



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ/ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ



**Συμβολή στην ανάπτυξη *per os* χορηγούμενων
μορφών με βάση το γάλα και στην ανάλυση της
κινητικής των πορειών απορρόφησης των
φαρμάκων με διαφορετικές εξισώσεις
κλασματικών παραγώγων.**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Κυταριόλος Ιωάννης, MSc
Φαρμακοποιός**

2011

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. Μαχαίρας, Καθηγητής ΕΚΠΑ, Τμήμα Φαρμακευτικής (επιβλέπων)

Μ. Κουμπάρης, Καθηγητής ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας (μέλος συμβουλευτικής επιτροπής)

Γ. Βαλσαμή, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ, Τμήμα Φαρμακευτικής (μέλος
συμβουλευτικής επιτροπής)

Π. Αργυράκης, Καθηγητής ΑΠΘ, Τμήμα Φυσικής (μέλος εξεταστικής επιτροπής)

Μ. Συμμιλίδου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ, Τμήμα Φαρμακευτικής (μέλος εξεταστικής
επιτροπής)

Δ. Φατούρος Επίκουρος Καθηγητής ΑΠΘ, Τμήμα Φαρμακευτικής (μέλος εξεταστικής
επιτροπής)

Α. Δοκουμετζίδης, Λέκτορας ΕΚΠΑ, Τμήμα Φαρμακευτικής (μέλος εξεταστικής
επιτροπής)

‘Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα’

N.5343/1932, άρθρο 202

*Αφιερωμένο στην οικογένειά μου για την υποστήριξη που προσέφεραν και
την υπομονή που επέδειξαν όλα αυτά τα χρόνια.*

Γιώργο, Τούλα, Δημήτρη, σας ευχαριστώ.

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Ένα τόσο πολυσύνθετο και μακροχρόνιο εγχείρημα όσο η εκπόνηση μίας διδακτορικής διατριβής απαιτεί την συνεισφορά πολλών ανθρώπων και η παρούσα δεν αποτελεί εξαίρεση. Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους αυτούς που συνέβαλαν, ο καθένας με τον δικό του τρόπο, στην επιτυχή ολοκλήρωσή της.

Πρωτίστως θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη και υποχρέωση στον καθηγητή μου Παναγιώτη Μαχαίρα, για τη ουσιαστική του καθοδήγηση και συμβολή όλα αυτά τα χρόνια, όχι μόνο σε επιστημονικό αλλά και σε προσωπικό επίπεδο. Όλα αυτά τα χρόνια είχα την τιμή να συνεργαστώ με ένα αληθινό δάσκαλο και ένα καταπληκτικό άνθρωπο.

Ιδιαίτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον καθηγητή Μιχάλη Κουμπάρη και την επίκουρη καθηγήτρια Γεωργία Βαλσαμή για τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά τη διάρκεια του ερευνητικού μου έργου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Δημήτρη Φατούρο για την εποικοδομητική συνεργασία μας, τον λέκτορα Αριστείδη Δοκουμετζίδα για την ουσιαστική συμβολή του στο δεύτερο τμήμα της παρούσας διατριβής και την επίκουρη καθηγήτρια Μοίρα Συμμιλίδου, με την οποία ξεκίνησα το ταξίδι στο χώρο της έρευνας.

Φυσικά δε θα μπορούσα να παραλείψω όλους τους συνταξιδιώτες και συνεργάτες όλα αυτά τα χρόνια, ιδιαίτερα τη Μαρία Βερτζώνη για την πολύτιμη συνεισφορά της, τη Γεωργία Χαρκοφτάκη για τη συνεργασία μας, το Σταύρο Πολίτη για τις συμβουλές του, τον Άγγελο Καρατζά και την Αμαλία Διακίδου για τη βοήθειά τους.

Σημαντική υπήρξε η συμβολή της εταιρείας Pharmathen S.A. και του προγράμματος COST B25 στην ολοκλήρωση του πρώτου τμήματος της διατριβής.

Τέλος σε όλους τους φίλους και συγγενείς που με υποστήριξαν και με ανέχτηκαν όλα αυτά τα χρόνια θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ. Χωρίς εσάς δε θα έγραφα αυτές τις λέξεις.

*Γιάννης Κυταριόλος
Αθήνα, Ιούνιος 2011*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη - Summary _____ 1

Περίληψη _____ 3

Summary _____ 5

Τμήμα Α. Συμβολή στην ανάπτυξη per os χορηγούμενων μορφών με βάση το γάλα _____ 7

Κεφάλαιο Α.1. Εισαγωγή _____ 9

A.1.1. Η γαστρεντερική απορρόφηση των δυσδιάλυτων φαρμάκων _____ 10

A.1.1.1. Φυσιολογία του γαστρεντερικού σωλήνα και μηχανισμοί απορρόφησης _____ 11

A.1.1.1.1. Ανατομικά χαρακτηριστικά γαστρεντερικού σωλήνα _____ 11

A.1.1.1.2. Μηχανισμοί απορρόφησης φαρμάκων _____ 13

A.1.1.1.3. Φυσιολογικοί φραγμοί κατά την απορρόφηση _____ 14

A.1.1.2. Μοριακές και φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμάκων που επηρεάζουν την γαστρεντερική απορρόφηση _____ 15

A.1.1.2.1. Ο «κανόνας των 5» _____ 15

A.1.1.2.2. Ρυθμός διάλυσης _____ 16

A.1.1.2.3. Διαλυτότητα _____ 16

A.1.1.2.4. Ιδιότητες στερεάς κατάστασης _____ 20

A.1.1.2.5. Στερεοχημεία _____ 21

A.1.1.2.6. Χημική σταθερότητα _____ 21

A.1.2. Φαρμακοτεχνικές προσεγγίσεις για τα δυσδιάλυτα φάρμακα _____ 23

A.1.2.1. Ρύθμιση pH και σχηματισμός αλάτων _____ 24

A.1.2.2. Συνδιαλύτες _____ 26

A.1.2.3. Συμπλοκοποίηση _____ 27

A.1.2.4. Αλλαγή στερεάς κατάστασης: πολυμορφισμός, άμορφα στερεά και στερεή διασπορά _____ 28

A.1.2.4.1. Πολυμορφισμός και άμορφα στερεά _____ 28

A.1.2.4.2. Στερεή διασπορά _____ 29

A.1.2.5. Επιφανειοδραστικά και μικκύλια _____ 30

A.1.2.6. Γαλακτώματα, μικρογαλακτώματα και συστήματα με βάση τα λιπίδια _____ 31

A.1.2.6.1. Εισαγωγικές έννοιες _____ 31

A.1.2.6.2. Προκλήσεις κατά το σχεδιασμό και το χαρακτηρισμό γαλακτωμάτων, μικρογαλακτωμάτων και λιπιδικών συστημάτων. _____ 33

A.1.2.7. Νανοεναιωρήματα _____ 34

A.1.2.8. Προφάρμακα _____ 35

A.1.2.9. Μείωση μεγέθους σωματιδίων _____ 36

A.1.3. Γάλα: Σύσταση, Δομή και Ρόλος _____ 37

A.1.3.1. Εισαγωγή _____ 37

A.1.3.2. Χημική σύσταση του γάλακτος _____ 37

A.1.3.2.1. Νερό _____ 38

A.1.3.2.2. Λίπος _____ 38

A.1.3.2.3. Πρωτεΐνες _____ 39

A.1.3.2.4. Υδατάνθρακες _____ 39

A.1.3.2.5. Άλατα _____ 39

A.1.3.2.6. Ιχνοστοιχεία _____ 40

A.1.3.2.7. Βιταμίνες _____ 40

A.1.3.2.8. Ένζυμα _____ 40

A.1.3.2.9. Άλλα συστατικά _____ 40

A.1.3.3. Δομή του γάλακτος _____ 41

A.1.3.3.1. Λιποσφαίρια _____ 41

A.1.3.3.2. Μικκύλια καζεΐνης _____ 42

A.1.3.4.	Φυσικές ιδιότητες του γάλακτος	43
A.1.3.4.1.	Οσμή και γεύση	43
A.1.3.4.2.	Χρώμα	44
A.1.3.4.3.	Οξύτητα – Ρυθμιστική ικανότητα	44
A.1.3.4.4.	Δυναμικό οξειδοαναγωγής	44
A.1.3.4.5.	Ειδικό βάρος	44
A.1.3.4.6.	Ιξώδες	44
A.1.3.4.7.	Επιφανειακή τάση	44
A.1.3.4.8.	Σημείο πήξης	45
A.1.3.4.9.	Σημείο ζέσης	45
A.1.3.4.10.	Δείκτης διάθλασης	45
A.1.3.4.11.	Ηλεκτρική αγωγιμότητα	45
A.1.3.4.12.	Ειδική θερμότητα και θερμική αγωγιμότητα	45
A.1.3.5.	Βιομηχανική επεξεργασία γάλακτος	46
A.1.3.5.1.	Ομογενοποίηση	46
A.1.3.5.2.	Παστερίωση-Αποστείρωση	46
A.1.3.6.	Ποιοτικός έλεγχος γάλακτος	46
A.1.3.7.	Το γάλα ως τρόφιμο	47
A.1.3.8.	Το γάλα ως βιομέσο για τη μελέτη φαινομένων αποδέσμευσης/απορρόφησης φαρμάκων	48
A.1.4.	Πρότυπες δραστικές ουσίες για χρήση με το γάλα	50
A.1.4.1.	Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	50
A.1.4.1.1.	Γενικές πληροφορίες	50
A.1.4.1.2.	Χημικές ιδιότητες	50
A.1.4.1.3.	Φυσικοχημικές ιδιότητες	50
A.1.4.1.4.	Φαρμακολογικές ιδιότητες	51
A.1.4.1.5.	Φαρμακοτεχνικές προσεγγίσεις	52
A.1.4.2.	Κυκλοσπορίνη Α	52
A.1.4.2.1.	Γενικές πληροφορίες	52
A.1.4.2.2.	Χημικές ιδιότητες	53
A.1.4.2.3.	Φυσικοχημικές ιδιότητες	53
A.1.4.2.4.	Φαρμακολογικές ιδιότητες	54
A.1.4.2.5.	Φαρμακοτεχνικές προσεγγίσεις	55
A.1.4.3.	Δαναζόλη	56
A.1.4.3.1.	Γενικές πληροφορίες	56
A.1.4.3.2.	Χημικές ιδιότητες	56
A.1.4.3.3.	Φυσικοχημικές ιδιότητες	56
A.1.4.3.4.	Φαρμακολογικές ιδιότητες	57
A.1.4.3.5.	Φαρμακοτεχνικές προσεγγίσεις	58
A.1.4.4.	Κλοπιδογρέλη	58
A.1.4.4.1.	Γενικές πληροφορίες	58
A.1.4.4.2.	Χημικές ιδιότητες	58
A.1.4.4.3.	Φυσικοχημικές ιδιότητες	59
A.1.4.4.4.	Φαρμακολογικές ιδιότητες	60
A.1.4.4.5.	Φαρμακοτεχνικές προσεγγίσεις	61
A.1.5.	Σκοπός της μελέτης	62
Κεφάλαιο Α.2.	Μέθοδοι	63
A.2.1.	Μελέτες Διαλυτότητας	63
A.2.1.1.	Μελέτες διαλυτότητας σε γάλα	63
A.2.1.1.1.	Υλικά	63
A.2.1.1.2.	Οργανολογία	63
A.2.1.1.3.	Μεθοδολογία	64
A.2.1.2.	Μελέτες διαλυτότητας σε αιθανολικά διαλύματα	65
A.2.1.2.1.	Υλικά	65
A.2.1.2.2.	Οργανολογία	66
A.2.1.2.3.	Μεθοδολογία	66

A.2.2.	Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός	68
A.2.2.1.	Μέγεθος και κατανομή σωματιδίων του γάλακτος	68
A.2.2.1.1.	Υλικά	68
A.2.2.1.2.	Οργανολογία	68
A.2.2.1.3.	Μεθοδολογία	68
A.2.2.2.	Δείκτης πολυδιασποράς	69
A.2.2.3.	ζ-δυναμικό	70
A.2.2.3.1.	Υλικά	70
A.2.2.3.2.	Οργανολογία	70
A.2.2.3.3.	Μεθοδολογία	70
A.2.2.4.	Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων	71
A.2.2.4.1.	Υλικά	71
A.2.2.4.2.	Οργανολογία	71
A.2.2.4.3.	Μεθοδολογία	72
A.2.2.5.	Φασματοσκοπία φθορισμού	72
A.2.2.5.1.	Υλικά	72
A.2.2.5.2.	Οργανολογία	73
A.2.2.5.3.	Μεθοδολογία	73
A.2.2.6.	Μετρήσεις pH	75
A.2.2.6.1.	Υλικά	75
A.2.2.6.2.	Οργανολογία	76
A.2.2.6.3.	Μεθοδολογία	76
A.2.3.	Μελέτες σταθερότητας	77
A.2.3.1.	Ποσοτικός προσδιορισμός-Προσμίξεις	77
A.2.3.1.1.	Υλικά	77
A.2.3.1.2.	Οργανολογία	77
A.2.3.1.3.	Μεθοδολογία	78
A.2.3.2.	Απώλεια μάζας	79
A.2.3.2.1.	Υλικά	79
A.2.3.2.2.	Οργανολογία	80
A.2.3.2.3.	Μεθοδολογία	80
A.2.4.	Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα	81
A.2.4.1.	Αναβράζοντα δισκία	81
A.2.4.1.1.	Υλικά	81
A.2.4.1.2.	Οργανολογία	82
A.2.4.1.3.	Μεθοδολογία	82
A.2.4.2.	Αιθανολικά διαλύματα	83
A.2.4.2.1.	Υλικά	83
A.2.4.2.2.	Οργανολογία	83
A.2.4.2.3.	Μεθοδολογία	84
A.2.4.3.	Κόνεις-Διασπειρόμενα δισκία	84
A.2.4.3.1.	Υλικά	84
A.2.4.3.2.	Οργανολογία	85
A.2.4.3.3.	Μεθοδολογία	85
A.2.5.	<i>In vivo</i> μελέτες	87
A.2.5.1.	Ασπιρίνη	87
A.2.5.1.1.	Υλικά	87
A.2.5.1.2.	Οργανολογία	87
A.2.5.1.3.	Μεθοδολογία	88
A.2.5.2.	Κυκλοσπορίνη	89
A.2.5.2.1.	Υλικά	89
A.2.5.2.2.	Οργανολογία	89
A.2.5.2.3.	Μεθοδολογία	90
Κεφάλαιο Α.3.	Αποτελέσματα-Συζήτηση	93
A.3.1.	Μελέτες διαλυτότητας	93

A.3.1.1.	Μελέτες διαλυτότητας σε γάλα	93
A.3.1.1.1.	Διαλυτότητα Δαναζόλης στο γάλα	93
A.3.1.1.2.	Διαλυτότητα Κλοπιδογρέλης στο γάλα	95
A.3.1.2.	Μελέτες διαλυτότητας σε αιθανολικά διαλύματα	97
A.3.1.2.1.	Δαναζόλη	98
A.3.1.2.2.	Κυκλοσπορίνη	100
A.3.1.2.3.	Κλοπιδογρέλη	100
A.3.2.	Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός φαρμακοτεχνικών μορφών	101
A.3.2.1.	Μέγεθος και κατανομή σωματιδίων	101
A.3.2.1.1.	Γάλα	101
A.3.2.1.2.	Σύστημα γάλακτος-αιθανόλης	104
A.3.2.1.3.	Δαναζόλη	109
A.3.2.1.4.	Κυκλοσπορίνη	112
A.3.2.1.5.	Κλοπιδογρέλη	115
A.3.2.2.	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	118
A.3.2.2.1.	Γάλα	118
A.3.2.2.2.	Σύστημα γάλακτος-αιθανόλης	119
A.3.2.2.3.	Δαναζόλη	120
A.3.2.2.4.	Κυκλοσπορίνη	121
A.3.2.2.5.	Κλοπιδογρέλη	121
A.3.2.3.	ζ-δυναμικό	122
A.3.2.3.1.	Γάλα	122
A.3.2.3.2.	Σύστημα γάλακτος-αιθανόλης	124
A.3.2.3.3.	Δαναζόλη	127
A.3.2.3.4.	Κυκλοσπορίνη	128
A.3.2.3.5.	Κλοπιδογρέλη	129
A.3.2.4.	Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων	131
A.3.2.5.	Φασματοσκοπία φθορισμού	133
A.3.2.5.1.	Γάλα	134
A.3.2.5.2.	Σύστημα γάλακτος-αιθανόλης	135
A.3.2.5.3.	Επίδραση συγκέντρωσης του ερυθρού του Νείλου στην ένταση και το σχήμα του φάσματος φθορισμού	140
A.3.2.5.4.	Αναλύσεις φασμάτων φθορισμού εκπομπής	143
A.3.2.6.	Μετρήσεις pH	147
A.3.3.	Μελέτες σταθερότητας	149
A.3.3.1.	Ποσοτικός προσδιορισμός	149
A.3.3.1.1.	Δαναζόλη	149
A.3.3.1.2.	Κυκλοσπορίνη	150
A.3.3.1.3.	Κλοπιδογρέλη	151
A.3.3.2.	Απώλεια μάζας	153
A.3.3.2.1.	Δαναζόλη	153
A.3.3.2.2.	Κυκλοσπορίνη	154
A.3.3.2.3.	Κλοπιδογρέλη	155
A.3.3.3.	Προσμίξεις	157
A.3.3.3.1.	Δαναζόλη	157
A.3.3.3.2.	Κυκλοσπορίνη	157
A.3.3.3.3.	Κλοπιδογρέλη	158
A.3.4.	Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα.	160
A.3.4.1.	Αναβράζοντα δισκία	160
A.3.4.1.1.	Ασπιρίνη σε 20ml νερού	160
A.3.4.1.2.	Ασπιρίνη σε 40ml νερού	164
A.3.4.2.	Αιθανολικά διαλύματα	166
A.3.4.2.1.	Δαναζόλη	166
A.3.4.2.2.	Κυκλοσπορίνη	169
A.3.4.2.3.	Κλοπιδογρέλη	172
A.3.4.3.	Κόνεις	175

A.3.4.3.1.	Κυκλοσπορίνη	175
A.3.4.3.2.	Κλοπιδογρέλη	176
A.3.4.4.	Διασπειρόμενα δισκία	178
A.3.4.4.1.	Κυκλοσπορίνη	178
A.3.4.4.2.	Κλοπιδογρέλη	179
A.3.5.	<i>In vivo</i> μελέτες	181
A.3.5.1.	Ασπιρίνη	181
A.3.5.2.	Κυκλοσπορίνη	184
Κεφάλαιο Α.4. Συνολικά συμπεράσματα		187

Τμήμα Β. Συμβολή στην ανάλυση της κινητικής των πορειών απορρόφησης με διαφορετικές εξισώσεις κλασματικών παραγώγων _____ 189

Κεφάλαιο Β.1. Εισαγωγή – Τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά των πορειών απορρόφησης 191

B.1.1.	Ορισμοί	191
B.1.1.1.	Διάχυση	191
B.1.1.2.	Διάλυση	191
B.1.1.3.	Αποδέσμευση	191
B.1.1.4.	Αποσάθρωση - Αποσυσσώματωση	192
B.1.1.5.	Απορρόφηση – Πρόσληψη	192
B.1.2.	Θεωρία της κινητικής των πορειών απορρόφησης	193
B.1.2.1.	Διάχυση	193
B.1.2.1.1.	Ιστορική αναδρομή	193
B.1.2.1.2.	Σημασία της διάχυσης στη φαρμακευτική	195
B.1.2.2.	Ρυθμός διάλυσης	196
B.1.2.2.1.	Ιστορική αναδρομή	196
B.1.2.2.2.	Σημασία του ρυθμού διάλυσης στη φαρμακευτική	200
B.1.2.2.3.	Νεότερες εξελίξεις – Προβληματισμοί	200
B.1.2.3.	Αποδέσμευση	201
B.1.2.3.1.	Η ανάγκη τροποποίησης του ρυθμού διάλυσης	201
B.1.2.3.2.	Ιστορική αναδρομή	202
B.1.2.3.3.	Νεότερες εξελίξεις-Προβληματισμοί	205
B.1.2.4.	Απορρόφηση – Πρόσληψη	206
B.1.2.4.1.	Ιστορική αναδρομή	206
B.1.2.4.2.	Νεότερες εξελίξεις – Προβληματισμοί	208
B.1.2.5.	Από την ανώμαλη διάχυση στη μορφοκλασματική (fractal) και στην κλασματική (fractional) κινητική.	208
B.1.3.	<i>In vitro-in vivo</i> συσχετίσεις	211
B.1.3.1.1.	Σημασία στη φαρμακευτική	211
B.1.3.1.2.	Νεότερες εξελίξεις – Προβληματισμοί	211
B.1.4.	Κλασματικές παράγωγοι	215
B.1.4.1.1.	Ιστορική αναδρομή	215
B.1.5.	Σκοπός της μελέτης	216

Κεφάλαιο Β.2. Εφαρμογή των κλασματικών παραγώγων στην ανάλυση της κινητικής των διαδικασιών απορρόφησης _____ 217

B.2.1.	Εισαγωγή στις κλασματικές παραγώγους	217
B.2.1.1.	Ιστορική αναδρομή	217
B.2.1.2.	Θεωρία	218
B.2.1.2.1.	Παράγωγος Riemann-Liouville	219
B.2.1.2.2.	Παράγωγος Caputo	220
B.2.1.3.	Βασικές σχέσεις	221
B.2.1.3.1.	Συνάρτηση Γάμμα	221

B.2.1.3.2.	Συνάρτηση Mittag-Leffler	222
B.2.1.4.	Εφαρμογές σε επιστημονικά πεδία	223
B.2.2.	Μηδενολογικές διαδικασίες	225
B.2.2.1.	Θεωρία	225
B.2.2.2.	Μέθοδοι	227
B.2.2.2.1.	Προσομοιώσεις	227
B.2.2.2.2.	Προσαρμογή σε πειραματικά δεδομένα	228
B.2.2.2.3.	Προσομοιώσεις φαρμακοκινητικών δεδομένων	228
B.2.2.3.	Αποτελέσματα σε in vitro μηδενολογική αποδέσμευση	230
B.2.2.3.1.	Εισαγωγή	230
B.2.2.3.2.	Προσομοιώσεις	230
B.2.2.3.3.	Προσαρμογή σε πειραματικά in vitro δεδομένα	234
B.2.2.4.	Αποτελέσματα σε in vivo μηδενολογική αποδέσμευση	244
B.2.2.4.1.	Προσομοιώσεις	244
B.2.2.4.2.	Προσαρμογή σε πειραματικά in vivo δεδομένα	244
B.2.2.5.	Προσομοιώσεις φαρμακοκινητικών δεδομένων	247
B.2.3.	Πρωτοταξικές διαδικασίες	254
B.2.3.1.	Θεωρία	254
B.2.3.2.	Μέθοδοι	257
B.2.3.2.1.	Προσομοιώσεις	257
B.2.3.2.2.	Προσαρμογή σε πειραματικά δεδομένα	257
B.2.3.3.	Αποτελέσματα σε in vitro πρωτοταξικές διαδικασίες	258
B.2.3.3.1.	Προσομοιώσεις	258
B.2.3.3.2.	Προσαρμογή σε πειραματικά in vitro δεδομένα	262
B.2.3.4.	Αποτελέσματα σε in vivo πρωτοταξικές διαδικασίες	271
B.2.3.4.1.	Προσομοιώσεις	271
B.2.3.4.2.	Προσαρμογή σε πειραματικά in vivo δεδομένα	271

Κεφάλαιο Β.3. Εφαρμογή των κλασματικών παραγώγων στις in vitro - in vivo συσχετίσεις **277**

B.3.1.	Εισαγωγή	277
B.3.2.	Θεωρία	279
B.3.2.1.	Μηδενολογικές διαδικασίες	279
B.3.2.2.	Πρωτοταξικές διαδικασίες	280
B.3.3.	Μέθοδοι	281
B.3.3.1.	Προσομοιώσεις	281
B.3.3.2.	Προσαρμογή σε πειραματικά δεδομένα	281
B.3.4.	Αποτελέσματα	284
B.3.4.1.	Αποτελέσματα στις μηδενολογικές διαδικασίες	284
B.3.4.1.1.	Προσομοιώσεις	284
B.3.4.1.2.	Προσαρμογή σε πειραματικά δεδομένα	289
B.3.4.2.	Αποτελέσματα στις πρωτοταξικές διαδικασίες	296
B.3.4.2.1.	Προσομοιώσεις	296
B.3.4.2.2.	Προσαρμογή σε πειραματικά δεδομένα	298
B.3.4.3.	Αποτελέσματα σε σύνθετες διαδικασίες	298
B.3.4.3.1.	Προσομοιώσεις	298

Παραρτήματα **301**

Παράρτημα Ι – Αναλύσεις υγρης χρωματογραφίας **303**

Ανάλυση Ασπιρίνης στο Γάλα	303
Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς	303
Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς	303
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα	303

Ανάλυση Ασπιρίνης <i>in Vivo</i> _____	304
Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς _____	304
Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς _____	304
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα _____	304
Ανάλυση Κυκλοσπορίνης σε Υδαταλκοολικό Διάλυμα _____	305
Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς _____	305
Αποτελέσματα καμπύλης αναφοράς _____	305
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα _____	305
Ανάλυση Κυκλοσπορίνης στο Γάλα _____	306
Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς _____	306
Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς _____	306
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα _____	306
Ανάλυση Δαναζόλης σε Υδαταλκοολικό Διάλυμα _____	307
Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς _____	307
Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς _____	307
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα _____	307
Ανάλυση Δαναζόλης στο Γάλα _____	308
Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς _____	308
Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς _____	308
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα _____	308
Ανάλυση Κλοπιδογρέλης σε Υδαταλκοολικό Διάλυμα _____	309
Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς _____	309
Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς _____	309
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα _____	309
Ανάλυση Κλοπιδογρέλης στο Γάλα _____	310
Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς _____	310
Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς _____	310
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα _____	310
Ανάλυση Κλοπιδογρέλης για Μελέτες Σταθεροτήτων _____	311
Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς _____	311
Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς _____	311
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα _____	311
Παράρτημα II – Ατομικά δεδομένα <i>in vivo</i> μελέτης ασπιρίνης _____	313
Σκεύασμα Αναφοράς _____	313
Σκεύασμα Ελέγχου _____	314
Παράρτημα III - Ρουτίνες _____	315
Ρουτίνα για την προσομοίωση κίνησης Brown (MatLab) _____	315
Ρουτίνα για την προσομοίωση κλασματικής μηδενοταξικής κινητικής (Mathematica). _____	316
Ρουτίνα για την μη γραμμική προσαρμογή της κλασματικής μηδενοταξικής σχέσης σε πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία (Mathematica). _____	317
Ρουτίνα για την προσομοίωση φαρμακοκινητικών δεδομένων στο μονοδιαμερισματικό μοντέλο με κλασματική μηδενοταξική είσοδο και πρωτοταξική απομάκρυνση (Mathematica). _____	319
Ρουτίνα για την προσομοίωση κλασματικής πρωτοταξικής κινητικής (Mathematica). _____	321
Ρουτίνα για την μη γραμμική προσαρμογή της κλασματικής πρωτοταξικής σχέσης σε πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία (Mathematica). _____	322
Ρουτίνα για την μη γραμμική προσαρμογή της κλασματικής πρωτοταξικής σχέσης σε <i>in vivo</i> πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία (MatLab) _____	323
Ρουτίνα κλασματικού μηδενοταξικού μοντέλου αποδέσμευσης/απορρόφησης σε <i>in vivo</i> πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία (MatLab) _____	325
Ρουτίνα κλασματικού πρωτοταξικού μοντέλου αποδέσμευσης/απορρόφησης σε <i>in vivo</i> πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία (MatLab) _____	326
Ρουτίνα της Mittag-Leffler για MatLab από τον Igor Podlubny _____	327

Ρουτίνα για την προσομοίωση IVVC με τη χρήση παραμετρικών διαγραμμάτων στην περίπτωση κλασματικής μηδενοταξικής κινητικής	330
Ρουτίνα για την προσομοίωση των σχέσεων B.3.2 και B.3.3.	331
Ρουτίνα για την προσαρμογή της σχέσης B.3.3 σε πειραματικά δεδομένα	332
Ρουτίνα για τη διαδικασία συνέλιξης με τη χρήση της σχέσης B.3.4	333
Ρουτίνα για την εξαγωγή των σχέσεων B.3.7 και B.3.8 (Ανω σκέλος)	334
Ρουτίνα για τη διαδικασία συνέλιξης με τη χρήση της σχέσης B.3.8	335

Βιβλιογραφία 337

ΛΙΣΤΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα A.1.1: Δέντρο απόφασης για την επιλογή κατάλληλης φαρμακοτεχνικής μορφής ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της δραστικής ουσίας (Rabinow, 2004; Tong, 2008).	24
Σχήμα A.3.1: Διαλυτότητα δαναζόλης σε σχέση με τη θερμοκρασία και το ποσοστό λίπους του γάλακτος. Οι γραμμές έχουν προκύψει από γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης στα πειραματικά δεδομένα.	94
Σχήμα A.3.2: Διαλυτότητα βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης σε σχέση με τη θερμοκρασία και το ποσοστό λίπους του γάλακτος.	95
Σχήμα A.3.3: Διαλυτότητα βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε σχέση με τη θερμοκρασία και το ποσοστό λίπους του γάλακτος.	96
Σχήμα A.3.4: Διαλυτότητα δαναζόλης σε αιθανολικά διαλύματα (20-100% κ.ο.) και σε θερμοκρασίες 10, 25 και 37 °C. Οι καμπύλες έχουν προκύψει από μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης του εκθετικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα.	98
Σχήμα A.3.5: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) στους 25 °C.	102
Σχήμα A.3.6: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 3,6% σε διάφορες θερμοκρασίες (5, 25 και 37 °C)	104
Σχήμα A.3.7: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 3,6% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-40%) στους 25 °C. Η μέτρηση με αιθανόλη 50% δεν περιλαμβάνεται λόγω κακής ποιότητας του δείγματος.	105
Σχήμα A.3.8: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 1,8% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-30%) στους 25 °C. Οι μετρήσεις με αιθανόλη 40 και 50% δεν περιλαμβάνονται λόγω κακής ποιότητας των δειγμάτων.	106
Σχήμα A.3.9: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 0,3% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-30%) στους 25 °C. Οι μετρήσεις με αιθανόλη 40 και 50% δεν περιλαμβάνονται λόγω κακής ποιότητας των δειγμάτων.	107
Σχήμα A.3.10: Επίδραση της αιθανόλης στο μέγεθος των σωματιδίων του γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% εκφρασμένο ως προς μέσο ζ (κανονική γραμμή) και μέσο όγκο (στικτή γραμμή).	108
Σχήμα A.3.11: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης στους 25 °C. Ως μέτρο σύγκρισης παρουσιάζονται οι αντίστοιχες καμπύλες ακατέργαστου γάλακτος καθώς και γάλακτος με την αντίστοιχη ποσότητα αιθανόλης.	110
Σχήμα A.3.12: Διαγράμματα P-P της κατανομής των σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης στους 25 °C. Οι ποσοστημοριακές τιμές των διαγραμμάτων αφορούν τιμές ανά 5% (20 συνολικά).	111
Σχήμα A.3.13: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης A στους 25 °C. Ως μέτρο σύγκρισης παρουσιάζονται οι αντίστοιχες καμπύλες ακατέργαστου γάλακτος καθώς και γάλακτος με την αντίστοιχη ποσότητα αιθανόλης.	113
Σχήμα A.3.14: Διαγράμματα P-P της κατανομής των σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης A στους 25 °C. Οι ποσοστημοριακές τιμές των διαγραμμάτων αφορούν τιμές ανά 5% (20 συνολικά).	114
Σχήμα A.3.15: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στους 25 °C. Ως μέτρο σύγκρισης παρουσιάζονται οι αντίστοιχες καμπύλες ακατέργαστου γάλακτος καθώς και γάλακτος με την αντίστοιχη ποσότητα αιθανόλης.	116

Σχήμα Α.3.16: Διαγράμματα P-P της κατανομής των σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στους 25 °C. Οι ποσοστημοριακές τιμές των διαγραμμάτων αφορούν τιμές ανά 5% (20 συνολικά).....	117
Σχήμα Α.3.17: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) στους 25 °C.	123
Σχήμα Α.3.18: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος 3,6% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.	124
Σχήμα Α.3.19: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος 1,8% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.	125
Σχήμα Α.3.20: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος 0,3% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.	126
Σχήμα Α.3.21: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος 3,6, 1,8% και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης στους 25 °C.	127
Σχήμα Α.3.22: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος 3,6, 1,8% και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης στους 25 °C.	129
Σχήμα Α.3.23: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος 3,6, 1,8% και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στους 25 °C.	130
Σχήμα Α.3.24: Φάσματα φθορισμού εκπομπής νερού και γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% περιεκτικότητας σε λίπος. Όλα τα δείγματα περιέχουν 500 ng/ml ερυθρό του Νείλου.	134
Σχήμα Α.3.25: Φάσματα φθορισμού εκπομπής γάλακτος 3,6% περιεκτικότητας σε λίπος πριν και ύστερα από την προσθήκη αιθανόλης (1-50%) στους 25 °C. Όλα τα δείγματα περιέχουν 500 ng/ml ερυθρό του Νείλου.	136
Σχήμα Α.3.26: Φάσματα φθορισμού εκπομπής γάλακτος 1,8% περιεκτικότητας σε λίπος πριν και ύστερα από την προσθήκη αιθανόλης (1-50%) στους 25 °C. Όλα τα δείγματα περιέχουν 500 ng/ml ερυθρό του Νείλου.	137
Σχήμα Α.3.27: Φάσματα φθορισμού εκπομπής γάλακτος 0% περιεκτικότητας σε λίπος πριν και ύστερα από την προσθήκη αιθανόλης (1-50%) στους 25 °C. Όλα τα δείγματα περιέχουν 500 ng/ml ερυθρό του Νείλου.	138
Σχήμα Α.3.28: Μέγιστες εντάσεις κορυφών φασμάτων φθορισμού εκπομπής σε σχέση με το ποσοστό αιθανόλης σε γάλα 3,6, 1,8 και 0,3%.	139
Σχήμα Α.3.29: Μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής φάσματος φθορισμού σε σχέση με το ποσοστό αιθανόλης σε γάλα 3,6, 1,8 και 0,3%.	140
Σχήμα Α.3.30: Φάσματα φθορισμού εκπομπής γάλακτος 3,6% περιεκτικότητας σε λίπος διαφορετικής περιεκτικότητας σε ερυθρό του Νείλου (250, 500 και 1000 ng/ml) στους 25 °C.	141
Σχήμα Α.3.31: Μέγιστες εντάσεις κορυφών φασμάτων φθορισμού εκπομπής σε σχέση με τη συγκέντρωση ερυθρού του Νείλου σε γάλα 3,6% περιεκτικότητας σε λίπος που περιέχει αιθανόλη (0-50% κ.ο.).	142
Σχήμα Α.3.32: Μέγιστες εντάσεις κορυφών φασμάτων φθορισμού εκπομπής σε σχέση με τη συγκέντρωση ερυθρού του Νείλου σε γάλα 1,8% περιεκτικότητας σε λίπος που περιέχει αιθανόλη (0-50% κ.ο.).	142
Σχήμα Α.3.33: Μέγιστες εντάσεις κορυφών φασμάτων φθορισμού εκπομπής σε σχέση με τη συγκέντρωση ερυθρού του Νείλου σε γάλα 0,3% περιεκτικότητας σε λίπος που περιέχει αιθανόλη (0-50% κ.ο.).	143
Σχήμα Α.3.34: Φάσματα φθορισμού εκπομπής διαλύματος καζείνης 1 mg/ml και διαλύματος νερού-αιθανόλης 50% κ.ο. Όλα τα δείγματα περιέχουν 500 ng/ml ερυθρό του Νείλου.	144
Σχήμα Α.3.35: Ανάλυση φασμάτων φθορισμού εκπομπής γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% περιεκτικότητας σε λίπος σε δύο κανονικές κατανομές.	145
Σχήμα Α.3.36: Ανάλυση φασμάτων φθορισμού εκπομπής γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% περιεκτικότητας σε λίπος που περιέχει 50% αιθανόλη κ.ο. σε δύο κανονικές κατανομές.	146
Σχήμα Α.3.37: Ποσοτικός προσδιορισμός αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης 100 mg/10 ml σε επιταχυνόμενες συνθήκες (40 ± 2 °C - 75% RH ± 5% RH).	150
Σχήμα Α.3.38: Ποσοτικός προσδιορισμός αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης 100 mg/5 ml σε επιταχυνόμενες συνθήκες (40 ± 2 °C - 75% RH ± 5% RH).	151
Σχήμα Α.3.39: Ποσοτικός προσδιορισμός αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε επιταχυνόμενες συνθήκες (40 ± 2 °C - 75% RH ± 5% RH).	152
Σχήμα Α.3.40: Ποσοτικός προσδιορισμός αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε ενδιάμεσες συνθήκες (30 ± 2 °C - 65% RH ± 5% RH).	152
Σχήμα Α.3.41: Ποσοτικός προσδιορισμός αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε μακροπρόθεσμες συνθήκες (25 ± 2 °C - 60% RH ± 5% RH).	153
Σχήμα Α.3.42: Απώλεια μάζας αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης 100 mg/10 ml σε επιταχυνόμενες συνθήκες (40 ± 2 °C - 75% RH ± 5% RH).	154

Σχήμα A.3.43: Απώλεια μάζας αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης 100 mg/5 ml σε επιταχυνόμενες συνθήκες ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ - 75% RH $\pm$ 5% RH).....	155
Σχήμα A.3.44: Απώλεια μάζας αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε επιταχυνόμενες συνθήκες ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ - 75% RH $\pm$ 5% RH).....	156
Σχήμα A.3.45: Απώλεια μάζας αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε ενδιάμεσες συνθήκες ($30 \pm 2^\circ\text{C}$ - 65% RH $\pm$ 5% RH).....	156
Σχήμα A.3.46: Απώλεια μάζας αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε μακροπρόθεσμες συνθήκες ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ - 60% RH $\pm$ 5% RH).....	157
Σχήμα A.3.47: Ποσοστό προσμίξεων % επί του συνόλου αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε επιταχυνόμενες συνθήκες ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ - 75% RH $\pm$ 5% RH).....	158
Σχήμα A.3.48: Ποσοστό προσμίξεων % επί του συνόλου αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε ενδιάμεσες συνθήκες ($30 \pm 2^\circ\text{C}$ - 65% RH $\pm$ 5% RH).....	158
Σχήμα A.3.49: Ποσοστό προσμίξεων % επί του συνόλου αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε μακροπρόθεσμες συνθήκες ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ - 60% RH $\pm$ 5% RH).....	159
Σχήμα A.3.50: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα σκευάσματος ασπιρίνης σε γάλα 3,5% ύστερα από αναβρασμό σε 20 ml νερού. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 500 mg της αρχικής δόσης ασπιρίνης. ASA: ακετυλοσαλικυλικό οξύ, SA: σαλικυλικό οξύ.....	161
Σχήμα A.3.51: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα σκευάσματος ασπιρίνης σε γάλα 1,5% ύστερα από αναβρασμό σε 20 ml νερού. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 500 mg της αρχικής δόσης ασπιρίνης. ASA: ακετυλοσαλικυλικό οξύ, SA: σαλικυλικό οξύ.....	162
Σχήμα A.3.52: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα σκευάσματος ασπιρίνης σε γάλα 0% ύστερα από αναβρασμό σε 20 ml νερού. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 500 mg της αρχικής δόσης ασπιρίνης. ASA: ακετυλοσαλικυλικό οξύ, SA: σαλικυλικό οξύ.....	163
Σχήμα A.3.53: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα σκευάσματος ασπιρίνης σε γάλα 3,5% ύστερα από αναβρασμό σε 40 ml νερού. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 500 mg της αρχικής δόσης ασπιρίνης. ASA: ακετυλοσαλικυλικό οξύ, SA: σαλικυλικό οξύ.....	165
Σχήμα A.3.54: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης σε γάλα 3,5, 1,5 και 0%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 100 mg της αρχικής δόσης δαναζόλης.....	167
Σχήμα A.3.55: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης A σε γάλα 3,5, 1,5 και 0%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 100 mg της αρχικής δόσης κυκλοσπορίνης.....	170
Σχήμα A.3.56: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπνερασμένης ως προς βάση σε γάλα 3,5, 1,5 και 0%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 75 mg της αρχικής δόσης κλοπιδογρέλης.....	173
Σχήμα A.3.57: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα κόνεως κυκλοσπορίνης A σε γάλα 3,5%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 100 mg της αρχικής δόσης κυκλοσπορίνης.....	175
Σχήμα A.3.58: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα κόνεως βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπνερασμένης ως προς βάση σε γάλα 3,5%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 75 mg της αρχικής δόσης κλοπιδογρέλης.....	177
Σχήμα A.3.59: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα διασπειρόμενων δισκίων κυκλοσπορίνης A σε γάλα 3,5%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 100 mg της αρχικής δόσης κυκλοσπορίνης.....	178
Σχήμα A.3.60: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα διασπειρόμενων δισκίων βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπνερασμένης ως προς βάση σε γάλα 3,5%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 75 mg της αρχικής δόσης κλοπιδογρέλης.....	179
Σχήμα A.3.61: Καμπύλες συγκέντρωσης-χρόνου για τα σκευάσματα αναφοράς και ελέγχου ασπιρίνης. ($x \pm SD$, n=4, SA: Σαλικυλικό οξύ, ASA: Ακετυλοσαλικυλικό οξύ).....	182
Σχήμα A.3.62: Καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου για το σκεύασμα ελέγχου κυκλοσπορίνης (100 mg κυκλοσπορίνης σε 5 ml αιθανολικού διαλύματος 60% απαιωρημένα σε 195 ml γάλακτος).....	184
Σχήμα B.1.1: Σχήμα B.1.2: Γραφική αναπαράσταση κίνησης Brown σε τρεις διαστάσεις με τη χρήση MatLab (βλ. Παράρτημα III).....	194
Σχήμα B.2.1: Γραφική αναπαράσταση της συνάρτησης Γάμμα για τους πραγματικούς αριθμούς.....	221
Σχήμα B.2.2: Γραφική αναπαράσταση της συνάρτησης Mittag-Leffler (B.2.17) (Άνω γράφημα: Όλο το εύρος τιμών, Κάτω γράφημα: Για την περιοχή τιμών που θα χρησιμοποιηθεί στην παρούσα διατριβή).....	223

Σχήμα B.2.3: Γραφική απεικόνιση εξίσωσης B.2.20 ή B.2.23 για τιμές του α που αναγράφονται στο διάγραμμα. Σε όλες τις περιπτώσεις $K'_{0,1}$ ή $K'_{0,2}=0,5$.	231
Σχήμα B.2.4: Γραφική απεικόνιση εξίσωσης B.2.24 (ή B.2.26) για τιμές του α που αναγράφονται στο διάγραμμα. Σε όλες τις περιπτώσεις $K_{0,1}$ ή $K_{0,2}=0,5$.	232
Σχήμα B.2.5: Γραφική απεικόνιση εξίσωσης B.2.20 ή B.2.23 για τιμές του $K'_{0,1}$ ή $K'_{0,2}$ που αναγράφονται στο διάγραμμα. Σε όλες τις περιπτώσεις $\alpha=0,5$.	233
Σχήμα B.2.6: Γραφική απεικόνιση εξίσωσης B.2.21 ή B.2.22 για τιμές t_{lag} που αναγράφονται στο διάγραμμα. Σε όλες τις περιπτώσεις $\alpha=0,5$ και $K'_{0,1}$ ή $K'_{0,2}=0,5$.	234
Σχήμα B.2.7: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των Cedillo-Ramírez et al. για τις συνταγές που περιέχουν μετρονιδαζόλη (150 mg), methocel και pharmatose 50-250mg (Cedillo-Ramírez et al., 2006).	235
Σχήμα B.2.8: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των Cedillo-Ramírez et al. για τις συνταγές που περιέχουν μετρονιδαζόλη (150 mg), carborol και pharmatose 50-250mg (Cedillo-Ramírez et al., 2006).	236
Σχήμα B.2.9: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης HCl 0,1N (AlKhatib et al., 2008).	239
Σχήμα B.2.10: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης ρυθμιστικό διάλυμα pH 6,8 (AlKhatib et al., 2008).	239
Σχήμα B.2.11: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης νερό (AlKhatib et al., 2008).	241
Σχήμα B.2.12: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης NaCl 5% (AlKhatib et al., 2008).	241
Σχήμα B.2.13: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της εξίσωσης B.2.22 στα πειραματικά δεδομένα των Dutta et al (Dutta et al., 2005).	245
Σχήμα B.2.14: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της εξίσωσης B.2.22 στα πειραματικά δεδομένα των Abrahamsson et al (Abrahamsson et al., 1998).	246
Σχήμα B.2.15: Προσομοίωση καμπύλης συγκέντρωσης φαρμάκου στο αίμα ως προς χρόνο στην περίπτωση που η αποδέσμευση είναι το περιοριστικό βήμα της εμφάνισης του φαρμάκου στην κυκλοφορία για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{0f}=0,5$ mg/h ^a , $k_{el}=0,2$ h ⁻¹ , $Q_0=1$ mg και $V_d=1$ L (B.2.32).	248
Σχήμα B.2.16: Προσομοίωση καμπύλης συγκέντρωσης φαρμάκου στο αίμα ως προς χρόνο στην περίπτωση που η αποδέσμευση είναι το περιοριστικό βήμα της εμφάνισης του φαρμάκου στην κυκλοφορία για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{0f}=0,5$ mg/h ^a , $k_{el}=0,5$ h ⁻¹ , $Q_0=1$ mg και $V_d=1$ L (B.2.32).	249
Σχήμα B.2.17: Προσομοίωση καμπύλης συγκέντρωσης φαρμάκου στο αίμα ως προς χρόνο στην περίπτωση που η αποδέσμευση είναι το περιοριστικό βήμα της εμφάνισης του φαρμάκου στην κυκλοφορία για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{0f}=0,2$ mg/h ^a , $k_{el}=0,5$ h ⁻¹ , $Q_0=1$ mg και $V_d=1$ L (B.2.32).	251
Σχήμα B.2.18: Προσομοίωση καμπύλης συγκέντρωσης φαρμάκου στο αίμα ως προς χρόνο στην περίπτωση που η αποδέσμευση είναι το περιοριστικό βήμα της εμφάνισης του φαρμάκου στην κυκλοφορία για διάφορες τιμές του α (0,5-1). Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{0f}=0,5$ mg/h ^a , $k_{el}=0,2$ h ⁻¹ , $Q_0=5$ mg και $V_d=1$ L (B.2.32).	252
Σχήμα B.2.19: Γραφική απεικόνιση των σχέσεων B.2.35 και B.2.36 για διάφορες τιμές του α (0,4-1,6) με $k_{1,1}=k_{1,2}=0,5$.	258
Σχήμα B.2.20: Γραφική απεικόνιση των σχέσεων B.2.39 και B.2.40 για διάφορες τιμές του α (0,4-1,6) με $k_{1,1}=k_{1,2}=0,5$.	260
Σχήμα B.2.21: Διαφορά της εξίσωσης $E_a(-t^a)$ από την Weibull $\exp(-t^a)$ για διάφορες τιμές του α ($\alpha<1$) και του χρόνου. Αριστερά: τρισδιάστατη απεικόνιση και δεξιά: ισοϋψής απεικόνιση (contour).	261
Σχήμα B.2.22: Διαφορά της εξίσωσης $E_a(-t^a)$ από την Weibull $\exp(-t^a)$ για διάφορες τιμές του α ($\alpha>1$) και του χρόνου. Αριστερά: τρισδιάστατη απεικόνιση και δεξιά: ισοϋψής απεικόνιση (contour).	261
Σχήμα B.2.23: Log-log διαγράμματα της εξίσωσης $E_a(-t^a)$ (κανονική γραμμή) από την Weibull $\exp(-t^a)$ (στικτή γραμμή) για διάφορες τιμές του α ($\alpha=0,8$ άνω αριστερά, $\alpha=0,6$ άνω δεξιά και $\alpha=0,4$ κάτω αριστερά).	262
Σχήμα B.2.24: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Gbureck et al. για το σύστημα βανκομυκίνης (Gbureck et al., 2008).	263
Σχήμα B.2.25: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Gómez-Carracedo et al. για το σύστημα θεοφυλλίνης (Gómez-Carracedo et al., 2009).	265

Σχήμα B.2.26: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Pattarino et al. για το σύστημα νιφεδιπίνης (Pattarino et al., 2007).....	267
Σχήμα B.2.27: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Ma et al. για το σύστημα ακυκλοβίρης (Ma et al., 2009).....	268
Σχήμα B.2.28: Συσχέτιση μεταξύ σταθεράς Weibull b και κλασματικού βαθμού παραγωγής α που έχει προκύψει από μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης στα ίδια βιβλιογραφικά δεδομένα. Με κόκκινη γραμμή η καμπύλη που προκύπτει από τη γραμμική συσχέτιση των δύο σταθερών λαμβάνοντας υπόψη όλα τα σημεία ($y=0,4731x+0,4929$, $r^2=0,8761$). Με πράσινη γραμμή η καμπύλη που προκύπτει από τη γραμμική συσχέτιση των δύο σταθερών λαμβάνοντας υπόψη τα μπλε σημεία ($y=0,5439x+0,4485$, $r^2=0,9006$). Με μαύρη διακεκομμένη γραμμή η ευθεία γραμμή για $b=\alpha$	270
Σχήμα B.2.29: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. χωρίς τη χρήση χρόνου υστέρησης και χωρίς περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α (Balan et al., 2001).....	272
Σχήμα B.2.30: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. χωρίς τη χρήση χρόνου υστέρησης και με περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α , με $\alpha < 1$ (Balan et al., 2001).	273
Σχήμα B.2.31: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. με τη χρήση χρόνου υστέρησης και χωρίς περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α (Balan et al., 2001).....	274
Σχήμα B.2.32: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. με τη χρήση χρόνου υστέρησης και με περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α , με $\alpha < 1$ (Balan et al., 2001).	275
Σχήμα B.3.1: Προσομοίωση IVIVC επιπέδου A στην περίπτωση κλασματικής μηδενοταξικής κινητικής με τη χρήση των σχέσεων B.2.20 και B.2.23 για $k'_{0,1} = k'_{0,2} = 1$ (χρόνος) $^{-\alpha}$. Οι in vitro συνθήκες είναι: $\alpha_1=1$ (πάνω αριστερά), $\alpha_1=1,2$ (πάνω δεξιά), $\alpha_1=0,8$ (κάτω αριστερά) και $\alpha_1=0,4$ (κάτω δεξιά). Οι αριθμοί στα γραφήματα αφορούν στις διαφορετικές τιμές του α_2 in vivo.	285
Σχήμα B.3.2: Προσομοίωση IVIVC επιπέδου A στην περίπτωση κλασματικής μηδενοταξικής κινητικής με τη χρήση των σχέσεων B.2.24 και B.2.26 για $k_{0,1}=k_{0,2}=1$ (χρόνος) $^{-\alpha}$. Οι in vitro συνθήκες είναι: $\alpha_1=1$ (πάνω αριστερά), $\alpha_1=1,2$ (πάνω δεξιά), $\alpha_1=0,8$ (κάτω αριστερά) και $\alpha_1=0,4$ (κάτω δεξιά). Οι αριθμοί στα γραφήματα αφορούν στις διαφορετικές τιμές του α_2 in vivo.	286
Σχήμα B.3.3: Προσομοίωση IVIVC επιπέδου A με χρήση των σχέσεων B.3.2 (άνω) και B.3.3 (κάτω). Οι αναγραφόμενες τιμές αντιστοιχούν στις τιμές της σταθεράς λ , ενώ οι τιμές των υπόλοιπων παραμέτρων είναι $\mu=1$ (άνω), $\mu=1,1$ και $\beta=-0,1$ (κάτω).....	288
Σχήμα B.3.4: Μη γραμμική προσαρμογή της σχέσης B.3.3 σε πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία. Άνω αριστερά: Dutta et al. (2005), άνω δεξιά: Ravishankar et al. (2006) και κάτω αριστερά: Corrigan et al. (2003). Οι εκτιμώμενες τιμές των παραμέτρων παρουσιάζονται στον Πίνακα B.3.1.	289
Σχήμα B.3.5: Μη γραμμική προσαρμογή των σχέσεων B.2.21 (άνω) και B.2.22 (κάτω) στα in vitro (άνω) και in vivo (κάτω) πειραματικά δεδομένα των Dutta et al. (2005) αντίστοιχα.....	291
Σχήμα B.3.6: Προσομοίωση καμπύλης συγκέντρωσης στο πλάσμα σε σχέση με το χρόνο ύστερα από διαδικασία συνέλιξης με χρήση της σχέσης B.3.4 και σύγκριση με τα πειραματικά δεδομένα (Dutta et al., 2005). Τα διαγράμματα αντιστοιχούν στις συνταγές fast (άνω αριστερά), medium (άνω δεξιά) και slow (κάτω αριστερά).....	293
Σχήμα B.3.7: Προσομοίωση καμπύλης συγκέντρωσης στο πλάσμα σε σχέση με το χρόνο ύστερα από διαδικασία συνέλιξης με χρήση της σχέσης B.3.8 και σύγκριση με τα πειραματικά δεδομένα (Dutta et al., 2005). Τα διαγράμματα αντιστοιχούν στις συνταγές fast (άνω αριστερά), medium (άνω δεξιά) και slow (κάτω αριστερά).....	294
Σχήμα B.3.8: Προσομοίωση IVIVC επιπέδου A στην περίπτωση κλασματικής πρωτοταξικής κινητικής με τη χρήση των σχέσεων B.2.39 και B.2.40 για $k_{1,1}=k_{1,2}=1$ (χρόνος) $^{-\alpha}$. Οι in vitro συνθήκες είναι: $\alpha_1=1$ (πάνω αριστερά), $\alpha_1=1,2$ (πάνω δεξιά), $\alpha_1=0,8$ (κάτω αριστερά) και $\alpha_1=0,4$ (κάτω δεξιά). Οι αριθμοί στα γραφήματα αφορούν στις διαφορετικές τιμές του α_2 in vivo.	297
Σχήμα B.3.9: Προσομοίωση IVIVC επιπέδου A στην περίπτωση κλασματικής μηδενοταξικής κινητικής in vitro και κλασματικής πρωτοταξικής κινητικής in vivo με τη χρήση των σχέσεων B.2.20 και B.2.40 για $k'_{0,1} = 1$ (χρόνος) $^{-\alpha}$ και $k_{1,2}=0,5$ (χρόνος) $^{-\alpha}$. Οι in vitro συνθήκες είναι: $\alpha_1=1$ (πάνω αριστερά), $\alpha_1=1,2$ (πάνω δεξιά), $\alpha_1=0,8$ (κάτω αριστερά) και $\alpha_1=0,4$ (κάτω δεξιά). Οι αριθμοί στα γραφήματα αφορούν στις διαφορετικές τιμές του α_2 in vivo.	299
Σχήμα B.3.10: Προσομοίωση IVIVC επιπέδου A στην περίπτωση κλασματικής πρωτοταξικής κινητικής in vitro και κλασματικής μηδενοταξικής κινητικής in vivo με τη χρήση των σχέσεων B.2.39 και B.2.23 για	

$k_{1,1}=1$ (χρόνος)^{-α} και $k'_{0,2}=0,5$ (χρόνος)^{-α}. Οι *in vitro* συνθήκες είναι: $\alpha_1=1$ (πάνω αριστερά), $\alpha_1=1,2$ (πάνω δεξιά), $\alpha_1=0,8$ (κάτω αριστερά) και $\alpha_1=0,4$ (κάτω δεξιά). Οι αριθμοί στα γραφήματα αφορούν στις διαφορετικές τιμές του α_2 *in vivo*.300

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας Α.1.Ι: Ενδεικτική σύσταση γάλακτος αγελάδας (Walstra et al., 1984).....	38
Πίνακας Α.1.ΙΙ: Χημικές ιδιότητες ακετυλοσαλικυλικού οξέος.....	50
Πίνακας Α.1.ΙΙΙ: Φυσικοχημικές ιδιότητες ακετυλοσαλικυλικού οξέος.....	51
Πίνακας Α.1.ΙV: Χημικές ιδιότητες κυκλοσπορίνης Α.....	53
Πίνακας Α.1.V: Φυσικοχημικές ιδιότητες κυκλοσπορίνης Α.....	54
Πίνακας Α.1.VI: Χημικές ιδιότητες δαναζόλης.....	56
Πίνακας Α.1.VII: Φυσικοχημικές ιδιότητες δαναζόλης.....	57
Πίνακας Α.1.VIII: Χημικές ιδιότητες κλοπιδογρέλης.....	59
Πίνακας Α.1.IX: Φυσικοχημικές ιδιότητες κλοπιδογρέλης.....	60
Πίνακας Α.2.Ι: Χημικά χαρακτηριστικά ερυθρού του Νείλου.....	74
Πίνακας Α.2.ΙΙ: Σύσταση κόνεων κλοπιδογρέλης και κυκλοσπορίνης (ποσότητα ανά sachet).....	85
Πίνακας Α.3.Ι: Τιμές διαλυτότητας της δαναζόλης σε γάλα διαφόρων περιεκτικότητας σε λίπος (0, 1,5 και 3,5 %) σε θερμοκρασίες 10 και 25 °C.....	94
Πίνακας Α.3.ΙΙ: Τιμές διαλυτότητας της βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης σε γάλα διαφόρων περιεκτικότητας σε λίπος (0, 1,5 και 3,5%) σε θερμοκρασίες 10° και 25 °C.....	96
Πίνακας Α.3.ΙΙΙ: Τιμές διαλυτότητας της βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε γάλα διαφόρων περιεκτικότητας σε λίπος (0, 1,5 και 3,5 %) σε θερμοκρασίες 10 και 25 °C.....	97
Πίνακας Α.3.ΙV: Τιμές διαλυτότητας της δαναζόλης σε αιθανολικά διαλύματα (20-100% κ.ο.) και σε θερμοκρασίες 10, 25 και 37 °C.....	99
Πίνακας Α.3.V: Λόγοι δόσης/διαλυτότητας (Dose/Solubility ratio – D/S) για τη δαναζόλη σε αιθανολικά διαλύματα για δόσεις 100 και 200 mg και σε θερμοκρασίες 10, 25 και 37 °C.....	100
Πίνακας Α.3.VI: Χαρακτηριστικά κορυφών γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) στους 25 °C.....	102
Πίνακας Α.3.VII: Τιμές p που προέκυψαν από την ανάλυση Kolmogorov-Smirnov 2 δειγμάτων στις κατανομές των σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης στους 25 °C.....	112
Πίνακας Α.3.VIII: Τιμές p που προέκυψαν από την ανάλυση Kolmogorov-Smirnov 2 δειγμάτων στις κατανομές των σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης Α στους 25 °C.....	115
Πίνακας Α.3.IX: Τιμές p που προέκυψαν από την ανάλυση Kolmogorov-Smirnov 2 δειγμάτων στις κατανομές των σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στους 25 °C.....	118
Πίνακας Α.3.X: Δείκτης πολυδιασποράς γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) στους 25 °C.....	118
Πίνακας Α.3.XI: Δείκτης πολυδιασποράς γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.....	119
Πίνακας Α.3.XII: Αποτελέσματα πολλαπλών ελέγχων ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα με τη μέθοδο Holm-Sidak (Multiple ANOVA Comparisons) για γάλα περιεκτικότητας 3,6, 1,8 και 0,3% σε λίπος για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C. Ως δείγμα αναφοράς έχει χρησιμοποιηθεί το εμπορικά διαθέσιμο γάλα. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές έχουν σημειωθεί με έντονη γραφή. 120	
Πίνακας Α.3.XIII: Δείκτης πολυδιασποράς γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης στους 25 °C και σύγκριση με το εμπορικά διαθέσιμο γάλα με έλεγχο t	120
Πίνακας Α.3.XIV: Δείκτης πολυδιασποράς γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης Α στους 25 °C και σύγκριση με το εμπορικά διαθέσιμο γάλα με έλεγχο t	121
Πίνακας Α.3.XV: Δείκτης πολυδιασποράς γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στους 25 °C και σύγκριση με το εμπορικά διαθέσιμο γάλα με έλεγχο t	122
Πίνακας Α.3.XVI: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) στους 25 °C.....	123
Πίνακας Α.3.XVII: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος 3,6% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.....	124
Πίνακας Α.3.XVIII: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος 1,8% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.....	125

Πίνακας A.3.XIX: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος 0,3% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.....	126
Πίνακας A.3.XX: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος 3,6, 1,8% και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης στους 25 °C.....	128
Πίνακας A.3.XXI: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος 3,6, 1,8% και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης στους 25 °C.....	129
Πίνακας A.3.XXII: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος 3,6, 1,8% και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στους 25 °C.....	130
Πίνακας A.3.XXIII: Τιμές pH γάλακτος 3,5, 1,5 και 0% πριν και μετά την προσθήκη διαφόρων φαρμακοτεχνικών μορφών.	148
Πίνακας A.3.XXIV: Ποσότητες ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ASA) και σαλικυλικού οξέος (SA) σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% και αρχικό αναβρασμό σε 20 ml νερού. Η συνολική ποσότητα είναι εκπεφρασμένη ως προς ASA (ιδανική τιμή 500 mg).....	161
Πίνακας A.3.XXV: Ποσότητες ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ASA) και σαλικυλικού οξέος (SA) σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 1,5% και αρχικό αναβρασμό σε 20 ml νερού. Η συνολική ποσότητα είναι εκπεφρασμένη ως προς ASA (ιδανική τιμή 500 mg).....	162
Πίνακας A.3.XXVI: Ποσότητες ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ASA) και σαλικυλικού οξέος (SA) σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 0% και αρχικό αναβρασμό σε 20 ml νερού. Η συνολική ποσότητα είναι εκπεφρασμένη ως προς ASA (ιδανική τιμή 500 mg).....	163
Πίνακας A.3.XXVII: Ποσότητες ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ASA) και σαλικυλικού οξέος (SA) σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% και αρχικό αναβρασμό σε 40 ml νερού. Η συνολική ποσότητα είναι εκπεφρασμένη ως προς ASA (ιδανική τιμή 500 mg).....	165
Πίνακας A.3.XXVIII: Ποσότητες δαναζόλης σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 100 mg).....	168
Πίνακας A.3.XXIX: Ποσότητες δαναζόλης σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 1,5% (ιδανική τιμή 100 mg).....	168
Πίνακας A.3.XXX: Ποσότητες δαναζόλης σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 0% (ιδανική τιμή 100 mg).....	168
Πίνακας A.3.XXXI: Ποσότητες κυκλοσπορίνης A σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 100 mg).....	171
Πίνακας A.3.XXXII: Ποσότητες κυκλοσπορίνης A σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 1,5% (ιδανική τιμή 100 mg).....	171
Πίνακας A.3.XXXIII: Ποσότητες κυκλοσπορίνης A σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 0% (ιδανική τιμή 100 mg).	171
Πίνακας A.3.XXXIV: Ποσότητες βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 75 mg).....	174
Πίνακας A.3.XXXV: Ποσότητες βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 1,5% (ιδανική τιμή 75 mg).....	174
Πίνακας A.3.XXXVI: Ποσότητες βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 0% (ιδανική τιμή 75 mg).	174
Πίνακας A.3.XXXVII: Ποσότητες κυκλοσπορίνης A σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής (κόνεως) και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 100 mg).....	176
Πίνακας A.3.XXXVIII: Ποσότητες βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας	

φαρμακοτεχνικής μορφής (κόνεως) και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 75 mg).....	177
Πίνακας A.3.XXXIX: Ποσότητες κυκλοσπορίνης A σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής (διασπειρόμενα δισκία) και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 100 mg).....	178
Πίνακας A.3.XL: Ποσότητες βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπνεφρασμένης ως προς βάση σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής (διασπειρόμενα δισκία) και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 75 mg).....	180
Πίνακας A.3.XLI: Φαρμακοκινητικές παράμετροι της <i>in vivo</i> μελέτης ασπιρίνης για το σκεύασμα ελέγχου και αναφοράς ($n = 4$, SA: Σαλικυλικό οξύ, ASA: Ακετυλοσαλικυλικό οξύ).....	183
Πίνακας A.3.XLII: Φαρμακοκινητικές παράμετροι της <i>in vivo</i> μελέτης κυκλοσπορίνης A για το σκεύασμα αναφοράς και σύγκριση με τιμές από τη βιβλιογραφία για σκευάσματα κυκλοσπορίνης (Kees et al., 2006).....	185
Πίνακας B.1.I: Μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν κινητικές αποδέσμευσης.....	206
Πίνακας B.2.I: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης B.2.20 σε πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία (Cedillo-Ramírez et al., 2006) για το 100% των δεδομένων.....	237
Πίνακας B.2.II: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης B.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης HCl 0,1N. για το 100% των δεδομένων (AlKhatib et al., 2008).....	240
Πίνακας B.2.III: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης B.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης ρυθμιστικό διάλυμα pH 6,8 για το 100% των δεδομένων (AlKhatib et al., 2008).....	240
Πίνακας B.2.IV: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης B.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης νερό για το 100% των δεδομένων (AlKhatib et al., 2008).....	242
Πίνακας B.2.V: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης B.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης NaCl 5% για το 100% των δεδομένων (AlKhatib et al., 2008).....	242
Πίνακας B.2.VI: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης B.2.22 στα πειραματικά δεδομένα των Dutta et al (Dutta et al., 2005).....	245
Πίνακας B.2.VII: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης B.2.22 στα πειραματικά δεδομένα των Abrahamsson et al (Abrahamsson et al., 1998).....	246
Πίνακας B.2.VIII: Εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{0f}=0,5 \text{ mg/h}^\alpha$, $k_{el}=0,2 \text{ h}^{-1}$, $Q_0=1 \text{ mg}$ και $V_d=1 \text{ L}$	248
Πίνακας B.2.IX: Εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{0f}=0,5 \text{ mg/h}^\alpha$, $k_{el}=0,5 \text{ h}^{-1}$, $Q_0=1 \text{ mg}$ και $V_d=1 \text{ L}$	249
Πίνακας B.2.X: Εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{0f}=0,2 \text{ mg/h}^\alpha$, $k_{el}=0,5 \text{ h}^{-1}$, $Q_0=1 \text{ mg}$ και $V_d=1 \text{ L}$	251
Πίνακας B.2.XI: Εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{0f}=0,5 \text{ mg/h}^\alpha$, $k_{el}=0,2 \text{ h}^{-1}$, $Q_0=5 \text{ mg}$ και $V_d=1 \text{ L}$	252
Πίνακας B.2.XII: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης B.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Gbureck et al. για το σύστημα βανκομυκίνης για το αρχικό κομμάτι της αποδέσμευσης (Gbureck et al., 2008).....	264
Πίνακας B.2.XIII: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης B.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Gómez-Carracedo et al. για το σύστημα θεοφυλλίνης (Gómez-Carracedo et al., 2009).....	266
Πίνακας B.2.XIV: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης B.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Pattarino et al. για το σύστημα νιφεδιπίνης (Pattarino et al., 2007).....	267
Πίνακας B.2.XV: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης B.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Ma et al. για το σύστημα ακυκλοβίρης (Ma et al., 2009).....	269
Πίνακας B.2.XVI: Αντιστοιχία σταθεράς Weibull b και σταθεράς Mittag-Leffler α που προκύπτει από τη μεταξύ τους συσχέτιση και πιθανολογούμενος μηχανισμός αποδέσμευσης με βάση τα δεδομένα των Papadopolou et al. (Papadopolou et al., 2006).....	271
Πίνακας B.2.XVII: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. χωρίς τη χρήση χρόνου υστέρησης και χωρίς περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α (Balan et al., 2001).....	272

Πίνακας B.2.XVIII: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. χωρίς τη χρήση χρόνου υστέρησης και με περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α , με $\alpha < 1$ (Balan et al., 2001).	273
Πίνακας B.2.XIX: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. με τη χρήση χρόνου υστέρησης και χωρίς περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α (Balan et al., 2001).	274
Πίνακας B.2.XX: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. με τη χρήση χρόνου υστέρησης και με περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α , με $\alpha < 1$ (Balan et al., 2001).	275
Πίνακας B.3.I: Εκτιμώμενες παράμετροι από τις μη γραμμικές προσαρμογές της σχέσης B.3.3 σε πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία (Corrigan et al., 2003; Dutta et al., 2005; Ravishankar et al., 2006).	290
Πίνακας B.3.II: Σύγκριση τιμών της σταθεράς α που προέκυψε από τις μη γραμμικές προσαρμογές των σχέσεων B.2.21 και B.2.22 στα <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> πειραματικά δεδομένα των Dutta et al. (2005) αντίστοιχα.	292
Πίνακας B.3.III: Εκτιμώμενες και πειραματικές φαρμακοκινητικές παράμετροι καθώς και % σφάλματα των εκτιμώμενων από τις παρατηρούμενες τιμές για τα πειραματικά δεδομένα των Dutta et al. (2005).	295

ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα A.1.1: Δομή μεμβράνης λιποσφαιρίου (Harper and Hall, 1976; Μάντης, 2000).	42
Εικόνα A.1.2: Αριστερά: Σχηματική αναπαράσταση υπομικκυλίου κατά Kimura (Kimura et al., 1979; Μάντης, 2000). Δεξιά: Σχηματική αναπαράσταση ενός μικκυλίου καζεΐνης που σχηματίζεται από υπομικκύλια (Slattery, 1976; Brunner, 1981; Μάντης, 2000).	43
Εικόνα A.2.1: Διαλύματα ερυθρού του Νείλου στο ορατό (πάνω) και στο υπεριώδες (366 nm, κάτω) σε διάφορους διαλύτες. Από αριστερά προς τα δεξιά: 1. Νερό, 2. Μεθανόλη, 3. Αιθανόλη, 4. Ακετονιτρίλιο, 5. Διμεθυλοφορμαμίδιο, 6. Ακετόνη, 7. Οξικός αιθυλεστέρας, 8. Διχλωρομεθάνιο, 9. κ-εξάνιο, 10. Μέθυλο- <i>t</i> -βουτυλο-αιθέρας, 11. Κυκλοεξάνιο, 12. Τολουόλιο (Πηγή: Wikipedia).	74
Εικόνα A.3.1: Τοπογραφική απεικόνιση γάλακτος 3,6% περιοχής 10μm×10μm.	132
Εικόνα A.3.2: Τρισδιάστατη τοπογραφική απεικόνιση γάλακτος 3,6% περιοχής 10μm×10μm.	132
Εικόνα A.3.3: Τοπογραφική απεικόνιση γάλακτος 3,6% που περιέχει αιθανόλη 5% περιοχής 10μm×10μm.	133
Εικόνα B.1.1: Το μοντέλο της στιβάδας διάχυσης.	198
Εικόνα B.1.2: Το μοντέλο του διεπιφανειακού φράγματος.	199
Εικόνα B.1.3: Το μοντέλο του Danckwerts.	199

ΠΕΡΙΛΗΨΗ - SUMMARY

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή αποτελείται από δύο τμήματα. Στο πρώτο τμήμα επιχειρείται η αξιοποίηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του γάλακτος για τη χορήγηση φαρμάκων με στόχο την ανάπτυξη μιας φαρμακευτικής σύνθεσης, όπως για παράδειγμα υδαταλκοολικού διαλύματος, σκόνης ή αναβράζοντος δισκίου, για τη χορήγηση φαρμάκων υπό μορφή διασποράς του φαρμάκου σε γάλα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις δραστικές ουσίες. Η ασπιρίνη, η κυκλοσπορίνη, η δαναζόλη και η κλοπιδογρέλη. Η επίδραση των φαρμάκων και των υδαταλκοολικών διαλυμάτων στο γάλα μελετήθηκε με μελέτες διαλυτότητας, κατανομής και μεγέθους σωματιδίων, ζ-δυναμικού, φασμάτων φθορισμού και ομοιογένειας και σταθερότητας περιεχομένου. Τα ικανοποιητικά χαρακτηριστικά των σκευασμάτων ασπιρίνης υπό μορφή αναβράζοντος δισκίου και κυκλοσπορίνης υπό μορφή υδαταλκοολικού διαλύματος σε γάλα επιβεβαιώθηκαν με *in vivo* μελέτες. Το τελικό συμπέρασμα του πρώτου τμήματος της διατριβής είναι ότι οι φαρμακοτεχνικές μορφές με βάση το γάλα αποτελούν μια εναλλακτική και αξιόλογη προσέγγιση για τη χορήγηση δυσδιάλυτων ή γαστροερεθιστικών δραστικών ουσιών.

Στο δεύτερο τμήμα της διατριβής επιχειρήθηκε η εφαρμογή των κλασματικών παραγώγων στις *in vitro* και στις *in vivo* διαδικασίες της διάλυσης και της αποδέσμευσης, η επέκταση των κλασματικών παραγώγων στο επίπεδο της φαρμακοκινητικής, ιδιαίτερα στις μηδενοταξικές διαδικασίες και η εφαρμογή των κλασματικών παραγώγων στο πεδίο των *in vitro-in vivo* συσχετίσεων προς ερμηνεία των μη γραμμικών σχέσεων. Τα κλασματικά ανάλογα της μηδενοταξικής και της πρωτοταξικής κινητικής οδηγούν σε νόμο δύναμης του χρόνου και στη συνάρτηση Mittag-Leffler αντίστοιχα. Επιχειρήθηκε προσαρμογή των κλασματικών σχέσεων σε *in vitro* και *in vivo* δεδομένα από τη βιβλιογραφία καθώς και προσομοίωση φαρμακοκινητικών δεδομένων θεωρώντας μηδενοταξική κλασματική κινητική. Τέλος επιχειρήθηκε εφαρμογή των κλασματικών παραγώγων στο πεδίο της ερμηνείας μη γραμμικών *in vitro-in vivo* συσχετίσεων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι κλασματικές παράγωγοι μπορούν να αξιοποιηθούν για την περιγραφή και ερμηνεία φαινομένων σε ετερογενείς συνθήκες, οδηγούν σε αξιόλογα φαρμακοκινητικά αποτελέσματα, ιδιαίτερα στο πεδίο της μηδενοταξικής κινητικής και η εφαρμογή τους είναι χρήσιμη για την περιγραφή και ερμηνεία μη γραμμικών συσχετίσεων.

Λέξεις-κλειδιά: φαρμακοτεχνικές μορφές με βάση το γάλα, φάρμακα χαμηλής διαλυτότητας, κλασματική κινητική, *in vitro-in vivo* συσχετίσεις, αποδέσμευση φαρμάκων

SUMMARY

This thesis consists of two parts. In the first section it is attempted to exploit the special characteristics of milk for drug delivery, in order to develop a pharmaceutical composition, for example a aqueous-ethanol solution, a powder or an effervescent tablet for drug delivery by dispersing the active substance in milk. For this purpose four active substances were used; namely, Aspirin, cyclosporine, danazol and clopidogrel. The effect of drugs and hydroethanolic solutions in milk was studied by solubility studies, particle size and distribution measurements, ζ -potential measurements, fluorescence emission spectra and finally by assessing the homogeneity and the stability of the formulation. The satisfactory features of aspirin formulations in the form of effervescent tablet and cyclosporine hydroethanolic solution in milk was confirmed by *in vivo* studies. The final conclusion of the first part of the thesis is that the milk-based formulations are an alternative and a valuable approach for the administration of low solubility and/or gastroirritant active substances.

The second part of the thesis deals with the application of fractional differential equations in pharmaceutical sciences. More specifically fractional derivatives are used to describe and to interpret *in vitro* and *in vivo* processes, such as dissolution and release, pharmacokinetics, especially zero-order processes and finally nonlinear *in vitro-in vivo* correlations. The fractional analogues of zero-order and first-order kinetics lead to power law and Mittag-Leffler function, respectively. Initially, the fractional relationships have been fitted to *in vitro* and *in vivo* data from literature references. Besides, pharmacokinetic data considering zero-order fractional kinetics have been simulated. Finally, fractional derivatives have been applied in the field for the interpretation of non-linear *in vitro-in vivo* correlations. The results show that the fractional derivatives can be used to describe and interpret absorption phenomena under heterogeneous conditions. Moreover, fractional derivatives are useful for the description and the interpretation of nonlinear *in vitro-in vivo* correlations.

Keywords: milk-based formulations, low-solubility drugs, fractional kinetics, *in vitro-in vivo correlations*, drug release

ΤΜΗΜΑ Α. ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ PER OS ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΓΑΛΑ

"The idea is to try to give all of the information to help others to judge the value of your contribution; not just the information that leads to judgment in one particular direction or another."

Richard Phillips Feynman (1918–1988)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα περισσότερα νέα φάρμακα καθώς και τα φάρμακα που βρίσκονται στο στάδιο της ανάπτυξης αφορούν μόρια μεγάλου μοριακού βάρους και υψηλής λιποφιλίας και ως εκ τούτου χαρακτηρίζονται από χαμηλή διαλυτότητα σε υδατικό περιβάλλον. Επειδή η διαλυτότητα είναι άμεσα συνυφασμένη με τη βιοδιαθεσιμότητα και τη φαρμακολογική δράση, τα τελευταία χρόνια ένα μεγάλο ποσοστό της έρευνας στο χώρο της φαρμακευτικής επικεντρώνεται στην ανάπτυξη νέων μεθόδων αύξησης της διαλυτότητας των φαρμάκων. Οι προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται κατά κόρον αφορούν τροποποίηση των φυσικών ή των χημικών χαρακτηριστικών της δραστικής ουσίας. Στις πρώτες ανήκουν η μείωση μεγέθους των σωματιδίων της δραστικής ουσίας, η τροποποίηση της κρυσταλλικής δομής, η διασπορά σε ευδιάλυτους φορείς και η χρήση συμπλόκων ή επιφανειοδραστικών ενώ οι χημικές μέθοδοι αφορούν κυρίως την τροποποίηση του pH και τη σύνθεση αλάτων. Από τις σημαντικότερες και πλέον ελπιδοφόρες τεχνικές είναι η χρήση (μικρο) γαλακτωμάτων και η χρήση λιπιδίων ως φορέων.

Το γάλα είναι ένα φυσικό γαλακτώμα που αποτελεί βασικό κομμάτι της διατροφής. Λόγω των φυσικοχημικών του χαρακτηριστικών έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν αρκετές προσπάθειες για τη χρήση του ως φορέα για τη χορήγηση φαρμάκων με ελπιδοφόρα ως εντυπωσιακά αποτελέσματα ως προς την αύξηση της διαλυτότητας δυσδιάλυτων μορίων. Εκτός αυτού η χρήση γάλακτος συνίσταται κατά τη χορήγηση αντιφλεγμονωδών φαρμάκων λόγω των γαστροπροστατευτικών ιδιοτήτων του.

Το πρώτο κομμάτι της παρούσας διατριβής αφορά στη μελέτη φαρμακοτεχνικών μορφών με βάση το γάλα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα φάρμακα η ασπιρίνη, η δαναζόλη, η κυκλοσπορίνη και η βενζολοσουλφονική κλοπιδογρέλη.

A.1.1. Η ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΤΩΝ ΔΥΣΔΙΑΛΥΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Η από του στόματος χορήγηση εξακολουθεί να θεωρείται ως η πιο κοινώς αποδεκτή οδός χορήγησης φαρμάκων, καθώς προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως ευκολία στη λήψη, καλή συμμόρφωση, και άριστη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας. Είναι επομένως λογικό, ότι η βιοδιαθεσιμότητα των *per os* χορηγούμενων φαρμάκων είναι ένα από τα πιο σημαντικά ζητήματα για την επιτυχή ανάπτυξη των βιοενεργών μορίων. Η κακή βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων συνήθως οδηγεί σε υψηλές τιμές ενδο- και διατομικής μεταβλητότητας σε ότι αφορά τα φαρμακοκινητικά και τα φαρμακοδυναμικά χαρακτηριστικά των φαρμάκων (Tong, 2008).

Κατά τα τελευταία χρόνια, έχουν υπάρξει πολλές προσπάθειες να προβλεφτούν οι επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες των υποψήφιων φαρμάκων. Η ανάλυση της μοριακής δομής και των ιδιοτήτων των φαρμάκων από τον Lipinski και τους συνεργάτες του (Lipinski et al., 1997), υπήρξε ο κύριος οδηγός για το συσχετισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων με την ανάπτυξη επιτυχημένων δραστικών μορίων. Επίσης αναλύθηκαν οι διαφορές στις φυσικές ιδιότητες των από του στόματος φαρμάκων σε σχέση με το χρόνο (Wenlock et al., 2003). Αυτές οι αναλύσεις οδήγησαν σε διάφορα σύνολα κανόνων που αφορούν στη λιποφιλία, στο μοριακό βάρος, στον αριθμό των δοτών και δεκτών πρωτονίων, στην πολική επιφάνεια και στη μοριακή δυσκαμψία (Vieth et al., 2004).

Ενώ οι κανόνες αυτοί οδηγούν στη σωστή κατεύθυνση το μοριακό σχεδιασμό και τη βελτιστοποίηση των φαρμάκων κατά το στάδιο της ανάπτυξης, η πρόοδος στην κατανόηση των αιτίων της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας έχουν οδηγήσει σε σημαντικές βελτιώσεις στις τεχνολογίες χορήγησης φαρμάκων.

Σε αυτό το κεφάλαιο συνοψίζονται οι μοριακές και φυσικοχημικές ιδιότητες που επηρεάζουν την από του στόματος απορρόφηση και εξετάζεται ο αντίκτυπος αυτών των ιδιοτήτων στη διαμόρφωση στρατηγικών βελτίωσης της βιοδιαθεσιμότητας δυσδιάλυτων ουσιών.

A.1.1.1. Φυσιολογία του γαστρεντερικού σωλήνα και μηχανισμοί απορρόφησης

Η γαστρεντερική απορρόφηση αποτελεί την κατεξοχήν οδό εισόδου των φαρμάκων στον οργανισμό. Η απορρόφηση των φαρμάκων πραγματοποιείται στο στομάχι, το λεπτό και το παχύ έντερο, και μέσω της πυλαίας φλέβας καταλήγουν αρχικά στο ήπαρ, πριν εισαχθούν στη γενική κυκλοφορία.

A.1.1.1.1. Ανατομικά χαρακτηριστικά γαστρεντερικού σωλήνα

Το γαστρεντερικό σύστημα αποτελείται από το στομάχι, το λεπτό και το παχύ έντερο. Αν και τα τρία αυτά όργανα συνδέονται εν σειρά, παρουσιάζουν ουσιαστικές διαφορές μεταξύ τους. Το πάγκρεας, η χολή και το ήπαρ, αποτελούν όργανα, τα οποία χωρίς να αποτελούν τμήμα του γαστρεντερικού συστήματος, έχουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της πέψης (Welling, 2006).

Το στομάχι είναι ουσιαστικά ένας σάκος επενδυμένος εσωτερικά με μια σχετικά λεία επιφάνεια επιθηλίου. Παρά το γεγονός ότι κάποιες ενώσεις μπορούν να απορροφηθούν από το στομάχι, η συμβολή του οργάνου αυτού στην απορρόφηση είναι μικρή. Η απορροφητική ικανότητα του λεπτού εντέρου είναι ανώτερη από οποιαδήποτε άλλη περιοχή του γαστρεντερικού σωλήνα. Ο ρυθμός με τον οποίο οι ενώσεις περνούν από το στομάχι στο λεπτό έντερο αποτελεί ένα σημαντικό περιοριστικό βήμα στην απορρόφηση του φαρμάκου. Η κινητικότητα του στομαχίου είναι πολύπλοκη και επηρεάζεται από νευρικά και το ορμονικά ερεθίσματα. Η ταχύτητα κένωσης του στομάχου είναι συνάρτηση των ρυθμικών συστολών που έχουν συχνότητα τρεις ανά λεπτό περίπου απουσία τροφής, και λιγότερο παρουσία τροφής. Η τροφή περνά από το στομάχι στο δωδεκαδάκτυλο, ως αποτέλεσμα αυτών των συσπάσεων. Όσο περισσότερες θερμίδες έχει ένα γεύμα και όσο υψηλότερη είναι η περιεκτικότητα του σε λίπος, τόσο περισσότερο καθυστερεί η μετάβαση στο λεπτό έντερο. Η διαδικασία αυτή λειτουργεί ως αμυντικός μηχανισμός, με τον οποίο προστατεύεται το λεπτό έντερο από ουσίες σκληρής υφής και ατελούς πέψης. Ενώ τα στερεά περιεχόμενα καθυστερούν τη γαστρική κένωση, τα υγρά τείνουν να επιταχύνουν τη διαδικασία. Όταν το περιεχόμενο είναι νερό πραγματοποιείται ταχεία κένωση του περιεχομένου του στομάχου στο δωδεκαδάκτυλο (Welling, 2006).

Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ του λεπτού εντέρου και του στομάχου είναι η φύση του βλεννογόνου της επιφάνειας του επιθηλίου. Η βλεννογόνος επιφάνεια του λεπτού εντέρου αυξάνεται με την παρουσία λαχνών, που προκύπτουν από πτυχές της επιφάνειας, και στη συνέχεια από μικρολάχνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των λαχνών. Τα δομικά αυτά στοιχεία του εντέρου αυξάνουν την επιφάνεια του εντερικού βλεννογόνου περίπου 600 φορές, σε περίπου 200 m², και 1-1,5 L του αίματος διέρχεται διαμέσου των εντερικών τριχοειδών κάθε λεπτό. Οι αντίστοιχες τιμές για το στομάχι είναι 100 m² επιφάνειας και ρυθμός ροής αίματος 150 ml/min. Έτσι, το λεπτό έντερο έχει επιφάνεια περίπου διπλάσια από αυτή του στομάχου και ρυθμό αιμάτωσης 6-10 φορές μεγαλύτερο. Και οι δύο παράγοντες συνηγορούν υπέρ της αποτελεσματικότερης απορρόφησης στο λεπτό έντερο. Οι λάχνες και οι μικρολάχνες του λεπτού εντέρου είναι επικαλυμμένες από ένα λεπτό στρώμα γλυκοπρωτεϊνών, με αποτελεσματικό πάχος 0,01 έως 1,0 mm. Τα μόρια κινούνται εντός του στατικού αυτού στρώματος με τη διαδικασία της διάχυσης, με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο προς την τετραγωνική ρίζα του μοριακού βάρους, για μόρια κάτω των 450 g/mol, και αντιστρόφως ανάλογο προς την κυβική ρίζα του μοριακού βάρους για μόρια άνω των 450 g/mol (Stein, 1967; Bijlsma et al., 1995; Welling, 2006). Το στρώμα αυτό είναι αρνητικά φορτισμένο. Αν ένα σημαντικό ποσοστό αυτών των κατιόντων αποτελείται από ιόντα υδρογόνου, τότε το μικροκλίμα στο εσωτερικό της διασυννοριακής επιφάνειας του επιθηλίου είναι πιθανό να είναι όξινο σε σχέση με το εντερικό περιεχόμενο. Αυτό μπορεί να επηρεάσει τον ιοντισμό των φαρμάκων στην επιφάνεια της μεμβράνης. Το χρονικό διάστημα κατά τη διάρκεια του οποίου το περιεχόμενο παραμένει στο λεπτό έντερο είναι περίπου 5 λεπτά για το δωδεκαδάκτυλο, 2 ώρες για την νήστιδα, και 3-6 ώρες για τον ειλεό (Welling, 2006).

Το εντερικό περιεχόμενο στη συνέχεια εισέρχεται στο παχύ έντερο. Το παχύ έντερο στερείται λαχνών ή μικρολαχνών στο βλεννογόνο της επιφάνειάς του. Το περιεχόμενό του είναι ουδέτερο ή αλκαλικό. Ως εκ τούτου, η απορρόφηση των φαρμάκων από το παχύ έντερο είναι λιγότερο αποδοτική από το λεπτό έντερο. Το παχύ έντερο και το κόλον περιέχουν ενεργό βακτηριακή μικροχλωρίδα που μπορεί να καταβολίσει μόρια που περιέχονται στο παχύ έντερο και έχει την τάση να μειώνει την απορρόφηση των φαρμάκων από αυτή την περιοχή του γαστρεντερικού σωλήνα (Welling, 2006).

A.1.1.1.2. Μηχανισμοί απορρόφησης φαρμάκων

Ένα από του στόματος χορηγούμενο φάρμακο πρέπει να διέρθει από μεγάλο αριθμό μεμβρανών, ώστε να απορροφηθεί και να καταλήξει στη συστηματική κυκλοφορία. Η μεταφορά διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών πραγματοποιείται παθητικά ή με μεσολάβηση φορέα (carrier mediated transport).

Ο μηχανισμός της παθητικής μεταφοράς βασίζεται κατά κύριο λόγο στη διαλυτότητα στα λιπίδια και τη διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης, και είναι υπεύθυνος για την μεταφορά της πλειοψηφίας των φαρμάκων διαμέσου των μεμβρανών. Μόρια τα οποία είναι ασθενή οξέα ή βάσεις, διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη ευκολότερα όταν βρίσκονται στη μη ιονισμένη τους μορφή. Παράλληλα όμως πρέπει να βρίσκονται σε μορφή διαλύματος. Η υδατική διαλυτότητα ενός φαρμάκου αυξάνεται όταν αυτό είναι ιονισμένο, κάτι το οποίο όμως δρα αρνητικά στην διαδικασία της διάχυσης διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, γιατί μειώνει τη λιπιδική διαλυτότητα. Αυτή η παράδοξη προϋπόθεση τόσο της υδατικής όσο και της λιπιδικής διαλυτότητας για την παθητική απορρόφηση των φαρμάκων, αποτελεί και το σημαντικότερο πρόβλημα στην ανάπτυξη φαρμάκων υψηλής βιοδιαθεσιμότητας (Welling, 2006).

Οι μηχανισμοί μεταφοράς με μεσολάβηση φορέα (carrier mediated transport) προϋπάρχουν για τη διευκόλυνση της εισόδου απαραίτητων για των οργανισμό μορίων. Υπάρχει μια πληθώρα μηχανισμών που ανήκουν στο γενικότερο όρο μεταφορά με μεσολάβηση φορέα και σύμφωνα με τον Welling κατατάσσονται ως ακολούθως (Welling, 2006):

- i. Πρωτεΐνες μεταφοράς, που απευθύνονται κυρίως στη μεταφορά πολικών μορίων
- ii. Κανάλια μεταφοράς για τη μεταφορά μικρών πολικών μορίων, πχ νερού, ή ιόντων.
- iii. Μηχανισμοί διευκολυνόμενης διάχυσης, κυρίως για αμινοξέα και σάκχαρα.
- iv. Αντλίες ενεργητικής μεταφοράς, όπως για παράδειγμα η αντλία νατρίου-καλίου.
- v. Μηχανισμοί συμμεταφοράς και αντιμεταφοράς.
- vi. Γλυκοπρωτεΐνες διαπερατότητας (P-gr), οι οποίες χρησιμεύουν στην άμυνα του κυττάρου απομακρύνοντας ξενοβιοτικά.

- vii. Τέλος, ιδιαίτερους μηχανισμούς απορρόφησης αποτελούν η πινοκύτωση και η παρακυττάρια μεταφορά.

A.1.1.1.3. Φυσιολογικοί φραγμοί κατά την απορρόφηση

Οι φυσιολογικοί φραγμοί τους οποίους καλείται να διαπεράσει ένα φάρμακο για να εισέλθει στη γενική κυκλοφορία είναι οι εξής (Dahan and Hoffman, 2006):

- i. Η διαλυτότητα στα γαστρεντερικά υγρά.

Για πολλά, κυρίως υδρόφοβα, μόρια αποτελεί το περιοριστικό βήμα κατά την απορρόφηση. Εξαιρετική σημασία έχουν τα χολικά άλατα, τα οποία μπορούν να δράσουν σαν επιφανειοδραστικά, και να αυξήσουν τη διαλυτότητα δυσδιάλυτων ουσιών.

- ii. Η σχετικά περιορισμένη περιοχή απορρόφησης.

Η απορρόφηση των φαρμάκων πραγματοποιείται συνήθως στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου. Εντούτοις ο χρόνος διέλευσης διαμέσου του τμήματος αυτού είναι περιορισμένος με αποτέλεσμα να περιορίζεται η απορρόφηση.

- iii. Η στατική υδατική στοιβάδα στην επιφάνεια του επιθηλίου.

Το πλάτος αυτής της στοιβάδας έχει υπολογιστεί σε περίπου 500 μm, και αποτελεί σημαντικό φραγμό για λιπόφιλα μόρια. Επιπλέον η παρουσία της στοιβάδας περιορίζει σημαντικά την διαθέσιμη επιφάνεια απορρόφησης.

- iv. Το κυτόχρωμα P450 3A4 και το σύστημα P-gr.

Το κυτόχρωμα P450 3A4 βρίσκεται στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου και ευθύνεται για το μεταβολισμό των φαρμάκων στο εντερικό τοίχωμα, καθορίζοντας στην ουσία το απορροφούμενο κλάσμα του φαρμάκου. Οι γλυκοπρωτεΐνες διαπερατότητας (P-gr), ευθύνονται για την απομάκρυνση των φαρμάκων από το εσωτερικό των κυττάρων και την επιστροφή τους στα περιεχόμενα του λεπτού εντέρου.

- v. Το φαινόμενο πρώτης διόδου.

Εφόσον ένα μόριο ξεπεράσει τους παραπάνω φραγμούς, θα καταλήξει διαμέσου της πυλαίας φλέβας στο ήπαρ, όπου θα εκτεθεί στα ηπατικά μεταβολικά ένζυμα. Εφόσον

αποτελεί υπόστρωμα για τα ένζυμα, το απορροφούμενο κλάσμα της δόσης του φαρμάκου μειώνεται περαιτέρω προς το βιοδιαθέσιμο κλάσμα. Ο φραγμός αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τα λιπόφιλα μόρια, τα οποία είναι και πιο επιρρεπή στα οξειδωτικά ένζυμα του ήπατος.

A.1.1.2. Μοριακές και φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμάκων που επηρεάζουν την γαστρεντερική απορρόφηση

A.1.1.2.1. Ο «κανόνας των 5»

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναφερθεί πολλές λεπτομερείς στατιστικές αναλύσεις με στόχο μια λεπτομερή κατανόηση των ιδιοτήτων σε μοριακό επίπεδο που είναι σημαντικές για τη βέλτιστη βιοδιαθεσιμότητα. Ο Lipinski (Lipinski et al., 1997) παρουσίασε τον λεγόμενο «κανόνα των 5», ο οποίος αναφέρει ότι η κακή απορρόφηση ή διαπερατότητα εμφανίζεται όταν μια ουσία έχει τα εξής χαρακτηριστικά: μοριακό βάρος πάνω από 500, logP πάνω από 5, πάνω από 5 δότες δεσμού υδρογόνου και πάνω από 10 δέκτες δεσμού υδρογόνου.

Πιο πρόσφατα αποδείχτηκε ότι το εμβαδόν πολικής επιφάνειας και η μοριακή ευελιξία είναι σημαντικοί παράμετροι καλής βιοδιαθεσιμότητας, ανεξάρτητα από το μοριακό βάρος (Veber et al., 2002). Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της από του στόματος βιοδιαθεσιμότητας 1100 υποψήφιων φαρμάκων σε αρουραίους, βρέθηκε μια αναπάντεχη θετική επίδραση της αύξησης της μοριακής ακαμψίας στην απορρόφηση, η οποία μετράται με τον αριθμό των περιστρεφόμενων δεσμών, και μια αναμενόμενη αρνητική επίδραση της αύξησης της πολικής επιφάνειας.

Από στατιστικές αναλύσεις σε εγκεκριμένα φάρμακα έχει αποδειχτεί ότι το μικρό μοριακό βάρος, ο επιθυμητός συντελεστής μερισμού και η υψηλή ακαμψία αποτελούν επιθυμητά χαρακτηριστικά (Wenlock et al., 2003). Επίσης γίνεται σαφές ότι κατά τις κλινικές μελέτες φάσης III, επιλέγονται φάρμακα με επιθυμητά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, ενώ απορρίπτονται συχνότερα τα λιπόφιλα μόρια.

Για να διασφαλιστεί ότι τα επιθυμητά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά θα διασφαλιστούν κατά την ανάπτυξη νέων δραστικών μορίων, έχουν διατυπωθεί συγκεκριμένες προσεγγίσεις (Kerns and Di, 2003; Huang and Tong, 2004; Borchardt,

2006). Εμπειρικοί κανόνες, όπως ο «κανόνας των 5», αποτελούν βασικό εργαλείο των φαρμακευτικών εταιρειών για την ανάπτυξη νέων μορίων.

A.1.1.2.2. Ρυθμός διάλυσης

Η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου στον οργανισμό εξαρτάται από την ικανότητά του να διαλύεται στα γαστρεντερικά υγρά. Εάν ο ρυθμός διάλυσης αποτελεί το περιοριστικό βήμα στην απορρόφηση, οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό διάλυσης θα έχουν αντίκτυπο στη βιοδιαθεσιμότητα.

Ο ρυθμός διάλυσης των φαρμάκων, σύμφωνα με το μοντέλο της στοιβάδας διάχυσης και την τροποποιημένη σχέση των Noyes-Whitney έχει ως εξής (Hörter and Dressman, 1997; Dokoumetzidis and Macheras, 2006):

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D \times A}{h \times V} (C_s - C) \quad \text{A.1.1}$$

όπου D ο συντελεστής διάχυσης, h το πάχος της στοιβάδας διάχυσης, A είναι η επιφάνεια του στερεού που εκτίθενται στο διαλύτη, V είναι ο όγκος του μέσου διάλυσης, C_s είναι η διαλυτότητα κορεσμού της ουσίας στο μέσο διάλυσης στην πειραματική θερμοκρασία, και C είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου στο διάλυμα κατά την χρονική στιγμή t .

Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, ο ρυθμός διάλυσης είναι συνάρτηση:

- Της διαλυτότητας του φαρμάκου
- Της μεταφοράς των μορίων με τη διαδικασία της διάχυσης μακριά από τη στερεή επιφάνεια μέσα από μια λεπτή περιοχή διαλύτη, σχετικά στάσιμη, η οποία περιβάλλει τα αδιάλυτα σωματίδια.
- Την επιφάνεια του στερεού που βρίσκεται σε πλήρη επαφή με το διαλύτη.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες που επηρεάζουν την κινητική της διάλυσης των φαρμάκων μπορούν να αποδοθούν σε ένα ή περισσότερους από αυτούς τους παράγοντες (Tong, 2008).

A.1.1.2.3. Διαλυτότητα

Η διαλυτότητα είναι μία από τις πιο σημαντικές ιδιότητες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα, λόγω του ρόλου της στη διάλυση. Είναι ένας από τους δύο

παράγοντες που καθορίζουν την Βιοφαρμακευτική Ταξινόμηση των Φαρμάκων (BCS) (Amidon et al., 1995).

Ως διαλυτότητα ορίζεται η αναλυτική σύνθεση ενός μείγματος ή ενός διαλύματος που είναι κορεσμένο ως προς ένα από τα συστατικά του μείγματος ή του διαλύματος, και εκφράζεται ως προς το ποσοστό του προσδιοριζόμενου συστατικού στο καθορισμένο μείγμα ή διάλυμα (Lorimer and Cohen-Adad, 2004).

Ο όρος «κορεσμένο» αναφέρεται στην ισορροπία στις διαδικασίες της διάλυσης και της κρυστάλλωσης για διαλυτότητα ενός στερεού σε ένα υγρό. Η ισορροπία μπορεί να είναι σταθερή ή μετασταθής, δηλαδή η σύνθεση ενός συστήματος μπορεί να διατηρήσει μια συγκεκριμένη τιμή για μεγάλο χρονικό διάστημα, αλλά μπορεί να μεταβεί ξαφνικά ή σταδιακά σε μια πιο σταθερή κατάσταση, αν υποβληθεί σε μια συγκεκριμένη διαταραχή. Για παράδειγμα, ένα στερεό μπορεί να είναι άμορφο και να μεταβεί σε μια πιο σταθερή κρυσταλλική μορφή, φέρνοντας το σύστημα από μια μετασταθή ισορροπία σε μια σταθερή. Στην πρόσφατη φαρμακευτική βιβλιογραφία, οι όροι "διαλυτότητα ισορροπίας" και "κινητική διαλυτότητα" συχνά χρησιμοποιούνται για τα συστήματα με σταθερές και μετασταθείς ισορροπίες, αντίστοιχα (Lipinski et al., 1997; Huang and Tong, 2004; Borchardt, 2006; Tong, 2008).

Οι δύο βασικοί παράγοντες που διέπουν την υδατική διαλυτότητα είναι η θερμότητα ή ενθαλπία ενυδάτωσης και η θερμότητα ή ενθαλπία τήξης. Ο συντελεστής μερισμού στο σύστημα οκτανόλης/νερού ($\log P$) είναι ένας καλός εκτιμητής της ενέργειας ενυδάτωσης, η οποία είναι η ενέργεια που συνδέεται με τη διάλυση μιας ουσίας στο νερό. Οι λιπόφιλες ενώσεις δεν αλληλεπιδρούν καλά με το νερό, με αποτέλεσμα η θερμότητα ενυδάτωσης να είναι μικρή και να μην είναι αρκετή για την αντιμετώπιση των ισχυρών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων του νερού, που οδηγεί εν τέλει σε κακή διαλυτότητα. Αν η ένωση είναι κρυσταλλική, απαιτείται επίσης πρόσθετη ενέργεια, για να απελευθερώσει το μόριο από το κρυσταλλικό πλέγμα, για να μπορέσει να διαλυθεί. Η ενέργεια αυτή χαρακτηρίζεται ως θερμότητα της τήξης. Το σημείο τήξης είναι εξαιρετικά χρήσιμο για το χαρακτηρισμό κρυσταλλικών δομών. Ουσίες με υψηλό σημείο τήξης και υψηλή θερμότητα τήξης έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, εκτός αν η θερμότητα ενυδάτωσης είναι υψηλότερη (Grant and Higuchi, 1990; Jain and Yalkowsky, 2001; Tong, 2008).

Η πλειονότητα των φαρμάκων είναι ασθενή οξέα ή βάσεις και ως εκ τούτου ιονίζονται. Επομένως, οι διαλυτότητές τους επηρεάζονται από το pH του διαλύματος και τα αντισταθμιστικά ιόντα, με τα οποία σχηματίζουν άλατα. Είναι προφανές ότι οι ιοντισμένες μορφές είναι πιο ευδιάλυτες σε σχέση με τις μη ιοντισμένες, λόγω της μεγαλύτερης συγγένειας με το πολικό νερό. Για παράδειγμα το όξινο περιβάλλον του στομάχου ευνοεί τη διαλυτότητα ασθενών βάσεων. Στην περίπτωση όμως που η ιοντισμένη βάση σχηματίζει δυσδιάλυτο άλας με τα ιόντα χλωρίου, τα οποία υπάρχουν σε περίσσεια στο στομάχι, η διαλυτότητα θα μειωθεί. Το γεγονός αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με εντεροδιαλυτή επικάλυψη (Tong, 2008).

Μια σημαντική παράμετρος που επηρεάζει τη διαλυτότητα είναι η θερμοκρασία. Η επίδραση της θερμοκρασίας στη διαλυτότητα περιγράφεται από τη σχέση van't Hoff:

$$\ln S = \frac{\Delta H}{RT} + k \quad \text{A.1.2}$$

όπου S είναι η μοριακή διαλυτότητα σε θερμοκρασία T (K), R είναι η σταθερά των ιδανικών αερίων, ΔH είναι η θερμότητα (ενθαλπία) διάλυσης, η συνολική θερμότητα δηλαδή που εκλύεται ή απορροφάται κατά τη διάλυση ενός γραμμομορίου ουσίας σε μια μεγάλη ποσότητα διαλύτη και k μια σταθερά. Για τις περισσότερες οργανικές ενώσεις, η θερμότητα (ενθαλπία) διάλυσης είναι περίπου 10 kcal/mol, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαλυτότητα στους 37 °C είναι διπλάσια από ότι στους 25 °C (Tong, 2008).

Η διαλυτότητα των φαρμάκων στο στομάχι και το έντερο μπορεί να ενισχυθεί με την παρουσία τροφής και συστατικών της χολής όπως χολικά άλατα και λεκιθίνη. Ανάλογα με τις ιδιότητες των φαρμάκων, ο βαθμός της διαλυτοποίησης διαφέρει. Για κάποιες υδρόφοβες ενώσεις έχουν αναφερθεί αυξήσεις της διαλυτότητας έως και 100 φορές, ύστερα από προσθήκη φυσιολογικών συγκεντρώσεων χολικών αλάτων σε υδατικά μέσα (Tong, 2008). Για να εκτιμηθεί η επίδραση της διαλυτότητας στην απορρόφηση, έχουν αναπτυχθεί μέσα προσομοίωσης των γαστρεντερικών υγρών, για την *in vitro* μελέτη της διαλυτότητας, όπως τα FaSSIF και FeSSIF (Greenwood, 1994; Dressman, 2000).

Δεδομένου ότι η από του στόματος απορρόφηση των φαρμάκων είναι μια συνεχής και αδιάλειπτη συνδυαστική διαδικασία διάλυσης και διαπερατότητας, η χαμηλή

απορρόφηση θεωρείται παραδοσιακά ότι οφείλεται είτε στην κακή διαλυτότητα ή είτε στην προβληματική διαπερατότητα. Εφόσον τα νεότερα θεραπευτικά μόρια είναι στην πλειοψηφία τους δυσδιάλυτα, υπάρχουν περιπτώσεις φαρμάκων με υψηλό ρυθμό διάλυσης και υψηλή διαπερατότητα, αλλά χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η διαλυτότητα είναι ο περιοριστικός παράγοντας για την απορρόφηση από το έντερο, καθώς το περιβάλλον είναι ήδη κορεσμένο και περαιτέρω αύξηση της δόσης δεν οδηγεί σε αύξηση της βιοδιαθέσιμης δόσης (Tong, 2008).

Σύμφωνα με τον Lipinski, η διαλυτότητα δεν είναι πιθανό να είναι ο περιοριστικός παράγοντας για την απορρόφηση ενός φαρμάκου όταν η δόση του είναι 1 mg/kg, εφόσον η διαλυτότητα είναι μεγαλύτερη από 65 $\mu\text{g/ml}$, αλλά είναι πιθανό να περιορίσει την απορρόφηση, εφόσον η διαλυτότητα είναι μικρότερη από 10 $\mu\text{g/ml}$ (Lipinski et al., 1997). Η μέγιστη απορροφούμενη δόση ενός φαρμάκου θεωρείται ότι είναι συνάρτηση της διαλυτότητας, της σταθεράς του ρυθμού απορρόφησης, του όγκου του περιεχομένου του λεπτού εντέρου (~250 ml) και του χρόνου διέλευσης από το λεπτό έντερο (~270 min).

Το FDA υιοθέτησε μία πολύ απλούστερη και συντηρητική προσέγγιση, τη βιοφαρμακευτική ταξινόμηση των φαρμάκων (BCS). Σύμφωνα με αυτή την προσέγγιση, η οποία ταξινομεί τις δραστικές ανάλογα με τη διαλυτότητα και την διαπερατότητά τους, ένα φάρμακο θεωρείται ως δυσδιάλυτο όταν η διαλυτότητα του σε 250 ml υδατικού διαλύματος pH 1-7.5 είναι μικρότερη από τη χορηγούμενη δόση. Υπάρχουν μόρια με χαμηλή μεν διαλυτότητα αλλά ικανοποιητική βιοδιαθεσιμότητα. Για παράδειγμα ασθενείς βάσεις με χαμηλές τιμές pK_a , μπορεί να έχουν χαμηλή διαλυτότητα στα εντερικά υγρά, αλλά να διαλύονται πλήρως στο όξινο περιβάλλον του στομάχου. Άλλα μόρια έχουν υψηλότερες τιμές διαλυτότητας στα προσομοιωμένα μέσα FaSSIF και FeSSIF, από ότι στα ρυθμιστικά διαλύματα (Tong, 2008). Επομένως η κατάταξη ενός φαρμάκου με βάση το BCS αποτελεί ένδειξη μόνο και όχι απόδειξη της *in vivo* συμπεριφοράς του.

Ο παραδοσιακός τρόπος μέτρησης της διαλυτότητας είναι με τη χρήση των ανακινούμενων κωνικών φιαλών. Περίσσεια στερεού προστίθεται στο μέσο διάλυσης, υπό συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας και ανάδευσης. Το υπερκείμενο υγρό μετρείται ανά χρονικά διαστήματα, μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία. Εκτιμήσεις

διαλυτότητας γίνονται επίσης *in silico*, είτε με τη χρήση σχέσεων που στηρίζονται σε πειραματικές τιμές όπως το logP και το σημείο τήξης (Yalkowsky and Valvani, 1980; Jain and Yalkowsky, 2001; Ran et al., 2001a), είτε με νεότερες μεθόδους που στηρίζονται στη μελέτη της δομής του μορίου, με τη χρήση νευρωνικών δικτύων (Huuskonen et al., 1998; Glomme et al., 2005). Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει απόλυτα αξιόπιστη μέθοδος υπολογιστικής εκτίμησης της διαλυτότητας (Taskinen and Yliruusi, 2003; Tong, 2008).

A.1.1.2.4. Ιδιότητες στερεάς κατάστασης

Η μορφή της στερεάς κατάστασης του φαρμάκου έχει ιδιαίτερη σημασία για την γαστρεντερική απορρόφηση. Ιδιότητες όπως ο πολυμορφισμός, ο αμορφισμός και το μέγεθος των σωματιδίων, παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοδιαθεσιμότητα.

Ως πολυμορφισμό ορίζουμε την ικανότητα μιας ουσίας να σχηματίζει κρυστάλλους σε περισσότερες από μια διαφορετικές διατάξεις (Haleblian and McCrone, 1969). Μια ουσία μπορεί επίσης να σχηματίσει ένυδρες μορφές. Τα διάφορα πολύμορφα σώματα χαρακτηρίζονται από διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως σημείο τήξης, διαλυτότητα, ρυθμό διάλυσης, οπότε ενδεχομένως χαρακτηρίζονται και από διαφορετική απορρόφηση. Κατά το στάδιο της ανάπτυξης επιλέγεται συνήθως η ενεργειακά σταθερότερη μορφή ενός μορίου, διότι σε περίπτωση κατά την οποία επιλεγεί μια ενεργειακά ασταθής μορφή, η μετάβαση της σε άλλη κατάσταση, θα επηρεάσει τις ιδιότητες της φαρμακοτεχνικής μορφής. Αν και ο λόγος των τιμών της διαλυτότητας μεταξύ δύο πολυμόρφων είναι συνήθως μικρότερος του 2, οι διαφορές είναι μεγαλύτερες όταν εξετάζονται ένυδρες μορφές (Pudipeddi et al., 2008). Είναι προφανές ότι για δυσδιάλυτες ουσίες η επιλογή του κατάλληλου πολύμορφου είναι κρίσιμης σημασίας.

Γενικά άμορφα υλικά καλούνται τα στερεά υλικά που δεν έχουν συγκεκριμένη δόμηση των μορίων ή ατόμων. Τα άμορφα υλικά έχουν την υψηλότερη ελεύθερη ενέργεια, επομένως θεωρητικά έχουν και υψηλότερη διαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα. Στις άμορφες μορφές η διαλυτότητα μιας ουσίας μπορεί να αυξηθεί μέχρι και 1000 φορές (Hancock and Zografi, 1997; Hancock and Parks, 2000). Δεδομένου ότι τα άμορφα υλικά είναι ασταθή, για να αξιοποιηθούν τα πλεονεκτήματά τους, πρέπει να μορφοποιηθούν με τέτοιο τρόπο ώστε να παραμείνουν σταθερά. Η συνήθης επιλογή είναι τα

συστήματα στερεής διασποράς. Με τον τρόπο αυτό ελέγχεται η θερμοκρασία μετάβασης και αποκλείεται η πιθανότητα να μεταβεί το μόριο σε κρυσταλλική δομή.

Το μέγεθος των σωματιδίων είναι μια σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την απορρόφηση, καθώς επηρεάζει άμεσα το ρυθμό διάλυσης. Η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων οδηγεί άμεσα σε αύξηση της συνολικής επιφάνειας η οποία είναι διαθέσιμη για αλληλεπίδραση με το διαλύτη. Είναι προφανές ότι για δυσδιάλυτα μόρια, η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων είναι εξαιρετικά σημαντική. Υπερβολική όμως μείωση τελικά μειώνει την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος και μειώνει το ρυθμό διάλυσης, καθώς τα σωματίδια έχουν την τάση να συσσωματώνονται. Η τάση αυτή μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση επιφανειοδραστικών παραγόντων (Rabinow, 2004; Tong, 2008).

A.1.1.2.5. Στερεοχημεία

Ο αντίκτυπος της στερεοχημείας στη βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων έχει επισημανθεί από τον Jamali (Jamali, 1992). Συνήθως, τα στερεοϊσομερή έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, και οι παθητικές διαδικασίες, όπως η διάχυση δεν διέπονται από κανένα συγκεκριμένο εναντιοεκλεκτικό μηχανισμό. Ωστόσο, η διαδικασία απορρόφησης των φαρμάκων είναι πιθανό να είναι εναντιοεκλεκτική όταν μεσολαβεί μηχανισμός ενεργητικής μεταφοράς. Επιπλέον, όταν χρησιμοποιούνται χειρόμορφα έκδοχα για τη μορφοποίηση εναντιομερών, η αλληλεπίδραση μεταξύ τους μπορεί να οδηγήσει σε στερεοεκλεκτική απελευθέρωση από τη φαρμακοτεχνική μορφή (Duddu et al., 1993). Πολλά εναντιοεκλεκτικά φάρμακα διατίθενται συνήθως στην αγορά ως ρακεμικά μείγματα, αν και οι θεραπευτικές ιδιότητες τους αποδίδονται μόνο σε συγκεκριμένο εναντιομερές (Tong, 2008).

A.1.1.2.6. Χημική σταθερότητα

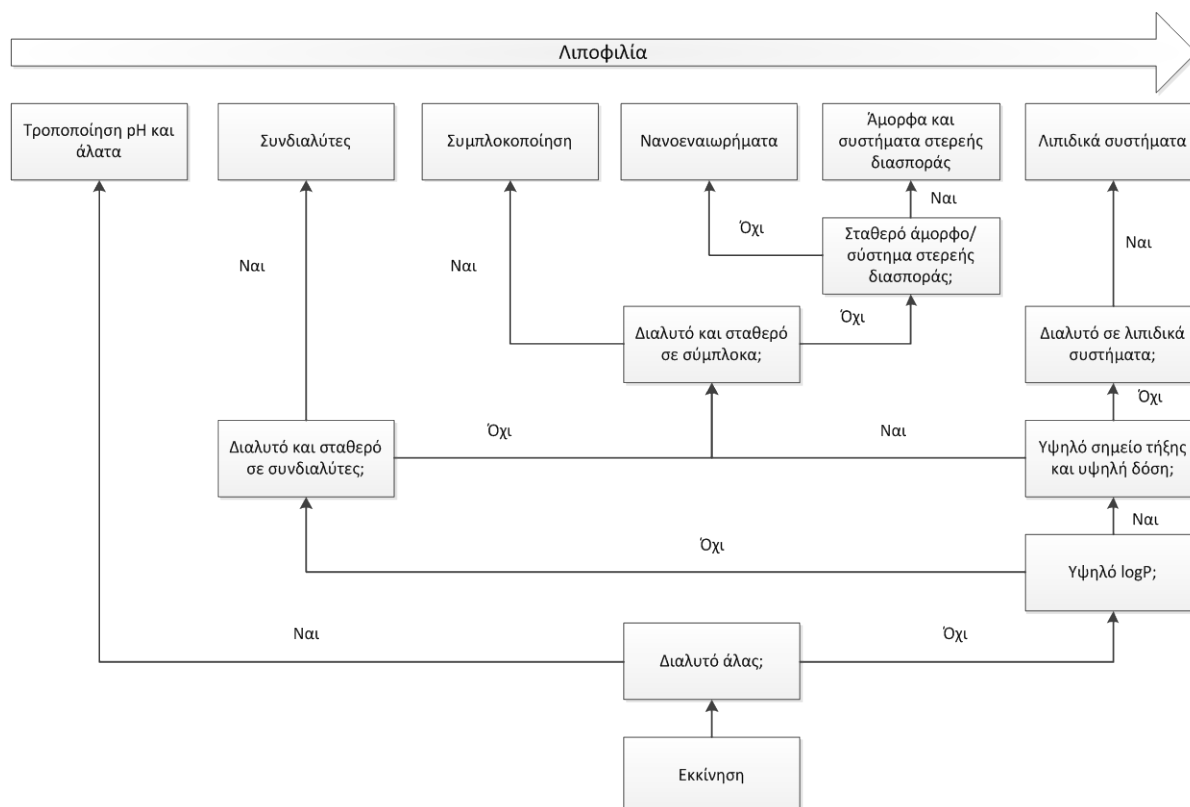
Η σταθερότητα μιας ουσίας στις αντίξοες συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα, αποτελεί μια σημαντική φυσικοχημική παράμετρο που επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα. Ιδιαίτερα για ιοντιζόμενα μόρια, η σταθερότητα τους σε συνάρτηση με το pH του περιβάλλοντος, είναι εξαιρετικά σημαντική για την ανάπτυξη φαρμακοτεχνικών μορφών. Το όξινο περιβάλλον του στομάχου ευνοεί την υδρόλυση ευαίσθητων ουσιών, όπως για παράδειγμα εστέρες, θειεστέρες, λακταμικοί δακτύλιοι και αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες. Στο λεπτό έντερο εντοπίζονται ένζυμα, το οποία μπορούν να

διασπάσουν ή να οξειδώσουν ουσίες, ενώ στο παχύ έντερο η βακτηριακή χλωρίδα μπορεί να βιομετατρέψει ορισμένα φάρμακα, όπως τη διγοξίνη, την ινδομεθακίνη και την ατροπίνη (Macheras et al., 1995; Tong, 2008).

A.1.2. ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΑ ΔΥΣΔΙΑΛΥΤΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Όπως έγινε αντιληπτό στο προηγούμενο κεφάλαιο, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμάκων επηρεάζουν σημαντικά την απορρόφηση. Το βασικότερο πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι η διαθεσιμότητα του φαρμάκου στις περιοχές απορρόφησης. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές στρατηγικές, ανάλογα με τις ιδιότητες της εκάστοτε δραστικής ουσίας, ώστε να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας, βελτιώνοντας παραμέτρους όπως η διαλυτότητα, ο ρυθμός διάλυσης και η σταθερότητα στο όξινο περιβάλλον του στομάχου. Το πρόβλημα της χαμηλής διαπερατότητας είναι δύσκολο να αντιμετωπιστεί, αν και νεότερες προσεγγίσεις προτείνουν μορφοποιήσεις ή έκδοχα, τα οποία συμβάλλουν στην αύξηση της διαπερατότητας, κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης με το σύστημα P-gp.

Στο ακόλουθο σχήμα παρουσιάζεται ένα δένδρο απόφασης για την επιλογή της κατάλληλης φαρμακοτεχνικής μορφής, ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της δραστικής ουσίας (Rabinow, 2004; Tong, 2008).



Σχήμα Α.1.1: Δέντρο απόφασης για την επιλογή κατάλληλης φαρμακοτεχνικής μορφής ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της δραστικής ουσίας (Rabinow, 2004; Tong, 2008).

Για ιοντιζόμενα μόρια η πρώτη επιλογή είναι ο σχηματισμός ενός ευδιάλυτου άλατος. Για λιπόφιλα μόρια με υψηλό logP, η προφανής επιλογή είναι η επιλογή λιπιδικών συστημάτων. Για μόρια με υψηλό σημείο τήξεως και υψηλή θερμότητα τήξεως, που υποδηλώνουν εξαιρετικά σταθερό κρυσταλλικό πλέγμα, η δυνατότητα άμορφων καταστάσεων πρέπει να διερευνηθεί. Φάρμακα τα οποία είναι ασταθή σε όξινο pH προστατεύονται με εντερική επικάλυψη ή κάποιο έκδοχο που να επηρεάζει το μικροπεριβάλλον της φαρμακοτεχνικής μορφής.

A.1.2.1. Ρύθμιση pH και σχηματισμός αλάτων

Πάνω από τα 2/3 των εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων είναι ιοντιζόμενα (Stahl et al., 2002). Όπως προαναφέρθηκε, μόρια στην ιοντισμένη μορφή είναι περισσότερο ευδιάλυτα, επομένως το ιδανικό φάρμακο είναι ιοντιζόμενο σε περιοχή pH 2-8, στις τιμές δηλαδή που επικρατούν στο γαστρεντερικό σύστημα (Hendrickson, 2005). Η ρύθμιση του pH επομένως αποτελεί ένα προφανή τρόπο για την αύξηση της διαλυτότητας ενός μορίου. Κάτι τέτοιο είναι σχετικά εύκολο σε ένα πόσιμο διάλυμα, όπου το pH μπορεί να κυμαίνεται από 2 μέχρι 9, αλλά είναι λιγότερο εύκολο σε μια

στερεή φαρμακοτεχνική μορφή. Στην περίπτωση αυτή η ρύθμιση του pH μπορεί να γίνει σε επίπεδο μικροπεριβάλλοντος του δισκίου, με την προσθήκη οξέων ή βάσεων ως έκδοχα στην τελική μορφή, με στόχο την οξίνιση ή αλκαλοποίηση των συνθηκών της αποδέσμευσης.

Γενικά για ένα μόριο με ιοντιζόμενες ομάδες, η διαλυτότητα την ιοντισμένης μορφής (S_T) είναι συνάρτηση της ενδογενούς διαλυτότητας της μη ιοντισμένης μορφής (S_0), του pH και της σταθεράς pK_a (Liu, 2008). Οι σχέσεις που δίνουν τη διαλυτότητα για ένα ασθενές οξύ και μια ασθενή βάση είναι αντίστοιχα:

$$S_T = S_0(1 + 10^{pH - pK_a}) \quad A.1.3$$

$$S_T = S_0(1 + 10^{pK_a - pH}) \quad A.1.4$$

Από τις παραπάνω σχέσεις είναι προφανές ότι τα ασθενή οξέα διαλύονται ευκολότερα σε τιμές pH υψηλότερες του pK_a τους, ενώ οι ασθενείς βάσεις σε τιμές pH μικρότερες του pK_a τους. Όταν η τιμή του pH διαφέρει κατά 2 μονάδες από το pK_a , η μία μορφή επικρατεί, και η διαλυτότητα είναι ανεξάρτητη του pH.

Ο σχηματισμός άλατος αποτελεί άλλη μία προφανή προσέγγιση για την αύξηση της διαλυτότητας. Τα άλατα είναι κατά κανόνα περισσότερο ευδιάλυτα σε υδατικό περιβάλλον, εφόσον οι ιοντισμένες ομάδες ελκύουν τα πολικά μόρια του νερού. Αν και τα διαφορετικά άλατα μιας δραστικής ουσίας έχουν το ίδιο φαρμακολογικό αποτέλεσμα, εντούτοις οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες ενδέχεται να διαφέρουν σημαντικά, επηρεάζοντας την απορρόφηση. Τα πλέον συνηθισμένα άλατα είναι το νάτριο, για τα ασθενή οξέα και τα υδροχλωρικά για τις ασθενείς βάσεις. Το υδροχλωρικό και το θειικό οξύ επιλέγονται επίσης για να αυξήσουν τον ιοντισμό των ασθενών βάσεων, αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Κατά αντίστοιχο τρόπο επιλέγονται και οργανικά αντισταθμιστικά ιόντα (Liu, 2008).

Το βασικό μειονέκτημα της τροποποίησης του pH και του σχηματισμού αλάτων είναι ότι σημαντικός αριθμός μορίων δεν περιέχουν ιοντιζόμενες ομάδες, και ως εκ τούτου αυτή η μέθοδος δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

A.1.2.2. Συνδιαλύτες

Η χρήση αναμίξιμων με το νερό συνδιαλυτών αποτελεί συνήθη πρακτική για την αύξηση της διαλυτότητας ενός δυσδιάλυτου μορίου, ιδιαίτερα αν είναι άπολο. Εφόσον στη διάλυση ισχύει ο κανόνας «όμοιο διαλύει όμοιο», η χρήση άπολων διαλυτών για να μειωθεί η πολικότητα του νερού, οδηγεί σε αύξηση της διαλυτότητας των υδρόφοβων μορίων. Η παράμετρος που καθορίζει την πολικότητα ενός διαλύτη, είναι η διηλεκτρική σταθερά. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται κυρίως για μόρια τα οποία δε διαθέτουν ιοντιζόμενες ομάδες, και δε μπορούν να σχηματίσουν άλατα (Hendrickson, 2005).

Η διαλυτότητα σε ένα σύστημα συνδιαλυτών συνήθως αυξάνει λογαριθμικά αυξάνοντας το κλάσμα του οργανικού διαλύτη (Rubino and Yalkowsky, 1987). Αν θεωρήσουμε ότι η ελεύθερη ενέργεια σε ένα σύστημα είναι το άθροισμα των επιμέρους ελεύθερων ενεργειών, η διαλυτότητα σε ένα διφασικό σύστημα μπορεί να περιγραφεί από την ακόλουθη σχέση (Liu, 2008):

$$\log S_T = \log S_W + f(\log S_C - \log S_W) \quad A.1.5$$

Όπου S_T η ολική διαλυτότητα στο σύστημα, S_W η υδατική διαλυτότητα του μορίου, S_C η διαλυτότητά του στον οργανικό διαλύτη και f το κλάσμα του οργανικού διαλύτη στο σύστημα.

Πολλές φορές η χρήση συνδιαλυτών γίνεται σε συνδυασμό με την τροποποίηση του pH.

Οι κύριοι συνδιαλύτες που χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική είναι η αιθυλική αλκοόλη, η προπυλενογλυκόλη, η πολυαιθυλενογλυκόλη 400 (PEG 400) και η γλυκερίνη.

Ένα από τα βασικά προβλήματα του συστήματος συνδιαλυτών είναι η κατακάθιση που παρατηρείται σε περίπτωση προσθήκης νερού ή αλληλεπίδρασης με υδατικό περιβάλλον. Το ίζημα το οποίο σχηματίζεται πρέπει να επαναδιαλυθεί για να απορροφηθεί το φάρμακο. Επιπλέον πολλοί από τους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι τοξικοί και πρέπει να αποφεύγεται η μακροχρόνια χορήγησή τους. Άλλα πιθανά προβλήματα είναι η επίδραση των συνδιαλυτών στα ένζυμα και τους υποδοχείς του γαστρεντερικού συστήματος και η επίδρασή τους στη σταθερότητα των φαρμακοτεχνικών μορφών.

A.1.2.3. Συμπλοκοποίηση

Με τον όρο συμπλοκοποίηση καλείται ο συνδυασμός δύο ή και περισσότερων μορίων, προς σχηματισμό ενός ομοιοπολικού μη μόνιμου συμπλόκου, με στόχο την αύξηση της διαλυτότητας του μορίου. Ο βασικός μηχανισμός με τον οποίο αυξάνεται η διαλυτότητα ενός δυσδιάλυτου μορίου ύστερα από συμπλοκοποίηση είναι η κάλυψη των υδρόφοβων ομάδων του μορίου από το συμπλοκοποιητικό παράγοντα, με αποτέλεσμα να μένουν εκτεθειμένες στο πολικό υδατικό περιβάλλον μόνο υδρόφιλες ομάδες (Hendrickson, 2005).

Τα βασικά μόρια που χρησιμοποιούνται για σχηματισμό συμπλόκων είναι οι κυκλοδεξτρίνες. Πρόκειται για μια κατηγορία κυκλικών ολιγοσακχαριτών, που αποτελούνται από 6-8 μονομερή, και σχηματίζουν μια λιπόφιλη κοιλότητα εσωτερικά και μια υδρόφιλη επιφάνεια εξωτερικά. Στη λιπόφιλη κοιλότητά τους έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν άπολα μόρια, ενώ οι εκτεθειμένες υδρόφιλες ομάδες βελτιώνουν τη διαλυτότητα του σχηματιζόμενου συμπλόκου. Η συνολική διαλυτότητα του συμπλόκου περιγράφεται από τη σχέση (Liu, 2008):

$$S_T = S_W + \left(\frac{KS_W}{1 + KS_W} \right) C_{CD} \quad A.1.6$$

Όπου S_T η ολική διαλυτότητα του συμπλόκου, S_W η υδατική διαλυτότητα του μορίου, K η σταθερά σύνδεσης του συμπλόκου και C_{CD} η συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης. Ουσιαστικά η διαλυτότητα του συμπλόκου εξαρτάται από την τιμή της σταθεράς σύνδεσης K . Πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη για να ευνοεί τη διαλυτότητα, αλλά όχι υπερβολικά μεγάλη, για να αποδεσμεύει εύκολα τη συμπλοκοποιημένη δραστική.

Αν και τα άπολα μόρια συμπλοκοποιούνται ευκολότερα με τις κυκλοδεξτρίνες, η συμπλοκοποίηση χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με το σχηματισμό άλατος. Η συμπλοκοποίηση επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βελτίωση της σταθερότητας, περιορισμό ερεθιστικών ιδιοτήτων του μορίου, κάλυψη γεύσης και αύξηση απορρόφησης. Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται τόσο για στερεές όσο και για υγρές *per os* φαρμακοτεχνικές μορφές, καθώς επίσης και σε εναιωρήματα, γαλακτώματα, ημιστερεές μορφές και ενέσιμα διαλύματα.

Τα βασικά μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ο περιορισμένος αριθμός μορίων που διαθέτουν την απαιτούμενη δομή για εγκλεισμό, η περιορισμένη διαλυτότητα των

κυκλοδεξτρινών στο νερό, η σημαντική επίδραση των κυκλοδεξτρινών στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους και τέλος η τοξικότητά τους.

A.1.2.4. *Αλλαγή στερεάς κατάστασης: πολυμορφισμός, άμορφα στερεά και στερεή διασπορά*

A.1.2.4.1. Πολυμορφισμός και άμορφα στερεά

Η διαλυτότητα ενός μορίου σε ένα διαλύτη εξαρτάται από τις δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ στερεού και διαλύτη και μεταξύ των μορίων του στερεού στον κρύσταλλο. Η αλλαγή της στερεάς κατάστασης του στερεού επηρεάζει την ελεύθερη ενέργεια του κρυστάλλου και επομένως τη διαλυτότητά του. Κρύσταλλοι υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας χαρακτηρίζονται από υψηλότερη διαλυτότητα, καθώς τα μόρια διαφεύγουν ευκολότερα από την κρυσταλλική δομή. Επομένως η αλλαγή της στερεάς κατάστασης ενός μορίου αποτελεί ένα τρόπο ελέγχου της διαλυτότητάς του, επομένως και της βιοδιαθεσιμότητας. Μια στερεή ουσία μπορεί να αποκτήσει διαφορετικές μορφές, όπως διαφορετικές κρυσταλλικές δομές (πολύμορφα), επιδιαλυτωμένες μορφές, ένυδρες μορφές και τέλος άμορφες καταστάσεις (Liu, 2008).

Οι παραδοσιακές τεχνικές ελέγχου της διαλυτότητας, όπως η τροποποίηση του pH, οι συνδιαλύτες, τα γαλακτώματα και τα μικκύλια, αφορούν σε τροποποίηση του διαλύτη. Ο έλεγχος της στερεάς κατάστασης τροποποιεί τη στερεά ουσία προς έλεγχο της διαλυτότητας. Επειδή όμως ο διαλύτης και η διαλυόμενη ουσία παραμένουν ίδια, η τελική διαλυτότητα κορεσμού δεν αλλάζει ανάλογα με την κρυσταλλική κατάσταση της ουσίας, εφόσον τελικά αυτή θα καταλήξει στη χαμηλότερη ενεργειακά μορφή.

Η αξιοποίηση πολυμόρφων υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας, μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση της διαλυτότητας, του ρυθμού διάλυσης και της βιοδιαθεσιμότητας. Αν και η διαλυτότητα κορεσμού είναι θερμοδυναμική σταθερά και δεν επηρεάζεται από τις διαφορετικές στερεές καταστάσεις, εντούτοις έχουν αναφερθεί παραδείγματα πολυμόρφων της ίδιας ουσίας με διαφορετικές τιμές διαλυτότητας (Shefter, 1981). Τέτοια περίπτωση είναι της βιταμίνης ριβοφλαβίνης (B2). Ο ρυθμός διάλυσης επηρεάζεται τόσο από τις αλλαγές στη διαλυτότητα όσο και από την επιφάνεια του κρυστάλλου. Επίσης διαφορετικοί κρύσταλλοι διαθέτουν και διαφορετικό μέγεθος, το οποίο επηρεάζει το ρυθμό διάλυσης. Στην περίπτωση επομένως κατά την οποία το

περιοριστικό βήμα για την απορρόφηση είναι η διαλυτότητα ή ο ρυθμός διάλυσης, η επιλογή του κατάλληλου πολύμορφου επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα (Liu, 2008).

Οι επιδιαλυτωμένες μορφές ενός μορίου προκύπτουν όταν μόρια από το διαλύτη ανακρυστάλλωσης ενσωματώνονται στο κρυσταλλικό πλέγμα. Στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι το νερό, η επιδιαλυτωμένη μορφή καλείται και ένυδρη. Ένυδρες μορφές μπορούν να προκύψουν και κατά την απορρόφηση μορίων νερού από την υγρασία της ατμόσφαιρας. Οι επιδιαλυτωμένες μορφές είναι συνήθως πιο σταθερές, διαθέτουν χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια και επομένως είναι πιο δυσδιάλυτες. Επίσης διαθέτουν διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όπως σημείο τήξης, ρυθμό διάλυσης και υγροσκοπικότητα, τα οποία επηρεάζουν τη συμπεριφορά της δραστικής ουσίας κατά τη μορφοποίηση. Αν και η τελική διαλυτότητα κορεσμού για μια ουσία σε δεδομένη θερμοκρασία και διαλύτη είναι ίδια και ανεξάρτητη από την κρυσταλλική δομή, εντούτοις έχουν αναφερθεί παραδείγματα ουσιών που οι επιδιαλυτωμένες μορφές παρουσίασαν διαφορετική διαλυτότητα. Τέτοια παραδείγματα είναι η σουλφαμεθοξαζόλη (Abdallah and El-Fattah, 1984) και η θεοφυλλίνη (Rodriguez-Hornedo and Lechuga-Ballesteros, 1992). Η βασική παράμετρος όμως που επηρεάζεται από την επιδιαλύτωση είναι ο ρυθμός διάλυσης, με τις άνυδρες μορφές να παρουσιάζουν συχνά φαινόμενα υπερκορεσμού (Shefter and Higuchi, 1963; Liu, 2008).

Οι άμορφες καταστάσεις προκύπτουν συνήθως είτε με ταχεία στερεοποίηση είτε με διαταραχή της κρυσταλλικής δομής. Η διγοξίνη, η σπιρονολακτόνη και η λακτόζη είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα ουσιών που διαθέτουν και άμορφες καταστάσεις. Τα άμορφα διαθέτουν μεγαλύτερη επιφάνεια και υψηλότερη ελεύθερη ενέργεια, επομένως είναι πιο ευδιάλυτα από μια κρυσταλλική ουσία. Είναι όμως ασταθή και τείνουν να μετατραπούν σε χαμηλότερης ελεύθερης ενέργειας δομές, είτε με κρυσταλλοποίηση είτε με επιδιαλύτωση. Η έκθεση τους στην υγρασία της ατμόσφαιρας επομένως αποτελεί συνήθως πρόβλημα (Liu, 2008).

A.1.2.4.2. Στερεή διασπορά

Η στερεή διασπορά διατυπώθηκε ως έννοια το 1961 από τον Sekiguchi (Sekiguchi and Obi, 1961; Sekiguchi et al., 1964) και αφορά στο σχηματισμό ευτηκτικών μιγμάτων για τη βελτίωση της απορρόφησης δυσδιάλυτων φαρμάκων. Ευτηκτικά καλούνται τα μίγματα, των οποίων το σημείο τήξης είναι μικρότερο του σημείου τήξης ορισμένων ή

(συνηθέστερα) του συνόλου των συστατικών του. Οι φορείς τέτοιων μιγμάτων είναι υδροδιαλυτές ουσίες, οι οποίες όταν διαλύονται αποδεσμεύουν τη δραστική. Η δραστική μπορεί να είναι διεσπαρμένη στη μήτρα υπό μορφή κρυστάλλων, διαλυτοποιημένη ή σε άμορφη κατάσταση (Chiou and Riegelman, 1971).

Το βασικό πλεονέκτημα των συστημάτων στερεής διασποράς είναι να αποδεσμεύουν τη δραστική σε σωματίδια εξαιρετικά μικρού μεγέθους, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο το ρυθμό διάλυσης. Φαινόμενα υπερκορεσμού δεν είναι σπάνια κατά τη διάλυση της μήτρας. Επίσης αποτελούν ένα χρήσιμο φορέα για τη μεταφορά ασταθών πολυμορφικών ή άμορφων ουσιών. Αποτελούν επομένως μια εξαιρετικά χρήσιμη εναλλακτική προσέγγιση για τη μορφοποίηση δυσδιάλυτων ουσιών, όταν οι άλλες προσεγγίσεις αποτυγχάνουν (Liu, 2008).

Οι κατηγορίες στερεής διασποράς είναι τα απλά ευτηκτικά μίγματα, η κρυσταλλική διασπορά ή εναιώρημα, η άμορφη στερεή διασπορά και τα στερεά διαλύματα. Τυπικά παραδείγματα εκδόχων που χρησιμοποιούνται σε αυτή την τεχνική είναι οι πολυαιθυλενογλυκόλες (PEG 1000, 1450, 8000), τα πολυσορβικά (Tween), η γλυκερίνη και το TPGS. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τους είναι η εξώθηση θερμικής τήξης (Hot-melt extrusion), η ενθυλάκωση θερμικής τήξης (Hot-melt encapsulation), η ξήρανση με ψεκασμό (spray drying) και η τεχνολογία υπερκρίσιμων υγρών (Supercritical fluid).

A.1.2.5. *Επιφανειοδραστικά και μικκύλια*

Τα επιφανειοδραστικά ή τασιενεργά είναι μόρια με πολικές και άπολες περιοχές, που τους επιτρέπουν να συναθροίζονται σε ένα διάλυμα και να σχηματίζουν μικκύλια. Ανάλογα με τη φύση της πολικής περιοχής τα επιφανειοδραστικά χωρίζονται σε μη ιοντικά, ιοντικά (ανιοντικά και κατιοντικά) και διοντικά (Hendrickson, 2005).

Τα επιφανειοδραστικά χρησιμοποιούνται για να αυξηθεί η διαβροχή των φαρμάκων, η οποία οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού διάλυσης, για να αποτραπεί η καθίζηση της δραστικής ουσίας και για να αυξηθεί η διαλυτότητα μέσω του σχηματισμού μικκυλίων.

Τα μικκύλια είναι κολλοειδή συστήματα διασποράς, τα οποία σχηματίζονται αυθόρμητα, όταν τα επιφανειοδραστικά αποκτήσουν ορισμένη συγκέντρωση (κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση). Το χαρακτηριστικό τους είναι ότι αποτελούνται από μια

εξωτερική υδρόφιλη επιφάνεια και ένα υδρόφοβο εσωτερικό τμήμα. Έχουν τη δυνατότητα επομένως να εγκλωβίζουν λιπόφιλα μόρια στο εσωτερικό τους και να τα διαλυτοποιούν. Επιπλέον πολικά μόρια μπορούν να εγκλωβιστούν στην πολική τους επιφάνεια ή σε ενδιάμεσες θέσεις. Τα μικκύλια επομένως διαλυτοποιούν πολικά και άπολα μόρια.

Η ολική διαλυτότητα ενός φαρμάκου σε ένα υδατικό διάλυμα με επιφανειοδραστικά δίνεται από τη σχέση (Liu, 2008):

$$S_T = S_W + k(C_S - C_{CMC}) \quad A.1.7$$

Όπου S_T η ολική διαλυτότητα του μορίου, S_W η υδατική διαλυτότητα του μορίου, k η διαλυτοποιητική ικανότητα του επιφανειοδραστικού και C_{CMC} η κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό μικκυλίων είναι η θερμοκρασία, το pH, οι ηλεκτρολύτες, η ιοντική ισχύς και η φύση του επιφανειοδραστικού.

Τα κυριότερα επιφανειοδραστικά στη φαρμακευτική είναι η λεκιθίνη, τα πολυσορβικά (Tween), το καστορέλαιο (Cremophor) και το λαυρυλοθειικό νάτριο (sodium lauryl sulphate). Πολλές φορές χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με συνδιαλύτες.

Τα βασικά πλεονεκτήματα των μικκυλίων πέρα από την αύξηση της διαλυτότητας είναι η μείωση της καθίζησης, η αύξηση της σταθερότητας *in vivo*, η στενή κατανομή μεγέθους και το μικρό τους μέγεθος. Τα μειονεκτήματά τους είναι η τοξικότητα ορισμένων επιφανειοδραστικών (π.χ. Cremophor) και η τάση τους να διαλύονται αν αραιωθούν.

A.1.2.6. Γαλακτώματα, μικρογαλακτώματα και συστήματα με βάση τα λιπίδια

A.1.2.6.1. Εισαγωγικές έννοιες

Τα γαλακτώματα είναι υγρά συστήματα διασποράς δύο μη αναμίξιμων φάσεων, στα οποία η μία φάση (ασυνεχής ή εσωτερική) είναι διεσπαρμένη υπό μορφή σταγονιδίων στην άλλη φάση (συνεχής ή εξωτερική), συνήθως με τη βοήθεια γαλακτωματοποιητών. Τα συνηθισμένα γαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή και το μέγεθος των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης είναι της τάξης των 200 nm, με αποτέλεσμα λόγω σκεδασμού του φωτός να έχουν γαλακτώδη εμφάνιση. Αντίθετα τα μικρογαλακτώματα

έχουν μέγεθος σταγονιδίων κάτω από 100 nm, είναι θερμοδυναμικά σταθερά και έχουν διάφανη όψη. Επίσης τα μικρογαλακτώματα παράγονται ευκολότερα με απλή ανάμειξη και δεν απαιτούν τις έντονες μηχανικές πιέσεις που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή των γαλακτωμάτων (Lawrence and Rees, 2000). Ο γενικότερος όρος των συστημάτων με βάση τα λιπίδια (lipid-based drug delivery systems ή LBDDSs), περιγράφει τις φαρμακοτεχνικές μορφές που αξιοποιούν τη διαλυτότητα των φαρμάκων σε λιπίδια και στοχεύουν στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας. Συνήθως τέτοια συστήματα περιέχουν ελάχιστη έως καθόλου υδατική φάση και σχηματίζουν γαλακτώματα όταν αναμιχθούν με γαστρικά ή εντερικά περιεχόμενα (Liu, 2008).

Τα γαλακτώματα αποτελούνται είτε από μια ελαιώδη φάση διεσπαρμένη σε μια υδατική (λάδι σε νερό), είτε το αντίθετο (νερό σε λάδι). Είναι προφανές ότι τα άπολα δυσδιάλυτα μόρια θα διαλυθούν στην ελαιώδη φάση. Η συνολική διαλυτότητα μιας δραστικής ουσίας σε ένα γαλάκτωμα είναι το άθροισμα των επιμέρους διαλυτοτήτων στις δύο φάσεις. Για ένα γαλάκτωμα λάδι σε νερό ισχύει (Liu, 2008):

$$S_T = S_W + S_{oil} f_{oil} \quad A.1.8$$

Όπου S_T η ολική διαλυτότητα του μορίου, S_W η υδατική διαλυτότητα του μορίου, S_{oil} η διαλυτότητα του μορίου στην ελαιώδη φάση και f_{oil} το κλάσμα της ελαιώδους φάσης στο σύστημα.

Η παραγωγή γαλακτωμάτων απαιτεί το συνδυασμό νερού, ελαίων και γαλακτωματοποιητών, ενώ των μικρογαλακτωμάτων απαιτεί συνήθως και ένα δεύτερο γαλακτωματοποιητή.

Τα λιπίδια είναι ο σημαντικότερος διαλύτης σε ένα λιπιδικό σύστημα, καθώς είναι ο φορέας της δραστικής ουσίας. Μπορεί να είναι ένα λιπίδιο ή συνδυασμός περισσότερων. Τα συνηθέστερα είναι τα τριγλυκερίδια, τα διγλυκερίδια, τα μονογλυκερίδια και τα αλειφατικά οξέα (κορεσμένα ή ακόρεστα). Επίσης χρησιμοποιούνται και εστέρες της προπυλενογλυκόλης (Liu, 2008).

Οι γαλακτωματοποιητές περιέχονται τόσο σε γαλακτώματα όσο και σε λιπιδικά συστήματα για να υποβοηθήσουν την αυτογαλακτωματοποίηση. Διακρίνονται ανάλογα με την τιμή του HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) σε λιπόφιλους (1-9), οι οποίοι ευνοούν το σχηματισμό γαλακτωμάτων νερό σε λάδι, και σε υδρόφιλους (10+),

οι οποίοι ευνοούν το σχηματισμό γαλακτωμάτων λάδι σε νερό (Griffin, 1949). Συχνά χρησιμοποιείται συνδυασμός λιπόφιλου-υδρόφιλου γαλακτωματοποιητή, ο οποίος συχνά οδηγεί σε ταχύτερη διασπορά.

Οι συνδιαλύτες χρησιμοποιούνται συχνά κατά την ανάπτυξη λιπιδικών συστημάτων για να αυξήσουν τη διαλυτότητα των μορίων. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των λιπιδικών συστημάτων που περιέχουν συνδιαλύτες σε σχέση με ένα μη λιπιδικό σύστημα συνδιαλυτών, είναι ότι στην πρώτη περίπτωση τα λιπίδια προστατεύουν την καταβύθιση της δραστικής ουσίας όταν εκτεθεί στο υδατικό περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα (Liu, 2008).

Τα αυτογαλακτωματοποιούμενα συστήματα (Self-emulsifying Drug Delivery Systems ή SEDDS) αποτελούνται από τη δραστική, επιφανειοδραστικά, την ελαιώδη φάση και ορισμένες φορές από συνδιαλύτες (Constantinides, 1995; Routon, 2000). Έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν γαλακτώματα ή μικρογαλακτώματα όταν εκτεθούν στο περιβάλλον του εντέρου. Τα αυτογαλακτωματοποιούμενα συστήματα διαθέτουν το επιπλέον πλεονέκτημα του μικρού όγκου έναντι των έτοιμων πόσιμων γαλακτωμάτων (Liu, 2008).

A.1.2.6.2. Προκλήσεις κατά το σχεδιασμό και το χαρακτηρισμό γαλακτωμάτων, μικρογαλακτωμάτων και λιπιδικών συστημάτων.

Τα δύο βασικά προβλήματα κατά το σχεδιασμό των γαλακτωμάτων είναι η φυσική και η χημική σταθερότητά τους.

Δεδομένου ότι ένα γαλάκτωμα είναι θερμοδυναμικά ασταθές, οι φαρμακοτεχνικές μορφές των γαλακτωμάτων θεωρούνται οι πιο ασταθείς από όλες τις υπόλοιπες *per os* χορηγούμενες μορφές. Το βασικότερο πρόβλημα είναι η δημιουργία κρέμας, η προς τα επάνω μετακίνηση και συγκέντρωση των σωματιδίων της διεσπαρμένης φάσης. Η διαδικασία αυτή είναι αντιστρεπτή με απλή ανάδευση. Οδηγεί όμως στη συνένωση των σωματιδίων και την κροκίδωσή τους, δημιουργώντας μεγαλύτερα σταγονίδια. Αυτή η διαδικασία είναι συνήθως μη αντιστρεπτή. Το τελικό στάδιο είναι ο διαχωρισμός των δύο φάσεων ή ακόμα χειρότερα η αντιστροφή των δύο φάσεων (Παπαϊωάννου, 1997; Liu, 2008). Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη φυσική σταθερότητα των γαλακτωμάτων είναι ο τύπος και η συγκέντρωση των επιφανειοδραστικών, ο λόγος των δύο φάσεων, το μέγεθος των σωματιδίων, τα υπόλοιπα έκδοχα και οι συνθήκες

φύλαξης, ιδιαίτερα η θερμοκρασία. Γενικά τα γαλακτώματα σταθεροποιούνται με μηχανική ή ηλεκτροστατική απώθηση των σταγονιδίων, με αύξηση του ιξώδους και με μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων (Liu, 2008).

Η χημική σταθερότητα της δραστικής ουσίας στο γαλάκτωμα πρέπει να διασφαλιστεί για τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Σημαντική σε αυτό το στάδιο είναι η γνώση της σταθερότητας του φαρμάκου στην ελαιώδη και την υδατική φάση. Αν το μόριο είναι ασταθές σε υδατικό περιβάλλον, η μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων επιδρά αρνητικά στη σταθερότητα του μορίου, καθώς αυξάνεται η επιφάνεια αλληλεπίδρασης των σταγονιδίων με τη συνεχή υδατική φάση. Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης, ενώ πολλά από τα λιπαρά έκδοχα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γαλακτωμάτων έχουν οξειδωτικές ιδιότητες (Liu, 2008).

Τα λιπιδικά συστήματα αντιμετωπίζουν άλλες προκλήσεις. Δεδομένου ότι σχηματίζουν γαλάκτωμα μέσα στον οργανισμό δεν αντιμετωπίζουν τα προβλήματα σταθερότητας των γαλακτωμάτων. Εντούτοις δεν υπάρχει αξιολογή *in vitro* μέθοδος αξιολόγησης της *in vivo* συμπεριφοράς τους. Ένα βασικό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν τέτοια συστήματα είναι η αλληλεπίδραση των εκδόχων με τη μαλακή κάψουλα ζελατίνης στην οποία συνήθως περιέχονται.

Ένα άλλο βασικό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν τα συστήματα αυτής της κατηγορίας, είναι η τοξικότητα των εκδόχων. Οι συνδιαλύτες και τα επιφανειοδραστικά που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως τοξικά σε υψηλές δόσεις. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις φαρμάκων, που η τοξικότητά τους μειώθηκε ύστερα από μορφοποίηση σε γαλάκτωμα ή σε λιπιδικό σύστημα, κυρίως λόγω της μείωσης της μεταβλητότητας κατά την απορρόφηση (πχ κυκλοσπορίνη Α, αμφοτερικίνη Β) (Liu, 2008).

A.1.2.7. Νανοεναιωρήματα

Τα νανοεναιωρήματα είναι κολλοειδή συστήματα διασποράς της δραστικής ουσίας σε κάποιο φορέα, με μέγεθος σωματιδίων κάτω από 1000 nm. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η διαθέσιμη επιφάνεια του στερεού και αυξάνεται ο ρυθμός διάλυσης. Τα πλεονεκτήματα είναι αντίστοιχα με τη μείωση μεγέθους των σωματιδίων.

Τα νανοεναιωρήματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή, ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται σταθεροποιητικά, για να αποτραπεί η συνένωση των στερεών σωματιδίων. Τα σταθεροποιητικά έχουν την ικανότητα να διαβρέχουν την επιφάνεια των σωματιδίων, διαθέτουν όμως ιοντισμένες ομάδες, οι οποίες συμβάλλουν στην ηλεκτροστατική απώθηση των σωματιδίων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη μορφοποίηση δυσδιάλυτων ουσιών, ιδιαίτερα κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης, όταν η δραστική πρέπει να χορηγηθεί σε εθελοντές. Παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα της απλότητας και της χαμηλής τοξικότητας, λόγω απουσίας εκδόχων, δεν ενδείκνυται όμως για όλα τα μόρια. Ιδιαίτερα για ασθενείς βάσεις με έντονη pH-εξαρτώμενη διαλυτότητα, η *per os* χορήγηση νανοεναιωρημάτων μπορεί να οδηγήσει σε καθίζηση στο αλκαλικό περιβάλλον του εντέρου, ακυρώνοντας ουσιαστικά τη φαρμακοτεχνική μορφή. Επιπλέον υπάρχουν πολλές ουσίες οι οποίες δε μπορούν να μορφοποιηθούν ως νανοεναιωρήματα (Liu, 2008).

A.1.2.8. Προφάρμακα

Τα προφάρμακα είναι ουσίες, οι οποίες πρέπει να βιομετατραπούν πριν ασκήσουν φαρμακολογική δράση. Η μετατροπή αυτή γίνεται με τα ένζυμα του οργανισμού, όπως για παράδειγμα με τις εστεράσες. Οι χημικές τροποποιήσεις για την κατασκευή ενός προφαρμάκου αποσκοπούν στη βελτίωση των φυσικοχημικών του χαρακτηριστικών, όπως η διαλυτότητα, ή στη βελτίωση της σταθερότητάς του. Είναι προφανές ότι οι τροποποιήσεις αυτές έχουν άμεσο αντίκτυπο στις φαρμακοκινητικές ιδιότητες της ουσίας, επηρεάζοντας την απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό και την απομάκρυνση.

Για να κατασκευαστεί ένα προφάρμακο, το αρχικό μόριο πρέπει να διαθέτει ομάδες διαθέσιμες προς τροποποίηση. Είναι επίσης σημαντικό να είναι δυνατή η μετατροπή του προφαρμάκου στο ενεργό μόριο ταχέως και ποσοτικά. Η μετατροπή αυτή μπορεί να γίνει πριν την απορρόφηση, όπως για παράδειγμα η υδρόλυση ενός εστέρα από τα εντερικά ένζυμα, κατά την απορρόφηση, για παράδειγμα από το συνένζυμο P450, αλλά και μετά την απορρόφηση, για παράδειγμα από τα ένζυμα του ήπατος. Επίσης θα πρέπει να είναι μη τοξικό.

A.1.2.9. *Μείωση μεγέθους σωματιδίων*

Η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων της δραστικής ουσίας οδηγεί σε αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας για αλληλεπίδραση με το υδατικό περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται ο ρυθμός διάλυσης και εν τέλει η απορρόφηση, ιδιαίτερα σε δραστικές για τις οποίες ο ρυθμός διάλυσης αποτελούσε το περιοριστικό βήμα για την εμφάνιση του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία. Το μέγεθος των σωματιδίων επηρεάζει και τη διαλυτότητα, καθώς η ελεύθερη ενέργεια του συστήματος αυξάνεται όσο μειώνεται το μέγεθος των σωματιδίων (Liu, 2008).

Έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις αυξημένης βιοδιαθεσιμότητας λόγω μείωσης του μεγέθους των σωματιδίων. Το επιθυμητό μέγεθος των σωματιδίων είναι κάτω από 1000 nm. Καθώς αυξάνεται ο ρυθμός διάλυσης, αυξάνεται και το ποσοστό του φαρμάκου που είναι διαθέσιμο στις περιοχές απορρόφησης και βελτιώνεται η βιοδιαθεσιμότητα (Liu, 2008).

A.1.3. ΓΑΛΑ: ΣΥΣΤΑΣΗ, ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ

A.1.3.1. Εισαγωγή

Γάλα είναι το έκκριμα του μαστικού αδένα των θηλαστικών που προορίζεται για τη διατροφή του νεογέννητου για το οποίο αποτελεί τη μοναδική τροφή μέχρι μια ορισμένη ηλικία. Για τον άνθρωπο όμως το γάλα εξακολουθεί να αποτελεί μέρος της καθημερινής διαίτας είτε αυτούσιο είτε με μορφή γαλακτοκομικών προϊόντων για όλη τη διάρκεια της ζωής του.

Ο ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π. 1998) ορίζει ότι γάλα είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν του ολοσχερούς χωρίς διακοπή αρμέγματος, υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης.

Σύμφωνα με ορισμό των οργανισμών FAO/WHO (1973), γάλα είναι το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που παίρνεται από μία ή δύο αμέλξεις χωρίς-να προστεθεί ή να αφαιρεθεί τίποτε (Μάντης, 2000). Το γάλα αποτελεί πηγή τροφής για τον άνθρωπο από την αρχή της καταγεγραμμένης ιστορίας. Από κείμενα των Σουμερίων προκύπτει ότι πριν το 6.000 π. Χ. ο άνθρωπος εκμεταλλευόταν το γάλα των ζώων, ενώ στη Βίβλο η Γη της Επαγγελίας είναι η γη στην οποία ρέει μέλι και γάλα. Αν και η χρήση του φρέσκου γάλακτος έχει αυξηθεί με την οικονομική ανάπτυξη, το μεγαλύτερο μέρος της κατανάλωσης αφορά επεξεργασμένο γάλα. Η βιομηχανία γάλακτος άνθισε όταν εισήχθησαν μέθοδοι για τη συντήρηση του υγρού γάλακτος (Μάντης, 2000; Kroschwitz, 2005).

A.1.3.2. Χημική σύσταση του γάλακτος

Το γάλα σχηματίζεται στο αδενικό επιθήλιο του μαστικού αδένα. Το αίμα μεταφέρει στο μαστό τις απαραίτητες δομικές ουσίες, από τις οποίες τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού συνθέτουν τα κυριότερα συστατικά του γάλακτος (λίπος, πρωτεΐνες, λακτόζη), ενώ ορισμένα απ' αυτά περνούν στο γάλα όπως υπάρχουν στο αίμα, χωρίς να υποστούν κανένα μετασχηματισμό στο μαστικό αδένα (Μάντης, 2000).

Το γάλα είναι η τροφή που η φύση προόρισε για τη διατροφή και τη γρήγορη ανάπτυξη του νεογέννητου στα θηλαστικά και παρά τις σημαντικές διαφορές που παρουσιάζει στην εκατοστιαία αναλογία των διαφόρων συστατικών του, τα κύρια από τα

συστατικά αυτά είναι τα ίδια για όλα τα είδη γάλακτος και αποτελούνται από λίπη, πρωτεΐνες, σάκχαρο (λακτόζη) και ανόργανα άλατα. Τα συστατικά αυτά είναι διαλυμένα ή εναιωρημένα στο νερό (Μάντης, 2000).

Επειδή το γάλα της αγελάδας έχει μελετηθεί περισσότερο από όλα τα άλλα γάλατα, θα εξεταστεί αναλυτικά ως προς τα συστατικά του και θα γίνει σύντομη αναφορά στα γάλατα των άλλων παραγωγικών ζώων. Η μέση χημική σύσταση του γάλακτος αγελάδας, όσον αφορά τα κύρια συστατικά, κατά τον Walstra, είναι: Νερό 87,3%, λίπος 3,9%, Καζεΐνες: 2,6%, Πρωτεΐνες ορού 0,65%, Λακτόζη 4,6% και Ανόργανα άλατα (τέφρα) 0,765%. Η παραπάνω σύσταση είναι ενδεικτική καθώς μπορεί να επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες (Walstra et al., 1984).

Πίνακας Α.1.1: Ενδεικτική σύσταση γάλακτος αγελάδας (Walstra et al., 1984).

Συστατικό	Μέσο ποσοστό % (w/w)	Εύρος τιμών ποσοστού % (w/w)	Μέσο ποσοστό % στο στερεό υπόλειμμα (w/w)
Νερό	87,3	85,5-88,7	
Στερεά (εξαιρούνται λίπη)	8,8	7,9-10,0	69
Λίπη στο στερεό υπόλειμμα	31	21-38	
Λακτόζη	4,6	3,8-5,3	36
Λίπη	3,9	2,4-5,5	31
Πρωτεΐνες	3,25	2,3-4,4	26
Καζεΐνη	2,6	1,7-3,5	20
Μεταλλικά στοιχεία	0,65	0,53-0,8	5,1
Οργανικά οξέα	0,18	0,13-0,22	1,4
Διάφορα	0,14		1,1

A.1.3.2.1. Νερό

Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε νερό είναι 85,5-88,7% και αποτελεί το συστατικό με τη μεγαλύτερη αναλογία.

A.1.3.2.2. Λίπος

Η περιεκτικότητα του αγελαδινού γάλακτος σε λίπος κυμαίνεται σε ευρεία όρια. Ο ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π., 1998) δέχεται σαν μικρότερη τιμή το 3,5%. Το ποσοστό αυτό αφορά το φρέσκο ακατέργαστο γάλα.

Το μεγαλύτερο μέρος του λίπους αποτελείται από τριγλυκερίδια (95-96%). Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερο από 80 διαφορετικά λιπαρά οξέα, τα οποία είναι απλής,

διπλής ή πολλαπλής αλυσίδας, κορεσμένα ή ακόρεστα. Οι στερόλες αποτελούν το 0,3-0,4% του λίπους.

A.1.3.2.3. Πρωτεΐνες

Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε πρωτεΐνες κυμαίνεται από 2,3-4,4 g/100 ml. Οι κυριότερες πρωτεΐνες είναι οι καζεΐνες, οι οποίες αποτελούν το 2,6% του γάλακτος, ενώ οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος ανευρίσκονται σε ποσοστό 0,6% περίπου.

Οι καζεΐνες είναι το κλάσμα των φωσφοπρωτεϊνών που καθιζάνει ύστερα από οξίνιση σε pH 4,6 και σε θερμοκρασία 20 °C. Αποτελούν το 75-80% των πρωτεϊνών του γάλακτος και με βάση τη διάταξη (ομολογία) των αμινοξέων στο μόριο τους διακρίνονται σε α_{s1} -, α_{s2} -, β , και κ -καζεΐνες. Το ισοηλεκτρικό pH των καζεϊνών είναι ~4,6.

Οι κυριότερες πρωτεΐνες που απομένουν στον ορό του γάλακτος, μετά από την καθίζηση των καζεϊνών, είναι η οροαλβουμίνη, η γαλακταλβουμίνη, η β-γαλακτοσφαιρίνη και οι ανοσοσφαιρίνες.

A.1.3.2.4. Υδατάνθρακες

Η λακτόζη αποτελεί το κύριο σάκχαρο του γάλακτος των θηλαστικών και αποτελεί το 4,6% του γάλακτος. Εκτός από τη λακτόζη υπάρχουν σε μικρά ποσά αρκετοί μονοσακχαρίτες, ουδέτεροι ή όξινοι ολιγοσακχαρίτες καθώς και σάκχαρα δεσμευμένα με πρωτεΐνες ή πεπτίδια.

A.1.3.2.5. Άλατα

Το γάλα περιέχει αρκετά μεταλλικά στοιχεία, είτε σε ιοντική μορφή, είτε δεσμευμένα σε άλλα συστατικά είτε τέλος με μορφή οργανικών ή ανόργανων αλάτων. Από τα κατιόντα τα κυριότερα είναι το Ca^{+2} , το Na^{+} , το K^{+} και το Mg^{+2} , ενώ από τα ανιόντα το Cl^{-} , ο P^{-2} και τα κιτρικά. Τα κάλιο, νάτριο και χλώριο βρίσκονται κυρίως ως ελεύθερα ιόντα, ενώ τα ασβέστιο και μαγνήσιο μόνο σε μικρό ποσοστό είναι σε ιοντισμένη μορφή. Στο γάλα αγελάδας το 20% του ασβεστίου είναι δεσμευμένο στις καζεΐνες σε συνδυασμό με το φωσφόρο, το 50% είναι σε ανόργανη κolloειδή μορφή και το 30% σε ιοντισμένη μορφή.

A.1.3.2.6. Ιχνοστοιχεία

Τα ιχνοστοιχεία ανευρίσκονται στο γάλα κυρίως με μορφή οργανικών ενώσεων, συνδεδεμένα κυρίως με τις πρωτεΐνες, αν και ορισμένα από αυτά (χαλκός, σίδηρος, μαγγάνιο, ψευδάργυρος) ανευρίσκονται και στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων. Άλλα ιχνοστοιχεία είναι το κοβάλτιο (συστατικό της βιταμίνης B12), το ιώδιο, το ρουβίδιο, το σελήνιο, το πυρίτιο και το βρώμιο.

A.1.3.2.7. Βιταμίνες

Το γάλα περιέχει όλες σχεδόν τις βιταμίνες, άλλες σε ικανοποιητική ποσότητα και άλλες σε ίχνη.

Από τις λιποδιαλυτές βιταμίνες η Α υπάρχει κυρίως ως εστέρας του παλμιτικού οξέος και η D ως μίγμα D2 (προέρχεται από τις τροφές) και D3 (προέρχεται από την ακτινοβολία πάνω στην προβιταμίνη D στο δέρμα του ζώου). Η βιταμίνη Ε απαντά κυρίως ως α-τοκοφερόλη (0,1 mg/100 ml) και ένα μικρό ποσοστό (5%) της όλης δραστηριότητας οφείλεται στη γ-τοκοφερόλη. Η βιταμίνη Κ ανευρίσκεται μόνο σε ίχνη.

Από τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, εκείνες του συμπλέγματος Β (θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, Β6, βιοτίνη, παντοθενικό οξύ, φολασίνη) ανευρίσκονται σταθερά στο γάλα των μηρυκαστικών ανεξάρτητα από τη διακύμανση της περιεκτικότητάς τους στην τροφή.

A.1.3.2.8. Ένζυμα

Τα ένζυμα που ανευρίσκονται φυσιολογικά στο γάλα παράγονται από τα κύτταρα του μαστού και δεν έχει αποδειχτεί εάν παίζουν κάποιο ιδιαίτερο ρόλο ή πρέπει να θεωρούνται ότι εισάγονται τυχαίως κατά τη διαδικασία της εκκρίσεως του γάλακτος. Τα ένζυμα που παράγονται από μικροοργανισμούς δεν θεωρούνται ως συστατικά του γάλακτος. Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευτεί περισσότερα από 40 διαφορετικά ένζυμα στο γάλα της αγελάδας. Τα κυριότερα είναι η αλκαλική φωσφατάση και οι λιπάσες.

A.1.3.2.9. Άλλα συστατικά

Άλλα συστατικά που περιέχονται στο γάλα είναι τα εξής:

- Ορμόνες
- Αλδεϋδες, κετόνες και αλειφατικά οξέα
- Μη πρωτεϊνικής φύσης αζωτούχες ενώσεις

- Θειούχες ενώσεις
- Χρωστικές
- Αέρια
- Κύτταρα

A.1.3.3. Δομή του γάλακτος

Το γάλα αποτελεί ένα σύνθετο βιολογικό υλικό, του οποίου η δομή έχει μελετηθεί εκτενώς. Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά του γάλακτος είναι τα λιποσφαίρια και τα μικκύλια καζεΐνης.

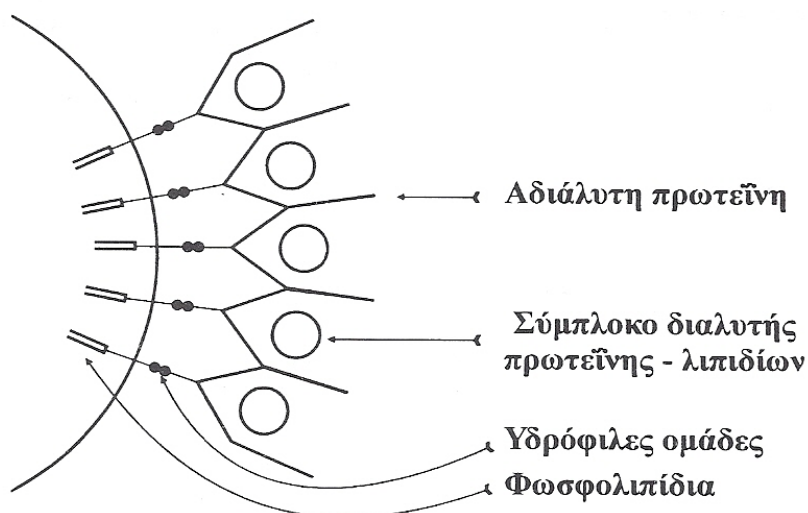
Επίσης το γάλα διακρίνεται δομικά σε πλάσμα και ορό. Το πλάσμα του γάλακτος αποτελείται από το γάλα μείον τα λιποσφαίρια (γάλα χωρίς λιπαρά), ενώ ο ορός αποτελείται από το πλάσμα μείον τα μικκύλια καζεΐνης. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται συνήθως με φυγοκέντρηση και κατακρήμνιση αντίστοιχα και σχεδόν ποτέ δεν είναι πλήρης (Walstra et al., 1984).

A.1.3.3.1. Λιποσφαίρια

Το λίπος του γάλακτος είναι διαμορφωμένο σε λιποσφαίρια, τα περισσότερα από τα οποία έχουν διάμετρο 1 έως 5 μm αλλά με ακραία μεγέθη από 0,1 έως 10 μm . Τα λιποσφαίρια περιβάλλονται από μεμβράνη πάχους 10 nm περίπου, η οποία περιέχει αρκετά συστατικά, από τα οποία όμως τα κυριότερα είναι τα φωσφολιπίδια και οι λιποπρωτεΐνες. Τα φωσφολιπίδια προσανατολίζονται στην επιφάνεια του λιποσφαιρίου κατά τέτοιον τρόπο ώστε η υδρόφιλη ομάδα τους (πολική) να προσανατολίζεται προς την υδάτινη φάση (Εικόνα Α.1.1). Έτσι αποκλείεται η εναπόθεση τριγλυκεριδίων και το μέγεθος του λιποσφαιρίου σταθεροποιείται. Με την υδρόφιλη ομάδα συνδέονται και οι πρωτεΐνες της μεμβράνης του λιποσφαιρίου. Η δομή αυτή του λιποσφαιρίου, δεν αλλοιώνεται κατά την ομογενοποίηση και τη διαίρεση του λιποσφαιρίου σε μικρότερα τμήματα τα οποία παίρνουν πάλι τη μορφή σφαιριδίων (Μάντης, 2000). Η ομογενοποίηση μειώνει το μέσο μέγεθος των λιποσφαιρίων και αυξάνει τη θερμοδυναμική σταθερότητα του γάλακτος (Walstra et al., 1984).

Τα λιποσφαίρια στο ομογενοποιημένο γάλα σταθεροποιούνται με δύο τρόπους. Ο βασικός τρόπος είναι η ηλεκτροστατική απώθηση μεταξύ τους, που οφείλεται στο ζ-δυναμικό που αναπτύσσεται. Δεδομένου ότι οι τιμές του ζ-δυναμικού που αναφέρονται στη βιβλιογραφία δεν αρκούν για την απώθηση συνένωσης των λιποσφαιρίων,

φαίνεται να υπάρχει και μηχανική παρεμπόδιση μεταξύ τους. Η παρεμπόδιση οφείλεται στις πρωτεΐνες (κυρίως καζεΐνες) που επικάθονται στην επιφάνεια των λιποσφαιρίων και με αυτό τον τρόπο εμποδίζουν τη συνένωση τους προς σχηματισμό μεγαλύτερων λιποσφαιρίων.



Εικόνα Α.1.1: Δομή μεμβράνης λιποσφαιρίου (Harper and Hall, 1976; Μάντης, 2000).

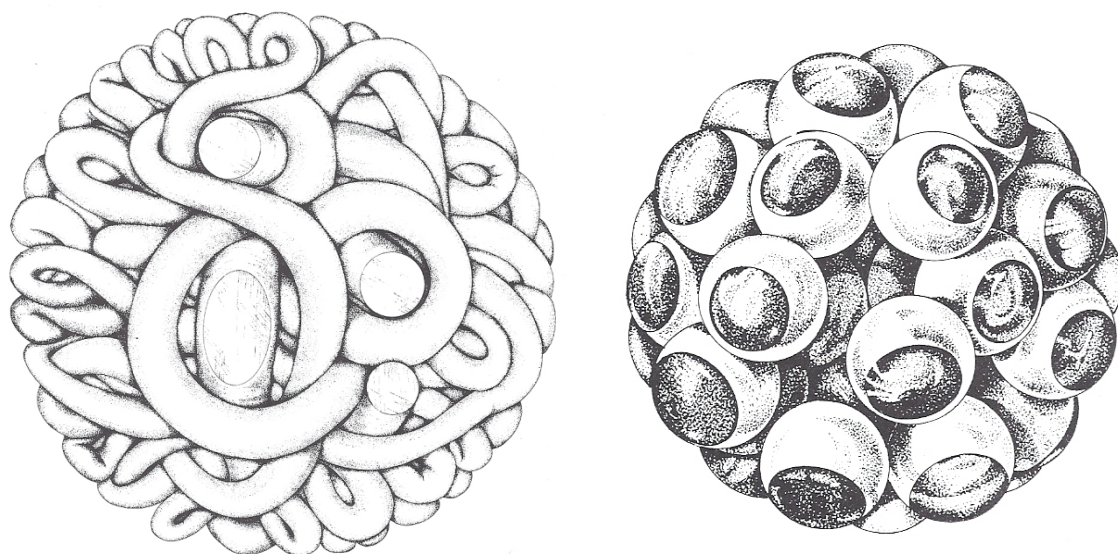
A.1.3.3.2. Μικκύλια καζεΐνης

Οι καζεΐνες που αναφέρθηκαν προηγουμένως απαντούν στο γάλα σε μορφή συμπλόκων μορίων των α_{s1} -, α_{s2} -, β , και κ -καζεϊνών, τα οποία καλούνται μικκύλια και βρίσκονται σε κολλοειδή διασπορά στην υδάτινη φάση. Τα μικκύλια αποτελούνται κατά 93% από καζεΐνη και κατά το υπόλοιπο από ανόργανη ύλη. Κύριο συστατικό της ανόργανης ύλης αποτελούν ο φωσφόρος και το ασβέστιο.

Το μέγεθος των μικκυλίων κυμαίνεται από 10 έως 300 nm και το μοριακό τους βάρος είναι της τάξεως των 10^7 έως 10^9 Da. Εάν ληφθεί υπόψη ότι το μοριακό βάρος των καζεϊνών είναι περίπου 23000 Da γίνεται αντιληπτό ότι ένα μέσου μεγέθους μικκύλιο αποτελείται από 25000 περίπου μονομερή καζεΐνης. Τα μικκύλια είναι σχεδόν σφαιρικοί σχηματισμοί που συντίθενται από εκατοντάδες μικρότερες μονάδες, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως υπομικκύλια, τα οποία έχουν μέγεθος 8-20 nm.

Η εξωτερική επιφάνεια των μικκυλίων έχει τριχοειδή δομή και αποτελείται κυρίως από κ -καζεΐνη, η οποία είναι και η πιο υδρόφιλη. Το υδρόφοβο εσωτερικό αποτελείται από

τις πιο λιπόφιλες καζεΐνες. Τα μόρια ασβεστίου δρουν κυρίως ως συνδετικό υλικό μεταξύ των υπομικκυλίων (Walstra et al., 1984; Μάντης, 2000).



Εικόνα Α.1.2: Αριστερά: Σχηματική αναπαράσταση υπομικκυλίου κατά Kimura (Kimura et al., 1979; Μάντης, 2000). Δεξιά: Σχηματική αναπαράσταση ενός μικκυλίου καζεΐνης που σχηματίζεται από υπομικκύλια (Slattery, 1976; Brunner, 1981; Μάντης, 2000).

A.1.3.4. Φυσικές ιδιότητες του γάλακτος

Το γάλα από φυσική άποψη παρουσιάζεται ως:

- i. Αραιό γαλάκτωμα της λιπαρής φάσεως.
- ii. Κολλοειδής διασπορά των μικκυλίων καζεΐνης.
- iii. Μοριακό διάλυμα των υδατοδιαλυτών συστατικών του.

Έτσι μπορεί να θεωρηθεί ως ένα ψευδοδιάλυμα. Οι φυσικές του ιδιότητες είναι αυτές του νερού, που αποκλίνουν ανάλογα με τη συγκέντρωση και την κατάσταση διασποράς των στερεών συστατικών του.

Οι κυριότερες φυσικές ιδιότητες του γάλακτος είναι (Walstra et al., 1984; Μάντης, 2000):

A.1.3.4.1. Οσμή και γεύση

Το γάλα έχει ιδιάζουσα οσμή και υπόγλυκή γεύση λόγω της λακτόζης. Αλλοίωση στην οσμή ή τη γεύση υποδηλώνει ακαταλληλότητα και ανθυγιεινότητα.

A.1.3.4.2. Χρώμα

Το χρώμα του γάλακτος είναι λευκό, λόγω του σκεδασμού του φωτός που προκαλείται από την αντανάκλαση στα λιποσφαίρια.

A.1.3.4.3. Οξύτητα – Ρυθμιστική ικανότητα

Το pH του γάλακτος έχει τιμή 6,6 με 6,8 με μέση τιμή 6,7 στους 20 και 6,6 στους 25 °C. Το γάλα έχει και ρυθμιστικές ικανότητες και αυτό το οφείλει στο φωσφορικό και κιτρικό ασβέστιο. Η θέρμανση του γάλακτος προκαλεί μικρή άνοδο του pH λόγω απώλειας CO₂ και μειώνει τη ρυθμιστική του ικανότητα λόγω καθιζήσεως του καζεϊνικού ασβεστίου, με παράλληλη απελευθέρωση ιόντων υδρογόνου. Θέρμανση όμως πάνω από 100 °C προκαλεί μείωση του pH λόγω παραγωγής οξέων από μερική διάσπαση της λακτόζης.

A.1.3.4.4. Δυναμικό οξειδοαναγωγής

Το γάλα περιέχει αρκετά οξειδο-αναγωγικά συστήματα (ασκορβικό, γαλακτικό, πυροσταφυλικό, ριβοφλαβίνη, οξυγόνο) η σχετική συγκέντρωση των οποίων καθορίζει και το δυναμικό οξειδο-αναγωγής του (Eh) σε δεδομένη στιγμή. Το πρόσφατης άμελης φυσιολογικό γάλα έχει θετικό Eh που κυμαίνεται από +200 μέχρι +300 mV και αυτό οφείλεται στο διαλυμένο οξυγόνο που περιέχει.

A.1.3.4.5. Ειδικό βάρος

Το ειδικό βάρος του γάλακτος εξαρτάται από τη συγκέντρωση των συστατικών, το βαθμό ενυδάτωσης των πρωτεϊνών και τον ειδικό όγκο της λιπαρής φάσης του γάλακτος. Για το γάλα αγελάδας κυμαίνεται από 1,029 έως 1,032.

A.1.3.4.6. Ιξώδες

Το ιξώδες του γάλακτος κυμαίνεται μεταξύ 0,9 και 2,1 cP (ή mPa/s) (συνήθως 2,0) και επηρεάζεται κυρίως από τη συγκέντρωση και τη διασπορά των κολλοειδών (μικκυλίων καζεΐνης) και τον αριθμό των λιποσφαιρίων. Η ομογενοποίηση αυξάνει τον αριθμό των λιποσφαιρίων και αυτό επιφέρει αύξηση του ιξώδους. Το ιξώδες επηρεάζεται επίσης από τη θερμοκρασία και είναι μεγαλύτερο σε χαμηλές θερμοκρασίες.

A.1.3.4.7. Επιφανειακή τάση

Η επιφανειακή τάση του γάλακτος είναι στους 0 °C, για το γάλα αγελάδας, από 55 έως 60 dynes/cm (ή 0,06 N/m). Με την άνοδο της θερμοκρασίας μειώνεται. Έτσι στους 20

°C είναι 50 dynes/cm (0,05 N/m) και στους 60 °C 40-45 dynes/cm (0,04-0,045 N/m). Οι καζεΐνες, τα φωσφολιπίδια, οι πρωτεΐνες του λιποσφαιρίου και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι τα κύρια συστατικά που διαμορφώνουν την επιφανειακή τάση του γάλακτος.

A.1.3.4.8. Σημείο πήξης

Το σημείο πήξης για το γάλα αγελάδας κυμαίνεται από -0,530 °C έως -0,570 °C με μέση τιμή τους -0,547 °C. Η χαμηλότερη αυτή τιμή, σε σχέση με εκείνη του αποσταγμένου νερού, οφείλεται κατά 80% σχεδόν στη συγκέντρωση της λακτόζης και τα ιόντα χλωρίου.

A.1.3.4.9. Σημείο ζέσης

Το γάλα βράζει στους 100,15 °C έως 100,17 °C και αυτό οφείλεται στα υδατοδιαλυτά συστατικά του.

A.1.3.4.10. Δείκτης διάθλασης

Σε θερμοκρασία 20 °C και με μήκος κύματος φωτός (γραμμή D φάσματος νατρίου) 589,3 nm, ο δείκτης διάθλασης του γάλακτος (n_D^{20}) είναι περίπου 1,338 (Δείκτης διάθλασης νερού = 1,3330).

A.1.3.4.11. Ηλεκτρική αγωγιμότητα

Στο γάλα η αγωγιμότητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ιόντων των διαφόρων αλάτων του και κυρίως του χλωριούχου νατρίου. Σε θερμοκρασία 25 °C η ηλεκτρική αγωγιμότητα του γάλακτος κυμαίνεται από 4-6 mS/cm.

A.1.3.4.12. Ειδική θερμότητα και θερμική αγωγιμότητα

Η ειδική θερμότητα του γάλακτος είναι μικρότερη από εκείνη του νερού (1 cal/g·K) και επηρεάζεται από την περιεκτικότητα σε λίπος και τη θερμοκρασία. Έτσι στους 0 °C η ειδική θερμότητα του αποβουτυρωμένου γάλακτος είναι κατά προσέγγιση 0,95, του πλήρους γάλακτος 0,92, της κρέμας 30% 0,67 και του καθαρού λίπους γάλακτος 0,51 cal/g·K.

Στο γάλα η μικρότερη θερμική αγωγιμότητα εμφανίζεται στους 35-37 °C (0,46 W/(m·K)) ενώ είναι μεγαλύτερη στους 0 °C.

A.1.3.5. Βιομηχανική επεξεργασία γάλακτος

Το γάλα ανάλογα με την τελική του μορφή υφίσταται μια σειρά από διεργασίες. Οι κυριότερες διαδικασίες επεξεργασίας του γάλακτος σε βιομηχανική κλίμακα είναι οι ακόλουθες:

A.1.3.5.1. Ομογενοποίηση

Ομογενοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα μίγμα συστατικών υπόκειται μηχανική επεξεργασία με στόχο να προκύψει ένα ομοιογενές προϊόν, το οποίο δεν διαχωρίζεται στα επιμέρους συστατικά (Kroschwitz, 2005). Στο γάλα τα λιποσφαίρια έχουν την τάση να ανέρχονται στην επιφάνεια σχηματίζοντας κρέμα. Η ομογενοποίηση κατακερματίζει τα λιποσφαίρια σε μικρότερα, μειώνοντας το εύρος μεγέθους από 1-15 μm σε 1-2 μm , και αυξάνοντας το συνολικό τους αριθμό κατά 10^4 φορές περίπου. Τα νέα λιποσφαίρια δεν περιβάλλονται από την αρχική τους μεμβράνη, αλλά από νέα που προέρχεται από τις πρωτεΐνες του ορού. Το βασικό πλεονέκτημα της ομογενοποίησης είναι ότι αυξάνεται η θερμοδυναμική σταθερότητα του γάλακτος (Μάντης, 2000; Kroschwitz, 2005).

A.1.3.5.2. Παστερίωση-Αποστείρωση

Παστερίωση είναι η διαδικασία θέρμανσης του γάλακτος με σκοπό την εξόντωση ή αδρανοποίηση των παθογόνων οργανισμών που περιέχει. Η παραδοσιακή διαδικασία παστερίωσης περιλαμβάνει τη θέρμανση του γάλακτος τουλάχιστον στους 63 °C για 30 min και στους 72 °C για τουλάχιστον 15 s. Η διαδικασία UHT (Ultra High Temperature) περιλαμβάνει την θέρμανση σε πολύ υψηλότερες θερμοκρασίες (ελάχιστη 138 °C) για μικρότερο χρόνο (2 s). Η διαδικασία πραγματοποιείται κάτω από άσηπτες συνθήκες και παράγει αποστειρωμένο γάλα. Το συγκεκριμένο είδος γάλακτος έχει μεγάλη διάρκεια ζωής σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

A.1.3.6. Ποιοτικός έλεγχος γάλακτος

Οι κυριότεροι έλεγχοι ποιότητας που πραγματοποιούνται στο τελικό προϊόν (κυρίως γάλα UHT) είναι οι ακόλουθοι:

- i. Μικροβιολογικός έλεγχος
- ii. Μακροσκοπικός έλεγχος (οσμή, γεύση, χρώμα, ιξώδες)
- iii. Έλεγχος κανονικότητας (περιεκτικότητα σε λίπος και στερεό υπόλειμμα)

- iv. Έλεγχος ομογενοποίησης (κατανομή μεγέθους σωματιδίων)
- v. Έλεγχος pH και ολικής οξύτητας
- vi. Έλεγχος σταθερότητας κολλοειδούς φάσης (δοκιμή αλκοόλης: ανάμειξη ίσων όγκων γάλακτος και αιθανόλης 68% δεν πρέπει να δίνει ίζημα)

A.1.3.7. Το γάλα ως τρόφιμο

Το γάλα αποτελεί τη μοναδική και πλήρη τροφή για τα πρώτα στάδια της ζωής του νεογέννητου των θηλαστικών. Στον άνθρωπο, μετά από τους πρώτους μήνες της ζωής του, το γάλα δεν επαρκεί για να καλύψει όλες τις ανάγκες του σε θρεπτικά συστατικά, εντούτοις αποτελεί μία άριστη τροφή και μία από τις σημαντικότερες πηγές πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, ασβεστίου, φωσφόρου καθώς και ορισμένων βιταμινών.

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος είναι υψηλής βιολογικής αξίας (δείκτης μεγαλύτερος του 90% και περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 95%). Περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και είναι πλούσιες σε ιστιδίνη, αμινοξύ που χρειάζεται ιδιαίτερα ο οργανισμός των νεαρών ατόμων. Γενικά οι πρωτεΐνες του γάλακτος είναι υπέρτερες από όλες τις άλλες ζωτικές πρωτεΐνες εκτός από αυτές του αυγού.

Το μόνο σάκχαρο, το οποίο βρίσκεται σε αξιόλογη ποσότητα στο γάλα είναι ο δισακχαρίτης λακτόζη. Η λακτόζη διέρχεται χωρίς καμία μεταβολή από το στομάχι, αλλά στο έντερο διασπάται βραδέως (υδρόλυση) με την επίδραση του ενζύμου λακτάση (β-D-γαλακτοσιδάση) σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Η τελευταία παίζει σπουδαίο ρόλο (σε συνδυασμό με τη βιταμίνη D) στην απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο. Συχνά παρατηρείται το φαινόμενο της κακής απορρόφησης από το έντερο της λακτόζης ή ακόμη και της μη ανοχής της. Η κατάσταση αυτή οφείλεται σε μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου λακτάση (β-D-γαλακτοσιδάση) στο λεπτό έντερο. Έτσι δεν διασπάται η λακτόζη, η οποία καθώς συγκεντρώνεται στο έντερο, αυξάνεται η οσμωτική πίεση, η οποία με τη σειρά της προκαλεί συγκέντρωση νερού, κωλικούς και διάρροια.

Το λίπος του γάλακτος υπερέχει σε πάρα πολλά σημεία σε σύγκριση με τα άλλα ζωικά λίπη. Συγκεκριμένα περιέχει ακόρεστα οξέα σε μεγάλη αναλογία, έχει χαμηλό σημείο τήξης και γι' αυτό είναι περισσότερο εύπεπτο και τέλος περιέχει τα απαραίτητα για τον οργανισμό λιπαρά οξέα λινελαϊκό και λινολενικό.

Το γάλα περιέχει πολλά άλατα και μεταλλικά στοιχεία. Από διαιτητική άποψη ενδιαφέρον έχουν τα άλατα ασβεστίου και φωσφόρου, γιατί το γάλα θεωρείται η κύρια πηγή προσπορισμού των στοιχείων αυτών.

Τέλος το γάλα περιέχει σχεδόν όλες τις βιταμίνες, αλλά από άποψη διαιτητική θεωρείται καλή πηγή μόνο για τις βιταμίνες Α, Β1, Β2, νιασίνη και παντοθενικό οξύ (Μάντης, 2000).

Α.1.3.8. Το γάλα ως βιομέσο για τη μελέτη φαινομένων αποδέσμευσης/απορρόφησης φαρμάκων

Αρκετές αναφορές στη βιβλιογραφία δείχνουν ότι η διαλυτότητα των λιπόφιλων φαρμάκων στο γάλα είναι πολύ υψηλότερη από τη διαλυτότητά τους στο νερό (Macheras and Reppas, 1986a, b; Macheras et al., 1989a, 1990; Macheras et al., 1991). Μελέτες διάλυσης με τις δραστικές ενώσεις δικουμαρόλη, σουλφαμεθιζόλη και νιτροφουραντοΐνη απέδειξαν ότι η διαλυτότητα των συγκεκριμένων ενώσεων ήταν αυξημένη στο γάλα σε σχέση με τα υδατικά τους διαλύματα. Η αύξηση αυτή αποδόθηκε αρχικά στην παρουσία της καζεΐνης, η οποία δρα ως διαλυτοποιητικός παράγοντας για τις λιπόφιλες ουσίες (Macheras and Reppas, 1986a, b). Οι ίδιες δραστικές χρησιμοποιήθηκαν και για την παρασκευή σκόνης γάλακτος-φαρμάκου για ανασύσταση, με την τεχνική της λυοφιλοποίησης. Οι μελέτες του ρυθμού διάλυσης στις μορφές αυτές απέδειξαν ανωτερότητα έναντι παραδοσιακών υδατικών προσεγγίσεων. Σε αντίστοιχα αποτελέσματα κατέληξαν και άλλοι ερευνητές (Galia et al., 1998). Τέλος, μια σειρά από μελέτες ρυθμού διάλυσης έχει δείξει ότι η διάλυση των φαρμάκων είναι υψηλότερη σε συστήματα διασποράς φαρμάκου-γάλακτος από ότι σε φυσικά μείγματα φαρμάκου-γάλακτος (Vijaya and Mishra, 2006; Sahin and Arslan, 2007).

Επιπλέον, έχουν πραγματοποιηθεί προσπάθειες για τη χρήση του γάλακτος ως μέσου προσομοίωσης των συνθηκών του γαστρεντερικού σωλήνα σε συνθήκες σίτισης. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών έδειξαν ότι το γάλα μπορεί να προσομοιώσει ικανοποιητικά τις συνθήκες που επικρατούν *in vivo* και να βοηθήσει στην εκτίμηση της αλληλεπίδρασης φαρμάκου-τροφής (Macheras et al., 1987; Macheras et al., 1989b).

Τα ανωτέρω *in vitro* δεδομένα έχουν επιβεβαιωθεί και από αντίστοιχες *in vivo* μελέτες. Έτσι σε *in vivo* μελέτες μετά από ανασύσταση λυοφιλοποιημένου συνδυασμού

γάλακτος-φαρμάκου έχει αποδειχθεί η υπεροχή αυτών των συστημάτων όσον αφορά τη βιοδιαθεσιμότητα (Macheras and Reppas, 1986a, b; Macheras et al., 1991).

A.1.4. ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΜΕ ΤΟ ΓΑΛΑ

A.1.4.1. Ακετυλοσαλικυλικό οξύ

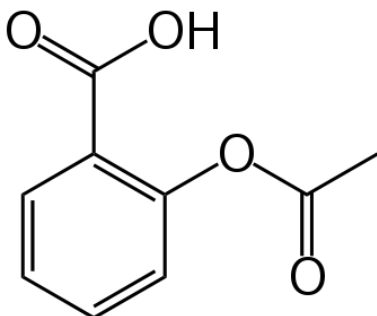
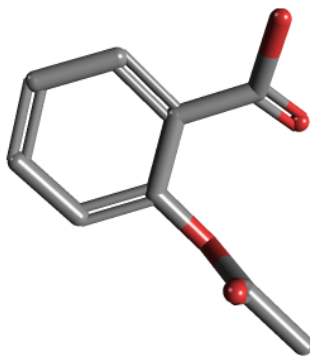
A.1.4.1.1. Γενικές πληροφορίες

Το πρότυπο αναλγητικό που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του ήπιου έως μέτριου πόνου. Έχει αντιφλεγμονώδεις και αντιπυρετικές ιδιότητες και δρα ως αναστολέας της κυκλοοξυγενάσης που οδηγεί στην αναστολή της βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών. Το ακετυλοσαλικυλικό οξύ αναστέλλει επίσης τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και χρησιμοποιείται για την πρόληψη της αρτηριακής και φλεβικής θρόμβωσης.

A.1.4.1.2. Χημικές ιδιότητες

Οι χημικές ιδιότητες του ακετυλοσαλικυλικού οξέος συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Α.1.ΙΙ: Χημικές ιδιότητες ακετυλοσαλικυλικού οξέος.

Μοριακός τύπος	C ₉ H ₈ O ₄
Όνομα IUPAC	2-acetoxybenzoic acid
Σχετική μοριακή μάζα	180,157
Δομή	 
CAS #	50-78-2
PubChem CID #	2244

A.1.4.1.3. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Σύμφωνα με την USP, η ασπιρίνη είναι λευκή κρυσταλλική ουσία, ελαφρώς διαλυτή στο νερό και διαλυτή στην αιθανόλη. Πρέπει να φυλάσσεται σε αεροστεγή δοχεία, διότι η ύπαρξη υγρασίας επιταχύνει την υδρόλυσή της σε σαλικυλικό οξύ (USP XXXII - NF XXVII, 2008).

Σε υδατικά διαλύματα, η ασπιρίνη είναι πιο σταθερή σε τιμές pH 2-3, λιγότερο σταθερή σε τιμές pH 4-8, και ελάχιστα σταθερή σε τιμές pH μικρότερες από 2 ή μεγαλύτερες του 8. Σε ένα κορεσμένο υδατικό διάλυμα με pH 5-7, η ασπιρίνη υδρολύεται σχεδόν ποσοτικά μέσα σε 1 εβδομάδα σε θερμοκρασία 25 °C. Αν είναι επιθυμητή μια υγρή μορφή χορήγησης για την βραχυπρόθεσμη αντιμετώπιση του πόνου, μπορεί να παρασκευαστεί ένα πόσιμο διάλυμα από εμπορικά διαθέσιμα αναβράζοντα δισκία. Μετά τη διάλυσή ενός αναβράζοντος δισκίου ασπιρίνης σε περίπου 90 ml νερού, το διάλυμα έχει pH 6-7. Στο προκύπτον διάλυμα, η ασπιρίνη είναι κατά 99% ιονισμένη και το 90% της δόσης δεν υδρολύεται για περίπου 10 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και περίπου 90 ώρες στους 5 °C (McEnoy, 2008).

Πίνακας Α.1.III: Φυσικοχημικές ιδιότητες ακετυλοσαλικυλικού οξέος.

Κατάσταση	Στερεό (λευκοί κρύσταλλοι)
Σημείο τήξης	136-140 °C
pKa	3,49
logP	1,4
Διαλυτότητα στο νερό	3,3 mg/ml

A.1.4.1.4. Φαρμακολογικές ιδιότητες

Η ασπιρίνη και άλλα σαλικυλικά απορροφώνται γρήγορα από το γαστρεντερικό σωλήνα, όταν λαμβάνονται από το στόμα, αλλά η απορρόφηση μετά από ορθική χορήγηση είναι λιγότερο αξιόπιστη. Η ασπιρίνη και άλλα σαλικυλικά μπορούν επίσης να απορροφηθούν από το δέρμα (Sweetman, 2007).

Μετά από *per os* χορήγηση, η απορρόφηση της μη ιονισμένης ασπιρίνης πραγματοποιείται στο στομάχι και το έντερο. Ένα ποσοστό ασπιρίνης υδρολύεται προς σαλικυλικό στα τοιχώματα του εντέρου. Το ποσοστό της απορροφούμενης δόσης είναι 80-100% της χορηγούμενης δόσης. Μόλις απορροφηθεί, η ασπιρίνη μετατρέπεται γρήγορα σε σαλικυλικό, αλλά κατά τα πρώτα 20 min μετά από μια *per os* χορήγηση, η ασπιρίνη είναι η κύρια μορφή του φαρμάκου στο πλάσμα. Η ασπιρίνη συνδέεται σε ποσοστό 80 έως 90% με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Ο όγκος κατανομής της στους ενήλικες φέρεται να είναι 170 ml/kg. Καθώς η συγκέντρωση στο πλάσμα αυξάνεται, οι θέσεις δέσμησης με τις πρωτεΐνες καθίστανται κορεσμένες και ο όγκος κατανομής αυξάνεται. Τόσο η ασπιρίνη όσο και το σαλικυλικό οξύ διαθέτουν φαρμακολογική δράση, εντούτοις μόνο η ασπιρίνη έχει αντιαιμοπεταλιακή δράση. Το σαλικυλικό

δεσμεύεται εκτενώς με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και κατανέμεται ταχέως σε όλα τα μέρη του σώματος. Το σαλικυλικό εμφανίζεται στο μητρικό γάλα και διαπερνά τον πλακούντα (Sweetman, 2007).

Το σαλικυλικό οξύ απομακρύνεται κυρίως μέσω ηπατικού μεταβολισμού. Ο κύριος μεταβολίτης είναι το σαλικυλουρικό οξύ και ο μεταβολισμός ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten, ως εκ τούτου είναι εύκολο να κορεστεί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, στη σταθεροποιημένη κατάσταση στο πλάσμα, το σαλικυλικό οξύ να αυξάνεται δυσανάλογα με τη δόση. Η απομάκρυνση είναι μια διαδικασία πρώτης τάξης και ο χρόνος ημιζωής του σαλικυλικού οξέος στο πλάσμα είναι περίπου 2 με 3 ώρες. Σε υψηλές δόσεις ασπιρίνης, ο χρόνος ημιζωής αυξάνεται στις 15 έως 30 ώρες. Το σαλικυλικό οξύ επίσης απεκκρίνεται αμετάβλητο στα ούρα. Το ποσό που αποβάλλεται μέσω αυτής της οδού εξαρτάται από τη δόση, το pH των ούρων, με περίπου το 30% της δόσης να απεκκρίνεται σε αλκαλικά ούρα σε σύγκριση με 2% της δόσης σε όξινα ούρα. Η νεφρική απέκκριση περιλαμβάνει σπειραματική διήθηση, ενεργό νεφρική σωληναριακή έκκριση, και παθητική σωληναριακή επαναπορρόφηση (Sweetman, 2007).

Το σαλικυλικό οξύ απομακρύνεται με αιμοκάθαρση (Sweetman, 2007).

A.1.4.1.5. Φαρμακοτεχνικές προσεγγίσεις

Η ασπιρίνη κυκλοφορεί σε πληθώρα φαρμακοτεχνικών μορφών, είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλες ουσίες, όπως καφεΐνη, παρακεταμόλη, κωδεΐνη και βιταμίνη C. Οι φαρμακοτεχνικές μορφές περιλαμβάνουν δισκία άμεσης αποδέσμευσης, εντεροδιαλυτά δισκία, καψάκια, διασπειρόμενα δισκία, αναβράζοντα δισκία, υπόθετα. Η χορηγούμενη δόση κυμαίνεται από 75 έως 650 mg ανάλογα με την ένδειξη.

A.1.4.2. Κυκλοσπορίνη Α

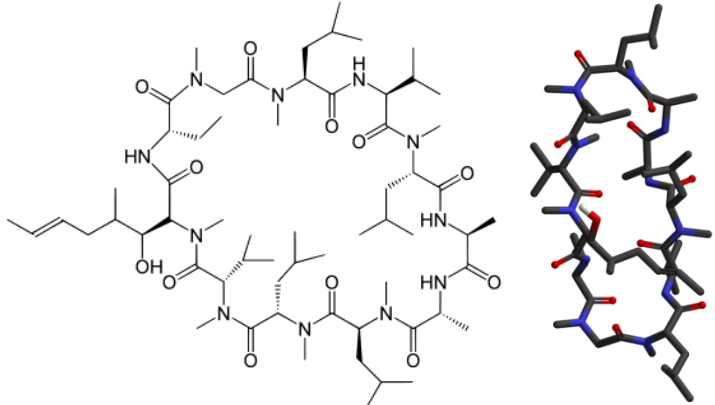
A.1.4.2.1. Γενικές πληροφορίες

Η κυκλοσπορίνη είναι ένα κυκλικό ολιγοπεπτίδιο που προέρχεται από μύκητες. Είναι ένα ισχυρό ανοσοκατασταλτικό με μια ειδική δράση στα T-λεμφοκύτταρα. Χρησιμοποιείται για την προφύλαξη της απόρριψης μοσχευμάτων σε μεταμοσχεύσεις ιστών και οργάνων.

Α.1.4.2.2. Χημικές ιδιότητες

Οι χημικές ιδιότητες της κυκλοσπορίνης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Α.1.IV: Χημικές ιδιότητες κυκλοσπορίνης Α.

Μοριακός τύπος	C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂
Όνομα IUPAC	(E)-14,17,26,32-tetrabutyl-5-ethyl-8-(1-hydroxy-2-methylhex-4-enyl)-1,3,9,12,15,18,20,23,27-nonamethyl-11,29-dipropyl-1,3,6,9,12,15,18,21,24,27,30- undecaazacyclodotriacontan-2,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaone
Σχετική μοριακή μάζα	1202,61
Δομή	
CAS #	59865-13-3
PubChem CID #	5284373

Α.1.4.2.3. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η κυκλοσπορίνη (κυκλοσπορίνη Α) είναι ένας ανοσοκατασταλτικός παράγοντας που παράγεται από το *Tolypocladium inflatum* Gams (πρώην *Trichoderma polysporum*) ή το *Cylindrocarpum lucidum* Booth. Το φάρμακο είναι ένα άπολο, κυκλικό ολιγοπεπτιδικό αντιβιοτικό που αποτελείται από 11 αμινοξέα. Η κυκλοσπορίνη είναι ένα από τα πολλά βιολογικώς ενεργά αντιβιοτικά που παράγονται από αυτά τα μανιτάρια, με την κυκλοσπορίνη Α και C να αποτελούν τα κυριότερα (McEnoy, 2008).

Η κυκλοσπορίνη εμφανίζεται ως λευκή, λεπτή, κρυσταλλική σκόνη. Το φάρμακο είναι σχετικά αδιάλυτο στο νερό, ενώ είναι διαλυτό σε λιπίδια και οργανικούς διαλύτες. Η τιμές της διαλυτότητας στο νερό, οι οποίες έχουν αναφερθεί είναι 40 μg/ ml (McEnoy, 2008) και 27,67 μg/ml στους 25 °C (Ismailos et al., 1991). Η διαλυτότητά της σε αιθυλική αλκοόλη είναι μεγαλύτερη από 80 mg / ml στους 25 °C (McEnoy, 2008).

Πίνακας Α.1.V: Φυσικοχημικές ιδιότητες κυκλοσπορίνης Α.

Κατάσταση	Στερεό (λευκοί κρύσταλλοι)
Σημείο τήξης	148-151 °C
pKa	-
logP	2,92
Διαλυτότητα στο νερό	27,67 µg/ml

A.1.4.2.4. Φαρμακολογικές ιδιότητες

Η φαρμακοκινητική της κυκλοσπορίνης χαρακτηρίζεται από έντονη μεταβλητότητα και είναι δύσκολο να προσδιοριστεί. Τα αποτελέσματα ποικίλουν ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη δοκιμασία, και οι τιμές που λαμβάνονται με διαφορετικές μεθόδους, δεν είναι απολύτως συγκρίσιμες (McEnoy, 2008).

Η απορρόφηση των συμβατικών σκευασμάτων της κυκλοσπορίνης από το γαστρεντερικό σωλήνα παρουσιάζει μεταβλητότητα και είναι περιορισμένη. Αντιθέτως, η φαρμακοτεχνική μορφή της κυκλοσπορίνης υπό μορφή μικρογαλακτώματος χαρακτηρίζεται από βελτιωμένα χαρακτηριστικά απορρόφησης, μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα και ταχύτερη απορρόφηση, με τις μέγιστες συγκεντρώσεις να επιτυγχάνονται περίπου 1,5 - 2 ώρες μετά τη χορήγηση. Η συγχορήγηση με τροφή αυξάνει το βιοδιαθέσιμο ποσοστό της κυκλοσπορίνης, ιδίως όταν το γεύμα είναι πλούσιο σε λίπος. Η συγχορήγηση με χολικά άλατα αυξάνει επίσης τη βιοδιαθεσιμότητα της κυκλοσπορίνης, όπως επίσης και η χορήγηση μικκυλίου με χρήση ενός παραγώγου της βιταμίνης Ε με πολυαιθυλενογλυκόλη (tocofersolan). Λόγω των προβλημάτων της *per os* μεταβλητότητας, αναπτύχθηκε το μικρογαλάκτωμα κυκλοσπορίνης, το οποίο προσφέρει σημαντικά βελτιωμένη και πιο προβλέψιμη βιοδιαθεσιμότητα, ιδιαίτερα σε ασθενείς με μεταμόσχευση ήπατος με μειωμένη ροή χολής. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το εν λόγω προϊόν περιλαμβάνει βιταμίνη Ε. Ωστόσο, μια μελέτη προτείνει ότι σε αντίθεση με τις προηγούμενες παραδοχές, οι συμβατικές μορφές της κυκλοσπορίνης απορροφούνται ικανοποιητικά, ενώ η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα οφείλεται στον εκτεταμένο μεταβολισμό του μορίου στα τοιχώματα του εντέρου. Αν πράγματι συμβαίνει αυτό, η βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα που παρατηρείται με το μικρογαλάκτωμα πιθανώς δεν συνδέεται με τη βελτίωση της απορρόφησης, αλλά με την προστασία από τον μεταβολισμό στα τοιχώματα του εντέρου.

Η κυκλοσπορίνη κατανέμεται ευρέως σε όλο το σώμα. Η κατανομή στο αίμα εξαρτάται από τη συγκέντρωση, με το 41 έως 58% να κατανέμεται στα ερυθροκύτταρα και 10 έως 20% στα λευκοκύτταρα. Το υπόλοιπο βρίσκεται στο πλάσμα με το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης να είναι περίπου 90%. Εξαιτίας της κατανομής στα κύτταρα του αίματος, η ολική συγκέντρωση στο αίμα είναι υψηλότερη της συγκέντρωσης στο πλάσμα. Ενώ οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα έχουν αναφερθεί περίπου 1 ng/ml (HPLC) για κάθε mg από του στόματος χορηγούμενης κυκλοσπορίνης, η συγκέντρωση στο ολικό αίμα για κάθε mg κυμαίνεται από περίπου 1,4 έως 2,7 ng/ml. Η κυκλοσπορίνη έχει αναφερθεί ότι διαπερνά τον πλακούντα και κατανέμεται στο μητρικό γάλα.

Η κάθαρση από το αίμα είναι διφασική. Ο τελικός χρόνος ημίσειας ζωής της από του στόματος χορήγησης κυμαίνεται από περίπου 5 έως 20 ώρες. Ο χρόνος ημιζωής είναι μικρότερος στα παιδιά και ως εκ τούτου η κάθαρση πιο γρήγορη.

Η κυκλοσπορίνη μεταβολίζεται εκτενώς στο ήπαρ και απεκκρίνεται κυρίως στα κόπρανα μέσω της χολής. Περίπου το 6% της δόσης αναφέρεται ότι απεκκρίνεται στα ούρα και λιγότερο από το 0,1% της δόσης απεκκρίνεται αμετάβλητο.

A.1.4.2.5. Φαρμακοτεχνικές προσεγγίσεις

Η κυκλοσπορίνη διατίθεται εμπορικά υπό μορφή πόσιμου διαλύματος και κάψουλας. Οι φαρμακοτεχνικές μορφές της κυκλοσπορίνης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

- i. Συμβατικές φαρμακοτεχνικές μορφές, οι οποίες περιλαμβάνουν το απλό πόσιμο διάλυμα κυκλοσπορίνης και την απλή κάψουλα, και
- ii. Στις αυτό-γαλακτωματοποιούμενες (self-emulsifying), οι οποίες περιλαμβάνουν το πόσιμο διάλυμα προς γαλακτωματοποίηση και την κάψουλα προς γαλακτωματοποίηση.

Οι συμβατικές φαρμακοτεχνικές μορφές της κυκλοσπορίνης, περιέχουν το φάρμακο διαλυμένο σε ένα μίγμα ελαίων και αιθανόλης, υπό υγρή μορφή. Στις αυτό-γαλακτωματοποιούμενες φαρμακοτεχνικές μορφές η κυκλοσπορίνη είναι διεσπαρμένη σε ένα μίγμα προπυλενογλυκόλης, μονο-, δι- και τριγλυκεριδίων, επιφανειοδραστικών, αιθανόλης και βιταμίνης Ε. Όταν εκτεθεί το μίγμα σε υδατικό περιβάλλον, σχηματίζεται γαλάκτωμα, με μέγεθος σταγονιδίων μικρότερο των 100 nm σε διάμετρο, χωρίς να

προηγηθεί κατακάθιση της δραστικής ουσίας. Οι δύο διαφορετικές φαρμακοτεχνικές μορφές (συμβατικές και αυτό-γαλακτωματοποιούμενες) δεν είναι μεταξύ τους βιοϊσοδύναμες (McEnoy, 2008).

A.1.4.3. Δαναζόλη

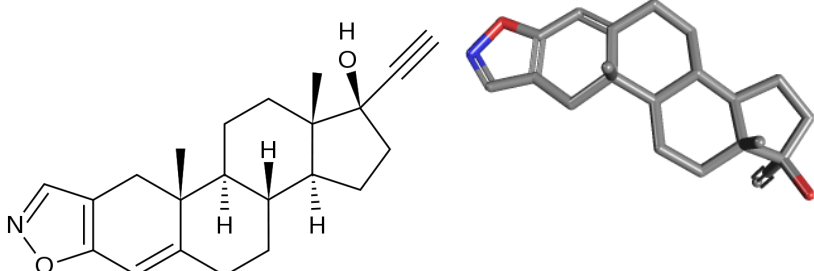
A.1.4.3.1. Γενικές πληροφορίες

Η δαναζόλη είναι ένα συνθετικό στεροειδές με αντιγοναδοτροπική και αντιοιστρογονική δράση που ενεργεί στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, αναστέλλοντας την παραγωγή των γοναδοτροπινών. Διαθέτει μερικές ανδρογονικές ιδιότητες. Η δαναζόλη έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της ενδομητρίωσης και ορισμένων καλοηθών παθήσεων του μαστού.

A.1.4.3.2. Χημικές ιδιότητες

Οι χημικές ιδιότητες της δαναζόλης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Α.1.VI: Χημικές ιδιότητες δαναζόλης.

Μοριακός τύπος	C ₂₂ H ₂₇ NO ₂
Όνομα IUPAC	(1S,2R,13R,14S,17R,18S)-17-ethynyl-2,18-dimethyl-7-oxa-6-azapentacyclo[11.7.0.0 ^{2,10} .0 ^{4,8} .0 ^{14,18}]icosa-4(8),5,9-trien-17-ol
Σχετική μοριακή μάζα	337,45
Δομή	
CAS #	17230-88-5
PubChem CID #	28417

A.1.4.3.3. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η δαναζόλη είναι ένα συνθετικό παράγωγο της τεστοστερόνης. Το φάρμακο εμφανίζεται ως λευκή έως ωχροκίτρινη, κρυσταλλική σκόνη και είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό και ελάχιστα διαλυτό στην αλκοόλη (McEnoy, 2008).

Οι διαθέσιμες στο εμπόριο κάψουλες δαναζόλης θα πρέπει να αποθηκεύονται σε καλά κλειστά δοχεία και σε θερμοκρασία μικρότερη των 40 °C, κατά προτίμηση μεταξύ 15-30 °C (McEnoy, 2008).

Πίνακας Α.1.VII: Φυσικοχημικές ιδιότητες δαναζόλης.

Κατάσταση	Στερεό (λευκό)
Σημείο τήξης	224,4-226,8 °C
pKa	-
logP	4,2
Διαλυτότητα στο νερό	Πρακτικά αδιάλυτη (0,59-1 µg/ml)

A.1.4.3.4. Φαρμακολογικές ιδιότητες

Η δαναζόλη απορροφάται από το γαστρεντερικό σωλήνα και μεταβολίζεται στο ήπαρ. Η απορρόφηση αυξάνεται με την λήψη τροφής. Ο χρόνος ημίσειας ζωής στο πλάσμα είναι 3 έως 6 ώρες, αλλά αυξάνεται στις 26 ώρες περίπου, ύστερα από επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις. Οι μεταβολίτες δεν έχουν φαρμακολογική δράση. Η δαναζόλη και οι μεταβολίτες της χαρακτηρίζονται από εντεροηπατική κυκλοφορία και απεκκρίνονται στα ούρα και τα κόπρανα (Sweetman, 2007).

Σε μια μελέτη σε υγιείς γυναίκες, η από του στόματος χορήγηση δαναζόλης 400 mg δύο φορές ημερησίως για 2 ημέρες οδήγησε σε συγκεντρώσεις στο πλάσμα που κυμαίνονται από 140-460 ng/ml, με μέση συγκέντρωση στο πλάσμα 260 ng/mL 2 ώρες μετά την τελευταία δόση. Μελέτες βιοδιαθεσιμότητας δείχνουν ότι οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα της δαναζόλης δεν αυξάνονται αναλογικά με τη δόση. Διπλασιάζοντας τη δόση οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα αυξήθηκαν κατά 35-40%. Ωστόσο, η βιοδιαθεσιμότητα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα της δαναζόλης αυξήθηκαν κατά 3 ή 4 φορές αντίστοιχα σε υγιείς γυναίκες οι οποίες έλαβαν 100 ή 200 mg εφάπαξ, με ένα γεύμα πλούσιο σε λιπαρά (περισσότερα από 30 g λίπους), σε σύγκριση με εκείνους που έλαβαν το φάρμακο κάτω από συνθήκες νηστείας. Επιπλέον, η χορήγηση με τροφή καθυστέρησε την εμφάνιση της μέγιστης συγκέντρωσης στο πλάσμα κατά περίπου 30 λεπτά (McEnoy, 2008).

Η δαναζόλη δρα καταστέλλοντας τις πληροφορίες που μεταφέρονται στον άξονα υπόφυσης-ωοθηκών μέσω της αναστολής της παραγωγής γοναδοτροπινών από την υπόφυση και τον υποθάλαμο. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η δαναζόλη αναστέλλει άμεσα τη

σύνθεση των στεροειδών του φύλου και δεσμεύει τους ορμονικούς υποδοχείς στο κυτταρόπλασμα των ιστών στόχων, εμφανίζοντας με αυτό τον τρόπο αντιοιστρογονική, αναβολική και ελαφρώς ανδρογόνο δράση. Η ανδρογόνος δράση είναι δόσοεξαρτώμενη. Επιπλέον, η δαναζόλη έχει αποδειχθεί ότι μειώνει σημαντικά τα επίπεδα των αντισωμάτων IgG, IgM, IgA σε ασθενείς με ενδομητρίωση, υποδεικνύοντας ότι αυτό θα μπορούσε να είναι ένας άλλος μηχανισμός δράσης. Η δαναζόλη δεν επηρεάζει τα επίπεδα κορτικοτροπίνης και κορτιζόλης (McEnoy, 2008).

A.1.4.3.5. Φαρμακοτεχνικές προσεγγίσεις

Η δαναζόλη κυκλοφορεί στο εμπόριο υπό μορφή καψουλών, σε συγκεντρώσεις 50, 100 και 200 mg.

A.1.4.4. Κλοπιδογρέλη

A.1.4.4.1. Γενικές πληροφορίες

Η κλοπιδογρέλη είναι ένας αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας, δομικά και φαρμακολογικά παρόμοιος με την τικλοπιδίνη. Χρησιμοποιείται για να μειώσει αθηρωματικές εκδηλώσεις, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου και εγκεφαλικό επεισόδιο σε ασθενείς που έχουν υποστεί πρόσφατα τέτοιες παθήσεις, ή πάσχουν από περιφερική αγγειακή νόσο.

A.1.4.4.2. Χημικές ιδιότητες

Οι χημικές ιδιότητες της κλοπιδογρέλης συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Α.1.VIII: Χημικές ιδιότητες κλοπιδογρέλης.

Μοριακός τύπος	C ₁₆ H ₁₆ ClNO ₂ S
Όνομα IUPAC	(+)-(S)-methyl 2-(2-chlorophenyl)-2-(6,7-dihydrothieno[3,2-c]pyridin-5(4H)-yl)acetate
Σχετική μοριακή μάζα	321,82
Δομή	
CAS #	113665-84-2
PubChem CID #	60606

Α.1.4.4.3. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η κλοπιδογρέλη υπό μορφή βάσης είναι ένα άχρωμο παχύρευστο έλαιο, με κολλώδη υφή (O'Neil, 2001; Kolbe et al., 2002; Lestari, 2010). Η βάση είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό (Product Monograph - Plavix, Plavix®, 2010). Οι τιμές διαλυτότητας στο νερό που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για τη βάση κυμαίνονται ανάλογα με την πηγή και είναι: κάτω από 0,02 mg/ml (Kolbe et al., 2002) ή 1 µg/ml (Singh, 2005; Zupančič et al., 2010). Η *in silico* υπολογισμένη διαλυτότητα είναι 50,78 µg/ml (Drugbank: <http://www.drugbank.ca/>). Εντούτοις η κλοπιδογρέλη παρουσιάζει έντονα pH-εξαρτώμενη διαλυτότητα, και θεωρείται ευδιάλυτη σε έντονα όξινο περιβάλλον (Product Monograph - Plavix, Plavix®, 2010). Ως τριτοταγής αμίνη είναι ασθενής βάση με τιμή pK_a ίση με 4,55, ενώ ο συντελεστής μερισμού είναι 3,9 σε pH 7,4 (Product Monograph - Plavix, Plavix®, 2010).

Λόγω των προβληματικών χαρακτηριστικών της κλοπιδογρέλης, τα εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα περιέχουν την δραστική υπό μορφή άλατος, ενώ λόγω της έντονης pH-εξαρτώμενης διαλυτότητας έχουν επιλεγεί ως αντισταθμιστικά ιόντα ισχυρά οξέα. Το πρωτότυπο σκεύασμα (Plavix®) κυκλοφορεί ως το όξινο θειικό άλας, ενώ τα γενόσημα κυκλοφορούν συνήθως ως βενζολοσουλφωνικά άλατα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα προαναφερόμενα κορεσμένα διαλύματα των αλάτων της

κλοπιδογρέλης να έχουν τιμές pH περίπου 1,5, γεγονός το οποίο ευνοεί σημαντικά τη διαλυτότητα της ουσίας (Zupančič et al., 2010). Τα προαναφερόμενα άλατα της κλοπιδογρέλης επομένως είναι ευδιάλυτα τόσο σε όξινο περιβάλλον όσο και σε απλό υδατικό διάλυμα. Αντιθέτως σε ρυθμιστικά διαλύματα με τιμές pH κοντά στην ουδέτερη περιοχή τα άλατα είναι δυσδιάλυτα.

Πίνακας Α.1.IX: Φυσικοχημικές ιδιότητες κλοπιδογρέλης.

Κατάσταση	Έλαιο (άχρωμο και παχύρευστο)
Σημείο τήξης	-
pK_a	4,55
logP	3,9 (pH: 7,4)
Διαλυτότητα στο νερό	Πρακτικά αδιάλυτη σε ουδέτερο pH. Διαλυτή σε έντονα όξινο περιβάλλον

A.1.4.4.4. Φαρμακολογικές ιδιότητες

Η κλοπιδογρέλη απορροφάται γρήγορα, αλλά ελλιπώς έπειτα από *per os* χορήγηση. Η απορρόφηση της είναι της τάξης του 50%. Η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα του ανενεργού προφαρμάκου παρατηρείται 45 min ύστερα από τη χορήγηση. Η βιοδιαθέσιμη δόση δεν επηρεάζεται από τη λήψη τροφής.

Η κλοπιδογρέλη και ο κύριος (αδρανής) μεταβολίτης δεσμεύονται αναστρέψιμα *in vitro* στις πρωτεΐνες του ανθρώπινου πλάσματος (98% και 94%, αντίστοιχα).

Η κλοπιδογρέλη είναι προφάρμακο και μεταβολίζεται εκτενώς στο ήπαρ, ακολουθώντας δύο κατευθύνσεις. Η βασική μεταβολική οδός περιλαμβάνει την υδρόλυση της κλοπιδογρέλης από εστεράσες, προς παραγωγή του ανενεργού παραγώγου του καρβοξυλικού οξέος της. Η κατεύθυνση αυτή ακολουθείται σε ποσοστό 85%. Η άλλη μεταβολική οδός διέρχεται από το κυτόχρωμα P450 και περιλαμβάνει αρχικά την οξείδωση της κλοπιδογρέλης προς τον ενδιάμεσο μεταβολίτη 2-oxo-clopidogrel. Στη συνέχεια ακολουθεί μεταβολισμός του ενδιάμεσου παραγώγου προς σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη, ο οποίος είναι ένα παράγωγο θειόλης της αρχικής ουσίας. Ο ενεργός μεταβολίτης συνδέεται *in vitro* ταχύτατα και μη αντιστρεπτά με τους υποδοχείς των αιμοπεταλίων, αποτρέποντας τη συσσωμάτωσή τους.

Η κλοπιδογρέλη και οι μεταβολίτες της απεκκρίνονται στα ούρα και στα κόπρανα. Περίπου το 50% της από του στόματος δόσης ανακτάται από τα ούρα και περίπου το 46% από τα κόπρανα. Ο χρόνος ημιζωής του προφαρμάκου είναι 6 h (Sweetman, 2007).

Η δραστική δόση είναι 75 mg βάσης κλοπιδογρέλης, τα οποία αντιστοιχούν σε 97,9 mg του όξινου θειικού ή 112,1 mg του βενζολοσουλφωνικού άλατος. Η συχνότητα χορήγησης είναι άπαξ ημερησίως, ενώ διατίθεται και σε μορφή περιεκτικότητας 300 mg ως προς τη βάση, ως δόση εφόδου.

Ο μηχανισμός δράσης της είναι ανάλογος της τικλοδιπίνης και δρα αναστέλλοντας την ATP κατευθυνόμενη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Χορηγείται προφυλακτικά ως εναλλακτική λύση της ασπιρίνης σε ασθενείς με αρτηριοσκλήρυνση που βρίσκονται σε κίνδυνο θρομβοεμβολικών διαταραχών, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου, περιφερική αρτηριακή νόσο, και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Χρησιμοποιείται επίσης με ασπιρίνη σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη (Sweetman, 2007).

A.1.4.4.5. Φαρμακοτεχνικές προσεγγίσεις

Τα εμπορικά σκευάσματα της κλοπιδογρέλης κυκλοφορούν ως επικαλυμμένα δισκία των 75 και 300 mg περιεκτικότητας ως προς τη βάση. Τα άλατα τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα είναι το όξινο θειικό, το βενζολοσουλφωνικό και το υδροχλωρικό.

A.1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα διατριβή διαπραγματεύεται με δύο αντικείμενα. Στο πρώτο τμήμα (σελ. 1-182) στόχος είναι η συμβολή στην ανάπτυξη φαρμακοτεχνικών μορφών με βάση το γάλα, ενώ στο δεύτερο τμήμα (σελ. 183-294) επιχειρείται εφαρμογή των κλασματικών παραγώγων στην κινητική των πορειών απορρόφησης.

Στο παρόν τμήμα της διδακτορικής διατριβής (Τμήμα Α), ο βασικός στόχος είναι η αξιοποίηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του γάλακτος για τη χορήγηση φαρμάκων, καθώς το γάλα είναι ένα φυσικό προϊόν το οποίο διαθέτει ορισμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά για την *per os* χορήγηση. Θα αξιοποιηθεί ως φυσικό γαλάκτωμα, κατά αντιστοιχία με τα τεχνητά γαλακτώματα που χρησιμοποιούνται για τη χορήγηση δυσδιάλυτων φαρμάκων, όπως για παράδειγμα η κυκλοσπορίνη (Neoral®, 2010). Αρκετές αναφορές στη βιβλιογραφία δείχνουν ότι η διαλυτότητα των λιπόφιλων φαρμάκων στο γάλα είναι πολύ υψηλότερη από τη διαλυτότητά τους στο νερό, και το γεγονός αυτό οδηγεί σε αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα *in vivo* (Macheras and Reppas, 1986a, b; Macheras et al., 1989a, 1990; Macheras et al., 1991). Επιπλέον οι γαστροπροστατευτικές ιδιότητες του γάλακτος, ιδιαίτερα σε χορήγηση π.χ. μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ), προδιαθέτουν για τα οφέλη της χορήγησης φαρμακοτεχνικών μορφών με βάση το γάλα.

Ο σκοπός της μελέτης είναι η ανάπτυξη μιας φαρμακευτικής σύνθεσης, όπως για παράδειγμα υδαταλκοολικού διαλύματος, σκόνης ή αναβράζοντος δισκίου, για τη χορήγηση φαρμάκων υπό μορφή διασποράς του φαρμάκου σε γάλα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές δραστικές με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (ασπιρίνη, κυκλοσπορίνη, δαναζόλη και κλοπιδογρέλη). Οι προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν αφορούσαν κυρίως την αξιοποίηση της υψηλής διαλυτότητας ορισμένων εξ' αυτών στην αιθανόλη με περαιτέρω απαιώρηση τους στο γάλα πριν από τη χορήγηση (κυκλοσπορίνη, δαναζόλη, κλοπιδογρέλη), καθώς και η προσπάθεια για χρήση αναβράζοντων δισκίων σε συνδυασμό με την ανασύσταση-διάλυσή τους σε γάλα (ασπιρίνη) και σκόνης (sachet) (κυκλοσπορίνη, κλοπιδογρέλη). Στα πλαίσια αυτά πραγματοποιήθηκε φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των φαρμακοτεχνικών μορφών για τη μελέτη της *in vitro* συμπεριφοράς τους και ακολούθησε *in vivo* μελέτη για δύο από τις προσεγγίσεις (αναβράζον δισκίο ασπιρίνης και υδαταλκοολικό διάλυμα κυκλοσπορίνης).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

A.2.1. ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ

A.2.1.1. Μελέτες διαλυτότητας σε γάλα

A.2.1.1.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Δαναζόλη (micro ionized): Sanofi-Aventis France
- Βενζολοσουλφονική κλοπιδογρέλη: Pharmathen S.A., Greece

Αντιδραστήρια:

- Γάλα μακράς διάρκειας, πλήρες, 3,5% και ημιαποβουτυρωμένο, 1,5% λιπαρά (Landesgenossenschaft Ennstal Molkerei-Betriebe, Steinach, Austria)
- Γάλα μακράς διάρκειας, άπαχο, 0% λιπαρά (ΦΑΓΕ, Μεταμόρφωση Αττικής, Ελλάδα)
- Ακετονιτρίλιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, E. Merck (Darmstadt, Germany).
- Νερό, βαθμού καθαρότητας HPLC, προερχόμενο από συσκευή Labconco® water pro ps. System (Kansas City, Missouri, USA).
- Μονοξίνο φωσφορικό νάτριο, Na_2HPO_4 , Riedel-de Haën (Seelze, Germany).
- Ορθοφωσφορικό οξύ, H_3PO_4 , αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Riedel-de Haën (Seelze, Germany).

A.2.1.1.2. Οργανολογία

- Ανακινούμενο και θερμοστατούμενο υδατόλουτρο pSelecta, Barcelona, Spain.
- Αναλυτικός ζυγός Mettler Toledo AT20, Mettler-Toledo Inc., Columbus, USA.
- Κωνικές φιάλες 25 ml.
- Ηθμοί σύριγγας αναγεννημένης κυτταρίνης, μέγεθος πόρων 0.45 μm , μέγεθος ηθμού 25 mm, Titan®, Scientific Resources Inc. (Eatown, NJ, USA).

Για την ανάλυση:

- Στήλη ODS C_{18} (150×4.6 mm ID, 5 μm) Hypersil® (ThermoQuest Inc., San Jose, USA).

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία LC 1120 HPLC pump, ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού LC 1210 UV/Vis Detector, και λογισμικό Clarity® (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Melbourne, Australia).
- Φυγόκεντρος Sigma 202 MK, Laborzentrifugen GmbH, W. Germany.
- Σύστημα περιδίνησης Reax Top 2400 rpm, Heidolph Instruments GmbH & Co., Germany.

A.2.1.1.3. Μεθοδολογία

Για τις μελέτες διαλυτότητας σε γάλα, περίσσεια των δραστικών τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες 25 ml και στη συνέχεια προστέθηκαν 15 ml γάλακτος. Οι κωνικές σφραγίστηκαν με Parafilm. Οι κωνικές τοποθετήθηκαν στο θερμοστατούμενο υδατόλουτρο και αφέθηκαν για 24 h σε ήπια ανάδευση (50 rpm).

Μετά την ολοκλήρωση της ανάδευσης, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min σε ταχύτητα 10000 rpm. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση του πλεονάζοντος στερεού, λόγω αδυναμίας του δείγματος να διέλθει από ηθμούς 0,45 nm. Στη συνέχεια λήφθηκε το υπερκείμενο υγρό και χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Αρχικά σε 500 μl του υπερκείμενου διαλύματος προστέθηκαν 1000 μl ακετονιτριλίου, και το μείγμα περιδινήθηκε για 1 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 15000 rpm για 15 min σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης. Το υπερκείμενο υγρό διηθήθηκε από ηθμό κυτταρίνης και όγκος 20 μl ενέθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα. Για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος που περιείχαν τις δραστικές σε προκαθορισμένες συγκεντρώσεις. Για το σκοπό αυτό είχαν παρασκευαστεί μητρικά διαλύματα σε μεθανόλη. Στη συνέχεια τα εμβολιασμένα δείγματα ακολούθησαν την ίδια μεθοδολογία που προαναφέρθηκε.

Η αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό της δαναζόλης στηρίχθηκε σε δημοσιευμένες μεθόδους (Kariem et al., 2000; Larsen et al., 2008; USP XXXII - NF XXVII, 2008). Εν συντομία χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση ακετονιτριλίου-νερού 65:35 και χρωματογραφική στήλη ODS RP-C18. Η ροή ήταν 1 ml/min και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 287 nm. Ο χρόνος ανάσχεσης της δαναζόλης ήταν περίπου 5 min. Η μέθοδος ήταν

γραμμική στο εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν (0,2-30 µg/ml) με συντελεστή προσδιορισμού 0,9998. Το ποσοστό ανάκτησης της δαναζόλης από το γάλα υπολογίστηκε ύστερα από σύγκριση καμπύλης αναφοράς σε γάλα και σε κινητή φάση και ήταν 103%. Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς και χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο παράρτημα.

Η αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό της κλοπιδογρέλης στηρίχθηκε σε ήδη δημοσιευμένη μέθοδο (Mitakos and Panderi, 2002) καθώς επίσης και στη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τις μελέτες σταθερότητας και τον προσδιορισμό των προσμίξεων και θα περιγραφεί παρακάτω. Εν συντομία χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση ακετονιτριλίου-ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=3, 65:35 και χρωματογραφική στήλη ODS RP-C18. Η ροή ήταν 1,5 ml/min και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 220 nm. Ο χρόνος ανάσχεσης της κλοπιδογρέλης ήταν περίπου 4 min. Η μέθοδος ήταν γραμμική στο εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν (1-40 µg/ml) με συντελεστή προσδιορισμού 0,9998. Το ποσοστό ανάκτησης της κλοπιδογρέλης από το γάλα υπολογίστηκε ύστερα από σύγκριση καμπύλης αναφοράς σε γάλα και σε κινητή φάση και ήταν 100%. Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς και χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα Ι.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό του χρωματογραφικού συστήματος. Οι καμπύλες αναφοράς και η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκαν στο Excel (Microsoft Office Professional Plus, 2010).

A.2.1.2. *Μελέτες διαλυτότητας σε αιθανολικά διαλύματα*

A.2.1.2.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Δαναζόλη (micro ionized): Sanofi-Aventis France
- Κυκλοσπορίνη Α: RPG Life Sciences Limited, India
- Βενζολοσουλφονική κλοπιδογρέλη: Pharmathen S.A., Greece

Αντιδραστήρια:

- Νερό, βαθμού καθαρότητας HPLC, προερχόμενο από συσκευή Labconco® water pro ps. System (Kansas City, Missouri, USA).
- Απόλυτη αιθανόλη, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).
- Ακετονιτρίλιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, E. Merck (Darmstadt, Germany).

A.2.1.2.2. Οργανολογία

- Ανακινούμενο και θερμοστατούμενο υδατόλουτρο pSelecta, Barcelona, Spain.
- Αναλυτικός ζυγός Mettler Toledo AT20, Mettler-Toledo Inc., Columbus, USA.
- Κωνικές φιάλες 25 ml.
- Ηθμοί σύριγγας αναγεννημένης κυτταρίνης, μέγεθος πόρων 0.45 μm , μέγεθος ηθμού 25 mm, Titan®, Scientific Resources Inc. (Eatown, NJ, USA).

Για την ανάλυση:

- Ηθμοί σύριγγας αναγεννημένης κυτταρίνης, μέγεθος πόρων 0.45 μm , μέγεθος ηθμού 25 mm, Titan®, Scientific Resources Inc. (Eatown, NJ, USA).
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-1700 PharmaSpec με λογισμικό UV-probe (Shimadzu, Kyoto, Japan).
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία LC 1120 HPLC pump, ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού LC 1210 UV/Vis Detector, και λογισμικό Clarity® (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Melbourne, Australia).
- Στήλη ODS C₁₈ (150×4.6 mm ID, 5 μm) Hypersil® (ThermoQuest Inc., San Jose, USA).
- Στήλη ODS C₁₈ (250×4.6 mm ID, 5 μm) Hypersil® (ThermoQuest Inc., San Jose, USA).
- Θερμοστατούμενος κλίβανος Eldex CH-150 (Eldex Laboratories, Inc., Napa, CA, USA).

A.2.1.2.3. Μεθοδολογία

Για τις μελέτες διαλυτότητας σε αιθανολικά διαλύματα, περίσσεια των δραστικών τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες 25 ml και στη συνέχεια προστέθηκαν 15 ml αιθανολικού διαλύματος. Οι κωνικές σφραγίστηκαν με Parafilm. Οι κωνικές

τοποθετήθηκαν στο θερμοστατούμενο υδατόλουτρο και αφέθηκαν για 24 h σε ήπια ανάδευση (50 rpm).

Μετά την ολοκλήρωση της ανάδευσης, τα δείγματα διηθήθηκαν διαμέσου ηθμού κυτταρίνης και το διήθημα χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση. Κατά τη διαδικασία της διήθησης το αρχικό διήθημα απορρίφθηκε, προς κορεσμό του φίλτρου.

Η ανάλυση της δαναζόλης πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, με την ίδια μεθοδολογία που περιγράφηκε προηγουμένως, στις μελέτες διαλυτότητας σε γάλα. Η μέθοδος δεν απαιτούσε την προεργασία των δειγμάτων και η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε σε κινητή φάση. Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς και χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο παράρτημα.

Η ανάλυση της κλοπιδογρέλης πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία υπεριώδους στα 220 nm. Κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς στο προς μελέτη διαλύτη (αιθανόλη-νερό) σε περιοχή συγκεντρώσεων 1-20 µg/ml, η οποία ήταν γραμμική, με συντελεστή προσδιορισμού 0,999. Η επιλογή του μήκους κύματος πραγματοποιήθηκε ύστερα από τη λήψη φάσματος στις πειραματικές συνθήκες.

Η ανάλυση της κυκλοσπορίνης πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και στηρίχθηκε στη μέθοδο της Αμερικάνικης Φαρμακοποιίας. Η μέθοδος τροποποιήθηκε σύμφωνα με τα ακόλουθα: κινητή φάση ακετονιτρίλιο-νερό 70:30, η ροή ήταν 2 ml/min, η θερμοκρασία της στήλης 50 °C και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 210 nm. Ο όγκος έγχυσης ήταν 50 µl και ο χρόνος ανάσχεσης της κυκλοσπορίνης ήταν περίπου 11,5 min. Η καμπύλη αναφοράς ήταν γραμμική στην περιοχή 10-100 µg/ml, με συντελεστή προσδιορισμού 0,9993. Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς και χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα Ι.

A.2.2. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

A.2.2.1. Μέγεθος και κατανομή σωματιδίων¹ του γάλακτος

A.2.2.1.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Δαναζόλη (micro ionized): Sanofi-Aventis France
- Κυκλοσπορίνη A: RPG Life Sciences Limited, India
- Βενζολοσουλφονική κλοπιδογρέλη: Pharmathen S.A., Greece

Αντιδραστήρια:

- Γάλα μακράς διάρκειας (UHT), British Whole Milk, Tesco, United Kingdom
- Απόλυτη αιθανόλη, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Απιονισμένο νερό

A.2.2.1.2. Οργανολογία

- Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK με MPT-2 Autotitrator και λογισμικό Dispersion Technology Software (DTS Nano) v. 5.10.
- Folded capillary cell (DTS1060), Malvern Instruments, Malvern, UK
- Δοκιμαστικοί σωλήνες Fisherbrand 20 ml, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

A.2.2.1.3. Μεθοδολογία

Το μέγεθος και η κατανομή των σωματιδίων του γάλακτος μετρήθηκαν με τη χρήση της τεχνικής δυναμικής σκέδασης του φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS), σε γωνία 173°. Εν συντομία η μέθοδος περιλαμβάνει την εκπομπή δέσμης laser στο δείγμα και την ανίχνευση του σκεδασμού σε γωνία 173°. Η τεχνική βασίζεται στη σκέδαση Rayleigh που προκαλείται από την εκπομπή φωτός στα μικρά σωματίδια του δείγματος.

Τα δείγματα αρχικά παρασκευάστηκαν σε μικρούς όγκους (10 ml) αντιπροσωπευτικούς της τελικής φαρμακοτεχνικής μορφής σε πλαστικούς

¹ Με τον όρο σωματίδια αποδίδονται κατά βάση τα συστατικά του γάλακτος π.χ. μικκύλια καζεΐνης και λιποσφαίρια, με μέγεθος από 10 nm μέχρι 10 µm.

δοκιμαστικούς σωλήνες. Τα δείγματα μετρήθηκαν χωρίς αραίωση, αφού τοποθετήθηκαν στην ειδική κυψελίδα (Disposable capillary cell). Κάθε δείγμα μετρήθηκε τρεις φορές και λήφθηκε η μέση τιμή των μετρήσεων. Οι τελικές μετρήσεις έχουν προκύψει από τρία δείγματα.

Η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων εκφράστηκε με βάση τον όγκο των σωματιδίων. Οι άλλοι δύο τρόποι απεικόνισης είναι βάση έντασης σκεδασμού και βάση αριθμού σωματιδίων. Οι μέσες κατανομές που προέκυψαν από τις επαναληπτικές μετρήσεις των δειγμάτων καθώς και μεταξύ των δειγμάτων προέκυψαν από το λογισμικό του οργάνου (DTS Nano®).

Για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων τα δεδομένα εξήχθηκαν σε πίνακες και εισήχθηκαν στο Excel® (Microsoft Office Professional Plus, 2010). Οι τελικές απεικονίσεις έχουν γίνει με τη χρήση του προγράμματος Sigma Plot® v 11.0 (Systat Software, Inc., 2008).

Για την κατασκευή των διαγραμμάτων P-P (Percentiles-Percentiles) εξήχθησαν τα εκατοστημόρια από το λογισμικό του οργάνου σε πίνακα στο Excel και απεικονίστηκαν στο Sigma Plot®.

Οι στατιστικές μη παραμετρικές αναλύσεις Kolmogorov-Smirnov πραγματοποιήθηκαν στο λογισμικό Systat® (Systat Software Inc., 2007).

A.2.2.2. Δείκτης πολυδιασποράς

Ο δείκτης πολυδιασποράς μετρήθηκε παράλληλα με τις μετρήσεις μεγέθους και κατανομής σωματιδίων.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο δείκτης πολυδιασποράς που προκύπτει από τις μετρήσεις μεγέθους σωματιδίων δεν ταυτίζεται με το δείκτη πολυδιασποράς των πολυμερών. Στο πεδίο της δυναμικής σκέδασης του φωτός ο δείκτης πολυδιασποράς είναι ένας αριθμός που προκύπτει από μια απλή προσαρμογή δύο παραμέτρων στα δεδομένα της μέτρησης και εκφράζει το εύρος της κατανομής των σωματιδίων. Ο δείκτης πολυδιασποράς είναι αδιάστατος και κλιμακώνεται, έτσι ώστε τιμές μικρότερες από 0,05 σπάνια παρατηρούνται ενώ τιμές μεγαλύτερες από 0,7 υποδεικνύουν ότι το δείγμα έχει μια πολύ ευρεία κατανομή μεγέθους και δεν είναι

πιθανόν κατάλληλο για μέτρηση με τη συγκεκριμένη τεχνική. Η μέγιστη τιμή του δείκτη περιορίζεται αυθαίρετα σε 1,0.

Τα αποτελέσματα εξήχθησαν σε πίνακα Excel® (Microsoft Office Professional Plus, 2010).

A.2.2.3. ζ-δυναμικό

A.2.2.3.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Δαναζόλη (micro ionized): Sanofi-Aventis France
- Κυκλοσπορίνη Α: RPG Life Sciences Limited, India
- Βενζολοσουλφονική κλοπιδογρέλη: Pharmathen S.A., Greece

Αντιδραστήρια:

- Γάλα μακράς διάρκειας (UHT), British Whole Milk, Tesco, United Kingdom
- Απόλυτη αιθανόλη, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Απιονισμένο νερό

A.2.2.3.2. Οργανολογία

- Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK με MPT-2 Autotitrator και λογισμικό Dispersion Technology Software (DTS Nano) v. 5.10.
- Folded capillary cell (DTS1060), Malvern Instruments, Malvern, UK
- Δοκιμαστικοί σωλήνες Fisherbrand 20 ml, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

A.2.2.3.3. Μεθοδολογία

Η εφαρμογή της τεχνικής της M3-PALS (προσέγγιση Smoluchowski), επέτρεψε τον καθορισμό του ζ-δυναμικού μέσω ηλεκτροφόρησης. Το ζ-δυναμικό μετράται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στο σύστημα διασποράς. Τα σωματίδια εντός της διασποράς, που διαθέτουν ζ-δυναμικό θα μετακινηθούν προς το ηλεκτρόδιο με αντίθετο φορτίο με ταχύτητα ανάλογη με το μέγεθος του ζ-δυναμικού. Η ταχύτητα μετακίνησης μετράται με ανεμομετρία laser Doppler.

Τα δείγματα αρχικά παρασκευάστηκαν σε μικρούς όγκους (10 ml) αντιπροσωπευτικούς της τελικής φαρμακοτεχνικής μορφής σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Τα δείγματα αραιώθηκαν 100 φορές με απιονισμένο νερό (Jack and Dahle, 1937) και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην ειδική κυψελίδα (Disposable capillary cell). Κάθε δείγμα μετρήθηκε τρεις φορές και λήφθηκε η μέση τιμή των μετρήσεων. Οι τελικές μετρήσεις έχουν προκύψει από τρία δείγματα.

Οι μέσες κατανομές που προέκυψαν από τις επαναληπτικές μετρήσεις των δειγμάτων καθώς και μεταξύ των δειγμάτων προέκυψαν από το λογισμικό του οργάνου (DTS Nano®). Στη συνέχεια οι κατανομές εξήχθησαν ως πίνακες και εισήχθησαν στο Excel® (Microsoft Office Professional Plus, 2010). Οι τελικές απεικονίσεις έχουν γίνει με τη χρήση του προγράμματος Sigma Plot® v 11.0 (Systat Software, Inc., 2008).

A.2.2.4. Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων

A.2.2.4.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Δαναζόλη (micro ionized): Sanofi-Aventis France
- Κυκλοσπορίνη A: RPG Life Sciences Limited, India
- Βενζολοσουλφονική κλοπιδογρέλη: Pharmathen S.A., Greece

Αντιδραστήρια:

- Γάλα μακράς διάρκειας (UHT), British Whole Milk, Tesco, United Kingdom
- Απόλυτη αιθανόλη, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Απιονισμένο νερό
- Αέριο άζωτο

A.2.2.4.2. Οργανολογία

- Μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων σε “tapping mode” (MultiMode/NanoScope IV Scanning Probe Microscope, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA).
- Μαρμαρυγία μοσχοβίτη (muscovite mica – Agar Scientific, Stansted, Essex, UK) επικολλημένο σε δίσκο νικελίου.
- Λογισμικό NanoScope® (v. 7.10, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA)

A.2.2.4.3. Μεθοδολογία

Η τοπολογία των δειγμάτων εκτιμήθηκε με μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων από την απεικόνιση μιας περιοχής 10x10 μm των δειγμάτων. Το όργανο διαθέτει μια ακίδα εξαιρετικά μικρού μεγέθους, που σαρώνει το δείγμα. Καθώς η ακίδα σαρώνει το δείγμα, λόγω των ανωμαλιών στην επιφάνεια, ασκούνται διαφορετικές δυνάμεις που αναγκάζουν τον πρόβολο (cantilever) να λυγίζει. Μια δέσμη laser ανακλάται στο πίσω μέρος του προβόλου καταλήγοντας σε μια φωτοδίοδο. Οι αποκλίσεις της ακίδας (λόγω της τοπογραφίας) ανιχνεύονται και καταγράφονται υπό μορφή τάσης στην έξοδο της φωτοδίοδου. Η δύναμη μεταξύ ακίδας και δείγματος καθορίζεται από την τάση στη φωτοδίοδο.

Τα δείγματα προς απεικόνιση ετοιμάστηκαν από την εναπόθεση 10 μL αραιωμένου με απιονισμένο νερό δείγματος (1:100) πάνω στην πρόσφατα αποσχισμένη επιφάνεια της μαρμαρυγίας μοσχοβίτη και στη συνέχεια το δείγμα στέγνωσε υπό ήπιο ρεύμα αζώτου.

A.2.2.5. Φασματοσκοπία φθορισμού

A.2.2.5.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Δαναζόλη (micro ionized): Sanofi-Aventis France
- Κυκλοσπορίνη A: RPG Life Sciences Limited, India
- Βενζολοσουλφονική κλοπιδογρέλη: Pharmathen S.A., Greece

Αντιδραστήρια:

- Γάλα μακράς διάρκειας (UHT), British Whole Milk, Tesco, United Kingdom
- Απόλυτη αιθανόλη, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Απιονισμένο νερό
- Ερυθρό του Νείλου (Nile Red) ≥98.0% (Sigma Life Science, Sigma-Aldrich Co., St.Louis, Missouri, U.S.A)
- Μετά νατρίου άλας καζεΐνης από βόειο γάλα (Sigma Life Science, Sigma-Aldrich Co., St.Louis, Missouri, U.S.A)

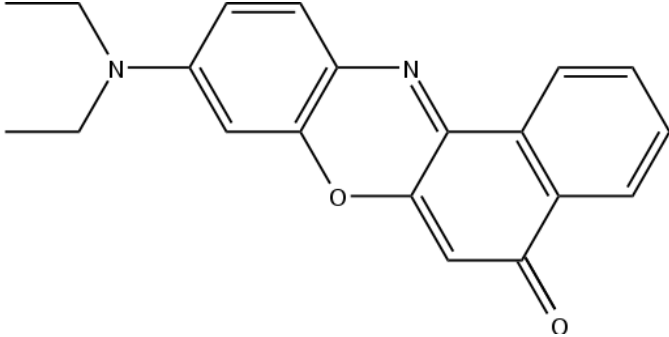
A.2.2.5.2. Οργανολογία

- Φθορισμοφασματοφωτόμετρο Varian Cary Eclipse (Varian Optical Spectroscopy Instruments, Mulgrave, Victoria, Australia) με λογισμικό Cary Eclipse Scan Application, v. 1.1 (Varian Inc., 2002)
- Κυψελίδες χαλαζία 1x1 cm
- Δοκιμαστικοί σωλήνες Fisherbrand 20 ml, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

A.2.2.5.3. Μεθοδολογία

Για να μελετηθούν τα δομικά χαρακτηριστικά των φαρμακοτεχνικών μορφών με βάση το γάλα χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία φθορισμού. Για το σκοπό αυτό αξιοποιήθηκε ο δείκτης ερυθρό του Νείλου, ο οποίος είναι εξαιρετικά υδρόφοβος και χαρακτηρίζεται από έντονο φθορισμό, με χαρακτηριστική κίτρινη-χρυσή εκπομπή όταν εντοπίζεται σε λιπόφιλο περιβάλλον. Το φάσμα εκπομπής του εξαρτάται από τη λιποφιλία του περιβάλλοντος, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως διαλυτοχρωμισμός (solvatochromism). Αναλυτικότερα, φάσμα εκπομπής του ερυθρού του Νείλου εμφανίζει υψοχρωμία όταν μειώνεται η πολικότητα του περιβάλλοντος και βαθυχρωμία όταν αυξάνεται, ενώ διατηρεί τη βασική του μορφή. Επιπλέον, το ερυθρό του Νείλου δε φθορίζει στο νερό. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά το καθιστούν ιδανικό δείκτη για μη παρεμβατική μελέτη της κατανομής υδρόφοβων ουσιών στο γάλα (Greenspan and Fowler, 1985; Jores et al., 2005).

Πίνακας Α.2.1: Χημικά χαρακτηριστικά ερυθρού του Νείλου.

Μοριακός τύπος	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₂
Όνομα IUPAC	7-diethylamino-3,4-benzophenoxazine-2-one
Μοριακό βάρος	318.369 g/mol
Δομή	
CAS #	7385-67-3
PubChem CID #	65182



Εικόνα Α.2.1: Διαλύματα ερυθρού του Νείλου στο ορατό (πάνω) και στο υπεριώδες (366 nm, κάτω) σε διάφορους διαλύτες. Από αριστερά προς τα δεξιά: 1. Νερό, 2. Μεθανόλη, 3. Αιθανόλη, 4. Ακετονιτρίλιο, 5. Διμεθυλοφορμαμίδιο, 6. Ακετόνη, 7. Οξικός αιθυλεστέρας, 8. Διχλωρομεθάνιο, 9. κ-εξάνιο, 10. Μέθυλο-*t*-βουτυλο-αιθέρας, 11. Κυκλοεξάνιο, 12. Τολουόλιο (Πηγή: Wikipedia).

Αρχικά κατασκευάστηκε διάλυμα ερυθρού του Νείλου 100 µg/ml σε απόλυτη αιθανόλη (314 µM). Κατάλληλες ποσότητες από το αρχικό αυτό διάλυμα προστέθηκαν στα δείγματα (25, 50 και 100 µl) σε όγκο 10 ml, με τελική συγκέντρωση ερυθρού του Νείλου 250, 500 και 1000 ng/ml (0,79, 1,57 και 3,14 µM αντίστοιχα). Στη συνέχεια καταγράφηκε το φάσμα φθορισμού.

Κατά τη διαδικασία της φασματοσκοπίας φθορισμού χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία διέγερσης 546 nm και το φάσμα καταγράφηκε σε εύρος 550-700 nm. Η ταχύτητα

σάρωσης ήταν 120 nm/min και τα εύρη των σχισμών διέγερσης και εκπομπής ήταν 5 nm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).

Τα φάσματα καταγράφηκαν με το λογισμικό του οργάνου και στη συνέχεια εξήχθησαν σε μορφή πίνακα (ASCII). Τα δεδομένα εισήχθησαν στο Excel® (Microsoft Office Professional Plus, 2010). Οι τελικές απεικονίσεις έχουν γίνει με τη χρήση του προγράμματος Sigma Plot® v 11.0 (Systat Software, Inc., 2008).

Για τις αναλύσεις των φασμάτων τα δεδομένα εισήχθησαν στο OriginPro 8 ® (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA). Αρχικά πραγματοποιήθηκε εξομάλυνση των φασμάτων (μέθοδος Savitzky-Golay, με πολυώνυμο 2^{ου} βαθμού) και στη συνέχεια έγινε μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης για την προσαρμογή δύο κανονικών κατανομών (Gaussian) στα εξομαλυμένα φάσματα (εντολή fitpeaks). Τα αποτελέσματα εξήχθησαν σε πίνακες και εισήχθησαν στο Excel®. Οι τελικές απεικονίσεις έχουν γίνει με τη χρήση του προγράμματος Sigma Plot®.

A.2.2.6. Μετρήσεις pH

A.2.2.6.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Δαναζόλη (micro ionized): Sanofi-Aventis France
- Κυκλοσπορίνη A: RPG Life Sciences Limited, India
- Βενζολοσουλφονική κλοπιδογρέλη: Pharmathen S.A., Greece

Αντιδραστήρια:

- Γάλα μακράς διαρκείας, πλήρες, 3,5% και ημιαποβουτυρωμένο, 1,5% λιπαρά (Landesgenossenschaft Ennstal Molkerei-Betriebe, Steinach, Austria)
- Γάλα μακράς διαρκείας, άπαχο, 0% λιπαρά (ΦΑΓΕ, Μεταμόρφωση Αττικής, Ελλάδα)
- Απόλυτη αιθανόλη, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Απιονισμένο νερό

A.2.2.6.2. Οργανολογία

- Συσκευή μέτρησης pH Orion model 410A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) με ηλεκτρόδιο Schott pH electrode blue line 17 ph (Schott AG, Germany)
- Μαγνητικός αναδευτήρας

A.2.2.6.3. Μεθοδολογία

Οι μετρήσεις pH πραγματοποιήθηκαν στις τελικές φαρμακοτεχνικές μορφές σε θερμοκρασία δωματίου εις τριπλούν.

A.2.3. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ

A.2.3.1. Ποσοτικός προσδιορισμός-Προσμίξεις

A.2.3.1.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Δαναζόλη (micro ionized): Sanofi-Aventis France
- Κυκλοσπορίνη A: RPG Life Sciences Limited, India
- Βενζολοσουλφονική κλοπιδογρέλη: Pharmathen S.A., Greece

Αντιδραστήρια:

- Απόλυτη αιθανόλη, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Απιονισμένο νερό
- Νερό, βαθμού καθαρότητας HPLC, προερχόμενο από συσκευή Labconco® water pro ps. System (Kansas City, Missouri, USA).
- Ακετονιτρίλιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, E. Merck (Darmstadt, Germany).
- Μεθανόλη, βαθμού καθαρότητας HPLC, E. Merck (Darmstadt, Germany).
- Τετραϋδροφουράνιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, E. Merck (Darmstadt, Germany).
- Μονόξινο φωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4 , Riedel-de Haën (Seelze, Germany).
- Ορθοφωσφορικό οξύ, H_3PO_4 , αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Riedel-de Haën (Seelze, Germany).
- Οκτανοσουλφονικό νάτριο, $C_8H_{17}O_3SNa$, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Riedel-de Haën (Seelze, Germany).

A.2.3.1.2. Οργανολογία

- Κλίβανος σταθεροτήτων Angelatoni EKOCH Series.
- Αναλυτικός ζυγός Mettler Toledo AT20, Mettler-Toledo Inc., Columbus, USA.

Για την ανάλυση:

- Ηθμοί σύριγγας αναγεννημένης κυτταρίνης, μέγεθος πόρων 0.45 μm , μέγεθος ηθμού 25 mm, Titan®, Scientific Resources Inc. (Eatown, NJ, USA).

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία LC 1120 HPLC pump, ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού LC 1210 UV/Vis Detector, και λογισμικό Clarity® (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Melbourne, Australia).
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης Shimadzu Prominence αποτελούμενο από αντλία LC-30AD Solvent Delivery Unit, ανιχνευτή PDA SPD-M20A, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20A, θερμοστατούμενο κλίβανο CTO-20A, απαεριωτή DGU-20A3/20A5, σύστημα ελέγχου CBM-20A/20Alite, και λογισμικό LCsolution® Ver.1.2 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).
- Στήλη ODS C₁₈ (150×4.6 mm ID, 5μm) Hypersil® (ThermoQuest Inc., San Jose, USA).
- Στήλη BDS C₈ Hypersil (250×4.6 mm ID, 5μm) Hypersil® (ThermoQuest Inc., San Jose, USA).

A.2.3.1.3. Μεθοδολογία

Για την μελέτη σταθεροτήτων αρχικά κατασκευάστηκαν μητρικά αιθανολικά διαλύματα όγκου 1 l που περιείχαν κατάλληλες συγκεντρώσεις δραστικών. Αναλυτικότερα η δαναζόλη διαλύθηκε σε απόλυτη αιθανόλη με τελική συγκέντρωση 100 mg/10 ml, η κυκλοσπορίνη σε αιθανολικό διάλυμα 60% κ.ο. με τελική συγκέντρωση 100 mg/5 ml και η κλοπιδογρέλη σε αιθανολικό διάλυμα 60% κ.ο. με τελική συγκέντρωση 75 mg/5 ml ως προς τη βάση. Οι αντίστοιχοι όγκοι μεταφέρθηκαν σε κατάλληλους υάλινους περιέκτες με πλαστικό πώμα. Για να υπολογιστεί η αρχική μάζα, οι υάλινοι περιέκτες ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό πριν και μετά την πλήρωση με τα αιθανολικά διαλύματα. Στο αρχικό μητρικό διάλυμα πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός για να επιβεβαιωθεί η αρχική συγκέντρωση των διαλυμάτων. Στη συνέχεια τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε κλιβάνους σταθεροτήτων.

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες σταθερότητας περιγράφονται αναλυτικά στην Ευρωπαϊκή οδηγία CPMP/ICH/2736/99, η οποία αποτελεί υιοθέτηση της οδηγίας ICH Topic Q1A(R2). Εν συντομία χρησιμοποιήθηκαν επιταχυνόμενες συνθήκες για όλα τα προϊόντα (40 ± 2 °C - 75% RH $\pm$ 5% RH). Επιπρόσθετα για την κλοπιδογρέλη χρησιμοποιήθηκαν ενδιάμεσες (30 ± 2 °C - 65% RH $\pm$ 5% RH) και μακροπρόθεσμες συνθήκες (25 ± 2 °C - 60% RH $\pm$ 5% RH).

Οι αναλυτικές συνθήκες για την κυκλοσπορίνη και τη δαναζόλη έχουν περιγραφεί προηγουμένως στις μελέτες διαλυτότητας σε αιθανολικά διαλύματα (βλ. Α.2.1.2: Μελέτες διαλυτότητας σε αιθανολικά διαλύματα, σελ. 65).

Για την κλοπιδογρέλη η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκε στήλη BDS C8 Hypersil (250x4.6 mm ID, 5μm). Η κινητή φάση Α αποτελούνταν από ρυθμιστικό διάλυμα-μεθανόλη-τετραϋδροφουράνιο 600/385/15 και κινητή φάση Β περιείχε τα ίδια συστατικά σε αναλογία 400/585/15. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιείχε 2,5 g K_2HPO_4 και 250 mg οκτανοσουλφονικού νατρίου ανά 1000 ml. Το pH της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στο 3,5 με ορθοφωσφορικό οξύ μετά την ανάμιξη. Το πρόγραμμα ροής των κινητών φάσεων ήταν: 100% κινητή φάση Α μέχρι τα 20 min, 20% κινητή φάση Α και 80% κινητή φάση Β από τα 20 μέχρι τα 40 min και 100% κινητή φάση Α από τα 40 μέχρι τα 50 min. Η ροή ήταν 0,8 ml/min, ο όγκος έγχυσης 10 μl, η θερμοκρασία της στήλης 30 °C και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 220 nm. Ως διαλύτης για όλες τις αραιώσεις και την καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η κινητή φάση Β. Η μέθοδος ήταν ικανή να προσδιορίσει τις προσμίξεις Α, Β και D της φαρμακοποιίας, καθώς και την κλοπιδογρέλη. Οι σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης σε σχέση με την κλοπιδογρέλη για τις προσμίξεις Α, Β και D ήταν 0,21, 1,14 και 0,38 αντίστοιχα. Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς και χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα Ι.

A.2.3.2. Απώλεια μάζας

A.2.3.2.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Δαναζόλη (micro ionized): Sanofi-Aventis France
- Κυκλοσπορίνη Α: RPG Life Sciences Limited, India
- Βενζολοσουλφονική κλοπιδογρέλη: Pharmathen S.A., Greece

Αντιδραστήρια:

- Απόλυτη αιθανόλη, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Απιονισμένο νερό

A.2.3.2.2. Οργανολογία

- Αναλυτικός ζυγός Mettler Toledo AT20, Mettler-Toledo Inc., Columbus, USA.

A.2.3.2.3. Μεθοδολογία

Κατά τη μελέτη σταθερότητας των φαρμακοτεχνικών μορφών μετρήθηκε η απώλεια μάζας. Για το σκοπό αυτό ζυγίστηκαν τα δείγματα πριν και μετά την ολοκλήρωση της παραμονής τους στον κλίβανο σταθεροτήτων, σε αναλυτικό ζυγό.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως το % ποσοστό της αρχικής μάζας και απεικονίστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Sigma Plot® v 11.0 (Systat Software, Inc., 2008).

A.2.4. ΟΜΟΙΟΜΟΡΦΙΑ ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΚΑΙ

ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων ομοιομορφίας της φαρμακοτεχνικής μορφής και της βραχυπρόθεσμης σταθερότητας, στόχος ήταν η μελέτη της συγκέντρωσης σε διάφορα σημεία του απαιωρήματος των φαρμάκων στο γάλα μετά την προσθήκη των δραστικών σε χρονικό διάστημα τεσσάρων ωρών. Για το σκοπό αυτό λήφθηκαν δείγματα όγκου 0,5 ml από την επιφάνεια, τη μέση και τον πυθμένα του ποτηριού ζέσεως σε χρονικά διαστήματα 2 min, 1 h, 2 h και 4 h μετά την προσθήκη της δραστικής ουσίας. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

A.2.4.1. Αναβράζοντα δισκία

A.2.4.1.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Salospir 500 mg αναβράζοντα δισκία (Uni-pharma S.A. Φαρμακευτικά εργαστήρια, Ελλάδα).
- Σαλικυλικό οξύ (Uni-pharma S.A. Φαρμακευτικά εργαστήρια, Ελλάδα).
- Ακετυλοσαλικυλικό οξύ (Uni-pharma S.A. Φαρμακευτικά εργαστήρια, Ελλάδα).

Αντιδραστήρια:

- Μεθανόλη, βαθμού καθαρότητας HPLC, E. Merck (Darmstadt, Germany).
- Απιονισμένο νερό.
- Νερό, βαθμού καθαρότητας HPLC, προερχόμενο από συσκευή Labconco® water pro ps. System (Kansas City, Missouri, USA).
- Οξικό οξύ, παγόμορφο, CH_3COOH , αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Riedel-de Haën (Seelze, Germany).
- Υδροχλωρικό οξύ 37 %, Riedel-de Haën (Seelze, Germany).
- Γάλα μακράς διάρκειας, πλήρες, 3,5% και ημιαποβουτυρωμένο, 1,5% λιπαρά (Landesgenossenschaft Ennstal Molkerei-Betriebe, Steinach, Austria).
- Γάλα μακράς διάρκειας, άπαχο, 0% λιπαρά (ΦΑΓΕ, Μεταμόρφωση Αττικής, Ελλάδα).

A.2.4.1.2. Οργανολογία

- Φυγόκεντρος Sigma 202 MK, Laborzentrifugen GmbH, W. Germany.
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία LC 1120 HPLC pump, ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού LC 1210 UV/Vis Detector, και λογισμικό Clarity® (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Melbourne, Australia).
- Στήλη ODS C₁₈ (150×4.6 mm ID, 5μm) Hypersil® (ThermoQuest Inc., San Jose, USA).
- Θερμοστατούμενος κλίβανος Eldex CH-150 (Eldex Laboratories, Inc., Napa, CA, USA).

A.2.4.1.3. Μεθοδολογία

Τα δείγματα λήφθηκαν σύμφωνα με τα όσα προαναφέρθηκαν. Τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης (1,5 ml) και προστέθηκε 1 ml HCl 2 N, προς κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Τα μείγματα περιδινήθηκαν για 1 λεπτό και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 15 min σε ταχύτητα 15000 rpm. Το υπερκείμενο υγρό εγχύθηκε στο σύστημα χρωματογραφίας (20 μl).

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση μεθανόλης-νερού-οξικού οξέος 450:550:16. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 237 nm με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού. Η ροή ήταν 1 ml/min και η θερμοκρασία της στήλης 30 °C. Οι χρόνοι ανάσχεσης για το ακετυλοσαλικυλικό οξύ ήταν περίπου 3,8 min και για το σαλικυλικό οξύ περίπου 5,3 min. Για την καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα σε γάλα, τα οποία επεξεργάστηκαν με αντίστοιχο τρόπο. Οι καμπύλες αναφοράς ήταν γραμμικές σε περιοχή 1-40 μg/ml για το ακετυλοσαλικυλικό ($r^2=0,999$) και σε περιοχή 1-10 μg/ml για το σαλικυλικό οξύ ($r^2=0,999$). Η ανάκτηση για το ακετυλοσαλικυλικό οξύ ήταν περίπου 78%. Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς και χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα Ι.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό του χρωματογραφικού συστήματος. Οι καμπύλες αναφοράς και η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκαν στο Excel® (Microsoft Office Professional Plus, 2010).

A.2.4.2. Αιθανολικά διαλύματα

A.2.4.2.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Δαναζόλη (micro ionized): Sanofi-Aventis France
- Βενζολοσουλφονική κλοπιδογρέλη: Pharmathen S.A., Greece
- Κυκλοσπορίνη A: RPG Life Sciences Limited, India

Αντιδραστήρια:

- Γάλα μακράς διάρκειας, πλήρες, 3,5% και ημιαποβουτυρωμένο, 1,5% λιπαρά (Landesgenossenschaft Ennstal Molkerei-Betriebe, Steinach, Austria).
- Γάλα μακράς διάρκειας, άπαχο, 0% λιπαρά (ΦΑΓΕ, Μεταμόρφωση Αττικής, Ελλάδα).
- Απόλυτη αιθανόλη, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).
- Ακετονιτρίλιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, E. Merck (Darmstadt, Germany).
- Νερό, βαθμού καθαρότητας HPLC, προερχόμενο από συσκευή Labconco® water pro ps. System (Kansas City, Missouri, USA).
- Μονοξίνο φωσφορικό νάτριο, Na_2HPO_4 , Riedel-de Haën (Seelze, Germany).
- Ορθοφωσφορικό οξύ, H_3PO_4 , αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Riedel-de Haën (Seelze, Germany).

A.2.4.2.2. Οργανολογία

Για την ανάλυση:

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία LC 1120 HPLC pump, ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού LC 1210 UV/Vis Detector, και λογισμικό Clarity® (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Melbourne, Australia).
- Στήλη ODS C_{18} (150×4.6 mm ID, 5μm) Hypersil® (ThermoQuest Inc., San Jose, USA).
- Στήλη ODS C_{18} (250×4.6 mm ID, 5μm) Hypersil® (ThermoQuest Inc., San Jose, USA).
- Θερμοστατούμενος κλίβανος Eldex CH-150 (Eldex Laboratories, Inc., Napa, CA, USA).

- Φυγόκεντρος Sigma 202 MK, Laborzentrifugen GmbH, W. Germany.
- Σύστημα περιδίνησης Reax Top 2400 rpm, Heidolph Instruments GmbH & Co., Germany.

A.2.4.2.3. Μεθοδολογία

Τα δείγματα λήφθηκαν σύμφωνα με τα όσα προαναφέρθηκαν. Τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης (1,5 ml) και προστέθηκε 1 ml ακετονιτρίλιο, προς κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Το μείγμα περιδινήθηκε για 1 λεπτό και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 15 min σε ταχύτητα 15000 rpm. Το υπερκείμενο υγρό εγχύθηκε στο σύστημα χρωματογραφίας.

Οι αναλυτικές μέθοδοι που ακολουθήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στις μελέτες διαλυτότητας (βλ. Α.2.1: Μελέτες Διαλυτότητας, σελ. 63).

A.2.4.3. **Κόνεις-Διασπειρόμενα δισκία**

A.2.4.3.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Βενζολοσουλφονική κλοπιδογρέλη: Pharmathen S.A., Greece.
- Κυκλοσπορίνη Α: RPG Life Sciences Limited, India.

Έκδοχα:

- Μανιτόλη
- PVP k25
- Crospovidone

Αντιδραστήρια:

- Γάλα μακράς διαρκείας, πλήρες, 3,5% και ημιαποβουτυρωμένο, 1,5% λιπαρά (Landesgenossenschaft Ennstal Molkerei-Betriebe, Steinach, Austria).
- Γάλα μακράς διαρκείας, άπαχο, 0% λιπαρά (ΦΑΓΕ, Μεταμόρφωση Αττικής, Ελλάδα).
- Απόλυτη αιθανόλη, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).
- Ακετονιτρίλιο, βαθμού καθαρότητας HPLC, E. Merck (Darmstadt, Germany).

- Νερό, βαθμού καθαρότητας HPLC, προερχόμενο από συσκευή Labconco® water pro ps. System (Kansas City, Missouri, USA).
- Μονοξίνο φωσφορικό νάτριο, Na₂HPO₄, Riedel-de Haën (Seelze, Germany).
- Ορθοφωσφορικό οξύ, H₃PO₄, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Riedel-de Haën (Seelze, Germany).

A.2.4.3.2. Οργανολογία

Για την ανάλυση:

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία LC 1120 HPLC pump, ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού LC 1210 UV/Vis Detector, και λογισμικό Clarity® (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Melbourne, Australia).
- Στήλη ODS C₁₈ (150×4.6 mm ID, 5μm) Hypersil® (ThermoQuest Inc., San Jose, USA).
- Στήλη ODS C₁₈ (250×4.6 mm ID, 5μm) Hypersil® (ThermoQuest Inc., San Jose, USA).
- Θερμοστατούμενος κλίβανος Eldex CH-150 (Eldex Laboratories, Inc., Napa, CA, USA).
- Φυγόκεντρος Sigma 202 MK, Laborzentrifugen GmbH, W. Germany.
- Σύστημα περιδίνησης Reax Top 2400 rpm, Heidolph Instruments GmbH & Co., Germany.

A.2.4.3.3. Μεθοδολογία

Η σύσταση των κόνεων περιγράφεται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Α.2.ΙΙ: Σύσταση κόνεων κλοπιδογρέλης και κυκλοσπορίνης (ποσότητα ανά sachet).

Ουσία	Ρόλος	Βενζολοσουλφονική Κλοπιδογρέλη		Κυκλοσπορίνη	
		Ποσότητα (mg)	%	Ποσότητα (mg)	%
Δραστική	-	112,1	7,71	100	6,67
Μαννιτόλη	Αραιωτικό	1222,15	84,04	1279,25	85,33
PVP k25	Συνδετικό	45	3,09	45	3,00
Crospovidone	Αποσθρωτικό	75	5,16	75	5,00
Σύνολο		1454,25	100	1499,25	100

Η διαδικασία παραγωγής περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια. Αρχικά ζυγίζονται οι κατάλληλες ποσότητες μαννιτόλης και PVP k25 και κοσκινίζονται (600 μm). Η δραστική διαλύεται σε απόλυτη αιθανόλη και γίνεται ζύμωση σε γουδί με τα έκδοχα. Το προϊόν κοσκινίζεται εκ νέου (2 mm) και αφήνεται να στεγνώσει σε κλίβανο προς εξάτμιση της αιθανόλης (60 °C για 2 h). Το προϊόν τοποθετείται πάλι στο γουδί προς επεξεργασία, ζυγίζεται και υπολογίζεται η ποσότητα crosponidone που απαιτείται. Προστίθεται το αποσαθρωτικό και το τελικό μείγμα κοσκινίζεται εκ νέου (900 μm).

Τα διασπειρόμενα δισκία παρασκευάστηκαν με απευθείας συμπίεση των κόνεων.

Οι κόνεις και τα διασπειρόμενα προστέθηκαν σε γάλα και πραγματοποιήθηκαν μελέτες ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σύμφωνα με τις διαδικασίες που έχουν προαναφερθεί.

A.2.5. *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΕΣ

A.2.5.1. *Ασπιρίνη*

A.2.5.1.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Salospir 500 mg αναβράζοντα δισκία (Uni-pharma S.A. Φαρμακευτικά εργαστήρια, Ελλάδα).
- Σαλικυλικό οξύ (Uni-pharma S.A. Φαρμακευτικά εργαστήρια, Ελλάδα).
- Ακετυλοσαλικυλικό οξύ (Uni-pharma S.A. Φαρμακευτικά εργαστήρια, Ελλάδα).

Αντιδραστήρια:

- Μεθανόλη, βαθμού καθαρότητας HPLC, E. Merck (Darmstadt, Germany).
- Απιονισμένο νερό.
- Νερό, βαθμού καθαρότητας HPLC, προερχόμενο από συσκευή Labconco® water pro ps. System (Kansas City, Missouri, USA).
- Οξικό οξύ, παγόμορφο, CH₃COOH, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, Riedel-de Haën (Seelze, Germany).
- Υδροχλωρικό οξύ 37 %, Riedel-de Haën (Seelze, Germany).
- Γάλα μακράς διάρκειας, πλήρες, 3,5% λιπαρά (Landesgenossenschaft Ennstal Molkerei-Betriebe, Steinach, Austria).

A.2.5.1.2. Οργανολογία

- Φυγόκεντρος Sigma 202 MK, Laborzentrifugen GmbH, W. Germany.
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία LC 1120 HPLC pump, ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού LC 1210 UV/Vis Detector, και λογισμικό Clarity® (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Melbourne, Australia).
- Στήλη ODS C₁₈ (150×4.6 mm ID, 5μm) Hypersil® (ThermoQuest Inc., San Jose, USA).
- Θερμοστατούμενος κλίβανος Eldex CH-150 (Eldex Laboratories, Inc., Napa, CA, USA).

A.2.5.1.3. Μεθοδολογία

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 2 υγιείς εθελοντές. Η μελέτη ήταν ανοικτή, ελεγχόμενη, 4 περιόδων, διασταυρωτή επαναληπτικού σχεδιασμού. Κατά την πρώτη και τρίτη περίοδο χορηγήθηκε το σκεύασμα αναφοράς και κατά τη δεύτερη και τέταρτη περίοδο το ελεγχόμενο σκεύασμα. Σε όλες τις περιπτώσεις οι εθελοντές προέρχονταν από 8ωρη νηστεία και δε χορηγήθηκε τροφή μέχρι και 4 ώρες μετά τη χορήγηση. Για μια ώρα πριν και μετά τη χορήγηση δε λήφθηκαν άλλα υγρά πέρα από τα προβλεπόμενα της μελέτης. Στη συνέχεια η λήψη υγρών ήταν ελεύθερη. Δε επιτρεπόταν η λήψη καφεΐνης ή ξανθινών κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Το σκεύασμα αναφοράς ήταν το αναβράζον δισκίο ασπιρίνης σε 200 ml νερού. Το ελεγχόμενο σκεύασμα ήταν το αναβράζον δισκίο ασπιρίνης με γάλα. Για το σκοπό αυτό, τα αναβράζοντα δισκία ασπιρίνης τοποθετήθηκαν αρχικά σε 20 ml νερού και στη συνέχεια στο ποτήρι προστέθηκαν 180 ml γάλακτος. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και χορήγηση στους εθελοντές. Τα υπολείμματα των ποτηριών αναλύθηκαν και δεν ανιχνεύθηκαν ποσότητες δραστικής ουσίας.

Οι δειγματοληψίες αίματος πραγματοποιήθηκαν στα 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 360, 480, 600 και 720 min μετά τη χορήγηση. Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς περιέκτες με κατάλληλο πληρωτικό υλικό (EDTA). Ακολούθησε ήπια ανάδευση και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν άμεσα σε ταχύτητα 4000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο πλάσμα λήφθηκε και τοποθετήθηκε σε υάλινους περιέκτες των 5 ml και στη συνέχεια φυλάχθηκε σε θερμοκρασία -20 °C μέχρι την ανάλυση (2-4 ημέρες).

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα όσα έχουν περιγραφεί προηγουμένως για την ασπιρίνη (βλ. Α.2.4: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα, σελ. 81). Η μόνη διαφοροποίηση εντοπίζεται στο στάδιο την κατακρήμνισης των πρωτεϊνών στο πλάσμα. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης παρατηρήθηκε ότι η επαναληπτικότητα της στήλης μειωνόταν. Ο λόγος του προβλήματος αποδόθηκε στο υδροχλωρικό οξύ που χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση, αν και αντίστοιχο πρόβλημα δεν είχε παρατηρηθεί κατά τα πειράματα σε γάλα. Για το λόγο αυτό στα δείγματα των περιόδων 2, 3 και 4 πραγματοποιήθηκε διόρθωση του pH με NaOH, ύστερα από την προσθήκη υδροχλωρικού οξέος και της

φυγοκέντρωσης. Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς και χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα Ι.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό του χρωματογραφικού συστήματος. Οι καμπύλες αναφοράς και η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκαν στο Excel® (Microsoft Office Professional Plus, 2010). Η τελική παρουσίαση και στατιστική επεξεργασία έγινε στο Sigma Plot® v 11.0 (Systat Software, Inc., 2008).

Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι προσδιορίστηκαν με μη διαμερισματική ανάλυση. Η μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα (C_{max}) και ο χρόνος έως τη μέγιστη συγκέντρωση (t_{max}) παρατηρήθηκαν άμεσα από την επιμέρους καμπύλη συγκέντρωσης του αίματος σε σχέση με το χρόνο. Η σταθερά απομάκρυνσης k_{el} υπολογίστηκε με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των λογαριθμοποιημένων συγκεντρώσεων σε σχέση με το χρόνο των δεδομένων της τελικής φάσης. Ο χρόνος ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) υπολογίστηκε σύμφωνα με τη σχέση $t_{1/2} = \ln 2 / k_{el}$. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη της συγκέντρωσης ($AUC_{0 \rightarrow t}$), υπολογίστηκε βάσει του κανόνα των τραπεζίων. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη μέχρι το άπειρο ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) υπολογίστηκε βάσει της σχέσης $AUC_{0 \rightarrow \infty} = AUC_{0 \rightarrow t} + C_t / k_{el}$, όπου C_t είναι η τελευταία προσδιορισθείσα συγκέντρωση.

A.2.5.2. Κυκλοσπορίνη

A.2.5.2.1. Υλικά

Φάρμακα:

- Κυκλοσπορίνη Α: RPG Life Sciences Limited, India

Αντιδραστήρια:

- Γάλα μακράς διαρκείας, πλήρες, 3,5% λιπαρά (Landesgenossenschaft Ennstal Molkerei-Betriebe, Steinach, Austria).
- Απόλυτη αιθανόλη, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

A.2.5.2.2. Οργανολογία

- ARCHITECT i2000SR (Abbott Diagnostics, Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A.).

A.2.5.2.3. Μεθοδολογία

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ένα υγιή εθελοντή. Η μελέτη ήταν ανοικτή, μη ελεγχόμενη. Ο εθελοντής προερχόταν από 8ωρη νηστεία και δε χορηγήθηκε τροφή μέχρι και 4 ώρες μετά τη χορήγηση. Για μια ώρα πριν και μετά τη χορήγηση δε λήφθηκαν άλλα υγρά πέρα από τα προβλεπόμενα της μελέτης. Έπειτα η λήψη υγρών ήταν ελεύθερη. Δε επιτρεπόταν η λήψη καφεΐνης ή ξανθινών κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Το ελεγχόμενο σκεύασμα ήταν το αιθανολικό διάλυμα κυκλοσπορίνης σε γάλα. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν αρχικά 5 ml αιθανολικού διαλύματος 60 % κ.ο. που περιείχαν 100 mg κυκλοσπορίνης. Το διάλυμα προστέθηκε σε 195 ml γάλακτος και ακολούθησε ήπια ανάδευση και χορήγηση στον εθελοντή.

Οι δειγματοληψίες αίματος πραγματοποιήθηκαν στα 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 360, 480, 600 και 720 min μετά τη χορήγηση. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υάλινους περιέκτες των 5 ml και στη συνέχεια φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία -20 °C μέχρι την ανάλυση (3 ημέρες).

Η ποσοτικοποίηση της κυκλοσπορίνης και των μεταβολιτών της πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αυτοματοποιημένου αναλυτή χημειοφωταύγειας (CMIA: Chemiluminescence Microparticle Immuno Assay). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ολικό αίμα αφού προηγήθηκε ένα στάδιο επεξεργασίας. Το στάδιο αυτό περιλάμβανε την προσθήκη αντιδραστηρίου διαλυτοποίησης ολικού αίματος και στη συνέχεια αντιδραστηρίου καθίζησης ολικού αίματος. Ακολούθησε περιδίνηση για 5-10 sec και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση για 4 min σε ταχύτητα 10000 rpm. Το υπερκείμενο υγρό αφαιρέθηκε και τοποθετήθηκε στον αναλυτή.

Το εύρος ποσοτικοποίησης του αναλυτή είναι 30 ng/ml (ελάχιστη αναφερόμενη τιμή με βάση την λειτουργική ευαισθησία) έως 1500 ng/ml. Το όριο ανίχνευσης είναι μικρότερο από 25 ng/ml και η μέση ανάκτηση $100 \pm 10\%$.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό του αναλυτή. Οι καμπύλες αναφοράς και η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκαν στο Excel® (Microsoft Office Professional Plus, 2010). Η τελική παρουσίαση και στατιστική επεξεργασία έγινε στο Sigma Plot® v 11.0 (Systat Software, Inc., 2008).

Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι προσδιορίστηκαν με μη διαμερισματική ανάλυση. Η μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα (C_{max}) και ο χρόνος έως τη μέγιστη συγκέντρωση (t_{max}) παρατηρήθηκαν άμεσα από την επιμέρους καμπύλη συγκέντρωσης του αίματος σε σχέση με το χρόνο. Η σταθερά απομάκρυνσης k_{el} υπολογίστηκε με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των λογαριθμοποιημένων συγκεντρώσεων σε σχέση με το χρόνο των δεδομένων της τελικής φάσης. Ο χρόνος ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) υπολογίστηκε σύμφωνα με τη σχέση $t_{1/2} = \ln 2 / k_{el}$. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη της συγκέντρωσης ($AUC_{0 \rightarrow t}$), υπολογίστηκε βάσει του κανόνα των τραπεζίων. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη μέχρι το άπειρο ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) υπολογίστηκε βάσει της σχέσης $AUC_{0 \rightarrow \infty} = AUC_{0 \rightarrow t} + C_t / k_{el}$, όπου C_t είναι η τελευταία προσδιορισθείσα συγκέντρωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Α.3.1. ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ

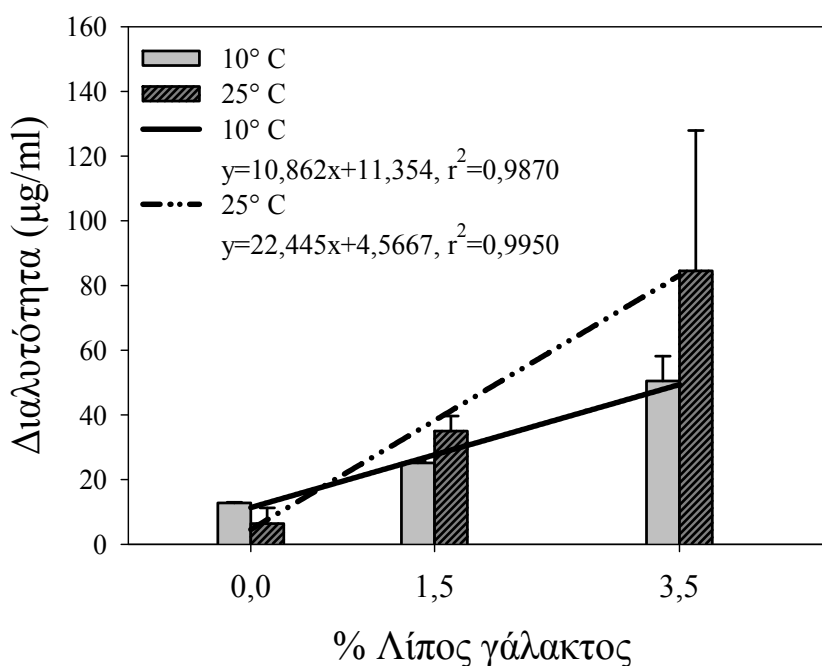
Στην ακόλουθη ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και η συζήτηση για τις μελέτες διαλυτότητας σε γάλα και σε αιθανόλη, όπου δεν υπήρχαν δεδομένα από τη βιβλιογραφία.

Α.3.1.1. *Μελέτες διαλυτότητας σε γάλα*

Οι μελέτες διαλυτότητας σε γάλα πραγματοποιήθηκαν για να μελετηθεί η δυνατότητα του γάλακτος να χρησιμοποιηθεί ως φορέας φαρμακευτικών ουσιών και να σχετιστεί η διαλυτότητα των σκευασμάτων με το ποσοστό λίπους του γάλακτος. Οι μελέτες έγιναν για τη δαναζόλη και την κλοπιδογρέλη. Μελέτες διαλυτότητας σε γάλα για την ασπιρίνη και την κυκλοσπορίνη Α έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν και δεν επαναλήφθηκαν.

Α.3.1.1.1. Διαλυτότητα Δαναζόλης στο γάλα

Στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα Α.3.1) παρουσιάζεται η διαλυτότητα κορεσμού της δαναζόλης στο γάλα υπό μορφή ραβδογράμματος, σε σχέση με το ποσοστό λίπους του γάλακτος και τη θερμοκρασία. Παράλληλα επιχειρήθηκε γραμμική συσχέτιση των αποτελεσμάτων σε σχέση με το ποσοστό λίπους (Charkoftaki et al., 2010b).



Σχήμα Α.3.1: Διαλυτότητα δαναζόλης σε σχέση με τη θερμοκρασία και το ποσοστό λίπους του γάλακτος. Οι γραμμές έχουν προκύψει από γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης στα πειραματικά δεδομένα.

Τα αποτελέσματα της διαλυτότητας της δαναζόλης στο γάλα παρουσιάζονται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.Ι).

Πίνακας Α.3.Ι: Τιμές διαλυτότητας της δαναζόλης σε γάλα διαφόρων περιεκτικοτήτων σε λίπος (0, 1,5 και 3,5 %) σε θερμοκρασίες 10 και 25 °C.

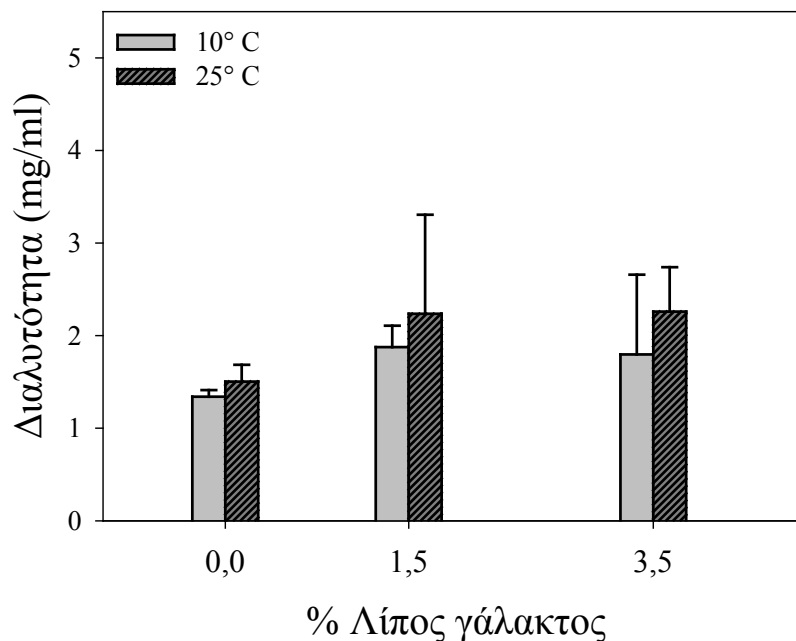
Θερμοκρασία (°C)	Διαλυτότητα (μg/ml)					
	0 % Λίπος		1,5 % Λίπος		3,5 % Λίπος	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
10	12,79	0,18	25,13	0,59	50,4	7,7
25	6,4	4,9	35,0	4,6	84	43

Όπως παρατηρούμε από τα αποτελέσματα, η διαλυτότητα της δαναζόλης είναι αυξημένη στο γάλα και αυξάνεται αναλογικά με την περιεκτικότητα του γάλακτος σε λίπος. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται τόσο στους 10 όσο και στους 25 °C. Η σύνδεση της διαλυτότητας με το ποσοστό λίπους οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα λιπίδια του γάλακτος συμβάλλουν σημαντικά στη διαλυτοποίηση της δαναζόλης. Επιπλέον, ακόμα και σε γάλα με 0 % περιεκτικότητα σε λίπος, η διαλυτότητα κορεσμού της δαναζόλης είναι αυξημένη κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με τη διαλυτότητα της σε νερό, η

οποία είναι της τάξεως του 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Sunesen et al., 2005). Το γεγονός αυτό αναδεικνύει ενδεχομένως δευτερεύον μηχανισμό διαλυτοποίησης, στον οποίο εμπλέκονται τα μικκύλια καζεΐνης. Εντούτοις θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αύξηση της διαλυτότητας σε γάλα 3,5 % στους 25 °C κατά δύο τάξεις μεγέθους σε σχέση με το νερό, δεν είναι αρκετή, καθώς απαιτούνται περίπου 1200 ml γάλακτος για να διαλύσουν την δραστική δόση των 100 mg.

A.3.1.1.2. Διαλυτότητα Κλοπιδογρέλης στο γάλα

Στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα A.3.2) παρουσιάζεται η διαλυτότητα κορεσμού της βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στο γάλα υπό μορφή ραβδογράμματος, σε σχέση με το ποσοστό λίπους του γάλακτος και τη θερμοκρασία.



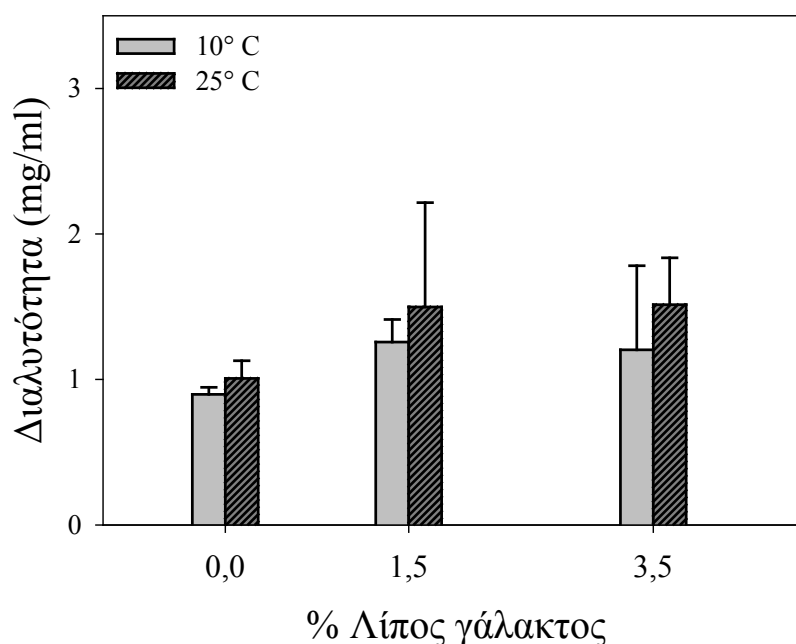
Σχήμα A.3.2: Διαλυτότητα βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης σε σχέση με τη θερμοκρασία και το ποσοστό λίπους του γάλακτος.

Τα αποτελέσματα της διαλυτότητας της βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στο γάλα παρουσιάζονται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας A.3.II).

Πίνακας Α.3.II: Τιμές διαλυτότητας της βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης σε γάλα διαφόρων περιεκτικοτήτων σε λίπος (0, 1,5 και 3,5%) σε θερμοκρασίες 10° και 25 °C.

Θερμοκρασία (°C)	Διαλυτότητα (mg/ml)					
	0% Λίπος		1,5% Λίπος		3,5% Λίπος	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
10	1,340	0,073	1,88	0,23	1,80	0,86
25	1,50	0,18	2,2	1,1	2,26	0,48

Τα προηγούμενα αποτελέσματα αναφέρονταν σε ποσότητα βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης ως προς το άλας της. Στη συνέχεια (Σχήμα Α.3.3) παρουσιάζονται τα ίδια αποτελέσματα, εκπεφρασμένα ως προς τη βάση (112,1 mg βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης αντιστοιχούν σε 75 mg βάσης κλοπιδογρέλης).



Σχήμα Α.3.3: Διαλυτότητα βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε σχέση με τη θερμοκρασία και το ποσοστό λίπους του γάλακτος.

Τα αποτελέσματα της διαλυτότητας της βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στο γάλα εκπεφρασμένα ως προς τη βάση παρουσιάζονται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.III).

Πίνακας Α.3.III: Τιμές διαλυτότητας της βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε γάλα διαφόρων περιεκτικοτήτων σε λίπος (0, 1,5 και 3,5 %) σε θερμοκρασίες 10 και 25 °C.

Θερμοκρασία (°C)	Διαλυτότητα (mg/ml)					
	0% Λίπος		1,5% Λίπος		3,5% Λίπος	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
10	0,898	0,073	1,25	0,16	1,20	0,58
25	1,01	0,12	1,50	0,72	1,51	0,32

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι η συσχέτιση της διαλυτότητας της κλοπιδογρέλης σε σχέση με το ποσοστό % λίπους του γάλακτος δεν είναι ισχυρή, σε αντίθεση με τη δαναζόλη. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στη ιοντική φύση της ουσίας. Η κλοπιδογρέλη παρουσιάζει αυξημένη διαλυτότητα σε όξινο περιβάλλον, ως εκ τούτου στο -σχεδόν ουδέτερου pH- ρυθμιστικό περιβάλλον του γάλακτος αναμένεται να έχει χαμηλότερη διαλυτότητα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τα πειραματικά αποτελέσματα. Επιπλέον η πολική φύση της ουσίας ενδεχομένως δεν ευνοεί τον εγκλεισμό της στα λιπίδια του γάλακτος. Η μικρή αύξηση της διαλυτότητας αναλογικά με το ποσοστό λίπους πιθανόν οφείλεται στη διαλυτοποίηση της μη ιοντισμένης βάσης της κλοπιδογρέλης. Εν κατακλείδι η διαλυτότητα της κλοπιδογρέλης στο γάλα είναι πολύ υψηλότερη από την αντίστοιχη της δαναζόλης και δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την περιεκτικότητα του γάλακτος σε λίπος.

A.3.1.2. Μελέτες διαλυτότητας σε αιθανολικά διαλύματα

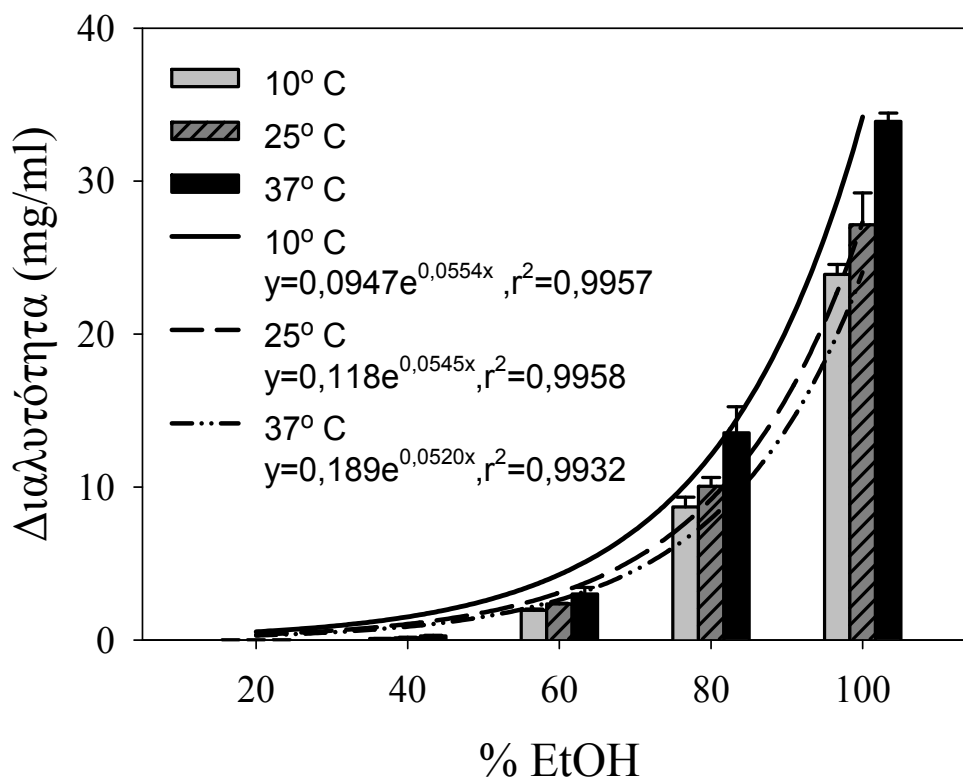
Οι μελέτες διαλυτότητας σε διαλύματα αιθανόλης-νερού πραγματοποιήθηκαν στα λιπόφιλα μόρια με σκοπό την μελέτη της επίδρασης του ποσοστού της αιθανόλης στη διαλυτότητα.

Η αιθανόλη ως οργανικός διαλύτης αναμένεται να επηρεάσει θετικά τη διαλυτότητα κορεσμού τον λιπόφιλων ουσιών.

Τα αποτελέσματα διαλυτότητας δαναζόλης και κυκλοσπορίνης σε υδαταλκοολικά διαλύματα έχουν δημοσιευτεί (Charkoftaki et al., 2010b).

A.3.1.2.1. Δαναζόλη

Στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα Α.3.4) παρουσιάζεται η διαλυτότητα κορεσμού της δαναζόλης σε υδαταλκοολικό μείγμα ως συνάρτηση του ποσοστού αιθανόλης, στους 10, 25 και 37 °C (Charkoftaki et al., 2010b).



Σχήμα Α.3.4: Διαλυτότητα δαναζόλης σε αιθανολικά διαλύματα (20-100% κ.ο.) και σε θερμοκρασίες 10, 25 και 37 °C. Οι καμπύλες έχουν προκύψει από μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης του εκθετικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα.

Τα αποτελέσματα της διαλυτότητας της δαναζόλης στα υδαταλκοολικά διαλύματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.IV).

Πίνακας Α.3.IV: Τιμές διαλυτότητας της δαναζόλης σε αιθανολικά διαλύματα (20-100% κ.ο.) και σε θερμοκρασίες 10, 25 και 37 °C.

Αιθανόλη (% κ.ο.)	Διαλυτότητα (mg/ml)					
	10 °C		25 °C		37 °C	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
20	0,002508	0,000067	0,004709	0,000075	0,00645	0,00074
40	0,0921	0,0074	0,146	0,031	0,266	0,034
60	1,932	0,082	2,349	0,052	3,01	0,42
80	8,70	0,64	10,04	0,58	13,54	1,71
100	23,90	0,65	27,15	2,08	33,91	0,54

Όπως παρατηρείται η διαλυτότητα κορεσμού της δαναζόλης αυξάνεται εκθετικά σε συνάρτηση με το ποσοστό της αιθανόλης στο διαλύτη. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τη σχέση Α.1.5 (σελ. 26), η οποία περιγράφει τη διαλυτότητα μιας ουσίας σε σύστημα συνδιαλυτών (βλ. Παράγραφο Α.1.2.2: Συνδιαλύτες, σελ. 26). Η αιθανόλη, ένας οργανικός διαλύτης πλήρως αναμίξιμος με το νερό, διαθέτει μια μικρή ανθρακική αλυσίδα, η οποία μειώνει την πολικότητα του μίγματος αιθανόλης νερού. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται η δυνατότητα του νερού να απωθεί τα λιπόφιλα μόρια και να μειώνει τη διαλυτότητά τους. Ειδικά σε απόλυτη αιθανόλη, η διαλυτότητα της δαναζόλης είναι κατά $5-10 \times 10^3$ φορές υψηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη υδατική.

Από τη μη γραμμική προσαρμογή του εκθετικού μοντέλου στα δεδομένα διαλυτότητας προκύπτει ότι για ποσοστό αιθανόλης 0%, η διαλυτότητα στο νερό είναι 94,7 $\mu\text{g/ml}$ στους 10 °C, 118 $\mu\text{g/ml}$ στους 25 °C και 189 $\mu\text{g/ml}$ στους 37 °C. Οι τιμές αυτές είναι σημαντικά υψηλότερες από τις αναφερόμενες τιμές στη βιβλιογραφία που είναι της τάξης του 0,5-1 $\mu\text{g/ml}$ (Mithani et al., 1996; Sunesen et al., 2005).

Η διαλυτότητα της δαναζόλης είναι ικανοποιητική για να διαλυθεί η θεραπευτική δόση των 100 mg σε σχετικά μικρό όγκο αλκοολικού διαλύματος, όπως φαίνεται και στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.V). Το χαρακτηριστικό αυτό μπορεί να αξιοποιηθεί περαιτέρω κατά την κατασκευή των φαρμακοτεχνικών μορφών με βάση το γάλα, ως αρχικό στάδιο διάλυσης.

Πίνακας Α.3.V: Λόγοι δόσης/διαλυτότητας (Dose/Solubility ratio – D/S) για τη δαναζόλη σε αιθανολικά διαλύματα για δόσεις 100 και 200 mg και σε θερμοκρασίες 10, 25 και 37 °C.

Αιθανόλη (% κ.ο.)	Dose/Solubility Ratio (D/S) (ml)					
	100 mg			200 mg		
	10 °C	25 °C	37 °C	10 °C	25 °C	37 °C
20	39840,64	21231,42	15503,88	79681,27	42462,85	31007,75
40	1085,78	684,93	375,94	2171,55	1369,86	751,88
60	51,76	42,57	33,20	103,52	85,14	66,40
80	11,50	9,96	7,39	23,00	19,92	14,77
100	4,18	3,68	2,95	8,37	7,37	5,90

A.3.1.2.2. Κυκλοσπορίνη

Η διαλυτότητα της κυκλοσπορίνης Α σε αιθανολικά διαλύματα συγκέντρωσης έως 40% κ.ο. έχει μελετηθεί στο παρελθόν και κρίθηκε χαμηλή για την παρασκευή αιθανολικού διαλύματος χαμηλού όγκου (Ran et al., 2001b). Η διαλυτότητα της κυκλοσπορίνης σε αιθανολικό διάλυμα 40% κ.ο. σε θερμοκρασία δωματίου ήταν περίπου 3 mg/ml.

Δεδομένου ότι σε αυτές τις συγκεντρώσεις (0-40%) η διαλυτότητα της κυκλοσπορίνης αυξανόταν αυξανόμενης της περιεκτικότητας σε αιθανόλη, κρίθηκε σκόπιμο να αυξηθεί περαιτέρω το ποσοστό αιθανόλης. Ως εκ τούτου μελετήθηκε η διαλυτότητα σε αιθανολικό διάλυμα 60% κ.ο. και βρέθηκε άνω των 60 mg/ml. Δεν επιτεύχθηκε διαλυτότητα κορεσμού καθώς η κυκλοσπορίνη διαλύθηκε ποσοτικά στο διάλυμα και το διάλυμα παρέμεινε διαυγές χωρίς ίζημα για μεγάλο χρονικό διάστημα (>7 ημέρες) σε θερμοκρασία δωματίου.

Η τιμή της διαλυτότητας κρίθηκε επαρκής για την παρασκευή διαλυμάτων και δεν πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω μελέτες. Όγκος 5 ml αιθανολικού διαλύματος 60% αρκεί για να διαλύσει τουλάχιστον 300 mg κυκλοσπορίνης.

A.3.1.2.3. Κλοπιδογρέλη

Η διαλυτότητα της κλοπιδογρέλης σε αιθανολικά διαλύματα 40 % και 60 % κ.ο. μετρήθηκε άνω των 300 mg/ml και 1000 mg/ml αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές κρίθηκαν επαρκείς για την παρασκευή διαλυμάτων και δεν πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω μελέτες, δεδομένου ότι η θεραπευτική δόση της κλοπιδογρέλης είναι 75 mg.

A.3.2. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ

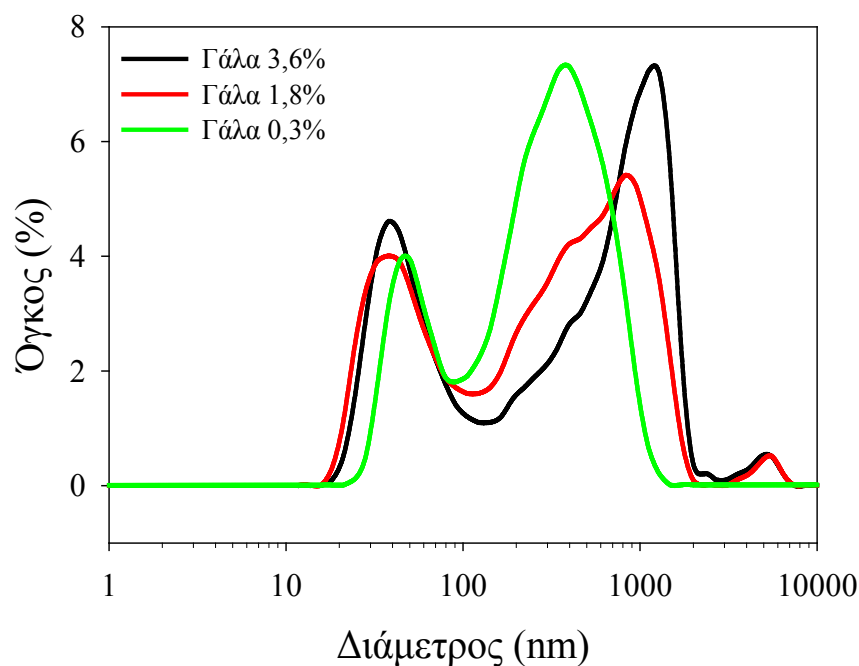
Ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των φαρμακοτεχνικών μορφών αφορά στη μελέτη του μεγέθους και της κατανομής σωματιδίων, στο ζ-δυναμικό, στο δείκτη πολυδιασποράς, στην φασματοσκοπία φθορισμού με χρήση ερυθρού του Νείλου, στην μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων και στη μέτρηση του pH.

A.3.2.1. Μέγεθος και κατανομή σωματιδίων

Το μέγεθος και η κατανομή των σωματιδίων τόσο του γάλακτος όσο και των φαρμακοτεχνικών μορφών μετρήθηκαν με την τεχνική DLS (Dynamic Light Scattering). Οι φαρμακοτεχνικές μορφές προέκυψαν από την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δραστικής ουσίας σε γάλα. Τα αποτελέσματα είναι απεικονισμένα ως κατανομές κατά όγκο σωματιδίων.

A.3.2.1.1. Γάλα

Αρχικά παρουσιάζεται η κατανομή των σωματιδίων του γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) στους 25 °C (Σχήμα A.3.5).



Σχήμα Α.3.5: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) στους 25 °C.

Όπως είναι εμφανές στο σχήμα, το γάλα περιέχει τρεις πληθυσμούς νανοσωματιδίων. Τα χαρακτηριστικά των τριών κορυφών αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.VI).

Πίνακας Α.3.VI: Χαρακτηριστικά κορυφών γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) στους 25 °C.

% Λίπος	Μέσο ζ (d.nm)	Κορυφή 1			Κορυφή 2			Κορυφή 3			Μέσο μέγεθος (d.nm)
		Μέσο Μέγεθος (d.nm)	Επιφάνεια (%)	Πλάτος (nm)	Μέσο Μέγεθος (d.nm)	Επιφάνεια (%)	Πλάτος (nm)	Μέσο Μέγεθος (d.nm)	Επιφάνεια (%)	Πλάτος (nm)	
3,6%	265,1	54,5	33,4	28,87	843,9	64,6	450,3	4737	1,9	1043	657,9
1,8%	251	48,97	32,1	22,64	617,8	66,5	393,4	5104	1,4	854,7	504,6
0,3%	240,4	54,41	22,2	17,14	395,2	77,8	223,5	0	0	0	323,5

Ο πρώτος πληθυσμός έχει μέσο μέγεθος περίπου 50 nm και είναι ανεξάρτητός του ποσοστού λίπους του γάλακτος. Η κατανομή της κορυφής είναι σχετικά στενή (πλάτος κορυφής περίπου 30 nm), αναδεικνύοντας ένα σχετικά ομοιόμορφο σε μέγεθος πληθυσμό σωματιδίων. Αντιστοιχεί στο 30% περίπου του συνολικού όγκου των

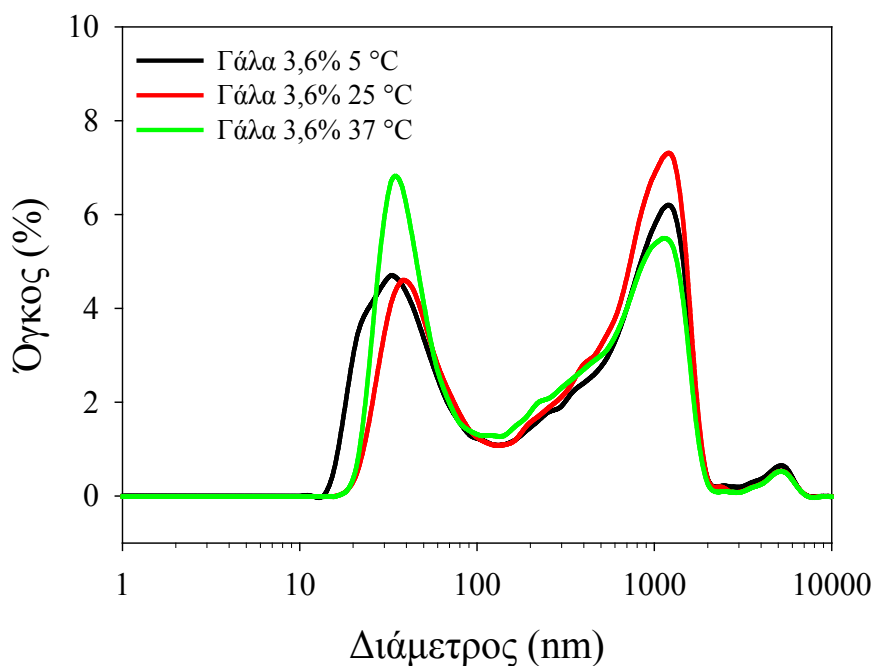
σωματιδίων. Από τα χαρακτηριστικά αποδεικνύεται ότι αυτή η κορυφή αντιστοιχεί στα μικκύλια καζεΐνης του γάλακτος. Το μέγεθος που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (10-300 nm) αντιστοιχεί στο αντίστοιχο εύρος τιμών. Επίσης είναι ανεξάρτητο του ποσοστού του λίπους, καθώς το ποσοστό της πρωτεΐνης στο γάλα είναι σταθερό.

Η δεύτερη κορυφή έχει μέσο μέγεθος που εξαρτάται από το ποσοστό του λίπους και κυμαίνεται από 850 nm για πλήρες γάλα μέχρι 400 nm για άπαχο. Η κορυφή είναι σχετικά ευρεία, ενώ αντιστοιχεί στο 65-75 % της συνολικής επιφάνειας. Είναι προφανές ότι η κορυφή αντιστοιχεί στα μικρά λιποσφαίρια του γάλακτος, τα οποία έχουν προκύψει από την ομογενοποίηση του αρχικού προϊόντος. Η ισχυρή συσχέτιση του μεγέθους με το ποσοστό του λίπους, είναι αποτέλεσμα την εντονότερης ομογενοποίησης που πραγματοποιείται στο άπαχο γάλα.

Η τρίτη κορυφή δεν παρουσιάζεται στο άπαχο γάλα. Έχει μέσο μέγεθος 5 μm περίπου και μεγάλο πλάτος. Αντιθέτως δεν καταλαμβάνει μεγάλο ποσοστό επί της συνολικής επιφάνειας. Η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στα μεγάλα λιποσφαίρια του γάλακτος, τα οποία έχουν προκύψει από τη συνένωση των μικρότερων λιποσφαιρίων. Δεδομένου ότι έχει προηγηθεί ομογενοποίηση, αυτά τα σωματίδια είναι αποτέλεσμα είτε ατελούς ομογενοποίησης είτε αποτέλεσμα της θερμοδυναμικής αστάθειας του γάλακτος. Είναι γνωστό ότι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα το λίπος του γάλακτος συσσωματώνεται στην επιφάνεια και σχηματίζει κρέμα.

Το συνολικό μέσο μέγεθος των σωματιδίων εξαρτάται από το ποσοστό λίπους, όπως φαίνεται από τα μεγέθη ζ-μέσο και μέσο μέγεθος κατά όγκο. Αυτό οφείλεται αφενός στην ύπαρξη λίπους και ως εκ τούτου λιποσφαιρίων και αφετέρου στην ηπιότερη μηχανική επεξεργασία που υπόκειται το πλήρες γάλα σε σχέση με το άπαχο.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην κατανομή των σωματιδίων του γάλακτος. Η μελέτη έγινε σε γάλα περιεκτικότητας 3,6% σε λίπος, αφού αφέθηκε ικανοποιητικό χρόνο στην αντίστοιχη θερμοκρασία (~10 min). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο ακόλουθο σχήμα.



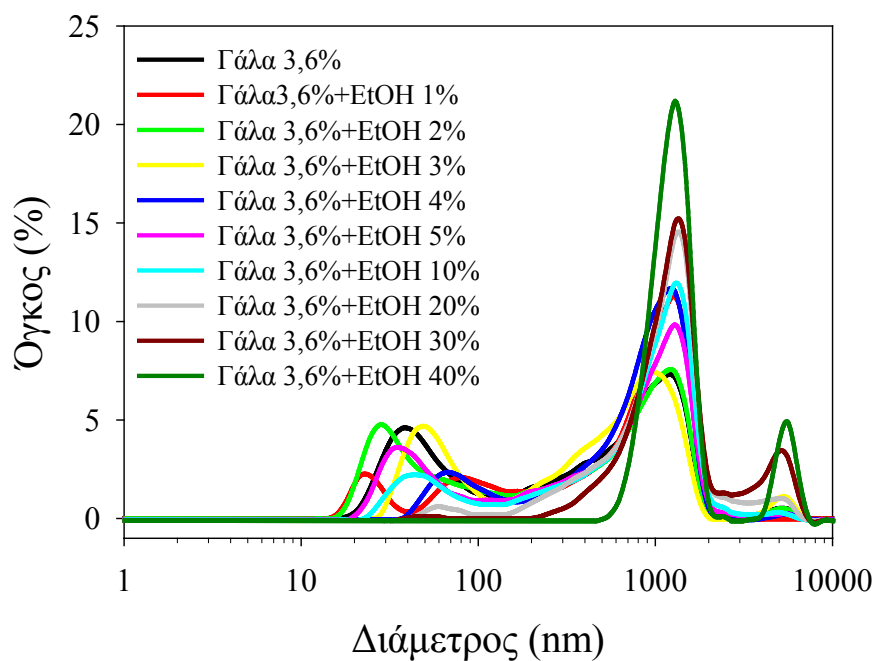
Σχήμα Α.3.6: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 3,6% σε διάφορες θερμοκρασίες (5, 25 και 37 °C)

Αποδεικνύεται ότι η θερμοκρασία δεν επηρεάζει την κατανομή των σωματιδίων. Ενδεχομένως μια μελέτη σταθερότητας κατά την οποία το γάλα θα παρέμενε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην αντίστοιχη θερμοκρασία θα είχε διαφορετικά αποτελέσματα. Εντούτοις είναι άνευ ουσίας, καθώς το γάλα μακράς διάρκειας που χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Α.3.2.1.2. Σύστημα γάλακτος-αιθανόλης

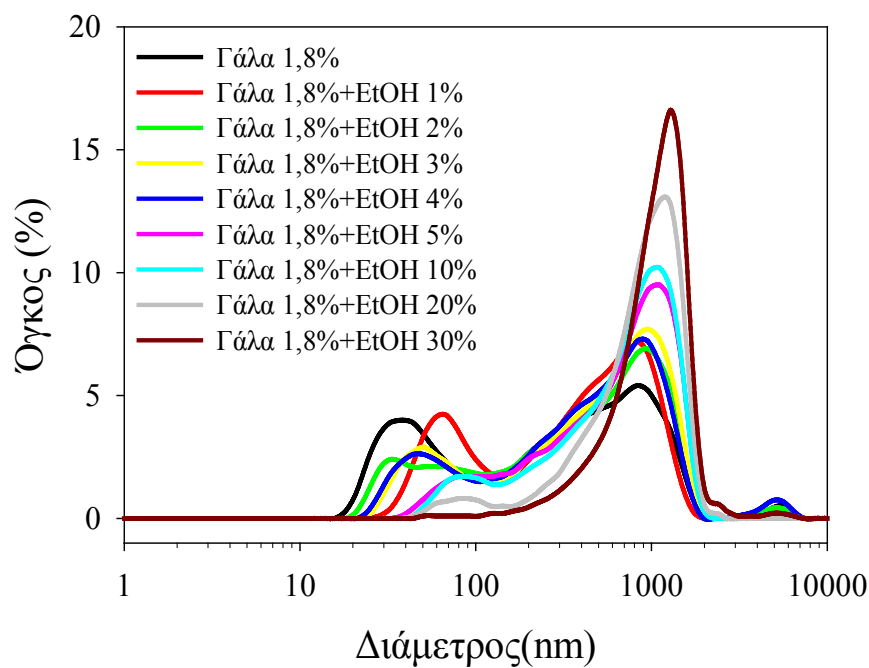
Στη συνέχεια μελετήθηκε η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων του γάλακτος ύστερα από προσθήκη αιθανόλης. Το μέγιστο ποσοστό αιθανόλης στο γάλα ήταν 50%. Δόθηκε έμφαση σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0-10%), ως εκ τούτου τα σημεία δεν είναι ισοκατανεμημένα. Σε ορισμένες περιπτώσεις κατά την προσθήκη μεγάλης ποσότητας αιθανόλης (40-50%), δεν ήταν δυνατόν να παραχθεί αποτέλεσμα, λόγω κακής ποιότητας του δείγματος (δείκτης πολυδιασποράς =1 λόγω κατακρήμνισης πρωτεϊνών).

Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το πλήρες γάλα 3,6% (Σχήμα Α.3.7).



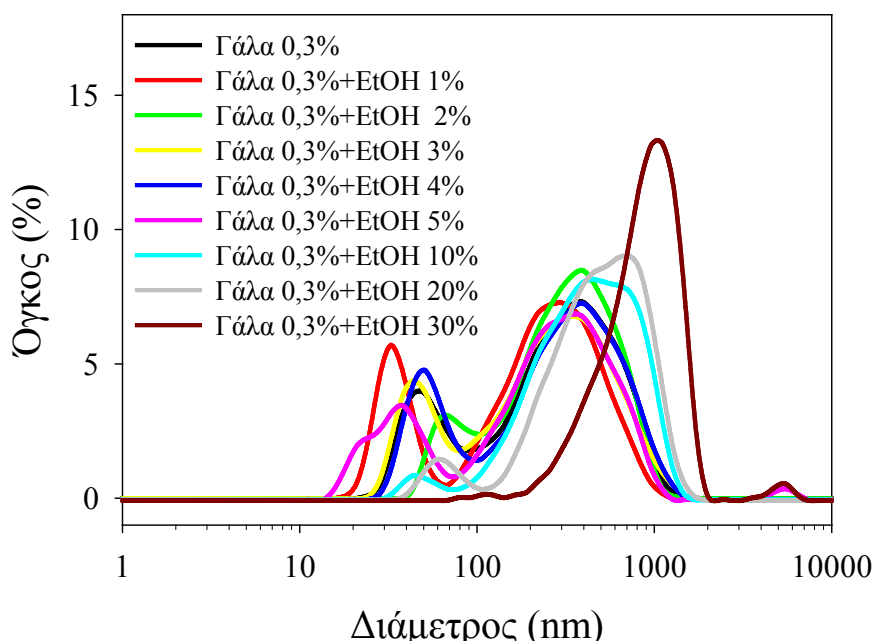
Σχήμα Α.3.7: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 3,6% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-40%) στους 25 °C. Η μέτρηση με αιθανόλη 50% δεν περιλαμβάνεται λόγω κακής ποιότητας του δείγματος.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το γάλα 1,8% (Σχήμα Α.3.8).



Σχήμα Α.3.8: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 1,8% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-30%) στους 25 °C. Οι μετρήσεις με αιθανόλη 40 και 50% δεν περιλαμβάνονται λόγω κακής ποιότητας των δειγμάτων.

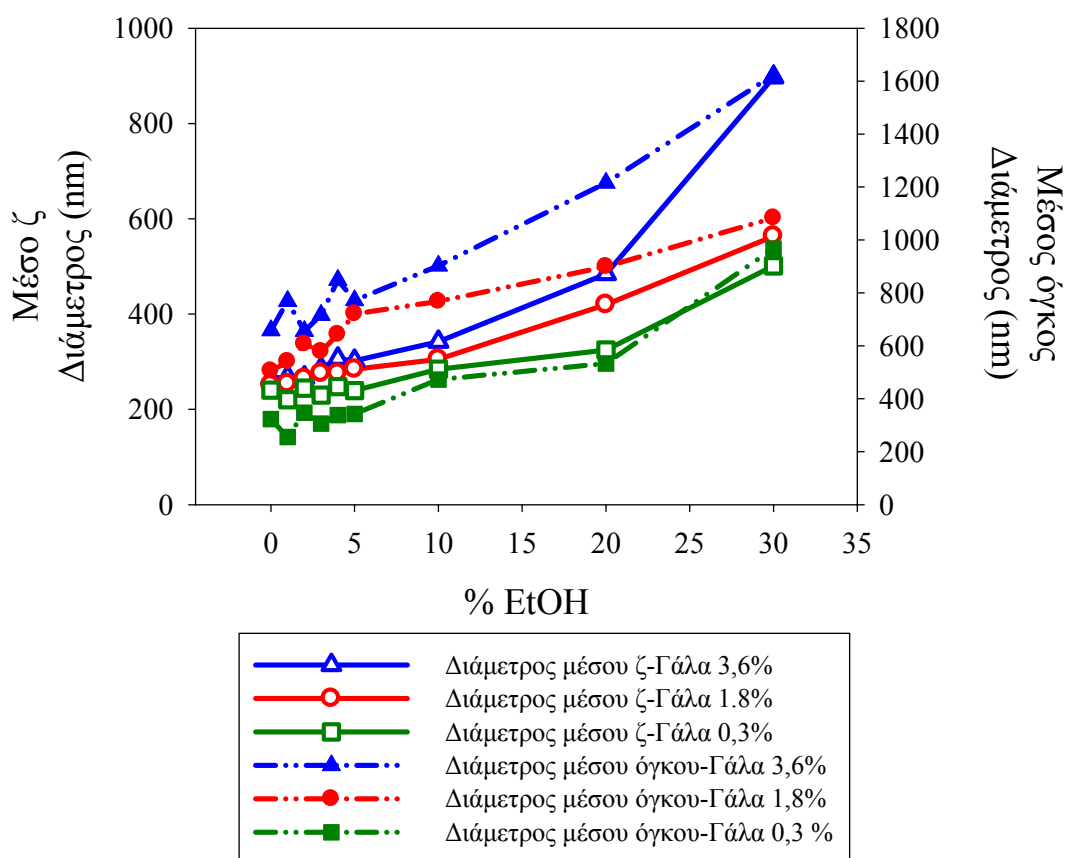
Τέλος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το γάλα 0,3% (Σχήμα Α.3.9).



Σχήμα Α.3.9: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 0,3% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-30%) στους 25 °C. Οι μετρήσεις με αιθανόλη 40 και 50% δεν περιλαμβάνονται λόγω κακής ποιότητας των δειγμάτων.

Σε όλες τις περιπτώσεις η προσθήκη μικρών ποσοτήτων αιθανόλης δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την κατανομή των σωματιδίων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται μέχρι συγκέντρωση αιθανόλης 10%. Από το σημείο αυτό περαιτέρω αύξηση οδηγεί σε σημαντική μείωση ως και εξαφάνιση της κορυφής των καζεϊνών. Παράλληλα αυξάνεται η συνολική επιφάνεια της κορυφής των λιποσφαιρίων και αυξάνεται και το μέσο μέγεθός τους. Τέλος αυξάνεται και η κορυφή των μεγάλων λιποσφαιρίων στα 5 μm ακόμα και στο άπαχο γάλα όπου απουσίαζε.

Οι σημαντικές αυτές αλλαγές αποτυπώνονται χαρακτηριστικά και στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα Α.3.10), που απεικονίζει το μέσο μέγεθος των σωματιδίων ως μέσο ζ (αριστερός άξονας, κενά σύμβολα) και ως μέση διάμετρο κατά όγκο (δεξιός άξονας, γεμάτα σύμβολα).



Σχήμα Α.3.10: Επίδραση της αιθανόλης στο μέγεθος των σωματιδίων του γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% εκφρασμένο ως προς μέσο ζ (κανονική γραμμή) και μέσο όγκο (στικτή γραμμή).

Και από αυτή την απεικόνιση αποδεικνύεται ότι το γάλα παραμένει ανεπηρέαστο σε συγκεντρώσεις αιθανόλης μέχρι 5-10%, ενώ σε μεγαλύτερες τιμές το μέσο μέγεθος των σωματιδίων αυξάνεται σημαντικά.

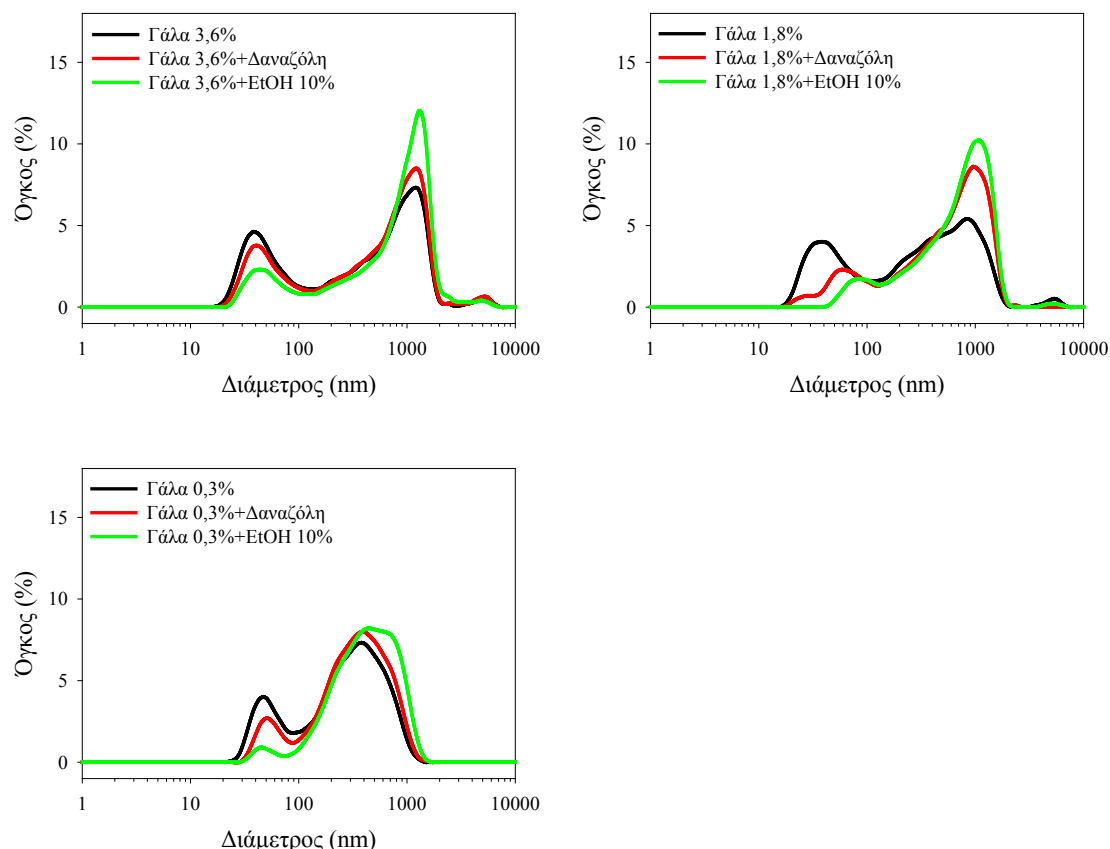
Τα φαινόμενα αυτά μπορούν να ερμηνευτούν με βάση την επίδραση της αιθανόλης στην καζεΐνη ειδικά και στις πρωτεΐνες γενικότερα. Υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης προκαλούν κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, καθώς μετουσιώνουν την τριτοταγή δομή τους, αλλοιώνοντας τις ιδιότητές τους. Είναι προφανές ότι η καζεΐνες χάνουν την ιδιότητα να σχηματίζουν μικκύλια και να είναι υδατοδιαλυτές και συσσωματώνονται. Παράλληλα τα λιποσφαίρια χάνουν τις προστατευτικές πρωτεΐνες που εμποδίζουν μηχανικά τη συνένωσή τους και με τη σειρά τους συνενώνονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας μεγαλύτερου μεγέθους σωματίδια. Το φαινόμενο αυτό κορυφώνεται με την αύξηση του μεγέθους και της συχνότητας των μεγάλων λιποσφαιρίων μεγέθους 5

μπ. Τελικά, το γάλα χάνει τη δομή του και από γαλάκτωμα υφίσταται διαχωρισμό φάσεων και μετατρέπεται σε εναιώρημα μετουσιωμένων πρωτεϊνών.

Στο σημείο αυτό οφείλει να τονιστεί το γεγονός ότι και μακροσκοπικά τα αποτελέσματα είναι αντίστοιχα. Εμφανή σημάδια κατακρήμνισης παρουσιάζονται σε συγκεντρώσεις αιθανόλης μεγαλύτερες από 30%.

A.3.2.1.3. Δαναζόλη

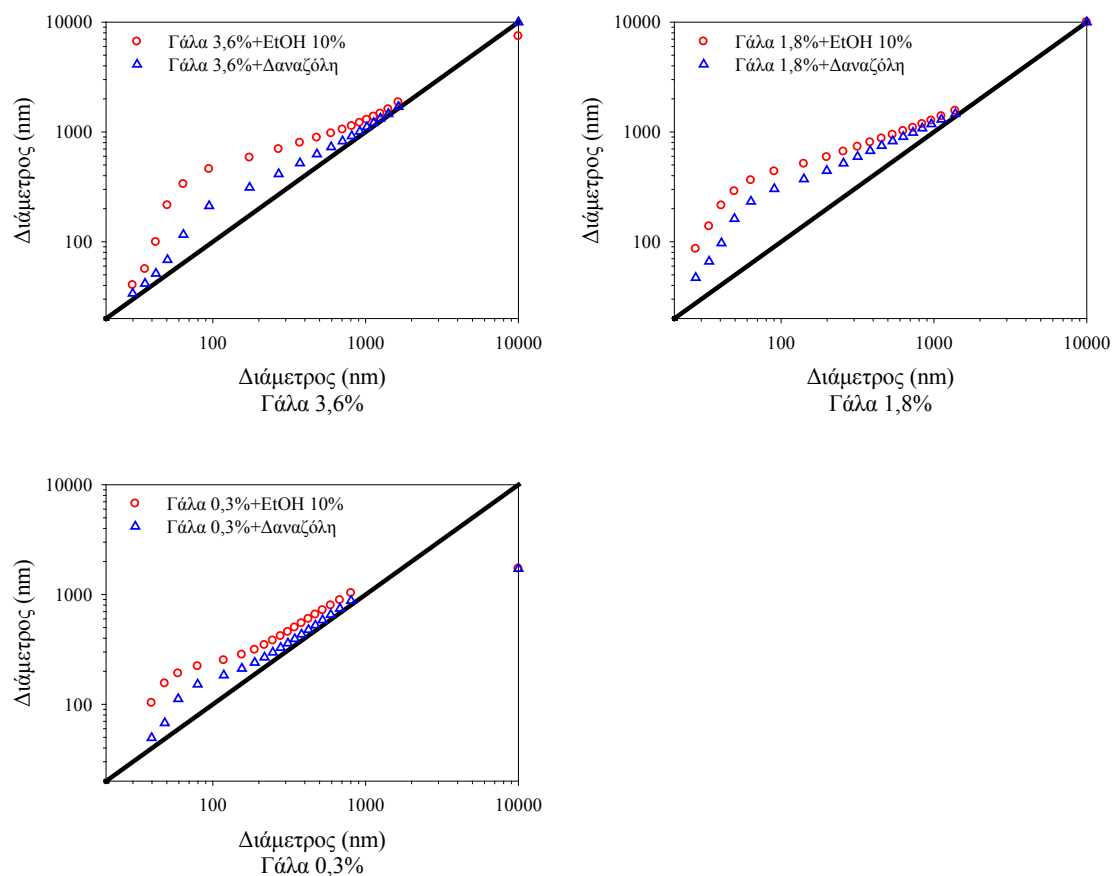
Στο ακόλουθο σχήμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μεγέθους και κατανομής σωματιδίων για τη φαρμακοτεχνική μορφή που προέκυψε από την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης σε γάλα (Σχήμα A.3.11). Ενδεικτικά παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα για το γάλα και για το γάλα με αντίστοιχη συγκέντρωση αιθανόλης (10%).



Σχήμα Α.3.11: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης στους 25 °C. Ως μέτρο σύγκρισης παρουσιάζονται οι αντίστοιχες καμπύλες ακατέργαστου γάλακτος καθώς και γάλακτος με την αντίστοιχη ποσότητα αιθανόλης.

Όπως φαίνεται από το σχήμα παρατηρούνται μικρές διαφοροποιήσεις στην κατανομή των σωματιδίων του γάλακτος, οι οποίες αφορούν στη μείωση της συνολικής επιφάνειας της κορυφής των μικκυλίων καζεΐνης που συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση της επιφάνειας των λιποσφαιρίων. Οι διαφοροποιήσεις αυτές είναι αντίστοιχες με αυτές που παρατηρούνται από την προσθήκη αιθανόλης και έχουν αναλυθεί προηγουμένως (βλ. Α.3.2.1.2: Σύστημα γάλακτος-αιθανόλης, σελ. 104). Εντούτοις οι αλλαγές ύστερα από την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης φαίνεται να είναι ηπιότερες από τις αλλαγές που προκαλεί προσθήκη αντίστοιχης συγκέντρωσης αιθανόλης. Το φαινόμενο αυτό ενδεχομένως μπορεί να αποδοθεί στην αλληλεπίδραση της λιπόφιλης δαναζόλης με το υδρόφοβο περιβάλλον των μικκυλίων καζεΐνης και των λιποσφαιρίων.

Οι διαφορές μεταξύ των κατανομών αποδίδονται χαρακτηριστικά σε διαγράμματα P-P (Percentile-Percentile Plot) στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα Α.3.13).



Σχήμα Α.3.12: Διαγράμματα P-P της κατανομής των σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης στους 25 °C. Οι ποσοστημοριακές τιμές των διαγραμμάτων αφορούν τιμές ανά 5% (20 συνολικά).

Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα P-P οι διαφορές εντοπίζονται κυρίως στην κορυφή των καζεϊνών, καθώς υπάρχει μια απόκλιση σε σχέση με την ευθεία γραμμή που υποδηλώνει πλήρη ταύτιση με την κατανομή του γάλακτος.

Η σύγκριση των κατανομών με στατιστική ανάλυση Kolmogorov-Smirnov αναδεικνύει το βαθμό της διαφοράς με σύγκριση των τιμών p. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.VII).

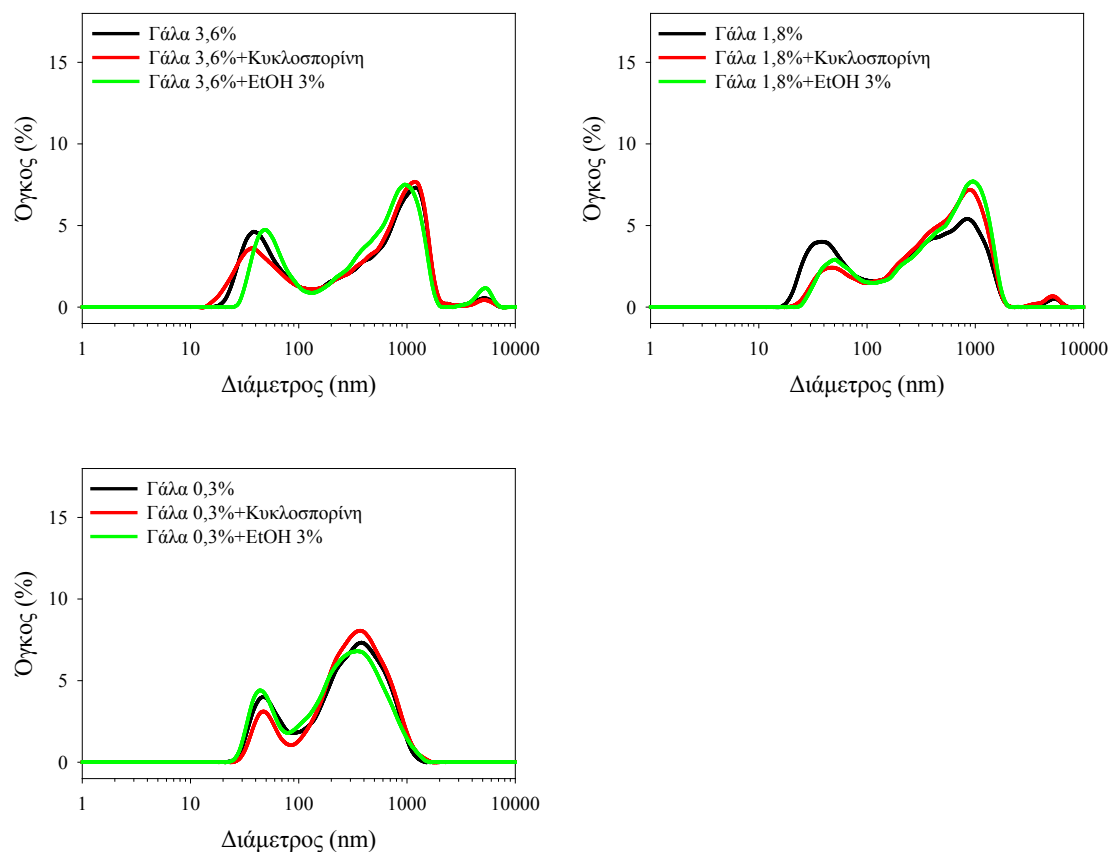
Πίνακας Α.3.VII: Τιμές p που προέκυψαν από την ανάλυση Kolmogorov-Smirnov 2 δειγμάτων στις κατανομές των σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης στους 25 °C.

	Γάλα 3,6%	Γάλα 3,6% + EtOH 10%	Γάλα 3,6% + Δαναζόλη
Γάλα 3,6%	1	-	-
Γάλα 3,6% + EtOH 10%	0,578	1	-
Γάλα 3,6% + Δαναζόλη	1	0,758	1
	Γάλα 1,8%	Γάλα 1,8% + EtOH 10%	Γάλα 1,8% + Δαναζόλη
Γάλα 1,8%	1	-	-
Γάλα 1,8% + EtOH 10%	0,276	1	-
Γάλα 1,8% + Δαναζόλη	0,411	0,758	1
	Γάλα 0,3%	Γάλα 0,3% + EtOH 10%	Γάλα 0,3% + Δαναζόλη
Γάλα 0,3%	1	-	-
Γάλα 0,3% + EtOH 10%	0,276	1	-
Γάλα 0,3% + Δαναζόλη	0,908	0,411	1

Η στατιστική επεξεργασία αποδεικνύει ότι το αιθανολικό διάλυμα δαναζόλης αλλοιώνει σε μικρότερο βαθμό την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων του γάλακτος σε σχέση με το αντίστοιχο αιθανολικό διάλυμα. Ιδιαίτερα στο γάλα 3,5 και 0,3% η κατανομή παρέμεινε ουσιαστικά αναλλοίωτη ($p>0,9$). Μεγαλύτερη επίδραση παρατηρείται στο γάλα 1,8%. Ενισχύεται επομένως η άποψη ότι η δαναζόλη δρα ενδεχομένως σταθεροποιητικά και εξομαλύνει τη δράση της αιθανόλης.

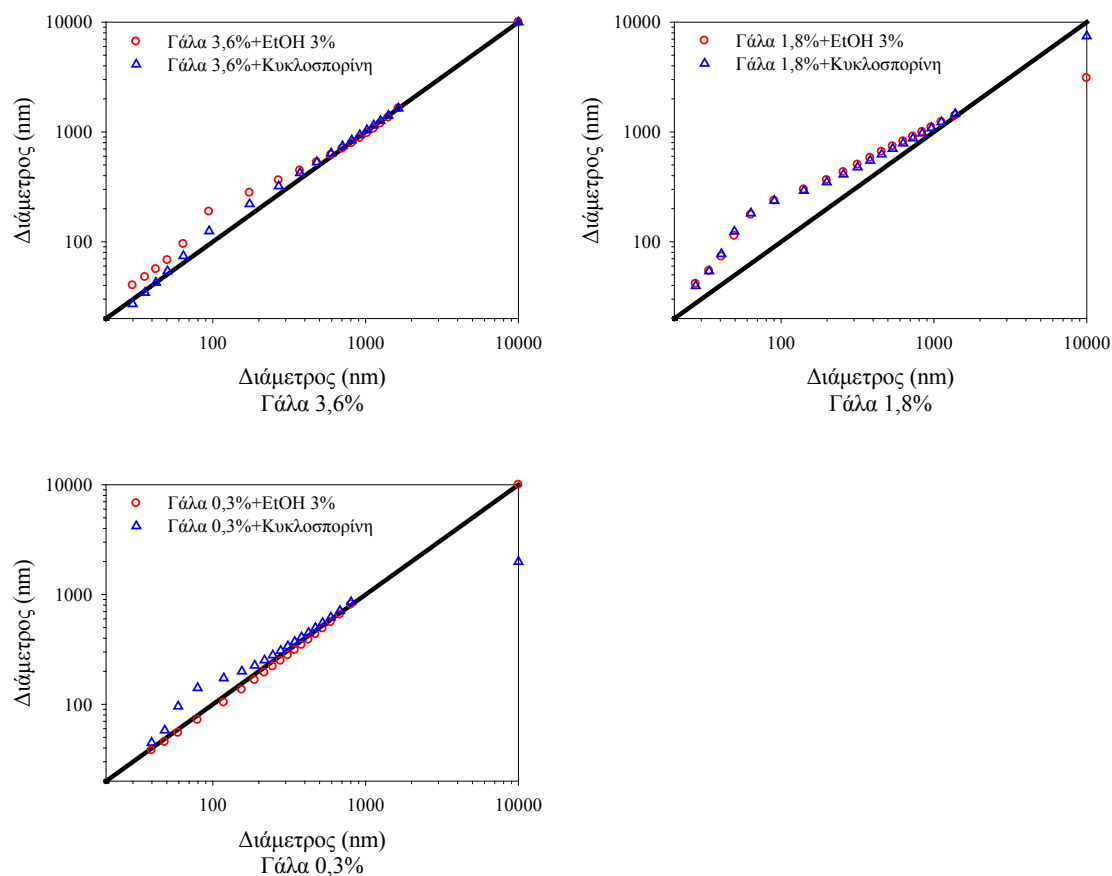
A.3.2.1.4. Κυκλοσπορίνη

Στο ακόλουθο σχήμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μεγέθους και κατανομής σωματιδίων για τη φαρμακοτεχνική μορφή που προέκυψε από την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης σε γάλα (Σχήμα Α.3.13). Ενδεικτικά παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα για το γάλα και για το γάλα με αντίστοιχη συγκέντρωση αιθανόλης (3%).



Σχήμα Α.3.13: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης Α στους 25 °C. Ως μέτρο σύγκρισης παρουσιάζονται οι αντίστοιχες καμπύλες ακατέργαστου γάλακτος καθώς και γάλακτος με την αντίστοιχη ποσότητα αιθανόλης.

Όπως φαίνεται από το σχήμα οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων είναι ουσιαστικά αμελητέες, γεγονός το οποίο οφείλεται στην μικρή ποσότητα αιθανόλης. Το αιθανολικό διάλυμα κυκλοσπορίνης. Οι μικρές διαφορές αποτυπώνονται και στα διαγράμματα P-P (Σχήμα Α.3.14).



Σχήμα Α.3.14: Διαγράμματα P-P της κατανομής των σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης Α στους 25 °C. Οι ποσοστημοριακές τιμές των διαγραμμάτων αφορούν τιμές ανά 5% (20 συνολικά).

Αντίστοιχα με τα αποτελέσματα της δαναζόλης, οι διαφορές που παρατηρούνται στο γάλα 3,6 και 0,3% είναι ασήμαντες, ενώ είναι μεγαλύτερες στο γάλα 1,8%.

Αντίστοιχα αποτελέσματα δίνει και η ανάλυση Kolmogorov-Smirnov που περιγράφεται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.VIII).

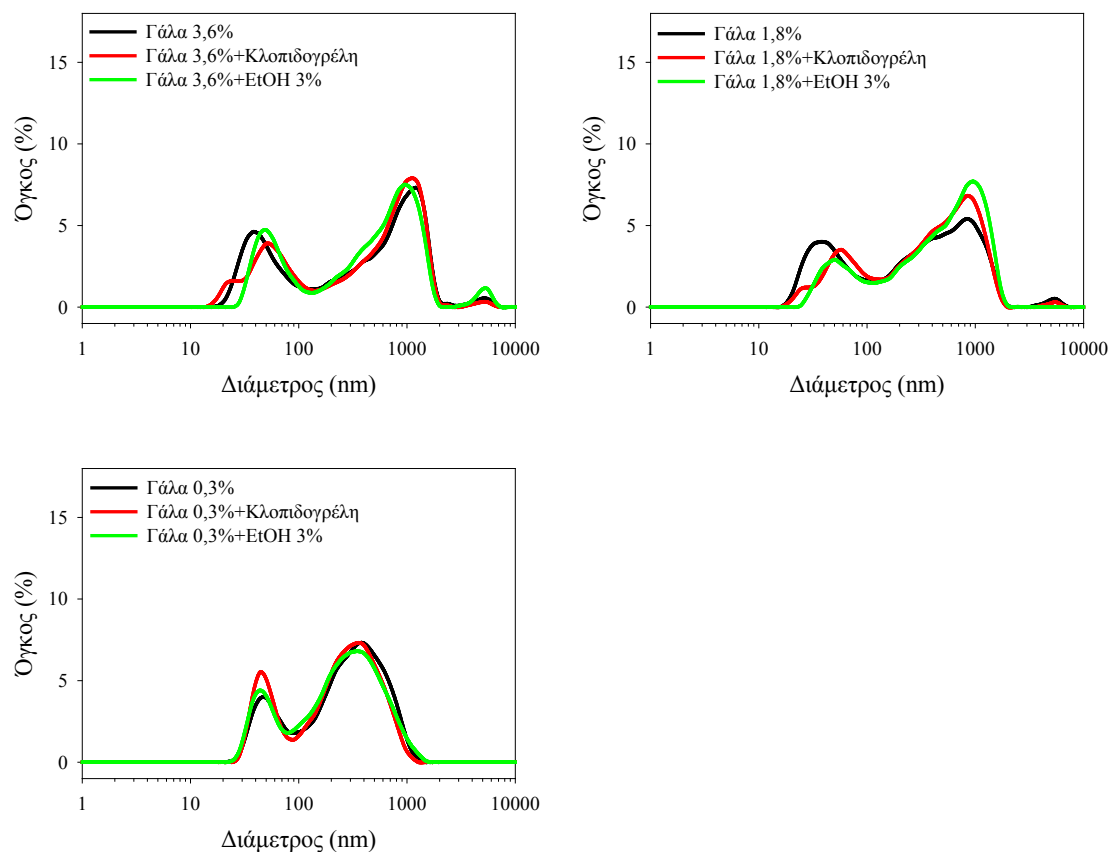
Πίνακας Α.3.VIII: Τιμές p που προέκυψαν από την ανάλυση Kolmogorov-Smirnov 2 δειγμάτων στις κατανομές των σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης Α στους 25 °C.

	Γάλα 3,6%	Γάλα 3,6% + EtOH 3%	Γάλα 3,6% + Κυκλοσπορίνη
Γάλα 3,6%	1	-	-
Γάλα 3,6% + EtOH 3%	0,908	1	-
Γάλα 3,6% + Κυκλοσπορίνη	0,985	0,758	1
	Γάλα 1,8%	Γάλα 1,8% + EtOH 3%	Γάλα 1,8% + Κυκλοσπορίνη
Γάλα 1,8%	1	-	-
Γάλα 1,8% + EtOH 3%	0,578	1	-
Γάλα 1,8% + Κυκλοσπορίνη	0,908	0,578	1
	Γάλα 0,3%	Γάλα 0,3% + EtOH 3%	Γάλα 0,3% + Κυκλοσπορίνη
Γάλα 0,3%	1	-	-
Γάλα 0,3% + EtOH 3%	1	1	-
Γάλα 0,3% + Κυκλοσπορίνη	0,908	0,908	1

Παρατηρούμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις σύγκρισης του γάλακτος πριν και μετά την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης οι τιμές p είναι μεγαλύτερες του 0,9, αποδεικνύοντας ότι η διαφορά είναι στατιστικά μη σημαντική.

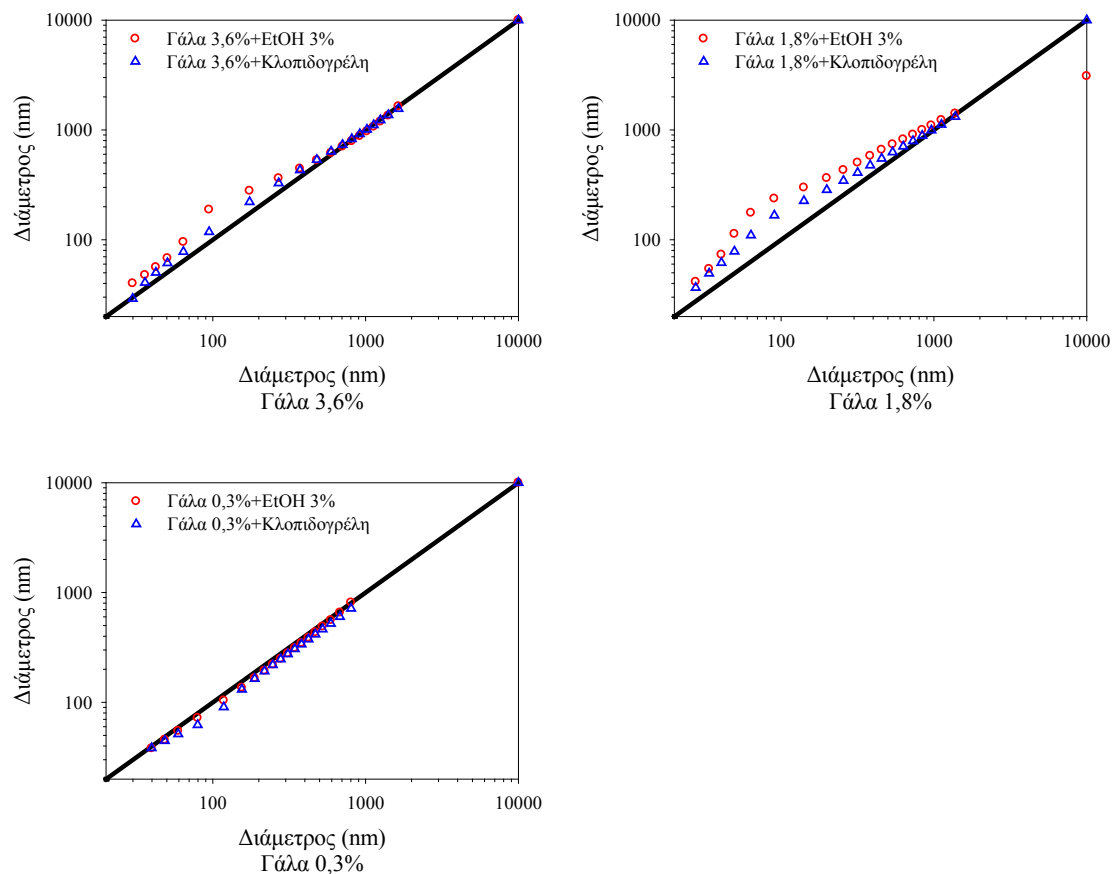
A.3.2.1.5. Κλοπιδογρέλη

Στο ακόλουθο σχήμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μεγέθους και κατανομής σωματιδίων για τη φαρμακοτεχνική μορφή που προέκυψε από την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης σε γάλα (Σχήμα Α.3.15). Ενδεικτικά παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα για το γάλα και για το γάλα με αντίστοιχη συγκέντρωση αιθανόλης (3%).



Σχήμα Α.3.15: Κατανομή σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στους 25 °C. Ως μέτρο σύγκρισης παρουσιάζονται οι αντίστοιχες καμπύλες ακατέργαστου γάλακτος καθώς και γάλακτος με την αντίστοιχη ποσότητα αιθανόλης.

Και σε αυτή την περίπτωση, όπως και στην κυκλοσπορίνη, οι αλλοιώσεις στην κατανομή των σωματιδίων είναι εξαιρετικά μικρές. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ύπαρξη μικρής ποσότητας αιθανόλης. Αντίστοιχα είναι και τα αποτελέσματα στα διαγράμματα P-P, στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα Α.3.16).



Σχήμα Α.3.16: Διαγράμματα P-P της κατανομής των σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στους 25 °C. Οι ποσοστημοριακές τιμές των διαγραμμάτων αφορούν τιμές ανά 5% (20 συνολικά).

Και σε αυτή την περίπτωση οι διαφορές είναι αμελητέες για το γάλα 3,6 και 0,3% ενώ φαίνεται να είναι μεγαλύτερες στο γάλα 1,8%. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται από την ανάλυση Kolmogorov-Smirnov που ακολουθεί (Πίνακας Α.3.IX).

Πίνακας Α.3.IX: Τιμές p που προέκυψαν από την ανάλυση Kolmogorov-Smirnov 2 δειγμάτων στις κατανομές των σωματιδίων γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στους 25 °C.

	Γάλα 3,6%	Γάλα 3,6% + EtOH 3%	Γάλα 3,6% + Κλοπιδογρέλη
Γάλα 3,6%	1	-	-
Γάλα 3,6% + EtOH 3%	0,908	1	-
Γάλα 3,6% + Κλοπιδογρέλη	1	0,985	1
	Γάλα 1,8%	Γάλα 1,8% + EtOH 3%	Γάλα 1,8% + Κλοπιδογρέλη
Γάλα 1,8%	1	-	-
Γάλα 1,8% + EtOH 3%	0,578	1	-
Γάλα 1,8% + Κλοπιδογρέλη	0,908	0,578	1
	Γάλα 0,3%	Γάλα 0,3% + EtOH 3%	Γάλα 0,3% + Κλοπιδογρέλη
Γάλα 0,3%	1	-	-
Γάλα 0,3% + EtOH 3%	1	1	-
Γάλα 0,3% + Κλοπιδογρέλη	1	1	1

Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές p που προκύπτουν μετά την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης είναι μεγαλύτερες του 0,9, αποδεικνύοντας ότι η τελική μορφή διαθέτει τα ίδια χαρακτηριστικά με το γάλα.

A.3.2.2. Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)

Ο δείκτης πολυδιασποράς μετρήθηκε παράλληλα με τις μετρήσεις μεγέθους με την τεχνική DLS.

A.3.2.2.1. Γάλα

Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το δείκτη πολυδιασποράς του εμπορικά διαθέσιμου γάλακτος (Πίνακας Α.3.X).

Πίνακας Α.3.X: Δείκτης πολυδιασποράς γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) στους 25 °C.

	Δείκτης πολυδιασποράς (±SD, n=3)
Γάλα 3,6%	0,468 (±0,022)
Γάλα 1,8%	0,374 (±0,017)
Γάλα 0,3%	0,250 (±0,008)

Όπως είναι εμφανές από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα, ο δείκτης πολυδιασποράς είναι ανάλογος της περιεκτικότητας του γάλακτος σε λίπος. Είναι προφανές ότι ο αυξημένος αριθμός των λιποσφαιρίων και το αυξημένο μέγεθός τους επηρεάζει την ανομοιογένεια του συστήματος. Αντίθετα το γάλα με μικρή περιεκτικότητα σε λίπος παρουσιάζει τιμές δείκτη πολυδιασποράς χαμηλότερες, πλησιέστερες σε αυτές ενός ιδανικού διαλύματος.

A.3.2.2.2. Σύστημα γάλακτος-αιθανόλης

Στο ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς του γάλακτος ύστερα από την προσθήκη αιθανόλης (Πίνακας A.3.IX).

Πίνακας A.3.XI: Δείκτης πολυδιασποράς γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.

% EtOH	Δείκτης πολυδιασποράς ($\pm$ SD, n=3)		
	Γάλα 3,6%	Γάλα 1,8%	Γάλα 0,3%
1	0,479 ($\pm$ 0,018)	0,379 ($\pm$ 0,020)	0,227 ($\pm$ 0,015)
2	0,458 ($\pm$ 0,047)	0,361 ($\pm$ 0,008)	0,232 ($\pm$ 0,008)
3	0,442 ($\pm$ 0,014)	0,320 ($\pm$ 0,034)	0,237 ($\pm$ 0,008)
4	0,474 ($\pm$ 0,002)	0,370 ($\pm$ 0,007)	0,247 ($\pm$ 0,017)
5	0,469 ($\pm$ 0,006)	0,352 ($\pm$ 0,043)	0,244 ($\pm$ 0,007)
10	0,471 ($\pm$ 0,058)	0,371 ($\pm$ 0,005)	0,236 ($\pm$ 0,007)
20	0,463 ($\pm$ 0,006)	0,304 ($\pm$ 0,008)	0,230 ($\pm$ 0,007)
30	0,456 ($\pm$ 0,010)	0,286 ($\pm$ 0,011)	0,250 ($\pm$ 0,016)
40	0,599 ($\pm$ 0,181)	1,000 ($\pm$ 0,000)	1,000 ($\pm$ 0,000)
50	1,000 ($\pm$ 0,000)	1,000 ($\pm$ 0,000)	1,000 ($\pm$ 0,000)

Αποδεικνύεται ότι σε συγκεντρώσεις αιθανόλης μεγαλύτερες του 30% κ.ο. ο δείκτης πολυδιασποράς επηρεάζεται σημαντικά και τελικά καταλήγει στη μέγιστη τιμή του δείκτη, ίση με τη μονάδα. Για να αναδειχθεί η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one way ANOVA) και σύγκριση με το εμπορικά διαθέσιμο γάλα αντίστοιχης περιεκτικότητας σε λίπος με τον έλεγχο Holm-Sidak). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα αναφοράς έχουν σημειωθεί με έντονη γραφή. Σε αντίθεση με τον έλεγχο t, οι τιμές P που είναι στατιστικά σημαντικές με τη μέθοδο Holm-Sidak πρέπει να είναι μικρότερες από μια κυμαινόμενη ανάλογα με το δείγμα τιμή, η οποία σε αυτή την περίπτωση είναι περίπου 0,005 (Πίνακας A.3.XII).

Πίνακας Α.3.XII: Αποτελέσματα πολλαπλών ελέγχων ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα με τη μέθοδο Holm-Sidak (Multiple ANOVA Comparisons) για γάλα περιεκτικότητας 3,6, 1,8 και 0,3% σε λίπος για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C. Ως δείγμα αναφοράς έχει χρησιμοποιηθεί το εμπορικά διαθέσιμο γάλα. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές έχουν σημειωθεί με έντονη γραφή.

% EtOH	Μη προσαρμοσμένες τιμές P		
	Γάλα 3,6%	Γάλα 1,8%	Γάλα 0,3%
1	0,824	0,752	0,010
2	0,840	0,414	0,039
3	0,601	0,002	0,127
4	0,904	0,800	0,718
5	0,984	0,173	0,472
10	0,952	0,849	0,102
20	0,920	<0,001	0,023
30	0,809	<0,001	1,000
40	0,014	<0,001	<0,001
50	<0,001	<0,001	<0,001

Η στατιστική ανάλυση αναδεικνύει το πρόβλημα της υψηλής πολυδιασποράς που παρατηρείται σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, που καθιστούν το δείγμα εναιώρημα, αυξάνοντας την ανομοιογένεια και αλλάζοντας τα φυσικοχημικά του χαρακτηριστικά. Είναι προφανές ότι σε συγκεντρώσεις αιθανόλης μεγαλύτερες από 30% ο δείκτης πολυδιασποράς διαφέρει σημαντικά από του εμπορικά διαθέσιμου προϊόντος.

A.3.2.2.3. Δαναζόλη

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του δείκτη πολυδιασποράς στο γάλα, ύστερα από την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης (Πίνακας Α.3.XIII). Παράλληλα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου t με το αντίστοιχο εμπορικά διαθέσιμο γάλα.

Πίνακας Α.3.XIII: Δείκτης πολυδιασποράς γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης στους 25 °C και σύγκριση με το εμπορικά διαθέσιμο γάλα με έλεγχο t.

	Δείκτης πολυδιασποράς ($\pm$ SD, n=3)	t-test (τιμή P)
Γάλα 3,6%	0,453 ($\pm$ 0,007)	0,323
Γάλα 1,8%	0,368 ($\pm$ 0,016)	0,679
Γάλα 0,3%	0,239 ($\pm$ 0,003)	0,090

Σε καμία από τις περιπτώσεις η προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης δεν επηρέασε σημαντικά το δείκτη πολυδιασποράς. Η μεγαλύτερη επίδραση παρατηρείται στο γάλα 0,3%, αλλά δεν είναι στατιστικά σημαντική. Επομένως η προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης δεν επηρεάζει το δείκτη πολυδιασποράς του γάλακτος.

A.3.2.2.4. Κυκλοσπορίνη

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του δείκτη πολυδιασποράς στο γάλα, ύστερα από την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης (Πίνακας Α.3.XIV). Παράλληλα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου t με το αντίστοιχο εμπορικά διαθέσιμο γάλα.

Πίνακας Α.3.XIV: Δείκτης πολυδιασποράς γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης Α στους 25 °C και σύγκριση με το εμπορικά διαθέσιμο γάλα με έλεγχο t.

	Δείκτης πολυδιασποράς ($\pm$SD, n=3)	t-test (τιμή P)
Γάλα 3,6%	0,448 ($\pm$ 0,006)	0,203
Γάλα 1,8%	0,338 ($\pm$ 0,009)	0,032
Γάλα 0,3%	0,236 ($\pm$ 0,009)	0,114

Στην περίπτωση της κυκλοσπορίνης παρατηρείται μεγαλύτερη διαφορά στις τιμές του δείκτη πολυδιασποράς πριν και μετά της προσθήκη του αιθανολικού διαλύματος με τη δραστική, η οποία στην περίπτωση του γάλακτος 1,8% είναι στατιστικά σημαντική. Το γεγονός αυτό δεν δικαιολογείται από την παρουσία της αιθανόλης, καθώς κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα (~3%). Μια προσεκτικότερη ανάγνωση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο δείκτης πολυδιασποράς εμφανίζεται ουσιαστικά μειωμένος σε σχέση με το εμπορικά διαθέσιμο γάλα, άρα η ομοιογένεια του δείγματος αυξήθηκε. Επομένως η αιθανόλη δεν φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά το γάλα και ιδιαίτερα τις πρωτεΐνες, αλλά φαίνεται να οδηγεί σε πιο ομοιογενή κατανομή του κολλοειδούς συστήματος. Ενδεχομένως η θετική αυτή επίδραση οφείλεται στην κυκλοσπορίνη.

A.3.2.2.5. Κλοπιδογρέλη

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του δείκτη πολυδιασποράς στο γάλα, ύστερα από την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος

βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης (Πίνακας Α.3.XV). Παράλληλα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου t με το αντίστοιχο εμπορικά διαθέσιμο γάλα.

Πίνακας Α.3.XV: Δείκτης πολυδιασποράς γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στους 25 °C και σύγκριση με το εμπορικά διαθέσιμο γάλα με έλεγχο t .

	Δείκτης πολυδιασποράς ($\pm$SD)	t-test (τιμή P)
Γάλα 3,6%	0,470 ($\pm$ 0,011)	0,895
Γάλα 1,8%	0,364 ($\pm$ 0,022)	0,567
Γάλα 0,3%	0,234 ($\pm$ 0,006)	0,050

Στην περίπτωση της κλοπιδογρέλης παρατηρείται μικρή επίδραση στις τιμές του δείκτη πολυδιασποράς, με εξαίρεση το γάλα 0,3%. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στη μικρή συγκέντρωση αιθανόλης (~3%). Σε αντίθεση με την κυκλοσπορίνη, δεν παρατηρείται μείωση της τιμής του δείκτη πολυδιασποράς. Πιθανόν η υδρόφιλη κλοπιδογρέλη κατανέμεται στη συνεχή υδατική φάση και δεν επηρεάζει την εσωτερική φάση των λιποσφαιρίων-καζεϊνών.

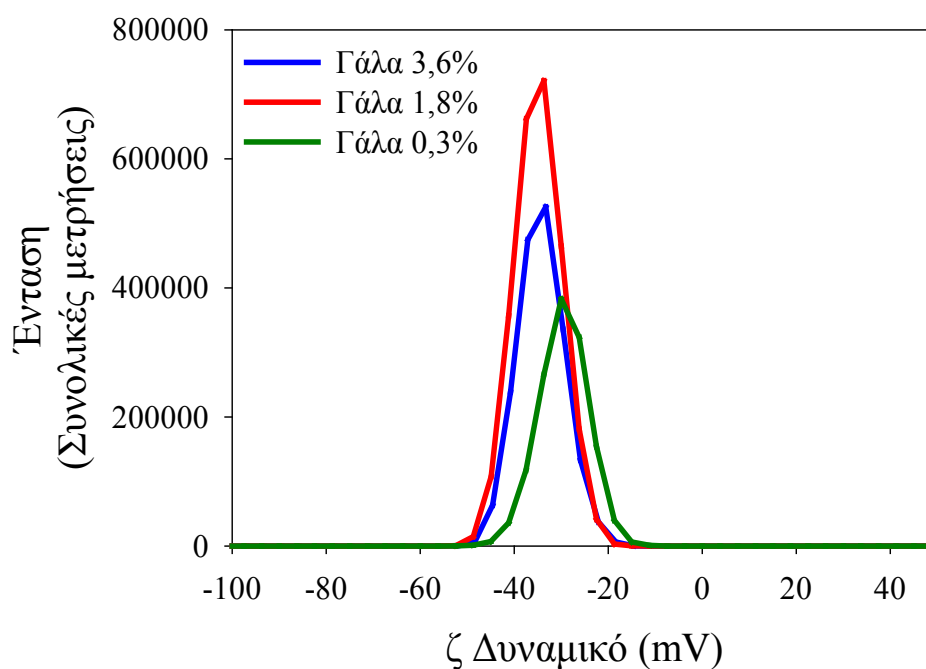
A.3.2.3. ζ-δυναμικό

Το ζ-δυναμικό των σωματιδίων του γάλακτος μετρήθηκε με την τεχνική DLS, αφού τα δείγματα είχαν προηγουμένως αραιωθεί με απιονισμένο νερό 100 φορές.

Το ζ-δυναμικό είναι μία από τις κύριες συνιστώσες που επηρεάζουν τις διασωματιδιακές αλληλεπιδράσεις. Σωματίδια με υψηλό ζ-δυναμικό του ίδιου φορτίου, είτε θετικό είτε αρνητικό, θα απωθούνται. Συμβατικά θεωρείται ότι υψηλό ζ-δυναμικό θεωρείται τιμή μεγαλύτερη από 30 mV κατά απόλυτη τιμή, δηλαδή <-30 mV και >30 mV. Αυτές οι τιμές ζ-δυναμικού σταθεροποιούν το κολλοειδές σύστημα, αποτρέποντας τη συνένωση των σωματιδίων.

A.3.2.3.1. Γάλα

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού για το εμπορικά διαθέσιμο γάλα συνοψίζονται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα Α.3.17).



Σχήμα Α.3.17: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) στους 25 °C.

Οι αναλυτικές τιμές της κατανομής του ζ-δυναμικού παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.XVI).

Πίνακας Α.3.XVI: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος για διάφορες περιεκτικότητες λίπους (3,6, 1,8 και 0,3%) στους 25 °C.

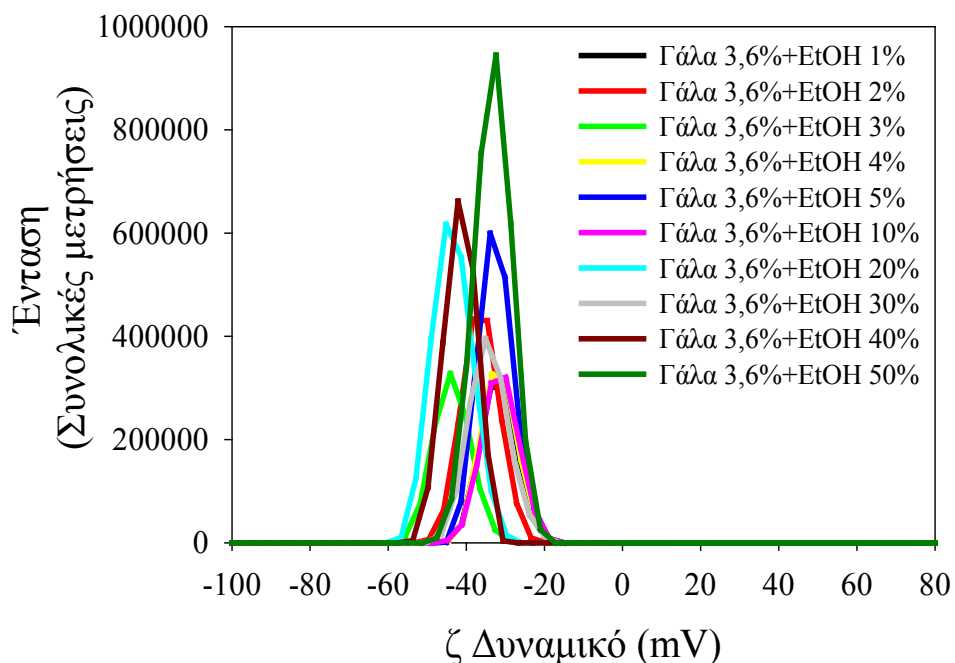
	ζ Δυναμικό (mV)	Απόκλιση ζ (mV) ²
Γάλα 3,6%	-34,2	4,84
Γάλα 1,8%	-35,0	5,67
Γάλα 0,3%	-29,7	5,24

Όπως αναδεικνύεται από τον πίνακα, το ζ-δυναμικό των σωματιδίων του γάλακτος έχει αρνητική τιμή, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Dalglish, 1984; Michalski et al., 2002). Εντούτοις το ζ-δυναμικό του γάλακτος 0,3% είναι αρκετά μικρότερο κατά απόλυτη τιμή από τα υπόλοιπα. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στη χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπιδικά συστατικά, το οποίο με τη σειρά του μειώνει κατά απόλυτη τιμή το επιφανειακό φορτίο.

² Η απόκλιση ζ εκφράζει την απόκλιση των τιμών της κατανομής από τη μέση τιμή και αποτελεί ένδειξη του εύρους της κατανομής.

A.3.2.3.2. Σύστημα γάλακτος-αιθανόλης

Στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα A.3.18) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού στο γάλα 3,6% ύστερα από την προσθήκη αιθανόλης.



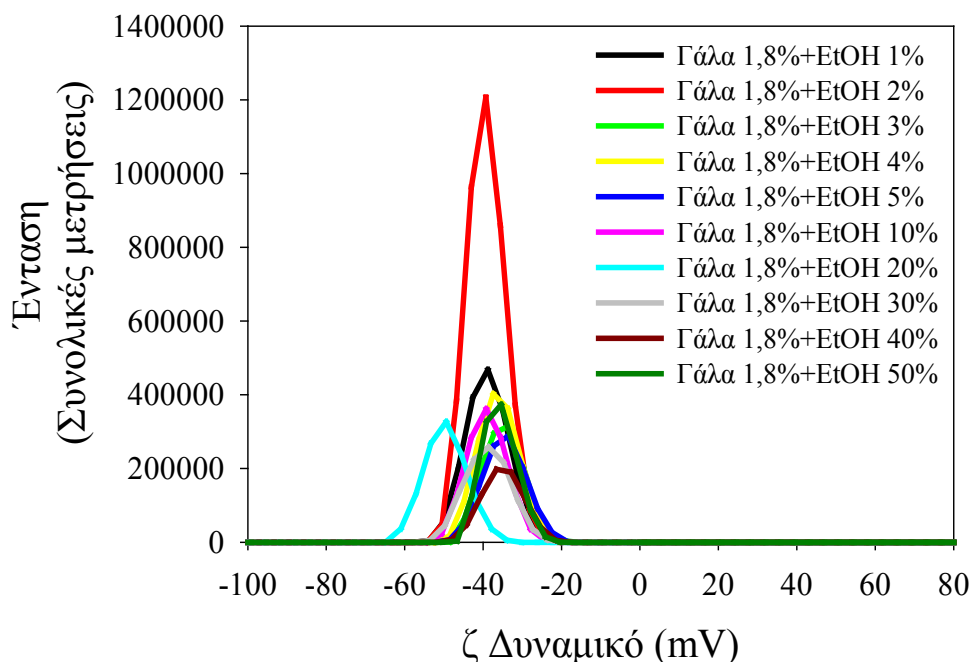
Σχήμα A.3.18: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος 3,6% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.

Οι αναλυτικές τιμές της κατανομής του ζ-δυναμικού παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας A.3.XVII).

Πίνακας A.3.XVII: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος 3,6% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.

% EtOH	ζ Δυναμικό (mV)	Απόκλιση ζ (mV)
1	-31,7	4,21
2	-32,5	4,70
3	-32,2	4,82
4	-31,6	4,50
5	-32,4	4,50
10	-31,3	4,65
20	-32,1	4,74
30	-30,4	4,92
40	-30,1	4,05
50	-29,4	4,12

Στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα Α.3.19) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού στο γάλα 1,8% ύστερα από την προσθήκη αιθανόλης.



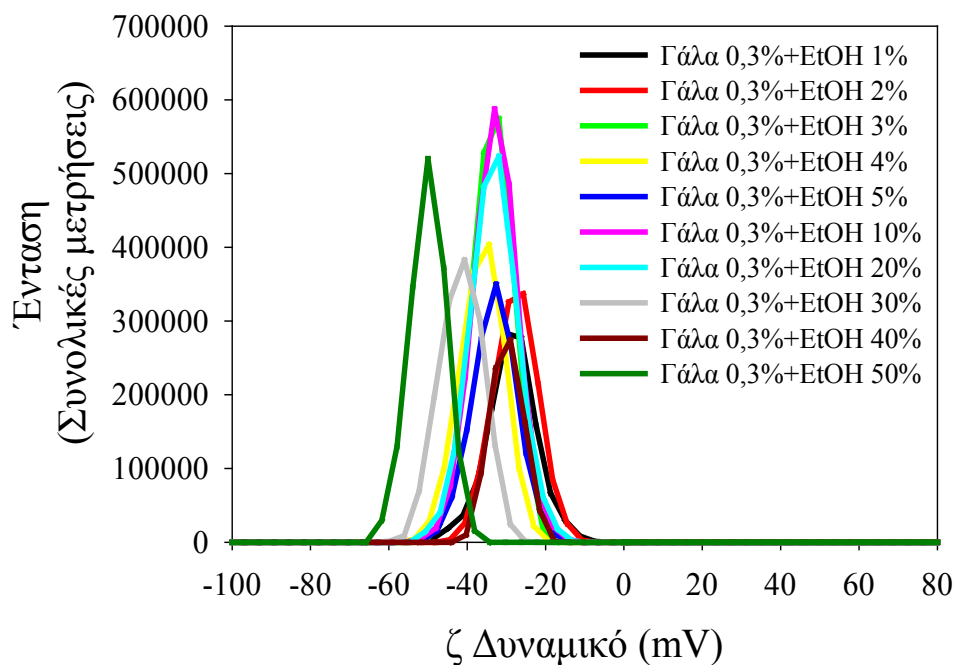
Σχήμα Α.3.19: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος 1,8% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.

Οι αναλυτικές τιμές της κατανομής του ζ-δυναμικού παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.XVIII).

Πίνακας Α.3.XVIII: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος 1,8% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.

% EtOH	ζ Δυναμικό (mV)	Απόκλιση ζ (mV)
1	-35,2	4,88
2	-35,6	4,57
3	-34,9	5,01
4	-36,0	5,07
5	-34,5	4,85
10	-35,3	4,50
20	-38,0	5,03
30	-35,1	5,87
40	-31,3	4,44
50	-32,0	4,25

Τέλος, στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα Α.3.20) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού στο γάλα 0,3% ύστερα από την προσθήκη αιθανόλης.



Σχήμα Α.3.20: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος 0,3% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.

Οι αναλυτικές τιμές της κατανομής του ζ-δυναμικού παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.XIX).

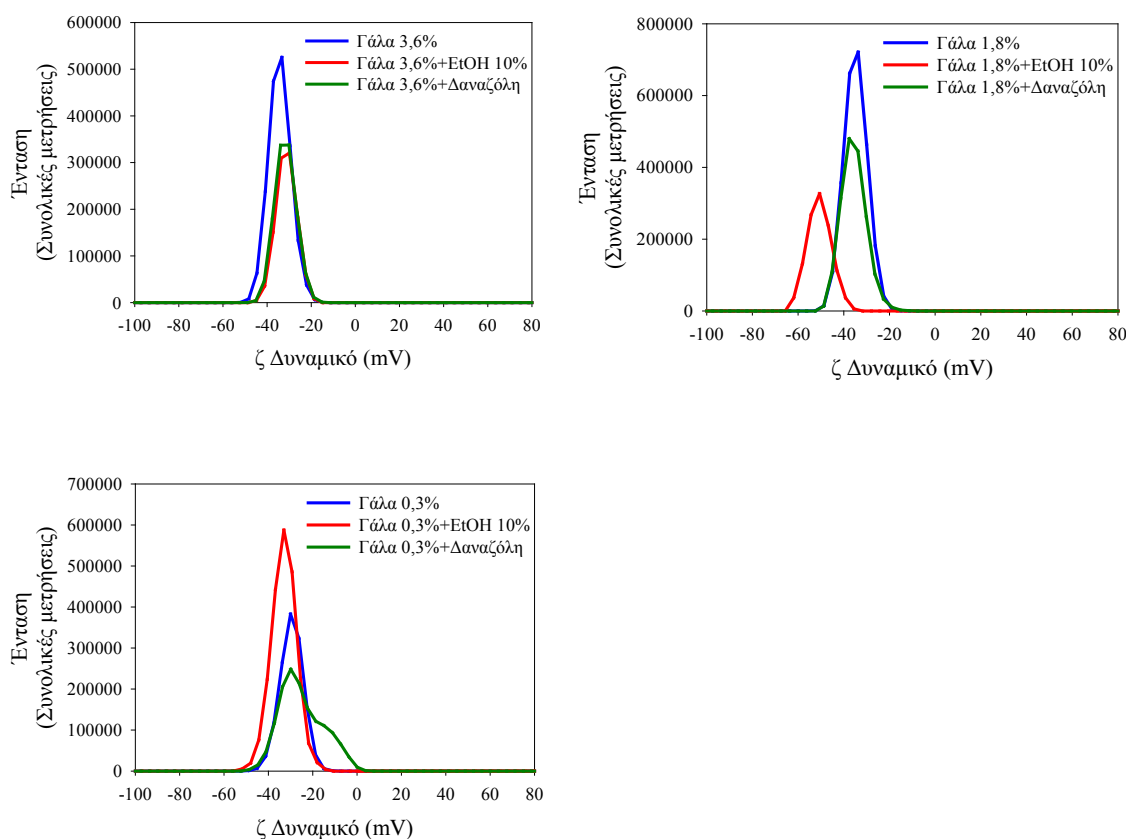
Πίνακας Α.3.XIX: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος 0,3% για διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης (0-50%) στους 25 °C.

% EtOH	ζ Δυναμικό (mV)	Απόκλιση ζ (mV)
1	-28,6	7,23
2	-27,6	5,49
3	-29,9	4,67
4	-28,6	5,17
5	-29,3	5,86
10	-29,2	5,82
20	-29,5	5,95
30	-30,0	5,46
40	-26,2	3,89
50	-30,3	4,65

Το συνολικό συμπέρασμα από τις μετρήσεις ζ-δυναμικού είναι ότι η παρουσία της αιθανόλης φαίνεται να έχει μικρή επίδραση στις τιμές του ζ-δυναμικού των σωματιδίων του γάλακτος, όπως αποδεικνύουν οι τιμές των πινάκων. Για χαμηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης αυτό το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο, καθώς η αιθανόλη δεν επηρεάζει σημαντικά την κατανομή των σωματιδίων και τη σταθερότητά τους. Σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης όμως, το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με την μακροσκοπική παρατήρηση και τα αποτελέσματα των μετρήσεων κατανομής μεγέθους. Ενδεχομένως μπορεί να αποδοθεί στα λιποσφαίρια, τα οποία εξακολουθούν να υπάρχουν, και όχι στα μικκύλια καζεΐνης, τα οποία έχουν μετουσιωθεί.

A.3.2.3.3. Δαναζόλη

Στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα Α.3.21) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων του ζ-δυναμικού μετά από την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης σε γάλα 3,6, 1,8 και 0,3% περιεκτικότητας σε λίπος.



Σχήμα Α.3.21: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος 3,6, 1,8% και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης στους 25 °C.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.XX).

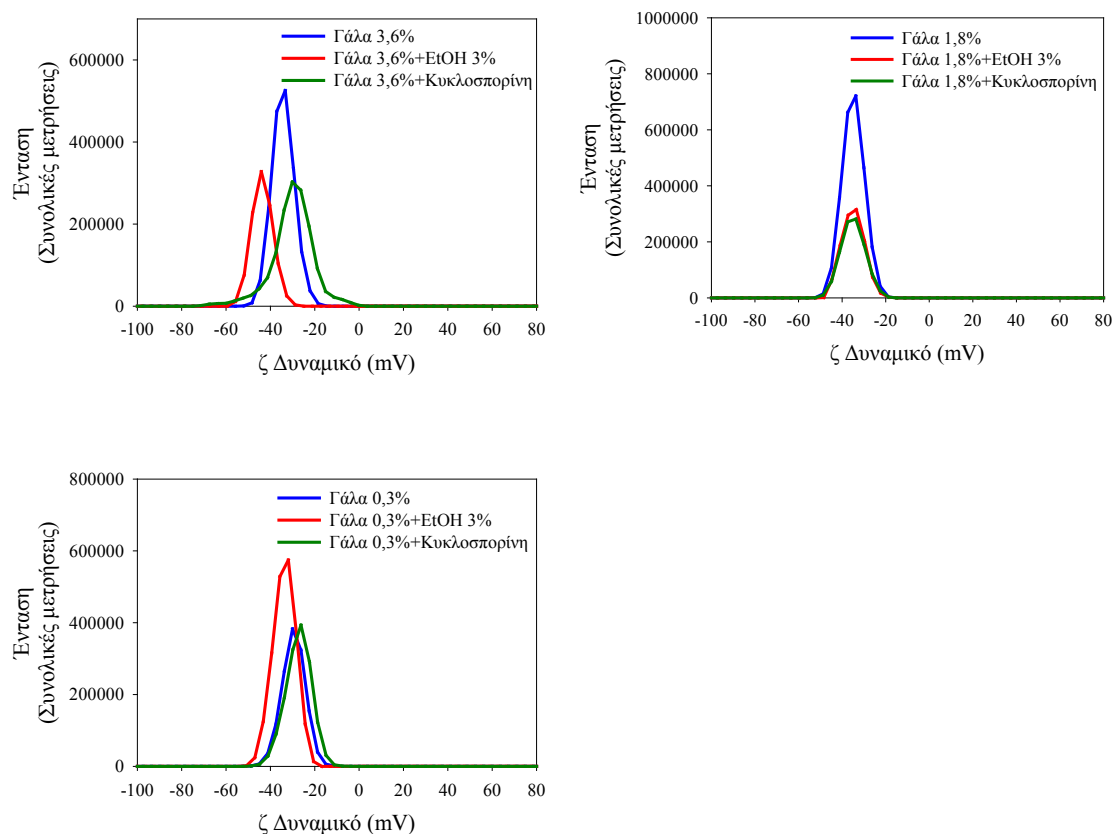
Πίνακας Α.3.ΧΧ: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος 3,6, 1,8% και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης στους 25 °C.

	ζ Δυναμικό (mV)	Απόκλιση ζ (mV)
Γάλα 3,6% + Δαναζόλη	-31,8	4,01
Γάλα 1,8% + Δαναζόλη	-35,6	4,54
Γάλα 0,3% + Δαναζόλη	-24,8	6,87

Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές με το εμπορικά διαθέσιμο προϊόν. Το γάλα περιεκτικότητας 0,3% σε λίπος διαθέτει το μικρότερο ζ-δυναμικό κατά απόλυτη τιμή. Ενδεχομένως αυτό προδιαθέτει αρνητικά για τη σταθερότητα του γαλακτώματος. Εντούτοις η τιμή είναι αντίστοιχη με του γάλακτος πριν την προσθήκη του αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης. Επιπλέον τα σωματίδια του γάλακτος σταθεροποιούνται τόσο με μηχανικές όσο με ηλεκτροστατικές απωθήσεις.

Α.3.2.3.4. Κυκλοσπορίνη

Στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα Α.3.22) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων του ζ-δυναμικού μετά από την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης σε γάλα 3,6, 1,8 και 0,3% περιεκτικότητας σε λίπος.



Σχήμα Α.3.22: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος 3,6, 1,8% και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης στους 25 °C.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.XXI).

Πίνακας Α.3.XXI: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος 3,6, 1,8% και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης στους 25 °C.

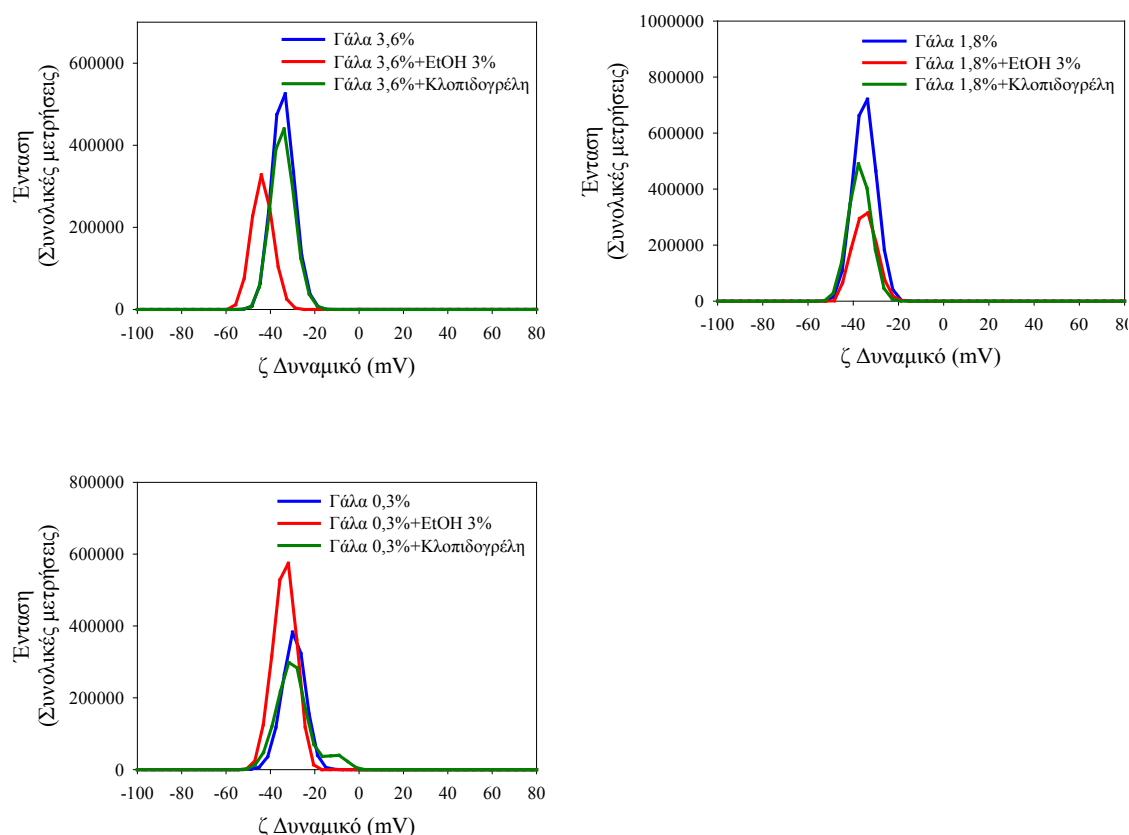
	ζ Δυναμικό (mV)	Απόκλιση ζ (mV)
Γάλα 3,6% + Κυκλοσπορίνη	-29,9	4,31
Γάλα 1,8% + Κυκλοσπορίνη	-34,8	5,08
Γάλα 0,3% + Κυκλοσπορίνη	-27,3	5,15

Και στην περίπτωση της κυκλοσπορίνης όπως στην περίπτωση της δαναζόλης, οι διαφοροποιήσεις στις τιμές του ζ-δυναμικού είναι ήσσονος σημασίας, γεγονός το οποίο αποτελεί ένδειξη σταθερότητας του τελικού προϊόντος.

Α.3.2.3.5. Κλοπιδογρέλη

Στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα Α.3.22) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων του ζ-δυναμικού μετά από την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος

βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης σε γάλα 3,6, 1,8 και 0,3% περιεκτικότητας σε λίπος.



Σχήμα Α.3.23: Κατανομή ζ δυναμικού γάλακτος 3,6, 1,8% και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στους 25 °C.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.XXII).

Πίνακας Α.3.XXII: Τιμές ζ δυναμικού γάλακτος 3,6, 1,8% και 0,3% ύστερα από προσθήκη αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης στους 25 °C.

	ζ Δυναμικό (mV)	Απόκλιση ζ (mV)
Γάλα 3,6% + Κλοπιδογρέλη	-34,4	5,13
Γάλα 1,8% + Κλοπιδογρέλη	-37,1	4,32
Γάλα 0,3% + Κλοπιδογρέλη	-24,6	7,09

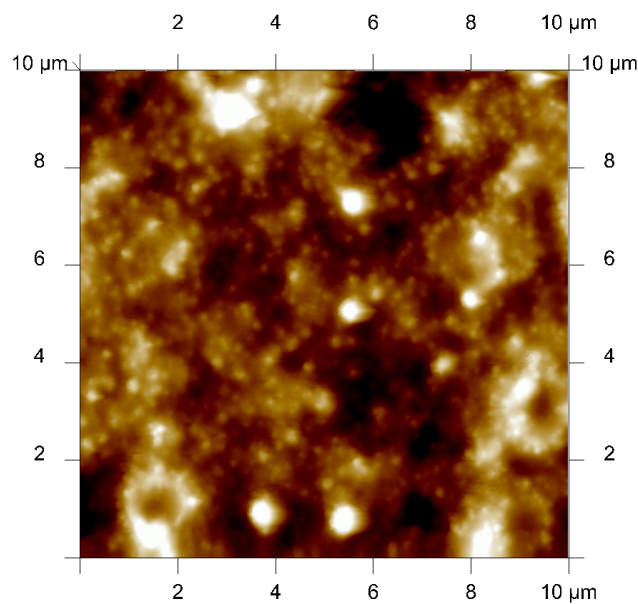
Οι τιμές του ζ-δυναμικού και σε αυτή την περίπτωση δε διαφοροποιούνται σημαντικά σε σχέση με το εμπορικά διαθέσιμο γάλα. Το γενικότερο συμπέρασμα που προκύπτει από την προσθήκη αιθανολικών διαλυμάτων δραστικών συστατικών στο γάλα είναι ότι προκύπτουν κολλοειδή συστήματα αντίστοιχων ηλεκτροστατικών ιδιοτήτων, με

αντίστοιχη σταθερότητα. Επομένως ούτε η αιθανόλη ούτε οι δραστικές που αξιοποιήθηκαν δεν επηρεάζουν το επιφανειακό φορτίο των σωματιδίων του γάλακτος.

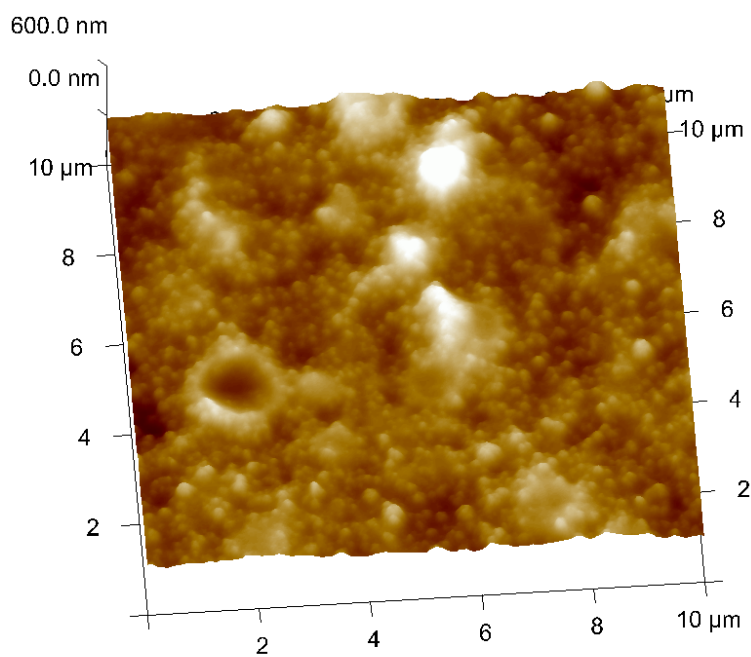
A.3.2.4. Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων

Η μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM) πραγματοποιήθηκε σε γάλα και σε γάλα που περιείχε 5% αιθανόλη, με σκοπό να μελετηθεί μικροσκοπικά η επίδραση αιθανόλης στα σωματίδια του γάλακτος. Τα δείγματα έχουν αραιωθεί 100 φορές με απιονισμένο νερό και η συνεχής φάση έχει εξατμιστεί με χρήση ρεύματος αζώτου.

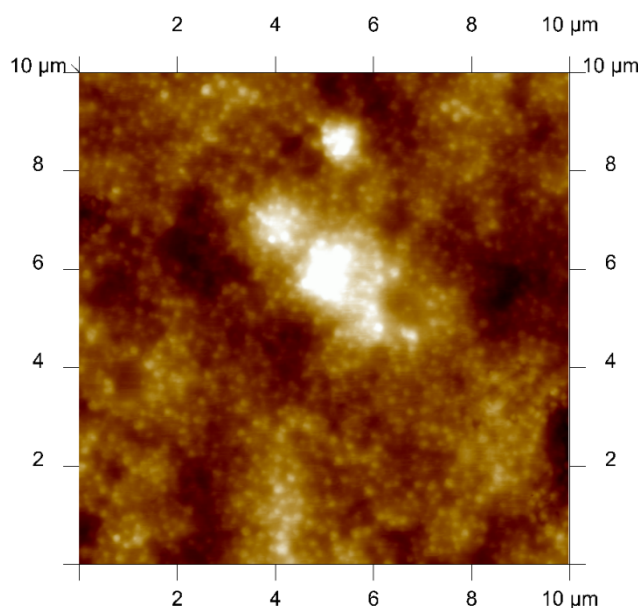
Στις ακόλουθες εικόνες παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές απεικονίσεις πλήρους γάλακτος καθώς και πλήρους γάλακτος με περιεκτικότητα αιθανόλης 5%.



Εικόνα Α.3.1: Τοπογραφική απεικόνιση γάλακτος 3,6% περιοχής $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$.



Εικόνα Α.3.2: Τρισδιάστατη τοπογραφική απεικόνιση γάλακτος 3,6% περιοχής $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$.



Εικόνα Α.3.3: Τοπογραφική απεικόνιση γάλακτος 3,6% που περιέχει αιθανόλη 5% περιοχής 10μm×10μm.

Τα σφαιρικά σταγονίδια του λίπους, γνωστά ως λιποσφαίρια καθώς και τα μικκύλια καζεΐνης είναι τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά του γάλακτος. Τα συγκεκριμένα σωματίδια απεικονίζονται χαρακτηριστικά στις εικόνες που προέκυψαν από μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων.

Οι μικρογραφίες δείχνουν μικρές σφαιρικές δομές με μέση διάμετρο περίπου 120 nm, τα οποία πιθανότατα είναι τα μικκύλια καζεΐνης, και άλλες, πολύ μεγαλύτερες, σφαιρικές δομές με μέση διάμετρο μέχρι 800 nm, τα οποία είναι επίσης συνεπή με τη δομή και το μέγεθος των λιποσφαιρίων. Τα μικκύλια εντοπίζονται κοντά στην επιφάνεια των λιποσφαιρίων, σχηματίζοντας ένα τόξο γύρω από αυτά τα σφαιρικά σταγονίδια. Επιπλέον, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση AFM συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με τα δεδομένα που προκύπτουν από τις μετρήσεις κατανομής και μεγέθους σωματιδίων.

Επομένως η ανάλυση με μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων αποδεικνύει μη ανιχνεύσιμη επίδραση της αιθανόλης στα δομικά συστατικά του γάλακτος.

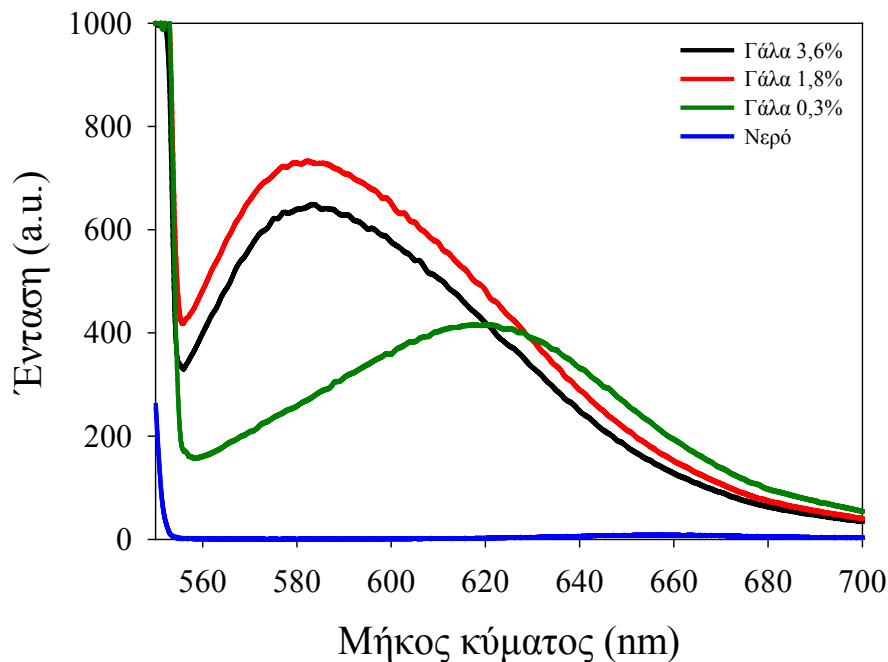
A.3.2.5. Φασματοσκοπία φθορισμού

Η φασματοσκοπία φθορισμού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του δείκτη ερυθρό του Νείλου (Nile Red). Πρόκειται για μία λιπόφιλη ουσία, που δεν φθορίζει στο νερό. Αντιθέτως φθορίζει έντονα σε λιπόφιλο περιβάλλον και το φάσμα εκπομπής της

επηρεάζεται από τη φύση του διαλύτη που έχει κατανεμηθεί. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως solvatochromism. Τα πειράματα αυτά αποτελούν ένα μη παρεμβατικό τρόπο μελέτης της συμπεριφοράς μιας λιπόφιλης ουσίας στο γάλα (Greenspan and Fowler, 1985; Jores et al., 2005).

A.3.2.5.1. Γάλα

Στο ακόλουθο σχήμα παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής του ερυθρού του Νείλου σε νερό και στα εμπορικά διαθέσιμα γάλατα περιεκτικότητας 3,6, 1,8 και 0,3% σε λίπος (Σχήμα A.3.24).



Σχήμα A.3.24: Φάσματα φθορισμού εκπομπής νερού και γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% περιεκτικότητας σε λίπος. Όλα τα δείγματα περιέχουν 500 ng/ml ερυθρό του Νείλου.

Όπως είναι αναμενόμενο, το φάσμα φθορισμού του ερυθρού του Νείλου στο νερό είναι εξαιρετικά αδύναμο και μετατοπισμένο προς το ερυθρό (βαθυχρωμία). Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής είναι περίπου 660 nm.

Αντιθέτως τα φάσματα εκπομπής σε γάλα είναι πολύ ισχυρότερα (υπερχρωμία) και μετατοπισμένα προς το κυανό (υψοχρωμία). Τα δείγματα παρουσιάζουν παρόμοια φασματική θέση και μορφή, ωστόσο το γάλα περιεκτικότητας 1,8% σε λίπος εμφανίζει υπερχρωμία σε σχέση με το γάλα περιεκτικότητας 3,6% σε λίπος. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός ότι το ερυθρό του Νείλου εισχωρεί βαθύτερα στα μικκύλια

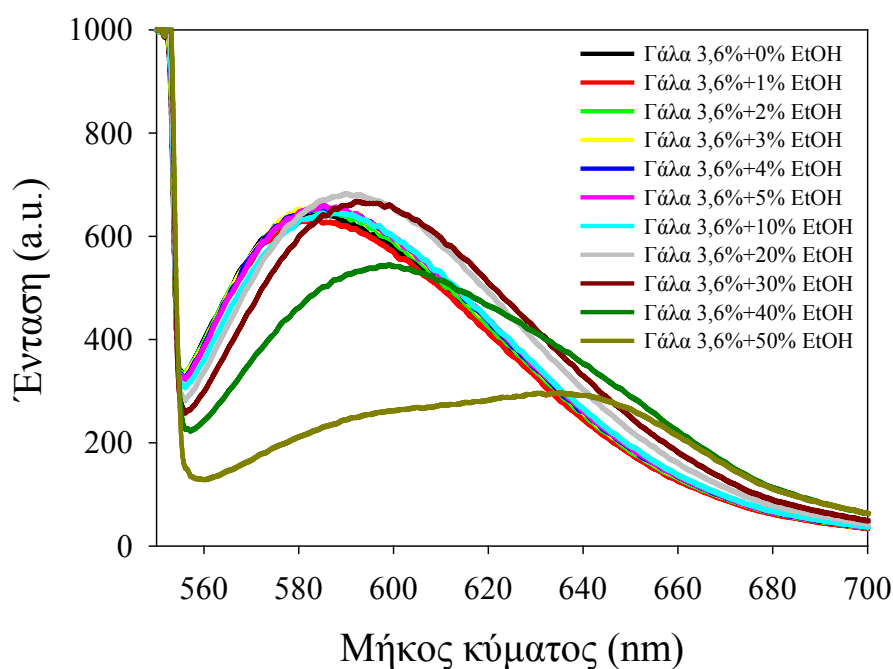
καζεΐνης ή τα λιποσφαίρια στο ημιαποβουτυρωμένο γάλα σε σχέση με το πλήρες, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο εκτεθειμένο στο νερό της συνεχούς φάσης. Ένα άλλο ενδεχόμενο είναι η διαφορετική κατανομή του δείκτη στην επιφάνεια των λιποσφαιρίων μεταξύ των δύο μορφών γάλακτος. Το γεγονός ότι το μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής παραμένει το ίδιο υποδηλώνει ότι η πολικότητα του περιβάλλοντος και στις δύο περιπτώσεις είναι ίδια.

Το φάσμα εκπομπής του ερυθρού του Νείλου στο αποβουτυρωμένο γάλα 0,3% έχει μετατοπιστεί σημαντικά προς το ερυθρό σε σχέση με τις άλλες μορφές, υποδηλώνοντας κατανομή σε πιο υδρόφιλο περιβάλλον ($\lambda_{\max} \approx 620 \text{ nm}$). Δεδομένου ότι τα λιποσφαίρια είναι σημαντικά μειωμένα τόσο σε αριθμό όσο και σε μέγεθος, το περιβάλλον αυτό αναμένεται να είναι τα μικκύλια καζεΐνης. Επίσης στο γάλα 0,3% αναμένεται ότι υπάρχουν λιγότερες περιοχές στις οποίες μπορεί να κατανεμηθεί το ερυθρό του Νείλου, επηρεάζοντας τόσο το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής, όσο και την ένταση του φάσματος.

A.3.2.5.2. Σύστημα γάλακτος-αιθανόλης

Στα ακόλουθα σχήματα παρουσιάζεται η σχέση μεταξύ της μορφής και της έντασης φθορισμού με το ποσό της αιθανόλης που είναι παρόν στο γάλα.

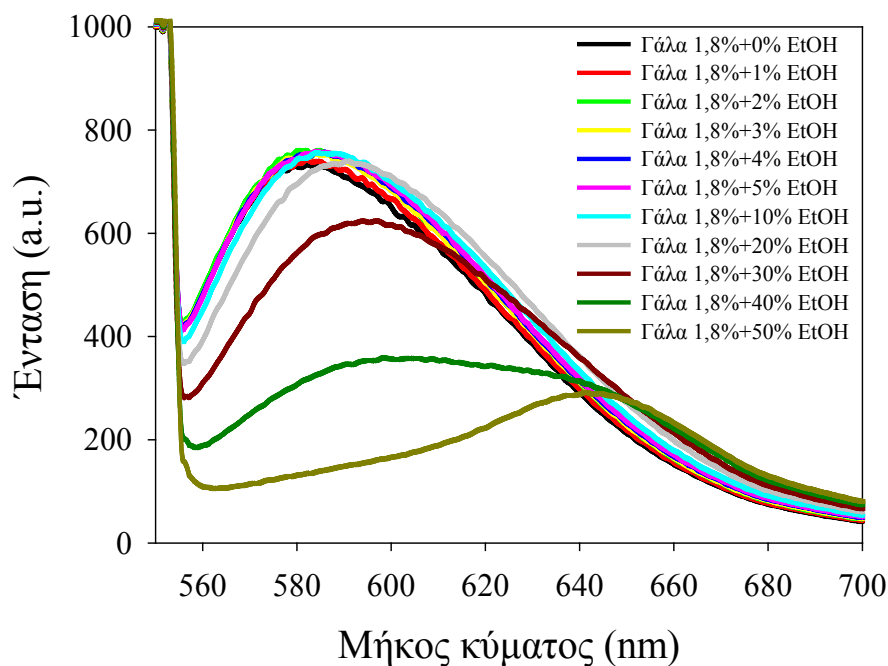
Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το πλήρες γάλα 3,6% (Σχήμα Α.3.25).



Σχήμα Α.3.25: Φάσματα φθορισμού εκπομπής γάλακτος 3,6% περιεκτικότητας σε λίπος πριν και ύστερα από την προσθήκη αιθανόλης (1-50%) στους 25 °C. Όλα τα δείγματα περιέχουν 500 ng/ml ερυθρό του Νείλου.

Για τα δείγματα γάλακτος περιεκτικότητας 3,6% σε λίπος η προσθήκη της αιθανόλης σε συγκεντρώσεις έως 30% κ.ο. φαίνεται να έχει μικρή επίδραση στο φάσμα φθορισμού του ερυθρού του Νείλου. Σε μεγαλύτερες τιμές παρατηρείται μια απότομη μείωση στην ένταση και μετατόπιση προς το ερυθρό, υποδηλώνοντας μείωση των περιοχών κατανομής και αύξηση της υδροφιλίας του περιβάλλοντος που κατανέμεται ο φθορίζων ιχνηθέτης.

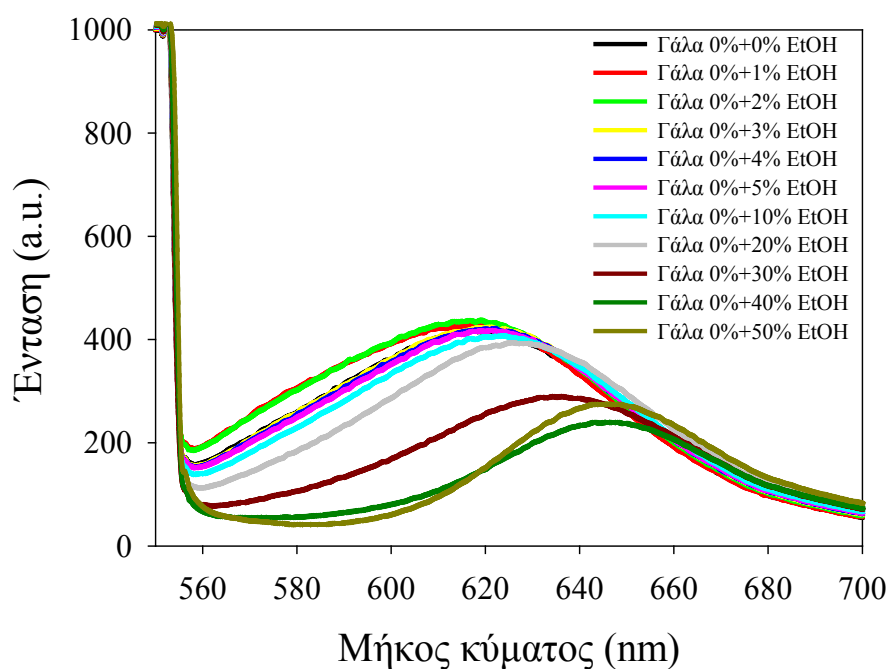
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το ημιαποβουτυρωμένο γάλα 1,8% (Σχήμα Α.3.26).



Σχήμα Α.3.26: Φάσματα φθορισμού εκπομπής γάλακτος 1,8% περιεκτικότητας σε λίπος πριν και ύστερα από την προσθήκη αιθανόλης (1-50%) στους 25 °C. Όλα τα δείγματα περιέχουν 500 ng/ml ερυθρό του Νείλου.

Αντίστοιχα με το πλήρες γάλα, για τα δείγματα γάλακτος περιεκτικότητας 1,8% σε λίπος η προσθήκη της αιθανόλης σε συγκεντρώσεις έως 20% κ.ο. φαίνεται να έχει μικρή επίδραση στο φάσμα φθορισμού του ερυθρού του Νείλου. Σε μεγαλύτερες τιμές παρατηρείται μια απότομη μείωση στην ένταση και μετατόπιση προς το ερυθρό, υποδηλώνοντας μείωση των περιοχών κατανομής και αύξηση της υδροφιλίας του περιβάλλοντος που κατανέμεται ο φθορίζων ιχνηθέτης.

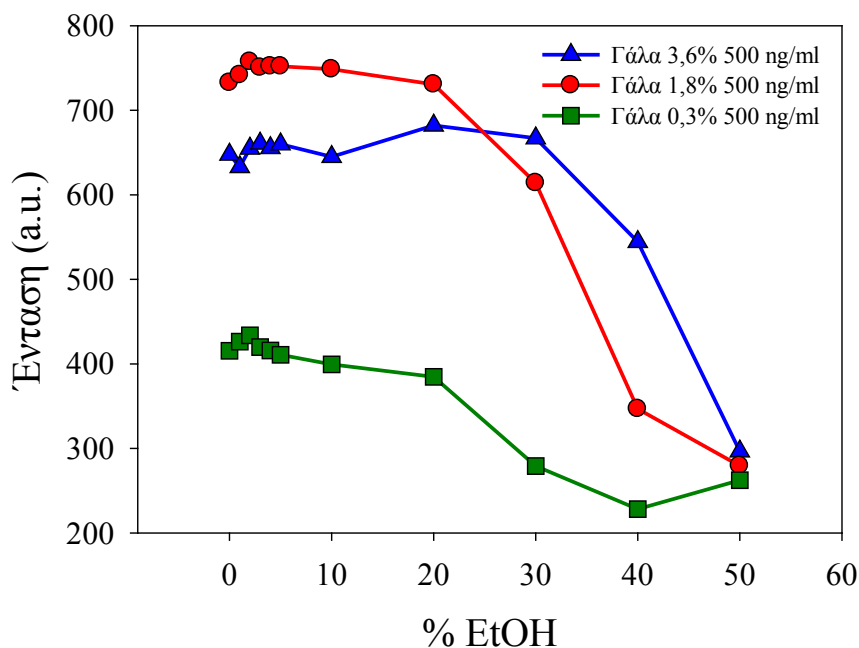
Τέλος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το αποβουτυρωμένο γάλα 0,3% (Σχήμα Α.3.27).



Σχήμα Α.3.27: Φάσματα φθορισμού εκπομπής γάλακτος 0% περιεκτικότητας σε λίπος πριν και ύστερα από την προσθήκη αιθανόλης (1-50%) στους 25 °C. Όλα τα δείγματα περιέχουν 500 ng/ml ερυθρό του Νείλου.

Αντίστοιχα με τα προηγούμενα αποτελέσματα, για τα δείγματα γάλακτος περιεκτικότητας 0,3% σε λίπος η προσθήκη της αιθανόλης σε συγκεντρώσεις έως 20% κ.ο. φαίνεται να έχει μικρή επίδραση στο φάσμα φθορισμού του ερυθρού του Νείλου. Σε μεγαλύτερες τιμές παρατηρείται μια απότομη μείωση στην ένταση και μετατόπιση προς το ερυθρό, υποδηλώνοντας μείωση των περιοχών κατανομής και αύξηση της υδροφιλίας του περιβάλλοντος που κατανέμεται ο φθορίζων ιχνηθέτης.

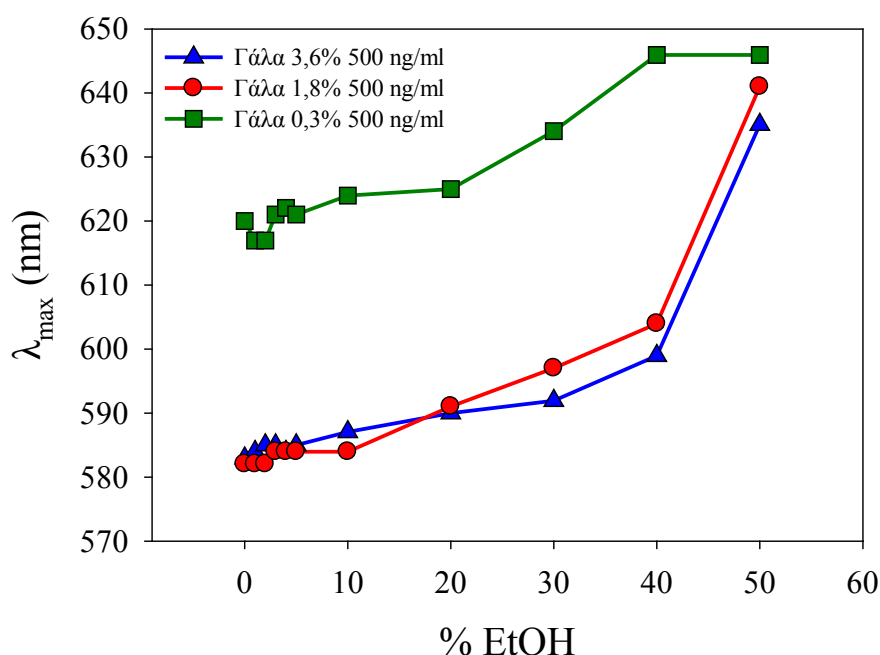
Η μέγιστη ένταση εκπομπής σε σχέση με το ποσοστό αιθανόλης στα δείγματα, παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα Α.3.28).



Σχήμα Α.3.28: Μέγιστες εντάσεις κορυφών φασμάτων φθορισμού εκπομπής σε σχέση με το ποσοστό αιθανόλης σε γάλα 3,6, 1,8 και 0,3%.

Όπως γίνεται αμέσως αντιληπτό, οι εντάσεις των φασμάτων φθορισμού παραμένουν ουσιαστικά αμετάβλητες σε συγκεντρώσεις αιθανόλης έως 20% κ.ο. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης οδηγεί σε σημαντική μείωση της έντασης του φάσματος φθορισμού. Αυτό αποδεικνύει ότι η διατάραξη που προκαλεί η αιθανόλη στο σύστημα, μειώνει την ικανότητα του συστήματος να διαλυτοποιεί λιπόφιλα μόρια, όπως το ερυθρό του Νείλου. Σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, ο ιχνηθέτης κατανέμεται στην εξωτερική φάση, που αποτελεί υδαταλκοολικό διάλυμα. Αντιθέτως η εσωτερική φάση του γαλακτώματος έχει διαταραχθεί σημαντικά, γεγονός το οποίο είναι εμφανές και μακροσκοπικά.

Στο ακόλουθο σχήμα απεικονίζεται η επίδραση της αιθανόλης στο μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής του ερυθρού του Νείλου.

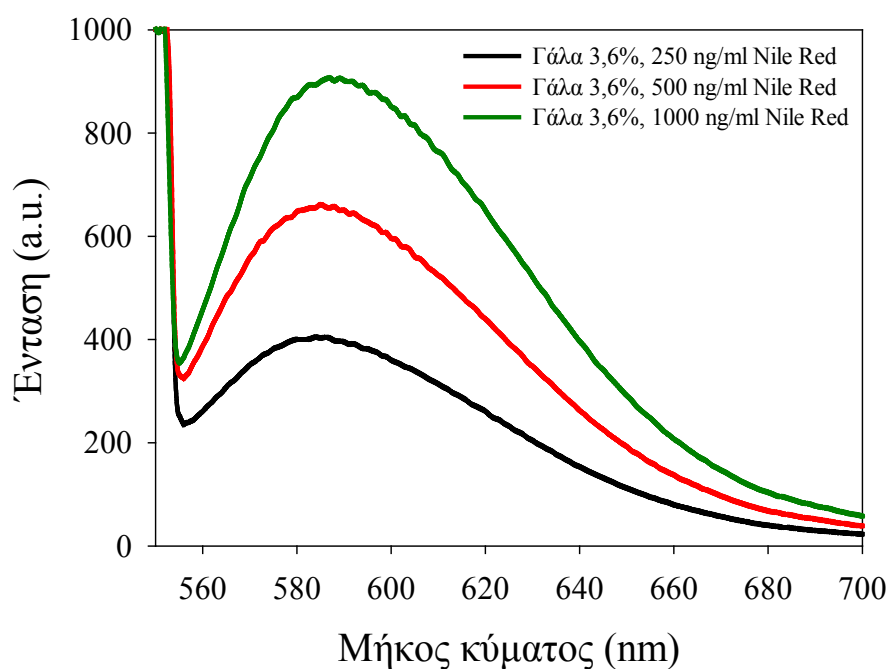


Σχήμα Α.3.29: Μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής φάσματος φθορισμού σε σχέση με το ποσοστό αιθανόλης σε γάλα 3,6, 1,8 και 0,3%.

Το μέγιστο μήκος εκπομπής σχετίζεται με την πολικότητα του περιβάλλοντος στο οποίο κατανέμεται το ερυθρό του Νείλου. Είναι προφανές ότι η αιθανόλη βαθμιαία μετατοπίζει το φάσμα προς το ερυθρό (βαθυχρωμία). Αυτό αποδεικνύει ότι η πολικότητα του συστήματος βαθμιαία αυξάνεται και το ερυθρό του Νείλου κατανέμεται σε διαφορετικό περιβάλλον. Δεδομένου ότι για τιμές αιθανόλης 50%, το $\lambda_{\max}$ είναι περίπου ίσο με αυτό που παρατηρείται στο νερό (≈ 645 nm), αναμένεται ότι η πολικότητα του περιβάλλοντος είναι αντίστοιχη. Η διαφορά στην ένταση όμως που παρατηρείται φαίνεται να οφείλεται στην παρουσία της αιθανόλης.

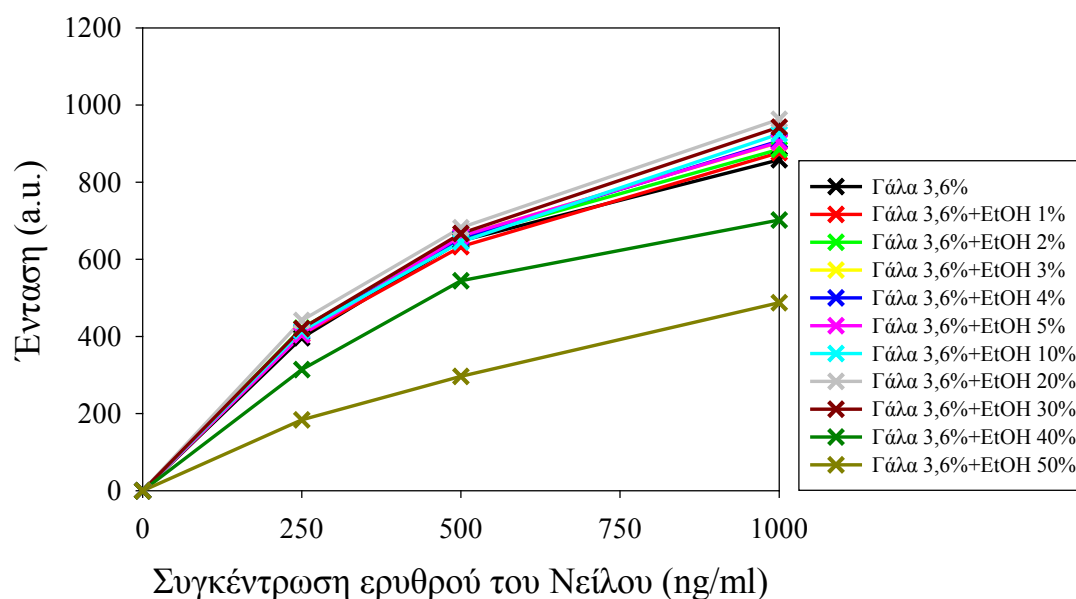
A.3.2.5.3. Επίδραση συγκέντρωσης του ερυθρού του Νείλου στην ένταση και το σχήμα του φάσματος φθορισμού

Για να μελετηθεί η χωρητικότητα του συστήματος στη διαλυτοποίηση λιπόφιλων μορίων, μελετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ερυθρού του Νείλου. Ενδεικτικά παρουσιάζεται το φάσμα εκπομπής του γάλακτος 3,6%, με διάφορες συγκεντρώσεις ερυθρού του Νείλου (Σχήμα Α.3.30).

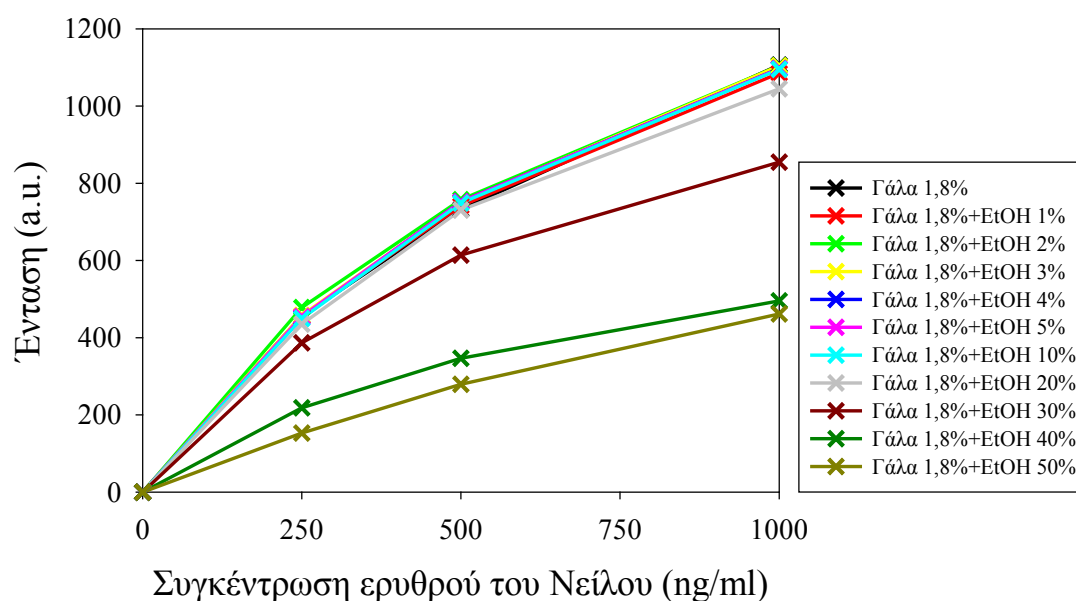


Σχήμα Α.3.30: Φάσματα φθορισμού εκπομπής γάλακτος 3,6% περιεκτικότητας σε λίπος διαφορετικής περιεκτικότητας σε ερυθρό του Νείλου (250, 500 και 1000 ng/ml) στους 25 °C.

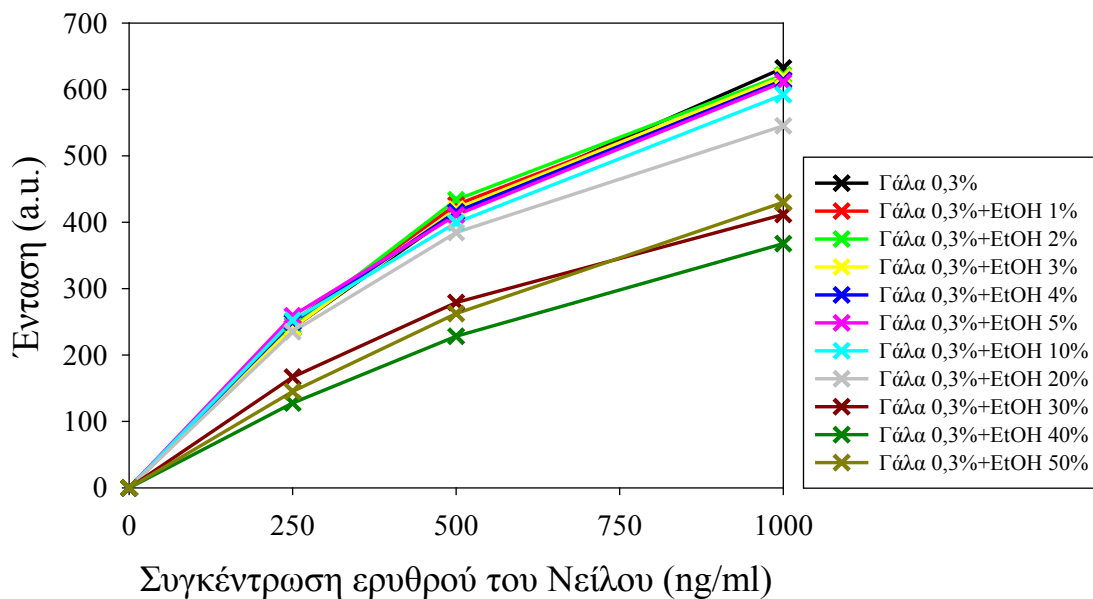
Παρατηρείται ότι αυξανόμενης της ποσότητας του ιχνηθέτη, αυξάνεται η ένταση του φάσματος φθορισμού. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η επιπλέον ποσότητα ερυθρού του Νείλου κατανέμεται σε λιπόφιλο περιβάλλον (λιποσφαίρια, μικκύλια καζεΐνης). Η γραμμικότητα της αύξησης εξετάζεται στα ακόλουθα σχήματα (Σχήμα Α.3.31, Σχήμα Α.3.32 και Σχήμα Α.3.33).



Σχήμα Α.3.31: Μέγιστες εντάσεις κορυφών φασμάτων φθορισμού εκπομπής σε σχέση με τη συγκέντρωση ερυθρού του Νείλου σε γάλα 3,6% περιεκτικότητας σε λίπος που περιέχει αιθανόλη (0-50% κ.ο.).



Σχήμα Α.3.32: Μέγιστες εντάσεις κορυφών φασμάτων φθορισμού εκπομπής σε σχέση με τη συγκέντρωση ερυθρού του Νείλου σε γάλα 1,8% περιεκτικότητας σε λίπος που περιέχει αιθανόλη (0-50% κ.ο.).



Σχήμα Α.3.33: Μέγιστες εντάσεις κορυφών φασμάτων φθορισμού εκπομπής σε σχέση με τη συγκέντρωση ερυθρού του Νείλου σε γάλα 0,3% περιεκτικότητας σε λίπος που περιέχει αιθανόλη (0-50% κ.ο.).

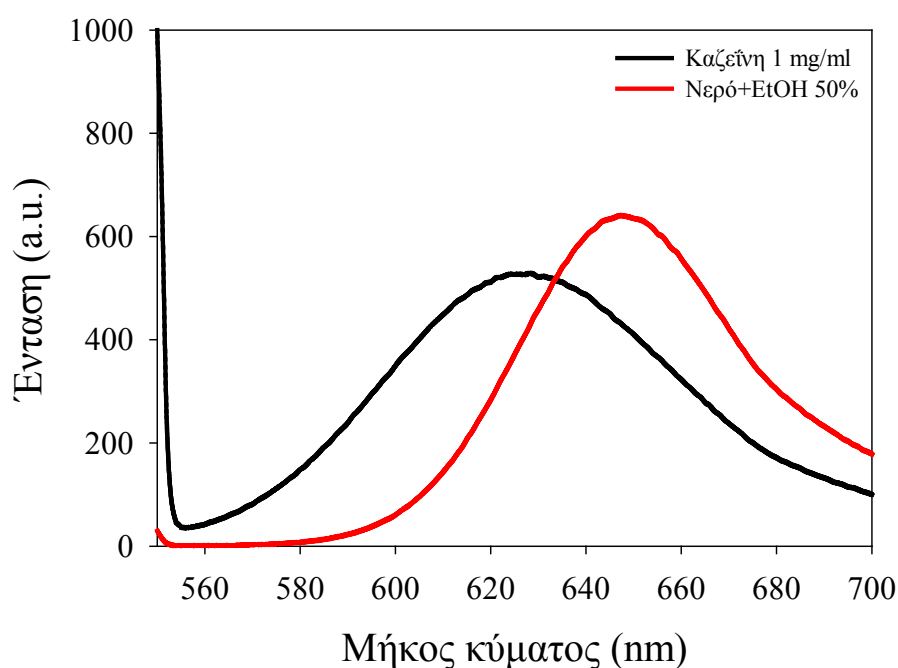
Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται ότι η σχέση μεταξύ της έντασης φθορισμού και της ποσότητας του ερυθρού του Νείλου δεν είναι γραμμική, αντιθέτως παρουσιάζει εικόνα εκθετικής αύξησης μέχρι μια μέγιστη τιμή. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε με μη γραμμικές προσαρμογές εκθετικών σχέσεων στα πειραματικά δεδομένα, που είχαν ως αποτέλεσμα υψηλό βαθμό συσχέτισης ($r^2 \geq 0,999$). Στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκε πειραματικά η μέγιστη τιμή έντασης φθορισμού, η οποία θα υποδήλωνε και το μέγιστο της χωρητικότητας των λιπόφιλων περιοχών στον ιχνηθέτη. Εντούτοις διαπιστώνεται ότι η ένταση φθορισμού τείνει προς μια μέγιστη τιμή. Μια άλλη ερμηνεία της ασυμπτωτικής φύσης της καμπύλης είναι η μείωση της εκπομπής λόγω αύξησης της απορρόφησης κατά τη φάση διέγερσης, γεγονός το οποίο οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση του ερυθρού του Νείλου. Εντούτοις κάτι τέτοιο οφείλει να αποκλειστεί εφόσον οι συγκεντρώσεις ερυθρού του Νείλου που χρησιμοποιήθηκαν είναι αντίστοιχες και μικρότερες από αυτές που εντοπίστηκαν στη βιβλιογραφία (Jores et al., 2005).

A.3.2.5.4. Αναλύσεις φασμάτων φθορισμού εκπομπής

Δεδομένου ότι τα φάσματα φθορισμού που παρουσιάστηκαν προηγουμένως δε φαίνεται εκ πρώτης όψεως να είναι αντιπροσωπευτικά δείγματα κατανομών που

χρησιμοποιούνται στις αναλύσεις φασμάτων (κατά Gauss ή κατά Lorentz κατανομές), έγινε προσπάθεια περαιτέρω μαθηματικής επεξεργασίας τους.

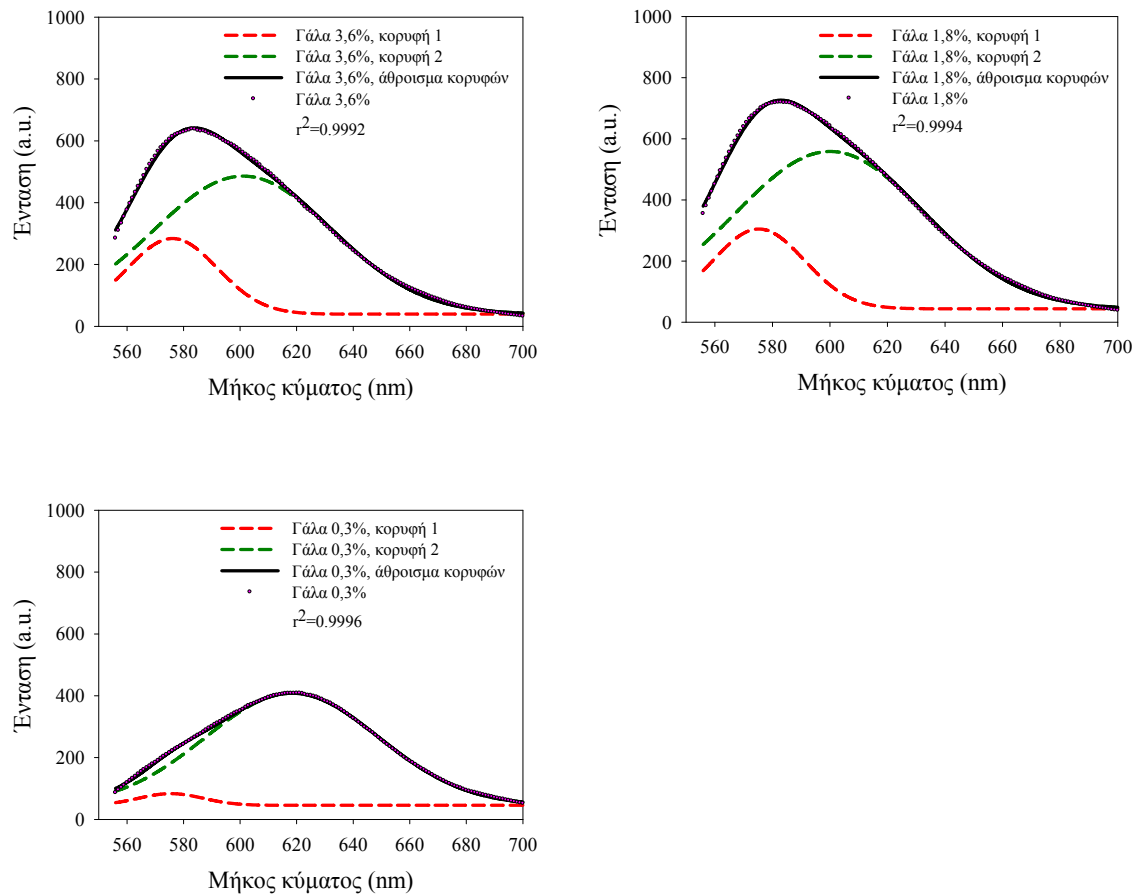
Αρχικά για να φανεί η επίδραση των επιμέρους συστατικών στη φύση του φάσματος φθορισμού, μελετήθηκε το φάσμα φθορισμού του ερυθρού του Νείλου σε υδατικό διάλυμα καζεΐνης 1 mg/ml και σε αιθανολικό διάλυμα 50% κ.ο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα Α.3.34).



Σχήμα Α.3.34: Φάσματα φθορισμού εκπομπής διαλύματος καζεΐνης 1 mg/ml και διαλύματος νερού-αιθανόλης 50% κ.ο. Όλα τα δείγματα περιέχουν 500 ng/ml ερυθρό του Νείλου.

Το διάλυμα καζεΐνης παρουσιάζει μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής περίπου στα 625 nm ενώ το αιθανολικό διάλυμα 50% κ.ο. περίπου στα 645 nm.

Στη συνέχεια αναλύθηκαν τα φάσματα φθορισμού εκπομπής σε δύο επιμέρους κανονικές κατανομές (Gaussian). Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα χωρίς αιθανόλη (Σχήμα Α.3.35).



Σχήμα Α.3.35: Ανάλυση φασμάτων φθορισμού εκπομπής γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% περιεκτικότητας σε λίπος σε δύο κανονικές κατανομές.

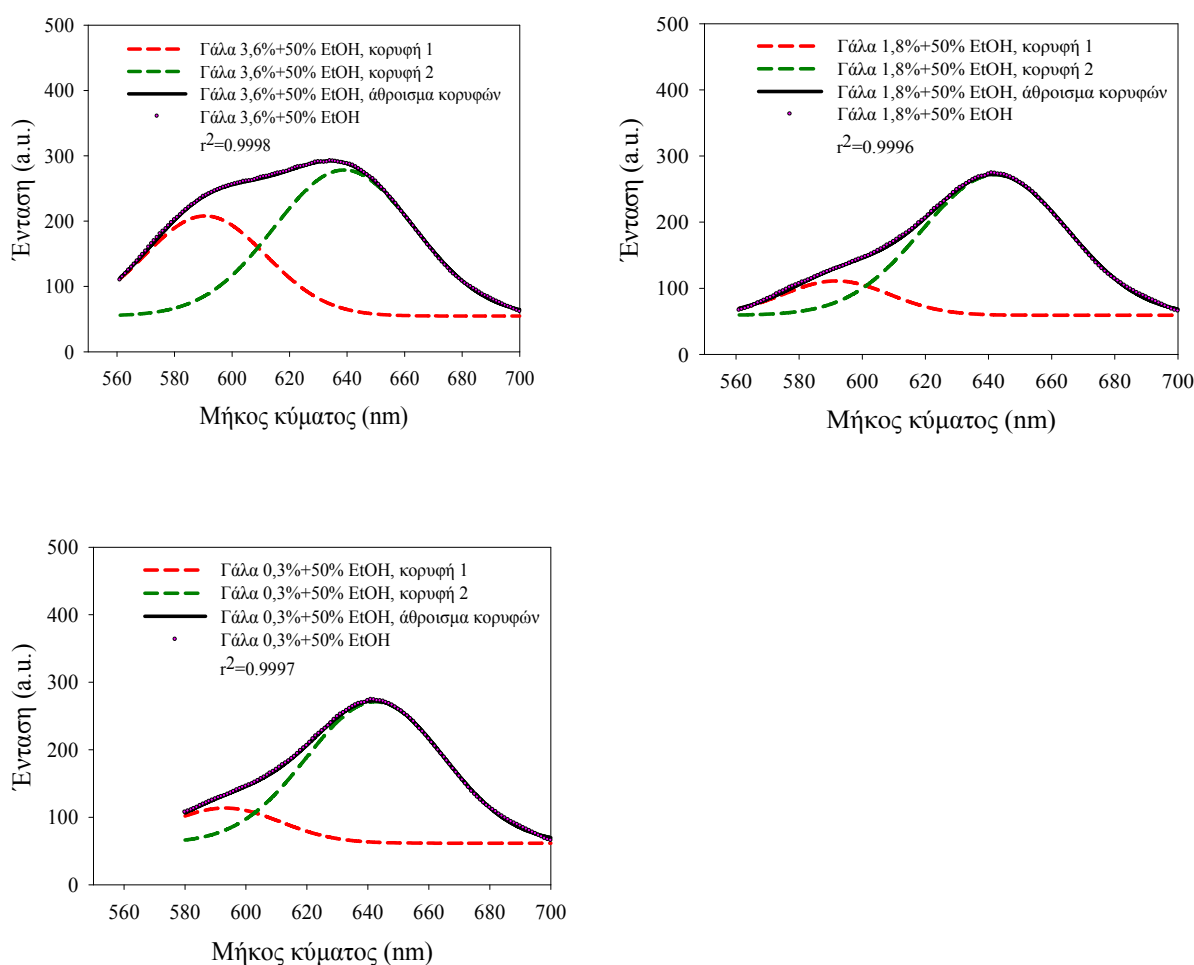
Όπως διακρίνεται εμφανώς, τα φάσματα φθορισμού φαίνεται να αποτελούνται από 2 επιμέρους κατανομές, με διαφορετικές μέγιστες τιμές, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις. Ο συντελεστής προσδιορισμού είναι εξαιρετικά υψηλός σε όλες τις περιπτώσεις.

Η πρώτη κορυφή, με μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής στα 570-580 nm φαίνεται να αντιστοιχεί στα λιποσφαίρια. Η θεωρία αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι αυτή η κορυφή είναι εξαιρετικά μειωμένη στο πλήρως αποβουτυρωμένο γάλα. Είναι μετατοπισμένη προς το κυανό, υποδηλώνοντας αυξημένη λιποφιλία, ενώ διαθέτει μικρή ένταση, υποδηλώνοντας ότι δεν φαίνεται να είναι το κύριο σημείο κατανομής του ερυθρού του Νείλου.

Η δεύτερη κορυφή έχει μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής στα 610-620 nm και φαίνεται να αντιστοιχεί στα μικκύλια καζεΐνης. Την άποψη αυτή ενισχύει το γεγονός ότι ταιριάζει με το φάσμα εκπομπής της καζεΐνης στο νερό που παρουσιάστηκε

προηγουμένως, ενώ η κορυφή αυτή παραμένει ανεξάρτητη από το ποσοστό του λίπους στο γάλα. Έχει αυξημένη ένταση σε σχέση με την κορυφή των λιποσφαιρίων, υποδηλώνοντας ότι αποτελεί το κύριο σημείο κατανομής του ερυθρού του Νείλου. Επιπλέον είναι μετατοπισμένη προς το ερυθρό, δείγμα μειωμένης λιποφιλίας στο εσωτερικό των μικκυλίων.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης για την ακραία περίπτωση της παρουσίας 50% κ.ο. αιθανόλης στο γάλα (Σχήμα Α.3.36).



Σχήμα Α.3.36: Ανάλυση φασμάτων φθορισμού εκπομπής γάλακτος 3,6, 1,8 και 0,3% περιεκτικότητας σε λίπος που περιέχει 50% αιθανόλη κ.ο. σε δύο κανονικές κατανομές.

Και σε αυτή την περίπτωση τα φάσματα φθορισμού φαίνεται να αποτελούνται από 2 επιμέρους κατανομές, με διαφορετικές μέγιστες τιμές, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις. Ο συντελεστής προσδιορισμού είναι εξαιρετικά υψηλός σε όλες τις

περιπτώσεις. Η πρώτη κορυφή εντοπίζεται περίπου στα 590 nm και η δεύτερη περίπου στα 645 nm.

Δεδομένου ότι η δεύτερη κορυφή ταιριάζει με τα χαρακτηριστικά του φάσματος φθορισμού αιθανολικού διαλύματος 50% κ.ο., είναι προφανές ότι αντιπροσωπεύει φθορισμό από τη συνεχή φάση, η οποία είναι πλέον ένα διάλυμα αιθανόλης-νερού.

Η πρώτη κορυφή ενδεχομένως αντιστοιχεί στα λιποσφαίρια. Οι ενδείξεις που οδηγούν σε αυτό το συμπέρασμα είναι η μείωση του μεγέθους της αυξανόμενου του λίπους του γάλακτος, το γεγονός ότι τα μικκύλια καζεΐνης είναι ουσιαστικά ανύπαρκτα λόγω διατάραξης της τριτοταγούς δομής των καζεϊνών και η αντιπαραβολή με τις μετρήσεις κατανομής και μεγέθους σωματιδίων. Από τα αποτελέσματα του μεγέθους σωματιδίων, σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, επικρατούσε μια μόνο κορυφή με μέση διάμετρο περίπου 1000 nm. Η αύξηση της έντασης της καμπύλης των λιποσφαιρίων σε σχέση με το εμπορικά διαθέσιμο γάλα απουσία αιθανόλης δικαιολογείται από την εξάλειψη των άλλων περιοχών κατανομής (μικκύλια καζεΐνης) και την αύξηση του μεγέθους των λιποσφαιρίων (βλ. ενότητα Α.3.2.1: Μέγεθος και κατανομή σωματιδίων, σελ. 101)

A.3.2.6. Μετρήσεις pH

Οι μετρήσεις pH πραγματοποιήθηκαν παράλληλα με της μελέτες ομοιομορφίας περιεχομένου-βραχυπρόθεσμης σταθερότητας, τόσο στα σκευάσματα ασπιρίνης με τη χρήση αναβραζόντων δισκίων όσο και στα αιθανολικά διαλύματα φαρμάκων μετά την προσθήκη τους σε γάλα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας Α.3.XXIII).

Πίνακας Α.3.XXIII: Τιμές pH γάλακτος 3,5, 1,5 και 0% πριν και μετά την προσθήκη διαφόρων φαρμακοτεχνικών μορφών.

Σύσταση	Μέσο διασποράς					
	Γάλα 3,5%		Γάλα 1,5%		Γάλα 0%	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
Ακατέργαστο γάλα	6,60	0,02	6,58	0,02	6,61	0,03
Αναβράζον δισκίο ασπιρίνης σε 20ml νερού	6,10	0,02	6,27	0,03	6,24	0,02
Αναβράζον δισκίο ασπιρίνης σε 40ml νερού	6,20	0,08	-	-	-	-
Αιθανολικό διάλυμα δαναζόλης	6,62	0,02	6,71	0,01	6,62	0,01
Αιθανολικό διάλυμα κυκλοσπορίνης	6,59	0,01	6,57	0,03	6,65	0,02
Κόνις κυκλοσπορίνης	6,70	0,01	-	-	-	-
Διασπειρόμενο δισκίο κυκλοσπορίνης	6,62	0,02	-	-	-	-
Αιθανολικό διάλυμα κλοπιδογρέλης	6,67	0,02	6,63	0,03	6,55	0,01
Κόνις κλοπιδογρέλης	6,60	0,02	-	-	-	-
Διασπειρόμενο δισκίο κλοπιδογρέλης	6,58	0,01	-	-	-	-

Από τα αποτελέσματα διαπιστώνονται τα εξής:

- Το γάλα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα (γάλα υψηλής παστερίωσης – μακράς διάρκειας UHT) έχει τιμή pH περίπου 6,6, η οποία είναι σύμφωνη με τη βιβλιογραφία.
- Η προσθήκη υδατικού διαλύματος που έχει προκύψει από τον αναβρασμό δισκίου ασπιρίνης στο γάλα, προκαλεί μείωση του pH κατά περίπου 0,5 μονάδες. Η μείωση οφείλεται αφενός στον όξινο χαρακτήρα της ασπιρίνης, αφετέρου στα στοιχεία αναβρασμού (κιτρικό οξύ). Είναι προφανές ότι η ρυθμιστική ικανότητα του γάλακτος δεν επαρκεί να αντισταθμίσει την οξύτητα των στοιχείων αυτών. Εντούτοις η πτώση του pH, αν και στατιστικά σημαντική, μπορεί να θεωρηθεί κλινικά ασήμαντη. Επιπλέον η τιμή του pH είναι παραπλήσια με την αντίστοιχη που παρατηρείται από τον αναβρασμό των δισκίων σε νερό.
- Τα αιθανολικά διαλύματα δαναζόλης, κυκλοσπορίνης και κλοπιδογρέλης δεν προκαλούν ουσιαστικά καμία μεταβολή στην οξύτητα του γάλακτος.
- Η προσθήκη στερεών φαρμακοτεχνικών μορφών στο γάλα (κόνις και διασπειρόμενα δισκία) κλοπιδογρέλης και κυκλοσπορίνης δεν επηρεάζουν το pH του γάλακτος.

Επομένως οι μορφές που χρησιμοποιήθηκαν δεν επηρεάζουν το pH του γάλακτος, με εξαίρεση την μικρή μείωση που προκαλεί η ασπιρίνη.

A.3.3. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ

Οι μελέτες σταθερότητας πραγματοποιήθηκαν στα αιθανολικά διαλύματα φαρμάκων ύστερα από παραμονή σε επιλεγμένες συνθήκες για τη δαναζόλη, την κυκλοσπορίνη και την κλοπιδογρέλη. Πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός, μελέτη απώλειας μάζας και έλεγχος προσμίξεων (κλοπιδογρέλη).

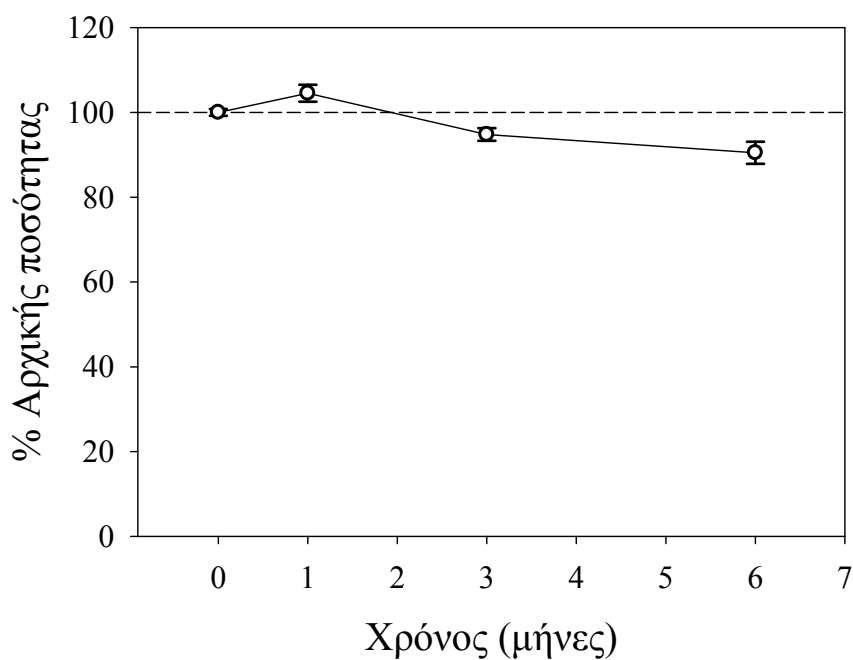
Για τη δαναζόλη και την κυκλοσπορίνη χρησιμοποιήθηκαν επιταχυνόμενες συνθήκες, ενώ για την κλοπιδογρέλη επιταχυνόμενες, ενδιάμεσες και βραχυπρόθεσμες συνθήκες.

A.3.3.1. Ποσοτικός προσδιορισμός

Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού για τα αιθανολικά διαλύματα δαναζόλης, κυκλοσπορίνης και κλοπιδογρέλης.

A.3.3.1.1. Δαναζόλη

Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις μελέτες σταθερότητας του αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης 100 mg/10 ml (Σχήμα A.3.37). Ο διαλύτης είναι απόλυτη αιθανόλη.

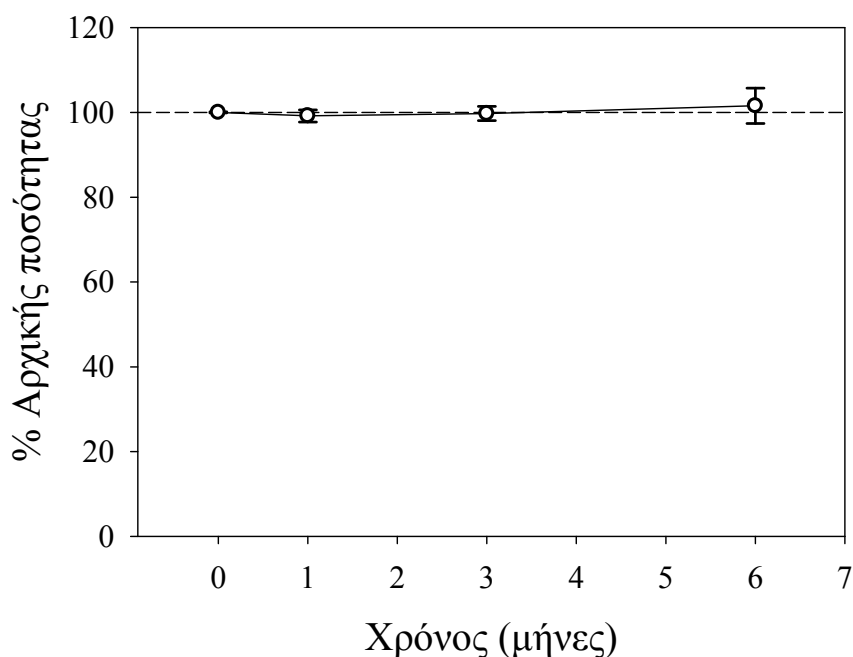


Σχήμα Α.3.37: Ποσοτικός προσδιορισμός αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης 100 mg/10 ml σε επιταχυνόμενες συνθήκες ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ - $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$).

Το αιθανολικό διάλυμα δαναζόλης παρουσιάζει προβλήματα σταθερότητας στις συνθήκες που μελετήθηκαν, καθώς σε έξι μήνες έχει παραμείνει το 90% περίπου της αρχικής ποσότητας.

A.3.3.1.2. Κυκλοσπορίνη

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις μελέτες σταθερότητας του αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης 100 mg/5 ml (Σχήμα Α.3.38). Ο διαλύτης είναι διάλυμα αιθανόλης 60% κ.ο.

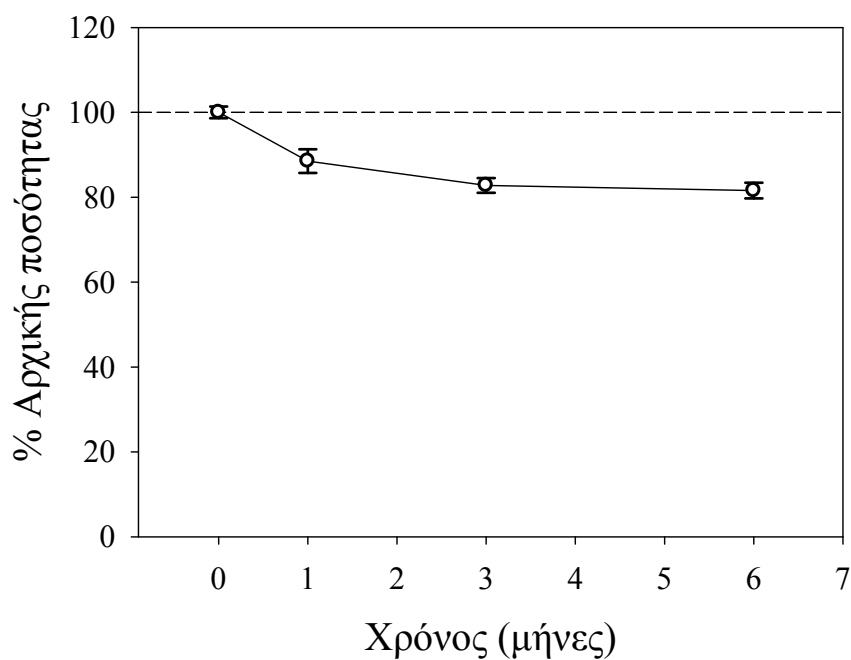


Σχήμα Α.3.38: Ποσοτικός προσδιορισμός αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης 100 mg/5 ml σε επιταχυνόμενες συνθήκες ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ - $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$).

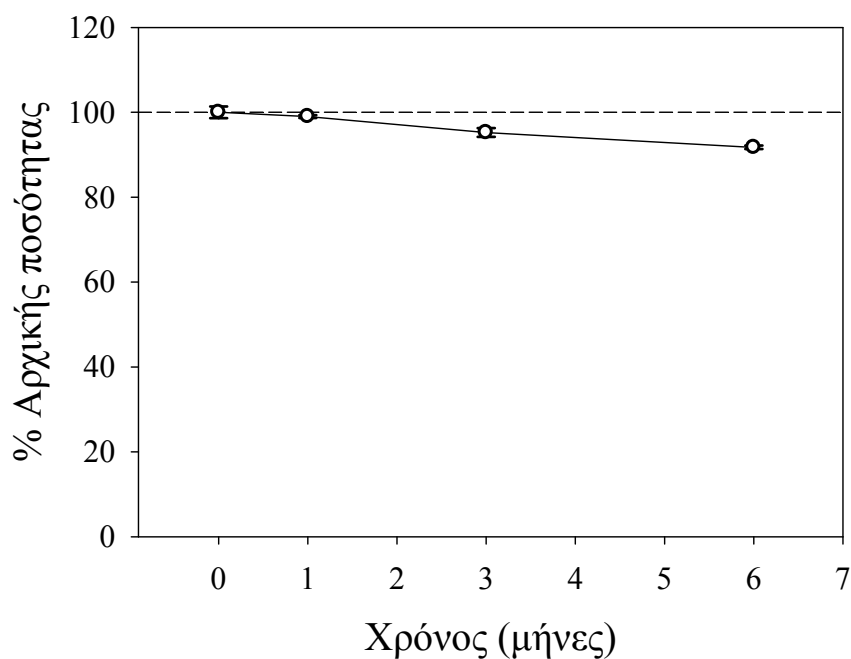
Το αιθανολικό διάλυμα κυκλοσπορίνης είναι εξαιρετικά σταθερό στις συνθήκες που αξιολογήθηκε η σταθερότητά του, καθώς σε έξι μήνες μετρήθηκε περίπου 101% της αρχικής ποσότητας.

Α.3.3.1.3. Κλοπιδογρέλη

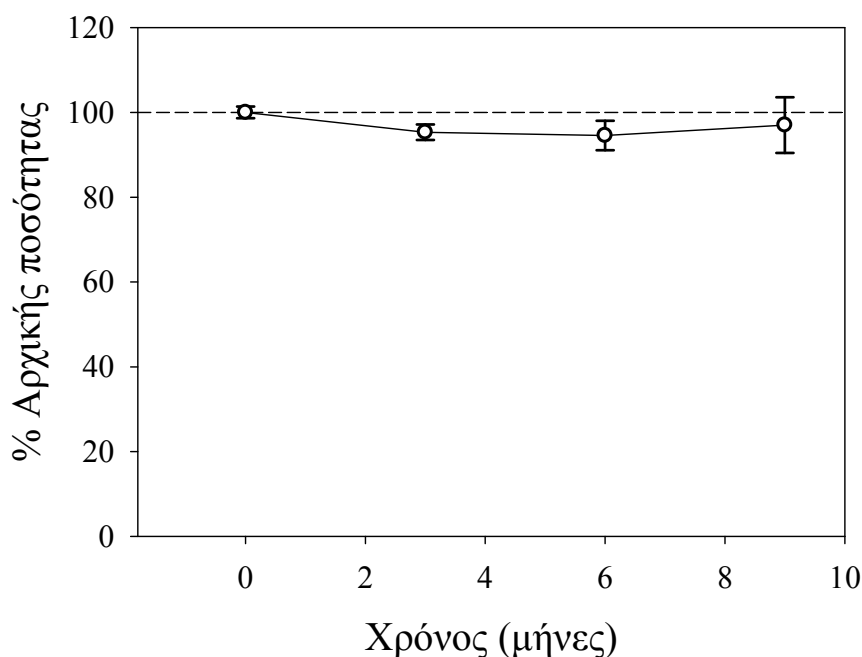
Τέλος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις μελέτες σταθερότητας του αιθανολικού διαλύματος κλοπιδογρέλης 100 mg/5 ml. Ο διαλύτης είναι διάλυμα αιθανόλης 60% κ.ο. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις επιταχυνόμενες συνθήκες (Σχήμα Α.3.39), τις ενδιάμεσες συνθήκες (Σχήμα Α.3.40) και τις μακροχρόνιες συνθήκες (Σχήμα Α.3.41).



Σχήμα Α.3.39: Ποσοτικός προσδιορισμός αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε επιταχυνόμενες συνθήκες (40 ± 2 °C - 75% RH $\pm$ 5% RH).



Σχήμα Α.3.40: Ποσοτικός προσδιορισμός αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε ενδιάμεσες συνθήκες (30 ± 2 °C - 65% RH $\pm$ 5% RH).



Σχήμα Α.3.41: Ποσοτικός προσδιορισμός αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε μακροπρόθεσμες συνθήκες ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ - $60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$).

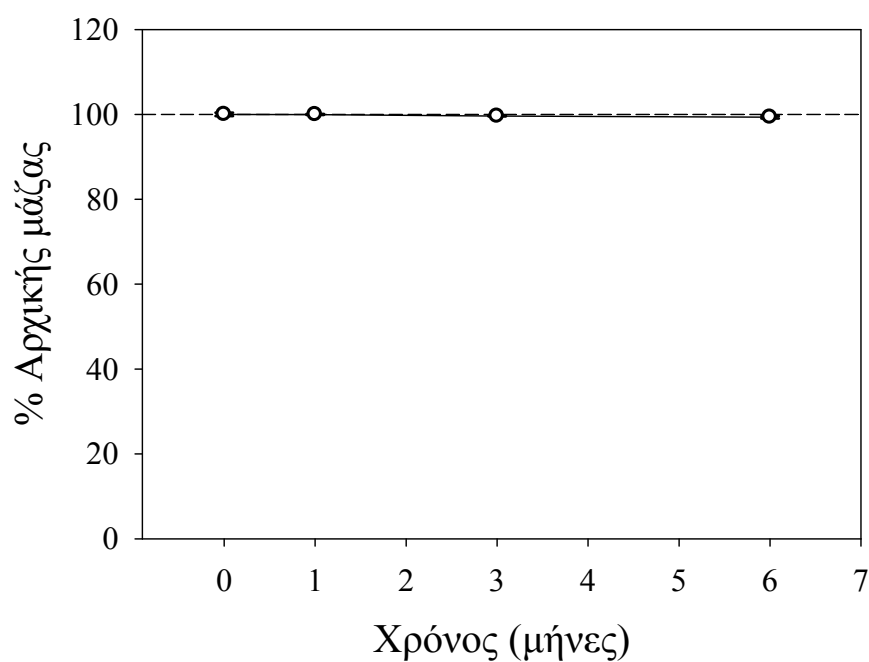
Στις επιταχυνόμενες συνθήκες η κλοπιδογρέλη παρουσιάζεται εξαιρετικά ασταθής, καθώς σε έξι μήνες διατηρήθηκε το 81% περίπου της αρχικής ποσότητας. Η σταθερότητά της αυξάνεται σε ενδιάμεσες συνθήκες (περίπου 92% της αρχικής ποσότητας σε έξι μήνες) και διατηρείται ουσιαστικά αμετάβλητη στις μακροπρόθεσμες συνθήκες, με το 97% της αρχικής ποσότητας να διατηρείται στο διάλυμα.

A.3.3.2. Απώλεια μάζας

Παράλληλα με τις μετρήσεις ποσοτικού προσδιορισμού μετρήθηκε και η απώλεια μάζας σε σχέση με την ημέρα παρασκευής των διαλυμάτων.

A.3.3.2.1. Δαναζόλη

Η μάζα του αρχικού διαλύματος ήταν 7,867 g ($\pm 0,031$ g). Η ιδανική τιμή του διαλύματος, υπολογισμένη με βάση την πυκνότητα της αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου και την ποσότητα της δραστικής ουσίας ήταν 8 g (διαφορά 0,133 g ή - 1,66%).

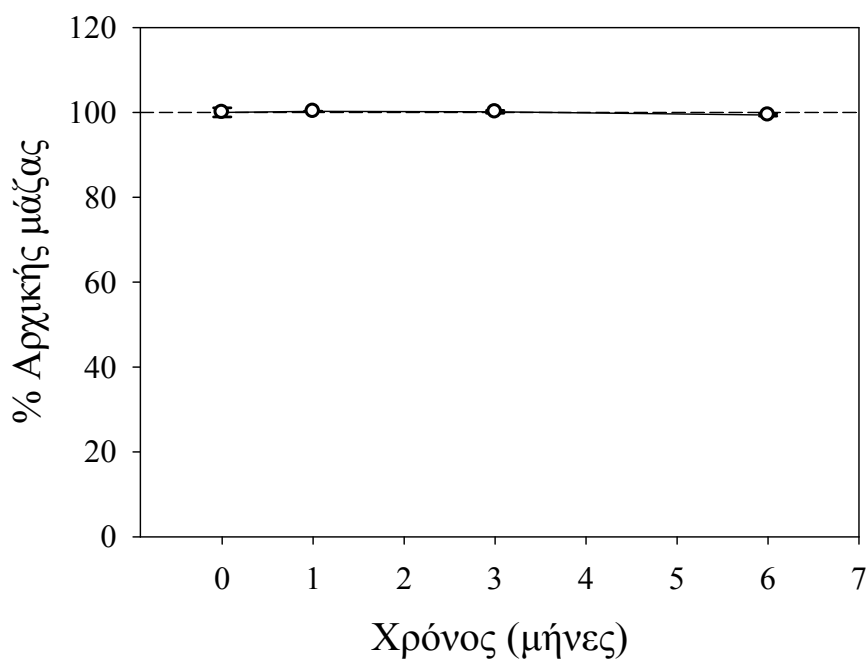


Σχήμα Α.3.42: Απώλεια μάζας αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης 100 mg/10 ml σε επιταχυνόμενες συνθήκες ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ - $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$).

Τα αιθανολικά διαλύματα δαναζόλης δεν απώλεσαν ανιχνεύσιμη ποσότητα μάζας κατά την παραμονή τους στις επιταχυνόμενες συνθήκες.

A.3.3.2.2. Κυκλοσπορίνη

Η μάζα του αρχικού διαλύματος ήταν 4,553 g ($\pm 0,050$ g). Η ιδανική τιμή του διαλύματος, υπολογισμένη με βάση την πυκνότητα της αιθανόλης και του νερού σε θερμοκρασία δωματίου και την ποσότητα της δραστικής ουσίας ήταν 4,470 g (διαφορά 0,083 g ή -1,85%).

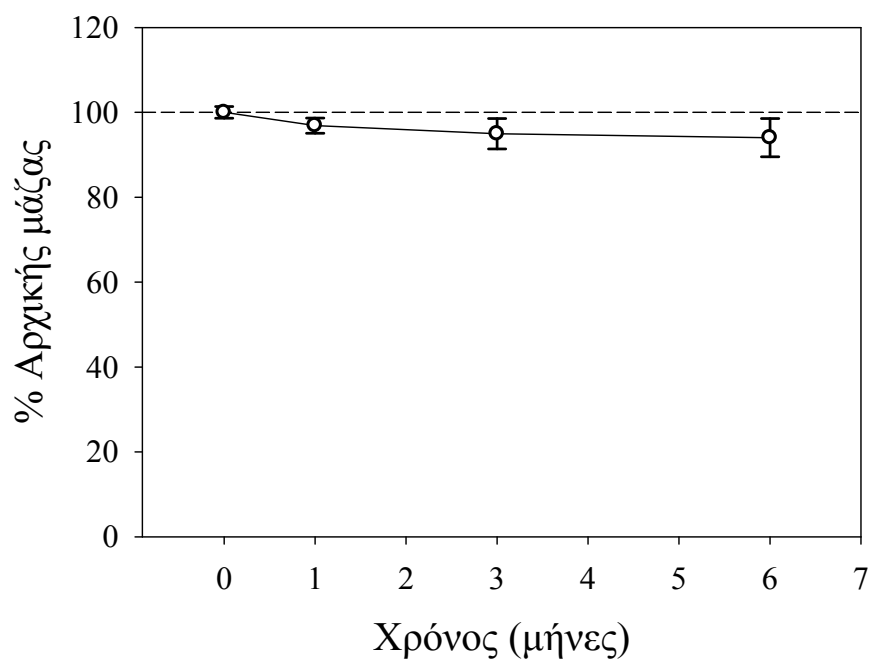


Σχήμα Α.3.43: Απώλεια μάζας αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης 100 mg/5 ml σε επιταχυνόμενες συνθήκες ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ - $75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$).

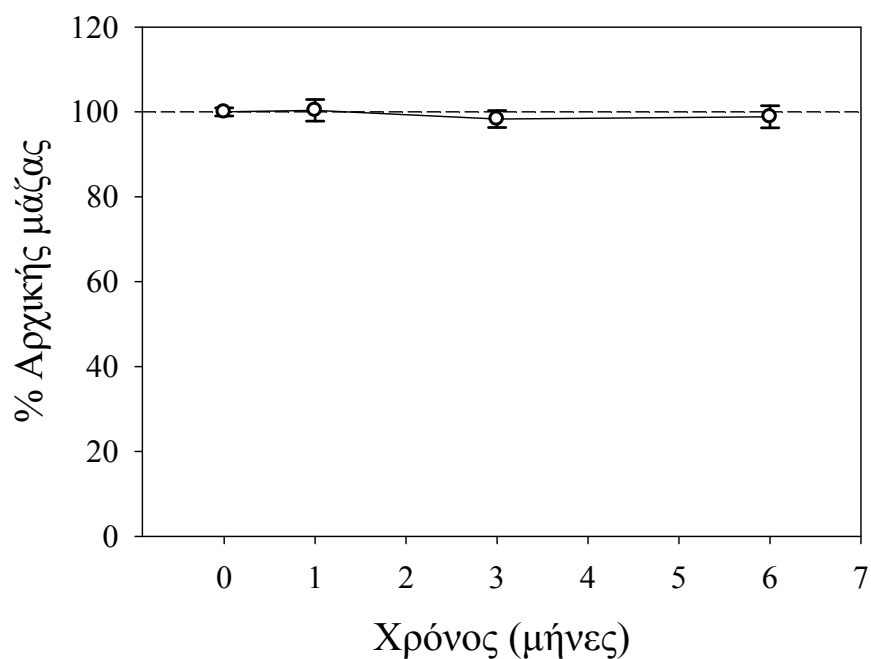
Τα αιθανολικά διαλύματα κυκλοσπορίνης δεν απώλεσαν ανιχνεύσιμη ποσότητα μάζας κατά την παραμονή τους στις επιταχυνόμενες συνθήκες.

A.3.3.2.3. Κλοπιδογρέλη

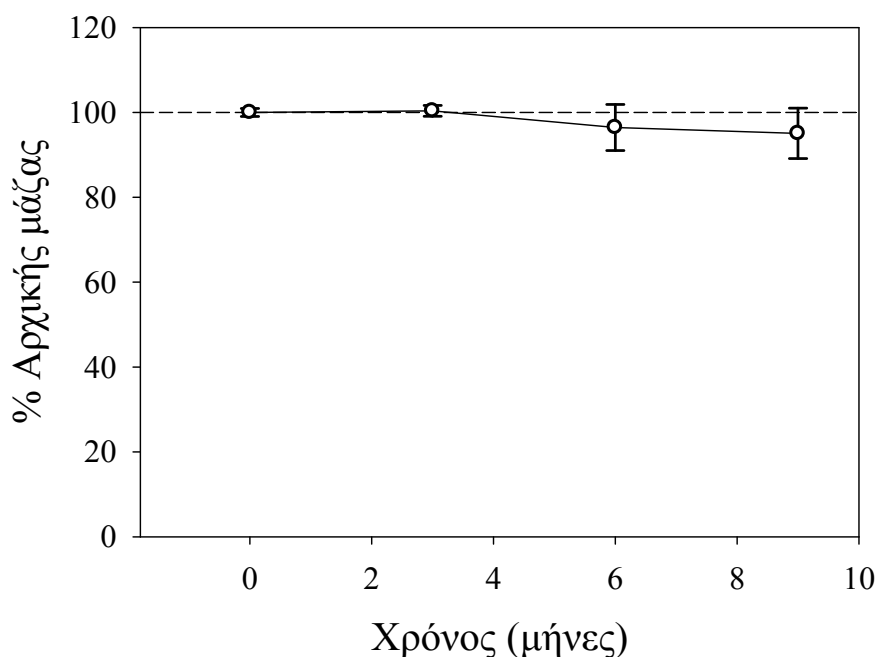
Η μάζα του αρχικού διαλύματος ήταν 4,516 g ($\pm 0,042$ g). Η ιδανική τιμή του διαλύματος, υπολογισμένη με βάση την πυκνότητα της αιθανόλης και του νερού σε θερμοκρασία δωματίου και την ποσότητα της δραστικής ουσίας ήταν 4,482 g (διαφορά 0,034 g ή 0,77%).



Σχήμα Α.3.44: Απώλεια μάζας αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε επιταχυνόμενες συνθήκες (40 ± 2 °C - 75% RH $\pm$ 5% RH).



Σχήμα Α.3.45: Απώλεια μάζας αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε ενδιάμεσες συνθήκες (30 ± 2 °C - 65% RH $\pm$ 5% RH).



Σχήμα Α.3.46: Απώλεια μάζας αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε μακροπρόθεσμες συνθήκες (25 ± 2 °C - $60\% RH \pm 5\% RH$).

Στις επιταχυνόμενες συνθήκες τα αιθανολικά διαλύματα κλοπιδογρέλης απώλεσαν οριακά σημαντική ποσότητα μάζας, καθώς παρέμεινε το 94% περίπου της αρχικής ποσότητας. Το φαινόμενο ήταν ηπιότερο στις ενδιάμεσες και τις μακροπρόθεσμες συνθήκες (99% και 95% διατηρήθηκε αντίστοιχα).

A.3.3.3. Προσμίξεις

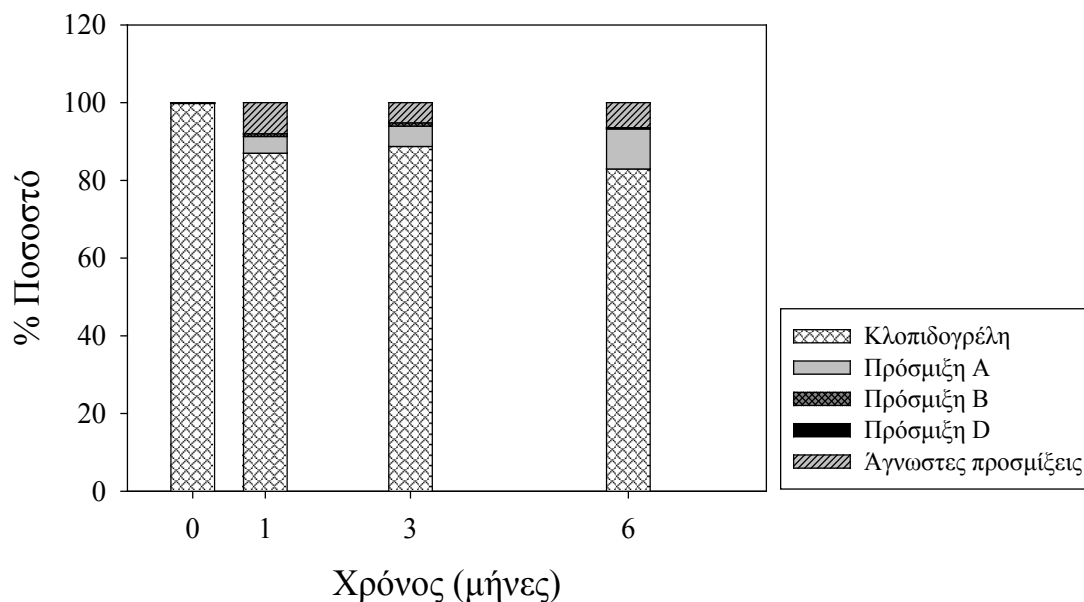
A.3.3.3.1. Δαναζόλη

Δεν ανιχνεύτηκαν προσμίξεις κατά τις μελέτες σταθερότητας της δαναζόλης.

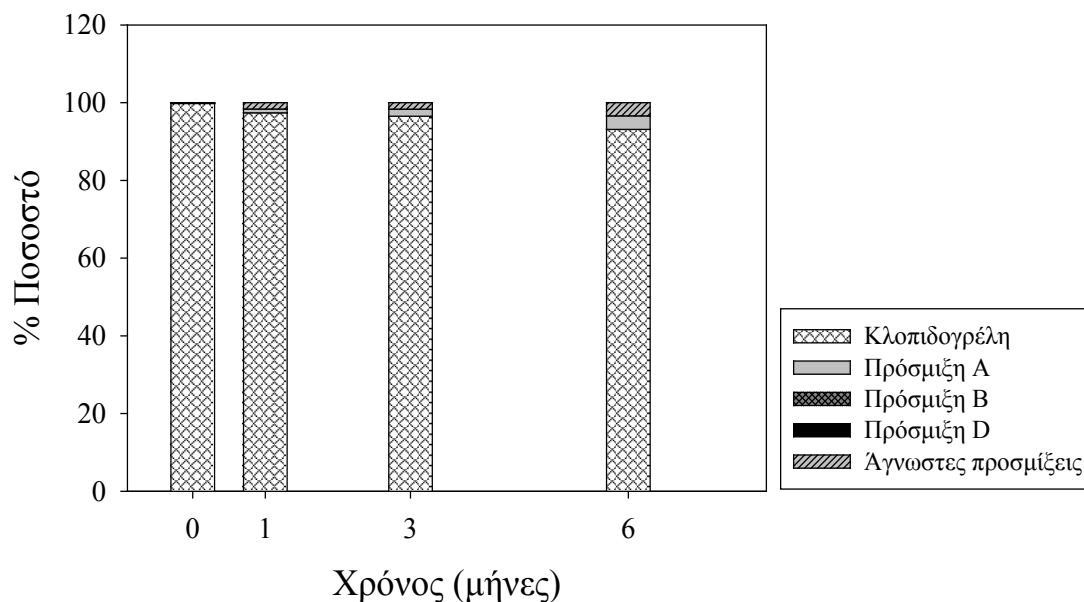
A.3.3.3.2. Κυκλοσπορίνη

Δεν ανιχνεύτηκαν προσμίξεις κατά τις μελέτες σταθερότητας της κυκλοσπορίνης.

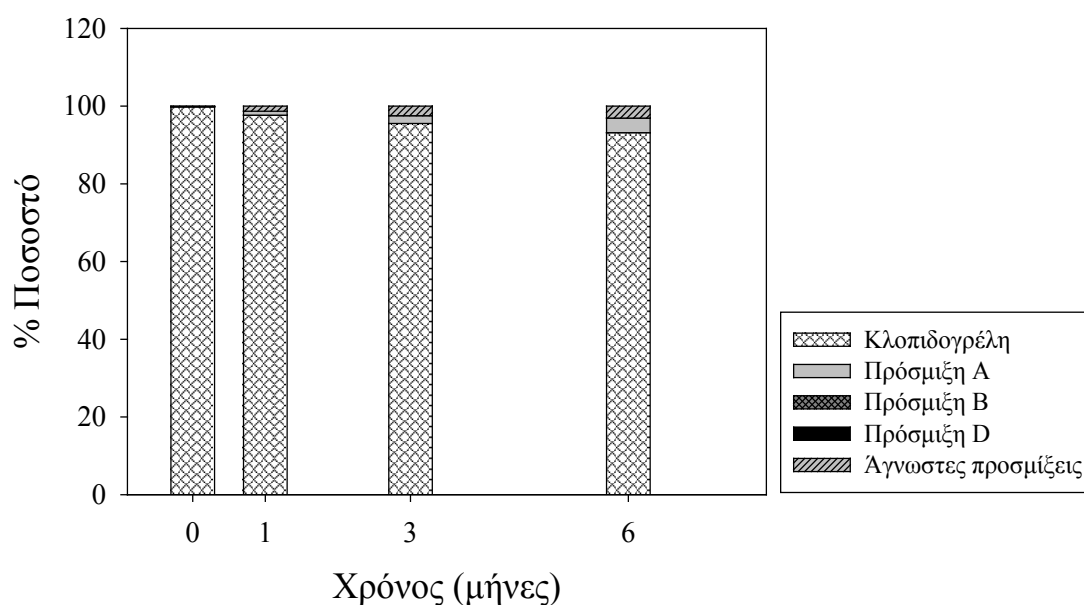
A.3.3.3.3. Κλοπιδογρέλη



Σχήμα A.3.47: Ποσοστό προσμίξεων % επί του συνόλου αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε επιταχυνόμενες συνθήκες (40 ± 2 °C - 75% RH ± 5% RH).



Σχήμα A.3.48: Ποσοστό προσμίξεων % επί του συνόλου αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε ενδιάμεσες συνθήκες (30 ± 2 °C - 65% RH ± 5% RH).



Σχήμα Α.3.49: Ποσοστό προσμίξεων % επί του συνόλου αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης 75 mg/5 ml ως προς βάση σε μακροπρόθεσμες συνθήκες ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ - $60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$).

Κατά τις μελέτες σταθερότητας της κλοπιδογρέλης παρατηρήθηκε ανιχνεύσιμο ποσοστό προσμίξεων, ιδιαίτερα της πρόσμιξης Α. Η πρόσμιξη Α ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 10% επί του συνόλου στους 6 μήνες σε επιταχυνόμενες συνθήκες, 3,5% σε ενδιάμεσες συνθήκες και 3,8% σε μακροπρόθεσμες. Οι τιμές είναι προφανώς εκτός ορίων φαρμακοποιίας. Επιπλέον η αστάθεια παρατηρήθηκε και μακροσκοπικά, καθώς το δείγμα είχε αλλάξει χρώμα από άχρωμο-υποκίτρινο προς κίτρινο. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού θέτουν θέμα σταθερότητας του αιθανολικού διαλύματος κλοπιδογρέλης ή της κλοπιδογρέλης σε μορφή διαλύματος γενικότερα. Η επίτευξη σταθερότητας απαιτεί περαιτέρω μελέτη και προφανώς και χρήση συντηρητικών και αντιοξειδωτικών.

A.3.4. ΟΜΟΙΟΜΟΡΦΙΑ ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΚΑΙ ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ.

Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν στις τελικές φαρμακοτεχνικές μορφές στο γάλα. Μετά την προσθήκη του διαλύματος ασπιρίνης ή των αιθανολικών διαλυμάτων δαναζόλης, κυκλοσπορίνης και κλοπιδογρέλης, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από την επιφάνεια, τη μέση και τον πυθμένα του δείγματος σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (2 min, 1 h, 2 h και 4 h).

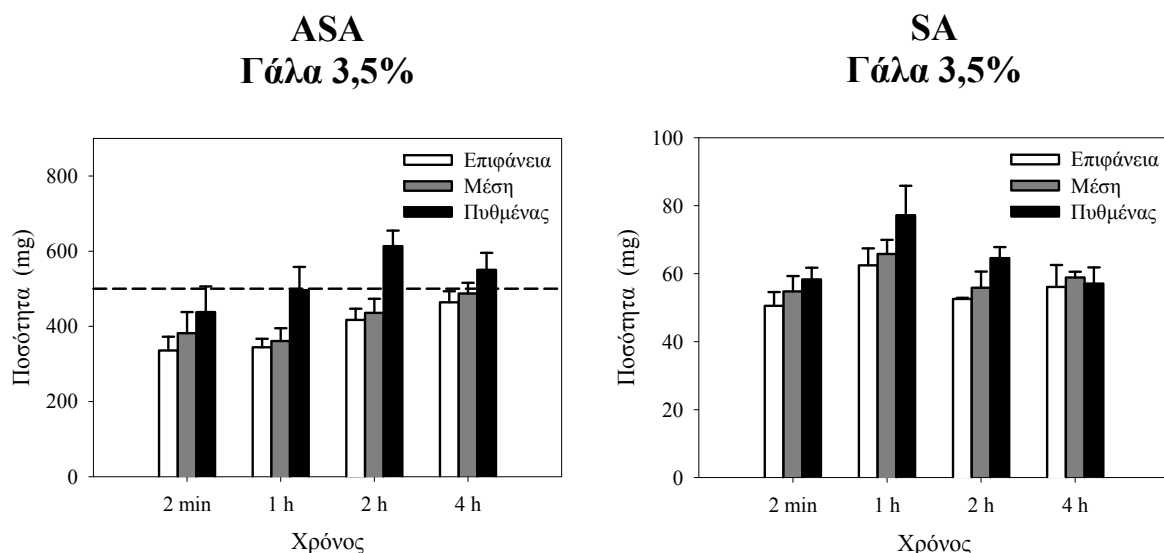
Χρησιμοποιήθηκαν επίσης κόνεις και διασπειρόμενα δισκία κυκλοσπορίνης και κλοπιδογρέλης.

A.3.4.1. Αναβράζοντα δισκία

Πριν την έναρξη των πειραμάτων σε γάλα, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός του εμπορικά διαθέσιμου αναβράζοντος δισκίου ύστερα από προσθήκη σε 100 ml νερού. Αμέσως μετά την ολοκλήρωση του αναβρασμού πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός με την ίδια αναλυτική μέθοδο. Τα αποτελέσματα ήταν 474,8 mg ακετυλοσαλικυλικού οξέος ($\pm 6,0$ mg) και 6,06 mg σαλικυλικού οξέος ($\pm 0,21$ mg). Η ποσότητα αντιστοιχεί σε 482,7 mg ακετυλοσαλικυλικού οξέος ($\pm 5,9$ mg).

A.3.4.1.1. Ασπιρίνη σε 20ml νερού

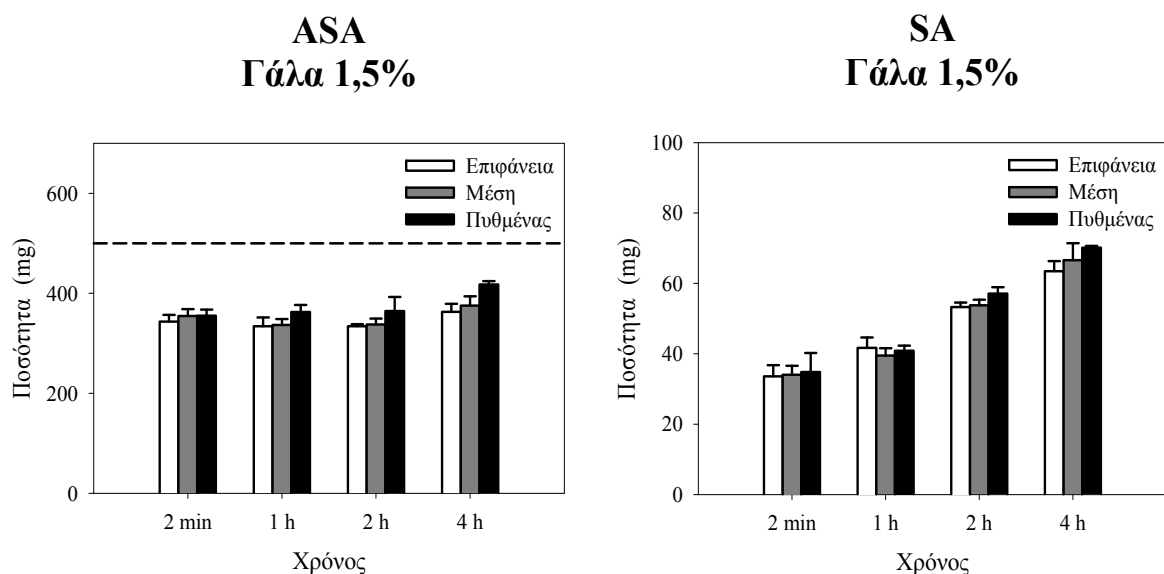
Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ύστερα από τη χρήση αναβραζόντων δισκίων ασπιρίνης. Τα δισκία αρχικά διαλύθηκαν σε 20 ml νερού και στη συνέχεια προστέθηκαν σε 180 ml γάλακτος (συνολικός όγκος 200 ml). Παρουσιάζονται διαδοχικά τα αποτελέσματα για γάλα 3,5%, 1,5% και 0% περιεκτικότητας σε λίπος.



Σχήμα Α.3.50: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα σκευάσματος ασπιρίνης σε γάλα 3,5% ύστερα από αναβρασμό σε 20 ml νερού. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 500 mg της αρχικής δόσης ασπιρίνης. ASA: ακετυλοσαλικυλικό οξύ, SA: σαλικυλικό οξύ.

Πίνακας Α.3.XXIV: Ποσότητες ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ASA) και σαλικυλικού οξέος (SA) σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% και αρχικό αναβρασμό σε 20 ml νερού. Η συνολική ποσότητα είναι εκπεφρασμένη ως προς ASA (ιδανική τιμή 500 mg).

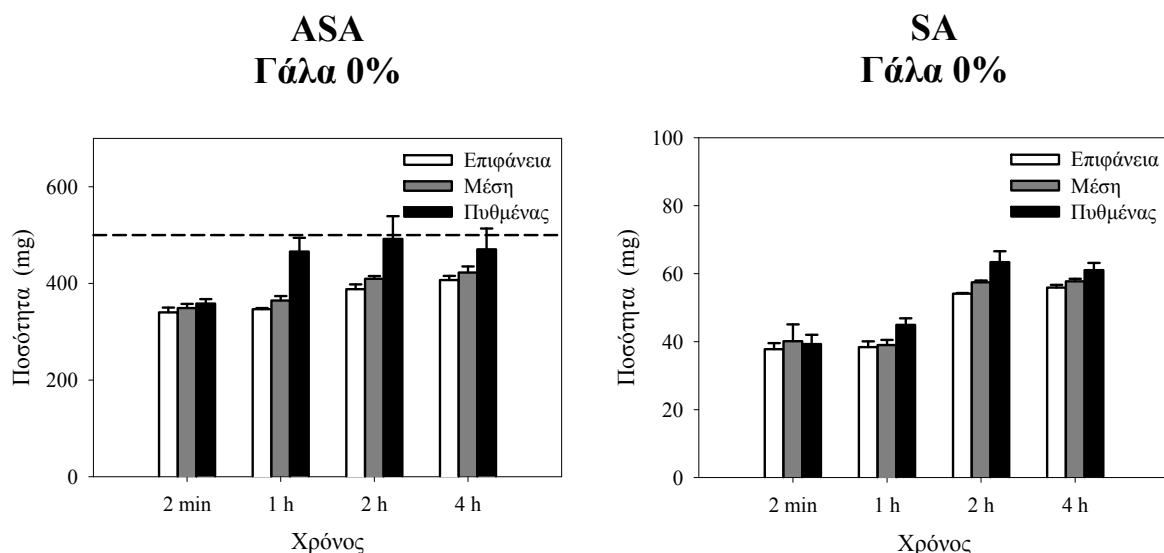
Χρόνος	Ποσότητα (mg)								
	Επιφάνεια			Μέση			Πυθμένας		
	ASA	SA	Σύνολο	ASA	SA	Σύνολο	ASA	SA	Σύνολο
2 min	336 (±36)	50,5 (±4,1)	401,74	382 (±56)	54,8 (±4,5)	453,16	437 (±68)	58,3 (±3,5)	513,72
1 h	344 (±22)	62,45 (±5,0)	425,60	361 (±33)	65,8 (±4,2)	446,58	496 (±62)	77,2 (±8,6)	596,46
2 h	416 (±30)	52,56 (±0,36)	485,29	435 (±37)	55,9 (±4,7)	508,60	613 (±42)	64,6 (±3,2)	697,26
4 h	464 (±29)	56,1 (±6,4)	536,97	487 (±29)	58,9 (±1,7)	563,85	550 (±45)	57,1 (±4,7)	624,67



Σχήμα Α.3.51: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα σκευάσματος ασπιρίνης σε γάλα 1,5% ύστερα από αναβρασμό σε 20 ml νερού. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 500 mg της αρχικής δόσης ασπιρίνης. ASA: ακετυλοσαλικυλικό οξύ, SA: σαλικυλικό οξύ.

Πίνακας Α.3.XXV: Ποσότητες ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ASA) και σαλικυλικού οξέος (SA) σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 1,5% και αρχικό αναβρασμό σε 20 ml νερού. Η συνολική ποσότητα είναι εκπεφρασμένη ως προς ASA (ιδανική τιμή 500 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)								
	Επιφάνεια			Μέση			Πυθμένας		
	ASA	SA	Σύνολο	ASA	SA	Σύνολο	ASA	SA	Σύνολο
2 min	343 (±13)	33,6 (±3,2)	387,20	354 (±14)	34,1 (±2,5)	398,96	355 (±12)	34,8 (±5,5)	400,59
1 h	334 (±18)	41,7 (±2,9)	388,40	336 (±12)	39,5 (±2,1)	387,86	362 (±14)	40,9 (±1,4)	415,80
2 h	334,1 (±4,0)	53,3 (±1,3)	403,29	337 (±12)	53,8 (±1,6)	407,74	364 (±28)	57,1 (±1,8)	438,70
4 h	362 (±16)	63,5 (±2,9)	445,24	375 (±18)	66,6 (±4,8)	462,09	417,7 (±6,9)	70,14 (±0,48)	508,85



Σχήμα Α.3.52: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα σκευάσματος ασπιρίνης σε γάλα 0% ύστερα από αναβρασμό σε 20 ml νερού. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 500 mg της αρχικής δόσης ασπιρίνης. ASA: ακετυλοσαλικυλικό οξύ, SA: σαλικυλικό οξύ.

Πίνακας Α.3.XXVI: Ποσότητες ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ASA) και σαλικυλικού οξέος (SA) σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 0% και αρχικό αναβρασμό σε 20 ml νερού. Η συνολική ποσότητα είναι εκπεφρασμένη ως προς ASA (ιδανική τιμή 500 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)								
	Επιφάνεια			Μέση			Πυθμένας		
	ASA	SA	Σύνολο	ASA	SA	Σύνολο	ASA	SA	Σύνολο
2 min	340,2 (±9,6)	37,8 (±1,8)	389,25	349,0 (±8,4)	40,1 (±5,0)	401,19	358,1 (±9,4)	39,3 (±2,7)	409,21
1 h	346,5 (±2,4)	38,4 (±1,7)	396,41	364,6 (±9,2)	39,0 (±1,4)	415,33	466 (±28)	44,9 (±2,0)	524,37
2 h	388 (±10)	54,13 (±0,18)	458,20	409,5 (±5,6)	57,46 (±0,53)	484,21	492 (±47)	63,4 (±3,2)	574,33
4 h	406,9 (±8,7)	55,91 (±0,76)	479,56	423 (±12)	57,76 (±0,76)	497,67	470 (±43)	61,0 (±2,1)	549,67

Από τα αποτελέσματα είναι προφανές ότι παρατηρείται μια ανομοιογένεια στην κατανομή της ασπιρίνης στο ποτήρι ζέσεως. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται στον πυθμένα του δείγματος, ενώ χαμηλότερες εντοπίζονται κοντά στην επιφάνεια. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι κατά τον αναβρασμό του δισκίου ασπιρίνης η διάλυση δεν ήταν πλήρης. Η διαλυτότητα της ασπιρίνης στο νερό

(~3 mg/ml) δεν επαρκεί για την πλήρη διάλυσή της. Επομένως το αρχικό προϊόν είναι εναιώρημα.

Με την πάροδο του χρόνου η ασπιρίνη διαλύεται και οι συγκεντρώσεις στο γάλα αυξάνονται. Εφόσον δεν υπήρχε ανάδευση, η διαδικασία της διάλυσης εξελίσσεται με το φαινόμενο της διάχυσης.

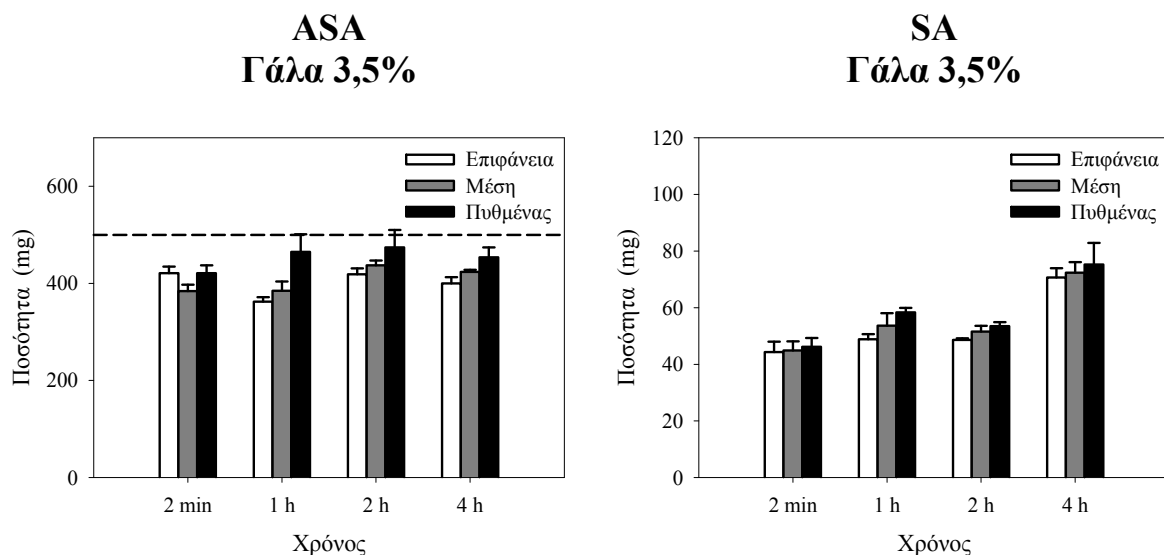
Παράλληλα παρατηρείται και μικρή αύξηση των επιπέδων του σαλικυλικού οξέος, το οποίο είναι το προϊόν υδρόλυσης της ασπιρίνης. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα αρχικά επίπεδα σαλικυλικού οξέος είναι σχετικά υψηλά. Με την πάροδο του χρόνου αυξάνονται τα επίπεδα του, όχι όμως σε ποσοστό που να δημιουργεί ανησυχία ή δείγμα κακής σταθερότητας. Επιπλέον, αν και το σαλικυλικό οξύ είναι ερεθιστικό για το στομάχι, οι γαστροπροστατευτικές ιδιότητες του γάλακτος αντισταθμίζουν την ερεθιστική του δράση.

Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μορφών γάλακτος, επομένως η περιεκτικότητα σε λίπος δεν επηρεάζει τη σταθερότητα και την ομοιογένεια.

A.3.4.1.2. Ασπιρίνη σε 40ml νερού

Στη συνέχεια ακολουθούν τα αποτελέσματα ύστερα από τη χρήση αναβραζόντων δισκίων ασπιρίνης. Τα δισκία αρχικά διαλύθηκαν σε 40 ml νερού και στη συνέχεια προστέθηκαν σε 180 ml πλήρους γάλακτος.

Η χρήση 40 ml νερού επιλέχθηκε για να μελετηθεί η επίδραση του αρχικού όγκου αναβρασμού στην ομοιομορφία και τη σταθερότητας της φαρμακοτεχνικής μορφής.



Σχήμα Α.3.53: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα σκευάσματος ασπιρίνης σε γάλα 3,5% ύστερα από αναβρασμό σε 40 ml νερού. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 500 mg της αρχικής δόσης ασπιρίνης. ASA: ακετυλοσαλικυλικό οξύ, SA: σαλικυλικό οξύ.

Πίνακας Α.3.XXVII: Ποσότητες ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ASA) και σαλικυλικού οξέος (SA) σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% και αρχικό αναβρασμό σε 40 ml νερού. Η συνολική ποσότητα είναι εκπεφρασμένη ως προς ASA (ιδανική τιμή 500 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)								
	Επιφάνεια			Μέση			Πυθμένας		
	ASA	SA	Σύνολο	ASA	SA	Σύνολο	ASA	SA	Σύνολο
2 min	363,3 (±9,4)	44,3 (±3,7)	420,92	384 (±13)	44,9 (±3,2)	442,42	421 (±16)	46,2 (±3,1)	481,16
1 h	362,2 (±9,5)	48,8 (±1,8)	425,71	385 (±19)	53,6 (±4,4)	454,49	465 (±36)	58,3 (±1,6)	540,52
2 h	419 (±12)	48,57 (±0,58)	481,84	437,4 (±9,6)	51,5 (±2,0)	504,40	474 (±36)	53,5 (±1,4)	543,87
4 h	400 (±13)	70,7 (±3,3)	491,65	423,7 (±4,4)	72,3 (±3,7)	517,73	454 (±21)	75,2 (±7,7)	551,36

Η αύξηση του αρχικού όγκου νερού φαίνεται να βελτιώνει την αρχική ποσότητα διαλυμένης ασπιρίνης, χωρίς να μειώνει τη σταθερότητά της. Είναι δεδομένο ότι τα 40 ml νερού δεν επαρκούν για την πλήρη διάλυση της ασπιρίνης. Η ομοιογένεια του δείγματος δεν επηρεάζεται, και παρατηρείται ο ίδιος βαθμός ετερογένειας όπως και

στις περιπτώσεις χρήσης μικρότερου όγκου νερού. Η αύξηση του όγκου του νερού δεν φαίνεται να επηρεάζει την υδρόλυση της ασπιρίνης προς σαλικυλικό οξύ.

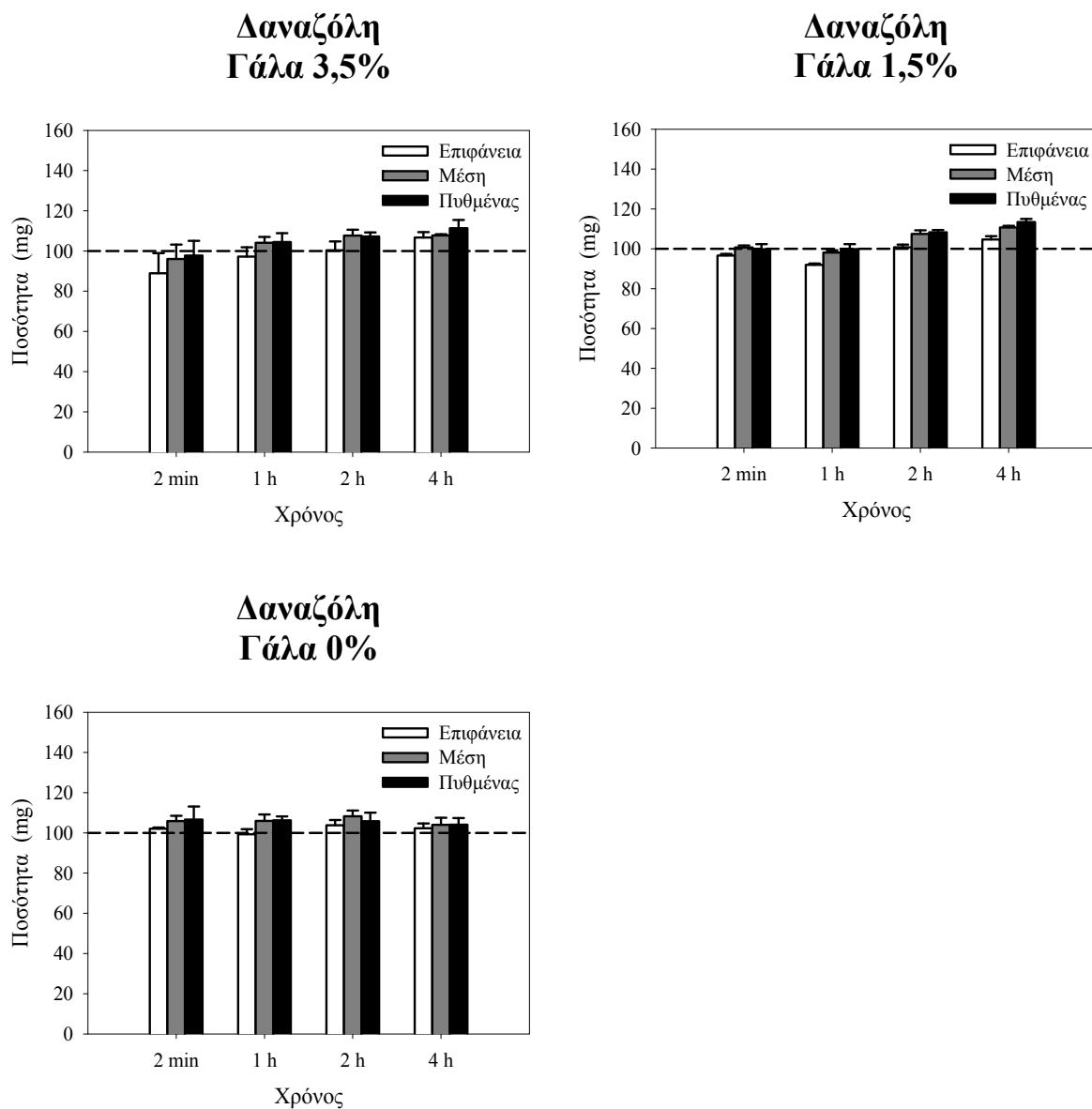
Συνολικά η χρήση 40 ml νερού κατά τον αναβρασμό οδηγεί σε μικρά μόνο οφέλη.

A.3.4.2. *Αιθανολικά διαλύματα*

A.3.4.2.1. *Δαναζόλη*

Το πρώτο φάρμακο που μελετήθηκε ως αιθανολικό διάλυμα στις μελέτες ομοιομορφίας και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας ήταν η δαναζόλη. Για το σκοπό αυτό 100 mg δαναζόλης διαλύθηκαν σε 10 ml απόλυτης αιθανόλης, και στη συνέχεια προστέθηκαν σε 190 ml γάλακτος (συνολικός όγκος 200 ml).

Χρησιμοποιήθηκε πλήρες γάλα (3,5% λίπος), ημιαποβουτυρωμένο (1,5% λίπος) και αποβουτυρωμένο (0% λίπος).



Σχήμα Α.3.54: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης σε γάλα 3,5, 1,5 και 0%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 100 mg της αρχικής δόσης δαναζόλης.

Πίνακας Α.3.XXVIII: Ποσότητες δαναζόλης σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 100 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	88,9	9,9	96,0	7,2	97,7	7,3
1 h	97,2	4,6	104,1	2,9	104,4	4,4
2 h	100,3	4,4	107,6	2,9	107,2	2,0
4 h	106,7	2,6	107,71	0,67	111,4	4,1

Πίνακας Α.3.XXIX: Ποσότητες δαναζόλης σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 1,5% (ιδανική τιμή 100 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	96,63	0,87	100,70	0,93	99,8	2,6
1 h	91,92	0,69	98,1	1,1	99,8	2,5
2 h	100,7	1,4	107,5	1,8	108,2	1,1
4 h	104,6	1,8	110,70	0,83	113,4	1,6

Πίνακας Α.3.XXX: Ποσότητες δαναζόλης σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 0% (ιδανική τιμή 100 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	102,10	0,59	105,9	2,6	106,6	6,5
1 h	99,3	2,6	106,0	3,1	106,3	1,9
2 h	103,8	2,6	108,3	2,8	105,8	4,3
4 h	102,3	2,4	104,0	3,6	104,1	3,3

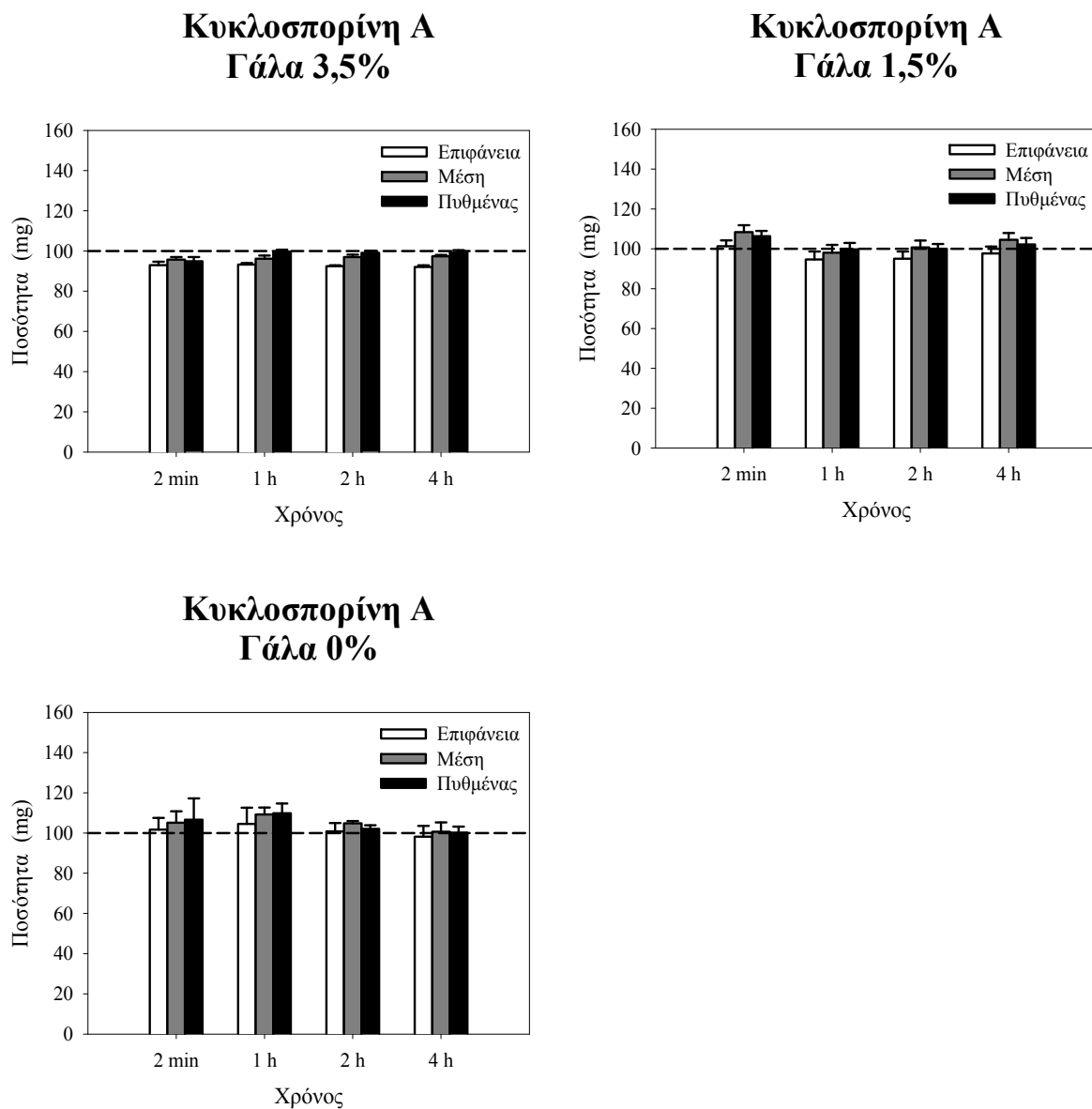
Είναι προφανές ότι η χρήση αιθανολικού διαλύματος της δαναζόλης οδηγεί σε ομοιομορφία του περιεχομένου του ποτηριού ζέσεως. Οι διαφορές μεταξύ των τριών σημείων δειγματοληψίας είναι πρακτικά αμελητέες. Η ελαφρώς υψηλότερη συγκέντρωση που παρατηρείται στον πυθμένα ενδεχομένως είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης της βαρύτητας στα σωματίδια του γάλακτος. Η σταθερότητα δεν επηρεάζεται, καθώς η δαναζόλη παραμένει σταθερή. Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε λίπος επίσης δεν επηρεάζει τη διαλυτότητα ή τη σταθερότητα της δαναζόλης.

Συνολικά η χρήση αιθανολικού διαλύματος δαναζόλης παρουσιάζει επιθυμητά χαρακτηριστικά.

A.3.4.2.2. Κυκλοσπορίνη

Το δεύτερο φάρμακο που μελετήθηκε ως αιθανολικό διάλυμα στις μελέτες ομοιομορφίας και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας ήταν η κυκλοσπορίνη. Για το σκοπό αυτό 100 mg κυκλοσπορίνης διαλύθηκαν σε 5 ml αιθανόλης 60% κ.ο., και στη συνέχεια προστέθηκαν σε 195 ml γάλακτος (συνολικός όγκος 200 ml).

Χρησιμοποιήθηκε πλήρες γάλα (3,5% λίπος), ημιαποβουτυρωμένο (1,5% λίπος) και αποβουτυρωμένο (0% λίπος).



Σχήμα Α.3.55: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης Α σε γάλα 3,5, 1,5 και 0%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 100 mg της αρχικής δόσης κυκλοσπορίνης.

Πίνακας Α.3.XXXI: Ποσότητες κυκλοσπορίνης Α σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 100 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	93,0	1,7	95,7	1,3	94,9	2,1
1 h	93,25	0,74	96,2	1,6	99,6	1,0
2 h	92,40	0,53	97,0	1,2	99,1	1,1
4 h	92,08	0,86	97,34	0,74	99,3	1,1

Πίνακας Α.3.XXXII: Ποσότητες κυκλοσπορίνης Α σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 1,5% (ιδανική τιμή 100 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	101,3	2,9	108,4	3,4	106,4	2,6
1 h	94,7	4,0	98,0	3,9	99,7	3,3
2 h	95,1	3,6	100,7	3,5	100,0	2,4
4 h	97,7	3,4	104,5	3,4	102,2	3,2

Πίνακας Α.3.XXXIII: Ποσότητες κυκλοσπορίνης Α σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 0% (ιδανική τιμή 100 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	101,7	5,8	105,2	5,7	107	11
1 h	104,6	8,0	109,2	3,4	109,8	4,8
2 h	100,8	4,1	104,8	1,1	102,1	1,8
4 h	98,2	5,3	100,6	4,7	100,2	3,0

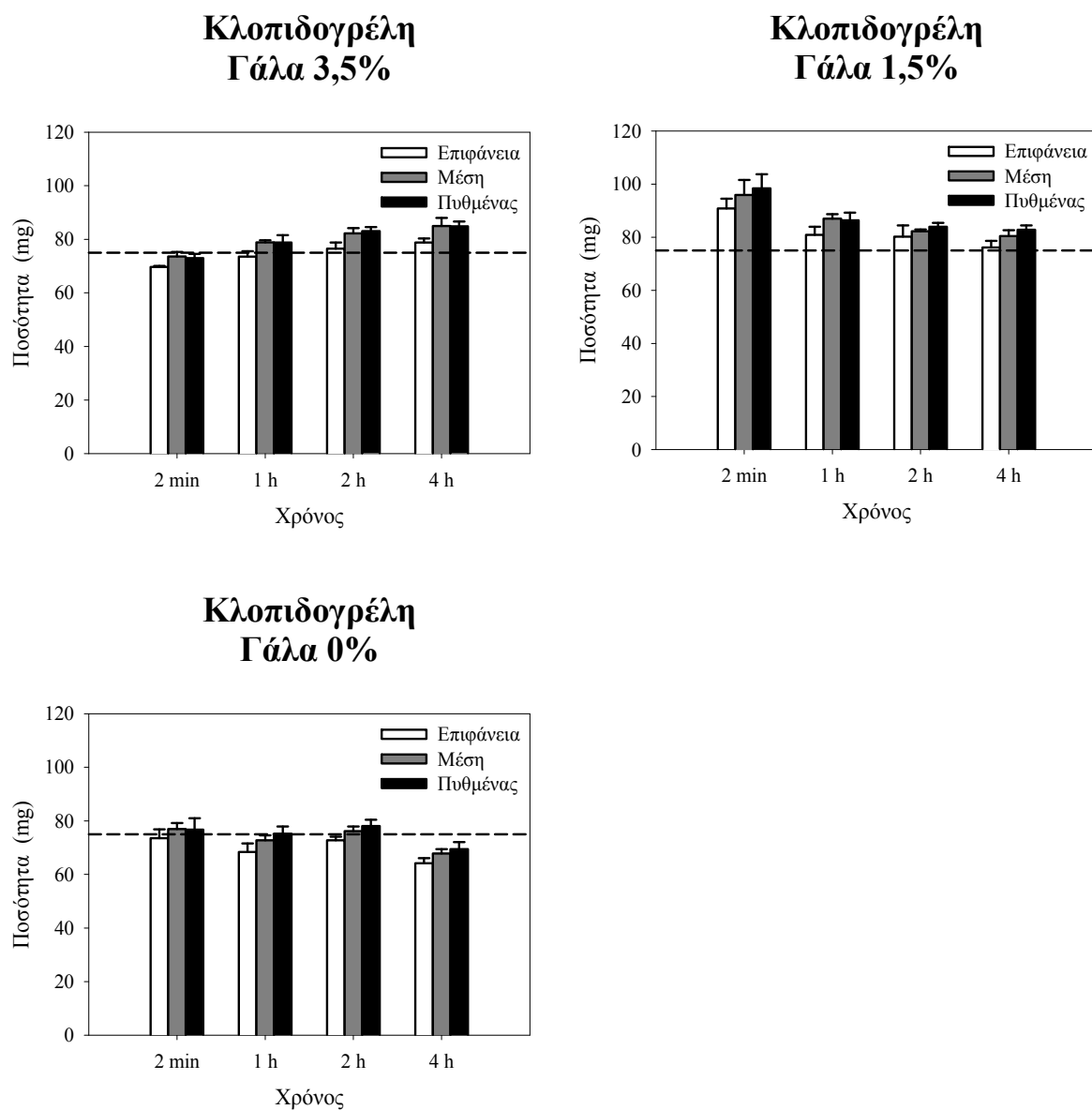
Αντίστοιχα με τη δαναζόλη οι τελικές φαρμακοτεχνικές μορφές που προκύπτουν από την προσθήκη αιθανολικών διαλυμάτων κυκλοσπορίνης σε γάλα χαρακτηρίζονται από υψηλού βαθμού ομοιογένεια μεταξύ των δειγματοληπτικών σημείων και εξαιρετική σταθερότητα. Η κυκλοσπορίνη παραμένει διαλυμένη στο γάλα κατά τη διάρκεια του πειράματος και η διαλυτότητά της είναι ανεξάρτητη της περιεκτικότητας του γάλακτος σε λίπος.

Επομένως και το αιθανολικό διάλυμα κυκλοσπορίνης παρουσιάζει επιθυμητά χαρακτηριστικά για φαρμακοτεχνική μορφή.

A.3.4.2.3. Κλοπιδογρέλη

Το τελευταίο φάρμακο που μελετήθηκε ως αιθανολικό διάλυμα στις μελέτες ομοιομορφίας και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας ήταν η κλοπιδογρέλη. Για το σκοπό αυτό διαλύθηκε ποσότητα που αντιστοιχεί σε 75 mg βάσης κλοπιδογρέλης σε 5 ml αιθανολικού διαλύματος 60%, και στη συνέχεια προστέθηκε σε 195 ml γάλακτος (συνολικός όγκος 200 ml).

Χρησιμοποιήθηκε πλήρες γάλα (3,5% λίπος), ημιαποβουτυρωμένο (1,5% λίπος) και αποβουτυρωμένο (0% λίπος).



Σχήμα Α.3.56: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα αιθανολικού διαλύματος βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε γάλα 3,5, 1,5 και 0%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 75 mg της αρχικής δόσης κλοπιδογρέλης.

Πίνακας Α.3.XXXIV: Ποσότητες βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 75 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	69,69	0,36	73,6	1,7	73,0	1,6
1 h	73,5	2,0	78,84	0,77	78,8	2,8
2 h	76,5	2,3	82,2	1,9	83,3	1,6
4 h	78,8	1,5	84,9	3,0	84,8	1,8

Πίνακας Α.3.XXXV: Ποσότητες βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 1,5% (ιδανική τιμή 75 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	90,8	3,7	95,9	5,6	98,4	5,3
1 h	80,9	3,0	86,9	1,7	86,4	2,9
2 h	80,2	4,2	82,21	0,70	83,9	1,5
4 h	76,1	2,5	80,4	2,2	82,8	1,6

Πίνακας Α.3.XXXVI: Ποσότητες βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 0% (ιδανική τιμή 75 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	73,6	3,3	76,9	2,3	76,7	4,3
1 h	68,4	3,2	72,8	1,8	75,2	2,7
2 h	72,8	1,3	76,2	1,7	78,1	2,3
4 h	64,2	1,9	67,8	1,6	69,4	2,7

Η κλοπιδογρέλη παρουσιάζει υψηλότερη ανομοιογένεια σε σχέση με τα αιθανολικά διαλύματα δαναζόλης και κυκλοσπορίνης. Το γεγονός αυτό είναι πιο έντονο στο ημιαποβουτυρωμένο γάλα. Ενδεχομένως οφείλεται στην ιοντική φύση του μορίου, κατά αντιστοιχία με την ασπιρίνη.

Τελικά η διαλυτότητα της κλοπιδογρέλης στο γάλα παραμένει υψηλή, και η ουσία είναι σταθερή για τη διάρκεια του πειράματος.

A.3.4.3. Κόνεις

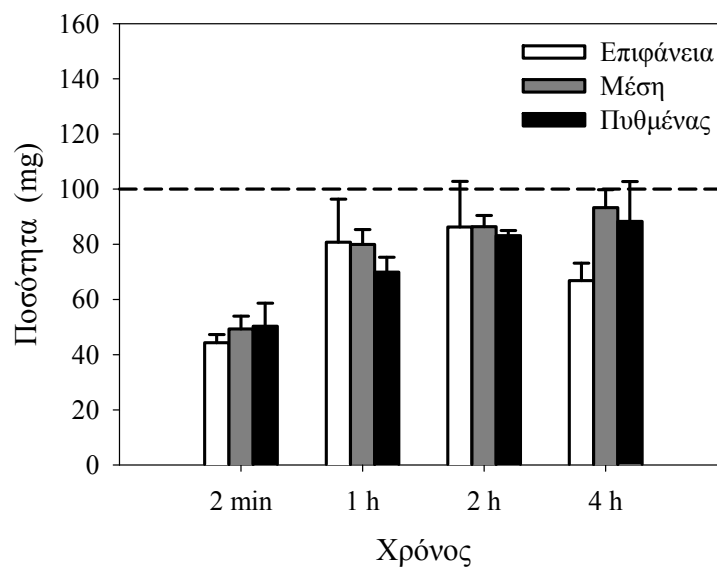
Οι κόνεις παρασκευάστηκαν με στόχο να περιέχεται η δραστική ποσότητα των φαρμάκων σε 1500 mg κόνεως. Πριν τα πειράματα σε γάλα πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός στις κόνεις και υπολογίστηκε η ποσότητα που περιέχει 100 mg κυκλοσπορίνης και 75 mg κλοπιδογρέλης. Στα πειράματα που ακολουθούν χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες κόνεων που περιείχαν τις παραπάνω τιμές δραστικών.

A.3.4.3.1. Κυκλοσπορίνη

Η κόνις κυκλοσπορίνης περιλαμβάνει ανά sachet: 100 mg κυκλοσπορίνης A, 1279,25 mg μαννιτόλης, 45 mg PVP k25 και 75 mg crospovidone.

Η κόνις προστέθηκε σε 200 ml πλήρους γάλακτος και ακολούθησε ελαφρά ανάδευση.

Κυκλοσπορίνη A Γάλα 3,5%



Σχήμα A.3.57: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα κόνεως κυκλοσπορίνης A σε γάλα 3,5%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 100 mg της αρχικής δόσης κυκλοσπορίνης.

Πίνακας Α.3.XXXVII: Ποσότητες κυκλοσπορίνης Α σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής (κόνεως) και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 100 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	44,3	3,0	49,4	4,6	50,3	8,4
1 h	81	16	80,0	5,4	69,9	5,4
2 h	86	16	86,4	4,0	83,2	1,9
4 h	66,8	6,3	93,3	6,5	88	14

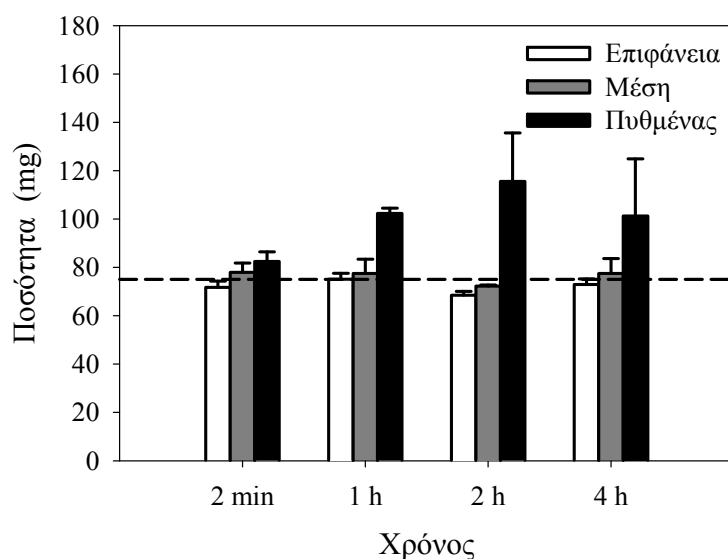
Η κόνις κυκλοσπορίνης δεν διαλύεται αμέσως στο γάλα, καθώς στα 2 λεπτά μόνο το 50% περίπου της δόσης είναι σε διαλυμένη μορφή. Στη συνέχεια το ποσοστό αυξάνεται, εντούτοις η ανομοιογένεια μεταξύ των δειγματοληπτικών σημείων είναι μεγάλη. Οι υψηλές συγκεντρώσεις που παρατηρούνται στην επιφάνεια οφείλονται στην συγκέντρωση της κόνεως στην περιοχή. Ενδεχομένως η κόνις είναι αρκετά υδρόφοβη με αποτέλεσμα η διαβροχή της από το γάλα να είναι δύσκολη, για το λόγο αυτό παραμένει στην επιφάνεια. Στη συνέχεια η κόνις σταδιακά κατακάθεται και η διαλυμένη ποσότητα της κυκλοσπορίνης αυξάνεται. Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η κόνις κυκλοσπορίνης χρήζει περαιτέρω βελτίωσης.

A.3.4.3.2. Κλοπιδογρέλη

Η κόνις κλοπιδογρέλης περιλαμβάνει ανά sachet: 112,1 mg βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης, 1222,15 mg μαννιτόλης, 45 mg PVP k25 και 75 mg crospovidone.

Η κόνις προστέθηκε σε 200 ml πλήρους γάλακτος και ακολούθησε ελαφρά ανάδευση.

Κλοπιδογρέλη Γάλα 3,5%



Σχήμα Α.3.58: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα κόνεως βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε γάλα 3,5%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 75 mg της αρχικής δόσης κλοπιδογρέλης.

Πίνακας Α.3.XXXVIII: Ποσότητες βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής (κόνεως) και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 75 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	71,7	2,6	78,0	3,9	82,5	3,9
1 h	75,1	2,4	77,5	5,8	102,3	2,2
2 h	68,5	1,6	72,26	0,45	116	20
4 h	72,9	2,3	77,4	6,2	101	24

Η κόνις της κλοπιδογρέλης φαίνεται να διαλύεται αμέσως στο γάλα, καθώς οι συγκεντρώσεις που παρατηρούνται αποδεικνύουν ότι η δραστική διαλύεται ποσοτικά. Με την πάροδο του χρόνου όμως η κόνις κατακάθεται στον πυθμένα του ποτηριού ζέσεως, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις στην περιοχή. Επομένως η διάλυση δεν είναι ποσοτική και ποσότητα στερεού εντοπίζεται στην πυθμένα.

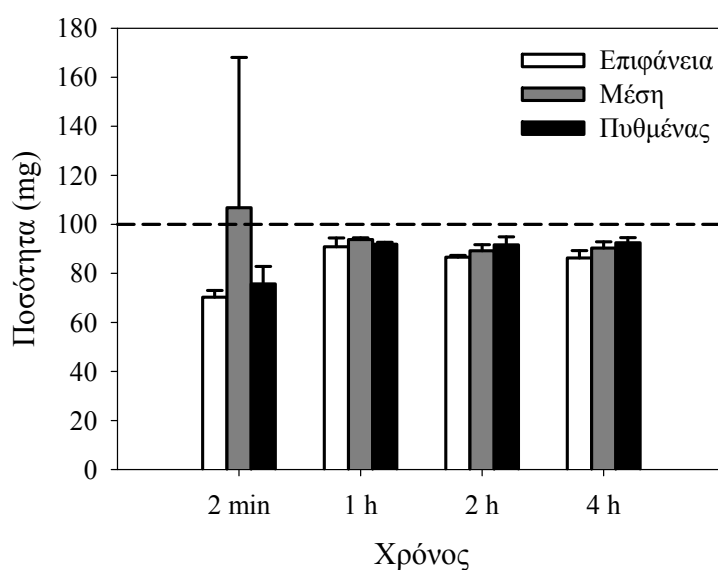
A.3.4.4. Διασπειρόμενα δισκία

Τα διασπειρόμενα δισκία παρασκευάστηκαν με απευθείας συμπίεση των αντίστοιχων κόνεων.

A.3.4.4.1. Κυκλοσπορίνη

Το διασπειρόμενο δισκίο κυκλοσπορίνης προστέθηκε σε 200 ml πλήρους γάλακτος και ακολούθησε έντονη ανάδευση.

Κυκλοσπορίνη Α Γάλα 3,5%



Σχήμα A.3.59: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα διασπειρόμενων δισκίων κυκλοσπορίνης Α σε γάλα 3,5%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 100 mg της αρχικής δόσης κυκλοσπορίνης.

Πίνακας A.3.XXXIX: Ποσότητες κυκλοσπορίνης Α σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής (διασπειρόμενα δισκία) και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 100 mg).

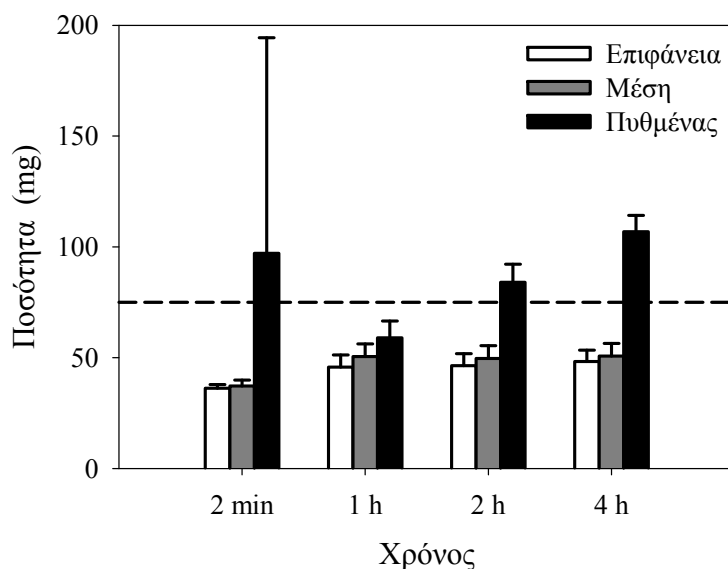
Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	70,3	2,7	107	61	75,7	7,1
1 h	90,8	3,6	93,81	0,73	91,90	0,78
2 h	86,63	0,69	89,2	2,5	91,6	3,3
4 h	86,3	3,0	90,4	2,5	92,5	2,1

Το διασπειρόμενο δισκίο κυκλοσπορίνης παρουσιάζει ικανοποιητικά χαρακτηριστικά. Με εξαίρεση την μέτρηση στη μέση του ποτηριού στα 2 min, η οποία προφανώς οφείλεται σε αναρρόφηση στερεού κατά τη δειγματοληψία, οι υπόλοιπες μετρήσεις δείχνουν ότι ποσοστό ~75% της δόσης είναι άμεσα διαθέσιμο σε διαλυμένη μορφή, ενώ με την πάροδο του χρόνου το ποσοστό αυξάνεται σε 90% περίπου.

A.3.4.4.2. Κλοπιδογρέλη

Το διασπειρόμενο δισκίο κλοπιδογρέλης προστέθηκε σε 200 ml πλήρους γάλακτος και ακολούθησε έντονη ανάδευση.

Κλοπιδογρέλη Γάλα 3,5%



Σχήμα Α.3.60: Ομοιομορφία φαρμακοτεχνικής μορφής και βραχυπρόθεσμη σταθερότητα διασπειρόμενων δισκίων βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε γάλα 3,5%. Η στικτή γραμμή αναφέρεται στα 75 mg της αρχικής δόσης κλοπιδογρέλης.

Πίνακας Α.3.ΧΛ: Ποσότητες βενζολοσουλφονικής κλοπιδογρέλης εκπεφρασμένης ως προς βάση σε διάφορες χρονικές στιγμές και σημεία δειγματοληψίας ύστερα από πείραμα ομοιομορφίας φαρμακοτεχνικής μορφής (διασπειρόμενα δισκία) και βραχυπρόθεσμης σταθερότητας σε γάλα 3,5% (ιδανική τιμή 75 mg).

Χρόνος	Ποσότητα (mg)					
	Επιφάνεια		Μέση		Πυθμένας	
	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)	$\bar{x}$	SD (n=3)
2 min	36,2	1,7	37,2	2,6	97	97
1 h	45,7	5,5	50,5	5,7	59,0	7,6
2 h	46,4	5,4	49,7	5,7	84,0	8,2
4 h	48,3	5,1	50,7	5,7	106,8	7,4

Το διασπειρόμενο δισκίο κλοπιδογρέλης παρουσιάζει τα προβλήματα ανομοιογένειας που παρουσιάζει και η κόνις. Σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται στον πυθμένα, ενώ στο υπόλοιπο δείγμα οι συγκεντρώσεις είναι χαμηλότερες από τις αναμενόμενες. Η φαρμακοτεχνική μορφή χρήζει περαιτέρω βελτίωσης.

A.3.5. *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΕΣ

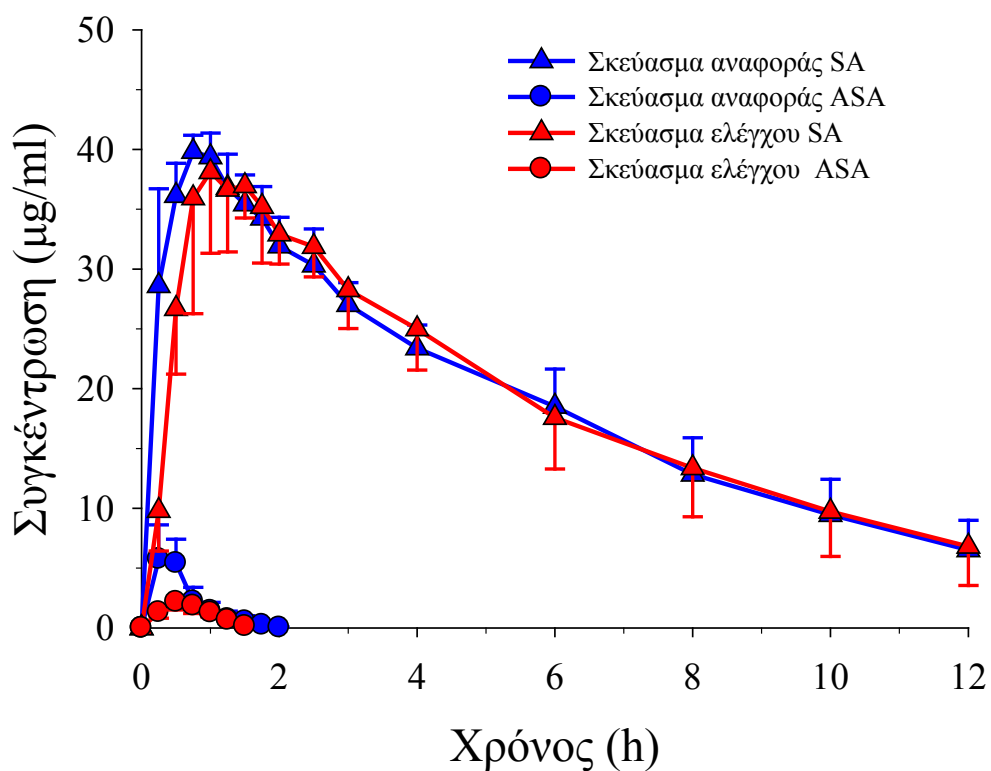
Πραγματοποιήθηκαν *in vivo* μελέτες για το σκεύασμα ασπιρίνης σε 2 εθελοντές. Χρησιμοποιήθηκε το αναβράζον δισκίο ασπιρίνης σε νερό ως σκεύασμα αναφοράς, ενώ ο σχεδιασμός ήταν 4 περιόδων.

Για το σκεύασμα κυκλοσπορίνης η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ένα εθελοντή χωρίς τη χρήση σκευάσματος αναφοράς.

Τα αποτελέσματα των *in vivo* μελετών της ασπιρίνης και της κυκλοσπορίνης έχουν παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία (Charkoftaki et al., 2010b).

A.3.5.1. *Ασπιρίνη*

Τα αποτελέσματα των *in vivo* μελετών συγκριτικής αξιολόγησης μεταξύ του σκευάσματος αναβράζουσας ασπιρίνης σε ένα ποτήρι νερό και αναβράζουσας ασπιρίνης σε ένα ποτήρι γάλα αφού έχει προηγηθεί αρχικός αναβρασμός σε μικρό όγκο νερού, παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα Α.3.61: Καμπύλες συγκέντρωσης-χρόνου για τα σκευάσματα αναφοράς και ελέγχου ασπιρίνης. ($\bar{x} \pm SD$, $n=4$, SA: Σαλικυλικό οξύ, ASA: Ακετυλοσαλικυλικό οξύ)

Αναλυτικότερα οι εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα. Οι ατομικές καμπύλες συγκέντρωσης-χρόνου για κάθε εθελοντή παρουσιάζονται στο Παράρτημα II (σελ. 307).

Πίνακας Α.3.XLI: Φαρμακοκινητικές παράμετροι της *in vivo* μελέτης ασπιρίνης για το σκεύασμα ελέγχου και αναφοράς ($n = 4$, SA: Σαλικυλικό οξύ, ASA: Ακετυλοσαλικυλικό οξύ).

Φαρμακοκινητικές παράμετροι	Σκεύασμα αναφοράς		Σκεύασμα ελέγχου	
	SA	ASA	SA	ASA
$C_{\max}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	39,8 ($\pm 1,4$)	5,8 ($\pm 2,9$)	38,1 ($\pm 6,8$)	2,16 ($\pm 0,65$)
$AUC_{0 \rightarrow t}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	233 (± 27)	4,0 ($\pm 1,4$)	230 (± 45)	1,78 ($\pm 0,51$)
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	274 (± 51)	4,3 ($\pm 1,6$)	273 (± 73)	2,19 ($\pm 0,28$)
$t_{\max}$ (h)	0,75	0,25	1,00	0,50
k_{el} (h^{-1})	0,18 ($\pm 0,04$)	2,15 ($\pm 0,75$)	0,18 ($\pm 0,06$)	2,0 ($\pm 1,1$)

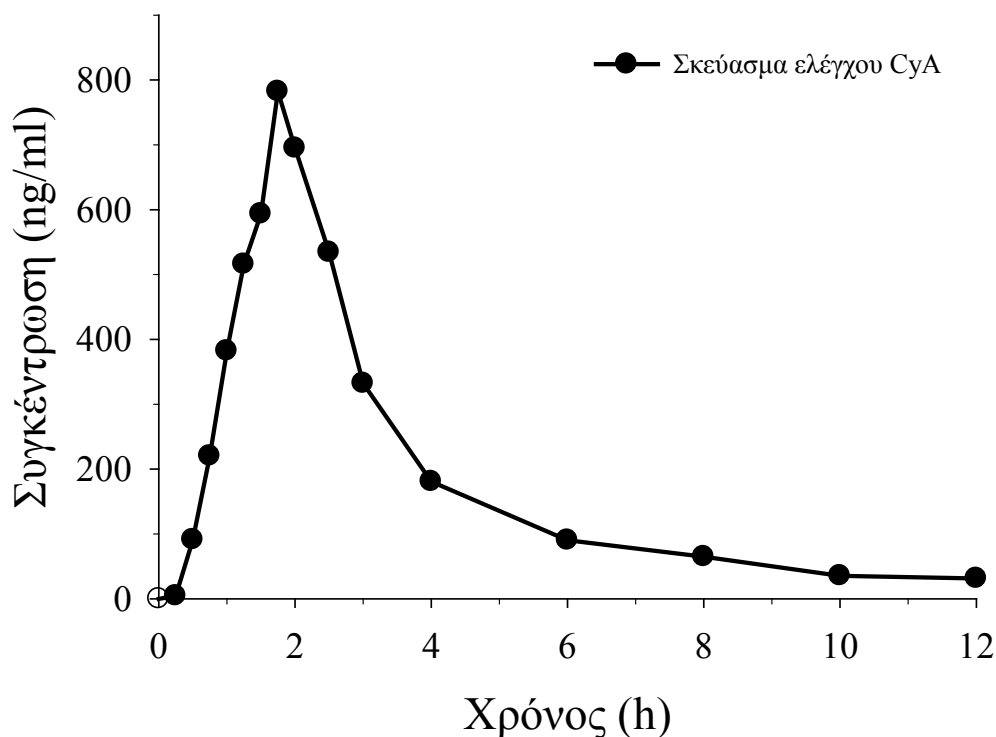
Η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη, η οποία εκφράζει την έκταση απορρόφησης, δείχνει ότι οι δύο μορφές απορροφώνται σε αντίστοιχο ποσοστό. (λόγος $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ Test/Reference = 1,00 για το σαλικυλικό οξύ). Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά στην επιφάνεια της καμπύλης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος (λόγος $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ Test/Reference = 0,51 για το ακετυλοσαλικυλικό οξύ). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε επίδραση του γάλακτος στην ταχύτητα υδρόλυσης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος *in vivo*. Κάτι τέτοιο όμως δεν έχει επιβεβαιωθεί από τα *in vitro* πειράματα.

Όσον αφορά το ρυθμό απορρόφησης, η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα του σαλικυλικού οξέος είναι πρακτικά ίδια (λόγος $C_{\max}$ Test/Reference = 0,96). Το ακετυλοσαλικυλικό οξύ παρουσιάζει μειωμένα μέγιστα επίπεδα στο πλάσμα (λόγος $C_{\max}$ Test/Reference = 0,38). Ο χρόνος εμφάνισης της μέγιστης συγκέντρωσης στο πλάσμα είναι μεγαλύτερος στην περίπτωση του γάλακτος. Προφανώς το θερμιδικό φορτίο του σκευάσματος καθυστερεί το χρόνο διέλευσης, με αποτέλεσμα να καθυστερεί η εμφάνιση της δραστικής ουσίας στην κυκλοφορία.

Εν κατακλείδι, τα δύο σκευάσματα φαίνεται να είναι βιοϊσοδύναμα όσον αφορά τη δραστική μορφή του σαλικυλικού οξέος. Παρατηρούνται κάποιες διαφοροποιήσεις όσον αφορά το ακετυλοσαλικυλικό οξύ. Για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικού αποτελέσματος απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός εθελοντών.

A.3.5.2. Κυκλοσπορίνη

Τα αποτελέσματα της *in vivo* μελέτης βιοδιαθεσιμότητας αιθανολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης 5 ml αραιωμένου σε ένα ποτήρι γάλα παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα A.3.62: Καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου για το σκεύασμα ελέγχου κυκλοσπορίνης (100 mg κυκλοσπορίνης σε 5 ml αιθανολικού διαλύματος 60% απαιωρημένα σε 195 ml γάλακτος).

Αναλυτικότερα οι εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα. Παράλληλα αντιπαραβάλλονται αναφερόμενες στη βιβλιογραφία τιμές.

Πίνακας Α.3.XLII: Φαρμακοκινητικές παράμετροι της in vivo μελέτης κυκλοσπορίνης Α για το σκεύασμα αναφοράς και σύγκριση με τιμές από τη βιβλιογραφία για σκευάσματα κυκλοσπορίνης (Kees et al., 2006).

Φαρμακοκινητικές παράμετροι	Σκεύασμα ελέγχου	Neoral® 100mg	Cicloral® 100mg	Sandimmune® 100mg
C_{max} (ng/ml)	782,3	581 ± 118	475 ± 88	376 ± 146
t_{max} (h)	1,75	1,38 ± 0,43	1,25 ± 0,26	1,88 ± 0,64
$AUC_{0 \rightarrow t}$ (ng*h/ml)	2,107	-	-	-
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (ng*h/ml)	2,279	1,83 ± 0,46	1,56 ± 0,25	1,30 ± 0,49
$t_{1/2}$ (h)	3,81	4,43 ± 0,59	4,09 ± 0,43	4,14 ± 0,94
k_{el} (h ⁻¹)	0,1819	-	-	-

Τα αποτελέσματα της *in vivo* μελέτης δείχνουν υψηλό ποσοστό απορρόφησης, υψηλή συγκέντρωση στο πλάσμα και μια μικρή καθυστέρηση στην εμφάνιση της μέγιστης συγκέντρωσης στο πλάσμα σε σχέση με το Neoral. Αν και δε μπορούν να βγουν σημαντικά συμπεράσματα από μια μόνο χορήγηση, τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρα για περαιτέρω ανάπτυξη, ιδιαίτερα αν αναλογιστεί κανείς τα προβλήματα της κυκλοσπορίνης στη μορφοποίηση και την απορρόφηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α.4. ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνοψίζονται στα ακόλουθα σημεία:

- Το γάλα αυξάνει τη διαλυτότητα λιπόφιλων μορίων, με βαθμό που είναι ανάλογος της περιεκτικότητάς του σε λίπος.
- Η αιθανόλη μπορεί να αξιοποιηθεί ως συνδιαλύτης για τη διάλυση λιπόφιλων μορίων.
- Η προσθήκη αιθανολικών διαλυμάτων φαρμάκων στο γάλα δεν επηρεάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του γάλακτος, καθώς το ποσοστό αιθανόλης είναι μικρό. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τις μελέτες μεγέθους σωματιδίων, δείκτη πολυδιασποράς, ζ-δυναμικού, μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων και pH.
- Τα λιπόφιλα μόρια στο γάλα κατανέμονται στις δύο εξωτερικές φάσεις του γαλακτώματος (λιποσφαίρια, μικκύλια καζεΐνης), όπως αποδεικνύουν τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας φθορισμού.
- Τα αιθανολικά διαλύματα φαρμάκων χρήζουν περαιτέρω βελτίωσης στον τομέα της σταθερότητας. Η προσθήκη συντηρητικών ενδεχομένως θα βελτιώσει τα αποτελέσματα.
- Οι τελικές φαρμακοτεχνικές μορφές που προκύπτουν μετά την προσθήκη των αιθανολικών διαλυμάτων στο γάλα είναι σταθερές και ομοιογενείς για τουλάχιστον 4 h. Οι στερεές φαρμακοτεχνικές μορφές ήταν σταθερές αλλά όχι ομοιογενείς.
- Οι *in vivo* μελέτες ασπιρίνης και κυκλοσπορίνης αποδεικνύουν ότι η χορήγηση φαρμάκων με τη χρήση γάλακτος χαρακτηρίζεται από εξαιρετική βιοδιαθεσιμότητα, συγκρίσιμη με τα εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα.

Καταλήγοντας, η χρήση γάλακτος για την ανάπτυξη φαρμακοτεχνικών μορφών, ιδιαίτερα στο πεδίο των δυσδιάλυτων φαρμάκων, μπορεί να αποτελέσει εναλλακτικό τρόπο χορήγησης, καθώς το γάλα αυξάνει τη διαλυτότητα και διαθέτει γαστροπροστατευτικές ιδιότητες. Η αξιοποίηση αυτών των ιδιοτήτων μπορεί να οδηγήσει σε καινοτόμα προϊόντα στο πεδίο των φαρμακοτεχνικών μορφών με βάση τα γαλακτώματα και τους συνδιαλύτες.

ΤΜΗΜΑ Β. ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΩΝ ΠΟΡΕΙΩΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΙΚΕΣ ΕΞΙΣΩΣΕΙΣ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

“Clouds are not spheres, mountains are not cones, coastlines are not circles, and bark is not smooth, nor does lightning travel in a straight line.”

Benoit Mandelbrot (1924-2010)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΤΑ ΘΕΜΕΛΙΩΔΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΠΟΡΕΙΩΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

Β.1.1. ΟΡΙΣΜΟΙ

Β.1.1.1. Διάχυση

Γενικά με τον όρο διάχυση (diffusion), ή παθητική μεταφορά, χαρακτηρίζεται η τάση των μορίων μιας ουσίας να διασπείρονται από περιοχές υψηλότερης συγκέντρωσης προς τις περιοχές μικρότερης συγκέντρωσης. Η τάση αυτή εκδηλώνεται με αντίστοιχη μετακίνηση των μορίων. Τούτο σημαίνει πως η μετακίνηση των μορίων γίνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις, με μεγαλύτερο ρυθμό από τη περιοχή της υψηλότερης συγκέντρωσης. Κάποια στιγμή οι συγκεντρώσεις εξισώνονται, κάτι που όμως δεν εμποδίζει την μετακίνηση των μορίων που συνεχίζεται, αυτή τη φορά, με ίσους ρυθμούς προς τις δύο κατευθύνσεις (Κατσάνος, 1993) (βλ. Β.1.2.1: Διάχυση, σελ. 193).

Β.1.1.2. Διάλυση

Με τον όρο διάλυση (dissolution) ορίζεται η διαδικασία που συνίσταται από τη διαφυγή μορίων από την επιφάνεια ενός στερεού και στη συνέχεια τη μεταφορά των διαλυμένων μορίων στο κυρίως διάλυμα (Μαχαίρας και Ρέππας, 1997). Η διάλυση επομένως είναι μια διαδικασία δύο σταδίων, της οποίας η ταχύτητα καθορίζεται από τη βραδύτερη συνιστώσα. Η πρώτη ποσοτική μελέτη της διαδικασίας της διάλυσης και της μελέτης του ρυθμού διάλυσης πραγματοποιήθηκε από τους Noyes και Whitney το 1897 (Noyes and Whitney, 1897) (βλ. Β.1.2.2: Ρυθμός διάλυσης, σελ. 196).

Β.1.1.3. Αποδέσμευση

Με τον όρο αποδέσμευση (release) ορίζεται το σύνολο των επιμέρους διαδικασιών, που συμβάλλουν στη μετάβαση του φαρμάκου από το χορηγούμενο σκεύασμα στα γαστρεντερικά υγρά (Μαχαίρας και Ρέππας, 1997). Ο όρος αναφέρεται στα συστήματα παρατεταμένης (ή ελεγχόμενης) αποδέσμευσης, τις φαρμακοτεχνικές μορφές δηλαδή που ο ρυθμός μετάβασης του φαρμάκου στα γαστρεντερικά υγρά καθορίζεται από το ίδιο το σύστημα και όχι από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου ή τις συνθήκες που επικρατούν στο γαστρεντερικό σωλήνα (βλ. Β.1.2.3: Αποδέσμευση, σελ. 201)

B.1.1.4. Αποσάθρωση - Αποσυσσωμάτωση

Το είδος της φαρμακοτεχνικής μορφής καθορίζει το μηχανισμό μετάβασης του φαρμάκου στα γαστρεντερικά υγρά και είναι δυνατό να περιλαμβάνει τις δύο ακόλουθες διαδικασίες. Η αποσάθρωση (disintegration) αποτελεί μια αρχική διαδικασία διάβρωσης της φαρμακοτεχνικής μορφής, κατά την οποία ένα δισκίο άμεσης αποδέσμευσης, όταν έλθει σε επαφή με υδατικό διάλυμα, αλλάζει σχήμα ή/και θρυματίζεται και βαθμιαία φθείρεται, ενώ η αποσυσσωμάτωση (deaggregation ή disaggregation) είναι η διαδικασία που οδηγεί σε μεμονωμένα στερεά σωματίδια του φαρμάκου (Μαχαίρας και Ρέππας, 1997).

B.1.1.5. Απορρόφηση – Πρόσληψη

Με τον όρο πρόσληψη ή απορρόφηση (absorption) συνοψίζονται όλες οι επιμέρους πορείες, που οδηγούν στη μεταφορά των φαρμάκων από το εσωτερικό του γαστρεντερικού σωλήνα στα αγγεία και στη συνέχεια στη γενική κυκλοφορία του αίματος (Μαχαίρας και Ρέππας, 1997). Αν και υπάρχουν περιπτώσεις μεταφοράς μορίων με μεσολάβηση φορέα, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων οι διαδικασίες απορρόφησης διέπονται από τις αρχές της διάχυσης, πραγματοποιούνται δηλαδή με παθητική μεταφορά.

B.1.2. ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΩΝ ΠΟΡΕΙΩΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

Ο έλεγχος του ρυθμού διάλυσης και αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας από μια φαρμακοτεχνική μορφή, αποτελεί βασικό έλεγχο κατά τη διάρκεια ανάπτυξης και παραγωγής ενός προϊόντος. Οι έλεγχοι αυτοί χρησιμοποιούνται τόσο για την προσομοίωση της *in vivo* συμπεριφοράς όσο και στον έλεγχο ποιότητας κατά την παραγωγή μιας φαρμακοτεχνικής μορφής.

B.1.2.1. Διάχυση

B.1.2.1.1. Ιστορική αναδρομή

Οι νόμοι που περιγράφουν τη διάχυση παρουσιάστηκαν το 1855 από τον Adolf Fick, και είναι πλέον γνωστοί ως ο πρώτος και ο δεύτερος νόμος του Fick (Fick, 1855). Ο Fick επηρεάστηκε από προγενέστερη δουλειά του Thomas Graham (Graham, 1850), ο οποίος αν και πραγματοποίησε τα απαραίτητα πειράματα δεν διατύπωσε τους αντίστοιχους νόμους.

Τα πειράματα του Fick αφορούσαν τη μέτρηση της συγκέντρωσης και της ροής κοινού μαγειρικού αλάτος (NaCl) κατά τη διάχυσή του ανάμεσα σε δύο δεξαμενές με σωλήνες νερού. Αξίζει να σημειωθεί ότι το έργο του Fick αφορούσε κατά κύριο λόγο διάχυση σε υγρά, επειδή εκείνη την εποχή η διάχυση σε στερεά δεν θεωρούνταν γενικά δυνατή. Σήμερα, οι νόμοι του Fick αποτελούν τον πυρήνα της αντίληψής μας για διάχυση σε στερεά, υγρά και αέρια. Όταν μια διαδικασία διάχυσης ακολουθεί τους νόμους του Fick χαρακτηρίζεται ως Fickian, ενώ όταν δεν ακολουθεί τους νόμους του Fick αναφερόμαστε σε διεργασίες όπως η μη Fickian (Philibert, 2006).

Ο πρώτος νόμος του Fick (B.1.1) συνδέει τη ροή της διάχυσης με τη συγκέντρωση θεωρώντας ότι η ροή λαμβάνει χώρα από περιοχές με υψηλή συγκέντρωση προς περιοχές με χαμηλή συγκέντρωση, με ένα μέγεθος που είναι ανάλογο με την διαφορά συγκέντρωσης (χωρική παράγωγος). Σε μια (χωρική) διάσταση επομένως ισχύει:

$$J_x = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad \text{B.1.1}$$

όπου J_x είναι η ροή μάζας κατά τη διεύθυνση x ανά μονάδα χρόνου και ανά μονάδα επιφάνειας καθέτου προς την x , D ο συντελεστής διάχυσης εκφραζόμενος σε μονάδες

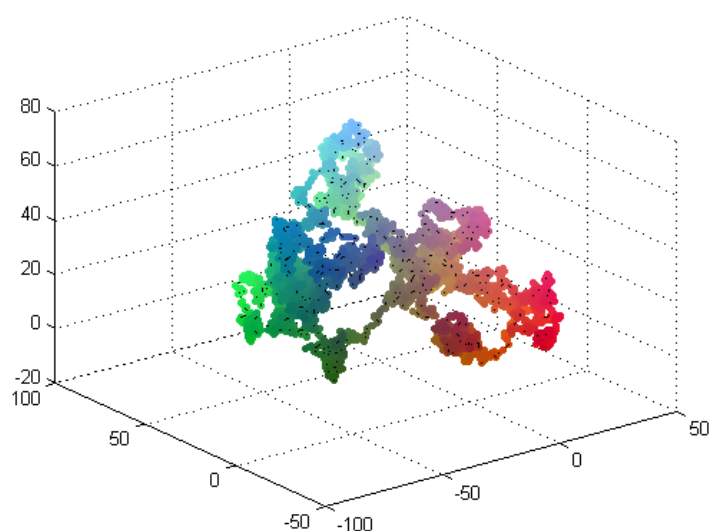
m^2/s και $-\partial C/\partial x$ είναι η διαφορά της συγκέντρωσης ως προς τη συντεταγμένη x (Κατσάνος, 1993).

Ο δεύτερος νόμος του Fick (B.1.2) περιγράφει τη διάχυση υπό συνθήκες χρονικά μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Αποτελεί το θεμελιώδη νόμο της διάχυσης και περιγράφεται μαθηματικά στην απλοποιημένη του μορφή ως εξής:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad \text{B.1.2}$$

όπου t ο χρόνος (Philibert, 2006).

Η αδιάκοπη κίνηση των σωματιδίων σε υγρά παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε κόκκους γύρης σε νερό από το βοτανολόγο Robert Brown, στον οποίο οφείλεται και το όνομά της (κίνηση Brown) (Brown, 1828). Μια προσεκτική διερεύνηση της κίνησης Brown έγινε από τον Georges Gouy σε μια σειρά από πειράματα με διάφορα είδη σωματιδίων σε διαφορετικά είδη υγρών (Gouy, 1889). Ο Gouy απέδειξε ότι αυτή η κίνηση είναι ανεξάρτητη από εξωτερικές δυνάμεις (όπως δονήσεις, φως, μαγνητισμός, θερμοκρασία) και είναι πιο έντονη στα λιγότερο ιξώδη υγρά.



Σχήμα B.1.1: Σχήμα B.1.2: Γραφική αναπαράσταση κίνησης Brown σε τρεις διαστάσεις με τη χρήση MatLab (βλ. Παράρτημα III).

Η μαθηματική έκφραση της κίνησης Brown παρουσιάστηκε το 1905 από τον Albert Einstein (Einstein, 1905). Ο Einstein κατάφερε να συνδέσει μια μακροσκοπική σταθερά

(τη σταθερά διάχυσης) με μικροσκοπικά χαρακτηριστικά (όπως το μέγεθος των σωματιδίων) και ήταν ο πρώτος που πρότεινε ότι η κίνηση Brown και η διάχυση αποτελούν την ίδια διαδικασία. Η συμβολή του στον τομέα της διάχυσης συνοψίζεται στις ακόλουθες σχέσεις:

$$L = \sqrt{2Dt} \quad \text{B.1.3}$$

Όπου L η μέση απόσταση που έχει διανύσει ένα σωματίδιο σε χρόνο t .

$$D = \frac{RT}{6\pi Nvr} \quad \text{B.1.4}$$

Όπου R η σταθερά των αερίων, T η απόλυτη θερμοκρασία, N ο αριθμός Avogadro, v το ιξώδες του διαλύτη και r η διάμετρος του σωματιδίου.

B.1.2.1.2. Σημασία της διάχυσης στη φαρμακευτική

Η διάχυση είναι μια διαδικασία που κυριαρχεί καθ' όλη την πορεία του φαρμάκου στο σώμα. Αρχικά κατά τα στάδια της διάλυσης και της αποδέσμευσης, η διάχυση είναι αυτή που αποτελεί συνήθως το περιοριστικό βήμα για την εμφάνιση του φαρμάκου στα γαστρεντερικά υγρά. Όπως θα αναφερθεί παρακάτω (βλ. B.1.2.2: Ρυθμός διάλυσης, σελ. 196), σχεδόν όλα τα μοντέλα που έχουν προταθεί για το μηχανισμό της διάλυσης προϋποθέτουν ένα στάδιο διάχυσης. Επιπλέον και στα συστήματα παρατεταμένης αποδέσμευσης, η διάχυση του δραστικού συστατικού διαμέσου μιας πολυμερούς μεμβράνης ή μήτρας, αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα ελέγχου της αποδέσμευσης του φαρμάκου.

Τέλος και οι διαδικασίες απορρόφησης και κατανομής του φαρμάκου διέπονται από τις αρχές της διάχυσης, καθώς το φάρμακο πρέπει να διέλθει διαμέσου κυτταρικών μεμβρανών για να εισέλθει στην κυκλοφορία ή να φτάσει στο σημείο-στόχο. Καθώς οι μεμβράνες και οι μεμβρανώδεις σχηματισμοί αποτελούν 40 με 90% της συνολικής μάζας των κυττάρων, η διάβαση τους με βάση τη διάχυση αποτελεί σημαντικότερη διαδικασία σε όλα τα βιολογικά συστήματα (Fernández-Morán, 1972). Επιπλέον, επειδή η μεταφορά των φαρμάκων διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών γίνεται συνήθως παθητικά και όχι με τη μεσολάβηση κάποιου φορέα, οι νόμοι του Fick βρίσκουν εφαρμογή στο πεδίο της απορρόφησης (βλ. B.1.2.4: Απορρόφηση – Πρόσληψη, σελ. 206).

B.1.2.2. Ρυθμός διάλυσης

B.1.2.2.1. Ιστορική αναδρομή

Ο ρυθμός διάλυσης περιγράφεται συνήθως ως μια πρωτοταξική διαδικασία, ο ρυθμός της οποίας εξαρτάται από τη διαφορά της στιγμιαίας συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας στο διάλυμα (C) σε χρόνο t από τη διαλυτότητα κορεσμού (C_s):

$$\frac{dC}{dt} = k(C_s - C) \quad \text{B.1.5}$$

όπου k η σταθερά του ρυθμού διάλυσης (Noyes and Whitney, 1897). Ουσιαστικά η παραπάνω σχέση υπακούει τον κλασικό νόμο της διάχυσης, καθώς η σταθερά του ρυθμού της διαδικασίας, k , συνδέεται γραμμικά με το συντελεστή διάχυσης D και ο ρυθμός διάλυσης είναι ανάλογος της διαφοράς της στιγμιαίας συγκέντρωσης από τη διαλυτότητα κορεσμού (Dokoumetzidis and Macheras, 2006; Macheras and Iliadis, 2006). Η σχέση B.1.5 προέκυψε από πειράματα που έκαναν οι Noyes και Whitney πάνω στο ρυθμό διάλυσης του βενζοϊκού οξέως και του χλωριούχου μολύβδου, σε συνθήκες σταθερής ανάδευσης και θερμοκρασίας, και με τρόπο ώστε η εκτεθειμένη επιφάνεια των στερεών να παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι Noyes και Whitney κατέληξαν ότι εφόσον δύο εντελώς διαφορετικές χημικές ουσίες υπακούουν στον ίδιο νόμο, ο νόμος αυτός πρέπει να είναι γενικός. Τέλος, απέδωσαν τα αποτελέσματα στην ύπαρξη μιας λεπτής στιβάδας διάχυσης γύρω από την επιφάνεια του στερεού.

Η εισαγωγή νέων παραμέτρων στη σχέση B.1.5 πραγματοποιήθηκε λίγα χρόνια αργότερα από τους Nernst και Brunner. Οι Nernst και Brunner συνέδεσαν το ρυθμό διάλυσης με την επιφάνεια του στερεού, τον όγκο του διαλύτη, το πάχος της στιβάδας διάχυσης και το συντελεστή διάχυσης, ο οποίος εξαρτάται από τη θερμοκρασία (βλ. σχέση B.1.4). Η σχέση που εκφράζει μαθηματικά τα ανωτέρω είναι γνωστή ως εξίσωση Nernst-Brunner (Brunner, 1904; Nernst and Schoenflies, 1904).

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh}(C_s - C) \quad \text{B.1.6}$$

όπου D ο συντελεστής διάχυσης, S η επιφάνεια του στερεού που έρχεται σε επαφή με το μέσο διάλυσης, V ο όγκος του μέσου διάλυσης και h το πάχος της στιβάδας διάχυσης.

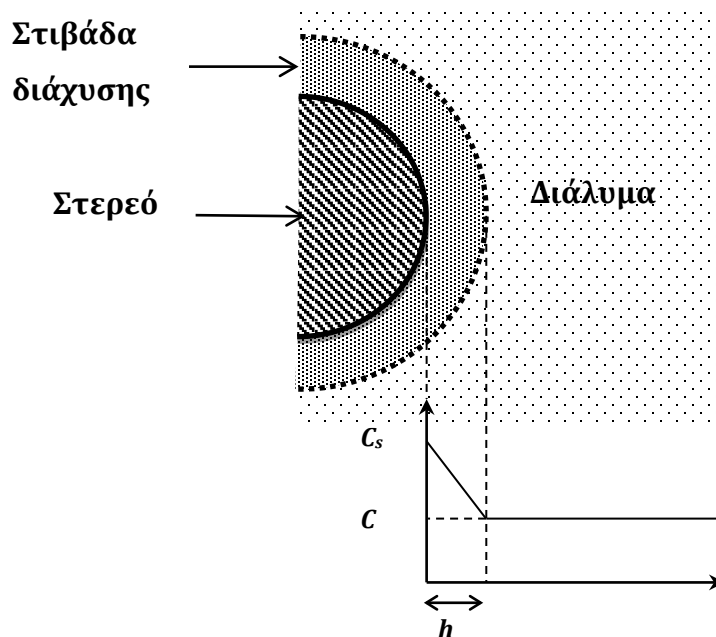
Όπως είναι προφανές, η σχέση B.1.6 προέρχεται από την αποδοχή του μοντέλου της στιβάδας διάχυσης (βλ. σχέση B.1.2).

Οι Hixson και Crowell, συνέδεσαν την επιφάνεια της ουσίας που έρχεται σε επαφή με το μέσο διάλυσης με τη μάζα της, θεωρώντας ότι η επιφάνεια είναι ανάλογη της μάζας υψωμένη σε δύναμη ίση με $2/3$, και κατέληξαν στην ακόλουθη σχέση, η οποία είναι γνωστή και σαν νόμος της κυβικής ρίζας (Hixson and Crowell, 1931):

$$w_0^{1/3} - w^{1/3} = k't \quad \text{B.1.7}$$

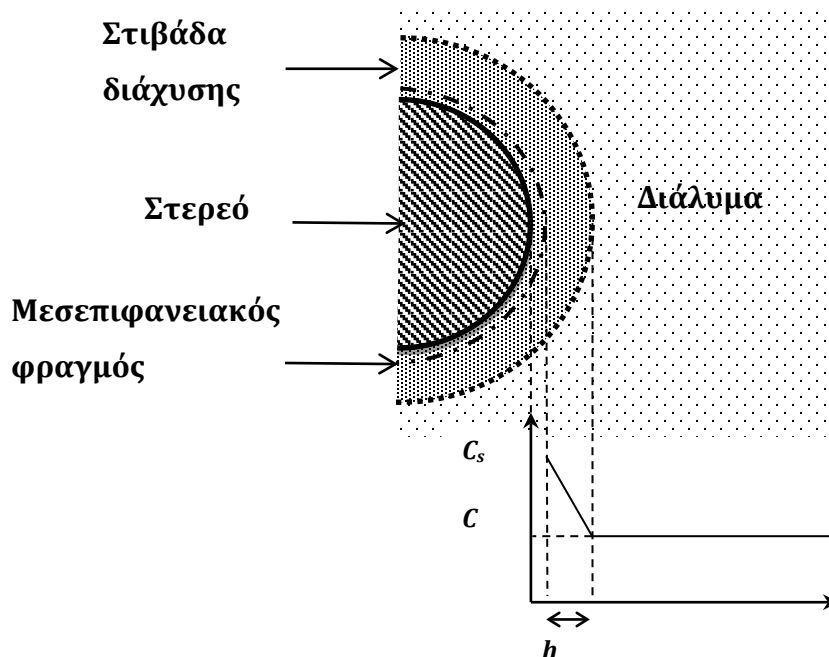
όπου w_0 η αρχική μάζα της ουσίας, w η στιγμιαία μάζα σε χρόνο t και k' μια σταθερά. Η σχέση B.1.7 ισχύει μόνο όταν τα σωματίδια είναι και παραμένουν σφαιρικά κατά τη διάρκεια της διάλυσης, με στενή κατανομή μεγέθους και διαλύονται σε συνθήκες δεξαμενής, όταν δηλαδή $C_s \gg C$. Επιπλέον η διαδικασία θα πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τη θεωρία της στιβάδας διάχυσης, όπου το πάχος της και η διαλυτότητα κορεσμού είναι ανεξάρτητα του μεγέθους των σωματιδίων.

Όπως γίνεται αντιληπτό, όλα τα παραπάνω μοντέλα προϋποθέτουν την αποδοχή του μοντέλου της στιβάδας διάχυσης, το οποίο αποδέχεται ως περιοριστικό βήμα στη διαδικασία της διάλυσης τη διάχυση των μορίων του στερεού από τη στιβάδα διάχυσης στο διαλύτη. Το μοντέλο της στιβάδας διάχυσης είναι το πλέον αποδεκτό και χρησιμοποιούμενο μοντέλο για την ερμηνεία της διάλυσης.



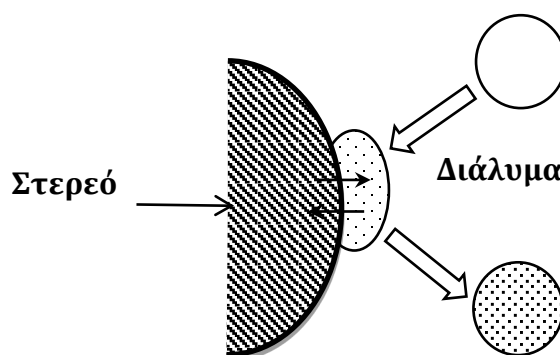
Εικόνα Β.1.1: Το μοντέλο της στιβάδας διάχυσης.

Υπάρχουν όμως και δύο εναλλακτικές προσεγγίσεις που δε στηρίζονται στη στιβάδα διάχυσης. Το πρώτο είναι το μοντέλου του διεπιφανειακού φράγματος (Wilderman, 1909; Zdanovskii, 1946; Higuchi, 1961), το οποίο θεωρεί ότι το περιοριστικό βήμα στη διάλυση είναι η αντίδραση που λαμβάνει χώρα στη διεπιφάνεια μεταξύ στερεού-υγρού λόγω των υψηλών απαιτήσεων σε ελεύθερη ενέργεια και όχι η διάχυση διαμέσου της στιβάδας διάχυσης, η οποία θεωρείται ταχεία. Το μοντέλο αυτό χαρακτηρίζεται ως περιορισμένο από την αντίδραση (reaction limited).



Εικόνα Β.1.2: Το μοντέλο του διεπιφανειακού φράγματος.

Το δεύτερο είναι το μοντέλο του Danckwerts (Danckwerts, 1951; Higuchi, 1961). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, ακόρεστα πακέτα διαλύτη κινούνται προς την επιφάνεια του στερεού, όπου και σύμφωνα με τους κανόνες της διάχυσης λαμβάνουν μόρια του στερεού, τα οποία στην πορεία μεταφέρουν στο διάλυμα, ακολουθούμενα από νέα πακέτα διαλύτη.



Εικόνα Β.1.3: Το μοντέλο του Danckwerts.

Όλα τα παραπάνω μοντέλα μπορούν να εφαρμοστούν σε ιδανικές συνθήκες διάλυσης, δηλαδή σε συνθήκες ήπιας ανάδευσης, όταν δεν εμφανίζονται φαινόμενα αποσάθρωσης και όταν δεν πραγματοποιούνται χημικές αντιδράσεις μεταξύ του διαλύτη και της διαλυμένης ουσίας. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις που η μεταφορά στο κυρίως διάλυμα γίνεται με διάχυση, δηλαδή με βάση το νόμο του

Fick, ο ρυθμός διάλυσης είναι ανάλογος της διαφοράς ($C_s - C$), δηλαδή πρόκειται για πρωτοταξικές διαδικασίες.

B.1.2.2.2. Σημασία του ρυθμού διάλυσης στη φαρμακευτική

Η σημασία του ρυθμού διάλυσης στη φαρμακευτική έγινε ευρέως αντιληπτή τη δεκαετία του 1950. Μέχρι τότε η *in vivo* συμπεριφορά του φαρμάκου θεωρούνταν συνάρτηση της αποσάθρωσης. Εκείνη την περίοδο τέθηκαν οι βάσεις για τον έλεγχο του ρυθμού διάλυσης ως *in vitro* εκτιμήτρια της *in vivo* συμπεριφοράς της φαρμακοτεχνικής μορφής (Edwards, 1951; Nelson, 1957) και έγινε αντιληπτό ότι οι διαφορές στη σύσταση των φαρμακοτεχνικών μορφών μπορούσαν να οδηγήσουν σε σημαντικές διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα (Campagna et al., 1963; Levy, 1964; Levy et al., 1964; Martin et al., 1968; Varley, 1968), με δυνητικά θανατηφόρες συνέπειες (Tytler et al., 1970; Lindenbaum et al., 1971).

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για το ρυθμό διάλυσης και τα ενδεχόμενα σοβαρά προβλήματα για τη δημόσια υγεία, οδήγησαν τον FDA στην υιοθέτηση της πρώτης συσκευής για τον έλεγχο του ρυθμού διάλυσης (USP apparatus I) το 1970, ακολουθούμενο σύντομα από μια δεύτερη συσκευή για τον ίδιο σκοπό το 1978 (USP apparatus II). Έκτοτε το επιστημονικό ενδιαφέρον για το ρυθμό διάλυσης στη φαρμακευτική παραμένει αμείωτο, όπως δηλώνει ο αριθμός των δημοσιεύσεων στη διεθνή βιβλιογραφία και ο αριθμός των μονογραφιών στη USP (Dokoumetzidis and Macheras, 2006). Πλέον η USP περιλαμβάνει τέσσερις συσκευές ελέγχου του ρυθμού διάλυσης (USP XXXII - NF XXVII, 2008), και έλεγχοι του ρυθμού διάλυσης πραγματοποιούνται συνεχώς, τόσο κατά τα στάδια ανάπτυξης πρωτότυπων και γενόσημων σκευασμάτων όσο και κατά τα στάδια ελέγχου και αποδέσμευσης των τελικών προϊόντων.

B.1.2.2.3. Νεότερες εξελίξεις – Προβληματισμοί

Αν και το μοντέλο της στιβάδας διάχυσης αποτελεί το πλέον διαδεδομένο μηχανισμό για την ερμηνεία του ρυθμού διάλυσης, νεότερες έρευνες προτείνουν εναλλακτικούς μηχανισμούς ερμηνείας των πειραματικών αποτελεσμάτων. Όπως προαναφέρθηκε, η εφαρμογή της σχέσης Noyes-Whitney προϋποθέτει ότι η διάχυση αποτελεί το περιοριστικό βήμα εμφάνισης του στερεού στο διάλυμα. Ήδη από το 1962 όμως ο Levich απέδειξε ότι η σχέση Noyes-Whitney ισχύει μόνο σε συνθήκες κατά τις οποίες ο

διαλύτης παραμένει σε ακινησία (Levich, 1962). Επιπλέον σε αρκετές περιπτώσεις έχουν υπολογιστεί εξαιρετικά μεγάλες τιμές για το πάχος της στιβάδας διάχυσης, που φτάνουν τα 20-100 μm (Μαχαίρας και Ρέππας, 1997). Σε καταστάσεις ανάδευσης επομένως, δηλαδή σε συνθήκες που ισχύουν κατά κόρον τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, η σχέση Noyes-Whitney δεν ισχύει. Αντιθέτως η μεταφορά του στερεού στο διάλυμα καθορίζεται από τις υδροδυναμικές συνθήκες που επικρατούν.

Οι παραπάνω προβληματισμοί οδήγησαν τους Nelson και Shah να διατυπώσουν τη θεωρία της διάχυσης και μεταφοράς (convective diffusion theory) (Nelson and Shah, 1975). Σύμφωνα με τους Nelson και Shah, η μεταφορά της ουσίας στο διάλυμα πραγματοποιείται σε δύο στάδια, τη μοριακή διάχυση και την εξαναγκασμένη μεταφορά λόγω της ροής του διαλύτη. Αν και η βασική υπόθεση του μοντέλου της στιβάδας διάχυσης έχει καταρριφθεί, εντούτοις εξακολουθεί να χρησιμοποιείται λόγω της μαθηματικής απλότητάς της (Charkoftaki et al., 2010a).

Το αδιέξοδο στο οποίο οδηγεί το μοντέλο της στιβάδας διάχυσης οδήγησε σε ένα έντονο ενδιαφέρον για το μοντέλο του διεπιφανειακού φράγματος ή μοντέλο περιοριζόμενο από την αντίδραση (reaction limited). Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες προσεγγίσεις ο ρυθμός διάλυσης βασίζεται σε μια αμφίδρομη χημική αντίδραση μεταξύ του αδιάλυτου στερεού και των μορίων του διαλύτη (Dokoumetzidis et al., 2008). Στις προσεγγίσεις αυτές η διαλυτότητα κορεσμού και η διαφορά της συγκέντρωσης C_s-C δεν αποτελούν κυρίαρχα χαρακτηριστικά που ρυθμίζουν το ρυθμό διάλυσης.

B.1.2.3. Αποδέσμευση

B.1.2.3.1. Η ανάγκη τροποποίησης του ρυθμού διάλυσης

Οι φαρμακοτεχνικές μορφές αποτελούν στην πλειοψηφία τους συστήματα άμεσης αποδέσμευσης. Τα συστήματα άμεσης αποδέσμευσης όμως παρουσιάζουν το μειονέκτημα της άμεσης απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας, με αποτέλεσμα την πιθανότητα εμφάνισης τοξικών φαινομένων λόγω υψηλών συγκεντρώσεων του μορίου στο αίμα και την ανάγκη συχνής χορήγησης για τη διατήρηση των θεραπευτικών επιπέδων στο αίμα. Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην ανάπτυξη των πρώτων μορφών παρατεταμένης αποδέσμευσης κατά τη δεκαετία του 1950.

Το βασικό χαρακτηριστικό των συστημάτων παρατεταμένης αποδέσμευσης είναι ότι ο ρυθμός εμφάνισης του φαρμάκου στα γαστρεντερικά υγρά και εν τέλει στην κυκλοφορία καθορίζεται από την ίδια τη φαρμακοτεχνική μορφή και όχι από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου. Αν και η διάχυση είναι ο βασικός μηχανισμός που κυριαρχεί σε αυτά τα συστήματα, η διάχυση εδώ δε λαμβάνει χώρα σε μια αδρανή στιβάδα, αλλά συνήθως τα μόρια του φαρμάκου διαχέονται διαμέσου αδρανών πολυμερών ή μεμβρανών.

Οι βασικοί λόγοι που οδηγούν στην τροποποίηση του ρυθμού αποδέσμευσης είναι:

- Η παράταση της διάρκειας δράσης και η επίτευξη σταθερών επιπέδων στο αίμα.
- Η αύξηση της απορρόφησης.
- Ο έλεγχος της χρονικής στιγμής της αποδέσμευσης.
- Ο έλεγχος του σημείου αποδέσμευσης στο γαστρεντερικό σωλήνα.
- Η τοπική δράση του φαρμάκου στο γαστρεντερικό σωλήνα.

B.1.2.3.2. Ιστορική αναδρομή

Οι βασικές σχέσεις που χρησιμοποιούνται για της περιγραφή της αποδέσμευσης από τις φαρμακοτεχνικές μορφές είναι η σχέση Higuchi και ο νόμος δύναμης του χρόνου (power law). Η πρώτη σχέση είναι η ακόλουθη (Higuchi, 1961):

$$M_t = A[D(2C_0 - C_s)t]^{1/2} \quad \text{B.1.8}$$

όπου M_t είναι η ποσότητα του φαρμάκου που έχει αποδεσμευτεί σε χρόνο t , A είναι η επιφάνεια της φαρμακοτεχνικής μορφής που είναι εκτεθειμένη στο μέσο διάλυσης και C_0 η αρχική συγκέντρωση της δραστικής ουσίας. Ο Higuchi κατέληξε στην παραπάνω σχέση αφού μελέτησε την αποδέσμευση φαρμάκων από αλοιφές, θεωρώντας ότι η δραστική είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη στη μήτρα και ότι ο μηχανισμός αποδέσμευσης ακολουθεί το νόμο του Fick. Πρέπει να σημειωθεί ότι η σχέση B.1.8 ισχύει σε συνθήκες δεξαμενής, και μπορεί να λάβει και άλλες μορφές ανάλογα με τη γεωμετρία και τη δομή του υλικού που είναι κατανεμημένο το φάρμακο. Το βασικό χαρακτηριστικό του νόμου Higuchi είναι ότι το μέγεθος M_t είναι ανάλογο της τετραγωνικής ρίζας του χρόνου.

Ο Wang το 1969 ήταν ο πρώτος που διατύπωσε την άποψη ότι η αποδέσμευση αποτελείται από δύο επιμέρους διαδικασίες, μια Fickian διαδικασία και μια

μηδενοταξική διαδικασία (ονομάζεται και Case II transport) (Wang et al., 1969). Οι δύο αυτοί μηχανισμοί είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους και συμβάλουν σε διαφορετικό βαθμό στην τελική αποδέσμευση του φαρμάκου.

Ο νόμος δύναμης του χρόνου παρουσιάστηκε το 1983 από τους Korsmeyer και Peppas και περιγράφεται μαθηματικά από τη σχέση (Korsmeyer et al., 1983; Peppas, 1985):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^n \quad \text{B.1.9}$$

όπου M_∞ είναι η ποσότητα της δραστικής ουσίας που αποδεσμεύεται σε άπειρο χρόνο, k_1 μια πειραματικά υπολογιζόμενη σταθερά και n ένας εκθέτης που εξαρτάται από τη γεωμετρία του συστήματος και σχετίζεται με το μηχανισμό διάχυσης. Η παραπάνω σχέση αποτελεί μια εμπειρική γενικευμένη προσέγγιση για την ερμηνεία της αποδέσμευσης, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον στη βιβλιογραφία για την ανάλυση πειραματικών δεδομένων αποδέσμευσης (Ritger and Peppas, 1987a; Rinaki et al., 2003; Varma et al., 2004). Η φαινομενικά απλή σχέση B.1.9 περιέχει δύο ανταγωνιστικούς μεταξύ τους μηχανισμούς για την αποδέσμευση του φαρμάκου: μια Fickian μοριακή διάχυση και μια μηδενοταξική αποδέσμευση τύπου II (Case II), όπως τις διατύπωσε ο Wang. Οι δύο αυτοί μηχανισμοί αποτελούν και τα δύο άκρα της σχέσης B.1.9. Πιο αναλυτικά η μοριακή διάχυση οφείλεται στη διαφορά συγκέντρωσης του φαρμάκου μεταξύ της μήτρας και των γαστρεντερικών υγρών και χαρακτηρίζεται από το νόμο του Fick (βλ. σχέσεις B.1.1, σελ. 193 και B.1.2, σελ. 194). Αντιθέτως η μεταφορά τύπου II οφείλεται στις δομικές μεταβολές που υπόκειται το πολυμερές, όπως διάβρωση, διόγκωση, αύξηση πορώδους κλπ. Οι δύο αυτοί μηχανισμοί έχουν αθροιστική επίδραση στην τιμή του εκθέτη n , με αποτέλεσμα αυτός να παίρνει διαφορετικές τιμές ανάλογα με το μηχανισμό που επικρατεί. Για $n=0,5$, η σχέση B.1.9 μεταπίπτει στην B.1.8 και ο μηχανισμός είναι κατά 100% Fickian. Για $n=1$, η σχέση B.1.9 γίνεται μηδενοταξική και ο μηχανισμός είναι κατά 100% μεταφορά τύπου II. Για τις ενδιάμεσες τιμές n μεταξύ 0,5 και 1 ο μηχανισμός χαρακτηρίζεται ως ανώμαλος, καθώς δεν επικρατεί κανένας από τους δυο, αντιθέτως συμβάλλουν και οι δυο στην αποδέσμευση. Τέλος οι συγγραφείς αναφέρθηκαν και σε περιπτώσεις όπου $n>1$, τις οποίες τις χαρακτήρισαν ως super Case II transport. Οι παραπάνω τιμές του εκθέτη n αφορούν σε συστήματα που έχουν γεωμετρία λεπτού υμενίου. Σε περιπτώσεις που το

σύστημα είναι σφαίρα ή κύλινδρος, οι τιμές του n τροποποιούνται (Sierpmann and Peppas, 2001).

Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι αν και οι δύο παραπάνω σχέσεις (B.1.8 και B.1.9) περιγράφουν μόνο το αρχικό 60% της διαδικασίας αποδέσμευσης φαρμάκων που ακολουθούν την κλασική κατά Fick διαδικασία διάχυσης (Ritger and Peppas, 1987b; Kosmidis et al., 2003c; Macheras and Iliadis, 2006), εφαρμόζονται ευρέως και με μεγάλη επιτυχία στην προσαρμογή πειραματικών δεδομένων διάλυσης (Sierpmann and Peppas, 2001; Macheras and Iliadis, 2006).

Η μηδενοταξική διαδικασία αποδέσμευσης μπορεί να θεωρηθεί ως μια ειδική περίπτωση του νόμου δύναμης του χρόνου (Ritger and Peppas, 1987b; Kosmidis et al., 2003c) και εξάγεται από τη σχέση B.1.9 για $n=0$.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 t \quad \text{B.1.10}$$

όπου k_0 η μηδενοταξική σταθερά αποδέσμευσης. Όπως προαναφέρθηκε η σχέση B.1.10 αποδίδεται σε μεταφορά τύπου II.

Οι Peppas και Sahlin πρότειναν μια παραλλαγή της σχέσης B.1.9, όπου το δεξί σκέλος της εξίσωσης περιλαμβάνει δύο τμήματα που αποδίδονται στους δυο διαφορετικούς μηχανισμούς αποδέσμευσης (Peppas and Sahlin, 1989).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad \text{B.1.11}$$

Όπου k_1 , k_2 και m είναι σταθερές. Ο πρώτος όρος στο δεξί σκέλος της σχέσης B.1.11 αποδίδεται σε Fickian μηχανισμό, ενώ ο δεύτερος όρος σε μεταφορά τύπου II.

Άλλη μια σχέση που χρησιμοποιείται εκτενώς είναι η εξίσωση Weibull, κυρίως όταν η διάλυση χαρακτηρίζεται από έναν αρχικό χρόνο υστέρησης (Weibull, 1951; Langenbucher, 1972; Costa and Sousa Lobo, 2001).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-\lambda t^b) \quad \text{B.1.12}$$

όπου λ και b δύο σταθερές, εκ των οποίων η λ ελέγχει τη χρονική εξέλιξη της σχέσης και η b σχετίζεται με το σχήμα της καμπύλης. Η σχέση B.1.12 προήλθε από τον Weibull το

1951 για να περιγράψει κατανομές σωματιδίων. Στο πεδίο της αποδέσμευσης την εισήγαγε ο Langenbucher το 1972. Αν και η εισαγωγή της παραπάνω σχέσης πραγματοποιήθηκε εμπειρικά, εντούτοις εξακολουθεί να αποτελεί ένα βασικό εργαλείο για την ανάλυση του ρυθμού διάλυσης και της αποδέσμευσης (Costa and Sousa Lobo, 2001). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σαν σχέση παρουσιάζει εξαιρετική ευελιξία και μπορεί με ευκολία να προσαρμοστεί σε πληθώρα πειραματικών δεδομένων, ειδικότερα αν στον εκθέτη προστεθεί μια επιπλέον σταθερά που να αφορά στο χρόνο υστέρησης κατά της διαδικασία της αποδέσμευσης (Goldsmith et al., 1978; Vudathala and Rogers, 1992). Εντούτοις η απουσία ικανοποιητικής ερμηνείας προέλευσης της και η αδυναμία υποστήριξής της από κάποιο μηχανισμό αποδέσμευσης την καθιστούν καθαρά εμπειρική και στόχο αυστηρής κριτικής (Pedersen and Myrick, 1978; Christensen et al., 1980). Τα βασικά μειονεκτήματα της σχέσης B.1.12 είναι ότι δεν υπάρχει καμία κινητική θεωρία που να τη στηρίζει, ότι μπορεί μόνο να περιγράψει και όχι να χαρακτηρίσει τη διαδικασία, ότι δεν υπάρχει καμιά παράμετρός της που να σχετίζεται με τον ενδογενή ρυθμό διάλυσης του φαρμάκου και ότι έχει περιορισμένη εφαρμογή στη ανάπτυξη και αξιολόγηση *in vitro-in vivo* συσχετίσεων (Costa and Sousa Lobo, 2001). Παρόλα αυτά, Monte Carlo προσομοιώσεις κατά τα τελευταία έτη έχουν δείξει ότι η τιμή του εκθέτη b μπορεί να συσχετιστεί με τους μηχανισμούς αποδέσμευσης (Kosmidis et al., 2003b).

B.1.2.3.3. Νεότερες εξελίξεις-Προβληματισμοί

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζεται μια σύνοψη των βασικών σχέσεων που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή ή και το χαρακτηρισμό των διαδικασιών αποδέσμευσης (Varma et al., 2004).

Πίνακας Β.1.1: Μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν κινητικές αποδέσμευσης.

Κινητικό μοντέλο	Σχέση	Φαρμακοτεχνικές μορφές	Βιβλιογραφία
Πρωτοταξικό	$\ln Q_t = \ln Q_0 + Kt$	Υδροδιαλυτά φάρμακα σε πορώδεις μήτρες	(Mulye and Turco, 1996)
Μηδενοταξικό	$f_t = K_0 t$	Διαδερμικά Ωσμωτικά	(Varelas et al., 1995; Costa and Sousa Lobo, 2001)
Higuchi	$f_t = K_H t^{1/2}$	Συστήματα μήτρας	(Higuchi, 1963)
Weibull	$m = 1 - \exp[-(t - T_i)^{b/a}]$	Διαβρωνόμενα	(Christensen et al., 1980)
Hixson-Crowell	$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t$	Διαβρωνόμενα ισομετρικά	(Hixson and Crowell, 1931)
Korsmeyer-Peppas	$M_t/M_\infty = Kt^n$	Διογκούμενα πολυμερή	(Korsmeyer et al., 1983)
Peppas-Sahlin	$M_t/M_\infty = K_1 t^m + K_2 t^{2m}$	Διογκούμενα πολυμερή	(Peppas and Sahlin, 1989)

a = παράμετρος κλίμακας, *b* = παράμετρος σχήματος, *f_t* = κλάσμα της δόσης που αποδεσμεύτηκε σε χρόνο 't', *K*, *K_H*, *K₀*, και *K_s* = σταθερές αποδέσμευσης χαρακτηριστικές για κάθε μοντέλο, *m* και *n* = εκθέτες αποδέσμευσης, *M_t* = ποσότητα που αποδεσμεύτηκε σε χρόνο 't', *M_∞* = ποσότητα που αποδεσμεύτηκε σε άπειρο χρόνο, *Q₀* = ποσότητα του φαρμάκου προς αποδέσμευση σε χρόνο 0, *Q_t* = ποσότητα του φαρμάκου προς αποδέσμευση σε χρόνο 't', *T_i* = χρόνος υστέρησης, *W₀* = αρχική ποσότητα του φαρμάκου παρούσα στη μήτρα, *W_t* = αποδεσμευμένη ποσότητα του φαρμάκου σε χρόνο 't'.

Όπως γίνεται αντιληπτό από τον πίνακα υπάρχει πληθώρα διαφορετικών μοντέλων για την περιγραφή των φαινομένων αποδέσμευσης. Κάποια από τα αναφερόμενα μοντέλα έχουν προκύψει εμπειρικά ενώ άλλα αποτελούν απλοποιημένες εκφράσεις πολύπλοκων σχέσεων. Το βασικό πρόβλημα είναι ότι απουσιάζει μια ενιαία θεώρηση, η οποία να συνδέει όλα τα επιμέρους μοντέλα, πέρα από το γεγονός ότι οι διαδικασίες αποδέσμευσης ελέγχονται από τη διάχυση.

B.1.2.4. Απορρόφηση – Πρόσληψη

B.1.2.4.1. Ιστορική αναδρομή

Η απορρόφηση των φαρμάκων αποτελεί ένα φαινόμενο, το οποίο καθορίζεται από τη διάχυση, καθώς το φάρμακο πρέπει να διέλθει διαμέσου κυτταρικών μεμβρανών για να εισέλθει στην κυκλοφορία. Επιπλέον επειδή η μεταφορά των φαρμάκων διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών γίνεται συνήθως παθητικά και όχι με τη μεσολάβηση κάποιου φορέα, οι νόμοι του Fick βρίσκουν εφαρμογή στο πεδίο της απορρόφησης.

Οι περισσότεροι ερευνητές αντιμετωπίζουν παραδοσιακά τη διαδικασία της γαστρεντερικής απορρόφησης, ως ένα φαινόμενο, το οποίο λαμβάνει χώρα σε ένα τέλεια αναδεδυμένο, ομοιογενές περιβάλλον, ενώ κατά τη διάχυση της δραστικής ουσίας διαμέσου του εντερικού τοιχώματος θεωρείται ότι επικρατούν συνθήκες δεξαμενής (Dressman and Fleisher, 1986; Sinko et al., 1991; Oh et al., 1993). Οι πρώτες

αυτές προσεγγίσεις για την ποιοτική εκτίμηση της απορρόφησης λάμβαναν υπόψη παραμέτρους όπως η διαλυτότητα, η δόση, η λιποφιλία και ο βαθμός ιοντισμού. Οι παραπάνω παράγοντες συνυπολογίζονται για την εξαγωγή ενός ποιοτικού δείκτη, ο οποίος ονομάστηκε δυναμικό απορρόφησης (Absorption Potential, AP) (Dressman et al., 1985). Η πρώτη προσπάθεια σύνδεσης του δυναμικού απορρόφησης με το κλάσμα της απορροφούμενης δόσης, ένα ποσοτικό δείκτη, ακολούθησε τέσσερα χρόνια αργότερα (Macheras and Symillides, 1989). Η σύνδεση των τριών θεμελιωδών παραμέτρων που καθορίζουν την έκταση της απορρόφησης (ρυθμός διάλυσης, διαπερατότητα και δόση), με τη χρήση διαφορικών εξισώσεων και λαμβάνοντας υπόψη της αρχή διατήρησης της μάζας, αποτέλεσε επανάσταση στην περιοχή (Oh et al., 1993). Οι παραπάνω εξελίξεις οδήγησαν στην ανάπτυξη του βιοφαρμακευτικού συστήματος κατάταξης (Biopharmaceutical Classification System, BCS) (Amidon et al., 1995).

Το γενικότερο πλαίσιο το οποίο καθόρισε την εξέλιξη των ανωτέρω μοντέλων ήταν η θεώρηση ότι η διαδικασία της αποδέσμευσης χαρακτηρίζεται από πρωτοταξική κινητική για τα συστήματα άμεσης αποδέσμευσης και μηδενοταξική κινητική για τα συστήματα παρατεταμένης αποδέσμευσης. Αντίστοιχα η απορρόφηση περιγράφεται συνήθως ως μια πρωτοταξική διαδικασία. Ακόμα και τα πιο εξελιγμένα και πολύπλοκα μοντέλα στηρίζονται είτε στην πρωτοταξική κινητική για την αποδέσμευση και την πρόσληψη (Oh et al., 1993; Rinaki et al., 2004), είτε σε συστήματα πρωτοταξικών διαφορικών εξισώσεων (Yu et al., 1996; Grass, 1997; Agoram et al., 2001).

Εντούτοις κατά τη διαδικασία της αποσυνέλιξης έχουν χρησιμοποιηθεί μια σειρά από μη συμβατικές και εμπειρικές σχέσεις, όπως ο νόμος της κυβικής ρίζας (Cutler, 1978b), πολυώνυμα (Cutler, 1978a), πολυεκθετικές σχέσεις (Veng-Pedersen, 1980) και τμηματικά πολυώνυμα (Verotta, 1993). Επιπλέον στο πεδίο της φαρμακοκινητικής έχουν χρησιμοποιηθεί εμπειρικά διάφορες στρατηγικές για την περιγραφή της απορρόφησης (Zhou, 2003), όπως η χρήση της συνάρτησης Weibull (Piotrovskii, 1987; Bressolle et al., 1994; Rietbrock et al., 1995; Appel-Dingemanse et al., 1999), η αντίστροφη κατανομή Gauss (Weiss, 1996) και η χρονοεξαρτώμενη απορρόφηση (Zhou, 2003).

B.1.2.4.2. Νεότερες εξελίξεις – Προβληματισμοί

Το γεγονός ότι για την περιγραφή της κινητικής της απορρόφησης έχουν χρησιμοποιηθεί μια σειρά από εμπειρικές σχέσεις, αποδεικνύει ότι η βασική θεώρηση της ομοιογένειας και των συνθηκών δεξαμενής αποτελούν μια υπεραπλούστευση των *in vivo* συνθηκών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από εξαιρετική πολυπλοκότητα. Οι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την απορρόφηση, όπως η διαλυτότητα του φαρμάκου στα γαστρεντερικά υγρά, η διαπερατότητα του διαμέσου του εντερικού τοιχώματος και οι διαφορές κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα (pH, υδροδυναμικές συνθήκες, ένζυμα, κινητικότητα του εντέρου), είναι δύσκολο να χαρακτηριστούν και να προβλεφτούν. Εντούτοις έχουν προταθεί διάφορες προσεγγίσεις για την ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της απορρόφησης μιας δραστικής ουσίας (Macheras and Iliadis, 2006). Τέτοιες νεότερες προσεγγίσεις στηρίζονται κυρίως σε πιθανοκρατικές διαδικασίες (Kalampokis et al., 1999a, b) ή σε μορφοκλασματικές (fractal) θεωρήσεις (Dokoumetzidis et al., 2007).

B.1.2.5. Από την ανώμαλη διάχυση στη μορφοκλασματική (fractal) και στην κλασματική (fractional) κινητική.

Όλες οι διαδικασίες που περιγράφουν την κινητική της απορρόφησης των φαρμάκων και αναφέρθηκαν στις προηγούμενες ενότητες του κεφαλαίου, αντιμετωπίζονται παραδοσιακά ως διαδικασίες, οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε ομοιογενείς συνθήκες, ως αποτέλεσμα καλής ανάδευσης. Αυτή η υπόθεση είναι προϊόν μιας άλλης υπόθεσης, η οποία αφορά το γεγονός ότι κατά τη διάχυση κατά Fick, το μέσο τετράγωνο της μετατόπισης ενός μορίου σε ένα ομοιογενές περιβάλλον είναι ανάλογο του χρόνου (Macheras and Iliadis, 2006; Pereira, 2009; Dokoumetzidis and Macheras, 2011).

$$\langle x^2(t) \rangle \propto t \quad \text{B.1.13}$$

Η υπόθεση αυτή όμως είναι γνωστό ότι δεν ισχύει, όταν το μέσο που μελετάται η διάχυση δεν είναι ισότροπο (Pereira, 2009). Σε αυτές τις περιπτώσεις η διάχυση χαρακτηρίζεται ανώμαλη. Σε τέτοια φαινόμενα το μέσο τετράγωνο της μετατόπισης ενός διαχεόμενου μορίου δεν είναι ανάλογο του χρόνου (Macheras and Iliadis, 2006):

$$\langle x^2(t) \rangle \propto t^{2/d_w} \quad \text{B.1.14}$$

Όπου d_w είναι η μορφοκλασματική διάσταση του χώρου όπου επιτελείται η διάχυση, για την οποία συνήθως ισχύει $d_w > 2$, το μέγεθος της οποίας συνδέεται με το βαθμό της ετερογένειας του συστήματος.

Τα χαρακτηριστικά της ανώμαλης διάχυσης, όπως για παράδειγμα η σχέση B.1.14, βρίσκουν εφαρμογή στο πεδίο της κινητικής των αντιδράσεων. Στις περισσότερες αντιδράσεις ο ρυθμός της αντίδρασης καθορίζεται αποκλειστικά από την ταχύτητα με την οποία αλληλεπιδρούν τα αντιδρώντα (reaction limited). Σε περιπτώσεις όμως κατά τις οποίες η διάχυση αποτελεί το περιοριστικό βήμα της αντίδρασης (diffusion limited), για παράδειγμα σε ανομοιογενείς συνθήκες, η ετερογένεια του μικροπεριβάλλοντος είναι αυτή που τελικά θα καθορίσει την ταχύτητα (Macheras and Iliadis, 2006).

Η επίδραση της ανώμαλης διάχυσης στην κινητική των χημικών αντιδράσεων και φαινομένων αποτέλεσε το αντικείμενο εκτενούς έρευνας από τον Kopelman (Anacker and Kopelman, 1984; Kopelman, 1986, 1988). Εν συντομία, λόγω τοπολογικών και διαστατικών περιορισμών παρατηρείται αδυναμία επανατυχαιοποίησης των μορίων των αντιδρώντων κατά την εξέλιξη της αντίδρασης. Αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη μη ομοιογενούς κατανομής των αντιδρώντων, η οποία επιδρά στην ταχύτητα της αντίδρασης. Τελικά, η σταθερά της αντίδρασης δεν έχει σταθερή τιμή αλλά αποκτά χρονοεξαρτώμενο χαρακτήρα, και εκφράζεται υπό μορφή νόμου δύναμης του χρόνου.

Δεδομένου ότι οι μορφοκλασματικές δομές επικρατούν τόσο στη φύση γενικά (Mandelbrot, 1982), όσο και στα βιολογικά συστήματα ειδικότερα (Losa et al., 2005; Macheras and Iliadis, 2006), ήταν αναμενόμενο ότι η θεωρία της ανώμαλης διάχυσης και της μορφοκλασματικής κινητικής θα έβρισκαν εφαρμογή στο πεδίο της φαρμακευτικής. Διαδικασίες όπως η διάλυση και η αποδέσμευση, οι οποίες εξαρτώνται από το φαινόμενο της διάχυσης, δε θα μπορούσαν να μείνουν ανεπηρέαστες (Macheras and Dokoumetzidis, 2000). Ενδεικτικά αναφέρονται εργασίες που σχετίζονται με τη εφαρμογή της μορφοκλασματικής κινητικής στο πεδίο του ρυθμού διάλυσης (Dokoumetzidis and Macheras, 1997; Valsami et al., 1999; Macheras and Dokoumetzidis, 2000; Lánský and Weiss, 2001; Kosmidis et al., 2003a; Lánský and Weiss, 2003; Lánský et al., 2004), στο πεδίο της απορρόφησης (Macheras and Argyrakakis, 1997; Caroli-Bosc et al., 2000; Higaki et al., 2001) και στο πεδίο της κατανομής των φαρμάκων στο σώμα (Karalis et al., 2001; Karalis and Macheras, 2002;

Karalis et al., 2002; Dokoumetzidis and Macheras, 2003; Karalis et al., 2003; Karalis et al., 2004). Στο πεδίο της φαρμακοκινητικής χρησιμοποιήθηκαν χρονοεξαρτώμενες σταθερές για να περιγράψουν τη φαρμακοκινητική του ασβεστίου (Macheras, 1996) και του mibefradil (Fuite et al., 2002; Kosmidis et al., 2004; Marsh and Tuszynski, 2006).

Γίνεται επομένως αντιληπτό, ότι αν και η μορφοκλασματική κινητική παραδοσιακά σχετίζεται με τη μορφοκλασματική γεωμετρία και τα χαοτικά συστήματα, στο πεδίο της φαρμακευτικής προκύπτει κυρίως από τα φαινόμενα ανώμαλης διάχυσης. Το βασικό εργαλείο για την περιγραφή και ερμηνεία τέτοιων φαινομένων είναι ο κλασματικός λογισμός (fractional calculus) (West et al., 2003).

B.1.3. *IN VITRO-IN VIVO* ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ

B.1.3.1.1. Σημασία στη φαρμακευτική

Τα τελευταία χρόνια, οι επιστήμονες και οι φαρμακευτικές βιομηχανίες απέδωσαν ιδιαίτερη έμφαση στην ανάπτυξη και επικύρωση των *in vitro-in vivo* συσχετίσεων (IVIVC), εφόσον διευκόλυναν την ανάπτυξη των προϊόντων τους και εξάλειψαν την ανάγκη για μελέτες βιοϊσοδυναμίας. Μια επιτυχημένη IVIVC μπορεί να αξιοποιηθεί ως *biowaiver*, με αποτέλεσμα να μειωθεί σημαντικά το κόστος ανάπτυξης για τον παραγωγό, δεδομένου ότι μια απλή *in vitro* μελέτη του ρυθμού διάλυσης μπορεί να προβλέψει την *in vivo* συμπεριφορά μιας φαρμακευτικής μορφής (Emami, 2006). Αυτή η αναζήτηση ισχύει ειδικότερα στα σκευάσματα παρατεταμένης αποδέσμευσης και οι κατευθυντήριες οδηγίες του FDA δίνουν ιδιαίτερη προσοχή σε όλες τις πτυχές της εσωτερικής (internal) και εξωτερικής (external) επικύρωσης της IVIVC (FDA Guidance, 1997). Παράλληλα, η οδηγία του FDA προσδιορίζει πέντε επίπεδα συσχέτισης, τα οποία σχετίζονται με την ικανότητα της συσχέτισης να προβλέπει το προφίλ συγκέντρωσης στο πλάσμα σε σχέση με το χρόνο του σκευάσματος μετά την χορήγηση σε ανθρώπους. Η IVIVC επιπέδου Α αποτελεί την πιο κατατοπιστική συσχέτιση, διότι αντανακλά την χρονική εξάρτηση των δεδομένων (FDA Guidance, 1997).

B.1.3.1.2. Νεότερες εξελίξεις – Προβληματισμοί

Από τις πρώτες ημέρες της εφαρμογής των IVIVC και μέχρι σήμερα, έχει αναφερθεί περιορισμένος αριθμός επικυρωμένων γραμμικών συσχετισμών (Levy et al., 1965; Humbert et al., 1994; Eddington et al., 1998; Mahayni et al., 2000; Takka et al., 2003; Emami, 2006). Σε όλες αυτές τις μελέτες, αναπτύχθηκε μια γραμμική σχέση ανάμεσα σε ένα κατάλληλο χαρακτηριστικό αποδέσμευσης και σε μια *in vivo* παράμετρο βιοδιαθεσιμότητας. Εκτός αυτού, υπάρχουν επίσης πολλά παραδείγματα στη βιβλιογραφία είτε κακής γραμμικής συσχέτισης (Lake et al., 1999; Varshosaz et al., 2000; Sreenivasa Rao et al., 2001; Al-Behaisi et al., 2002) ή ασυσχέτιστων δεδομένων (Eddington et al., 1998; Meyer et al., 1998; Mircioiu et al., 2005). Δεδομένου ότι μια IVIVC θεωρείται συνήθως συνώνυμη με τη γραμμικότητα, οι μη γραμμικές συσχετίσεις αντιμετωπίζονται ως αποτυχημένες και παραμένουν αδημοσίευτες.

Αν και οι περισσότερες από τις εργασίες σχετικές με IVIVC βασίζονται σε γραμμικές σχέσεις, τόσο η USP όσο και ο FDA δηλώνουν ότι τα μη γραμμικά μοντέλα είναι

αποδεκτά για την περιγραφή μιας *in vitro-in vivo* συσχέτισης (FDA Guidance, 1997; Young, 2006; USP XXXII - NF XXVII, 2008). Στην πραγματικότητα, πρόσφατες αναφορές παρέχουν επιστημονικές αποδείξεις για την επιτυχημένη ανάπτυξη μη γραμμικών συσχετίσεων (Polli et al., 1996; Sirisuth et al., 2002; Corrigan et al., 2003). Πολλές δημοσιεύσεις έχουν προτείνει μη γραμμικές *IVIVC* χρησιμοποιώντας διαφορετικές προσεγγίσεις, όπως η χρήση ενός μοντέλου που προκύπτει θεωρώντας πρωτοταξική διάλυση και απορρόφηση (Polli et al., 1996), πιθανοτικές διαδικασίες (Dunne et al., 1997, 1999), τετραγωνικές, κυβικές και σιγμοειδείς συσχετίσεις (Sirisuth et al., 2002), εμπειρικές εξισώσεις (Mendell-Harary et al., 1997) και τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (Hussain, 1997; Dowell et al., 1999; Parojčić et al., 2007). Αυτές οι μη γραμμικές συσχετίσεις αναφέρονται συνήθως ως *IVIVR* (*in vitro-in vivo* relationships), για να ξεχωρίζουν από την κλασική γραμμική προσέγγιση. Αυτή η αυξανόμενη τάση να αναλύονται οι *in vitro-in vivo* σχέσεις, χρησιμοποιώντας μη γραμμικές προσεγγίσεις, κλονίζει την αντίληψη ότι αυτοί οι συσχετισμοί θα πρέπει να είναι γραμμικοί.

Σε μια γραμμική *IVIVC* η *in vitro* καμπύλη διάλυσης και η *in vivo* καμπύλη απορρόφησης αλληλεπικαλύπτονται (Emami, 2006). Όταν αυτό δεν είναι δυνατόν, εισάγεται συνήθως ένας παράγοντας κλιμάκωσης του χρόνου (FDA Guidance, 1997; USP XXXII - NF XXVII, 2008). Είναι σαφές ότι μια γραμμική *IVIVC* βασίζεται στην επιτυχή τροποποίηση των *in vitro* συνθηκών, δεδομένου ότι οι *in vivo* συνθήκες είναι δύσκολο να χειραγωγηθούν. Οι πειραματικές *in vitro* συνθήκες, οι οποίες υπόκεινται σε αλλαγές περιλαμβάνουν τις συνθήκες ανάδευσης, το pH, την ιοντική ισχύ, τη χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών και την επιλογή της συσκευής διάλυσης. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει *in vitro* σύστημα διάλυσης ή προσομοιωμένο μέσο διάλυσης που να μπορεί να μιμηθεί με απόλυτη επιτυχία τις *in vivo* συνθήκες (Blanquet et al., 2004), οι περισσότερες γραμμικές *IVIVC* είναι επιτυχείς μόνο όταν ένα σύστημα παρατεταμένης/ελεγχόμενης αποδέσμευσης συμπεριφέρεται κατά τρόπο επαναλήψιμο και ανεξάρτητο από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται, δηλαδή η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας είναι ανεξάρτητη από το pH και την ανάδευση (Frick et al., 1998). Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να έχουμε κατά νου ότι στις περισσότερες περιπτώσεις στις οποίες η διαλυτότητα ή ο ρυθμός διάλυσης εξαρτώνται από το pH ή την ανάδευση, καθώς και στις περιπτώσεις κατά τις οποίες παρατηρούνται ιδιαίτερα χαρακτηριστικά διαπερατότητας, δεν αναμένονται *in vitro-in vivo* συσχετίσεις αναλογίας 1:1 (Frick et al., 1998).

Επιπλέον, οι παραδοχές που στηρίζουν τη γραμμικότητα των *in vivo* διαδικασιών έχουν αποδυναμωθεί, καθώς αρκετές αναφορές σχετικά με την *in vivo* εκτίμηση των από το στόματος χορηγούμενων φαρμακοτεχνικών μορφών παρέχουν πειραματικές αποδείξεις για την επίδραση της δομικής και λειτουργικής ετερογένειας του γαστρεντερικού σωλήνα στην κινητική απορρόφησης των φαρμάκων (Digenis et al., 1991; Weitschies et al., 2005). Πειραματικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι τα γαστρεντερικά υγρά δεν είναι ομοιογενώς κατανεμημένα κατά μήκος του εντέρου (Schiller et al., 2005) και οι υδροδυναμικές συνθήκες στον γαστρεντερικό σωλήνα είναι πολύ πιο πολύπλοκες από ότι προκύπτει από μια απλή ομοιογενή θεώρηση.

Οι υδροδυναμικές συνθήκες αποτελούν μια σημαντική συνιστώσα του ρυθμού διάλυσης. Πρόσφατες μελέτες που στηρίζονται σε μεθόδους υπολογιστικής ρευστοδυναμικής (McCarthy et al., 2003; McCarthy et al., 2004; D'Arcy et al., 2005, 2006; D'Arcy et al., 2009) απέδειξαν όχι μόνο την πολυπλοκότητα της ροής του υγρού κατά τη χρήση των συσκευών μελέτης του ρυθμού διάλυσης, αλλά και τις χαοτικές πτυχές της υδροδυναμικής (D'Arcy et al., 2006). Επιπλέον, μια απλή σύγκριση των αριθμών Reynolds που επικρατούν στις *in vitro* και *in vivo* συνθήκες (Kukura et al., 2004; Abrahamsson et al., 2005; Baxter et al., 2005) δείχνει όχι μόνο τις μεγάλες διαφορές μεταξύ των *in vitro* και *in vivo* συνθηκών, αλλά και μεταξύ των διαφορετικών *in vitro* συστημάτων. Αν και οι αριθμοί Reynolds της ροής γύρω από δισκία διαμέτρου 1 cm εντός του στομάχου είναι της τάξης 0,01 έως 30, τιμές χαμηλότερες από εκείνες που απαιτούνται για την ύπαρξη τυρβώδους ροής, οι *in vitro* συνθήκες οδηγούν σε αριθμούς Reynolds τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες από τις φυσιολογικές και αρκετά μεγάλες για να δημιουργήσουν μια ισχυρή, μη φυσιολογική, τυρβώδη ροή, γύρω από το περιβάλλον του δισκίου (Kukura et al., 2004; Abrahamsson et al., 2005; Baxter et al., 2005).

Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στη *in vivo* μεταβλητότητα είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαρμάκων, της τροφής και των χολικών εκκρίσεων. Επίσης, μία από τις πλέον σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ιδανικών *in vitro* συνθηκών και της *in vivo* πραγματικότητας, είναι οι συνθήκες που επικρατούν στο μέσο του μικροπεριβάλλοντος της συσκευής. Η διάχυση, η οποία είναι ο βασικός μηχανισμός της αποδέσμευσης των φαρμάκων, είναι σε μεγάλο βαθμό εξαρτώμενη από τις υδροδυναμικές συνθήκες και την έλλειψη ανάδευσης. Αυτό ενδέχεται να επηρεάζει την

τοπολογία και την διαστατικότητα του μέσου, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει την κινητική της διαδικασίας αποδέσμευσης.

Δεδομένου ότι τόσο η διάλυση όσο και η αποδέσμευση είναι ελεγχόμενες από τη διάχυση διαδικασίες, οι οποίες πραγματοποιούνται σε περιορισμένο τοπολογικά χώρο, η διάχυση των φαρμάκων επιβραδύνεται και ακολουθεί μια ανώμαλη πορεία. Σε αυτό το πλαίσιο, επινοήθηκε ο όρος κινητικά «ετερογενή» φαινόμενα για τη διάλυση και την αποδέσμευση των φαρμάκων για να τονιστεί ότι η διάχυση των φαρμάκων πραγματοποιείται σε διαταραγμένα μέσα, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* συνθήκες (Macheras and Argyrakakis, 1997; Dokoumetzidis and Macheras, 2008). Πρόσφατες εξελίξεις στη μοντελοποίηση της διάλυσης των φαρμάκων θέσπισαν μέτρα για το βαθμό της ετερογένειας (Lánský and Weiss, 2001, 2003; Lánský et al., 2004). Επιπλέον, μελέτες με Monte Carlo προσομοιώσεις της αποδέσμευσης φαρμάκων σε χώρους μορφοκλασματικών δομών (Bunde et al., 1985; Kosmidis et al., 2003a, b; Macheras and Iliadis, 2006), καθώς και πειραματικές μελέτες αποδέσμευσης (Rinaki et al., 2004; Dokoumetzidis et al., 2006) διαπίστωσαν αποκλίσεις της κινητικής συμπεριφοράς από τους κλασικούς νόμους. Στην πραγματικότητα, η συνάρτηση Weibull (Weibull, 1951; Langenbucher, 1972), η οποία απολαμβάνει ευρείας αλλά εμπειρικής χρήσης σε μελέτες διάλυσης (Costa and Sousa Lobo, 2001) αποδείχθηκε κατάλληλη για την περιγραφή της αποδέσμευσης φαρμάκων τόσο σε χώρους Ευκλείδειας όσο και σε χώρους χαοτικής γεωμετρίας (Kosmidis et al., 2003a, b; Papadopoulou et al., 2006).

Στην παρούσα εργασία αξιοποιείται ο κλασματικός λογισμός (fractional calculus) για να περιγράψει φαινόμενα ανώμαλης κινητικής, προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα εφαρμογής των κλασματικών παραγώγων στις *IVIVC*.

B.1.4. ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΟΙ

B.1.4.1.1. Ιστορική αναδρομή

Οι περισσότερες από τις σχέσεις που αναφέρθηκαν στο παρόν κεφάλαιο, έχουν προκύψει είτε από τη θεώρηση ενός ομοιογενούς μοντέλου είτε εμπειρικά και προϋποθέτουν ομοιογενείς διαδικασίες. Εντούτοις πρόσφατες μελέτες στο τομέα της διάχυσης οδήγησαν στη χρήση κλασματικών παραγώγων για την ερμηνεία των διαδικασιών διάλυσης σε ετερογενείς συνθήκες. Παρόλο που οι κλασματικές παράγωγοι έχουν εισαχθεί στα μαθηματικά από τον Leibniz το 1695, οι εφαρμογές τους μόλις πρόσφατα γίνονται αντιληπτές. Η εισαγωγή τους στον τομέα της φαρμακευτικής και ιδιαίτερα στο πεδίο της φαρμακοκινητικής έγινε το 2009 (Dokoumetzidis and Macheras, 2009).

Τα περίπλοκα μαθηματικά πίσω από τον κλασματικό λογισμό έχουν περιγραφεί εκτενώς (Podlubny, 1999; Sokolov et al., 2002). Εν ολίγοις ο κλασματικός λογισμός εισάγει παραγώγους και ολοκληρώματα κλασματικής τάξης. Οι κλασματικές παράγωγοι είναι παράγωγοι μη ακέραιου βαθμού, αλλά κλασματικού, όπως για παράδειγμα $\frac{3}{4}$. Έχει αποδειχθεί ότι διαφορικές εξισώσεις με κλασματικές παραγώγους περιγράφουν καλύτερα φαινόμενα ανώμαλης διάχυσης. Τελευταία πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια για να διερευνηθεί η δυνατότητα εφαρμογής των κλασματικών παραγώγων στο πεδίο της φαρμακοκινητικής, καθώς και στην κινητική των πορειών απορρόφησης των φαρμάκων (Dokoumetzidis and Macheras, 2009; Dokoumetzidis et al., 2010).

B.1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στο παρόν τμήμα της διδακτορικής διατριβής (Τμήμα Β) θα επιχειρηθεί η εφαρμογή των κλασματικών παραγώγων στο πεδίο της φαρμακευτικής και ιδιαίτερα στην κινητική των πορειών απορρόφησης (διάλυση, αποδέσμευση, απορρόφηση). Πιο συγκεκριμένα σκοπός του παρόντος τμήματος είναι:

- Η εφαρμογή των κλασματικών παραγώγων στις *in vitro* και στις *in vivo* διαδικασίες της διάλυσης και της αποδέσμευσης.
- Η επέκταση των κλασματικών παραγώγων στο επίπεδο της φαρμακοκινητικής, ιδιαίτερα στις μηδενοταξικές διαδικασίες.
- Η δυνατότητα αξιοποίησης της διασύνδεσης των κλασματικών παραγώγων με τις υδροδυναμικές συνθήκες και η εφαρμογή της στο πεδίο των *in vitro-in vivo* συσχετίσεων προς ερμηνεία των μη γραμμικών σχέσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β.2. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

Β.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΟΥΣ

Κλασματική ανάλυση ή λογισμός (fractional calculus) ονομάζεται ο τομέας της μαθηματικής ανάλυσης, ο οποίος έχει σχέση με την έρευνα και τις εφαρμογές των ολοκληρωμάτων και των παραγώγων αυθαίρετης (πραγματικής ή μιγαδικής) τάξης. Ο όρος «κλασματική» δεν είναι δόκιμος, αλλά διατηρείται λόγω της διαχρονικής χρήσης του (Butzer and Westphal, 2000; Δημαρέση, 2008).

Β.2.1.1. Ιστορική αναδρομή

Η σύλληψη της ιδέας της κλασματικής ανάλυσης πιστεύεται ότι οφείλεται σε μια ερώτηση που υπέβαλε το 1695 ο Marquis de L'Hôpital στον Gottfried Wilhelm Leibniz,

σχετική με το αν έχει έννοια ο συμβολισμός $\frac{d^n y}{dx^n}$ όταν $n = \frac{1}{2}$. Στην απάντηση του στις

30 Σεπτεμβρίου 1695 ο Leibniz έγραψε: «Πρόκειται για ένα φαινομενικό παράδοξο, από το οποίο μια μέρα θα προκύψουν χρήσιμες συνέπειες». Επίσης ο Leibniz έλυσε το πρώτο πρόβλημα κλασματικών παραγώγων, απαντώντας ότι $d^{1/2}x = x\sqrt{dx}:x$ (Sokolov et al., 2002; Dalir and Bashour, 2010).

Ο Lacroix ήταν ο πρώτος που ασχολήθηκε με μια κλασματική παράγωγο και το 1819 απέδειξε ότι για $y = x^\alpha$, $\alpha \in \mathbb{R}_+$ ισχύει (Lacroix, 1819):

$$\frac{d^{1/2}y}{dx^{1/2}} = \frac{\Gamma(\alpha+1)}{\Gamma(\alpha+\frac{1}{2})} x^{\alpha-\frac{1}{2}} \quad \text{B.2.1}$$

Όπου Γ η συνάρτηση Γάμμα (βλ. Β.2.1.3.1. Συνάρτηση Γάμμα, σελ. 221).

Με το πέρας του χρόνου και άλλοι μεγάλοι μαθηματικοί ασχολήθηκαν με την κλασματική ανάλυση, εντούτοις η πρώτη σοβαρή προσέγγιση έγινε από τον Liouville το 1832 (Liouville, 1832). Ακολούθησε η εργασία του Riemann (Riemann, 1876) που βελτίωσε τον ορισμό του Liouville (βλ. Β.2.1.2.1. Παράγωγος Riemann-Liouville, σελ. 219) και πολύ αργότερα ο ορισμός του Caputo το 1967 (Caputo, 1967). Το 1974

πραγματοποιήθηκε το πρώτο μαθηματικό συνέδριο σχετικό με το αντικείμενο και έκτοτε ο τομέας του κλασματικού λογισμού βρίσκεται σε άνθιση.

B.2.1.2. Θεωρία

Η παράγωγος μιας συνάρτησης αντιπροσωπεύει μια απειροελάχιστη αλλαγή στη συνάρτηση σε σχέση με μία απειροελάχιστη μεταβολή σε μια από τις μεταβλητές της συνάρτησης.

Η «απλή» παράγωγος μιας συνάρτησης f σε σχέση με μια μεταβλητή t συμβολίζεται ως $f'(t)$ ή df/dt . Σε περίπτωση που η παραγωγή πραγματοποιηθεί n φορές, όπου n φυσικός αριθμός ($n \in \mathbb{N}$), ο συμβολισμός είναι $f^{(n)}(t)$ ή $\frac{d^n f}{dt^n}$. Ένας άλλος τρόπος συμβολισμού της παραγώγου που θα χρησιμοποιηθεί και παρακάτω είναι $D^{(n)}f(t)$, όπου n ο βαθμός παραγώγισης ($n \in \mathbb{N}$).

Η πρώτη παράγωγος μιας συνεχούς συνάρτησης $f(t)$ ως προς τη μεταβλητή της t ορίζεται ως:

$$D^1 f(t) \equiv \lim_{h \rightarrow 0} \frac{f(t+h) - f(t)}{h} \quad \text{B.2.2}$$

Η επανάληψη της σχέσης B.2.2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απόδοση της σχέσης που δίνει την n -βαθμού παράγωγο μιας συνάρτησης (<http://www.xuru.org/fc/Intro.asp>):

$$D^n f(t) = \lim_{h \rightarrow 0} h^{-n} \sum_{i=0}^n (-1)^i \binom{n}{i} f(t + (n-i)h) \quad \text{B.2.3}$$

Όπου:

$$\binom{n}{i} = \frac{n!}{i!(n-i)!} \quad \text{B.2.4}$$

Δεδομένου ότι από τη σχέση B.2.3 φαίνεται ότι η έννοια της παραγώγου ισχύει για κάθε φυσικό αριθμό, είναι φυσιολογικό να αναρωτηθεί κανείς αν μπορεί να επεκταθεί σε κάθε πραγματικό αριθμό, δηλαδή για $n \in \mathbb{R}$.

B.2.1.2.1. Παράγωγος Riemann-Liouville

Η παράγωγος Riemann-Liouville είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη γενίκευση του κανόνα παραγωγίσης. Βασίζεται στη σχέση του Cauchy για τον υπολογισμό επαναλαμβανόμενων ολοκληρωμάτων. Σε περίπτωση που το πρώτο ολοκλήρωμα μιας συνάρτησης, το οποίο ισοδυναμεί με την παραγωγή της εις την -1 , είναι:

$$D^{-1}f(t) = \int_0^t f(\tau) d\tau \quad \text{B.2.5}$$

Μπορεί να αποδειχθεί ότι η επανάληψη της ολοκλήρωσης μπορεί να οδηγήσει στην ακόλουθη σχέση για τον υπολογισμό επαναλαμβανόμενων ολοκληρωμάτων:

$$D^{-n}f(t) = \frac{1}{(n-1)!} \int_0^t f(\tau)(t-\tau)^{n-1} d\tau \quad \text{B.2.6}$$

Όπου $n \in \mathbb{N}$.

Η παραπάνω σχέση μπορεί να γενικευθεί εύκολα σε μη ακέραιους αριθμούς. Η σχέση που προκύπτει είναι γνωστή ως ολοκλήρωμα Riemann-Liouville.

$${}_b D_t^{-\alpha} f(t) = \frac{1}{\Gamma(\alpha)} \int_b^t f(\tau)(t-\tau)^{\alpha-1} d\tau \quad \text{B.2.7}$$

Η σχέση B.2.7 αποτελεί μια γενικευμένη σχέση για τον υπολογισμό ολοκληρωμάτων τάξης α , όπου $\alpha \in \mathbb{R}$. Ο δείκτης β κάτω και αριστερά του D δηλώνει το κατώτερο όριο της ολοκλήρωσης, το οποίο συνήθως (αλλά όχι πάντα) είναι ίσο με μηδέν. Διαφορετικά κατώτερα όρια οδηγούν και σε διαφορετικές ιδιότητες για τα κλασματικά ολοκληρώματα. Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η σχέση B.2.7 είναι στην ουσία μία συνέλιξη μεταξύ της συνάρτησης $f(t)$ και της μεταβλητής t σε μορφή νόμου δύναμης. Δηλαδή ισχύει:

$${}_b D_t^{-\alpha} f(t) = \frac{1}{\Gamma(\alpha)} t^{\alpha-1} * f(t) \quad \text{B.2.8}$$

Όπου το σύμβολο « $*$ » δηλώνει τη συνέλιξη. Στην παραπάνω ιδιότητα οφείλονται και τα φαινόμενα μνήμης που αποδίδονται σε αυτές τις σχέσεις.

Εάν παραγωγίσουμε τη σχέση B.2.7 και με βάση το βασικό θεώρημα του απειροστικού λογισμού, σύμφωνα με το οποίο η παραγωγή και η ολοκλήρωση είναι αντίστροφες

διαδικασίες, θα πάρουμε την ακόλουθη σχέση, που είναι γνωστή και ως παράγωγος Riemann-Liouville.

$${}_b D_t^\alpha f(t) = \frac{1}{\Gamma(n-\alpha)} \frac{d^n}{dt^n} \int_b^t \frac{f(\tau)}{(t-\tau)^{\alpha-n+1}} d\tau \quad \text{B.2.9}$$

Ή στην απλοποιημένη της μορφή για $b=0$ και $n=1$:

$${}_0 D_t^\alpha f(t) = \frac{1}{\Gamma(1-\alpha)} \frac{d}{dt} \int_0^t \frac{f(\tau)}{(t-\tau)^\alpha} d\tau \quad \text{B.2.10}$$

Γενικεύοντας την προσέγγιση του υπολογισμού της κλασματικής παραγώγου μέσω του κλασματικού ολοκληρώματος, η κλασματική παράγωγος μιας συνάρτησης $f(t)$ βαθμού $\mu > 0$ (σε περίπτωση που υπάρχει), ορίζεται με τη βοήθεια του κλασματικού ολοκληρώματος $D^{-\nu} f(t)$ ως εξής:

$$D^\mu f(t) = D^m [D^{-(m-\mu)} f(t)] \quad \text{B.2.11}$$

Όπου m ακέραιος αριθμός $\geq \lceil \mu \rceil$, όπου $\lceil \mu \rceil$ είναι η συνάρτηση στρογγυλοποίησης στον αμέσως μεγαλύτερο ακέραιο (*ceiling function*). Επομένως οποιαδήποτε παράγωγος μιας συνάρτησης μπορεί να υπολογιστεί αφού αρχικά υπολογιστεί η αντιπαράγωγός της και στη συνέχεια πραγματοποιηθεί κανονική παραγωγή.

B.2.1.2.2. Παράγωγος Caputo

Η παράγωγος Caputo αποτελεί ένα εναλλακτικό ορισμό κλασματικών παραγώγων, ο οποίος προτιμάται σε πολλές περιπτώσεις διότι το αρχικό σημείο παραγωγής είναι ίσο με μηδέν και έχει πολλές ιδιότητες κοινές με τις «απλές» παραγώγους. Επίσης, η παράγωγος Caputo μιας συνάρτησης προτιμάται γιατί ο μετασχηματισμός της κατά Laplace εκφράζεται με τη μορφή της συνάρτησης και μιας παραγώγου της ακέραιου βαθμού και όχι με κλασματικό ολοκλήρωμα όπως η παράγωγος Riemann-Liouville.

$${}_0^C D_t^\alpha f(t) = \frac{1}{\Gamma(1-\alpha)} \int_0^t \frac{f'(\tau)}{(t-\tau)^\alpha} d\tau \quad \text{B.2.12}$$

Όπου ο δείκτης C πάνω και αριστερά του D δηλώνει την παράγωγο κατά Caputo. Μια σημαντική ιδιότητα της σχέσης B.2.12 είναι ότι η παραγωγή μιας σταθεράς δίνει μηδέν όπως και στις «απλές» παραγώγους.

B.2.1.3. Βασικές σχέσεις

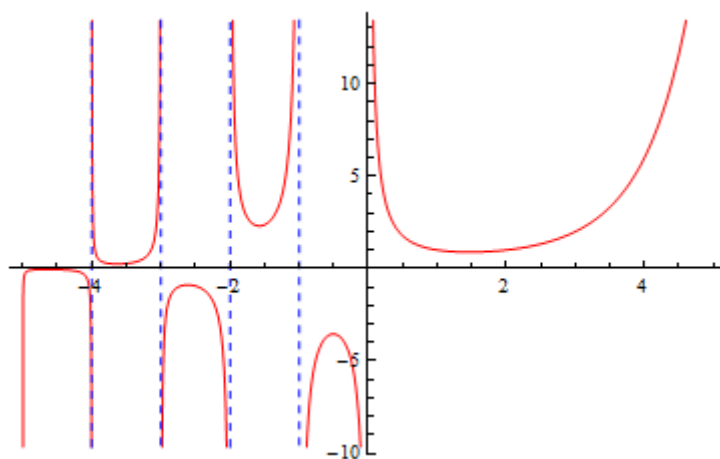
Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν εν συντομία δύο βασικές συναρτήσεις που εφαρμόζονται πολύ συχνά στο πεδίο των κλασματικών παραγώγων, η συνάρτηση Γάμμα και η συνάρτηση Mittag-Leffler.

B.2.1.3.1. Συνάρτηση Γάμμα

Η συνάρτηση Γ είναι μια επέκταση του παραγοντικού πολυωνύμου σε πραγματικούς και μιγαδικούς αριθμούς. Για έναν μιγαδικό αριθμό z με θετικό πραγματικό μέρος, η συνάρτηση Γ είναι:

$$\Gamma(z) = \int_0^{\infty} t^{z-1} e^{-t} dt \quad \text{B.2.13}$$

Αν το z είναι θετικός ακέραιος τότε $\Gamma(n) = (n-1)!$.



Σχήμα Β.2.1: Γραφική αναπαράσταση της συνάρτησης Γάμμα για τους πραγματικούς αριθμούς.

Όπως γίνεται αντιληπτό και από τη γραφική της απεικόνιση, η συνάρτηση Γάμμα δεν ορίζεται για αρνητικούς ακέραιους αριθμούς.

Η συνάρτηση Γάμμα οφείλει της ύπαρξή της στον Leonhard Euler.

Η σχέση B.2.13 έχει καθορισμένα όρια ολοκλήρωσης. Οι άνω και κάτω ατελείς συναρτήσεις Γάμμα, προκύπτουν αν αλλάξουν τα κάτω και άνω όρια ολοκλήρωσης αντίστοιχα. Έτσι για παράδειγμα η άνω ατελής συνάρτηση Γάμμα ορίζεται ως εξής:

$$\Gamma(z, x) = \int_x^{\infty} t^{z-1} e^{-t} dt \quad \text{B.2.14}$$

Αντίστοιχα η κάτω ατελής συνάρτηση Γάμμα ορίζεται ως εξής:

$$\gamma(z, x) = \int_0^x t^{z-1} e^{-t} dt \quad \text{B.2.15}$$

B.2.1.3.2. Συνάρτηση Mittag-Leffler

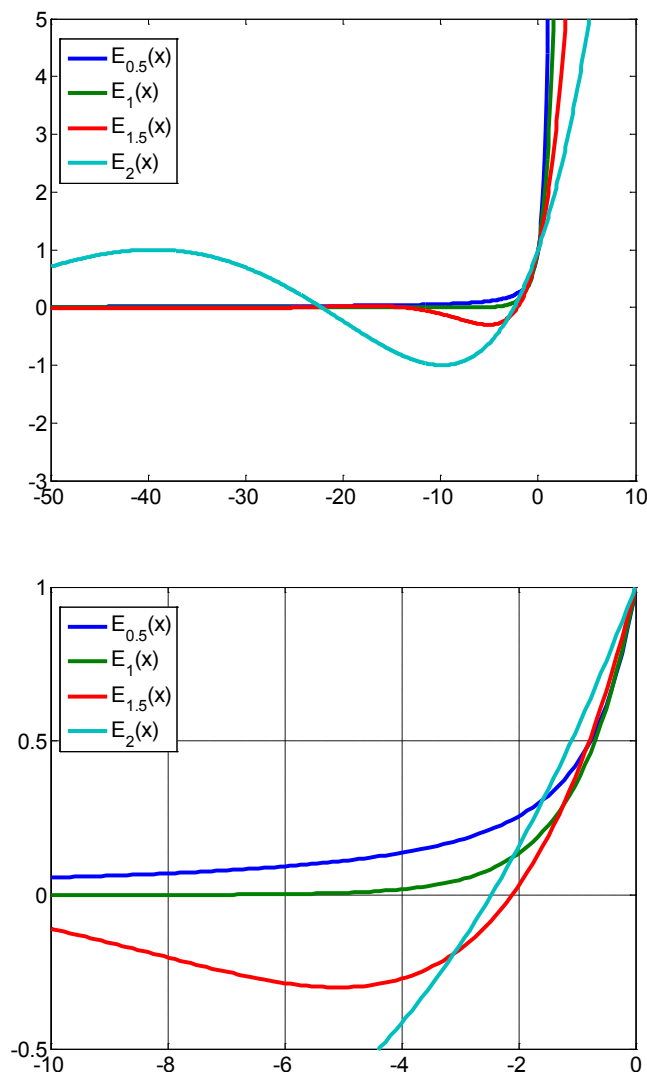
Η συνάρτηση Mittag-Leffler είναι μια ειδική συνάρτηση που εξαρτάται από δύο παραμέτρους, α και β με $\alpha > 0$ και περιγράφεται μαθηματικά από τη σχέση:

$$E_{\alpha, \beta}(z) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{z^k}{\Gamma(\alpha k + \beta)} \quad \text{B.2.16}$$

Και στην απλή της μορφή, όπου $\beta=1$ και η οποία θα χρησιμοποιηθεί παρακάτω:

$$E_{\alpha}(z) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{z^k}{\Gamma(\alpha k + 1)} \quad \text{B.2.17}$$

Σε περίπτωση που $\alpha=1$, η B.2.17 γίνεται: $E_1(z) = e^z$.



Σχήμα Β.2.2: Γραφική αναπαράσταση της συνάρτησης Mittag-Leffler (Β.2.17)
(Άνω γράφημα: Όλο το εύρος τιμών, Κάτω γράφημα: Για την περιοχή τιμών που θα
χρησιμοποιηθεί στην παρούσα διατριβή).

Η συνάρτηση Mittag-Leffler οφείλει το όνομα της στο μαθηματικό Gösta Mittag-Leffler.

Β.2.1.4. Εφαρμογές σε επιστημονικά πεδία

Ο κλασματικός λογισμός πέρα από το μαθηματικό ενδιαφέρον στην επίλυση πολύπλοκων παραγώγων και ολοκληρωμάτων, βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς των φυσικών επιστημών, όπως στη μελέτη δυναμικών διεργασιών σε χώρους μη ακέραιας διάστασης (πχ διάχυση), στο πεδίο μελέτης υλικών (ιξωδοελαστικότητα), στα ηλεκτρονικά κυκλώματα για τη μείωση θορύβου, στα ηλεκτρικά δίκτυα, στην οικονομία, στη φυσιολογία (μελέτη ιστών) και στην χημεία (κινητική αντιδράσεων). Ενδεικτικά αναφέρονται οι εργασίες των Sokolon πάνω στην ανώμαλη διάχυση

(Sokolov et al., 2002), Magin στη βιοτεχνολογία και τη διάχυση (Magin, 2004; Magin et al., 2007) και Hilfer στη διάχυση (Hilfer, 2000). Τέλος θα πρέπει να αναφερθούν οι πρόσφατες εφαρμογές στη βιοφαρμακευτική-φαρμακοκινητική (Dokoumetzidis and Macheras, 2009; Dokoumetzidis et al., 2010; Kytariolos et al., 2010; Dokoumetzidis and Macheras, 2011).

Παρόλο που ο κλασματικός απειροστικός λογισμός είναι ένα πεδίο άγνωστο για πολλούς επιστήμονες, οι περισσότεροι κατέληξαν στην εφαρμογή του λόγω σοβαρών και ουσιαστικών φυσικών και μαθηματικών λόγων και όχι λόγω της ευελιξίας που παρέχει στην περιγραφή διαφόρων φαινομένων. Αυτό πηγάζει από το γεγονός ότι οι «απλές» παράγωγοι που χρησιμοποιούνται συνήθως μπορούν να θεωρηθούν ως υποπερίπτωση των κλασματικών παραγώγων, οι οποίες διαθέτουν ιδιότητες που δεν έχουν οι «απλές» παράγωγοι. Ενδεικτικά αναφέρεται η ιδιότητα της μνήμης που διαθέτουν οι κλασματικές παράγωγοι και σχετίζεται με μη αντιστρεπτές διαδικασίες, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται με τη χρήση ακέραιου βαθμού παραγώγων (Baumann, 2005; Dalir and Bashour, 2010).

Το βασικό πεδίο εφαρμογής των κλασματικών παραγώγων, το οποίο αξιοποιείται στην παρούσα διατριβή, είναι η εφαρμογή τους σε φαινόμενα ανώμαλης διάχυσης. Οι κλασματικές εξισώσεις της διάχυσης αποτελούν γενίκευση του νόμου του Fick, λαμβάνοντας υπόψη φαινόμενα μνήμης (Sokolov et al., 2002).

B.2.2. ΜΗΔΕΝΟΤΑΞΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

B.2.2.1. Θεωρία

Η κλασική μηδενοταξική διαφορική εξίσωση (case II transport, βλ. B.1.1.3: Αποδέσμευση, σελ. 191) μπορεί να γραφτεί ως κλασματική διαφορική εξίσωση ως εξής:

$$\frac{d^\alpha M}{dt^\alpha} = k_{0,f} \quad \text{B.2.18}$$

όπου $d^\alpha M/dt^\alpha$ είναι η κατά Caputo κλασματική παράγωγος μη-ακέραιου βαθμού α , M είναι η ποσότητα του αποδεσμευμένου φαρμάκου σε χρόνο t και $k_{0,f}$ είναι η κλασματική μηδενοταξική σταθερά εκφρασμένη σε μονάδες ποσότητα/(χρόνος) $^{-\alpha}$. Η εξίσωση με ολοκλήρωση δίνει την ακόλουθη σχέση (Dokoumetzidis and Macheras, 2009):

$$M = \frac{k_{0,f}}{\Gamma(\alpha + 1)} t^\alpha \quad \text{B.2.19}$$

Όπου $\Gamma(x)$ είναι η συνάρτηση Γάμμα. Η εξίσωση αποτελεί έναν νόμο δύναμης του χρόνου, και μπορεί να αξιοποιηθεί για την περιγραφή μηδενοταξικών διαδικασιών αποδέσμευσης σε μη ακέραιες διαστάσεις. Η εξίσωση B.2.19 μπορεί να γραφτεί ως προς το κλάσμα της δόσης που έχει αποδεσμευτεί (F_r) ως εξής:

$$F_r = \frac{k'_{0,1}}{\Gamma(\alpha_1 + 1)} t^{\alpha_1} \quad \text{B.2.20}$$

όπου $k'_{0,1}$ είναι η κλασματική μηδενοταξική σταθερά εκφρασμένη σε μονάδες (χρόνος) $^{-\alpha}$. Μπορούμε να εισάγουμε και ένα χρόνο υστέρησης t_{lag} , ο οποίος αντιστοιχεί στο χρόνο που απαιτείται για να ξεκινήσει η διαδικασία της αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας από τη φαρμακοτεχνική μορφή και να προκύψει η ακόλουθη σχέση:

$$F_r = \frac{k'_{0,1}}{\Gamma(\alpha_1 + 1)} (t - t_{lag})^{\alpha_1} \quad \text{B.2.21}$$

Η *in vivo* αντίστοιχη της σχέσης B.2.21, στην περίπτωση κατά την οποία η μηδενοταξική αποδέσμευση αποτελεί το περιοριστικό βήμα εμφάνισης του φαρμάκου στην κυκλοφορία είναι η:

$$F_{\alpha} = \frac{k'_{0,2}}{\Gamma(\alpha_2 + 1)} (t - t_{lag})^{\alpha_2} \quad \text{B.2.22}$$

Όπου F_{α} το κλάσμα της δόσης που έχει απορροφηθεί σε χρόνο t .

Στην περίπτωση που δεν υπάρχει χρόνος υστέρησης κατά την *in vivo* αποδέσμευση, η σχέση B.2.22 γράφεται αντίστοιχα με την B.2.20 ως εξής:

$$F_{\alpha} = \frac{k'_{0,2}}{\Gamma(\alpha_2 + 1)} t^{\alpha_2} \quad \text{B.2.23}$$

Η εξίσωση B.2.20 μπορεί να απλοποιηθεί περαιτέρω:

$$F_r = k_{0,1} t^{\alpha_1} \quad \text{B.2.24}$$

Όπου $k_{0,1}$ είναι η μηδενοταξική σταθερά αποδέσμευσης εκφρασμένη σε μονάδες (χρόνος)^{- α_1} . Είναι προφανές ότι η $k_{0,1}$ ισούται με $\frac{k'_{0,1}}{\Gamma(\alpha_1 + 1)}$. Ο δείκτης 1 στις σταθερές $k_{0,1}$

και α_1 δηλώνει *in vitro* διαδικασία, ενώ ο δείκτης 2 δηλώνει *in vivo* διαδικασία.

Τέλος μπορούμε να εισάγουμε ένα χρόνο υστέρησης t_{lag} , ο οποίος αντιστοιχεί στο χρόνο που απαιτείται για να ξεκινήσει η διαδικασία της αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας από τη φαρμακοτεχνική μορφή και να προκύψει η ακόλουθη σχέση:

$$F_r = k_{0,1} (t - t_{lag})^{\alpha_1} \quad \text{B.2.25}$$

Η εξισώσεις B.2.24 και B.2.25 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να περιγράψουν *in vitro* διαδικασίες αποδέσμευσης από συστήματα παρατεταμένης αποδέσμευσης σε συνθήκες ανώμαλης διάχυσης. Πρόκειται στην ουσία για νόμους δύναμης (βλ. Σχέσεις B.1.9, σελ. 203 και B.1.10, σελ. 204). Στην ειδική περίπτωση που $\alpha_1=1$ οι δύο σχέσεις μετατρέπονται σε συνηθισμένες μηδενοταξικές εξισώσεις, όπου το ποσοστό αποδέσμευσης συνδέεται γραμμικά με το χρόνο. Σε περίπτωση που $\alpha_1 \neq 1$, τα δύο μεγέθη (ποσοστό αποδέσμευσης και χρόνος) συνδέονται μη γραμμικά με νόμο δύναμης που καθορίζει το μέγεθος του μη ακέραιου εκθέτη α_1 .

Αντίστοιχα για τις *in vivo* διαδικασίες το κλάσμα της δόσης που έχει απορροφηθεί (F_{α}) σε χρόνο t όταν η αποδέσμευση αποτελεί το περιοριστικό βήμα της διαδικασίας μπορεί να εκφραστεί ως:

$$F_{\alpha} = k_{0,2} t^{\alpha_2} \quad \text{B.2.26}$$

Όπου $k_{0,2}$ είναι η μηδενοταξική σταθερά αποδέσμευσης ($k_{0,2} = \frac{k'_{0,2}}{\Gamma(\alpha + 1)}$) εκφρασμένη σε μονάδες (χρόνος)^{-α}. Και σε αυτή την περίπτωση μπορούμε να εισάγουμε ένα χρόνο υστέρησης t_{lag} , ο οποίος αντιστοιχεί στο χρόνο που απαιτείται για να ξεκινήσει η διαδικασία της αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας από τη φαρμακοτεχνική μορφή ή στο χρόνο που απαιτείται για να φτάσει η φαρμακοτεχνική μορφή στο σημείο αποδέσμευσης/απορρόφησης, και να προκύψει η ακόλουθη σχέση:

$$F_{\alpha} = k_{0,2} (t - t_{lag})^{\alpha_2} \quad \text{B.2.27}$$

Για τις σχέσεις B.2.26 και B.2.27 ισχύουν τα ίδια συμπεράσματα με τις σχέσεις B.2.24 και B.2.25, δηλαδή τις *in vitro* αντίστοιχές τους. Επομένως σε περιπτώσεις κατά τις οποίες η εμφάνιση του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία εξαρτάται μόνο από την αποδέσμευση, δηλαδή η απορρόφηση δεν αποτελεί περιοριστικό βήμα, και η αποδέσμευση είναι μηδενοταξική διαδικασία μπορούν να εφαρμοστούν αυτούσιες. Είναι προφανές ότι όταν $\alpha=1$ οι δύο σχέσεις μετατρέπονται σε συνηθισμένες μηδενοταξικές εξισώσεις, όπου το ποσοστό αποδέσμευσης συνδέεται γραμμικά με το χρόνο. Όταν όμως $\alpha \neq 1$ η σχέση των παραμέτρων δεν είναι γραμμική, καθώς η διαδικασία περιγράφεται μαθηματικά με κλασματική διαφορική εξίσωση. Λόγω των ειδικών υδροδυναμικών συνθηκών που επικρατούν στο γαστρεντερικό σωλήνα είναι λογικό να αναμένουμε τιμές $\alpha \neq 1$.

B.2.2.2. Μέθοδοι

B.2.2.2.1. Προσομοιώσεις

Οι σχέσεις B.2.20, B.2.21, B.2.24, B.2.25, B.2.26 και B.2.27 απεικονίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Wolfram Mathematica® 7.0 (Wolfram Research, Inc.). Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τιμές παραμέτρων για να μελετηθεί η επίδρασή τους στη μορφή της καμπύλης. Είναι προφανές ότι οι *in vitro* σχέσεις B.2.24 και B.2.25 είναι όμοιες με τις αντίστοιχες *in vivo* B.2.26 και B.2.27.

Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των καμπυλών παρουσιάζονται στο Παράρτημα III.

B.2.2.2.2. Προσαρμογή σε πειραματικά δεδομένα

Η σχέση B.2.20 προσαρμόστηκε σε πειραματικά δεδομένα που προήλθαν από τη βιβλιογραφία (Cedillo-Ramírez et al., 2006; AlKhatib et al., 2008) και εκτιμήθηκαν οι τιμές των παραμέτρων $k'_{0,f}$ και α . Τα βιβλιογραφικά δεδομένα επιλέχθηκαν με κριτήριο την χρήση της σχέσης Korsmeyer-Peppas για την προσαρμογή στο 100% των πειραματικών δεδομένων.

Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τις προσαρμογές προήλθαν από ψηφιοποίηση των διαγραμμάτων της βιβλιογραφίας με χρήση του προγράμματος GetData Graph Digitizer®. Όπου απαιτήθηκε έγινε μετατροπή των δεδομένων έτσι ώστε ο χρόνος να εκφράζεται σε ώρες και το % ποσοστό αποδέσμευσης να εκφράζεται σε F_r . Τα δεδομένα εξήχθησαν σε πίνακα Excel® (Microsoft Office 2007), και στη συνέχεια σε Tab-delimited αρχείο κειμένου (κατάληξης txt). Τα αρχεία αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή των δεδομένων στο πρόγραμμα Mathematica® με τη χρήση της ρουτίνας "ReadList". Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με χρήση της εντολής "NonlinearModelFit". Υπολογίστηκαν οι τιμές των παραμέτρων $k'_{0,f}$ και α καθώς και τα τυπικά σφάλματα (SE), τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) και ο συντελεστής προσδιορισμού r^2 . Ένα τυπικό παράδειγμα μη γραμμικής προσαρμογής σε πειραματικά δεδομένα παρουσιάζεται στο Παράρτημα III.

Αντίστοιχα η σχέση B.2.22 χρησιμοποιήθηκε για την προσαρμογή σε *in vivo* δεδομένα απορρόφησης από ψηφιοποίηση δεδομένων που προήλθαν από τη βιβλιογραφία. Τα δεδομένα προήλθαν από τις δημοσιεύσεις των Dutta et al. (Dutta et al., 2005) και Abrahamsson et al. (Abrahamsson et al., 1998).

B.2.2.2.3. Προσομοιώσεις φαρμακοκινητικών δεδομένων

Για την προσομοίωση φαρμακοκινητικών δεδομένων στο μονοδιαμερισματικό μοντέλο που προκύπτουν από μηδενοταξική αποδέσμευση κλασματικής τάξης στην περίπτωση που η αποδέσμευση είναι το περιοριστικό βήμα της εμφάνισης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία, είναι απαραίτητη η εξαγωγή της σχέσης που δίνει τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα σε συνάρτηση με το χρόνο. Είναι προφανές ότι η κατάλληλη σχέση θα προκύψει ύστερα από συνέλιξη της συνάρτησης εισόδου $I(t)$ [Input function] με τη χαρακτηριστική συνάρτηση του συστήματος $W(t)$ [Weighting function ή Unit Impulse Response] για να προκύψει η απόκριση του συστήματος $R(t)$ [Response

function]. Δηλαδή $R(t) = I(t) * W(t)$. Η προηγούμενη σχέση αποδίδεται μαθηματικά ως εξής:

$$R(t) = \int_0^t I(\tau)W(t-\tau)d\tau \quad \text{B.2.28}$$

Στην προκειμένη περίπτωση η συνάρτηση εισόδου θα είναι η πρώτη παράγωγος της σχέσης B.2.19, ενώ η χαρακτηριστική συνάρτηση θα είναι η απόκριση του συστήματος σε μοναδιαία IV bolus χορήγηση.

$$I(t) = D^1 \frac{k_{0,f}}{\Gamma(1+\alpha)} t^\alpha = \frac{\alpha k_{0,f}}{\Gamma(1+\alpha)} t^{\alpha-1} \quad \text{B.2.29}$$

$$W(t) = e^{-k_{el}t} \quad \text{B.2.30}$$

Όπου k_{el} η σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης του φαρμάκου.

Η συνέλιξη των δύο προηγούμενων σχέσεων με χρήση του ολοκληρώματος B.2.28 και με τη χρήση του λογισμικού Mathematica®, δίνει την ακόλουθη:

$$R(t) = k_{0,f} e^{-k_{el}t} (-k_{el})^{-\alpha} \left(1 - \frac{\Gamma(\alpha, -k_{el}t)}{\Gamma(\alpha)} \right) \quad \text{B.2.31}$$

Η παραπάνω σχέση μας δίνει την ποσότητα του φαρμάκου στο σώμα, επομένως η διαίρεσή της με τον όγκο κατανομής του φαρμάκου (V_d) αποδίδει τη συγκέντρωση.

Είναι προφανές ότι η παραπάνω σχέση ισχύει μέχρι την εξάντληση των αποθεμάτων της φαρμακοτεχνικής μορφής σε δραστική, η οποία πραγματοποιείται σε χρόνο

$T = \sqrt[\alpha]{\frac{Q_0 \Gamma(\alpha+1)}{k_{0,f}}}$, όπου Q_0 η χορηγούμενη δόση. Η σχέση που αποδίδει το χρόνο

εξάντλησης των αποθεμάτων προκύπτει από τη σχέση B.2.19, θέτοντας $M=Q_0$.

Επομένως η σχέση που δίνει τη συγκέντρωση C στο μονοδιαμερισματικό μοντέλο είναι η:

$$C = \begin{cases} \frac{1}{V_d} k_{0,f} e^{-k_{el}t} (-k_{el})^{-\alpha} \left(1 - \frac{\Gamma(\alpha, -k_{el}t)}{\Gamma(\alpha)} \right) & , t < T \\ R(T) e^{-k_{el}(t-T)} & , t \geq T \end{cases} \quad \text{B.2.32}$$

B.2.2.3. Αποτελέσματα σε *in vitro* μηδενοταξική αποδέσμευση

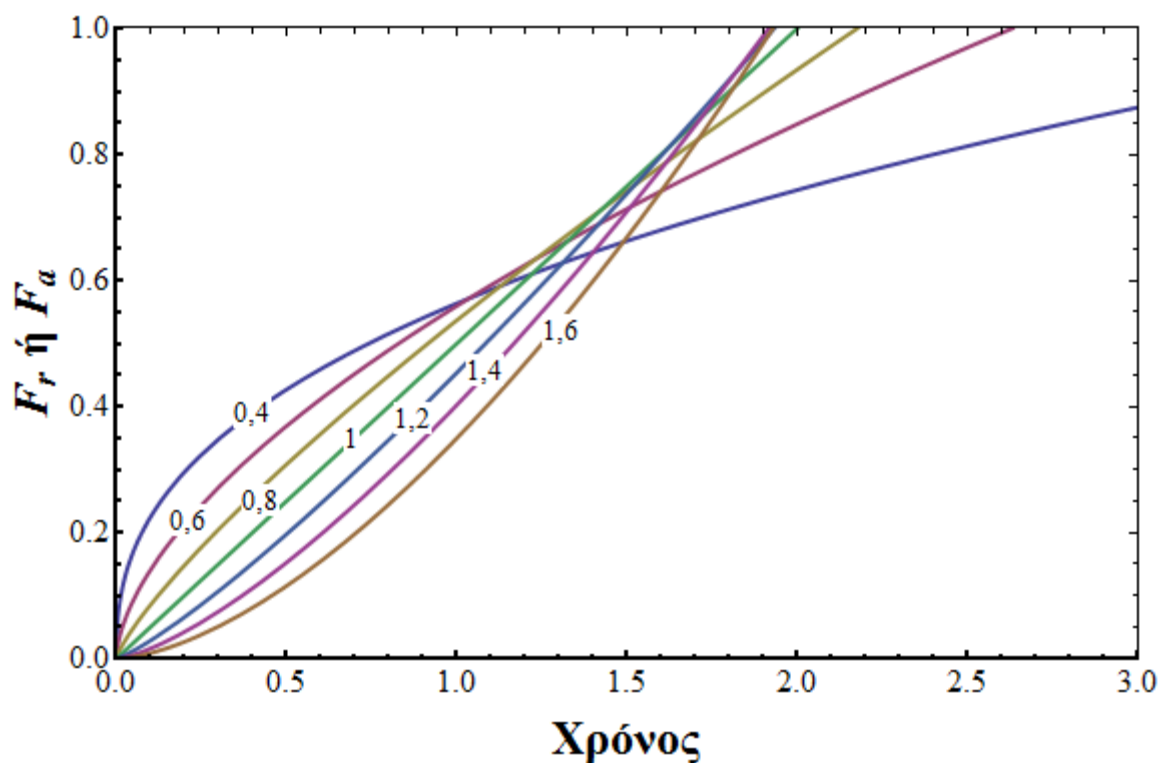
B.2.2.3.1. Εισαγωγή

Το ιδιαίτερο ενδιαφέρον της μελέτης της *in vitro* μηδενοταξικής αποδέσμευσης με κλασματικές παραγώγους έγκειται στο γεγονός ότι η ολοκληρωμένη μορφή είναι ένας νόμος δύναμης που συνδέει το αποδεσμευμένο κλάσμα του φαρμάκου με το χρόνο (βλ. Σχέση B.2.20) καθ' όλο το διάστημα της διαδικασίας. Η ανάλυση δεδομένων της *in vitro* αποδέσμευσης με βάση το νόμο δύναμης έχει εφαρμοστεί και εφαρμόζεται εκτεταμένα στη βιβλιογραφία (Korsmeyer et al., 1983; Peppas, 1985; Ritger and Peppas, 1987a, b; Peppas and Sahlin, 1989; Siepmann and Peppas, 2001), αλλά περιορίζεται μέχρι το 60% του συνολικά αποδεσμευμένου φαρμάκου. Η χρήση του νόμου δύναμης μέχρι του ποσοστού 60% βασίζεται στο γεγονός ότι ο νόμος της δύναμης, όπως εισήχθη στη βιβλιογραφία από τους Peppas et al., αποτελεί προσεγγιστική λύση της ακριβούς σχέσης που διέπει την αποδέσμευση. Η μόνη εργασία που ερμηνεύει την εφαρμογή του νόμου δύναμης στο σύνολο της διαδικασίας βασίζεται στην υπόθεση της κινητικής μη ακέραιων διαστάσεων (fractal) και διατυπώθηκε από τους Rinaki et al. το 2003 (Rinaki et al., 2003).

Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας προσφέρουν μια επιπλέον θεωρητική βάση για την ερμηνεία πειραματικών παρατηρήσεων που ακολουθούν το νόμο δύναμης για το σύνολο (0-100%) της αποδέσμευσης του φαρμάκου. Για τους λόγους αυτούς στην ενότητα αυτή επιχειρείται μια διεξοδική ανάλυση του νόμου δύναμης και της εφαρμογής του σε πειραματικά δεδομένα, θεωρώντας ότι η κινητική της αποδέσμευσης περιγράφεται με κλασματική διαφορική εξίσωση λόγω της ετερογένειας του μικροπεριβάλλοντος στο χώρο αποδέσμευσης του φαρμάκου.

B.2.2.3.2. Προσομοιώσεις

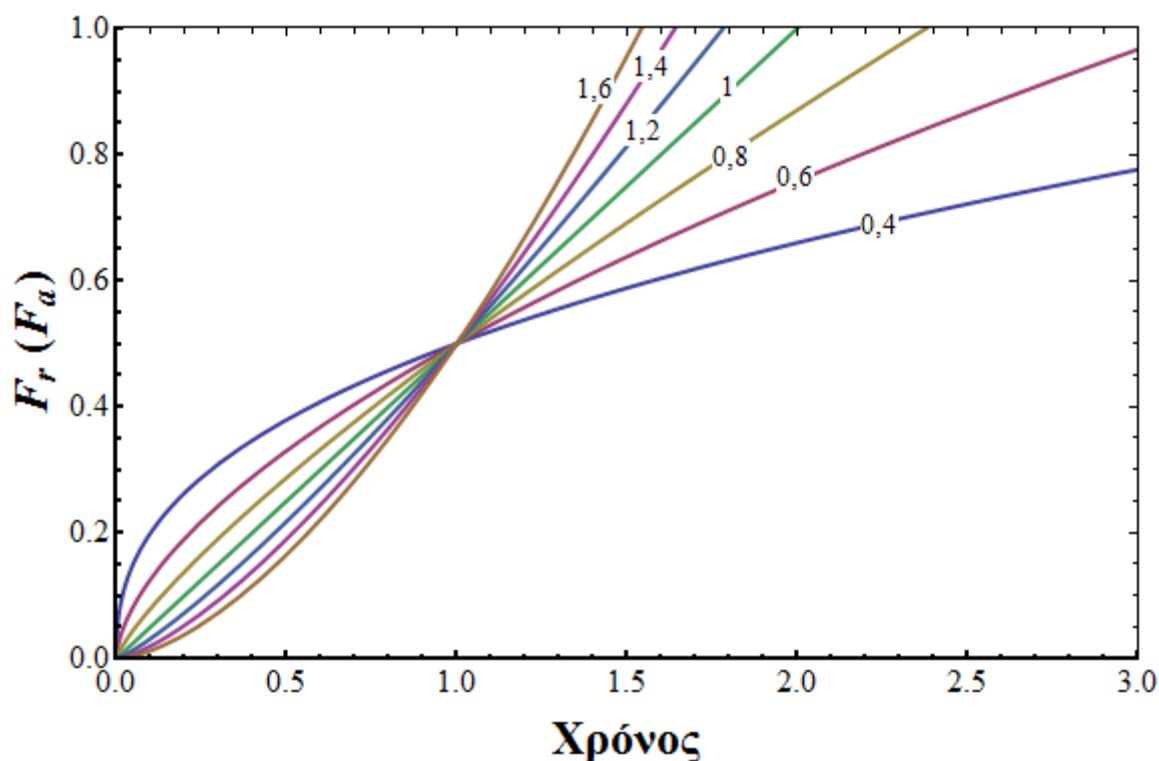
Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των τιμών της σταθεράς α στην μορφή της σχέσης B.2.20. Υπενθυμίζεται ότι η σταθερά α είναι ο μη ακέραιος βαθμός της μηδενοταξικής παραγώγου (ή ακέραιος στην περίπτωση που $\alpha=1$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα B.2.3.



Σχήμα Β.2.3: Γραφική απεικόνιση εξίσωσης Β.2.20 ή Β.2.23 για τιμές του α που αναγράφονται στο διάγραμμα. Σε όλες τις περιπτώσεις $k'_{0,1}$ ή $k'_{0,2}=0,5$.

Παρατηρείται ότι για τιμές $\alpha < 1$ η καμπύλη στρέφει τα κοίλα προς τα κάτω, για τιμές $\alpha > 1$ η καμπύλη στρέφει τα κοίλα προς τα άνω, ενώ για $\alpha = 1$ η απεικόνιση είναι ευθεία γραμμή. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι αναμενόμενες, δεδομένου ότι η σχέση Β.2.20 είναι στην ουσία ένας νόμος δύναμης.

Για να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές με τον κλασικό νόμο δύναμης του χρόνου, οι σχέσεις Β.2.24 και Β.2.26 απεικονίστηκαν γραφικά, διατηρώντας τις τιμές των παραμέτρων ίδιες ($k'_{0,r} = k_{0,1} = k_{0,2} = 0,5$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα Β.2.4.



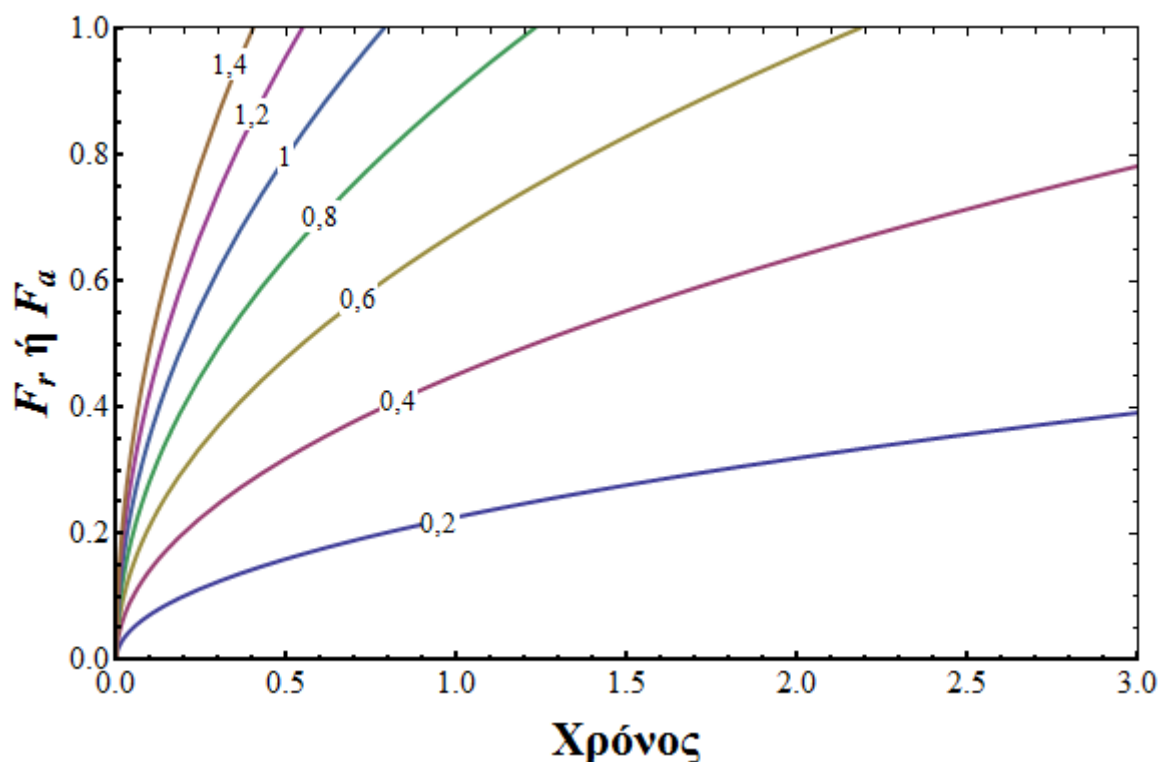
Σχήμα Β.2.4: Γραφική απεικόνιση εξίσωσης Β.2.24 (ή Β.2.26) για τιμές του α που αναγράφονται στο διάγραμμα. Σε όλες τις περιπτώσεις $k_{0,1}$ ή $k_{0,2}=0,5$.

Παρατηρείται αντίστοιχη συμπεριφορά με τη σχέση Β.2.20 ως προς την καμπυλότητα. Η μόνη διαφορά εντοπίζεται στο γεγονός ότι οι καμπύλες των σχέσεων Β.2.24 και Β.2.26 διέρχονται από το ίδιο σημείο για όλες τις τιμές της σταθεράς α , το οποίο έχει συντεταγμένες $[1, k_{0,1}]$ ή $[1, k_{0,2}]$ αντίστοιχα. Αντιθέτως στην περίπτωση της σχέσης Β.2.20, για χρόνο ίσο με τη μονάδα, οι καμπύλες διέρχονται από το σημείο $[1, \frac{k'_{0,r}}{\Gamma(\alpha+1)}]$, το οποίο είναι συνάρτηση του α .

Οι ομοιότητες των σχέσεων Β.2.20, Β.2.24 και Β.2.26 με το νόμο δύναμης είναι προφανείς. Το ίδια αποτελέσματα όμως προκύπτουν από διαφορετικές θεωρήσεις, καθώς στην περίπτωση των σχέσεων Β.2.20, Β.2.24 και Β.2.26 η κινητική έχει χαρακτήρα μηδενοταξικό, καθώς η κλασματική διαφορική εξίσωση έχει σταθερό μέγεθος στο δεξί σκέλος. Οι διαφορές στις τιμές α αποδίδουν διαφορετική κλασματική παραγωγή, η οποία συνδέεται με τις υδροδυναμικές συνθήκες που επικρατούν κατά τη διαδικασία της αποδέσμευσης. Αντιθέτως, στην περίπτωση του νόμου δύναμης του χρόνου η κινητική είναι μηδενοταξική μόνο για $n=1$, και στις υπόλοιπες περιπτώσεις η

κινητική θεωρείται ανώμαλη και περιγράφει μόνο το 60% της διαδικασίας (Ritger and Peppas, 1987a).

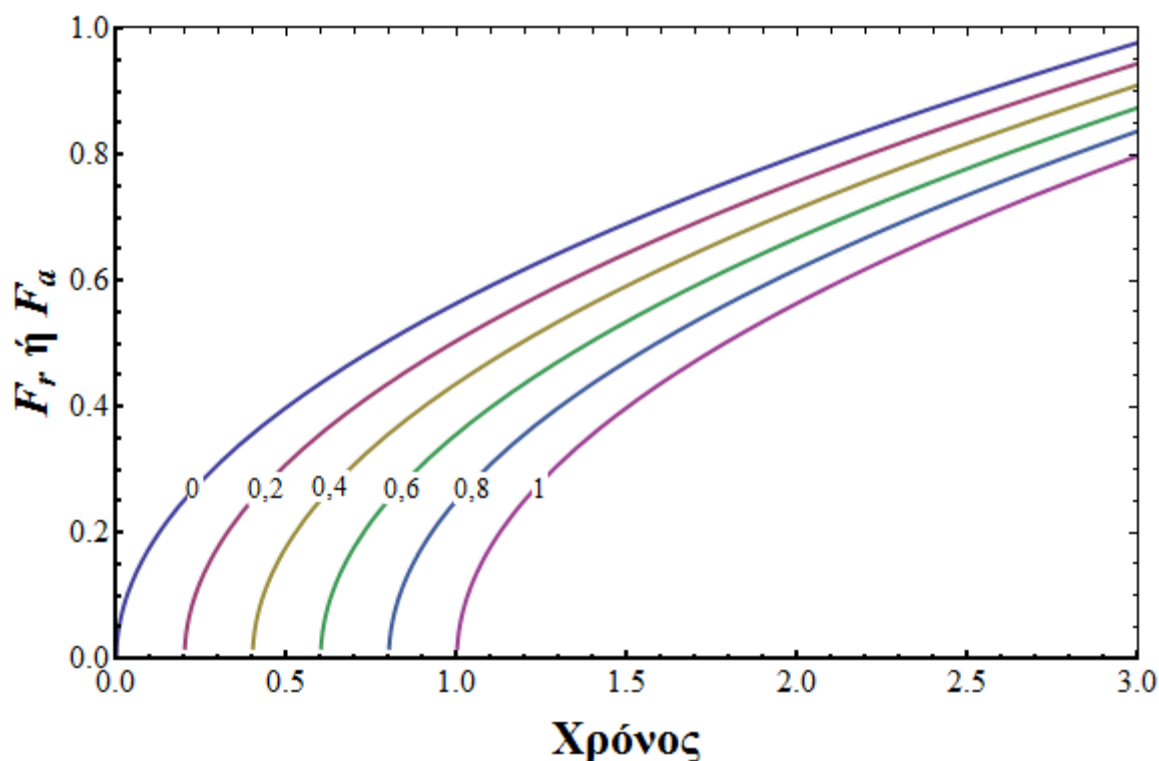
Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της σταθεράς $k'_{0,f}$ στη μορφή της απεικόνισης της σχέσης B.2.20, διατηρώντας την τιμή της παραμέτρου α σταθερή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα B.2.5.



Σχήμα B.2.5: Γραφική απεικόνιση εξίσωσης B.2.20 ή B.2.23 για τιμές του $k'_{0,1}$ ή $k'_{0,2}$ που αναγράφονται στο διάγραμμα. Σε όλες τις περιπτώσεις $\alpha=0,5$.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η σταθερά $k'_{0,f}$ επηρεάζει την καμπυλότητα της απεικόνισης. Μεγάλες τιμές της παραμέτρου $k'_{0,f}$ οδηγούν ταχύτερα στη μέγιστη τιμή της καμπύλης $F_r=1$ (ή $F_\alpha=1$). Το χρονικό σημείο το οποίο η καμπύλη επιτυγχάνει τη μέγιστή της τιμή προκύπτει αν αντικαταστήσουμε στη σχέση B.2.20 το F_r με τη μονάδα και λύσουμε ως προς το χρόνο και ισούται με $t_{\max} = \sqrt[\alpha]{\frac{\Gamma(\alpha+1)}{k'_{0,f}}}$. Είναι προφανές ότι για $\alpha=1$, $t_{\max} = \frac{1}{k'_{0,f}}$.

Η τελευταία παράμετρος της οποίας μελετήθηκε η επίδρασή της στην απεικόνιση της σχέσης B.2.21 ήταν ο χρόνος υστέρησης t_{lag} . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα B.2.6.



Σχήμα Β.2.6: Γραφική απεικόνιση εξίσωσης Β.2.21 ή Β.2.22 για τιμές t_{lag} που αναγράφονται στο διάγραμμα. Σε όλες τις περιπτώσεις $\alpha=0,5$ και $k'_{0,1}$ ή $k'_{0,2}=0,5$.

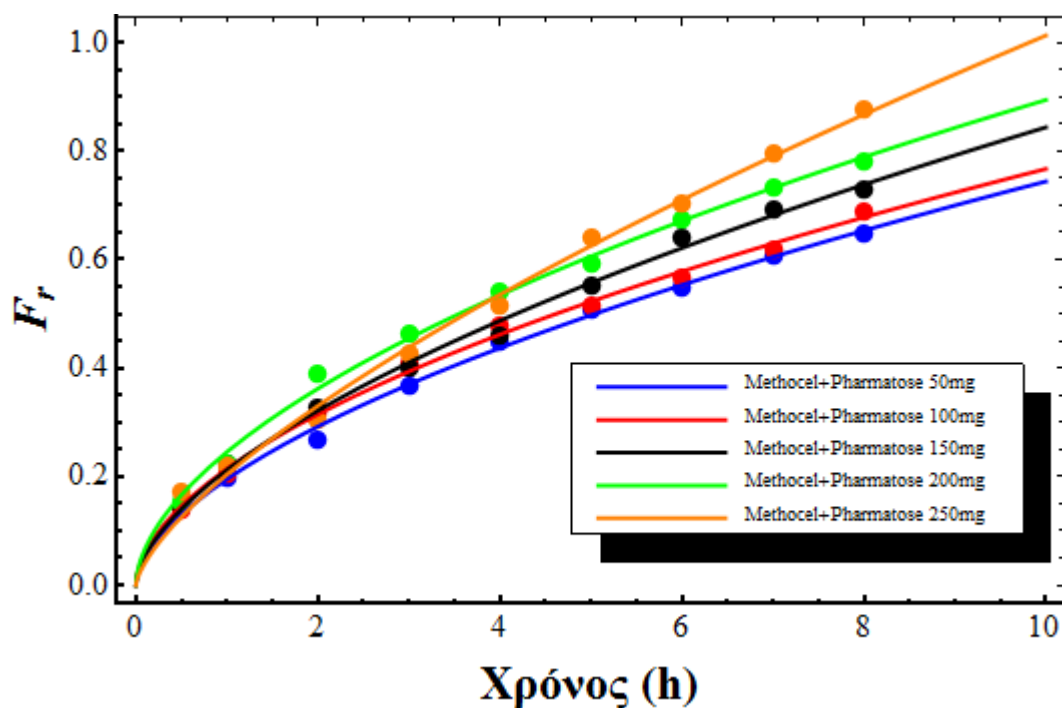
Η ύπαρξη χρόνου υστέρησης στη σχέση Β.2.21 έχει ως επακόλουθο την ολίσθηση της καμπύλης κατά μήκος του άξονα του χρόνου κατά απόσταση ίση με t_{lag} .

Σαν γενικό συμπέρασμα μπορεί να διατυπωθεί ότι οι προσομοιώσεις των σχέσεων Β.2.20, Β.2.21, Β.2.24, Β.2.25, Β.2.26 και Β.2.27 οδηγούν σε αναμενόμενα αποτελέσματα. Σε όλες τις περιπτώσεις η μορφή της καμπύλης εξαρτάται από τις τιμές των παραμέτρων α , $k'_{0,f}$ και t_{lag} .

Β.2.2.3.3. Προσαρμογή σε πειραματικά in vitro δεδομένα

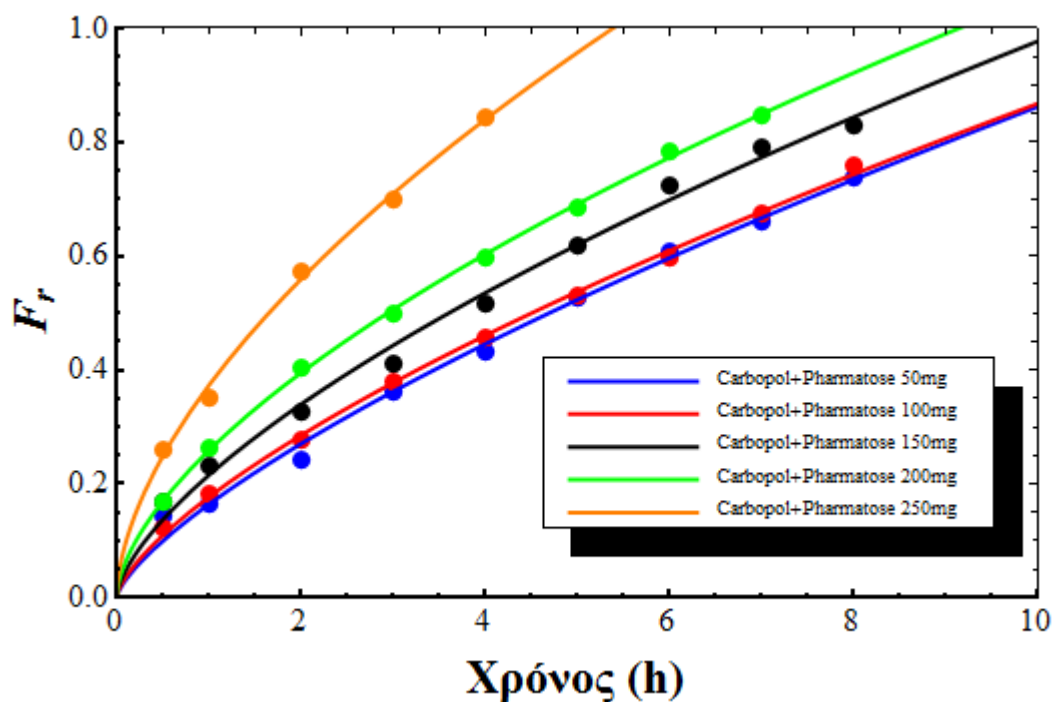
Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των Cedillo-Ramírez et al., για τα επιπλέοντα συστήματα μήτρας που ανέπτυξαν για τη μετρονιδαζόλη (Cedillo-Ramírez et al., 2006).

Το πρώτο σύστημα που ανέπτυξαν εξέταζε την επίδραση του εκδόχου Pharmatose DCL11 στην αποδέσμευση της μετρονιδαζόλης από σύστημα μήτρας που περιείχε Methocel K4M και 48 mg διττανθρακικό νάτριο. Η γραφική απεικόνιση της προσαρμογής της σχέσης Β.2.20 στα δεδομένα παρουσιάζεται στο Σχήμα Β.2.7.



Σχήμα Β.2.7: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των Cedillo-Ramírez et al. για τις συνταγές που περιέχουν μετρονιδαζόλη (150 mg), methocel και pharmatose 50-250mg (Cedillo-Ramírez et al., 2006).

Το δεύτερο σύστημα που ανέπτυξαν εξέταζε την επίδραση του εκδόχου Pharmatose DCL11 στην αποδέσμευση της μετρονιδαζόλης από σύστημα μήτρας που περιείχε Carborol 971P NF/NaHCO₃. Η γραφική απεικόνιση της προσαρμογής της σχέσης Β.2.20 στα δεδομένα παρουσιάζεται στο Σχήμα Β.2.8.



Σχήμα Β.2.8: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των Cedillo-Ramírez et al. για τις συνταγές που περιέχουν μετρονιδαζόλη (150 mg), carbopol και pharmatose 50-250mg (Cedillo-Ramírez et al., 2006).

Τα αποτελέσματα από τις μη γραμμικές προσαρμογές, δηλαδή οι εκτιμούμενες παράμετροι της σχέσης Β.2.20, μαζί με τα τυπικά σφάλματά τους και το συντελεστή προσδιορισμού r^2 παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

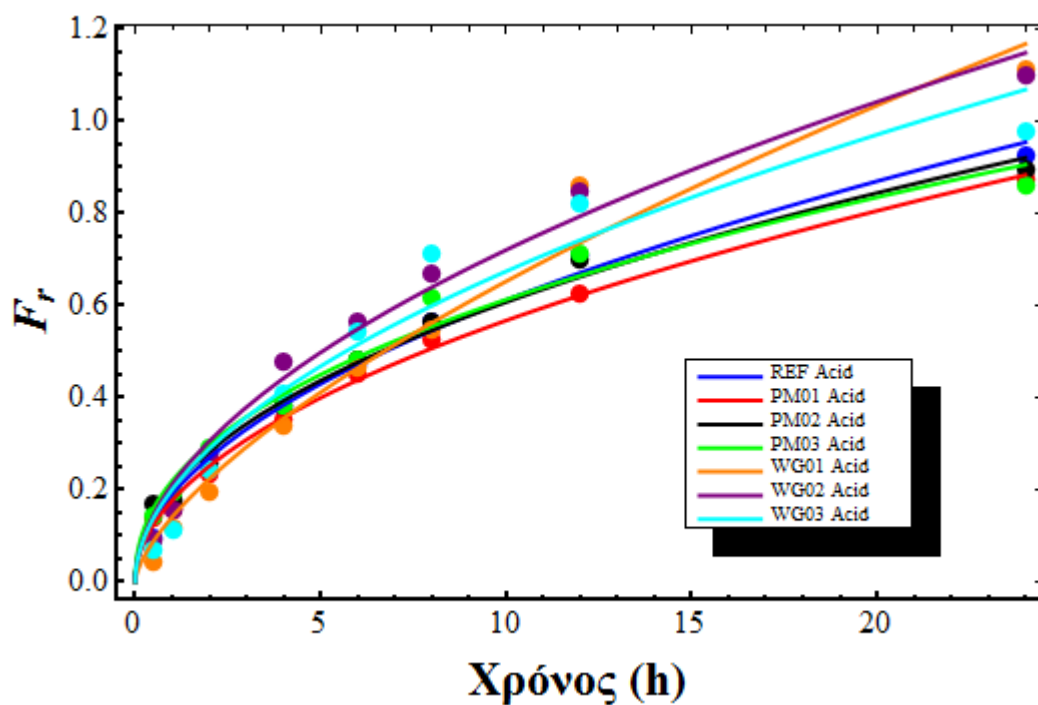
Πίνακας Β.2.Ι: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης Β.2.20 σε πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία (Cedillo-Ramírez et al., 2006) για το 100% των δεδομένων.

Συνταγή			Εκτιμώμενες παράμετροι (SE) [95% CI]		
			α	$k'_{0,1} [h^{-\alpha}]$	r^2
Methocel	Pharmatose (mg)	50	0,5804 (0,0173)	0,1743 (0,0049)	0,9995
			[0,5396-0,6212]	[0,1627-0,1859]	
		100	0,5536 (0,0172)	0,1906 (0,0054)	0,9995
			[0,5129-0,5943]	[0,1779-0,2033]	
		150	0,5991 (0,0214)	0,1897 (0,0066)	0,9992
			[0,5484-0,6499]	[0,1742-0,2053]	
		200	0,5614 (0,0183)	0,2184 (0,0066)	0,9994
			[0,5181-0,6048]	[0,2029-0,2339]	
		250	0,6958 (0,0309)	0,1853 (0,0090)	0,9987
			[0,6227-0,7689]	[0,1640-0,2065]	
Carbopol	Pharmatose (mg)	50	0,7215 (0,0340)	0,1494 (0,0079)	0,9985
			[0,6412-0,8019]	[0,1308-0,1681]	
		100	0,6921 (0,0153)	0,1599 (0,0038)	0,9997
			[0,6558-0,7283]	[0,1508-0,1690]	
		150	0,6574 (0,0305)	0,1938 (0,0094)	0,9986
			[0,5853-0,7295]	[0,1716-0,2160]	
		200	0,6119 (0,0101)	0,2310 (0,0035)	0,9999
			[0,5871-0,6366]	[0,2225-0,2395]	
		250	0,5869 (0,0260)	0,3319 (0,0089)	0,9995
			[0,5040-0,6698]	[0,3039-0,3598]	

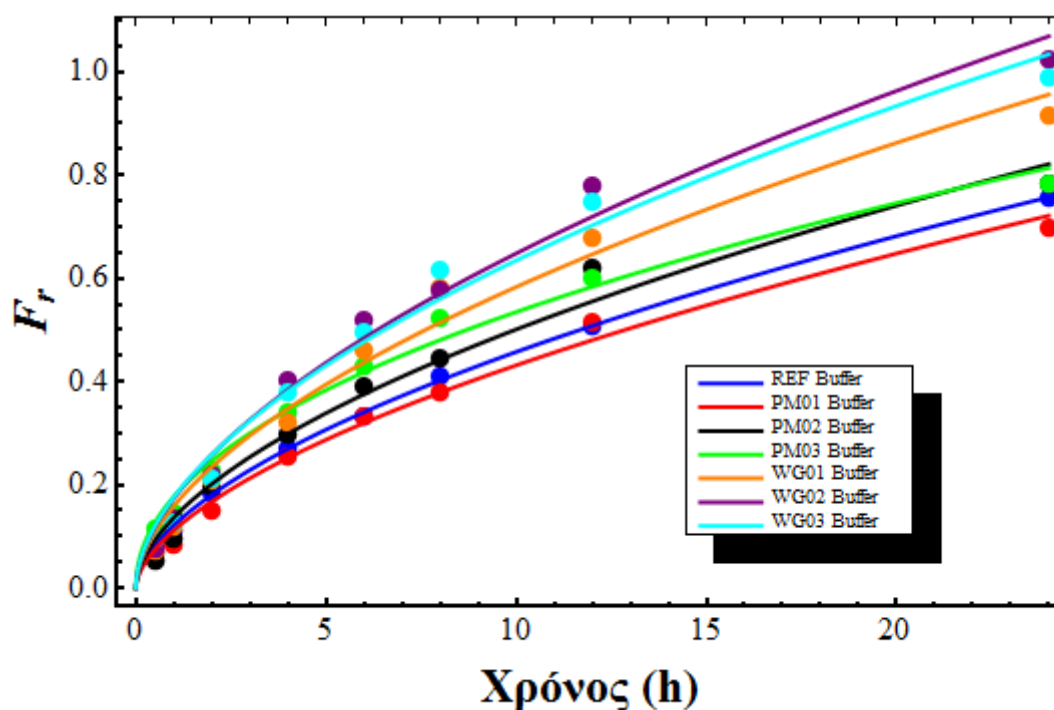
Είναι εμφανές ότι σε όλες τις περιπτώσεις η προσαρμογή της σχέσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα είναι άριστη, με τιμές r^2 που κυμαίνονται μεταξύ 0,9985 και 0,9999. Η άριστη προσαρμογή αποδεικνύεται και από τα πολύ μικρά τυπικά σφάλματα στις εκτιμήσεις των παραμέτρων α και $k'_{0,1}$. Η σύγκριση των παραπάνω αποτελεσμάτων με τις προσαρμογές που έκαναν οι συγγραφείς χρησιμοποιώντας τη σχέση Korsmeyer-Peppas, δείχνει ότι οι σχέσεις είναι αντίστοιχες, καθώς οι τιμές του εκθέτη α της σχέσης Β.2.20 με τον εκθέτη n της σχέσης Korsmeyer-Peppas είναι αντίστοιχες και στις περισσότερες των περιπτώσεων στατιστικά ασήμαντες, δεδομένου ότι οι τιμές n περιέχονται στο 95% διάστημα εμπιστοσύνης (CI) των εκτιμώμενων παραμέτρων α .

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. (AlKhatib et al., 2008) για τα συστήματα μήτρας που ανέπτυξαν με βάση την υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη (HPMC) και την ηλεκτρική χιτοζάνη (chitosan

succinate) και περιείχαν βουσπιρόνη. Οι μελέτες του ρυθμού διάλυσης πραγματοποιήθηκαν σε 4 διαφορετικά μέσα. Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα μέσα διάλυσης HCl 0,1N και ρυθμιστικό διάλυμα pH 6,8.



Σχήμα Β.2.9: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης HCl 0,1N (AlKhatib et al., 2008).



Σχήμα Β.2.10: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης ρυθμιστικό διάλυμα pH 6,8 (AlKhatib et al., 2008).

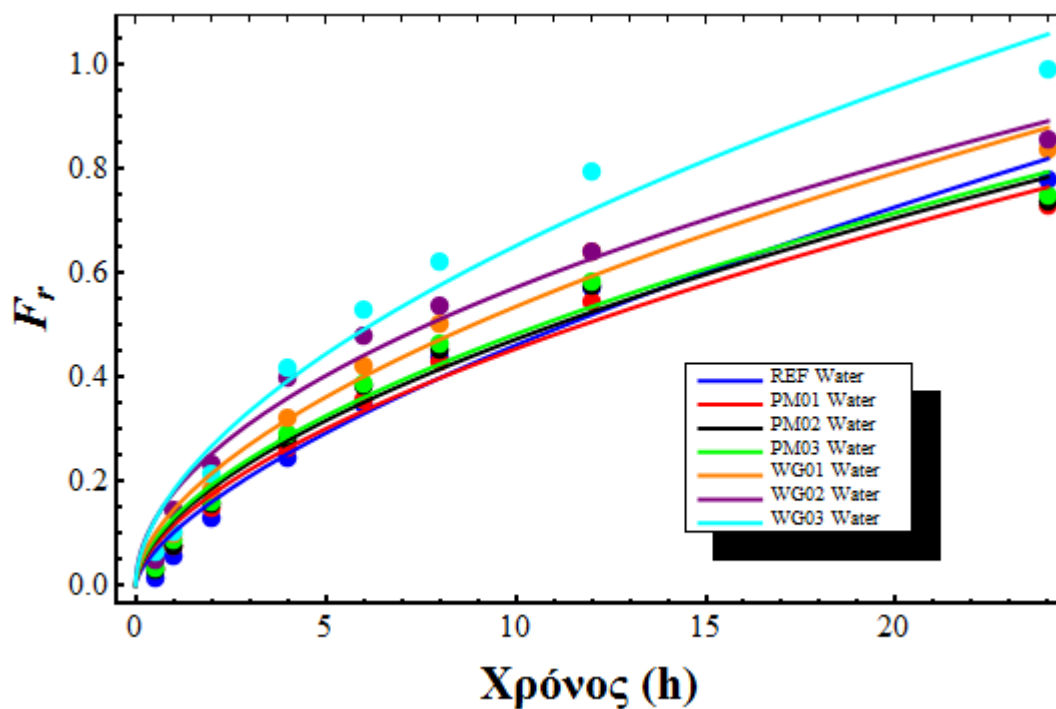
Πίνακας Β.2.II: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης HCl 0,1N. για το 100% των δεδομένων (AlKhatib et al., 2008).

Μέσο διάλυσης	Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι (SE) [95% CI]		
		α	$k'_{0,1} [h^{-\alpha}]$	r^2
Οξύ (0,1N HCl)	REF	0,5086 (0,0241)	0,1680 (0,0102)	0,9977
		[0,4497-0,5675]	[0,1429-0,1930]	
	PM01	0,5059 (0,0144)	0,1568 (0,0057)	0,9992
		[0,4707-0,5411]	[0,1428-0,1708]	
	PM02	0,4752 (0,0222)	0,1801 (0,0101)	0,998
		[0,4210-0,5294]	[0,1554-0,2048]	
	PM03	0,4462 (0,0327)	0,1942 (0,0160)	0,9953
		[0,3661-0,5262]	[0,1550-0,2335]	
	WG01	0,6652 (0,0534)	0,1272 (0,0172)	0,9918
		[0,5346-0,7958]	[0,08504-0,1694]	
	WG02	0,5327 (0,0366)	0,1875 (0,0174)	0,995
		[0,4432-0,6223]	[0,1449-0,2301]	
	WG03	0,5263 (0,0660)	0,1780 (0,0298)	0,9838
		[0,3648-0,6878]	[0,1051-0,2509]	

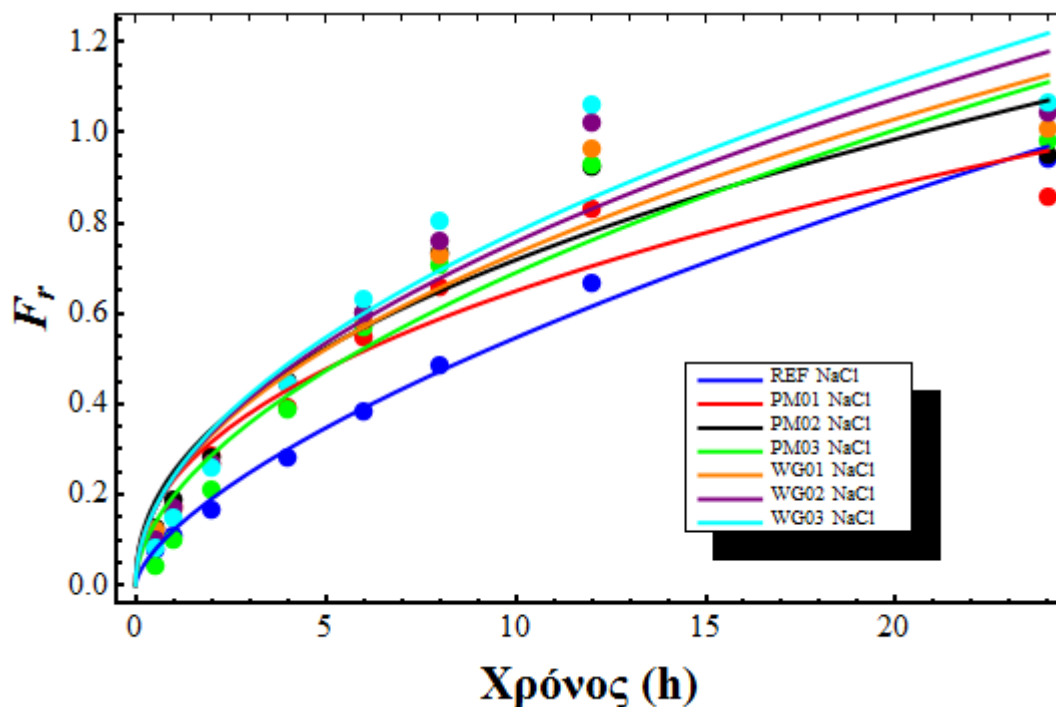
Πίνακας Β.2.III: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης ρυθμιστικό διάλυμα pH 6,8 για το 100% των δεδομένων (AlKhatib et al., 2008).

Μέσο διάλυσης	Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι (SE) [95% CI]		
		α	$k'_{0,1} [h^{-\alpha}]$	r^2
Ρυθμιστικό διάλυμα (USP Phosphate buffer, pH 6,8)	REF	0,5757 (0,0084)	0,1082 (0,0023)	0,9998
		[0,5551-0,5963]	[0,1026-0,1139]	
	PM01	0,5865 (0,0292)	0,0997 (0,0074)	0,9971
		[0,5150-0,6581]	[0,08162-0,1179]	
	PM02	0,5644 (0,0420)	0,1216 (0,0130)	0,9939
		[0,4617-0,6671]	[0,0899-0,1533]	
	PM03	0,4795 (0,0259)	0,1570 (0,0103)	0,9972
		[0,4161-0,5429]	[0,1318-0,1822]	
	WG01	0,5644 (0,0414)	0,1415 (0,0149)	0,9940
		[0,4630-0,6657]	[0,1051-0,1780]	
	WG02	0,5711 (0,0369)	0,1550 (0,0145)	0,9953
		[0,4808-0,6615]	[0,1194-0,1905]	
	WG03	0,5572 (0,0387)	0,1565 (0,0154)	0,9947
		[0,4626-0,6518]	[0,1189-0,1940]	

Ακολουθούν τα αποτελέσματα για τα μέσα διάλυσης νερό και NaCl 5%.



Σχήμα Β.2.11: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης νερό (AlKhatib et al., 2008).



Σχήμα Β.2.12: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης NaCl 5% (AlKhatib et al., 2008).

Πίνακας Β.2.IV: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης νερό για το 100% των δεδομένων (AlKhatib et al., 2008).

Μέσο διάλυσης	Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι (SE) [95% CI]		
		α	$k'_{0,1} [h^{-\alpha}]$	r^2
Νερό	REF	0,6569 (0,0552)	0,0915 (0,0128)	0,9911
		[0,5217-0,7921]	[0,0601-0,1230]	
	PM01	0,5952 (0,0451)	0,1030 (0,0118)	0,9933
		[0,4848-0,7056]	[0,0741-0,1319]	
	PM02	0,5788 (0,0536)	0,1111 (0,0151)	0,9903
		[0,4475-0,7101]	[0,0740-0,1481]	
	PM03	0,5694 (0,0515)	0,1158 (0,0151)	0,9909
		[0,4434-0,6954]	[0,0787-0,1528]	
	WG01	0,5666 (0,0399)	0,1293 (0,0131)	0,9945
		[0,4690-0,6642]	[0,0972-0,1613]	
	WG02	0,5069 (0,0410)	0,1578 (0,0164)	0,9934
		[0,4064-0,6073]	[0,1177-0,1980]	
	WG03	0,5536 (0,0556)	0,1620 (0,0228)	0,9891
		[0,4176-0,6895]	[0,1061-0,2179]	

Πίνακας Β.2.V: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. σε μέσο διάλυσης NaCl 5% για το 100% των δεδομένων (AlKhatib et al., 2008).

Μέσο διάλυσης	Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι (SE) [95% CI]		
		α	$k'_{0,1} [h^{-\alpha}]$	r^2
5% NaCl	REF	0,6543 (0,0298)	0,1091 (0,0083)	0,9974
		[0,5814-0,7272]	[0,0889-0,1293]	
	PM01	0,4459 (0,0314)	0,2061 (0,0320)	0,9836
		[0,2956-0,5961]	[0,1279-0,2842]	
	PM02	0,4560 (0,0652)	0,2226 (0,0367)	0,9819
		[0,2965-0,6155]	[0,1329-0,3123]	
	PM03	0,5439 (0,0893)	0,1752 (0,0397)	0,9717
		[0,3254-0,7625]	[0,0780-0,2724]	
	WG01	0,4916 (0,0679)	0,2092 (0,0360)	0,9817
		[0,3254-0,6578]	[0,1212-0,2973]	
	WG02	0,5036 (0,0765)	0,2107 (0,0408)	0,9774
		[0,3164-0,6908]	[0,1108-0,3107]	
	WG03	0,5108 (0,0864)	0,2131 (0,0466)	0,9718
		[0,2996-0,7221]	[0,0990-0,3273]	

Η προσαρμογή της σχέσης Β.2.20 στα πειραματικά δεδομένα των AlKhatib et al. για όλες τις συνταγές σε όλα τα μέσα διάλυσης είναι πολύ καλή, με τιμές r^2 που κυμαίνονται μεταξύ 0,9838 και 0,9992 για το HCl 0,1N, 0,9939 και 0,9998 για το ρυθμιστικό διάλυμα, 0,9891 και 0,9945 για το νερό και 0,9717 και 0,9974 για το NaCl

5%. Αν και οι προσαρμογές δεν πέτυχαν το υψηλό ποσοστό επιτυχίας των προσαρμογών στα δεδομένα των Cedillo-Ramírez et al., εντούτοις σε όλες τις περιπτώσεις επετεύχθησαν υψηλότερες τιμές r^2 από τις τιμές που αναφέρουν οι συγγραφείς για τις προσαρμογές της σχέσης Korsmeyer-Peppas. Δεδομένου ότι οι δύο σχέσεις είναι πρακτικά όμοιες, οι διαφορές αυτές αποδίδονται στη χρήση διαφορετικού αλγόριθμου για την μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.

Από τα αποτελέσματα των προσαρμογών της σχέσης B.2.20, η οποία περιγράφει τις μηδενοταξικές διαδικασίες κλασματικού βαθμού, στα πειραματικά δεδομένα της βιβλιογραφίας για το 100% της καμπύλης διαπιστώνεται ότι οι προσαρμογές ήταν επιτυχείς. Η σχέση B.2.20 επομένως μπορεί να αξιοποιηθεί για την περιγραφή και ερμηνεία δεδομένων, τα οποία προς το παρόν ερμηνεύονται με τη χρήση της σχέσης Korsmeyer-Peppas (B.1.9). Αυτό είναι αναμενόμενο, δεδομένου ότι οι δύο σχέσεις είναι μαθηματικά όμοιες, πρόκειται δηλαδή για δυο νόμους δύναμης. Εντούτοις προκύπτουν από δύο διαφορετικές θεωρήσεις. Ενώ η σχέση των Korsmeyer-Peppas συνδέεται με το μηχανισμό αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας από τη φαρμακοτεχνική μορφή και αποτελεί το υβρίδιο μεταξύ μιας μηδενοταξικής και μιας πρωτοταξικής διαδικασίας, η μηδενοταξική κλασματική σχέση B.2.20 συνδέεται με το βαθμό παραγωγίσις του ρυθμού της διαδικασίας, διατηρώντας το μηδενοταξικό χαρακτήρα της.

Επομένως το σημαντικότερο συμπέρασμα των προηγούμενων προσαρμογών είναι όχι η δυνατότητα των κλασματικών μηδενοταξικών σχέσεων να προσαρμόζονται στα πειραματικά δεδομένα, αλλά το γεγονός ότι μια διαφορετική θεώρηση των διαδικασιών μπορεί να οδηγήσει σε αντίστοιχα ή και καλύτερα αποτελέσματα. Μέχρι πρόσφατα είχε προταθεί μόλις μία θεώρηση για την εφαρμογή του νόμου δύναμης στο 100% των πειραματικών δεδομένων, οι οποία στηρίζεται στη χρήση κινητικής μη ακέραιων διαστάσεων (Rinaki et al., 2003). Η εφαρμογή των κλασματικών παραγώγων στην *in vitro* αποδέσμευση προσφέρει μια επιπλέον θεωρητική βάση για την εφαρμογή του νόμου δύναμης στην περιγραφή και ερμηνεία των πειραματικών δεδομένων, η οποία επιπλέον αφορά στο σύνολο της αποδέσμευσης (0-100%) και όχι μόνο στο αρχικό 60%. Τα αποτελέσματα των προσαρμογών δεν αποδυναμώνουν το νόμο δύναμης, αντιθέτως τον ενισχύουν, προσφέροντας μια επιπλέον θεωρητική βάση στην προέλευση του και επεκτείνοντας την εφαρμογή του στο 100% της διαδικασίας αποδέσμευσης.

Τα παραπάνω συνηγορούν στο ότι η ερμηνεία των διαδικασιών αποδέσμευσης από συστήματα παρατεταμένης αποδέσμευσης που έχουν αναπτυχθεί με στόχο τη μηδενοταξική αποδέσμευση του φαρμάκου (πχ ωσμωτικά) ή σε συστήματα τα οποία μέχρι στιγμής θεωρούνταν ότι αποδεσμεύουν με πρωτοταξικό ρυθμό (πχ Higuchi), με τη χρήση μηδενοταξικών κλασματικών παραγώγων, μπορεί να οδηγήσει σε μια νέα αντιμετώπιση αυτών των φαινομένων. Η σύνδεση του βαθμού παραγωγίσιμης με τη διάχυση και ιδιαίτερα με συνθήκες ανώμαλης διάχυσης, μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι οι υδροδυναμικές συνθήκες είναι αυτές που καθορίζουν το ρυθμό αποδέσμευσης από ένα σύστημα ελεγχόμενης αποδέσμευσης, συνθήκες οι οποίες εύκολα ελέγχονται *in vitro* αλλά είναι εξαιρετικά απρόβλεπτες *in vivo*. Η διαφορά αυτή θα αξιοποιηθεί στις *in vitro-in vivo* συσχετίσεις (βλ. Κεφάλαιο Β.3, σελ. 277).

B.2.2.4. Αποτελέσματα σε *in vivo* μηδενοταξική αποδέσμευση

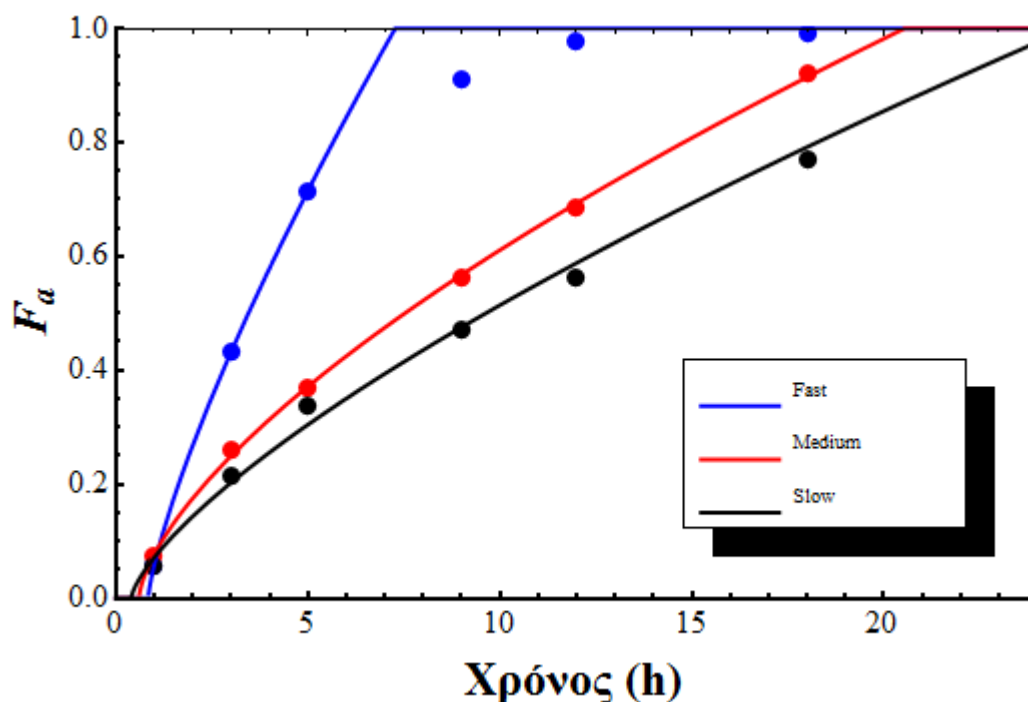
B.2.2.4.1. Προσομοιώσεις

Είναι προφανές ότι τα αποτελέσματα *in vivo* μηδενοταξικής αποδέσμευσης σε περιπτώσεις κατά τις οποίες η αποδέσμευση είναι το περιοριστικό βήμα της εμφάνισης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία, είναι αντίστοιχες των *in vitro* προσομοιώσεων αποδέσμευσης. Ως εκ τούτου τα αποτελέσματα σε αυτή την ενότητα δεν παρουσιάζονται καθώς είναι αντίστοιχα του κεφαλαίου Β.2.2.3.1, σελ. 230.

B.2.2.4.2. Προσαρμογή σε πειραματικά *in vivo* δεδομένα

Η σχέση Β.2.22 χρησιμοποιήθηκε για τη μη γραμμική προσαρμογή *in vivo* δεδομένων από τη βιβλιογραφία, τα οποία προέκυψαν από αποσυνέλιξη *in vivo* δεδομένων.

Αρχικά επιχειρήθηκε προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα των Dutta et al., 2005, οι οποίοι επιχείρησαν την ανάπτυξη μιας φαρμακευτικής μορφής παρατεταμένης αποδέσμευσης για την δραστική *divalproex sodium* (αποτελείται από βαλπροϊκό οξύ και βαλπροϊκό νάτριο σε αναλογία 1:1). Για το σκοπό της μελέτης ανέπτυξαν τρεις φαρμακοτεχνικές μορφές με διαφορετικό ρυθμό αποδέσμευσης (fast, medium, slow) με τις οποίες επιχείρησαν να αποδείξουν την ύπαρξη *IVIVC*.



Σχήμα B.2.13: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της εξίσωσης B.2.22 στα πειραματικά δεδομένα των Dutta et al (Dutta et al., 2005).

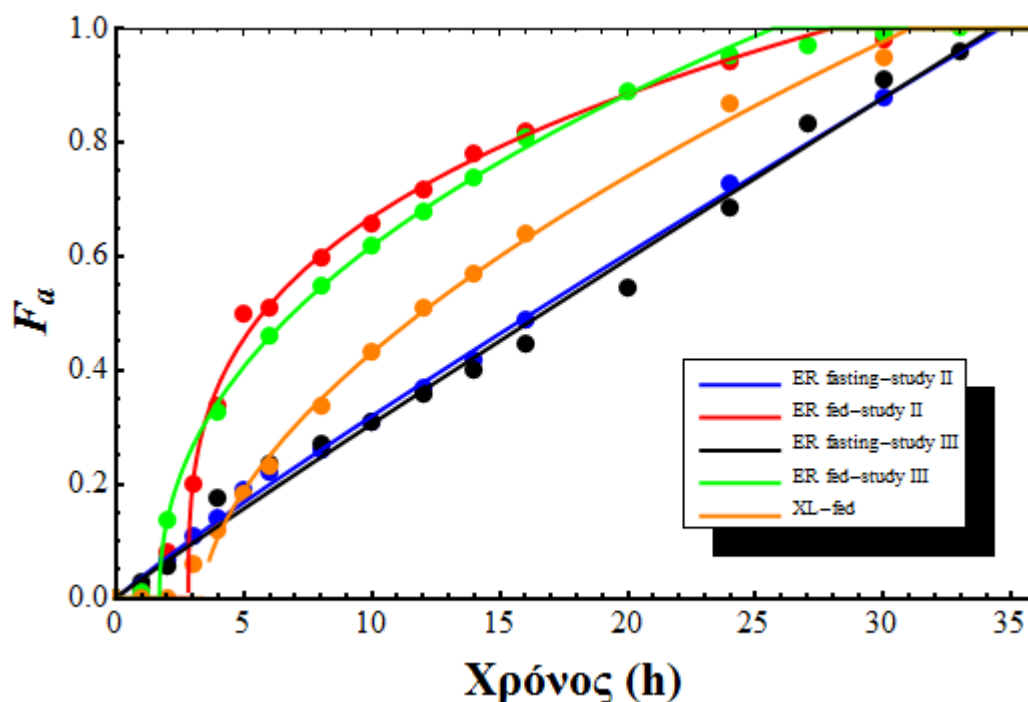
Τα αποτελέσματα από τις μη γραμμικές προσαρμογές, δηλαδή οι εκτιμώμενες παράμετροι της σχέσης B.2.22, μαζί με τα τυπικά σφάλματά τους και το συντελεστή προσδιορισμού r^2 παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας B.2.VI: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης B.2.22 στα πειραματικά δεδομένα των Dutta et al (Dutta et al., 2005).

Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι (SE) [95% CI]			
	α	$k'_{0,2} [h^{-\alpha}]$	$t_{lag} (h)$	r^2
Fast	0,7679 (0,2366)	0,2394 (0,0835)	0,8424 (0,2588)	0,9981
	[0,1109-1,4249]	[0,0074-0,4713]	[0,1238-1,5610]	
Medium	0,6550 (0,0155)	0,1408 (0,0060)	0,6040 (0,0810)	0,9999
	[0,6119-0,6981]	[0,1241-0,1574]	[0,3791-0,8290]	
Slow	0,7122 (0,0572)	0,1027 (0,0183)	0,4014 (0,4383)	0,9986
	[0,5533-0,8711]	[0,0518-0,1535]	[-0,8157-1,6184]	

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την μη γραμμική προσαρμογή της σχέσης B.2.22 στα πειραματικά δεδομένα των Abrahamsson et al. (Abrahamsson et al., 1998). Οι ερευνητές επιχείρησαν την ανάπτυξη μιας φαρμακοτεχνικής μορφής τύπου ωσμωτικής αντλίας (XL) για την χορήγηση νιφεδιπίνης και τη συνέκριναν με ένα άλλο

σύστημα παρατεταμένης αποδέσμευσης (ER). Παράλληλα μελέτησαν και την επίδραση της λήψης τροφής.



Σχήμα Β.2.14: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της εξίσωσης Β.2.22 στα πειραματικά δεδομένα των Abrahamsson et al (Abrahamsson et al., 1998).

Τα αποτελέσματα από τις μη γραμμικές προσαρμογές, δηλαδή οι εκτιμούμενες παράμετροι της σχέσης Β.2.22, μαζί με τα τυπικά σφάλματά τους και το συντελεστή προσδιορισμού r^2 παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Β.2.VII: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της εξίσωσης Β.2.22 στα πειραματικά δεδομένα των Abrahamsson et al (Abrahamsson et al., 1998).

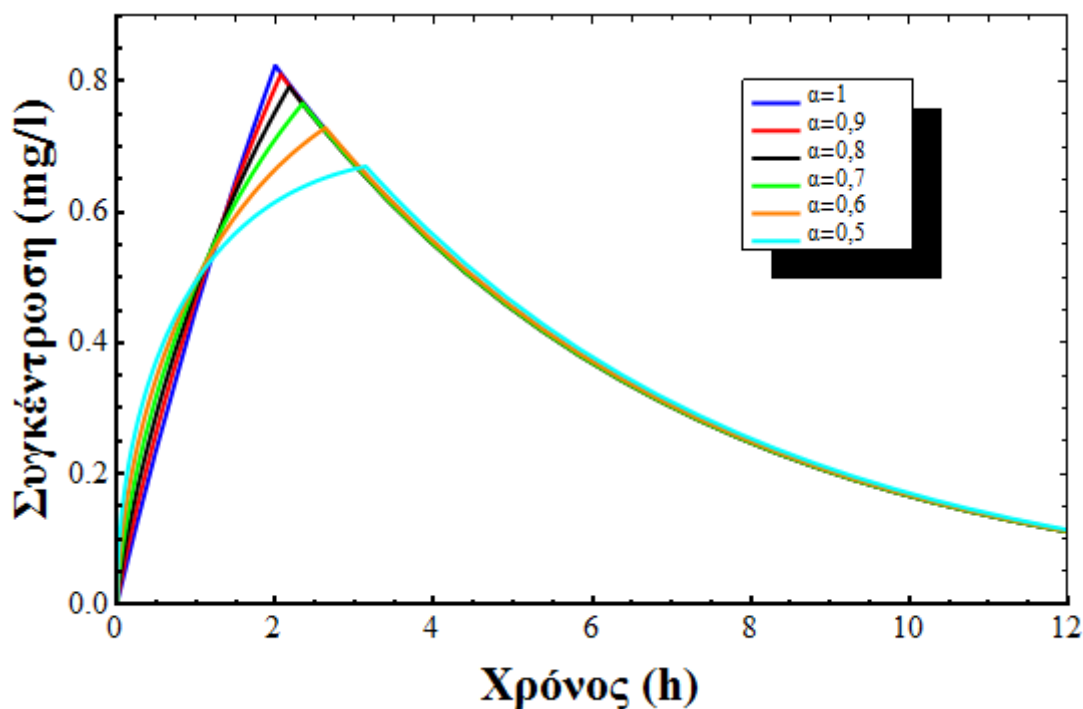
Συνταγή	Εκτιμούμενες παράμετροι (SE) [95% CI]			
	α	$k'_{0,2} [h^{-\alpha}]$	t_{lag}	r^2
ER fasting II	0,9179 (0,0347) [0,8424-0,9935]	0,0388 (0,0047) [0,0286-0,0490]	0,0613 (0,3580) [-0,7187-0,8413]	0,9994
ER fed II	0,3208 (0,0237) [0,2693-0,3724]	0,3553 (0,0205) [0,3107-0,4000]	2,8400 (0,0997) [2,6227-3,0573]	0,9983
ER fasting III	0,9613 (0,0782) [0,7924-1,1303]	0,0334 (0,0095) [0,0128-0,0540]	$5,404 \times 10^{-6}$ (0,9451) [-2,0417-2,0417]	0,9974
ER fed III	0,4536 (0,0135) [0,4244-0,4829]	0,2366 (0,0088) [0,2176-0,2556]	1,7069 (0,0770) [1,5405-1,8733]	0,9998
XL fed	0,5894 (0,0322) [0,5193-0,6595]	0,1412 (0,0141) [0,1105-0,1720]	3,3688 (0,2839) [2,7503-3,9873]	0,9985

Από τις μη γραμμικές προσαρμογές της σχέσης Β.2.22 στα *in vivo* αποσυνελιγμένα

βιβλιογραφικά δεδομένα προκύπτει ότι οι προσαρμογές είναι επιτυχημένες με συντελεστές προσδιορισμού που κυμαίνονται μεταξύ 0,9981 και 0,9999 στα δεδομένα των Dutta et al. και 0,9974 και 0,9998 στα δεδομένα των Abrahamsson et al. Στα δεδομένα των Dutta et al. παρατηρείται πιο επιτυχημένη προσαρμογή στις medium και slow συνταγές από την fast συνταγή, η οποία παρουσιάζει χαρακτηριστικά φαρμακοτεχνικής μορφής άμεσης αποδέσμευσης και ως εκ τούτου η διαδικασία αποδέσμευσης έχει ενδεχομένως πρωτοταξικά στοιχεία. Σε αυτό συνηγορεί και το γεγονός ότι η αξιοπιστία των τιμών α και $k'_{0,2}$ με βάση όλα τα στατιστικά χαρακτηριστικά δεν είναι έγκυρη. Από τις προσαρμογές στα πειραματικά δεδομένα των Abrahamsson et al. παρουσιάζει ενδιαφέρον η συσχέτιση του εκθέτη α με την κατάσταση σίτισης. Ενώ σε περιπτώσεις μη σίτισης η τιμή του α πλησιάζει τη μονάδα και ουσιαστικά παρουσιάζουν στατιστικά ασήμαντη διαφορά, γεγονός το οποίο οφείλεται σε κλασική μηδενοταξική κινητική, σε περιπτώσεις σίτισης η τιμή του α μειώνεται σημαντικά. Αντίθετα κινούνται οι εκτιμώμενες τιμές της παραμέτρου $k'_{0,f}$. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη της επίδρασης του μικροπεριβάλλοντος στο γαστρεντερικό αυλό στα χαρακτηριστικά αποδέσμευσης της φαρμακοτεχνικής μορφής. Ενδεχομένως η ανομοιογένεια που προκύπτει από τη λήψη τροφής οδηγεί σε φαινόμενα ανώμαλης διάχυσης, τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζουν το ρυθμό αποδέσμευσης, οδηγώντας μια κλασική μηδενοταξική διαδικασία σε μηδενοταξική διαδικασία κλασματικού τύπου.

B.2.2.5. Προσομοιώσεις φαρμακοκινητικών δεδομένων

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις προσομοιώσεις φαρμακοκινητικών δεδομένων στο μονοδιαμερισματικό μοντέλο στην περίπτωση μηδενοταξικής αποδέσμευσης κλασματικού βαθμού, στην περίπτωση που η πρόσληψη δεν αποτελεί περιοριστικό βήμα της εμφάνισης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία. Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσομοίωσης όταν η αριθμητική τιμή του $k_{0,f}$ είναι μεγαλύτερη από k_{el} .



Σχήμα Β.2.15: Προσομοίωση καμπύλης συγκέντρωσης φαρμάκου στο αίμα ως προς χρόνο στην περίπτωση που η αποδέσμευση είναι το περιοριστικό βήμα της εμφάνισης του φαρμάκου στην κυκλοφορία για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{of}=0,5 \text{ mg/h}^\alpha$, $k_{el}= 0,2 \text{ h}^{-1}$, $Q_0=1 \text{ mg}$ και $V_d=1L$ (B.2.32).

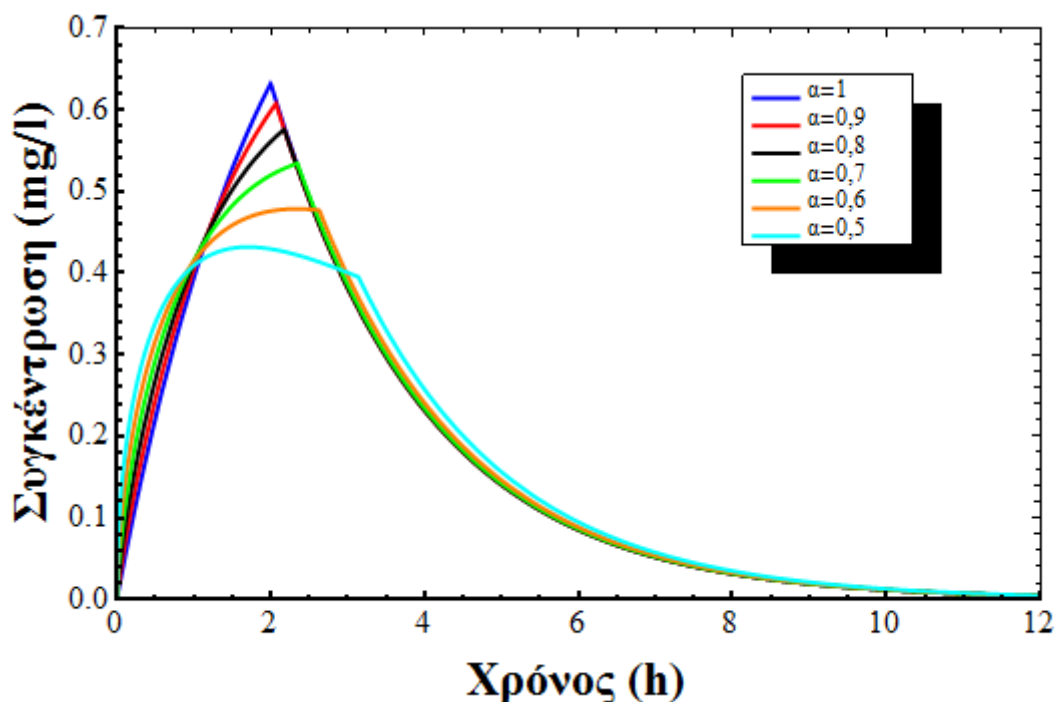
Οι εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι, όπως C_{max} , t_{max} , $AUC_{0 \rightarrow 12}$ και $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ που προκύπτουν από τις προσομοιώσεις παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Β.2.VIII: Εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{of}=0,5 \text{ mg/h}^\alpha$, $k_{el}= 0,2 \text{ h}^{-1}$, $Q_0=1 \text{ mg}$ και $V_d=1L$.

α	Φαρμακοκινητικές παράμετροι			
	C_{max}	t_{max}	$AUC_{0 \rightarrow 12}$	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$
1	0,8242	2	4,4423	5
0,9	0,8103	2,0686	4,4441	5
0,8	0,7918	2,1762	4,4450	5
0,7	0,7663	2,3475	4,4441	5
0,6	0,7289	2,6316	4,4403	5
0,5	0,6699	3,1416	4,4305	5

Παρατηρείται ότι η τιμή της μέγιστης συγκέντρωσης μειώνεται παράλληλα με τη μείωση της τιμής του α , ενώ το χρονικό σημείο που παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση συμπίπτει με τη χρονική στιγμή κατά την οποία το φάρμακο παύει να αποδεσμεύεται από την φαρμακοτεχνική μορφή.

Στη συνέχεια ακολουθούν τα αποτελέσματα της προσομοίωσης για την περίπτωση όπου $k_{0,f}$ και k_{el} έχουν την ίδια αριθμητική τιμή.



Σχήμα Β.2.16: Προσομοίωση καμπύλης συγκέντρωσης φαρμάκου στο αίμα ως προς χρόνο στην περίπτωση που η αποδέσμευση είναι το περιοριστικό βήμα της εμφάνισης του φαρμάκου στην κυκλοφορία για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{0,f}=0,5 \text{ mg/h}^\alpha$, $k_{el}=0,5 \text{ h}^{-1}$, $Q_0=1 \text{ mg}$ και $V_d=1 \text{ L}$ (Β.2.32).

Οι εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι, όπως C_{max} , t_{max} , $AUC_{0 \rightarrow 12}$ και $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ που προκύπτουν από τις προσομοιώσεις παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Β.2.IX: Εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{0,f}=0,5 \text{ mg/h}^\alpha$, $k_{el}=0,5 \text{ h}^{-1}$, $Q_0=1 \text{ mg}$ και $V_d=1 \text{ L}$.

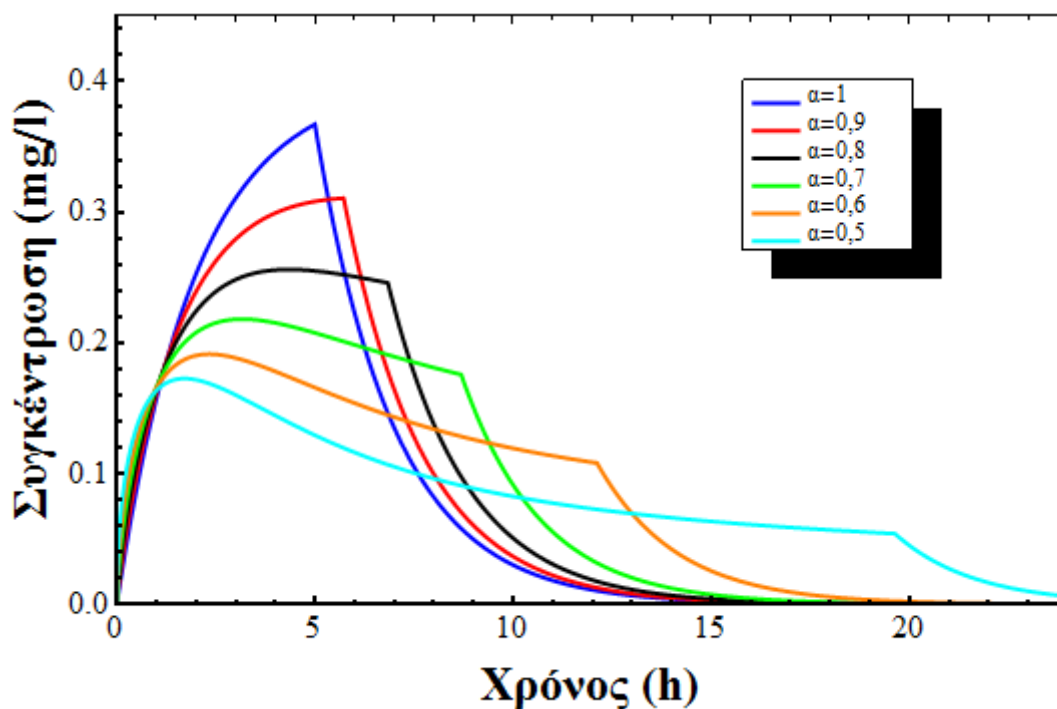
α	Φαρμακοκινητικές παράμετροι			
	C_{max}	t_{max}	$AUC_{0 \rightarrow 12}$	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$
1	0,6321	2	1,9915	2
0,9	0,6075	2,0686	1,9915	2
0,8	0,5759	2,1762	1,9915	2
0,7	0,5341	2,3475	1,9914	2
0,6	0,4783	2,3350	1,9912	2
0,5	0,4317	1,7081	1,9906	2

Παρατηρείται ότι η τιμή της μέγιστης συγκέντρωσης μειώνεται παράλληλα με τη μείωση της τιμής του α , ενώ το χρονικό σημείο που παρατηρείται η μέγιστη

συγκέντρωση συμπίπτει με τη χρονική στιγμή κατά την οποία η αποδέσμευση του φαρμάκου ολοκληρώνεται, με εξαίρεση τις περιπτώσεις που $\alpha=0,6$ και $\alpha=0,5$. Επίσης η τιμή του $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ είναι αναμενόμενη και ίση με $Q_0/k_{el}V_d$. Επίσης παρατηρούνται χαμηλότερες τιμές C_{max} σε σχέση με την προηγούμενη προσομοίωση, γεγονός το οποίο αποδίδεται στη μεγαλύτερη τιμή της σταθεράς απομάκρυνσης k_{el} . Σε αυτό το γεγονός αποδίδεται επίσης και η χαμηλότερη τιμή $AUC_{0 \rightarrow \infty}$.

Το γεγονός ότι η μέγιστη τιμή C_{max} σε ορισμένες περιπτώσεις δεν παρατηρείται στο χρονικό σημείο κατά το οποίο σταματάει η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας από τη φαρμακοτεχνική μορφή αλλά νωρίτερα, οφείλεται σε συνδυασμό δύο παραγόντων, της τιμής της σταθεράς α και της σταθεράς k_{el} . Κατά την *per os* χορήγηση ενός φαρμάκου, η μέγιστη τιμή C_{max} παρατηρείται το χρονικό σημείο εκείνο κατά το οποίο ο ρυθμός εισόδου του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία εξισώνεται με το ρυθμό απομάκρυνσης. Οι προσομοιώσεις της κλασματικής μηδενοταξικής κινητικής προβλέπουν για τιμές $\alpha < 1$ αρχικά υψηλό ρυθμό αποδέσμευσης, ο οποίος στη συνέχεια φθίνει σημαντικά. Το φαινόμενο αυτό είναι εντονότερο όσο οι τιμές της σταθεράς α αποκλίνουν από τη μονάδα (βλ. Κεφάλαιο Β.2.2.3.2, σελ. 230). Επιπλέον όσο μικρότερη είναι η σταθερά α από τη μονάδα, τόσο ο χρόνος αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας παρατείνεται. Τα ανωτέρω σε συνδυασμό με την υψηλή τιμή της σταθεράς απομάκρυνσης k_{el} οδηγούν σε ένα σενάριο κατά το οποίο η εξίσωση του ρυθμού εισόδου με το ρυθμό απομάκρυνσης επέρχεται νωρίτερα από τη στιγμή κατά την οποία εξαντλούνται τα αποθέματα της φαρμακοτεχνικής μορφής σε δραστική.

Στη συνέχεια ακολουθούν τα αποτελέσματα της προσομοίωσης όταν η αριθμητική τιμή του $k_{0,f}$ είναι μικρότερη από k_{el} .



Σχήμα Β.2.17: Προσομοίωση καμπύλης συγκέντρωσης φαρμάκου στο αίμα ως προς χρόνο στην περίπτωση που η αποδέσμευση είναι το περιοριστικό βήμα της εμφάνισης του φαρμάκου στην κυκλοφορία για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{of}=0,2 \text{ mg/h}^\alpha$, $k_{el}=0,5 \text{ h}^{-1}$, $Q_0=1 \text{ mg}$ και $V_d=1 \text{ L}$ (Β.2.32).

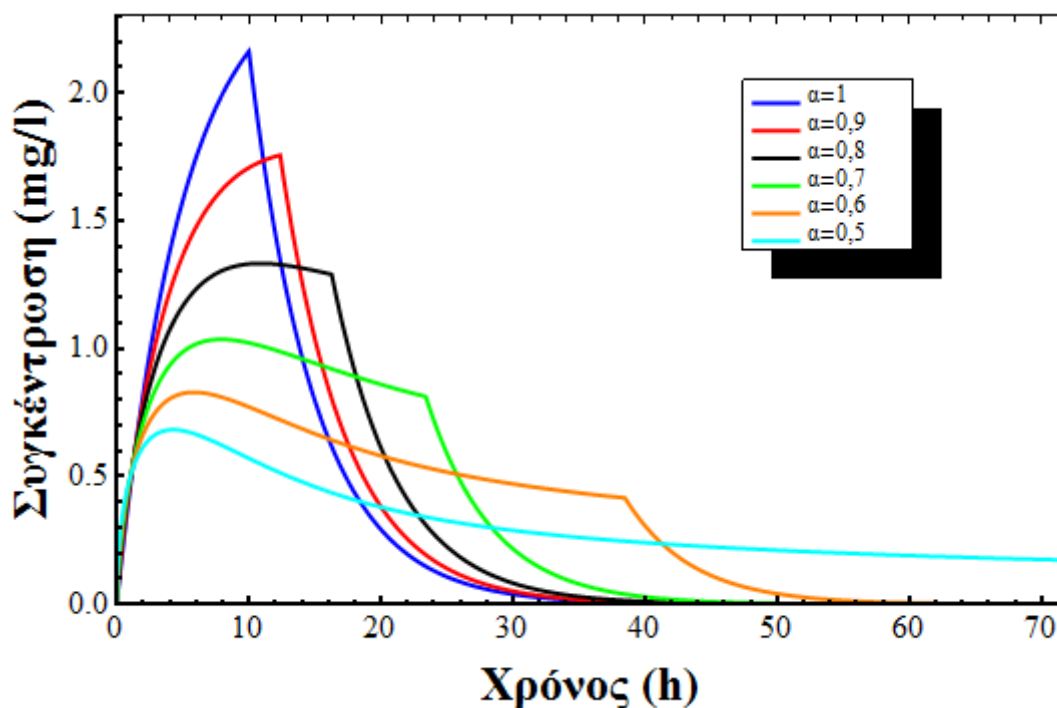
Οι εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι, όπως C_{max} , t_{max} , $AUC_{0 \rightarrow 12}$ και $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ που προκύπτουν από τις προσομοιώσεις παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Β.2.Χ: Εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{of}=0,2 \text{ mg/h}^\alpha$, $k_{el}=0,5 \text{ h}^{-1}$, $Q_0=1 \text{ mg}$ και $V_d=1 \text{ L}$.

α	Φαρμακοκινητικές παράμετροι			
	C_{max}	t_{max}	$AUC_{0 \rightarrow 12}$	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$
1	0,3672	5	1,9778	2
0,9	0,3107	5,7256	1,9730	2
0,8	0,2561	4,3454	1,9627	2
0,7	0,2181	3,3164	1,9328	2
0,6	0,1913	2,3350	1,7710	2
0,5	0,1727	1,7081	1,4173	2

Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται ότι η τιμή της μέγιστης συγκέντρωσης μειώνεται παράλληλα με τη μείωση της τιμής του α , ενώ αντίστοιχα σημαντική είναι και η επίδραση της τιμής του α στη μέγιστη συγκέντρωση που παρατηρείται στο αίμα. Επιπλέον στις περισσότερες των περιπτώσεων ο χρόνος t_{max} δεν ταυτίζεται με το χρόνο εξάντλησης των αποθεμάτων της φαρμακοτεχνικής μορφής σε δραστική.

Τέλος παρουσιάζεται και ένα σενάριο με υψηλότερη δόση (5 mg).



Σχήμα Β.2.18: Προσομοίωση καμπύλης συγκέντρωσης φαρμάκου στο αίμα ως προς χρόνο στην περίπτωση που η αποδέσμευση είναι το περιοριστικό βήμα της εμφάνισης του φαρμάκου στην κυκλοφορία για διάφορες τιμές του α (0,5-1). Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{of}=0,5 \text{ mg/h}^\alpha$, $k_{el}=0,2 \text{ h}^{-1}$, $Q_0=5 \text{ mg}$ και $V_d=1\text{L}$ (B.2.32).

Οι εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι, όπως C_{max} , t_{max} , $AUC_{0 \rightarrow 12}$ και $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ που προκύπτουν από τις προσομοιώσεις παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Β.2.XI: Εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παράμετροι για διάφορες τιμές του α . Οι τιμές των παραμέτρων είναι: $k_{of}=0,5 \text{ mg/h}^\alpha$, $k_{el}=0,2 \text{ h}^{-1}$, $Q_0=5 \text{ mg}$ και $V_d=1\text{L}$.

α	Φαρμακοκινητικές παράμετροι			
	C_{max}	t_{max}	$AUC_{0 \rightarrow 12}$	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$
1	2,1617	10	17,755	25
0,9	1,7558	12,368	15,576	25
0,8	1,3326	10,8636	12,9465	25
0,7	1,0356	7,9100	10,6965	25
0,6	0,8289	5,8376	8,7810	25
0,5	0,6826	4,2702	7,1590	25

Η χορηγούμενη δόση επηρεάζει όπως είναι αναμενόμενο τη μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα, λόγω της παράτασης του χρόνου αποδέσμευσης. Επίσης παρατηρείται και αύξηση των τιμών AUC γεγονός το οποίο φανερώνει μεγαλύτερη έκταση απορρόφησης.

Και σε αυτή την περίπτωση $AUC_{0 \rightarrow \infty} = Q_0/k_{el}V_d$, γεγονός το οποίο αποδεικνύει ότι οι προσομοιώσεις παράγουν λογικά αποτελέσματα.

Το γενικότερο συμπέρασμα που προκύπτει από τις προσομοιώσεις είναι ότι τα αποτελέσματα που παράγονται στις περισσότερες των περιπτώσεων είναι λογικά και ομοιάζουν με τυπικά φαρμακοκινητικά δεδομένα που προκύπτουν από τη χορήγηση φαρμακοτεχνικών μορφών παρατεταμένης αποδέσμευσης. Ιδίως όσον αφορά τις τιμές της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη (AUC) παρατηρούνται αναμενόμενες τιμές, γεγονός το οποίο αξιοποιείται για την επιβεβαίωση της ορθότητας των προσομοιώσεων. Εντούτοις σε μια σειρά περιπτώσεων παρατηρείται το παράδοξο της ασυμφωνίας του χρόνου που παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα (t_{max}) με το χρόνο που εξαντλούνται τα αποθέματα της φαρμακοτεχνικής μορφής σε δραστική. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε περιπτώσεις όπου η τιμή της σταθεράς α είναι αρκετά μικρότερη της μονάδας (συνήθως για $\alpha < 0,7$) και η αριθμητική τιμή της σταθεράς απομάκρυνσης k_{el} είναι σχετικά υψηλή σε σχέση με τη σταθερά k_{of} . Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στις περιπτώσεις κατά τις οποίες η εξίσωση του ρυθμού εισόδου με το ρυθμό απομάκρυνσης, χρονική στιγμή κατά την οποία παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα, εμφανίζεται νωρίτερα από τη διακοπή της εισόδου του φαρμάκου στο πλάσμα, λόγω εξάντλησης των αποθεμάτων του.

B.2.3. ΠΡΩΤΟΤΑΞΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

B.2.3.1. Θεωρία

Η θεώρηση θα πραγματοποιηθεί με βάση την κλασική πρωτοταξική διαδικασία της διάλυσης.

Το κλασματικό ανάλογο της σχέσης Noyes-Whitney είναι η σχέση B.2.33.

$$\frac{d^\alpha (C_s - C)}{dt^\alpha} = -k(C_s - C) \quad \text{B.2.33}$$

Όπου k η σταθερά του ρυθμού διάλυσης με μονάδες (χρόνος) $^{-\alpha}$. Η σχέση B.2.33 με ολοκλήρωση δίνει (Dokoumetzidis and Macheras, 2009):

$$C = C_s [1 - E_\alpha(-kt^\alpha)] \quad \text{B.2.34}$$

Όπου E_α η συνάρτηση Mittag-Leffler (Σχέση B.2.17).

Η σχέση B.2.34 για $\alpha=1$ δίνει την κλασική πρωτοταξική σχέση του ρυθμού διάλυσης $C=C_s(1-e^{-kt})$. Η παραπάνω σχέση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη και ερμηνεία φαινομένων πρωτοταξικής φύσης, όπως για παράδειγμα φαινόμενα διάλυσης από φαρμακοτεχνικές μορφές άμεσης αποδέσμευσης σε μη ομοιογενές περιβάλλον. Είναι προφανές ότι η σχέση B.2.34 παρουσιάζει ομοιότητες με την Weibull (Σχέση B.1.12), καθώς και οι δύο είναι διπλές εκθετικές συναρτήσεις.

Η B.2.34 μπορεί να γραφτεί ως προς το κλάσμα της δόσης που έχει διαλυθεί:

$$F_r = 1 - E_\alpha(-k_{1,1}t^{\alpha_1}) \quad \text{B.2.35}$$

Και ως προς το κλάσμα της δόσης που έχει απορροφηθεί *in vivo*:

$$F_\alpha = 1 - E_\alpha(-k_{1,2}t^{\alpha_2}) \quad \text{B.2.36}$$

Οι σχέσεις B.2.35 και B.2.36 μπορούν να τροποποιηθούν περαιτέρω με την εισαγωγή ενός χρόνου υστέρησης t_{lag} .

$$F_r = 1 - E_\alpha[-k_{1,1}(t - t_{lag})^{\alpha_1}] \quad \text{B.2.37}$$

$$F_\alpha = 1 - E_\alpha[-k_{1,2}(t - t_{lag})^{\alpha_2}] \quad \text{B.2.38}$$

Τέλος επειδή η συνάρτηση Mittag-Leffler για $\alpha > 1$ είναι μη μονοτονική και έχει συμπεριφορά που ομοιάζει με φθίνουσα ταλάντωση (για $\alpha = 2$ γίνεται ο απλός αρμονικός ταλαντωτής), μπορούμε να εισάγουμε ένα περιορισμό ώστε να μην αποκτά τιμές $F_r > 1$ (ή $C > C_s$). Αν θεωρήσουμε ότι για χρόνο t_{100} οι σχέσεις B.2.37 και B.2.38 αποκτούν τιμή ίση με 1, μπορούν να γραφούν ως:

$$F_r = \begin{cases} 1 - E_\alpha[-k_{1,1}(t - t_{lag})^{\alpha_1}] & \text{για } t < t_{100} \\ 1 & \text{για } t \geq t_{100} \end{cases} \quad \text{B.2.39}$$

$$F_\alpha = \begin{cases} 1 - E_\alpha[-k_{1,2}(t - t_{lag})^{\alpha_2}] & \text{για } t < t_{100} \\ 1 & \text{για } t \geq t_{100} \end{cases} \quad \text{B.2.40}$$

Οι σχέσεις B.2.36, B.2.38 και B.2.40 μπορούν να τροποποιηθούν περαιτέρω, προσθέτοντας το κλάσμα της βιοδιαθέσιμης δόσης, F , στο δεξί τους σκέλος, το οποίο θα αποτελεί και τη μέγιστη τιμή των σχέσεων αυτών

$$F_\alpha = F[1 - E_\alpha(-k_{1,2}t^{\alpha_2})] \quad \text{B.2.41}$$

$$F_\alpha = F[1 - E_\alpha[-k_{1,2}(t - t_{lag})^{\alpha_2}]] \quad \text{B.2.42}$$

$$F_\alpha = \begin{cases} F[1 - E_\alpha[-k_{1,2}(t - t_{lag})^{\alpha_2}]] & \text{για } t < t_{100} \\ F & \text{για } t \geq t_{100} \end{cases} \quad \text{B.2.43}$$

Άλλος ένας τρόπος έκφρασης του ρυθμού διάλυσης προκύπτει αν πολλαπλασιάσουμε κάθε μέρος της σχέσης B.2.34 με V/M_0 (όγκος μέσου διάλυσης προς δόση).

$$\Phi = \frac{1}{q}[1 - E_\alpha(-kt^\alpha)] \quad \text{B.2.44}$$

Όπου Φ το μέρος της δόσης που έχει διαλυθεί και $q = M_0/V \times C_s$ είναι ο λόγος της δόσης προς τη διαλυτότητα, εκφρασμένο ως αδιάστατο μέγεθος. Η σχέση B.2.44 ισχύει μόνο όταν $q \geq 1$, δηλαδή όταν ένα μέρος της δόσης διαλύεται και το φάρμακο φτάνει το επίπεδο κορεσμού $1/q$.

Όταν όμως $M_0 < C_s V$, δηλαδή $q < 1$, που σημαίνει ότι ολόκληρη η δόση έχει διαλυθεί, η καμπύλη ακολουθεί την φυσιολογική της μορφή μέχρι το σημείο που $\Phi = 1$ σε χρόνο t_{100} και μετά σταθεροποιείται σε τιμή ίση με 1, δηλαδή:

$$\Phi = \begin{cases} \frac{1}{q} [1 - E_\alpha(-kt^\alpha)] & \text{for } t < t_{100} (\Phi < 1) \\ 1 & \text{for } t \geq t_{100} \end{cases} \quad \text{B.2.45}$$

B.2.3.2. Μέθοδοι

B.2.3.2.1. Προσομοιώσεις

Οι σχέσεις B.2.35, B.2.36, B.2.37, B.2.38, B.2.39 και B.2.40 απεικονίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Wolfram Mathematica® 7.0 (Wolfram Research, Inc.). Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τιμές παραμέτρων για να μελετηθεί η επίδρασή τους στη μορφή της καμπύλης. Είναι προφανές ότι οι *in vitro* σχέσεις B.2.35, B.2.37 και B.2.39 είναι όμοιες με τις αντίστοιχες *in vivo* B.2.36, B.2.38 και B.2.40.

Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των καμπυλών παρουσιάζονται στο Παράρτημα III.

Επιπλέον κατά το στάδιο των προσομοιώσεων επιχειρήθηκε και σύγκριση μεταξύ των σχέσεων $y=E_{\alpha}(-kt^{\alpha})$ και της $y=\exp(-t^{\alpha})$, δηλαδή μεταξύ των σχέσεων Mittag-Leffler και Weibull, με στόχο τη μελέτη των ομοιοτήτων στη συμπεριφορά τους.

B.2.3.2.2. Προσαρμογή σε πειραματικά δεδομένα

Οι σχέσεις B.2.35, B.2.37 και B.2.39 προσαρμόστηκαν σε πειραματικά δεδομένα που προήλθαν από τη βιβλιογραφία και εκτιμήθηκαν οι τιμές των παραμέτρων $k_{1,1}$, α_1 και t_{lag} . Τα δεδομένα προήλθαν από τις δημοσιεύσεις των ακόλουθων: (Pattarino et al., 2007; Gbureck et al., 2008; Giovagnoli et al., 2008; Gómez-Carracedo et al., 2009; Ma et al., 2009).

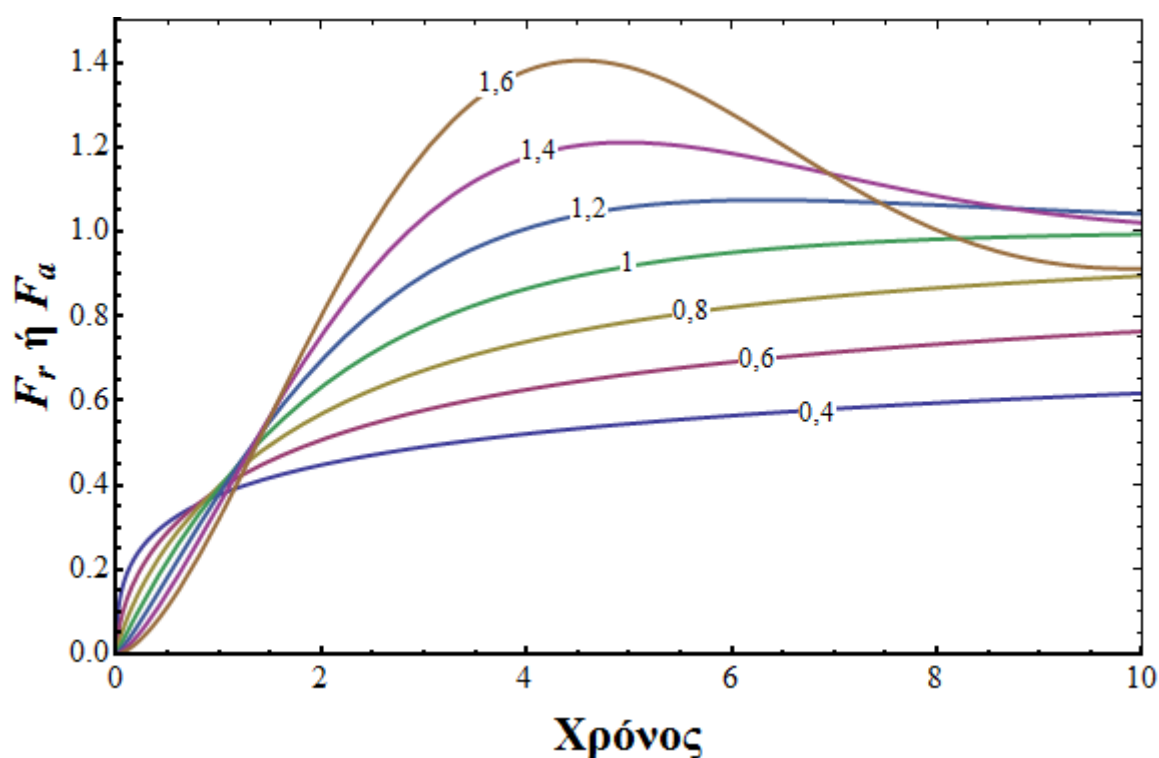
Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τις προσαρμογές προήλθαν από ψηφιοποίηση των διαγραμμάτων της βιβλιογραφίας με χρήση του προγράμματος GetData Graph Digitizer®. Όπου απαιτήθηκε έγινε μετατροπή τον δεδομένων έτσι ώστε ο χρόνος να εκφράζεται σε ώρες και το % ποσοστό αποδέσμευσης να εκφράζεται σε F_r . Τα δεδομένα εξήχθησαν σε πίνακα Excel® (Microsoft Office 2007), και στη συνέχεια σε Tab-delimited αρχείο κειμένου (κατάληξης txt). Τα αρχεία αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή των δεδομένων στο πρόγραμμα Mathematica με τη χρήση της ρουτίνας "ReadList". Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με χρήση της εντολής "NonlinearModelFit". Υπολογίστηκαν οι τιμές των παραμέτρων $k_{1,1}$, α_1 και t_{lag} , καθώς και τα τυπικά σφάλματα (SE), τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) και ο συντελεστής προσδιορισμού r^2 . Ένα τυπικό παράδειγμα μη γραμμικής προσαρμογής σε πειραματικά δεδομένα παρουσιάζεται στο Παράρτημα III.

Αντίστοιχα οι σχέσεις B.2.36, B.2.38 και B.2.40 χρησιμοποιήθηκαν για την προσαρμογή σε *in vivo* δεδομένα που προέκυψαν από αποσυνέλιξη, ύστερα από ψηφιοποίηση των δεδομένων της βιβλιογραφίας. Τα δεδομένα προήλθαν από τις δημοσιεύσεις των ακόλουθων συγγραφέων: (Balan et al., 2001). Για τα *in vivo* δεδομένα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MatLab® R2009b (The Mathworks, Inc.).

B.2.3.3. Αποτελέσματα σε *in vitro* πρωτοταξικές διαδικασίες

B.2.3.3.1. Προσομοιώσεις

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της σταθεράς α στην καμπύλη της σχέσης B.2.35 (ή της *in vivo* αντίστοιχης B.2.36). Υπενθυμίζεται ότι η σταθερά α είναι ο μη ακέραιος βαθμός της πρωτοταξικής παραγώγου (ή ακέραιος στην περίπτωση που $\alpha=1$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα.

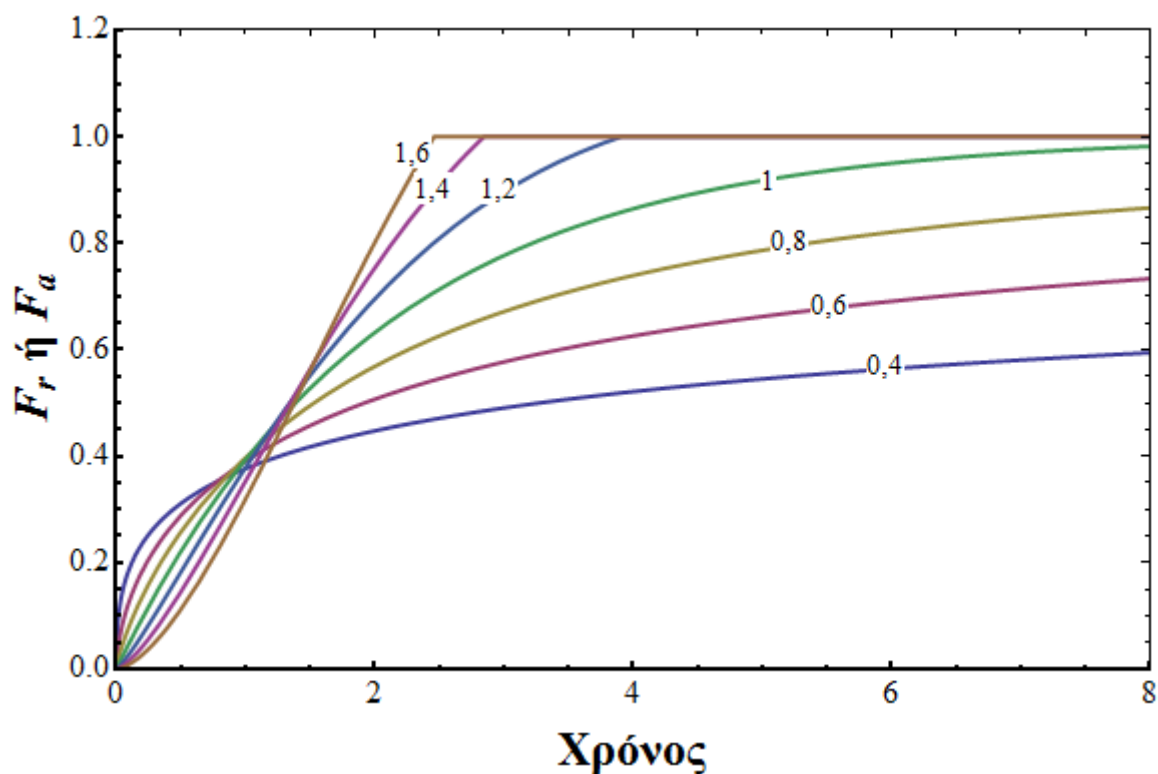


Σχήμα B.2.19: Γραφική απεικόνιση των σχέσεων B.2.35 και B.2.36 για διάφορες τιμές του α (0,4-1,6) με $k_{1,1}=k_{1,2}=0,5$.

Από τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων παρατηρείται ότι για $\alpha=1$, οι σχέσεις B.2.35 και B.2.36 συμπεριφέρονται όμοια με την σχέση $F=1-e^{-kt}$, δηλαδή πλησιάζουν ασυμπτωτικά τη μονάδα, γεγονός το οποίο είναι αναμενόμενο διότι για $\alpha=1$ η Mittag-Leffler (B.2.17) μεταπίπτει στην κλασική εκθετική συνάρτηση e^x . Για τιμές $\alpha<1$, οι

σχέσεις B.2.35 και B.2.36 αρχικά και για σύντομο χρονικό διάστημα παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό αύξησης σε σχέση με την $F = 1 - e^{-kt}$, εντούτοις στην πορεία ο ρυθμός αύξησης μειώνεται και οι σχέσεις προσεγγίζουν ασυμπτωτικά μέγιστες τιμές χαμηλότερες της μονάδας, ανάλογες της τιμής του βαθμού παραγωγίσης α . Για τιμές $\alpha > 1$, οι σχέσεις B.2.35 και B.2.36 αρχικά και για σύντομο χρονικό διάστημα παρουσιάζουν μειωμένο ρυθμό αύξησης σε σχέση με την $F = 1 - e^{-kt}$, εντούτοις στην πορεία ο ρυθμός αύξησης αυξάνεται, οι τιμές των συναρτήσεων ξεπερνούν τη μονάδα και τελικά σταθεροποιούνται σε αυτή πραγματοποιώντας φθίνουσα ταλάντωση, της οποίας το πλάτος κύματος είναι ανάλογο της τιμής του βαθμού παραγωγίσης α . Η συμπεριφορά των σχέσεων B.2.35 και B.2.36 για $\alpha > 1$ αν και χαρακτηρίζονται από φυσική ασυνέπεια, δεδομένου ότι οι τιμές του κλάσματος της δόσης που έχει διαλυθεί ξεπερνούν τη μονάδα, ενδεχομένως θα μπορούσαν να βρουν εφαρμογή για την περιγραφή φαινομένων υπερκορεσμού.

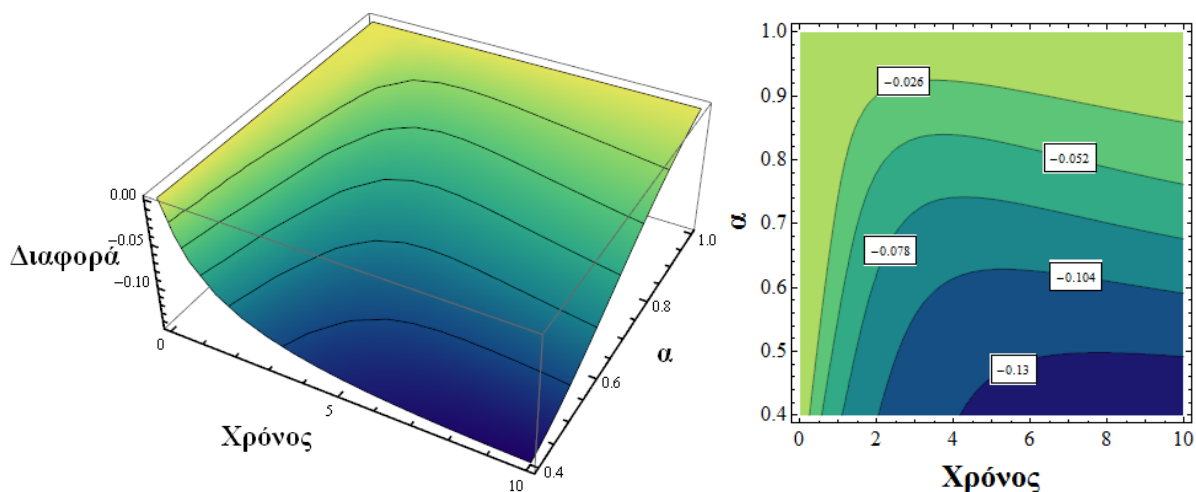
Το γεγονός ότι η τιμή της συνάρτησης ξεπερνάει τη μονάδα για $\alpha > 1$, οδήγησε στην ανάπτυξη των σχέσεων B.2.39 και B.2.40, στις οποίες το μέγιστο ορίζεται ίσο με τη μονάδα. Η γραφική απεικόνιση των παραπάνω σχέσεων απεικονίζεται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα Β.2.20: Γραφική απεικόνιση των σχέσεων Β.2.39 και Β.2.40 για διάφορες τιμές του α (0,4-1,6) με $k_{1,1} = k_{1,2} = 0,5$.

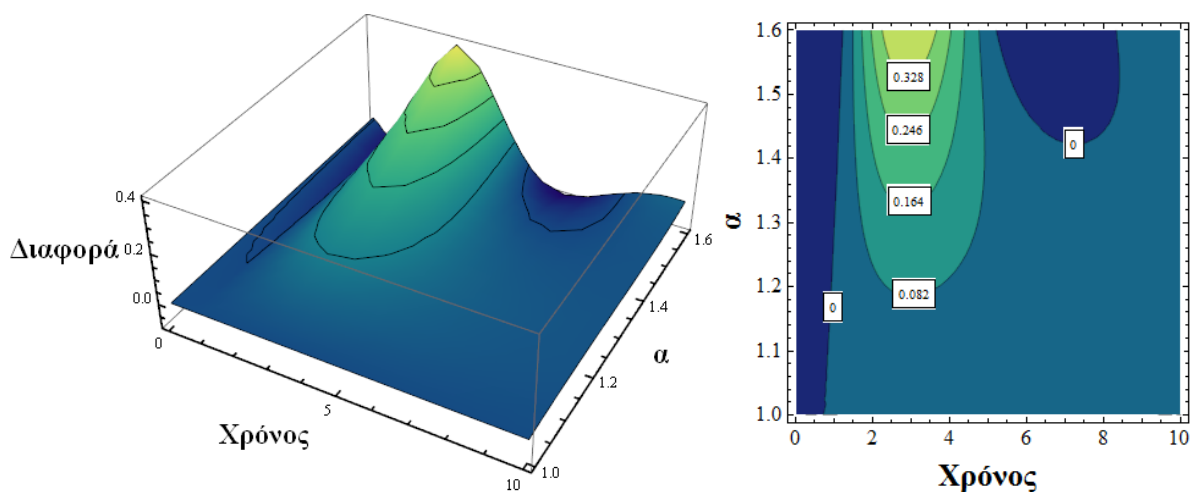
Η σύνθετη συμπεριφορά των σχέσεων Β.2.35, Β.2.36, Β.2.39 και Β.2.40, οι οποίες μπορούν να συμπεριφερθούν ως κλασικές ασυμπτωτικές συναρτήσεις προσέγγισης μέγιστης τιμής ή ως σιγμοειδείς συναρτήσεις, οφείλονται στις ιδιότητες της συνάρτησης Mittag-Leffler (Β.2.17). Αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσιάζει και η εξαιρετικά χρήσιμη, αλλά προβληματική ως προς την φυσική της προέλευση, συνάρτηση Weibull (Β.1.12). Το επόμενο στάδιο αφορά στη σύγκριση των συναρτήσεων Mittag-Leffler και Weibull.

Αρχικά υπολογίστηκε η διαφορά της εξίσωσης $E_{\alpha}(-t^{\alpha})$ από την εκθετική $\exp(-t^{\alpha})$ για διάφορες τιμές του α και του χρόνου t .



Σχήμα Β.2.21: Διαφορά της εξίσωσης $E_{\alpha}(-t^{\alpha})$ από την Weibull $\exp(-t^{\alpha})$ για διάφορες τιμές του α ($\alpha < 1$) και του χρόνου. Αριστερά: τρισδιάστατη απεικόνιση και δεξιά: ισοϋψής απεικόνιση (contour).

Για τιμές $\alpha < 1$, οι διαφορές μεταξύ της εξίσωσης $E_{\alpha}(-t^{\alpha})$ από την Weibull $\exp(-t^{\alpha})$ είναι μικρές για τιμές α κοντά στη μονάδα και για μικρό χρόνο. Αντιθέτως η απόκλιση μεταξύ των δύο σχέσεων αυξάνεται για τιμές α σημαντικά μικρότερες της μονάδας και για μεγάλο χρόνο.

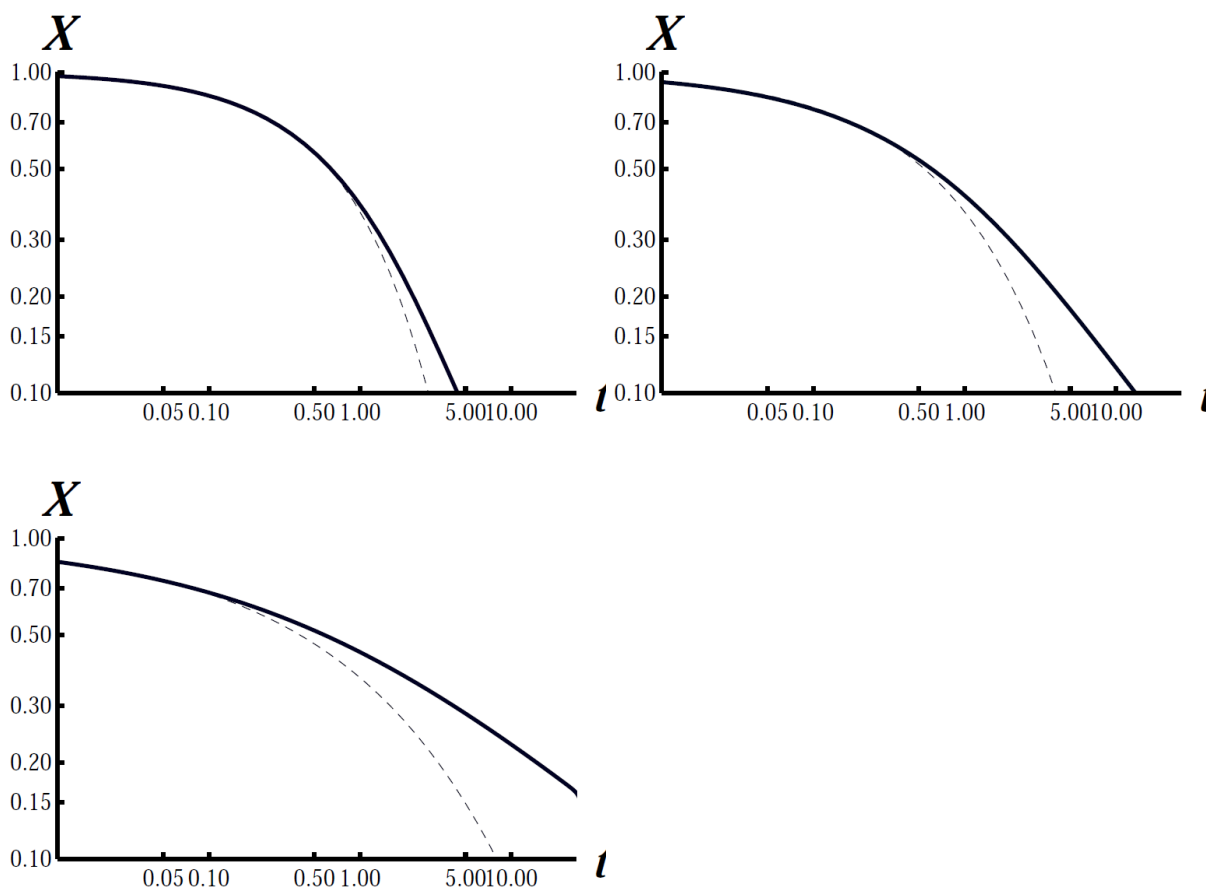


Σχήμα Β.2.22: Διαφορά της εξίσωσης $E_{\alpha}(-t^{\alpha})$ από την Weibull $\exp(-t^{\alpha})$ για διάφορες τιμές του α ($\alpha > 1$) και του χρόνου. Αριστερά: τρισδιάστατη απεικόνιση και δεξιά: ισοϋψής απεικόνιση (contour).

Αντίστοιχα, για τιμές $\alpha > 1$, οι διαφορές μεταξύ της εξίσωσης $E_{\alpha}(-t^{\alpha})$ από την Weibull $\exp(-t^{\alpha})$ είναι μικρές για τιμές α κοντά στη μονάδα ενώ αντιθέτως η απόκλιση μεταξύ των δύο σχέσεων αυξάνεται για τιμές α σημαντικά μεγαλύτερες της μονάδας. Επίσης οι

δύο συναρτήσεις αποκλίνουν σημαντικά στο σημείο που η Mittag-Leffler πραγματοποιεί τη μέγιστη ταλάντωση.

Ένας άλλος τρόπος δισδιάστατης απεικόνισης της διαφοράς της Mittag-Leffler από τη Weibull σε *log-log* διαγράμματα παρουσιάζεται παρακάτω:



Σχήμα Β.2.23: Log-log διαγράμματα της εξίσωσης $E_{\alpha}(-t^{\alpha})$ (κανονική γραμμή) από την Weibull $\exp(-t^{\alpha})$ (στικτή γραμμή) για διάφορες τιμές του α ($\alpha=0,8$ άνω αριστερά, $\alpha=0,6$ άνω δεξιά και $\alpha=0,4$ κάτω αριστερά).

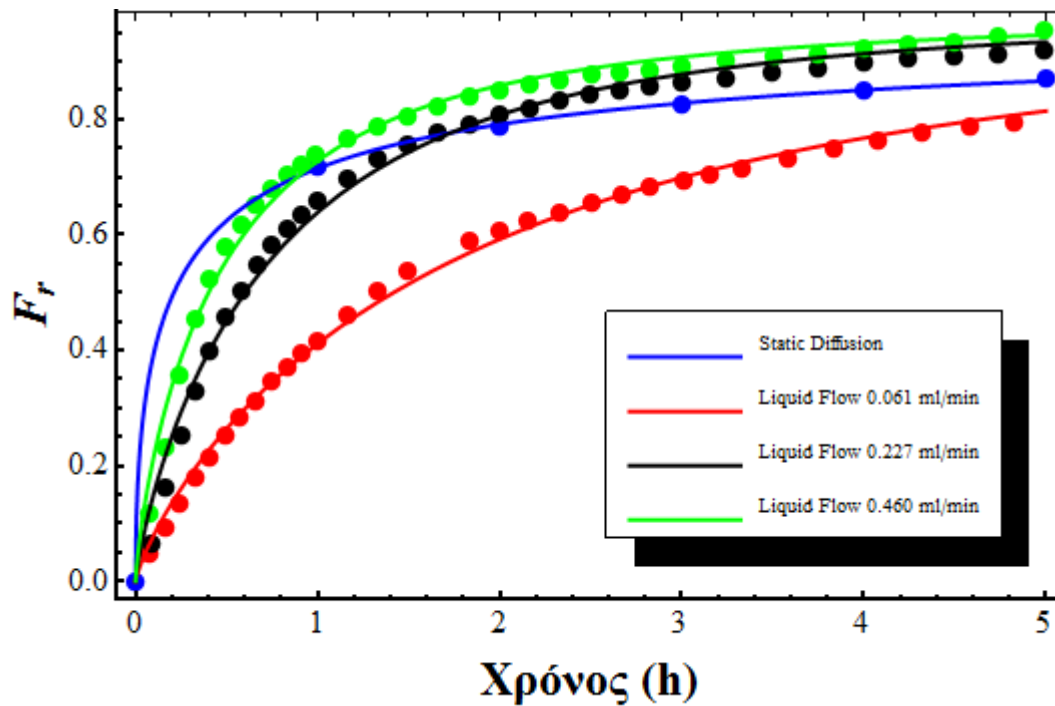
Και πάλι είναι εμφανές ότι για τιμές του α κοντά στη μονάδα οι δύο σχέσεις έχουν παρόμοια συμπεριφορά ενώ για $\alpha=1$ ταυτίζονται.

Β.2.3.3.2. Προσαρμογή σε πειραματικά *in vitro* δεδομένα

Κατά την προσαρμογή των κλασματικών πρωτοταξικών σχέσεων σε *in vitro* δεδομένα αξιοποιήθηκαν δεδομένα από τη βιβλιογραφία, στα οποία οι συγγραφείς είχαν χρησιμοποιήσει τη σχέση Weibull για την περιγραφή της αποδέσμευσης.

Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Gbureck et al., 2008,

για το σύστημα βανκομυκίνης που ανέπτυξαν με μικροπορώδη κεραμικά από φωσφορικό ασβέστιο. Η αποδέσμευση μελετήθηκε σε διαφορετικές υδροδυναμικές συνθήκες και οι προσαρμογές έγιναν στο αρχικό κομμάτι των καμπυλών (Gbureck et al., 2008).



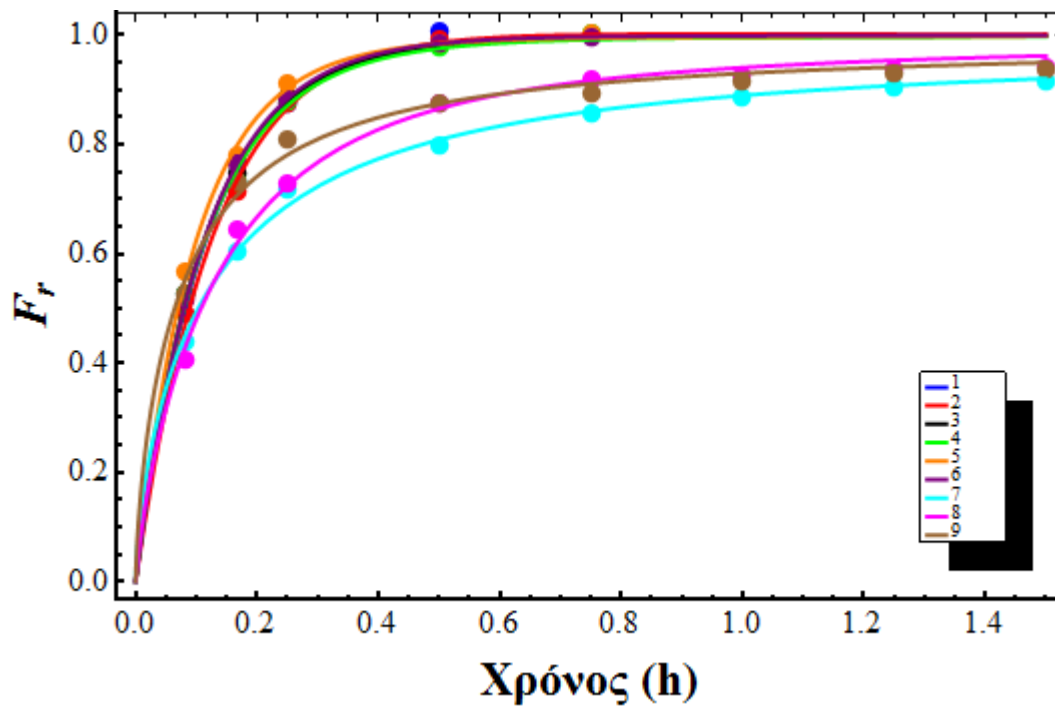
Σχήμα Β.2.24: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Gbureck et al. για το σύστημα βανκομυκίνης (Gbureck et al., 2008).

Πίνακας Β.2.XII: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Gbureck et al. για το σύστημα βανκομυκίνης για το αρχικό κομμάτι της αποδέσμευσης (Gbureck et al., 2008).

Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι (SE)			
	[95% CI]			
	Weibull		Κλασματική πρωτοταξική αποδέσμευση (Σχέση Β.2.35)	
	b	r^2	α	r^2
Static Diffusion	0,299 (0,008)	1	0,5215 (0,0100) [0,4896-0,5533]	1,0000
Liquid Flow 0,061 ml/min	0,736 (0,011)	0,996	0,8244 (0,0081) [0,8078-0,8409]	0,9995
Liquid Flow 0,227 ml/min	0,707 (0,022)	0,985	0,8335 (0,0123) [0,8085-0,8586]	0,9991
Liquid Flow 0,460 ml/min	0,652 (0,026)	0,976	0,7975 (0,0121) [0,7728-0,8223]	0,9993

Σε όλες τις περιπτώσεις οι προσαρμογές της σχέσης Β.2.35 είναι ισάξιες ή και καλύτερες από τις αντίστοιχες Weibull. Επίσης παρατηρείται σημαντική αύξηση της τιμής του βαθμού παραγωγίσης α μεταξύ των συνθηκών στατικής διάχυσης και αυξημένης ροής, γεγονός το οποίο αποτελεί ένδειξη σύνδεσης του βαθμού παραγωγίσης με τις υδροδυναμικές συνθήκες.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα από τη μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Gómez-Carracedo et al. για το σύστημα σφαιριδίων μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης που περιείχαν θεοφυλλίνη (Gbureck et al., 2008; Gómez-Carracedo et al., 2009).



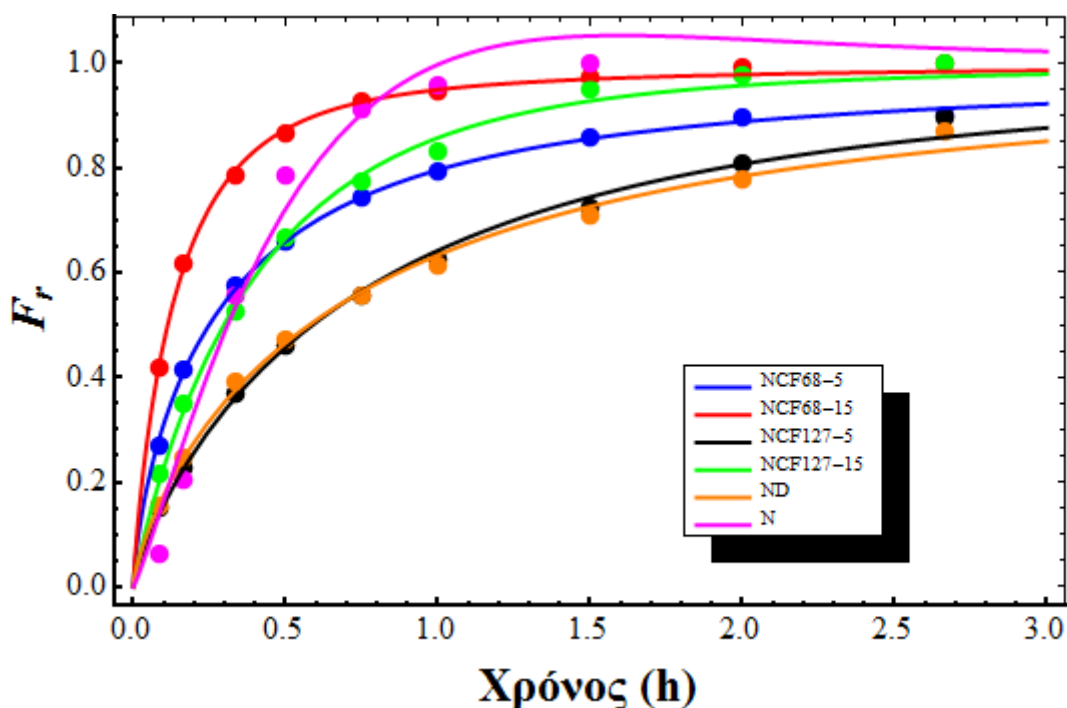
Σχήμα Β.2.25: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Gómez-Carracedo et al. για το σύστημα θεοφυλλίνης (Gómez-Carracedo et al., 2009).

Πίνακας Β.2.XIII: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Gómez-Carracedo et al. για το σύστημα θεοφυλλίνης (Gómez-Carracedo et al., 2009).

Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι (SE)			
	[95% CI]			
	Weibull		Κλασματική πρωτοταξική αποδέσμευση (Σχέση Β.2.35)	
	b	r^2	α	r^2
1	0,976 (0,007)	0,999	0,9942 (0,0430) [0,8093-1,1793]	0,9994
2	1,002 (0,021)	0,999	1,0135 (0,0281) [0,8926-1,1343]	0,9997
3	0,999 (0,022)	0,999	0,9829 (0,0185) [0,9035-1,0624]	0,9999
4	1,001 (0,001)	0,999	0,9750 (0,0247) [0,8963-1,0537]	0,9998
5	0,983 (0,019)	0,999	0,9778 (0,0198) [0,9147-1,0409]	0,9999
6	1,004 (0,024)	0,999	0,9939 (0,0025) [0,9859-1,0019]	1,0000
7	0,506 (0,003)	0,999	0,7101 (0,0180) [0,6659-0,7543]	0,9997
8	0,652 (0,006)	0,999	0,8314 (0,0243) [0,7719-0,8908]	0,9995
9	0,458 (0,028)	0,998	0,7233 (0,0319) [0,6453-0,8013]	0,9995

Σε όλες τις περιπτώσεις οι προσαρμογές της σχέσης Β.2.35 είναι ισάξιες ή και καλύτερες από τις αντίστοιχες Weibull.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα από τη μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Pattarino et al., 2009, για το σύστημα επικαλυμμένων μικροσωματιδίων νιφεδιπίνης με βάση την τεχνική Hot Air Coating (HAC) (Pattarino et al., 2007).



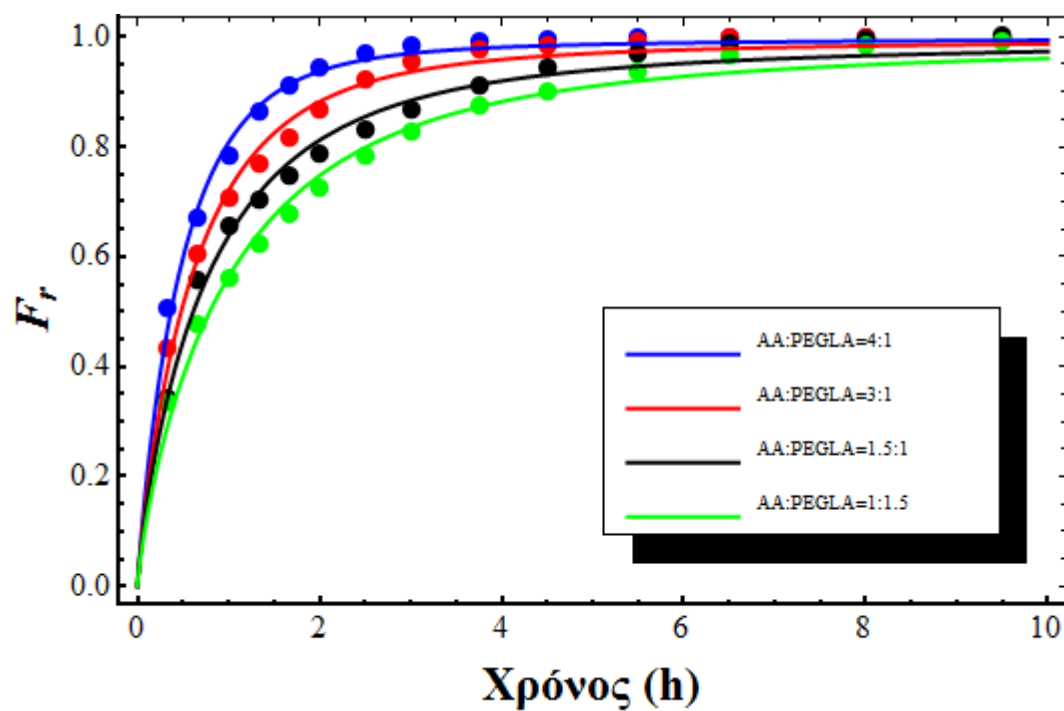
Σχήμα Β.2.26: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Pattarino et al. για το σύστημα νιφεδιπίνης (Pattarino et al., 2007).

Πίνακας Β.2.XIV: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Pattarino et al. για το σύστημα νιφεδιπίνης (Pattarino et al., 2007).

Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι (SE)			
	[95% CI]			
	Weibull		Κλασματική πρωτοταξική αποδέσμευση (Σχέση Β.2.35)	
	b	r ²	α	r ²
N	1,6299	0,9897	1,1556 (0,0631) [0,9934-1,3177]	0,9946
NC	0,7069	0,9958	0,7715 (0,0193) [0,7259-0,8172]	0,9992
NCF68-5	0,5844	0,9939	0,7426 (0,0080) [0,7236-0,7616]	0,9999
NCF68-15	0,737	0,9907	0,8587 (0,0107) [0,8335-0,8839]	0,9999
NCF127-5	0,7349	0,9942	0,8245 (0,0195) [0,7784-0,8706]	0,9992
NCF127-15	0,8072	0,9965	0,9220 (0,0205) [0,8735-0,9705]	0,9994

Σε όλες τις περιπτώσεις οι προσαρμογές της σχέσης B.2.35 είναι καλύτερες από τις αντίστοιχες Weibull.

Τέλος, ακολουθούν τα αποτελέσματα από τη μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Ma et al. για το σύστημα ελεγχόμενης αποδέσμευσης ακυκλοβίρης με βάση pH-ευαίσθητη υδρογέλη (Ma et al., 2009).



Σχήμα B.2.27: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Ma et al. για το σύστημα ακυκλοβίρης (Ma et al., 2009).

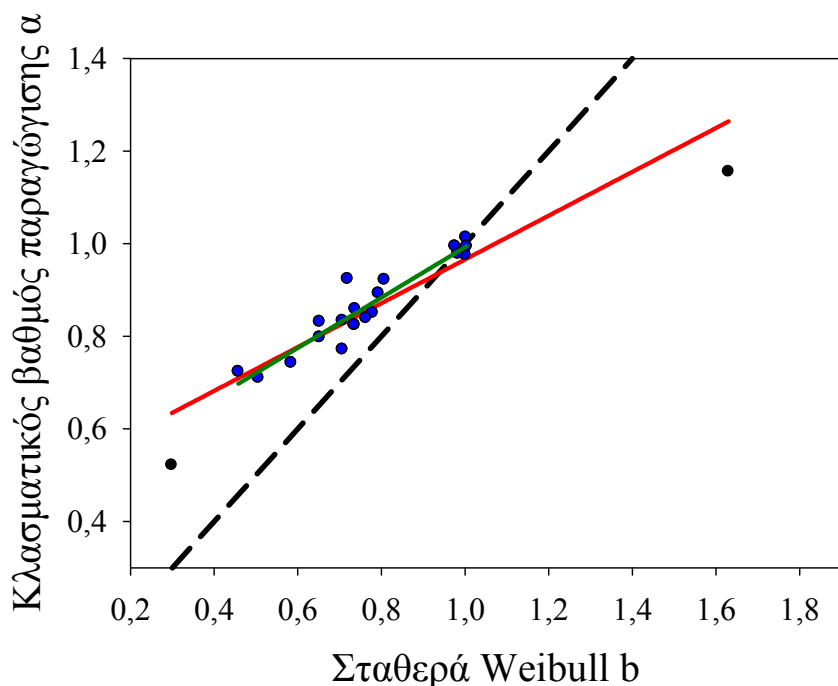
Πίνακας Β.2.XV: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.35 στα πειραματικά δεδομένα των Ma et al. για το σύστημα ακυκλοβίρης (Ma et al., 2009).

Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι (SE)			
	[95% CI]			
	Weibull		Κλασματική πρωτοταξική αποδέσμευση (Σχέση Β.2.35)	
	b	r^2	α	r^2
AA:PEGLA=4:1	0,719	0,989	0,9240 (0,0172) [0,8864-0,9615]	0,9997
AA:PEGLA=3:1	0,793	0,994	0,8929 (0,0208) [0,8477-0,9382]	0,9995
AA:PEGLA=1,5:1	0,779	0,986	0,8507 (0,0223) [0,8021-0,8994]	0,9992
AA:PEGLA=1:1,5	0,763	0,993	0,8392 (0,0217) [0,7919-0,8865]	0,9991

Και σε αυτά τα δεδομένα όλες τις περιπτώσεις οι προσαρμογές της σχέσης Β.2.35 είναι καλύτερες από τις αντίστοιχες Weibull.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, οι μη γραμμικές προσαρμογές της σχέσης Β.2.35 σε πειραματικά *in vitro* δεδομένα από τη βιβλιογραφία είναι εξαιρετικά ικανοποιητικές. Οι προσαρμογές εμφάνισαν αντίστοιχο ή και καλύτερο συντελεστή προσδιορισμού. Υπενθυμίζεται ότι οι προσαρμογές πραγματοποιήθηκαν σε δεδομένα, στα οποία είχε προσαρμοστεί η συνάρτηση Weibull. Επομένως, η κλασματική πρωτοταξική αποδέσμευση ενδεχομένως μπορεί να αξιοποιηθεί για την προσαρμογή και ερμηνεία πειραματικών δεδομένων, στα οποία μέχρι σήμερα γινόταν χρήση της συνάρτησης Weibull. Πρέπει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί, ότι η χρήση της σχέσης της κλασματικής πρωτοταξικής αποδέσμευσης Β.2.35, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα πειραματικά δεδομένα, τα οποία παρουσιάζουν κλασική πρωτοταξική κινητική, δεδομένου ότι για $\alpha=1$ η σχέση Β.2.17 μεταπίπτει στην $E_{\alpha}(x)=e^x$. Επομένως η επιτυχής προσαρμογή της Β.2.35 σε τέτοια πειραματικά δεδομένα θεωρείται δεδομένη.

Ο βαθμός συσχέτισης μεταξύ της σταθεράς Weibull b και κλασματικού βαθμού παραγωγίσης α που έχει προκύψει από μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης στα ίδια βιβλιογραφικά δεδομένα, απεικονίζεται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα Β.2.28: Συσχέτιση μεταξύ σταθεράς Weibull b και κλασματικού βαθμού παραγωγής α που έχει προκύψει από μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης στα ίδια βιβλιογραφικά δεδομένα. Με κόκκινη γραμμή η καμπύλη που προκύπτει από τη γραμμική συσχέτιση των δύο σταθερών λαμβάνοντας υπόψη όλα τα σημεία ($y=0,4731x+0,4929$, $r^2=0,8761$). Με πράσινη γραμμή η καμπύλη που προκύπτει από τη γραμμική συσχέτιση των δύο σταθερών λαμβάνοντας υπόψη τα μπλε σημεία ($y=0,5439x+0,4485$, $r^2=0,9006$). Με μαύρη διακεκομμένη γραμμή η ευθεία γραμμή για $b=\alpha$.

Από την παραπάνω γραφική απεικόνιση γίνεται εμφανές ότι για τιμές $b < 1$ ισχύει $\alpha > b$, ενώ για τιμές $b > 1$ ισχύει $\alpha < b$. Αντίθετα για $b \approx 1$ οι δύο σταθερές ταυτίζονται. Είναι επίσης προφανές ότι η συσχέτιση μεταξύ των δύο σταθερών δεν φαίνεται να είναι γραμμικού τύπου.

Το σημαντικότερο συμπέρασμα που προκύπτει από τις συσχετίσεις είναι το γεγονός ότι επιβεβαιώνεται η συγγένεια της Mittag-Leffler με τη Weibull. Η συγγένεια των δύο σχέσεων προσφέρει μια νέα εκδοχή για την ικανότητα της Weibull να προσαρμόζεται σε πειραματικά δεδομένα και προσφέρει μια εναλλακτική προσέγγιση που καλύπτει το κενό της φυσικής ερμηνείας της. Οι προσομοιώσεις και οι συσχετίσεις αποδεικνύουν ότι η Mittag-Leffler διαθέτει τα πλεονεκτήματα της Weibull, χωρίς να στερείται φυσικής ερμηνείας, ενώ τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της αποδίδονται στις συνθήκες ανώμαλης διάχυσης που ενδεχομένως επικρατούν κατά τη διαδικασία της αποδέσμευσης.

Επιπλέον επεκτείνοντας τη σκέψη των Papadopolou et al., 2006, σχετικά με τη συσχέτιση της σταθεράς b και του μηχανισμού αποδέσμευσης, και λαμβάνοντας υπόψη τις συσχετίσεις από το Σχήμα Β.2.28 ο πίνακας 3 από την ανωτέρω δημοσίευση, μπορεί να γραφεί ως εξής:

Πίνακας Β.2.XVI: Αντιστοιχία σταθεράς Weibull b και σταθεράς Mittag-Leffler α που προκύπτει από τη μεταξύ τους συσχέτιση και πιθανολογούμενος μηχανισμός αποδέσμευσης με βάση τα δεδομένα των Papadopolou et al. (Papadopolou et al., 2006).

Σταθερά Weibull b	Σταθερά Mittag-Leffler α	Μηχανισμός
$b < 0,35$	$\alpha < 0,65$	Δεν παρατηρείται στη βιβλιογραφία (πέρα από μια περίπτωση)
$b \sim 0,35-0,39$	$\alpha \sim 0,65-0,7$	Διάχυση σε μορφοκλασματικό υπόστρωμα μορφολογικά παρόμοιο με το σύμπλεγμα διήθησης (percolation cluster)
$0,39 < b < 0,69$	$0,7 < \alpha < 0,8$	Διάχυση σε μορφοκλασματικό ή διαταραγμένο υπόστρωμα διαφορετικό από το σύμπλεγμα διήθησης (percolation cluster)
$b \sim 0,69-0,75$	$\alpha \sim 0,8-0,85$	Διάχυση σε Ευκλείδειους χώρους
$0,75 < b < 1$	$0,85 < \alpha < 1$	Διάχυση σε Ευκλείδειους χώρους με συμβολή άλλου μηχανισμού
$b = 1$	$\alpha = 1$	Κλασική πρωτοταξική αποδέσμευση σύμφωνα με το νόμο του Fick
$b > 1$	$\alpha > 1$	Σιγμοειδής καμπύλη ενδεικτική σύνθετου μηχανισμού αποδέσμευσης.

B.2.3.4. Αποτελέσματα σε *in vivo* πρωτοταξικές διαδικασίες

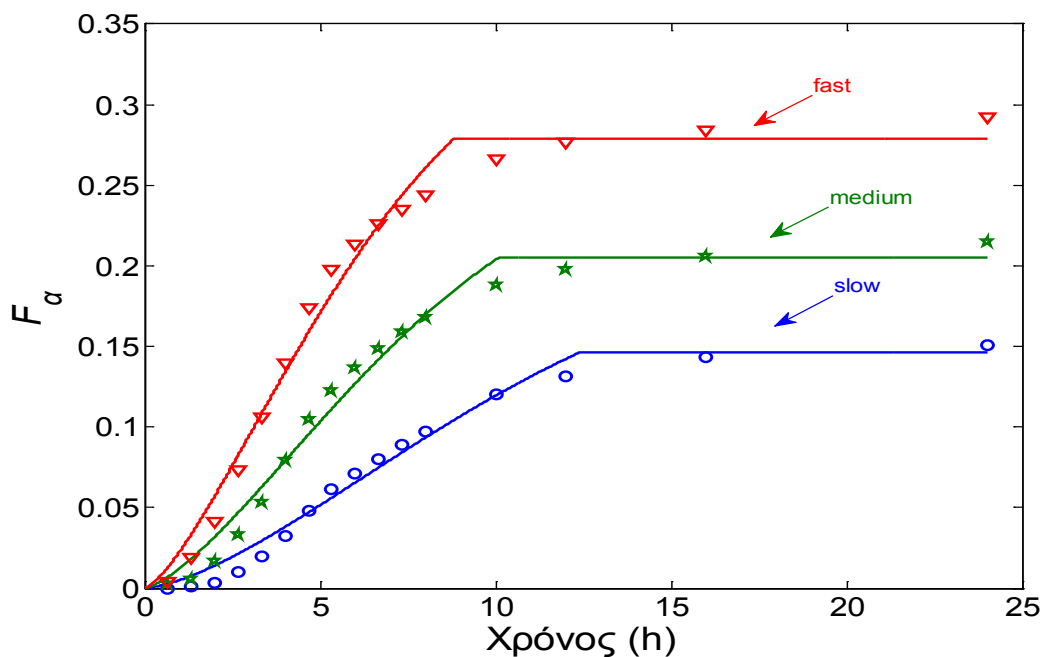
B.2.3.4.1. Προσομοιώσεις

Είναι προφανές ότι τα αποτελέσματα της *in vivo* πρωτοταξικής αποδέσμευσης σε περιπτώσεις κατά τις οποίες η αποδέσμευση είναι το περιοριστικό βήμα της εμφάνισης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία, είναι αντίστοιχα των *in vitro* προσομοιώσεων αποδέσμευσης. Ως εκ τούτου τα αποτελέσματα σε αυτό το κεφάλαιο είναι αντίστοιχα του κεφαλαίου Β.2.3.3.1, σελ. 258.

B.2.3.4.2. Προσαρμογή σε πειραματικά *in vivo* δεδομένα

Οι προσαρμογές τις κλασματικής πρωτοταξικής κινητικής σε δεδομένα της βιβλιογραφίας πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας διάφορες εκδοχές της σχέσης Β.2.43. Τα δεδομένα αντλήθηκαν από τους Balan et al. και αφορούσαν στην εγκαθίδρυση *IVIVC* για μια φαρμακοτεχνική μορφή παρατεταμένης αποδέσμευσης που περιείχε μεθορμίνη (Balan et al., 2001).

Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα χωρίς τη χρήση χρόνου υστέρησης και χωρίς περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγίσης α .

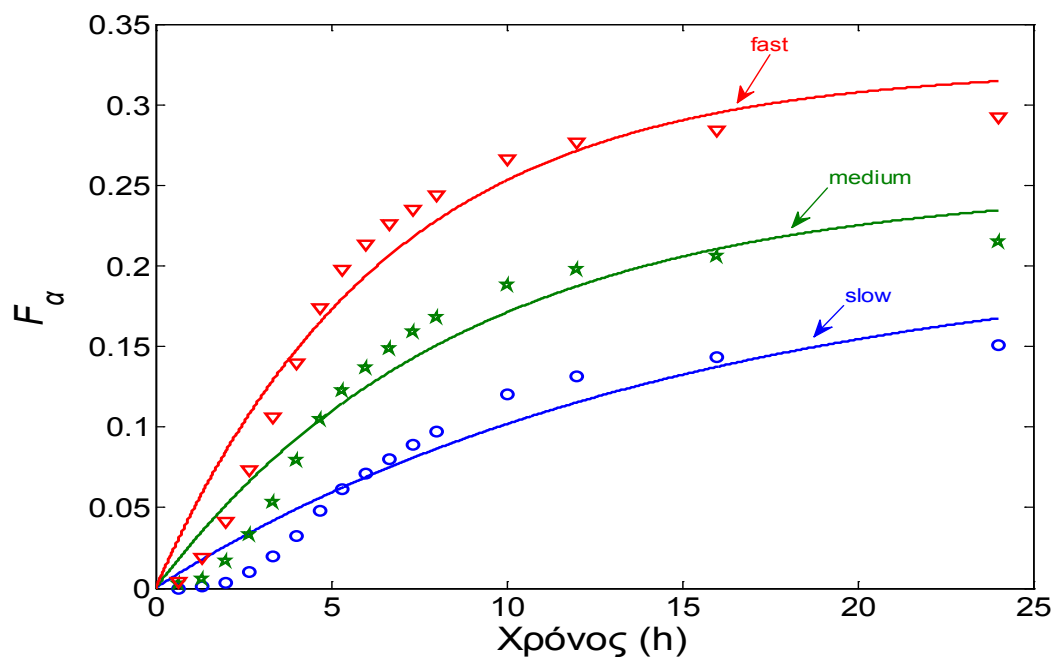


Σχήμα B.2.29: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. χωρίς τη χρήση χρόνου υστέρησης και χωρίς περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγίσισης α (Balan et al., 2001).

Πίνακας B.2.XVII: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. χωρίς τη χρήση χρόνου υστέρησης και χωρίς περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγίσισης α (Balan et al., 2001).

Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι			
	α	$k_{1,2}$	F	r^2
Slow	1,5202	0,1318	0,1460	0,9528
Medium	1,4379	0,1679	0,2049	0,9764
Fast	1,3940	0,1974	0,2789	0,9866

Ακολουθούν τα αποτελέσματα στα ίδια δεδομένα χωρίς τη χρήση χρόνου υστέρησης και με περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγίσισης α , με $\alpha < 1$.

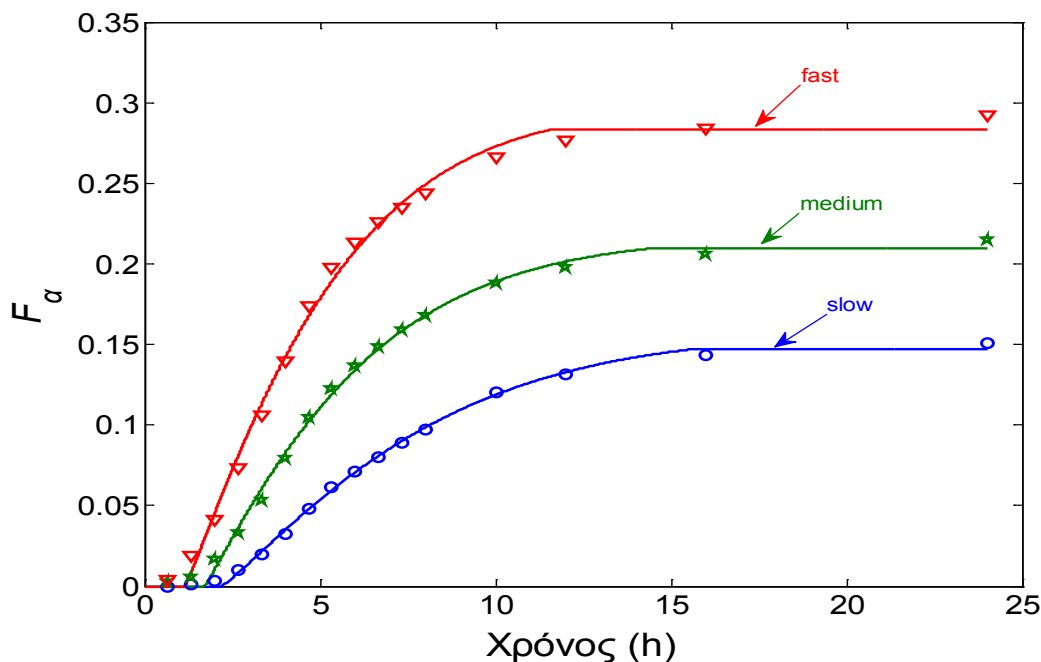


Σχήμα B.2.30: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. χωρίς τη χρήση χρόνου υστέρησης και με περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α , με $\alpha < 1$ (Balan et al., 2001).

Πίνακας B.2.XVIII: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. χωρίς τη χρήση χρόνου υστέρησης και με περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α , με $\alpha < 1$ (Balan et al., 2001).

Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι			
	α	$k_{1,2}$	F	r^2
Slow	1,0000	0,0658	0,2109	0,7888
Medium	1,0000	0,1148	0,2503	0,8943
Fast	1,0000	0,1529	0,3229	0,9399

Ακολουθούν τα αποτελέσματα στα ίδια δεδομένα με τη χρήση χρόνου υστέρησης και χωρίς περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α .

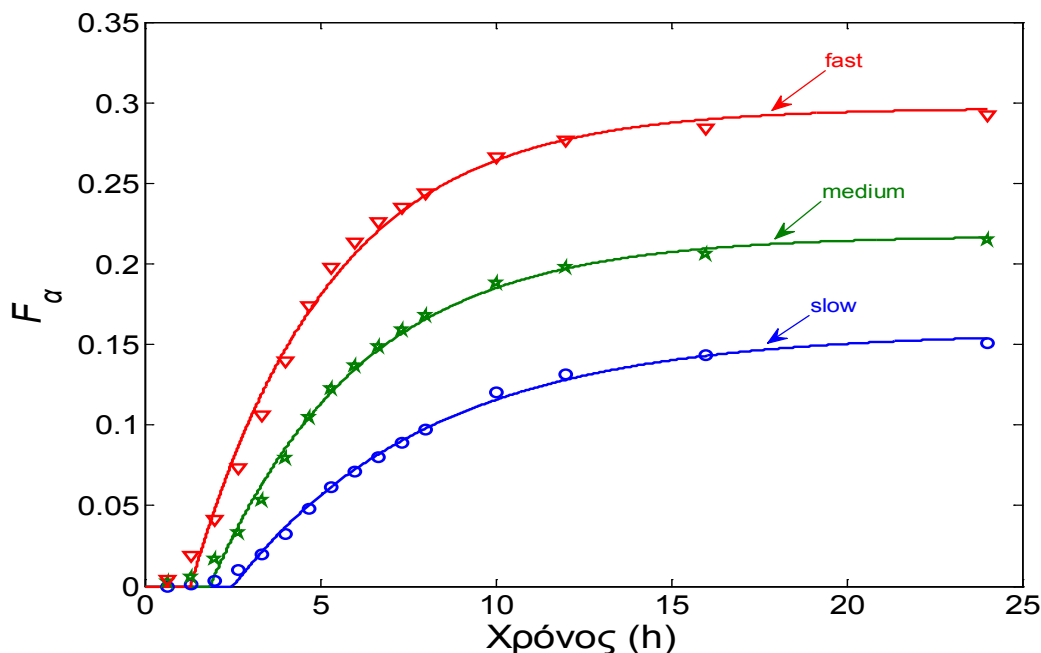


Σχήμα Β.2.31: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. με τη χρήση χρόνου υστέρησης και χωρίς περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγίσις α (Balan et al., 2001).

Πίνακας Β.2.XIX: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης Β.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. με τη χρήση χρόνου υστέρησης και χωρίς περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγίσις α (Balan et al., 2001).

Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι				
	α	$k_{1,2}$	F	t_{lag}	r^2
Slow	1,1482	0,1846	0,1469	2,2010	0,9855
Medium	1,0920	0,2347	0,2094	1,7057	0,9927
Fast	1,1219	0,2554	0,2832	1,1412	0,9959

Τέλος ακολουθούν τα αποτελέσματα στα ίδια δεδομένα με τη χρήση χρόνου υστέρησης και με περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγίσις α , με $\alpha < 1$.



Σχήμα B.2.32: Μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. με τη χρήση χρόνου υστέρησης και με περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α , με $\alpha < 1$ (Balan et al., 2001).

Πίνακας B.2.XX: Αποτελέσματα μη γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης της σχέσης B.2.43 στα πειραματικά δεδομένα των Balan et al. με τη χρήση χρόνου υστέρησης και με περιορισμό στις τιμές του βαθμού παραγωγής α , με $\alpha < 1$ (Balan et al., 2001).

Συνταγή	Εκτιμώμενες παράμετροι				
	α	$k_{1,2}$	F	t_{lag}	r^2
Slow	1,0000	0,1761	0,1576	2,5158	0,9762
Medium	1,0000	0,2326	0,2175	1,8619	0,9881
Fast	1,0000	0,2533	0,2967	1,3084	0,9932

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τις παραπάνω προσαρμογές είναι τα ακόλουθα:

- Οι καλύτερες προσαρμογές προκύπτουν με τη χρήση χρόνου υστέρησης και χωρίς περιορισμό στις τιμές της σταθεράς α . Αυτό συμβαίνει διότι η προσθήκη επιπλέον παραμέτρων, όπως για παράδειγμα του χρόνου υστέρησης, προσδίδει επιπλέον ευελιξία στην προσαρμογή, δίνοντας της τη δυνατότητα της καλύτερης προσαρμογής στα πειραματικά δεδομένα. Επιπλέον η χρήση του χρόνου υστέρησης έχει και φυσιολογική σημασία, καθώς ανταποκρίνεται στο χρόνο που

απαιτείται για φτάσει το σκεύασμα στην περιοχή απορρόφησης και εν τέλει στη γενική κυκλοφορία.

- Οι χειρότερες προσαρμογές προκύπτουν χωρίς τη χρήση χρόνου υστέρησης και με περιορισμό στις τιμές του α . Η απουσία χρόνου υστέρησης στερεί από την καμπύλη τη δυνατότητα να προσαρμοστεί στο αρχικό κομμάτι των πειραματικών δεδομένων, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις που το άνω όριο της σταθεράς α ορίστηκε ίσο με τη μονάδα, η τιμή της σταθεράς προσδιορίστηκε στο άνω όριο.
- Η δυνατότητα της σταθεράς α να αποκτά τιμές μεγαλύτερες της μονάδας δίνει τη δυνατότητα στην καμπύλη να προσαρμόζεται καλύτερα στο αρχικό σιγμοειδές τμήμα, το οποίο σε συνδυασμό με τη χρήση του χρόνου υστέρησης δίνει εξαιρετικά αποτελέσματα.
- Αν και η δυνατότητα των πρωτοταξικών κλασματικών σχέσεων να αποκτούν τιμές $\alpha > 1$ τους προσδίδει εξαιρετικά πλεονεκτήματα, εντούτοις εκκρεμεί η φυσική ερμηνεία αυτού του φαινομένου. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να ρυθμιστεί με τη χρήση κατάλληλων περιορισμών για να αποφευχθεί η ταλάντωση.
- Γενικά επιβεβαιώνεται η χρησιμότητα των κλασματικών παραγώγων για την ερμηνεία και πρόβλεψη της κινητικής των πορειών απορρόφησης στις *in vivo* συνθήκες. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο, δεδομένου ότι ο κλασματικός λογισμός αποτελεί χρήσιμο εργαλείο σε ετερογενή περιβάλλοντα, όπως αυτό του γαστρεντερικού αυλού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β.3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΣΤΙΣ *IN VITRO* - *IN VIVO* ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ

Β.3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων και των μη γραμμικών προσαρμογών των κλασματικών εξισώσεων που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, έδειξαν ότι η κινητική των πορειών απορρόφησης, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* μπορεί να ερμηνευτεί και να περιγραφεί με τη χρήση διαφορικών εξισώσεων κλασματικών παραγώγων (βλ. Κεφάλαιο Β.2: Εφαρμογή των κλασματικών παραγώγων στην ανάλυση της κινητικής των διαδικασιών απορρόφησης, σελ. 217). Επιπλέον η τιμή της σταθεράς α είναι ενδεικτική της ανομοιογένειας του συστήματος (Metzler and Klafter, 2000). Θεωρητικά όσο η τιμή της σταθεράς α πλησιάζει τη μονάδα τόσο περισσότερο ομοιογενές είναι το σύστημα και η κινητική ομοιάζει με κλασική μηδενοταξική ή πρωτοταξική. Εντούτοις οι προσαρμογές απέδειξαν ότι στις περισσότερες των περιπτώσεων η τιμή αυτή απέχει από τη μονάδα.

Επίσης οι υδροδυναμικές συνθήκες στο μικροπεριβάλλον στο οποίο λαμβάνει χώρα η αποδέσμευση/διάλυση διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το αν η διαδικασία πραγματοποιείται *in vitro* ή *in vivo*. Είναι δεδομένο ότι οι συνθήκες που επικρατούν σε ένα ποτήρι ελέγχου του ρυθμού διάλυσης κατά την εκτέλεση ενός πειράματος, αποτελούν υπεραπλούστευση των πραγματικών συνθηκών που επικρατούν *in vivo*. Επιπλέον η πολυπλοκότητα των *in vivo* συνθηκών ενισχύεται από την ενδο- και διατομική μεταβλητότητα που παρατηρείται κατά τη χορήγηση φαρμακοτεχνικών σκευασμάτων (Weitschies et al., 2005).

Συνδυάζοντας τις δύο ανωτέρω παρατηρήσεις, δηλαδή την επίδραση της ομοιογένειας του συστήματος στην κινητική των πορειών της απορρόφησης και την διαφοροποίηση μεταξύ *in vitro* και *in vivo* συνθηκών, προκύπτουν ενδιαφέροντες προβληματισμοί για το πεδίο στο οποίο βρίσκει κατεξοχήν εφαρμογή η συσχέτιση μεταξύ των *in vitro* και των *in vivo* συνθηκών, δηλαδή τις *in vitro-in vivo* συσχετίσεις (IVIVC). Στην παρούσα ενότητα θα μελετηθεί η επίδραση της διαφοράς των *in vitro* και των *in vivo* συνθηκών στο επίπεδο της ομοιογένειας του μικροπεριβάλλοντος της διάλυσης ή αποδέσμευσης στην εφαρμογή και εγκαθίδρυση των *in vitro-in vivo* συσχετίσεων. Η μελέτη θα περιοριστεί σε επιπέδου Α IVIVC, καθώς αυτές αποτελούν και το υψηλότερο επίπεδο

συσχέτισης, και ιδιαίτερο βάρος θα δοθεί σε κλασματικές μηδενοταξικές διαδικασίες, καθώς οι *in vitro-in vivo* συσχετίσεις αφορούν κυρίως φαρμακοτεχνικές μορφές ελεγχόμενης αποδέσμευσης, οι οποίες συνήθως ακολουθούν μηδενοταξική κινητική.

B.3.2. ΘΕΩΡΙΑ

B.3.2.1. Μηδενοταξικές διαδικασίες

Οι *in vitro-in vivo* συσχετίσεις απεικονίζουν το κλάσμα της απορροφούμενης δόσης (F_a) ως συνάρτηση του κλάσματος της αποδεσμευμένης δόσης (F_r). Πρόκειται δηλαδή για μια παραμετρική απεικόνιση δύο εξαρτημένων μεταβλητών, οι οποίες εξαρτώνται από μια τρίτη ανεξάρτητη μεταβλητή, το χρόνο. Επομένως για να απεικονιστεί μια *in vitro-in vivo* συσχέτιση πρέπει να εξαλειφθεί ο χρόνος από τις σχέσεις που αποδίδουν το κλάσμα της αποδεσμευμένης και της απορροφούμενης χορηγούμενης δόσης.

Από τις εξισώσεις B.2.24 και B.2.26, λύνοντας την B.2.24 ως προς χρόνο και αντικαθιστώντας στην B.2.26, προκύπτει η ακόλουθη σχέση:

$$F_a = k_{0,2} \left(\frac{F_r}{k_{0,1}} \right)^{\alpha_2/\alpha_1} \quad \text{B.3.1}$$

Η παραπάνω σχέση αποδίδει το κλάσμα της απορροφούμενης δόσης σε σχέση με το κλάσμα της αποδεσμευμένης δόσης, συνδέει δηλαδή μια *in vitro* με μια *in vivo* μεταβλητή. Η εξαγωγή της σχέσης B.3.1 προϋποθέτει την ταυτόχρονη χρονική εξέλιξη των *in vitro* και των *in vivo* διεργασιών. Η προϋπόθεση αυτή δεν ισχύει πάντοτε, δεδομένου ότι ενδέχεται να υπάρχει χρόνος υστέρησης (t_{lag}) *in vivo* ή η *in vivo* διαδικασία ενδέχεται να εξελίσσεται με διαφορετικό ρυθμό. Το πρώτο πρόβλημα αντιμετωπίζεται με τη μετατόπιση της καμπύλης στον άξονα του χρόνου (time shifting) ενώ το δεύτερο με την κλιμάκωση του χρόνου (time scaling).

Η εξίσωση B.3.1 απλοποιείται περαιτέρω στην ακόλουθη σχέση:

$$F_a = \mu F_r^\lambda \quad \text{B.3.2}$$

Όπου $\lambda = \alpha_2/\alpha_1$ και $\mu = k_{0,2} / k_{0,1}^{\alpha_2/\alpha_1}$. Η σταθερά λ αντιπροσωπεύει την ομοιότητα μεταξύ των *in vitro* και των *in vivo* συνθηκών. Είναι προφανές ότι τιμές της σταθεράς λ πλησίον της μονάδας προκύπτουν από αντιστοιχίες μεταξύ του *in vitro* και του *in vivo* μικροπεριβάλλοντος όσον αφορά τις υδροδυναμικές συνθήκες. Για $\lambda=1$ οι συνθήκες είναι ίδιες και η απεικόνιση της σχέσης B.3.2 είναι ευθεία γραμμή. Αντιθέτως για τιμές $\lambda \neq 1$, η απεικόνιση της σχέσης B.3.2 είναι καμπύλη.

Στην Β.3.2 μπορούμε να εισάγουμε μια σταθερά β που αντιπροσωπεύει την τομή στον άξονα των y .

$$F_{\alpha} = \mu F_r^{\lambda} - \beta \quad \text{B.3.3}$$

Η σταθερά β εξυπηρετεί το σκοπό της χρονικής μετάθεσης. Επειδή κατά τις *in vivo* διεργασίες παρατηρείται συχνά χρόνος υστέρησης, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα κατά την απεικόνιση των *in vitro-in vivo* συσχετίσεων να παρατηρείται σημαντική τομή στον άξονα των y (F_{α}), η οποία συνήθως έχει αρνητική τιμή. Κατά την εξαγωγή των σχέσεων Β.3.2 και Β.3.3 δε χρησιμοποιήθηκε τεχνική μετατόπισης του χρόνου, επομένως είναι αναμενόμενο να παρατηρείται τομή στον άξονα των y κατά την εφαρμογή των σχέσεων σε πειραματικά δεδομένα.

Η σχέση Β.3.3 εξαρτάται από τρεις παραμέτρους, τις σταθερές λ , μ και β . Η σταθερά λ καθορίζει την καμπυλότητα της απεικόνισης. Για $\lambda=1$ η απεικόνιση είναι ευθεία γραμμή, για $\lambda<1$ στρέφει τα κοίλα προς τα κάτω ενώ για $\lambda>1$ στρέφει τα κοίλα προς τα άνω. Η σταθερά μ καθορίζει την κλίση της καμπύλης, ενώ η σταθερά β καθορίζει την τομή της στον άξονα των y .

B.3.2.2. Πρωτοταξικές διαδικασίες

Οι πρωτοταξικές διαδικασίες είναι χαρακτηριστικές των συστημάτων άμεσης αποδέσμευσης. Δεδομένου ότι η εγκαθίδρυση *in vitro-in vivo* συσχετίσεων σε συστήματα άμεσης αποδέσμευσης είναι εξαιρετικά δύσκολη έως αδύνατη, δε δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στον τομέα αυτό. Επιπλέον λόγω της πολυπλοκότητας της σχέσης Mittag-Leffler, η οποία καθορίζει τις πρωτοταξικές διεργασίες, δεν ήταν δυνατή η εξαγωγή μιας άμεσης σχέσης η οποία να περιγράφει τις *in vitro-in vivo* συσχετίσεις κατ' αντιστοιχία με τις σχέσεις Β.3.2 και Β.3.3. Εντούτοις τα χαρακτηριστικά μιας πιθανής *in vitro-in vivo* συσχέτισης στην περίπτωση μιας πρωτοταξικής διεργασίας μελετήθηκαν κατά το στάδιο των προσομοιώσεων.

B.3.3. ΜΕΘΟΔΟΙ

B.3.3.1. Προσομοιώσεις

Οι προσομοιώσεις των *in vitro-in vivo* συσχετίσεων πραγματοποιήθηκαν σε δύο στάδια. Αρχικά προσομοιώθηκαν απεικονίσεις *IVIVC* με τη χρήση παραμετρικών διαγραμμάτων. Κατά το στάδιο αυτό απεικονίστηκαν οι εξαρτημένες μεταβλητές F_r και F_a στο ίδιο διάγραμμα στους άξονες x και y αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκαν οι κλασματικές μηδενοταξικές και πρωτοταξικές σχέσεις που έχουν περιγραφεί στα κεφάλαια B.2.2 και B.2.3. Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Wolfram Mathematica 7.0 (Wolfram Research, Inc.). Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τιμές παραμέτρων για να μελετηθεί η επίδρασή τους στη μορφή της συσχέτισης. Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των καμπυλών παρουσιάζονται στο Παράρτημα III. Ο στόχος των προσομοιώσεων είναι η μελέτη των *in vitro-in vivo* απεικονίσεων στην περίπτωση όπου επικρατούν διαφορετικές υδροδυναμικές συνθήκες μεταξύ των *in vitro* και των *in vivo* συνθηκών, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τις τιμές των σταθερών α .

Κατά το δεύτερο στάδιο των προσομοιώσεων απεικονίστηκε γραφικά η σχέση B.3.3 με τη χρήση του λογισμικού Wolfram Mathematica 7.0 (Wolfram Research, Inc.). Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τιμές παραμέτρων για να μελετηθεί η επίδρασή τους στη μορφή της καμπύλης. Στόχος ήταν η μελέτη της δυνατότητας της σχέσης B.3.3 να περιγράφει και να ερμηνεύει τις *in vitro-in vivo* συσχετίσεις.

B.3.3.2. Προσαρμογή σε πειραματικά δεδομένα

Η σχέση B.3.3 προσαρμόστηκε σε πειραματικά δεδομένα που προήλθαν από τη βιβλιογραφία (Corrigan et al., 2003; Dutta et al., 2005; Ravishankar et al., 2006) και εκτιμήθηκαν οι τιμές των παραμέτρων λ , μ και β . Τα βιβλιογραφικά δεδομένα επιλέχθηκαν με κριτήριο την μη γραμμικότητα των απεικονίσεων.

Στην περίπτωση των δεδομένων του Dutta et al. πραγματοποιήθηκε σύγκριση των πειραματικών δεδομένων με τα εκτιμώμενα από τη σχέση που περιγράφει την *in vitro-in vivo* συσχέτιση. Η επικύρωση των αποτελεσμάτων προέκυψε από την συνέλιξη του *in vitro* ρυθμού εισόδου του φαρμάκου στον οργανισμό, της *IVIVC* σχέσης και της χαρακτηριστικής συνάρτησης του συστήματος $\exp(-k_{el}t)$. Για τον υπολογισμό του *in*

in vivo ρυθμού εισόδου χρησιμοποιήθηκαν τα *in vitro* δεδομένα, τα οποία με τη χρήση της προσαρμοσμένης σχέσης B.3.3 στα πειραματικά δεδομένα, μετατράπηκαν στα αντίστοιχα *in vivo* δεδομένα. Στη συνέχεια μπορεί να υπολογιστεί ο σταθερός ρυθμός εισόδου μεταξύ δύο χρονικών σημείων που έχει πραγματοποιηθεί η δειγματοληψία *in vitro* και να εισαχθεί στη διαδικασία της συνέλιξης. Η συνέλιξη πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού Mathematica®. Η τελική σχέση που προκύπτει και δίνει τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα C_b σε σχέση με τα πειραματικά *in vitro* σημεία F_{rj} στα χρονικά σημεία τ_j , τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους k_{el} , V_d , τη χορηγούμενη δόση Q_0 και τις παραμέτρους από την *in vitro-in vivo* συσχέτιση λ και μ είναι η ακόλουθη (O'Hara et al., 2001; Dutta et al., 2005; Kytariolos et al., 2010):

$$C_b(t) = \frac{Q_0}{V_d} \sum_{j=1}^{m-1} \frac{\mu(F_{rj+1}^\lambda - F_{rj}^\lambda)}{k_{el}(\tau_{j+1} - \tau_j)} (e^{-k_{el}(t-\tau_{j+1})H(t-\tau_{j+1})} - e^{-k_{el}(t-\tau_j)H(t-\tau_j)}) \quad \text{B.3.4}$$

Όπου m είναι ο συνολικός αριθμός των *in vitro* δεδομένων και $H(x)$ είναι η κλιμακωτή συνάρτηση, η οποία παίρνει τιμή 1 για $x \geq 0$ και 0 για $x < 0$.

Ο παραπάνω τρόπος αποτελεί μια ανεξάρτητη από το μοντέλο προσέγγιση για την εκτίμηση των *in vivo* δεδομένων. Μια άλλη προσέγγιση αποτελεί η συνέλιξη του *in vivo* ρυθμού εισόδου που έχει προκύψει από τα *in vitro* πειραματικά δεδομένα, χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα της προσαρμογής του νόμου της δύναμης του χρόνου, δηλαδή της κλασματικής μηδενοταξικής σχέσης. Σε αυτή την περίπτωση η σχέση που προκύπτει και δίνει τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα C_b είναι αντίστοιχη της σχέσης B.2.32. Το κλάσμα της απορροφούμενης δόσης με τη χρήση των σχέσεων B.3.3 και B.2.20 μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$F_\alpha = \mu \left[\frac{k'_{0,1} t^{\alpha_1}}{\Gamma(1 + \alpha_1)} \right]^\lambda - \beta \quad \text{B.3.5}$$

Εναλλακτικά με τη χρήση των σχέσεων B.3.3 και B.2.24 μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$F_\alpha = \mu (k_{0,1} t^{\alpha_1})^\lambda - \beta \quad \text{B.3.6}$$

Οι δύο παραπάνω σχέσεις δίνουν το κλάσμα της απορροφούμενης δόσης. Για να υπολογίσουμε το ρυθμό εισόδου του φαρμάκου στην κυκλοφορία, δηλαδή τη συνάρτηση εισόδου του συστήματος, αρχικά θα πρέπει να πολλαπλασιαστεί το δεξί

σκέλος τους με τη χορηγούμενη δόση (Q_0), και στη συνέχεια υπολογίζεται η πρώτη παράγωγος. Επομένως η συνάρτηση εισόδου είναι η:

$$I(t) = Q_0 \alpha_1 \lambda \mu k_{0,1}^{\lambda} t^{\alpha_1 \lambda - 1} \quad \text{B.3.7}$$

Τελικά η συνέλιξη της B.3.7 με τη χαρακτηριστική συνάρτηση του συστήματος και η διαίρεση του αποτελέσματος με τον όγκο κατανομής, δίνει τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα σε συνάρτηση με το χρόνο:

$$C_b(t) = \begin{cases} \frac{Q_0}{V_d} \alpha_1 e^{-k_{el} t} k_{0,1}^{\lambda} (-k_{el})^{-\alpha_1 \lambda} \lambda \mu [\Gamma(\alpha_1 \lambda) - \Gamma(\alpha_1 \lambda, -k_{el} t)] & , t < T \\ R(T) e^{-k_{el}(t-T)} & , t \geq T \end{cases} \quad \text{B.3.8}$$

Όπου T το χρονικό σημείο στο οποίο σταματάει η αποδέσμευση. Η σχέση B.3.8 μπορεί να απλοποιηθεί ελαφρώς στην ακόλουθη:

$$C_b(t) = \begin{cases} \frac{Q_0}{V_d} \alpha_1 e^{-k_{el} t} k_{0,1}^{\lambda} (-k_{el})^{-\alpha_1 \lambda} \lambda \mu [\gamma(\alpha_1 \lambda, -k_{el} t)] & , t < T \\ R(T) e^{-k_{el}(t-T)} & , t \geq T \end{cases} \quad \text{B.3.9}$$

Όπου $\gamma(x, z)$ η κάτω ατελής συνάρτηση Γάμμα.

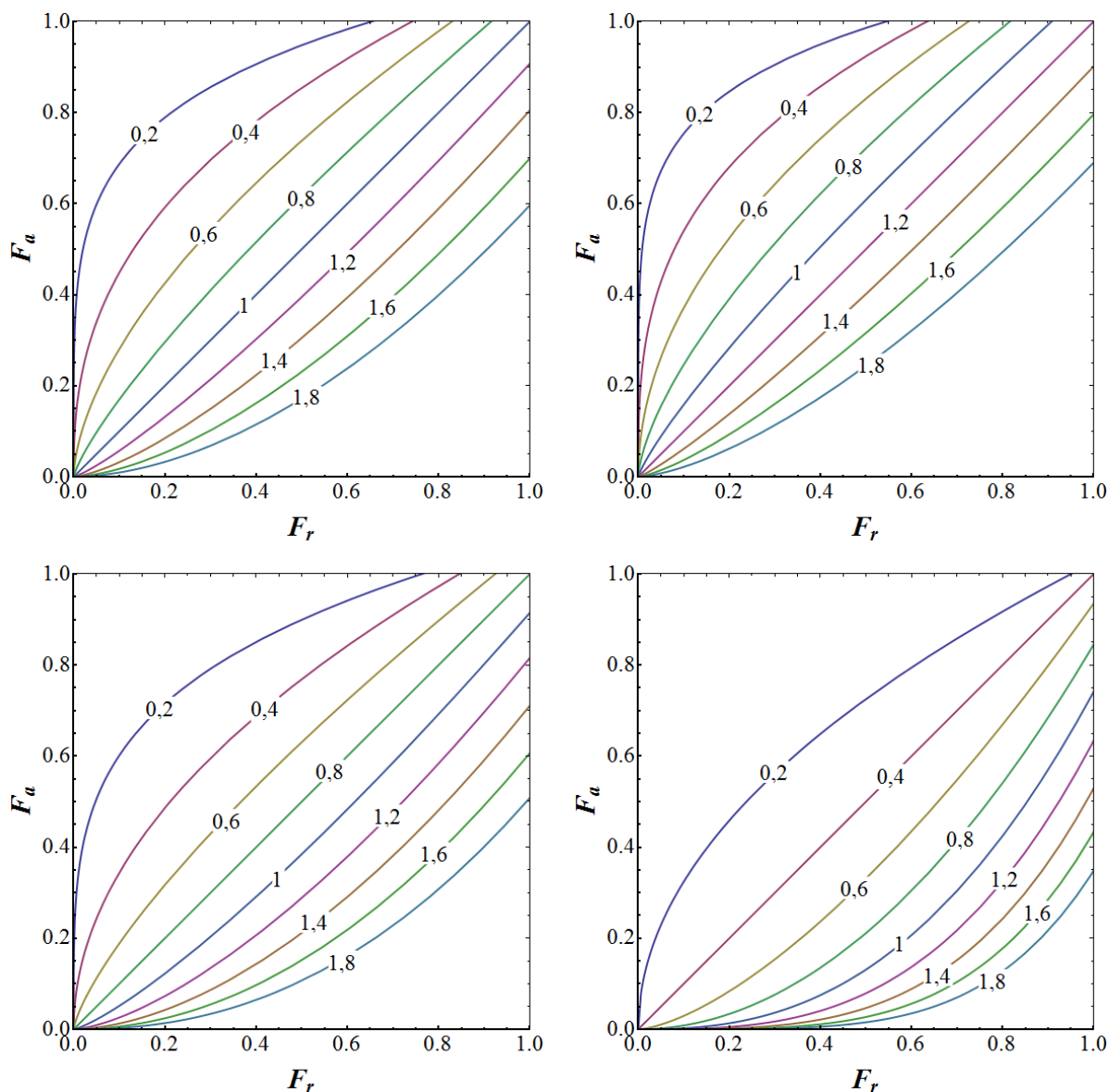
Τα σημεία που χρησιμοποιήθηκαν για τις προσαρμογές προήλθαν από ψηφιοποίηση των διαγραμμάτων της βιβλιογραφίας με χρήση του προγράμματος GetData Graph Digitizer. Τα δεδομένα εξήχθησαν σε πίνακα Excel (Microsoft Office 2007), και στη συνέχεια σε Tab-delimited αρχείο κειμένου (κατάληξης txt). Τα αρχεία αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή των δεδομένων στο πρόγραμμα Mathematica με τη χρήση της ρουτίνας "ReadList". Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με χρήση της εντολής "NonlinearModelFit". Υπολογίστηκαν οι τιμές των παραμέτρων, καθώς και τα τυπικά σφάλματα (SE), τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) και ο συντελεστής προσδιορισμού r^2 .

B.3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

B.3.4.1. Αποτελέσματα στις μηδενοταξικές διαδικασίες

B.3.4.1.1. Προσομοιώσεις

Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων με τη χρήση παραμετρικών διαγραμμάτων. Συνολικά παρουσιάζονται τέσσερα διαφορετικά *in vitro* σενάρια, με τέσσερις διαφορετικές τιμές της σταθεράς α_1 και οι δυνατοί συνδυασμοί που προκύπτουν με τις διαφορετικές τιμές της *in vivo* σταθεράς α_2 . Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη χρήση των σχέσεων B.2.20 και B.2.23.

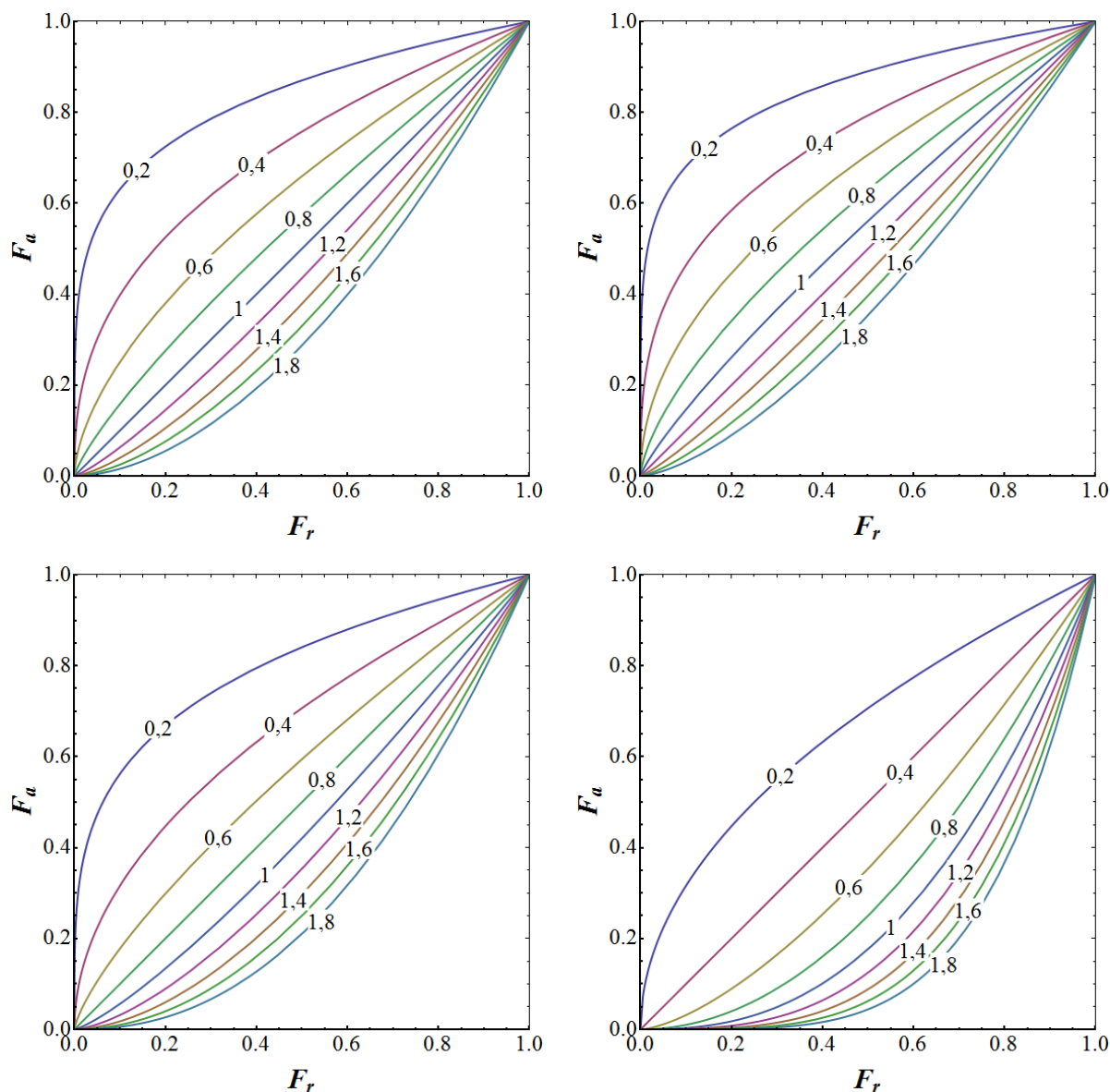


Σχήμα Β.3.1: Προσομοίωση IVIVC επιπέδου Α στην περίπτωση κλασματικής μηδενοταξικής κινητικής με τη χρήση των σχέσεων Β.2.20 και Β.2.23 για $k'_{0,1} = k'_{0,2} = 1$ (χρόνος) $^{-\alpha}$. Οι *in vitro* συνθήκες είναι: $\alpha_1=1$ (πάνω αριστερά), $\alpha_1=1,2$ (πάνω δεξιά), $\alpha_1=0,8$ (κάτω αριστερά) και $\alpha_1=0,4$ (κάτω δεξιά). Οι αριθμοί στα γραφήματα αφορούν στις διαφορετικές τιμές του α_2 *in vivo*.

Σε όλα τα σενάρια που μελετήθηκαν γίνεται εμφανές ότι σε περίπτωση κατά την οποία οι τιμές των σταθερών α_1 και α_2 διαφέρουν, η συσχέτιση μεταξύ του *in vitro* αποδεσμευμένου και του *in vivo* απορροφημένου κλάσματος είναι μη γραμμική, με το βαθμό καμπυλότητας να είναι ανάλογος της διαφοράς των δύο σταθερών. Στην περίπτωση όπου $\alpha_1=\alpha_2$ η απεικόνιση είναι ευθεία γραμμή, η οποία διέρχεται από την αρχή των αξόνων.

Εντούτοις οι παραπάνω απεικονίσεις παρουσιάζουν το ελάττωμα ότι δε συγκλίνουν στη μονάδα, γεγονός το οποίο αντιμετωπίζεται με τη χρήση των απλούστερων

σχέσεων B.2.24 και B.2.26. Τα αποτελέσματα των προσομοιωμένων *in vitro-in vivo* συσχετίσεων με τη χρήση των σχέσεων B.2.24 και B.2.26 παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα.

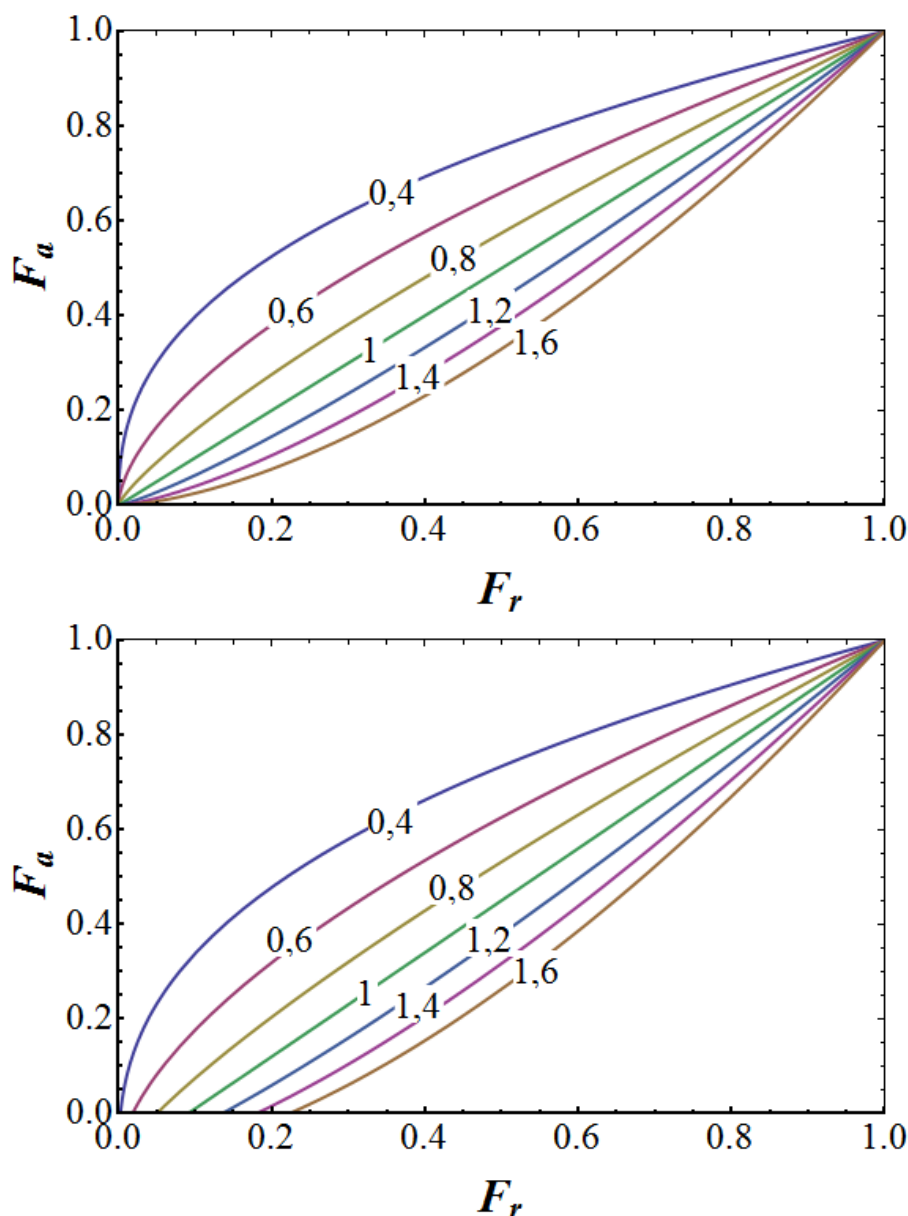


Σχήμα Β.3.2: Προσομοίωση IVIVC επιπέδου Α στην περίπτωση κλασματικής μηδενοταξικής κινητικής με τη χρήση των σχέσεων B.2.24 και B.2.26 για $k_{0,1}=k_{0,2}=1$ (χρόνος)^{-α}. Οι *in vitro* συνθήκες είναι: $\alpha_1=1$ (πάνω αριστερά), $\alpha_1=1,2$ (πάνω δεξιά), $\alpha_1=0,8$ (κάτω αριστερά) και $\alpha_1=0,4$ (κάτω δεξιά). Οι αριθμοί στα γραφήματα αφορούν στις διαφορετικές τιμές του α_2 *in vivo*.

Και σε αυτή την περίπτωση είναι εμφανές ότι όταν οι τιμές των σταθερών α_1 και α_2 διαφέρουν, η συσχέτιση μεταξύ του *in vitro* αποδεσμευμένου και του *in vivo* απορροφημένου κλάσματος είναι μη γραμμική, με το βαθμό καμπυλότητας να είναι ανάλογος της διαφοράς των δύο σταθερών. Στην περίπτωση όπου $\alpha_1=\alpha_2$ η απεικόνιση είναι ευθεία γραμμή, η οποία διέρχεται από την αρχή των αξόνων.

Το συμπέρασμα που προκύπτει από τις παραπάνω προσομοιώσεις είναι ότι οι *in vitro*-*in vivo* συσχετίσεις μπορούν να είναι μη γραμμικές σε περίπτωση κατά την οποία η αποδέσμευση ακολουθεί κλασματική μηδενοταξική κινητική και παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των *in vitro* και των *in vivo* υδροδυναμικών συνθηκών στο μικροπεριβάλλον που λαμβάνει χώρα η αποδέσμευση. Οι διαφορές αυτές αποτυπώνονται σε διαφορετικές τιμές των σταθερών α , οι οποίες αντιπροσωπεύουν την ομοιογένεια του μικροπεριβάλλοντος που περιβάλλει τη φαρμακοτεχνική μορφή. Δεδομένου ότι οι *in vitro* υδροδυναμικές συνθήκες διαφέρουν σημαντικά από τις αντίστοιχες *in vivo*, είναι λογικό να αναμένονται μη γραμμικές συσχετίσεις. Εντούτοις οι περισσότεροι ερευνητές επιδιώκουν να εγκαθιδρύσουν γραμμικές συσχετίσεις, θεωρώντας ότι αντιπροσωπεύουν καλύτερη συσχέτιση. Γίνεται όμως αντιληπτό ότι οι γραμμικές συσχετίσεις είναι εφικτές μόνο σε δύο περιπτώσεις. Η πρώτη περίπτωση είναι οι υδροδυναμικές συνθήκες *in vitro* και *in vivo* να είναι αντίστοιχες, κάτι το οποίο είναι δύσκολο να επιτευχθεί. Η δεύτερη περίπτωση είναι η φαρμακοτεχνική μορφή να αποδεσμεύει τη δραστική πάντοτε κατά τον ίδιο τρόπο, ανεξάρτητα από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Δυστυχώς όμως αυτό απαιτεί μια σειρά από προϋποθέσεις, οι οποίες δύσκολα ισχύουν.

Το επόμενο βήμα στο στάδιο των προσομοιώσεων είναι η γραφική απεικόνιση των σχέσεων Β.3.2 και Β.3.3, για διάφορες τιμές των σταθερών μ , λ και β .



Σχήμα Β.3.3: Προσομοίωση IVIVC επιπέδου Α με χρήση των σχέσεων Β.3.2 (άνω) και Β.3.3 (κάτω). Οι αναγραφόμενες τιμές αντιστοιχούν στις τιμές της σταθεράς λ , ενώ οι τιμές των υπόλοιπων παραμέτρων είναι $\mu=1$ (άνω), $\mu=1,1$ και $\beta=-0,1$ (κάτω).

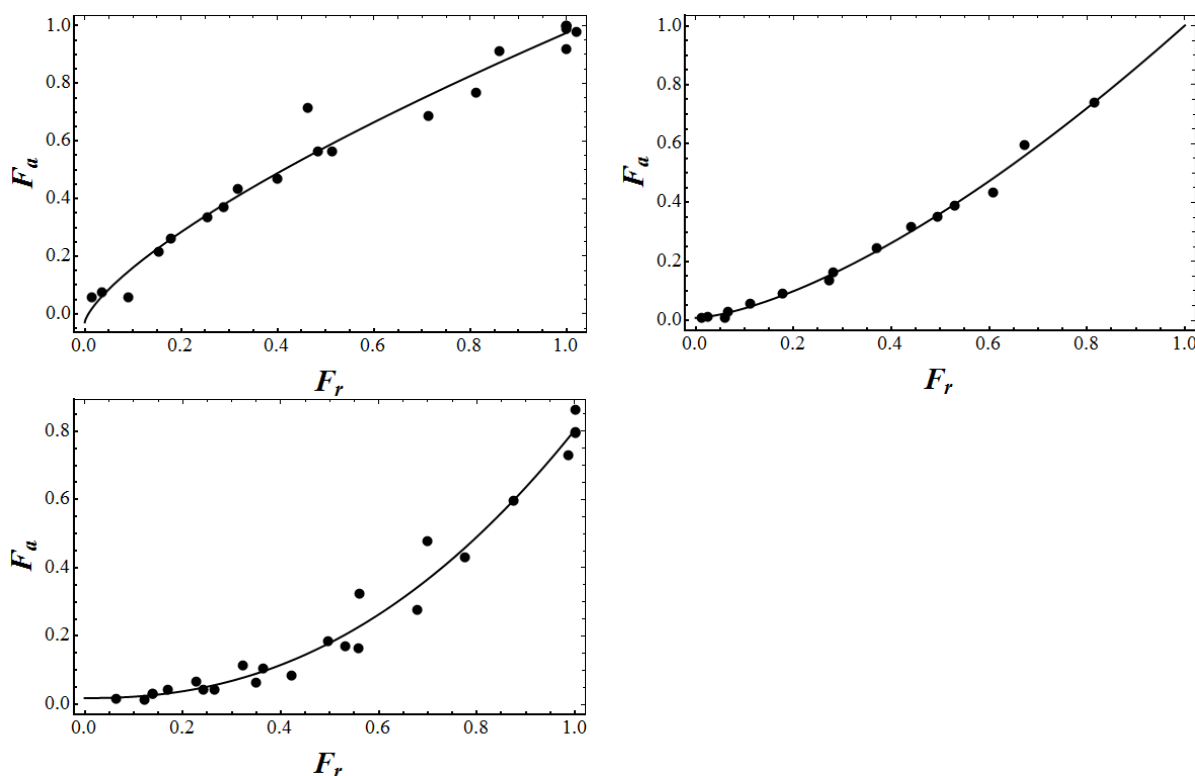
Οι προσομοιωμένες *in vitro-in vivo* συσχετίσεις με τη χρήση των σχέσεων Β.3.2 και Β.3.3 αποδεικνύουν ότι στις περιπτώσεις κατά τις οποίες ο εκθέτης α έχει διαφορετικές τιμές *in vitro* από ότι *in vivo* δηλαδή όταν $\lambda \neq 1$, αναμένονται μη γραμμικές συσχετίσεις. Ο βαθμός της απόκλισης από τη γραμμικότητα είναι ανάλογος της διαφοράς των υδροδυναμικών συνθηκών που επικρατούν μεταξύ των δύο συνθηκών. Η εισαγωγή της σταθεράς β , η οποία αντιπροσωπεύει την τομή στον άξονα των y , προσδίδει στις συσχετίσεις ένα πιο ρεαλιστικό και ευέλικτο χαρακτήρα. Επιπλέον η χρήση των σχέσεων Β.3.2 και Β.3.3 παράγει αποτελέσματα τα οποία είναι σύμφωνα με τις προσομοιωμένες *in vitro-in vivo* συσχετίσεις που παρουσιάστηκαν προηγουμένως με τη

χρήση παραμετρικών διαγραμμάτων (βλ. Σχήμα Β.3.1 σελ. 285 και Σχήμα Β.3.2, σελ. 286). Εν κατακλείδι οι σχέσεις Β.3.2 και Β.3.3 που επιδιώκουν να περιγράψουν τις *in vitro-in vivo* συσχετίσεις υπό μορφή νόμου δύναμης, χαρακτηρίζονται από πλεονεκτήματα, τα οποία προδιαθέτουν θετικά για τη χρήση τους στην περιγραφή και την ερμηνεία μη γραμμικών *in vitro-in vivo* συσχετίσεων.

Β.3.4.1.2. Προσαρμογή σε πειραματικά δεδομένα

Στην προηγούμενη ενότητα αποδείχθηκε με τη χρήση προσομοιώσεων η δυνατότητα των σχέσεων Β.3.2 και Β.3.3, που προκύπτουν θεωρώντας κλασματική μηδενοταξική κινητική, να περιγράφουν μη γραμμικές *in vitro-in vivo* συσχετίσεις. Σε αυτή την ενότητα θα γίνει εφαρμογή σε πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία.

Αρχικά μελετήθηκε η εφαρμογή της σχέσης Β.3.3 σε *in vitro-in vivo* συσχετίσεις από τη βιβλιογραφία, οι οποίες παρουσίαζαν ποικίλου βαθμού καμπυλότητα (Corrigan et al., 2003; Dutta et al., 2005; Ravishankar et al., 2006).



Σχήμα Β.3.4: Μη γραμμική προσαρμογή της σχέσης Β.3.3 σε πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία. Άνω αριστερά: Dutta et al. (2005), άνω δεξιά: Ravishankar et al. (2006) και κάτω αριστερά: Corrigan et al. (2003). Οι εκτιμώμενες τιμές των παραμέτρων παρουσιάζονται στον Πίνακα Β.3.1.

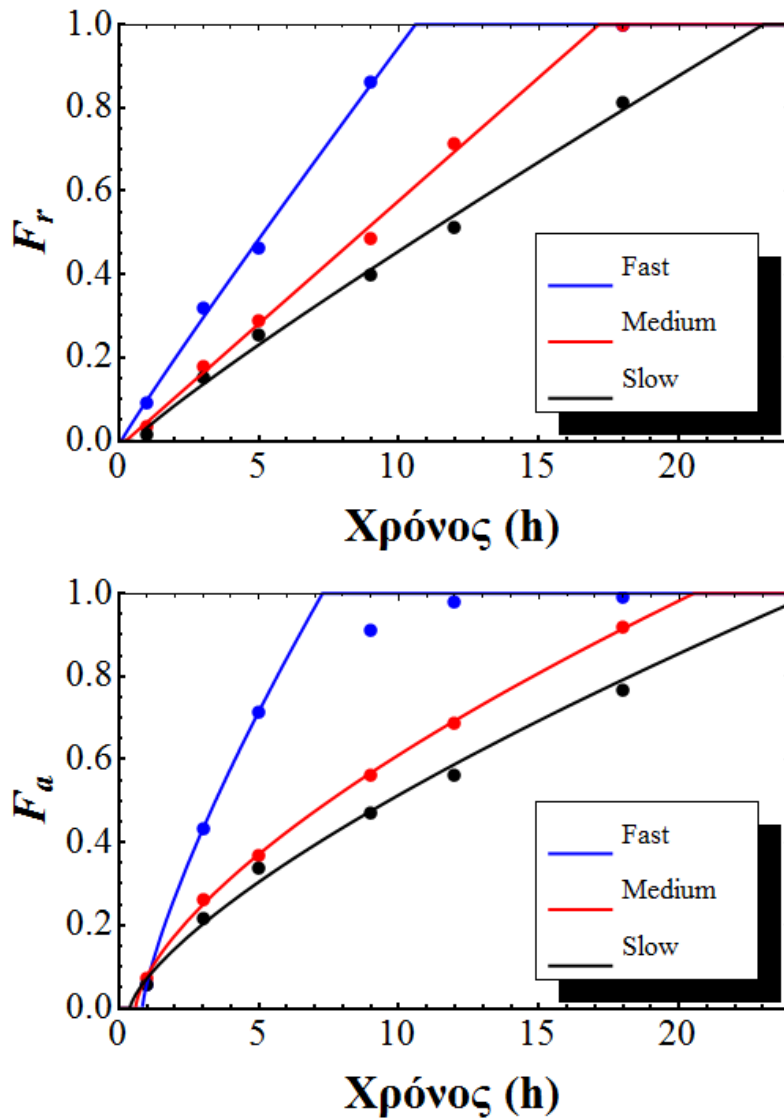
Πίνακας Β.3.1: Εκτιμούμενες παράμετροι από τις μη γραμμικές προσαρμογές της σχέσης Β.3.3 σε πειραματικά δεδομένα από τη βιβλιογραφία (Corrigan et al., 2003; Dutta et al., 2005; Ravishankar et al., 2006).

Βιβλιογραφική πηγή	Εκτιμούμενες παράμετροι (SE) [95% CI]			
	λ	μ	β	r^2
Dutta et al. (2005)	0,7236 (0,0920)	1,0050 (0,0580)	0,0294 (0,0586)	0,9940
	[0,5302-0,9170]	[0,8832-1,1269]	[-0,1526-0,0937]	
Ravishankar et al. (2006)	1,4868 (0,0795)	0,9931 (0,0311)	-0,0084 (0,0103)	0,9970
	[1,3137-1,6600]	[0,9253-1,0609]	[-0,0140-0,0309]	
Corrigan et al. (2003)	2,2804 (0,2048)	0,7856 (0,0267)	0,0184 (0,0187)	0,9881
	[1,8544-2,7061]	[0,7301-0,8411]	[-0,0205-0,0573]	

Τα αποτελέσματα των προσαρμογών αναδεικνύουν το μη γραμμικό χαρακτήρα των βιβλιογραφικών δεδομένων. Σε όλες τις περιπτώσεις η τιμή της σταθεράς λ είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετική από τη μονάδα. Υπενθυμίζεται ότι για $\lambda=1$ η σχέση Β.3.3 είναι γραμμική, ενώ για $\lambda \neq 1$ η σχέση είναι μη γραμμική. Στις περιπτώσεις των Ravishankar et al. (2006) και: Corrigan et al. (2003), οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν μη γραμμική σχέση για την περιγραφή της *in vitro-in vivo* συσχέτισης, διαφορετικής όμως μορφής από τη σχέση Β.3.3. Αντίθετα στην περίπτωση των Dutta et al. (2005) οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν γραμμική σχέση. Εντούτοις φαίνεται ότι μια μη γραμμική σχέση είναι καταλληλότερη, όχι μόνο γιατί προσαρμόζεται καλύτερα στα δεδομένα (r^2 : 0,9659 για τη γραμμική σχέση έναντι 0,9940 για την Β.3.3), αλλά διότι δίνει και πιο τυχαία κατανομημένα υπόλοιπα.

Το επόμενο στάδιο στην αξιολόγηση της σχέσης Β.3.3 για τις *in vitro-in vivo* συσχετίσεις είναι η χρήση της για την αναγέννηση *in vivo* φαρμακοκινητικών δεδομένων από *in vitro* πειραματικά δεδομένα και η σύγκρισή τους με τα πραγματικά *in vivo* πειραματικά δεδομένα. Η διαδικασία αυτή, γνωστή και ως εσωτερική πιστοποίηση, είναι απαραίτητη κατά την ανάπτυξη και επικύρωση των *in vitro-in vivo* συσχετίσεων. Για το σκοπό αυτό θα χρησιμοποιηθούν τα πειραματικά δεδομένα των Dutta et al. (2005).

Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μη γραμμικές προσαρμογές των σχέσεων Β.2.21 και Β.2.22 στα πειραματικά *in vitro* και *in vivo* δεδομένα αντίστοιχα.



Σχήμα Β.3.5: Μη γραμμική προσαρμογή των σχέσεων Β.2.21 (άνω) και Β.2.22 (κάτω) στα *in vitro* (άνω) και *in vivo* (κάτω) πειραματικά δεδομένα των Dutta et al. (2005) αντίστοιχα.

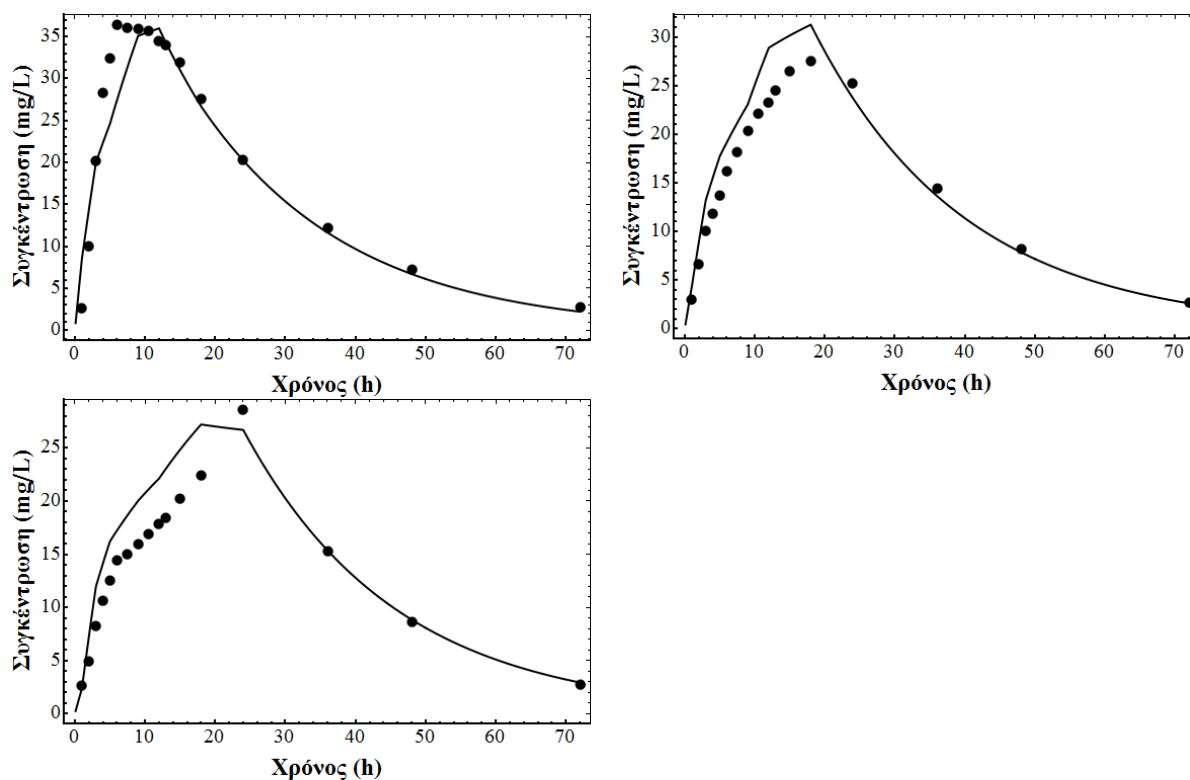
Από το σχήμα φαίνεται ότι η κινητική *in vitro* διαφέρει από την κινητική *in vivo*. Η βασική διαφορά εντοπίζεται στις τιμές της σταθεράς α , η οποία επηρεάζει την καμπυλότητα των απεικονίσεων. Οι διαφορές αυτές παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Β.3.II: Σύγκριση τιμών της σταθεράς α που προέκυψε από τις μη γραμμικές προσαρμογές των σχέσεων Β.2.21 και Β.2.22 στα *in vitro* και *in vivo* πειραματικά δεδομένα των Dutta et al. (2005) αντίστοιχα.

Συνταγή	Τιμές σταθεράς α (SE) [95% CI]	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Fast	0,9523 (0,1076)	0,7679 (0,2366)
	[0,6535-1,2511]	[0,1109-1,4249]
Medium	1,0000 (0,1314)	0,6550 (0,0155)
	[0,6351-1,3649]	[0,6119-0,6981]
Slow	0,9111 (0,0884)	0,7122 (0,0572)
	[0,6659-1,1569]	[0,5533-0,8711]

Από τον πίνακα αποδεικνύεται ότι η κινητική μεταξύ των *in vivo* και των *in vitro* συνθηκών διαφέρει, γεγονός το οποίο αποτυπώνεται στις τιμές της σταθεράς α . Διαφορετικές τιμές του α μεταξύ των *in vivo* και των *in vitro* συνθηκών συνεπάγεται ότι η τιμή του λ της σχέσης Β.3.3 θα διαφέρει από τη μονάδα, με αποτέλεσμα η συσχέτιση να είναι μη γραμμική. Αυτό αποδείχτηκε για τα δεδομένα των Dutta et al. (2005) προηγουμένως στην ίδια ενότητα (βλ. Σχήμα Β.3.4 σελ 289 και Πίνακας Β.3.I σελ. 290).

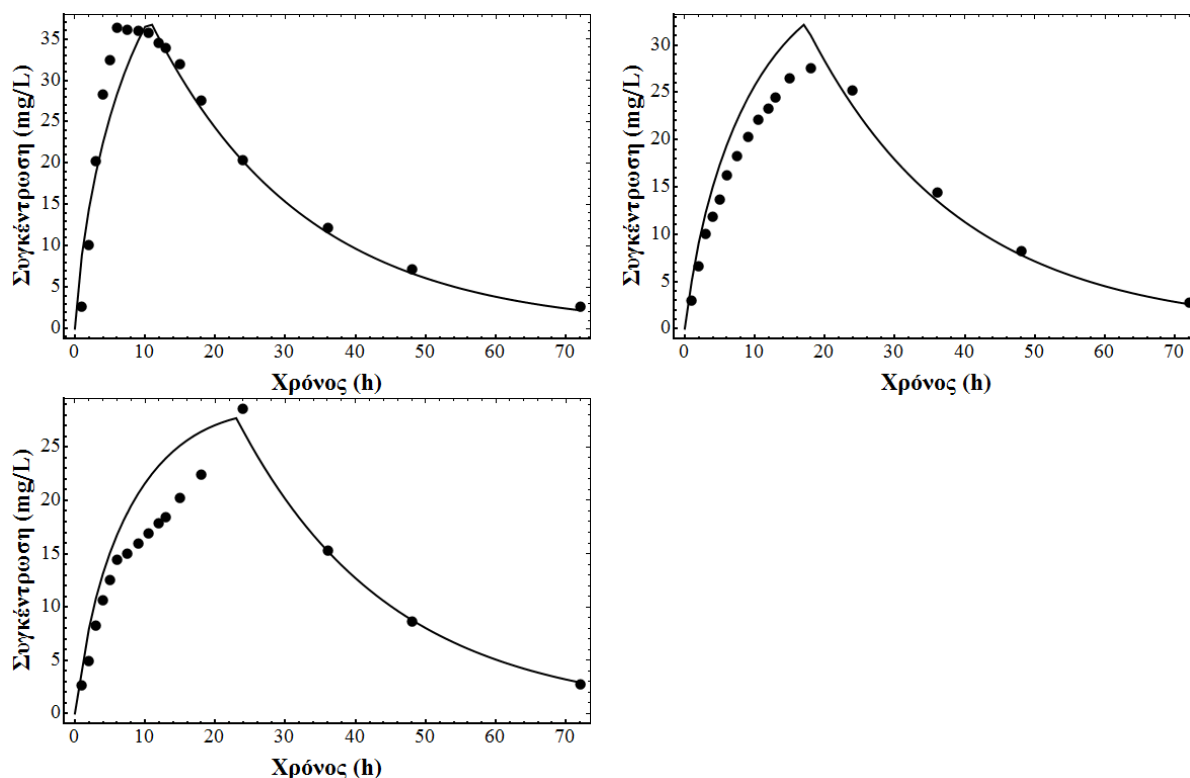
Εφόσον η σχέση Β.3.3 έχει προσαρμοστεί στην *in vitro-in vivo* συσχέτιση, το επόμενο βήμα είναι η χρήση της για την μετατροπή των *in vitro* δεδομένων στα *in vivo* αντίστοιχα τους και η σύγκριση με τα πειραματικά *in vivo* φαρμακοκινητικά δεδομένα. Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφει η σχέση Β.3.4.



Σχήμα Β.3.6: Προσομοίωση καμπύλης συγκέντρωσης στο πλάσμα σε σχέση με το χρόνο ύστερα από διαδικασία συνέλιξης με χρήση της σχέσης Β.3.4 και σύγκριση με τα πειραματικά δεδομένα (Dutta et al., 2005). Τα διαγράμματα αντιστοιχούν στις συνταγές *fast* (άνω αριστερά), *medium* (άνω δεξιά) και *slow* (κάτω αριστερά).

Τα ανωτέρω αποτελέσματα προκύπτουν από μια ανεξάρτητη από το κινητικό μοντέλο θεώρηση, εφόσον χρησιμοποιούνται μόνο τα πειραματικά *in vitro* σημεία από την καμπύλη του ρυθμού διάλυσης, τα οποία μετατρέπονται στα αντίστοιχα *in vivo* με τη χρήση της εξίσωσης της καμπύλης της *in vitro-in vivo* συσχέτισης (Σχέση Β.3.3).

Μια άλλη προσέγγιση αποτελεί η συνέλιξη με τη χρήση της σχέσης Β.3.8. Τα αποτελέσματα αυτής της μεθοδολογίας παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα Β.3.7: Προσομοίωση καμπύλης συγκέντρωσης στο πλάσμα σε σχέση με το χρόνο ύστερα από διαδικασία συνέλιξης με χρήση της σχέσης Β.3.8 και σύγκριση με τα πειραματικά δεδομένα (Dutta et al., 2005). Τα διαγράμματα αντιστοιχούν στις συνταγές *fast* (άνω αριστερά), *medium* (άνω δεξιά) και *slow* (κάτω αριστερά).

Τα ανωτέρω αποτελέσματα, σε αντίθεση με του προηγούμενου σχήματος, προκύπτουν από μια εξαρτημένη από το κινητικό μοντέλο θεώρηση. Τα πειραματικά *in vitro* δεδομένα από την καμπύλη του ρυθμού διάλυσης χρησιμοποιούνται για την προσαρμογή σε αυτά της κλασματικής μηδενοταξικής σχέσης Β.2.24. Στη συνέχεια οι εκτιμώμενες παράμετροι εισάγονται στη σχέση Β.3.6, από την οποία προκύπτει η σχέση Β.3.7, η οποία εκφράζει τον *in vivo* ρυθμό εισόδου του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία.

Η σύγκριση των δύο μεθοδολογιών μεταξύ τους καθώς και με τα πειραματικά δεδομένα όσον αφορά τις εκτιμώμενες φαρμακοκινητικές παραμέτρους C_{max} και AUC_{∞} καθώς και τα % σφάλματα των εκτιμώμενων από τις παρατηρούμενες τιμές παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Β.3.III: Εκτιμώμενες και πειραματικές φαρμακοκινητικές παράμετροι καθώς και % σφάλματα των εκτιμώμενων από τις παρατηρούμενες τιμές για τα πειραματικά δεδομένα των Dutta et al. (2005).

Συνταγή	Σχέση συνέλιξης	Εκτιμώμενες παράμετροι		Πειραματικές παράμετροι		% Σφάλμα εκτίμησης	
		C_{max}	AUC_{∞}	C_{max}	AUC_{∞}	C_{max}	AUC_{∞}
Fast	B.3.4	35,80	1073	39,30	1148	8,91	6,53
	B.3.8	36,72	1070			6,56	6,79
Medium	B.3.4	31,11	1073	29,74	1056	4,61	1,61
	B.3.8	32,15	1071			8,10	1,42
Slow	B.3.4	27,21	1074	31,13	1040	12,59	3,27
	B.3.8	27,72	1071			10,95	2,98

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι και οι δύο μέθοδοι συνέλιξης παράγουν αντίστοιχα αποτελέσματα. Η μέθοδος με τη χρήση των σχέσεων B.3.3 και B.3.4, δηλαδή με τη χρήση μόνο των πειραματικών *in vitro* αποτελεσμάτων χωρίς την προσαρμογή τους σε κάποιο μοντέλο, έχει κατά μέσο όρο $8,70 \pm 4,0 \%$ και $3,80 \pm 2,5 \%$ σφάλμα εκτίμησης στις σταθερές C_{max} και AUC_{∞} αντίστοιχα. Η μέθοδος με τη χρήση των σχέσεων B.3.3 και B.3.8, δηλαδή με τη χρήση της σχέσης που προέκυψε από μη γραμμική συσχέτιση στα πειραματικά *in vitro* σημεία, έχει κατά μέσο όρο $8,54 \pm 2,2 \%$ και $3,73 \pm 2,8 \%$ σφάλμα εκτίμησης στις σταθερές C_{max} και AUC_{∞} αντίστοιχα. Και οι δύο προσεγγίσεις απέτυχαν να εκτιμήσουν επιτυχώς την τιμή της σταθεράς C_{max} στη συνταγή “slow”, καθώς το % σφάλμα εκτίμησης και στις δύο περιπτώσεις ξεπέρασε το όριο του 10 %. Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις οι εκτιμήσεις ήταν επιτυχημένες.

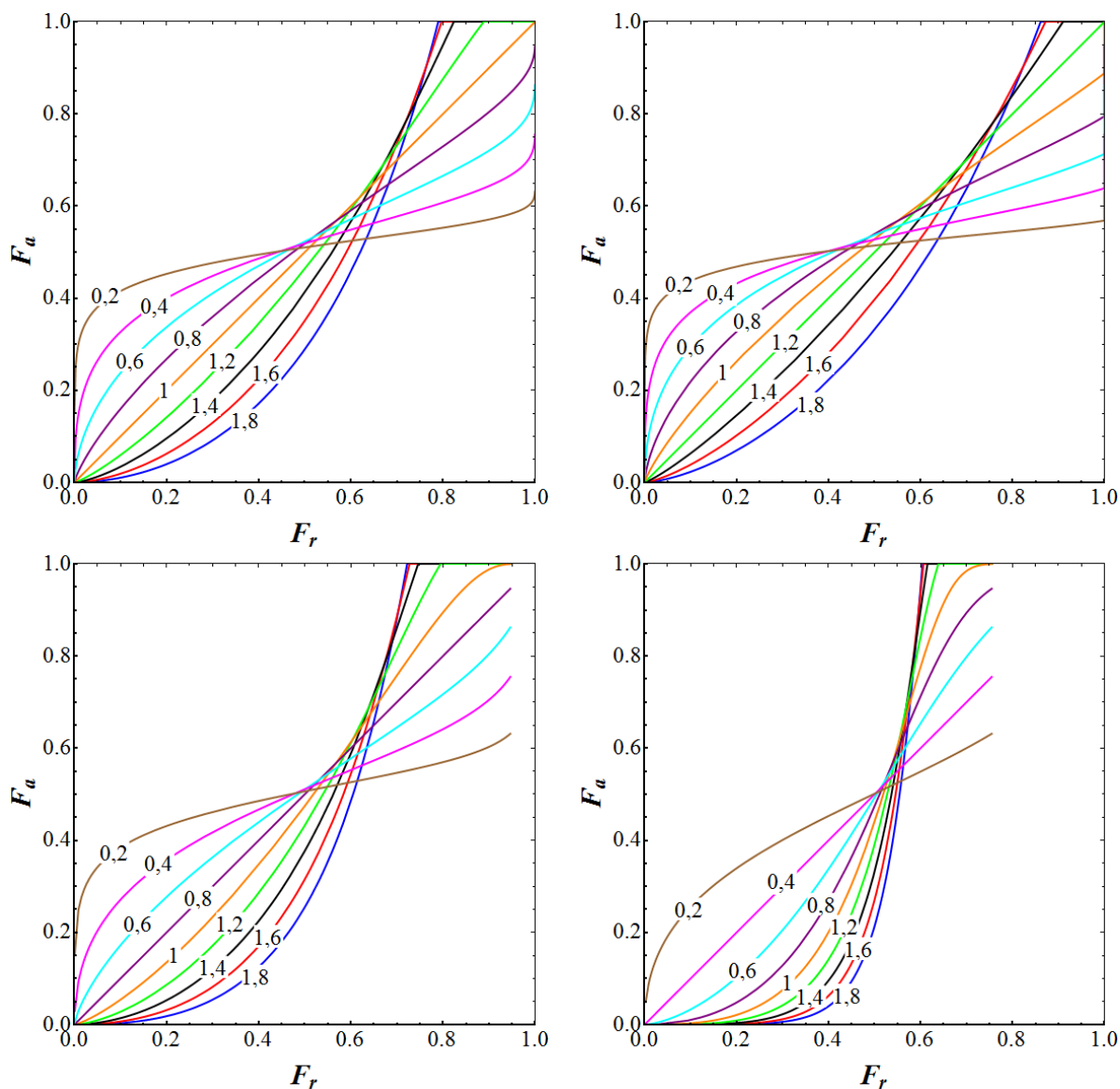
Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι η χρήση της σχέσης B.3.3 στις *in vitro-in vivo* συσχετίσεις είναι επιτυχημένη. Η σχέση B.3.3 προκύπτει από τη βασική θεώρηση της κλασματικής μηδενοταξικής κινητικής, και η επιτυχημένη χρήση της ενισχύει την άποψη ότι η κινητική αποδέσμευσης όχι μόνο διαφέρει μεταξύ των *in vitro* και των *in vivo* συνθηκών, αλλά έχει και χαρακτήρα κλασματικής κινητικής. Επιπλέον αποδυναμώνει την πεποίθηση ότι οι *in vitro-in vivo* συσχετίσεις οφείλουν να είναι γραμμικές. Η σχέση B.3.3 αν και μπορεί να έχει γραμμικό χαρακτήρα, εκφράζει κατά κύριο λόγο μια μη γραμμική συσχέτιση μεταξύ του *in vitro* αποδεσμευμένου και του *in vivo* απορροφημένου κλάσματος. Η μη γραμμικότητα προκύπτει από τη διαφορά των υδροδυναμικών συνθηκών και είναι ανάλογη της τιμής της απόκλισης αυτής, η οποία εκφράζεται στις διαφορετικές τιμές της τάξης παραγωγίσις α .

Η επιτυχημένη εφαρμογή της σχέσης B.3.3 στις *in vitro-in vivo* συσχετίσεις είναι το επιστέγασμα της επιτυχημένης εφαρμογής των κλασματικών παραγώγων στις διαδικασίες απορρόφησης. Αρχικά η εξαγωγή του νόμου της δύναμης του χρόνου θεωρώντας κλασματική κινητική, στη συνέχεια η επιτυχημένη προσαρμογή της σχέσης σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικά δεδομένα, οι επιτυχημένες προσομοιώσεις φαρμακοκινητικών δεδομένων και τέλος η εφαρμογή για την ερμηνεία μη γραμμικών *in vitro-in vivo* συσχετίσεων, συνθέτουν μια ισχυρή βάση για την εδραίωση των κλασματικών παραγώγων στην ανάλυση *in vitro* και *in vivo* δεδομένων απορρόφησης και γενικότερα στη φαρμακοκινητική.

B.3.4.2. Αποτελέσματα στις πρωτοταξικές διαδικασίες

B.3.4.2.1. Προσομοιώσεις

Σε αντιστοιχία με τις κλασματικές μηδενοταξικές διαδικασίες, στο επόμενο σχήμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων με τη χρήση παραμετρικών διαγραμμάτων για την περίπτωση των κλασματικών πρωτοταξικών διαδικασιών. Συνολικά παρουσιάζονται τέσσερα διαφορετικά *in vitro* σενάρια, με τέσσερεις διαφορετικές τιμές της σταθεράς α_1 και οι δυνατοί συνδυασμοί που προκύπτουν με τις διαφορετικές τιμές της *in vivo* σταθεράς α_2 . Τα ακόλουθα αποτελέσματα προκύπτουν από τη χρήση των σχέσεων B.2.39 για τις *in vitro* και B.2.40 για τις *in vivo* διαδικασίες.



Σχήμα Β.3.8: Προσομοίωση IVIVC επιπέδου Α στην περίπτωση κλασματικής πρωτοταξικής κινητικής με τη χρήση των σχέσεων Β.2.39 και Β.2.40 για $k_{1,1}=k_{1,2}=1$ (χρόνος)^{-α}. Οι *in vitro* συνθήκες είναι: $\alpha_1=1$ (πάνω αριστερά), $\alpha_1=1,2$ (πάνω δεξιά), $\alpha_1=0,8$ (κάτω αριστερά) και $\alpha_1=0,4$ (κάτω δεξιά). Οι αριθμοί στα γραφήματα αφορούν στις διαφορετικές τιμές του α_2 *in vivo*.

Αντίστοιχα με τις προσομοιώσεις των κλασματικών μηδενοταξικών διαδικασιών, σε όλα τα σενάρια που μελετήθηκαν γίνεται εμφανές ότι σε περίπτωση κατά την οποία οι τιμές των σταθερών α_1 και α_2 διαφέρουν, η συσχέτιση μεταξύ του *in vitro* αποδεσμευμένου και του *in vivo* απορροφημένου κλάσματος είναι μη γραμμική, με το βαθμό καμπυλότητας να είναι ανάλογος της διαφοράς των δύο σταθερών. Στην περίπτωση όπου $\alpha_1=\alpha_2$ η απεικόνιση είναι ευθεία γραμμή, η οποία διέρχεται από την αρχή των αξόνων.

Οι πρωτοταξικές διαδικασίες χαρακτηρίζουν συνήθως φαρμακοτεχνικές μορφές άμεσης αποδέσμευσης, ως εκ τούτου οι *in vitro-in vivo* συσχετίσεις στις πρωτοταξικές

διαδικασίες δεν είναι συνηθισμένες και συνήθως αποτυγχάνουν. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η συσχέτιση μεταξύ μιας ταχείας *in vitro* διάλυσης με τις *in vivo* συνθήκες είναι πρακτικά αδύνατη, καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις η εμφάνιση του φαρμάκου στην κυκλοφορία καθορίζεται από το ρυθμό απορρόφησης, ο οποίος δεν προσομοιώνεται σε ένα πείραμα ρυθμού διάλυσης. Οι παραπάνω προσομοιώσεις επομένως προϋποθέτουν ταχεία απορρόφηση του φαρμάκου. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι οι φαρμακοτεχνικές μορφές άμεσης αποδέσμευσης είναι πιο ευαίσθητες στην επίδραση των υδροδυναμικών συνθηκών, καθώς δεν έχουν σχεδιαστεί να αποδεσμεύουν τη δραστική ουσία ανεξάρτητα του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται, σε αντίθεση με τις μορφές ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Δεδομένου ότι οι διαφορές μεταξύ των *in vitro* και των *in vivo* υδροδυναμικών συνθηκών είναι σημαντικές, σύμφωνα με τις προσομοιώσεις αναμένονται μη γραμμικές συσχετίσεις, με το βαθμό καμπυλότητας να είναι ανάλογος της διαφοράς των σταθερών α_1 και α_2 . Επομένως είναι πιθανό ο λόγος για τον οποίο δε δημοσιεύονται *in vitro-in vivo* συσχετίσεις στις πρωτοταξικές διαδικασίες να είναι ότι θεωρούνται αποτυχημένες, λόγω του μη γραμμικού χαρακτήρα τους. Οι προσομοιώσεις όμως αποδεικνύουν ότι και στην περίπτωση των κλασματικών πρωτοταξικών διαδικασιών, οι γραμμικές συσχετίσεις αποτελούν την εξαίρεση.

B.3.4.2.2. Προσαρμογή σε πειραματικά δεδομένα

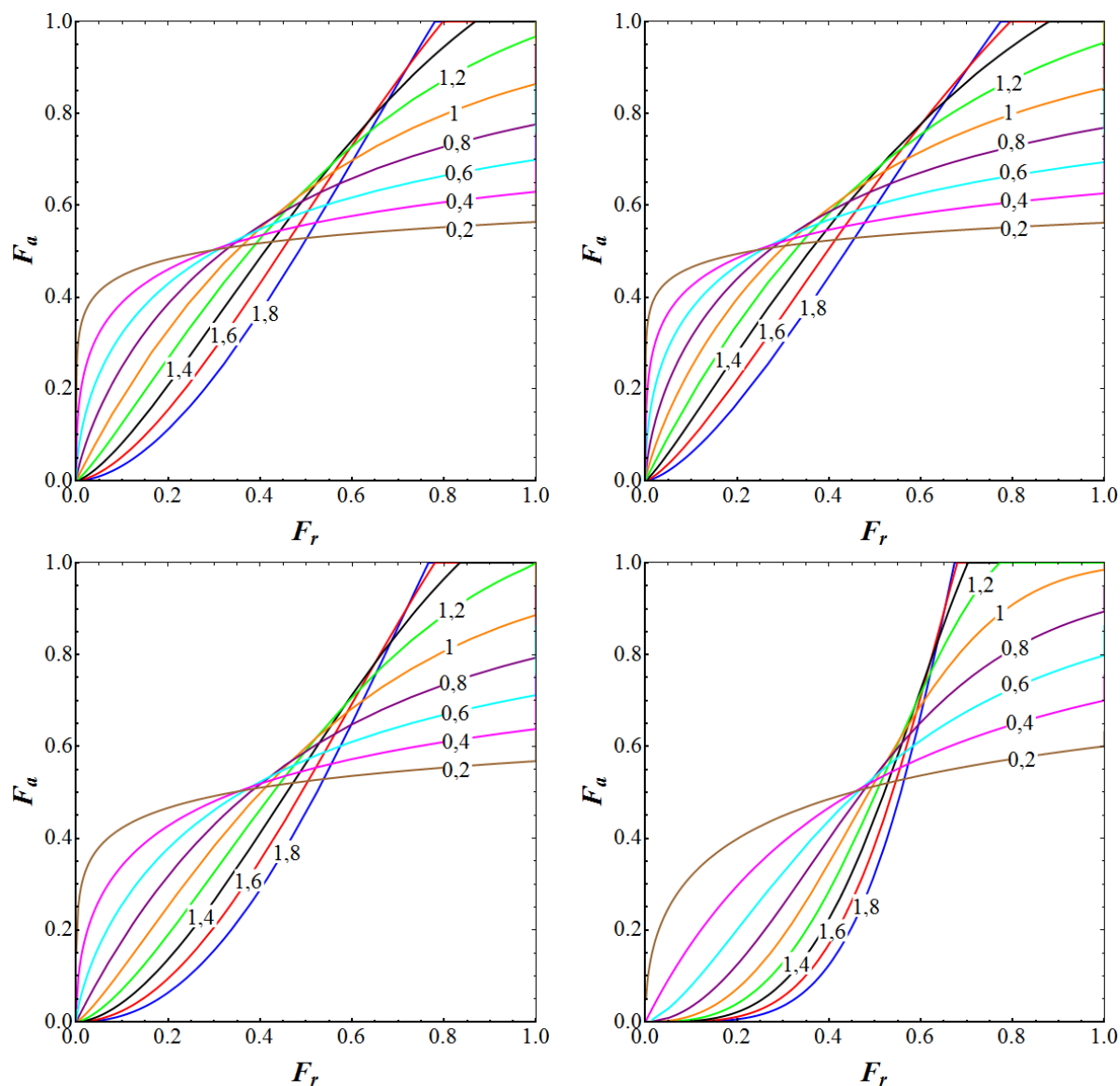
Δεν έχει πραγματοποιηθεί λόγω απουσίας σχέσης, αντίστοιχης της B.3.3.

B.3.4.3. Αποτελέσματα σε σύνθετες διαδικασίες

B.3.4.3.1. Προσομοιώσεις

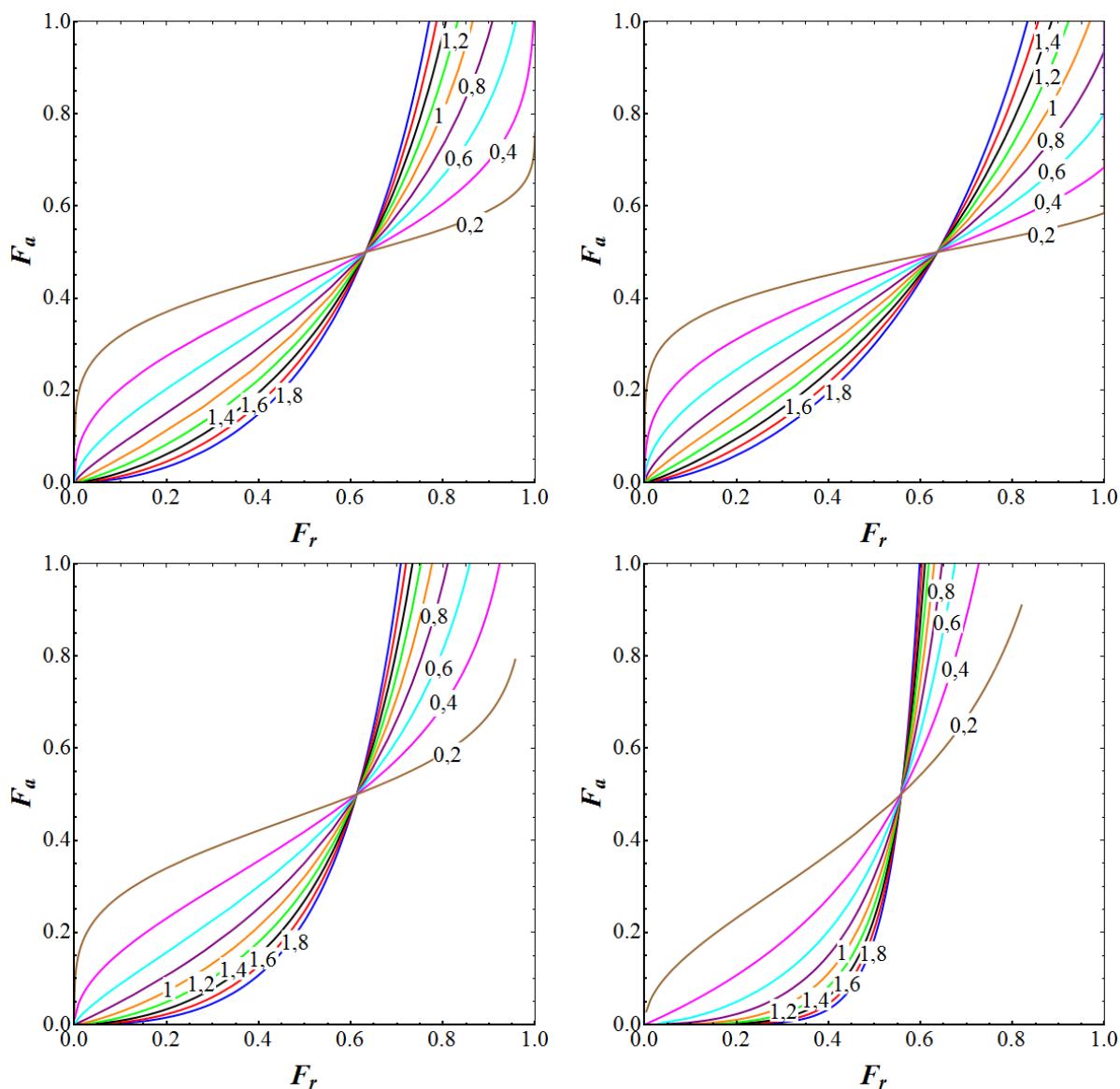
Κατά τη διάρκεια της βιβλιογραφικής αναζήτησης, παρατηρήθηκαν διαδικασίες, οι οποίες χαρακτηρίζονταν από κινητική διαφορετικής τάξης μεταξύ των *in vitro* και των *in vivo* συνθηκών. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην επίδραση της απορρόφησης στην εμφάνιση του φαρμάκου στον οργανισμό (αποτελώντας το περιοριστικό βήμα) ή στις διαφορές στις υδροδυναμικές συνθήκες. Γι αυτό το λόγο και κυρίως ως άσκηση επί χάρτου παρουσιάζονται στη συνέχεια προσομοιώσεις *in vitro-in vivo* συσχετίσεων, των οποίων η τάξη της κινητικής διαφέρει ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται.

Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για *in vitro* αποδέσμευση κλασματικού μηδενοταξικού βαθμού και *in vivo* εμφάνιση στην γενική κυκλοφορία κλασματικού πρωτοταξικού βαθμού.



Σχήμα Β.3.9: Προσομοίωση IVIVC επιπέδου Α στην περίπτωση κλασματικής μηδενοταξικής κινητικής *in vitro* και κλασματικής πρωτοταξικής κινητικής *in vivo* με τη χρήση των σχέσεων Β.2.20 και Β.2.40 για $k'_{0,1} = 1$ (χρόνος) $^{-\alpha}$ και $k_{1,2} = 0,5$ (χρόνος) $^{-\alpha}$. Οι *in vitro* συνθήκες είναι: $\alpha_1 = 1$ (πάνω αριστερά), $\alpha_1 = 1,2$ (πάνω δεξιά), $\alpha_1 = 0,8$ (κάτω αριστερά) και $\alpha_1 = 0,4$ (κάτω δεξιά). Οι αριθμοί στα γραφήματα αφορούν στις διαφορετικές τιμές του α_2 *in vivo*.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα για *in vitro* αποδέσμευση κλασματικού πρωτοταξικού βαθμού και *in vivo* εμφάνιση του φαρμάκου στην γενική κυκλοφορία κλασματικού μηδενοταξικού βαθμού.



Σχήμα Β.3.10: Προσομοίωση IVIVC επιπέδου Α στην περίπτωση κλασματικής πρωτοταξικής κινητικής *in vitro* και κλασματικής μηδενοταξικής κινητικής *in vivo* με τη χρήση των σχέσεων Β.2.39 και Β.2.23 για $k_{1,1}=1$ (χρόνος) $^{-\alpha}$ και $k'_{0,2}=0,5$ (χρόνος) $^{-\alpha}$. Οι *in vitro* συνθήκες είναι: $\alpha_1=1$ (πάνω αριστερά), $\alpha_1=1,2$ (πάνω δεξιά), $\alpha_1=0,8$ (κάτω αριστερά) και $\alpha_1=0,4$ (κάτω δεξιά). Οι αριθμοί στα γραφήματα αφορούν στις διαφορετικές τιμές του α_2 *in vivo*.

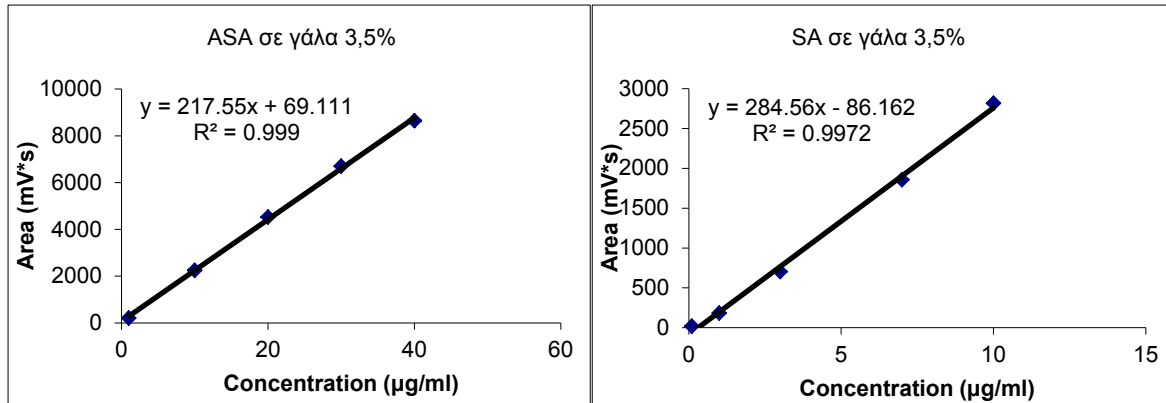
Τα διαγράμματα αναδεικνύουν το γεγονός ότι στην περίπτωση κατά την οποία η τάξη της κινητικής διαφέρει μεταξύ των *in vitro* και των *in vivo* συνθηκών, οι *in vitro-in vivo* συσχετίσεις δεν είναι σε καμία περίπτωση γραμμικές. Η περίπτωση η τάξη μιας διαδικασίας να αλλάζει ανάλογα με το περιβάλλον, αν και μπορεί να χαρακτηριστεί ως σπάνια, δε μπορεί να αποκλειστεί, λόγω της πολυπλοκότητας των φαινομένων που επηρεάζουν την πορεία της απορρόφησης. Είναι προφανές ότι σε τέτοιες περιπτώσεις η εγκαθίδρυση IVIVC καθίσταται δύσκολη έως αδύνατη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι – ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΣΠΙΡΙΝΗΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς

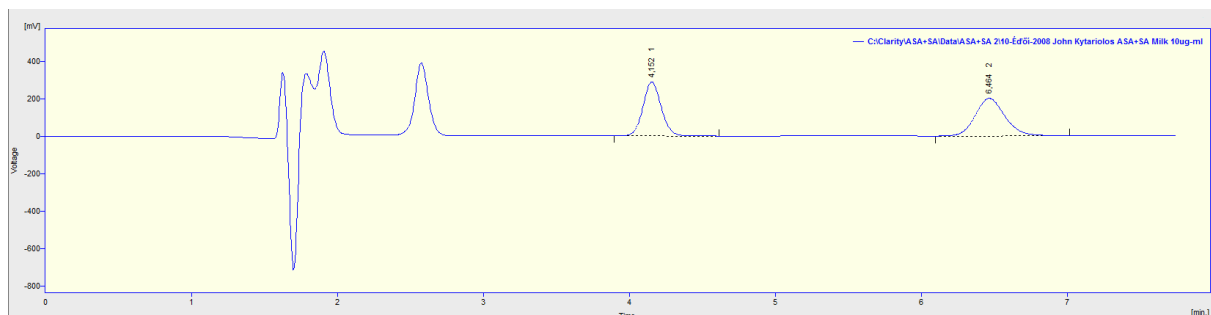


Σχήμα παραρτήματος 1: Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς σε γάλα 3,5% για την ασπιρίνη (αριστερά) και το σαλικυλικό οξύ (δεξιά)

Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς

Γάλα		Τιμές ASA	Τιμές SA
3,5%	Κλίση	217,55	284,56
	Τομή	69,11	-86,16
	r ²	0,999	0,997
1,5%	Κλίση	258,17	361,80
	Τομή	151,25	-32,35
	r ²	0,998	0,999
0%	Κλίση	268,74	422,26
	Τομή	-34,26	-104,18
	r ²	0,999	0,999

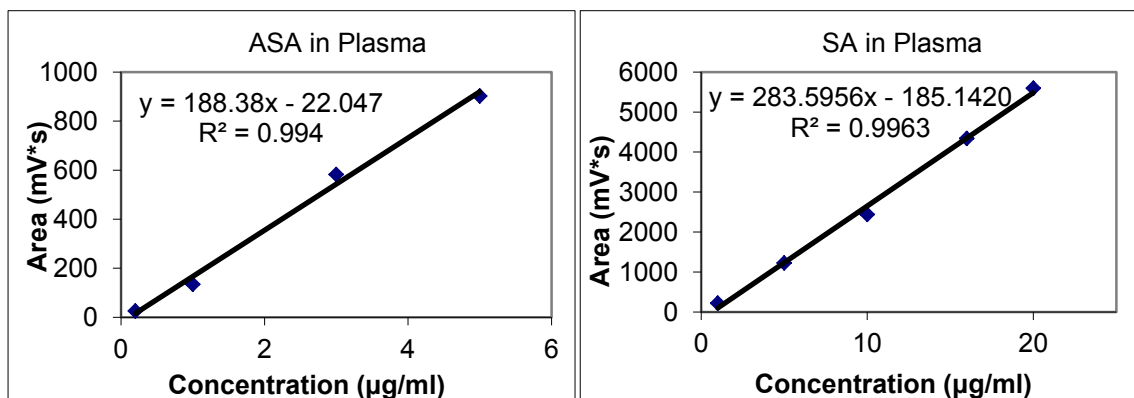
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα



Εικόνα παραρτήματος 1: Ενδεικτικό χρωματογράφημα ασπιρίνης και σαλικυλικού οξέος σε γάλα 3,5%, συγκέντρωσης από 10 μg/ml.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΣΠΙΡΙΝΗΣ *IN VIVO*

Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς

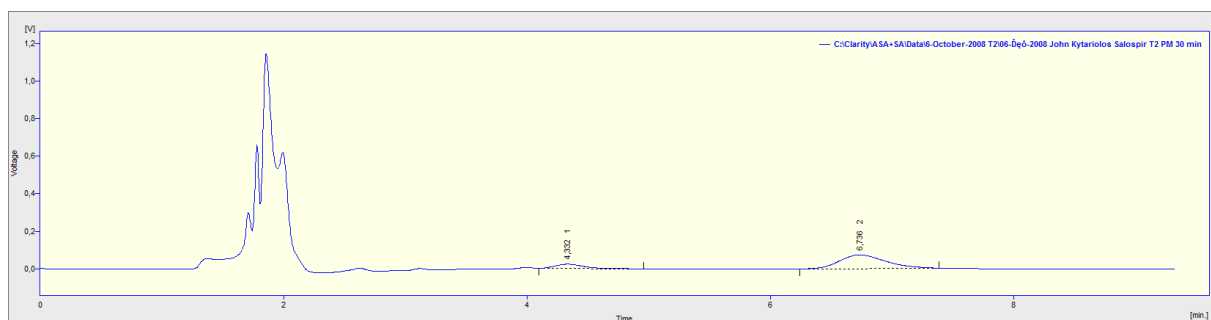


Σχήμα παραρτήματος 2: Ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς σε πλάσμα για την ασπιρίνη (αριστερά) και το σαλικυλικό οξύ (δεξιά)

Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς

	ASA ($\pm$ SD, n=4)	SA ($\pm$ SD, n=4)
Κλίση	232 ($\pm$ 31)	305 ($\pm$ 28)
Τομή	-13 ($\pm$ 18)	-170 ($\pm$ 84)
r^2	0,997 ($\pm$ 0,0022)	0,99 ($\pm$ 0,0082)

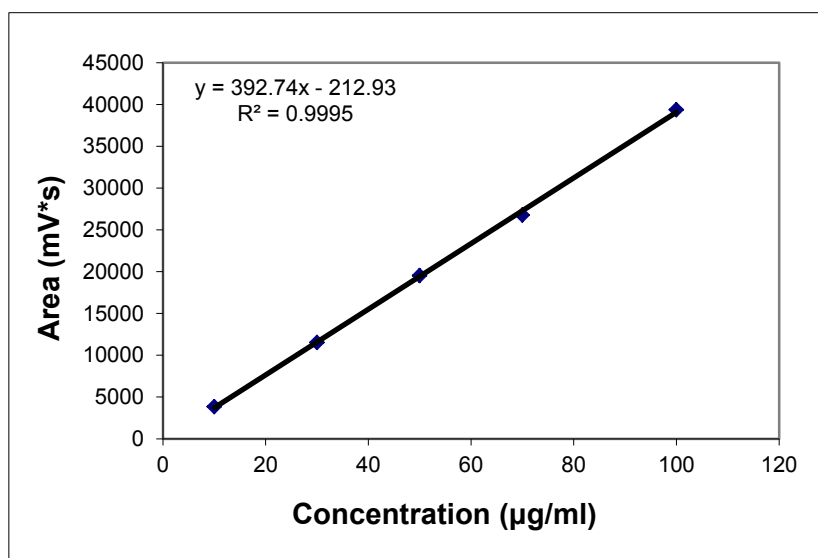
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα



Εικόνα παραρτήματος 2: Ενδεικτικό χρωματογράφημα ασπιρίνης και σαλικυλικού οξέος στο πλάσμα, 30 min μετά τη χορήγηση του σκευάσματος ελέγχου.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΚΛΟΣΠΟΡΙΝΗΣ ΣΕ ΥΔΑΤΑΛΚΟΟΛΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς

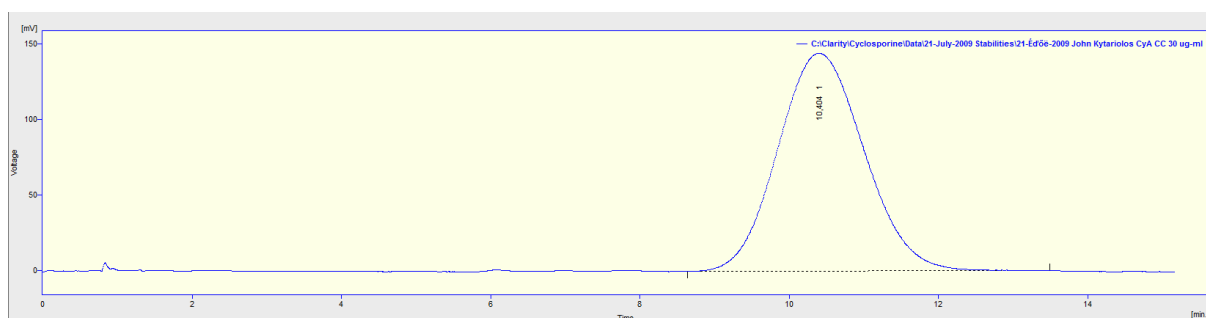


Σχήμα παραρτήματος 3: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τη μελέτη διαλυτότητας κυκλοσπορίνης σε υδαταλκοολικό διάλυμα.

Αποτελέσματα καμπύλης αναφοράς

	Τιμές (±SD, n=6)
Κλίση	417 (±40)
Τομή	-55 (±220)
r ²	0,9993 (±0,0012)

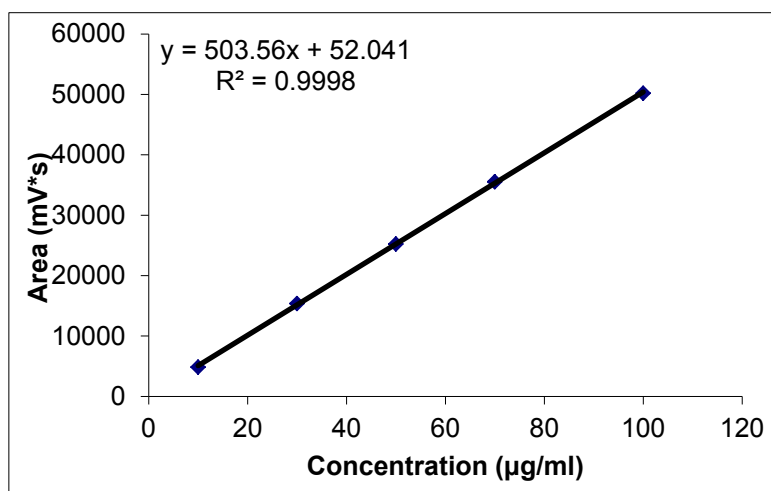
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα



Εικόνα παραρτήματος 3: Ενδεικτικό χρωματογράφημα κυκλοσπορίνης σε υδαταλκοολικό διάλυμα, συγκέντρωσης 20 µg/ml.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΚΛΟΣΠΟΡΙΝΗΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς

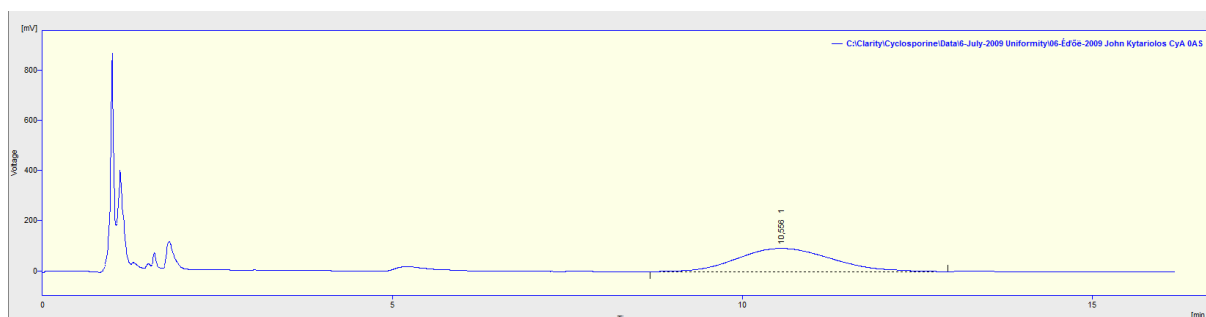


Σχήμα παραρτήματος 4: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τη μελέτη διαλυτότητας κυκλοσπορίνης σε γάλα 3,5%.

Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς

Γάλα		Τιμές
3,5%	Κλίση	503,56
	Τομή	52,04
	r ²	0,9998
1,5%	Κλίση	439,55
	Τομή	-230,51
	r ²	0,9994
0%	Κλίση	405,61
	Τομή	1074,4
	r ²	0,995

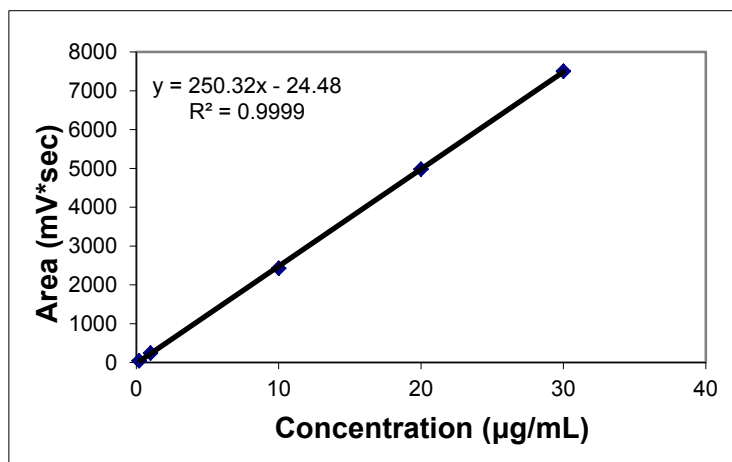
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα



Εικόνα παραρτήματος 4: Ενδεικτικό χρωματογράφημα μελέτης ομοιομορφίας περιεχομένου υδαταλκοολικού διαλύματος κυκλοσπορίνης σε γάλα 3,5%.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΑΝΑΖΟΛΗΣ ΣΕ ΥΔΑΤΑΛΚΟΟΛΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς

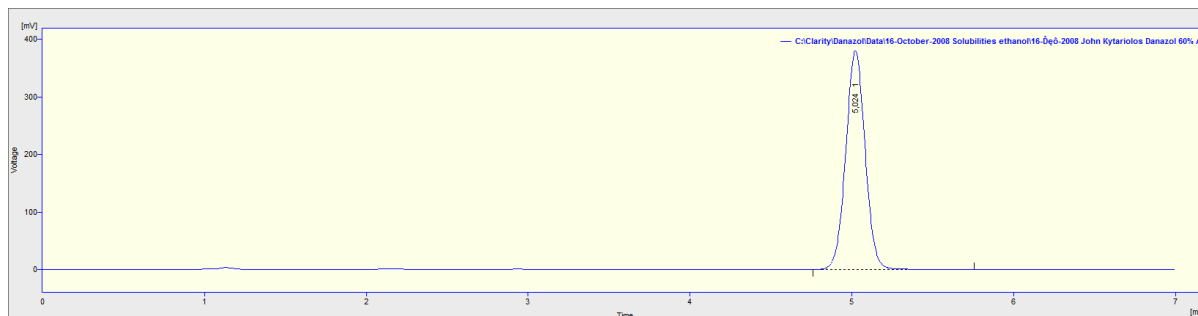


Σχήμα παραρτήματος 5: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τη μελέτη διαλυτότητας δαναζόλης σε υδαταλκοολικό διάλυμα.

Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς

	Τιμές (±SD, n=3)
Κλίση	289 (±34)
Τομή	-21 (±13)
r ²	0,9999 (±0)

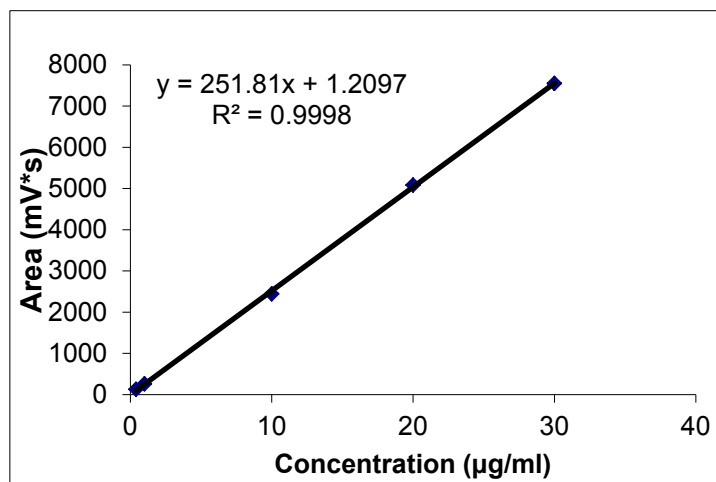
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα



Εικόνα παραρτήματος 5: Ενδεικτικό χρωματογράφημα δαναζόλης σε υδαταλκοολικό διάλυμα.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΑΝΑΖΟΛΗΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς

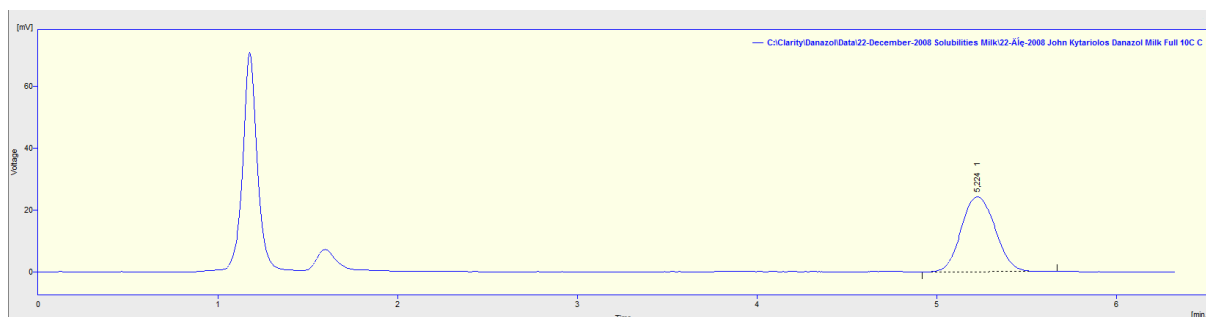


Σχήμα παραρτήματος 6: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τη μελέτη διαλυτότητας δαναζόλης σε γάλα 3,5%.

Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς

Γάλα		Τιμές
3,5%	Κλίση	251,81
	Τομή	1,21
	r ²	0,9998
1,5%	Κλίση	329,60
	Τομή	-14,91
	r ²	0,9999
0%	Κλίση	319,99
	Τομή	65,54
	r ²	0,9991

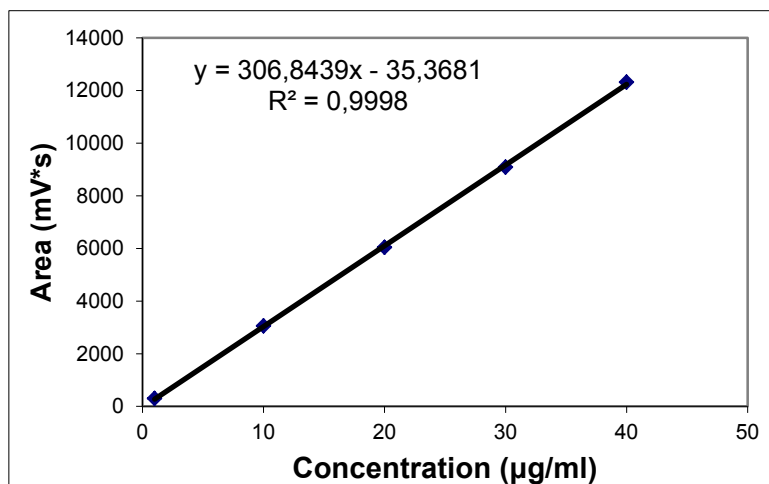
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα



Εικόνα παραρτήματος 6: Ενδεικτικό χρωματογράφημα μελέτης διαλυτότητας δαναζόλης σε γάλα 3,5%.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗΣ ΣΕ ΥΔΑΤΑΛΚΟΟΛΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς



Σχήμα παραρτήματος 7: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τη μελέτη διαλυτότητας κλοπιδογρέλης σε υδαταλκοολικό διάλυμα (συγκεντρώσεις ως προς βάση).

Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς

	Τιμές
Κλίση	306,84
Τομή	-35,37
r^2	0,9998

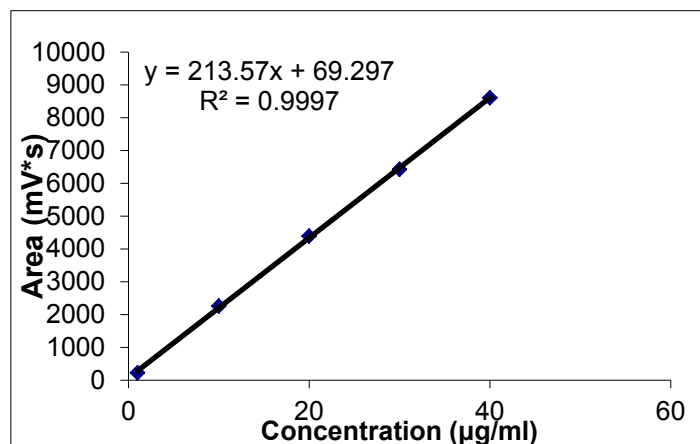
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα



Εικόνα παραρτήματος 7: Ενδεικτικό χρωματογράφημα κλοπιδογρέλης σε υδαταλκοολικό διάλυμα.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς

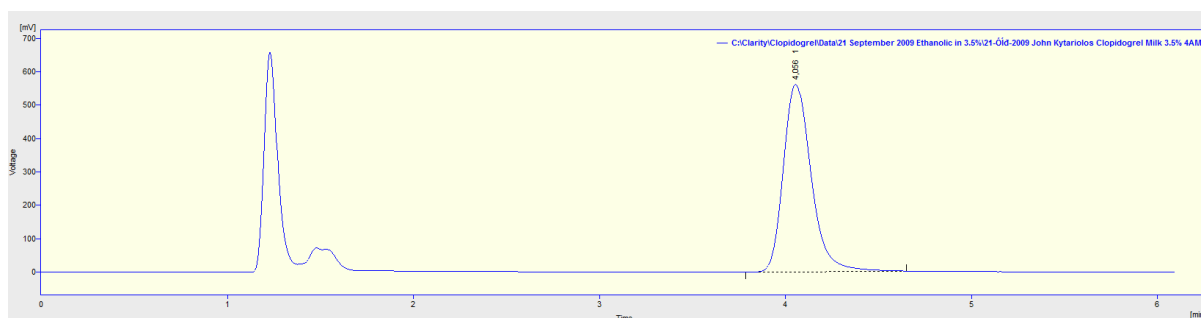


Σχήμα παραρτήματος 8: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τη μελέτη διαλυτότητας κλοπιδογρέλης σε γάλα 3,5% (συγκεντρώσεις ως προς βάση).

Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς

Γάλα		Τιμές
3,5%	Κλίση	213,57
	Τομή	69,30
	r ²	0,9997
1,5%	Κλίση	209,98
	Τομή	45,76
	r ²	0,999
0%	Κλίση	236,62
	Τομή	28,97
	r ²	0,9999

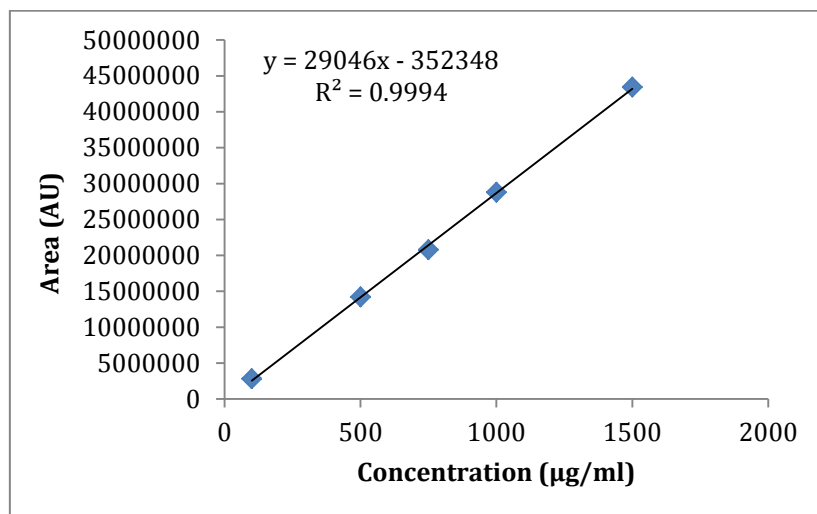
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα



Εικόνα παραρτήματος 8: Ενδεικτικό χρωματογράφημα μελέτης διαλυτότητας κλοπιδογρέλης σε γάλα 3,5%.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗΣ ΓΙΑ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΩΝ

Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς

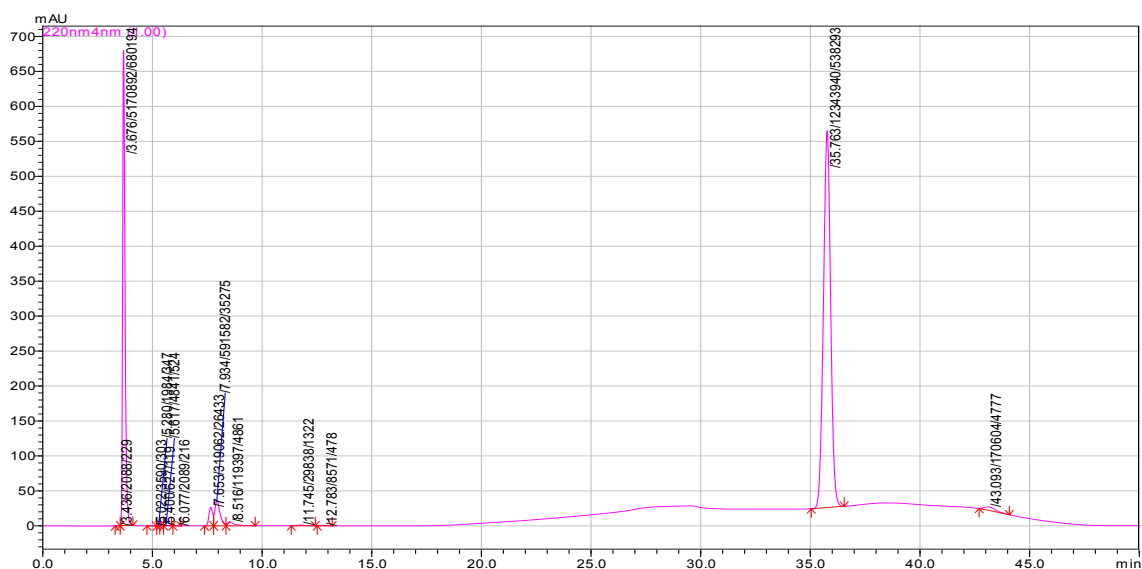


Σχήμα παραρτήματος 9: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τη μελέτη σταθερότητας κλοπιδογρέλης σε υδαταλκοολικό διάλυμα 60% κ.ο. (συγκεντρώσεις ως προς βάση).

Αποτελέσματα καμπύλων αναφοράς

	Τιμές (±SD, n=3)
Κλίση	28866 (±401)
Τομή	-589123 (±491428)
r ²	0,998 (±0,002)

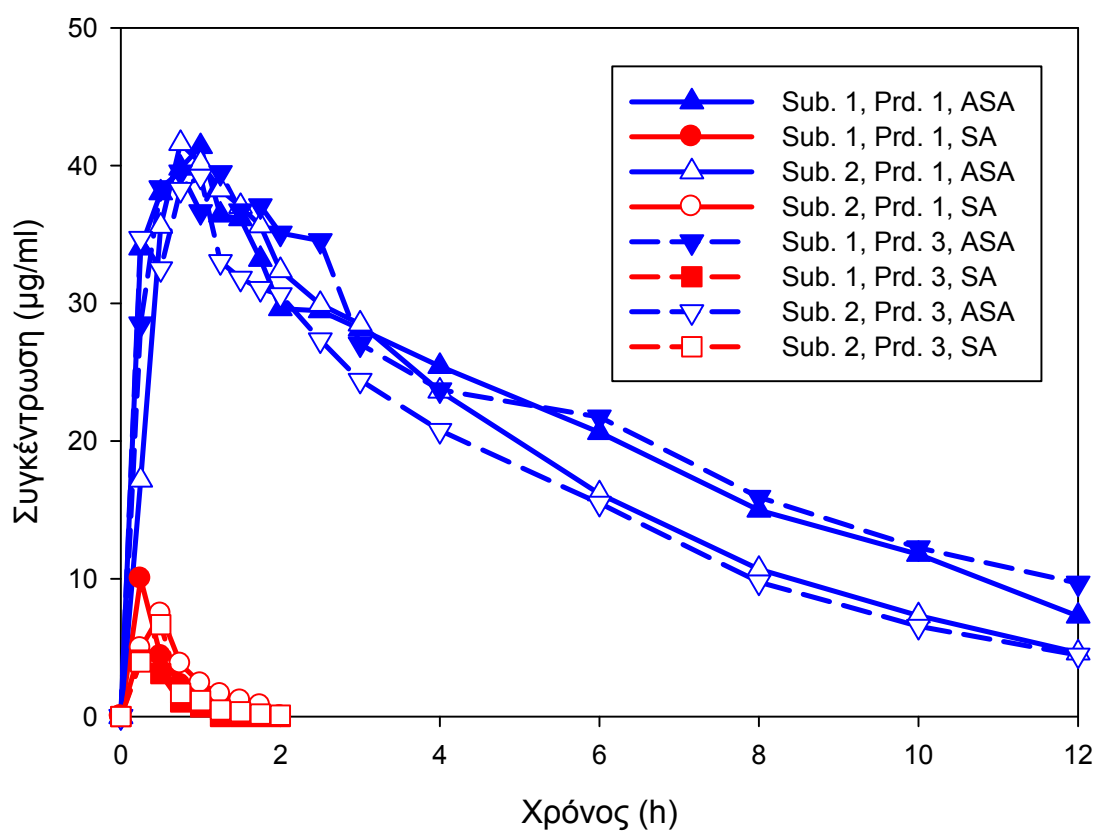
Ενδεικτικό Χρωματογράφημα



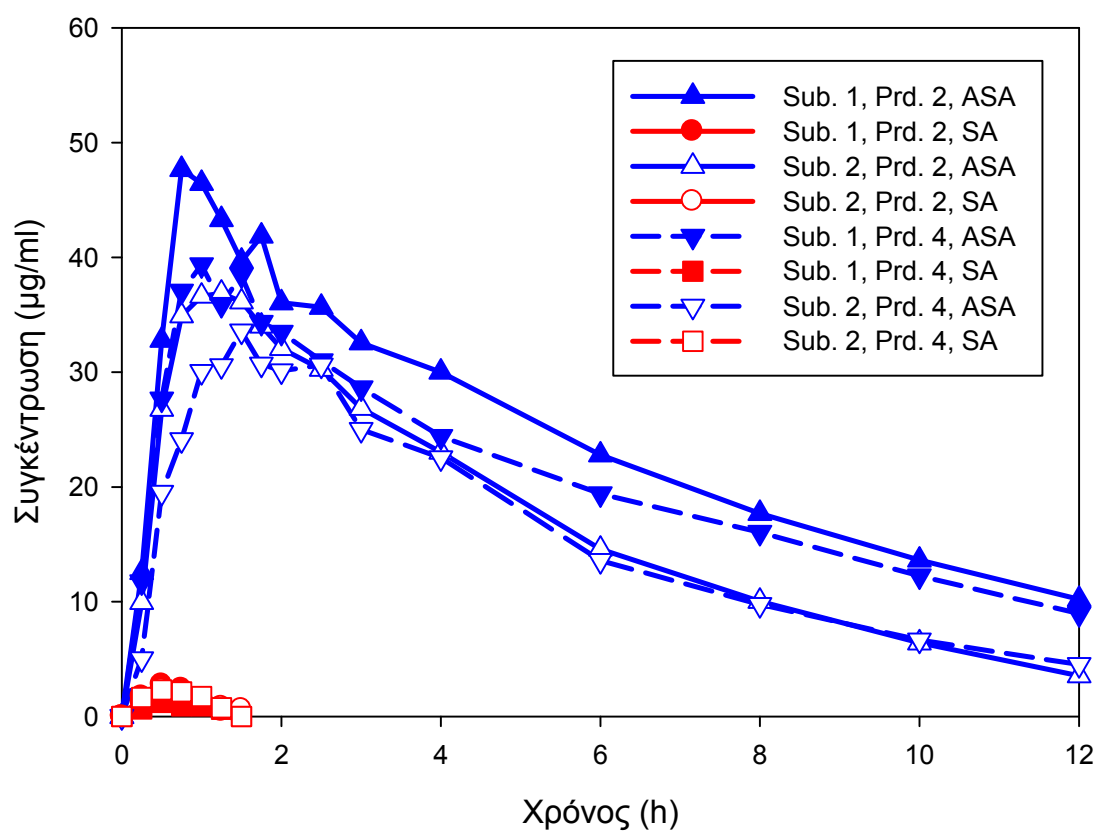
Εικόνα παραρτήματος 9: Ενδεικτικό χρωματογράφημα μελέτης σταθερότητας κλοπιδογρέλης σε υδαταλκοολικό διάλυμα 60% κ.ο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II – ΑΤΟΜΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΣΠΙΡΙΝΗΣ

ΣΚΕΥΑΣΜΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ



ΣΚΕΥΑΣΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ - ΡΟΥΤΙΝΕΣ

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΚΙΝΗΣΗΣ BROWN (MATLAB)

```
% BM3PLOT Generate and plot a 3-dimensional Brownian motion
%
% Inputs: npoints - length of the trajectory
%         sigma - optional, the norming constant. Default 1.
%
% Outputs: bmproc - npoints x 3 matrix with values of the process

% set default parameter values
sigma = 1;
npoints = 5000;
% generate a 3-dimensional random walk with normally distributed
% jumps
bmproc = cumsum([zeros(1, 3); sigma^0.5*randn(npoints-1, 3)]);
% plot the process
% first the trajectory in black
plot3(bmproc(:, 1), bmproc(:, 2), bmproc(:, 3), 'k');
% create colour matrices for every point
p_col = (bmproc-repmat(min(bmproc), npoints, 1))./ ...
    repmat(max(bmproc)-min(bmproc), npoints, 1);
% plot the jump points as points in the colour cube
% to get a "space" feeling
hold on;
scatter3(bmproc(:, 1), bmproc(:, 2), bmproc(:, 3), ...
    10, p_col, 'filled');
grid on;
hold off;
```

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΜΗΔΕΝΟΤΑΞΙΚΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ (MATHEMATICA).

Σχήμα Β.2.3: Γραφική απεικόνιση εξίσωσης Β.2.20 ή Β.2.23 για τιμές του α που αναγράφονται στο διάγραμμα. Σε όλες τις περιπτώσεις $k'_{0,1}$ ή $k'_{0,2}=0,5$

```
Plot[Evaluate@Table[ $\frac{k}{\Gamma[a+1]} x^a$ /. {k → 0.5}, {a, 4, 1.6, .2}], {x, 0, 3}, PlotRange
→ {{0, 3}, {0, 1}}, AxesOrigin → {0, 0}, Frame → True, FrameLabel
→ {Style["Χρόνος", 16, Bold, Black, Large], Style[Fr("Fa"), 16, Bold, Black, Large]}, FrameStyle
→ {{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 16, PlotStyle → Thick, ImageSize
→ Large]
```

Σχήμα Β.2.4: Γραφική απεικόνιση εξίσωσης Β.2.24 (ή Β.2.26) για τιμές του α που αναγράφονται στο διάγραμμα. Σε όλες τις περιπτώσεις $k_{0,1}$ ή $k_{0,2}=0,5$

```
Plot[Evaluate@Table[kx^a/. {k → 0.5}, {a, 4, 1.6, .2}], {x, 0, 3}, PlotRange
→ {{0, 3}, {0, 1}}, AxesOrigin → {0, 0}, Frame → True, FrameLabel
→ {Style["Χρόνος", 16, Bold, Black, Large], Style[Fr("Fa"), 16, Bold, Black, Large]}, FrameStyle
→ {{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 16, PlotStyle → Thick, ImageSize
→ Large]
```

Σχήμα Β.2.5: Γραφική απεικόνιση εξίσωσης Β.2.20 ή Β.2.23 για τιμές του $k'_{0,1}$ ή $k'_{0,2}$ που αναγράφονται στο διάγραμμα. Σε όλες τις περιπτώσεις $\alpha=0,5$.

```
Plot[Evaluate@Table[ $\frac{k}{\Gamma[a+1]} x^a$ /. {a → 0.5}, {k, 2, 1.4, .2}], {x, 0, 3}, PlotRange
→ {{0, 3}, {0, 1}}, AxesOrigin → {0, 0}, Frame → True, FrameLabel
→ {Style["Χρόνος", 16, Bold, Black, Large], Style[Fr("Fa"), 16, Bold, Black, Large]}, FrameStyle
→ {{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 16, PlotStyle → Thick, ImageSize
→ Large]
```

Σχήμα Β.2.6: Γραφική απεικόνιση εξίσωσης Β.2.21 ή Β.2.22 για τιμές t_{lag} που αναγράφονται στο διάγραμμα.

```
Plot[Evaluate@Table[UnitStep[x - x0]  $\frac{k}{\Gamma[a+1]} (x - x0)^a$ /. {k → 0.5, a -
> 0.5}, {x0, 0, 1, .2}], {x, 0, 3}, PlotRange → {{0, 3}, {0, 1}}, AxesOrigin → {0, 0}, Frame
→ True, FrameLabel
→ {Style["Χρόνος", 16, Bold, Black, Large], Style[Fr("Fa"), 16, Bold, Black, Large]}, FrameStyle
→ {{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 16, PlotStyle → Thick, ImageSize
→ Large]
```

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΗ ΓΡΑΜΜΙΚΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΜΗΔΕΝΟΤΑΞΙΚΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (MATHEMATICA).

```

dat1 = ReadList[E:\...\data1.txt, {Number, Number}];
dat2 = ReadList["E:\...\data2.txt", {Number, Number}];

pdat1 = ListPlot[dat1, Joined → False, PlotRange → All, PlotStyle
    → {Blue, PointSize[0.02]}, AxesOrigin → {0,0}];
pdat2 = ListPlot[dat2, Joined → False, PlotRange → All, PlotStyle
    → {Red, PointSize[0.02]}, AxesOrigin → {0,0}];

alltogetherplot = Show[pdat1, pdat2]

model =  $\frac{k_0}{\Gamma[a + 1]} x^a$ ;

nlm1 = NonlinearModelFit[dat1, {model, 0 < a}, {{a, 0.5}, {k0, 0.5}}, x];
nlm2 = NonlinearModelFit[dat2, {model, 0 < a}, {{a, 0.5}, {k0, 0.5}}, x];

plot1 = Plot[nlm1[x], {x, 0, 24}, PlotStyle → {Blue, Thick}, PlotRange → All];
plot2 = Plot[nlm2[x], {x, 0, 24}, PlotStyle → {Red, Thick}, PlotRange → All];

alltogetherplot2 = Show[plot1, plot2]

Needs["PlotLegends`"]

l = {{Graphics[{Blue, Thick, Line[{{0,.7}, {15,.7}}]}], "data1"},
{Graphics[{Red, Thick, Line[{{0,.7}, {15,.7}}]}], "data2"}}

ShowLegend[Show[alltogetherplot, alltogetherplot2, PlotRange → All, Frame
    → True, FrameLabel
    → {Style["Χρόνος (h)", 16, Bold, Black, Large], Style[Fr, 16, Bold, Black, Large]}, FrameStyle
    → {{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 16, ImageSize
    → Large], {l, LegendPosition → {2, -.3}, LegendSize → {.4,.3}}]

nlm1[ParameterTable]

nlm1[BestFitParameters]

```

nlm1[ParameterErrors]

nlm1[ParameterConfidenceIntervalTable]

nlm1[ANOVATable]

ListPlot[nlm1["FitResiduals"], Filling → Axis]

Grid[Transpose[{#, nlm1[#]}&[{"AdjustedRSquared", "AIC", "BIC", "RSquared"}]], Alignment
→ Left]

nlm2[ParameterTable]

nlm2[BestFitParameters]

nlm2[ParameterErrors]

nlm2[ParameterConfidenceIntervalTable]

nlm2[ANOVATable]

ListPlot[nlm2["FitResiduals"], Filling → Axis]

Grid[Transpose[{#, nlm2[#]}&[{"AdjustedRSquared", "AIC", "BIC", "RSquared"}]], Alignment
→ Left]

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΟ ΜΟΝΟΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΜΕ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΜΗΔΕΝΟΤΑΞΙΚΗ ΕΙΣΟΔΟ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΤΑΞΙΚΗ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ (MATHEMATICA).

$$\text{conc} = \text{If}[t < \left(\frac{\text{DoseGamma}[1 + a]}{k_0}\right)^{\frac{1}{a}}, k_0 \text{Exp}[-ket](-ke)^a - a(1 - \text{Gamma}[a, -ket]/\text{Gamma}[a]), \text{Dosee}^{-ke\left(\frac{\text{DoseGamma}[1+a]}{k_0}\right)^{\frac{1}{a}}} k_0(-ke)^{-a} (1 - \frac{\text{Gamma}[a, -ke\left(\frac{\text{DoseGamma}[1 + a]}{k_0}\right)^{\frac{1}{a}}]}{\text{Gamma}[a]}) \text{Exp}[a] - \left(\frac{\text{DoseGamma}[1 + a]}{k_0}\right)^{\frac{1}{a}}]]$$

```
plot1 = Plot[conc/.{Dose → 1, k0 → ". 5" , ke → ". 5" , a → 1} , {t, 0,24}, PlotStyle
→ {Blue, Thick}, PlotRange → All];
```

```
plot2 = Plot[conc/.{Dose → 1, k0 → ". 5" , ke → ". 5" , a → "&". 9" } , {t, 0,24}, PlotStyle →
{Red, Thick}, PlotRange → All];
```

```
plot3 = Plot[conc/.{Dose → 1, k0 → ". 5" , ke → ". 5" , a → ". 8" } , {t, 0,24}, PlotStyle
→ {Black, Thick}, PlotRange → All];
```

```
plot4 = Plot[conc/.{Dose → 1, k0 → ". 5" , ke → ". 5" , a → ". 7" } , {t, 0,24}, PlotStyle
→ {Green, Thick}, PlotRange → All];
```

```
plot5 = Plot[conc/.{Dose → 1, k0 → ". 5" , ke → ". 5" , a → ". 6" } , {t, 0,24}, PlotStyle
→ {Orange, Thick}, PlotRange → All];
```

```
plot6 = Plot[conc/.{Dose → 1, k0 → ". 5" , ke → ". 5" , a → ". 5" } , {t, 0,24}, PlotStyle
→ {Cyan, Thick}, PlotRange → All];
```

```
alltogetherplot = Show[plot1, plot2, plot3, plot4, plot5, plot6]
```

```
Needs[PlotLegends`]
```

```
l = {{Graphics[{Blue, Thick, Line[{{0,.7}, {15,.7}}]}], Style["α
= 1", 12]}, {Graphics[{Red, Thick, Line[{{0,.7}, {15,.7}}]}], Style["α
= 0,9", 12]}, {Graphics[{Black, Thick, Line[{{0,.7}, {15,.7}}]}], Style["α
= 0,8", 12]}, {Graphics[{Green, Thick, Line[{{0,.7}, {15,.7}}]}], Style["α
= 0,7", 12]}, {Graphics[{Orange, Thick, Line[{{0,.7}, {15,.7}}]}], Style["α
= 0,6", 12]}, {Graphics[{Cyan, Thick, Line[{{0,.7}, {15,.7}}]}], Style["α
= 0,5", 12]}}
```

```
ShowLegend[Show[alltogetherplot, PlotRange → {{0,12}, {0,.7}}, Frame
→ True, FrameLabel
→ {Style["Χρόνος (h)", 16, Bold, Black, Large], Style["Συγκέντρωση (mg
/L)", 16, Bold, Black, Large]}, FrameStyle
→ {{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 16, ImageSize
→ Large], {l, LegendPosition → {.3,.2}, LegendSize → {.3,.3}}]
```

```
NIntegrate[ $\frac{\text{conc}}{L \cdot \{Dose \rightarrow 1, k0 \rightarrow \quad, ke \rightarrow \quad, a \rightarrow 1\}}$ , {t, 0, Infinity}]
```

```
NIntegrate[conc/.{Dose → 1, k0 → .5, ke → .5, a → 1}, {t, 0, 24}]
```

```
FindMaximum[conc/.{Dose → 1, k0 → .5, ke → .5, a → 1}, t]
```

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΞΙΚΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ (MATHEMATICA).

$$f[x_, a_, b_] := 1 - \sum_{k=0}^{100} \frac{(-bx^a)^k}{\text{Gamma}[ak + 1]}$$

Plot[Evaluate@Table[f[x, a, b]/. {b → 0.5}, {a, 4, 1.6, .2}], {x, 0, 10}, PlotRange

→ {{0, 10}, {0, 1.5}}, AxesOrigin → {0, 0}, Frame → True, FrameLabel

→ {Style["Χρόνος", 16, Bold, Black, Large], Style[F_r("F_a"), 16, Bold, Black, Large]}, FrameStyle

→ {{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 16, PlotStyle → Thick, ImageSize

→ Large]

$$g[x_, a_, b_] := \text{If}\left[1 - \sum_{k=0}^{500} \frac{(-bx^a)^k}{\text{Gamma}[ak + 1]} < 1, 1 - \sum_{k=0}^{500} \frac{(-bx^a)^k}{\text{Gamma}[ak + 1]}, 1\right]$$

Plot[Evaluate@Table[g[x, a, b]/. {b → 0.5}, {a, 4, 1.6, .2}], {x, 0, 10}, PlotRange

→ {{0, 8}, {0, 1.2}}, AxesOrigin → {0, 0}, Frame → True, FrameLabel

→ {Style["Χρόνος", 16, Bold, Black, Large], Style[F_r("F_a"), 16, Bold, Black, Large]}, FrameStyle

→ {{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 16, PlotStyle → Thick, ImageSize

→ Large]

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΗ ΓΡΑΜΜΙΚΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΞΙΚΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (MATHEMATICA).

```
dat1 = ReadList[E:\...\data1.txt, {Number, Number}];
```

```
dat2 = ReadList["E: ...\data2.txt", {Number, Number}];
```

```
pldat1 = ListPlot[dat1, Joined → False, PlotRange → All, PlotStyle  
→ {Blue, PointSize[0.02]}, AxesOrigin → {0,0}];
```

```
pldat2 = ListPlot[dat2, Joined → False, PlotRange → All, PlotStyle  
→ {Red, PointSize[0.02]}, AxesOrigin → {0,0}];
```

```
alltogetherplot = Show[pldat1, pldat2]
```

$$\text{model} = 1 - \sum_{k=0}^{100} \frac{(-bx^a)^k}{\text{Gamma}[ak + 1]};$$

```
nlm1 = NonlinearModelFit[dat1, {model, 0 < a}, {{a, 0.9}, {b, 1}}, x];
```

```
nlm2 = NonlinearModelFit[dat2, {model, 0 < a}, {{a, 0.9}, {b, 1}}, x];
```

```
plot1 = Plot[nlm1[x], {x, 0,5}, PlotStyle → {Blue, Thick}, PlotRange → All];
```

```
plot2 = Plot[nlm2[x], {x, 0,5}, PlotStyle → {Red, Thick}, PlotRange → All];
```

```
alltogetherplot2 = Show[plot1, plot2]
```

```
Needs["PlotLegends`"]
```

```
l = {{Graphics[{Blue, Thick, Line[{{0,.7}, {15,.7}}]}], "data1"},  
{Graphics[{Red, Thick, Line[{{0,.7}, {15,.7}}]}], "data2"}}
```

```
ShowLegend[Show[alltogetherplot, alltogetherplot2, PlotRange → All, Frame  
→ True, FrameLabel
```

```
→ {Style["Χρόνος (h)", 16, Bold, Black, Large], Style[Fr, 16, Bold, Black, Large]}, FrameStyle
```

```
→ {{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 16, ImageSize
```

```
→ Large], {l, LegendPosition → {.2, -.3}, LegendSize → {.7,.4}}]
```

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΗ ΓΡΑΜΜΙΚΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΞΙΚΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΣΕ *IN VIVO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (MATLAB)

```
format long;

datafile1='balan_abs_slow.txt';
datafile2='balan_abs_medium.txt';
datafile3='balan_abs_fast.txt';

% initial estimates
x0=[1 .16 .14];

% bounds
LB=[0 0 0];
UB=[1 1 1];

fid1 = fopen(datafile1, 'r');
data1 = fscanf(fid1, '%g %g', [2 inf]);
fclose(fid1);
data1=data1';

fid2 = fopen(datafile2, 'r');
data2 = fscanf(fid2, '%g %g', [2 inf]);
fclose(fid2);
data2=data2';

fid3 = fopen(datafile3, 'r');
data3 = fscanf(fid3, '%g %g', [2 inf]);
fclose(fid3);
data3=data3';

xdata1=data1(:,1);
ydata1=data1(:,2);

xdata2=data2(:,1);
ydata2=data2(:,2);

xdata3=data3(:,1);
ydata3=data3(:,2);

nparam=length(x0);
ndata1=length(xdata1);
ndata2=length(xdata2);
ndata3=length(xdata3);

options=optimset('MaxFunEvals',100000,'MaxIter',10000,'Display','iter');

[x1,resnorm,residual,exitflag,output,lambda,jacobian] =
lsqcurvefit(@modellnl,x0,xdata1,ydata1,LB,UB,options);

[x2,resnorm,residual,exitflag,output,lambda,jacobian] =
lsqcurvefit(@modellnl,x0,xdata2,ydata2,LB,UB,options);

[x3,resnorm,residual,exitflag,output,lambda,jacobian] =
lsqcurvefit(@modellnl,x0,xdata3,ydata3,LB,UB,options);
```

```
y1=model1nl(x1,xdata1);
y2=model1nl(x2,xdata2);
y3=model1nl(x3,xdata3);
timesim1=[0:.001:xdata1(length(xdata1))];
timesim2=[0:.001:xdata2(length(xdata2))];
timesim3=[0:.001:xdata3(length(xdata3))];
plot(timesim1,model1nl(x1,timesim1),timesim2,model1nl(x2,timesim2),timesim3
,model1nl(x3,timesim3))
hold on
plot(xdata1,ydata1,'o',xdata2,ydata2,'x',xdata3,ydata3,'v')
hold off
```

output

x1

x2

x3

Rsqrabs1=1-resnorm/norm(ydata1-mean(ydata1))^2;

Rsqrabs1

Rsqrabs2=1-resnorm/norm(ydata2-mean(ydata2))^2;

Rsqrabs2

Rsqrabs3=1-resnorm/norm(ydata3-mean(ydata3))^2;

Rsqrabs3

ΡΟΥΤΙΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΜΗΔΕΝΟΤΑΞΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ
ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ/ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ *IN VIVO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗ
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (MATLAB)

```
function f = model0(x,xdata)
%MODEL Zero order fractional
% Detailed explanation goes here
fin=10000000;
% global fin
a=x(1);
k=x(2);
x0=x(3);

f=zeros(length(xdata),1);
for i=1:length(xdata);
    if xdata(i)>=fin;
        f(i)=1;
    else
        f(i)=step(xdata(i)-x0)*(k/gamma(a+1))*(xdata(i)-x0)^a;
        if f(i)>1
            fin=xdata(i);
            f(i)=1;
        end
    end

end

end
end

function f=step(x)
if x<0
    f=0;
else
    f=1;
end
end
```

ΡΟΥΤΙΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΤΑΞΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ/ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ *IN VIVO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (MATLAB)

```
function f = modell(x,xdata)
%MODEL Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here
fin=10000000;
% global fin
a=x(1);
k=x(2);
F=x(3);
x0=x(4);

f=zeros(length(xdata),1);
for i=1:length(xdata);
    if xdata(i)>=fin;
        f(i)=F;
    else
        f(i)=step(xdata(i)-x0)*F*(1-MLF(a,1,-(k*(xdata(i)-x0))^a));
        if f(i)>F
            fin=xdata(i);
            f(i)=F;
        end
    end

end

end

end

function f=step(x)
if x<0
    f=0;
else
    f=1;
end
end
```

ΠΟΥΤΙΝΑ ΤΗΣ MITTAG-LEFFLER ΓΙΑ MATLAB ΑΠΟ ΤΟΝ IGOR PODLUBNY

(<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/8738>)

```
function [e]=mlf(alf,bet,c,fi);
%
% MLF -- Mittag-Leffler function.
%       MLF (alpha,beta,Z,P) is the Mittag-Leffler function
%       E_{alpha,beta}(Z)
%       evaluated with accuracy 10^(-P) for each element of Z.
% (C) 2001-2005 Igor Podlubny, Martin Kacenak

if nargin<4 , fi=6;      end
if nargin<3 | alf<=0 | fi<=0
else
    [r,s]=size(c); [r1,s1]=size(alf); [r2,s2]=size(bet);
    mx=max([r,s]); mx1=max([r1,s1]); mx2=max([r2,s2]);
    if (r>1 & s>1) | (r1>1 & s1>1) | (r2>1 & s2>1) | (mx1>1 & mx2>1)
        sprintf('wrong number of input parameters')
    else
        if mx1>mx2 , mxx=mx1; e=zeros(mx,mx1);
        else, mxx=mx2; e=zeros(mx,mx2);end;
        for i1= 1:mxx
            for i2=1:mxx

                if r>s , z=c(i1,1); else,z=c(1,i1); end
                if mx1>mx2 , if r1>s1 , alfa=alf(i2,1); else,
alfa=alf(1,i2);end, beta=bet;
                else if r2>s2 ,beta=bet(i2,1); else, beta=bet(1,i2); end,
alfa=alf; end
                if beta<0 , rc=(-2*log(10^(-
fi)*pi/(6*(abs(beta)+2)*(2*abs(beta))^(abs(beta))))^alfa;
                else , rc=(-2*log(10^(-fi)*pi/6))^alfa; end
                r0=max([1,2*abs(z),rc]);
                if (alfa==1 & beta==1)
                    e(i1,i2)=exp(z);
                else
                    if (alfa<1 & abs(z)<=1) | (1<=alfa<2 &
abs(z)<=floor(20/(2.1-alfa)^(5.5-2*alfa))) | (alfa>=2 & abs(z)<=50)
                        oldsum=0;
                        k=0;
                        while (alfa*k+beta)<=0
                            k=k+1;
                        end
                        newsum=z^k/gamma(alfa*k+beta);
                        while newsum~=oldsum
                            oldsum=newsum;
                            k=k+1;
                            term=z^k/gamma(alfa*k+beta);
                            newsum=newsum+term;
                            k=k+1;
                            term=z^k/gamma(alfa*k+beta);
                            newsum=newsum+term;
                        end
                        e(i1,i2)=newsum;
                    else
                        if (alfa<=1 & abs(z)<=fix(5*alfa+10))
```

```

        if ((abs(angle(z))>pi*alfa) & (abs(abs(angle(z))-(
(pi*alfa))>10^(-fi)))
            if beta<=1
                e(i1,i2)=rombint('K',0,r0,fi,alfa,beta,z);
            else
                eps=1;
                e(i1,i2)=rombint('K',eps,r0,fi,alfa,beta,z)+ ...
                    rombint('P',-
pi*alfa,pi*alfa,fi,alfa,beta,z,eps);
            end
        elseif (abs(angle(z))<pi*alfa & abs(abs(angle(z))-(
(pi*alfa))>10^(-fi)))
            if beta<=1
                e(i1,i2)=rombint('K',0,r0,fi,alfa,beta,z)+ ...
                    (z^((1-beta)/alfa))*(exp(z^(1/alfa))/alfa);
            else
                eps=abs(z)/2;
                e(i1,i2)=rombint('K',eps,r0,fi,alfa,beta,z)+ ...
                    rombint('P',-
pi*alfa,pi*alfa,fi,alfa,beta,z,eps)+ ...
                    (z^((1-beta)/alfa))*(exp(z^(1/alfa))/alfa);
            end
        else
            eps=abs(z)+0.5;
            e(i1,i2)=rombint('K',eps,r0,fi,alfa,beta,z)+ ...
                rombint('P',-
pi*alfa,pi*alfa,fi,alfa,beta,z,eps);
        end
    else
        if alfa<=1
            if (abs(angle(z))<(pi*alfa/2+min(pi,pi*alfa))/2)
                % alfa
                newsum=(z^((1-beta)/alfa))*exp(z^(1/alfa))/alfa;
                for k=1:floor(fi/log10(abs(z)))
                    newsum=newsum-((z^(-k))/gamma(beta-alfa*k));
                % k
                end
                e(i1,i2)=newsum;
            else
                newsum=0;
                for k=1:floor(fi/log10(abs(z)))
                    newsum=newsum-((z^(-k))/gamma(beta-alfa*k));
                end
                e(i1,i2)=newsum;
            end
        else
            if alfa>=2
                m=floor(alfa/2);
                sum=0;
                for h=0:m
                    zn=(z^(1/(m+1)))*exp((2*pi*i*h)/(m+1));
                    sum=sum+mlf(alfa/(m+1),beta,zn,fi);
                end
                e(i1,i2)=(1/(m+1))*sum;
            else
                e(i1,i2)=(mlf(alfa/2,beta,z^(1/2),fi)+mlf(alfa/2,beta,-z^(1/2),fi))/2;
            end
        end
    end
end
end
end

```

```
        end
    end
end
end
end
```

```
function [res]=rombint(funfcn,a,b,order,varargin);
if nargin<4 ,order=6; end
if nargin<3
    Warning ('Error in input format')
else
    rom=zeros(2,order);
    h=b-a;
    rom(1,1)=h*(feval(funfcn,a,varargin{:})+feval(funfcn,b,varargin{:}))/2;

    ipower=1;
    for i= 2:order
        sum=0;
        for j=1:ipower
            sum=sum+feval(funfcn,(a+h*(j-0.5)),varargin{:});
        end
        rom(2,1)=(rom(1,1)+h*sum)/2;
        for k=1:i-1
            rom(2,k+1)=((4^k)*rom(2,k)-rom(1,k))/((4^k)-1);
        end

        for j=0:i-1
            rom(1,j+1)=rom(2,j+1);
        end
        ipower=ipower*2;
        h=h/2;
    end
    res=rom(1,order);
end
```

```
function res=K(r,alfa,beta,z)
res=r.^((1-beta)/alfa).*exp(-r.^(1/alfa)).*(r*sin(pi*(1-beta))-...
z*sin(pi*(1-beta+alfa)))/(pi*alfa*(r.^2-2*r*z*cos(pi*alfa)+z.^2));
```

```
function res=P(r,alfa,beta,z,eps)
w=(eps^(1/alfa))*sin(r/alfa)+r*(1+(1-beta)/alfa);
res=((eps^(1+(1-beta)/alfa))/(2*pi*alfa))*((exp((eps^(1/alfa))*cos(r/alfa)).*...
(cos(w)+i*sin(w)))/(eps*exp(i*r)-z);
```

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ *IVVC* ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΩΝ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΜΗΔΕΝΟΤΑΞΙΚΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ

Σχήμα B.3.1: Με τη χρήση των σχέσεων B.2.20 και B.2.23.

```
ParametricPlot[Evaluate@Table[{x,  $\frac{1}{\text{Gamma}[a+1]} x^a$ }, {a, 2, 1.8, .2}], {x, 0, 3}, PlotRange →
{{0, 1}, {0, 1}}, AxesOrigin → {0, 0}, Frame → True, FrameLabel →
{Style[Fr, 30, Bold, Black], Style[Fa, 30, Bold, Black]}, FrameStyle →
{{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 24, PlotStyle → Thick, ImageSize →
Large, MaxRecursion → 15]
```

Σχήμα B.3.2: Με τη χρήση των σχέσεων B.2.24 και B.2.26.

```
ParametricPlot[Evaluate@Table[{x, xa}, {a, 2, 1.8, .2}], {x, 0, 3}, PlotRange →
{{0, 1}, {0, 1}}, AxesOrigin → {0, 0}, Frame → True, FrameLabel →
{Style[Fr, 30, Bold, Black], Style[Fa, 30, Bold, Black]}, FrameStyle →
{{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 24, PlotStyle → Thick, ImageSize →
Large, MaxRecursion → 15]
```

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ B.3.2 ΚΑΙ B.3.3.

Σχέση B.3.2:

```
Plot[Evaluate@Table[kx^a/. k → 1, {a, 4, 1.6, .2}], {x, 0, 10}, PlotRange →
{{0, 1}, {0, 1}}, AxesOrigin → {0, 0}, Frame → True, FrameLabel →
{Style[Fr, 30, Bold, Black], Style[Fa, 30, Bold, Black]}, FrameStyle →
{{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 24, PlotStyle → Thick, ImageSize →
Large, MaxRecursion → 15]
```

Σχέση B.3.3:

```
Plot[Evaluate@Table[kx^a + b/. k → 1.1/. b → -.1, {a, 4, 1.6, .2}], {x, 0, 10}, PlotRange →
{{0, 1}, {0, 1}}, AxesOrigin → {0, 0}, Frame → True, FrameLabel →
{Style[Fr, 30, Bold, Black], Style[Fa, 30, Bold, Black]}, FrameStyle →
{{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 24, PlotStyle → Thick, ImageSize →
Large, MaxRecursion → 15]
```

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ B.3.3 ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

```

data = ReadList["E: ...\\data.txt", {Number, Number}]

pdat1 = ListPlot[dat1, Joined → False, PlotRange → All, PlotStyle →
PointSize[0.02], AxesOrigin → {0,0}]

f[x_, k_, a_, b_] := kxa + b

model1 = f[x, k, a, b];

nlm1 = NonlinearModelFit[dat1, {model1, 0 < a}, {{a, 1}, {k, 1}, {b, 0}}, x]

Show[ListPlot[dat1, Joined → False, PlotRange → All, PlotStyle →
{Black, PointSize[0.02]}, AxesOrigin → {0,0}], Plot[nlm1[x], {x, 0, 24}, AxesOrigin →
{0,0}, PlotStyle → {Black, Thick}, PlotRange → All], Frame → True, AxesOrigin →
{0,0}, FrameLabel → {Style[Fr, 30, Bold, Black], Style[Fa, 30, Bold, Black]}, FrameStyle →
{{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle → 20, ImageSize →
Large, AxesOrigin → {0,0}]

nlm1["ParameterTable"]

nlm1["BestFitParameters"]

nlm1[ParameterErrors]

nlm1["ParameterConfidenceIntervalTable"]

nlm1["ANOVATable"]

Grid[Transpose[{{#, nlm1[#]}&{"AdjustedRSquared", "AIC", "BIC", "RSquared"}}, Alignment →
Left]

```

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΝΕΛΙΞΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ B.3.4

Fr = {0,0.09111111,0.317778,0.462222,0.86,1.02,1,1,1};

time = {0,1,3,5,9,12,18,24,72};

lamda = 0.7236 mu = 1.005 k = 0.046 Dose = 500 V = 10.2

```
Table[{t, Dose/V N Sum[mu (Fr[[j + 1]]lamda - Fr[[j]]lamda)/(time[[j + 1]] - time[[j]])/k
(-Exp[-kUnitStep[t - time[[j]]](t - time[[j]]) + Exp[-kUnitStep[t - time[[j +
1]]](t - time[[j + 1]]))], {j, 1, m}]/. m → Position[time, x_ /; x < t][[-1]][[1]], {t, 1, 72}]

ex = {{1., 2.6005}, {2., 10.0473}, {3., 20.2128}, {4., 28.2506}, {5., 32.3877}, {6., 36.4066},
{7.5, 36.052}, {9., 35.9338}, {10.5, 35.6974}, {12., 34.5154}, {13., 33.9243}, {15., 31.9149},
{18., 27.5414}, {24., 20.331}, {36., 12.1749}, {48., 7.2104}, {72., 2.7187}};
```

```
auc1 = Integrate[Interpolation[ctt, InterpolationOrder → 1][x], {x, 0, 72}] +
ctt[[-1]][[2]]/k
```

```
pldat1 = Show[ListPlot[ex, PlotStyle →
{Black, PointSize[0.02]}], ListLinePlot[ctt, PlotStyle → {Thick, Black}], Frame →
True, AxesOrigin → {0, 0}, FrameLabel →
{Style["Χρόνος (h)", 24, Bold, Black], Style["Συγκέντρωση (mg/
L)", 24, Bold, Black]}, FrameStyle → {{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle →
20, ImageSize → Large]
```

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ B.3.7 ΚΑΙ B.3.8 (ΑΝΩ ΣΚΕΛΟΣ)

$$D[\{Dose(mu(kt^a)^{lamda} - beta)\}, t]$$

Το αποτέλεσμα είναι η σχέση B.3.7, η οποία στο Mathematica δίνεται ως εξής:

$$aDoseklamdamut^{-1+a}(kt^a)^{-1+lamda}$$

Η οποία με απλοποίηση δίνει την B.3.7.

Η ρουτίνα που δίνει το άνω σκέλος της σχέσης B.3.8 είναι η ακόλουθη (διαδικασία συνέλιξης):

$$\text{Integrate}[(Dosea\lambda m d a m u k^{\lambda} \lambda m d a t a u^{(a\lambda m d a - 1)}) \text{Exp}[-k e(t - \tau)], \{\tau, 0, t\}, \text{Assumptions} \rightarrow \{a > 0, \lambda m d a > 0, t > 0\}]$$

Η οποία δίνει ως αποτέλεσμα:

$$aDosee^{-ket} k^{\lambda m d a} (-ke)^{-a\lambda m d a} \lambda m d a m u (\text{Gamma}[a\lambda m d a] - \text{Gamma}[a\lambda m d a, -ket])$$

Το οποίο είναι στην ουσία το άνω σκέλος της B.3.8.

Στην ακόλουθη ρουτίνα συνδυάζονται τα παραπάνω για την εφαρμογή σε πειραματικά δεδομένα.

ΡΟΥΤΙΝΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΝΕΛΙΞΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ B.3.8

lamda = 0.7236 mu = 1.005 ke = 0.046 Dose = 500 V = 10.2 a = 0.9523

tlag = 0.0928492 k = 0.106505

t0 = (1/k)^(1/a) + tlag

ctt1 = Table[{t, Dose/V If[t < t0, NIntegrate[If[tau < tlag, 0, a k lamda mu(tau - tlag)^{-1+a}(k(tau - tlag)^a)^{-1+lamda}] * Exp[-ke(t - tau)], {tau, 0, t}], NIntegrate[If[tau < tlag, 0, a k lamda mu(tau - tlag)^{-1+a}(k(tau - tlag)^a)^{-1+lamda}] * Exp[-ke(t0 - tau)], {tau, 0, t0}] * Exp[-ke(t - t0)]}], {x, 0, 24}]

auc1 = Integrate[Interpolation[ctt1, InterpolationOrder → 1][x], {x, 0, 72}] +
ctt1[[-1]][[2]]/ke

ex1 = {{1., 2.6005}, {2., 10.0473}, {3., 20.2128}, {4., 28.2506}, {5., 32.3877}, {6., 36.4066},
{7.5, 36.052}, {9., 35.9338}, {10.5, 35.6974}, {12., 34.5154}, {13., 33.9243}, {15., 31.9149},
{18., 27.5414}, {24., 20.331}, {36., 12.1749}, {48., 7.2104}, {72., 2.7187}};

pldat1 = Show[ListPlot[ex1, PlotStyle →
{Black, PointSize[0.02]}], ListLinePlot[ctt1, PlotStyle → {Thick, Black}], Frame →
True, AxesOrigin → {0, 0}, FrameLabel →
{Style["Χρόνος (h)", 24, Bold, Black], Style["Συγκέντρωση (mg/
L)", 24, Bold, Black]}, FrameStyle → {{Thick, Large}, {Thick, Large}}, FrameTicksStyle →
20, ImageSize → Large]

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdallah, O., El-Fattah, S. A., 1984. Thermodynamic properties of two forms of sulfamethoxazole. *Pharmazeutische Industrie* 46, 970-971.
2. Abrahamsson, B., Alpsten, M., Bake, B., Jonsson, U. E., Eriksson-Lepkowska, M., Larsson, A., 1998. Drug absorption from nifedipine hydrophilic matrix extended-release (ER) tablet-comparison with an osmotic pump tablet and effect of food. *Journal of Controlled Release* 52, 301-310.
3. Abrahamsson, B., Pal, A., Sjöberg, M., Carlsson, M., Laurell, E., Brasseur, J. G., 2005. A novel in vitro and numerical analysis of shear-induced drug release from extended-release tablets in the fed stomach. *Pharmaceutical Research* 22, 1215-1226.
4. Agoram, B., Woltosz, W. S., Bolger, M. B., 2001. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50, S41-S67.
5. Al-Behaisi, S., Antal, I., Morovján, G., Szúnyog, J., Drabant, S., Marton, S., Klebovich, I., 2002. In vitro simulation of food effect on dissolution of deramciclanc film-coated tablets and correlation with in vivo data in healthy volunteers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, 157-162.
6. AlKhatib, H., Aiedeh, K., Bustanji, Y., Hamed, S., Mohammad, M., AlKhalidi, B., Najjar, S., 2008. Modulation of buspirone HCl release from hypromellose matrices using chitosan succinate: Implications for pH-independent release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70, 804-812.
7. Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., Crison, J. R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research* 12, 413-420.
8. Anacker, L., Kopelman, R., 1984. Fractal chemical kinetics: Simulations and experiments. *The Journal of Chemical Physics* 81, 6402-6403.
9. Appel-Dingemanse, S., Lemarechal, M. O., Kumle, A., Hubert, M., Legangneux, E., 1999. Integrated modelling of the clinical pharmacokinetics of SDZ HTF 919, a novel selective 5-HT₄ receptor agonist, following oral and intravenous administration. *British Journal of Clinical Pharmacology* 47, 483-491.
10. Balan, G., Timmins, P., Greene, D. S., Marathe, P. H., 2001. In vitro-in vivo correlation (IVIVC) models for metformin after administration of modified-release (MR) oral dosage forms to healthy human volunteers. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90, 1176-1185.
11. Baumann, G., 2005. *Fractional Calculus and Symbolic Solution of Fractional Differential Equations*, in: Losa, G. A., Merlini, D., Nonnenmacher, T. F., Weibel, E. R. (Eds.), *Fractals in Biology and Medicine*. Birkhäuser Basel, pp. 287-298.
12. Baxter, J. L., Kukura, J., Muzzio, F. J., 2005. Hydrodynamics-induced variability in the USP apparatus II dissolution test. *International Journal of Pharmaceutics* 292, 17-28.

13. Bijlsma, P. B., Peeters, R. A., Groot, J. A., Dekker, P. R., Taminiau, J. A., Van Der Meer, R., 1995. Differential in vivo and in vitro intestinal permeability to lactulose and mannitol in animals and humans: a hypothesis. *Gastroenterology* 108, 687-696.
14. Blanquet, S., Zeijdner, E., Beyssac, E., Meunier, J. P., Denis, S., Havenaar, R., Alric, M., 2004. A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharmaceutical Research* 21, 585-591.
15. Borchardt, R. T., 2006. *Optimizing the "drug-like" properties of leads in drug discovery*. Springer, New York, NY.
16. Bressolle, F., Gomeni, R., Alric, R., Royer-Morrot, M. J., Necciari, J., 1994. A double Weibull input function describes the complex absorption of sustained-release oral sodium valproate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83, 1461-1464.
17. Brown, R., 1828. XXVII. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Philosophical Magazine Series 2* 4, 161-173.
18. Brunner, E., 1904. Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen systemen. *Z. phys. Chem* 47, 56-102.
19. Brunner, J. R., 1981. Cow milk proteins: twenty-five years of progress [Identification and characterization]. *Journal of Dairy Science (USA)*.
20. Bunde, A., Havlin, S., Nossal, R., Stanley, H., Weiss, G., 1985. On controlled diffusion limited drug release from a leaky matrix. *Journal of Chemical Physics* 83, 5909-5913.
21. Butzer, P., Westphal, U., 2000. An introduction to fractional calculus. *Applications of Fractional Calculus in Physics*, 1-85.
22. Campagna, F. A., Cureton, G., Mirigian, R. A., Nelson, E., 1963. Inactive prednisone tablets U.S.P. XVI. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52, 605-606.
23. Caputo, M., 1967. Linear Models of Dissipation whose Q is almost Frequency Independent-II. *Geophysical Journal of the Royal Astronomical Society* 13, 529-539.
24. Caroli-Bosc, F. X., Iliadis, A., Salmon, L., Macheras, P., Montet, A. M., Bourgeon, A., Garraffo, R., Delmont, J. P., Montet, J. C., 2000. Ursodeoxycholic acid modulates cyclosporin A oral absorption in liver transplant recipients. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 14, 601-609.
25. Cedillo-Ramírez, E., Villafuerte-Robles, L., Hernandez-Leon, A., 2006. Effect of added Pharmatose DCL11 on the sustained-release of metronidazole from Methocel K4M and Carbopol 971P NF floating matrices. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 32, 955-965.

26. Charkoftaki, G., Dokoumetzidis, A., Valsami, G., Macheras, P., 2010a. Biopharmaceutical classification based on solubility and dissolution: a reappraisal of criteria for hypothesis models in the light of the experimental observations. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 106, 168-172.
27. Charkoftaki, G., Kytariolos, J., Macheras, P., 2010b. Novel milk-based oral formulations: Proof of concept. *International Journal of Pharmaceutics* 390, 150-159.
28. Chiou, W. L., Riegelman, S., 1971. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 60, 1281-1302.
29. Christensen, F., Hansen, F., Bechgaard, H., 1980. Physical interpretation of parameters in the Rosin-Rammler-Sperling-Weibull distribution for drug release from controlled release dosage forms. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 32, 580.
30. Constantinides, P. P., 1995. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharmaceutical Research* 12, 1561-1572.
31. Corrigan, O., Devlin, Y., Butler, J., 2003. Influence of dissolution medium buffer composition on ketoprofen release from ER products and in vitro-in vivo correlation. *International Journal of Pharmaceutics* 254, 147-154.
32. Costa, P., Sousa Lobo, J., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13, 123-133.
33. Cutler, D., 1978a. Numerical deconvolution by least squares: use of polynomials to represent the input function. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 6, 243-263.
34. Cutler, D., 1978b. Numerical deconvolution by least squares: use of prescribed input functions. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 6, 227-241.
35. D'Arcy, D., Corrigan, O., Healy, A., 2005. Hydrodynamic simulation (computational fluid dynamics) of asymmetrically positioned tablets in the paddle dissolution apparatus: impact on dissolution rate and variability. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57, 1243-1250.
36. D'Arcy, D., Corrigan, O., Healy, A., 2006. Evaluation of hydrodynamics in the basket dissolution apparatus using computational fluid dynamics--Dissolution rate implications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27, 259-267.
37. D'Arcy, D. M., Healy, A. M., Corrigan, O. I., 2009. Towards determining appropriate hydrodynamic conditions for in vitro in vivo correlations using computational fluid dynamics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 37, 291-299.
38. Dahan, A., Hoffman, A., 2006. *Enhanced Gastrointestinal Absorption of Lipophilic Drugs*, Enhancement in Drug Delivery. CRC Press, Boca Raton.

39. Dalgleish, D. G., 1984. Measurement of electrophoretic mobilities and zeta-potentials of particles from milk using laser Doppler electrophoresis. *Journal of Dairy Research* 51, 425-438.
40. Dalir, M., Bashour, M., 2010. Applications of Fractional Calculus. *Applied Mathematical Sciences* 4, 1021-1032.
41. Danckwerts, P., 1951. Significance of liquid-film coefficients in gas absorption. *Industrial & Engineering Chemistry* 43, 1460-1467.
42. Digenis, G. A., Sandefer, E. P., Beihn, R. M., Parr, A. F., 1991. Dual-isotope imaging of neutron-activated erbium-171 and samarium-153 and the in vivo evaluation of a dual-labeled bilayer tablet by gamma scintigraphy. *Pharmaceutical Research* 8, 1335-1340.
43. Dokoumetzidis, A., Macheras, P., 1997. A population growth model of dissolution. *Pharmaceutical Research* 14, 1122-1126.
44. Dokoumetzidis, A., Macheras, P., 2003. A model for transport and dispersion in the circulatory system based on the vascular fractal tree. *Annals of Biomedical Engineering* 31, 284-293.
45. Dokoumetzidis, A., Macheras, P., 2006. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. *International Journal of Pharmaceutics* 321, 1-11.
46. Dokoumetzidis, A., Macheras, P., 2008. IVIVC of controlled release formulations: Physiological-dynamical reasons for their failure. *Journal of Controlled Release* 129, 76-78.
47. Dokoumetzidis, A., Macheras, P., 2009. Fractional kinetics in drug absorption and disposition processes. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 36, 165-178.
48. Dokoumetzidis, A., Macheras, P., 2011. The Changing Face of the Rate Concept in Biopharmaceutical Sciences: From Classical to Fractal and Finally to Fractional. *Pharmaceutical Research*.
49. Dokoumetzidis, A., Magin, R., Macheras, P., 2010. Fractional kinetics in multi-compartmental systems. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 37, 507-524.
50. Dokoumetzidis, A., Papadopoulou, V., Macheras, P., 2006. Analysis of dissolution data using modified versions of Noyes-Whitney equation and the Weibull function. *Pharmaceutical Research* 23, 256-261.
51. Dokoumetzidis, A., Papadopoulou, V., Valsami, G., Macheras, P., 2008. Development of a reaction-limited model of dissolution: application to official dissolution tests experiments. *International Journal of Pharmaceutics* 355, 114-125.
52. Dokoumetzidis, A., Valsami, G., Macheras, P., 2007. Modelling and simulation in drug absorption processes. *Xenobiotica* 37, 1052-1065.

53. Dowell, J. A., Hussain, A., Devane, J., Young, D., 1999. Artificial neural networks applied to the in vitro-in vivo correlation of an extended-release formulation: Initial trials and experience. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88, 154-160.
54. Dressman, J. B., 2000. *Dissolution Testing of Immediate-Release Products and Its Application to Forecasting In Vivo Performance*, in: Dressman, J. B., Lennernäs, H. (Eds.), Oral drug absorption: prediction and assessment. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 155-182.
55. Dressman, J. B., Amidon, G. L., Fleisher, D., 1985. Absorption potential: estimating the fraction absorbed for orally administered compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 74, 588-589.
56. Dressman, J. B., Fleisher, D., 1986. Mixing-tank model for predicting dissolution rate control or oral absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75, 109-116.
57. Duddu, S. P., Vakilynejad, M., Jamali, F., Grant, D. J., 1993. Stereoselective dissolution of propranolol hydrochloride from hydroxypropyl methylcellulose matrices. *Pharmaceutical Research* 10, 1648-1653.
58. Dunne, A., O'Hara, T., Devane, J., 1997. Level A in vivo-in vitro correlation: nonlinear models and statistical methodology. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86, 1245-1249.
59. Dunne, A., O'Hara, T., Devane, J., 1999. A new approach to modelling the relationship between in vitro and in vivo drug dissolution/absorption. *Statistics in Medicine* 18, 1865-1876.
60. Dutta, S., Qiu, Y., Samara, E., Cao, G., Granneman, G., 2005. Once-a-day extended-release dosage form of divalproex sodium III: development and validation of a Level A in vitro-in vivo correlation (IVIVC). *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, 1949-1956.
61. Eddington, N., Marroum, P., Uppoor, R., Hussain, A., Augsburger, L., 1998. Development and internal validation of an in vitro-in vivo correlation for a hydrophilic metoprolol tartrate extended release tablet formulation. *Pharmaceutical Research* 15, 466-473.
62. Edwards, L., 1951. The dissolution and diffusion of aspirin in aqueous media. *Transactions of the Faraday Society* 47, 1191-1210.
63. Einstein, A., 1905. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der physik* 322, 549-560.
64. Emami, J., 2006. In vitro-in vivo correlation: From theory to applications. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 31-52.
65. FDA Guidance, 1997. Extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of an in vitro/in vivo correlation, US Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research.

66. Fernández-Morán, H., 1972. Electron Microscopy: A Glimpse into the Future. *Annals of the New York Academy of Sciences* 195, 376-389.
67. Fick, A., 1855. V. On liquid diffusion. *Philosophical Magazine Series 4* 10, 30-39.
68. Frick, A., Möller, H., Wirbitzki, E., 1998. Biopharmaceutical characterization of oral controlled/modified-release drug products. In vitro/in vivo correlation of roxatidine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 46, 313-319.
69. Fuite, J., Marsh, R., Tuszynski, J., 2002. Fractal pharmacokinetics of the drug mibefradil in the liver. *Physical Review E: Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* 66, 021904.
70. Galia, E., Nicolaidis, E., Horter, D., Lobenberg, R., Reppas, C., Dressman, J. B., 1998. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharmaceutical Research* 15, 698-705.
71. Gbureck, U., Vorndran, E., Barralet, J. E., 2008. Modeling vancomycin release kinetics from microporous calcium phosphate ceramics comparing static and dynamic immersion conditions. *Acta Biomaterialia* 4, 1480-1486.
72. Giovagnoli, S., Blasi, P., Ricci, M., Schoubben, A., Perioli, L., Rossi, C., 2008. Physicochemical characterization and release mechanism of a novel prednisone biodegradable microsphere formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97, 303-317.
73. Glomme, A., Marz, J., Dressman, J. B., 2005. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, 1-16.
74. Goldsmith, J. A., Randall, N., Ross, S. D., 1978. On methods of expressing dissolution rate data. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 30, 347-349.
75. Gómez-Carracedo, A., Alvarez-Lorenzo, C., Coca, R., Martínez-Pacheco, R., Concheiro, A., Gómez-Amoza, J., 2009. Fractal analysis of SEM images and mercury intrusion porosimetry data for the microstructural characterization of microcrystalline cellulose-based pellets. *Acta Materialia* 57, 295-303.
76. Gouy, L., 1889. Sur le mouvement brownien. *Comptes Rendues de l'Académie des Sciences, Paris* 109, 102.
77. Graham, T., 1850. *On the diffusion of liquids*. Printed by R. and JE Taylor, London.
78. Grant, D. J. W., Higuchi, T., 1990. *Solubility behavior of organic compounds*. Wiley-Interscience, New York.
79. Grass, G. M., 1997. Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. *Advanced Drug Delivery Reviews* 23, 199-219.
80. Greenspan, P., Fowler, S., 1985. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *Journal of Lipid Research* 26, 781.

81. Greenwood, D. E., 1994. *Small intestinal pH and buffer capacity: implications for dissolution of ionizable compounds*. PhD Thesis, University of Michigan.
82. Griffin, W. C., 1949. Classification of surface-active agents by HLB. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 1, 97.
83. Halebian, J., McCrone, W., 1969. Pharmaceutical applications of polymorphism. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 58, 911-929.
84. Hancock, B. C., Parks, M., 2000. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharmaceutical Research* 17, 397-404.
85. Hancock, B. C., Zografi, G., 1997. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86, 1-12.
86. Harper, W. J., Hall, C. W., 1976. *Dairy technology and engineering*. AVI Publishing Co., Inc., Westport.
87. Hendrickson, R., 2005. Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Lippincott Williams & Wilkins, New York, p. 2394.
88. Higaki, K., Yamashita, S., Amidon, G. L., 2001. Time-dependent oral absorption models. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 28, 109-128.
89. Higuchi, T., 1961. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 50, 874-875.
90. Higuchi, T., 1963. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52, 1145-1149.
91. Hilfer, R., 2000. *Applications of fractional calculus in physics*. World Scientific, New Jersey.
92. Hixson, A., Crowell, J., 1931. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. *Industrial & Engineering Chemistry* 23, 923-931.
93. Hörter, D., Dressman, J. B., 1997. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews* 25, 3-14.
94. Huang, L. F., Tong, W. Q., 2004. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 321-334.
95. Humbert, H., Cabiach, M., Bosshardt, H., 1994. In vitro-in vivo correlation of a modified-release oral form of ketotifen: In vitro dissolution rate specification. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83, 131-131.

96. Hussain, A., 1997. *Artificial neural network based in vitro-in vivo correlations*, in: Young, D., Devane, J., Butler, J. (Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Volume 423. Plenum Press, New York, pp. 149-158.
97. Huuskonen, J., Salo, M., Taskinen, J., 1998. Aqueous solubility prediction of drugs based on molecular topology and neural network modeling. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 38, 450-456.
98. Ismailos, G., Reppas, C., Dressman, J. B., Macheras, P., 1991. Unusual solubility behaviour of cyclosporin A in aqueous media. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43, 287-289.
99. Jack, E., Dahle, C., 1937. The Electrokinetic Potential of Milk Fat: I. General Electrophoretic Studies. *Journal of Dairy Science* 20, 551-556.
100. Jain, N., Yalkowsky, S. H., 2001. Estimation of the aqueous solubility I: application to organic nonelectrolytes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90, 234-252.
101. Jamali, F., 1992. Stereochemistry and bioequivalence. *Journal of Clinical Pharmacology* 32, 930-934.
102. Jores, K., Haberland, A., Wartewig, S., M der, K., Mehnert, W., 2005. Solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded SLN studied by spectrofluorometry and Raman spectroscopy. *Pharmaceutical Research* 22, 1887-1897.
103. Kalampokis, A., Argyrakis, P., Macheras, P., 1999a. Heterogeneous tube model for the study of small intestinal transit flow. *Pharmaceutical Research* 16, 87-91.
104. Kalampokis, A., Argyrakis, P., Macheras, P., 1999b. A heterogeneous tube model of intestinal drug absorption based on probabilistic concepts. *Pharmaceutical Research* 16, 1764-1769.
105. Karalis, V., Claret, L., Iliadis, A., Macheras, P., 2001. Fractal volume of drug distribution: it scales proportionally to body mass. *Pharmaceutical Research* 18, 1056-1060.
106. Karalis, V., Dokoumetzidis, A., Macheras, P., 2004. A physiologically based approach for the estimation of recirculatory parameters. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308, 198-205.
107. Karalis, V., Macheras, P., 2002. Drug disposition viewed in terms of the fractal volume of distribution. *Pharmaceutical Research* 19, 696-703.
108. Karalis, V., Tsantili-Kakoulidou, A., Macheras, P., 2002. Multivariate statistics of disposition pharmacokinetic parameters for structurally unrelated drugs used in therapeutics. *Pharmaceutical Research* 19, 1827-1834.
109. Karalis, V., Tsantili-Kakoulidou, A., Macheras, P., 2003. Quantitative structure-pharmacokinetic relationships for disposition parameters of cephalosporins. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 20, 115-123.

110. Kariem, E. A., Abounassif, M. A., Hagga, M. E., Al-Khamees, H. A., 2000. Photodegradation kinetic study and stability-indicating assay of danazol using high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23, 413-420.
111. Kees, F., Bucher, M., Schweda, F., Gschaidmeier, H., Burhenne, J., Mikus, G., Faerber, L., 2006. Comparative bioavailability of the microemulsion formulation of cyclosporine (Neoral) with a generic dispersion formulation (Cicloral) in young healthy male volunteers. *Therapeutic Drug Monitoring* 28, 312-320.
112. Kerns, E. H., Di, L., 2003. Pharmaceutical profiling in drug discovery. *Drug Discovery Today* 8, 316-323.
113. Kimura, T., Taneya, S., Kanaya, K., 1979. Observation of internal structure of casein submicelles by means of iron beam sputtering. *Milchwissenschaft* 34, 521.
114. Kolbe, I., Vikmon, M., Gerloczy, A., Szejtli, J., 2002. Preparation and Characterization of Clopidogrel/DIMEB Complex. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 44, 183-184.
115. Kopelman, R., 1986. Rate processes on fractals: theory, simulations, and experiments. *Journal of Statistical Physics* 42, 185-200.
116. Kopelman, R., 1988. Fractal reaction kinetics. *Science* 241, 1620.
117. Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N. A., 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 15, 25-35.
118. Kosmidis, K., Argyrakis, P., Macheras, P., 2003a. Fractal kinetics in drug release from finite fractal matrices. *The Journal of Chemical Physics* 119, 6373.
119. Kosmidis, K., Argyrakis, P., Macheras, P., 2003b. A reappraisal of drug release laws using Monte Carlo simulations: the prevalence of the Weibull function. *Pharmaceutical Research* 20, 988-995.
120. Kosmidis, K., Karalis, V., Argyrakis, P., Macheras, P., 2004. Michaelis-Menten kinetics under spatially constrained conditions: application to mibefradil pharmacokinetics. *Biophysical Journal* 87, 1498-1506.
121. Kosmidis, K., Rinaki, E., Argyrakis, P., Macheras, P., 2003c. Analysis of Case II drug transport with radial and axial release from cylinders. *International Journal of Pharmaceutics* 254, 183-188.
122. Kroschwitz, J. I., 2005. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, 5th ed. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, N.J.
123. Kukura, J., Baxter, J., Muzzio, F., 2004. Shear distribution and variability in the USP Apparatus 2 under turbulent conditions. *International Journal of Pharmaceutics* 279, 9-17.

124. Kytariolos, J., Dokoumetzidis, A., Macheras, P., 2010. Power law IVIVC: an application of fractional kinetics for drug release and absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41, 299-304.
125. Lacroix, S., 1819. *Traité du calcul différentiel et du calcul intégral: Vol.: 3*. Courcier, Paris.
126. Lake, O., Olling, M., Barends, D., 1999. In vitro/in vivo correlations of dissolution data of carbamazepine immediate release tablets with pharmacokinetic data obtained in healthy volunteers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 48, 13-19.
127. Langenbucher, F., 1972. Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 24, 979.
128. Lánský, P., Lánská, V., Weiss, M., 2004. A stochastic differential equation model for drug dissolution and its parameters. *Journal of Controlled Release* 100, 267-274.
129. Lánský, P., Weiss, M., 2001. Modeling Heterogeneity of Particles and Random Effects in Drug Dissolution. *Pharmaceutical Research* 18, 1061-1067.
130. Lánský, P., Weiss, M., 2003. Classification of dissolution profiles in terms of fractional dissolution rate and a novel measure of heterogeneity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92, 1632-1647.
131. Larsen, A., Holm, R., Pedersen, M. L., Müllertz, A., 2008. Lipid-based formulations for danazol containing a digestible surfactant, Labrafil M2125CS: in vivo bioavailability and dynamic in vitro lipolysis. *Pharmaceutical Research* 25, 2769-2777.
132. Lawrence, M. J., Rees, G. D., 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 45, 89-121.
133. Lestari, M. L. A. D., 2010. Clopidogrel Bisulfate. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 71-115.
134. Levich, V. G., 1962. *Physicochemical hydrodynamics*. Prentice-Hall Englewood Cliffs, New Jersey.
135. Levy, G., 1964. Effect of Dosage Form Properties on Therapeutic Efficacy of Tolbutamide Tablets. *Canadian Medical Association Journal* 90, 978-979.
136. Levy, G., Hall, N., Nelson, E., 1964. Studies on inactive prednisone tablets USP XVI. *American Journal of Hospital Pharmacy* 21, 402.
137. Levy, G., Leonards, J. R., Procknal, J. A., 1965. Development of in vitro dissolution tests which correlate quantitatively with dissolution rate limited drug absorption in man. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 54, 1719-1722.
138. Lindenbaum, J., Mellow, M., Blackstone, M., Butler Jr, V., 1971. Variation in biologic availability of digoxin from four preparations. *The New England journal of medicine* 285, 1344.

139. Liouville, J., 1832. Mémoire sur le calcul des différentielles à indices quelconques. *Journal de l'Ecole polytechnique* 13, 71-162.
140. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J., 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 23, 3-25.
141. Liu, R., 2008. *Water-insoluble drug formulation*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
142. Lorimer, J. W., Cohen-Adad, R., 2004. *Thermodynamics of Solubility*, in: Hefter, G., Tomkins, R. (Eds.), *The Experimental Determination of Solubilities*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 17-76.
143. Losa, G. A., Merlini, D., Nonnenmacher, T. F., Weibel, E. R., 2005. *Fractals in biology and medicine*. Birkhauser, Basel.
144. Ma, J., Liu, X., Yang, Z., Tong, Z., 2009. A pH-Sensitive Hydrogel with Hydrophobic Association for Controlled Release of Poorly Water-Soluble Drugs. *Journal of Macromolecular Science, Part A* 46, 816-820.
145. Macheras, P., 1996. A fractal approach to heterogeneous drug distribution: calcium pharmacokinetics. *Pharmaceutical Research* 13, 663-670.
146. Macheras, P., Argyrakakis, P., 1997. Gastrointestinal drug absorption: is it time to consider heterogeneity as well as homogeneity? *Pharmaceutical Research* 14, 842-847.
147. Macheras, P., Dokoumetzidis, A., 2000. On the heterogeneity of drug dissolution and release. *Pharmaceutical Research* 17, 108-112.
148. Macheras, P., Iliadis, A., 2006. *Modeling in biopharmaceutics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics: homogeneous and heterogeneous approaches*. Springer Verlag, New York.
149. Macheras, P., Ismailos, G., Reppas, C., 1991. Bioavailability study of a freeze-dried sodium phenytoin-milk formulation. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 12, 687-695.
150. Macheras, P., Koupparis, M., Antimisiaris, S., 1989a. Effect of temperature and fat content on the solubility of hydrochlorothiazide and chlorothiazide in milk. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 78, 933-936.
151. Macheras, P., Koupparis, M., Antimisiaris, S., 1989b. An in vitro model for exploring CR theophylline-milk fat interactions. *International Journal of Pharmaceutics* 54, 123-130.
152. Macheras, P., Koupparis, M., Antimisiaris, S., 1990. Drug binding and solubility in milk. *Pharmaceutical Research* 7, 537-541.

153. Macheras, P., Koupparis, M., Apostolelli, E., 1987. Dissolution of 4 controlled-release theophylline formulation in milk. *International Journal of Pharmaceutics* 36, 73-79.
154. Macheras, P., Reppas, C., 1986a. Studies on drug-milk freeze-dried formulations. I: Bioavailability of sulfamethizole and dicumarol formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75, 692-696.
155. Macheras, P., Reppas, C., 1986b. Studies on freeze-dried drug-milk formulations. II: Effect of regenerated fluid volume on nitrofurantoin bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75, 1145-1150.
156. Macheras, P., Reppas, C., Dressman, J. B., 1995. *Biopharmaceutics of orally administered drugs*. Ellis Horwood, London; New York.
157. Macheras, P., Symillides, M., 1989. Toward a quantitative approach for the prediction of the fraction of dose absorbed using the absorption potential concept. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 10, 43-53.
158. Magin, R., 2004. Fractional Calculus in Bioengineering, Part 1-3. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 32.
159. Magin, R., Abdullah, O., Baleanu, D., Zhou, X., 2007. Anomalous diffusion expressed through fractional order differential operators in the Bloch-Torrey equation. *Journal of Magnetic Resonance* 190, 255-270.
160. Mahayni, H., Rekhi, G., Uppoor, R., Marroum, P., Hussain, A., Augsburger, L., Eddington, N., 2000. Evaluation of "External" Predictability of an In Vitro-In Vivo Correlation for an Extended-Release Formulation Containing Metoprolol Tartrate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89, 1354-1361.
161. Mandelbrot, B. B., 1982. *The fractal geometry of nature*. Freeman, New York.
162. Marsh, R. E., Tuszynski, J. A., 2006. Fractal michaelis-menten kinetics under steady state conditions: Application to mibefradil. *Pharmaceutical Research* 23, 2760-2767.
163. Martin, C., Rubin, M., O'Malley, W., Garagusi, V., McCauley, C., 1968. Brand, generic drugs differ in man. *JAMA* 205, 23-24.
164. McCarthy, L. G., Bradley, G., Sexton, J. C., Corrigan, O. I., Healy, A. M., 2004. Computational fluid dynamics modeling of the paddle dissolution apparatus: Agitation rate, mixing patterns, and fluid velocities. *AAPS PharmSciTech* 5, 50-59.
165. McCarthy, L. G., Kosiol, C., Healy, A. M., Bradley, G., Sexton, J. C., Corrigan, O. I., 2003. Simulating the hydrodynamic conditions in the United States Pharmacopeia paddle dissolution apparatus. *AAPS PharmSciTech* 4, 83-98.
166. McEvoy, G., 2008. AHFS Drug Information. American Society of Health-System Pharmacists Inc., Bethesda, Maryland,.

167. Mendell-Harary, J., Dowell, J., Bigora, S., Piscitelli, D., Butler, J., Farrell, C., Devane, J., Young, D., 1997. *Nonlinear in vitro-in vivo correlations*, in: Young, D., Devane, J., Butler, J. (Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Volume 423. Plenum Press, New York, pp. 199-215.
168. Metzler, R., Klafter, J., 2000. The random walk's guide to anomalous diffusion: a fractional dynamics approach. *Physics Reports* 339, 1-77.
169. Meyer, M., Straughn, A., Mhatre, R., Shah, V., Williams, R., Lesko, L., 1998. Lack of in vivo/in vitro correlations for 50 mg and 250 mg primidone tablets. *Pharmaceutical Research* 15, 1085-1089.
170. Michalski, M.-C., Michel, F., Sainmont, D., Briard, V., 2002. Apparent [zeta]-potential as a tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 23, 23-30.
171. Mircioiu, C., Mircioiu, I., Voicu, V., Miron, D., 2005. Dissolution- Bioequivalence Non-Correlations. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 96, 262-264.
172. Mitakos, A., Panderi, I., 2002. A validated LC method for the determination of clopidogrel in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28, 431-438.
173. Mithani, S. D., Bakatselou, V., TenHoor, C. N., Dressman, J. B., 1996. Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration. *Pharmaceutical Research* 13, 163-167.
174. Mulye, N. V., Turco, S. J., 1996. An Examination of Assumptions Underlying the First-Order Kinetic Model for Release of Water-Soluble Drugs from Dicalcium Phosphate Dihydrate Matrices. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 22, 673-679.
175. Nelson, E., 1957. Solution rate of theophylline salts and effects from oral administration. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 46, 607-614.
176. Nelson, K., Shah, A., 1975. Convective diffusion model for a transport-controlled dissolution rate process. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 64, 610-614.
177. Neoral® , Product Monograph, <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/neoral.pdf>, 15/11/2010
178. Nernst, W., Schoenflies, A. M., 1904. *Einführung in die mathematische behandlung der naturwissenschaften*, 4. aufl. ed. R. Oldenbourg, München & Berlin,.
179. Noyes, A., Whitney, W., 1897. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *Journal of the American Chemical Society* 19, 930-934.
180. O'Hara, T., Hayes, S., Davis, J., Devane, J., Smart, T., Dunne, A., 2001. In vivo-in vitro correlation (IVIVC) modeling incorporating a convolution step. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 28, 277-298.

181. O'Neil, M. J., 2001. *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 13th ed. Merck, Whitehouse Station, N.J.
182. Oh, D. M., Curl, R. L., Amidon, G. L., 1993. Estimating the fraction dose absorbed from suspensions of poorly soluble compounds in humans: a mathematical model. *Pharmaceutical Research* 10, 264-270.
183. Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., Macheras, P., 2006. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* 309, 44-50.
184. Parojčić, J., Ibrić, S., Djurić, Z., Jovanović, M., Corrigan, O., 2007. An investigation into the usefulness of generalized regression neural network analysis in the development of level A in vitro-in vivo correlation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30, 264-272.
185. Pattarino, F., Giovannelli, L., Bellomi, S., 2007. Effect of poloxamers on nifedipine microparticles prepared by Hot Air Coating technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 65, 198-203.
186. Pedersen, P. V., Myrick, J. W., 1978. Versatile kinetic approach to analysis of dissolution data. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67, 1450-1455.
187. Peppas, N., 1985. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 60, 110.
188. Peppas, N. A., Sahlin, J. J., 1989. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics* 57, 169-172.
189. Pereira, L., 2009. Fractal pharmacokinetics. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 1-24.
190. Philibert, J., 2006. One and a half century of diffusion: Fick, Einstein, before and beyond. *Diffusion Fundamentals* 4, 1-19.
191. Piotrovskii, V. K., 1987. Pharmacokinetic stochastic model with Weibull-distributed residence times of drug molecules in the body. *European Journal of Clinical Pharmacology* 32, 515-523.
192. Plavix ®, Product Monograph, <http://www.sanofi-aventis.ca/products/en/plavix.pdf>, 15/2/2010
193. Podlubny, I., 1999. *Fractional differential equations*. Academic press, New York.
194. Polli, J., Crison, J., Amidon, G., 1996. Novel approach to the analysis of in vitro-in vivo relationships. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85, 753-760.
195. Pouton, C. W., 2000. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 11 Suppl 2, S93-98.

196. Pudipeddi, M., Serajuddin, A. T. M., Grant, D. J. W., Stahl, P. H., 2008. *Solubility and Dissolution of Weak Acids, Bases, and Salts*, in: Stahl, P. H., Wermuth, C. G. (Eds.), *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich, pp. 19-39.
197. Rabinow, B. E., 2004. Nanosuspensions in drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 785-796.
198. Ran, Y., Jain, N., Yalkowsky, S. H., 2001a. Prediction of aqueous solubility of organic compounds by the general solubility equation (GSE). *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 41, 1208-1217.
199. Ran, Y., Zhao, L., Xu, Q., Yalkowsky, S. H., 2001b. Solubilization of cyclosporin A. *AAPS PharmSciTech* 2, 23-26.
200. Ravishankar, H., Patil, P., Samel, A., Petereit, H., Lizio, R., Iyer-Chavan, J., 2006. Modulated release metoprolol succinate formulation based on ionic interactions: In vivo proof of concept. *Journal of Controlled Release* 111, 65-72.
201. Riemann, B., 1876. Versuch einer Auffassung der Integration und Differentiation. *Gesammelte Mathematische Werke und Wissenschaftlicher Nachlass*, 331-344.
202. Rietbrock, S., Merz, P. G., Fuhr, U., Harder, S., Marschner, J. P., Loew, D., Biehl, J., 1995. Absorption behavior of sulpiride described using Weibull functions. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 33, 299-303.
203. Rinaki, E., Dokoumetzidis, A., Valsami, G., Macheras, P., 2004. Identification of biowaivers among class II drugs: theoretical justification and practical examples. *Pharmaceutical Research* 21, 1567-1572.
204. Rinaki, E., Valsami, G., Macheras, P., 2003. The power law can describe the 'entire' drug release curve from HPMC-based matrix tablets: a hypothesis. *International Journal of Pharmaceutics* 255, 199-207.
205. Ritger, P., Peppas, N., 1987a. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release* 5, 23-36.
206. Ritger, P., Peppas, N., 1987b. A simple equation for description of solute release. II: fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release* 5, 37-42.
207. Rodriguez-Hornedo, N., Lechuga-Ballesteros, D., 1992. Phase transition and heterogeneous/epitaxial nucleation of hydrated and anhydrous theophylline crystals. *International Journal of Pharmaceutics* 85, 149-162.
208. Rubino, J. T., Yalkowsky, S. H., 1987. Cosolvency and cosolvent polarity. *Pharmaceutical Research* 4, 220-230.

209. Sahin, N., Arslan, H., 2007. Inclusion complex of prednisolone with skimmed milk. Part I: Physicochemical characterization. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 127, 1255.
210. Schiller, C., FR HLICH, C. P., Giessmann, T., Siegmund, W., M nnikes, H., Hosten, N., Weitschies, W., 2005. Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 22, 971-979.
211. Sekiguchi, K., Obi, N., 1961. Studies on Absorption of Eutectic Mixture. I: A Comparison of the Behavior of Eutectic Mixture of Sulfathiazole and that of Ordinary Sulfathiazole in Man. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 9, 866-872.
212. Sekiguchi, K., Obi, N., Ueda, Y., 1964. Studies on Absorption of Eutectic Mixture. II: Absorption of Fused Conglomerates of Chloramphenicol and Urea in Rabbits. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 12, 134-144.
213. Shefter, E., 1981. *Solubilization by solid-state manipulation*, in: Yalkowsky, S. H. (Ed.), *Techniques of Solubilization of Drugs*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 159-182.
214. Shefter, E., Higuchi, T., 1963. Dissolution behavior of crystalline solvated and nonsolvated forms of some pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52, 781-791.
215. Siepmann, J., Peppas, N., 2001. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews* 48, 139-157.
216. Singh, B. N., 2005. A quantitative approach to probe the dependence and correlation of food-effect with aqueous solubility, dose/solubility ratio, and partition coefficient (Log P) for orally active drugs administered as immediate-release formulations. *Drug Development Research* 65, 55-75.
217. Sinko, P., Leesman, G., Amidon, G., 1991. Predicting fraction dose absorbed in humans using a macroscopic mass balance approach. *Pharmaceutical Research* 8, 979-988.
218. Sirisuth, N., Augsburger, L., Eddington, N., 2002. Development and validation of a non-linear IVIVC model for a diltiazem extended release formulation. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 23, 1-8.
219. Slattery, C. W., 1976. Review: casein micelle structure; an examination of models. *Journal of Dairy Science* 59, 1547-1556.
220. Sokolov, I., Klafter, J., Blumen, A., 2002. Fractional kinetics. *Physics Today* 55, 48-54.
221. Sreenivasa Rao, B., Seshasayana, A., Pardha Saradhi, S., Ravi Kumar, N., Narayan, C., Ramana Murthy, K., 2001. Correlation of 'in vitro' release and 'in vivo' absorption characteristics of rifampicin from ethylcellulose coated nonpareil beads. *International Journal of Pharmaceutics* 230, 1-9.

222. Stahl, P. H., Wermuth, C. G., International Union of Pure and Applied Chemistry., 2002. *Handbook of pharmaceutical salts : properties, selection, and use*. VHCA ; Wiley-VCH, Weinheim ; New York.
223. Stein, W. D., 1967. *The movement of molecules across cell membranes*. Academic Press, New York,.
224. Sunesen, V. H., Pedersen, B. L., Kristensen, H. G., Mullertz, A., 2005. In vivo in vitro correlations for a poorly soluble drug, danazol, using the flow-through dissolution method with biorelevant dissolution media. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 24, 305-313.
225. Sweetman, S., 2007. Martindale: The complete drug reference. Pharmaceutical Press, London.
226. Takka, S., Sakr, A., Goldberg, A., 2003. Development and validation of an in vitro-in vivo correlation for buspirone hydrochloride extended release tablets. *Journal of Controlled Release* 88, 147-157.
227. Taskinen, J., Yliruusi, J., 2003. Prediction of physicochemical properties based on neural network modelling. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 1163-1183.
228. Tong, W.-Q., 2008. *Molecular and Physicochemical Properties Impacting Oral Absorption of Drugs*, in: Krishna, R., Yu, L. (Eds.), Biopharmaceutics Applications in Drug Development. Springer, New York, pp. 26-46.
229. Tyrer, J., Eadie, M., Sutherland, J., Hooper, W., 1970. Outbreak of anticonvulsant intoxication in an Australian city. *British Medical Journal* 4, 271.
230. USP XXXII - NF XXVII, 2008. United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, USA.
231. Valsami, G., Dokoumetzidis, A., Macheras, P., 1999. Modeling of supersaturated dissolution data. *International Journal of Pharmaceutics* 181, 153-157.
232. Varelas, C. G., Dixon, D. G., Steiner, C. A., 1995. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. *Journal of Controlled Release* 34, 185-192.
233. Varley, A. B., 1968. The generic inequivalence of drugs. *JAMA* 206, 1745-1748.
234. Varma, M., Kaushal, A., Garg, A., Garg, S., 2004. Factors affecting mechanism and kinetics of drug release from matrix-based oral controlled drug delivery systems. *American Journal of drug delivery* 2, 43-57.
235. Varshosaz, J., Ghafghazi, T., Raisi, A., Falamarzian, M., 2000. Biopharmaceutical characterization of oral theophylline and aminophylline tablets. Quantitative correlation between dissolution and bioavailability studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 301-306.

236. Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D., 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* 45, 2615-2623.
237. Veng-Pedersen, P., 1980. An algorithm and computer program for deconvolution in linear pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 8, 463-481.
238. Verotta, D., 1993. Two constrained deconvolution methods using spline functions. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 21, 609-636.
239. Vieth, M., Siegel, M. G., Higgs, R. E., Watson, I. A., Robertson, D. H., Savin, K. A., Durst, G. L., Hipskind, P. A., 2004. Characteristic physical properties and structural fragments of marketed oral drugs. *Journal of Medicinal Chemistry* 47, 224-232.
240. Vijaya, K. S. G., Mishra, D., 2006. Preparation and evaluation of solid dispersion of meloxicam with skimmed milk. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 126, 93.
241. Vudathala, G. K., Rogers, J. A., 1992. Dissolution of fludrocortisone from phospholipid coprecipitates. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 81, 282-286.
242. Walstra, P., Jenness, R., Badings, H. T., 1984. *Dairy chemistry and physics*. Wiley, New York.
243. Wang, T. T., Kwei, T. K., Frisch, H. L., 1969. Diffusion in glassy polymers. III. *Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics* 7, 2019-2028.
244. Weibull, W., 1951. A statistical distribution function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics* 18, 293-297.
245. Weiss, M., 1996. A novel extravascular input function for the assessment of drug absorption in bioavailability studies. *Pharmaceutical Research* 13, 1547-1553.
246. Weitschies, W., Kosch, O., Mönnikes, H., Trahms, L., 2005. Magnetic Marker Monitoring: An application of biomagnetic measurement instrumentation and principles for the determination of the gastrointestinal behavior of magnetically marked solid dosage forms. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 1210-1222.
247. Welling, P. G., 2006. Absorption of Drugs. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology: Third Edition*, 19-33.
248. Wenlock, M. C., Austin, R. P., Barton, P., Davis, A. M., Leeson, P. D., 2003. A comparison of physiochemical property profiles of development and marketed oral drugs. *Journal of Medicinal Chemistry* 46, 1250-1256.
249. West, B. J., Bologna, M., Grigolini, P., 2003. *Physics of fractal operators*. Springer Verlag, New York.

250. Wilderman, M., 1909. Über die Geschwindigkeit molekularer und chemischer Reaktionen in heterogenen Systemen. Erster Teil. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 66, 445-495.
251. Yalkowsky, S. H., Valvani, S. C., 1980. Solubility and partitioning I: Solubility of nonelectrolytes in water. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 69, 912-922.
252. Young, D., 2006. *Significance of in vitro in vivo correlation (IVIVC)*, in: Amidon, G., Lesko, L., Midha, K., Shah, V., Hilfinger, J. (Eds.), *International Bioequivalence standards: A new era*. TSRL, Ann Arbor, pp. 41-48.
253. Yu, L. X., Lipka, E., Crison, J. R., Amidon, G. L., 1996. Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 19, 359-376.
254. Zdanovskii, A. B., 1946. The role of the interphase solution in the kinetics of the solution of salts. *Zhurnal Fizicheskoi Khimii (USSR)* 20, 869-880.
255. Zhou, H., 2003. Pharmacokinetic strategies in deciphering atypical drug absorption profiles. *Journal of Clinical Pharmacology* 43, 211-227.
256. Zupančič, V., Smrkolj, M., Benkič, P., Simonič, I., Plevnik, M., Ritlop, G., Kristl, A., Vrečer, F., 2010. Preformulation Investigation of Some Clopidogrel Addition Salts. *Acta chimica slovenica* 57, 376-385.
257. Δημαρέση, Ε., 2008. *Συνήθειες διαφορικές εξισώσεις κλασματικής τάξης*. MSc, Σχολή Θετικών Επιστημών - Τμήμα Μαθηματικών, Πανεπιστήμιο Πατρων, Πάτρα.
258. Κατσάνος, Ν. Α., 1993. *Φυσικοχημεία - Βασική Θεώρηση*. Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα.
259. Μάντης, Α. Ι., 2000. *Υγιεινή και Τεχνολογία του Γάλακτος και των Προϊόντων του*, 3η ed. Αδελφοί Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
260. Μαχαίρας, Π., Ρέππας, Χ., 1997. *Βιοφαρμακευτική*, Αθήνα.
261. Παπαϊωάννου, Γ., 1997. *Μαθήματα Φαρμακευτικής Φυσικής και Φαρμακοτεχνίας*. Δέσποινα Μαυρομάτη, Αθήνα.