T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

AÇLIK VE TOKLUK DURUMLARINI TAKLİT EDEN ÇÖZÜNME ORTAMLARINDA YAPILAN ÇÖZÜNME HIZINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz.Diren SARISALTIK

Tez Danışmanı
Yrd.Doç.Dr.Zeynep Şafak TEKSİN

ANKARA
Ağustos 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

AÇLIK VE TOKLUK DURUMLARINI TAKLİT EDEN ÇÖZÜNME ORTAMLARINDA YAPILAN ÇÖZÜNME HIZINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz.Diren SARISALTIK

Tez Danışmanı
Yrd.Doç.Dr.Zeynep Şafak TEKSİN

Bu tez "Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri" kapsamında 02/2008-20 numaralı proje olarak desteklenmiştir.
Çalışmanın bir bölümü "2009 yılı Novartis Farmasötik Teknoloji Proje Desteği" kapsamında desteklenmiştir.

ANKARA
Ağustos 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/08/2010

İmza

Prof.Dr.İlbeyi AĞABEYOĞLU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Doç.Dr.Ercüment KARASULU
Ege Üniversitesi

İmza

Yrd.Doç.Dr.Zeynep Şafak TEKSİN
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

Kabul ve Onay
İçindekiler i
Şekiller ix
Tablolar xii
Kısaltmalar xvi

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çözünme ve Çözünme Hızı 5
2.1.1. İlaçların Mide-Bağırsak Kanalından Emiliminde Çözünmenin Önemi 6
2.1.2. Mide-Bağırsak Kanalında İlacın Çözünürlüğü ve Çözünme Hızını Etkileyen Faktörler 7
2.1.2.1. Mide-Bağırsak Sisteminin Fizyolojisi 7
2.1.2.2. İlaçların İyonizasyon Özelliği 11
2.1.2.3. Mide-Bağırsak Motilitesi 14
2.1.2.4. Enzimler 15
2.1.2.5. Hacim 15
2.1.2.6. Safra Bileşenleri 15
2.1.3. İn Vitro Çözünme Hızı Testleri 17
2.1.3.1. İn Vitro Çözünme Ortamları 18
2.1.3.1.1. Klasik İn Vitro Çözünme Ortamları 18
2.1.3.1.2. Yüzey Etkin Madde İçeren İn Vitro Çözünme Ortamları 18
2.1.3.1.3. Biyouyumlu Ortamlar 20
2.1.3.1.4. SIF Powder® 27
2.1.3.1.5. İn Vitro Çözünme Hızı Testlerinde Kullanılan Aletler 29

2.1.3.1.6. İn Vitro Çözünme Hızı Kinetikleri 29
2.1.3.1.6.1. Model Bağımsız Yöntemler 29
2.1.3.1.6.2. Model Bağımlı Yöntemler 30
2.1.3.1.6.3. DDSolver Programının İn Vitro Çözünme Hızı Kinetiklerinin Değerlendirilmesinde Kullanımı 30
2.2. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS) 35
2.2.1. BCS'de Temel Alınan Parametreler 38
2.2.1.1. Etkin Maddenin Çözünürlüğü 38
2.2.1.2. Etkin Maddenin Permeabilitesi 39
2.2.1.3. Çözünme Hızı 40
2.2.2. BCS'e Dayanan Muafiyet 40
2.2.3. BCS'e Göre İn Vitro Çözünme Ortamı Seçimi 42
2.2.3.1. Sınıf 1 Bileşikler 42
2.2.3.2. Sınıf 2 Bileşikler 42
2.2.3.3. Sınıf 3 Bileşikler 44
2.2.3.4. Sınıf 4 Bileşikler 44
2.3. Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sistemi (BDDCS) 45
2.3.1. BDDCS'de Taşıyıcı Etkisi 46
2.3.2. BDDCS'de Yiyecek Etkisi 47
2.4. Caco-2 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Permeabilite Değerlendirmelerinde Biyouyumlu Ortamların Kullanımı 49
2.5. Levofloksasin 50
2.5.1. Fizikokimyasal Özellikleri 50
2.5.1.1. Kimyasal Yapısı 50
2.5.1.2. Görünüş ve Erime Özellikleri 50
2.5.1.3. Çözünürlük Özellikleri 51
2.5.2. Miktar Tayini Yöntemleri 51
2.5.3. Farmakolojik Özellikleri 51
2.5.3.1. Endikasyonları 51

2.5.3.2. Kullanım Şekli ve Dozu 52
2.5.4. Farmakokinetik Özellikleri 53
2.5.4.1. Emilimi 53
2.5.4.2. Dağılımı 55
2.5.4.3. Biyotransformasyonu 56
2.5.4.4. Atılımı 56
2.5.5. BCS Sınıfı 57
2.6. Flurbiprofen 57
2.6.1. Fizikokimyasal Özellikleri 57
2.6.1.1. Kimyasal Yapısı 57
2.6.1.2. Görünüş ve Erime Özellikleri 58
2.6.1.3. Çözünürlük Özellikleri 58
2.6.2. Miktar Tayini Yöntemleri 59
2.6.3. Farmakolojik Özellikleri 59
2.6.3.1. Endikasyonları 60
2.6.3.2. Kullanım Şekli ve Dozu 60
2.6.4. Farmakokinetik Özellikleri 61
2.6.4.1. Emilimi 61
2.6.4.2. Dağılımı 63
2.6.4.3. Biyotransformasyonu 63
2.6.4.4. Atılımı 63
2.6.5. BCS Sınıfı 65

3. MATERYAL VE YÖNTEM 66

3.1. MATERYAL 66
3.1.1. Kimyasal Maddeler 66
3.1.2. Araç ve Gereçler 67
3.2. YÖNTEM 68
3.2.1. İn Vitro Çözünme Ortamlarının Hazırlanması 68

3.2.2. İn Vitro Çözünme Ortamlarında Yapılan Çalışmalar 69
3.2.2.1. Yüzey Gerilimi 69
3.2.2.2. Viskozite 70
3.2.2.3. Biyouyumlu Ortamların Misel Büyüklüğü 70
3.2.3. Levofloksasin 71
3.2.3.1. Partikül Büyüklüğü 71
3.2.3.2. UV Spektrumu 71
3.2.3.3. İn Vitro Çözünme Ortamlarında Yapılan Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Standart Doğrunun Hazırlanması 72
3.2.3.4. UV Spektrofotometre ile Miktar Tayini Yöntem Validasyonu 72
3.2.3.4.1. Doğruluk ve Geri Elde 72
3.2.3.4.2. Tekrar Edilebilirlik 73
3.2.3.4.3. Özgünlük, Seçicilik 73
3.2.3.4.4. Doğrusallık 73
3.2.3.4.5. Stabilite 74
3.2.3.5. Çözünürlük 74
3.2.3.6. Tabletlerde Yapılan Kalite Denetimleri 75
3.2.3.6.1. Çap ve Kalınlık 75
3.2.3.6.2. Ağırlık Tekdüzeliği 75
3.2.3.6.3. Sertlik 76
3.2.3.6.4. Ufalanma – Aşınma 76
3.2.3.6.5. Dağılma 76
3.2.3.6.6. Etkin Madde Miktar Tayini 76
3.2.3.7. İn Vitro Çözünme Hızı Deneyleri 77
3.2.4. Flurbiprofen 78
3.2.4.1. Partikül Büyüklüğü 78
3.2.4.2. UV Spektrumu 78
3.2.4.3. İn Vitro Çözünme Ortamlarında Yapılan Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Standart Doğrunun Hazırlanması 78

3.2.4.4. UV Spektrofotometre ile Miktar Tayini Yöntem Validasyonu 79
3.2.4.4.1. Doğruluk ve Geri Elde 79
3.2.4.4.2. Tekrar Edilebilirlik 79
3.2.4.4.3. Özgünlük, Seçicilik 80
3.2.4.4.4. Doğrusallık 80
3.2.4.4.5. Stabilite 80
3.2.4.5. Çözünürlük 81
3.2.4.6. Tabletlerde Yapılan Kalite Denetimleri 81
3.2.4.6.1. Çap ve Kalınlık 81
3.2.4.6.2. Ağırlık Tekdüzeliği 82
3.2.4.6.3. Sertlik 82
3.2.4.6.4. Ufalanma – Aşınma 82
3.2.4.6.5. Dağılma 82
3.2.4.6.6. Etkin Madde Miktar Tayini 82
3.2.4.7. İn Vitro Çözünme Hızı Deneyleri 83
3.2.5. Caco-2 Hücre Kültürü ile İlgili Çalışmalar 84
3.2.5.1. Caco-2 Hücrelerinin Üretilmesi 84
3.2.5.2. Caco-2 Hücrelerinin Kuyucuklara Aktarılması 85
3.2.5.3. MTT Testi (Sitotoksisite Analizi) 86

4. BULGULAR 90

4.1. İn Vitro Çözünme Ortamlarında Yapılan Çalışmalar 90
4.1.1.1. Yüzey Gerilimi 90
4.1.1.2. Viskozite 90
4.1.1.3. Biyouyumlu Ortamlardaki Misel Büyüklüğü 91
4.2. Levofloksasin 93
4.2.1. Partikül Büyüklüğü 93
4.2.2. UV Spektrumu 94
4.2.3. İn Vitro Çözünme Ortamlarındaki Standart Doğrulara Ait Bulgular 96

4.2.4. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yöntem Validasyonu 100
4.2.4.1. Doğruluk ve Geri Elde 100
4.2.4.2. Tekrar Edilebilirlik 101
4.2.4.3. Özgünlük ve Seçicilik 103
4.2.4.4. Doğrusallık 104
4.2.4.5. Stabilite 104
4.2.5. Çözünürlük 106
4.2.6. Tabletlerde Yapılan Kalite Denetimleri 107
4.2.6.1. Çap ve Kalınlık 107
4.2.6.2. Ağırlık Tekdüzeliği 108
4.2.6.3. Sertlik 109
4.2.6.4. Ufalanma – Aşınma 109
4.2.6.5. Dağılma 110
4.2.6.6. Etkin Madde Miktar Tayini 110
4.2.7. İn Vitro Çözünme Hızı Deneyleri 111
4.2.8. Yüzey Grafikleri 114
4.2.9. İn Vitro Çözünme Hızı Kinetiklerinin Değerlendirilmesi 114
4.2.9.1. Model Bağımsız Yöntemler 114
4.2.9.2. Model Bağımlı Yöntemler 115
4.3. Flurbiprofen 118
4.3.1. Partikül Büyüklüğü 118
4.3.2. UV Spektrumu 118
4.3.3. İn Vitro Çözünme Ortamlarda Yapılan Standart Doğrulara Ait Bulgular 121
4.3.4. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yöntem Validasyonu 125
4.3.4.1. Doğruluk ve Geri Elde 126
4.3.4.2. Tekrar Edilebilirlik 127
4.3.4.3. Özgünlük ve Seçicilik 127
4.3.4.4. Doğrusallık 127

4.3.4.5. Stabilite 127
4.3.5. Çözünürlük 129
4.3.6. Tabletlerde Yapılan Kalite Denetimleri 130
4.3.6.1. Çap ve Kalınlık 130
4.3.6.2. Ağırlık Tekdüzeliği 131
4.3.6.3. Sertlik 132
4.3.6.4. Ufalanma – Aşınma 132
4.3.6.5. Dağılma 133
4.3.6.6. Etkin Madde Miktar Tayini 133
4.3.7. İn Vitro Çözünme Hızı Deneyleri 133
4.3.8. Yüzey Grafikleri 137
4.3.9. İn Vitro Çözünme Hızı Kinetiklerinin Değerlendirilmesi 137
4.3.9.1. Model Bağımsız Yöntemler 137
4.3.9.2. Model Bağımlı Yöntemler 139
4.4. MTT Testine Ait Bulgular 144

5. TARTIŞMA 150

5.1. Etkin Maddeler Üzerinde Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi 150
5.1.1. Yüzey Gerilimi 150
5.1.2. Viskozite 151
5.1.3. Biyouyumlu Ortamlardaki Misel Büyüklüğü 152
5.2. Partikül Büyüklüğü Değerlendirmeleri 153
5.3. UV Spektrofotometrik Miktar Tayini Validasyonu 153
5.4. İn Vitro Çözünme Ortamlarındaki Çözünürlük Değerlendirmeleri 155
5.5. Tabletlerde Yapılan İn Vitro Kalite Denetimlerinin Değerlendirilmesi 160
5.6. Tabletlerin Çözünme Hızı Tayini 161
5.7. pH-Çözünürlük-Çözünme Hızı Yüzey Grafiklerinin Değerlendirilmesi 164
5.8. İn Vitro Çözünme Hızı Kinetiklerinin Değerlendirilmesi 165

5.8.1. Model BağımsızYöntemler 165
5.8.2. Model Bağımlı Yöntemler 167
5.9. BCS Değerlendirmesi 170
5.10. BDDCS Değerlendirmesi 173
5.11. Sitotoksisite Değerlendirmeleri 175
6. SONUÇ **180**
7. ÖZET **182**
8. SUMMARY **184**
9. KAYNAKLAR **186**
10. ÖZGEÇMİŞ **202**
11. TEŞEKKÜR **203**

ŞEKİLLER **SAYFA**

Şekil 1. Oral alınmış ilacın in vivoda geçirdiği aşamalar 6
Şekil 2. Açlık ve tokluk durumunda mide pH'sının zamana göre değişimi 9
Şekil 3. Açlık ve tokluk durumunda ince bağırsak pH'sının zamana göre değişimi 10
Şekil 4. Zayıf asitlerin çözünürlüklerinin pH'ya bağlı değişimi 13
Şekil 5. Zayıf bazların çözünürlüklerinin pH'ya bağlı değişimi 14
Şekil 6. İn vitro çözünme hızı testlerinin kullanımı 17
Şekil 7. SIF Powder® 27
Şekil 8. Levofloksasinin kimyasal yapısı 50
Şekil 9. Flurbiprofenin kimyasal yapısı 58
Şekil 10. Flurbiprofenin ortam pH'sına göre çözünürlük değerleri 59
Şekil 11. MTT testi sırasında Caco-2 hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü 86
Şekil 12. MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi 87
Şekil 13. MTT Testi için kullanılan 96 kuyucuklu hücre kültür kabı 88
Şekil 14a. FaSSIF ortamına ait misel boyutları 91
Şekil 14b. SIF-FaSSIF ortamına ait misel boyutları 92
Şekil 14c. FeSSIF ortamına ait misel boyutları 92
Şekil 14d. SIF-FeSSIF ortamına ait misel boyutları 92
Şekil 15. Levofloksasinin partikül büyüklüğü ve dağılımı 93
Şekil 16a,b. Levofloksasinin pH 1.2 ve pH 4.5 çözünme ortamlarındaki UV spektrumları 94
Şekil 16c,d. Levofloksasinin pH 6.8 ve Kör FaSSIF çözünme ortamlarındaki UV spektrumları 95
Şekil 16e,f. Levofloksasinin FaSSIF ve SIF-FaSSIF çözünme ortamlarındaki UV spektrumları 95
Şekil 16g,h. Levofloksasinin Kör FeSSIF ve FeSSIF çözünme

ortamlarındaki UV spektrumu 95
Şekil 16i. Levofloksasinin SIF-FeSSIF çözünme ortamındaki UV spektrumu 96
Şekil 17a,b. Levofloksasinin pH 1.2 ve pH 4.5 çözünme ortamlarındaki standart doğruları 96
Şekil 17c,d. Levofloksasinin pH 6.8 ve Kör FaSSIF çözünme ortamlarındaki standart doğruları 97
Şekil 17e,f. Levofloksasinin FaSSIF ve SIF-FaSSIF çözünme ortamlarındaki standart doğrusu 97
Şekil 17g,h. Levofloksasinin Kör FeSSIF ve FeSSIF çözünme ortamlarındaki standart doğrusu 98
Şekil 17i. Levofloksasinin SIF-FeSSIF çözünme ortamındaki standart doğrusu 98
Şekil 18a,b. Levofloksasin için pH 1.2 ve pH 4.5'te özgünlük-seçicilik 103
Şekil 18c. Levofloksasin için pH 6.8'de özgünlük - seçicilik 103
Şekil 19a,b. Levofloksasinin pH 1.2'de 25˚C ve 37˚C'deki stabilitesi 104
Şekil 19c,d. Levofloksasinin pH 4.5'te 25˚C ve 37˚C'deki stabilitesi 105
Şekil 19e,f. Levofloksasinin pH 6.8'de 25˚C ve 37˚C'deki stabilitesi 105
Şekil 20. Levofloksasinin pH-çözünürlük profili 107
Şekil 21. Tavanic® tabletlerin karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri 113
Şekil 22. Ortamların pH'sı, levofloksasinin farklı ortamlardaki çözünürlüğü ve Tavanic®'in 30. dak'da farklı ortamlardaki çözünen miktarlarını gösteren yüzey grafiği 114
Şekil 23. Flurbiprofenin partikül büyüklüğü ve dağılımı 118
Şekil 24a,b. Flurbiprofenin pH 4.5 ve pH 6.8 çözünme ortamlarındaki UV spektrumları 119
Şekil 24c,d. Flurbiprofenin Kör FaSSIF ve FaSSIF çözünme ortamlarındaki UV spektrumları 119
Şekil 24e,f. Flurbiprofenin SIF-FaSSIF ve Kör-FeSSIF çözünme

ortamlarındaki UV spektrumları 120
Şekil 24g,h. Flurbiprofenin FeSSIF ve SIF-FeSSIF çözünme ortamlarındaki UV spektrumları 120
Şekil 25a,b. Flurbiprofenin pH 4.5 ve pH 6.8 çözünme ortamlarındaki standart doğruları 121
Şekil 25c,d. Flurbiprofenin Kör FaSSIF ve FaSSIF çözünme ortamlarındaki standart doğruları 122
Şekil 25e,f. Flurbiprofenin SIF-FaSSIF ve Kör FeSSIF çözünme ortamlarındaki standart doğruları 122
Şekil 25g,h. Flurbiprofenin FeSSIF ve SIF-FeSSIF çözünme ortamlarındaki standart doğruları 123
Şekil 26a,b. Flurbiprofen için pH 4.5 ve pH 6.8'de özgünlük-seçicilik 127
Şekil 27a,b. Flurbiprofenin pH 4.5'te 25˚C ve 37˚C'deki stabilitesi 128
Şekil 27c,d. Flurbiprofenin pH 6.8'de 25˚C ve 37˚C'deki stabilitesi 128
Şekil 28. Flurbiprofenin pH-çözünürlük profili 129
Şekil 29. Maximus® tabletlerin in vitro ortamlardaki karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri 135
Şekil 30. Ansaid® tabletlerin in vitro ortamlardaki karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri 136
Şekil 31a,b. Ortamların pH'sı, levofloksasinin farklı ortamlardaki çözünürlüğü ve Ansaid® ve Maximus®'un 30. dak'da farklı ortamlardaki çözünen miktarlarını gösteren yüzey grafiği 137
Şekil 32. MTT Testi sonucunda Caco-2 hücrelerinde gözlenen renklenme 144
Şekil 33a. Levofloksasinin Caco-2 hücresindeki 1. saatteki MTT sonuçları 145
Şekil 33b. Levofloksasinin Caco-2 hücresindeki 24. saatteki MTT sonuçları 145
Şekil 34a. Flurbiprofenin Caco-2 hücresindeki 1. saatteki

MTT sonuçları 146
Şekil 34b. Flurbiprofenin Caco-2 hücresindeki 24. saatteki MTT sonuçları 146
Şekil 35a. Ortamların Caco-2 hücresindeki MTT testi sonuçlarına göre % canlılık (Hücre Kontrol: Serumlu DMEM) 147
Şekil 35b. Biyouyumlu ortamlarda levofloksasinin Caco-2 hücresindeki MTT sonuçlarına göre % canlılık 148
Şekil 35c. Biyouyumlu ortamlarda flurbiprofenin Caco-2 hücresindeki MTT sonuçlarına göre % canlılık 149

TABLOLAR **SAYFA**

Tablo 1. Midenin ortalama fizyolojik değerleri 9
Tablo 2. İnce bağırsağın açlık ve tokluk durumundaki pH'sı ve alıkonma süresi 10
Tablo 3. Mide-bağırsak sistemindeki ilacın çözünme ve çözünme hızına etki eden faktörler 11
Tablo 4. Mideyi taklit eden çözünme ortamlarının karşılaştırılması 22
Tablo 5. İnce bağırsağı taklit eden çözünme ortamları 23
Tablo 6. Çözünme hızı kinetik modellemede en sık kullanılan modeller 32
Tablo 7. İlaçların BCS'e göre sınıflandırılması 36
Tablo 8. İlaçların BDDCS'e göre sınıflandırması 46
Tablo 9. Levofloksasinin endike olduğu hastalıklar ve etken bakteriler 52
Tablo 10. Levofloksasin farmakokinetik parametrelerinin özeti 54
Tablo 11. Levofloksasinin vücut dokularına ve vücut sıvılarına dağılımı 55
Tablo 12. Flurbiprofen tabletin kullanım şekli 60
Tablo 13. Flurbiprofen farmakokinetik parametrelerinin özeti 62
Tablo 14. 100 mg tek oral doz verilmesini takiben serum ve sinoviyal sıvılardaki flurbiprofen konsantrasyonları 64
Tablo 15. Tabletlerde ağırlık sapması 76
Tablo 16. Tavanic® tabletler ile gerçekleştirilen çözünme hızı test koşulları 77
Tablo 17. Ansaid® ve Maximus® tabletler ile gerçekleştirilen çözünme hızı test koşulları 83
Tablo 18. MTT Testi deney tasarımı 89
Tablo 19. İn vitro çözünme ortamlarının ortalama yüzey gerilimi değerleri 90
Tablo 20. İn vitro çözünme ortamlarının viskozite değerleri 91
Tablo 21. İn vitro çözünme ortamlarında oluşan misel büyüklükleri 93
Tablo 22. Levofloksasinin maksimum absorbans verdiği λ_{maks} değerleri 94

Tablo 23. Levofloksasinin çözünme ortamlarındaki standart doğrularına ait parametreler ve uyum ölçütleri 99
Tablo 24a. pH 1.2 için levofloksasinin geri eldesi 100
Tablo 24b. pH 4.5 için levofloksasinin geri eldesi 100
Tablo 24c. pH 6.8 için levofloksasinin geri eldesi 101
Tablo 25a. pH 1.2'de levofloksasinin tekrarlanabilirlik sonuçları 101
Tablo 25b. pH 4.5'te levofloksasinin tekrarlanabilirlik sonuçları 102
Tablo 25c. pH 6.8'de levofloksasinin tekrarlanabilirlik sonuçları 102
Tablo 26. Levofloksasinin çözünürlük ve D_0 değerleri 106
Tablo 27. Tavanic® tabletlerin boyutları 107
Tablo 28. Tavanic® tabletlerin ağırlıkları 108
Tablo 29. Tavanic® tabletlerin sertliği 109
Tablo 30. Tavanic® tabletlerin dağılma süreleri 110
Tablo 31. Tavanic® tabletlerde yapılan etkin madde miktar tayini Sonuçları 110
Tablo 32. Levofloksasin tabletlerin zamana karşı ortalama % çözünen miktarları 112
Tablo 33. İn vitro çözünme ortamlarında levofloksasinin gösterdiği çözünme özelliklerinin f_2 ile karşılaştırılması 115
Tablo 34. Tavanic® tabletlerin çözünme hızı verilerinin DDSolver ile kinetik modellemesi 116
Tablo 35. Flurbiprofenin maksimum absorbans verdiği λ_{maks} değerleri 121
Tablo 36. Flurbiprofenin standart doğrusuna ait parametreler ve uyum ölçütleri 124
Tablo 37a. pH 4.5 için flurbiprofenin geri eldesi 125
Tablo 37b. pH 6.8 için flurbiprofenin geri eldesi 125
Tablo 38a. pH 4.5'te flurbiprofenin tekrarlanabilirlik sonuçları 126
Tablo 38b. pH 6.8'de flurbiprofenin tekrarlanabilirlik sonuçları 126
Tablo 39. Flurbiprofenin çözünürlük değerleri 129

Tablo 40. Maximus® ve Ansaid® tabletlerinin boyutları 130
Tablo 41. Maximus® ve Ansaid® tabletlerin ağırlıkları 131
Tablo 42. Maximus® ve Ansaid® tabletlerin sertlik değerleri 132
Tablo 43. Maximus® ve Ansaid® tabletlerin dağılma süreleri 133
Tablo 44. Maximus® ve Ansaid® tabletlerinin miktar tayini sonuçları 133
Tablo 45. Flurbiprofen tabletlerin zamana karşı ortalama % çözünen miktarları 134
Tablo 46. İn vitro çözünme ortamlarında flurbiprofenin gösterdiği çözünme özelliklerinin f_2 ile karşılaştırılması 138
Tablo 47. İn vitro çözünme ortamlarında Maximus® ve Ansaid® tabletlerin çözünme özelliklerinin f_2 ile karşılaştırılması 139
Tablo 48. Maximus® tabletlerin çözünme hızı verilerinin DDSolver ile kinetik modellemesi 140
Tablo 49. Ansaid® tabletlerin çözünme hızı verilerinin DDSolver ile kinetik modellemesi 142
Tablo 50. Tavanic®, Maximus® ve Ansaid® tabletler için en uygun çözünme hızı kinetikleri 168

KISALTMALAR

BCS – Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi

BDDCS – Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sınıflandırma Sistemi

BE – Biyoeşdeğerlik

BY – Biyoyararlanım

FaSSIF – Açlık durumu yapay bağırsak ortamı

FeSSIF – Tokluk durumu yapay bağırsak ortamı

FDA – Amerikan İlaç ve Gıda İdaresi

EMA – Avrupa İlaç Değerlendirme Ajansı

GMK – Göç eden motor kompleks

GI – Gastrointestinal

CMC – Kritik misel konsantrasyonu

SGF – Yapay mide ortamı

SIF – Yapay bağırsak ortamı

SLS – Sodyum lauril sülfat

IVIVC – İn vitro in vivo korelasyon

MSD – Çok değişkenli istatistiksel aralık

R^2 – Determinasyon katsayısı

MSE – Ortalama kare hatası

SKT – Sapma kareleri toplamı

WSS, ASKT – Ağırlıklı sapma kareleri toplamı

AIC – Akaike bilgilendirme kriteri

MSC – Model seçme kriteri

D_0 – Doz numarası

SUPAC – Ölçek artırma ve başvuru sonrası değişiklikler

C_{max} – Maksimum kan konsantrasyonu

t_{max} – Maksimum kan konsantrasyonu

AUC – Eğri altında kalan alan

V_d – Sanal dağılım hacmi

$t_{½}$ – Yarılanma ömrü

NSAİİ – Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar

COX – Siklooksijenaz

X_{ort} – Ortalama değerler

SS – Standart sapma

VK – Varyasyon katsayısı

λ_{maks} – Maksimum dalga boyu

EKKAR – En Küçük Kareler Yöntemi, Doğrusal Regresyon Yöntemi

EDTA – Etilendiamin tetraasetik asit

f_1 – Farklılık faktörü

f_2 – Benzerlik faktörü

1. GİRİŞ

Günümüzde modern ilaçla ilgili yasal düzenlemeler ilacın çözünürlüğü, permeabilitesi ve çözünme hızı gibi in vitro biyofarmasötik değerlendirmelere önem vermektedir. İlaçlar, bu farmasötik değerlendirmeler göz önüne alınarak, sağlık otoritelerinin de kabul ettiği, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine (BCS) göre sınıflandırılmaktadır. İlaçların bu sisteme bağlı olarak hangi sınıfta olduğu, etkin maddenin çözünürlüğü, permeabilitesi ve hızlı salımlı katı oral dozaj şeklinin mide bağırsak kanalını taklit eden in vitro çözünme ortamlarındaki in vitro çözünme hızı çalışmalarına göre belirlenmektedir.

Yüksek çözünürlük/yüksek permeabilite gösteren Sınıf 1 ilaçlar için biyoeşdeğerlik (BE) çalışmalarından vazgeçme (biyomuafiyet) sözkonusudur. Özellikle düşük çözünürlük ve yüksek permeabilite gösteren Sınıf 2 ilaçlarda çözünme, emilim hız ve derecesini belirleyen en önemli etkendir. Bu tarz ilaçların emiliminde hız kısıtlayıcı basamak in vivo çözünmeleridir. İlacın mide bağırsak kanalında çözünmesinde safra bileşenleri, enzimler, açlık ve tokluk durumlarındaki pH değişiklikleri, motilite, iyonizasyon gibi etkenler rol oynamaktadır. Bu nedenle, in vivo emilim ortamının in vitro olarak en iyi şekilde taklit edilebilmesi büyük önem taşımaktadır. İlacın emilim bölgesinde yüksek çözünürlük göstermesi ve dozaj şeklinden hızlı salınması Sınıf 2 ilaçların biyomuafiyetini de düşündürmektedir. Bu tarz ilaçlar için in vivo çözünmelerini in vitro olarak tahmin edilebilecek çözünme ortam ve yöntemlerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Son yıllardaki etik kurallar ve insan sağlığı göz önünde bulundurularak yapılan yasal düzenlemelerle ilgili çalışmalar, in vivo BE testlerinin in vitro biyofarmasötik değerlendirmelerle yer değiştirmesine olanak

sağlamaktadır. Dolayısıyla, sağlıklı gönüllülerde yapılan ve maliyeti oldukça yüksek olan BE çalışmalarını azaltmak hedeflenerek, etkin madde ve farmasötik dozaj şeklinde çözünürlük ve çözünme hızı etkisinin açlık ve tokluk durumlarında incelenmesi alternatif bir yol olarak düşünülmektedir. Yeni ilaç şekillerinin geliştirilmesindeki Ar-Ge çalışmalarında, in vitro deneylerle yapılan kestirimlerde, ilaçların çözünme/permeabilite özellikleriyle in vivo davranışları arasında in vitro-in vivo korelasyonların kurulmasında, yiyeceklerin ilaç biyoyararlanımına olan etkisinin tahmininde, in vivo çözünmenin tahmininde ve biyomuafiyet değerlendirmelerinde biyolojik olarak uyumlu (biyouyumlu) ortamların kullanılması önem kazanmıştır.

Biyouyumlu (biyorelevant) ortamlar, in vivo performansa en yakın sonuçlar veren in vitro yöntemlerin geliştirilmesi, emilim bölgesindeki çözünürlüğün ve dozaj şeklinden hızlı çözünmenin tahmini için tasarlanan sistemlerdir. Bu çözünme ortamları, değişik oranda safra tuzları ve lesitin karışımlarını içermekte ve in vivo fizyolojik koşullara kullanılmakta olan mide bağırsak ortamlarından daha fazla benzerlik göstermektedir. Günümüzde, biyouyumlu ortamlarda yapılan çalışmalara olan ilgi de yukarıda belirtilmiş olan nedenlerden dolayı hızla artmaktadır.

Bu çalışmada, BCS'ye göre Sınıf 1 (yüksek çözünürlük-yüksek permeabilite) ve Sınıf 2 (düşük çözünürlük-yüksek permeabilite) kategorisinden seçilen 2 farklı etkin maddenin hızlı salımlı dozaj şekillerinin açlık tokluk durumlarındaki in vivo performanslarının in vitro çalışmalarla incelenmesi amaçlanmıştır. Burada, BCS 1 ilaçlardan levofloksasin (antibakteriyel) ve BCS 2 ilaçlardan da flurbiprofen (nonsteroidal antiinflamatuvar) model etkin madde/ilaç olarak seçilmiştir.

İn vitro çalışmalar:

(1)Klasik mide ve bağırsak ortamlarında (pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8) ve biyouyumlu açlık durumu yapay bağırsak ortamı (FaSSIF) – tokluk durumu yapay bağırsak ortamında (FeSSIF) yapılan çözünürlük ve çözünme hızı çalışmalarını,

(2)Biyouyumlu ortamların hazırlanmasında karşılaşılan zorluklara alternatif olarak geliştirilen SIF Powder® karışımının performansının in vitro çözünürlük ve çözünme hızı deneyleriyle saptanmasını,

(3)pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, FaSSIF, FeSSIF, SIF-FaSSIF ve SIF-FeSSIF in vitro çözünme ortamlarındaki çözünme hızı profillerinin karşılaştırılmasını,

(4)Çözünme hızı verilerinin DDSolver çözünme hızı kinetik programıyla modellenmesini,

(5)Kullanılan mide-bağırsak ortamlarının hücrelerin canlılığına olan etkisinin saptanması amacıyla Caco-2 hücre kültüründe yapılan MTT testi ile sitotoksisite değerlendirmelerini içermektedir.

Biyouyumlu bağırsak ortamlarının Caco-2 hücrelerin canlılığı üzerinde herhangi bir toksik etki oluşturmaması amacıyla safra tuzu/fosfolipit miktarı ve çeşidinin önemle seçilmesi gerekmektedir. Hücrelerin canlılığını sürdürebilmesi açısından en uygun biyouyumlu ortamın saptanması üzerinde yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Ayrıca, şu ana kadar SIF Powder® ile yapılan çözünme hızı çalışmaları olmakla birlikte bu ortamların Caco-2 hücre kültüründe kullanımına ait herhangi bir değerlendirme de bulunmamaktadır.

Bir ilacın çözünürlüğü ve permeabilitesi formülasyon geliştirme sürecinde oldukça önemlidir. Türk İlaç Piyasasından seçilen hızlı salımlı katı oral dozaj şekillerinin açlık-tokluk durumlarındaki in vitro performanslarının ilk kez incelenecek olması ve bu çalışmaların daha sonra yapılması planlanan

geçiş çalışmalarıyla birlikte değerlendirilmesinin çözünürlük, permeabilite ve çözünme hızı gibi in vitro biyofarmasötik değerlendirmeler açısından jenerik ilaç üretimine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Az çözünen ilaçlar için çözünürlük ve çözünme hızında etkili tek faktör pH olmadığından, biyouyumlu ortamlar kullanıldığında in vivo kestirimler ve değerlendirmeler açısından daha kesin sonuçların alınacağı açıktır. Özellikle BCS Sınıf 2'deki zayıf asidik ilaçların emilim bölgesi olan ince bağırsaklarda yüksek çözünürlükte olması ve katı oral dozaj şeklinden hızlı çözünmesi bu tarz ilaçların BE çalışmasından vazgeçilebileceğini düşündürmektedir. Flurbiprofen de yüksek permeabiliteye sahip bir ilaç olduğundan emilim bölgesindeki çözünürlüğü ve çözünmesi dikkate alındığında in vivo BE çalışmalarından vazgeçme uygulanabilir. Bu nedenle, flurbiprofen gibi ilaçlar için biyouyumlu ortamlarda yapılan çalışmalarla BCS Sınıf 2 ilaçlar için de biyomuafiyet kriterlerinin oluşturulması sağlanabilir. Sonuç olarak, zayıf asidik BCS Sınıf 2 ilaçlar BCS Sınıf 1 ilaç olarak değerlendirilebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çözünme ve Çözünme Hızı

Çözünme hızı, birim zamanda oral katı dozaj şeklinden çözünerek çözünme ortamına geçen etkin madde miktarı veya daha genel anlamda katı madde miktarı olarak tanımlanabilir.

Katı ilaç dozaj formunun sıvı bir ortam içerisinde dağılarak çözünmesi iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada katı faz ile sıvı faz arasındaki etkileşim sonucu katı fazda çözünmüş moleküller oluşur. İkinci fazda ise bu moleküller difüzyonun etkisiyle ara yüzeyden sıvı ortama geçer[1]. Çözünme, Modifiye Noyes-Whitney eşitliği ile açıklanmaktadır[2].

$$dC/_{dt} = \frac{D.S}{V.h}(C_s - C)$$ Eşitlik 1

dC/dt: Ortamdaki etkin madde derişiminin zamana göre değişimi, çözünme hızı

C_s: İlacın ortamdaki çözünürlüğü (mg/mL)

C: t zamanında ortamdaki etkin madde derişimi (mg/mL)

S: Çözünen katının yüzey alanı (cm^2)

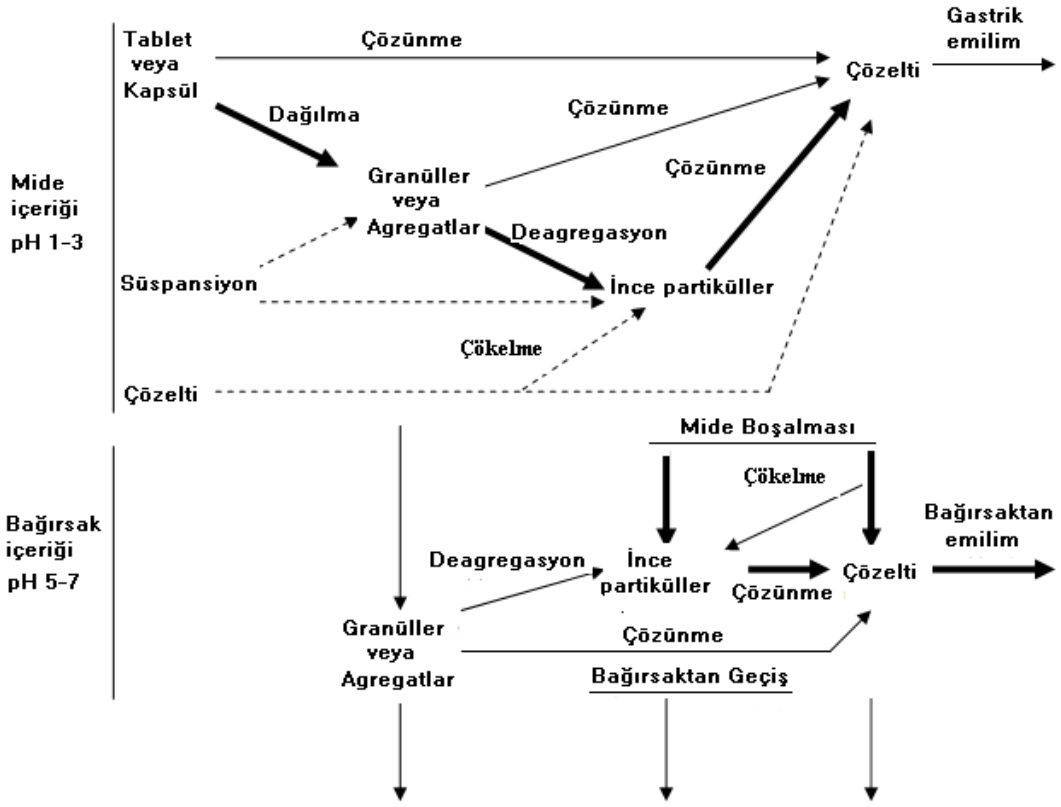
D: Difüzyon katsayısı (cm^2/sn)

V: Çözünme ortamının hacmi (mL)

h: Difüzyon tabakasının kalınlığı (cm)

2.1.1. İlaçların Mide Bağırsak Kanalından Emiliminde Çözünmenin Önemi

Hızlı salımlı, oral katı dozaj formları için, ilacın dozaj formundan salınıp sistemik dolaşıma geçişinde ilacın dağılma, çözünme ve emilim basamakları rol oynar.



Şekil 1. Oral alınmış ilacın in vivoda geçirdiği aşamalar[3]

Şekil 1'de gösterilen aşamalarda dağılma işlemi, deagregasyon, çözünme ve emilim işlemlerinden daha yavaşsa, dağılmanın hız saptayan adım olduğu söylenebilir. Bu durum daha çok enterik kaplı dozaj şekilleri için geçerli olmaktadır. Buna karşılık çözünme işlemi, dağılma, deagregasyon ve emilim işlemlerinden daha yavaşsa, çözünmenin hız saptayan adım olduğu söylenebilir[4].

Dağılma, deagregasyon ve çözünme işlemleri dozaj şeklinin formülasyonuna bağlı olan farmasötik etkenlerdir. Emilim işlemi ise etkin maddenin bir parametresi olup formülasyondan bağımsızdır. Ancak emilimin gerçekleşebilmesi için çözünme işleminin gerçekleşmesi şarttır[4].

2.1.2. Mide-Bağırsak Kanalında İlacın Çözünürlüğü ve Çözünme Hızını Etkileyen Faktörler

Mide-bağırsak kanalının oral yoldan alınan ilaçlar için karmaşık bir ortam olduğu bilinmektedir. Açlık durumunda sağlıklı insanlarda ilaçların çözünürlüğünü, dolayısıyla emilimini ve BY'sini etkileyen iki önemli fizyolojik faktör vardır: 1) Mide-bağırsak kanalının hidrodinamiği 2) Mide-bağırsak sıvılarının bileşenleri.

Mide-bağırsak kanalının hidrodinamiği doğrudan mide-bağırsak motilitesine bağlıdır. Motilite, midenin boşalmasını, göç eden motor kompleksi (GMK) ve ince bağırsak hareketlerinin şiddetini ve sıklığını kapsamaktadır.

Mide-bağırsak sıvılarında; pH, safra tuzları ve tampon türleri, enzimler, osmolarite, hacim ve viskozite ilacın çözünürlüğünü etkiler. Ayrıca, mide-bağırsak kanalından geçiş zamanı[5-7] ve splanknik kan akışı[8-10] da ilaç emiliminde etkili faktörler arasında yer almaktadır. Bu faktörlerin yanı sıra mide-bağırsak sisteminde salınan hidroklorik asit, bikarbonatlar, yüzey etkin maddeler, elektrolitler ve mukus, ilacın çözünürlüğüne etki eden diğer faktörlerdendir[11]. Tüm bu fizyolojik faktörler dinamik olarak birbirlerinden etkilenmektedir ve bireyiçi ve bireylerarası farklılıklar göstermektedir.

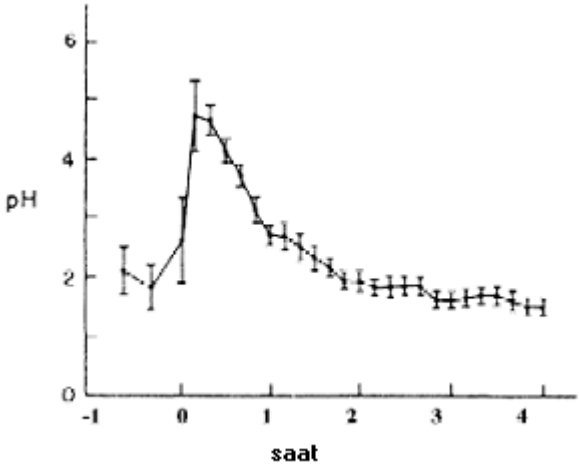
2.1.2.1. Mide Bağırsak Sisteminin Fizyolojisi

İlaç alımı için en çok tercih edilen yol oral yoldur. Oral yoldan uygulanan bir ilaç etki edeceği bölgeye ulaşmadan önce sindirim kanalında ilerlemek zorundadır.

Mide-bağırsak sisteminin başlangıcı olan a**ğız boşluğu**, oral alınan ilaçlar için giriş bölgesi olup, ana salgısı tükürüktür. Tükürük günde yaklaşık 1500 mL salınır ve pH'sı 6.2-7.4'tür.

İlaç yutulduktan sonra **yemek borusu**na gelir. İlaçların yemek borusundan geçişi vücudun duruşuna bağlı olarak 5-15 saniye sürer[12]. İlaçlar buradan **mide**ye ulaşır ve emilim midede başlar. Mide kaslarının hareketi sonucu asidik mide sıvısı yardımıyla sindirim olayı başlar. İlacın midede çözünen miktarı, oral dozaj formunun tipine ve salım özelliğine (hızlı salım, uzatılmış salım gibi) ve ilacın çözünürlük özelliklerine (pH'ya bağımlı çözünürlük gibi) bağlı olarak değişiklik gösterir.

Açlık ve tokluk durumlarında gastrik asit sekresyonu değişiklik gösterir. Açlık durumunda bazal gastrik asit sekresyonu erkeklerde yaklaşık 2-4 mmol/s iken, kadınlarda daha düşüktür[13]. Yemeklerden sonra gastrik asit sekresyonu hızla artar ve yaklaşık 90 dak içinde en yüksek seviyeye ulaşır[13,14]. Açlık durumunda mide pH'sı 1.5-2'dir[13,15]. Yiyecek alımından hemen sonra mide pH'sı yaklaşık 5'e ulaşır. Yiyecek alımından 60 dak sonra pH 3'ün altına iner ve 120 dak sonunda da pH 2'nin altına düşer[3](Şekil 2). Açlık ve tokluk durumunda gözlenen belirgin pH farklılıkları pH'ya bağımlı çözünürlük profili gösteren hızlı salımlı ilaçlar için önemli olmaktadır. pH artışıyla çözünürlükleri azalan zayıf bazik özellikteki ilaçların midedeki çözünürlükleri açlık durumunda, tokluk durumuna göre daha fazladır[16]. İlaçların açlık veya tokluk durumunda alınması gastrik alıkonma zamanını da etkilemektedir. Gastrik boşalma açlık durumunda daha hızlı gerçekleşmektedir.



Şekil 2. Açlık ve tokluk durumunda mide pH'sının zamana göre değişimi (Yiyecek alımının gerçekleştiği nokta sıfırıncı saat olarak ifade edilmiştir)[3].

Açlık ve tokluk durumunda fizyolojik parametrelerde değişkenlik gözlenmektedir. Bu değişkenlikler Tablo 1'de gösterilmiştir:

Tablo 1. Midenin açlık ve tokluk durumunda ortalama fizyolojik değerleri[17-19]

Fizyolojik parametre	**Açlık**	**Tokluk**
Mide pH'sı	1.7	5.0
Mide boşalma zamanı (s)	0.25	1.0
Hepatik kan akışı (L/s)	90	120
Yüzey gerilimi (mN/m)	35-45	-
Osmolalite (mosm/kg)	191	-

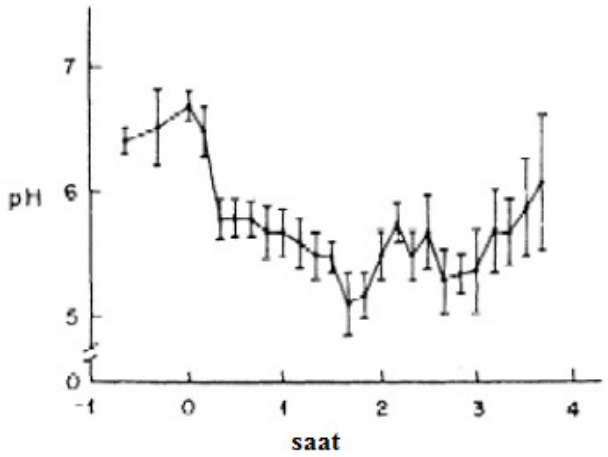
İnce bağırsağın yapısı emilim ve sekresyon kapasitesi özellikleri açısından farklılıklar gösterir. **Duodenum** ince bağırsaktaki ilk kısımdır. Belirgin mukoza tabakası içeren ince bir duvar ile kaplıdır ve duodenal sindirim bezlerini içerir. **Jejunum,** duodenuma göre daha ince bir duvara ve daha kassı bir dokuya sahiptir ve ileumdan daha fazla sayıda villus içerir. **İleum** ise, ince bağırsağın en fazla Peyer plaklarını içeren bölümüdür.

İnce bağırsak geniş yüzey alanı (duodenum 0.1 m^2, jejunum 60 m^2, ileum 60 m^2) ve yüksek kan akışı (25 mL/dak) nedeniyle emilimin en fazla gerçekleştiği bölgedir[20]. İnce bağırsağın osmolalitesi ortalama 271 mosm/kg olarak bulunmuştur[21]. İnce bağırsağın açlık ve tokluk durumlarındaki pH değerleri ve ince bağırsakta alıkonma süresi Tablo 2'de verilmiştir:

Tablo 2 – İnce bağırsağın açlık ve tokluk durumundaki pH'sı ve alıkonma süresi[11]

	Açlık pH	**Tokluk pH**	**Alıkonma Süresi**
Duedenum	4.9 – 6.4	5.1 – 5.4	3 – 4 saat
Jejenum	4.4 – 6.5	5.2 – 6.2	3 – 4 saat
İleum	6.5 – 7.4	6.5 – 8.0	3 – 4 saat

Yemeklerden hemen sonra midedeki asidik kimusun aktarımı nedeniyle ince bağırsak pH'sı önce azalır, ancak daha sonra pankreatik bikarbonat çıkışı nedeniyle açlık durumu pH'sına geri döner[21]. Açlık ve tokluk durumunda ince bağırsak pH'sının zamana göre değişimi Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Açlık ve tokluk durumunda ince bağırsak pH'sının zamana göre değişimi (Yiyecek alımının gerçekleştiği nokta sıfırıncı saat olarak ifade edilmiştir)[21].

Kalın bağırsak, mide-bağırsak sisteminin en son adımıdır. Kalın bağırsakta besinler içerisinde kalan su ve minerallerin emilimi gerçekleşir.

Mide-bağırsak sisteminde ilacın çözünme ve çözünme hızına etki eden fizikokimyasal ve fizyolojik etkenler Tablo 3'te özetlenmiştir[11].

Tablo 3. Mide-bağırsak sistemindeki ilacın çözünme ve çözünme hızına etki eden faktörler[11]

Faktör	**Fizikokimyasal Parametre**	**Fizyolojik Parametre**
Yüzey alanı (S)	Partikül büyüklüğü, ıslanabilirlik	Mide sıvısındaki yüzey etkin maddeler ve safra tuzu varlığı
Difüzyonu(D)	Molekül büyüklüğü	Lümen içi sıvısının viskozitesi
Difüzyon tabakasının kalınlığı (h)		Mide-bağırsak sistemi motilitesi ve hızı
Doygunluk konsantrasyonu (C_s)	Hidrofilik özellik, kristal yapı, çözünürlük	pH, tamponlama kapasitesi, safra tuzu, yiyecek içeriği
Çözünmüş ilaç derişimi (C)		Permeabilite
Çözücünün hacmi (V)		Mide-bağırsak sistemi sıvılarının hacmi ve sekresyonu, alınan sıvı miktarı

2.1.2.2. İlaçların İyonizasyon Özelliği

İlaçların serbest asit veya baz şeklinin çözünürlüğü **intrinsik çözünürlük** olarak tanımlanmaktadır. Zayıf asidik ve bazik ilaçların çözünürlüğü iyonizasyon katsayılarına (K_a) ve çözünme ortamının pH'sına bağlıdır[21]. Çözünürlük-pH ilişkisi Henderson-Hasselbach eşitliği ile açıklanmaktadır. Bu eşitlik, ilacın intrinsik çözünürlüğü, pH ve pK_a'sı ile ilişkilidir.

Monoasidik bileşikler için, çözünürlük-pH ilişkisi Eşitlik 2'de, monobazik bileşikler için ise Eşitlik 3'te verilmiştir:

$$S_T = S_0\left[1 + 10^{(pH - pK_a)}\right]$$ Eşitlik 2

$$S_T = S_0\left[1 + 10^{(pK_a - pH)}\right]$$ Eşitlik 3

Burada:

S_T: Toplam çözünürlük (mg/mL)

S_0: İlacın pH'dan bağımsız çözünürlüğü (mg/mL)

pK_a: İyonizasyon sabiti

Az çözünen zayıf asitler için bağırsak daha uygun bir çözünme ortamı sağlar. Bu bileşikler için emilimde sınırlayıcı basamak mide boşalmasıdır.

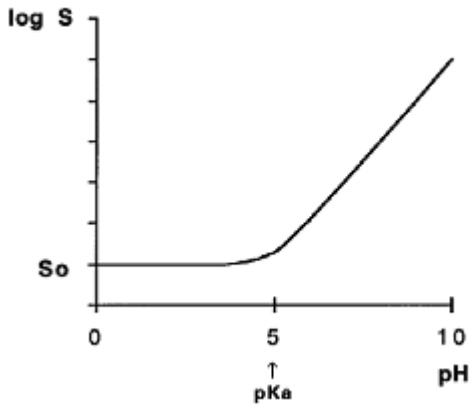
Zayıf asitler için pH değeri artarsa asidin çözünürlüğü iyonize formun oluşumu nedeniyle artar (Eşitlik 4), (Şekil 4).

$$S = S_0\left(1 + \frac{K_a}{[H^+]}\right)$$ Eşitlik 4

S: İlacın pH'ya bağlı çözünürlüğü (mg/mL)

S_0: İlacın pH'dan bağımsız çözünürlüğü (mg/mL)

K_a: Asitlik sabiti



Şekil 4. Zayıf asitlerin çözünürlüklerinin pH'ya bağlı değişimi (örneğin pK_a'sı 5 olan bir ilaç için)[21]

Az çözünen zayıf bazik ilaçların, midedeki çözünürlükleri daha fazladır[22]. Bu durumda ilaç, mideden pH'sı daha yüksek olan ince bağırsağa geçtiğinde çökme oluşabilir. Bu durum ince bağırsakta bulunan safra bileşenleri ile engellenebilir[23].

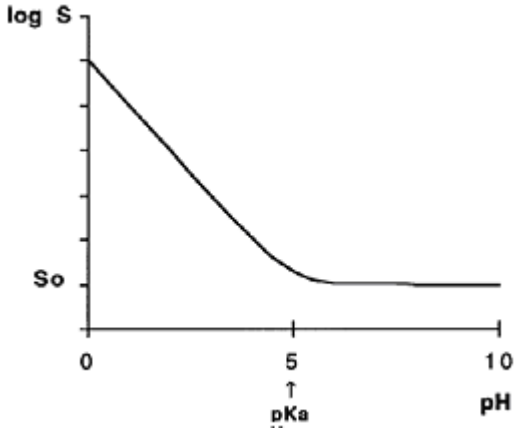
Zayıf bazik ilaçların çözünürlüğü ise pH'nın azalmasıyla artar (Eşitlik 5), (Şekil 5).

$$S = S_0 \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a}\right)$$ Eşitlik 5

S: İlacın pH'ya bağlı çözünürlüğü (mg/mL)

S_0: İlacın pH'dan bağımsız çözünürlüğü (mg/mL)

K_a: Asitlik sabiti



Şekil 5. Zayıf bazların çözünürlüklerinin pH'ya bağlı değişimi (pK_a'sı 5 olan bir ilaç için)[21]

2.1.2.3. Mide-Bağırsak Motilitesi

Mide-bağırsak motilitesi, ilacın duodenum ve jejunuma girme hızını, ince bağırsakta kalış süresini ve ilacın mide-bağırsak sıvısı ile etkileşme dinamiğini yansıtır. Mide-bağırsak kanalındaki hidrodinamik koşullar yiyecek alımına ve bireylerarası çeşitliliğe bağlıdır. Motilite mide boşalmasını etkilemek suretiyle ilaçların çözünme ve emilim özelliklerini etkilemektedir. Midenin boşalması ise, alınan sıvı hacmi, viskozite, partikül boyutu, pH ve osmolariteden etkilenmektedir[24-26].

Açlık durumunda, GMK gastrik motilite ile harekete geçer. GMK her 90-120 dak'da bir oluşur ve üç faza ayrılabilir. Faz I motorun sessizlik evresi olarak bilinen durgun fazı, faz II aralıklı ve düzensiz kasılma aktivitesini gösterirken faz III sık ve şiddetli kasılmalar ile karakterizedir[27]. Faz III katı ve sıvıların mideden bağırsaklara doğru hareketinden sorumludur ve bu hareketler açlık durumunda midede başlar, pilora yayılır ve yavaşça ince bağırsağa doğru inerek artar[28-30]. GMK karakteristikleri bireyden bireye farklılık göstermektedir. Bu değişiklikler bağırsaktan geçiş özellikleri, stresin etkisi, yaş, cinsiyet ve ırk gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır[27,31].

2.1.2.4. Enzimler

Mide sıvısında bulunan birincil enzim bir eksopeptidaz olan pepsindir. Lipaz, amilaz ve proteaz pankreastan ince bağırsağa yiyeceklerin alımına bir cevap olarak salınır ve sindirimden sorumlu enzimlerdir. Proteaz ve pepsin enzimleri protein ve peptitlerin; lipaz ise, yağların emiliminde rol oynar. Ayrıca distal ileuma ve kolona yerleşen bakteriler de çeşitli enzimler salgılar. Belirli kimyasal bağları parçalayabilen bakteriyel ekzoenzimler kolona hedeflenen bazı dozaj formlarının tasarlanmasında kullanılırlar[11].

2.1.2.5. Hacim

İlacın çözünmesi için mide-bağırsak kanalında bulunması gereken sıvı hacmi, vücuda alınan sıvı miktarına, sekresyonlara ve bağırsak duvarından geçen sıvı akışına bağlıdır. Günde oral yoldan yaklaşık 2 L sıvı alınır. Ancak bu durum şartlara, vücut ağırlığına, aktivite ve kişisel alışkanlıklara bağlı olarak da değişebilmektedir. Açlık durumunda midedeki su hacmi 20-30 mL civarındadır. Bu durumda mide, ıslaklığını mukus varlığı ile korumaktadır. Mide hacmi 1.5 L'yi aştığında mide basıncı artmaya başlar. Mide sekresyonunun yanında karaciğer, pankreas ve tükürük bezlerinden de sekresyon gerçekleşir. Bu endojen sekresyonlarla sıvı hacmi günde yaklaşık 6 L'yi bulmaktadır. Pankreatik sıvıların ve safranın salımı yiyecek alımından sonra gerçekleşmektedir[11].

2.1.2.6. Safra Bileşenleri

Safra, karaciğerde hepatositler tarafından salgılanan yeşilimsi sarı bir sıvıdır. Safra, safra kesesinde depolanır ve yemeklerden sonra hazmı kolaylaştırmak için duodenuma salgılanır. Safra içeriği yaklaşık %84 su, %15.5 safra tuzu, %3 lesitin, %0.5 kolesterol ve %1 diğer bileşiklerden (safra pigmentleri, inorganik iyonlar ve protein gibi) oluşmaktadır. İlacın ince

bağırsaktaki çözünürlüğü, amfifilik safra bileşenlerine (safra tuzları, lesitin ve monooleinler gibi) bağlı olarak artabilmektedir. İlacın çözünürlüğünün artışı iki şekilde gerçekleşir : (1) Katı ilaç ve çözünme ortamı ara yüzey enerjisinin azaltılması (2) Miseller çözünürlük yoluyla çözünürlüğün artması.

Genellikle kritik misel konsantrasyonlarının (CMC) altındaki konsantrasyonlarda ortama ilave edilen safra tuzlarıyla ıslanabilirlik artmaktadır. CMC'nin üzerindeki konsantrasyonlarda ise çözünürlük artışı baskındır[13]. Birçok ilacın çözünürlüğünün safra bileşenleri ilavesi ile artırıldığı görülmüştür(griseofulvin, glutetimid, digoksin, lökotrien-D4 antagonistleri, gemfibrozil, danazol gibi). Bu sayede ilaçların çözünürlüğü sudaki çözünürlüklerine oranla 100 kata kadar artırılabilmiştir[21].

Mide-bağırsak kanalında en çok bulunan safra tuzları kolat, deoksikolat, kenodeoksikolat ve bunların tauro- ve glikol- konjugat formlarıdır[32,33]. Açlık durumunda midede bulunan safra tuzu miktarı genellikle 4-6 mM civarındadır. Yemeklerden sonra bu değer 10-20 mM civarına ulaşmakta[13], bazen de 40 mM'a kadar artış gösterebilmektedir[34-37]. İyonize olmayan bileşiklerde, mide-bağırsak kanalındaki pH değişiklikleri ilacın çözünürlüğünü etkilemezken, safra tuzlarının ilacın çözünürlüğünü belirgin derecede artırdığı görülmüştür[38,39].

Mide-bağırsak kanalında safra tuzlarının haricinde çözünmeyi etkileyen bir diğer safra bileşeni de lesitindir. Lesitin yumurtadan veya soya fasülyesinden elde edilen yüzey etkin madde özelliği gösteren bir maddedir. Tamamen metabolize edilebildiğinden, in vivo biyolojik ortamlar ile uyumludur[40].

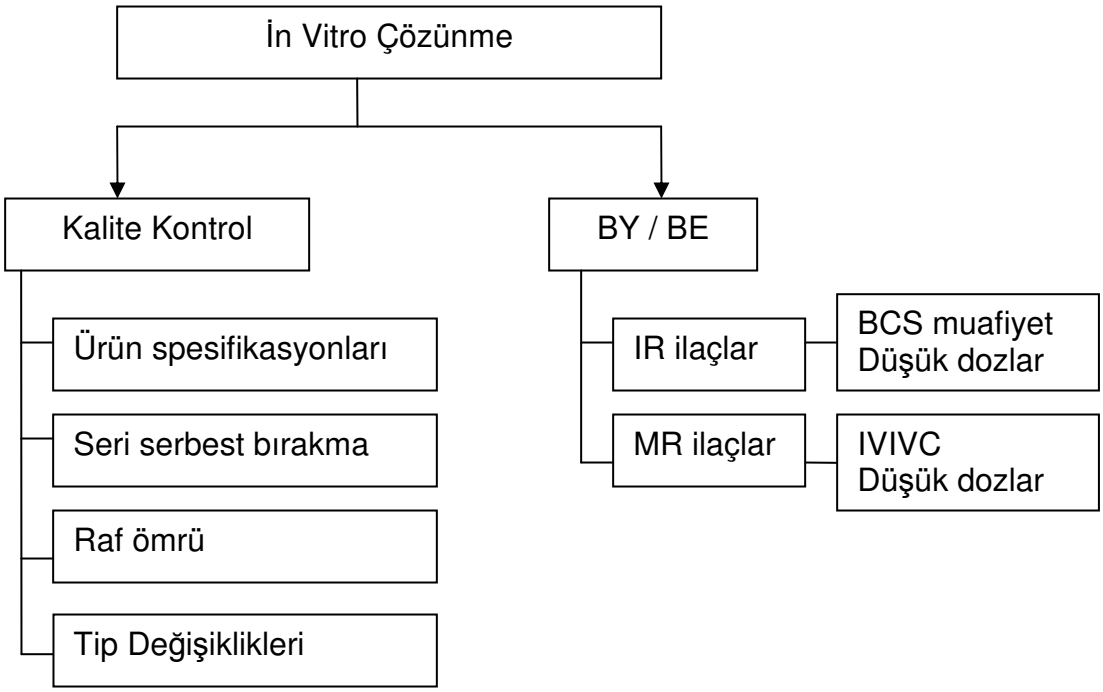
Safra tuzu ve lesitin oranı ilacın çözünürlüğünü etkiler[21]. İn vivo olarak bu oran 1:2 ve 1:5 arasında değişmektedir. İn vivoyu taklit etmek

amacıyla yapılan in vitro çalışmalarda açlık koşulları için 3-5 mM safra tuzu kullanılmakta olup, lesitin:safra tuzu oranı da 1:3'tür. Tokluk koşulları için ise 10-15 mM safra tuzu kullanılmakta olup oran aynıdır[11].

Mide-bağırsak kanalını taklit eden ortamlarda safra asitleri ve lesitinin yanında, yağ asitleri (oleik asit gibi) ve monogliseritler (monoolein gibi) de kullanılmaktadır[41-44].

2.1.3. İn Vitro Çözünme Hızı Testleri

Çözünme hızı testleri, ilacın mide-bağırsak kanalındaki davranışının in vitro koşullar altında doğrudan gözlemlenmesine olanak sağlar. Aynı zamanda ilacın kalitesinin de göstergesidir. İn vitro çözünme hızı testlerinin kullanımı Şekil 6'da özetlenmiştir:



Şekil 6. İn vitro çözünme hızı testlerinin kullanımı[45]

2.1.3.1. İn Vitro Çözünme Ortamları

2.1.3.1.1. Klasik İn Vitro Çözünme Ortamları

Farmakopelerde pH değerleri 1.2 ile 7.5 arasında değişen çözünme ortamları belirtilmiştir. Farmakopelerde bazı ilaçlara özgü çözünme ortamları olmakla birlikte genel olarak pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8 in vitro çözünme ortamları kullanılmaktadır. Bunların dışında pepsin içeren veya içermeyen yapay mide ortamı (SGF) ve pankreatin içeren veya içermeyen yapay bağırsak ortamları (SIF) da farmakopelerde kayıtlı in vitro çözünme ortamlarıdır.

2.1.3.1.2. Yüzey Etkin Madde İçeren İn Vitro Çözünme Ortamları

Mide-bağırsak kanalının pH'sını taklit eden, fakat yüzey etkin madde içermeyen in vitro çözünme ortamları çözünürlüğü düşük birçok ilaç için uygun olmamaktadır[46]. Vücutta bulunan yüzey etkin özellikteki bileşenler, ilaçların çözünürlüğü üzerinde etkili olduğundan, çözünme ortamına bir yüzey etkin maddenin[47] veya bir organik çözücünün ilavesi alternatif yol olarak düşünülmüştür[24,48]. Bu amaçla yüzey etkin madde olarak SLS, Tween 20, dodesiltrimetilamonyum bromür gibi bileşenler kullanılmıştır. Bu maddelerin ortama ilavesi ile çözünürlüğü düşük ilaçların miseller içerisine hapsolması ile çözünürlüklerinde belirgin artışlar gözlenmiştir[49].

Miseller aracılı çözünürlük artışı Eşitlik 6 ve Eşitlik 7 ile açıklanabilir[49]:

$$\Phi = \frac{J_{tot}}{J_s} = \left(\frac{D_{eff}^{2/3}}{D_s^{2/3}}\right) \cdot \left(\frac{C_{tot}}{C_s}\right) \qquad \text{Eşitlik 6}$$

J_{tot}: Total akı (g/cm^{2}sn)

J_s: Çözücüdeki akı (g/cm^{2}sn)

D_{eff}: Efektif difüzyon (cm^2/sn)

D_s: Çözücüdeki difüzyon (cm^2/sn)

C_{tot}: Toplam ilaç konsantrasyonu (g/cm^3)

C_s: Çözünürlük (g/cm^3)

$$k^* = \frac{C_{sm(0)}}{C_{s(0)} \cdot C_{m(b)}}$$ Eşitlik 7

k*: Denge katsayısı

$C_{sm(0)}$: İlaç yüklü misel derişimi (g/cm^3)

$C_{m(b)}$: Çözeltideki yüzey etkin madde derişimi (g/cm^3)

$C_{s(0)}$: Çözünürlük (g/cm^3)

Çözünme ortamında kullanılan yüzey etkin maddenin cinsinin ve derişiminin seçimi oldukça önemlidir. Yüzey etkin madde derişimi etkin maddelerin özelliklerine göre değişkenlik göstermekle birlikte, % 2'den fazla kullanılmaz. Bu yüzdenin belirlenmesinde çözünme ortamına belirli yüzdelerde (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0) yüzey etkin madde ilave edilerek ilacın çözünmesini belirli bir süre içerisinde(örneğin 120 dak) % 75-85'e ulaştıran konsantrasyon tercih edilir[50]:

Yüzey etkin maddeler, amfifilik özellikte maddelerdir ve polar / non-polar ara yüzey yokluğunda veya CMC'nin üzerindeki konsantrasyonlarda birleşerek (self-association) silindirik, tek tabakalı veya çift tabakalı bir dizilim ile miselleri oluşturmaktadır. Misellerin şekli ve oluşum süreci çevresel faktörlere (safra tuzu ve lesitin derişimi, osmolarite ve pH gibi) çok duyarlıdır. Oluşan misel sistemi ile birçok ilacın çözünürlük değerlerinde artış gözlenir.

Hidrofobik ilaçların yüzey etkin maddeler yardımıyla çözündürme (solubilizasyon) işleminde bu ilaçlar misellerin hidrofobik kısmında hapsedilir. Solubilizasyon yüzey etkin maddenin derişimine, yapısına ve sıcaklığına bağlıdır. Ayrıca solubilizasyon işlemi CMC'nin üzerinde ve misellerin sayısı ile orantılıdır[3].

Dressman ve ark[49] yaptıkları bir çalışmada çözünme ortamına 0.05-0.08 mol/L SLS ilavesi ile griseofulvinin çözünürlüğünün klasik çözünme ortamlarına göre 140 kat arttığını gözlemiştir.

2.1.3.1.3. Biyouyumlu Ortamlar

Yüzey etkin maddelerin kullanıldığı in vitro çözünme ortamları mide-bağırsak kanalını taklit etme konusunda yetersizdir. Bu nedenle, in vitro çözünme hızı ortamı geliştirilirken mide-bağırsak kanalının fizyolojik değerlerinin de göz önüne alınması gerekmektedir. İnsan ince bağırsağının bileşiminde çözünürlüğü artırmaya yarayan safra tuzları, lesitinler ve diğer lipidler bulunmaktadır. Bu nedenle in vivo ortamı daha iyi taklit etmesi açısından çözünme ortamlarına biyolojik kaynaklı bu maddelerin ilave edilmesi düşünülmüştür. Biyolojik ortamları daha iyi taklit eden bu ortamlara "**biyouyumlu ortamlar**" denir. Biyouyumlu ortamlar ilaçların in vivo ortamdaki davranışının kestiriminde önemli bir model olarak ortaya çıkmıştır[51,52]. Biyolojik ortamları taklit ederken pH ve biyouyumlu ortam bileşenleri yanında osmolalite, viskozite, yüzey gerilimi ve tampon kapasitesi gibi parametreler de önemli rol oynar.

Biyouyumlu ortamlar safra tuzu ve fosfolipitleri içeren ortamlardır[34]. Safra tuzları safra kanalından salındıktan sonra lesitinler ve yağ asitleriyle birlikte mide bağırsak kanalında misel oluşumuna neden olur. Bu sayede bazı ilaçların çözünürlüğünde belirgin artışlar gözlenir. Biyouyumlu

ortamlar, özellikle az çözünen ilaçlar için kritik önem taşımaktadır. Çözünürlüğün safra tuzları ile artırılmasında açlık ve tokluk durumlarında ilaçların BY'lerinin karşılaştırılması da önemlidir, zira bazı ilaçların BY'leri yiyeceklerle birlikte alındığında değişmektedir[53,54]. Örneğin, çözünürlüğü düşük bir etkin madde olan danazolün BY'si tokluk durumunda, açlık durumuna göre dört kat artmaktadır[55].

Yiyeceklerin ilaç biyoyararlanımını değiştirmesinde özellikle yağlı yiyeceklerin etkisi önemlidir. Yağlı yiyecekler; mide boşalmasını geciktirmek, safra akışını uyarmak, mide - bağırsak pH'sını değiştirmek, splanknik kan akışını artırmak, etkin maddenin lüminal metabolizmasını değiştirmek ve etkin madde veya dozaj formu ile fiziksel veya kimyasal olarak etkileşerek ilaçların BY'sini etkileyebilmektedir[56].

Safra tuzları ve fosfolipitlerin değişik kombinasyonlarını içeren çok sayıda çalışma yapılmıştır[11,57-59]. İn vivoya en iyi uyum sağlayan ortamlar Dressman tarafından geliştirilen FaSSIF ve FeSSIF'tir[34]. Mide ve ince bağırsağı taklit eden in vitro çözünme ortamlarının karşılaştırılması Tablo 4 ve Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 4. Mideyi taklit eden çözünme ortamlarının karşılaştırılması

Fizikokimyasal Özellikler	SGF_{SLS}	SGF_{Triton}	FaSSGF[60]	FeSSGF	İn Vivo Veriler (Açlık)[15,19,60]	İn Vivo Veriler (Tokluk)[61]
SLS (a/h)	0.25 %	-	-	-	-	-
Triton X100 (a/h)	-	0.1 %	-	-	-	-
Pepsin (mg/mL)	-	-	0.1	-	~ 0.8	-
NaTC (mM)	-	-	80	-	~ 80	-
Lesitin (mM)	-	-	20	-	-	-
NaCl (mM)	34.2	34.2	34.2	237.02	68 ± 29	-
Glasiyel asetik asit (mM)	-	-	-	17.12	-	-
Sodyum asetat (mM)	-	-	-	29.75	-	-
Süt/Tampon	-	-	-	1:1	-	-
HCl / NaOH	y.m.	y.m.	y.m.	y.m.	y.m.	-
Yüzey gerilimi (mN/m)	33.7	32.0	42.6	-	41.0 ± 6.0	25.8
Osmolarite (mosm/kg)	180.5 ± 3.6	157.7 ± 2.9	120.7 ± 2.5	~ 400	191 ± 36	500 ± 15
pH	1.2	1.2	1.6	5.0	1.4 – 2.1	4.9 – 5.9

SGF_{SLS}: Sodyum lauril sülfat içeren yapay mide ortamı, SGF_{Triton}: Triton X 100 içeren yapay mide ortamı,
FaSSGF: Açlık durumu yapay mide ortamı, FeSSGF: Tokluk durumu yapay mide ortamı, NaTC: Sodyum taurokolat

Tablo 5. İnce bağırsağı taklit eden çözünme ortamları

Fizikokimyasal Özellikler	**SIF**	**FaSSIF**[34]	**FaSSIF**[62,63]	**FaSSIF-V2**[44,63]	**FeSSIF**[34]	**FeSSIF-V2**[44]
KH_2PO_4 (g)	6.8	3.9	-	-	-	-
NaH_2PO_4 (g)	-	-	3.438	-		-
Pankreatin (g)	10.0	-	-	-	-	-
NaOH	0.62 g	-	-	34.8 mM	-	81.65 mM
NaTC (mM)	-	3	3	3	15	10
Lesitin (mM)	-	0.75	0.75	0.2	3.75	2
KCl (g)	-	7.7	-	-	15.2	-
Asetik asit (g)	-	-	-	-	8.65	-
Maleik asit (mM)	-	-	-	19.12	-	55.2
NaCl	-	-	6.186 g	68.62 mM	-	125.5 mM
Gliseril monooleat (mM)	-	-	-	-	-	5
Sodyum oleat	-	-	-	-	-	0.8
Deiyonize su (y.m.)	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L
Osmolarite (mosm/kg)	-	270 ± 10	270 ± 10	180 ± 10	635 ± 10	390 ± 10
pH	6.8	6.5	6.5	6.5	5.0	5.8

SIF: Yapay bağırsak ortamı, FaSSIF: Açlık durumu yapay bağırsak ortamı,
FeSSIF: Tokluk durumu yapay bağırsak ortamı, NaTC: Sodyum taurokolat
FaSSIF-V2: Modifiye FaSSIF
FeSSIF-V2: Modifiye FeSSIF

Galia ve ark[34] çözünürlük problemi olan (danazol, mefenamik asit, ketokonazol) ve olmayan (asetaminofen ve metaprolol) ilaçların katı oral dozaj formlarından çözünme hızlarını palet yöntemi ile 500 mL hacimde çeşitli çözünme ortamları kullanarak incelemiştir. Çözünme ortamı olarak distile su (pH 5.9-7.0), SIF (pH 7.5), SGF (pH 1.2), sığır sütü (% 3.5, pH 6.5), FaSSIF (pH 6.5, 3 mM safra tuzu, 0.75 mM lesitin) ve FeSSIF (pH 5.0, 15 mM safra tuzu, 3.75 mM lesitin) kullanılmıştır. Çözünürlük ve permeabilitesi yüksek olan parasetamol tabletlerin süt haricindeki bütün ortamlarda hızla çözündüğü görülmüştür. Danazol kapsüllerinin safra tuzu/lesitin içeren ortamda çözünürlüğü 30-100 kat artış göstermesine rağmen yeterli çözünürlüğe ulaşılamadığı görülmüştür. En fazla çözünme süt ortamında (2 saat sonunda yaklaşık % 25) gözlenirken FeSSIF ile % 10-15, FaSSIF ile % 0-5 arasında çözünme gözlenmiştir. Distile su ortamında herhangi bir çözünme gözlenmemiştir. Ketokonazol zayıf bazik özellikte olduğundan, düşük pH'larda daha fazla çözünürlük göstermektedir. Bu nedenle SGF'de 30 dak içinde çözünmüştür. FeSSIF ortamında çözünme daha düşüktür (2 saatte % 70). FaSSIF ortamında ise 2 saatte % 6'lık bir çözünme gerçekleşmiştir. Mefenamik asit kapsülleri yüksek pH'ya bağlı olarak en fazla çözünmeyi SIF'de (1 saatte % 30-40) göstermiştir. 1 saat sonunda sütte % 10-20 çözünme gözlenirken, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında sırasıyla % 5-6 ve % 3-4 civarında çözünme gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyondaki safra tuzunun mefenamik asitin çözünürlüğüne etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu çalışma ile çözünürlük problemi olan ilaçların çözünme hızlarında seçilen ortamın tipi ve kompozisyonunun önemli olduğu saptanmıştır[34].

Nicolaides ve ark[59] lipofilik ve az çözünen ilaçlar (troglitazon, atovakuan ve sanfetrinem) kullanarak su, süt, SIF, FaSSIF, FeSSIF ortamlarındaki çözünme hızlarını karşılaştırmıştır. Zayıf bazik özellikte olan troglitazon için en yüksek çözünme FeSSIF ortamında(1 saatte yaklaşık

% 70) gözlenmiştir. Sütte % 70'e yakın bir çözünme gözlenmiş, ancak bu değere deneyin 2. saatine doğru ulaşılmıştır. FaSSIF ortamında ise %10-20'lik bir çözünme elde edilmiştir. Nötral özellikteki atovakuan için tabletlerden en fazla çözünme sütte (yaklaşık % 12) gözlenmiştir. Diğer ortamlarda %3'ten daha az bir çözünme elde edilmiştir. Sanfetrinem de nötral bir bileşik olup, en fazla çözünme sütte (2. saatte % 70) daha sonra FeSSIF'te (1 saatte % 50-60) gözlenmiştir. FaSSIF'te ise % 20-30'luk bir çözünme elde edilmiştir. Sonuç olarak, güç çözünen ilaçların in vivo performanslarının tahmininde biyouyumlu ortamlarla yapılmış olumlu sonuçlar alınmakla birlikte, daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır[59].

Kostewicz ve ark[57] zayıf bazik özellikte ve düşük çözünürlük gösteren dipiridamol tabletlerin FeSSIF ortamında tamamının 20 dak'da; FaSSIF ortamında 2 saat sonunda %80'inin salındığı belirtmiş ve zayıf bazik ilaçlar için de biyouyumlu ortamların kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Löbenberg ve ark[64] glibenklamidin iki farklı tablet formülasyonunun açlık ve tokluk durumlarını taklit eden in vitro ortamlardaki çözünme hızlarını incelemiştir. Glibenklamid, zayıf asidik özellikte, çözünürlüğü düşük ve büyük oranda pH'ya bağımlı olan antihiperglisemik ajandır. Çalışmada SGF, SIF, pH 6.0 fosfat tamponu, FaSSIF ve FeSSIF kullanılmış ve GastroPlus® programı yardımıyla in vitro - in vivo korelasyon (IVIVC) kurulmuştur. FaSSIF kullanılması ile iyi bir korelasyon elde edilirken, SIF kullanıldığında korelasyon görülmemiştir. Sonuç olarak biyouyumlu ortamlarda, klasik çözünme ortamlarına göre in vivoya daha yakın sonuçlar elde edilmiştir.

İn vitro çözünme hızı deneylerinde biyouyumlu ortamların kullanılmasının gerekli olup olmadığı, ilaçların fizikokimyasal özelliklerine, çözünürlüğüne ve permeabilitesine bağlıdır. Fagerber ve ark[65] dört bazik

(astemizol, karvedilol, sinnarizin ve tamoksifen), üç asidik (glibenklamid, indometazin ve tolfenamik asit) ve üç nötral (albendazol, danazol ve felodipin) özellikteki ilacın biyouyumlu ortamlardaki davranışlarını incelemişlerdir. Karvedilol ve astemizol dışındaki tüm maddeler kör ortamları ile kıyaslandığında, FaSSIF ve FeSSIF ortamında daha yüksek çözünürlük ve daha hızlı çözünme göstermiştir. Nötral bileşikler FeSSIF ortamında, FaSSIF'e göre daha yüksek çözünürlük göstermiştir. Ayrıca pH'ya bağlı çözünme gösteren asidik bileşiklerin de FeSSIF kullanımı ile çözünürlükleri FaSSIF'e göre daha fazla artmıştır. Çalışma sonucunda yapısal özelliklerin çözünürlüğü etkilediği ve biyouyumlu ortamlarda nötral ve pozitif yüklü bileşiklerin diğer ortamlara göre daha yüksek çözünürlük gösterdiği saptanmıştır[65].

Kleberg ve ark[66] safra tuzları ve lesitinin yanısıra oleik asit ve monolein bileşenlerini farklı oranlarda içeren biyouyumlu ortamlar geliştirmişlerdir. Hazırlanan ortamlarda oleik asit : monolein oranı 2:1 veya 6:1 olarak kullanılmıştır. Bu ortamları kullanarak danazol, fenofibrat ve sinnarizin gibi güç çözünen ilaçların çözünürlük kapasiteleri değerlendirildiğinde, fenofibrat ve sinnarizinin kullanılan biyouyumlu ortamlarda oluşan misellerde çözündüğü; danazolün çözünürlüğünün ise bu kompozisyondan etkilenmediği belirtilmiştir[66].

Geliştirilen biyouyumlu ortamların özel hazırlanış yöntemleri bulunmaktadır. Bu in vitro çözünme ortamlarının hazırlanışında bazı dezavantajlar bulunmaktadır. Bu ortamların hazırlanışı:

- Uzun sürer.
- Birçok madde ilavesi gerektirir.
- Toksik bir organik çözücü kullanımını gerektirir.
- Çökme gibi problemler görülebilir.
- Büyük hacimlerde hazırlanması zordur.
- Farklı üretim yerlerinde tekrarlanabilirliği zordur.

Tüm bu dezavantajlar biyouyumlu ortamların hazırlanışında yeni arayışları gündeme getirmiştir.

2.1.3.1.4. SIF Powder®

Biyouyumlu ortamlar hazırlanırken yukarıda bahsedilen zorluklar nedeniyle, Phares firması tarafından FaSSIF ve FeSSIF'in hazırlanmasında kullanılan sodyum taurokolat ve lesitin içeren SIF Powder® liyofilize toz karışımı geliştirilmiştir(Şekil 7).



Şekil 7. SIF Powder®

SIF Powder® karışımının avantajları aşağıdadır:

1. Kolay kullanım:

- FaSSIF ve FeSSIF aynı liyofilize toz karışımı kullanılarak hazırlanabilmektedir.
- Bu ortamlar küçük ve büyük miktarlarda, çok kısa sürede, kolaylıkla hazırlanabilmektedir.
- Kullanmadan hemen önce hazırlanacağından, sterilizasyon ve saklama problemleri bulunmamaktadır.

2. Yüksek kalite:

- SIF Powder® yüksek kalitedeki yardımcı maddelerden elde edilmiştir. Kullanılan yardımcı maddelerin saflık açısından oldukça dar spesifikasyon limitleri bulunmaktadır.
- Her seri standart bir üretim prosedürüne göre valide edilmiş ekipmanlar kullanılarak üretilmektedir.
- Ürün kalite kontrol testlerinden geçmekte ve spesifikasyonları analiz sertifikaları ile belirtilmektedir.

3. Standardizasyon:

- Toz karışım standart prosedürlere göre hazırlandığından, farklı üretim yerlerinden veya kişisel farklılıktan kaynaklanan varyasyonlar gözlenmemektedir. Her defasında aynı standartlarda biyouyumlu ortamlar elde edilmektedir.
- FaSSIF ve FeSSIF hazırlamak için SIF Powder® standart bir misel boyutu sağlamaktadır.

Günümüzde SIF Powder®, kullanım amaçlarından dolayı in vitro çözünme hızı deneylerinde FaSSIF ve FeSSIF ortamlarının hazırlanışında tercih edilmektedir[67,68].

2.1.3.1.5. İn Vitro Çözünme Hızı Testlerinde Kullanılan Aletler

Oral, katı dozaj şekillerinin in vitro çözünme hızı testlerinde en çok USP Cihaz 1 (sepet) ve Cihaz 2 (palet) kullanılmaktadır. USP Cihaz 4 (sürekli akış hücresi) de düşük çözünürlüğü olan ilaçlar için uygundur[4].

2.1.3.1.6. İn Vitro Çözünme Hızı Kinetikleri

2.1.3.1.6.1. Model Bağımsız Yöntemler

Moore ve Flanner[69] in vitro çözünme hızı profillerinin karşılaştırılmasında iki eşitlik tanımlamıştır. Bunlar fark faktörü (f_1) ve benzerlik faktörü(f_2)'dür(Eşitlik 8 ve Eşitlik 9). Her iki eşitlik de FDA tarafından çözünme profillerinin karşılaştırılmasında önerilmekle birlikte, uygulamalarda f_2 eşitliği daha çok tercih edilmektedir.

$$f_1 = \left\{\left[\sum_{t=1}^{n} |R_t - T_t|\right] / \left[\sum_{t=1}^{n} .R_t\right]\right\} .100 \qquad \text{Eşitlik 8}$$

$$f_2 = 50 .\log\left\{\left[1 + \left({}^{1}/_{n}\right)\sum_{t=1}^{n} (R_t - T_t)^2\right]^{-0,5} .100\right\} \qquad \text{Eşitlik 9}$$

Eşitliklerde;

n : Zaman noktalarının sayısı

$R_{(t)}$: Referansın çözünen yüzdesi

$T_{(t)}$: Testin çözünen yüzdesi

İn vitro çözünme hızı profillerinin benzer kabul edilebilmesi için f_1 değeri sıfıra yakın olmalı ve f_2 değeri 100'e yakın olmalıdır. Genel olarak f_1 değerinin 0-15 arasında ve f_2 değerinin ise 50-100 arasında olması iki profilin benzerliği veya eşdeğerliği anlamına gelmektedir[70].

2.1.3.1.6.2. Model Bağımlı Yöntemler

Model bağımlı yöntemlerin uygulanabilmesi için en az 4 zaman noktası gerekmektedir. Uygulamada, çözünme verisini tanımlayabilen uygun bir modele gereksinim duyulmaktadır. Önce matematiksel fonksiyon seçilir, daha sonra model parametreleri ile çözünme profilleri elde edilir[71].

Model bağımlı yöntemlerde, test ve referans serilerin model parametrelerindeki MSD'nin (çok değişkenli istatistiksel aralık, multivariate statistical distance) hesaplanması ve iki seri arasındaki gerçek farkın %90 güven aralığının belirlenmesi gerekmektedir.

2.1.3.1.6.3. DDSolver Programının İn Vitro Çözünme Hızı Kinetiklerinin Değerlendirilmesinde Kullanımı

İlaçların çözünme hızı verilerinin uygunluğunun değerlendirilmesinde çeşitli matematiksel modeller kullanılmaktadır; ancak ilacın çözünme özelliğine göre spesifik non-lineer eşitliğin tespit edilmesini sağlayacak uygun bir bilgisayar programı kullanılmadığında, bu modellerin değerlendirilmesinde uyumsuzluklar gözlenmektedir. Çözünme hızı verilerinin uygunluğu profesyonel istatistiksel programlar (Micro-Math Scientist, GraphPad Prism, SigmaPlot, SYSTAT gibi) yardımıyla değerlendirilebilmektedir. Ancak bu programlar, kullanıcının ilgili eşitliği elle girmesini ve her parametre için ilk değerin girilmesini gerektirmektedir. Bu nedenle çözünme özelliğinin uygunluğunun değerlendirmesinde kolay

uygulanabilen ve çok sayıda in vitro çözünme hızı modelini içeren kapsamlı bir programa ihtiyaç duyulmaktadır. DDSolver, bu amaçla geliştirilmiş Microsoft Excel üzerinden yazılmış kullanıcı uyumlu bir programdır[72].

DDSolver'ın avantajları şu şekilde özetlenebilir:

- Non-lineer optimizasyon yöntemi kullanılarak çözünme hızı verilerinin değerlendirmesinde 40 adet farklı model içermektedir.
- Çeşitli yaklaşımlar kullanarak çözünme hızı profilleri arasındaki benzerliğin değerlendirilmesini sağlamaktadır.
- Kullanımı kolay, çabuk sonuç veren ve hata oranı düşük bir programdır.

DDSolver programına göre en sık kullanılan modeller Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Çözünme hızı kinetik modellemede en sık kullanılan modeller

Model	**Eşitlik**	**Parametreler**
[a]Sıfırıncı derece kinetik	$F = k_0 . t$	k_0
[b]Birinci derece kinetik	$F = 100 . (1 - e^{-k_1 . t}) . t$	k_0, F_0
[c]Higuchi	$F = k_H . t^{0,5}$	k_H
[d]Korsmeyer-Peppas	$F = k_{KP} . t^n$	k_{KP}, n
[e]Hixson-Crowell	$F = 100 . [1 - (1 - k_{HC} . t)^3]$	k_{HC}
[f]Hopfenberg	$F = 100 . [1 - (1 - k_{HB} . t)^n]$	k_{HB}, n
[g]Baker-Lonsdale	$\frac{3}{2}\left[1 - \left(1 - \frac{F}{100}\right)^{\frac{2}{3}}\right] - \frac{F}{100} = k_{BL} . t$	k_{BL}
[h]Makoid-Banakar	$F = k_{MB} . t^n . e^{-k . t}$	k_{MB}, n, k
[i]Peppas-Sahlin_1	$F = k_1 . t^m + k_2 . t^{2m}$	k_1, k_2, m
[j]Peppas-Sahlin_2	$F = k_1 . t^{0,5} + k_2 . t$	k_1, k_2
[k]Quadratic	$F = 100 . (k_1 . t^2 + k_2 . t)$	k_1, k_2
[l,m]Weibull_1	$F = 100 . \left[1 - e^{-\frac{(t - Ti)^\beta}{\alpha}}\right]$	α, β, T_i
[l]Weibull_2	$F = 100 . \left[1 - e^{-\frac{t^\beta}{\alpha}}\right]$	α, β
[l,n]Weibull_3	$F = F_{max} . \left(1 - e^{-\frac{t^\beta}{\alpha}}\right)$	α, β, F_{max}
[l,m,n]Weibull_4	$F = F_{max} . \left[1 - e^{-\frac{(t - Ti)^\beta}{\alpha}}\right]$	α, β, T_i, F_{max}
[o]Logistic_1	$F = 100 . \frac{e^{\alpha + \beta . \log(t)}}{1 + e^{\alpha + \beta . \log(t)}}$	α, β
[n,o]Logistic_2	$F = F_{max} . \frac{e^{\alpha + \beta . \log(t)}}{1 + e^{\alpha + \beta . \log(t)}}$	α, β, F_{max}

[n,p]Logistic_3	$F = F_{max} \cdot \frac{1}{1 + e^{-k.(t-\gamma)}}$	k, γ, F_{max}
[r]Gompertz_1	$F = 100.e^{-\alpha.e^{-\beta.\log(t)}}$	α, β
[n,q]Gompertz_2	$F = F_{max}.e^{-\alpha.e^{-\beta.\log(t)}}$	α, β, F_{max}
[n,r]Gompertz_3	$F = F_{max}.e^{-e^{-k.(t-\gamma)}}$	k, γ, F_{max}
[n,s] Gompertz_4	$F = F_{max}.e^{-\beta.e^{-k.t}}$	k, β, F_{max}
[t]Probit_1	$F = 100.\emptyset[\alpha + \beta.\log(t)]$	α, β
[n,t]Probit_2	$F = F_{max}.\emptyset[\alpha + \beta.\log(t)]$	α, β, F_{max}

Tüm modellerde F, t zamanında salınan ilaç kesri (%)

[a] k_0, sıfırıncı derece hız sabiti

[b] k_1, birinci derece hız sabiti

[c] k_H, Higuchi hız sabiti

[d] k_{KP}, dozaj formunun yapısal ve geometrik özelliklerini kapsayan hız sabiti. n, ilaç salım mekanizmasını gösteren difüzyonel üs

[e] k_{HC}, Hixson-Crowell hız sabiti

[f] k_{HB}, Hopfenberg modelinin kombine hız sabiti. $k_{HB} = k_0 / (C_0 * a_0)$, burada k_0 erozyon hız sabiti, C_0 ilacın matristeki başlangıç konsantrasyonu, a_0 küre veya silindirin başlangıç yarıçapı veya düz yüzey kalınlığının yarısı, n ise düz yüzey, silindir ve küre için sırasıyla 1, 2 ve 3.

[g] k_{BL},Baker-Lonsdale modelinin kombine hız sabiti $k_{BL} = \left[3 * D * C_s / \left(r_0^2 * C_0\right)\right]$ burada D difüzyon katsayısı, C_s doygunluk çözünürlüğü, , r_0 küre veya silindirin başlangıç yarıçapı veya düz yüzey kalınlığının yarısı, C_0 ilacın matristeki başlangıç konsantrasyonu

[h] k_{MB}, n ve k Makoid-Banakar modelinin ampirik parametreleridir (k_{MB}, n, k > 0)

[i] k_1, Fick kinetikleri ile ilişkili sabit, k_2 Case II kinetiği ile ilişkili sabit, m kontrollü ilaç salım mekanizmasını gösteren difüzyonel üs

[j] k_1, $t^{0,5}$ ile ilişkili difüzif ilaç hız sabiti, k_2 t ile ilişkili polimere bağımlı ilaç salımını gösteren sabit

[k] k_1, t^2 ile ilişkili Quadratic ilaç hız sabiti, k_2 t'ye bağımlı Quadratic ilaç salımını gösteren sabit

[l] α, prosesin zaman skalasını tanımlayan parametre, β şekil parametresi β=1 ise eğri, β>1 ise sigmoid, β<1 ise parabolik

[m] T_i, Çözünme veya salım işleminin başlangıcındaki gecikme zamanını gösteren parametre. Genelde sıfırdır.

[n] F_{max}, sonsuzda salınan maksimum ilaç kesri

[o] α, Logistic 1 ve 2 modellerinde çözünme ve zamanla ilgili parametre, β ise şekil faktörü

[p] k, Logistic 3 modelinde şekil faktörü; γ ise $F = F_{max}/2$' deki zaman

[q] α, Gompertz 1 ve 2 modellerinde zaman faktörü, β ise şekil faktörü

[r] k,Gompertz 3 modelinde şekil faktörü, γ ise $F = F_{max}/\exp(1) \approx F = F_{max} * 0.368$

[s] β, Gompertz 4 modelinde zaman faktörü, k ise şekil faktörü

[t] φ, standart normal dağılım, α Probit modelinde zaman faktörü, β ise şekil faktörü

DDSolver model uygunluğunun saptanmasında birçok istatistiksel yaklaşımı kullanır. Bunlar; korelasyon katsayısı ($R_{_obs\text{-}pre}$), determinasyon katsayısı (R_{sqr}, R^2 veya COD), düzeltilmiş determinasyon katsayısı (R_{sqr_adj}, $R^2_{adjusted}$), ortalama kare hatası (MSE), kalıntıların standart sapması (MSE_root veya Sy.x), sapma kareleri toplamı (SS, SKT), ağırlıklı sapma kareleri toplamı (WSS, ASKT), Model Seçme Kriteri (MSC) ve Akaike Bilgi Ölçütü (AIC, AKAIKE)'dir. Tüm bu kriterler arasında en çok kullanılanları $R^2_{adjusted}$, MSC ve AIC'dir (Eşitlik 10).

$$R^2_{adjusted} = 1 - \frac{n-1}{n-p} . (1 - R^2) \qquad \text{Eşitlik 10}$$

n: Veri noktalarının sayısı

p: Modeldeki parametre sayısı

WSS: Sapma kareleri toplamı

$R^2_{adjusted}$ değerinin yüksek olduğu modelin seçimi daha uygundur.

MSC de diğer bir istatistiksel model seçme kriteridir.

Eşitlik 11

$$MSC = \ln\left(\frac{\sum_{i=1}^{n} W_i . (y_{i_obs} - \hat{y}_{_obs})^2}{\sum_{i=1}^{n} W_i . (y_{i_obs} - \hat{y}_{_pre})^2}\right) - \frac{2p}{n}$$

w_i: Ağırlık faktörüdür ve çözünme hızı verileri uygunluğu için genellikle 1'dir.

y_{i_obs}: i.'de gözlenen y değeri

y_{i_pre}: i.'de tahmin edilen y değeri

$\hat{y}_{_obs}$: Gözlenen tüm y değerlerinin ortalaması

$\hat{y}_{_pre}$: Tahmin edilen tüm y değerlerinin ortalaması

p: Modeldeki parametre sayısı

n: Veri noktalarının sayısı

Farklı modeller karşılaştırılırken MSC değeri en yüksek olan model en uygun modeldir.

AIC en iyi modeli seçmek için kullanılan ölçütlerden biridir.

$$AIC = n.\ln(WSS) + 2.p$$ Eşitlik 12

n: Veri noktalarının sayısı
p: Modeldeki parametre sayısı
WSS: Sapma kareleri toplamı

Karşılaştırılan iki modelin parametre sayısı farklı ise, AIC değeri daha düşük olan modelin daha iyi olduğu söylenebilir.

DDSolver programı ile in vitro çözünme hızı profillerinin kıyaslanması da mümkündür. Bunun için programa kayıtlı f_1, f_2 faktörleri, tek değişkenli ANOVA, oran-test prosedürleri, rescigno indeksi, %90 GA farklılığı yöntemi, çok değişkenli istatistiksel güven aralığı yöntemi, model bağımlı yaklaşımlar, Bootstrap f_2 yöntemi, Chow ve Ki yöntemi gibi alternatif yöntemler de bulunmaktadır[72].

2.2. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS)

Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS) ilaçların çözünme özellikleri ile etkin maddenin çözünürlük ve permeabilite özelliklerine dayanan bilimsel bir yaklaşımdır[73]. Hızlı salımlı oral katı dozaj şekillerini kapsar. Salım özelliği değiştirilmiş ilaçlar için uygun bir sınıflandırma sistemi değildir. Sistemin amacı çözünürlük ve permeabilite ölçümlerinden hareketle ilacın in vivo performansını tahmin etmek, in vitro çalışmaları artırıp, in vivo çalışmaları en aza indirmek, in vitro-in vivo korelasyonu sağlamak ve BY/BE çalışmalarından vazgeçme kriterlerini belirlemektir.

BCS'e göre ilaçlar çözünürlük ve permeabilite özelliklerine göre dört grup altında toplanmaktadır(Tablo 7).

Tablo 7. İlaçların BCS'e göre sınıflandırılması[73]

	Yüksek Çözünürlük	**Düşük Çözünürlük**
Yüksek Permeabilite	**SINIF 1** ***(Hızlı çözünme)***	**SINIF 2**
Düşük Permeabilite	**SINIF 3**	**SINIF 4**

Sınıf 1 ilaçlar – Yüksek çözünürlük, hızlı çözünme ve yüksek permeabiliteye sahip ilaçlardır. Bu sınıftaki ilaçların emiliminde hız sınırlayıcı basamak çözünmedir veya ilaç çok hızlı çözünme gösteriyorsa hız sınırlayıcı basamak mide boşalmasıdır. Bu durumda çözünme profilleri iyi tanımlanmalı ve tekrarlanabilir olmalıdır[56]. Bu gruptaki ilaçlar bir takım gereklilikleri sağladığı takdirde in vivo BE çalışmalarından muaf tutulabilmektedir (biyomuafiyet)[56]. Bunun için:

- İlaç gastrointestinal kanalda dayanıklı olmalı,
- Formülasyonda kullanılan diğer yardımcı maddeler ilacın emilim hızı ve miktarını etkilememeli,
- İlacın terapötik indeksi dar olmamalı,
- İlacın emilimi ağızda gerçekleşmemelidir.

Tüm bu koşulların sağlanması durumunda ilaç, katı dozaj formu gibi değil, daha çok oral çözelti gibi davranır. İki ilacın BE'sini saptanması için in vivo çalışmaya gerek duyulmadan çözünme hızı profilleri karşılaştırılır. Elde edilen çözünme hızı profilleri, kandaki konsantrasyon-zaman profillerinin yerini tutar ve test ve referans ilacın BE durumu in vitro testlerle belirlenebilir.

Sınıf 2 ilaçlar – Düşük çözünürlük ve yüksek permeabiliteye sahip ilaçlardır. Bu sınıftaki ilaçların emiliminde hız sınırlayıcı basamak ilacın çözünmesidir. Çözünme profilleri, farklı pH'larda ve en az 4-6 nokta ile tanımlanmalıdır. İyi tasarlanmış in vitro koşullar sağlanarak in vitro – in vivo korelasyon kurulabilir.

Sınıf 3 ilaçlar – Sınıf 3 ilaçlar, yüksek çözünürlük gösterir ve emilimleri genellikle formülasyondan bağımsızdır. Eğer Sınıf 3 ilaçlar için çözünme tüm fizyolojik pH'larda çok hızlıysa (15 dak içinde %85 veya daha fazla çözünme) in vivo ortamda adeta oral çözelti gibi davranırlar. Oral çözeltiler ise genellikle in vivo BE çalışmalarından muaftırlar. Ancak GI transiti (şeker alkolleri gibi) veya ilaç emilimini (yüzey etkin maddeler gibi) etkileyen bir takım yardımcı maddeler bulunmaktadır. Sınıf 3 ilaçlar, formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler ile etkileşme özelliklerine göre iki gruba ayrılabilirler[74]:

Sınıf 3a – Yüksek çözünürlük / Düşük permeabilite / Hızlı çözünme / Yardımcı maddelerden etkilenmeme

Sınıf 3b – Yüksek çözünürlük / Düşük permeabilite / Yardımcı maddelerden etkilenme

Buna göre Sınıf 3a ilaçların çok hızlı çözünmesi halinde in vivo BE çalışmalarından muaf tutulabilmektedir[75].

Birçok yardımcı maddenin permeabilite üzerinde etkili olmadığı belirlenmiş olmasına rağmen az sayıda da olsa permeabiliteyi etkileyebilecek yardımcı madde bulunmaktadır. Örneğin SLS ilaçların permeabilitesini etkilemezken; Tween 80, furosemit, simetidin ve hidroklorotiyazit gibi etkin maddelerin permeabilitesini apikalden bazolaterale doğru artırmaktadır. Bu durumda, BE çalışmalarında referans ürün ile aynı veya permeabilite üzerine etkisi bulunmadığı bilinen yardımcı maddelerin kullanılması ile Sınıf 3 ilaçlar için biyomuafiyetten söz edilebilir[76].

Sınıf 4 ilaçlar – Düşük çözünürlük ve düşük permeabiliteye sahip ilaçlardır. Bu grupta yer alan ilaçların oral emiliminde belirgin problemler bulunmaktadır.

BCS, 2000 yılında Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve 2002 yılında Avrupa İlaç Değerlendirme Ajansı (EMA) tarafından kabul edilerek yönetmelik halinde yayınlanmıştır[56,77].

2.2.1. BCS'de Temel Alınan Parametreler

2.2.1.1. Etkin Maddenin Çözünürlüğü

BCS kapsamında sağlık otoritelerince kabul gören çözünürlük kriterine göre ilacın piyasadaki en yüksek dozu, 37˚C'de, pH 1.0-6.8 aralığında, 250 mL veya daha az miktardaki ortamda çözünebiliyorsa ilaç yüksek çözünürlük gösterir. Çalışmalarda genellikle pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8 in vitro çözünme ortamları tercih edilmektedir[75].

İlacın çözünürlük ve çözünme özellikleri incelenirken sıklıkla yararlanılan parametre doz numarasıdır(Eşitlik 13). Doz numarası (D_o) değerinin 1'den küçük olduğu ilaçlar yüksek çözünürlük göstermektedir.

$$D_0 = \frac{\left(Doz/V_0\right)}{C_s}$$ Eşitlik 13

D_o: Doz numarası

Doz: En yüksek doz (mg)

C_s: Çözünürlük (mg/mL)

V_o: 250 mL (ABD, İngiltere ve İspanya kılavuzlarına göre)

V_o: 150 mL (Japonya kılavuzlarına göre)

2.2.1.2. Etkin Maddenin Permeabilitesi

Bir etkin maddenin permeabilitesi dolaylı olarak emilme oranına bağlıdır. BCS'e göre ilacın mide-bağırsak kanalında dayanıklı olması koşulu ile ölçülen emilim oranının FDA'ya göre %90'a eşit veya daha büyük olması gerekirken, EMA'da bu değer % 85'e eşit veya daha büyük olarak belirtilmektedir[56,75].

Emilimin ölçümü;

- İnsanlarda yapılan farmakokinetik çalışmalar (Mutlak BY ve kütle denge çalışmaları)
- Hayvan deneyleri (in vivo veya in situ intestinal perfüzyon)
- İn vitro hücre kültürü modelleri (epitelyal hücre kültüründe yapılan in vitro geçiş deneyleri gibi) ile de hesaplanabilmektedir[73].

Permeabilite ve ilacın emilen kesri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar sonucu bir ilacın permeabilite değerinin 2'nin üzerinde olması durumunda tam bir emilimin beklenebileceği belirtilmiştir[24].

2.3.1.3. Çözünme Hızı

BCS'e göre; USP'de belirtilen çözünme hızında kullanılan aletlerden; USP Cihaz 1 ile 100 rpm hızda veya USP cihaz 2 ile 50 rpm hızda, 900 mL pH 1.2 (veya enzimsiz mide sıvısı), pH 4.5 ve pH 6.8 (veya bağırsak sıvısı) in vitro çözünme ortamlarının her birinde; ortama herhangi bir yüzey etkin madde ilave edilmeden ilacın en az % 85'i 30 dak içerisinde çözünüyorsa ilaç hızlı çözünme özelliği gösterir[73]. Çözünme hızı deneyinde örnek alma aralıkları için 10, 15, 20, 30 ve 45. dak önerilmektedir[75].

2.2.2. BCS'e Dayanan Biyomuafiyet

Bir etkin maddenin çözünürlüğünün yüksek olduğu biliniyorsa, ilacın vücuda alınması sonrasında karşılaşacağı pH aralığında dozaj sisteminin dağılmasını takiben hızla çözünmesi ve permeabilitesinin de yüksek olması koşuluyla ilacın herhangi bir BY sorunu oluşturmayacağı beklenmektedir. Bu durumda çözünme hızı profillerinin benzerliğine dayanarak in vivo BE çalışması zorunluluğu kaldırılabilir[56].

BCS'e dayanan biyomuafiyet kavramı in vivo BE çalışmalarını azaltmak amacıyla geliştirilmiş bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım terapötik indeksi dar olmayan, yüksek çözünürlük gösteren ve emilimi bilinen ilaçları kapsamaktadır[75]. Oral yoldan alınan, hemen salım gösteren katı dozaj şekillerini içermektedir.

BCS Sınıf 1'e dayalı biyomuafiyette:

- Etkin madde yüksek çözünürlük ve tam emilim gösteriyorsa (BCS Sınıf 1)
- Test ve referans ürün in vitro çözünme hızı testlerinde çok hızlı çözünme(≥%85/15 dak) veya hızlı çözünme(≥%85/30 dak) gösteriyorsa
- Formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler BY kalitatif veya kantitatif olarak etkileyebileceğinden, her iki formülasyonda genellikle aynı veya benzer yardımcı maddeler kullanılıyorsa sağlanabilir.

BCS Sınıf 3'e dayalı biyomuafiyet:

- Etkin madde yüksek çözünürlük ve sınırlı emilim gösteriyorsa (BCS Sınıf 3)
- Test ve referans ürün in vitro çözünme hızı testlerinde çok hızlı çözünme (≥ %85/15 dak) gösteriyorsa
- Formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler BY'yi kalitatif veya kantitatif olarak etkileyebileceğinden, her iki formülasyonda genellikle aynı veya benzer yardımcı maddeler kullanılıyorsa sağlanabilir.

Biyomuafiyet kararının uygunluk riski Sınıf 3 ilaçlarda spesifik bölgeden emilim, taşıyıcı-protein etkileşimi, yardımcı madde kompozisyonu ve terapötik risk gibi nedenlerden dolayı Sınıf 1'den daha kritik olmaktadır[75].

Biyomuafiyet için yapılan in vitro çözünme hızı profillerinin karşılaştırılmasında f_2 değerinin hesaplanması önerilmektedir. f_2 değeri 50-100 arasında ise iki ilacın benzer olduğu yorumu yapılmaktadır. Benzerlik faktörü değerlendirmelerinde varyasyon katsayısının erken zamanlarda %20'den fazla olabileceği, fakat sonraki zamanlarda % 10'u geçmemesi gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca ardı ardına gelen iki zaman noktasının ortalamasının standart sapması % 10'u geçmemelidir. İlacın % 85'ten

fazlasının çözünme hızı testinin ilk 15 dak'sı içerisinde çözünmesi durumunda çözünme profilleri f_2 hesaplaması yapılmaksızın benzer kabul edilmektedir[56].

2.2.3. BCS'e Göre İn Vitro Çözünme Ortamının Seçimi

2.2.3.1. Sınıf 1 Bileşikler

Sınıf 1 bileşiklerin çözünürlüğü yüksek ve mide-bağırsak kanalından geçişleri kolaydır. Bu nedenle bu bileşiklerin oral BY'si %100'e yakındır. Çözünme özellikleri çözünme ortamına bakılmaksızın hızla %100'e yakın bir değere ulaşır. Sınıf 1 bileşiklerin emilim hızları genellikle dozaj formundan bağımsız olduğundan bu ilaçların konvansiyonel dozaj formları için IVIVC nadiren başarılı olur. Çözünme hızı ortamı olarak klasik çözünme ortamlarının kullanılması önerilir ve FDA'ya göre 30 dak içerisinde çözünme ortamında %85 çözünme göstermelidir. Oral uygulama sonrası bu ilaçlar mideden hızla geçer ve genellikle orada dağılır; bu nedenle SGF kullanımı uygun olmaktadır.

Buna alternatif olarak ince bağırsak pH'sını taklit eden SIF çözünme ortamı olarak kullanılabilir. Bu ortam genellikle zayıf asidik özellikteki ilaçlar için uygun olmaktadır[49].

2.2.3.2. Sınıf 2 Bileşikler

Sınıf 2 bileşikler az çözünürler, ancak bağırsak mukozasından kolayca geçebilirler. Çözünürlüğü düşük olan birçok lipofilik ilaç bağırsakta yer alan absorptif hücrelerin lipit tabakalarından rahatlıkla geçebilmektedir.

Oral BY'de sınırlayıcı faktör çözünme hızı olan bileşikler düşük çözünürlük gösteren bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Çözünürlük değeri

100 µg/mL'den düşük olan ilaçların in vivo ortamda da problemli çözünme özellikleri taşıyacağı belirtilmektedir[49].

İlaçların mide bağırsak kanalındaki optimum çözünme şartları doz (mg) /çözünürlük (mg/mL) oranı (D/S) ile tanımlanır. İlacın tüm dozunu çözmek için gerekli sıvı hacmini (mL) tanımlar. Bu değer mide-bağırsak sıvısının hacminden yüksek ise, çözünme ve dolayısıyla emilim olayının tamamen gerçekleşmeyeceği söylenebilir[49]. FDA, SUPAC yönetmeliğinde D/S oranı için iyi çözünürlük değeri olarak 250 mL'yi önermiştir[78].

Sınıf 2 bileşikler için çözünme hızı çalışmalarında kullanılabilecek in vitro çözünme ortamları aşağıda verilmiştir:

1. SGF + Yüzey Etkin Madde: Yüzey etkin madde içeren yapay mide ortamı daha çok asidik koşullarda çözünen zayıf bazik özellikteki ilaçlar (ketokonazol ve dipiridamol gibi) için uygundur. Ortama ilave edilen yüzey etkin maddeler, ilacın ıslanabilirliğini ve çözünürlüğünü sağlamaktadır.

2. Ensure ve Süt: Ensure ve süt ilaç geliştirme çalışmalarında tokluk durumunu taklit etmek amacıyla kullanılmaktadır. İlaçların bu ortamların yağlı kısmında ve kazein misellerinde çözünürlüğünün artış göstermesi muhtemeldir. Bu iki ortam sadece IVIVC için uygundur: Süzme aşamasının ve ilacın bu ortamlardan uzaklaştırılmasındaki zorluklar bu ortamların in vitro çözünme hızı testlerinde kullanımını sınırlar[49].

3. FaSSIF ve FeSSIF: Bu iki biyouyumlu ortam in vivoyu açlık ve tokluk durumunda taklit etmek için en uygun ortamlar olarak belirtilebilir. Biyouyumlu ortamların bileşenleri, osmolalite, yüzey gerilimi değerleri fizyolojik koşullara çok yakın olduğundan, bu ortamlar IVIVC'de

kullanılabilecek en uygun ortamlar olarak kabul edilmektedir. Ancak hazırlama zorlukları ve maliyet yüksekliği kullanımlarını sınırlar[49].

4. Sentetik Yüzey Etkin Maddeler İçeren Ortamlar: Biyouyumlu ortamların pahalı ve hazırlanmalarının daha zor olması nedeniyle SLS veya tritonX100 gibi sentetik yüzey etkin maddeleri içeren çözünme ortamları kullanılabilir. Ancak bu yüzey etkin maddelerin neden olduğu yüzey gerilimi biyouyumlu ortamların oluşturduğundan daha düşük olup, gerçeği tam olarak yansıtmamaktadır. Burada yüzey etkin maddenin cinsi ve derişiminin seçimi de önem taşımaktadır.

2.2.3.3. Sınıf 3 Bileşikler

Çözünürlüklerinin yüksek olmasına rağmen, bağırsak membranından permeabiliteleri düşük olduğundan Sınıf 3 bileşiklerin oral BY'leri çok iyi değildir. Çözünme hızı testlerinde Sınıf 1 bileşiklerde olduğu gibi klasik çözünme ortamlarının kullanılması yeterlidir. Emilimlerinde hız sınırlayıcı basamak membran permeabilitesi olduğundan ve çözünme hızları mide boşalma hızından yüksek olduğu için Sınıf 3 bileşikler IVIVC'ye uygun ilaçlar değildir.

2.2.3.4. Sınıf 4 Bileşikler

Sınıf 4 bileşiklerin hem çözünürlük, hem de permeabilite problemleri bulunmaktadır. Bu nedenle Sınıf 3 bileşikler gibi oral BY problemleri bulunmaktadır. İn vitro çözünme hızı testleri için SGF, SIF ve bunların yüzey etkin maddeler ilavesi ile kullanımı uygundur[49].

2.3. Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sınıflandırma Sistemi (Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System, BDDCS)

BCS, ruhsatlandırma aşamasında ilaçların in vivo çalışmalardan muafiyetinin sağlandığı önemli bir adımdır. Ancak kabul kriterlerinin halen tartışılmakta olması, bazı ilaçların aynı anda birden fazla sınıfta yer alması ve daha önemlisi sınıflandırmada metabolizma, taşıyıcıların etkisi ve yiyecek etkisi gibi önemli noktaların göz ardı edilmesi yeni sınıflandırma sistemlerinin oluşturulmasını kaçınılmaz kılmaktadır.

Wu ve Benet[79], BCS sınıfı önceki çalışmalarla belirlenmiş olan ilaçları bir araya toplamış ve Sınıf 1 ve 2'deki bileşiklerin vücutta metabolize olduklarını; Sınıf 3 ve 4'deki bileşiklerin ise vücuttan değişmeden safra ve idrar yoluyla atıldıklarını belirtmişlerdir. Buradan hareketle BCS'nin eksik yönlerini göz önünde bulundurarak alternatif bir sınıflandırma sistemi geliştirmiş ve bu sisteme Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sınıflandırma Sistemi (BDDCS) adını vermiştir. Bu sisteme göre permeabilite yerine ilacın metabolizma özelliği temel alınmaktadır. Buna göre; majör eliminasyon yolağı metabolizma ise ilacın yüksek permeabilite gösterdiği söylenir. Ancak majör eliminasyon yolu böbrekler veya safra yoluyla gerçekleşiyorsa düşük permeabilite gösterdiği belirtilir(Tablo 8).

Tablo 8. İlaçların BDDCS'e göre sınıflandırması[79]

	Yüksek Çözünürlük	**Düşük Çözünürlük**
Yüksek Permeabilite	**SINIF 1** **Metabolizma** ***(Hızlı çözünme)***	**SINIF 2** **Metabolizma**
Zayıf Permeabilite	**SINIF 3** **Değişmeyen ilacın böbrekler veya safrayla atılımı**	**SINIF 4** **Değişmeyen ilacın böbrekler veya safrayla atılımı**

Biyomuafiyet için yüksek oranda metabolizma, yüksek çözünürlük, hızlı çözünme şartları önerilmiştir. Buna göre ilaçlar %70 veya daha fazla metabolize olursa, yüksek metabolizma özelliğini taşır. Bu sınıflandırma ile BCS'de gözlenen aynı ilacın birden fazla sınıfta yer alması durumu ortadan kalkmıştır. Ayrıca ilaçların metabolizmasının saptanmasının, permeabilite ölçümüne göre daha kolay ve maliyetinin daha düşük olması sebebiyle daha fazla sayıda ilaç sınıflandırılabilmektedir[79].

2.3.1. BDDCS'de Taşıyıcıların Etkisi

Bağırsakta ilaçların emilimini sağlayan birincil taşıyıcı PEPT1 taşıyıcısı, emilimi engelleyerek ilacı geri püskürten taşıyıcılar ise p-glikoprotein (p-gp) ve OATP3 taşıyıcılarıdır. İlaçların p-gp substratı ve/veya inhibitörü olarak etki etmesi sınıflandırma sistemlerindeki yerlerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır[79].

Sınıf 1 ilaçların yüksek permeabilite ve yüksek çözünürlük özelliği göstermeleri, bu ilaçların bağırsakta yüksek konsantrasyonlara ulaşmasına ve bu sayede hem effluks hem de influks taşıyıcıların doyurulmasıyla bağırsak membranından kolayca geçmelerine olanak sağlamaktadır. Dolayısıyla Sınıf 1 ilaçların BY'sinde taşıyıcı etkisi en azdır.

Sınıf 2 bileşiklerin yüksek permeabiliteleri bağırsak membranından geçmeleri için yeterlidir. Bu ilaçlar genellikle pasif olarak ve lipofilitelerinin bir sonucu olarak emildikleri için enterositlere geçişlerinde permeabilite hızları çok önemli olmayacaktır. Ancak bu bileşiklerin düşük çözünürlük göstermesi enterositler içerisine giren konsantrasyonu sınırlar, böylece effluks taşıyıcıların doyurulması önlenir. Sınıf 2 bileşiklerin CYP3A4 ve faz 2 bağırsak enzimleri için substrat olmaları nedeniyle taşıyıcı-enzim etkileşimi önemlidir. Sınıf 2 bileşiklerde effluks taşıyıcıların etkisi baskındır.

Sınıf 3 bileşikler için iyi çözünürlük özelliklerine bağlı olarak bağırsak lümeninde yeterli ilaç bulunur ancak permeabiliteleri düşük olduğundan geçişlerinin sağlanması için influks taşıyıcıya gerek duyulmaktadır. Sınıf 3 bileşikler için absorptif taşıyıcı etkisi baskındır.

Sınıf 4 bileşiklerin hem çözünürlük hem de permeabilite özelliklerinin düşük olmasına bağlı olarak ilk bakışta hem influks hem de effluks taşıyıcılardan etkilenmelerini beklenir. Taşıyıcıların bu ilaçların BY'sini ne şekilde etkileyeceği henüz bilinmemektedir[79].

2.3.2. BDDCS'de Yiyecek Etkisi

Fleisher ve ark[80], yaptıkları çalışmada BCS'de yer alan ilaçları yiyeceklerle olan etkileşimlerine göre gruplandırmıştır.

Sınıf 1 bileşiklerin tamamen emilmesi sebebiyle bu grup ilaçlarda ilaç-yiyecek etkileşiminin olmadığı düşünülmektedir. Genellikle pasif emilme özelliğine sahip olmaları nedeniyle aşırı yağlı yiyeceklerin sınıf 1 bileşiklerin BY'si üzerine belirgin etkisi bulunmamaktadır. Ancak aşırı yağlı yiyeceklerin mide boşalmasını geciktirmesi dolayısı ile maksimum kan konsantrasyonuna ulaşma zamanında (t_{max}) artış gözlenebilir[79].

Sınıf 2 bileşiklerin BY'si aşırı yağlı yiyeceklerin bağırsaktaki effluks taşıyıcıları inhibe etmesine ve bağırsak lümenindeki ilacın çözünürlüğünü artırmasına bağlı olarak artar. İlaçların formülasyonlarında değişiklik yapılarak Sınıf 2 bileşiklerin çözünürlüklerinin artırılması yoluyla aşırı yağlı yiyeceklerin etkisinin azaltılması mümkündür. İlaç formülasyonunda kullanılan yardımcı maddeler Sınıf 2 ilaçların, Sınıf 1 ilaçlar gibi davranmasına olanak sağlar[79].

Sınıf 3 bileşiklerin BY'si aşırı yağlı yiyeceklerin influks taşıyıcıları inhibe etmesiyle artar. Sınıf 3 ilaçlar için gecikmiş mide boşalması ve emilimin yavaşlaması sebebiyle t_{max}'ın artması beklenir.

Sınıf 4 bileşikler hem çözünürlük, hem de permeabilite problemi olan ilaçlar olduğundan Sınıf 2 ve Sınıf 3'te gözlenen tüm durumlardan etkilenebilmektedir. Yiyeceklerin bu ilaçların biyoyararlanımını ne şekilde etkileyeceği bilinmemektedir.

Bazı durumlarda, BY/BE çalışmalarında GI fizyolojiyi ve sistemik ilaç yararlanımını artırabilmek için aşırı yağlı yiyeceklerin kullanılması önerilmektedir. Yapılan son çalışmalarda, yağlı yiyeceklerin içindeki monogliseritlerin taşıyıcıları inhibe ederek BY'si artırdığı saptanmıştır[81].

2.4. Caco-2 Hücreleri Kullanılarak Yapılan Permeabilite Değerlendirmelerinde Biyouyumlu Ortamların Kullanımı

Caco-2 hücreleri insan kolon karsinoma hücreleridir. Bu hücreler, aktif taşıyıcı sistemi, mikrovillusları ve sıkı bağlantı noktalarına doğru olan parasellüler taşıyıcı sistemi ile bağırsak epitel hücrelerine büyük oranda benzerlik göstermektedir. Klasik ilaç emilim modellerine kıyasla, Caco-2 hücre kültürlerinin birçok üstünlüğü bulunmaktadır[82,83]. Bunlar:

- İlaç permeabilitesinin ve metabolizmasının hızlı değerlendirilmesi
- Kontrollü koşullar altında ilaç emilim mekanizmasını çalışma olanağı
- Ön ilaç, emilim artırıcı veya diğer farmasötik maddeler kullanarak ilaç emilimini artırma metotlarının hızlı değerlendirilmesi
- Kosolvanların hücresel etkilerinin önformülasyon çalışmalarında kullanımı
- Bağırsak epitelinin bariyer özelliklerinin incelenmesi
- İnsan hücreleri üzerinde çalışma yapabilme imkânı
- Zaman sınırlaması, maliyet açısından hayvan çalışmalarını ve insanlarda yapılan deneyleri en aza indirme imkânı

Yapılan çalışmalarda, değişik biyouyumlu ortamların hücre kültürlerinde kullanımı denenmiştir. Ingels ve ark[84] FaSSIF'ın Caco-2 hücreleri ile kullanımının uygun olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada FeSSIF ortamının yüksek safra tuzu, düşük pH (pH 5.0) ve yüksek osmolalitenin etkisi ile hücreler üzerinde zararlı etkiler yaratabileceğini belirtmiştir[84,85].

Kataoka ve Patel'in yaptığı iki ayrı çalışmada da, FeSSIF ortamının pH'sı 6.0-6.5'a ayarlanıp, osmolalitesi düşürüldüğü takdirde

hücreler üzerindeki toksisitenin minimize edildiği belirlenmiştir[86]. Diğer çalışmada ise Caco-2 hücrelerinin apikal ortamında modifiye edilmiş FaSSIF ve FeSSIF ortamlarının kullanımı ile IVIVC'nin sağlandığı gösterilmiştir[87].

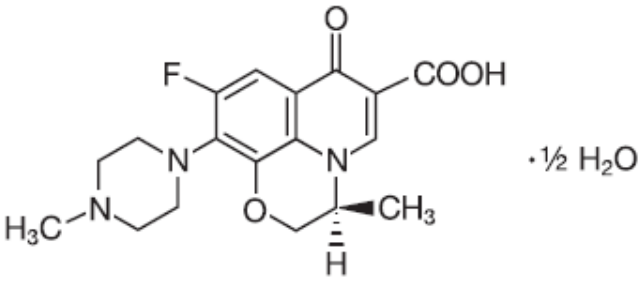
Caco-2 hücre kültürlerinde, biyouyumlu çözünme hızı ortamlarının kullanılması, in vivoya yakın sonuçlar veren koşulların sağlanabileceği konusunda umut vermektedir.

2.5. Levofloksasin

2.5.1. Fizikokimyasal Özellikleri

2.5.1.1. Kimyasal Yapısı

Levofloksasin molekül ağırlığı 370 olan ve molekül formülü $C_{18}H_{20}FN_3O_4$. $\frac{1}{2}H_2O$ olan bir bileşiktir. Yapısında iki iyonize fonksiyonel grup içermektedir. Bunlar; bir karboksilik (pKa_1 = 6.05) grup ve bir piperazinil (pKa_2 = 8.22) gruptur. Kimyasal yapısı Şekil 8'de verilmiştir[88]:



Şekil 8. Levofloksasinin kimyasal yapısı

2.5.1.2. Görünüş ve Erime Özellikleri

Levofloksasin, katı formda kokusuz, beyaz-sarı renkte, kristalize bir tozdur. Erime noktası 228.6˚C'dir[89].

2.5.1.3. Çözünürlük Özellikleri

Levofloksasin suda az çözünür. pH 5.8'in üzerinde çözünürlüğü hızla artmaya başlar ve pH 6.7'de maksimum çözünürlüğüne (272 mg/mL) erişir ve bu aralıkta kolaylıkla çözünür. pH 6.7'den sonra çözünürlüğü azalmaya başlar ve pH 6.9 civarında minimum çözünürlüğe (50 mg/mL) ulaşır[88].

Etanol, kloroform, etanol-su karışımı, metilen klorür ve asetik asitte çözünür. Oktanol/su partisyon katsayısı 0.6'dır[89].

2.5.2. Miktar Tayini Yöntemleri

Levofloksasinin biyolojik sıvılardaki miktar tayini, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)[90], kemiluminesans (CL)[91] ve spektroflorometrik[89] yöntemler kullanılmaktadır.

2.5.3. Farmakolojik Özellikleri

Levofloksasin florokinolon grubu bir antibakteriyel ilaç olup, ofloksasinin sentetik L-izomeridir. Tip II topoizomeraz enzimini (bakteriyel topoizomeraz IV ve DNA giraz) inhibe etmek suretiyle bakteri hücresinde DNA replikasyonu, transkripsiyou, onarılması ve rekombinasyonu gibi kritik proseslere müdahale ederek etkisini gösterir. Topoizomeraz IV enzimi inhibisyonu ile Gram-pozitiflerde, DNA giraz(topoizomeraz II) enzimi inhibisyonu ile de Gram-negatifler üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir.

2.5.3.1. Endikasyonları

Levofloksasin; levofloksasine duyarlı mikroorganizmaların etken olduğu aşağıda belirtilen erişkinlerdeki enfeksiyonların tedavisinde endikedir[88](Tablo 9).

Tablo 9. Levofloksasinin endike olduğu hastalıklar ve etken bakteriler[88]

Hastalık	**Etken Bakteri**
Akut bakteriyel sinüzit	*S.pneumoniae*, *H.influenzae, M.catarrhalis*
Kronik bronşitin akut alevlenmesi	*S.aureus*, *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *H.parainfluenzae, M.catarrhalis*
Nosokomiyal pnömoni	Metisiline duyarlı *S.aureus, P.aeruginosa, S.marcescens, E. coli, K.pneumonia, H.influenzae, S. Pneumoniae*
Toplumda edinilmiş pnömoni	*S.aureus*, *S.pneumoniae*, *H.influenzae, H.parainfluenzae*, *K.pneumoniae, M. catarrhalis, C.pneumoniae, L.pneumophila, M.pneumoniae*
Piyelonefrit dahil komplike üriner sistem enfeksiyonları	*E.coli, E.faecalis, E.cloacae, K.pneumoniae, P.mirabilis, P.aeruginos*a
Komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonları	*E.coli, K.pneumonia, S. saprophyticus*
Komplike bakteriyel prostatit	*E.coli, E.faecalis, S. epidermidis*
Komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonları	Metisiline duyarlı *S.aureus*, *E.faecalis, S.pyogenes, P.mirabilis*
Komplike olmayan deri ve deri ekleri enfeksiyonları	*S.aureus*, *S.pyogenes*

2.5.3.2. Kullanım Şekli ve Dozu

Levofloksasin tabletler çiğnenmeden yeterli miktarda sıvı ile alınmalıdır. Doz ayarlaması için gerektiğinde tabletler bölünebilir. Levofloksasin tablet yemeklerden 1 saat önce veya 2 saat sonra alınmalıdır. Levofloksasin tabletler emiliminin azalmasını önlemek için demir tuzları antiasitler ve sukralfat uygulamasından 2 saat önce veya 2 saat sonra alınmalıdır. Levofloksasin genel olarak günlük 500 ve 750 mg dozlarda, ortalama 1-2 hafta süresince kullanılmaktadır[88].

2.5.4. Farmakokinetik Özellikleri

2.5.4.1. Emilimi

Oral yoldan uygulanan levofloksasin, gastrointestinal kanaldan hızla emilir[88,92,93]. Oral uygulamadan sonra plazma doruk derişimlerine 1-2 saat içinde ulaşılır[88,93-95]. 500 mg veya 750 mg tablet oral verildiğinde elde edilen mutlak biyoyararlanım yaklaşık %99'dur[88,93]. Günlük 750 mg dozu takiben, yaklaşık 48 saatte kararlı durum derişimlerine ulaşılır[88,93]. Oral veya i.v. levofloksasin uygulama sonrasında doğrusal farmakokinetik gösterir[88,93].

Yiyeceklerle alındığında, t_{max} değeri 1 saat uzar. 500 mg levofloksasin tabletin yiyeceklerle alınması C_{max}'ta %14'lük bir azalmaya neden olur. Bu nedenle yemeklerle alınması önerilmez[88].

Uygulama yolu ve dozuna göre levofloksasin alınmasını takiben elde edilen farmakokinetik parametreler Tablo 10'da verilmiştir[96].

Tablo 10. Levofloksasin farmakokinetik parametrelerinin özeti ($X_{ort} \pm SS$)[97]

	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (s)	AUC (µg.s/mL)	Cl/F (mL/dak)	Vd/F (L)	$t_{1/2}$ (s)	Cl_R (mL/dak)
Tek doz							
250 mg oral tablet	2.80 ± 0.40	1.60 ± 1.00	27.2 ± 3.9	156 ± 20	ND*	7.30 ± 0.90	142 ± 21
500 mg oral tablet	5.10 ± 0.80	1.30 ± 0.60	47.9 ± 6.8	178 ± 28	ND	6.30 ± 0.60	103 ± 30
500 mg oral çözelti	5.80 ± 1.80	0.800 ± 0.700	47.8 ± 10.8	183 ± 40	112 ± 37	7.00 ± 1.40	ND
500 mg i.v.	6.20 ± 1.00	1.00 ± 0.00	48.3 ± 5.4	175 ± 20	90.0 ± 11.0	6.40 ± 0.70	112 ± 25
750 mg oral tablet	9.30 ± 1.60	1.60 ± 0.80	101 ± 20	129 ± 24	83.0 ± 17.0	7.50 ± 0.90	ND
750 mg i.v.	11.5 ± 4.0	ND	110 ± 40	126 ± 39	75.0 ± 13.0	7.50 ± 1.60	ND
Çoklu doz							
24 saatte bir 500 mg oral tablet	5.70 ± 1.40	1.10 ± 0.40	47.5 ± 6.7	175 ± 25	102 ± 22	7.60 ± 1.60	116 ± 31
24 saatte bir 500 mg i.v.	6.40 ± 0.80	ND	54.6 ± 11.1	158 ± 29	91.0 ± 12.0	7.00 ± 0.80	99.0 ± 28.0
24 saatte bir 750 mg oral tablet	8.60 ± 1.90	1.40 ± 0.50	90.7 ± 17.6	143 ± 29	100 ± 16	8.80 ± 1.50	116 ± 28
24 saatte bir 750 mg i.v.	12.1 ± 4.1	ND	108 ± 34	126 ± 37	80.0 ± 27.0	7.90 ± 1.90	ND
Cinsiyet ve yaşın etkisi (500 mg tek doz oral tablet)							
Erkek	5.50 ± 1.10	1.20 ± 0.40	54.4 ± 18.9	166 ± 44	89.0 ± 13.0	7.50 ± 2.10	126 ± 38
Kadın	7.00 ± 1.60	1.70 ± 0.50	67.7 ± 24.2	134 ± 44	62.0 ± 16.0	6.10 ± 0.80	106 ± 40
Genç	5.50 ± 1.00	1.50 ± 0.60	47.5 ± 9.8	182 ± 35	83.0 ± 18.0	6.00 ± 0.90	140 ± 33
Yaşlı	7.00 ± 1.60	1.40 ± 0.50	74.7 ± 23.3	121 ± 33	67.0 ± 19.0	7.60 ± 2.00	91.0 ± 29.0
Böbrek yetmezliğinin etkisi (500 mg tek doz oral tablet)							
CLCR 50-80 mL/dak	7.50 ± 1.80	1.50 ± 0.50	95.6 ± 11.8	88.0 ± 10.0	ND	9.10 ± 0.90	57.0 ± 8.0
CLCR 20-49 mL/dak	7.10 ± 3.10	2.10 ± 1.30	182 ±63	51.0 ± 19.0	ND	27.0 ± 10.0	26.0 ± 13.0
CLCR < 20 mL/dak	8.20 ± 2.60	1.10 ± 1.00	263 ±73	33.0 ± 8.0	ND	35.0 ± 5.0	13.0 ± 3.0
Hemodiyaliz	5.70 ± 1.00	2.80 ± 2.20	ND	ND	ND	76.0 ± 42.0	ND
CAPD	6.90 ± 2.30	1.40 ± 1.10	ND	ND	ND	51.0 ± 24.0	ND

ND: Dedekte edilemedi

2.5.4.2. Dağılımı

Levofloksasinin 500 veya 750 mg dozda uygulanmasından sonra ortalama dağılım hacmi(V_d) 74-112 L'dir. Alveolar makrofajlara, bronşiyal mukozaya, epiteli kaplayan sıvıya ve tükürüğe dağılır. Vücut doku ve sıvılarına dağılan konsantrasyon genellikle serum konsantrasyonlarını aşmaktadır[98]. Levofloksasinin vücut doku ve sıvılarına dağılan miktarları Tablo 11'de verilmiştir. Levofloksasin serum proteinlerine yaklaşık %24-%38 oranında bağlanır[88,93].

Tablo 11. Levofloksasinin vücut dokularına ve vücut sıvılarına dağılımı[92].

Doku / Sıvı	Doz (mg) [doz sonrası geçen süre (s)]	Kan Konsantrasyonu (mg/L)	Doku / Sıvı Konsantrasyonu (mg/L)	Doku / Sıvı Kan Konsantrasyon Oranı
Alveolar makrofajlar	500 [4] 500 [12] 500 [24] 750 [4] 750 [12] 750 [24]	4.10-5.30 1.60-3.10 0.400-0.600 6.60-12.0 3.50-4.10 0.800-1.70	27.7-97.9 18.3-36.7 5.60-13.8 81.7-105 36.2-78.2 13.5-15.1	2.30-18.5 11.2-12.0 11.7-23.0 8.80-12.5 8.90-22.2 8.90-15.8
Bronşiyal lavaj sıvısı	200 [1-3]	2.50	0.120	0.0600
Bronkoalveolar lavaj sıvısı	200 [1-3]	2.50	0.210	0.100
Epitelyumu kaplayan sıvı	500 [4] 500 [6-8] 500 [12] 500 [24] 750 [4] 750 [12] 750 [24]	4.10-5.30 4.00 1.60-3.10 0.400-0.600 6.60-12.0 3.50-4.10 0.800-1.70	9.90-11.0 10.1 2.50-6.50 0.700-1.70 12.9-22.1 6.00-9.20 1.50-1.70	1.90-3.00 2.70 1.50-2.10 1.20-2.60 1.90-2.00 1.70-2.30 0.900-2.10
Akciğer	500 [4-6] 500 [21-25]	2.90 0.700	11.3 2.40	5.00 4.10
Tükürük	100 [4]	1.10	1.30	1.20

2.5.4.3. Biyotransformasyonu

Levofloksasin kanda ve idrarda stereokimyasal açıdan dayanıklıdır, enantiyomeri olan D-ofloksasine dönüşmez[96]. Oral yoldan 500 mg levofloksasin alımını takiben 48 saat içerisinde dozun %64-102'si idrarla değişmeden atılır[99,100]. Levofloksasin, uygulanan dozun % 5'i oranında karaciğerde demetil-levofloksasin ve levofloksasin-*N*-oksit metabolitlerine dönüşür[92,101]. Bu metabolitler düşük farmakolojik aktiviteye sahiptir[96].

2.5.4.4. Atılımı

Levofloksasinin ana eliminasyon yolağı böbreklerdir. 500 veya 750 mg dozda oral alımı takiben % 75-87'si 48-72 saat içerisinde idrarla değişmeden atılır[88,93-95]. %4'ten daha az oranda feçesle atılır[88]. %5'ten daha az oranda metabolitleri şeklinde idrarla atılır[88]. 750 mg tek doz verildiğinde idrardaki levofloksasin derişimi 4 saatte 475 mg/L ve 24 saatte 186 mg/L olarak saptanmıştır[93].

Levofloksasinin ortalama görünen total vücut klirensi(CL) yaklaşık 8-9.4 L/s[93,94] ve 8.60-13.6 L/s[88,93] ve renal klirens 3.00-7.10 L/s[93,95] ve 5.80-8.50 L/s[88,93] civarındadır.

Tek veya çoklu doz, 750 mg oral veya intravenöz levofloksasin alımı sonrasında elde edilen yarılanma ömrü ($t_{½}$) 7.50-8.80 saat arasında bulunmuştur[93-95].

Levofloksasin kullanan böbrek hastalarında (kreatinin klirensi <50 mL/dak olan hastalarda) $t_{½}$'nin uzadığı gözlenmiştir. Bu hastalarda uygulamadan önce özel doz ayarlaması gerekmektedir[88,93].

2.5.5. BCS Sınıfı

Levofloksasin pH'ya bağımlı çözünürlük göstermektedir. Çözünürlük değeri pH 1.0 ila pH 8.0 arasında 30-300 mg/mL arasında değişmektedir. Yüksek çözünürlük gösteren sınıfta yer almaktadır[102].

Levofloksasin, oral uygulama sonrasında hızla ve neredeyse tamamen emilmektedir. BY'si 500 mg ve 750 mg oral dozda yaklaşık %99'dur[103].

Volpe ve ark[104] in vitro Caco-2 hücre kültürü kullanarak levofloksasinin permeabilitesini hesaplamıştır. Çalışmada yüksek permeabilite gösteren model ilaç olarak labetalol kullanılmıştır (P_{app}: $18.1x10^{6}$ ± $1.90x10^{6}$cm/sn). Levofloksasinin hesaplanan permeabilite değeri referansınkinden yüksek bulunmuştur (P_{app}: $28.3x10^{6}$±$1.93x10^{6}$cm/sn). Bu nedenle levofloksasin yüksek permeabilite göstermektedir.

Levofloksasin BCS'e göre yüksek çözünürlük, yüksek permeabilite ve hızlı çözünme özelliklerini kapsayan Sınıf 1'de yer almaktadır.

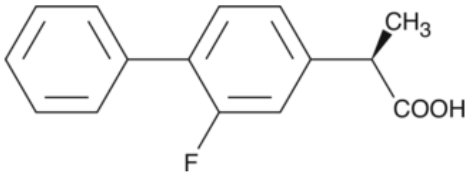
2.6. Flurbiprofen

2.6.1. Fizikokimyasal Özellikleri

2.6.1.1. Kimyasal Yapısı

Flurbiprofen molekül ağırlığı 244 molekül formülü $C_{15}H_{13}FO_2$ ve pKa değeri 4.22 olan zayıf asit özellikte bir bileşiktir. Kimyasal yapısında içerdiği arilpropiyonik grubuna bağlı olarak non-steroidal antiinflamatuvar (NSAİİ) özellik göstermektedir. Flurbiprofenin yapısında bir kiral merkez ve

analjezik etkiye sahip R- ve S- izomerleri vardır. Ancak en yüksek analjezik etkiyi S(+)-izomeri göstermektedir.
Flurbiprofenin kimyasal yapısı Şekil 9'da verilmiştir[105].



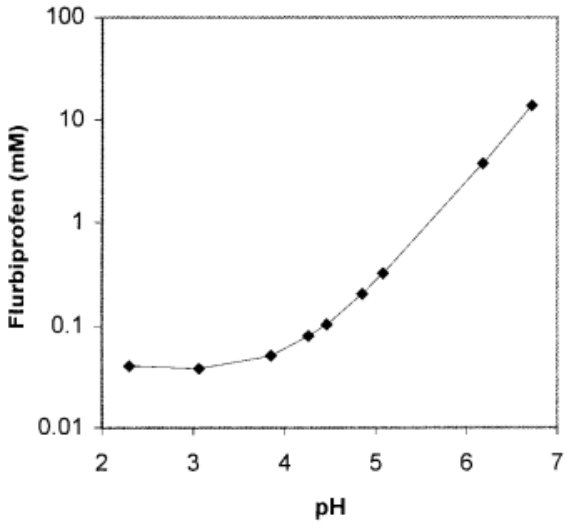
Şekil 9. Flurbiprofenin kimyasal yapısı

2.6.1.2. Görünüş ve Erime Özellikleri

Flurbiprofen, katı formda kokusuz, beyaz renkte, kristalize bir tozdur. Erime aralığı 114˚C-117 ˚C'dir[105].

2.6.1.3. Çözünürlük Özellikleri

Flurbiprofen, aseton, dehidrate alkol, eter ve metanolde kolay çözünür; asetonitrilde çözünür; pratikte suda çözünmez[105]. pH 1.2'deki çözünürlüğü 0.00800 mg/mL'dir[106]. Çözünürlüğü pH'ya bağımlı olarak belirgin şekilde değişmektedir. Şekil 10'da çözünme ortamının pH'sına karşı flurbiprofen çözünürlük değerleri gösterilmektedir[107].



Şekil 10. Flurbiprofenin ortam pH'sına göre çözünürlük değerleri[107]

2.6.2. Miktar Tayini Yöntemleri

Flurbiprofenin biyolojik sıvılardaki miktar tayininde, HPLC[108-111] ve stereospesifik olmayan sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS)[112], gaz kromatografisi/yüksek resolüsyonlu kütle spektrometresi(GC/HRMS)[113] ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi(HPTLC)[114] yöntemleri kullanılırken dozaj formundan miktar tayini hesaplanmasında LC[115,] HPLC[108] ve UV spektroskopisi[115,116] yöntemleri kullanılmaktadır.

2.6.3. Farmakolojik Özellikleri

NSAİİ'ler analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik etkilerini prostoglandin sentezini güçlü bir şekilde inhibe etmek suretiyle gösterirler[117]. Prostoglandin sentezini gerçekleştiren enzimler siklooksijenaz(COX-1 ve COX-2) izoenzimleridir. Flurbiprofen COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe etmek suretiyle prostaglandin sentezini önler. COX-1 ve COX-2

enzimlerinde inhibisyon meydana getirmek için gereken flurbiprofen konsantrasyonu (IC50) sırasıyla 0.0400 μM ve 0.510 μM'dır[118]. COX-1'e karşı olan inhibisyonu daha etkilidir[119]. Flurbiprofen COX-1 enzimini inhibe ederek sindirim organları ve böbreklerde sitoprotektif etkiye neden olur[120]. COX-2 ise enflamasyonlara neden olur[121]. Bu nedenle NSAİİ'ler COX-2 inhibisyonuyla antienflamatuvar etki gösterirken, COX-1 inhibisyonu nedeniyle gastrointestinal yan etkilere neden olurlar.

2.6.3.1. Endikasyonları

Flurbiprofen, romatoid artrit, osteoartrit, ankilozan spondilit, kas ağrıları, periartrit, sebebi bilinmeyen şiddetli omuz ağrısı, bursit, tendinit, tenosinovit, bel ağrısı, burkulma gibi travmatik ağrıların giderilmesinde endikedir. Ayrıca, diş ağrısı, post-operatif ağrılar, dismenore ve migrenin hafif ve orta şiddetteki ağrılarının tedavisinde kullanılır.

2.6.3.2. Kullanım Şekli ve Dozu

Flurbiprofen tabletler çiğnenmeden yeterli miktardaki sıvı ile yutulmalıdır. Flurbiprofenin endikasyonlarına göre kullanım şekli ve dozu Tablo 12'de verilmiştir[122].

Tablo 12. Flurbiprofen tabletin kullanım şekli

Hastalık	Dozaj	Uygulama Yolu	Uygulama Şekli
Romatoit artrit	200-300 mg/gün	Oral tablet (50 ve 100 mg)	Günde 2,3 veya 4 defa bölünmüş dozlar halinde verilebilir. Günlük alınan doz 300 mg'ı aşmamalıdır. Gastrointestinal rahatsızlıkları önlemek için yiyeceklerle veya sütle alınabilir.
Osteoartrit	200-300 mg/gün	Oral tablet (50 ve 100 mg)	Günde 2,3 veya 4 defa bölünmüş dozlar halinde verilebilir. Günlük alınan doz 300 mg'ı aşmamalıdır. Gastrointestinal rahatsızlıkları önlemek için yiyeceklerle veya sütle alınabilir.
Dismenore	50 mg	Oral tablet	Günde 4 defaya kadar alınabilir. Gastrointestinal rahatsızlıkları önlemek için yiyeceklerle veya sütle alınabilir.

2.6.4. Farmakokinetik Özellikleri

2.6.4.1. Emilimi

Oral yoldan uygulanan flurbiprofen mide bağırsak kanalından hızla emilir[123-125]. Oral uygulama sonrası doğrusal farmakokinetik gösterir[126]. t_{max} değeri 1-3 saattir. 100 mg tablet oral verildiğinde elde edilen mutlak BY değeri yaklaşık %96'dır[127].

Yiyeceklerle alındığında C_{max} değerinde ve emiliminde artış gözlenmiştir[128].

Flurbiprofenin oral alımını takiben elde edilen farmakokinetik parametreler Tablo 13'te özetlenmiştir.

Tablo 13. Flurbiprofen farmakokinetik parametrelerinin özeti[126,127,129,130] (X_{ort} ± SS)

	C_{max} (µg/mL)	t_{max} (s)	AUC_{0-t} (µg.s/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (µg.s/mL)	Cl/F (L/s)	Vd/F (L)	$t_{1/2}$ (s)	Cl_R (mL/s/dak)
Tek doz								
50 mg oral tablet	9.40 ± 2.50	2.30 ± 1.00	-	50.6 ± 17.6	1.09 ± 0.35	6.12 ± 1.11	4.30 ± 1.60	-
50 mg oral tablet	19.7 ± 4.3	2.29 ± 0.80	119 ± 29 (t:24)	124 ± 33	1.09 ± 0.35	6.12 ± 1.11	4.77 ± 1.35	-
100 mg oral tablet	11.7 ± 9.9	2.30 ± 1.60	58.3 ± 12.1 (t:12)	58.3 ± 12.1	1.77 ± 0.31	15.8 ± 4.7	6.20 ± 1.60	-
100 mg oral tablet	14.0 ± 4.0	1.90 ± 1.50	-	83.0 ± 20.0	-	14.0 ± 3.0	7.50 ± 0.80	-
Çoklu doz								
12 saatte bir 100 mg oral tablet (8 gün)	13.7 ± 4.2	2.20 ± 1.10	62.4± 15.4 (t:12)	-	1.68 ± 0.36	12.8 ± 3.2	5.40 ± 1.60	3.70 ± 1.00
Yaşlılarda								
100 mg oral tek doz	12.7 ± 3.9	1.70 ± 1.60	56.8 ± 15.1 (t:12)	69.6 ± 23.0	1.61 ± 0.58	12.3 ± 3.2	5.60 ± 1.60	-
12 saatte bir 100 mg oral tablet (8 gün)	15.6 ± 4.9	2.20 ± 3.00	76.6± 24.0 (t:12)	-	1.46 ± 0.54	11.8 ± 4.5	5.80 ± 1.90	2.40 ± 1.00
Stereoselektivite								
R- enantiyomer 100 mg oral tablet	6.90 ± 1.80	1.50 (1.50-2.00)	41.3 ± 3.1 (t:24)	42.3 ± 2.6	19.7 ± 1.2	7.80 ± 1.40	4.50 ± 0.60	1.20 ± 0.60
S- enantiyomer 100 mg oral tablet	6.50 ± 1.60	2.50 (1.50-3.00)	46.5 ± 3.6 (t:24)	49.5 ± 5.3	17.0 ± 1.9	7.60 ± 0.90	5.20 ± 0.70	0.990 ± 0.640
Böbrek yetmezliğinde								
100 mg oral tek doz	9.00	2.30	-	44.0	-	10.0	3.30	-
Alkolik siroz hastalarda								
200 mg oral tek doz	9.00	1.20	-	50.0	-	14.0	5.40	-

2.6.4.2. Dağılımı

Görünür dağılma hacmi değeri 0.100-0.200 L/kg'dır. Başta albumin olmak üzere plazma proteinlerine % 99.5'ten fazla oranda bağlanır[122]. Oral uygulamadan 6 saat sonra sinovial sıvılardaki ilaç konsantrasyonu plazma ile karşılaştırılabilir düzeye ulaşır(Tablo 14)[131].

2.6.4.3. Biyotransformasyonu

Flurbiprofenin hidroksilasyon ve metilasyon yoluyla meydana gelen üç ana metaboliti idrar yoluyla atılır. Faz II metabolizma sonucu oluşan açilglukuronit ve aminoasit esteri metabolitleri de ayrıca önem taşımaktadır[113]. Majör metabolitleri 4'-hidroksi, 3'-hidroksi-4'-metoksi ve 3',4'-dihidroksi türevleridir[124]. Majör metabolit olan 4'hidroksiflurbiprofen, hayvan modellerinde hafif düzeyde antienflamatuvar etki göstermektedir.

2.6.4.4. Atılımı

Flurbiprofen, hidroksil ve glukuronit metabolitleri halinde idrardan atılır. Yaklaşık % 20-25'i ise idrarla değişmeden atılır[132]. Ayrıca % 40-47'si 4'-hidroksi, % 20-25'i 3'-hidroksi-4'-metoksi ve yaklaşık % 5'i 3',4'-dihidroksi metabolitleri şeklinde idrardan atılır[133]. t½'si 5.70 saat ve CL'si 1.13 L/s'tir[122].

Tablo 14. 100 mg tek oral doz verilmesini takiben serum ve sinoviyal sıvılardaki flurbiprofen konsantrasyonları[131]

Hasta no	Sinoviyal sıvılardaki konsantrasyonları (µg/mL)					Serum konsantrasyonları (µg/mL)					$t_{½}$ (s)
	1.5. s	3. s	6. s	9. s	12. s	1.5. s	3. s	6. s	9. s	12. s	
1	1.13	1.75	1.98	2.27	1.38	7.03	4.12	2.26	1.56	0.720	3.40
2	1.33	2.01	1.51	1.40	0.790	7.39	4.07	2.00	1.10	0.720	3.20
3	1.46	2.54	2.28	ND	ND	9.28	3.94	1.61	0.850	0.360	2.40
X_{ort}	1.31	2.10	1.92	1.83	1.09	7.90	4.04	1.96	1.17	0.600	3.00

ND:Dedekte edilemedi

2.6.5. BCS Sınıfı

Flurbiprofen pH'ya bağımlı çözünürlük göstermektedir. Çözünürlük değeri pH 1.2, pH 5.0 ve pH 7.4'te sırasıyla 0.007 mg/mL, 0.06 mg/mL ve 2.60 mg/mL'dir. Düşük pH'lardaki çözünürlük değerleri flurbiprofenin düşük çözünürlük gösteren sınıfta yer aldığını göstermektedir[51].

Flurbiprofen, oral uygulama sonrasında hızla ve neredeyse tamamen emilmektedir. BY'si 100 mg oral dozda %92'dir[134].

Yazdanian ve ark[51] in vitro Caco-2 hücre kültürü kullanarak flurbiprofenin permeabilitesini hesaplamıştır. Çalışmada yüksek permeabilite gösteren referans ilaç olarak verapamil kullanılmıştır (P_{A-B}: $15.8x10^6$ ± $1.2x10^6$cm/sn ve P_{B-A}: $21.1x10^6$ ± $2.0x10^6$cm/sn). Flurbiprofenin hesaplanan permeabilite değeri referansınkinden yüksek bulunmuştur (P_{A-B}: $20.1x10^6$±$2.7x10^6$ cm/sn ve P_{B-A}:$18.8x10^6$±$0.3x10^6$ cm/sn). Sonuç olarak flurbiprofenin yüksek permeabilite gösterdiği saptanmıştır.

Flurbiprofen, BCS'e göre düşük çözünürlük, yüksek permeabilite özelliklerini kapsayan Sınıf 2'de yer almaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Levofloksasin hemihidrat	Neuland Laboratories, Hindistan
Flurbiprofen	Sun Pharmaceuticals, Hindistan
Sodyum taurokolat (% 97 Saflıkta)	Sigma, ABD
A-L-fosfatidil kolin (lesitin)	Sigma, ABD
Hidroklorik asit (% 37)	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Glasiyel asetik asit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Merck, Almanya
Diklorometan	Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	AppliChem, Almanya
Sodyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
SIF Powder®	Phares, İsviçre
Caco-2	Hücre Kültürü Koleksiyonu, Türkiye
DMEM	Biochrom, Almanya
MTT	Sigma, ABD
EDTA	Biochrom, Almanya
Fötal Sığır Serumu	Biochrom, Almanya
Tripan Mavisi	Sigma, ABD
İzopropil alkol	Applichem, Almanya
RPMI 1640	Biochrom, Almanya

3.1.2. Araç ve Gereçler

Sertlik tayin aleti	CGS, Hardness tester HDT 1 V-3, Almanya
Ufalanma-aşınma tayin aleti	Roche Friabilatör, Almanya
USP Dağılma tayin aleti	PharmaTest, Almanya
UV Spektrofotometre	Schimadzu, UV-170, Japonya
pHmetre	Sentron A102-001 Argus, ABD
Ultrasonik banyo	Bransonic 221, Almanya
Partikül büyüklüğü ölçüm aleti	Sympatec Gmbh System-Partikel Technik, Almanya
Damlacık büyüklüğü ölçüm aleti	Zetasizer-Nano ZS-Malvern, İngiltere
Hassas terazi	Shimadzu AW320, Japonya
Etüv	Heram, Fransa
Çözünme hızı aleti	PharmaTest, PTWS3C Almanya
Rotary evaporatör	Heidolph, İngiltere
Manyetik karıştırıcı	Labinco, Hollanda
Otomatik pipetler	Eppendorf Research, Almanya
Doku kültürü şişesi	Costar, İngiltere
Membran filtre, 0.22 µm	Sigma-Aldrich, ABD
Membran filtre, 0.45 µm	Millipore Millex-HV, ABD
Plate	Cellstar-Greinerbio-one, Almanya
Hemasitometre	Bürker, Almanya
Işık mikroskobu	Olympos CH, Japonya
Tensiyometre	Cambridge Du Nouy, İngiltere
Viskozimetre	Brookfield, DV-III, ABD

3.2. YÖNTEM

3.2.1. İn Vitro Çözünme Ortamlarının Hazırlanması

Klasik çözünme ortamları farmakopelere göre hazırlandı. Buna göre;

pH 1.2 Tamponu: 8.30 mL % 37 'lik HCl 1 L ye distile suyla tamamlandı ve daha sonra 0.2 M NaOH çözeltisi ile pH'sı 1.2'ye pHmetre ile ayarlandı.

pH 4.5 Tamponu: 6.80 g monobazik KH_2PO_4 distile suyla 1L'ye tamamlandı ve daha sonra 0.2 M HCl ve 0.2 M NaOH çözeltileri ile pH'sı 4.5'e ayarlandı.

pH 6.8 Tamponu: 6.80 g KH_2PO_4 distile suyla 1L'ye tamamlandı ve daha sonra 0.2 M NaOH çözeltisi ile pH'sı 6.8'e ayarlandı.

Kör FaSSIF Ortamı: 2.10 g NaOH pelletleri, 19.8 g $NaH_2PO_4.H_2O$ ve 30.9 g NaCl distile suyla 5L'ye tamamlandı ve 0.2 M NaOH çözeltisi ile pH'sı 6.5'e ayarlandı.

FaSSIF Ortamı: 3.30 g sodyum taurokolat, 500 mL Kör FaSSIF'te çözüldü. Ayrı bir beherde hazırlanan 1.18 g lesitinin 11.8 mL diklorometan çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti sodyum taurokolat çözeltisine eklenerek emülsiyon oluşumu sağlandı. Daha sonra diklorometan 40˚C'de evaporatörde 15 dak süresince karıştırıldı ve diklorometanın ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Sonuçta berrak miseller bir çözelti elde edildi. Bu çözelti oda sıcaklığına geldikten sonra Kör FaSSIF ile 2 L'ye tamamlandı. Opaklaşması için 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.

SIF-FaSSIF Ortamı: 2.24 g SIF Powder® 500 mL Kör FaSSIF ortamında çözüldü. Kör FaSSIF ortamı ile 1 L'ye tamamlandı.

Kör FeSSIF Ortamı: 20.2 g NaOH pelletleri, 43.3 g glasiyel asetik asit ve 59.4 g NaCl 5 L distile suda çözüldü ve 0.2 M NaOH çözeltisi ile pH'sı 5.0'a ayarlandı.

FeSSIF Ortamı: 16.5 g sodyum taurokolat, 500 mL Kör FeSSIF ortamında çözüldü. Ayrı bir beherde hazırlanan 5.91 g lesitinin 59.1 mL diklorometandaki çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti sodyum taurokolat çözeltisine eklendi ve emülsiyon oluşumu sağlandı. Daha sonra diklorometan 40˚C'de evaporatörde 30 dak süresince buharlaştırıldı. Böylece miseller bir çözelti elde edildi. Bu çözelti oda sıcaklığına geldikten sonra Kör FeSSIF ortamı ile 2 L'ye tamamlandı.

SIF-FeSSIF Ortamı: 11.2 g SIF Powder® 500 mL Kör FeSSIF'te çözüldü. Kör FeSSIF ortamı ile 1 L'ye tamamlandı.

3.2.2. İn Vitro Çözünme Ortamlarda Yapılan Çalışmalar

3.2.2.1. Yüzey Gerilimi*

Ortamların yüzey gerilimini ölçmek amacıyla Du Nouy tensiyometre* kullanıldı. İlk kullanım öncesi cihaz yüzey gerilimi bilinen bir sıvı olan metanol (22-23 mN/m) kullanılarak kalibre edildi. Cihazın sıfır ayarı için platin halka ana çubuğa takılarak vidalar yardımıyla cihazın gergin telinin ayna görüntüsü sabit konuma getirildi.

---

*Ortamların yüzey gerilimi ölçümleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde yapılmıştır. Yardımlarından dolayı Doç.Dr.Nilüfer Yüksel ve Dr.Ecz.Özge İnal'a teşekkür ederiz.

Cihazın ölçüm yöntemi olarak halka koparma yöntemi kullanıldı. Bu amaçla çapı 6 cm standart örnek kabı sıvı düzeyi halkadan 1 cm aşağıda olacak şekilde cihazın tablasına yerleştirildi. İçine ortam sıvıları doldurduldu. Halka sıvılara daldırıldı. Vida yardımıyla halka yavaş yavaş yukarı kaldırıldı. Halkanın sıvıdan koptuğu an skaladaki değer okundu. Ölçümler üç paralel gerçekleştirildi. Ortalama (X_{ort}), standart sapma (SS) ve yüzde varyasyon katsayısı (%VK) hesaplandı. Student-t testi uygulanarak ortalamalar arasında anlamlı fark olup olmadığı değerlendirildi.

3.2.2.2. Viskozite

Ortamların viskozitesine ölçmek için Brookfield viskozimetresi kullanıldı. Brookfield viskozimetresinde bir yay ile aletin motoruna bağlanan, farklı hızda dönüş yapabilen miller bulunmaktadır. Ortam örnekleri aletin kabına yerleştirildi. Millerin örnek içinde dönmesiyle oluşan viskoz sürüklenme, kayma geriliminin fonksiyonu olarak aletin göstergesinden okundu. Viskozite değerleri kaydedildi.

3.2.2.3. Biyouyumlu Ortamların Misel Büyüklüğü

Biyouyumlu ortamların misel büyüklüğünü tespit etmek için için Malvern Zeta Sizer aleti kullanıldı. Malvern Zeta Sizer aleti, dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemleriyle çalışmaktadır. Bu alet, çözelti içinde bulunan damlacıkların büyüklüğünün ölçümünde, zeta potansiyel ölçümü ile stabilite değerlendirilmesinde, molekül ağırlığı ölçümünde kullanılmaktadır. Bu alette, partikül büyüklüğü 0.6 ile 6000 nm aralığında, molekül ağırlığı 1.10^3 ile 2.10^7 Dalton aralığında olan partiküllerin ölçümleri yapılabilmektedir. Ayrıca, partikül büyüklüğü 5 nm ile 10 µm aralığında olan partiküllerin zeta potansiyeli ölçümünde de kullanılabilmektedir. Çalışmada

ortamların misel büyüklükleri üç paralel olarak ölçüldü. X_{ort}, SS ve %VK değerleri saptandı.

3.2.3. Levofloksasin

3.2.3.1. Partikül Büyüklüğü

Etkin maddelerin partikül büyüklüğü tayini için Laser-X Diffraction Particle Sizer aleti kullanıldı. Aletin ölçüm bölmesine etkin maddenin çözünmediği ortam olan eter konuldu, daha sonra toz haldeki etkin madde bu ortama ilave edildi. Ölçüm işlemi üç kez tekrarlanarak elde edilen değerlerin X_{ort} ve SS değerleri hesaplandı.

Laser-X Diffraction Particle Sizer aletinin çalışma prensibi, partikül yüzeyine çarpan lazer ışığının saçılma ve absorpsiyon gibi optik özelliklerine dayanmaktadır. Kırılma (difraksiyon), gelen lazer ışınının saçılma ve absorpsiyonundan kalan kısmında gerçekleşir. Sistem, sırasıyla lazer, ışın artırıcı, ölçme noktası, lens odaklanması ve çok noktalı fotodedektörden oluşmuştur. Ölçme zonu ve lenslerin odaklanması fotodedektördeki spektrumu belirler. Fotodedektör lensin odaklanma aralığına göre ayarlanmıştır. Partikül büyüklüğü ve dağılımına bağlı olarak dairesel, simetrik görüntüler oluşur. Merkezden uzaklaşmak enerji yoğunluğunu azaltır. Çok elementli fotodedektör 31 adet yarım çember şeklindeki zonu ölçme kapasitesine sahiptir. Işık yoğunluğu orantılı olarak akıma çevrilir ve sayısal olarak ifade edilir, kaydedilerek bilgisayarda değerlendirilir. Partikül büyüklüğüne ait X_{ort} ve SS değerleri hesaplanır.

3.2.3.2. UV Spektrumu

Levofloksasinin hazırlanan pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF

ortamlarında 10 µg/mL derişiminde çözeltileri hazırlandı. 200-800 nm arasında 1 cm'lik kuvartz küvetler kullanılarak, kör çözeltilerine karşı spektrumları alındı ve λ_{maks} değerleri saptandı.

3.2.3.3. İn Vitro Çözünme Ortamlarında Yapılan Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Standart Doğrunun Hazırlanması

Levofloksasinin çözünme hızı deneylerinde ve miktar tayininde kullanılmak üzere, dokuz ayrı in vitro çözünme ortamında (pH 1.2, p 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF) standart doğruları ve standart doğru denklemleri bulundu. Bunun için levofloksasinin 10 µg/mL derişimde hazırlanan stok çözeltilerinden uygun seyreltmeler yapılarak 1.25-10 µg/mL arasında çözeltileri hazırlandı. Her bir çözünme ortamı için önceden belirlenen λ_{maks}'ta bu derişimlere karşılık gelen absorbans değerleri okundu. Çalışma üç paralel olacak şekilde tekrarlandı ve ortalama değerler hesaplandı. Levofloksasinin derişimine karşı ortalama absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve standart doğru denklemleri elde edildi

3.2.3.4. UV Spektrofotometre ile Miktar Tayini Yöntem Validasyonu

Validasyon, etkin maddenin miktar tayini için kullanılan yöntemin sürekli olarak beklenen sonuçları sağladığının kanıtlanması amacıyla yapılması gereken işlemleri kapsamaktadır. Bu sayede yöntemin güvenilirliği kanıtlanmaktadır. Yöntemin validasyonu üç ayrı pH ortamında (pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8) gerçekleştirildi.

3.2.3.4.1. Doğruluk ve Geri Elde

Saptanan değerin gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanır. Miktar tayini yöntemin doğruluğunu gösterir. Yöntemin doğruluğu geri alma

yüzdesine bağlıdır. Bu amaçla etkin madde miktarının % 80'ini, % 100'ünü ve % 120'sini kapsayan miktarlarda üç ayrı derişimde geri elde çalışması yapıldı. 5 µg/mL derişimde hazırlanan levofloksasin çözeltileri % 100 kabul edilerek hesaplanan miktardaki levofloksasin çalışılan çözünme ortamlarında çözüldü ve λ_{maks} değerlerinde spektrofotometrede absorbansları okundu. Çalışmalar üç paralel olacak şekilde tekrarlandı ve değerlerin ortalamaları hesaplandı. Her bir ortam için bulunan standart doğru denklemlerinde bulunan absorbans değerleri yerine konularak derişimler saptandı. X_{ort}, SS ve %VK hesaplandı.

3.2.3.4.2. Tekrar Edilebilirlik

Levofloksasinin standart doğru denklemlerini oluşturmak için 10 µg/mL'lik farklı pH'lardaki (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8) ortamlardan alınan örneklerden her birinin spektrofotometrede ard arda 10 kez ölçülmesi ile absorbanslar elde edildi. Absorbanslara karşılık gelen derişimlerine ait X_{ort}, SS ve %VK değerleri hesaplandı. %VK'nın %1'den küçük olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir.

3.2.3.4.3. Özgünlük ve Seçicilik

Spektrofotometrik miktar tayini yönteminin sadece analiz edilen levofloksasini saptayabilmesi amacıyla etkin madde içermeyen çözeltilerin pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8'de 200-800 nm arasındaki dalga boylarında spektrumları alındı.

3.2.3.4.4. Doğrusallık

Örnekteki maddenin derişimi ile elde edilen deney bulgularının belirli bir aralıkta orantılı olduğunun göstergesidir. Doğrusallık absorbans değerlerine karşılık gelen derişimlere doğrusal regresyon yöntemi (En Küçük

Kareler Yöntemi, EKKAR) uygulanarak regresyon doğrusunun saptanmasıyla gösterildi. Levofloksasinin pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarında 10 µg/mL derişimde üçer adet stok çözeltileri hazırlandı. Her stok çözeltiden dokuz adet seyreltme yapılarak, dokuz farklı derişimde (1.25-10 µg/mL arasında) çözeltiler elde edildi. Her derişim ve bu derişime karşılık gelen absorbans değerleri EKKAR yöntemine göre değerlendirilip, her çözünme ortamı için standart doğru denklemleri bulundu.

3.2.3.4.5. Stabilite

Etkin maddenin in vitro çözünme ortamlarındaki stabilitelerini incelemek amacıyla levofloksasinin üç ayrı pH'daki (pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8) stabiliteleri incelendi. Bu amaçla etkin maddenin 10 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlanıp oda sıcaklığında (25˚C) ve 37˚C ± 0.5˚C'de 24 saat süreyle bekletildi. 0, 5, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 480, 720 ve 1440. dak'da örnekler alınarak absorbans değerleri okundu. Çalışmalar üç paralel olacak şekilde yapıldı. Absorbanslara karşılık gelen derişimler standart doğru denklemleri kullanılarak hesaplandı. Derişimlerin X_{ort} değerleri hesaplanarak değişiklik olup olmadığı saptandı.

3.2.3.5. Çözünürlük

Çözünürlük, çözücünün belirli bir hacminde çözünebilen etkin maddenin azami miktarı olarak tanımlanır. Levofloksasinin çözünürlüğünün belirlenmesi amacıyla çözünme ortamlarının (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF) çözemeyeceği miktardaki levofloksasin erlenlere aktarılarak üzerlerine belirli hacimdeki (50 mL) çözünme ortamları ilave edildi. Erlenler 37 ± 0.5˚C sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirildi magnetler yardımıyla karışması

sağlandı. Belirli aralıklarda örnekler alındı. Alınan örnekler membran filtreden (0.45 µm) süzüldü ve uygun seyreltmeler yapıldıktan sonra spektrofotometrede absorbansları okundu. Absorbans değerleri standart doğru denklemlerinde yerine konularak elde edilen derişimler X_{ort}, SS ve %VK ile değerlendirildi. Student-t testi uygulanarak ortalamalar arasında anlamlı fark olup olmadığı değerlendirildi.

Levofloksasinin in vitro çözünme ortamlarındaki çözünürlüklerini değerlendirmek için D_o değerleri hesaplandı. D_o değerinin 1'den büyük veya küçük olmasına göre levofloksasinin farklı çözünme ortamlarındaki çözünürlükleri değerlendirildi.

3.2.3.6. Tabletlerde Yapılan Kalite Denetimleri

Tabletlerde yapılan denetimlerde 500 mg dozda levofloksasin içeren Tavanic® 500 mg Film Tablet (Aventis) kullanıldı. Yapılan tüm tablet kontrolleri farmakope şartlarına göre gerçekleştirildi.

3.2.3.6.1. Çap ve Kalınlık

Duyarlılığı 0.01 mm olan mikrometre ile 10 tabletin çap ve kalınlıkları ölçüldü. Değerler X_{ort}, SS ve %VK ile değerlendirildi.

3.2.3.6.2. Ağırlık Tekdüzeliği

Rastgele alınan 20 tabletin hepsi birden tartıldı ve X_{ort} değeri hesaplandı. Daha sonra tabletler teker teker tartıldı. Tablo 15'te gösterilen % SS'ye göre 20 tabletten iki tanesinin SS değeri A sütununda gösterilen değerden büyük olabilir, fakat 20 tabletten hiçbiri B sütununda gösterilen değerden fazla sapma göstermemelidir şeklinde değerlendirildi.

Tablo 15. Tabletlerde ağırlık sapması

Ortalama ağırlık	SS (%)	
	A	B
80 mg veya daha az	10	15
80 mg – 250 mg	7.5	12.5
250 mg'dan daha fazla	5	10

3.2.3.6.3. Sertlik

Rastgele alınan 10 tabletin sertliği, sertlik ölçüm cihazında newton (N) cinsinden belirlendi. Sonuçlar X_{ort}, SS ve %VK ile değerlendirildi.

3.2.3.6.4. Ufalanma-Aşınma

Ufalanma-aşınma deneyinde Roche friabilitörü kullanıldı. 20 tablet ile çalışıldı. Kullanılacak olan tabletlerin toplam ağırlığı saptanıp, aletin döner silindirine konuldu. Alet, 25 devir/dak hızda 4 dak çalıştırıldı. Bu sürenin sonunda tabletler alındı ve yumuşak bir fırça yardımıyla üzerindeki toz temizlenip tekrar tartıldı. Tabletlerin ağırlık kaybı, toplam ağırlığın %1'inden fazla olmamalı şeklinde değerlendirildi.

3.2.3.6.5. Dağılma

Dağılma test aletinin altı sepetinin her birine birer tablet konuldu. 37℃'de sıcaklıkta pH 1.2 ortamına daldırılarak alet çalıştırıldı. Dağılma gerçekleştikten sonra, sepetler ortamdan çıkartıldı. Saptanan dağılma sürelerinin X_{ort}, SS ve %VK değerleri hesaplandı.

3.2.3.6.6. Etkin Madde Miktar Tayini

Tabletlerde miktar tayini yapmak için 10 tablet toz haline getirildi. Toz karışımından bir tabletin ortalama ağırlığına eşit miktarda toz tartıldı ve pH 1.2 tamponu ile gerekli seyreltmeler yapılarak spektrofotometrik miktar tayini yapıldı. Miktar tayini çalışmaları üç farklı

stoktan üç paralel olacak şekilde tekrarlandı. X_{ort}, SS ve %VK değerleri hesaplandı.

3.2.3.7. İn Vitro Çözünme Hızı Deneyleri

Tavanic® tabletler ile gerçekleştirilen çözünme hızı testi koşulları aşağıda verilmiştir:

Tablo 16. Tavanic® tabletler ile gerçekleştirilen çözünme hızı test koşulları

Yöntem	Palet Yöntemi
Çözünme Ortamı	pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF- FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF
Ortam Hacmi	900 mL
Dalga Boyu	292 nm (pH 1.2, pH 4.5 ve Kör FeSSIF) 286 nm (pH 6.8) 288 nm (Kör FaSSIF, FaSSIF ve SIF-FaSSIF) 294 nm (FeSSIF ve SIF-FeSSIF)
Ortam Sıcaklığı	37˚C ± 0.5˚C
Tablet Sayısı	n=6 (pH 1.2, 4.5 ve 6.8) n=3 (biyouyumlu ortamlar ve kör ortamlar)
Hız	50 rpm
Deney Süresi	60 dak
Örnek Alma Süreleri	5, 10, 15, 20, 30, 45 ve 60. dak

Paletler kabın tabanından 2.5 cm yüksekte olacak şekilde yerleştirildi. İn vitro çözünme ortamları aletin cam kaplarına doldurudu. Tabletler çözünme ortamına atılarak ve yukarıda belirtilen koşullarda deneyler yapıldı. Belirli zaman aralıklarında çözünme ortamından 5 mL örnekler membran filtreden (0.45 µm) süzülerek alındı ve çekilen her örnek yerine aynı hacimde taze çözelti ortama ilave edildi. Alınan örneklerde spektrofotometrik olarak miktar tayini yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri çözünme hızı deneyleri öncesinde hesaplanan günlük standart

doğru denklemleri yardımıyla derişime çevrildi ve % çözünen levofloksasin miktarları saptanarak zamana karşı grafiğe geçirildi.

3.2.4. Flurbiprofen

3.2.4.1. Partikül Büyüklüğü

Laser-X Diffraction Particle Sizer aletinin ölçüm bölmesine flurbiprofenin çözünmediği ortam olan distile su konuldu, daha sonra toz haldeki etkin madde bu ortama ilave edildi. Ölçüm işlemi üç kez tekrarlanarak elde edilen değerlerin X_{ort} ve SS değerleri hesaplandı.

3.2.4.2. UV Spektrumu

Flurbiprofen pH 1.2'de çözünmediğinden, in vitro çalışmalarda pH 1.2 kullanılmamıştır. Flurbiprofenin hazırlanan pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarında 10 µg/mL derişiminde çözeltileri hazırlandı. 200-800 nm arasında 1 cm'lik kuvartz küvetler kullanılarak, kör çözeltisine karşı spektrumları alındı ve λ_{maks} değerleri saptandı.

3.2.4.3. İn Vitro Çözünme Ortamlarında Yapılan Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Standart Doğrunun Hazırlanması

Flurbiprofenin çözünme hızı deneylerinde ve miktar tayininde kullanılmak üzere, pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF, SIF-FeSSIF ortamlarında standart doğruları ve standart doğru denklemleri bulundu. Bunun için flurbiprofenin 10 µg/mL derişimde hazırlanan stok çözeltilerinden uygun seyreltmeler yapılarak 2-10 µg/mL arasında standart çözeltileri hazırlandı. Önceden belirlenen λ_{maks}'da bu derişimlere karşılık gelen absorbans değerleri okundu. Çalışmalar üç paralel olacak şekilde tekrarlandı ve ortalama değerler hesaplandı. Flurbiprofenin

derişimine karşı ortalama absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve standart doğru denklemleri elde edildi

3.2.4.4. UV Spektrofotometre ile Miktar Tayini Yöntem Validasyonu

Kullanılan spektrofotometrik yöntemin güvenilirliğini kanıtlamak amacıyla yöntemin validasyonu pH 4.5 ve pH 6.8 ortamlarında gerçekleştirildi.

3.2.4.4.1. Doğruluk ve Geri Elde

Etkin madde miktarının % 80'ini, % 100'ünü ve % 120'sini kapsayan miktarlarda 3 ayrı derişimde geri elde çalışması yapıldı. 6 µg/mL derişimde hazırlanan flurbiprofen çözeltileri % 100 kabul edilerek hesaplanan miktardaki flurbiprofen çalışılan in vitro çözünme ortamlarında çözüldü ve spektrofotometrede absorbansları okundu. Çalışmalar üç paralel olacak şekilde tekrarlandı ve değerlerin ortalamaları hesaplandı. Standart doğru denkleminde bulunan absorbans değerleri yerine konularak derişimler saptandı. X_{ort}, SS ve %VK hesaplandı.

3.2.4.4.2. Tekrar Edilebilirlik

Flurbiprofenin standart doğru denklemini oluşturmak için 10 µg/mL'lik farklı çözelti stoklarından (pH 4.5 ve pH 6.8) alınan örneklerden her birinin spektrofotometrede ard arda 10 kez ölçülmesi ile absorbanslar elde edildi. Absorbanslara karşılık gelen X_{ort}, SS ve %VK değerleri hesaplandı. %VK'nın %1'den küçük olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir.

3.2.4.4.3. Özgünlük ve Seçicilik

Spektrofotometrik miktar tayini yönteminin sadece analiz edilen flurbiprofeni saptayabilmesi amacıyla etkin madde içermeyen çözeltilerin pH 4.5 ve pH 6.8'de, 200-800 nm arasındaki dalga boylarında spektrumları alındı.

3.2.4.4.4. Doğrusallık

Doğrusallık absorbans değerlerine karşılık gelen derişimlere EKKAR yöntemi uygulanarak regresyon doğrusunun saptanmasıyla gösterildi. Flurbiprofenin pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarında 10 µg/mL derişimde üçer adet stok çözeltisi hazırlandı. Her stok çözeltiden dokuz adet seyreltme yapılarak dokuz farklı derişimde (2-10 µg/mL) çözeltiler elde edildi. Her derişim ve bu derişime karşılık gelen absorbans değerleri EKKAR yöntemine göre değerlendirilip, her çözünme ortamı için standart doğru denklemi bulundu.

3.2.4.4.5. Stabilite

Etkin maddenin in vitro çözünme ortamlarındaki stabilitelerini incelemek amacıyla flurbiprofenin stabilitesi pH 4.5 ve pH 6.8'de incelendi. Bu amaçla etkin maddenin 10 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlanıp oda sıcaklığında (25˚C) ve 37˚C ± 0.5˚C'de 24 saat süreyle bekletildi ve 0, 5, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 480 ve 1440. dak'da örnekler alınarak absorbans değerleri okundu. Çalışmalar üç paralel olacak şekilde yapıldı. Absorbanslara karşılık gelen derişimler standart doğru denklemleri kullanılarak hesaplandı. Derişimlerin X_{ort} değerleri hesaplanarak değişiklik olup olmadığı saptandı.

3.2.4.5. Çözünürlük

Flurbiprofenin çözünürlüğünün belirlenmesi amacıyla çözünme ortamlarının (pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF) çözemeyeceği miktardaki flurbiprofen erlenlere aktarılarak üzerlerine belirli hacimdeki (50 mL) çözünme ortamları ilave edildi. Erlenler 37 ± 0.5˚C sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirildi magnetler yardımıyla karışması sağlandı. Belirli aralıklarda örnekler alındı. Alınan örnekler membran filtreden (0.45 µm) süzüldü ve uygun seyreltmeler yapıldıktan sonra spektrofotometrede absorbansları okundu. Standart doğru denkleminde yerine konularak elde edilen derişimler X_{ort}, SS ve %VK ile değerlendirildi. Student t testi uygulanarak ortalamalar arasında anlamlı fark olup olmadığı değerlendirildi.

Flurbiprofenin in vitro çözünme ortamlarındaki çözünürlüklerini değerlendirmek için D_o değerleri hesaplandı. D_o değerinin 1'den büyük veya küçük olmasına göre flurbiprofenin farklı çözünme ortamlarındaki çözünürlükleri değerlendirildi.

3.2.4.6. Tabletlerde Yapılan Kalite Denetimleri

Tabletlerde yapılan denetimlerde 100 mg dozda flurbiprofen içeren Ansaid® 100 mg Film Tablet (Pfizer) ve Maximus® 100 mg Film Tablet (Drogsan) kullanıldı. Tüm kontroller her iki tablet ile farmakopeye göre gerçekleştirildi.

3.2.4.6.1. Çap ve Kalınlık

Duyarlılığı 0.01 mm olan mikrometre ile 10 tabletin çap ve kalınlıkları ölçüldü. Değerler X_{ort}, SS ve %VK ile değerlendirildi.

3.2.4.6.2. Ağırlık Tekdüzeliği

Rastgele alınan 20 tabletin hepsi birden tartıldı ve X_{ort} değeri hesaplandı. Daha sonra tabletler teker teker tartıldı. Tablo 15'te verilen %SS'ye göre 20 tabletten iki tanesinin SS değeri A sütununda gösterilen değerden büyük olabilir, fakat 20 tabletten hiçbiri B sütununda gösterilen değerden fazla sapma göstermemelidir şeklinde değerlendirildi.

3.2.4.6.3. Sertlik

Rastgele alınan 10 tabletin sertliği, sertlik ölçüm cihazında newton (N) cinsinden belirlendi. Sonuçlar X_{ort}, SS ve %VK ile değerlendirildi.

3.2.4.6.4. Ufalanma- Aşınma

Ufalanma-aşınma deneyinde Roche fribilatörü kullanıldı. 20 tablet ile çalışıldı. Kullanılacak olan tabletlerin toplam ağırlığı saptanıp aletin döner silindirine konuldu. Alet, 25 devir/dak hızda 4 dak çalıştırıldı. Bu sürenin sonunda tabletler alındı ve yumuşak bir fırça yardımıyla üzerindeki toz temizlenip tekrar tartıldı. Tabletlerin ağırlık kaybı, toplam ağırlığın %1'inden fazla olmamalıdır.

3.2.4.6.5. Dağılma

Dağılma test aletinin altı sepetinin her birine birer tablet konuldu. 37℃'de pH 6.8 ortamına daldırılarak alet çalıştırıldı. Dağılma gerçekleştikten sonra, sepetler sıvıdan çıkartıldı. Saptanan dağılma sürelerinin X_{ort}, SS ve %VK değerleri hesaplandı.

3.2.4.6.6. Etkin Madde Miktar Tayini

Tabletlerde miktar tayini yapmak için 10 tablet toz haline getirildi. Toz karışımından bir tabletin ortalama ağırlığına eşit miktarda toz

tartıldı ve pH 6.8 ortamı ile gerekli seyreltmeler yapılarak spektrofotometrik miktar tayini yapıldı. Miktar tayini çalışmaları üç farklı stoktan üç paralel olacak şekilde tekrarlandı. X_{ort}, SS ve %VK değerleri hesaplandı.

3.2.4.7. İn Vitro Çözünme Hızı Deneyleri

Ansaid® 100 mg Film Tablet (Pfizer) ve Maximus® 100 mg Film Tablet (Drogsan) ile gerçekleştirilen çözünme hızı test koşulları Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 17. Ansaid® ve Maximus® tabletler ile gerçekleştirilen çözünme hızı test koşulları

Yöntem	Palet Yöntemi
Çözünme Ortamı	pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF- FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF
Ortam Hacmi	900 mL
Dalga Boyu	246 nm (pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, Kör FeSSIF ve FaSSIF) 248 nm (SIF-FaSSIF) 250 nm (SIF-FeSSIF ve FeSSIF)
Ortam Sıcaklığı	37˚C ± 0.5˚C
Tablet Sayısı	n=6 (pH 4.5 ve pH 6.8) n=3 (biyouyumlu ortamlar ve kör ortamlar)
Hız	50 rpm
Deney Süresi	60 dak
Örnek Alma Süreleri	5, 10, 15, 20, 30, 45 ve 60. dak

Paletler kabın tabanından 2.5 cm yüksekte olacak şekilde yerleştirildi. İn vitro çözünme ortamları aletin cam kaplarına dolduruldu. Tabletler çözünme ortamına atılarak ve yukarıda belirtilen koşullarda deneyler yapıldı. Belirli zaman aralıklarında çözünme ortamından 5 mL örnekler membran filtreden (0.45 µm) süzülerek alındı ve çekilen her örnek

yerine aynı hacimde taze çözelti ortama ilave edildi. Alınan örneklerde spektrofotometrik olarak miktar tayini yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri çözünme hızı deneyleri öncesinde hesaplanan günlük standart doğru denklemleri yardımıyla derişime çevrildi ve yüzde çözünen levofloksasin miktarları saptanarak zamana karşı grafiğe geçirildi.

3.2.5. Hücre Kültürü Sistemleri ile İlgili Çalışmalar

3.2.5.1. Caco-2 Hücrelerinin Üretilmesi*

Çalışmada Caco-2 insan kolon kanser hücre kültürü kullanıldı. Hücreler saklama ortamları olan –196°C'den çıkarılarak 37°C'deki su banyosunda kısa sürede çözdürüldü ve 800 rpm'de 5 dak santrifüj işleminden sonra, içinde % 10 fötal sığır serumu (FBS) olan Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besi ortamı ile T25 cm^2 hücre kültürü üretme kabına alındı ve 37ºC, % 5 CO_2'li etüve kaldırıldı. Logaritmik üreme fazında olan, aktif ve yüzeyi % 90-95 oranında kaplamış hücreler tripsin/EDTA [Etilendiamin tetraasetik asit] (% 0.05 / % 0.02) çözeltisi ile yıkanarak tripsinize edildi ve 37°C'deki inkübatörde yaklaşık 5-10 dak bekletildi. Bu süre sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak incelenen hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldıkları gözlendi. Yüzeyden ayrılan hücreler % 10 serum içeren DMEM besi ortamı ile 5 dak 800 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra platedeki hücreler tekrar, önceden sıcaklığı 37°C'ye getirilmiş % 10 serum ve % 1 antibiyotikli DMEM besi ortamı ile homojenize edildi ve hücre süspansiyonu üç adet T25 kültür kabına bölünerek hücre pasajlama işlemi tamamlanmış olup, bu şekilde üç seri pasaj yapıldı.

---

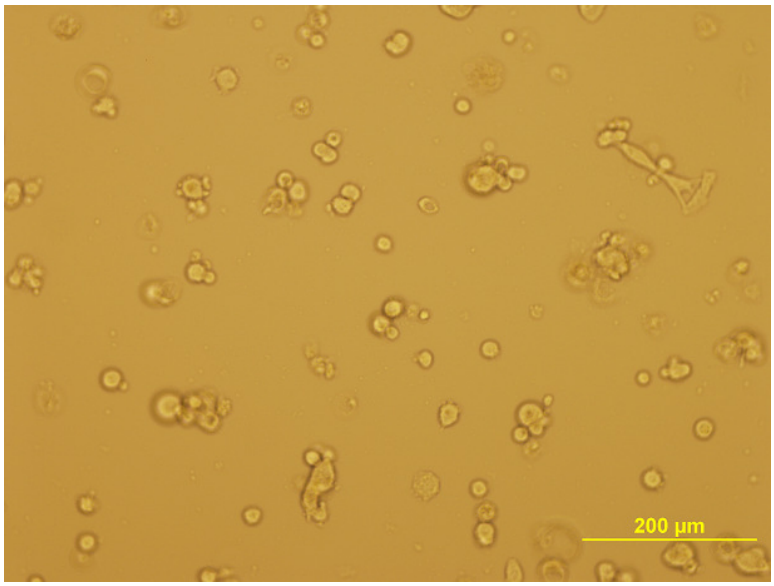
*MTT testleri ve hücrelerin üretimi ŞAP Enstitüsünde yapılmıştır. Yardımlarından dolayı Sayın Uzm.Biyolog Şükran Yılmaz'a teşekkür ederiz.

3.2.5.2. Caco-2 Hücrelerinin Kuyucuklara Aktarılması*

Logaritmik üreme fazında olan, aktif ve yüzeyi %90-95 oranında kaplamış hücreler pasajlama işleminde olduğu gibi kültür kabı yüzeyinden ayrıldı ve serumlu besi ortamı ile hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücre sayımı için 0.9 mL hücre süspansiyonu üzerine 0.1 mL tripan mavisi çözeltisi ilave edildi ve hemasitometre kullanılarak ışık mikroskobunda hücre sayımı yapıldı, aynı zamanda hücre canlılığı da kontrol edildi. 96 gözlü hücre üretme kapları için istenilen yoğunluktaki hücre sayısı hesaplandı ve bu sayımdaki hücre %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM besi ortamı ile homojenize edilerek mL'de 4×10^4 hücre/mL olacak şekilde bir hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu hücre süspansiyonu 96 gözlü hücre üretme kaplarına 100 µL/kuyucuk olacak şekilde taksim edildi ve %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda 96 gözlü hücre üretme kaplarındaki hücreler inverted doku kültürü mikroskobunda üremeleri ve ortamın sterilitesi kontrol edildi. MTT testi sırasında Caco-2 hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüleri Şekil 11'de verilmiştir. Daha sonra kültür ortamındaki DMEM besi ortamı aspire edilerek uzaklaştırıldı ve yerine önceden hazırlanmış ve +4°C'de muhafaza edilen besi ortamları 100 mL/kuyucuk olarak taksim edildi ve yine % 5 CO_2'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra MTT testi işlemine geçildi.

---

*MTT testleri ve hücrelerin üretimi ŞAP Enstitüsünde yapılmıştır. Yardımlarından dolayı Sayın Uzm.Biyolog Şükran Yılmaz'a teşekkür ederiz.

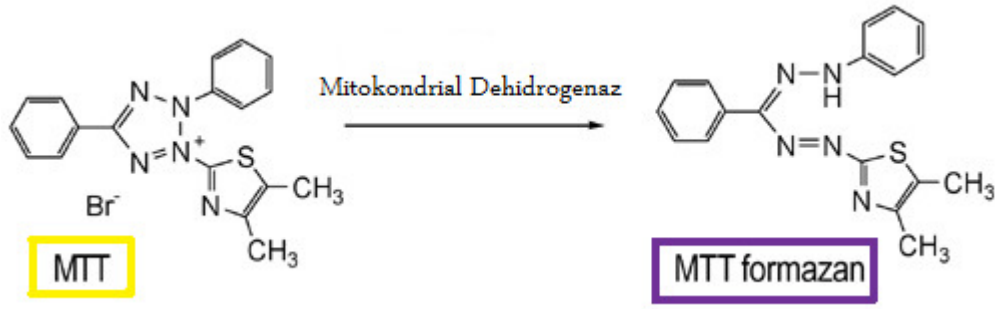


Şekil 11. MTT testi sırasında Caco-2 hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü

3.2.5.3. MTT Testi (Sitotoksisite Analizi)

Hücre kültürü çalışmaları yapılmadan önce ilaçların sitotoksisite testlerinin yapılması permeabilite çalışmalarını yönlendirmektedir. Sitotoksisite çalışmaları, canlı hücrelerdeki NADPH ile Cell Titer 96®'nin reaksiyonu ile kolorimetrik olarak, laktat dehidrogenaz aktivitesi, nötral kırmızısı ile spektrofotometrik analiz, DNA-propidium iyodid boyama analizi, WST-1 analiz metodu, kaspaz-3 aktivitesi ile, sulforodamin B ve 3H-timidin analizi, tripan mavisi veya eritrosin B ile boyanarak hematositometre ile hücrelerin sayımı, akridin oranj ile hücrelerin boyanmasından sonra floresans mikroskobu ile incelenme, MTT ([3-(4,5–dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] gibi yöntemlerle yapılabilmektedir. Bu yöntemler arasında en çok kullanılan yöntem MTT testidir. Sitotoksisite, hücre canlılığı ve yaşayan hücrelerin çoğalmasının

analizi için geniş ölçüde kullanılmaktadır. Kolorimetrik bir yöntemdir ve sarı tetrazolyum tuzu MTT'nin yaşayan hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile mor formazan boyasına redüksiyonuna dayanmaktadır(Şekil 12).



Şekil 12. MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi

Çalışmada MTT, fenol kırmızısı içermeyen RPMI 164O besi ortamı ile karıştırılarak, homojenize edildi ve final konsantrasyonu 5 mg/mL olan MTT çözeltisi hazırlandı.

MTT testi, sodyum taurokolat ve lesitin içeren biyouyumlu ortamların (FaSSIF ve FeSSIF) ve SIF Powder® ile hazırlanan ortamların (SIF-FaSSIF ve SIF-FeSSIF) Caco-2 hücrelerinde kullanılmasının hücreler üzerinde toksik etki oluşturup oluşturmayacağını araştırmak için uygulandı. MTT testinde biyouyumlu ortamların haricinde, levofloksasin ve flurbiprofenin bu ortamlardaki 100 µM ve 500 µM derişimdeki çözeltilerinin sitotoksisitesi de incelendi. Etkin maddeleri içermeyen ortamlar ve etkin maddeleri içeren ortamların tümü 0.22 µm'lik membran filtreden süzülerek sterilize edildi.

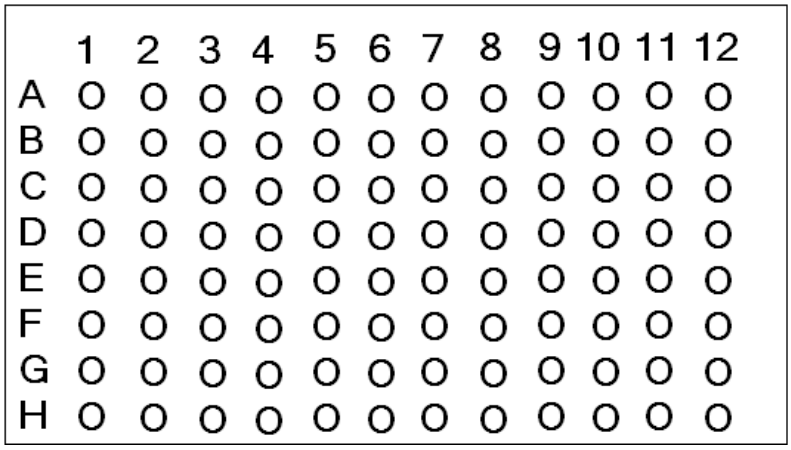
Daha önceden 24 saat inkübasyona bırakılan 96 gözlü hücre kültürü kapları inkübasyon sonrası besi ortamları boşaltılarak yerlerine hazırlanan kör çözünme ortamları, biyouyumlu ortamlar ve etkin maddeleri

içeren ortamlar 100 µL/kuyucuk olarak taksim edildi. % 5 CO_2'li inkübatörde 1 saat ve 24 saatlik inkübasyonlara bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda 1 saat ve 24 saat bekletilen 96 gözlü hücre üretme test ortamları uzaklaştırıldı ve hücre üretme kaplarına 100µL/kuyucuk olacak şekilde DMEM besi ortamı ve 13 µL/kuyucuk MTT çözeltisi konuldu. Kültür kapları alüminyum folyoya sarılarak CO_2'li etüvde 37℃'de 3 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası MTT çözeltisi aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. 96 gözlü hücre üretme kaplarına izopropil alkol 100 µL/kuyucuk olarak konulup oluşan formazonun optik yoğunluğu spektrofotometrede 570 nm'de belirlendi. Test ortamlarının hazırlanışından bu aşamaya kadar olan deneyler üç kez tekrarlandı. Derişime karşı ortalama absorbans ve derişime karşı % canlılık değerleri grafiğe geçirildi. 1 ve 24 saatlik deneyler sonunda her ortam için canlı kalan hücre sayıları karşılaştırıldı.

MTT Testleri üç paralel gerçekleştirilmiştir ve her grup için üçer plate olmak üzere toplam dokuz platetten 24 kuyucuk kullanılmıştır(Şekil 13)

.



Şekil 13. MTT Testi için kullanılan 96 kuyucuklu hücre kültür kabı

İn vitro çözünme ortamları için MTT testi deney tasarımı Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tablo 18. MTT Testi deney tasarımı

Konum	Plate 1 (n=24)	Plate 2 (n=24)	Plate 3 (n=24)
A1-H1	Hücre Kontrol	SIF-FeSSIF + 100 µM Levofloksasin	SIF-FeSSIF + 100 µM Flurbiprofen
A2-H2	Kör FaSSIF	Kör FaSSIF + 500 µM Levofloksasin	Kör FaSSIF + 500 µM Flurbiprofen
A3-H3	FaSSIF	FaSSIF + 500 µM Levofloksasin	FaSSIF + 500 µM Flurbiprofen
A4-H4	SIF-FaSSIF	SIF-FaSSIF + 500 µM Levofloksasin	SIF-FaSSIF + 500 µM Flurbiprofen
A5-H5	Kör FeSSIF	Kör FeSSIF + 500 µM Levofloksasin	Kör FeSSIF + 500 µM Flurbiprofen
A6-H6	FeSSIF	FeSSIF + 500 µM Levofloksasin	FeSSIF + 500 µM Flurbiprofen
A7-H7	SIF-FeSSIF	SIF-FeSSIF + 500 µM Levofloksasin	SIF-FaSSIF + 500 µM Flurbiprofen
A8-H8	Kör FaSSIF + 100 µM Levofloksasin	Kör FaSSIF + 100 µM Flurbiprofen	Serumlu DMEM
A9-H9	FaSSIF + 100 µM Levofloksasin	FaSSIF + 100 µM Flurbiprofen	Serumlu DMEM
A10-H10	SIF-FaSSIF + 100 µM Levofloksasin	SIF-FaSSIF + 100 µM Flurbiprofen	Hücre Kontrol
A11-H11	Kör FeSSIF + 100 µM Levofloksasin	Kör FeSSIF + 100 µM Flurbiprofen	Hücre Kontrol
A12-H12	FeSSIF + 100 µM Levofloksasin	FeSSIF + 100 µM Flurbiprofen	Hücre Kontrol

Hücrelerin % canlılık değerleri hücre kontrol grubu olan serumlu DMEM ve serumsuz DMEM absorbansları %100 kabul edilerek (Test absorbansı/Hücre kontrol absorbansı)x100 şeklinde hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. İn Vitro Çözünme Ortamlarda Yapılan Çalışmalar

4.1.1. Yüzey Gerilimi

Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı şekilde Du Nouy tensiyometresi kullanılarak gerçekleştirilen yüzey gerilimi ölçüm sonuçları Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19. İn vitro çözünme ortamlarının ortalama yüzey gerilimi değerleri

Ortam	Ortalama Yüzey Gerilimi (mN/m)	SS	% VK
pH 1.2	56.1	0.2	0.309
pH 4.5	58.1	1.3	2.29
pH 6.8	63.3	0.5	0.746
Kör FaSSIF[a]	48.9	0.2	0.354
FaSSIF[b]	41.2	0.3	0.610
SIF-FaSSIF	45.2	0.3	0.639
Kör FeSSIF[c]	44.9	0.3	0.561
FeSSIF[d]	38.7	1.0	2.62
SIF-FeSSIF	41.2	0.8	1.98

[a] Kör FaSSIF-FaSSIF: %95 olasılıkla anlamlı fark ($p<0.05$)
[b] FaSSIF-SIF FaSSIF: %95 olasılıkla anlamlı fark ($p<0.05$)
[c] Kör FeSSIF-FeSSIF: %95 olasılıkla anlamlı fark ($p<0.05$)
[d] FeSSIF-SIF FeSSIF: %95 olasılıkla anlamlı fark ($p<0.05$)

4.1.2. Viskozite

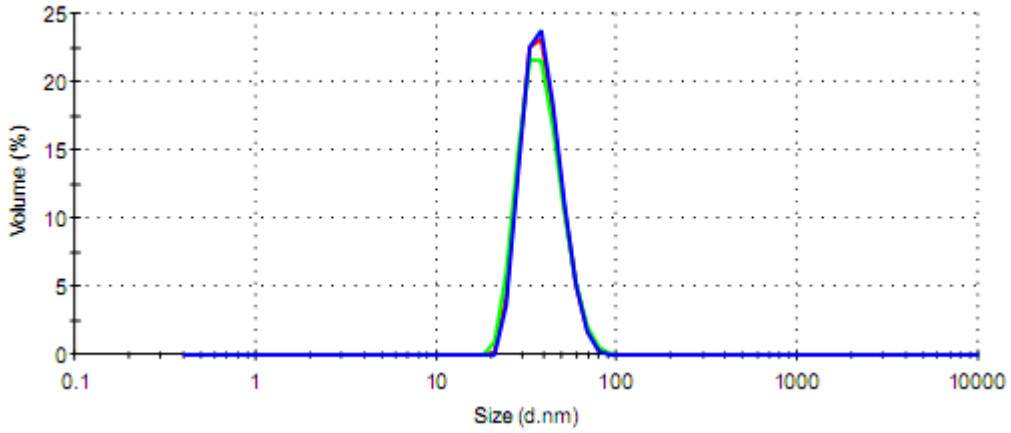
İn vitro ortamların viskozitesi Brookfield viskozimetresi kullanılarak Bölüm 3.2.2.2.'de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür. Viskozite sonuçları Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. İn vitro çözünme ortamlarının viskozite değerleri

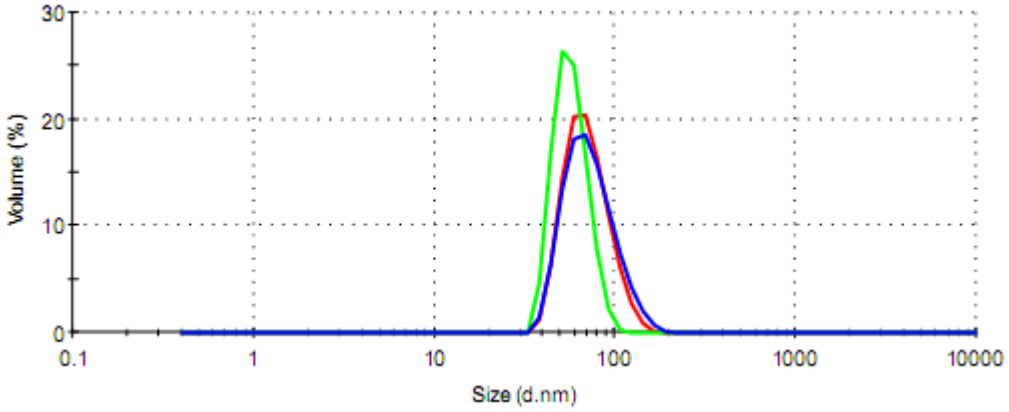
Ortam	Viskozite (mPas)
pH 1.2	0.980
pH 4.5	1.14
pH 6.8	1.14
Kör FaSSIF	1.14
FaSSIF	1.72
SIF-FaSSIF	1.14
Kör FeSSIF	1.06
FeSSIF	1.72
SIF-FeSSIF	1.39

4.1.3. Bioyuyumlu Ortamlardaki Misel Büyüklüğü

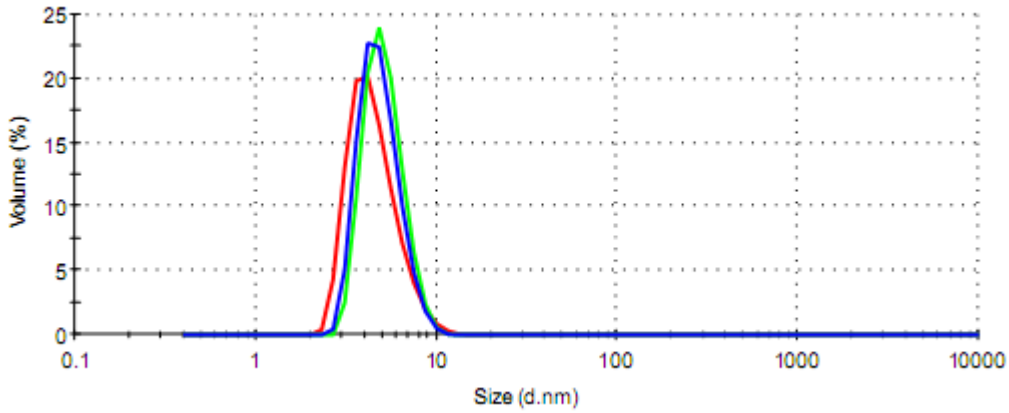
Biyouyumlu ortamlarda Malvern partikül büyüklüğü ölçüm aleti kullanılarak elde edilen sonuçlar Şekil 14 ve Tablo 21'de verilmiştir.



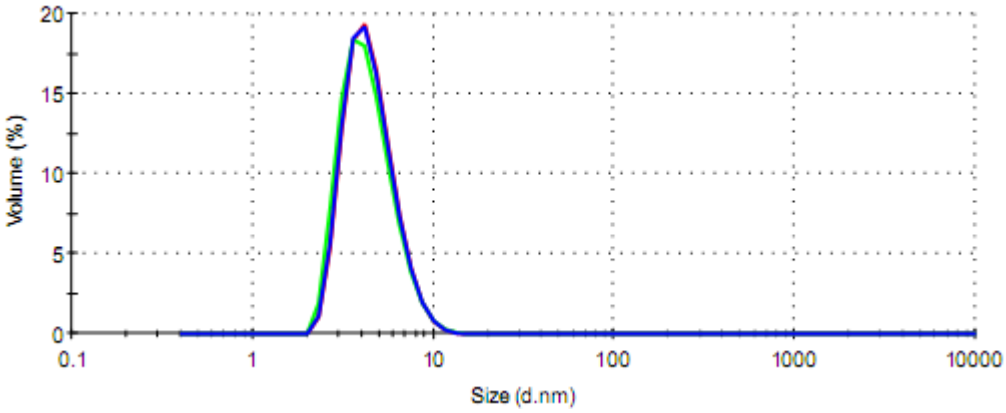
Şekil 14a. FaSSIF ortamına ait misel boyutları



Şekil 14b. SIF-FaSSIF ortamına ait misel boyutları



Şekil 14c. FeSSIF ortamına ait misel boyutları



Şekil 14d. SIF-FeSSIF ortamına ait misel boyutları

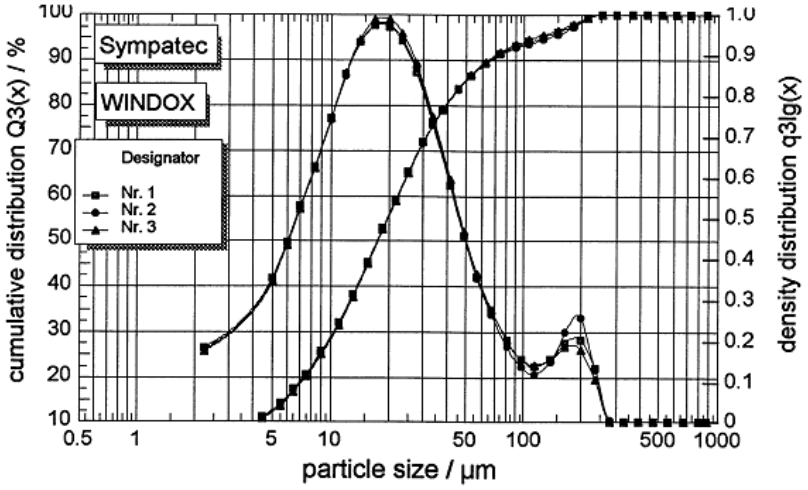
Tablo 21. İn vitro çözünme ortamlarında oluşan misel büyüklükleri

Biyouyumlu Ortam	Ortalama Misel Büyüklüğü (nm)	SS	% VK
FaSSIF	39.0	0.3	0.646
SIF-FaSSIF	67.2	8.9	13.3
FeSSIF	4.92	0.30	6.01
SIF-FeSSIF	4.55	0.07	1.54

4.2. Levofloksasin

4.2.1. Partikül Büyüklüğü

Bölüm 3.2.3.1'de anlatıldığı şekilde Lazer X Diffraction Particle Sizer aletinde yapılan ölçümler sonucu levofloksasinin partikül büyüklüğü 17.6 ± 0.6 µm olarak bulundu. Partikül büyüklüğü dağılımına ilişkin grafik Şekil 15'te verilmiştir.



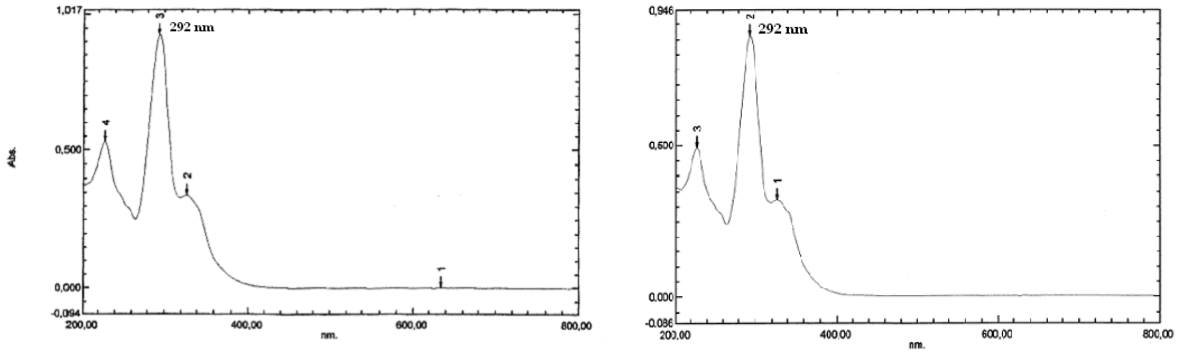
Şekil 15. Levofloksasinin partikül büyüklüğü ve dağılımı

4.2.2. UV Spektrumu

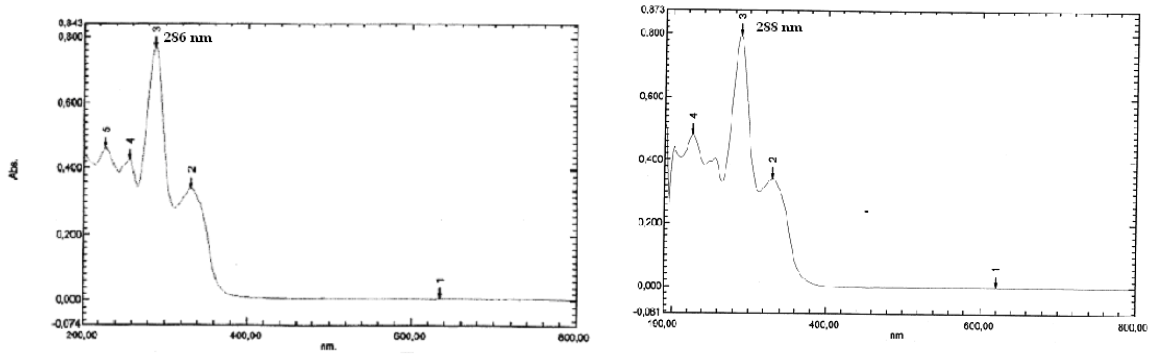
Levofloksasinin hazırlanan pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarındaki UV spektrumları Şekil 16'da ve levofloksasinin λ_{maks} değerleri Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22. Levofloksasinin maksimum absorbans verdiği λ_{maks} değerleri

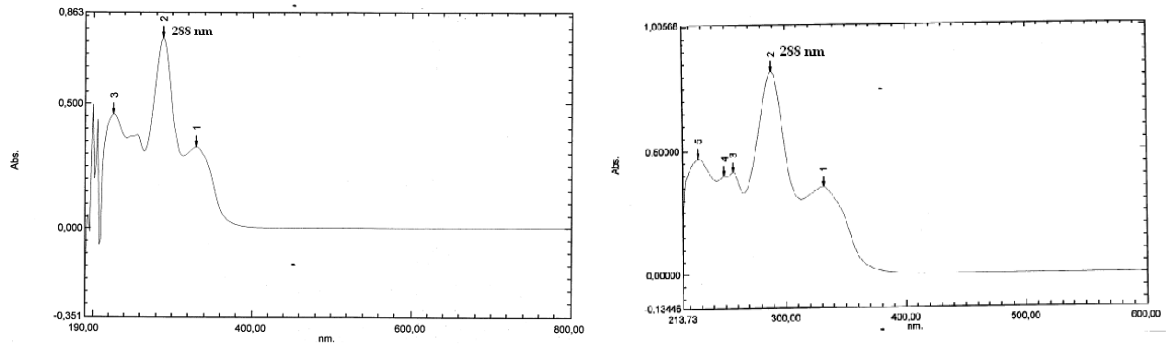
Çözünme Ortamı	**λ_{maks} (nm)**
pH 1.2	292
pH 4.5	292
pH 6.8	286
Kör FaSSIF (pH 6.5)	288
FaSSIF (pH 6.5)	288
SIF-FaSSIF (pH 6.5)	288
Kör FeSSIF (pH 5.0)	292
FeSSIF (pH 5.0)	294
SIF-FeSSIF (pH 5.0)	294



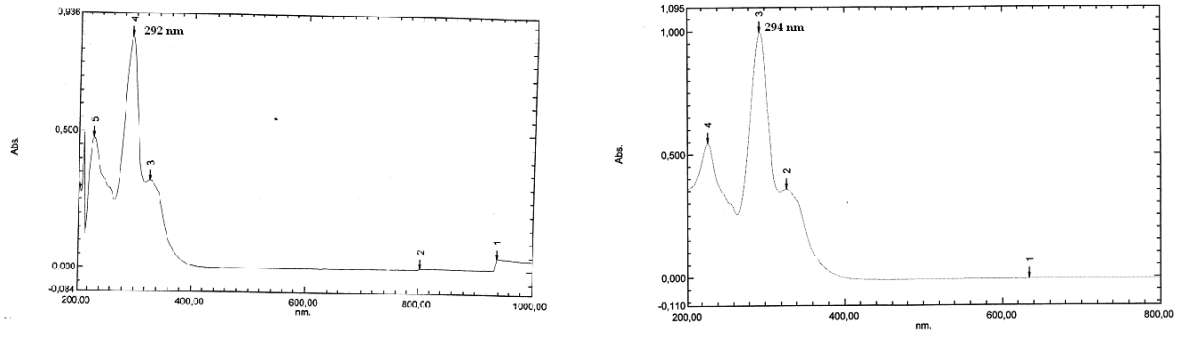
Şekil 16a,b. Levofloksasinin pH 1.2 ve pH 4.5 çözünme ortamlarındaki UV spektrumları



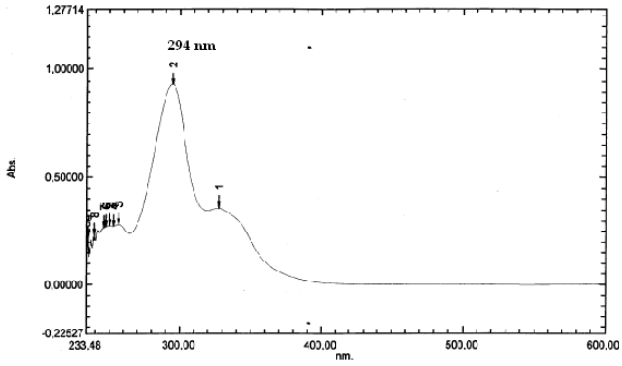
Şekil 16c,d. Levofloksasinin pH 6.8 ve Kör FaSSIF çözünme ortamlarındaki UV spektrumları



Şekil 16e,f. Levofloksasinin FaSSIF ve SIF-FaSSIF çözünme ortamlarındaki UV spektrumları



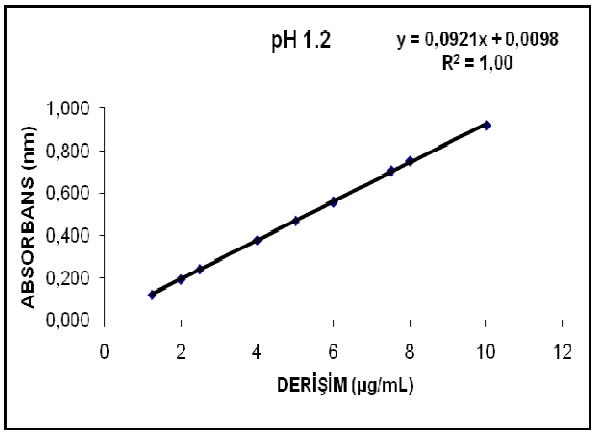
Şekil 16g,h. Levofloksasinin Kör FeSSIF ve FeSSIF çözünme ortamlarındaki UV spektrumları

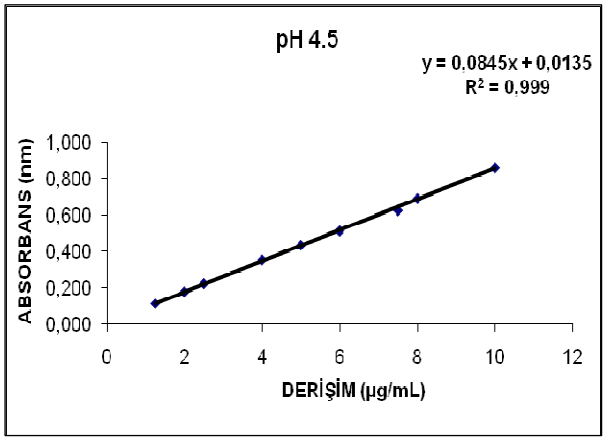


Şekil 16i. Levofloksasinin SIF-FeSSIF çözünme ortamındaki UV spektrumu

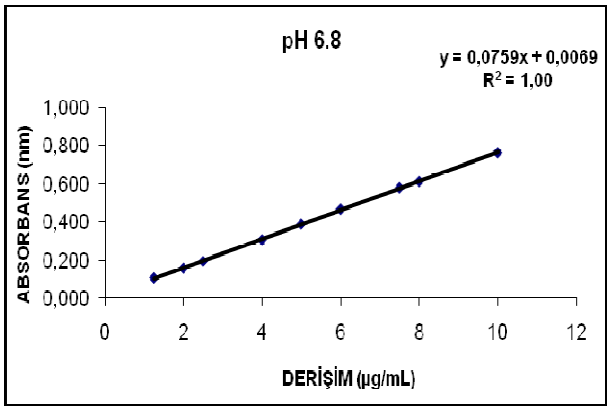
4.2.3. İn Vitro Çözünme Ortamlarındaki Standart Doğrulara Ait Bulgular

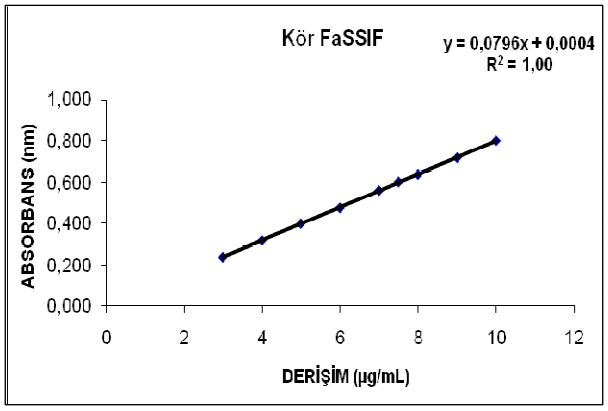
Levofloksasinin standart doğrularının hazırlanması bölüm 3.2.3.2'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Şekil 17'de levofloksasinin değişik çözünme ortamlarındaki standart doğruları görülmektedir. Standart doğrulara ait parametreler ve uyum ölçütleri Tablo 23'te gösterilmiştir.



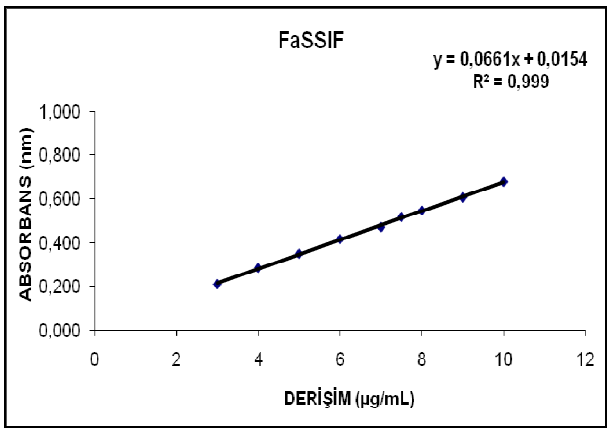


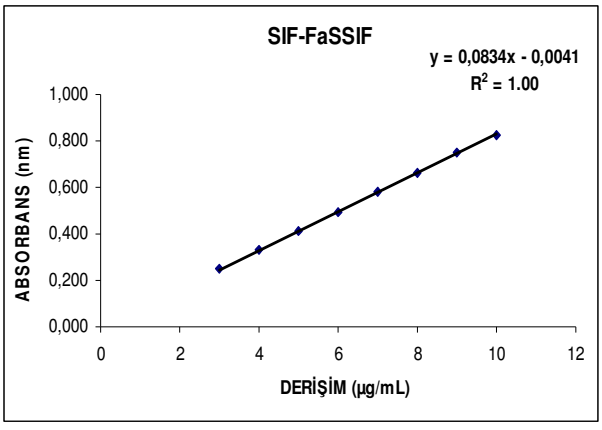
Şekil 17a,b. Levofloksasinin pH 1.2 ve pH 4.5 çözünme ortamlarındaki standart doğruları



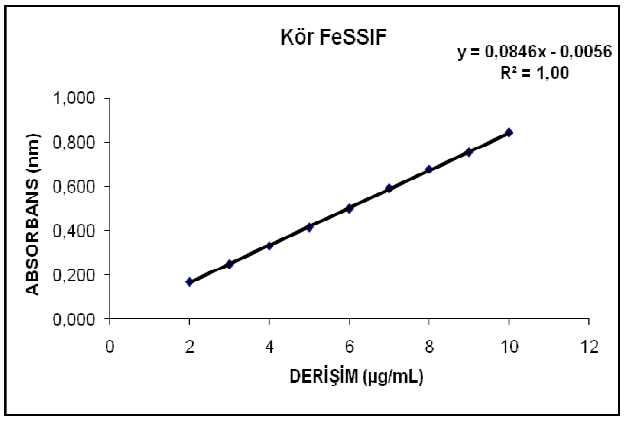


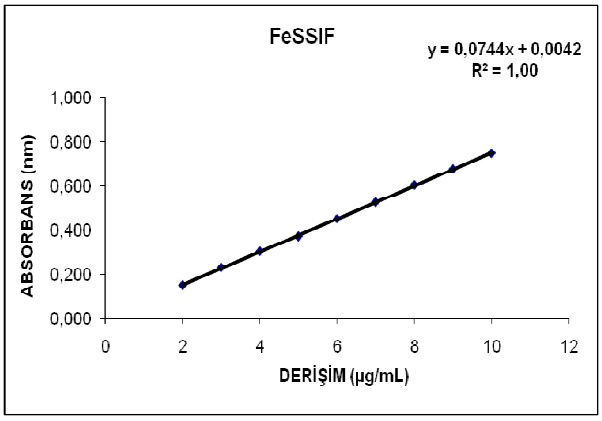
Şekil 17c,d. Levofloksasinin pH 6.8 ve Kör FaSSIF çözünme ortamlarındaki standart doğruları



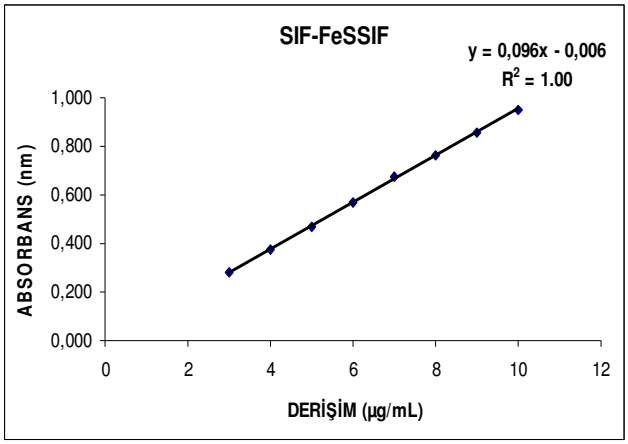


Şekil 17e,f. Levofloksasinin FaSSIF ve SIF-FaSSIF çözünme ortamlarındaki standart doğruları





Şekil 17g,h. Levofloksasinin Kör FeSSIF ve FeSSIF çözünme ortamlarındaki standart doğruları



Şekil 17i. Levofloksasinin SIF-FeSSIF çözünme ortamındaki standart doğrusu

Tablo 23. Levofloksasinin çözünme ortamlarındaki standart doğrularına ait parametreler ve uyum ölçütleri

İn Vitro Çözünme Ortamı	Eğim ± GA	Kesişim ± GA	Determinasyon Katsayısı (R^2)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)	Ağırlıklı Sapma Kareleri Toplamı (ASKT)	Kare Ağırlıklı Sapma Kareleri Toplamı (KASKT)	AKAIKE Bilgi Ölçütü (AIC)
pH 1.2	0.0921 ± 0.0011	0.00980 ± 0.0065	1.00	0.000492	0.000901	0.00264	-64.6
pH 4.5	0.0845 ± 0.0018	0.0135 ± 0.0104	0.999	0.000465	0.00111	0.00399	-65.1
pH 6.8	0.0759 ± 0.0008	0.00690 ± 0.0045	1.00	0.000778	0.00416	0.0288	-60.4
Kör FaSSIF	0.0796 ± 0.0015	0.000400 ± 0.0102	1.00	0.0000320	0.0000560	0.000103	- 89.1
FaSSIF	0.0661 ± 0.0015	0.0154 ± 0.0103	0.999	0.000182	0.000494	0.00153	-73.5
SIF-FaSSIF	0.0834 ± 0.0008	0.00410 ± 0.0053	1.00	0.0000931	0.000186	0.000459	-79.5
Kör FeSSIF	0.0846 ± 0.0010	0.00560 ± 0.0062	1.00	0.000107	0.000296	0.00113	-78.3
FeSSIF	0.0744 ± 0.0008	0.00420 ± 0.0051	1.00	0.000682	0.00191	0.00678	-61.6
SIF-FeSSIF	0.00960 ± 0.0011	0.00600 ± 0.0073	1.00	0.000177	0.000282	0.000479	-73.8

4.2.4. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yöntem Validasyonu

4.2.4.1. Doğruluk ve Geri Elde

Bölüm 3.2.3.4.1'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Levofloksasinin her ortam için geri elde sonuçları Tablo 24'te gösterilmiştir.

Tablo 24a. pH 1.2 için levofloksasinin geri eldesi

Derişim (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)	% Geri Elde	X_{ort}	SS	%VK
4	3.61	90.3	91.0	0.0	0.845
4	3.67	91.8			
4	3.64	91.0			
5	4.49	89.8	91.0	0.0	0.712
5	4.51	90.1			
5	4.55	91.0			
6	5.50	91.7	94.5	0.1	1.66
6	5.52	92.0			
6	5.67	94.5			

Tablo 24b. pH 4.5 için levofloksasinin geri eldesi

Derişim (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)	% Geri Elde	X_{ort}	SS	%VK
4	4.17	104	103	0	0.764
4	4.14	104			
4	4.11	103			
5	5.23	104	104	0	0.443
5	5.19	104			
5	5.23	104			
6	6.25	104	104	0	0.660
6	6.30	105			
6	6.34	105			

Tablo 24c. pH 6.8 için levofloksasinin geri eldesi

Derişim (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)	% Geri Elde	X_{ort}	SS	%VK
4	4.06	101	101	0	1.12
4	4.08	103			
4	4.04	102			
5	5.13	102	102	0	0.352
5	5.09	102			
5	5.11	101			
6	6.14	101	102	0	0.354
6	6.09	102			
6	6.10	101			

4.2.4.2. Tekrar Edilebilirlik

Levofloksasine ait tekrarlanabilirlik sonuçları kullanılan çözünme ortamları için Tablo 25'te verilmiştir.

Tablo 25a. pH 1.2'de levfloksasinin tekrarlanabilirlik sonuçları

Örnek	Derişimi (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)
1	10	10.5
2	10	10.5
3	10	10.6
4	10	10.4
5	10	10.5
6	10	10.6
7	10	10.5
8	10	10.5
9	10	10.4
10	10	10.5
X_{ort}		**10.5**
SS		**0.1**
%VK		**0.498**

Tablo 25b. pH 4.5'te levofloksasinin tekrarlanabilirlik sonuçları

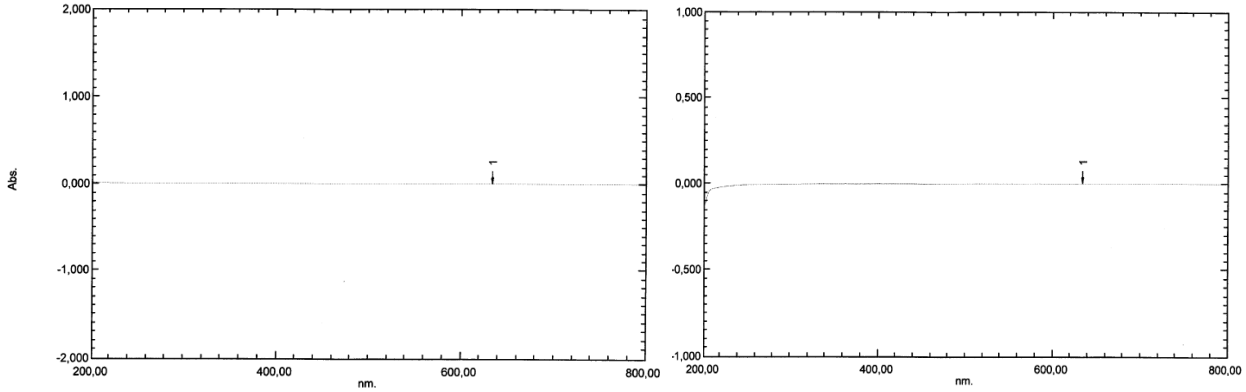
Örnek	Derişimi (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)
1	10	10.8
2	10	10.8
3	10	11.1
4	10	10.9
5	10	10.9
6	10	10.9
7	10	10.9
8	10	11.0
9	10	10.8
10	10	10.8
X_{ort}		**10.9**
SS		**0.1**
%VK		**0.697**

Tablo 25c. pH 6.8'de levofloksasinin tekrarlanabilirlik sonuçları

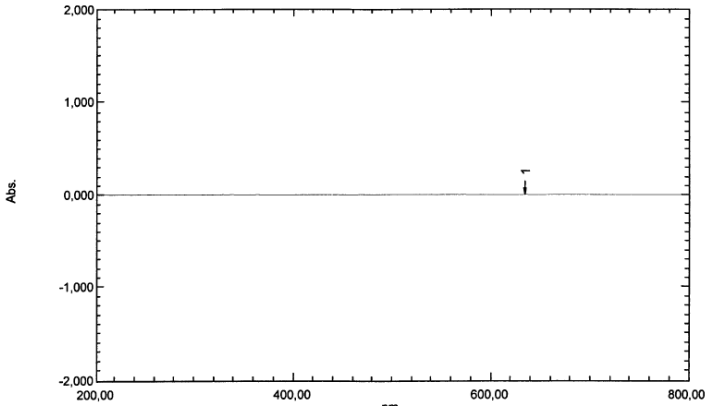
Örnek	Derişimi (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)
1	10	11.0
2	10	11.0
3	10	11.0
4	10	10.9
5	10	10.9
6	10	10.9
7	10	10.9
8	10	10.9
9	10	11.0
10	10	11.0
X_{ort}		**10.9**
SS		**0.0**
%VK		**0.303**

4.2.4.3. Özgünlük ve Seçicilik

Spektrofotometrik miktar tayini yönteminin sadece levofoksasini saptayabilmesi için etkin madde içermeyen üç farklı pH'daki çözeltinin (pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8) spektrumları 200-800 nm dalga boyları arasında incelendi. Elde edilen spektrumlar 10 µg/mL etkin madde içeren pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8 çözünme ortamlarından elde edilen spektrumlarla karşılaştırıldı.



Şekil 18a,b. Levofloksasin için pH 1.2 ve pH 4.5'te özgünlük - seçicilik



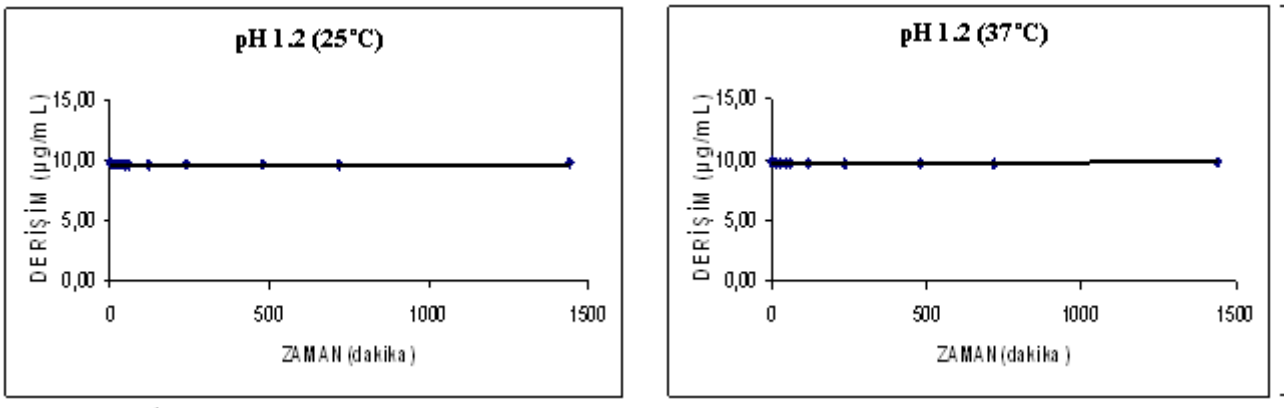
Şekil 18c. Levofloksasin için pH 6.8'de özgünlük - seçicilik

4.2.4.4. Doğrusallık

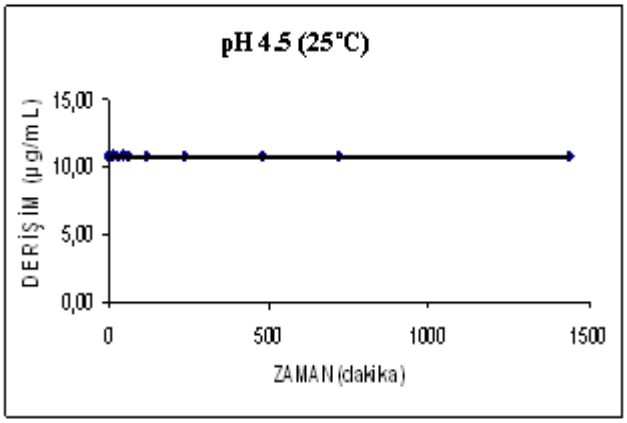
Doğrusallık değerlendirmeleri bölüm 3.2.3.4.4'te anlatıldığı şekilde farklı çözünme ortamlarında gerçekleştirildi. Sonuçların değerlendirilmesinde derişime karşı, ölçülen absorbans değerleri grafiklendi. Doğrusal regresyonlar yapıldı ve standart doğru denklemleri bulundu. Bu denklemlerin R^2 değerleri hesaplandı. Söz konusu derişim aralığında bulunan standart doğru denklemlerin doğrusallıkları incelendi(Şekil 17).

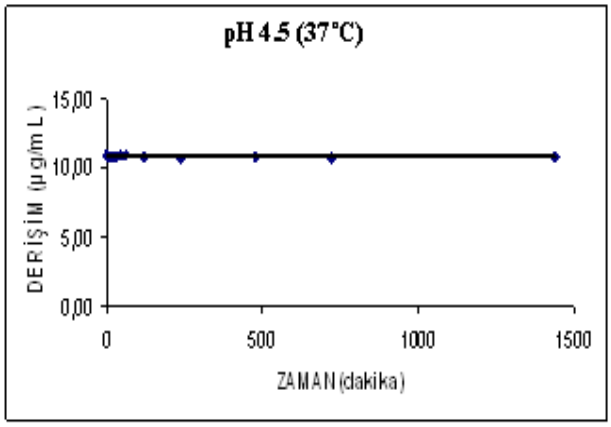
4.2.4.5. Stabilite

Levofloksasinin üç farklı pH'daki çözünme ortamında (pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8) stabilitelerinin incelenmesi amacıyla, bölüm 3.2.3.3.5'te anlatıldığı şekilde oda sıcaklığında (25˚C) ve 37˚C'de stabilite deneyleri yapıldı. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede okundu. Bu değerler standart doğru denklemlerinde yerine konularak derişimler hesaplandı. Derişim değerlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenip gözlenmediği saptandı. Şekil 19'da üç farklı çözünme ortamında 24 saat süreyle izlenen zamana karşılık ortalama derişim grafikleri görülmektedir.

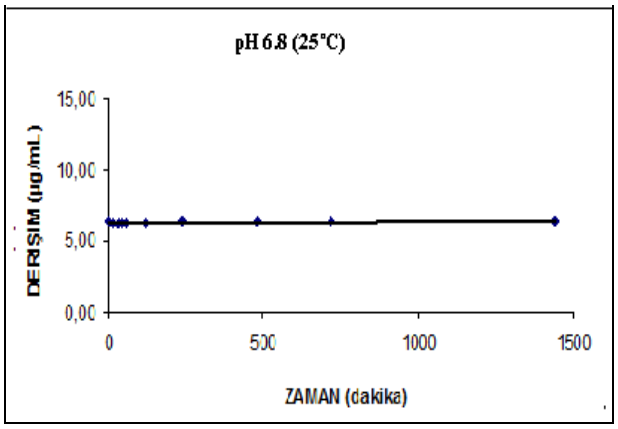


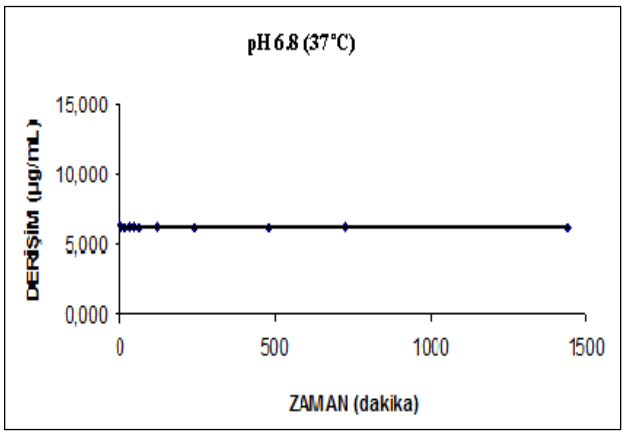
Şekil 19a,b. Levofloksasinin pH 1.2'de 25˚C ve 37˚C'deki stabilitesi





Şekil 19c,d. Levofloksasinin pH 4.5'te 25˚C ve 37˚C'deki stabilitesi





Şekil 19e,f. Levofloksasinin pH 6.8'de 25˚C ve 37˚C'deki stabilitesi

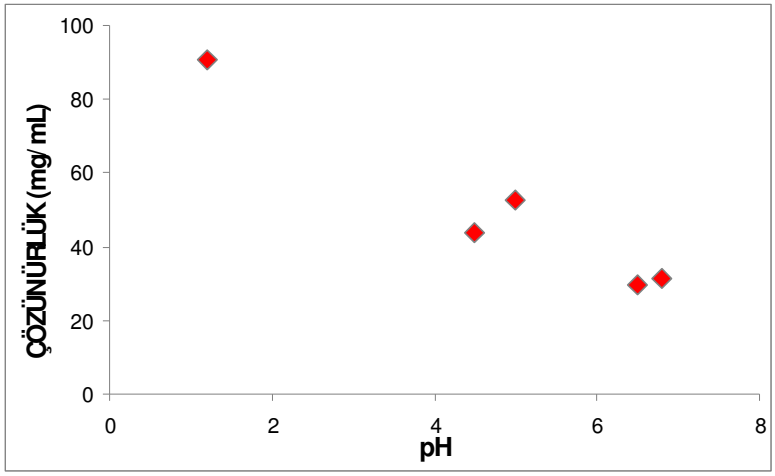
4.2.5. Çözünürlük

Bölüm 3.2.3.5'te anlatıldığı şekilde farklı çözünme ortamlarında yapılan çözünürlük sonuçları ve hesaplanan D_0 değerleri Tablo 26'da verilmiştir. Levofloksasine ait pH-çözünürlük profili de Şekil 20'de gösterilmiştir.

Tablo 26. Levofloksasinin çözünürlük ve D_0 değerleri

Çözünme Ortamı	Çözünürlük (mg/mL) ± SS	D_0 ± SS
pH 1.2	90.5 ± 1.3	0.0221 ± 0.0003
pH 4.5	43.9 ± 0.3	0.0456 ± 0.0003
pH 6.8	31.5 ± 0.1	0.0635 ± 0.0001
Kör FaSSIF[a]	29.5 ± 0.0	0.0679 ± 0.0001
FaSSIF[b]	37.0 ± 0.3	0.0540 ± 0.0004
SIF-FaSSIF	98.4 ± 0.1	0.0203 ± 0.0000
Kör FeSSIF[c]	52.5 ± 0.1	0.0380 ± 0.0001
FeSSIF[d]	67.8 ± 0.2	0.0295 ± 0.0000
SIF-FeSSIF	142 ± 0	0.0141 ± 0.0000

[a] Kör FaSSIF-FaSSIF: %95 olasılıkla anlamlı fark($p<0.05$)
[b] FaSSIF-SIF FaSSIF: %95 olasılıkla anlamlı fark($p<0.05$)
[c] Kör FeSSIF-FeSSIF: %95 olasılıkla anlamlı fark($p<0.05$)
[d] FeSSIF-SIF FeSSIF: %95 olasılıkla anlamlı fark($p<0.05$)



Şekil 20. Levofloksasinin pH-çözünürlük profili

4.2.6. Tabletlerde Yapılan Kalite Denetimleri

4.2.6.1. Çap ve Kalınlık

Bölüm 3.2.3.6.1'de anlatıldığı şekilde ölçülen tabletlerin boyutları Tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 27. Tavanic® tabletlerin boyutları

Tablet No	Uzunluk (cm)	Genişlik (cm)	Kalınlık (cm)
1	0.510	0.820	1.62
2	0.510	0.810	1.61
3	0.510	0.810	1.61
4	0.520	0.820	1.62
5	0.510	0.810	1.62
6	0.510	0.810	1.62
7	0.510	0.820	1.61
8	0.520	0.810	1.62
9	0.510	0.810	1.61
10	0.510	0.810	1.62
X_{ort}	**0.512**	**0.813**	**1.62**
SS	**0.004**	**0.005**	**0.01**
%VK	**0.824**	**0.594**	**0.320**

4.2.6.2. Ağırlık Tekdüzeliği

Bölüm 3.2.3.6.2'de anlatıldığı şekilde yapılan deneyler sonucu levofloksasinin ortalama tablet ağırlıkları Tablo 28'de verilmiştir.

Tablo 28. Tavanic® tabletlerin ağırlıkları

Tablet No	Tablet Ağırlığı
1	618
2	621
3	616
4	624
5	623
6	611
7	625
8	624
9	624
10	616
11	619
12	627
13	625
14	620
15	622
16	616
17	618
18	628
19	624
20	624
X_{ort}	**621**
X_{ort} ± %5	**590 – 652**
X_{ort} ± %10	**559 – 683**
SS	**5**
%VK	**0.704**

4.2.6.3. Sertlik

Bölüm 3.2.3.6.3'te anlatıldığı şekilde yapılan tablet sertlik ölçümleri Tablo 29'da verilmiştir.

Tablo 29. Tavanic® tabletlerin sertliği

Tablet No	Sertlik (N)
1	426
2	401
3	408
4	369
5	404
6	436
7	432
8	401
9	405
10	405
X_{ort}	**409**
SS	**19**
%VK	**4.73**

4.2.6.4. Ufalanma-Aşınma

Bölüm 3.2.3.6.4'te anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucu levofloksasin tabletlerinin ufalanma-aşınma değeri aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır.

$$\%\ Friabilite = \left(\frac{X_{ort_1} - X_{ort_2}}{X_{ort_1}}\right) .100$$ Eşitlik 14

Bu eşitlikte;

X_{ort1} = Ufalanma-aşınma testi uygulanmadan önceki ortalama tablet ağırlığı (mg)

X_{ort2} = Ufalanma-aşınma testi uygulandıktan sonraki ortalama tablet ağırlığı (mg)

X_{ort1} = 12441.1 mg

X_{ort2} = 12440.2 mg

% Friabilite = %0.00723

4.2.6.5. Dağılma

Bölüm 3.2.3.6.5'te anlatıldığı şekilde yapılan deneyler sonucu Tavanic® Tabletlerin dağılma süreleri Tablo 30'da verilmiştir.

Tablo 30. Tavanic® tabletlerin dağılma süreleri

Tablet No	Dağılma Süresi (dak)
1	8.32
2	8.42
3	8.42
4	8.45
5	8.46
6	8.47
X_{ort}	**8.42**
SS	**0.05**
%VK	**0.649**

4.2.6.6. Etkin Madde Miktar Tayini

Tabletlerde levofloksasin miktar tayini bölüm 3.2.3.6.6'da anlatıldığı şekkilde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 31'de verilmektedir.

Tablo 31. Tavanic® tabletlerde yapılan etkin madde miktar tayini sonuçları

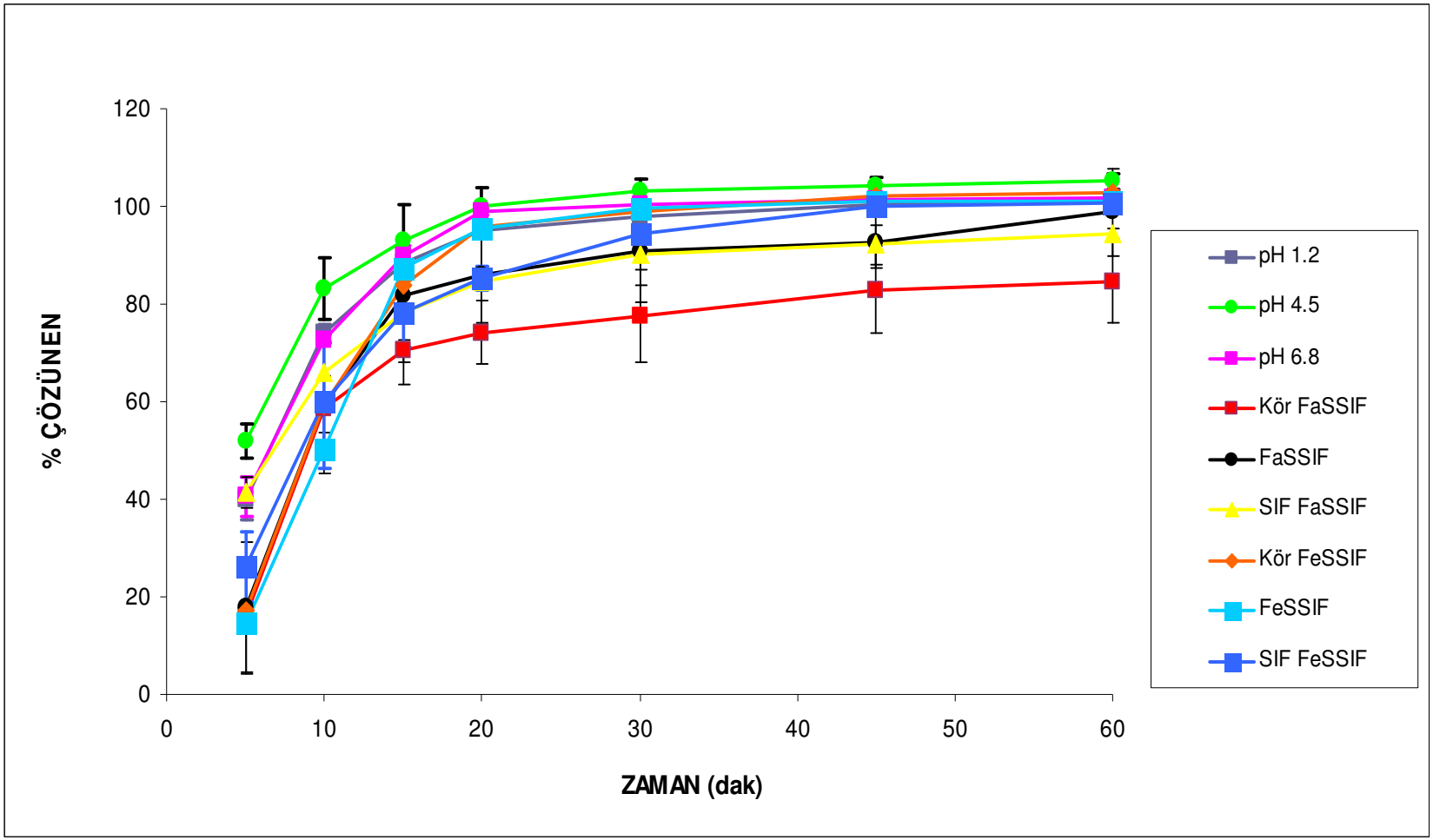
Paralel Sayısı	Etkin Madde Miktarı (mg)	Ortalama Miktar (mg) ± SS
1	500	495 ± 1
2	500	493 ± 2
3	500	495 ± 0

4.2.7. İn Vitro Çözünme Hızı Profilleri

Bölüm 3.2.3.7'de anlatıldığı gibi yapılan in vitro çözünme hızı deneyleri sonucunda dokuz farklı çözünme ortamında (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF), Tavanic® 500 mg film tabletle yapılmıştır. Tabletlerden ortalama % çözünen levofloksasin değerleri Tablo 32'de gösterilmiştir. Elde edilen çözünme hızı profilleri Şekil 21'de, karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri Şekil 21'de verilmiştir.

Tablo 32. Levofloksasin tabletlerin zamana karşı ortalama % çözünen miktarları

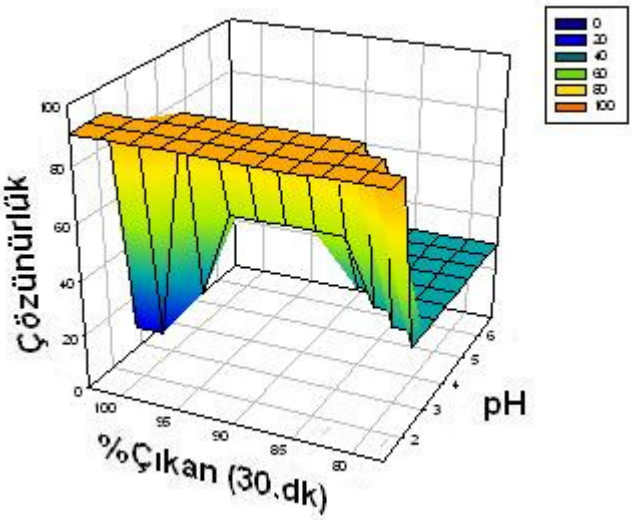
		Zaman (dak)						
		5	**10**	**15**	**20**	**30**	**45**	**60**
pH 1.2	Xort	40.1	74.0	88.8	95.1	97.9	101	102
	%VK	9.82	2.85	3.33	1.63	2.24	1.33	1.63
pH 4.5	Xort	51.9	83.2	92.9	100	103	104	105
	%VK	7.47	8.48	8.92	4.39	2.76	1.99	1.81
pH 6.8	Xort	40.6	72.8	90.0	98.9	100	101	102
	%VK	11.3	1.52	2.42	0.769	0.850	1.41	1.26
Kör FaSSIF	Xort	16.1	58.8	70.5	74.1	77.6	82.9	84.5
	%VK	35.8	22.3	4.87	4.18	9.35	5.24	4.88
FaSSIF	Xort	17.9	59.4	81.7	85.9	90.8	92.8	98.8
	%VK	35.7	4.66	5.33	5.50	5.52	2.74	4.37
SIF FaSSIF	Xort	41.4	66.0	78.3	84.5	90.1	92.2	94.5
	%VK	3.79	4.55	6.26	5.03	3.47	2.11	0.547
Kör FeSSIF	Xort	17.0	59.1	84.0	95.9	99.1	102	102
	%VK	2.18	3.63	3.44	1.73	2.52	0.364	0.722
FeSSIF	Xort	14.7	50.1	87.5	95.5	99.7	101	101
	%VK	2.70	0.693	1.17	0.606	0.695	0.559	0.382
SIF FeSSIF	Xort	26.2	60.2	78.1	85.3	94.6	101	101
	%VK	13.1	11.1	4.36	1.36	1.79	0.213	0.527



Şekil 21. Tavanic® tabletlerin karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri

4.2.8. Yüzey Grafikleri

Levofloksasinin pH'ya bağımlı olarak değişen değerlerinin ve Tavanic® tabletlerin pH'ya bağımlı olarak gösterdiği değişikliklerin, ortamlardaki çözünürlük değeri ve çözünme hızı değerleri arasındaki ilişkinin bir arada değerlendirilebilmesi için üç boyutlu yüzey grafiklerinden yararlanılmıştır(Şekil 22).



Şekil 22. Ortamların pH'sı, levofloksasinin farklı ortamlardaki çözünürlüğü ve Tavanic® tabletlerin 30. dak'daki farklı ortamlardaki çözünen miktarlarını gösteren yüzey grafiği

4.2.9. İn Vitro Çözünme Hızı Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

4.2.9.1. Model Bağımsız Yöntemler

Sodyum taurokolat ve lesitinin çözünme hızına olan etkisinin değerlendirilmesinde, Tavanic® tabletlerin farklı çözünme ortamlarındaki (Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF) çözünme profilleri f_2 benzerlik faktörü ile karşılaştırılmıştır. Burada kullanılan

ortamlar sodyum taurokolat ve lesitin içerip içermeme durumuna göre değerlendirilmiş, ayrıca FaSSIF ve SIF-FaSSIF'in ve FeSSIF ve SIF-FeSSIF'in çözünme profilleri karşılaştırılmıştır. Tablo 33'te in vitro çözünme ortamlarında levofloksasinin gösterdiği çözünme özelliklerinin f_2 benzerlik faktörü ile karşılaştırılması verilmiştir.

Tablo 33. İn vitro çözünme ortamlarında levofloksasinin gösterdiği çözünme özelliklerinin f_2 ile karşılaştırılması

Test Ortam	**Referans Ortam**	**f_2 Değeri**	**Benzerlik Durumu**
Kör FaSSIF	FaSSIF	48.7	Benzer değil
Kör FaSSIF	SIF-FaSSIF	43.6	Benzer değil
Kör FeSSIF	FeSSIF	69.9	Benzer
Kör FeSSIF	SIF-FeSSIF	60.5	Benzer
FaSSIF	SIF-FaSSIF	51.0	Benzer
FeSSIF	SIF-FeSSIF	54.6	Benzer

4.2.9.2. Model Bağımlı Yöntemler

İn vitro çözünme hızı kinetiklerinin değerlendirilmesinde DDSolver programı kullanılmıştır. Değerlendirmede levofloksasinin çözünme verilerini en iyi şekilde tanımlayan model belirlenmiştir. DDSolver model uygunluğunun saptanmasında, $R^2_{adjusted}$, MSC ve AIC kriterleri kullanılmıştır. Bölüm 2.1.3.1.6.3'de Tablo 6'da verilen kinetik modellere uygunluk değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 34'te verilmiştir. Uyum parametrelerine göre en uygun kinetik model kırmızı ile belirtilmiştir.

Tablo 34a. Tavanic® tabletlerin çözünme hızı verilerinin DDSolver ile kinetik modellemesi

KİNETİK MODEL	pH 1.2			pH 4.5			pH 6.8			Kör FaSSIF			FaSSIF		
	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC
Weibull 1	0.988	4.08	27.3	0.928	2.34	37.6	0.972	3.31	33.1	0.708	0.840	59.1	0.893	1.85	46.4
Weibull 2	0.977	3.71	29.9	***0.950***	***2.74***	***34.8***	0.981	3.77	29.9	0.704	0.890	58.7	0.869	1.70	47.4
Weibull 3	0.868	1.59	44.7	0.843	1.57	43.0	0.855	1.48	45.9	0.738	0.950	58.3	0.845	1.42	49.4
Weibull 4	0.900	1.88	42.7	0.891	1.92	40.5	0.883	1.70	44.4	0.741	0.930	58.4	0.834	1.37	50.0
Peppas-Sahlin 1	0.798	1.17	47.7	0.857	1.54	43.2	0.775	1.05	48.9	0.669	0.700	60.3	0.656	0.651	54.8
Peppas-Sahlin 2	0.872	1.70	44.0	0.910	2.11	39.2	0.859	1.58	45.2	0.751	1.05	57.5	0.751	1.04	52.1
Logistic 1	0.982	3.88	28.7	0.921	2.19	38.6	0.934	2.49	38.9	0.801	1.31	55.4	0.945	2.59	41.2
Logistic 2	0.947	2.53	38.2	0.894	2.35	37.5	0.918	2.07	41.8	0.848	1.54	53.6	0.922	2.13	44.5
Logistic 3	0.481	0.209	54.4	0.401	0.121	53.1	0.401	0.063	55.8	0.427	0.180	64.4	0.638	0.588	55.2
Gompertz 1	0.961	3.33	32.6	0.904	1.97	40.2	0.875	1.84	43.4	0.844	1.61	53.0	***0.960***	***2.99***	***38.4***
Gompertz 2	0.964	2.98	35.0	0.899	2.46	36.8	0.928	2.24	40.6	***0.885***	***1.92***	***50.5***	0.949	2.57	41.3
Gompertz 3	0.465	0.181	54.6	0.383	0.0984	53.3	0.365	0.004	56.3	0.373	0.0800	65.2	0.536	0.357	56.8
Gompertz 4	0.490	0.225	54.3	0.440	0.172	52.8	0.472	0.189	55.0	0.393	0.110	65.0	0.535	0.353	56.9
Probit 1	***0.988***	***4.11***	***27.1***	0.937	2.47	36.7	0.964	3.11	34.5	0.792	1.27	55.7	0.934	2.40	42.5
Probit 2	0.917	2.06	41.5	0.873	1.93	40.4	0.898	1.84	43.4	0.822	1.38	54.9	0.894	1.84	46.5
First order	0.962	34.4	3.07	0.922	2.61	35.7	0.918	2.46	39.1	0.581	0.730	60.1	0.884	1.88	46.2
Hopfenberg	0.936	2.79	36.4	0.933	2.39	37.2	***0.990***	***4.22***	***26.8***	0.212	-0.0238	66.1	0.872	1.74	47.2

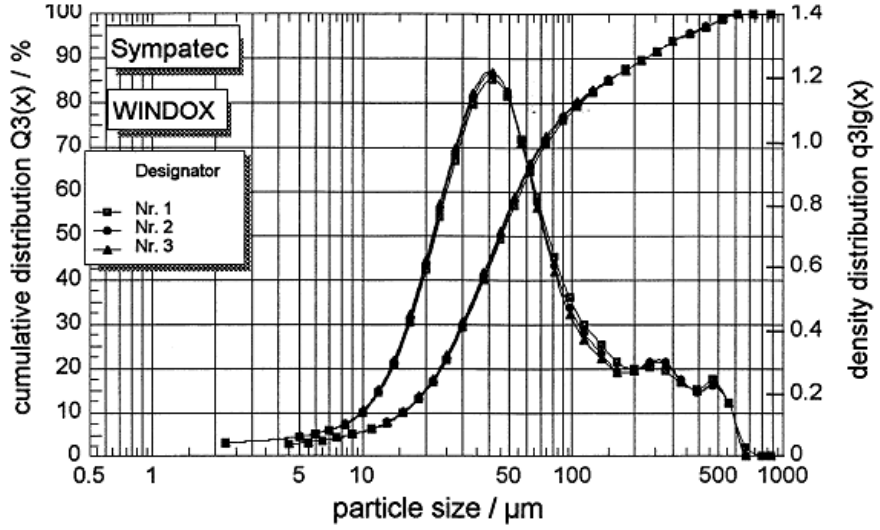
Tablo 34b. Tavanic® tabletlerin çözünme hızı verilerinin DDSolver ile kinetik modellemesi

KİNETİK MODEL	SIF-FaSSIF			Kör FeSSIF			FeSSIF			SIF-FeSSIF		
	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC
Weibull 1	0.966	3.06	32.3	0.992	4.49	29.5	0.989	4.10	33.0	***0.990***	***4.84***	***24.8***
Weibull 2	0.943	2.55	35.9	0.987	4.29	30.9	***0.990***	***4.46***	***30.5***	0.986	4.03	30.4
Weibull 3	0.933	2.35	37.3	0.849	1.44	50.9	0.816	1.23	53.1	0.933	2.29	42.6
Weibull 4	0.955	2.82	34.0	0.897	1.93	47.4	0.874	1.73	49.5	0.959	3.12	36.8
Peppas-Sahlin 1	0.890	1.83	40.9	0.635	0.558	57.0	0.581	0.418	58.7	0.787	1.09	51.0
Peppas-Sahlin 2	0.937	2.45	36.6	0.738	0.951	54.3	0.694	0.795	56.1	0.855	1.54	47.8
Logistic 1	0.982	3.78	27.3	0.986	4.10	32.2	0.968	3.08	40.1	0.969	3.81	32.0
Logistic 2	0.978	3.55	28.9	0.948	2.51	43.4	0.927	2.16	46.5	0.988	4.21	29.1
Logistic 3	0.635	0.598	49.5	0.643	0.605	56.7	0.613	0.506	58.1	0.764	1.03	51.4
Gompertz 1	***0.990***	***3.93***	***26.2***	0.964	3.05	39.6	0.955	2.75	42.4	0.911	2.56	40.7
Gompertz 2	0.981	3.54	29.0	0.968	3.06	39.5	0.928	2.18	46.4	0.994	4.79	25.1
Gompertz 3	0.638	0.621	49.4	0.518	0.285	59.0	0.452	0.151	60.6	0.715	0.810	53.0
Gompertz 4	0.638	0.621	49.4	0.551	0.351	58.5	0.542	0.329	59.4	0.714	0.805	53.0
Probit 1	0.973	3.36	30.2	***0.992***	***4.50***	***29.5***	0.980	3.57	36.7	0.990	4.64	21.5
Probit 2	0.965	3.12	32.0	0.926	2.16	45.8	0.900	1.86	48.7	0.977	3.48	34.3
First order	0.921	2.33	37.4	0.777	1.25	52.2	0.660	0.817	55.9	0.959	2.96	37.9
Hopfenberg	0.717	1.11	46.0	0.938	2.41	44.1	0.926	2.29	45.6	0.969	3.16	36.5

4.3. Flurbiprofen

4.3.1. Partikül Büyüklüğü

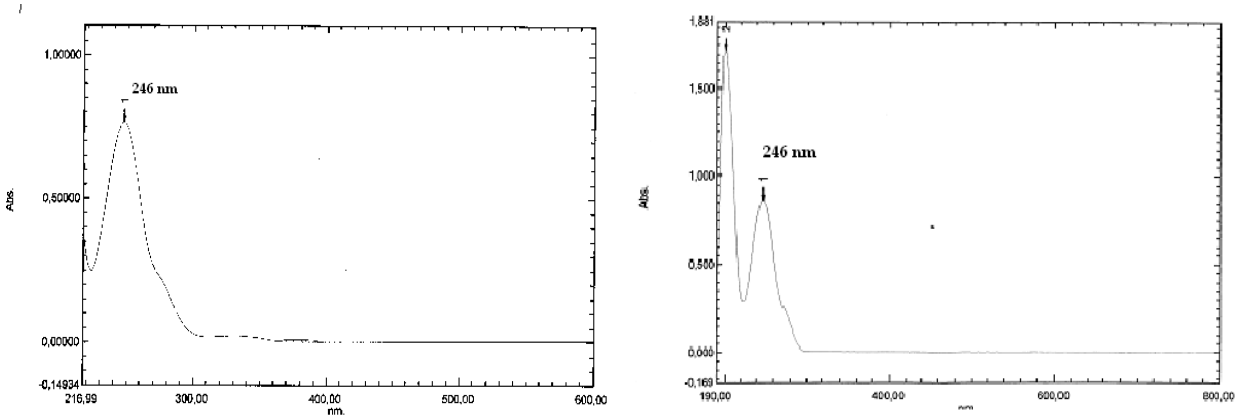
Bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı şekilde yapılan ölçümler sonucu flurbiprofen partikül büyüklüğü 45.1 ± 1.9 µm olarak bulundu. Flurbiprofenin partikül büyüklüğü dağılımına ilişkin grafik Şekil 23'te verilmiştir.



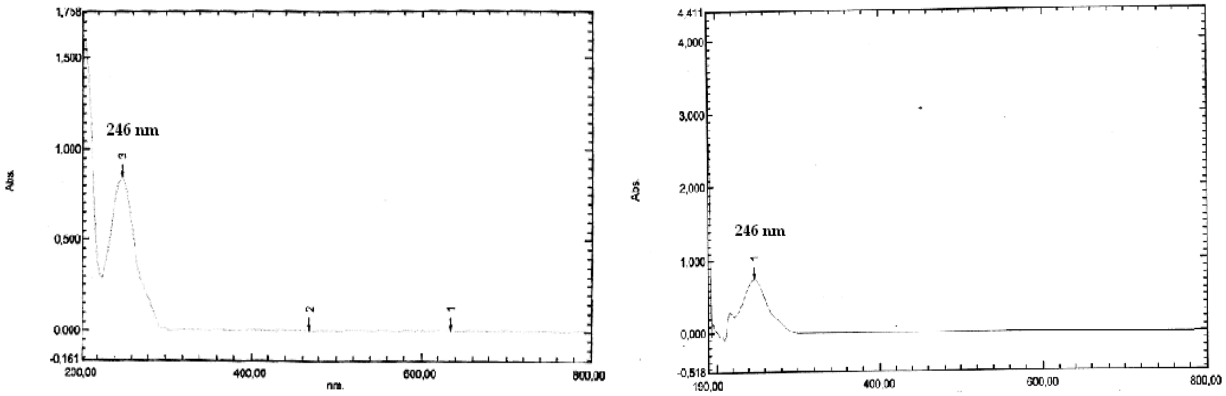
Şekil 23. Flurbiprofenin partikül büyüklüğü ve dağılımı

4.3.2. UV Spektrumu

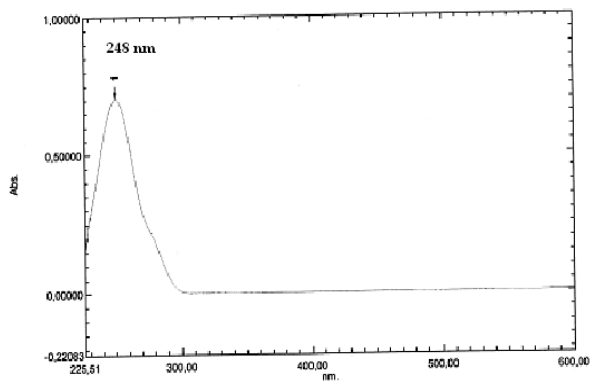
Bölüm 3.2.4.2.'de anlatıldığı şekilde yapılan ölçümler sonucunda flurbiprofenin hazırlanan pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarındaki UV spektrumları Şekil 24'te ve flurbiprofenin λ_{maks} değerleri Tablo 35'te verilmiştir.

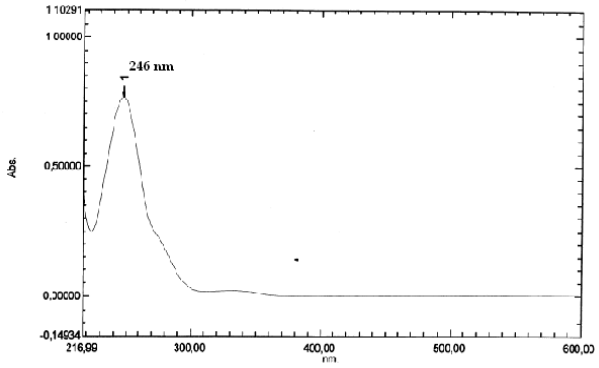


Şekil 24a,b. Flurbiprofenin pH 4.5 ve pH 6.8 çözünme ortamlarındaki UV spektrumları

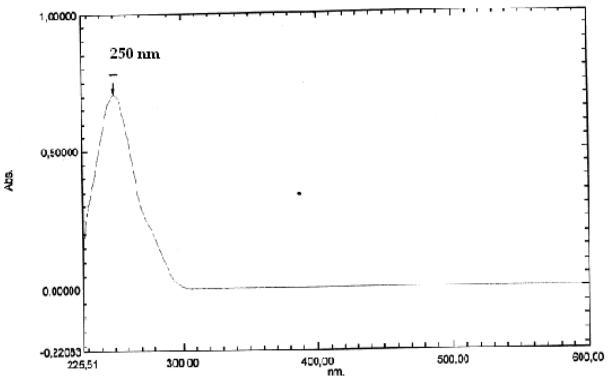


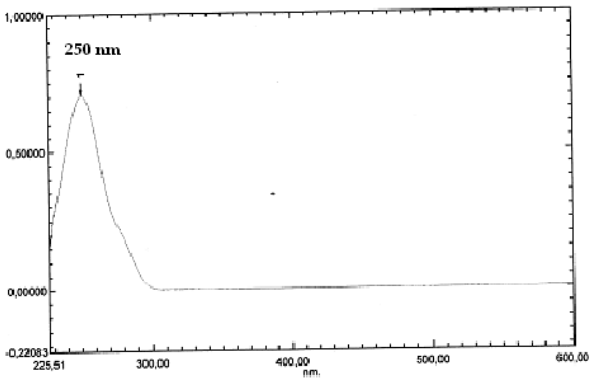
Şekil 24c,d. Flurbiprofenin Kör FaSSIF ve FaSSIF çözüne ortamlarındaki UV spektrumları





Şekil 24e,f. Flurbiprofenin SIF-FaSSIF ve Kör FeSSIF ortamlarındaki UV spektrumları





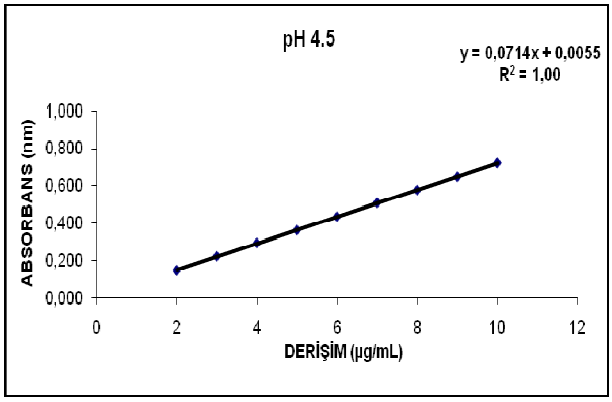
Şekil 24g,h. Flurbiprofenin FeSSIF ve SIF-FeSSIF çözünme ortamlarındaki UV spektrumları

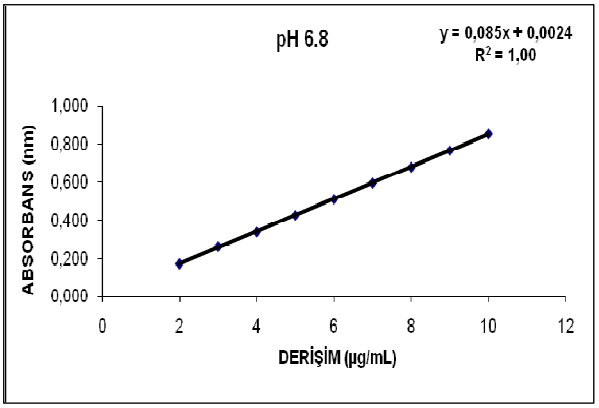
Tablo 35. Flurbiprofenin maksimum absorbans verdiği λ_{maks} değerleri

Çözünme Ortamı	λ_{maks} (nm)
pH 4.5	246
pH 6.8	246
Kör FaSSIF (pH 6.5)	246
FaSSIF (pH 6.5)	246
SIF-FaSSIF (pH 6.5)	248
Kör FeSSIF (pH 5.0)	246
FeSSIF (pH 5.0)	250
SIF-FeSSIF (pH 5.0)	250

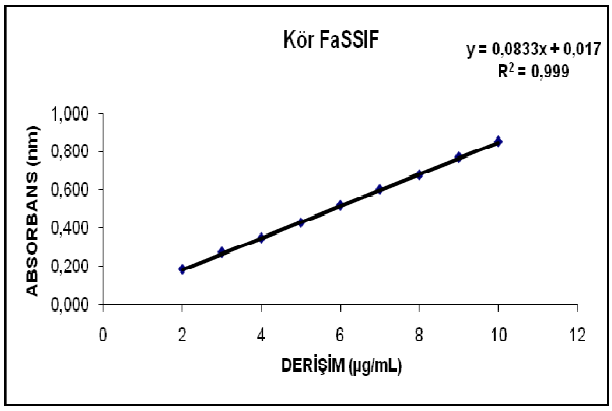
4.3.3. İn Vitro Çözünme Ortamlarındaki Standart Doğrulara Ait Bulgular

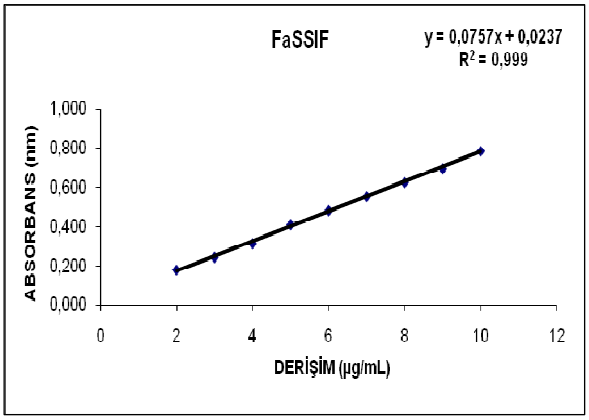
Flurbiprofenin standart doğrusunun hazırlanması bölüm 3.2.4.2'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Şekil 25'te flurbiprofenin pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarındaki standart doğruları görülmektedir. Standart doğrulara ait parametreler ve uyum ölçütleri Tablo 36'da gösterilmiştir.



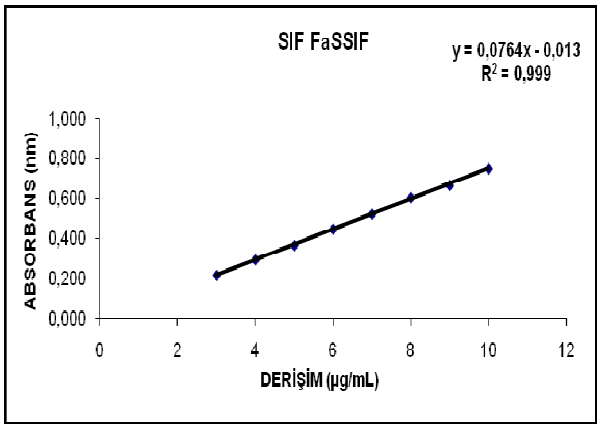


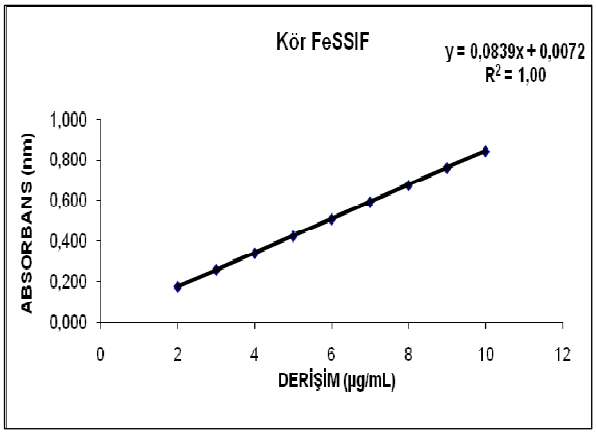
Şekil 25a,b. Flurbiprofenin pH 4.5 ve pH 6.8 çözünme ortamlarındaki standart doğruları



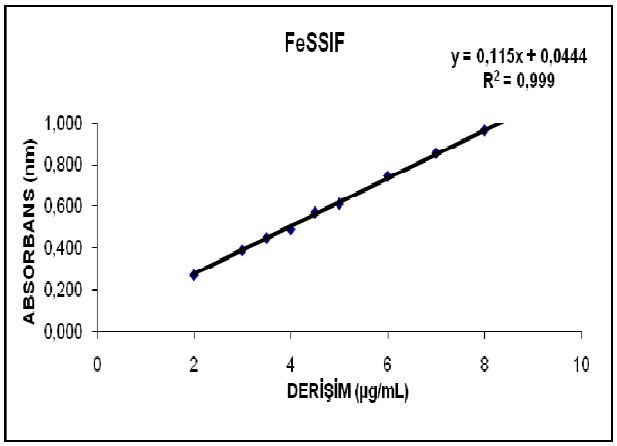


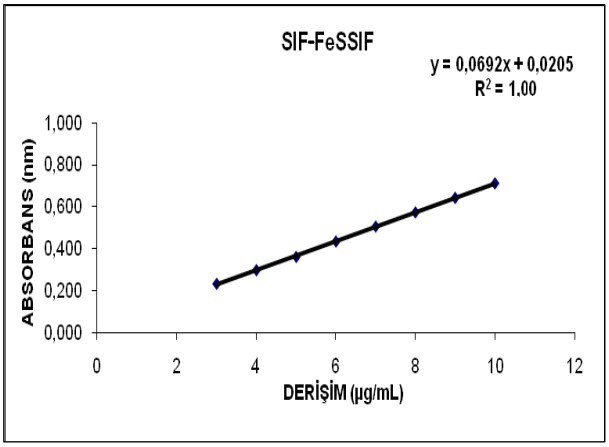
Şekil 25c,d. Flurbiprofenin Kör FaSSIF ve FaSSIF çözünme ortamlarındaki standart doğruları





Şekil 25e,f. Flurbiprofenin SIF-FaSSIF ve Kör FeSSIF çözünme ortamlarındaki standart doğruları





Şekil 25g,h. Flurbiprofenin FeSSIF ve SIF-FeSSIF çözünme ortamlarındaki standart doğruları

Tablo 36. Flurbiprofenin standart doğrusuna ait parametreler ve uyum ölçütleri

İn Vitro Çözünme Ortamı	Eğim ± GA	Kesişim ± GA	Determinasyon Katsayısı (R^2)	Sapma Kareleri Toplamı (SKT)	Ağırlıklı Sapma Kareleri Toplamı (ASKT)	Kare Ağırlıklı Sapma Kareleri Toplamı (KASKT)	AKAIKE Bilgi Ölçütü (AIC)
pH 4.5	0.0714 ± 0.0004	0.00550 ± 0.0028	1.00	0.0624	0.104	0.205	-21.0
pH 6.8	0.0850 ± 0.0006	0.00240 ± 0.0041	1.00	0.0000467	0.000131	0.000418	-86.0
Kör FaSSIF	0.0833 ± 0.0010	0.0170 ± 0.0066	0.999	0.000119	0.000277	0.000752	-77.3
FaSSIF	0.0757 ± 0.0019	0.0237 ± 0.0121	0.999	0.000402	0.00108	0.00343	-66.4
SIF-FaSSIF	0.0764 ± 0.0012	0.013 ± 0.008	0.999	0.000137	0.000235	0.000425	-67.2
Kör FeSSIF	0.0839 ± 0.0003	0.0072 ± 0.0020	1.00	0.0377	0.0937	0.304	-25.5
FeSSIF	0.115 ± 0.003	0.0444 ± 0.0147	0.999	0.000605	0.000992	0.00174	-55.3
SIF-FeSSIF	0.0692 ± 0.0013	0.0205 ± 0.0082	1.00	0.0000480	0.000154	0.000525	-75.6

4.3.4. Spektrofotometrik Miktar Tayini Yöntem Validasyonu

4.3.4.1. Doğruluk ve Geri Elde

Bölüm 3.2.4.3.1'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Flurbiprofenin pH 4.5 ve pH 6.8 için geri elde sonuçları Tablo 37'de gösterilmiştir.

Tablo 37a. pH 4.5 için flurbiprofenin geri eldesi

Derişim (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)	% Geri Elde	X_{ort}	SS	%VK
4.80	4.76	99.1	98.7	0.0	0.452
4.80	4.71	98.2			
4.80	4.74	98.8			
6.00	5.95	99.1	99.5	0.1	0.888
6.00	6.03	101			
6.00	5.93	98.9			
7.20	7.09	98.5	98.8	0.1	0.301
7.20	7.14	99.1			
7.20	7.11	98.7			

Tablo 37b. pH 6.8 için flurbiprofenin geri eldesi

Derişim (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)	% Geri Elde	X_{ort}	SS	%VK
4.80	4.77	99.4	99.8	0.0	0.511
4.80	4.78	100			
4.80	4.82	100			
6.00	5.97	99.5	99.3	0.0	0.456
6.00	5.92	98.7			
6.00	5.97	99.5			
7.20	7.11	98.9	99.3	0.0	0.578
7.20	7.20	99.9			
7.20	7.15	99.3			

4.3.4.2. Tekrar Edilebilirlik

Flurbiprofene ait tekrarlanabilirlik sonuçları pH 4.5 ve pH 6.8 için Tablo 38'de verilmiştir.

Tablo 38a. pH 4.5'te flurbiprofenin tekrarlanabilirlik sonuçları

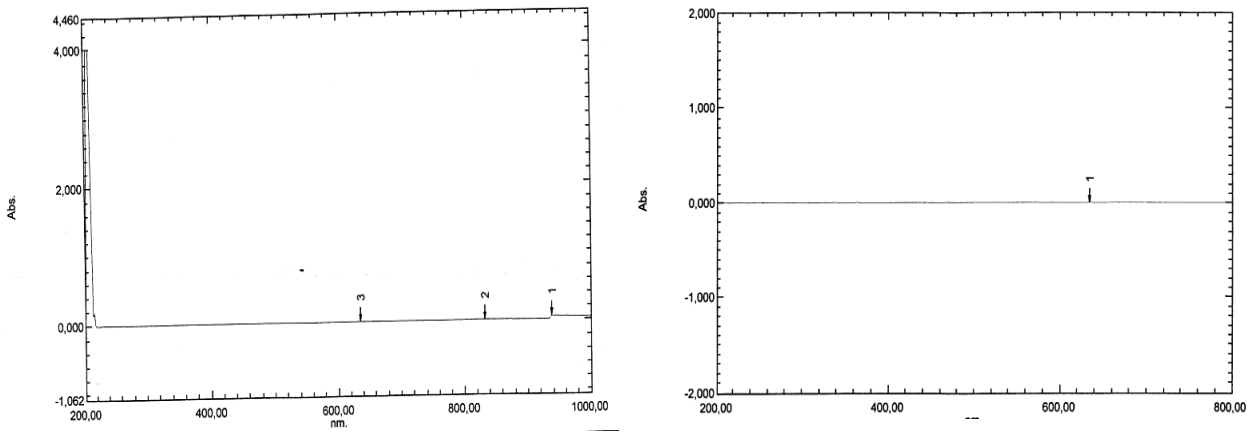
Örnek	Derişimi (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)
1	10.0	10.0
2	10.0	10.1
3	10.0	10.0
4	10.0	10.1
5	10.0	10.1
6	10.0	10.1
7	10.0	10.0
8	10.0	10.1
9	10.0	10.0
10	10.0	10.1
X_{ort}		**10.0**
SS		**0.0**
%VK		**0.239**

Tablo 38b. pH 6.8'de flurbiprofenin tekrarlanabilirlik sonuçları

Örnek	Derişimi (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)
1	10.0	10.0
2	10.0	10.0
3	10.0	10.1
4	10.0	10.0
5	10.0	10.0
6	10.0	10.0
7	10.0	10.0
8	10.0	10.0
9	10.0	10.0
10	10.0	10.0
X_{ort}		**10.0**
SS		**0.0**
%VK		**0.164**

4.3.4.3. Özgünlük ve Seçicilik

Özgünlük ve seçicilik değerlendirmeleri bölüm 3.2.4.3.3'de belirtildiği şekilde spektrofotometrik miktar tayini yönteminin sadece flurbiprofeni saptayabilmesi için etkin madde içermeyen çözeltinin (pH 4.5 ve pH 6.8) spektrumları 200-800 nm dalga boyları arasında incelendi (Şekil 26).



Şekil 26a,b. Flurbiprofen için pH 4.5 ve pH 6.8'de özgünlük-seçicilik

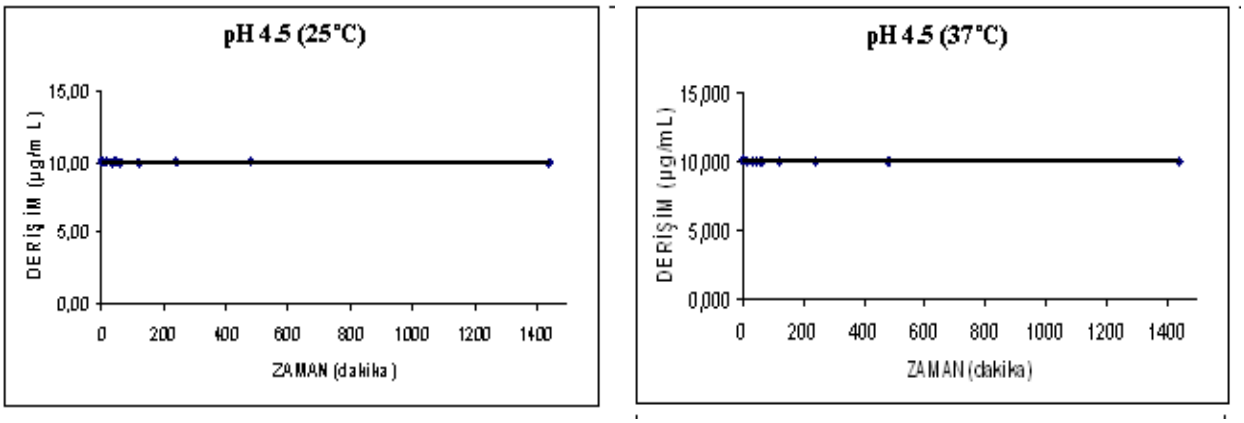
4.3.4.4. Doğrusallık

Bölüm 3.2.4.3.4'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Derişime karşı ölçülen absorbans değerleri grafiklendi. Verilere doğrusal regresyon yapılarak standart doğru denklemleri bulundu. Bu denklemlerin R^2 değerleri hesaplandı. Söz konusu derişim aralığında bulunan standart denklemlerin doğrusallıkları incelendi(Şekil 25).

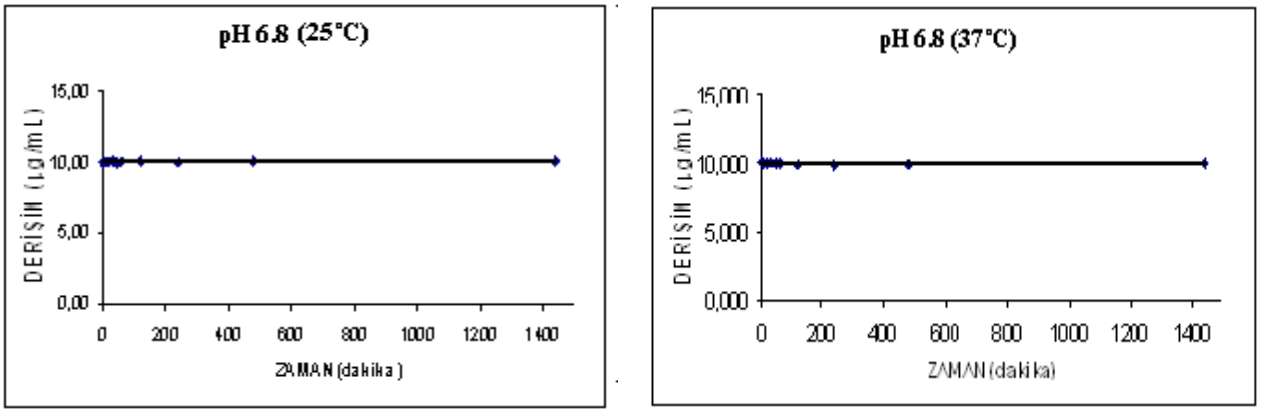
4.3.4.5. Stabilite

Flurbiprofenin pH 4.5 ve pH 6.8 ortamlarındaki stabilitesinin incelenmesi amacıyla, Bölüm 3.2.4.3.5'te anlatıldığı şekilde oda sıcaklığında (25˚C) ve 37˚C'de stabilite deneyleri yapıldı. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede okundu. Bu değerler

standart doğru denkleminde yerine konularak derişimler hesaplandı. Derişim değerlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenip gözlenmediği saptandı. Şekil 27'de pH 4.5 ve pH 6.8 tamponlarında 24 saat süreyle izlenen zamana karşılık ortalama derişim grafikleri görülmektedir.



Şekil 27a,b. Flurbiprofenin pH 4.5'te 25˚C ve 37˚C'deki stabilitesi



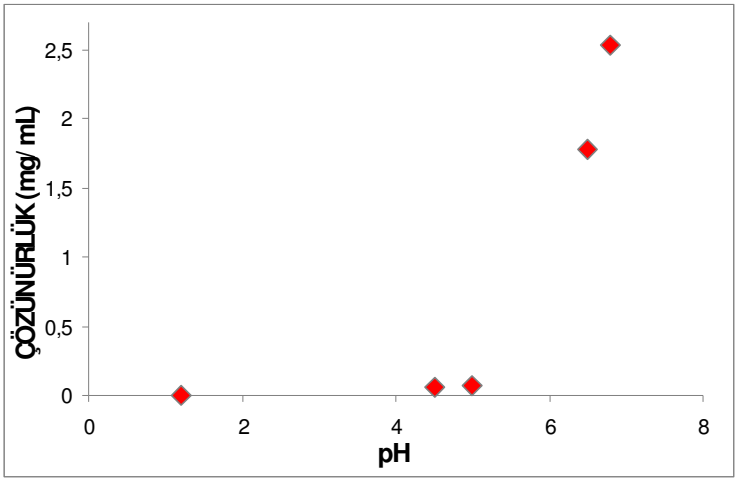
Şekil 27c,d. Flurbiprofenin pH 6.8'de 25˚C ve 37˚C'deki stabilitesi

4.3.5. Çözünürlük

Bölüm 3.2.4.4.2'de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucu flurbiprofenin çözünürlük değerleri saptanmış ve D_0 değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 39'da, pH-çözünürlük grafiği Şekil 29'da verilmiştir.

Tablo 39. Flurbiprofenin çözünürlük değerleri

Çözünme Ortamı	Çözünürlük (mg/mL) ± SS	D_0 ± SS
pH 4.5	0.0555 ± 0.0003	7.21 ± 0.04
pH 6.8	2.53 ± 0.05	0.323 ± 0.006
Kör FaSSIF	1.78 ± 0.03	0.224 ± 0.003
FaSSIF	1.25 ± 0.02	0.158 ± 0.003
SIF-FaSSIF	1.70 ± 0.01	0.237 ± 0.001
Kör FeSSIF	0.0756 ± 0.0014	5.29 ± 0.09
FeSSIF	0.529 ± 0.007	0.756 ± 0.011
SIF-FeSSIF	4.20 ± 0.02	0.0946 ± 0.0005



Şekil 29. Flurbiprofenin pH-çözünürlük profili

4.3.6. Tabletlerde Yapılan Kalite Denetimleri

Tabletlerde yapılan denetimlerde 100 mg dozda flurbiprofen içeren Ansaid® 100 mg film tablet (Aventis) ve Maximus® 100 mg film tablet (Drogsan) kullanıldı.

4.3.6.1 Çap ve Kalınlık

Bölüm 3.2.4.5.1'de anlatıldığı şekilde ölçülen tabletlerinin boyutları Tablo 40'ta verilmiştir.

Tablo 40. Maximus® ve Ansaid® tabletlerinin boyutları

Tablet No	MAXİMUS®		ANSAİD®		
	Çap (cm)	Kalınlık (cm)	Uzunluk (cm)	Genişlik (cm)	Kalınlık (cm)
1	1.20	0.410	1.37	0.840	0.480
2	1.20	0.410	1.38	0.840	0.480
3	1.20	0.410	1.38	0.840	0.480
4	1.20	0.410	1.37	0.840	0.480
5	1.20	0.410	1.38	0.840	0.480
6	1.20	0.410	1.37	0.840	0.480
7	1.20	0.410	1.37	0.840	0.480
8	1.20	0.410	1.38	0.840	0.480
9	1.20	0.410	1.37	0.850	0.480
10	1.20	0.410	1.37	0.840	0.480
X_{ort}	**1.20**	**0.410**	**1.37**	**0.841**	**0.480**
SS	**0.00**	**0.000**	**0.01**	**0.003**	**0.000**
%VK	**0.00**	**0.000**	**0.376**	**0.376**	**0.000**

4.3.6.2. Ağırlık Tekdüzeliği

Bölüm 3.2.4.6.2'de anlatıldığı şekilde yapılan ölçümler sonucu flurbiprofen tabletlerinin ağırlıkları Tablo 41'de verilmiştir.

Tablo 41. Maximus® ve Ansaid® tabletlerin ağırlıkları

Tablet No	MAXİMUS®	ANSAİD®
	Tablet Ağırlığı	Tablet Ağırlığı
1	309	423
2	308	418
3	313	416
4	313	419
5	313	418
6	309	425
7	313	418
8	310	420
9	307	416
10	307	420
11	311	421
12	313	420
13	308	420
14	307	420
15	307	420
16	309	417
17	309	421
18	307	415
19	309	418
20	308	418
X_{ort}	**310**	**419**
X_{ort} ± %5	**294-325**	**398-440**
X_{ort} ± %10	**279-340**	**377-461**
SS	**2**	**2**
%VK	**0.730**	**0.568**

4.3.6.3. Sertlik

Bölüm 3.2.4.6.3'te anlatıldığı şekilde yapılan sertlik ölçümleri sonucu flurbiprofen tabletlerinin sertlik değerleri Tablo 42'de verilmiştir.

Tablo 42. Maximus® ve Ansaid® tabletlerin sertlik değerleri

Tablet No	MAXİMUS®	ANSAİD®
	Sertlik (N)	Sertlik (N)
1	112	108
2	105	119
3	122	127
4	106	114
5	121	129
6	118	124
7	115	109
8	111	124
9	128	133
10	115	120
X_{ort}	**115**	**121**
SS	**7**	**8**
%VK	**6.14**	**6.84**

4.3.6.4. Ufalanma – Aşınma

Bölüm 3.2.4.6.4'te anlatıldığı şekilde yapılan ölçümler sonucu flurbiprofen tabletlerinin ufalanma-aşınma değeri Eşitlik 14'e göre hesaplanmıştır.

Maximus® tabletler için;

X_{ort1} = 3100.3 mg

X_{ort2} = 3100.3 mg

%friabilite: % 0

Ansaid® tabletler için;

X_{ort1} = 4193.1 mg

X_{ort2} = 4192.9 mg

%friabilite: % 0.0477

4.3.6.5. Dağılma

Bölüm 3.2.4.6.5'te anlatıldığı şekilde yapılan deneyler sonucu flurbiprofen tabletlerinin dağılma süreleri Tablo 43'te verilmiştir.

Tablo 43. Maximus® ve Ansaid® tabletlerin dağılma süreleri

Tablet No	MAXİMUS®	ANSAİD®
	Dağılma Süresi (sn)	Dağılma Süresi (sn)
1	49.3	45.6
2	51.8	45.9
3	60.1	46.8
4	60.1	47.0
5	60.3	49.1
6	60.4	52.0
X_{ort}	**57.0**	**47.7**
SS	**5.0**	**2.4**
%VK	**8.86**	**5.08**

4.3.6.6. Etkin Madde Miktar Tayini

Tabletlerdeki flurbiprofen miktar tayini bölüm 3.2.4.6.6'da anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 44'te gösterilmiştir.

Tablo 44. Maximus® ve Ansaid® tabletlerinin miktar tayini sonuçları

Paralel Sayısı	Etkin Madde Miktarı (mg)	MAXİMUS®	ANSAİD®
		Miktar Tayini (mg) ± %VK	Miktar Tayini (mg) ± %VK
1	100	96.0 ± 2.1	98.0 ± 0.7
2	100	96.0 ± 1.3	98.0 ± 0.4
3	100	97.0 ± 1.4	98.0 ± 1.2

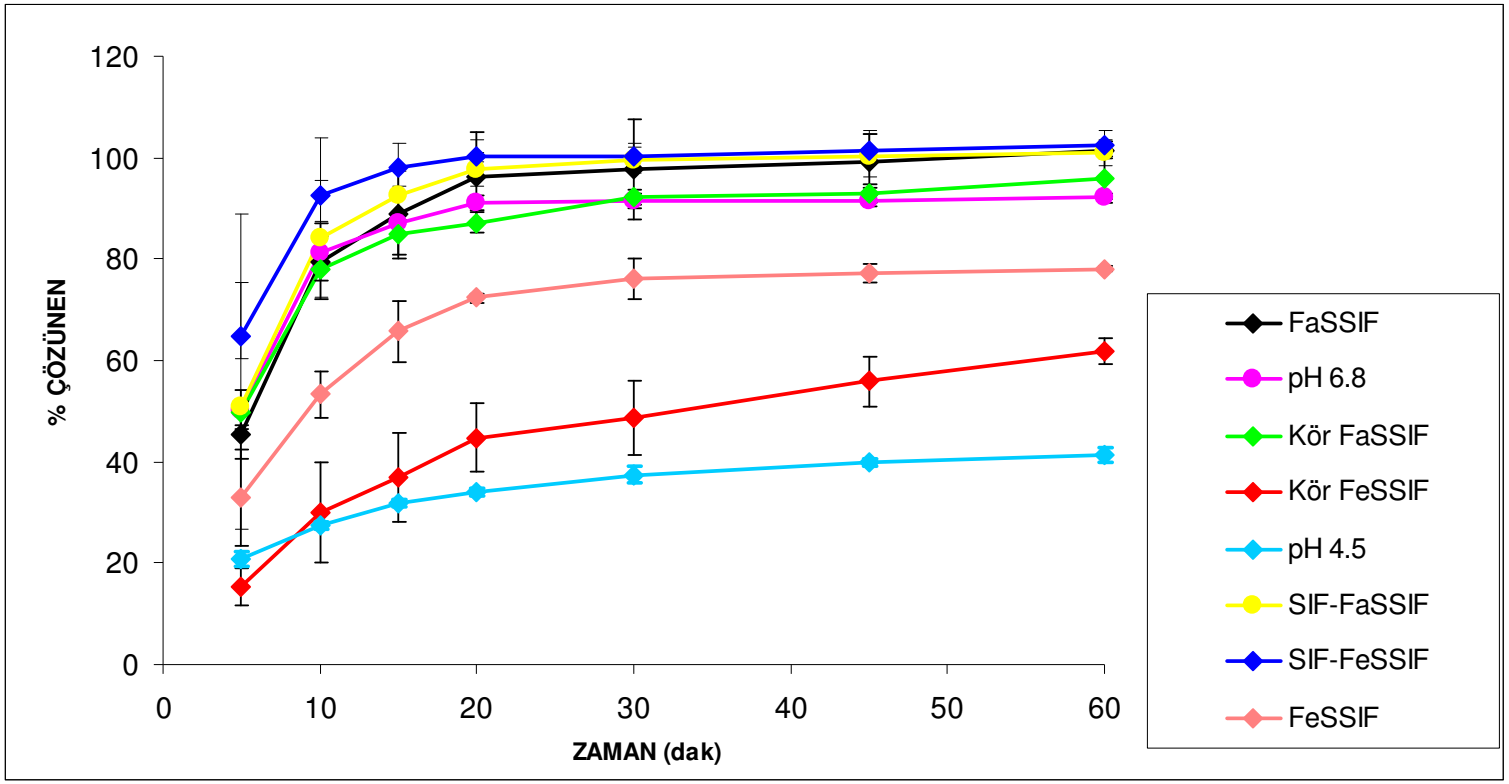
4.3.7. İn Vitro Çözünme Hızı Testleri

Bölüm 3.2.4.7'de anlatıldığı gibi yapılan in vitro çözünme hızı deneyleri sonucunda pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarında, Maximus® ve Ansaid® için

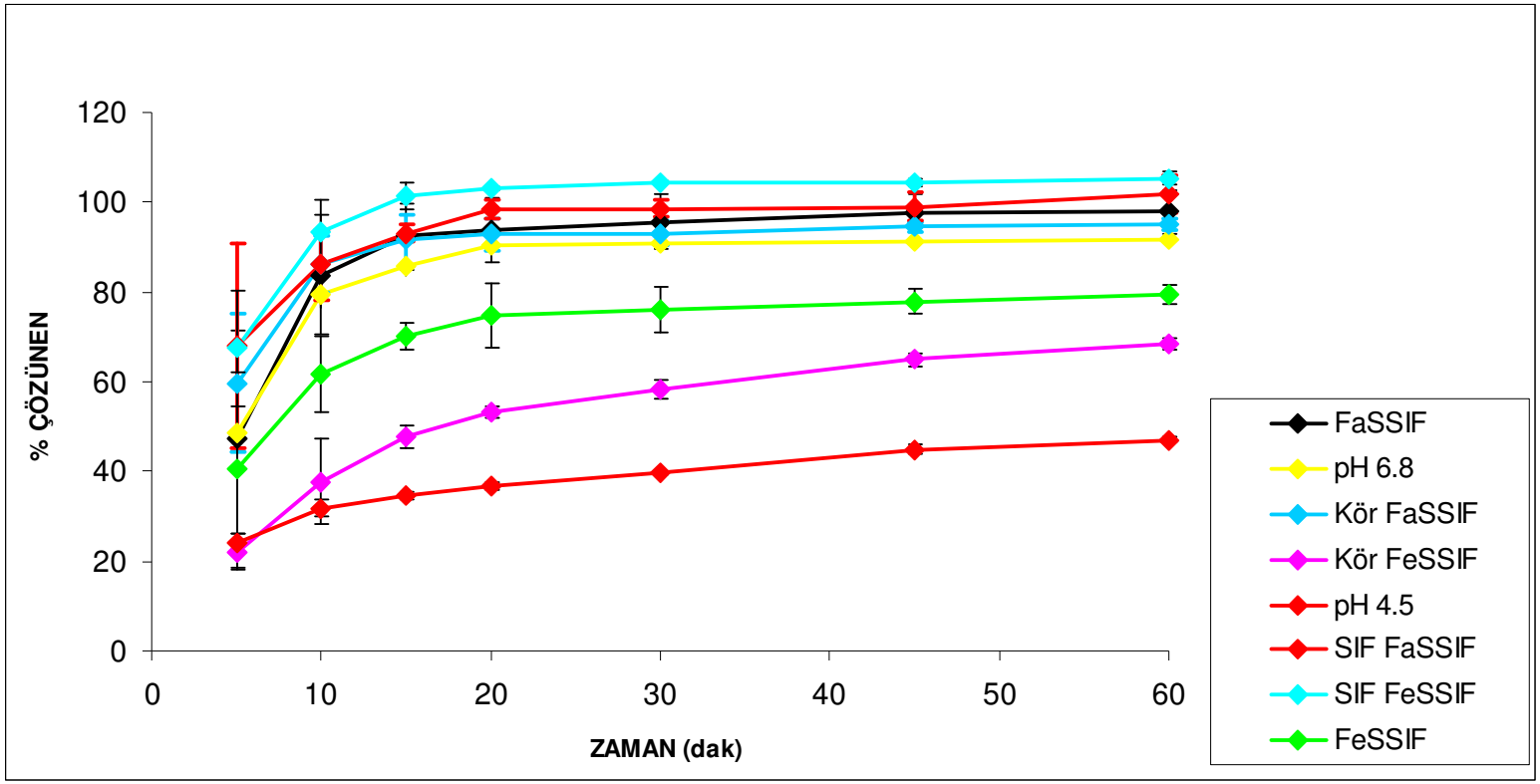
zamana karşı ortalama çözünen değerler Tablo 45'te verilmiştir. Elde edilen çözünme hızı profilleri de Şekil 30'da verilmiştir. Tüm ortamlar için Maximus® ve Ansaid® tabletlerin zamana karşı ortalama % çözülen değerleri de Tablo 46'da verilmiştir. Maximus® tabletlerin karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri Şekil 29'da ve Ansaid® tabletlerin karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri ise Şekil 30'da verilmiştir.

Tablo 45. Flurbiprofen tabletlerin zamana karşı ortalama % çözünen miktarları

	Preparatlar		Zaman (dak)						
			5	10	15	20	30	45	60
pH 4.5	Maximus 100 mg Film Tablet	Xort	21.0	27.5	31.8	34.1	37.5	39.8	41.5
		%VK	1.59	0.803	0.974	0.859	1.70	0.873	1.60
	Ansaid 100 mg Film Tablet	Xort	24.1	31.8	34.8	36.7	39.6	44.9	47.0
		%VK	2.22	2.03	0.983	1.04	0.357	1.17	0.776
pH 6.8	Maximus 100 mg Film Tablet	Xort	50.2	81.2	87.1	91.1	91.4	91.5	92.1
		%VK	8.53	4.53	2.55	1.78	1.90	1.33	1.04
	Ansaid 100 mg Film Tablet	Xort	48.5	79.8	86.0	90.6	90.9	91.3	91.7
		%VK	6.04	4.18	2.95	1.93	0.974	0.954	0.600
Kör FaSSIF	Maximus 100 mg Film Tablet	Xort	49.6	77.9	84.8	87.2	92.2	93.0	96.0
		%VK	2.30	1.28	2.18	1.15	0.80	0.93	2.09
	Ansaid 100 mg Film Tablet	Xort	59.7	86.2	91.6	92.8	93.1	94.5	95.1
		%VK	15.2	4.33	3.73	2.33	1.79	0.57	0.77
FaSSIF	Maximus 100 mg Film Tablet	Xort	45.5	79.5	89.0	96.2	97.6	99.3	101
		%VK	5.40	4.55	4.90	4.38	4.91	2.64	0.821
	Ansaid 100 mg Film Tablet	Xort	47.5	83.9	92.4	93.9	95.7	97.7	97.8
		%VK	24.2	7.71	3.92	3.65	3.15	2.12	2.47
SIF-FaSSIF	Maximus 100 mg Film Tablet	Xort	51.0	84.0	92.5	97.5	99.4	100	100
		%VK	11.7	5.58	2.27	1.60	1.25	2.02	1.28
	Ansaid 100 mg Film Tablet	Xort	68.2	86.1	93.1	98.3	98.6	99.0	101.8
		%VK	11.1	3.80	0.876	1.04	0.912	1.55	2.05
Kör FeSSIF	Maximus 100 mg Film Tablet	Xort	15.3	30.0	36.9	44.7	48.7	55.8	61.7
		%VK	1.74	4.74	4.31	3.30	3.59	2.45	1.28
	Ansaid 100 mg Film Tablet	Xort	22.2	37.8	47.8	53.3	58.3	65.0	68.2
		%VK	8.47	12.0	2.53	1.06	1.77	1.12	0.902
FeSSIF	Maximus 100 mg Film Tablet	Xort	33.0	53.3	65.7	72.3	76.1	77.3	78.1
		%VK	4.56	2.24	2.93	0.455	1.93	0.878	0.316
	Ansaid 100 mg Film Tablet	Xort	37.8	48.7	53.9	56.8	58.1	61.4	62.4
		%VK	4.35	5.27	5.21	3.67	2.95	3.04	3.26
SIF-FeSSIF	Maximus 100 mg Film Tablet	Xort	64.6	92.4	97.9	100	100	101	101
		%VK	2.12	2.32	1.64	0.524	0.382	0.679	0.401
	Ansaid 100 mg Film Tablet	Xort	67.4	93.5	102	103	104	104	105
		%VK	6.16	3.43	1.42	0.293	0.127	0.367	0.636



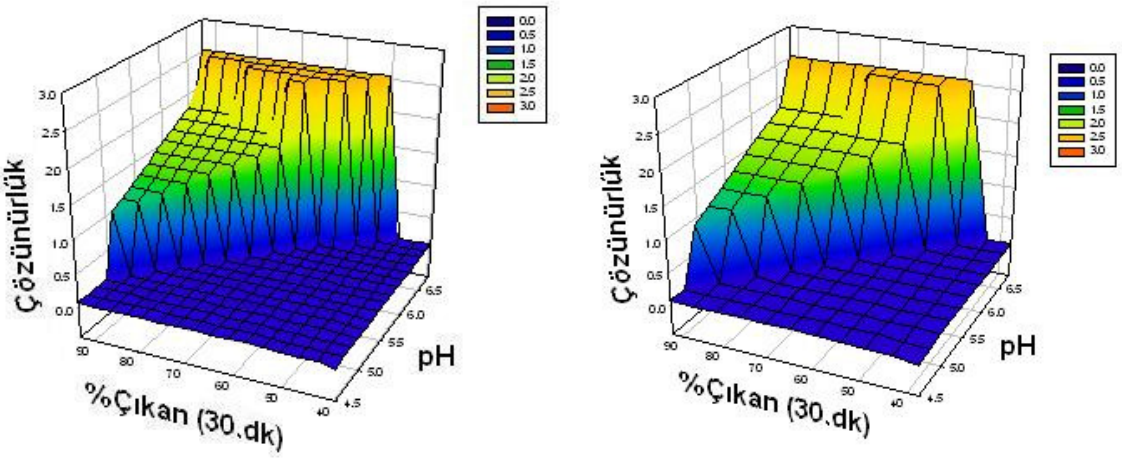
Şekil 29. Maximus® tabletlerin in vivo ortamlardaki karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri



Şekil 30. Ansaid® tabletlerin in vivo ortamlardaki karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri

4.3.8. Yüzey Grafikleri

Flurbiprofenin pH'ya bağımlı olarak değişen değerlerinin ve Ansaid® / Maximus® tabletlerin pH'ya bağımlı olarak gösterdiği değişikliklerin, ortamlardaki çözünürlük değeri ve çözünme hızı değerleri arasındaki ilişkinin bir arada değerlendirilebilmesi amacıyla üç boyutlu yüzey grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 31).



Şekil 31a,b. Ortamların pH'sı, levofloksasinin farklı ortamlardaki çözünürlüğü ve Ansaid® ve Maximus® tabletlerin 30. dak'daki farklı ortamlarda çözünen miktarlarını gösteren yüzey grafiği

4.3.9 İn Vitro Çözünme Hızı Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

4.3.9.1. Model Bağımsız Yöntemler

İn vitro çözünme hızı kinetiklerinin değerlendirilmesinde model bağımsız yöntem olarak kullanılan f_2 değerlendirmesi dozaj şekillerinin karşılaştırılması ve in vitro çözünme ortamlarının karşılaştırılması şeklinde yapılmıştır.

İn vitro çözünme ortamlarında referansa (Ansaid®) karşılık test tabletinin (Maximus®) çözünme profillerinin karşılaştırılması amacıyla f_2 benzerlik faktörü değerlendirmesi yapılmıştır(Tablo 46).

Sodyum taurokolat ve lesitinin çözünme hızına olan etkisinin değerlendirilmesinde, Ansaid® ve Maximus® tabletlerin farklı ortamlardaki (Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF) çözünme profilleri f_2 benzerlik faktörü ile karşılaştırılmıştır. Burada kullanılan ortamlar sodyum taurokolat ve lesitin içerip içermeme durumuna göre değerlendirilmiş; ayrıca FaSSIF, SIF-FaSSIF'in ve FeSSIF ve SIF-FeSSIF'in çözünme profilleri karşılaştırılmıştır(Tablo 47)

Tablo 46. İn vitro çözünme ortamlarında Maximus® ve Ansaid® tabletlerin çözünme profillerinin f_2 ile karşılaştırılması

Çözünme Ortam	**Ansaid®/Maximus® f_2 Değeri**	**Benzerlik Durumu**
pH 4.5	69.9	Benzer
pH 6.8	92.1	Benzer
Kör FaSSIF	60.8	Benzer
FaSSIF	75.6	Benzer
SIF-FaSSIF	58.8	Benzer
Kör FeSSIF	53.1	Benzer
FeSSIF	65.8	Benzer
SIF-FeSSIF	74.6	Benzer

Tablo 47. Farklı in vitro çözünme ortamlarında Maximus® ve Ansaid® tabletlerin çözünme profillerinin f_2 ile karşılaştırılması

	Test Ortamı	Referans Ortam	f_2 Değeri	Benzerlik Durumu
Maximus® 100 mg	Kör FaSSIF	FaSSIF	62.4	Benzer
	Kör FaSSIF	SIF-FaSSIF	57.8	Benzer
	Kör FeSSIF	FeSSIF	31.3	Benzer değil
	Kör FeSSIF	SIF-FeSSIF	13.9	Benzer değil
	FaSSIF	SIF-FaSSIF	74.1	Benzer
	FeSSIF	SIF-FeSSIF	26.5	Benzer değil
Ansaid® 100 mg	Kör FaSSIF	FaSSIF	64.2	Benzer
	Kör FaSSIF	SIF-FaSSIF	63.3	Benzer
	FaSSIF	SIF-FaSSIF	54.0	Benzer
	Kör FeSSIF	FeSSIF	36.2	Benzer değil
	Kör FeSSIF	SIF-FeSSIF	16.3	Benzer değil
	FeSSIF	SIF-FeSSIF	27.2	Benzer değil

4.3.9.2. Model Bağımlı Yöntemler

İn vitro çözünme hızı kinetiklerinin değerlendirilmesinde DDSolver programı kullanılmıştır. Değerlendirmede flurbiprofenin çözünme verilerini en iyi şekilde tanımlayan model belirlenmiştir. DDSolver model uygunluğunun saptanmasında, $R^2_{adjusted}$, MSC ve AIC kriterleri kullanılmıştır. Bölüm 2.1.3.1.6.3'de Tablo 6'da verilen kinetik modellere uygunluk değerlendirilmiştir.

Sonuçlar Maximus® için Tablo 48'de ve Ansaid® için de Tablo 48'de gösterilmiştir. Uyum parametrelerine göre en uygun kinetik model kırmızı ile belirtilmiştir.

Tablo 48a. Maximus® tabletlerin çözünme hızı verilerinin DDSolver ile kinetik modellemesi

KİNETİK MODEL	pH 4.5			pH 6.8			Kör FaSSIF			FaSSIF			SIF-FaSSIF		
	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC
Weibull 1	0.958	2.85	20.3	0.802	1.18	42.3	0.919	2.18	36.0	0.940	2.37	37.5	0.971	3.18	30.5
Weibull 2	0.945	2.61	22.0	0.734	0.95	43.9	0.887	1.89	38.1	0.934	2.41	37.2	0.952	2.67	34.0
Weibull 3	***0.981***	***3.85***	***13.3***	0.697	0.76	45.3	0.854	1.53	40.6	0.819	1.26	45.3	0.797	1.15	44.7
Weibull 4	0.966	3.28	17.3	0.791	1.14	42.6	0.887	1.79	38.8	0.848	1.45	43.9	0.851	1.46	42.5
Peppas-Sahlin 1	0.978	3.53	15.5	0.795	1.14	42.6	0.874	1.66	39.7	0.817	1.54	43.3	0.814	1.30	43.7
Peppas-Sahlin 2	0.979	3.63	14.8	***0.847***	***1.51***	***40.0***	0.907	2.02	37.2	0.875	1.96	40.4	0.863	1.61	41.5
Logistic 1	0.955	2.83	20.5	0.769	1.09	42.9	0.939	2.74	32.1	0.961	2.97	33.2	***0.973***	***4.00***	***24.8***
Logistic 2	0.949	2.71	21.3	0.745	0.940	44.1	0.917	2.19	36.0	0.906	1.92	40.7	0.872	1.63	41.3
Logistic 3	0.874	1.68	28.5	0.120	-0.320	52.8	0.470	0.206	49.9	0.393	0.0530	53.7	0.304	-0.09	53.4
Gompertz 1	0.970	3.23	17.6	0.759	1.06	43.2	***0.950***	***3.14***	***29.3***	***0.966***	***3.33***	***30.8***	0.963	3.90	25.5
Gompertz 2	0.901	1.96	26.5	0.739	0.92	44.2	0.933	2.52	33.7	0.919	2.11	39.3	0.884	1.77	40.4
Gompertz 3	0.894	1.88	27.1	0.089	-0.360	53.1	0.468	0.205	49.9	0.399	0.0600	53.7	0.278	-0.12	53.6
Gompertz 4	0.899	1.95	26.6	0.200	-0.230	52.2	0.470	0.208	49.8	0.399	0.0600	53.7	0.339	-0.04	53.0
Probit 1	0.960	2.94	19.7	0.753	1.02	43.4	0.925	2.44	34.2	0.953	2.66	35.4	0.975	3.35	29.3
Probit 2	0.969	3.30	17.1	0.722	0.85	44.7	0.901	1.94	37.7	0.866	1.56	43.2	0.834	1.36	43.3

Tablo 48b. Maximus® tabletlerin çözünme hızı verilerinin DDSolver ile kinetik modellemesi

KİNETİK MODEL	Kör FeSSIF			FeSSIF			SIF-FeSSIF		
	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC
Weibull 1	0.958	2.84	31.4	0.865	1.60	40.7	0.970	3.30	25.9
Weibull 2	0.943	2.54	33.5	0.850	1.55	41.1	0.973	3.48	24.6
Weibull 3	0.973	3.22	28.8	0.850	1.55	41.1	0.689	0.736	43.8
Weibull 4	0.977	3.31	28.1	0.941	2.47	34.7	0.789	1.14	41.0
Peppas-Sahlin 1	0.923	2.14	36.3	0.855	1.56	41.0	0.811	1.25	40.2
Peppas-Sahlin 2	0.947	2.58	33.2	0.916	2.21	36.4	0.800	1.28	40.0
Logistic 1	0.967	3.11	29.5	0.901	1.98	38.1	***0.984***	***3.74***	***22.8***
Logistic 2	0.969	3.08	29.7	0.969	3.17	29.7	0.741	0.926	42.5
Logistic 3	0.891	1.78	38.8	0.585	0.445	48.8	0.151	-0.28	50.9
Gompertz 1	***0.985***	***3.95***	***23.7***	0.923	2.24	36.3	0.979	3.50	24.5
Gompertz 2	0.931	2.31	35.1	***0.974***	***3.24***	***29.3***	0.726	0.883	42.8
Gompertz 3	0.918	2.12	36.4	0.574	0.426	48.9	0.133	-0.31	51.1
Gompertz 4	0.918	2.12	36.4	0.596	0.470	48.6	0.154	-0.28	50.9
Probit 1	0.972	3.32	28.1	0.893	1.89	38.7	0.976	3.57	24.0
Probit 2	0.977	3.37	27.7	0.955	2.77	32.5	0.715	0.827	43.2

Tablo 49a. Ansaid® tabletlerin çözünme hızı verilerinin kinetik modellemesi

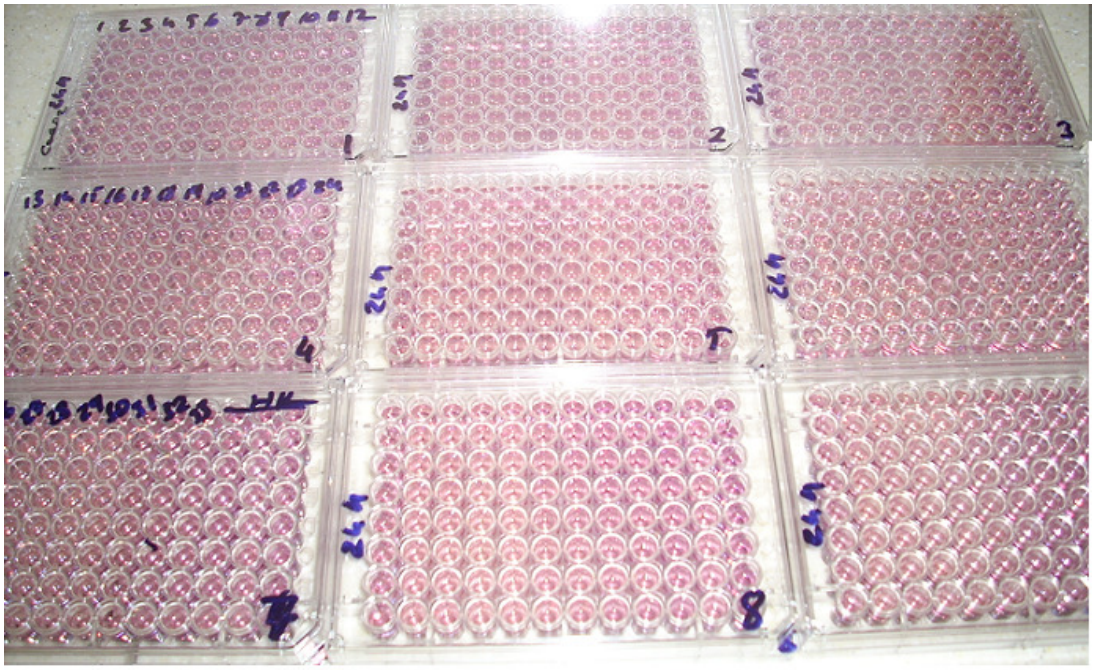
KİNETİK MODEL	pH 4.5			pH 6.8			Kör FaSSIF			FaSSIF			SIF-FaSSIF		
	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC
Weibull 1	0.979	3.71	15.4	0.811	1.24	42.4	***0.827***	***1.41***	***37.9***	0.882	2.36	36.5	0.965	2.98	25.6
Weibull 2	0.975	3.71	15.4	0.751	1.03	43.9	0.753	1.11	40.0	0.845	2.11	38.3	0.969	3.14	24.6
Weibull 3	0.960	2.92	20.9	0.722	0.860	45.1	0.676	0.778	42.3	0.725	0.899	46.7	0.863	1.57	35.5
Weibull 4	0.928	2.33	25.1	0.808	1.23	42.5	0.771	1.12	40.0	0.783	1.18	44.8	0.890	1.78	34.0
Peppas-Sahlin 1	0.965	3.49	17.9	0.802	1.18	42.8	0.754	0.978	40.9	0.752	1.09	45.4	0.667	1.13	38.6
Peppas-Sahlin 2	0.939	2.64	22.9	***0.861***	***1.61***	***39.8***	0.728	0.941	41.1	0.821	1.45	42.9	0.545	0.940	39.9
Logistic 1	0.979	3.89	14.2	0.784	1.19	42.8	0.758	1.22	39.2	***0.892***	***2.57***	***35.1***	0.959	2.82	26.7
Logistic 2	0.911	2.10	26.7	0.770	1.14	43.1	0.699	0.961	41.0	0.782	1.19	44.7	0.923	2.14	31.6
Logistic 3	0.927	2.27	25.5	0.157	-0.273	53.0	0.138	-0.268	49.6	0.210	-0.203	54.4	0.450	0.157	45.4
Gompertz 1	0.982	3.92	13.9	0.782	1.19	42.8	0.777	1.36	38.3	0.895	2.25	37.2	0.942	2.46	29.3
Gompertz 2	0.823	1.33	32.1	0.771	1.09	43.4	0.722	1.07	40.3	0.798	1.26	44.2	0.937	2.32	30.3
Gompertz 3	0.942	2.54	23.6	0.126	-0.309	53.2	0.119	-0.288	49.8	0.180	-0.24	54.7	0.445	0.150	45.5
Gompertz 4	0.942	2.54	23.6	0.238	-0.172	52.3	0.191	-0.213	49.3	0.262	-0.139	54.0	0.445	0.150	45.5
Probit 1	***0.980***	***3.94***	***13.8***	0.770	1.11	43.3	0.750	1.14	39.8	0.877	2.55	35.1	***0.972***	***3.26***	***23.7***
Probit 2	0.928	2.29	25.3	0.744	0.963	44.3	0.688	0.862	41.7	0.756	1.05	45.7	0.890	1.80	33.9

Tablo 49b. Ansaid® tabletlerin çözünme hızı verilerinin kinetik modellemesi

KİNETİK MODEL	Kör FeSSIF			FeSSIF			SIF-FeSSIF		
	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC	R^2_{adj}	MSC	AIC
Weibull 1	0.953	2.67	32.8	0.833	1.36	39.4	0.866	1.60	37.9
Weibull 2	0.937	2.40	34.7	0.817	1.33	39.7	***0.900***	***1.95***	***35.5***
Weibull 3	0.977	3.42	27.6	0.874	1.65	37.4	0.725	0.887	42.9
Weibull 4	0.983	3.79	25.0	0.898	1.88	35.8	0.820	1.33	39.8
Peppas-Sahlin 1	0.916	2.06	37.1	0.861	1.65	37.4	0.834	1.37	39.5
Peppas-Sahlin 2	0.947	2.60	33.3	0.888	1.80	36.3	0.809	1.34	39.7
Logistic 1	0.965	3.02	30.4	0.865	1.63	37.6	0.874	1.74	36.9
Logistic 2	0.982	3.58	26.5	0.939	2.36	32.4	0.778	1.11	41.3
Logistic 3	0.880	1.69	39.7	0.488	0.220	47.4	0.169	-0.255	50.9
Gompertz 1	0.983	3.84	24.6	0.884	1.78	36.5	0.868	1.70	37.2
Gompertz 2	0.950	2.56	33.6	***0.952***	***2.61***	***30.7***	0.776	1.13	41.2
Gompertz 3	0.887	1.74	39.3	0.480	0.207	47.5	0.149	-0.278	51.1
Gompertz 4	0.889	1.77	39.1	0.485	0.215	47.6	0.208	-0.212	50.6
Probit 1	0.967	3.07	30.1	0.855	1.55	38.1	0.890	1.86	36.1
Probit 2	***0.987***	***3.96***	***23.8***	0.920	2.10	34.2	0.754	1.01	42.0

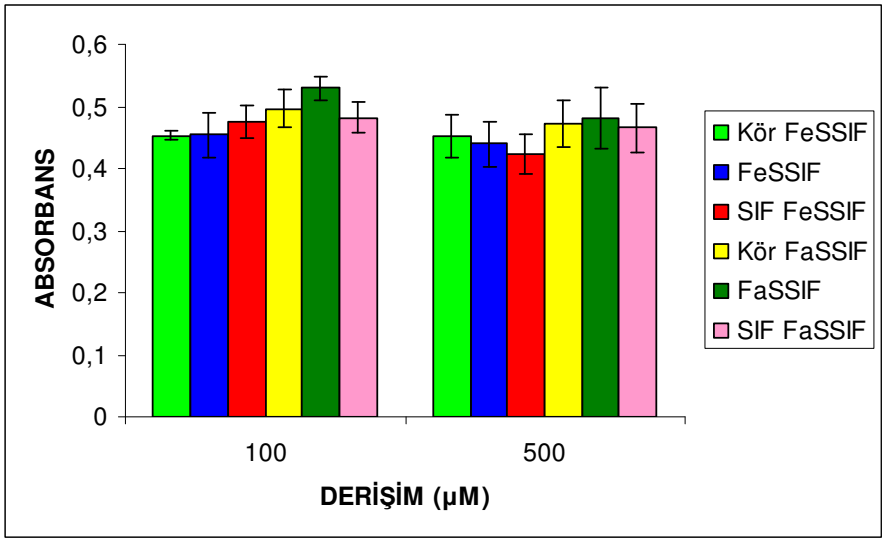
4.4. MTT Testine ait Bulgular

Etkin maddelerin ve biyouyumlu ortamların Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri bölüm 3.2.5.3'te anlatıldığı şekilde incelendi. MTT Testi sonucunda kültür kaplarında oluşan mor renk Şekil 32'de verilmiştir.

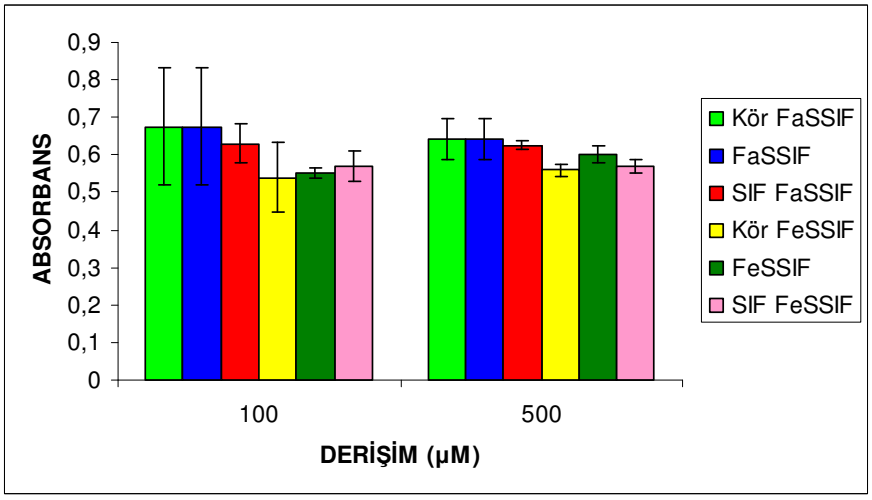


Şekil 32. MTT Testi sonucunda Caco-2 hücrelerinde gözlenen renklenme

100 ve 500 µM olarak hazırlanan levofloksasin içeren biyouyumlu ortamlarda yapılan MTT testleri sonucunda 1. ve 24. saat sonucunda elde edilen ortalama absorbans değerleri ve %95 olasılıklı güven aralıkları Şekil 33'te verilmiştir:



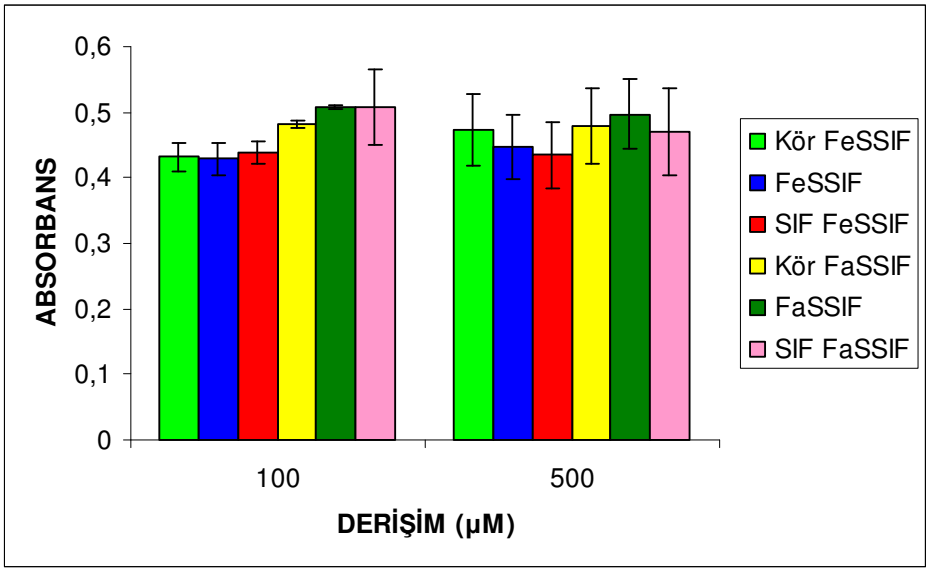
Şekil 33a. Levofloksasinin Caco-2 hücresindeki 1. saatteki MTT sonuçları



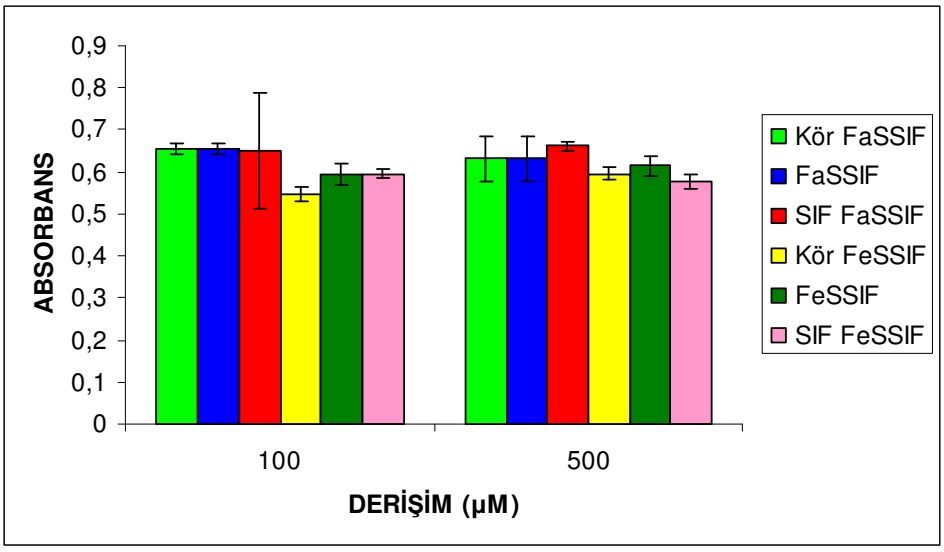
Şekil 33b. Levofloksasinin Caco-2 hücresindeki 24. saatteki MTT sonuçları

100 ve 500 µM olarak hazırlanan flurbiprofen içeren biyouyumlu ortamlarda yapılan MTT testleri sonucunda 1. ve 24. saat sonucunda elde edilen ortalama absorbans değerleri ve %95 olasılıklı güven aralıkları Şekil 34'te verilmiştir.

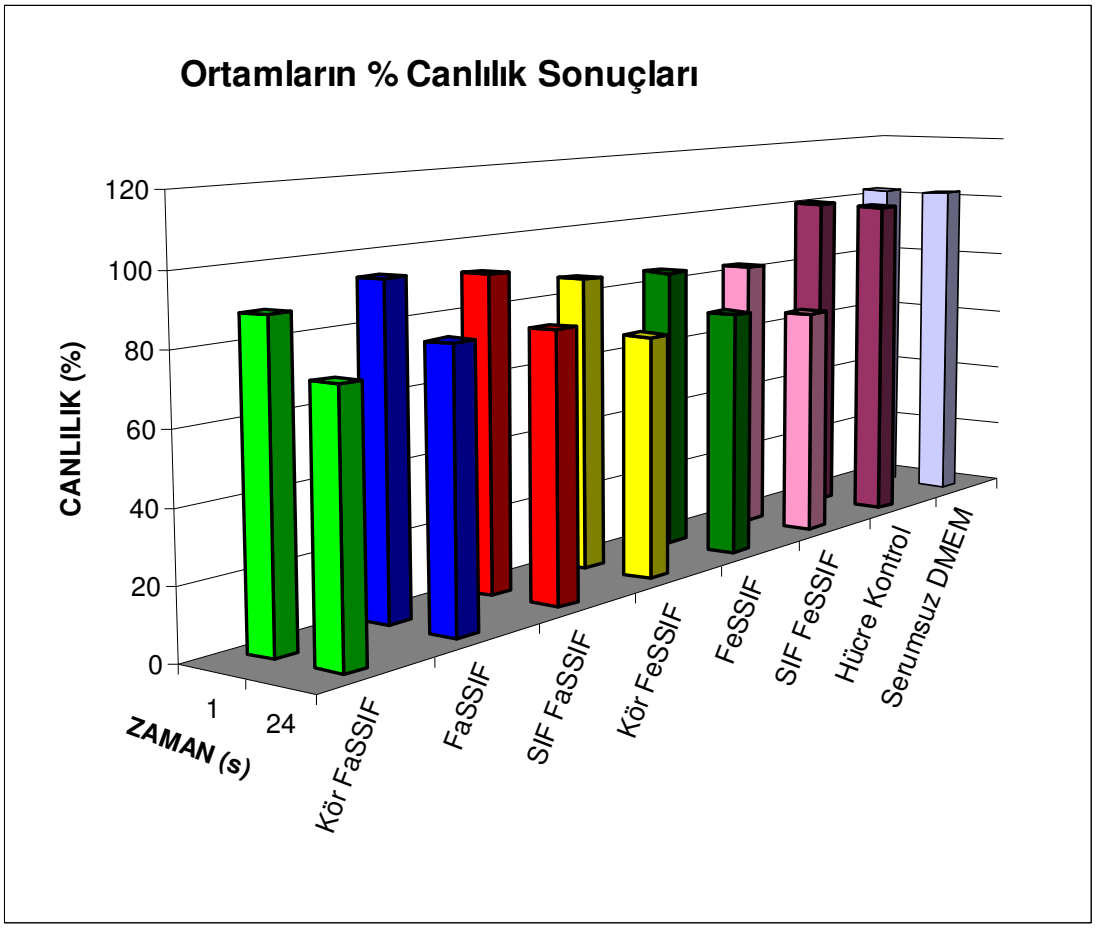
İn vitro çözünme ortamlarının, bu ortamlardaki levofloksasin ve flurbiprofenin % canlılık ve absorbans değerlerine ait grafikler Şekil 34'te verilmiştir:



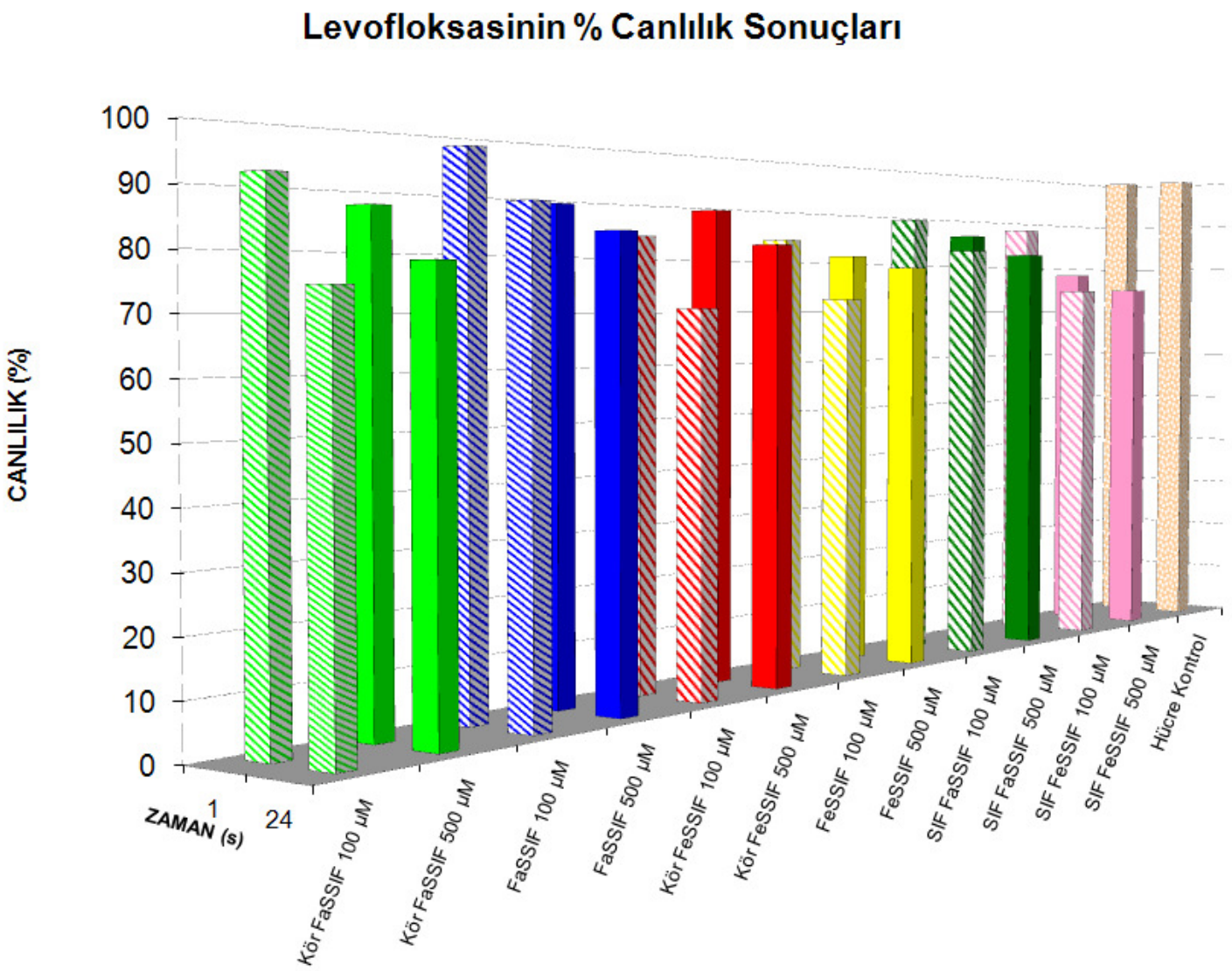
Şekil 34a. Flurbiprofenin Caco-2 hücresindeki 1. saatteki MTT sonuçları



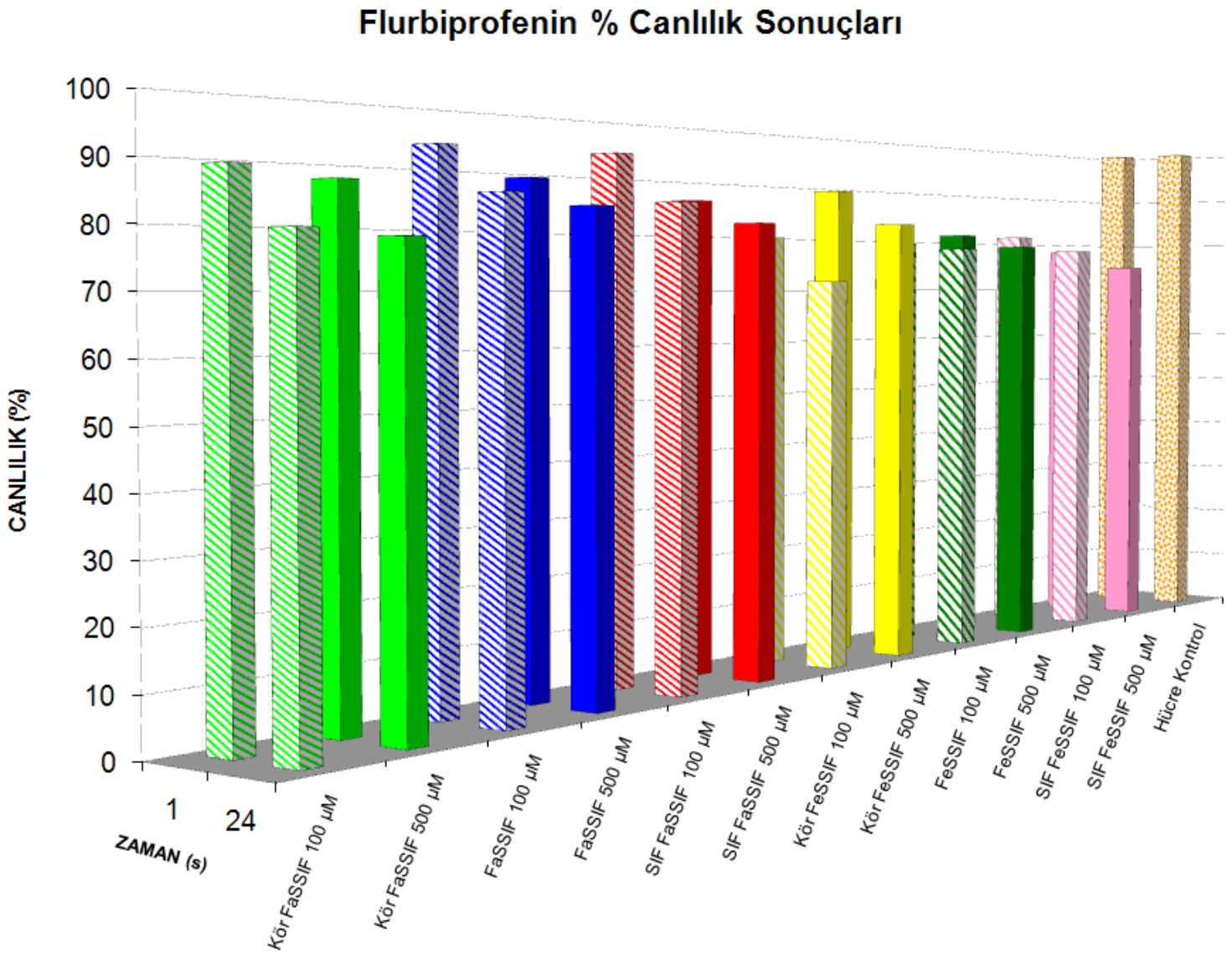
Şekil 34b. Flurbiprofenin Caco-2 hücresindeki 24. saatteki MTT sonuçları



Şekil 35a. Ortamların Caco-2 hücresindeki MTT testi sonuçlarına göre % canlılık (hücre kontrol: serumlu DMEM)



Şekil 35b. Biyouyumlu ortamlarda levofloksasinin Caco-2 hücresindeki MTT sonuçlarına göre % canlılık



Şekil 35c. Biyouyumlu ortamlarda flurbiprofenin Caco-2 hücresindeki MTT sonuçlarına göre % canlılık

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Türk İlaç Piyasasında bulunan BCS Sınıf 1'e göre yüksek çözünürlük-yüksek permeabilite gösteren levofloksasinin ve Sınıf 2'ye göre düşük çözünürlük-yüksek permeabilite gösteren flurbiprofenin hızlı salımlı tablet şekillerinin açlık tokluk durumlarındaki in vivo performanslarının in vitro çözünürlük, ve çözünme hızı açısından değerlendirilmesi ve kullanılan ortamların hücrelerin canlılığına olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Öncelikle ortamlara, etkin maddelere ve dozaj şekillerine ait çalışmalar yapılmıştır. İn vitro çalışmalar, pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8 gibi klasik mide ve bağırsak ortamlarında, FaSSIF ve FeSSIF biyouyumlu ortamlarda ve SIF-Powder® karışımından hareketle hazırlanan ortamlarda yapılmıştır.

5.1. İn Vitro Çözünme Ortamlarında Yapılan Denetimler

5.1.1. Yüzey Gerilimi

Yüzey gerilimi ölçümleri Du Nouy tensiyometre kullanılarak klasik çözünme ortamları, kör ortamlar ve biyouyumlu ortamlarda yapılmıştır(Tablo 19). Klasik çözünme ortamları olan pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8 ortamlarında ölçülen ortalama yüzey gerilimleri sırasıyla 56.1 ± 0.3, 58.1 ± 2.3 ve 63.3 ± 0.7 mN/m (veya dyn/cm) olarak bulunmuştur.

Kör FaSSIF (48.9 ± 0.4 mN/m) ve FaSSIF (41.2 ± 0.6 mN/m) ortamlarının yüzey gerilimleri karşılaştırıldığında, FaSSIF ortamının yüzey gerilimi daha düşük bulunmuştur. Burada ortama ilave edilen sodyum taurokolat ve lesitinin yüzey gerilimini düşürmesi % 95 olasılıkla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p<0.05$).

SIF-FaSSIF (45.2 ± 0.6 mN/m) ortamındaki yüzey geriliminin, FaSSIF (41.2 ± 0.6 mN/m) değerlerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Tokluk durumu ortamlarının yüzey gerilimi karşılaştırıldığında FeSSIF (38.7 ± 2.6 mN/m), Kör FeSSIF (44.9 ± 0.6 mN/m) ortamına göre daha düşük ve anlamlı farklı bulunmuştur ($p<0.05$).

SIF-FeSSIF (41.2 ± 0.6 mN/m) ve FeSSIF (38.7 ± 2.6 mN/m) ortamlarında yüzey gerilimi değerleri arasında da anlamlı farklılık görülmüştür($p<0.05$).

Kullanılan biyouyumlu ortamlar (FaSSIF, SIF-FaSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF) sodyum taurokolat ve lesitin içermektedir. Sodyum taurokolat ve lesitin yüzey etkin madde özelliği gösterdiğinden, bu maddelerin açlık ve tokluk çözünme ortamlarının yüzey gerilimini düşürdüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlardan hareketle biyouyumlu ortamlarda yapılan çözünürlük ve çözünme hızı çalışmalarında da artış gözlenmesi beklenmiştir.

5.1.2. Viskozite

Biyouyumlu ortamlarda yer alan sodyum taurokolat ve lesitinin ortam viskozitesini artırıp artırmadığını incelemek amacıyla tüm in vitro çözünme ortamlarında (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF) Brookfield viskozimetresi kullanılarak viskozite değerleri ölçülmüştür.

En düşük viskozite 0.980 mPas değeri ile pH 1.2 ortamında gözlenmiştir. pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF ve SIF-FaSSIF değerleri

1.14 mPas olarak saptanmıştır. Kör FeSSIF ve SIF-FeSSIF için bu değerler sırasıyla 1.06 ve 1.39 mPas'tır(Tablo 20). En yüksek viskozite değeri ise FaSSIF ve FeSSIF ortamında 1.72 mPas olarak elde edilmiştir. FaSSIF ve FeSSIF ortamlarının SIF Powder®'la hazırlanan ortamlarına göre daha yüksek viskozite değerleri göstermesi, SIF Powder®'la hazırlanan ortamların liyofilize bir karışım olmasına bağlanabilir.

5.1.3. Biyouyumlu Ortamlardaki Misel Büyüklüğü

Biyouyumlu ortamlarda bulunan safra bileşenlerinin ilaçların çözünürlük ve çözünme hızlarında artışa neden olması miseller çözünürlüğe dayanmaktadır. Çözünme ortamına sodyum taurokolat ve lesitin ilavesiyle miseller çözelti oluşmaktadır. Çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin misellerin içerisine hapsolmasıyla çözünürlüklerinde belirgin artışlar görülmektedir[49].

Çalışmada misel büyüklüğü ölçümleri Malvern Zeta Sizer aletiyle yapılmıştır. Yapılan ölçümlerde, açlık durumu ortamlarının miseller boyutu, tokluk durumu ortamlarıyla karşılaştırıldığında belirgin farklılıklar görülmektedir(Tablo 21). FaSSIF'in misel boyutu 39.0 ± 0.6 nm iken, SIF-FaSSIF'in misel boyutu 67.2 ± 13.3 nm olarak bulunmuştur. FeSSIF ve SIF-FeSSIF'in misel boyutları ise 4.92 ± 0.30 ve 4.55 ± 0.07 nm olarak bulunmuştur.

Yapılan literatür değerlendirmelerinde, FaSSIF ve FeSSIF ortamlarına ilişkin misel büyüklüğü ile ilgili verilere rastlanmamıştır.

SIF Powder® analiz sertifikasında yer alan spesifikasyonlarda ise misel büyüklüğü için FaSSIF için 30 – 70 nm, FeSSIF için ise 2 – 10 nm olarak belirtilmiştir. SIF-FaSSIF ve SIF-FeSSIF'e ait sonuçların bu

aralıklarda yer aldığı görülmektedir. Ayrıca FaSSIF ve FeSSIF ortamlarının misel boyutu da aynı misel büyüklüğü aralıklarına girmektedir.

5.2. Partikül Büyüklüğü Değerlendirmeleri

Etkin maddelerin partikül büyüklükleri Laser X-Diffraction Particle Sizer aletiyle yapılmıştır. Levofloksasinin partikül büyüklüğü dağılımı eterde, flurbiprofeninki distile su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Levofloksasinin ortalama partikül büyüklüğü değeri 17.6 ± 0.6 µm bulunmuştur. Flurbiprofenin ortalama partikül büyüklüğü ise 45.1 ± 1.9 µm olarak bulunmuştur. Partikül büyüklüğüne karşılık kümülatif partikül büyüklüğü dağılım grafikleri değerlendirildiğinde etkin maddelerin partikül büyüklüklerinin homojen dağılım gösterdiği görülmektedir(Şekil 15 ve Şekil 23).

5.3. UV Spektrofotometrik Miktar Tayini Validasyonu

Levofloksasinin pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarında her biri 9 noktalı olan kalibrasyonlar üçer seride gerçekleştirilmiştir. Flurbiprofen için ise pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarında aynı şekilde dokuz noktalı ve üç seri kalibrasyon yapılarak standart doğru denklemleri elde edilmiştir. Günlük kalibrasyonlar da dokuz noktalı olarak yapılmış ve çözünürlük, etkin madde miktar tayini ve çözünme hızı verilerinin analizlerinde kullanılmıştır.

Spektrofotometrik yönteme ait analitik yöntem validasyonları levofloksasin için pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8'de, flurbiprofen için ise pH 4.5 ve pH 6.8'de yapılmıştır. Kullanılan analitik yöntemin doğrusallığı, kesinliği, tekrar edilebilirliği istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Yöntemin doğrusallığı levofloksasin için 1.25-10 µg/mL ve flurbiprofen için 2-10 µg/mL konsantrasyon aralığında gösterilmiş ve çizilen regresyon doğrusuna ait R^2 değerleri 0.999 veya 1.00 olarak bulunmuştur. Artan derişim ile absorbanslar arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir. Standart doğrulara ait uyum ölçütleri de (SKT, ASKT, KASKT ve AIC) değerlendirilmiş ve sonuçların oldukça düşük olduğu görülmüştür.

Yöntemin doğruluğunda farklı derişimlerde yapılan analiz sonuçları % geri elde ve %VK ile değerlendirilmiştir. Hem levofloksasin hem de flurbiprofen için geri elde değerleri %90-110 aralığında bulunmuş ve tüm % VK değerleri %2'den düşük bulunmuştur.

Yöntemin kesinliğinin tayini için tekrar edilebilirlik ve kesinlik parametreleri tayin edilmiş ve sonuçlar X_{ort}, SS ve % VK'ların hesaplanarak değerlendirilmiştir. %VK değerleri %2'nin altında bulunmuştur.

Levofloksasine ait spektrofotometrik miktar tayini yönteminin sadece bu etkin maddeye özgün ve seçici olduğu görülmüştür. Aynı durum flurbiprofen için de geçerlidir.

Levofloksasinin ve flurbiprofenin oda sıcaklığında (25˚C) ve 37˚C'de 24 saat olarak gerçekleştirilen stabilite testleri sonucunda her iki etkin maddenin de belirtilen koşullarda dayanıklı olduğu gözlenmiştir.

5.4. İn Vitro Çözünme Ortamlarındaki Çözünürlük Değerlendirmeleri

Levofloksasin ve flurbiprofenin farklı çözünme ortamlarındaki çözünürlük değerleri sırasıyla bölüm 3.2.2.4.2 ve bölüm 3.2.3.4.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Her iki etkin maddenin

değişik in vitro çözünme ortamlarındaki çözünürlükleri de pH'ya göre belirgin değişiklikler göstermektedir.

Çözünürlük sonuçlarını değerlendirebilmek amacıyla D_0 değerleri göz önüne alınmıştır. D_0, doz konsantrasyonunun (ilacın dozu / doz alınırken tüketilen sıvı hacmi) ilacın çözünürlüğüne olan oranıdır. İlaç alınırken kullanılan sıvı hacmi sabit olup, 250 mL olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle D_0 değerini belirleyen esas faktör ilacın tedavide kullanılan dozunun, çözünürlüğe olan oranıdır. D_0 değerinin 1'den küçük olması ilacın yüksek çözünürlük gösterdiğinin kanıtıdır.

D_0 kriterinin hesaplanmasında, levofloksasin içeren Tavanic® tabletlerinin dozu 500 mg; flurbiprofen içeren Ansaid®, ve Maximus® tabletlerin dozu ise 100 mg'dır.

Çözünürlük çalışmaları iki şekilde yorumlanmıştır: 1) pH'nın etkisi 2) Sodyum taurokolat ve lesitin konsantrasyonunun etkisi

Çözünürlüğe pH etkisinin değerlendirmesinde, FDA'nın "Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms" adlı kılavuzunda kullanılması önerilen pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8 klasik in vitro çözünme ortamları ve biyouyumlu ortamların hazırlanmasında kullanılan, sodyum taurokolat ve lesitin içermeyen Kör FaSSIF (pH 6.5) ve Kör FeSSIF (pH 5.0) ortamları kullanılmıştır.

Levofloksasin çözünürlüğü klasik in vitro çözünme ortamlarda değerlendirildiğinde en yüksek çözünürlük pH 1.2 ortamında (90.5 ± 0.0 mg/mL) gözlenmiştir. pH 4.5 ve pH 6.8 ortamlarında ise sırasıyla 43.9 ± 0.3 mg/mL ve 31.5 ± 0.1 mg/mL olarak elde edilmiştir. Kör FeSSIF (52.5 ± 0.1 mg/mL) ortamının çözünürlüğü, pH 4.5 (43.9 ± 0.3 mg/mL)

ortamının çözünürlüğüne yakındır. Kör FaSSIF ortamının çözünürlüğü de (29.5 ± 0.0 mg/mL) pH 6.8 (31.5 ± 0.1 mg/mL) ortamının çözünürlüğüne yakındır.

Levofloksasinin pH-çözünürlük profiline bakıldığında (Şekil 20) pH'da gözlenen ufak değişikliklerle çözünürlük değeri değişse bile levofloksasin tüm ortamlarda yüksek çözünürlük göstermektedir. Klasik in vitro çözünme ortamlarındaki D_0 değerleri hesaplandığında tüm ortamlarda bu değerin 1'den küçük olması da levofloksasinin yüksek çözünürlük gösterdiğinin kanıtıdır(Tablo 26).

Çözünürlüğe sodyum taurokolat ve lesitin konsantrasyonlarının etkisinin değerlendirilmesinde fizyolojik ortamı daha iyi yansıttığı düşünülen biyouyumlu ortamlar dikkate alınarak çözünürlük çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Açlık durumundaki bağırsak fizyolojisini taklit etmek amacıyla Dressman'ın[34] önerdiği şekilde laboratuvarda hazırlanan 3 mM sodyum taurokolat ve 0.75 mM lesitin içeren FaSSIF ortamı ve liyofilize toz halinde bulunan SIF Powder® kullanılarak hazırlanan SIF-FaSSIF ortamında çözünürlük çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca, FaSSIF ve SIF-FaSSIF ortamlarındaki sodyum taurokolat ve lesitin etkilerinin değerlendirilmesi için her iki ortamın körü olan pH 6.5 fosfat tamponu (Kör FaSSIF) de çözünürlük değerlendirmelerinde kullanılmıştır. FaSSIF (37.0 ± 0.3 mg/mL) ve Kör FaSSIF (29.5 ± 0.0 mg/mL) ortamlarından elde edilen çözünürlüklerde; FaSSIF ortamında levofloksasin çözünürlüğünde artış gözlenmiştir. Buna karşılık FaSSIF ile SIF-FaSSIF'deki çözünürlükler karşılaştırıldığında SIF-FaSSIF'te (98.4 ± 0.1 mg/mL) yaklaşık üç kat artış görülmüştür. Bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p<0.05$)(Tablo 26). Bu

çözünürlük değerleri D_0 açısından değerlendirildiğinde yüksek çözünürlük kriterini sağladığı görülmüştür.

Tokluk durumunu taklit eden biyouyumlu ortamlar için Dressman'ın[34] önerdiği şekilde hazırlanan 15 mM sodyum taurokolat ve 3.75 mM lesitin içeren FeSSIF, SIF Powder® ile hazırlanan SIF-FeSSIF ve her iki ortamın da kör çözeltisi olan pH 5.0 ortamı (Kör FeSSIF) çözünürlük değerlendirmelerinde kullanılmıştır(Tablo 26). Levofloksasinin çözünürlük değerleri Kör FeSSIF ortamında 52.5 ± 0.1 mg/mL iken; FeSSIF ortamında 67.8 ± 0.2 mg/mL çözünürlük değeri bulunmuştur. SIF-FeSSIF (142 ± 0) ortamında yapılan çözünürlük çalışmasında, FeSSIF ortamına göre yaklaşık 2 kat artış gözlenmiştir. Bu artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu çözünürlük değerleri D_0 açısından değerlendirildiğinde yüksek çözünürlük kriterini sağladığı görülmüştür.

Flurbiprofen zayıf asit özellikte bir maddedir ve pKa değeri 4.22'dir. pK_a değerine yakın olan pH'larda çözünürlüğü düşüktür. pH-çözünürlük profili incelendiğinde ortamın pH değeri arttıkça çözünürlüğünün de arttığı gözlenmiştir (Şekil 29). pH 1.2 in vitro çözünme ortamında pratikte çözünmediğinden, çözünürlük çalışması bu ortamda gerçekleştirilememiştir.

Flurbiprofenin çözünürlüğüne pH etkisinin değerlendirmesinde, pH 4.5 ve pH 6.8 klasik in vitro çözünme ortamları ve Kör FaSSIF (pH 6.5) ve Kör FeSSIF (pH 5.0) ortamları kullanılmıştır.

pH 4.5 ortamındaki çözünürlüğü 0.0555 ± 0.0003 mg/mL iken pH 6.8'de bu değer yaklaşık 46 katına (2.53 ± 0.05 mg/mL) ulaşmıştır. Kör FaSSIF (1.78 ± 0.27 mg/mL) ortamının çözünürlüğü Kör FeSSIF

ortamının çözünürlüğü (0.0756 ± 0.0014 mg/mL) olarak bulunmuştur. FaSSIF ile SIF-FaSSIF ortamındaki ve FeSSIF ile SIF-FeSSIF ortamındaki çözünürlük değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Çözünürlük sonuçları göstermiştir ki pH arttıkça flurbiprofenin çözünürlüğü artmaktadır. Bu nedenle en yüksek çözünürlük değeri pH 6.8 ortamında görülmüştür.

D_0 değerleri incelendiğinde flurbiprofen pH 4.5 ve pH 5.0 (Kör FeSSIF) ortamlarında düşük çözünürlük ($D_0 > 1$) gösterirken, diğer tüm ortamlarda yüksek çözünürlük ($D_0 < 1$) göstermiştir(Tablo 39).

Çözünürlüğe sodyum taurokolat ve lesitin konsantrasyonlarının etkisinin değerlendirilmesinde flurbiprofenin biyouyumlu ortamlar kullanılarak çözünürlük çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Flurbiprofenin açlık durumunda yapılan çözünürlük çalışmalarına bakıldığında Kör FaSSIF çözünme ortamındaki çözünürlüğü 1.78 ± 0.03 mg/mL iken, FaSSIF ortamı kullanıldığında 1.25 ± 0.22 mg/mL ve SIF-FaSSIF ortamı kullanıldığında 1.70 ± 0.10 mg/mL bulunmuştur. Bu durumda, 3 mM sodyum taurokolat ve 0.75 mM lesitin ilavesinin flurbiprofenin çözünürlük değerinin artışında yeterli olmadığı görülmüştür.

FaSSIF ve SIF-FaSSIF ortamlarındaki çözünürlük değerleri, pH 6.8 ortamındaki çözünürlüğü ile karşılaştırıldığında, daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeni, flurbiprofenin zayıf asit özelliğine bağlı olarak yüksek pH'larda daha iyi çözünmesidir; zira FaSSIF ve SIF-FaSSIF ortamlarının pH değeri 6.5'tir.

Tokluk durumunu taklit eden biyouyumlu ortamlar için FeSSIF, SIF-FeSSIF ve Kör FeSSIF (pH 5.0) ortamları çözünürlük

değerlendirmelerinde kullanılmıştır. Flurbiprofenin çözünürlük değerleri Kör FeSSIF ortamında 0.0756 ± 0.0014 mg/mL iken; FeSSIF ortamında 0.529 ± 0.007 mg/mL olarak bulunmuştur. FeSSIF ortamında Kör FeSSIF'e göre yaklaşık olarak 7 kat artış gözlenmiştir. SIF-FeSSIF (4.20 ± 0.02) ortamında yapılan çözünürlük çalışmasında, FeSSIF ortamına göre yaklaşık 8 kat artış gözlenmiştir. SIF-FeSSIF, Kör FeSSIF ortamı ile karşılaştırıldığında ise yaklaşık 56 kat artış görülmüştür(Tablo 39). Sonuçta çözünme ortamına 15 mM sodyum taurokolat ve 3.75 mM lesitin ilavesinin flurbiprofenin çözünürlüğünde belirgin artışlara neden olduğu görülmüştür.

Flurbiprofenin tokluk durumu çözünürlük değerleri D_0 açısından değerlendirildiğinde yüksek çözünürlük kriterini sağladığı görülmüştür (Tablo 39).

Sonuç olarak levofloksasin ve flurbiprofenin çözünürlük değerleri karşılaştırıldığında, liyofilize toz şeklindeki SIF Powder®'la hazırlanan ortamların, laboratuvarda hazırlanan biyouyumlu ortamlara göre daha yüksek ve tutarlı sonuç verdiği görülmüştür.

5.5. Tabletlerde Yapılan İn Vitro Kalite Denetimlerinin Değerlendirilmesi

Tüm kalite denetimleri Levofloksasin içeren Tavanic® tabletler ve flurbiprofen içeren Ansaid® ve Maximus® tabletlerinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan tüm kalite denetimleri farmakope şartlarında gerçekleştirilip, sonuçlar X_{ort}, SS ve %VK değerleri ile gösterilmiştir.

Tablerde yapılan çap-kalınlık ve ağırlık tekdüzeliği testlerinde hesaplanan SS ve %VK değerleri %2'nin altındadır.

Tabletlerde yapılan etkin madde miktar tayini testlerinde hesaplanan ortalama miktarlar %95-105 aralığındadır. Hesaplanan SS ve %VK değerleri %2'nin altındadır.

Sertlik değerleri Tavanic® tabletler için ortalama 409 ± 5 N, Ansaid® ve Maximus® tabletler için ise sırasıyla ortalama 121 ± 7 N ve 115 ± 6 N olarak ölçülmüştür.

Tüm tabletler için ufalanma-aşınma testi sonuçları % 1'den küçük bulunmuştur. Tavanic® tabletlerdeki % friabilite % 0.00723'tür. Maximus® tabletlerde ufalanma-aşınma sonucunda ağırlık kaybı gözlenmemiş olup Ansaid® tabletlerde %friabilite değeri % 0.0477 olarak bulunmuştur. Bu değerler % 1'den düşük olduğundan tabletlerin ufalanma aşınma değerleri uygun bulunmuştur.

Dağılma testi sonucunda Tavanic® tabletler ortalama 8.42 ± 0.65 dak'da dağılırken; Maximus® tabletler ortalama 57.0 ± 8.9 sn'de; Ansaid® tabletler ise 47.7 ± 5.1 sn'de dağılmıştır. Tüm tabletler 30 dak içerisinde dağıldığından farmakope sonuçlarına uygundur.

5.6. Tabletlerin Çözünme Hızı Tayini

Çözünme hızı testi ile ilacın mide-bağırsak kanalındaki davranışının, in vitro koşullarda tahmini amaçlanmaktadır. Bir etkin maddenin yüksek çözünürlük ve yüksek permeabilite özelliklerine sahip olması, o ilacın BY açısından sorun yaratmayacağının göstergesidir. Bu durumda BE çalışmaları için test ve referans maddelerin çözünme hızı profilleri pH 1.0-7.5 arasında karşılaştırılarak in vivo BE çalışmalarından muaf tutulmaları 2000 yılında FDA ve 2002 yılında EMA kılavuzlarında yerini

almıştır. Etkin maddeyi içeren katı oral dozaj formunun FDA kılavuzunda pH 1.0-7.5 ortamlarında, EMA'nın 2010 kılavuzunda pH aralığı olarak 1.0-6.8 belirtilmekte olup, genellikle pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8'de ilk 30 dak içerisinde % 85'inden fazlası çözünüyorsa ilacın hızlı çözündüğü kabul edilir. Eğer 15 dak içerisinde % 85'ten fazla çözünme gerçekleştiyse ilacın çok hızlı çözündüğü belirtilmiştir.

500 mg levofloksasin içeren hızlı salımlı Tavanic® tabletlerin çözünme hızı deneyleri Bölüm 3.2.3.6'da anlatıldığı şekilde dokuz farklı pH ortamında (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF) yapılmıştır. Deneyler 60 dak süresince gerçekleştirilmiştir. Kör FaSSIF (pH 6.5) dışındaki tüm ortamlarda 30.dak'da Tavanic® tabletlerden % çözünen levofloksasin değeri % 85'ten fazladır. Bu durum levofloksasinin hızlı çözündüğünün bir göstergesidir. Bütün ortamlarda (Kör FaSSIF hariç) 60 dak içinde yaklaşık %100 çözünme gözlenmiştir. Buna karşılık Kör FaSSIF ortamında 30. dak'da %78 çözünme gerçekleşmiştir. Levofloksasinin çözünürlüğü ve çözünme hızı pH'dan yüksek oranda etkilenmektedir. Ortho-Mc Neil-Janssen(ABD) firmasının verileri levofloksasinin en düşük çözünürlük gösterdiği pH 6.7 iken en yüksek çözünürlüğü pH 6.9'da gösterdiğini belirtmektedir[88]. Yapılan çalışmalarda da pH 1.2 – pH 6.8 aralığındaki çözünürlük değerlerinin dalgalanma gösterdiği ve çözünürlük/çözünme hızının pH'ya duyarlı olduğu saptanmıştır.

Levofloksasinin iki farklı pKa değeri bulunmaktadır. Bu değerler pK_{a1}: 6.05, pK_{a2}: 8.22'dir ve pK_a değerlerine yakın pH değerlerinde levofloksasinin non-iyonize halde bulunması nedeniyle çözünürlük değerlerinde değişkenlik gözlenmesi söz konusudur. Bölüm 5.2.2'de değerlendirilen çözünürlük çalışması sonuçlarında da levofloksasin için pH

değeri 6.5 olan Kör FaSSIF (29.5 mg/mL) ortamında diğer çözünme ortamlarına göre daha düşük çözünürlük değeri elde edilmiştir. Levofloksasinin çözünürlüğünün düşük olduğu pH'da çözünme hızının da düşük olması beklenen bir sonuçtur. Aynı pH'ya sahip olan (pH 6.5) FaSSIF (37 mg/mL) ve SIF-FaSSIF(98.4 mg/mL) ortamlarında çözünürlük yanında, çözünme hızının arttığı görülmüştür. FaSSIF ve SIF-FaSSIF ortamları kullanıldığında, levofloksasinin 30. dak'da % çıkan miktarı % 90'a ulaşmıştır. Bu sonuç levofloksasin tabletler için sodyum taurokolat ve lesitinin, çözünme hızında artışa neden olduğunun ispatıdır.

100 mg flurbiprofen içeren Maximus® ve Ansaid® tabletlerde yapılan çözünme hızı deneyleri sekiz farklı pH ortamında (pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF) yapılmıştır. Flurbiprofen zayıf asit özellikte bir maddedir ve pKa değeri 4.22'dir. Flurbiprofenin iyonizasyonu, çözünmesinde önemli bir parametredir. pKa değerine yakın olan pH'larda çözünürlüğü düşüktür. Ortamın pH değeri arttıkça flurbiprofenin iyonize formu artacağından, çözünmesi de artmaktadır. Buna bağlı olarak 60. dak'daki % çözünen değerleri de düşük bulunmuştur. pH 4.5 ortamında % çözünen flurbiprofen miktarı 60. dak'da Maximus® tablet için % 42; Ansaid® tablet için de % 47 iken Kör FeSSIF (pH 5.0) ortamında sırasıyla % 62 ve % 68'dir. Bu durumda, flurbiprofenin pK_a değerinden uzaklaştıkça artan pH'larda çözünme hızında artış olmasına rağmen dozaj şeklinden tam salım gözlenmemiştir.

pH'sı 5.0 olan SIF-FeSSIF ortamında yüksek derişimlerde bulunan sodyum taurokolat ve lesitine bağlı olarak çözünme hızla gerçekleşmiştir. Bu ortamlarda Maximus® tabletlerde 60. dak'da % 101, Ansaid® tabletlerde ise % 105 olarak tamamen çözünme gözlenmiştir. FeSSIF ortamında Maximus®için % 78; Ansaid® için % 62 olan % çözünme,

Kör FeSSIF ortamına göre artış göstermiş olsa da, bu artış SIF-FeSSIF kadar yüksek değildir. FeSSIF ortamı laboratuvar koşularında sodyum taurokolat ve lesitin çözeltilerinin ayrı ayrı hazırlanıp evaporatörde miseller çözelti haline getirilmesiyle hazırlanmaktadır. Buna karşılık SIF-FeSSIF, sodyum taurokolat ve lesitinin liyofilize toz karışımı olan SIF Powder®'dan hareketle kolaylıkla hazırlanmaktadır. FeSSIF ve SIF-FeSSIF sonuçlarının değişkenlik göstermesi ve SIF Powder®'ın liyofilize bir toz karışım olması nedeniyle hazırlama şartlarının farklılığından kaynaklanmaktadır.

Flurbiprofenin pH-çözünürlük profilinde (Şekil 29) görüldüğü gibi pH'nın artışına bağlı olarak flurbiprofen çözünürlüğü artmaktadır. Buna bağlı olarak pH 4.5 ve pH 6.8'de yapılan çözünme hızı çalışmalarında pH'nın artışı ile 60. dak'da çözünen değerlerde yaklaşık iki kat artış gözlenmiştir. Maximus® için pH 4.5'ta % 42 iken, pH 6.8'de % 92 çözünme gözlenmiştir. Ansaid® için bu değerler sırasıyla % 47 ve % 92'dir.

pH'sı 6.5 olan FaSSIF ve SIF-FaSSIF ortamlarında ise, tüm tabletlerde 30. dak'da % 85'ten fazla çözünme gözlenmiştir. FaSSIF ortamında Maximus® % 98, Ansaid® için % 96 çözünme gözlenirken SIF-FaSSIF ortamında her iki tablet de % 99 çözünmüştür.

5.7.pH-Çözünürlük-Çözünme Hızı Yüzey Grafiklerinin Değerlendirilmesi

pH, çözünürlük ve çözünme hızı verilerinin bir arada incelenmesine olanak sağlayan yüzey grafiklerinde; pH skalasında, klasik ortamlar olan pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8 ve pH 5.0(Kör FeSSIF) ve pH 6.5(Kör FaSSIF) değerleri kullanılmıştır. Etkin maddelerin bu ortamlardaki çözünürlükleri ve tabletlerin 30. dak'daki % çözünen değerleri yüzey grafiklerinde gösterilmiştir(Şekil 22 ve Şekil 31).

Levofloksasinin yüzey grafiği Şekil 22'de görüldüğü gibi dalgalanmalar göstermektedir. Levofloksasinin pH 1.2'deki yüksek çözünürlük değeri pH 4.5'te azalmakta, pH 5.0'da biraz artış göstererek pH 6.5'te en düşük değerine ulaşmakta, pH 6.8'de de yeniden artmaktadır. Çözünme hızı değerleri göz önüne alındığında ise levofloksasin pH 1.2, pH 4.5, pH 5.0 ve pH 6.8'de hızlı çözünme gösterirken, pH 6.5'te nispeten yavaş çözünmektedir. Bu Bölüm.5.2.2.'de açıklandığı şekilde levofloksasinin pH'ya bağımlı çözünürlük özelliğinden kaynaklanmaktadır.

Şekil 31'de görüldüğü gibi, flurbiprofen için pH'nın artmasıyla çözünürlük ve çözünme hızı değerleri birbiriyle paralel olarak artmaktadır. Bu nedenle en yüksek çözünürlük ve çözünme hızı değerleri pH 6.8'de görülmüştür. Maximus® ve Ansaid® tabletlerinden % çözünen flurbiprofene göre çizilen yüzey grafikleri benzerlik göstermektedir.

5.8. İn Vitro Çözünme Hızı Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

5.8.1. Model Bağımsız Yöntemler

Tavanic® tabletlerin in vitro çözünme hızı profilleri Şekil 21'de verilmiştir. Tavanic® tabletlerin in vitro çözünme ortamlarındaki çözünme profilleri test ve referans ortam şeklinde f_2 benzerlik faktörü ile değerlendirilmiştir(Tablo 33).

Test ortam olarak Kör FaSSIF ile referans olarak seçilen FaSSIF ve SIF-FaSSIF ortamlarındaki çözünme hızı profilleri benzer bulunmamıştır(f_2=43.6 ve f_2=48.7). Bu durum, FaSSIF ve SIF-FaSSIF ortamlarının içeriğinde bulunan sodyum taurokolat ve lesitinin

levofloksasinin çözünürlüğünü, dolayısıyla çözünme hızını Kör FaSSIF ortamına göre artırmasıyla açıklanabilir.

Test ortam olarak Kör FeSSIF ile referans olarak seçilen FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarındaki çözünme hızı profilleri benzerdir(f_2=69.9 ve f_2=60.5). Her üç ortamda da pH'ya bağlı olarak Tavanic® tabletlerden levofloksasinin salımı tamamen benzer şekilde gerçekleştiğinden çözünme hızı profilleri benzerdir.

Test ortam olarak FaSSIF ve referans ortam olarak SIF-FaSSIF kullanıldığında profiller benzerdir (f_2=51.0). Bu durum FaSSIF ve SIF-FaSSIF ortamlarının Tavanic®'in çözünme hızını artırması açısından benzerliğini göstermektedir.

Test ortam olarak FeSSIF ile referans olarak seçilen SIF-FeSSIF ortamlarındaki çözünme hızı profilleri benzerdir(f_2=54.6). Bu durum da pH'ya bağlı olarak Tavanic® tabletlerden levofloksasinin salımı tamamen gerçekleşmektedir.

Test ürün olarak Maximus® ve referans ürün olarak Ansaid® kullanıldığında in vitro çözünme profilleri f_2 benzerlik faktörüyle birbirleriyle karşılaştırıldığında tüm ortamlardaki çözünme hızı profilleri benzerdir (Tablo 46).

Buna karşılık bu tabletlerin kullanıldığı çözünme ortamlarının kıyaslanmasında da test ortam olarak Kör FaSSIF ile referans olarak seçilen FaSSIF ve SIF-FaSSIF ortamlarındaki çözünme hızı profilleri de benzerdir (f_2=64.2 ve f_2=63.3). Şekil 30'da gösterildiği gibi tabletlerden flurbiprofenin tam ve benzer şekilde salındığı görülmektedir. Bu nedenle çözünme hızı profilleri benzer bulunmuştur.

Test ortam olarak Kör FeSSIF ile referans olarak seçilen FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarındaki çözünme hızı profilleri benzer değildir (f_2=36.2 ve f_2=16.3). 15 mM sodyum taurokolat ve 3.75 mM lesitin, tabletlerden flurbiprofenin salınmasını belirgin olarak artırmıştır(Şekil 30), bu nedenle profiller benzer bulunmamıştır.

Test ortam olarak FeSSIF ve referans ortam olarak SIF-FeSSIF ortamlarındaki çözünme hızı profilleri de benzer değildir (f_2=27.2). SIF-FeSSIF ortamı flurbiprofenin tabletlerden tamamen salınmasını sağlarken; FeSSIF ortamında tabletlerden salım ancak % 80 civarındadır. Her iki ortam da Kör FeSSIF'e (yaklaşık % 65) göre belirgin bir artış gösterse de SIF-FeSSIF ortamındaki çözünme hızı artışı daha belirgindir.

Sonuç olarak, her iki etkin madde için de SIF Powder® kullanılarak hazırlanan açlık ve tokluk ortamlarındaki çözünme hızı artışları daha yüksektir.

5.8.2. Model Bağımlı Yöntemler

Tabletlerin çözünme hızı verilerinde kinetik modelleme yapılması düşünülmüş ve bu amaçla DDSolver programı kullanılmıştır. Bu programda yer alan kinetik modeller zamana karşı % çözünen verilere uygulanmıştır. Model uyumunun değerlendirilmesinde programın önerdiği şekilde $R^2_{adjusted}$, MSC ve AIC ölçütleri kullanılmıştır. Burada $R^2_{adjusted}$ ve MSC ölçütleri yüksek olan; AIC ölçütü küçük olan modeller en uygun model olarak belirlenmiştir. Tavanic® için Tablo 34'de, Maximus® için Tablo 48 ve Ansaid® için Tablo 49'da verilmiş olan çözünme hızı model değerlendirme tablosundaki en uygun kinetik modeller Tablo 50'de özetlenmiştir.

Tablo 50. Tavanic®, Maximus® ve Ansaid® tabletler için en uygun çözünme hızı kinetikleri

	Etkin Madde	Çözünme Ortamı	Kinetik Model	Model Parametre
Tavanic®	Levofloksasin	pH 1.2	Probit 1	α, β
		pH 4.5	Weibull 2	α, β
		pH 6.8	Hopfenberg	k_{HB}, n
		Kör FaSSIF	Gompertz 2	α, β, F_{max}
		FaSSIF	Gompertz 1	α, β
		SIF-FaSSIF	Gompertz 1	α, β
		Kör FeSSIF	Probit 1	α, β
		FeSSIF	Weibull 2	α, β
		SIF-FeSSIF	Weibull 1	α, β, T_i
Maximus®	Flurbiprofen	pH 4.5	Weibull 3	α, β, F_{max}
		pH 6.8	Peppas-Sahlin 2	k_1, k_2
		Kör FaSSIF	Gompertz 1	α, β
		FaSSIF	Gompertz 1	α, β
		SIF-FaSSIF	Logistic 1	α, β
		Kör FeSSIF	Gompertz 1	α, β
		FeSSIF	Gompertz 2	α, β, F_{max}
		SIF-FeSSIF	Logistic 1	α, β
Ansaid®	Flurbiprofen	pH 4.5	Gompertz 1	α, β
		pH 6.8	Peppas-Sahlin 2	k_1, k_2
		Kör FaSSIF	Weibull 1	α, β, T_i
		FaSSIF	Logistic 1	α, β
		SIF-FaSSIF	Probit 1	α, β
		Kör FeSSIF	Probit 2	α, β, F_{max}
		FeSSIF	Gompertz 2	α, β, F_{max}
		SIF-FeSSIF	Weibull 2	α, β

Çözünme hızı kinetik modellerine ait tüm parametreler Tablo 6'da açıklanmıştır. Tablo 50'de ise en iyi uyumu veren modelin parametrelerinden α, çözünme ve zamanla ilgili bir parametredir. β ise şekil parametresi olup β=1 ise eksponansiyel eğriyi; β>1 ise sigmoid eğriyi ve

β<1 ise parabolik eğriyi tanımlamaktadır. F_{max} sonsuzda çözünen maksimum ilaç kesridir. T_i parametresi ise çözünme prosesindeki gecikme süresini ifade etmektedir. k_{HB}, Hopfenberg modelinde erozyon hız sabiti ve ilacın matristeki başlangıç konsantrasyonuna ve başlangıç yarıçapına bağlı olarak ifade edilen kombine hız sabitidir. n parametresi yüzey özelliklerini ifade eden şekil katsayısıdır; n=1 ise düz yüzey, n=2 ise silindir, n=3 ise küre şeklini ifade eder. k_1, $\sqrt{t}$ ile ilişkili ilaç difüzyonunu gösteren hız sabiti, k_2 ise t ile ilişkili polimere bağımlı ilaç salımını gösteren hız sabitidir.

Genel olarak çözünme hızı kinetiklerinde sıfırıncı, birinci derece kinetikler ile sigmoidal çözünme profili gösteren sistemlerden bahsedilir. Çözünme profillerinin sigmoidal bir yapıya sahip olması farklı ve karmaşık çözünme modelleriyle açıklanabilir. Levofloksasin ve flurbiprofen içeren tabletlerin farklı çözünme ortamlarındaki kinetik modelleri ve model parametreleri sıfırıncı ve birinci derece kinetiğine göre değil, üssel bir ifadeye bağlı olarak eksponansiyel olarak değişmektedir. Probit 1, Weibull 2, Gompertz 1 ve Logistic 1 modellerinde aynı parametreler (α ve β) farklı üssel denklemlerle tanımlanmaktadır. Probit 2, Weibull 3 ve Gombertz 2 modellerinde bu iki parametreye ilave olarak F_{max} parametresini de içermektedir. Weibull 1 modeli ise α ve β parametrelerinin yanında T_i parametresini de içeren modeldir. Bu modellerin hepsi temel denklem olarak üssel ifadelerdir ve bu modeller FDA'nın "Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms" kılavuzunda da çözünme hızı kinetiklerinin değerlendirilmesi için kullanılan modeller olarak belirtilmektedir.

Hem levofloksasin, hem de flurbiprofen tabletlerde pH 6.8 ortamında farklı bir kinetik davranış gözlenmiştir. Tavanic® tabletler pH 6.8'de tablet yüzeyinden erozyonun etkin olduğu Hopfenberg modeline

uyum göstermektedir. Buradaki çözünme hızına etkili olan parametreler tabletin yüzey ve şekil özelliklerine bağlıdır. Bu kinetiğe uyumun sebebi film kaplama materyalinin pH 6.8 ortamındaki davranışından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Flurbiprofen içeren Maximus® ve Ansaid® tabletlerinin her ikisi de pH 6.8 ortamında Peppas-Sahlin 2 kinetik modeline uyum göstermektedir. Burada etkin maddenin tabletten salımında zamanın karekköüne bağlı olarak difüzyon ve kaplama materyalindeki polimerin fiziksel özelliğinin ilaç salımında etkili olduğu düşünülmektedir.

FDA'nın "Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms" adlı kılavuzunda da model bağımlı çözünme hızı kinetiklerinin değerlendirilmesinde hızlı salımlı katı oral dozaj şekillerinde Logistic, Probit ve Weibull gibi modellerin kullanımının uygun olacağı belirtilmektedir[70].

5.9 BCS Değerlendirmeleri

Çalışmalarımızda BCS Sınıf 1 için levofloksasin ve Sınıf 2 için flurbiprofen model etkin maddeler olarak seçilmiştir. Levofloksasin ve flurbiprofen içeren tabletlerin açlık ve tokluk durumlarını taklit eden biyouyumlu ortamlarda çözünme hızı ile ilgili değerlendirmeler bulunmamaktadır. Levofloksasinin bu ortamlardaki in vitro davranışının yüksek çözünürlük ve hızlı çözünme özelliği göstereceği beklenmiştir. Düşük çözünürlük gösteren flurbiprofenin de biyouyumlu ortamlar kullanılarak in vitro çözünürlük ve çözünme hızı artışının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

BCS kapsamında sağlık otoritelerince kabul gören çözünürlük kriterine göre ilacın piyasadaki en yüksek dozu, 37˚C'de, pH 1.0-7.5

aralığında, 250 mL veya daha az miktardaki ortamda çözünebiliyorsa ilaç yüksek çözünürlük gösterir.

Levofloksasin için bütün fizyolojik pH aralıklarını kapsayan değerlerde yüksek çözünürlük gözlenmiştir. Çözünürlük değerlendirilmesinde esas alınan parametrelerden biri D_0 değeridir. Levofloksasin için hesaplanan D_0 değerleri dokuz farklı pH için (pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FaSSIF) 1'den küçük olduğundan çözünürlüğü yüksektir.

BCS'e göre ilacın mide-bağırsak kanalında dayanıklı olması koşulu ile ölçülen emilim oranının %90'dan büyük olması durumunda ilaç yüksek permeabilite gösterir. Permeabilitenin saptanması amacıyla çok sık kullanılan yöntemlerden biri de in vitro hücre kültürü modellerinin kullanılmasıdır. Volpe ve ark[104] tarafından in vitro Caco 2 hücreleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada yüksek permeabilite gösterdiğini kanıtlamışlardır (Papp: $28.36x10^6 \pm 1.93x10^6$ cm/sn). Aynı zamanda 500 mg ve 750 mg levofloksasin içeren tabletlerin mutlak BY'ı yaklaşık % 99 olup, emilim hız ve oranı da yüksektir.

Yaptığımız in vitro çözünme hızı çalışmalarında Tavanic® tabletlerin kılavuzlarda belirtilen pH 1.0-7.5 aralığını kapsayan ortamlardaki çözünme hızının, biyouyumlu ortamlar da dahil olmak üzere, tüm ortamlarda (30 dak % 85'ten fazla) etkin madde çıkışı gözlenmiştir. Bu da biyomuafiyet açısından hızlı çözünme kriterine uymaktadır.

Sonuç olarak levofloksasin hem klasik çözünme ortamlarında, hem de biyouyumlu ortamlarda yüksek çözünürlük göstermektedir. Aynı şekilde Tavanic® tabletler de hem klasik çözünme ortamlarında hem de

biyouyumlu ortamlarda 30 dak % 85'ten fazla çözünme göstermektedir. Bu nedenle yüksek çözünürlük ve yüksek çözünme hızı özelliklerinden dolayı biyouyumlu ortamların levofloksasin için kullanımı alternatif bir yol olarak önerilmemektedir. Biyomuafiyet değerlendirmelerinde klasik in vitro ortamlardaki yüksek çözünürlük ve hızlı çözünme kriteri yüksek permeabilite kriteriyle birlikte yeterlidir.

Flurbiprofen için bütün fizyolojik pH 1.0-7.5 aralığında yapılması önerilen çözünürlük çalışması pH 4.5, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FaSSIF ortamlarında gerçekleştirilmiştir. D_0 değerleri pH 4.5 ve Kör FeSSIF (pH 5.0) hariç, 1'den küçüktür. Bu iki ortam dışındaki tüm ortamlarda flurbiprofen yüksek çözünürlük göstermektedir.

Yazdanian ve ark[51] in vitro Caco-2 hücre kültürü kullanarak flurbiprofenin permeabilitesinin yüksek permeabilite kriterine uyduğunu göstermişlerdir(P_{A-B}: $20.1x10^6$ $\pm 2.7x10^6$cm/sn).

Yaptığımız in vitro çözünme hızı çalışmalarında Maximus® ve Ansaid tabletlerdeki sonuçlar flurbiprofenin pH'ya bağımlı çözünürlüğüyle ilişkilidir. pH 4.5 ve pH 5.0 (Kör FaSSIF) ortamında çözünme hızı düşük olmakla birlikte, pH artışına bağlı olarak çözünme hızı artmaktadır. Bu ortamların haricindeki tüm ortamlarda hızlı çözünme kriteri sağlanmaktadır. pH 5.0'daki düşük çözünme, ortama ilave edilen sodyum taurokolat ve lesitine bağlı olarak artış göstermiş olmakla birlikte, bu artış SIF-FeSSIF ortamı kullanıldığında, FeSSIF ortamına göre daha belirgin olmaktadır. SIF-FeSSIF ortamında hızlı çözünme kriterini sağlamıştır.

Flurbiprofen, pH 6.8, Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, SIF-FeSSIF ortamlarında çözünürlük ve çözünme hızı özelliklerine bağlı olarak BCS Sınıf 1 gibi davranmaktadır.

Flurbiprofen gibi az çözünen ilaçlar için çözünürlük ve çözünme hızında etkili olan tek faktörün pH olmadığı görülmüş olup, biyouyumlu ortamlar kullanıldığında daha iyi çözünürlük/çözünme hızı sonuçları elde edilmiştir. Flurbiprofen zayıf asidik özellikte bir etkin madde olduğundan, emilim bölgesi ince bağırsaktır. Emilim bölgesindeki çözünürlüğü ve çözünme hızında bağırsak sıvısının pH'sı ve içeriği göz önüne alındığında biyouyumlu ortamlar kullanıldığında daha iyi sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle BCS Sınıf 2'deki zayıf asidik ilaçlar için emilim bölgesindekince bağırsaklardaki, yani çözünürlüğü ve çözünmesi dikkate alınmalıdır. Bağırsaklardaki çözünürlüğü ve çözünme hızını tayin edebilmek için klasik çözünme ortamlarına nazaran in vivoya daha çok benzerlik gösteren biyouyumlu ortamların kullanılması gereklidir.

5.10. BDDCS Değerlendirilmesi

BDDCS permeabilite yerine ilacın metabolizma özelliğini temel almaktadır. Bu sistemde, majör eliminasyon yolağı metabolizma ise, ilacın yüksek permeabilite gösterdiği, majör eliminasyon yolu böbrekler veya safra yoluyla değişmeden atılımı söz konusuysa, düşük permeabilite gösterdiği belirtilmektedir. İlaçlar % 70 veya daha fazla metabolize olursa, yüksek metabolizma özelliğini taşımaktadır. Biyomuafiyet için yüksek oranda metabolizma, yüksek çözünürlük ve hızlı çözünme şartları önerilmektedir[79].

Levofloksasinin uygulanan dozunun % 62-102'si idrarla değişmeden atılmaktadır. Levofloksasin karaciğerde biyotransformasyonu sonucunda oluşan levofloksasin-N-oksit ve demetil-lev-ofloksasin

metabolitleri ise uygulanan dozun yaklaşık % 5'i kadardır ve bu metabolitler de idrarla atılır[92]. BCS değerlendirmesine göre Sınıf 1'de yer alan levofloksasin, BDDCS değerlendirmesine göre yüksek çözünürlük ve düşük metabolizma özelliklerinden dolayı Sınıf 3'e kaymaktadır. Bu durumda BDDCS için levofloksasin biyomuafiyet kriterine uygunluk göstermeyecektir.

BDDCS sınıflamasında göz önüne alınması gereken diğer bir parametre ise taşıyıcıların etkisidir. İlaçların p-gp substratı ve/veya inhibitörü olarak etki etmesi, sınıflandırma sistemlerindeki yerlerinin belirlenmesinde önemlidir[79]. Bu açıdan değerlendirildiğinde, levofloksasinin p-gp substratı özelliğinde olduğu belirtilmiştir. P-gp substratı olmasına rağmen permeabilitesinin yüksek olması, çözünen ilaç miktarı ile ilşkilidir. Yani yüksek levofloksasin miktarı p-gp'nin doygunluğa ulaşmasını sağlayarak p-gp'nin effluks etkisini azaltmakta, böylece levofloksasin geçişi artmaktadır.

Wu ve Benet[79], BDDCS'de yiyecek etkisinin de önemli olduğunu belirtmektedir. Sınıf 1 bileşiklerin tamamen emilmesi nedeniyle ilaç-yiyecek etkileşiminin olmadığı düşünülmektedir. Buna karşılık aşırı yiyecekler mide boşalmasını geciktireceğinden t_{max} değerinde artışa neden olabilirler. Levofloksasin içeren tabletlerin yemeklerden 1 saat önce veya 2 saat sonra alınması önerilmektedir. 500 mg dozda alınan levofloksasin tabletlerin yiyeceklerle alındığında, t_{max}'ın 1 saat uzadığı ve C_{max}'ta %14'lük bir azalmaya neden olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle levofloksasinin yiyecek etkisinden dolayı tabletlerinin yemeklerle bir arada alınmaması geremektedir[88].

BCS'e göre Sınıf 2'de bulunan flurbiprofen, karaciğerde hidroksilasyon ve metilasyon yoluyla üç ana metabolitine dönüşerek idrarla atılmaktadır. Ana metabolitlerinin yanında açilglukuronid ve aminoasit esteri

metabolitleri de bulunmaktadır[113]. Flurbiprofenin idrarla değişmeden atılan miktarı uygulanan dozun yaklaşık %20-25'idir[132]. %40-47'si 4'-hidroksi, %20-25'i 3'-hidroksi-4'-metoksi ve yaklaşık %5'i 3',4'-dihidroksi metabolitleri şeklinde idrardan atılmaktadır[133]. Bu durumda flurbiprofen BDDCS sınıflandırmasında düşük çözünürlük ve yüksek metabolizasyon kriterlerini sağlayarak Sınıf 2'de yer almaktadır.

Flurbiprofenin taşıyıcılar, özellikle de p-gp substratı ya da inhibitörü olmasına ilişkin henüz bir bulgu bulunmamaktadır.

Flurbiprofen içeren tabletlerin yiyeceklerle alındığında C_{max} değerinde ve emiliminde anlamlı artış gözlenmiştir[128]. Bu nedenle tok karnına kullanımı flurbiprofenin BY'sini artırmaktadır.

Çalışmalarımızda sodyum taurokolat ve lesitin miktarı yüksek olan tokluk durumu in vitro ortamlarda flurbiprofenin çözünürlüğünde anlamlı artışlar görülmüştür. Ayrıca tokluk koşullarını taklit eden biyouyumlu ortamlarda flurbiprofenin çözünme hızının da belirgin derecede arttığı bulunmuştur.

Sonuç olarak düşük çözünürlük gösteren Sınıf 2 bileşiklerin aşırı yağlı yiyeceklerle kullanımı bağırsak lümenindeki ilacın çözünürlüğünün, dolayısıyla ilacın çözünme hızının artırılmasında alternatif bir yol olabilir.

5.11. Sitotoksisite Değerlendirmeleri

Biyouyumlu bağırsak ortamlarının Caco-2 canlılığı ve hücrelerde herhangi bir toksik etki oluşturmaması açısından; safra tuzu, fosfolipit miktarı ve çeşidinin dikkatle seçilmesi gerekmektedir. Hücrelerin

canlılığını sürdürebilmesi açısından en uygun biyouyumlu ortamın seçilmesi üzerinde yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Ingels ve ark[84] Caco-2 hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada hücre kültürlerinde sıklıkla kullanılan HBSS-benzeri tamponlar yerine biyouyumlu ortamların kullanımını denemişlerdir. FaSSIF kullanıldığında hücrelerde herhangi bir toksik etki gözlenmezken (yaklaşık % 100 canlılık); FeSSIF kullanıldığında canlılık oranı %5.4 ± 0.3 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak FeSSIF kullanımının hücreler üzerinde toksik etki yarattığı sonucuna varılmıştır. Bu durum FeSSIF ortamındaki yüksek sodyum taurokolat ve lesitin miktarı ile ilişkilendirilmiştir.

Patel ve ark.'nın[130] yaptığı benzer bir çalışmada da FaSSIF ve FeSSIF'in hücrelerden geçişi için kullanıldığında % canlılık oranının % 60-70 olduğu belirtmiştir. Bu çalışmanın sonucu olarak FaSSIF ve FeSSIF gibi biyouyumlu ortamların hücre kültürü deneylerinde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Bu iki çalışmanın birbirini desteklemediği görülmektedir. Burada her iki çalışmada da ortamların, hücre canlılığı üzerindeki sitotoksisitelerinde biyouyumlu ortamların kör çözeltileri ile herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır. Ayrıca gözlenen sitotoksisitenin farklı pH değerlerinden de kaynaklanabileceği hakkında bir yorum da bulunmamaktadır.

Çalışmalarımızda kullandığımız mide-bağırsak ortamlarının (Kör FaSSIF, FaSSIF, SIF-FaSSIF, Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF) Caco-2 hücrelerindeki sitotoksisitesi MTT testi ile değerlendirilmiştir (Şekil 35).

Bölüm 3.2.5.3'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilen çalışmalarda hücrelerdeki canlılık yüzdeleri farklı zaman ve farklı etkin madde derişimi açısından değerlendirilmiştir.

Sitotoksisite çalışmalarını değerlendirirken hücrelerde gözlenen canlılık yüzdelerine göre sitotoksisite dereceleri sınıflandırılmıştır. Buna göre; %90'dan fazla canlılık varsa sitotoksik değil, %60-90 canlılık hafif sitotoksik, %30-59 canlılık orta derecede sitotoksik ve %30'dan daha az canlılık şiddetli sitotoksik olarak belirlenmiştir[135].

Model madde olarak kullandığımız BCS Sınıf 1'de yer alan levofloksasin ve BCS Sınıf 2'de yer alan flurbiprofenin permeabilitelerinin yüksek olduğu bilinmektedir. Bu nedenle ilk değerlendirmeler 1. saatte yapılmıştır. 24. saat ise MTT değerlendirmelerinde rutin kullanılan bir süredir.

Kör FaSSIF, FaSSIF ve SIF-FaSSIF ortamlarındaki hücrelerin canlılık yüzdeleri 1. saatte sırasıyla % 88.4 ± 7.2, % 93.7 ± 6.7 ve % 91.3 ± 2.7 ve 24. saat sonunda ise % 73.2 ± 1.5, % 78.5 ± 1.6 ve % 77.5 ± 8.0 olarak bulunmuştur. Sitotoksisite değerlendirmesine göre bu değerler "hafif sitotoksik" sınıfına girmektedir. Elde edilen değerler, FaSSIF/SIF-FaSSIF içerisinde bulunan 3 mM sodyum taurokolat ve 0.75 mM lesitinin hücrelerin canlılığı açısından kör çözeltilere göre anlamlı bir fark oluşturmadığını göstermiştir. Buna karşılık 24. saat sonunda gözlenen % canlılık, 1. saatte elde edilen % canlılık değerinden yaklaşık % 15 oranında düşük bulunmuştur.

Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarındaki % canlılık değerleri ise 1. saatte sırasıyla % 86.1 ± 2.4, % 84.3 ± 4.2 ve

% 82.4 ± 4.8 olarak bulunmuştur. 24. saat sonunda ise % 70.8 ± 8.2, % 73.2 ± 3.0, % 69.1 ± 4.4 olarak saptanmıştır. Sitotoksisite değerlendirmesine göre bu değerler "hafif sitotoksik" sınıfına girmektedir. Bu durumda FeSSIF/SIF-FeSSIF ortamlarındaki 15 mM sodyum taurokolat ve 3.75 mM lesitinin de hücrelerin canlılığı üzerinde kör ortamla karşılaştırıldığında ilave bir etki yaratmadığı görülmektedir. 24. saat sonunda gözlenen % canlılık oranında 1. saatte elde edilen değerlere göre yaklaşık % 10-15'lik bir azalma gözlenmiştir.

Kullanılan serumlu DMEM ve serumsuz DMEM ortamlarının pH'sı 7.4'tür. Buna karşılık Kör FaSSIF, FaSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarının pH'sı 6.5 ve Kör FeSSIF, FeSSIF ve SIF-FeSSIF ortamlarının pH'sı 5.0'dır. Bu durum göz önüne alındığında yukarıda bahsedilen %10-15'lik hücre canlılıklarındaki azalmanın pH değerlerinden etkilendiği düşünülebilir.

Etkin maddelerin konsantrasyonlarının % canlılığa olan etkisini değerlendirebilmek amacıyla seçilen konsantrasyonlar (100 ve 500 µM) önceden yapılmış olan geçiş çalışmalarına göre belirlenmiştir[136,137]. Bu konsantrasyonlardaki etkin madde çözeltileri biyouyumlu ortamlar kullanılarak hazırlanmıştır.

Sitotoksisite sonuçlarına göre levofloksasin için 100 µM ve 500 µM konsantrasyonlarda birbirine benzer sonuçlar elde edilmiş ve % canlılık 1. saatin sonunda % 78-98 arasında (ortalama % 86.8 ± 6.0); 24. saat sonunda ise %71-89 arasında (ortalama %77.9 ± 7.0) bulunmuştur(Şekil 33).

Flurbiprofen için de 100 ve 500 µM konsantrasyonlarda hazırlanan biyouyumlu ortam çözeltileriyle yapılan sitotoksisite

çalışmalarında da birbirilerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yüzde canlılık değerleri 1. saat sonunda % 80-94 arasında (ortalama % 86.3 ± 6.3) olup, 24. saat sonunda ise %72-87 arasında (ortalama % 79.6 ± 6.0) bulunmuştur(Şekil 34).

Tek başına biyouyumlu ortamlarla ve biyouyumlu ortamlardaki etkin madde çözeltileriyle yapılan sitotoksisite deneylerinde canlılık yüzdesi %70-90 arasında bulunduğundan, kullanılan biyouyumlu ortamlar hafif sitotoksik olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak biyouyumlu ortamların Caco-2 hücre kültürlerinde kullanımının permeabilite çalışmaları açısından uygun olacağı görülmektedir. Ayrıca, SIF Powder®'la hazırlanan biyouyumlu ortamların sitotoksisite değerlendirmesi ilk kez yapılmış olup, bu ortamların da Caco-2 hücre modellerinde güvenle kullanılabileceği saptanmıştır.

6. SONUÇ

Bu çalışmada in vivo bağırsak koşullarını açlık ve tokluk durumlarında en iyi taklit eden biyouyumlu ortamların, BCS Sınıf 2'de (düşük çözünürlük/yüksek permeabilite) yer alan flurbiprofenin çözünürlük/çözünme hızı üzerinde sağladığı artışı incelemek ve bu artışı BCS Sınıf 1 (yüksek çözünürlük/yüksek permeabilite) ilaçlardan levofloksasin ile birlikte değerlendirmek amaçlanmıştır. Aynı zamanda, biyouyumlu ortamların Caco-2 hücreleriyle yapılan geçiş çalışmalarında klasik HBSS ortamları yerine kullanımını incelemek amacıyla MTT testi yapılarak, biyouyumlu ortamların hücre canlılığı üzerine olan etkisi (sitotoksisite) değerlendirilmiştir.

Levofloksasinin biyouyumlu ortamlardaki çözünürlük değerlerinde artış görülse de, klasik çözünme ortamlarında da çözünürlük değerlerinin oldukça yüksek olması ve çözünme hızı çalışmalarında kullanılan Tavanic® tabletlerin hem klasik, hem de biyouyumlu ortamlarda %100'e yakın çözünme göstermesi, biyouyumlu ortamların BCS Sınıf 1 ilaçlar için kullanılmasının anlamlı olmadığını göstermiştir.

Flurbiprofen zayıf asit özellikte olduğundan, çözünürlüğünün hem pH değerinden, hem de sodyum taurokolat ve lesitin konsantrasyonlarından etkilendiği görülmüştür. pK_a değerinden düşük pH'larda sodyum taurokolat ve lesitin etkisinin; yüksek pH'larda da pH etkisinin daha belirgin olduğu saptanmıştır. Ayrıca, flubiprofen yüksek permeabiliteye sahip olduğundan, emilim bölgesindeki, yani ince bağırsaklardaki çözünürlüğü ve çözünmesi dikkate alındığında, in vivo BE çalışmalarından vazgeçme kriterlerinin uygulanabileceği açıktır. Burada, biyouyumlu in vitro bağırsak ortamlarının kullanımı, BCS Sınıf 2 zayıf asidik ilaçların çözünürlük ve çözünme hızında belirgin artışlara neden olması açısından oldukça önemlidir.

Biyouyumlu ortamlarda yapılan çözünme hızı deneylerinde çözünme kinetiği açısından bir farklılık olup olmadığını gözlemlemek için tüm çözünme hızı verilerine DDSolver programıyla kinetik modelleme yapılmıştır. Tüm verilerin genel olarak FDA'nın "Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms" kılavuzunda hemen salan preparatlar için önerilen üçten fazla parametre içermeyen üssel denklemlere uygunluk gösterdiği görülmüştür.

Caco-2 hücrelerinde uygulanan MTT testi sonuçlarına göre biyouyumlu ortamların kullanımında hücrelerdeki canlılık değerleri % 60-90 arasında "hafif sitotoksik" etki görülmüştür. Bu sonuç biyouyumlu ortamların hücre kültürü deneylerinde güvenle uygulanabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, yeni ilaç formülasyonlarının geliştirilmesinde ve dozaj şeklinin in vitro/in vivo performans değerlendirmelerinde biyouyumlu ortamlarda yapılan biyofarmasötik değerlendirmeler doğru bir yaklaşım olup; az çözünen zayıf asidik BCS Sınıf 2 ilaçlar için BE çalışmalarından vazgeçme sağlayabilir ve bu tarz ilaçlar BCS Sınıf 1 ilaç olarak değerlendirilebilir.

7. ÖZET

Açlık ve Tokluk Durumlarını Taklit Eden Çözünme Ortamlarında Yapılan Çözünme Hızına Yönelik Çalışmalar

Günümüzde modern ilaçla ilgili yasal düzenlemeler ilacın permeabilitesi ve çözünme hızı gibi in vitro biyofarmasötik değerlendirmelere önem vermektedir. İlaçlar, bu farmasötik değerlendirmeler göz önüne alınarak sağlık otoritelerinin de kabul ettiği Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine (BCS) göre sınıflandırılmışlardır.

Biyouyumlu ortamlar değişik oranda safra tuzları ve lesitin karışımlarını içerir ve in vitro çözünme çözünme hızı metotlarını kullanarak ilacın in vivo performansının tahminde kullanılır. Bu ortamlar, in vivo fizyolojik koşullara kullanılmakta olan mide barsak ortamlarından daha fazla benzerlik gösteren çözünme ortamlarıdır.

Bu çalışmada, BCS'e göre Sınıf 1 (yüksek çözünürlük-yüksek permeabilite) levofloksasinin ve Sınıf 2 (düşük çözünürlük-yüksek permeabilite) flurbiprofenin açlık tokluk durumlarındaki in vivo performanslarının in vitro çalışmalarla incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, klasik mide ve bağırsak ortamlarında (pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8) ve açlık durumu yapay bağırsak ortamı (FaSSIF) – tokluk durumu yapay bağırsak ortamını (FeSSIF) taklit eden biyouyumlu çözünme ortamlarında ve SIF Powder® karışımı ile hazırlanan biyouyumlu ortamlarda çözünürlük ve çözünme hızı deneyleri yapılmıştır. Çözünme hızı profilleri ve çözünme hızı verileri DDSolver kinetik programıyla değerlendirilmiştir.

Kullanılan biyouyumlu çözünme ortamlarının hücrelerin canlılığına olan etkisinin saptanması amacıyla Caco-2 hücre kültüründe yapılan MTT testi ile sitotoksisite değerlendirmeleri yapılmıştır.

Yapılan çalışmalarda levofloksasinin gibi BCS Sınıf 1 ilaçlar için biyouyumlu ortamların kullanılmasının anlamlı olmadığı görülmüştür.

Flurbiprofenin çözünürlüğünün hem pH değerinden, hem de sodyum taurokolat ve lesitin konsantrasyonlarından etkilendiği belirlendi. Biyouyumlu ortamların flurbiprofen gibi BCS Sınıf 2 zayıf asidik ilaçların çözünürlük ve çözünme hızı çalışmalarında kullanımının uygun olduğu görüldü. BCS Sınıf 2 ilaçların emilim bölgesindeki çözünürlüğü ve çözünmesi dikkate alındığında, in vivo BE çalışmalarından vazgeçme kriterleri uygulanabilir. Sonuç olarak, zayıf asidik BCS Sınıf 2 ilaçlar BCS Sınıf 1 ilaç olarak değerlendirilebilir.

8. SUMMARY

The Performance of In Vitro Dissolution Studies in Dissolution Media Mimicking Fast and Fed States

Nowadays, legal regulations of modern drugs consider in vitro biopharmaceutic evaluations such as drug permeability and dissolution rate. The drugs are classified considering these biopharmaceutical evaluations according to Biopharmaceutics Classification System (BCS) which is accepted the health authories.

Biorelevant dissolution media, which include different amounts and compositions of bile salts and lecithin, is used to predict the in vivo performace of drugs using the in vitro dissolution tests. These media mimic the in vivo physiological conditions more than current used dissolution media.

In this work, it was purposed to investigate fasted and fed state in vivo performances of levofloxacin in the BCS Class 1 (high solubility – high permeability) and flurbiprofen in the BCS Class 2 (low solubility – high permeability) drugs by using the in vitro tests.

The solubility and the dissolution rate experiments were conducted in the conventional gastric and intestinal dissolution media (pH 1.2, pH 4.5, and pH 6.8), and the fasted state simulated intestinal fluid (FaSSIF), and fed state simulated intestinal fluid (FeSSIF), and the biorelevant media which was prepared with SIF Powder® mixture. Dissolution rate profiles and and dissolution rate data were analyzed using DDSolver kinetic program.

Biorelevant dissolution media used the effect to the cell viability of Caco-2 cell cultures to determine the cytotoxicity was evaluated by MTT test.

It was found that, using biorelevant media was not significant for BCS Class 1 drugs such as levofloxacin.

It was determined that, flurbiprofen solubility was affected by pH value and also concentrations of sodium taurocholate and lecithin. It was seen that, the biorelevant media were convenient for solubility and dissolution studies in BCS Class 2 weak acidic drugs such as flurbiprofen. The BCS Class 2 drugs' solubility and dissolution in the absorption site are considered that the waiver criteria for in vivo bioequivalence can be applied. Finally, the weakly acidic BCS Class 2 drugs can be considered as a member of BCS Class 1 drug.

9. KAYNAKLAR

1. Abdou HM. Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence. 1st ed. Easton: Mack; 1989.
2. Noyes1897 - Noyes AA, Whitney WR. The rate of solution of solid substances in their own solutions. J Am Chem Soc. 1897;19(12):930-934.
3. Hecq J. Development characterization and evaluation of crystalline nanoparticles for enhancing the solubility, the dissolution rate and the oral bioavailability of poorly water soluble drugs. Doctorate thesis. Brüksel:Universite Libre De Bruxelles; 2006. p.16-17.
4. Acartürk F, Ağabeyoğlu İ, Çelebi N et al. Modern Farmasötik Teknoloji. Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını. Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi. 2007. p.407-452.
5. Amidon GL, DeBrincat GA, Najib N. Effects of gravity on gastric emptying, intestinal transit, and drug absorption. J Clin Pharmacol. 1991;31:968-973.
6. Moës AJ. Gastroretentive dosage forms. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1993;10:143-195.
7. Kimura T, Higaki K. Gastrointestinal transit and drug absorption. Biol Pharm Bull. 2002;25:149-164.
8. Sieber C, Beglinger C, Jager K, Stalder GA. Intestinal phase of superior mesenteric artery blood flow in man. Gut. 1992;33:497-501.
9. Oosterhius B, Jonkman JH. Pharmacokinetic studies in healthy volunteers in the context of in vitro/in vivo correlations. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 1993;18:19-30.
10. Matheson PJ, Wilson MA, Garrison RN. Regulation of intestinal blood flow. J Surg Res. 2000;93:182-196.

11. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. Dissolution testing as a prognostic tool for oral absorption: immediate release dosage forms. Pharm Res. 1998;15(1):11-22.
12. Wilson CG. Drugs and the pharmaceutical sciences: Oral drug absorption: Prediction and assessment. In: Dressman JB, Lennernas H, Dekker M, editors. Gastrointestinal transit and drug absorption. New York, 2000;(106); 1-9.
13. Charman WN, Porter CJ, Mithani S, Dressman JB. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. J Pharm Sci. 1997;86:169-282.
14. Fordtran JS, Walsh JH. Gastric acid secretion rate and buffer content of the stomach after eating. Results in normal subjects and in patients with duodenal ulcer. J Clin Invest. 1973;52(3):645-657.
15. Dressman JB, Berardi R, Dermentzoglou, Russell T, Schmaltz S, Barnett J, Jarvenpaa K. Upper gastrointestinal pH in young, healthy men and women. Pharm Res. 1990;7:756-761.
16. Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vrancks H, Boulanger P, Lamer SL, Amighi K. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of nano-sized crystals for dissolution rate enhancement of ucb-35440-3, a highly dosed poorly water-soluble weak base. Eur J Pharm Biopharm. 2006;64:360-368.
17. Jones HM, Parrott N, Ohlenbusch G, Lave T. Predicting pharmacokinetic food effects using biorelevant solubility media and physiologically based modelling. Clin Pharmacokinet 2006;45(12):1213-1226.
18. Aburub A, Risley DS, Mishra D. A critical evaluation of fasted state simulating gastric fluid (FaSSGF) that contains sodium lauryl sulfate and proposal of a modified recipe. Int J Pharm. 2008; 347: 16 – 22.

19. Lindahl A, Ungell AL, Knuston L, Lennernas H. Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. Pharm Res. 1997;14:497-502.
20. Washington N, Washington C, Wilson CG. Physiological pharmaceutics, barriers to drug absorption, Second edition, Taylor and Francis, Cornwall, 2001.p.71-75.
21. Hörter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. Adv Drug Deliv Rev. 2001;46:75-87.
22. Dressman JB, Vertzoni M, Goumas K, Reppas C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59:591-602.
23. Kostewicz ES, Wunderlich M, Brauns U, Becker R, Bock T, Dressman JB. Predicting the precipitation of poorly soluble weak bases upon entry in the small intestine. J Pharm Pharmacol. 2004;56:43-51.
24. Löbenberg R, Amidon GL. Modern bioavailability, bioequivalence, biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. Eur J Pharm Biopharm. 2000;50:3-12.
25. Oberle1990 - Oberle RL, Chen TS, Lloyd C, Barnett JL, Owyang C, Meyer J, Amidon GL. The influence of the interdigestive migrating myoelectric complex on the gastric emptying of liquids. Gastroenterology. 1990:99:1275-1282.
26. Welling PG. Effects of food on drug absorption. Annu Rev Nutr. 1996;16:383-415.
27. Luiking YC, Reijden ACVD, Henegouven GPVB, Akkermans LMA. Migrating motor complex cycle duration is determined by gastric or

duodenal origin of phase III. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 1998;275:1246-1251.

28. Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of Fundamentals. J Clin Pharmacol. 2002;42:620-643.
29. Jones MP, Wessinger S. Small intestinal motility. Curr Opin Gastroenterol. 2005;21:141-146.
30. Ohtsuka T, Takahata S, Ohuchida J, Takeda T, Matsunaga H, Yokuhata K, Yamaguchi K, Chijiiwa K, Tanaka M. Gastric phase 3 motility after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy. Ann Surg. 2002;235(3):417-423.
31. Husebye E. The patterns of small bowel motility: physiology and implications in organic disease and functional disorders. Neurogastroenterol Mot. 1999;11:141-161.
32. Moreno MPC, Oth M, Deferme S, Lammert F, Tack J, Dressman J, Augustijns P. Characterization of fasted-state human intestinal fluids collected from duodenum and jejunum. J Pharm Pharmacol. 2006;58:1079-1089.
33. Wiedmann TS, Kamel L. Examination of the solubilization of drugs by bile salt micelles. J Pharm Sci. 2002;91(8):1743-64.
34. Galia E, Nicolaides E, Hörter D, Löbenberg R, Reppas C, Dressman JB. Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting In Vivo Performance of Class I and II Drugs. Pharm Res 1998;15(5):698-705.
35. Pedersen BL, Müllertz A, Brondsted H, Gjelstrup H. A comparison of the solubility Danazol in human and simulated gastrointestinal fluids. Pharm Res. 2000;17(7):891- 894.
36. Persson EM, Gustafsson, AS, Carlsson AS, Nilsson RG, Knutson L, Forsell P, Hanisch G, Lennernäs, Abrahamsson B. The effects of food

on the dissolution of poorly soluble drug in human and in model small intestinal fluids. Pharm Res. 2005; 22(12):2141-2151.

37. Mithani SD, Bakatselou V, TenHoor CN, Dressman JB. Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration. Pharm Res. 1996;13(1):163-167.
38. Balakrishnan A, Rege BD, Amidon GL, Polli JE. Surfactant-mediated dissolution: Contributions of solubility enhancement and relatively low micelle diffusivity. J Pharm Sci. 2004;93:2064-2075.
39. Granero GE, Ramachandran C, Amidon GL. Dissolution and solubility behavior of fenofibrate in sodium lauryl sulfate solutions. Drug Dev Ind Pharm. 2005;31:917-922.
40. Shankland W. The equilibrium and structure of lecithin-cholate mixed micelles. Chem Phys Lipids. 1970;4:109-130.
41. Wiedmann TS, Liang W, Kamel L et al. Solubilisation of drugs by physiological mixtures of bile salts. Pharm. Res. 2002;19:1203-1208.
42. Nielsen PB, Müllertz A, Norling T, Kristensen HG. The effect of alpha-tocopherol on the in vitro solubilisation of lipophilic drugs. Int J Pharm. 2001;222:217-224.
43. Christensen JØ, Schultz K, Mollgaard B, Kristensen HG, Mullertz A. Solubilisation of poorly water-soluble drugs during in vitro lipolysis of medium- and long-chain triacylglycerols. Eur J Pharm Sci. 2004;23:287-296.
44. Jantraid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. Pharm Res. 2008;25(7):1663-1676.
45. Dressman JB, Krämer J. Pharmaceutical dissolution testing. New York. Taylor & Francis Group. 2005.p.86-87.

46. Jinno J, Oh DM, Crison JR, Amidon GL. Dissolution of ionizable water-insoluble drugs: the combined effect of pH and surfactant. J Pharm Sci. 2000;89(2):268-275.
47. Shah VP, Konecny JJ, Everett RL, McCullough B, Noorizadeh AC, Skelly JP. In vitro dissolution profile of water insoluble drug dosage forms in the presence of surfactants. Pharm Res. 1989;6:612-618.
48. Löbenberg R, Vieira M, Amidon GL. Solubility as a limiting factor to drug absorption. In Dressman JB and Lennernäs H (eds). Methods for assessing oral absorption. Marcel Dekker. 2000.p.137-153.
49. Dressman JB, Lennernäs H. Oral Drug Absorption. Prediction and Asessment. New York. Marcel Dekker. 2000.p.146-174.
50. Noory C, Tran N, Ouderkirk L, Shah V. Steps for development of a dissolution test for sparingly water-soluble drug products. Diss Techn. Article 3. 2000. http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200articles/200art3.html
51. Yazdanian M, Briggs K, Jankovsky C, Hawi A. The high solubility definition of the current FDA guidance on biopharmaceutical classification system may be too strict for acidic drugs. Pharm Res 2004; 21(2): 293- 299.
52. Karalis V, Magklara E, Shah VP, Macheras P. From drug delivery systems to drug release, dissolution, IVIVC, BCS, BDDCS, bioequivalence and biowaivers. Pharm Res. 2010. DOI 10.1007/s1 1095-010-0220-9.
53. Wei H, Löbenberg R. Biorelevant dissolution media as a predictive tool for glyburide, a class II drug. J Pharm Sci. 2006; 29: 45 – 52.
54. Lue BM, Nielsen FS, Magnussen T, Schou HM, Kristensen K, Jacobsen LO, Müllertz A. Using biorelevant dissolution to obtain IVIVC of solid dosage forms containing a poorly – soluble model compound. Eur J Pharm Biopharm. 2008;69(2):648-657.

55. Sunesen VH, Pedersen BL, Kristensen HG, Müllertz A. In vivo in vitro correlations for a poorly soluble drug, danazol, using the flow-through dissolution method with biorelevant dissolution media. Pharm Sci. 2005; 24; 305 – 313.
56. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2000. Guidance for Industry: waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on Biopharmaceutics Classification System. Food and Drug Administration, Ed. Rockville, MD.p.1-13.
57. Kostewicz ES, Brauns U, Becker R, Dressman JBl. Forecasting the oral absorption behavior of poorly soluble weak bases using solubility and dissolution studies in biorelevant media. Pharm Res. 2002;19(3):345-349.
58. Bates T, Gibaldi M, Kanig J. Solubilizing properties of bile salt solutions. J Pharm Sci. 1966;55:191-199.
59. Nicolaides E, Galia E, Efthymiopoulus C, Dressman JB, Reppas C. Forecasting the in vivo performance of four low solubility drugs from their in vitro dissolution data. Pharm Res. 1999;12:1876-1882.
60. Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. Simulation of fasting gastric onditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. Eur J Pharm Biopharm. 2005;60:413-417.
61. Diakidou A, Vertzoni M, Dressman J, Reppas C. Estimation of intragastric drug solubility in the fed state: comparison of various media with data in aspirates. Biopharm Drug Dispos. 2009;30:318-325.
62. Marques M. Dissolution media simulating fasted and fed states. Diss Tech. 2004;11(2):16.

63. Klein S. The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. AAPS J. 2010;12(3):397-406.
64. Löbenberg R, Krämer J, Shah VP, Amidon GL, Dressman JB. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: dissolution behaviour of glibenclamide. Pharm Res. 2000; 17(4); 439 – 444.
65. Fagerberg JH, Tsinman O, Sun N, Tsinman K, Avdeef A, Bergström CAS. Dissolution rate and apparent solubility of poorly soluble drugs in biorelevant dissolution media. Mol Pharm. 2010.(DOI: 10.1021/mp100049m).
66. Kleberg K, Jacobsen F, Fatouros DG, Müllertz A. Biorelevant media simulating fed state intestinal fluids: Colloid phase characterization and impact on solubilization capacity. J Pharm Sci. 2010;99(8):3522-3532.
67. Boni JE, Brickl RS, Dressman J, Pfefferle ML. Instant FaSSIF and FeSSIF – Biorelevance meets practicality. Diss Tech. August 2009:41-45.
68. Schewebel HJ, Hoogevest VP, Leigh MLS, Kuentz M. The apparent solubilizing capacity of simulated intestinal fluids for poorly water-soluble drugs. Pharm Dev Tech. 2010. (DOI: 10.3109/10837451003664099).
69. Moore JW, Flanner HH. Mathematical Comparison of curves with an emphasis on in vitro dissolution profiles. Pharm Tech. 1996;20(6): 64-74.
70. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1997. Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Food and Drug Administration, Ed. Rockville, MD.p.8-11.

71. Sathe PM, Tsong Y, Shah VP. In-vitro dissolution profile comparison: Statistics and analysis, model dependent approach. Pharm Res. 1996;13(12):1799-1801.
72. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, Yao C, Xie S. DDSolver: An add-in program model modeling and comparison of drug dissolution profiles. AAPS J. 2010;12(3):263-271.
73. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharm Res. 1995;12(3):413-420.
74. Blume HH, Schug BS. The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs better candidates for BA/BE waiver? Eur J Pharm Sci. 1999;9:117-121.
75. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2010. Guideline on the Investigation of Bioequivalence.p.1-27.
76. Stavchansky S**.** Scientific perspectives on extending the provision for waivers of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for drug products containing high solubility – low permeability drugs(BCS 3). AAPS J. 2008;10(2):300-305.
77. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), 2002. Not for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence.p.1-11.
78. Rudman A, Williams R. Guidance for Industry: Immediate release solid oral dosage forms. Scale-up and post-approval changes: chemistry, manufacturing and controls, in vitro dissolution testing and in vivo

bioequivalence documentation. Center for drug evaluation and research, Food and Drug Administration, 1995.p.1-11.

79. Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition in via application of BCS: Transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. Pharm Res. 2005; 22(1):11-23.
80. Fleischer D, Li C, Zhou Y, Pao LH, Karim A. Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clin Pharmacokinet. 1999; 36(3): 233-254.
81. Custodio JM, Wu CY, Benet. LZ. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60:717-733.
82. Audus KL, Bartel RL, Hidalgo IJ, Borchardt RT. The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. Pharm Res. 1990;7(5):435-449.
83. Artursson P. Epithelial transport of drug in cell cultures: Caco-2 and beyond. Pharm Res. 1997;14(12):1655-1658.
84. Ingels F, Deferme S, Destexhe E, Oth M, Van den Mooter G, Augustijns P. Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. Int J Pharm. 2002;232:183-192.
85. Ingels FM, Augustijns PF. Biological, pharmaceutical and analytical consideration with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2. J Pharm Sci. 2003;92:1545-1558.
86. Patel N, Forbes B, Eskola S, Murray J. Use of Simulated Intestinal Fluids with Caco-2 Cells and Rat Ileum. Drug Dev Ind Pharm. 2006;32(2):151-161.

87. Kataoka M, Masaoka Y, Sakuma S,Yamashita S. Effect of food intake on the oral absorbtion of poorly water-soluble drugs: in vitro assessment of drug dissolution and permeation assay system. J Pharm Sci. 2006;95:2051-2061.
88. Levaquin®: US Prescribing information. Raritan(NJ): Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc. 2008.
89. Gonzales JAO, Manuel CM, De La Rosa FJB. Spectrofluorimetric determination of levofloxacin in tablets, human urine and serum. Talanta 2000; 52: 1149-1156.
90. Chien S, Wells TG, Blumer JL, Kearns GL, Bradley JS, Bocchini JA, Natarajan J, Maldonado S, Noel GJ. Levofloxacin pharmacokinetics in children. J Clin Pharm. 2005;45:153-160.
91. Sun H, Li L, Chen X. Flow-injection chemiluminescence detemination of ofloxacin and levofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids. Anal Sci. 2006;22:1145-1149.
92. Croom KF, Goa KL. Levofloxacin: a review of its use in the treatment of bacterial infections in the United States. Drugs 2003;63(24):2769-2802.
93. Anderson VR, Perry CM. Levofloxacin: a review of its use as a high-dose, short-course treatment for bacterial infection. Drugs 2008; 68(4): 535-565.
94. Chow AT, Fowler C, Williams RR. Safety and pharmacokinetics of multiple 750-miligram doses of intravenous levofloxacin in healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemoter. 2001; 45(7): 2122-2125.
95. Chien SC, Wong FA, Fowler CL. Double blind evaluation of the safety and pharmacokinetics of multiple oral once-daily 750 mg and 1 gram doses of levofloxacin in healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemoter. 1998; 42(4): 885-888.

96. U.S. Food and Drug Administration. Levaquin Prescribing Information. 2008.
97. Sarısaltık D, Teksin ZS. Bioavailability file: levofloksasin. FABAD J Pharm Sci. 2007;32:197-208.
98. Zhanel GG, Noreddin AM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: focus on respiratory infections. Curr Op Pharm. 2001;1(5):459-463.
99. Chien SG, Rogge MC, Gisclon LG. Pharmacokinetic profile of levofloxacin following once-daily 500-miligram oral or intravenous doses. Antimicrob Agents Chemoter. 1997;41(10):2256-2260.
100. Lubasch A, Keller I, Borner K. Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, trovafloxacin and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2600-2603.
101. Fish DN, Chow AT. The clinical pharmacokinetics of levofloxacin. Clin Pharmacokinet 1997;32:101-119.
102. Frick A, Möller H, Wirbitzki E. Biopharmaceutical characterization of immediate release drug products. In vitro/in vivo comparison of phenoxymethylpenicillin potassium, glimepiride and levofloxacin. Eur J Pharm Biopharm. 1998;46:305-311.
103. Pickerill KE, Paladino JA, Schentag JJ. Comparison of the fluoroquinolones based on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. Pharmacotherapy 2000;20: 417-428.
104. Volpe DA. Permeability classification of representative fluoroquinolones by a cell culture method. AAPS Pharm Sci. 2004;6(2):1-6.
105. USP 30. Monographs: Flurbiprofen Tablets.p.2180.

106. Varma MM, Pandi JK. Dissolution, solubility, XRD and DSC studies on flurbiprofen-nicotinamide solid dispersion. Drug Dev Ind Pharm. 2005;31:417-423.
107. Li P, Zhao L. Solubilization of flurbiprofen in pH-surfactant solutions. J Pharm Sci. 2003;92(5):951-956.
108. Muraoka A, Tokumura T, Machida Y. Evaluation of the bioavailability of flurbiprofen and its β-cyclodextrin inclusion complex in four different doses upon oral administration to rats. Eur J Pharm Biopharm. 2004;58:667-671.
109. Hutzler JM, Frye RF. , Korzekwa KR, Branch RA, Huang SM, Tracy TS. Minimal in vivo activation of CYP2C9-mediated flurbiprofen metabolism by dapsone. Eur J Pharm Sci. 2001;14:47-52.
110. Hirai T, Matsumoto S, Kishi I. Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction. J Chromatogr. 1997;692:375-388.
111. Giagoudakis G, Markantonis SL. An alternative high-performance liquid –chromatographic method for the determination of diclofenac and flurbiprofen in plasma. J Pharm Biomed Anal. 1998;17:897-901.
112. Liu YM, Liu GY, Liu Y, Li SC, Jia JY, Zhang MQ, Lu C, Zhang YM, Li XN, Yu C. Pharmacokinetic and bioequivalence comparison between orally disintegrating and conventional tablet formulations of flurbiprofen: a single dose, randomized-sequence, open-label, two-period crossover study in healthy chinese male volunteers. 2009;31(8):1787-1795.
113. Tsitsimpikou C, Spyridaki MHE, Georgoulakis I, Kouretas D, Konstantinidou M, Georgapoulos CG. Elimination profiles of

flurbiprofen and its metabolites in equine urine for doping analysis. Talanta. 2001;55:1173-1180.

114. Dhavse VV, Parmar DV, Devarajan PV. High-performance thin-layer chromatographic determination of flurbiprofen in plasma. J Chromatogr. 1997;694:449-453.
115. Sajeev J, Jadhav PR, Ravishankar D, Saha RN. Determination of flurbiprofen in pharmaceutical formulations by UV spectrophotometry and liquid chromatography. Anal Chim. 2002;463:207-217.
116. Darwish MK, Elmeshad AL. Buccal mucoadhesive tablets of flurbiprofen: characterization and optimization. Drug Discov Ther. 2009;3(4):181-189.
117. Wu KK. Biochemical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Biochem Pharmacol. 1998;55:543-547.
118. Barnett J, Chow J, Ives D. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. Biochim Biophys Acta. 1994;1209:130–139.
119. Curnock AP, Robson PA, Yea CM, Moss D, Gadher S, Thomson TA, Westwood R, Ruuth E, Williamson RA. Potencies of leflunomide and HR325 as inhibitors of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and-2: comparison with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. J Pharmacol Exp Ther. 1997;282(1):339–347.
120. Mitchell J, Akarasereenont P, Thıemermann C, Flower RJ, Vane JR. selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. Proc Natl Acad Sci. 1994;90:11693-11697.
121. Gou Q, Liu CH, Av PB, Hla T. Dissociation of basal turnover and cytokine-ınduced transcript stabilization of the human

cyclooxygenase-2 mRNA by mutagenesis of the 3'-Untranslated Region. Biochem Bioph Res Comm. 1998;242:508–512.

122. Riley MR, editor. Drug Facts and Comparisons. 5 th ed. Saint Louis Missouri. 2001. p. 445–456.
123. Davies NM. Clinical pharmacokinetics of flurbiprofen and its enantiomers. Clin Pharmacokinet. 1995;28:100-14.
124. Risdall PC, Adams SS, Crampton EL, Marchant B. The disposition and metabolism of flurbiprofen in several species ıncluding man. Xenobiotica. 1978;8(11):691-704.
125. Kaiser DG, Brooks CD, Lomen PL. Pharmacokinetics of flurbiprofen. Am J Med. 1986;80(3):10-15.
126. Kean WF, Antal EJ, Grace EM, Cauvier H, Rischke J, Buchanan WW. The pharmacokinetics of flurbiprofen in younger and elderly patients with rheumatoid arthritis. J Clin Pharmacol. 1992;32:41-48.
127. Ansaid®: US Prescribing information. Medication Guide. 2007.
128. Pargal A, Kelkar MG, Nayak PJ. The effect of food on the bioavailability of ibuprofen and flurbiprofen from sustained release formulations. Biopharm Drug Disp. 1996;17:511-519.
129. Zgheib NK, Frye RF, Tracy TS, Romkes M, Branch RA. Evaluation of flurbiprofen urinary ratios as in vivo indices for CYP2C9 activity. Br J Clin Pharmacol. 2006;63(4):477-487.
130. Patel BK, Jackson SHD, Swift CG, Hutt AJ. disposition of flurbiprofen in man:influence of stereochemistry and age. Xenobiotica. 2003;33(10):1043-4057.
131. Chalmers TM, Glass RC, Risdall PC. Concentration of flurbiprofen in serum and synovial fluid from patients with active rheumatoid disease: some preliminary observations. Curr Med Res Opin. 1977;5:17-20.

132. Buchanan WW, Kassam YB. European experience with flurbiprofen. A new analgesic/antiinflammatory agent. Am J Med. 1986;80(3A): 145–152.
133. Szpunar GJ, Albert KS, Bole GG, Dreyfus JN, Lockwood GF, Wagner JG. Pharmacokinetics of flurbiprofen in man. I. Area / dose relationships. Biopharm Drug Dispos. 1987;8:273-283.
134. Rinaki E, Dokoumetzidis A, Valsami G, Macheras P. Identification of biowaivers among class II drugs: Theoretical justification and practical examples. Pharm Res. 2004;2(9):1567-1572.
135. Dahl JE, Frangou-Polyzois MJ, Polyzois GL. In vitro biocompatibility of denture relining materials. Gerodontology. 2006;23:17-22.
136. Laitinen L, Takala E, Vuorela H, Vuorela P, Kaukonen AM, Marvola M. Anthranoid laxatives influence the absorption of poorly permeable drugs in human intestinal cell culture model (Caco-2). Eur J Pharm Biopharm. 2007;66:135-145.
137. Takaai M, Suzuki H, Ishida K, Tahara K, Hashimoto Y. Pharmacokinetic analysis of transcellular transport of levofloxacin across LLC-PK_1 and Caco-2 cell monolayers. Biol Pharm Bull. 2007;30(11):2167-2172.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Diren

Soyadı: Sarısaltık

Doğum Yeri ve Tarihi: Diyarbakır; 01.01.1985

İş Tecrübesi: Ruhsatlandırma Sorumlusu (2006-)
Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş.

Eğitimi

- Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 2007- (Yüksek Lisans)
- Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2002-2006 (Lisans)
- Diyarbakır Anadolu Lisesi 1995-2002

Yabancı Dili

İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- TÜFTAD (Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği)
- FABAD (Farmasötik Bilimler Ankara Derneği)

Bilimsel Etkinlikleri

Projeler:

1. **Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP)** "Safra Tuzları İçeren İn Vitro Çözünme Ortamlarında Yapılan Çözünme Hızı Çalışmalarının Değerlendirilmesi", Proje Kodu: 02/2008-20, ***(2008-).***
2. **Novartis Farmasötik Teknoloji Proje Desteği** "Açlık ve Tokluk Durumlarını Taklit Eden Mide-Barsak Ortamlarında Levofloksasin (BCS Sınıf 1) ve Atorvastatinin (BCS Sınıf 2) Çözünürlük ve Permeabilite Özelliklerinin Biyoyararlanım/Biyoeşdeğerlik Açısından Değerlendirilmesi", ***(2009-)***.

Yayınlar:

1. **Sarısaltık D**, Teksin ZS. "Bioavailability file: Levofloksasin". FABAD J Pharm Sci. ***2007***, 32:197-208.
2. **Sarısaltık D**, Teksin ZS. "Biyoeşdeğerlik çalışmalarından vazgeçilmesinde biyofarmasötik ilaç sınıflandırma sistemlerinin değerlendirilmesi: Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS) ve Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sınıflandırma Sistemi (BDDCS)". Gazi Medical Journal ***2010*** *(incelemede).*

11. TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgisi, desteği ve güleryüzüyle yanımda olan, tüm heyecanımı paylaşan, ihtiyacım olan her konuda benden yardımlarını esirgemeyen sevgili danışman hocam **Yrd.Doç.Dr.Zeynep Şafak Teksin**'e**,**

İhtiyaç duyduğumda bilgi birikimlerini içtenlikle benimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen **Prof.Dr.İlbeyi Ağabeyoğlu**'na**,**

Gösterdikleri yakın ilgi, destek ve yardımlarından dolayı **Prof.Dr.Nevin Çelebi** ve **Prof.Dr. Füsun Acartürk**'e**,**

En yoğun zamanlarında bile yardım isteklerimi geri çevirmeyen ve deneyimlerinden faydalandığım **Prof.Dr.Tuncer Değim** ve **Doç.Dr.Figen Tırnaksız**'a,

Sitotoksisite çalışmalarındaki yardım ve desteklerinden dolayı, **Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Bölümü'**nden **Uzm.Biyolog Şükran Yılmaz**'a,

Hiçbir talebimi geri çevirmeden çalışmalarım sırasında her konuda desteğini hissettiğim **Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş.**'den **Dr.Ecz.Nizam Emritte**'ye,

SIF Powder®'ın teminindeki destek ve yakın ilgilerinden dolayı Sayın **Sevgi Ökten**'e ve başta **Emel Arslangi**l olmak üzere **Zentiva Sağlık Ürünleri San. ve Tic. A.Ş.**'ne,

Destek ve yardımlarından dolayı **Prof.Dr.Tanver Doğanay**, **Doç.Dr.Sevgi Takka** ve **Doç.Dr.Zelihagül Değim**'e**,**

Çalışmaların sırasındaki destekleri için **Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş.** çalışanlarından **Ecz.Canan Aslan, Uzm.Ecz.Güliz Kutlar, Ecz.Mehtap Saydam, Kim.Dilek Özer, Ecz.Burcu Erdoğan, Uzm.Ecz.Tuğçe Yıldız** ve **Uzm.Ecz.Mustafa Arısoy**'a,

Benden destek ve ilgilerini esirgemeyen arkadaşlarım **Figen Esiringü, Gizem Kocamanoğlu, Şeyda Akkuş, Fatmanur Tuğcu-Demiröz, Sibel Tamer**, **Başaran Mutlu, Tuba İnceçayır** ve **Fatma Çelik**'e,

Tezimin başından sonuna kadar sevincimi ve üzüntümü en iyi anlayan ve her koşulda yanımda olan dostlarım **Emine Tuncay** ve **Nazenin İpek**'e**,**

Her kararımı destekleyerek anlayışlarını bir an bile esirgemeyen annem **Suzan Sarısaltık,** babam **Mehmet Sarısaltık,** ablam **Evin Kasımoğlu** ve minik ilham kaynağım **Ekin Dila Kasımoğlu**'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.