

UNIwersYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Wydział Farmaceutyczny

Karolina Wanat

**Dane chromatograficzne i właściwości fizykochemiczne w prognozowaniu
zdolności przenikania leków i innych związków chemicznych do mleka
matki**

Chromatographic data and physicochemical properties in predicting the ability of
drugs to enter mother's milk

Praca wykonana
w Zakładzie Chemii Analitycznej
Katedra Chemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Promotor rozprawy: prof. dr hab. n. farm. Elżbieta Brzezińska

Promotor pomocniczy: dr hab. n. farm. Anna Sobańska

Łódź 2021

Niniejsza praca została zrealizowana
z wykorzystaniem środków finansowych
z Zadania Badawczego Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 502-03/3-016-03/502-34-106
oraz 503/3-016-03/503-31-001

*Chciałabym serdecznie podziękować mojej promotor
Pani Profesor Elżbiecie Brzezińskiej za opiekę naukową i cenne wskazówki, ale także za
dużą dawkę motywacji do rozwoju kariery naukowej oraz wiarę w moje możliwości.*

*Dziękuję wszystkim pracownikom Zakładu Chemii Analitycznej za niepowtarzalną
atmosferę w pracy oraz merytoryczne wskazówki podczas wykonywania badań .*

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	7
Wprowadzenie	9
CZĘŚĆ TEORYCZNA	10
Farmakoterapia w okresie laktacji	11
Mleko kobiece.....	11
Przenikanie leków do mleka matki.....	12
Klasyfikacja leków stosowanych podczas laktacji	14
Stosunek M/P	16
Białka osocza krwi.....	18
Wiązanie leków z białkami.....	18
Białka występujące w osoczu	18
Ludzka albumina osocza.....	19
Funkcje albuminy osocza.....	20
Miejsca wiązania leków i kwasów tłuszczowych.....	21
Alfa-1-kwaśna glikoproteina	21
Wpływ wiązania z białkami na dystrybucję leków przez bariery organizmu	23
Transport substancji przez błony komórkowe	23
Bariera krew-mózg	24
Bariera łożyskowa.....	25
Przenikanie przez skórę	29
Przenikanie do mleka matki.....	30
Metody chemometryczne.....	31
Badania QSPR w projektowaniu leków.....	31
Metody statystyczne	32
Regresja wielokrotna	33
Analiza składowych głównych	34
Metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów.....	35
Analiza funkcji dyskryminacyjnej	36
Las losowy	37
Analiza skupień.....	38
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	39
Cele pracy	40

Doświadczenia chromatograficzne	41
Materiały i odczynniki	41
Izolacja substancji aktywnych	41
Impregnacja płytek TLC	42
Chromatografia NP TLC	43
Chromatografia RP-2 TLC	44
Chromatografia HPLC _{HSA}	44
Chromatografia HPLC _{IAM}	45
Analizy statystyczne	45
Deskryptory molekularne	47
BADANIA WŁASNE	52
Analiza modeli regresji wielokrotnej i analizy dyskryminacyjnej przenikania leków do mleka matki.....	53
Założenia związane z przenikaniem leków do mleka matki.....	53
Deskryptory molekularne stosowane w modelach	56
Analiza dyskryminacyjna związków kwaśnych, zasadowych i obojętnych.....	61
Modele regresji wielokrotnej dla M/P _{abn}	63
Analiza dyskryminacyjna grup klasyfikujących ryzyko stosowania leku podczas laktacji.....	68
Analiza przenikania do mleka matki metodami najmniejszych cząstkowych kwadratów i lasu losowego.....	73
Model PLS	74
Model RF	76
Podsumowanie analizy regresji dla przenikania do mleka kobiecego.....	79
Porównanie modeli analitycznych wiązania leków z białkami z wykorzystaniem parametrów chromatograficznych z NP TLC, RP TLC i HPLC _{HSA}	82
Model chromatografii kolumnowej HPLC _{HSA}	83
Modele chromatografii cienkowarstwowej NP i RP TLC.....	85
Modele MLR z wykorzystaniem NP TLC.....	86
Modele MLR z wykorzystaniem RP TLC.....	96
Podsumowanie MLR	101
Porównanie metod statystycznych w badaniach wiązania leków z białkami z wykorzystaniem fizykochemicznych, biologicznych i chromatograficznych deskryptorów	107

Regresja wielokrotna	107
Analiza dyskryminacyjna	114
Analiza składowych głównych	117
Analiza skupień.....	120
Regresja metodami najmniejszych cząstkowych kwadratów i lasu losowego	122
Model PLS	123
Modele RF	125
WNIOSKI	136
Streszczenie	139
Summary.....	141
Tabele zawierające struktury związków wykorzystywanych w badaniach (n = 129 i grupa zewnętrzna n = 38) oraz zebrane dla nich dane biologiczne, fizykochemiczne oraz chromatograficzne.....	143
BIBLIOGRAFIA	190
Wykaz Tabel	203
Spis Rysunków	205

WYKAZ SKRÓTÓW

AAG – ang. alpha-1-acid glycoprotein, alfa-1-kwaśna glikoproteina

AJs – ang. adherens junctions, połączenia przylegające

ANOVA – ang. analysis of variance, analiza wariancji

API – ang. active pharmaceutical ingredient, substancja aktywna preparatu farmaceutycznego

BBB – ang. blood-brain barrier, bariera krew-mózg

BSA – ang. bovine serum albumin, bydlęca albumina osoczowa

CA – ang. cluster analysis, analiza skupień

DFA – ang. discriminant function analysis, analiza funkcji dyskryminacyjnej

FDA – Agencja Żywności i Leków

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HPLC_{HSA} – wysokosprawna chromatografia cieczowa z kolumną immobilizowaną albuminą osocza krwi ludzkiej

HPLC_{IAM} – wysokosprawna chromatografia cieczowa z kolumną ze sztuczną membraną

HSA – ang. human serum albumin; ludzka albumina osoczowa

IAM – ang. immobilized artificial membrane; immobilizowana sztuczna membrana

LMO – ang. leave-many-out, procedura walidacji krzyżowej „pomiń wiele na zewnątrz”

LOO – ang. leave-one-out, procedura walidacji krzyżowej „pomiń jeden na zewnątrz”

LV – zmienna ukryta

M/P – stosunek zawartości leku w mleku matki (M) do jego zawartości w osoczu (P)

MCPT – ang. Monte Carlo permutation test, test permutacji Monte Carlo

MLR – ang. multiple linear regression, regresja wielokrotna

NP TLC – chromatografia cienkowarstwowa w normalnym układzie faz

OTC – ang. over the counter drugs, leki wydawane bez przepisu lekarza

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PB – ang. protein binding, odsetek związania leku z białkami osocza

PC – ang. principal component, składowa główna

PCA – ang. principal component analysis, analiza składowych głównych

PLS – ang. partial least squares, metoda najmniejszych cząstkowych kwadratów

PRESS – przewidywane resztkowe sumy kwadratów

QSAR – ang. quantitative structure–activity relationship, ilościowa zależność struktura-aktywność

QSPR – ang. quantitative structure–property relationship, ilościowa zależność struktura-właściwość

RF – ang. random forest, metoda lasu losowego

RMSECV – średnia kwadratowa błędów walidacji krzyżowej

RMSEP – średni kwadratowy błąd prognozowania

RP TLC – chromatografia cienkowarstwowa w odwróconym układzie faz

SDEP - standard odchylenia błędu przewidywania

S_{PRESS} – odchylenie standardowe na podstawie PRESS

TJs – ang. tight junctions, połączenia ścisłe

TLC – chromatografia cienkowarstwowa

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia

Wprowadzenie

Przenikanie do mleka matki jest ważnym aspektem podczas farmakoterapii kobiet karmiących piersią. Większość kobiet podczas laktacji jest zmuszona do sięgnięcia po różnego rodzaju leki i zazwyczaj rezygnuje wtedy z karmienia piersią. Często jest to niepotrzebny zabieg ponieważ większość leków przenika do mleka w ograniczonym zakresie a stężenie wynosi ułamek dawki stosowanej u dzieci, czy niemowląt [1–3]. Na przenikanie związków chemicznych do mleka matki ma wpływ wiele czynników, związanych zarówno z samą cząsteczką jak i stanem fizjologicznym organizmu kobiety karmiącej. Masa molowa, lipofilowość, zdolność do jonizacji czy wiązania z białkami osocza to niektóre z właściwości fizykochemicznych, które mogą ograniczać (lub zwiększać) przechodzenie leków do mleka. Szczególnie duży wpływ na ogólnie pojmowaną farmakokinetykę leków ma wiązanie z białkami. Za najważniejszy aspekt tego zjawiska uznaje się jego oddziaływanie na transport związków przez błony komórkowe i bariery fizjologiczne: barierę krew-mózg, barierę łożyskową czy dystrybucję do mleka matki podczas laktacji. Często wskazuje się, że jest to czynnik najsilniej ograniczający dystrybucję w ustroju człowieka, zmniejszający biodostępność leku, ale również minimalizujący przenikanie ksenobiotyków do płodu lub organizmu dziecka karmionego piersią. Wiązanie z białkami jest ważnym aspektem analizowanym i monitorowanym podczas projektowania nowych substancji leczniczych. Białka są szeroko rozprzestrzenione w ludzkim organizmie; wchodzi w skład prawie każdej jego struktury więc uniknięcie interakcji między nimi a podawanymi medykamentami wydaje się niemożliwe. Z tego powodu stworzono szereg metod do analizy tego zjawiska, przeprowadzanych zarówno *in vitro* jak i *in vivo* a coraz większe znaczenie zdobywają metody chemometryczne – głównie za sprawą względnej prostoty i niskich kosztów, które korzystają z danych pomiarowych do przewidywania właściwości chemicznych, fizycznych bądź biologicznych związków.

CZĘŚĆ TEORYCZNA

Farmakoterapia w okresie laktacji

Mleko kobiece

Ludzkie mleko, podobnie jak mleko innych ssaków, jest mieszaniną wody, tłuszczu, węglowodanów, białek, witamin i soli mineralnych i jest uważane za najlepszy pokarm dla nowo narodzonego organizmu [4,5]. Dokładny skład mleka zależy od fazy laktacji, pory dnia oraz czasu karmienia [6,7]. Zależność składu od fazy laktacji wynika ze zmian jakie następują w gruczole piersiowym. Wymienia się 4 etapy laktacji: mammogenezę, laktogenezę, laktację i involucję. Dwa pierwsze obejmują rozwój tkanki gruczołowej w piersiach oraz początek wydzielania mleka; w czasie etapu laktacji sekrecja mleka stabilizuje się, a ostatni okres obejmuje zakończenie produkcji oraz obumieranie laktocytów, czyli komórek odpowiedzialnych za wytwarzanie mleka [8]. Laktocyty oraz znajdujące się wewnątrz pęcherzyki mleczone są otoczone warstwą mięśni gładkich, które kurcząc się pod wpływem hormonów (m.in. oksytocyny) powodują wypływ mleka do przewodów mleczych [9].

Początkowe mleko tzw. siara, produkowane w pierwszych dniach po porodzie, jest gęste, lekko żółte a w swoim składzie zawiera głównie białko w celu dostarczenia budulca do rozwoju organizmu a także związki zapewniające wsparcie układu immunologicznego: interferony, przeciwciała, limfocyty, laktoferynę i makrofagi [10–12]. Mleko przejściowe wytwarzane w 2-3 tygodniu po porodzie zawiera więcej tłuszczu, zawartość białka spada i jest bardziej wodniste od siary, dodatkowo wzrasta jego kaloryczność, natomiast mleko dojrzałe składa się już w 80% z wody i jest zarazem najbardziej odżywcze ze wszystkich: w 100 ml zawiera ok. 75 kcal [8,12]. Jest ono również bogate w makro- i mikroelementy (Tabela 1) [8,10].

Tabela 1. Skład dojrzalego mleka

składnik	stężenie w mleku kobiecym
Węglowodany	74 g/L
Tłuszcze	40 g/L
Białka	10-11 g/L
Wapń	280-330 mg/L
Fosfor	150 mg/L
Magnez	35 mg/L
Cynk	1,2 mg/L
Żelazo	0,3 mg/L
Wit. B6	93 mg/L
Wit. C	30-43 mg/L
Wit. E	2,3 mg/L
Wit. A	0,67 mg/L
Wit. K	2,1 µL

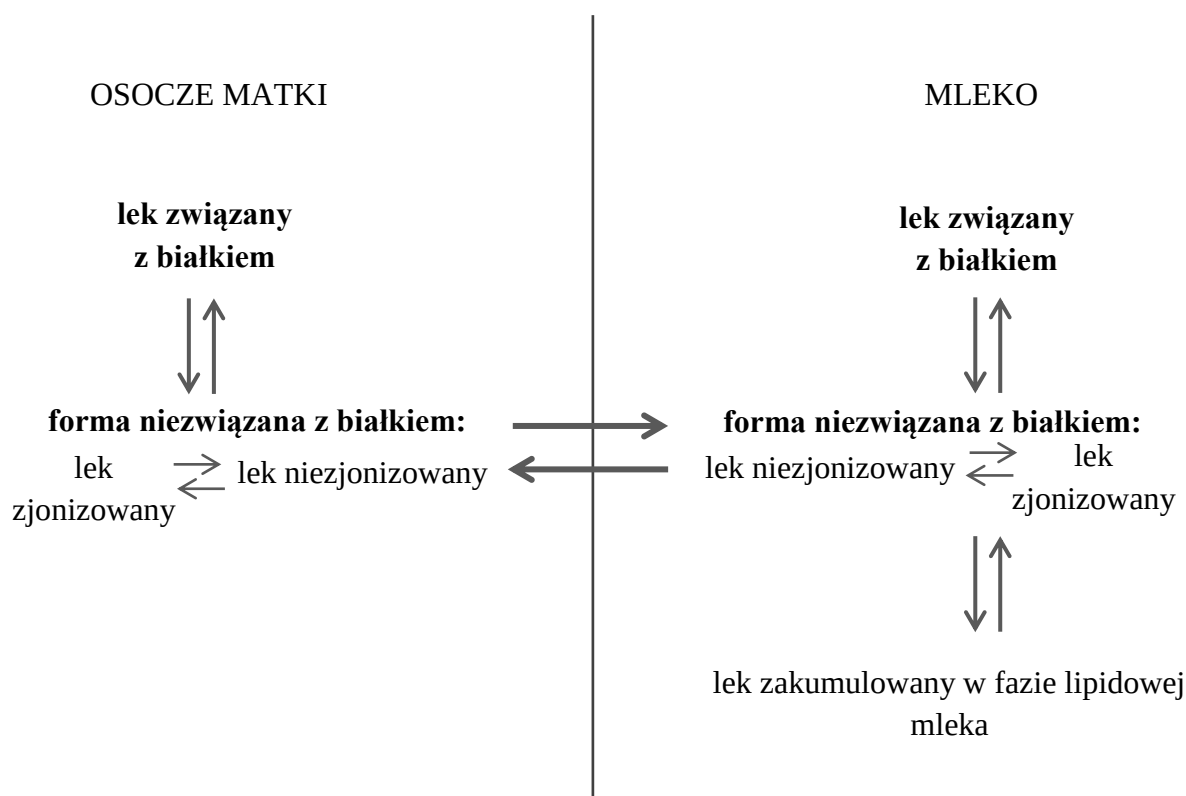
Standardy WHO z 2020 roku zalecają wyłączone karmienie piersią dziecka do ukończenia 6 miesiąca, następnie możliwość kontynuacji karmienia do 2 roku życia wraz z wprowadzaniem innych pokarmów do diety. Poleca się również zacząć karmienie jak najszybciej, już godzinę po urodzeniu dziecka, jeżeli jest to możliwe [13].

Zalety karmienia piersią są szeroko opisywane w literaturze fachowej, obejmują one m.in. redukcję ryzyka wystąpienia chorób dolnych dróg oddechowych u dzieci poniżej 1 r.ż., zmniejszenie występowania infekcji żołądkowo-jelitowych u noworodków, zapobiega nadwadze i otyłości w dorosłym życiu, a nawet obniżenie ryzyka wystąpienia nagłej śmierci łóżeczkowej [14–16].

Przenikanie leków do mleka matki

Początkowo, w pierwszych dniach laktacji pomiędzy laktocytami występują duże przestrzenie komórkowe, do których łatwo mogą przenikać związki z naczyń

krwionośnych i limfy [17]. Leki przenikają z naczyń krwionośnych do gruczołu piersiowego najczęściej na drodze dyfuzji prostej wraz z gradientem stężeń, lecz na dystrybucję substancji do mleka ma również wpływ szereg innych czynników związanych z właściwościami związku chemicznego: masa cząsteczkowa, lipofilowość, wiązanie z białkami oraz pKa [1,18]. pKa może przyczyniać się do kumulacji związków w mleku, które charakteryzuje się pH niższym od pH osocza krwi. Przyjmuje się, że są to wartości z zakresu od 6,35 aż do 7,65 [19–21], a jako pH średnie w literaturze zazwyczaj spotyka się pH ok. 7,1 lub 7,2 [7,8] czyli średnio jest ono niższe od pH osocza, które waha się w zakresie od 7,35 do 7,45. W związku z tym leki o charakterze słabych zasad ulegają w niższym pH mleka jonizacji co uniemożliwia na powrót przejście do krwioobiegu matki [18,22,23]. Z kolei wysoka lipofilowość związku, wyrażona np. przy pomocy współczynnika podziału oktanol:woda i logarytmu z tej wartości; log P, może sugerować jego akumulację w fazie tłuszczowej mleka. Wiązanie leku z białkami osocza mocno ogranicza jego dystrybucję do mleka jednak to zjawisko może również zachodzić po drugiej stronie tej bariery biologicznej ponieważ w skład mleka wchodzi proteiny, które także posiadają zdolność do wiązania molekuł. Białkowy komponent – stanowiący ok. 1% dojrzalego mleka tworzą m.in: kazeiny alfaS1, alfaS2, beta i kappa; białka serwatkowe: alfa-laktoalbumina, beta-laktoglobulina, albumina osoczowa, laktoferryina, sekrecyjna immunoglobulina A, immunoglobuliny M i G oraz lizozym, alfa-1-kwaśna glikoproteina i wiele innych [4,6,24–26]. Zjawisko to w mleku zachodzi jednak z mniejszą siłą niż w przypadku wiązania z białkami osocza [18].



Rysunek 1. Schemat przenikania leków między osoczem a mlekiem matki

Podsumowując losy leku po wnikięciu do mleka: może on ulec jonizacji, związać się z białkiem lub przeniknąć do fazy lipidowej, gdzie może zostać zakumulowany (Rysunek 1) [7,27].

Klasyfikacja leków stosowanych podczas laktacji

Podobnie jak w przypadku ryzyka stosowania leku w ciąży (klasyfikacja FDA, klasy A-X) wprowadzono podobny podział w przypadku laktacji. Wyodrębniono 5 klas leków od L1 do L5, które wskazują ryzyko stosowania danego preparatu podczas karmienia piersią (Tabela 2).

Tabela 2. Ryzyko stosowania w czasie laktacji - klasyfikacja prof. Hale’a [28]

klasa	charakterystyka
L1	• Najbezpieczniejszy lek, badania przeprowadzone na dużej liczbie kobiet wykazały brak ryzyka wystąpienia działań niepożądanych dla karmionego dziecka • Był on przyjmowany przez dużą liczbę kobiet karmiących i nie zaobserwowano negatywnego wpływu na organizm dziecka • Lek nie jest dostępny dla dziecka drogą doustną
L2	• Lek bezpieczny, badania przeprowadzone na ograniczonej liczbie kobiet, które nie wykazały zwiększonego ryzyka wystąpienia działań niepożądanych dla karmionego dziecka • Ryzyko negatywnego działania na organizm dziecka jest mało prawdopodobne
L3	• Lek umiarkowanie bezpieczny, brak kontrolowanych badań na karmiących kobietach jednak istnieje ryzyko wystąpienia działań niepożądanych u dziecka • Badania wykazały minimalne, niegroźne działanie niepożądane • Nowy lek bez przeprowadzonych badań. Leki z tej kategorii stosowane są wyłącznie gdy korzyści u matki przewyższają ryzyko u dziecka.
L4	• Lek prawdopodobnie niebezpieczny, wykazano niekorzystny wpływ na organizm dziecka • Wykazano niekorzystny wpływ na proces laktacji. Lek stosowany wyłącznie w przypadkach zagrożenia życia matki i/lub gdy inny lek nie może być stosowany lub jest nie skuteczny.
L5	• lek przeciwwskazany, badania wykazały istotne ryzyko wystąpienia negatywnego działania na organizm dziecka. Ryzyko to przewyższa korzyści stosowania leku dla matki więc leki z tej kategorii nie są stosowane u kobiet karmiących.

Drugą klasyfikacją, określającą bezpieczeństwo stosowania leków podczas laktacji jest baza LactMed [29], która grupuje dotychczasowe doniesienia z artykułów naukowych na temat dawki danego związku aktywnego, który przeniknął do mleka oraz możliwych działań niepożądanych występujących u dziecka i na tej podstawie określa ryzyko stosowania danego preparatu.

Stosunek M/P

Do określenia, ile leku przeniknęło do mleka matki stosuje się stosunek stężenia tego związku w mleku – M (ang. milk) do jego stężenia w osoczu – P (ang. plasma) po ustaleniu się stanu równowagi między obiema stronami bariery biologicznej (ang. milk-to-plasma concentration ratio) [30]. Wartość ta może być oznaczona eksperymentalnie poprzez badania kliniczne, analizę pojedynczych przypadków klinicznych lub wyznaczona farmakokinetycznie na podstawie krzywej AUC (ang. area under the curve) czyli wykresu stężenia związku w osoczu w funkcji czasu [31–33]. W literaturze można również znaleźć wyznaczanie metodami *in vitro* [34]. Często też korzysta się z metod chemometrycznych i obliczeniowych to wyznaczania M/P na podstawie właściwości fizykochemicznych substancji [35–37]. W niektórych modelach wykorzystuje się również zlogarytmowaną postać – log M/P. Modele dystrybucyjne wskazują na szczególne znaczenie czynników: pKa, log P i wiązania z białkami, a dokładniej frakcji niezwiązanej z białkiem w przewidywaniu wartości M/P (Równania 1-5) [7,32,38].

$$\text{Leki kwaśne: } M_u/P_u = \frac{1 + 10^{pH_m - pKa}}{1 + 10^{pH_p - pKa}} \quad (1)$$

$$\text{Leki zasadowe: } M_u/P_u = \frac{1 + 10^{pKa - pH_m}}{1 + 10^{pKa - pH_p}} \quad (2)$$

M_u/P_u – stosunek M/P leku niezwiązanego z białkiem

pH_m – pH mleka

pH_p – pH osocza

pKa – wartość pKa leku

[32]

$$M/P = f_{up} \times M_u/P_u [(0,995/f_{um}) + (0,045 \times \text{milk lipid } P)] \quad (3)$$

f_{up} – frakcja leku w osoczu niezwiązana z białkiem

f_{um} – frakcja leku w mleku niezwiązana z białkiem

M_u/P_u – stosunek M/P leku niezwiązanego z białkiem, obliczony z równań 1 i 2

milk lipid P – współczynnik skorelowany z lipofilowością leku: $-0,88 + 1,29 \log P$ [38]

$$M/P = \frac{f_{up} \times f_{unp}}{f_{um} \times f_{unm} \times S/M} \quad (4)$$

f_{up} – frakcja leku w osoczu niezwiązana z białkiem

f_{um} – frakcja leku w mleku niezwiązana z białkiem

f_{unp} – niezjonizowana frakcja leku w osoczu

f_{unm} – niezjonizowana frakcja leku w mleku

S/M – stosunek stężenia leku w mleku odtłuszczonym (S) do stężenia w mleku pełnym (M) [7].

Znając wartość M/P dla danego leku można obliczyć jaką ilość przyjmie dziecko podczas karmienia [30]:

$$D_{\text{niemowlę}} = C_p \times M/P \times V_{\text{mleka}} \quad (5)$$

$D_{\text{niemowlę}}$ – dawka, którą przyjmie karmione niemowlę

C_p – stężenie leku w osoczu matki

M/P – milk-to-plasma ratio

V_{mleka} – objętość spożytego mleka

Ogólne założenia mówią, że leki z wartością M/P poniżej 1 są relatywnie bezpieczne w stosowaniu u kobiet karmiących, ze względu na niską dystrybucję do mleka [28].

Białka osocza krwi

Wiązanie leków z białkami

Lek we krwi może ulec związaniu z białkami osocza - przede wszystkim albuminą i alfa-1-kwaśną glikoproteiną, lipoproteinami a nawet z erytrocytami [39–41].

Wiązanie leków z albuminą ma znaczny wpływ na ich biodostępność oraz aktywność biologiczną. Zwiększa ich rozpuszczalność w osoczu co ma duże znaczenie w przypadku związków o hydrofobowym charakterze, zmniejsza toksyczność i wydłuża czas półtrwania leku. Wywiera także ochronny wpływ przed utlenianiem [42,43]. Białka służą jako nośniki i bez nich wiele związków nie byłoby w stanie przemieszczać się w ustroju, jednak ta cecha jest limitowana przez powinowactwo do białek; lek wiążący się w większym stopniu będzie wypierał z połączeń inny o mniejszym powinowactwie [44,45]. Jednocześnie lek związany z białkiem ma mocno ograniczoną dystrybucję przez błony biologiczne, w związku z dużą masą cząsteczkową takiego kompleksu [46].

Poziom połączenia się z białkami zależy od warunków środowiska, w którym ono zachodzi. Wpływ będzie wywierała temperatura, pH osocza, które może zmieniać stopień jonizacji związku, zależy również od samego stężenia białek w osoczu, które zmienia się pod wpływem czynników zarówno fizjologicznych (wiek, ciąża) jak i patofizjologicznych (choroby, niedożywienie) [42,47].

Białka występujące w osoczu

Ludzkie osocze krwi składa się z wody, elektrolitów, czynników krzepnięcia, hormonów, białek, składników odżywczych oraz produktów przemiany materii. Stężenie białka całkowitego w osoczu wynosi 7,0-7,5 g/dL. Można wyróżnić wśród nich trzy zasadnicze frakcje: albuminy, globuliny oraz fibrynogen; większość białek stanowią białka złożone; połączone są z łańcuchami oligosacharydowymi tworząc glikoproteiny [48]. Białka występujące w ludzkim osoczu spełniają wiele funkcji i uczestniczą w różnych procesach: koagulacji, fibrynolizie, odpowiedzi immunologicznej czy transporcie substancji przez krew (Tabela 3) [48,49].

Tabela 3. Białka osocza i ich funkcja

białko osocza	funkcja
Albuminy, tym ludzka albumina osoczowa	Transport substancji, utrzymanie ciśnienia onkotycznego krwi
Białka ostrej fazy: alfa-1-kwaśna glikoproteina, białko C-reaktywne, alfa-1-antytrypsyna, haptoglobina, ceruloplazmina	Syntetyzowane w odpowiedzi na stan zapalny
Białka układu dopełniacza	Syntetyzowane w odpowiedzi na stan zapalny
Fibrynogen	Udział w procesie krzepnięcia
Transferyna i ferrytyna	Udział w gospodarce żelazem w organizmie
Białka transportujące hormony	Transport m.in. tyroksyny, kortyzolu, hormonów płciowych
Immunoglobuliny: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM	Udział w humoralnej odpowiedzi odpornościowej
Enzymy i hormony białkowe	Kataliza reakcji i funkcje regulacyjne

Kluczową rolę w dystrybucji związków w organizmie pełni ludzka albumina osocza i alfa-1-kwaśna glikoproteina i to właśnie na tych dwóch białkach skupia się główne zainteresowanie w kwestii wiązalności z proteinami.

Ludzka albumina osocza

Najbardziej rozpowszechnionym białkiem ludzkiego osocza jest albumina (ang. human serum albumin, HSA), stanowi ona ok. 60% wszystkich białek znajdujących się we krwi, a jej stężenie w osoczu wynosi 3,5-5,0 g/dL. Należy do rodziny albumin wraz z alfa-fetoproteiną (AFP), alfa-albuminą (inaczej afaminą, AFM) oraz białkiem wiążącym witaminę D (ang. vitamin D binding protein, VDBP) [50,51]. Jest ona produkowana w wątrobie, jej czas półtrwania wynosi ok. 17 dni [39].

Cząsteczka ludzkiej albuminy osocza o masie cząsteczkowej 65-69 kDa jest zbudowana z 585 aminokwasów ułożonych w 9 podwójnych pętli, które tworzą trzy domeny: I, II i III (każda złożona z trzech pętli), domeny z kolei dzielą się na dwie subdomeny i w rezultacie otrzymujemy sześć fragmentów: IA, IB, IIA, IIB, IIIA i IIIB. Domena II stanowi rdzeń cząsteczki, domeny I i III tworzą swoiste „płaty”, które mogą ulec fałdowaniu [43,52]. Struktura drugorzędowa przyjmuje głównie postać α -helisy - stanowi ona 67%, a sama cząsteczka uchodzi za dość elastyczną co może mieć wpływ na jej zdolność do wiązania różnych związków [39]. Przestrzenna forma cząsteczki, czyli jej trzeciorzędowa struktura określana jest jako trójkątna [53], bądź o kształcie serca [54]. Każda domena białka obdarzona jest ładunkiem, odpowiednio: -9, -8 i +2 [55]. Punkt izoelektryczny występuje przy pH 4.9 jednak w fizjologicznym pH krwi, które wynosi ok. 7,4 albumina zachowuje amfoteryczne właściwości [56].

Funkcje albuminy osocza

Albumina osocza (ang. human serum albumin; HSA) jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za prawidłowe ciśnienie onkotyczne krwi, głównie poprzez wywieranie bezpośredniego działania osmotycznego jak również wywołując efekt Gibbsa-Donnana, który polega na przyciąganiu przez negatywne ładunki na cząsteczce białka jonów sodu, które następnie powodują napływ wody do światła naczynia. Jest także związkiem o właściwościach przeciwutleniających, przeciwzapalnych, przeciwkrzepliwych, immunomodulujących i regulujących czynność śródbłonna naczyń [54,57].

HSA dzięki swojej strukturze, ma zdolność do wiązania różnych endo- i egzogennych związków: kwasów tłuszczowych, steroidów, hormonów, bilirubiny i kwasów żółciowych czy jonów metali oraz szerokiej gamy leków, które przedostały się do krwioobiegu [43,58,59]. Najczęściej przyłącza hydrofobowe cząsteczki o właściwościach kwasowych, dzięki sumarycznemu ujemnemu ładunkowi [39,60]. Związki te łączą się z dodatnio naładowanymi resztami aminokwasów (głównie lizyny), które znajdują się w niepolarnych regionach miejsc wiązania cząsteczek. Dodatkowo przy pomocy oddziaływań elektrostatycznych do HSA mogą się przyłączyć leki

pozostające bez ładunku, takie połączenie jest następnie wzmacniane przez wytworzenie wiązań hydrofobowych [56].

Miejsca wiązania leków i kwasów tłuszczowych

Albumina osocza ma co najmniej dwa miejsca wiązania leków, informacje dotyczące trzeciego miejsca nie zostały dotąd potwierdzone [61,62]. Miejsce pierwsze znajduje się w subdomenie IIA, drugie w IIIA. Oba są hydrofobowymi przestrzeniami, jednak drugie miejsce zawiera mały obszar polarny w środku; dodatkowo jego wejście jest mniej ograniczone w porównaniu do miejsca w subdomenie IIA, na które częściowo nakładają się części IIB i IIIA [61,63–65]. Sytuacja wygląda odmiennie jeśli chodzi o transport kwasów tłuszczowych, których albumina jest głównym nośnikiem we krwi. Wyróżnia się aż siedem miejsc, zdolnych do przyłączenia cząsteczki kwasu. Początkowe obserwacje pokazały, że od dwóch do trzech miejsc wykazują silne powinowactwo do kwasów tłuszczowych a od czterech do pięciu - umiarkowane [63,66]. Dalsze badania ujawniły, że pierwszorzędowymi miejscami o wysokim powinowactwie są te o numerach 2, 4, 5; natomiast 5-10-krotnie niższe wykazują miejsca 1, 3, 6, 7 [66,67].

Alfa-1-kwaśna glikoproteina

Drugim białkiem pod względem rozpowszechnienia w osoczu jest alfa-1-kwaśna glikoproteina (ang. alpha-1-acid glycoprotein, AAG). Jej stężenie nie jest stałe i zmienia się pod wpływem czynników fizjologicznych i patologicznych. Należy do białek ostrej fazy dlatego jej zwiększony poziom AAG występuje podczas np. stanu zapalnego, infekcji, zranienia lub poparzenia tkanek, chorób sercowo-naczyniowych oraz niektórych schorzeń nerek i wątroby; natomiast obniżenie stężenia ma miejsce w przebiegu m.in. zapalenia wątroby, nowotworu trzustki, niedożywienia i kacheksji [68]. Różnice w stężeniach obserwuje się u kobiet w trakcie cyklu menstruacyjnego oraz ciąży, występują także podczas przyjmowania niektórych leków (np. leków hormonalnych, przeciwpadaczkowych, niektóre źródła mówią również o doustnych środkach antykoncepcyjnych) [68,69]. W produkcji kwaśnej glikoproteiny bierze udział

wątroba a w przypadku stanu zapalnego tą funkcję mogą pełnić także inne tkanki i organy [70]. Masa cząsteczkowa jest niższa niż w przypadku albuminy i wynosi 40-44 kDa, tak jak i ilość aminokwasów wchodzących w skład cząsteczki - 183 [71,72]. W swojej strukturze alfa-1-kwaśna glikoproteina zawiera reszty węglowodanowe (ok. 45% struktury) [70] oraz kwasu sjałowego (N-acetyloneuraminowego), które nadają jej właściwości kwasowe z wartością pH punktu izoelektrycznego od 2,7 do 3,2 [71,72]. Prawdopodobnie większą część struktury drugorzędowej tworzy β -harmonijka, jednak dokładny obraz cząsteczki nie został jeszcze poznany [73,74]. Podobnie jest z miejscami wiązania leków, przyjmuje się, że są dwa: jedno dla leków kwaśnych a drugie dla zasadowych, nachodzą one na siebie i mogą wzajemnie wpływać na swoje funkcjonowanie [64,75], inne badania mówią również o występowaniu pięciu dodatkowych miejsc zdolnych do wiązania leków [68].

Wpływ wiązania z białkami na dystrybucję leków przez bariery organizmu

Transport substancji przez błony komórkowe

Wyróżniamy dwa podstawowe rodzaje transportu przez błony komórkowe: transport bierny (dyfuzja prosta i ułatwiona), którego mechanizm jest prostszy i przebiega wraz z gradientem stężeń oraz transport aktywny, wymagający nakładów energii, aby przenieść cząsteczki wbrew różnicy stężeń [76]. Dyfuzja prosta opiera się na swobodnym przechodzeniu, najczęściej małych, lipofilowych cząsteczek nie obdarzonych ładunkiem bezpośrednio przez błony. W przypadku związków zjonizowanych odbywa się to przez specjalne kanały jonowe. Dyfuzja ułatwiona nadal opiera się na przechodzeniu cząsteczek do miejsca o mniejszym stężeniu, ale wykorzystywane są w tym celu specjalne białka błonowe. Proces transportowania związków wbrew gradientowi wymaga dostarczenia energii, dlatego zawsze też jest sprzężony z innym, który jej dostarcza np. hydrolizą wysokoenergetycznego adenozynotrifosforanu, czyli ATP [77].

W przypadku bardzo dużych cząstek możliwy jest mechanizm wnikania do komórki na zasadzie pinocytozy. Jest to jedna z form transportu wewnątrzkomórkowego, w której z błony komórkowej tworzony jest pęcherzyk otaczający molekułę [78].

Błona komórkowa jest półprzepuszczalną membraną złożoną z dwóch warstw fosfolipidów o grubości ok. 10 nm oraz białek znajdujących się na powierzchni lub w niej zakotwiczonych, które pełnią różnorakie funkcje: receptorów, nośników, kanałów jonowych czy enzymów [78,79]. Z czynników, które wpływają na zdolność związków do przekraczania błon biologicznych wymienia się: masę cząsteczkową, stan zjonizowania, stężenie po obu stronach membrany, lipofilowość oraz wiązanie z białkami [78]. Z ogólnych założeń można wymienić: [78,80,81]:

1. Związki o masie cząsteczkowej poniżej 500 Da z łatwością przenikają przez błony komórkowe.
2. Leki silnie wiążące się z białkami mają ograniczoną dystrybucję z kompartmentu centralnego do innych. Jest to związane przede wszystkim z większą masą kompleksu lek-białko niż cząsteczki niezwiązanej i uniemożliwienie tym samym przejścia przez błonę.

3. Ze względu na lipofilowy charakter błony komórkowej wyłącznie niejonizowane cząsteczki mogą przenikać na drugą stronę membrany. Stan zjonizowania zależy od pK_a związku oraz pH środowiska. Z równania Hendersona-Hasselbacha [82] wynika, że jeśli pH jest wyższe niż pK_a to formy zjonizowanej jest więcej i na odwrót: przy niższym pH formy niejonizowanej będzie więcej. W sytuacji gdy $pH = pK_a$ formy zjonizowanej jest tyle samo co niejonizowanej.
4. Ponownie: w związku z lipofilowością błony komórkowej lipofilowe cząsteczki łatwiej przez nią przenikają. Jednak nie mogą być to skrajne wartości, ponieważ może wtedy dojść do akumulacji cząsteczki w błonie.
5. Związki chętniej przechodzą do środowiska o mniejszym stężeniu. Odbywa się to na zasadzie dyfuzji, czyli bez nakładów energetycznych.

Trudniejszą kwestią jest przenikanie substancji przez bariery fizjologiczne. Są one inaczej zbudowane niż zwykłe błony komórkowe a dodatkowo posiadają szereg innych mechanizmów zapobiegających przenikaniu ksenobiotyków na drugą stronę. Szczególnie trudne jest pokonanie bariery krew-mózg, ochraniającej najważniejszą strukturę w organizmie.

Bariera krew-mózg

Jest jedną z najważniejszych barier fizjologicznych występujących w ludzkim organizmie, oddziela ośrodkowy układ nerwowy (OUN) od naczyń krwionośnych a tym samym od reszty ustroju. Zbudowana jest z komórek endotelialnych wyściełających naczynia krwionośne, mocno ze sobą połączonych przez tzw. złącza ścisłe (ang. tight junctions, TJs) i połączenia przylegające (ang. adherens junctions, AJs), które są charakterystyczne dla BBB; komórek glejowych (inaczej astrocytów), błony podstawnej oraz pericytów i neuronów znajdujących się dookoła [83]. Dokładne przyleganie do siebie komórek nabłonka zapobiega biernemu przenikaniu substancji do mózgowia, całość transportu przebiega drogą intracelularną [84]. Dodatkowo pinocytoza występuje w ograniczonym zakresie, podobnie jak ilość porów w błonie komórkowej, przez które mogłyby przenikać substancje różnego pochodzenia [84,85]. Poza ograniczeniem fizycznym istnieje również bariera metaboliczna, którą stanowi głównie swoista

aktywność enzymatyczna występująca w obrębie bariery powodująca rozpad związków chemicznych oraz jako trzeci element ochrony – system aktywnego usuwania substancji z mózgowia (ang. brain-to-blood efflux), który przebiega przy pomocy transporterów [84,86,87].

Główną funkcją bariery krew-mózg jest ochrona mózgowia przed wnikaniem niepotrzebnych i toksycznych substancji oraz selektywne dostarczanie związków niezbędnych do jego prawidłowego funkcjonowania – glukozy i składników odżywczych oraz tlenu [83]. Gazy i substancje lipofilowe łatwo dyfundują przez błony komórkowe, także te w obrębie bariery; składniki odżywcze: glukoza, aminokwasy są przenoszone poprzez transportery, a związki o dużej masie cząsteczkowej (insulina, transferyna, albumina i inne białka osocza) wnikają na zasadzie endocytozy, często za pośrednictwem receptorów [84,88]. Leki przenikają przez BBB zazwyczaj na drodze dyfuzji przezbłonowej (szczególnie te lipofilowe, o małej masie cząsteczkowej) oraz przy pomocy transporterów [85].

Wielokrotnie badano związek między wiązaniem substancji z białkami a ich przenikaniem przez BBB [85,89–91]. Albumina i inne białka bardzo słabo przenikają przez barierę, a kompleks białko-lek jest zazwyczaj połączeniem o dużej masie cząsteczkowej i rozmiarach więc logicznym jest założenie, że im więcej cząsteczek związku będzie przyłączone do białek tym mniej przedostanie się do OUN [92]. Dla niektórych substancji (np. bilirubiny) to założenie się potwierdziło jednak co ciekawe zauważono pewne wyjątki od reguły [93]. Pewne związki, które dobrze przenikają do mózgu (m.in. benzodiazepiny, steroidy, niektóre hormony) uzyskiwały tam większe stężenie niż to zakładano biorąc pod uwagę ich frakcję niezwiązaną z białkami w osoczu [94]. Jedną z hipotez, która próbowała wyjaśnić ten fenomen było występowanie zmian w konformacji białka podczas zetknięcia się z komórkami bariery, które doprowadzało do dysocjacji kompleksu białko-ligand i pozwalało nie związanemu już ligandowi na wniknięcie do OUN [95,96].

Bariera łożyskowa

Łożysko jest narządem tworzącym się w przebiegu ciąży z kosmówki (część płodowa) oraz błony śluzowej macicy (część matczyzna). Najczęściej ma kształt

dyskoidalny o średnicy 20-22 cm, grubości 2,5-3 cm a jego masa pod koniec ciąży może osiągać do 500 g; dojrzałe łożysko jest gładkie od strony płodowej a od strony matczynej ma budowę zrazikową – zrazy łożyska są jego podstawową jednostką strukturalną [97,98]. Łožysko służy przede wszystkim do wymiany substancji między organizmami matki i płodu a w dalszych etapach ciąży przyjmuje także inne funkcje: syntezę hormonów steroidowych i białkowych oraz aktywność metaboliczną [79,97]. Początkowo barierę łożyskową tworzą cztery warstwy: warstwa endotelium naczyń krwionośnych płodu, trofoblast, cytotrofoblast oraz syncytiotrofoblast będący zewnętrzną warstwą położoną od strony matczynej. Potem wraz z rozwojem łożyska środkowe warstwy zanikają i zostaje tylko nabłonek naczyń i syncytiotrofoblast, który bezpośrednio łączy się z krwią matki [97].

Krew matki i płodu nie mieszają się, jednak budowa łożyska zapewnia dostateczny transport składników odżywczych niezbędnych do rozwoju dziecka, usuwanie produktów przemiany materii z jego ustroju a także wymianę gazową [97]. Z tego względu łożysko uznawane jest za najsłabszą barierę w ludzkim organizmie i pełni bardziej funkcję filtra niż faktycznej ochrony, choć nie do końca słusznie – dużą rolę odgrywa również aktywność metaboliczna łożyska oraz aktywność transporterów [99]. Zatrzymuje komórki bakterii (wirusy przenikają), immunoglobuliny (oprócz IgG), insulinę, heparynę i bilirubinę w stanie związanym. Przepuszcza większość leków w tym barbiturany, antybiotyki i sulfonamidy oraz alkohol [79]. Przenikanie substancji przez łożysko odbywa się na zasadzie dyfuzji, która dotyczy głównie wody, elektrolitów i małych cząsteczek jak również wielu leków, transportu ułatwionego i aktywnego [79] ewentualnie poprzez transport wewnątrzkomórkowy czyli pino- i fagocytozę [100]. Dyfuzja prosta zachodzi w przypadku większości leków a jej szybkość opisuje poniższe Równanie 6 [99]:

$$\text{szybkość dyfuzji} = D \times \Delta c \times A/d \quad (6)$$

D - stała dyfuzji leku

Δc - różnica stężeń po obu stronach bariery łożyskowej

A - powierzchnia wymiany

d - grubość powierzchni wymiany

Na ilość leku, jaka przenika przez łożysko wpływ mają różne czynniki: właściwości fizykochemiczne (lipofilowość, pKa, masa cząsteczkowa) czy farmakokinetyka leku (czas półtrwania, procesy eliminacji) jak i różnica stężeń leku po obu stronach bariery łożyskowej, różnice w pH osocza u matki i płodu oraz wiązaniu z białkami w obu organizmach, a także ilość, lokalizacja i aktywność transporterów [101,102]. Najczęściej przy aktywnym transporcie leków uczestniczą transportery ABC (ang. ATP-binding cassette transporter) występujące na łożysku głównie od strony matki [101]. Jest to superrodzina transporterów białkowych, które wykorzystują energię powstającą podczas hydrolizy ATP do przenoszenia związków chemicznych przez błony komórkowe [103]. Najważniejszymi z tej grupy są glikoproteina P (ang. P-glycoprotein, P-gp) i białko oporności raka piersi (ang. breast cancer resistance protein, BCRP lub placenta-specific ABC transporter, ABCP – nazwa ta związana jest z wysoką ekspresją tego białka w łożysku). Transportery mogą przenosić leki na obie strony łożyska jednak uważa się, że głównie usuwają ksenobiotyki z komórek płodowych, zapobiegają ich przechodzeniu do rozwijającego się organizmu i dzięki temu mają duże znaczenie przy tworzeniu bariery łożyskowej [104,105].

Nie jest możliwe uniknięcie stosowania leków podczas ciąży, a ich spożycie z biegiem lat wzrasta [101,106]. Są stosowane w leczeniu chorób przewlekłych u matki (np. nadciśnienie, epilepsja, cukrzyca) lub doraźnie podczas np. infekcji oraz w ramach samoleczenia preparatami OTC [101,102,106]. Ze względu na stosunkowo słabą ochronę przed wnikaniem substancji jaką stanowi łożysko Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) nadała lekom odpowiednie kategorie, które mówią o ryzyku dla płodu podczas stosowania danego preparatu w czasie ciąży (Tabela 4) [107,108].

Tabela 4. Ryzyko stosowania w czasie ciąży - klasyfikacja FDA

kategoria	charakterystyka
kategoria A	Badania u ludzi nie wykazały istnienia ryzyka dla płodu. Uszkodzenia płodu są mało prawdopodobne.
kategoria B	Badania na zwierzętach nie wykazały istnienia ryzyka dla płodu, brak badań na ludziach. Podczas obserwacji ciężarnych kobiet nie stwierdzono istnienia ryzyka dla płodu.

kategoria C	Badania na zwierzętach wykazały istnienie ryzyka dla płodu, działanie teratogenne lub zabójcze. Brak badań na ludziach.
kategoria D	Istnieją dowody na negatywny wpływ na płód jednak dopuszcza się stosowanie takich leków w przypadkach zagrażających życiu i zdrowiu matki, kiedy nie ma innych, bezpieczniejszych leków lub gdy są one nieskuteczne
kategoria X	Badania na zwierzętach i ludziach wykazały negatywny wpływ na płód a ryzyko znacznie przewyższa korzyści wynikające z zastosowania leku

Wiązanie z białkami jest wymieniane jako jeden z elementów wpływających na transport leków przez łożysko [109]. Jest czynnikiem, który wpływa na szybkość transportu przez łożysko jak i jego natężenie [99]. Jednym z powodów jest, jak w każdym przypadku przenikania przez błony komórkowe, wzrost masy cząsteczkowej leku w kompleksie z białkiem, która skutecznie uniemożliwia dyfuzję [99].

Wpływ na dystrybucję związków między organizmami matki i płodu mają różnice w stężeniu kluczowych białek, które dodatkowo ulegają zmianie w trakcie trwania ciąży. Stężenie albuminy, początkowo niższe u płodu, pod koniec ciąży jest u niego o ok. 20% wyższe niż u matki a stężenie alfa-1-kwasnej glikoproteiny u płodu wzrasta wraz z dojrzewaniem jednak nigdy nie przewyższa wartości w osoczu matki i w okolicach porodu jest o ok. 30-40% niższe [110]. Różne jest też powinowactwo protein do leków – w przypadku płodowej albuminy (alfa-fetoproteiny) jest niższe [110,111]. Dodatkowo należy pamiętać że wiązanie z białkami zachodzi nie tylko w osoczu ale również w tkankach matki, płodu i łożyska. Kumulacja leków po związaniu z białkami łożyska tworzy swoisty rezerwuar, z którego leki mogą przedostawać się z powrotem do krwi matki lub dalej do krążenia płodowego [99]. Tam po wiązaniu z białkami mogą zatrzymywać się w organizmie płodu co dobrze przedstawia przykład diazepamu należącego do kategorii D wg FDA więc możliwy jest jego negatywny wpływ na płód [110,112].

Przenikanie przez skórę

Podawanie preparatów na skórę staje się coraz bardziej popularne i dotyczy leków działających zarówno miejscowo, w obrębie naskórka (np. preparaty przeciwgrzybicze) jak i tych wnikaących do głębszych warstw a także przenikających do krążenia ogólnoustrojowego. Do związków przenikających do dalszych tkanek możemy zaliczyć między innymi niesteroidowe leki przeciwzapalne stosowane w bólach kostno-stawowych, natomiast działanie systemowe przy podaniu przezskórnym wykazuje m.in. fentanyl w leczeniu silnego bólu, nitrogliceryna przy dławicy piersiowej czy nikotyna w postaci plastrów w terapii leczenia uzależnienia [113–115].

Początkowo uważano, że lek podany na skórę w dużym stopniu przedostaje się do krążenia skórniego i dalej do ogólnoustrojowego, a czynnikami regulującymi ten proces są: formuacja preparatu farmaceutycznego oraz struktury substancji i skóry [113]. Dodatkowo na wnikanie substancji w głąb skóry ma jej kondycja ponieważ skóra uszkodzona może przepuszczać większe ilości leku [116]. Z czasem jednak stwierdzono silniejszą zależność między właściwościami i budową związku (z uwzględnieniem jego wiązalności z białkami) a dystrybucją po podaniu przezskórnym [113].

Leki podawane na skórę postaci maści, kremów czy żeli mogą ulegać wiązaniu z białkami w skórze. Preparaty mające na celu działające transdermalne zazwyczaj w swoim składzie mają substancje aktywne o na tyle małej masie cząsteczkowej, że są one w stanie przeniknąć przez barierę skórną i dostać się do krążenia ogólnego. W takim przypadku wiązanie z białkami w skórze jest zjawiskiem niepożądanym ponieważ związek pozostaje w powłokach skórnych i jego działanie ogólnoustrojowe jest zmniejszone. Badania udowodniły, że obniżone jest jego stężenie we krwi a czas transferu przez skórę wydłuża się [117,118]. Z drugiej strony leki działające wyłącznie miejscowo po utworzeniu kompleksu z białkiem zostają zakotwiczone w swoim miejscu działania i nie wywierają wpływu na resztę organizmu co mogłoby wiązać się z występowaniem efektów ubocznych.

W przypadku wiązania z białkami w osoczu, lek pod wniknięciem do krążenia skórniego jest szybciej i w większej ilości dystrybuowany do dalszych kompartmentów jeśli w dużym stopniu ulega wiązaniu z proteinami osocza. Związane jest

to prawdopodobnie z funkcją białek osocza jako transporterów i zwiększeniem rozpuszczalności kompleksu lek-białko [113].

Przenikanie do mleka matki

Jak opisano we wcześniejszym rozdziale „Przenikanie leków do mleka matki”, wiązanie substancji aktywnych z białkami odgrywa bardzo dużą rolę w tym procesie. Dyfuzja prosta, która jest głównym mechanizmem transportu do mleka, może być łatwo ograniczona dużą masą cząsteczkową związku, co ma miejsce po połączeniu się leku z makromolekułami jakimi są białka osocza [119]. Ogólne założenie, iż leki silnie wiążące się z białkami w mniejszym stopniu przechodzą do mleka zdaje się sprawdzać w praktyce. Przykładem są leki z grupy selektywnych inhibitorów wychwyty serotoniny (SSRI) m.in. fluoksetyna, citalopram, sertralina, charakteryzujące się wysokim odsetkiem wiązania z białkami osocza (od 80 do 99%), były oznaczane w mleku w ilościach śladowych, rzędu kilkuset mikrogramów na litr [120].

Kolejna kwestia do rozważenia to wiązanie z białkami mleka, co dodatkowo zmniejsza ilość leku, który końcowo spożyje niemowlę [6,18]. Eksperci twierdzą, że przy karmieniu piersią nie należy przerywać farmakoterapii, chyba że jest to konieczne. Jednak, powinny istnieć wystarczające dowody na to, że lek jest bezpieczny dla niemowląt karmionych piersią lub nie wpływa na przebieg laktacji.

Metody chemometryczne

Badania QSPR w projektowaniu leków

Proces odkrywania i badania nowych substancji leczniczych jest niezwykle czasochłonny i wymagający dużych nakładów finansowych. Średni czas od stworzenia nowej cząsteczki do wypuszczenia gotowego preparatu leczniczego na rynek to 20 lat. Metody *in silico*: QSAR (ang. quantitative structure–activity relationship; ilościowa zależność aktywność-struktura) lub QSPR (ang. quantitative structure–property relationship, ilościowa zależność właściwość-struktura) pomagają w szybki i niedrogi sposób zrobić „odsiew” struktur, które na pewno nie spełnią stawianych im kryteriów [121–123]. Takim sposobem sprawdza się przede wszystkim aktywność biologiczną cząsteczki: powinowactwo do określonych receptorów, punkty uchwytu itd. Drugim ważnym aspektem jest farmakokinetyka związku, czyli tzw. właściwości ADME (ang. absorption – wchłanianie, distribution – dystrybucja, metabolism – metabolizm, excretion – wydalanie) [124,125]. Do etapu dystrybucji zalicza się zdolność do przenikania cząsteczki przez błony i bariery biologiczne do innych kompartmentów oraz wiązanie z białkami osocza, które ma znaczny wpływ na ostateczne działanie farmakologiczne leku. Dodatkowo ważnym aspektem, analizowanym metodami obliczeniowymi jest również działanie toksyczne [126].

Przenikanie leku do mleka matki jest bardzo ważnym zagadnieniem podczas ustalania farmakoterapii kobiety karmiącej. O ile krótkotrwałe leczenie np. infekcji górnych dróg oddechowych nie stanowi większego problemu to już długa farmakoterapia chorób przewlekłych zmusza do zastanowienia się nad stosunkiem korzyści do ryzyka związanego z karmieniem piersią [127,128]. Dostarczanie wraz z pokarmem substancji leczniczych do organizmu dziecka, może skutkować nie tylko wystąpieniem działań niepożądanych, ale też poważnie wpłynąć na rozwój nieukształtowanych ostatecznie organów.

Badania *in vivo* w takim przypadku stanowią duży problem natury etycznej. Jeżeli podejmuje się jakieś próby analizowania zawartości substancji aktywnej w mleku kobiecym, są to zazwyczaj pojedyncze przypadki, tzw. case study lub badania na bardzo małych grupach kobiet, które nie znajdują odniesienia do całej populacji [127–130].

Metody QSAR, wydają się tutaj słusznym rozwiązaniem. Przetestowanie zależności między strukturą i właściwościami fizykochemicznymi a farmakokinetyką cząsteczki pozwolą na oszacowanie zawartości tej substancji w mleku matki, bez konieczności wykonywania badań klinicznych. Od lat podejmowane są próby stworzenia modeli matematycznych dla różnych struktur przy pomocy rozlicznych metod statystycznych [27,36,131]. Idealnym rozwiązaniem byłby uniwersalny model dla dowolnej struktury chemicznej, który przewidyje z wysokim współczynnikiem determinacji przenikanie do mleka kobiecego.

Metody statystyczne

Analiza statystyczna zajmuje się badaniem zależności między zjawiskami zachodzącymi w otaczającym świecie. Poznanie przyczyn niektórych procesów może przyczynić się do lepszego ich zrozumienia, a przyczyny te zazwyczaj biorą początek w prostych zależnościach między czynnikami. W medycynie, podobnie jak w innych gałęziach gospodarki, szuka się tych podstawowych czynników, a następnie ustala ich wpływ na dane zagadnienie. W przypadku leczenia może to być wystąpienie jednostki chorobowej, ekspresja genów, farmakokinetyka danej substancji aktywnej w organizmie itd. Ważnym elementem analiz statystycznych jest wykazanie zależności na dostatecznie dużej grupie badanych przypadków. Jedynie wtedy można założyć, że dana korelacja nie jest dziełem przypadku, a rzeczywistym oddziaływaniem.

Zmienne, które są badane pod kątem wywierania wpływu na dane zjawisko nazywane są zmiennymi niezależnym, objaśniającymi lub zmiennymi X, natomiast zmienna zależna bądź objaśniana (zmienna Y) w sposób matematyczny to zjawisko wyraża. Analiza statystyczna pomaga określić jak zmiana wartości zmiennej X (lub kilku zmiennych X na raz) wpływa na zmienną Y.

Zmienne X mogą mieć charakter zmiennych kategorycznych lub ciągłych, podobnie zmienna Y. Zmienne kategoryczne mogą przyjmować wyłącznie określone wartości (np. tylko cyfry 1, 2, 3 lub 4) a zmienne ciągłe mogą być wyrażone dowolną liczbą rzeczywistą, zdarza się, że ograniczeniem jest zakres w jakim te liczby mogą się znajdować (np. między 0 a 1), związany z charakterem danej zmiennej.

Regresja wielokrotna

Celem regresji wielokrotnej (ang. Multiple Linear Regression; MLR) jest ilościowe ujęcie związków pomiędzy wieloma zmiennymi niezależnymi a zmienną zależną. Ogólny model regresji jest wyrażony równaniem [132]:

$$Y = a + b_1 \times X_1 + b_2 \times X_2 + \dots + b_n \times X_n$$

gdzie $X_1, X_2 \dots X_n$ to kolejne zmienne niezależne; $b_1, b_2 \dots b_n$ to współczynniki regresji, ilustrujące wkład każdej zmiennej w predykcję Y , natomiast a stanowi wyraz wolny. Model taki można przedstawić na wykresie rozrzutu. Linia regresji wyraża najlepszą predykcję zmiennej zależnej przy wprowadzonych zmiennych X . Najlepsze dopasowanie linii do odległości od punktów wyliczane jest metodą najmniejszych kwadratów [133]. Zazwyczaj mamy do czynienia z odchyleniami punktów od linii regresji. Odchylenie danego punktu na wykresie od jego wartości przewidywanej nazywamy wartością resztową. Im mniejsze są wartości reszt, tym wartość predykcyjna modelu jest lepsza. Współczynnik determinacji (R^2) jest miarą dopasowania, przyjmuje wartości od 0 do 1, często też jest wyrażany w postaci procentowej. Współczynnik R^2 pokazuje ile procent zmienności Y jest tłumaczone przy pomocy danego modelu [132].

Pierwiastkiem kwadratowym ze współczynnika determinacji jest współczynnik korelacji (R), określający siłę zależności między, przyjmujący wartość między 0 a 1 lub -1, ponieważ korelacja może być dodatnia bądź ujemna. Dla R określono skalę, mówiącą o mocy korelacji [134]:

- $R = 0$ – brak korelacji
- $0 < R \leq 0,1$ – korelacja nikła
- $0,1 < R \leq 0,3$ – korelacja słaba
- $0,3 < R \leq 0,5$ – korelacja przeciętna
- $0,5 < R \leq 0,7$ – korelacja wysoka
- $0,7 < R \leq 0,9$ – korelacja bardzo wysoka
- $0,9 < R < 1$ – korelacja prawie pełna
- $R = 1$ – korelacja pełna

Założeniem w MLR jest liniowość zależności między zmiennymi X i Y , co można potwierdzić analizując wykresy rozrzutu. W przypadku odchylen od prostej,

można skorzystać z transformacji zmiennych (np. przekształcenia ich na postać zlogarytmowaną) bądź pozostawić model w formie pierwotnej, jednak może to stwarzać trudności interpretacyjne [132]. Liczba zmiennych wchodząca w skład równania regresji wielokrotnej również podlega ograniczeniom, ponieważ wraz ze wzrostem liczby zmiennych niezależnych rośnie współczynnik determinacji. Skutkowałoby to tworzeniem modeli z obliczoną wysoką predykcją w praktycznie każdej analizie, ale niekoniecznie odpowiadającym rzeczywistości. Przyjmuje się, że na każde 5 analizowanych przypadków do równania wprowadza się jedną zmienną niezależną. Zmienne X nie mogą być również wysoko skorelowane między sobą, ponieważ sztucznie podnosi to wyniki dopasowania. Liniowa regresja wielokrotna jest podstawą dla wielu metod wielowymiarowych, takich jak regresja najmniejszych cząstkowych kwadratów czy analiza dyskryminacyjna.

Analiza składowych głównych

Jest jedną z form analizy czynnikowej, która służy albo do redukcji ilości danych albo do wykrywania ukrytych zależności między zmiennymi niezależnymi. Zbierając dane, które dotyczą zmiennych niezależnych wysoko skorelowanych między sobą, można napotkać kłopoty z ich interpretacją. Analiza składowych głównych (ang. Principal Component Analysis; PCA) najogólniej mówiąc służy do łączenia zmiennych wysoko skorelowanych między sobą w jedną nową zmienną zwaną czynnikiem (ang. principal component, PC) [132]. Obliczenie nowych czynników polega na diagonalizacji macierzy korelacji bądź kowariancji. Wybór macierzy zależy od tego czy zmienne pierwotne wymagają standaryzacji czy wycentrowania na wartości średnie. W taki sposób generuje się zmniejszona liczba nowych zmiennych, ale wyjaśniająca w możliwie najwyższym stopniu pierwotną wariancję.

Dalsze poszukiwania prowadzą do uzyskiwania kolejnych czynników, które między sobą nie wykazują już korelacji, czyli są względem siebie ortogonalne. Każdy kolejny utworzony czynnik wyjaśnia mniej wariancji między zmiennymi pierwotnymi. To, ile całkowitej wariancji dany czynnik wyjaśnia jest opisane jako wartość własna (można to również łatwo przeliczyć na procent wariancji całkowitej mnożąc wartość własną razy 100%). Natomiast ładunki wektorowe ukazują korelację pomiędzy PC

a zmiennymi niezależnymi, czyli pokazują, które zmienne miały największy wpływ na tworzenie danego czynnika [132].

Metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów

Regresja metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów (ang. Partial Least Squares, PLS) jest rozwinięciem liniowej regresji wielokrotnej, łączy w sobie cechy analiz MLR oraz PCA. Ogólnie mówiąc, model liniowy PLS, podobnie jak w MLR określa związek pomiędzy zmienną zależną, czyli Y a zbiorem predyktorów. PLS jest dość elastyczną metodą, na którą nie ma nałożonych ograniczeń takich jak w MLR i przykładowo liczba predyktorów może być większa niż liczba analizowanych przypadków. Umożliwia to analizę gdy zebrano niewielką grupę przypadków, operując jednocześnie dużą liczbą uzyskanych danych doświadczalnych. Podobnie znika problem wewnętrznej korelacji między zmiennymi X.

Celem regresji najmniejszych cząstkowych kwadratów jest budowa modelu liniowego wyrażonego równaniem:

$$Y=X \times B+E$$

gdzie Y oznacza macierz odpowiedzi o wymiarach $n \times m$ (liczba przypadków $\times$ liczba zmiennych), X oznacza macierz predyktorów o wymiarach $n \times p$ (również liczba przypadków $\times$ liczba zmiennych), B oznacza macierz współczynników regresji o wymiarach $p \times m$ a E jest składnikiem losowym modelu, o wymiarach jak macierz Y. Zmienne X i Y zostają zazwyczaj wycelowane poprzez odjęcie od nich ich wartości średnich oraz wyskalowane uzyskane dzięki podzieleniu przez wartości odchyłeń standardowych [135].

W celu określenia modelu, regresja PLS tworzy macierz wag W dla predyktorów (o wymiarach $p \times c$), w której $T=X \times W$, Wagi te są obliczane w taki sposób, że każda z nich maksymalizuje kowariancję pomiędzy zmiennymi Y a przynależnymi do nich wartościami czynnikowymi. Następnie wykorzystywane są procedury zwykłej metody najmniejszych kwadratów dla regresji Y względem T w celu utworzenia macierzy Q zawierającej wagi (zwane ładunkami) dla odpowiedzi Y,

w których $Y=T \times Q + E$. Dzięki wyliczeniu Q otrzymujemy równanie $Y=X \times B + E$ (gdzie $B=W \times Q$). W ten sposób uzyskuje się liniowy model, umożliwiający predykcję [132].

Ważnym etapem przy tworzeniu modeli predykcyjnych, jest przeprowadzenie oceny krzyżowej uzyskanych wyników, tzn. zastosowanie modelu do nowego zbioru przypadków, który nie był używany w trakcie modelowania. W tym celu dane do analizy dzieli się na zestaw treningowy (ok. 70-80% wszystkich przypadków), na którym buduje się model predykcyjny, który następnie jest stosowany na zestawie testowym (reszta, czyli 20-30% przypadków), dzięki czemu sprawdza się moc dopasowania na danych zewnętrznych.

Analiza funkcji dyskryminacyjnej

Analiza funkcji dyskryminacyjnej (ang. Discriminant Function Analysis, DFA) jest analizą klasyfikacyjną określającą, które zmienne niezależne najlepiej determinują przypisanie poszczególnych przypadków do każdej z wcześniej ustalonych grup. Model uzyskuje się przy pomocy funkcji dyskryminacyjnych, które są liniowymi układami zmiennych niezależnych. W przypadku jednej zmiennej X , test F jest testem istotności tego, czy dyskryminuje on grupy [132]. Służy on do analizy wariancji w danej grupie bądź porównania wartości wariancji między różnymi grupami. Jeżeli występują istotne różnice między wariancjami w grupach, można założyć, że dana zmienna dobrze dyskryminuje przypadki. W przypadku wielu zmiennych niezależnych analizowanych na raz, aby sprawdzić ich wpływ na dyskryminację przypadków do grup stosuje się wielowymiarowe testy F .

W sytuacji, gdy DFA ma rozdzielić przypadki na więcej niż dwie grupy, można określać więcej niż jedną funkcję dyskryminacyjną. Dodatkowo analiza kanoniczna umożliwia ustalenie optymalnej kombinacji zmiennych X , tak aby pierwsza funkcja zapewniła dość ogólne rozdzielenie między grupami, a następne – dalsze podziały. Funkcje te powinny być niezależne od siebie; ich udział w dyskryminowaniu grup nie powinien się pokrywać.

Przy interpretacji uzyskanego modelu, korzysta się z kilku statystyk. Lambda Wilksa to parametr służący do oceny mocy dyskryminacyjnej całego modelu, czyli

wszystkich zmiennych niezależnych obecnych w modelu; przyjmuje ona wartości od 0 do 1; im te wartości są bliższe zeru tym model charakteryzuje się dużą mocą dyskryminacyjną. Częstkowe lambdy Wilksa mówią o wkładzie poszczególnych zmiennych X do ogólnej mocy modelu. Wartość statystyki F opisuje moc dyskryminacyjną danej zmiennej. W analizie krokowej postępującej, zmienne dodawane są do modelu zgodnie z wartościami F , na początku wprowadzana jest ta, której moc dyskryminacyjna jest największa a dalej kolejne.

Innym zastosowaniem DFA jest potrzeba prognozowania klasyfikacji nowych przypadków. W tym celu korzysta się z prawdopodobieństw klasyfikacyjnych *a priori* i *a posteriori*. Prawdopodobieństwo *a posteriori* oparte jest na wartościach innych zmiennych, które przypisują dany przypadek do konkretnej grupy, czyli prawdopodobieństwo to jest ustalane po wykonaniu doświadczenia losowego. Natomiast klasyfikacja *a priori* obliczana jest przed jego realizacją.

Las losowy

Metodę lasu losowego (ang. Random Forest, RF), należącą do metod uczenia maszynowego, wykorzystuje się zarówno do analiz regresyjnych jak i klasyfikacyjnych. Przewidywanie wartości zmiennej Y realizowane jest poprzez zespół wielu prostych drzew decyzyjnych, z których każde z nich przewiduje wartość Y na podstawie zmiennych niezależnych, a ustalanie całego modelu predykcyjnego wyznaczane jest przez obliczanie średniej lub mediany (regresja) albo poprzez głosowanie (klasyfikacja) [136].

Pierwszym etapem jest losowanie (ze zwracaniem) podzbioru przypadków z dostępnego zestawu uczącego. Następnie, tworzone jest drzewo dla stworzonego podzbioru. Dalej dokonuje się podziału podzbioru, polegającego na wylosowaniu określonej liczby predyktorów oraz znalezieniu najlepszego podziału na wylosowanego podzbioru zmiennych na dwie części.

Liczba drzew jest wybierana na podstawie najniższego błędu klasyfikacji w próbie testowej (ang. out-of-bag error). Kiedy wartość tego błędu przestaje maleć, uczenie powinno zostać przerwane. Następnie drzewa "głosują" nad rozwiązaniem,

wybór następuje zwykłą większością głosów, w przypadku zadań klasyfikacyjnych, a w przypadku regresji wyciągana jest średnia bądź mediana z uzyskanych wartości.

Dużą zaletą metody RF jest odporność na problemy z brakami danych, duże zestawy predyktorów, charakteryzują się również stabilnością predykcji oraz odpornością na przeuczenie.

Analiza skupień

Celem analizy skupień (ang. Cluster Analysis; CA) jest połączenie przypadków w grupy tak, aby powiązanie w obrębie do tej samej grupy był jak największe, a z przypadkami z pozostałych grup jak najmniejsze [132].

Grupowanie przeprowadza się aby:

- a) uzyskać ujednolicone zmienne
- b) zredukować dużą liczbę zmiennych pierwotnych
- c) odkryć ukrytą strukturę analizowanych zmiennych

Metodą grupowania danych jaką zastosowano była metoda k-średnich, w której bada się średnie dla każdego skupienia i w każdym wymiarze, co pozwala ocenić, w jakim stopniu stworzone skupienia są od siebie różne. W analizie wariancji wielkość statystyki F wykonanej w każdym pokazuje, na ile dobrze dany wymiar rozdziela poszczególne skupienia. W najlepszej sytuacji otrzymuje się bardzo różne średnie dla większości wymiarów poddanych analizie [132].

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Cele pracy

Celem pracy jest analiza przenikania ksenobiotyków do mleka kobiecego i stworzenie modeli QSPR, przy pomocy metod statystycznych z wykorzystaniem prostych deskryptorów, związanych z właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi tych związków. W czasie badań sprawdzono również możliwość zastosowania danych z chromatografii cienkowarstwowej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej do budowy modeli matematycznych, przewidywania obecności leku w mleku matki. Aby zwiększyć możliwości metod chromatograficznych zastosowano płytki oraz kolumny z immobilizowaną albuminą osoczną (ludzką lub bydlęcą) w związku z dużym wpływem jaki wywiera wiązanie z białkami osocza na zdolność leków do przenikania przez bariery biologiczne. Ta praca ma również na celu porównanie różnych środowisk chromatografii powinowactwa do odwzorowania przewidywanego poziomu wiązania leków z białkami.

Dodatkowo porównano kilka różnych metod analizy statystycznej do przewidywania przenikania leków do mleka matki oraz wiązania z białkami osocza; wykonano również analizy klasyfikujące oraz obserwacje korelacji między parametrami związanymi z właściwościami substancji biologicznie czynnych.

Doświadczenia chromatograficzne

Materiały i odczynniki

W chromatografii TLC korzystano ze szklanych płytek chromatograficznych 20×20 cm firmy Merck, pokrytych żelem krzemionkowym z dodatkiem wskaźnika fluorescencyjnego. Do normalnego układu faz (ang. normal phase; NP) zastosowano zwykłe płytki Merck TLC Silica gel 60 F254, natomiast w odwróconym układzie faz (ang. reversed phase; RP) korzystano z płytek silanizowanych RP-2: Merck TLC Silica gel 60 RP-2 F254, silanized.

Do fazy ruchomej używano rozpuszczalników z firmy J.T. Baker – wody, metanolu i acetonitrylu, z klasą gradientu HPLC. W celu sporządzenia buforu octanowego o pH 7,4 korzystano z octanu amonu (LACH-NER, Ammonium acetate p.a.).

Fazę stacjonarną płytek, zarówno NP i RP, modyfikowano przy pomocy wodnego roztworu bydlęcej albuminy osoczowej, zakupionej od Sigma Aldrich (albumina surowicy bydlęcej, proszek liofilizowany).

Kolumna chromatograficzna z immobilizowaną na złożu ludzką albuminą osoczną pochodziła od firmy Daicel: CHIRALPAK®HSA, 5 µm; 4×10 mm, natomiast kolumna ze sztuczną membraną IAM od Regis Technologies Inc.: IAM.PC.DD.2, 10µm; 4.6×10 mm.

W chromatografii HPLC wykorzystywane rozpuszczalniki organiczne (acetonitryl i metanol) oraz woda również pozyskane były od J.T. Baker (gradient HPLC). Do sporządzenia buforu octanowego (HPLC_{HSA}) korzystano z octanu amonu LACH-NER, Ammonium acetate p.a., natomiast do sporządzenia buforu fosforanowego (HPLC_{IAM}) z gotowego odczynnika w formie tabletek (Sigma, Phosphate buffered saline, tablets) do rozpuszczenia w ściśle określonej ilości wody do HPLC.

Izolacja substancji aktywnych

W eksperymentach chromatograficznych wykorzystano łącznie 237 substancji aktywnych (ang. active pharmaceutical ingredient; API), wyizolowanych z preparatów

farmaceutycznych, zazwyczaj tabletek bądź kapsułek twardych. Roztarte w moździerzu tabletki (pozbawione otoczek) bądź zawartość kapsułek umieszczano w 100 mL 99,8% metanolu, mieszano przy pomocy mieszadła magnetycznego przez ok. 30 minut, po czym przepuszczano przez lejek z założonym sączkiem do krystalizatorek. Naczynie z przesączem pozostawiano do odparowania rozpuszczalnika, a wykrystalizowaną substancję aktywną przenoszono do zamykanych szczelnie fiolek, przechowywanych w warunkach chłodniczych.

Czystość wyizolowanych substancji sprawdzano metodą chromatografii TLC oraz skanowania densytometrycznego. Wszystkie wyizolowane substancje dały pojedyncze piki densytometryczne i zostały użyte bez dalszego oczyszczania. Otrzymane API rozpuszczono w 99,8% metanolu uzyskując 1 mg/mL roztwory, które następnie zastosowano w chromatografii TLC i HPLC.

Impregnacja płytek TLC

Białkiem modyfikującym powierzchnię fazy stacjonarnej płytek do chromatografii cienkowarstwowej była bydlęca albumina osoczowa (ang. bovine serum albumin, BSA), która jest tańszym substytutem ludzkiej albuminy, wykazuje z nią 76% homologii i podobne właściwości wiązania leków [55,137–140]. Na początek sprawdzono przyczepność białka do powierzchni płytek TLC normalnego i odwróconego układu faz. W tym celu naniesiono przy pomocy kapilary roztwory BSA w wodzie destylowanej o stężeniach 1, 2, 3 i 4 mg/mL, pozostawiono do wyschnięcia na powietrzu a następnie rozwinięto w fazie ruchomej. Po wyjęciu płytek z komór chromatograficznych oraz ich wysuszeniu spryskano płytki 1% roztworem ninhydryny, która dzięki specyficznej reakcji uwidoczniła naniesione plamki BSA na płytkach. Eksperyment ten wykazał że, albumina dobrze przyczepia się do powierzchni zarówno zwykłych płytek z żelem krzemionkowym: NP jak i silanizowanych, RP-2, stężenia naniesionych roztworów nie miały wpływu na tą przyczepność.

Impregnacja płytek przeprowadzona była przy pomocy 2 mg/mL roztworu naniesiono na powierzchnię przy użyciu ręcznego rozpylacza Desaga SG 1 i wysuszono na powietrzu. Dobór najlepszego stężenia został dokonany wcześniej. Na płytki NP zaimpregnowane 1, 2 oraz 4 mg/mL roztworami BSA naniesiono substancje aktywne

w stężeniu 1 mg/ml (roztwory w 99,8% metanolu) charakteryzujące się różnym stopniem wiązania z białkami opisanym w literaturze. Wartości retencji różniły się znacząco między płytkami pokrytymi 1 a 2 mg/mL BSA, natomiast nie stwierdzono różnicy między stężeniem 2 a 4 mg/mL. W związku z tym zdecydowano o zastosowaniu stosunku 1:2; stężenia leku do stężenia BSA na płytce.

Chromatografia NP TLC

Cienkowarstwowa chromatografia w normalnym układzie faz (NP TLC) została wykonana przy użyciu płytek szklanych pokrytych żelem krzemionkowym. Połowa z nich została pokryta 2 mg/mL roztworem bydlęcej albuminy osoczowej, a połowa pozostała czysta.

Na płytki nałożono przy pomocy automatycznego aplikatora Desaga HPTLC-Applicator AS 30 roztwory wyizolowanych substancji aktywnych w 99,8% metanolu (1 mg/mL). Mobilność związków również określano na płytkach bez udziału białka jako modyfikatora. Zostały one oznaczone jako kontrole (C) i pozwolą ocenić wpływ modyfikatora na ruchliwość API. Następnie płytki zostały wywołane w fazie ruchomej składającej się z acetonitrylu, buforu octanowego o pH 7,4 i metanolu w stosunku 60:20:20 (v/v/v). Bufor octanowy (20 mM) przygotowano przez rozpuszczenie 1,54 g octanu amonu w 1L wody destylowanej. Następnie pH wyregulowano stężonym roztworem amoniaku, przy użyciu pH-metru. Płytki rozwijano w standardowych pionowych komorach chromatograficznych, używając z każdym razem 100 ml fazy ruchomej, po wcześniejszym nasyceniu komory parami rozpuszczalników – ok. 1 godziny.

Rozwinięte płytki zaimpregnowane białkiem oraz płytki kontrolne skanowano za pomocą densytometru Desaga CD 60. Zbierano wartości współczynnika opóźnienia (R_f). Analityczne długości fal zostały dobrane indywidualnie dla każdej API za pomocą opcji skanowania wielofalowego (wartości zawierały się w zakresie od 200 do 300 nm). Eksperyment został powtórzony (zarówno płytki pokryte BSA jak i kontrolne) i zebrane wartości R_f są średnią z obu serii doświadczenia.

Kolejnym parametrem TLC używanym w analizach statystycznych był R_M , związany R_f , uzyskiwany wg równania: $R_M = \log (1/R_f - 1)$.

Chromatografia RP-2 TLC

W odwróconym układzie faz, zastosowano płytki pokryte silanizowanym żelem krzemionkowym; RP-2. Doświadczenie zostało przeprowadzone w taki sam sposób jak w przypadku chromatografii NP (nanoszenie roztworów API, skład fazy ruchomej, skanowanie densytometryczne) oraz również zostało wykonane dwukrotnie a zebrane wartości R_f są średnią z obu powtórzeń. Obliczono także wartości parametru R_M .

Chromatografia HPLC_{HSA}

Wysokosprawna chromatografia cieczowa przeprowadzona została z użyciem kolumny chromatograficznej z immobilizowaną ludzką albuminą osoczną. Oznaczenie przeprowadzono na aparacie Perkin Elmer Series 200 połączonym ze spektrometrem UV-VIS jako detektorem. Analityczna długość fali była taka sama dla wszystkich związków i wynosiła 210 nm. Eksperyment został przeprowadzony przy użyciu 1 mg/mL metanолоwych roztworów substancji aktywnych opisanych wcześniej. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina 10 mM buforu octanowego o pH 7,4, acetonitrylu oraz metanolu w stosunku 85:10:5 (v/v/v). Bufor octanowy przygotowano przez rozpuszczenie 0,77 g octanu amonu w 1L wody destylowanej. Następnie pH wyregulowano stężonym roztworem amoniaku, przy użyciu pH-metru.

Przepływ fazy przez układ ustawiono na 0,9 mL/min, zgodnie z zaleceniem producenta kolumny. Roztwory były dostarczane na kolumnę przy pomocy strzykawki autosamplera, wielkość nastrzyku wynosiła 10µL. Ponieważ nie było możliwości termostatowania kolumny, w pomieszczeniu utrzymywano stałą temperaturę 25 stopni Celsjusza.

Dane chromatograficzne (współczynnik retencji k i pochodna: $\log k$) uzyskano przy użyciu podłączonego do aparatu HPLC oprogramowania TotalChrom. Współczynnik k , który jest stosunkiem między ilością analitu w fazie stacjonarnej ilości

w fazie ruchomej, otrzymano z równania $k = (t_R - t_M)/t_M$, gdzie t_R to czas retencji substancji analizowanej, a t_M to czas martwy (markerem czasu martwego był metanol). Eksperyment został następnie powtórzony, a zebrane współczynniki retencji były średnimi wartościami z obu serii.

Chromatografia HPLC_{IAM}

Drugi eksperyment wykonano z użyciem kolumny chromatograficznej ze sztuczną membraną (ang. Immobilized Artificial Membrane; IAM). Oznaczenie także przeprowadzono na aparacie Perkin Elmer Series 200 połączonym ze spektrometrem UV-VIS jako detektorem. Analityczna długość fali była taka sama dla wszystkich związków i wynosiła 210 nm. Eksperyment został przeprowadzony przy użyciu 1 mg/mL metanolowych roztworów substancji aktywnych opisanych wcześniej. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina 10 mM buforu fosforanowego o pH 7,4 oraz acetonitrylu w stosunku 80:20 (v/v). Bufor fosforanowy otrzymano przez rozpuszczenie gotowej tabletki w odpowiedniej ilości wody destylowanej (1 tabletka na 200 mL). W tym przypadku nie było konieczności regulacji pH buforu przy użyciu pH-metru.

Przepływ fazy przez układ ustawiono na 0,5 mL/min, zgodnie z zaleceniem producenta kolumny. Roztwory były dostarczane na kolumnę przy pomocy strzykawki autosamplera, wielkość nastrzyku wynosiła 10 µL.

Zebrane dane chromatograficzne, podobnie jak w doświadczeniu z kolumną HPLC, stanowił współczynnik retencji k i pochodna: $\log k$, które uzyskano przy użyciu podłączonego do aparatu HPLC oprogramowania TotalChrom. Eksperyment został następnie powtórzony, a zebrane współczynniki retencji były średnimi wartościami z obu serii.

Analizy statystyczne

Analizy macierzy korelacji, regresję wieloraką, analizę funkcji dyskryminacyjnej, analizę skupień i składowych głównych przeprowadzono na oprogramowaniu STATISTICA 13.1 (TIBCO Software Inc.), korzystając z gotowych

funkcji do wykonywania wspomnianych obliczeń. Analiza regresji metodą najmniejszych cząstkowych kwadratów i lasu losowego zostały wykonane w programie MATLAB ver. 2019a (The MathWorks, USA), na nowych skryptach napisanych specjalnie do badań z wykorzystaniem zebranych danych. Skrypty zostały napisane we współpracy z dr Bekzodem Khakimovem, podczas stażu naukowego doktorantki na Uniwersytecie Kopenhaskim.

Regresja wielokrotna została przeprowadzona metodą krokową postępującą. Walidację modeli regresji MLR przeprowadzono za pomocą ogólnej wewnętrznej walidacji krzyżowej procedury: „pomiń jeden na zewnątrz” (ang. leave-one-out; LOO) i „pomiń wiele na zewnątrz” (ang. leave-many-out; LMO). W walidacji LOO jeden przypadek jest usuwany ze zbioru danych i używany do weryfikacji zbudowanego modelu z pozostałymi elementami; procedura jest następnie powtarzana z pozostałymi elementami. W podejściu LMO, zbiór danych jest podzielony na dwa podzbiory (25% i 75%), które są używane do budowy modelu – 75% przypadków i jego oceny – 25%. Moc predykcyjną modeli oszacowano za pomocą walidowanego krzyżowo współczynnika korelacji kwadratowej (Q^2_{LOO} i Q^2_{LMO}), przewidywane resztkowe sumy kwadratów (PRESS), odchylenie standardowe na podstawie PRESS (SPRESS) i standardu odchylenia błędu przewidywania (SDEP). Sugerowane kryteria przewidywania dokładności modeli MLR [141] to $R^2 > 0,6$ i $Q^2_{LOO/LMO} > 0,5$; $R^2 \geq Q^2_{LOO/LMO}$ i $Q^2_{LOO} \approx Q^2_{LMO}$. Wyniki analizy DFA oceniono za pomocą macierzy klasyfikacji a ich jakość przy użyciu parametru lambda Wilksa [142].

Wydajność modeli PLS i RF została oceniona przez podwójną walidację krzyżową (wewnętrzną i zewnętrzną). Opracowane modele treningowe zostały następnie przetestowane na niezależnych zestawach próbek (zestawy testowe, 30% przypadków), które nie zostały wykorzystane przy tworzeniu modeli treningowych (70% przypadków).

Aby ocenić predykcję, przeprowadzono test permutacji Monte Carlo (MCPT). Wykonano dwuetapowy MCPT. Dla zestawu treningowego i testowego wykonano regresję PLS oraz obliczono RMSECV, Q^2 i R^2 . Następnie ta procedura została powtórzona 1000 razy, za każdym razem zestawy treningowy i testowy były losowane od nowa. Dokładnie ten sam test permutacji MCPT (1000 perm.) przeprowadzono następnie na permutowanym zestawie treningowym. Następnie porównano rozkład Q^2

w oryginalnych i permutowanych modelach oraz przeprowadzona została jednokierunkowa ANOVA. W następnym etapie 1000 par treningów (70%) i zestawów testowych (30%) przygotowano przez losowe podzielenie oryginalnej macierzy danych. Następnie wykonano podobny MCPT (1000 perm.) na zestawie treningowym i testowym, które pochodziły z permutowanej macierzy danych. Otrzymano wyniki z pierwotnych i permutowanych modeli oraz porównano je pod względem Q^2 .

Deskryptory molekularne

Wybrane do analiz statystycznych fizykochemiczne deskryptory molekularne, które powinny mieć istotny wpływ na przenikanie do mleka matki są wymienione w Tabeli 5. Część zaczerpnięto z literatury, m.in. stosunek M/P uzyskany *in vivo* [28,32,35,36,131,143] oraz wartości BB_{vivo} [144–146] lub z internetowych baz danych: DrugBank [147] i ChEMBL [148]. Większość danych fizykochemicznych wyliczono w programach: HyperChem (HyperChem dla Windows wersja 7.02, HyperCube Inc, 2002) i ACD /Labs (ACD/Labs™ Log D Suite 8.0, pKa dB 7.0, Advanced Chemistry Development Inc.,2004). Wykorzystano również bazę danych dedykowaną kobietom karmiącym: LactMed [29] oraz skalę Hale'a [28]. Niektóre parametry można było zebrać tylko dla wybranych leków z naszego zestawu i jest to powód, dla którego liczba związków w niektórych analizach jest zmienna.

Tabela 5. Lista deskryptorów molekularnych związanych z właściwościami fizykochemicznymi leków

deskryptor	opis	odnośnik/baza danych/program
acid/base	kwaśny, zasadowy lub obojętny charakter związku, opisuje podział na grupy: a, b i n	ChEMBL
B2	parametr obliczeniowy B2, opisuje biodostępność w OUN i określa penetrację przez barierę krew-mózg: $\log bb = 0,547 - 0,016 PSA$	Clark et al. 1999
B3	parametr obliczeniowy związany z wiązaniem białka: $\log(\text{frakcja związana/frakcja niezwiązana}) = 0,5 \log P$	Ozeki et al. 1974

	- 0,665	
BB_{vivo}	biodostępność leku w OUN oznaczana <i>in vivo</i> i opisana w literaturze	<i>Platts et al. 2001</i> <i>Usansky et al. 2003</i> <i>Vilar et al. 2010</i>
CNS+/-	zdolność przenikania do ośrodkowego układu nerwowego (+ lub -)	DrugBank
DM	moment dipolowy	HyperChem, Hypercube, Inc.
eH	energia najwyższej obsadzonego orbitalu molekularnego (HOMO)	HyperChem, Hypercube, Inc.
eH-eL	zdolność do jonizacji	HyperChem, Hypercube, Inc.
eL	energia najniższej obsadzonego orbitalu molekularnego (LUMO)	HyperChem, Hypercube, Inc.
HA	liczba akceptorów wiązań wodorowych	ACD/Labs
HD	liczba donorów wiązań wodorowych	ACD/Labs
LactMed	wskaźnik obecności leków w mleku (0 – nieobecny, 1 – słabe przenikanie, 2 – wysokie przenikanie)	LactMed database
LLL H	zmienna opisana przez skalę toksyczności Hale'a (L1 – L5)	<i>Hale et al. 2012</i>
log D	współczynnik dystrybucji	ACD/LAbs
log M/P	logarytm z M/P	
log MW	logarytm z MW	
log P	współczynnik podziału	HyperChem, Hypercube, Inc.
log U/D 7.2	stosunek postaci obojętnej do zjonizowanej w środowisku mleka pH 7,2; określa stopień jonizacji	Wyliczony z pK _a , wg wzoru: pK _a – pH dla kwasów, pH – pK _a dla zasad
M/P;	stosunek zawartości leku w mleku do	<i>Abraham et al. 2009</i>

M/P_{ratio}	zawartości w osoczu, uzyskiwany <i>in vivo</i>	<i>Agatanovic-Kustrin et al. 2000</i> <i>Hale et al. 2012</i> <i>Katritzky et al. 2005</i> <i>Meskin et al. 1985</i> <i>Wilson et al. 1980</i>
MW	masa molowa	HyperChem, Hypercube, Inc.
MW_{root}	pierwiastek kwadratowy z masy molowej	HyperChem, Hypercube, Inc.
PB	odsetek wiązania z białkami osocza	DrugBank
PhCharge	ładunek związku w warunkach fizjologicznych	DrugBank
pK_a	ujemny logarytm ze stałej dysocjacji kwasu (K _a)	ACD/Labs
PSA	pole powierzchni polarnej cząsteczki	ACD/Labs
Sa	pole powierzchni cząsteczki	HyperChem, Hypercube, Inc.
V	objętość cząsteczki	HyperChem, Hypercube, Inc.

Dalej zaprezentowane są (Tabela 6) parametry chromatograficzne uzyskane z eksperymentów TLC i HPLC oraz ich pochodne, połączone z właściwościami fizykochemicznymi.

Tabela 6. Lista parametrów chromatograficznych z TLC i HPLC oraz ich pochodnych

parameter chromatograficzny lub pochodna	opis
NP; RP	R _f otrzymany z TLC odpowiednio w normalnym bądź odwróconym układzie faz
NP/C; RP/C	R _f z impregnowanej płytki NP bądź RP/R _f z kontroli
NP/PSA; RP/PSA	R _f z impregnowanej płytki NP bądź RP/pole powierzchni polarnej

NP/PB; RP/PB	R_f z impregnowanej płytki NP bądź RP/odsetek wiązania z białkami
NP/logP; RP/logP	R_f z impregnowanej płytki NP bądź RP/współczynnik podziału
NP/B2; RP/B2	R_f z impregnowanej płytki NP bądź RP/obliczeniowy parametr B2
R_MNP; R_MRP	R_M otrzymany z TLC odpowiednio w normalnym bądź odwróconym układzie faz
R_MNP/C; R_MRP/C	R_M z impregnowanej płytki NP bądź RP/ R_M z kontroli
R_MNP/PSA; R_MRP/PSA	R_M z impregnowanej płytki NP bądź RP/pole powierzchni polarnej
R_MNP/PB; R_MRP/PB	R_M z impregnowanej płytki NP bądź RP/odsetek wiązania z białkami
R_MNP/logP; R_MRP/logP	R_M z impregnowanej płytki NP bądź RP/współczynnik podziału
R_MNP/B2; R_MRP/B2	R_M z impregnowanej płytki NP bądź RP/obliczeniowy parametr B2
log k_{HSA}	logarytm ze współczynnika retencji uzyskanego z $HPLC_{HSA}$
log k_{HSA}/PSA	logarytm ze współczynnika retencji uzyskanego z $HPLC_{HSA}$ /pole powierzchni polarnej
log k_{HSA}/PB	logarytm ze współczynnika retencji uzyskanego z $HPLC_{HSA}$ /odsetek wiązania z białkami
log $k_{HSA}/logP$	logarytm ze współczynnika retencji uzyskanego z $HPLC_{HSA}$ / współczynnik podziału
log k_{IAM}	logarytm ze współczynnika retencji uzyskanego z $HPLC_{IAM}$
log k_{IAM}/PSA	logarytm ze współczynnika retencji uzyskanego z $HPLC_{IAM}$ /pole powierzchni polarnej

$\log k_{IAM}/PB$	logarytm ze współczynnika retencji uzyskanego z $HPLC_{IAM}$ /odsetek wiązania z białkami
$\log k_{IAM}/\log P$	logarytm ze współczynnika retencji uzyskanego z $HPLC_{IAM}$ / współczynnik podziału
$\log k_{IAM}/B2$	logarytm ze współczynnika retencji uzyskanego z $HPLC_{IAM}$ / obliczeniowy parametr B2

BADANIA WŁASNE

Analiza modeli regresji wielokrotnej i analizy dyskryminacyjnej przenikania leków do mleka matki

Założenia związane z przenikaniem leków do mleka matki

Obserwując różne leki stosowane w okresie laktacji, widoczny jest wpływ niektórych właściwości fizykochemicznych na zdolność przenikania i ich wzmożoną obecność w mleku matki. Niektóre właściwości i cechy farmakokinetyczne leków powiązane są z ułatwionym lub utrudnionym przechodzeniem do pokarmu, szczególnie transportu biernego do laktocytów. Występowanie leków w mleku matki opisuje najczęściej stosunek ich stężeń w mleku i osoczu matki, wyrażanych najczęściej jako: $\log M/P$, M/P lub M/P_{ratio} [32,38].

Do ważnych założeń stawianych pomiędzy zjawiskiem przedostawania się substancji leczniczych do mleka matki i innymi farmakokinetycznymi cechami związków należą:

1. Jednym ze sposobów dystrybucji leków w organizmie, również przez bariery biologiczne, jest transport aktywny, przy użyciu przenośników błony komórkowej.
2. Bazy danych o lekach zawierają często informacje o zawartości we krwi frakcji związanej z proteinami (PPB%, PB). Wiązanie z białkami utrudnia transport i zmienia biodostępność leku. Stwierdzone wiązanie z białkami osocza na poziomie powyżej 85-90%, sugeruje większe bezpieczeństwo stosowania leku u kobiet w okresie karmienia piersią. Nie jest to jednak efekt oczywisty – wiązanie z białkami może być też podstawą kumulacji leków w mleku matki, z powodu utrudnienia dyfuzji zwrotnej.
3. Efekt wiązania z białkiem zależy od charakteru kwasowo-zasadowego leku. Związki zasadowe, obojętne i kwasowe wiążą się zwykle z różnymi białkami, zawartymi w osoczu krwi, ale również w mleku matki.
4. Albumina jest zdolna do wiązania leków kwaśnych i obojętnych. Leki zasadowe tworzą połączenia z alfa-1-kwaśną glikoproteiną.
5. Zastosowanie chromatograficznych modeli analitycznych, z fazą stacjonarną, modyfikowaną różnymi proteinami, efekt wiązania może mieć charakter prognostyczny. Stosując w środowisku chromatograficznym (faza ruchoma)

bufory utrzymujące pH 7,4, odpowiednie dla krwi lub niższe (6,8-7,2), jak w pokarmie, można obserwować siłę wiązania w obu środowiskach.

6. Wpływ zmiennej jonizacji leków w osoczu i mleku matki wynika z niższej wartości pH mleka w stosunku do krwi matki. Z tego powodu słabe kwasy ulegają jonizacji we krwi i nie przenikają do mleka; słabe zasady przenikają, w mleku ulegają jonizacji i zostają uwięzione; bardzo słabe zasady i bardzo słabe kwasy nie ulegają pułapce. Badanie biodostępności leków w pokarmie jest więc często związane z wyznaczonymi dla nich deskryptorami molekularnymi zdolności jonizacji (pK_a , $\log U/D$).
7. Transport bierny ułatwiony jest w przypadku związków o większej lipofilowości i małych rozmiarach cząsteczek. Leki takie łatwiej przenikają przez błony cytoplazmatyczne i przemieszczają się w przestrzeniach między laktocytami. Taki typ transportu ułatwia również charakter obojętny lub słabo zjonizowany cząsteczek. Obie cechy ułatwiają dyfuzję zwrotną, opartą na różnicy stężeń. Transport bierny jest więc związany z deskryptorami molekularnymi o charakterze hydro-lipofilowym i objętościowym: V , $\log P$, $\log U/D$ i MW . Masa cząsteczkowa o wartości do 150 Da to najczęściej swobodne przenikanie przez bariery. Utrudnione przenikanie pojawia się przy 500-800 Da. Leki o MW powyżej 1000 Da uznawane są za bezpieczne ze względu na brak przenikania.
8. Dla leków z oznaczoną wartością $M/P < 1$ zakłada się bezpieczeństwo stosowania [28].
9. Podwyższone niebezpieczeństwo dystrybucji leku do mleka występuje w przypadku związków przenikających barierę krew-mózg (BBB) (B_1 , B_2 , BB_{vivo} , $CNS+/-$) [149,150].

Z piśmiennictwa wynikają liczne warunki szczegółowe. Od początku prowadzonych badań, dotyczących wpływu właściwości fizykochemicznych leków na ich transport do mleka matki, wskazywano ważne parametry dla leków zasadowych: MW_{root} , $\log P$, pK_a , $\log U/D$. Z tymi parametrami porównywano, obserwowane przenikanie do mleka matki [143,151]. Lipofilowość i $\log U/D$ są tu odwrotnie proporcjonalne do wartości $\log M/P$. Silne zasady łatwo przenoszone są do mleka.

Lipofilowe związki wiążą się silnie z białkami albuminy przez niespecyficzne oddziaływanie hydrofobowe. Dla wysokich wartości $\log P$ wartości $\log M/P$ jest mniejsza [151].

Kwasowe związki są mniej narażone na przenikanie do mleka. Wiązane są przez albuminy, które stanowią 55-65% białek krwi. Istnieje silny związek pomiędzy wiązalnością leków z białkami i przenikaniem do mleka, wiązanie z białkami (PB) tłumaczy ok 50% zmienności $\log M/P$ [152]. Większa masa (MW) i znaczna lipofilowość ($\log P$) zwiększają wiązalność ligandów kwasowych z albuminą i zmniejszają ich biodostępność w mleku matki. Nie jest to jednak efekt oczywisty, ponieważ $\log P$ może wpływać na M/P tylko przy dużych wartościach i wiązanie z białkami nie jest tu ochroną, np. oxazepam ($\log P$ 4,3) ma wysoki poziom M/P pomimo znacznej wiązalności PB [152]. Znaczący jest również poziom jonizacji, choć wyniki dla kwasów i zasad mogą być przeciwne [151]. W analizie przenikania leków do mleka matki wykorzystywano różne właściwości fizykochemiczne związków i deskryptory molekularne. Stworzono wiele modeli przewidywania opartych na analizie QSAR leków [7,35,36,38]. Pierwsze modele przewidywania poziomu wartości M/P dla środków leczniczych oparte były na wiązaniu z białkami. Ustalone wartości PB tłumaczą często około 50% zmienności $\log M/P$. Trudno jednak ustalić model uniwersalny dla różnych leków. Często te same deskryptory molekularne leków kwaśnych i zasadowych tworzą odwrotne zależności z poziomem M/P a wspólne ich badanie musi być prowadzone z wielką ostrożnością [152]. Dobre wyniki może dawać równoległe porównanie tych związków na bazie innego doświadczalnego wskaźnika biodostępności (np. biodostępności do OUN).

Powtarza się motyw dwóch rodzajów wiązania leków z białkami. Niespecyficzne oddziaływanie w kieszeni hydrofobowej (związane z $\log P$) i obszary wiązania związane z jonizacją i stopniem dysocjacji. Wartość $\log M/P$ jest wprost proporcjonalna do stopnia dysocjacji [153]. Wiązanie z białkami następuje w wyniku oddziaływań hydrofobowych, van der Waalsa oraz elektrostatycznych. Tylko forma wolna leku jest zdolna do działania i pokonywania barier biologicznych.

Deskrytory molekularne stosowane w modelach

Wskazane wcześniej założenia (1-9) skłoniły do obserwacji kolejnych deskryptorów, opisujących grupę badanych związków. Niektóre właściwości ustalono tylko dla części przypadków objętych analizą, na przykład zdolnością przenikania do OUN (BB_{vivo}). Liczba związków jest z tego powodu zmienna.

Badania rozpoczęto od danych chromatograficznych w wykonanych doświadczeniach w relacji ze wskaźnikiem podstawowym, jakim jest wartość stosunku stężenia przypadków w mleku i osoczu matki (M/P lub $\log M/P$ – dane cytowane z badań *in vivo* [28,32,35,36,143]. Doświadczenie chromatograficzne miało na celu stworzenie modelu analitycznego przewidywania biodostępności leków w mleku matki. Model powinien wykazać zdolność wiązania badanych leków z białkami w warunkach fizjologicznego pH krwi matki, jako najważniejszego czynnika ochrony przed przenikaniem do pokarmu. Białkiem modyfikującym powierzchnię fazy stacjonarnej była albumina osocza krwi krowiej (BSA).

Dane chromatograficzne ustalono dla wszystkich przypadków z określoną wartością M/P. Badano wyniki dwóch doświadczeń: w normalnym i odwróconym układzie faz. W grupie 83 związków (wszystkie przypadki grupy testowej z ustalonym M/P), w której obserwowano leki: kwasowe, zasadowe i obojętne łącznie; najlepszą korelację wykazują wyniki chromatografii badanych związków, w postaci wartości R_f , (oznaczane dalej jako NP) z doświadczenia z zastosowaniem normalnego układu faz: $R = 0,45$ ($n = 83$). Zależność jest odwrotnie proporcjonalna. W modelu użyto również parametru NP/C – stosunek wartości R_f na płytkach modyfikowanych albuminą do wartości R_f na płytkach bez albuminy. Parametr ten lepiej odwzorowuje wpływ modyfikatora na chromatografię każdego analitu. Dodatkowa zmienna niezależna związana z wpływem lipofilowości leków – NP/ $\log P$ – praktycznie nie zmienia pierwotnej wartości wyniku. Korelacje tych danych ze wskaźnikiem przenikania leku do mleka matki są jednakowe. Dane chromatograficzne w postaci (R_M) wykazują mniejszą korelację: $R = 0,40$. Dane z doświadczenia chromatograficznego z fazą stacjonarną modyfikowaną albuminą, w odwróconym układzie faz, przyniosły negatywny wynik – R około 0,2. Na tej podstawie dalsza analiza, wszystkich przypadków łącznie, prowadzona była z zastosowaniem danych chromatograficznych (R_f), uzyskanych w normalnym układzie faz.

Obserwowano również korelację wskaźników przenikania i danych chromatograficznych w grupach leków z podziałem na kwasy (a), zasady (b) i związki obojętne (n).

W grupie związków o charakterze zasadowym ($n_b = 23$) uzyskano najlepsze korelacje ($R = 0,43$) dla zmiennej NP/C, w normalnym układzie faz. Wynik ten, mimo podobieństwa do efektu badania całej grupy 83 leków, jest gorszy z uwagi na znaczne zmniejszenie liczby obserwowanych przypadków. Obserwowany efekt powinowactwa do albuminy może być ograniczony do oddziaływań hydrofobowych. Znaczenie lipofilowości badanych związków jest tu wyraźne. Wprowadzenie do równania dodatkowej zmiennej – NP/log P powoduje zwiększenie korelacji do $R = 0,59$ ($n_b=23$). Powiększenie grupy badanej o przypadki o charakterze obojętnym ($n_{bn} = 66$) znacznie poprawiło wynik, dla chromatografii w normalnym układzie faz. Korelacja zmiennych NP i NP/C ze wskaźnikiem przenikania M/P wynosi $R = 0,51$. Udział lipofilowości leków w wiązaniu z albuminą jest niewielki. Widoczna jest tylko mała poprawa tej korelacji po wprowadzeniu do równania zmiennej NP/log P ($R = 0,53$).

Badano leki obojętne (n_n) w grupie 43 przypadków. Korelacja ustalona pomiędzy M/P i zmiennymi NP i NP/C jest wyraźna ($R = 0,57$). Wprowadzenie do równania dodatkowej zmiennej niezależnej – NP/log P nie zmienia wyniku. Niespecyficzne oddziaływania oparte na lipofilowości przypadków obojętnych ma widocznie niewielki udział w obserwowanym zjawisku przenikania.

Dane chromatograficzne – NP i NP/C, ustalone dla grupy leków kwaśnych i obojętnych ($n_{an} = 60$ przypadków) wykazują wartość korelacji ze wskaźnikiem M/P na poziomie $R = 0,49$. Dodatkowa zmienna NP/log P zwiększa korelację bardzo nieznacznie ($R = 0,50$). Jak widać, w przypadku tego typu leków, znaczenie oddziaływań niespecyficznych ma mniejsze znaczenie.

Ostatnią badaną grupą były przypadki, tylko o charakterze kwasów. Mimo niewielkiej liczebności badanej grupy ($n_a = 17$), najlepszy uzyskany wynik korelacji wskaźników M/P nie przekracza wartości 0,35. Zmienna NP/log P bardzo nieznacznie wpływa na zwiększenie korelacji.

Przedstawione powyżej, wstępne wyniki, użyteczności danych chromatograficznych w badaniu przenikania leków do mleka matki, są pozytywne. Dodatkowe wnioski wynikają z systematycznej obserwacji różnych grup przypadków: kwaśnych, obojętnych i zasadowych. Korelacja wskaźników przenikania z ustalonymi danymi chromatograficznymi w grupie wszystkich przypadków łącznie, jest bardzo obiecująca. Nie różni się znacząco od korelacji dla zawężonych grup: a, b, n, mimo znacznie większej liczebności. Dodatkowy wpływ lipofilowości leków jest tu też bardzo mały i zmienna $NP/\log P$ prawdopodobnie nie będzie wprowadzana do tworzonych modeli. Zmienna ta jest bardzo istotna jedynie dla badania wydzielonej grup związków zasadowych (b), dla których prawdopodobny jest niespecyficzny charakter wiązania z BSA.

Następnie prześledzono wpływ najczęściej wymienianych deskryptorów molekularnych, wskazywanych jako odpowiedzialne za dystrybucję leku do mleka matki i wiązanie z białkami: MW i MW_{root} – masa cząsteczkowa i jej pierwiastek kwadratowy, HD – liczba donorów wiązań wodorowych, HA – liczba akceptorów wiązań wodorowych, DM – moment dipolowy, $eH-eL$ – zdolność do jonizacji, $\log U/D\ 7.2$ – stopień jonizacji leku w środowisku mleka, Sa – pole powierzchni cząsteczki, $\log D$ – współczynnik dystrybucji, $\log P$ – współczynnik podziału.

W grupie wszystkich rodzajów przypadków ($n_{\text{abn}} = 76-82$) korelacje nie są wysokie, jednak należy wymienić wpływ następujących deskryptorów molekularnych: $eH-eL$, pK_a , $\log U/D\ 7.2$, $\log P$, Sa , V , HD . Badane zmienne niezależne wykazały w analizie regresji liniowej (MLR) istotny statystycznie wynik $R = 0,63$, który tłumaczy około 40% zmienności całkowitej wskaźnika M/P_{abn} .

Grupa leków zasadowych, o mniejszej liczebności ($n_b = 22$), tworzy model przenikania do mleka tłumaczący 52% zmienności wskaźnika M/P_b ($R=0,72$). Zmienne niezależne, które znalazły się w modelu to: $\log P$, eL (zależność odwrotnie proporcjonalna) i $\log U/D\ 7.2$ (zależność wprost proporcjonalna). Rozszerzenie grupy badanych przypadków do zasadowych i obojętnych dało słaby wynik (M/P_{bn} , $R = 0,46$) i zmieniło grupę ważnych zmiennych niezależnych (Sa , $eH-eL$, HA , $\log D$). Ten sam efekt uzyskano dla liczącej 41 przypadków grupy leków obojętnych.

Przypadki zdefiniowane jako kwasy stanowią grupę zaledwie 16 leków. Model zawierający zmienne: $\log P$, eH i HA tłumaczy 63% zmienności M/P_a . W połączeniu z przypadkami obojętnymi ($n_{an} = 57$ przypadków), korelacja pomiędzy przenikaniem do mleka matki a zmiennymi niezależnymi w modelu wyniosła $R = 0,58$ i wyjaśnił 34% zmienności M/P_{an} . Wynik nie wskazuje na zdolność predykcyjną modelu. Warto jednak zauważyć, że wprowadzone deskryptory molekularne: $\log U/D$, eL , MW , V , $\log P$ i eH , potwierdzają znaczenie wiązania tych przypadków z albuminą osocza, wykazane wcześniej w analizie QSPR przenikania do mleka. Ustalone parametry, w kolejności wprowadzania do modelu, to: zdolność jonizacji leku: $eH-eL$, lipofilowość: $\log P$, stopień jonizacji: $\log U/D$, eL i liczba donorów wiązań wodorowych HD .

Trzecia grupa wskaźników, związanych ze zdolnością przenikania leku do mleka matki, to: $B3$ – obliczeniowy, odpowiada wartości $\log B/F (PB) = 0,5 \log P - 0,665$ [154]; $B2$ – obliczeniowy, opisuje dostępność leku w OUN i określa przenikanie przez barierę krew-mózg $\log BB = 0,547 - 0,16 PSA$ [155]; BB_{vivo} – dostępność leku w OUN oznaczony *in vivo* i opisany w piśmiennictwie [144–146]; PB – odsetek leku związanego z białkiem [147]; $PhCharge$ – ładunek leku w warunkach fizjologicznych [147]; $\log U/D$ – stosunek formy obojętnej do jonowej w odpowiednim środowisku, obliczony wg wzoru (Równanie 7 i 8):

$$\text{Leki kwaśne: } \log \frac{U}{D} = pKa - pH \quad (7)$$

$$\text{Leki zasadowe: } \log \frac{U}{D} = pH - pKa \quad (8)$$

(pKa – stała reakcji jonizacji wyznaczona w programie ACD/Lab)

LactMed – wskaźnik obecności leków w mleku [29]; Acid/Base opisujący podział na grupy: a, b i n; LLL H – zmienna opisana skalą toksyczności Hale’a [28]. Do badań tego etapu dołączono dane o biodostępności leków w ośrodkowym układzie nerwowym. Powodem jest podwyższone niebezpieczeństwo dystrybucji leku do mleka dla związków przenikających barierę krew-mózg (BBB) ($B2$, BB_{vivo} , $CNS+/$). Ta grupa liczy jedynie 28 przypadków łącznie. Z tego powodu obserwacja wpływu wszystkich

zmiennych niezależnych na przenikanie leków do mleka matki ogranicza znacznie badanie. Przeprowadzono więc analizę wpływu każdej zmiennej na: wszystkie przypadki (M/P_{abn}), związki zasadowe (M/P_b), związki obojętne (M/P_n) oraz kwasy (M/P_a). Wyniki zależności (z macierzy korelacji) przedstawiono w Tabeli 7 poniżej:

Tabela 7. Korelacje zmiennych niezależnych z wartościami M/P dla wszystkich związków oraz poszczególnych grup: a, b i n

zmienna	n _{abn}	n _b	n _n	n _a	M/P _{abn} *	M/P _b *	M/P _n *	M/P _a *
acid/base	82				0,48			
BB _{vivo}	31	6	21	4	-0,26	0,51	0,53	-0,88
B1	82	23	43	16	0,14	-0,05	-0,06	-0,36
B2	82	23	43	16	0,08	-0,15	-0,04	-0,30
B3	82	23	43	16	-0,03	-0,29	-0,11	-0,52
log U/D 7.2	82	23	43	16	0,22	0,18	0,28	-0,30
NP	82	23	43	16	-0,30	0,09	-0,44	-0,05
NP/C	82	23	43	16	0,22	0,43	0,16	0,22
NP/PSA	82	23	43	16	0,07	-0,12	0,32	0,45
NP/log P	82	23	43	16	0,04	-0,36	-0,02	0,21
MW	82	23	43	16	0,05	-0,15	0,30	-0,33
MW _{root}	82	23	43	16	0,07	-0,09	0,30	-0,36
HD	82	23	43	16	0,05	0,02	0,02	0,36
HA	82	23	43	16	-0,13	0,13	-0,10	-0,28
eL	82	23	43	16	-0,30	-0,55	-0,13	-0,49
eH-eL	82	23	43	16	0,07	0,07	-0,10	0,50
log P	82	23	43	16	-0,04	-0,30	-0,11	-0,52
log D	82	23	43	16	0,09	0,16	0,01	-0,24
Sa	82	23	43	16	0,30	0,30	0,10	-0,16
V	82	23	43	16	0,10	0,35	-0,14	-0,45
LactMed	76	21	40	15	0,37	0,47	0,08	0,26
LLL H	76	21	40	15	0,26	0,57	-0,22	0,40
PhCharge	82	23	43	16	0,40	-0,10	0,29	0,19
pKa	82	23	43	16	0,21	-0,18	-0,14	-0,29
PB	75	19	42	14	-0,24	-0,20	-0,45	0,11
CNS+/-	79	23	40	16	-0,07	-0,23	-0,10	0,39

* korelacja

Analiza dyskryminacyjna związków kwaśnych, zasadowych i obojętnych

Wszystkie deskrytory, najsilniej związane ze zmiennością wskaźnika M/P, które równocześnie nie ograniczały liczby badanych przypadków, wprowadzono do

analizy funkcji dyskryminacyjnej (DFA). Wszystkie przypadki badano przy zastosowaniu kodu b/n/a. Kod przypisuje związkom zasadowym (b) liczbę „1”, związkom obojętnym (n) liczbę „0” i kwaśnym (a) liczbę „-1”.

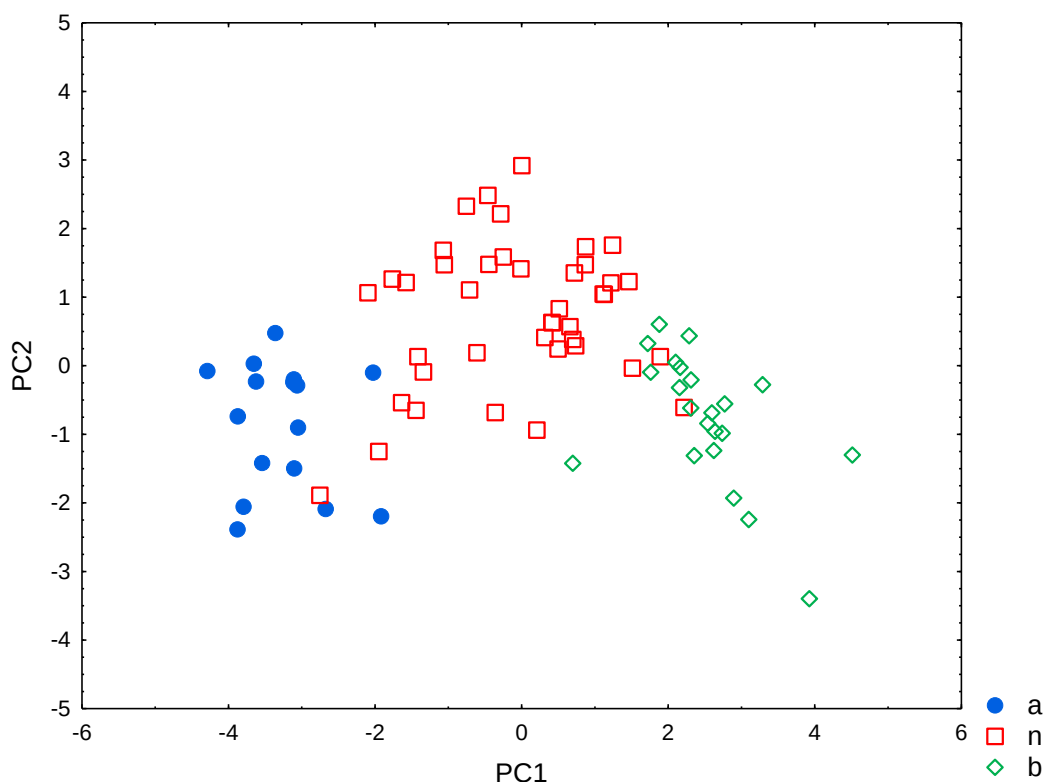
W krokowej analizie dyskryminacyjnej, do zmiennych dyskryminujących zaliczono 8 z 16 wprowadzonych zmiennych: PhCharge, pKa, M/P, eL, B2, NP, log U/D i B3. Klasyfikowano 79 przypadków (liczba ograniczona wprowadzonymi zmiennymi łącznie). Uzyskano macierz klasyfikacji o łącznej wartości 93,6% poprawnej klasyfikacji (Tabela 8). Liczba błędnie sklasyfikowanych przypadków jest proporcjonalna do liczebności grup. Odnotowano 5 błędów wśród związków obojętnych i bezbłędne przyporządkowanie związków kwaśnych oraz zasadowych:

Tabela 8. Macierz klasyfikacji dla modelu ze zmiennymi dyskryminującymi (PhCharge, pKa, M/P, eL, B2, NP, log U/D, B3)

grupa	Przypadki sklasyfikowane poprawnie (%)	a p=,20253	n p=,51899	b p=,27848
a	100,00	16	0	0
n	87,80	2	36	3
b	100,00	0	0	22
Razem	93,67	18	36	25

Tabela 9. Funkcje klasyfikacyjne dla grup a, b i n

zmienne dyskryminujące	Funkcje klasyfikacyjne dla każdej z grup: a, n, b		
	a p=,20253	n p=,51899	b p=,27848
B2	-1,925	-1,245	0,854
M/P	0,507	0,604	2,020
pKa	0,528	1,687	2,308
NP	11,970	15,809	11,284
PhCharge	-1,751	4,712	8,352
log U/D 7.2	-0,532	0,109	-0,530
eL	0,016	-0,053	0,173
B3	0,143	0,233	0,444
Stała	-9,309	-14,367	-22,139



Rysunek 2. Dyskryminacja na kwasy (a), zasady (b) i leki obojętne (n). Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwiastka 1 względem pierwiastka 2. Zmienne dyskryminujące: PhCharge, pKa, M/P, eL, B2, NP, log U/D i B3.

Czynnik (pierwiastek) PC1 najsilniej dyskryminuje grupy związków (wartość własna PC1 = 4,07). Najważniejszy udział w jego wartości mają zmienne PhCharge i pKa. Ich wpływ na dyskryminację przypadków a, n i b jest oczywisty. Czynniki PC2 (wartość własna PC2 = 0,67) ukształtowały wskaźniki M/P, NP i eL. Średnie zmiennych kanonicznych (PC1) dla grupy a = -3,26, dla grupy n = -0,08 i dla grupy b = 2,52. Średnie zmiennych kanonicznych (PC2) dla grupy a = -0,86, dla grupy n = 0,75 i dla grupy b = -0,77 (Tabela 9, Rysunek 2).

Modele regresji wielokrotnej dla M/P_{abn}

Na tej podstawie stwierdzić można wpływ charakteru kwasowego, zasadowego i obojętnego leków na ich biodostępność w mleku matki i zdecydować, czy analiza musi być prowadzona z podziałem na grupy: a, n i b. W przypadku zmiennych M/P, NP i eL słabiej dyskryminują przypadki kwasowe, obojętne i zasadowe. Zmienna B2,

reprezentująca biodostępność leku w OUN, należy do obu czynników na bardzo podobnym poziomie. Wprowadza to do analizy wskaźnik przenikania leku przez BBB, wymieniany wielokrotnie, jako istotny dla bezpieczeństwa karmionych piersią dzieci. Wskaźnik BB_{vivo} ogranicza grupę przypadków ($n = 28$). Jak widać większość obserwowanych zmiennych, wprowadzonych do analizy nie została zaliczona do zmiennych dyskryminujących. Te, jak również zmienne o niewielkim wpływie na dyskryminację przypadków mogą być stosowane w analizie wszystkich przypadków łącznie.

Tabela 10. Korelacje między deskryptorami a stosunkiem M/P dla 28 związków z określonymi wartościami BB_{vivo}

zmienna	n_{all}	M/P_{abn}[*]	zmienna	n_{all}	M/P_{abn}[*]
acid/base	28	0,39	HA	28	0,19
BB_{vivo}	28	-0,40	eL	28	-0,08
B1	28	-0,24	eH-eL	28	-0,11
B2	28	-0,33	log P	28	-0,07
B3	28	-0,07	log D	28	-0,67
log U/D 7.2	28	0,23	Sa	28	0,24
NP	28	-0,60	V	28	-0,10
NP/C	28	-0,13	LactMed	28	0,41
NP/PSA	28	-0,54	LLL H	28	0,00
NP/PB	28	-0,63	PhCharge	28	0,54
NP/log P	28	-0,27	pKa	28	0,18
MW	28	-0,10	PB	28	-0,80
HD	28	0,41	CNS+/-	28	-0,51

* korelacja

Bardzo widoczny jest związek M/P_{abn} z PB, NP/PB oraz NP (Tabela 10). Zgodnie z założeniami, zależności PB oraz NP są ze sobą powiązane i odwrotnie proporcjonalne do biodostępności leku w pokarmie (odpowiednio $R = -0,80$, $R = -0,63$ i $R = -0,60$). Wartości ich wzajemnych korelacji są niskie ($<0,6$) i zmienne mogą tworzyć wspólnie model analityczny.

Z grupy zmiennych niezależnych, o charakterze fizykochemicznym, wyłoniono równanie regresji w postaci (Równanie 9):

$$\begin{aligned}
M/P_{\text{abn}} &= 2.51(\pm 0,50) + 0,17(\pm 0,20) B2 + 0,13(\pm 0,05) \log U/D + 0,17(\pm 0,15) \\
&LLL H - 2.57(\pm 0,01) PB \\
R &= 0,86; R^2 = 0,74 \quad F(4,23) = 16.4670; p < 0,0000; s = 0,22374; n=28 \\
Q^2_{\text{LOO}} &= 0,57, SDEP = 0,3823, PRESS = 10,7068, S_{\text{PRESS}} = 0,6183, Q^2_{\text{LMO}} = 0,54
\end{aligned}
\tag{9}$$

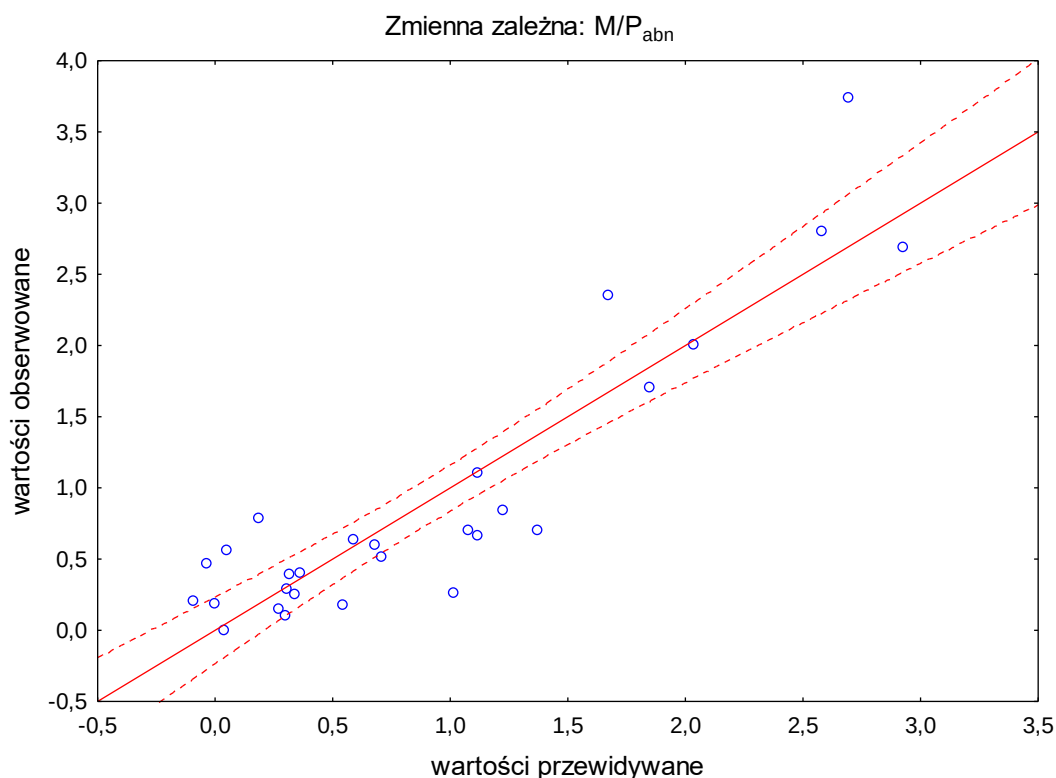
Powstały model matematyczny tłumaczy 74% zmienności całkowitej zdolności przenikania leków do mleka matki.

Równanie regresji powstałe metodą krokową potwierdza zależność obecności leku w mleku matki od wszystkich wymienionych wpływów: biodostępności w OUN (B2), jonizacji ($\log U/D$) i szczególnie poziomowi wiązalności z białkami (PB). Wskazuje to na możliwość wzbogacenia obserwacji poprzez wprowadzenie danych chromatograficznych. Modyfikowany parametr chromatograficzny NP/PB, o dużym powinowactwie do M/P, który może być stosowany w modelu regresji łącznie z parametrem PB z powodu nieznacznej wzajemnej korelacji (0,46) tych zmiennych.

Po wprowadzeniu danych z chromatografii przeprowadzonej w normalnym układzie faz, otrzymano model regresji (Równanie 10):

$$\begin{aligned}
M/P_{\text{abn}} &= 0,18(\pm 0,13) - 1.99(\pm 0,31) PB - 1.29(\pm 0,44) NP + 0,07(\pm 0,05) \log \\
&U/D + 0,18(\pm 0,13) LLL H - 0,30(\pm 0,13) eH - eL \\
R &= 0,91; R^2 = 0,83 \quad F(6,21) = 17.112; p < 0,0000; s = 0,44844; n=28 \\
Q^2_{\text{LOO}} &= 0,71, SDEP = 0,2592, PRESS = 7.2575, S_{\text{PRESS}} = 0,5091, Q^2_{\text{LMO}} = 0,67
\end{aligned}
\tag{10}$$

Powstały model tłumaczy 83% zmienności M/P, w grupie o zdefiniowanym BB_{vivo} (Rysunek 3).



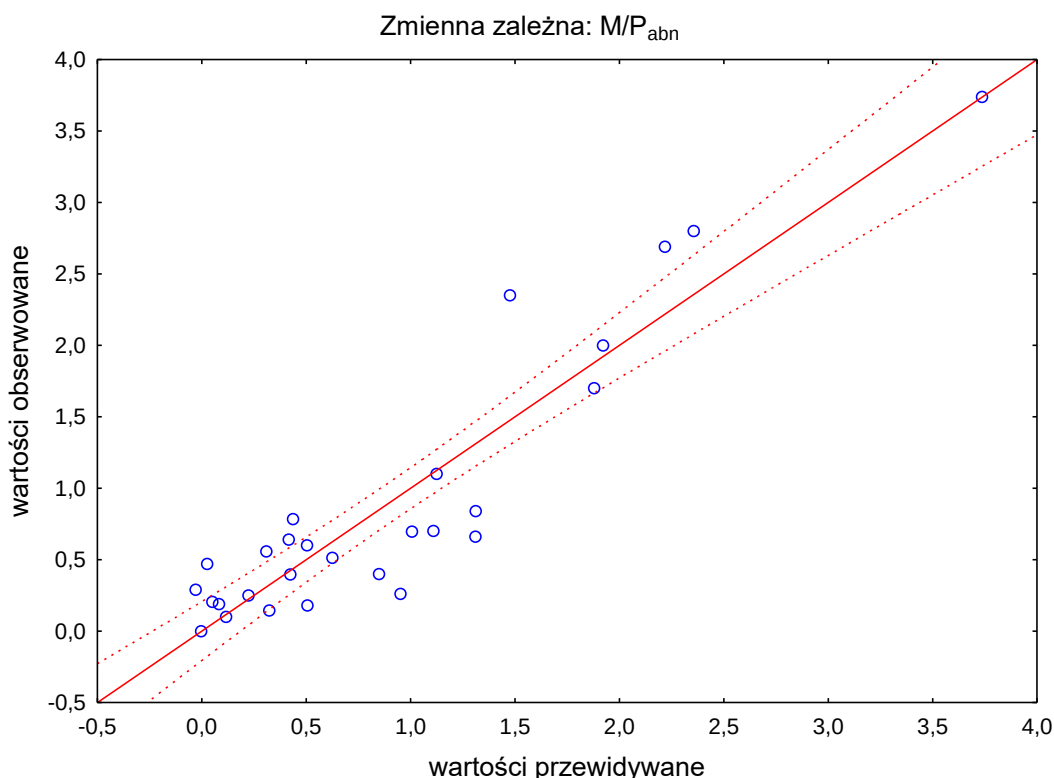
Rysunek 3. Wykres rozrzutu wartości M/P przewidywanych względem obserwowanych dla modelu MLR z równania 10. Deskryptory molekularne uwzględnione w tym modelu to: PB, NP, log U/D 7.2, LLL H, eH-eL.

Powstałe w systematycznej analizie modele matematyczne oraz badanie macierzy korelacji wszystkich, wskazanych jako ważne, zmiennych niezależnych potwierdzają wymienione na wstępie założenia. Dane chromatograficzne NP TLC, z fazą stacjonarną modyfikowaną BSA, zwiększa możliwość przewidywania dystrybucji leków do mleka matki. Leki mogą być badane bez uprzedniego rozdziału na grupy: zasad, kwasów i związków obojętnych.

W grupie leków, z określoną biodostępnością w OUN, przeprowadzono też analizę wartości modelu chromatograficznego M/P. Użyto w niej tylko danych chromatograficznych i poziomu wiązania z białkami. Uzyskano wynik tłumaczący 86% całkowitej zmienności M/P (Równanie 11, Rysunek 4).

Powstało równanie o parametrach lepszych niż poprzednie, bez wykorzystania fizykochemicznych deskryptorów molekularnych, poza poziomem wiązania z białkiem:

$$\begin{aligned}
 M/P_{\text{abn}} = & -1.28(\pm 3.61) - 1.71(\pm 0,34) \text{ PB} - 1.86(\pm 0,42) \text{ NP} + 0,04(\pm 0,01) \\
 & \text{NP/PB} + 18.65(\pm 15.16) \text{ NP/PSA} + 4.24(\pm 3.65) \text{ NP/C} \\
 R = & 0,93; R^2 = 0,86 \text{ F}(6,21) = 26.515; p < 0,0000; s = 0,4012; n=28 \\
 Q^2_{\text{LOO}} = & 0,57, \text{ SDEP} = 0,3870, \text{ PRESS} = 10,8383, S_{\text{PRESS}} = 0,6222, Q^2_{\text{LMO}} = 0,63
 \end{aligned}
 \tag{11}$$



Rysunek 4. Wykres rozrzutu wartości M/P przewidywanych względem obserwowanych dla modelu MLR z równania 11. Deskryptory molekularne uwzględnione w tym modelu to: PB, NP, NP/PB, NP/PSA i NP/C

Przedstawiony model matematyczny został pomyślnie walidowany. Zmienne niezależne w modelu nie wykazują wzajemnych korelacji. Ten wynik potwierdza wartość predycyjną modelu analitycznego, opartego na badaniu chromatograficznym wiązania z białkami. Wynik jest bardzo dobry, pomimo badania związków bez rozdziału na zasady, kwasy i związki obojętne oraz zastosowania albuminy osocza krwi krowiej (BSA). Nie ma jednak charakteru uniwersalnego – te same zmienne niezależne użyte w analizie wszystkich przypadków, ze znaną wartością M/P i PB równocześnie ($n_{\text{abn}} = 75$), dają wynik $R = 0,50$. Związki o stwierdzonej biodostępności w OUN są grupą ściśle związaną z biodostępnością w mleku matki. Wiele badanych leków ma tu

charakter zasad i związków obojętnych. Tylko dwa przypadki zdefiniowano jako kwasy. Wśród wszystkich 83 przypadków ta proporcja jest bardziej zrównoważona.

Analiza dyskryminacyjna grup klasyfikujących ryzyko stosowania leku podczas laktacji

Przeprowadzono również analizę dyskryminacyjną (DFA) dla najczęściej pojawiających się wskaźników bezpieczeństwa stosowania leków przez kobiety karmiące – LactMed i LLL H [28,29]. Oba wskaźniki nie mają charakteru ilościowego i są umowną skalą zagrożeń w farmakoterapii. Traktowane są głównie, jako kod klasyfikacji leków do grup bezpieczeństwa i zdolności przenikania do mleka matki. W takiej sytuacji trudno spodziewać się dobrych wyników. Korelacje tych wskaźników z miarą M/P, przedstawione w Tabelach 7 i 10 potwierdzają niewielkie powiązanie skali i wartości oznaczonych doświadczalnie (M/P). Korelacje LactMed i LLL H z M/P wynoszą odpowiednio 0,37 i 0,26 ($n = 76$) oraz 0,41 i 0,00 ($n = 28$). Przeprowadzona analiza sprawdza więc tylko wpływ innych parametrów na tę dyskryminację.

LactMed dzieli leki na bardziej bezpieczne („1”) i mniej bezpieczne („2”). W analizie DFA wydzielono dwie grupy: LactMed 1 ($n = 21$) oraz LactMed 2 ($n = 7$). Kod LactMed przewiduje też oznaczenie „0” dla leków całkowicie bezpiecznych. Wśród badanych przypadków nie ma przedstawicieli tej grupy. W analizie DFA użyto, wszystkich zmiennych, opisujących właściwości przypadków (bez podziału na: a, b, n). Zmienne niezależne użyte do analizy pochodzą z MLR w równaniu (Równanie 10). Wprowadzenie do analizy wskaźnika BB_{vivo} ograniczyło grupę badaną do 28 przypadków. Zmienne dyskryminujące, odpowiednio w kolejności wprowadzenia, to: BB_{vivo} , B3, M/P, $\log U/D$ 7.2, PB, NP, NP/ $\log P$, eH-eL. Łącznie poprawnie klasyfikowano 93% badanych związków. Przedstawione poniżej zmienne grupujące w 100% dyskryminują grupę LactMed 1 i w 71% grupę LactMed 2 (Tabela 11).

Tabela 11. Macierz klasyfikacji dla modelu ze zmiennymi dyskryminującymi (BB_{vivo} , B3, M/P, log U/D 7.2, PB, NP, NP/log P, eH-eL)

grupa	przypadki sklasyfikowane poprawnie (%)	LactMed 1 p=,75000	LactMed 2 p=,25000
LactMed 1	100,00	21	0
LactMed 2	71,43	2	5
Razem	92,86	23	5

Wynik klasyfikacji i prawdopodobieństwo *a posteriori* jest dobry. Niepoprawnie zdefiniowano jedynie dwa z 28 leków: diazepam i lamotryginę (należące do grupy LactMed 2).

W celu określenia wartości zmiennych dyskryminujących, uzyskanych w powyższej analizie, wykonano DFA dla całej grupy badanych leków. Zmienna BB_{vivo} , ograniczająca liczbę przypadków, została zamieniona na obliczeniowy parametr B2, dostępny dla wszystkich przypadków. Łącznie zbadano 70 przypadków (56 grupy LactMed 1 i 14 grupy LactMed 2). Dobrze zdefiniowana (100%) jest tylko grupa LactMed 1. Grupa LactMed 2, o mniejszej liczbie przypadków, została prawidłowo klasyfikowana jedynie w 29%. Dziesięć na 14 związków zostało niepoprawnie zdefiniowanych, wśród nich ponownie pojawił się diazepam. Funkcje klasyfikacyjne nie mogą służyć do przewidywania kodów LactMed. Całkowita klasyfikacja wynosi 86% przypadków. Ze względu na niekorzystny wynik poszerzenia grupy badanych przypadków, nie przedstawiono obliczonych funkcji klasyfikacji.

Wskaźnik LactMed nie ma charakteru ilościowego. Można go traktować jako wskazówkę terapeutyczną. Granice podziału na grupy, bardziej i mniej bezpiecznych leków, nie są ścisłe. Klasyfikacja leków wynika z wielu obserwacji terapeutycznych, nie tylko z właściwości związków chemicznych, opisanych stosowanymi deskryptorami. W połączeniu z ilościowymi zmiennymi dyskryminującymi można założyć pewne niedokładności.

Podobny charakter ma kod LLL H (1-5) w kolejności wzrastającego zagrożenia w przypadku stosowania u kobiet karmiących piersią. LLL H ma znaczenie jako umowna skala bezpieczeństwa. Zbiór badanych przypadków, z określonym BB_{vivo} , nie zawiera leków z grup „4” i „5” (Tabela 12).

Tabela 12. Macierz klasyfikacji dla modelu ze zmiennymi dyskryminującymi (HA, BB_{vivo}, B2, M/P, log D, HD, MW, NP/C)

grupa	Przypadki s lasyfikowane poprawnie (%)	LLL H 1 p=,10714	LLL H 2 p=,32143	LLL H 3 p=,57143
LLL H 1	100,00	3	0	0
LLL H 2	88,89	0	8	1
LLL H 3	100,00	0	0	16
Razem	96,43	3	8	17

Obliczono funkcje klasyfikacyjne dla każdej grupy aktywności LLL H 1- LLL H 3 (Równanie 12-14):

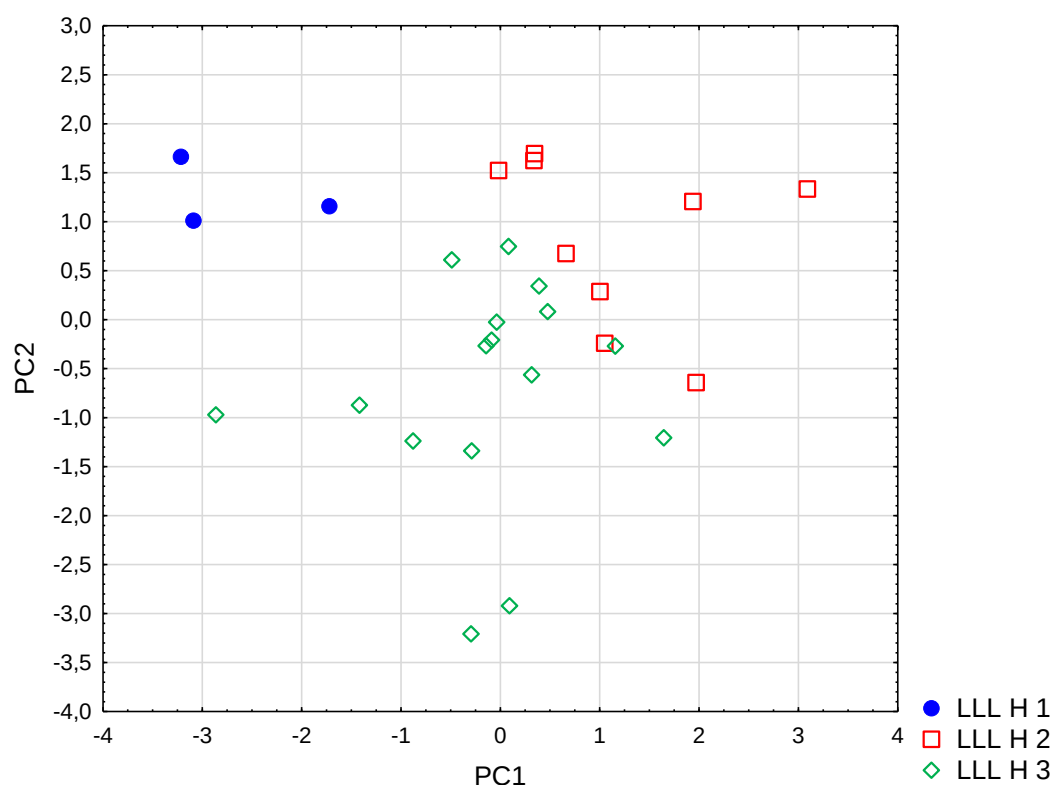
$$\text{LLL H 1} = -1,26 \text{ HA} + 70,02 \text{ BB}_{\text{vivo}} + 67,39 \text{ B2} + 17,42 \text{ M/P} - 28,21 \log \text{ D} + 8,44 \text{ HD} + 57,17 \text{ MW} + 3066,96 \text{ NP/C} - 1568,86 \quad (12)$$

$$\text{LLL H 2} = 5,37 \text{ HA} + 73,16 \text{ BB}_{\text{vivo}} + 91,32 \text{ B2} + 21,63 \text{ M/P} - 25,12 \log \text{ D} + 11,38 \text{ HD} + 56,04 \text{ MW} + 3047,00 \text{ NP/C} - 1572,84 \quad (13)$$

$$\text{LLL H 3} = 2,96 \text{ HA} + 75,08 \text{ BB}_{\text{vivo}} + 85,08 \text{ B2} + 20,76 \text{ M/P} - 27,63 \log \text{ D} + 10,13 \text{ HD} + 58,84 \text{ MW} + 3119,19 \text{ NP/C} - 1636,93 \quad (14)$$

Prawdopodobieństwo *a posteriori* klasyfikacji związków badanych wykazuje jeden błąd. Przedstawiciel grupy LLL H 2 – kofeina została zdefiniowana, z prawdopodobieństwem 0,58 w grupie LLL H 3.

Czynnik PC1 najsilniej dyskryminuje grupy związków (wartość własna PC1 = 1,35). Najważniejszy udział w jego kształtowaniu mają zmienne NP/C, MW i HA. Czynniki PC2 (wartość własna PC2 = 0,76) ukształtowały wskaźniki BB_{vivo}, B2 i HD. Średnie zmiennych kanonicznych (PC1) dla grupy LLL H 1 = -2,68, dla grupy LLL H 2 = 1,15 i dla grupy LLL H 3 = -0,15. Średnie zmiennych kanonicznych (PC2) dla grupy LLL H 1 = 1,28, dla grupy LLL H 2 = 0,83 i dla grupy LLL H 3 = -0,71 (Rysunek 5).



Rysunek 5. Dyskryminacja na grupy LLL H 1, 2 i 3. Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwiastka 1 względem pierwiastka 2. Zmienne dyskryminujące: HA, BB_{vivo} , B2, M/P, log D, HD, MW, NP/C.

Przeprowadzenie analizy dyskryminacyjnej LLL H dla wszystkich przypadków (zamiana BB_{vivo} na B2), w której znalazły się 74 związki (w tym 6 z grupy LLL H 4), wypadło znacznie gorzej. Wprowadzono zmienne dyskryminujące uzyskane w analizie dla 28 przypadków. Łączna poprawna klasyfikacja wynosi zaledwie 52,70%. Ta DFA może być uznana za próbę walidacji przy użyciu grupy zewnętrznej, ponieważ oba modele powstały z udziałem tych samych zmiennych dyskryminujących. Wynik jest jednak bardzo niekorzystny.

Następnie pojęto próbę wykonania krokowej DFA z użyciem wszystkich zgromadzonych zmiennych, poza BB_{vivo} . Po 9 krokach, wprowadzono kolejno następujące zmienne: eH-eL, HD, NP/C, NP, HA, M/P, NP/PB, PB i Sa.

Aktualna macierz klasyfikacji jest następująca (Tabela 13):

Tabela 13. Macierz klasyfikacji dla modelu ze zmiennymi dyskryminującymi (eH-eL, HD, NP/C, NP, HA, M/P, NP/PB, PB i Sa)

grupa	Przypadki sklasyfikowane poprawnie (%)	LLL H 1 p=,12903	LLL H 2 p=,37097	LLL H 3 p=,41935	LLL H 4 p=,08065
LLL H 1	75,00	6	0	2	0
LLL H 2	73,08	1	19	6	0
LLL H 3	67,86	1	8	19	0
LLL H 4	40,00	0	2	1	2
Razem	68,66	8	29	28	2

Uzyskane wyniki nie mogą być podstawą przewidywania bezpieczeństwa stosowania leków. Jedyne poprawne klasyfikacje uzyskano z udziałem wartości doświadczalnych M/P, PB i BB_{vivo}. W takim przypadku przewidywanie klasyfikacji LactMed lub LLL H nie jest już konieczne. Wszelkie próby walidacji zakończyły się niepowodzeniem. DFA podkreśla jednak widocznie znaczenie dyskryminujące danych chromatograficznych proponowanego modelu analitycznego. Wykazuje również wpływ wiązania z białkiem i biodostępności leków w OUN na bezpieczeństwo ich stosowania przez matki karmiące.

Stosowanie zmiennych grupujących LLL H i LactMed nie może służyć prognozowaniu bezpieczeństwa stosowania leków u matek karmiących na podstawie danych teoretycznych (bez obserwacji klinicznych), szczególnie z użyciem zmiennych dyskryminujących o charakterze ilościowym. Można nawet stwierdzić, że wyniki uznawane za dobre mogą prowadzić do mylnych klasyfikacji.

Analiza przenikania do mleka matki metodami najmniejszych cząstkowych kwadratów i lasu losowego

W dalszym etapie badań podjęto próbę zastosowania bardziej zaawansowanych metod regresji – metodę najmniejszych cząstkowych kwadratów (PLS) oraz metodę lasu losowego (RF). W pierwszej metodzie macierz zmiennych niezależnych jest analizowana pod względem zmiennych „ukrytych” (ang. latent variables; LVs), które najlepiej opisują kowariancję między zmiennymi X a zmienną Y. Następnie te przekształcone zmienne niezależne są wykorzystywane w regresji do przewidzenia odpowiedzi Y. Natomiast w metodzie RF korzysta się z wielu drzew decyzyjnych, które na podstawie wprowadzonych zmiennych X wielokrotnie „podejmują decyzję” o przewidywanej wartości Y dla każdego przypadku, z której następnie wyciągana jest wartość średnia.

Analizy regresji PLS i RF przeprowadzono przy użyciu 25 zmiennych niezależnych, wymienionych w Tabeli 14. Zastosowano tylko parametry chromatograficzne (R_f) związane z eksperymentem NP TLC, zgodnie z wcześniejszymi ustaleniami. W związku z tym, że modele PLS i RF nie zachowywały liniowości w wykresach rozrzutu zdecydowano o przekształceniu stosunku M/P na postać zlogarytmowaną – $\log M/P$, aby ułatwić dalszą interpretację wyników.

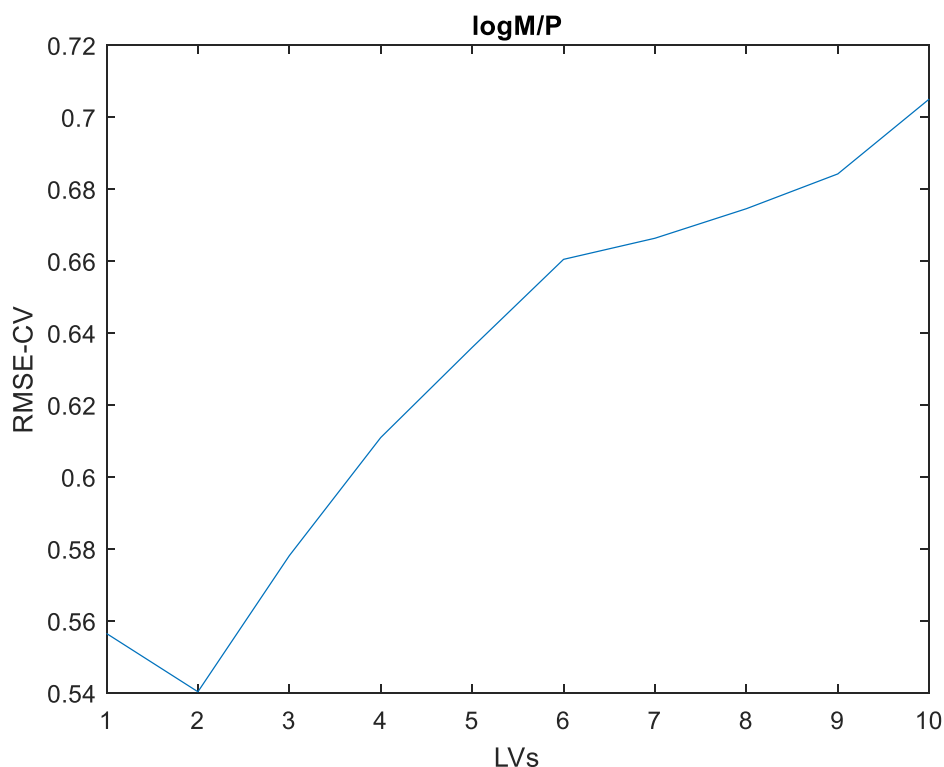
W tych analizach dobrą praktyką jest podział zbioru przypadków na dwa zestawy: treningowy i testowy w celu przeprowadzenia walidacji zewnętrznej, która wykaże zdolności predykcyjne modelu. Zestaw treningowy stanowi ok. 70% wszystkich zgromadzonych przypadków i służy on do zbudowania równania regresji (modelu szkolącego). Resztę, czyli ok. 30% przypadków włącza się do zestawu testowego, na którym równanie to jest walidowane. Zestawy treningowy i testowy są dzielone w sposób losowy. W celu sprawdzenia stabilności modelu i wykluczenia efektów przypadkowych warto taki podział na dwa podzbiory oraz budowę równania przeprowadzić kilkakrotnie. Wykorzystuje się do tego test permutacji Monte Carlo (ang. Monte Carlo Permutation Test, MCPT).

Tabela 14. Zmienne niezależne (1-25) w kolejności oraz zmienna zależna (log M/P) używane w budowaniu modeli regresji metodami PLS i RF

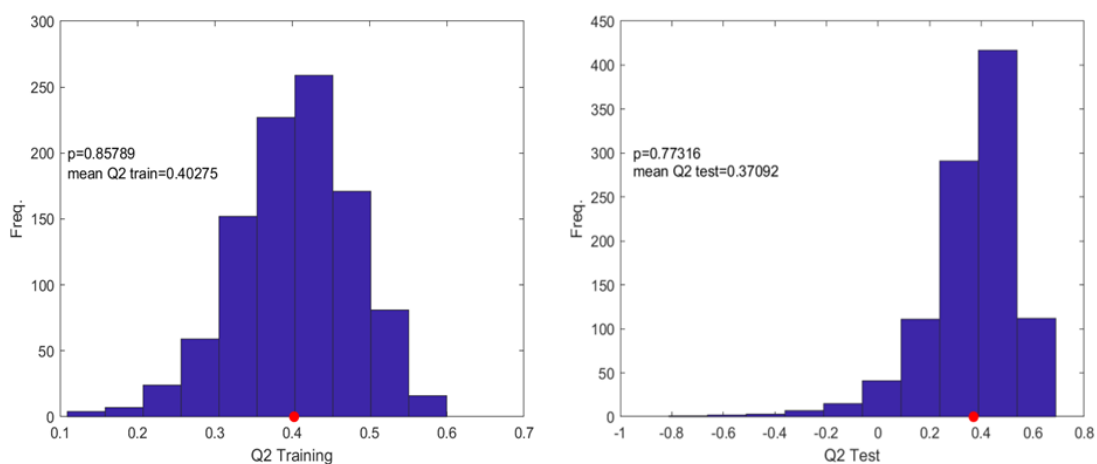
Lp.	X	Lp.	X	Y
1.	B2	14.	log P	log M/P
2.	B3	15.	HD	
3.	LactMed	16.	HA	
4.	LLL H	17.	log D	
5.	PhCharge	18.	MW	
6.	pKa	19.	MW _{root}	
7.	log U/D 7.2	20.	eL	
8.	PB	21.	eH-eL	
9.	NP	22.	NP/log P	
10.	NP/C	23.	PSA	
11.	NP/PSA	24.	DM	
12.	Sa	25.	eH	
13.	V			

Model PLS

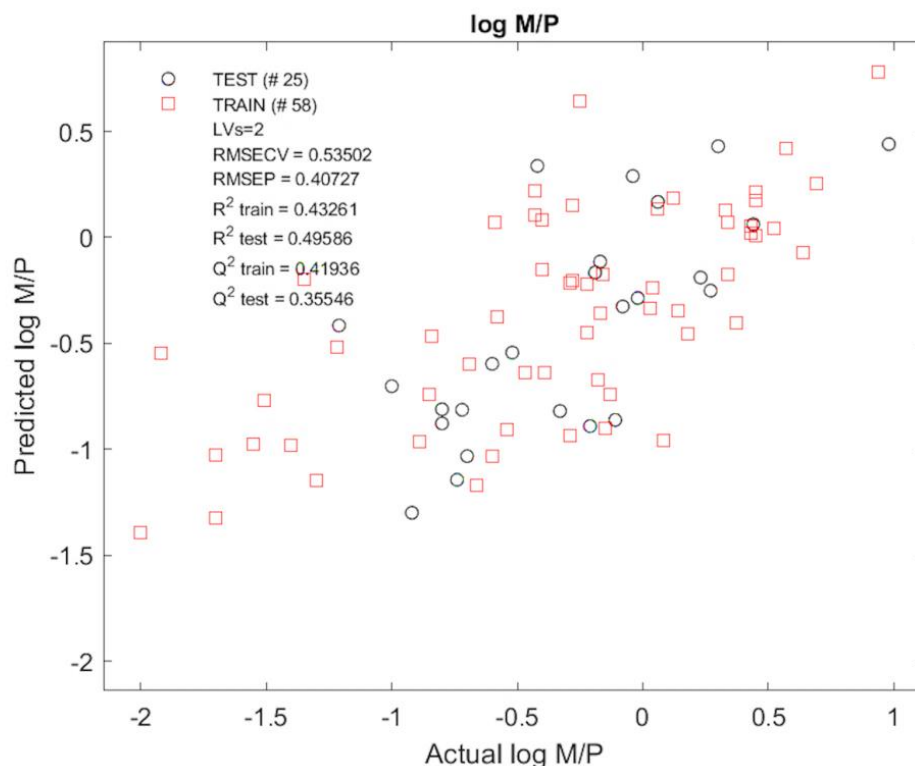
W analizie PLS pierwszym etapem był wybór liczby ukrytych zmiennych, które użyte zostaną w dalszym postępowaniu. Średnia kwadratowa błędów walidacji krzyżowej (RMSECV) modelu treningowego regresji PLS sugeruje, że model dwóch zmiennych ukrytych jest optymalny (Rysunek 6). Test permutacji Monte Carlo przeprowadzono zgodnie z opisem w części doświadczalnej. W sumie wykonano 1000 permutacji, aby ocenić moc predykcyjną modelu treningu regresji PLS do prawidłowego przewidywania log M/P badanych leków (Rysunek 7). Udowodniono, że wartość Q^2 nie różniła się między modelami prawdziwymi i permutowanymi, zarówno pod względem uczenia, jak i przewidywań zestawu testowego ($p = 0,9$). Rysunek 8 przedstawia rzeczywiste i przewidywane wartości M/P ze średnich modeli regresji PLS wybranych na podstawie parametru wydajności modelu Q^2 .



Rysunek 6. Błąd średniokwadratowy walidacji krzyżowej (RMSECV) jako funkcja ukrytych zmiennych (LV). Najniższa wartość RMSECV wskazuje optymalną liczbę ukrytych zmiennych do regresji PLS



Rysunek 7. Test permutacji Monte Carlo (MCPT) pokazujący Q^2 uzyskany z modeli regresji PLS opracowanych na zestawie treningowym i zestawie testowym, liczba powtórzeń wynosiła $n = 1000$. Średnie wartości Q^2 dla zestawu treningowego i zestawu testowego są wyświetlane na wykresach (odpowiednio 0,403 i 0,371) wraz z wartościami p.



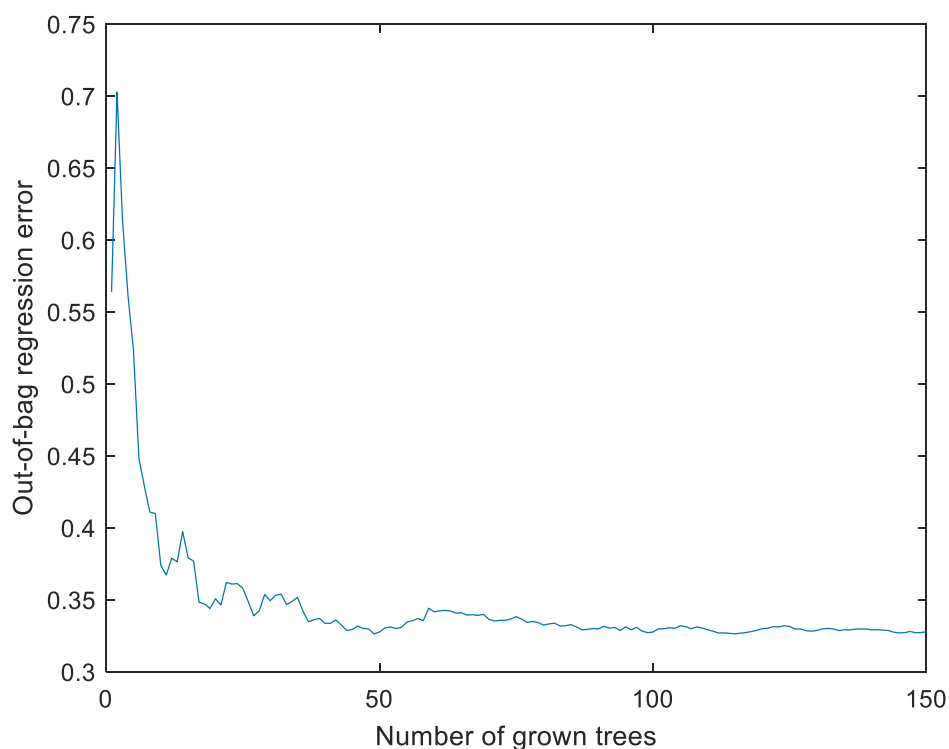
Rysunek 8. Rzeczywiste w porównaniu z przewidywanymi wartości $\log M/P$, przy użyciu modelowania regresji PLS 25 deskryptorów molekularnych. LV = zmienna ukryta, RMSECV = średni kwadratowy błąd walidacji krzyżowej, RMSEP = średni kwadratowy błąd prognozowania, R^2 train/test = współczynnik determinacji dla modeli zestawu treningowego i testowego, Q^2 train/test = współczynnik determinacji dla modeli poddanych walidacji krzyżowej.

Prognozy $\log M/P$ oparte na regresji PLS zaobserwowano ze stosunkowo wysokim błędem przewidywania i niskim Q^2 , zarówno dla zestawów treningowych, jak i testowych. Biorąc pod uwagę fakt, że niektóre modele MLR mogą lepiej przewidywać $\log M/P$ niż modele regresji PLS, można uznać, że ukryta zmienna nie jest liniowa ze względu na złożoną zależność między deskryptorami molekularnymi związków badanych a ich zdolnością do przenikania do mleka kobiecego. To skłoniło nas do przetestowania innej metody analizy regresji, a mianowicie regresji lasu losowego, o której wiadomo, że lepiej radzi sobie z nieliniowością w wielowymiarowych zbiorach danych.

Model RF

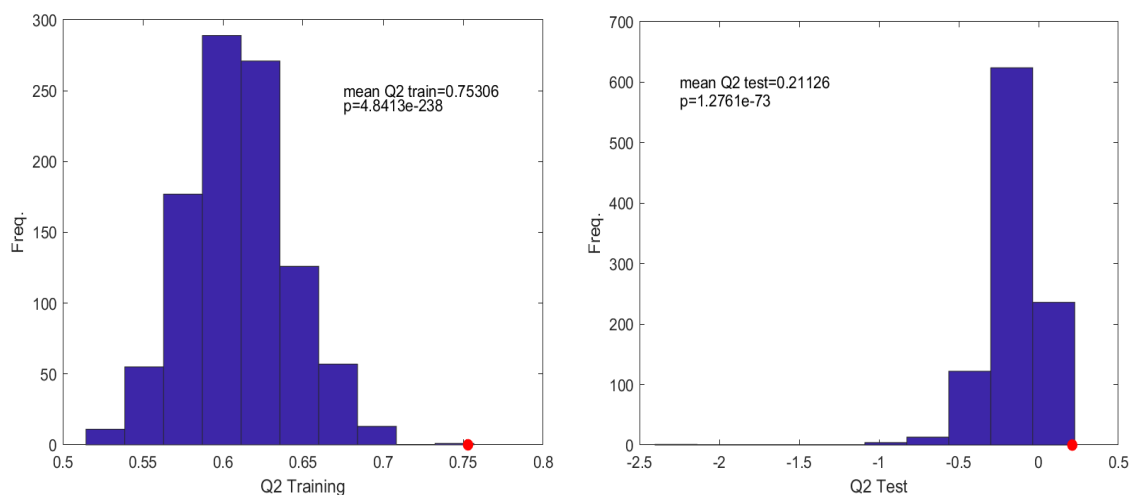
Podobnie jak w modelowaniu PLS, 58 leków w zestawie treningowym wykorzystano do opracowania modelu treningu RF. Zgodnie z wykresem błędu out-of-

bag (OOB) w funkcji liczby drzew decyzyjnych, nasze dane mogą być prawie w równym stopniu wykorzystujące od 50 do 150 drzew (Rysunek 9).

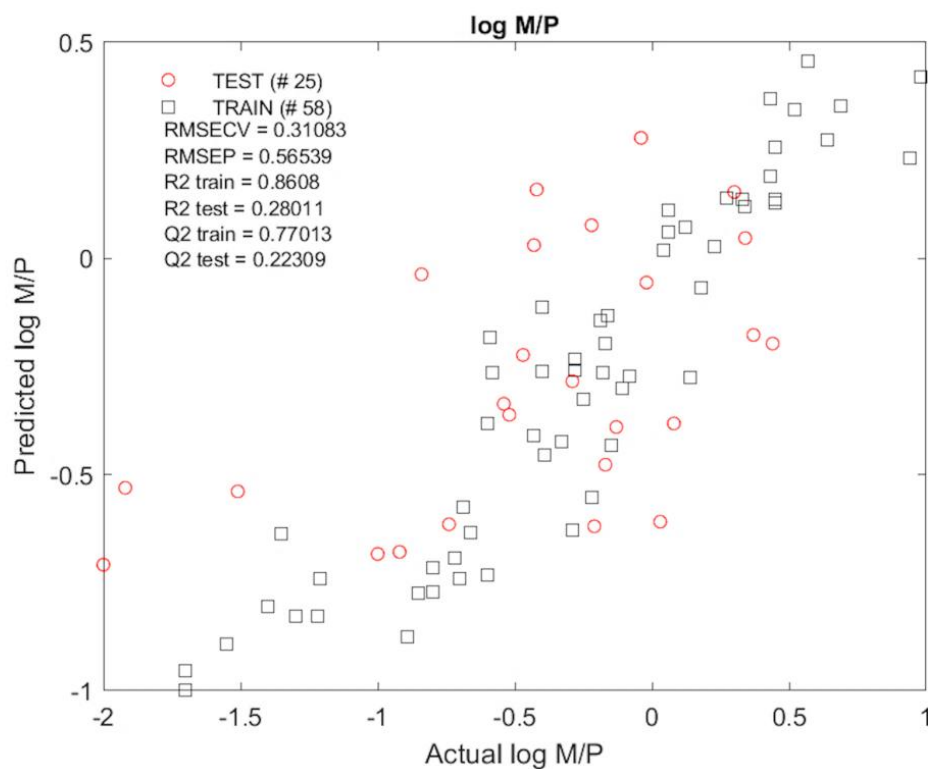


Rysunek 9. Błąd regresji „out-of-bag” jako funkcja liczby drzew decyzyjnych. Najniższy błąd OOB sugeruje optymalną liczbę drzew do analizy lasu losowego.

W celu uproszczenia modelu regresji RF wybrano model 50 drzew do przewidywania zbioru testowego. Podobnie jak w przypadku modelowania PLS, MCPT przeprowadzane z zestawami treningowymi i testowymi pozwoliło ocenić moc predykcyjną modeli. Test permutacji wykazał, że Q^2 wynoszący 0,75 w modelach uczących opracowanych na podstawie prawdziwych danych log M/P był statystycznie inny niż te otrzymane przy użyciu permutowanych zestawów danych. Podobnie MCPT wykonany z predykcją zestawu testów regresji RF wykazał istotną, ale stosunkowo niską moc predykcji (średnia $Q^2 = 0,21$) modelu regresji treningowej RF do prognozowania wartości log M/P nieznanych leków (Rysunek 10).

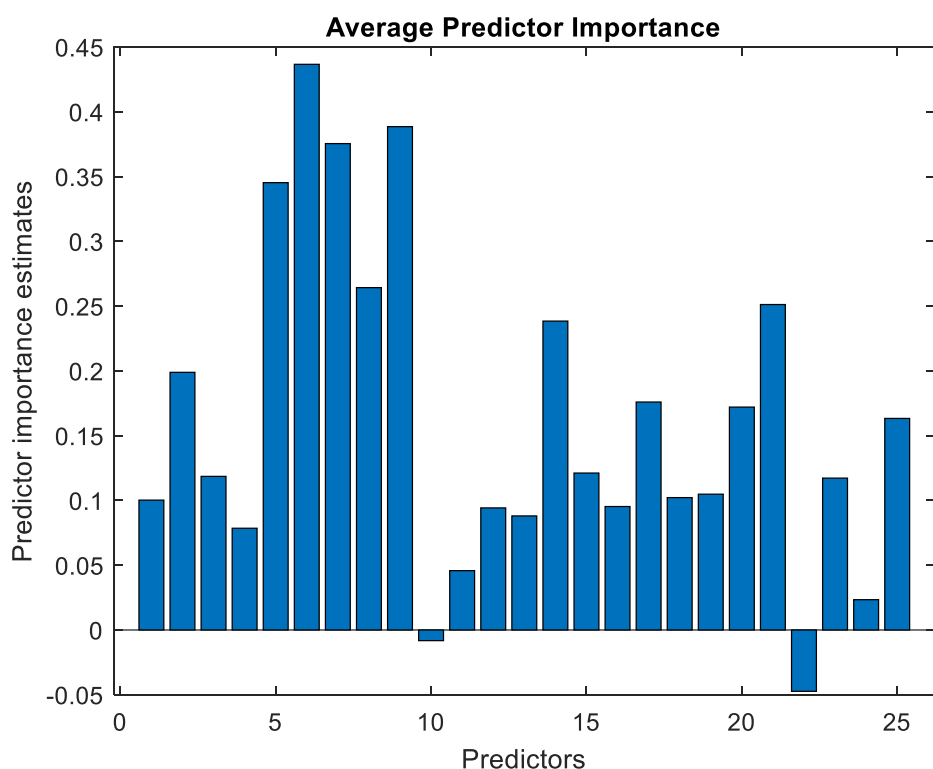


Rysunek 10. Symulacje Monte Carlo dla Q^2 uzyskane z modeli regresji RF zestawu treningowego i testowego, liczba permutacji, $n = 1000$. Na wykresach są wyświetlane średnie wartości Q^2 dla zestawów treningowego i testowego (odpowiednio 0,753 i 0,211) wraz z wartościami p .



Rysunek 11. Model regresji RF z 25 zmiennymi niezależnymi i $\log M/P$ jako zmienną zależną. RMSECV = średniokwadratowy błąd walidacji krzyżowej, RMSEP = średni kwadratowy błąd prognozy, R^2 train/test = współczynnik determinacji dla modeli zestawu treningowego i zestawu testowego, Q^2 train test = współczynnik determinacji dla modeli poddanych walidacji krzyżowej.

Rysunek 11 przedstawia rzeczywiste i przewidywane wartości log M/P ze średnich losowych modeli regresji lasu wybranych na podstawie parametru wydajności modelu Q^2 . Wykres znaczenia predyktorów (Rysunek 12) w permutowanych modelach RF wskazuje, że niektóre zmienne niezależne miały większy wpływ na tworzenie modelu niż inne: pKa, log U/D 7.2, NP, PB, log P lub eH-eL (kolejność zmiennych na wykresie jest taka sama jak w Tabeli 14).



Rysunek 12. Znaczenie predyktorów dla modelu regresji RF. Średnie wartości uzyskano z 1000 powtórzeń modelu.

Podsumowanie analizy regresji dla przenikania do mleka kobiecego

W celu porównania uzyskanych wyników regresji MLR, PLS i RF, zebrano je w Tabeli 15.

Tabela 15. Podsumowanie wyników regresji dla modeli MLR, PLS i RF

metoda regresji	n	train R^2, Q^2	test R^2, Q^2	zmienne*
MLR	28	$R^2 = 0,74$ $Q^2 = 0,57$	-	B2, log U/D 7.2, LLL H, PB
MLR	28	$R^2 = 0,83$ $Q^2 = 0,71$	-	PB, NP, log U/D 7.2, LLL H, eH-eL
MLR	28	$R^2 = 0,86$ $Q^2 = 0,57$	-	PB, NP, NP/PB, NP/PSA, NP/C
PLS	83 (train 58, test 25)	$R^2 = 0,44$ $Q^2 = 0,42$	$R^2 = 0,41$ $Q^2 = 0,40$	-
RF	83 (train 58, test 25)	$R^2 = 0,85$ $Q^2 = 0,76$	$R^2 = 0,29$ $Q^2 = 0,24$	PhCharge, pKa, log U/D 7.2, NP, B3, PB, log P, eH-eL

* zmienne tworzące model (w przypadku MLR) lub zmienne mające duży udział w jego tworzeniu (RF)

W przedstawionych modelach regresji wyraźnie widać silny wpływ zmiennych niezależnych związanych z założeniami przenikania do mleka opisanymi na początku części doświadczalnej (1-9). Są to: stopień jonizacji (deskryptory: log U/D 7.2, eH-eL czy PhCharge), wiązania z białkami (PB, B3, parametry chromatograficzne) czy zdolność do przenikania do OUN. Regresja wielokrotna wskazała na słuszność zastosowania danych chromatograficznych z NP TLC w badaniach nad przenikaniem do mleka, co potwierdziło się również w analizie lasu losowego (silny wpływ parametru NP na tworzenie modelu).

Zastosowane zaawansowane metody regresji nie przyniosły jednak pożądaných rezultatów. Udało się zbudować dobry model metodą RF, jednak wykazał on niską wartość predykcyjną dla nowych wprowadzanych przypadków. Może to wynikać z charakteru samej zmiennej zależnej, czyli wartości M/P, które były pozyskiwane z badań *in vivo*, co charakteryzuje się dużym wpływem innych czynników fizjologicznych lub nawet patologicznych. Dodatkowo utrudnieniem jest stosunkowo mała liczba uzyskanych danych dotyczących M/P, co związane jest oczywiście ze

względami etycznymi. Większa ilość danych pozwoliłaby na wyciągnięcie wartości średnich, które lepiej oddawałyby charakter przenikania leków do mleka kobiecego.

Porównanie modeli analitycznych wiązania leków z białkami z wykorzystaniem parametrów chromatograficznych z NP TLC, RP TLC i HPLC_{HSA}

Doświadczenia chromatograficzne zaplanowano jako wskaźnik powinowactwa badanych związków do wiązania z białkami. Założono możliwość wykorzystania danych z tych doświadczeń do przewidywania przenikania leków do mleka matki. Model powinien wykazać zdolność wiązania badanych leków z białkami w warunkach fizjologicznego pH krwi matki, jako najważniejszego czynnika ochrony przed przenikaniem do pokarmu. Istotną wartością danych chromatograficznych jest ich ilościowy charakter. Zastosowano chromatografię powinowactwa substancji aktywnych (analitów) do fazy stacjonarnej, modyfikowanej białkiem, w formacie kolumnowym i cienkowarstwowym. Faza ruchoma, w obu przypadkach oparta została na udziale buforu o pH 7,4; co zbliża warunki analizy do fizjologicznych. Różne warianty chromatografii badano w poszukiwaniu szybkiej, taniej i wygodnej metody analitycznej do przewidywania wiązania związków chemicznych (w głównej mierze substancji czynnych leków) z białkami osocza. Porównanie skuteczności tych metod oraz zaproponowanie modyfikacji matematycznych wartości retencji badanych leków może być źródłem wygodnych parametrów ilościowych w przewidywaniu losów związków chemicznych w organizmie. Dane chromatograficzne, uzyskane w kolejnych doświadczeniach, porównywano z wartościami PB, pochodzącymi z literatury. Dane chromatograficzne ustalono dla wszystkich badanych przypadków z określoną wartością odsetka formy związanej leku z białkiem (PB).

Uzyskano dane chromatograficzne dla 184 związków w doświadczeniu HPLC, z kolumną HSA ($\log k_{\text{HSA}}$) oraz po 198 związków w doświadczeniach RP i NP TLC, impregnowanych roztworem BSA (R_f i R_M). Liczba przypadków, w badaniu prognozowania wiązania z białkami, wynika z liczby analizowanych leków i liczby ustalonych wartości PB, równocześnie.

W grupie 129 przypadków (z ustalonym odsetkiem PB), obserwowano związki o charakterze: kwasowym, zasadowym i obojętnym łącznie.

Model chromatografii kolumnowej HPLC_{HSA}

Analizę rozpoczęto od danych o wartościach retencji, kolejno badanych przypadków w analizie HPLC, z kolumną immobilizowaną albuminą osocza krwi ludzkiej (HSA). Warunki chromatografii opisano w części doświadczalnej pracy.

Badanie objęło wskaźnik retencji ($\log k_{HSA}$) oraz wszystkie pochodne tej zmiennej które mogą uwzględniać dodatkowy wpływ innych czynników na uzyskany wynik chromatografii. Należą do nich dane chromatograficzne podzielone przez deskryptory molekularne: B2 – zdolność do przenikania leku przez barierę krew-mózg, PSA – pole polarnej powierzchni leku, $\log P$ – lipofilowość leku, PB – odsetek frakcji leku powiązanej z białkiem. Obliczono macierz korelacji wszystkich zmiennych chromatograficznych i poziomu wiązania z białkami osocza (PB_{abn}). W grupie tej badano łącznie związki o charakterze zasad (b), kwasów (a) i obojętne (n). Wartości $\log k_{HSA}$, wyznaczone dla badanych leków wykazują znaczną korelację $R = 0,56$ ($n_{abn} = 128$). Korelacja wartości zmiennej $\log k_{HSA}/PB$ z PB_a jest mniejsza i wynosi 0,46, a obie zmienne są silnie powiązane ze sobą (0,86). Korelacje pozostałych, modyfikowanych wartości wskaźnika $\log k$, obserwowano pod kątem ich wzajemnych korelacji. Wprowadzenie do analizy MLR wszystkich niepowiązanych zmiennych niezależnych ($\log k_{HSA}$, $\log k_{HSA}/B2$ i $\log k_{HSA}/PSA$) nie zwiększyło korelacji ze wskaźnikiem PB_{abn} ($R = 0,57$, $n_{abn} = 129$). Ten wynik jest znacznie mniej satysfakcjonujący niż oczekiwano.

Dla związków o charakterze kwasów (a), analiza wykazała również znaczne zależności. Wszystkie dane chromatograficzne i ich pochodne są wprost proporcjonalne do poziomu wiązania z białkami. Korelacje są wysokie, szczególnie w przypadku niezależnej $\log k_{HSA}$ i $\log k_{HSA}/PB$, odpowiednio $R = 0,58$ i $0,63$ ($n_a = 28$). Model matematyczny, zbudowany na więcej niż jednej zmiennej niezależnej, nie jest możliwy ze względu na bardzo silne powiązania między zmiennymi. Ta grupa odznacza się również małą liczbą przypadków, a obserwowane tu znaczne korelacje zmiennych chromatograficznych mogą być zależne od polarnego charakteru tych leków ($\log k_{HSA}$ i $\log k_{HSA}/PSA$).

Grupa przypadków obojętnych (n) zawiera 63 przypadki badane. Macierz korelacji obejmująca wiązanie z białkami i dane chromatograficzne pokazuje brak powiązań pomiędzy zmiennymi chromatograficznymi (poza $\log k_{HSA}$ i $\log k_{HSA}/PB$) i dość wysoki współczynnik korelacji wskaźnika $\log k$ i wiązania z białkiem PB_n ($R = 0,58$; $n_n = 63$). Analiza MLR, przeprowadzona metodą krokową postępującą, z użyciem niepowiązanych zmiennych, nie daje poprawy wyniku.

Połączone przypadki a i n, stanowią większą grupę, o liczebności $n_{an} = 91$. Takie struktury najczęściej wiązane są przez albuminy osocza krwi. To powiększenie liczby przypadków nie zmniejsza korelacji pomiędzy wskaźnikiem wiązania związków z białkiem PB_{an} i zmiennej niezależnej $\log k_{HSA}$ – $R = 0,57$ ($n_{an} = 91$), a nawet bardzo nieznacznie ją zwiększa. Zwiększyła się też zależność PB_{an} od $\log k_{HSA}/PB$: $R = 0,57$ ($n_{an} = 91$). Te dwie zmienne pozostają silnie powiązane, a kolejne zmienne niezależne nie wykazują powiązań wzajemnych. Pozwala to na próbę ustalenia regresji wielorakiej. W powstałym równaniu pojawiły się dwie zmienne niezależne: $\log k_{HSA}$, $\log k_{HSA}/B2$. Model ten tłumaczy 33% zmienności całkowitej wskaźnika PB_{an} ($R = 0,58$).

Badaniu poddano również dane chromatograficzne, z kolumny $HPLC_{HSA}$, związków o charakterze zasad (b). Ta grupa liczy 37 przypadków ($n_b = 37$). Rozkład zależności danych chromatograficznych i poziomu wiązania z białkami jest podobny do poprzednich grup, ale wydaje się korzystniejszy. Wszystkie zmienne niezależne są wprost proporcjonalne do zmiennej zależnej. Nie pojawiają się znaczne zależności pomiędzy zmiennymi niezależnymi. Tym samym ich użyteczność wzrasta. Bardzo słaba jest tym razem korelacja $\log k_{HSA}/PB$ i PB_b i wynosi zaledwie 0,22. Korelacja pomiędzy wskaźnikiem wiązania związków z białkiem PB_b i zmiennej niezależnej $\log k_{HSA}$ wzrosła do $R = 0,63$ ($n_b = 37$). Ta pojedyncza zmienna tłumaczy więc 40% wariancji całkowitej PB_b . Równanie MLR zawierające zmienne $\log k_{HSA}$, i $\log k_{HSA}/PSA$, tłumaczy 41% zmienności PB_b ($R = 0,64$, $n_b = 37$).

Zwiększenie grupy przypadków (b) o leki obojętne (n) powoduje kolejną zmianę obserwowanych zależnościach. Liczba przypadków wzrasta do 100, jednak poziom korelacji, najważniejszych zmiennych niezależnych, ze wskaźnikiem PB_{bn} nie ulega widocznym zmianom. Dane chromatograficzne i ich pochodne nie są powiązane ze sobą po wykluczeniu zmiennej $\log k_{HSA}/PB$. Model MLR powstający ze wszystkich zmiennych niezależnych nie jest lepszy od korelacji pomiędzy PB_{bn} i $\log k_{HSA}$.

Równanie jest istotne statystycznie, ale wynik nie jest satysfakcjonujący ($R = 0,57$, $n_{bn} = 100$).

Przypadki (b) w połączeniu z przypadkami (a) wykazują, w macierzy korelacji PB_{ab} danych chromatograficznych, bardzo podobny układ zależności. Najkorzystniejsze korelacje widoczne są ze zmiennymi $\log k_{HSA}$, $\log k_{HSA}/PSA$ i $\log k_{HSA}/PB$. Zależności pomiędzy zmiennymi niezależnymi nie dają możliwość tworzenia modelu MLR, po wykluczeniu zmiennej $\log k_{HSA}/PB$. Wynik analizy krokowej wprowadza do modelu cztery zmienne $\log k_{HSA}$, $\log k_{HSA}/PSA$, $\log k_{HSA}/B2$ z wynikiem $R = 0,60$, $n_{ab} = 65$. Model tłumaczy 36% zmienności wskaźnika PB_{ab} .

Ocena wpływu danych chromatograficznych $HPLC_{HSA}$ na możliwość prognozowania wiązania leków z białkami wykazała dość duże znaczenie zmiennej $\log k_{HSA}$. Parametr ten jest silnie i wprost proporcjonalnie skorelowany ze wskaźnikiem PB. Można to stwierdzić we wszystkich badanych grupach przypadków, niezależnie od ich charakteru: kwaśnego, obojętnego lub zasadowego oraz we wszystkich wariantach połączeń tych grup. Poziom tej korelacji zmienia się bardzo nieznacznie dla grup o różnej liczebności: R w granicach 0,56-0,63 dla n w granicach 27-128 przypadków. Jedynie w przypadku związków zasadowych ($n_b = 37$) jest najwyższy i wynosi 0,63. Analiza danych chromatograficznych $HPLC_{HSA}$ wykazała również, że tworzenie chromatograficznej zmiennej niezależnej, zawierającej element wartości PB, nie daje bezpośredniego wzrostu korelacji ze zmienną zależną PB w żadnej grupie przypadków.

Wskaźniki chromatograficzne mogą być ważnymi zmiennymi niezależnymi w modelach matematycznych, w połączeniu z, istotnymi dla PB, deskryptorami fizykochemicznymi leków. Ta część pracy na celu porównanie różnych środowisk chromatografii powinowactwa do odwzorowania przewidywanego poziomu wiązania leków z białkami.

Modele chromatografii cienkowarstwowej NP i RP TLC

Przeprowadzono analizę danych chromatograficznych, uzyskanych w dwóch niezależnych doświadczeniach. Badano wartość prognostyczną modeli chromatograficznych TLC dla oceny wiązania leków z białkami. W normalnym

i odwróconym układzie faz, na żelu krzemionkowym (NP) i na żelu krzemionkowym silanizowanym (RP) osadzono warstwę albuminy osocza krwi krowiej. Chromatografia powinowactwa powinna wykazać skłonność leków do tworzenia połączeń z białkiem. Fazy stacjonarne (RP i NP) zastosowano w poszukiwaniu wspólnego środowiska rozdziału licznych związków chemicznych o zróżnicowanych właściwościach. Istotną cechą takiego podłoża powinno być również dobre przyleganie modyfikatora białkowego i równomierne pokrycie całej powierzchni płytek. Substancja modyfikująca, powinna być jak najmniej ruchoma w warunkach chromatografii. Daje to szansę na ilościową ocenę wpływu naniesionej BSA na migrację leków w zastosowanym środowisku chromatograficznym.

W badaniu ustalono wartości R_f i R_M , dla każdego doświadczenia. Dla płytek impregnowanych BSA i bez impregnacji, odpowiednio: R_f oznaczono jako NP i C_{NP} ; RP i C_{RP} ; R_M jako R_{MRP} i R_{MNP} . W dalszych obliczeniach użyto również parametrów chromatograficznych, zmodyfikowanych właściwościami badanych związków: NP/C, RP/C, R_{MNP}/C i R_{MRP}/C – stosunek tych wartości lepiej odwzorowuje wpływ modyfikatora na chromatografię każdego analitu; zmienne związane z wpływem lipofilowości leków – NP lub RP/log P, R_{MNP} lub R_{MRP} /log P; zmienne związane z polarnym polem powierzchni leków – NP lub RP/PSA, R_{MNP} lub R_{MRP}/PSA ; zmienne związane ze zdolnością przenikania bariery krew-mózg – NP lub RP/B2, R_{MNP} lub $R_{MRP}/B2$; zmienne związane z powinowactwem do białek – NP lub RP/PB, R_{MNP} lub R_{MRP}/PB . Dane C_{NP} i C_{RP} (zarówno dla R_f i R_M) występują oczywiście tylko w połączeniu z odpowiednimi danymi NP i RP (R_f lub R_M). Z tego powodu we wszystkich czterech przypadkach używano, dla uproszczenia, tylko symbolu C (dane porównawcze w odpowiednim badaniu i zbiorze danych).

Modele MLR z wykorzystaniem NP TLC

Badania porównawcze dwóch modeli analitycznych TLC i wartości prognostycznej uzyskanych parametrów (zmiennych) rozpoczęto od środowiska w normalnym układzie faz. Analiza objęła 129 przypadków, o charakterze kwasów, zasad i obojętnych, łącznie i 6 zmiennych niezależnych.

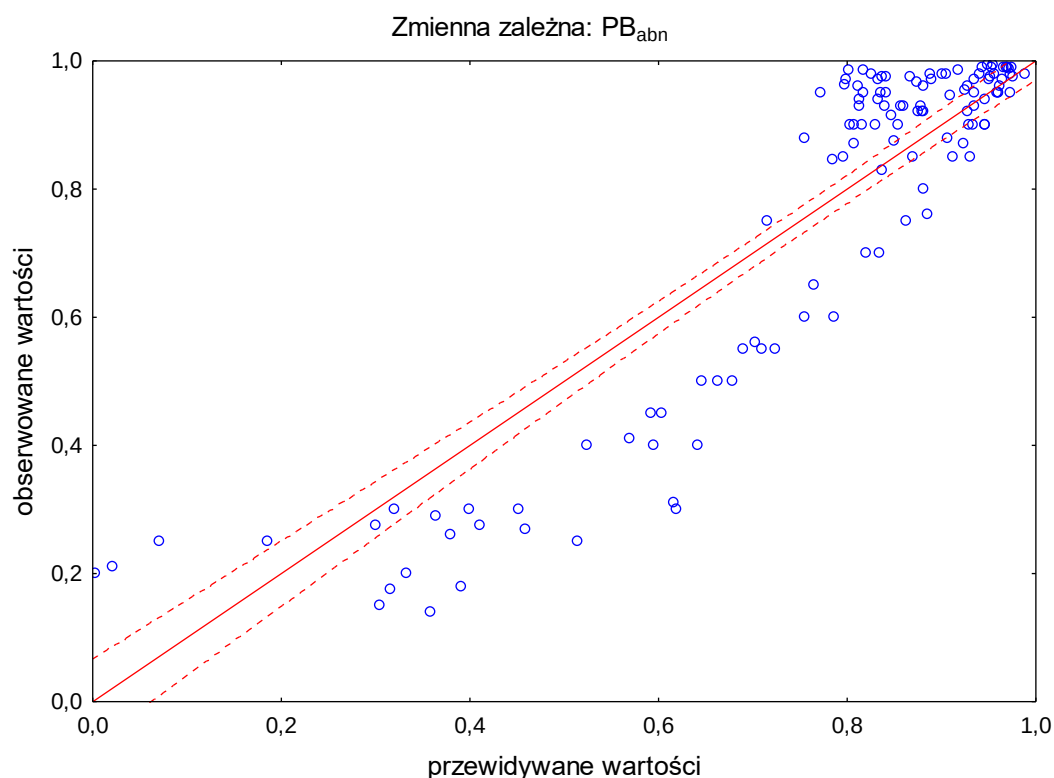
Na podstawie obserwacji macierzy korelacji, stwierdzono brak widocznych powiązań pomiędzy zmiennymi niezależnymi. Pozwoliło to na próbę stworzenia modelu matematycznego MLR zależności wskaźnika PB od ustalonych parametrów chromatograficznych NP TLC. Wykonano analizę MLR metodą krokową. W modelu znalazły się zmienne: NP, NP/C, NP/PSA i NP/PB. Wszystkie zmienne są istotne statystycznie. Korelacja dla zmiennej zależnej jest wysoka ($R = 0,90$; $n_{abn} = 129$). Model tłumaczy 81,5% zmienności całkowitej PB_{abn} w grupie wszystkich badanych związków (Równanie 15).

$$PB_{abn} = 1.23(\pm 0,28) - 0,27(\pm 0,01) NP/PB + 0,58(\pm 0,06) NP + 0,02(\pm 0,008) NP/PSA - 0,61(\pm 0,29) NP/C \quad (15)$$

$$R = 0,90; R^2 = 0,81 \quad F(4,124) = 136.12; p < 0,0000; s = 0,12549; n_{abn} = 129$$

$$Q^2_{LOO} = 0,70, SDEP = 0,1569, PRESS = 3.1970, S_{PRESS} = 0,1568, Q^2_{LMO} = 0,63$$

Dobra reprezentacja wiązania leków z białkiem widoczna jest na wykresie rozrzutu wartości przewidywanych PB w stosunku do obserwowanych (Rysunek 13).



Rysunek 13. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu z Równania 15. Zmienna zależna: PB_{abn}

Dane chromatograficzne w postaci wartości R_M i ich pochodne (takie same we wszystkich TLC) wykazują niższe korelacje z PB_{abn} . Najważniejszym parametrem jest, odwrotnie proporcjonalny do wiązania z białkiem: R_{MNP} ($R = 0,26$; $n_{abn} = 129$). Próba zastosowania wszystkich zmiennych niezależnych do analizy MLR potwierdziła znacznie gorsze dopasowanie PB_{abn} i R_{MNP} – $R = 0,41$, $n_{abn} = 129$.

Dla przypadków z grupy kwasów (a), o liczebności $n_a = 29$, odnotowano bardzo dobre wyniki. Macierz korelacji PB_a i danych chromatograficznych (R_f) wykazała dobre dopasowanie wszystkich zmiennych niezależnych do wskaźnika PB_a i brak powiązania pomiędzy zmiennymi. Wartość korelacji wskaźnika NP wzrosła do $R = 0,48$.

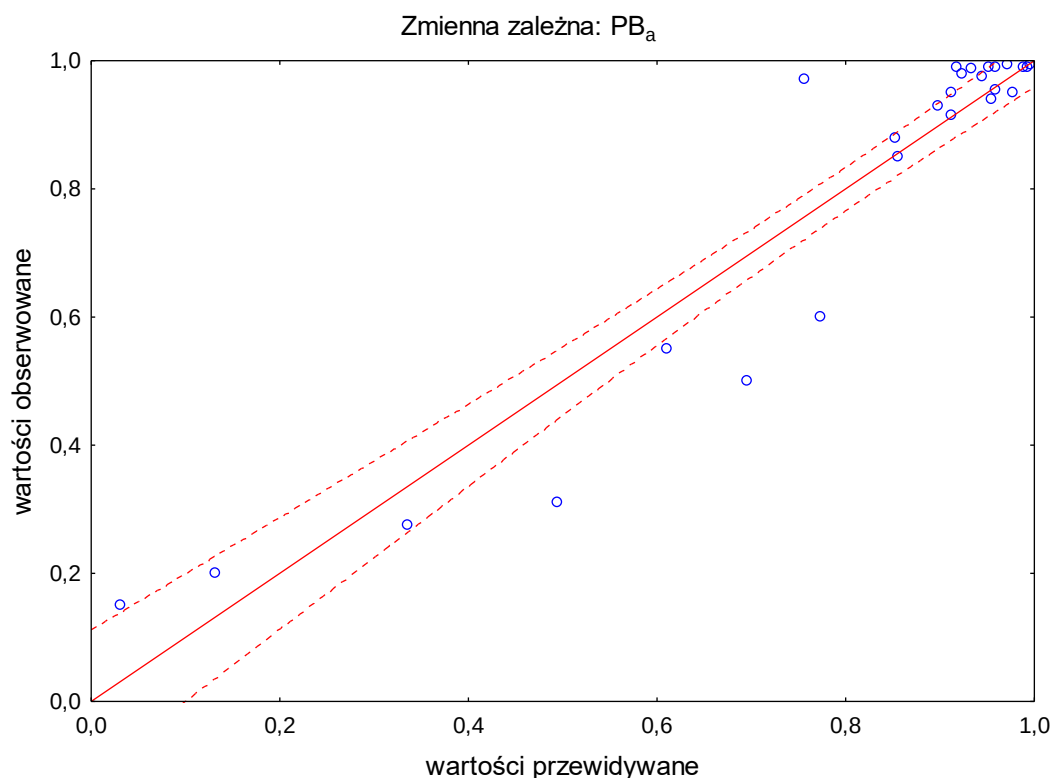
Model matematyczny, na podstawie analizy krokowej MLR, tłumaczy 91% zmienności całkowitej PB w grupie kwasów. Równanie jest istotne statystycznie i mimo niewielkiej grupy przypadków, wynik można uznać za bardzo dobry: $R = 0,95$; $n_a = 29$.

$$PB_a = -2.99(\pm 1.23) + 0,48(\pm 0,10) NP + 3.53(\pm 1.26) NP/C + 0,15(\pm 0,04) NP/PSA - 0,21(\pm 0,02) NP/PB \quad (16)$$

$$R = 0,95; R^2 = 0,91 \quad F(4,24) = 57.434; p < 0,0000; s = 0,09925; n_a = 29$$

$$Q^2_{LOO} = 0,81, SDEP = 0,1308, PRESS = 0,5376, S_{PRESS} = 0,1362, Q^2_{LMO} = 0,81$$

Potwierdza to wykres rozrzutu wartości obserwowanych względem przewidywanych (Rysunek 14):



Rysunek 14. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu z Równania 16. Zmienna zależna: PB_a

Dla przypadków z grupy kwasów (a), o liczebności $n_a = 29$, odnotowano lepsze wyniki w obserwowanej macierzy korelacji PB_a i danych chromatograficznych R_M , które wykazała znaczące korelacje poszczególnych zmiennych. Niestety zmienne chromatograficzne są ze sobą powiązane. Najwyższą korelację z PB wykazują parametry R_{MNP}/PSA i R_{MNP} (odwrotnie proporcjonalne) odpowiednio $R = 0,64$ i $0,53$ $n_a = 29$. Zmienna R_{MNP} jest jednak silnie skorelowana z R_{MNP}/PSA ($0,77$) oraz z R_{MNP}/PB ($0,85$). Model matematyczny, na podstawie analizy MLR, z nieskorelowanych zmiennych, tłumaczy jednak tylko $57,50\%$ zmienności całkowitej PB_a w grupie kwasów. Równanie jest istotne statystycznie, wynik można uznać za nienajlepszy – $R = 0,76$; $n_a = 29$.

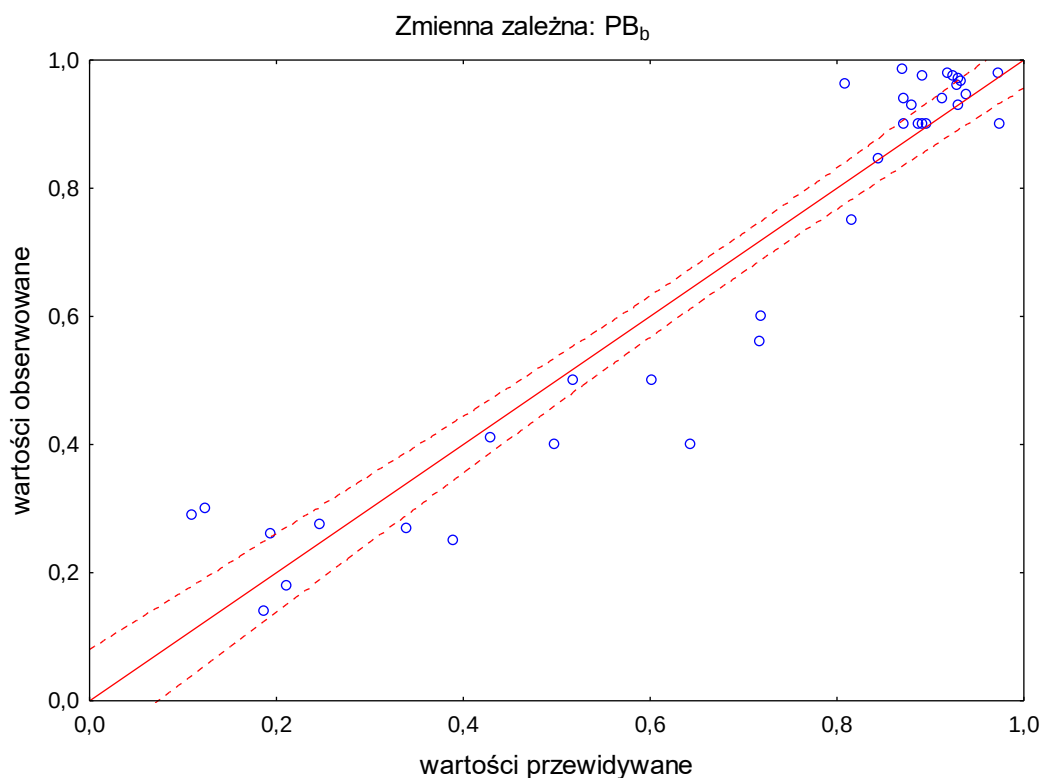
Kolejną grupę przypadków stanowią zasady (b), o liczebności $n_b = 37$. Dla tej grupy przypadków odnotowano równie dobre wyniki. Macierz korelacji PB_b , danych chromatograficznych (R_f) i ich pochodnych, stosowanych w doświadczeniu, wykazała możliwość analizy MLR. Model matematyczny, na podstawie jej, tłumaczy ponad 91% zmienności całkowitej PB_b . Równanie jest istotne statystycznie i mimo niewielkiej grupy przypadków, wynik można uznać za bardzo dobry – $R = 0,96$; $n_b = 34$.

$$PB_b = 0,76(\pm 0,054) + 0,88(\pm 0,11) NP - 0,54(\pm 0,03) NP/PB \quad (17)$$

$R = 0,96$; $R^2 = 0,91$ $F(2,31) = 160,74$; $p < 0,0000$; $s = 0,09437$; $n_b = 34$

$Q^2_{LOO} = 0,88$, $SDEP = 0,1063$, $PRESS = 0,3636$, $S_{PRESS} = 0,1034$, $Q^2_{LMO} = 0,86$

Tę, równie dobrą, zależność potwierdza wykres rozrzutu wartości obserwowanych względem przewidywanych (Rysunek 15):



Rysunek 15. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 17). Zmienna zależna: PB_b

Dla tych samych przypadków z grupy zasad (b), o liczebności $n_b = 37$, opisanych zmiennymi R_M , wykazano złe wyniki. Macierz korelacji PB_b i danych chromatograficznych ujawnia silne powiązania pomiędzy zmiennymi niezależnym. Model matematyczny, na podstawie analizy MLR, zawiera tylko zmienne $R_{MNP/PB}$ i $R_{MNP/C}$ i tłumaczy zaledwie 25% zmienności całkowitej PB_b w grupie zasad.

Badane leki o charakterze związków obojętnych (n), obejmują 64 przypadki. Macierz korelacji PB_n i danych chromatograficznych (R_f) wykazała brak powiązań zmiennych niezależnych. Poziom powiązania poszczególnych zmiennych niezależnych ze zmienną zależną PB_n jest bardzo podobny do odpowiednich korelacji NP

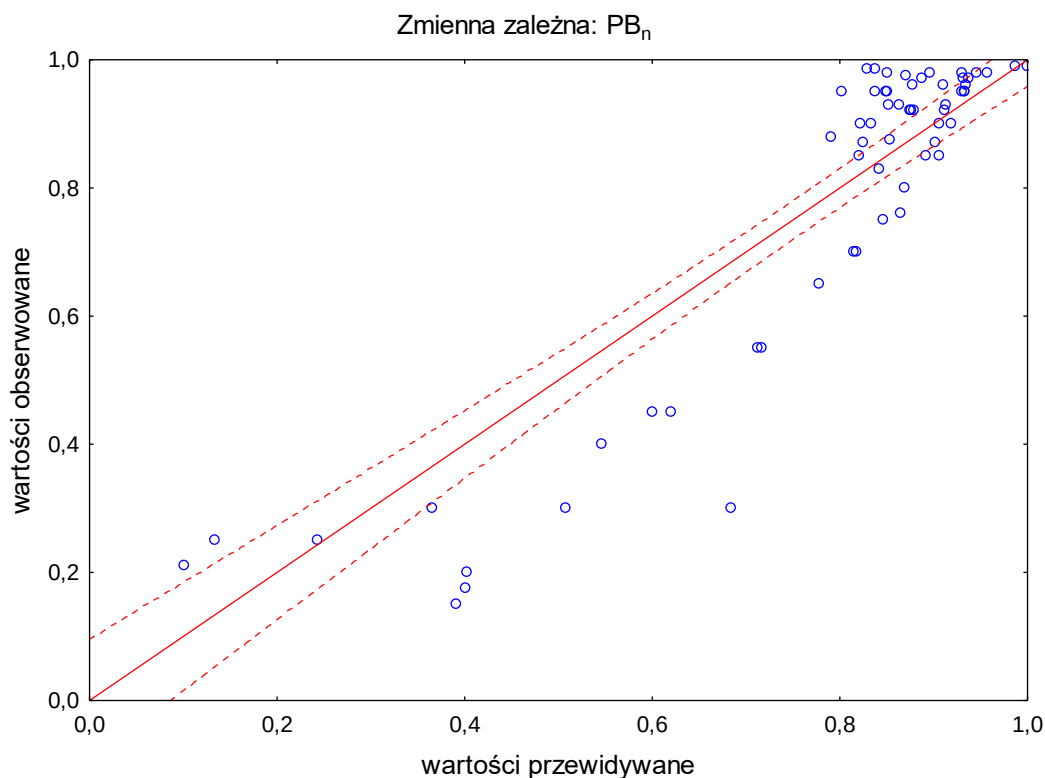
i pochodnych, w grupach a i b. Model matematyczny, na podstawie analizy MLR, tłumaczy 81% zmienności całkowitej PB_n dla grupy związków obojętnych. Równanie jest istotne statystycznie i mimo powiększenia liczby przypadków, wynik można uznać za bardzo podobny do uzyskanego w poprzednich grupach a i b: $R = 0,90$, $n_n = 66$ (Równanie 18).

$$PB_n = 0,80(\pm 0,05) + 0,44(\pm 0,06) NP - 0,29(\pm 0,02) NP/PB \quad (18)$$

$$R = 0,90; R^2 = 0,81 \quad F(2,64) = 133,29; p < 0,0000; s = 0,11958; n_n = 66$$

$$Q^2_{LOO} = 0,77, SDEP = 0,1298, PRESS = 1,0890, S_{PRESS} = 0,1285, Q^2_{LMO} = 0,76$$

Poniżej wykres rozrzutu wartości obserwowanych względem przewidywanych, który potwierdza wartość równania (Rysunek 16):



Rysunek 16. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 18). Zmienna zależna: PB_n

Wynik ten porównano z badaniem zmiennych chromatograficznych z obliczoną wartością R_M . Wyniki były ponownie niesatysfakcjonujące. Zmienne są skorelowane ze sobą i wykazują małe powiązanie z wartościami PB , nie przekraczające $R = 0,21$

($R_{MNP/PSA}$ i $R_{MNP/PB}$). Te zmienne nie są ze sobą skorelowane, lecz nawet łącznie użyte w równaniu regresji dają słaby wynik: $R = 0,30$.

Trzeba zauważyć, że wykres rozrzutu (ze zmiennych R_f) w każdej z niezależnych grup przypadków: a, b, n przedstawia bardzo podobny (nieliniowy) kształt rozkładu przypadków. Charakterystyka rozrzutu jest też odwzorowaniem rozrzutu wszystkich przypadków badanych łącznie.

Analizę MLR przeprowadzono następnie w grupach połączonych a i b, a i n oraz b i n. Związki zasadowe i obojętne, to największa część wszystkich przypadków. Grupuje ona 101 przypadków. Macierz korelacji, ze zmiennymi R_f , wykazuje brak powiązań pomiędzy zmiennymi niezależnymi oraz, podobne do pozostałych grup, korelacje jednostkowe ze zmiennością PB_{bn} .

Tabela 16. Korelacje wewnętrzne między parametrami chromatograficznymi i ich pochodnymi

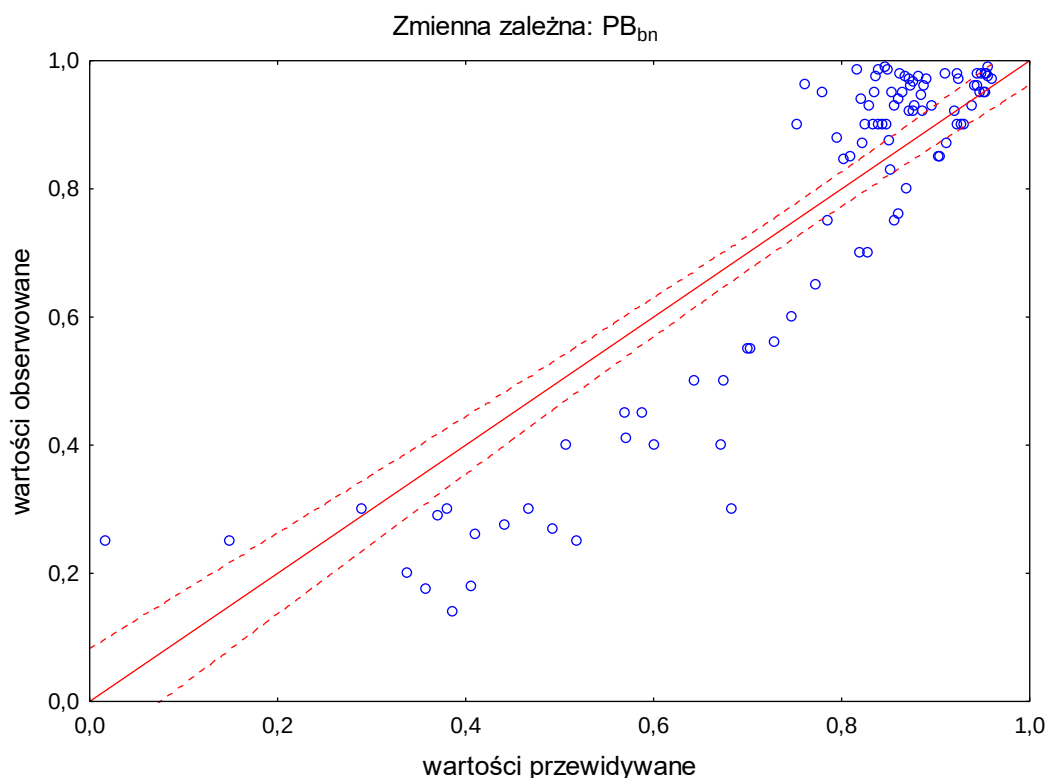
	NP	NP/C	NP/PSA	NP/PB	NP/B2	NP/log P	PB
NP	1,00000	0,43476	0,11617	0,33392	-0,10367	-0,08883	0,20126
NP/C		1,00000	0,11120	0,23799	-0,08528	-0,04225	-0,06376
NP/PSA			1,00000	-0,15575	0,07932	0,00211	0,27541
NP/PB				1,00000	-0,05083	-0,13009	-0,74726
NP/B2					1,00000	0,01675	0,02338
NP/log P						1,00000	0,12042

Dla tej licznej grupy leków powstał model matematyczny, który tłumaczy wiązanie z białkami w 78% ($R = 0,88$; $n_{bn} = 101$) (Rysunek 17). Otrzymano więc wynik o bardzo podobnej wartości prognostycznej do badania całej grupy przypadków łącznie (Równanie 19).

$$PB_{bn} = 0,74(\pm 0,037) + 0,56(\pm 0,06) NP - 0,34(\pm 0,02) NP/PB \quad (19)$$

$$R = 0,88; R^2 = 0,78, F(2,97) = 174.29; p < 0,0000; s = 0,1339; n_{bn} = 101$$

$$Q^2_{LOO} = 0,75, SDEP = 0,1420, PRESS = 1.9875, S_{PRESS} = 0,1410, Q^2_{LMO} = 0,75$$



Rysunek 17. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 19). Zmienna zależna: PB_{bn}

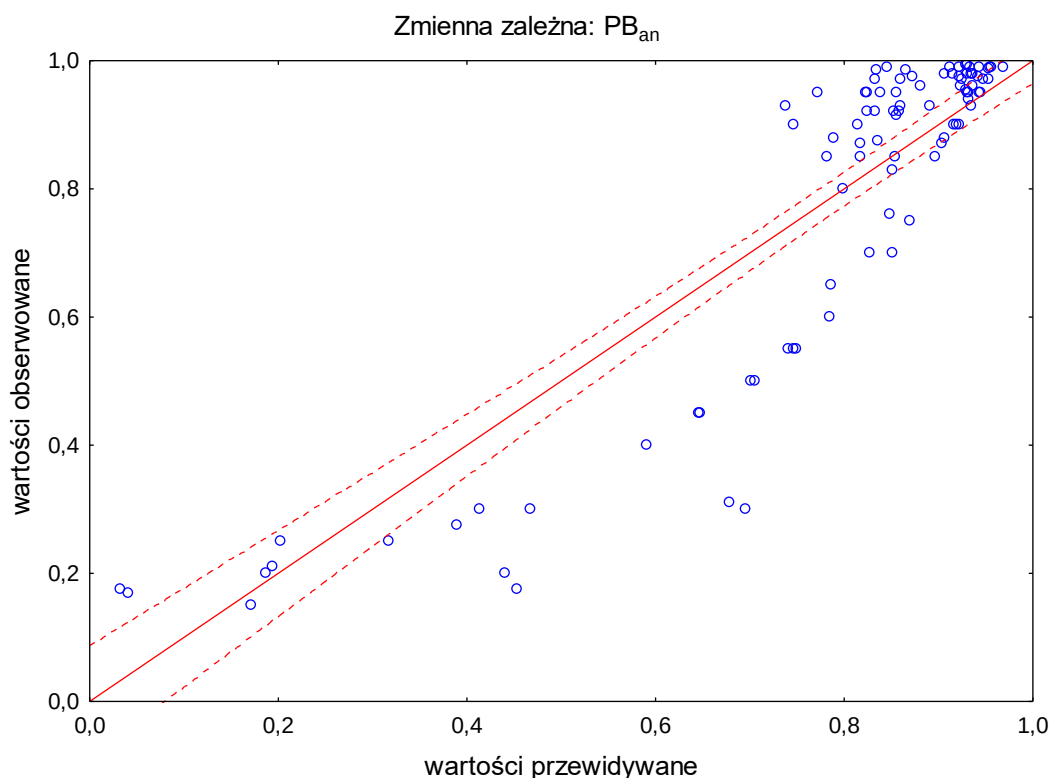
Obserwowano również, obliczone dane R_M dla tej grupy. Najwyższą korelację z wskaźnikiem PB_{bn} uzyskano dla zmiennej $R_M NP/C$: $R = 0,24$ $n_{bn} = 101$. Model matematyczny, po wprowadzeniu zmiennych: $R_M NP/C$, $R_M NP/PSA$ i $R_M NP/\log P$, tłumaczy zaledwie 11% zmienności PB : $R = 0,33$ $n_{bn} = 101$.

Związki kwaśne i obojętne stanowią również dużą grupę przypadków ($n_{an} = 95$). Widoczny jest tu wpływ związków obojętnych. Zależności pomiędzy wskaźnikiem PB_{an} i danymi chromatograficznymi odpowiada pozostałym grupom zmiennych (R_f). Brak powiązań pomiędzy zmiennymi niezależnymi. Model matematyczny ponownie wprowadza zmienną NP i NP/PB (Równanie 20, Rysunek 18).

$$PB_{an} = 0,74(\pm 0,05) + 0,49(\pm 0,05) NP - 0,26(\pm 0,01) NP/PB + 0,01(\pm 0,00) \quad (20)$$

$$R = 0,89; R^2 = 0,76, F(3,91) = 111,21; p < 0,0000; s = 0,13042; n_{an} = 95$$

$$Q^2_{LOO} = 0,70, SDEP = 0,1504, PRESS = 2,2123, S_{PRESS} = 0,1526, Q^2_{LMO} = 0,69$$



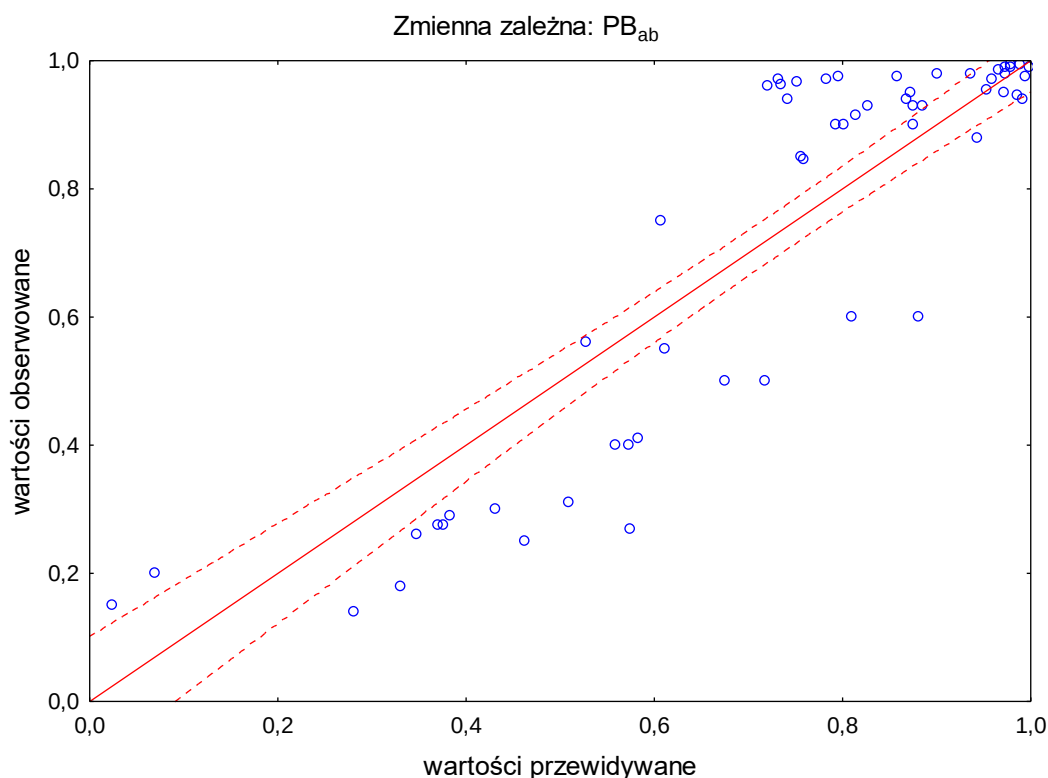
Rysunek 18. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 20). Zmienna zależna: PB_{an}

Przypadki a i n nie mogą być tak korzystnie zdefiniowane przy użyciu zmiennych R_M . Najwyższą korelację ze wskaźnikiem PB_{an} uzyskano dla zmiennej R_{MNP} oraz R_{MNP}/PSA : $R = 0,28$; $n_{an} = 95$. Model matematyczny, po wprowadzeniu zmiennych: R_{MNP} , R_{MNP}/C , R_{MNP}/PB i $R_{MNP}/\log P$, tłumaczy 24% zmienności PB : $R = 0,50$; $n_{an} = 95$.

Na koniec porównano też dane chromatograficzne (R_f) i wartość wiązania z białkami grupy kwasów i zasad łącznie ($n_{ab} = 65$). W tej grupie przypadków obserwuje się wysoką korelację pomiędzy zmienną NP i PB_{ab} (0,41). Zmienne niezależne nie są ze sobą powiązane. Możliwe jest powstanie modelu matematycznego (Równanie 21, Rysunek 19):

$$PB_{ab} = 1.39(\pm 0,41) + 0,80(\pm 0,09) NP - 0,30(\pm 0,02) NP/PB + 0,01(\pm 0,00) NP/B2 + 0,03(\pm 0,01) NP/PSA - 0,89(\pm 0,43) NP/C \quad (21)$$

$R = 0,89$; $R^2 = 0,80$ $F(5,57) = 44.235$; $p < 0,0000$; $s = 0,14432$; $n_{ab} = 63$
 $Q^2_{LOO} = 0,63$, $SDEP = 0,1883$, $PRESS = 2.6723$, $S_{PRESS} = 0,2060$, $Q^2_{LMO} = 0,63$



Rysunek 19. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 21). Zmienna zależna: PB_{ab} .

Grupa a+b oceniana była przy użyciu zmiennych R_M . Najwyższą korelację ze wskaźnikiem PB_{ab} uzyskano dla zmiennej R_{MNP} i R_{MNP}/PB $R = 0,40$ i $0,38$ $n_{ab} = 65$. Model matematyczny, po wprowadzeniu zmiennych: R_{MNP} , R_{MNP}/C , $R_{MNP}/B2$, tłumaczy 23% zmienności PB : $R = 0,48$ $n_{ab} = 65$.

Obserwując badania wszystkich grup przypadków, w warunkach chromatografii NP TLC, można zauważyć duże podobieństwo wyników analizy. Niezależnie od znacznego zróżnicowania struktury, charakteru kwasowo-zasadowego i liczebności grup przypadków: 129, 101, 95, 65, 37 i 29, parametry chromatograficzne opisują zdolność leków do wiązania z białkami na bardzo podobnym poziomie, zarówno wysokim (dla obserwacji danych R_f), jak i niskim (dla R_M). Współczynnik korelacji, we wszystkich satysfakcjonujących przypadkach, waha się w granicach 0,89-0,96. Modele matematyczne z udziałem zmiennych R_f tłumaczą 79-91% zmienności PB w grupach i zawierają najczęściej zmienne niezależne: NP, NP/B2 i NP/PB. Wydaje się, że analiza chromatograficzna NP TLC, z fazą stacjonarną modyfikowaną albuminą osocza bydlęcego dostarcza danych (R_f i ich pochodnych) o wiązaniu z białkami, dla dowolnej grupy leków. Zmienne R_M , niestety można uznać za mało przydatne w przewidywaniu

poziomu PB. Interesującą obserwacją jest obraz wykresu rozrzutu obserwowanych i przewidywanych wartości PB. Można tu wyróżnić specyficzne położenie grup przypadków: o wysokim odsetku wiązania z białkiem osocza – od 85 do 100%; wartości średnie, w szerokim zakresie – od 25 do 85%; widoczna jest też grupa o najmniejszym wiązaniu z białkiem – od 0 do 25%. Zmniejszenie powinowactwa do białek wiąże się też z oddaleniem ich wartości przewidywanych od linii trendu.

Modele MLR z wykorzystaniem RP TLC

Analiza chromatograficzna w odwróconym układzie faz RP TLC została wykonana dla tej samej grupy związków chemicznych, które badano w dwóch eksperymentach, opisanych powyżej. Doświadczenie przeprowadzono w celu ustalenia najdogodniejszego środowiska chromatografii do badania zróżnicowanych strukturalnie grup przypadków. Badano wpływ powinowactwa kolejnych przypadków do albuminy osocza krwi krowiej (BSA), która posłużyła do modyfikowania fazy stacjonarnej płytek RP. Ustalono dane chromatograficzne w postaci R_f i R_M oraz ich pochodnych, również przedstawionych wcześniej.

Wszystkie przypadki, zbadane w tym doświadczeniu, stanowiły grupę 129 związków. Macierz korelacji nie ujawniła powiązań pomiędzy zmiennymi chromatograficznymi R_f .

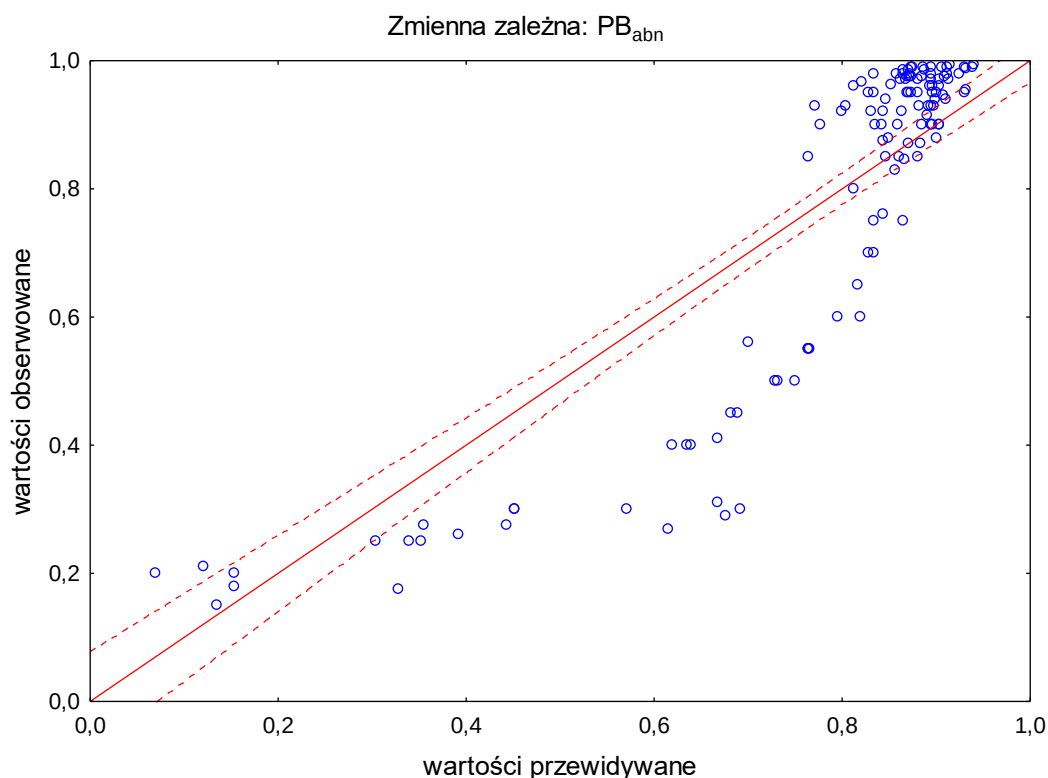
$$PB_{abn} = 0,76(\pm 0,05) + 0,41(\pm 0,07) RP - 0,22(\pm 0,01) RP/PB + 0,004(\pm 0,002) \quad (22)$$

RP/B2

$$R = 0,87; R^2 = 0,76 \quad F(3,125) = 132,78; p < 0,0000; s = 0,14191; n_{abn} = 129$$

$$Q^2_{LOO} = 0,72, SDEP = 0,1514, PRESS = 2,9392, S_{PRESS} = 0,1509, Q^2_{LMO} = 0,72$$

Zmienne niezależne w modelu nie są ze sobą powiązane. Model tłumaczy 76% zmienności wskaźnika PB (Równanie 22, Rysunek 20). Uzyskany tu wynik jest jednak gorszy niż w przypadku eksperymentu chromatograficznego z fazą stacjonarną NP, modyfikowaną BSA (patrz Równanie 15).



Rysunek 20. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 22). Zmienna zależna: PB_{abn} .

Badanie wiązania z białkami dla całej grupy przypadków, ze zmiennymi R_{MRP} , również nie dało dobrych wyników. Dzięki małemu powiązaniu zmiennych niezależnych, powstał model matematyczny, zawierający zmienne: R_{MRP}/PB , R_{MRP}/PSA , $R_{MRP}/B2$ i $R_{MRP}/\log P$. Współczynnik korelacji dla PB_{abn} wynosi $R = 0,61$ i 129 przypadków. Wynik ten jest lepszy niż uzyskany z użyciem danych R_{MNP} (0,41). Nie jest to jednak zależność pozwalająca na przewidywanie poziomu wiązania z białkiem.

Tak, jak poprzednio, grupy przypadków, które określono jako kwasy, zasady i związki obojętne, mają mniejszą liczebność. Powtórzono analizę statystyczną dla wszystkich trzech rodzajów przypadków (a, b, n) oraz w grupach mieszanych (an, bn, ab). Każdorazowo porównywano wyniki analizy danych chromatograficznych R_f i R_M . Wyniki podano poniżej.

Kwasy (a) badano w grupie 29 przypadków. Macierz korelacji nie wykazuje korelacji zmiennych niezależnych (poniżej 0,48). Pozwala to na stworzenie modelu matematycznego, przewidywania poziomu wiązania tych związków z białkami.

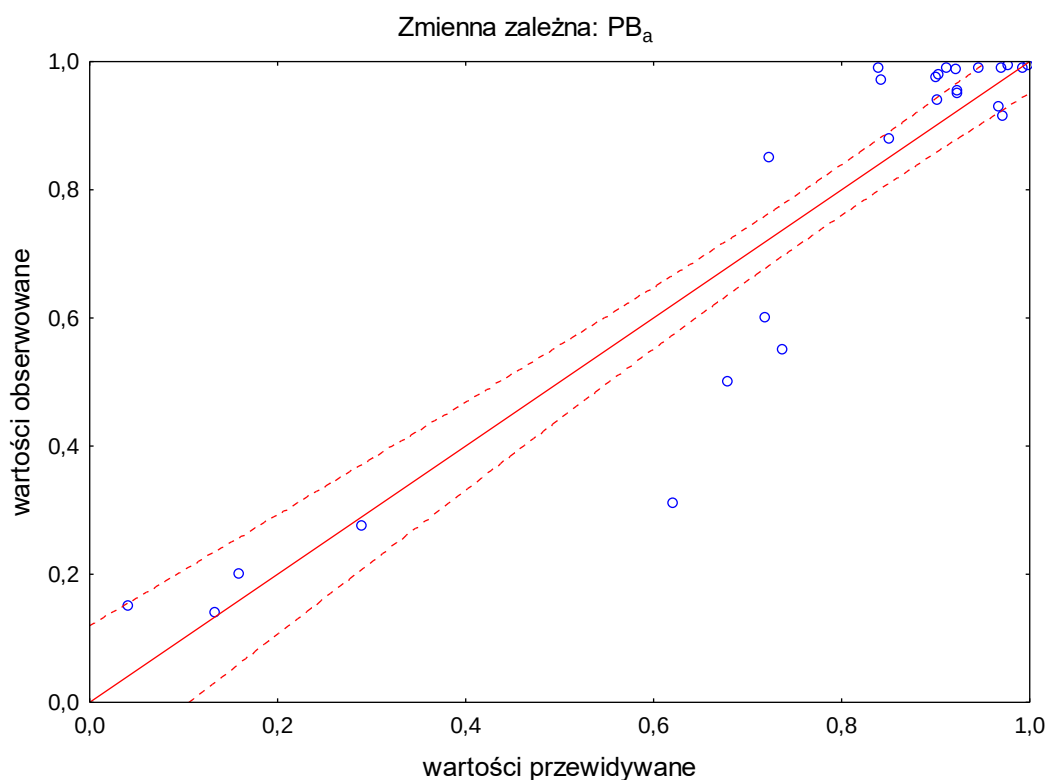
Otrzymany model MLR, przy użyciu metody krokowej postępującej, wprowadza 5 zmiennych niezależnych i ustala korelację tych zmiennych z wartościami PB_a na wysokim poziomie $R = 0,94$ ($n_a = 29$). Wyniki są istotne statystycznie (Równanie 23, Rysunek 21).

$$PB_a = 0,68(\pm 0,09) + 0,43(\pm 0,12) RP - 0,23(\pm 0,02) RP/PB + 0,01(\pm 0,00) \quad (23)$$

$$RP/B2 + 0,10(\pm 0,04) RP/PSA$$

$$R = 0,93; R^2 = 0,86, F(4,24) = 36.4743; p < 0,0000; s = 0,1213; n_a = 29$$

$$Q^2_{LOO} = 0,74, SDEP = 0,1541, PRESS = 0,8425, S_{PRESS} = 0,1704, Q^2_{LMO} = 0,74$$



Rysunek 21. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 23). Zmienna zależna: PB_a .

W przypadku użycia zmiennych typu R_M , otrzymano znacznie gorszy wynik. Zmienne niezależne są silnie powiązane ze sobą. Jedyną, wprowadzoną do równania, zmienną jest $R_M RP/PB$, a współczynnik korelacji, pomiędzy PB_a i zmienną chromatograficzną, wyniósł 0,61. W przypadku grupy liczącej 29 przypadków, można go uznać za brak korelacji.

Grupa przypadków o charakterze zasad (b) liczy 34 związki badane. Uzyskane wyniki porównania PB_b z wartościami RP i R_MRP są bardzo podobne do poprzedniej grupy. Ponownie efekt badania danych o charakterze wartości R_f był lepszy niż w przypadku danych R_M ($R = 0,69$, przy 4 zmiennych w modelu, tylko R_MRP/PB jest istotna statystycznie). Bardziej efektywne zmienne R_f , dają korelację ze zmienną zależną PB_b : $R = 0,86$, ale równanie nie jest istotne statystycznie. W modelu znalazły się trzy zmienne niezależne: RP/C, RP/PSA i RP/PB. Wyraz wolny tego równania także nie jest istotny statystycznie, świadczy to o braku zastosowania takiego modelu.

Dwukrotnie większa grupa związków obojętnych ($n_n = 66$) umożliwia zbudowanie modelu MLR dla zmiennej PB_n , z użyciem trzech zmiennych: RP/PB, RP/C i RP/log P. Uzyskany wynik jest dobry: $R = 0,92$, współczynnik determinacji $R^2 = 0,84$. Niestety wyraz wolny w powstałym równaniu ma złe parametry. Nie jest istotny statystycznie, a błąd standardowy jest stukrotnie większy od jego wartości. Takie równanie nie może być zastosowane do przewidywania zmiennej zależnej.

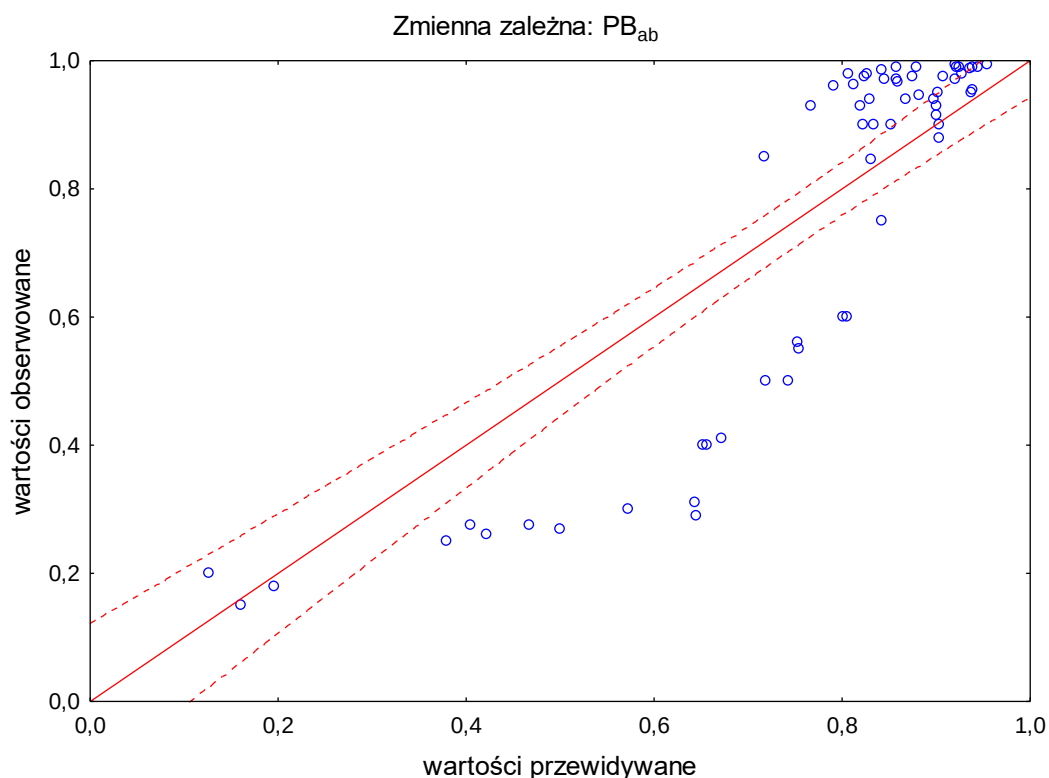
Zmienne R_MRP i ich pochodne nie dają możliwości uzyskania bardziej satysfakcjonującego wyniku. Powstały model, z użyciem wszystkich zmiennych niezależnych, tłumaczy jedynie 48% zmienności PB_n . Tylko zmienna R_MRP/PB i wyraz wolny są istotne statystyczne.

Badanie połączonych przypadków a i b, z zastosowaniem danych typu RP i R_MRP , potwierdziło większą użyteczność danych R_f : RP, RP/C, RP/PSA, RP/B2, RP/PB, RP/log P. Krokowa analiza regresji wprowadziła do równania dwie, statystycznie istotne zmienne niezależne: RP i RP/PB. Powstał model matematyczny, tłumaczący 73% zmienności wśród wartości PB_{ab} , zgodnie z równaniem (Równanie 24, Rysunek 22).

$$PB_{ab} = 0,71(\pm 0,07) + 0,46(\pm 0,10) RP - 0,21(\pm 0,02) RP/PB \quad (24)$$

$$R = 0,85; R^2 = 0,73 \quad F(2,60) = 80,471; p < 0,00000; s = 0,16193; n_{ab} = 63$$

$$Q^2_{LOO} = 0,67, SDEP = 0,1772, PRESS = 1,9589, S_{PRESS} = 0,1763, Q^2_{LMO} = 0,62$$



Rysunek 22. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 24). Zmienna zależna: PB_{ab}

Po wprowadzeniu do analizy zbioru danych R_{MRP} i ich pochodnych, pojawiły się liczne wzajemne powiązania zmiennych niezależnych, co znacznie zmniejszyło możliwości analizy. Niemniej powstał model, z udziałem zmiennych R_{MRP} , $R_{MRP}/B2$ i R_{MRP}/PB , tłumaczy 42% zmienności całkowitej PB_{ab} i wszystkie jego elementy są istotne statystycznie.

Grupa przypadków a i n – PB_{an} liczy 95 przypadków. Analiza regresji wielorakiej, przeprowadzona metodą krokową, z użyciem danych R_f , wprowadza zmienne: RP , RP/C , $RP/B2$, RP/PB . Uzyskany wynik jest dobry: $R = 0,89$, współczynnik determinacji $R^2 = 0,80$, Niestety wyraz wolny w powstałym równaniu ma złe parametry. Nie jest istotny statystycznie, a błąd standardowy jest równy jego wartości. Takie równanie nie może być zastosowane do przewidywania zmiennej zależnej. Zastosowanie danych R_{MRP} daje model o niższej wartości. Model zawiera tylko zmienne R_{MRP}/PSA i R_{MRP}/PB . Wyraz wolny nie jest istotny statystycznie, równanie tłumaczy 45% zmienności całkowitej wskaźnika PB_{an} .

Badanie grupy przypadków b i n w stosunku do wskaźnika PB_{bn} , dało niemal analogiczne wyniki do efektu grupy an. Ponownie zmienne R_f budują model o pozornie dobrej korelacji $R = 0,89$ ($n_{bn} = 101$), po wprowadzeniu tych samych zmiennych: RP/PB , RP , i RP/C . Niestety wyraz wolny tego modelu ponownie jest nieistotny statystycznie i stosowanie go musiałoby być bardzo ostrożne. Zmienne niezależne, w postaci pochodnych $R_M RP$, słabiej korelują z wartościami PB_{bn} . Wynik jest bardzo podobny do poprzedniego – w grupie związków n i an. Trudno nie zauważyć, że otrzymane wyniki w grupach an i bn, których liczebność zdominowana jest przez przedstawicieli grupy n ($n_n = 66$), dają też podobne efekty analizy, jak w grupie n. Ta obserwacja skłania do wniosku, że ewentualne prognozowanie wiązania z białkami związków obojętnych, na podstawie danych chromatograficznych (w doświadczeniu w odwróconym układzie faz, z użyciem albuminy do modyfikowanie fazy stacjonarnej) może nie być pewne, a nawet trafne. Dołączenie tej grupy do innych (a lub b) może również zmniejszać możliwości prognozowania tego zjawiska dla kwasów i zasad. Duża grupa 129 związków, zawiera połowę przypadków obojętnych i efekt grupy n ulega wyraźnemu obniżeniu.

Podsumowanie MLR

W wyniku opisanej powyżej analizy MLR, wszystkich uzyskanych danych chromatograficznych, ustalono równania matematyczne tłumaczące zmienność wiązania z białkiem PB (Tabela 17).

Tabela 17. Podsumowanie wyników regresji wielokrotnej z wykorzystaniem parametrów NP TLC i RP TLC

Równanie	R ²	n
$PB_{abn} = 1,18 - 0,32 NP/PB + 0,62 NP + 0,02 NP/PSA - 0,51 NP/C$	0,81	129
$PB_a = -2,99(\pm 1,23) + 0,48 NP + 3,53 NP/C + 0,15 NP/PSA - 0,21 NP/PB$	0,91	29
$PB_b = 0,79 + 0,80 NP - 0,54 NP/PB$	0,91	37
$PB_n = 0,80 + 0,44 NP - 0,29 NP/PB$	0,81	66
$PB_{bn} = 0,74 + 0,56 NP - 0,34 NP/PB$	0,79	101
$PB_{an} = 0,74 + 0,49 NP - 0,26 NP/PB + 0,01 NP/B2$	0,76	95
$PB_{ab} = 1,39 + 0,80 NP - 0,30 NP/PB + 0,01 NP/B2 + 0,03 NP/PSA - 0,89 NP/C$	0,80	65
$PB_{all} = 0,76 + 0,41 RP - 0,22 RP/PB + 0,01 RP/B2$	0,76	129
$PB_a = 0,71 + 0,38 RP - 0,25 RP/PB + 0,01 RP/B2 + 0,01 RP/PSA$	0,88	29
$PB_{ab} = 0,71 + 0,46 RP - 0,21 RP/PB$	0,73	63

Przedstawione powyżej, wstępne wyniki, użyteczności danych chromatograficznych, w badaniu wiązania leków z białkiem osocza krwi, jako efekt zabezpieczający przed szybkim przenikaniem do mleka matki, są pozytywne. Dodatkowe wnioski wynikają z systematycznej obserwacji różnych grup przypadków: kwaśnych, obojętnych i zasadowych. Korelacja wskaźników przenikania z ustalonymi danymi chromatograficznymi w grupie wszystkich przypadków łącznie, jest bardzo obiecująca. Nie różni się znacząco od korelacji dla zawężonych grup: a, b, n, mimo znacznie większej liczebności. Dodatkowy wpływ lipofilowości leków jest tu też bardzo mały. Zmienna ta jest bardzo istotna jedynie dla badania wydzielonej grup związków zasadowych (b), dla których prawdopodobny jest niespecyficzny charakter wiązania z BSA.

W doświadczeniach opisanych powyżej posłużono się grupą badawczą przypadków (198). W dalszym przebiegu badań, zasilono ją grupą związków (tzw. zewnętrznych) używanych w celach testowych (38). Zgromadzono dla nich wszystkie używane w analizie dane, a szczególnie wartości M/P i PB. Wybór składu grupy badanej i zewnętrznej były przypadkowe. Ocena przedstawionych modeli doświadczalnych obejmuje ich uniwersalny charakter, prostotę wykonania, możliwie niski koszt, pracochłonność i czasochłonność. Uniwersalność metod analitycznych to

możliwość bezpiecznego ich stosowania w przypadku dużego zróżnicowania strukturalnego badanych przypadków, bez konieczności wstępnej selekcji. Dlatego założono, że wyniki powinny być odporne na skład grup przypadków. Uznano jednak znaczenie ewentualnego wpływu charakteru kwasowo-zasadowego przypadków. Dalsze porównania i ocena modeli uwzględnia te cechy leków. Jeśli stosowanie modeli analitycznych może podlegać tym wpływom, porównanie pozwoli wprowadzić stosowne poprawki.

Badania zależności przechodzenia do mleka i siły wiązania z białkami kwasów (a), zasad (b) i leków obojętnych (n), wykazały wyraźne różnice, które wynikają z budowy miejsc wiążących białka oraz trwałości tych połączeń. Różne tendencje kwasów, zasad i związków obojętnych do wiązania z białkami wpływa na bezpieczeństwo stosowania tych leków w farmakoterapii matek karmiących.

W pierwszej kolejności zgromadzono wartości zależności M/P i PB z macierzy korelacji zmiennych użytych w badaniu, a następnie z porównania wszystkich związków (grupa badana + testowa). Analiza ta ma na celu potwierdzenie zastosowania chromatografii powinowactwa do białka, w celu prowadzenia badań nad bezpieczeństwem farmakoterapii matki karmiącej. Uzyskane wyniki, dla porównania przedstawiono w jednej tabeli. Liczby przypadków zależne są od liczby zgromadzonych równocześnie danych M/P i PB, dla aktualnej macierzy korelacji.

Wykazano również średnie wartości (z odchyleniem standardowym) PB i M/P w odpowiednich grupach i korelacje pomiędzy nimi (Tabela 18).

Tabela 18. Średnie wartości PB i M/P dla poszczególnych grup leków

Grupa*		n	średnie PB** (odchylenie standardowe)	średnie M/P (odchylenie standardowe)	korelacja
bad.	a	13	0,71 (0,35)	0,24 (0,37)	0,11
+zew.		19	0,69 (0,34)	0,45 (0,69)	-0,30
bad.	n	40	0,69 (0,30)	0,69 (0,68)	-0,39
+zew.		56	0,63 (0,34)	0,70 (0,60)	-0,38
bad.	b	14	0,78 (0,26)	2,73 (3,02)	-0,43
+zew.		30	0,69 (0,29)	1,50 (2,25)	-0,17
bad.	bn	54	0,71 (0,29)	1,22 (1,84)	-0,20
+zew.		86	0,65 (0,33)	1,10 (1,51)	-0,15
bad.	an	53	0,70 (0,31)	0,58 (0,64)	-0,29
+zew.		75	0,64 (0,34)	0,63 (0,63)	-0,37
bad.	ab	27	0,74 (0,30)	1,53 (2,50)	-0,15
+zew.		49	0,69 (0,31)	1,31 (1,93)	-0,15
bad.	abn	67	0,71 (0,30)	1,01 (1,70)	-0,16
+zew.		105	0,66 (0,33)	0,98 (1,41)	-0,16

*bad. – grupa badana; zew. – grupa zewnętrzna

** – odpowiednio PB_a, PB_n, PB_b, PB_{bn}, PB_{an}, PB_{ab}, PB_{abn}

Analiza powyższych wyników wykazuje znaczną odporność korelacji pomiędzy PB i M/P na zmianę liczebności grupy. Zależność ta jest odwrotnie proporcjonalna, co jest wnioskiem oczekiwanym. Pojedynczy wynik dodatni jest tak niewielki (grupa badana jest również mała), że można go uznać za wartość w granicach błędu obliczenia. Średnie wartości PB we wszystkich grupach są bardzo zbliżone. Dotyczy to również ich odchylenia standardowego. Zwiększenie liczebności grupy skutkuje jedynie bardzo małym zmniejszeniem średniej wartości PB. Średnie wartości M/P są znacznie niższe dla związków kwaśnych i obojętnych. Połączenie przedstawicieli tej grupy z zasadami obniża wartości M/P takiego zespołu. Związki zasadowe podnoszą wskaźnik M/P, a kwasy najsilniej obniżają. Ta obserwacja związana jest z wiązaniem tych leków z różnymi białkami. Kwasy wiążą się z albuminami (stosowanymi również w doświadczeniu), zaś zasady z AAG. Należy również zwrócić uwagę na fakt występowania bardzo dużego standardowego odchylenia M/P od wartości średniej we wszystkich grupach przypadków i niezależnie od liczebności grupy. Można to uznać za znaczny wpływ różnorodności przyczyn przenikania leków do mleka matki. Wiązanie leków z białkami jest jednak niewątpliwie ważnym czynnikiem bezpieczeństwa

stosowania leku. Modele analityczne, odwzorowujące warunki wiązania z białkiem, mogą stanowić cenny element badań wstępnych nowych, potencjalnych substancji leczniczych.

Model analityczny, zachowania substancji aktywnej w organizmie żywym, powinien dawać możliwość badania substancji o zmiennej budowie i właściwościach. Ponownie, wynik analizy powinien też być odporny na liczebność badanej grupy przypadków. Poniżej (patrz Tabela 19) przedstawiono wyniki badania kolejnych modeli analitycznych w analizie porównawczej danych chromatograficznych i wiązania z białkami (PB). Badania obejmowały: całą grupę zgromadzonych przypadków leków (abn), kwasy (a), zasady (b), leki obojętne (n) oraz całą grupę leków badanych powiększoną o przypadki zewnętrzne do testów (+zew.).

Tabela 19. Średnie wartości parametrów chromatograficznych: NP, RP i $\log k_{HSA}$ oraz ich korelacje z wartościami wiązania z białkami (PB), dla grup badanych i powiększonych o związku z grupy testowej

Grupa*		n	$\log k_{HSA}^{**}$	PB ^{***}	NP ^{**}	PB ^{***}	RP ^{**}	PB ^{***}
bad.	a	29	0,59 (0,93)	0,63	0,80 (0,21)	0,48	0,80 (0,22)	0,09
+zew.		35	0,54 (0,95)	0,49	0,78 (0,24)	0,56	0,80 (0,25)	0,16
bad.	n	65	0,22 (0,60)	0,60	0,73 (0,25)	0,09	0,72 (0,17)	-0,32
+zew.		80	0,11 (0,63)	0,67	0,75 (0,24)	0,07	0,74 (0,17)	-0,24
bad.	b	34	0,51 (0,50)	0,67	0,48 (0,16)	0,22	0,60 (0,18)	-0,37
+zew.		50	0,43 (0,55)	0,63	0,46 (0,20)	0,03	0,63 (0,19)	-0,45
bad.	bn	99	0,32 (0,58)	0,56	0,64 (0,25)	0,17	0,68 (0,18)	-0,28
+zew.		131	0,24 (0,62)	0,63	0,64 (0,26)	0,09	0,70 (0,19)	-0,28
bad.	an	94	0,33 (0,73)	0,59	0,75 (0,24)	0,21	0,74 (0,19)	-0,15
+zew.		115	0,24 (0,76)	0,58	0,76 (0,24)	0,22	0,76 (0,19)	-0,09
bad.	ab	63	0,55 (0,72)	0,61	0,63 (0,24)	0,37	0,69 (0,22)	-0,05
+zew.		85	0,48 (0,74)	0,54	0,59 (0,26)	0,31	0,70 (0,21)	-0,01
bad.	abn	129	0,38 (0,68)	0,58	0,68 (0,25)	0,24	0,71 (0,20)	-0,16
+zew.		165	0,67 (0,26)	0,57	0,67 (0,26)	0,20	0,72 (0,20)	-0,16

* bad. – grupa badana; zew. – grupa zewnętrzna

** – wartość średnia (odchylenie standardowe)

*** – korelacja z danymi chromatograficznymi

Duże wahania liczebności badanych grup przypadków nie wpływają tu na zmienną zależną. Wszystkie doświadczenia chromatograficzne, z udziałem białek osocza, jako elementu fazy stacjonarnej, stanowią modele analityczne odporne na

efekty przypadkowe. Najlepsze wyniki uzyskano w przypadku doświadczenia $HPLC_{HSA}$. Taki wynik jest oczywisty, ponieważ dane zmiennej zależnej (PB), pobrane z piśmiennictwa, dotyczą wiązania leków z albuminą osocza krwi ludzkiej, która jest elementem budowy fazy stacjonarnej kolumny HSA. Pozostałe doświadczenia prowadzono z użyciem albuminy osocza krwi krowiej BSA. Prezentowane modele powstały w związku z założeniem badania przenikania leków do mleka matki. Korelacja z tym właśnie parametrem stanowi ważny efekt badania.

Porównanie metod statystycznych w badaniach wiązania leków z białkami z wykorzystaniem fizykochemicznych, biologicznych i chromatograficznych deskryptorów

Regresja wielokrotna

W pierwszej części przedstawiono porównanie metod statystycznych w badaniu przenikania leków do mleka matki karmiącej (parametr M/P). W doświadczeniu tym wykazano również ścisły związek tej biodostępności z poziomem wiązania leków z białkami (PB) oraz z poziomem i charakterem jonizacji substancji czynnej. Badanie to objęło zaledwie 83 związki, dla których zaprezentowano dane M/P, LLL H, LactMed i PB równocześnie. Dalej opisano też najskuteczniejsze warunki analizy chromatograficznej, jako modelu analitycznego do przewidywania przenikania leków do mleka matki. Można jednak założyć, że użycie wskaźników wiązalności leków z białkiem, wraz z danymi chromatograficznymi pozwoli prognozować poziom dystrybucji leku do mleka matki. Doświadczenie miało również na celu porównanie zastosowanych metod statystycznych w prognozowaniu potencjalnego M/P. Jak wykazano, analizy MLR oraz RF najskuteczniej opisywały zjawisko farmakokinetyczne, przechodzenia leku do mleka matki, z wykorzystaniem danych chromatograficznych i właściwości fizykochemicznych badanych związków. Analizy te nie odbiegały od znanych zasad dostępności do mleka matki i wykazały, że poziom jonizacji (deskryptory: PhCharge, pKa, log U/D 7.2, eH-eL), wiązanie z białkiem (B3, PB, NP) i lipofilowość (log P) są istotnymi czynnikami wpływającymi na poziom M/P.

Kolejne doświadczenie przeprowadzono na większej grupie związków (167 przypadków), którą ograniczało zgromadzenie przykładów oznaczonego wiązania z białkiem (PB). Wiązanie z białkiem potraktowano tu jako wskaźnik biodostępności leków przez barierę krew-mleko. Bezpośredni związek tego parametru z elementami modelu chromatograficznego, mógł być pomocny w osiągnięciu narzędzia przewidywania M/P. Zbadano jakość wszystkich proponowanych modeli: HPLC_{HSA}, NP TLC i RP TLC. Mimo zwiększenia liczby badanych przypadków (z 83 do 167), wyniki są bardzo podobne do uzyskanych poprzednio. Poziom PB koreluje z danymi chromatograficznymi, uzyskanymi z zastosowaniem modeli analitycznych, najlepszymi dla przewidywania wskaźnika M/P. W doświadczeniu tym nie badano wpływu właściwości fizykochemicznych leków na wartość PB, ani doboru metod statystycznych do budowania modeli matematycznych przewidywania PB. Badania powiązano

ponownie z kwaśnym, obojętnym i zasadowym charakterem przypadków. Ten charakter ma udowodniony wpływ zarówno na PB i M/P.

W tej części, znajdują się badania uzupełniające do poprzednich rozdziałów. Doświadczenia obejmują: ustalenie parametrów fizykochemicznych związanych z wiązaniem leku z białkami; poszukiwania modelu matematycznego przewidywania PB i/lub M/P; zastosowania danych chromatografii powinowactwa fazy stacjonarnej do leków, jako wskaźnik właściwości farmakokinetycznych.

Badano wyniki zastosowania danych z paru doświadczeń analizy chromatograficznej: HPLC_{HSA}, NP TLC i RP TLC oraz dodatkowo HPLC_{IAM} w przewidywaniu wiązania leków z białkiem i biodostępności do mleka matki (patrz Tabela 20). W grupie 167 związków (wszystkie przypadki z ustalonym PB), w której obserwowano leki: kwasowe, zasadowe i obojętne łącznie, najlepszą korelację wykazują wyniki chromatografii badanych związków, w postaci wartości $\log k$ i R_f , z doświadczenia z zastosowaniem HPLC_{HSA} (165 związków, $R=0,39$) i NP TLC (162 związki, $R=0,31$; Tabela 20). Zależność jest wprost proporcjonalna. Taki jest wynik dla wszystkich rodzajów związków. O wiele lepsze wyniki uzyskuje się dla leków kwaśnych (0,50), nawet biorąc pod uwagę mniejszą grupę przypadków ($n = 34$).

Tabela 20. Dane chromatograficzne z eksperymentów TLC i HPLC oraz ich pochodne wykorzystane w analizie modeli analitycznych

zmienna	n_{abn}	n_b	n_n	n_a	PB_{abn}^*	PB_b^*	PB_n^*	PB_a^*
NP	162	49	79	34	0,31	0,31	0,15	0,50
NP/C	162	49	79	34	0,00	-0,11	-0,02	0,50
NP/PSA	162	49	79	34	0,19	0,28	0,17	0,37
NP/B2	162	49	79	34	-0,10	0,02	0,18	-0,69
NP/log P	162	49	79	34	0,12	0,02	-0,20	-0,44
RP	162	49	79	34	0,01	-0,05	-0,20	0,17
RP/C	162	49	79	34	0,12	0,17	0,19	-0,10
RP/PSA	162	49	79	34	0,11	0,21	0,11	-0,03
RP/B2	162	49	79	34	-0,08	0,02	0,07	-0,44
RP/log P	162	49	79	34	0,12	0,09	0,18	0,16
log k_{HSA}	165	49	80	34	0,39	0,28	0,45	0,55
log $k_{HSA}/B2$	165	49	80	36	0,01	0,05	-0,04	0,08
log $k_{HSA}/log P$	165	49	80	36	-0,11	-0,04	-0,16	0,09
log k_{HSA}/PSA	165	49	80	36	0,16	0,11	0,25	0,51
log k_{IAM}	159	49	74	36	0,20	0,17	0,41	0,28
log k_{IAM}/PSA	159	49	74	36	-0,05	-0,04	0,07	-0,07
log $k_{IAM}/log P$	159	49	74	36	0,04	0,11	-0,05	-0,04
log $k_{IAM}/B2$	159	49	74	36	-0,03	-0,06	-0,04	-0,06

*korelacja z danymi chromatograficznymi

Następnie prześledzono wpływ najczęściej wymienianych deskryptorów molekularnych, wskazywanych jako odpowiedzialne za dystrybucję leku do mleka matki i wiązanie z białkami: MW – masa cząsteczkowa, MW/V – stosunek masy do objętości, HD – liczba donorów wiązań wodorowych, HA – liczba akceptorów wiązań wodorowych, DM – moment dipolowy, eH-eL – zdolność do jonizacji, stała jonizacji – pK i log U/D 7.2 – stopień jonizacji leku w środowisku mleka, log D – współczynnik dystrybucji, DM – moment dipolowy, wskaźniki elektronowe związane z jonizacją: eL, eH, eH-eL, log P – współczynnik podziału, biodostępność do mleka matki – wskaźnik M/P_{abn} .

Poniżej przedstawiono wyniki (Tabela 21) obserwacji pojedynczych korelacji z wartością PB i równocześnie przedstawiono liczbę badanych przypadków. W grupie z innymi parametrami, często liczebność przypadków ulega ograniczeniu.

Tabela 21. Parametry fizykochemiczne związków i ich korelacje z danymi dotyczącymi PB

zmienna	n_{abn}	n_b	n_n	n_a	PB_{abn}^*	PB_b^*	PB_n^*	PB_a^*
Acid/base	166				-0,15			
BB_{vivo}	38	8	27	3	0,27	0,24	0,59	0,45
B1	129	34	66	29	0,28	0,36	0,48	0,13
B2	166	50	81	35	0,12	0,13	0,27	0,05
B3	166	50	81	35	0,13	0,11	0,21	0,05
log U/D 7.2	160	50	75	35	0,05	0,16	0,02	0,22
DM	160	47	79	34	-0,02	0,04	-0,04	-0,16
Sa/V	160	47	79	34	-0,29	-0,34	-0,32	-0,04
eH	160	47	79	34	0,05	0,13	-0,02	0,17
MW	162	48	79	35	-0,17	0,14	0,24	0,00
HD	166	50	81	35	-0,23	-0,07	-0,39	-0,23
HA	166	50	81	35	-0,14	-0,16	-0,23	-0,13
eL	160	47	79	35	0,03	0,14	0,00	-0,015
eH-eL	160	50	79	35	0,01	-0,08	-0,01	0,12
log P	160	49	79	35	0,31	0,10	0,34	0,41
log D	160	50	81	35	0,28	0,19	0,38	0,30
MW/V	160	47	79	35	0,03	0,18	0,09	0,03
LactMed	111	35	58	24	-0,05	-0,18	-0,12	0,22
LLL H	143	44	70	24	0,14	-0,33	0,26	0,36
PhCharge	165	50	80	35	-0,13	-0,05	0,06	-0,20
pKa	160	50	75	35	-0,05	-0,15	0,08	0,22
M/P	104	30	55	19	-0,29	-0,20	-0,35	0,11
CNS+/-	154	49	72	33	-0,18	-0,05	0,16	0,33

* korelacja z danymi fizykochemicznymi

We wszystkich grupach przypadków dominującą rolę odgrywają deskryptory molekularne związane z hydro-lipofilowym charakterem leków. Najważniejszymi parametrami są współczynnik podziału i współczynnik dystrybucji (log P, B1 i log D). Zdolność tworzenia wiązań wodorowych (HD, HA) jest tu widoczna, a korelacja z miarą wiązania z białkami jest znacząca. Ten zestaw parametrów fizykochemicznych jest ważny dla wszystkich grup (a, b, n) przypadków. Znaczenia nie wykazują, podobnie do badania przenikania do mleka: stosunek formy obojętnej do zdysocjowanej w pH charakterystycznym dla mleka (log U/D 7,2), stała dysocjacji (pK_a) i zdolność jonizacji związków (eH-eL) oraz pozostałe deskryptory elektronowe eL i eH. Wpływ

parametrów hydrofobowych (S_a , V , MW) widoczny jest tylko w postaci stosunku powierzchni do objętości cząsteczek (S_a/V). W bibliografii proponowano wskaźnik przenikania do mleka – MW/V [143]. Wartość tego parametru nie zyskała jednak potwierdzenia w badaniu wiązania z białkiem (patrz Tabela 21). W tym przypadku znaczenie ma dostępność powierzchni molekuly dla kontaktu z powierzchnią białka. Dlatego zastosowano inny parametr tego rodzaju – S_a/V – stosunek pola powierzchni cząsteczki do objętość van der Waalsa. Jak widać powyżej, czynnik ten jest skorelowany ze wszystkimi rodzajami przypadków odwrotnie proporcjonalnie. Bardzo słabe jest powiązanie z kwasami (a). Ta grupa, mimo najmniejszej liczebności, nie wyróżnia się wysokimi korelacjami z miarą wiązania z białkiem.

Grupy przypadków, opisane poszczególnymi parametrami, nie pokrywają się. Użycie deskryptorów molekularnych łącznie powoduje znaczne ograniczenie przypadków. Wykonano jednak próbę uzyskania modelu matematycznego MLR. Podstawą były dane zamieszczone w Tabeli 22 poniżej

Znaczące jest powiązanie wskaźników M/P , LLL H i PB . Widoczna i odwrotnie proporcjonalna zależność biodostępności leków w pokarmie matki od wiązania z białkiem jest oczywista i potwierdza wybór rodzaju modelu analitycznego do badania i przewidywanie wartości M/P dla leków. Przeprowadzono więc analizę wpływu każdej zmiennej na: wszystkie przypadki (PB_{abn}), zasady (PB_b), związki obojętne (PB_n) oraz kwasy (PB_a). W tym przypadku dane mogą być traktowane jak zmienne niezależne w budowaniu modeli MLR dla wszystkich grup. Wyniki korelacji przedstawiono w Tabeli 22, poniżej. Najważniejsze wpływy widoczne są jednak dla danych chromatograficznych, szczególnie dla doświadczeń $HPLC_{HSA}$ i $HPLC_{IAM}$. Wyniki regresji wielokrotnej dla wszystkich grup są pokazane w Tabeli 23.

Tabela 22. Dane fizykochemiczne, biologiczne i chromatograficzne związków oraz ich korelacje z danymi PB

zmienna	PB _a [*] (n _a =12)	PB _{abn} [*] (n _{abn} =62)	PB _n [*] (n _n =37)	PB _b [*] (n _b =13)	PB _{bn} [*] (n _{bn} =50)	PB _{an} [*] (n _{an} =49)	PB _{ab} [*] (n _{ab} =25)
B1	-0,01	0,29	0,45	-0,16	0,40	0,31	-0,01
B2	0,37	0,45	0,49	0,50	0,49	0,45	0,35
B3	-0,154	0,09	0,20	0,35	0,21	0,07	-0,07
M/P	0,02	-0,17	-0,38	-0,41	-0,18	-0,33	-0,21
pKa	0,38	0,04	0,06	-0,10	0,08	0,02	0,08
log U/D 7.2	0,38	0,05	0,03	0,10	0,03	0,05	0,24
MW/V	-0,12	-0,18	-0,21	0,48	-0,19	-0,19	0,06
HD	-0,38	-0,43	-0,44	-0,50	-0,45	-0,42	-0,40
HA	-0,39	-0,44	-0,48	-0,25	-0,46	-0,46	-0,32
logD	0,50	0,32	0,33	0,59	0,34	0,31	0,43
Sa/V	-0,24	-0,44	-0,49	-0,58	-0,49	-0,43	-0,36
logP	0,41	0,54	0,60	0,35	0,56	0,56	0,40
DM	0,04	-0,06	-0,13	0,20	-0,09	-0,08	0,09
eH	-0,11	0,04	-0,04	0,40	0,11	-0,08	0,15
eL	0,18	0,01	0,04	-0,20	-0,04	0,11	-0,06
eH-eL	-0,15	0,02	-0,06	0,35	0,10	-0,12	0,12
NP	0,57	0,22	0,17	0,50	0,13	0,26	0,45
RP	-0,02	-0,19	-0,27	-0,08	-0,26	-0,19	-0,04
log k _{HSA}	0,58	0,64	0,69	0,72	0,68	0,63	0,62
log k _{IAM}	0,48	0,49	0,71	0,75	0,66	0,50	0,30

*korelacja z danymi fizykochemicznymi, biologicznymi i chromatograficznymi

Tabela 23. Zmienne niezależne w modelach matematycznych przewidywania wartości PB w analizach MLR

Grupa związków	R ²	n	Zmienna zależna	Zmienne niezależne w modelu
abn	0,72	62	PB _{abn}	NP, log k _{HSA} , log k _{IAM} , log D, B3, Sa/V, B2, M/P, log P
a	0,68	12	PB _a	B3, eL, log k _{HSA}
n	0,77	37	PB _n	HA, log D, eL, M/P, Sa/V, log k _{IAM}
b	0,86	13	PB _b	B1, HA, log k _{IAM}
bn	0,82	50	PB _{bn}	HD, NP, HA, B2, eH, log D, Sa/V, M/P, log k _{HSA}
an	0,66	49	PB _{an}	B3, log k _{IAM} , log k _{HSA} , B2, M/P, log P
ab	0,78	25	PB _{ab}	Sa/V, NP, log D, M/P, B3, log k _{HSA}

Korzystny fakt, to widoczne powiązanie parametrów wiązania leków z białkami i przenikania leków do mleka matki. Potwierdza to fakt silnego powiązania obu zjawisk i poprawności postawionej wcześniej tezy badań. Obserwacja wszystkich wskaźników opisujących właściwości farmakokinetyczne i farmakologiczne łącznie pozwalają na obserwację ich związków, choć znacznie ogranicza liczbę przypadków (n = 89). Zwraca uwagę brak zależności pomiędzy dwoma wskaźnikami wiązania z białkiem PB i B3. Bardzo niska korelacja pomiędzy wskaźnikami farmakoterapeutycznymi LLL H i LactMed z wartością M/P potwierdzają obserwacje przedstawione w poprzedniej części (Tabela 24). Ich wartości, które mają charakter umownego kodu, nie mogą być prognozowane przy pomocy ilościowych wskaźników PB oraz M/P, ani odwrotnie.

Tabela 24. Korelacje między deskryptorami obliczeniowymi: B1, B2 i B3 oraz wartościami kodującymi LactMed i LLL H a PB i M/P

n = 89	B2	B3	M/P	LactMed	LL H	PB
B2		0,08	0,06	0,10	0,22	0,12
B3	0,08		-0,05	-0,32	0,01	0,04
M/P	0,06	-0,05		0,27	0,08	-0,35
LactMed	0,11	-0,32	0,27		0,19	-0,03
LLL H	0,22	0,01	0,08	0,19		0,18
PB	0,12	0,04	-0,35	-0,03	0,18	

Wykonana analiza regresji wielokrotnej, metodą krokową postępującą wykazuje, że 18% zmienności wiązania leków z białkiem można przewidywać na podstawie ich obecności w mleku matki M/P, poziomu bezpieczeństwa farmakoterapii LLL H i wskaźnika biodostępności do mózgu B2.

Niestety nie udało się uzyskać korzystnego algorytm dla przewidywania wiązania z białkami, który byłby powtarzalny dla różnej liczebności grup. Można jednak wskazać parametry fizykochemiczne i dane chromatograficzne dla przeprowadzenia badania DFA.

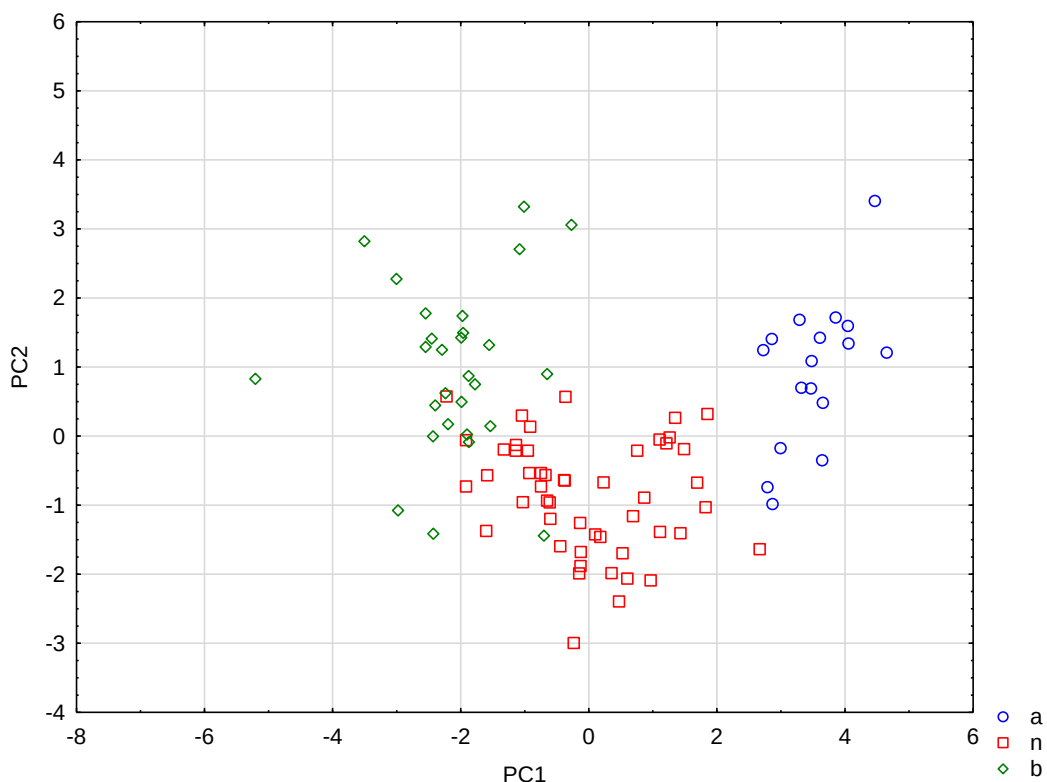
Analiza dyskryminacyjna

Wszystkie deskryptory, najsilniej związane ze zmiennością wskaźnika PB, które równocześnie nie ograniczały liczby badanych przypadków, wprowadzono do analizy funkcji dyskryminacyjnej (DFA). Były to: NP, $\log k_{HSA}$, $\log k_{IAM}$, $\log D$, B3, Sa/V, B2, M/P, $\log P$, eL, HA, B1, eH, HD, jako zmienne niezależne charakteryzujące różne grupy przypadków i charakterystyki wiązania z białkiem. Wszystkie przypadki badano przy zastosowaniu kodu b/n/a. Kod, podobnie jak we wcześniejszej analizie, przypisuje związkom zasadowym (b) liczbę „1”, związkom obojętnym (n) liczbę „0” i kwaśnym (a) liczbę „-1”.

W krokowej analizie dyskryminacyjnej, do zmiennych dyskryminujących zaliczono 9 z 16 wprowadzonych zmiennych: PhCharge, B2, pKa, M/P, $\log k_{HSA}$, $\log k_{IAM}$, NP, eL, $\log U/D$. Klasyfikowano 95 przypadków (liczba ograniczona wprowadzonymi zmiennymi łącznie). Uzyskano macierz klasyfikacji o łącznej wartości 95,79% poprawnej klasyfikacji (Tabela 25). Liczba błędnie sklasyfikowanych przypadków jest proporcjonalna do liczebności grup. Odnotowano 4 błędy wśród związków obojętnych i zasadowych oraz bezbłędne przyporządkowanie związków kwaśnych (Rysunek 23).

Tabela 25. Macierz klasyfikacji dla modelu z wykorzystaniem zmiennych dyskryminujących (PhCharge, B2, pKa, M/P, $\log k_{HSA}$, $\log k_{IAM}$, NP, eL, $\log U/D$)

grupy	Przypadki sklasyfikowane poprawnie (%)	a p=,17895	n p=,52632	b p=,29474
a	100,00	17	0	0
n	96,00	0	48	2
b	92,86	0	2	26
Razem	95,80	17	50	28



Rysunek 23. Dyskryminacja na kwasy (a), zasady (b) i leki obojętne (n). Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwiastka 1 względem pierwiastka 2. Zmienne dyskryminujące: PhCharge, B2, pKa, M/P, $\log k_{HSA}$, $\log k_{IAM}$, NP, eL, $\log U/D$.

Tabela 26. Funkcje klasyfikacyjne dla grup a, b i n

zmienne	a p=,17895	n p=,52632	b p=,29474
PhCharge	-3,4012	1,2691	4,3132
pKa	0,6143	1,4345	1,8691
B2	-2,9243	-0,7532	0,9106
log k_{HSA}	4,8380	-0,4787	0,1620
log k_{IAM}	-1,5475	0,7210	0,8429
NP	7,1415	12,2796	7,3366
log U/D 7.2	-1,0509	-0,0770	-0,6322
eL	0,0688	-0,1067	0,0013
M/P	0,4784	0,5712	1,4193
Stała	-11,8346	-11,8008	-16,7240

Czynnik PC1 najsilniej dyskryminuje grupy związków (wartość własna PC1 = 3,61). Najważniejszy udział w jego wartości mają zmienne PhCharge i pKa. Ich wpływ na dyskryminację przypadków a, n i b jest oczywisty. Czynnik PC2 (wartość własna PC2 = 0,81) ukształtowały wskaźniki chromatograficzne oraz zdolność do jonizacji. Średnie zmiennych kanonicznych (PC1) dla grupy a = -3.52, dla grupy n = 0.03 i dla grupy b = 2.08. PC1 najsilniej dyskryminuje grupy a i b. Średnie zmiennych kanonicznych (PC2) dla grupy a = -0.93, dla grupy n = 0.86 i dla grupy b = -0.97. W tym przypadku centroidy grup a i b są prawie jednakowe. Najlepiej dyskryminowana jest grupa związków obojętnych n.

Na tej podstawie stwierdzić można wpływ charakteru kwasowego, zasadowego i obojętnego leków na ich zdolność wiązania z białkami i zdecydować, czy analiza bezpieczeństwa farmakoterapii matek karmiących (przewidywania M/P) musi być prowadzona z podziałem na grupy: a, n i b. Obliczone wartości lambda Wilksa dla obu pierwiastków: PC1 i PC2 potwierdzają wartość uzyskanych wyników (0,11 i 0,54).

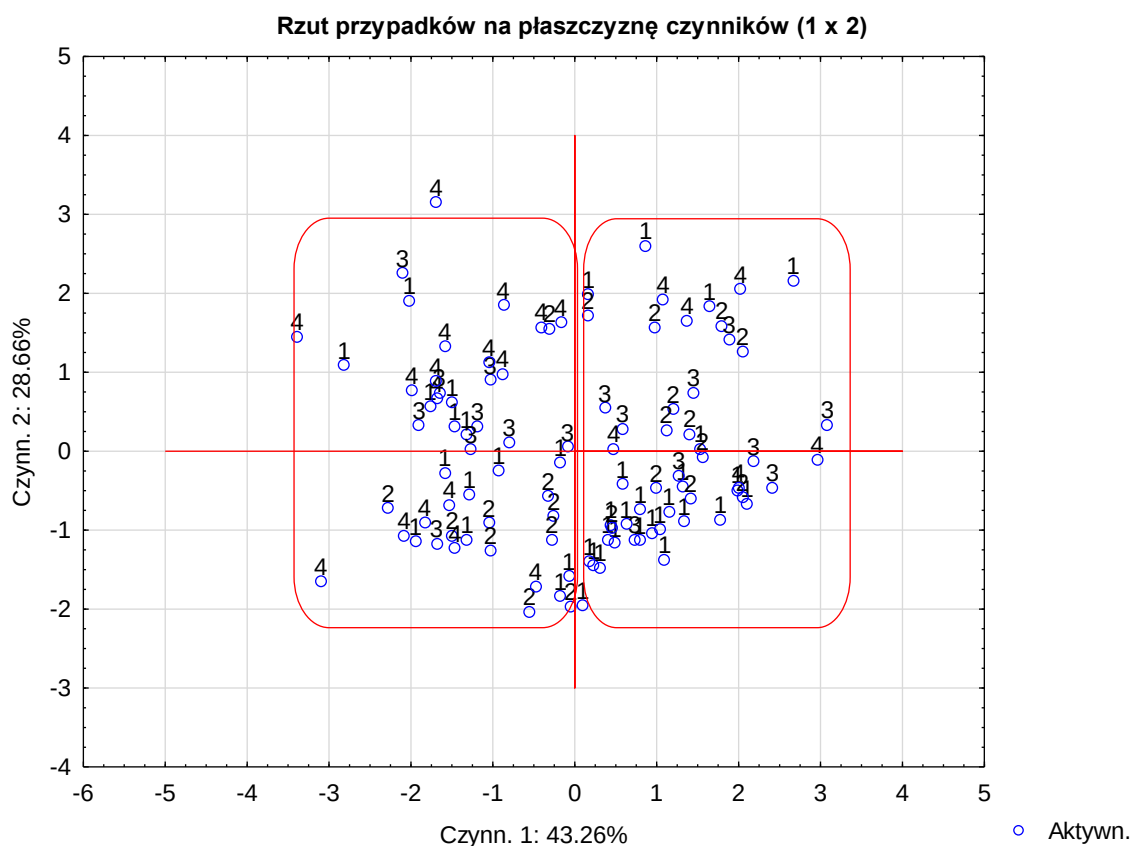
Uzyskane wyniki nie mogą być podstawą przewidywania bezpieczeństwa stosowania leków. Jedyne poprawne klasyfikacje uzyskano z udziałem wartości doświadczalnych M/P, PB i BB_{vivo}. W takim przypadku przewidywanie klasyfikacji LactMed lub LLL H nie jest już konieczne. DFA podkreśla jednak widocznie znaczenie dyskryminujące danych chromatograficznych proponowanego modelu analitycznego. Wykazuje również wpływ wiązania z białkiem i biodostępności leków w OUN na bezpieczeństwo ich stosowania przez matki karmiące.

Analiza składowych głównych

Wykonano analizę składowych głównych w celu ustalenia wpływu podstawowych deskryptorów na charakterystykę zdolności przenikania leków do mleka matki. Przypadki badane stanowiły tylko związki z ustaloną wartością M/P. W celu lepszego obrazowania uzyskanych wyników analizy, wartości M/P przekształcono w skalę poziomu przenikania leku do mleka – M/P_{kod} . Wartości tego wskaźnika mieszczą się w granicach 1-4. Kod 1 odpowiada lekom o wartości $M/P < 0,40$ – całkowicie bezpieczne; 2 odpowiada zakresowi 0,40-0,80 – na granicy bezpieczeństwa; 3 zakresowi 0,81-1,20 – prawdopodobnie przekraczające granicę bezpieczeństwa; 4 to $M/P > 1,20$ – niebezpieczne. W przebiegu analizy ustalono początkowo najmniejszą liczbę składowych głównych tłumaczącą maksymalny zakres wariancji całkowitej w grupie.

Pięć czynników wyjaśnia 100% zmienności poziomu przenikania leków do mleka matki. Dwa pierwsze czynniki – PC1 i PC2 (składowe główne) opisane są przez wszystkie zastosowane deskryptory. W wyniku otrzymano dwie składowe główne wyjaśniające łącznie 72% zmienności. Za pierwszą składową PC1 (43,26%) odpowiedzialne są dane chromatograficzne $HPLC_{HSA}$, $HPLC_{IAM}$, NP TLC i RP TLC, drugą składową PC2 (28,66%) kształtuje wartość PB.

Projekcja przypadków na płaszczyznę $PC1 \times PC2$ przedstawiona jest poniżej (Rysunek 24):



Rysunek 24. Projektacja przypadków na płaszczyznę $PC1 \times PC2$

Na podstawie analizy rozproszenia przypadków na wykresie 2D zależności $PC1$ od $PC2$ widoczne jest, że wariancja powinowactwa leków do wiązania z białkami powoduje rozróżnienie ich pod względem poziomu przenikania do mleka matki. Wszystkie parametry wykorzystane w analizie są powiązane z tym zjawiskiem. Tym samym analiza składowych głównych potwierdza wartość chromatograficznych modeli analitycznych M/P wybranych na podstawie wartości PB.

Na wykresie projekcji przypadków na płaszczyznę czynników, gdzie zmienną grupującą jest skala przenikania leku do mleka matki (M/P_{kod}) widać, że badane związki można podzielić na dwie grupy (na wykresie otoczone ramką). W jednej znalazły się leki o niższym poziomie przenikania M/P 1-2 – bezpieczne, a w drugiej grupie M/P 3-4 – niebezpieczne. Podział ten nie jest zupełnie oczywisty. Powstał na podstawie czynników tłumaczących 75% zmienności. Widoczne są nieliczne przykłady niewłaściwej klasyfikacji. Rozgraniczenie tych grup związane jest z $PC1$. Pochodne o niskich M/P położone są po prawej stronie wykresu i związane są wyraźnie z dodatnimi wartościami $PC1$. Związki łatwo przenikające do mleka znalazły się po lewej stronie wykresu

i przyjmują ujemne wartości PC1. Udział zmiennych w tej składowej, określony przez korelację PC1-zmienne (ładunki czynnikowe), ujawnia parametry o największym znaczeniu dla badanej cechy farmakokinetycznej leków. Są nimi: $\log k_{HSA}$, $\log k_{IAM}$, NP oraz RP. I tak chromatografia powinowactwa, oparta na wiązaniu z białkiem, może prognozować biodostępność leku do mleka matki.

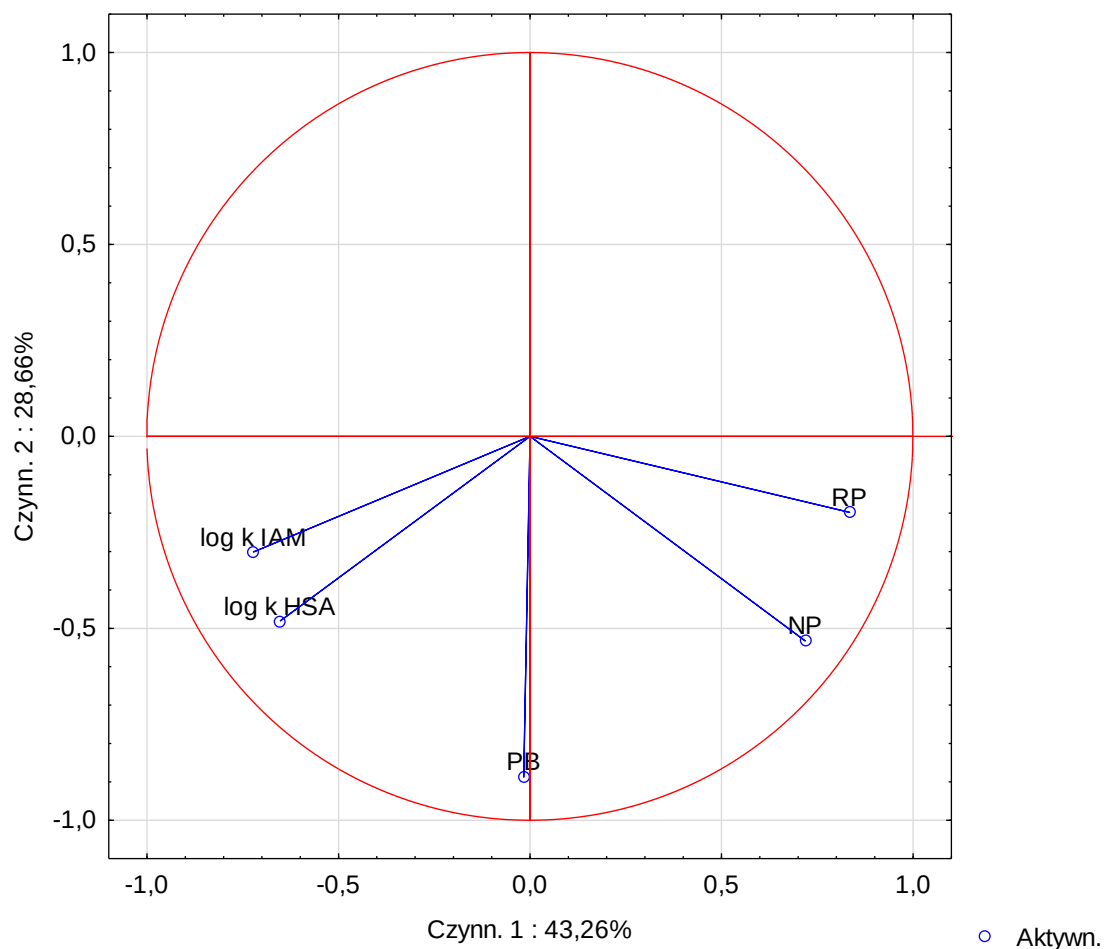
Obliczono także współrzędne czynnikowe zmiennych, na podstawie korelacji ze składową. W tabeli przedstawiono dwie pierwsze składowe główne PC1-2 w postaci ładunków wektorowych (współrzędnych czynnikowych) dla zmiennych aktywnych (Tabela 27).

Tabela 27. Wartości ładunków wektorowych i korelacji zmiennych dla PC 1 i 2 związków aktywnych

zmienne	Czynnik 1	Czynnik 2
PB	-0,016238	-0,887216
NP	0,718351	-0,532494
RP	0,834436	-0,197707
$\log k_{HSA}$	-0,653187	-0,481749
$\log k_{IAM}$	-0,723796	-0,301762

Na wykresie projekcji zmiennych na płaszczyznę PC ujawnia się w sposób graficzny zależność pomiędzy składową a zmienną. Wykres pokazuje tak zwane koło jednostkowe, czyli maksymalna korelację, wynoszącą 1, pomiędzy zmienną a czynnikiem. Im dana zmienna znajduje się bliżej linii koła jednostkowego, tym większa jej korelacja z obserwowanym zjawiskiem.

Projekcja zmiennych na płaszczyznę czynników PC1 x PC2 (Rysunek 25):



Rysunek 25. Projekcja zmiennych na płaszczyznę czynników (1 x 2)

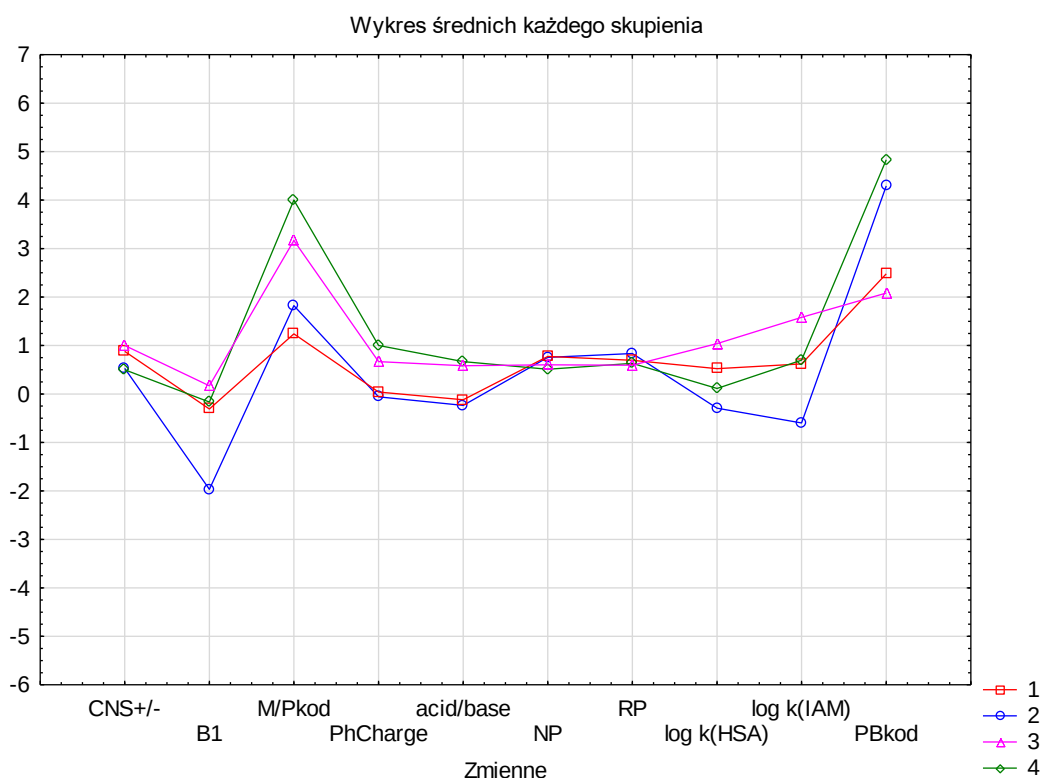
Na podstawie tej analizy można powiedzieć, że dane chromatografii powinowactwa leków do wiązania z białkiem, w postaci zaproponowanych modeli analitycznych, oraz samo wiązanie z białkiem, jako podstawa planowania doświadczenia, są najważniejszymi parametrami w przewidywaniu przenikania leków do mleka matki.

Analiza skupień

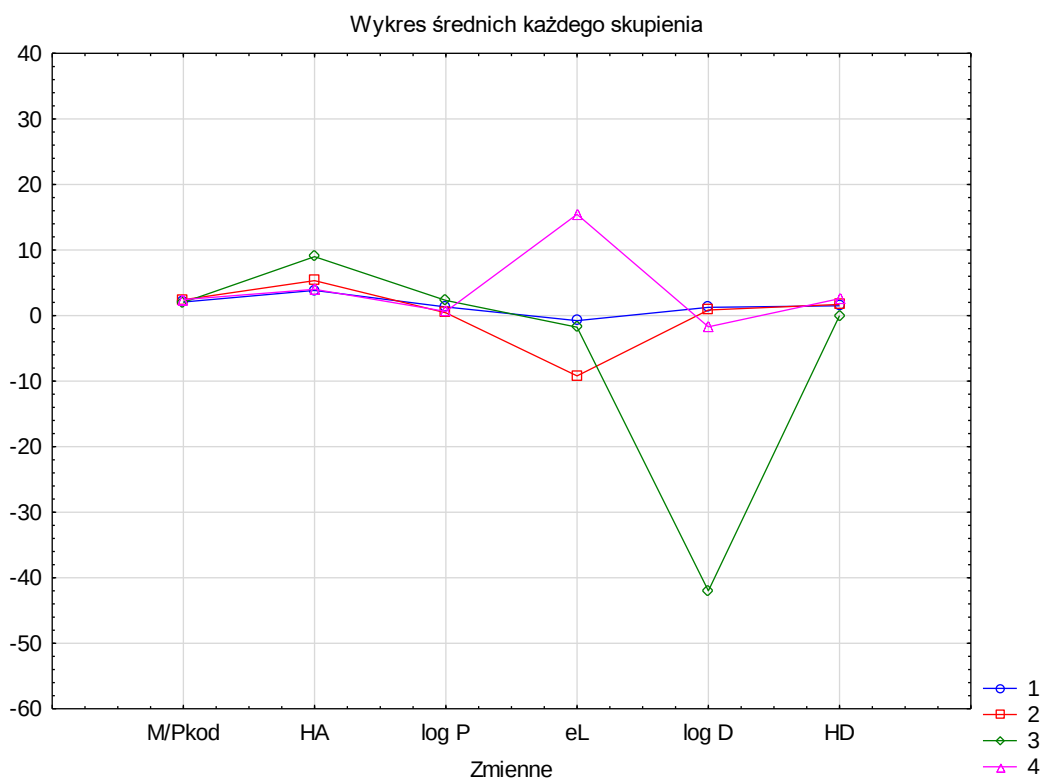
Dla podkreślenia wartości diagnostycznej doświadczenia i określenia różnicy wartości parametrów decydujących o zdolności przenikania leków do mleka matki, w zaproponowanej skali M/P_{kod} , przeprowadzono też analizę skupień (Cluster Analysis; CA) metodą k-średnich. Średnie najważniejszych deskrytorów właściwości leku (CNS+/-, B1, PhCharge, acid/base, NP, RP, log k_{HSA}, log k_{AM} i PB.) porównano dla grup M/P_{kod} 1-4. Sposób tworzenia grup kodowych 1-4 opisano w doświadczeniu

analizy składowych głównych. W tej skali przenikania leku do mleka, przypisano wartości M/P, odpowiednio oznaczenia kodowe: 1, 2, 3 i 4.

Jak pokazano, wszystkie parametry właściwości biologicznych leków, wykazały zmienność grupową (patrz Rysunek 26). Wartości M/P_{kod} rozciągają się na przestrzeni skali od 1 do 4 z wyraźnym rozróżnieniem grup względnie bezpiecznych i niebezpiecznych. Parametry właściwości fizykochemicznych: PB, acid/base, HD, log P, eL, log D również wykazuje zróżnicowanie, ale nie we wszystkich przypadkach. Niestety M/P_{kod} i PB_{kod} są tu zbyt skupione, co wskazuje na mniejszy wpływ badanych właściwości na obserwowaną cechę (Rysunek 27). Największe zróżnicowanie wykazują deskrytory: log D i eL.



Rysunek 26. Średnie wartości deskryptorów w analizie skupień M/P_{kod} (metoda k-średnich) z użyciem deskryptorów biologicznych i chromatograficznych



Rysunek 27. Średnie wartości deskryptorów w analizie skupień M/P_{kod} (metoda k-średnich) z użyciem deskryptorów fizykochemicznych

W powyższych analizach potwierdzono wartość parametrów HA, log P, log D, eL. Największe zróżnicowanie wykazują parametry log D, HA, eL. Niestety wartości M/P_{kod} są słabo zróżnicowane i ich wartości nie odpowiadają zmienności innych deskryptorów. Wykorzystywane analizy: MLR i DFA wyłoniły grupę parametrów fizykochemicznych i chromatograficznych, ważnych dla biodostępności leków do mleka. Zastosowanie CA podkreśliło zróżnicowanie ich średnich wartości w grupach M/P 1-4.

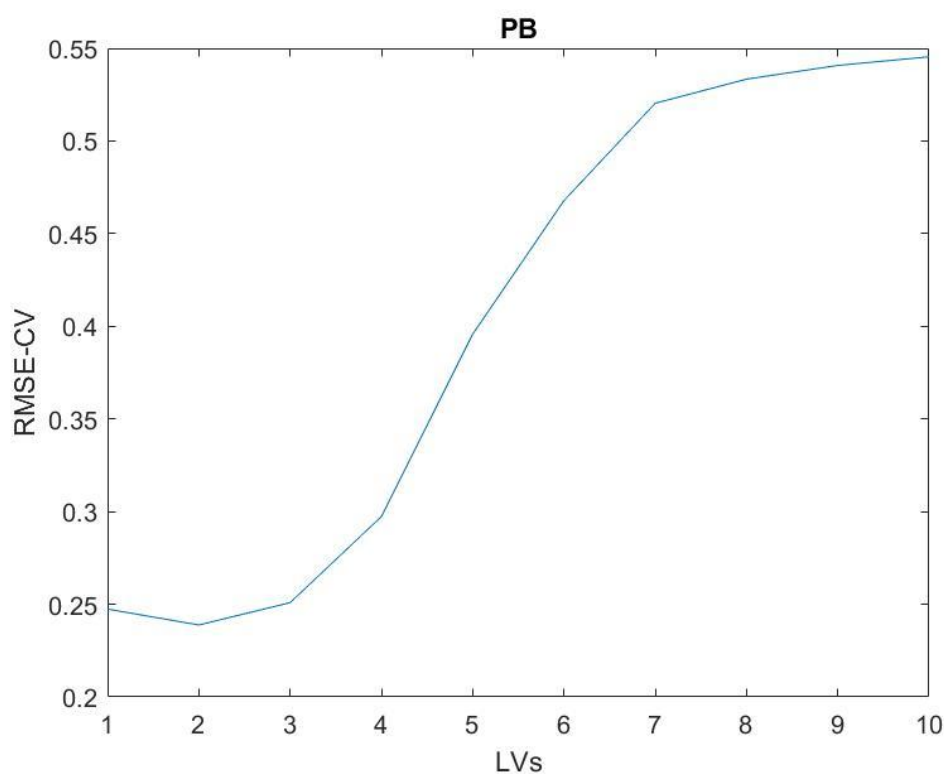
Regresja metodami najmniejszych cząstkowych kwadratów i lasu losowego

W związku z trudnościami w stworzeniu modelu z wykorzystaniem parametrów chromatograficznych i fizykochemicznych metodą MLR, podjęto próbę analizy wiązania z białkiem innymi metodami regresji. Do wykonania regresji najmniejszych cząstkowych kwadratów i lasu losowego użyto 167 badanych związków (129 pierwotnie analizowanych i 38 z grupy zewnętrznej) oraz 22-23 zmiennych

niezależnych. Ta rozbieżność wynika z różnic w liczbie parametrów chromatograficznych pozyskanych z eksperymentów TLC i HPLC_{HSA}. Wykorzystane zmienne są wymienione przy każdym modelu (Tabele 28, 29 i 31). W trakcie analizy 167 związków zostało losowo podzielone na zestaw treningowy – 70% całości (TRAIN, n = 115 związków) i zestaw testowy do walidacji zewnętrznej – 30% całości (TEST, n = 50).

Model PLS

W analizie PLS średnia kwadratowa błędów walidacji krzyżowej (RMSECV) modelu treningowego regresji PLS sugeruje, że model dwóch zmiennych ukrytych jest optymalny (Rysunek 28).

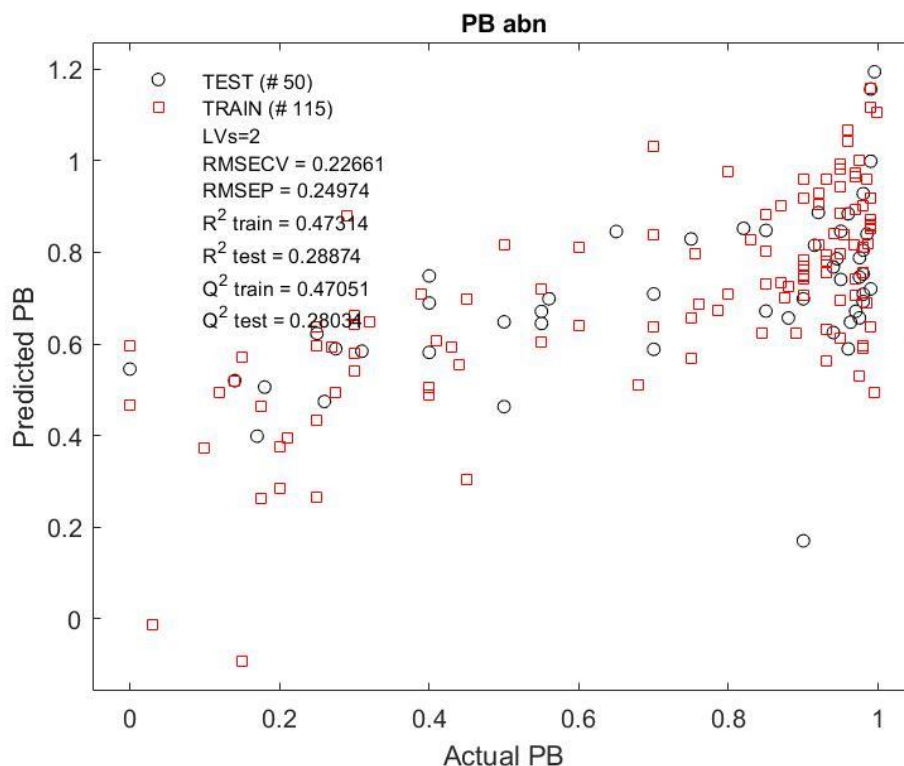


Rysunek 28. Błąd średniokwadratowy walidacji krzyżowej (RMSECV) jako funkcja ukrytych zmiennych (LV). Najniższa wartość RMSECV wskazuje optymalną liczbę ukrytych zmiennych

Model PLS (Rysunek 29) z wykorzystaniem 23 zmiennych niezależnych związanych z eksperymentem NP TLC oraz właściwościami fizykochemicznymi (Tabela 28), wykazał niskie wartości R^2 i Q^2 ; ok. 0,47 oraz jeszcze niższe wyniki walidacji zewnętrznej: ok. 0,28.

Tabela 28. 23 zmienne niezależne z danymi TLC użyte do stworzenia modelu metodą najmniejszych cząstkowych kwadratów i lasu losowego dla PB_{abn}

Lp.	zmienna niezależna	Lp.	zmienna niezależna	Lp.	zmienna niezależna
1.	B3	9.	NP/B2	17.	eH
2.	PhCharge	10.	NP/log P	18.	eL
3.	acid/base	11.	MW	19.	eH-eL
4.	pKa	12.	log MW	20.	logD
5.	log U/D 7,2	13.	PSA	21.	Sa
6.	C	14.	HD	22.	V
7.	NP	15.	HA	23.	logP
8.	NP/C	16.	DM		

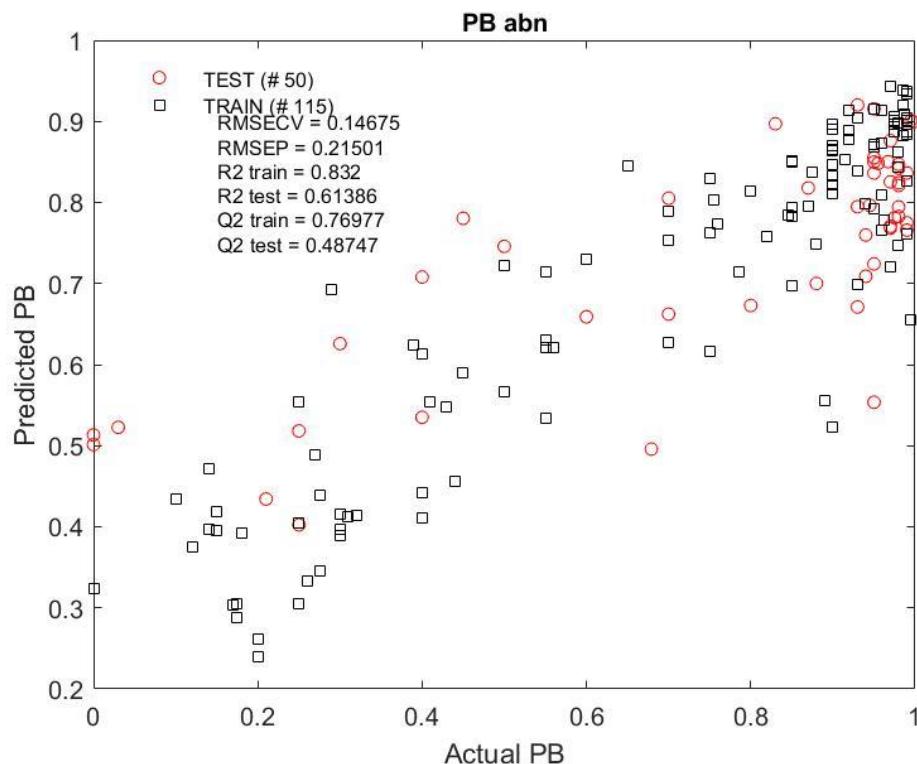


Rysunek 29. Rzeczywiste w porównaniu z przewidywanymi wartości PB_{abn} , przy użyciu modelowania PLS i 23 deskryptorów molekularnych. LVs = zmienne ukryte, RMSECV = średni kwadratowy błąd walidacji krzyżowej, RMSEP = średni kwadratowy błąd prognozowania, R^2 train/test = współczynnik determinacji dla modeli zestawu treningowego i testowego, Q^2 train/test = współczynnik determinacji dla modeli poddanych walidacji krzyżowej.

Jeszcze niższe wartości osiągnięto przy użyciu danych chromatograficznych RP TLC i HPLC_{HSA}. Wskazuje to, że podobnie jak w przypadku modeli przewidywania przenikania do mleka matki, metoda PLS ponownie nie znajduje tutaj szerszego zastosowania i nie jest odpowiednią metodą do analizy tego typu danych. Z tego powodu nie kontynuowano dalszych badań poszczególnych grup leków (PB_a , PB_b , PB_{an} itd.).

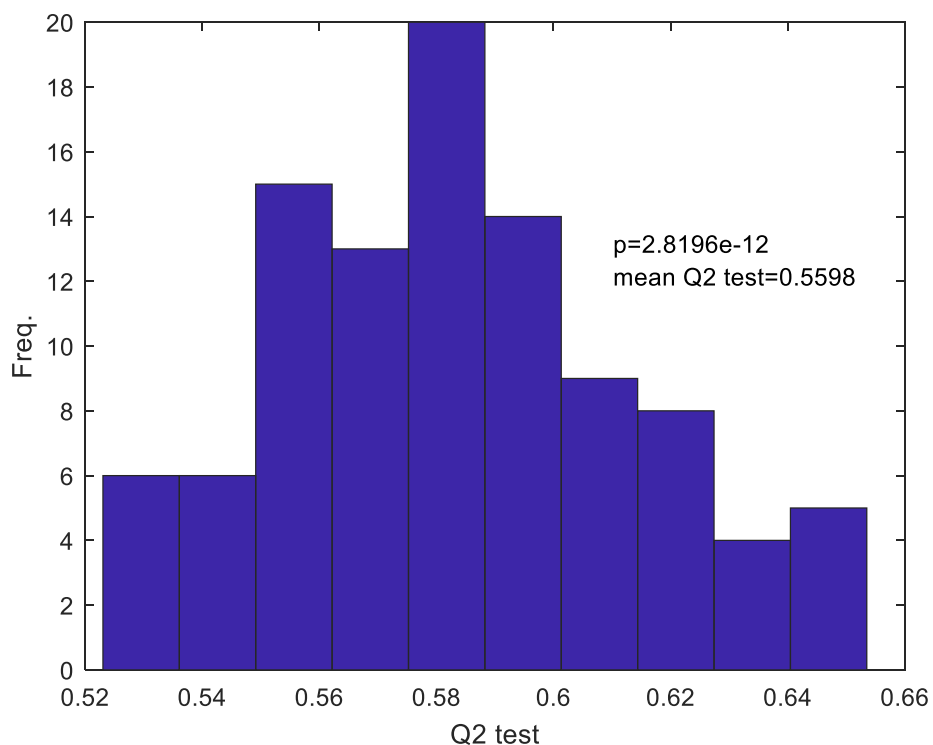
Modele RF

Podjęto próbę regresji metodą lasu losowego, z użyciem 150 wygenerowanych drzew losowych. Na początek zastosowano dane z NP TLC. Zmienne niezależne użyte do analizy wszystkich 167 przypadków (PB_{abn}), są takie same jak w analizie PLS i wymienione w Tabeli 28.



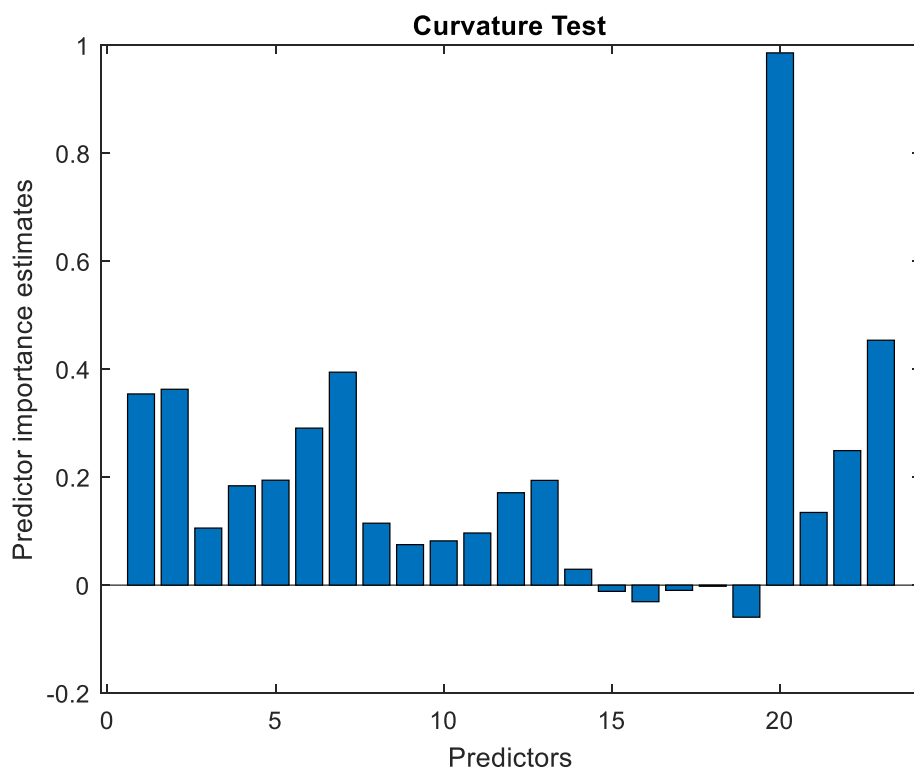
Rysunek 30. Rzeczywiste w porównaniu z przewidywanymi wartości PB_{abn} , przy użyciu regresji RF i 23 deskryptorów molekularnych, w tym tych związanych z TLC.

Uzyskany model (Rysunek 30) wykazał zadowalające wyniki, szczególnie zestawu treningowego ($n_{abn} = 115$): $R^2_{train} = 0,83$; $Q^2_{train} = 0,77$. Wyniki walidacji zewnętrznej, przy użyciu zestawu testowego ($n_{abn} = 50$) były niższe: $R^2_{test} = 0,61$; $Q^2_{test} = 0,49$. Test Permutacji Monte Carlo wykazał średnią wartość parametru Q^2_{test} równą 0,56 (Rysunek 31), czyli nieco wyższą niż w prezentowanym modelu.



Rysunek 31. Test permutacji Monte Carlo (MCPT) pokazujący Q^2 uzyskane z modeli regresji PLS opracowanych na zestawie testowym, liczba powtórzeń wynosiła $n = 100$. Średnia wartość Q^2 wynosiła 0,5598 przy poziomie istotności $p = 2,8196 \times 10^{-12}$

Wpływ poszczególnych zmiennych niezależnych na model przedstawiona jest na wykresie poniżej (Rysunek 32). Kolejność przedstawionych na nim deskryptorów jest taka jak w Tabeli 28. Najsilniejszy wpływ na model z wykorzystaniem danych z NP TLC wykazuje parametr log D.



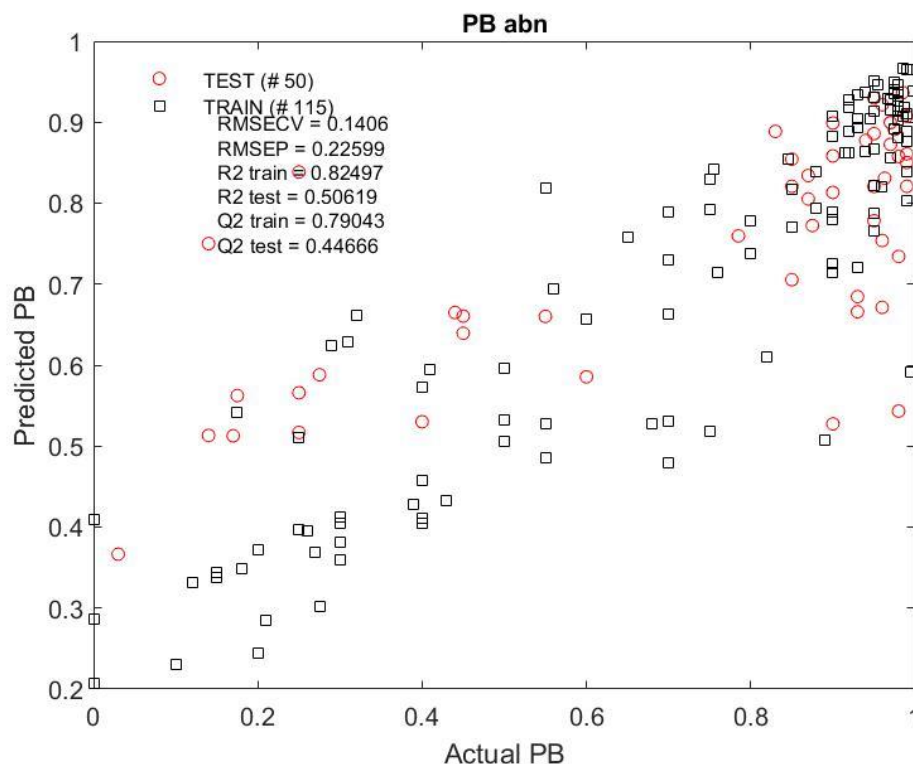
Rysunek 32. Udział poszczególnych deskryptorów (Tabela 28) na tworzenie modelu regresji RF dla PB_{abn} . Największy wpływ wykazuje zmienna nr 20, czyli log D.

Model wykorzystaniem danych RP TLC wykazywał niższe wartości, szczególnie w walidacji zewnętrznej ($Q^2_{test} = 0,32$). Następnie do regresji RF użyto danych z eksperymentu $HPLC_{HSA}$ (Tabela 29).

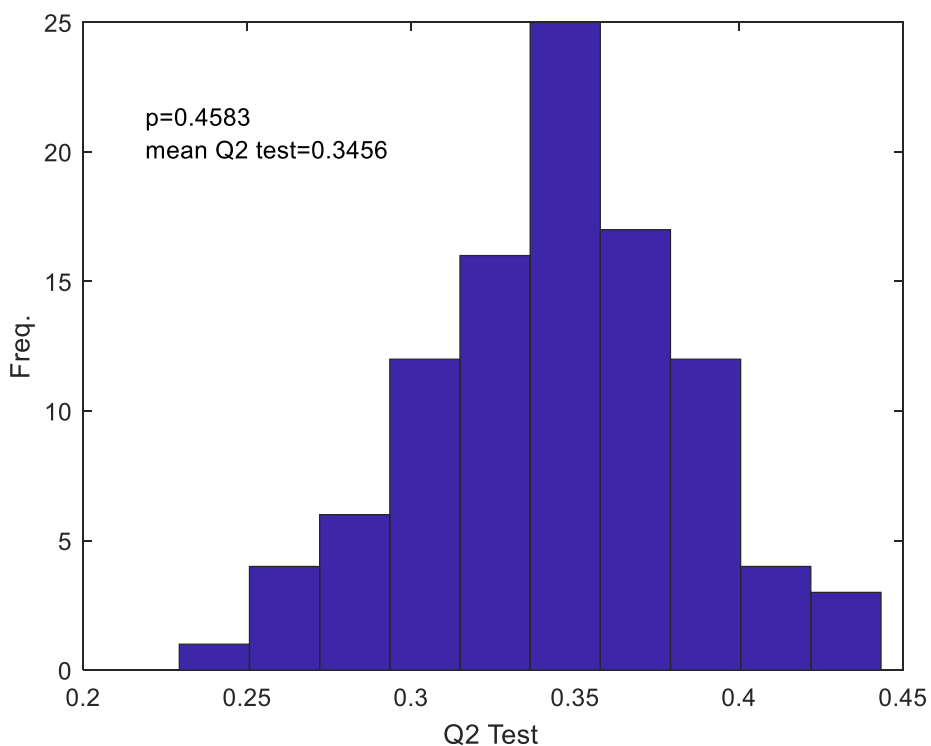
Tabela 29. 22 zmienne niezależne z danymi HPLC użyte do stworzenia modelu metodą lasu losowego dla PB_{abn}

Lp.	zmienna niezależna	Lp.	zmienna niezależna	Lp.	zmienna niezależna
1.	B3	9.	$\log k_{HSA}/\log P$	17.	eL
2.	PhCharge	10.	MW	18.	eH-eL
3.	acid/base	11.	$\log MW$	19.	$\log D$
4.	pKa	12.	PSA	20.	Sa
5.	$\log U/D 7.2$	13.	HD	21.	V
6.	k_{HSA}	14.	HA	22.	$\log P$
7.	$\log k_{HSA}$	15.	DM		
8.	$\log k_{HSA}/B2$	16.	eH		

Uzyskany model (Rysunek 33) ponownie ma dobre wyniki zestawu treningowego ($n_{\text{abn}} = 115$): $R^2_{\text{train}} = 0,82$; $Q^2_{\text{train}} = 0,79$ ale dużo niższe parametry uzyskano przy walidacji zewnętrznej ($n_{\text{abn}} = 50$): $R^2_{\text{test}} = 0,50$; $Q^2_{\text{test}} = 0,47$; w MCPT wartość Q^2_{test} była już na niskim poziomie i wynosiła 0,35 (Rysunek 34).

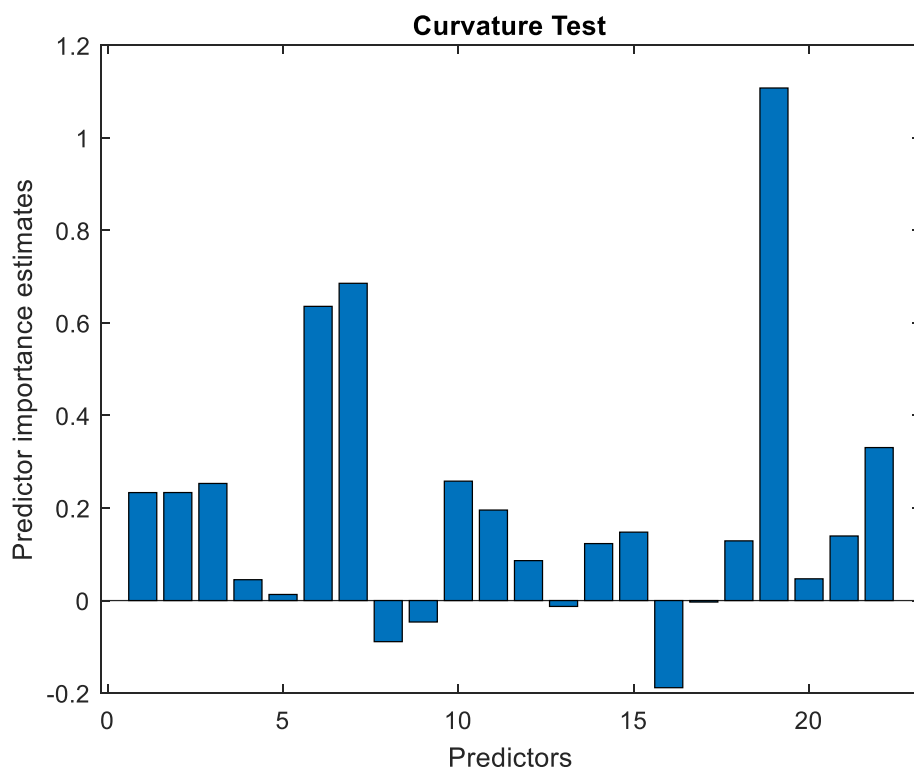


Rysunek 33. Rzeczywiste w porównaniu z przewidywanymi wartości PB_{abn} , przy użyciu regresji RF i 22 deskryptorów molekularnych w tym parametrów z $HPLC_{\text{HSA}}$. RMSECV = średni kwadratowy błąd walidacji krzyżowej, RMSEP = średni kwadratowy błąd prognozowania, $R^2_{\text{train/test}}$ = współczynnik determinacji dla modeli zestawu treningowego i testowego, $Q^2_{\text{train/test}}$ = współczynnik determinacji dla modeli poddanych walidacji krzyżowej.



Rysunek 34. Test permutacji Monte Carlo (MCPT) pokazujący Q^2 uzyskane z modeli regresji PLS opracowanych na zestawie testowym, liczba powtórzeń wynosiła $n = 100$. Średnia wartość Q^2 wynosiła 0,3456 przy poziomie istotności $p = 0,4583$.

W tym przypadku również $\log D$ miało największy udział w tworzeniu modelu (Rysunek 35), ale widoczny jest dodatkowo duży udział deskryptorów chromatograficznych nr 6 i 7 (z Tabeli 29) czyli k_{HSA} i $\log k_{HSA}$.



Rysunek 35. Udział poszczególnych deskryptorów (Tabela 29) na tworzenie modelu regresji RF dla PB_{abn} . Największy wpływ wykazuje zmienna nr 19, czyli $\log D$ oraz dwie zmienne chromatograficzne (nr 6 i 7): k_{HSA} i $\log k_{HSA}$

Następnie zajęto się poszczególnymi grupami związków, czyli osobno (a), (b) i (n) oraz grupami łączonymi (an), (bn) i (ab). Wyniki przedstawiono w Tabeli 30. Do tworzenia modeli wykorzystano tylko dane z chromatografii NP TLC (Tabela 31), która podczas badania całego zestawu związków ($n_{abn} = 167$) dały najlepsze rezultaty.

Tabela 30. Wyniki regresji metodą lasu losowego na poszczególnych zestawach leków

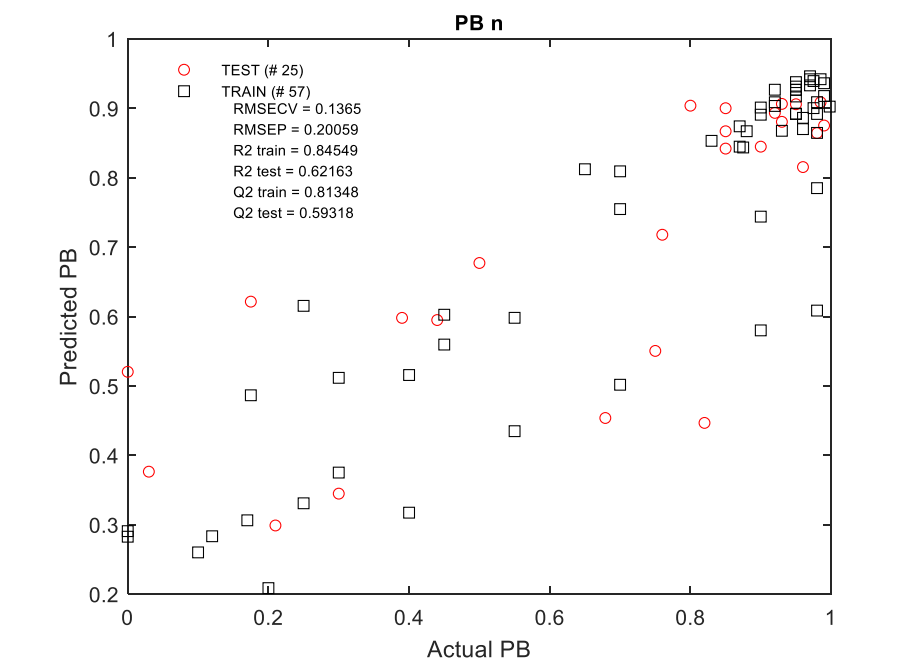
grupa	zestaw treningowy	zestaw testowy
PB_a	$n = 24$ $R^2 = 0,78$; $Q^2 = 0,62$	$n = 11$ $R^2 = 0,29$; $Q^2 = 0,11$
PB_b	$n = 35$ $R^2 = 0,88$; $Q^2 = 0,80$	$n = 15$ $R^2 = 0,33$; $Q^2 = 0,29$
PB_n	$n = 57$ $R^2 = 0,85$; $Q^2 = 0,81$	$n = 25$ $R^2 = 0,62$; $Q^2 = 0,59$
PB_{an}	$n = 82$ $R^2 = 0,82$; $Q^2 = 0,74$	$n = 35$ $R^2 = 0,60$; $Q^2 = 0,55$
PB_{bn}	$n = 92$ $R^2 = 0,85$; $Q^2 = 0,80$	$n = 40$ $R^2 = 0,44$; $Q^2 = 0,44$
PB_{ab}	$n = 59$ $R^2 = 0,80$; $Q^2 = 0,72$	$n = 26$ $R^2 = 0,38$; $Q^2 = 0,33$

Tabela 31. 22 zmienne niezależne z danymi NP TLC użyte do stworzenia modeli lasu losowego dla poszczególnych grup leków podzielonych ze względu na charakter kwasowo-zasadowy

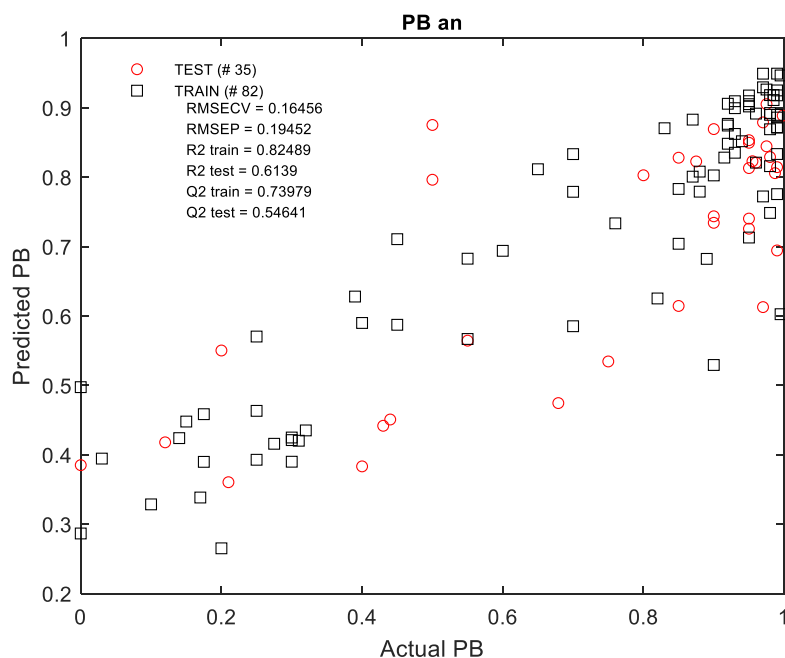
Lp.	zmienna niezależna	Lp.	zmienna niezależna	Lp.	zmienna niezależna
1.	B3	9.	NP/log P	17.	eL
2.	PhCharge	10.	MW	18.	eH-eL
3.	pKa	11.	log MW	19.	log D
4.	log U/D 7.2	12.	PSA	20.	Sa
5.	C	13.	HD	21.	V
6.	NP	14.	HA	22.	log P
7.	NP/C	15.	DM		
8.	NP/B2	16.	eH		

Modele RF dla PB_a ($n_a = 35$) i PB_b ($n_b = 50$) dały słabe wyniki, szczególnie w walidacji zewnętrznej, podobnie ich grupa łączona ($n_{ab} = 85$), gdzie wyniki walidacji zewnętrznej były w granicach 0,4-0,3.

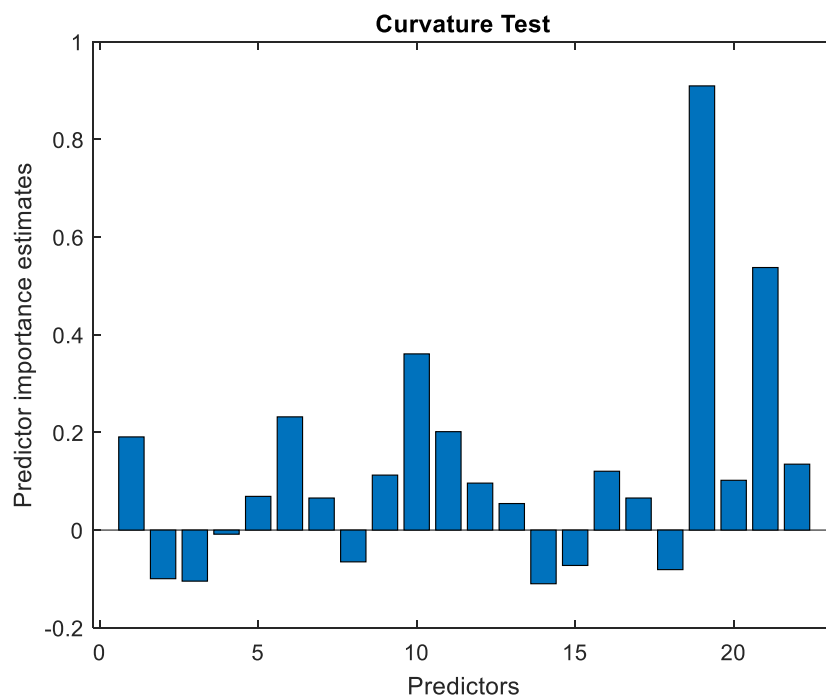
Najlepsze wyniki uzyskano dla grup PB_n ($n_n = 82$) i PB_{an} ($n_{an} = 117$). Wartości R^2 i Q^2 zestawów testowych wahały się między 0,55 a 0,62 (Rysunek 36 i 37). W obu modelach wartości log D mają największe znaczenie w ich tworzeniu (Rys. 38 i 39).



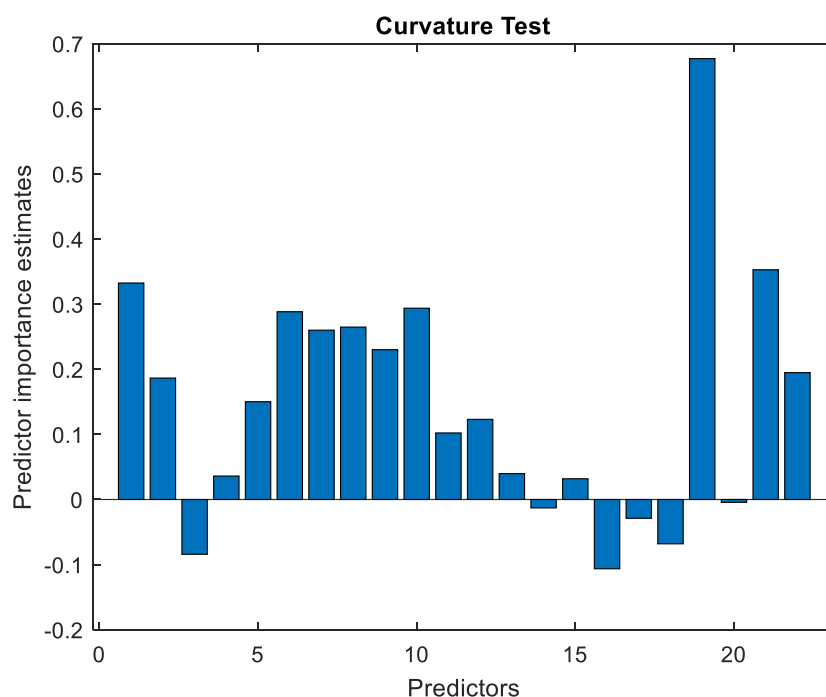
Rysunek 36. Rzeczywiste w porównaniu z przewidywanymi wartości PB_n , przy użyciu regresji RF i 22 deskryptorów molekularnych w tym parametrów NP TLC (Tabela 31). RMSECV = średni kwadratowy błąd walidacji krzyżowej, RMSEP = średni kwadratowy błąd prognozowania, R^2 train/test = współczynnik determinacji dla modeli zestawu treningowego i testowego, Q^2 train/test = współczynnik determinacji dla modeli poddanych walidacji krzyżowej.



Rysunek 37. Rzeczywiste w porównaniu z przewidywanymi wartości PB_{an} , przy użyciu regresji RF i 22 deskryptorów molekularnych w tym parametrów NP TLC (Tabela 31).



Rysunek 38. Udział poszczególnych deskryptorów (Tabela 31) na tworzenie modelu regresji RF dla PB_n . Największy wpływ wykazuje zmienna nr 19, czyli log D, poza tym znaczenie mają masa molowa (MW) i objętość molowa (V)



Rysunek 39. Udział poszczególnych deskryptorów (Tabela 31) na tworzenie modelu regresji RF dla PB_{an} . Największy wpływ wykazuje zmienna nr 19, czyli log D, w tym przypadku widać również większy udział zmiennych chromatograficznych (zmiennne nr 6 – 9)

Najlepsze wyniki przy pomocy regresji lasu losowego uzyskano dla całego zestawu związków; PB_{abn} oraz dla grup PB_n i PB_{an} . To właśnie związki kwaśne i neutralne wiążą się przede wszystkim z albuminą, która stanowi większość białek osocza więc wartości literaturowe wiązania z białkami (PB) odnoszą się głównie do łączenia się leków z HSA.

Najlepszą metodą chromatograficzną ponownie okazała się NP TLC. W przypadku $HPLC_{HSA}$ interesujący okazał się stosunkowo duży udział wyników z kolumny w tworzeniu modelu. Drugim czynnikiem, który wysuwa się w prawie wszystkich modelach to duży udział parametru $\log D$, czyli lipofilowości powiązanej z jonizacją.

Modele utworzone przy pomocy regresji metodą lasu losowego prezentują znaczną zależność, widoczną na wykresach rozrzutu (Rys. 30, 32, 34, 35). Wyszczególniony jest również wpływ współczynnika determinacji ($\log D$) i parametrów chromatograficznych z eksperymentu NP TLC oraz $HPLC_{HSA}$ w każdym modelu. Niestety, nie wykazują one najlepszej zdolności predykcyjnej (walidacja zewnętrzna na poziomie $Q^2_{test} = 0,56$ i $0,35$ w testach MCPT).

WNIOSKI

Modele analityczne, odwzorowujące warunki fizjologiczne (np. wiązania z białkiem), mogą stanowić cenny element badań wstępnych dla potencjalnych substancji aktywnych. Modyfikacja fazy stacjonarnej może rozszerzać te możliwości do przewidywania danych związanych z farmakodynamiką lub farmakokinetyką substancji biologicznie czynnych.

Wybór modelu analitycznego wiązania leku z białkami opiera się na możliwości odwzorowania tego zjawiska farmakokinetycznego poprzez wykonanie prostej analizy laboratoryjnej. Wielki wpływ wiązania leków z białkiem na przebieg farmakoterapii, spowodował opracowanie wielu metod jego oceny i wyznaczenia. W zakresie przeprowadzonych badań, założono podobieństwo do warunków fizjologicznych biodostępności na granicy bariery krew-mleko, które mogą wpływać na powinowactwo fazowe chromatografii. Skonstruowane modele wykorzystują pH środowiska, obecność albumin, wpływ lipofilowości, polarności i jonizacji substancji aktywnych.

Uzyskano pozytywne wyniki celowości użycia danych chromatograficznych w badaniu wiązania z białkiem i przenikania leków do mleka matki. Przedstawione analizy statystyczne, wykazały ścisły związek danych analitycznych HPLC i TLC (w ustalonych warunkach, definiujących modele analityczne) z biodostępnością leku w mleku matki. Korelacja wskaźników PB i M/P z tymi danymi chromatograficznymi są wysokie, również w grupie wszystkich przypadków łącznie. Najefektywniejsze okazało się zastosowanie danych NP TLC oraz HPLC_{HSA}. Widoczna jest tu także większa korelacja pomiędzy PB i danymi chromatograficznymi w grupie kwasów (a), czyli dla wiązania specyficznego z albuminą.

Analiza regresji MLR małej grupy (n=28) związków z ustalonymi wartościami przenikania do mleka i OUN, poskutkowało otrzymaniem równania regresji potwierdzającego wpływ parametrów: obecności leku w OUN (B2), stopnia jego jonizacji (log U/D) oraz wiązania z białkami na wnikanie związków do laktocytów. Wskazało to na możliwość rozbudowania obserwacji, poprzez wprowadzenie do analiz danych chromatograficznych. Parametry uzyskane w NP TLC, z fazą stacjonarną modyfikowaną BSA, zwiększyły szanse przewidywania dystrybucji leków do mleka matki.

DFA klasyfikacji na grupy a, b i n, pozwoliła potwierdzić wpływ właściwości kwasowych, zasadowych i obojętnych leków na zdolność do wiązania z białkami

i podjąć decyzję, czy analiza bezpieczeństwa farmakoterapii matek karmiących (przewidywania M/P) musi być prowadzona z podziałem na te trzy grupy.

Uzyskane w analizie DFA wyniki przewidywania klasyfikacji LactMed lub LLL H wykazały, że jako sprawdzone źródło wiedzy o bezpieczeństwie stosowania leków u matek karmiących, nie mogą jednak być podstawą jego przewidywania. Skale te nie mają charakteru ilościowego. Kod, który stanowią, jest oparty na obserwacjach klinicznych. Porównywane z ilościowymi parametrami właściwości i zachowania leków w środowisku badania, mogą prowadzić do mylących wniosków. Jedyne poprawne klasyfikacje uzyskano z udziałem wartości doświadczalnych M/P, PB i BB_{vivo}. Analiza dyskryminacyjna podkreśliła jednak widocznie znaczenie dyskryminujące danych chromatograficznych, wykazała również wpływ wiązania z białkiem i obecności leków w ośrodkowym układzie nerwowym na bezpieczeństwo ich stosowania przez kobiety w czasie laktacji.

W połączeniu obserwacji danych fizykochemicznych, biologicznych i chromatograficznych z analizą chemometryczną ustalono, że dane chromatograficzne (NP TLC) i biologiczne (takie jak przenikanie do OUN) lepiej charakteryzują zagrożenie przenikania leków do mleka matki niż właściwości fizykochemiczne tych leków. Te grupy parametrów dają możliwość tworzenia modeli matematycznych, użytecznych w przewidywaniu zdolności przekraczania bariery krew-mleko matki.

Przenikanie leków do mleka może być prognozowane również bez dostępu do wyników badań *in vivo* M/P.

Analiza PCA potwierdziła wartość prognostyczną danych chromatografii powinowactwa leków, w postaci zaproponowanych modeli analitycznych wiązania z białkiem, oraz samego wiązanie z białkiem, jako najważniejszych parametrów w przewidywaniu przenikania leków do mleka matki.

Analiza składowych głównych – CA – potwierdziła wartość parametrów HA, log P, log D i eL. Największe zróżnicowanie wykazują parametry log D, HA, eL. Niestety wartości M/P_{kod} są słabo zróżnicowane.

Wykorzystywane analizy: MLR, PCA i DFA wyłoniły grupę parametrów fizykochemicznych i chromatograficznych, ważnych dla biodostępności leków w mleku

matki. Zastosowanie CA podkreśliło zróżnicowanie ich średnich wartości w grupach M/P_{kod} 1-4.

Analizy PLS i RF badanych leków, zarówno dla przenikania do mleka matki (M/P) i wiązania z białkami (PB), nie dały modeli z wysokimi wynikami zestawów testowych, ale potwierdziły znaczny udział parametrów chromatograficznych związanych z NP TLC i $HPLC_{HSA}$ oraz $\log D$ w determinacji tych zjawisk farmakokinetycznych. Uwidocznily również silny wpływ wiązania z białkami (PB, B3) na przewidywanie wartości M/P.

Streszczenie

Okres laktacji jest bardzo istotny podczas pierwszych miesięcy życia nowo narodzonego dziecka, a mleko matki stanowi najlepsze źródło białka, tłuszczu, węglowodanów i mikroelementów dla rozwijającego się organizmu. Farmakoterapia matki w czasie tego okresu budzi dużo spekulacji na temat bezpieczeństwa stosowania preparatów farmaceutycznych. Główną kwestię stanowi, ile substancji aktywnej jest w stanie przeniknąć do mleka matki i jaki wpływ będzie ona wywierać na dziecko. Jest to szczególnie istotne podczas terapii chorób przewlekłych, ponieważ wtedy narażenie dziecka na działanie leku jest długotrwałe, a to może prowadzić do wystąpienia działań niepożądanych.

Przenikanie ksenobiotyków do mleka kobiecego jest głównie związane z ich właściwościami fizykochemicznymi takimi jak: masa molowa, stopień jonizacji w warunkach fizjologicznych czy lipofilowość; dodatkowo determinują je właściwości farmakokinetyczne związku, z których na pierwszym miejscu wymieniane jest wiązanie z białkami osocza krwi. Wnioskiem ogólnym, który pojawia się w literaturze jest fakt, że związki wiążące się z proteinami osocza w mniejszym stopniu przenikają do leukocytów.

W związku z problemami natury etycznej, w badaniach dotyczących kobiet karmiących często sięga się po metody chemometryczne, które w sposób bezpieczny pomagają nakreślić wnioski dotyczące stopnia wnikania leku do mleka. Szczególny udział wykazują metody oparte na QSPR, w których bada się zależność między strukturą związku chemicznego a jego właściwościami.

Niniejsza praca obejmuje analizy statystyczne oraz obserwacje korelacji między parametrami związanymi z właściwościami fizykochemicznymi szerokiej grupy substancji aktywnych a literaturowymi wartościami M/P (ang. milk-to-plasma ratio), które określają poziom przenikania związków z krwi do mleka. Wykorzystano kilka metod regresji w celu stworzenia uniwersalnego modelu przewidującego przechodzenie leków o różnorodnej strukturze do mleka kobiecego, jak również kilka analiz do określenia wpływu poszczególnych parametrów na to zjawisko. W związku z dużym znaczeniem wiązania z białkami osocza zastosowano również dane chromatograficzne z eksperymentów prowadzonych różnych środowiskach: chromatografii

cienkowarstwowej (TLC) z płytkami impregnowanymi roztworami bydlęcej albuminy osoczowej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z kolumnami z immobilizowaną ludzką albuminą (HSA) oraz sztuczną membraną (IAM).

Wyniki badań chemometrycznych potwierdziły istotny wpływ kilku parametrów fizykochemicznych i biologicznych, w tym stopnia jonizacji związku w osoczu i wiązania z białkami na przenikanie do mleka. Uzyskane parametry chromatograficzne, szczególnie te uzyskane w chromatografii cienkowarstwowej w normalnym układzie faz, w wysokim stopniu odnosiły się do wartości wiązania z białkami, dostępnych w literaturze. Obiecujące wyniki uzyskano też z zastosowaniem parametrów retencji uzyskanych z HPLC_{HSA}. Znalazły one zastosowanie w stworzonych modelach predykcyjnych. Sugeruje to, że przeprowadzona chromatografia powinowactwa, z wykorzystaniem prostej metody jaką jest TLC, może służyć do budowy modeli farmakokinetycznych, które w szybki sposób pozwolą przewidzieć istotne cechy nowych substancji aktywnych.

Summary

The lactation is very important period for a newborn baby and breast milk is the best source of proteins, fats, carbohydrates and microelements for the developing organism. During this time, maternal pharmacotherapy raised much speculation about the safety of pharmaceuticals' usage. The main question is how much of the active pharmaceutical ingredient is able to pass into the breast milk and what effect it will have on the baby. This is especially important in the treatment of chronic diseases, because then the child's exposure to the drug is prolonged, which may lead to side effects.

The penetration of xenobiotics into breast milk is mainly related to their physicochemical properties, such as: molar mass, degree of ionization under physiological conditions or lipophilicity; they are additionally determined by the pharmacokinetic properties of the compound, the first of which is binding to plasma proteins. The general conclusion that appears in the literature is the fact that compounds highly binding to plasma proteins penetrate to lactocytes to a lesser extent.

Due to ethical problems, studies on nursing women often use chemometric methods that safely can draw conclusions about the extent of drugs' penetration into milk. Methods based on QSPR, in which the relationship between the structure of a chemical compound and its properties are studied, show a special share.

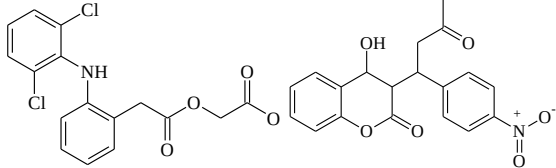
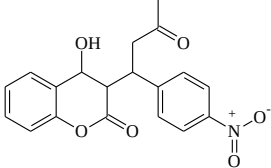
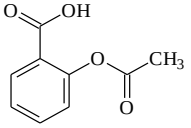
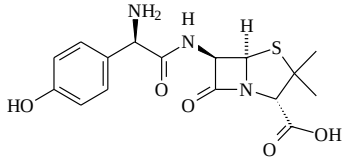
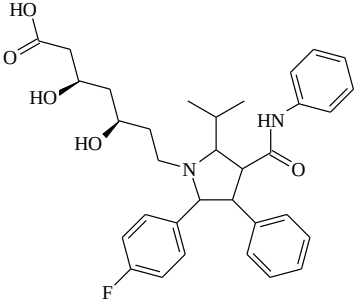
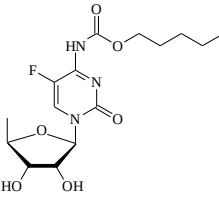
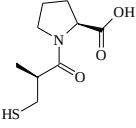
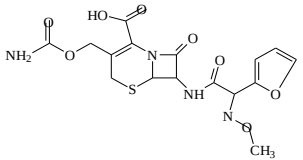
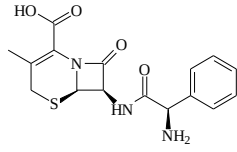
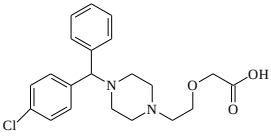
This work includes statistical analyzes together with observations of the correlation between the parameters related to the physicochemical properties of a wide group of active substances and the literature values of M/P (milk-to-plasma ratio), which determine the level of penetration into milk. Several regression methods were used to create an universal model predicting the transfer of drugs of various structures into human milk, as well as several analyzes to determine the effect of individual parameters on this phenomenon. Due to the high importance of plasma protein binding, chromatographic data from experiments conducted in various environments were also used: thin layer chromatography (TLC) with plates impregnated with bovine serum albumin solutions and high performance liquid chromatography (HPLC) with columns with immobilized human albumin and the artificial membrane.

The results of chemometric studies confirmed the significant influence of several physicochemical and biological parameters, including the degree of ionization of the

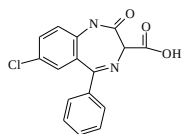
compound in plasma and protein binding, on the penetration into breast milk. The obtained chromatographic parameters, especially those obtained in normal phase thin layer chromatography, were highly related to protein binding values available in the literature. Promising results were also obtained using retention parameters from HPLC_{HSA}. They were also used in the created predictive models. This suggests that the performed affinity chromatography, with the use of a simple method such as TLC, can be used to build pharmacokinetic models that will quickly predict the essential features of new active substances.

Tabele zawierające struktury związków wykorzystywanych w badaniach (n = 129 i grupa zewnętrzna n = 38) oraz zebrane dla nich dane biologiczne, fizykochemiczne oraz chromatograficzne

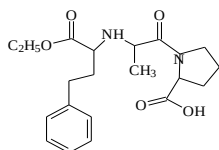
Tabela 32. Struktury kwasowych związków (n_a = 29)

1. aceclofenac	2. acenocumarol	3. acetylsalicylic acid	4. amoxicillin	5. atorvastatin
				
6. capecitabine	7. captopril	8. cefuroxime	9. cephalixin	10. cetirizine
				

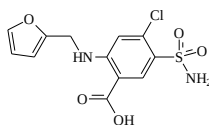
11. clorazepate



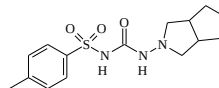
12. enalapril



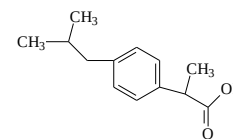
13. furosemide



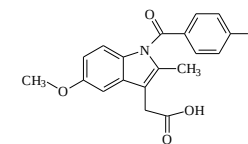
14. gliclazide



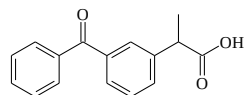
15. ibuprofen



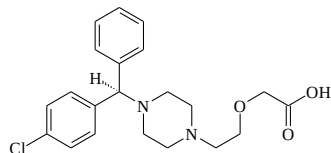
16. indomethacin



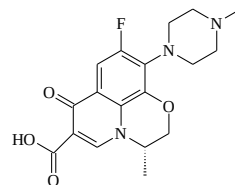
17. ketoprofen



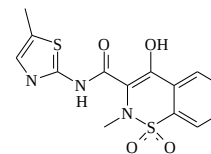
18. levocetirizine



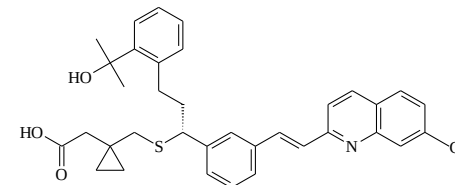
19. levofloxacin



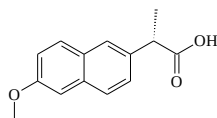
20. meloxicam



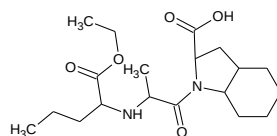
21. montelukast



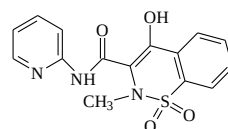
22. naproxen



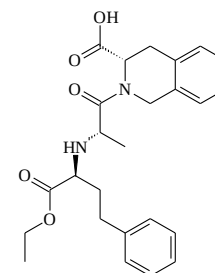
23. perindopril



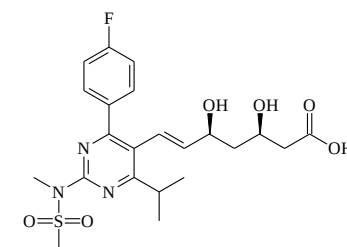
24. piroxicam



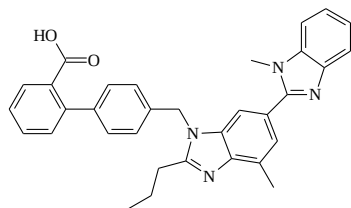
25. quinapril



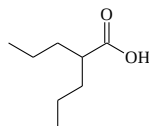
26. rosuvastatin



27. telmisartan



28. valproic acid



29. valsartan

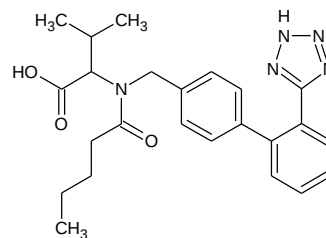
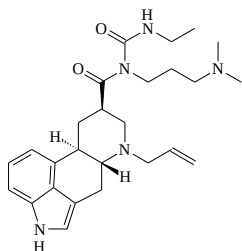


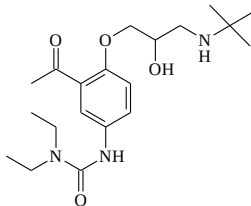
Tabela 33. Struktury zasadowych związków ($n_b = 34$)

1. acebutolol	2. amiodarone	3. amlodipine	4. astemizol
5. atropine	6. azithromycin	7. betaxolol	8. biperiden
9. bisoprolol			

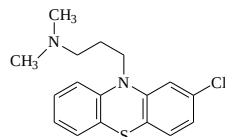
10. carbegoline



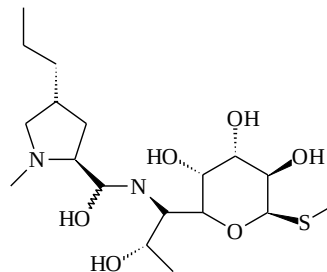
11. celiprolol



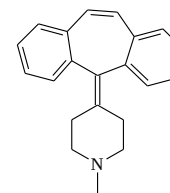
12. chlorpromazine



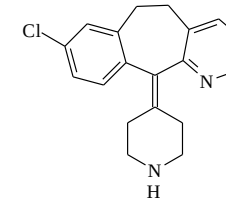
13. clindamycin



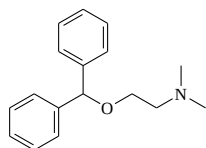
14. cyproheptadine



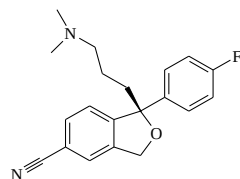
15. desloratadine



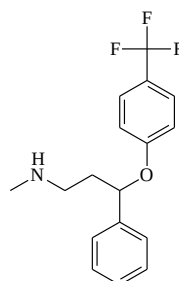
16. diphenhydramin



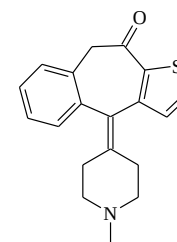
17. escitalopram



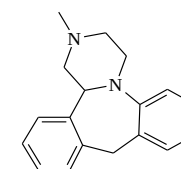
18. fluoxetine



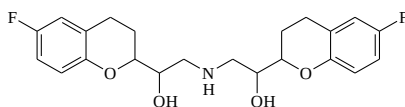
19. ketotifen



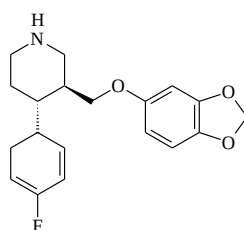
20. mianserin



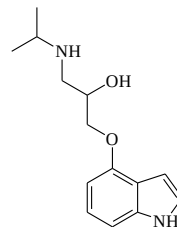
21. nebivolol



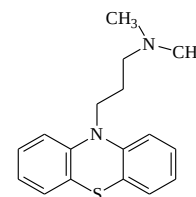
22. paroxetine



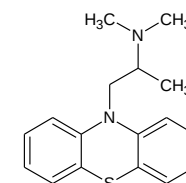
23. pindolol



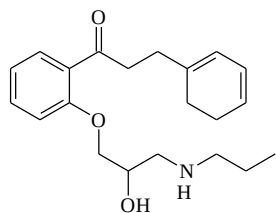
24. promazine



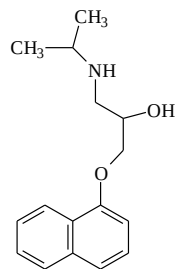
25. promethazine



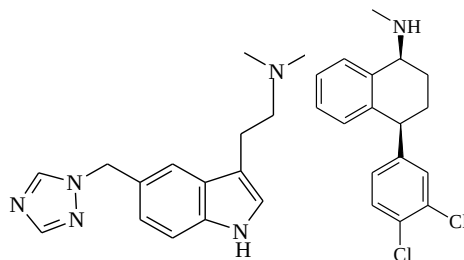
26. propafenone



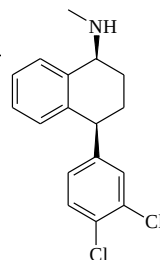
27. propranolol



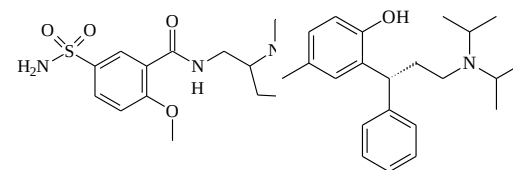
28. rizatriptan



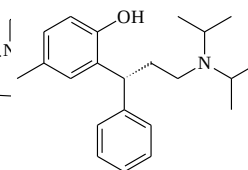
29. sertraline



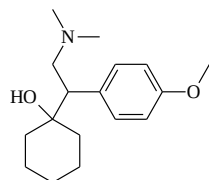
30. sulpiride



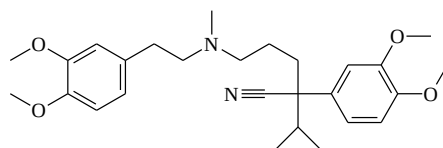
31. tolterodine



32. venlafaxine



33. verapamil



34. zolmitriptane

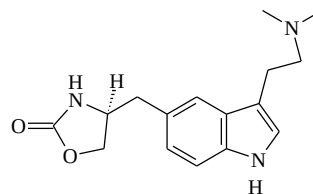
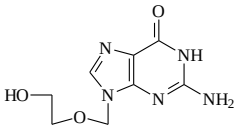
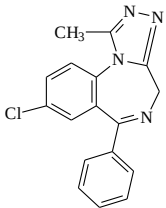
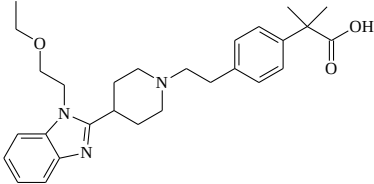
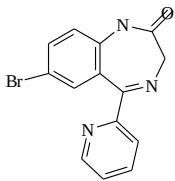
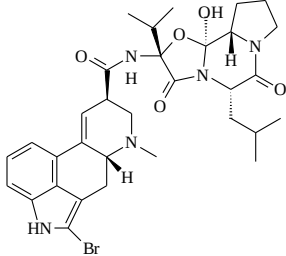
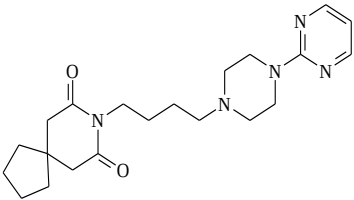
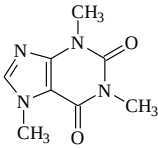
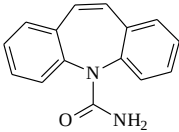
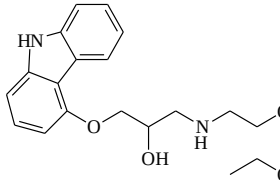
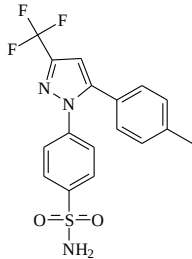
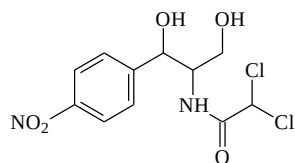


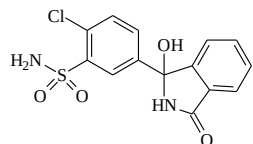
Tabela 34. Struktury neutralnych związków ($n_n = 66$)

1. aciclovir	2. alprazolam	3. bilastine	4. bromazepam	5. bromocriptine
				
6. buspirone	7. caffeine	8. carbamazepine	9. carvedilol	10. celecoxib
				

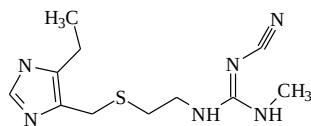
11. chloramphenicol



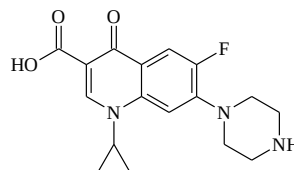
12. chlortalidone



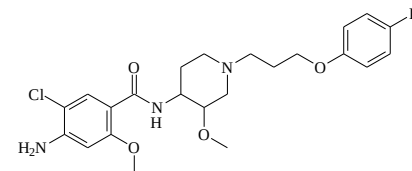
13. cimetidine



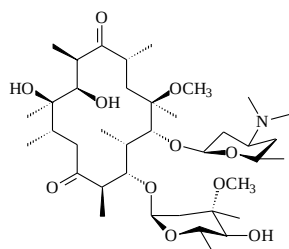
14. ciprofloxacin



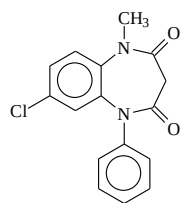
15. cisapride



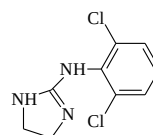
16. clarithromycin



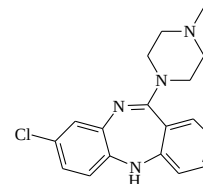
17. clobazam



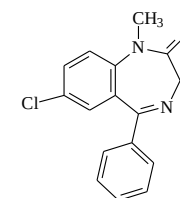
18. clonidine



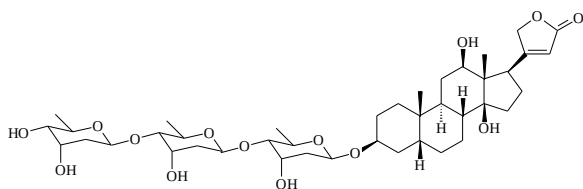
19. clozapine



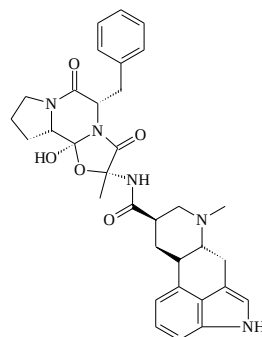
20. diazepam



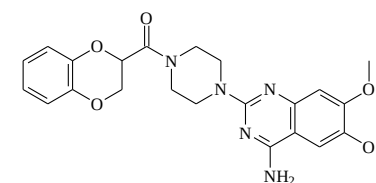
21. digoxin



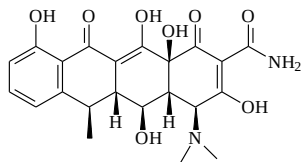
22. dihydroergotamine



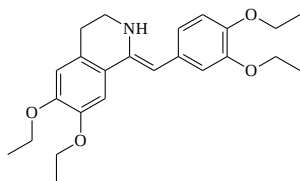
23. doxazosin



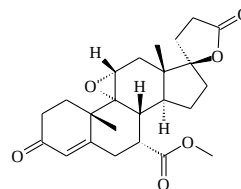
24. doxycycline



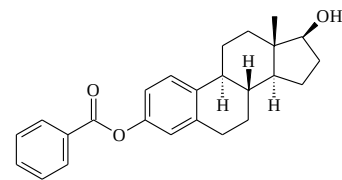
25. drotaverine



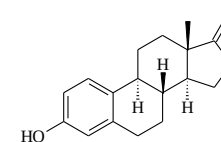
26. eplerenone



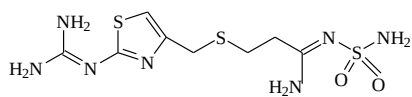
27. estradiol benzoate



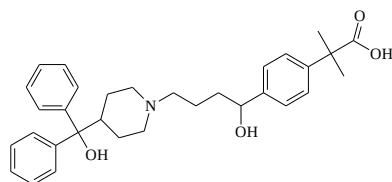
28. estrone



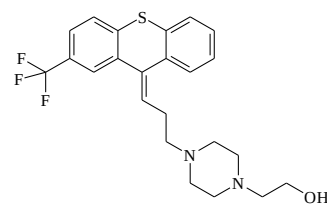
29. famotidine



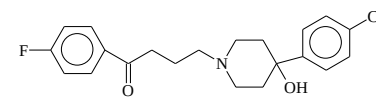
30. fexofenadine



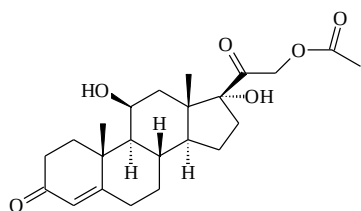
31. flupenthixol



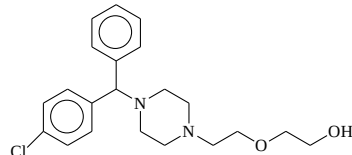
32. haloperidol



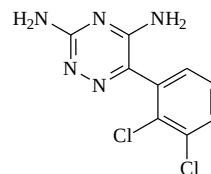
33. hydrocortisone acetate



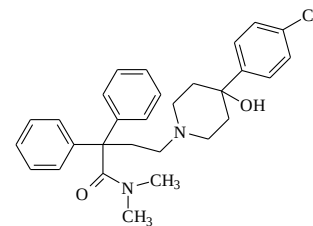
34. hydroxyzine



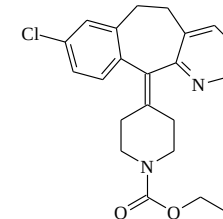
35. lamotrigine



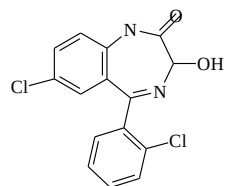
36. loperamide



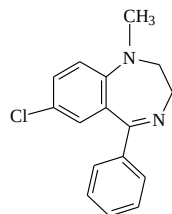
37. loratadine



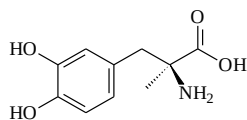
38. lorazepam



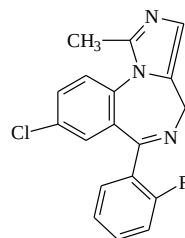
39. medazepam



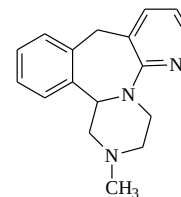
40. methyldopa



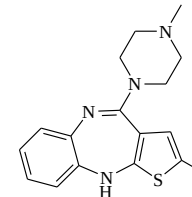
41. midazolam



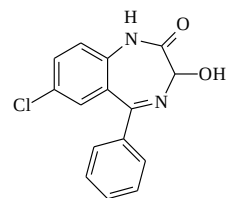
42. mirtazapine



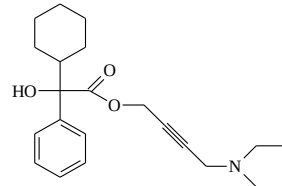
43. olanzapine



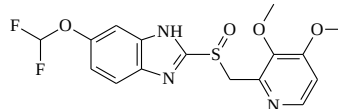
44. oxazepam



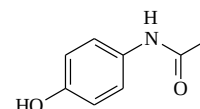
45. oxybutinin



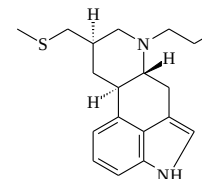
46. pantoprazole



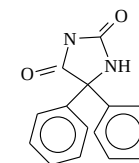
47. paracetamol



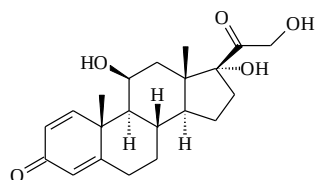
48. pergolide



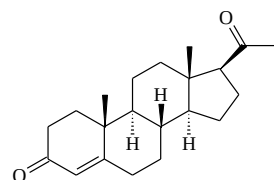
49. phenytoin



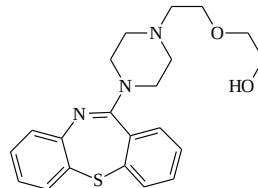
50. prednisolone



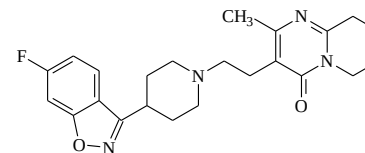
51. progesterone



52. quetiapine



53. risperidone



54. roxitromicin

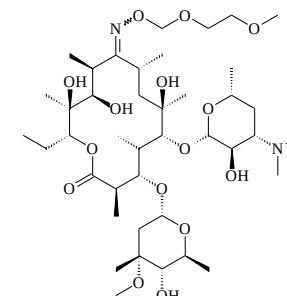
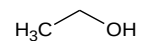


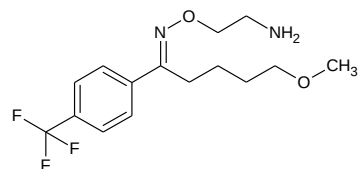
Tabela 35. Struktury związków z grupy zewnętrznej (n = 38)

1. acetazolamid	2. amitriptyline	3. bupivacaine	4. chloroquine
5. citalopram	6. clomipramine	7. colchicine	8. diltiazem
9. doxepin	10. duloxetine	11. eletriptan	12. ethambutol

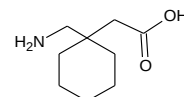
13. ethanol



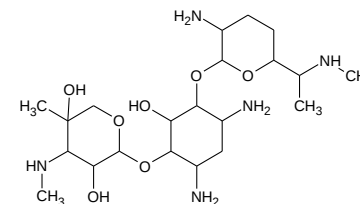
14. fluvoxamine



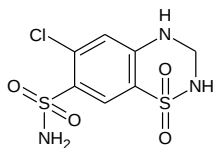
15. gabapentin



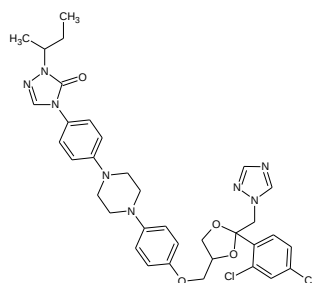
16. gentamicin



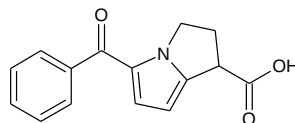
17. hydrochlorothiazide



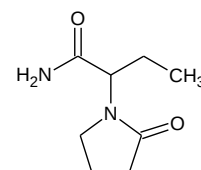
18. itraconazole



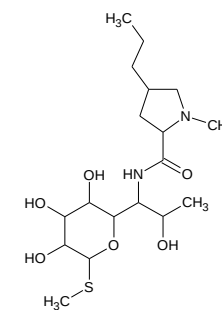
19. ketorolac



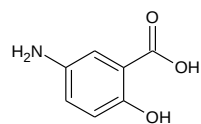
20. levetiracetam



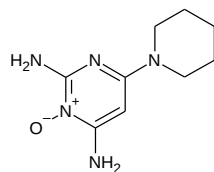
21. lincomycin



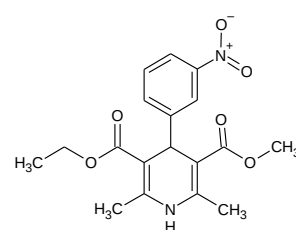
22. mesalazine



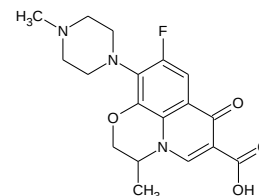
23. minoxidil



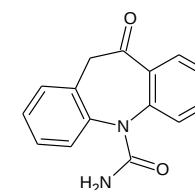
24. nitrendipine



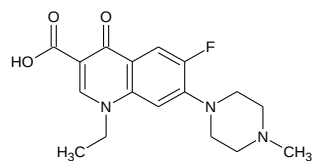
25. ofloxacin



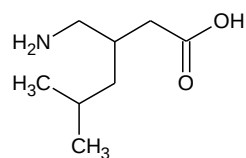
26. oxcarbamazepine



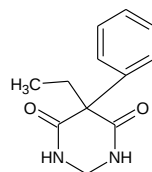
27. pefloxacin



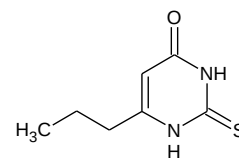
28. pregabalin



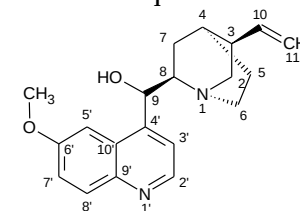
29. primidone



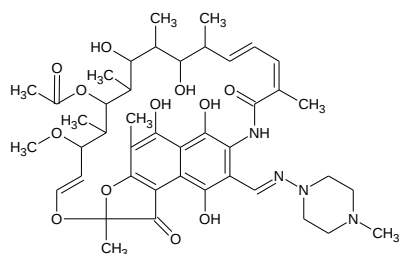
30. propylthiouracil



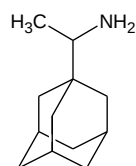
31. quinine



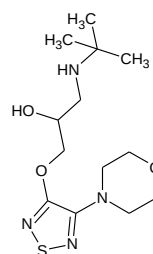
32. rifampicin



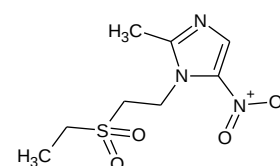
33. rimantadine



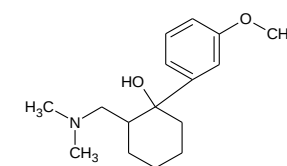
34. timolol



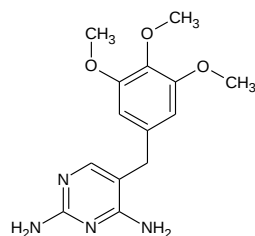
35. tinidazole



36. tramadol



37. trimethoprim



38. warfarin

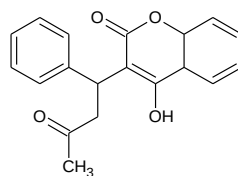


Tabela 36. Właściwości biologiczne leków (n = 129)

nazwa leku	B1	B2	B3	BB _{vivo}	CNS+/-	LactMed	LLL H	log U/D 7.2	M/P	M/P _{kod}	PB	PB _{kod}	PhCharge
acebutolol	0,09	-0,86	-0,83		0	2	3	-2,2	9,65	4	0,26	5	1
aceclofenac	-0,44	-0,66	1,11					-4,6			0,99	1	-1
acenocumarol	-1,07	-1,20	0,68		1	1		-2,7			0,987	1	-1
acetylsalicylic acid	-4,75	-0,47	-13,67		1	2	3	-3,72	1,08	3	0,995	1	-1
aciclovir	-1,71	-1,21	-1,39	-0,836		1	2	-2,09	2,35	4	0,21	5	0
alprazolam	0,29	-0,06	1,68	0,019	1	1	3	-4,83	0,18	1	0,8	4	0
amiodarone	0,60	-0,14	0,84		1	2		-2,17	8,8	4	0,96	2	1
amlodipine	-0,09	-1,05	-1,42		0	1	3	-1,77			0,975	2	1
amoxicillin	-2,23	-1,99	-0,74		0	1	1	-4,76	0,028	1	0,2	5	0
astemizol	-0,31	-0,05	-0,31		1			-1,48	4,4	4	0,967	2	1
atorvastatin	0,37	-1,24	0,11		0		3	-2,91			0,98	1	-1
atropine	-0,34	-0,25	0,19	-0,060	1		3	-2,78			0,18	5	1
azithromycin	0,51	-2,33	0,56		0	1	2	-1,39			0,29	5	2
betaxolol	0,29	-0,26	-0,17		0	2	3	-2,23	2,75	4	0,5	5	1
bilastine	-0,70	-0,71	0,39					-0,61			0,87	3	0
biperiden	0,55	0,17	0,69		1			-2,06			0,6	4	1
bisoprolol	-0,42	-0,41	0,40		0		3	-2,22			0,3	5	1
bromazepam	-0,27	-0,32	0,63		1			-4,19			0,7	4	0
bromocriptine	-0,93	-1,34	1,58	-1,100	0	0		-0,76			0,93	3	0
buspirone	-0,71	-0,57	-0,08	0,480	1	1	3	-0,52			0,95	2	1
caffeine	-0,81	-0,31	-1,20	-0,022	1	2	2	-6,68	0,661	2	0,3	5	0
capecitabine	-1,57	-1,38	-0,40		1			-1,79			0,6	4	0
captopril	0,18	-0,37	-0,52		1	1	2	-3,61	0,031	1	0,275	5	-1
carbamazepine	-4,80	-0,19	-14,67	-0,070	1	2	2	-6,74	0,558	2	0,76	4	0
carbegoline	-0,88	-0,60	-0,52		1		4	-2,21			0,41	5	2
carvedilol	-0,17	-0,66	-1,69		0		3	-1,04			0,98	1	1

cefuroxime	-3,12	-2,64	-1,71		0	0	2	-4,61			0,5	5	-1
celecoxib	0,29	-0,70	-0,16		1	1	2	-2,48	0,41	2	0,97	2	0
celiprolol	0,07	-0,91	-0,89					-2,3			0,275	5	1
cephalexin	-0,06	0,03	-1,32		0	1	1	-4,08	0,012	1	0,14	5	0
cetirizine	-0,32	-0,30	0,39	-2,150	1	1	2	-3,74			0,93	3	0
chloramphenikol	-1,61	-1,30	-0,79		0	1	4	-3,83	0,6	2	0,55	4	0
chlorpromazine	0,24	0,04	1,22	0,950	1	1	3	-2,21	0,4	2	0,9	3	1
chlortalidone	-1,70	-1,34	-0,98		1	1	4	-2,37	0,062	1	0,75	4	0
cimetidine	-1,64	-1,28	-0,96	-1,420	0	1	1	-0,13	1,7	4	0,17	5	1
ciprofloxacin	-0,14	-0,62	-1,59			1	3	-0,36	2,15	4	0,3	5	0
cisapride	-0,79	-0,83	0,46		1	1		-0,27	0,045	1	0,975	2	1
clarithromycin	-2,57	-2,38	-0,67		0	1	1	-0,96	0,25	1	0,7	4	1
clindamycin	0,38	-1,15	0,13		0	1	2	-1,53	0,3	1	0,93	3	1
clobazam	-0,67	-0,10	-1,37	0,350	1	1	3	-1,39	0,25	1	0,85	3	-1
clonidine	-0,36	-0,04	-0,53	0,150	1	2	3	-0,9	2	4	0,3	5	1
clorazepate	-0,95	-1,09	0,71		1	2	3	-1,9	0,2	1	0,975	2	-1
clozapine	0,36	0,50	0,22		1		3	-0,13	2,79	4	0,99	1	1
cypheptadine	-0,09	0,10	-0,09		1		3	-1,75			0,975	2	1
desloratidine	-0,22	0,15	-0,63		1	1	2	-3,07			0,845	4	1
diazepam	0,11	0,02	0,84	0,346	1	2	3	-3,8	0,19	1	0,98	1	0
digoxin	-2,46	-2,70	0,67	-1,230	0	1	2	-6,3	0,7	2	0,25	5	0
dihydroergotamine	-0,18	-1,34	-1,72		0		4	-0,02			0,93	3	1
diphenhydramin	0,27	0,35	0,38		1	1	2	-1,56			0,985	1	1
doxazosin	0,46	-1,42	0,41		1	1	4	-0,68			0,98	1	1
doxycycline	-2,83	-2,36	-1,60		0	1	3	-0,47	0,34	1	0,9	3	0
drotaverine	-0,81	-0,24	-1,42		1			-1,03			0,875	3	1
enalapril	-0,93	-0,99	0,49		0	1	2	-4,05	0,02	1	0,55	4	-1
eplerenone	-0,73	-0,72	0,32		1		3				0,5	5	0
escitalopram	0,27	-0,03	-0,23		1	1	2	-2,37	2,2	4	0,56	4	1

estradiol benzoate	-0,97	-1,07	1,44				3				0,95	2	0
estrone	-0,87	-1,02	0,77					-3,05			0,95	2	0
famotidine	-3,55	-3,26	-1,22		1	1	1	-0,73	1,5	4	0,175	5	1
fexofenadine	-0,48	-0,75	1,24	-0,980	0	1	2	-0,27			0,65	4	0
fluoxetine	0,43	0,21	0,30		1	2	2	-2,85	0,68	2	0,945	2	1
flupenthixol	0,18	-0,29	2,00		1	1		-0,15	1,15	3	0,95	2	1
furosemide	-1,84	-1,55	-0,79		0		3	-4,16			0,95	2	-1
gliclazide	-0,86	-0,84	0,29		1			-1,13			0,94	3	-1
haloperidol	-0,26	-0,10	-0,01	1,340	1	1	3	-0,84	0,64	2	0,92	3	1
hydrocortisone acetate	-0,12	-0,42	1,44				2	-5,22			0,95	2	0
hydroxyzine	-0,21	-0,03	-0,05	0,285	1	1	1	-0,58			0,93	3	1
ibuprofen	0,17	-0,05	1,25	-0,180	1	1	1	-2,79	0	1	0,95	2	-1
indomethacin	-1,02	-0,47	-1,38	-1,260	1	1	3	-3,24	0,47	2	0,97	2	-1
ketoprofen	0,53	-0,32	0,62		1	1		-2,97			0,99	1	-1
ketotifen	-0,54	-0,23	-0,54		1	0	3	-1,64			0,75	4	1
lamotrigine	-0,99	-0,90	0,03	0,480	1	2	3	-1,81	0,513	2	0,55	4	0
levocetizine	-0,12	-0,30	1,08		1	1	3	-3,74			0,915	3	0
levofloxacin	-0,85	-0,63	-0,36			1	3	-2,01	0,95	3	0,31	5	-1
loperamide	0,25	-0,15	1,84	0,770	0		2	-0,56			0,97	2	1
loratadine	-0,44	-0,13	-0,52		1	1	1	-2,93	1,2	4	0,98	1	0
lorazepam	-0,25	-0,44	1,05	0,440	1	1	3	-3,6	0,205	1	0,87	3	0
medazepam	0,56	0,30	1,48		1			-1,02			0,99	1	
meloxicam	-2,05	-1,63	-1,25		0		3	-2,7			0,99	1	-1
methyldopa	-1,62	-1,11	-1,40		0	1	2	-1,63	0,265	1	0,2	5	0
mianserin	0,19	0,44	-0,20	0,990	1	1		-1,06	2,2	4	0,9	3	0
midazolam	0,28	0,14	1,04	0,398	1	1	2	-1,17	0,785	2	0,97	2	0
mirtazapine	0,03	0,24	-0,09	0,530	1	1	3	-0,9	1,1	3	0,85	3	0
montelukast	0,77	-0,58	1,40		1	1	3	-2,44			0,99	1	-1

naproxen	-0,10	-0,20	0,83		1	1	4	-2,36	0,16	1	0,99	1	-1
nebivolol	-0,02	-0,59	-1,18		1		3	-1,45			0,98	1	1
olanzapine	-1,34	-0,80	-1,45			1	2	-0,13	0,38	1	0,175	5	1
oxazepam	-0,33	-0,44	0,79	0,580	1	1	3	-3,74	0,1	1	0,85	3	0
oxybutinin	0,63	-0,25	0,96		1		3	-1,04			0,92	3	1
pantoprazole	-0,15	-0,83	-1,61		0	1	1	-1,13			0,98	1	0
paracetamol	-0,79	-0,24	-1,33	-0,463	1	1	1	-2,66	0,84	3	0,25	5	0
paroxetine	0,06	-0,09	-0,91		1	1	2	-2,48	0,675	2	0,94	3	1
pergolide	-0,17	-0,16	0,48	0,300	1			-0,78			0,9	3	1
perindopril	-0,97	-0,99	0,37		0	1	3	-4,05			0,15	5	-1
phenytoin	-0,61	-0,38	-0,30	-0,096	1	1	2	-0,88	0,29	1	0,9	3	0
pindolol	-0,05	-0,37	-1,28		1	1	3	-2,34			0,4	5	1
piroxicam	-1,30	-1,18	-0,13		0	1	2	-2,7	0,02	1	0,99	1	-1
prednizolone	-0,96	-0,97	0,34		1		2	-5,26	0,13	1	0,9	3	0
progesterone	-0,08	-0,20	0,90			1	3				0,975	2	0
promazine	0,16	0,04	0,96	0,880	1			-2,23			0,94	3	1
promethazine	-0,36	0,04	-0,77		1		2	-1,78			0,93	3	1
propafenone	0,42	-0,39	0,27		0	1	2	-2,11			0,97	2	1
propranolol	-0,05	-0,12	0,74	1,110	1	1	2	-2,3	0,396	1	0,9	3	1
quetiapine	-0,52	-0,63	0,76		1	1	2	-0,46			0,83	4	1
quinapril	0,40	-0,99	0,18		0	1	2	-3,81	0,12	1	0,97	2	-1
risperidone	-0,68	-0,44	-0,35	-0,020	1	1	3	-0,87	0,26	1	0,88	3	1
rizatriptan	-0,78	-0,40	-0,80	0,780	1		3	-2,29			0,14	5	1
rosuvastatin	0,32	-1,71	-0,08		0	1	3	-2,95			0,88	3	-1
roxitromicin	0,58	-2,92	0,79		0	1		-0,96	0,04	1	0,96	2	1
rupatadine	-0,04	0,08	0,15					-0,25			0,985	1	1
sertraline	0,39	0,35	0,18		1	1	2	-2,27	1,85	4	0,98	1	1
sildenafil	-0,08	-1,20	-1,40		1	1	3	-1,17			0,96	2	0
simvastatin	-0,27	-0,62	1,55		1		3	-6,29			0,95	2	0

spironolactone	-0,62	-0,82	1,00		1		2		0,615	2	0,9	3	0
sulpiride	-1,42	-1,21	-0,43		1	2	2	-1,77			0,4	5	1
telmisartan	0,33	-0,46	3,03		1		4	-3,34			0,995	1	-1
temazepam	-0,17	-0,30	0,91		1	1	3	-4,46	0,14	1	0,96	2	0
theophylline	-1,09	-0,56	-1,32	-0,341	1	1	3	-1,4	0,697	2	0,4	5	0
thioridazine	-0,07	-0,37	1,43	0,285	1		4	-2,64			0,95	2	1
tolterodine	0,63	0,17	0,96		1		3	-3,48			0,963	2	1
trazodone	-0,06	-0,13	0,74		1	1	2	-0,32	0,53	2	0,92	3	1
tropicamid	0,14	-0,31	-0,67		1		3	-1,88			0,45	5	0
valproic acid	0,54	-0,05	0,64		1	1	4	-2,38	0,05	1	0,85	3	-1
valsartan	-0,93	-1,25	1,28		0		3	-3,64			0,955	2	-1
venlafaxine	0,36	0,02	0,05		1	1	3	-2,07	3,32	4	0,27	5	1
verapamil	-0,72	-0,48	-0,38	-0,470	1	1	2	-1,77	0,6	2	0,9	3	1
zolmitriptane	-0,86	-0,37	-1,17		1		3	-2,32			0,25	5	1
zolpidem	-0,29	-0,05	-0,24	-0,480	1	1	3	-0,43	0,15	1	0,92	3	0
zopiclone	-0,87	-0,92	0,49		0		2	-0,5	0,51	2	0,45	5	0
zuclopenthixol	0,12	-0,29	1,82		1	1	3	-0,17	0,37	1	0,985	1	1

Tabela 37. Właściwości fizykochemiczne leków (n = 129)

nazwa leku	a/b/n kod ¹	DM	eH	eH-eL	eL ²	HA	HD	log D	log P	MW ³	pKa	PSA ⁴	Sa ³	V ³
acebutolol	1	2,65	-9,19	-8,68	-5,11	5	3	0,26	-0,33	3,36	9,4	8,77	6,33	3,29
aceclofenac	-1	1,93	-8,85	-8,58	-2,68	5	2	0,44	3,54	3,54	2,6	7,56	4,44	2,84
acenocumarol	-1	8,94	-9,74	-8,27	-14,71	7	1	0,34	2,68	3,53	4,5	10,94	4,66	2,96
acetylsalicylic acid	-1	5,18	-9,78	-9,08	-6,93	4	1	-1,89	1,30	1,80	3,48	6,36	3,05	1,52
aciclovir	0	5,69	-8,76	-8,27	-4,89	8	4	-1,76	-1,45	2,25	5,11	10,98	3,59	1,86
alprazolam	0	6,16	-9,51	-9,36	-1,42	4	0	2,5	4,68	3,09	2,37	3,81	2,94	2,69
amiodarone	1	5,30	-7,46	-4,11	-33,48	3	0	6,94	3,01	6,45	9,37	4,27	5,21	4,46
amlodipine	1	2,88	-8,66	-8,32	-3,35	5	2	2,59	-1,51	4,09	8,97	9,99	5,92	3,62
amoxicillin	-1	4,32	-9,20	-8,87	-3,31	8	5	-2,43	-0,15	3,65	2,44	15,83	4,88	3,07
astemizol	1	1,71	-7,83	-7,52	-3,07	5	1	4,08	0,71	4,59	8,68	3,74	6,02	4,22
atorvastatin	-1	2,22	-9,00	-8,86	-1,40	5	4	1,11	1,54	5,63	4,29	11,18	6,75	5,21
atropine	1	2,48	-9,42	-9,46	0,41	4	1	-0,94	1,71	2,89	9,98	4,98	4,24	2,79
azithromycin	1			0,00		13	5	3,18	2,44		8,59	18,01		
betaxolol	1	1,20	-8,98	-9,42	4,43	4	2	0,93	1,00	3,07	9,43	5,07	5,89	3,15
bilastine	0	2,69	-8,82	-8,70	-1,22	6	2	1,97	2,10	4,64	6,59	7,85	6,65	4,54
biperiden	1	2,30	-9,16	-9,48	3,22	2	1	1,68	2,71	3,11	9,26	2,35	4,11	3,20
bisoprolol	1	1,93	-9,09	-9,42	3,27	5	2	0,4	2,13	3,25	9,42	6,00	7,05	3,31
bromazepam	0	2,87	-9,13	-9,02	-1,07	4	1	1,65	2,59	3,16	11,39	5,44	2,67	2,36
bromocriptine	0	4,25	-8,92	-7,96	-9,58	10	3	5,07	4,48	6,69	6,44	11,82	6,06	5,64
buspirone	0	4,32	-8,74	-8,58	-1,56	7	0	3,35	1,18	3,86	7,72	6,96	5,19	3,71
caffeine	0	3,92	-9,00	-8,47	-5,36	6	0	-0,13	-1,06	1,94	0,52	5,35	3,41	1,68
capecitabine	-1	4,97	-9,72	-8,38	-13,37	9	3	-0,73	0,53	3,59	5,41	12,07	5,37	3,04
captopril	-1	1,87	-9,35	-9,45	1,05	3	2	-3,15	0,30	2,17	3,59	5,76	3,63	1,92
carbamazepine	0	3,25	-9,05	-8,53	-5,19	3	2	2,67	2,10	2,36	13,94	4,63	2,85	2,19
carbегoline	1	3,58	-8,39	-8,15	-2,38	7	2	-0,19	0,29	4,24	9,41	7,17	6,41	4,10
carvedilol	0	3,15	-8,56	-8,35	-2,09	5	3	3,29	-2,04	4,20	8,24	7,57	5,49	3,97

cefuroxime	-1	2,73	-8,76	-7,44	-13,17	4	12	2,91	-2,08	4,24	2,59	19,91	4,26	3,75
celecoxib	0	4,09	-9,93	-8,51	-14,21	3	1	4,21	1,02	3,81	9,68	7,80	5,10	2,97
celiprolol	1	2,01	-9,24	-8,78	-4,56	5	3	0,22	-0,45	3,65	9,5	9,09	6,62	3,59
cephalexin	-1	5,35	-9,59	-8,97	-6,25	5	3	-2,44	-1,31	3,47	3,12	3,25	4,24	2,95
cetirizine	-1	3,56	-8,97	-8,75	-2,20	5	1	-1,13	2,11	3,75	3,46	5,30	5,01	3,37
chloramphenikol	0	-9,08	-10,34	-9,01	-13,37	7	3	1,02	-0,25	3,23	11,03	11,54	4,50	2,44
chlorpromazine	1	7,13	-6,83	-6,90	0,74	2	0	3,26	3,77	3,19	9,41	3,18	3,04	2,62
chlortalidone	0	4,04	-9,45	-8,68	-7,73	6	4	-0,74	-0,63	3,19	9,57	11,79	3,79	2,51
cimetidine	0	11,01	-8,75	-8,48	-2,76	6	3	-0,25	-0,59	2,52	7,07	11,42	2,94	2,29
ciprofloxacin	0	6,93	-8,72	-7,94	-7,85	6	2	-0,85	-1,85	331,35	7,56	7,29	4,25	2,84
cisapride	0	1,68	-8,72	-8,54	-1,86	7	3	2,6	2,25	4,66	7,47	8,61	6,66	4,11
clarithromycin	0			0,00		14	4	2,33	3,16		8,16	18,29		
clindamycin	1			0,00		7	4	0,48	1,59		8,73	10,58		
clobazam	0	4,18	-9,21	-8,66	-5,52	4	0	1,59	-1,40	3,01	8,59	4,03	4,02	2,58
clonidine	0	3,51	-8,90	-8,48	-4,25	3	2	-0,68	0,28	2,30	8,1	3,64	3,10	1,86
clorazepate	-1	3,51	-9,12	-9,01	-1,13	6	4	1,55	2,75	3,15	5,3	10,22	2,91	2,57
clozapine	0	1,13	-8,78	-8,51	-2,69	1	0	4,86	1,77	2,87	7,33	0,32	3,81	2,90
cypheptadine	1	1,98	-8,63	-8,83	2,03	3	1	2,44	1,16	2,65	8,95	2,76	3,89	2,66
desloratidine	1	3,04	-9,13	-8,83	-2,94	2	1	4,1	0,07	3,11	10,27	2,49	3,75	2,88
diazepam	0	3,57	-9,06	-8,96	-1,00	3	0	2,91	3,01	2,85	3,4	3,27	2,80	2,50
digoxin	0	5,58	-8,45	-7,28	-11,68	14	6	0,85	2,67	7,81	13,5	20,31	7,66	7,05
dihydroergotamine	0	3,90	-8,60	-8,50	-1,05	6	3	2,05	-2,11	4,78	7,22	11,82	5,13	4,33
diphenhydramin	1	0,52	-9,18	-9,41	2,36	2	0	2,29	2,09	2,55	8,76	1,25	4,92	2,65
doxazosin	0	4,02	-8,67	-7,54	-11,34	9	1	0,6	2,14	4,09	6,52	12,27	4,93	3,46
doxycycline	0	11,15	-9,00	-7,85	-11,51	10	7	-3,32	-1,86	4,44	7,67	18,16	4,43	3,68
drotaverine	0	3,56	-8,36	-7,99	-3,63	5	1	6,12	-1,51	3,98	6,17	4,90	6,39	3,89
enalapril	-1	3,46	-9,37	-9,38	0,20	7	2	-2,35	2,30	3,75	3,15	9,59	4,19	3,48
eplerenone		3,20	-10,28	-10,00	-2,81	6	0	1,05	1,96	4,15		7,89	4,43	3,73
escitalopram	1	2,57	-9,21	-8,37	-8,44	3	0	0,39	0,87	3,24	9,57	3,63	5,46	3,08

estradiol benzoate	0	5,95	-10,11	-9,97	-1,40	4	0	2,51	4,20	3,73		6,04	4,77	3,58
estrone	0	5,76	-10,17	-9,95	-2,21	6	1	2,53	2,86	4,02	10,25	9,77	4,73	3,67
famotidine	0	1,01	-8,55	-7,97	-5,85	9	8	-1,02	-1,11	3,36	7,93	23,78	4,85	2,69
fexofenadine	0	2,61	-8,98	-8,75	-2,28	5	3	2,3	3,81	5,02	6,93	8,10	6,27	4,87
fluoxetine	1	4,43	-9,41	-9,02	-3,95	2	1	1,56	1,93	3,09	10,05	2,13	4,99	2,71
flupenthixol	0	4,80	-7,61	-6,76	-8,51	3	1	4,42	5,33	4,30	7,05	5,20	5,85	3,65
furosemide	-1	3,27	-8,92	-7,90	-10,23	7	4	-0,12	-0,24	3,11	3,04	13,10	4,19	2,42
gliclazide	-1	5,31	-9,38	-8,30	-10,80	6	2	-0,28	1,90	3,23	6,07	8,69	4,91	2,86
haloperidol	0	2,85	-9,22	-8,75	-4,64	3	1	2,11	1,31	3,76	8,04	4,05	5,29	3,37
hydrocortisone acetate	0	4,23	-10,14	-10,06	-0,86	4	0	4,53	4,20	3,73	12,42	6,04	4,77	3,58
hydroxyzine	0	1,27	-8,81	-8,75	-0,65	4	1	2	1,23	3,75	6,62	3,59	5,48	3,54
ibuprofen	-1	1,91	-9,39	-9,58	1,92	2	1	0,8	3,83	2,06	4,41	3,73	2,52	2,42
indomethacin	-1	2,98	-8,69	-8,12	-5,75	5	1	-0,16	-1,43	3,58	3,96	6,36	4,94	3,05
ketoprofen	-1	4,50	-9,96	-9,56	-3,99	3	1	-0,25	2,56	2,54	4,23	5,44	4,07	2,36
ketotifen	1	4,07	-9,08	-8,07	-10,10	2	0	3,28	0,26	3,09	8,84	4,86	3,89	2,87
lamotrigine	0	2,75	-8,22	-7,66	-5,61	5	4	-0,19	1,38	2,56	5,39	9,07	3,15	1,93
levocetizine	-1	1,73	-9,00	-8,83	-1,67	5	1	-1,13	3,48	3,89	3,46	5,30	5,59	3,55
levofloxacin	-1	7,21	-8,72	-7,88	-8,37	7	1	0,65	0,62	3,61	5,19	7,33	4,75	3,06
loperamide	0	4,65	-8,52	-8,50	-0,23	4	1	3,53	5,01	4,77	7,76	4,38	4,89	4,33
loratadine	0	2,90	-9,02	-8,36	-6,59	4	0	5,94	0,30	3,69	4,27	4,24	4,93	3,31
lorazepam	0	6,40	-7,77	-7,65	-1,17	4	2	2,47	3,42	3,21	10,8	6,17	2,58	2,53
medazepam	0	4,08	-8,34	-8,28	-0,59	2	0	4,42	4,29	3,30	6,18	1,56	2,80	2,49
meloxicam	-1	5,35	-7,64	-6,38	-12,59	7	2	-0,09	-1,16	3,51	4,5	13,62	4,03	2,71
methyldopa	0	1,56	-9,07	-9,34	2,75	5	5	-2,38	-1,46	2,11	5,57	10,38	3,34	1,85
mianserin	1	0,56	-8,66	-8,93	2,68	2	0	2,76	0,94	2,64	8,26	0,65	3,65	2,64
midazolam	0	3,03	-9,24	-9,11	-1,28	3	0	3,92	3,41	3,26	6,03	2,53	3,04	2,76
mirtazapine	0	1,76	-8,79	-8,81	0,19	3	0	1,97	1,16	2,65	8,1	1,94	3,57	2,60
montelukast	-1	3,34	-7,46	-6,83	-6,36	4	2	5,19	4,13	5,88	4,76	7,04	7,27	5,47
naproxen	-1	1,92	-9,10	-8,82	-2,79	3	1	0,47	2,99	2,30	4,84	4,65	3,89	2,15

nebivolol	1	2,46	-9,05	-8,94	-1,07	5	3	2,4	-1,03	4,05	8,65	7,10	5,05	3,53
olanzapine	0	7,55	-9,20	-8,41	-7,85	6	1	-1,48	-1,56	3,28	7,33	8,41	6,19	3,01
oxazepam	0	3,38	-9,09	-8,98	-1,06	4	2	2,32	2,91	2,87	10,94	6,17	2,72	2,72
oxybutinin	0	1,02	-9,18	-9,11	-0,66	3	1	5,53	3,24	3,57	8,24	4,98	5,82	3,61
pantoprazole	0	7,25	-9,09	-8,19	-9,03	6	1	1,5	-1,89	3,83	8,33	8,63	5,08	3,01
paracetamol	0	3,28	-8,58	-8,65	0,73	3	2	0,34	-1,32	1,51	9,86	4,93	3,03	1,39
paroxetine	1	2,12	-9,00	-9,04	0,34	4	1	1,19	-0,49	3,31	9,68	3,97	4,12	2,99
pergolide	0	1,93	-8,35	-8,50	1,51	2	1	2,29	2,29	3,14	7,98	4,43	4,50	3,09
perindopril	-1	6,26	-9,78	-10,07	2,88	7	2	-0,01	2,06	3,68	3,15	9,59	5,43	3,52
phenytoin	0	2,98	-9,84	-9,55	-2,94	4	2	2,48	0,73	2,52	6,32	5,82	3,32	2,26
pindolol	1	3,19	-8,47	-8,53	0,63	3	3	0,19	-1,23	2,48	9,54	5,73	4,60	2,44
piroxicam	-1	11,24	-8,63	-8,84	2,05	7	2	-2,14	1,07	3,33	4,5	10,80	2,66	2,50
prednisolone	0	3,68	-10,01	-9,54	-4,70	5	3	1,49	2,01	3,46	12,46	9,48	3,96	3,14
progesterone		5,88	-9,29	-9,03	-2,60	3	1	6,24	3,12	3,77		4,65	4,54	3,60
promazine	1	2,86	-7,54	-7,15	-3,93	2	0	2,67	3,25	2,84	9,43	3,18	2,93	2,53
promethazine	1	3,40	-7,83	-7,76	-0,65	2	0	3,2	-0,20	2,84	8,98	3,18	4,36	2,76
propafenone	1	2,97	-8,77	-8,59	-1,75	4	2	2,06	1,86	3,29	9,31	5,86	5,36	3,28
propranolol	1	1,53	-8,36	-7,79	-5,71	3	2	1,27	2,80	2,59	9,5	4,15	3,09	2,56
quetiapine	0	1,57	-8,68	-7,95	-7,24	5	1	1,55	2,84	3,84	6,74	7,36	5,42	3,55
quinapril	-1	5,13	-9,50	-9,59	0,91	5	2	0,85	1,69	4,39	3,39	9,59	6,10	4,10
risperidone	0	3,42	-8,93	-8,06	-8,76	6	0	2,27	0,63	4,10	8,07	6,19	4,91	3,73
rizatriptan	1	1,76	-8,14	-7,45	-6,90	4	1	2,68	-0,27	3,12	9,49	5,91	4,26	2,90
rosuvastatin	-1	5,66	-9,19	-8,13	-10,63	8	3	-2,63	1,18	4,82	4,25	14,09	6,89	4,12
roxitromicin	0			0,00		16	5	2,9	2,90		8,16	21,69		
rupatadine	0	1,61	-8,99	-8,35	-6,43	3	0	5,97	1,63	4,15	6,95	2,90	4,97	3,94
sertraline	1	2,87	-9,19	-9,09	-0,94	1	1	2,77	1,68	3,06	9,47	1,20	4,21	2,72
sildenafil	0	5,84	-8,91	-9,86	9,47	8	1	2,27	-1,47	4,75	6,03	10,91	6,47	4,20
simvastatin	0	5,78	-9,10	-9,33	2,25	5	1	4,41	4,43	4,19	13,49	7,28	5,71	4,10
spironolactone		1,67	-9,76	-8,96	-7,98	4	0	3,12	3,33	4,17		8,57	4,94	3,82

sulpiride	1	3,65	-7,89	-6,22	-16,74	7	3	-1,12	0,48	3,41	8,97	11,01	5,08	3,02
telmisartan	-1	0,71	-8,56	-8,02	-5,48	6	1	4,76	7,39	5,01	3,86	6,31	6,39	4,69
temazepam	0	2,48	-9,17	-9,09	-0,83	4	1	2,15	3,15	3,01	11,66	5,29	2,84	2,53
theophylline	0	3,47	-9,10	-8,53	-5,77	6	1	-0,2	-1,31	1,80	8,6	6,93	3,02	1,50
thioridazine	0	0,98	-7,92	-7,65	-2,68	2	0	3,94	4,18	3,71	9,84	5,71	4,89	3,50
tolterodine	1	2,18	-8,95	-9,17	2,20	2	1	2,94	3,24	3,25	10,68	2,35	5,73	3,44
trazodone	0	3,41	-8,50	-7,88	-6,21	6	0	1,58	2,80	3,72	7,52	4,24	5,01	3,36
tropicamid	0	4,06	-9,68	-9,40	-2,81	3	1	1,15	-0,01	2,84	5,32	5,34	4,15	2,76
valproic acid	-1	1,93	-11,19	-12,19	10,01	2	1	0,16	2,61	1,44	4,82	3,73	3,75	5,54
valsartan	-1	2,92	-9,69	-9,05	-6,39	8	2	0,05	3,88	4,22	3,56	11,21	5,46	3,92
venlafaxine	1	3,25	-9,02	-9,29	2,73	3	1	1,07	1,44	2,77	9,27	3,27	4,44	2,85
verapamil	1	5,44	-8,76	-8,85	0,90	6	0	2,33	0,57	4,55	8,97	6,40	7,51	4,53
zolmitriptane	1	4,09	-8,73	-8,57	-1,57	5	2	-0,44	-1,01	2,89	9,52	5,74	4,68	2,74
zolpidem	0	6,69	-8,37	-8,33	-0,45	4	0	3,02	0,86	3,07	6,77	3,76	3,33	2,94
zopiclone	0	5,47	-9,13	-8,95	-1,78	9	0	-42	2,31	3,89	6,7	9,18	3,36	3,86
zuclopenthixol	0	2,45	-7,57	-7,12	-4,53	3	1	5,06	4,97	3,97	7,03	5,20	5,58	3,55

1 – kod opisujący właściwości kwasowo-zasadowe: (-1) – kwasy; (0) – związki neutralne; (1) - zasady

2 – wartość pomnożona razy 10

3 – wartość podzielona przez 100

4 – wartość podzielona przez 10

Tabela 38. Dane chromatograficzne i ich pochodne uzyskane z eksperymentu NP TLC dla 129 związków

nazwa leku	C _{NP} *	NP**	NP/C	NP/PSA	R _M NP	R _M NP	R _M NP/C	R _M NP/PSA	R _M NP/PB	R _M NP/logP	R _M NP/B2	NP/B2	NP/PB	NP/logP
acebutolol	0,45	0,46	1,02	0,52	0,07	0,09	0,80	0,0008	0,268	-0,2110	-0,081	-0,54	1,77	-1,39
aceclofenac	0,89	0,90	1,01	1,19	-0,95	-0,91	1,05	-0,0126	-0,964	-0,2696	1,439	-1,36	0,91	0,25
acenocumarol	0,99	0,98	0,99	0,90	-1,69	-2,00	0,85	-0,0154	-1,712	-0,6307	1,404	-0,81	0,99	0,37
acetylsalicylic acid	0,89	0,90	1,01	1,41	-0,93	-0,91	1,02	-0,0146	-0,935	-0,7159	1,978	-1,90	0,90	0,69
aciclovir	0,73	0,73	0,99	0,66	-0,42	-0,43	0,97	-0,0038	-2,005	0,2903	0,348	-0,60	3,45	-0,50
alprazolam	0,85	0,86	1,01	2,25	-0,79	-0,75	1,05	-0,0207	-0,985	-0,1685	12,466	-13,60	1,08	0,18
amiodarone	0,55	0,6	1,09	1,41	-0,18	-0,09	2,02	-0,0041	-0,183	-0,0585	1,296	-4,42	0,63	0,20
amlodipine	0,56	0,56	1,00	0,56	-0,10	-0,10	1,00	-0,0010	-0,107	0,0694	0,100	-0,53	0,57	-0,37
amoxilicillin	0,68	0,68	1,00	0,43	-0,33	-0,33	1,00	-0,0021	-1,637	2,1824	0,165	-0,34	3,40	-4,53
astemizol	0,62	0,61	0,98	1,63	-0,19	-0,21	0,91	-0,0052	-0,201	-0,2736	3,791	-11,90	0,63	0,86
atorvastatin	0,9	0,9	1,00	0,81	-0,95	-0,95	1,00	-0,0085	-0,974	-0,6196	0,769	-0,72	0,92	0,58
atropine	0,27	0,26	0,96	0,52	0,45	0,43	1,05	0,0091	2,524	0,2656	-1,822	-1,04	1,44	0,15
azithromycin	0,63	0,63	1,00	0,35	-0,23	-0,23	1,00	-0,0013	-0,797	-0,0947	0,099	-0,27	2,17	0,26
betaxolol	0,66	0,65	0,98	1,28	-0,27	-0,29	0,93	-0,0053	-0,538	-0,2688	1,016	-2,46	1,30	0,65
bilastine	0,46	0,44	0,96	0,56	0,10	0,07	1,50	0,0013	0,120	0,0499	-0,148	-0,62	0,51	0,21
biperiden	0,68	0,65	0,96	2,77	-0,27	-0,33	0,82	-0,0115	-0,448	-0,0992	-1,568	3,79	1,08	0,24
bisoprolol	0,67	0,66	0,98	1,09	-0,28	-0,31	0,91	-0,0046	-0,928	-0,1307	0,675	-1,59	2,18	0,31
bromazepam	0,87	0,90	1,03	1,65	-0,93	-0,83	1,13	-0,0171	-1,329	-0,3593	2,885	-2,77	1,28	0,35
bromocriptine	0,95	0,96	1,01	0,81	-1,38	-1,28	1,08	-0,0117	-1,484	-0,3081	1,027	-0,71	1,03	0,21
buspirone	0,57	0,58	1,01	0,83	-0,13	-0,12	1,07	-0,0019	-0,138	-0,1113	0,231	-1,01	0,61	0,49
caffeine	0,82	0,82	1,00	1,53	-0,66	-0,66	1,00	-0,0123	-2,195	0,6213	2,130	-2,65	2,73	-0,77
capecitabine	0,92	0,92	1,00	0,76	-1,06	-1,06	1,00	-0,0088	-1,768	-2,0013	0,766	-0,66	1,53	1,74
captopril	0,77	0,74	0,96	1,28	-0,45	-0,52	0,87	-0,0079	-1,652	-1,5142	1,212	-1,97	2,69	2,47
carbamazepine	0,95	0,95	0,99	2,04	-1,24	-1,28	0,97	-0,0267	-1,625	-0,5881	6,357	-4,86	1,24	0,45
carbегoline	0,68	0,68	1,00	0,95	-0,33	-0,33	1,00	-0,0046	-0,798	-1,1288	0,546	-1,13	1,66	2,34
carvedilol	0,73	0,9	1,23	1,19	-0,95	-0,43	2,21	-0,0126	-0,974	0,4678	1,437	-1,36	0,92	-0,44
cefuroxime	0,97	0,98	1,01	0,49	-1,69	-1,51	1,12	-0,0085	-3,380	0,8126	0,641	-0,37	1,96	-0,47
celecoxib	0,98	0,99	1,01	1,27	-2,00	-1,69	1,18	-0,0256	-2,057	-1,9565	2,848	-1,41	1,02	0,97

celiprolol	0,45	0,46	1,02	0,51	0,07	0,09	0,80	0,0008	0,253	-0,1547	-0,077	-0,51	1,67	-1,02
cephalexin	0,9	0,9	1,00	2,77	-0,95	-0,95	1,00	-0,0293	-6,816	0,7284	-35,766	33,73	6,43	-0,69
cetirizine	0,64	0,65	1,01	1,22	-0,26	-0,25	1,04	-0,0049	-0,279	-0,1229	0,861	-2,14	0,69	0,31
chloramphenikol	0,99	0,97	0,98	0,84	-1,51	-2,00	0,76	-0,0131	-2,745	6,0386	1,162	-0,75	1,76	-3,88
chlorthalidone	0,43	0,43	0,99	1,34	0,13	0,12	1,07	0,0041	0,146	0,0348	3,408	11,03	0,47	0,11
chlortalidone	0,96	0,96	0,99	0,81	-1,33	-1,38	0,96	-0,0113	-1,769	2,1060	0,991	-0,71	1,27	-1,52
cimetidine	0,64	0,67	1,05	0,59	-0,31	-0,25	1,23	-0,0027	-1,809	0,5213	0,240	-0,52	3,94	-1,14
ciprofloxacin	0,11	0,11	1,00	0,15	0,91	0,91	1,00	0,0125	3,027	-0,4908	-1,467	-0,18	0,37	-0,06
cisapride	0,64	0,63	0,98	0,73	-0,23	-0,25	0,93	-0,0027	-0,237	-0,1027	0,279	-0,76	0,65	0,28
clarithromycin	0,99	0,99	0,99	0,54	-1,82	-2,00	0,91	-0,0099	-2,596	-0,5751	0,764	-0,41	1,41	0,31
clindamycin	0,69	0,66	0,96	0,62	-0,29	-0,35	0,83	-0,0027	-0,310	-0,1812	0,252	-0,58	0,71	0,42
clobazam	0,95	0,95	1,00	2,36	-1,28	-1,28	1,00	-0,0318	-1,504	0,9134	13,161	-9,78	1,12	-0,68
clonidine	0,49	0,50	1,02	1,37	0,00	0,02	0,00	0,0000	0,000	0,0000	0,000	-14,00	1,67	1,79
clorazepate	0,94	0,94	1,00	0,92	-1,19	-1,19	1,00	-0,0117	-1,226	-0,4345	1,099	-0,86	0,96	0,34
clozapine	0,45	0,46	1,01	14,04	0,08	0,09	0,90	0,0242	0,079	0,0443	0,158	0,92	0,46	0,26
cypheptadine	0,45	0,43	0,94	1,54	0,13	0,09	1,51	0,0048	0,135	0,1132	1,251	4,05	0,44	0,37
desloratidine	0,36	0,35	0,97	1,40	0,27	0,25	1,08	0,0108	0,318	3,8406	1,813	2,36	0,41	5,00
diazepam	0,95	0,95	0,99	2,89	-1,24	-1,28	0,97	-0,0378	-1,260	-0,4103	-50,868	38,92	0,96	0,31
digoxin	0,80	0,77	0,96	0,38	-0,51	-0,60	0,85	-0,0025	-2,050	-0,1920	0,190	-0,28	3,06	0,29
dihydroergotamine	0,72	0,75	1,04	0,63	-0,48	-0,41	1,16	-0,0040	-0,513	0,2261	0,355	-0,56	0,81	-0,36
diphenhydramin	0,42	0,33	0,77	2,61	0,32	0,14	2,26	0,0255	0,322	0,1519	0,913	0,94	0,33	0,16
doxazosin	0,8	0,81	1,01	0,66	-0,63	-0,60	1,05	-0,0051	-0,643	-0,2943	0,445	-0,57	0,83	0,38
doxycycline	0,06	0,05	0,75	0,02	1,33	1,19	1,11	0,0073	1,474	-0,7133	-0,562	-0,02	0,05	-0,02
drotaverine	0,61	0,59	0,97	1,21	-0,16	-0,19	0,81	-0,0032	-0,181	0,1047	0,669	-2,50	0,67	-0,39
enalapril	0,33	0,33	0,98	0,34	0,32	0,31	1,03	0,0033	0,577	0,1380	-0,321	-0,33	0,59	0,14
eplerenone	0,94	0,94	1,00	1,19	-1,19	-1,19	1,00	-0,0151	-2,390	-0,6097	1,670	-1,31	1,88	0,48
escitalopram	0,42	0,42	1,00	1,16	0,14	0,14	1,00	0,0039	0,250	0,1611	-4,227	-12,67	0,75	0,48
estradiol benzoate	0,97	0,98	1,01	1,62	-1,69	-1,51	1,12	-0,0280	-1,779	-0,4024	1,583	-0,92	1,03	0,23
estrone	0,99	0,99	1,00	1,01	-2,00	-2,00	1,00	-0,0204	-2,101	-0,6978	1,963	-0,97	1,04	0,35
famotidine	0,70	0,71	1,01	0,30	-0,39	-0,37	1,06	-0,0016	-2,222	0,3503	0,119	-0,22	4,06	-0,64
fexofenadine	0,61	0,60	0,98	0,73	-0,17	-0,19	0,86	-0,0021	-0,257	-0,0438	0,223	-0,79	0,92	0,16

fluoxetine	0,68	0,67	0,99	3,15	-0,31	-0,33	0,94	-0,0145	-0,325	-0,1594	-1,487	3,24	0,71	0,35
flupenthixol	0,51	0,52	1,02	1,00	-0,03	-0,02	2,00	-0,0007	-0,037	-0,0065	0,122	-1,82	0,55	0,10
furosemide	0,92	0,92	1,00	0,70	-1,06	-1,06	1,00	-0,0081	-1,117	4,4196	0,685	-0,59	0,97	-3,83
gliclazide	0,95	0,95	1,00	1,09	-1,28	-1,28	1,00	-0,0147	-1,360	-0,6730	1,516	-1,13	1,01	0,50
haloperidol	0,66	0,65	0,98	1,59	-0,26	-0,29	0,90	-0,0064	-0,282	-0,1980	2,551	-6,35	0,70	0,49
hydrocortisone acetate	0,96	0,96	1,00	1,59	-1,38	-1,38	1,00	-0,0228	-1,453	-0,3286	3,286	-2,29	1,01	0,23
hydroxyzine	0,55	0,55	1,00	1,53	-0,09	-0,09	1,00	-0,0024	-0,094	-0,0709	3,108	-19,61	0,59	0,45
ibuprofen	0,93	0,90	0,96	2,40	-0,93	-1,12	0,83	-0,0249	-0,980	-0,2430	18,687	-17,97	0,94	0,23
indomethacin	0,88	0,90	1,02	1,42	-0,95	-0,87	1,10	-0,0150	-0,984	0,6673	2,028	-1,91	0,93	-0,63
ketoprofen	0,89	0,89	1,00	1,64	-0,91	-0,91	1,00	-0,0167	-0,917	-0,3547	2,812	-2,76	0,90	0,35
ketotifen	0,34	0,36	1,06	0,74	0,25	0,29	0,87	0,0051	0,333	0,9611	-1,087	-1,57	0,48	1,38
lamotrigine	0,89	0,90	1,01	0,99	-0,93	-0,91	1,02	-0,0103	-1,692	-0,6744	1,029	-0,99	1,63	0,65
levocetizine	0,63	0,64	1,02	1,21	-0,25	-0,23	1,08	-0,0047	-0,273	-0,0718	0,830	-2,13	0,70	0,18
levofloxacin	0,17	0,17	0,97	0,23	0,70	0,69	1,02	0,0096	2,272	1,1358	-1,125	-0,26	0,53	0,27
loperamide	0,68	0,67	0,99	1,53	-0,31	-0,33	0,94	-0,0070	-0,317	-0,0614	2,004	-4,37	0,69	0,13
loratadine	0,94	0,94	1,00	2,22	-1,19	-1,19	1,00	-0,0282	-1,219	-3,9833	9,061	-7,13	0,96	3,13
lorazepam	0,94	0,94	1,00	1,52	-1,19	-1,19	1,00	-0,0194	-1,374	-0,3494	2,716	-2,14	1,08	0,27
medazepam	0,91	0,94	1,03	6,03	-1,19	-1,00	1,19	-0,0766	-1,207	-0,2785	-4,018	3,16	0,95	0,22
meloxicam	0,99	0,98	0,99	0,72	-1,69	-2,00	0,85	-0,0124	-1,707	1,4571	1,035	-0,60	0,99	-0,84
methyldopa	0,38	0,37	0,96	0,35	0,24	0,21	1,13	0,0023	1,202	-0,1647	-0,216	-0,33	1,83	-0,25
mianserin	0,54	0,55	1,01	8,41	-0,08	-0,07	1,13	-0,0121	-0,087	-0,0834	-0,177	1,23	0,61	0,58
midazolam	0,82	0,83	1,01	3,27	-0,67	-0,66	1,02	-0,0267	-0,694	-0,1975	-4,709	5,77	0,85	0,24
mirtazapine	0,39	0,39	0,99	1,99	0,20	0,19	1,05	0,0105	0,239	0,1754	0,858	1,62	0,45	0,33
montelukast	0,95	0,95	1,00	1,35	-1,28	-1,28	1,00	-0,0182	-1,292	-0,3096	2,206	-1,64	0,96	0,23
naproxen	0,92	0,89	0,97	1,91	-0,91	-1,06	0,86	-0,0195	-0,917	-0,3037	4,598	-4,51	0,90	0,30
nebivolol	0,75	0,75	1,00	1,06	-0,48	-0,48	1,00	-0,0067	-0,487	0,4632	0,811	-1,28	0,77	-0,73
olanzapine	0,28	0,29	1,02	0,34	0,40	0,41	0,97	0,0048	2,283	-0,2561	-0,500	-0,36	1,63	-0,18
oxazepam	0,93	0,94	1,01	1,52	-1,16	-1,12	1,03	-0,0188	-1,362	-0,3979	2,631	-2,12	1,10	0,32
oxybutinin	0,68	0,66	0,97	1,33	-0,29	-0,33	0,88	-0,0058	-0,313	-0,0889	1,155	-2,65	0,72	0,20
pantoprazole	0,93	0,92	0,99	1,07	-1,06	-1,12	0,94	-0,0123	-1,082	0,5612	1,271	-1,10	0,94	-0,49
paracetamol	0,93	0,94	1,01	1,90	-1,16	-1,12	1,03	-0,0235	-4,632	0,8772	4,779	-3,86	3,74	-0,71

paroxetine	0,55	0,56	1,02	1,41	-0,10	-0,09	1,20	-0,0026	-0,111	0,2137	1,183	-6,33	0,60	-1,14
pergolide	0,48	0,47	0,98	1,06	0,05	0,03	1,50	0,0012	0,058	0,0228	-0,322	-2,90	0,52	0,21
perindopril	0,47	0,46	0,97	0,47	0,08	0,05	1,50	0,0008	0,523	0,0381	-0,079	-0,46	3,03	0,22
phenytoin	0,97	0,97	1,00	1,67	-1,51	-1,51	1,00	-0,0259	-1,677	-2,0680	3,929	-2,52	1,08	1,33
pindolol	0,53	0,52	0,98	0,91	-0,03	-0,05	0,67	-0,0006	-0,087	0,0283	0,094	-1,41	1,30	-0,42
piroxicam	0,98	0,98	1,00	0,91	-1,69	-1,69	1,00	-0,0157	-1,707	-1,5796	1,432	-0,83	0,99	0,92
prednisolone	0,94	0,94	0,99	0,99	-1,16	-1,19	0,97	-0,0122	-1,287	-0,5761	1,193	-0,96	1,04	0,47
progesterone	0,96	0,96	1,00	2,06	-1,38	-1,38	1,00	-0,0297	-1,416	-0,4424	6,989	-4,86	0,98	0,31
promazine	0,39	0,37	0,95	1,16	0,23	0,19	1,19	0,0073	0,246	0,0711	6,000	9,61	0,39	0,11
promethazine	0,43	0,42	0,98	1,32	0,14	0,12	1,15	0,0044	0,151	-0,7009	3,639	10,90	0,45	-2,10
propafenone	0,57	0,59	1,04	1,01	-0,16	-0,12	1,29	-0,0027	-0,163	-0,0850	0,405	-1,51	0,61	0,32
propranolol	0,54	0,50	0,93	1,21	0,00	-0,07	0,00	0,0000	0,000	0,0000	0,000	-4,28	0,56	0,18
quetiapine	0,68	0,68	1,00	0,92	-0,33	-0,33	1,00	-0,0044	-0,394	-0,1153	0,519	-1,08	0,82	0,24
quinapril	0,44	0,44	1,00	0,46	0,10	0,10	1,00	0,0011	0,108	0,0620	-0,106	-0,45	0,45	0,26
risperidone	0,29	0,29	0,98	0,46	0,40	0,39	1,03	0,0064	0,454	0,6341	-0,900	-0,64	0,32	0,45
rizatriptan	0,20	0,20	0,98	0,33	0,62	0,60	1,02	0,0104	4,398	-2,2806	-1,544	-0,49	1,39	-0,72
rosuvastatin	0,9	0,89	0,99	0,63	-0,91	-0,95	0,95	-0,0064	-1,032	-0,7695	0,532	-0,52	1,01	0,75
roxitromicin	0,91	0,92	1,01	0,42	-1,06	-1,00	1,06	-0,0049	-1,105	-0,3658	0,363	-0,31	0,96	0,32
rupatadine	0,42	0,43	1,02	1,48	0,12	0,14	0,87	0,0042	0,124	0,0751	1,480	5,20	0,44	0,26
sertraline	0,53	0,53	1,00	4,41	-0,05	-0,05	1,00	-0,0043	-0,053	-0,0311	-0,147	1,49	0,54	0,32
sildenafil	0,69	0,67	0,97	0,61	-0,31	-0,35	0,89	-0,0028	-0,320	0,2092	0,256	-0,56	0,70	-0,46
simvastatin	0,19	0,17	0,89	0,23	0,69	0,63	1,09	0,0095	0,725	0,1554	-1,114	-0,27	0,18	0,04
spironolactone	0,98	0,96	0,97	1,11	-1,33	-1,69	0,78	-0,0155	-1,474	-0,3984	1,609	-1,16	1,06	0,29
sulpiride	0,27	0,26	0,96	0,24	0,45	0,43	1,05	0,0041	1,136	0,9464	-0,374	-0,21	0,65	0,54
telmisartan	0,90	0,90	0,99	1,42	-0,93	-0,95	0,98	-0,0148	-0,935	-0,1259	2,013	-1,94	0,90	0,12
temazepam	0,94	0,94	0,99	1,77	-1,16	-1,19	0,97	-0,0219	-1,206	-0,3676	3,867	-3,12	0,97	0,30
theophylline	0,86	0,87	1,01	1,25	-0,81	-0,79	1,02	-0,0116	-2,017	0,6158	1,436	-1,54	2,16	-0,66
thioridazine	0,47	0,43	0,91	0,75	0,12	0,05	2,35	0,0021	0,129	0,0293	-0,334	-1,17	0,45	0,10
tolterodine	0,1	0,08	0,80	0,34	1,06	0,95	1,11	0,0452	1,101	0,3274	6,186	0,47	0,08	0,02
trazodone	0,71	0,72	1,01	1,69	-0,40	-0,39	1,03	-0,0094	-0,434	-0,1427	3,044	-5,45	0,78	0,26
tropicamid	0,85	0,86	1,01	1,61	-0,79	-0,75	1,05	-0,0148	-1,752	78,8370	2,561	-2,79	1,91	-86,00

valproic acid	0,69	0,67	0,97	1,80	-0,31	-0,35	0,89	-0,0082	-0,362	-0,1178	6,176	-13,45	0,79	0,26
valsartan	0,89	0,91	1,02	0,81	-0,98	-0,91	1,08	-0,0087	-1,025	-0,2523	0,786	-0,73	0,95	0,23
venlafaxine	0,36	0,37	1,03	1,13	0,23	0,25	0,93	0,0071	0,856	0,1605	9,712	15,55	1,37	0,26
verapamil	0,54	0,53	0,97	0,82	-0,04	-0,07	0,62	-0,0007	-0,048	-0,0763	0,091	-1,10	0,58	0,92
zolmitriptane	0,31	0,29	0,94	0,51	0,39	0,35	1,12	0,0068	1,555	-0,3850	-1,049	-0,78	1,16	-0,29
zolpidem	0,86	0,88	1,02	2,34	-0,87	-0,79	1,10	-0,0230	-0,941	-1,0062	15,802	-16,07	0,96	1,02
zopiclone	0,96	0,96	1,00	1,05	-1,38	-1,38	1,00	-0,0150	-3,067	-0,5975	1,498	-1,04	2,13	0,42
zuclopenthixol	0,47	0,47	1,00	0,90	0,05	0,05	1,00	0,0010	0,053	0,0105	-0,183	-1,65	0,48	0,09

* wartość R_f z nieimpregnowanej płytki NP (kontrola)

** wartość R_f z płytki NP impregnowanej 2 mg/mL roztworem BSA

Tabela 39. Dane chromatograficzne i ich pochodne uzyskane z eksperymentu RP TLC dla 129 związków

nazwa leku	C _{RP} *	RP**	RP/C	RP/PSA	R _M RP	R _M RP	R _M RP/C	R _M RP/PSA	R _M RP/PB	R _M RP/logP	R _M RP/B2	RP/B2	RP/PB	RP/logP
acebutolol	0,78	0,82	1,05	0,94	-0,55	-0,66	1,20	-0,01	-2,533	1,996	0,770	-0,96	3,15	-2,48
aceclofenac	0,93	0,93	1,00	1,23	-1,12	-1,12	1,00	-0,01	-1,135	-0,317	1,694	-1,40	0,94	0,26
acenocumarol	0,93	0,92	0,99	0,84	-1,12	-1,06	0,94	-0,01	-1,075	-0,396	0,881	-0,76	0,93	0,34
acetylsalicylic acid	0,98	0,99	1,01	1,56	-1,69	-2,00	1,18	-0,03	-2,006	-1,535	4,241	-2,10	0,99	0,76
aciclovir	0,99	0,98	0,99	0,89	-2,00	-1,69	0,85	-0,02	-8,049	1,166	1,397	-0,81	4,67	-0,68
alprazolam	0,80	0,78	0,98	2,05	-0,60	-0,55	0,91	-0,01	-0,687	-0,117	8,692	-12,33	0,98	0,17
amiodarone	0,33	0,34	1,03	0,80	0,31	0,29	0,94	0,01	0,300	0,096	-2,120	-2,50	0,35	0,11
amlodipine	0,61	0,68	1,11	0,68	-0,19	-0,33	1,69	0,00	-0,336	0,217	0,311	-0,65	0,70	-0,45
amoxilcillin	0,99	0,98	0,99	0,62	-2,00	-1,69	0,85	-0,01	-8,451	11,268	0,851	-0,49	4,90	-6,53
astemizol	0,65	0,62	0,95	1,66	-0,27	-0,21	0,79	-0,01	-0,220	-0,299	4,149	-12,10	0,64	0,87
atorvastatin	0,80	0,89	1,11	0,80	-0,60	-0,91	1,51	-0,01	-0,927	-0,590	0,731	-0,72	0,91	0,58
atropine	0,73	0,72	0,99	1,45	-0,43	-0,41	0,95	-0,01	-2,279	-0,240	1,645	-2,89	4,00	0,42
azithromycin	0,24	0,24	1,00	0,13	0,50	0,50	1,00	0,00	1,726	0,205	-0,214	-0,10	0,83	0,10
betaxolol	0,27	0,25	0,93	0,49	0,43	0,48	1,10	0,01	0,954	0,477	-1,804	-0,95	0,50	0,25
bilastine	0,76	0,72	0,95	0,92	-0,50	-0,41	0,82	-0,01	-0,471	-0,195	0,579	-1,02	0,83	0,34
biperiden	0,87	0,85	0,98	3,62	-0,83	-0,75	0,91	-0,03	-1,256	-0,278	-4,393	4,96	1,42	0,31
bisoprolol	0,57	0,56	0,98	0,93	-0,12	-0,10	0,86	0,00	-0,349	-0,049	0,254	-1,36	1,87	0,26
bromazepam	0,83	0,81	0,98	1,49	-0,69	-0,63	0,91	-0,01	-0,900	-0,243	1,952	-2,51	1,16	0,31
bromocriptine	0,69	0,70	1,01	0,59	-0,35	-0,37	1,06	0,00	-0,396	-0,082	0,274	-0,52	0,75	0,16
buspirone	0,70	0,69	0,99	0,99	-0,37	-0,35	0,94	0,00	-0,366	-0,294	0,613	-1,22	0,73	0,58
caffeine	0,91	0,90	0,99	1,68	-1,00	-0,95	0,95	-0,02	-3,181	0,900	3,087	-2,91	3,00	-0,85
capecitabine	0,90	0,89	0,99	0,74	-0,95	-0,91	0,95	-0,01	-1,513	-1,713	0,656	-0,64	1,48	1,68
captopril	0,99	0,99	1,00	1,72	-2,00	-2,00	1,00	-0,03	-7,257	-6,652	5,325	-2,64	3,60	3,30
carbamazepine	0,83	0,84	1,01	1,81	-0,69	-0,72	1,05	-0,02	-0,948	-0,343	3,707	-4,32	1,11	0,40
carbegoline	0,68	0,68	1,00	0,95	-0,33	-0,33	1,00	0,00	-0,798	-1,129	0,546	-1,13	1,66	2,34
carvedilol	0,59	0,61	1,03	0,81	-0,16	-0,19	1,23	0,00	-0,198	0,095	0,292	-0,92	0,62	-0,30
cefuroxime	0,88	0,87	0,99	0,44	-0,87	-0,83	0,95	0,00	-1,651	0,397	0,313	-0,33	1,74	-0,42
celecoxib	0,75	0,75	1,00	0,96	-0,48	-0,48	1,00	-0,01	-0,492	-0,468	0,681	-1,07	0,77	0,74

celiprolol	0,75	0,79	1,05	0,87	-0,48	-0,58	1,21	-0,01	-2,092	1,279	0,634	-0,87	2,87	-1,76
cephalexin	0,99	0,99	1,00	3,04	-2,00	-2,00	1,00	-0,06	-14,255	1,523	-74,799	37,11	7,07	-0,76
cetirizine	0,83	0,82	0,99	1,55	-0,69	-0,66	0,96	-0,01	-0,708	-0,312	2,187	-2,72	0,88	0,39
chloramphenikol	0,89	0,89	1,00	0,77	-0,91	-0,91	1,00	-0,01	-1,651	3,632	0,699	-0,69	1,62	-3,56
chlorthalidone	0,49	0,50	1,02	1,57	0,02	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	12,98	0,56	0,13
chlortalidone	0,91	0,92	1,01	0,78	-1,00	-1,06	1,06	-0,01	-1,414	1,684	0,792	-0,69	1,23	-1,46
cimetidine	0,88	0,87	0,99	0,76	-0,87	-0,83	0,95	-0,01	-4,856	1,399	0,645	-0,68	5,12	-1,47
ciprofloxacin	0,38	0,21	0,55	0,29	0,21	0,58	2,71	0,01	1,918	-0,311	-0,929	-0,34	0,70	-0,11
cisapride	0,65	0,62	0,95	0,72	-0,27	-0,21	0,79	0,00	-0,218	-0,094	0,256	-0,75	0,64	0,28
clarithromycin	0,83	0,78	0,94	0,43	-0,69	-0,55	0,80	0,00	-0,785	-0,174	0,231	-0,33	1,11	0,25
clindamycin	0,25	0,25	1,00	0,24	0,48	0,48	1,00	0,00	0,513	0,300	-0,417	-0,22	0,27	0,16
clobazam	0,79	0,80	1,01	1,99	-0,58	-0,60	1,05	-0,01	-0,708	0,430	6,197	-8,23	0,94	-0,57
clonidine	0,73	0,68	0,93	1,87	-0,43	-0,33	0,76	-0,01	-1,091	-1,169	9,165	-19,04	2,27	2,43
clorazepate	0,81	0,81	1,00	0,79	-0,63	-0,63	1,00	-0,01	-0,646	-0,229	0,579	-0,74	0,83	0,29
clozapine	0,57	0,57	1,00	17,59	-0,12	-0,12	1,00	-0,04	-0,124	-0,069	-0,247	1,15	0,58	0,32
cypheptadine	0,45	0,47	1,04	1,70	0,09	0,05	0,60	0,00	0,054	0,045	0,497	4,48	0,48	0,41
desloratidine	0,58	0,58	1,00	2,33	-0,14	-0,14	1,00	-0,01	-0,166	-2,003	-0,945	3,91	0,69	8,29
diazepam	0,77	0,77	1,00	2,36	-0,52	-0,52	1,00	-0,02	-0,535	-0,174	-21,613	31,71	0,79	0,26
digoxin	0,84	0,85	1,01	0,42	-0,72	-0,75	1,05	0,00	-3,013	-0,282	0,279	-0,31	3,40	0,32
dihydroergotamine	0,78	0,78	1,00	0,66	-0,55	-0,55	1,00	0,00	-0,591	0,261	0,409	-0,58	0,84	-0,37
diphenhydramin	0,58	0,54	0,93	4,33	-0,14	-0,07	0,50	-0,01	-0,071	-0,033	-0,200	1,55	0,55	0,26
doxazosin	0,75	0,73	0,97	0,59	-0,48	-0,43	0,91	0,00	-0,441	-0,202	0,305	-0,52	0,74	0,34
doxycycline	0,08	0,09	1,13	0,05	1,06	1,00	0,95	0,01	1,116	-0,540	-0,426	-0,04	0,10	-0,05
drotaverine	0,55	0,58	1,05	1,18	-0,09	-0,14	1,61	0,00	-0,160	0,093	0,593	-2,46	0,66	-0,38
enalapril	0,60	0,58	0,97	0,60	-0,18	-0,14	0,80	0,00	-0,255	-0,061	0,142	-0,59	1,05	0,25
eplerenone	0,84	0,85	1,01	1,08	-0,72	-0,75	1,05	-0,01	-1,507	-0,384	1,053	-1,19	1,70	0,43
escitalopram	0,55	0,52	0,95	1,43	-0,09	-0,03	0,40	0,00	-0,062	-0,040	1,048	-15,68	0,93	0,60
estradiol benzoate	0,63	0,62	0,98	1,03	-0,23	-0,21	0,92	0,00	-0,224	-0,051	0,199	-0,58	0,65	0,15
estrone	0,79	0,77	0,97	0,79	-0,58	-0,52	0,91	-0,01	-0,552	-0,183	0,516	-0,76	0,81	0,27
famotidine	0,98	0,99	1,01	0,42	-1,69	-2,00	1,18	-0,01	-11,404	1,798	0,613	-0,30	5,66	-0,89
fexofenadine	0,85	0,86	1,01	1,06	-0,75	-0,79	1,05	-0,01	-1,213	-0,207	1,053	-1,15	1,32	0,23

fluoxetine	0,54	0,73	1,35	3,43	-0,07	-0,43	6,20	-0,02	-0,457	-0,224	-2,088	3,53	0,77	0,38
flupenthixol	0,66	0,66	1,00	1,27	-0,29	-0,29	1,00	-0,01	-0,303	-0,054	1,010	-2,31	0,69	0,12
furosemide	0,96	0,96	1,00	0,73	-1,38	-1,38	1,00	-0,01	-1,453	5,751	0,891	-0,62	1,01	-4,00
gliclazide	0,83	0,80	0,96	0,92	-0,69	-0,60	0,87	-0,01	-0,640	-0,317	0,714	-0,95	0,85	0,42
haloperidol	0,61	0,64	1,05	1,58	-0,19	-0,25	1,29	-0,01	-0,272	-0,191	2,458	-6,30	0,70	0,49
hydrocortisone acetate	0,82	0,82	1,00	1,36	-0,66	-0,66	1,00	-0,01	-0,693	-0,157	1,568	-1,95	0,86	0,20
hydroxyzine	0,62	0,59	0,95	1,64	-0,21	-0,16	0,74	0,00	-0,170	-0,129	5,637	-21,04	0,63	0,48
ibuprofen	0,83	0,81	0,98	2,17	-0,69	-0,63	0,91	-0,02	-0,663	-0,164	12,645	-16,27	0,85	0,21
indomethacin	0,88	0,87	0,99	1,37	-0,87	-0,83	0,95	-0,01	-0,851	0,577	1,754	-1,85	0,90	-0,61
ketoprofen	0,91	0,86	0,95	1,58	-1,00	-0,79	0,78	-0,01	-0,796	-0,308	2,441	-2,66	0,87	0,34
ketotifen	0,75	0,74	0,99	1,52	-0,48	-0,45	0,95	-0,01	-0,606	-1,747	1,977	-3,22	0,99	2,85
lamotrigine	0,87	0,86	0,99	0,95	-0,83	-0,79	0,95	-0,01	-1,433	-0,571	0,872	-0,95	1,56	0,62
levocetizine	0,83	0,83	1,00	1,57	-0,69	-0,69	1,00	-0,01	-0,753	-0,198	2,287	-2,76	0,91	0,24
levofloxacin	0,27	0,30	1,11	0,41	0,43	0,37	0,85	0,01	1,187	0,594	-0,588	-0,48	0,97	0,48
loperamide	0,75	0,77	1,03	1,76	-0,48	-0,52	1,10	-0,01	-0,541	-0,105	3,419	-5,02	0,79	0,15
loratadine	0,68	0,68	1,00	1,60	-0,33	-0,33	1,00	-0,01	-0,334	-1,091	2,482	-5,16	0,69	2,27
lorazepam	0,83	0,83	1,00	1,35	-0,69	-0,69	1,00	-0,01	-0,792	-0,201	1,565	-1,89	0,95	0,24
medazepam	0,66	0,65	0,98	4,17	-0,29	-0,27	0,93	-0,02	-0,272	-0,063	-0,904	2,19	0,66	0,15
meloxicam	0,95	0,95	1,00	0,70	-1,28	-1,28	1,00	-0,01	-1,292	1,102	0,783	-0,58	0,96	-0,82
methyldopa	0,85	0,86	1,01	0,83	-0,75	-0,79	1,05	-0,01	-3,942	0,540	0,708	-0,77	4,30	-0,59
mianserin	0,55	0,55	1,00	8,49	-0,09	-0,09	1,00	-0,01	-0,097	-0,093	-0,197	1,24	0,61	0,59
midazolam	0,66	0,66	1,00	2,61	-0,29	-0,29	1,00	-0,01	-0,297	-0,084	-2,014	4,62	0,68	0,19
mirtazapine	0,58	0,58	1,00	2,99	-0,14	-0,14	1,00	-0,01	-0,165	-0,121	-0,591	2,45	0,68	0,50
montelukast	0,70	0,69	0,99	0,98	-0,37	-0,35	0,94	0,00	-0,351	-0,084	0,599	-1,19	0,70	0,17
naproxen	0,88	0,87	0,99	1,87	-0,87	-0,83	0,95	-0,02	-0,834	-0,276	4,181	-4,41	0,88	0,29
nebivolol	0,40	0,40	1,00	0,56	0,18	0,18	1,00	0,00	0,180	-0,171	-0,299	-0,68	0,41	-0,39
olanzapine	0,53	0,50	0,94	0,59	-0,05	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	-0,63	2,86	-0,32
oxazepam	0,83	0,84	1,01	1,36	-0,69	-0,72	1,05	-0,01	-0,847	-0,247	1,637	-1,91	0,99	0,29
oxybutinin	0,29	0,24	0,83	0,48	0,39	0,50	1,29	0,01	0,544	0,155	-2,008	-0,96	0,26	0,07
pantoprazole	0,85	0,83	0,98	0,96	-0,75	-0,69	0,91	-0,01	-0,703	0,364	0,825	-0,99	0,85	-0,44
paracetamol	0,92	0,92	1,00	1,86	-1,06	-1,06	1,00	-0,02	-4,243	0,804	4,378	-3,80	3,68	-0,70

paroxetine	0,60	0,67	1,12	1,69	-0,18	-0,31	1,75	-0,01	-0,327	0,628	3,474	-7,57	0,71	-1,37
pergolide	0,55	0,53	0,96	1,20	-0,09	-0,05	0,60	0,00	-0,058	-0,023	0,322	-3,27	0,59	0,23
perindopril	0,57	0,58	1,02	0,60	-0,12	-0,14	1,15	0,00	-0,935	-0,068	0,142	-0,59	3,87	0,28
phenytoin	0,87	0,86	0,99	1,48	-0,83	-0,79	0,95	-0,01	-0,876	-1,080	2,052	-2,24	0,96	1,18
pindolol	0,76	0,78	1,03	1,36	-0,50	-0,55	1,10	-0,01	-1,374	0,447	1,488	-2,11	1,95	-0,63
piroxicam	0,58	0,60	1,03	0,56	-0,14	-0,18	1,26	0,00	-0,178	-0,165	0,149	-0,51	0,61	0,56
prednisolone	0,87	0,88	1,01	0,93	-0,83	-0,87	1,05	-0,01	-0,961	-0,430	0,892	-0,91	0,98	0,44
progesterone	0,71	0,68	0,96	1,46	-0,39	-0,33	0,84	-0,01	-0,336	-0,105	1,658	-3,44	0,70	0,22
promazine	0,51	0,51	1,00	1,60	-0,02	-0,02	1,00	0,00	-0,018	-0,005	-0,451	13,24	0,54	0,16
promethazine	0,49	0,47	0,96	1,48	0,02	0,05	3,00	0,00	0,056	-0,261	1,355	12,20	0,51	-2,35
propafenone	0,56	0,61	1,09	1,04	-0,10	-0,19	1,85	0,00	-0,200	-0,104	0,498	-1,56	0,63	0,33
propranolol	0,64	0,63	0,98	1,52	-0,25	-0,23	0,93	-0,01	-0,257	-0,083	1,978	-5,39	0,70	0,23
quetiapine	0,73	0,69	0,95	0,94	-0,43	-0,35	0,80	0,00	-0,419	-0,122	0,551	-1,09	0,83	0,24
quinapril	0,57	0,56	0,98	0,58	-0,12	-0,10	0,86	0,00	-0,108	-0,062	0,106	-0,57	0,58	0,33
risperidone	0,62	0,58	0,94	0,94	-0,21	-0,14	0,66	0,00	-0,159	-0,223	0,316	-1,31	0,66	0,92
rizatriptan	0,72	0,77	1,07	1,30	-0,41	-0,52	1,28	-0,01	-3,748	1,944	1,316	-1,93	5,50	-2,85
rosuvastatin	0,92	0,88	0,96	0,62	-1,06	-0,87	0,82	-0,01	-0,983	-0,733	0,507	-0,52	1,00	0,75
roxitromicin	0,80	0,79	0,99	0,36	-0,60	-0,58	0,96	0,00	-0,599	-0,198	0,197	-0,27	0,82	0,27
rupatadine	0,55	0,52	0,95	1,79	-0,09	-0,03	0,40	0,00	-0,035	-0,021	-0,420	6,29	0,53	0,32
sertraline	0,49	0,48	0,98	3,99	0,02	0,03	2,00	0,00	0,035	0,021	0,098	1,35	0,49	0,29
sildenafil	0,77	0,76	0,99	0,70	-0,52	-0,50	0,95	0,00	-0,521	0,341	0,417	-0,63	0,79	-0,52
simvastatin	0,66	0,65	0,98	0,89	-0,29	-0,27	0,93	0,00	-0,283	-0,061	0,435	-1,05	0,68	0,15
spironolactone	0,78	0,77	0,99	0,90	-0,55	-0,52	0,95	-0,01	-0,583	-0,158	0,636	-0,93	0,86	0,23
sulpiride	0,85	0,86	1,01	0,78	-0,75	-0,79	1,05	-0,01	-1,971	-1,642	0,649	-0,71	2,15	1,79
telmisartan	0,87	0,85	0,98	1,35	-0,83	-0,75	0,91	-0,01	-0,757	-0,102	1,630	-1,84	0,85	0,12
temazepam	0,79	0,79	1,00	1,49	-0,58	-0,58	1,00	-0,01	-0,599	-0,183	1,922	-2,64	0,82	0,25
theophylline	0,94	0,93	0,99	1,34	-1,19	-1,12	0,94	-0,02	-2,808	0,858	2,000	-1,66	2,33	-0,71
thioridazine	0,40	0,40	1,00	0,70	0,18	0,18	1,00	0,00	0,185	0,042	-0,481	-1,09	0,42	0,10
tolterodine	0,45	0,43	0,96	1,83	0,09	0,12	1,40	0,01	0,127	0,038	0,714	2,51	0,45	0,13
trazodone	0,76	0,74	0,97	1,75	-0,50	-0,45	0,91	-0,01	-0,494	-0,162	3,461	-5,64	0,80	0,26
tropicamid	0,83	0,83	1,00	1,55	-0,69	-0,69	1,00	-0,01	-1,530	68,863	2,237	-2,70	1,84	-83,00

valproic acid	0,04	0,04	1,00	0,11	1,38	1,38	1,00	0,04	1,624	0,529	-27,715	-0,80	0,05	0,02
valsartan	0,97	0,96	0,99	0,86	-1,51	-1,38	0,91	-0,01	-1,445	-0,356	1,108	-0,77	1,01	0,25
venlafaxine	0,61	0,65	1,07	1,99	-0,19	-0,27	1,38	-0,01	-0,996	-0,187	-11,296	27,31	2,41	0,45
verapamil	0,86	0,86	1,00	1,34	-0,79	-0,79	1,00	-0,01	-0,876	-1,383	1,656	-1,81	0,96	1,51
zolmitriptane	0,86	0,86	1,00	1,50	-0,79	-0,79	1,00	-0,01	-3,153	0,781	2,126	-2,32	3,44	-0,85
zolpidem	0,76	0,77	1,01	2,05	-0,50	-0,52	1,05	-0,01	-0,570	-0,610	9,583	-14,06	0,84	0,90
zopiclone	0,84	0,83	0,99	0,90	-0,72	-0,69	0,96	-0,01	-1,530	-0,298	0,748	-0,90	1,84	0,36
zuclopenthixol	0,62	0,60	0,97	1,15	-0,21	-0,18	0,83	0,00	-0,179	-0,035	0,618	-2,10	0,61	0,12

* wartość R_f z nieimpregnowanej płytki RP (kontrola)

** wartość R_f z płytki RP impregnowanej 2 mg/mL roztworem BSA

Tabela 40. Dane chromatograficzne uzyskane dla 129 związków z eksperymentów HPLC_{HSA} i HPLC_{IAM} oraz ich pochodne

nazwa leku	k _{HSA}	log k _{HSA}	log k _{HSA} /B2	log k _{HSA} /log P	log k _{HSA} /PB	log k _{HSA} /PSA	k _{IAM}	log k _{IAM}	log k _{IAM} /B2	log k _{IAM} /log P	log k _{IAM} /PB	log k _{IAM} /PSA
acebutolol	1,13	0,05	-0,06	-0,16	0,20	0,001	5,06	0,70	-0,82	-2,13	2,71	0,01
aceclofenac	55,89	1,75	-2,64	0,49	1,76	0,023	2,63	0,42	-0,63	0,12	0,42	0,01
acenocumarol	18,58	1,27	-1,05	0,47	1,29	0,012	0,53	-0,27	0,23	-0,10	-0,28	0,00
acetylsalicylic acid	0,31	-0,51	1,08	-0,39	-0,51	-0,008	0,03	-1,52	3,22	-1,17	-1,52	-0,02
aciclovir	0,19	-0,72	0,60	0,50	-3,43	-0,007	0,09	-1,04	0,86	0,72	-4,94	-0,01
alprazolam	0,89	-0,05	0,80	-0,01	-0,06	-0,001	3,14	0,50	-7,85	0,11	0,62	0,01
amiodarone	124,01	2,09	-15,41	0,70	2,18	0,049	99,63	2,00	-14,71	0,66	2,08	0,05
amlodipine	5,45	0,74	-0,70	-0,49	0,75	0,007	98,90	2,00	-1,90	-1,32	2,05	0,02
amoxicillin	0,94	-0,03	0,01	0,18	-0,13	0,000	0,05	-1,32	0,66	8,80	-6,60	-0,01
astemizol	13,32	1,12	-21,95	1,58	1,16	0,030	26,27	1,42	-27,70	2,00	1,47	0,04
atorvastatin	3,48	0,54	-0,44	0,35	0,55	0,005	8,28	0,92	-0,74	0,60	0,94	0,01
atropine	1,23	0,09	-0,36	0,05	0,50	0,002	3,91	0,59	-2,38	0,35	3,29	0,01
azithromycin	0,23	-0,64	0,27	-0,26	-2,20	-0,004	0,06	-1,20	0,51	-0,49	-4,14	-0,01
betaxolol	1,59	0,20	-0,76	0,20	0,40	0,004	15,60	1,19	-4,51	1,19	2,39	0,02
bilastine	0,67	-0,17	0,25	-0,08	-0,20	-0,002	0,55	-0,26	0,36	-0,12	-0,30	0,00
biperiden	0,58	-0,24	-1,38	-0,09	-0,39	-0,010	41,47	1,62	9,43	0,60	2,70	0,07
bisoprolol	1,07	0,03	-0,07	0,01	0,10	0,000	6,74	0,83	-2,01	0,39	2,76	0,01
bromazepam	0,63	-0,20	0,62	-0,08	-0,29	-0,004	2,21	0,34	-1,07	0,13	0,49	0,01
bromocriptine	8,09	0,91	-0,68	0,20	0,98	0,008	12,69	1,10	-0,82	0,25	1,19	0,01
buspirone	0,89	-0,05	0,09	-0,04	-0,05	-0,001	7,00	0,84	-1,49	0,72	0,89	0,01
caffeine	0,23	-0,64	2,06	0,60	-2,13	-0,012	0,18	-0,75	2,44	0,71	-2,51	-0,01
capecitabine	0,3	-0,52	0,38	-0,99	-0,87	-0,004	1,11	0,04	-0,03	0,08	0,07	0,00
captopril	0,15	-0,82	2,20	-2,75	-3,00	-0,014	0,01	-2,19	5,83	-7,28	-7,95	-0,04
carbamazepine	1,09	0,04	-0,19	0,02	0,05	0,001	1,50	0,18	-0,91	0,08	0,23	0,00
carbегoline	3,23	0,51	-0,85	1,76	1,24	0,007	17,05	1,23	-2,05	4,25	3,00	0,02

carvedilol	14,5	1,16	-1,75	-0,57	1,19	0,015	0,00					
cefuroxime	0,23	-0,64	0,24	0,31	-1,28	-0,003	1,69	0,23	-0,09	-0,11	0,45	0,00
celecoxib	13,42	1,13	-1,61	1,11	1,16	0,014	50,01	1,70	-2,42	1,67	1,75	0,02
celiprolol	1,12	0,05	-0,05	-0,11	0,18	0,001	5,87	0,77	-0,85	-1,71	2,80	0,01
cephalexin	0,16	-0,80	-29,83	0,61	-5,68	-0,024	0,00					
cetirizine	1,55	0,19	-0,63	0,09	0,20	0,004	1,05	0,02	-0,07	0,01	0,02	0,00
chloramphenikol	0,61	-0,21	0,17	0,86	-0,39	-0,002	1,08	0,03	-0,03	-0,13	0,06	0,00
chlorpromazine	13,33	1,12	29,20	0,30	1,25	0,035	58,85	1,77	45,94	0,47	1,97	0,06
chlortalidone	0,85	-0,07	0,05	0,11	-0,09	-0,001	1,32	0,12	-0,09	-0,19	0,16	0,00
cimetidine	0,67	-0,17	0,14	0,29	-1,02	-0,002	0,26	-0,58	0,45	0,98	-3,41	-0,01
ciprofloxacin	0,19	-0,72	1,17	0,39	-2,40	-0,010	1,22	0,09	-0,14	-0,05	0,29	0,00
cisapride	4,88	0,69	-0,83	0,31	0,71	0,008	57,99	1,76	-2,13	0,78	1,81	0,02
clarithromycin	0,82	-0,09	0,04	-0,03	-0,12	0,000	0,10	-1,02	0,43	-0,32	-1,45	-0,01
clindamycin	1,34	0,13	-0,11	0,08	0,14	0,001	11,34	1,05	-0,92	0,66	1,13	0,01
clobazam	1,01	0,00	-0,04	0,00	0,01	0,000	2,58	0,41	-4,23	-0,29	0,48	0,01
clonidine	1,35	0,13	-3,65	0,47	0,43	0,004	2,83	0,45	-12,66	1,61	1,51	0,01
clorazepate	3,99	0,60	-0,55	0,22	0,62	0,006	4,88	0,69	-0,63	0,25	0,71	0,01
clozapine	6,84	0,84	1,69	0,47	0,84	0,258	50,94	1,71	3,45	0,96	1,72	0,53
cypheptadine	9,7	0,99	9,40	0,85	1,01	0,036	23,79	1,38	13,12	1,19	1,41	0,05
desloratidine	5,97	0,78	5,23	11,09	0,92	0,031	50,45	1,70	11,48	24,33	2,02	0,07
diazepam	3,57	0,55	22,76	0,18	0,56	0,017	5,08	0,71	29,07	0,23	0,72	0,02
digoxin	0,21	-0,68	0,25	-0,25	-2,71	-0,003	3,69	0,57	-0,21	0,21	2,27	0,00
dihydroergotamine	0,23	-0,64	0,47	0,30	-0,69	-0,005	0,00					
diphenhydramin	1,88	0,27	0,79	0,13	0,28	0,022	3,66	0,56	1,62	0,27	0,57	0,05
doxazosin	5,51	0,74	-0,52	0,35	0,76	0,006	0,22	-0,66	0,46	-0,31	-0,67	-0,01
doxycycline	1,68	0,23	-0,10	-0,12	0,25	0,001	1,76	0,24	-0,10	-0,13	0,27	0,00
drotaverine	1,91	0,28	-1,19	-0,19	0,32	0,006	31,24	1,49	-6,33	-0,99	1,71	0,03
enalapril	0,34	-0,47	0,47	-0,20	-0,85	-0,005	0,05	-1,29	1,31	-0,56	-2,35	-0,01
eprenone	0,21	-0,68	0,95	-0,35	-1,36	-0,009	1,54	0,19	-0,26	0,10	0,38	0,00

escitalopram	2,84	0,45	-13,67	0,52	0,81	0,013	32,08	1,51	-45,42	1,73	2,69	0,04
estradiol benzoate			0,00	0,00	0,00		6,92	0,84	-0,79	0,20	0,88	0,01
estrone	11,01	1,04	-1,02	0,36	1,10	0,011	29,40	1,47	-1,44	0,51	1,55	0,02
famotidine	0,99	0,00	0,00	0,00	-0,02	0,000	0,26	-0,58	0,18	0,53	-3,33	0,00
fexofenadine	1,07	0,03	-0,04	0,01	0,05	0,000	1,08	0,03	-0,04	0,01	0,05	0,00
fluoxetine	6,06	0,78	3,78	0,41	0,83	0,037	66,64	1,82	8,82	0,94	1,93	0,09
flupenthixol	15,36	1,19	-4,16	0,22	1,25	0,023	51,21	1,71	-5,99	0,32	1,80	0,03
furosemide	11,66	1,07	-0,69	-4,44	1,12	0,008	0,28	-0,56	0,36	2,32	-0,59	0,00
gliclazide	9,69	0,99	-1,17	0,52	1,05	0,011	0,28	-0,55	0,66	-0,29	-0,59	-0,01
haloperidol	4,8	0,68	-6,70	0,52	0,74	0,017	23,74	1,38	-13,53	1,05	1,50	0,03
hydrocortisone acetate	0,66	-0,18	0,43	-0,04	-0,19	-0,003	2,82	0,45	-1,07	0,11	0,47	0,01
hydroxyzine	3,69	0,57	-20,22	0,46	0,61	0,016	13,82	1,14	-40,67	0,93	1,23	0,03
ibuprofen	65,66	1,82	-36,49	0,47	1,91	0,049	0,86	-0,07	1,34	-0,02	-0,07	0,00
indomethacin	64,78	1,81	-3,85	-1,27	1,87	0,028	1,08	0,03	-0,07	-0,02	0,03	0,00
ketoprofen	24,32	1,39	-4,29	0,54	1,40	0,025	0,20	-0,71	2,19	-0,28	-0,72	-0,01
ketotifen	5,83	0,77	-3,33	2,94	1,02	0,016	22,04	1,34	-5,85	5,17	1,79	0,03
lamotrigine	1,08	0,03	-0,04	0,02	0,06	0,000	0,71	-0,15	0,16	-0,11	-0,27	0,00
levocetizine	1,77	0,25	-0,82	0,07	0,27	0,005	3,82	0,58	-1,93	0,17	0,64	0,01
levofloxacin	3,94	0,60	-0,95	0,96	1,92	0,008	0,90	-0,04	0,07	-0,07	-0,14	0,00
loperamide	4,47	0,65	-4,24	0,13	0,67	0,015	0,00					
loratadine	10,54	1,02	-7,76	3,41	1,04	0,024	11,76	1,07	-8,12	3,57	1,09	0,03
lorazepam	2,21	0,34	-0,78	0,10	0,40	0,006	9,04	0,96	-2,17	0,28	1,10	0,02
medazepam	17,86	1,25	4,21	0,29	1,26	0,080	34,65	1,54	5,18	0,36	1,56	0,10
meloxicam	63,54	1,80	-1,10	-1,55	1,82	0,013	0,49	-0,31	0,19	0,27	-0,31	0,00
methyldopa	0,36	-0,44	0,40	0,30	-2,22	-0,004	0,10	-1,02	0,91	0,70	-5,08	-0,01
mianserin	6,39	0,81	1,82	0,86	0,90	0,124	21,72	1,34	3,02	1,42	1,49	0,21
midazolam	3,22	0,51	3,55	0,15	0,52	0,020	5,69	0,76	5,28	0,22	0,78	0,03
mirtazapine	2,96	0,47	1,99	0,41	0,55	0,024	5,83	0,77	3,23	0,66	0,90	0,04
montelukast	0,19	-0,72	1,24	-0,17	-0,73	-0,010	99,10	2,00	-3,44	0,48	2,02	0,03

naproxen	90,08	1,95	-9,90	0,65	1,97	0,042	0,31	-0,51	2,59	-0,17	-0,52	-0,01
nebivolol	7,49	0,87	-1,49	-0,85	0,89	0,012	0,00					
olanzapine	4,83	0,68	-0,86	-0,44	3,91	0,008	20,31	1,31	-1,64	-0,84	7,47	0,02
oxazepam	1,65	0,22	-0,49	0,07	0,26	0,004	4,78	0,68	-1,54	0,23	0,80	0,01
oxybutinin	4,01	0,60	-2,42	0,19	0,66	0,012	49,68	1,70	-6,80	0,52	1,84	0,03
pantoprazole	2,09	0,32	-0,38	-0,17	0,33	0,004	2,19	0,34	-0,41	-0,18	0,35	0,00
paracetamol	0,28	-0,55	2,28	0,42	-2,21	-0,011	0,32	-0,49	2,03	0,37	-1,97	-0,01
paroxetine	5,96	0,78	-8,76	-1,58	0,82	0,020	115,77	2,06	-23,31	-4,21	2,20	0,05
pergolide	0,07	-1,15	7,12	-0,50	-1,28	-0,026	0,00					
perindopril	0,49	-0,31	0,31	-0,15	-2,07	-0,003	0,18	-0,76	0,77	-0,37	-5,05	-0,01
phenytoin	1,63	0,21	-0,55	0,29	0,24	0,004	1,78	0,25	-0,65	0,34	0,28	0,00
pindolol	1,65	0,22	-0,59	-0,18	0,54	0,004	6,09	0,78	-2,12	-0,64	1,96	0,01
piroxicam	32,92	1,52	-1,29	1,42	1,53	0,014	0,16	-0,79	0,67	-0,74	-0,80	-0,01
prednisolone	0,52	-0,28	0,29	-0,14	-0,32	-0,003	2,84	0,45	-0,47	0,23	0,50	0,00
progesterone	5,7	0,76	-3,83	0,24	0,78	0,016	34,99	1,54	-7,82	0,49	1,58	0,03
promazine	8,9	0,95	24,65	0,29	1,01	0,030	0,10	-1,02	-26,48	-0,31	-1,08	-0,03
promethazine	5,35	0,73	18,91	-3,64	0,78	0,023	14,96	1,17	30,50	-5,87	1,26	0,04
propafenone	3,23	0,51	-1,31	0,27	0,52	0,009	66,74	1,82	-4,68	0,98	1,88	0,03
propranolol	3,48	0,54	-4,64	0,19	0,60	0,013	28,09	1,45	-12,40	0,52	1,61	0,03
quetiapine	2,48	0,39	-0,63	0,14	0,48	0,005	17,02	1,23	-1,95	0,43	1,48	0,02
quinapril	3,1	0,49	-0,50	0,29	0,51	0,005	1,22	0,09	-0,09	0,05	0,09	0,00
risperidone	2,11	0,32	-0,73	0,51	0,37	0,005	4,83	0,68	-1,54	1,09	0,78	0,01
rizatriptan	2,06	0,31	-0,79	-1,16	2,24	0,005	2,53	0,40	-1,01	-1,49	2,88	0,01
rosuvastatin	1,96	0,29	-0,17	0,25	0,33	0,002	0,96	-0,02	0,01	-0,02	-0,02	0,00
roxitromicin	1,03	0,01	0,00	0,00	0,01	0,000	0,00					
rupatadine	12,38	1,09	13,22	0,67	1,11	0,038	9,29	0,97	11,71	0,59	0,98	0,03
sertraline	13,19	1,12	3,16	0,67	1,14	0,093	42,89	1,63	4,60	0,97	1,67	0,14
sildenafil	1,62	0,21	-0,17	-0,14	0,22	0,002	14,26	1,15	-0,96	-0,79	1,20	0,01
simvastatin	8,72	0,94	-1,52	0,21	0,99	0,013	13,21	1,12	-1,81	0,25	1,18	0,02

spironolactone	0,82	-0,09	0,10	-0,03	-0,10	-0,001	13,38	1,13	-1,37	0,34	1,25	0,01
sulpiride	1,45	0,16	-0,13	0,34	0,40	0,001	1,66	0,22	-0,18	0,46	0,55	0,00
telmisartan	22,51	1,35	-2,93	0,18	1,36	0,021	4,68	0,67	-1,45	0,09	0,67	0,01
temazepam	1,26	0,10	-0,33	0,03	0,10	0,002	6,74	0,83	-2,77	0,26	0,86	0,02
theophylline	0,22	-0,66	1,17	0,50	-1,64	-0,009	0,12	-0,94	1,67	0,72	-2,35	-0,01
thioridazine	18,57	1,27	-3,46	0,30	1,34	0,022	47,61	1,68	-4,58	0,40	1,77	0,03
tolterodine	2,9	0,46	2,70	0,14	0,48	0,020	0,21	-0,68	-3,95	-0,21	-0,70	-0,03
trazodone	2,22	0,35	-2,64	0,12	0,38	0,008	9,30	0,97	-7,38	0,35	1,05	0,02
tropicamid	0,15	-0,82	2,68	82,39	-1,83	-0,015	1,06	0,03	-0,09	-2,68	0,06	0,00
valproic acid	4,46	0,65	-13,04	0,25	0,76	0,017	0,08	-1,09	21,90	-0,42	-1,28	-0,03
valsartan	48,78	1,69	-1,35	0,44	1,77	0,015	0,08	-1,10	0,88	-0,28	-1,15	-0,01
venlafaxine	1,05	0,02	0,89	0,01	0,08	0,001	8,25	0,92	38,52	0,64	3,40	0,03
verapamil	2,22	0,35	-0,73	0,61	0,38	0,005	11,97	1,08	-2,26	1,89	1,20	0,02
zolmitriptane	1,7	0,23	-0,62	-0,23	0,92	0,004	3,30	0,52	-1,40	-0,51	2,07	0,01
zolpidem	1,77	0,25	-4,53	0,29	0,27	0,007	2,60	0,42	-7,58	0,48	0,45	0,01
zopiclone	0,76	-0,12	0,13	-0,05	-0,26	-0,001	0,91	-0,04	0,04	-0,02	-0,09	0,00
zuclopenthixol	16,18	1,21	-4,24	0,24	1,23	0,023	48,73	1,69	-5,92	0,34	1,71	0,03

Tabela 41. Właściwości biologiczne dla leków z grupy zewnętrznej (n = 38)

nazwa leku	B1	B2	B3	BB _{vivo}	CNS+/-	LactMed	LLL H	log U/D 7.2	M/P	PB	PhCharge
acetazolamid	-1,60	-1,29	0,52		1	1	2	-0,24	0,28	0,98	-1
amitriptyline	0,76	0,50	-0,45	0,89	1	1	2	-1,98	0,92	0,95	1
bupivacaine	0,16	0,03	1,25		1	1	2	-0,93	0,37	0,95	1
chloroquine	0,39	0,10	0,89		1	1	2	-3,27	2,65	0,55	2
citalopram	0,13	-0,03	-0,23		1	2	2	-2,37	1,03	0,80	1
clomipramine	0,79	0,44	-0,28		1	1	2	-2,26	1,13	0,98	1
colchicine	-0,93	-0,78	-1,99		1	2	4		0,95	0,39	0
diltiazem	-0,02	-0,40	-1,22		1	1	3	-1,74	0,99	0,75	1
doxepin	0,54	0,35	-0,18		1	1	5	-2,20	1,37	0,76	1
duloxetine	0,56	0,21	-0,65		1	1	3	-2,82	0,78	0,90	1
eletriptan	-0,19	-0,30	-0,84		1	1	3	-3,15	0,25	0,85	1
ethambutol	-0,86	-0,49	-0,52		0	1	2	-2,39	1,00	0,25	1
ethanol	-0,19	0,22	-0,67	-0,16	1	2	3		0,95	0,00	0
fluvoxamine	-0,14	-0,36	0,68		1	1	2	-2,19	1,33	0,79	1
gabapentin	-0,63	-0,47	-0,19		1	1	2	-0,29	1,00	0,03	0
gentamycin	-3,13	-2,65	-2,40		0	1	2	-2,57	0,36	0,15	5
hydrochlorotiazide	-1,62	-1,35	-2,29		0	1	2	-1,75	0,38	0,68	0
itraconazole	-0,66	-1,07	3,68		0	1	2	-0,73	1,14	1,00	0
ketorolac	-0,33	-0,40	0,23		1	1	2	-2,91	0,03	0,99	-1
levetiracetam	-0,93	-0,47	-1,02		1	1	3		1,00	0,10	0
lincomycin	-1,62	-1,47	-0,43		0		2	-1,58	0,15	0,70	1
mesalazine	-0,99	-0,79	-1,55		0	1	3	-5,30	2,69	0,43	-1
minoxidil	-1,00	-0,95	-0,18		1		3	-1,66	0,82	0,00	0
nitrendipine	-0,92	-1,22	-1,09		0	1	2	-4,41	0,30	0,99	0

ofloxacin	-0,66	-0,63	-1,97		0	1	2	-2,01	1,26	0,32	-1
oxcarbamazepine	-0,55	-0,47	-0,87		1		3	-6,53	0,50	0,40	0
pefloxacin	-0,52	-0,48	-1,44		0			-7,04	0,96	0,25	-1
pregabalin	-0,63	-0,47	-0,22		1	1	3	-0,57	0,55	0,00	0
primidone	-0,60	-0,38	-0,31		1	2	3	-5,06	0,72	0,70	0
propylthiouracil	-0,29	-0,11	-0,31		1	1	2	-0,43	0,17	0,82	0
quinine	-0,11	-0,18	-0,07		1	1	2	-2,08	0,23	0,70	1
rifampicin	-2,81	-2,98	-0,67		0	1	2	-2,24	0,40	0,89	1
rimantadine	0,26	0,13	0,43		1		3	-3,56	2,00	0,40	1
timolol	-0,85	-0,73	-0,06		0	1	2	-2,15	0,80	0,10	1
tinidazole	-1,35	-1,02	-0,65		1	1	3	-4,90	1,14	0,12	0
tramadol	0,01	0,02	-0,67		1	1	2	-2,41	2,30	0,20	1
trimethoprim	-1,33	-1,14	-1,90		1	1	2	-0,30	1,25	0,44	1
warfarin	-0,33	-0,47	-0,44		1	0	2	-2,70	0,00	0,99	-1

Tabela 42. Właściwości fizykochemiczne dla zewnętrznej grupy leków (n = 38)

nazwa leku	a/b/n kod ¹	DM	eH	eH-eL	eL ²	HA	HD	log D	log P	MW ³	pKa	PSA ⁴	Sa ³	V ³
acetazolamid	0	0,89	-9,06	-9,13	0,69	5	2	-0,55	-0,26	2,22	7,44	11,50	4,69	2,9
amitriptyline	1	6,42	-9,9	-8,20	-17,01	1	0	3,15	4,41	2,77	9,18	0,32	3,61	1,56
bupivacaine	0	3,02	-9,03	-9,37	3,37	2	1	2,80	3,31	2,88	8,13	3,23	4,78	3,02
chloroquine	1	4,4	-8,6	-8,03	-5,71	3	1	1,87	4,41	3,20	10,47	2,82	5,94	3,11
citalopram	1	2,83	-7,98	-8,86	8,83	3	0	0,39	3,48	3,24	9,57	3,63	5,88	3,14
clomipramine	1	1,53	-8,49	-8,65	1,56	2	0	3,50	4,94	3,15	9,46	0,65	5,11	3,05
colchicine	0	5,95	-9,11	-8,52	-5,91	6	1	0,92	1,07	3,99		8,31	5,47	3,61
diltiazem	1	2,43	-8,71	-8,52	-1,86	4	0	2,10	4,73	4,15	8,94	5,91	6,17	3,96
doxepin	1	0,31	-9,11	-9,03	-0,81	2	0	2,08	3,84	2,79	9,40	1,25	4,69	2,81
duloxetine	1	0,96	-9,01	-8,63	-3,82	2	1	1,24	4,81	2,97	10,02	2,13	4,56	2,84
eletriptan	1	4,88	-8,5	-7,90	-5,96	3	1	0,36	2,98	3,83	10,35	5,32	4,69	3,57
ethambutol	1	1,11	-9,11	-11,45	23,39	4	4	-2,21	-0,29	2,04	9,59	6,45	4,95	2,18
ethanol	0					1	1	-0,19	-0,18	0,46		2,02		
fluvoxamine	1	3,9	-9,69	-8,87	-8,25	4	1	1,15	3,71	3,18	9,39	5,68	5,89	2,79
gabapentin	0	1,56	-9,35	-10,19	8,36	3	2	-1,31	1,08	1,71	7,50	6,33	2,38	1,7
gentamycin	1	4,31	-9,34	-11,20	18,62	12	8	-7,81	-2,04	4,78	9,77	19,97	4,71	4,25
hydrochlorotiazide	0	7,27	-9,64	-8,46	-11,83	5	3	-0,09	-0,02	2,98	8,95	11,84	3,85	2,01
itraconazole	0	6,11	-8,42	-7,65	-7,7	9	0	4,26	4,53	6,73	6,47	10,08	8,43	6,15
ketorolac	-1	2,14	-9,19	-8,83	-3,63	3	1	-0,95	2,68	2,55	4,29	5,93	3,87	2,39
levetiracetam	0	5,71	-9,8	-10,45	6,49	2	1	-0,67	-0,88	1,70		6,34	3,09	1,62
lincomycin	1	3,92	-8,5	-8,50	0,04	8	5	-0,48	0,72	4,07	8,78	12,60	6,35	3,89
mesalazine	-1	3,8	-8,18	-8,06	-1,23	4	3	-2,61	0,74	1,53	1,90	8,36	2,49	1,28
minoxidil	0	4,2	-8,07	-8,10	0,29	5	2	0,65	1,62	2,09	5,54	9,36	3,16	1,96
nitrendipine	0	6,92	-9,09	-8,00	-10,94	5	1	3,50	3,81	3,60	2,79	11,05	5,3	2,98
ofloxacin	-1	4,68	-8,72	-7,82	-8,97	7	1	-0,65	1,85	3,61	5,19	7,33	4,74	3,07
oxcarbamazepine	0	3,46	-9,31	-8,84	-4,73	2	1	1,25	1,66	2,52	13,73	6,34	3,02	2,26

pefloxacin	-1	9,41	-9,01	-7,97	-10,45	6	1	0,52	1,92	3,33	0,16	6,41	4,66	2,91
pregabalin	0	1,67	-9,53	-10,46	9,29	3	2	-1,38	1,09	1,59	7,77	6,33	3,54	1,65
primidone	0	2,84	-9,78	-9,77	-0,15	2	2	0,40	0,83	2,18	12,26	5,82	3,19	2,02
propylthiouracil	0	5,57	-9,2	-7,93	-12,71	1	2	1,18	1,15	1,70	7,63	4,11	3,32	1,51
quinine	1	1,73	-9,55	-9,54	-0,14	4	1	1,58	2,82	3,24	9,28	4,56	4,22	3,06
rifampicin	-1					14	6	-0,46	2,05	8,23	4,96	22,02		
rimantadine	1	1,22	-9,33	-12,28	29,54	1	1	0,08	3,31	1,79	10,76	2,60	2,43	1,91
timolol	1	3,06	-9,17	-8,05	-11,24	7	2	-1,39	1,28	3,16	9,35	7,97	4,95	2,88
tinidazole	0	2,34	-10,52	-9,24	-12,82	5	0	-0,27	-0,29	2,47	2,30	9,78	4,41	2
tramadol	1					3	1	0,36	2,32	2,63	9,61	3,27		
trimethoprim	0	2,09	-8,8	-8,68	-1,22	7	2	0,58	0,59	2,90	6,90	10,55	4,14	2,63
warfarin	-1	4,12	-7,38	-6,05	-13,35	3	1	-0,90	3,13	3,08	4,50	6,36	4,01	2,76

1 – kod opisujący właściwości kwasowo-zasadowe: (-1) – kwasy; (0) – związki neutralne; (1) - zasady

2 – wartość pomnożona razy 10

3 – wartość podzielona przez 100

4 – wartość podzielona przez 10

Tabela 43. Dane chromatograficzne i ich pochodne uzyskane z eksperymentów NP TLC i RP TLC dla grupy zewnętrznej leków (n = 38)

nazwa leku	C _{NP} [*]	NP ^{**}	NP/C	NP/PSA	C _{RP} [*]	RP ^{**}	RP/C	RP/PSA	NP/B2	RP/B2	NP/PB	RP/PB	NP/logP	RP/logP
acetazolamid	0,94	0,94	1,00	0,817	0,97	0,96	0,99	0,834	-0,727	-0,742	0,959	0,980	-3,615	-3,692
amitriptyline	0,32	0,31	0,97	9,568	0,67	0,63	0,94	19,444	0,626	1,272	0,326	0,663	0,070	0,143
bupivacaine	0,67	0,67	1,00	2,072	0,74	0,75	1,01	2,319	22,666	25,372	0,705	0,789	0,202	0,227
chloroquine	0,17	0,17	1,00	0,604	0,40	0,30	0,75	1,065	1,763	3,111	0,309	0,545	0,039	0,068
citalopram	0,30	0,29	0,97	0,800	0,62	0,60	0,97	1,655	-8,745	-18,094	0,363	0,750	0,083	0,172
clomipramine	0,33	0,32	0,97	4,938	0,59	0,59	1,00	9,105	0,722	1,331	0,327	0,602	0,065	0,119
colchicine	0,79	0,77	0,97	0,927	0,91	0,91	1,00	1,095	-0,984	-1,163	1,974	2,333	0,720	0,850
diltiazem	0,49	0,49	1,00	0,829	0,76	0,72	0,95	1,219	-1,230	-1,808	0,653	0,960	0,104	0,152
doxepin	0,30	0,31	1,03	2,486	0,58	0,54	0,93	4,330	0,892	1,554	0,411	0,715	0,081	0,141
duloxetine	0,32	0,33	1,03	1,552	0,57	0,53	0,93	2,493	1,595	2,562	0,367	0,589	0,069	0,110
eletriptan	0,29	0,28	0,97	0,527	0,62	0,62	1,00	1,166	-0,922	-2,041	0,329	0,729	0,094	0,208
ethambutol	0,19	0,21	1,11	0,325	0,97	0,95	0,98	1,472	-0,433	-1,957	0,840	3,800	-0,724	-3,276
ethanol														
fluvoxamine	0,34	0,32	0,94	0,563	0,62	0,62	1,00	1,091	-0,883	-1,711	0,408	0,790	0,086	0,167
gabapentin	0,91	0,91	1,00	1,437	0,66	0,66	1,00	1,042	-1,952	-1,416	30,333	22,000	0,843	0,611
gentamycin	0,96	0,94	0,98	0,471	0,91	0,90	0,99	0,451	-0,355	-0,340	6,267	6,000	-0,461	-0,441
hydrochlorotiazide	0,96	0,96	1,00	0,811	0,97	0,96	0,99	0,811	-0,713	-0,713	1,414	1,414	-48,000	-48,000
itraconazole	0,96	0,97	1,01	0,962	0,86	0,84	0,98	0,833	-0,910	-0,788	0,972	0,842	0,214	0,185
ketorolac	0,92	0,91	0,99	1,535	0,96	0,96	1,00	1,619	-2,265	-2,389	0,919	0,970	0,340	0,358
levetiracetam	0,92	0,92	1,00	1,451	0,92	0,92	1,00	1,451	-1,968	-1,968	9,200	9,200	-1,045	-1,045
lincomycin	0,91	0,91	1,00	0,722	0,94	0,94	1,00	0,746	-0,620	-0,640	1,300	1,343	1,264	1,306
mesalazine	0,94	0,93	0,99	1,113	0,99	0,97	0,98	1,161	-1,178	-1,228	2,163	2,256	1,257	1,311
minoxidil	0,43	0,42	0,98	0,449	0,80	0,82	1,03	0,876	-0,442	-0,862			0,259	0,506
nitrendipine	0,97	0,97	1,00	0,878	0,86	0,86	1,00	0,779	-0,795	-0,705	0,980	0,869	0,255	0,226
ofloxacin	0,24	0,23	0,96	0,314	0,54	0,50	0,93	0,682	-0,367	-0,799	0,719	1,563	0,124	0,270
oxcarbamazepine	0,91	0,90	0,99	1,420	0,91	0,91	1,00	1,435	-1,926	-1,947	2,250	2,275	0,542	0,548

pefloxacin	0,30	0,29	0,97	0,452	0,76	0,70	0,92	1,092	-0,606	-1,463	1,160	2,800	0,151	0,365
pregabalin	0,76	0,76	1,00	1,200	0,41	0,41	1,00	0,648	-1,630	-0,880			0,697	0,376
primidone	0,90	0,93	1,03	1,598	0,93	0,97	1,04	1,667	-2,421	-2,525	1,329	1,386	1,120	1,169
propylthiouracil	0,94	0,94	1,00	2,285	0,93	0,93	1,00	2,261	-8,462	-8,372	1,146	1,134	0,817	0,809
quinine	0,30	0,29	0,97	0,636	0,66	0,64	0,97	1,404	-1,590	-3,508	0,414	0,914	0,103	0,227
rifampicin	0,73	0,77	1,05	0,350	0,95	0,94	0,99	0,427	-0,259	-0,316	0,865	1,056	0,376	0,459
rimantadine	0,92	0,92	1,00	3,536	0,95	0,95	1,00	3,651	7,040	7,270	2,300	2,375	0,278	0,287
timolol	0,34	0,32	0,94	0,401	0,97	0,97	1,00	1,216	-0,439	-1,331	3,200	9,700	0,250	0,758
tinidazole	0,89	0,88	0,99	0,900	0,94	0,93	0,99	0,951	-0,865	-0,914	7,333	7,750	-3,034	-3,207
tramadol	0,31	0,31	1,00	0,948	0,63	0,64	1,02	1,957	13,025	26,891	1,550	3,200	0,134	0,276
trimethoprim	0,57	0,59	1,04	0,559	0,84	0,83	0,99	0,787	-0,517	-0,727	1,341	1,886	1,000	1,407
warfarin	0,99	0,99	1,00	1,557	0,87	0,83	0,95	1,305	-2,104	-1,764	1,000	0,838	0,316	0,265

* wartość R_f z nieimpregnowanej płytki NP/RP (kontrola)

** wartość R_f z płytki NP/RP impregnowanej 2 mg/mL roztworem BSA

Tabela 44. Dane chromatograficzne i ich pochodne uzyskane z eksperymentów HPLC_{HSA} i HPLC_{IAM} dla zewnętrznej grupy leków (n = 38)

nazwa leku	k _{HSA}	log k _{HSA}	log k _{HSA} /B2	log k _{HSA} /PB	log k _{HSA} /log P	k _{IAM}	log k _{IAM}
acetazolamid	0,74	-0,13	-0,575	0,760	-2,863	2,90	0,46
amitriptyline	5,87	0,77	11,854	6,178	1,331	1,56	0,19
bupivacaine	1,18	0,07	40,084	1,247	0,358	3,02	0,48
chloroquine	18,05	1,26	187,127	32,812	4,092	3,11	0,49
citalopram	2,67	0,43	-80,418	3,333	0,766	3,14	0,50
clomipramine	9,09	0,96	20,510	9,278	1,841	3,05	0,48
colchicine	0,28	-0,55	-0,362	0,726	0,265	3,61	0,56
diltiazem	1,74	0,24	-4,362	2,316	0,367	3,96	0,60
doxepin	4,25	0,63	12,220	5,624	1,106	2,81	0,45
duloxetine	8,16	0,91	39,435	9,063	1,696	2,84	0,45
eletriptan	3,78	0,58	-12,429	4,441	1,267	3,57	0,55
ethambutol	1,73	0,24	-3,557	6,906	-5,953	2,18	0,34
ethanol	0,02	-1,76	0,078		-0,097	0,01	-2,09
fluvoxamine	0,25	-0,60	-0,696	0,321	0,068	2,79	0,45
gabapentin	0,15	-0,84	-0,312	4,843	0,135	1,70	0,23
gentamycin	1,50	0,18	-0,568	10,028	-0,737	4,25	0,63
hydrochlorotiazide	0,61	-0,22	-0,452	0,897	-30,451	2,01	0,30
itraconazole	9,65	0,98	-9,055	9,668	2,130	6,15	0,79
ketorolac	9,65	0,98	-24,017	9,747	3,601	2,39	0,38
levetiracetam	0,07	-1,16	-0,149	0,696	-0,079	1,62	0,21
lincomycin	0,82	-0,08	-0,560	1,175	1,142	3,89	0,59
mesalazine	0,18	-0,73	-0,234	0,430	0,250	1,28	0,11
minoxidil	0,40	-0,40	-0,422		0,248	1,96	0,29
nitrendipine	3,55	0,55	-2,906	3,581	0,931	2,98	0,47
ofloxacin	6,62	0,82	-10,566	20,673	3,576	3,07	0,49
oxcarbamazepine	0,40	-0,40	-0,846	0,988	0,238	2,26	0,35

pefloxacin	12,43	1,09	-25,980	49,720	6,474	2,91	0,46
pregabalin	0,14	-0,87	-0,291		0,124	1,65	0,22
primidone	0,22	-0,66	-0,569	0,312	0,263	2,02	0,31
propylthiouracil	0,33	-0,48	-2,950	0,400	0,285	1,51	0,18
quinine	2,59	0,41	-14,194	3,699	0,918	3,06	0,49
rifampicin	0,03	-1,53	-0,010	0,034	0,015	8,37	0,92
rimantadine	0,16	-0,80	1,222	0,399	0,048	1,91	0,28
timolol	0,13	-0,88	-0,179	1,304	0,102	2,88	0,46
tinidazole	0,12	-0,92	-0,118	0,997	-0,413	2,00	0,30
tramadol	1,08	0,03	45,221	5,381	0,464	3,90	0,59
trimethoprim	0,85	-0,07	-0,749	1,943	1,449	2,63	0,42
warfarin	13,86	1,14	-29,454	14,001	4,428	2,76	0,44

BIBLIOGRAFIA

1. Hotham, N.; Hotham, E. Drugs in breastfeeding. *Aust. Prescr.* 2015, 38, 156–9, doi:10.18773/austprescr.2015.056.
2. Lauterbach, R. Stosowanie leków a karmienie piersią. *Pediatr. po Dyplomie* 2011, 15, 77–85.
3. American Academy of Pediatrics Committee on Drugs: The transfer of drugs and other chemicals into human milk. *Pediatrics* 2001, 108, 776–789.
4. Newton, E.R. Breastmilk: The gold standard. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2004, 47, 632–642, doi:10.1097/01.grf.0000136184.19927.98.
5. Jasik, J. Karmienie naturalne – cenny dar i kamień milowy opieki nad noworodkiem. *Rocz. Lubuski* 2014, 40.
6. Lis, J.; Orczyk-Pawilowicz, M.; Kątnik-Prastowska, I. Białka mleka ludzkiego zaangażowane w procesy immunologiczne. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2013, 67, 529–547, doi:10.5604/17322693.1051648.
7. Fleishaker, J.C.; Desai, N.; McNamara, P.J. Factors affecting the milk to plasma drug concentration ratio in lactating women: Physical interactions with protein and fat. *J. Pharm. Sci.* 1987, 76, 189–93, doi:10.1002/jps.2600760302.
8. Florea, M. Laktacja i karmienie piersią. Przegląd piśmiennictwa. *Perinatol. Neonatol. i Ginekol.* 2014, 7, 165–170.
9. Zabel, M. *Histologia. Podręcznik dla studentów medycyny i stomatologii wyd. I, red. M. Zabel*; Urban & Partner, 2013;
10. Zdrojewicz, Z.; Herman, M.; Sałamacha, M.; Starostecka, E. Ludzkie mleko - Fakty i mity. *Pediatr. i Med. Rodz.* 2017, 13, 11–20, doi:10.15557/PiMR.2017.0001.
11. Rak, K.; Bronkowska, M. Immunologiczne znaczenie siary. *Hygeia Public Heal.* 2014, 49, 249–254.
12. Kowalska, D.; Gruczyńska, E.; Bryś, J. Mleko matki-pierwsza żywność w życiu człowieka. *Probl Hig Epidemiol* 2015, 96, 387–98.
13. Kowol-Trela, K.; Mijas, J.; Nehring-Gugulska, M. Czy mleko matki zawsze jest bezpieczne dla dziecka? Farmakoterapia matki karmiącej. *Postępy Nauk Med.* 2017, XXX, 500–503, doi:10.25121/pnm.2017.30.9.500.
14. Hoddinott, P.; Tappin, D.; Wright, C. Breast feeding. *BMJ* 2008, 336, 881–887,

doi:10.1136/bmj.39521.566296.BE.

15. Ito, S.; Lee, A. Drug excretion into breast milk - Overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003.
16. Walker, A. Breast Milk as the Gold Standard for Protective Nutrients. *J. Pediatr.* 2010, 156, Suppl. 1, doi:10.1016/j.jpeds.2009.11.021.
17. Riordan, J.; Wambach, K. *Breastfeeding and human lactation*; Jones & Bartlett Learning, 4th edition, 2005;
18. Breitzka, R.L.; Sandritter, T.L.; Hatzopoulos, F.K. Principles of Drug Transfer into Breast Milk and Drug Disposition in the Nursing Infant. *J. Hum. Lact.* 1997, 13, 155–158, doi:10.1177/089033449701300219.
19. Morriss, F.H.; Brewer, E.D.; Spedale, S.B.; Riddle, L.; Temple, D.M.; Caprioli, R.M.; West, M.S. Relationship of human milk pH during course of lactation to concentrations of citrate and fatty acids. *Pediatrics* 1986, 78, 458–464.
20. Yurchak, A.M.; Jusko, W.J. Theophylline secretion into breast milk. *Pediatrics* 1976, 57, 518–520.
21. Ansell, C.; Moore, A.; Barrie, H. Electrolyte and pH changes in human milk. *Pediatr. Res.* 1977, 11, 1177–1179, doi:10.1203/00006450-197712000-00002.
22. Russell, P.; Yates, L.; Grant, E.; Golightly, P. Drugs in pregnancy and lactation. In *Clinical Pharmacy and Therapeutics*; Elsevier Ltd., 2012; pp. 739–752.
23. Agatonovic-Kustrin, S.; Ling, L.H.; Tham, S.Y.; Alany, R.G. Molecular descriptors that influence the amount of drugs transfer into human breast milk. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 29, 103–119, doi:10.1016/S0731-7085(02)00037-7.
24. D'Alessandro, A.; Scaloni, A.; Zolla, L. Human milk proteins: An interactomics and updated functional overview. *J. Proteome Res.* 2010, 9, 3339–3373, doi:10.1021/pr100123f.
25. Ballard, O.; Morrow, A.L. Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr. Clin. North Am.* 2013, 60, 49–74, doi:10.1016/j.pcl.2012.10.002.
26. Jenness, R. The composition of human milk. *Semin. Perinatol.* 1979, 3, 225–39, doi:10.1007/BF02748197.
27. Atkinson, H.C.; Begg, E.J.; Darlow, B.A. Drugs in Human Milk: Clinical Pharmacokinetic Considerations. *Clin. Pharmacokinet.* 1988, 14, 217–40, doi:10.2165/00003088-198814040-00003.

28. Hale, T.W. *Medications and Mother's Milk*; 15th ed.; Pharmasoft Medical Publishing, 2012;
29. Drugs and Lactation Database (LactMed) Available online: <https://toxnet.nlm.nih.gov/pda/lactmed.htm> (accessed on Nov 11, 2019).
30. Ilett, K.F.; Kristensen, J.H.; Wojnar-Horton, R.E.; Begg, E.J. Drug distribution in human milk. *Aust. Prescr.* 1997, 20, 35–40, doi:10.18773/austprescr.1997.032.
31. Benet, L.Z.; Hoener, B.A. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2002, 71, 115–121, doi:10.1067/mcp.2002.121829.
32. Wilson, J.T.; Brown, R.D.; Cherek, D.R.; Dailey, J.W.; Hilman, B.; Jobe, P.C.; Manno, B.R.; Manno, J.E.; Redetzki, H.M.; Stewart, J.J. Drug Excretion in Human Breast Milk: Principles, Pharmacokinetics and Projected Consequences. *Clin. Pharmacokinet.* 1980, 5, 1–66, doi:10.2165/00003088-198005010-00001.
33. Gardiner, S.J.; Kirkpatrick, C.M.J.; Begg, E.J.; Zhang, M.; Peter Moore, M.; Saville, D.J. Transfer of metformin into human milk. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2003, 73, 71–77, doi:10.1067/mcp.2003.9.
34. Athavale, M.; Maitra, A.; Patel, S.; Bhate, V.; Toddywalla, V. Development of an in vitro cell culture model to study milk to plasma ratios of therapeutic drugs. *Indian J. Pharmacol.* 2013, 45, 324–329, doi:10.4103/0253-7613.114994.
35. Agatonovic-Kustrin, S.; Tucker, I.G.; Zecevic, M.; Zivanovic, L.J. Prediction of drug transfer into human milk from theoretically derived descriptors. *Anal. Chim. Acta* 2000, 418, 181–195, doi:10.1016/S0003-2670(00)00963-6.
36. Katritzky, A.R.; Dobchev, D.A.; Hür, E.; Fara, D.C.; Karelson, M. QSAR treatment of drugs transfer into human breast milk. *Bioorganic Med. Chem.* 2005, 13, 1623–32, doi:10.1016/j.bmc.2004.12.015.
37. Anderson, P.O.; Saubaran, J.B. Modeling drug passage into human milk. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2016, 100, 42–52, doi:10.1002/cpt.377.
38. Atkinson, U.C.; Begg, E.J. Prediction of Drug Distribution into Human Milk from Physicochemical Characteristics. *Clin. Pharmacokinet.* 1990, 18, 151–67, doi:10.2165/00003088-199018020-00005.
39. Sun, H.; Zhao, H. Physiologic Drug Distribution and Protein Binding. In *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*; McGraw-Hill Education, 2012; pp. 259–308.
40. Kratz, F.; Elsadek, B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J.*

Control. Release 2012, 161, 429–445, doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.028.

41. Grandison, M.K.; Boudinot, F.D. Age-related changes in protein binding of drugs. Implications for therapy. *Clin. Pharmacokinet.* 2000, 38, 271–290, doi:10.2165/00003088-200038030-00005.
42. Chechłacz, M.; Korytowska, N. Związki wiążące się z białkami osocza u ludzi. Znaczenie w terapii oraz metody oznaczania wolnej frakcji. *Biul. Wydz. Farm. WUM* 2017, 6, 50–59.
43. Arroyo, V.; García-Martínez, R.; Salvatella, X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. *J. Hepatol.* 2014.
44. Polin, R.A.; Abman, S.H.; Rowitch, D.; Benitz, W.E. Developmental Pharmacology and Pharmacokinetics. In *Fetal and Neonatal Physiology*; Elsevier B.V., 2017; pp. 187–249 ISBN 978-0-323-35214-7.
45. Riccardi, K.; Cawley, S.; Yates, P.D.; Chang, C.; Funk, C.; Niosi, M.; Lin, J.; Di, L. Plasma Protein Binding of Challenging Compounds. *J. Pharm. Sci.* 2015, 104, 2627–2636, doi:10.1002/jps.24506.
46. Heuberger, J.; Schmidt, S.; Derendorf, H. When is protein binding important? *J. Pharm. Sci.* 2013, doi:10.1002/jps.23559.
47. Roberts, J.A.; Pea, F.; Lipman, J. The clinical relevance of plasma protein binding changes. *Clin. Pharmacokinet.* 2013, 52, 1–8, doi:10.1007/s40262-012-0018-5.
48. Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. *Harper's Illustrated Biochemistry (31st Edition)*; 2018; ISBN 978-1-25-983794-4.
49. Schaller, J.; Gerber, S.; Kämpfer, U.; Lejon, S.; Trachsel, C. *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function*; 2008; ISBN 9780470016749.
50. Fanali, G.; Di Masi, A.; Trezza, V.; Marino, M.; Fasano, M.; Ascenzi, P. Human serum albumin: From bench to bedside. *Mol. Aspects Med.* 2012, 33, 209–290, doi:10.1016/j.mam.2011.12.002.
51. Mizejewski, G.J. Alpha-fetoprotein structure and function: Relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp. Biol. Med.* 2001, 226, 377–408, doi:10.1177/153537020122600503.
52. Lambrinidis, G.; Vallianatou, T.; Tsantili-Kakoulidou, A. In vitro, in silico and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding. A review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015.

53. Duman, O.; Tunç, S.; Kancı Bozoğlu, B. Characterization of the binding of metoprolol tartrate and guaifenesin drugs to human serum albumin and human hemoglobin proteins by fluorescence and circular dichroism spectroscopy. *J. Fluoresc.* 2013, 23, 59–69, doi:10.1007/s10895-013-1177-y.
54. Spinella, R.; Sawhney, R.; Jalan, R. Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications. *Hepatol. Int.* 2016, 10, 124–132, doi:10.1007/s12072-015-9665-6.
55. Tunç, S.; Çetinkaya, A.; Duman, O. Spectroscopic investigations of the interactions of tramadol hydrochloride and 5-azacytidine drugs with human serum albumin and human hemoglobin proteins. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2013, 120, 59–65, doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.01.011.
56. Florence, A.T.; Atwood, D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*; Pharmaceutical Press, 4th edition, 2005;
57. Caraceni, P.; Domenicali, M.; Tovoli, A.; Napoli, L.; Ricci, C.S.; Tufoni, M.; Bernardi, M. Clinical indications for the albumin use: Still a controversial issue. *Eur. J. Intern. Med.* 2013, 24, 721–728, doi:10.1016/j.ejim.2013.05.015.
58. Huang, S.; Xie, J.; Cui, J.; Liu, L.; Liang, Y.; Liu, Y.; Xiao, Q. Comparative investigation of binding interactions between three steroidal compounds and human serum albumin: Multispectroscopic and molecular modeling techniques. *Steroids* 2017, 128, 136–146, doi:10.1016/j.steroids.2017.09.011.
59. Bailey, D.N.; Briggs, J.R. The Binding of Selected Therapeutic Drugs to Human Serum α -1 Acid Glycoprotein and to Human Serum Albumin In Vitro. *Ther. Drug Monit.* 2004, 26, 40–43, doi:10.1097/00007691-200402000-00009.
60. Schmidt, S.; Gonzalez, D.; Derendorf, H. Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.* 2010, 99, 1107–1122, doi:10.1002/jps.21916.
61. Sudlow, G.; Birkett, D.J.; Wade, D.N. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* 1975.
62. Tesseromatis, C.; Alevizou, A. The role of the protein-binding on the mode of drug action as well the interactions with other drugs. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2008, 33, 225–230, doi:10.1007/BF03190876.
63. Ghuman, J.; Zunszain, P.A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A.A.; Otagiri, M.; Curry, S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 2005, 353, 38–52, doi:10.1016/j.jmb.2005.07.075.

64. Otagiri, M. A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2005, 20, 309–323, doi:10.2133/dmpk.20.309.
65. Filip, Z.; Jan, K.; Vendula, S.; Jana, K.Z.; Kamil, M.; Kamil, K. Albumin and α 1-acid glycoprotein: Old acquaintances. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2013, 9, 943–954, doi:10.1517/17425255.2013.790364.
66. Vusse, G.J. van der Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2009, 24, 300–307.
67. Simard, J.R.; Zunszain, P.A.; Hamilton, J.A.; Curry, S. Location of High and Low Affinity Fatty Acid Binding Sites on Human Serum Albumin Revealed by NMR Drug-competition Analysis. *J. Mol. Biol.* 2006, 361, 336–351, doi:10.1016/j.jmb.2006.06.028.
68. Israili, Z.H.; Dayton, P.G.; Frederick, J.; Di, C. Human α 1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab. Rev.* 2001, 33, 161–235, doi:10.1081/.
69. Colombo, S.; Buclin, T.; Décosterd, L.A.; Telenti, A.; Furrer, H.; Lee, B.L.; Biollaz, J.; Eap, C.B. Orosomucoid (α 1-acid glycoprotein) plasma concentration and genetic variants: Effects on human immunodeficiency virus protease inhibitor clearance and cellular accumulation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2006, 80, 307–318, doi:10.1016/j.clpt.2006.06.006.
70. Fournier, T.; Medjoubi-N, N.; Porquet, D. α 1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 2000, 1482, 157–171, doi:10.1016/S0167-4838(00)00153-9.
71. Hocheplied, T.; Berger, F.G.; Baumann, H.; Libert, C. α 1-acid glycoprotein: An acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003.
72. Huang, Z.; Ung, T. Effect of α 1-Acid Glycoprotein Binding on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Curr. Drug Metab.* 2013, doi:10.2174/1389200211314020011.
73. Kopecký, V.; Ettrich, R.; Hofbauerová, K.; Baumruk, V. Structure of human α 1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, doi:10.1016/S0006-291X(02)02765-1.
74. Kopecký, V.; Ettrich, R.; Pazderka, T.; Hofbauerová, K.; Řeha, D.; Baumruk, V. Influence of ligand binding on structure and thermostability of human α 1-acid glycoprotein. *J. Mol. Recognit.* 2016, 29, 70–79, doi:10.1002/jmr.2496.
75. Maruyama, T.; Otagiri, M.; Takadate, A. Charakterization of drug binding sites

- on α 1-acid glycoprotein. *Chem. Pharm. Bull.* 1990, 38, 1688–1691.
76. Tymoczko, J.L.; Berg, J.M.; Stryer, L. *Biochemia*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2009; ISBN 9788301158118.
 77. Stillwell, W. Membrane Transport. In *An Introduction to Biological Membranes*; 2016; pp. 423–451.
 78. Peck, T.; Hill, S.; Williams, M. Drug passage across the cell membrane. In *Pharmacology for Anaesthesia and Intensive Care, Third Edition*; Cambridge University Press, 2008; pp. 1–10 ISBN 978-0-521-70463-2.
 79. Traczyk, W.Z. *Fizjologia człowieka w zarysie*; PZWL: Warszawa, 2013; ISBN 978-83-200-4655-7.
 80. Benet, L.Z.; Hosey, C.M.; Ursu, O.; Oprea, T.I. BDDCS, the Rule of 5 and drugability. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016, 101, 89–98, doi:10.1016/j.addr.2016.05.007.
 81. Yang, N.J.; Hinner, M.J.; Gautier, A.; Hinner, M.J. Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins BT - Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols. In *Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols*; Humana Press: New York, 2015; pp. 29–53 ISBN 978-1-4939-2272-7.
 82. De Levie, R. The Henderson-Hasselbalch equation: Its history and limitations. *J. Chem. Educ.* 2003, 80, 146, doi:10.1021/ed080p146.
 83. Persidsky, Y.; Ramirez, S.H.; Haorah, J.; Kanmogne, G.D. Blood-brain barrier: Structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2006, 1, 223–236, doi:10.1007/s11481-006-9025-3.
 84. Brzezińska, K.; Ziaja, M. Struktura i funkcje bariery krew-mózg. The structure and role of blood-brain barrier. *Postępy Biol. Komórki* 2012, 39, 84–99.
 85. Banks, W.A. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol.* 2009, 9, doi:10.1186/1471-2377-9-S1-S3.
 86. Taylor, E.M. Clinical impact of efflux transporters in the BBB. In *Efflux Transporters and the Blood-brain Barrier*; Nova Science Publishers Inc., 2005; pp. 7–9.
 87. Abbott, J. Anatomy and physiology of the Blood-Brain Barriers. In *Drug Delivery to the Brain: Physiological Concepts, Methodologies and Approaches*; Springer Science & Business Media, 2013; pp. 3–22.

88. Ballabh, P.; Braun, A.; Nedergaard, M. The blood–brain barrier: an overview. *Neurobiol. Dis.* 2004, 16, 1–13, doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016.
89. Kakee, A.; Terasaki, T.; Sugiyama, Y. Brain efflux index as a novel method of analyzing efflux transport at the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, 277, 1550–9.
90. Kalvass, J.C.; Maurer, T.S.; Pollack, G.M. Use of plasma and brain unbound fractions to assess the extent of brain distribution of 34 drugs: Comparison of unbound concentration ratios to in vivo P-glycoprotein efflux ratios. *Drug Metab. Dispos.* 2007, 35, 660–6, doi:10.1124/dmd.106.012294.
91. Kalvass, J.C.; Maurer, T.S. Influence of nonspecific brain and plasma binding on CNS exposure: Implications for rational drug discovery. *Biopharm. Drug Dispos.* 2002, 23, 327–38, doi:10.1002/bdd.325.
92. Hammarlund-Udenaes, M.; Fridén, M.; Syvänen, S.; Gupta, A. On the rate and extent of drug delivery to the brain. *Pharm. Res.* 2008.
93. Smith, Q.R.; Fisher, C.; Allen, D. The role of plasma protein binding in drug delivery to brain. In *Blood–Brain Barrier*; Springer, 2001; pp. 311–321.
94. Tanaka, H.; Mizojiri, K. Drug-protein binding and blood-brain barrier permeability. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999.
95. Pardridge, W.M.; Landaw, E.M. Tracer kinetic model of blood-brain barrier transport of plasma protein-bound ligands. Empiric testing of the free hormone hypothesis. *J. Clin. Invest.* 1984, 74, 745–752, doi:10.1172/JCI111490.
96. Pardridge, W.M. CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. *J. Neurochem.* 1998, 70, 1781–1792, doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70051781.x.
97. Van Der Aa, E.M.; Peereboom-Stegeman, J.H.; Noordhoek, J.; Gribnau, F.W.; Russel, F.G. Mechanisms of drug transfer across the human placenta. *Pharm. World Sci.* 1998, 20, 139–48, doi:10.1023/A:1008656928861.
98. Huppertz, B. The anatomy of the normal placenta. *J. Clin. Pathol.* 2008, 61, 1296–1302., doi:10.1136/jcp.2008.055277.
99. Polin, R.A.; Abman, S.H.; Rowitch, D.; William, E.B. *Fetal and neonatal physiology*; Elsevier Books, 2016;
100. Rubinchik-Stern, M.; Eyal, S. Drug interactions at the human placenta: What is the evidence? *Front. Pharmacol.* 2012, 3, doi:10.3389/fphar.2012.00126.

101. Evseenko, D.; Paxton, J.W.; Keelan, J.A. Active transport across the human placenta: impact on drug efficacy and toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2006, 2, 51–69, doi:10.1517/17425255.2.1.51.
102. Gedeon, C.; Koren, G. Designing Pregnancy Centered Medications: Drugs Which Do Not Cross the Human Placenta. *Placenta* 2006, 27, 861–8, doi:10.1016/j.placenta.2005.09.001.
103. Bamburowicz-Klimkowska, M.; Bogucka, U.; Szutowski, M. Funkcje transporterów typu ABC. *Biul. Wydz. Farm. WUM*, 2011, 3, 34–40.
104. Jamroziak, K.; Kowalczyk, M.; Robak, T. Białko oporności raka piersi ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) nowy transporter z nadrodziny ABC związany z opornością wielolekową. *Acta Haematol. Pol.* 2002, 33, 403–416.
105. Iqbal, M.; Audette, M.C.; Petropoulos, S.; Gibb, W.; Matthews, S.G. Placental drug transporters and their role in fetal protection. *Placenta* 2012, 33, 137–42, doi:10.1016/j.placenta.2012.01.008.
106. Włoch, S.; Pałasz, A.; Kamiński, M. Active and passive transport of drugs in the human placenta. *Ginekol. Pol.* 2009.
107. Andrade, S.; Gurwitz, J.; Davis, R.; Chan, K.; Finkelstein, J.; Fortman, K.; McPhillips, H.; Raebel, M.; Roblin, D.; Smith, D.; et al. Prescription drug use in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004, 191, 398–407.
108. Briggs, G.G.; Freeman, R.K.; Yaffe, S.J. *Briggs Drugs in Pregnancy and Lactation: A Reference Guide to Fetal and Neonatal Risk*; Lippincott Williams & Wilkins; 8th edition, 2008;
109. Tomi, M.; Nishimura, T.; Nakashima, E. Mother-to-fetus transfer of antiviral drugs and the involvement of transporters at the placental barrier. *J. Pharm. Sci.* 2011, 100, 3708–3718, doi:10.1002/jps.22642.
110. Hill, M.D.; Abraon, F.P. The Significance of Plasma Protein Binding on the Fetal/Maternal Distribution of Drugs at Steady-State. *Clin. Pharmacokinet.* 1988, 14, 156–170, doi:10.2165/00003088-198814030-00004.
111. Unadkat, J.; Dahlin, A.; Vijay, S. Placental Drug Transporters. *Curr. Drug Metab.* 2005, 5, 125–31, doi:10.2174/1389200043489171.
112. Tetro, N.; Moushaev, S.; Rubinchik-Stern, M.; Eyal, S. The Placental Barrier: the Gate and the Fate in Drug Distribution. *Pharm. Res.* 2018, 35, 1–16, doi:10.1007/s11095-017-2286-0.
113. Cross, S.E.; Roberts, M.S. Targeting local tissues by transdermal application:

Understanding drug physicochemical properties that best exploit protein binding and blood flow effects. *Drug Dev. Res.* 1999, doi:10.1002/(SICI)1098-2299(199903/04)46:3/4<309::AID-DDR17>3.0.CO;2-H.

114. Yang, R.; Wei, T.; Goldberg, H.; Wang, W.; Cullion, K.; Kohane, D.S. Getting Drugs Across Biological Barriers. *Adv. Mater.* 2017, 29, doi:10.1002/adma.201606596.
115. Paudel, K.S.; Milewski, M.; Swadley, C.L.; Brogden, N.K.; Ghosh, P.; Stinchcomb, A.L. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. *Ther. Deliv.* 2010, 1, 109–131, doi:10.4155/tde.10.16.
116. Benfeldt, E.; Serup, J.; Menné, T. Effect of barrier perturbation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin: In vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function. *Br. J. Dermatol.* 1999, 140, 739–48, doi:10.1046/j.1365-2133.1999.02859.x.
117. Hwang, S.; Bayne, W. Influence of protein binding on the accumulation and depletion of drug from the skin. *J Pharm Sci* 1984, 73, 710–712.
118. Dalvi, U.G.; Zatz, J.L. Effect of skin binding on percutaneous transport of benzocaine from aqueous suspensions and solutions. *J. Pharm. Sci.* 1982, 71, 824–826, doi:10.1002/jps.2600710728.
119. Eberhard-Gran, M.; Eskild, A.; Opjordsmoen, S. Use of psychotropic medications in treating mood disorders during lactation: Practical recommendations. *CNS Drugs* 2006.
120. Weissman, A.M.; Levy, B.T.; Hartz, A.J.; Bentler, S.; Donohue, M.; Ellingrod, V.L.; Wisner, K.L. Pooled analysis of antidepressant levels in lactating mothers, breast milk, and nursing infants. *Am. J. Psychiatry* 2004, 161, 1066–1078, doi:10.1176/appi.ajp.161.6.1066.
121. Colmenarejo, G. In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin. *Med. Res. Rev.* 2003, 3, 21–27, doi:10.1002/med.10039.
122. Danishuddin; Khan, A.U. Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design. *Drug Discov. Today* 2016, 21, 1291–1302, doi:10.1016/j.drudis.2016.06.013.
123. Cherkasov, A.; Muratov, E.N.; Fourches, D.; Varnek, A.; Baskin, I.I.; Cronin, M.; Dearden, J.; Gramatica, P.; Martin, Y.C.; Todeschini, R.; et al. QSAR modeling: Where have you been? Where are you going to? *J. Med. Chem.* 2014, 57, 4977–5010, doi:10.1021/jm4004285.
124. Khan, M.; Sylte, I.; Khan, M.; Sylte, I. Predictive QSAR Modeling for the

- Successful Predictions of the ADMET Properties of Candidate Drug Molecules. *Curr. Drug Discov. Technol.* 2007, 4, 141–149, doi:10.2174/157016307782109706.
125. Manallack, D.T. The pKa Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. *Perspect. Medicin. Chem.* 2007, 1, 25–38.
 126. Wiśniowska, B.; Polak, S. Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem – przewidywanie potencjalnych działań toksycznych. *Farm. Pol.* 2009, 65, 445–452.
 127. Constantinescu, S.; Pai, A.; Coscia, L.A.; Davison, J.M.; Moritz, M.J.; Armenti, V.T. Breast-feeding after transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2014, doi:10.1016/j.bpobgyn.2014.09.001.
 128. Cooper, S.D.; Felkins, K.; Baker, T.E.; Hale, T.W. Transfer of methylprednisolone into breast milk in a mother with multiple sclerosis. *J. Hum. Lact.* 2015, doi:10.1177/0890334415570970.
 129. Hays, K.E.; Ryu, R.J.; Swisher, E.M.; Reed, E.; McManus, T.; Rybeck, B.; Petros, W.P.; Hebert, M.F. Duration of cisplatin excretion in breast milk. *J. Hum. Lact.* 2013, doi:10.1177/0890334413479671.
 130. Williams, A.S. Antidepressants in pregnancy and breastfeeding. *Aust. Prescr.* 2007.
 131. Abraham, M.H.; Gil-Lostes, J.; Fatemi, M. Prediction of milk/plasma concentration ratios of drugs and environmental pollutants. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 2452–2458.
 132. StatSoft (2006). *Elektroniczny Podręcznik Statystyki PL*, Kraków Available online: <http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html>. (accessed on Mar 19, 2021).
 133. Stanisław, A. *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny. Tom 3. Analizy wielowymiarowe*; Statsoft Polska, 2007;
 134. Guilford, J.P. *Fundamental Statistics in Psychology and Education*; New York, 1965;
 135. Geladi, P.; Kowalski, B.R. Partial least-squares regression: a tutorial. *Anal. Chim. Acta* 1986, 185, 1–17, doi:10.1016/0003-2670(86)80028-9.
 136. Breiman, L. Random forests. *Mach. Learn.* 2001, 45, 5–32, doi:10.1023/A:1010933404324.

137. Carter, D.C.; Ho, J.X. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 1994, doi:10.1016/S0065-3233(08)60640-3.
138. Ayranci, E.; Duman, O. Binding of fluoride, bromide and iodide to bovine serum albumin, studied with ion-selective electrodes. *Food Chem.* 2004, *84*, 539–43, doi:10.1016/S0308-8146(03)00276-0.
139. Ayranci, E.; Duman, O. Binding of Lead Ion to Bovine Serum Albumin Studied by Ion Selective Electrode. *Protein Pept. Lett.* 2005, doi:10.2174/0929866043406814.
140. Raoufinia, R.; Mota, A.; Keyhanvar, N.; Safari, F.; Shamekhi, S.; Abdolalizadeh, J. Overview of albumin and its purification methods. *Adv. Pharm. Bull.* 2016, *6*, 495–507, doi:10.15171/apb.2016.063.
141. Tropsha, A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Mol. Inform.* 2010.
142. Mardia, K.; Kent, J.; Bibbly, J.. *Multivariate Analysis*; Academic Press: New York, 1979;
143. Meskin, M.S.; Lien, E.J. QSAR analysis of drug excretion into human breast milk. *J. Clin. Pharm. Ther.* 1985, *10*, 269–78, doi:10.1111/j.1365-2710.1985.tb00924.x.
144. Platts, J.A.; Abraham, M.H.; Zhao, Y.H.; Hersey, A.; Ijaz, L.; Butina, D. Correlation and prediction of a large blood-brain distribution data set - An LFER study. *Eur. J. Med. Chem.* 2001, *36*, 719–730, doi:10.1016/S0223-5234(01)01269-7.
145. Usansky, H.H.; Sinko, P.J. Computation of log BB values for compounds transported through carrier-mediated mechanisms using in vitro permeability data from brain microvessel endothelial cell (BMEC) monolayers. *Pharm. Res.* 2003, *20*, 390–6, doi:10.1023/A:1022647903205.
146. Vilar, S.; Chakrabarti, M.; Costanzi, S. Prediction of passive blood-brain partitioning: Straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors. *J. Mol. Graph. Model.* 2010, *28*, 899–903, doi:10.1016/j.jmgm.2010.03.010.
147. Drugbank Available online: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01174>.
148. ChEMBL Database Available online: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>.
149. Furugen, A.; Nishimura, A.; Kobayashi, M.; Umazume, T.; Narumi, K.; Iseki, K. Quantification of eight benzodiazepines in human breastmilk and plasma by

- liquid-liquid extraction and liquid-chromatography tandem mass spectrometry: Application to evaluation of alprazolam transfer into breastmilk. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019, 168, 83–93, doi:10.1016/j.jpba.2019.02.011.
150. Gentile, S.; Rossi, A.; Bellantuono, C. SSRIs during breastfeeding: Spotlight on milk-to-plasma ratio. *Arch. Womens. Ment. Health* 2007, 10, 39–51, doi:10.1007/s00737-007-0173-0.
 151. Atkinson, H.C.; Begg, E.J. Relationship between human milk lipid-ultrafiltrate and octanol-water partition coefficients. *J. Pharm. Sci.* 1988, 77, 796–8, doi:10.1002/jps.2600770916.
 152. Begg, E.; Atkinson, H.; Duffull, S. Prospective evaluation of a model for the prediction of milk:plasma drug concentrations from physicochemical characteristics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1992, 33, 501–5, doi:10.1111/j.1365-2125.1992.tb04077.x.
 153. Notarianni, L.; Belk, D.; Aird, S.; Bennett, P. An in vitro technique for the rapid determination of drug entry into breast milk. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1995, 40, 333–337, doi:10.1111/j.1365-2125.1995.tb04555.x.
 154. Ozeki, S.; Tejima, K. Drug Interactions. II. Binding of Some Pyrazolone and Pyrazolidine Derivatives to Bovine Serum Albumin. *Chem. Pharm. Bull.* 1974, 22, 1297–301, doi:10.1248/cpb.22.1297.
 155. Clark, D.E. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88, 815–21, doi:10.1021/js980402t.

Wykaz Tabel

Tabela 1. Skład dojrzalego mleka	12
Tabela 2. Ryzyko stosowania w czasie laktacji - klasyfikacja prof. Hale'a [28].....	15
Tabela 3. Białka osocza i ich funkcja.....	19
Tabela 4. Ryzyko stosowania w czasie ciąży - klasyfikacja FDA	27
Tabela 5. Lista deskryptorów molekularnych związanych z właściwościami fizykochemicznymi leków	47
Tabela 6. Lista parametrów chromatograficznych z TLC i HPLC oraz ich pochodnych	49
Tabela 7. Korelacje zmiennych niezależnych z wartościami M/P dla wszystkich związków oraz poszczególnych grup: a, b i n	61
Tabela 8. Macierz klasyfikacji dla modelu ze zmiennymi dyskryminującymi (PhCharge, pKa, M/P, eL, B2, NP, log U/D, B3)	62
Tabela 9. Funkcje klasyfikacyjne dla grup a, b i n.....	62
Tabela 10. Korelacje między deskryptorami a stosunkiem M/P dla 28 związków z określonymi wartościami BB _{vivo}	64
Tabela 11. Macierz klasyfikacji dla modelu ze zmiennymi dyskryminującymi (BB _{vivo} , B3, M/P, log U/D 7.2, PB, NP, NP/log P, eH-eL)	69
Tabela 12. Macierz klasyfikacji dla modelu ze zmiennymi dyskryminującymi (HA, BB _{vivo} , B2, M/P, log D, HD, MW, NP/C).....	70
Tabela 13. Macierz klasyfikacji dla modelu ze zmiennymi dyskryminującymi (eH-eL, HD, NP/C, NP, HA, M/P, NP/PB, PB i Sa).....	72
Tabela 14. Zmienne niezależne (1-25) w kolejności oraz zmienna zależna (log M/P) używane w budowaniu modeli regresji metodami PLS i RF	74
Tabela 15. Podsumowanie wyników regresji dla modeli MLR, PLS i RF	80
Tabela 16. Korelacje wewnętrzne między parametrami chromatograficznymi i ich pochodnymi	92
Tabela 17. Podsumowanie wyników regresji wielokrotnej z wykorzystaniem parametrów NP TLC i RP TLC.....	102
Tabela 18. Średnie wartości PB i M/P dla poszczególnych grup leków	104
Tabela 19. Średnie wartości parametrów chromatograficznych: NP, RP i log k _{HSA} oraz ich korelacje z wartościami wiązania z białkami (PB), dla grup badanych i powiększonych o związku z grupy testowej	105
Tabela 20. Dane chromatograficzne z eksperymentów TLC i HPLC oraz ich pochodne wykorzystane w analizie modeli analitycznych	109
Tabela 21. Parametry fizykochemiczne związków i ich korelacje z danymi dotyczącymi PB	110
Tabela 22. Dane fizykochemiczne, biologiczne i chromatograficzne związków oraz ich korelacje z danymi PB.....	112
Tabela 23. Zmienne niezależne w modelach matematycznych przewidywania wartości PB w analizach MLR	112
Tabela 24. Korelacje między deskryptorami obliczeniowymi: B1, B2 i B3 oraz wartościami kodującymi LactMed i LLL H a PB i M/P	113
Tabela 25. Macierz klasyfikacji dla modelu z wykorzystaniem zmiennych dyskryminujących (PhCharge, B2, pKa, M/P, log k _{HSA} , log k _{IAM} , NP, eL, log U/D).....	115
Tabela 26. Funkcje klasyfikacyjne dla grup a, b i n.....	116
Tabela 27. Wartości ładunków wektorowych i korelacji zmiennych dla PC 1 i 2 związków aktywnych	119

Tabela 28. 23 zmienne niezależne z danymi TLC użyte do stworzenia modelu metodą najmniejszych cząstkowych kwadratów i lasu losowego dla PB_{abn}	124
Tabela 29. 22 zmienne niezależne z danymi HPLC użyte do stworzenia modelu metodą lasu losowego dla PB_{abn}	128
Tabela 30. Wyniki regresji metodą lasu losowego na poszczególnych zestawach leków	131
Tabela 31. 22 zmienne niezależne z danymi NP TLC użyte do stworzenia modeli lasu losowego dla poszczególnych grup leków podzielonych ze względu na charakter kwasowo-zasadowy	132
Tabela 32. Struktury kwasowych związków ($n_a = 29$).....	143
Tabela 33. Struktury zasadowych związków ($n_b = 34$)	146
Tabela 34. Struktury neutralnych związków ($n_n = 66$).....	149
Tabela 35. Struktury związków z grupy zewnętrznej ($n = 38$)	154
Tabela 36. Właściwości biologiczne leków ($n = 129$)	157
Tabela 37. Właściwości fizykochemiczne leków ($n = 129$).....	162
Tabela 38. Dane chromatograficzne i ich pochodne uzyskane z eksperymentu NP TLC dla 129 związków	167
Tabela 39. Dane chromatograficzne i ich pochodne uzyskane z eksperymentu RP TLC dla 129 związków	172
Tabela 40. Dane chromatograficzne uzyskane dla 129 związków z eksperymentów HPLC _{HSA} i HPLC _{IAM} oraz ich pochodne	177
Tabela 41. Właściwości biologiczne dla leków z grupy zewnętrznej ($n = 38$).....	182
Tabela 42. Właściwości fizykochemiczne dla zewnętrznej grupy leków ($n = 38$)	184
Tabela 43. Dane chromatograficzne i ich pochodne uzyskane z eksperymentów NP TLC i RP TLC dla grupy zewnętrznej leków ($n = 38$)	186
Tabela 44. Dane chromatograficzne i ich pochodne uzyskane z eksperymentów HPLC _{HSA} i HPLC _{IAM} dla zewnętrznej grupy leków ($n = 38$).....	188

Spis Rysunków

Rysunek 1. Schemat przenikania leków między osoczem a mlekiem matki	13
Rysunek 2. Dyskryminacja na kwasy (a), zasady (b) i leki obojętne (n). Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwiastka 1 względem pierwiastka 2. Zmienne dyskryminujące: PhCharge, pKa, M/P, eL, B2, NP, log U/D i B3.	61
Rysunek 3. Wykres rozrzutu wartości M/P przewidywanych względem obserwowanych dla modelu MLR z równania 10. Deskryptory molekularne uwzględnione w tym modelu to: PB, NP, log U/D 7.2, LLL H, eH-eL.....	64
Rysunek 4. Wykres rozrzutu wartości M/P przewidywanych względem obserwowanych dla modelu MLR z równania 11. Deskryptory molekularne uwzględnione w tym modelu to: PB, NP, NP/PB, NP/PSA i NP/C	65
Rysunek 5. Dyskryminacja na grupy LLL H 1, 2 i 3. Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwiastka 1 względem pierwiastka 2. Zmienne dyskryminujące: HA, BBvivo, B2, M/P, log D, HD, MW, NP/C.	69
Rysunek 6. Błąd średniokwadratowy walidacji krzyżowej (RMSECV) jako funkcja ukrytych zmiennych (LV). Najniższa wartość RMSECV wskazuje optymalną liczbę ukrytych zmiennych do regresji PLS.....	73
Rysunek 7. Test permutacji Monte Carlo (MCPT) pokazujący Q2 uzyskany z modeli regresji PLS opracowanych na zestawie treningowym i zestawie testowym, liczba powtórzeń wynosiła n = 1000. Średnie wartości Q2 dla zestawu treningowego i zestawu testowego są wyświetlane na wykresach (odpowiednio 0,403 i 0,371) wraz z wartościami p.....	73
Rysunek 8. Rzeczywiste w porównaniu z przewidywanymi wartości log M/P, przy użyciu modelowania regresji PLS 25 deskryptorów molekularnych. LV = zmienna ukryta, RMSECV = średni kwadratowy błąd walidacji krzyżowej, RMSEP = średni kwadratowy błąd prognozowania, R2 train/test = współczynnik determinacji dla modeli zestawu treningowego i testowego, Q2 train/test = współczynnik determinacji dla modeli poddanych walidacji krzyżowej.	74
Rysunek 9. Błąd regresji „out-of-bag” jako funkcja liczby drzew decyzyjnych. Najniższy błąd OOB sugeruje optymalną liczbę drzew do analizy lasu losowego.....	75
Rysunek 10. Symulacje Monte Carlo dla Q2 uzyskane z modeli regresji RF zestawu treningowego i testowego, liczba permutacji, n = 1000. Na wykresach są wyświetlane średnie wartości Q2 dla zestawów treningowego i testowego (odpowiednio 0,753 i 0,211) wraz z wartościami p.	76
Rysunek 11. Model regresji RF z 25 zmiennymi niezależnymi i log M/P jako zmienną zależną. RMSECV = średniokwadratowy błąd walidacji krzyżowej, RMSEP = średni kwadratowy błąd prognozy, R2 train/test = współczynnik determinacji dla modeli zestawu treningowego i zestawu testowego, Q2 train test = współczynnik determinacji dla modeli poddanych walidacji krzyżowej.	76
Rysunek 12. Znaczenie predyktorów dla modelu regresji RF. Średnie wartości uzyskano z 1000 powtórzeń modelu.	77
Rysunek 13. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu z równania 15. Zmienna zależna: PBabn	85
Rysunek 14. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu z równania 16. Zmienna zależna: PBa	86
Rysunek 15. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 17). Zmienna zależna: PBb.....	88

Rysunek 16. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 18). Zmienna zależna: PBn.....	89
Rysunek 17. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 19). Zmienna zależna: PBbn.....	91
Rysunek 18. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 20). Zmienna zależna: PBan.....	92
Rysunek 19. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 21). Zmienna zależna: PBab.....	93
Rysunek 20. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 22). Zmienna zależna: PBabn.....	95
Rysunek 21. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 23). Zmienna zależna: PBa.....	96
Rysunek 22. Przewidywane i obserwowane wartości dla modelu (Równanie 24). Zmienna zależna: PBab.....	98
Rysunek 23. Dyskryminacja na kwasy (a), zasady (b) i leki obojętne (n). Wykres rozrzutu wartości kanonicznych dla pierwiastka 1 względem pierwiastka 2. Zmienne dyskryminujące: PhCharge, B2, pKa, M/P, log kHSA, log kIAM, NP, eL, log U/D.	111
Rysunek 24. Projekcja przypadków na płaszczyznę PC1 × PC2	114
Rysunek 25. Projekcja zmiennych na płaszczyznę czynników (1 x 2)	116
Rysunek 26. Średnie wartości deskryptorów w analizie skupień M/Pkod (metoda k-średnich) z użyciem deskryptorów biologicznych i chromatograficznych	117
Rysunek 27. Średnie wartości deskryptorów w analizie skupień M/Pkod (metoda k-średnich) z użyciem deskryptorów fizykochemicznych	118
Rysunek 28. Błąd średniokwadratowy walidacji krzyżowej (RMSECV) jako funkcja ukrytych zmiennych (LV). Najniższa wartość RMSECV wskazuje optymalną liczbę ukrytych zmiennych	119
Rysunek 29. Rzeczywiste w porównaniu z przewidywanymi wartości PBabn, przy użyciu modelowania PLS i 23 deskryptorów molekularnych. LVs = zmienne ukryte, RMSECV = średni kwadratowy błąd walidacji krzyżowej, RMSEP = średni kwadratowy błąd prognozowania, R ² train/test = współczynnik determinacji dla modeli zestawu treningowego i testowego, Q ² train/test = współczynnik determinacji dla modeli poddanych walidacji krzyżowej.	120
Rysunek 30. Rzeczywiste w porównaniu z przewidywanymi wartości PBabn, przy użyciu regresji RF i 23 deskryptorów molekularnych, w tym tych związanych z TLC	121
Rysunek 31. Test permutacji Monte Carlo (MCPT) pokazujący Q ² uzyskane z modeli regresji PLS opracowanych na zestawie testowym, liczba powtórzeń wynosiła n = 100. Średnia wartość Q ² wynosiła 0,5598 przy poziomie istotności p = 2,8196 × 10 ⁻¹²	122
Rysunek 32. Udział poszczególnych deskryptorów (Tabela 28) na tworzenie modelu regresji RF dla PBabn. Największy wpływ wykazuje zmienna nr 20, czyli log D.	123
Rysunek 33. Rzeczywiste w porównaniu z przewidywanymi wartości PBabn, przy użyciu regresji RF i 22 deskryptorów molekularnych w tym parametrów z HPLCHSA. RMSECV = średni kwadratowy błąd walidacji krzyżowej, RMSEP = średni kwadratowy błąd prognozowania, R ² train/test = współczynnik determinacji dla modeli zestawu treningowego i testowego, Q ² train/test = współczynnik determinacji dla modeli poddanych walidacji krzyżowej.	124

- Rysunek 34.** Test permutacji Monte Carlo (MCPT) pokazujący Q^2 uzyskane z modeli regresji PLS opracowanych na zestawie testowym, liczba powtórzeń wynosiła $n = 100$. Średnia wartość Q^2 wynosiła 0,3456 przy poziomie istotności $p = 0,4583$ **125**
- Rysunek 35.** Udział poszczególnych deskryptorów (Tabela 29) na tworzenie modelu regresji RF dla PBabn. Największy wpływ wykazuje zmienna nr 19, czyli log D oraz dwie zmienne chromatograficzne (nr 6 i 7): kHSA i log kHSA **126**
- Rysunek 36.** Rzeczywiste w porównaniu z przewidywanymi wartości PBn, przy użyciu regresji RF i 22 deskryptorów molekularnych w tym parametrów NP TLC (Tabela 31). RMSECV = średni kwadratowy błąd walidacji krzyżowej, RMSEP = średni kwadratowy błąd prognozowania, $R^2_{\text{train/test}}$ = współczynnik determinacji dla modeli zestawu treningowego i testowego, $Q^2_{\text{train/test}}$ = współczynnik determinacji dla modeli poddanych walidacji krzyżowej. **128**
- Rysunek 37.** Rzeczywiste w porównaniu z przewidywanymi wartości PBan, przy użyciu regresji RF i 22 deskryptorów molekularnych w tym parametrów NP TLC (Tabela 31). **128**
- Rysunek 38.** Udział poszczególnych deskryptorów (Tabela 31) na tworzenie modelu regresji RF dla PBn. Największy wpływ wykazuje zmienna nr 19, czyli log D, poza tym znaczenie mają masa molowa (MW) i objętość molowa (V) **129**
- Rysunek 39.** Udział poszczególnych deskryptorów (Tabela 31) na tworzenie modelu regresji RF dla PBan. Największy wpływ wykazuje zmienna nr 19, czyli log D, w tym przypadku widać również większy udział zmiennych chromatograficznych (zmienne nr 6 – 9) **129**