

Açlık ve Tokluk Durumlarını Taklit Eden Biyouyumlu Çözünme Ortamlarının Değerlendirilmesi

Diren SARISALTIK YAŞIN^{*,**}, Zeynep Şafak TEKSİN^{***}

Evaluation of biorelevant dissolution media simulating fasted and fed states

SUMMARY

The most important criteria for evaluating in vitro performance and in vivo behavior of drugs is dissolution tests. It is necessary to provide conditions that best mimic the in vivo media in dissolution tests. The most important condition is the dissolution media used. The dissolution media recommended in pharmacopoeias and guidelines are generally based on the pH values the physiological media. Even though these media are proper for drugs without solubility and dissolution problems, they do not sufficiently reflect in vivo environments for low soluble drugs. However, lipophilicity, solubility, ionization properties of drugs and food-drug interactions should also be considered while selecting a dissolution medium. For this purpose biorelevant media simulating gastrointestinal conditions were developed. Components, osmolality, pH, and buffer capacity of these media are different according to fasting or fed states. In this study, the physiology of gastrointestinal fluids was investigated, the dissolution medium developed to mimic gastric, intestine and colon fluids in fasted and fed states were evaluated.

Key Words: Biorelevant media, dissolution, BCS, FaSSIF, FeSSIF, FaSSGF, FeSSGF

Açlık ve tokluk durumlarını taklit eden biyouyumlu çözünme ortamlarının değerlendirilmesi

ÖZET

İlaçların in vitro performanslarının değerlendirilmesinde ve in vivo davranışlarının tabmin edilmesinde kullanılan en önemli kriter çözünme hızı testleridir. Çözünme hızı testlerinde in vivo ortamı en iyi şekilde taklit eden koşulların sağlanması gereklidir. Bu koşullardan en önemlisi ise kullanılan çözünme ortamıdır. Farmakopeler ve kılavuzlarda önerilen çözünme ortamları genelde fizyolojik ortamların pH değerlerini temel alır. Bu ortamlar, çözünürlük ve çözünme problemi olmayan ilaçlar için uygun olsa da düşük çözünürlük gösteren ilaçlar için in vivo koşulları yeterince yansıtmamaktadır. Oysa çözünme ortamı seçilirken ilacın lipofilitesi, çözünürlüğü, iyonizasyon özellikleri ve yiyecekler ile etkileşimleri gibi faktörler de dikkate alınmalıdır. Bu sebeple, gastrointestinal koşulları taklit eden biyouyumlu ortamlar geliştirilmiştir. Bu ortamların içerikleri, osmolalitesi, pH'sı ve tampon kapasitesi açlık ve tokluk durumlarına göre farklılık göstermektedir. Bu çalışmada gastrointestinal sıvıların fizyolojisi incelenmiş, açlık ve tokluk durumlarında mide, ince bağırsak ve kolon sıvılarını taklit etmek amacıyla geliştirilen çözünme ortamları değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyouyumlu çözünme ortamı, çözünme hızı, BCS, FaSSIF, FeSSIF, FaSSGF, FeSSGF

Received: 30.04.2018

Revised: 20.05.2018

Accepted: 28.05.2018

* Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 21280, Sur – Diyarbakır, Türkiye

** Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06330, Etiler – Ankara, Türkiye

*** Corresponding Author: Zeynep Şafak Teksin,

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06330, Etiler – Ankara, Türkiye.

Tel: +90 (312) 202 30 42,

Faks: +90 (312) 212 79 58

e-mail: zsteksın@gazi.edu.tr

GİRİŞ

İn vitro çözünme hızı testleri ilaç geliştirme, kalite kontrol ve biyomuafiyet değerlendirmelerinde performansın ve kalitenin en önemli göstergesidir.

Bu testler, formülasyon geliştirme çalışmalarında, seriler arası benzerliğin kanıtlanmasında, üretimin devamlılığında, kalitenin sürekliliğinde, üründeki tip değişikliklerinde, ölçek büyütmede ve BCS Sınıf 1 ve Sınıf 3 ilaçların biyomuafiyetlerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Dressman et al.,1998; Shah,V.P.,2001; Baxevanis et al.,2016). *İn vitro* çözünme testleri *in vivo*yu yansıtmak amacıyla *in vivo* çalışmaların bir ön adımı olarak düşünülebilir. Ancak *in vivo* ortamı en iyi taklit eden ayırt edici bir ortam ve yöntem geliştirmek sanıldığı kadar kolay değildir (Yılmaz et al., 2015). Yöntemin basit, tekrarlanabilir ve güvenilir olması istenirken, aynı zamanda fizyolojik ortamları içerik ve hidrodinamizm açısından mümkün olduğu kadar iyi temsil etmesi de beklenmektedir (Klein et al.,2010).

Çözünme hızı, çözünürlük ve permeabilite gibi ilaca ait faktörlerden, kullanılan yardımcı maddeler, üretim yöntemi ve salım özellikleri gibi dozaj formula ait özelliklerden ve kullanılan cihaz, yöntem ve çözünme ortamı gibi test koşullarından etkilenmektedir. Bir çözünme hızı testi geliştirilirken ilacın ve dozaj formunun özelliklerinin gastrointestinal kanalın fizyolojik koşullarından etkilenebileceği dikkate alınmalıdır (Wang et al., 2009).

Amidon ve arkadaşlarının (Amidon et al., 1995) geliştirdiği Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine (BCS) göre ilaçlar çözünürlük ve permeabilite özelliklerine göre dört sınıfa ayrılmıştır. Sınıf 1 ilaçlar yüksek çözünürlük ve yüksek permeabilite gösteren ilaçlar olup hızlı salımlı dozaj şekillerinde çözünme hızı testleri ile birlikte değerlendirildiğinde, uygun koşullarda *in vivo* biyoeşdeğerlik çalışmalarından muaf olabilen ilaçlardır. Sınıf 2 ilaçlar düşük çözünürlük ve yüksek permeabilite gösterirler. Sınıf 3 ilaçlar yüksek çözünürlük ve düşük permeabilite gösterir ve yine belirli kriterler sağlandığında biyomuafiyet alabilen ilaçlardır. Sınıf 4 ilaçlar ise hem çözünürlük hem de permeabilite açısından sorunlu ilaçlardır. Bu sınıflandırmada Sınıf 2 ve 4 kategorisinde yer alan bazı ilaçlar fizyolojik koşullardan çok fazla etkilenmektedir ve çözünme hızı çalışmalarında bu noktanın göz önüne alınması gerekmektedir (Sarısaltık 2010; Sarısaltık et al., 2012; Yılmaz et al., 2015; Sarısaltık et al., 2018).

Bu çalışmada ilaçların *in vivo* performansını yansıtmak amacıyla açlık ve tokluk durumlarındaki gastrointestinal fizyoloji gözönüne alınarak geliştirilen biyoyumlu *in vitro* çözünme ortamları incelenmiştir.

İn vitro Çözünme Ortamları

Çözünme hızı testleri, ilacın gastrointestinal kanaldaki davranışının *in vitro* koşullarda gözlemlenmesine olanak sağlar. Sağlık otoritelerine göre *in vivo* biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılacak ilaçların aynı serileri için *in vitro* benzerliğin de gösterilmesi gerekmektedir. Eğer *in vitro* ve *in vivo* sonuçlarda paralellik sağlanmazsa *in vivo* sonuçlar temel alınarak *in vitro* sonuçlardaki tutarsızlık için kapsamlı gerekçelendirme istenmektedir (EMA, 2010). Bu durumda, *in vitro* çözünme hızı yönteminin tasarımı önemli rol oynamaktadır. FDA, EMA ve WHO *in vivo* koşulları taklit etmek amacıyla çözünme testlerinde ortam olarak farklı pH'larda çeşitli tampon çözeltilerin kullanımını önermektedir (EMA, 2010; FDA, 2015). Ancak güncel çalışmalar, yalnızca pH değişiminin *in vivo* ortamı taklit etmekte yetersiz olduğunu belirterek çok sayıda biyoyumlu ortam önerisinde bulunmaktadır (Ruby et al., 1996; Dressman et al., 1998; Galia et al., 1999; Kossena et al., 2003; Marquez et al., 2004; Vertzoni et al., 2005; Vertzoni et al., 2007; Jantraid et al., 2008; Fatouros et al., 2009; Vertzoni et al., 2010; Kleberg et al., 2010; Psachoulias et al., 2012; Fuchs et al., 2015; Zhou et al., 2017; Madsen et al., 2018). Aşağıda tüm bu biyoyumlu çözünme ortamlarının değerlendirilmesi sunulmaktadır.

Mideleri Taklit Eden Ortamlar

Midenin fizyolojik koşulları açlık ve tokluk durumlarında farklı değerlendirilmektedir. Açlık durumunda mide koşulları pH, osmolalite, yüzey gerilimi, tampon kapasitesi ve protein içeriği ile karakterize edilir. Tokluk durumunda ise bunlara ek olarak yiyeceğin ve gastrik sıvının bileşimi de eklenmektedir (Koziolek et al., 2013; Baxevanis et al., 2016).

Gastrik motilite, açlık durumunda gözlenen göç eden motor kompleks ile kontrol edilir ve üç fazdan oluşur. Dinlenme fazında çok seyrek kasılmalar gözlenir, ikinci faz kesik kesik ve düzensiz kasılmalardan meydana gelir, üçüncü fazda ise çok düzenli ve şiddetli kasılmalar görülür (Culen et al., 2013). Tokluk durumu motilite deseni (özellikle faz III) ise doğrudan gastrik boşalma ile ilişkilidir. Tokluk durumunda yiyeceklerin küçük parçalara ayrılması esnasında oluşan bir gecikme periyodu bulunmaktadır (Mitra et al., 2014). Boşalma zamanı katı gıdalar için sıvı gıdalardan anlamlı olarak daha uzun sürer. Açlık durumunda midenin yarı boşalma zamanı yaklaşık 80.5 dakika iken tokluk durumunda yaklaşık 127 dakikadır (Fredua-Agyeman et al., 2015).

Mide günde 1.0 – 1.5 L kadar sıvı salgılar. Mide sıvısı, su hidroklorik asit (HCl), elektrolitler (sodyum,

potasyum, kalsiyum, fosfat, sülfat ve bikarbonat), mukus, enzimler (pepsin, lipaz, amilaz, renin ve jelatinaz), hormonlar (gastrin) ve proteinlerin bir karışımıdır (Washington et al., 2001a). Kalantzi ve ark. (Kalantzi et al., 2006a) yaptıkları bir çalışmada açlık ve tokluk durumlarında gastrointestinal fizyolojiyi araştırmıştır. Açlık durumu için gönüllülere 250 mL su verilirken, tokluk durumunu taklit etmek için Ensure® Plus verilmiş ve yirmi hastadan mide ve bağırsak sıvıları aspire edilmiştir. Tokluk durumunda aspire edilen sıvılardan elde edilen pepsin derişimi tokluk durumunda açlık durumunun yaklaşık iki katına çıkmıştır. Aynı çalışmada midedeki safra asitleri 500 µM'den düşük bulunmuştur. Yalnızca bir bireyde tokluk durumunda bu değerin üstünde bulunmuştur. Midenin safra asidi miktarını inceleyen bazı çalışmalarda ise (Efentakis et al., 1998; Pedersen et al., 2000) safra asitlerinin 1 mM'ın üstünde olduğu belirtilmiştir. Bu durum, sıvı aspirasyonunun mide boşalması esnasında değil, dinlenme esnasında gerçekleştirildiğini akıllara getirmektedir.

Midenin pH değerleri asit sekresyonuna, farklı motilite örgüsüne ve gastrik bileşenlere göre yüksek varyasyon göstermektedir. Bu durum yiyecek alımdan sonra daha karmaşık olmaktadır. Yemekten sonra yiyeceklerin tamponlama etkisiyle gastrik pH önce artar. Sindirim başlayınca gastrik asit sekresyonuyla tekrar azalmaya başlar ve yemeğin üstünden 3-4 saat geçtikten sonra stabil hale gelir (Charman et al., 1997; Hörter et al., 2001). Gastrik pH varyasyonunu etkileyen bir diğer faktör gastrik asit salgısındaki sirkadyen varyasyondur. En yüksek asit salgısı akşamları olmaktadır iken en düşük salgı da sabahları gerçekleşmektedir (Washington et al., 2001a). Gastrik pH yaştan da etkilenmektedir. Russel ve ark. (Russel et al., 1993) yaptığı bir çalışmada genç ve yaşlı bireylerin mide pH'sı değerleri arasında farklılıklar saptamıştır (Tablo 1).

Tablo 1'de çeşitli çalışmalardan elde edilen açlık ve tokluk durumlarında mideye ait fizyolojik değerler gösterilmektedir.

Tablo 1. Midenin açlık ve tokluk durumlarında ölçülen fizyolojik değerleri

Fizyolojik Parametre	Açlık	Tokluk	Referans
pH	2.4-1.7 (20 dk.-60 dk.) 1.7-3.9 1.7 1.4-2.0 1.1-1.6*	6.4-2.7 (5 dk.-210 dk.) - 6.4-7.0 4.4-5.6 3.9-5.5*	Kalantzi et al., 2006a - Pedersen et al., 2000 Russel et al., 1993 Russel et al., 1993
Tampon kapasitesi	7-18 mmol/L/ΔpH (20 dk.-60 dk.)	14-28 mmol/L/ΔpH (30 dk.-210 dk.)	Kalantzi et al., 2006a
Pepsin derişimi	0.11-0.22 mg/mL (20 dk.-60 dk.) 0.83-1.27 mg/mL	0.26-0.58 mg/mL (30 dk.-210 dk.) -	Kalantzi et al., 2006a Pedersen et al., 2000
Osmolalite	98-140 mOsm/kg (20 dk. - 60 dk.) 206-236 mOsm/kg 271 mOsm/kg	559-217 mosm/kg (20 dk. - 60 dk.) - -	Kalantzi et al., 2006a - Pedersen et al., 2000 Lindahl et al., 1997
Yüzey gerilimi	41.9-45.7 mN/m 24-43 mN/m 27.7-39.5 mN/m	30-31 mN/m - -	Kalantzi et al., 2006a Efentakis et al., 1998 Pedersen et al., 2000
Safra asitleri/tuzları	< 0.5 mM 0.1-3 mM 2.9 mM 0.25-1.39 mM	< 500 µM - - - 51 µM (Standart kahvaltayı takiben)	Kalantzi et al., 2006a Efentakis et al., 1998 Lindahl et al., 1997 Pedersen et al., 2000 Dewar et al., 1982.
Lipaz derişimi	-	16.7 ± 0.7 µg/mL	Carriere et al., 1993
Hacim	45 ± 18 mL 27 mL 26.7 ± 18.8 mL 23.9 ± 24.4 mL	- - - -	Schiller et al., 2005 Lobo et al., 2009 Maltby et al., 1986 Lydon et al., 1999.

* Geriyatrik bireylerdeki veriler (n=79).

Açlık durumunda mideyi yansıtmak için FDA ve EMA tarafından kabul edilen klasik çözünme ortamındaki temel nokta ortamın pH değeridir. Bu amaçla en çok 0.1 N HCl (pH 1.2) kullanılır. Bunun dışında Amerika Farmakopesi (USP) ve Avrupa Farmakopesi (Ph.Eur.) tarafından önerilen yapay mide sıvısının

(SGF) enzimli veya enzimsiz olarak kullanımı sağlık otoriteleri tarafından kabul edilmektedir (USP 41- NF 36, 2018; Ph.Eur. 9th Edition, 2016). SGF'nin pH'sı yine 1.2 olarak ayarlanmakta ve enzim olarak mide-deki en önemli enzim olan pepsin kullanılmaktadır. FDA ve EMA tarafından kabul edilen mide ortamları

rında pH değeri 1.2 önerilmesine rağmen yapılan çalışmalarda fizyolojik pH'nın biraz daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 1).

Daha iyi fizyolojik uyum için araştırmacılar çeşitli biyoyumlu ortam önerilerinde bulunmuştur. Bu amaçla ortama çeşitli yüzey etkin maddeler ilave edilmiş, bazı safra tuzları eklenmiş, pH değişimi ve osmolalite değerleri göz önüne alınmıştır. Bu ortamlar Tablo 2'de görülmektedir. Duodenal ortamın mideye geri akımı nedeniyle fizyolojik olarak midenin yüzey gerilimi azalmaktadır. *İn vitro* olarak bu durumu taklit etmek amacıyla çözünme ortamına sodyum lauril sülfat (SLS) ve Triton X-100 gibi yüzey etkin maddeler ilave edildiğinde çözünürlüğü düşük olan ilaçların çözünürlüğünde belirgin artış gözlenmiştir (Dressman et al., 1998; Galia et al., 1999). Bu da çözünme testlerinde yüzey geriliminin önemini göstermektedir. Ancak yüzey etkin madde olarak özellikle SLS'nin ilacın çözünürlüğünü olması gerekenden daha fazla artırdığı yönündeki çalışmalar bu maddenin biyoyumlu ortam oluşturmada şüphe oluşturduğunu göstermektedir (Luner et al., 2001; Vertzoni et al., 2007). Tang ve ark. SLS'yi çeşitli oranlarda (%0.25-1) kullanarak *in vitro - in vivo* korelasyonu (IVIVC) değerlendirmiş ve en iyi korelasyonun SLS'nin en düşük oranda kullanıldığı ortamda olduğunu gözlemlemiştir (Tang et al., 2001). Ayrıca çözünme ortamında SLS ve pepsinin birlikte kullanılmasının pepsin aktivitesinde anlamlı azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Guzman et al., 2016).

Vertzoni ve ark. mideyi daha iyi taklit eden bir biyoyumlu ortam geliştirmişlerdir (Vertzoni et al., 2005). Bu ortam (FaSSGF – açlık durumu yapay mide sıvısı) enzim olarak pepsin, safra tuzu olarak sodyum taurokolat, fosfolipitlerden lesitin ve NaCl ihtiva etmektedir. Bu ortamın yüzey gerilimi, osmolaritesi ve pH'sı da sırasıyla 42.6 mN/m, 120.7 mosm/kg ve 1.6 olup fizyolojik değerlere daha yakındır. Sonraki yıllarda bu ortamın içerdiği NaCl miktarı güncel fizyolojik değerlere göre değiştirilerek FaSSGF-V2 oluşturulmuştur (Vertzoni et al., 2007) (Tablo 2).

Yukarıda bahsedilen çözünme ortamları açlık durumunu yansıtmaktadır. Tokluk durumunda daha karmaşık fizyolojik değerler ortaya çıkmaktadır. Yiyecek varlığında ilaçların çözünürlük ve emilimi değişebilir. Örneğin çözünürlüğü düşük olan danazolün emilimi yağlı yiyeceklerle alındığında artmaktadır. Bu durum ilacın midede tutulma zamanındaki artıştan kaynaklanmaktadır (Sunesen et al., 2005). Bunun dışında yiyecekler gastrik boşalmayı yavaşlatabilir, safra akışını uyarabilir ve ilaçlarla etkileşime neden olabilir (Lentz et al., 2008).

Tokluk durumunda yiyeceğin çeşidi, yaş gibi bireylerarası farklılıklar, ilacın fizikokimyasal özellikleri

gibi birçok faktör gastrointestinal sıvıların bileşimini ve ölçülen değerleri etkilemektedir (Baxevanis et al., 2016). Tokluk durumunda midede hidrodinamik bir ortam oluşmaktadır ve çözünme çalışmalarında bu durum göz önüne alınmalıdır. pH değerleri yükselmekte ve süreye bağlı değişkenlik göstermektedir. pH'da gözlenen bu artış özellikle zayıf asit ve zayıf baz özellikteki ilaçların çözünürlüğü ve emiliminde değişikliğe neden olmaktadır. Açlık durumunda midenin düşük pH ortamında çoğunlukla non-iyonize halde bulunan zayıf asidik ilaçlar, tokluk durumunda ani pH yükselmesine bağlı olarak iyonize forma geçmekte ve çözünürlükleri artmaktadır. Zayıf bazik özellikteki ilaçlar için ise tersi söz konusudur. Midenin pH'sının artmasıyla birlikte midedeki çözünürlüklerinde azalma gözlenmektedir. (Kostewicz et al., 2004).

Bunun yanında tokluk durumunda alınan yiyeceğin içeriğindeki lipit miktarı da ilaçların lipofilitelerini etkileyebilmektedir. Lipofilitte partiyon katsayısı ile ifade edilir ve ilaçların biyolojik membranlarından geçmelerinde önemli bir etkidir. Ayrıca tokluk durumunda ilaçların midede kalma süreleri uzayacağı için ilacın mide sıvısıyla etkileşim süresine bağlı olarak çözünme şansı da artmaktadır. Lipoliz ürünlerinin sindirimi de çözünürlüğü düşük olan ilacın mide sıvısındaki çözünürlüğünü artırabilmektedir (Charman et al., 1997). Bu nedenle tokluk durumu mide ortamı taklit edilirken *in vitro* ortama lipaz enzimi ilavesi de dikkate alınmalıdır (Baxevanis et al., 2016).

Tokluk durumunda, pepsin derişimi, yüzey gerilimi ve osmolalitede aklıktan çok farklı değerlere ulaşmaktadır (Tablo 1). Tokluk durumunda yiyeceklerin alınmasına bir cevap olarak lipaz, proteaz ve amilaz enzimleri salınmaktadır (Dressman et al., 1998). Özellikle yağların sindiriminden sorumlu lipaz enzimi trigliseritleri digliseritlere ve yağ asitlerine parçalamasından dolayı önemlidir (Carriere et al., 1993).

Tokluk durumunda sağlık otoriteleri tarafından kabul edilen özel bir çözünme ortamı bulunmamasına rağmen araştırmacılar en uygun ortamı bulmak için çok sayıda araştırma yapmaktadır. Bu amaçla ilk önce gerçek mide sıvısıyla homojenize edilen yiyeceklerin çözünme ortamı olarak kullanılması düşünülmüştür (Carriere et al., 2000). Ancak bu ortamdan ilaç analizi zor olduğu için alternatif arayışlara geçilmiştir. Örneğin sütün çözünme ortamı olarak kullanımı uzun yıllar önce düşünülmüştür. Macheras ve ark. %0.75 oranında yağ içeren sütü çeşitli fizikokimyasal özellikler gösteren dört ilacın çözünme testinde akış enjeksiyonlu dinamik diyaliz yöntemiyle kullanmıştır (Macheras et al., 1986). Süt içerik olarak tokluk durumu mide ortamına benzer olsa da osmolalite ve yüzey gerilimi değerleriyle ve bileşiminde gastrik enzimleri içermemesi nedeniyle biyolojik uyumdan uzaktır. Sü-

tün içerdiği yağ oranı arttıkça ilacın süt bileşenlerine daha fazla bağlandığı görülmüştür (Macheras et al., 1988). Galia ve ark. tokluk durumunda mideyi taklit etmek için %3.5 yağ içeren süt kullanmışlardır. Bu ortamın pH'sı 6.5 ve tampon kapasitesi 14 mEq/L/pH olarak hesaplanmıştır. Ancak çalışmada parasetamol tabletlerde yer alan bazı bileşiklerin süt ortamındaki maddelerle etkileşimine bağlı olarak tabletlerin çözünme hızında azalma gözlemlendiği belirtilmiştir (Galia et al., 1998). Sütün kullanımının bir diğer dezavantajı ise taze sütün stabilite sorunudur (Klein et al., 2010). Bir başka sakıncası ise etkin maddenin çözünürlüğünün sütte bulunan kazeinlerin oluşturduğu miseller nedeniyle gerçeği yansıtmayan şekilde arttığı düşünülmesidir (Koziolek et al., 2013). Tokluk durumunda mideyi taklit etmesi için düşünülen bir diğer çözünme ortamı Ensure® Plus'tır. Ensure® Plus'da %3.5 yağ içeren süt gibi fizikokimyasal özellikler bakımından FDA standart kahvaltısına benzerdir (Klein et al., 2004). Her ikisi de osmolalite ve viskozite gibi özellikler bakımından biyoyumlu değildir. Klein ve ark., yaptıkları çalışmada Ensure® Plus'ın viskozitesini %0.45 pektin ile ayarladıklarında bu ortamın uygun olabileceğini belirtmiştir (Klein et al., 2004). Ancak

çalışmada FDA standart kahvaltısı referans alınmıştır ve gastrik sıvı ile karşılaştırma yapılmamıştır. Daha sonra Ensure® Plus'a benzer başka beslenme emülsiyonları ile de çalışmalar yapılmıştır (Brouwers et al., 2010) Bu sıvılar Ensure® Plus'a temelde benzer olup protein, yağ ve karbonhidrat miktarlarında değişiklik bulunmaktadır.

Tokluk durumunda mide koşullarını yansıtmak için önemli bir nokta da mide içeriğinin sindirim esnasında ve mide boşalması sırasında değişmesidir. Jantraid ve ark. bu durumu dikkate alarak mideyi yiyecek alımından 200 dk. sonrasına kadar taklit eden üç farklı benzer ortam geliştirmiştir. Bu ortamlar erken (0-75 dk.), orta (75-165 dk.) ve geç (165 dk. ve sonrası) olarak adlandırılmış ve süttten hareketle geliştirilmiştir. Ortamların bileşenleri Tablo 3'te görülmektedir (Jantraid et al., 2008). Bu ortamlar tokluk durumu yapay mide sıvısı (FeSSGF) olarak bilinmekte ve şimdikiye kadar tokluk durumunda mideyi en iyi yansıtan ortamlar olduğu düşünülmektedir. Ancak bu ortamlar pepsin veya lipaz gibi enzimleri içermediği için ileride başka benzer ortamlar geliştirileceği düşünülmektedir.

Tablo 2. Açlık durumunda mide sıvısını taklit eden çözünme ortamları

Bileşenler	SGF (USP 33)	SGFsp	AGF (Ruby et al., 1996)	SGF _{SLS} (Dressman et al., 1998)	SGF _{Triton} (Galia et al., 1999)	FaSSGF (Vertzoni et al., 2005)	FaSSGF-V2 (Vertzoni et al., 2007)
Sodyum klorür	2.0 g/L	2.0 g/L	-	2.0 g/L	34.2 mM	34.2 mM	68 mM
Pepsin	3.2 g/L	-	1.25 g/L	-	-	0.1 g/L	0.1 g/L
Sodyum sitrat	-	-	0.5 g/L	-	-	-	-
Sodyum maleat	-	-	0.5 g/L	-	-	-	-
Laktik asit	-	-	420 µl/L	-	-	-	-
Asetik asit	-	-	500 µl/L	-	-	-	-
Sodyum lauril sülfat	-	-	-	2.5 g/L	-	-	-
Triton X-100	-	-	-	-	1 g/L	-	-
Sodyum taurokolat	-	-	-	-	-	80 µM	80 µM
Lesitin	-	-	-	-	-	20 µM	20 µM
Tampon tipi	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl
pH	1.2	1.2	1.2 2.0 3.0	1.2	1.2	1.6	1.6
Yüzey gerilimi (m/Nm⁻¹)	-	-	51.8 50.07 50.58	33.3	30.83	42.6	42.6
Osmolarite (mOsm/kg)	-	-	-	180.5 ± 3.6	157.7 ± 2.9	120.7 ± 2.9	-
Viskozite (cP)	0.7054 (Anwar et al., 2005)	-	0.7122 0.7096 0.7089 (Anwar et al., 2005)	0.7085 (Anwar et al., 2005)	0.7051 (Anwar et al., 2005)	-	-

SGF: Simulated gastric fluid (yapay mide sıvısı), SGFsp: Pepsin içermeyen SGF; AGF: Artificial gastric fluid (yapay mide sıvısı)

Tablo 3. Tokluk durumunda mide sıvısını taklit eden çözünme ortamları

Bileşenler	Standart kahvaltı 1 (%62 yağ) (Klein et al., 2004)	Standart kahvaltı 2 (%37 yağ) (Klein et al., 2004)	Süt (%3.5 yağ) (Galia et al., 1998)	Ensure® Plus (%29.5 yağ) (Klein et al., 2004)	FeSSGF _{erken} (Jantraid et al., 2008)	FeSSGF _{orta} (Jantraid et al., 2008)	FeSSGF _{geç} (Jantraid et al., 2008)
Sodyum klorür	-	-	-	-	148 mM	237.02	122.6
Asetik asit	-	-	-	-	-	17.12	-
Sodyum asetat	-	-	-	-	-	29.75	-
Ortofosforik asit	-	-	-	-	-	-	5.5
Sodyum dihidrojen fosfat	-	-	-	-	-	-	32
Tampon tipi	-	-	-	-	Süt : Asetat tamponu (1:0)	Süt : Asetat tamponu (1:1)	Süt : Asetat tamponu (1:3)
pH	6.51 (25°C) 6.61 (37°C)	5.28 (25°C) 5.12 (37°C)	6.5	6.62 (25°C) 6.45 (37°C)	6.4	5	3
Osmolalite (mOsm/kg)	771	713	-	730	559	400	300
Tampon kapasitesi (mEq/L/pH)	29.3 (25°C) 30.1 (37°C)	49 (25°C) 45 (37°C)	14	20 (25°C) 21 (37°C)	21.33	25	25

İnce Bağırsağı Taklit Eden Ortamlar

Mide sıvısı ilaçların çözünmesinde önemli bir rol oynasa da, ilaçların emilimi için esas bölge ince bağırsaktır (Reppas et al., 2012). 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 kaslı 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 m², jejunum 60 m², ileum, 60 m²) ve yüksek kan akışı (25 mL/dk.) nedeniyle emilimin en fazla gerçekleştiği bölgedir (Washington et al, 2001b). İnce bağırsağın osmolalitesi ortalama 271 mOsm/kg olarak bulunmuştur (Hörter et al., 2001). İnce bağırsağın açlık ve tokluk durumlarındaki fizyolojik değerleri Tablo 4'te verilmiştir.

USP'de önerilen yapay bağırsak sıvısında (Simulated Intestinal Fluid, SIF) dikkate alınan asıl nokta bağırsak pH'sıdır. Bu ortamın pH'sı 6.8'dir ve bu değer sağlık otoritelerinin önerdiği bağırsak ortamı pH'sıdır. Bu ortam pankreatin enzimini içerebilir veya içermeyebilir. Pratikte daha çok enzimsiz ortam tercih edilmektedir. Oysa biyolojik uyum için tampon kapasitesi, pankreas sekresyonu, yüzey gerilimi, osmolalite, bağırsak sıvısının hacmi ve bileşenleri de dikkate alınmalıdır (Klein et al., 2010). Bu nedenle midede olduğu gibi bağırsak için de çeşitli biyoyumlu ortamlar öne-

rilmıştır. Galia ve ark. (Galia et al., 1998) bu amaçla açlık durumu yapay bağırsak sıvısı (Fasted State Intestinal Fluid, FaSSIF) ortamını geliştirmiştir. Bu ortam Ar-Ge çalışmalarında sıklıkla kullanılmakta ve safra tuzu olarak sodyum taurokolat, fosfolipit olarak da leşitin ihtiva etmektedir. Bu bileşenler ilaçların islanabilirliğini artırır, düşük çözünürlüğü olan ilaçları karışık miseller içerisine hapsederek çözünürlüklerini artırır (Klein et al, 2010). Bu yüzden eğer çözünme ortamına bu bileşikler eklenmezse, BCS Sınıf 2 ve Sınıf 4 bileşikler için *in vivo*ya yakın sonuçlar elde edilemeyeceği belirtilmektedir. Aspire edilen insan bağırsak sıvısının pH değerlerinden hareketle FaSSIF ortamının pH'sı 6.5 olarak ayarlanmıştır. SIF için otoriteler genellikle 900 mL hacimle çözünme hızı çalışması yapılmasını tercih etse de FaSSIF için önerilen hacim en fazla 500 mL'dir, zira proksimal bağırsak sıvısının toplam hacmi 300-500 mL kadardır (Klein et al., 2010).

İlerleyen yıllarda FaSSIF ortamının modifiye edilmesi ile yeni ortamlar geliştirilmiştir. FaSSIF'in safra tuzu/fosfolipit oranı 4 iken, FaSSIF-V2'de bu oran 15'e yükseltilmiştir. Bunun yanında osmolalite ve fosfolipit miktarı da değiştirilmiştir. (Jantraid et al., 2008). FaSSIF-V3'te ise safra tuzu/fosfolipit oranı 9'a düşürülmüş ve ortama safra tuzu olarak taurokolata ek olarak glikokolat da eklenmiştir. Fosfolipit olarak da fosfatidilkolinin yanında lizofosfatidilkolin de ortama ilave edilmiştir. FaSSIF-V3'te ortam pH'sı yeniden 6.7'ye yükseltilmiştir (Fuchs et al., 2015). Yapay endojen bağırsak sıvısı (Simulated endogenous intestinal fluid, SEIF) ise daha karmaşık bir ortam olup bileşi-

minde altı çeşit safra tuzu içermektedir (Kossena et al., 2003) (Tablo 5).

Tokluk durumunda, sindirim sonrası bağırsağın hidrodinamiği ve intralümenal hacmi değişmektedir. Tokluk durumunda bağırsak sıvısının pH'sı açlık durumuna göre azalma gösterirken, osmolalite ve tampon kapasitesi belirgin bir artış göstermektedir (Tablo 4). Tokluk durumunda bağırsak içeriğinde yer alan safra tuzları, fosfolipitler, monogliseritler ve yağ asitleri gibi diğer amfilik maddelerin bazı ilaçların çözünürlük, çözünme hızı ve emilimi üzerinde büyük etkisi bulunmaktadır. Bu bileşikler öncelikle gastrointestinal sıvıların yüzey gerilimini düşürerek ilaçların ıslanabilirliğini artırır (Kleberg et al., 2010). Ayrıca bu amfilik bileşiklerin oluşturduğu veziküller ve diğer kolloidal yapılar ortamın solubilizasyon kapasitesini artırır ve ilacın lümeninden difüzyonunu ve mukozal tabakadan geçişini kolaylaştırarak onu emilime hazır hale getirirler (Wang et al., 2009; Reppas et al., 2012; Kleberg et al., 2010). Tokluk durumunda bağırsak sıvısını yansıtmak için otoriteler tarafından herhangi bir ortam önerilmemiştir. Bu amaçla ilk biyouyumlu ortam önerisi FaSSIF ortamını geliştiren Galia ve ark. (Galia et al., 1998) tarafından yapılmıştır (Fed State Intestinal Fluid, FeSSIF). FeSSIF'de yer alan taurokolat ve lesitin miktarı FaSSIF'takinin 5 katıdır. Bundan 10 sene sonra Jantraid ve ark. (Jantraid et al., 2008) sindirimin erken, orta ve geç fazlarına göre üç farklı biyouyumlu ortam önermiştir. Bu ortamlar insanlardan aspire edilen bağırsak sıvıları temel alınarak geliştirilmiş, osmolalite ve tampon kapasiteleri gibi fizyolojik değerleri de fazlarına göre değiştirilmiştir. Bu ortamlar değişik oranlarda safra tuzu ve lesitin yanında gliseril monooleat ve sodyum oleat gibi lipolitik ürünler de içermektedir. Ayrıca tercih edilmesi halinde ortamlara pankreatin enziminin de ilave edilebileceği belirtilmiştir. Jantraid ve ark. bu üç benzer ortamdan hareketle yeni bir FeSSIF-V2 ortamı önermiştir (Jantraid et al., 2008). Copenhagen tokluk (Kleberg et al., 2010) ortamı geliştirilmiş Fatouros ve

ark. (Fatouros et al., 2009) geliştirdiği ortamlarda ise ortama lipoliz ürünleri eklenmiştir (Tablo 5).

Açlık ve tokluk durumları için önerilen ortamlardan FaSSIF, FeSSIF ve FeSSIF-V2'nin oluşturduğu çok tabakalı veziküller, karışık miseller ve yağ damlacıkları cryo-SEM, cryo-TEM ve negatif leke elektron mikroskopu teknikleri ile gözlenerek, açlık ve tokluk durumunda insanlardan alınan bağırsak sıvıları ile (Fasted State Human Intestinal Fluid, FaHIF; Fed State Human Intestinal Fluid, FeHIF) karşılaştırılmıştır (Riethorst et al., 2017). FaSSIF ve FeSSIF ortamlarında boyutları 10 ila 50 nm arasında değişen miseller gözlenmiştir. FaSSIF'de hem küçük hem büyük miseller olmasına rağmen, FeSSIF'de daha çok büyük miseller baskındır. Oysa FeSSIF-V2 içerdiği yağ asitleri ve mono açıl gliseritler nedeniyle küçük boyutlu miseller de içermektedir. Hiçbir *in vitro* çözünme ortamında lipit agregatları veya damlacıklarına rastlanmamıştır. FaHIF (açlık durumunda insandan aspire edilen bağırsak sıvısı) incelendiğinde FaSSIF'e benzer şekilde 10-50 nm boyutları arasında ve küçük miseller de içeren yapılar gözlenmiştir. FaSSIF gibi FaHIF'de de vezikül gözlenmemiştir. Ancak FeHIF (tokluk durumunda insandan aspire edilen bağırsak sıvısı) ortamında 10 nm'den 2 µm'ye kadar değişen, karışık miseller, veziküller ve yağ damlacıkları gözlenmiştir. Fatouros ve ark. (Fatouros et al., 2009) geliştirdiği monoolein ve oleik asit içeren modifiye FeSSIF'te (FeSSIF_{lipoliz}) ise çok tabakalı veziküller gözlenmiştir. Ancak yine de FeHIF ortamı çok iyi taklit edilememiştir. Bu çalışma gelecekte yeni tokluk durumu bağırsak ortamları ile karşılaşılabileceğinin sinyalinin vermektedir.

Güncel çalışmalarda bilgisayar yazılımları ve modellemeler yardımıyla oluşturulan deney tasarımları ile açlık ve tokluk durumları için birçok parametre aynı anda incelenmektedir. Bu sayede ilaçların çeşitli ortamlardaki davranışlarını daha hızlı ve sistematik bir şekilde karşılaştırmak da mümkün olmaktadır (Madsen et al, 2018; Zhou et al., 2017).

Tablo 4. İnce bağırsağın açlık ve tokluk durumlarında ölçülen fizyolojik değerleri

Fizyolojik Parametre	Açlık	Tokluk	Referans
pH	4.9-6.4 (Duodenum) 4.4-6.5 (Jejunum) 6.5-7.4 (İleum) 7.0 ± 0.4 (Duodenum) 6.8 ± 0.4 (Jejunum) 6.2 (Duodenum) 7.1 ± 0.6 (Jejunum) 6.1 - 7.2 ± 0.4 (İleum) 6.8 ± 0.3 (Jejunum) 6.5 ± 0.3 (Duodenum) 7.49 ± 0.46 (İleum) 6.63 ± 0.53 (Jejunum) -	5.1-5.4 (Duodenum) 5.2-6.2 (Jejunum) 6.5-8.0 (İleum) - - 6.6 (Duodenum) - 5.4 5.7 7.4 ± 0.3 (İleum) 6.7 ± 0.4 (Jejunum) 6.2 ± 0.2 (Duodenum) - - 6.2 ± 0.6 (Duodenum)	Dressman et al., 1998 Dressman et al., 1998 Dressman et al., 1998 Moreno et al., 2006 Moreno et al., 2006 Kalantzi et al., 2006a Lindahl et al., 1997 Dressman et al, 1990 Mansbach et al., 1975 Ibekwe et al., 2008 Ibekwe et al., 2008 Ibekwe et al., 2008 Evans et al., 1988 Evans et al., 1988 Aburub et al, 2018
Tampon kapasitesi	4-13 mmol/L/pH 5.6 mmol/L/pH	- 18-30 mmol/L/pH	Moreno et al., 2006 Kalantzi et al., 2006a
Osmolalite (mOsm/kg)	262-294 137 ± 54 (Duodenum) 200 ± 68 (Jejunum) 178 (Duodenum) 271 (Jejunum) 197 (Duodenum)	- - - 287 (Duodenum) - 408 (Duodenum)	Pedersen et al.,2000 Moreno et al., 2006 Moreno et al., 2006 Kalantzi et al., 2006a Lindahl et al., 1997 Kalantzi et al., 2006b
Yüzey gerilimi (mN/m)	30.9-34.6 32.3 33.6	- 28.5 28.1	Pedersen et al.,2000 Kalantzi et al., 2006a Kalantzi et al., 2006b
Safra tuzu (mM)	2.6 (Duodenum) 0.57-5.14 (Duodenum) 0.83-5.47 (Jejunum) 2.9 ± 2.9 (Jejunum) 1.52 ± 1.77 (Jejunum) 2.0 ± 0.2 (Jejunum) - - 2.82 (Duodenum) 4.3 - 6.4 (Duodenum) 0 - 14 (Jejunum)	9.3 ± 0.8 (Duodenum) - - - - 8.0 ± 0.1 (Jejunum) 0.5 - 8.6 (Jejunum) 9.3 ± 0.75 (Duodenum) 10.7 (Duodenum) 5.8 - 39.6 (Duodenum) 4 - 34 (Jejunum)	Kalantzi et al., 2006a Moreno et al., 2006 Moreno et al., 2006 Lindahl et al., 1997 Pedersen et al., 2000 Persson et al., 2005 Persson et al., 2006 Mansbach et al., 1975 Kalantzi et al., 2006b Dressman et al., 1998 Dressman et al., 1998
Fosfolipit (mM)	- -	2.4 ± 0.35 (Duodenum) 5.77 (Duodenum)	Mansbach et al., 1975 Kalantzi et al., 2006b
Monogliserit (mM)	-	2.53 ± 1.2 (Duodenum)	Mansbach et al., 1975
Protein içeriği (mg/mL)	3.1 (Duodenum) 2.1 (Jejunum)	- -	Kalantzi et al., 2006a Lindahl et al., 1997
Hacim (mL)	105 ± 72 103 - 209 112 ± 27 109 ± 36	- 9 - 34 (90.dk.) 124 ± 24 (90.dk.) 590 ± 73 (90. dk.)	Schiller et al., 2005 Marciani et al., 2010 Placidi et al., 2009 Placidi et al., 2009

Tablo 5. Açlık durumunda bağırsak ortamını taklit eden çözünme ortamları

Bileşenler	SIF (USP 33)	SIFsp	FaSSIF (Galia et al., 1998)	FaSSIF (Marquez et al., 2004; Klein et al., 2010)	SEIF (Kossena et al., 2003)	FaSSIF-V2 (Jantraid et al., 2008)	Copenhagen açıklık (Kleberg et al., 2010)	FaSSIF-V2 Plus (Psachoulas et al., 2012)	FaSSIF-V3 (Fuchs et al., 2015)	Simulated SIF (DoE) (Madsen et al, 2018)
KH ₂ PO ₄	6.8 g/L	6.8 g/L	3.9 g/L	-	-	-	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	3.438 g/L	-	18 mM	-	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄	-	-	-	-	12 mM	-	-	-	-	-
Na ₃	-	-	-	-	6 mM	-	-	-	-	-
Pankreatin	10.0 g/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaOH	0.62 g/L	0.62 g/L	y.m.	y.m.	-	34.8 g/L	-	34.8 g/L	16.56 mM	-
Safra tuzları:										
Taurokolat (sodyum)	-	-	3 mM	3 mM	0.5 mM	3 mM	2.5 mM*	3 mM	1.4 mM	-
Taurodeoksikolat	-	-	-	-	0.3 mM	-	-	-	-	1.4-5.9 mM
Taurokenodeoksikolat	-	-	-	-	0.5 mM	-	-	-	-	-
Glikokolat	-	-	-	-	1 mM	-	-	-	1.4 mM	-
Glikodeoksikolat	-	-	-	-	0.7 mM	-	-	-	-	-
Glikokenodeoksikolat	-	-	-	-	1 mM	-	-	-	-	-
Fosfolipitler:										
Fosfatidilkolin	-	-	0.75 mM	0.75 mM	-	0.2 mM	0.625 mM	0.2 mM	0.035 mM	0.093-0.6 mM
Lizo-fosfatidilkolin	-	-	-	-	1 mM	-	-	-	0.315 mM	-
Safra tuzu / Fosfolipit oranı	-	-	4	4	4	15	4	15	9	≤ 35
KCl	-	-	7.7 g/L	-	-	-	-	-	-	-
Maleik asit	-	-	-	-	-	19.12 mM	-	19.12 mM	10.26 mM	-
NaCl	-	-	-	6.186 g/L	98 mM	68.62 g/L	-	68.62 g/L	93.3 mM	-
Kolesterol	-	-	-	-	0.25 mM	-	-	0.2 mM	0.2 mM	-
Sodyum oleat	-	-	-	-	-	-	-	0.5 mM	0.315 mM	-
pH	6.8	6.8	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.7	5.6-7.8
Tampon tipi	Fosfat	Fosfat	Fosfat	Fosfat	Fosfat	Maleat	Trizma maleat	Maleat	Maleat	MES/HEPES
Yüzey gerilimi (m/Nm⁻¹)	-	-	-	54	-	-	-	-	54.4	-
Osmolarite (mOsm/kg)	-	-	270 ± 10	270 ± 10	289.25	180 ± 10	270	181.2	220 ± 10	137-300
Tampon kapasitesi (mmol/L/ΔpH)	-	-	-	12	-	10	-	10	5.6	2.0-9.0

SIF: Yapay bağırsak ortamı; SIF-sp: Enzimsiz yapay bağırsak ortamı; FaSSIF: Açlık durumu yapay bağırsak ortamı; SEIF: Yapay endojen bağırsak ortamı; FaSSIF-V2: FaSSIF versiyon 2; FaSSIF-V3: FaSSIF versiyon 3 * Safra tuzu olarak sodyum taurokolat veya ham domuz safra tuzu kullanılır. MES: 2-(N-morpholino)etansülfonik asit, HEPES: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetsülfonik asit

Tablo 6. Tokluk durumunda bağırsak ortamını taklit eden çözünme ortamları

Bileşenler	FeSSIF (Galia et al., 1998)	FeSSIF (Klein et al., 2010)	FeSSIF ^{erken} (Jantraid et al., 2008)	FeSSIF ^{orta} (Jantraid et al., 2008)	FeSSIF ^{geç} (Jantraid et al., 2008)	FeSSIF-V2 (Jantraid et al., 2008)	Copenhagen tokluk (Kleberg et al., 2010)	FeSSIF ^{lipalız} (Fatouros et al., 2009)	Fed SIF (DoE) (Zhou et al., 2017)
Pankreatin	-	-	*	*	*	*	-	-	100-150 U/mL
Pankreatik lipaz	-	-	-	-	-	-	-	800 ünite/mL	-
NaOH	y.m.	4.04 g/L	52.5 Mm	65.3 mM	72 Mm	81.65 mM	-	-	-
Safra tuzları: Taurokolat (sodyum)	15 Mm	15 Mm	10 Mm	7.5 mM	4.5 Mm	10 mM	5 - 20 mM**	20 mM	3.6-24 mM
Fosfolipitler: Fosfatidilkolin Lizo-fosfatidilkolin	3.75 mM - -	3.75 mM - -	3 mM - -	2 mM - -	0.5 mM - -	2 mM - -	1.25 - 5 mM - -	5 mM - -	0.5-4.8 mM
Safra tuzu / Fosfolipit oranı	4	4	3.33	3.75	9	5	4	4	-
KCl	15.2 g/L	-	-	-	-	-	-	-	-
Asetik asit	8.65 g/L	8.65 g/L	-	-	-	-	-	-	-
Maleik asit	-	-	28.6 Mm	44 mM	58.09 Mm	55.02 mM	-	-	-
NaCl	-	11.874 g/L	145.2 Mm	122.8 mM	51 Mm	125.5 mM	-	59.5 mM	125-203 mM
Gliseril monooleat	-	-	6.5 Mm	5 mM	1 Mm	5 mM	-	-	1-6.5 mM
Monoolein	-	-	-	-	-	-	0 - 10 mM	10 mM	-
Oleik asit	-	-	-	-	-	-	0 - 45 mM	20 mM	-
Sodyum oleat	-	-	40 Mm	30 mM	0.8 Mm	0.8 mM	-	-	0.8-52 mM
pH	5.0	5.0	6.5	5.8	5.4	5.8	6.5	6.5	5.0-7.0
Tampon tipi	Asetat	Asetat	Maleat	Maleat	Maleat	Maleat	Trizma maleat	Trizma maleat	Maleik asit
Yüzey gerilimi (m/Nm⁻¹)	-	48	-	-	-	-	-	-	-
Osmolarite (mOsm/kg)	635 ± 10	670	400 ± 10	390 ± 10	240 ± 10	390 ± 10	Değişken	270	-
Tampon kapasitesi (mmol/L/ΔpH)	-	72	25	25	15	25	-	-	-

*Pankreatin ilavesi isteğe bağlıdır. ** Safra tuzu olarak sodyum taurokolat veya ham domuz safra tuzu kullanılır.

Kolону Taklit Eden Ortamlar

İlaçların emilimi çoğunlukla ince bağırsakta tamamlanır. Ancak, eğer ilacın permeabilitesi ince bağırsakta çok düşükse ve bir miktar ilacın emilimi kolon mukozasından gerçekleşiyorsa veya uzatılmış salımlı bir ilaç söz konusuysa ya da ilaç kolona hedeflendirilmiş bir ilaç şekli ise kolonu taklit eden çözünme ortamları kullanılabilir. Bu amaçla ilk önceleri pH 5.8 asetat tamponu kullanılmıştır (Reppas et al., 2012). Daha sonra Vertzoni ve ark. (Vertzoni et al., 2010) açlık ve tokluk durumlarında çıkan kolonun fizikokimyasal özelliklerini de dikkate alarak iki ortam hazırlamıştır. Kolon ortamların içerikleri Tablo 7’de görülmektedir.

Tablo 7. Çıkan kolonu taklit eden çözünme ortamları (Vertzoni et al., 2010)

Bileşenler	FaSSCoF	FeSSCoF
Protein / peptit (sığır serum albümini)	3 mg/mL	3 mg/mL
Toplam karbonhidrat (glikoz)	-	14 mg/mL
Toplam safra tuzu (safra tuzu ekstraktı)	150 µM	600 µM
Uzun zincirli yağ asitleri (palmitik asit)	100 µM	200 µM
Fosfatidilkolin	300 µM	500 µM
pH	7.8	6.0
Tampon tipi	Trizma maleat	Trizma maleat
Yüzey gerilimi (m/Nm⁻¹)	51.4	50.4
Osmolarite (mOsm/kg)	196	207
Tampon kapasitesi (mmol/L/ΔpH)	16/26	15/14

SONUÇ

Yeni ilaç geliştirme aşamasında ilaca bağlı çözünme özelliklerinin tespitinde ve ilaçların yiyecek etkileşimlerinin araştırılmasında önemli yer tutan *in vitro* çözünme testleri, eşdeğer ilaç geliştirmesinde BCS Sınıf 1 ve Sınıf 3 ilaçlar için *in vivo* biyoeşdeğerlik çalışmalarından muafiyetin sağlanmasında, BCS Sınıf 2 ve Sınıf 4 ilaçlar için de *in vivo*yu daha iyi yansıtmamasından dolayı yapılan *in vitro* çalışmalar açısından oldukça önemlidir. BCS Sınıf 1 ve Sınıf 3 ilaçların çözünürlükleri yüksek olduğu için bu ilaçların katı dozaj şekillerinin çözünme testlerinde biyoyumlu ortam kullanımına gerek duyulmamaktadır. Bu ilaçların çözünmesinde hız sınırlayıcı basamak dozaj şeklinin dağılması ve çözünmesidir. Bu ilaçların çözünme hızı testinde farmakopelerde belirtilen basit çözünme testleri uygundur. Ancak BCS Sınıf 2 ve Sınıf 4 ilaç-

lar için, çözünürlük ve formülasyon özellikleri *in vitro* ve *in vivo* çözünmeyi etkiler (Wang et al., 2009). Bu nedenle, çözünme testlerinde hangi ortamların kullanılacağına karar verilirken ilaçların fizikokimyasal özellikleri, BCS sınıfı, dozaj şekli ve açlık-tokluk durumlarında kullanım gibi parametreler de gözönüne alınmalıdır (Markopoulos et al., 2015).

Yeni geliştirilen çözünme testlerinde esas amaç “*in vivo*ya en iyi uyum” olmaktadır (Grady et al, 2018). Bu açıdan test yönteminde, gastrointestinal sistemin hidrodinamizmi ve gastrointestinal sıvılara benzer ortamlar gibi farklı yaklaşımlar söz konusudur. Hidrodinamizm, *in vitro* koşullarda kullanılan cihazın cinsi ve tasarımı, karıştırma hızı, ortam hacmi, viskozite ve dozaj formunun konumu gibi birçok faktöre bağlıdır (Wang et al., 2009). Cihazın seçiminde sıklıkla kullanılan palet ve sepet yönteminin yanında sürekli akış hücresi ve iner çıkar silindir yöntemi de kullanılabilir. Bu cihazların çalıştırılma koşulları yiyeceğin varlığı veya yokluğu göz önüne alınarak ayarlanmaktadır. Ayrıca bu sistemlerde zamana bağlı pH değişimleri de dikkate alınmalıdır (Wang et al., 2009). Ancak özellikle yüksek permeabilite gösteren BCS Sınıf 2 ilaçlar için çözünme ortamının içeriği hidrodinamizmden daha belirleyici olmaktadır (Markopoulos et al., 2015). Bu yüzden araştırmacılar özellikle güç çözünür ilaçlar için *in vivo*ya en yakın çözünme ortamını bulmak için yoğun araştırmalar yapmaktadır (Grady et al., 2018).

Bu çalışmada mide, ince bağırsak ve kolon için geliştirilen biyoyumlu ortamlar kapsamlı olarak incelenmiştir. Ancak en iyi ortamın bulunması ve bu ortamın sağlık otoritelerince kabul görmesi, ortam içeriğinin yanında hazırlanmasındaki kolaylık ve uygulanabilirliğinin yüksek olmasına da bağlıdır. Hazırlanma aşamasında kolaylık ve standardizasyonu sağlamak amacıyla literatürde belirtilen bazı biyoyumlu ortamların (FaSSIF, FeSSIF, FaSSGF, FaSSIF-V2, FeSSIF-V2, FaSSCoF ve FeSSCoF gibi) liyofilize edilmiş karışımları hazırlanarak standardize halde kullanıma sunulmuştur (Biorelevant dissolution media, 2018).

Biyoyumlu ortamlar geliştirilirken dikkat edilmesi gereken bir diğer önemli nokta da ilacın ortamdaki ekstraksiyonudur. Biyoyumlu ortamlar kompleks yapılar içerdiğinden ve özellikle tokluk durumu mide ortamı gibi süt ihtiva eden ortamlardan ilaçların ekstraksiyonu ve analizi konusunda sıkıntılar yaşanabilmektedir. Bu amaçla da çeşitli çalışmalar yapılmakta ve ekstraksiyon işleminin standart hale getirilmesi amaçlanmaktadır (Baxevanis et al., 2018).

Sonuç olarak, günümüzde biyoyumlu ortamların içerik, hazırlama ve analizleri kapsamlı araştırmalara konu olmaktadır. *In vivo*ya “en uyumlu ortam”ların

geliştirilmesi ve standardizasyonu, deneklerden alınan gastrointestinal sıvı örnekleriyle kıyaslanması ve *in vitro in vivo* korelasyonu ile ilgili değerlendirmeler devam etmektedir. Klasik çözünme ortamları yerine biyoyumlu ortamların kullanımı için tüm bu çalışmalar değerlendirilerek içerikler ve özellikler *in vivo*ya en uyumlu standardize açlık-tokluk durumundaki mide, barsak ve kolon sıvısı olarak belirlenmelidir. Ancak bundan sonra sağlık otoriteleri tarafından onaylanması, ilgili kılavuzlarda ve yasal uygulamalarda yer alması söz konusu olabilir.

KAYNAKLAR

- Aburub, A., Fischer, M., Camilleri, M., Semler, J.R., Fadda, H.M. (2018). Comparison of pH and motility of the small intestine of healthy subjects and patients with symptomatic constipation using the wireless motility capsule. *International Journal of Pharmaceutics*, 544(1):158-64.
- Amidon, G.L., Lennernas, H., Shah, V.P., Crison, J.R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3), 413-420.
- Baxevanis, F., Kuiper, J., Fotaki, N. (2016). Fed-state gastric media and drug analysis techniques: Current status and points to consider. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 107, 234-248.
- Baxevanis, F., Kuiper, J., Fotaki, N. (2018). Strategic drug analysis in fed-state gastric biorelevant media based on drug physicochemical properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 326-341.
- Biorelevant dissolution media (2018): Oral product development tools. Available from: <https://biorelevant.com>.
- Brouwers, J., Anneveld, B., Goudappel, G.J., Duchateau, G., Annaert, P., Augustijns, P., Zeijdner, E. (2011). Food-dependent disintegration of immediate release fosamprenavir tablets: *in vitro* evaluation using magnetic resonance imaging and a dynamic gastrointestinal system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(2), 313-319.
- Carriere, F., Barrowman, J.A., Verger, A., Laugier, R. (1993). Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology*, 105, 876-888.
- Carriere, F., Renou, C., Lopez, V., De Caro J., Ferrato, F., Lengsfeld, H., De Caro, A., Laugier, R., Verger, R. (2000). The specific activities of human digestive lipases measured from the *in vivo* and *in vitro* lipolysis of test meals. *Gastroenterology*, 119, 949-960.
- Charman, W.N., Porter, C.J.H., Mithani, S., Dressman, J.B. (1997). Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: The role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(3), 269-282.
- Culen, M., Rezacova, A., Jampilek, J., Dohnal, J. (2013). Designing a dynamic dissolution method: A review of instrumental options and corresponding physiology of stomach and small intestine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(9), 2995-3017.
- Dewar, P., King, R., Johnston, D. (1982). Bile acid and lysolecithin concentrations in the stomach in patients with duodenal ulcer before operation and after treatment by highly selective vagotomy, partial gastrectomy, or truncal vagotomy and drainage. *Gut* 23, 569-577.
- Dressman, J.B., Berardi, R.R., Dermentzoglou, L.C., Russel, T.L., Schmaltz, S.P., Barnett, J.L., Jarvenpaa, K.M. (1990). Upper gastrointestinal pH in young, healthy men and women. *Pharmaceutical Research*, 7(7), 756-761.
- Dressman, J.B., Reppas, C., Amidon, G.L., Shah, V.P. (1998). Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. *Pharmaceutical Research*, 15, 11-22.
- Efentakis, M., Dressman, J.B. (1998). Gastric juice as a dissolution medium: Surface tension and pH. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 23(2), 97-102.
- EMA. (2010). Guideline on the investigation of bioequivalence. London, UK: Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).
- Evans, D.F., Pye, G., Bramley, R., Clark, A.G., Dyson, T.J., Hardcastle, J.D. (1988). Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut*, 29, 1035-1041.
- Fuchs, A., Leigh, M., Kloefler, B., Dressman, J.B. (2015). Advances in the design of fasted state simulating intestinal fluids: FaSSIF-V3. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 94, 229-240.

- Galia, E., Nicolaidis, E., Hörter, D., Löbenberg, R., Reppas, C., Dressman, J.B. (1998). Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of Class I and II drugs. *Pharmaceutical Research*, 15(5);698-705.
- Galia, E., Horton, J., Dressman J.B. (1999). Albendazole generics – a comparative study. *Pharmaceutical Research*, 16(12), 1871-1875.
- Grady, H., Elder, D., Webster, G.K., Mao, Y., Lin, Y., Flanagan, T., Mann, J., Blanchard, A., Cohen, M.J., Lin, J., Kesisoglou, F., Hermans, A., Abend, A., Zhang, L., Curran, D. (2018). Industry's view on using quality control, biorelevant, and clinically relevant dissolution tests for pharmaceutical development, registration, and commercialization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107;34-41.
- Hörter, D., Dressman, J.B. (2001). Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 75-87.
- Ibekwe, V.C., Fadda, H.M., McConnell, E.L., Khela, M.K., Evans, D.F., Basit, A.W. (2008). Interplay between intestinal pH, transit time and feed status on the in vivo performance of pH responsive ileo-colonic release systems. *Pharmaceutical Research*, 25(8), 1828-1835.
- Fatouros, D.G., Walrand, I., Bergenstahl, B., Müllertz, A. (2009). Colloidal structures in media simulating intestinal fed state conditions with and without lipolysis products. *Pharmaceutical Research*, 26(2), 361-374.
- FDA. (2015). Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. In: Draft guidance. Rockville MD, USA: US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
- Fredua-Agyeman, M., Gaisford, S. (2015). Comparative survival of commercial probiotic formulations: tests in biorelevant gastric fluids and real-time measurements using microcalorimetry. *Beneficial Microbes*, 6(1), 141-151.
- Guzman, M.L., Marquez, M.R., Olivera, M.E., Stippler, E.S. (2016). Enzymatic activity in the presence of surfactants commonly used in dissolution media, Part 1: Pepsin. *Results in Pharma Sciences*, 6, 15-19.
- Jantraid, E., Janssen, N., Reppas, C., Dressman, J.B. (2008). Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: An update. *Pharmaceutical Research*, 25(7), 1663-1676.
- Jantraid, E., Dressman, J.B. (2009). Dissolution media simulating the proximal human gastrointestinal tract: An update. *Dissolution Technology*, 16, 21-25.
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J.B., Reppas, C. (2006) a. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical Research*, 23(1), 165-176.
- Kalantzi, L., Persson, E., Polentarutti, B., Abrahamsson, B., Goumas, K., Dressman, J.B., Reppas, C. (2006) b. Canine intestinal contents vs. simulated media for the assessment of solubility of two weak bases in the human small intestinal contents. *Pharmaceutical Research*, 23(6), 1373-1381.
- Kleberg, K., Jacobsen, J., Müllertz, A. (2010). Characterising the behaviour of poorly water soluble drugs in the intestine: Application of biorelevant media for solubility, dissolution and transport studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62, 1656-1668.
- Klein, S, Butler, J., Hempenstahl, J.M., Reppas, C., Dressman, J.B. (2004). Media to simulate the postprandial stomach I. Matching the physicochemical characteristics of standard breakfasts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 605-610.
- Klein, S. (2010). The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. *The AAPS Journal*, 12(3), 397-406.
- Kossena, G.A., Charman, W.N., Boyd, B.J., Dunstan, D.E., Porter, C.J.H. (2003). Probing drug solubilization patterns in the gastrointestinal tract after administration of lipid-based delivery systems: A phase diagram approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(2), 332-348.
- Kostewicz, E.S., Wunderlich, M., Brauns, U., Becker, R., Bock, T., Dressman, J.B. (2004). Predicting the precipitation of poorly soluble weak bases upon entry in the small intestine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 43-51.

- Koziolek, M., Garbacz, G., Neumann, M., Weitschies, W. (2013). Simulating the postprandial stomach: biorelevant test methods for the estimation of intragastric drug dissolution. *Molecular Pharmaceutics*, 10, 2211-2221.
- Lentz, K.A. (2008). Current methods for predicting human food effect. *The AAPS Journal*, 10(2), 282-288.
- Lindahl, A., Ungel, A.L., Knutson, L., Lennernas H. (1997). Characterizations of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. *Pharmaceutical Research*, 14(4), 497-502.
- Lobo, D.N., Hendry, P.O., Rodrigues, G., Marciani, L., Totman, J.J., Wright, J.W., Preston, T., Gowland, P., Spiller, R.C., Fearon, K.C.H. (2009). Gastric emptying of three liquid oral preoperative metabolic preconditioning regimens measured by magnetic resonance imaging in healthy adult volunteers: A randomised double-blind, crossover study. *Clinical Nutrition*, 28, 636-641.
- Luner, P.E., VanDer Kamp, D. (2001). Wetting characteristics of media emulating gastric fluids. *International Journal of Pharmaceutics*, 212, 81-91.
- Lydon, A., Murray, C., McGinley, J., Plant, R., Duggan, F., Shorten, G. (1999). Cisapride does not alter gastric volume or pH in patients undergoing ambulatory surgery. *Canadian Journal of Anesthesia*, 46(12), 1181-1184.
- Macheras, P., Koupparis, M., Tsaprounis, C. (1986). Drug dissolution studies in milk using the automated flow injection serial dynamic dialysis technique. *International Journal of Pharmacy*, 33, 125-136.
- Macheras, P.E., Koupparis, M., Antimisiaris, S.G. (1988). Effect of temperature and fat content on the binding of hydrochlorothiazide and chlorothiazide to milk. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77:334-336.
- Madsen, C.M., Feng, K.I., Leithead, A., Canfield, N., Jorgensen, S.A., Müllerts, A., Rades, T. (2018). Effect of composition of simulated intestinal media on the solubility of poorly soluble compounds investigated by the design of experiments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111, 311-9.
- Maltby, J.R., Sutherland, A.D., Sale, J.P., Shaffer, E.A. (1986). Preoperative oral fluids: Is a five-hour fast justified prior to elective surgery. *Anesthesia and Analgesia*, 65, 1112-1116.
- Mansbach, C.M., Cohen, R.S., Leff, P.B. (1975). Isolation and properties of the mixed lipid micelles present in intestinal content during fed digestion in men. *The Journal of Clinical Investigation*, 56, 781-791.
- Marciani, L., Wright, J., Foley, S., Hoad, C.L., Totman, J.J., Bush, D., Hartley, C., Armstrong, A., Manby, P., Blackshaw, E., Perkins, A.C., Gowland, P.A., Spiller, R.C. (2010). Effects of a 5-HT₃ antagonist, ondansetron, on fasting and postprandial small bowel water content assessed by magnetic resonance imaging. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 32, 655-663.
- Markopoulos, C., Andreas, C.J., Vertzoni, M., Dressman, J., Reppas, C. (2015). In vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93:173-82.
- Marques M. (2004). Dissolution media simulating fasted and fed states. *Dissolution Technology*, 11(2), 16.
- Moreno, M.P.C., Oth, M., Deferme, S., Lammert, F., Tack, J., Dressman, J., Augustijns, P. (2006). Characterization of fasted-state human intestinal fluids collected from duodenum and jejunum. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58, 1079-1089.
- Mitra, A. and Fadda, H.M. (2014). Effect of surfactants, gastric emptying, and dosage form on supersaturation of dipyridamole in an in vitro model simulating the stomach and duodenum. *Molecular Pharmaceutics*, 11, 2835-2844.
- Pedersen, B.L., Müllertz, A., Brondsted, H., Kristensen, H.G. (2000). A comparison of the solubility of danazol in human and simulated gastrointestinal fluid. *Pharmaceutical Research*, 17(7), 891-894.
- Persson, E.M., Gustafsson, A.S., Carlsson, A.S., Nilsson, R.G., Knutson, L., Forsell, P., Hanisch, G., Lennernas, H., Abrahamsson, B. (2005). The effects of food on the dissolution of poorly soluble drugs in human and in model small intestinal fluids. *Pharmaceutical Research*, 22(12), 2141-2151.
- Persson, E.M., Nilsson, R.G., Hansson, G.I., Löfgren, L.J., Liback, F., Knutson, L., Hanisch, G., Abrahamsson, B., Lennernas, H. (2006). A clinical single-pass perfusion investigation of the dynamic in vivo secretory response to a dietary meal in human proximal small intestine. *Pharmaceutical Research*, 23(4), 742-751.

- Ph.Eur, European Pharmacopeia (Ph. Eur.) 9th Edition (2018). Council of Europe. 4.1.3. Buffer Solutions (pp. 430-435).
- Placidi, E., Hoad, C.L., Gowland, P.A., Spiller, R.C. (2017). Effects of an osmotic laxative on the distribution of water between the small and large intestine in human. Neurogastroenterology/motility posters, Conference Paper in Gut 59(Suppl 1):A141-A141 · April 2010. Doi:10.1136/gut.2009.209049f.
- Psachoulias, D., Vertzoni, M., Butler, J., Busby, D., Symillides, M., Dressman, J., Reppas, C. (2012). An in vitro methodology for forecasting luminal concentrations and precipitation of highly permeable lipophilic weak bases in the fasted upper small intestine. *Pharmaceutical Research*, 29, 3486-3498.
- Reppas, C. and Vertzoni, M. (2012). Biorelevant in-vitro performance testing of orally administered dosage forms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64, 919-930.
- Ruby, M.V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., Sellstone, C.M. (1996). Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental Scientific Technology*, 30, 422-430.
- Russel, T.L., Berardi, R.R., Barnett, J.L., Dermentzoglou, L.C., Jarvenpaa, K.M., Schmaltz, S.P., Dressman, J.B. (1993). Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, elderly, North American men and women. *Pharmaceutical Research*, 10(2), 187-196.
- Sarısaltık, D. (2010). Açlık ve tokluk durumlarını taklit eden çözünme ortamlarında yapılan çözünme hızı deneylerine yönelik çalışmalar. *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi*.
- Sarısaltık, D., Teksin, Z.Ş. (2012). Biyoşekerlik çalışmalarından vazgeçilmesinde biyofarmasötik ilaç sınıflandırma sistemlerinin değerlendirilmesi: Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi ve Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sınıflandırma Sistemi. *Türkiye Klinikleri Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 1(1), 16-30.
- Sarısaltık-Yaşın, D., Teksin, Z.S. (2018). Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi: uluslararası kılavuzlar ve ülkeler bazında değerlendirmeler. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 7(2):160-174.
- Schiller, C., Fröhlich, C.P., Giessman, T., Siegmund, W., Mönnikess, H., Hosten, W., Weitschies, W. (2005). Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 22, 971-979.
- Shah, V.P. (2001). Dissolution: A quality control test vs. a bioequivalence test. *Dissolution Technologies*, 8(4), 6-7.
- Sunesen, V.H., Vedelsdal, R., Kristensen, H.G., Christrup, L., Mullertz, A. (2005) Effect of liquid volume and food intake on the absolute bioavailability of danazol, a poorly soluble drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(4), 297-303.
- Tang, L., Khan, S.U., Muhammed, N.A. (2001). Evaluation and selection of bio-relevant dissolution media for a poorly water-soluble new chemical entity. *Pharmaceutical Development Technology*, 6, 531-540.
- The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia – The National Formulary (USP 41/NF36) (2018). Buffer Solutions (pp. 5773-5774).
- Vertzoni, M., Dressman, J., Butler, J., Hempenstall, J., Reppas, C. (2005). Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60, 413-417.
- Vertzoni, M., Pastelli, E., Psachoulias, D., Kalantzi, L., Reppas, C. (2007). Estimation of intragastric solubility of drugs: in what medium. *Pharmaceutical Research*, 24(5), 909-917.
- Vertzoni, M., Diakidou, A., Chatziliias, M., Söderlind, E., Abrahamsson, B., Dressman, J.B., Reppas, C. (2010). Biorelevant media to simulate fluids in the ascending colon of humans and their usefulness in predicting intracolonic drug solubility. *Pharmaceutical Research*, 27, 2187-2196.
- Wang, Q., Fotaki, N., Mao, Y. (2009). Biorelevant dissolution: Methodology and application in drug development. *Dissolution Technologies*, 6-12.
- Washington, N., Washington, C., Wilson, C.G. (2001) a. Physiological Pharmaceutics. Barriers to drug absorption (2nd edition). *Chapter 5: The stomach*. (pp.75-108). London: Taylor and Francis.

- Washington, N., Washington, C., Wilson, C.G. (2001)b. *Physiological Pharmaceutics. Barriers to drug absorption (2nd edition). Chapter 6: Drug absorption from the small intestine.(pp.109-141).* London: Taylor and Francis.
- Yılmaz, D., Teksin, Z.Ş. (2015). *İn vitro çözünme hızı çalışmalarında yeni yaklaşımlar. FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, 33-40.
- Zhou, Z., Dunn, C., Khadra, I., Wilson, C.G., Halbert, G.W. (2017). *Statistical investigation of simulated fed intestinal media composition on the equilibrium solubility of oral drugs. European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99:95-104.