρήθηκε και με βάση τη σχέση $\log Perm_{best} / \log k_w^{IAM}_{best}$. Σε κάθε περίπτωση ωστόσο εμφανίζονται ενώσεις με αποκλίνουσα συμπεριφορά. Η μη γραμμική σχέση που παρατηρείται στα Σχήματα II-B-33 έως II-B-35 μπορεί να προσομοιωθεί με προσαρμογή στο μοντέλο που προτείνουν οι Kotecha και συν¹⁹⁴ σύμφωνα με τη γενική σχέση που αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.7 στο Θεωρητικό Μέρος:

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + (A2X))}} \quad (I-23)$$

όπου: X η συγκράτηση στη στήλη IAM, η λιποφιλία logD ή η διαπερατότητα στις κυτταρικές σειρές MDCK και A1, A2 οι συντελεστές παλινδρόμησης που υπολογίζονται από τη μη γραμμική προσαρμογή. Προέκυψαν οι εξισώσεις:

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + A2 \log k_w^{IAM}(best))}} \quad (II-B-35)$$

$$n = 28, r = 0,607, r^2 = 0,369, A1 = 2,76(\pm 0,28), A2 = 0,83(\pm 0,24)$$

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + A2 \log D(best))}} \quad (II-B-36)$$

$$n = 29, r = 0,631, r^2 = 0,398, A1 = 3,41(\pm 0,22), A2 = 0,66(\pm 0,19)$$

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + A2 \log Perm(best))}} \quad (II\text{B-}37)$$

$$n = 12, r = 0,832, r^2 = 0,693, A1 = 16,16(\pm 4,40), A2 = 1,76(\pm 0,57)$$

Με βάση τις διαφορές υπολογιστικών πειραματικών τιμών διαπιστώθηκε ότι η βεναζεπρίλη (No 4) εμφανίζει αποκλίνουσα συμπεριφορά στις εξισώσεις (II\text{B-}35) και (II\text{B-}36). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η τιμή %HOA της βεναζεπρίλης είναι κατά πολύ μικρότερη της αντίστοιχης τιμής για την εναλαπρίλη. Εξάλλου αν και η τιμή logP της βεναζεπρίλης είναι κατά πολύ μεγαλύτερη της τιμής logP της εναλαπρίλης η σειρά αντιστρέφεται όσο αφορά τις τιμές logD_{best}. Αντίθετα η συγκράτηση στη στήλη IAM εμφανίζεται πολύ ισχυρότερη στην περίπτωση της βεναζεπρίλης σε pH 7,4 ενώ σε pH 5,0 η εναλαπρίλη εκλύεται με το νεκρό χρόνο. Εξαίρεση της βεναζεπρίλης από την ανάλυση οδήγησε στις εξισώσεις (II\text{B-}38) και (II\text{B-}39):

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + A2 \log kWIAM(best))}} \quad (II\text{B-}38)$$

$$n = 27, r = 0,703, r^2 = 0,494, A1 = 2,79(\pm 0,24), A2 = 0,94(\pm 0,23)$$

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + A2 \log D(best))}} \quad (II\text{B-}39)$$

$$n = 28, r = 0,738, r^2 = 0,545, A1 = 3,57(\pm 0,22), A2 = 0,82(\pm 0,19)$$

Ακολούθως δοκιμάστηκε η εισαγωγή πρόσθετων παραμέτρων στις εξισώσεις (II\text{B-}37), (II\text{B-}38) και (II\text{B-}39). Η παράμετρος βασικότητας του Abraham B βελτίωσε τις συσχετίσεις και στις τρεις περιπτώσεις. Προέκυψαν οι εξισώσεις:

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + A2 \log kWIAM(best) + A3B)}} \quad (II\text{B-}40)$$

$$n = 27, r = 0,857, r^2 = 0,735, A1 = 7,68(\pm 1,61), A2 = 0,80(\pm 0,19), A3 = -2,72(\pm 0,84)$$

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + A2 \log D(best) + A3B)}} \quad (II\text{B-}41)$$

$$n = 28, r = 0,851, r^2 = 0,724, A1 = 7,65(\pm 1,31), A2 = 0,65(\pm 0,14), A3 = -2,35(\pm 0,70)$$

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + A2 \log Perm(best) + A3B)}} \quad (II\text{B}-42)$$

$$n = 12, r = 0,984, r^2 = 0,969, A1 = 22,42(\pm 2,65), A2 = 1,04(\pm 0,28), A3 = -6,81(\pm 0,90)$$

Η συσχέτιση των τιμών %HOA με τη διαπερατότητα στις σειρές MDCK συνοδεύεται από πολύ καλό συντελεστή συσχέτισης, εξίσωση (II\text{B}-42). Ωστόσο στην περίπτωση αυτή τα δεδομένα είναι λιγότερα και δεν μπορεί να γίνει άμεση σύγκριση με τις αντίστοιχες εξισώσεις (II\text{B}-40) και (II\text{B}-41) που προκύπτουν με το συντελεστή κατανομής και τη συγκράτηση IAM.

Με βάση την παρατήρηση για υπερέκφραση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στη στατική φάση IAM, ενώ οι αλληλεπιδράσεις αυτές δεν εκφράζονται καθόλου στο σύστημα οκτανόλης-νερού, δοκιμάστηκε η εισαγωγή των κλασμάτων F^+ και F^- στις συσχετίσεις με την %HOA.

Δεδομένου ότι στις ενώσεις συμπεριλαμβάνονται ορισμένοι αμφολύτες που σχηματίζουν εσωτερικά άλατα διερευνήθηκε κατά πόσο έπρεπε να ληφθεί υπόψη η τιμή του κλάσματος F^z ή η τιμή του να προστεθεί στα κλάσματα F^+ και F^- θεωρώντας ότι κατά την αλληλεπίδραση με ανισότροπες επιφάνειες το εσωτερικό άλας διασπάται. Καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν τελικά θεωρώντας ότι δεν διασπάται το εσωτερικό άλας, εκτός από την περίπτωση της πιροξικάμης και τενοξικάμης όπου η τιμή F^z ενσωματώθηκε στις τιμές F^+ και F^- .

Το κλάσμα F^- δεν ήταν στατιστικά σημαντικό σε καμία περίπτωση. Αντίθετα, όταν εισήχθη το κλάσμα F^+ στη σχέση μεταξύ των τιμών %HOA και των βέλτιστων τιμών $\log k_w^{IAM}$ προέκυψε η εξίσωση (II\text{B}-43) με ελαφρώς βελτιωμένα στατιστικά στοιχεία:

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + A2 \log k_w^{IAM}(best) + A3B + A4F^+)}} \quad (II\text{B}-43)$$

$$n = 27, r = 0,874, r^2 = 0,763, A1 = 7,10(\pm 1,62), A2 = 1,10(\pm 0,26), A3 = -2,25(\pm 0,86), A4 = -0,96(\pm 0,52)$$

Ο παράγοντας F^+ εμφανίζει αρνητικό πρόσημο, γεγονός που συνηγορεί για την υπερέκφραση των ηλεκτροστατικών δεσμών που αναπτύσσονται στην επιφάνεια IAM με τις πρωτονιωμένες μορφές των βασικών ενώσεων.

Η αντίστοιχη εξίσωση στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται οι συντελεστές κατανομής εμφανίζεται περισσότερο βελτιωμένη, βλ. εξίσωση (II\text{B}-44). Στην

περίπτωση αυτή ωστόσο το κλάσμα F^+ έχει θετικό πρόσημο επιβεβαιώνοντας τη συμμετοχή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων των πρωτονιωμένων ενώσεων στην απορρόφηση και οι οποίες δεν μπορούν να εκφραστούν στο σύστημα οκτανόλης-νερού.

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + A2 \log D(\text{best}) + A3B + A4F+)}} \quad (\text{IIB-44})$$

$n = 28$, $r = 0,903$, $r^2 = 0,815$, $A1 = 7,69(\pm 1,04)$, $A2 = 0,71(\pm 0,13)$, $A3 = -2,75(\pm 0,60)$, $A4 = 1,17(\pm 0,36)$

Στην περίπτωση εφαρμογής των δεδομένων διαπερατότητας στη συσχέτιση με τις τιμές %HOA η παράμετρος F^+ είναι επίσης στατιστικά σημαντική με θετική τιμή, βλ. εξίσωση (IIB-45), η οποία ωστόσο είναι περίπου το ήμισυ του αντίστοιχου συντελεστή που προκύπτει για την εξίσωση (IIB-44):

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(A1 + A2 \log \text{Perm}(\text{best}) + A3B + A4F+)}} \quad (\text{IIB-45})$$

$n = 12$, $r = 0,991$, $r^2 = 0,982$, $A1 = 22,56(\pm 2,31)$, $A2 = 1,05(\pm 0,25)$, $A3 = -6,27(\pm 0,78)$, $A4 = 0,53(\pm 0,22)$

Συμπερασματικά, από τις εξισώσεις (IIB-43), (IIB-44) και (IIB-45) προκύπτει ότι στην απορρόφηση συμβάλλουν και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στην περίπτωση πρωτονιωμένων ενώσεων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές υπερκεφράζονται στη στατική φάση IAM (αρνητικό πρόσημο του όρου F^+), δεν εκφράζονται στη κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού, ενώ εκφράζονται μερικώς μόνο στη διαπερατότητα από τις κυτταρικές σειρές MDCK. Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι οι συντελεστές παλινδρόμησης των όρων $\log k_w^{\text{IAM}}_{\text{best}}$ και $\log \text{Perm}_{\text{best}}$ είναι κοντά στη μονάδα, διαφέρουν όμως σημαντικά οι συντελεστές παλινδρόμησης της παραμέτρου B, υποδηλώνοντας διαφοροποίηση στη συμμετοχή των δεκτών σε δεσμούς υδρογόνου στη συγκράτηση IAM και στη διαπερατότητα από τις κυτταρικές σειρές MDCK.

Στον Πίνακα IIB-12 αναφέρονται οι τιμές %HOA που προβλέπονται από τις εξισώσεις (IIB-43), (IIB-44) και (IIB-45) μαζί με τις διαφορές τους από τις πειραματικές τιμές ($\%HOA - \%HOA_{\text{pred}}$).

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Α. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ

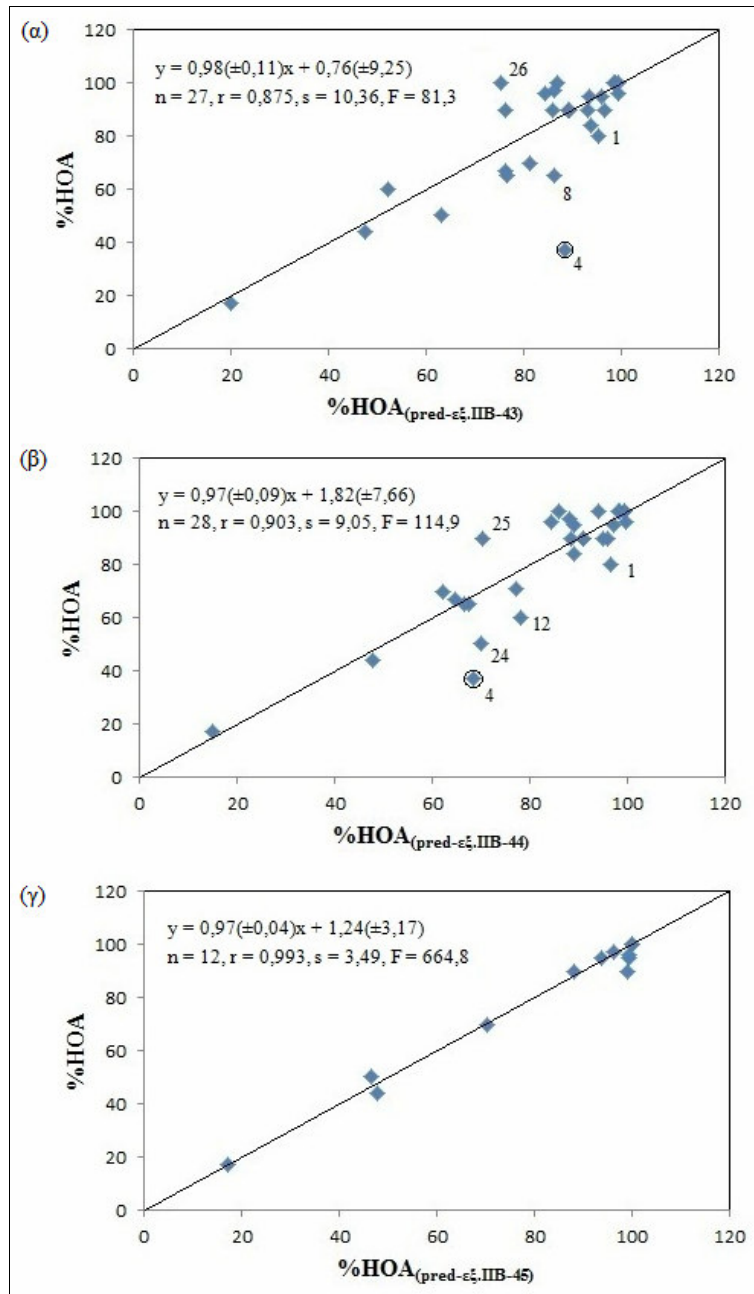
Πίνακας ΠΒ-12. Υπολογισμένες τιμές %HOA και οι διαφορές τους από τις πειραματικές τιμές.

No	Ένωση	%HOA (εξ.ΠΑ-43)	%HOA- %HOA (εξ.ΠΑ-43)	%HOA (εξ.ΠΑ-44)	%HOA- %HOA (εξ.ΠΑ-44)	%HOA (εξ.ΠΑ-45)	%HOA- %HOA (εξ.ΠΑ-45)
1	Ακεταμινοφαίνη	95,52	-15,52	96,72	-16,72	17,26	-0,26
2	Ακυκλοβίρη	19,81	-2,81	14,88	2,12	47,87	-3,87
3	Ατενολόλη	47,36	-3,36	47,69	-3,69	-	-
4	Βεναζεπρίλη*	88,49	-51,49	68,46	-31,46	-	-
5	Βρωμαζεπάμη	93,88	-9,88	89,09	-5,09	-	-
6	Καπτοπρίλη	-	-	77,37	-6,37	-	-
7	Χλωροπρομαζίνη	99,54	-3,54	99,83	-3,83	-	-
8	Χλωροθαλιδόνη	86,32	-21,32	67,57	-2,57	-	-
9	Κυπροφλοξακίνη	76,29	-9,29	64,67	2,33	-	-
10	Διαζεπάμη	98,68	1,32	98,07	1,93	-	-
11	Διλτιαζέμη	88,98	1,02	88,5	1,50	-	-
12	Εναλαπρίλη	52,23	7,77	78,26	-18,26	70,21	-0,21
13	Υδροχλωροθειαζίδιο	81,32	-11,32	62,14	7,86	-	-
14	Ιμιπραμίνη	98,59	1,41	99,39	0,61	99,97	0,03
15	Κετοπροφαίνιο	98,90	1,10	98,51	1,49	93,84	1,16
16	Λαβηταλόλη	93,49	1,51	89,26	5,74	99,99	0,01
17	Ναπροξένιο	99,42	0,58	99,4	0,60	-	-
18	Νιφεδιπίνη	96,63	-6,63	95,06	-5,06	-	-
19	Νορφλοξακίνη	76,70	-11,70	66,57	-1,57	-	-
20	Οξπρενολόλη	85,87	4,13	91,06	-1,06	98,99	-8,99
21	Πινδολόλη	89,29	0,71	91,14	-1,14	-	-
22	Πιροξικάμη	86,92	13,08	94,16	5,84	99,45	-4,45
23	Προπρανολόλη	96,08	-1,08	97,18	-2,18	46,42	3,58
24	Ρανιτιδίνη	63,11	-13,11	70,15	-20,15	-	-
25	Σκοπολαμίνη	76,17	13,83	70,24	19,76	-	-
26	Τενοξικάμη	75,45	24,55	86,01	13,99	99,35	-3,35
27	Θεοφυλλίνη	84,45	11,55	84,38	11,62	96,16	0,84
28	Τριμεθοπρίμη	86,41	10,59	88,13	8,87	88,14	1,86
29	Βεραπαμίλη	93,24	-3,24	95,93	-5,93	17,26	-0,26

* δεν είχε συμπεριληφθεί για την εξαγωγή των αρχικών εξισώσεων.

Σύμφωνα με τον Πίνακα ΠΒ-12 για την πλειοψηφία των ενώσεων η γαστρεντερική απορρόφηση προβλέπεται με επιτυχία. Για ελάχιστες ενώσεις, {χλωροθαλιδόνη (No 8), ρανιτιδίνη (No 24), σκοπολαμίνη (No 25) και τενοξικάμη (No 26)}, η διαφορά %HOA-%HOA_{pred} είναι >20%, ενώ η ακεταμινοφαίνη (No 1) και η εναλαπρίλη (No 12) μπορούν να θεωρηθούν ως οριακά αποκλίνουσες ενώσεις. Στο Σχήμα ΠΒ-36 απεικονίζονται οι σχέσεις των πειραματικών ως προς τις προβλεπόμενες τιμές %HOA με βάση τις εξισώσεις (ΠΒ-43), (ΠΒ-44) και (ΠΒ-45), ενώ περιλαμβάνονται και οι

αντίστοιχες εξισώσεις. Η βεναζεπρίλη (No 4) η οποία έχει κυκλωθεί στο Σχήμα δεν έχει συμπεριληφθεί στις αρχικές εξισώσεις. Όπως φαίνεται στο Σχήμα ΠΒ-36 οι συσχετίσεις μεταξύ υπολογιστικών και πειραματικών τιμών είναι 1:1, οι κλίσεις των εξισώσεων βρίσκονται κοντά στη μονάδα και οι σταθεροί όροι δεν είναι στατιστικά σημαντικοί.



Σχήμα ΠΒ-36. Γραφική απεικόνιση των πειραματικών ως προς τις προβλεπόμενες τιμές %HOA με βάση: α) τις τιμές $\log k_w^{IAM}_{best}$, β) τις τιμές $\log D_{best}$ και γ) τις τιμές $\log Perm_{best}$.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
B. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

B. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

1. Συγκράτηση δομικά μη συγγενών φαρμακευτικών μορίων στη στατική φάση HSA

1.1 Εισαγωγή

Η εφαρμογή της χρωματογραφίας συγγένειας για την εκτίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης συγκεντρώνει αυξανόμενο ενδιαφέρον. Ωστόσο δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία πολλές συστηματικές μελέτες για τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες και για τους παράγοντες που εμπλέκονται στο μηχανισμό συγκράτησης. Στην παρούσα ενότητα μελετήθηκε διεξοδικά η συγκράτηση φαρμακευτικών μορίων διαφορετικής δομής σε στήλη ανθρώπινης αλβουμίνης του ορού (HSA) υπό διαφορετικές συνθήκες κινητής φάσης, χρησιμοποιώντας δυο οργανικούς τροποποιητές και έγινε προσπάθεια διερεύνησης της συμμετοχής των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στη συγκράτηση πέραν του μηχανισμού κατανομής. Τέλος επιλέχθηκαν οι καταλληλότερες συνθήκες για την εξαγωγή πρότυπων εξισώσεων πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

1.2 Σειρά εργασίας

Χρωματογραφικοί δείκτες HSA

Συνολικά μελετήθηκαν 63 δομικά διαφορετικές φαρμακευτικές ενώσεις, οι οποίες καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος λιποφιλίας και τιμών πρωτεϊνικής σύνδεσης. Οι ενώσεις χωρίστηκαν σε δυο κατηγορίες: 39 ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν ως σειρά εκπαίδευσης (ενώσεις αναφοράς) και μετρήθηκαν σε διάφορες χρωματογραφικές συνθήκες, ενώ 24 ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν ως σειρά ελέγχου και μετρήθηκαν στις βέλτιστες συνθήκες σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη σειρά εκπαίδευσης (βλ. Πίνακες IIB-16 και IIB-17). Οι δομές των ενώσεων παρουσιάζονται στα Σχήματα 2 έως 4 στο Παράρτημα.

Δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης

Τα δεδομένα της πρωτεϊνικής σύνδεσης των ενώσεων αυτών (%PPB) προέρχονται από το εγχειρίδιο των Goodman and Gilman²⁹¹, τη βάση δεδομένων DrugBank²⁹² και άλλες βιβλιογραφικές πηγές^{293,294,295,296,297,298,299} και αναφέρονται στον Πίνακα ΠB-13. Οι βιβλιογραφικές αυτές τιμές μετατράπηκαν σε τιμές logK (K: φαινόμενη σταθερά σύνδεσης), ώστε να βρίσκονται σε γραμμική σχέση με την ελεύθερη ενέργεια, σύμφωνα με την εξίσωση (ΠB-46):

$$\log K = \log \left(\frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \right) \quad (\text{ΠB-46})$$

Στον παρονομαστή του λόγου έχει τεθεί η τιμή 101 ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός τιμών logK και στην περίπτωση 100% πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Δεδομένα λιποφιλίας

Οι τιμές των συντελεστών μερισμού και κατανομής ελήφθησαν από τη βάση δεδομένων PhysProp³⁰⁰ και από άλλες βιβλιογραφικές πηγές^{18,122,124,153,190,301}, ενώ η επαλρεστάτη μετρήθηκε πειραματικά. Οι τιμές logP και logD_{7,4} περιλαμβάνονται στους Πίνακες ΠB-14 και ΠB-15.

Οξεοβασικές ιδιότητες

Τα κλάσματα των μοριακών ιόντων υπολογίστηκαν από το λογισμικό πακέτο ADME Boxes 3.0 και συμβολίζονται ως F⁺ (κλάσμα κατιόντων) και F⁻ (κλάσμα ανιόντων). Οι τιμές F⁺ και F⁻ περιλαμβάνονται στους Πίνακες ΠB-14 και ΠB-15.

Σολβατοχρωμικές παράμετροι

Υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την επιλογή Absolv, η οποία είναι επίσης ενσωματωμένη στο λογισμικό πακέτο ADME Boxes 3.0. Οι σολβατοχρωμικές παράμετροι αναφέρονται στους Πίνακες 7 και 8 στο Παράρτημα.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Β. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Πίνακας ΠΙΒ-13. Δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης των ενώσεων.

Ενώσεις αναφοράς				Ενώσεις ελέγχου			
No	Ένωση	%PPB	logK	No	Ένωση	%PPB	logK
1	Ακεταμινοφαίνη	14,00 ^(α)	-0,79	40	Αλπραζολάμη	71,00 ^(α)	0,37
2	Αντιπυρίνη	12,80 ^(γ)	-0,84	41	Αμιτριπτυλίνη	94,80 ^(α)	1,18
3	Ατενολόλη	5,00 ^(α)	-1,28	42	Ασπιρίνη	49,00 ^(α)	-0,03
4	Καπτοπρίλη	30,00 ^(α)	-0,37	43	Ατροπίνη	18,00 ^(α)	-0,66
5	Καρβαμαζεπίνη	74,00 ^(α)	0,44	44	Βηταμεθαζόνη	64,00 ^(α)	0,24
6	Κεφαμανδόλη	74,00 ^(α)	0,44	45	Καφεΐνη	36,00 ^(α)	-0,26
7	Κεφορανίδη	81,00 ^(α)	0,61	46	Κλομπραμίνη	97,00 ^(β)	1,38
8	Κεφοξιτίνη	73,00 ^(δ)	0,42	47	Δικλοφαινάκη	99,50 ^(α)	1,82
9	Κεφαζιδίμη	17,00 ^(α)	-0,69	48	Αλοπεριδόλη	92,00 ^(α)	1,01
10	Χλωροφαινυραμίνη	61,00 ^(α)	0,18	49	Μεφαιναμικό οξύ	90,00 ^(β)	0,91
11	Χλωροπρομαζίνη	95,00 ^(α)	1,20	50	Μιδαζολάμη	98,00 ^(α)	1,51
12	Διαζεπάμη	87,00 ^(α)	0,79	51	Νιμεσουλίδιο	97,50 ^(η)	1,44
13	Διλτιαζέμη	78,00 ^(α)	0,53	52	Νοτριπτυλίνη	92,00 ^(α)	1,01
14	Διφαινυδραμίνη	55,40 ^(α)	0,09	53	Οξπρενολόλη	80,00 ^(α)	0,58
15	Διπυριδαμόλη	93,00 ^(β)	1,06	54	Πινδολόλη	51,00 ^(α)	0,01
16	Δοξεπίνη	83,20 ^(α)	0,67	55	Προμεθαζίνη	93,00 ^(β)	1,07
17	Επαλρεστάτη	90,10 ^(ε)	0,92	56	Προτριπτυλίνη	92,00 ^(ζ)	1,01
18	Φλουνιτραζεπάμη	79,70 ^(α)	0,57	57	Πυριμεθαμίνη	87,00 ^(β)	0,79
19	Φλουοξετίνη	94,00 ^(α)	1,13	58	Σαλικυλικό οξύ	95,00 ^(α)	1,20
20	Ιμπραμίνη	90,00 ^(α)	0,92	59	Σουλφαμεθοξαζόλιο	53,00 ^(α)	0,04
21	Ινδομεθακίνη	99,50 ^(α)	1,82	60	Τενοξικάμη	99,00 ^(β)	1,69
22	Κετοπροφαίλιο	98,70 ^(α)	1,63	61	Τεστοστερόνη	58,00 ^(β)	0,13
23	Λοραζεπάμη	91,00 ^(α)	0,96	62	Θειοριδαζίνη	95,00 ^(β)	1,20
24	Μεβενδαζόλιο	89,80 ^(β)	0,90	63	Τριαζολάμη	89,00 ^(θ)	0,87
25	Ναπροξένιο	99,70 ^(α)	1,88				
26	Νιφεδιπίνη	69,50 ^(α)	0,34				
27	Πεντοβαρβιτάλη	28,80 ^(α)	-0,40				
28	Περφαιναζίνη	94,80 ^(στ)	1,18				
29	Φαινακετίνη	35,20 ^(ζ)	-0,28				
30	Φαινοβαρβιτάλη	35,20 ^(α)	-0,28				
31	Φαιντοΐνη	75,50 ^(α)	0,47				
32	Προξικάμη	94,50 ^(α)	1,16				
33	Προπαφαινόνη	91,10 ^(α)	0,96				
34	Προπρανολόλη	87,00 ^(α)	0,79				
35	Κινιδίνη	77,00 ^(α)	0,51				
36	Τερβουταλίνη	28,80 ^(α)	-0,61				
37	Τολβουταμίδιο	96,00 ^(α)	1,28				
38	Τραζοδόνη	93,00 ^(α)	1,07				
39	Τριμεθοπρίμη	44,00 ^(α)	-0,11				

^(α)από την παραπομπή (291), ^(β)από την παραπομπή (292), ^(γ)από την παραπομπή (293), ^(δ)από την παραπομπή (294), ^(ε)από την παραπομπή (295), ^(στ)από την παραπομπή (296), ^(ζ)από την παραπομπή (297), ^(η)από την παραπομπή (298), ^(θ)από την παραπομπή (299).

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
B. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Πίνακας ΠΙΒ-14. Παράμετροι λιποφιλίας και κλάσματα μοριακών ιόντων (ενώσεις αναφοράς).

No	Ένωση	logP	logD _{7,4}	F ⁺	F ⁻
1	Ακεταμινοφαίνη	0,51 ^(β)	0,51 ^(β)	0,000	0,001
2	Αντιτυρίνη	0,38 ^(ε)	0,38 ^(β)	0,000	0,000
3	Ατενολόλη	0,16 ^(β)	-1,61 ^(β)	0,994	0,000
4	Καπτοπρίλη	1,02 ^(δ)	-1,48 ^(δ)	0,000	1,000
5	Καρβαμαζεπίνη	2,45 ^(ε)	2,19 ^(β)	0,000	0,000
6	Κεφαμανδόλη	0,50 ^(ε)	-2,40 ^(γ)	0,000	1,000
7	Κεφορανίδη	-1,34 ^(ε)	-3,70 ^(γ)	0,993	1,000
8	Κεφοξιτίνη	-0,02 ^(ε)	-1,89 ^(γ)	0,000	1,000
9	Κεφαζιδίμη	-1,60 ^(ε)	-2,95 ^(δ)	1,000	1,000
10	Χλωροφαινουραμίνη	3,38 ^(ε)	1,41 ^(β)	0,986	0,000
11	Χλωροπρομαζίνη	5,41 ^(β)	3,22 ^(β)	0,991	0,000
12	Διαζεπάμη	2,79 ^(β)	2,79 ^(β)	0,000	0,000
13	Διλτιαζέμη	2,80 ^(β)	2,06 ^(β)	0,875	0,000
14	Διφαινυδραμίνη	3,27 ^(ε)	1,29 ^(β)	0,965	0,000
15	Διπυριδαμόλη	4,47 ^(β)	4,47 ^(β)	0,100	0,000
16	Δοξεπίνη	3,96 ^(β)	2,20 ^(β)	0,982	0,000
17	Επαλρεστάτη	3,16*	-0,51*	0,000	1,000
18	Φλουνιτραζεπάμη	2,06 ^(ε)	2,14 ^(β)	0,000	1,000
19	Φλουοξετίνη	4,26 ^(β)	1,82 ^(β)	0,997	0,000
20	Ιμιπραμίνη	4,44 ^(β)	2,40 ^(β)	0,991	0,000
21	Ινδομεθακίνη	4,27 ^(δ)	1,03 ^(δ)	0,000	0,928
22	Κετοπροφαίνιο	3,12 ^(δ)	-0,25 ^(δ)	0,000	0,999
23	Λοραζεπάμη	2,51 ^(β)	2,51 ^(β)	0,000	0,000
24	Μεβενδαζόλιο	2,90 ^(β)	2,90 ^(β)	0,004	0,002
25	Ναπροξένιο	3,18 ^(δ)	0,33 ^(δ)	0,000	0,999
26	Νιφεδιπίνη	2,20 ^(β)	2,22 ^(β)	0,000	0,000
27	Πεντοβαρβιτάλη	2,07 ^(δ)	2,00 ^(δ)	0,000	0,221
28	Περφαιναζίνη	4,20 ^(ε)	3,51 ^(στ)	0,737	0,000
29	Φαινακετίνη	1,58 ^(ε)	1,58 ^(ε)	0,000	0,000
30	Φαινοβαρβιτάλη	1,44 ^(δ)	1,14 ^(δ)	0,000	0,416
31	Φαινυτοΐνη	2,47 ^(δ)	2,06 ^(δ)	0,000	0,102
32	Προξικάμη	1,61 ^(δ)	-0,05 ^(δ)	0,000	0,993
33	Προπαφαινόνη	1,61 ^(ε)	1,81 ^(β)	0,994	0,000
34	Προπρανολόλη	2,98 ^(β)	1,26 ^(β)	0,994	0,000
35	Κινιδίνη	3,44 ^(ε)	2,04 ^(β)	0,946	0,000
36	Τερβουταλίνη	0,90 ^(ε)	-1,35 ^(α)	0,986	0,006
37	Τολβουταμίδιο	2,34 ^(δ)	1,04 ^(δ)	0,000	0,993
38	Τραζοδόνη	3,21 ^(ε)	2,54 ^(β)	0,218	0,000
39	Τριμεθοπρίμη	0,91 ^(β)	0,74 ^(β)	0,469	0,000

^(α) από την παραπομπή (122), ^(β) από την παραπομπή (124), ^(γ) από την παραπομπή (153), ^(δ) από την παραπομπή (190), ^(ε) από την παραπομπή (300), ^(στ) από την παραπομπή (301), *προσδιορίστηκε πειραματικά στην παρούσα διατριβή.

Πίνακας ΠΒ-15. Παράμετροι λιποφιλίας και κλάσματα μοριακών ιόντων (ενώσεις ελέγχου).

No	Ένωση	logP	logD _{7,4}	F ⁺	F ⁻
40	Αλπραζολάμη	2,12 ^(δ)	2,12 ^(β)	0,000	0,000
41	Αμιτριπτυλίνη	4,92 ^(β)	2,50 ^(β)	0,982	0,000
42	Ασπιρίνη	1,13 ^(γ)	-1,20 ^(γ)	0,000	1,000
43	Ατροπίνη	1,83 ^(δ)	-0,55 ^(β)	0,996	0,000
44	Βηταμεθαζόνη	3,60 ^(β)	3,60 ^(β)	0,000	0,000
45	Καφεΐνη	-0,07 ^(δ)	-0,07 ^(β)	0,000	0,000
46	Κλομιπραμίνη	5,46 ^(β)	3,27 ^(β)	0,991	0,000
47	Δικλοφαινάκη	4,51 ^(β)	1,22 ^(β)	0,000	0,999
48	Αλοπεριδόλη	4,28 ^(β)	2,98 ^(β)	0,933	0,000
49	Μεφαιναμικό οξύ	5,12 ^(β)	2,00 ^(β)	0,000	0,999
50	Μιδαζολάμη	3,27 ^(β)	3,27 ^(β)	0,081	0,000
51	Νιμεσουλίδιο	2,38 ^(β)	1,53 ^(β)	0,000	0,966
52	Νορτριπτυλίνη	4,04 ^(β)	1,69 ^(β)	0,998	0,000
53	Οξπρενολόλη	2,10 ^(β)	0,13 ^(β)	0,994	0,000
54	Πινδολόλη	1,75 ^(β)	-0,10 ^(β)	0,994	0,000
55	Προμεθαζίνη	4,81 ^(β)	2,79 ^(β)	0,989	0,000
56	Προτριπτυλίνη	4,89 ^(β)	1,36 ^(β)	0,875	0,000
57	Πυριμεθαμίνη	2,69 ^(β)	2,34 ^(β)	0,584	0,000
58	Σαλικυλικό οξύ	2,27 ^(γ)	-0,90 ^(γ)	0,000	1,000
59	Σουλφαιμεθοξαζόλιο	0,72 ^(γ)	-0,76 ^(γ)	0,000	0,978
60	Τενοξικάμη	0,81 ^(γ)	-0,32 ^(γ)	0,000	0,993
61	Τεστοστερόνη	3,32 ^(δ)	3,29 ^(β)	0,000	0,000
62	Θειοριδαζίνη	5,90 ^(δ)	3,34 ^(β)	0,991	0,000
63	Τριαζολάμη	2,42 ^(δ)	1,63 ^(α)	0,017	0,000

^(α) από την παραπομπή (18), ^(β) από την παραπομπή (124), ^(γ) από την παραπομπή (153),

^(δ) από την παραπομπή (300).

1.3 Προσδιορισμός χρωματογραφικών δεικτών HSA

1.3.1 Οργανολογία

Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή HPLC που περιγράφηκε στην 1^η ενότητα (Κεφάλαιο Α, §2.1.1).

1.3.2 Αντιδραστήρια

Το ακετονιτρίλιο και η ισοπροπανόλη ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC-grade), της εταιρίας Lab-Scan. Το νερό ήταν απιονισμένο και καθαρισμένο μέσω του

συστήματος παραγωγής νερού Milli-Q Plus (Millipore). Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε το PBS σε pH 7,0 (βλ. 1^η ενότητα, Κεφάλαιο A, §2.1.2).

1.3.3 Χρωματογραφικές συνθήκες

Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε στήλη ChromTech, CHIRAL-HSA (50x4 mm i.d.). Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν μίγματα οργανικού τροποποιητή-ρρυθμιστικού διαλύματος σε διάφορες αναλογίες και συγκεκριμένα με περιεκτικότητα σε οργανικό τροποποιητή από 5-20% και βήμα 5%. Όπου ήταν δυνατό η κινητή φάση αποτελείτο από 100% ρυθμιστικό διάλυμα. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στο 1 ml/min. Η χρωματογραφική διαδικασία και ο προσδιορισμός των ανηγμένων τιμών $\log k_w$ αναφέρθηκαν στην 1^η ενότητα (Κεφάλαιο B, §2.1.4 και 2.15).

1.4 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Οι τιμές $\log k_w^{HSA}$ μαζί με τις κλίσεις S που προέκυψαν παρουσία ακετονιτριλίου και ισοπροπανόλης αναφέρονται στους Πίνακες ΠB-16 και ΠB-17 αντίστοιχα. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι συντελεστές συσχέτισης r είχαν τιμή υψηλότερη από 0,99. Τα σταθερά σφάλματα των τιμών $\log k_w$ και των κλίσεων S ήταν χαμηλότερα από $\pm 0,09$ και $\pm 0,01$ αντίστοιχα. Εξαιρέση αποτέλεσαν η ατροπίνη (No 43), η οξπρενολόλη (No 53) και η πινδολόλη (No 54), οι οποίες εμφάνισαν μη γραμμική συμπεριφορά. Στις περιπτώσεις αυτές δεν ήταν δυνατόν να υπολογιστούν τιμές $\log k_w^{HSA}$. Η σχέση $\log k^{HSA}/\varphi$ για αυτές τις ενώσεις απεικονίζεται στο Σχήμα ΠB-37. Στην περίπτωση των χειρόμορφων ενώσεων δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός εναντιομερών Η βηταμεθαζόνη (No 44) παρουσία ακετονιτριλίου εμφάνισε δυο παραπλήσιες κορυφές. Στην περίπτωση αυτή λήφθηκε υπόψη ο μέσος όρος των ισοκρατικών τιμών.

Στον Πίνακα ΠB-16 περιλαμβάνονται επίσης οι τιμές $\log k_w^{HSA}_{(act)}$ που προσδιορίστηκαν απουσία οργανικού τροποποιητή. Για τις ενώσεις που εμφάνισαν μεγαλύτερη συγκράτηση και δεν ήταν δυνατόν να μετρηθούν με 100% υδατική φάση οι τιμές $\log k_w^{HSA}_{(act)}$ υπολογίστηκαν με βάση τις συσχετίσεις μεταξύ $\log k_w^{HSA}_{(act)}$ και $\log k_w^{HSA}_{(ACN)}$ ή $\log k_w^{HSA}_{(2-prop)}$ και ελήφθη ο μέσος όρος (βλ. §1.4.2).

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
B. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Πίνακας ΠΙΒ-16. Τιμές $\log k_w^{HSA}$ (act), $\log k_w^{HSA}$ (ACN) και κλίσεις S για τις ενώσεις αναφοράς.

No	Ένωση	$\log k_w^{HSA}$ (act)	$\log k_w^{HSA}$ (ACN)	Sx100	$\log k_w^{HSA}$ (2-prop)	Sx100
1	Ακεταμινοφαίνη	-0,20	-0,10	4,15	0,06	9,21
2	Αντιπυρίνη	0,18	-0,67	3,71	-0,73	3,13
3	Ατενολόλη	-0,84	-0,39	6,80	-0,70	3,70
4	Καπτοπρίλη	-0,84	-0,85	3,98	-0,70	3,68
5	Καρβαμαζεπίνη	1,08	0,93	5,56	0,80	4,31
6	Κεφαμανδόλη	-0,44	-0,55	1,81	-0,42	4,15
7	Κεφορανίδη	-0,49	-0,55	1,81	-0,43	0,94
8	Κεφοξιτίνη	-0,06	-0,18	3,27	-0,22	1,99
9	Κεφαζιδίμη	-0,90	-0,42	3,01	-0,62	1,18
10	Χλωροφαινουραμίνη	1,00	0,78	4,57	0,74	2,71
11	Χλωροπρομαζίνη	2,15*	1,88	5,62	1,74	4,22
12	Διαζεπάμη	2,26*	1,99	9,49	1,83	8,42
13	Διλτιαζέμη	1,12	0,89	5,68	0,49	2,38
14	Διφαινυδραμίνη	0,70	0,57	4,08	0,47	2,52
15	Διπυριδαμόλη	2,00*	1,83	9,82	1,53	8,04
16	Δοξεπίνη	1,36	1,20	6,02	1,09	3,41
17	Επαλρεστάτη	3,46*	3,05	10,11	2,86	8,12
18	Φλουνιτραζεπάμη	1,34	1,01	7,12	0,96	4,99
19	Φλουοξετίνη	1,65*	1,50	6,23	1,24	2,21
20	Ιμπραμίνη	1,46	1,33	5,26	1,08	2,97
21	Ινδομεθακίνη	3,17*	2,36	6,26	3,02	7,72
22	Κετοπροφαίνιο	2,28*	1,89	5,23	1,95	6,88
23	Λοραζεπάμη	1,51	1,29	6,14	1,24	4,07
24	Μεβενδαζόλιο	1,81	1,56	8,35	1,58	6,52
25	Ναπροξένιο	2,87*	2,62	5,43	2,27	6,21
26	Νιφεδιπίνη	1,90	1,67	9,06	1,66	7,77
27	Πεντοβαρβιτάλη	0,46	0,49	5,17	0,32	2,92
28	Περφαιναζίνη	2,45*	2,09	7,81	2,05	5,65
29	Φαινακετίνη	0,50	0,55	8,96	0,22	3,95
30	Φαινοβαρβιτάλη	0,24	0,22	4,21	0,04	2,41
31	Φαιντοΐνη	1,14	1,03	5,56	0,98	3,99
32	Πιροξικάμη	2,06*	1,84	5,48	1,62	6,26
33	Προπαινόνη	1,19	0,98	5,20	0,95	3,20
34	Προπρανολόλη	1,14	0,89	4,16	0,77	2,68
35	Κινιδίνη	1,00	0,66	3,61	0,71	2,99
36	Τερβουταλίνη	-0,16	-0,06	2,89	-0,32	0,56
37	Τολβουταμίδιο	1,49	1,50	6,25	1,13	4,22
38	Τραζοδόνη	2,02*	1,70	8,90	1,68	8,36
39	Τριμεθοπρίμη	0,51	0,50	7,09	0,23	3,67

*μέσος όρος των τιμών που υπολογίστηκαν με βάση τις εξισώσεις (ΠΙΒ-48) και (ΠΙΒ-49).

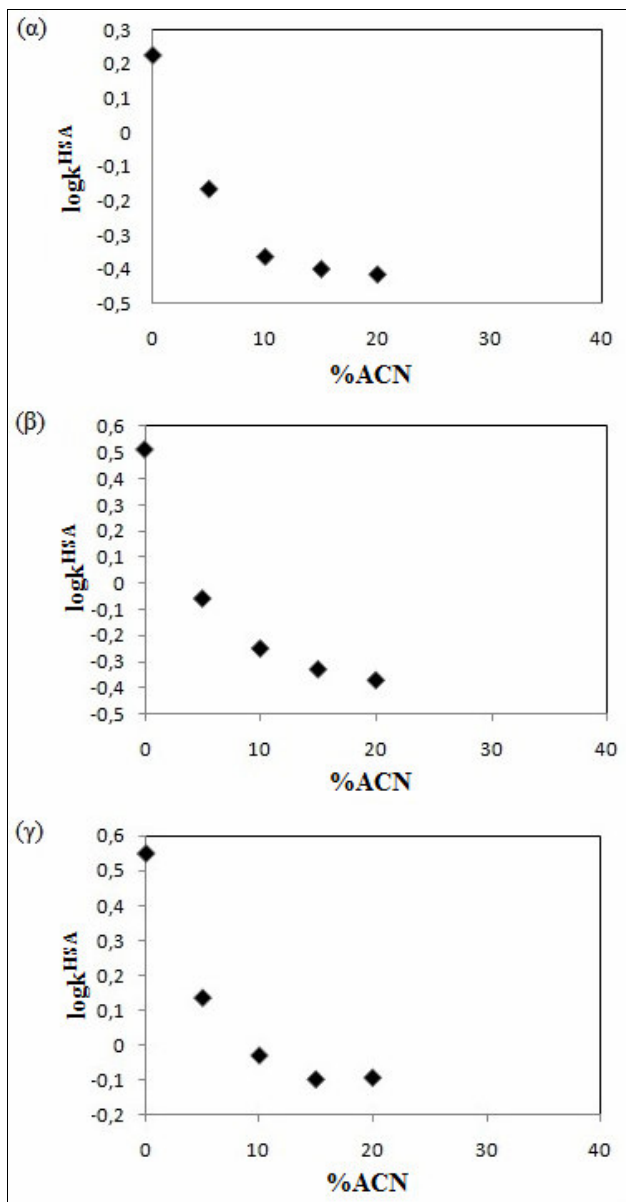
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
B. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Πίνακας ΠΒ-17. Τιμές $\log k_w^{HSA}$ και κλίσεις S για τις ενώσεις ελέγχου.

No	Ένωση	$\log k_w^{HSA}_{(ACN)}$	Sx100
40	Αλπραζολάμη	1,06	7,38
41	Αμιτριπτυλίνη	1,45	5,40
42	Ασπιρίνη	0,94	5,22
43	Ατροπίνη*	-	-
44	Βηταμεθαζόνη	1,93**	9,23**
45	Καφεΐνη	-0,48	2,53
46	Κλομιπραμίνη	1,76	5,94
47	Δικλοφαινάκη	2,04	4,57
48	Αλοπεριδόλη	1,34	5,51
49	Μεφαιναμικό οξύ	2,38	5,44
50	Μιδαζολάμη	2,08	10,54
51	Νιμεσουλίδιο	2,14	7,86
52	Νοτριπτυλίνη	1,36	5,27
53	Οξπρενολόλη*	-	-
54	Πινδολόλη*	-	-
55	Προμεθαζίνη	1,58	5,00
56	Προτριπτυλίνη	1,36	5,05
57	Πυριμεθαμίνη	1,40	6,12
58	Σαλικυλικό οξύ	0,88	5,16
59	Σουλφαμεθοξαζόλιο	0,44	3,93
60	Τενοξικάμη	2,05	5,36
61	Τεστοστερόνη	1,76	8,13
62	Θειοριδαζίνη	2,30	7,26
63	Τριαζολάμη	1,38	8,31

*εμφάνισαν μη-γραμμική συμπεριφορά.

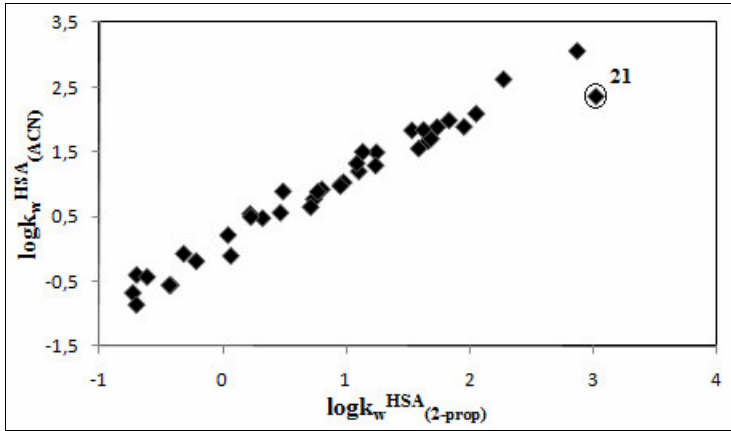
**πρόεκυψε με βάση το μέσο όρο των ισοκρατικών τιμών.



Σχήμα II-B-37. Γραφική απεικόνιση της σχέσης $\log k^{HSA}/\varphi$: α) ατροπίνη, β) οξπρενολόλη, γ) πινδολόλη.

1.4.1 Επίδραση του οργανικού τροποποιητή

Εξετάστηκε η επίδραση της φύσης του οργανικού τροποποιητή στις ενώσεις αναφοράς. Για την πλειοψηφία των περιπτώσεων η επίδραση ήταν αμελητέα, οδηγώντας σε 1:1 συσχέτιση μεταξύ $\log k_w^{HSA}(\text{ACN})$ και $\log k_w^{HSA}(\text{2-prop})$ με $r=0,988$, εξίσωση (II-B-47). Η ινδομεθακίνη (No 21), η οποία σημειώνεται με κύκλο στο Σχήμα II-B-38 εμφάνισε μεγαλύτερη απόκλιση και δεν συμπεριλήφθηκε στην εξίσωση.



Σχήμα ΠΒ-38. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$ και $\log k_w^{\text{HSA}}_{(2\text{-prop})}$.

$$\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})} = 1,03(\pm 0,03)\log k_w^{\text{HSA}}_{(2\text{-prop})} + 0,10(\pm 0,03) \quad (\text{ΠΒ-47})$$

$$n = 38, r = 0,988, s = 0,150, F = 1469,8$$

1.4.2 Σχέση μεταξύ των ανηγμένων τιμών $\log k_w^{\text{HSA}}$ και των τιμών $\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{act})}$

Η αντιστοιχία των τιμών $\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{act})}$ με τις ανηγμένες τιμές $\log k_w^{\text{HSA}}$ ελέγχθηκε για τις ενώσεις οι οποίες ήταν δυνατόν να προσδιοριστούν με τη χρήση 100% ρυθμιστικού διαλύματος. Οι συσχετίσεις που προέκυψαν εμφάνισαν αποδεκτά στατιστικά στοιχεία, συνοδευόμενες από όριο ανοχής σφάλματος (2s) της τάξεως των 0,22 και 0,28 λογαριθμικών μονάδων για το ακετονιτρίλιο και την ισοπροπανόλη αντίστοιχα. Ωστόσο παρατηρήθηκαν ενώσεις με αποκλίνουσα συμπεριφορά. Στην εξίσωση (ΠΒ-48) μεγαλύτερη απόκλιση εμφάνισαν η αντιτυρίνη (No 2), η ατενολόλη (No 3) και η κεφαζιδίμη (No 9) και δεν συμπεριλήφθηκαν στη συσχέτιση. Για τον ίδιο λόγο η ακεταμινοφαίνη (No 1) και η αντιτυρίνη (No 2) δεν συμπεριλήφθηκαν στην εξίσωση (ΠΒ-49).

$$\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{act})} = 1,09(\pm 0,03)\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})} - 0,06(\pm 0,03) \quad (\text{ΠΒ-48})$$

$$n = 25, r = 0,990, s = 0,112, F = 1085,9$$

$$\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{act})} = 1,19(\pm 0,04)\log k_w^{\text{HSA}}_{(2\text{-prop})} + 0,11(\pm 0,03) \quad (\text{ΠΒ-49})$$

$$n = 26, r = 0,986, s = 0,143, F = 865,8$$

Οι εξισώσεις (ΠB-48) και (ΠB-49) χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των τιμών $\log k_{w(\text{act})}$ για τις ενώσεις οι οποίες συγκρατούνται ισχυρά στη στήλη και επομένως είναι αδύνατον να προσδιοριστούν πειραματικά. Οι μέσοι όροι των τιμών που προέκυψαν σημειώνονται με έναν αστερίσκο στον Πίνακα ΠB-16.

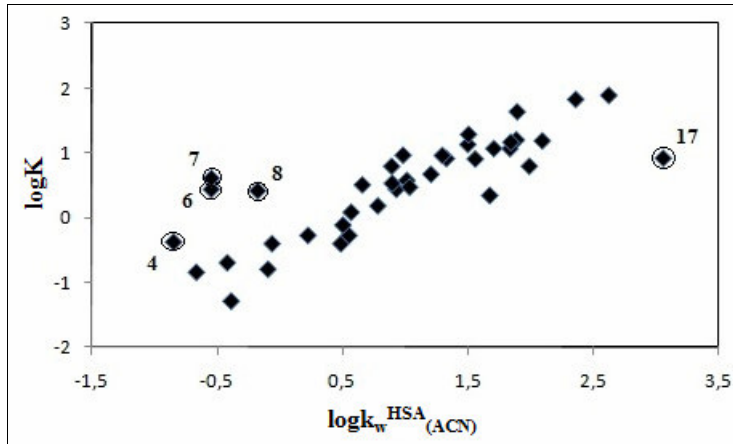
1.4.3 Σχέση μεταξύ τιμών $\log k_w^{\text{HSA}}$ και κλίσεων S

Στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως, καλή γραμμικότητα μεταξύ των τιμών $\log k_w$ και των κλίσεων S θεωρείται ως ένδειξη ομοιομορφίας στο μηχανισμό συγκράτησης. Στην περίπτωση της χρωματογραφίας HSA δεν έχουν πραγματοποιηθεί σχετικές συστηματικές μελέτες. Ο μηχανισμός κατανομής διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συγκράτηση στη χρωματογραφία HSA, αντανακλώντας τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που εμπλέκονται στην πρωτεϊνική σύνδεση, ωστόσο οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ιδιαίτερα στην περίπτωση των όξινων ενώσεων θα πρέπει να θεωρηθούν εξίσου σημαντικές. Για το λόγο αυτό αναμένεται μειωμένη γραμμικότητα μεταξύ $\log k_w^{\text{HSA}}/S$. Πράγματι διαπιστώθηκαν συντελεστές συσχέτισης 0,683 και 0,666 παρουσία ακετονιτριλίου και ισοπροπανόλης αντίστοιχα, οι οποίοι αντιστοιχούν σε ~45% συμβολή της υδρόφοβης σύνδεσης στο μηχανισμό συγκράτησης.

1.4.4 Συσχέτιση των χρωματογραφικών δεικτών HSA με την πρωτεϊνική σύνδεση στο πλάσμα

Οι τιμές $\log K$ συσχετίστηκαν με τους χρωματογραφικούς δείκτες $\log k_w^{\text{HSA}}$ και με τις ισοκρατικές τιμές $\log k^{\text{HSA}}$ που προσδιορίστηκαν στις διάφορες χρωματογραφικές συνθήκες. Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε καλή συσχέτιση αν και συγκεκριμένες ενώσεις εμφάνισαν αποκλίνουσα συμπεριφορά. Οι τρεις κεφαλοσπορίνες (Nos 6, 7 και 8), οι οποίες δεν σχηματίζουν εσωτερικά άλατα και η επίσης όξινη καπτοπρίλη (No 4) συγκρατούνται στη στήλη HSA λιγότερο απ'ότι αναμένεται με βάση την ισχυρή πρωτεϊνική τους σύνδεση. Από την άλλη πλευρά η επαλρεστάτη (No 17) εμφάνισε μεγαλύτερη συγκράτηση από την αναμενόμενη. Στο Σχήμα ΠB-39 απεικονίζεται ένα αντιπροσωπευτικό διάγραμμα μεταξύ τιμών $\log K$ και συγκράτησης

στη στήλη HSA. Οι αποκλίνουσες ενώσεις σημειώνονται με κύκλο και δεν συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική ανάλυση.



Σχήμα ΠΒ-39. Απεικόνιση μεταξύ $\log K$ και $\log k_w^{HSA(ACN)}$.

Διαπιστώθηκαν καλύτερες συσχετίσεις στην περίπτωση των ισοκρατικών τιμών $\log k_{10}$ που προσδιορίστηκαν παρουσία 10% οργανικού τροποποιητή. Στον Πίνακα ΠΒ-18 παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών $\log K$ και των παραγόντων χωρητικότητας, οι οποίες εξήχθησαν χρησιμοποιώντας τις ανηγμένες τιμές $\log k_w^{HSA}$, τις τιμές $\log k_w^{HSA(Act)}$ και τις ισοκρατικές τιμές σε ποσοστό 10% οργανικού τροποποιητή.

Πίνακας ΠΒ-18. Συσχετίσεις μεταξύ $\log K$ και παραγόντων χωρητικότητας (n=34).

$\log K = a + b \log k_{(I)}$						
(I)	a	b	r	s	F	εξ.
$\log k_w^{HSA(Act)}$	-0,42(±0,08)	0,76(±0,05)	0,933	0,287	217,0	(ΠΒ-50)
$\log k_w^{HSA(ACN)}$	-0,44(±0,08)	0,90(±0,06)	0,933	0,287	216,4	(ΠΒ-51)
$\log k_w^{HSA(2-prop)}$	-0,27(±0,08)	0,83(±0,06)	0,919	0,316	173,3	(ΠΒ-52)
$\log k_{10}^{HSA(ACN)}$	0,04(±0,05)	1,06(±0,05)	0,961	0,220	389,1	(ΠΒ-53)
$\log k_{10}^{HSA(2-prop)}$	0,02(±0,05)	1,00(±0,06)	0,949	0,253	288,8	(ΠΒ-54)

Οι ισοκρατικές τιμές $\log k_{10}^{HSA}$ οδηγούν σε σχεδόν 1:1 συσχέτιση με τις τιμές $\log K$. Ιδιαίτερα στην περίπτωση των τιμών $\log k_{10}^{HSA(ACN)}$ η εξίσωση εμφάνισε πολύ καλά στατιστικά στοιχεία. Οι εξισώσεις που λήφθησαν από τις ανηγμένες τιμές $\log k_w^{HSA}$ και από τις τιμές κανονικοποιημένες τιμές $\log k_w^{HSA(Act)}$ εμφάνισαν ελαφρώς χαμηλότερα στατιστικά στοιχεία, ενώ οι κλίσεις και οι σταθεροί όροι διέφεραν από τη μονάδα και το μηδέν αντίστοιχα. Οι ισοκρατικές τιμές $\log k_{10}$ εμφανίζουν το

πλεονέκτημα της μίας μόνο μέτρησης, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την αποδοτικότητα της μεθόδου. Επιπλέον υπερτερούν έναντι των ανηγμένων τιμών και ως προς τη μέτρηση ενώσεων οι οποίες συγκρατούνται ισχυρά και επομένως είναι δύσκολο να μετρηθούν με 100% υδατική κινητή φάση.

Με βάση τα παραπάνω η εξίσωση (ΠB-53) που προέκυψε από τις τιμές $\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$ χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως εξίσωση αναφοράς για τον υπολογισμό των τιμών $\log K$. Οι υπολογισμένες αυτές τιμές ($\log K_{\text{pred}}$) μετατράπηκαν εκ νέου σε % ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης ($\% \text{PPB}_{\text{pred}}$), ώστε να συγκριθούν με τις βιβλιογραφικές τιμές. Οι τιμές αυτές και οι διαφορές τους από τις βιβλιογραφικές τιμές ($\% \text{PPB} - \% \text{PPB}_{\text{pred}}$) αναφέρονται στον Πίνακα ΠB-19. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές $\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})} > 1,85$ οδηγούν σε τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης $> 100\%$. Στις περιπτώσεις αυτές οι τιμές $\% \text{PPB}_{\text{pred}}$ θεωρήθηκαν πρακτικά ως 100%. Αυτή η εξομάλυνση εξηγεί και το γεγονός ότι η επαλρεστάτη (No 17), η οποία εμφανίζει αποκλίνουσα τιμή στο διάγραμμα μεταξύ $\log K$ και $\log K_{\text{pred}}$, βρίσκεται εντός των ορίων στη σχέση μεταξύ $\% \text{PPB}$ και $\% \text{PPB}_{\text{pred}}$.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
B. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Πίνακας ΠΙΒ-19. Τιμές $\log_{10}^{\text{HSA}}(\text{ACN})$, υπολογισμένες τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης και οι διαφορές τους από τις βιβλιογραφικές για τις ενώσεις αναφοράς.

No	Ένωση	$\log_{10}^{\text{HSA}}(\text{ACN})$	$\log K_{\text{pred}}$	%PPB _{pred}	%PPB-%PPB _{pred}
1	Ακεταμινοφαίνη	-0,56	-0,55	22,3	-8,3
2	Αντιπυρίνη	-1,04	-1,05	8,2	4,6
3	Ατενολόλη	-1,04	-1,05	8,2	-3,2
4	Καπτοπρίλη	-1,26	-1,29	4,9	25,1
5	Καρβαμαζεπίνη	0,35	0,42	73,3	0,7
6	Κεφαμανδόλη	-0,74	-0,73	15,7	58,3
7	Κεφορανίδη	-0,74	-0,73	15,7	65,3
8	Κεφοξιτίνη	-0,51	-0,49	24,7	48,3
9	Κεφταζιδίμη	-0,74	-0,73	15,7	1,3
10	Χλωροφαινυραμίνη	0,27	0,33	69,0	-8,0
11	Χλωροπρομαζίνη	1,34	1,47	97,7	-2,7
12	Διαζεπάμη	1,02	1,13	94,1	-7,1
13	Διλτιαζέμη	0,33	0,40	72,2	5,8
14	Διφαινυδραμίνη	0,14	0,19	61,6	-6,1
15	Διπυριδαμόλη	0,81	0,91	90,0	3,0
16	Δοξεπίνη	0,56	0,64	82,3	0,9
17	Επαλρεστάτη	2,00	2,17	100,0	-10,2
18	Φλονιτραζεπάμη	0,26	0,32	68,5	11,2
19	Φλουοξετίνη	1,13	1,24	95,6	-1,5
20	Ιμιπραμίνη	0,77	0,87	89,0	1,0
21	Ινδομεθακίνη	1,76	1,92	99,8	-0,3
22	Κετοπροφαίνιο	1,39	1,52	98,0	0,7
23	Λοραζεπάμη	0,67	0,75	85,9	5,1
24	Μεβενδαζόλιο	0,69	0,78	86,6	3,2
25	Ναπροξένιο	1,55	1,69	99,0	0,7
26	Νιφεδιπίνη	0,70	0,79	86,8	-17,3
27	Πεντοβαρβιτάλη	-0,04	0,01	50,8	-22,0
28	Περφαιναζίνη	1,24	1,36	96,8	-2,0
29	Φαινακετίνη	-0,26	-0,23	37,5	-2,3
30	Φαινοβαρβιτάλη	-0,22	-0,19	39,9	-4,7
31	Φαιντοϊνη	0,44	0,52	77,5	-2,0
32	Πιροξικάμη	1,33	1,46	97,6	-3,1
33	Προπαφαινόνη	0,42	0,50	76,6	14,5
34	Προπρανολόλη	0,48	0,56	79,0	8,0
35	Κινιδίνη	0,29	0,36	70,3	6,7
36	Τερβουταλίνη	-0,40	-0,35	31,1	-2,3
37	Τολβουταμίδιο	0,83	0,93	90,4	5,6
38	Τραζοδόνη	0,82	0,92	90,1	2,9
39	Τριμεθοπρίμη	-0,19	-0,15	41,9	2,2

1.4.5 Αξιολόγηση της εξίσωσης αναφοράς

Για την αξιολόγηση της εξίσωσης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις της σειράς ελέγχου. Οι τιμές $\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$ εισήχθησαν στην εξίσωση (ΠΒ-53) και υπολογίστηκαν οι τιμές $\log K_{\text{pred}}$, οι οποίες μετατράπηκαν σε τιμές $\% \text{PPB}_{\text{pred}}$. Οι τιμές αυτές μαζί με τις διαφορές τους από τις βιβλιογραφικές τιμές ($\% \text{PPB} - \% \text{PPB}_{\text{pred}}$) βρίσκονται στον Πίνακα ΠΒ-20. Για το μεφαιναμικό οξύ (No 49) το οποίο συγκρατείται ισχυρά στη στήλη ($\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})} > 1,85$) η τιμή $\% \text{PPB}_{\text{pred}}$ θεωρήθηκε ως 100.

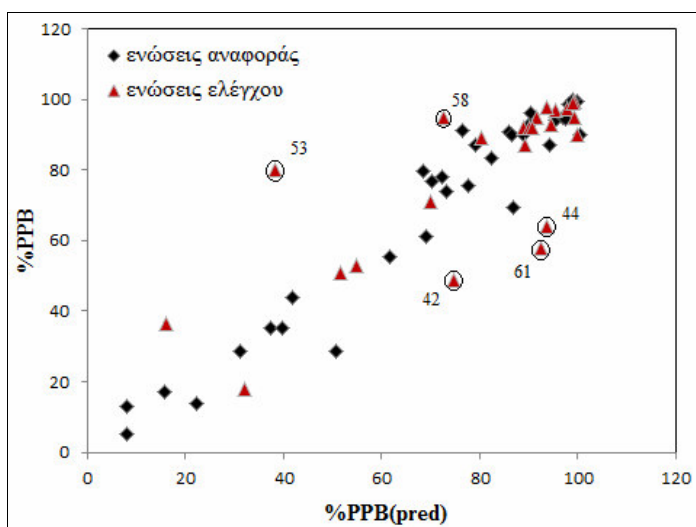
Πίνακας ΠΒ-20. Τιμές $\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$, υπολογισμένες τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης και οι διαφορές τους από τις βιβλιογραφικές για τις ενώσεις ελέγχου.

No	Ένωση	$\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$	$\log K_{\text{pred}}$	$\% \text{PPB}_{\text{pred}}$	$\% \text{PPB} - \% \text{PPB}_{\text{pred}}$
40	Αλπραζολάμη	0,29	0,35	70,0	1,0
41	Αμιτριπτυλίνη	0,89	0,99	91,7	3,1
42	Ασπρίνη	0,38	0,45	74,7	-25,7
43	Ατροπίνη	-0,36	-0,33	32,1	-14,1
44	Βηταμεθαζόνη	1,00*	1,11	93,7	-29,7
45	Καφεΐνη	-0,74	-0,73	15,9	20,1
46	Κλομιπραμίνη	1,12	1,24	95,5	1,5
47	Δικλοφαινάκη	1,59	1,73	99,3	0,3
48	Αλοπεριδόλη	0,77	0,86	88,9	3,2
49	Μεφαιναμικό οξύ	1,84	2,00	100,0	-10,0
50	Μιδαζολάμη	0,99	1,10	93,5	4,5
51	Νιμεσουλίδιο	1,35	1,49	97,8	-0,3
52	Νοτριπτυλίνη	0,82	0,92	90,1	1,9
53	Οξπρενολόλη	-0,25	-0,22	38,3	41,8
54	Πινδολόλη	-0,03	0,02	51,6	-0,6
55	Προμεθαζίνη	1,05	1,16	94,5	-1,5
56	Προτριπτυλίνη	0,84	0,94	90,7	1,3
57	Πυριμεθαμίνη	0,78	0,88	89,2	-2,2
58	Σαλικυλικό οξύ	0,34	0,41	72,7	22,3
59	Σουλφαμεθοξαζόλιο	0,03	0,08	54,9	-1,9
60	Τενοξικάμη	1,52	1,67	98,9	0,1
61	Τεστοστερόνη	0,94	1,04	92,6	-34,6
62	Θειοριδαζίνη	1,59	1,74	99,2	-4,2
63	Τριαζολάμη	0,51	0,59	80,4	8,6

*προέκυψε με βάση το μέσο όρο των ισοκρατικών τιμών.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα ΠΒ-20 για την πλειοψηφία των ενώσεων ελέγχου προβλέπεται με επιτυχία η πρωτεϊνική σύνδεση. Πέντε μόνο ενώσεις προβλέφθηκαν

λανθασμένα με διαφορά $\%PPB - \%PPB_{pred} > 20\%$. Η πρωτεϊνική σύνδεση της οξπρενολόλης (No 53) υποτιμήθηκε, ενώ αυτή των ισχυρά λιπόφιλων στεροειδών βηταμεθαζόνης (No 44) και τεστοστερόνης (No 61) υπερτιμήθηκε. Η ασπιρίνη (No 42) και το σαλικυλικό οξύ (No 58) με παρόμοιες τιμές $\%PPB_{pred}$ μπορούν να θεωρηθούν ως οριακά αποκλίνουσες ενώσεις με διαφορές $-25,7\%$ και $22,3\%$ αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, αξ σημειωθεί ότι η χαμηλή βιβλιογραφική τιμή πρωτεϊνικής σύνδεσης της ασπιρίνης, η οποία διαφέρει σημαντικά από αυτή του σαλικυλικού οξέος, πιθανότατα να οφείλεται σε προβλήματα σταθερότητας. Η σχέση μεταξύ $\%PPB$ και $\%PPB_{pred}$ για το σύνολο των φαρμακευτικών μορίων απεικονίζεται γραφικά στο Σχήμα ΠΒ-40.



Σχήμα ΠΒ-40. Απεικόνιση μεταξύ $\%PPB$ και $\%PPB_{pred}$.

Βασιζόμενοι στις ανωτέρω παρατηρήσεις και προκειμένου να ενισχυθεί η εξίσωση (ΠΒ-53), επαναλήφθηκε η στατιστική ανάλυση για το σύνολο των ενώσεων. Προέκυψε η γενική εξίσωση (ΠΒ-55), η οποία πρακτικά δεν διαφέρει από την αρχική εξίσωση αναφοράς:

$$\log K = 1,07(\pm 0,05)\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})} + 0,04(\pm 0,04) \quad (\text{ΠΒ-55})$$

$n = 52, r = 0,956, s = 0,226, F = 533,2$

Από την εξίσωση παλινδρόμησης αποκλείστηκαν οι αποκλίνουσες ενώσεις καπτοπρίλη (No 4), κεφαμανδόλη (No 6), κεφορανίδη (No 7), κεφοξιτίνη (No 8),

ασπιρίνη (No 42), βηταμεθαζόνη (No 44), οξπρενολόλη (No 53), σαλικυλικό οξύ (No 58) και τεστοστερόνη (No 61) καθώς επίσης η επαλρεστάτη (No 17) και το μεφαιναμικό οξύ (No 49), για τις οποίες η συγκράτηση ($\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})} > 1,85$) αντιστοιχεί σε πρωτεϊνική σύνδεση 100%. Η εξίσωση (ΠB-55) προτείνεται ως γενική εξίσωση αναφοράς για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής σύνδεσης στο πλάσμα. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι οι βιβλιογραφικές τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης αναφέρονται στη σύνδεση σε όλες τις πρωτεΐνες του πλάσματος και όχι μόνο στην HSA. Ως εκ τούτου, η εξίσωση (ΠB-55) μπορεί να οδηγήσει σε συγκεκριμένες περιπτώσεις σε υποτίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης και χρήζει περαιτέρω αξιολόγησης.

1.4.6 Σχέση της χρωματογραφίας HSA με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού

Προκειμένου να αναλυθεί ο μηχανισμός συγκράτησης, εξετάστηκε η σχέση των χρωματογραφικών δεικτών με τα δεδομένα λιποφιλίας για το σύνολο των φαρμακευτικών μορίων. Χρησιμοποιώντας τις τιμές $\log D_{7,4}$ δεν παρατηρήθηκε ικανοποιητική συσχέτιση ($r < 0,597$), ενώ μέτριες συσχετίσεις λήφθηκαν με τις τιμές $\log P$ ($0,737 < r < 0,756$). Ο συντελεστής συσχέτισης r εμφάνισε υψηλότερη τιμή στην περίπτωση των ισοκρατικών τιμών $\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$ ($r = 0,818$), ο οποίος αντιστοιχεί σε ~67% συμβολή της υδρόφοβης σύνδεσης στο μηχανισμό συγκράτησης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία και με τις χαμηλές συσχετίσεις μεταξύ των τιμών $\log k_w^{\text{HSA}}$ και των κλίσεων S (βλ. §1.3.3). Δεδομένου ότι οι ιοντικοί δεσμοί ιδιαίτερα με τα ανιόντα των όξινων ενώσεων παίζουν σημαντικό ρόλο στη συγκράτηση εισήχθησαν στη σχέση $\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})} / \log P$ τα κλάσματα των μοριακών ιόντων F^+ (κλάσμα θετικά φορτισμένων ιόντων) και F^- (κλάσμα αρνητικά φορτισμένων ιόντων) αντίστοιχα. Αρχικά εισήχθη το κλάσμα F^- και προέκυψε η εξίσωση (ΠB-56) με εμφανώς βελτιωμένα στατιστικά στοιχεία:

$$\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})} = 0,41(\pm 0,03)\log P + 0,63(\pm 0,11)F^- - 0,78(\pm 0,10) \quad (\text{ΠB-56})$$

$n = 59, r = 0,888, r^2 = 0,788, s = 0,338, F = 109,06$

Η καπτοπρίλη (No 4), η κεφταζιδίμη (No 9), η πιροξικάμη (No 32) και η τενοξικάμη (No 60) εμφάνισαν έκτροπες τιμές και δεν συμπεριλήφθηκαν στην εξίσωση (IIB-56).

Ο όρος F^- είναι στατιστικά σημαντικός με τιμή $|t|=5,89$ και θετικό πρόσημο, το οποίο εκφράζει τις αναμενόμενες ελκτικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ανιονικών ενώσεων και της βιομιμητικής στατικής φάσης HSA.

Η επιπλέον εισαγωγή του όρου F^+ οδήγησε σε περαιτέρω βελτίωση της εξίσωσης, εξίσωση (IIB-57):

$$\log k_{10}^{HSA}_{(ACN)} = 0,43(\pm 0,03)\log P - 0,32(\pm 0,10)F^+ + 0,49(\pm 0,11)F^- - 0,66(\pm 0,10) \quad (\text{IIB-57})$$

$$n = 59, r = 0,905, r^2 = 0,819, s = 0,313, F = 88,36, |t|F^+ = 3,22, |t|F^- = 4,47$$

Το αρνητικό πρόσημο του όρου F^+ υποδηλώνει ότι η πρωτονίωση παραμένει ένας σημαντικός παράγοντας στη συγκράτηση των βασικών φαρμακευτικών μορίων, οδηγώντας σε χαμηλότερη κατανομή στη στατική φάση HSA.

Ακολούθως η στατιστική ανάλυση επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας τις τιμές $\log D_{7,4}$, με αποτέλεσμα να ληφθεί η εξίσωση (IIB-58):

$$\log k_{10}^{HSA}_{(ACN)} = 0,43(\pm 0,04)\log D_{7,4} + 1,28(\pm 0,16)F^- - 0,38(\pm 0,10) \quad (\text{IIB-58})$$

$$n = 59, r = 0,824, r^2 = 0,680, s = 0,423, F = 59,38$$

Η εξίσωση (IIB-58) παρότι εμφανίζει φτωχότερα στατιστικά δείχνει σαφώς την ισχυρή επίδραση των ανιόντων στη συγκράτηση, καθώς ο παράγοντας F^- είναι στατιστικά σημαντικός με $|t|=8,04$ και συνοδεύεται από μεγάλο συντελεστή παλινδρόμησης.

Με την εισαγωγή του όρου F^+ προέκυψε η εξίσωση (IIB-59):

$$\log k_{10}^{HSA}_{(ACN)} = 0,47(\pm 0,03)\log D_{7,4} + 0,48(\pm 0,12)F^+ + 1,62(\pm 0,17)F^- - 0,73(\pm 0,13) \quad (\text{IIB-59})$$

$$n = 59, r = 0,857, r^2 = 0,735, s = 0,378, F = 54,71, |t|F^+ = 3,90, |t|F^- = 9,72$$

Ο παράγοντας F^+ σε αντίθεση με την εξίσωση (IIB-57) εμφανίζει θετικό πρόσημο, γεγονός που θα πρέπει να αποδοθεί μάλλον στο μειωμένο ιονισμό στο βιομιμητικό περιβάλλον της στατικής φάσης ή/και στην ενδεχόμενη ανάπτυξη ηλεκτροστατικών

αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτονιωμένων βασικών κέντρων και ανιονικών θέσεων στην επιφάνεια της HSA, αν και σε μικρότερο βαθμό.

Ανάλογη εξίσωση προέκυψε και με τις ανηγμένες τιμές $\log k_w^{HSA}_{(ACN)}$, εξίσωση (ΠB-60), με ελαφρώς χαμηλότερα στατιστικά στοιχεία:

$$\log k_w^{HSA}_{(ACN)} = 0,56(\pm 0,05)\log D_{7,4} + 0,30(\pm 0,16)F^+ + 1,67(\pm 0,22)F^- - 0,18(\pm 0,17)(\text{ΠB-60})$$

$n = 56, r = 0,826, r^2 = 0,683, s = 0,488, F = 40,52$

Για τις 36 ενώσεις για τις οποίες οι ανηγμένες τιμές προσδιορίστηκαν επίσης παρουσία ισοπροπανόλης ελήφθη η εξίσωση (ΠB-61):

$$\log k_w^{HSA}_{(2\text{-prop})} = 0,57(\pm 0,08)\log D_{7,4} + 0,30(\pm 0,25)F^+ + 2,01(\pm 0,36)F^- - 0,39(\pm 0,25) (\text{ΠB-61})$$

$n = 36, r = 0,780, r^2 = 0,608, s = 0,591, F = 19,09$

1.4.7 Σολβατοχρωμική ανάλυση

Μια προσέγγιση που παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη σύγκριση μεταξύ φαινομένων τα οποία λαμβάνουν χώρα σε περιβάλλον συμπυκνωμένων φάσεων (όπως η κατανομή, η συγκράτηση και διάφορες βιολογικές διαδικασίες) αποτελούν οι γραμμικές σχέσεις ενέργειας επιδιάλυτωσης (LSERs: linear solvation energy relationships), οι οποίες είναι βασισμένες στις σολβατοχρωμικές παραμέτρους του Abraham. Σύμφωνα μ' αυτή τη μέθοδο, τα φαινόμενα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση στερικούς και πολικούς παράγοντες, οι οποίοι εκφράζουν διαφορετικούς τύπους ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, όπως περιγράφεται από την εξίσωση (ΠB-62):

$$\log Property = aA + bB + sS + eE + vV + c \quad (\text{ΠB-62})$$

όπου A και B η οξύτητα και η βασικότητα αντίστοιχα ως προς το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, S η διπολικότητα/πολωσιμότητα, E η πλεονάζουσα μοριακή διάθλαση και V ο μοριακός όγκος McGowan, ενώ *a*, *b*, *s*, *e*, *c* είναι σταθερές οι οποίες χαρακτηρίζουν το σύστημα και προκύπτουν από πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης. Καλή συμφωνία μεταξύ των συντελεστών παλινδρόμησης για

εξισώσεις που προκύπτουν για διαφορετικά συστήματα καταδεικνύει ότι τα υπό μελέτη φαινόμενα χαρακτηρίζονται από το ίδιο ισοζύγιο ενδομοριακών δυνάμεων⁷³.

Μια εξίσωση LSER για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης έχει αναφερθεί από τους Valkó και συν²⁴⁵, όπου οι όροι B, V και E εμφανίζονται ως οι πλέον σημαντικοί, εξίσωση (I-29) στο Θεωρητικό Μέρος:

$$\begin{aligned} \log K_{HSA} = & 0,18(\pm 0,14)A - 1,97(\pm 0,15)B - 0,36(\pm 0,15)S + 0,82(\pm 0,15)E \\ & + 1,62(\pm 0,21)V - 1,28 \end{aligned} \quad (I-29)$$

$n = 52, r = 0,91, s = 0,33, F = 44$

Αν και στην εξίσωση αναφέρεται ο όρος A, το τυπικό σφάλμα που τον συνοδεύει δείχνει ότι δεν είναι στατιστικά σημαντικός, γεγονός που συμφωνεί και με ανάλογη εξίσωση για τους συντελεστές κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού³⁰².

Αντίστοιχη ανάλυση για τις υπο μελέτη φαρμακευτικές ενώσεις οδήγησε ωστόσο σε φτωχή εξίσωση LSER, ακόμα και μετά την εξαίρεση των έκτροπων τιμών. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι παράμετροι του Abraham προκύπτουν από ουδέτερες ενώσεις με αποτέλεσμα να μην εκφράζεται ο ιονισμός και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στις αντίστοιχες εξισώσεις. Για να αντιμετωπιστεί η αδυναμία αυτή εισήχθησαν οι όροι F^+ και F^- στην ανάλυση ως επιπλέον παράμετροι. Προέκυψε η εξίσωση (IIB-63) με αρκετά καλά στατιστικά στοιχεία. Στην εξίσωση (IIB-63) ο όρος F^- είναι στατιστικά σημαντικός και απεικονίζει τη θετική συμβολή των ανιονικών μορφών στη σύνδεση στην HSA.

$$\begin{aligned} \log K_{HSA} = & - 1,06(\pm 0,11)B + 0,39(\pm 0,12)E + 1,08(\pm 0,15)V + 0,51(\pm 0,12)F^- - \\ & - 1,29(\pm 0,22) \end{aligned} \quad (IIB-63)$$

$n = 59, r = 0,844, r^2 = 0,714, s = 0,342, F = 34,74, |t|F^- = 4,84$

Ο λόγος B/V ο οποίος θεωρείται χαρακτηριστική σταθερά της εξίσωσης είναι ~1, ενώ στην εξίσωση της Valkó είναι 1,22.

Η κεφαζιδίμη (No 9), η ατροπίνη (No 43), η πιροξικάμη (No 32) και η τενοξικάμη (No 60) εμφάνισαν έκτροπες τιμές και δεν συμπεριλήφθηκαν στην εξίσωση (IIB-63).

Η ίδια ανάλυση για τη χρωματογραφική συγκράτηση στη στήλη HSA χρησιμοποιώντας τις τιμές $\log k_{10}^{HSA}_{(ACN)}$ οδήγησε στην εξίσωση (IIB-64). Στην

περίπτωση αυτή ο όρος F^+ αποδείχθηκε επίσης οριακά στατιστικά σημαντικός με αρνητικό πρόσημο σε συμφωνία με την εξίσωση (IIB-57). Εκτός από αυτή τη διαφοροποίηση, η πλεονάζουσα μοριακή διάθλαση E, οριακά σημαντική στην εξίσωση (IIB-63) δεν είναι στατιστικά σημαντική στην εξίσωση (IIB-64). Οι συντελεστές παλινδρόμησης των όρων B και του μοριακού όγκου McGowan V εμφανίζουν το ίδιο πρόσημο, αλλά ελαφρά χαμηλότερες τιμές στην εξίσωση (IIB-64), ενώ ο λόγος B/V είναι 0,89:

$$\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})} = -1,40(\pm 0,13)B + 1,58(\pm 0,16)V - 0,28(\pm 0,14)F^+ + 0,49(\pm 0,15)F^- - 1,21(\pm 0,26) \quad (\text{IIB-64})$$

$$n = 59, r = 0,831, r^2 = 0,691, s = 0,424, F = 33,40, |t|F^+ = 1,97, |t|F^- = 3,33$$

Η κεφαζιδίμη (No 9), η ατροπίνη (No 43), η πιροξικάμη (No 32) και η τενοξικάμη (No 60) εμφάνισαν έκτροπες τιμές και δεν συμπεριλήφθηκαν στην εξίσωση (IIB-64).

Η παράμετρος A της οξύτητας των δεσμών υδρογόνου δεν είναι στατιστικά σημαντική στις εξισώσεις (IIB-63) και (IIB-64), σε αναλογία όπως ήδη προαναφέρθηκε με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού, καταδεικνύοντας την ομοιότητα μεταξύ των δυο διαδικασιών. Ας σημειωθεί ότι η επιλογή του συστήματος οκτανόλης-νερού ως σύστημα αναφοράς για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας βασίστηκε εν μέρει στην ικανότητά του να προσομοιώνει την πρωτεϊνική σύνδεση⁸.

2. Συγκράτηση δομικά μη συγγενών φαρμακευτικών μορίων στη στατική φάση AGP

2.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε στο Θεωρητικό Μέρος (βλ. §3.8) η α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη αποτελεί επίσης σημαντική πρωτεΐνη του ανθρώπινου πλάσματος αν και βρίσκεται σε μικρότερες ποσότητες. Στην περίπτωση της AGP δεν υπάρχει η πληθώρα των μελετών που συναντάται όσον αφορά την HSA και τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης είναι περιορισμένα.

Για την προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης στην α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε στατική φάση AGP και μελετήθηκαν οι ίδιες ενώσεις που αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο B1. Οι ενώσεις παρουσιάζονται με την ίδια αρίθμηση στον Πίνακα ΠB-21. Επιπλέον προσδιορίστηκε η λιδοκαΐνη, η οποία προστέθηκε στο τέλος της αρίθμησης.

2.2 Προσδιορισμός χρωματογραφικών δεικτών AGP

2.2.1 Οργανολογία

Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή HPLC που περιγράφηκε στην 1^η ενότητα (Κεφάλαιο A, §2.1.1).

2.2.2 Αντιδραστήρια

Το ακετονιτρίλιο και η ισοπροπανόλη ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC-grade), της εταιρίας Lab-Scan. Το νερό ήταν απιονισμένο και καθαρισμένο μέσω του συστήματος παραγωγής νερού Milli-Q Plus (Millipore). Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε το PBS σε pH 7,0 (βλ. 1^η ενότητα, Κεφάλαιο A, §2.1.2).

2.2.3 Χρωματογραφικές συνθήκες

Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε στήλη ChromTech, CHIRAL-AGP (50x4 mm i.d.), Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν μίγματα οργανικού τροποποιητή-ρυθμιστικού διαλύματος σε διάφορες αναλογίες και συγκεκριμένα με περιεκτικότητα σε οργανικό τροποποιητή από 5-20% και βήμα 5%. Όπου ήταν δυνατό η κινητή φάση αποτελείτο από 100% ρυθμιστικό διάλυμα. Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στο 1 ml/min. Η χρωματογραφική διαδικασία και ο προσδιορισμός των ανηγμένων τιμών $\log k_w$ αναφέρθηκαν στην 1^η ενότητα (Κεφάλαιο B, §2.1.4 και 2.15).

2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Οι τιμές $\log k_w^{AGP}$ μαζί με τις κλίσεις S που προέκυψαν για όλες τις πειραματικές συνθήκες αναφέρονται στον Πίνακα ΠΒ-21. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι συντελεστές συσχέτισης r είχαν τιμή υψηλότερη από 0,990. Τα σταθερά σφάλματα των τιμών $\log k_w$ και των κλίσεων S ήταν χαμηλότερα από $\pm 0,19$ και $\pm 1,48$ αντίστοιχα. Όλες οι ενώσεις εμφάνισαν γραμμική συμπεριφορά της συγκράτησης ως προς το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
B. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

Πίνακας ΠΙΒ-21. Τιμές $\log k_w^{AGP}$ και κλίσεις S για όλες τις πειραματικές συνθήκες.

No	Ένωση	$\log k_w^{AGP}_{(act)}$	$\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$	Sx100	$\log k_w^{AGP}_{(2-prop)}$	Sx100
1	Ακεταμινοφαίνη	0,05	-0,20	2,92	-0,25	2,73
2	Αντιπυρίνη	0,88	0,56	8,75	0,30	8,92
3	Ατενολόλη	0,14	0,00	1,12	-0,01	1,11
4	Καπτοπρίλη	1,50	1,47	14,52	1,59	15,74
5	Καρβαμαζεπίνη	*	1,71	8,72	1,41	7,02
6	Κεφαμανδόλη	-0,06	-0,18	10,00	-0,25	7,41
7	Κεφορανίδη	-0,15	-0,33	4,78	-0,42	5,22
8	Κεφοξιτίνη	-0,12	-0,15	8,13	-0,20	6,36
9	Κεφαζιδίμη	-0,04	-0,24	9,55	-0,37	6,54
10	Χλωροφαιнуραμίνη	*	1,59	6,91	1,35	6,74
11	Χλωροπρομαζίνη	*	2,05	5,46	1,96	6,07
12	Διαζεπάμη	*	1,73	9,09	1,28	7,35
13	Διλτιαζέμη	*	1,90	10,69	1,16	6,72
14	Διφαινυδραμίνη	*	1,80	7,81	1,32	7,17
15	Διπυριδαμόλη	*	2,21	12,85	1,25	11,91
16	Δοξεπίνη	*	1,95	6,34	1,89	5,77
17	Επαλρεστάτη	*	1,52	9,09	1,20	6,05
18	Φλουνιτραζεπάμη	1,44	0,67	4,46	0,74	5,27
19	Φλουοξετίνη	*	2,05	8,19	1,50	4,09
20	Ιμπραμίνη	*	2,07	6,93	1,77	6,27
21	Ινδομεθακίνη	*	1,49	11,22	1,04	8,06
22	Κετοπροφαίνιο	0,98	1,37	7,37	1,37	7,75
23	Λοραζεπάμη	1,33	1,34	6,67	1,24	6,19
24	Μεβενδαζόλιο	*	1,67	9,15	1,51	7,61
25	Ναπροξένιο	0,17	0,30	6,33	0,16	5,65
26	Νιφεδιπίνη	0,76	1,68	11,12	1,29	10,93
27	Πεντοβαρβιτάλη	1,35	0,99	7,98	0,49	5,49
28	Περφαιναζίνη	*	2,97	10,32	2,74	10,30
29	Φαινακετίνη	0,07	0,26	4,95	0,08	4,88
30	Φαινοβαρβιτάλη	1,05	0,41	5,06	-0,01	2,92
31	Φαιντοΐνη	*	1,47	7,83	1,06	6,23
32	Πιροξικάμη	*	1,54	11,26	1,20	9,09
33	Προπαιναζόνη	1,82	1,25	6,70	1,11	5,44
34	Προπρανολόλη	*	2,02	6,53	1,66	6,79
35	Κινιδίνη	*	1,48	5,90	1,27	5,29
36	Τερβουταλίνη	0,28	0,12	1,12	0,11	1,27
37	Τολβουταμίδιο	0,65	-0,05	4,61	-0,27	2,22
38	Τραζοδόνη	*	2,40	12,32	1,65	8,32
39	Τριμεθοπρίμη	1,12	0,64	5,27	0,34	3,73
41	Αμιτριπυλίνη	*	2,28	7,49	1,89	6,19
46	Κλομιπραμίνη	*	2,53	8,13	2,24	8,16
52	Νορτριπυλίνη	*	2,18	7,03	1,83	6,02
55	Προμεθαζίνη	*	2,44	8,21	1,89	6,12
64	Λιδοκαΐνη	*	1,11	5,45	0,71	4,77

*δεν προσδιορίστηκαν λόγω αυξημένης συγκράτησης.

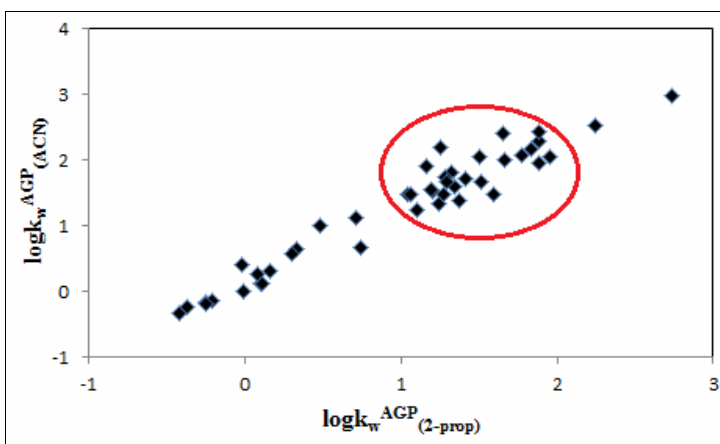
2.3.1 Επίδραση του οργανικού τροποποιητή

Εξετάστηκε η επίδραση της φύσης του οργανικού τροποποιητή στις ενώσεις που μελετήθηκαν. Διαπιστώθηκε σχεδόν 1:1 συσχέτιση μεταξύ $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$ και $\log k_w^{AGP}_{(2-prop)}$:

$$\log k_w^{AGP}_{(ACN)} = 1,09(\pm 0,04)\log k_w^{AGP}_{(2-prop)} + 0,18(\pm 0,05) \quad (\text{ΠB-65})$$

$$n = 44, r = 0,970, s = 0,219, F = 665,8$$

Η σχέση μεταξύ $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$ και $\log k_w^{AGP}_{(2-prop)}$ απεικονίζεται στο Σχήμα ΠB-41:



Σχήμα ΠB-41. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$ και $\log k_w^{AGP}_{(2-prop)}$.

Ωστόσο, όπως φαίνεται στο Σχήμα ΠB-41, παρά την πολύ καλή συσχέτιση, η απεικόνιση εμφανίζει σχετικά μεγαλύτερη διασπορά σε εύρος τιμών $\log k_w^{AGP}_{(2-prop)}$ από 1 έως 2 και $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$ από 1 έως 2,5. Η περιοχή αυτή έχει κυκλωθεί στο Σχήμα ΠB-41. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι τιμές $\log k_w$ είναι δυνατόν να επηρεάζονται από τη φύση του οργανικού τροποποιητή. Η απομόνωση των τιμών στην εν λόγω περιοχή αναμένεται να οδηγήσει σε διαφοροποιημένα αποτελέσματα κατά τη συσχέτιση με φυσικοχημικά ή βιολογικά μεγέθη.

2.3.2 Σχέση μεταξύ των ανηγμένων τιμών $\log k_w^{AGP}$ και των τιμών $\log k_w^{AGP}_{(act)}$

Η αντιστοιχία των τιμών $\log k_w^{AGP}_{(act)}$ με τις ανηγμένες τιμές $\log k_w^{AGP}$ ελέγχθηκε για τις ενώσεις οι οποίες ήταν δυνατόν να προσδιοριστούν με τη χρήση 100%

ρυθμιστικού διαλύματος. Προέκυψαν οι εξισώσεις (ΠB-66) και (ΠB-67) για το ακετονιτρίλιο και την ισοπροπανόλη αντίστοιχα:

$$\log k_w^{AGP}(\text{act}) = 1,03(\pm 0,13)\log k_w^{AGP}(\text{ACN}) + 0,25(\pm 0,09) \quad (\text{ΠB-66})$$

$$n = 18, r = 0,898, s = 0,304, F = 66,57$$

$$\log k_w^{AGP}(\text{act}) = 0,97(\pm 0,15)\log k_w^{AGP}(\text{2-prop}) + 0,40(\pm 0,10) \quad (\text{ΠB-67})$$

$$n = 18, r = 0,845, s = 0,369, F = 39,97$$

Το κετοπροφαίνιο (No 22) και η νιφεδιπίνη (No 26) εμφάνισαν μεγαλύτερη απόκλιση και δεν συμπεριλήφθηκαν στις δυο εξισώσεις.

Οι εξισώσεις (ΠB-66) και (ΠB-67) δεν εμφανίζουν υψηλά στατιστικά στοιχεία και ως εκ τούτου δεν χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των τιμών $\log k_w^{AGP}(\text{act})$ των ενώσεων που είναι αδύνατον να προσδιοριστούν πειραματικά λόγω ισχυρής συγκράτησης. Επιπλέον οι μέτριες συσχετίσεις μεταξύ $\log k_w^{AGP}(\text{act})$ και ανηγμένων τιμών $\log k_w^{AGP}$ αποτελούν περαιτέρω ένδειξη για την επίδραση του οργανικού τροποποιητή στη συγκράτηση στη στήλη AGP.

2.3.3 Σχέση μεταξύ τιμών $\log k_w^{AGP}$ και κλίσεων S

Σε αντιστοιχία με ότι συμβαίνει στη χρωματογραφία HSA, δεν υπάρχουν συστηματικές μελέτες που αφορούν τη γραμμικότητα μεταξύ των τιμών $\log k_w$ και των κλίσεων S στη χρωματογραφία AGP. Όπως αναμένετο η γραμμικότητα μεταξύ $\log k_w^{AGP}/S$ ήταν μειωμένη, με τις αντίστοιχες εξισώσεις να εμφανίζουν φτωχά στατιστικά στοιχεία ($r < 0,5$). Η έλλειψη γραμμικότητας και σ' αυτή την περίπτωση πρέπει να αποδοθεί στη συμμετοχή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ιδιαίτερα όσον αφορά πρωτονιωμένες βασικές ενώσεις με όξινα κέντρα στην επιφάνεια της AGP.

2.3.4 Συσχέτιση των χρωματογραφικών δεικτών AGP με τη σύνδεση στην α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος

Διερευνήθηκε η δυνατότητα προσομοίωσης της σύνδεσης στην α-όξινη-γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος μέσω της χρωματογραφίας AGP. Από τη

βιβλιογραφία ελήφθησαν τιμές IC₅₀ και τιμές σταθερών σύνδεσης K ως προς τη γενετική παραλλαγή A και το μίγμα F1*S των παραλλαγών F1 και S της α-όξινης γλυκοπρωτεΐνης³⁰³. Οι τιμές αυτές ελήφθησαν από το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο (πειράματα εκτόπισης επισημασμένων ενώσεων-δεικτών) με διαφορετικούς υπολογισμούς. Στην πρώτη περίπτωση οι τιμές IC₅₀ (εκφρασμένες σε μM) αφορούν στη συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί 50% μείωση της μέγιστης συγκέντρωσης προσδεμένης ένωσης-δείκτη και εκτιμήθηκαν με βάση τη συγκέντρωση του προσδεμένης ένωσης-δείκτη ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου αναστολέα (κατά προσέγγιση της ολικής συγκέντρωσης του αναστολέα).

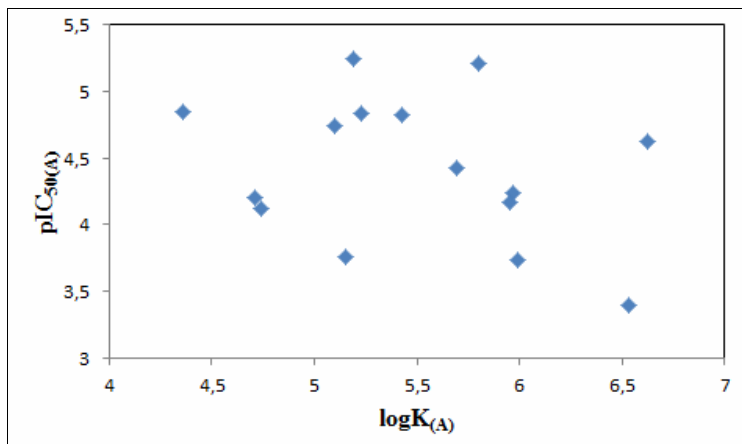
Στη δεύτερη περίπτωση οι τιμές K (επίσης εκφρασμένες σε $10^6 \frac{\text{liters}}{\text{mol}}$) εκτιμήθηκαν

με βάση τη συγκέντρωση του προσδεμένου δείκτη ως συνάρτηση της ολικής συγκέντρωσης του αναστολέα, λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό θέσεων ισχυρής σύνδεσης, τη σταθερά σύνδεσης του δείκτη και τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Οι τιμές IC₅₀ μετατράπηκαν σε μοριακές συγκεντρώσεις και ακολούθως στον αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο pIC₅₀ και οι τιμές K σε logK και αναφέρονται στον Πίνακα ΠΙΒ-22. Οι δείκτες σε παρένθεση συμβολίζουν τις γενετικές παραλλαγές.

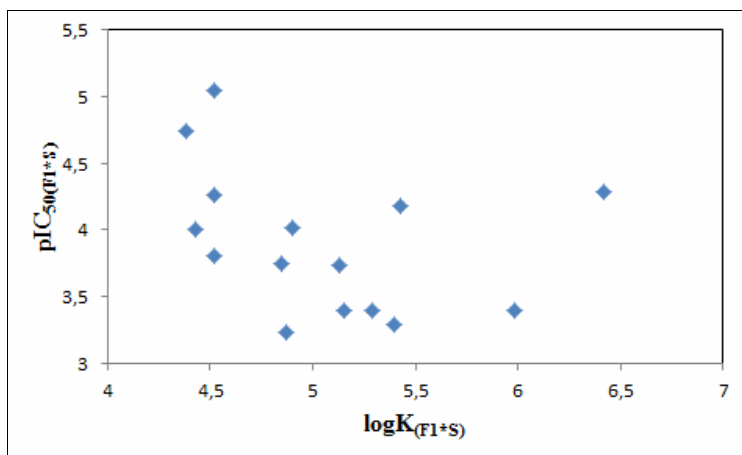
Πίνακας ΠΙΒ-22. Τιμές pIC₅₀ και logK της κάθε γενετικής παραλλαγής.

No	Ένωση	pIC _{50(A)}	pIC _{50(F1*S)}	logK _(A)	logK _(F1*S)
10	Χλωροφαιнуραμίνη	3,39	3,23	4,36	4,38
11	Χλωροπρομαζίνη	4,85	4,74	5,99	5,98
12	Διαζεπάμη	3,74	3,39	4,71	4,52
14	Διφαινυδραμίνη	4,42	3,39	5,43	4,52
15	Διπυριδαμόλη	4,20	5,05	5,19	6,42
20	Ιμιπραμίνη	4,82	3,80	5,97	4,90
33	Προπαφαινόνη	5,25	4,29	6,62	5,43
34	Προπρανολόλη	4,24	4,02	5,23	5,15
35	Κινιδίνη	4,12	4,00	5,10	5,13
38	Τραζοδόνη	4,17	4,26	5,15	5,40
41	Αμιτριπτυλίνη	5,21	3,75	6,53	4,87
46	Κλομιπραμίνη	4,63	4,18	5,69	5,29
52	Νορτριπτυλίνη	4,83	3,39	5,95	4,52
55	Προμεθαζίνη	4,74	3,74	5,80	4,85
64	Λιδοκαΐνη	3,76	3,29	4,74	4,43

Αν και οι δείκτες pIC_{50} και $\log K$ έχουν προκύψει από το ίδιο πείραμα δεν εκφράζουν το ίδιο πληροφοριακό περιεχόμενο, όπως φαίνεται και από την έλλειψη καλής συσχέτισης μεταξύ τους, βλ. Σχήματα ΠΒ-42 και ΠΒ-43.



Σχήμα ΠΒ-42. Απεικόνιση $pIC_{50(A)}$ ως προς $\log K_{(A)}$.

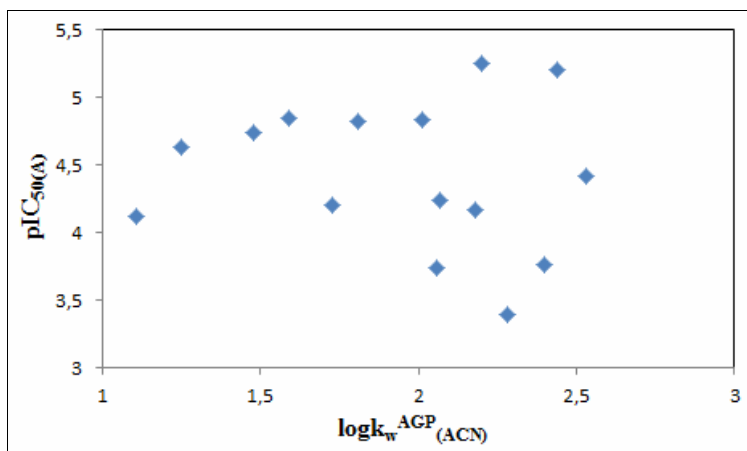


Σχήμα ΠΒ- 43. Απεικόνιση $pIC_{50(F1*S)}$ ως προς $\log K_{(F1*S)}$.

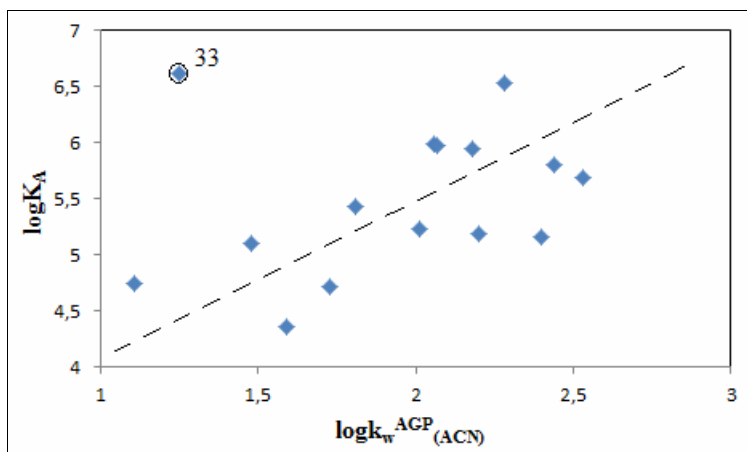
Σύγκριση των χρωματογραφικών δεικτών AGP με τις τιμές $pIC_{50(A)}$ και $\log K_{(A)}$

Απεικονίστηκαν γραφικά οι τιμές $pIC_{50(A)}$ και $\log K_{(A)}$ έναντι των διαφόρων χρωματογραφικών δεικτών. Δεν εμφανίστηκε καμία συσχέτιση με τις τιμές $pIC_{50(A)}$. Αντίθετα παρατηρήθηκε συσχέτιση των χρωματογραφικών δεικτών με τις τιμές $\log K_{(A)}$, με την προπαφαινόνη (No 33) να εμφανίζει αποκλίνουσα συμπεριφορά σε όλες τις περιπτώσεις. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι η συγκράτηση στη στήλη AGP μπορεί να συγκριθεί με σταθερές σύνδεσης και όχι με τα μεγέθη pIC_{50} τα

οποία σχετίζονται έμμεσα με σταθερές ισορροπίας. Στα Σχήματα ΠΒ-44 και ΠΒ-45 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές απεικονίσεις των τιμών $pIC_{50(A)}$ και $\log K_{(A)}$ ως προς τους χρωματογραφικούς δείκτες $\log k_{w(ACN)}$.



Σχήμα ΠΒ-44. Απεικόνιση $pIC_{50(A)}$ ως προς $\log k_{w(ACN)}$.



Σχήμα ΠΒ-45. Απεικόνιση $\log K_{(A)}$ ως προς $\log k_{w(ACN)}$.

Ακολούθως διερευνήθηκαν οι συσχετίσεις των χρωματογραφικών δεικτών με τις σταθερές σύνδεσης $\log K_{(A)}$, εξαιρώντας την προπαφαινόνη:

$$\log K_{(A)} = 0,95(\pm 0,33)\log k_w^{AGP}_{(ACN)} + 3,53(\pm 0,67) \quad (\text{ΠΒ-68})$$

$$n = 14, r = 0,639, s = 0,482, F = 8,29$$

$$\log K_{(A)} = 1,11(\pm 0,30)\log k_w^{AGP}_{(2\text{-prop})} + 3,67(\pm 0,48) \quad (\text{ΠΒ-69})$$

$$n = 14, r = 0,732, s = 0,427, F = 13,88$$

Οι συσχετίσεις έχουν μέτρια στατιστικά στοιχεία, κλίση κοντά στη μονάδα και μεγάλο σταθερό όρο που υποδηλώνει ότι οι χρωματογραφικοί δείκτες είναι κατά 3,5 περίπου λογαριθμικές μονάδες χαμηλότεροι των τιμών σύνδεσης στην α-όξινη-γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος. Εν συνεχεία έγινε προσπάθεια βελτίωσης των συσχετίσεων με την εισαγωγή πρόσθετων παραμέτρων που αντιστοιχούν σε δεσμούς υδρογόνου, πολικότητα, όγκο, χωρίς ωστόσο επιτυχία. Αντίθετα, όταν εισήχθη το κλάσμα της πρωτονιωμένης μορφής F^+ στη σχέση $\log K_{(A)}/\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$ προέκυψε η εξίσωση (ΠB-70) με σχετικά βελτιωμένα στατιστικά στοιχεία και τον παράγοντα F^+ να είναι στατιστικά σημαντικός ($|t|=2,36$) με θετικό πρόσημο:

$$\log K_{(A)} = 0,96(\pm 0,28)\log k_w^{AGP}_{(ACN)} + 0,72(\pm 0,31)F^+ + 2,94(\pm 0,62) \quad (\text{ΠB-70})$$

$n = 14, r = 0,779, r^2 = 0,535, s = 0,410, F = 8,49$

Στην περίπτωση ωστόσο της ισοπροπανόλης το κλάσμα F^+ δεν ήταν στατιστικά σημαντικό. Ως εκ τούτου κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η χρήση του όρου F^+ στις συσχετίσεις που εξάγονται με τις ισοκρατικές τιμές $\log k^{AGP}_{(ACN)}$ και $\log k^{AGP}_{(2-prop)}$. Διαπιστώθηκε ότι η τιμή t του όρου F^+ μειώνεται με αύξηση του ποσοστού του ακετονιτριλίου και παραμένει στατιστικά σημαντική μόνο για τις τιμές $\log k_5^{AGP}_{(ACN)}$. Παρουσία ισοπροπανόλης η τιμή t παραμένει κάτω από 2 για όλες τις ισοκρατικές τιμές καθώς και για τις τιμές $\log k_w^{AGP}$. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο οργανικός τροποποιητής συμμετέχει στην τελική διαμόρφωση της στατικής φάσης δημιουργώντας ενδεχομένως μερική κάλυψη των ανιοντικών κέντρων στην επιφάνεια της α-όξινης γλυκοπρωτεΐνης, πιθανόν μέσω δημιουργίας δεσμών υδρογόνου με τα μόρια του διαλύτη. Ας σημειωθεί ότι το ακετονιτρίλιο αποτελεί μόνο δέκτη πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου, ενώ η ισοπροπανόλη είναι και δέκτης και δότης. Με βάση την ανωτέρω παρατήρηση επανεξετάστηκε η επίδραση της φύσης του οργανικού τροποποιητή στη συγκράτηση για την ίδια υπο-ομάδα ενώσεων που αναλύεται στις ανωτέρω εξισώσεις. Με εξαίρεση τη λιδοκαΐνη οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν υψηλή συγκράτηση ($\log k_w^{AGP} > 1$) και στις δυο συνθήκες οργανικού τροποποιητή. Προέκυψε η εξίσωση (ΠB-71) με σημαντικά χαμηλότερα στατιστικά στοιχεία από την εξίσωση (ΠB-65) η οποία αφορά όλες τις ενώσεις:

$$\log k_w^{AGP}_{(ACN)} = 0,93(\pm 0,15)\log k_w^{AGP}_{(2-prop)} + 0,50(\pm 0,25) \quad (\text{ΠB-71})$$

$n = 15, r = 0,859, s = 0,231, F = 36,69$

Η συσχέτιση βελτιώνεται με εισαγωγή του όρου F^+ :

$$\log k_w^{AGP}{}_{(ACN)} = 1,06(\pm 0,12)\log k_w^{AGP}{}_{(2-prop)} - 0,46(\pm 0,13)F^+ + 0,67(\pm 0,18) \quad (\text{ΠB-72})$$

$$n = 15, r = 0,922, r^2 = 0,851, s = 0,168, F = 41,04, t|F^+| = 3,55$$

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι ο όρος F^+ δεν είναι στατιστικά σημαντικός αν εισαχθεί στη συνολική εξίσωση (ΠB-66), γεγονός που αποτελεί περαιτέρω ένδειξη αναντιστοιχίας μεταξύ ολικών και επιμέρους μοντέλων.

Ανάλογη εξίσωση λαμβάνεται μεταξύ των ισοκρατικών τιμών $\log k_5^{AGP}$, εξίσωση (ΠB-73), βελτιώνοντας τον αρχικό συντελεστή συσχέτισης ($r=0,885$):

$$\log k_5^{AGP}{}_{(ACN)} = 0,97(\pm 0,11)\log k_5^{AGP}{}_{(2-prop)} - 0,35(\pm 0,12)F^+ + 0,66(\pm 0,13) \quad (\text{ΠB-73})$$

$$n = 15, r = 0,921, r^2 = 0,849, s = 0,148, F = 40,47, t|F^+| = 2,86$$

Η συσχέτιση μεταξύ των υπολοίπων ισοκρατικών τιμών βελτιώνεται με αύξηση του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή που συνεπάγεται παράλληλα μείωση της σημαντικότητας του όρου F^+ . Για τις τιμές $\log k_{20}^{AGP}$ λαμβάνεται πολύ καλή 1:1 συσχέτιση, εξίσωση (ΠB-74):

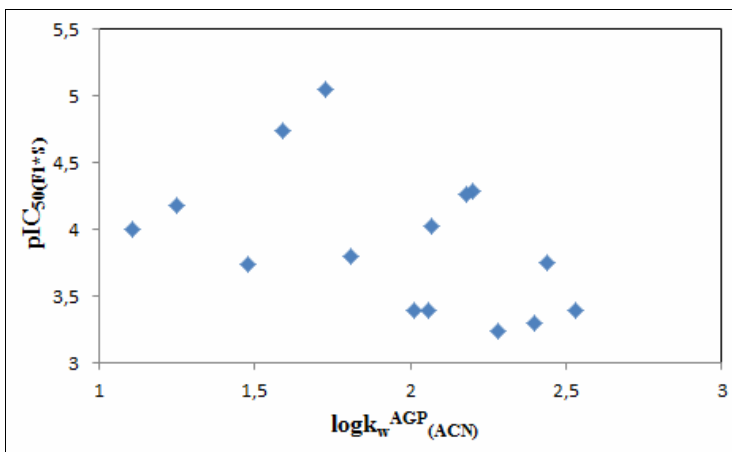
$$\log k_{20}^{AGP}{}_{(ACN)} = 0,97(\pm 0,10)\log k_{20}^{AGP}{}_{(2-prop)} + 0,18(\pm 0,05) \quad (\text{ΠB-74})$$

$$n = 15, r = 0,943, s = 0,131, F = 95,77$$

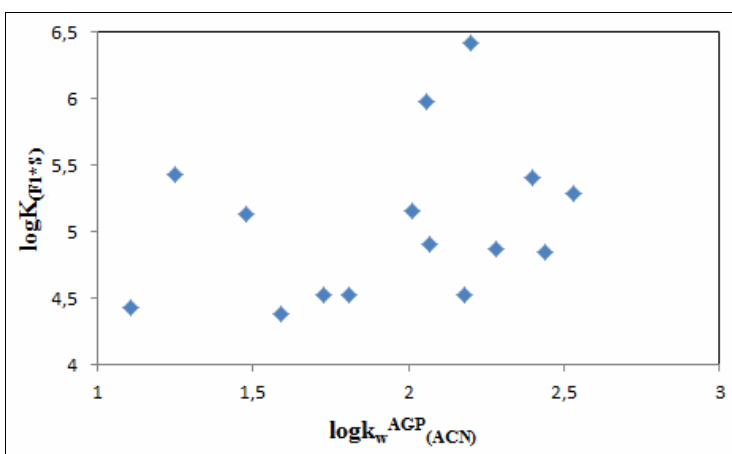
Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τόσο η φύση όσο και τα ποσοστά του οργανικού τροποποιητή συμμετέχουν στη τελική διαμόρφωση της στατικής φάσης επηρεάζοντας τη συμμετοχή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στη συγκράτηση.

Σύγκριση των χρωματογραφικών δεικτών AGP με τις τιμές $pIC_{50(F1*S)}$ και $\log K_{(F1*S)}$

Η γραφική απεικόνιση των τιμών $pIC_{50(F1*S)}$ και $\log K_{(F1*S)}$ έναντι των διαφόρων χρωματογραφικών δεικτών δεν κατέδειξε κάποια τάση και οι αντίστοιχες συσχετίσεις είχαν χαμηλούς συντελεστές συσχέτισης. Στα Σχήματα ΠB-46 και ΠB-47 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές απεικονίσεις των τιμών $pIC_{50(F1*S)}$ και $\log K_{(F1*S)}$ ως προς τους χρωματογραφικούς δείκτες $\log k_w^{AGP}{}_{(ACN)}$.



Σχήμα ΠΒ-46. Απεικόνιση $pIC_{50(F1*S)}$ ως προς $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$.



Σχήμα ΠΒ-47. Απεικόνιση $\log K_{(F1*S)}$ ως προς $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$.

Εισαγωγή ωστόσο της σολβατοχρωμικής παραμέτρου B βελτίωσε σημαντικά την ποιότητα των σχέσεων μεταξύ $\log K_{(F1*S)}$ και $\log k_w^{AGP}$. Προέκυψαν οι εξισώσεις (ΠΒ-75) και (ΠΒ-76):

$$\log K_{(F1*S)} = 0,47(\pm 0,25)\log k_w^{AGP}_{(ACN)} + 0,70(\pm 0,18)B + 3,25(\pm 0,55) \quad (\text{ΠΒ-75})$$

$$n = 15, r = 0,734, r^2 = 0,539, s = 0,400, F = 9,19, t|B| = 3,94$$

$$\log K_{(F1*S)} = 0,79(\pm 0,24)\log k_w^{AGP}_{(2-prop)} + 0,88(\pm 0,16)B + 2,68(\pm 0,49) \quad (\text{ΠΒ-76})$$

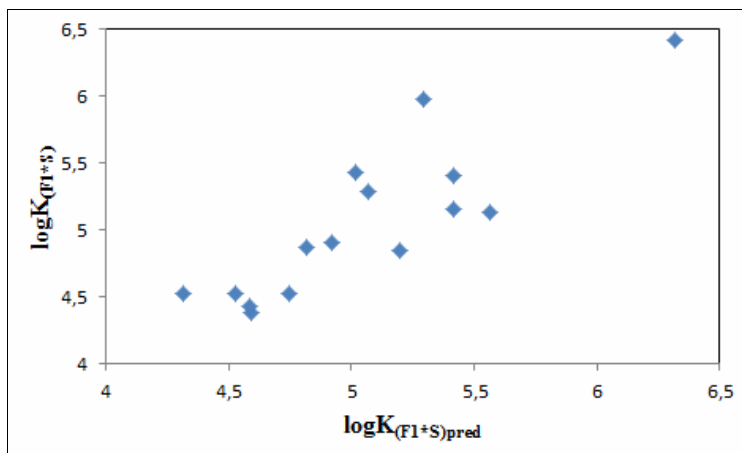
$$n = 15, r = 0,830, r^2 = 0,689, s = 0,329, F = 16,52, t|B| = 5,62$$

Η σημαντικότητα του όρου B στις συσχετίσεις των τιμών $\log K_{(F1*S)}$ με τις ισοκρατικές τιμές $\log k^{AGP}$ διαπιστώθηκε ότι εξαρτάται από το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή. Στην περίπτωση του ακετονιτριλίου η τιμή t του όρου B αυξάνεται με την αύξηση του ποσοστού του διαλύτη, ενώ το αντίθετο παρατηρείται παρουσία ισοπροπανόλης. Σε κάθε περίπτωση πάντως η σολβατοχρωμική παράμετρος B είναι στατιστικά σημαντική με θετικό πρόσημο. Η καλύτερη εξίσωση λήφθηκε παρουσία 20% ακετονιτριλίου, εξίσωση (ΠB-77):

$$\log K_{(F1*S)} = 0,97(\pm 0,28)\log k_{20}^{AGP}{}_{(ACN)} + 1,13(\pm 0,19)B + 3,20(\pm 0,35) \quad (\text{ΠB-77})$$

$$n = 15, r = 0,837, r^2 = 0,700, s = 0,323, F = 17,32, |tB| = 5,85$$

Στο Σχήμα ΠB-48 απεικονίζεται η σχέση μεταξύ των πειραματικών και των προβλεπόμενων με βάση την εξίσωση (ΠB-77) τιμών $\log K_{(F1*S)}$:



Σχήμα ΠB-48. Απεικόνιση $\log K_{(F1*S)}$ ως προς $\log K_{(F1*S)pred}$.

Η εισαγωγή του όρου F^+ δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε αντίθεση με τις αντίστοιχες συσχετίσεις για τη γενετική παραλλαγή A.

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα προκύπτει ότι οι χρωματογραφικοί δείκτες AGP δεν προσομοιώνουν πολύ ικανοποιητικά τη σύνδεση με την α-όξινη-γλυκοπρωτεΐνη. Ωστόσο παρέχουν τη δυνατότητα να διερευνηθούν διαφοροποιήσεις στη σύνδεση των ενώσεων στη γενετική παραλλαγή A συγκριτικά με τη σύνδεση στο μίγμα F1*S. Η σύνδεση στη γενετική παραλλαγή A φαίνεται να εξαρτάται περισσότερο από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, η έκφραση των οποίων σε συνδυασμό με τη

χρωματογραφική συγκράτηση στη στήλη AGP αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την καλύτερη προσομοίωση. Από την άλλη η πολική συνιστώσα που αφορά στη βασικότητα των ενώσεων ως προς το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου επηρεάζει περισσότερο τη σύνδεση στο μίγμα F1*S και απαιτείται η εισαγωγή της αντίστοιχης παραμέτρου στη σχέση των σταθερών $\log K_{(F1*S)}$ με τη χρωματογραφική συγκράτηση AGP. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύονται από το γεγονός ότι σε προηγούμενη ανάλυση CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) της ίδιας σειράς ενώσεων εξήχθη μοντέλο μόνο για τη γενετική παραλλαγή A³⁰³. Η αδυναμία εξαγωγής μοντέλου για το μίγμα F1*S θα μπορούσε να αποδοθεί στην αδυναμία της ανάλυσης CoMFA να εκφράσει τις αλληλεπιδράσεις που οφείλονται σε δεσμούς υδρογόνου.

Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν σαφείς πληροφορίες για τις γενετικές παραλλαγές της α-όξινης γλυκοπρωτεΐνης που ενσωματώνονται στη στήλη AGP κατά την παρασκευή της, θεωρήσαμε σκόπιμο να αξιολογήσουμε τη δυνατότητα προσομοίωσης της α-όξινης γλυκοπρωτεΐνης συνολικά. Για τη συνολική σύνδεση των ενώσεων στην α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε το άθροισμα των σταθερών σύνδεσης ($\log K_A + \log K_{F1*S}$) στη βάση της προσθετικότητας των δράσεων (sum of activities)³⁰⁴. Η καλύτερη συσχέτιση λήφθηκε παρουσία 20% ισοπροπανόλης:

$$(\log K_A + \log K_{F1*S}) = 1,56(\pm 0,55) \log k_{20}^{AGP}_{(2-prop)} + 10,03(\pm 0,25) \quad (IIB-78)$$

n = 14, r = 0,637, s = 0,753, F = 8,18

Στην περίπτωση του ακετονιτριλίου η καλύτερη συσχέτιση ελήφθη σε ποσοστό 15%, ήταν ωστόσο αναγκαία η εισαγωγή της παραμέτρου B:

$$(\log K_A + \log K_{F1*S}) = 2,26(\pm 0,46) \log k_{15}^{AGP}_{(ACN)} + 1,22(\pm 0,31)B + 7,07(\pm 0,70) \quad (IIB-79)$$

n = 14, r = 0,802, r² = 0,643, t|B| = 3,94, s = 0,560, F = 12,72

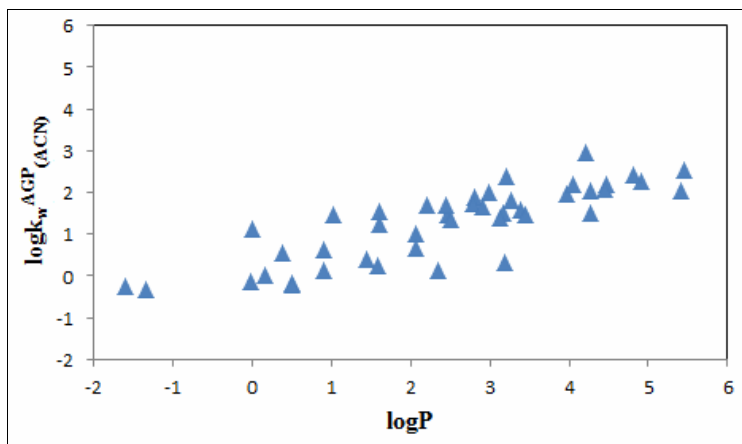
Η προπαφαινόνη (No 33) εμφάνισε αποκλίνουσα συμπεριφορά σε κάθε περίπτωση, ως εκ τούτου δεν συμπεριλήφθηκε στις στατιστικές αναλύσεις.

Συμπερασματικά διαπιστώθηκε ότι στη χρωματογραφία AGP η φύση και τα ποσοστά του οργανικού τροποποιητή επηρεάζουν σημαντικά την τελική διαμόρφωση της στατικής φάσης AGP και κατά συνέπεια την προσομοίωση με την α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη. Για την συσχέτιση της συνολικής σύνδεσης στην α-όξινη

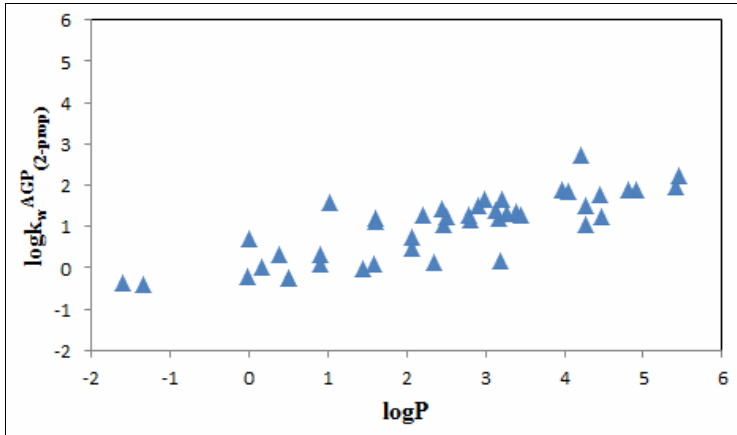
γλυκοπρωτεΐνη καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν με τις ισοκρατικές τιμές $\log k_{15}^{AGP}_{(ACN)}$ σε συνδυασμό με τη βασικότητα ως προς το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Ωστόσο η σειρά των ενώσεων είναι αρκετά περιορισμένη και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των χρωματογραφικών συνθηκών και του μηχανισμού συγκράτησης.

2.3.5 Σχέση της χρωματογραφίας AGP με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού

Δεδομένου ότι και στη σύνδεση με την α-όξινη-γλυκοπρωτεΐνη οι υδρόφοβες δυνάμεις αποτελούν την κινητήρια δύναμη οι χρωματογραφικοί δείκτες AGP συσχετίστηκαν με τα δεδομένα λιποφιλίας προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του μηχανισμού κατανομής στη συγκράτηση. Στα Σχήματα ΠΒ-49 και ΠΒ-50 απεικονίζονται οι ανηγμένες τιμές συγκράτησης $\log k_{w(ACN)}$ και $\log k_{w(2-prop)}$ στη στήλη AGP σε σχέση με τις τιμές $\log P$.



Σχήμα ΠΒ-49. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_{w(ACN)}^{AGP}$ και $\log P$.



Σχήμα IIΒ-50. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP(2-prop)}$ και $\log P$.

Οι αντίστοιχες εξισώσεις συνοδεύονται από σχετικά ικανοποιητικά στατιστικά και κλίσεις χαμηλότερες από 0,5, εξισώσεις (IIΒ-80) και (IIΒ-81):

$$\log k_w^{AGP(ACN)} = 0,43(\pm 0,05)\log P - 0,22(\pm 0,13) \quad (\text{IIΒ-80})$$

$$n = 44, r = 0,833, s = 0,497, F = 95,46$$

$$\log k_w^{AGP(2-prop)} = 0,38(\pm 0,04)\log P - 0,08(\pm 0,12) \quad (\text{IIΒ-81})$$

$$n = 44, r = 0,822, s = 0,455, F = 87,61$$

Με βάση τους συντελεστές r των συσχετίσεων η συμμετοχή των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων αντιστοιχεί σε ποσοστό ~70%.

Οι συσχετίσεις με τις τιμές $\log D_{7,4}$ εμφάνισαν λιγότερο ικανοποιητικά στατιστικά στοιχεία με τιμές $r=0,756$ και $0,705$ για το ακετονιτρίλιο και την ισοπροπανόλη αντίστοιχα.

Ακολούθως έγινε συσχέτιση με τις επιμέρους ισοκρατικές τιμές. Ελαφρώς βελτιωμένες συσχετίσεις ελήφθησαν σε ποσοστό 10% οργανικού τροποποιητή, εξισώσεις (IIΒ-82) και (IIΒ-83):

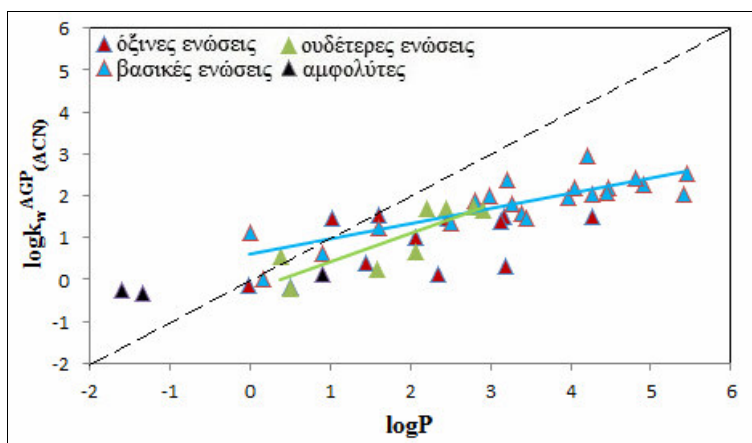
$$\log k_{10}^{AGP(ACN)} = 0,39(\pm 0,04)\log P - 0,46(\pm 0,11) \quad (\text{IIΒ-82})$$

$$n = 44, r = 0,850, s = 0,421, F = 109,51$$

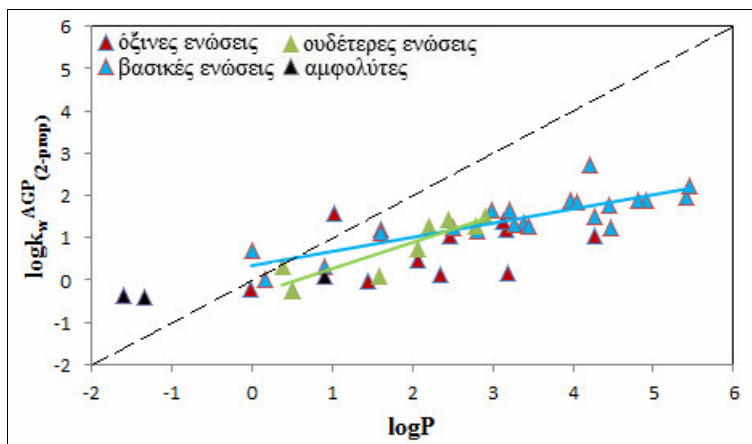
$$\log k_{10}^{AGP(2-prop)} = 0,34(\pm 0,03)\log P - 0,52(\pm 0,10) \quad (\text{IIΒ-83})$$

$$n = 44, r = 0,851, s = 0,370, F = 110,36$$

Δεδομένου ότι στη συγκράτηση στη στήλη AGP εμπλέκονται και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ενώ αυτές δεν εκφράζονται στο σύστημα οκτανόλης-νερού επισημάνθηκαν κατά την απεικόνιση με διαφορετικά χρώματα οι όξινες, βασικές, ουδέτερες και αμφολυτικές ενώσεις (Σχήματα ΠΒ-51 και ΠΒ-52). Η στικτή γραμμή αντιστοιχεί στην ιδανική 1:1 συσχέτιση.



Σχήμα ΠΒ-51. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP} (ACN)$ και $\log P$.



Σχήμα ΠΒ-52. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP} (2-prop)$ και $\log P$.

Παρατηρείται σαφής διαφοροποίηση της σχέσης $\log k_w^{AGP} / \log P$ ανάλογα με τον οξεοβασικό χαρακτήρα των ενώσεων. Οι βασικές ενώσεις ακολουθούν γραμμική συμπεριφορά με σαφώς χαμηλότερη κλίση συγκριτικά με τις ουδέτερες. Αντίθετα η συγκράτηση των όξινων ενώσεων δεν διαφοροποιείται με αύξηση της λιποφιλίας. Οι όξινες ενώσεις πρακτικά τοποθετούνται σε δυο οριζόντιες ευθείες που τέμνουν τον

άξονα των τιμών $\log k_w^{AGP}$ στις τιμές -0,5 και 0,5 αντίστοιχα. Οι τρεις αμφολυτικές ενώσεις (κεφορανίδη, κεφταζιδίμη και τερβουταλίνη) προσαρμόζονται εξίσου καλά μαζί με τις βασικές και τις όξινες ενώσεις .

Ακολουθούν οι εξισώσεις παλινδρόμησης για τις βασικές και ουδέτερες ενώσεις χωριστά, εξισώσεις (IIB-84) και (IIB-85) και εξισώσεις (IIB-86) και (IIB-87) αντίστοιχα. Οι τρεις αμφολυτικές ενώσεις συμπεριλαμβάνονται μαζί με τις βασικές ενώσεις.

$$\log k_w^{AGP}_{(ACN)} = 0,41(\pm 0,04)\log P + 0,41(\pm 0,14) \quad (\text{IIB-84})$$

$$n = 24, r = 0,913, s = 0,385, F = 109,75$$

$$\log k_w^{AGP}_{(2-prop)} = 0,37(\pm 0,03)\log P + 0,21(\pm 0,12) \quad (\text{IIB-85})$$

$$n = 24, r = 0,915, s = 0,338, F = 112,95$$

$$\log k_w^{AGP}_{(ACN)} = 0,68(\pm 0,18)\log P - 0,25(\pm 0,37) \quad (\text{IIB-86})$$

$$n = 8, r = 0,844, s = 0,451, F = 14,81$$

$$\log k_w^{AGP}_{(2-prop)} = 0,62(\pm 0,13)\log P - 0,35(\pm 0,28) \quad (\text{IIB-87})$$

$$n = 8, r = 0,884, s = 0,342, F = 21,51$$

Προκειμένου να μελετηθεί εκτενέστερα ο ρόλος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, εισήχθησαν οι όροι F^+ και F^- στη σχέση μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών και των τιμών $\log P$. Ο όρος F^+ δεν ήταν στατιστικά σημαντικός σε καμία περίπτωση. Σε ότι αφορά τον όρο F^- διαπιστώθηκε ότι η σημαντικότητά του εξαρτάται από τη φύση και το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή. Στην περίπτωση του ακετονιτριλίου ο όρος F^- ήταν στατιστικά σημαντικός ($|tF^-|=2,10$) στη σχέση $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}/\log P$, με την αύξηση δε του ποσοστού του ακετονιτριλίου αυξάνει η σημαντικότητα του όρου. Αντίθετα παρουσία ισοπροπανόλης ο όρος F^- δεν είναι στατιστικά σημαντικός, ενώ δεν παρατηρείται ομαλή συμπεριφορά ως προς τη σημαντικότητα με την αύξηση του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή. Οι καλύτερες συσχετίσεις λήφθηκαν παρουσία 15% ακετονιτριλίου και 5% ισοπροπανόλης αντίστοιχα, εξισώσεις (IIB-88) και (IIB-89):

$$\log k_{15}^{AGP}_{(ACN)} = 0,32(\pm 0,03)\log P - 0,74(\pm 0,03)F - 0,45(\pm 0,11) \quad (\text{IIB-88})$$

$n = 44, r = 0,908, r^2 = 0,825, s = 0,331, F = 102,45, |tF| = 5,86$

$$\log k_5^{AGP}_{(2-prop)} = 0,33(\pm 0,03)\log P - 0,46(\pm 0,14)F - 0,03(\pm 0,12) \quad (\text{IIB-89})$$

$n = 44, r = 0,880, r^2 = 0,775, s = 0,360, F = 75,12, |tF| = 3,37$

Η μη σημαντικότητα του όρου F^+ υποδηλώνει εξισορρόπηση της μείωσης της συγκράτησης λόγω πρωτονίωσης από την ανάπτυξη ηλεκτροστατικών δυνάμεων με τα όξινα κέντρα της α -όξινης γλυκοπρωτεΐνης, ενώ αντίστοιχη εξισορρόπηση δεν συμβαίνει με τις όξινες ενώσεις, ο ιονισμός των οποίων οδηγεί σε μείωση της συγκράτησης (αρνητικό πρόσημο του όρου F^-).

2.3.6 Σολβατοχρωμική ανάλυση

Για την περαιτέρω διερεύνηση των δυνάμεων που αναπτύσσονται κατά τη συγκράτηση των ενώσεων στη στατική φάση AGP πραγματοποιήθηκε σολβατοχρωμική ανάλυση των τιμών $\log k_w^{AGP}$ των υπό μελέτη ενώσεων. Προέκυψαν οι εξισώσεις (IIB-90) και (IIB-91), στις οποίες όλοι οι όροι εμφανίζονται στατιστικά σημαντικοί:

$$\log k_w^{AGP}_{(ACN)} = - 0,66(\pm 0,24)A - 0,75(\pm 0,27)B - 0,58(\pm 0,22)S + 0,72(\pm 0,24)E + 0,88(\pm 0,26)V - 0,41(\pm 0,38) \quad (\text{IIB-90})$$

$n = 44, r = 0,840, r^2 = 0,706, s = 0,482, F = 21,64$

$$\log k_w^{AGP}_{(2-prop)} = - 0,49(\pm 0,22)A - 0,85(\pm 0,25)B - 0,44(\pm 0,21)S + 0,68(\pm 0,22)E + 0,73(\pm 0,24)V - 0,33(\pm 0,35) \quad (\text{IIB-91})$$

$n = 44, r = 0,826, r^2 = 0,683, s = 0,445, F = 19,55$

Χαρακτηριστική διαφοροποίηση των εξισώσεων (IIB-90) και (IIB-91) από τις αντίστοιχες εξισώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για το σύστημα οκτανόλης νερού³⁰², τη χρωματογραφία IAM¹⁹⁰, αλλά και από την εξίσωση (IIB-64) για τη χρωματογραφία HSA που εξήχθη στην παρούσα διατριβή (βλ. §1.4.7) είναι η σημαντικότητα της οξύτητας σε δεσμούς υδρογόνου.

Επιπλέον οι εξισώσεις (ΠB-90) και (ΠB-91) δείχνουν την επίδραση του οργανικού τροποποιητή στη συγκράτηση AGP σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις που αναφέρονται στην παράγραφο 2.3.5. Διαπιστώνεται ότι παρουσία ισοπροπανόλης, εξίσωση (ΠB-91), η επίδραση της οξύτητας εμφανίζεται μειωμένη και η επίδραση της βασικότητας αυξημένη σε σχέση με την εξίσωση (ΠB-90) που λαμβάνεται για το ακετονιτρίλιο. Η στατιστική σημαντικότητα των όρων A και B εξαρτάται επίσης από το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή. Διαπιστώθηκε ότι η $t|A|$ μειώνεται με την αύξηση του διαλύτη, με αποτέλεσμα ο όρος A να μην είναι στατιστικά σημαντικός ήδη σε ποσοστά 5% ισοπροπανόλης και 10% ακετονιτρίλιου αντίστοιχα. Ο λόγος B/V ο οποίος θεωρείται χαρακτηριστική σταθερά σε μια σολβατοχρωμική εξίσωση διαφοροποιείται επίσης ανάλογα με τη φύση του οργανικού τροποποιητή και λαμβάνει τις τιμές είναι 0,85 και 1,16 για το ακετονιτρίλιο και την ισοπροπανόλη αντίστοιχα.

Αν και παρατηρείται γενικά ισχυρότερη συγγένεια της α-όξινης-γλυκοπρωτεΐνης με τις βασικές ενώσεις, εισαγωγή του ποσοστού της πρωτονιωμένης μορφής F^+ στις εξισώσεις (ΠB-90) και (ΠB-91) δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Ως εκ τούτου η ανάπτυξη των ηλεκτροστατικών δυνάμεων με τα όξινα κέντρα της στατικής φάσης φαίνεται ότι είναι λιγότερο ισχυρή συγκριτικά με τις αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις κατά τη συγκράτηση των όξινων ενώσεων στη στατική φάση HSA όπου το ποσοστό της ανιονικής μορφής F^- συμβάλλει θετικά, βλ. εξίσωση (ΠB-64) και αντισταθμίζεται από την επίδραση του βαθμού ιονισμού.

Στον Πίνακα ΠB-23 συνοψίζονται οι συντελεστές παλινδρόμησης των σολβατοχρωμικών εξισώσεων που εξήχθησαν στην παρούσα διατριβή για την πρωτεϊνική σύνδεση και τη συγκράτηση στις στατικές φάσεις HSA και AGP σε σύγκριση με τους συντελεστές των αντίστοιχων εξισώσεων για την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού και τη συγκράτηση στη στατική φάση IAM που έχουν προκύψει από προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριο και αφορούν σε ανάλογη σειρά φαρμακευτικών ενώσεων.

Πίνακας ΠΙΒ-23. Συντελεστές παλινδρόμησης των σολβατοχρωμικών εξισώσεων για τα διαφορετικά συστήματα.

	n	A	B	S	E	V	F ⁺	F ⁻
logP	613 ^(a)	-	-3,46	-1,05	0,56	3,84	-	-
logP	55 ^(b)	-	-2,65	-1,00	1,05	2,70	-	-
logD _{7,4}	58 ^(b)	-	-2,23	-0,66	1,03	2,77	-1,70	-2,10
logk _w ^{IAM}	57 ^(b)	-	-1,56	-0,54	1,02	1,64	-	-1,03
logK _{HSA}	59	-	-1,06	-	0,39	1,08	-	0,51
logk ₁₀ ^{HSA} (ACN)	59	-	-1,40	-	-	1,58	-0,28	0,49
logk _w ^{AGP} (ACN)	44	-0,66	-0,75	-0,58	0,72	0,88	-	-
logk _w ^{AGP} (2-prop)	44	-0,49	-0,85	-0,44	0,68	0,73	-	-

^(a) η εξίσωση που αναφέρεται στην επιλογή Absolv του λογισμικού πακέτου ADME Boxes 3.0, παραπομπή (73), ^(b) από την παραπομπή (278).

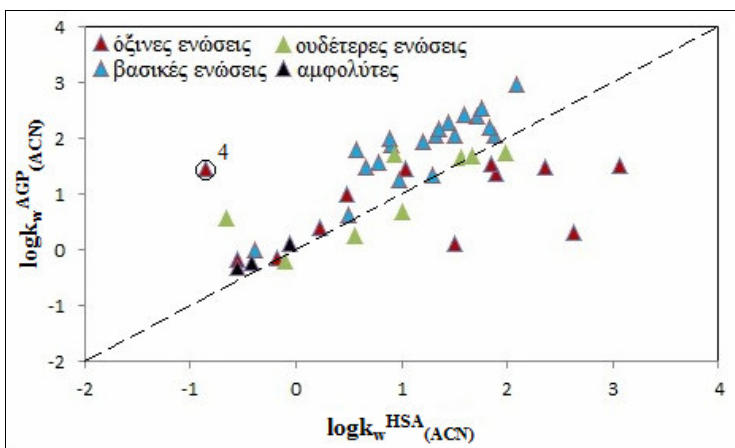
Όπως φαίνεται από τον Πίνακα ΠΙΒ-23 τα ποσοστά ιονισμού F⁺ και F⁻ είναι στατιστικά σημαντικά στην ανάλυση των τιμών logD εκφράζοντας την επίδραση του ιονισμού. Στη συγκράτηση IAM η επίδραση της πρωτονίωσης αντισταθμίζεται από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα να είναι στατιστικά σημαντικός μόνο ο όρος F⁻, ενώ τόσο στην πρωτεϊνική σύνδεση όσο και στη συγκράτηση στη στήλη HSA ο όρος F⁻ εμφανίζει θετικό πρόσημο αντανακλώντας τις πολύ ισχυρές αλληλεπιδράσεις των ανιόντων με τη στατική φάση. Η συγκράτηση AGP διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα συστήματα ως προς τη σημαντικότητα του όρου A, ενώ ο όγκος V έχει σημαντικά μικρότερο συντελεστή. Επιπλέον τα κλάσματα F⁺ και F⁻ δεν είναι στατιστικά σημαντικά είτε ως αποτέλεσμα αντιστάθμισης της επίδρασης του ιονισμού με τις ηλεκτροστατικές επιδράσεις ή/και λόγω μειωμένου ιονισμού στο περιβάλλον της στήλης.

3. Διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ των βιομημητικών χρωματογραφικών δεικτών HSA, AGP και IAM

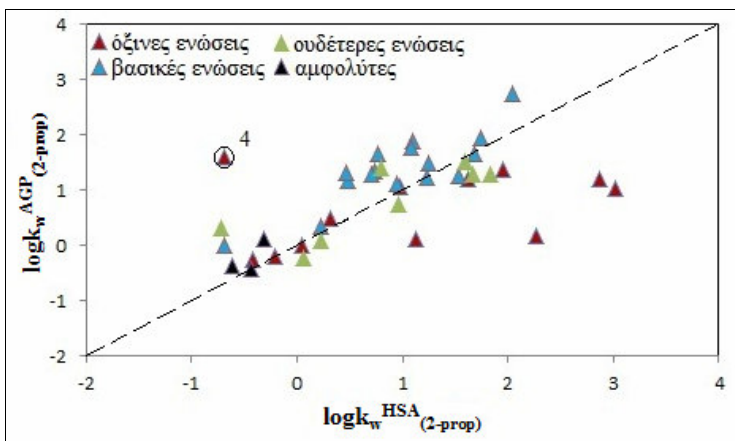
Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα διερευνήθηκαν οι επιμέρους σχέσεις μεταξύ των βιομημητικών χρωματογραφικών δεικτών διαχωρίζοντας τις ενώσεις με βάση τον οξεοβασικό τους χαρακτήρα.

3.1 Σχέση της χρωματογραφίας HSA με τη χρωματογραφία AGP

Στα Σχήματα ΠΒ-53 και ΠΒ-54 παρουσιάζονται οι γραφικές απεικονίσεις των χρωματογραφικών δεικτών που προέκυψαν από τις χρωματογραφίες HSA και AGP για το ακετονιτρίλιο και την ισοπροπανόλη αντίστοιχα. Η στικτή διαγώνια γραμμή αντιστοιχεί στην ιδανική 1:1 συσχέτιση.



Σχήμα ΠΒ-53. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP} (ACN)$ και $\log k_w^{HSA} (ACN)$.



Σχήμα ΠΒ-54. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP} (2-prop)$ και $\log k_w^{HSA} (2-prop)$.

Όπως φαίνεται στα Σχήματα ΠΒ-53 και ΠΒ-54, οι όξινες ενώσεις έχουν σαφώς υψηλότερη συγκράτηση στη στήλη HSA και βρίσκονται στην πλειοψηφία τους κάτω από τη στικτή γραμμή με εξαίρεση την καπτοπρίλη (No 4) η οποία εμφάνισε αποκλίνουσα συμπεριφορά. Οι βασικές ενώσεις με ελαφρώς ισχυρότερη συγκράτηση

στη στήλη AGP βρίσκονται στην πλειοψηφία τους πάνω από τη στικτή γραμμή, ενώ για τις ουδέτερες ενώσεις πρακτικά ισχύει 1:1 συσχέτιση. Με βάση τα ανωτέρω εισήχθησαν οι όροι F^+ και F^- στη σχέση μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών HSA και AGP. Στη στατιστική ανάλυση δεν συμπεριλήφθηκε η καπτοπρίλη (No 4). Ελήφθησαν οι εξισώσεις (ΠΒ-92) και (ΠΒ-93):

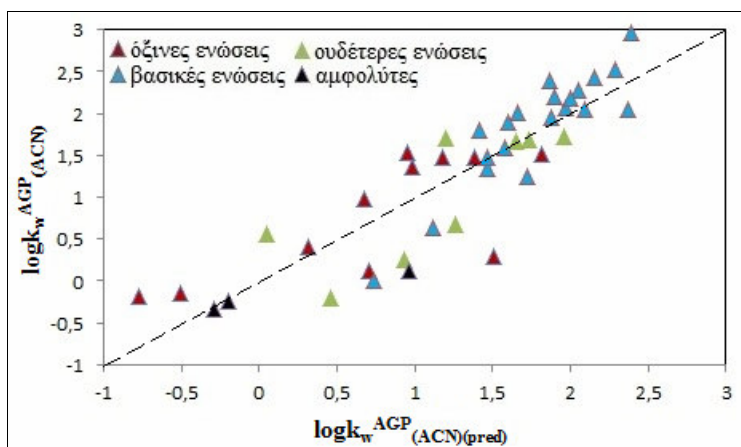
$$\log k_w^{AGP}_{(ACN)} = 0,72(\pm 0,08)\log k_w^{HSA}_{(ACN)} + 0,49(\pm 0,16)F^+ - 0,91(\pm 0,18)F^- + 0,53(\pm 0,16) \quad (\text{ΠΒ-92})$$

$$n = 42, r = 0,863, r^2 = 0,745, t|F^+|=3,02, t|F^-|=5,06, s = 0,459, F = 40,95$$

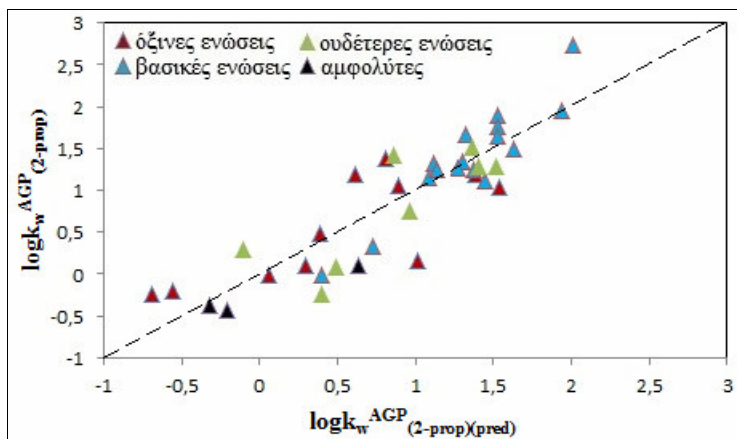
$$\log k_w^{AGP}_{(2-prop)} = 0,63(\pm 0,07)\log k_w^{HSA}_{(2-prop)} + 0,49(\pm 0,15)F^+ - 0,78(\pm 0,15)F^- + 0,36(\pm 0,13) \quad (\text{ΠΒ-93})$$

$$n = 38, r = 0,870, r^2 = 0,757, t|F^+|=3,38, t|F^-|=5,18, s = 0,381, F = 39,52$$

Οι εξισώσεις (ΠΒ-92) και (ΠΒ-93) εμφανίζουν σαφώς βελτιωμένα στατιστικά στοιχεία σε σχέση με τις απευθείας συσχετίσεις απουσία των όρων F^+ και F^- , οι οποίες είχαν τιμές $r=0,667$ και $0,659$ αντίστοιχα. Ο όρος F^+ εμφανίζει θετικό συντελεστή και τιμές $|t|$ 3,02 και 3,38 αντίστοιχα και ο όρος F^- αρνητικό πρόσημο και τιμές $|t|$ 5,06 και 5,18 αντίστοιχα. Στα Σχήματα ΠΒ-55 και ΠΒ-56 απεικονίζονται οι σχέσεις μεταξύ των πειραματικών και των προβλεπόμενων με βάση τις εξισώσεις (ΠΒ-92) και (ΠΒ-93) τιμών $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$.



Σχήμα ΠΒ-55. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$ και $\log k_w^{AGP}_{(ACN)(pred)}$.

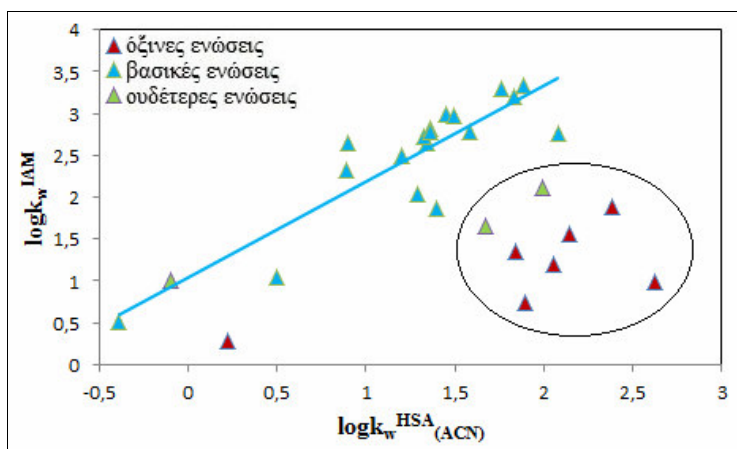


Σχήμα ΠΒ-56. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP(2-prop)}$ και $\log k_w^{AGP(2-prop)(pred)}$.

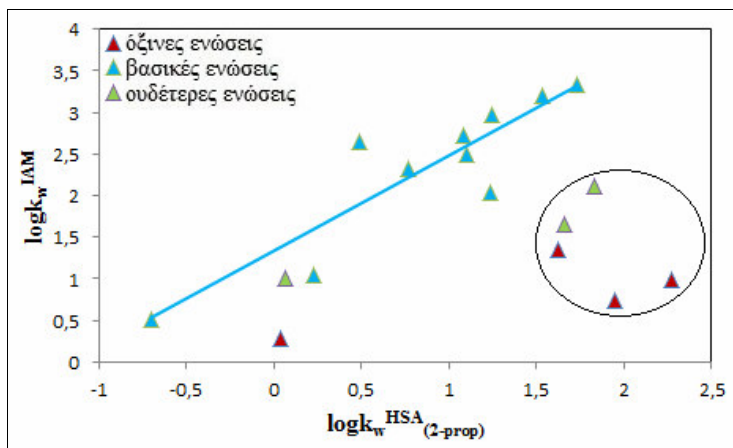
3.2 Σύγκριση της συγκράτησης στις στήλες HSA και AGP με τη συγκράτηση στη στήλη IAM

Για τη σύγκριση της συγκράτησης στις στατικές φάσεις IAM και HSA αναλύθηκαν 28 ενώσεις (18 βασικές, 7 όξιμες και 3 ουδέτερες) στην περίπτωση του ακετονιτριλίου και 17 ενώσεις (10 βασικές, 4 όξιμες και 3 ουδέτερες) στην περίπτωση της ισοπροπανόλης (Πίνακες ΠΒ-1, ΠΒ-16 και ΠΒ-17).

Οι γραφικές απεικονίσεις των χρωματογραφικών δεικτών IAM ως προς τους δείκτες HSA που προσδιορίστηκαν παρουσία ακετονιτριλίου και ισοπροπανόλης αντίστοιχα παρουσιάζονται στα Σχήματα ΠΒ-57 και ΠΒ-58.



Σχήμα ΠΒ-57. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{IAM}$ και $\log k_w^{HSA(ACN)}$.



Σχήμα ΠΒ-58. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{IAM}$ και $\log k_w^{HSA(2-prop)}$.

Στα Σχήματα ΠΒ-57 και ΠΒ-58 παρατηρείται ότι οι περισσότερο υδρόφοβες όξινες και ουδέτερες ενώσεις ($\log P > 1,5$) -σημειωμένες με κύκλο- διαφοροποιούνται από τις βασικές ενώσεις και εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη συγκράτηση στη στήλη HSA. Το αντίθετο παρατηρείται για τις βασικές ενώσεις οι οποίες συγκρατούνται πολύ ισχυρότερα στη στήλη IAM. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις χρησιμοποιήθηκαν τα μοριακά κλάσματα F^+ και F^- για την εξαγωγή των εξισώσεων (ΠΒ-94) και (ΠΒ-95), οι οποίες εμφανίζουν σχετικά ικανοποιητικά στατιστικά στοιχεία. Τα πρόσημα των όρων F^+ και F^- αντιστοιχούν στις αναμενόμενες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

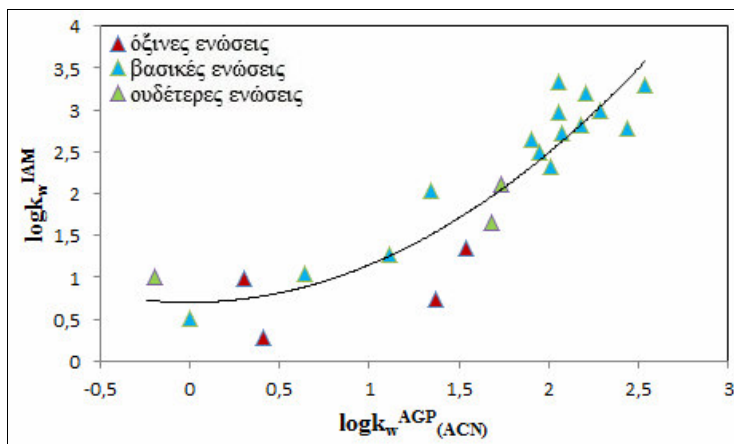
$$\log k_w^{IAM} = 0,98(\pm 0,13)\log k_w^{HSA(ACN)} + 0,65(\pm 0,21)F^+ - 1,58(\pm 0,26)F^- + 0,73(\pm 0,23) \quad (\text{ΠΒ-94})$$

$n = 28, r = 0,885, r^2 = 0,784, s = 0,420, F = 33,65, t|F^+|=3,11, t|F^-|=6,16$

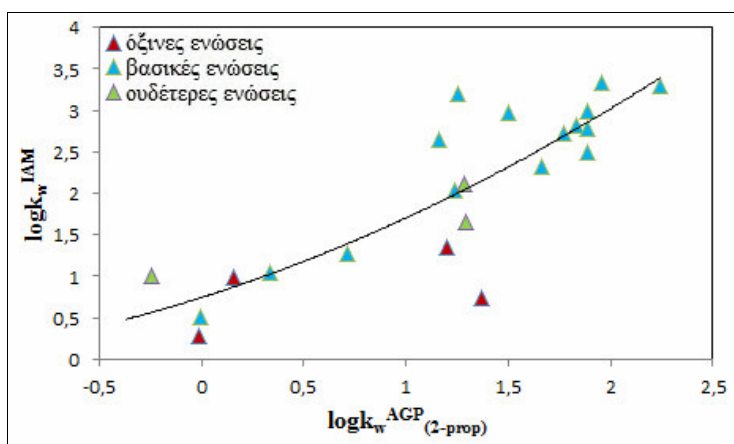
$$\log k_w^{IAM} = 0,94(\pm 0,16)\log k_w^{HSA(2-prop)} + 0,89(\pm 0,29)F^+ - 1,57(\pm 0,37)F^- + 0,78(\pm 0,26) \quad (\text{ΠΒ-95})$$

$n = 17, r = 0,876, r^2 = 0,768, s = 0,473, F = 18,63, t|F^+|=3,13, t|F^-|=4,28$

Για τη σύγκριση της συγκράτησης στις στατικές φάσεις IAM και AGP αναλύθηκαν 22 ενώσεις (15 βασικές, 4 όξινες και 3 ουδέτερες) (Πίνακες ΠΒ-1 και ΠΒ-21). Στα Σχήματα ΠΒ-59 και ΠΒ-60 παρουσιάζονται οι γραφικές απεικονίσεις των χρωματογραφικών δεικτών IAM ως προς τους δείκτες AGP που προσδιορίστηκαν παρουσία ακετονιτριλίου και ισοπροπανόλης αντίστοιχα.



Σχήμα ΠΙΒ-59. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{IAM}$ και $\log k_w^{AGP(ACN)}$.



Σχήμα ΠΙΒ-60. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{IAM}$ και $\log k_w^{AGP(2-prop)}$.

Η προαναφερθείσα επίδραση του οργανικού τροποποιητή στη συγκράτηση στη στήλη AGP είναι εμφανής στα Σχήματα ΠΙΒ-59 και ΠΙΒ-60. Οι τιμές $\log k_w^{AGP(ACN)}$ ακολουθούν σχέση υπερβολής ως προς τις τιμές $\log k_w^{IAM}$ σύμφωνα με την οποία η συγκράτηση στη στήλη AGP των πολικών ($\log P < 1$) και όξινων ενώσεων είναι ανεξάρτητη της συγκράτησης στη στήλη IAM εντοπιζόμενες στο πλατώ όπου $\log k_w^{IAM} < 1$. Αντίθετα για περισσότερο υδρόφοβες ουδέτερες και βασικές ενώσεις με ισχυρή συγκράτηση στη στήλη IAM ακολουθείται γραμμική σχέση ως προς τη συγκράτηση στη στήλη AGP. Η αντίστοιχη εικόνα δεν είναι σαφής για τις τιμές $\log k_w^{AGP(2-prop)}$.

Η διαφοροποίηση των όξινων ενώσεων στη σχέση $\log k_w^{IAM} / \log k_w^{AGP}$ εκφράζεται με την εισαγωγή του όρου F στις αντίστοιχες εξισώσεις (ΠΙΒ-96) και (ΠΙΒ-97).

Δεδομένου ωστόσο ότι τα δεδομένα είναι περιορισμένα οι εξισώσεις (ΠB-96) και (ΠB-97) χρήζουν περαιτέρω επικύρωσης.

$$\log k_w^{\text{IAM}} = 0,97(\pm 0,11)\log k_w^{\text{AGP}}_{(\text{ACN})} - 0,75(\pm 0,26)F^- + 0,66(\pm 0,21) \quad (\text{ΠB-96})$$

$$n = 22, r = 0,913, r^2 = 0,833, s = 0,401, F = 53,38, t|F| = 2,86$$

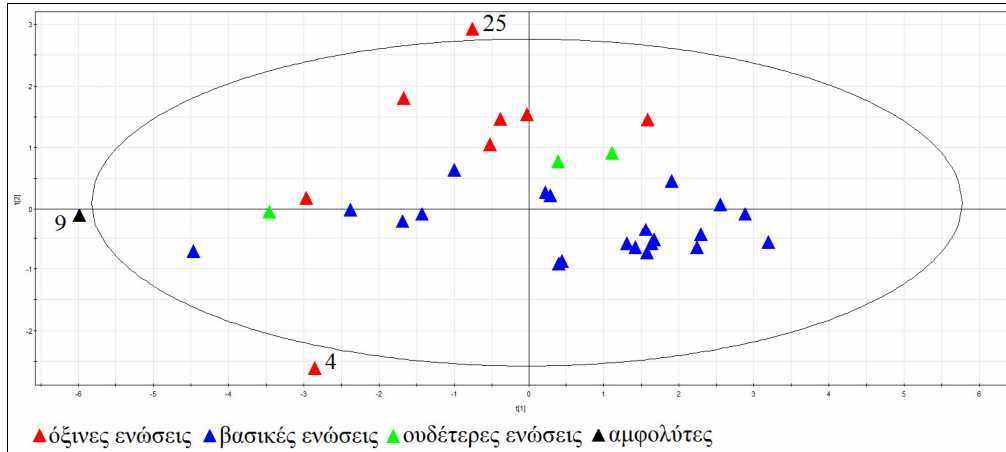
$$\log k_w^{\text{IAM}} = 1,02(\pm 0,14)\log k_w^{\text{AGP}}_{(2\text{-prop})} - 0,89(\pm 0,29)F^- + 0,94(\pm 0,21) \quad (\text{ΠB-97})$$

$$n = 22, r = 0,884, r^2 = 0,782, s = 0,458, F = 38,53, t|F| = 3,04$$

3.3 Εφαρμογή Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών (PCA) στους βιομημητικούς χρωματογραφικούς δείκτες και στις παραμέτρους λιποφιλίας

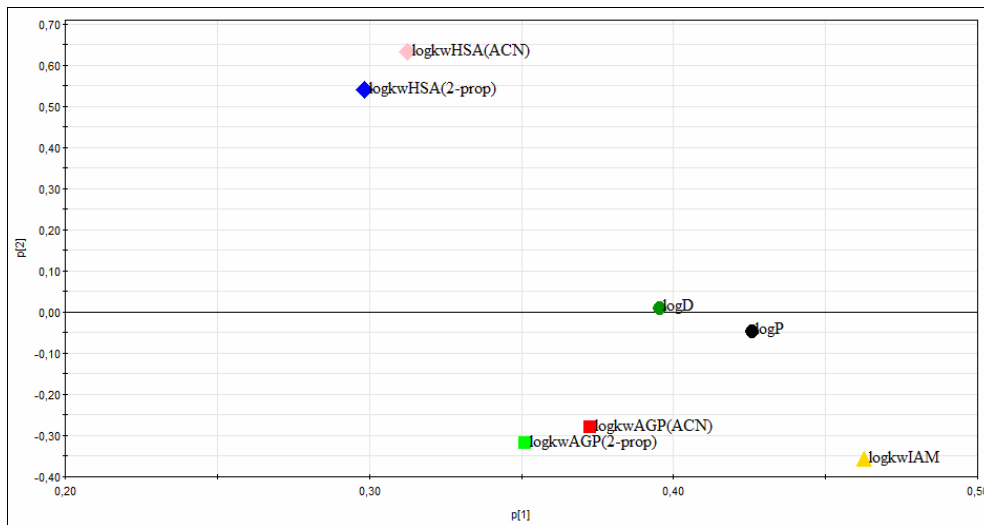
Για την περαιτέρω διερεύνηση των ομοιοτήτων/ανομοιοτήτων μεταξύ των βιομημητικών χρωματογραφικών δεικτών και των παραμέτρων λιποφιλίας εφαρμόστηκε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών. Οι τιμές συγκράτησης στις τρεις στατικές φάσεις και οι τιμές logP και logD χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του Πίνακα των μεταβλητών X. Ο Πίνακας περιλάμβανε 33 ενώσεις για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμες τιμές για τουλάχιστον δυο βιομημητικές στατικές φάσεις. Στην περίπτωση της στατικής φάσης IAM υπήρχε 6,1% έλλειψη τιμών, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τις τιμές $\log k_w^{\text{AGP}}$, $\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$ και $\log k_w^{\text{HSA}}_{(2\text{-prop})}$ ήταν 33,3%, 15,2% και 48,5%. Εξήχθη μοντέλο με τρεις κύριες συνιστώσες, συνολικό συντελεστή συσχέτισης $R^2=0,953$ και διασταυρούμενο συντελεστή συσχέτισης $Q^2=0,769$. Η πρώτη κύρια συνιστώσα ερμηνεύει το 74,3% της διακύμανσης, η δεύτερη το 15% και η τρίτη ~6%. Στο Σχήμα ΠB-61 απεικονίζεται το διάγραμμα των συντεταγμένων επί των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών. Οι όξινες, βασικές, ουδέτερες και αμφολυτικές ενώσεις επισημαίνονται με διαφορετικά χρώματα.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
 Β. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ



Σχήμα II-B-61. Διάγραμμα των συντεταγμένων των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών.

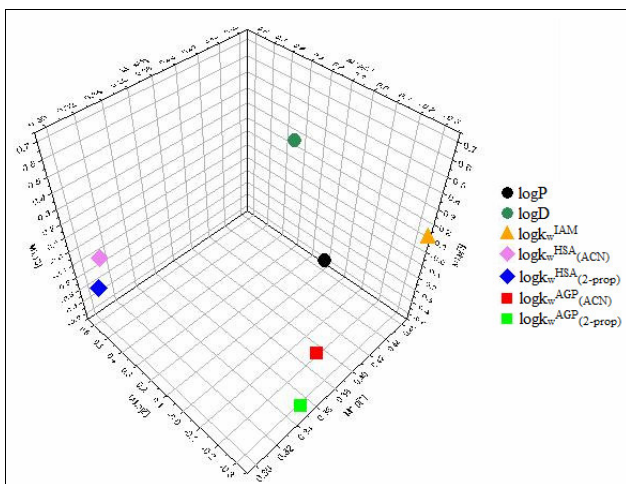
Στο Σχήμα II-B-61 διακρίνεται ένας σχετικός διαχωρισμός των βασικών και όξινων ενώσεων με τις τρεις ουδέτερες ενώσεις ανάμεσα. Η αμφολυτική κεφαζιδίμη (No 9) βρίσκεται χωριστά έξω από την έλλειψη Hotelling T2. Η καπτοπρίλη (No 4) και το ναπροξένιο (No 25) εμφανίζουν επίσης έκτροπες τιμές. Για τη διερεύνηση των ομοιοτήτων/ανομοιοτήτων μεταξύ των μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το διάγραμμα των φορτίων των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών, Σχήμα II-B-62:



Σχήμα II-B-62. Διάγραμμα των φορτίων των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα II-B-62 οι μεταβλητές $\log k_w^{IAM}$ και $\log k_w^{AGP}$ ισοαπέχουν από τις παραμέτρους λιποφιλίας $\log P$ και $\log D$ εμφανίζοντας παρόμοιες τιμές

φορτίων στη δεύτερη κύρια συνιστώσα (εύρος φορτίων $p[2]$: -0,25 έως -0,35), αλλά σημαντικές διαφορές στις τιμές των φορτίων στην πρώτη κύρια συνιστώσα. Οι μεταβλητές $\log k_w^{HSA}$ βρίσκονται απομακρυσμένες σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταβλητές, με διαφοροποιημένες τιμές φορτίων τόσο στην πρώτη όσο και στη δεύτερη συνιστώσα. Τα συμπεράσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα χαρακτηριστικά των στηλών IAM και AGP οι οποίες εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια για βασικές ενώσεις, σε αντίθεση με τη στήλη HSA όπου συνδέονται ισχυρότερα όξινες ενώσεις. Για την πληρέστερη απεικόνιση των ομοιοτήτων/ανομοιοτήτων των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το τρισδιάστατο διάγραμμα των φορτίων και για τις τρεις κύριες συνιστώσες, Σχήμα ΠΒ-63:



Σχήμα ΠΒ-63. Τρισδιάστατο διάγραμμα των φορτίων των τριών κυρίων συνιστωσών.

Στο Σχήμα ΠΒ-63 είναι εμφανέστερη η επίδραση του οργανικού τροποποιητή στη στατική φάση AGP καθώς και η διαφοροποίηση των τιμών $\log P$ και $\log D$.

4. Συμπεράσματα

Η μελέτη της συγκράτησης των δομικά μη συγγενών φαρμακευτικών μορίων στη στατική φάση HSA κατέδειξε τις ισοκρατικές τιμές $\log k_{10}^{HSA(ACN)}$ ως τις πλέον κατάλληλες για την εκτίμηση του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης στην ανθρώπινη αλβουμίνη του πλάσματος. Η εξίσωση αναφοράς που εξήχθη και επικυρώθηκε επιτυχώς με σειρά ελέγχου έχει ως βασικό πλεονέκτημα το ότι απαιτεί μία μόνο

μέτρηση με αποτέλεσμα την υψηλή απόδοση της μεθόδου, ενώ η παρουσία ακετονιτριλίου στην κινητή φάση επιτρέπει τη μέτρηση ενώσεων οι οποίες συγκρατούνται ισχυρά στη στήλη και δεν μπορούν να μετρηθούν παρουσία 100% ρυθμιστικού διαλύματος. Τιμές $\log k_{10}^{\text{HSA}}(\text{ACN})$ πάνω από 1,85 οδηγούν σε τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης πρακτικά 100%. Ανάλυση της συγκράτησης κατέδειξε ότι πέραν του μηχανισμού κατανομής σημαντικό ρόλο παίζουν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ανιονικών μορφών και των βασικών κέντρων στην επιφάνεια HSA.

Λιγότερο ενθαρρυντικά ήταν τα αποτελέσματα της μελέτης των διαφόρων χρωματογραφικών συνθηκών στη στήλη AGP όσον αφορά στην προσομοίωση της σύνδεσης με την α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος. Η επίδραση του οργανικού τροποποιητή διαπιστώθηκε ότι διαφοροποιεί σημαντικά τη συγκράτηση, διαφοροποίηση που εκφράζεται και κατά τις συσχετίσεις με τις σταθερές σύνδεσης στις γενετικές παραλλαγές της α-όξινης γλυκοπρωτεΐνης.

Κατά τη σύγκριση των βιομιμητικών δεικτών HSA και AGP διαπιστώθηκε η διαφορετική συμβολή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στη συγκράτηση, σε συμφωνία με την αναμενόμενη συμβολή στις αντίστοιχες πρωτεΐνες.

Σημαντική διαφοροποίηση της χρωματογραφίας AGP συγκριτικά με τη χρωματογραφία HSA, αλλά και με τη χρωματογραφία IAM και το σύστημα οκτανόλης-νερού κατέδειξε η σολβατοχρωμική ανάλυση αναδεικνύοντας την οξύτητα σε δεσμούς υδρογόνου ως σημαντική παράμετρο, σε αντίθεση με τη μη σημαντικότητα της παραμέτρου αυτής στα υπόλοιπα συστήματα. Από την άλλη κατά την Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών περισσότερο απομακρυσμένοι βρέθηκαν οι δείκτες HSA γεγονός που θα πρέπει να αποδοθεί στο ότι τελικά στην ταξινόμηση των συστημάτων υπερισχύει το κοινό χαρακτηριστικό της συγγένειας των στηλών AGP και IAM για τις βασικές ενώσεις.

Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HSA ΚΑΙ AGP ΟΞΙΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ

1.1 Εισαγωγή

Διερευνήθηκε η συγκράτηση των παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος στις βιομιμητικές στήλες συγγενείας HSA και AGP. Η σειρά των ενώσεων επεκτάθηκε και στα παράγωγα της διφθοροφαινόλης (σειρά ενώσεων II). Χρησιμοποιήθηκαν οι χρωματογραφικές συνθήκες που περιγράφονται στο Κεφάλαιο Β (§1.3.3 και 2.2.3).

Στη στατική φάση HSA η συγκράτηση προσδιορίστηκε σε pH 5,0 και 7,0 (όρια χρήσης της στήλης ως προς το pH) ώστε να διερευνηθεί η έκφραση του ιονισμού των ενώσεων στο περιβάλλον HSA.

Η χρωματογραφική διαδικασία και ο προσδιορισμός των ανηγμένων τιμών $\log k_w$ αναφέρθηκαν στην 1^η ενότητα (Κεφάλαιο Β, §2.1.4 και 2.15).

1.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Οι τιμές $\log k_w$ μαζί με τις κλίσεις S που προέκυψαν για όλες τις πειραματικές συνθήκες αναφέρονται στους Πίνακες ΠΒ-24 έως ΠΒ-26. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι συντελεστές συσχέτισης r των εξισώσεων είχαν τιμή υψηλότερη από 0,990. Τα σταθερά σφάλματα των τιμών $\log k_w$ και των κλίσεων S ήταν χαμηλότερα από $\pm 0,20$ και $\pm 2,03$ αντίστοιχα. Όλες οι ενώσεις εμφάνισαν γραμμική συμπεριφορά.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HSA ΚΑΙ AGP
ΟΞΙΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ

Πίνακας ΠΒ-24. Τιμές $\log k_w^{HSA[pH\ 5,0]}$ και κλίσεις S*.

No	$\log k_w^{HSA}_{(act)}$	$\log k_w^{HSA}_{(ACN)}$	Sx100	$\log k_w^{HSA}_{(2-prop)}$	Sx100
1	1,22	0,96	5,73	0,87	4,14
2	1,35	1,24	6,29	1,14	4,51
3	**	2,02	8,28	1,88	5,74
5	1,59	1,51	6,63	1,39	4,54
6	**	2,61	10,16	2,36	6,99
7	1,10	1,08	5,99	0,94	3,73
8	1,61	1,50	7,29	1,33	4,27
9	1,52	1,41	6,43	1,31	4,41
10	1,88	1,64	7,05	1,62	5,36
11	**	2,22	8,74	2,08	6,19
12	**	1,88	7,64	1,73	5,42
13	**	1,99	8,19	1,88	6,22
14	**	2,19	9,31	2,06	7,14
15	**	2,73	11,63	2,53	8,94
16	1,52	1,58	7,73	1,33	4,85
17	**	2,01	7,47	2,08	5,67
18	1,42	1,39	5,95	1,30	4,33
19	**	2,42	9,74	2,37	7,28
20	**	2,38	10,04	2,31	7,44
21	**	2,57	10,78	2,56	8,53
22	**	2,65	11,43	2,50	8,32
23	**	2,10	8,72	2,02	6,21
24	**	2,22	9,30	2,17	7,19
25	1,46	1,48	7,64	1,31	5,08
26	1,71	1,72	8,36	1,62	5,29
27	1,73	1,65	8,61	1,60	6,37

*δεν μετρήθηκαν τιμές για την ένωση 4 λόγω έλλειψης δείγματος.

**δεν προσδιορίστηκαν λόγω αυξημένης συγκράτησης.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HSA ΚΑΙ AGP
ΟΞΙΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ

Πίνακας ΠΒ-25. Τιμές $\log k_w^{\text{HSA}[\text{pH } 7,0]}$ και κλίσεις S*.

No	$\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{act})}$	$\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$	Sx100	$\log k_w^{\text{HSA}}_{(2\text{-prop})}$	Sx100
1	1,26	0,95	6,78	0,90	4,98
2	1,36	1,23	6,74	1,22	5,06
3	**	1,82	9,16	1,63	6,41
5	1,55	1,49	6,96	1,40	5,04
6	**	2,41	10,18	2,08	7,00
7	1,00	1,05	7,53	0,86	4,03
8	1,54	1,51	8,47	1,22	4,65
9	1,41	1,35	6,96	1,20	4,76
10	1,62	1,41	7,48	1,30	5,03
11	**	2,07	7,83	2,06	6,18
12	**	1,76	8,06	1,59	5,96
13	**	1,90	8,54	1,78	6,56
14	**	2,14	9,53	1,99	7,64
15	**	2,65	10,23	2,71	10,17
16	1,48	1,51	7,01	1,45	6,46
17	**	2,04	6,86	2,48	6,45
18	1,42	1,38	6,10	1,23	4,22
19	**	1,94	8,91	1,87	6,16
20	**	2,31	8,65	2,35	7,17
21	**	2,41	9,18	2,68	8,83
22	**	2,35	8,79	2,63	8,71
23	**	2,24	8,27	2,22	7,22
24	**	2,29	8,89	2,23	7,22
25	1,34	1,25	6,29	1,18	4,60
26	1,67	1,70	6,93	1,57	4,86
27	1,67	1,52	7,64	1,42	5,72

*δεν μετρήθηκαν τιμές για την ένωση 4 λόγω έλλειψης δείγματος.

**δεν προσδιορίστηκαν λόγω αυξημένης συγκράτησης.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HSA ΚΑΙ AGP
ΟΞΙΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ

Πίνακας ΠΒ-26. Τιμές $\log k_w^{AGP[pH\ 7,0]}$ και κλίσεις S*.

No	$\log k_w^{AGP}_{(act)}$	$\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$	Sx100	$\log k_w^{AGP}_{(2-prop)}$	Sx100
1	0,09	-0,08	10,78	0,08	12,14
2	0,36	0,21	9,21	0,15	7,50
3	1,04	0,89	10,76	0,47	5,93
5	0,37	0,11	8,85	0,14	6,67
6	1,24	1,18	9,40	1,04	8,55
7	-0,09	-0,34	3,35	-0,52	1,54
8	0,42	0,07	8,24	0,12	6,55
9	1,35	1,07	11,20	0,96	11,08
10	1,29	1,29	12,38	0,99	9,80
11	0,96	0,87	9,86	0,53	7,75
12	0,56	0,11	6,69	0,00	4,16
13	1,58	1,04	10,61	0,73	7,73
14	0,98	1,03	10,86	0,74	8,79
15	1,31	0,97	11,49	0,83	10,21
16	1,45	1,15	6,05	1,35	7,08
17	1,36	0,95	7,92	0,86	6,57
18	0,56	0,16	5,41	0,17	5,51
19	1,10	0,96	8,52	0,89	6,95
20	**	1,62	8,59	1,92	7,39
21	**	1,64	10,73	2,19	10,82
22	**	1,45	8,64	1,73	7,10
23	**	1,75	10,71	1,77	10,04
24	**	1,70	9,39	1,90	7,64
25	1,00	0,89	7,63	0,89	7,15
26	0,97	0,93	8,40	1,02	9,07
27	1,18	0,89	7,21	0,96	7,46

*δεν μετρήθηκαν τιμές για την ένωση 4 λόγω έλλειψης δείγματος.

**δεν προσδιορίστηκαν λόγω αυξημένης συγκράτησης.

1.3.1 Επίδραση του οργανικού τροποποιητή

Εξετάστηκε η επίδραση του οργανικού τροποποιητή στις ανηγμένες τιμές της συγκράτησης στη στήλη HSA και AGP. Στον Πίνακα ΠΒ-27 εμφανίζονται οι διαφορές μεταξύ των τιμών $\log k_{w(ACN)}$ και $\log k_{w(2-prop)}$ για όλες τις πειραματικές συνθήκες.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HSA ΚΑΙ AGP
ΟΞΙΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ

Πίνακας ΠΒ-27. Διαφορές $\log k_{w(ACN)} - \log k_{w(2-prop)}$.

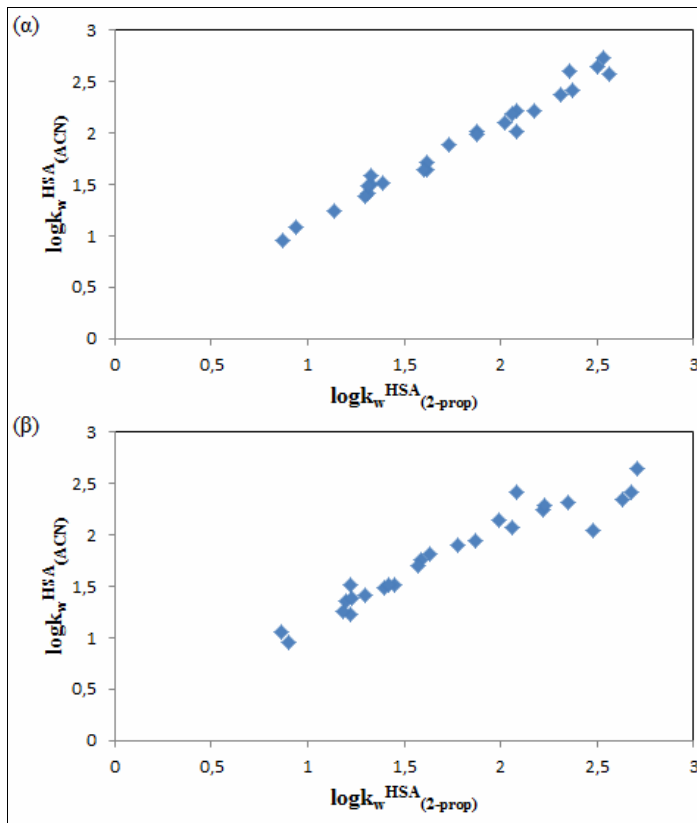
No	$\Delta^{HSA\ pH\ 5,0}$	$\Delta^{HSA\ pH\ 7,0}$	$\Delta^{AGP\ pH\ 7,0}$
1	0,09	0,05	-0,16
2	0,10	0,01	0,06
3	0,14	0,19	0,42
5	0,12	0,09	-0,03
6	0,25	0,33	0,14
7	0,14	0,19	0,18
8	0,17	0,29	-0,05
9	0,10	0,15	0,11
10	0,02	0,11	0,30
11	0,14	0,01	0,34
12	0,15	0,19	0,11
13	0,11	0,12	0,31
14	0,15	0,15	0,29
15	0,20	-0,05	0,14
16	0,25	0,06	-0,20
17	-0,07	-0,44	0,09
18	0,09	0,15	-0,01
19	0,05	0,07	0,98
20	0,07	-0,04	-0,30
21	0,01	-0,27	-0,55
22	0,15	-0,28	-0,28
23	0,08	0,02	-0,02
24	0,05	0,06	-0,20
25	0,17	0,07	0,00
26	0,10	0,13	-0,09
27	0,05	0,10	-0,07

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων οι διαφορές στις τιμές είναι <0,3. Μεγαλύτερες διαφορές εμφανίστηκαν στις ενώσεις 10, 11, 17, 20 και 21 (επισημαίνονται με μαύρα). Οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών $\log k_{w(ACN)}$ και $\log k_{w(2-prop)}$ παρουσιάζονται στον Πίνακα ΠΒ-28. Για τη χρωματογραφία HSA σε pH 5,0 λαμβάνεται 1:1 συσχέτιση, ωστόσο σε pH 7,0 οι κλίσεις είναι μικρότερες της μονάδας.

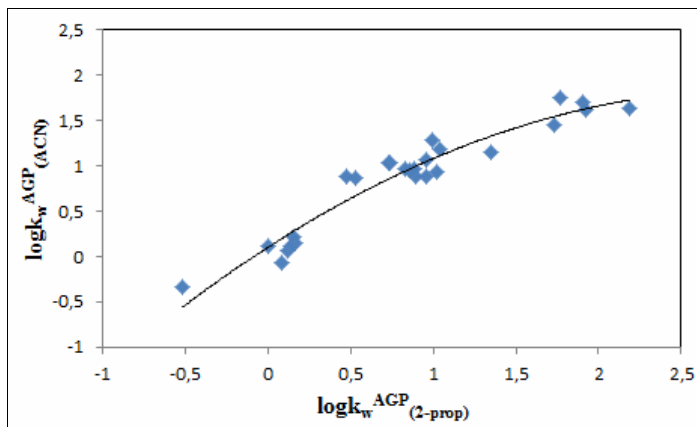
Πίνακας ΠΒ-28. Συσχετίσεις μεταξύ $\log k_{w(ACN)}/\log k_{w(2-prop)}$ (n=26).

$\log k_{w(ACN)} = a \log k_{w(2-prop)} + b$						
	a	b	r	s	F	εξ.
HSA pH 5,0	0,98(±0,03)	0,14(±0,05)	0,990	0,071	1230,9	(ΠΒ-98)
HSA pH 7,0	0,81(±0,05)	0,38(±0,09)	0,960	0,135	279,66	(ΠΒ-99)
AGP pH 7,0	0,82(±0,06)	0,18(±0,06)	0,947	0,190	210,64	(ΠΒ-100)

Οι αντίστοιχες απεικονίσεις παρουσιάζονται στα Σχήματα ΠΒ-64 και ΠΒ-65: Παρά τον καλό συντελεστή συσχέτισης της εξίσωσης (ΠΒ-100), η απεικόνιση των τιμών $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$ -ως προς τις τιμές $\log k_w^{AGP}_{(2-prop)}$ εμφανίζει τάση για σχέση υπερβολής (Σχήμα ΠΒ-65).



Σχήμα ΠΒ-64. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{HSA}_{(ACN)}$ και $\log k_w^{HSA}_{(2-prop)}$: α) pH 5,0, β) pH 7,0.



Σχήμα ΠΒ-65. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$ και $\log k_w^{AGP}_{(2-prop)}$.

1.3.2 Σχέση μεταξύ ανηγμένων τιμών $\log k_w$ και τιμών $\log k_{w(\text{act})}$

Εξετάστηκε η συνέπεια μεταξύ των ανηγμένων τιμών $\log k_w$ και των τιμών που προέκυψαν χρησιμοποιώντας 100% ρυθμιστικό διάλυμα για τις ενώσεις οι οποίες μπορούσαν να μετρηθούν χωρίς τη χρήση οργανικού τροποποιητή. Στον Πίνακα ΠΙΒ-29 εμφανίζονται οι διαφορές των άμεσων τιμών $\log k_{w(\text{act})}$ από τις ανηγμένες τιμές $\log k_w$.

Πίνακας ΠΙΒ-29. Διαφορές $\log k_{w(\text{act})} - \log k_w$.

No	HSA pH 5,0		HSA pH 7,0		AGP pH 7,0	
	$\Delta_{(\text{ACN})}$	$\Delta_{(2\text{-prop})}$	$\Delta_{(\text{ACN})}$	$\Delta_{(2\text{-prop})}$	$\Delta_{(\text{ACN})}$	$\Delta_{(2\text{-prop})}$
1	0,26	0,35	0,31	0,36	0,17	0,01
2	0,11	0,21	0,13	0,14	0,15	0,21
3					0,15	0,57
5	0,08	0,20	0,06	0,15	0,26	0,23
6					0,06	0,20
7	0,02	0,16	-0,05	0,14	0,25	0,43
8	0,11	0,28	0,03	0,32	0,35	0,30
9	0,11	0,21	0,06	0,21	0,28	0,39
10	0,24	0,26	0,21	0,32	0,00	0,30
11					0,09	0,43
12					0,45	0,56
13					0,54	0,85
14					-0,05	0,24
15					0,34	0,48
16	-0,06	0,19	-0,03	0,03	0,30	0,10
17					0,41	0,50
18	0,03	0,12	0,04	0,19	0,40	0,39
19					0,14	0,21
20						
21						
22						
23						
24						
25	-0,02	0,15	0,09	0,16	0,11	0,11
26	-0,01	0,09	-0,03	0,10	0,04	-0,05
27	0,08	0,13	0,15	0,25	0,29	0,22

Οι ανηγμένες τιμές εμφανίζονται στις περισσότερες περιπτώσεις ελαφρώς υπερτιμημένες. Οι διαφορές είναι σημαντικότερες στη χρωματογραφία AGP ως αποτέλεσμα της μεγαλύτερης επίδρασης του οργανικού τροποποιητή στην τελική διαμόρφωση της στατικής φάσης.

Οι συσχετίσεις άμεσων-ανηγμένων τιμών εμφανίζουν μέτρια στατιστικά στοιχεία με κλίση ελαφρώς μικρότερη της μονάδας, εξισώσεις (ΠΒ-101) έως (ΠΒ-106), Πίνακας ΠΒ-30.

Πίνακας ΠΒ-30. Συσχετίσεις μεταξύ $\log k_{w(\text{act})}/\log k_w$ (n=21).

$\log k_{w(\text{act})} = a \log k_{w(I)} + b$							
	(I)	a	b	r	s	F	εξ.
HSA pH 5,0	(ACN)	0,87(±0,13)	0,27(±0,18)	0,910	0,096	48,36	(ΠΒ-101)
	(2-prop)	0,87(±0,09)	0,37(±0,12)	0,952	0,071	96,77	(ΠΒ-102)
HSA pH 7,0	(ACN)	0,78(±0,14)	0,38(±0,20)	0,868	0,099	30,63	(ΠΒ-103)
	(2-prop)	0,81(±0,14)	0,44(±0,17)	0,883	0,094	35,35	(ΠΒ-104)
AGP pH 7,0	(ACN)	0,91(±0,07)	0,29(±0,06)	0,946	0,156	162,65	(ΠΒ-105)
	(2-prop)	0,91(±0,10)	0,37(±0,08)	0,899	0,212	80,406	(ΠΒ-106)

1.3.3 Σχέση μεταξύ τιμών $\log k_w^{\text{HSA}}$, $\log k_w^{\text{AGP}}$ και κλίσεων S

Για τις δομικά διαφορετικές φαρμακευτικές ενώσεις αναφέρεται μειωμένη γραμμικότητα μεταξύ των τιμών $\log k_w^{\text{HSA}}$ και των αντίστοιχων κλίσεων S, η οποία αποδόθηκε στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται στην περίπτωση των ανιόντων (βλ. Κεφάλαιο A, §1.4.3). Αντίθετα για τα δομικά συγγενή παράγωγα του πυρρολίου διαπιστώθηκε υψηλή γραμμικότητα μεταξύ των τιμών $\log k_w^{\text{HSA}}$ και S, δεδομένου ότι η παρουσία όξινης ομάδας σε όλες τις ενώσεις καθορίζει την ομοιογένεια του μηχανισμού συγκράτησης. Οι συσχετίσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα ΠΒ-31, εξισώσεις (ΠΒ-107) έως (ΠΒ-110). Αντιθέτως, η γραμμικότητα μεταξύ $\log k_w^{\text{AGP}}$ και S παρά τη δομική συγγένεια των ενώσεων διατηρείται εξαιρετικά χαμηλή με συντελεστές συσχέτισης <0,5 σε συμφωνία με την αντίστοιχη παρατήρηση για τις δομικά διαφορετικές ενώσεις (βλ. Κεφάλαιο B, §2.3.3). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι ο μηχανισμός συγκράτησης στη στήλη AGP είναι περισσότερο πολύπλοκος και απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

Πίνακας ΠΒ-31. Συσχετίσεις μεταξύ $\log k_w^{\text{HSA}}$ και κλίσεων S (n=26).

$\log k_w = aS + b$							
	(I)	a	b	r	s	F	εξ.
HSA pH 5,0	(ACN)	0,28(±0,02)	-0,45(±0,17)	0,946	0,166	203,43	(ΠΒ-107)
	(2-prop)	0,33(±0,02)	-0,16(±0,15)	0,941	0,175	185,86	(ΠΒ-108)
HSA pH 7,0	(ACN)	0,32(±0,05)	-0,77(±0,41)	0,794	0,292	40,91	(ΠΒ-109)
	(2-prop)	0,33(±0,03)	-0,30(±0,20)	0,903	0,244	106,33	(ΠΒ-110)

1.3.4 Επίδραση του ιονισμού στη χρωματογραφία HSA

Εξετάστηκε η επίδραση του ιονισμού στη συγκράτηση HSA για τα παράγωγα του πυρρολίου. Στον Πίνακα ΠΙΒ-32 παρουσιάζονται οι διαφορές $\log k_w^{HSA[pH\ 5,0]} - \log k_w^{HSA[pH\ 7,0]}$ για την περίπτωση του ακετονιτριλίου και της ισοπροπανόλης.

Πίνακας ΠΙΒ-32. Διαφορές $\log k_w^{HSA[pH\ 5,0]} - \log k_w^{HSA[pH\ 7,0]}$.

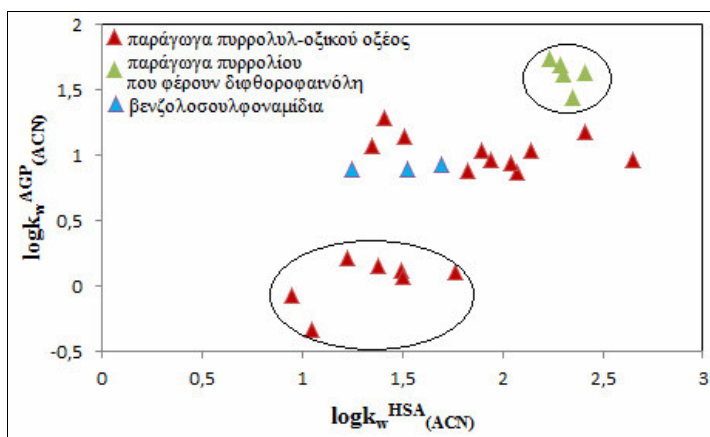
No	$\Delta_{(ACN)}$	$\Delta_{(2-prop)}$
1	0,01	-0,03
2	0,01	-0,08
3	0,20	0,25
5	0,02	0,00
6	0,20	0,28
7	0,03	0,08
8	0,01	0,11
9	0,06	0,11
10	0,23	0,32
11	0,15	0,02
12	0,12	0,14
13	0,09	0,10
14	0,05	0,07
15	0,08	-0,18
16	0,07	-0,12
17	-0,04	-0,40
18	0,01	0,07
19	0,48	0,49
20	0,07	-0,04
21	0,16	-0,12
22	0,30	-0,12
23	-0,14	-0,20
24	-0,07	-0,06
25	0,23	0,13
26	0,03	0,05
27	0,13	0,18

Παρόλο που οι ενώσεις εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς το βαθμό ιονισμού (ιδιαίτερα τα καρβοξυλικά οξέα) σε pH 5,0 και 7,0, στο περιβάλλον της στήλης δεν διαπιστώθηκε ανάλογη διαφοροποίηση. Η χαμηλή διηλεκτρική σταθερά στην επιφάνεια HSA πιθανόν οδηγεί σε μείωση του ιονισμού, ενώ η επίδρασή του στη συγκράτηση αντισταθμίζεται επιπλέον από την ανάπτυξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τα βασικά κέντρα της στήλης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στη

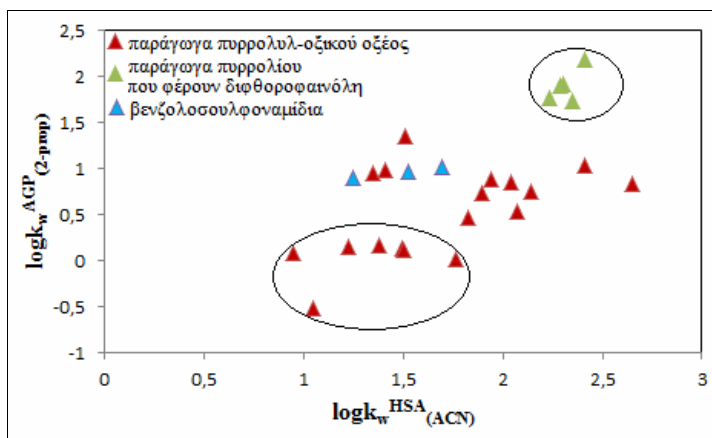
χρωματογραφία IAM όπου οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με ανιόντα είναι λιγότερο ισχυρές η αντίστοιχη διαφοροποίηση των τιμών $\log k_w$ σε pH 5,0 και 7,0 για τις ενώσεις 1 έως 18 είναι περίπου 0,5 (βλ. Κεφάλαιο Α, §1.4.4).

1.3.5 Σύγκριση της συγκράτησης στη χρωματογραφία HSA και AGP

Στα Σχήματα ΠΒ-66 και ΠΒ-67 παρουσιάζονται οι γραφικές απεικονίσεις των χρωματογραφικών δεικτών HSA και AGP με οργανικό τροποποιητή ακετονιτρίλιο και ισοπροπανόλη αντίστοιχα. Οι τρεις κατηγορίες ενώσεων που περιλαμβάνονται στη συνολική σειρά, δηλ. τα παράγωγα του πυρρολ-υλ-οξικού οξέος (ενώσεις 1 έως 19), τα παράγωγα του πυρρολίου με ομάδα διφθοροφαινόλης (ενώσεις 20 έως 24) και τα βενζολοσουλφοναμίδια με ομάδα διφθοροφαινόλης (ενώσεις 25 έως 27) απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα. Δεδομένου ότι στη στήλη HSA δεν παρατηρείται διαφοροποίηση στη συγκράτηση λόγω οργανικού τροποποιητή απεικονίστηκαν οι τιμές $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$ και $\log k_w^{AGP}_{(2-prop)}$ ως προς τις τιμές $\log k_w^{HSA}_{(ACN)}$.



Σχήμα ΠΒ-66. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP}_{(ACN)}$ και $\log k_w^{HSA}_{(ACN)}$.



Σχήμα ΠΒ-67. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP}_{(2-prop)}$ και $\log k_w^{HSA}_{(ACN)}$.

Σύμφωνα με τα Σχήματα ΠΒ-66 και ΠΒ-67 τα παράγωγα του πυρρολίου ως όξινες ενώσεις εμφανίζουν υψηλότερη συγκράτηση στη στήλη HSA συγκριτικά με τη στήλη AGP. Γενικά δεν παρατηρείται καλή συσχέτιση μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών ($r=0,708$ και $0,657$ αντίστοιχα).

1.3.6 Σύγκριση της συγκράτησης στις στήλες HSA και AGP με τη συγκράτηση στη στήλη IAM

Η συγκράτηση των παραγώγων του πυρρολίου στη στήλη HSA είναι γενικά υψηλότερη, οι διαφορές των χρωματογραφικών δεικτών ωστόσο είναι σημαντικά μικρότερες από τις διαφορές μεταξύ των τιμών $\log k_w^{HSA} - \log k_w^{AGP}$. Η σχετικά μικρή διαφοροποίηση στη συγκράτηση HSA και IAM υποστηρίζει περαιτέρω τη συμμετοχή, αν και περιορισμένη, ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ανιόντων και του φορτισμένου αζώτου της χολίνης στην επιφάνεια IAM βλ. Κεφάλαιο Α, §1.3.3). Επιπλέον παρατηρήθηκε καλή συσχέτιση της συγκράτησης στις στήλες HSA και IAM, εξισώσεις (ΠΒ-111) και (ΠΒ-112):

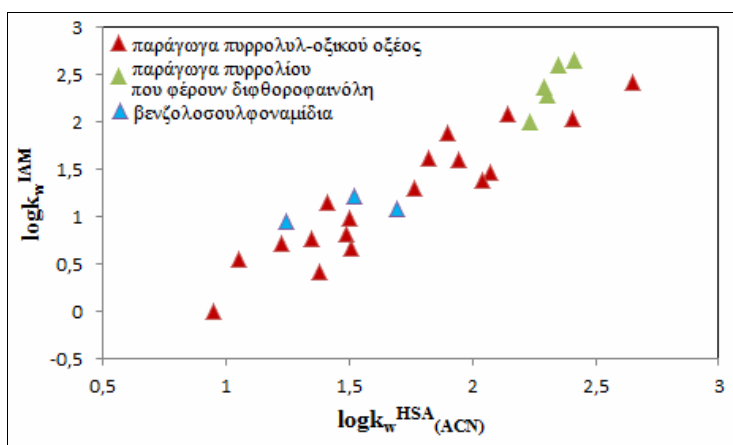
$$\log k_w^{IAM} = 1,46(\pm 0,11)\log k_w^{HSA}_{(ACN)} - 1,20(\pm 0,20) \quad (\text{ΠΒ-111})$$

$$n = 26, r = 0,939, s = 0,257, F = 178,88$$

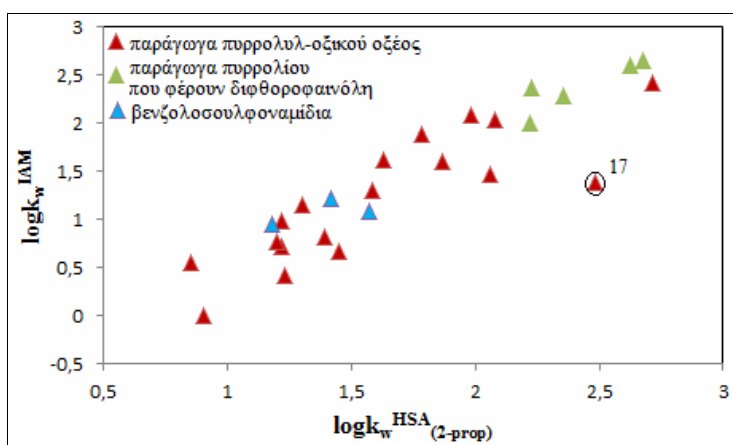
$$\log k_w^{IAM} = 1,19(\pm 0,11)\log k_w^{HSA}_{(2-prop)} - 0,65(\pm 0,21) \quad (\text{ΠΒ-112})$$

$$n = 26, r = 0,905, s = 0,318, F = 108,81$$

Οι αντίστοιχες απεικονίσεις παρουσιάζονται στα Σχήματα ΠΙΒ-68 και ΠΙΒ-69.



Σχήμα ΠΙΒ-68. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{\text{IAM}}$ και $\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$.



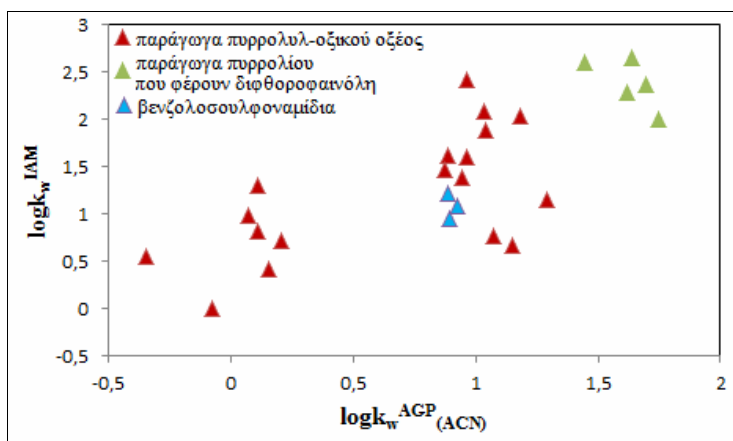
Σχήμα ΠΙΒ-69. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{\text{IAM}}$ και $\log k_w^{\text{HSA}}_{(2\text{-prop})}$.

Στο Σχήμα ΠΙΒ-69 η ένωση 17 (παράγωγο του βενζοθειαζολίου) εμφανίζει αποκλίνουσα συμπεριφορά. Αφαιρώντας την ένωση 17 από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε η εξίσωση (ΠΙΒ-113) με στατιστικά στοιχεία ανάλογα με την εξίσωση (ΠΙΒ-111)

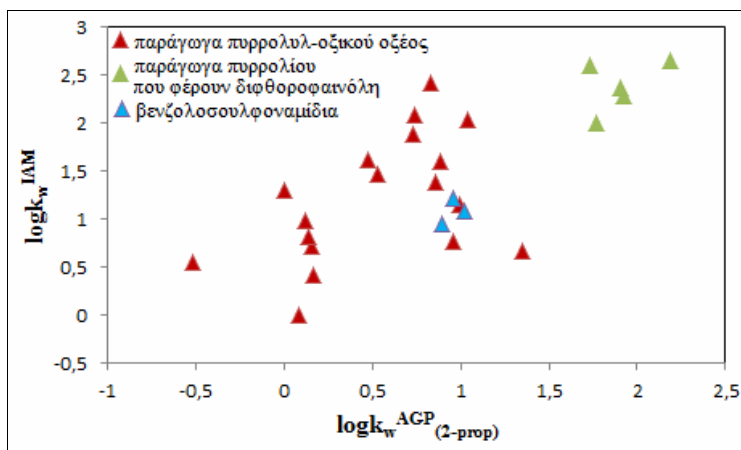
$$\log k_w^{\text{IAM}} = 1,29(\pm 0,09)\log k_w^{\text{HSA}}_{(2\text{-prop})} - 0,78(\pm 0,17) \quad (\text{ΠΙΒ-113})$$

$$n = 25, r = 0,944, s = 0,252, F = 187,74$$

Οι χρωματογραφικοί δείκτες AGP είναι σημαντικά χαμηλότεροι από τους δείκτες IAM και όπως προκύπτει από τα αντίστοιχα διαγράμματα (Σχήματα ΠΒ-70 και ΠΒ-71) δεν παρατηρείται ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ τους ($r=0,757$ και $0,711$ αντίστοιχα).



Σχήμα ΠΒ-70. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{IAM}$ και $\log k_w^{AGP(ACN)}$.

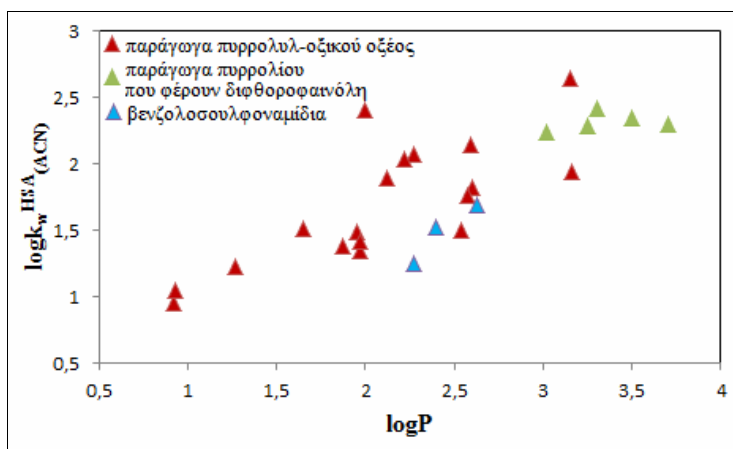


Σχήμα ΠΒ-71. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{IAM}$ και $\log k_w^{AGP(2-prop)}$.

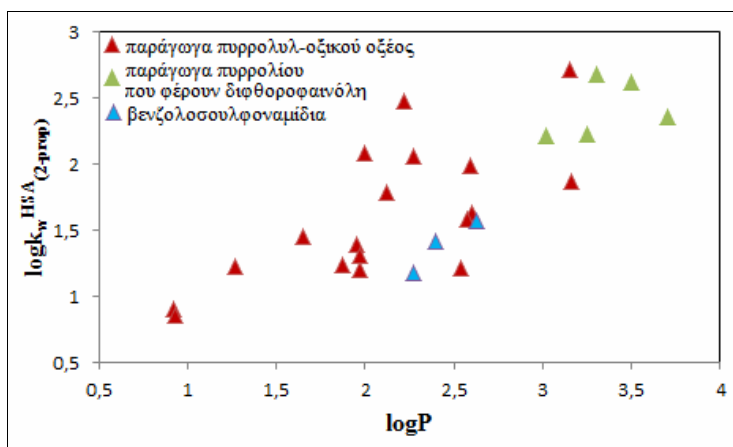
1.3.7 Σχέση των χρωματογραφιών ΗSA και AGP με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού

Για να διερευνηθεί η συμβολή των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στη συγκράτηση στις βιομιμητικές στήλες ΗSA και AGP εξήχθησαν οι συσχετίσεις μεταξύ των

αντίστοιχων χρωματογραφικών δεικτών και των τιμών $\log P$. Με βάση τους συντελεστές r των συσχετίσεων οι οποίοι είχαν τιμές 0,800 και 0,714 η συμμετοχή των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων αντιστοιχεί σε ποσοστά 64% και 51% για την HSA και AGP λαμβάνοντας υπόψη τις καλύτερες χρωματογραφικές συνθήκες (ακετονιτρίλιο στην HSA, ισοπροπανόλη στην AGP αντίστοιχα). Αναλυτικότερα η σχέση των χρωματογραφικών δεικτών HSA με τις τιμές $\log P$ απεικονίζεται στα Σχήματα ΠΙΒ-72 και ΠΙΒ-73.



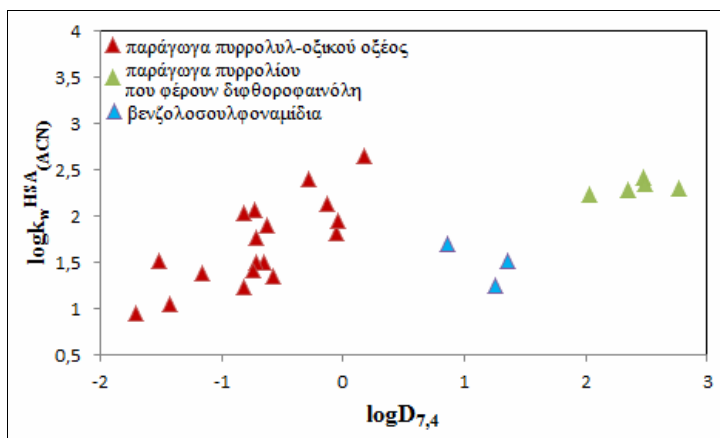
Σχήμα ΠΙΒ-72. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{HSA(ACN)}$ και $\log P$.



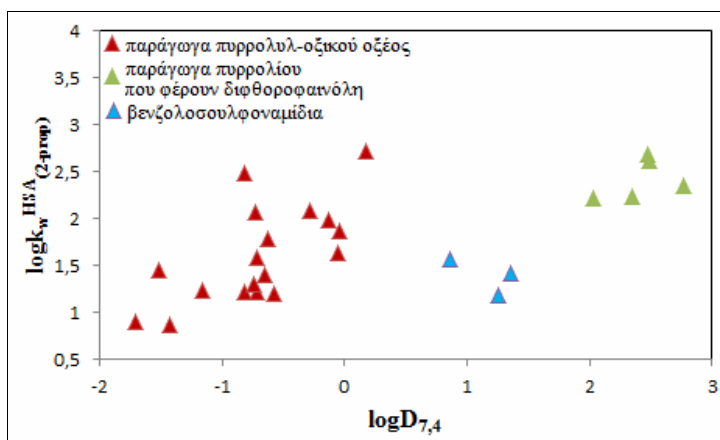
Σχήμα ΠΙΒ-73. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{HSA(2-prop)}$ και $\log P$.

Χρησιμοποιώντας τις τιμές $\log D_{7,4}$ για την απεικόνιση των χρωματογραφικών δεικτών HSA παρατηρήθηκε σαφής διάκριση των καρβοξυλικών οξέων από τα παράγωγα της διφθοροφαινόλης με τα πρώτα να εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια

για τη στατική φάση ΗSA όπως φαίνεται από τις αντίστοιχες απεικονίσεις στα Σχήματα ΠΒ-74 και ΠΒ-75.



Σχήμα ΠΒ-74. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$ και $\log D_{7,4}$.



Σχήμα ΠΒ-75. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{\text{HSA}}_{(2\text{-prop})}$ και $\log D_{7,4}$.

Η εισαγωγή παραμέτρου-δείκτη I για την παρουσία καρβοξυλικού ανιόντος οδήγησε στις εξισώσεις (ΠΒ-114) και (ΠΒ-115):

$$\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})} = 0,63(\pm 0,10)\log D_{7,4} + 1,36(\pm 0,29)I + 0,78(\pm 0,22) \quad (\text{ΠΒ-114})$$

$$n = 26, r = 0,801, r^2 = 0,642, s = 0,282, t_{\text{III}} = 4,72, F = 23,44$$

$$\log k_w^{\text{HSA}}_{(2\text{-prop})} = 0,69(\pm 0,13)\log D_{7,4} + 1,39(\pm 0,37)I + 0,70(\pm 0,28) \quad (\text{ΠΒ-115})$$

$$n = 26, r = 0,764, r^2 = 0,584, s = 0,359, t_{\text{III}} = 3,77, F = 18,53$$

Με βάση την παρατήρηση αυτή επαναλήφθηκε η στατιστική ανάλυση ενσωματώνοντας τα παράγωγα του πυρρολίου στις γενικές εξισώσεις (ΠΒ-60) και (ΠΒ-61) για τις δομικά διαφορετικές ενώσεις με επιπλέον εισαγωγή της παραμέτρου-δείκτη I. Προέκυψαν οι εξισώσεις (ΠΒ-116) και (ΠΒ-117):

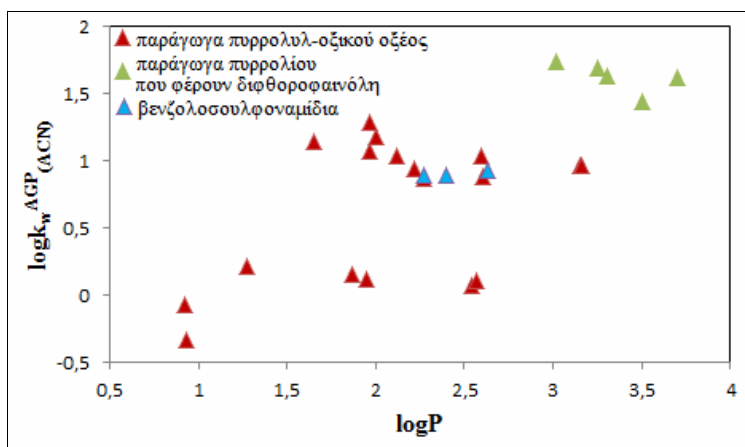
$$\log k_w^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})} = 0,57(\pm 0,04)\log D_{7,4} + 1,00(\pm 0,16)F + 0,98(\pm 0,19)I - 0,04(\pm 0,11)(\text{ΠΒ-116})$$

$$n = 82, r = 0,847, r^2 = 0,717, s = 0,433, tF = 6,19, tI = 5,33, F = 69,57$$

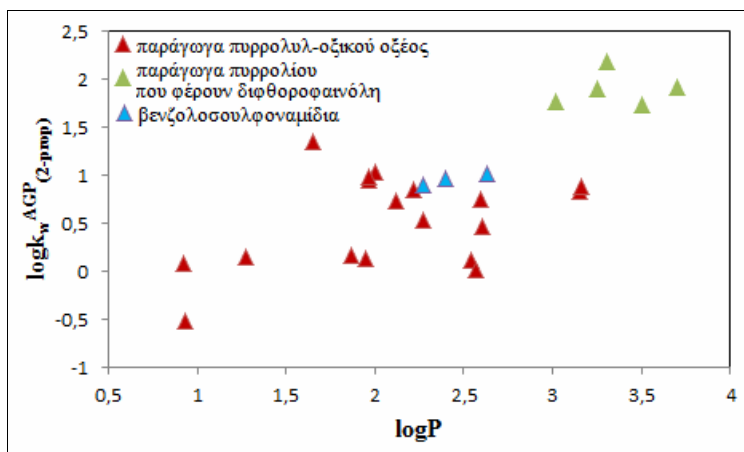
$$\log k_w^{\text{HSA}}_{(2\text{-prop})} = 0,62(\pm 0,06)\log D_{7,4} + 1,13(\pm 0,20)F + 1,21(\pm 0,24)I - 0,32(\pm 0,13)(\text{ΠΒ-117})$$

$$n = 62, r = 0,859, r^2 = 0,738, s = 0,460, tF = 5,77, tI = 5,11, F = 58,42$$

Στα Σχήματα ΠΒ-76 και ΠΒ-77 απεικονίζονται οι τιμές $\log k_w^{\text{AGP}}$ σε σχέση με τις τιμές $\log P$.



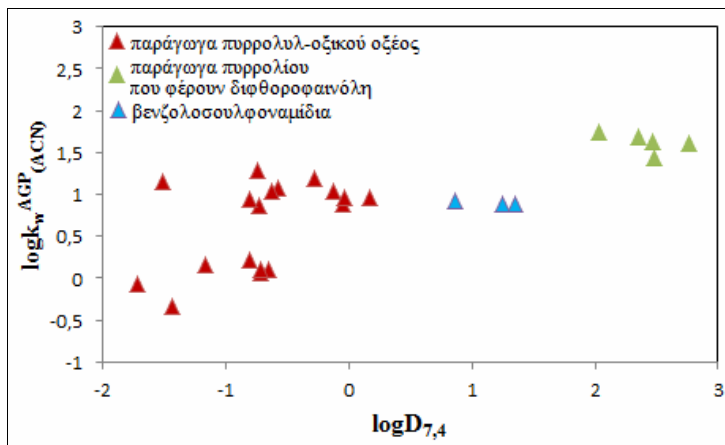
Σχήμα ΠΒ-76. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{\text{AGP}}_{(\text{ACN})}$ και $\log P$.



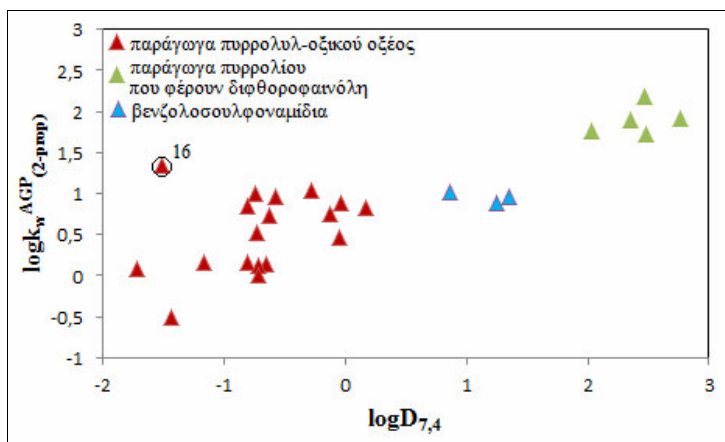
Σχήμα II-B-77. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP(2-prop)}$ και $\log P$.

Αν και στην περίπτωση των δομικά διαφορετικών ενώσεων δεν είχε παρατηρηθεί όσον αφορά στα οξέα εξάρτηση της συγκράτησης AGP ως προς τις τιμές $\log P$, για τα δομικά συγγενή παράγωγα του πυρρολίου παρατηρείται μια τάση αύξησης της συγκράτησης με αύξηση της λιποφιλίας, εμφανέστερη στην περίπτωση των τιμών $\log k_w^{AGP(2-prop)}$. Οι αντίστοιχες συσχετίσεις εμφανίζουν $r=0,698$ και $0,713$.

Οι απεικονίσεις της συγκράτησης AGP ως προς τις τιμές $\log D_{7,4}$ (Σχήματα II-B-78 και II-B-79) έδωσαν καλύτερη εικόνα. Ειδικότερα στην περίπτωση των τιμών $\log k_w^{AGP(2-prop)}$ λαμβάνεται ικανοποιητική συσχέτιση αν εξαιρεθεί η ένωση 16, εξίσωση (II-B-118):



Σχήμα II-B-78. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP(ACN)}$ και $\log D_{7,4}$.



Σχήμα ΠΒ-79. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP(2-prop)}$ και $\log D_{7,4}$.

$$\log k_w^{AGP(2-prop)} = 0,45(\pm 0,05)\log D_{7,4} + 0,74(\pm 0,07) \quad (\text{ΠΒ-118})$$

$n = 25, r = 0,884, s = 0,326, F = 82,58$

Όπως προκύπτει από τα Σχήματα ΠΒ-78 και ΠΒ-79 στη στήλη AGP δεν παρατηρείται διαφοροποίηση της συμπεριφοράς των καρβοξυλικών οξέων.

Ενσωμάτωση των παραγώγων του πυρρολίου με τις δομικώς διαφορετικές ενώσεις απαιτεί την εισαγωγή και του όρου F^- , ο οποίος συνοδεύεται με αρνητικό πρόσημο, εξίσωση (ΠΒ-119).

Αντίθετα ο όρος F^+ δεν ήταν στατιστικά σημαντικός γιατί η μείωση της συγκράτησης λόγω πρωτονίωσης εξισορροπείται από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, κάτι που δεν συμβαίνει με τα ανιόντα.

$$\log k_w^{AGP(ACN)} = 0,40(\pm 0,04)\log P - 0,47(\pm 0,12)F^- + 0,39(\pm 0,14) \quad (\text{ΠΒ-119})$$

$n = 70, r = 0,825, r^2 = 0,681, s = 0,458, F = 74,71, t|F^-| = 3,93$

Η αντίστοιχη εξίσωση για τις τιμές $\log k_w^{AGP(2-prop)}$ δεν κατέδειξε στατιστικά σημαντικό τον όρο F^- και είχε φτωχότερα στατιστικά στοιχεία.

Στις αντίστοιχες συσχετίσεις οστόσο με τις τιμές $\log D_{7,4}$, εξισώσεις (ΠΒ-120) και (ΠΒ-121), εμφανίζονται και τα δύο μοριακά κλάσματα F^+ και F^- στατιστικά σημαντικά με θετικό πρόσημο.

$$\log k_w^{\text{AGP}}(\text{ACN}) = 0,42(\pm 0,05)\log D_{7,4} + 0,69(\pm 0,17)F^+ + 0,52(\pm 0,20)F^- + 0,34(\pm 0,17)(\text{ΠΒ-120})$$

$$n = 70, r = 0,807, r^2 = 0,652, s = 0,478, t|F^+| = 4,02, t|F^-| = 2,66, F = 44,11$$

$$\log k_w^{\text{AGP}}(2\text{-prop}) = 0,43(\pm 0,04)\log D_{7,4} + 0,70(\pm 0,16)F^+ + 0,79(\pm 0,19)F^- + 0,01(\pm 0,16)(\text{ΠΒ-121})$$

$$n = 70, r = 0,796, r^2 = 0,633, s = 0,454, t|F^+| = 4,30, t|F^-| = 4,24, F = 40,66$$

Η θετική συμβολή των μοριακών κλασμάτων F^+ και F^- υποστηρίζει περαιτέρω την άποψη ότι στο περιβάλλον της στήλης AGP ο ιονισμός είναι μειωμένος.

1.3.8 Σύγκριση της συγκράτησης στη χρωματογραφία HSA και AGP με τη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως

Για τη σύγκριση της συγκράτησης στη βιομιμητική χρωματογραφία HSA και AGP με τη συγκράτηση στην αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές $\log k_w^{\text{ABZ}}$ που προσδιορίστηκαν παρουσία MOPS ως ρυθμιστικού διαλύματος, δεδομένου ότι σε αυτές τις συνθήκες υπήρχαν διαθέσιμες τιμές για όλες τις ενώσεις. Για τη χρωματογραφία HSA, οι καλύτερες συσχετίσεις, αν και με μέτρια στατιστικά στοιχεία, εξισώσεις (ΠΒ-122) και (ΠΒ-123), ελήφθησαν με τις τιμές $\log k_w^{\text{ABZ}}_{[0,25\%]}$ σε συμφωνία με τα αποτελέσματα για τη χρωματογραφία IAM (Κεφάλαιο Α, §1.3.4).

$$\log k_w^{\text{HSA}}(\text{ACN}) = 0,68(\pm 0,08)\log k_w^{\text{ABZ}}_{[0,25\%]} + 0,62(\pm 0,15) \quad (\text{ΠΒ-122})$$

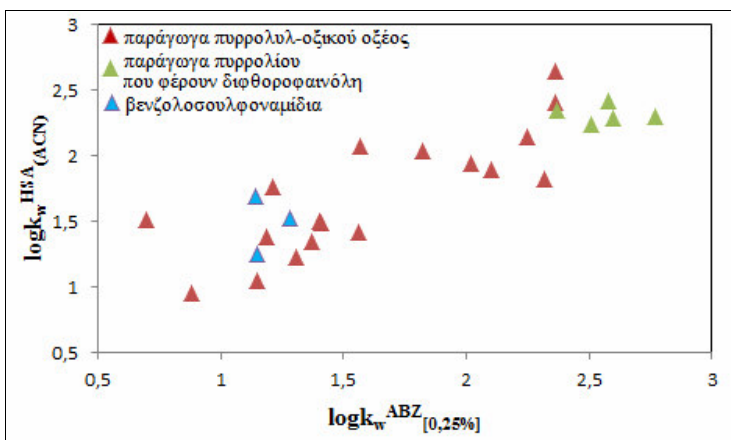
$$n = 26, r = 0,865, s = 0,241, F = 71,59$$

$$\log k_w^{\text{HSA}}(2\text{-prop}) = 0,76(\pm 0,11)\log k_w^{\text{ABZ}}_{[0,25\%]} + 0,42(\pm 0,20) \quad (\text{ΠΒ-123})$$

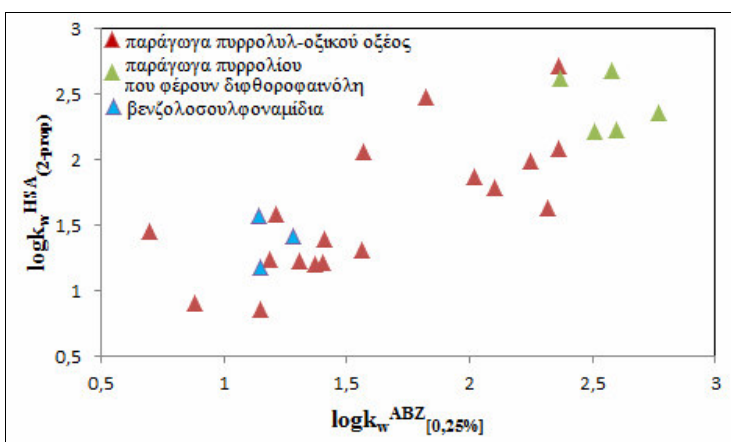
$$n = 26, r = 0,821, s = 0,324, F = 49,69$$

Οι αντίστοιχες απεικονίσεις παρουσιάζονται στα Σχήματα ΠΒ-80 και ΠΒ-81.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
 Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HSA ΚΑΙ AGP
 ΟΞΙΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ



Σχήμα ΠΒ-80. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{HSA}_{(ACN)}$ και $\log k_w^{ABZ}_{[0,25\%]}$.

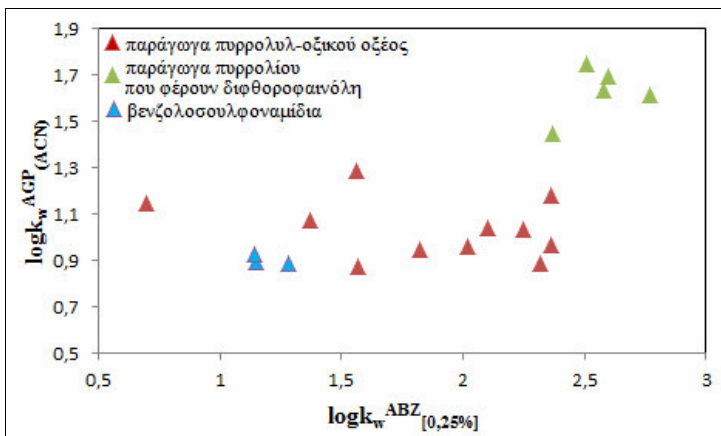


Σχήμα ΠΒ-81. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{HSA}_{(2-prop)}$ και $\log k_w^{ABZ}_{[0,25\%]}$.

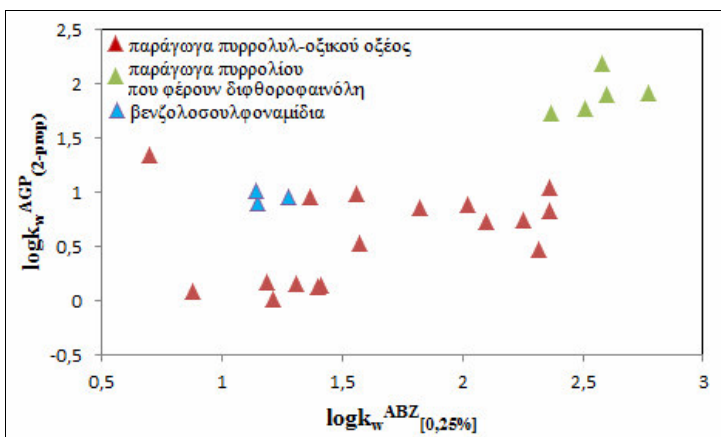
Δεδομένου ότι και στις δυο στήλες ABZ^+ και HSA εμφανίζεται αυξημένη συγκράτηση των καρβοξυλικών ανιόντων δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση των τελευταίων από τα παράγωγα της διφθοροφαινόλης.

Η απεικόνιση των χρωματογραφικών δεικτών AGP ως προς τις τιμές $\log k_w^{ABZ}$ παρουσιάζεται στα Σχήματα ΠΒ-82 και ΠΒ-83. Αν και η εικόνα δεν είναι σαφής διακρίνεται η διαφοροποίηση των καρβοξυλικών οξέων τα οποία παρουσιάζουν ισχυρότερη συγγένεια με τη στατική φάση ABZ^+ .

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
 Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΗSA ΚΑΙ AGP
 ΟΞΙΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ



Σχήμα ΠΒ-82. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP(ACN)}$ και $\log k_w^{ABZ[0,25\%]}$.



Σχήμα ΠΒ-83. Απεικόνιση μεταξύ $\log k_w^{AGP(2-prop)}$ και $\log k_w^{ABZ[0,25\%]}$.

Εισαγωγή της παραμέτρου-δείκτη I για τα καρβοξυλικά οξέα οδηγεί στις εξισώσεις (ΠΒ-124) και (ΠΒ-125):

$$\log k_w^{AGP(ACN)} = 0,55(\pm 0,13)\log k_w^{ABZ[0,25\%]} - 0,48(\pm 0,17)I + 0,55(\pm 0,13) \quad (\text{ΠΒ-124})$$

$$n = 26, r = 0,786, r^2 = 0,585, s = 0,376, F = 18,63, t|F| = 2,83$$

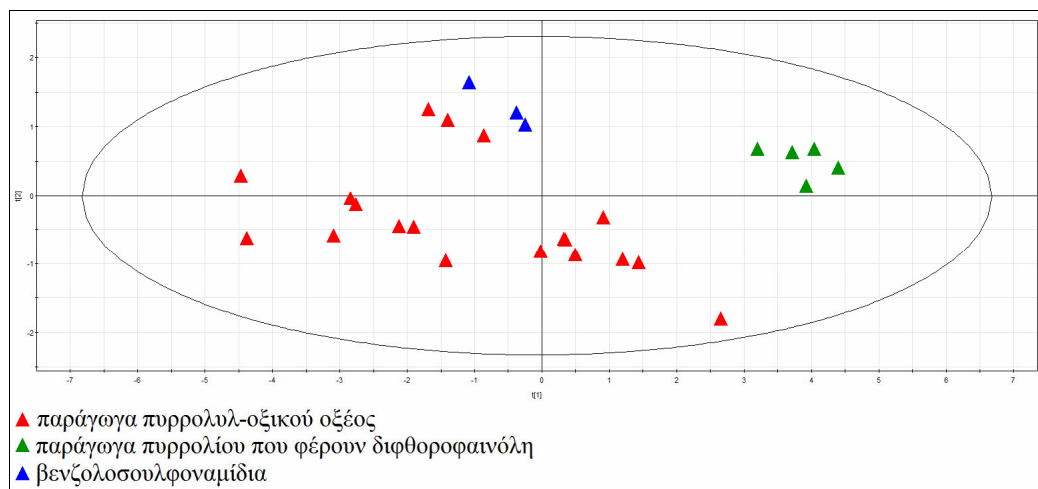
$$\log k_w^{AGP(2-prop)} = 0,50(\pm 0,14)\log k_w^{ABZ[0,25\%]} - 0,81(\pm 0,18)I + 0,54(\pm 0,32) \quad (\text{ΠΒ-125})$$

$$n = 26, r = 0,823, r^2 = 0,648, s = 0,401, F = 24,05, t|F| = 4,49$$

1.4 Εφαρμογή Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών (PCA) στους χρωματογραφικούς δείκτες και στις παραμέτρους λιποφιλίας

Εφαρμόστηκε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών για τη διερεύνηση των ομοιοτήτων/ανομοιοτήτων στη συμπεριφορά των παραγώγων του πυρρολίου στα διαφορετικά συστήματα που μελετήθηκαν. Για την κατασκευή του Πίνακα των μεταβλητών X χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές συγκράτησης στις τέσσερις στατικές φάσεις και οι τιμές logP και logD. Στην περίπτωση των στατικών φάσεων IAM, AGP και HSA υπήρχε 3,7% έλλειψη τιμών. Εξήχθη μοντέλο με τρεις κύριες συνιστώσες, συνολικό συντελεστή συσχέτισης $R^2=0,945$ και διασταυρούμενο συντελεστή συσχέτισης $Q^2=0,791$.

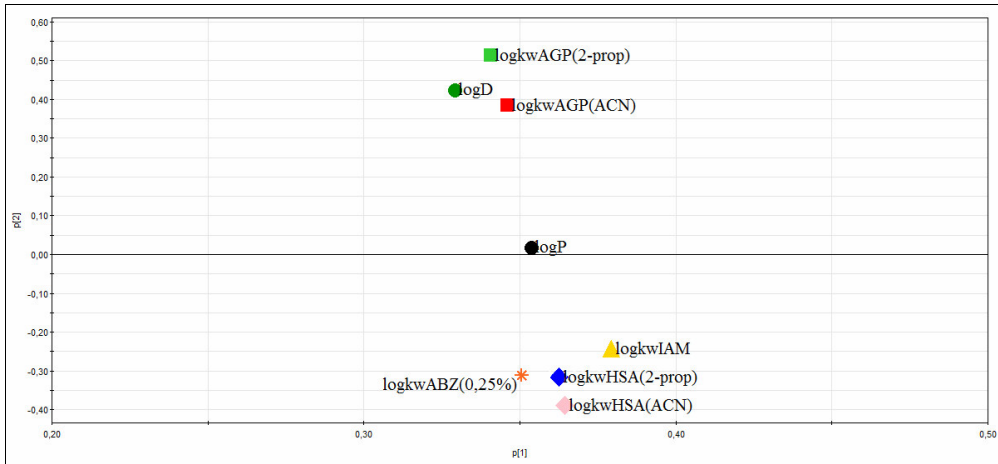
Στο Σχήμα ΠΒ-84 απεικονίζεται το διάγραμμα των συντεταγμένων των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών στο οποίο τα παράγωγα του πυρρολ-υλ-οξικού οξέος (ενώσεις 1 έως 19), τα παράγωγα του πυρρολίου με την ομάδα της διφθοροφαινόλης (ενώσεις 20 έως 24) και τα βενζολοσουλφοναμίδια, με την ομάδα της διφθοροφαινόλης (ενώσεις 25 έως 27) απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα και ομαδοποιούνται αντίστοιχα.



Σχήμα ΠΒ-84. Διάγραμμα των συντεταγμένων των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών.

Στο Σχήμα ΠΒ-85 απεικονίζεται το διάγραμμα των φορτίων των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών:

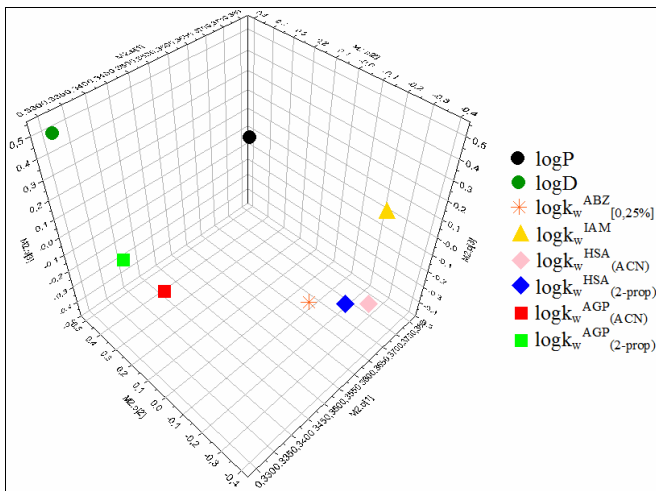
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
 Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΗSA ΚΑΙ AGP
 ΟΞΙΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ



Σχήμα ΠΒ-85. Διάγραμμα των φορτίων των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών.

Συγκρίνοντας το Σχήμα ΠΒ-85 με το αντίστοιχο διάγραμμα για τις δομικά διαφορετικές ενώσεις (Σχήμα ΠΒ-62) παρατηρούμε μια αναστροφή των θέσεων των μεταβλητών $\log k_w^{HSA}$ και $\log k_w^{AGP}$. Πλέον η μεταβλητή $\log k_w^{HSA}$ εμφανίζει παρόμοιες τιμές φορτίων με τη μεταβλητή $\log k_w^{IAM}$ και στις δυο συνιστώσες. Η μεταβλητή $\log k_w^{ABZ}_{[0,25\%]}$ βρίσκεται επίσης κοντά στις μεταβλητές $\log k_w^{IAM}$ και $\log k_w^{HSA}$, γεγονός που αποδίδεται στην υπερίσχυση της υψηλής συγγένειας των καρβοξυλικών ανιόντων για τις τρεις αυτές στατικές φάσεις ως κοινού χαρακτηριστικού.

Στο Σχήμα ΠΒ-86 απεικονίζεται το τρισδιάστατο διάγραμμα των φορτίων για τις τρεις κύριες συνιστώσες.

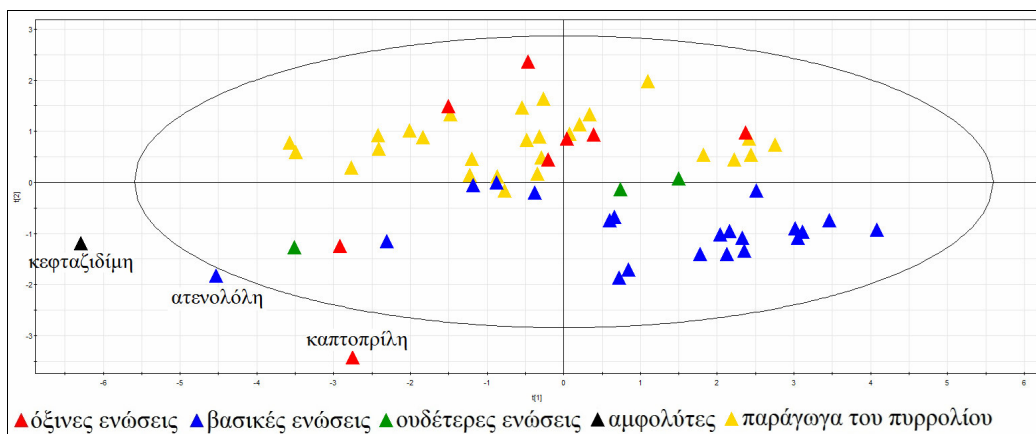


Σχήμα ΠΒ-86. Τρισδιάστατο διάγραμμα των φορτίων των τριών κυρίων συνιστωσών.

Στο Σχήμα ΠΒ-86 οι τιμές $\log k_w^{ABZ}_{[0,25\%]}$ και $\log k_w^{HSA}$ τοποθετούνται πολύ κοντά, οι τιμές $\log k_w^{IAM}$ και $\log k_w^{AGP}$ διαφοροποιούνται σε αντίθετες κατευθύνσεις, οι τιμές $\log P$ ισαπέχουν από τα χρωματογραφικά δεδομένα, ενώ οι τιμές $\log D$ βρίσκονται στην ίδια κατεύθυνση με τις τιμές $\log k_w^{AGP}$.

Οι παρατηρούμενες ομοιότητες/ανομοιότητες μεταξύ των διαφορετικών συστημάτων στο Σχήμα ΠΒ-86 βρίσκονται σε συμφωνία με τις συσχετίσεις μεταξύ των αντίστοιχων δεδομένων. Επιπλέον η σύγκριση των διαγραμμάτων στα Σχήματα ΠΒ-63 και ΠΒ-86 υποστηρίζει την αναντιστοιχία που μπορεί να παρατηρείται μεταξύ γενικού και επιμέρους μοντέλου, όταν ένας παράγοντας εκφράζεται ισχυρότερα στα πλαίσια δομικώς συγγενών ενώσεων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η διαφοροποίηση οφείλεται στην ιδιαίτερη συμπεριφορά των καρβοξυλικών ανιόντων.

Η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών επεκτάθηκε ακολούθως για το σύνολο των ενώσεων. Η συγκράτηση στη στήλη ABZ^+ δεν συμπεριλήφθηκε δεδομένου ότι δεν υπήρχαν δεδομένα για τις δομικά μη συγγενείς ενώσεις. Το συνολικό μοντέλο που εξήχθη ήταν ανάλογο του αρχικού μοντέλου για τις δομικά διαφορετικές ενώσεις με χαμηλότερα ωστόσο στατιστικά στοιχεία ($R^2=0,884$, $Q^2=0,760$). Το διάγραμμα των συντεταγμένων των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών απεικονίζεται στο Σχήμα ΠΒ-87:

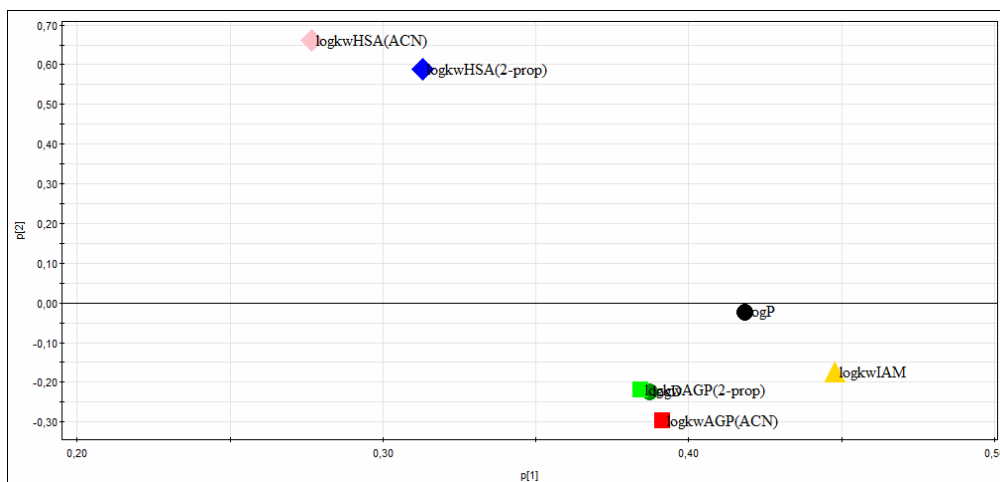


Σχήμα ΠΒ-87. Διάγραμμα των συντεταγμένων των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα ΠΒ-87 τα παράγωγα του πυρρολίου προσαρμόζονται μαζί με τις υπόλοιπες όξινες ενώσεις.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ ΣΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΗSA ΚΑΙ AGP
ΟΞΙΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ

Το διάγραμμα των φορτίων των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών παρουσιάζεται στο Σχήμα ΠΒ-88:



Σχήμα ΠΒ-88. Διάγραμμα των φορτίων των δυο πρώτων κυρίων συνιστωσών.

Στο Σχήμα ΠΒ-88 οι μεταβλητές εντοπίζονται στις ίδιες θέσεις όπως στο αντίστοιχο διάγραμμα του Σχήματος ΠΒ-62, με τις τιμές $\log D$ ωστόσο να μετακινούνται πλησιέστερα στις τιμές $\log k_w^{AGP}$. Η αποκατάσταση των αρχικών θέσεων των μεταβλητών δείχνει την ανθεκτικότητα του ολικού μοντέλου PCA όσον αφορά στη βασική κατηγοριοποίηση των συστημάτων, αν και παρατηρείται σχετική μεταβλητότητα ως προς την ταξινόμηση των τιμών $\log D$.

Δ. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΣΥΝΟΛΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ

Τα δεδομένα της βιομηχανικής χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του συνολικού φυσικοχημικού/φαρμακοκινητικού προφίλ των παραγώγων του πυρρολίου με εισαγωγή τους στα αντίστοιχα μοντέλα για την από του στόματος απορρόφηση και την πρωτεϊνική σύνδεση.

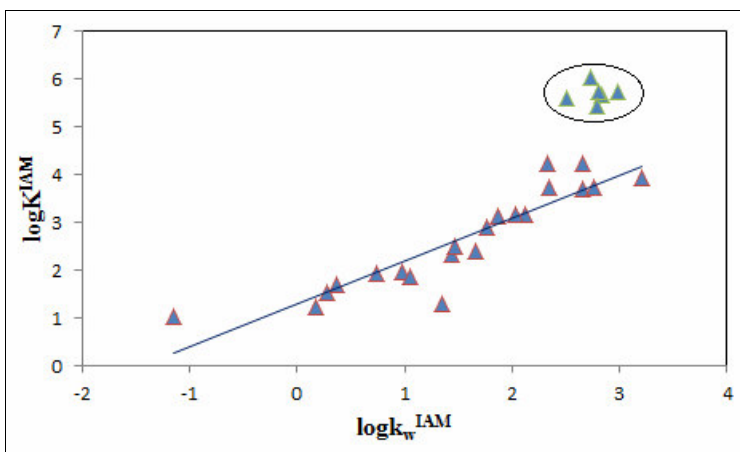
Οι τιμές %HOA υπολογίστηκαν με βάση τις εξισώσεις (IIA-43) και (IIA-44) θεωρώντας ως βέλτιστες τιμές $\log k_w^{IAM}_{best}$ τις τιμές σε pH 3,0 και ως βέλτιστες τιμές $\log D_{best}$ τις τιμές $\log P$. Οι προβλεπόμενες τιμές %HOA παρουσιάζονται στον Πίνακα IIB-33.

Σε ότι αφορά την πρωτεϊνική σύνδεση εφαρμόστηκε η γενική εξίσωση αναφοράς με βάση τις τιμές $\log k_{10}^{HSA}_{(ACN)}$, εξίσωση (IIB-55). Οι τιμές $\log K_{pred}$ που υπολογίστηκαν μετατράπηκαν σε τιμές %PPB_{pred} και συμπεριλαμβάνονται επίσης στον Πίνακα IIB-33, ενώ οι τιμές $\log k_{10}^{HSA}_{(ACN)}$ περιλαμβάνονται στον Πίνακα 9 στο Παράρτημα.

Στη βιβλιογραφία²⁵² προτείνεται επίσης ανάλογη εξίσωση, βλ. εξίσωση (I-33) στο Θεωρητικό Μέρος, για την εκτίμηση του όγκου κατανομής (VD), στη βάση της συγκράτησης IAM και HSA, δεδομένου ότι η πρωτεϊνική σύνδεση επηρεάζει επίσης την κατανομή των φαρμάκων. Οι τιμές όξινου και βασικού pK_a αποτελούν επιπλέον στατιστικά σημαντικούς όρους της εξίσωσης.

Στην εξίσωση (I-33) οι τιμές $\log K^{IAM}$ και $\log K^{HSA}$ έχουν προκύψει από τον προσδιορισμό χρωματογραφικών δεικτών CHI, οι οποίοι αντιστοιχούν σε ποσοστό οργανικού τροποποιητή που οδηγεί σε ισοκατανομή μεταξύ στατικής και κινητής φάσης (βλ. §2.8 στο Θεωρητικό Μέρος). Ως εκ τούτου έγινε συσχέτιση των παραγόντων συγκράτησης $\log k_w$ με τις τιμές $\log K$ για τις ενώσεις για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα²⁵² και ακολούθησε αντίστοιχη κανονικοποίηση των τιμών $\log k_w$ των παραγώγων του πυρρολίου.

Η απεικόνιση των τιμών $\log K^{IAM}$ έναντι των τιμών $\log k_w^{IAM}$ παρουσιάζεται στο Σχήμα IIB-89



Σχήμα ΠΒ-89. Απεικόνιση μεταξύ $\log K^{IAM}$ και $\log k_w^{IAM}$.

Σύμφωνα με το Σχήμα ΠΒ-89 παρατηρείται γραμμική σχέση μεταξύ των δυο μεγεθών η οποία εκφράζεται με την εξίσωση (ΠΒ-126):

$$\log K^{IAM} = 0,90(\pm 0,09)\log k_w^{IAM} + 1,28(\pm 0,17) \quad (\text{ΠΒ-126})$$

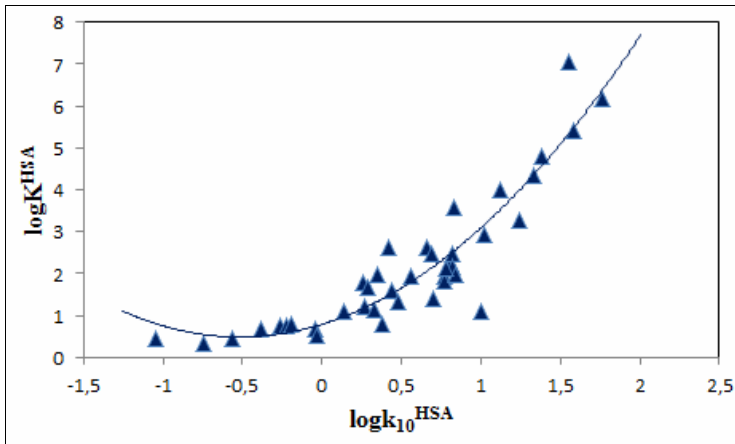
$$n = 21, r = 0,909, s = 0,442, F = 90,55$$

Εκτός γραμμικότητας βρίσκονται οι τιμές $\log K^{IAM} > 5$ (σημειωμένες με κύκλο) οι οποίες αφορούν σε πρωτονιωμένες βάσεις (δοξεπίνη, φλουοξετίνη, μιπραμίνη, μαπροτίλη, νοτριπτυλίνη και προτριπτυλίνη) και δεν συμπεριλαμβάνονται στην εξίσωση (ΠΒ-126).

Η εξίσωση (ΠΒ-126) χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των τιμών $\log k_w^{IAM}$ των παραγώγων του πυρρολίου (Πίνακας 9 στο Παράρτημα).

Όσον αφορά στη στήλη HSA χρησιμοποιήθηκαν οι ισοκρατικές τιμές $\log k_{10}^{HSA} (ACN)$ για τη σύγκριση με τις τιμές $\log K^{HSA}$ δεδομένου ότι σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας προσομοιώνουν καλύτερα την πρωτεϊνική σύνδεση (βλ. Κεφάλαιο Β. §1.3.4). Παρατηρήθηκε παραβολική σχέση μεταξύ των δυο μεγεθών (Σχήμα ΠΒ-90) η οποία εκφράζεται με την εξίσωση (ΠΒ-127) με ικανοποιητικά στατιστικά στοιχεία.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Δ. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΣΥΝΟΛΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ
ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ



Σχήμα ΠΒ-90. Απεικόνιση μεταξύ $\log K^{\text{HSA}}$ και $\log k_{10}^{\text{HSA}}$.

$$\log K^{\text{HSA}} = 1,14(\pm 0,19)[\log k_{10}^{\text{HSA}}]^2 + 1,17(\pm 0,22)\log k_{10}^{\text{HSA}} + 0,79(\pm 0,14) \quad (\text{ΠΒ-127})$$

$$n = 21, r = 0,927, r^2 = 0,860, s = 0,382, F = 113,40$$

Ας σημειωθεί ότι η αντίστοιχη σχέση με τις τιμές $\log k_w^{\text{HSA}}$ εμφάνισε μεγαλύτερη διασπορά και φτωχότερα στατιστικά στοιχεία.

Η εξίσωση (ΠΒ-127) χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των τιμών $\log k_{10}^{\text{HSA}}$ των παραγώγων του πυρρολίου (Πίνακας 9 στο Παράρτημα).

Οι κανονικοποιημένες τιμές $\log K^{\text{IAM}}$ και $\log K^{\text{HSA}}$ σύμφωνα με τις εξισώσεις (ΠΒ-126) και (ΠΒ-127) εφαρμόστηκαν στην εξίσωση (I-33) σε συνδυασμό και με τις τιμές pK_a των ενώσεων.

Οι προβλεπόμενες τιμές $\log VD$ παρατίθενται στον Πίνακα ΠΒ-33. Στον ίδιο Πίνακα περιλαμβάνονται και οι τιμές $\log P$ και $\log D_{7,4}$ για λόγους σύγκρισης.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ
Δ. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΣΥΝΟΛΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ
ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΠΥΡΡΟΛΙΟΥ

Πίνακας ΠΒ-33. Τιμές logP, logD, %HOA, %PPB και logVD.

No	logP	logD _{7,4}	%HOA _(εξ.ΠΑ-43)	%HOA _(εξ.ΠΑ-44)	%PPB	logVD
1	0,92	-1,71	96,68	97,88	66,95	0,42
2	1,27	-0,81	97,39	98,67	81,30	0,46
3	2,60	-0,05	98,82	99,55	91,56	0,64
4	1,57	-1,76	96,28	*	*	*
5	1,95	-0,65	98,37	98,93	89,74	0,43
6	2,00	-0,28	98,83	99,79	97,90	0,52
7	0,93	-1,43	95,70	97,65	76,83	0,40
8	2,54	-0,72	98,59	98,86	86,14	0,51
9	1,97	-0,58	98,31	98,79	84,82	0,47
10	1,97	-0,74	98,11	99,11	84,92	0,56
11	2,27	-0,73	98,47	99,35	97,34	0,38
12	2,57	-0,72	98,76	99,16	91,86	0,49
13	2,12	-0,63	95,89	98,96	93,64	0,58
14	2,59	-0,13	94,67	98,75	95,76	0,59
15	3,15	0,17	93,68	98,09	99,35	0,35
16	1,65	-1,51	96,48	97,45	88,79	0,34
17	2,22	-0,81	98,85	99,13	98,04	0,19
18	1,87	-1,16	98,18	98,71	88,42	0,41
19	3,16	-0,04	98,51	99,33	93,47	0,67
20	3,70	2,76	99,15	99,63	98,42	0,55
21	3,30	2,47	98,16	99,64	98,84	0,63
22	3,50	2,48	98,17	99,39	98,74	0,51
23	3,02	2,03	98,58	99,54	97,96	0,53
24	3,25	2,35	97,77	99,44	97,89	0,62
25	2,27	1,25	97,56	98,87	84,00	0,62
26	2,63	0,86	95,84	98,92	93,74	0,55
27	2,48	1,35	96,11	98,26	87,78	0,59

*δεν προβλέφθηκαν τιμές λόγω έλλειψης πειραματικών τιμών.

Σύμφωνα με τον Πίνακα ΠΒ-33 για όλα τα παράγωγα του πυρρολίου παρατηρείται %HOA μεγαλύτερη από την τιμή του 90% η οποία προτείνεται για τα καλώς απορροφούμενα φάρμακα μετά από του στόματος χορήγηση. Οι διαφορές των τιμών %HOA που λαμβάνονται με βάση τις τιμές logD και $\log k_w^{IAM}$ δεν διαφέρουν σημαντικά. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά ως προς την καταλληλότητα της χρωματογραφίας IAM, λαμβάνοντας υπόψη τη φιλικότητα και ταχύτητα της μεθόδου. Η πρωτεϊνική σύνδεση των παραγώγων του πυρρολίου κυμαίνεται από 66 έως 99%, ενώ εκτιμούνται μικροί όγκοι κατανομής. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επαλρεστάτη, αναστολέας της αναγωγής της αλδόξης που κυκλοφορεί στην Ιαπωνική αγορά εμφανίζει σχεδόν 100% πρωτεϊνική σύνδεση.

ΣΥΝΟΨΗ-ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πρώτο τμήμα της διατριβής καταδείχθηκαν οι δυσκολίες που αφορούν στην επιλογή του κατάλληλου αλγόριθμου για τον υπολογισμό του $\log P$ προκειμένου για δομικά συγγενή σειρά ενώσεων. Το μη-γραμμικό μοντέλο Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων ANN₀₅ διαπιστώθηκε ότι εκφράζει με μεγαλύτερη συνέπεια τα χαρακτηριστικά που εμπλέκονται στη διαδικασία κατανομής των υπό μελέτη παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος. Η αδυναμία σωστού υπολογισμού των τιμών $\log P$ και $\log D$ είναι δυνατόν να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα ως προς τη σχέση της λιποφιλίας με τη βιολογική δράση. Ως εκ τούτου στην περίπτωση νέων χημειούπων οι πειραματικές τιμές $\log P/\log D$ εξακολουθούν να πλεονεκτούν έναντι των υπολογιστικών τιμών. Ο συνδυασμός των πειραματικών τιμών $\log P$ με την πολικότητα ή την ηλεκτρονιακή επίδραση των υποκαταστατών οδήγησε σε ικανοποιητικές ποσοτικές σχέσεις για την αναστολή της αναγωγής της αλδόζης, οι οποίες αν και δεν αποτελούν γενικά μοντέλα αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την περαιτέρω σύνθεση δομικών αναλόγων. Αν και η πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου απαιτεί την παρουσία ιονισμένης όξινης ομάδας, η εισαγωγή των τιμών $\log D_{7,4}$ δεν οδήγησε σε επιτυχείς σχέσεις, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι τιμές $\log P$ εκφράζουν περισσότερο αξιόπιστα την υδρόφοβη σύνδεση και στην περίπτωση ιονισμένων μορφών.

Με δεδομένη την αναγκαιότητα πειραματικών τιμών λιποφιλίας διερευνήθηκε η επίδοση των χρωματογραφικών τεχνικών RP-HPLC και RP-TLC για τον προσδιορισμό δεικτών λιποφιλίας και αξιολογήθηκε η εφαρμογή των χρωματογραφικών δεδομένων ως παραμέτρων στις ποσοτικές σχέσεις με την ανασταλτική δράση έναντι της αναγωγής της αλδόζης. Επιβεβαιώθηκε ο κρίσιμος ρόλος της οκτανόλης ως προσθετικού παράγοντα στην κινητή φάση για την καλύτερη προσομοίωση του συστήματος οκτανόλης-νερού. Ωστόσο διαπιστώθηκε σημαντική διαφοροποίηση των συσχετίσεων των τιμών $\log k_w$ με τις τιμές $\log P/\log D$ σε σχέση με τις προτεινόμενες πρότυπες εξισώσεις που προκύπτουν από δομικά διαφορετικές ενώσεις. Τα επιμέρους μοντέλα αν και με μέτρια στατιστικά στοιχεία αποδείχτηκαν περισσότερο αξιόπιστα στην πρόβλεψη των συντελεστών κατανομής των παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος συγκριτικά με τις γενικές εξισώσεις αναφοράς. Οι τιμές $\log k_w$ που προσδιορίστηκαν παρουσία 0,05% οκτανόλης στην κινητή φάση σε pH 3,0 αποδείχτηκαν οι καταλληλότερες για να αντικαταστήσουν τις τιμές $\log P$ στις

συσχετίσεις με την αναστολή της αναγωγής της αλδόζης. Ωστόσο διαφοροποιήσεις ως προς το συντελεστή παλινδρόμησης και τις ενώσεις με αποκλίνουσα συμπεριφορά υποδηλώνουν ότι το πληροφοριακό περιεχόμενο των χρωματογραφικών δεικτών δεν είναι απόλυτα ταυτόσημο με αυτό των τιμών $\log P$.

Στην περίπτωση της RP-TLC αποδείχθηκε ότι ο ιονισμός RP-TLC επηρεάζει τη συγκράτηση στα πλαίσια των συγκεκριμένων ενώσεων παρά τις αντίθετες αναφορές της βιβλιογραφίας. Διαπιστώθηκε ότι η στατική φάση σιλιανοποιημένη με οκτώ άτομα άνθρακα αποτελεί την πλέον κατάλληλη επιλογή τόσο όσον αφορά στην προσομοίωση της λιποφιλίας όσο και στη συσχέτιση με τη βιολογική δράση. Ωστόσο ο συνδυασμός των τιμών $R_{Mw(C8)}$ και $R_{Mw(C18)}$ με επιπλέον παραμέτρους οδηγεί και στις δυο περιπτώσεις σε ικανοποιητικές συσχετίσεις με τη βιολογική δράση.

Το δεύτερο τμήμα της διατριβής εστιάστηκε στη βιομημητική χρωματογραφία (χρωματογραφία IAM) και στη χρωματογραφία συγγένειας (χρωματογραφίες HSA και AGP), ως φιλικών τεχνικών για την εκτίμηση αντίστοιχων βιολογικών διεργασιών.

Μελετήθηκε η συγκράτηση των παραγώγων του πυρρολίου (πυρρολυλ-οξικών οξέων και παραγώγων διφθοροφαινόλης) στις στατικές φάσεις IAM, HSA και AGP και εξήχθησαν επιμέρους συσχετίσεις μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών και των παραμέτρων λιποφιλίας για τη διερεύνηση του μηχανισμού συγκράτησης στα πλαίσια δομικώς συγγενών ενώσεων. Παρατηρήθηκε αυξημένη συγκράτηση των παραγώγων του οξικού οξέος στις στήλες IAM και HSA, γεγονός που αποδόθηκε στην προσβασιμότητα των ανιόντων στην επιφάνεια της πυριτίας και τη δυνατότητα σχηματισμού συμπλόκων με ίχνη μετάλλου σε αναλογία με αντίστοιχες παρατηρήσεις για τις στήλες αντιστρόφου φάσεως.

Τα παράγωγα του πυρρολίου χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση πρότυπης εξίσωσης πρόβλεψης των τιμών $\log k_w^{IAM}$ με βάση τις τιμές $\log D_{7,4}$ και τα ποσοστά των ιονισμένων μορφών.

Για ορισμένες ενώσεις συγκρίθηκε το προφίλ της συγκράτησης σε μεγάλο εύρος pH στις στήλες IAM και ABZ⁺ με το αντίστοιχο προφίλ της κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού και συζητήθηκαν οι διαφοροποιήσεις λόγω της παρουσίας δευτερευουσών αλληλεπιδράσεων σε κάθε περίπτωση.

Σε ότι αφορά τη χρωματογραφία συγγένειας η μελέτη της συγκράτησης επεκτάθηκε σε δομικώς μη συγγενή φαρμακευτικά μόρια στις στατικές φάσεις HSA και AGP χρησιμοποιώντας διαφορετικές χρωματογραφικές συνθήκες. Διερευνήθηκε η

επίδραση του ακετονιτριλίου και της ισοπροπανόλης ως οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση. Σύγκριση των χρωματογραφικών δεικτών HSA με τιμές λιποφιλίας έδειξε ότι πέραν του μηχανισμού κατανομής στη συγκράτηση εμπλέκονται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ανιονικών μορφών των ενώσεων και των βασικών κέντρων της επιφάνειας HSA, ενώ σε μικρότερο βαθμό επηρεάζει η πρωτονίωση. Στη χρωματογραφία AGP διαπιστώθηκε εντονότερη επίδραση της φύσης και του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή στο μηχανισμό συγκράτησης.

Οι παράγοντες που καθορίζουν τη συγκράτηση στις στήλες HSA και AGP διερευνήθηκαν αναλυτικότερα εφαρμόζοντας σολβατοχρωμική ανάλυση. Χαρακτηριστική διαφορά της συγκράτησης στη στήλη AGP συγκριτικά με τη χρωματογραφία HSA, την πρωτεϊνική σύνδεση αλλά και την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού αποτελεί η σημαντικότητα της οξύτητας A σε δεσμούς υδρογόνου. Επιπλέον ενώ τα μοριακά κλάσματα F^+ και F^- είναι στατιστικά σημαντικά στην ανάλυση των δεικτών HSA (ιδιαίτερα ο όρος F^-), δεν υπεισέρχονται ως στατιστικά σημαντικοί όροι στην ανάλυση των δεικτών AGP. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των κατιόντων με τα όξινα κέντρα της στατικής φάσης AGP είναι ασθενέστερες των αντίστοιχων αλληλεπιδράσεων των ανιόντων με τα βασικά κέντρα της στατικής φάσης HSA.

Για την περαιτέρω διερεύνηση των ομοιοτήτων/ανομοιοτήτων μεταξύ των διαφορετικών συστημάτων χρησιμοποιήθηκε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA), η οποία εφαρμόστηκε διαδοχικά στη σειρά δομικώς διαφορετικών ενώσεων, στα παράγωγα του πυρρολίου και στο σύνολο των ενώσεων. Η διαφοροποίηση μεταξύ των μοντέλων PCA αντανάκλα την ισχυρή επίδραση της διαφορετικής συμπεριφοράς των παραγώγων του πυρρολυλ-οξικού οξέος, η οποία οδηγεί σε αντιστροφή των θέσεων των δεικτών HSA και AGP στο διάγραμμα των φορτίων.

Τα δεδομένα της βιομιμητικής χρωματογραφίας αξιολογήθηκαν ως προς τις δυνατότητες που παρέχουν για την προσομοίωση βιολογικών διεργασιών.

Αξιοποιήθηκαν βιβλιογραφικές τιμές $\log k_w^{IAM}$ δομικώς διαφορετικών ενώσεων για την εξαγωγή μοντέλων πρόβλεψης της γαστρεντερικής απορρόφησης %HOA συγκριτικά με αντίστοιχα μοντέλα που εξάγονται στη βάση παραμέτρων λιποφιλίας και δεδομένων σε κυτταρικές σειρές MDCK. Διαπιστώθηκαν και στις τρεις περιπτώσεις μη γραμμικές σχέσεις, οι οποίες βελτιώνονται με την εισαγωγή της παραμέτρου B (βασικότητα σε δεσμούς υδρογόνου). Ενδιαφέρον παρουσίασε η εισαγωγή του κλάσματος της πρωτονιωμένης μορφής F^+ ως έκφρασης των

ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Διαπιστώθηκε υπερέκφραση των αλληλεπιδράσεων αυτών στη στατική φάση IAM, μειωμένη έκφραση στις κυτταρικές σειρές MDCK, ενώ το θετικό πρόσημο της παραμέτρου F^+ στη σχέση %HOA ως προς $\log D$ καταδεικνύει τη θετική τους συμβολή στην απορρόφηση.

Οι χρωματογραφικοί δείκτες HSA που προσδιορίστηκαν στα πλαίσια της παρούσης διατριβής συγκρίθηκαν με βιβλιογραφικά δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης. Διαπιστώθηκε καλύτερη συσχέτιση χρησιμοποιώντας τις ισοκρατικές τιμές $\log k_{10}^{HSA}_{(ACN)}$ και κατασκευάστηκε εξίσωση αναφοράς η οποία αξιολογήθηκε επιτυχώς με σειρά ελέγχου. Η δυνατότητα χρήσης ισοκρατικών τιμών αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα έναντι άλλων αντίστοιχων σχέσεων που αναφέρονται στη βιβλιογραφία δεδομένου ότι απαιτούν μια μόνο μέτρηση, ενώ επιτρέπουν τον προσδιορισμό ενώσεων που συγκρατούνται ισχυρά και δεν θα ήταν δυνατόν να μετρηθούν παρουσία 100% υδατικής φάσης.

Προσπάθειες συσχέτισης των χρωματογραφικών δεικτών AGP με σταθερές σύνδεσης στις γενετικές παραλλαγές A και F1*S της α -όξινης γλυκοπρωτεΐνης του πλάσματος δεν οδήγησαν σε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ωστόσο διαπιστώθηκαν ορισμένες διαφορές κατά τη συσχέτιση των δεδομένων των δυο γενετικών παραλλαγών με το κλάσμα πρωτονίωσης ως έκφραση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων να είναι στατιστικά σημαντικό στην παραλλαγή A και τη βασικότητα των ενώσεων ως προς το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου στο μίγμα των γενετικών παραλλαγών F1*S. Επιπλέον η σημαντική επίδραση του οργανικού τροποποιητή στο μηχανισμό συγκράτησης οδηγεί σε διαφοροποίηση των εξισώσεων που προκύπτουν με τους διαφορετικούς χρωματογραφικούς δείκτες, με την ισοπροπανόλη να φαίνεται ως περισσότερο κατάλληλη. Απαιτείται ωστόσο περαιτέρω μελέτη όσον αφορά στην αποσαφήνιση της επίδρασης των χρωματογραφικών συνθηκών στην τελική διαμόρφωση της στατικής φάσης AGP και συγκέντρωση περισσότερο δεδομένων για τη διερεύνηση της ικανότητας της χρωματογραφίας AGP να προσομοιώνει τη σύνδεση με την α -όξινη γλυκοπρωτεΐνη.

Η εφαρμογή των προτύπων εξισώσεων αναφοράς/μοντέλων για τα παράγωγα του πυρρολίου οδήγησε σε πρώτες εκτιμήσεις για την απορρόφηση, πρωτεϊνική σύνδεση και κατανομή τους, στοιχεία που αποτελούν χρήσιμες πληροφορίες για την περαιτέρω έρευνα ανάλογων χημειοτύπων με ανασταλτική δράση επί της αναγωγής της αλδόζης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Τιμές σταθερών ιονισμού, ηλεκτρονιακής σταθεράς σ , τοπολογικό εμβαδόν επιφάνειας και παράγοντας ενυδάτωσης B για τα παράγωγα του πυρρολυλ-οξικού οξέος.

No	pK _{alc}	pK _{a(ADME)}	σ	TPSA	B
1	4,08	4,00(±0,50)	0,00	59,30	0,97
2	4,09	4,00(±0,50)	-0,17	59,30	0,97
3	4,09	4,00(±0,50)	-0,20	59,30	1,02
4	4,07	4,00(±0,50)	-0,27	68,53	1,18
5	4,05	4,00(±0,50)	0,23	59,30	0,97
6	4,04	4,00(±0,50)	0,54	59,30	0,86
7	4,02	4,00(±0,50)	0,78	105,12	1,07
8	4,08	4,00(±0,50)	-0,01	59,30	1,07
9	4,05	4,00(±0,50)	0,37	59,30	0,97
10	4,08	4,00(±0,50)	0,22	59,30	1,03
11	4,08	4,00(±0,50)	0,04	59,30	1,03
12	4,08	4,00(±0,50)	0,00	59,30	1,03
13	3,84	4,00(±0,50)	0,00	76,37	1,36
14	3,83	4,00(±0,50)	-0,27	85,60	1,58
15	3,86	4,00(±0,50)	-0,54	94,83	1,79
16	4,05	4,00(±0,50)	-0,27	68,53	1,10
17	4,13 ^a -1,26 ^b	4,00(±0,50) ^a 2,40(±1,80) ^b	0,00	55,12	0,91
18	3,79	4,00(±0,50)	0,00	70,16	0,99

^aόξινη ομάδα, ^bβασική ομάδα.

Πίνακας 2. Τιμές logP, logD_{7,4} και logk_w^{IAM} για τα παράγωγα της διφθοροφαινόλης*.

No	logP	logD _{7,4}	logk _w ^{IAM[pH 3,0]}	logk _w ^{IAM[pH 7,4]}
20	3,70	2,76	2,66	2,29
21	3,30	2,47	3,10	2,66
22	3,50	2,48	2,62	2,61
23	3,02	2,03	2,46	2,00
24	3,25	2,35	2,78	2,37
25	2,27	1,25	1,63	0,95
26	2,63	0,86	1,88	1,08
27	2,48	1,35	1,64	1,22

*όλες οι τιμές ελήφθησαν από την παραπομπή (277).

Πίνακας 3. Τιμές logk_w^{ABZ} σε pH 3,0 και 7,4 για τα παράγωγα της διφθοροφαινόλης*.

No	pH 3,0	pH 7,4		
	logk _w ^{ABZ} _[0,25%]	logk _w ^{ABZ} _[no-oct]	logk _w ^{ABZ} _[0,05%]	logk _w ^{ABZ} _[0,25%]
20	3,13	2,85	2,59	2,59
21	3,15	2,90	2,61	2,58
22	3,33	3,02	2,70	2,37
23	2,73	2,95	2,72	2,51
24	3,01	3,13	2,84	2,60
25	2,19	1,57	1,23	1,15
26	2,21	1,68	1,21	1,14
27	2,21	1,91	1,43	1,28

*όλες οι τιμές ελήφθησαν από την παραπομπή (277).

Πίνακας 4. Τιμές $\log k_w^{IAM}$, $\log P$ και $\log D$ της σειράς εργασίας για την εξαγωγή του μοντέλου γαστρεντερικής απορρόφησης .

No	Ένωση	$\log k_w^{IAM[pH 5,0]}$	$\log k_w^{IAM[pH 7,4]}$	$\log P$	$\log D_{5,0}$	$\log D_{7,4}$
1	Ακεταμινοφαίνη	-0,06 ^(γ)	0,18 ^(γ)	0,51 ^(β)	0,51 ^(β)	0,51 ^(β)
2	Ακυκλοβίρη	-1,37 ^(γ)	-1,15 ^(γ)	-1,56 ^(β)	-1,56 ^(γ)	-1,56 ^(β)
3	Ατενολόλη	-0,20 ^(γ)	0,51 ^(γ)	0,16 ^(β)	-2,55 ^(γ)	-1,61 ^(β)
4	Βεναζεπρίλη	1,80 ^(γ)	1,21 ^(γ)	3,26 ^(α)	1,48 ^(γ)	-0,18 ^(γ)
5	Βρωμαζεπάμη	1,39 ^(γ)	1,44 ^(γ)	1,65 ^(β)	1,65 ^(γ)	1,65 ^(β)
6	Καπτοπρίλη	* ^(γ)	* ^(γ)	1,02 ^(γ)	-2,15 ^(γ)	-1,48 ^(γ)
7	Χλωροπρομαζίνη	2,58 ^(γ)	3,33 ^(γ)	5,41 ^(β)	1,84 ^(γ)	3,38 ^(γ)
8	Χλωροθαλιδόνη	1,27 ^(γ)	1,37 ^(γ)	1,12 ^(β)	1,12 ^(γ)	1,12 ^(β)
9	Κυπροφλοξακίνη	1,29 ^(γ)	1,31 ^(γ)	-1,08 ^(α)	-1,30 ^(γ)	-1,11 ^(γ)
10	Διαζεπάμη	2,12 ^(γ)	2,12 ^(γ)	2,79 ^(β)	2,79 ^(γ)	2,79 ^(β)
11	Διλτιαζέμη	1,55 ^(γ)	2,65 ^(γ)	2,80 ^(β)	0,07 ^(γ)	2,06 ^(β)
12	Εναλαπρίλη	* ^(γ)	-0,33 ^(γ)	0,71 ^(α)	-1,64 ^(γ)	-1,05 ^(γ)
13	Υδροχλωροθειαζίδιο	0,58 ^(δ)	0,53 ^(δ)	-0,07 ^(η)	-0,07 ^(η)	-0,12 ^(η)
14	Ιμιπραμίνη	2,05 ^(γ)	2,73 ^(γ)	4,44 ^(β)	1,29 ^(γ)	2,40 ^(β)
15	Κετοπροφαίνο	1,55 ^(γ)	0,74 ^(γ)	3,12 ^(γ)	1,77 ^(γ)	-0,25 ^(β)
16	Λαβηταλόλη	2,07 ^(στ)	1,90 ^(ε)	-0,02 ^(ζ)	-0,02 ^(ζ)	1,15 ^(ζ)
17	Ναπροξένο	1,71 ^(γ)	0,98 ^(γ)	3,35 ^(α)	2,24 ^(γ)	0,33 ^(γ)
18	Νιφεδιτίνη	1,64 ^(γ)	1,66 ^(γ)	2,20 ^(β)	2,20 ^(γ)	2,20 ^(γ)
19	Νορφλοξακίνη	1,31 ^(γ)	1,01 ^(γ)	-1,00 ^(γ)	-1,17 ^(γ)	-1,03 ^(γ)
20	Οξπρενολόλη	0,87 ^(γ)	1,47 ^(γ)	2,10 ^(β)	-0,61 ^(γ)	0,32 ^(γ)
21	Πινδολόλη	0,73 ^(γ)	1,47 ^(γ)	1,75 ^(α)	-1,15 ^(γ)	-0,21 ^(γ)
22	Πιροξικάμη	1,73 ^(γ)	1,35 ^(γ)	1,61 ^(γ)	2,18 ^(γ)	-0,05 ^(γ)
23	Προπρανολόλη	1,63 ^(γ)	2,33 ^(γ)	2,98 ^(β)	0,32 ^(γ)	1,26 ^(β)
24	Ρανιτιδίνη	0,46 ^(στ)	0,98 ^(ε)	-	-	-0,29 ^(η)
25	Σκοπολαμίνη	0,73 ^(γ)	1,15 ^(γ)	0,55 ^(β)	-2,31 ^(γ)	-0,23 ^(β)
26	Τενοξικάμη	1,52 ^(γ)	1,20 ^(γ)	0,81 ^(α)	1,75 ^(γ)	-0,32 ^(γ)
27	Θεοφυλλίνη	-0,26 ^(γ)	-0,08 ^(γ)	-0,02 ^(β)	-0,02 ^(γ)	-0,02 ^(β)
28	Τριμεθοπρίμη	0,74 ^(γ)	1,05 ^(γ)	0,91 ^(β)	-1,25 ^(γ)	0,74 ^(β)
29	Βεραπαμίλη	1,86 ^(γ)	2,76 ^(γ)	3,79 ^(β)	1,20 ^(γ)	2,57 ^(β)

^(α)από την παραπομπή (36), ^(β)από την παραπομπή (187), ^(γ)από την παραπομπή (190),

^(δ)από την παραπομπή (203), ^(ε)από την παραπομπή (282), ^(στ)από την παραπομπή (283), ^(ζ)από την παραπομπή (284), ^(η)από την παραπομπή (285), *δεν εκλούστηκαν.

Πίνακας 5. Τιμές διαπερατότητας σε κυτταρικές σειρές MDCK*.

No	Ένωση	logPerm _{5,5}	logPerm _{7,4}
2	Ακυκλοβίρη	-7,85	-7,70
3	Ατενολόλη	-8,10	-7,93
13	Υδροχλωροθειαζίδιο	-8,12	-7,96
15	Κετοπροφαίνιο	-6,09	-6,81
16	Λαβηταλόλη	-7,38	-6,70
17	Ναπροξένιο	-5,95	-6,51
21	Πινδολόλη	-7,30	-6,57
23	Προπρανολόλη	-7,25	-6,35
24	Ρανιτιδίνη	-8,26	-8,12
27	Θεοφυλλίνη	-6,50	-6,52
28	Τριμεθοπρίμη	-7,21	-6,78
29	Βεραπαμίλη	-7,28	-6,58

*όλες οι τιμές ελήφθησαν από την παραπομπή (286).

Πίνακας 6. Παράμετρος B του Abraham και κλάσματα μοριακών ιόντων της σειράς εργασίας.

No	Ένωση	B	F ⁺ [pH 5,0]	F ⁺ [pH 7,4]	F ^z [pH 5,0]	F ^z [pH 7,4]	F ⁺ _(best)
1	Ακεταμινοφαίνη	0,86	0,000	0,000			0,000
2	Ακυκλοβίρη	2,19	0,000	0,000			0,000
3	Ατενολόλη	2,00	1,000	0,994			0,994
4	Βεναζεπρίλη	2,08	0,052	0,000	0,729	0,014	0,052
5	Βρωμαζεπάμη	1,62	0,124	0,000			0,000
6	Καπτοπρίλη	1,13	0,000	0,000			0,000
7	Χλωροπρομαζίνη	0,94	1,000	0,991			0,991
8	Χλωροθαλιδόνη	1,98	0,000	0,000			0,000
9	Κυπροφλοξακίνη	1,85	0,934	0,965	0,066	0,914	0,934
10	Διαζεπάμη	1,25	0,014	0,000			0,000
11	Διλτιαζέμη	2,12	0,999	0,875			0,875
12	Εναλαπρίλη	1,92	0,011	0,000	0,769	0,014	0,011
13	Υδροχλωροθειαζίδιο	1,76	0,000	0,000			0,000
14	Ιμπραμίνη	1,15	1,000	0,991			0,991
15	Κετοπροφαίνιο	0,89	0,000	0,000			0,000
16	Λαβηταλόλη	1,72	0,997	0,552			0,552
17	Ναπροξένιο	0,68	0,000	0,000			0,000
18	Νιφεδιπίνη	1,45	0,000	0,000			0,000
19	Νορφλοξακίνη	1,84	0,934	0,965	0,066	0,914	0,934
20	Οξπρενολόλη	1,62	1,000	0,994			0,994
21	Πινδολόλη	1,48	1,000	0,994			0,994
22	Πιροξικάμη	1,82	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001
23	Προπρανολόλη	1,42	1,000	0,994			0,994
24	Ρανιτιδίνη	1,97	1,000	0,933			0,933
25	Σκοπολαμίνη	1,88	0,998	0,689			0,689
26	Τενοξικάμη	2,06	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
27	Θεοφυλλίνη	1,34	0,000	0,000			0,000
28	Τριμεθοπρίμη	1,62	0,996	0,469			0,469
29	Βεραπαμίλη	1,89	1,000	0,982			0,982

Πίνακας 7. Σολβατοχρωμικές παράμετροι (σειρά εργασίας).

No	Ένωση	A	B	S	E	V
1	Ακεταμινοφαίνη	0,91	0,93	1,66	1,12	1,17
2	Αντιπυρίνη	0,00	1,28	1,75	1,42	1,49
3	Ατενολόλη	0,78	1,85	1,97	1,48	2,18
4	Καπτοπρίλη	0,57	1,13	1,77	1,17	1,62
5	Καρβαμαζεπίνη	0,39	0,92	2,06	2,12	1,81
6	Κεφαμανδόλη	0,39	3,18	4,03	3,63	3,04
7	Κεφορανίδη	1,63	3,61	4,77	3,86	3,44
8	Κεφοξιτίνη	1,29	2,65	3,74	2,64	2,77
9	Κεφταζιδίμη	1,64	3,19	4,31	3,45	3,66
10	Χλωροφαινουραμίνη	0,00	1,02	1,49	1,52	2,21
11	Χλωροπρομαζίνη	0,00	0,99	1,83	2,26	2,41
12	Διαζεπάμη	0,00	1,04	1,72	2,11	2,07
13	Διλτιαζέμη	0,00	2,12	2,55	2,42	3,14
14	Διφαινυδραμίνη	0,00	0,95	1,43	1,36	2,19
15	Διπυριδαμόλη	0,95	3,03	2,90	3,74	3,87
16	Δοξεπίνη	0,00	0,98	1,46	1,75	2,32
17	Επαλρεστάτη	0,57	1,27	2,68	2,44	2,26
18	Φλουνιτραζεπάμη	0,00	1,15	2,15	2,14	2,14
19	Φλουοξετίνη	0,13	0,78	1,19	1,01	2,24
20	Ιμιπραμίνη	0,00	0,95	1,59	1,81	2,40
21	Ινδομεθακίνη	0,57	1,24	2,49	2,44	2,53
22	Κετοπροφαίνη	0,57	0,87	1,97	1,56	1,98
23	Λοραζεπάμη	0,64	1,29	1,83	2,37	2,11
24	Μεβενδαζόλη	0,71	1,38	2,76	2,45	2,13
25	Ναπροξένη	0,57	0,75	1,49	1,54	1,78
26	Νιφεδιπίνη	0,13	1,53	2,25	1,56	2,50
27	Πεντοβαρβιτάλη	0,52	1,24	1,35	0,98	1,80
28	Περφαιναζίνη	0,23	1,84	2,33	2,87	3,02
29	Φαινακετίνη	0,41	0,87	1,55	0,96	1,45
30	Φαινοβαρβιτάλη	0,52	1,29	1,81	1,56	1,70
31	Φαινυτοΐνη	0,44	1,14	2,04	1,94	1,87
32	Προξικάμη	0,44	2,17	3,09	2,66	2,25
33	Προπαφαινόνη	0,29	1,67	2,04	1,83	2,83
34	Προπρανολόλη	0,29	1,36	1,44	1,76	2,15
35	Κινιδίνη	0,23	1,81	1,71	2,40	2,55
36	Τερβουταλίνη	1,38	1,63	1,31	1,39	1,84
37	Τολβουταμίδη	0,59	1,15	2,21	1,33	2,06
38	Τραζοδόνη	0,00	1,92	2,47	2,64	2,73
39	Τριμεθοπρίμη	0,45	1,62	2,81	2,04	2,18

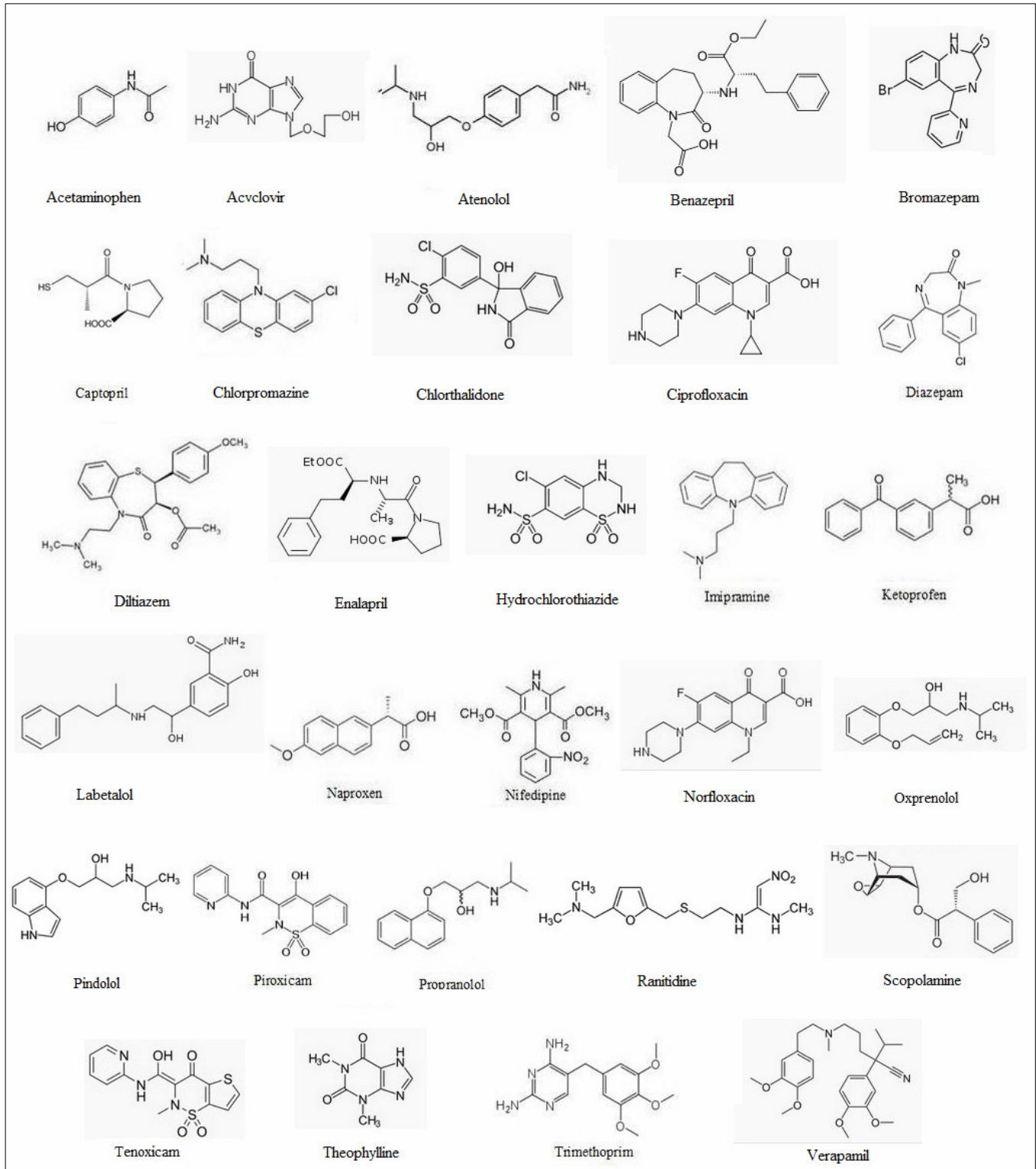
Πίνακας 8. Σολβατοχρωμικές παράμετροι (σειρά ελέγχου).

No	Ένωση	A	B	S	E	V
40	Αλπραζολάμη	0,00	0,84	1,95	2,59	2,20
41	Αμιτριπυλίνη	0,00	0,77	1,31	1,71	2,40
42	Ασπρίνη	0,57	0,77	1,42	0,84	1,29
43	Ατροπίνη	0,31	1,31	1,63	1,46	2,28
44	Βηταμεθαζόνη	0,80	1,97	2,95	2,07	2,91
45	Καφεΐνη	0,00	1,27	1,90	1,48	1,36
46	Χλωμιπραμίνη	0,00	0,89	1,66	1,94	2,52
47	Δικλοφενάκη	0,70	0,67	1,95	1,81	2,03
48	Αλλοπεριδόλη	0,31	1,45	2,08	2,00	2,80
49	Μεφαιναμικό οξύ	0,65	0,70	1,47	1,65	1,92
50	Μιδαζολάμη	0,00	0,80	1,76	2,41	2,26
51	Νιμεσουλίδιο	0,43	1,10	2,68	2,03	2,08
52	Νορτριπυλίνη	0,13	0,72	1,30	1,69	2,26
53	Οξπρενολόλη	0,29	1,61	1,69	1,23	2,22
54	Πινδολόλη	0,60	1,51	1,53	1,70	2,01
55	Προμεθαζίνη	0,00	1,09	1,72	2,14	2,28
56	Προτριπυλίνη	0,13	0,73	1,34	1,72	2,26
57	Πυριμεθαμίνη	0,45	0,99	2,01	2,26	1,85
58	Σαλικυλικό οξύ	0,70	0,40	1,10	0,91	0,99
59	Σουλφαμεθοξαζόλιο	0,59	1,21	2,43	1,99	1,72
60	Τενοξικάμη	0,72	2,06	3,04	2,51	2,18
61	Τεστοστερόνη	0,31	1,01	2,27	1,55	2,38
62	Θειοριδαζίνη	0,00	1,13	1,93	2,70	2,90
63	Τριαζολάμη	0,00	0,83	2,03	2,74	2,33

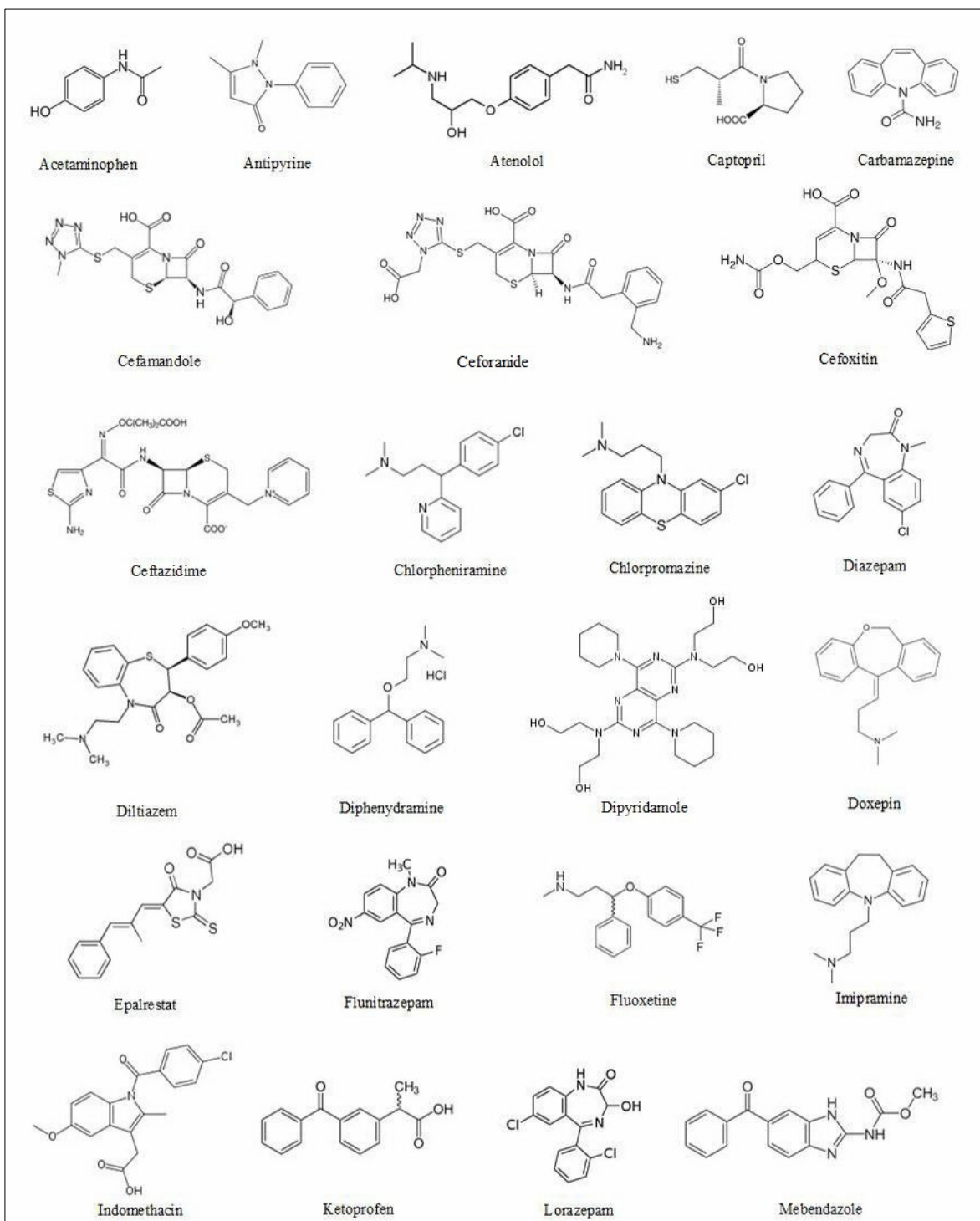
Πίνακας 9. Τιμές $\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$ και κανονικοποιημένες τιμές $\log K^{\text{HSA}}$ και $\log K^{\text{IAM}}$ για τα παράγωγα του πυρρολίου*.

No	$\log k_{10}^{\text{HSA}}_{(\text{ACN})}$	$\log K^{\text{HSA}}$	$\log K^{\text{IAM}}$
1	0,24	1,13	2,28
2	0,54	1,75	2,67
3	0,89	2,72	3,65
5	0,81	2,47	2,85
6	1,36	4,51	3,97
7	0,43	1,51	2,38
8	0,68	2,10	2,98
9	0,64	1,99	2,78
10	0,64	2,00	3,11
11	1,29	4,21	3,38
12	0,90	2,76	3,16
13	1,00	3,08	3,59
14	1,14	3,61	3,85
15	1,63	5,71	3,88
16	0,77	2,36	2,51
17	1,38	4,59	2,91
18	0,75	2,32	2,73
19	0,99	3,05	3,76
20	1,44	4,84	3,67
21	1,52	5,18	4,07
22	1,50	5,09	3,64
23	1,37	4,54	3,49
24	1,36	4,50	3,78
25	0,61	1,93	2,75
26	1,00	3,10	2,97
27	0,73	2,25	2,76

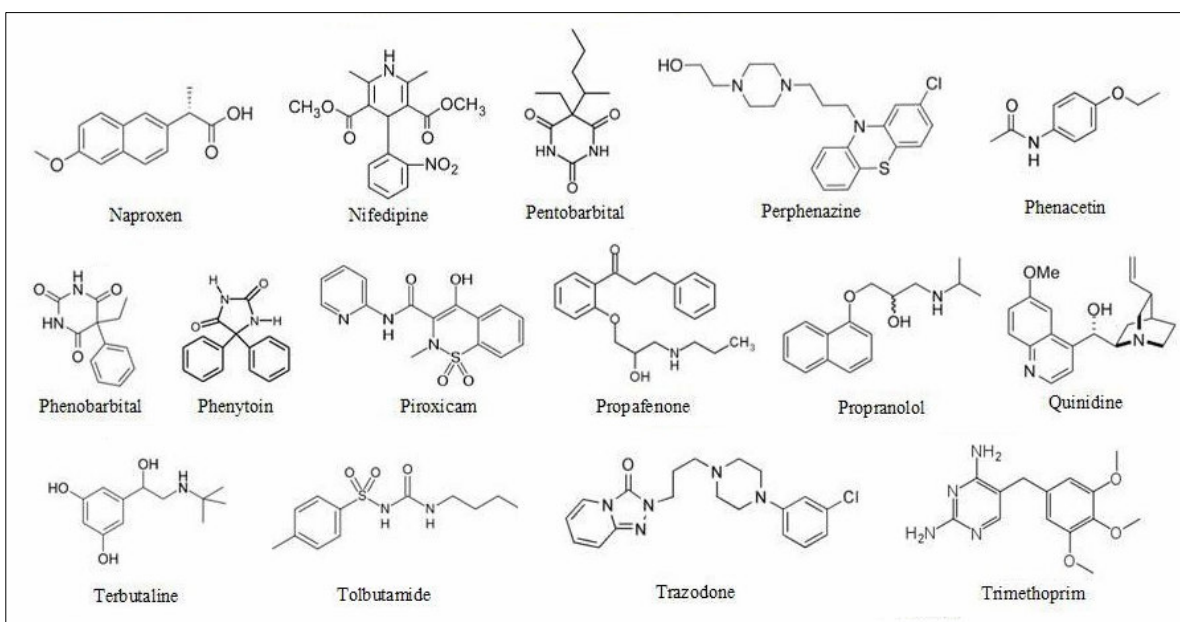
*δεν μετρήθηκαν τιμές για την ένωση 4 λόγω έλλειψης δείγματος και ως εκ τούτου δεν προβλέφθηκαν τιμές.



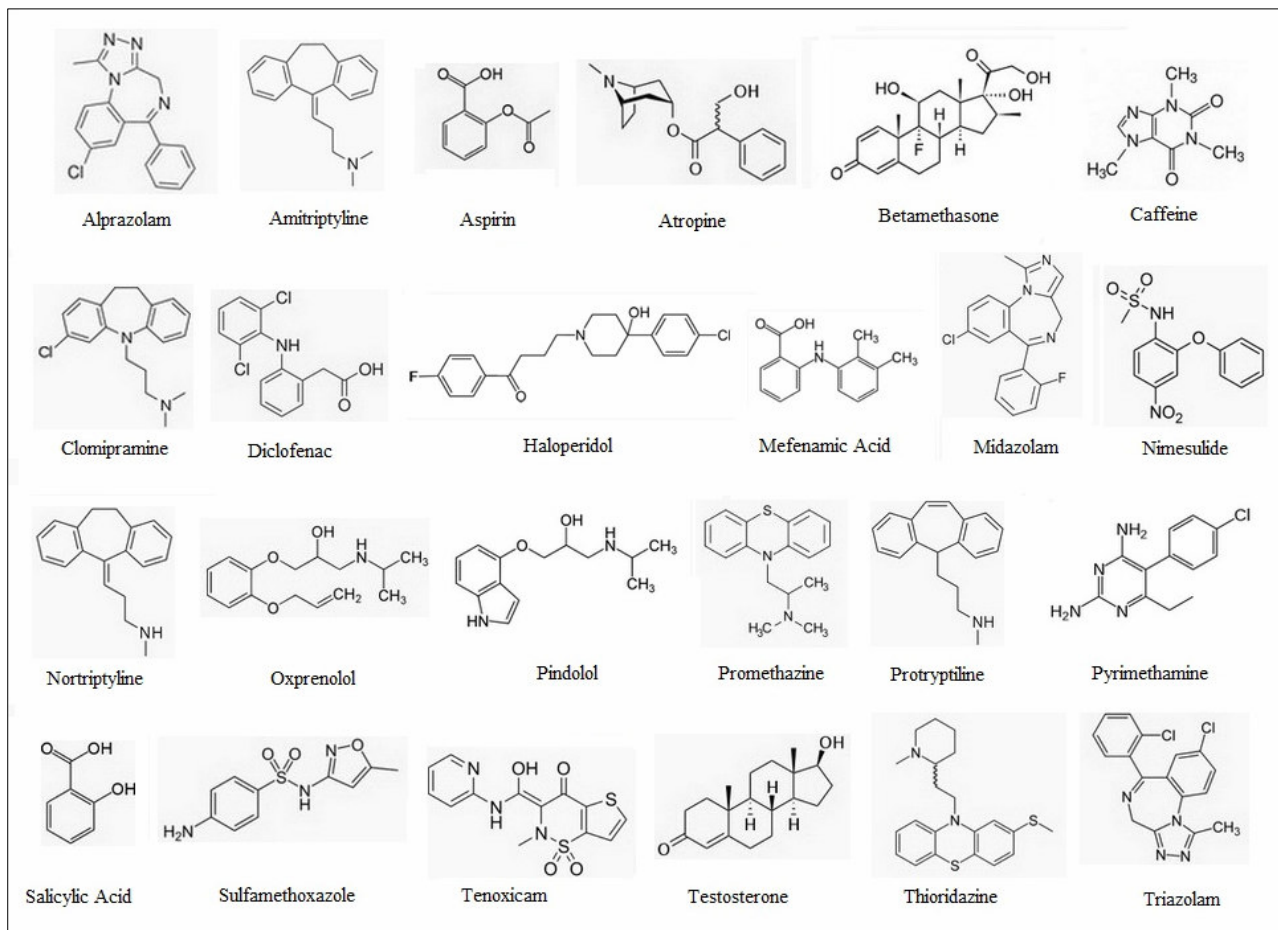
Σχήμα 1. Δομές των ενώσεων που αποτέλεσαν τη σειρά εργασίας στη χρωματογραφία IAM.



Σχήμα 2. Δομές των ενώσεων αναφοράς στη χρωματογραφία HSA (A-M).



Σχήμα 3. Δομές των ενώσεων αναφοράς στη χρωματογραφία HSA (N-T).



Σχήμα 4. Δομές των ενώσεων ελέγχου στη χρωματογραφία HSA.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ R. Lahana, How many leads from HTS?, *Drug Discov. Today*, 4, **1999**, 447-448.
- ² L. Pickering, ADME/Tox models can speed development, *Drug Discov. Dev.*, **2001**, 34-36.
- ³ I. Kola, J. Landis, Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?, *Nat. Rev. Drug Discov. Today*, 3, **2004**, 711-716.
- ⁴ H. Meyer, Zur Theorie der Alkoholnarkose. Welche eigenschaft der anasthetica bedingt inre Narkotische wirkung?, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 42, **1899**, 109-118.
- ⁵ C.E. Overton, Studien über die Narkose zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie, Gustav Fischer, Jena, **1901**.
- ⁶ J. Ferguson, Proceedings of the Royal Society, 127, **1939**, 387-403.
- ⁷ C. Hansch, Fujita T., ρ - σ - π Analysis, A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, **1964**, 1616-1626.
- ⁸ A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.*, **71**, **1971**, 525-616.
- ⁹ J.T. Penniston, L. Beckett, D.L. Bentley, C. Hansch, Passive Permeation of Organic Compounds through Biological Tissue: a Non-Steady-State Theory, *Mol. Pharmacol.*, **5**, 1969, 333-341.
- ¹⁰ A. Tsantili-Kakoulidou, D.K. Agrafiotis, The 18th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships, *Expert Opin. Drug Discovery*, 6, **2011**, 453-456.
- ¹¹ C. Hansch, A. Leo, Substituents Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, Wiley-Interscience, New York, **1979**.

-
- ¹² C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 23, **1997**, 3-25.
- ¹³ M. Congreve, R. Carr, C. Murray, H. Jhoti, A Rule of Three for fragment-based lead discovery?, *Drug Discov. Today*, 8, **2003**, 876-877.
- ¹⁴ C. Hansch, A.R. Steward, S.M. Anderson, D.L. Bentley, Parabolic dependence of drug action upon lipophilic character as revealed by a study of hypnotics, *J. Med. Chem.*, 11, **1968**, 1-11.
- ¹⁵ H. Kubinyi, Lipophilicity and Biological Activity: Drug transport and drug distribution in model systems and in biological systems, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 29, **1979**, 1067-1080.
- ¹⁶ Physicochemical Parameter Database, Medicinal Chemistry Project, Pomona College, Claremont, CA, USA. (www.biobyte.com/bb/prod/cqsar.html)
- ¹⁷ C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman (eds.), Exploring QSAR, Hydrophobic, Electronic and Steric Constants, American Chemical Society: Washington DC, **1995**, 217-324.
- ¹⁸ C. Hansch, J.P. Bjorkroth, A. Leo, Hydrophobicity and central nervous system agents: On the principle of minimal hydrophobicity in drug design, *J. Pharm. Sci.*, 76, **1987**, 663-687.
- ¹⁹ C. Hansch, Quantitative Structure-Activity Relationships and the Unnamed Science, *Acc. Chem Res.*, 26, **1993**, 147-153.
- ²⁰ G.Z. Yang, E.J. Lien, R. Guo, Physical factors contributing to hydrophobic constant π , *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 5, **1986**, 12-18.
- ²¹ N. El Tayar, B. Testa, P.A. Carrupt, Polar intermolecular interactions encoded in partition coefficients: an indirect estimation of hydrogen-bond parameters of polyfunctional solutes. *J. Phys. Chem.*, 96, **1992**, 1455-1459.

-
- ²² B. Testa, P.A. Carrupt, P. Gaillard, R.S. Tsai, Intramolecular Interactions encoded in Lipophilicity: Their nature and significance, in: *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, V. Pliska, B. Testa, H. van de Waterbeemd (eds.), VCH: Weinheim, **1996**, 49-71.
- ²³ O.A. Raevsky, K.J. Schaper, J.K. Seydel, H-Bond contribution to octanol-water partition coefficients of polar compounds, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 14, **1995**, 433-436.
- ²⁴ A. Tsantili-Kakoulidou, A. Varvaresou, T. Siatra-Papastaikoudi, O. Raevsky, A comprehensive investigation of the partitioning and hydrogen bonding behavior of Indole containing derivatives of 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole by means of experimental and calculative approaches, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 18, **1999**, 482-489.
- ²⁵ P. Gaillard, P.A. Carrupt, B. Testa, The Conformation-Dependent Lipophilicity of Morphine Glucuronides as Calculated from the Molecular Lipophilicity Potential, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4, **1994**, 737-742.
- ²⁶ P.A. Carrupt, P. Gaillard, F. Billois, P. Weber, B. Testa, C. Meyer, S. Perez. The Molecular Lipophilicity Potential (MLP): A New Tool for logP Calculations and Docking, and in Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA), in: *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, V. Pliska, B. Testa, H. van de Waterbeemd (eds.), VCH: Weinheim, **1996**, 195-217.
- ²⁷ C.A. Lipinski, Filtering in drug discovery, *Ann. Rep. Comp. Chem.*, 1, **2005**, 155-168.
- ²⁸ S.J. Teague, A.M. Davis, P.D. Leeson, T.I Oprea, The Design of Leadlike Combinatorial Libraries, *Angew. Chem. Int.*, 38, **1999**, 3743-3748.
- ²⁹ T.I Oprea, A.M. Davis, S.J. Teague, P.D. Leeson, Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 41, **2001**, 1308-1315.

-
- ³⁰ R.A. Scherrer, Biolipid pK_a values in the lipophilicity of ampholytes and ion pairs, in: *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*, B. Testa, H. van de Waterbeemd, G. Folkers, R. Guy (eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich and Wiley-VCH: Weinheim, **2001**, 351-381.
- ³¹ A. Leo, Some advantages of calculating octanol-water partition coefficients, *J. Pharm. Sci.*, **76**, **1987**, 166-168.
- ³² T. Fujita, T. Iwasa, J.C. Hansch, A new substituent constant, K , derived from partition coefficients, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, **1964**, 5175-5180.
- ³³ J. Bradshaw, P.J. Taylor, Rationalisations among Heterocyclic Partition Coefficients. Part 3: π -Excessive Heterocycles. Some Comments on the ClogP Algorithm, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **8**, **1989**, 279-287.
- ³⁴ C. Yamagami, N. Takao, T. Fujita, Hydrophobicity parameter of diazines. III: Relationship of partition coefficients of monosubstituted diazines and pyridines in different partitioning systems, *J. Pharm. Sci.*, **82**, **1993**, 155-161.
- ³⁵ F. Gago, M. Pastor, J. Perez-Budragueno, R. Lopez, J. Avarez-Builla, J. Elguero, Hydrophobicity of Heterocycles: Determination of the π values of substituents on N-Phenylpyrazoles, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **13**, **1994**, 165-171.
- ³⁶ D. Vrakas, A. Tsantili-Kakoulidou, D. Hadjipavlou-Litina, Exploring the consistency of logP estimation for substituted coumarins, *QSAR Comb. Sci.*, **22**, **2003**, 622-629.
- ³⁷ T. Masuda, T. Jikihara, K. Nakamura, A. Kimura, T. Takagi, H. Fujiwara, Introduction of solvent-accessible surface area in the calculation of the hydrophobicity parameter logP from an atomistic approach, *J. Pharm. Sci.*, **86**, **1997**, 57-63.

-
- ³⁸ N.G.J. Richards, P.B. Williams, M.S. Tute, Empirical methods for computing molecular partition coefficients. I. Upon the need to model the specific hydration of polar groups in fragment-based approaches, *Int. J. Quantum Chem.*, 40, **1991**, 299-316.
- ³⁹ G.G. Nys, R.F. Rekker, Statistical analysis of a series of partition coefficients with special reference to the predictability of folding of drug molecules Introduction of hydrophobic fragmental constants (f values), *Chim. Ther.*, 8, **1973**, 521-535.
- ⁴⁰ R.F. Rekker, H.M. de Kort, The hydrophobic fragmental constants: an extension to a 1000 data point set, *Eur. J. Med. Chem.*, 14, **1979**, 479-488.
- ⁴¹ R.F. Rekker, The History of Drug Research: From Overton to Hansch, *Quant. Struct-Act. Relat.*, 11, **1992**, 195-199.
- ⁴² A.J. Leo, P.Y.C. Jow, C. Silipo, C. Hansch, Calculation of hydrophobic constant (logP) from π and f constants, *J. Med. Chem.*, 18, **1975**, 865-868.
- ⁴³ A.J. Leo, Calculating logP(oct) from structures, *Chem. Rev.*, 93, **1993**, 1281-1306.
- ⁴⁴ C. Hansch, A. Leo, Exploring QSAR: Fundamentals and applications in chemistry and biology, American Chemical Society, Washington DC, **1995**.
- ⁴⁵ P. Broto, G. Moreau, C. Vandycke, Molecular structures, perception, autocorrelation descriptor and SAR studies, *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.*, 19, **1984**, 71-78.
- ⁴⁶ A.K. Ghose, G.M. Crippen, Atomic Physicochemical Parameters for Three-Dimensional Structure-Directed Quantitative Structure-Activity Relationships I. Partition Coefficients as a Measure of Hydrophobicity, *J. Comput. Chem.*, 7, **1986**, 565-577.

-
- ⁴⁷ I. Moriguchi, S. Hirono, Q. Liu, I. Nakagome, Y. Matsushita, Simple method of calculating octanol/water partition coefficient, *Chem. Pharm. Bull.*, 40, **1992**, 127-130.
- ⁴⁸ G. Klopman, L.D. Iroff, Calculation of partition coefficients by the charge density method, *J. Comput. Chem*, 2, **1981**, 157-160.
- ⁴⁹ T. Suzuki, Y. Kudo, Automatic logP estimation based on combined additive modeling methods, *J. Comp-Aid. Mol. Des.*, 4, **1990**, 155-198.
- ⁵⁰ W. M. Meylan, P. H. Howard, Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients, *J. Pharm. Sci.*, 84, **1995**, 83-92.
- ⁵¹ W.J. Dunn, M.G. Koehler, S. Grigoras, The role of solvent-accessible surface area in determining partition coefficients, *J. Med. Chem.*, 30, **1987**, 1121-1126.
- ⁵² I.V. Tetko, V.Y. Tanchuk, Application of Associative Neural Networks for Prediction of Lipophilicity in ALOGPS 2.1 Program, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 42, **2002**, 1136-1145.
- ⁵³ Pharma Algorithms (www.pharma-algorithms.com)
- ⁵⁴ M. Partham, L. Hall, M. Kier, Accurate prediction of logP using E-state indices with Neural Network Analysis, American Chemical Society Meeting, Washington DC, **2000**.
- ⁵⁵ L.H. Hall, B. Mohny, L.B. Kier, The electrotopological State: An atom index for QSAR, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 10, **1991**, 43-52.
- ⁵⁶ P. Gaillard, P.A. Carrupt, B. Testa, A. Boudon, Molecular Lipophilicity Potential, a tool in 3D QSAR: Method and applications, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 8, **1994**, 83-96.
- ⁵⁷ R. Mannhold, Calculation of Lipophilicity: A Classification of Methods, in: *Pharmacokinetic Profiling in Drug Research*, B. Testa, S.D. Krämer, H. Wunderli-

Allenspach, G. Folkers (eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich and Wiley-VCH: Weinheim, **2006**, 333-352.

⁵⁸ R.F. Rekker, R. Mannhold, Calculation of Drug Lipophilicity, VCH, Weinheim, **1992**.

⁵⁹ CompuDrug Ltd. (<http://www.compudrug.com/>)

⁶⁰ J.T. Chou, P.C. Jurs, Computer-Assisted Computation of Partition Coefficients from Molecular Structures Using Fragment Constants, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **19**, **1979**, 172-178.

⁶¹ A.J. Leo, D. Hoekman, Calculating logP(oct) with no missing fragments. The problem of estimating new interaction parameters, *Perspect. Drug Discov. Des.*, **18**, **2000**, 19-38.

⁶² BioByte Corporation (<http://www.biobyte.com/>)

⁶³ M. Waldherr-Teschner, T. Goetze, W. Heiden, M. Knoblauch, H. Vollhardt, J. Brickmann, MOLCAD-Computer Aided Visualization and Manipulation of Models in Molecular Science, in: *Advances in Scientific Visualization*, F.H. Post, A.J.S. Hin (eds.), Springer: Heidelberg, **1992**, 58-67.

⁶⁴ G. Klopman, J.-Y. Li, S. Wang, M. Dimayuga, Computer Automated logP Calculations Based on an Extended Group-Contribution Approach, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **34**, **1994**, 752-781.

⁶⁵ S.A. Wildman, C.G. Crippen, Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **39**, **1999**, 868-873.

⁶⁶ A.A. Petrauskas, E.A. Kolovanov, ACD/LogP method description, *Perspect. Drug Discov. Des.*, **19**, **2000**, 99-116.

⁶⁷ A.A. Petrauskas, E.A. Kolovanov, *13th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships*, Abstract Book p.4, Düsseldorf, **2000**.

-
- ⁶⁸ P. Japertas, R. Didziapetris, A. Petrauskas, Fragmental Methods in the Design of New Compounds. Applications of The Advanced Algorithm Builder, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 21, **2002**, 23-37.
- ⁶⁹ V.K. Gombar, K. Enslein, Assessment of n-octanol/water partition coefficient: when is the assessment reliable?, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 36, **1996**, 1127-1134
- ⁷⁰ N. Bodor, Z. Gabanyi, C.-K. Wong, A new method for the estimation of partition coefficient, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, **1989**, 3783-3786.
- ⁷¹ J. Devillers, D. Domine, C. Guillon, W. Karcher, Simulating Lipophilicity of Organic Molecules with a Back-Propagation Neural Network, *J. Pharm. Sci.*, 87, **1998**, 1086-1090.
- ⁷² N. Bodor, P. Buchwald, Molecular size based approach to estimate partition properties for organic solutes, *J. Phys. Chem. B*, 101, **1997**, 3404-3412.
- ⁷³ M.H. Abraham, H.S. Chadha, G.S. Whiting, R.C. Mitchell, Hydrogen Bonding. 32. An Analysis of water-octanol and water-alkane partitioning, and the $\Delta\log P$ parameter of Seiler, *J. Pharm. Sci.*, 83, **1994**, 1085-1100.
- ⁷⁴ G.E. Kellogg, S.F. Semus, D.J. Abraham, HINT-A New Method of Empirical Hydrophobic Field Calculation for CoMFA, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 5, **1991**, 545-552.
- ⁷⁵ I.V. Tetko, G.I. Poda, C. Ostermann, R. Mannhold, Large-Scale Evaluation of logP Predictors, Local Corrections May Compensate Insufficient Accuracy and Need of Experimentally Testing Every Other Compound, in: *Chemistry & Biodiversity, Physchem & ADMET Profiling in Drug Research*, B. Testa, O. Potterat (eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich, **2009**, 1837-1845.
- ⁷⁶ A. Avdeef, Physicochemical Profiling (Solubility, Permeability and Charge State), *Curr. Top. Med. Chem.*, 1, **2001**, 277-351.
- ⁷⁷ R.A. Scherrer, The Unstirrable Water Layer Is Unstirrable because It Does Not Exist, in: *Chemistry & Biodiversity, Physchem & ADMET Profiling in Drug*

Research, B. Testa, O. Potterat (eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich, **2009**, 1917-1922.

⁷⁸ A. Tsantili-Kakoulidou, I. Panderi, F. Csizmadia, F. Darvas, Prediction of Distribution Coefficient from Structure. 2. Validation of Prolog D, an Expert System, *J. Pharm. Sci.*, 86, **1997**, 1173-1179.

⁷⁹ A.C. Lee, G.M. Crippen, Predicting pK_a, *J. Chem. Inf. Model.*, 49, **2009**, 2013-2033.

⁸⁰ D.P. Reynolds, Rapid Physicochemical Profiling, UK QSAR Symposium at Syngenta, **2001** (<http://www.ukqsar.org/ukqsar/authorMeetings.html>).

⁸¹ G. Caron, G. Ermondi, New Insights into the Lipophilicity of Ionized Species, in: *Pharmacokinetic Profiling in Drug Research*, B. Testa, S.D. Krämer, H. Wunderli-Allenspach, G. Folkers (eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich and Wiley-VCH: Weinheim, **2006**, 165-185.

⁸² J. Sangster, Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry: Wiley, **1996**, 57-78.

⁸³ A. Avdeef, Assessment of Distribution-pH Profiles, in: *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, V. Pliska, B. Testa, H. van de Waterbeemd (eds.), VCH: Weinheim, **1996**, 109-139.

⁸⁴ A. Brändström, A Rapid Method for the Determination of Distribution Coefficient of Bases for Biological Purposes, *Acta Chem. Scand.*, 17, **1963**, 1218-1224.

⁸⁵ Y. Ito, M.A. Weinstein, I. Aoki, R. Harada, E. Kimura, K. Nunogaki, The coil planet centrifuge, *Nature*, 212, **1966**, 985-987.

⁸⁶ R.S. Tsai, G. Lisa, P.A. Carrupt, B. Testa, Centrifugal Partition Chromatography for Lipophilicity Measurements, in: *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, V. Pliska, B. Testa, H. van de Waterbeemd (eds.), VCH: Weinheim, **1996**, 89-106.

-
- ⁸⁷ J.C. Dearden, G.M. Bresnen, The measurement of partition coefficients, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **7**, **1988**, 133-144.
- ⁸⁸ A. Hersey, A.P. Hill, R.M. Hyde, D.J. Livingstone, Principles of method selection in partition studies, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **8**, **1989**, 288-296.
- ⁸⁹ H. van de Waterbeemd, M. Kansy, B. Wagner, H. Fischer, Lipophilicity Measurement by High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), in: *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, V. Pliska, B. Testa, H. van de Waterbeemd (eds.), VCH: Weinheim, **1996**, 73-87.
- ⁹⁰ R. Mannhold, K. Dross, C. Sonntag, Estimation of Lipophilicity by Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography, in: *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, V. Pliska, B. Testa, H. van de Waterbeemd (eds.), VCH: Weinheim, **1996**, 141-156.
- ⁹¹ E. Bird, A.C. Marshall, Reversed-phase thin-layer chromatography and partition coefficients of penicillins, *J. Chromatogr. A*, **63**, **1971**, 313-319.
- ⁹² A. Hushoff, J.H. Perrin, Quantitative correlations between albumin binding constants and chromatographic R_M values of phenothiazine derivatives, *J. Med. Chem.*, **20**, **1973**, 430-439.
- ⁹³ A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, A new form of chromatography employing two liquid phases, *J. Biochem.*, **35**, **1941**, 1358-1368.
- ⁹⁴ R. Consden, A.H. Gordon, R.L.M. Synge, Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper, *J. Biochem.*, **38**, **1944**, 224-232.
- ⁹⁵ T. Brauman, Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: theory, experimental techniques and application in studies on quantitative structure-activity relationships, *J. Chromatogr. A*, **373**, **1986**, 191-225.

-
- ⁹⁶ G. Rippel, E. Alattyani, L. Szepesy, Characterization of stationary phases used in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A.*, 668, **1994**, 301-312.
- ⁹⁷ S. Eksborg, Reversed-phase liquid chromatography of adriamycin and daunorubicin and their hydroxyl metabolites adriamycinol and daunorubicinol, *J. Chromatogr. A.*, 149, **1978**, 225-232.
- ⁹⁸ S. Eksborg, H. Ehrsson, U. Lonroth, Liquid chromatographic determination of tetracyclines in plasma and urine, *J. Chromatogr. A.*, 185, **1979**, 583-591.
- ⁹⁹ J.G. Dorsey, M.G. Khaledi, Hydrophobicity estimations by Reversed-Phase Liquid Chromatography. Implications for biological partitioning processes, *J. Chromatogr. A.*, 656, **1993**, 485-499.
- ¹⁰⁰ A. Bechalany, A. Tsantili-Kakoulidou, N. El Tayar, B. Testa, Measurement of lipophilicity indices by reversed-phase high-performance liquid chromatography: comparison of two stationary phases and various eluents, *J. Chromatogr. A.*, 541, **1991**, 221-229.
- ¹⁰¹ N. El Tayar, A. Tsantili-Kakoulidou, T. Roethlisberger, B. Testa, J. Gal, Different partitioning behaviour of sulphonyl-containing compounds in reversed-phase high-performance liquid chromatography and octanol-water systems, *J. Chromatogr. A.*, 439, **1988**, 237-244.
- ¹⁰² R. Kaliszan, High Performance Liquid Chromatographic Methods and Procedures of Hydrophobicity Determination, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 9, **1990**, 83-87.
- ¹⁰³ N. El Tayar, H. van de Waterbeemd, B. Testa, Lipophilicity measurements of protonated basic compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography: II. Procedure for the determination of a lipophilic index measured by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, 320, **1985**, 305-312.

-
- ¹⁰⁴ A. Pagliara, E. Khamis, A. Trinh, P.A. Carrupt, R.S. Tsai, B. Testa, Structural properties governing retention mechanisms on RP-HPLC stationary phases used for lipophilicity measurements, *J. Liq. Chromatogr.*, 18, **1995**, 1721-1745.
- ¹⁰⁵ J. Layne, Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded and polar-endcapped reversed phase liquid chromatography stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 957, **2002**, 149-164.
- ¹⁰⁶ T.L. Ascah, K.M.R. Kallury, C.A. Szafranski, S.D. Corman, F. Liu, Characterization and High Performance Liquid Chromatographic Evaluation of a New Amide-Functionalized Reversed Phase Column, *J. Liq. Chromatogr.*, 19, **1996**, 3049-3073.
- ¹⁰⁷ J.E. O'Gara, B.A. Alden, T. Walters, J. Petersen, C. Niederlander, U.D. Neue, Simple preparation of a C8 HPLC stationary phase with an internal polar functional group, *Anal. Chem.*, 67, **1995**, 3809-3813.
- ¹⁰⁸ C. Stella, P. Seuret, S. Rudaz, P.A. Carrupt, P.A. Gauvrit, P. Lanteri, J.L. Veuthey, Characterization of chromatographic supports for the analysis of basic compounds, *J. Sep. Sci.*, 25, **2002**, 1351-1363.
- ¹⁰⁹ S.F. Donovan, M.C. Pescatore, Method for measuring the logarithm of the octanol-water partition coefficient by using short octadecyl-poly(vinyl alcohol) high-performance liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A*, 952, **2002**, 47-61.
- ¹¹⁰ Supelco **2001** catalog, Bellefonte, PA, USA 16823.
(<http://www.sigmaaldrich.com>)
- ¹¹¹ X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, Lipophilicity Measurement by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC): A Comparison of Two Stationary Phases Based on Retention Mechanisms, *Helv. Chim. Act.*, 87, **2004**, 2866-2876.

¹¹² S.H. Unger, J.R. Cook, J.S. Hollenberg, Simple procedure for determining octanol-aqueous partition, distribution, and ionization coefficients by reversed-phase high-pressure liquid chromatography, *J. Pharm. Sci.*, 67, **1978**, 1364-1367.

¹¹³ M.S. Mirrlees, S.J. Moulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor, Direct measurement of octanol-water partition coefficients by high-pressure liquid chromatography, *J. Med. Chem.*, 19, **1976**, 615-619.

¹¹⁴ M. Cichna, P. Markl, J.F.K. Huber, Determination of true octanol-water partition coefficients by means of solvent generated liquid-liquid chromatography, *J. Pharm. Biom. Anal.*, 13, **1995**, 339-351.

¹¹⁵ H.A. Claessens, M.A. van Straten, Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1060, **2004**, 23-41.

¹¹⁶ A. Tsantili-Kakoulidou, R.F. Rekker, A critical appraisal of logP fragmental procedures and connectivity indexing for reversed-phase thin-layer chromatographic and high-performance liquid chromatographic data obtained for a series of benzophenones, *J. Chromatogr. A*, 295, **1984**, 341-353.

¹¹⁷ C. Horváth, W. Melander, I. Molnar, Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 125, **1976**, 129-156.

¹¹⁸ U.A. Th. Brinkman, G. De Vries, Use of chemically bonded stationary phases in high-performance thin-layer chromatography: II, *J. Chromatogr. A*, 192, **1980**, 331-340.

¹¹⁹ B.L. Karger, J. Gant, A. Hartkopf, P.H. Weiner, Hydrophobic effects in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 128, **1976**, 65-78.

¹²⁰ Μ. Πούλου, Τεχνικές Διαχωρισμού στη Φαρμακευτική Ανάλυση, **1997**, 131-171.

-
- ¹²¹ G. Cimpan, F. Irimie, S. Gocan, H.A. Claessens, Role of stationary phase and eluent composition on the determination of logP values of hydroxyethylamide of aryloxyalkylen and pyridine carboxylic acids by reversed-phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, 714, **1998**, 247-261.
- ¹²² F. Lombardo, M.Y. Shalaeva, K.A. Tupper, F. Gao, ElogD_{oct}: A tool for Lipophilicity Determination in Drug Discovery. 2. Basic and Neutral Compounds, *J. Med. Chem.*, 44, **2001**, 2490-2497.
- ¹²³ X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, H. Chuman, Determination of lipophilicity by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Influence of 1-octanol in the mobile phase, *J. Chromatogr. A.*, 1091, **2005**, 51-59.
- ¹²⁴ C. Giaginis, S. Theocharis, A. Tsantili-Kakoulidou, Contribution to the standardization of the chromatographic conditions for the lipophilicity assessment of neutral and basic drugs, *Anal. Chim. Acta*, 573-574, **2006**, 311-318.
- ¹²⁵ C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, The performance of 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid as mobile phase additive in HPLC-based lipophilicity assessment, *Biomed. Chromatogr.*, 25, **2011**, 606-612.
- ¹²⁶ B. Malwsaka, Determination of the lipophilicity of some N-substituted amides of α - piperazine- γ -hydroxybutyric acid, *J. Planar Chromatogr.*, 11, **1998**, 137-140.
- ¹²⁷ B. Malwsaka, K. Kulig, M. Wiśniewska, Determination of the lipophilicity of antiarrhythmic and antihypertensive 1-[2-hydroxy- or 1-[2-acetoxy-3-(4-aryl-1-piperazinyl)propyl]-pyrrolidin-2-one derivatives, *J. Planar Chromatogr.*, 13, **2000**, 187-190.
- ¹²⁸ C. Giaginis, D. Dellis, A. Tsantili-Kakoulidou, Effect of the mobile phase aqueous component on RP-TLC retention and its inference on lipophilicity determination for a series of structurally diverse drugs, *J. Planar Chromatogr.*, 19, **2006**, 151-156.

-
- ¹²⁹ K.P. Dross, R. Mannhold, R.F. Rekker, Drug lipophilicity in QSAR practice. II. Aspects of RM-determinations and their interrelations with partition coefficients, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 11, **1992**, 36-44.
- ¹³⁰ K.P. Dross, R.F. Rekker, G. de Vries, R. Mannhold, The lipophilic behavior of organic compounds: 3. The search for interconnections between reversed-phase chromatographic data and logP_{oct} values, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 17, **1998**, 549-557.
- ¹³¹ P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan, Influence of organic modifiers on the retention behavior in reversed-phase Liquid Chromatography and its consequences for gradient elution, *J. Chromatogr. A*, 185, **1979**, 179-195.
- ¹³² K. Valkó, L.R. Snyder, G.L. Glajch, Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition, *J. Chromatogr. A.*, 656, **1993**, 501-520.
- ¹³³ S.A. Koufopoulou, C. Pistos, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, Application of the ion pair concept to the n-octanol-water partitioning of cefepime and ceftiofime, *Int. J. Pharm.*, 316, **2006**, 52-57.
- ¹³⁴ A. Nahum, C. Horváth, Surface Silanols in Silica-Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases I. Dual Retention Mechanism in Reversed-Phase Chromatography, *J. Chromatogr. A*, 203, **1981**, 53-63.
- ¹³⁵ K.E. Bij, C. Horváth, W.R. Melander, A. Nahum, Surface Silanols in Silica-Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases II. Irregular Retention Behavior and Effect of Silanol Masking, *J. Chromatogr. A*, 203, **1981**, 65-84.
- ¹³⁶ C. Horváth, W. Melander, I. Molnar, Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 125, **1976**, 129-156.

¹³⁷ T. Braumann, G. Weber, L.H. Grimme, Quantitative structure-activity relationships for herbicides: Reversed-phase liquid chromatographic retention parameter, $\log k_w$, versus liquid-liquid partition coefficient as a model of the hydrophobicity of phenylureas, s-triazines and phenoxy-carbonic acid derivatives, *J. Chromatogr. A*, 261, **1983**, 329-343.

¹³⁸ D. Vrakas, I. Panderi, D. Hadjipavlou-Litina, A. Tsantili-Kakoulidou, Investigation of the Relationships Between $\log P$ and Various Chromatographic Indices for a Series of Substituted Coumarins. Evaluation of their Similarity/Dissimilarity using Multivariate Statistics, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 24, **2005**, 254-260.

¹³⁹ C. Yamagami, T. Ogura, N. Takao, Hydrophobicity parameters determined by reversed-phase liquid chromatography: I. Relationship between capacity factors and octanol-water partition coefficients for monosubstituted pyrazines and the related pyridines, *J. Chromatogr. A*, 514, **1990**, 123-136.

¹⁴⁰ C. Yamagami, M. Yokota, N. Takao, Hydrophobicity Parameters Determined by Reversed-Phase Liquid Chromatography. IX. Relationship between capacity factors and octanol-water partition coefficient of monosubstituted pyrimidines, *Chem. Pharm. Bull.*, 42, **1994**, 907-912.

¹⁴¹ F. Lombardo, M.Y. Shalaeva, B.D. Bissett, N. Christokhodova, Physicochemical and biological profiling in drug research. ElogD_{7,4} 20.000 compounds later: Refinements, observations and applications, in: *Pharmacokinetic Profiling in Drug Research*, B. Testa, S.D. Krämer, H. Wunderli-Allenspach, G. Folkers (eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich and Wiley-VCH: Weinheim, **2006**, 187-201.

¹⁴² D. Reymond, G.N. Chting, J.M. Mayer, B. Testa, Lipophilicity measurement of nicotines by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Differences in retention behaviour, but similarities of $\log k_w$ values, in methanol-water and acetonitrile-water eluents, *J. Chromatogr. A*, 391, **1987**, 97-109.

-
- ¹⁴³ K. Valkó, P. Slégel, New chromatographic hydrophobicity index (ϕ_0) based on the slope and the intercept of the logk versus organic phase concentration plot, *J. Chromatogr. A*, 631, **1993**, 49-61.
- ¹⁴⁴ K. Valkó, C. Bevan, D. Reynolds, Chromatographic Hydrophobicity Index by Fast-Gradient RP-HPLC: A High-Throughput Alternative to logP/logD, *Anal. Chem.*, 69, **1997**, 2022-2029.
- ¹⁴⁵ K. Valkó, Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution, *J. Chromatogr. A.*, 1037, **2004**, 299-310.
- ¹⁴⁶ P.W. Carr, J. Li, A.J. Dallas, D.I. Elkens, L.C. Tan, Revisionist look at solvophobic driving forces in reversed-phase-liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 656, **1993**, 113-133.
- ¹⁴⁷ D. Dellis, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, Physicochemical profile of nimesulide. Exploring the interplay of lipophilicity, solubility and ionization, *J. Pharm. Biom. Anal.*, 44, **2007**, 57-62
- ¹⁴⁸ M. Iwahashi, Y. Hayashi, N. Hachiya, H. Matsuzawa, H. Kobayashi, Self-association of octan-1-ol in the pure liquid state and in decane solutions as observed by viscosity, self-diffusion, nuclear magnetic resonance and near-infrared spectroscopy measurements, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 89, **1993**, 707-712.
- ¹⁴⁹ S.H. Unger, G.H. Chiang, Octanol-physiological buffer distribution coefficients of lipophilic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography and their correlation with biological activity, *J. Med. Chem.*, 24, **1981**, 262-270.
- ¹⁵⁰ D.J. Minick, J.H. Frenz, M.A. Patrick, D.A. Brent, A comprehensive method for determining hydrophobicity constants by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Med. Chem.*, 31, **1988**, 1923-1933.

-
- ¹⁵¹ F. Lombardo, M.Y. Shalaeva, K.A. Tupper, F. Gao, M.H. Lombardo, ElogP_{oct}: A tool for Lipophilicity Determination in Drug Discovery, *J. Med. Chem.*, 43, **2000**, 2922-2928.
- ¹⁵² C. Stella, A. Galland, X. Liu, B. Testa, S. Rudaz, J.L. Veuthey, P.A. Carrupt, Novel RPLC stationary phases for lipophilicity measurement: Solvatochromic analysis of retention mechanisms for neutral and basic compounds, *J. Sep. Sci.*, 28, **2005**, 2350-2362.
- ¹⁵³ C. Giaginis, S. Theocharis, A. Tsantili-Kakoulidou, Octanol/water partitioning simulation by reversed-phase high performance liquid chromatography for structurally diverse acidic drugs: Effect of n-octanol as mobile phase additive, *J. Chromatogr. A*, 1166, **2007**, 116-125.
- ¹⁵⁴ H. Engelhardt, T. Lobert, Chromatographic determination of metallic impurities in reversed phase HPLC columns, *Anal. Chem.*, 71, **1999**, 1885-1892.
- ¹⁵⁵ J. Hodgson, ADMET-Turning chemicals into drugs, *Nat. Biotechnol.*, 19, **2001**, 722-726.
- ¹⁵⁶ H. van der Waterbeemd, D.A. Smith, K. Beaumont, D.K. Walker, Property-based design: Optimization of drug absorption and pharmacokinetics, *J. Med. Chem.*, 44, **2001**, 1313-1333.
- ¹⁵⁷ M.H. Abraham, A. Ibrahim, A.M. Zissimos, Y.H. Zhao, J. Cormer, D.P. Reynolds, Application of hydrogen bonding calculations in property based drug design, *Drug Discov. Today*, 7, **2002**, 1056-1063.
- ¹⁵⁸ I. Kola, J. Landis, Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3, **2004**, 711-716.
- ¹⁵⁹ H. Van de Waterbeemd, Improving compound quality through in vitro and in silico physicochemical profiling, *Chem. Biodivers.*, 6, **2009**, 1760-1766.

-
- ¹⁶⁰ C. Pidgeon, U.V. Venkataram, Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids, *Anal. Biochem.*, 176, **1989**, 36-47.
- ¹⁶¹ G. Felix, A. Berthod, Commercial Chiral Stationary Phases for the Separations of Clinical Racemic Drugs, in: *Separation & Purification Reviews*, 36, **2007**, 285-481.
- ¹⁶² N.P. Franks, M.H. Abraham, W.R. Lieb, Molecular organization of liquid n-octanol: an X-ray diffraction analysis, *J. Pharm. Sci.*, 82, **1993**, 466-470.
- ¹⁶³ S. Kramer, Liposomes/water partitioning: Theory Techniques and Applications, In Pharmacokinetic Optimization in Drug Research, Testa B, van de Waterbeemd H., Folkers G., Guy R. (eds.) Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich and Wiley-VCH: Weinheim, **2001**
- ¹⁶⁴ H. Miyoshi, H. Maeda, N. Tokutake, T. Fujita, Quantitative analysis of partition behavior of substituted phenols from aqueous phase into liposomes made of lecithin and various lipids, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 60, **1987**, 4357-4362.
- ¹⁶⁵ B.I. Escher, R.P. Schwarzenbach, Partitioning of substituted phenols in liposome-water, biomembrane water, and octanol-water systems, *Environ. Sci. Tech.*, 30, **1996**, 260-270.
- ¹⁶⁶ C. Pidgeon, U.V. Venkataram, Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids, *Anal. Biochem*, 176, **1989**, 36-47.
- ¹⁶⁷ C. Pidgeon, S. Ong, H. Choi, H. Liu, Preparation of mixed ligand immobilized artificial membranes for predicting drug binding to membranes, *Anal. Chem.*, 66, **1994**, 2701-2709.
- ¹⁶⁸ C. Pidgeon, S. Ong, H. Liu, X. Qui, M. Pidgeon, A.H. Dantzig, J. Munroe, W.J. Hornback, J.S. Kasher, L. Glunz, T. Szczerba, IAM chromatography: an *in vitro* screen for predicting drug membrane permeability, *J. Med. Chem.*, 38, **1995**, 590-594.

-
- ¹⁶⁹ S. Ong, H. Liu, X. Qiu, G. Bhat, C. Pidgeon, Membrane partition coefficients chromatographically measured using immobilized artificial membrane surfaces, *Anal. Chem.*, **67**, **1995**, 755-762.
- ¹⁷⁰ S. Ong, C. Pidgeon, Thermodynamics of solute partitioning into immobilized artificial membranes, *Anal. Chem.*, **67**, **1995**, 2119-2128.
- ¹⁷¹ S. Ong, H. Liu, C. Pidgeon, Immobilized artificial membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability, *J. Chromatogr. A*, **728**, **1996**, 113-128.
- ¹⁷² A. Nasal, M. Sznitowska, A. Bucinski, R. Kaliszan, Hydrophobicity parameter from high-performance liquid chromatography on an immobilized artificial membrane column and its relationship to bioactivity, *J. Chromatogr. A*, **692**, **1995**, 83-89.
- ¹⁷³ F. Barbato, M.I. La Rotonda, F. Quaglia, Interactions of nonsteroidal antiinflammatory drugs with phospholipids: comparison between octanol/buffer partition coefficients and chromatographic indexes on immobilized artificial membranes, *J. Pharm. Sci.*, **86**, **1997**, 225-229.
- ¹⁷⁴ T. Salminen, A. Pulli, J. Taskinen, Relationship between immobilized artificial membrane chromatographic retention and the brain penetration for structurally diverse drugs, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15**, **1997**, 469-477.
- ¹⁷⁵ L. Escuder-Gilabert, S. Sagrado, R.M., Villanueva-Camanas, M.J. Medina-Hernandez, Development of predictive retention-activity relationship models of non-steroidal anti-inflammatory drugs by micellar liquid chromatography: comparison with immobilized artificial membrane columns, *J. Chromatogr B*, **740**, **2000**, 59-70.
- ¹⁷⁶ A. Taillardat-Bertschinger, F. Barbato, M.T. Quercia, P.A. Carrupt, M. Reist, M.I. La Rotonda, B. Testa, Structural Properties Governing Retention Mechanisms on Immobilized Artificial Membrane (IAM) HPLC Columns, *Helv. Chim. Acta*, **85**, **2002**, 519-532.

-
- ¹⁷⁷ R.J. Markovich, X. Qiu, D.E. Nichols, C. Pidgeon, B. Invergo, F.M. Alvarez, Silica subsurface amine effect on the chemical stability and chromatographic properties of end-capped immobilized artificial membrane surfaces, *Anal. Chem.*, **63**, **1991**, 1851-1860.
- ¹⁷⁸ R.J. Markovich, J.M. Stevens, C. Pidgeon, Fourier transform infrared assessed of membrane lipids immobilized to silica: leaching and stability of immobilized artificial membrane-bonded phase, *Anal. Biochem.*, **182**, **1989**, 237-244.
- ¹⁷⁹ G.W. Caldwell, J.A. Masucci, M. Evangelisto, R. White, Evaluation of the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine. Drug discovery column for high-performance liquid chromatographic screening of drug-membrane interactions, *J. Chromatogr. A*, **800**, **1998**, 161-169.
- ¹⁸⁰ B.H. Stewart, O.H. Chan, Use of immobilized artificial membrane chromatography for drug transport applications, *J. Pharm. Sci.*, **87**, **1998**, 1471-1478.
- ¹⁸¹ F. Barbato, G. di Martino, G. Grunetto, M.I. La Rotonda, Prediction of drug-membrane interactions by IAM-HPLC: Effects of different phospholipid stationary phases on the partition of bases, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **22**, **2004**, 261-269.
- ¹⁸² P. Mueller, D.O. Rudin, H. Ti Tien, W.C. Wescott, Reconstitution of Excitable Cell Membrane Structure in Vitro, *Circulation*, **26**, **1962**, 1167-1171.
- ¹⁸³ A. Taillardat-Bertschinger, A. Galland, P.A. Carrupt, B. Testa, Immobilized artificial membrane (IAM)-HPLC: proposed guidelines for technical optimization of retention measurements, *J. Chromatogr. A*, **953**, **2002**, 39-53.
- ¹⁸⁴ D. Rhee, R. Markovich, W.G. Chae, X. Qiu, C. Pidgeon, Chromatographic surfaces prepared from lyso phosphatidylcholine ligands, *Anal. Chim. Acta*, **297**, **1994**, 377-386.

-
- ¹⁸⁵ A. Taillardat-Bertschinger, C.A. Martinet, P.A. Carrupt, M. Reist, G. Caron, R. Fruttero, B. Testa, Molecular Factors Influencing Retention on Immobilized Artificial Membranes (IAM) Compared to Partitioning in Liposomes and n-Octanol, *Pharm. Res.*, 19, **2002**, 729-737.
- ¹⁸⁶ K. Morse, C. Pidgeon, Importance of Mobile Phase in Immobilized Artificial Membrane Chromatography, in: Pharmacokinetic Optimization in Drug Research, B. Testa, H. van de Waterbeemd, G. Folkers, R. Guy (eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta: Zurich and Wiley-VCH: Weinheim, **2001**, 429-445.
- ¹⁸⁷ D. Vrakas, D. Hadjipavlou-Litina, A. Tsantili-Kakoulidou, Retention of substituted coumarins using immobilized artificial membrane (IAM) chromatography: A comparative study with n-octanol partitioning and reversed-phase HPLC and TLC, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39, **2005**, 908-913.
- ¹⁸⁸ S. Demare, D. Roy, J.Y. Legendre, Factors governing the retention of solutes on chromatographic immobilized artificial membranes: application to anti-inflammatory and analgesic drugs, *J. Liq. Chromatogr.*, 22, **1999**, 2675-2688.
- ¹⁸⁹ C. Ottiger, H. Wunderli-Allenspach, Immobilized artificial membrane (IAM)-HPLC for partition studies of neutral and ionized acids and bases in comparison with the liposomal partition system, *Pharm. Res.*, 16, **1999**, 643-650.
- ¹⁹⁰ D. Vrakas, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, Electrostatic interactions and ionization effect in immobilized artificial membrane retention: A comparative study with octanol-water partitioning, *J. Chromatogr. A*, 1187, **2008**, 67-78.
- ¹⁹¹ T. Osterberg, M. Svensson, P. Lundahl, Chromatographic retention of drug molecules on immobilized liposomes prepared from egg phospholipids molecules and from chemically pure phospholipids, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 12, **2001**, 427-439.

-
- ¹⁹² B.H. Stewart, F.Y. Chung, B. Tait, C. John, O.E. Chan, Hydrophobicity of HIV protease inhibitors by immobilized artificial membrane chromatography: application and significance to drug transport, *Pharm. Res.*, 15, **1998**, 1401-1406.
- ¹⁹³ M. Genty, G. Gonzalez, C. Clere, V. Desangle-Gouty, J.Y. Legendre, Determination of passive absorption through the rat intestine using chromatographic indices and molar volume. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 12, **2001**, 223-229.
- ¹⁹⁴ J. Kotecha, S. Shah, I. Rathod, G. Subbaiah, Relationship between immobilized artificial membrane chromatographic retention and human oral absorption of structurally diverse drugs, *Int. J. Pharm.*, 333, **2007**, 127-135.
- ¹⁹⁵ A. Ducarme, M. Neuwels, S. Goldstein, R. Massingham, IAM retention and blood brain barrier penetration, *Eur. J. Med. Chem.*, 33, **1998**, 215-223.
- ¹⁹⁶ A. Reichel, D.J. Begley, Potential of immobilized artificial membranes for predicting drug penetration across the blood-brain barrier, *Pharm. Res.*, 15, **1998**, 1270-1274.
- ¹⁹⁷ E. Kepczynska, J. Boyarski, P. Haber, R. Kaliszan, Retention of barbituric acid derivatives on immobilized artificial membrane stationary phase and its correlation with biological activity, *Biomed. Chromatogr.*, 14, **2000**, 256-260.
- ¹⁹⁸ C.H Yoon, S.J. Kim, B.S. Shin, K.C. Lee, S.D. Yoo, Rapid Screening of Blood-Brain Barrier Penetration of Drugs Using the Immobilized Artificial Membrane Phosphatidylcholine Column Chromatography, *J. Biomol. Screen.*, 11, **2006**, 13-20.
- ¹⁹⁹ O.A. Raevsky, V.L. Festiov, E.P. Treplina, J.W. McFarland, K. Schaper, Quantitative estimation of drug absorption in humans for passively transported compounds on the basis of their physico-chemical parameters, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 19, **2000**, 366-374.

-
- ²⁰⁰ P. Stenberg, U. Norinder, K. Luthman, P. Artursson, Experimental and computational screening models for the prediction of intestinal drug absorption, *J. Med. Chem.*, 44, **2001**, 1927-1937.
- ²⁰¹ K. Sugano, N. Takata, M. Machida, K. Saitoh, K. Terada, Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model, *Int. J. Pharm.*, 241, **2002**, 241-251.
- ²⁰² P. Matsson, C.A.S. Bergstrom, N. Nagahara, S. Tavelin, U. Norinder, P. Artursson, Exploring the role of different drug transport routes in permeability Screening, *J. Med. Chem.*, 48, **2005**, 604-613.
- ²⁰³ J. Kotecha, S. Shah, I. Rathod, G. Subbaiah, Prediction of oral absorption in humans by experimental immobilized artificial membrane chromatography indices and physicochemical descriptors, *Int. J. Pharm.*, 360, **2007**, 96-106.
- ²⁰⁴ F. Pérhourcq, M. Matoga, B. Bannwarth, Diffusion of arylpropionate non-steroidal anti-inflammatory drugs into the cerebrospinal fluid: A quantitative structure activity relationship approach, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 18, **2004**, 65-70.
- ²⁰⁵ F. Pérhourcq, C. Jarry, B. Bannwarth, Potential of immobilized artificial membrane chromatography for lipophilicity determination of arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33, **2003**, 137-144.
- ²⁰⁶ K. Jozwiak, H. Szumilo, B. Sencyna. Lipophilicity parameter from high-performance liquid chromatography on an immobilized artificial membrane column and its relationships to bioactivity of the group of 2,4-dihydroxythiobenzanilides, *Acta Pol. Pharm.-Drug Research*, 59, **2002**, 341-346.
- ²⁰⁷ M. Reta, L. Giacconelli, M. Santo, R. Cattana, J.J. Silber, C. Ochoa., M. Rodriguez, A. Chana, Determination of lipophilic descriptors of antihelmintic 6,7-diaryl-pteridine derivatives useful for bioactivity predictions, *Biomed. Chromatogr.*, 17, **2003**, 365-372.

-
- ²⁰⁸ K. Ito, T. Iwatsubo, S. Kanamitsu, Y. Nakajima, Y. Sugiyama, Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on metabolism together with binding and transport, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, **1998**, 461-499.
- ²⁰⁹ M. Rowley, J.J. Kulagowski, A.P. Watt, D. Rathbone, G.I. Stevenson, R.W. Carling, R. Baker, G.R. Marshall, J.A. Kemp, A.C. Foster, S. Grimwood, R. Hargreaves, C. Hurley, K.L. Saywell, M.D. Tricklebank, P.D. Leeson. Effect of plasma protein binding on in vivo activity and brain penetration of glycine/NMDA receptor antagonists, *J. Med. Chem.*, **40**, **1997**, 4053-4068.
- ²¹⁰ P.E. Rolan, Plasma protein binding displacement interactions-Why are they regarded as clinically important?, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **37**, **1994**, 125-128.
- ²¹¹ A.M. Talbert, G.E. Tranter, E. Holmes, P.L. Francis. Determination of drug-plasma protein binding kinetics and equilibria by chromatographic profiling: Exemplification of the method using L-tryptophan and albumin, *Anal. Chem.*, **74**, **2002**, 446-452.
- ²¹² R.E. Fessey, R.P. Austin, P. Barton, A.M. Davis, M.C. Wenlock, The Significance of Plasma-Protein Binding in Drug Research, in: *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*, B. Testa, H. van de Waterbeemd, G. Folkers, R. Guy (eds.) Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich and Wiley-VCH: Weinheim, **2001**, 189-197.
- ²¹³ K. Williams, E. Lee, Importance of drug enantiomers in clinical pharmacology, *Drugs*, **30**, **1985**, 333-354.
- ²¹⁴ F. Jamali, R. Mehvar, F.M. Pasutto, Enantioselective aspects of drug action and disposition: therapeutic pitfalls, *J. Pharm. Sci.*, **78**, **1989**, 695-715.
- ²¹⁵ K. Schmid, Alpha-1 acid glycoprotein, in: *The Plasma Proteins*, F.W. Putnam (ed.), Academic Press: New York, **1975**, 184-228.

-
- ²¹⁶ R.H. McMenamy, J.L. Oncley, The specific binding of l-tryptophan to serum albumin, *J. Biol. Chem.*, 233, **1958**, 1436-1447.
- ²¹⁷ W.E. Muller, Stereoselective plasma protein binding of drugs, in: *Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology*, I.W. Wainer, D.E. Drayer (eds.), Marcel Dekker: New York, **1988**, 227-244.
- ²¹⁸ E. Domenici, C. Bertucci, P. Salvadori, S. Motellier, I.W. Wainer, Immobilized serum albumin: rapid HPLC probe of stereoselective protein-binding interactions, *Chirality*, 2, **1990**, 263-268.
- ²¹⁹ G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin, *Mol. Pharmacol.*, 11, **1975**, 824-832.
- ²²⁰ S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, Crystal Structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution, *Protein Engineering*, 12, **1999**, 439-446.
- ²²¹ W.E. Muller, U. Wollert, Human serum albumin as a 'silent receptor' for drugs and endogenous substances, *Pharmacology*, 19, **1979**, 59-67.
- ²²² J. Hermansson, Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs using α 1-acid glycoprotein as the chiral stationary phase, *J. Chromatogr. A*, 269, **1983**, 71-80.
- ²²³ D.L. Schönfeld, R.B.G. Ravelli, U. Mueller, A. Skerra, The 1.8-Å Crystal Structure of α 1-Acid Glycoprotein (Orosomucoid) Solved by UV RIP Reveals the Broad Drug-Binding Activity of This Human Plasma Lipocalin, *J. Mol. Biol.*, 384, **2008**, 393-405.
- ²²⁴ C.B. Eap, P. Baumann, The genetic polymorphism of human alpha-1-acid glycoprotein, in: *Alpha-1-Acid Glycoprotein. Genetics, Biochemistry, Physiological Functions and Pharmacology*, P. Baumann, C.B. Eap, W.E. Müller, J.P. Tillement (eds.), Alan R. Liss: New York, **1989**, 111-125.

-
- ²²⁵ I. Yuasa, S. Weidinger, K. Umetsu, K. Suenaga, G. Ishimoto, C.B. Eap, J.C. Duché, P. Baumann, Orosomucoid system: 17 additional orosomucoid variants and proposal of a new nomenclature, *Vox. Sang.*, 64, **1993**, 47-55.
- ²²⁶ L. Dente L, M.G. Pizza, A. Metspalu, R. Cortese, Structure and expression of the genes coding for human alpha-1-acid glycoprotein, *EMBO J.*, 6, **1987**, 2289-2296.
- ²²⁷ L. Tomei L, C.B. Eap, P. Baumann, L. Dente, Use of transgenic mice for the characterization of human a1-acid glycoprotein (orosomucoid) variants, *Hum. Genet.*, 84, **1989**, 89-91.
- ²²⁸ K. Schmid, Alpha-1-acid glycoprotein, in: *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*, F.W. Putnam (ed.), Academic Press: New York, **1975**, 183-228.
- ²²⁹ D.S. Ashton, C.R. Beddell, G.S. Cockerill, K. Gohil, C. Gowrie, J.E. Robinson, M.J. Slater, K. Valkó, Binding measurements of indolocarbazole derivatives to immobilized human serum albumin by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, 677, **1996**, 194-198.
- ²³⁰ E. Domenici, C. Bertucci, P. Salvadori, I.W. Wainer, Use of a human serum albumin-based high-performance liquid chromatography chiral stationary phase for the investigation of protein binding: Detection of the allosteric interaction between warfarin and benzodiazepine binding sites, *J. Pharm. Sci.*, 80, **1991**, 164-166.
- ²³¹ F. Beaudry, M. Coutu, N.K. Brown, Determination of drug-plasma protein binding using human serum albumin chromatographic column and multiple linear regression model, *Biomed. Chromatogr.*, 13, **1999**, 401-406.
- ²³² F. Barbato, G. di Martino, L. Grumetto, M.I. La Rotonda, Retention of quinolones on human serum albumin and α_1 -acid glycoprotein HPLC columns: Relationships with different scales of lipophilicity, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 30, **2007**, 211-219.

-
- ²³³ T.C. Pinkerton, K.A. Koeplinger, Determination of warfarin-human serum albumin protein binding parameters by an improved Hummel-Dreyer high-performance liquid chromatographic method using internal surface reversed-phase columns, *Anal. Chem.*, 62, **1990**, 2114-2122.
- ²³⁴ E. Domenici, C. Bertucci, P. Salvadori, G. Felix, I. Cahange, S. Motellier, I.W. Wainer, Synthesis and Chromatographic Properties of an HPLC Chiral Stationary Phase Based upon Human Serum Albumin, *Chromatographia*, 29, **1990**, 170-176.
- ²³⁵ ChromTech User's Guide: Separation of chiral compounds on Chiral-AGP, Chiral-CBH, Chiral-HSA, 2nd ed., **2007**.
- ²³⁶ J.J. Morris, P.P. Bruneau, Prediction of physicochemical properties, in: *Virtual Screening for bioactive compounds*, H-J Boehm, H. Schneider (eds.), Wiley-VCH: Weinheim, **2000**, 33-56.
- ²³⁷ F.D. Pérhourcq, A. Radouane, L. Labat, B. Bannwarth, Influence of lipophilicity on the protein binding affinity of cephalosporins, *Pharm. Res.*, 12, **1995**, 1535-1538.
- ²³⁸ R. Kaliszan, T.A.G. Noctor, I.W. Wainer, Quantitative Structure-Enantioselective Retention Relationships for the Chromatography of 1,4-Benzodiazepines on a Human Serum Albumin Based HPLC Chiral Stationary Phase: An Approach to the Computational Prediction of Retention and Enantioselectivity, *Chromatographia*, 33, **1992**, 546-550.
- ²³⁹ T.A.G. Noctor, M.J. Diaz-Perez, I.W. Wainer, Use of a human serum albumin-based stationary phase for high-performance liquid chromatography as a tool for the rapid determination of drug-plasma protein binding, *J. Pharm. Sci.*, 82, **1993**, 675-676.
- ²⁴⁰ M. Šoškić, V. Magnus, Binding of ring-substituted indole-3-acetic acids to human serum albumin, *Bioorg. & Med. Chem.*, 15, **2007**, 4595-4600.

-
- ²⁴¹ G. Colmenarejo, A. Alvarez-Pedraglio, J.L. Lavandera, Cheminformatic Models To Predict Binding Affinities to Human Serum Albumin, *J. Med. Chem.*, 44, **2001**, 4370-4378.
- ²⁴² N.A. Kratochwil, W. Huber, F. Müller, M. Kansy M, P.R. Gerber, Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach, *Biochem. Pharmacol.*, 64, **2002**, 1355-1374.
- ²⁴³ Y. Cheng, E. Ho, B. Subramanyam, J.L. Tseng, Measurements of drug-protein binding by using immobilized human serum albumin liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 809, **2004**, 67-73.
- ²⁴⁴ R.D. Saiakhov, L.R. Stefan, G. Klopman, Multiple computer-automated structure evaluation model of the plasma protein binding affinity of diverse drugs, *Perspect Drug. Discov. Des.*, 19, **2000**, 133-155.
- ²⁴⁵ K. Valkó, 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.*, 9, **2003**, 2236-2248.
- ²⁴⁶ M.H. Abraham, Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes, *Chem. Soc. Rev.*, 22, **1993**, 73-83.
- ²⁴⁷ F. Barbato, F. Quaglia, M.T. Quercia, M.I. La Rotonda, Enantioselective Retention of 4-Aryl-1,4-dihydropyridine Calcium-Channel Blockers on Human Serum Albumin and 1-Acid Glycoprotein HPLC Columns: Relationships with Different Scales of Lipophilicity, *Helv. Chim. Acta*, 83, **2000**, 767-776.
- ²⁴⁸ F. Tsopelas, A. Tsantili-Kakoulidou, M. Ochsenkühn-Petropoulou, Exploring the elution mechanism of selenium species on liquid chromatography, *J. Sep. Sci.*, 34, **2011**, 376-384.

-
- ²⁴⁹ S.S. Singh, J. Mehta, Measurement of drug-protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration, *J. Chromatogr. B*, 834, **2006**, 108-116.
- ²⁵⁰ F. Beaudry, M. Coutu, N.K. Brown, Determination of drug-plasma protein binding using human serum albumin chromatographic column and multiple linear regression model, *Biomed. Chromatogr.*, 13, **1999**, 401-406.
- ²⁵¹ J. Reilly, D. Etheridge, B. Everatt, Z. Jiang, C. Aldcroft, P. Wright, I. Clemens, B. Cox, N.J. Press, S. Watson, D. Porter, C. Springer, R.A. Fairhurst, Studies in Drug Albumin Binding Using HSA and RSA Affinity Methods, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 34, **2011**, 317-327.
- ²⁵² F. Hollósy, K. Valkó, A. Hersey, S. Nunhuck, G. Kéri, C. Bevan, Estimation of volume of distribution in humans from high throughput HPLC-based measurements of human serum albumin binding and immobilized artificial membrane partitioning, *J. Med. Chem.*, 49, **2006**, 6958-6971.
- ²⁵³ G. Caron, G. Ermondi, New Insights into the Lipophilicity of Ionized Species, in: *Pharmacokinetic Profiling in Drug Research*, B. Testa, S.D. Krämer, H. Wunderli-Allenspach, G. Folkers (eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich and Wiley-VCH: Weinheim, **2006**, 165-185.
- ²⁵⁴ L.P. Krall, *World Book of Diabetes in Practice*, Elsevier Biomedical Press: Amsterdam, **1986**.
- ²⁵⁵ H. King, R.E. Aubert, W.H. Herrnan, Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections, *Diabetes Care*, 21, **1998**, 1414-1431.
- ²⁵⁶ D. Halgh, Avandia-From Molecular to Market for Type 2 Diabetes, *Abstracts of Papers*, 223rd National Meeting of the American Chemical Society, Orlando, FL, American Chemical Society: Washington, DC, 132-MEDI, Apr 1-11, **2002**.

-
- ²⁵⁷ S.B. Singh, M.S. Malamas, T.C. Hohman, R. Nilakantan, O.A. Carper, D.J. Kitchen, Molecular Modeling of the Aldose Reductase-Inhibitor Complex Based on the X-ray Crystal Structure and Studies with Single-Site-Directed Mutants, *J. Med. Chem.*, 43, **2000**, 1062-1070.
- ²⁵⁸ A. Urzhumtsev, F. Tête-Favier, A. Mitschler, J. Barbanton, P. Parth, I. Urzhumtseva, J.F. Biellman, A.D. Podjarny, D.A. Moras, A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil, *Structure*, 5, **1997**, 601-612.
- ²⁵⁹ G. Klebe, O. Kramer, C. Sotriffer, Strategies for the design of inhibitors of aldose reductase, an enzyme showing pronounced induced-fit adaptations, *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, **2004**, 783-793.
- ²⁶⁰ C.A. Sotriffer, O. Kramer, G. Klebe, Probing flexibility and "induced-fit" phenomena in aldose reductase by comparative crystal structure analysis and molecular dynamics simulations, *Proteins*, 56, **2004**, 52-66.
- ²⁶¹ N. Zaher, I. Nicolaou, V.J. Demopoulos, Pyrrolylbenzothiazole Derivatives as Aldose Reductase Inhibitors, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 17, **2002**, 131-135.
- ²⁶² I. Nicolaou, V.J. Demopoulos, Substituted Pyrrol-1-ylacetic Acids That Combine Aldose Reductase Enzyme Inhibitory Activity and Ability To Prevent the Nonenzymatic Irreversible Modification of Proteins from Monosaccharides, *J. Med. Chem.*, 46, **2003**, 417-426.
- ²⁶³ I. Nicolaou, C. Zika, V.J. Demopoulos, [1-(3,5-Difluoro-4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrol-3-yl]phenylmethanone as a Bioisostere of a Carboxylic Acid Aldose Reductase Inhibitor, *J. Med. Chem.*, 47, **2004**, 2706-2709.

- ²⁶⁴ P. Alexiou, I. Nicolaou, M. Stefek, A. Kristl, V.J. Demopoulos, Design and synthesis of N-(3,5-difluoro-4-hydroxyphenyl)benzenesulfonamides as aldose reductase inhibitors, *Bioorg. & Med. Chem.*, 16, **2008**, 3926-3932.
- ²⁶⁵ C. Anagnostou, I. Nicolaou, V. J. Demopoulos, Synthesis of [5-(4-pyrrol-1-yl-benzoyl)-1 H-pyrrol-2-yl]-acetic acid and in vitro study of its inhibitory activity on aldose reductase enzyme and on protein glycation, *Pharmazie*, **2002**, 57, 435-437.
- ²⁶⁶ V. J. Demopoulos, I. Nicolaou, P. Alexiou, Ch. Zika, K. Sturm, A. Kristl, in: *Brilliant Light in Life and Material Sciences*, V. Tsakanov, H. Wiedeman, (eds.), Springer: Heidelberg, **2007**, 241-250.
- ²⁶⁷ T. Rosen, A. Nagel, J.P. Rizzi, J.L. Ives, J.B. Daffeh, A.H. Ganong, K. Guarino, J. Heym, S. McLean, J.T. Nowakowski, A.W. Schmidt, T.F. Seeger, C.J. Siok, L.A. Vincent, Thiazole as a carbonyl bioisostere. A novel class of highly potent and selective 5-HT₃ receptor antagonists, *J. Med. Chem.*, 33, **1990**, 2715-2720.
- ²⁶⁸ Ελληνική Φαρμακοποιία, Έκδοση V, 1^ο και 2^ο Συμπλήρωμα, **2002**.
- ²⁶⁹ F. Csizmadia, A. Tsantili-Kakoulidou, I. Panderi, F. Darvas, Prediction of distribution coefficient from structure. 1. Estimation method, *J. Pharm. Sci.*, 86, **1997**, 865-871.
- ²⁷⁰ M. Zentgraf, H. Steuber, C. Koch, C. La Motta, S. Sartini, C.A. Sotriffer, G. Klebe, How reliable are current docking approaches for structure-based drug design? Lessons from aldose reductase, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 46, **2007**, 3575-3578.
- ²⁷¹ A. Tsantili-Kakoulidou, I. Nicolaou, D. Vrakas, V.J. Demopoulos, Modelling of aldose reductase inhibitory activity of pyrrol-1-yl-acetic acid derivatives by means of multivariate statistics, *Med. Chem.*, 1, **2005**, 321-326.
- ²⁷² D.K. Chalmers, G.H. Scholz, D.J. Topliss, E. Kollinatis, S.L.A. Munro, D.J. Craik, M.N. Iskander, J.R. Stockigt, Thyroid hormone uptake by hepatocytes: structure-

activity relationships of phenylanthranilic acids with inhibitory activity, *J. Med. Chem.*, **36**, **1993**, 1272-1277.

²⁷³ C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, Alternative measures of lipophilicity: From octanol-water partitioning to IAM retention, *J. Pharm. Sci*, **97**, **2008**, 2984-3004.

²⁷⁴ G.L. Biagi, A.M. Barbaro, A. Sapone, P.A. Borea, K. Varani, M. Rekanatini, Study of lipophilic character of serotonergic ligands, *J. Chromatogr. A*, **723**, **1996**, 135-143.

²⁷⁵ J.K. Rózyło, A. Niewiadomy, A. Zabińska, J. Martysiak, RPTLC investigation of the hydrophobicity and biological activity of new fungicidal compounds, *J. Plan. Chromatogr.*, **11**, **1998**, 450-456.

²⁷⁶ C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, RPTLC Retention Indices of Basic and Neutral Drugs as Surrogates of Octanol-Water Distribution Coefficients. Effect of Buffer Constituents and pH, *J. Planar Chromatogr.*, **3**, **2009**, 217-224.

²⁷⁷ Α. Κολέτσου, Συγκριτική μελέτη λιποφιλίας-(φωσφο)λιποφιλίας όξινων ενώσεων, αναστολέων της αναγωγής της αλδόζης, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Αθήνα, **2009**.

²⁷⁸ Δ. Βρακάς, Συγκριτική μελέτη της χρωματογραφικής συγκράτησης φαρμακευτικών μορίων σε στήλες ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM) και αντιστρόφου φάσεως. Εφαρμογή στην ανάλυση δεδομένων διαπερατότητας, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα, **2007**.

²⁷⁹ F. Barbato, M.I. La Rotonda, F. Quaglia, Chromatographic indices determined on an immobilized artificial membrane (IAM) column as descriptors of lipophilic and polar interactions of 4-phenyldihydropyridine calcium-channel blockers with biomembranes, *Eur. J. Med. Chem.*, **1996**, 311-318.

-
- ²⁸⁰ U.D. Neue, K. Tran, P.C. Iraneta, B.A. Alden, Characterization of HPLC packings, *J. Sep. Sci.*, 26, **2003**, 174-186.
- ²⁸¹ T.L. Ascah, K.M.R. Kallury, C.A. Szafranski, S.D. Corman, F. Liu, Characterization and High Performance Liquid Chromatographic evaluation of a new amide-functionalized reversed phase column, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 1996, 19, 3049-3073.
- ²⁸² E.C.Y. Chan, W.L. Tan, P.C. Ho, L.J. Fang, Modeling Caco-2 permeability of drugs using immobilized artificial membrane chromatography and physicochemical descriptors, *J. Chromatogr. A*, 1072, **2005**, 159-168,
- ²⁸³ T.E. Yen, S. Agatonovic-Kustrin, A.M. Evans, R.L. Nation, J. Ryand, Prediction of drug absorption based on immobilized artificial membrane (IAM) chromatography separation and calculated molecular descriptors, *J. Pharm. Biom. Anal.*, 38, **2005**, 472-478.
- ²⁸⁴ N. Gulyaeva, A. Zaslavsky, P. Lechner, M. Chlenov, A. Chait, B. Zaslavsky, Relative hydrophobicity and lipophilicity of b-blockers and related compounds as measured by aqueous two-phase partitioning, octanol-buffer partitioning, and HPLC, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 17, **2002**, 81-93.
- ²⁸⁵ C. Zhu, L. Jiang, T.-M. Chen, K.K. Hwang, A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential, *Eur. J. Med. Chem.*, 37, **2002**, 399-407.
- ²⁸⁶ V.E. Thiel-Demby, J.E. Humphreys, L.A. St. John Williams, H.M. Ellens, N. Shah, A.D. Ayrton, J.W. Polli, Biopharmaceutics Classification System: Validation and Learnings of an in Vitro Permeability Assay, *Mol. Pharmaceut.*, 6, **2009**, 11-18.
- ²⁸⁷ Y.H. Zhao, J. Le, M.H. Abraham, A. Hersey, P.J. Eddershaw, C.N. Luscombe, D. Butina, G. Beck, B. Sherborne, I. Cooper, J.A. Platts, Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity

relationship (QSAR) with the Abraham descriptors, *J. Pharm. Sci.*, 90, **2001**, 749-784.

²⁸⁸ K. Sugano, N. Takata, M. Machida, K. Saitoh, K. Terada, Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model, *Int. J. Pharm.*, 241, **2002**, 241-251.

²⁸⁹ C.T. Dollery, *Therapeutic Drugs*, 2nd ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, **1999**.

²⁹⁰ 43. Microscopic Protonation/Deprotonation Equilibria of the Anti-inflammatory Agent Piroxicam, K. Takács-Novák, J. Kökösi, B. Podányi, B. Noszál, R.S. Tsai, G. Lisa, P.A. Carrupt, B. Testa, *Helv. Chim. Act.*, 78, **1995**, 553-562.

²⁹¹ A. Goodman Gilman, J.G. Hardman, L.E. Limbird (eds.), *The pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed., Macmillan Publishing: New York, **2001**, 1924-2023.

²⁹² DrugBank database (<http://www.drugbank.ca/>)

²⁹³ The Merck Manuals Online Medical Library
(<http://www.merck.com/mmpe/index.html>)

²⁹⁴ A. Rane, G.R. Wilkinson, D.G. Shand, Prediction of hepatic extraction ratio from in vitro measurement of intrinsic clearance, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 200, **1977**, 420-424.

²⁹⁵ M.A. Ramirez, N.L. Borja, Epalrestat: an aldose reductase inhibitor for the treatment of diabetic neuropathy, *Pharmacotherapy*, 28, **2008**, 646-655.

²⁹⁶ Medicine Central (<http://im.unboundmedicine.com/>)

²⁹⁷ MedicinesComplete (<http://www.medicinescomplete.com/>)

-
- ²⁹⁸ K.D. Rainsford (ed.), *Nimesulide: Actions and Uses*, Birkhäuser Verlag: Basel, **2005**, 80.
- ²⁹⁹ P.D. Kroboth, R.B. Smith, M.I. Sorkin, M.R. Silver, R. Rault, M. Garry, R.P. Juhl, Triazolam protein binding and correlation with alpha-1 acid glycoprotein concentration, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 36, **1984**, 379-383.
- ³⁰⁰ PhysProp database
(<http://www.srcinc.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>)
- ³⁰¹ N. Gulyaeva, A. Zaslavsky, P. Lechner, M. Chlenov, O. McConnell, A. Chait, V. Kipnis, B. Zaslavsky, Relative hydrophobicity and lipophilicity of drugs measured by aqueous two-phase partitioning, octanol-buffer partitioning and HPLC. A simple model for predicting blood-brain distribution, *Eur. J. Med. Chem.*, 38, **2003**, 391-396.
- ³⁰² K. Valkó, C.M. Du, C.D. Bevan, D.P. Reynolds, M.H. Abraham, Rapid-gradient HPLC method for measuring drug interactions with immobilized artificial membrane: Comparison with other lipophilicity measures, *J. Pharm. Sci.*, 89, **2000**, 1085-1096.
- ³⁰³ F. Hervé, G. Caron, J.C. Duché, P. Gaillard, N. Abd. Rahman, A. Tsantili-Kakoulidou, P.A. Carrupt, P. d'Athis, J.P. Tillement, B. Testa, Ligand Specificity of the Genetic Variants of Human α 1-Acid Glycoprotein: Generation of a Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Model for Drug Binding to the A Variant, *Mol. Pharmacol.*, 54, **1998**, 129-138.
- ³⁰⁴ S. Sundriyal, P.V. Bharatam, 'Sum of activities' as dependent parameter: A new CoMFA-based approach for the design of pan PPAR agonists, *Eur. J. Med. Chem.*, 44, **2009**, 42-53.