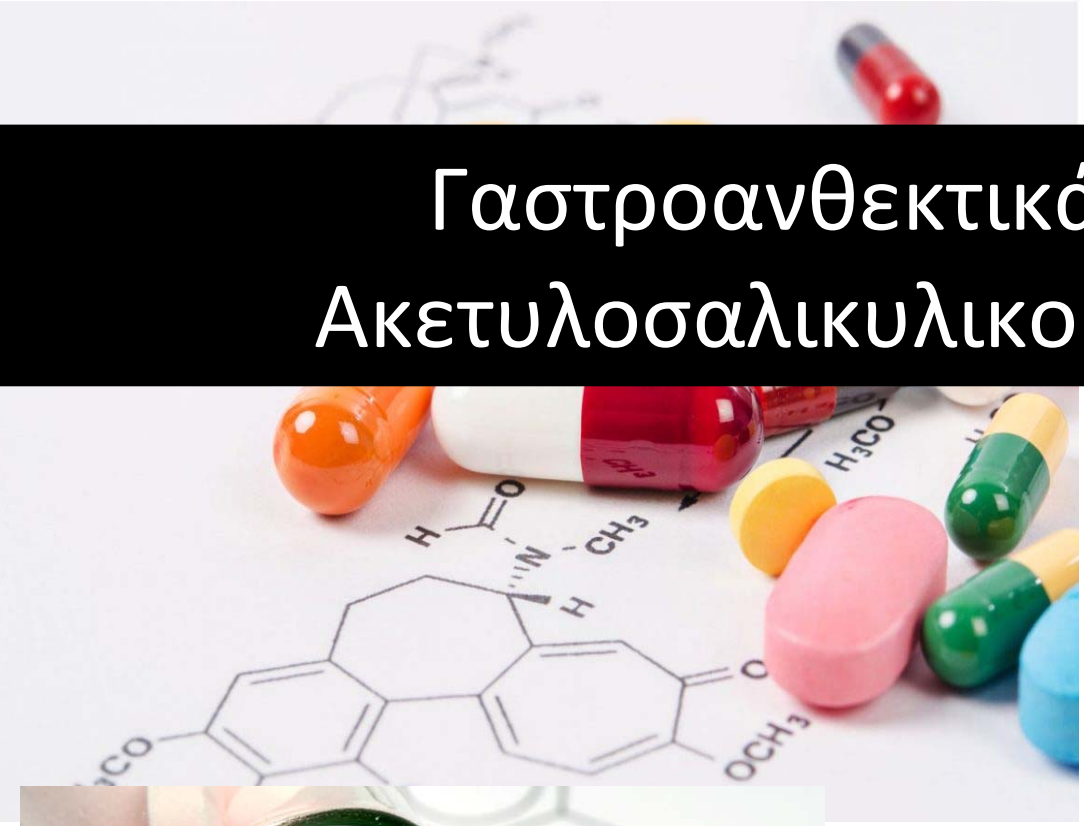
Γαστροανθεκτικά Δισκία Ακετυλοσαλικυλικού Οξέος



Περιεχόμενα

	ΣΕΛΙΔΑ
Το πρόβλημα	**3**
Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας	**4-6**
Μεθοδολογία	**6-10**
Αποτελέσματα	**11-14**
Συμπεράσματα	**15**
Δεξιότητες που αποκτήθηκαν	**16**
Παράρτημα	**17**
Βιβλιογραφία	**17-18**

Το πρόβλημα

Σε ένα συνεχώς μεταβαλλόμενο κόσμο, στο τομέα της υγείας, της τεχνολογίας κ.ο.κ. η ανάπτυξη φαρμάκων που έχει ως απώτερο σκοπό τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας και της ποιότητας ζωής αποτελεί πρωταρχικό στόχο της επιστημονικής κοινότητας. Η κατανάλωση φαρμάκων για την καταπολέμηση παθήσεων/ασθενειών αποτελεί σήμερα, μέρος της καθημερινότητάς μας. Δραστικές ουσίες όπως το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, η παρακεταμόλη, η ιβουπροφένη κ.α. αποτελούν μερικά παραδείγματα ευρέως διαδεδομένων χημικών ενώσεων που λαμβάνονται με μεγάλη συχνότητα από το γενικό πληθυσμό, μέσω διάφορων φαρμακοτεχνικών μορφών, με την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη να αποτελεί η κατάποση δισκίων από το στόμα (per os). Η μακροπρόθεσμη λήψη φαρμακευτικών προϊόντων ωστόσο δύναται να επιφέρει αρνητικές συνέπειες στην υγεία. Για το λόγο αυτό η ανάπτυξη νέων τεχνικών αποδέσμευσης με απώτερο σκοπό την προστασία/θωράκιση της υγείας αποτελεί πρωταρχικό μέλημα της επιστημονικής κοινότητας.

Η ασπιρίνη[1], με δραστικό συστατικό το ακετυλοσαλικυλικό οξύ ανήκει στα λεγόμενα **Μ**η **Σ**τεροειδή **Α**ντιφλεγμονώδη **Φ**άρμακα (**ΜΣΑΦ**). Πρόκειται για ένα φάρμακο με αναλγητική, αντιπυρετική, αντιφλεγμονώδης και αντιθρομβωτική δράση, το οποίο διατίθεται χωρίς να απαιτείται ιατρική συνταγή. Χρησιμοποιείται ευρέως ως αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας σε ασθενείς με καρδιαγγειακά προσβήματα[2], καθώς αδρανοποιεί την κυκλοοξυγενάση (COX), αποτελώντας ένα εκλεκτικό αναστολέα του εν λόγο ενζύμου, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία ενός ισχυρού ενεργοποιητή αιμοπεταλίων, της θρομβοξάνης (TX) A_2 [3], η οποία προκαλεί αγγειοσυστολή και τη δημιουργία των λεγόμενων θρόμβων στο αίμα καθώς αυξάνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επειδή ωστόσο η COX βρίσκεται σε πολλούς ιστούς και ιδιαίτερα στο στομάχι, η αναστολή της τελευταίας από την ασπιρίνη προδιαθέτει σε γαστρεντερικές παρενέργειες όπως το γαστρικό έλκος, γαστρική αιμορραγία και δυσπεψία.

Σε μια προσπάθεια για πρόληψη των δυσμενών γαστρικών επιδράσεων, που αποδίδονται στην απελευθέρωση του ακετυλοσαλικυλικού οξέος (δραστική της ασπιρίνης) στο στομάχι, συνταγογραφούνται δισκία[4] με εντερική επικάλυψη, τα οποία ονομάζονται γαστροανθεκτικά δισκία. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η in vitro μελέτη αποδέσμευσης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος από γαστροανθεκτικά δισκία, σε συνθήκες pH, που προσομοιάζουν το γαστρικό περιβάλλον καθώς και αυτό του λεπτού εντέρου, όργανο της πεπτικής οδού που πραγματοποιείται η απορρόφηση του φαρμάκου.

Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας

Τα φάρμακα αποτελούνται από τη δραστική ουσία, το ενεργό δηλαδή συστατικό που προσδίδει στο φάρμακο τη δράση του καθώς και κάποια έκδοχα, όπου πρόκειται για ανενεργές ουσίες με συμπληρωματικές δράσεις, πχ προστασία της δραστικής ουσίας, βελτίωση της γεύσης κ.ο.κ. Η λήψη φαρμάκων δύναται να πραγματοποιηθεί με ποικίλους οδούς χορήγησης[5-6], η οποία καθορίζεται από:

α) τις ιδιότητες του φαρμάκου που θα χρησιμοποιηθεί

β) τον επιθυμητό χρόνο δράσης (π.χ. ταχεία/καθυστερημένη/παρατεταμένη έναρξη δράσης του φαρμάκου)

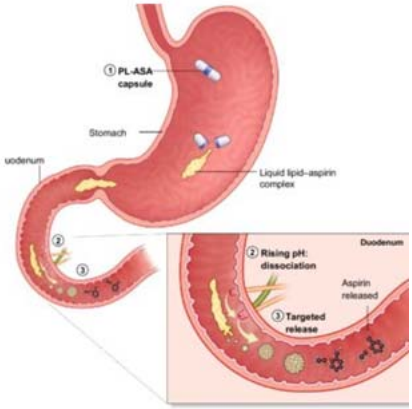
Οι τρεις κύριες οδοί χορηγήσεως των φαρμάκων πραγματοποιούνται είτε από τους βλεννογόνους (π.χ. στόμα, υπογλώσσια, εισπνεόμενα) και το δέρμα (π.χ. διαδερμικά, κολπικά, πρωκτικά) είτε παρεντερικά (ενδοφλέβια, ενδομυϊκά, υποδόρια). Η πιο συχνή οδός χορήγησης των φαρμάκων είναι μέσω του στόματος με τη χρήση δισκίων ή καψακίων. Χαρακτηρίζεται από σχετικά αργή έναρξη δράσης, ενώ ορισμένες φορές παρατηρείται, ακανόνιστη απορρόφηση της δραστικής καθώς και καταστροφή της τελευταίας γαστρεντερικό σύστημα.

Η πορεία που ακολουθεί ένα δισκίο μέχρι την είσοδό της δραστικής στη συστηματική κυκλοφορία[7] (βιοδιαθεσιμότητα) είναι μία πολύπλοκη διαδικασία. Αρχικά πραγματοποιείται η αποσάθρωση (καταθρυμματισμός) του δισκίου στο στομάχι με την επίδραση του γαστρικού υγρού, το περιβάλλον του οποίου είναι ισχυρά όξινο (pH≈1). Ακολούθως η δραστική διαλύεται και μεταφέρεται στο λεπτό έντερο, όπου πραγματοποιείται η απορρόφηση της δραστικής και η μεταφορά της στη γενική κυκλοφορία του αίματος.

Η επικάλυψη των δισκίων αποτελεί μία διαδικασία, η οποία εφαρμόζεται εδώ και πολλές δεκαετίες μέχρι και σήμερα και εξυπηρετεί διάφορους σκοπούς, όπως η βελτίωση στην εμφάνιση, την οσμή και τη γεύση των δισκίων (οργανοληπτικούς παράγοντες). Από ιστορικής άποψης, ο πρώτος τύπος επικάλυψης ήταν η επικάλυψη με στρώμα σακχάρων που προήλθε από τη βιομηχανία τροφίμων για να βελτιώσει την εμφάνιση και κυρίως τη γεύση των δισκίων. Η επικάλυψη των δισκίων παρέχει επίσης προστασία της φαρμακευτικής ουσίας από τις επιδράσεις του περιβάλλοντος στο οποία βρίσκονται αυξάνοντας τη σταθερότητα του προϊόντος. Ανάλογα με το σκοπό βελτίωσης ενός δισκίου, η επικάλυψη πραγματοποιείται είτε με στρώμα σακχάρων, συνήθως σουρκόζης (βελτίωση οργανοληπτικών παραγόντων), είτε με κάποιο υμένιο πολυμερούς υλικού. (καθυστερημένης/παρατεταμένης αποδέσμευσης). Το 1930 αναπτύχθηκε το πρώτο σύστημα επικάλυψης με υμένιο, με το πρώτο εμπορικό προϊόν να εμφανίζεται το 1954 από την Abott.

Δισκία με εντερική επικάλυψη, επίσης γνωστή ως γαστροανθεκτική επίστρωση παρασκευάζονται μέσω μίας ειδικά σχεδιασμένης διαδικασίας, με την οποία

εφαρμόζεται ένα στρώμα υλικού επικάλυψης στην επιφάνεια ενός δισκίου προκειμένου να προσδώσει στο δισκία συγκεκριμένα οφέλη[8]. Το ενδιαφέρον με τα δισκία με εντερική επικάλυψη αποδίδεται στην ικανότητά τους να παραμένουν ανθεκτικά στο ισχυρά όξινο περιβάλλον που επικρατεί στο στομάχι (pH≈1) λόγο των γαστρικών υγρών. Ειδικότερα η επικάλυψη εμποδίζει την αποδέσμευση του φαρμάκου στις όξινες συνθήκες του στομαχιού. Στη συνέχεια όταν το δισκίο μεταφερθεί στο λεπτό έντερο, όπου το περιβάλλον είναι σχεδόν ουδέτερο (pH≈7) το λεπτό υμένιο του πολυμερούς διασπάται με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η δραστική, η οποία ακολούθως απορροφάτε από το λεπτό έντερο και μεταφέρεται στη συστηματική κυκλοφορία. Η εν λόγο επικάλυψη επιδρά στη φαρμακοδυναμική (κυτταρική φυσιολογία, μηχανισμό δράσης κ.ο.κ.) και φαρμακοκινητική (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμό & απέκκριση) του φαρμάκου ελέγχοντας την καθυστερημένη απελευθέρωση του φαρμάκου[9]. Τα πιο συνηθισμένα δισκία, επικαλυμμένα με εντερικά υμένια είναι εκείνα που δεν διασπώνται στις χαμηλές τιμές pH, αλλά ιονίζονται όταν το pH αυξηθεί σε τιμές 4–5.



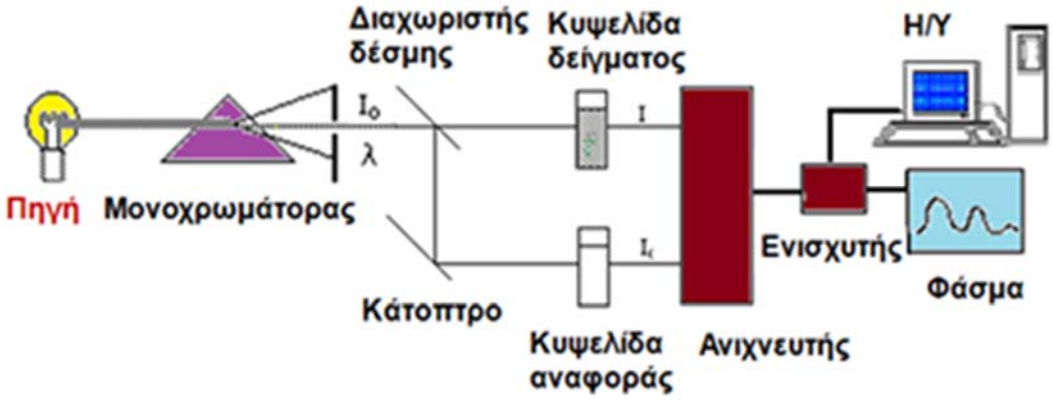
Οι πιο ευρεία διαδεδομένες εφαρμογές αυτού του είδους δισκίων αναφέρονται σε δραστικές που i) προκαλούν ερεθισμό του γαστρικού σωλήνα (π.χ.ασπιρίνη) ii) είναι ασταθής στα γαστρικά υγρά (πχ ερυθρομικίνη, παγκρεατίνη), με αποτέλεσμα να διασπώνται και να μειώνεται η δράση τους iii) προορίζονται για τοπική δράση στο έντερο (π.χ. αντισηπτικά του εντέρου) αποδεσμεύοντας έτσι το φάρμακο απευθείας στο σημείο απορρόφησης. Οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την επικάλυψη των δισκίων με λεπτό υμένιο είναι διάφορα πολυμερή όπως οι πολυαιθυλενογλυκόλες και παράγωγα κυτταρίνης (π.χ. φθαλική οξική & βουτυρική οξική κυτταρίνη). Τα πολυμερή αυτά έχουν κοινό χαρακτηριστικό ότι περιέχουν πολλές ενεργές όξινες ή εστερικές ομάδες, οι οποίες παραμένουν αδιάλυτες στο χαμηλό pH του στομάχου, ενώ διαλύονται με υδρόλυση, καθώς προχωρούν στο λεπτό έντερο όπου το pH αυξάνεται σε 7 έως 8. Το πολυμερές που θα επιλεγεί παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στον σχηματισμό και την συνεκτικότητα της στιβάδας επικάλυψης, όσο και στις φυσικοχημικές της ιδιότητες. Ένα ιδεώδες πολυμερές πρέπει να είναι αδιαπέραστο από το γαστρικό υγρό και ευδιαπεραστο από το εντερικό, να μην

είναι τοξικό, να διατίθεται στην αγορά και να είναι σχετικά φθηνό. Επιπρόσθετα πρέπει να δύναται ο σχηματισμός λεπτού υμενίου με τις κατάλληλες μηχανικές ιδιότητες, αλλά και διαλυτότητα στον γαστρεντερικό σωλήνα. Το υλικό επικάλυψης περιέχει εκτός από το πολυμερές και κάποια έκδοχα, όπως οι πλαστικοποιητές ούτως ώστε να βελτιωθούν οι ιδιότητες της υμενίου (ευκινησία, ελαστικότητα & αντοχή μεμβράνης υμενίου)

Η διαδικασία επικάλυψης ενός δισκίου είτε με λεπτό υμένιο είτε με σουρκόζη (κουφετοποίηση) επιτυγχάνεται σε ειδικούς περιστροφικούς τυμπάνους. Το υλικό επικάλυψης προστίθεται στα ανακινούμενα δισκία με μορφή διαλύματος ή εναιωρήματος είτε με τη μορφή αερολύματος με τη βοήθεια ψεκαστήρα. Σε μία άλλη διαδικασία επικάλυψης, γνωστή και ως μέθοδος αεροαπαιώρησης, τα δισκία φέρονται σε θάλαμο όπου εμφυσάτε από το κάτω μέρος ρεύμα θερμού αέρα, το οποίο τα θέτει σε κίνηση. Το διάλυμα της επικάλυψης εισάγεται με ψεκαστήρα από το κάτω μέρος του θαλάμου. Το ρεύμα του αέρα μετακινεί προς τα πάνω τα ψεκασμένα δισκία, ενώ τα νέα δισκία φέρονται προς τη βάση και ψεκάζονται. Λόγω του θερμού αέρα ο διαλύτης εξατμίζεται και λαμβάνονται τα τελικά επικαλυμμένα δισκία.

Μεθοδολογία

Η μελέτη αποδέσμευσης της ασπιρίνης με εντερική επικάλυψη σε συνάρτηση με το pH, πραγματοποιήθηκε με χρήση φασματοφωτόμετρου UV-Vis. Γενικά οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χημικής ανάλυσης, όπου ανήκει και η φασματοφωτομετρία UV-VIS, χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την επίλυση διαφόρων χημικών προβλημάτων, που σχετίζονται με τη δομή, την κινητική, την ταυτοποίηση και την ποσοτική ανάλυση διαφόρων ενώσεων, ενεργών στο UV-Vis (απορροφούν ακτινοβολία). Η πιο απλή μορφή φασματοφωτόμετρου είναι το φασματοφωτόμετρο ορατού φάσματος (Vis από το Visible).

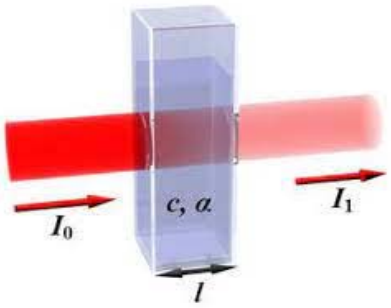


Περιραμτική διάταξη φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Τα φάσματα UV-Vis είναι διαγράμματα της έντασης της απορρόφησης της ακτινοβολίας (δηλαδή του φωτος) συναρτήση του μήκους κύματος, οι μονάδες

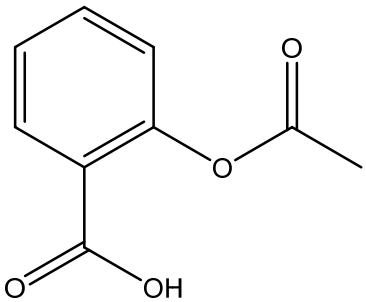
μέτρησης του οποίου είναι τα nm. Η ένταση της απορρόφησης εκφράζεται είτε ως απορροφητικότητα (A) ειτε ως % διαπερατότητα (T) και εμφανίζονται ως καμπύλες με κάποια μέγιστα ή ελάχιστα αντίστοιχα. Η πηγή είναι μια κοινή λάμπα πυράκτωσης. Το σύστημα διαχωρισμού είναι ένα κοινό πρίσμα ή συνηθέστερα ένα περιθλαστικό φράγμα, το οποίο απομονώνει την επιθυμητή μονοχρωματική ακτινοβολία (μια συχνότητα ορατή σαν κόκκινο, πράσινο, κίτρινο φως κ.ο.κ.).

Η ακτινοβολία αυτή περνάει μέσα από μια κυψελίδα, πρόκειται για ένα διαφανές, άχρωμο δοχείο που περιέχει το προς εξέταση δείγμα. Μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ενδέχεται να απορροφηθεί από το δείγμα, ενώ όσο φως δεν απορροφηθεί από το διάλυμα του δείγματος, εξέρχεται από την κεψελίδα και μετράται από ένα κοινό φωτόμετρο που βρίσκεται στην απέναντι πλευρά της κυψελίδας.



Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στην ποσοτική ανάλυση. Οι βασικές δομικές μονάδες ενός φασματοφωτόμετρου είναι μια πηγή ακτινοβολίας σταθερής ισχύος, ένας μονοχρωμάτορας για την απομόνωση της επιθυμητής ακτινοβολίας, μια κυψελίδα για την τοποθέτηση του δείγματος και μια δεύτερη για την τοποθέτηση του τυφλού διαλύματος, ένας ανιχνευτής ακτινοβολίας που μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό και τέλος ένα σύστημα μετρήσεως που περιλαμβάνει ενισχυτή του σήματος και όργανο αναγνώσεως. Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το φασματοφωτόμετρο συλλέγει τα δεδομένα προς ανάλυση, τα οποία τα μετατρέπει σε φάσμα.

Αναφορικά με το μόριο του ακετυλοσαλικυλικού οξέος, όταν το τελευταίο ακτινοβοληθεί με ενέργεια που βρίσκεται στο εύρος του UV-Vis, απορροφά μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα τη διέγερση του μορίου σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες. Η απορρόφηση αυτή, εμφανίζεται ως κορυφή στο μήκος κύματος 273nm και οφείλεται στις ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις που πραγματοποιούνται στον αρωματικό δακτύλιο του μορίου.



Ακετυλοσαλικυλικό οξύ (aspirin)

Μοριακός τύπος: $C_9H_8O_4$
Μοριακή μάζα: 180,16

Συντακτικός τύπος (δομή) του ακετυλοσαλικυλικού οξέος, δραστικής ένωσης του φαρμάκου με την επωνυμία ασπιρίνη.

Πειραματικό Μέρος

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια -Σκεύη – Όργανα

Όργανα	Υλικά
Αναλυτικός ζυγός (ακρίβεια 4 δεκαδικών)	π. HCℓ 37% w/w
Ογκομετρικές φιάλες 50ml	1L HCℓ ~0,1M
Ογκομετρική φιάλη 100ml	Διάλυμα NaOH 4M & 1M
Βαθμονομημένο σιφώνιο 20mL	0,0182 g Ακετυλοσαλικυλικό οξύ >99%
Σιφώνια 20mL, 10mL, 5mL	Ασπιρίνη NU-SEALS 75 (75mg/δισκίο)
Ελαστικός αναρροφητήρας (πουάρ)	Απεσταγμένο νερό
Ποτήρια ζέσεως 200ml, 500ml, 2L	
Θερμόμετρο αλκοόλης	
Ορθοστάτης με συνδέσμους και λαβίδες	
Κρυσταλλωτήριο	
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμή πλάκα	
Μαγνήτες ανάδευσης	
Κυψελίδες χαλαζία (quartz)	
Φασματοφωτόμετρο UV-VIS	

<u>Πειραματική Διαδικασία – Μέρος 1</u>

Για τη μελέτη αποδέσμευσης της ασπιρίνης με εντερική επικάλυψη σε συνάρτηση με το pH, κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος σε εύρος τιμών συγκεντρώσεων. Πιο συγκεκριμένα παρασκευάστηκε αρχικά διάλυμα 100mL πυκνού ακετυλοσαλικυλικού οξέος μοριακότητας $C_1=1\times10^{-3}$ M. Για την παρασκευή του πυκνού διαλύματος ζυγίστηκαν 0,0182 g ακετυλοσαλικυλικού οξέος σε βάρκα ζύγισης και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως των 200mL που περιείχε 50 mL απεσταγμένο νερό. Η βάρκα ζύγισης εκπλύθηκε με απεσταγμένο νερό, το οποίο και μεταφέρθηκε στο ποτήρι ζέσεως. Το μείγμα που προέκυψε αναδεύτηκε με γυάλινη ράβδο μέχρι την πλήρη διάλυση του στερεού ακετυλοσαλικυλικού οξέος. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρθηκε με τη χρήση γυάλινου χωνιού σε ογκομετρική φιάλη των 100mL. Για την ποσοτική μεταφορά της δραστικής, πραγματοποιήθηκε έκπλυση του ποτηριού ζέσεως και της γυάλινης ράβδου και στη συνέχεια μεταφορά των εκπλυμάτων στην ογκομετρική φιάλη. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το νόμο της αραίωσης $C_\pi V_\pi= C_\alpha V_\alpha$ υπολογίστηκε ο όγκος του πυκνού διαλύματος 1×10^{-3} M που έπρεπε να χρησιμοποιηθεί ούτως ώστε να γίνει η παρασκευή των αραιωμένων διαλυμάτων ακετυλοσαλικυλικού οξέος με τιμές μοριακότητας όπως παραουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Υπολογισμοί για την παρασκευή των διαλυμάτων της καμπύλης βαθμονόμησης.

C_α / M	V_α / mL	V_π (1×10^{-3} M) / mL
8×10^{-4}	50	40
4×10^{-4}	50	20
2×10^{-4}	50	10
1×10^{-4}	50	5

Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των απορροφήσεων των δειγμάτων ακετυλοσαλικυλικού οξέος γνωστής μοριακότητας σε διάφορα μήκη κύματος. Οι καμπύλες των εντάσεων των απορροφήσεων σε συνάρτηση με τα μήκη κύματος της ακτινοβολίας στα οποία μετρήθηκαν οι απορροφήσεις αποτελούν τα λεγόμενα φάσματα απορρόφησης. Για τη λήψη των φασμάτων τοποθετήθηκαν περίπου 2,5 – 3,0 mL καθαρού διαλύτη, απεσταγμένου H_2O στην κυψελίδα χαλαζία, διαμέτρου 1cm (κυψελίδα αναφοράς/τυφλό) και μετρήθηκε η απορρόφηση. Παρομοίως σε μία δεύτερη κυψελίδα χαλαζία τοποθετήθηκαν 2,5 – 3,0 mL του υπό εξέταση διαλύματος και καταγράφηκε η απορρόφηση. Για να διασφαλίσουμε πως η ένδειξη της απορρόφησης που καταγράφετε στο φασματοφωτόμετρο στα υπό εξέταση δείγματα αποδίδεται αποκλειστικά στο μόριο του ακετυλοσαλικυλικού οξέος και όχι σε πιθανή απορρόφηση μορίων του διαλύτη, από τη τιμή απορροφήσεως που λήφθηκε από τα δείγματα γνωστής μοριακότητας, αφαιρέθηκε αυτόματα από το φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση του τυφλού.

Μετά τη λήψη των φασμάτων σε όλα τα διαλύματα με διαφορετική μοριακότητα που παρασκευάστηκαν, καταρτίσθηκε πίνακας με την απορρόφηση της κορυφής στα 273nm του ακετυλοσαλικυλικού οξέος συγκριτικά με τη μοριακότητα του κάθε διαλύματος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων καθώς επίσης και τα φάσματα, τα οποία λήφθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στο Μέρος της Ανάλυσης των Αποτελεσμάτων.

<u>Πειραματική Διαδικασία – Μέρος 2</u>

Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα μοριακότητας ~0,1 M από πυκνό διάλυμα $HC\ell$ 37% w/w, χρησιμοποιώντας το νόμο της αραίωσης. Με χρήση ηλεκτρονικού pHμέτρου μετρήθηκε το pH του διαλύματος, το οποίου ισούται με 0,71. Σε 2 διαφορετικά ποτήρια ζέσεως των 2L τοποθετήθηκαν 500mL διαλύματος $HC\ell$, μαζί με μαγνητάκι ανάδευσης. Τα ποτήρια ζέσεως βυθίστηκαν σε κρυσταλλωτήριο, το οποίο περιείχε νερό και ακολούθως θερμάνθηκαν σε υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 36-37 ^oC, με χρήση θερμομέτρου αλκοόλης. Για να διασφαλισθεί η επιθυμητή θερμοκρασία στο διάλυμα του $HC\ell$, ο έλεγχος της θερμοκρασίας ήταν συνεχής και γινόταν στο εσωτερικό του

διαλύματος (όχι στο υδρόλουτρο), ενώ παράλληλα, καθόλα τη διάρκεια του πειράματος η στάθμη του διαλύματος HCℓ (500mL) βρισκόταν σε χαμηλότερο επίπεδο συγκριτικά με τη στάθμη του εξωτερικού διαλύματος του νερού (εξολοκλήρου βυθισμένη στο υδρόλουτρο).

Μετά τη σταθεροποίηση της θερμοκρασίας τοποθετήθηκε σε κάθε ποτήρι ζέσεως το γαστροανθεκτικό δισκίο με εντερική επικάλυψη, NU-SEALS 75, μάζας 75mg. Μετά από χρονικό διάστημα 3 λεπτών λήφθηκε ποσότητα 2,5 – 3,0 mL του υπό ανάλυση διαλύματος που περιείχε το γαστροανθεκτικό δισκίο, η οποία τοποθετήθηκε σε κυψελίδα χαλαζία και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μέτρηση της κορυφής απορρόφησης στα 273nm. Ακολούθησαν μετρήσεις απορρόφησης σε χρόνους 9, 15, 20, 25, και 30 λεπτά, οι οποίες καταγράφονται στον πίνακα που παρουσιάζεται στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Μετά το πέρας των 30 λεπτών το pH του διαλύματος στο ένα από τα δύο ποτήρια ρυθμίστηκε στο 6.38 με προσθήκη υδατικού διαλύματος NaOH και ακολούθως συνεχίστηκε η ανάδευση του διαλύματος σε σταθερή θερμοκρασία 36-37 ^{o}C. Το χρονικό αυτό σημείο ορίζεται ως το σημείο μηδέν και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της κορυφής απορρόφησης στα 273nm σε χρόνους 30, 60, 70, 75 και 80 λεπτά, και στα δύο ποτήρια ζέσεως, οι οποίες καταγράφονται στον πίνακα 3.

Σημείωση: *Συνολικός χρόνος παραμονής δισκίου στο διάλυμα 80 + 30 λεπτά = 110 λεπτά.*

Αποτελέσματα

Ο ρυθμός αποδέσμευσης του ακετυλοσαλικυλικού οξεός (in vitro) στο διάλυμα που περιείχε το γαστροανθεκτικό δισκίο πραγματοποιήθηκε υπολογίζοντας τη μοριακότητα του ακετυλοσαλικυλικού οξεός σε κάθε χρονικό σημείο που λήφθηκε η απορρόφηση της κορυφής στα 273nm. Για την μετατροπή της τιμής απορρόφησης σε μοριακότητα χρησιμοποιήθηκε η μαθητική συνάρτηση που προκύπτει από το Νόμο του Lambert–Beer, ο οποίος αποτελεί την αρχή της φασματοφωτομετρίας και περιγράφεται πιο κάτω:

$$\mathbf{A = \varepsilon \cdot c \cdot b}$$

όπου,

A *είναι η απορρόφηση σε δεδομένο μήκος κύματος (χωρίς μονάδες)*

ε *είναι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), ο οποίος διαφέρει σε κάθε ένωση καθώς εξαρτάται από τη φύση της ένωσης.*

b *είναι το μήκος διαδρομής του δείγματος ή αλλιώς το μήκος της κυψελίδας (1cm)*

c *είναι η συγκέντρωση της ένωσης στο διάλυμα (mol · L^{-1})*

<u>Σημείωση:</u> Ο νόμος του Lambert-Beer βρίσκει πολύ καλή εφαρμογή για αραιά διαλύματα, τα εμφανίζουν τιμές απορρόφησης (A) μέχρι το 2. Αντίθετα στα πολύ πυκνά διαλύματα επειδή τα μόρια είναι πιο συνωστισμένα η απορρόφηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας δεν γίνεται το ίδιο αποτελεσματικά, οπότε οι τιμές των (A) είναι μικρότερες των αναμενόμενων.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων (γνωστής μοριακότητας) ακετυλοσαλικυλικού οξέος στο μήκος κύματος 273nm (λ_{max}).

Μοριακότητα (mol · L^{-1})	**Απορρόφηση λ_{max} (273nm)**
1×10^{-3}	0,8112
8×10^{-4} M	0,6166
4×10^{-4}	0,2721
2×10^{-4}	0,1149
1×10^{-4}	0,0480

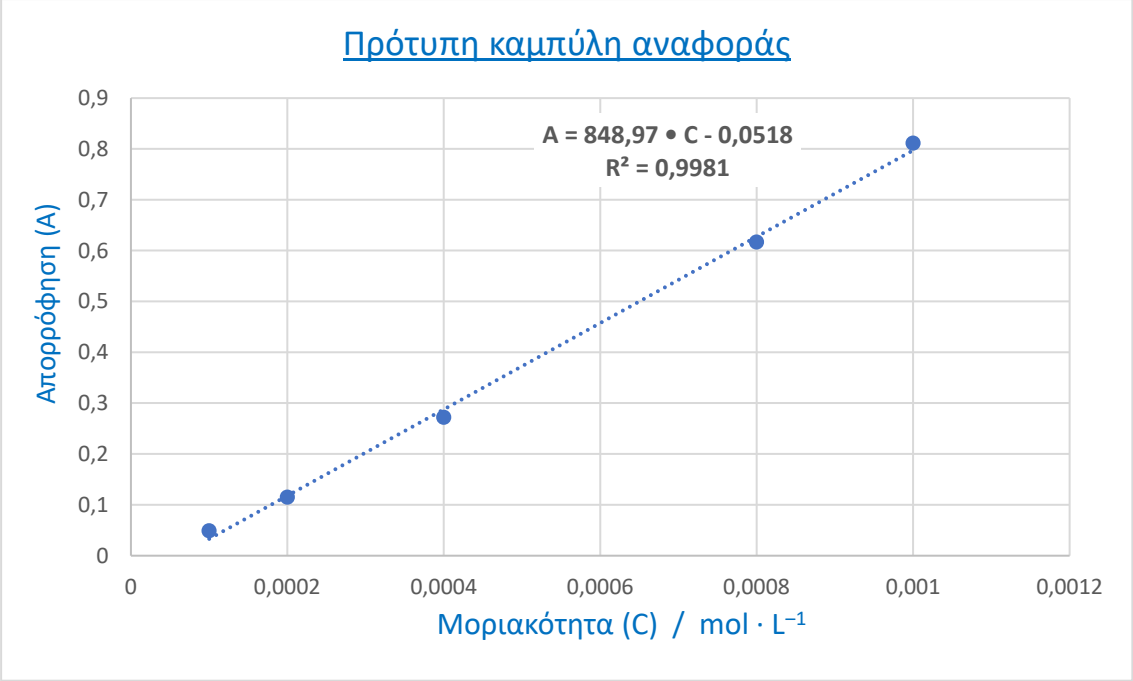
Λαμβάνοντας υπόψη τις πιο πάνω τιμές κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς/βαθμονόμησης. Ειδικότερα πρόκειται για τη γραφική παράσταση της απορρόφησης σε συνάρτηση με τη μοριακότητα του πρότυπου διαλύματος σε ακετυλοσαλικυλικό οξύ, A = f (C). Από τη γραφική αυτή παράσταση προκύπτει η γραμμική σχέση που συνδέει τις δύο αυτές τιμές (A vs C), η οποία είναι:

$$\mathbf{A = \alpha \cdot C + \beta}$$ *(<u>σημείωση</u>: είναι της μορφής ψ = αx + β)*

όπου,

α είναι κλίση της ευθείας και ισούται με 848,97

β είναι η αποτέμνουσα, η οποία ισούται με –0,0518



Από τη γραφική παράσταση υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), ο οποίος ισούται με 0,9981 (πολύ κοντά στη μονάδα) επιβεβαιώνοντας την πολύ καλή γραμμικότητα της συνάρτησης/συσχέτιση των δύο τιμών (A vs C). Στη συνέχεια, μετρώντας στο ίδιο μήκος κύματος (λ_{max}=273nm) την απορρόφηση ενός διαλύματος άγνωστης συγκέντρωσης ακετυλοσαλικυλικού οξέος, γίνεται ο υπολογισμός της μοριακότητάς του. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τη μαθηματική συνάρτηση που προέκυψε από την καμπύλη αναφοράς, προσδιορίστηκε η μοριακότητα του ακετυλοσαλικυλικού οξέος με την πάροδο του χρόνου, στο ποτήρι ζέσεως που περιείχε το γαστροανθεκτικό δισκίο. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές απορρόφησης και μοριακότητας που προέκυψαν. Για τον υπολογισμό της % αποδέσμευσης της δραστικής από το γαστροανθεκτικό δισκίο στο όξινο περιβάλλον, οι τιμές τις μοριακότητας σε κάθε χρονικό σημείο (C_t) πολλαπλασιάστηκαν ×100 και διαιρέθηκαν με τη μέγιστη μοριακότητα (C_{max}) που δύναται να προκύψει εάν όλη η ποσότητα του δισκίου σε ακετυλοσαλικυλικό οξύ (75mg) διαλυθεί σε συνολικό όγκο 500mL διαλύματος $HC\ell$ (pH=0,71). Πραγματοποιήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία και στις μετρήσεις απορρόφησης που λήφθηκαν μετά την προσθήκη διαλύματος NaOH που είχε ως αποτέλεσμα τη μεταβολή στο pH του διαλύματος από pH=0,71 σε pH=6,38. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον πιο κάτω πίνακα.

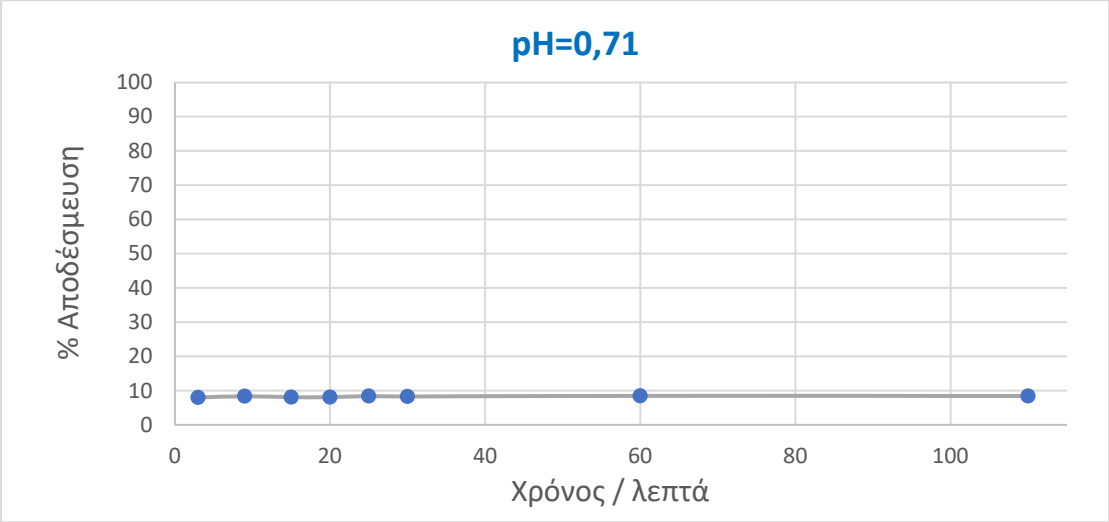
$$\%\ \alpha\pi\epsilon\lambda\epsilon\upsilon\theta\acute{\epsilon}\rho\omega\sigma\eta = \frac{C_t \times 100}{C_{max}}$$

όπου,

$$C_{max} = \frac{n}{V} = \frac{m/M_r}{V} = \frac{m}{M_r \times V} = \frac{75 \times 10^{-3}\ g}{180{,}16\ g/mol \times 0{,}5\ L} = 8{,}326 \times 10^{-4}\ M$$

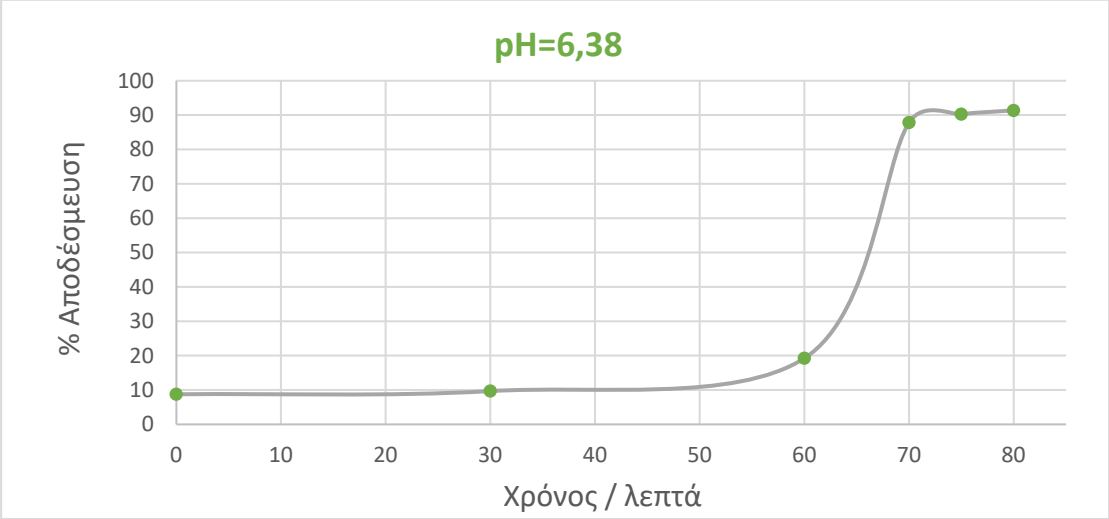
Όξινο περιβάλλον, pH=0,71			
Χρόνος *(λεπτά)*	**Απορρόφηση** λ_{max} *(273nm)*	**Μοριακότητα** *(mol · L⁻¹)*	**% Αποδέσμευση**
3	0,0049	$6{,}68\times10^{-5}$ M	8,03
9	0,0073	$6{,}96\times10^{-5}$ M	8,37
15	0,0053	$6{,}73\times10^{-5}$ M	8,08
20	0,0055	$6{,}75\times10^{-5}$ M	8,11
25	0,0077	$7{,}01\times10^{-5}$ M	8,42
30	0,0069	$6{,}91\times10^{-5}$ M	8,32
60	0,0081	$7{,}06\times10^{-5}$ M	8,48
110	0,0078	$7{,}02\times10^{-5}$ M	8,44
Ουδέτερο περιβάλλον, pH=6,38			
Χρόνος *(λεπτά)*	**Απορρόφηση** λ_{max} *(273nm)*	**Μοριακότητα** *(mol · L⁻¹)*	**% Αποδέσμευση**
0	0,0102	$7{,}30\times10^{-5}$ M	8,78
30	0,0168	$8{,}08\times10^{-5}$ M	9,71
60	0,0842	$1{,}60\times10^{-4}$ M	19,25
70	0,5689	$7{,}31\times10^{-4}$ M	87,88
75	0,5859	$7{,}51\times10^{-4}$ M	90,28
80	0,5936	$7{,}60\times10^{-4}$ M	91,37

Από τις τιμές αυτές κατασκευάστηκε γραφική παράσταση της % αποδέσμευσης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος από το γαστροανθεκτικό δισκίο σε συνάρτηση με το χρόνο τόσο στο όξινο περιβάλλον (pH=0,71) όσο και στο ουδέτερο περιβάλλον (pH=6,38).



Από τη γραφική παράσταση που προέκυψε στο όξινο περιβάλλον, παρατηρήθηκε πως η % αποδέσμευση της δραστικής παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα της τάξεως περίπου του 8% για τουλάχιστον 110 λεπτά, υποδεικνύοντας πως το γαστροανθεκτικό δισκίο παρέμεινε αδιάλυτο σε αυτό το περιβάλλον λόγο της εντερικής επικάλυψης. Αναφορικά με την απόκλιση της % αποδέσμευσης από τη τιμή μηδέν (ξεκίνησε και παρέμεινε στο ~8%), να σημειωθεί πως επειδή τα όρια που μελετήθηκαν ήταν πολύ χαμηλά, οι μετρήσεις απορρόφησης στα 273nm εμπίπτουν στα όρια του σφάλματος κατά τις χρονικές περιόδους όπου η δραστική παρέμενε αδιάλυτη στο διάλυμα.

Στη συνέχεια και μετά τη ρύθμιση του pH σε ουδέτερο περιβάλλον και πιο συγκεκριμένα στα επόμενα 50 λεπτά (επιπρόσθετα από τα πρώτα 30 λεπτά που παρέμεινε στο όξινο περιβάλλον) ξεκίνησε η αποδέσμευση της δραστικής, λόγο της ρήξης που επήλθε στην εντερική επικάλυψη, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την αύξηση στην τιμή της % αποδέσμευσης. Όπως διαπιστώνεται από τη γραφική παράσταση που παρουσιάζεται πιο κάτω, μετά από συνολικό χρόνο 70 λεπτά σε περιβάλλον του οποίου το pH=6,38 επήλθε αποδέσμευση του ακετυλοσαλικυλικού οξέος σε ποσοστό ~90%, το οποίο παρέμεινε σχεδόν πρακτικά σταθερό στα επόμενα λεπτά του πειράματος.



Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η in vitro αποδέσμευση της δραστικής ουσίας του ακετυλοσαλικυλικού οξέος που περιέχεται σε γαστροανθεκτικά δισκία ασπιρίνης του εμπορίου. Η ανάλυση του ρυθμού αποδέσμευσης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος οληκληρώθηκε σε τέσσερα συνολικά στάδια, σύμφωνα με τα οποία:

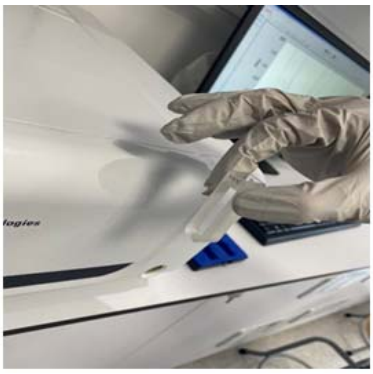
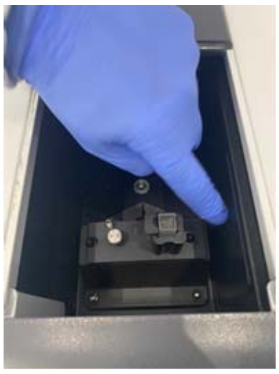
1. Πραγματοποιήθηκε η λήψη φάσματος απορρόφησης της ουσίας με σκοπό την εύρεση του μήκους κύματος της μέγιστης απορρόφησης (λ_{max}), το οποίο εντοπίστηκε στα 273nm.
2. Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλης αναφοράς της μορφής $\mathbf{A = \alpha \cdot c + \beta}$, από διαλύματα γνωστής μοριακότητας σε ακετυλοσαλικυλικό οξύ, η οποία συσχετίζει την απορρόφηση στο λ_{max} με τη μοριακότητα.
3. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις απορρόφησης στο λ_{max} σε διάλυμα που περιείχε γαστροανθεκτικό δισκίο ακετυλοσαλικυλικού οξέος τόσο σε όξινο όσο και σε ουδέτερο περιβάλλον σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, από τις οποίες έγινε ο υπολογισμός της μοριακότητας της δραστικής με βάση την πρότυπη καμπύλης αναφοράς.
4. Κατασκευάστηκαν γραφικές παραστάσεις της % αποδέσμευσης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος σε σχέση με το χρόνο.

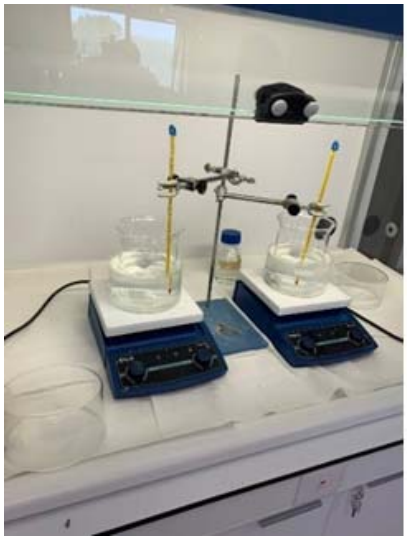
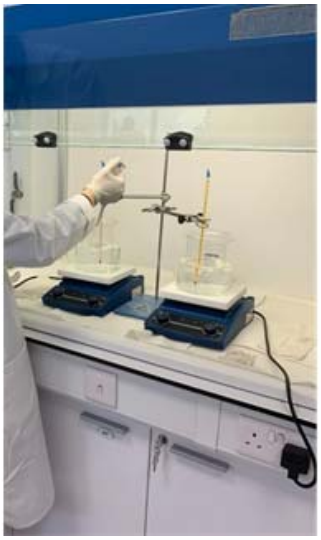
Με βάση τις καμπύλες % αποδέσμευσης διαπιστώθηκε ο τρόπος λειτουργίας ενός γαστροανθεκτικού δισκίου. Ειδικότερα παρατηρήθηκε πως η εντερική επικάλυψη ενός τέτοιου είδους δισκίου παρέχει προστασία από το όξινο περιβάλλον (pH~1) που επικρατεί στο στομάχι, εμποδίζοντας την αποσάθρωση αρχικά του δισκίου και τη διάλυση στη συνέχεια της δραστικής, για χρονικό διάστημα περίπου 2 ωρών. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγονται οι δυσμενείς επιδράσεις που αποδεδειγμένα προκαλεί παρατεταμένη χρήση της ασπιρίνης, όπως το γαστρικό έλκος. Αντιθέτως μετά τη ρύθμιση του pH του διαλύματος σε ουδέτερο περιβάλλον (pH=6,38) και την παραμονή του δισκίου για ~50 λεπτά σε αυτό το περιβάλλον, διαπιστώθηκε η σταδιακή απελευθέρωση του ακετυλοσαλικυλικού οξέος, η οποία έφτασε το ποσοστό του 90% (αποτελεί το επιθυμητό ποσοστό απελευθέρωσης στα φάρμακα) μετά από ~70-75 λεπτά παραμονής του δισκίου σε ουδέτερο περιβάλλον. Συμπερασματικά, επιβεβαιώθηκε πειραματικά η αποδέσμευση ενός γαστροανθεκτικού δισκίου στο λεπτό έντερο, όπου επικρατεί ουδέτερο περιβάλλον κατά τη σταδιακή μεταφορά του δισκίο από το στομάχι σε αυτό.

Δεξιότητες που αποκτήθηκαν

Μία από τις βασικές προκλήσεις που καλούνται να αντιμετωπίζουν τα μαθήματα των θετικών επιστημών στην Κύπρο, όπως το μάθημα της Χημείας είναι η έλλειψη γνώσης και συμμετοχής των μαθητών σε θέματα που αφορούν τις επιστήμες και βρίσκουν εφαρμογή στην καθημερινότητα μας, όπως τα φάρμακα, τα οποία αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της κοινωνίας μας. Τα εργαστηριακά πειράματα αποτελούν μία πολύ καλή πρακτική προσέγγισης των μαθητών με σκοπό την κατανόηση επιστημονικών θεμάτων. Στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας, ο οποίος και υλοποιήθηκε σε πολύ μεγάλο βαθμό αποτελεί, ο σχεδιασμός και η εμπλοκή των μαθητών σε τεχνικές και πειραματικές διαδικασίες που σχετίζονται με τα φάρμακα. Πίο συγκεκριμένα μέσω της εργασίας αυτής, οι μαθητές είχαν τη δυνατότητα να παρατηρήσουν την απελευθέρωση του ακετυλοσαλικυλικού οξέος (δραστική της ασπιρίνης) σε γαστροανθεκτικά δισκία με εντερική επικάλυψη.
Με την διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας οξύνθηκε το ενδιαφέρον των μαθητών σχετικά με την έρευνα. Παράλληλα οι μαθητές έχουν αποκτήσει εμπειρίες σχετικά με τον τρόπο συγγραφής και παρουσίασης των αποτελεσμάτων που προκύπτουν μέσα από τις πειραματικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν. Επιπρόσθετα, έχουν αναπτύξει ικανότητες διερεύνησης και συλλογής πληροφοριών, μέσω του διαδικτύου και συγκεκριμένα ηλεκτρονικών περιοδικών. Επίσης έγινε εκμάθηση αναλυτικών μεθόδων, που χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μοριακότητας διαλυμάτων. Πιο συγκεκριμένα οι μαθητές έμαθαν να κατασκευάζουν καμπύλες βαθμονόμησης, να χρησιμοποιούν την εξίσωση του Lambert-Beer, καθώς επίσης και να χρησιμοποιούν το φασματοφοτόμετρο UV-Vis, ένα πολύ χρήσιμο αναλυτικό όργανο, η χρήση του οποίου είναι ευρέως διαδεδομένη. Κλείνοντας, μία πιθανή διάκριση στο διαγωνισμό αυτό, θα αποτελέσει ένα επιπλέον προσόν στο βιογραφικό τους.

Παράρτημα

Φωτογραφίες κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής μελέτης.

Στην επόμενη σελίδα επισυνάπτεται συνέντευξη από παιδίατρο, νεογνολόγο, εντατικολόγο, αναφορικά με τη χρήση γαστροανθεκτικών δισκίων στην Κύπρο.

Βιβλιογραφία

1. PRODUCT MONOGRAPH of ASPIRIN, BAYER INC., 2004.

2. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. BMJ. 2002;324:71– 86.

3. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975;72:2994 –2998.

4. Συνέντευξη από γιατρό. Παρατίθεται μαζί με την εργασία.

5. Wen, H., Park, K. Oral controlled release formulation design and drug delivery: theory to practice: John Wiley & Sons. 2011.

6. Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, A.B. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics: McGraw-Hill. 2007

7. Guidelines for biopharmaceutical studies in man. A.Ph.A. Academy of Pharmaceutical Science, Washington, DC. Feb. 1972

8. Lanza, F., MDFACG, Chan, FMD, FRCP, FACG, Quigley, EMD, FACG, Επιτροπή Παραμέτρων Πρακτικής του Αμερικανικού Κολλεγίου Γαστρεντερολογίας. Πρόληψη των επιπλοκών των ελκών που σχετίζονται με ΜΣΑΦ. Ιστοσελίδα Αμερικανικού Κολλεγίου Γαστρεντερολογίας, Μάρτιος 2016.

9. Hua, S., Marks, E., Schneider, J.J., Keely, S. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. Nanom. Nanotech. Biol. Med., 11(5), 1117-32, 2015.

Όλα τα σχήματα, οι εικόνες και τα γραφήματα που παρουσιάζονται σε αυτή την μελετη προέρχονται από την πειραματικη διαδικασια που πραγματοποιηθηκε