

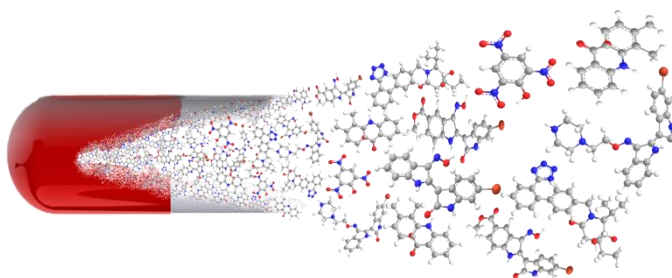


**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ**



ΡΕΡΡΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017

“Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Φαρμακευτικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών,
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα”

(Ν.5343/1932, αρθρ.202)

I make the right moves but I'm lost within...

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ:

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

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΓΚΙΚΑΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α. (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΙΩΑΝΝΗΣ ΝΤΟΤΣΙΚΑΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα Τσαντίλη – Κακουλίδου Άννα που αποδέχτηκε την πρότασή μου να ενταχθώ στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα της φαρμακευτικής ανάλυσης υπό την δική της επίβλεψη και να με εισάγει σε ένα άγνωστο επιστημονικό πεδίο για εμένα, το αντικείμενο της λιποφιλίας που αγαπάω πλέον πάρα πολύ. Αν και οι περισσότεροι δεν κατανοούν τη σημασία της λιποφιλίας στο τομέα των φαρμάκων παρόλο που πάντα χρησιμοποιούν την λιποφιλία για τον σχεδιασμό των πειραμάτων τους, μπορώ να πω σίγουρα ότι την λάτρεψα.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και την εκτίμηση μου προς τον έτερο επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Γκίκα Ευάγγελο για την δυνατότητα που μου προσέφερε να ασχοληθώ με το επιστημονικό κομμάτι της φασματομετρίας μαζών και συγκεκριμένα με τον ανιχνευτή μαζών που έχει εξουσιάσει την τεχνολογική εξέλιξη του τομέα της ανάλυσης φαρμακευτικών προϊόντων, δίνοντας μου το πλεονέκτημα να συνδέσω τις παραδοσιακές τεχνικές αναλύσεων με τα σύγχρονα ευρήματα στο πεδίο των αναλυτικών μεθόδων. Περισσότερο τον ευχαριστώ για την δυνατότητα που μου έδωσε να συνδιαλαγώ με έναν από τους εφυστέρους ανθρώπους που έχω γνωρίσει.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ντότσικα Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθεια του σε όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού και ειδικά κατά τη συγχώνευση του πρώτου έτους σε ένα εξάμηνο. Εκείνη την περίοδο όλοι οι φοιτητές του μεταπτυχιακού διαβάζαμε σαν τρελοί για να ολοκληρώσουμε την ύλη ενός έτους σε ένα εξάμηνο με αποτέλεσμα να μην διαθέτουμε τον χρόνο να διεκπεραιώσουμε τις απαραίτητες υποχρεώσεις όπως είναι η συνεννόηση για την ύλη των μαθημάτων ή ενημέρωση βαθμών του μαθήματος μικροβιολογίας που έλαβε μέρος στην Ιατρική Αθήνας. Ο κ. Ντότσικας ήταν εκεί να μας βοηθήσει. Επίσης είναι ο άνθρωπος που με ενημέρωσε για την επιτυχή επιλογή μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα της ανάλυσης δίνοντας μου πληροφορίες για τα επόμενα βήματα που έπρεπε να κάνω. Εντυπωσιακή ήταν η εκπλήρωση κάθε γεγονότος στον χρόνο που είχε οριστεί, κάτι που δεν το είχα συναντήσει μέχρι τότε, από την μακρόχρονη εμπειρία μου στο πανεπιστήμιο.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη του εργαστηρίου ανάλυσης Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Παντερή Ειρήνη για την άριστη συνεργασία μας καθ'όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Επίσης δεν ξεχνώ τον πρώτο καθήγητη που με πίστεψε και αυτός είναι ο Καθηγητής κ. Καραμάνος Νικόλαος του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών όπως και τους συμφοιτητές μου στο μεταπτυχιακό που με ανέχτηκαν. Τους ευχαριστώ όλους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πολυτιμότερο άνθρωπο που έχω να πορεύεται μαζί μου στη ζωή, την αδερφή μου Ρέρρα Ελένη για όλη την βοήθεια και τις συμβουλές που μου προσέφερε για την επιλογή, εισαγωγή και περαίωση του μεταπτυχιακού.

ΡΕΡΡΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ
ΑΘΗΝΑ, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2016

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
SUMMARY	3
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	5
ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΧΥΤΑΤΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	5
1.2 ΛΙΠΟΦΙΛΙΑ: ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΣΤΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ	6
1.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	7
1.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ	7
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΥΔΡΟΦΟΒΙΑΣ (CHI)	16
2.1 Αναζήτηση αποτελεσματικότερων μεθόδων προσδιορισμού της λιποφιλίας.....	16
2.2 Από την ισοκρατική έκλυση μετάβαση στη βαθμιδωτή έκλυση	16
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (MS)	20
3.1 Προϋποθέσεις ανίχνευσης χημικών ενώσεων	20
3.2 Κατανομή των αναλυτών στα σχηματιζόμενα σταγονίδια	20
3.3 Στάδια των σταγονιδίων στη πηγή ιοντισμού	23
3.4 Μηχανισμός διάσπασης σταγονιδίων.....	24
3.5 Μετάβαση των αναλυτών από τα σταγονίδια στην αέρια φάση.....	25
3.6 Ενέργεια Διαλυτοποίησης.....	26
3.7 Παράγοντες που επηρεάζουν την μετάβαση στην αέρια φάση χημικών ενώσεων	26
3.8 Πηγή φορτίου των φορτισμένων σταγονιδίων	27
3.9 Συσχέτιση των χρωματογραφικών δεδομένων με την ένταση σήματος των αναλυτών.....	28
ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	29
4.1 Στήλες Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μembranών.....	29
4.2 Διαφορές στατικής φάσης IAM και συστήματος οκτανόλη / νερό.....	30
4.3 Κινητές φάσεις στην χρωματογραφική στήλη Ακίνητοποιημένης Τεχνητής Μembrάνης.....	31
4.4 Χρωματογραφικοί Δείκτες IAM.....	31
4.5 Χρωματογραφικός Δείκτης Υδροφοβίας CHI – IAM	32
4.6 Συσχέτιση κατανομής φαρμάκων σε στήλη IAM και βιολογικών συστημάτων .	32

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	35
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	36
1ο ΜΕΡΟΣ: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΙΣΟΚΡΑΤΙΚΗΣ – ΒΑΘΜΙΩΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΥ ΦΑΣΕΩΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ.....	36
1.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ – ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ – ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΝΑΛΥΤΩΝ.....	38
1.2 ΜΕΛΕΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ pH = 5.0.....	43
1.2.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΚΤΑΝΟΛΗ / ΝΕΡΟ (Log D_{5.0}).....	47
1.2.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CHI ΜΕ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ Log D_{5.0}	54
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ.....	58
1.3 ΜΕΛΕΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ pH = 7.4.....	58
1.3.1.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΚΤΑΝΟΛΗ / ΝΕΡΟ (Log D_{7.4}).....	62
1.3.1.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CHI ΜΕ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ Log D_{7.4}	70
1.3.2.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΚΤΑΝΟΛΗ / ΝΕΡΟ (Log D_{7.4}) 	76
1.3.2.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CHI ΜΕ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ Log D_{7.4}	84
1.3.3.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΕΔΤΑ ΜΕ ΤΟΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΚΤΑΝΟΛΗ / ΝΕΡΟ (Log D_{7.4}).....	91
1.3.3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ 1% ΕΔΤΑ ΜΕ ΤΟΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΚΤΑΝΟΛΗ / ΝΕΡΟ (Log D_{7.4}).....	98
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	101
2ο ΜΕΡΟΣ: ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΠΗΓΗ ΙΟΝΙΣΜΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	103
2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΠΗΓΗ ΙΟΝΙΣΜΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ	106
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	117

3ο ΜΕΡΟΣ: ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗ ΣΤΗ ΣΤΗΛΗ ΙΑΜ ΚΑΙ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ.....	118
3.1 ΙΝΤΙΡΟΥΜΠΙΝΕΣ.....	118
3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΙΝΤΙΡΟΥΜΠΙΝΩΝ	121
3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ pH = 7.4.....	122
3.3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΑΜ.....	122
3.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΚΤΑΝΟΛΗ / ΝΕΡΟ (Log D_{7,4}).....	126
3.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CHI ΜΕ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ Log D_{7,4}	130
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	131
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	132

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη εστιάζεται στη βελτίωση και ανάπτυξη μεθόδων για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας, πρωταρχικής ιδιότητας στη δράση των φαρμάκων. Η μέθοδος ανακινούμενης φιάλης είναι η επικρατέστερη μέθοδος για τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής στο σύστημα οκτανόλη / νερό, ο οποίος αποτελεί το ευρέως αποδεκτό μέτρο της λιποφιλίας. Ωστόσο τα μεγάλα προβλήματα που παρουσιάζει έχουν στρέψει το ενδιαφέρον σε άλλες μεθόδους.

Στο πρώτο μέρος αξιοποιούνται τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η υδροχρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως σε στήλη ABZ+ την έχουν κατατάξει σε αξιόπιστη μέθοδο προσδιορισμού της λιποφιλίας. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συνθήκες για τον προσδιορισμό ανηγμένων τιμών $\log k_w$. Οι χρωματογραφικές συνθήκες είναι οξικό αμμώνιο – οξικό οξύ / ακετονιτρίλιο για pH 5.0 ενώ σε pH 7.4 εξετάστηκε οξικό αμμώνιο – αμμωνία / ακετονιτρίλιο και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (κορεσμένο σε οκτανόλη) / μεθανόλη (+0.25% οκτανόλη). Οι ανηγμένες τιμές $\log k_w$ παρουσίασαν αποκλίσεις στον προσδιορισμό των τιμών $\log D$. Εξετάστηκαν οι τιμές ϕ_0 (ισοκατανομή του αναλύτη μεταξύ κινητής και στατικής φάσης) με εμφανώς καλύτερα αποτελέσματα στην περίπτωση των ρυθμιστικών δ/των οξικού αμμωνίου. Ωστόσο οι ισοκρατικές συνθήκες για τον προσδιορισμό των ανηγμένων τιμών $\log k_w$ και τιμών ϕ_0 είναι χρονοβόρες με ταυτόχρονη κατανάλωση μεγάλης ποσότητας διαλυτών. Έτσι πραγματοποιήθηκε μετάβαση στην σύντομη βαθμιδωτή έκλουση και εισαγωγή του Χρωματογραφικού Δείκτη Υδροφοβίας (CHI). Οι τιμές CHI επέδειξαν καλύτερα αποτελέσματα από τις τιμές $\log k_w$, χωρίς να ισχύει το ίδιο για τις τιμές ϕ_0 (στην περίπτωση ρυθμιστικού δ/τος φωσφορικών οι τιμές $\log k_w$ εμφάνισαν μικρότερες αποκλίσεις από τις τιμές ϕ_0 και CHI). Για την βελτίωση των μεθόδων προσδιορισμού λιποφιλίας προστέθηκε ποσότητα EDTA στη κινητή φάση με στόχο την μείωση συγκράτησης των ιονισμένων οξέων ενδεχόμενης συμπλοκοποίησης με προσμίξεις μετάλλων. Τελικά η εισαγωγή EDTA προκάλεσε αύξηση της συγκράτησης.

Στο δεύτερο μέρος εξετάζεται η συσχέτιση της λιποφιλίας χημικών ενώσεων με την ένταση σήματος στο φασματόμετρο μαζών. Σχεδιάστηκαν τρία μοντέλα σε συνθήκες pH 5.0. Συσχέτιση λιποφιλίας – ένταση σήματος για οξέα, βάσεις και ένωση των αποτελεσμάτων με σκοπό την συνολική εικόνα λιποφιλίας – ένταση σήματος στη περίπτωση ταυτόχρονης ανάλυσης οξέων και βάσεων. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν την δυνατότητα αξιόπιστου προσδιορισμού της λιποφιλίας φαρμάκων.

Στο τρίτο μέρος πραγματοποιείται εισαγωγή στην βιομηχανική χρωματογραφία μέσω της στήλης IAM.PC.DD2 για τον προσδιορισμό χρωματογραφικών δεικτών ικανών για την εξέταση σύνδεσης της λιποφιλίας με την συγκράτηση στις μεμβράνες για τον καθορισμό της δράσης λιπόφιλων παραγώγων ιντροουμπινών. Παρατηρήθηκε αυξημένη συγκράτηση των παραγώγων ιντιρουμπίνης στην στατική φάση της IAM στήλης που υποδεικνύει την πιθανότητα πρόκλησης τοξικών επιπτώσεων στα κύτταρα. Τα παράγωγα ιντιρουμπινών έχουν σχεδιαστεί και συντεθεί ως αναστολείς κινασών στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων Ε.Κ.Π.Α.

SUMMARY

The present study is focused on the development of new methods and improve them in order to determine the lipophilicity of drugs. The shaking flask is still the most dominant procedure for the estimation of the distribution coefficient at water / octanol partition. Unfortunately, the problems have escalate the intrest for new methods.

The first part capitalizes on liquid chromatography and it's advantages against traditional shaking flask for the determination of lipophilicity by the use of ABZ+ coloumn. For the estimation of chromatographic parameters such as $\log k_w$ values has applied different conditions. Especially, the tested conditions are ammonium acetate – acetic acid / acetonitrile under pH 5.0 and ammonium acetate – ammonia / acetonitrile and phosphate buffer solution (saturated in octanol) / methanol (+ 0.25% octanol) for pH 7.4. $\log k_w$ values have led to considerable $\log D$ values diviations. An other approach was the insertion of ϕ_0 values (the percentage of organic modifier required to achieve an equal distribution of compound between the mobile and stationary phase) which shows better results in the case of ammonium acetate buffers. Unfortunately, isocratic elutions are tedious and substantial solvent – consuming process. The transition from isocratic to gradient elution was obligated. The outcome was the introduction of Chromatographic Hydrophobicity Index (CHI). The CHI values demonstrated more reliable results than $\log k_w$ values even though ϕ_0 parameter maintains the highest $\log D$ correlation (an exception is the phosphate buffer where the $\log k_w$ values present the minor deviations for both ϕ_0 and CHI values respecting to experimental $\log D$ values). An attempt to eliminate the abnormality of retention time where ionized acids are analyzied, was EDTA as mobile phase additive. EDTA was expected to prevent the complexation between ionized acids and metal impurities on silica surface by reducing the retention time of acids. On the contrary, the retention was increased.

The second part uses the electrospray mass spectrometry (ESI/MS) as a potential tool for determining the lipophilicity of acids and bases. For the purpose of the study, three models have been created. The first is for the acids, the second for the bases and the third combines both acids and bases. The results show a good correlation between $\log D$ and the ion intensity in electrospray mass spectrometry. The expirement performed at pH 5.0 conditions.

The third part linkage the lipophilicity of indirubin derivatives with cells membrane permeability. Crucial is the apply of biomimetic chromatography by IAM.PC.DD2 coloumn installation. The chromatographic results have shown prolonged retention in IAM stationary phase. The extended retentions may induce toxicity in human cells. The indirubin derivatives

were synthesized at University of Athens, Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΧΥΤΑΤΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

1.1 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Η διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων αφορά στο σχεδιασμό και τη σύνθεση χημικών ενώσεων που θα έχουν την ικανότητα να συνδεθούν με τον υποδοχέα – στόχο και να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα σε συνδυασμό με την ασφάλεια για τον ανθρώπινο οργανισμό [1]. Κατά τον σχεδιασμό φαρμάκων πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στον καθορισμό της καταλληλότητας ενός μορίου ως αποτελεσματικού φαρμάκου. Η δραστηριότητα του μορίου εκφραζόμενη μέσω της αλληλεπίδρασης του με τον υποδοχέα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Ωστόσο, υπάρχουν άλλοι αρκετοί παράγοντες που εξασφαλίζουν τις ικανές συνθήκες ώστε να καταστεί δραστικό το φάρμακο. Έτσι, μια χημική ένωση μπορεί να αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τον υποδοχέα από μια άλλη χημική ένωση, όμως η δεύτερη εμφανίζει καλύτερα χαρακτηριστικά λιποφιλίας, κατανομής στους ιστούς, διαπερατότητας των μεμβρανών, διαλυτότητα και μικρότερη πρωτεϊνική σύνδεση. Η πλήρωση των παραπάνω παραγόντων παρέχει στην δεύτερη ένωση τη δυνατότητα να αυξήσει την αποτελεσματικότητα πρόσβασης και αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα. Άρα θα αναμενόταν η δραστικότερη ένωση να χορηγείται σε μικρότερη δόση ενώ η λιγότερο δραστική ένωση σε μεγαλύτερη δόση. Αντίθετα και τα δυο υποψήφια φάρμακα χορηγούνται με την ίδια συγκέντρωση (αφού η μικρότερη δραστηριότητα του ενός αντισταθμίζεται από τους φυσικοχημικούς παράγοντες που το καθιστούν αποτελεσματικότερο) [2].

Επομένως, ο σχεδιασμός των υποψήφιων φαρμάκων χωρίζεται σε δυο φάσεις: στην ανακάλυψη ενώσεων – οδηγών και στη βελτιστοποίηση των ενώσεων – οδηγών [3].

1.2 ΛΙΠΟΦΙΛΙΑ: ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΣΤΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Στις σημαντικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων συγκαταλέγεται η λιποφιλία, η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στη συγγένεια με τον υποδοχέα – στόχο όσο στην φαρμακοκινητική πορεία [4].

Η λιποφιλία αποτελεί μια σύνθετη ιδιότητα που καθορίζεται από δύο βασικές συνιστώσες, την υδροφοβία και την πολικότητα των ενώσεων [5,6]:

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβία} - \text{Πολικότητα} \quad (1)$$

Σύμφωνα με την σχέση (1) οι όροι λιποφιλία και υδροφοβία 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 άπωσης τους από το νερό έτσι ώστε να καταλαμβάνουν τη μικρότερη δυνατή επιφάνεια [7].

Οι συνιστώσες της λιποφιλίας μπορούν να περιγραφούν από διάφορες παραμέτρους. Η υδροφοβία (στερική συνιστώσα) μπορεί να εκτιμηθεί με παραμέτρους μοριακού όγκου, μοριακής επιφάνειας, το μοριακό βάρος και την πολωσιμότητα του μορίου [8]. Η σημαντική συμβολή του όγκου στη λιποφιλία έχει ως αποτέλεσμα τη σχετικά ισχυρή συσχέτιση του συντελεστή κατανομής με τις προαναφερθείσες παραμέτρους ιδιαίτερα στην περίπτωση μη πολικών μορίων. Ας σημειωθεί ότι για τα αλκάνια η λιποφιλία ταυτίζεται με την υδροφοβία. Η πολικότητα εκφράζεται από τη διπολική ροπή, την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και ηλεκτρονιακές παραμέτρους. Ιδιαίτερα η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου συμβάλλει σημαντικά στη λιποφιλία και σε πολλές άλλες περιπτώσεις, ιδιαίτερα για μη ηλεκτρολύτες [6]. Στο γεγονός αυτό βασίστηκαν διάφορες προσπάθειες ανάλυσης του Log P στη βάση παραμέτρων όγκου και της ικανότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Εξάλλου σε αρωματικά συστήματα έχει προταθεί η σταθερά σ των υποκαταστατών ως έκφραση της συμβολής των ηλεκτρονιακών χαρακτηριστικών στην λιποφιλία [9,10].

1.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Η λιποφιλία εκφράζεται από τον συντελεστή μερισμού στο σύστημα οκτανόλης – νερού Log P για δεδομένη τιμή pH που οι χημικές ενώσεις βρίσκονται στη μη ιοντισμένη μορφή τους και τον συντελεστή κατανομής Log D για τιμές pH που οι χημικές ενώσεις βρίσκονται κατά ένα ποσοστό (ή πλήρως) υπο την ιοντισμένη μορφή [13].

Η πλέον αποδεκτή μέθοδος προσδιορισμού της λιποφιλίας είναι η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης, η οποία στηρίζεται στην άμεση κατανομή των ουσιών ανάμεσα στην οκτανόλη και το νερό. Η μέθοδος είναι επίπονη, χρονοβόρα και οι μετρήσιμες τιμές Log P περιορίζονται σε εύρος -2.5 – 4. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων εξαρτάται από τις προσδιοριζόμενες τιμές και είναι χαμηλή ιδιαίτερα για ακραίες τιμές. Άλλα μειονεκτήματα της μεθόδου εκτός των μεγάλων πειραματικών χρόνων είναι η ευαισθησία στις προσμίξεις, χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών, περιορισμός στο εύρος λιποφιλίας της εξεταζόμενης ένωσης και η λήψη των αποτελεσμάτων σε ξεχωριστό στάδιο [14].

1.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ

Η υγροχρωματογραφία (HPLC) παρουσιάζει πλειάδα πλεονεκτημάτων έναντι της παραδοσιακής μεθόδου ανακινούμενης φιάλης του συστήματος οκτανόλη / νερό. Στα πλεονεκτήματα συμπεριλαμβάνονται η γρήγορη εκτέλεση των πειραμάτων, η μείωση του πειραματικού χρόνου, η επαναληψιμότητα, η ανάλυση μεγαλύτερου εύρους λιποφιλίας δειγμάτων, η εμφάνιση των αποτελεσμάτων σε ένα στάδιο, η χρήση μικρών ποσοτήτων δείγματος, η μηδενική ευαισθησία σε προσμίξεις και η μικρή κατανάλωση οργανικών διαλυτών [15,16]. Ωστόσο, ο προσδιορισμός με υγροχρωματογραφία αποτελεί έμμεση τεχνική και τα αποτελέσματα πρέπει να συγκρίνονται με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης / νερού. Για πολλές δεκαετίες η έρευνα έχει εστιάσει στην καθιέρωση βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών για την προσομοίωση του συντελεστή μερισμού / κατανομής.

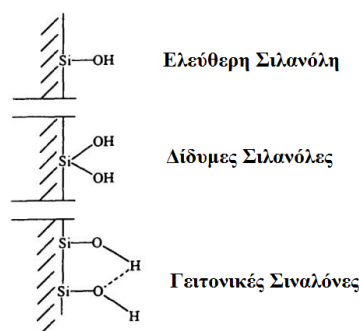
Η βελτιστοποίηση αφορά τόσο την επιλογή της χρωματογραφικής στήλης όσο και στη σύνθεση της κινητής φάσης.

1.4.1 Στατικές φάσεις

Οι χρωματογραφικές στήλες με στατική φάση συνδεδεμένη με 18 άτομα άνθρακα θεωρούνται οι καταλληλότερες στον προσδιορισμό της λιποφιλίας [17]. Αν το προς εξέταση δείγμα διαθέτει μια πολική ομάδα και το υπόλοιπο μέρος είναι λιπόφιλο τότε παρουσιάζεται ασύμμετρη κορυφή και έντονο το φαινόμενο σχηματισμού ουράς. Τα παραπάνω προβλήματα λύνονται με κάλυψη των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης ώστε να είναι περιορισμένη η εγκαθίδρυση ατόμων μετάλλου στις ομάδες της σίλικας [19].

Στην υδροχρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως χρησιμοποιούνται υδρόφοβες στατικές φάσεις. Συνήθως είναι ακυλιωμένες αλυσίδες (C8, C18) συνδεδεμένες στην επιφάνεια της σίλικας. Η πυριτία προτιμάται για την μηχανική σταθερότητα της και το μικρό σφαιρικό σχήμα της που βοηθάει στο πακετάρισμα της στήλης. Η μηχανική αντοχή συνεισφέρει στην εφαρμογή μεγάλων ταχυτήτων και υψηλών πιέσεων, συνθήκες που προτιμώνται συχνά στον διαχωρισμό ουσιών. Η σύνδεση είναι προϊόν αντιδράσεως οργανικών χλωροσιλανίων με τις ομάδες σιλανόλης. Οι πιο διαδεδομένες αντιστρόφου φάσεως στήλες είναι οι ODS και BDS στήλες που προσομοιάζουν σε ικανοποιητικό βαθμό το σύστημα οκτανόλη / νερό. Η ύπαρξη ελεύθερων ομάδων σιλανόλης στην στήλη ODS οδηγεί σε σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα την εμφάνιση αποκλίσεων από το μηχανισμό κατανομής και την αύξηση της συγκράτησης των υπό προσδιορισμό ουσιών. Η προσθήκη μικρών πολικών μορίων στις ελεύθερες ομάδες σιλανόλης που δεν αντιδρούν με ακυλικές ομάδες επέφερε την παρασκευή της χρωματογραφικής στήλης BDS. Ωστόσο, η εξάλειψη των δυσαρμονιών των στατικών φάσεων παραμένει και εντείνεται στην περίπτωση εισαγωγής ιονισμένων χημικών ενώσεων. Η έλλειψη συμμετρίας των κορυφών εξαρτάται από τις χαρακτηριστικές ομάδες των υπο ανάλυση ενώσεων.

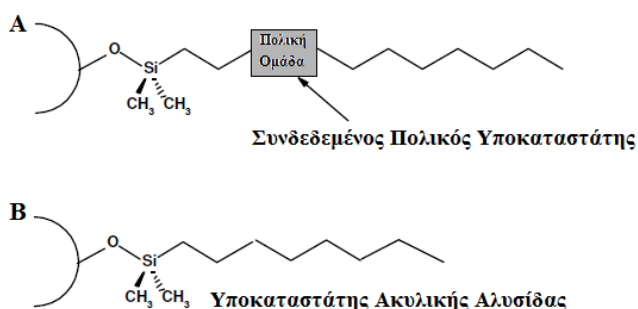
Υπάρχουν διάφορες μορφές ομάδων σιλανόλης. Κάθε μια συνεισφέρει διαφορετικά στις αλληλεπιδράσεις της σίλικας με τους αναλύτες και προσδίδει διαφορετικές ιδιότητες στην εκάστοτε στατική φάση [20].



Σχήμα 1: Διάφορες μορφές ομάδων σιλανόλης

Οι ελεύθερες σιλανόλες είναι δυνατόν να αλληλεπιδράσουν μέσω δεσμών υδρογόνου ή σε pH όπου βρίσκονται ιοντισμένες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει μετατόπιση του χρόνου έκλουσης και δημιουργία ουράς της χρωματογραφικής κορυφής [19,20]. Οι σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας, δεδομένου ότι επηρεάζουν τον μηχανισμό κατανομής μεταξύ στατικής / κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να οδηγούν σε αυξημένες τιμές φαινόμενης λιποφιλίας.

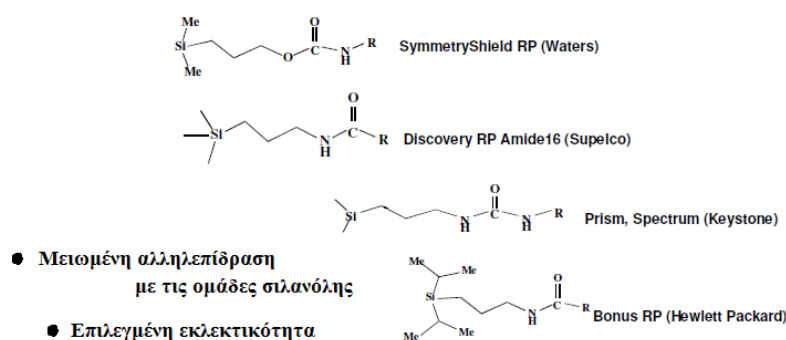
Οι δευτερογενείς σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις περιορίζονται με την εισαγωγή υδρόφοβων βασικών παραγόντων επικάλυψης όπως είναι η δεκυλαμίνη ή χρησιμοποιώντας διαφορετικού τύπου χρωματογραφικές στήλες (end – capped columns) με μικρά μόρια να καλύπτουν τις ελεύθερες ομάδες σιλανόλης [21].



Σχήμα 2: A) Στατική φάση υγροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως (C8) συνδεδεμένη με ακυλικές αλυσίδες με πολικό υποκαταστάτη, B) Στατική φάση υγροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως συνδεδεμένη με ακυλική αλυσίδα (C8)

Στην προσπάθεια μείωσης των προβλημάτων πραγματοποιείται η εισαγωγή μικρότερων μορίων που μπορούν να εισχωρήσουν ανάμεσα στις υδρογονανθρακικές αλυσίδες (C8, C18) και να καλύψουν τις ελεύθερες ομάδες σιλανόλης. Επιπλέον σε στήλες νέας γενιάς για να μειωθεί η προσβασιμότητα στα ελεύθερα υδροξύλια παρεμβάλλονται εστερικές ή αμιδικές ομάδες μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων και του σκελετού της πυριτίας.

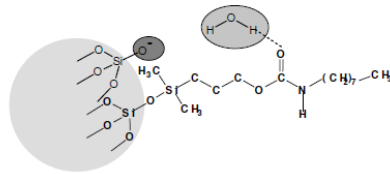
Οι σχηματιζόμενοι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των γειτονικών αλυσίδων αφ' ενός δημιουργούν ένα προστατευτικό πλέγμα, αφ' ετέρου συμβάλλουν στην εκτεταμένη διαμόρφωση των αλυσίδων και αποφεύγεται η υδρόφοβη κατάρρευσή τους σε κινητές φάσεις 100% νερό. Οι στήλες αυτές χαρακτηρίζονται ως polar embedded ή polar encapped. Στην κατηγορία polar embedded ανήκουν οι στήλες ABZ+ και Discovery Rp amide 16 οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας. Η στήλη Aquasil, η οποία είναι polar encapped έχει προταθεί για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας περισσότερο υδρόφιλων ενώσεων [11].



Σχήμα 3: Χρωματογραφικές στήλες του εμπορίου με στατικές φάσεις συνδεδεμένες με ακυλικές αλυσίδες με πολικό υποκαταστάτη.

Συγκεκριμένα, η χρωματογραφική στήλη ABZ+ έχει ως υποστηρικτικό υλικό ομάδα αμιδίου που προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα. Η ομάδα αμιδίου είναι πολικό μόριο που περιέχει άτομα με ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Έτσι η ομάδα αμιδίου πραγματοποιεί δεσμούς υδρογόνου με τις ομάδες σιλανόλης εμποδίζοντας τους αναλύτες να αλληλεπιδράσουν με την σίλικα. Ουσιαστικά τα υποστηρικτικά υλικά λειτουργούν ως ηλεκτροστατική ασπίδα ανάμεσα στη σίλικα και τους αναλύτες. Όταν χρησιμοποιούνται υδατικές κινητές φάσεις, τα μόρια νερού βοηθούν στην εγκαθίδρυση της ασπίδας, αφού τα πολικά μόρια του νερού έλκονται από τα πολικά υποστηρικτικά υλικά δημιουργώντας έναν επιπλέον τοίχο προστασίας μεταξύ αναλυτών και σίλικα.

Οι πολικές ομάδες αυξάνουν την συγκέντρωση του νερού στην επιφάνεια της σίλικα

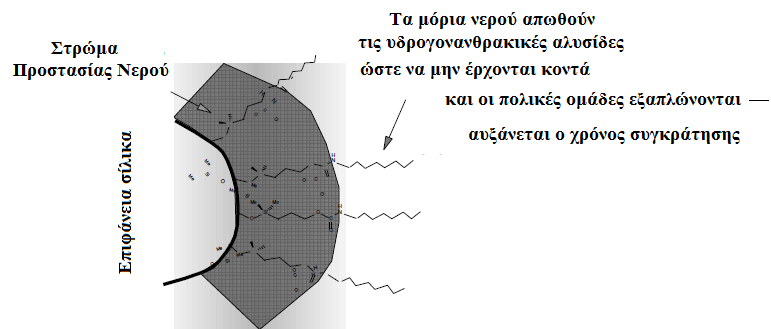


Προστασία από το αρνητικό φορτίο των ομάδων σιλανόλης



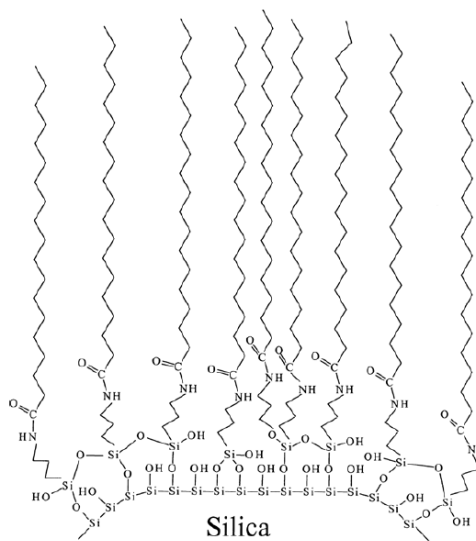
- Δεν προστίθενται παράγοντες αύξησης των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων
- Μειωμένος χρόνος έκλουσης των βασικών ενώσεων
- Μείωση του φαινομένου "ουράς" των χρωματογραφικών κορυφών

Σχήμα 4: Πιθανός μηχανισμός δράσης συνδεδεμένου πολικού υποκαταστάτη στην ακυλική αλυσίδα της υδροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως.



Σχήμα 5: Οι συνδεδεμένες πολικές ομάδες στη στατική φάση αυξάνουν τα μόρια νερού που εισέρχονται στο εσωτερικό των αλυσίδων.

Τα παραπάνω πλεονεκτήματα καθιστούν την ABZ+ τη χρωματογραφική στήλη επιλογής για τον προδιορισμό της λιποφιλίας [22].



Σχήμα 6: Στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης ABZ+

Παρά την ανάπτυξη των στηλών δεύτερης γενιάς για τη μείωση των σιλανόφιλων και γενικότερα των δευτερευουσών αλληλεπιδράσεων, συχνά παρατηρούνται δυσαρμονίες όσον αφορά στην προσομοίωση της συγκράτησης με τη λιποφιλία. Τα προβλήματα αφορούν ιδιαίτερα τις ιοντιζόμενες ενώσεις. Στη περίπτωση πρωτονιωμένων βάσεων ή ασθενών οξέων έχουν προταθεί προτυποποιημένες συνθήκες κινητής φάσης με αρκετά επιτυχή αντιμετώπιση των προβλημάτων [11,12]. Στη περίπτωση, ωστόσο, ισχυρών οξέων δεν έχει σταθεί δυνατόν να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες, παρά τις σχετικές έρευνες [11].

Η ιδιαίτερα ισχυρή συγκράτηση των ανιόντων στη στατική φάση πυριτίας είναι δυνατόν, πέρα των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων να οφείλεται και στον σχηματισμό χηλικών συμπλόκων με ίχνη μετάλλων που πιθανόν υπάρχουν στο υλικό της πυριτίας από την παρασκευή της ή στο χρωματογραφικό σύστημα μέσω των συνδέσεων [19]. Ο Kohler έχει αναφέρει ότι η καλύτερη μέθοδος καθαρισμού της πυριτίας είναι η εισαγωγή EDTA [23].

Λαμβάνοντας υπόψιν τα στοιχεία από τα οποία αποτελούνται τα εξαρτήματα της HPLC, τα ιόντα μετάλλου που αναμένεται να παραχθούν από τις αντιδράσεις οξειδωσης είναι χρώμιο, σίδηρος, μαγνήσιο, μολυβδαίνιο και νικέλιο. Μπορούν να βρεθούν ως ιόντα ή σε σύμπλοκα με στοιχεία της κινητής φάσης. Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί η συμμετοχή του frit (πορώδες μεταλλικό υλικό) των χρωματογραφικών στηλών στην αύξηση των προσμίξεων μετάλλου. Τα περισσότερα μέταλλα που ανιχνεύονται, βρισκονται στο frit. Στο συγκεκριμένο εξάρτημα εμφανίζονται αρκετά σημεία αυξανόμενης πίεσης καθώς περνάει η κινητή φάση που προσθέτει έναν επιπλέον παράγοντα στη δημιουργία προσμίξεων ατόμων μετάλλου [24]. Τα εξαρτήματα, το frit ή τα διαλύματα δεν είναι οι μόνες πηγές μόλυνσης. Οι στήλες διαθέτουν προσμίξεις μετάλλων χωρίς να έχει γίνει κάποια χρήση τους. Συνήθως οι συγκεκριμένες προσμίξεις είναι απόρροια της μεθόδου παρασκευής της στατικής φάσης (ιδιαίτερα των χημικά τροποποιημένων στατικών φάσεων) [23,25,26,27]. Επίσης, μέταλλα περιέχονται στους διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία κινητών φάσεων. Ωστόσο το ποσοστό είναι πολύ μικρό [24].

1.4.2 Κινητές φάσεις

Οι κινητές φάσεις στην υδροχρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως αποτελούνται από τον συνδυασμό νερού με οργανικούς τροποποιητές. Η πολικότητα του νερού δεν επιτρέπει την αλληλεπίδραση του με τις υδρόφοβες ομάδες της χημικά τροποποιημένης στατικής φάσης, καθιστώντας το νερό ως μέσο με πολύ μικρή εκλουστική ισχύ. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία οργανικών τροποποιητών που χρησιμοποιούνται στις κινητές φάσεις. Από τους συνηθέστερους είναι η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Η μεθανόλη παρουσιάζει μικρότερη λιποφιλία οδηγώντας σε μεγαλύτερους χρόνους συγκράτησης. Επίσης, αυξάνει το ιξώδες της κινητής φάσης με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πίεση κατά την εισαγωγή της στην χρωματογραφική στήλη. Ωστόσο, το μικρό μέγεθος του μορίου της μεθανόλης, όσο και η ικανότητα της να λειτουργεί ως δότης και δέκτης πρωτονίου την κατατάσσουν στους φιλικούς για την στατική φάση οργανικούς διαλύτες, ενώ δεν διαταράσσει σημαντικά τη δομή του νερού [28,29]. Το ακετονιτρίλιο συγκαταλέγεται στους υδρόφοβους οργανικούς διαλύτες. Οι χρόνοι συγκράτησης είναι σαφώς μικρότεροι επιδεικνύοντας μεγαλύτερη εκλουστική ισχύ. Το ακετονιτρίλιο δεν συμμετέχει ως δότης σε δεσμούς υδρογόνου.

Εκτός από τον οργανικό τροποποιητή όπως ήδη αναφέρθηκε συχνά χρησιμοποιούνται παράγοντες επικάλυψης των τυχόν ελεύθερων ομάδων σιλανόλης. Η δεκυλαμίνη αποτελεί τον ευρύτερα χρησιμοποιούμενο παράγοντα επικάλυψης σε ποσοστά 0.15 – 0.20% στο συνολικό όγκο της κινητής φάσης. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι η προσθήκη μικρή ποσότητας οκτανόλης στον όγκο του οργανικού τροποποιητή (0.2%) λειτουργεί επίσης ως παράγοντας επικάλυψης, ενώ προσδίδει χαρακτηριστικά οκτανόλης στη στατική φάση.

Ως ρυθμιστικό διάλυμα επιλέγεται συχνά το αμφολυτικό μορφολινο-προπανο-σουλφονικό οξύ, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται ως παράγοντας επικάλυψης η δεκυλαμίνη όπως στην περίπτωση βασικών και ουδέτερων ενώσεων. Για την έκλυση οξέων χρησιμοποιείται συνήθως ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Στη βαθμιδωτή έκλυση για τον προσδιορισμό δεικτών υδροφοβίας χρησιμοποιείται επίσης ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, που επιτρέπει και τη μεταφορά της μεθόδου σε σύστημα LC-MS.

1.4.3 Χρωματογραφικοί δείκτες λιποφιλίας

Για την προσομοίωση του συντελεστή μερισμού / κατανομής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και ισοκρατικές τιμές του παράγοντα χωρητικότητας υπό την λογαριθμική μορφή $\log k$, αλλά και οι αντίστοιχες ανηγμένες τιμές $\log k_w$, που αντιστοιχούν σε συνθήκες κινητής φάσης αποτελούμενης από 100% νερό. Οι τιμές $\log k_w$ προκύπτουν με βάση την σχέση

των ισοκρατικών τιμών $\log k$ και του ποσοστού οργανικού τροποποιητή σύμφωνα με το μοντέλο δ του Schoenmaker [38], (εξίσωση 2).

$$\log k = A\varphi + B\varphi^2 + E\sqrt{\varphi} + \log k_w \quad (2)$$

με A, B, E = συντελεστές εξίσωσης
 $\log k_w$ = τετμημένη επί της αρχής που αντιπροσωπεύει τον παράγοντα συγκράτησης όταν $\varphi=0$, δηλαδή 00%νερό
 $B\varphi^2$ = αντιπροσωπεύει τις σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν μέρος σε υψηλά ποσοστά οργανικού διαλύτη στη κινητή φάση.
 ο όρος $E\sqrt{\varphi}$ αναφέρεται στα προβλήματα επιδιαλύτωσης της στατικής φάσης που παρουσιάζονται σε κινητές φάσεις πλούσιες σε νερό ($\varphi < 0.2\%$)

Έχει παρατηρηθεί σε χαμηλά ποσοστά οργανικού τροποποιητή αύξηση του σφάλματος υπολογισμού των τιμών $\log k_w$ λόγω καμπύλωσης της ευθείας. Αντίθετα σε ποσοστά μεγαλύτερα του 0.2% οργανικού τροποποιητή και μέχρι κάποιο ποσοστό που εξαρτάται από τον οργανικό τροποποιητή αλλά και τις υπο ανάλυση ενώσεις, η καμπύλη είναι ευθεία με αποτέλεσμα τον αξιόπιστο υπολογισμό των τιμών $\log k_w$. Η εξίσωση 2 μπορεί συνεπώς για συγκεκριμένο εύρος οργανικού τροποποιητή να απλοποιηθεί σύμφωνα με τον Snyder στην εξίσωση 3:

$$\log k = - S\varphi + \log k_w \quad (3)$$

όπου S = κλίση της ευθείας.

Εάν στα πλαίσια σειράς ενώσεων ο μηχανισμός συγκράτησης είναι ομοιογενής η κλίση S συσχετίζεται με τις τιμές $\log k_w$. Επιπλέον η κλίση S θεωρείται ότι εκφράζει την υδρόφοβη επιφάνεια των αναλυτών [17].

1.4.4 Προτυποποίηση χρωματογραφικών συνθηκών

Οι τιμές $\log k$ και $\log k_w$ συσχετίζονται με τον συντελεστή μερισμού με εξισώσεις τύπου Collander, τα στατιστικά στοιχεία των οποίων εξαρτώνται από τις χρωματογραφικές συνθήκες αλλά και τη δομή των ενώσεων.

$$\text{Log } k = a \log P + b \quad (4)$$

$$\text{Log } k_w = a \log P + b \quad (5)$$

Για βασικές και ουδέτερες ενώσεις οι χρωματογραφικές συνθήκες έχουν προτυποποιηθεί ώστε να λαμβάνονται 1:1 εξισώσεις μεταξύ $\text{Log } k_w$ και $\log P$. Οι συνθήκες αυτές

περιλαμβάνουν κινητές φάσεις που αποτελούνται από ρυθμιστικό διάλυμα MOPS και οργανικό τροποποιητή μεθανόλη. Η κινητή φάση περιέχει 0.15% δεκυλαμίνη ενώ στον όγκο της μεθανόλης προστίθεται 0.2% οκτανόλη. Ως στατική φάση μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες BDS ή ABZ+ [12,17].

Η δεκυλαμίνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση οξέων διότι σχηματίζει ζεύγη ιόντων. Κατά συνέπεια η προτυποποίηση των συνθηκών στην περίπτωση οξέων έχει αποδειχθεί πιο δύσκολη. Ωστόσο η προσθήκη οκτανόλης στην κινητή φάση έχει διαπιστωθεί ότι αποτελεί ευνοϊκή συνθήκη. Σε προηγούμενη εργασία διερευνήθηκε την επίδραση της οκτανόλης ως προσθετικού παράγοντα στη συγκράτηση ασθενών και ισχυρών οξέων [30]. Διαπιστώθηκε ότι απαιτείται ο διαχωρισμός τους κατά την στατιστική επεξεργασία για την εξαγωγή των συσχτίσεων. Στη περίπτωση ασθενών οξέων η προσθήκη 0.25% οκτανόλης στον όγκο της μεθανόλης οδήγησε σε 1:1 συσχέτιση μεταξύ της συγκράτησης και των συντελεστών κατανομής. Για τα ισχυρά οξέα οι ίδιες συνθήκες οδήγησαν σε πολύ καλή αλλά διαφορετική εξίσωση.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΥΔΡΟΦΟΒΙΑΣ (CHI)

2.1 Αναζήτηση αποτελεσματικότερων μεθόδων προσδιορισμού της λιποφιλίας

Μια εναλλακτική ενδιαφέρουσα προσέγγιση χρωματογραφικών δεικτών στηρίζεται στη θεώρηση του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή που παρατηρείται ισοκατανομή της ουσίας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης δηλ. $k = 1$ ή $\log k = 0$. Το ποσοστό αυτό χαρακτηρίζεται ως ϕ_0 . Το ϕ_0 μπορεί να προκύψει από την εξίσωση 6 [31,32]:

$$\text{Log } k = S\phi + \log k'_w = 0 \Rightarrow \phi_0 = -\log k'_w / S \quad (6)$$

Απόρροια των τιμών ϕ_0 είναι ότι όσο πιο λιπόφιλη είναι η χημική ένωση τόσο μεγαλύτερο θα πρέπει να είναι το απαιτούμενο ποσοστό του οργανικού διαλύτη για ισοκατανομή. Εναλλακτικά ο δείκτης ϕ_0 αντιπροσωπεύει το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή που απαιτείται ώστε ο χρόνος έκλουσης του αναλύτη να είναι ο διπλάσιος του νεκρού χρόνου [33]. Θεωρητικά οι τιμές ϕ_0 κυμαίνονται από 0 – 100 (ή 0 – 1, αν θεωρείται το κλάσμα του οργανικού τροποποιητή). Ωστόσο για υπερβολικά υδρόφοβες ενώσεις οι τιμές ϕ_0 ξεπερνούν την τιμή 100 ενώ για υδρόφιλες ενώσεις ($\log k_w < 0$) εμφανίζουν αρνητικές τιμές ϕ_0 [32]. Τέτοιου είδους τιμές αντιμετωπίζονται με δυσπιστία, δεδομένου ότι στερούνται φυσικής έννοιας. Το ϕ_0 εξαρτάται από τον οργανικό τροποποιητή που χρησιμοποιείται και στην περίπτωση των ιονισμένων ενώσεων από το pH (λόγω επιρροής του στον συντελεστή κατανομής, αλλά και στον μηχανισμό συγκράτησης γενικότερα) [31].

Οι τιμές ϕ_0 έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες λιποφιλίας, ενώ ανάλυσή τους με πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων έχει δείξει ότι εξαρτώνται κυρίως από παραμέτρους όγκου [34].

2.2 Από την ισοκρατική έκλυση μετάβαση στη βαθμιδωτή έκλυση

Με βάση την προσέγγιση ϕ_0 και με στόχο τη μείωση του αναλυτικού χρόνου με την μικρότερη αναλυτική απώλεια η Valko και οι συναδελφοί της [33] μετέφεραν την ανάλυση των δειγμάτων από το επίπεδο των ισοκρατικών μεθόδων στη συντομότερη μέθοδο της βαθμιδωτής έκλυσης, εισάγοντας τον Χρωματογραφικό Δείκτη Υδροφοβίας (CHI). Ο δείκτης CHI στηρίζεται στην πολύ καλή συσχέτιση που παρατηρείται μεταξύ των τιμών ϕ_0 και του χρόνου βαθμιδωτής έκλυσης t_R (gradient).

Η σχέση της βαθμιδωτής έκλουσης με την ισοκρατική εκφράζεται μέσω του χρόνου συγκράτησης των δυο μεθόδων. Η σχέση αυτών των δυο παρουσιάζεται από την μαθηματική εξίσωση:

$$t_R = (t_0/S) \log(2.3k_wSt_0 + 1/t_g) + t_0 + t_D \quad (7)$$

t_R = ισοκρατικός χρόνος έκλουσης

t_0 = νεκρός χρόνος χρωματογραφικής στήλης

t_D = χρόνος παραμονής

t_g = χρόνος μεταβίβασης από 0% έως 100% στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

Καθώς το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης βρίσκεται σε λειτουργία κάθε χρονικό σημείο του προγράμματος ισοδυναμεί με μια συγκεκριμένη ποσότητα οργανικού τροποποιητή. Έτσι γνωρίζοντας τον νεκρό χρόνο και τον χρόνο παραμονής του συστήματος HPLC είναι δυνατός ο υπολογισμός του ποσοστού της οργανικής φάσης σε όλη την διάρκεια έκλουσης του αναλύτη. Ο χρόνος παραμονής αντιστοιχεί στον χρόνο που απαιτείται ώστε να απομακρυνθεί η κινητή φάση (που προϋπάρχει στην στήλη πριν την έναρξη της βαθμιδωτής έκλουσης) και να εισέλθει στην στήλη η κινητή φάση βαθμιδωτής έκλουσης [33,35,38].

Με βάση τα ανωτέρω για τον προσδιορισμό των τιμών CHI απαιτείται η κατασκευή πρότυπης καμπύλης φ_0 / t_R (gradient) [35,36]. Με βάση την ανωτέρω προσέγγιση η Valko και οι συναδελφοί της κατάφεραν να περιορίσουν τον αναλυτικό χρόνο με την εφαρμογή προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης διάρκειας 5 min [37].

Χαρακτηριστικό στοιχείο των συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία είναι η διασφάλιση του μη ιοντισμού των δειγμάτων. Επομένως, στη μέθοδο της Valko ρυθμίζονται οι τιμές pH ώστε τα δείγματα να παραμένουν μη ιοντισμένα με τελικό σκοπό τον προσδιορισμό των τιμών log P. Για την ρύθμιση του pH επιλέγεται ρυθμιστικό διάλυμα οξικών ώστε να είναι συμβατές οι συνθήκες με το σύστημα LC/MS. Η εφαρμογή της μεθόδου για αδιάστατες ενώσεις αποτελεί ωστόσο ένα σημαντικό περιορισμό.

Οι τιμές CHI συσχετίζονται με τις τιμές log P στο σύστημα οκτανόλης / νερού και μπορούν να μετατραπούν σε τιμές (CHI log P ή CHI log D) μέσω της εξίσωσης 8 η οποία έχει προκύψει από 80 μόρια φαρμάκων ποικίλης δομής

$$CHI \log D = 0.054CHI - 1.467 \quad (8)$$

Για ουδέτερες ενώσεις που λειτουργούν ως δότες υδρογόνου προς σχηματισμό δεσμών υδρογόνου διαπιστώνονται χαμηλότερες τιμές CHI log P, ενώ για ιονισμένες παρτηρείται υπερτίμηση των τιμών CHI log P σε σχέση με τις τιμές log P (οκτανόλη / νερό) των αντίστοιχων ενώσεων [35,36]. Διόρθωση των τιμών log P ως προς την ικανότητα δεσμών υδρογόνου των ενώσεων ως δότες είναι εφικτή με βάση την εξίσωση 9, η οποία έχει προκύψει από την ανάλυση 86 ενώσεων.

$$\text{Log } P_{\text{oct}} = 0.05\text{CHI} + 0.41\text{HBC} - 1.41 \quad (9)$$
$$N = 86 \quad R = 0.942 \quad s = 0.40$$

HBC = αριθμός δοτών σε δεσμούς υδρογόνου

Στη βαθμιδωτή έκλυση οι παράγοντες που αλλάζουν είναι η τιμή pKa των ενώσεων και το pH της κινητής φάσης. Σε ισοκρατικές συνθήκες η κινητή φάση έχει καθορισμένη τιμή pH σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η αύξηση του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή (μεθανόλη) στην εφαρμογή της μεθόδου βαθμιδωτής έκλυσης προκαλεί αύξηση των τιμών pKa οξέων (μείωση της οξύτητας) ενώ στην περίπτωση των βασικών ενώσεων οι τιμές pKa μειώνονται με την % αύξηση του οργανικού διαλύτη (μείωση της βασικότητας). Επιπλέον κατά την βαθμιδωτή έκλυση μεταβάλλεται η τιμή του pH, αν και για αρχική τιμή 7.4 σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 50 mM οι μεταβολές στο pH δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικές για αλλαγή στα ποσοστά ακετονιτριλίου από 10 - 90%. Η αλλαγή στη συμπεριφορά των οξέων και των βάσεων είναι πιθανό να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις των αναλυτών με την στατική φάση είτε με την κινητή φάση. Οι μεταβολές στις αλληλεπιδράσεις των αναλυτών που λαμβάνουν μέρος στη βαθμιδωτή έκλυση μπορούν να ερμηνευτούν από ομάδα ισοκρατικών εκλύσεων στις οποίες αλλάζει το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή σε κάθε κύκλο ισοκρατικής έκλυσης με την προσθήκη του παράγοντα διόρθωσης [18]. Λόγω αυτών των προβλημάτων η Valko και οι συναδελφοί της για την προτυποποίηση της μεθόδου χρησιμοποίησαν τιμές pH ώστε τα δείγματα να παραμένουν μη ιοντισμένα.

Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η εξαγωγή τιμών CHI είναι η χρησιμοποίηση μικρής ποσότητας δειγμάτων, ο ελάχιστος επηρεασμός του από προσμίξεις [14], αλλά κυρίως ο μειωμένος πειραματικός χρόνος [35]. Ο Mutton και οι συναδελφοί του έχουν παρατηρήσει ότι η αύξηση της ροής και η χρήση μικρού μήκους στήλης οδηγεί σε περαιτέρω μείωση της χρονικής διάρκειας του προγράμματος βαθμιδωτής έκλυσης χωρίς σημαντική απώλεια αναλυτικής ικανότητας [40]. Η εξοικονόμηση χρόνου που είναι ταυτόχρονα συνδεδεμένη με το

περιορισμένο κόστος, προσφέρει μεγάλο πλεονέκτημα στη μέθοδο βαθμιδωτής έκλουσης ως εργαλείο για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας [35]. Για το λόγο αυτό η μεθοδολογία CHI έχει υιοθετηθεί σε μεγάλο βαθμό από τη φαρμακευτική βιομηχανία, ενώ έχει επεκταθεί και στη βιομημητική χρωματογραφία για τον προσδιορισμό αντίστοιχων μεγεθών σε στήλες Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM) ή σε στήλες πρωτεϊνών (στήλες ανθρώπινης αλβουμίνης, HSA, α1 όξινης γλυκοπρωτεΐνης, AGP).

ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (MS)

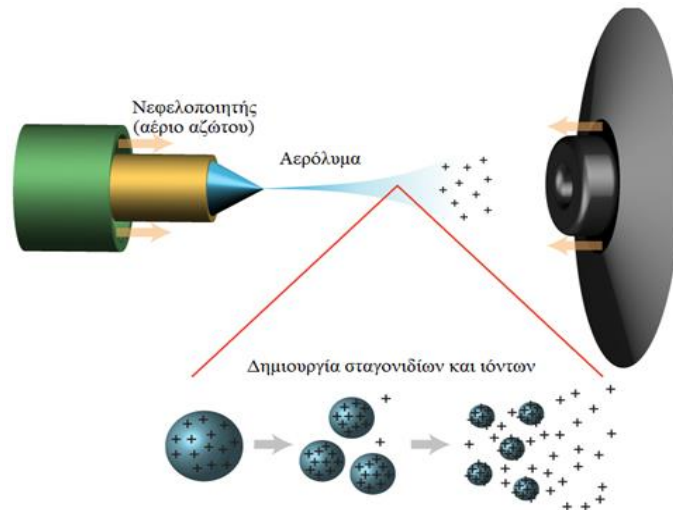
Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί σύνδεση των στηλών υγροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως με τον ανιχνευτή μάζας. Η πλειονότητα των χημικών ενώσεων προέρχεται από τις επιστήμες της φαρμακευτικής, βιολογίας και του περιβάλλοντος και αφορούν αναλύτες με μοριακό βάρος μικρότερο της τιμής 400. Διαδεδομένη είναι η χρήση του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ως πηγή ιοντισμού στο φασματόμετρο μάζας διότι προσφέρει εκλεκτικότητα και ειδικότητα παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την δομή των αναλυτών, χωρίς να καταστρέφει την δομή τους, ιδιότητα που την κατατάσσει στις ήπιες μορφές ιοντισμού [41].

3.1 Προϋποθέσεις ανίχνευσης χημικών ενώσεων

Το φασματόμετρο μάζας είναι ικανό να ανιχνεύει ιόντα και όχι ουδέτερα μόρια. Επομένως ο αναλύτης θα πρέπει να ιοντίζεται (συμβαίνει σε πολικά μόρια) στο διάλυμα που βρίσκεται. Έτσι ο ανιχνευτής μάζας παρουσιάζει περιορισμούς στο είδος των δειγμάτων που μπορούν να ανιχνευτούν. Επίσης στα αρνητικά συγκαταλέγεται η δημιουργία ψευδομοριακού ιόντος. Το ψευδομοριακό ιόν αναφέρεται στη προσθήκη ιόντος που συνυπάρχει στο διάλυμα με τον αναλύτη ικανό να διέλθει μέσα στον ανιχνευτή και να εμφανιστεί στο τελικό φάσμα δημιουργώντας προβλήματα στην ανάλυση του φάσματος. Το ψευδομοριακό ιόν συνήθως συγκροτείται από ανιόντα οξέων που περιέχουν αρωματικούς δακτυλίους σε πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό [42].

3.2 Κατανομή των αναλυτών στα σχηματιζόμενα σταγονίδια

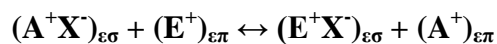
Όταν το τριχοειδές αντιπροσωπεύει το αρνητικό ηλεκτρόδιο τότε τα ανιόντα του διαλύματος ωθούνται στην επιφάνεια του υγρού μέσου ενώ τα θετικά φορτισμένα καταλήγουν στο εσωτερικό και η μετακίνηση εξακολουθεί να λαμβάνει μέρος μέχρι την πλήρη φορτιακή κατανομή. Τελικά στα σταγονίδια η επιφάνεια τους είναι καλυμμένη μόνο από ανιόντα. Έτσι από τα ανιόντα του ηλεκτρολύτη στην επιφάνεια του σταγονιδίου δημιουργείται πλεονάζον φορτίο (τα κατιόντα βρίσκονται στο εσωτερικό ή έχουν απομακρυνθεί κατά την διαδικασία σχηματισμού των σταγονιδίων) [43].



Σχήμα 7: Πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκάσμο (ESI)

Ο Enke αντιλήφθηκε την μετακίνηση των ιόντων από το εσωτερικό των σταγονιδίων στην επιφάνεια τους ως έναν μηχανισμό κατανομής των ιόντων μεταξύ δυο φάσεων. Το εσωτερικό μέρος του σταγονιδίου που αποτελείται από μόρια του διαλύτη και ζεύγη ιόντων και την επιφάνεια της σταγόνας που προβάλλονται τα ιόντα. Ο μηχανισμός κατανομής επιτελείται με γρήγορους ρυθμούς. Συγκεκριμένα με την δημιουργία των μεγάλων σταγόνων, η επιφάνεια τους καλύπτεται από τα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος αφού βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα. Τα μόρια του αναλύτη βρίσκονται υπο τη μορφή ζεύγους ιόντων με αντισταθμιστικά ιόντα του διαλύματος. Στη συνέχεια, τα ιόντα του αναλύτη προχωρούν σε ταχύτατη ανταλλαγή αντισταθμιστικών ιόντων με τα ελεύθερα ιόντα της επιφάνειας του σταγονιδίου. Έτσι ιόντα ρυθμιστικού διαλύματος συνάπτουν ιοντικούς δεσμούς με τα αντισταθμιστικά ιόντα και καταλήγουν στο εσωτερικό του σταγονιδίου ενώ τα ιονισμένα μόρια αναλύτη καταλαμβάνουν τις πλέον κένες θέσεις στην επιφάνεια της σταγόνας.

Η αντίδραση που περιγράφει την παραπάνω διαδικασία είναι:



με A^+ = ιόν αναλύτη

E^+ = ιόν ρυθμιστικού διαλύματος

X^- = αντισταθμιστικό ιόν

$(A^+X^-)_{εσ}$ = ζεύγος ιόντων στο εσωτερικό του σταγονιδίου

$(E^+)_{επ}$ = ιόν στην επιφάνεια του σταγονιδίου

$(E^+X^-)_{εσ}$ = ζεύγος ιόντων στο εσωτερικό του σταγονιδίου

$(A^+)_{επ}$ = ιόν στην επιφάνεια του σταγονιδίου

Η σταθερά ισορροπίας της κατανομής:

$$\frac{K_A}{K_E} = \frac{[E^+X^-]_{εσ} [A^+]_{επ}}{[A^+X^-]_{εσ} [E^+]_{επ}} \quad (10)$$

Η ένταση του σήματος αναλυτών:

$$R_A = Pf \frac{C_A K_A}{C_A K_A + C_E K_E} [Q] \quad (11)$$

Η τιμή του γινομένου $\mathbf{f} \times \mathbf{P}$ μπορεί να υπολογιστεί από την σχέση [43]:

$$\mathbf{R}_A + \mathbf{R}_B = \mathbf{P} \mathbf{f} \times \mathbf{I} \quad (12)$$

R_A = ένταση σήματος αναλύτη

R_B = ένταση ρεύματος που προκαλείται από τον αναλύτη B

P = το ποσοστό των ιόντων που βρίσκονται στην αέρια φάση και τελικά ανιχνεύονται από το φασματόμετρο μαζών σε συνθήκες 1 atm

f = το ποσοστό των ιόντων που βρίσκονται στην επιφάνεια των σταγονιδίων και μεταφέρονται στην αέρια φάση ως ελεύθερα ιόντα.

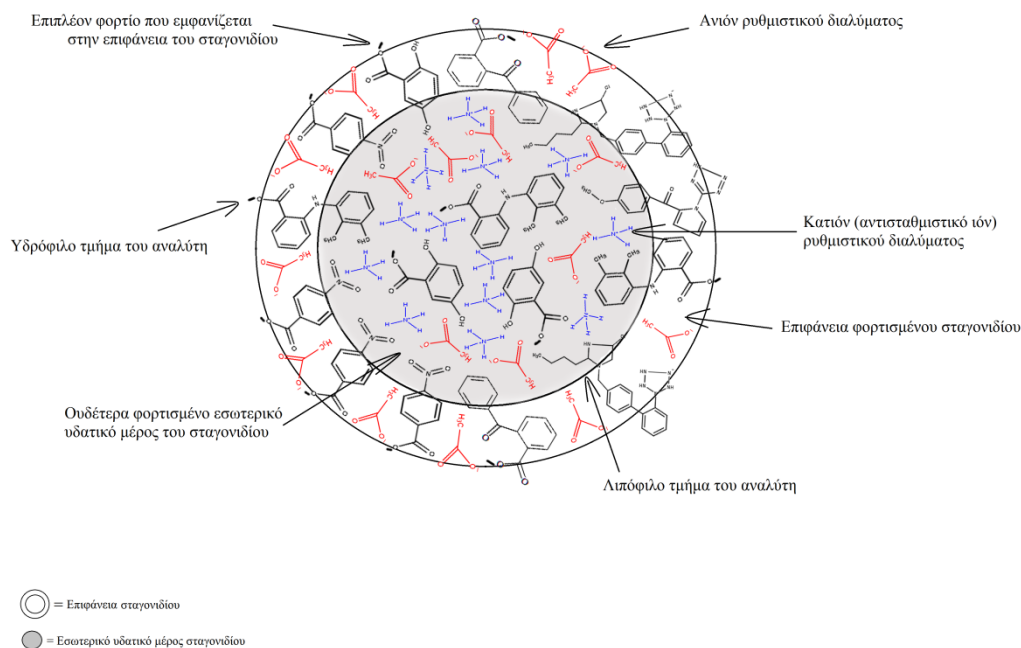
K_A, K_E = σταθερές ισορροπίας του αναλύτη και ιόντος ρυθμιστικού διαλύματος, αντίστοιχα

C_A, C_B = συγκεντρώσεις αναλύτη και ιόντος ρυθμιστικού διαλύματος, αντίστοιχα

Το $[Q]$ αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του πλεονάζοντος φορτίου, δηλ. την διαφορά των κατιόντων και των ανιόντων στο σύνολο των σταγονιδίων. Υπολογίζεται με την βοήθεια του συνολικού ρεύματος της πηγής ESI, \mathbf{I} , της ταχύτητας ροής \mathbf{L} και την σταθερά Faradays \mathbf{F}

$$[Q] = \mathbf{I} / \mathbf{L} \mathbf{F} \quad (13)$$

Το \mathbf{f} εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις του αναλύτη τόσο με τα μόρια του διαλύτη όσο με το αντισταθμιστικό ιόν [44]. Επίσης τα σταγονίδια με το μικρότερο μέγεθος διαθέτουν μεγαλύτερο ποσοστό πλεονάζοντος φορτίου που συνεπάγεται ότι μεγαλύτερος αριθμός ιόντων μεταβαίνει στην αέρια φάση (μεγαλύτερη τιμή \mathbf{f}) [45].



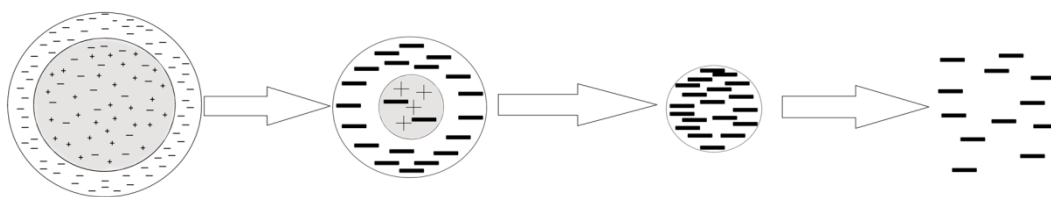
Σχήμα 8: Προτεινόμενη κατανομή των αναλυτών στα σταγονίδια που δημιουργούνται στην πηγή ιονισμού ESI. Οι λιπόφιλες ιοντισμένες χημικές ενώσεις καταλαμβάνουν την επιφάνεια του σταγονιδίου με αποτέλεσμα κατά την σχάση να επωφεληθεί από το επιπλέον φορτίο που προκαλείται στην επιφάνεια με τελικό αποτέλεσμα την ανίχνευση τους (αύξηση έντασης σήματος). Οι υδρόφιλες ενώσεις παραμένουν στο εσωτερικό συνδεδεμένες με το αντισταθμιστικό ιόν με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή μαζών (απομακρύνονται ως ουδέτερες ενώσεις).

3.3 Στάδια των σταγονιδίων στη πηγή ιοντισμού

Κατά την διάρκεια ανάπτυξης ηλεκτρικού πεδίου μεταξύ ακίδας τριχοειδούς γεμάτο με διάλυμα και ενός ενδεικτικού ηλεκτροδίου, τα ιόντα που περιέχονται στο διάλυμα έχουν την τάση να μετακινούνται υπό την επίδραση του πεδίου προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την πλήρη κατανομή των ιόντων στο διάλυμα. Το παραπάνω ονομάζεται ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός φορτίου και αποτελεί τη διαδικασία παραγωγής φορτισμένων σταγονιδίων.

Τα φορτισμένα σταγονίδια αρχίζουν να κινούνται προς το ενδεικτικό ηλεκτρόδιο μειώνοντας το μέγεθος τους με εξάτμιση του διαλύτη. Καθώς το μέγεθος μειώνεται, τα φορτία των ιόντων έρχονται πιο κοντά με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πυκνότητα του φορτίου στα σταγονίδια και με την συρρίκνωση του σταγονιδίου, η άπωση των ομόνυμων φορτίων υπερνικά την επιφανειακή τάση με τελικό στάδιο την σχάση του σταγονιδίου [44].

Τα μεγάλα σταγονίδια διατηρούν τη συνεκτικότητά τους αδυνατώντας να βρεθούν σε κατάσταση διάσπασης σε μικρότερα σταγονίδια ή στην εκπομπή φορτισμένων μορίων στην αέρια φάση [43,46].



Σχήμα 9: Μετάβαση των αναλυτών από τα φορτισμένα σταγονίδια, στην αέρια φάση μέσω της εξάτμισης του διαλύτη στα σταγονίδια

3.4 Μηχανισμός διάσπασης σταγονιδίων

Ο μηχανισμός που λαμβάνει μέρος στη διάσπαση (σχάση) των σταγονιδίων (διάσπαση σε δυο ίδια ή διαφορετικού μεγέθους σταγονίδια) είναι σημαντικός διότι γίνεται δυνατός ο υπολογισμός του λόγου των φορτίων, με N να αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ιόντων στην επιφάνεια του σταγονιδίου και n τον αριθμό του ζεύγους ιόντων στο εσωτερικό του σταγονιδίου. Στην περίπτωση διάσπασης του μεγάλου σταγονιδίου σε δυο ίσα σε μάζα και φορτίο σταγονίδια, ο λόγος N / n θα παρέμενε σταθερός. Αντίθετα στη περίπτωση της διάσπασης σε διαφορετικού μεγέθους, τα παραγόμενα σταγονίδια αποκτούν το 15% του φορτίου και το 2% της μάζας (ή όγκου) της αρχικής σταγόνας. Έτσι ο λόγος N / n αυξάνεται 7 φορές περισσότερο. Αν συνεχιστεί η διάσπαση με τον ίδιο μηχανισμό στα νέα σταγονίδια τότε ο λόγος N / n αυξάνεται ξανά κατά 7 φορές στις νέο – σχηματιζόμενες σταγόνες καταλήγοντας σε N / n 49 φορές μεγαλύτερο από την αρχική σταγόνα. Τελικά το σταγονίδιο κατά την διάσπαση δεν χωρίζεται σε δυο ίσα σε μάζα και φορτίο σταγονίδια αλλά στο κρίσιμο σημείο αρχίζει να δονείται και να επιμηκύνεται καταλήγοντας σε σταγόνα με σχηματιζόμενη ουρά απ' όπου αποσχίζονται μικρότερες σταγόνες.

Η θεωρία διάσπασης στηρίζεται στη μετακίνηση ιόντων που βρίσκονται στην επιφάνεια του αρχικού σταγονιδίου προς το εσωτερικό της νέο – σχηματιζόμενης σταγόνας. Έτσι στα νέα σταγονίδια παρατηρείται μεγαλύτερη μεταφορά ιόντων σε σχέση με τα ζεύγη ιόντων και μορίων. Στην περίπτωση διάσπασης δυο ίσων σταγόνων θα δινόταν η ευκαιρία στη μεταφορά μεγάλης ποσότητας μορίων διαλύματος ή ζεύγους ιόντων στα νέα σταγονίδια [43].

3.5 Μετάβαση των αναλυτών από τα σταγονίδια στην αέρια φάση

3.5.1 Θεωρία εξάτμισης (Ion evaporation model)

Ο προτεινόμενος μηχανισμός μετάβασης των ιόντων από τα σταγονίδια στα ελεύθερα ιόντα ακολουθεί την θεωρία της εξάτμισης [Ion evaporation model (IEM)] [43,47]. Τα σταγονίδια μετά την δημιουργία τους μεταβαίνουν από τον κώνο του τριχοειδούς στους ηλεκτροστατικούς φακούς. Στο στάδιο της μετάβασης το διάλυμα που περιέχει τους αναλύτες και τα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος εξατμίζεται συρικνώνοντας την σταγόνα, μειώνοντας τον χώρο μεταξύ των ιόντων, προκαλώντας την σχάση του σταγονιδίου και στο τελικό στάδιο την εμφάνιση των ελεύθερων ιόντων. Ωστόσο η παραπάνω προσέγγιση έχει υποστεί μεγάλη κριτική αφού στις συνθήκες που επικρατούν στη πηγή ιονισμού όπως είναι η θερμοκρασία, δεν διαφαίνεται να εξατμίζεται σε ικανοποιητικό βαθμό το σταγονίδιο ώστε να φθάσει το ιόν στους ηλεκτροστατικούς φακούς. Ακόμα, εάν ήταν δυνατή η εξάτμιση μέχρι το σημείο παραγωγής ελεύθερων ιόντων θα ήταν πιθανός ο ιοντισμός ενώσεων που θα προκαλούσαν πρόβλημα στο φάσμα μαζών (π.χ. προσμίξεις) [43]. Ερωτηματικά υπάρχουν για την απόσταση που θα πρέπει να βρίσκεται το ιόν από την επιφάνεια του σταγονιδίου ώστε να μεταβεί στην αέρια φάση αφού στη θεωρία της εξάτμισης το ιόν βρίσκεται σε ισορροπία μέσα στο σταγονίδιο [48].

Τελικά το μοντέλο IEM στερείται εκλεκτικότητας και δίνει την ευκαιρία σε μόρια που δεν έχουν την ικανότητα να βρεθούν στην αέρια φάση να εμφανίζονται στο τελικό φάσμα. Για αυτό τον λόγο παρατηρήθηκαν αποκλίσεις του μοντέλου από τα πειραματικά αποτελέσματα [47].

3.5.2 Διάσπαση διαφορετικού μεγέθους σταγονίδια (Charge Residue Model)

Στο μηχανισμό διάσπασης του αρχικού σταγονιδίου σε διαφορετικού μεγέθους σταγονίδια [Charge Residue Model (CRM)] [43,47] έχουν προταθεί δυο διαφορετικές διαδικασίες. Η πρώτη διαδικασία αναφέρεται στην συνεχή διάσπαση των σταγονιδίων μέχρι την ύπαρξη σταγόνας με ακτίνα $R \sim 1 \text{ nm}$ (ουσιαστικά θα περιέχει ένα ιόν). Στην περιγραφή της διαδικασίας δεν διευκρινίζεται ο τρόπος επίτευξης εκλεκτικότητας ή η διαφορετική ένταση του σήματος άμεσα σε δυο αναλύτες με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες.

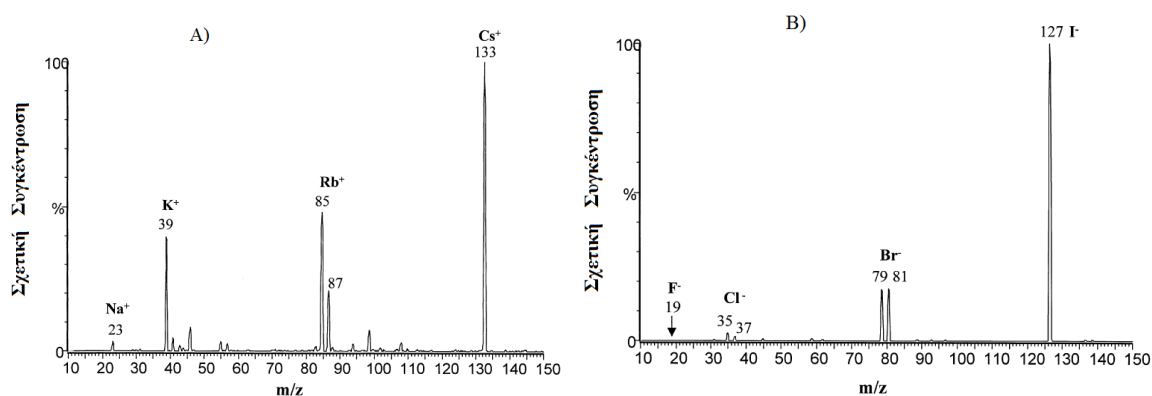
Στη δεύτερη διαδικασία τα ελεύθερα ιόντα προέρχονται από φορτισμένα μικρά σταγονίδια έπειτα από σχάση, δηλαδή η εξάτμιση δεν λαμβάνει μέρος μέχρι το τελικό ιόν αλλά μέχρι το σημείο που το φορτισμένο σταγονίδιο δεν είναι ικανό να διατηρήσει την συνοχή του. Με αυτή τη μέθοδο οι σχάσεις είναι συνεχείς αφού η απομάκρυνση των ιόντων από την επιφάνεια του κάθε σταγονιδίου ακολουθείται από την μείωση της ακτίνας του. Άρα καταλήγει σε μια συνεχόμενη παραγωγή ιόντων [43].

3.6 Ενέργεια Διαλυτοποίησης

Σημαντικός παράγοντας στη μετάβαση των αναλυτών από τα σταγονίδια στην αέρια φάση και κατά συνέπεια την αύξηση της έντασης του σήματος είναι η ενέργεια διαλυτοποίησης.

Τα ιόντα που δεν διαλυτοποιούνται εύκολα, μεταβαίνουν σε μεγαλύτερο ποσοστό στην επιφάνεια των σταγονιδίων. Ουσιαστικά για ιόντα που εμφανίζονται με περισσότερα μόρια διαλύτη γύρω τους καθίσταται δύσκολη η μετάβαση τους στην επιφάνεια του σταγονιδίου, σε αντίθεση με τα ιόντα που ελκύουν λιγότερα μόρια διαλύτη.

Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελούν τα αλογονίδια αλκαλικών μετάλλων που θεωρούνται μη πτητικά και η παρουσία τους στα σταγονίδια οδηγεί σε αύξηση της έντασης του σήματος στο φάσμα. Αποτελέσματα ερευνών έδειξαν, για χαμηλότερη ενέργεια διαλυτοποίησης, αυξανόμενη ένταση σήματος. Επίσης μεγαλύτερα σε όγκο κατιόντα εμφάνιζαν μικρότερη ενέργεια διαλυτοποίησης [47].



Σχήμα 10: Α) Φάσμα ανιχνευτή μαζών ρυθμισμένο για την ανίχνευση κατιόντων NaCl, KCl, RbCl, και CsCl για ίδια τιμή συγκεντρώσεων για το κάθε άλας, Β) Φάσμα ανιχνευτή μαζών ρυθμισμένο για την ανίχνευση ανιόντων NaF, NaCl, NaBr, και NaI για ίδια τιμή συγκεντρώσεων για το κάθε άλας.

3.7 Παράγοντες που επηρεάζουν την μετάβαση στην αέρια φάση χημικών ενώσεων

Εξετάζεται η επιρροή δυο σημαντικών παραγόντων στην ανίχνευση ενώσεων από τον ανιχνευτή μαζών. Οι παράγοντες είναι η λιποφιλία και η σταθερά pKa των χημικών ενώσεων.

Για τον σκοπό αυτό έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα ομόλογων ενώσεων (υποκατεστημένα βενζοϊκά οξέα) με μικρές αποκλίσεις στις τιμές log P (ή log D) και pKa. Σε συνθήκες pH που τα βενζοϊκά οξέα καθίστανται μη ιοντισμένα, παρατηρήθηκε η εξάρτηση της έντασης σήματος των αναλυτών από την λιποφιλία ανεξάρτητα από των τιμών pKa των οξέων.

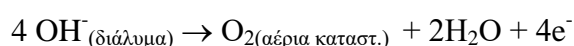
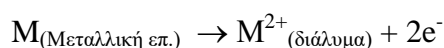
Ωστόσο δεν έχει διευκρινιστεί η επιρροή του pH στην διαδικασία μετάβασης των ιόντων από το διάλυμα στην αέρια φάση διότι κατά την διαδικασία διάσπασης των σταγονιδίων σε μικρότερα επακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη, συμπύκνωση των ιόντων και μεταβολές συγκεντρώσεων οξέων / βάσεων μέσα στο σταγονίδιο. Ενδεχομένως η pKa των αναλυτών να αλλάζει [49 – 51].

Στο πείραμα των βενζοϊκών οξέων μελετήθηκε η απόκριση του ανιχνευτή για ποικίλες τιμές pKa και παρατηρήθηκε μείωση της έντασης σήματος για οξέα που συνδύαζαν μικρή τιμή pKa και απουσία λιπόφιλων (ή υδρόφοβων) ομάδων [41].

3.8 Πηγή φορτίου των φορτισμένων σταγονιδίων

Εάν ο διαχωρισμός των φορτίων γίνεται ηλεκτροφορητικά (δηλ. στο τριχοειδές) σε σταθερή κατάσταση, τότε θα παράγονται συνεχώς φορτισμένα σταγονίδια (είτε θετικά είτε αρνητικά). Λαμβάνοντας υπόψιν τον μηχανισμό λειτουργίας του ανιχνευτή που περιέχει πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, θα πρέπει να υπάρχει συνεχής ροή ηλεκτρικού ρεύματος. Μέσω των μεταλλικών καλωδίων δύνανται να διαπερνούν μόνο τα ηλεκτρόνια, τροφοδοτώντας το δυναμικό των ηλεκτροδίων. Για να πραγματοποιηθεί το παραπάνω στη πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό θα πρέπει να λαμβάνει μέρος ηλεκτροχημική αντίδραση (μετατροπή) με σκοπό την δημιουργία ιόντων και ηλεκτρονίων. Επομένως η πηγή ηλεκτροψεκασμού ως συσκευή μπορεί να θεωρηθεί ένα είδος ηλεκτροχημικού κελιού που ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται στα φορτισμένα σταγονίδια. Σύμφωνα με την επικρατούσα θεωρία η μετατροπή λαμβάνει μέρος μεταξύ της μεταλλικής επιφάνειας του τριχοειδούς και του διαλύματος.

Στη περίπτωση ρύθμισης της πηγής ιοντισμού για την δημιουργία θετικά φορτισμένων σταγονιδίων, η αντίδραση οξειδοαναγωγής είτε προκαλεί τον ιοντισμό μεταλλικών ατόμων και μεταφορά κατιόντων μετάλλου στο διάλυμα με ταυτόχρονη παραγωγή ηλεκτρονίων, είτε τη μετατροπή ανιόντων του διαλύματος σε ουδέτερα (απώλεια ηλεκτρονίου) και μετάβασης των ηλεκτρονίων στη μεταλλική επιφάνεια του τριχοειδούς.



Ανιχνευτές μαζών με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμό με τριχοειδή ακροφύσια αποτελούμενα από Zn εμφάνιζαν σήματα στο τελικό φάσμα που αντιστοιχούσαν σε Zn^{2+} . Μάλιστα η ένταση του σήματος Zn^{2+} ήταν ανάλογη του ρεύματος που παράγονταν στην πηγή

ιονισμού. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα στη χρήση ανοξειδωτού μετάλλου με μεταφορά Fe^{2+} στο διάλυμα.

Η συγκέντρωση των ιόντων μετάλλου που μεταφέρονται είναι μικρή ($\cong 2 \times 10^{-6}$ M) αλλά ανιχνεύσιμη από το φασματόμετρο μαζών. Ωστόσο, η παρουσία των ιόντων μετάλλων δεν επιρραάζει τους αναλύτες και δεν παρεμποδίζει την διαδικασία ανίχνευσης των δειγμάτων [43,52].

3.9 Συσχέτιση των χρωματογραφικών δεδομένων με την ένταση σήματος των αναλυτών

Πραγματοποιείται προσπάθεια σύνδεσης δυο μηχανισμών κατανομής. Ο μηχανισμός κατανομής στατικής / κινητής φάσης στην υγροχρωματογραφία με την κατανομή στα σταγονίδια της πηγής ESI. Συνδέθηκε ο αυξημένος χρόνος συγκράτησης των λιπόφιλων ενώσεων με την αυξημένη ένταση σήματος των φασμάτων στον ανιχνευτή μαζών. Ωστόσο, η συσχέτιση δεν ήταν πλήρως γραμμική που υποδηλώνει ότι η κατανομή μέσα στα σταγονίδια δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας στη τελική ανίχνευση από το φασματόμετρο μαζών [53].

ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

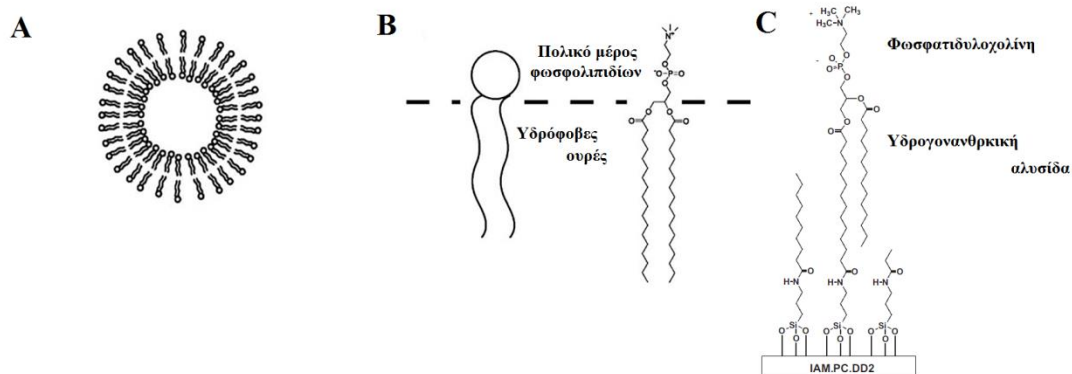
4.1 Στήλες Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών

Ο συντελεστής κατανομής στο σύστημα οκτανόλη / νερό έχει υποστεί αρκετή κριτική ως ένα πολύ επιφανειακό μέτρο προσομοίωσης των κυτταρικών μεμβρανών. Σε αντίθεση με τις ανισότροπες κυτταρικές μεμβράνες η οκτανόλη αποτελεί ισότροπο σύστημα ενώ σημαντική διαφοροποίηση αποτελεί η απουσία ιονισμένων κέντρων [55,54]. Τα λιποσώματα έχουν θεωρηθεί ότι προσομοιώνουν άμεσα τις κυτταρικές μεμβράνες. Ωστόσο τόσο η παρασκευή λιποσωμάτων όσο και τα πειράματα κατανομής σε συστήματα λιποσωμάτων – νερού παρουσιάζουν πολλές πρακτικές δυσκολίες. Ως εκ τούτου τα λιποσώματα δεν μπόρεσαν να καθιερωθούν ως εναλλακτικά συστήματα ως προς την οκτανόλη νερό [56].

Η ανάπτυξη της χρωματογραφίας ακίνητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM) από τους Pidgeon και συν. [57 – 59] αποτέλεσε μια σημαντική τομή δεδομένου ότι συνδυάζει την κατανομή σε μεμβράνες με την φιλικότητα και την ταχύτητα της χρωματογραφικής τεχνικής.

Οι Pidgeon και συν. κατασκεύασαν στατική φάση προπυλαμινοπυριτίας στην οποία ακίνητοποιήθηκαν φωσφολιπίδια. Αρχικά έγινε προσπάθεια σύνδεσης λεκιθίνης σε χρωματογραφικό υποστηρικτικό υλικό. Αργότερα προσέδεσαν με χημικό δεσμό φωσφολιπίδια σε αμινοπρόπυλο σίλικα [60 – 63]. Σήμερα είναι εμπορικά δυο διαθέσιμες στήλες που περιέχουν φωσφατιδυλοχολίνη (IAM – MG και IAMDD2). Η διαφοροποίηση των δυο στηλών έγκειται στον τρόπο δέσμευσης των αμινομάδων της προπυλαμίνης. Η στατική φάση IAM αποτελείται από δυο τμήματα. Το πολικό τμήμα που περιέχει μόριο φωσφατιδυλοχολίνης ενώ το υδρόφοβο τμήμα αποτελείται από ακυλοαλυσίδες. Τα δυο τμήματα συνδέονται με εστέρα ή αιθέρα. Ο εστέρας συνδέει την ομάδα γλυκερόλης της φωσφατιδυλοχολίνης με την ακυλοαλυσίδα [64].

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι στήλες IAM αποτελούν μονοστιβάδες λιπιδίων σε αντίθεση με τα λιποσώματα που αποτελούνται από διπλοστιβάδες.



Εκόνα 12: Α) Κυτταρική μεμβράνη (φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα), Β) Δομή φωσφολιπιδίου, Γ) Στατική φάση IAM στήλης

4.2 Διαφορές στατικής φάσης IAM και συστήματος οκτανόλη / νερό

Το σύστημα οκτανόλη / νερό χρωματογραφικά προσομοιώνεται με σιλανοποιημένες στήλες C18. Ωστόσο οι στατικές φάσεις IAM είναι σημαντικά λιγότερο υδρόφοβες και σύμφωνα με σχετική μελέτη θα μπορούσαν να συγκριθούν με στατικές φάσεις που περιέχουν τρία άτομα άνθρακα (C3) [65]. Η κυριότερη διαφοροποίηση είναι η παρουσία ιοντισμένων φωσφορικών ομάδων δίπλα στον υδρόφοβο κορμό της στατικής φάσης και το μόνιμα φορτισμένο άζωτο της χολίνης στο εξωτερικό άκρο. Ως εκ τούτου στις στατικές φάσεις IAM αναπτύσσονται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται αυξημένη συγκράτηση των ιοντισμένων ενώσεων, ιδιαίτερα των πρωτονιωμένων βάσεων [14, 66 – 69].

Ειδικότερα στη περίπτωση βασικών ενώσεων, ο αναλύτης λόγω του θετικού φορτίου που διαθέτει αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες της στατικής φάσης IAM, με αποτέλεσμα να εκλύεται αργότερα από ότι θα αναμενόταν με βάση τη λιποφιλία. Σε αντίθεση με το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες των φωσφολιπιδίων, το θετικό φορτίο της χολίνης δεν επιδεικνύει ανάλογη συμμετοχή στο διαχωρισμό αρνητικά φορτισμένων αναλυτών. Η εξήγηση δίνεται από την θέση στην οποία βρίσκεται η χολίνη στα φωσφολιπίδια. Η χολίνη βρίσκεται τοποθετημένη στην εξωτερική περιοχή των ακινητοποιημένων τεχνητών φωσφολιπιδίων με αποτέλεσμα να βρίσκεται σε επαφή με την υδατική κινητή φάση, και ως ένα βαθμό να θωρακίζεται. Η επιδιалύτωση του φορτισμένου αζώτου το καθιστά λιγότερο διαθέσιμο και ως εκ τούτου αναπτύσσονται ασθενέστερες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με την ιοντική μορφή των ενώσεων [66].

4.3 Κινητές φάσεις στην χρωματογραφική στήλη Ακίνητοποιημένης Τεχνητής Μembrάνης

Ως ρυθμιστικό διάλυμα προτιμάται το ισότονο διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer saline, PBS) ώστε να προσομοιώνονται καλύτερα οι φυσιολογικές συνθήκες του οργανισμού. Ορισμένοι ερευνητές χρησιμοποιούν ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών χωρίς την προσθήκη ηλεκτρολυτών για μικρότερη επιβάρυνση του χρωματογραφικού συστήματος [70]. Στην στήλη IAM χρησιμοποιείται κατά προτίμηση ακετονιτρίλιο ως οργανικός τροποποιητής δεδομένου ότι η μεθανόλη είναι δυνατόν να οδηγήσει σε μεθανόλυση των λιπιδίων μειώνοντας τον χρόνο ζωής της στήλης [71].

4.4 Χρωματογραφικοί Δείκτες IAM

Όπως και στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως, στην IAM χρησιμοποιείται επίσης ο χρόνος συγκράτησης υπο τη λογαριθμική του μορφή $\log k^{IAM}$. Λόγω χαμηλής υδροφοβίας της στήλης είναι εφικτός ο προσδιορισμός της συγκράτησης με κινητή φάση 100% ρυθμιστικό διάλυμα. Σε περίπτωση ισχυρά συγκρατούμενων ενώσεων προστίθεται ακετονιτρίλιο ως οργανικός τροποποιητής μέχρι 30% και εξάγονται οι ανηγμένες τιμές $\log k_w^{IAM}$ εξάγονται όπως και στην αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία με βάση την εξίσωση 14

Στη περίπτωση της IAM ισχύει η εξίσωση:

$$\log k^{IAM} = -S\phi + \log k_w^{IAM} \quad (14)$$

με $\log k^{IAM}$ = παράγοντας συγκράτησης για την χρωματογραφία IAM

S = κλίση της ευθείας

ϕ = ποσοστό ακετονιτρίλιου

$\log k_w^{IAM}$ = παράγοντας συγκράτησης σε κινητή φάση αποτελούμενη από 100% νερό στην χρωματογραφία IAM

Οι δείκτες $\log k_w^{IAM}$ συσχετίζονται πολύ καλά με τις τιμές $\log P$ στην περίπτωση ουδέτερων ενώσεων [76,77]. Στην περίπτωση ιονιζόμενων ενώσεων και ιδιαίτερα στην περίπτωση πρωτονιωμένων βάσεων έχουν παρατηρηθεί καλύτερες συσχετίσεις με τις τιμές $\log P$ παρά με τις τιμές $\log D$ λόγω των προαναφερθεισών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες εν μέρει αντισταθμίζουν την επίδραση του ιοντισμού [78]. Ως εκ τούτου, η συσχέτιση $\log k_w^{IAM} / \log D$ βελτιώνεται σημαντικά αν εισαχθούν στην εξίσωση τα κλάσματα κατιοντικής και ανιοντικής μορφής (F^+ , F^-) ως πρόσθετες παράμετροι, όπως έχει προκύψει από την ανάλυση 56 ενώσεων διαφορετικής δομής [69].

$$\text{Log } k_w^{\text{IAM}} = 0.31 + 0.62 \log D_{7.4} + 1.14 F^+ + 0.48 F^- \quad (15)$$

$$N = 56 \quad R = 0.938 \quad s = 0.413$$

Στην εξίσωση 15 είναι εμφανής η ισχυρότερη συμβολή του κατιοντικού κλάσματος F^+ συγκριτικά με το ανιοντικό σε συμφωνία με τις επικρατούσες υποθέσεις για το μηχανισμό δράσης που προαναφέρθηκαν. Η εξίσωση 15 έχει επικυρωθεί επιτυχώς με νέες ενώσεις [79].

4.5 Χρωματογραφικός Δείκτης Υδροφοβίας CHI – IAM

Ο υπολογισμός των τιμών CHI στην στήλη IAM έχει προταθεί κατά αντίστοιχο τρόπο όπως στην αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία. Πριν την εφαρμογή της μεθόδου βαθμιδωτής έκλουσης χρησιμοποιείται η ισοκρατική ανάλυση πρότυπων χημικών ενώσεων για την εξαγωγή τιμών ϕ_0 με βάση τη σχέση:

$$\phi_0 = \log k_w^{\text{IAM}} / S \quad (16)$$

Ακολούθως συσχετίζονται οι τιμές ϕ_0 με τον χρόνο συγκράτησης σε βαθμιδωτή έκλουση, κατ'αναλογία με όσα αναφέρθηκαν για τον χρωματογραφικό δείκτη υδροφοβίας CHI σε αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία.

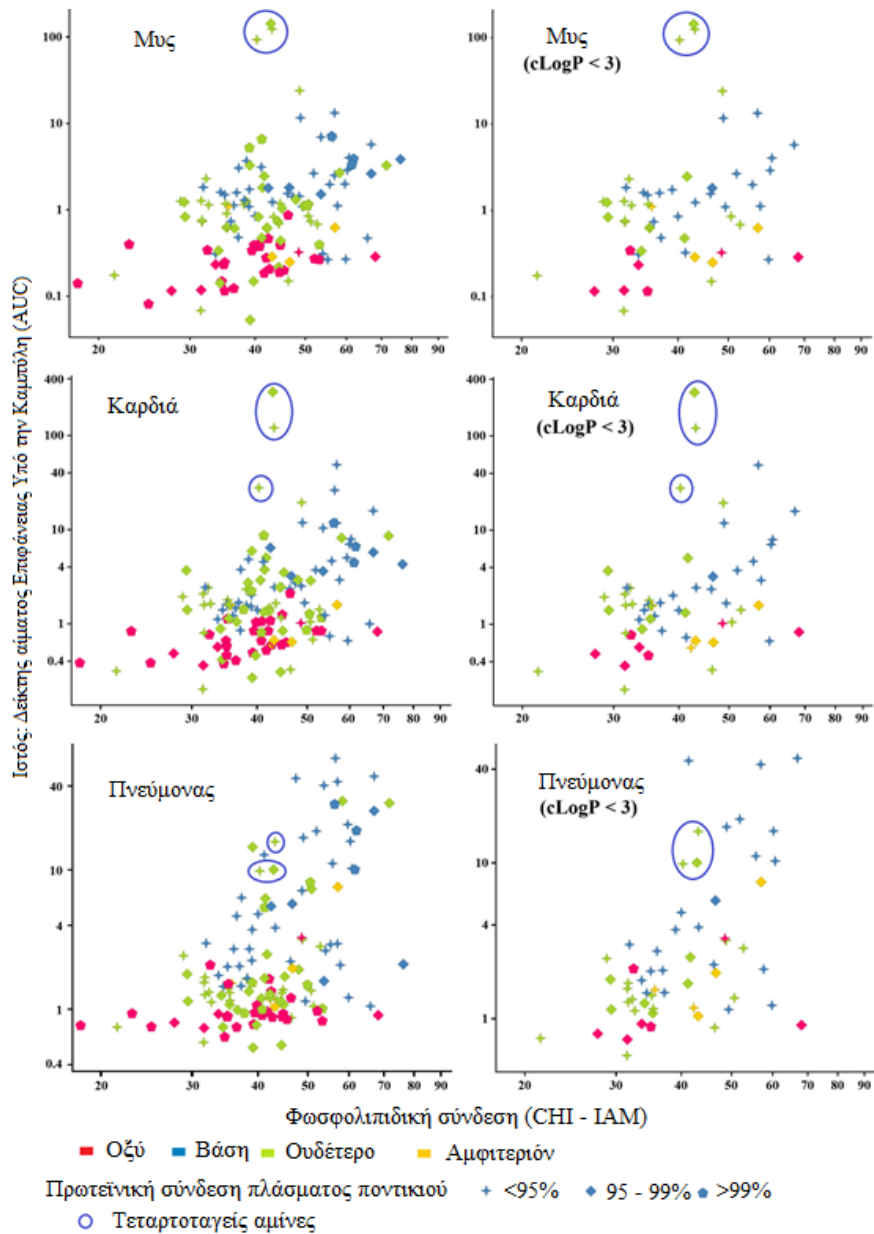
Τα πλεονεκτήματα των τιμών CHI – IAM είναι αντίστοιχα με αυτά που ήδη αναφέρθηκαν για τους δείκτες CHI σε αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία και ιδιαίτερα ο μειωμένος χρόνος για τον προσδιορισμό τους [64].

4.6 Συσχέτιση κατανομής φαρμάκων σε στήλη IAM και βιολογικών συστημάτων

Η χρωματογραφία με στήλη IAM συσχετίστηκε με την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και ως συνέπεια την απορρόφηση του φαρμάκου από το κύτταρο όταν έγινε η σύγκριση των τιμών του παράγοντα συγκράτησης της στήλης IAM με τον παράγοντα κατανομής 23 δομικά διαφορετικών χημικών μορίων στα λιποσώματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πάρα πολύ καλή συσχέτιση. Συγκεκριμένα, η κλίση έτεινε στη μονάδα κάτι που ενισχύει το επιχείρημα ότι η διαδικασία κατανομής των αναλυτών στην στατική φάση της IAM είναι ανάλογη με τη διαδικασία που λαμβάνει μέρος στα λιποσώματα [68,80].

Η συγκράτηση IAM έχει εμφανίσει καλές συσχετίσεις με τη διαπερατότητα σε κυτταρικές σειρές Caco-2 [81,82] με την γαστρεντερική απορρόφηση [83,84] καθώς και με τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [85]. Ωστόσο στις συσχετίσεις αυτές, οι τιμές $\log k^{IAM}$ συνδυάζονται με πρόσθετες παραμέτρους, κυρίως το μοριακό βάρος και παράγοντες πολικότητας.

Ισχυρή δέσμευση των αναλυτών με τις ομάδες των φωσφολιπιδίων (αυξημένος χρόνος συγκράτησης στην στήλη IAM) θεωρείται ότι προσδίδει στα φάρμακα αυξημένη κατανομή στους ιστούς που σημαίνει μεγάλο ποσοστό διαπερατότητας στο κύτταρο και μικρή ποσότητα ελεύθερου φαρμάκου στο πλάσμα [72]. Υπο αυτή την έννοια οι Valko και συν. προτείνουν τους χρωματογραφικούς δείκτες IAM και συγκεκριμένα τους δείκτες CHI (IAM) για την εκτίμηση του όγκου κατανομής σε συνδυασμό με τους αντίστοιχους δείκτες CHI (HSA) που προσδιορίζονται κατά ανάλογο τρόπο σε βιομιμητικές στήλες ανθρώπινης αλβουμίνης (Human Serum Albumin, HSA). Οι ίδιοι ερευνητές έχουν διερευνήσει την κατανομή των φαρμάκων σε διάφορους ιστούς στον οργανισμό με βάση τους ανωτέρω δείκτες CHI (IAM) και CHI (HSA) (Σχήμα 13) [73]. Επιπλέον, η συγκράτηση σε χρωματογραφία IAM στην περίπτωση βασικών ενώσεων έχει συσχετιστεί με τη φωσφολιπίδωση, μια τοξική ανεπιθύμητη ενέργεια ορισμένων φαρμάκων [66,86].



Σχήμα 13: Χρήση της φωσφολιπιδικής και πρωτεϊνικής σύνδεσης για την σκιαγράφιση της κατανομής φαρμάκων που δεν επηρεάζονται από την μη ειδική πρόσδεση. Χημικές ενώσεις με τεταρτοταγείς ομάδες έδειξαν καλύτερη κατανομή σε ιστούς μυων (καρδιά και σκελετικός μυς) σε αντίθεση με άλλους ιστούς (όπως πνεύμονες). Χημικές ενώσεις με λιποφιλία μικρότερη από 3 εμφάνισαν ελατωμένο το φαινόμενο της μη ειδικής σύνδεσης στις μεμβράνες των κυττάρων.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία αποτελείται από τρία μέρη.

Στο πρώτο μέρος γίνεται η σύγκριση των ανηγμένων χρωματογραφικών δεικτών $\log k_w$ που προκύπτουν με ισοκρατική έκλυση με τους χρωματογραφικούς δείκτες CHI που προσδιορίζονται με βαθμιδωτή έκλυση για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας. Ειδικότερα μελετήθηκαν όξινες ενώσεις για τις οποίες δεν έχουν προταθεί αποδεκτές συνθήκες προτυποποίησης των χρωματογραφικών συνθηκών. Ως συνέχεια προηγούμενων μελετών στο εργαστήριο μας, έγινε προσπάθεια επέκτασης της προσέγγισης CHI σε τιμές pH 5 (αρχή του εντέρου) και 7.4 (φυσιολογικό pH) που οι ενώσεις είναι μερικώς ή και πλήρως ιοντισμένες και διερευνήθηκε η γραμμικότητα των ισοκρατικών τιμών $\log k_w$ με τον χρόνο συγκράτησης βαθμιδωτής έκλυσης υπό διαφορετικές χρωματογραφικές συνθήκες, για την εξαγωγή αξιόπιστων τιμών CHI. Τα αποτελέσματα των συσχετίσεων των τιμών $\log D$ με τις τιμές CHI συγκρίθηκαν με αυτά που λαμβάνονται με τις ανηγμένες τιμές $\log k_w$ υπο συνθήκες που έχουν προταθεί παλαιότερα από το εργαστήριό μας. Επιπλέον για να αντιμετωπιστεί η αυξημένη συγκράτηση των ανιόντων στη χρωματογραφική στήλη σιλανοποιημένης πυριτίας, η οποία πιθανόν να οφείλεται σε προσμίξεις μετάλλων, δοκιμάστηκε η χρήση EDTA ως προσθετικού παράγοντα στη κινητή φάση και διερευνήθηκε η επίδρασή του στη συγκράτηση.

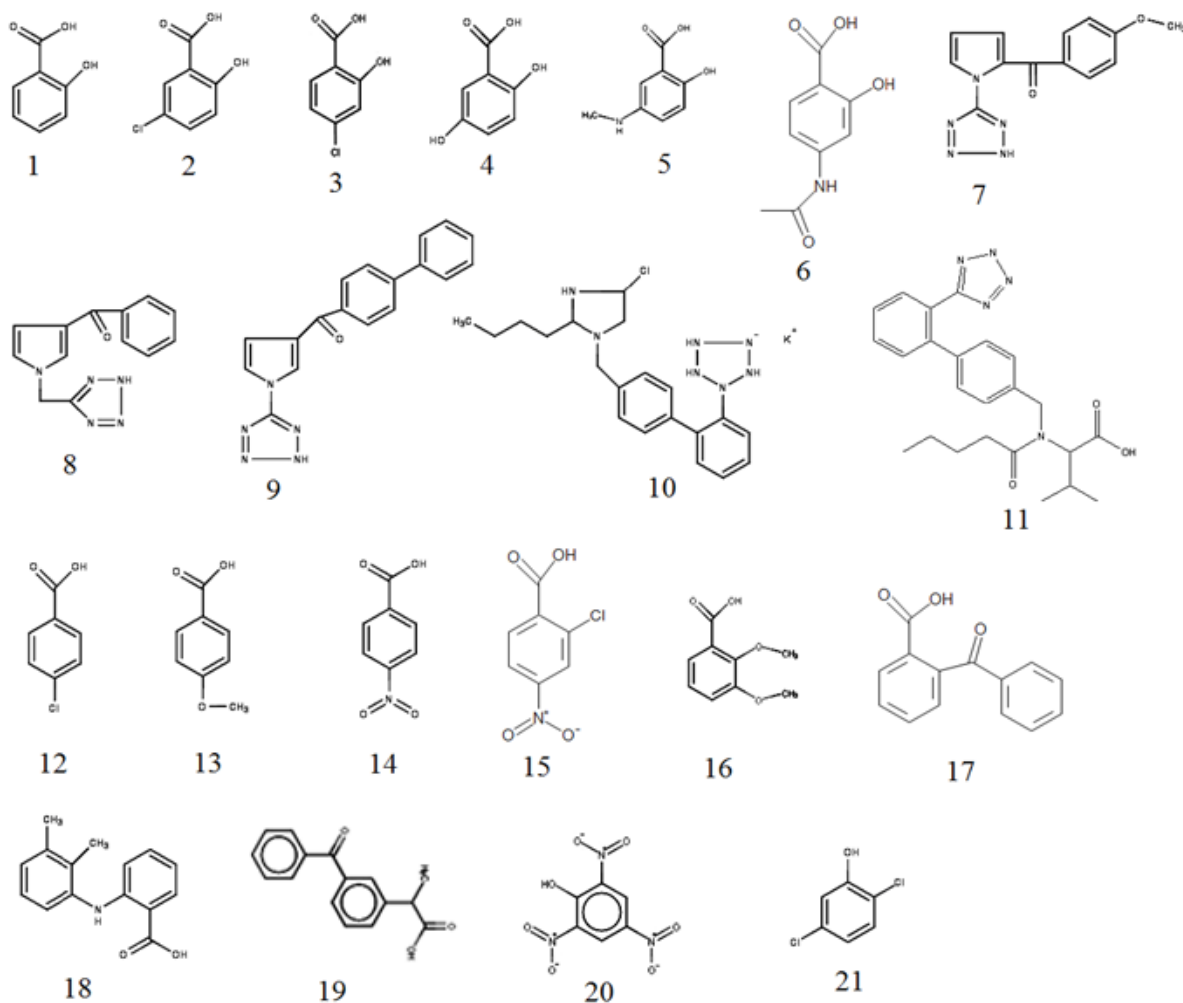
Στο δεύτερο μέρος γίνεται προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί άμεσα η φασματομετρία μαζών στην κατασκευή προτύπων εξισώσεων για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας. Η προσπάθεια αυτή αποτελεί μια εντελώς νέα προσέγγιση. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές σειρές όξινων και βασικών ενώσεων και προσδιορίστηκε η απόκριση τους στον ανιχνευτή μαζών με πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό.

Το τρίτο μέρος περιλαμβάνει τον προσδιορισμό χρωματογραφικών δεικτών σε βιομηχανική χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM) σε σειρά λιπόφιλων παραγώγων ιντορουμπινών, οι οποίες έχουν σχεδιαστεί και συντεθεί ως αναστολείς στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων Ε.Κ.Π.Α. Σκοπός ήταν η διερεύνηση της συγκράτησης των ενώσεων στις μεμβράνες συγκριτικά με τη λιποφιλία τους ώστε να υποστηριχθούν σχετικές διαφοροποιήσεις στη δράση.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1ο ΜΕΡΟΣ: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΙΣΟΚΡΑΤΙΚΗΣ – ΒΑΘΜΙΑΩΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΥ ΦΑΣΕΩΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ

Χρησιμοποιήθηκε σειρά 21 όξινων ενώσεων, η δομή των οποίων παρουσιάζεται στο Σχήμα 1. Πρόκειται για υποκατεστημένα καρβοξυλικά οξέα (14), φαινόλες (2) και παράγωγα τεραζολίου (5). Τα πειράματα διεξήχθησαν σε συνθήκες pH 5.0 και 7.4.



Σχήμα 1: Ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία

Πίνακας 1: Ονομασία των δειγμάτων και σύνδεση με τους αντίστοιχους αριθμούς από το Σχήμα 1.

Αριθμός	Δείγματα
1	Σαλικυλικό οξύ
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ
7	Τετραζόλιο II
8	Τετραζόλιο IV
9	Τετραζόλιο III
10	Λοσαρτάνη
11	Βαλσαρτάνη
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ
18	Μεφαιναμικό οξύ
19	Κετοπροφαίνη
20	Πικρικό οξύ
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη

Οι τιμές pKa οι οποίες καθορίζουν τον βαθμό ιονισμού των ενώσεων υπολογίστηκαν με το λογισμικό ADME Boxes της εταιρείας Pharma Algorithms και αναφέρονται στον Πίνακα 4. Με εξαίρεση την 2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη, πρόκειται για ισχυρά οξέα.

Δεδομένου ότι στη βιβλιογραφία για τις υπό μελέτη ενώσεις δεν υπάρχουν τιμές log D σε pH 5.0 αλλά και αυτές σε pH 7.4 διαφοροποιούνται μεταξύ των εργαστηρίων, έγινε στην παρούσα εργασία προσδιορισμός των τιμών log D όλων των ενώσεων με την μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης.

1.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ – ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ – ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

1.1.1 Μέθοδος ανακινούμενης φιάλης

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή διαλυμάτων και όργανα / συσκευές που συνεισέφεραν στον προσδιορισμό λιποφιλίας με την μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης για pH 5 και 7.4 παρουσιάζονται στον Πίνακα 2

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια και όργανα / συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν.

Αντιδραστήρια / Συσκευές / Όργανα	Εταιρεία / Πληροφορίες
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH ₂ PO ₄)	Merck
Όξινο φωσφορικό νάτριο (NaHPO ₄)	Merck
Οκτανόλη	Merck
Μεθανόλη	Merck
Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH)	Merck
Όργανο ζύγισης	Gibertini
Όργανο μέτρησης pH	Metrohm 654 pH – meter
Όργανο ανακίνησης φιάλης	Selecta P unitronic - OR
Φυγόκεντρος	Universal 32 R Hettich
Φασματοφωτόμετρο	UV / Vis Lambda 7 Perkin – Elmer
Συσκευή υγροχρωματογραφίας (HPLC)	GBC
Αντλία συστήματος	GBC 1126
Σύστημα εισαγωγής δείγματος	Rheodyne 7725i
Βρόγχος	20 μ L
Ανιχνευτής UV–vis	GBC LC1210
Λογισμικό HPLC	Empower Build 1154
Χρωματογραφική στήλη	ABZ+ 15cm x 4.6mm ID, σωματίδια 5 μ m

1. Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων

Τα ρυθμιστικά διαλύματα pH 5 και 7.4 παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την Φαρμακοποιία [75].

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (0.2 M) για pH 5.0

Για ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH = 5.5

- Διάλυμα I: Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄)

m = 6.805 g διαλύονται σε H₂O μέχρι τα 500 mL

- Διάλυμα II: Όξινο φωσφορικό νάτριο (NaHPO₄)

m = 17.905 g διαλύονται σε H₂O μέχρι τα 500 mL

Αναλογίες διαλυμάτων I και II για $V = 250 \text{ mL}$

➤ Διάλυμα I: $96.4 \text{ mL} \times 2.5 = 241 \text{ mL}$

➤ Διάλυμα II: $3.6 \times 2.5 = 9 \text{ mL}$

Τα 250 mL φωσφορικών ιόντων μεταφέρονται από τον ογκομετρικό κύλινδρο σε ποτήρι ζέσεως 500 mL .

Το pH του παραπάνω διαλύματος φωσφορικών είναι 5.5. Για ληφθεί το επιθυμητό pH προστέθηκαν λίγες σταγόνες H_3PO_4 (φωσφορικό οξύ).

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (0.2 M) για pH 7.4

➤ Διάλυμα I: Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4)

$m = 6.805 \text{ g}$ διαλύονται σε H_2O μέχρι τα 500 mL

Διάλυμα II: Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH)

➤ $V = 393.6 \text{ mL}$ Υδροξειδίου του Νατρίου συγκέντρωσης 0.2 M

Η ανάμειξη των δυο διαλυμάτων οδηγεί στην παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος pH 7.4. Τυχόν αποκλίσεις ρυθμίζονται με μικρές προσθήκες NaOH ή H_3PO_4 .

2. Κορεσμός με οκτανόλη

Το ρυθμιστικό διάλυμα ανακινείται ελαφρά σε διαχωριστική χοάνη με οκτανόλη και αφήνεται σε ηρεμία «μέχρι το επόμενο πρωί». Συλλέγονται οι δυο φάσεις.

3. Προετοιμασία δείγματος

Ζυγίζεται συγκεκριμένη ποσότητα αναλύτη (ώστε το τελικό διαλυμά να περιέχει $C < 0.2 \text{ mM}$)

- Η ποσότητα που ζυγίστηκε διαλύεται στο ρυθμιστικό διάλυμα (κορεσμένο σε οκτανόλη)
- Το παραπάνω διάλυμα αποτελεί το διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution)
- Από το διάλυμα παρακαταθήκης λαμβάνεται κάθε φορά ποσότητα δείγματος που διαμοιράζεται στις ανακινούμενες φιάλες.

4. Τοποθέτηση διαλυμάτων στις ανακινούμενες φιάλες

Σε κάθε ανακινούμενη φιάλη προστίθεται διαφορετική αναλογία διαλύματος παρακαταθήκης* / οκτανόλη

* πολλές φορές ο όγκος του διαλύματος παρακαταθήκης που προστίθεται στην ανακινούμενη φιάλη αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα κορεσμένο σε οκτανόλη

- Οι ανακινούμενες φιάλες τοποθετούνται στο μηχάνημα ανακίνησης
- Ρυθμίσεις στη συσκευή ανακίνησης:
 - 25 °C
 - εισαγωγή νερού (μέχρι 3 cm κάτω από το ανώτατο επίπεδο)
- Οι φιάλες ανακινούνται για 3 – 4 h

5. Φυγοκέντρηση

Οι σωλήνες φυγοκέντρησης τοποθετούνται στη συσκευή φυγοκέντρησης

- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για να καταστεί βέβαιος ο πλήρης διαχωρισμός των δυο φάσεων. Σε αντίθετη περίπτωση, ποσότητα οργανικής φάσης θα δημιουργήσει πρόβλημα στα αποτελέσματα των μετρήσεων.
- Οι ρυθμίσεις της συσκευής:
 - Διάρκεια φυγοκέντρησης → 15 min
 - Στροφές → 2.500
 - Θερμοκρασία → 25 °C

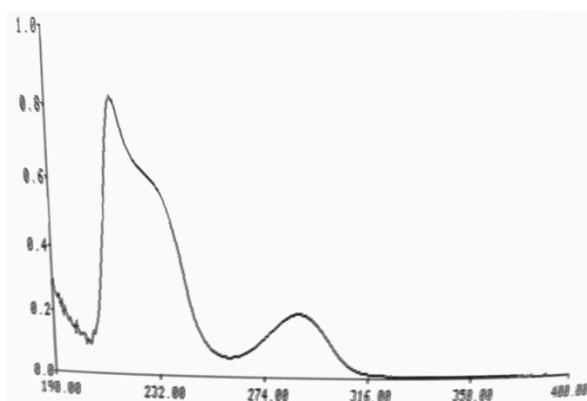
➤ Μετρηση με φασματομετρία UV-Vis

Τα διαλύματα (που περιέχουν τον αναλύτη μετά την φυγοκέντρηση) φωτομετρούνται σε μήκος κύματος για το οποίο παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση.

Στην παρούσα μελέτη τα δείγματα έχουν χωρισθεί σε 5 ομάδες απορρόφησης διαφορετικών νανομέτρων. Παρουσία μορίων EDTA πραγματοποιήθηκε αλλαγή του μήκους κύματος.

Πίνακας 3: Αναλύτες ομαδοποιημένοι ως προς το μήκος κύματος λ_{\max}

λ_{\max}	Αναλύτες		
217 nm	Τετραζόλιο III Βαλσαρτάνη	Τετραζόλιο IV 2 - Χλωρο - 4 - Νιτρο - Βενζοϊκό οξύ	Τετραζόλιο II
226 nm	2,5 - Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	4 - Χλωρο - Σαλικυλικό οξύ	2,5 - Διχλωρο - Φαινόλη
	5 - Χλωρο - Σαλικυλικό οξύ	4 - Νιτρο - Βενζοϊκό οξύ	Μεφαιναμικό οξύ
	Λοσαρτάνη	2 - Νίτρο - Βενζοϊκό οξύ	Πικρικό οξύ
	2,3 - Μεθοξυ - Βενζοϊκό οξύ	5 - Μεθυλάμινο - Βενζοϊκό οξύ	
231 nm	4 - Μεθοξυ - Βενζοϊκό οξύ	Σαλικυλικό οξύ	4 - Χλωρο - Βενζοϊκό οξύ
	3 - Ακεταμίδο - Σαλικυλικό οξύ	2 - Βενζοϋλο - Βενζοϊκό οξύ	



Σχήμα 2: Φωτομέτρηση του δείγματος 3 – Υδροξυ – Βενζοϊκό οξύ για pH = 5.

• Προσδιορισμός Log D

Ο υπολογισμός Log D γίνεται με βάση τη σχέση με βάση

$$\text{Log D} = \text{Log} \left[\frac{A_{\text{αρχ.}} - A_{\text{τελ.}}}{A_{\text{τελ.}}} \times \frac{V_{\text{οδ.}}}{V_{\text{οργ.}}} \right] \quad (1)$$

$A_{\text{αρχ.}}$ = απορρόφηση δείγματος στο οποίο δεν έχει προστεθεί ποσότητα οκτανόλης στο στάδιο της ανακινούμενης φιάλης (διάλυμα παρακαταθήκης)

$A_{\text{τελ.}}$ = απορρόφηση δείγματος μετά την προσθήκη οκτανόλης στο στάδιο της ανακινούμενης φιάλης

$V_{\text{οδ.}}$ = όγκος υδατικής φάσης στην ανακινούμενη φιάλη

$V_{\text{οργ.}}$ = όγκος οκτανόλης (οργανική φάση) στην ανακινούμενη φιάλη

➤ Ανάλυση δειγμάτων με HPLC

Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε:

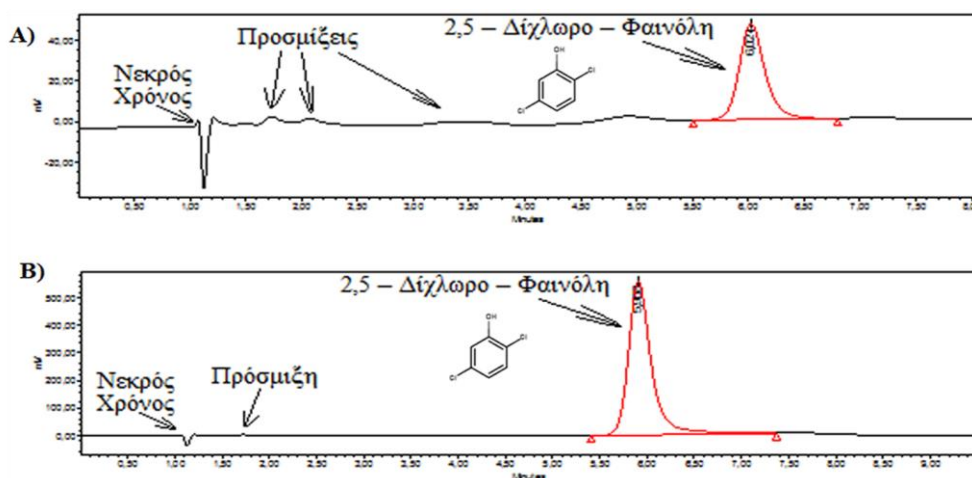
1) ABZ+ 15cm x 4.6mm ID, σωματίδια 5μm

Κινητή φάση:

Υδατική φάση: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH = 5.0 και pH = 7.4)

Οργανική φάση: Μεθανόλη

Κάθε δείγμα ενέθηκε τρεις φορές και ελήφθηκε ο μέσος όρος των εμβαδών.



Σχήμα 3: Χρωματογραφικές κορυφές του αναλύτη 2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη μετά το στάδιο της ανακινούμενης φιάλης. A) Ρυθμιστικό διάλυμα – οκτανόλη 30 mL / 0.5 mL (μετά την ανακίνηση), B) Ρυθμιστικό διάλυμα 30 mL (διάλυμα παρακαταθήκης πριν την ανακίνηση). Είναι εμφανής η μείωση του εμβαδού στο χρωματογράφημα A μετά ην ανακίνηση.

Στο παρόν pH υπολογίζονται οι τιμές log D από την σχέση:

$$\text{Log D} = \text{Log} \left[\frac{A_{\text{αρχ.}} - A_{\text{τελ.}}}{A_{\text{τελ.}}} \times \frac{V_{\text{υδατ.}}}{V_{\text{οργ.}}} \right] \quad (2)$$

$A_{\text{αρχ.}}$ = εμβαδόν χρωματογραφικής κορυφής δείγματος στο οποίο δεν έχει προστεθεί ποσότητα οκτανόλης στο στάδιο της ανακινούμενης φιάλης (διάλυμα παρακαταθήκης)

$A_{\text{τελ.}}$ = εμβαδόν χρωματογραφικής κορυφής δείγματος μετά την προσθήκη οκτανόλης στο στάδιο της ανακινούμενης φιάλης

$V_{\text{υδ.}}$ = όγκος υδατικής φάσης στην ανακινούμενη φιάλη

$V_{\text{οργ.}}$ = όγκος οκτανόλης (οργανική φάση) στην ανακινούμενη φιάλη

Οι τιμές log D που προσδιορίστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4

Πίνακας 4: Αναλύτες, pKa, Log D και τη τυπική απόκλιση για pH 5.0 και 7.4 των εκάστοτε αναλυτών

Αναλύτες		pKa	Log D _{5.0}	±	Log D _{7.4}	±
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	4.4	1.12	0.06	-1.25	0.03
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	3.9	1.47	0.05	-0.83	0.04
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	3.0	-1.12	0.04	-2.18	0.21
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	7.5	2.76	0.05	2.11	0.27
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	2.6	0.77	0.02	-0.52	0.00
9	Τετραζόλιο III	4.5	2.68	0.04	0.47	0.40
8	Τετραζόλιο IV	5.3	0.32	0.03	-0.31	0.03
7	Τετραζόλιο II	4.5	-0.16	0.07	-1.65	0.05
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	3.3	-0.15	0.06	-1.6	0.01
18	Μεφαιναμικό οξύ	4.3	3.94	0.00	1.74	0.13
10	Λοσαρτάνη	4.5	1.88	0.28	0.78	0.05
1	Σαλικυλικό οξύ	3.0	0.19	0.03	-1.48	0.03
11	Βαλσαρτάνη	2.9	2.04	0.01	-0.96	0.18
17	2 – Βενζοϊκό οξύ	3.6	0.89	0.03	-1.36	0.04
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	3.0	-0.82	0.04	-2.13	0.07
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	2.0	-1.29	0.05	-1.71	0.05
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	4.0	-	-	-1.83	0.15
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	2.4	-	-	-1.96	0.06
20	Πικρικό οξύ	0.8	-	-	-0.54	0.02
19	Κετοπροφαίνη	4.3	-	-	-0.3	0.01
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	2.7	-	-	-0.53	0.02

1.2 ΜΕΛΕΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ pH = 5.0.

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε σε pH 5.0.

I. Η χρωματογραφική στήλη:

- ABZ+ 15cm x 4.6mm ID, σωματίδια 5μm

II. Ρυθμιστικό διάλυμα

- Οξικό αμμώνιο / Οξικό οξύ ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4^+$ / CH_3COOH) με συγκέντρωση C = 50 mM

III. Οργανικός τροποποιητής

- Ακετονιτρίλιο

IV. Ροή κινητής φάσης: 1 mL / min

Η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση αναφέρεται στον Πίνακα 2.

➤ **Ισοκρατικές συνθήκες**

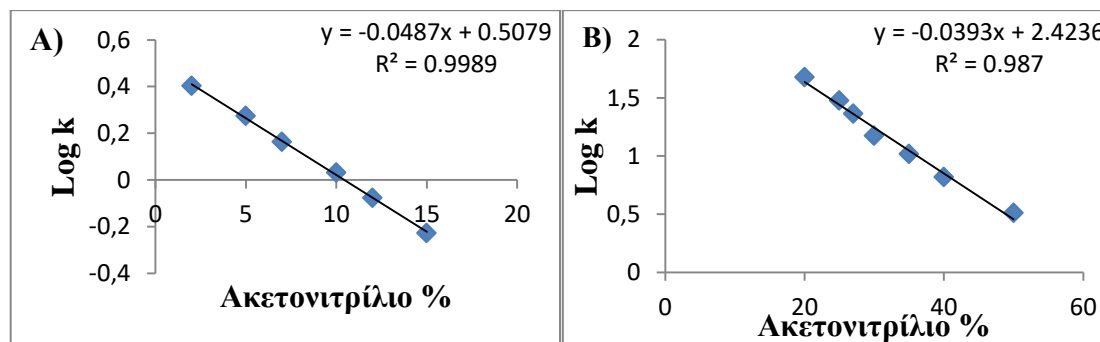
Σε συνθήκες pH = 5 και κινητής φάσης ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου / οξικού οξέος - ακετονιτρίλιο μελετήθηκαν 16 όξινες ενώσεις. (βλ. Πίνακα 4 ενώσεις για τις οποίες έχουν προσδιοριστεί τιμές log D_{5,0}).

Οι μετρήσεις έγιναν σε τουλάχιστον 6 ισοκρατικές φάσεις και εξήχθησαν οι συσχετίσεις μεταξύ του ποσοστού οργανικού τροποποιητή και του παράγοντα συγκράτησης Log k.

Πίνακας 5: Αναφέρονται οι αναλογίες ρυθμιστικού διαλύματος – οργανικού τροποποιητή των κινητών φάσεων για τον υπολογισμό των ανηγμένων τιμών Log k_w (για τον κάθε αναλύτη).

pH = 5				
Οξικό αμμώνιο – Οξικό οξύ / Ακετονιτρίλιο				
50 / 50	60 / 40	65 / 35		
70 / 30	73 / 27	75 / 25	80 / 20	
85 / 15	88 / 12	90 / 10	93 / 7	95 / 5

Στο Σχήμα 1 φαίνονται οι αντιπροσωπευτικές απεικονίσεις δυο ενώσεων, της υδρόφιλης χημικής ένωσης 2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ (log D_{5,0} = -1,12) και της λιπόφιλης χημικής ένωσης 2,5 – Διγλωρο – Φαινόλη (log D_{5,0} = 2,76) για pH = 5.0.



Σχήμα 4: Συσχέτιση του ποσοστού οργανικού τροποποιητή – λογαριθμικού παράγοντα συγκράτησης. A) 2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ (log D_{5,0} = -1,12), B) 2,5 – Διγλωρο – Φαινόλη (log D_{5,0} = 2,76)

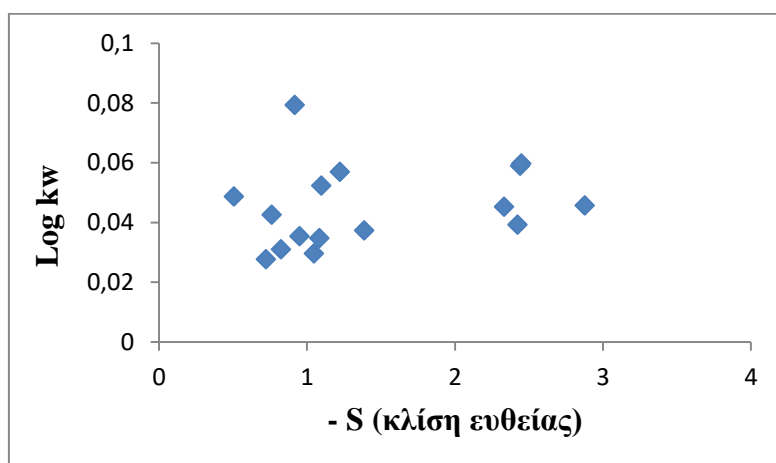
Οι σχέσεις log k_{5,0} / φ_{5,0} (ποσοστό οργανικού τροποποιητή) χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των ανηγμένων τιμών log k_{w5,0}. Σε όλες τις περιπτώσεις οι συντελεστές προσδιορισμού (R²) είναι μεγαλύτεροι από 0.970 (εξάιρεση αποτελούν οι αναλύτες Τετραζόλιο IV και Λοσαρτάνη). Στον Πίνακα 6 περιλαμβάνονται οι τιμές log k_{w5,0}, οι κλίσεις S των συσχετίσεων, οι συντελεστές προσδιορισμού (R²) και τα αντίστοιχα στατιστικά στοιχεία.

Πίνακας 6: Εξεταζόμενες χημικές ενώσεις, οι τιμές R^2 , ο λογαριθμικός παράγοντας συγκράτησης ($\log k_{w5.0}$), η κλίση ευθείας (S) των γραφικών παραστάσεων ισοκρατικής έκλυσης και τη τυπική απόκλιση αντίστοιχα.

Αναλύτες		$\log k_{w5.0}$	\pm	S	\pm	R^2
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	0.72	0.54	-0.0277	0.002	0.984
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	1.05	0.08	-0.0296	0.002	0.971
4	2,5 – Διόξυ - Βενζοϊκό οξύ	0.51	0.01	-0.0487	0.001	0.999
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	2.42	0.07	-0.0393	0.002	0.987
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	1.39	0.08	-0.0374	0.002	0.983
9	Τετραζόλιο III	2.33	0.07	-0.0453	0.002	0.989
8	Τετραζόλιο IV	0.95	0.15	-0.0354	0.004	0.930
7	Τετραζόλιο II	0.83	0.07	-0.031	0.002	0.980
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	1.22	0.07	-0.057	0.003	0.982
18	Μεφαιναμικό οξύ	2.88	0.12	-0.0457	0.003	0.980
10	Λοσαρτάνη	2.44	0.16	-0.059	0.005	0.968
1	Σαλικυλικό οξύ	1.10	0.05	-0.0523	0.002	0.990
11	Βαλσαρτάνη	2.45	0.13	-0.0597	0.004	0.981
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	1.09	0.08	-0.0348	0.002	0.980
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	0.92	0.04	-0.0793	0.004	0.992
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	0.76	0.03	-0.0426	0.001	0.995

Παρατηρείται ότι όλες οι τιμές $\log k_{w5.0}$ είναι θετικές, αν και για ορισμένες ενώσεις η τιμή $\log D_{5.0}$ είναι αρνητική. Η υδρόφιλη ένωση 2,5 – Διόξυ - Βενζοϊκό οξύ με την χαμηλότερη τιμή $\log D_{5.0}$ (- 1.12) εμφανίζει την μικρότερη τιμή $\log k_{w5.0}$ (0.51) ενώ η λιπόφιλη ένωση Μεφαιναμικό οξύ με την μεγαλύτερη τιμή $\log D_{5.0}$ (3.94) εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή $\log k_{w5.0}$ (2.88).

Στο Σχήμα 5 εξετάζεται η συσχέτιση των ανηγμένων τιμών $\log k_{w5.0}$ και της κλίσης S ευθείας παλινδρόμησης.



Σχήμα 5: Ανηγμένες τιμές $\log k_{w5.0}$ και οι αντίστοιχες τιμές των κλίσεων ισοκρατικών εκλούσεων πολλαπλασιασμένες με την τιμή -1.

Δεν παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ $\log k_{w5.0}$ και S , γεγονός που υποδηλώνει ότι οι συνθήκες δεν διασφαλίζουν ελαχιστοποίηση των δευτερευουσών (σιλανόφιλων) αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ενιαίος μηχανισμός συγκράτησης στα πλαίσια των ενώσεων. Η απουσία συσχέτισης υποδηλώνει επίσης διαφοροποίηση του πληροφοριακού περιεχομένου της κλίσης S .

Από τον τύπο $\text{Log } k = -S\phi + \text{Log } k_w$ υπολογίζονται οι τιμές ϕ_0 που αντιστοιχούν σε ισοκατανομή των αναλυτών μεταξύ στατικής και κινητής φάσης ($k = 1$, $\log k = 0$). Στον Πίνακα 7 αναγράφονται οι τιμές $\phi_{05.0}$ για τις υπο μελέτη ενώσεις. Η υδρόφιλη ένωση 2,5 - Διόξυ - Βενζοϊκό οξύ με την χαμηλότερη τιμή $\log D_{5.0}$ (- 1.12) εμφανίζει την μικρότερη τιμή ϕ_0 (10.43) ενώ η λιπόφιλη ένωση Μεφαιναμικό οξύ με την μεγαλύτερη τιμή $\log D_{5.0}$ (3.94) εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή $\phi_{05.0}$ (62.95).

Πίνακας 7: Αναγράφονται οι αναλύτες και το αντίστοιχο φ0

Αναλύτες		φ0 _{5.0}
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	26.11
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	35.38
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	10.43
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	61.67
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	38.12
9	Τετραζόλιο III	52.40
8	Τετραζόλιο IV	26.06
7	Τετραζόλιο II	27.20
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	21.46
18	Μεφαιναμικό οξύ	62.95
10	Λοσαρτάνη	41.31
1	Σαλικυλικό οξύ	20.98
11	Βαλσαρτάνη	41.46
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	31.15
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	11.58
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	17.91

1.2.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΚΤΑΝΟΛΗ / ΝΕΡΟ (Log D_{5.0})

Η συσχέτιση των τιμών log D_{5.0} με τις τιμές log k_{w5.0} και S σε συνθήκες pH = 5.0 εξάγεται η εξίσωση 3 με μέτριο συντελεστή συσχέτισης.

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{5.0} &= 1.69 (\pm 0.25) \text{ Log } k_{w5.0} - 1.52 (\pm 0.40) \\ N &= 16 \quad R^2 = 0.768 \quad R = 0.876 \quad s = 0.74 \end{aligned} \quad (3)$$

Δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των τιμών log k_{w5.0} και των κλίσεων S, επιχειρήθηκε η εισαγωγή της κλίσης S στη σχέση log D_{5.0} / log k_{w5.0}. Ελήφθηκε η εξίσωση 4 με πολύ ικανοποιητικά στατιστικά στοιχεία.

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{5.0} &= 1.84 (\pm 0.18) \text{ Log } k_{w5.0} - 39.99 (\pm 9.97) S + 0.06 (\pm 0.48) \\ N &= 16 \quad R^2 = 0.896 \quad R = 0.947 \quad s = 0.52 \end{aligned} \quad (4)$$

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται οι τιμές $\log D_{5.0}$ που υπολογίζονται με την εξίσωση 4 και συγκρίνονται με τις πειραματικές τιμές.

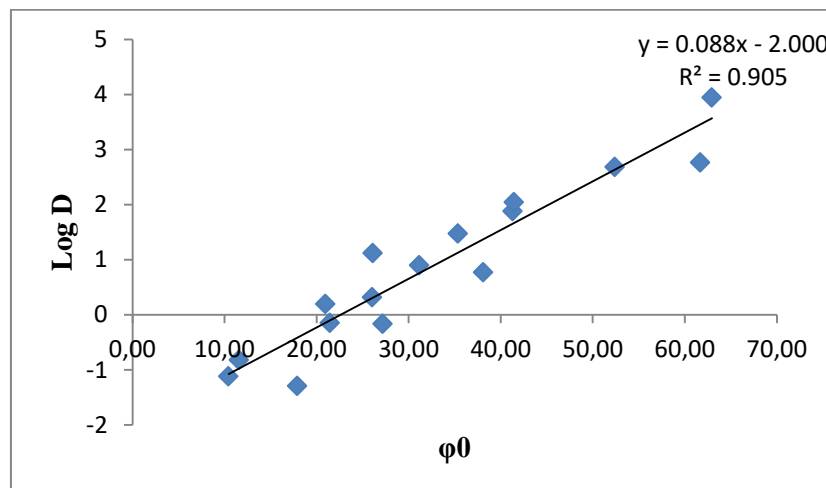
Πίνακας 8: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D_{5.0}$ (υπολ.) και οι πειραματικές τιμές $\log D_{5.0}$ των αντίστοιχων ενώσεων και η αντίστοιχη απόκλιση.

Αναλύτες		Log $D_{5.0}$ (υπολ.)	Log $D_{5.0}$	Απόκλιση
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	0.28	1.12	-0.84
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	0.81	1.47	-0.66
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	-0.95	-1.12	0.17
21	2,5 – Διγλωρο – Φαινόλη	2.94	2.76	0.18
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	1.12	0.77	0.35
9	Τετραζόλιο III	2.54	2.68	-0.14
8	Τετραζόλιο IV	0.39	0.32	0.07
7	Τετραζόλιο II	0.35	-0.16	0.51
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	0.03	-0.15	0.18
18	Μεφαιναμικό οξύ	3.53	3.94	-0.41
10	Λοσαρτάνη	2.19	1.88	0.31
1	Σαλικυλικό οξύ	-0.01	0.19	-0.20
11	Βαλσαρτάνη	2.18	2.04	0.14
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	0.67	0.89	-0.22
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	-1.42	-0.82	-0.60
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-0.25	-1.29	1.04

Κατά την σύγκριση των τιμών $\log D_{5.0}$ είναι γενικά αποδεκτή η απόκλιση της υπολογιστικής τιμής από την πειραματική για $\Delta \leq 0.5$. Για αποκλίσεις τιμών $0.5 < \Delta < 1$ καθίσταται εντός αποδεκτών ορίων, ενώ για $\Delta > 1$ οι υπολογιστικές τιμές θεωρούνται μη αποδεκτές. Σύμφωνα με τα παραπάνω:

- 11 αποδεκτές τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)
- 4 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)
- 1 μη αποδεκτές τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)

Στη συνέχεια παρατίθεται το διάγραμμα $\varphi_{0,5.0} - \log D_{5.0}$. Η συσχέτιση οδηγεί στην εξίσωση 5 με καλύτερο συντελεστή συσχέτισης από τον αντίστοιχο συντελεστή του που λαβάνεται με τις ανηγμένες τιμές $\log k_{w5.0}$ (εξίσωση 4).



Σχήμα 6: Τιμές φ_0 σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D$ σε pH 5.0.

Η συσχέτιση των τιμών $\varphi_{0,5.0} - \log D_{5.0}$ οδήγησε στην εξίσωση 5 με πολύ καλό συντελεστή συσχέτισης.

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{5.0} &= 0.088 (\pm 0.008) \varphi_{0,5.0} - 2.000 (\pm 0.279) & (5) \\ N &= 16 \quad R^2 = 0.905 \quad R = 0.951 \quad s = 0.477 \end{aligned}$$

Η καλύτερη συσχέτιση συγκριτικά με τη σχέση $\log D_{5.0} / \log k_{w5.0}$ ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η παράμετρος $\varphi_{0,5.0}$ που είναι συνδυασμός των μεγεθών $\log k_{w5.0}$ και S .

Στον Πίνακα 9 συγκρίνονται οι τιμές που υπολογίζονται από την εξίσωση 5 με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές.

Πίνακας 5: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D_{5.0}$ (υπολ.) και οι πειραματικές τιμές $\log D_{5.0}$ των αντίστοιχων ενώσεων και η αντίστοιχη απόκλιση.

Αναλύτες		Log $D_{5.0}$ (υπολ.)	Log $D_{5.0}$	Απόκλιση
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	0.31	1.12	0.81
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	1.13	1.47	0.34
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	-1.08	-1.12	-0.04
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	3.45	2.76	-0.69
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	1.37	0.77	-0.60
9	Τετραζόλιο III	2.63	2.68	0.05
8	Τετραζόλιο IV	0.30	0.32	0.01
7	Τετραζόλιο II	0.40	-0.16	-0.57
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-0.10	-0.15	-0.05
18	Μεφαιναμικό οξύ	3.56	3.94	0.38
10	Λοσαρτάνη	1.65	1.88	0.23
1	Σαλικυλικό οξύ	-0.15	0.19	0.34
11	Βαλσαρτάνη	1.66	2.04	0.38
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	0.75	0.89	0.14
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	-0.98	-0.82	0.16
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-0.42	-1.29	-0.88

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5 διαπιστώνονται:

- 11 αποδεκτές τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)
- 5 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)
- 0 μη αποδεκτές τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)

➤ **Βαθμιδωτή έκλουση**

Στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου / οξικό οξύ ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4^+$ / CH_3COOH) με συγκέντρωση $C = 50 \text{ mM}$ και οργανικός τροποποιητής το ακετονιτρίλιο με ροή κινητής φάσης: $1 \text{ mL} / \text{min}$. Τα στάδια του προγράμματος εμφανίζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.

pH = 5		
Χρόνος	A = Ρυθμιστικό διάλυμα	B = Οργανικός τροποποιητής
0 – 2 min	A = 100%	B = 0%
2 – 11 min	A = 0%	B = 100%
11 – 13 min	A = 0%	B = 100%
13 – 13.5 min	A = 100%	B = 0%
13.5 – 15 min	A = 100%	B = 0%

Από την εφαρμογή βαθμιδωτής έκλουσης σύμφωνα με το πρόγραμμα του Πίνακα 10, καταγράφηκε ο χρόνος έκλουσης των 16 χημικών ενώσεων. Στον Πίνακα 11 καταγράφονται οι χρόνοι συγκράτησης t_R .

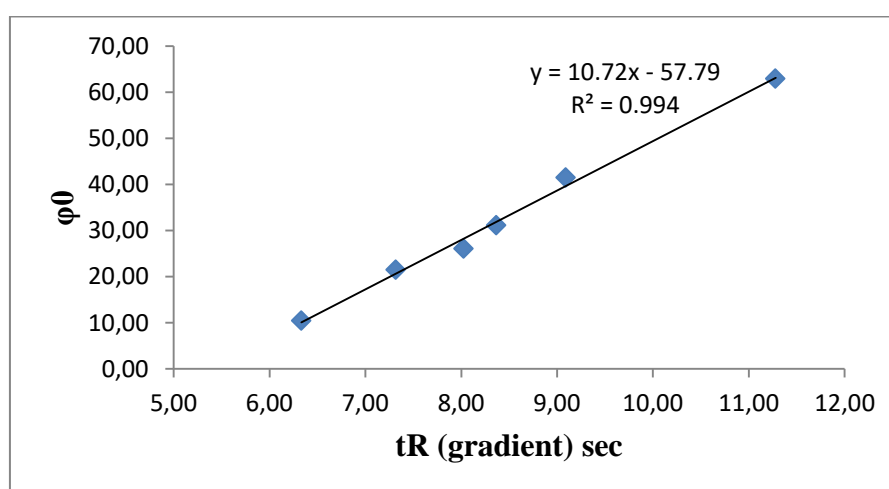
Πίνακας 11: Οι χημικές ενώσεις, χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης και τιμές $\phi_{0.5}$ για την κάθε χημική ένωση

Αναλύτες		Χρόνος (t_R gradient) min
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	7.92
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	8.54
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	6.33
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	11.05
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	8.72
9	Τετραζόλιο III	10.27
8	Τετραζόλιο IV	8.03
7	Τετραζόλιο II	7.92
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	7.32
18	Μεφαιναμικό οξύ	11.28
10	Λοσαρτάνη	9.13
1	Σαλικυλικό οξύ	7.40
11	Βαλσαρτάνη	9.09
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	8.37
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	6.62
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	6.94

Επιλέχθησαν 6 χημικές ενώσεις ως πρότυπες ενώσεις για τον σχεδιασμό πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Η επιλογή των χημικών ενώσεων ήταν αντιπροσωπευτική ως προς τις τιμές $\log D_{5.0}$.

- Υδρόφιλες ενώσεις: 2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ, 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ
- Ενδιάμεσης λιποφιλίας ενώσεις: Τετραζόλιο IV, 2 – Βενζοΐλο – Βενζοϊκό οξύ
- Λιπόφιλες ενώσεις: Βαλσαρτάνη, Μεφαιναμικό οξύ

Στο Σχήμα 7 αποτυπώνονται οι τιμές $\phi_{5.0}$ έναντι των χρόνων συγκράτησης βαθμιδωτής έκλυσης t_R .



Σχήμα 7: Ο χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλυσης (t_R gradient) έναντι των τιμών $\phi_{5.0}$ ισοκρατικών εκλύσεων για τις 6 πρότυπες ενώσεις.

Παρατηρείται πολύ καλή γραμμικότητα μεταξύ των τιμών $\phi_{5.0}$ και του χρόνου συγκράτησης, η οποία εκφράζεται από την εξίσωση 6. Για λόγους συμβολισμού στην εξίσωση 6 αντικαθίσταται ο όρος $\phi_{5.0}$ με $CHI_{5.0}$ (ως $\phi_{5.0}$ αναγράφονται οι τιμές που λαμβάνονται με την εφαρμογή ισοκρατικών μεθόδων ενώ $CHI_{5.0}$ οι τιμές που λαμβάνονται με την εφαρμογή βαθμιδωτής έκλυσης).

$$CHI_{5.0} = 10.72 (\pm 0.41) tR - 57.79 (\pm 3.50) \quad (6)$$

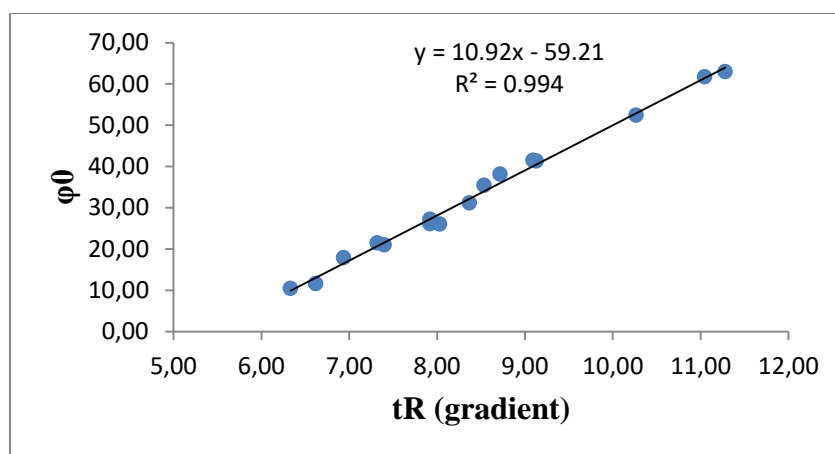
$$N = 6 \quad R^2 = 0.994 \quad R = 0.997 \quad s = 1.55$$

Αξιοποιώντας την εξίσωση 6 που προκύπτει από το Σχήμα 7, υπολογίζονται οι τιμές $CHI_{5.0}$ των υπολοίπων προς εξέταση χημικών ενώσεων. Στον Πίνακα 12 συγκρίνονται οι τιμές $CHI_{5.0}$ με τις τιμές $\phi_{5.0}$ και δίδεται η αντίστοιχη απόκλιση.

Πίνακας 12: Οι τιμές $CHI_{5.0}$ και $\phi_{5.0}$ των αντίστοιχων ενώσεων και η απόκλιση τιμών.

Αναλύτες		$CHI_{5.0}$	$\phi_{5.0}$	Απόκλιση
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	27.08	26.11	-0.97
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	33.66	35.38	1.72
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	60.58	61.67	1.09
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	35.61	38.12	2.51
9	Τετραζόλιο ΙΙΙ	52.22	52.40	0.18
7	Τετραζόλιο ΙΙ	27.08	27.20	0.12
10	Λοσαρτάνη	40.03	41.31	1.27
1	Σαλικυλικό οξύ	21.49	20.98	-0.51
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	13.15	11.58	-1.57
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	16.53	17.91	1.39

Αν και η καμπύλη αναφοράς είναι πολύ καλή, ωστόσο θεωρήθηκε σκόπιμο να συσχετιστούν οι τιμές $\phi_{5.0}$ όλων των αναλυτών με τους αντίστοιχους χρόνους συγκράτησης για να προκύψει η εξίσωση 7 που αντιπροσωπεύει σε μεγαλύτερο βαθμό την σχέση μεταξύ του χρόνου συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης και των τιμών $\phi_{5.0}$. Η εξίσωση 7 εξάγεται από το Σχήμα 8.



Σχήμα 8: Ο χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης (t_R gradient) έναντι των τιμών $\phi_{5.0}$ ισοκρατικών εκλούσεων για τις 16 χημικές ενώσεις.

Η καμπύλη του Σχήματος 8 δεν διαφέρει από την αρχική καμπύλη αναφοράς και γίνεται εμφανές από την εξίσωση 7.

$$CHI_{5.0} = 10.92 (\pm 0.23) tR - 59.21 (\pm 1.97) \quad (7)$$

$$N = 16 \quad R^2 = 0.994 \quad R = 0.952 \quad s = 1.31$$

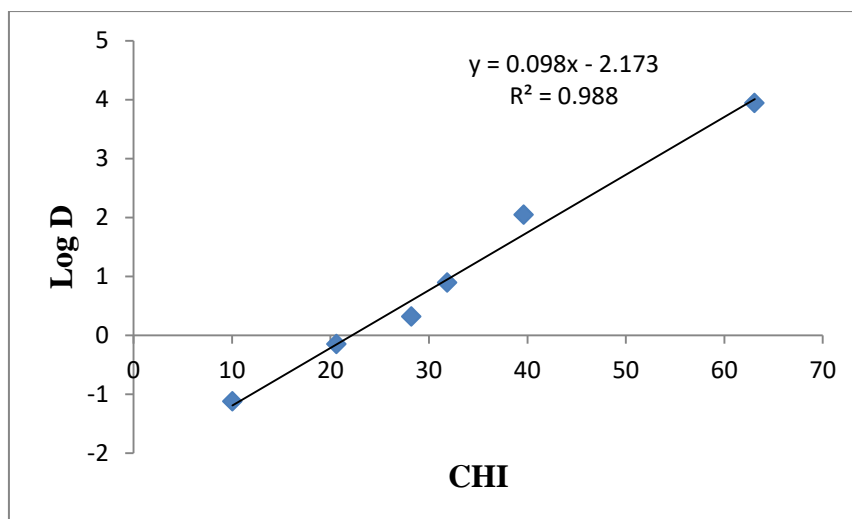
Με βάση την εξίσωση 7, υπολογίζονται οι τιμές $CHI_{5.0}$ των 16 χημικών ενώσεων και συγκρίνονται με τις τιμές $\varphi_{5.0}$ στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Οι τιμές $CHI_{5.0}$ και $\varphi_{5.0}$ και την απόκλιση τιμών των αντίστοιχων ενώσεων.

Αναλύτες		$CHI_{5.0}$	$\varphi_{5.0}$	Απόκλιση
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	26.92	26.11	-0.81
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	33.43	35.38	1.95
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	10.09	10.43	0.34
21	2,5 – Διγλωρο – Φαινόλη	60.04	61.67	1.63
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	35.36	38.12	2.76
9	Τετραζόλιο III	51.77	52.40	0.62
8	Τετραζόλιο IV	28.05	26.06	-2.00
7	Τετραζόλιο II	26.92	27.20	0.28
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	20.52	21.46	0.93
18	Μεφαιναμικό οξύ	62.52	62.95	0.43
10	Λοσαρτάνη	39.73	41.31	1.58
1	Σαλικυλικό οξύ	21.40	20.98	-0.42
11	Βαλσαρτάνη	39.34	41.46	2.12
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	31.67	31.15	-0.52
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	13.15	11.58	-1.57
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	16.49	17.91	1.42

1.2.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CHI ΜΕ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ $\log D_{5.0}$

Οι τιμές $CHI_{5.0}$ των 6 ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατάρτιση της καμπύλης αναφοράς του Σχήματος 4, επιστρατεύονται για την συσχέτιση τους με τις πειραματικές τιμές $\log D_{5.0}$ με τελικό σκοπό να προκύψει εκ νέου καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 9, εξίσωση 8) για τον υπολογισμό των τιμών $\log D_{5.0}$.



Σχήμα 9: Τιμές $CHI_{5.0}$ των προτύπων σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{5.0}$

Η καμπύλη του Σχήματος 9 είναι απόρροια της σχέσης των τιμών $CHI_{5.0}$ και $\log D_{5.0}$ που εκφράζεται από την εξίσωση 8 με πολύ καλά στατιστικά στοιχεία.

$$\begin{aligned} \log D_{5.0} &= 0.098 (\pm 0.005) CHI_{5.0} - 2.173 (\pm 0.199) & (8) \\ N &= 6 \quad R^2 = 0.988 \quad R = 0.994 \quad s = 0.02 \end{aligned}$$

Με βάση την εξίσωση 8, υπολογίζονται οι τιμές $\log D_{5.0}$ των υπολοίπων χημικών ενώσεων και συγκρίνονται με τις πειραματικές τιμές (Πίνακας 14).

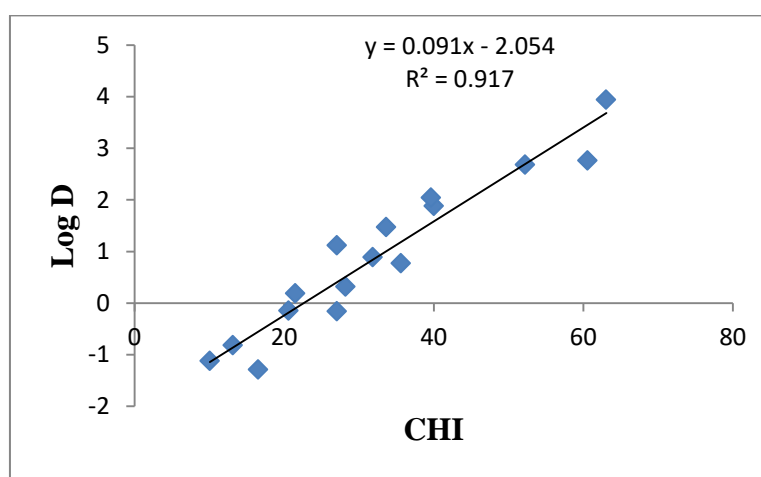
Πίνακας 14: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D_{5.0}$ (υπολ.), οι πειραματικές τιμές $\log D_{5.0}$ και η απόκλιση τιμών των αντίστοιχων ενώσεων.

Αναλύτες		Log $D_{5.0}$ (υπολ.)	Log $D_{5.0}$	Απόκλιση
13	4 – Μεθοξύ – Βενζοϊκό οξύ	0.48	1.12	-0.64
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	1.13	1.47	-0.34
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	3.76	2.76	1.00
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	1.32	0.77	0.55
9	Τετραζόλιο III	2.94	2.68	0.26
7	Τετραζόλιο II	0.48	-0.16	0.64
10	Λοσαρτάνη	1.75	1.88	-0.13
1	Σαλικυλικό οξύ	-0.07	0.19	-0.26
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	-0.88	-0.82	-0.06
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-0.55	-1.29	0.74

Σύμφωνα με τον Πίνακα 14 διαπιστώνονται:

- 5 αποδεκτές τιμές Log D_{5.0} (υπολ.)
- 4 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log D_{5.0} (υπολ.)
- 1 μη αποδεκτές τιμές Log D_{5.0} (υπολ.)

Ακολούθως στο Σχήμα 10 και στην εξίσωση 9 παρουσιάζεται η συσχέτιση των τιμών log D_{5.0} με τις αντίστοιχες τιμές CHI_{5.0} όλων των χημικών ενώσεων.



Σχήμα 10: Τιμές CHI_{5.0} των εξεταζόμενων φαρμάκων σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές log D_{5.0}.

Η καμπύλη του Σχήματος 10 είναι απόρροια της σχέσης των τιμών CHI_{5.0} και log D_{5.0} που εκφράζεται από την εξίσωση 9

$$\begin{aligned} \text{Log D}_{5.0} &= 0.091 (\pm 0.007) \text{ CHI}_{5.0} - 2.054 (\pm 0.262) & (9) \\ N &= 16 \quad R^2 = 0.917 \quad R = 0.958 \quad s = 0.44 \end{aligned}$$

Από την εξίσωση 9 καταγράφεται μικρότερη συσχέτιση τιμών CHI_{5.0} με τις τιμές log D_{5.0} σε σχέση με την πρότυπη καμπύλη (6 χημικών ενώσεων) του Σχήματος 9. Παρατηρείται ελαφρώς καλύτερη συσχέτιση των τιμών CHI_{5.0} με τις τιμές log D_{5.0} σε σύγκριση με την σχέση τιμών φ_{05.0} – log D_{5.0}.

Με βάση την εξίσωση 9, υπολογίζονται οι τιμές $\log D_{5.0}$ των χημικών ενώσεων και συγκρίνονται με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές (Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D_{5.0}$ (υπολ.) και οι πειραματικές τιμές $\log D_{5.0}$ και η απόκλιση τιμών των αντίστοιχων ενώσεων.

Αναλύτες		Log $D_{5.0}$ (υπολ.)	Log $D_{5.0}$	Απόκλιση
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	0.41	1.12	0.71
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	1.01	1.47	0.46
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	-1.14	-1.12	0.02
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	3.46	2.76	-0.70
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	1.19	0.77	-0.42
9	Τετραζόλιο III	2.70	2.68	-0.02
8	Τετραζόλιο IV	0.51	0.32	-0.19
7	Τετραζόλιο II	0.41	-0.16	-0.57
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-0.18	-0.15	0.03
18	Μεφαιναμικό οξύ	3.69	3.94	0.25
10	Λοσαρτάνη	1.59	1.88	0.29
1	Σαλικυλικό οξύ	-0.10	0.19	0.29
11	Βαλσαρτάνη	1.55	2.04	0.49
17	2 – Βενζοϊλο – Βενζοϊκό οξύ	0.85	0.89	0.04
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	-0.86	-0.82	0.04
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-0.55	-1.29	-0.74

Σύμφωνα με τον Πίνακα 14 διαπιστώνονται:

- 12 αποδεκτές τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)
- 4 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)
- 0 μη αποδεκτές τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)

Συγκεντρωτική σύγκριση των συσχετίσεων μεταξύ $\log k_{w5.0} - \log D_{5.0}$, $\varphi_{05.0} - \log D_{5.0}$ και $CHI_{5.0} - \log D_{5.0}$ φαίνεται στον Πίνακα 16

Πίνακας 16: Συγκριτικός πίνακας αποδεκτών, εντός ορίων και μη αποδεκτές τιμών Log $D_{5.0}$ με βάση τις εξισώσεις 4, 5, 9 .

Δ	$(\log k_{w5.0} + S) - \log D_{5.0}$	$\varphi_{05.0} - \log D_{5.0}$	$CHI_{5.0} - \log D_{5.0}$
$\Delta \leq 0.5$	11	11	12
$0.5 < \Delta < 1$	4	5	4
$\Delta > 1$	1	0	0

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ

Σε pH = 5.0 που οι αναλύτες είναι μερικώς ιονισμένοι προσδιορίζονται αξιόπιστες τιμές $CHI_{5.0}$. Επιπλέον τόσο οι τιμές $CHI_{5.0}$ όσο και οι αντίστοιχες τιμές φ_0 συσχετίζονται σημαντικά καλύτερα με τις τιμές $\log D_{5.0}$ συγκριτικά με τις ανηγμένες τιμές $\log k_{w5.0}$. Για αξιόπιστη συσχέτιση των ανηγμένων τιμών $\log k_{w5.0}$ με τις τιμές $\log D_{5.0}$ απαιτείται η εισαγωγή της κλίσης S ως δεύτερης παραμέτρου.

1.3 ΜΕΛΕΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ pH = 7.4

Σε pH = 7.4 χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχες συνθήκες ρυθμιστικού διαλύματος και οργανικού τροποποιητή με τις συνθήκες σε pH = 5.0 (ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου / αμμωνία – ακετονιτρίλιο). Επιπλέον για λόγους σύγκρισης με προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων – μεθανόλη (+ 0.25% οκτανόλη) οι οποίες έχουν προταθεί ως βέλτιστες για τον χρωματογραφικό ισοκρατικό προσδιορισμό της λιποφιλίας των οξέων .

1.3.1 Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου / αμμωνία – ακετονιτρίλιο

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε σε pH 7.4.

- V. Η χρωματογραφική στήλη:
 - ABZ+ 15cm x 4.6mm ID, σωματίδια 5 μ m
- VI. Ρυθμιστικό διάλυμα
 - Οξικό αμμώνιο / Αμμωνία ($CH_3COO^-NH_4^+ / NH_3$) συγκέντρωσης C = 50 mM
- VII. Οργανικός τροποποιητής
 - Ακετονιτρίλιο
- VIII. Ροή κινητής φάσης: 1 mL / min

Η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση αναφέρεται στον Πίνακα 2.

➤ **Ισοκρατική έκλυση**

Σε συνθήκες pH = 7.4 εμπλουτίστηκε η σειρά με την προσθήκη 5 ισχυρών οξέων (βλ. Πίνακας 4).

Οι ενώσεις που προστέθηκαν είναι:

- (16) 2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ
- (5) 5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ
- (20) Πικρικό οξύ
- (19) Κετοπροφαίνη
- (3) 4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ

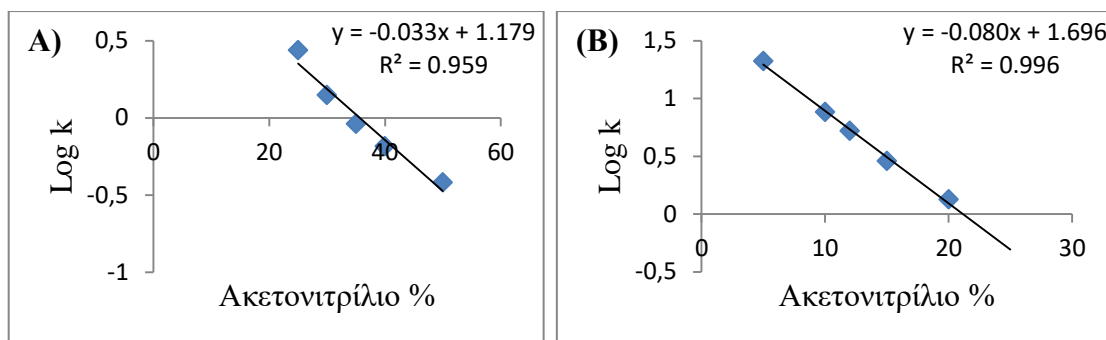
Σε pH = 7.4 οι αναλύτες βρίσκονται πλήρως ιονισμένοι με εξαίρεση τη 2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη, με αποτέλεσμα να αναμένονται ισχυρότερες δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση.

Οι μετρήσεις έγιναν σε τουλάχιστον 6 ισοκρατικές φάσεις οι οποίες αναφέρονται στον πίνακα 17 και εξήχθησαν οι συσχετίσεις μεταξύ του ποσοστού οργανικού τροποποιητή και του παράγοντα συγκράτησης $\log k_{7.4\text{οξικό}}$.

Πίνακας 17: Αναφέρονται οι αναλογίες ρυθμιστικού διαλύματος – οργανικού τροποποιητή των κινητών φάσεων για τον υπολογισμό των ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4\text{οξικό}}$ (για τον κάθε αναλύτη).

pH = 7.4				
Οξικό αμμώνιο – Αμμωνία / Ακετονιτρίλιο				
50 / 50	55 / 45	60 / 40	65 / 35	70 / 30
75 / 25	80 / 20	85 / 15	88 / 12	90 / 10
95 / 5	97 / 3	98 / 2		

Στο Σχήμα 11 φαίνονται οι αντιπροσωπευτικές απεικονίσεις ισοκρατικών εκλύσεων της χημικής ένωσης Τετραζόλιο III ($\log D_{7.4} = 0.47$) και 2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ ($\log D_{7.4} = -1,36$) σε συνθήκες pH 7.4.



Σχήμα 11: Ισοκρατική έκλυση σε pH = 7.4 για τα οξέα A) Τετραζόλιο III ($\log D_{7.4} = 0.47$) και B) 2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ ($\log D_{7.4} = -1,36$).

Οι σχέσεις $\log k_{7.4\text{οξικό}} / \varphi_{7.4\text{οξικό}}$ (ποσοστό οργανικού τροποποιητή) χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4\text{οξικό}}$. Σε όλες τις περιπτώσεις οι συντελεστές προσδιορισμού (R^2) είναι μεγαλύτεροι από 0.970 (εξάιρεση αποτελούν οι αναλύτες Τετραζόλιο IV και Λοσαρτάνη). Στον Πίνακα 13 περιλαμβάνονται οι τιμές $\log k_{w7.4\text{οξικό}}$, οι κλίσεις S των συσχετίσεων, οι συντελεστές προσδιορισμού (R^2) και τα αντίστοιχα στατιστικά στοιχεία.

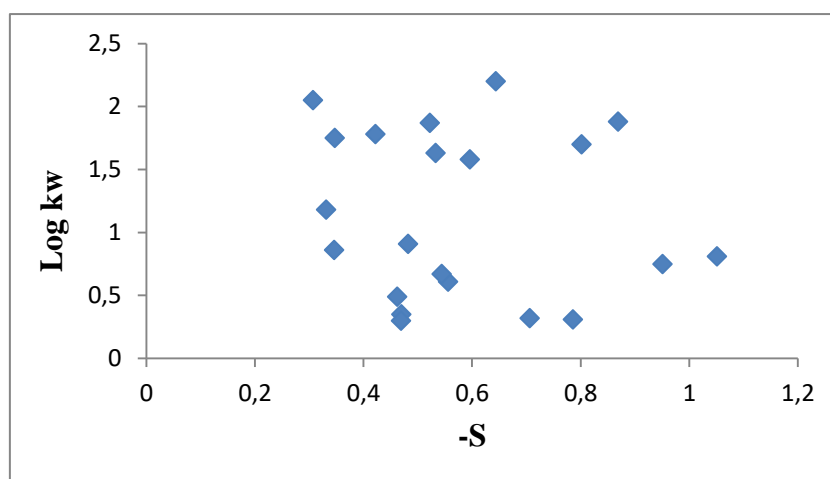
Πίνακας 18: Εξεταζόμενες χημικές ενώσεις, οι τιμές R^2 , ο λογαριθμικός παράγοντας συγκράτησης ($\log k_{w7.4\text{οξικό}}$), η κλίση ευθείας (S) των γραφικών παραστάσεων ισοκρατικής έκλυσης και τη τυπική απόκλιση αντίστοιχα.

	Αναλύτες	$\log k_{w7.4\text{οξικό}}$	\pm	S	\pm	R^2
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	0.35	0.03	-0.047	0.003	0.9848
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	0.91	0.13	-0.0482	0.001	0.9986
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	0.32	0.00	-0.0706	0.001	0.9999
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	2.05	0.10	-0.0307	0.003	0.9908
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	1.58	0.06	-0.0596	0.003	0.9917
9	Τετραζόλιο III	1.18	0.15	-0.0331	0.004	0.9587
8	Τετραζόλιο IV	1.88	0.06	-0.0869	0.004	0.9948
7	Τετραζόλιο II	0.30	0.05	-0.0469	0.005	0.9634
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	0.61	0.01	-0.0556	0.002	0.9976
18	Μεφαιναμικό οξύ	1.75	0.14	-0.0347	0.003	0.9731
10	Λοσαρτάνη	2.2	0.17	-0.0644	0.005	0.9832
1	Σαλικυλικό οξύ	0.67	0.01	-0.0544	0.003	0.9968
11	Βαλσαρτάνη	0.86	0.19	-0.0346	0.005	0.9569
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	1.7	0.04	-0.0802	0.003	0.9957
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	0.75	0.06	-0.0951	0.008	0.9789
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	0.49	0.01	-0.0462	0.002	0.9950
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	0.31	0.03	-0.0786	0.001	0.9864
5	5 – Μεθουλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	0.81	0.03	-0.1051	0.005	0.9953
20	Πικρικό οξύ	1.87	0.01	-0.0522	0.001	0.9994

19	Κετοπροφαίνη	1.78	0.12	-0.0422	0.003	0.9814
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	1.63	0.04	-0.0533	0.002	0.9971

Παρατηρείται ότι όλες οι τιμές $\log k_{w7.4oξικo}$ είναι θετικές, αν και η πλειοψηφία των ενώσεων έχει αρνητική τιμή $\log D_{7.4}$. Η υδρόφιλη ένωση 2,5 – Διόξυ - Βενζοϊκό οξύ με την χαμηλότερη τιμή $\log D_{7.4}$ (-2,18) δεν εμφανίζει την μικρότερη τιμή $\log k_{w7.4oξικo}$ (0.32) όπως συμβαίνει σε συνθήκες $pH = 5.0$. Την μικρότερη τιμή $\log k_{w7.4oξικo}$ την εμφανίζει η χημική ένωση Τετραζόλιο II ($\log k_{w7.4oξικo} = 0.30$) ενώ η λιπόφιλη ένωση 2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη με την μεγαλύτερη τιμή $\log D_{7.4}$ (2.11) εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή $\log k_{w7.4oξικo}$ (2.05), δεδομένου ότι είναι σε μικρό βαθμό ιοντισμένη.

Στο Σχήμα 12 εξετάζεται η συσχέτιση των ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4oξικo}$ και της κλίσης ευθείας των ισοκρατικών εκλούσεων για των εκάστοτε οξέων.



Σχήμα 12: Ανηγμένες τιμές $\log k_{w7.4oξικo}$ και οι αντίστοιχες τιμές των κλίσεων ισοκρατικών εκλούσεων πολλαπλασιασμένες με την τιμή -1.

Δεν παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ $\log k_{w7.4oξικo}$ και S , γεγονός που υποδηλώνει ότι οι συνθήκες δεν διασφαλίζουν ελαχιστοποίηση των δευτερευουσών (σιλανόφιλων) αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ενιαίος μηχανισμός συγκράτησης στα πλαίσια των ενώσεων.

Από τον τύπο $\text{Log } k_{7.4oξικo} = -S\phi + \text{Log } k_{w7.4oξικo}$ υπολογίζονται οι τιμές $\phi_{7.4oξικo}$ που αντιστοιχούν σε ισοκατανομή των αναλυτών μεταξύ στατικής και κινητής φάσης ($k = 1$, $\log k = 0$).

Στον Πίνακα 19 αναγράφονται οι τιμές $\phi_{7.4oξικo}$ για τις υπο μελέτη ενώσεις. Η υδρόφιλη ένωση 2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ αν και δεν έχει την χαμηλότερη τιμή $\log D_{7.4}$ (- 1.83),

εμφανίζει την μικρότερη τιμή $\phi_{07.4οξικό}$ (3.48) ενώ η λιπόφιλη ένωση 2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη με την μεγαλύτερη τιμή $\log D_{7.4}$ (2.11) εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή $\phi_{07.4οξικό}$ (66.75).

Πίνακας 19: Αναγράφονται οι αναλύτες και το αντίστοιχο $\phi_{07.4οξικό}$

Αναλύτες		$\phi_{07.4οξικό}$
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	7.48
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	18.82
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	4.69
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	66.75
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	26.47
9	Τετραζόλιο III	35.63
8	Τετραζόλιο IV	21.67
7	Τετραζόλιο II	6.43
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	11.01
18	Μεφαιναμικό οξύ	50.51
10	Λοσαρτάνη	34.16
1	Σαλικυλικό οξύ	12.32
11	Βαλσαρτάνη	24.94
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	21.14
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	7.85
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	10.56
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	3.48
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	7.59
20	Πικρικό οξύ	35.80
19	Κετοπροφαίνη	27.90
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	30.63

1.3.1.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΚΤΑΝΟΛΗ / ΝΕΡΟ ($\log D_{7.4}$)

Εξετάζεται η συσχέτιση των τιμών $\log k_{w7.4οξικό} - \log D_{7.4}$ σε συνθήκες $pH = 7.4$ με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου / αμμωνία και οργανικό τροποποιητή ακετονιτρίλιο.

$$\begin{aligned} \log D_{7.4} &= 1.41 (\pm 0.27) \log k_{w7.4οξικό} - 2.38 (\pm 0.36) \\ N &= 21 \quad R^2 = 0.589 \quad R = 0.766 \quad s = 0.79 \end{aligned} \quad (10)$$

Δεν παρατηρείται ικανοποιητική συσχέτιση. Ωστόσο η εξίσωση 10 βελτιώνεται σημαντικά με την εισαγωγή της κλίσης S ως πρόσθετης παραμέτρου (εξίσωση 11), αν και ο συντελεστής συσχέτισης είναι μικρότερος του αντίστοιχου για pH 5.0.

$$\text{Log } D_{7.4} = 1.30 (\pm 0.20) \text{ Log } k_{w7.4\text{οξικό}} - 26.30 (\pm 6.17) S - 0.73 (\pm 0.47) \quad (11)$$

$$N = 21 \quad R^2 = 0.795 \quad R = 0.892 \quad s = 0.57$$

Στον Πίνακα 20 παρουσιάζονται οι τιμές $\log D_{7.4}$ που υπολογίζονται με την εξίσωση 11 και συγκρίνονται με τις πειραματικές τιμές.

Πίνακας 20: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D_{7.4}$ (υπολ.) και οι πειραματικές τιμές $\log D_{7.4}$ των αντίστοιχων ενώσεων και η αντίστοιχη απόκλιση.

	Αναλύτες	Log $D_{7.4}$ (υπολ.)	Log $D_{7.4}$	Απόκλιση
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-1.51	-1.25	-0.26
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	-0.81	-0.83	0.02
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	-2.17	-2.18	0.01
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	1.13	2.11	-0.98
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-0.24	-0.52	0.28
9	Τετραζόλιο III	-0.06	0.47	-0.53
8	Τετραζόλιο IV	-0.57	-0.31	-0.26
7	Τετραζόλιο II	-1.57	-1.65	0.08
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.39	-1.60	0.21
18	Μεφαιναμικό οξύ	0.64	1.74	-1.10
10	Λοσαρτάνη	0.44	0.78	-0.34
1	Σαλικυλικό οξύ	-1.28	-1.48	0.20
11	Βαλσαρτάνη	-0.52	-0.96	0.44
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	-0.62	-1.36	0.74
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	-2.25	-2.13	-0.12
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.30	-1.71	0.41
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-2.39	-1.83	-0.56
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	-2.44	-1.96	-0.48
20	Πικρικό οξύ	0.33	-0.54	0.87
19	Κετοπροφαίνη	0.48	-0.30	0.78
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-0.01	-0.53	0.52

Σύμφωνα με τον Πίνακα 20 διαπιστώνονται:

- 13 αποδεκτές τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)
- 7 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)
- 1 μη αποδεκτές τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)

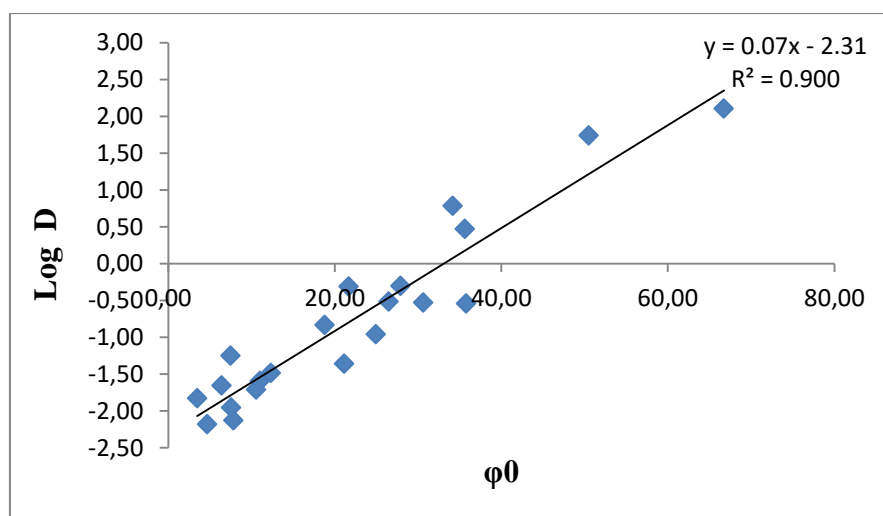
Για λόγους σύγκρισης πραγματοποιείται η επι μέρους ανάλυση των 16 ενώσεων που προσδιορίστηκαν pH = 5.0.

Λαμβάνεται η εξίσωση 12 με καλύτερο συντελεστή συσχέτισης.

$$\text{Log } D_{7.4} = 1.63 (\pm 0.17) \text{ Log } k_{w7.4\text{οξικό}} - 35.84 (\pm 5.81) S - 0.49 (\pm 0.38) \quad (12)$$

$$N = 16 \quad R^2 = 0.903 \quad R = 0.950 \quad s = 0.44$$

Το Σχήμα 13 και η εξίσωση 13 αντιπροσωπεύουν την συσχέτιση τιμών $\varphi_{07.4\text{οξικό}} - \log D_{7.4}$ των 21 όξινων ενώσεων.



Σχήμα 12: Τιμές $\varphi_{07.4\text{οξικό}}$ σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{7.4}$.

Η συσχέτιση των τιμών $\varphi_{07.4\text{οξικό}} - \log D_{7.4}$ οδήγησε στην εξίσωση 13 με καλύτερα στατιστικά στοιχεία συγκριτικά με την εξίσωση 11.

$$\text{Log } D_{7.4} = 0.07 (\pm 0.005) \varphi_{07.4\text{οξικό}} - 2.31 (\pm 0.146) \quad (13)$$

$$N = 21 \quad R^2 = 0.900 \quad R = 0.949 \quad s = 0.39$$

Πίνακας 21: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D_{7.4}$ (υπολ.) και οι πειραματικές τιμές $\log D_{7.4}$ των αντίστοιχων ενώσεων και η αντίστοιχη απόκλιση.

Αναλύτες		Log $D_{7.4}$ (υπολ.)	Log $D_{7.4}$	Απόκλιση
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-1.79	-1.25	0.54
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.00	-0.83	0.16
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	-1.99	-2.18	-0.19
21	2,5 – Διγλωρο – Φαινόλη	2.35	2.11	-0.25
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-0.46	-0.52	-0.05
9	Τετραζόλιο III	0.18	0.47	0.29
8	Τετραζόλιο IV	-0.80	-0.31	0.49
7	Τετραζόλιο II	-1.86	-1.65	0.21
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.54	-1.60	-0.05
18	Μεφαιναμικό οξύ	1.22	1.74	0.52
10	Λοσαρτάνη	0.07	0.78	0.71
1	Σαλικυλικό οξύ	-1.45	-1.48	-0.03
11	Βαλσαρτάνη	-0.57	-0.96	-0.39
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	-0.84	-1.36	-0.52
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	-1.77	-2.13	-0.36
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.58	-1.71	-0.13
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-2.07	-1.83	0.24
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	-1.78	-1.96	-0.17
20	Πικρικό οξύ	0.19	-0.54	-0.73
19	Κετοπροφαίνη	-0.36	-0.30	0.06
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-0.17	-0.53	-0.36

Σύμφωνα με τον Πίνακα 21 διαπιστώνονται:

- 16 αποδεκτές τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)
- 5 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)
- 0 μη αποδεκτές τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)

Η εξίσωση 14 αντιπροσωπεύει την συσχέτιση τιμών $\varphi_{0_{7.4\text{οξικό}}} - \log D_{7.4}$ των 16 όξινων ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν σε συνθήκες pH 5.0 με πολύ καλό συντελεστή συσχέτισης.

$$\log D_{7.4} = 0.073 (\pm 0.006) \varphi_{0_{7.4\text{οξικό}}} - (\pm 0.160) 2.326 \quad (14)$$

$$N = 16 \quad R^2 = 0.921 \quad R = 0.960 \quad s = 0.38$$

Οι εξισώσεις 12 και 14 είναι σε συμφωνία με τις αντίστοιχες εξισώσεις 4 και 5 σε pH 5 επιβεβαιώνοντας την καλύτερη απόδοση της σύνθετης παραμέτρου $\varphi_{0_{7.4\text{οξικό}}}$.

➤ **Βαθμιδωτή έκλουση**

Στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου / αμμωνία ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$) συγκέντρωσης $C = 50 \text{ mM}$ και οργανικός τροποποιητής το ακετονιτρίλιου με ροή κινητής φάσης: $1 \text{ mL} / \text{min}$. Τα στάδια του προγράμματος εμφανίζονται στον Πίνακα 22.

Πίνακας 22: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.

pH = 7.4		
Χρόνος	A = Ρυθμιστικό διάλυμα	B = Οργανικός τροποποιητής
0 – 5 min	A = 100%	B = 0%
5 – 10 min	A = 40%	B = 60%
10 – 13.5 min	A = 40%	B = 60%
13.5 – 14 min	A = 100%	B = 0%
14 – 16 min	A = 100%	B = 0%

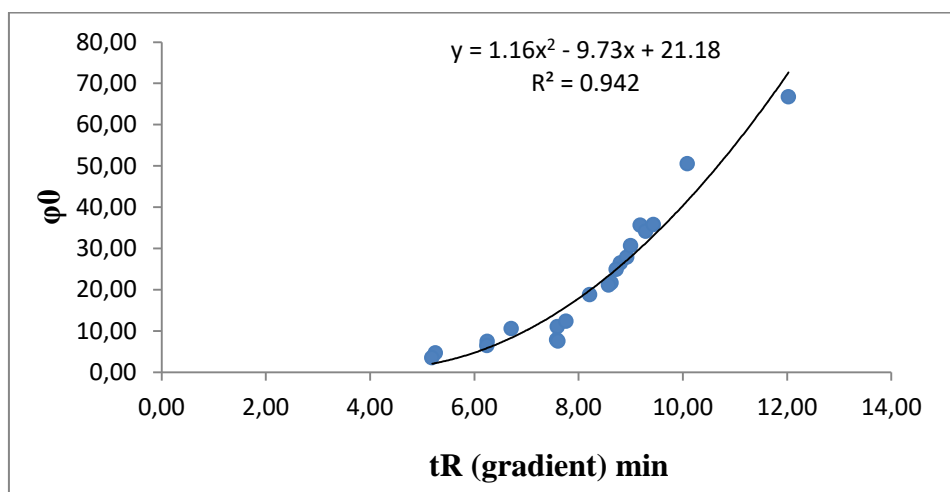
Από την εφαρμογή βαθμιδωτής έκλουσης σύμφωνα με το πρόγραμμα του Πίνακα 22, καταγράφηκε ο χρόνος έκλουσης των 21 χημικών ενώσεων. Στον Πίνακα 23 καταγράφονται οι χρόνοι συγκράτησης t_R .

Πίνακας 23: Οι χημικές ενώσεις, χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης και τιμές $\phi_{07.4\text{οξικό}}$ για την κάθε χημική ένωση

Αναλύτες		Χρόνος (t_R gradient) min
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	6.25
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	8.22
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	5.25
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	12.03
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	8.81
9	Τετραζόλιο III	9.19
8	Τετραζόλιο IV	8.63
7	Τετραζόλιο II	6.25
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	7.60
18	Μεφαιναμικό οξύ	10.09
10	Λοσαρτάνη	9.29
1	Σαλικυλικό οξύ	7.76
11	Βαλσαρτάνη	8.73
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	8.58
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	7.58
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	6.71
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	5.19
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	7.61

20	Πικρικό οξύ	9.44
19	Κετοπροφαίνη	8.93
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	9.00

Η συσχέτιση των τιμών $\phi_{7.40\xi\kappa\omicron}$ με τον χρόνο συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης (t_R) εμφάνισε καμπύλη αντι της γραμμικής ευθείας του αντίστοιχου διαγράμματος σε συνθήκες pH = 5.0. Η κύρτωση παρατηρείται για $t_R < 7.58$. Στο Σχήμα 14 αναπαρίσταται η καμπύλη.



Σχήμα 14: Ο χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης (t_R gradient) έναντι των τιμών $\phi_{7.40\xi\kappa\omicron}$ ισοκρατικών εκλούσεων για τις 21 χημικές ενώσεις.

Εξάγεται παραβολική σχέση ως προς t_R^2 (εξίσωση 15) με καλά στατιστικά στοιχεία.

$$\text{CHI}_{7.40\xi\kappa\omicron} = 1.16(\pm 0.24) t_R^2 - 9.73(\pm 4.03) t_R + 21.18 (\pm 16.42) \quad (15)$$

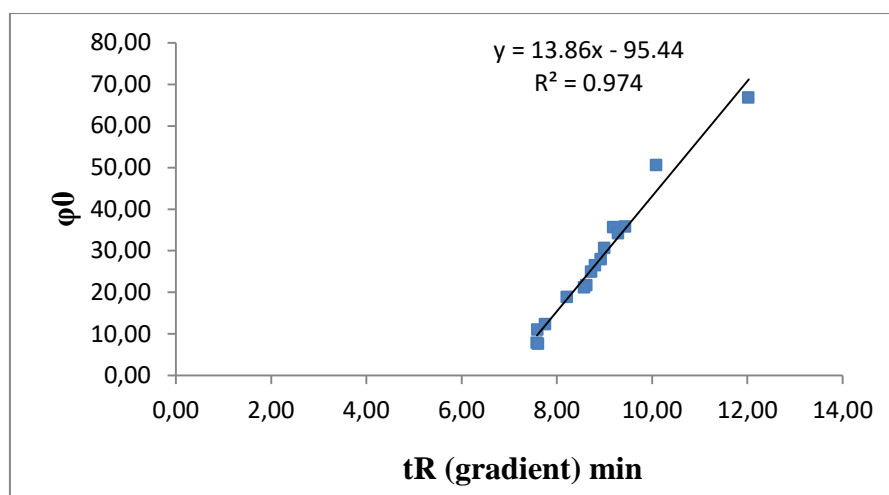
$$N = 21 \quad R^2 = 0.942 \quad R = 0.970 \quad s = 4.16$$

Με βάση την εξίσωση 15, υπολογίζονται οι τιμές $\text{CHI}_{7.40\xi\kappa\omicron}$ των υπολοίπων προς εξέταση χημικών ενώσεων και συγκρίνονται με τις πειραματικές τιμές (Πίνακας 24).

Πίνακας 24: Οι τιμές CHI και φ0 και την απόκλιση τιμών των αντίστοιχων ενώσεων.

Αναλύτες		CHI _{7.4οξικό}	φ0 _{7.4οξικό}	Απόκλιση
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	5.89	7.48	-1.59
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	19.90	18.82	1.08
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	2.22	4.69	-2.47
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	72.67	66.75	5.92
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	25.85	26.47	-0.62
9	Τετραζόλιο III	30.14	35.63	-5.49
8	Τετραζόλιο IV	23.93	21.67	2.26
7	Τετραζόλιο II	5.86	6.43	-0.57
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	14.50	11.01	3.49
18	Μεφαιναμικό οξύ	41.59	50.51	-8.92
10	Λοσαρτάνη	31.33	34.16	-2.83
1	Σαλικυλικό οξύ	15.82	12.32	3.50
11	Βαλσαρτάνη	24.99	24.94	0.06
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	23.47	21.14	2.32
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	14.39	7.85	6.54
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	8.36	10.56	-2.19
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	2.07	3.48	-1.41
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	14.61	7.59	7.02
20	Πικρικό οξύ	33.09	35.80	-2.70
19	Κετοπροφαίνη	27.19	27.90	-0.70
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	28.01	30.63	-2.63

Διαπιστώνεται για χρόνο συγκράτησης (t_R) < 7.58 κλίση της καμπύλης $\phi_{07.4οξικό} / t_R$ βρίσκεται κοντά στο 0. Ως εκ τούτου επαναλαμβάνεται η αντίστοιχη επεξεργασία για τις ενώσεις με $t_R > 7.58$ min. Αποκλείονται οι 5 πιο υδρόφιλες ενώσεις οπότε λαμβάνεται η γραμμική απεικόνιση του Σχήματος 15.



Σχήμα 15: Ο χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης (t_R gradient) έναντι των τιμών $\phi_{0,7.4οξικό}$ ισοκρατικών εκλούσεων για τις 16 χημικές ενώσεις.

Η συσχέτιση των τιμών οδηγεί στην εξίσωση 16 με πολύ καλά στατιστικά στοιχεία:

$$CHI_{7.4οξικό} = 13.86 (\pm 0.61) tR - 95.44 (\pm 5.42) \quad (16)$$

$$N = 16 \quad R^2 = 0.974 \quad R = 0.987 \quad s = 2.63$$

Με βάση την εξίσωση 16, υπολογίζονται οι τιμές $CHI_{7.4οξικό}$ όλων των χημικών ενώσεων και συγκρίνονται με τις πειραματικές τιμές (Πίνακας 25).

Πίνακας 25: Οι τιμές $CHI_{7.4οξικό}$ και $\phi_{0,7.4οξικό}$ και την απόκλιση τιμών των αντίστοιχων ενώσεων.

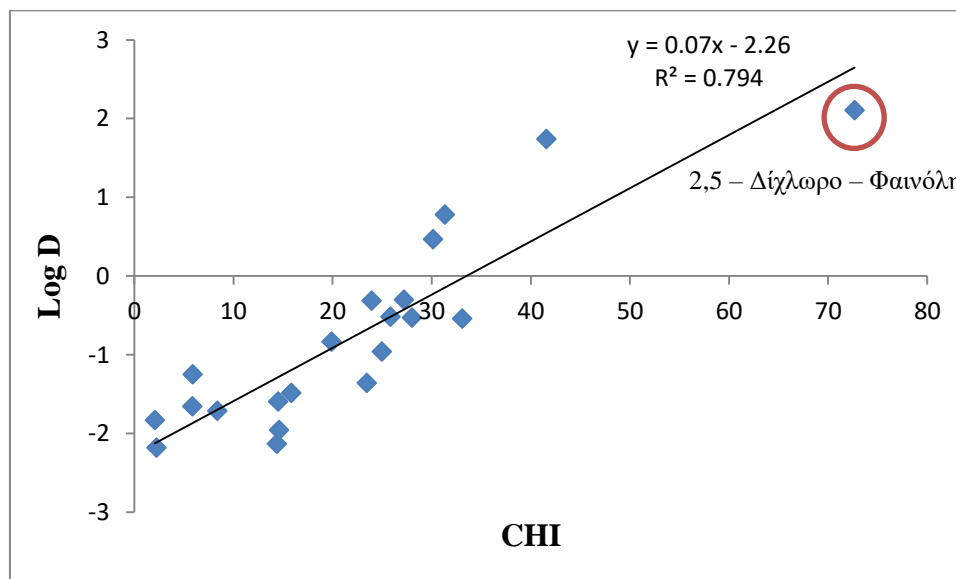
Αναλύτες		$CHI_{7.4οξικό}$	$\phi_{0,7.4οξικό}$	Απόκλιση
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	18.42	18.82	0.39
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	71.22	66.75	-4.47
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	26.59	26.47	-0.12
9	Τετραζόλιο III	31.88	35.63	3.75
8	Τετραζόλιο IV	24.08	21.67	-2.40
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	9.82	11.01	1.19
18	Μεφαιναμικό οξύ	44.35	50.51	6.16
10	Λοσαρτάνη	33.28	34.16	0.88
1	Σαλικυλικό οξύ	12.06	12.32	0.26
11	Βαλσαρτάνη	25.48	24.94	-0.54
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	23.45	21.14	-2.31
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	9.63	7.85	-1.78
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	10.00	7.59	-2.42
20	Πικρικό οξύ	35.30	35.80	0.49

19	Κετοπροφαίνη	28.29	27.90	-0.39
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	29.30	30.63	1.33
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-8.82	7.48	16.30
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	-22.66	4.69	27.35
7	Τετραζόλιο ΙΙ	-8.91	6.43	15.34
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-2.44	10.56	13.00
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-23.53	3.48	27.01

Τα 5 υδρόφιλα οξέα δίνουν αρνητικές τιμές $CHI_{7.4οξικό}$, γεγονός που δεν έχει φυσική έννοια. Ως εκ τούτου στις περαιτέρω συσχετίσεις με τις τιμές $\log D_{7.4}$ χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές $CHI_{7.4οξικό}$ που ελήφθησαν από την παραβολική σχέση (εξίσωση 16).

1.3.1.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CHI ΜΕ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ $\log D_{7.4}$

Για την συσχέτιση των τιμών $\log D_{7.4}$ χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές $CHI_{7.4οξικό}$ που υπολογίστηκαν από την παραβολική εξίσωση 16. Στο Σχήμα 16 αναπαρίσταται η συσχέτιση τιμών $CHI_{7.4οξικό} - \log D_{7.4}$.



Σχήμα 16: Τιμές $CHI_{7.4οξικό}$ των εξεταζόμενων φαρμάκων σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{7.4}$.

Λαμβάνεται η εξίσωση 17 με μέτρια στατιστικά αποτελέσματα.

$$\text{Log } D_{7.4} = 0.068 (\pm 0.008) \text{ CHI}_{7.4\text{οξικό}} - (\pm 0.214) 2.264 \quad (17)$$

$$N = 21 \quad R^2 = 0.794 \quad R = 0.891 \quad s = 0.56$$

Με βάση την εξίσωση 17, υπολογίζονται οι τιμές $\log D_{7.4}$ των χημικών ενώσεων και συγκρίνονται με τις πειραματικές τιμές (Πίνακας 26).

Πίνακας 26: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D_{7.4}$ (υπολ.) και οι πειραματικές τιμές $\log D_{7.4}$ και η απόκλιση τιμών των αντίστοιχων ενώσεων.

Αναλύτες		Log $D_{7.4}$ (υπολ.)	Log $D_{7.4}$	Απόκλιση
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-1.87	-1.25	-0.62
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	-0.92	-0.83	-0.09
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	-2.11	-2.18	0.07
21	2,5 – Διγλωρο – Φαινόλη	2.65	2.11	0.54
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-0.52	-0.52	0.00
9	Τετραζόλιο III	-0.23	0.47	-0.70
8	Τετραζόλιο IV	-0.65	-0.31	-0.33
7	Τετραζόλιο II	-1.87	-1.65	-0.21
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.28	-1.60	0.31
18	Μεφαιναμικό οξύ	0.55	1.74	-1.19
10	Λοσαρτάνη	-0.15	0.78	-0.93
1	Σαλικυλικό οξύ	-1.19	-1.48	0.29
11	Βαλσαρτάνη	-0.57	-0.96	0.38
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	-0.68	-1.36	0.68
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	-1.29	-2.13	0.84
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.70	-1.71	0.01
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-2.12	-1.83	-0.30
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	-1.28	-1.96	0.68
20	Πικρικό οξύ	-0.03	-0.54	0.51
19	Κετοπροφαίνη	-0.43	-0.30	-0.12
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-0.37	-0.53	0.16

Σύμφωνα με Πίνακα 26 διαπιστώνονται:

- 12 αποδεκτές τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)
- 8 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)
- 1 μη αποδεκτές τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)

Από το Σχήμα 16 φαίνεται η 2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη να εκμοχλεύει την ευθεία παλινδρόμησης με αποτέλεσμα μείωση της κλίσης. Αφαιρώντας την 2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη λαμβάνεται η εξίσωση 18 με μικρή μείωση του συντελεστή συσχέτισης:

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{7.4} &= 0.08 (\pm 0.01) \text{ CHI}_{7.4\text{οξικό}} - (\pm 0.25) 2.48 & (18) \\ N &= 20 & R^2 &= 0.739 & R &= 0.860 & s &= 0.54 \end{aligned}$$

1.3.2 Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών αλάτων (κορεσμένα σε οκτανόλη) / Μεθανόλη (προσθήκη 0.25% οκτανόλη)

Η συσχέτιση τιμών $\log k_{w7.4\text{φωσφ.}} - \log D_{7.4}$ για συνθήκες $\text{pH} = 7.4$ έχει εξεταστεί ενδελεχώς για ισοκρατικές συνθήκες σε προηγούμενες μελέτες. Οι βέλτιστες συνθήκες αφορούσαν σε κινητή φάση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (κορεσμένο σε οκτανόλη) / μεθανόλη ως οργανικό τροποποιητή και προσθήκη 0.25% οκτανόλη στον όγκο της μεθανόλης και στατική φάση είτε BDS είτε ABZ+ [11].

Οι συντελεστές προσδιορισμού ήταν αρκετά χαμηλοί. Ωστόσο με διαχωρισμό των οξέων σε δυο ομάδες, ισχυρά οξέα ($\text{pKa} < 4$) και ασθενή οξέα ($\text{pKa} > 4$), ελήφθησαν διαφορετικές εξισώσεις με καλά στατιστικά στοιχεία.

Στη παρούσα μελέτη εφαρμόζονται οι ίδιες συνθήκες για τον υπολογισμό των τιμών $\text{CHI}_{7.4\text{φωσφ.}}$ στην προσπάθεια βελτιστοποίησης των μεθόδων προσδιορισμού λιποφιλίας όξινων χημικών ενώσεων.

➤ Ισοκρατικές συνθήκες

IX. Η χρωματογραφική στήλη:

- ABZ+ 15cm x 4.6mm ID, σωματίδια 5μm

X. Ρυθμιστικό διάλυμα

- Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών κορεσμένο σε δ/μα οκτανόλης (PO_4^{3-}) συγκέντρωσης $C = 0.2 \text{ M}$

XI. Οργανικός τροποποιητής

- Μεθανόλη (προσθήκη 0.25% οκτανόλη στον όγκο της μεθανόλης)

XII. Ροή κινητής φάσης: 1 mL / min

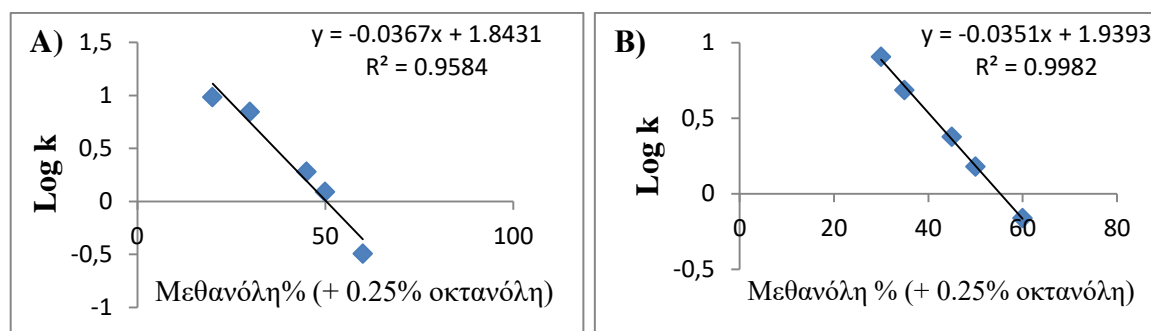
Η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση αναφέρεται στον Πίνακα 2.

Προσδιορίστηκαν οι τιμές $\log k_{7.4\text{φωσφ.}}$ σε τουλάχιστον 5 αναλογίες μεθανόλης (Πίνακας 27) και ελήφθησαν οι ανηγμένες τιμές $\log k_{w7.4\text{φωσφ.}}$.

Πίνακας 27: Αναφέρονται οι αναλογίες ρυθμιστικού διαλύματος – οργανικού τροποποιητή των κινητών φάσεων για τον υπολογισμό των ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4\text{φωσφ.}}$ (για τον κάθε αναλύτη).

Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (κορ. σε οκτανόλη) – Μεθανόλη (+ 0.25% οκτανόλη)				
40 / 60	45 / 55	50 / 50	55 / 45	60 / 40
65 / 35	70 / 30	75 / 25	80 / 20	85 / 15
88 / 12	90 / 10	93 / 7	95 / 5	98 / 2
99.2 / 0.8	99.5 / 0.5	99.8 / 0.2		

Στο Σχήμα 17 φαίνονται οι απεικονίσεις $\log k_{7.4\text{φωσφ.}} / \varphi_{7.4\text{φωσφ.}}$ (ποσοστό οργανικού τροποποιητή) δυο αντιπροσωπευτικές ενώσεις.



Σχήμα 17: Ισοκρατική έκκλιση σε $\text{pH} = 7.4$ για τα οξέα A) Βαλσαρτάνη ($\text{Log } D_{7.4} = -0.96$) και B) Τετραζόλιο III ($\text{Log } D_{7.4} = 0.47$).

Στο Σχήμα 17 παρατηρείται ικανοποιητική συσχέτιση των τιμών $\log k_{7.4\text{φωσφ.}} / \varphi_{7.4\text{φωσφ.}}$ με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται αξιόπιστη η εξαγωγή ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4\text{φωσφ.}}$.

Πίνακας 28: Εξεταζόμενες χημικές ενώσεις, οι τιμές R^2 , ο λογαριθμικός παράγοντας συγκράτησης ($\log k_{w7.4\text{φωσφ.}}$), η κλίση ευθείας (S) των γραφικών παραστάσεων ισοκρατικής έκλυσης και τη τυπική απόκλιση αντίστοιχα.

Αναλύτες		Log $k_{w7.4\text{φωσφ.}}$	\pm	S	\pm	R^2
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	0.00	0.02	-0.0289	0.003	0.9948
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	0.83	0.05	-0.0222	0.003	0.9677
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	-0.22*	-	-	-	-
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	2.40	0.18	-0.0329	0.004	0.9743
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	1.10	0.04	-0.0208	0.002	0.9851
9	Τετραζόλιο III	1.94	0.04	-0.0351	0.001	0.9982
8	Τετραζόλιο IV	1.17	0.09	-0.0346	0.006	0.9621
7	Τετραζόλιο II	0.09	0.01	-0.0380	0.002	0.9955
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	0.30	0.02	-0.0305	0.004	0.9613
18	Μεφαιναμικό οξύ	2.86	0.07	-0.0408	0.001	0.9961
10	Λοσαρτάνη	2.89	0.06	-0.0495	0.001	0.9982
1	Σαλικυλικό οξύ	0.32	0.00	-0.0284	0.000	0.9997
11	Βαλσαρτάνη	1.84	0.19	-0.0367	0.004	0.9584
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	0.70	0.08	-0.0299	0.006	0.9155
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	-0.10	0.06	-0.0388	0.012	0.9946
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	0.22	0.01	-0.0298	0.002	0.9908
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	0.11*	-	-	-	-
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	0.01	0.02	-0.0502	0.004	0.9847
20	Πικρικό οξύ	0.96	0.03	-0.0141	0.001	0.9623
19	Κετοπροφαίνη	1.66	0.10	-0.0328	0.002	0.9871
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	1.35	0.04	-0.0212	0.002	0.9744

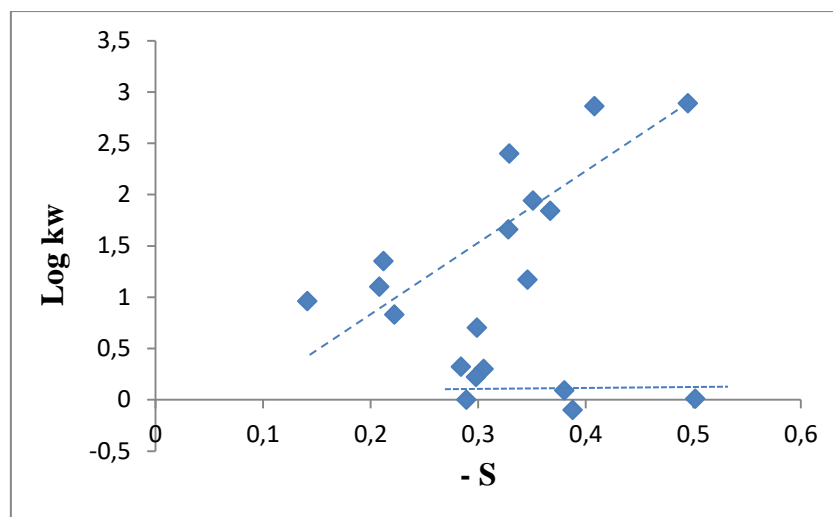
*Οι τιμές προσδιορίστηκαν σε 100% υδατική φάση

Οι τιμές $\log k_{w7.4\text{φωσφ.}}$ που προσδιορίστηκαν στις ανωτέρω συνθήκες εμφάνισαν μέτρια συσχέτιση με τις αντίστοιχες τιμές $\log k_{w7.4\text{οξικό}}$.

$$\text{Log } k_{w(\text{φωσφορικών})} = 1.16 (\pm 0.25) \text{ Log } k_{w(\text{οξικό αμμώνιο αμμωνία})} - 0.35 (\pm 0.34) \quad (19)$$

$$N = 19 \quad R^2 = 0.567 \quad R = 0.753 \quad s = 0.65$$

Στο Σχήμα 18 εξετάζεται η συσχέτιση των ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4\text{φωσφ.}}$ και της κλίσης της ευθείας παλινδρόμησης.



Σχήμα 18: Ανηγμένες τιμές $\log k_{w7.4\varphi\omega\sigma\varphi}$ και οι αντίστοιχες απόλυτες τιμές των κλίσεων ισοκρατικών εκλούσεων.

Σύμφωνα με το Σχήμα 18 διαφαίνεται μια τάση για τις ενώσεις με τιμές $\log k_w > 0.5$, υποδηλώνοντας ομοιόμορφο μηχανισμό συγκράτησης. Για ενώσεις με χαμηλότερη συγκράτηση διαπιστώνεται ευθεία γραμμή με κλίση 0. Για τις ενώσεις αυτές (επισημασμένες με γκρί στον Πίνακα 28) έχουν χρησιμοποιηθεί πολύ μικρά ποσοστά οργανικού τροποποιητή, γεγονός που καθιστά λιγότερο αξιόπιστη τη σχέση $\log k_{7.4\varphi\omega\sigma\varphi} / \varphi_{7.4\varphi\omega\sigma\varphi}$ και είναι προτιμότερο η συγκράτηση να προσδιορίζεται με 100% υδατική φάση. Οι περιπτώσεις αυτές καταδεικνύουν περιορισμό της προσέγγισης $CHI_{7.4\varphi\omega\sigma\varphi}$ που στηρίζεται στην παρουσία οργανικού τροποποιητή.

Από τον τύπο $\text{Log } k_{7.4\varphi\omega\sigma\varphi} = -S\varphi + \text{Log } k_{w7.4\varphi\omega\sigma\varphi}$ υπολογίζονται οι τιμές $\varphi_{7.4\varphi\omega\sigma\varphi}$ που αντιστοιχούν σε ισοκατανομή των αναλυτών μεταξύ στατικής και κινητής φάσης ($k = 1$, $\text{Log } k = 0$). Στον Πίνακα 23 αναγράφονται οι τιμές φ_0 για τις υπο μελέτη ενώσεις. Η υδρόφιλη ένωση 2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ με την χαμηλότερη τιμή $\log D_{7.4}$ (- 1.83) εμφανίζει την μικρότερη τιμή φ_0 (- 9.00) ενώ η λιπόφιλη ένωση 2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη με την μεγαλύτερη τιμή $\log D_{7.4}$ (2.11) εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή φ_0 (73.00). Για τις ενώσεις με αρνητικές τιμές $\log k_{w7.4\varphi\omega\sigma\varphi}$ θεωρήθηκε ότι δεν έχει φυσική έννοια ο προσδιορισμός των τιμών $\varphi_{7.4\varphi\omega\sigma\varphi}$. Στη περίπτωση πολύ υδρόφιλων ενώσεων είναι προτιμότερο να προσδιορίζονται απουσία οργανικού τροποποιητή.

Στον πίνακα 29 αναφέρονται οι τιμές $\varphi_{7.4\varphi\omega\sigma\varphi}$. Για λόγους σύγκρισης στον ίδιο Πίνακα αναγράφονται εκ νέου οι αντίστοιχες τιμές $\varphi_{7.4\text{οξικό}}$ που προσδιορίστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα οξεϊκό αμμώνιο – αμμωνία / ακετονιτρίλιο και οι διαφορές τους.

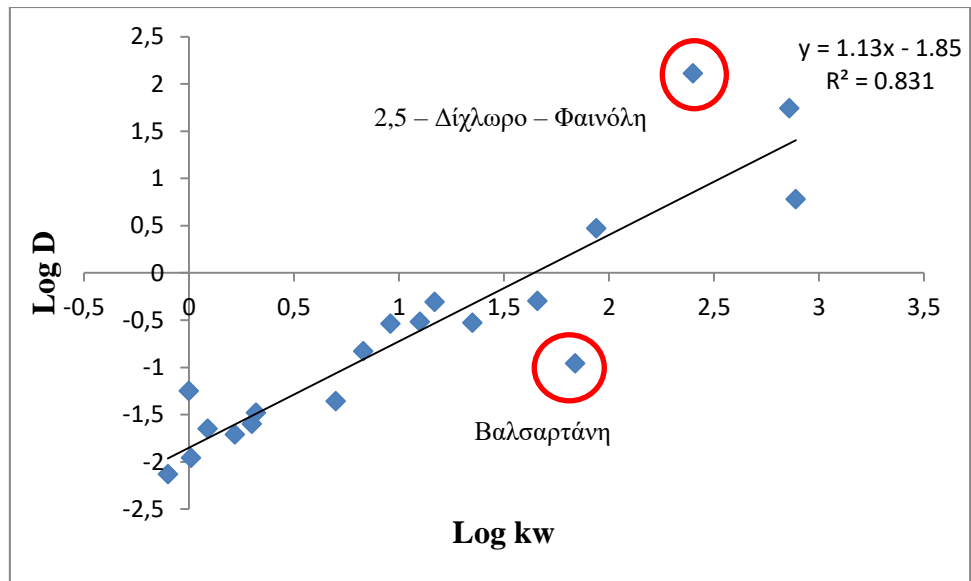
Πίνακας 29: Σύγκριση των τιμών φ0 στις διαφορετικές συνθήκες κινητής φάσης.

	Αναλύτες	φ0 (Φωσφορικά άλατα / μεθανόλη (+ 0.25% οκτανόλη)	φ0 (Οξικό αμμώνιο – οξικό οξύ / ακετονιτρίλιο)	Δφ0
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-	7.48	-
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	37.23	18.82	18.41
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	-	4.69	-
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	73.00	66.75	-6.25
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	52.76	26.47	26.29
9	Τετραζόλιο III	55.25	35.63	19.62
8	Τετραζόλιο IV	33.12	21.67	11.45
7	Τετραζόλιο II	2.49	6.43	-3.94
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	9.90	11.01	-1.11
18	Μεφαιναμικό οξύ	70.17	50.51	19.66
10	Λοσαρτάνη	58.42	34.16	24.26
1	Σαλικυλικό οξύ	11.18	12.32	-1.14
11	Βαλσαρτάνη	50.22	24.94	25.28
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	23.35	21.14	2.21
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	-	7.85	-
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	7.33	10.56	-3.23
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-	3.48	-
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	0.20	7.59	-7.39
20	Πικρικό οξύ	68.13	35.80	32.33
19	Κετοπροφαίνη	50.75	27.90	22.85
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	63.56	30.63	32.93

Οι τιμές φ0 που προσδιορίστηκαν παρουσία οξικού αμμωνίου – αμμωνίας / ακετονιτρίλιου είναι γενικά μεκρότερες από αυτές που ελήφθησαν παρουσία φωσφορικών (κορ. σε οκτανόλη) / μεθανόλης(+ 0.25% οκτανόλη) με εξαίρεση αυτές που αφορούν στις υδρόφιλες ενώσεις για τις οποίες ήδη έχει επισημανθεί η χαμηλή αξιοπιστία του προσδιορισμού της συγκράτησης παρουσία οργανικού τροποποιητή (με γκρι στον Πίνακα 29).

1.3.2.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΚΤΑΝΟΛΗ / ΝΕΡΟ (Log D_{7,4})

Οι τιμές log k_{w7.4φωσφ.} με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (κορεσμένο σε οκτανόλη) και οργανικό τροποποιητή μεθανόλη (+0.25% οκτανόλη) συσχετίζονται αρκετά ικανοποιητικά με τις τιμές log D_{7,4} όπως φαίνεται από το Σχήμα 19 και την εξίσωση



Σχήμα 19: Τιμές $\log k_{w7.4\text{φωσφ.}}$ των εξεταζόμενων φαρμάκων σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{7.4}$.

Από την συσχέτιση των τιμών $\log k_{w7.4\text{φωσφ.}}$ - $\log D_{7.4}$ εξάγεται η εξίσωση 20 με χαμηλή τιμή συντελεστή συσχέτισης.

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{7.4} &= 1.13 (\pm 0.12) \text{Log } k_{w7.4\text{φωσφ.}} - 1.85 (\pm 0.18) & (20) \\ N &= 19 & R^2 = 0.831 & R = 0.912 & s = 0.50 \end{aligned}$$

Για λόγους σύγκρισης εξάγεται μέσω της εξίσωσης 21 η συσχέτιση τιμών $\log k_{w7.4\text{φωσφ.}}$ - $\log D_{7.4}$ για τον αριθμό οξέων που χρησιμοποιήθηκαν σε συνθήκες $\text{pH} = 5.0$.

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{7.4} &= 1.13 (\pm 0.14) \text{Log } k_{w7.4\text{φωσφ.}} - 1.83 (\pm 0.22) & (21) \\ N &= 14 & R^2 = 0.827 & R = 0.909 & s = 0.56 \end{aligned}$$

Στις εξισώσεις 20 και 21 έκτροπη τιμή αποτελεί η 2,5 - Διγλωρο - Φαινόλη, η οποία αποτελεί ασθενές οξύ. Σύμφωνα με τους Γιαγκίνη και συν. [11] τα ασθενή οξέα προσαρμόζονται σε διαφορετική εξίσωση. Αποκλείοντας την ένωση αυτή από την ανάλυση λαμβάνεται η εξίσωση 22 με μικρή βελτίωση των στατιστικών στοιχείων.

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{7.4} &= 1.01 (\pm 0.10) \text{Log } k_{w7.4\text{φωσφ.}} - 1.80 (\pm 0.14) & (22) \\ N &= 18 & R^2 = 0.862 & R = 0.928 & s = 0.39 \end{aligned}$$

Μεγάλη απόκλιση εμφανίζει και η Βαλσαρτάνη, για λόγους που δεν είναι προφανείς. Οι εξισώσεις 14 και 16 επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών μας για την εύρεση βέλτιστων συνθηκών χρωματογραφικού προσδιορισμού της λιποφιλίας όξινων ενώσεων. Στον Πίνακα 30 παρουσιάζονται οι τιμές $\log D_{7.4}$ που υπολογίζονται με την εξίσωση 22 και συγκρίνονται με τις πειραματικές τιμές.

Πίνακας 30: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D_{7.4}$ (υπολ.) και οι πειραματικές τιμές $\log D_{7.4}$ των αντίστοιχων ενώσεων και η αντίστοιχη απόκλιση.

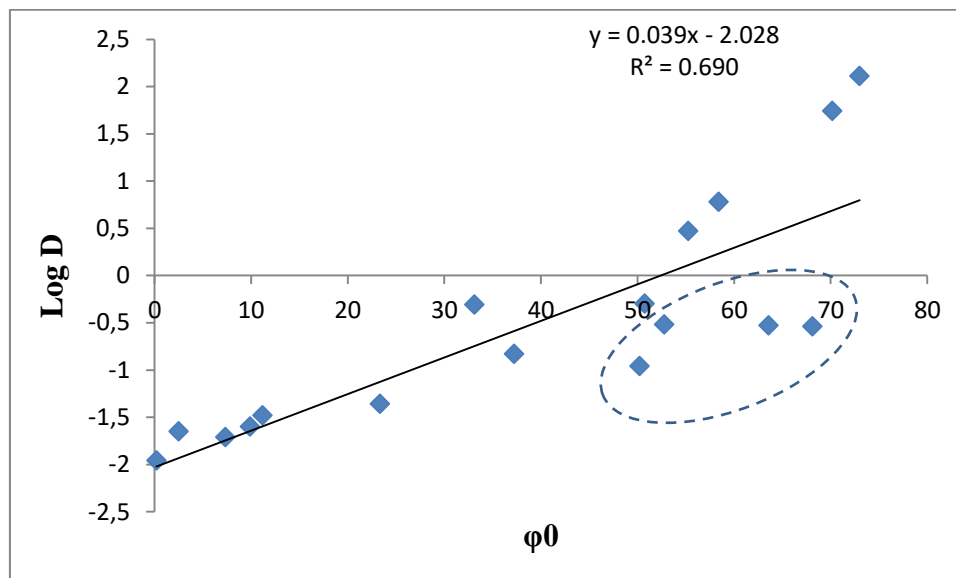
Αναλύτες		Log $D_{7.4}$ (υπολ.)	Log $D_{7.4}$	Απόκλιση
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-1.80	-1.25	-0.55
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	-0.96	-0.83	-0.13
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-0.69	-0.52	-0.17
9	Τετραζόλιο III	0.15	0.47	-0.32
8	Τετραζόλιο IV	-0.62	-0.31	-0.31
7	Τετραζόλιο II	-1.71	-1.65	-0.06
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.50	-1.60	0.10
18	Μεφαιναμικό οξύ	1.08	1.74	-0.66
10	Λοσαρτάνη	1.11	0.78	0.33
1	Σαλικυλικό οξύ	-1.48	-1.48	0.00
11	Βαλσαρτάνη	0.05	-0.96	1.01
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	-1.10	-1.36	0.26
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	-1.90	-2.13	0.23
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.58	-1.71	0.13
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	-1.79	-1.96	0.17
20	Πικρικό οξύ	-0.83	-0.54	-0.29
19	Κετοπροφαίνη	-0.13	-0.30	0.17
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-0.44	-0.53	0.09

Σύμφωνα με τον Πίνακα 30 προκύπτουν:

- 15 αποδεκτές τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)
- 2 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)
- 1 μη αποδεκτές τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)

Η συσχέτιση τιμών $\log k_{w7.4\text{φωσφ.}} - \log D_{7.4}$ σε $\text{pH} = 7.4$ παρουσιάζει τις μικρότερες αποκλίσεις από τις πειραματικές τιμές $\log D_{7.4}$ συγκριτικά με τις τιμές $\log k_{w7.4\text{οξικό.}}$

Στη συνέχεια παρατίθενται τα διαγράμματα $\log D_{7.4} - \varphi_{0_{7.4\text{φωσφ.}}}$. Η συσχέτιση οδηγεί στην εξίσωση 23 για το Σχήμα 20 με μικρότερο συντελεστή συσχέτισης από τους αντίστοιχους συντελεστές των εξισώσεων 20 και 21.



Σχήμα 20: Τιμές $\varphi_{0_{7.4\text{φωσφ.}}}$ σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{7.4}$.

Το 4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ, το 5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ η Βαλσαρτάνη και το Πικρικό οξύ δεν προσαρμόζονται στην ευθεία και αποτελούν έκτροπες τιμές.

Η συσχέτιση των τιμών $\varphi_{0_{7.4\text{φωσφ.}}} - \log D_{7.4}$ σε συνθήκες $\text{pH} = 7.4$ οδηγεί στην εξίσωση 23 με χαμηλό συντελεστή συσχέτισης.

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{7.4} &= 0.039 (\pm 0.007) \varphi_{0_{7.4\text{φωσφ.}}} - 2.028 (\pm 0.311) & (23) \\ N &= 17 & R^2 &= 0.690 & R &= 0.831 & s &= 0.68 \end{aligned}$$

Για λόγους σύγκρισης εξάγεται μέσω της εξίσωσης 24 η συσχέτιση τιμών $\log k_{w7.4\text{φωσφ.}} - \log D_{7.4}$ για τον αριθμό οξέων που χρησιμοποιήθηκαν σε συνθήκες $\text{pH} = 5.0$.

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{7.4} &= 0.048 (\pm 0.007) \varphi_{0_{7.4\text{φωσφ.}}} - 2.191 (\pm 0.300) & (24) \\ N &= 13 & R^2 &= 0.818 & R &= 0.905 & s &= 0.58 \end{aligned}$$

Αφαιρώντας τις 4 έκτροπες τιμές του Σχήματος 20 προκύπτει η εξίσωση 25 με εμφανώς καλύτερα στατιστικά στοιχεία.

$$\text{Log } D_{7.4} = 0.050 (\pm 0.004) \varphi_{0_{7.4\text{φωσφ.}}} - 2.140 (\pm 0.179) \quad (25)$$

$$N = 13 \quad R^2 = 0.925 \quad R = 0.962 \quad s = 0.39$$

Στον Πίνακα 31 παρουσιάζονται οι τιμές $\log D_{7.4}$ που υπολογίζονται με την εξίσωση 23 και συγκρίνονται με τις πειραματικές τιμές.

Πίνακας 31: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D_{7.4}$ (υπολ.) και οι πειραματικές τιμές $\log D_{7.4}$ των αντίστοιχων ενώσεων και η αντίστοιχη απόκλιση.

Αναλύτες		Log $D_{7.4}$ (υπολ.)	Log $D_{7.4}$	Απόκλιση
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	-0.59	-0.83	0.24
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	0.80	2.11	-1.31
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	0.01	-0.52	0.53
9	Τετραζόλιο III	0.11	0.47	-0.36
8	Τετραζόλιο IV	-0.75	-0.31	-0.44
7	Τετραζόλιο II	-1.93	-1.65	-0.28
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.65	-1.60	-0.05
18	Μεφαιναμικό οξύ	0.69	1.74	-1.05
10	Λοσαρτάνη	0.23	0.78	-0.55
1	Σαλικυλικό οξύ	-1.60	-1.48	-0.12
11	Βαλσαρτάνη	-0.08	-0.96	0.88
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	-1.12	-1.36	0.24
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.74	-1.71	-0.03
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	-2.02	-1.96	-0.06
20	Πικρικό οξύ	0.61	-0.54	1.15
19	Κετοπροφαίνη	-0.06	-0.30	0.24
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	0.43	-0.53	0.96

Σύμφωνα με τον Πίνακα 31 διαπιστώνονται:

- 10 αποδεκτές τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)
- 4 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)
- 3 μη αποδεκτές τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)

➤ **Βαθμιδωτή έκλυση**

Στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών κορεσμένο σε δ/μα οκτανόλης (PO_4^{3-}) συγκέντρωσης $C = 0.2 \text{ M}$ και οργανικός τροποποιητής μεθανόλη (προσθήκη 0.25% στον όγκο της μεθανόλης) με ροή κινητής φάσης: $1 \text{ mL} / \text{min}$. Τα στάδια του προγράμματος εμφανίζονται στον Πίνακα 32.

Πίνακας 32: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης.

pH = 7.4		
Χρόνος	A = Ρυθμιστικό διάλυμα	B = Οργανικός τροποποιητής
0 – 5 min	A = 100%	B = 0%
5 – 10 min	A = 40%	B = 60%
10 – 13.5 min	A = 40%	B = 60%
13.5 – 14 min	A = 100%	B = 0%
14 – 16 min	A = 100%	B = 0%

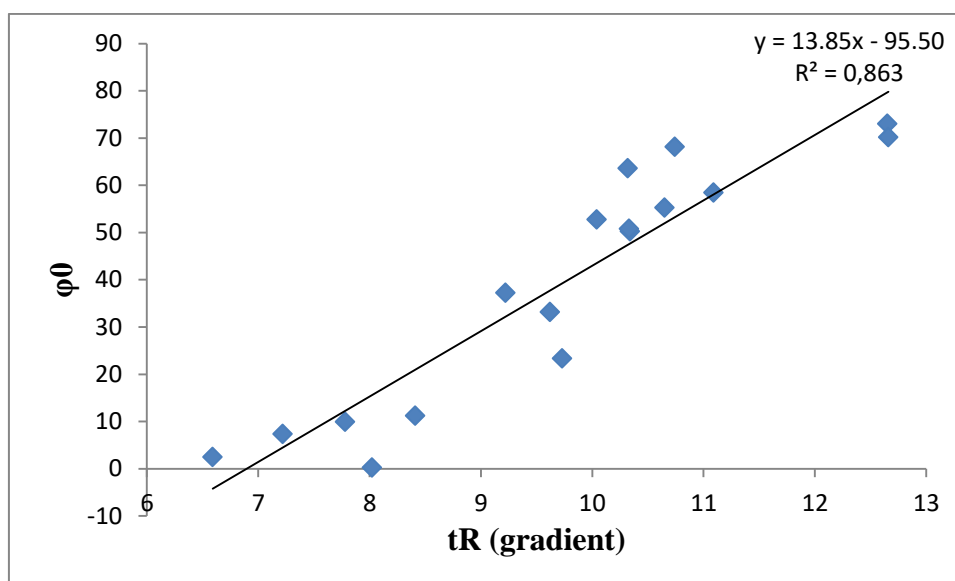
Από την εφαρμογή βαθμιδωτής έκλυσης σύμφωνα με το πρόγραμμα του Πίνακα 32, καταγράφηκε ο χρόνος έκλυσης των 21 χημικών ενώσεων. Στον Πίνακα 33 καταγράφονται οι χρόνοι συγκράτησης t_R .

Πίνακας 33: Οι χημικές ενώσεις, χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλυσης για την κάθε χημική ένωση

Αναλύτες		Χρόνος (t_R gradient) min
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	6.48
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	9.22
4	2,5 – Διοξυ – Βενζοϊκό οξύ	5.79
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	12.65
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	10.04
9	Τετραζόλιο III	10.65
8	Τετραζόλιο IV	9.62
7	Τετραζόλιο II	6.59
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	7.78
18	Μεφαιναμικό οξύ	12.66
10	Λοσαρτάνη	11.09
1	Σαλικυλικό οξύ	8.41
11	Βαλσαρτάνη	10.34
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	9.73
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	8.02
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	7.22
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	4.96

5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	8.02
20	Πικρικό οξύ	10.74
19	Κετοπροφαίνη	10.33
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	10.32

Η συσχέτιση των τιμών $\varphi_{0_{7.4\varphi\omega\sigma\varphi}}$ με τον χρόνο συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης (t_R) δεν εμφάνισε καμπύλη όπως παρατηρήθηκε στο αντίστοιχο διάγραμμα σε συνθήκες οξικού αμμωνίου ($\text{pH} = 7.4$). Στο Σχήμα 21 αναπαρίσταται η σχέση t_R (gradient) – $\varphi_{0_{7.4\varphi\omega\sigma\varphi}}$.



Σχήμα 21: Ο χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης (t_R gradient) έναντι των τιμών $\varphi_{0_{7.4\varphi\omega\sigma\varphi}}$ ισοκρατικών εκλούσεων για τις 17 χημικές ενώσεις.

Εξάγεται σχέση ως προς t_R (εξίσωση 26) με καλά στατιστικά στοιχεία.

$$\text{CHI}_{7.4\varphi\omega\sigma\varphi} = 13.85 (\pm 1.42) t_R - 97.50 (\pm 14.04) \quad (26)$$

$$N = 17 \quad R^2 = 0.863 \quad R = 0.929 \quad s = 9.74$$

Με βάση την εξίσωση 26, υπολογίζονται οι τιμές $\text{CHI}_{7.4\varphi\omega\sigma\varphi}$ των υπολοίπων προς εξέταση χημικών ενώσεων και συγκρίνονται με τις πειραματικές τιμές (Πίνακας 34).

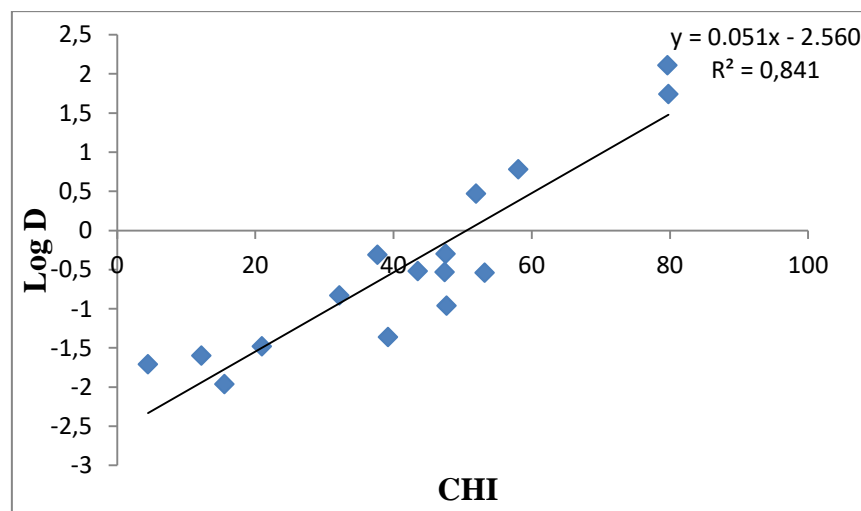
Πίνακας 34: Οι τιμές $CHI_{7.4\text{φωσφ.}}$ και $\phi_{7.4\text{φωσφ.}}$ και την απόκλιση τιμών των αντίστοιχων ενώσεων.

Αναλύτες		$CHI_{7.4\text{φωσφ.}}$	$\phi_{7.4\text{φωσφ.}}$	Απόκλιση
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	32.18	37.23	-5.05
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	79.67	73.00	6.67
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	43.53	52.76	-9.23
9	Τετραζόλιο III	51.98	55.25	-3.27
8	Τετραζόλιο IV	37.71	33.12	4.59
7	Τετραζόλιο II	-4.24	2.49	-6.73
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	12.23	9.90	2.33
18	Μεφαιναμικό οξύ	79.81	70.17	9.64
10	Λοσαρτάνη	58.07	58.42	-0.35
1	Σαλικυλικό οξύ	20.96	11.18	9.78
11	Βαλσαρτάνη	47.69	50.22	-2.53
17	2 – Βενζοΐλο – Βενζοϊκό οξύ	39.24	23.35	15.89
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	4.48	7.33	-2.85
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	15.56	0.20	15.36
20	Πικρικό οξύ	53.22	68.13	-14.91
19	Κετοπροφαίνη	47.55	50.75	-3.20
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	47.41	63.56	-16.15

Το Τετραζόλιο II παρουσιάζει αρνητική τιμή $CHI_{7.4\text{φωσφ.}}$, γεγονός που δεν έχει φυσική έννοια.

1.3.2.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CHI ΜΕ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ Log D_{7.4}

Η συσχέτιση τιμών CHI_{7.4φωσφ.} – log D_{7.4} φαίνεται στο Σχήμα 22 Η αντίστοιχη εξίσωση 27 έχει μέτρια στατιστικά στοιχεία.



Σχήμα 22: Τιμές CHI_{7.4φωσφ.} των εξεταζόμενων φαρμάκων σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές log D_{7.4}.

Η καμπύλη του Σχήματος 22 είναι απόρροια της σχέσης των τιμών CHI_{7.4φωσφ.} και log D_{7.4} που εκφράζεται από την εξίσωση 27:

$$\text{Log D}_{7.4} = 0.051 (\pm 0.006) \text{ CHI}_{7.4\text{φωσφ.}} - 2.560 (\pm 0.276) \quad (27)$$
$$N = 16 \quad R^2 = 0.841 \quad R = 0.917 \quad s = 0.49$$

Από το Σχήμα 22 έχει αφαιρεθεί το Τετραζόλιο II λόγω της αρνητικής τιμής CHI_{7.4φωσφ.}. Με βάση την εξίσωση 27, υπολογίζονται οι τιμές Log D_{7.4} των υπολοίπων προς εξέταση χημικών ενώσεων και συγκρίνονται με τις πειραματικές τιμές (Πίνακας 35).

Πίνακας 35: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D_{7.4}$ (υπολ.) και οι πειραματικές τιμές $\log D_{7.4}$ και η απόκλιση τιμών των αντίστοιχων ενώσεων.

Αναλύτες		Log $D_{7.4}$ (υπολ.)	Log $D_{7.4}$	Απόκλιση
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	-0.93	-0.83	-0.10
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	1.47	2.11	-0.64
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-0.36	-0.52	0.16
9	Τετραζόλιο III	0.07	0.47	-0.40
8	Τετραζόλιο IV	-0.65	-0.31	-0.34
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.94	-1.60	-0.34
18	Μεφαιναμικό οξύ	1.48	1.74	-0.26
10	Λοσαρτάνη	0.38	0.78	-0.40
1	Σαλικυλικό οξύ	-1.50	-1.48	-0.02
11	Βαλσαρτάνη	-0.15	-0.96	0.81
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	-0.57	-1.36	0.79
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-2.33	-1.71	-0.62
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	-1.77	-1.96	0.19
20	Πικρικό οξύ	0.13	-0.54	0.67
19	Κετοπροφαίνη	-0.15	-0.30	0.15
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-0.16	-0.53	0.37

Σύμφωνα με τον Πίνακα 35 διαπιστώνονται:

- 11 αποδεκτές τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)
- 4 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)
- 0 μη αποδεκτές τιμές Log $D_{7.4}$ (υπολ.)

Πίνακας 36: Συγκριτικός πίνακας αποδεκτών, εντός ορίων και μη αποδεκτές τιμών $\log D_{7.4}$ με βάση τις εξισώσεις 11, 13, 17, 22, 23 και 27

Δ	(Log $k_{w7.4οξικό} + S$) N = 21	$\phi_{7.4οξικό}$ N = 21	CHI _{7.4οξικό} N = 21	Log $k_{w7.4φωσφ.}$ N = 18	$\phi_{7.4φωσφ.}$ N = 17	CHI _{7.4φωσφ.}} N = 16
$\Delta \leq 0.5$	13	16	12	15	10	11
$0.5 < \Delta < 1$	7	5	8	2	4	4
$\Delta > 1$	1	0	1	1	3	0

Στον Πίνακα 37 καταγράφονται οι τιμές R^2 της συσχέτισης τιμών $\log D$ με τις αντίστοιχες τιμές $\log k_w$, ϕ_0 και CHI για συνθήκες pH 5.0 και 7.4

Πίνακας 37: Οι τιμές R^2 των εξισώσεων 4, 5 και 9 για pH 5.0 και 11, 13, 17, 22, 23 και 27 για pH 7.4

	R^2
Log $k_{w5.0οξικό} + S$ N = 21	0.896
$\varphi_{5.0οξικό}$ N = 21	0.905
CHI _{5.0οξικό} N = 21	0.917
Log $k_{w7.4οξικό} + S$ N = 21	0.795
$\varphi_{7.4οξικό}$ N = 21	0.900
CHI _{7.4οξικό} N = 21	0.794
Log $k_{w7.4φωσφ.}$ N = 18	0.862
$\varphi_{7.4φωσφ.}$ N = 17	0.690
CHI _{7.4φωσφ.}} N = 16	0.841

1.3.3 Προσθήκη για συμπλοκοποίηση EDTA

Όπως έχει αναφερθεί τα ανιόντα των οξέων σε pH 7.4 εμφανίζουν υψηλότερη συγκράτηση από την αναμενομένη σε σχέση με την λιποφιλία τους [11]. Ως εκ τούτου, για ισχυρά οξέα δεν λαμβάνεται 1:1 σχέση $\log k_w / \log D$ ακόμη και όταν έχει χρησιμοποιηθεί οκτανόλη ως πρόσθετος παράγοντας. Η αυξημένη συγκράτηση οφείλεται στην παρουσία ιχνών μετάλλων στην επιφάνεια της πυριτίας. Με βάση τα ανωτέρω θεωρήθηκε σκόπιμη η χρησιμοποίηση ποσότητας EDTA με ταυτόχρονη παρουσία 0.25% οκτανόλης ως πρόσθετο μέσο στην κινητή φάση. Το EDTA προστέθηκε στη κινητή φάση σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις.

→ 0.2% EDTA στον όγκο της κινητής φάσης

→ 1% EDTA στον όγκο της κινητής φάσης

Οι χρωματογραφικές συνθήκες ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε pH 7.4 (κορεσμένο σε οκτανόλη) / μεθανόλη (0.25% οκτανόλη).

➤ **Ισοκρατική έκλυση**

XIII. Η χρωματογραφική στήλη:

- ABZ+ 15cm x 4.6mm ID, σωματίδια 5µm

XIV. Ρυθμιστικό διάλυμα

- Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών κορεσμένο σε δ/μα οκτανόλης (PO_4^{3-}) συγκέντρωσης $C = 0.2 \text{ M} + 0.2\% \text{ EDTA}$

XV. Οργανικός τροποποιητής

- Μεθανόλη (προσθήκη 0.25% οκτανόλη στον όγκο της μεθανόλης)

Η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση αναφέρεται στον Πίνακα 2.

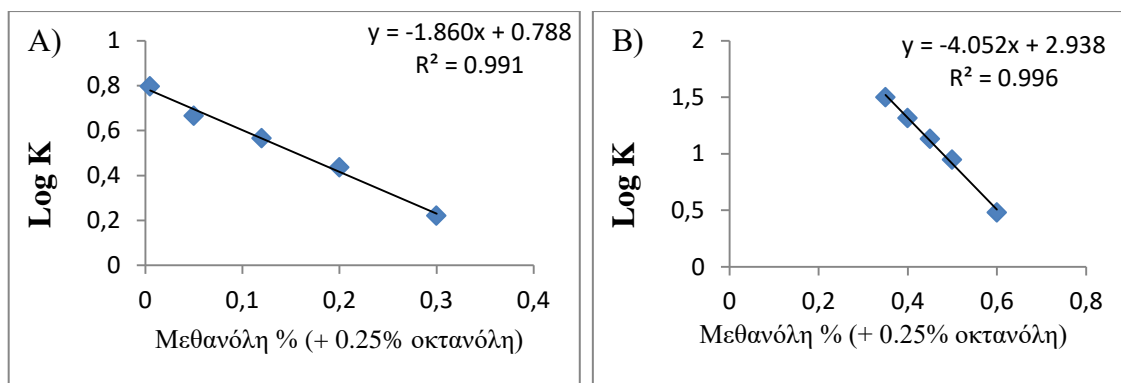
Λόγω της ισχυρής απορρόφησης του EDTA στα μήκη κύματος των ενώσεων (Πίνακας 3) ο ανιχνευτής ρυθμίστηκε σε υψηλότερα μήκη κύματος. Επιπλέον πρέπει να επισημανθεί ότι ο χρόνος εξισορρόπησης του χρωματογραφικού συστήματος ήταν πολύ μεγάλος.

Προσδιορίστηκαν οι τιμές $\log k_{7.4\text{EDTA}0.2\%}$ σε τουλάχιστον 5 αναλογίες μεθανόλης και ελήφθησαν οι ανηγμένες τιμές $\log k_{w7.4\text{EDTA}0.2\%}$.

Πίνακας 38: Αναφέρονται οι αναλογίες ρυθμιστικού διαλύματος – οργανικού τροποποιητή των κινητών φάσεων για τον υπολογισμό των ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4\text{EDTA}0.2\%}$ (για τον κάθε αναλύτη).

Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών (κορ. οκτανόλη) – Μεθανόλη (+ 0.25% οκτανόλη) + EDTA				
40 / 60	45 / 55	50 / 50	55 / 45	60 / 40
65 / 35	70 / 30	75 / 25	80 / 20	85 / 15
88 / 12	90 / 10	93 / 7	95 / 5	98 / 2
99 / 1	99.5 / 0.5			

Στο Σχήμα 23 φαίνονται οι απεικονίσεις $\log k_{7.4\text{EDTA}0.2\%} / \varphi_{7.4\text{EDTA}0.2\%}$ (ποσοστό οργανικού τροποποιητή) δυο αντιπροσωπευτικές ενώσεις.



Σχήμα 23: Ισοκρατική έκλωση για τα δείγματα A) 4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ και B) Μεφαιναμικό οξύ

Με εξαίρεση το Πικρικό οξύ και το 4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ (παρατηρήθηκε απόκλιση από την γραμμικότητα σε μικρά ποσοστά οργανικού τροποποιητή με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η εξαγωγή των ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4EDTA0.2\%}$) παρατηρήθηκε πολύ καλή συσχέτιση τιμών $\log k_{7.4EDTA0.2\%} / \varphi_{7.4EDTA0.2\%}$.

Πίνακας 39: Εξεταζόμενες χημικές ενώσεις, οι τιμές R^2 , ο λογαριθμικός παράγοντας συγκράτησης ($\log k_{w7.4EDTA0.2\%}$), η κλίση ευθείας (S) των γραφικών παραστάσεων ισοκρατικής έκλωσης και τη τυπική απόκλιση αντίστοιχα.

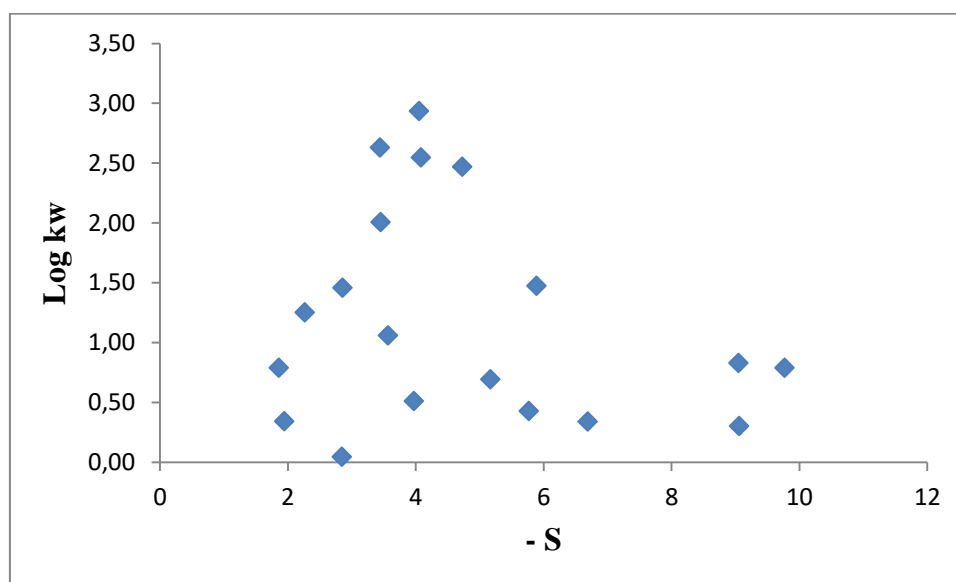
Αναλύτες		Log $k_{w7.4EDTA0.2\%}$	±	S	±	R^2
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	0.43	0.05	-0.0577	0.55	0.9819
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	0.79	0.02	-0.0186	0.10	0.9912
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	0.34	0.14	-0.0669	1.77	0.9771
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	2.63	0.03	-0.0344	0.06	0.9993
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	1.25	0.03	-0.0227	0.13	0.9906
9	Τετραζόλιο III	2.00	0.03	-0.0345	0.06	0.9992
8	Τετραζόλιο IV	1.06	0.14	-0.0357	1.02	0.8604
7	Τετραζόλιο II	0.04	0.03	-0.0285	0.24	0.9857
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	0.34	0.03	-0.0194	0.28	0.9612
18	Μεφαιναμικό οξύ	2.93	0.07	-0.0405	0.15	0.9959
10	Λοσαρτάνη	2.54	0.14	-0.0408	0.32	0.9816
1	Σαλικυλικό οξύ	0.69	0.04	-0.0517	0.42	0.9872
11	Βαλσαρτάνη	2.47	0.08	-0.0473	0.18	0.9958
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	1.47	0.07	-0.0589	0.55	0.9831
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	0.83	0.11	-0.0905	1.08	0.9593
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	0.51	0.08	-0.0397	0.90	0.9825

16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	0.30	0.02	-0.0906	0.28	0.9972
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	0.79	0.08	-0.0977	0.87	0.9845
20	Πικρικό οξύ*	-	-	-	-	-
19	Κετοπροφαίνη	1.46	0.06	-0.0286	0.12	0.9950
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ*	-	-	-	-	-

*Ελλειψη γραμμικότητας

Παρατηρείται μικρή διαφορά στη συγκράτηση σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές χωρίς την προσθήκη EDTA. Στις περισσότερες περιπτώσεις η συγκράτηση είναι ελαφρώς αυξημένη (εξαιρέση αποτελούν οι αναλύτες 4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ, Λοσαρτάνη, Κετοπροφαίνη που παρατηρείται μειωμένη συγκράτηση).

Δεν παρατηρείται συσχέτιση των ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4EDTA0.2\%}$ με τις κλίσεις S (Σχήμα 24) γεγονός που δείχνει ότι η παρουσία του EDTA διαταράσσει το μηχανισμό συγκράτησης κατά μη συστηματικό τρόπο.



Σχήμα 24: Απεικόνιση ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4EDTA0.2\%}$ και κλίσεων S.

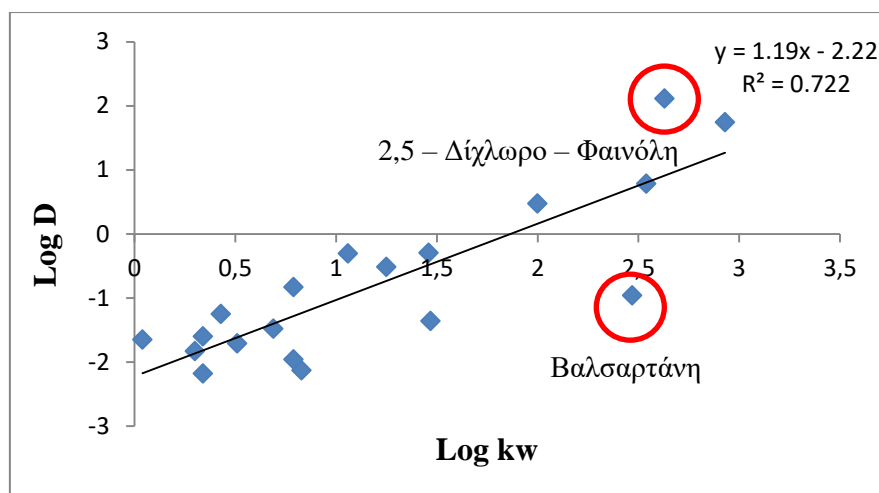
Από τον τύπο $\log k_{7.4EDTA0.2\%} = -S\phi + \log k_{w7.4EDTA0.2\%}$ υπολογίζονται οι τιμές $\phi_{7.4EDTA0.2\%}$ που αντιστοιχούν σε ισοκατανομή των αναλυτών μεταξύ στατικής και κινητής φάσης ($k = 1$, $\log k = 0$). Στον Πίνακα 40 αναγράφονται οι τιμές $\phi_{7.4EDTA0.2\%}$ για τις υπο μελέτη ενώσεις. Η ένωση Τετραζόλιο II χωρίς να εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή $\log D_{7.4}$ (- 1.65) εμφανίζει την μικρότερη τιμή $\phi_{7.4EDTA0.2\%}$ (1.56) ενώ η λιπόφιλη ένωση 2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη με την μεγαλύτερη τιμή $\log D_{7.4}$ (2.11) εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή $\phi_{7.4EDTA0.2\%}$ (76.36).

Πίνακας 40: Αναγράφονται οι αναλύτες και το αντίστοιχο $\varphi_{0.7.4EDTA0.2\%}$

Αναλύτες		$\varphi_{0.7.4EDTA0.2\%}$
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	7.41
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	42.34
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	5.05
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	76.36
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	55.20
9	Τετραζόλιο III	58.08
8	Τετραζόλιο IV	30.16
7	Τετραζόλιο II	1.56
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	17.63
18	Μεφαιναμικό οξύ	72.53
10	Λοσαρτάνη	62.30
1	Σαλικυλικό οξύ	13.37
11	Βαλσαρτάνη	52.18
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	24.99
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	9.15
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	12.84
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	3.34
5	5 – Μεθυλάμινο – Βενζοϊκό οξύ	8.08
20	Πικρικό οξύ	-
19	Κετοπροφαίνη	51.04
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-

1.3.3.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ EDTA ΜΕ ΤΟΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΚΤΑΝΟΛΗ / ΝΕΡΟ (Log D_{7.4})

Εξετάζεται η συσχέτιση των τιμών $\log k_{w7.4EDTA0.2\%} - \log D_{7.4}$. Λαμβάνεται το Σχήμα 25 και η αντίστοιχη εξίσωση 28



Σχήμα 25: Τιμές $\log k_{w7.4EDTA0.2\%}$ των εξεταζόμενων φαρμάκων σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{7.4}$.

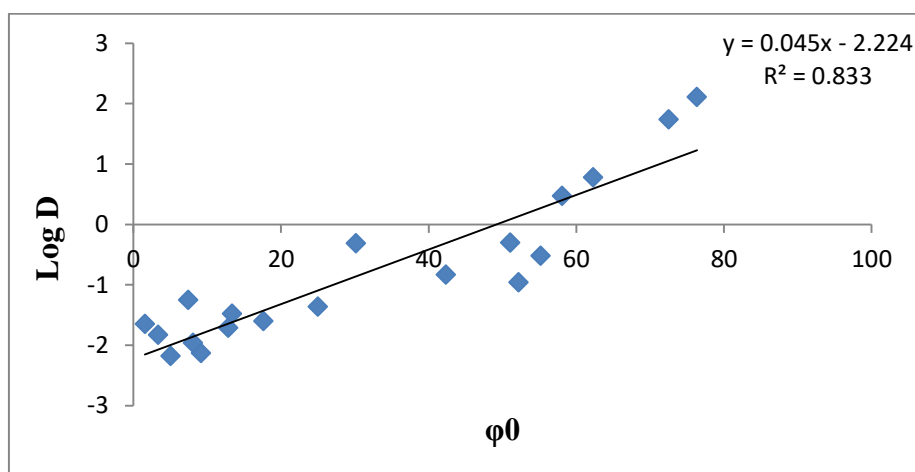
Από την συσχέτιση των τιμών $\log k_{w7.4EDTA0.2\%} - \log D_{7.4}$ εξάγεται η εξίσωση 28 με χαμηλή τιμή συντελεστή συσχέτισης.

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{7.4} &= 1.19 (\pm 0.18) \text{Log } kw_{7.4EDTA0.2\%} - 2.22 (\pm 0.27) & (28) \\ N &= 19 & R^2 &= 0.722 & R &= 0.850 & s &= 0.69 \end{aligned}$$

Παρατηρείται μείωση του συντελεστή συσχέτισης που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η προσθήκη EDTA επηρεάζει δυσμενώς την κατανομή των αναλυτών στην στατική φάση. Οι τιμές των ενώσεων 2,5 - Διγλωρο - Φαινόλη και Βαλσαρτάνη αποτελούν έκτροπες τιμές. Η αφαίρεση των έκτροπων τιμών οδηγεί στη εξίσωση 29 με καλύτερα στατιστικά αποτελέσματα.

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{7.4} &= 1.24 (\pm 0.15) \text{Log } kw_{7.4EDTA0.2\%} - 2.24 (\pm 0.20) & (29) \\ N &= 17 & R^2 &= 0.814 & R &= 0.902 & s &= 0.50 \end{aligned}$$

Στη συνέχεια παρατίθεται τα διαγράμματα $\varphi_{0.7.4EDTA0.2\%} - \log D_{7.4}$. Η συσχέτιση οδηγεί στην εξίσωση 30 για το Σχήμα 26 με ελάχιστα μικρότερο συντελεστή συσχέτισης από τον αντίστοιχο συντελεστή της εξίσωσης 23.



Σχήμα 26: Τιμές $\varphi_{0.7.4EDTA0.2\%}$ σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{7.4}$.

Από την συσχέτιση των τιμών $\varphi_{0.7.4EDTA0.2\%} - \log D_{7.4}$ εξάγεται η εξίσωση (30) με μέτρια τιμή συντελεστή συσχέτισης.

$$\begin{aligned} \log D_{7.4} &= 0.045 (\pm 0.005) \varphi_{0.7.4EDTA0.2\%} - (\pm 0.198) 2.224 & (30) \\ N &= 19 & R^2 &= 0.833 & R &= 0.913 & s &= 0.53 \end{aligned}$$

Ο συντελεστής συσχέτισης αυξήθηκε ελαφρώς από τον αντίστοιχο συντελεστή κινητής φάσης απουσίας EDTA. Επίσης η συσχέτιση $\varphi_{0.7.4EDTA0.2\%} - \log D_{7.4}$ είναι καλύτερη από την συσχέτιση τιμών $\log k_{w7.4EDTA0.2\%} - \log D_{7.4}$.

➤ Βαθμιδωτή έκλυση

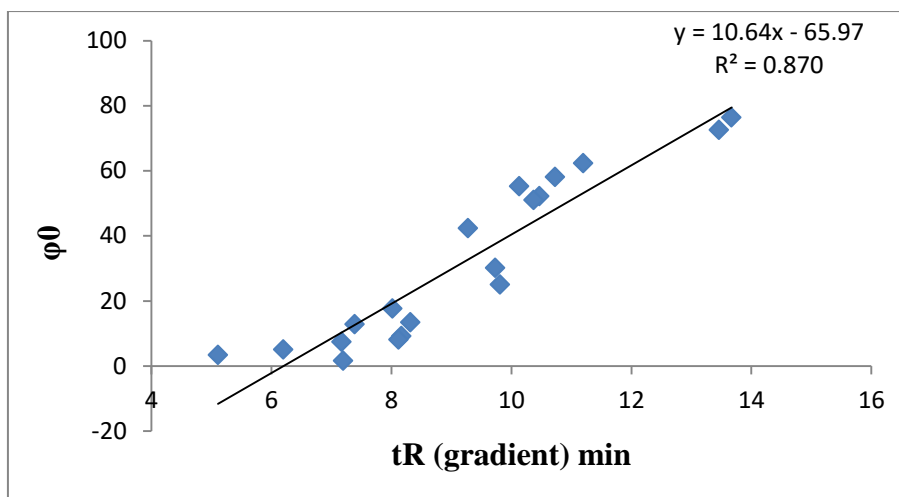
Στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών κορεσμένο σε δ/μα οκτανόλης (PO_4^{3-}) συγκέντρωσης $C = 0.2 \text{ M}$ με προσθήκη 0.2% EDTA και οργανικός τροποποιητής μεθανόλη (προσθήκη 0.25% στον όγκο της μεθανόλης). Τα στάδια του προγράμματος εμφανίζονται στον Πίνακα 22.

Από την εφαρμογή βαθμιδωτής έκλυσης σύμφωνα με το πρόγραμμα του Πίνακα 22, καταγράφηκε ο χρόνος έκλυσης των 21 χημικών ενώσεων. Στον Πίνακα 41 καταγράφονται οι χρόνοι συγκράτησης t_R .

Πίνακας 41: Οι χημικές ενώσεις, χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης και τιμές $\phi_{0.74EDTA0.2\%}$ για την κάθε χημική ένωση

Αναλύτες		Χρόνος (t_R gradient) min
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	7.17
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	9.28
4	2,5 – Διοξυ – Βενζοϊκό οξύ	6.20
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	13.67
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	10.13
9	Τετραζόλιο III	10.73
8	Τετραζόλιο IV	9.73
7	Τετραζόλιο II	7.20
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	8.02
18	Μεφαιναμικό οξύ	13.46
10	Λοσαρτάνη	11.20
1	Σαλικυλικό οξύ	8.32
11	Βαλσαρτάνη	10.47
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	9.81
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	8.17
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	7.39
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	5.11
5	5 – Μεθυλάμινο – Βενζοϊκό οξύ	8.12
20	Πικρικό οξύ	10.81
19	Κετοπροφαίνη	10.37
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	10.45

Η συσχέτιση των τιμών $\phi_{0.74EDTA0.2\%}$ με τον χρόνο συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης (t_R) οδηγεί στο Σχήμα 27 που αναπαρίσταται η καμπύλη.



Σχήμα 27: Ο χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης (t_R gradient) έναντι των τιμών $\phi_{0,7.4EDTA0.2\%}$ ισοκρατικών εκλούσεων για τις 19 χημικές ενώσεις.

Η συσχέτιση των τιμών οδηγεί στην εξίσωση 31 με μη ικανοποιητικά στατιστικά στοιχεία:

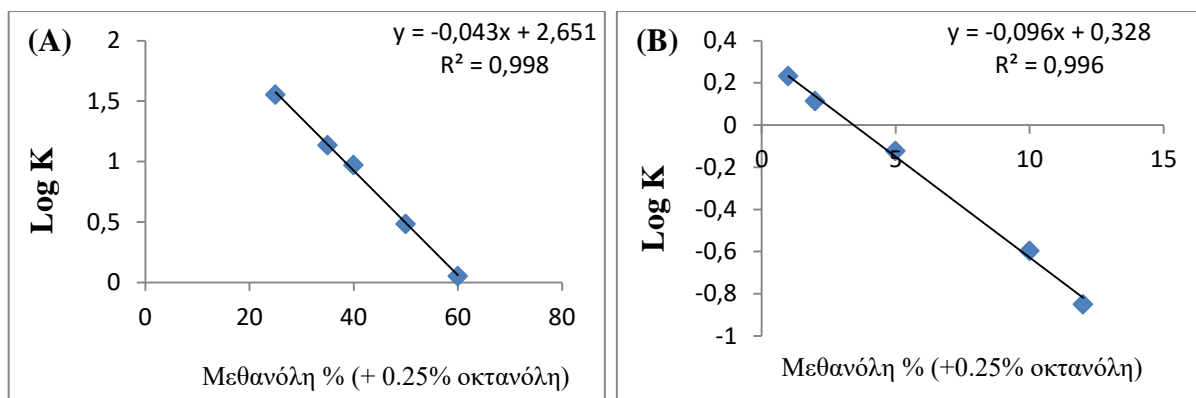
$$CHI_{7.4EDTA0.2\%} = 10.64 (\pm 1.00) tR - 65.97 (\pm 9.41) \quad (31)$$

$$N = 19 \quad R^2 = 0.870 \quad R = 0.933 \quad s = 9.47$$

Η προσθήκη EDTA δεν βελτιστοποίησε την σχέση του χρόνου συγκράτησης με τις τιμές $\phi_{0,7.4EDTA0.2\%}$. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση 0.2% EDTA δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά, πραγματοποιήθηκε επανάληψη των πειραμάτων με χορήγηση 1% EDTA στον όγκο της κινητής φάσης.

➤ Ισοκρατική έκλουση

Προσδιορίστηκαν οι τιμές $\log k_{7.4EDTA1\%}$ σε τουλάχιστον 5 αναλογίες μεθανόλης και ελήφθησαν οι ανηγμένες τιμές $\log k_{w7.4EDTA1\%}$ (Πίνακας 42). Στο Σχήμα 28 φαίνονται οι απεικονίσεις $\log k_{7.4EDTA1\%} / \phi_{7.4EDTA1\%}$ (ποσοστό οργανικού τροποποιητή) δυο αντιπροσωπευτικές ενώσεις. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν παρουσιάστηκαν αποκλίσεις από τη γραμμικότητα για το σύνολο των ενώσεων.



Σχήμα 28: Ισοκρατική έκλωση για τα δείγματα A) 4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ ($\log D_{7.4} = -0.83$) και B) Μεφαιναμικό οξύ ($\log D_{7.4} = -1.74$)

Στο Σχήμα 28 παρατηρείται ικανοποιητική συσχέτιση των τιμών $\log k_{7.4\text{EDTA}1\%} / \varphi_{7.4\text{EDTA}1\%}$. Οι τιμές R^2 είναι μεγαλύτερες από την τιμή 0.870 με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται αξιόπιστη η εξαγωγή ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4\text{EDTA}1\%}$.

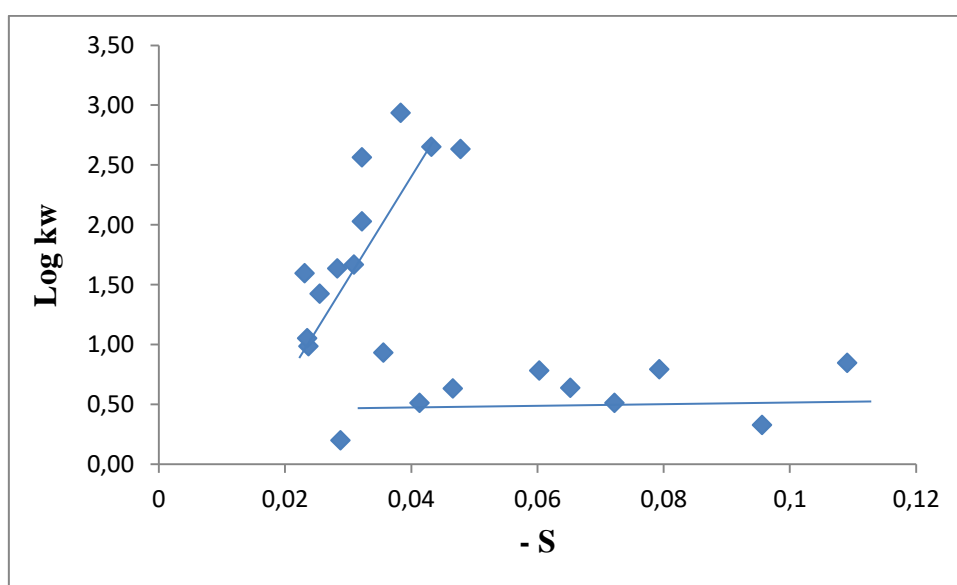
Πίνακας 42: Εξεταζόμενες χημικές ενώσεις, οι τιμές R^2 , ο λογαριθμικός παράγοντας συγκράτησης ($\log k_{w7.4\text{EDTA}1\%}$), η κλίση ευθείας (S) των γραφικών παραστάσεων ισοκρατικής έκλωσης και τη τυπική απόκλιση αντίστοιχα.

Αναλύτες		Log $k_{w7.4\text{EDTA}1\%}$	\pm	S	\pm	R^2
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	0.64	0.02	-0.0652	0.002	0.8913
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	0.99	0.05	-0.0237	0.002	0.9396
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	0.51	0.02	-0.0722	0.003	0.8787
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	2.56	0.07	-0.0322	0.001	0.9764
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	1.42	0.01	-0.0255	0.001	0.9899
9	Τετραζόλιο III	2.03	0.06	-0.0322	0.001	0.9850
8	Τετραζόλιο IV	1.05	0.10	-0.0235	0.005	0.9151
7	Τετραζόλιο II	0.20	0.03	-0.0288	0.003	0.9807
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	0.63	0.02	-0.0466	0.002	0.8885
18	Μεφαιναμικό οξύ	2.94	0.08	-0.0383	0.002	0.9946
10	Λοσαρτάνη	2.65	0.05	-0.0432	0.001	0.9980
1	Σαλικυλικό οξύ	0.78	0.02	-0.0603	0.002	0.9441
11	Βαλσαρτάνη	2.63	0.11	-0.0478	0.002	0.9922
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	0.93	0.08	-0.0356	0.006	0.9527
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	0.79	0.12	-0.0793	0.026	0.9788
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	0.51	0.07	-0.0413	0.01	0.8887
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	0.33	0.03	-0.0956	0.003	0.9963
5	5 – Μεθυλαμινο – Σαλικυλικό οξύ	0.85	0.03	-0.1091	0.003	0.9972
20	Πικρικό οξύ	1.64	0.09	-0.0283	0.004	0.9390

19	Κετοπροφαίνη	1.67	0.11	-0.0309	0.002	0.9821
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	1.60	0.06	-0.0231	0.003	0.9436

Σε αντίθεση με ότι αναμένεται, η προσθήκη επιπλέον ποσότητας EDTA προκάλεσε μεγαλύτερους χρόνους συγκράτησης για τις όξιες χημικές ενώσεις. Οι τιμές $\log k_{w7.4EDTA1\%}$ παρουσιάζονται εμφανώς μεγαλύτερες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές για 0.2% EDTA και στην περίπτωση απουσίας μορίων EDTA.

Στο Σχήμα 29 εξετάζεται η συσχέτιση των ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4EDTA1\%}$ και της κλίσης ευθείας των ισοκρατικών εκλούσεων για την εκάστοτε οξέων.



Σχήμα 29: Ανηγμένες τιμές $\log k_{w7.4EDTA1\%}$ και οι αντίστοιχες απόλυτες τιμές των κλίσεων ισοκρατικών εκλούσεων.

Στο Σχήμα 29 διαπιστώνεται ανάλογη συμπεριφορά των σημείων με το Σχήμα 18 (χωρίς προσθήκη EDTA).

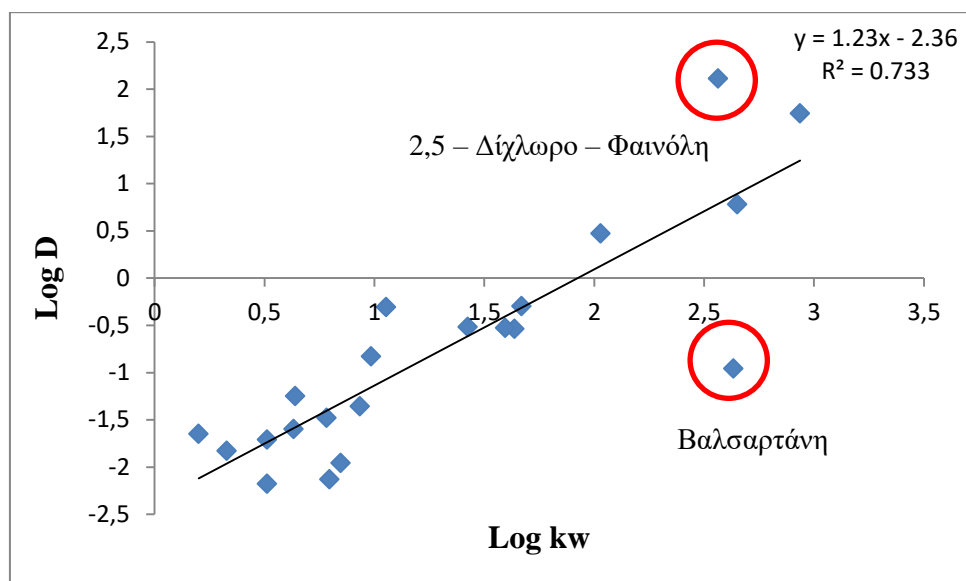
Από τον τύπο $\log k_{7.4EDTA1\%} = -S\phi + \log k_{w7.4EDTA1\%}$ υπολογίζονται οι τιμές $\phi_{7.4EDTA1\%}$ που αντιστοιχούν σε ισοκατανομή των αναλυτών μεταξύ στατικής και κινητής φάσης ($k = 1$, $\log k = 0$). Στον Πίνακα 43 αναγράφονται οι τιμές $\phi_{7.4EDTA1\%}$ για τις υπο μελέτη ενώσεις. Η ένωση 2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ χωρίς να εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή $\log D_{7.4}$ (- 1.83) εμφανίζει την μικρότερη τιμή $\phi_{7.4EDTA1\%}$ (3.43) ενώ η λιπόφιλη ένωση 2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη με την μεγαλύτερη τιμή $\log D_{7.4}$ (2.11) εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή $\phi_{7.4EDTA1\%}$ (79.59).

Πίνακας 43: Αναγράφονται οι αναλύτες και το αντίστοιχο $\phi_{0,7.4EDTA1\%}$

Αναλύτες		$\phi_{0,7.4EDTA1\%}$
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	9.80
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	41.58
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	7.09
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	79.59
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	55.85
9	Τετραζόλιο III	63.02
8	Τετραζόλιο IV	44.83
7	Τετραζόλιο II	6.94
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	13.56
18	Μεφαιναμικό οξύ	76.67
10	Λοσαρτάνη	61.37
1	Σαλικυλικό οξύ	12.97
11	Βαλσαρτάνη	55.08
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	26.23
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	10.02
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	12.39
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	3.43
5	5 – Μεθυλάμινο – Βενζοϊκό οξύ	7.76
20	Πικρικό οξύ	57.83
19	Κετοπροφαίνη	54.01
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	69.06

1.3.3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ 1% EDTA ΜΕ ΤΟΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΚΤΑΝΟΛΗ / ΝΕΡΟ (Log D_{7.4})

Εξετάζεται η συσχέτιση των τιμών $\log k_{w7.4EDTA1\%} - \log D_{7.4}$. Η κατάρτιση του διαγράμματος $\log k_{w7.4EDTA1\%} - \log D_{7.4}$ (Σχήμα 30) πραγματοποιείται με την προσθήκη 21 ενώσεων.



Σχήμα 30: Τιμές $\log k_{w7.4EDTA1\%}$ των εξεταζόμενων φαρμάκων σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{7.4}$.

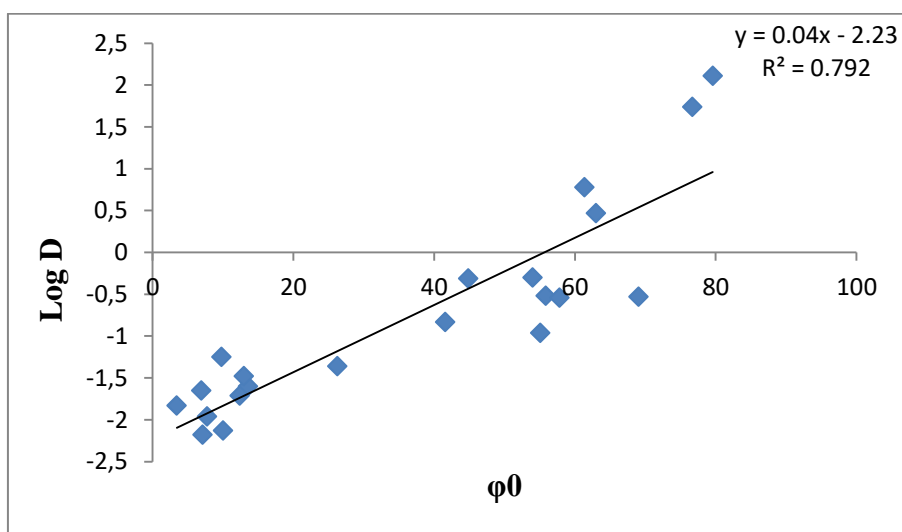
$$\begin{aligned} \text{Log } D_{7.4} &= 1.23 (\pm 0.17) \text{ Log } k_{w7.4EDTA1\%} - 2.36 (\pm 0.26) \quad (32) \\ N &= 21 \quad R^2 = 0.733 \quad R = 0.856 \quad s = 0.64 \end{aligned}$$

Αφαιρώντας τις έκτροπες τιμές των 2,5 - Διγλωρο - Φαινόλη και Βαλσαρτάνη προκύπτει η εξίσωση 32 με σημαντική βελτίωση των στατιστικών στοιχείων.

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{7.4} &= 1.31 (\pm 0.12) \text{ Log } k_{w7.4EDTA1\%} - 2.43 (\pm 0.17) \quad (33) \\ N &= 21 \quad R^2 = 0.8741 \quad R = 0.935 \quad s = 0.39 \end{aligned}$$

Παρατηρείται αύξηση του συντελεστή συσχέτισης από 0.2 - 1% EDTA που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αύξηση του ποσοστού EDTA επηρεάζει θετικά την κατανομή των αναλυτών

στην στατική φάση. Στη συνέχεια παρατίθεται το διάγραμμα $\varphi_{0.7.4EDTA1\%} - \log D_{7.4}$. Η συσχέτιση οδηγεί στην εξίσωση 34 για το Σχήμα 31 με μικρότερο συντελεστή συσχέτισης από τον αντίστοιχο συντελεστή της εξίσωσης 23.



Σχήμα 31: Τιμές $\varphi_{0.7.4EDTA1\%}$ σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{7.4}$.

Από την συσχέτιση των τιμών $\varphi_{0.7.4EDTA1\%} - \log D_{7.4}$ εξάγεται η εξίσωση 34 με μέτρια τιμή συντελεστή συσχέτισης.

$$\text{Log } D_{7.4} = 0.04 (\pm 0.005) \varphi_{0.7.4EDTA1\%} - 2.23 (\pm 0.212) \quad (34)$$

$$N = 21 \quad R^2 = 0.792 \quad R = 0.850 \quad s = 0.56$$

Παρατηρείται αρνητική επιρροή από την αύξηση των μορίων EDTA στη συσχέτιση των τιμών $\varphi_{0.7.4EDTA1\%} - \log D_{7.4}$. Ο συντελεστής συσχέτισης είναι μικρότερος από τον αντίστοιχο συντελεστή κινητής φάσης είτε απουσίας EDTA είτε προσθήκης 0.2% EDTA (στη περίπτωση συγκέντρωσης 0.2% EDTA έχουν αφαιρεθεί 2 χημικές ενώσεις).

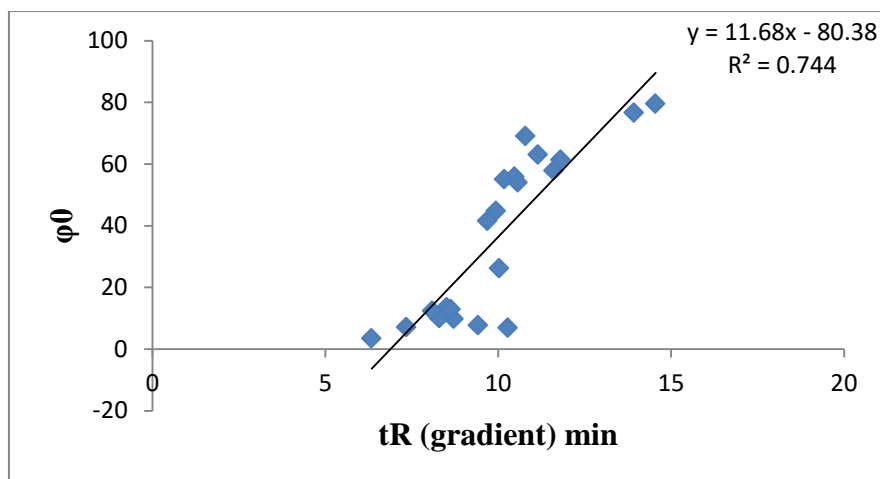
➤ **Βαθμιδωτή έκλυση**

Από την εφαρμογή βαθμιδωτής έκλυσης σύμφωνα με το πρόγραμμα του Πίνακα 22, καταγράφηκε ο χρόνος έκλυσης των 21 χημικών ενώσεων. Στον Πίνακα 44 καταγράφονται οι χρόνοι συγκράτησης t_R .

Πίνακας 44: Οι χημικές ενώσεις, χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλυσης και τιμές $\phi_{0.7.4EDTA1\%}$ για την κάθε χημική ένωση

Αναλύτες		Χρόνος (t_R gradient) min
13	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	8.71
12	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	9.68
4	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	7.34
21	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	14.55
2	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	10.47
9	Τετραζόλιο III	11.14
8	Τετραζόλιο IV	9.94
7	Τετραζόλιο II	10.28
14	4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	8.51
18	Μεφαιναμικό οξύ	13.93
10	Λοσαρτάνη	11.80
1	Σαλικυλικό οξύ	8.63
11	Βαλσαρτάνη	10.17
17	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	10.03
6	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	8.30
15	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	8.10
16	2,3 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	6.34
5	5 – Μεθυλάμινο – Βενζοϊκό οξύ	9.42
20	Πικρικό οξύ	11.60
19	Κετοπροφαίνη	10.57
3	4 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	10.79

Η συσχέτιση των τιμών $\phi_{0.7.4EDTA1\%}$ με τον χρόνο συγκράτησης βαθμιδωτής έκλυσης (t_R) οδηγεί στο Σχήμα 32 που αναπαρίσταται η καμπύλη.



Σχήμα 32: Ο χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης (t_R gradient) έναντι των τιμών $\phi_{0,7.4EDTA1\%}$ ισοκρατικών εκλούσεων για τις 21 χημικές ενώσεις.

Η συσχέτιση των τιμών οδηγεί στην εξίσωση 35 με μη ικανοποιητικά στατιστικά στοιχεία:

$$\begin{aligned} \text{CHI}_{7.4EDTA1\%} &= 11.68 (\pm 1.57) tR - 80.38 (\pm 16.05) \\ N = 21 \quad R^2 &= 0.744 \quad R = 0.862 \quad s = 13.88 \end{aligned} \quad (35)$$

Η εισαγωγή 1% EDTA στον όγκο της κινητής φάσης επέφερε μη ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τελικά η προσθήκη EDTA στον όγκο της κινητής φάσης προκάλεσε αντίθετα του αναμενομένου αποτελέσματα. Έτσι η παρουσία μορίων EDTA δημιούργησε μη ελεγχόμενες συνθήκες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρατηρήθηκε ότι σε συνθήκες pH που οι χημικές ενώσεις βρίσκονται στη μη ιοντισμένη μορφή τους, οι αποκλίσεις των τιμών $\log D_{\text{υπολ.}}$ για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας είναι πολύ μικρές. Συγκεκριμένα σε pH 5.0 η συσχέτιση τιμών $\log D_{5.0}$ με τις τιμές $\log k_{w5.0}$, $\phi_{0,5.0}$ και $\text{CHI}_{5.0}$ επέφερε καλύτερα στατιστικά αποτελέσματα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα σε pH 7.4. Έτσι σε περιπτώσεις ιοντισμένων χημικών ενώσεων οι αποκλίσεις των τιμών $\log D_{\text{υπολ.}}$ είναι μεγαλύτερες. Στην χρήση οξικού αμμωνίου και ακετονιτριλίου (pH 7.4) χωρίς την προσθήκη μέσου επικάλυψης της στατικής φάσης, η συσχέτιση τιμών $\log k_{w7.4\text{οξικό}} - \log D_{7.4}$ παρουσίασε μη ικανοποιητικά στατιστικά στοιχεία, με αποτέλεσμα την εισαγωγή της κλίσης S ως πρόσθετη παράμετρο. Τα αποτελέσματα βελτιώθηκαν, ωστόσο, ο συντελεστής συσχέτισης παρέμεινε μικρότερος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο σε pH 5.0. Οι τιμές ϕ_0 επέδειξαν πολύ καλή

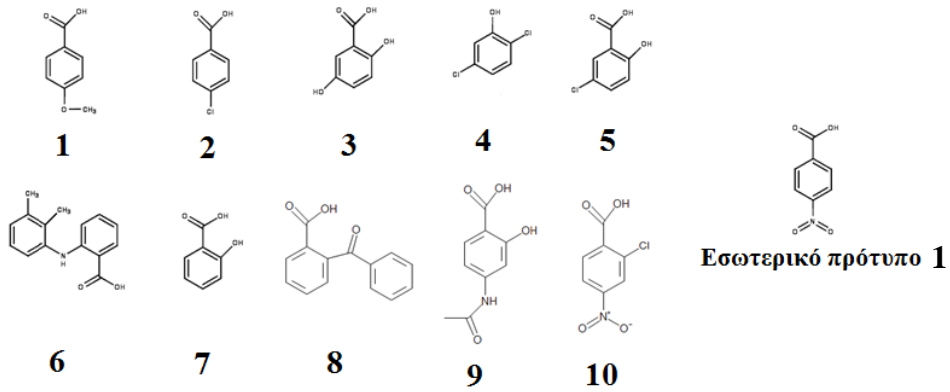
συσχέτιση με τις τιμές $\log D_{7.4}$ με στατιστικά αποτελέσματα όμοια με εκείνα σε pH 5.0, υποδηλώνοντας ότι θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ο παράγοντας S κατά την ανάλυση. Οι τιμές $\text{CHI}_{7.4\text{οξικό}}$ οδήγησαν σε μεγαλύτερες αποκλίσεις από τις αντίστοιχες σε pH 5.0 με αποτέλεσμα τον χαμηλό συντελεστή συσχέτισης. Η ανάλυση οξέων σε pH 7.4 με την εισαγωγή φωσφορικών (κορ. σε οκτανόλη) / μεθανόλη ως οργανικό τροποποιητή και προσθήκη οκτανόλης ως μέσο επικάλυψης της στατικής φάσης εμφάνισε χαμηλό συντελεστή συσχέτισης για τιμές $\text{CHI}_{7.4\text{φωσφ}}$ και χαμηλότερο για τιμές $\text{φ}0_{7.4\text{φωσφ}}$. Αντίθετα, η συσχέτιση τιμών $\log k_{w7.4\text{φωσφ}} - \log D_{7.4}$ επέδειξε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις τιμές $\text{CHI}_{7.4\text{φωσφ}}$ και $\text{φ}0_{7.4\text{φωσφ}}$ όπως και με τις τιμές $\log k_{w7.4\text{οξικό}}$ που οδηγεί στο συμπέρασμα της θετικής επιρροής της οκτανόλης ως μέσο προστασίας των αναλυτών από σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις ενώ παράλληλα κατέστη σαφής η αρνητική επίδραση της προσθήκης του παράγοντα S. Επιπλέον, σε ανάλυση εξαιρετικά υδρόφιλων ενώσεων προτιμάται η συγκράτηση να προσδιορίζεται με 100% υδατική φάση αποκλείοντας τον υπολογισμό των τιμών CHI που στηρίζονται στην εισαγωγή οργανικού τροποποιητή. Η προσθήκη EDTA στον όγκο της κινητής φάσης προκάλεσε αποτελέσματα αντίθετα των αναμενομένων, αυξάνοντας τον χρόνο συγκράτησης αντί να τον μειώνει. Επιπλέον η παρουσία μορίων EDTA δημιούργησε μη σταθερές συνθήκες και αύξησε δραματικά τον αναγκαίο χρόνο για την εξισορρόπηση του συστήματος. Ανάλυση των φασμάτων EDTA απουσία και παρουσία μετάλλων σε συνδυασμό με ανάλυση της κινητής φάσης με προσθετικό παραγοντα EDTA κατά την έξοδο της από το χρωματογραφικό σύστημα έδειξε ότι πραγματοποιείται συμπλοκοποίηση με μέταλλα (μετατόπιση του φάσματος EDTA). Αυτό σημαίνει ότι ενδεχομένως το EDTA συμπλοποιεί ίχνη μετάλλου που υπάρχουν στο σύστημα και δεν είναι πλέον διαθέσιμο για να αλληλεπιδράσει με τη στατική φάση.

2ο ΜΕΡΟΣ: ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΠΗΓΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

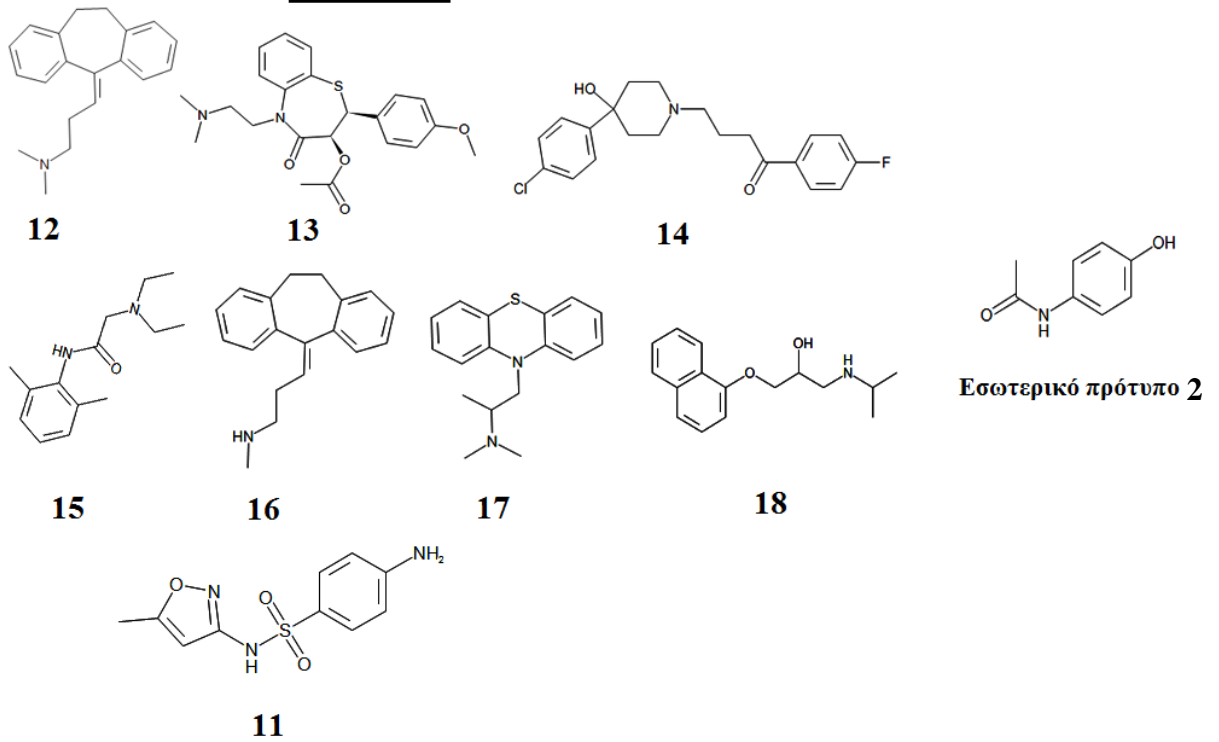
Στο 2^ο μέρος εξετάζεται ο προσδιορισμός της λιποφιλίας στο αρχικό στάδιο σύνθεσης νέων φαρμάκων. Στόχος είναι η περαιτέρω εξοικονόμηση πειραματικού χρόνου, ποσότητας και χρηματών αντιδραστηρίων κατά των σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Πλέον αποτελεί απαραίτητο στάδιο για τον προσδιορισμό της δομής χημικών ενώσεων ο ανιχνευτής μάζας. Η πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό είναι η συνηθέστερη πηγή ιονισμού.

Χρησιμοποιήθηκε σειρά 10 όξινων ενώσεων, 7 βασικών ενώσεων και 1 επαμφοτερίζουσα ένωση, η δομή των οποίων παρουσιάζεται στο Σχήμα 1. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δυο εσωτερικά πρότυπα. Το 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο στην ανάλυση οξέων ενώ η Παρακεταμόλη στην ανάλυση των βάσεων. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε συνθήκες pH 5.0.

ΟΞΕΑ



ΒΑΣΕΙΣ



Σχήμα 1: Ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία

Πίνακας 1: Ονομασία των ενώσεων και σύνδεση με τους αντίστοιχους αριθμούς από το Σχήμα 1.

Αριθμός	Οξέα / Βάσεις	Αναλύτες
1	Οξέα	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ
2		4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ
3		2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ
4		2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη
5		5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ
6		Μεφαιναμικό οξύ
7		Σαλικυλικό οξύ
8		2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ
9		4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ
10		2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ
Εσωτερικό προτ. 1		4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ
11	Επαμφοτερίζων	Σουλφαμεθοξαζόλη
12	Βάσεις	Αμιτριπυλίνη
13		Διλτιαζέμη
14		Αλοπεριδόλη
15		Λιδοκαΐνη
16		Νορτριπυλίνη
17		Προμεθαζίνη
18		Προπρανολόλη
Εσωτερικό προτ. 2		Παρακεταμόλη

Οι τιμές pKa οι οποίες καθορίζουν τον βαθμό ιοντισμού των ενώσεων υπολογίστηκαν με το λογισμικό ADME Boxes της εταιρείας Pharma Algorithms και αναφέρονται στον Πίνακα 2. Σε pH 5.0 οι όξινες και βασικές ενώσεις βρίσκονται στην ιοντισμένη μορφή τους, με εξαίρεση την 2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη (ασθενές οξύ), την Σουλφαμεθοξαζόλη (μη ιοντισμένη) και το εσ. πρότυπο Παρακεταμόλη (μη ιοντισμένη).

Δεδομένου ότι στη βιβλιογραφία για τις υπο μελέτη ενώσεις, είτε δεν υπάρχουν τιμές log D σε pH 5.0 είτε υπάρχουν αλλά διαφοροποιούνται μεταξύ εργαστηρίων πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία προσδιορισμός των τιμών log D_{5.0} όλων των ενώσεων με την μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης.

Πίνακας 2: Αναλύτες, pKa, Log D και η τυπική απόκλιση για pH 5.0 των εκάστοτε αναλυτών

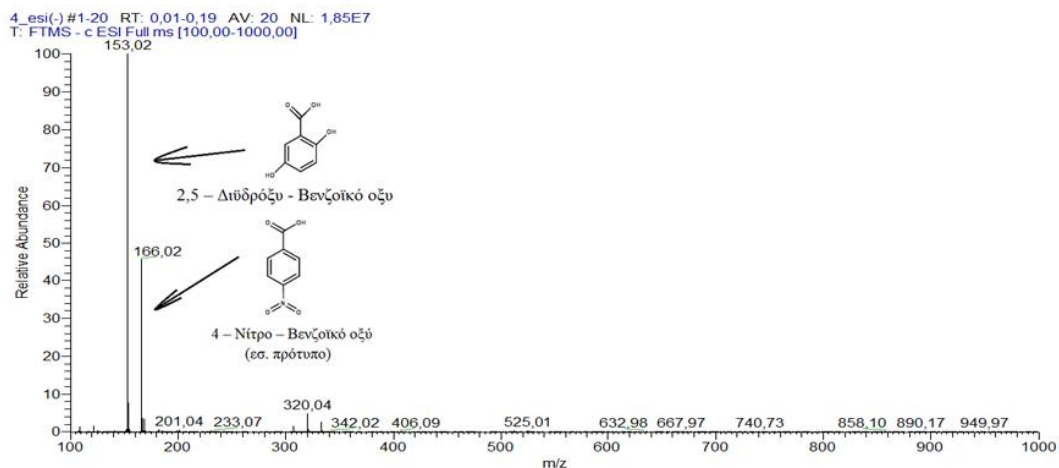
Αναλύτες	pKa*(οξύ)	±	pKa*(βάση)	±	Log D _{5.0}
1	4.4	±0.5	-	-	1.12
2	3.9	±0.5	-	-	1.47
3	3.0	±0.5	-	-	-1.12
4	7.5	±0.5	-	-	2.76
5	2.6	±0.5	-	-	0.77
6	4.3	±0.5	-	-	3.94
7	3.0	±0.5	-	-	0.19
8	3.6	±0.5	-	-	0.89
9	3.0	±0.5	-	-	-0.82
10	2.0	±0.5	-	-	-1.29
Εσωτερικό προτ. 1	3.3	±0.5	-	-	-0.15
11	5.7	±0.5	1.8	±0.5	0.72
12	-	-	9.1	±0.5	1.20
13	-	-	8.2	±0.5	-0.02
14	-	-	8.2	±0.5	1.20
15	-	-	7.9	±0.5	-0.60
16	-	-	10.1	±0.5	1.92
17	-	-	9.3	±0.5	0.64
18	-	-	9.6	±0.5	-0.05
Εσωτερικό προτ. 2	10.2	±0.5	-	-	0.40

* υπολογίστηκαν με το λογισμικό ADME Boxes της εταιρείας Pharma Algorithms

2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΠΗΓΗ ΙΟΝΙΣΜΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε σε pH 5.0.

- Το φασματόμετρο μαζών που χρησιμοποιήθηκε: Orbitrap της Thermo Fisher
- Τα διαλύματα των αναλυτών μέσω τριχοειδούς σωλήνα στην πηγή ιοντισμού.
- Κάθε διάλυμα εισαγωγής περιείχε τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο (γνωστών φυσικοχημικών ιδιοτήτων).
- Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με την βοήθεια του λογισμικού Xcalibur της εταιρείας Thermo Scientific.
- Από την επεξεργασία σημάτων των αναλυτών, καταγράφηκαν οι εντάσεις σήματος (αναλύτη και εσωτερικού προτύπου)



Σχήμα 2: Εντάσεις σημάτων του αναλύτη (2,5 – Διϋδρόξυ – Βενζοϊκό οξύ) και του εσωτερικού προτύπου (4 – Νίτρο – Βενζοϊκό οξύ) με την βοήθεια του λογισμικού Xcalibur.

Πραγματοποιείται λήψη των φασμάτων για τις περιπτώσεις των οξέων με εσ. πρότυπο το 4 – Νίτρο – Βενζοϊκό οξύ, των βάσεων και της επαμφοτερίζουσας ένωσης με εσ. πρότυπο την Παρακεταμόλη. Ο λόγος $\log (R_{\text{αναλύτη}} / R_{\text{εσ. προτύπου}})$ καταγράφεται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3: Εξεταζόμενες χημικές ενώσεις και ο λόγος των σημάτων [$\log (R_{\text{αναλύτη}} / R_{\text{εσ. προτύπου}})$] αντίστοιχα.

	Οξέα / Βάσεις	Αναλύτες	Λόγος Σημάτων
1	Οξέα	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-1.1907
2		4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.2022
3		2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	0.3416
4		2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	-1.4255
5		5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	0.2086
6		Μεφαιναμικό οξύ	-1.4040
7		Σαλικυλικό οξύ	-0.1346
8		2 – Βενζούλο – Βενζοϊκό οξύ	-0.5189
9		4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	0.2340
10		2 – Χλωρο – 4 – Νίτρο – Βενζοϊκό οξύ	0.4350
11	Επαμφοτερίζων	Σουλφαμεθοξαζόλη	-0.5345
12	Βάσεις	Αμιτριπυλίνη	-0.7362
13		Διλτιαζέμη	0.1232
14		Αλοπεριδόλη	-0.2984
15		Λιδοκαΐνη	0.0023
16		Νοτριπυλίνη	-1.0639
17		Προμεθαζίνη	-0.2271
18		Προπρανολόλη	-0.3418

2.1.1 Μαθηματική σχέση σύνδεση λιποφιλίας – έντασης σήματος

Στην προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού μετάβασης των αναλυτών από το διάλυμα στην αέρια φάση, έχουν διατυπωθεί αρκετές προσεγγίσεις με σκοπό την μαθηματική έκφραση του φαινομένου. Στόχος της παρούσας προσέγγισης είναι να προσδιοριστεί η λιποφιλία ενός αναλύτη με υπολογισμό των τιμών $\log P$ ή $\log D$ σε συνάρτηση με την ένταση του σήματος του.

Οι αναλύτες για να διέλθουν στην επιφάνεια του σταγονιδίου με τελικό σκοπό την ανιχνεύσή τους επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες. Οι δυο σημαντικότεροι είναι ο βαθμός ιοντισμού (εκφράζεται μέσω των τιμών pK_a) και η λιποφιλία τους (εκφράζεται μέσω του συντελεστή μερισμού $\log P$ ή συντελεστή κατανομής $\log D$).

Ο συντελεστής μερισμού περιγράφεται από την εξίσωση 1:

$$\text{Log } P_A = \text{Log} \left(\frac{C_{A \text{ οργ.}}}{C_{A \text{ υδατ.}}} \right) \quad (1)$$

Ο λόγος των σταθερών ισορροπίας στο σταγονίδιο των ιόντων αναλύτη και ρυθμιστικού διαλύματος αντίστοιχα (εξίσωση 2):

$$\frac{K_{A^+}}{K_{E^+}} = \frac{\frac{(A^+)_{\text{επιφαν.}}}{(A^+X^-)_{\text{εσωτ.}}}}{\frac{(E^+X^-)_{\text{εσωτ.}}}{(E^+)_{\text{επιφαν.}}}} = \frac{\frac{n_{A^+ \text{ επιφαν.}}}{n_{A^+X^- \text{ εσωτ.}}}}{\frac{n_{E^+X^- \text{ εσωτ.}}}{n_{E^+ \text{ επιφαν.}}}} \Rightarrow \frac{K_{A^+}}{K_{E^+}} \cdot \frac{n_{E^+X^- \text{ εσωτ.}}}{n_{E^+ \text{ επιφαν.}}} = \frac{n_{A^+ \text{ επιφαν.}}}{n_{A^+X^- \text{ εσωτ.}}} \quad (2)$$

Το ποσοστό του αναλύτη που παραμένει στο εσωτερικό των σταγονιδίων δεν ανιχνεύεται και χάνεται υπό τη μορφή άλατος. Στην περίπτωση του συντελεστή μερισμού, προσδιορίζεται η ποσότητα του αναλύτη που βρίσκεται στην υδατική φάση. Συνδυάζοντας τον συντελεστή μερισμού με την κατανομή των αναλυτών στα σταγονίδια, ο αναλύτης που βρίσκεται στο εσωτερικό των σταγονιδίων αντιπροσωπεύει την ποσότητα του αναλύτη που βρίσκεται στην οργανική φάση ενώ το ποσοστό του αναλύτη που καταλαμβάνει την επιφάνεια των σταγονιδίων αντιστοιχεί στην ποσότητα του αναλύτη στην υδατική φάση. Συνεπώς από τις εξισώσεις 1 και 2 προκύπτει (εξίσωση 3):

$$\log P_A = \log \left(\frac{C_{A \text{ οργ.}}}{C_{A \text{ υδατ.}}} \right) \Rightarrow P_A = \frac{C_{A \text{ οργ.}}}{C_{A \text{ υδατ.}}} = \lambda_A \frac{n_{A^+X^- \text{ οργ.}}}{n_{A^+ \text{ υδατ.}}} = \lambda_A \cdot \frac{n_{E^+X^- \text{ οργ.}}}{n_{E^+ \text{ υδατ.}}} \cdot \frac{K_{A^+}}{K_{E^+}} = \Phi_A \frac{K_{A^+}}{K_{E^+}} \quad (3)$$

Από την εξίσωση 4 είναι δυνατός ο υπολογισμός της συνολικής συγκέντρωσης των ιόντων αναλύτη που βρίσκονται στις επιφάνειες των σταγονιδίων:

$$[A^+]_{\varepsilon\pi}^2 \left(\frac{K_A}{K_E} - 1 \right) - [A^+]_{\varepsilon\pi} \left([Q] \left(\frac{K_A}{K_E} - 1 \right) + C_A \frac{K_A}{K_E} + C_E \right) + C_A [Q] \frac{K_A}{K_E} = 0 \quad (4)$$

με $[A^+]_{\varepsilon\pi}$ = συγκέντρωση ιόντων αναλύτη στην επιφάνεια των σταγονιδίων
 C_A, C_E = συγκέντρωση αναλύτη και ιόντων ρυθμιστικού διαλύματος στο αρχικό διάλυμα εισαγωγής αντιστοίχως

$[Q]$ = συγκέντρωση του πλεονάζοντος φορτίου

K_A, K_E = σταθερές ισορροπίας αναλύτη και ιόντος ρυθμιστικού διαλύματος αντίστοιχα

Σε περιπτώσεις που οι αναλύτες είναι 2 ή περισσότεροι η εξίσωση 4 γίνεται ακόμα πιο δύσκολη αφού για την ανάλυση 2 αναλυτών η εξίσωση 4 μετατρέπεται σε εξίσωση τρίτου βαθμού.

Ωστόσο στην περίπτωση που $C_A \ll [Q]$ τότε η εξίσωση 4 μπορεί να απλοποιηθεί (εξίσωση 5):

$$[A^+]_{\varepsilon\pi} = C_A \left(\frac{K_A/K_E}{K_A/K_E - 1 + C_E/[Q]} \right) \quad (5)$$

Από τις εξισώσεις 5 και 3 προκύπτει (εξίσωση 6):

$$[A^+] = C_{A^+} \left(\frac{\frac{P_A}{\Phi_A}}{\frac{P_A}{\Phi_A} - 1 + \frac{C_{E^+}}{|Q|}} \right) \quad (6)$$

Αντίστοιχα για το εσωτερικό πρότυπο η εξίσωση 6 μετατρέπεται στην εξίσωση 7:

$$[B^+] = C_{B^+} \left(\frac{\frac{P_B}{\Phi_B}}{\frac{P_B}{\Phi_B} - 1 + \frac{C_{E^+}}{|Q|}} \right) \quad (7)$$

Από τις εξισώσεις 6 και 7 προκύπτει (εξίσωση 8):

$$\frac{[A^+]}{[B^+]} = \frac{\frac{P_A}{\Phi_A} - 1 + \frac{C_{E^+}}{|Q|}}{\frac{P_B}{\Phi_B} - 1 + \frac{C_{E^+}}{|Q|}} \Rightarrow \frac{[A^+]}{[B^+]} = \frac{P_A}{P_B} \quad (8)$$

Φ_A και Φ_B = σταθερά αναλογίας για τον αναλύτη (A) και του εσωτερικού προτύπου (B)

Στο επόμενο στάδιο εισάγεται ο παράγοντας pK_a στον προσδιορισμό της λιποφιλίας μέσω των τιμών $\log D$ των εξισώσεων 9 και 10:

Οξέα

$$\text{Log } D = \text{Log } P - \text{Log}(1 + 10^{pH-pK_a}) \quad (9)$$

Βάσεις

$$\text{Log } D = \text{Log } P - \text{Log}(1 + 10^{pK_a-pH}) \quad (10)$$

Τελικά η εξίσωση 11 συνδυάζει την τιμή $\log D$ του αναλύτη με τον λόγο σήματος (αναλύτη / εσ. προτύπου):

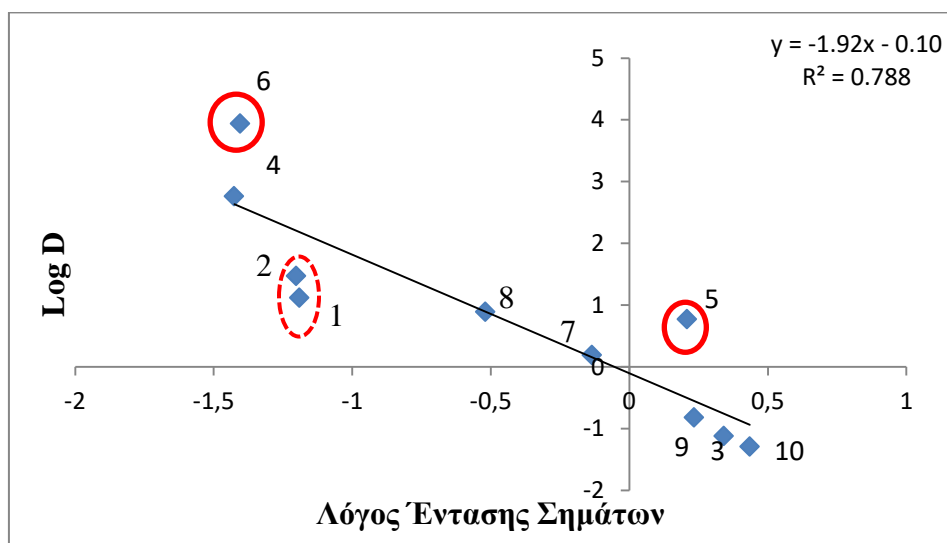
$$\text{Log } D_{\text{αναλύτη}} = \text{Log} \left(\frac{R_{\text{αναλύτη}}}{R_{\text{εσ. προτύπου}}} \right) + \text{Log } D_{\text{εσ. προτύπου}} \quad (11)$$

Η μαθηματική σχέση που χρησιμοποιείται, χωρίς την παρουσία του εσωτερικού προτύπου θα απέδιδε μόνο μια σειρά κατάταξης (ranking) των ενώσεων που εξετάζονται χωρίς όμως την δυνατότητα αυτές να αντιστοιχίζονται σε πραγματικές τιμές λιποφιλίας. Η σύγκριση όμως των πειραματικών αποτελεσμάτων με την υπολογισμένη με άλλη μεθοδολογία τιμή του συντελεστή λιποφιλίας του εσωτερικού προτύπου δίνει προσεγγιστικά, την πραγματική τιμή της λιποφιλίας εκφρασμένη στην ορθή κλίμακα.

2.1.2 ΟΞΕΑ

- Συγκέντρωση $C = 2.5 \text{ mM}$.
- Ρυθμιστικό διάλυμα: Οξικό αμμώνιο / Οξικό οξύ ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4^+ / \text{CH}_3\text{COOH}$) με συγκέντρωση $C = 50 \text{ mM}$.
- Οι αναλύτες διαλύθηκαν στο 100% ρυθμιστικό διάλυμα (εξαίρεση αποτελεί το Μεφαιναμικό οξύ που το διάλυμα περιείχε 40% μεθανόλη).

Η συσχέτιση του λόγου της έντασης σήματος (οξέων / εσ. προτύπου) με τις τιμές $\log D_{5.0}$ παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3: Λόγος έντασης σήματος των αναλυτών / εσωτερικού προτύπου σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{5.0}$.

Η συσχέτιση των τιμών $(R_{\text{αναλύτη}} / R_{\text{εσ. προτύπου}}) - \log D_{5.0}$ οδήγησε στην εξίσωση 12 με μέτρια στατιστικά στοιχεία:

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{5.0A} &= - 1.92 (\pm 0.36) \text{Log } (R_A / R_B) - 0.10 (\pm 0.31) \\ N &= 10 \quad R^2 = 0.788 \quad R = 0.886 \quad s = 0.83 \end{aligned} \quad (12)$$

Με βάση την εξίσωση 12, υπολογίζονται οι τιμές $\log D_{5.0}$ των οξέων και συγκρίνονται με τις πειραματικές τιμές (**Πίνακας 4**).

Πίνακας 4: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D_{5.0}$ (υπολ.) και οι πειραματικές τιμές $\log D_{5.0}$ των αντίστοιχων ενώσεων και η αντίστοιχη απόκλιση.

Αναλύτες		Log $D_{5.0}$ (υπολ.)	Log $D_{5.0}$	Απόκλιση
1	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	2.18	1.12	1.06
2	4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	2.20	1.47	0.73
3	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	-0.76	-1.12	0.36
4	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	2.63	2.76	-0.13
5	5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-0.50	0.77	-1.27
6	Μεφαιναμικό οξύ	2.59	3.94	-1.35
7	Σαλικυλικό οξύ	0.16	0.19	-0.03
8	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	0.89	0.89	0.00
9	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	-0.55	-0.82	0.27
10	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-0.94	-1.29	0.35

Κατά την σύγκριση των τιμών $\log D_{5.0}$ είναι γενικά αποδεκτή η απόκλιση της υπολογιστικής τιμής από την πειραματική για $\Delta \leq 0.5$. Για αποκλίσεις τιμών $0.5 < \Delta < 1$ καθίσταται εντός αποδεκτών ορίων, ενώ για $\Delta > 1$ οι υπολογιστικές τιμές θεωρούνται μη αποδεκτές. Σύμφωνα με τα παραπάνω:

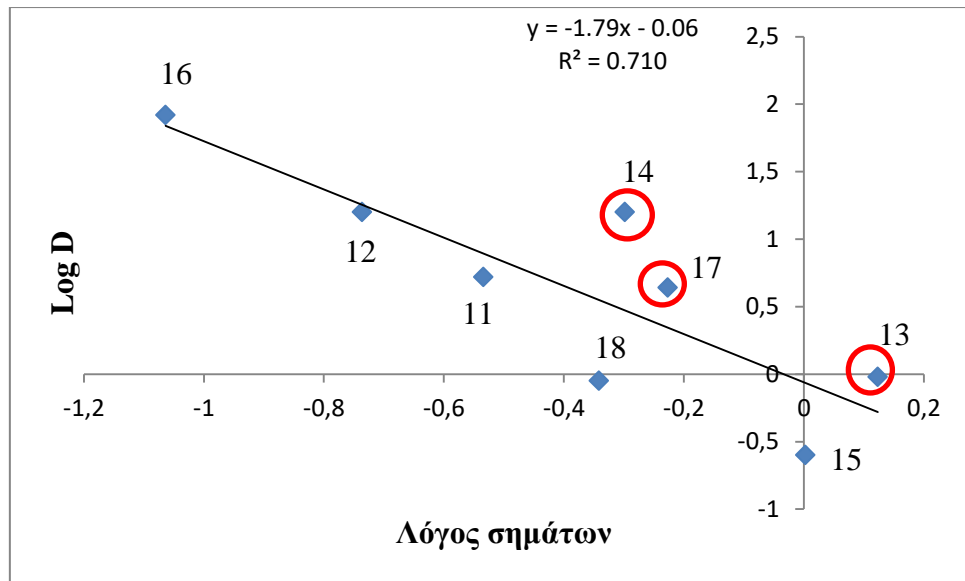
- 6 αποδεκτές τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)
- 1 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)
- 3 μη αποδεκτές τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)

Σημαντική απόκλιση εμφανίζεται για τα οξέα Μεφαιναμικό οξύ και 5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ. Τα 4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ και 4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ παρουσιάζουν μικρότερες αποκλίσεις

2.1.3 ΒΑΣΕΙΣ

- Συγκέντρωση $C = 5 \mu\text{M}$.
- Ρυθμιστικό διάλυμα: Οξικό αμμώνιο / Οξικό οξύ ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4^+ / \text{CH}_3\text{COOH}$) με συγκέντρωση $C = 10 \text{ mM}$.
- Οι αναλύτες διαλύθηκαν σε 100% ρυθμιστικό διάλυμα.

Κάθε κύκλος ανάλυσης περιείχε τον αναλύτη (βάση και επαμφοτερίζουσα) και το εσωτερικό πρότυπο. Η συσχέτιση τιμών του λόγου των σημάτων – τιμές $\log D_{5.0}$ παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.



Σχήμα 4: Λόγος έντασης σήματος των αναλυτών / εσωτερικού προτύπου σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{5.0}$.

Η συσχέτιση των τιμών $(R_{\text{αναλύτη}} / R_{\text{εσ. προτύπου}}) - \log D_{5.0}$ οδήγησε στην εξίσωση 13 με χαμηλό συντελεστή συσχέτισης:

$$\text{Log } D_{5.0A} = -1.79 (\pm 0.47) \text{Log } (R_A / R_B) - 0.06 (\pm 0.25) \quad (13)$$

$N = 8 \quad R^2 = 0.710 \quad R = 0.842 \quad s = 0.48$

Με βάση την εξίσωση 13, υπολογίζονται οι τιμές $\log D_{5.0}$ των οξέων και συγκρίνονται με τις πειραματικές τιμές (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D$ (υπολ.) και οι πειραματικές τιμές $\log D$ των αντίστοιχων ενώσεων και η αντίστοιχη απόκλιση.

Αναλύτες		Log $D_{5.0}$ (υπολ.)	Log $D_{5.0}$	Απόκλιση
11	Σουλφαμεθοξαζόλη	0.89	0.72	0.17
12	Αμιτριπτυλίνη	1.25	1.20	0.05
13	Διλτιαζέμη	-0.28	-0.02	-0.26
14	Αλοπεριδόλη	0.47	1.20	-0.73
15	Λιδοκαΐνη	-0.06	-0.60	0.54
16	Νορτριπτυλίνη	1.84	1.92	-0.08
17	Προμεθαζίνη	0.34	0.64	-0.30
18	Προπρανολόλη	0.55	-0.05	0.60

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5 διαπιστώνονται:

- 5 αποδεκτές τιμές Log D_{5,0} (υπολ.)
- 3 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log D_{5,0} (υπολ.)
- 0 μη αποδεκτές τιμές Log D_{5,0} (υπολ.)

Σημαντική απόκλιση εμφανίζεται για την βασική ένωση Αλοπεριδόλη. Μικρότερη απόκλιση εμφανίζει η βάση Προμεθαζίνη. Επίσης οι βασικές ενώσεις Αλοπεριδόλη, Προμεθαζίνη και Διλτιαζέμη επηρεάζουν δυσμενώς την ευθεία παλινδρόμησης (μετατόπιση της ευθείας).

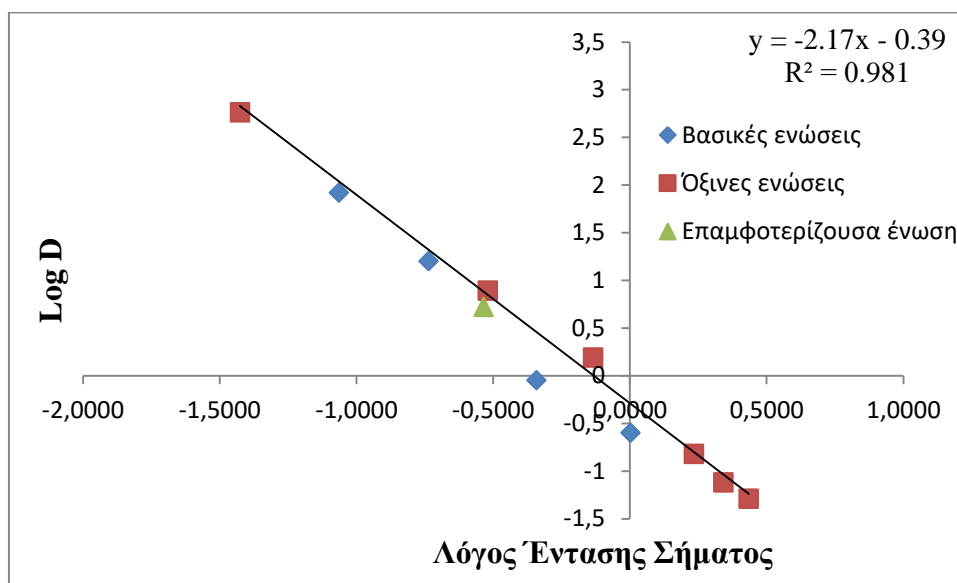
2.1.4 ΟΞΕΑ + ΒΑΣΕΙΣ

Στο παρόν στάδιο αφαιρούνται οι έκτροπες τιμές (Μεφαιναμικό οξύ, 5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ, 4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ και 4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ για τα οξέα και Αλοπεριδόλη, Προμεθαζίνη και Διλτιαζέμη για τις βάσεις) των Σχημάτων 3 και 4 και σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη του Σχήματος 5 που περιλαμβάνει 6 οξέα, 4 βάσεις και 1 επαμφοτερίζουσα (μη ιοντισμένη μορφή σε pH 5.0). Στον Πίνακα 6 καταγράφονται οι αναλύτες της πρότυπης καμπύλης.

Πίνακας 6: Χημικές ενώσεις για τον σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης.

Αναλύτες		Οξέα / Βάσεις
1	2,5 – Διοξυ - Βενζοϊκό οξύ	Οξέα
2	2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	
3	Σαλικυλικό οξύ	
4	2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	
5	4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	
6	2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	
7	Σουλφαμεθοξαζόλη	Επαμφοτερίζων
8	Αμιτριπυλίνη	Βάσεις
9	Λιδοκαΐνη	
10	Νορτριπυλίνη	
11	Προπρανολόλη	

Η συσχέτιση τιμών του λόγου των σημάτων - τιμές $\log D_{5.0}$ παρουσιάζεται στο Σχήμα 5 και περιγράφεται από την εξίσωση 14.



Σχήμα 5: Λόγος έντασης σήματος των πρότυπων χημικών ενώσεων / εσωτερικού προτύπου σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{5.0}$.

Η συσχέτιση των τιμών $(R_{\text{αναλύτη}} / R_{\text{εσ. προτύπου}}) - \log D_{5.0}$ οδήγησε στην εξίσωση 14 με πολύ καλό συντελεστή συσχέτισης:

$$\begin{aligned} \text{Log } D_{5.0A} &= -2.17 (\pm 0.10) \text{Log } (R_A / R_B) - 0.39 (\pm 0.07) & (14) \\ N &= 11 & R^2 &= 0.981 & R &= 0.990 & s &= 0.19 \end{aligned}$$

Από την εξίσωση 14 υπολογίζονται οι τιμές $\text{Log } D_{5.0}$ όλων των χημικών ενώσεων (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Οι υπολογισμένες τιμές $\log D_{5.0}$ (υπολ.) και οι πειραματικές τιμές $\log D_{5.0}$ των αντίστοιχων ενώσεων και η αντίστοιχη απόκλιση.

	Οξέα / Βάσεις	Αναλύτες	Log $D_{5.0}$ (υπολ.)	Log $D_{5.0}$	Απόκλιση
1	Οξέα	4 – Μεθοξυ – Βενζοϊκό οξύ	2.19	1.12	1.07
2		4 – Χλωρο – Βενζοϊκό οξύ	2.22	1.47	0.75
3		2,5 – Διοξυ – Βενζοϊκό οξύ	-1.13	-1.12	-0.01
4		2,5 – Διχλωρο – Φαινόλη	2.70	2.76	-0.06
5		5 – Χλωρο – Σαλικυλικό οξύ	-0.85	0.77	-1.62
6		Μεφαιναμικό οξύ	2.65	3.94	-1.29
7		Σαλικυλικό οξύ	-0.10	0.19	-0.29
8		2 – Βενζοϋλο – Βενζοϊκό οξύ	0.73	0.89	-0.16
9		4 – Ακεταμιδο – Σαλικυλικό οξύ	-0.90	-0.82	-0.08
10		2 – Χλωρο – 4 – Νιτρο – Βενζοϊκό οξύ	-1.34	-1.29	-0.05
11	Επαμφοτερίζων	Σουλφαμεθοξαζόλη	0.77	0.72	0.05
12	Βάσεις	Αμιτριπυλίνη	1.20	1.20	0.00
13		Διτταζέμη	-0.66	-0.02	-0.64
14		Αλοπεριδόλη	0.25	1.20	-0.95
15		Λιδοκαΐνη	-0.40	-0.60	0.20
16		Νοτριπυλίνη	1.92	1.92	0.00
17		Προμεθαζίνη	0.10	0.64	-0.54
18		Προπρανολόλη	0.35	-0.05	0.40

Σύμφωνα με τον Πίνακα 7 διαπιστώνονται:

- 11 αποδεκτές τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)
- 4 εντός αποδεκτών ορίων τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)
- 3 μη αποδεκτές τιμές Log $D_{5.0}$ (υπολ.)

Οι μεγαλύτερες αποκλίσεις εμφανίζονται για τις ενώσεις που αποκλίστηκαν κατά τον σχεδιασμό της καμπύλης του Σχήματος 5.

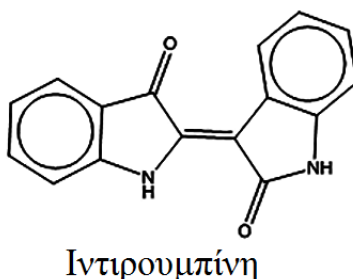
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στον προσδιορισμό λιποφιλίας οξέων μέσω της έντασης σήματος σε πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό και με την χρήση εσωτερικού προτύπου ανέκυψαν μέτρια στατιστικά αποτελέσματα. Ανάλογη συμπεριφορά εμφανίστηκε στον προσδιορισμό λιποφιλίας βασικών ενώσεων. Ωστόσο, εάν αποκλειστούν οι έκτροπες τιμές και σχεδιαστεί εν νέου η πρότυπη καμπύλη που περιλαμβάνει οξέα και βάσεις, τότε προκύπτει πολύ καλή συσχέτιση της έντασης σήματος των αναλυτών με τις τιμές $\log D$. Παρατηρήθηκε τάση για οξέα και βάσεις με τιμές $\log D$ μικρότερες των εσωτερικών προτύπων να εμφανίζουν μεγαλύτερη ένταση σήματος (εξάιρεση αποτελεί η Προπρανολόλη). Επίσης, στην περίπτωση των οξέων την μεγαλύτερη απόκλιση εμφάνισαν το 5 - Χλωρο - Σαλικυλικό οξύ με την μικρότερη τιμή pK_a και το Μεφαιναμικό οξύ με την μεγαλύτερη τιμή pK_a . Ενδεχομένως, ο παράγοντας pK_a να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη κατανομή των αναλυτών μέσα στα σταγονίδια. Επιπλέον το διάλυμα ένεσης του Μεφαιναμικού οξέως περιείχε 40% μεθανόλη που πιθανώς να επηρέαζε την ανάλυση. Για διαλύματα που εισάγονται στη πηγή ιοντισμού με μεγάλο ποσοστό νερού παρατηρείται αύξηση στην απόκριση του αναλύτη. Με την αύξηση του ποσοστού του νερού οι υδρόφοβες ενώσεις έχουν την τάση να απομακρύνονται από το εσωτερικό του σταγονιδίου και να καταλαμβάνουν την επιφάνεια του. Βέβαια, στην περίπτωση εξαιρετικά λιπόφιλων χημικών ενώσεων υπάρχει περιορισμός στο ποσοστό του νερού διότι περαιτέρω αύξηση συνεπάγεται μείωση της διαλυτότητας, επομένως επέρχεται μείωση της έντασης του σήματος. Επιπρόσθετα, με τη χρήση διαλυτών μικρότερης επιφανειακής τάσης όπως πχ η μεθανόλη σε σύγκριση με το νερό επιτυγχάνεται ευχερέστερη αποδιαλύτωση των σταγονιδίων με αποτέλεσμα την αύξηση του σήματος. Φαίνεται, λοιπόν, ότι ο μηχανισμός της αποδιαλύτωσης είναι πολυπαραγοντικός με αποτέλεσμα η απλούστευση του να οδηγεί σε προσεγγιστικά μόνο συμπεράσματα.

3ο ΜΕΡΟΣ: ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗ ΣΤΗ ΣΤΗΛΗ ΙΑΜ ΚΑΙ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

3.1 ΙΝΤΙΡΟΥΜΠΙΝΕΣ

Τα ιντιγκοειδή στην αρχαιότητα χρησιμοποιούνταν ως μέσο βαφής. Την δεκαετία του 90 το ενδιαφέρον έγινε εντονότερο όταν διαπιστώθηκε η συμβολή τους σε Κινέζικη συνταγή για την θεραπεία της λευχαιμίας. Ο τίτλος που δόθηκε στη συνταγή είναι το Danggui Longhui Wan και χρησιμοποιείται στην Παραδοσιακή Κινέζικη Ιατρική. Οι ιντιρουμπίνη και ίντιγκο αποτελούν τον πυρήνα του σκελετού των ιντιγκοειδών, που συγκροτούν μια ξεχωριστή κατηγορία ισομερών διμερών ινδολίου αποτελώντας συστατικά της βαφής των Μπλέ Ίντιγκο και Μώβ Tyrian. Η βαφή Ίντιγκο Μπλέ προέρχεται από τα φύλλα των φυτών *Isatis* sp. (Brassicaceae), *Polygonum* sp. (Polygonaceae) and *Indigofera* sp. (Fabaceae). Ο σχηματισμός των ιντογκοειδών στη φύση βασίζεται στη σύνθεση των ενδιάμεσων προϊόντων ινδόλης από βακτήρια, οργανισμούς, φυτά ή μαλάκια [74].



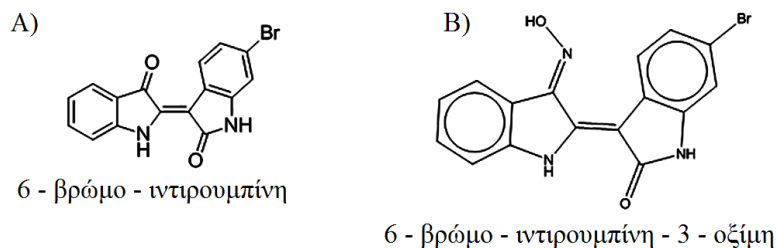
Σχήμα 1: Ιντιρουμπίνη (φυσικό προϊόν)

3.1.1 Παράγωγα Ιντιρουμπινών

Έχουν συντεθεί αρκετά δομικά ομόλογα των ιντιρουμπινών. Η 6 – βρωμοϊντιρουμπίνη - 3 – οξίμη ανήκει σε μια μεγάλη κατηγορία τροποποιημένων ιντιρουμπινών στη προσπάθεια δημιουργίας ενισχυμένων φαρμακολογικά ενεργών παραγόντων.

Έχουν προταθεί για την αντιμετώπιση παρασιτικών λοιμώξεων όπως η λεισμανίαση και το τοξόπλασμα. Πλέον οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην αντιμετώπιση του καρκίνου με την βοήθεια τροποποιημένων ιντιρουμπινών.

Ιντιρουμπίνες που περιέχουν ετεροάτομα στον ανθρακικό σκελετό έχουν την δυνατότητα να διαλυτοποιούνται ευκολότερα και να διαφοροποιείται ο μηχανισμός δράσης. Η προσθήκη του βρωμίου και της οξίμης πραγματοποιήθηκε με σκοπό την αύξηση της λιποφιλίας [74].



Σχήμα 2: Παράγωγα μορίου ιντιρουμπίνης. Α) 6 – βρώμο – ιντιρουμπίνη, Β) 6 – βρώμο – ιντιρουμπίνη – 3 – οξίμη

3.1.2 Μηχανισμός δράσης των Ιντιρουμπινών

Ο μηχανισμός στην αντιμετώπιση του καρκίνου στοχεύει στις κινάσες που συμμετέχουν στη μετάδοση σημάτων μεταξύ των κυττάρων και στην αποκλίνουσα δραστηριότητα τους σε περιπτώσεις νόσων. Οι κινάσες έχουν γίνει αντικείμενο έρευνας για την αντιμετώπιση του καρκίνου σε μεγάλο βαθμό την τελευταία δεκαετία από ερευνητικά κέντρα και βιομηχανίες.

Η ικανότητα των ιντιρουμπινών και της ιντιρουμπίνη – 3 – οξίμη να αναστέλλουν τις CDK έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για την σύνθεση δομικών αναλόγων με την υποκατάσταση ατόμων.

Οι συνηθέστερες υποκαταστάσεις που γίνονται στις ιντιρουμπίνες είναι η προσθήκη οξίμης, αλογόνων, εστέρων, καρβοξυλικό οξύ και αλυσίδες αμινών.

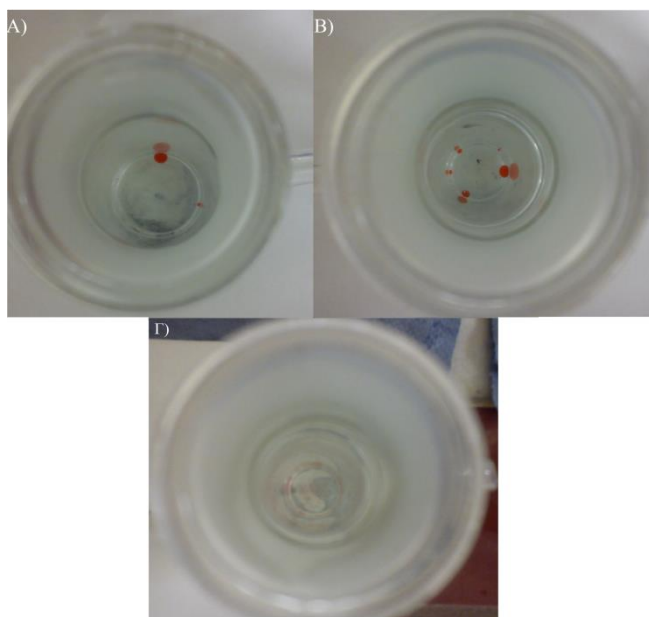
Η υπερβολική έκφραση κινασών εμφανίζεται συχνά στα κυτταρικά σήματα των συμπαγών όγκων και η αντιμετώπιση της μέσω μικρών μορίων που επιδρούν στην διαδικασία μεταφοράς σήματος από κύτταρο σε κύτταρο έχει συγκεντρώσει το ερευνητικό ενδιαφέρον.

Η ικανότητα των ιντιρουμπινών να αναστέλλουν τις κινάσες έχει επισκιάσει κάθε άλλη λειτουργία τους που είναι ευεργητική για τον ανθρώπινο οργανισμό.

Μπορεί οι αναστολές των CDK ή γενικότερα των κινασών να θεωρούνται δικαιολογημένα υψίστης σημασίας ωστόσο η έλλειψη εκλεκτικότητας λόγω των δομικών ομοιοτήτων των κινασών είναι ένα μεγάλο μειονέκτημα.

Στα 20 χρόνια που οι ιντιρουμπίνες βρίσκονται στο επίκεντρο των ερευνών έχουν γίνει αρκετά *in vivo* πειράματα αλλά δεν υπάρχουν κλινικά αποτελέσματα για τα παράγωγα ιντιρουμπινών. Τα θετικά αποτελέσματα που έχουν εμφανίσει τα παράγωγα ιντιρουμπινών σε *in vitro* πειράματα δεν έχουν συνδυαστεί με πειράματα *in vivo*. Το συγκεκριμένο κενό είναι σημαντικό για την αξιοποίηση των πλεονεκτημάτων των ιντιρουμπινών στην παραγωγή φαρμάκων. Από τους επικρατέστερους λόγους είναι το μικρό ποσοστό διαλυτότητας των ιντιρουμπινών και της μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας. Προσπάθειες για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων είχαν γίνει με την προσθήκη ειδικών φορέων που αυξάνει την διαλυτότητα,

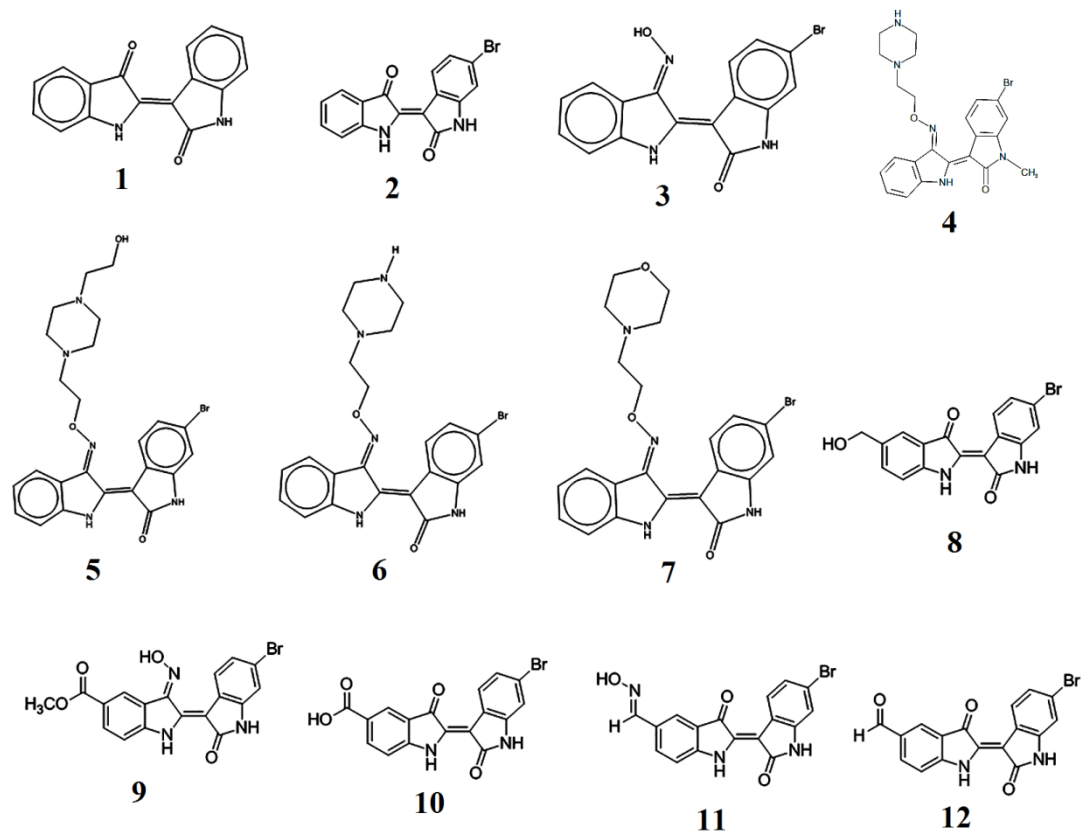
την βιοδιαθεσιμότητα και δίνει καλύτερη εικόνα των τοξικολογικών αποτελεσμάτων. Ωστόσο, χρειάζεται η έρευνα να συνεχιστεί περαιτέρω στον συγκεκριμένο τομέα.



Σχήμα 3: Προβλήματα κατά τον προσδιορισμό λιποφιλίας της 6 – Βρώμο – Ιντιρουμπίνης με την μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης λόγω μεγάλης λιποφιλίας (ή υδροφοβίας). Συνολική μετάβαση των μορίων 6 – Βρώμο – Ιντιρουμπίνης στην οκτανόλη με αποτέλεσμα απουσία της από το υδατικό μέρος A) όγκος ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών: 4 mL / όγκος οκτανόλης: 2 mL, B) όγκος ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών: 4 mL / όγκος οκτανόλης: 4 mL, Γ) όγκος ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών: 4 mL (δεν έχει προστεθεί οκτανόλη διότι αντιπροσωπεύει $C_{αρχ.}$)

Εκτός από τις δομικές ομοιότητες των κινασών που οδηγούν σε μη εκλεκτική σύνδεση, ένας επιπλέον παράγοντας που συνεισφέρει στην απώλεια εκλεκτικότητας είναι η μεγάλη συγγένεια που παρουσιάζουν οι ιντιρουμπίνες για την περιοχή σύνδεσης των ATP μορίων. Έτσι οι ιντιρουμπίνες συνδέονται ισχυρά στις κοιλότητες δυο μεγάλων ομάδων κινασών (κινάσες σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης) που οδηγεί σε πολλαπλή στόχευση [74].

Στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων ΕΚΠΑ γίνεται εκτεταμένη έρευνα στη σύνθεση νέων εκλεκτικών ιντιρουμπινών, η δομή των οποίων φαίνεται στο Σχήμα 4.



Σχήμα 4: Δομές παραγώγων φυσικής ιντιρουμπίνης.

3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΙΝΤΙΡΟΥΜΠΙΝΩΝ

Οι ιντιρουμπίνες αντιπροσωπεύουν χημικές ενώσεις εξαιρετικά λιπόφιλες που χαρακτηρίζονται από την δυσκολία προσδιορισμού της λιποφιλίας τους με την εφαρμογή της παραδοσιακής τεχνικής της ανακινούμενης φιάλης.

3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ pH = 7.4

Στον Πίνακα 1 περιγράφονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υπο μελέτη ενώσεων (pKa, Log D_{7.4}).

Πίνακας 1: Αναλύτες, pKa, Log D και τυπική απόκλιση για pH 7.4 των εκάστοτε αναλυτών

Αναλύτες	pKa*(οξύ)	±	pKa*(βάση)	±	Log D _{7.4} **	Log P**
1	-	-	-	-	-	2.37
2	-	-	-	-	-	3.18
3	8.30	±0.5	-	-	3.32	-
4	-	-	8.10	±0.5	3.35	-
5	-	-	7.80	±0.5	2.85	-
6	-	-	9.00	±0.5	2.17	-
7	-	-	7.40	±0.5	3.19***	-
8	-	-	-	-	-	2.58
9	8.30	±0.5	-	-	3.51	-
10	3.80	±0.5	-	-	0.11	-
11	-	-	-	-	-	2.93
12	-	-	-	-	-	2.77

* Οι τιμές pKa ελήφθησαν από το λογισμικό πρόγραμμα ADME Boxes.

**Οι τιμές Log D και Log P ελήφθησαν από το λογισμικό πρόγραμμα MedChem Designer.

***Η τιμή Log D ελήφθει από το λογισμικό πρόγραμμα ADME Boxes.

Στην ανάλυση των ιντιρουμπινών ο ανιχνευτής που είναι συνδεδεμένος με την HPLC (1^ο Μέρος Πίνακας 2) έχει ρυθμιστεί να μετράται η απορρόφηση σε $\lambda = 290 \text{ nm}$.

3.3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ IAM

➤ Ισοκρατικές συνθήκες

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε σε pH 7.4.

I. Χρωματογραφική στήλη:

- IAM.PC.DD. 2, 3cm x 4.6mm, σωματίδια 10μm

II. Ρυθμιστικό διάλυμα

- Ισοτονικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

III. Οργανικοί τροποποιητές

- Ακετονιτρίλιο

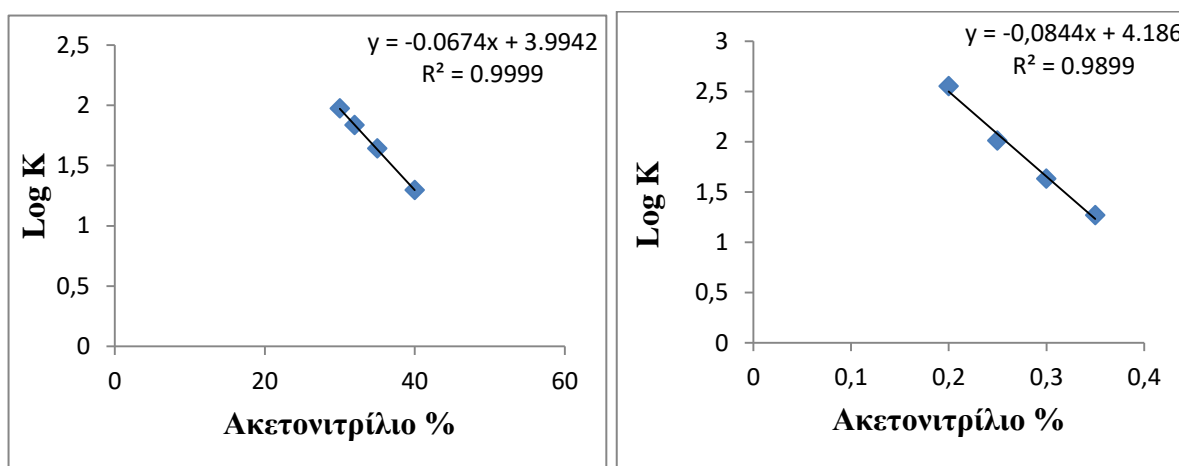
IV. Ροή κινητής φάσης: 0.50 – 3.00 mL / min

Προσδιορίστηκαν οι τιμές $\log k_{7.4\text{ιντιρ}}$ σε τουλάχιστον 4 αναλογίες ακετονιτρίλιου και ελήφθησαν οι ανηγμένες τιμές $\log k_{w7.4\text{ιντιρ}}$.

Πίνακας 2: Αναφέρονται οι αναλογίες ρυθμιστικού διαλύματος – οργανικού τροποποιητή των κινητών φάσεων για τον υπολογισμό των ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4\text{ιντιρ}}$ (για τον κάθε αναλύτη).

pH = 7.4				
PBS / Ακετονιτρίλιο				
60 / 40	63 / 37	65 / 35	68 / 32	70 / 30

Στο Σχήμα 5 φαίνονται οι απεικονίσεις $\log k_{7.4\text{ιντιρ}} / \varphi_{7.4\text{ιντιρ}}$ (ποσοστό οργανικού τροποποιητή) δυο αντιπροσωπευτικές ενώσεις



Σχήμα 6: Συσχέτιση του ποσοστού οργανικού τροποποιητή – λογαριθμικού παράγοντα συσχέτισης. Α) Ιντιρουμπίνη 4 ($\text{Log } D_{7.4} = 3,35$), Β) Ιντιρουμπίνη 12 ($\text{Log } D_{7.4} = 2,77$)

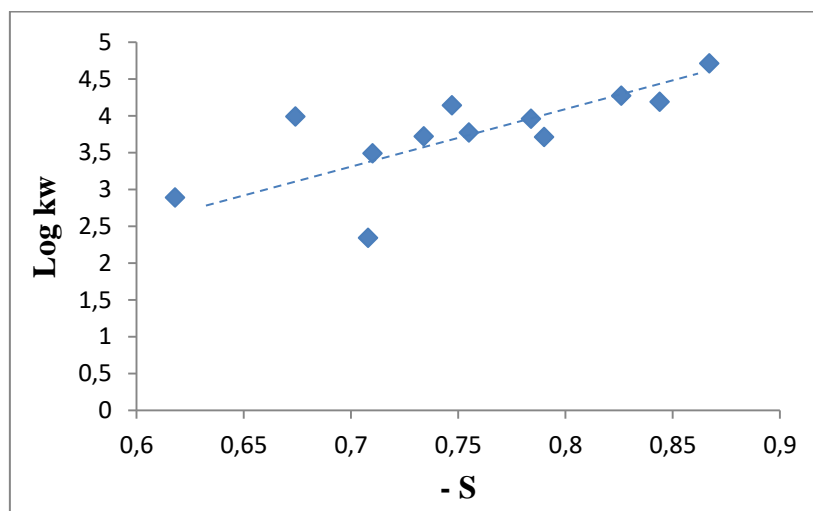
Οι σχέσεις $\log k_{7.4\text{ιντιρ}} / \varphi_{7.4\text{ιντιρ}}$ (ποσοστό οργανικού τροποποιητή) χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4\text{ιντιρ}}$. Σε όλες τις περιπτώσεις οι συντελεστές προσδιορισμού (R^2) είναι μεγαλύτεροι από 0.9729. Στον Πίνακα 3 περιλαμβάνονται οι τιμές $\log k_{w7.4\text{ιντιρ}}$, οι κλίσεις S των συσχετίσεων, οι συντελεστές προσδιορισμού (R^2) και τα αντίστοιχα στατιστικά στοιχεία.

Πίνακας 3: Εξεταζόμενες χημικές ενώσεις, οι τιμές R^2 , ο λογαριθμικός παράγοντας συγκράτησης ($\log k_{w7.4ivtip}$), η κλίση ευθείας (S) των γραφικών παραστάσεων ισοκρατικής έκλυσης και τη τυπική απόκλιση αντίστοιχα.

Αναλύτες	$\log k_{w7.4ivtip}$	\pm	S	\pm	R^2
1	2.89	0.11	-0.0618	0.003	0.9947
2	3.72	0.06	-0.0734	0.002	0.9989
3	4.14	0.15	-0.0747	0.005	0.9916
4	3.99	0.02	-0.0674	0.001	0.9999
5	3.77	0.19	-0.0755	0.005	0.9850
6	3.49	0.17	-0.0710	0.005	0.9858
7	3.96	0.11	-0.0784	0.003	0.9968
8	3.71	0.18	-0.0790	0.006	0.9872
9	4.71	0.30	-0.0867	0.01	0.9729
10	2.34	0.22	-0.0708	0.008	0.9761
11	4.27	0.20	-0.0826	0.007	0.9855
12	4.19	0.17	-0.0844	0.006	0.9899

Η ιντιρουμπίνη 10 με την χαμηλότερη τιμή $\log D_{7.4}$ (0.11) εμφανίζει την μικρότερη τιμή $\log k_{w7.4ivtip}$ (2.34) ενώ η λιπόφιλη ιντιρουμπίνη 9 με την μεγαλύτερη τιμή $\log D_{7.4}$ (3.51) εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή $\log k_{w7.4ivtip}$ (4.71).

Στο Σχήμα 7 εξετάζεται η συσχέτιση των ανηγμένων τιμών $\log k_{w7.4ivtip}$ και της κλίσης ευθείας των ισοκρατικών εκλύσεων για την εκάστοτε οξέων.



Σχήμα 7: Ανηγμένες τιμές $\log k_{w7.4ivtip}$ και οι αντίστοιχες τιμές των κλίσεων ισοκρατικών εκλύσεων.

Σύμφωνα με το Σχήμα 7 διαφαίνεται τάση για τις ιντιρουμπίνες, υποδηλώνοντας ομοιόμορφο μηχανισμό συγκράτησης. Από τον τύπο $\log k_{7.4ivtip} = -S\phi + \log k_{w7.4ivtip}$ υπολογίζονται οι τιμές $\phi_{7.4ivtip}$ που αντιστοιχούν σε ισοκατανομή των αναλυτών μεταξύ στατικής και κινητής φάσης ($k = 1$, $\log k = 0$). Στον Πίνακα 4 αναγράφονται οι τιμές $\phi_{7.4ivtip}$

για τις υπο μελέτη ενώσεις. Η ιντιρουμπίνη 10 με την χαμηλότερη τιμή $\log D_{7.4}$ (0.11) εμφανίζει την μικρότερη τιμή $\phi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}}$ (33.08) και η ιντιρουμπίνη 9 που δεν διαθέτει την μεγαλύτερη τιμή $\log D_{7.4}$ (3.35) εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή $\phi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}}$ (59.26).

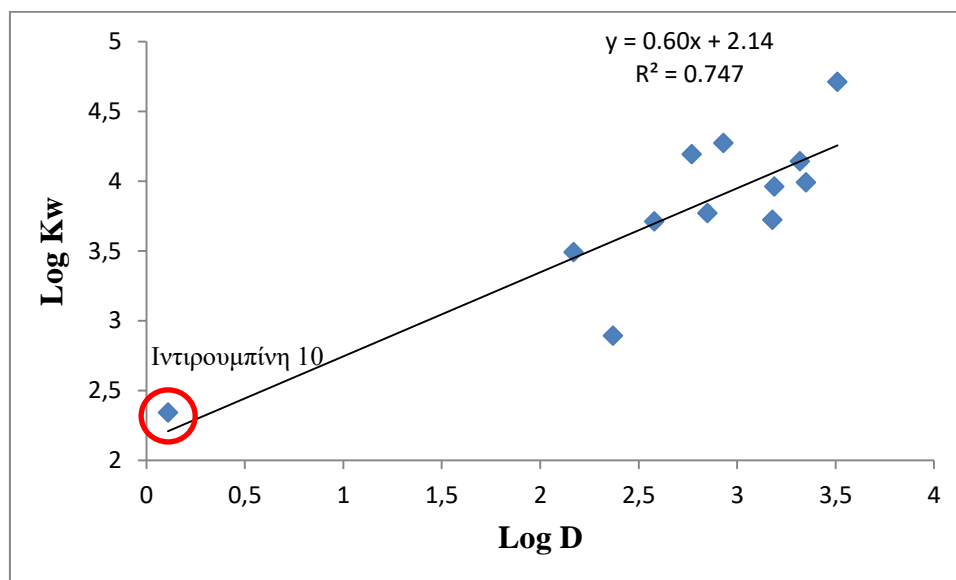
Πίνακας 4: Αναγράφονται οι αναλύτες και το αντίστοιχο ϕ_0

Αναλύτες	$\phi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}}$
1	46.67
2	50.67
3	55.47
4	59.26
5	49.92
6	49.2
7	50.55
8	46.90
9	54.33
10	33.08
11	51.68
12	49.60

Οι τιμές $\phi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}}$ είναι μεγάλες διότι αλληλεπιδρούν ισχυρά με την στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης IAM με αποτέλεσμα να απαιτείται μεγάλη ποσότητα οργανικού τροποποιητή ώστε να επιτευχθεί ισοκατανομή μεταξύ στατικής – κινητής φάσης.

3.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΚΤΑΝΟΛΗ / ΝΕΡΟ (Log D_{7.4})

Στο Σχήμα 8 απεικονίζονται οι τιμές log D_{7.4} έναντι των ανηγμένων τιμών log k_{w7.4ιντιρ}.



Σχήμα 8: Τιμές log D_{7.4} των ιντιρουμπινών σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές log k_{w7.4ιντιρ}.

Η συσχέτιση των τιμών log k_{w7.4ιντιρ} – log D_{7.4} σε συνθήκες pH = 7.4 εξάγεται η εξίσωση 1 με μικρό συντελεστή συσχέτισης.

$$\begin{aligned} \text{Log } k_{w7.4\text{ιντιρ}} &= 0.60 (\pm 0.11) \text{Log } D_{7.4} + 2.14 (\pm 0.31) \\ N &= 12 \quad R^2 = 0.747 \quad R = 0.864 \quad s = 0.34 \end{aligned} \quad (1)$$

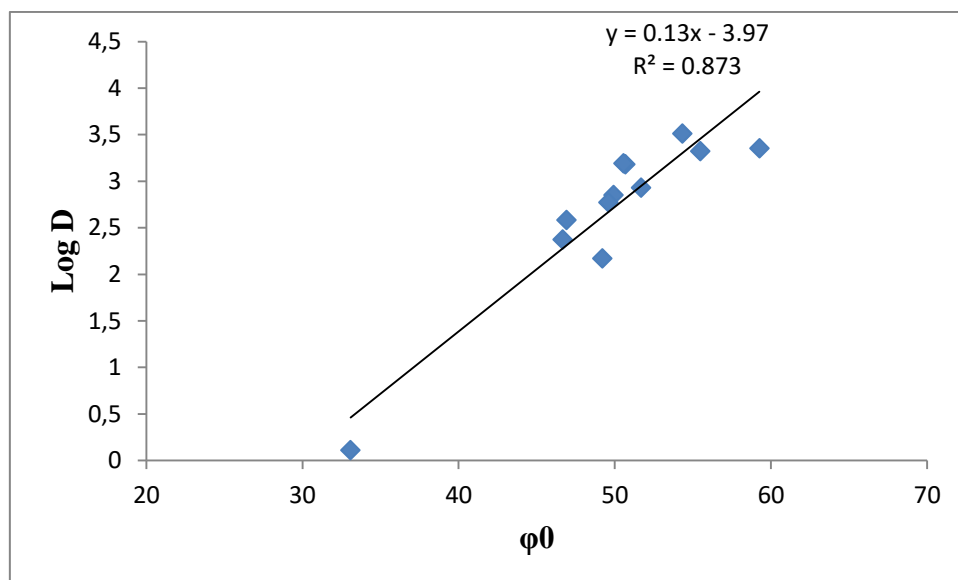
Η ιντιρουμπίνη 10 απέχει από τις υπόλοιπες ενώσεις με αποτέλεσμα να ασκεί εκμόχλευση στην ευθεία παλινδρόμησης.

Αφαιρώντας την ιντιρουμπίνη 10 προκύπτει η εξίσωση 2 με μικρή τιμή συντελεστή συσχέτισης.

$$\begin{aligned} \text{Log } k_w &= 0.80 (\pm 0.25) \text{Log } D_{7.4} + 1.54 (\pm 0.74) \\ N &= 11 \quad R^2 = 0.536 \quad R = 0.732 \quad s = 0.34 \end{aligned} \quad (2)$$

Η μείωση του συντελεστή συσχέτισης οφείλεται στην εκμόχλευση της εξίσωσης 1 από την ένωση 10.

Στη συνέχεια παρατίθεται το διάγραμμα $\varphi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}} - \text{Log } D_{7.4}$. Η συσχέτιση οδηγεί στην εξίσωση 3 με καλύτερο συντελεστή συσχέτισης από τον αντίστοιχο συντελεστή του Σχήματος 8.



Σχήμα 9: Τιμές $\varphi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}}$ σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{7.4}$.

Η συσχέτιση των τιμών $\varphi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}} - \log D_{7.4}$ σε συνθήκες $\text{pH} = 7.4$ την εξίσωση 3 με ικανοποιητικό συντελεστή συσχέτισης.

$$\text{Log } D_{7.4} = 0.13 (\pm 0.016) \varphi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}} - 3.97 (\pm 0.809) \quad (3)$$

$$N = 12 \quad R^2 = 0.873 \quad R = 0.934 \quad s = 0.34$$

Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η πολύ καλή συσχέτιση των τιμών $\varphi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}}$ με τις τιμές $\log D_{7.4}$, με το $\varphi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}}$ να συνδυάζει τις ανηγμένες τιμές $\log k_{w_{7.4\text{ιντιρ}}}$ που αφορά κυρίως την στατική φάση και την κλίση S που αφορά κυρίως την κινητή φάση. Ωστόσο θα πρέπει να επισημανθεί ότι η ιντιρουμπίνη 10, η οποία βρίσκεται μακριά από τις υπόλοιπες στο διάγραμμα 9 εκοχλεύει ως ένα βαθμό την εξίσωση με αποτέλεσμα αύξηση του συντελεστή συσχέτισης.

➤ **Βαθμιδωτή έκλυση**

V. Χρωματογραφική στήλη:

- IAM.PC.DD. 2, 3cm x 4.6mm, σωματίδια 10μm

VI. Ρυθμιστικό διάλυμα

- Ισοτονικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

VII. Οργανικοί τροποποιητές

- Ακετονιτρίλιο

VIII. Ροή κινητής φάσης: 1 mL / min

Η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση αναφέρεται στο 1^ο Μέρος Πίνακας 2.

Στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ισοτονικό διάλυμα φωσφορικών και οργανικός τροποποιητής ακετονιτρίλιου. Τα στάδια του προγράμματος εμφανίζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης

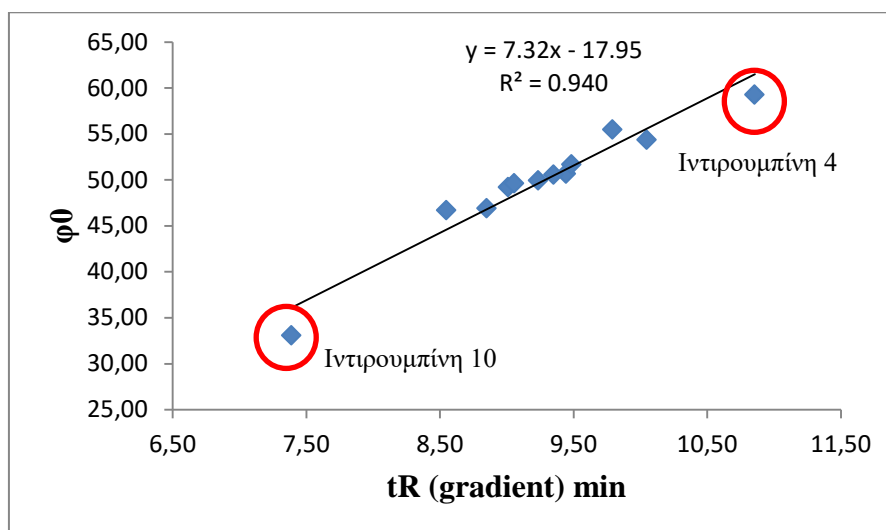
pH = 7.4		
	A = Ρυθμιστικό διάλυμα	B = Οργανικός τροποποιητής
0 – 5 min	A = 100%	B = 0%
5 – 10 min	A = 40%	B = 60%
10 – 13.5 min	A = 40%	B = 60%
13.5 – 14 min	A = 100%	B = 0%
14 – 16 min	A = 100%	B = 0%

Από την εφαρμογή βαθμιδωτής έκλυσης σύμφωνα με το πρόγραμμα του Πίνακα 5, καταγράφηκε ο χρόνος έκλυσης των 12 ιντιρουμπινών. Στον Πίνακα 6 καταγράφονται οι χρόνοι συγκράτησης t_R .

Πίνακας 6: Οι χημικές ενώσεις, χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης και τιμές $\phi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}}$ για την κάθε χημική ένωση

Αναλύτες	Χρόνος (t_R gradient) min
1	8.55
2	9.44
3	9.79
4	10.86
5	9.24
6	9.01
7	9.35
8	8.85
9	10.05
10	7.39
11	9.49
12	9.06

Στο Σχήμα 10 παρατείθεται η συσχέτιση τιμών χρόνου συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης t_R – $\phi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}}$.



Σχήμα 10: Ο χρόνος συγκράτησης βαθμιδωτής έκλουσης (t_R gradient) έναντι των τιμών $\phi_{0_{7.4\text{ιντιρ}}}$ ισοκρατικών εκλούσεων.

Η συσχέτιση των τιμών οδηγεί στην εξίσωση 4 με καλά στατιστικά στοιχεία:

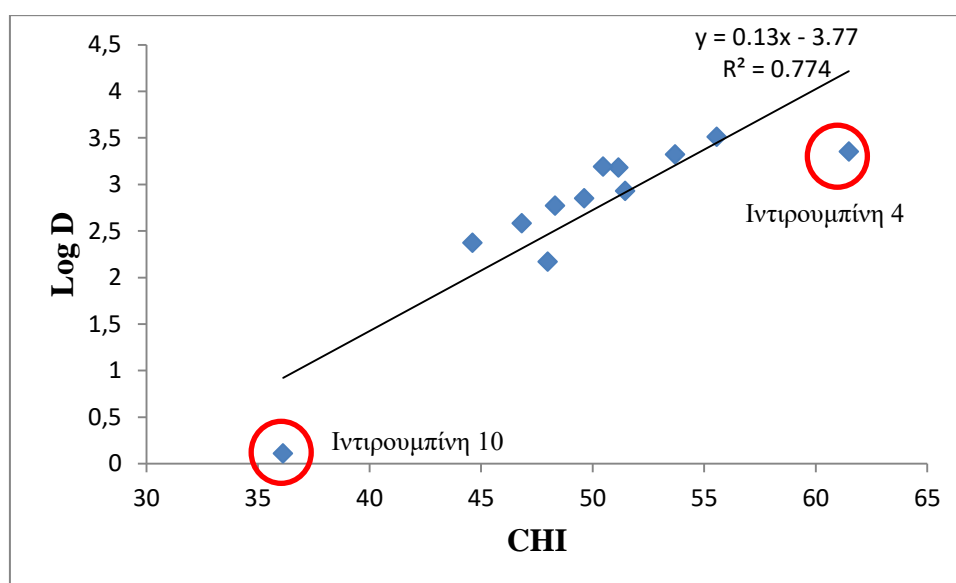
$$\text{CHI}_{7.4\text{ιντιρ}} = 7.32 (\pm 0.58) tR - 17.95 (\pm 5.43) \quad (4)$$

$$N = 12 \quad R^2 = 0.940 \quad R = 0.969 \quad s = 1.63$$

Με βάση την εξίσωση 4, υπολογίζονται οι τιμές $\text{CHI}_{7.4\text{ιντιρ}}$ των χημικών ενώσεων.

3.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CHI ΜΕ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ Log D_{7.4}

Για την συσχέτιση των τιμών log D_{7.4} χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές CHI_{7.4ιντιπ} που υπολογίστηκαν από την εξίσωση 4. Στο Σχήμα 11 αναπαρίσταται η συσχέτιση τιμών CHI_{7.4ιντιπ} – log D_{7.4}.



Σχήμα 11: Τιμές CHI_{7.4ιντιπ} των ιντιρουμπινών σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές log D_{7.4}.

Η καμπύλη του Σχήματος 11 είναι απόρροια της σχέσης των τιμών CHI_{7.4ιντιπ} και log D_{7.4} που εκφράζεται από την εξίσωση 5 με χαμηλό συντελεστή συσχέτισης

$$\text{Log } D_{7.4} = 0.13 (\pm 0.02) \text{ CHI}_{7.4\text{ιντιπ}} - 3.77 (\pm 1.13) \quad (5)$$

$$N = 12 \quad R^2 = 0.774 \quad R = 0.880 \quad s = 0.45$$

Αφαιρώντας την ιντιρουμπίνη 10 και ιντιρουμπίνη 4 από το Σχήμα 11, προκύπτει η εξίσωση 6 με ελαφρώς βελτιωμένα στατιστικά στοιχεία και διαφοροποίηση στους συντελεστές παλινδρόμησης.

$$\text{Log } D_{7.4} = 0.18 (\pm 0.02) \text{ CHI}_{7.4\text{ιντιπ}} - 2.94 (\pm 1.09) \quad (6)$$

$$N = 10 \quad R^2 = 0.782 \quad R = 0.884 \quad s = 0.21$$

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρατηρείται απόκλιση της ιντιρουμπίνης 10 (ισχυρό οξύ) που οδηγεί σε εσφαλμένο υψηλό συντελεστή συσχέτισης. Στην περίπτωση που αφαιρεθεί τότε ο συντελεστής συσχέτισης μειώνεται αισθητά (εξίσωση 2). Επίσης η ιντιρουμπίνη 4 αποκλίνει σε μικρό ποσοστό από την ευθεία ωστόσο μπορεί να οφείλεται σε σφάλμα του υπολογιστικού προγράμματος MedChem Designer κατά τον προσδιορισμό των τιμών $\log D_{7.4}$.

Στην ανάλυση των ιντιρουμπινών χαρακτηριστικοί είναι οι μεγάλοι χρόνοι συγκράτησης που εμφανίζονται στην στήλη IAM. Για την εξαγωγή συμπερασμάτων εισάγονται οι τιμές $\log D_{7.4}$ στη μελέτη των ιντιρουμπινών για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας τους. Οι ιντιρουμπίνες είναι λιπόφιλες ενώσεις ωστόσο εμφανίζουν πολύ μεγάλες τιμές $\log k_{w7.4\text{ivtip}}$. Συγκεκριμένα η ιντιρουμπίνη 11 παρουσιάζει την δεύτερη μεγαλύτερη τιμή $\log k_{w7.4\text{ivtip}}$ (4.27) με τιμή $\log D_{7.4} = 2.93$. Η ιντιρουμπίνη 9 είναι η ένωση με την μεγαλύτερη συγκράτηση ($\log k_{w7.4\text{ivtip}} = 4.71$, $\log D_{7.4} = 3.51$). Πιθανή εξήγηση της μεγάλης συγκράτησης των ιντιρουμπινών 9 και 11 να προκαλείται λόγω των δομών τους. Οι δυο ιντιρουμπίνες λόγω των δομών τους εξετάζεται να έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την ομάδα της φωσφατιδυλοχολίνης (ομάδες $-OH$ και O σε κοντινή απόσταση). Η συγκράτηση χημικών ενώσεων στην στατική φάση της IAM έχει συσχετισθεί με ισχυρή σύνδεση στα φωσφολιπίδια των βιομεμβρανών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. M. C. Wenlock, R. P. Austin, P. Barton, A. M. Davis, P. D. Leeson, **A comparison of physiochemical property profiles of development and marketed oral drugs.** Journal of Medicinal Chemistry, 46, 1250 – 1256, 2003
2. D. Montanari, E. Chiarparin, M. P. Gleeson, S. Braggio, R. Longhi, K. Valko, T. Rossi, **Application of drug efficiency index in drug discovery: a strategy towards low therapeutic dose.** Expert Opinion on Drug Discovery, 6, 913 – 920, 2011
3. T. Fujita, **QSAR and drug design. New developments and applications.** Elsevier Science, 300, 1995
4. K. Roy S. Kar, R. N. Das, **A primer on QSAR/QSPR modeling. Fundamental concepts.** Springer, 15 – 17, 2015
5. J. Ghasemi, S. Saaidpour, **QSRR prediction of the chromatographic retention behavior of painkiller drugs.** Journal of Chromatographic Science, 47, 156 – 163, 2009
6. N. El Tayar, B. Testa, Pierre – Alain Carrupt, **Polar intermolecular interactions encoded in partition coefficients: an indirect estimation of hydrogen-bond parameters of polyfunctional solutes,** The Journal of Physical Chemistry, 96, 1455 – 1459, 1992.
7. K.A. Dill, **Dominant forces in protein folding,** Biochemistry, 29, 7133 – 7155, 1990.
8. P. Ruelle, U. W. Kesselring, **The hydrophobic effect. 2. Relative importance of the hydrophobic effect on the solubility of hydrophobes and pharmaceuticals in H – bonded solvents,** Journal of Pharmaceutical Sciences, 87, 1015 – 1024, 1998.
9. A. Tsantili – Kakoulidou, N. El Tayar, H. Van de Waterbeemd, B. Testa, **Structural effects in the lipophilicity of di – and polysubstituted benzenes as measured by reversed-phase high-performance liquid chromatography,** Journal of Chromatography A, 389, 33 – 45, 1987.
10. Leo, **The octanol – water partition coefficient of aromatic solutes: the effect of electronic interactions, alkyl chains, hydrogen bonds, and ortho – substitution,** Journal of the Chemical. Society. Perkin Transactions 2, 11, 825 – 838, 1983.
11. K. Giaginis, S. Theocharis, A. Tsantili – Kakoulidou, **Octanol / water partitioning simulation by RP-HPLC for structurally diverse acidic drugs: Comparison of three columns in the presence and absence of n – octanol as the mobile phase additive,** Journal of Separation Science, 36, 3830 – 3836, 2013

12. F. Lombardo, M.Y. Shalaeva, K.A. Tupper, **F. Gao, E logD(oct): a tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and neutral compounds**, *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 2490 – 2497, 2001
13. E. H. Kernsa, L. Dia, S. Petuskya, T. Kleintopa, D. Huryna, O. Mc Connell , G. Carter, **Pharmaceutical profiling method for lipophilicity and integrity using liquid chromatography–mass spectrometry**. *Journal of Chromatography B*, 791, 381 – 388, 2003
14. L. Giaginis, A. Tsantili – Kakoulidou, **Current state of the art in HPLC methodology for lipophilicity assessment of basic drugs. A review**. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 31, 79 – 96, 2008
15. H. van de Waterbeemd, M. Kansy, B. Wagner, H. Fischer, **Lipophilicity in Drug Action and Toxicology**. VCH, Weinheim, 73 – 87, 1996
16. J.G. Dorsey, M.G. Khaledi, **Hydrophobicity estimations by reversed-phase liquid chromatography. Implications for biological partitioning processes**. *Journal of Chromatography A*, 656, 485 – 499, 1993
17. K. Giaginis, S. Theocharis, A. Tsantili – Kakoulidou, **Contribution to the standardization of the chromatographic conditions for the lipophilicity assessment of neutral and basic drugs**. *Analytica Chimica Acta*, 573 – 574, 311 – 318, 2006
18. Canals, K. Valko, E. Bosch, A. P. Hill, M. Roses, **Retention of ionizable compounds on HPLC. 8. Influence of mobile – phase pH change on the chromatographic retention of acids and bases during gradient elution**. *Analytical Chemistry*, 73, 4937 – 4945, 2001
19. Y. Ohtsu, Y. Shiojima, T. Okumura, J. I. Koyama, K. Nakamura, O. Nakata, **Performance of polymer - coated silica C18 packing materials prepared from high – purity silica gel. The Suppression of undesirable minondary retention processes**. *Journal of Chromatography*, 481, 147 – 151, 1989
20. Corradini, E. Eksteen (Katz), R. Eksteen, P. Schoenmakers, N. Miller, **Handbook of HPLC**. Marcel Dekker, Chromatographic Science, 78, 293 – 300, 1998
21. S. C. Gad, **Preclinical development Handbook: ADME and biopharmaceutical properties**. Wiley, 178 – 179, 2008
22. O. Farsa, **Chromatographic behaviour predicts the ability of potential nootropics to permeate the blood – brain barrier**. *Scientia Pharmaceutica*, 81, 81 – 91, 2013
23. R.A. Mowery, Jr., **The corrosion of 316 stainless steel in process liquid chromatography with acetonitrile or methanol carriers**. *Journal of Chromatographic Science*, 23, 22 – 29, 1985

24. P. R. HADDAD, R. C. L. FOLEY, **Contamination stainless – steel of aqueous eluents due to corrosion of chromatographic components.** Journal of Chromatography, 407, 133-140, 1987
25. H. Engelhardt, T. Lobert, **Chromatographic determination of metallic impurities in reversed – phase HPLC columns.** Analytical Chemistry, 71, 1885-1892, 1999
26. R. K. Iler, **The chemistry of silica. Solubility, polymerization, colloid and surface properties and biochemistry of silica.** Wiley, 570 – 587, 1979
27. S. Ahuja, H. Rasmussen, **HPLC method development for pharmaceuticals.** Elsevier, 98, 2007
28. N. El Tayar, Han 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,** Journal of Chromatography A, 320, 305-312, 1985
29. 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,** Journal of Chromatography A, 541, 221 – 229, 1991.
30. 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.** Journal of Chromatography A, 1166, 116 – 125, 2007
31. K. Valkó, P. Slégel, **New chromatographic hydrophobicity index (ϕ_0) on the slope and the intercept of the log k' versus phase concentration plot.** Journal of Chromatography, 63, 49 – 61, 1993
32. K. Valkó, C. Bevan, D. Reynolds, **Chromatographic hydrophobicity index by fast – gradient RP – HPLC: a high – throughput alternative to log P/log D.** Analytical Chemistry, 69, 2022 – 2029, 1997
33. K. Valkó, **Measurement and predictions of physicochemical properties.** Eaton Publishing, 2002
34. 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.** Quantitative structure – activity relationship, 24, 254 – 269, 2005

35. K. Valkó, **Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution.** *Journal of Chromatography A*, 1037, 299 – 310, 2004
36. Camurri, A. Zaramella, **High – throughput liquid chromatography / mass spectrometry method for the determination of the chromatographic hydrophobicity index.** *Analytical Chemistry*, 73, 3716 – 3722, 2001
37. C. M. Du, K. Valkó, C. Bevan, D. Reynolds, M. H. Abraham, **Rapid gradient RP – HPLC method for lipophilicity determination: a solvation equation based comparison with isocratic methods.** *Analytical Chemistry*, 70, 4228 – 4234, 1998
38. D. Guillarme, J. L. Veuthey, **Requirements for UHPLC instruments, method development in UHPLC and method transfer from regular HPLC to UHPLC.** *Laboratory of Analytical Pharmaceutical Chemistry, University of Geneva*
39. P. J. Schoenmakers, H. A. H. Billiet, L. De Galan, **Influence of organic modifiers on the retention behaviour in reversed-phase liquid chromatography and its consequences for gradient elution.** *Journal of Chromatography A*, 185, 179 – 195, 1979
40. K. Valko, **Separation Methods in Drug Synthesis and Purification.** Elsevier, Amsterdam, 73, 2000
41. T. Henriksen, R. K. Juhler, B. Svensmark, N. B. Cech, **The relative influences of acidity and polarity on responsiveness of small organic molecules to analysis with negative ion electrospray ionization, mass spectrometry (ESI-MS).** *American Society for Mass Spectrometry*, 16, 446 – 455, 2005
42. K. Schug, H. M. McNair, **A dduct formation in electrospray ionization mass spectrometry II. Benzoic acid derivatives.** *Journal of Chromatography A*, 985, 531 – 539, 2003
43. P. Kebarle, L. Tang, **From ions in solution to ions in the gas phase. The mechanism of electrospray mass spectrometry.** *Analytical Chemistry*, 65, 972 – 986, 1993
44. P. J. R. Sjöberg, C. F. Bolkman, D. Bylund, K. E. Markides, **A method for determination of ion distribution within electrosprayed droplets.** *Analytical Chemistry*, 73, 23 – 28, 2001
45. P. Jolles, H. Jörnvall, **Proteomics in Functional Genomics: Protein Structure Analysis.** Birkhäuser, 7, 2000
46. N. B. Cech, C. G. Enke, **Effect of affinity for droplet surfaces on the fraction of analyte molecules charged during electrospray droplet fission.** *Analytical Chemistry*, 73, 4632 – 4639, 2001

47. G. Wang, R. B. Cole, **Charged residue versus ion evaporation for formation of alkali metal halide cluster ions in ESI.** *Analytica Chimica Acta*, 406, 53 – 65, 2000
48. V. Iribarne, B. A. Thomson, **On the evaporation of small ions from charged droplets.** *The Journal of Chemical Physics*, 64, 2287 – 2294, 1976
49. C. Gatlin, F. Turecek, **Acidity determination in droplets formed by electrospraying methanol – water solutions.** *Analytical Chemistry*, 66, 712 – 718, 1994
50. S. Zhou, B. S. Prebyl, K. D. Cook, **Profiling pH Changes in the Electrospray Plume.** *Analytical Chemistry*, 74, 4885 – 4888, 2002
51. G. J. Van Berkel, F. Zhou, J. T. Aronson, **Changes in Bulk Solution pH Caused by the Inherent Controlled – Current Electrolytic Process of an Electrospray Source.** *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 162, 55 – 67, 1997
52. C. G. Enke, **A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly – charged ionic analytes.** *Analytical Chemistry*, 69, 4885 – 4893, 1997
53. N. B. Cech, J. R. Krone, C. G. Enke, **Predicting electrospray response from chromatographic retention time.** *Analytical Chemistry*, 73, 208 – 213, 2001
54. L. G. Herbette, G. Gaviraghi, T. Tulenko, R. Preston Mason, **Molecular interaction between lacidipine and biological membranes.** *Journal of Hypertension*, 11, 13 – 19, 1993
55. 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 biomembranest.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 31, 311 – 318, 1996
56. S. Krämer. **Liposomes/water partitioning: Theory Techniques and Applications.** In: **Testa B, van de Waterbeemd H, Folkers G, Guy R (Eds). Pharmacokinetic Optimization in Drug Research,** Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich and Wiley, Weinheim: VCH, 2001
57. C. Pidgeon, U. V. Venkataram, **Immobilized artificial membrane chromatography: Supports composed of membrane lipids.** *Analytical Biochemistry*, 176, 36 – 47, 1989
58. C. Pidgeon, J. Stevens, S. Otto, C. Jefcoate, C. Marcus, **Rapid purification of functional membrane proteins.** *Analytical Biochemistry*, 194, 163 – 173, 1991
59. J. W. Kelly, T. O. Baldwin, **Applications of enzyme biotechnology.** New York: Plenum, 201 – 220, 1991
60. M. Kansy, F. Senner, K. Gubernator, **Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 1007 – 1010, 1998

61. S. Ong, H. Liu, X. Qui, G. Bhat, C. Pidgeon, **Membrane partition coefficients chromatographically measured using immobilized artificial membrane surfaces.** *Analytical Chemistry*, 67, 755 – 762, 1995
62. 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.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 590 – 594, 1995
63. W. Caldwell, J. A. Masucci, M. Evangelisto, R. White, **Evaluation of the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine. Drug discovery column for high – performance liquid chromatography screening of drug – membrane interactions.** *Journal of Chromatography A*, 800, 161 – 169, 1998
64. K. Valko, 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.** *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 89, 1085 – 1096, 2000
65. A. Taillardat – Bertschinger, F. Barbato, MT. Quercia, et al. **Structural Properties Governing Retention Mechanisms on Immobilized Artificial Membrane (IAM) HPLC Columns.** *Helvetica Chimica Acta*, 85, 519 – 532, 2002
66. M. Chrysanthakopoulos, F. Tsopelas, A. Tsantili-Kakoulidou, **Biomimetic Chromatography: A Useful Tool in the Drug Discovery Process.** *Advances in Chromatography*, 51, 91 – 125, 2014
67. D. Vrakas, C. Giaginis, A. Tsantili – Kakoulidou, **Different retention behavior of structurally diverse basic and neutral drugs in immobilized artificial membrane and reversed – phase high performance liquid chromatography. Comparison with octanol – water partitioning.** *Journal of Chromatography A*, 1116, 158 – 164, 2006
68. K. Μακρής, N. Τσιρίγκος – Καραπάνος, Μ. Εφεντάκης, **Μεγαλομόρια ως Φορείς Φαρμακευτικών Ουσιών προς Συγκεκριμένο Στόχο.** *Φαρμακευτική*, 4, 120, 1991
69. D. Vrakas, C. Giaginis, A. Tsantili – Kakoulidou, **Electrostatic interactions and ionization effect in immobilized artificial membrane retention A comparative study with octanol – water partitioning.** *Journal of Chromatography A*, 1187, 67 – 78, 2008
70. F. Barbato, V. Cirocco, L. Grumetto, M. Immacolata La Rotonda. **Comparison between immobilized artificial membrane (IAM) HPLC data and lipophilicity in n – octanol for quinolone antibacterial agents.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 288 – 97, 2007

71. A. Taillardat – Bertschinger, PA. Carrupt, F. Barbato, B. Testa. **Immobilized artificial membrane HPLC in drug research.** Journal of Medicinal Chemistry, 46, 655 – 665, 2003
72. K. Valko, **Physicochemical and biomimetic properties in drug discovery – chromatographic techniques for lead optimization.** Wiley, 371 – 376, 2014
73. W. Harrell, C. Sychterz, M. Y. Ho, A. Weber, K. Valko, K. Negash, **Interrogating the relationship between rat in vivo tissue distribution and drug property data for >200 structurally unrelated molecules.** Pharmacology Research and Perspectives, 3, e00173, 2015
74. N. G. Kolar, K. Vougiougiannopoulou, A. L. Skaltsounis, **Indirubin derivatives: a patent review.** Expert Opinion on Therapeutic Patents, 25, 583 – 593, 2015
75. **Ελληνική Φαρμακοποιία.** Έκδοση IV, Τόμος I, 537 – 541, 1989
76. 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.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 39, 908 – 913, 2005
77. F. Barbato, MI. 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.** European Journal of Medicinal Chemistry, 31, 311 – 318, 1996
78. F. Barbato, G. di Martino, L. Grumetto, MI. La Rotonda. **Can protonated beta-blockers interact with biomembranes stronger than neutral islipophilic compounds? A chromatographic study on three different phospholipid stationary phases (IAM-HPLC).** European Journal of Pharmaceutical Sciences, 25, 379 – 86, 2005
79. F. Tsopelas, N. Malaki, T. Vallianatou, et al. **Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane chromatography using two stationary phases.** Journal of Chromatography A, 1396, 25 – 33, 2015
80. 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.** Pharmaceutical Research, 16, 643 – 650, 1999
81. EC. Chan, WL. Tan, PC. Ho, LJ. Fang. **Modelling Caco-2 permeability of drugs using immobilized artificial membrane chromatographic and physicochemical descriptors.** Journal of Chromatography A, 1072, 159 – 68, 2005
82. BH. Stewart, FY. Chung, B. Tait, et al. **Hydrophobicity of HIV protease inhibitors by immobilized artificial membrane chromatography: Application and significance to drug transport.** Pharmaceutical Research, 15, 1401 – 1406, 1998

83. F. Tsopelas, T. Vallianatou, A. Tsantili – Kakoulidou. **The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, 81, 82 – 93, 2016
84. J. Kotecha, S. Shah, I. Rathod, G. Subbaiah. **Prediction of oral absorption in humans by experimental immobilized artificial membrane chromatography indices and physicochemical descriptors.** International Journal of Pharmaceutics, 360, 96 – 106, 2008
85. T. Salminen, A. Pulli, J. Taskinen. **Relationship between immobilised artificial membrane chromatographic retention and the brain penetration of structurally diverse drugs.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 15, 469 – 477, 1997
86. UM. Hanumegowda, G. Wenke, A. Regueiro – Ren, et al. **Phospholipidosis as a function of basicity, lipophilicity, and volume of distribution of compounds.** Chemical Research in Toxicology, 23, 749 – 755, 2010

I Was Dying

First I was dying to finish high school and start college.

And then I was dying to finish college and start working.

And then I was dying to marry and have children.

And then I was dying for my children to grow old enough for school so I could return to work.

And then I was dying to retire.

And now, I am dying... and suddenly I realize I forgot to live.