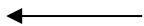


← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı**
bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**COVID-19 TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARDAN
FAVİPİRAVİR'İN VE BOZUNDURMA
SAFSIZLIKLARININ HPLC YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

BÜŞRA GÜLŞEN

**DANIŞMAN
PROF. DR. SIDIKA ERTÜRK TOKER**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Babama ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın yapılmasına olanak sağlayan, çalışmamın her aşamasında bilgisi, samimiyeti ve yol göstericiliği ile her zaman yanımda olan Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Sıdıka ERTÜRK TOKER'e;

En başta eğitim hayatım boyunca beni hep destekleyen ve bu süreçte kaybettiğim canım babama ve ardından tüm aileme, Ar-Ge Direktörüm Sn. Prof. Dr. Serdar ÜNLÜ'ye, Ar-Ge Analitik Müdürüm Sn. Yük. Kmg. Filiz DEMİR'e, çalışmalarım süresince tüm laboratuvar olanaklarından yararlandığım Ali Raif İlaç Sanayi A.Ş.'ye, desteği ile her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Tuğba EROL'a, bana sağladıkları, kazandırdıkları her şey ve tüm destekleri için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Favipiravir.....	3
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	3
2.1.2. Etki Mekanizması ve Farmakokinetiği	5
2.1.3. Favipiravir Tayini için Geliştirilmiş Analitik Yöntemler	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
3.1. Geliştirilip Valide Edilen Analitik Yöntem	9
3.1.1. Analitik Yöntem Şartları.....	9
3.1.2. Çözeltilerin Hazırlanışı	9
3.1.3. Kimyasal Maddeler, Çalışma Standardı ve Farmasötik Preparatlar	11
3.1.4. Ekipman ve Malzemeler	11
3.2. Analitik Yöntem Geliştirme Çalışmaları	14
3.2.1. Dalga Boyu Seçimi	14
3.2.2. Kolon Seçimi.....	14
3.2.3. Hareketli Faz ve Çözücü Seçimi	14
3.2.4. Analiz Süresinin Belirlenmesi	15
3.2.5. Numune ve Standart Çözeltileri İçin Filtre Seçimi	15
3.2.6. Numune ve Standart Çözeltileri Konsantrasyonları ile Safsızlık Spesifikasyonlarının Belirlenmesi	15
3.3. Geliştirilen Yöntemin Valide Edilmesi.....	16
3.3.1. Spesifiklik	16
3.3.2. Sistem Uygunluğu.....	18

3.3.3. Teşhis Edilebilme Alt Sınırı.....	19
3.3.4. Kantitatif Tayin Sınırı	20
3.3.5. Doğrusallık ve Aralık.....	21
3.3.6. Doğruluk	23
3.3.7. Kesinlik	25
3.3.7.1. Tekrarlanabilirlik.....	25
3.3.7.2. Ara Kesinlik	27
3.3.8. Sağlamlık	28
3.3.9. Çözelti Stabilitesi	30
3.4. Tabletlerde Favipiravir Analizi.....	31
3.4.1. Tablet Analizi İçin Numune ve Standart Çözeltilerinin Hazırlanışı	31
3.4.2. Geliştirilen Yöntem İle Tabletlerde Favipiravir Analizi	31
3.5. Bozundurma ve Stres Çalışmaları.....	32
3.5.1. Alkali Bozundurma	33
3.5.2. Asidik Bozundurma	33
3.5.3. Oksidatif Bozundurma	34
3.5.4. Sıcaklık Etkisi	34
3.5.5. Nem Etkisi.....	35
3.5.6. Fotodegradasyon	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Analitik Yöntemin Geliştirilmesi Sürecinde Elde Edilen Bulgular	37
4.1.1. Dalga Boyu Seçimi	38
4.1.2. Kolon seçimi	40
4.1.3. Hareketli Faz ve Çözücü Seçimi	43
4.1.4. Analiz Süresinin Belirlenmesi	51
4.1.5. Numune ve Standart Çözeltileri için Filtre Seçimi	55
4.1.6. Numune ve Standart Çözeltileri Konsantrasyonları ile Safsızlık Spesifikasyonlarının Belirlenmesi	58
4.2. Geliştirilen Yöntemin Valide Edilmesi Sürecinde Elde Edilen Bulgular	64
4.2.1. Spesifiklik Bulguları	64
4.2.2. Sistem Uygunluğu Bulguları.....	67
4.2.3. Teşhis Edilebilme Alt Sınırı Bulguları.....	68
4.2.4. Kantitatif Tayin Sınırı Bulguları	69

4.2.5. Doğrusallık ve Aralık Bulguları.....	71
4.2.6. Doğruluk Bulguları	73
4.2.7. Kesinlik Bulguları	75
4.2.7.1. Tekrarlanabilirlik Bulguları	75
4.2.7.2. Ara Kesinlik Bulguları	76
4.2.8. Sağlamlık Bulguları	80
4.2.9. Çözelti Stabilitesi Bulguları	85
4.3. Tabletlerde Favipiravir Analizi Bulguları.....	89
4.3.1. Geliştirilen Yöntem İle Tabletlerde Favipiravir Analizi Bulguları.....	89
4.4. Bozundurma ve Stres Çalışmaları Bulguları.....	90
4.4.1. Alkali Bozundurma Bulguları	93
4.4.2. Asidik Bozundurma Bulguları	95
4.4.3. Oksidatif Bozundurma Bulguları	97
4.4.4. Sıcaklık Etkisi Bulguları	100
4.4.5. Nem Etkisi Bulguları	102
4.4.6. Fotodegradasyon Çalışması Bulguları	104
5. TARTIŞMA	107
KAYNAKLAR	110
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	114

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Favipiravir MS/MS spektrumundaki spesifik iyon pikleri (Drugbank, 2021)	4
Tablo 2-2. CN104914185A ve CN104914185B patentlerindeki yöntem için verilen gradient programı.....	7
Tablo 3-1. Geliştirilen HPLC Yöntemine ait Parametreler	9
Tablo 3-2. Yöntem Validasyonu Sırasında Çalışılan Parametreler	16
Tablo 3-3. Yöntem validasyonu geri kazanım çözeltilerinin hazırlanması	24
Tablo 3-4. Sağlamlık çalışmasında değiştirilen yöntem parametreleri.....	29
Tablo 3-5. Sağlamlık çalışmasında ve yöntem validasyonu boyunca kullanılan kolon bilgileri.....	29
Tablo 4-1. Favipiravir UV spektrumundan elde edilen dalga boylarına karşılık maksimum absorbans değerleri	38
Tablo 4-2. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (Odaşartı) Numune Çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$) sonuçları için 222 & 322 nm karşılaştırması	39
Tablo 4-3. Kolon seçimi çalışmasında denenen kolonların özellikleri (Waters Corporation, 2016; Phenomenex Inc., 2016).....	40
Tablo 4-4. Kinetex® EVO C18 ve XBridge® C8 kolonlar ile yapılan numune çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$) enjeksiyonlarından elde edilen sayısal sonuçlar	42
Tablo 4-5. Kinetex® EVO C18 (250 x 4.6 mm, 5 μm , 100Å) kolon ile yapılan enjeksiyonlardan elde edilen sistem uygunluk sonuçları.....	43
Tablo 4-6. 222 nm'ye yakın değerlerde bazı çözeltilerin verdiği absorbanslar (Agrahari, Bajpai, & Nanda, 2013; Snyder, Kirkland, & Glajch, 1998).....	44
Tablo 4-7. Ters faz kromatografisinde kullanılan bazı tampon çözeltilerinin özellikleri (Agrahari, Bajpai, & Nanda, 2013; LoBrutto & Kazakevich, 2007).....	45
Tablo 4-8. Hareketli faz ve çözücünün nihaileştirilmesi için yapılan deneysel çalışmalar	47
Tablo 4-9. Deneysel çalışma-3 ve 4'e ait sayısal bulgular	48
Tablo 4-10. Deneysel çalışma-1 ve 2'ye ait sayısal bulgular	49
Tablo 4-11. Hareketli faz çözeltisi için denenen farklı tampon ve organik oranları sonucunda elde edilen alıkonma zamanları (dakika).....	51
Tablo 4-12. Analiz süresinin belirlenmesi çalışmasında yapılan ardışık enjeksiyonlar .	52

Tablo 4-13. Analiz süresinin belirlenmesi çalışmasındaki numune çözeltisi ($70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN} / 7 \text{ Gün}$) enjeksiyon sonuçları	52
Tablo 4-14. Analiz süresinin belirlenmesi çalışmasındaki numune çözeltisi ($70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN} / 7 \text{ Gün}$) enjeksiyonlarından alınan Favipiravir alıkonma zamanı, pik alanı ve pik saflığı sonuçları	55
Tablo 4-15. Denenen filtrelerin çözeltiler ile kimyasal olarak uyumlulukları (Merck, 2020; Macherey-Nagel, 2020)	56
Tablo 4-16. Denenen filtrelerin özellikleri	56
Tablo 4-17. Filtre seçimi çalışması sonuçları	57
Tablo 4-18. ICH Q3B (R2)'ye göre ilaç formları için safsızlık limitleri (European Medicines Agency, 2006)	59
Tablo 4-19. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (FAAR1-V-01) analiz sonuçları (Hızlandırılmış dönem, $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%75 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$).....	60
Tablo 4-20. Avigan® 200 mg Film Tablet (Seri No: PC1021, Japonya) analiz sonuçları (Hızlandırılmış dönem, $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%75 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$).....	60
Tablo 4-21. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (FAAR1-V-01) analiz sonuçları (Koşul: $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$).....	61
Tablo 4-22. Avigan® 200 mg Film Tablet (Seri No: PC1021, Japonya) analiz sonuçları (Koşul: $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$).....	61
Tablo 4-23. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (FAAR1-V-01) sıcaklık stres/stabilite analiz sonuçları	62
Tablo 4-24. Spesifiklik çalışması - sayısal bulgular	64
Tablo 4-25. Yöntem validasyonu sistem uygunluk çalışması standart çözeltisi verileri	68
Tablo 4-26. Yöntem validasyonu sistem uygunluk çalışması numune çözeltisi verileri	68
Tablo 4-27. Yöntem validasyonu Favipiravir teşhis edilebilme alt sınırı (LOD) sonuçları	69
Tablo 4-28. Yöntem validasyonu Favipiravir kantitatif tayin sınırı (LOQ) sonuçları....	70
Tablo 4-29. Yöntem validasyonu Favipiravir doğrusallık çalışması verileri	72
Tablo 4-30. Favipiravir doğrusallık grafiği ve denklemine ait sayısal bulgular.....	73
Tablo 4-31. Yöntem validasyonu doğruluk çalışması için enjeksiyon verilen standart çözeltilerine ait veriler	74
Tablo 4-32. Yöntem validasyonu doğruluk çalışması verileri.....	74

Tablo 4-33. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltileri ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışması verileri	75
Tablo 4-34. Numune çözeltileri ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışması verileri	76
Tablo 4-35. Yöntem validasyonu ara kesinlik çalışması için enjeksiyon verilen standart çözeltilerine ait veriler	77
Tablo 4-36. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltileri ile gerçekleştirilen ara kesinlik çalışması verileri	77
Tablo 4-37. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltileri ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik & ara kesinlik çalışmalarının birlikte değerlendirilmiş verileri	78
Tablo 4-38. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltileri ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmalarından elde edilen Favipiravir % geri kazanım sonuçları için uyum testi - 1 – <i>F-test</i>	79
Tablo 4-39. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltileri ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmalarından elde edilen Favipiravir % geri kazanım sonuçları için uyum testi – 2 – <i>t-test</i>	79
Tablo 4-40. Numune çözeltileri ile gerçekleştirilen ara kesinlik çalışması verileri	80
Tablo 4-41. Standart çözeltisi için <i>akış hızı</i> , <i>kolon sıcaklığı</i> ve <i>dalga boyu</i> değişimi sonuçları	81
Tablo 4-42. Standart çözeltisi <i>kolon değişimi</i> sonuçları	82
Tablo 4-43. Numune çözeltisi sağlamlık parametresi sonuçları	83
Tablo 4-44. Numune çözeltisi sağlamlık parametresi safsızlık sonuçları (%)	84
Tablo 4-45. Buzdolabı koşullarında (2-8 °C) Favipiravir pik alanı değişimleri	85
Tablo 4-46. HPLC koşullarında Favipiravir pik alanı değişimleri	85
Tablo 4-47. Buzdolabı koşullarında (2 – 8 °C) numune çözeltisi safsızlıklarının % sonuç verileri	86
Tablo 4-48. HPLC koşullarında numune çözeltisi safsızlıklarının % sonuç verileri	86
Tablo 4-49. Buzdolabı koşullarında (2 – 8 °C) numune çözeltisi safsızlıklarının ilk 6 saatlik % sonuç verileri	87
Tablo 4-50. HPLC koşullarında numune çözeltisi safsızlıklarının 6 saatlik % sonuç verileri	88
Tablo 4-51. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tabletlerin geliştirilen yöntem ile elde edilen Favipiravir miktar tayini analiz sonuçları	89

Tablo 4-52. Bozundurma çalışmasında referans olarak kullanılan normal koşul numunesi	91
Tablo 4-53. Bozundurma ve stres çalışmalarında Favipiravir pik saflığı için sayısal bulgular	92
Tablo 4-54. Alkali koşullardaki bozundurma çalışmasına ait sonuçlar	94
Tablo 4-55. Asidik koşullardaki bozundurma çalışmasına ait sonuçlar	97
Tablo 4-56. Oksidatif koşullardaki bozundurma çalışmasına ait sonuçlar	100
Tablo 4-57. Sıcaklık etkisi çalışmasına ait sonuçlar	102
Tablo 4-58. Nem etkisi çalışmasına ait sonuçlar	104
Tablo 4-59. Fotodegradasyon çalışmasına ait sonuçlar	105



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Favipiravir molekül yapısı (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2014).....	3
Şekil 2-2. Favipiravir molekülünün MS/MS spektrumu (10V, Pozitif) (Drugbank, 2021)	3
Şekil 2-3. Favipiravir'in etki mekanizması (RXMediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, 2020).....	5
Şekil 4-1. Favipiravir diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ölçümü sıcaklık-ısı akışı grafiği.....	37
Şekil 4-2. Favipiravir molekülüne ait UV spektrumu ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.01 \text{ mg/ml}$; <i>Metanol</i>)	38
Şekil 4-3. Metanol çözücüsüne (boş çözelti) ait UV spektrumu	38
Şekil 4-4. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi (Odaşartı) ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$) – 222 ve 322 nm'ye ait karşılaştırmalı kromatogram	40
Şekil 4-5. <i>Kinetex® EVO C18</i> kolon ile yapılan numune çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$) enjeksiyonuna ait kromatogramlar (222 nm & 322 nm).....	41
Şekil 4-6. <i>XBridge® C8</i> kolon ile yapılan numune çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$) enjeksiyonuna ait kromatogramlar (222 nm & 322 nm).....	42
Şekil 4-7. Deneysel çalışma-3 ve 4'e ait karşılaştırmalı kromatogram	47
Şekil 4-8. Deneysel çalışma-3'teki çözücü & hareketli faz uyumsuzluğu (ters pik varlığı)	48
Şekil 4-9. Deneysel çalışma-1 ve 2'ye ait karşılaştırmalı kromatogram	49
Şekil 4-10. Analiz süresinin belirlenmesi çalışmasındaki numune çözeltisi enjeksiyonları	53
Şekil 4-11. Analiz süresinin belirlenmesi çalışmasındaki seyreltme çözeltisi enjeksiyonları.....	54
Şekil 4-12. RRT 0.51 Safsızlığı için sıcaklığa bağlı % Sonuç değişimi grafiği (Hızlandırılmış dönem, $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%75 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$).....	61
Şekil 4-13. RRT 0.51 Safsızlığı için sıcaklığa bağlı % Sonuç değişimi grafiği (Koşul: $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$).....	62
Şekil 4-14. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (FAAR1-V-01) ürününe ait Arrhenius Grafiği.....	63

Şekil 4-15. Hareketli faz çözeltisine (seyreltme çözeltisi) ait kromatogram	65
Şekil 4-16. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisine ait kromatogram.....	65
Şekil 4-17. Standart çözeltisine ait kromatogram	65
Şekil 4-18. Standart çözeltisine ait Favipiravir pik saflığı.....	66
Şekil 4-19. Numune çözeltisine ait kromatogram	66
Şekil 4-20. Numune çözeltisine ait Favipiravir pik saflığı	66
Şekil 4-21. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltisine ait kromatogram	67
Şekil 4-22. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltisine ait Favipiravir pik saflığı	67
Şekil 4-23. Favipiravir LOD seviyesi kromatogramı	69
Şekil 4-24. Favipiravir LOQ seviyesi kromatogramı	70
Şekil 4-25. Favipiravir doğrusallık grafiği ve denklemi.....	71
Şekil 4-26. Referans yardımcı madde (plasebo) çözeltisi kromatogramı	90
Şekil 4-27. Hareketli faz çözeltisi (seyreltme çözeltisi) kromatogramı.....	90
Şekil 4-28. Referans numune çözeltisi kromatogramı.....	90
Şekil 4-29. Referans numune çözeltisi Favipiravir pik saflığı.....	91
Şekil 4-30. Numune çözeltisi ile alkali bozundurma çalışması kromatogramları	93
Şekil 4-31. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ile alkali bozundurma çalışması kromatogramı.....	93
Şekil 4-32. Alkali bozundurma çalışması boş çözelti kromatogramı	94
Şekil 4-33. Numune çözeltisi ile alkali bozundurma çalışması Favipiravir pik saflığı ..	94
Şekil 4-34. Numune çözeltisi ile asidik bozundurma çalışması kromatogramları.....	95
Şekil 4-35. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ile asidik bozundurma çalışması kromatogramı	96
Şekil 4-36. Asidik bozundurma çalışması boş çözelti kromatogramı	96
Şekil 4-37. Numune çözeltisi ile asidik bozundurma çalışması Favipiravir pik saflığı .	96
Şekil 4-38. Numune çözeltisi ile oksidatif bozundurma çalışması kromatogramları	98
Şekil 4-39. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ile oksidatif bozundurma çalışması kromatogramları.....	98
Şekil 4-40. Oksidatif bozundurma çalışması boş çözelti kromatogramları	99
Şekil 4-41. Numune çözeltisi ile oksidatif bozundurma çalışması Favipiravir pik saflığı	99
Şekil 4-42. Numune çözeltisi ile sıcaklık etkisi çalışması kromatogramı	101

Şekil 4-43. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ile sıcaklık etkisi çalışması kromatogramı	101
Şekil 4-44. Numune çözeltisi ile sıcaklık etkisi çalışması Favipiravir pik saflığı	101
Şekil 4-45. Numune çözeltisi ile nem etkisi çalışması kromatogramı	102
Şekil 4-46. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ile nem etkisi çalışması kromatogramı	103
Şekil 4-47. Nem etkisi çalışması boş çözelti kromatogramı	103
Şekil 4-48. Numune çözeltisi ile nem etkisi çalışması Favipiravir pik saflığı	103
Şekil 4-49. Numune çözeltisi ile fotodegradasyon çalışması kromatogramı	104
Şekil 4-50. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ile fotodegradasyon çalışması kromatogramı	105
Şekil 4-51. Numune çözeltisi ile fotodegradasyon çalışması Favipiravir pik saflığı ...	105

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

UV-VIS: Ultraviyole ve Görünür Işık

MS: Kütle Spektrometrisi

IR: Kızılötesi

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

USP: Amerikan Farmakopesi

EP: Avrupa Farmakopesi

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Komitesi

IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

Ar-Ge: Araştırma - Geliştirme

RSD: Bağlı Standart Sapma

SD: Standart Sapma

RT: Alıkonma Zamanı

RRT: Bağlı Alıkonma Zamanı

R: Korelasyon Katsayısı

R²: Belirleme (Determinasyon) Katsayısı

LOQ: Kantitatif Tayin Limiti

LOD: Teşhis Edilebilme Alt Sınırı

RN: Bağlı Nem

DAD/PDA: Diyot Dizi Dedektörü/Fotodiyot Dizi Dedektörü

pKa: Asitlik Ayrışma Sabiti

m/z: Kütle/Yük

S/N: Sinyal/Gürültü

ACN: Asetonitril

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

RLA: Raporlama Limitinin Altında

DE: Dedekte Edilmedi

TGA: Toplam Günlük Alım

CAS No: Kimyasal Kimlik Numarası

PET: Polyester

PTFE: Politetrafloroetilen

PVDF: Poliviniliden Diflorür

RNA: Ribonükleik Asit

ÖZET

Büşra Gülşen (2021). Covid-19 Tedavisinde Kullanılan İlaçlardan Favipiravir'in Ve Bozundurma Safsızlıklarının HPLC Yöntemi ile Tayini. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Favipiravir, 2019 yılında başlayıp halen tüm dünyada devam etmekte olan Covid-19 salgınında tedavi edici olarak kullanılan ilaç etken maddelerinden biridir. Yapılan literatür araştırmalarında bu etken maddenin ve safsızlıklarının tablet formundaki farmasötik preparatlarda tayinini detaylı bozundurma çalışmaları ile destekleyecek şekilde oluşturulmuş bir HPLC yöntemine rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında bu amaca hizmet edecek şekilde favipiravir ve safsızlıklarının yanyana analizi için bir analiz yöntemi geliştirilmiş ve yöntemin validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemde sabit faz olarak Kinetex® EVO C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm, 100Å) kolonu; hareketli faz olarak ise 10 mM KH₂PO₄ tamponu (pH = 3.0) ve asetonitrilin hacimce 90:10 oranındaki karışımı kullanılmıştır. Kromatografik ayırmalar 30 °C kolon fırını sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve maddeler UV-Görünür alan dedektörü ile 222 nm' dalga boyunda 0.5 ml/dakika akış hızı ile izlenmiştir. 25 dakikada tamamlanan analizde Favipiravir alıkonma zamanı yaklaşık 9. dakikada; alkali, asidik, oksidatif koşullarda oluşan majör safsızlıkların alıkonma zamanları ise yaklaşık 4. 5. 7. ve 12. dakikalarda (RRT 0.51, 0.54, 0.76, 1.31) gözlenmiştir.

Yöntemin validasyon bulgularında, doğrusallık gösterdiği aralık 0.00003 – 0.00075 mg/ml, kantitatif tayin sınırı (LOQ) 0.00003 mg/ml, teşhis edebilme alt sınırı (LOD) 0.00001 mg/ml olarak elde edilmiştir. Güniçi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında elde edilen yüzde bağıl standart sapma değerleri (%RSD) sırasıyla %0.17 ve %0.28, ortalama geri kazanım değeri ise %99.46 olarak saptanmıştır.

Validasyonu tamamlanan bu yöntem Favipiravir'in yüksek sıcaklık, nem ve fotodegradasyon gibi stres koşullarında artış gösteren olası tüm bozundurma safsızlıklarının tablet formundan tayinine başarıyla uygulanmıştır. Geliştirilen yöntem özellikle hız ve kolaylık açısından Covid-19 salgınının tedavisinde kullanılan bu ilacın sanayideki rutin analizleri için son derece uygundur.

Anahtar Kelimeler: Covid-19, Favipiravir, Bozundurma Safsızlıkları, HPLC, Validasyon

ABSTRACT

Büşra Gülşen (2021). Determination of Favipiravir that is one of the drugs for Covid-19 treatment and its degradation impurities by HPLC. Istanbul University Institute of Health Sciences, Analytical Chemistry Department. Master Thesis. Istanbul.

Favipiravir is one of the active pharmaceutical ingredients used in the treatment of the Covid-19 epidemic that started in 2019 and is still continuing all over the world. In the literature researches, no HPLC method was found to support the determination of this active substance and its impurities in pharmaceutical preparations in tablet form with detailed degradation studies. In this thesis, an analysis method was developed for the simultaneous analysis of favipiravir and its impurities, and the method was validated.

In the developed method, Kinetex® EVO C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm, 100Å) column and a mixture of 10 mM KH₂PO₄ buffer (pH = 3.0) and acetonitrile (90:10; v / v) were used as the stationary and mobile phase. Chromatographic separations were carried out at 30 °C column temperature and samples were monitored by a UV-Visible detector with a wavelength of 222 nm at 0.5 ml / min flow rate. Total analysis time was 25 minutes, Favipiravir retention time was approximately 9 minutes; The retention times of major impurities formed under alkaline, acidic, oxidative conditions were observed at about 4., 5., 7 and 12 minutes (RRT 0.51, 0.54, 0.76, 1.31).

According to validation results, the linearity range was obtained as 0.00003 – 0.00075 mg/ml, the limit of quantitation (LOQ) and the limit of detection (LOD) were 0.00003 mg/ml and 0.00001 mg/ml, respectively. Percentage relative standard deviation values (% RSD) obtained in intra-day and between day repeatability studies were determined as 0.17% and 0.28%, respectively, and the average recovery value was found 99.46%.

This validated method, has been successfully applied to the determination of all possible degradation impurities of Favipiravir that increase under stress conditions such as high temperature, humidity and photodegradation from tablet form. The developed method is extremely suitable for the routine analysis of this drug used in the treatment of the Covid-19 outbreak, especially in terms of speed and convenience.

Key Words: Covid-19, Favipiravir, Degradation Impurities, HPLC, Validation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Favipiravir, 2014 yılında Japonya’da pandemik influenza enfeksiyonlarını tedavi etmek amacıyla onaylanmış bir antiviral ilaçtır (Delong, Abdelnabi, & Neyts, 2018). Bu etken madde, influenza enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmasının yanı sıra ilk olarak Çin’in Wuhan Eyaleti’nde 2019 yılının Aralık ayında ateş, öksürük, nefes darlığı gibi solunum yolu belirtileri ile ortaya çıkan ve bu belirtileri gösteren hastaların tabi tutulduğu araştırmalar sonucunda 13 Ocak 2020 tarihinde tanımlanmış bir virüs olan Covid-19’un tedavisinde de kullanılmaktadır (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2020).

Favipiravir, RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp) enzim inhibitörü olma özelliğine sahip bir ilaçtır (Drugbank, 2021). Bu nedenle anti-influenza virüs aktivitesine ek olarak, flavi-, alfa-, filo-, bunya-, arena-, noro- ve diğer RNA virüslerinin replikasyonunu bloke edebilme yeteneğine sahiptir (Baranovich, ve diğerleri, 2013). Favipiravir’in hücrelerde aktif fosforil forma dönüştürülerek viral RNA polimeraz tarafından substrat olarak tanınıp RNA polimeraz aktivitesini inhibe edebilme özelliği sayesinde bir RNA virüsü olan SARS-CoV-2 üzerinde potansiyel antiviral etkisi olacağı düşünülmüş ve ardından çalışmalar başlamıştır (Kiso, ve diğerleri, 2010). Bu düşüncüyü doğrular şekilde, Covid-19 tedavisine yönelik olarak başlatılan araştırmalar kapsamında 14 Şubat 2020’de, Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Klinik Tıp Araştırma Merkezi ve Şenzen Üçüncü Halk Hastanesi tarafından başlatılarak deney grubu ve kontrol grubu dahil 80 hasta ile yürütülen klinik çalışmada, Favipiravir’in, lopinavir+ritonavirin birlikte kullanılmasıyla elde edilen antiviral etkisinden daha güçlü bir antiviral etkiye sahip olduğu, tedavi grubundaki hastalarda anlamlı bir advers etki göstermediği, bahsedilen kombine ilaç grubundan daha az yan etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Kiso, ve diğerleri, 2010; Watanabe, ve diğerleri, 2013).

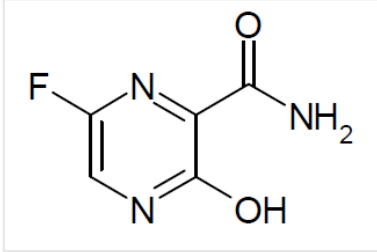
Favipiravir etken maddesini içeren ilk farmasötik preparat, bir influenza antiviral ajan olarak ve Japonya menşei tablet formunda bir ilaçtır (Avigan® 200 mg Tablet). Bu ilaç yalnızca diğer anti-influenza virüs ajanlarının etkin olmadığı veya yeterince etkin olmadığı yeni veya yeniden ortaya çıkan influenza virüsü enfeksiyonu salgınlarında kullanımı düşünülen ve hükümetin bu tür virüslere karşı önlem olarak kullanmaya karar verdiği bir ilaçtır (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2014).

Favipiravir, hızlı ve etkin tedavinin elzem olduğu içinde yaşadığımız pandemi döneminde Covid-19 ile mücadelede tercih edilen seçeneklerden biri haline gelmiştir. Öyle ki, tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de pandemi sürecinde çok daha fazla ilaca ihtiyaç duyulmuş ve duyulmaktadır. Yeri geldiğinde temininde güçlük çekilebilecek bir ilaç olduğundan yerli üretiminin de kaçınılmaz olduğu bir gerçektir. Bu ilacın üretimi sırasında kolay ve hızlı bir şekilde analiz edilebilmesi adına iyi geliştirilmiş ve valide edilmiş analitik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde Favipiravir safsızlık tayinini konu edinen yalnızca CN104914185A ve CN104914185B numaralı Çin patentleri mevcuttur; ancak hem bu çalışmalarda hem de yapılan literatür taramalarında, Favipiravir ve safsızlıklarının farmasötik preparatlarda eş zamanlı olarak tayininin detaylı bozundurma çalışmaları ile desteklenerek verildiği herhangi bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) çalışmasına rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu özgün yüksek lisans tezi ile, küresel Covid-19 salgını sürecinde bir antiviral ajan olarak kullanılan Favipiravir etken maddesinin ve bozundurma safsızlıklarının birlikte ve girişimsiz olarak tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntemin validasyonu yapılarak farmasötik preparatlarda uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

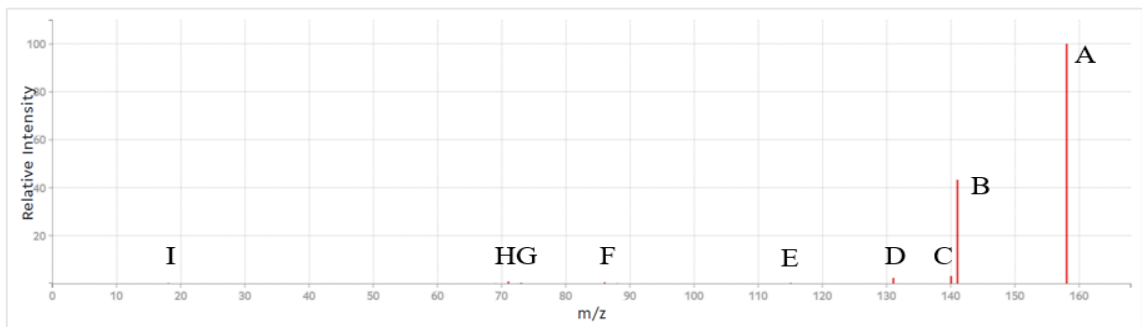
2.1. Favipiravir

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



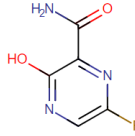
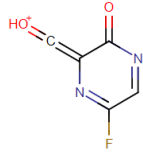
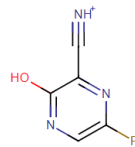
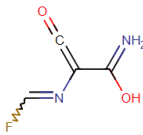
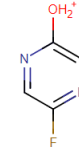
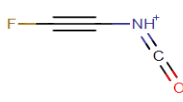
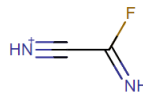
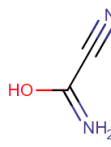
Şekil 2-1. Favipiravir molekül yapısı (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2014)

259793-96-9 CAS numaralı Favipiravir'in IUPAC adı 6-floro-3-hidroksipirazin-2-karboksamid'tir, Şekil 2-1'de molekül yapısı verilen Favipiravir $C_5H_4FN_3O_2$ kimyasal formülüne ve 157.104 g/mol molekül kütlesine sahiptir (Drugbank, 2021). Favipiravir, karboksamid bağlanmış pirazin halkası ile pirazinkarboksamid olarak bilinen organik madde sınıfında yer alan bir moleküldür (Drugbank, 2021). pKa değeri 5.1 olan, fiziksel olarak katı formda ve beyazımsı açık sarı renkte bulunan bu molekülün asetonitril, metanol ve 5.5 – 6.1 aralığındaki pH değerlerinde çözünürlüğü azdır; su, etanol ve 2.0 – 5.5 aralığındaki pH değerlerindeki çözünürlüğü ise daha azdır (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2014). Favipiravir erime noktası aralığı da literatürde 187 °C-193 °C olarak geçmektedir (Drugbank, 2021; Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2014). Favipiravir'e ait MS/MS spektrumu Şekil 2-2'de, bu spektrumda görülen spesifik iyon piklerinin m/z değerleri ve molekül yapıları Tablo 2-1'de görülmektedir.



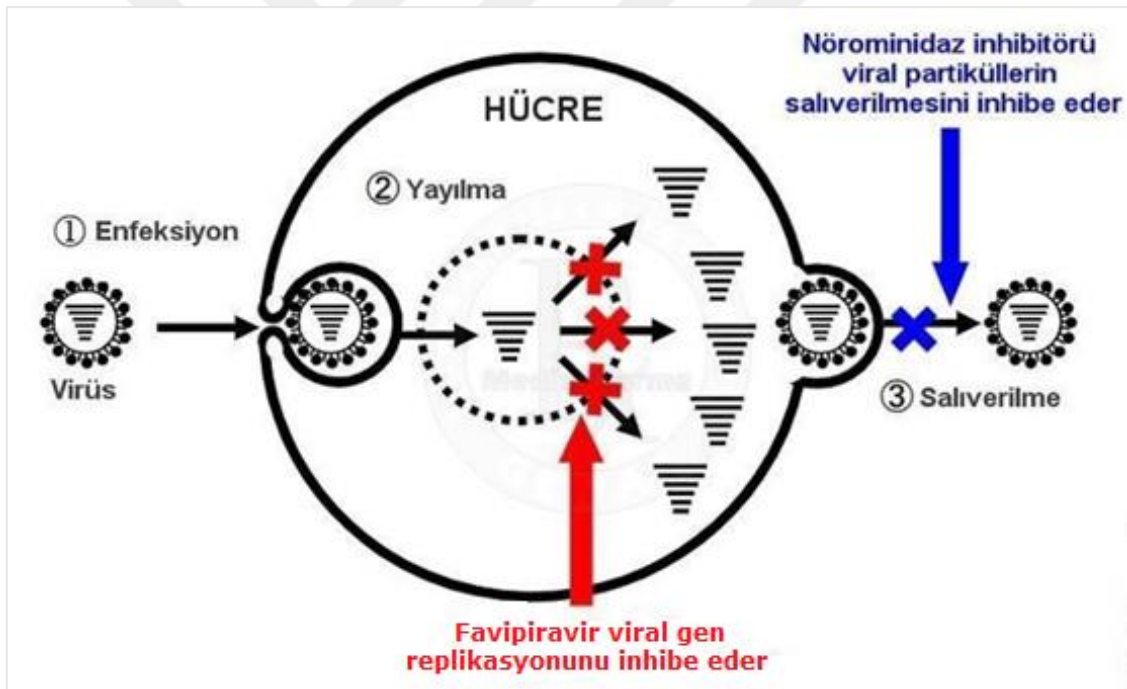
Şekil 2-2. Favipiravir molekülünün MS/MS spektrumu (10V, Pozitif) (Drugbank, 2021)

Tablo 2-1. Favipiravir MS/MS spektrumundaki spesifik iyon pikleri (Drugbank, 2021)

Maddeler	Molekül Yapısı	m/z (M ⁺)
A		158.04
B		141.01
C		140.03
D		131.02
E		115.03
F		86.02
G		73.02
H		71.02
I	NH_4^+	18.03

2.1.2. Etki Mekanizması ve Farmakokinetiği

Favipiravir, hücre içerisinde RNA sentezini inhibe eden Favipiravir-ribofuranosil-5'-trifosfat'a (Favipiravir-RTP) dönüştürülmekte ve bu form RdRp aktivitesini engelleyerek antiviral etki göstermektedir (Furuta, ve diğerleri, 2013). Yani enfeksiyonun yayılımı hücre içerisinde viral gen replikasyonunu inhibe eden Favipiravir molekülü aracılığı ile Şekil 2-3'te gösterildiği gibi önlenmektedir (RXMediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, 2020). Enfeksiyonun yayılımının önlenmesi için yalnızca virüs partiküllerinin hücre dışına çıkmalarını engelleyen nöraminidaz inhibitörü antivirallere kıyasla, direkt olarak viral RNA polimerazı inhibe ederek virütik replikasyonu ve transkripsiyonu önlemesi, favipiraviri antiviral tedavide önemli bir ilaç yapmıştır (Furuta, ve diğerleri, 2005).



Şekil 2-3. Favipiravir'in etki mekanizması (RXMediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, 2020)

Hızlı emilen ve biyoyararlanımı yüksek bir ilaç olan Favipiravir ağız yoluyla alınmakta olup plazmadaki yarılanma ömrü 4 saattir (Madelain, ve diğerleri, 2016). Aldehit oksidaz enzimi Favipiravir'in farmakokinetiğinin zamana ve doza bağlı bir karmaşıklıkta olmasına neden olmaktadır; çünkü bu enzim hem Favipiravir'i inaktif M1

metabolitine dönüştürebilmekte hem de Favipiravir tarafından inhibe edilebilmektedir (Madelain, ve diğerleri, 2016). Bu bağlamda düşünüldüğünde, Favipiravir'in kandaki seviyesinin düşmemesi adına yükleme yapılması gerekmektedir. Bu sebeple hastalara 1. gün 2 x 1600 mg yükleme dozu ve 2 – 5. günler 2 x 600 mg idame dozu uygulanmaktadır (Drugbank, 2021).

2.1.3. Favipiravir Tayini için Geliştirilmiş Analitik Yöntemler

Favipiravir tabletlerin miktar tayininde kullanılmak üzere geliştirilen bir HPLC yönteminde kromatografik kolon olarak Shiseido Capcell Pak® C18 MGII (250 x 4.6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Yöntemde hareketli faz olarak hacimce 80:20 oranında trifloroasetik asit ile pH 3.2 ye ayarlanmış 0.01 M amonyum dihidrojen fosfat tamponu ve metanol:asetonitil (50:50, h/h) karışımı 1 ml/dakika akış hızı ile kullanılmıştır. Dalga boyu 225 nm, kolon sıcaklığı 30 °C, enjeksiyon hacmi 10 µL'dir. Yöntemin doğrusallık aralığı 0.0403 mg/ml – 0.1208 mg/ml, ortalama geri kazanımı % 0.39 RSD ile % 100.2 olarak verilmiştir. Bu yöntem ile ve Favipiravir pik saflığının iyi şekilde sağlandığı bildirilmiştir (Cuiyan, Yuanyuan, Lichao, Yangjin, & Lei, 2015).

CN104914185A ve CN104914185B patentlerinde Favipiravir miktar tayini ve safsızlık analizleri için kullanılan HPLC yönteminde C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolon kullanılmış, akış hızı 1.0 ml/dakika ve kolon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir. Gradient mod ile çalışılarak hareketli faz A için asetonitril; mobil faz B için fosfat tamponu kullanılmıştır. Miktar tayini analizi için kullanılabilecek bu yöntem Favipiravir alıkonma zamanının 5 katı kadar bir süre ile safsızlıkların analizi için de kullanılabilmektedir. Fosfat tamponuna ait bilgiler kapsamında konsantrasyon ve pH aralıklarının sırasıyla 0.005 ~ 0.015 mol/L ve pH 6.0 ~ 8.0 olması gerektiği, bu değerlerin optimum noktalarının 0.010 mol/L ve pH 7.0 olduğu, hazırlanacak miktar tayini ve safsızlık analizi numune çözeltilerinin konsantrasyonlarının sırasıyla 0.002 mg/ml ve 0.2 mg/ml olduğu bildirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 10 µL olan ve gradient modda 60 dakikalık bir sürede gerçekleştirilen yönteme ait kromatogram incelendiğinde Favipiravir alıkonma zamanı yaklaşık 12 dakikadır. Belirtilen kromatografik şartlar ile uygulanan gradient programı Tablo 2-2'de verilmiştir (Çin Patent No. CN104914185A, 2015; Çin Patent No. CN104914185B, 2016).

Tablo 2-2. CN104914185A ve CN104914185B patentlerindeki yöntem için verilen gradient programı

Zaman (dakika)	% A (Organik Faz) Asetonitril	% B (Tampon Çözeltilisi) 0.010 M KH_2PO_4, pH 7.0
0	10	90
15	15	85
35	20	80
45	30	70
50	35	65
60	35	65

Bir diğer yayın kontaminasyonun önlenmesi için ekipman yüzeylerinde kalıntı halinde bulunabilecek Favipiravir'i HPLC, Luminesans ve Spektrofotometri yöntemleri ile tayin edebilmeyi konu almaktadır. Bu yöntemlerde Favipiravir konsantrasyon aralıkları sırasıyla 0.02–2.0 µg/ml, 0.3–3.5 µg/ml ve 1.0–20.0 µg/ml; LOD değerleri ise sırasıyla 0.023 µg/ml, 0.12 µg/ml ve 0.11 µg/ml'dir. Bu çalışma ile geliştirilen HPLC yönteminde sabit faz Zorbax® Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm, 5µ) kolonudur. Hareketli faz olarak aşağıdaki iki bileşen hacimce 70:30 oranında birleştirilerek izokratik modda kullanılmıştır. Bu bileşenlerden ilki, 1.19 gram amonyum dihidrojen fosfat tuzunun 1000 ml distile suda çözündürülerek trifloroasetik asit ile pH değerinin 3.2'ye ayarlandığı tampon çözelti; ikincisi ise hacimce 50:50 oranında birleştirilmiş metanol:asetonitril karışımıdır. Deiyonize su kullanılarak 0.02 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanan numuneler 100 µL enjeksiyon hacmi ile cihaza verilmiştir. Dedektör dalga boyu olarak 225 nm'nin kullanıldığı yöntemde Favipiravir için yaklaşık alıkonma zamanı ve toplam analiz süresi sırasıyla 2.3 ve 6 dakikadır. Yayında geçen Lüminesans yönteminde Favipiravir tayini 360 nm'deki eksitasyon sonunda 430 nm'deki floresans ölçümü ile sağlanmıştır; Spektrofotometri yönteminde ise Favipiravir'in maksimum absorbans verdiği dalga boyları 225, 322 ve 366 nm olarak saptanmış ve 322 nm'de çalışılmıştır. (Yegorova, Scrypynets, Leonenko, Umetskaya, & Voitiuk, 2020)

Favipiravir tayini için spektrofotometrik yöntemi konu alan farklı bir makalede, 0.2 M borat tamponu (pH 8.0) içerisindeki Favipiravir'in tayini 361 nm'deki eksitasyonun ardından 432 nm'deki floresansının ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Favipiravir konsantrasyonlarına karşılık olarak elde edilen floresans ölçümlerinin doğrusallık aralığı 40 – 280 ng/ml, LOD değeri 9.44 ng/ml ve kantitatif tayin sınırı (LOQ)

28.60 ng/ml olarak bulunmuştur. Yöntem farmasötik formlara uygulandığında Favipiravir için geri kazanımın 99.26 ± 0.87 olduğu bildirilmiştir. Yöntemin ayrıca insan kan plazmasına da uygulandığı ve plazmadan Favipiravir tayinini 48 – 192 ng/mL doğrusallık aralığı ile yapabildiği rapor edilmiştir. (Megahed, Habib, Hammad, & Kamal, 2020)

Son olarak, İ. Bulduk tarafından Favipiravir'in farmasötik formlardan tayini için bir HPLC-UV yöntemi geliştirmiştir. Bu çalışmada, 50 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 2.3) ve asetonitril hacimce 90:10 oranında birleştirilerek hareketli faz olarak kullanılmıştır. Sabit faz olarak Inertsil® ODS-3V C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolonunun kullanıldığı yöntemde dalga boyu 323 nm, akış hızı 1.0 ml/dakika ve kolon sıcaklığı 30 °C'dir. Deiyonize su kullanılarak ultrasonik etki ile hazırlanan ve konsantrasyonu 1 µg/ml olan numunelerden Favipiravir miktar tayini bu yöntem ile 15 dakikada tamamlanmıştır. Yöntemin doğrusallık aralığı 10 – 100 µg/ml (R^2 : 0.9999), LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1.20 µg/ml ve 3.60 µg/ml, geri kazanımı ise % 99.19 - % 100.17 aralığında bulunmuştur. Bunlara ek olarak, yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında pik alanı için % RSD: 0.4; alıkonma zamanı için % RSD: 0.2; sağlamlık çalışmalarında sistem uygunluk parametreleri için % RSD < 1.0 bulunmuştur (Bulduk, 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, 2020-2021 yılları arasında Ali Raif İlaç Sanayi A.Ş. Ar-Ge Merkezi Analitik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Covid-19 tedavisinde kullanılan ilaçlardan biri olan Favipiravir'in ve degradasyon safsızlıklarının HPLC ile tayinini konu alan bu tez çalışmasında, tüm yöntem geliştirme çalışmaları ve yöntemin farmasötik preparatlar kullanılarak gerçekleştirilen validasyonu anlatılacaktır.

3.1. Geliştirilip Valide Edilen Analitik Yöntem

3.1.1. Analitik Yöntem Şartları

Geliştirilen yönteme ait parametreler Tablo 3-1'de görülmektedir.

Tablo 3-1. Geliştirilen HPLC Yöntemine ait Parametreler

Cihaz	HPLC Sistemi
Dedektör	Diode Array Dedektör (DAD)
Kolon	Kinetex® EVO C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm, 100Å)
Akış Hızı	0.5 ml/dakika
Dalga Boyu	222 nm
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon Hacmi	10 µl
Enjeksiyon Süresi	25 dakika (izokratik sistem)
Hareketli Faz Çözeltisi	[90:10, h/h] oranında [10 mM KH ₂ PO ₄ Tampon Çözeltisi (pH 3.0):Asetonitril]
Seyreltme Çözeltisi	[90:10, h/h] oranında [10 mM KH ₂ PO ₄ Tampon Çözeltisi (pH 3.0):Asetonitril]

3.1.2. Çözeltilerin Hazırlanışı

10 mM Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH₂PO₄) Tampon Çözeltisinin Hazırlanışı: 1000 ml distile suya 1.36 g potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) eklenir ve 15 dakika boyunca manyetik karıştırıcı kullanılarak çözünmesi sağlanır. Bu süre sonunda çözeltinin pH'ı %85'lik fosforik asit ile 3.0'a (± 0.05) ayarlanır. Hazırlanan bu çözelti 0.45 µm membran filtreden süzülür.

Hareketli Faz Çözeltisinin Hazırlanışı: 10 mM potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tampon çözeltisi ve asetonitril hacimce (90:10, h/h) oranında birleştirilir ve 15 dakika boyunca manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılır.

Seyreltme Çözeltisi Hazırlanışı: Hareketli faz çözeltisi, seyreltme çözeltisi olarak kullanılır.

Standart Stok Çözeltisinin Hazırlanışı: 25 mg Favipiravir çalışma standardı tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarılır. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletilir. Çözünme sağlandıktan sonra ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vorteks mikserle karıştırılır ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$).

Standart Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 1 ml alınarak 100 ml'lik balon jojeye aktarılır ve seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlandıktan sonra 1 dakika boyunca vortekslenmesi sağlanır. Bu çözeltiden de 1 ml alınarak 10 ml'lik balon jojeye aktarılır ve yine seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlanarak 1 dakika boyunca vortekslenir. HPLC sistemine enjekte edilmeden önce çözelti Chromafil® PET-45/25 0.45 μm turuncu filtreden süzülerek viallere aktarılır ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005 \text{ mg/ml}$).

Numune Çözeltisinin Hazırlanışı: 3 adet Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet havanda ezilerek toz haline getirilir. Hazırlanan bu tozdan 25 mg Favipiravir'e eşdeğer miktarda tablet tozu (32.58 mg) tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarılır. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletilir. Bu süre sonunda ultrasonik banyodan alınan balon jojenin oda sıcaklığına kadar soğuması sağlanır ve seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslenir. Çözelti Chromafil® PET-45/25 0.45 μm turuncu filtreden süzülerek HPLC viallerine aktarılır ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$).

Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisinin Hazırlanışı: Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'e ait yardımcı madde karışımından (plasebo) 7.58 mg tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarılır. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletilir. Bu süre sonunda ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra seyreltme çözeltisiyle hacmine

tamamlanır ve 1 dakika boyunca vortekslenir. Çözelti Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek HPLC viallerine aktarılır.

0.01 mg/ml Favipiravir Çözeltisinin Hazırlanışı: 1 mg Favipiravir çalışma standardı hassas bir şekilde tartılarak 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 50 ml metanol eklenerek ultrasonik banyoda 10 dakika bekletildi. Çözünme sağlandıktan sonra ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Ardından hacmine metanol ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.01 \text{ mg/ml}$).

3.1.3. Kimyasal Maddeler, Çalışma Standardı ve Farmasötik Preparatlar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar maddeler, çalışma standardı ve farmasötik preparatlar aşağıda sıralanmıştır:

Potasyum Dihidrojen Fosfat (Merck®, analitik saflıkta)

%85'lik Fosforik Asit (Merck®, analitik saflıkta)

%37'lik Hidroklorik Asit (Merck®, analitik saflıkta)

%30'luk Hidrojen Peroksit (Merck®, analitik saflıkta)

Sodyum Hidroksit (Merck®, analitik saflıkta)

Asetonitril (J.T.Baker®, HPLC saflıkta)

Metanol (J.T.Baker®, HPLC saflıkta)

Distile su (HPLC saflıkta)

Favipiravir çalışma standardı (Seri No:2020301, Zhejiang Hengkang Pharmaceutical Co., Ltd., Çin)

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet ve Yardımcı Madde (Plasebo) Karışımı (Seri No: FAAR1-V-01 ve FAAR1-P-01, Ali Raif İlaç San. A.Ş., Türkiye)

Avigan® 200 mg Film Kaplı Tablet (Seri No: PC1021, Toyama Chemical Co., Ltd., Japonya)

3.1.4. Ekipman ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan ekipman ve malzemeler aşağıda sıralanmıştır:

1. Shimadzu® HPLC Sistemi - Seri No : L20224301111 (Japonya)
 - LC-20A Pompa Sistemi
 - CBM-20A Sistem Kontrol Ünitesi
 - SIL-20A Oto Örnekleyici Bölmesi
 - CTO-20A Kolon Fırını
 - SPD-M20A DAD Dedektör
 - DGU-20A5 Degaze Etme Ünitesi
 - LPGE Düşük Basıncılı Gradient Ünitesi
 - Yüksek Basınç Valfi
 - Shimadzu LC-Solution Yazılımı
2. Waters® Acquity Arc HPLC Sistemi – Seri No : E17VQS861G (ABD)
 - Quaternary Solvent Manager-R (QSM-R) Modülü
 - Sample Manager FTN-R (SM FTN-R) Modülü
 - Kolon Fırını Modülü
 - UV/Visible Dedektör (2489)
 - PDA Dedektör (Photodiode Array Dedector) (2998)
 - Empower Kromatografi Yazılımı (Versiyon 3)
3. HPLC Kolonu
 - Phenomenex® Kinetex EVO C18 (100Å, 250 x 4.6 mm, 5 µm) (ABD)
 - Waters® XBridge C8 (250 x 4.6 mm, 5 µm) (ABD)
4. Shimadzu® UV-1800 UV-VIS Spektrofotometre ve UVProbe Yazılımı (Japonya)
5. Shimadzu® DSC Cihazı – Seri No: C30454600905, Model: DSC-60 (Japonya)
6. Merck® Millipore Milli-Q Advantage A10 Ultra Saf Su Cihazı (ABD)
7. Mettler Toledo® XS205 ve XP204 Analitik Teraziler (Almanya)
8. Heidolph® MR 3001K Standart Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Almanya)
9. Isolab® Vorteks Karıştırıcı (Almanya)
10. Isolab® Ultrasonik Banyo (Almanya)
11. Mettler Toledo® S20 SevenEasy pH Metre (0.00 pH – 14.00 pH) (Almanya)
12. Isolab® Vakum Filtrasyon Süzme Seti (Almanya)

13. Cam ve Plastik Malzemeler

- Isolab® 1000, 2000, 5000 ml'lik Hareketli Faz Şişeleri (Almanya)
- Isolab® 10, 20, 50, 100 ml'lik Balon Jojeler (Almanya)
- Isolab® 1, 2, 5, 10 ml'lik Cam Pipetler (Almanya)
- Isolab® 50, 250 ml'lik Cam Beherler (Almanya)
- Isolab® HPLC Vialleri (Almanya)
- Isolab® 500, 1000, 2000 ml'lik Plastik Mezürler (Almanya)
- Isolab® Plastik Pastör Pipet (Almanya)

14. Yazılımlar ve Programlar

- Microsoft Office 365 Word Programı (Sürüm 2009)
- Microsoft Office 365 Excel Programı (Sürüm 2009)

15. Diğer Malzemeler ve Ekipmanlar

- Macherey-Nagel® Chromafil PET-45/25 0.45 µm Turuncu Filtre (Almanya)
- Merck® Millipore Millex-LCR Hidrofilik PTFE 0.45 µm Beyaz Filtre (ABD)
- Merck® Millipore Millex-HV Hidrofilik PVDF 0.45 µm Sarı Filtre (ABD)
- Isolab® 0.45 µm Membran Filtre (Almanya)
- Isolab® Kuvartz UV Spektrofotometre Küvetleri (Almanya)
- Isolab® Porselen Havan (Almanya)
- Isolab® Manyetik Balık (Almanya)
- Isolab® Mikro Kaşıklı Paslanmaz Çelik Spatül (Almanya)
- Jeio Tech® Etüv (Kore)
- Atlas Suntest® CPS (II) Fotostabilite Kabini (Almanya)
- Canon® F-715S Bilimsel Hesap Makinesi (Japonya)

3.2. Analitik Yöntem Geliştirme Çalışmaları

3.2.1. Dalga Boyu Seçimi

0.01 mg/ml Favipiravir Çözeltisinin Hazırlanışı: 1 mg Favipiravir çalışma standardı hassas bir şekilde tartılarak 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 50 ml metanol eklenerek ultrasonik banyoda 10 dakika bekletildi. Çözünme sağlandıktan sonra ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra hacmine metanol ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.01 \text{ mg/ml}$)

Yukarıda hazırlanışı verilen 0.01 mg/ml Favipiravir çözeltisinin Spektrofotometre ile 190 nm – 800 nm dalga boyu aralığındaki UV-Görünür bölge spektrumu alındı. Bu spektrum yardımıyla maddenin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyları bulundu. Ardından bu dalga boylarında izleme ile alınan HPLC deki kromatogramları incelenerek çalışma dalga boyu seçildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1'de yer almaktadır.

3.2.2. Kolon Seçimi

Kolon seçimi aşamasında Favipiravir molekülünün yapısı, polaritesi, sahip olduğu pKa değeri (5.1) gibi özellikleri değerlendirilerek, ayrıca literatür çalışmalarından da yola çıkarak C8 ve C18 bağlı faz kolonlar ile denemeler yapıldı. Kolon seçimi ile ilgili ayrıntılı sonuçlar Bölüm 4.1.2'de yer almaktadır.

3.2.3. Hareketli Faz ve Çözücü Seçimi

Yöntemin geliştirilmesi sürecinde hareketli fazın belirlenmesi aşamasında, hareketli faz bileşenlerinden olan tampon çözelti ve organik çözücünün belirlenmesinde özellikle seçilen dalga boyu olan 222 nm de absorpsiyon yapmayan çözücülerle denemeler yapılmıştır. Seçilen çözücülerle maddenin pKa değerine uygun olacak şekilde farklı pH değerlerinde tamponlar kullanılarak hareketli fazlar hazırlanmış ve denemeler yapılmıştır. Ayrıntılı sonuçlar Bölüm 4.1.3'te yer almaktadır.

3.2.4. Analiz Süresinin Belirlenmesi

Enjeksiyon verilecek sürenin saptanması sırasında, daha önce belirlenen kolon, hareketli faz ve çözücü ile Waters marka HPLC (PDA Dedektör) cihazı kullanılarak Bölüm 3.1.1’de anlatılan analitik yöntem şartları ile enjeksiyonlar yapılmıştır. Elde edilen kromatogramdaki en son safsızlığın alıkonma zamanının 1.5 katına denk gelecek şekilde analiz süresi belirlenmiş ve bu sürenin uygunluğu tekrarlı enjeksiyonlarla kesinleştirilmiştir. Ayrıntılı sonuçlar Bölüm 4.1.4’te yer almaktadır.

3.2.5. Numune ve Standart Çözeltileri İçin Filtre Seçimi

Filtrasyon işlemi, kolonun ve cihazın korunması noktasında oldukça önemlidir. Kullanılan kolon ve cihaz ile bir bütün olan analiz yönteminin devamlılığı için de süzme de kullanılacak filtrenin uygun şekilde seçilmesi gerekmektedir. Bu aşamada HPLC kolonu, hareketli faz (seyreltme çözeltisi) çözeltisi ve dalga boyu belirlenen analitik yöntemin numune ve standart çözeltisi konsantrasyonlarının da belirlenmesinin ardından bu çözeltilerin hangi filtreden geçirilerek HPLC cihazına enjeksiyon için verileceğinin saptanması adına bu bölümde ek bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada denenecek filtrelerin seçimine, yöntemde kullanılacak çözeltiler ile uyumluluklarına, membran özelliklerine ve por çapı büyüklüğüne bakılarak karar verilmiştir. Seçilen filtrelerle seyreltme çözeltisi, standart çözelti, örnek çözeltisi ve plasebo çözeltilerinin süzme işlemi yapıldıktan sonra HPLC sistemine enjeksiyonları yapılmıştır. Ayrıntılı sonuçlar Bölüm 4.1.5’te yer almaktadır.

3.2.6. Numune ve Standart Çözeltileri Konsantrasyonları ile Safsızlık Spesifikasyonlarının Belirlenmesi

Numune ve Standart çözeltilerinin konsantrasyonları, Favipiravir molekülü içeren bir farmasötik form için önerilen maksimum günlük alım dozu ve ICH Q3B (R2) klavuzundaki günlük alım dozuna göre etkin madde ve safsızlıklar için belirlenen raporlama limitleri dikkate alınarak belirlenmiştir. Belirlenen limitlerin raf ömrü ile uyumluluğu Arrhenius denklemi kullanılarak hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar referans ürün raf ömrü ile karşılaştırılmıştır. Ayrıntılı sonuçlar Bölüm 4.1.6’da yer almaktadır.

3.3. Geliştirilen Yöntemin Valide Edilmesi

Bu tez çalışması ile geliştirilen analitik yöntemin validasyonu *ICH Q2 (R1) – Analitik Prosedürlerin Validasyonu* için yayınlanan klavuzda (European Medicines Agency, 1995) belirtilen parametrelere ve açıklamalarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda validasyon boyunca Avrupa ve Amerikan Farmakopelerine, Amerikan Farmakopesi – *USP <1225>* (U.S. Pharmacopeia, 2017), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından yayınlanan *Kromatografik Yöntemlerin Validasyonu Klavuzu*'na (U.S. Food & Drug Administration, 1994), *İlaçlar ve Biyolojikler için Analitik Prosedürler & Metotların Validasyonu Klavuzu*'na (*Endüstri için Klavuz*) (U.S. Food and Drug Administration, 2015) bağlı kalmıştır. Bu kapsamda, yöntemin validasyonu Tablo 3-2'de belirtilen parametreler üzerinden çalışılmıştır.

Tablo 3-2. Yöntem Validasyonu Sırasında Çalışılan Parametreler

Parametreler
Spesifiklik - <i>Specificity</i>
Sistem Uygunluğu - <i>System Suitability</i>
Teşhis Edilebilme Alt Sınırı – <i>Limit of Dedection</i>
Kantitatif Tayin Sınırı – <i>Limit of Quantitation</i>
Doğrusallık - <i>Linearity</i>
Aralık - <i>Range</i>
Doğruluk - <i>Accuracy</i>
Kesinlik – <i>Precision</i>
Tekrarlanabilirlik - <i>Repeatability</i>
Ara Kesinlik – <i>Intermediate Precision</i>
Sağlamlık - <i>Robustness</i>
Akış Hızı Değişimi – <i>Change of Flow Rate</i>
Kolon Sıcaklığı Değişimi – <i>Change of Column Temperature</i>
Dalga Boyu Değişimi – <i>Change of Wavelength</i>
Kolon Değişimi – <i>Different Columns</i>
Çözelti Stabilitesi – <i>Stability of Solution</i>

3.3.1. Spesifiklik

Tanım: Spesifiklik, test edilen maddenin safsızlık ve/veya yardımcı madde içeren karışımdan (plasebo) seçici olarak tayin edilebilmesidir. Bir analitik yöntemin spesifikliği, etken madde veya bitmiş ürün içerisindeki analiz edilebilecek maddeye ait sinyalin; safsızlık, yardımcı madde ve yöntemde kullanılan diğer çözeltilerin sinyalleri ile girişim yapıp yapmadığının kontrolü ile belirlenir.

Kullanılan Çözeltiler

10 mM Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH₂PO₄) Tampon Çözeltisinin Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2’de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Hareketli Faz Çözeltisinin Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2’de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Seyreltme Çözeltisi Hazırlanışı: Hareketli faz çözeltisi, seyreltme çözeltisi olarak kullanıldı.

Standart Stok Çözeltisi-1 Hazırlanışı: 25 mg Favipiravir çalışma standardı tartılarak 50 ml’lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 25 ml eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Çözünme sağlandıktan sonra ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$)

Standart Stok Çözeltisi-2 Hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisi-1’den 1 ml alınarak 10 ml’lik balon jojeye aktarıldı. Balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.05 \text{ mg/ml}$)

Standart Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisi-2’den 1 ml alınarak 100 ml’lik balon jojeye aktarıldı ve balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce çözelti Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005 \text{ mg/ml}$)

Numune Çözeltisinin Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2’de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisinin Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2’de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Favipiravir + Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisinin Hazırlanışı: Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet’e ait yardımcı madde karışımından (plasebo) 15.16 mg tartılarak 100 ml’lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine hazırlanan standart stok çözeltisi-2’den 1 ml ve seyreltme çözeltisinden 50 ml eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005 \text{ mg/ml}$)

İşlem

Hareketli faz çözeltisinden (seyreltme çözeltisi), yardımcı madde (plasebo) çözeltisinden, standart çözeltisinden, numune çözeltisinden, Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltisinden 1'er enjeksiyon verildi. Bu parametre boyunca DAD dedektör kullanıldı. Yöntem validasyonu **spesifiklik** çalışmasından elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.1'de verilmiştir.

Kabul Kriteri

Standart çözeltisi, numune çözeltisi ve Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltisindeki Favipiravir piki ile enjeksiyon verilen diğer tüm çözeltilerin kromatogramlarından elde edilen pikler arasında herhangi bir girişim olmamalıdır.

3.3.2. Sistem Uygunluğu

Tanım: Sistem uygunluk testleri; analitik yöntemin, numunenin ve ekipmanın doğru ve kesin sonuçlar verdiğinin, tekrarlanabilir olduğunun değerlendirilmesini sağlayan testlerdir.

Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltisi Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Numune Çözeltisi Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

İşlem

1'er adet hazırlanan standart ve numune çözeltilerinin her birinden 6 ardışık enjeksiyon verildi.

Yöntem validasyonu **sistem uygunluğu** çalışmasından elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.2'de verilmiştir.

Kabul Kriterleri

Standart çözeltisinin ardışık enjeksiyonlarından elde edilen kromatogramlardaki Favipiravir pikine ait kuyruklanma faktörü 2.0'dan fazla; teorik plaka sayısı 2000'den az olmamalıdır. Ayrıca sistemde tekrarlanabilirliğin sağlandığının göstergesi olarak standart ve numune çözeltilerinin ardışık enjeksiyonlarındaki Favipiravir pik alanları arasındaki bağıl standart sapma değeri % 2.0'dan büyük olmamalıdır.

3.3.3. Teşhis Edilebilme Alt Sınırı

Tanım: Analitin, bir madde içinde saptanabileceği (miktarlandırılması şart olmayan) en düşük konsantrasyona teşhis edilebilme alt sınırı denir.

Kullanılan Çözeltiler

Standart Stok Çözeltisinin Hazırlanışı: 25 mg Favipiravir çalışma standardı tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Çözünme sağlandıktan sonra ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$)

Standart Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 1 ml alınarak 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı ve jojenin hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanarak 1 dakika boyunca vortekslenmesi sağlandı. Bu çözeltiden de 1 ml alınarak 10 ml'lik balon jojeye aktarıldı ve joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanarak 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005 \text{ mg/ml}$)

LOD Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan standart çözeltisinden 0.6 ml alınarak 10 ml'lik balon jojeye aktarıldı ve balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Bu çözeltiden de 3.0 ml alınarak 10 ml'lik balon jojeye aktarıldı ve balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.00001 \text{ mg/ml}$)

İşlem

Hazırlanan LOD çözeltisinden 1 enjeksiyon verildi. Yöntem validasyonu **teşhis edilebilme alt sınırı** çalışmasından elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.3'te verilmiştir.

Kabul Kriteri

LOD çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen Favipiravir pik yüksekliğinin gürültüye oranı - **signal to noise (S/N)** 2:1 ile 3:1 aralığında olmalıdır.

3.3.4. Kantitatif Tayin Sınırı

Tanım: Bir analitik yöntemin kantitatif tayin sınırı; test edilen maddenin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile sayısal olarak ölçüm yapılabilen en düşük konsantrasyonudur.

Kullanılan Çözeltiler

Standart Stok Çözeltisinin Hazırlanışı: 25 mg Favipiravir çalışma standardı tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Çözünme sağlandıktan sonra ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5$ mg/ml)

Standart Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 1 ml alınarak 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı ve jojenin hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanarak 1 dakika boyunca vortekslenmesi sağlandı. Bu çözeltiden de 1 ml alınarak 10 ml'lik balon jojeye aktarıldı ve joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanarak 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005$ mg/ml)

LOQ Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan standart çözeltisinden 0.6 ml alınarak 10 ml'lik balon jojeye aktarıldı ve balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.00003$ mg/ml)

İşlem

Hazırlanan LOQ çözeltisinden 6 ardışık enjeksiyon verildi. Yöntem validasyonu **kantitatif tayin sınırı (LOQ)** çalışmasından elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.4'te verilmiştir.

Kabul Kriterleri

Kantitatif tayin sınırı (LOQ), Favipiravir pik yüksekliğinin gürültüye oranının - **signal to noise (S/N)** 10:1 olduğu konsantrasyon olmalıdır.

LOQ çözeltisinden verilecek 6 ardışık enjeksiyondan elde edilen Favipiravir pik alanları arasındaki %RSD 10.0'dan küçük olmalıdır.

3.3.5. Doğrusallık ve Aralık

Tanım: Doğrusallık; belirlenmiş olan konsantrasyon aralığında, çözelti konsantrasyonu ile ölçülen sinyaller arasındaki lineerlik ilişkisidir.

Tanım: Aralık; analitik test metodunun doğru, kesin ve doğrusal sonuç verdiği alt ve üst konsantrasyon aralığıdır. Bir analitik yöntemin aralığı doğrusallık çalışmalarında belirlenir. Uygun doğrusallık, doğruluk ve kesinliğe sahip bir yöntemle tayin edilen bileşenin alt ve üst konsantrasyonları arasındaki aralık o maddeye ait uygun çalışma aralığıdır.

Kullanılan Çözeltiler

Doğrusallık Standart Stok Çözeltilisinin Hazırlanışı: 25 mg Favipiravir çalışma standardı tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Çözünme sağlandıktan sonra ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Bu çözeltiden 1 ml alınarak 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı ve balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.005 \text{ mg/ml}$)

%150 Doğrusallık Çözeltilisinin Hazırlanışı: Hazırlanan doğrusallık standart stok çözeltisinden 1.5 ml alınarak 10 ml'lik balon joje içerisine aktarıldı. Balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.00075 \text{ mg/ml}$)

%120 Doğrusallık Çözeltilisinin Hazırlanışı: Hazırlanan doğrusallık standart stok çözeltisinden 1.2 ml alınarak 10 ml'lik balon joje içerisine aktarıldı. Balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0006 \text{ mg/ml}$)

%100 Doğrusallık Çözeltilisinin Hazırlanışı: Hazırlanan doğrusallık standart stok çözeltisinden 1.0 ml alınarak 10 ml'lik balon joje içerisine aktarıldı. Balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005 \text{ mg/ml}$)

%80 Doğrusallık Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan doğrusallık standart stok çözeltisinden 0.8 ml alınarak 10 ml'lik balon joje içerisine aktarıldı. Balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0004 \text{ mg/ml}$)

%60 Doğrusallık Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan doğrusallık standart stok çözeltisinden 0.6 ml alınarak 10 ml'lik balon joje içerisine aktarıldı. Balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0003 \text{ mg/ml}$)

%50 Doğrusallık Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan doğrusallık standart stok çözeltisinden 0.5 ml alınarak 10 ml'lik balon joje içerisine aktarıldı. Balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.00025 \text{ mg/ml}$)

%30 Doğrusallık Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan doğrusallık standart stok çözeltisinden 0.3 ml alınarak 10 ml'lik balon joje içerisine aktarıldı. Balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.00015 \text{ mg/ml}$)

%LOQ Doğrusallık Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan %100 doğrusallık çözeltisinden 0.6 ml alınarak 10 ml'lik balon joje içerisine aktarıldı. Balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.00003 \text{ mg/ml}$)

İşlem

% 150, % 120, % 80, % 60, % 50, % 30 konsantrasyonlarındaki doğrusallık çözeltilerinin her birinden 3 enjeksiyon verildi. İstisnai olarak sistem uygunluğu parametresinde de kullanmak üzere % 100 doğrusallık seviyesinden; kantitatif tayin sınırı parametresinde de kullanmak üzere % LOQ doğrusallık seviyesinden 6'şar enjeksiyon verildi. Yöntem validasyonu **doğrusallık ve aralık** çalışmasından elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.5'te verilmiştir.

Kabul Kriterleri

Yöntem validasyonunun doğrusallık parametresinde, hazırlanacak farklı konsantrasyonlara karşılık gelen sinyallerin oluşturacağı bir grafik oluşturulmalıdır. Bu cevaplar orantılı olmalı ve konsantrasyonlara karşılık gelecek sinyallerin kesişimi olan noktalar, çizilecek grafikteki doğrunun üzerinde veya yakınında yer almalıdır. Grafik elde edildikten sonra doğrusallık denklemi, doğruya ait eğim, y-ekseni kesim noktası, korelasyon katsayısı (R), belirleme (determinasyon) katsayısı (R^2) ve y-kesim noktası kriteri (%) raporlanmalıdır. Raporlanacak kriterlerden belirleme (determinasyon) katsayısı (R^2) 0.999'dan az olmamalı ($R^2 \geq 0.999$) ve lineerlik eğrisinin y-kesim noktası kriteri (%) % 100'lük standart çözeltisinin verdiği sinyalin $\pm$ % 20.0 aralığında olmalıdır.

Yöntem validasyonunun aralık parametresinde, doğrusallık parametresi ile belirlenecek olan tayin edilebilen en düşük konsantrasyon ve lineerlik sınırları içerisinde kalan en yüksek konsantrasyon arasındaki tüm değerler, bu yöntemin uygun çalışma aralığı olarak raporlanmalıdır.

3.3.6. Doğruluk

Tanım: Analitik metodun doğruluğu, bu metot ile test edilen analiz sonuçlarının gerçek sonuçlara yakınlığı demektir.

Kullanılan Çözeltiler

Standart Stok Çözeltisi-1 Hazırlanışı: 25 mg Favipiravir çalışma standardı tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Çözünme sağlandıktan sonra ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5$ mg/ml)

Standart Stok Çözeltisi-2 Hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisi-1'den 1 ml alınarak 10 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.05$ mg/ml)

Standart Stok Çözeltisi-3 Hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisi-1'den 0.6 ml alınarak 100 ml'lik balon jöjeye aktarıldı. Balon jöje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.003 \text{ mg/ml}$)

Standart Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisi-2'den 1 ml alınarak 100 ml'lik balon jöjeye aktarıldı. Balon jöje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 μm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005 \text{ mg/ml}$)

Geri Kazanım Çözeltilerinin Hazırlanışı (% LOQ, % 100, % 150): Her bir geri kazanım çözeltisi için ayrı ayrı olmak üzere, Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'e ait yardımcı madde (plasebo) karışımından Tablo 3-3'te belirtilen miktarda tartılarak 100 ml'lik balon jöjeye aktarıldı. Üzerine Tablo 3-3'te belirtilen standart stok çözeltisinden belirtilen hacimde ve seyreltme çözeltisinden 50 ml eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletilmesi sağlandı. Bu süre sonunda ultrasonik banyodan alınan balon jöje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 μm turuncu filtreden süzülerek viallendi.

Tablo 3-3. Yöntem validasyonu geri kazanım çözeltilerinin hazırlanması

Geri Kazanım Çözeltileri	Yardımcı Madde (Plasebo) Miktarı (mg)	Standart Stok Çözeltisi-2 (ml)	Standart Stok Çözeltisi-3 (ml)	Nihai Favipiravir Konsantrasyonu (mg/ml)
% LOQ	15.16	-	1	0.00003
% 100	15.16	1	-	0.0005
% 150	15.16	1.5	-	0.00075

İşlem

2 adet standart çözeltisi hazırlandı. Standart çözeltisi-1'den 6, standart çözeltisi-2'den 2 ardışık enjeksiyon verildi. Her iki standart çözeltisinden elde edilen Favipiravir pik alanları arasında uyum olup olmadığı kontrol edildi. Uyumlu oldukları görüldükten sonra, 6 tekrarlı enjeksiyon verilen standart çözeltisine (standart çözeltisi-1) ait Favipiravir pik alanları arasındaki % RSD, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı değerlendirildi. Bu parametreler için gerekli sistem uygunluk kabul kriterleri de sağlandığından, % LOQ, % 100 ve % 150 geri kazanım seviyelerinin her birinden 3'er

adet çözelti hazırlandı ve hazırlanan her bir çözeltiden 3'er enjeksiyon verildi. Yöntem validasyonu *doğruluk* çalışmasından elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.6'da verilmiştir.

Kabul Kriterleri

Standart çözeltisi-1 ve standart çözeltisi-2'nin ardışık enjeksiyonlarından elde edilen Favipiravir pik alanlarının ortalamaları arasındaki uyum % 98.0 - % 102.0 aralığında olmalıdır. Standart çözeltisi-1 enjeksiyonlarından elde edilen kromatogramlardaki Favipiravir pikine ait kuyruklanma faktörü 2.0'dan fazla; teorik plaka sayısı 2000'den az olmamalıdır. Ayrıca standart çözeltisi-1'in ardışık enjeksiyonlarındaki Favipiravir pik alanları arasındaki bağıl standart sapma değeri % 2.0'dan büyük olmamalıdır.

Hazırlanan her bir seviyedeki (% LOQ, % 100, % 150) geri kazanım değeri, eklendiği bilinen Favipiravir etken madde miktarının % geri kazanımı olarak raporlanır. Her seviye için o seviyeye ait tekrarlı numunelerin (3 adet) tekrarlı enjeksiyonlarından (3 defa) elde edilen % geri kazanım sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve % 95 güven aralığı hesaplanarak raporlanır.

Yapılacak çalışma sonrasında Favipiravir için elde edilecek ortalama % geri kazanım değeri 90.0 – 110.0 aralığında olmalıdır.

3.3.7. Kesinlik

3.3.7.1. Tekrarlanabilirlik

Tanım: Tekrarlanabilirlik parametresi, aynı işlem koşulları altında ve kısa bir zaman aralığında, ortak bir prosedür ile birbirinden bağımsız hazırlanan analit içerikli çözeltilere ait sonuçların birbirleriyle olan uyumunun ölçüsüdür.

Kullanılan Çözeltiler

10 mM Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH₂PO₄) Tampon Çözeltisinin Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Hareketli Faz Çözeltisinin Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Seyreltme Çözeltisi Hazırlanışı: Hareketli faz çözeltisi, seyreltme çözeltisi olarak kullanıldı.

Standart Stok Çözeltisi-1 Hazırlanışı: 25 mg Favipiravir çalışma standardı tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Çözünme sağlandıktan sonra ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5$ mg/ml)

Standart Stok Çözeltisi-2 Hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisi-1'den 1 ml alınarak 10 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Balon joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.05$ mg/ml)

Standart Çözeltisinin Hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisi-2'den 1 ml alınarak 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005$ mg/ml)

Numune Çözeltisinin Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisinin Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Favipiravir + Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisinin Hazırlanışı: Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'e ait yardımcı madde karışımından (plasebo) 15.16 mg tartılarak 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine hazırlanan standart stok çözeltisi-2'den 1 ml ve seyreltme çözeltisinden 50 ml eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005$ mg/ml)

İşlem

2 adet standart çözeltisi hazırlandı. Standart çözeltisi-1'den 6, standart çözeltisi-2'den 2 ardışık enjeksiyon verildi. Her iki standart çözeltisinden elde edilen Favipiravir pik alanları arasında uyum olup olmadığı kontrol edildi. Uyumlu oldukları görüldükten sonra, 6 tekrarlı enjeksiyon verilen standart çözeltisine (standart çözeltisi-1) ait Favipiravir pik alanları arasındaki % RSD, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı değerlendirildi. Bu parametreler için gerekli sistem uygunluk kabul kriterleri de sağlandığından, yapılan enjeksiyonlardan elde edilen kromatogramlar değerlendirilerek

safsızlık değerlendirmesi ve geri kazanım hesabı yapıldı. Yöntem validasyonu **kesinlik – tekrarlanabilirlik** çalışmasından elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.7.1’de verilmiştir.

Kabul Kriterleri

Standart çözeltisi-1 ve standart çözeltisi-2’nin ardışık enjeksiyonlarından elde edilen Favipiravir pik alanlarının ortalamaları arasındaki uyum % 98.0 - % 102.0 aralığında olmalıdır. Standart çözeltisi-1 enjeksiyonlarından elde edilen kromatogramlardaki Favipiravir pikine ait kuyruklanma faktörü 2.0’dan fazla; teorik plaka sayısı 2000’den az olmamalıdır. Ayrıca standart çözeltisi-1’in ardışık enjeksiyonlarındaki Favipiravir pik alanları arasındaki bağıl standart sapma değeri % 2.0’dan büyük olmamalıdır.

Birbirinden bağımsız hazırlanan 6 adet Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltisi üzerinden yapılan değerlendirme sonunda; her bir Favipiravir % geri kazanım değeri 90.0 – 110.0 aralığında olmalı; bu sonuçların standart sapması, bağıl standart sapması ve % 95 güven aralığı hesaplanarak raporlanmalıdır. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltilerinden elde edilen Favipiravir % geri kazanım sonuçları arasındaki RSD % 10.0’den küçük olmalıdır.

Birbirinden bağımsız hazırlanan 6 adet numune çözeltisi üzerinden yapılan değerlendirme sonunda; % safsızlık sonuçları raporlama limitinin (% 0.05) üzerinde ise, sonuçlar arasındaki standart sapma, bağıl standart sapma ve % 95 güven aralığı raporlanmalıdır; raporlama limitinin üzerinde elde edilen safsızlık sonuçları arasındaki RSD % 10.0’den küçük olmalıdır. Safsızlık sonuçları raporlama limitinin altında kalıyorsa, standart sapma, % RSD ve % 95 güven aralığı hesaplanmamalıdır.

3.3.7.2. Ara Kesinlik

Tanım: Ara kesinlik parametresi, aynı laboratuvarlarda rastgele değişimlerin (gün, ekipman, analist) analitik yönetime etkisi olarak ifade edilir.

Kullanılan Çözeltiler ve İşlem

Ara Kesinlik çalışması sırasında tüm çözeltiler, 3.3.7.1 Tekrarlanabilirlik çalışmasında anlatıldığı şekilde farklı bir analist tarafından farklı bir günde hazırlandı ve yine bu çalışmada yapılan işlem sırası aynı şekilde uygulandı. Yöntem validasyonu **kesinlik – ara kesinlik** çalışmasından elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.7.2’de verilmiştir.

Kabul Kriterleri

Bölüm 3.3.7.1. de anlatılmıştır.

Bu çalışma ve 3.3.7.1 Tekrarlanabilirlik çalışması ile hazırlanan Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltilerinden elde edilen Favipiravir % geri kazanım sonuçları arasındaki RSD % 10.0'dan küçük olmalıdır. Her iki çalışmanın Favipiravir % geri kazanım sonuçları arasındaki uyum, istatistiksel testler (F-test ve t-test) ile gösterilmelidir.

Eğer raporlama limitinin üzerinde sonuçlar elde ediliyorsa, bu çalışma ve 3.3.7.1 Tekrarlanabilirlik çalışması ile hazırlanan numune çözeltilerinden elde edilen safsızlık sonuçları arasındaki RSD % 10.0'dan küçük olmalıdır; her iki çalışmanın safsızlık sonuçları arasındaki uyum, istatistiksel testler (f-test ve t-test) ile gösterilmelidir. Safsızlık sonuçları raporlama limitinin altında kalıyorsa standart sapma, % RSD ve % 95 güven aralığı hesaplanmamalı ve istatistiksel testler yapılmamalıdır.

3.3.8. Sağlamlık

Tanım: Analitik bir yöntemin sağlamlığı, metot parametrelerinde yapılan kasıtlı ve küçük değişiklikler ile normal kullanımda yöntemin güvenilirliğinin ölçütünü belirlemeyi amaçlayan ve yöntemin kapasitesini ölçen bir çalışmadır.

Bu yöntem için yapılan sağlamlık çalışmalarında yöntemin akış hızı, kolon sıcaklığı ve dalga boyu parametrelerinde yapılacak ufak değişikliklere ve ayrıca farklı seri numaralı kolonlar kullanılması durumuna karşı dayanıklılığı incelenmiştir.

Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltisi Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Numune Çözeltisi Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

İşlem

1'er adet standart çözeltisi ve numune çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerin her ikisinden de yöntemin normal kullanım analiz koşulları ile Tablo 3-4'te verilen değiştirilmiş koşulların her biri için 3'er enjeksiyon yapıldı. Ayrıca Tablo 3-5'te bilgileri verilen kolonlar kullanılarak farklı seri numaralı kolonlar kullanıldığında karşılaşılabilecek değişimler incelendi. Yöntem validasyonu **sağlamlık çalışması**

sırasında akış hızı, kolon sıcaklığı, dalga boyu ve kolon değişimlerinden elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.8’de verilmiştir.

Tablo 3-4. Sağlamlık çalışmasında değiştirilen yöntem parametreleri

Parametre	Normal Koşul	Alt Değer	Üst Değer
Akış Hızı	0.5 ml/dakika	0.45 ml/dakika	0.55 ml/dakika
Kolon Sıcaklığı	30 °C	28 °C	32 °C
Dalga Boyu	222 nm	215 nm	230 nm
Farklı Kolon*			

* Farklı kolon bilgileri Tablo 3-5’te verilmiştir.

Tablo 3-5. Sağlamlık çalışmasında ve yöntem validasyonu boyunca kullanılan kolon bilgileri

Yöntem Validasyonu Boyunca Kullanılan Kolon Bilgileri				
Kolon Adı	Kaynak	Seri No	Parti No	Boyut&Özellikler
Kinetex® EVO C18	Phenomenex®	H20-113547	00G-4633-E0	250 x 4.6 mm, 5 µm, 100Å
Sağlamlık Çalışmasında Kullanılan Farklı Kolon Bilgileri				
Kolon Adı	Kaynak	Seri No	Parti No	Boyut&Özellikler
Kinetex® EVO C18	Phenomenex®	H19-377918	00G-4633-E0	250 x 4.6 mm, 5 µm, 100Å

Kabul Kriterleri

Değiştirilen her bir parametrede standart çözeltisi enjeksiyonlarından elde edilen kromatogramlardaki Favipiravir pikine ait kuyruklanma faktörü 2.0’den fazla; teorik plaka sayısı 2000’den az olmamalıdır. Standart çözeltisinin ardışık enjeksiyonlarındaki Favipiravir pik alanları arasındaki bağıl standart sapma değeri % 2.0’dan büyük olmamalıdır. Her bir parametrede standart ve numune çözeltisi için değişiklik öncesinde ve sonrasında elde edilen Favipiravir pik alanları arasındaki % değişim 5.0’dan fazla olmamalıdır. Ayrıca, enjeksiyon verilen numune çözeltilerinin safsızlık sonuçları da kontrol edilmeli, var olabilecek artışlar ile limit dışı durumlar değerlendirilmelidir. Elde edilen bilinmeyen ve toplam safsızlık sonuçları raporlama limitinin altında kalıyorsa bunlar için % değişim hesabı yapılmasına gerek yoktur.

3.3.9. Çözelti Stabilitesi

Tanım: Çözelti stabilitesi, analitik yöntemde hazırlanan standart ve test çözeltilerinin stabil olduğu koşullar ve sürenin belirlendiği çalışmadır.

Kullanılan Çözeltiler

Standart Çözeltisi Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2’de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Numune Çözeltisi Hazırlanışı: Bölüm 3.1.2’de anlatıldığı gibi hazırlandı.

İşlem

1’er adet hazırlanan standart ve numune çözeltileri ikiye bölünerek HPLC koşullarında ve buzdolabı sıcaklığında (2-8°C) saklandı. HPLC koşullarındaki çözeltilerden Başlangıç, 6., 21., 27. ve 45. saatlerde; buzdolabı sıcaklığında (2-8°C) tutulan çözeltilerden ise Başlangıç, 4., 19., 27. ve 45. saatlerde 3’er enjeksiyon verildi. Yöntem validasyonu **çözelti stabilitesi** çalışmasından elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.9’da verilmiştir.

Kabul Kriterleri

HPLC koşullarında ve buzdolabı koşullarında (2–8°C) bekletilen standart ve numune çözeltilerinden belirtilen saatlerde enjeksiyon verildiğinde, her iki çözeltide de Favipiravir pik alanlarının başlangıçtaki ve ilgili saate ait değerleri arasındaki % değişim 5.0’dan fazla olmamalıdır. Ayrıca, enjeksiyon verilen numune çözeltilerinin safsızlık sonuçları da kontrol edilmeli, var olabilecek artışlar ile limit dışı durumlar değerlendirilmeli, bu sayede numune çözeltilerinin safsızlık sonuçları (%) açısından stabil kaldığı süre saptanmalıdır.

3.4. Tabletlerde Favipiravir Analizi

3.4.1. Tablet Analizi İçin Numune ve Standart Çözeltilerinin Hazırlanışı

Standart Stok Çözeltilisinin Hazırlanışı: 25 mg Favipiravir çalışma standardı tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarılır. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletilir. Çözünme sağlandıktan sonra ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslenir. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$)

Standart Çözeltilisinin Hazırlanışı: Hazırlanan standart stok çözeltisinden 1 ml alınarak 10 ml'lik balon jojeye aktarılır ve jojenin hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanarak 1 dakika boyunca vortekslenmesi sağlanır. Enjeksiyon verilmeden önce çözelti Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallenir. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.05 \text{ mg/ml}$)

Numune Çözeltilisinin Hazırlanışı: 3 adet Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet havanda ezilerek toz haline getirilir. Hazırlanan bu tozdan 25 mg Favipiravir'e eşdeğer miktar (32.58 mg) tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarılır. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletilir. Bu süre sonunda ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslenir. Hazırlanan bu çözeltiden 1 ml alınarak 10 ml'lik balon jojeye aktarılır ve joje hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslenir. Enjeksiyon verilmeden önce Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtreden süzülerek viallenir. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.05 \text{ mg/ml}$)

3.4.2. Geliştirilen Yöntem İle Tabletlerde Favipiravir Analizi

2 adet standart çözeltisi ve birbirinden bağımsız olarak 6 adet numune çözeltisi hazırlanıp bu çözeltiler HPLC sisteminde enjeksiyon verildi. Tabletlerdeki Favipiravir miktarı, konsantrasyonu bilinen standart çözeltisi enjeksiyonlarına göre değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.1' de verilmiştir.

3.5. Bozundurma ve Stres Çalışmaları

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet farmasötik formu ile gerçekleştirilen bozundurma ve stres çalışmaları kapsamında bu ürün/ürüne;

- 0.1 N NaOH, 0.1 N HCl, %3 H₂O₂ ile 4'er saat boyunca 60 °C sıcaklıkta muamele edilmiştir,
- Atlas Sunset CPS (II) fotostabilite kabininde (500 W/m²) petri kabı içerisine konularak 7 gün boyunca bekletilmiştir,
- 70°C ± 2°C, %100 RN ± %5 RN koşuluna ayarlanan etüvde bu sıcaklığa 7 gün boyunca maruz bırakılmıştır,
- Distile su içerisinde 8 saat boyunca bekletilmiştir.

Ek olarak, yapılan bozundurma ve stres çalışmalarının karşılaştırılabilmesi için;

- Herhangi bir muamele yapılmayan referans numune çözeltisi ve referans yardımcı madde (plasebo) çözeltisi hazırlanmıştır,
- Tüm koşullar için aynı koşullara maruz bırakılmış yardımcı madde karışımlarından kullanılarak yardımcı madde (plasebo) çözeltileri hazırlanmıştır,
- Alkali, asidik, oksidatif bozundurma ve nem etkisi çalışmaları için bu koşullara maruz bırakılmış boş çözeltiler hazırlanmıştır.

Aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanan çözeltiler Diode Array Dedektör (DAD) ile analiz süresi 45 dakika yapılarak analiz edilmiştir. Bozundurma çalışmalarından elde edilen sonuçlar Bölüm 4.4'te verilmiştir.

Kullanılan Çözeltiler

0.1 N NaOH Çözeltisinin Hazırlanışı: NaOH pelletlerinden 4 gram tartılarak içerisinde bir miktar distile su bulunan 1000 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Pelletlerin gözle görülür şekilde çözünmesi sağlandıktan sonra balon joje hacmine distile su ile tamamlandı. Elde edilen çözeltinin 10 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılması sağlandı.

0.1 N HCl Çözeltisinin Hazırlanışı: 8.3 ml derişik HCl (%37'lik ve 1.2 g/ml yoğunluğa sahip) çözeltisi içerisinde bir miktar distile su bulunan 1000 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Ardından balon joje hacmine distile su ile tamamlandı. Elde edilen

çözeltinin 10 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılması sağlandı.

%3 H₂O₂ Çözeltisinin Hazırlanışı: Konsantre (%30'luk) H₂O₂ çözeltisinden 10 ml alınarak içerisinde bir miktar distile su bulunan 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Ardından balon joje hacmine distile su ile tamamlandı. Elde edilen çözeltinin 10 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılması sağlandı.

3.5.1. Alkali Bozundurma

Numune Çözeltisi ile Alkali Bozundurma Çalışması: 5 adet Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'in ezilmesiyle elde edilen tozdan 25 mg Favipiravir'e eşdeğer miktar (32.58 mg) tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 5 ml 0.1 N NaOH çözeltisi eklendi ve 4 saat boyunca 60 °C sıcaklıkta muamele edildi. Süre tamamlandıktan sonra, balon jojeye 5 ml 0.1 N HCl çözeltisi ilave edildi ve balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi ile Alkali Bozundurma Çalışması: Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'e ait yardımcı madde karışımından (plasebo) 7.58 mg tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 5 ml 0.1 N NaOH çözeltisi eklendi ve 4 saat boyunca 60 °C sıcaklıkta muamele edildi. Süre tamamlandıktan sonra, balon jojeye 5 ml 0.1 N HCl çözeltisi ilave edildi ve balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

Alkali Bozundurma Çalışması Boş Çözelti: 5 ml 0.1 N NaOH çözeltisi 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Bu çözelti 4 saat boyunca 60 °C sıcaklıkta bekletildi. Süre tamamlandıktan sonra, balon jojeye 5 ml 0.1 N HCl çözeltisi ilave edildi ve balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

3.5.2. Asidik Bozundurma

Numune Çözeltisi ile Asidik Bozundurma Çalışması: 5 adet Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'in ezilmesiyle elde edilen tozdan 25 mg Favipiravir'e eşdeğer miktar (32.58 mg) tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 5 ml 0.1 N HCl çözeltisi eklendi ve 4 saat boyunca 60 °C sıcaklıkta muamele edildi. Süre tamamlandıktan sonra, balon jojeye 5 ml 0.1 N NaOH çözeltisi ilave edildi ve balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi ile Asidik Bozundurma Çalışması:

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'e ait yardımcı madde karışımından (plasebo) 7.58 mg tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 5 ml 0.1 N HCl çözeltisi eklendi ve 4 saat boyunca 60 °C sıcaklıkta muamele edildi. Süre tamamlandıktan sonra, balon jojeye 5 ml 0.1 N NaOH çözeltisi ilave edildi ve balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

Asidik Bozundurma Çalışması Boş Çözelti: 5 ml 0.1 N HCl çözeltisi 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Bu çözelti 4 saat boyunca 60 °C sıcaklıkta bekletildi. Süre tamamlandıktan sonra, balon jojeye 5 ml 0.1 N NaOH çözeltisi ilave edildi ve balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

3.5.3. Oksidatif Bozundurma

Numune Çözeltisi ile Oksidatif Bozundurma Çalışması: 5 adet Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'in ezilmesiyle elde edilen tozdan 25 mg Favipiravir'e eşdeğer miktar (32.58 mg) tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 2 ml %3 H₂O₂ çözeltisi eklendi ve 4 saat boyunca 60 °C sıcaklıkta muamele edildi. Süre tamamlandıktan sonra, balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi ile Oksidatif Bozundurma Çalışması: Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'e ait yardımcı madde karışımından (plasebo) 7.58 mg tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 2 ml %3 H₂O₂ çözeltisi eklendi ve 4 saat boyunca 60 °C sıcaklıkta muamele edildi. Süre tamamlandıktan sonra, balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

Oksidatif Bozundurma Çalışması Boş Çözelti: 2 ml %3 H₂O₂ çözeltisi 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Bu çözelti 4 saat boyunca 60 °C sıcaklıkta bekletildi. Süre tamamlandıktan sonra, balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

3.5.4. Sıcaklık Etkisi

Numune Çözeltisi ile Sıcaklık Etkisi Çalışması: 70°C ± 2°C, %100 RN ± %5 RN sıcaklığa ayarlanan etüv içerisinde bu koşula 7 gün boyunca maruz bırakılan 5 adet

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'in ezilmesiyle elde edilen tozdan 25 mg Favipiravir'e eşdeğer miktar (32.58 mg) tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi ile Sıcaklık Etkisi Çalışması: $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$ sıcaklığa ayarlanan etüv içerisinde bu sıcaklığa 7 gün boyunca maruz bırakılan Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'e ait yardımcı madde karışımından (plasebo) 7.58 mg tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

3.5.5. Nem Etkisi

Numune Çözeltisi ile Nem Etkisi Çalışması: 5 adet Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'in ezilmesiyle elde edilen tozdan 25 mg Favipiravir'e eşdeğer miktar (32.58 mg) tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 5 ml distile su eklenerek 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildi. Ardından balon joje 8 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Süre tamamlandıktan sonra, balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi ile Nem Etkisi Çalışması: Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'e ait yardımcı madde karışımından (plasebo) 7.58 mg tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 5 ml distile su eklenerek 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildi. Ardından balon joje 8 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Süre tamamlandıktan sonra, balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

Nem Etkisi Çalışması Boş Çözelti: 5 ml distile su 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Balon joje 8 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Süre tamamlandıktan sonra, balon joje hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

3.5.6. Fotodegradasyon

Numune Çözeltisi ile Fotodegradasyon Çalışması: Atlas Sunset CPS (II) (500 W/m²) fotostabilite kabini içerisinde petri kabında 7 gün boyunca bekletilen 5 adet Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'in ezilmesiyle elde edilen tozdan 25 mg Favipiravir'e eşdeğer miktar (32.58 mg) tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi ile Fotodegradasyon Çalışması: Atlas Sunset CPS (II) (500 W/m²) fotostabilite kabini içerisinde petri kabında 7 gün boyunca bekletilen Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'e ait yardımcı madde karışımından (plasebo) 7.58 mg tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

Referans Çözeltiler

Referans Numune Çözeltisi: 3 adet Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet havanda ezilerek toz haline getirildi. Hazırlanan bu tozdan 25 mg Favipiravir'e eşdeğer miktar (32.58 mg) tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi. ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$)

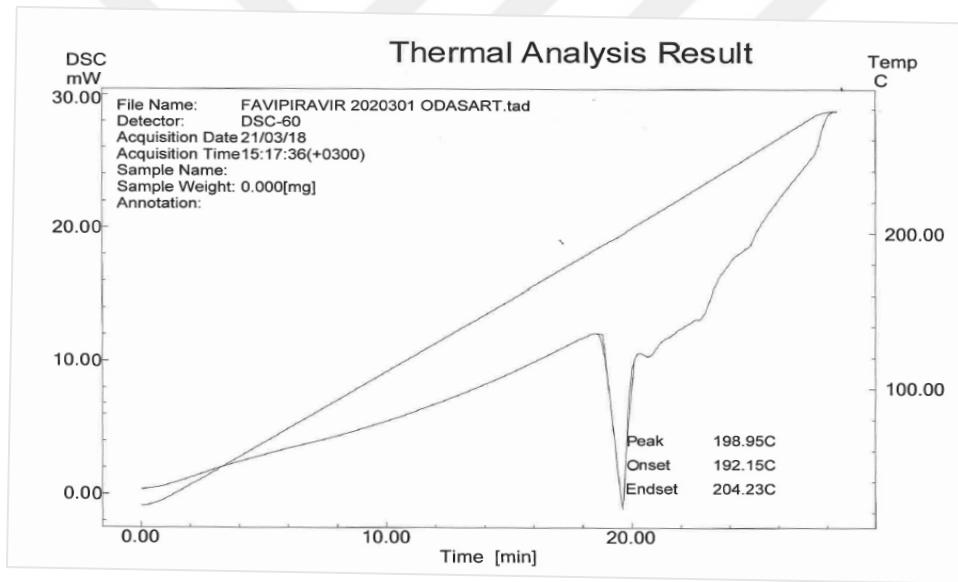
Referans Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi: Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'e ait yardımcı madde karışımından (plasebo) 7.58 mg tartılarak 50 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 25 ml seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda ultrasonik banyodan alınan balon joje oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra hacmine seyreltme çözeltisiyle tamamlanıp 1 dakika boyunca vortekslendi.

4. BULGULAR

Bu bölümde sırasıyla analitik yöntemin geliştirilmesi, geçerli kılınması ve bu yöntemle yapılan bozundurma çalışmalarından elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

4.1. Analitik Yöntemin Geliştirilmesi Sürecinde Elde Edilen Bulgular

Favipiravir erime noktası aralığı literatürde 187 °C - 193 °C olarak verilmiştir. (Drugbank, 2021; Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2014). DSC cihazı (Shimadzu, Model: DSC-60) ile elde edilen Şekil 4-1'deki Zamana karşı Sıcaklık-Isı Akışı grafiğinde görüldüğü gibi Favipiravir erime noktası aralığı 198.95 °C (192.15 °C – 204.23 °C) olarak ölçülmüştür.

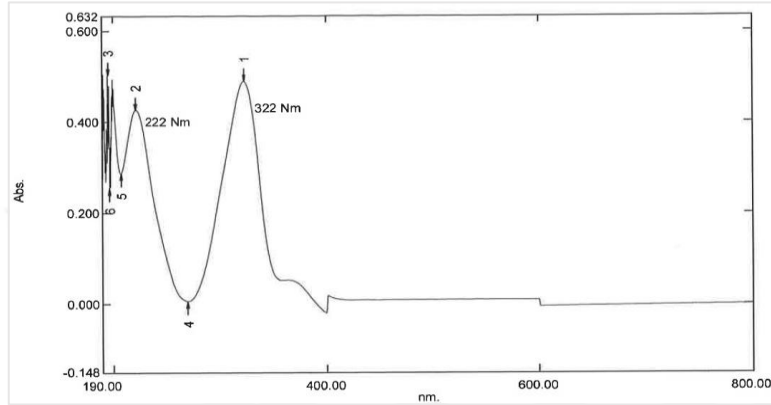


Şekil 4-1. Favipiravir diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ölçümü sıcaklık-ısı akışı grafiği

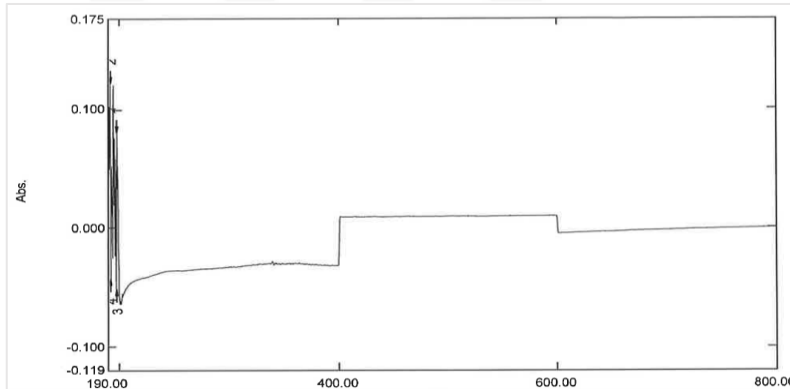
Yöntemin geliştirilmesi sürecinde Favipiravir ve safsızlıklarının analizini gerçekleştirmek için dedektör dalga boyu, kolon, hareketli faz, çözücü, analiz süresi, filtre seçimi gibi parametrelerin belirlenmesi sırasında elde edilen sonuçlar aşağıda ayrıntılarıyla verilmiştir.

4.1.1. Dalga Boyu Seçimi

Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi Favipiravir molekülüne ait λ_{maks} değerlerinin belirlenebilmesi için metanol ile hazırlanan Favipiravir çözeltisinin ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.01$ mg/ml, *Metanol*) ve çözücünün (*Metanol*, *boş çözelti*) UV-Görünür alan spektrumları sonucunda Şekil 4-2, Şekil 4-3’te görülmektedir.



Şekil 4-2. Favipiravir molekülüne ait UV spektrumu ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.01$ mg/ml; *Metanol*)



Şekil 4-3. Metanol çözücüsüne (boş çözelti) ait UV spektrumu

Tablo 4-1. Favipiravir UV spektrumundan elde edilen dalga boylarına karşılık maksimum absorbans değerleri

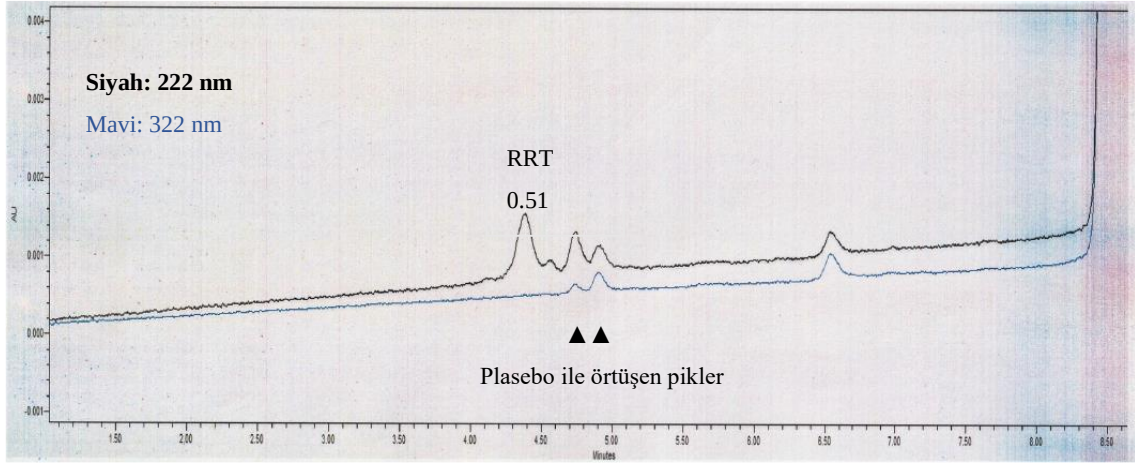
UV Spektrofotometre Çalışması	
Dalga Boyu (nm)	Absorbans
222	0.426
322	0.488

Favipiravir çözeltisinin UV-Görünür alan spektrumunda Tablo 4-1’de verilen dalga boylarına karşılık Favipiravir maksimum absorbans sonuçları elde edilmiştir. Bu dalga boyları sırasıyla 222 nm ve 322 nm’dir.

Waters marka HPLC cihazı (PDA Dedektör) kullanılarak yöntemin geliştirme sürecinde belirlenen nihai konsantrasyonda; Bölüm 3.1.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanan Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (odaşartı) numune çözeltisi ile yapılmış enjeksiyon sonucunda, 222 nm’ye ait kromatogramda 322 nm’ye ait kromatograma göre fazladan bir safsızlık piki – **RRT 0.51** görünmekte ve bu pik yardımcı madde karışımı (plasebo) ile örtüşmemektedir. 322 nm’ye ait kromatogramda var olan tüm safsızlık pikleri ise 222 nm’ye ait kromatogramda mevcut olup, bu safsızlıklara ait % sonuç değerleri dalga boyu farkından etkilenmemekte ve değişiklik göstermemektedir. RRT 0.51 safsızlığı, Bölüm 3.5’te anlatıldığı gibi gerçekleştirilen bozundurma çalışmalarından asidik ve oksidatif koşullar sonucunda major safsızlık olarak dedekte edilmiştir. Ayrıca, iki dalga boyuna ait Favipiravir pik alanları arasındaki % uyum, %98.0 - %102.0 aralığında tespit edilmiştir. Tüm bunlar değerlendirildiğinde, RRT 0.51 safsızlığının takibinin sağlanabilmesi için Favipiravir’in maksimum absorbans verdiği dalga boylarından biri olan 222 nm, Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet ürününün çalışılacağı spesifik dalga boyu olarak belirlenmiştir. Çalışma ile ilgili karşılaştırmalı kromatogramlar ve sayısal sonuçlar Şekil 4-4 ve Tablo 4-2’de verilmiştir.

Tablo 4-2. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (Odaşartı) Numune Çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$) sonuçları için 222 & 322 nm karşılaştırması

Pik Alanları ve % Uyumu & Alıkonma Zamanı				
	Alıkonma Zamanı (dakika)	222 nm	322 nm	Pik Alanları Arasındaki % Uyum
Favipiravir	8.7	22048880	22454160	98.2
Safsızlıkların % Sonuçları				
		222 nm		322 nm
RRT 0.51		0.020		-
RRT 0.76		0.008		0.008
RRT 1.11		0.002		0.002
RRT 1.18		0.004		0.002
RRT 1.99		0.003		0.002



Şekil 4-4. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi (Odaşartı) ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$) – 222 ve 322 nm’ye ait karşılaştırmalı kromatogram

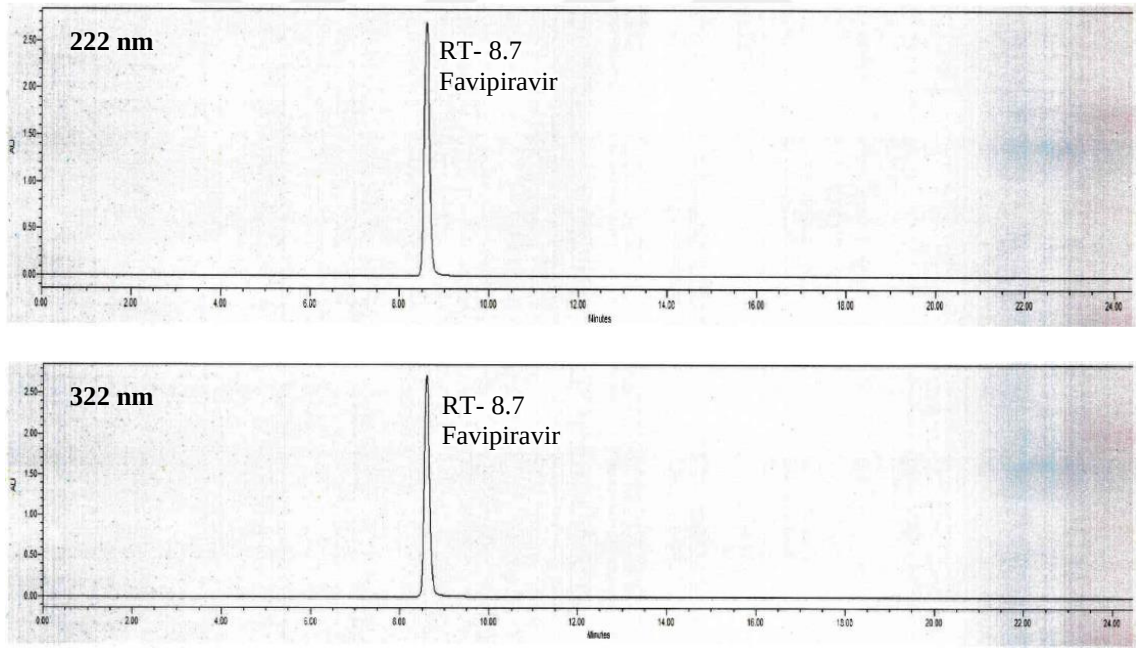
4.1.2. Kolon seçimi

Favipiravirin molekül yapısı ve pKa değeri göz önüne alındığında Favipiravir’in polar ve bazik karakterde olduğu söylenebilir. pKa değerinin 5.1 olması fonksiyonel grubu amid olan Favipiravir molekülünün sahip olduğu hidroksil grubu sebebiyledir (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2014); çünkü bu grup intramoleküler Hidrojen bağı oluşumunu sağlamaktadır. Bu özelliklere sahip olması sebebiyle, kromatografik ayırma denemeleri üzere C8 ve C18 kolonların kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca, kullanılacak kolonun dayanıklılık gösterebileceği pH aralığı bilgisinin önemi düşünüldüğünde, bu aralık hem Favipiravir_{pKa} ± 2 sınırlarının karşılık geleceği pH değerlerini kapsamalı hem de pH değişimlerinden kaynaklanabilecek dolgu malzemesinin çözünmesi ihtimalini ortadan kaldıracak genişlikte olmalıdır. Bu sebeple, denemeler için tercih edilen C8 ve C18 kolonlara ait pH aralıklarının geniş olmasına dikkat edilmiştir. Deneme çalışmalarının yapıldığı C8 ve C18 kolonların özellikleri Tablo 4-3’te görülmektedir.

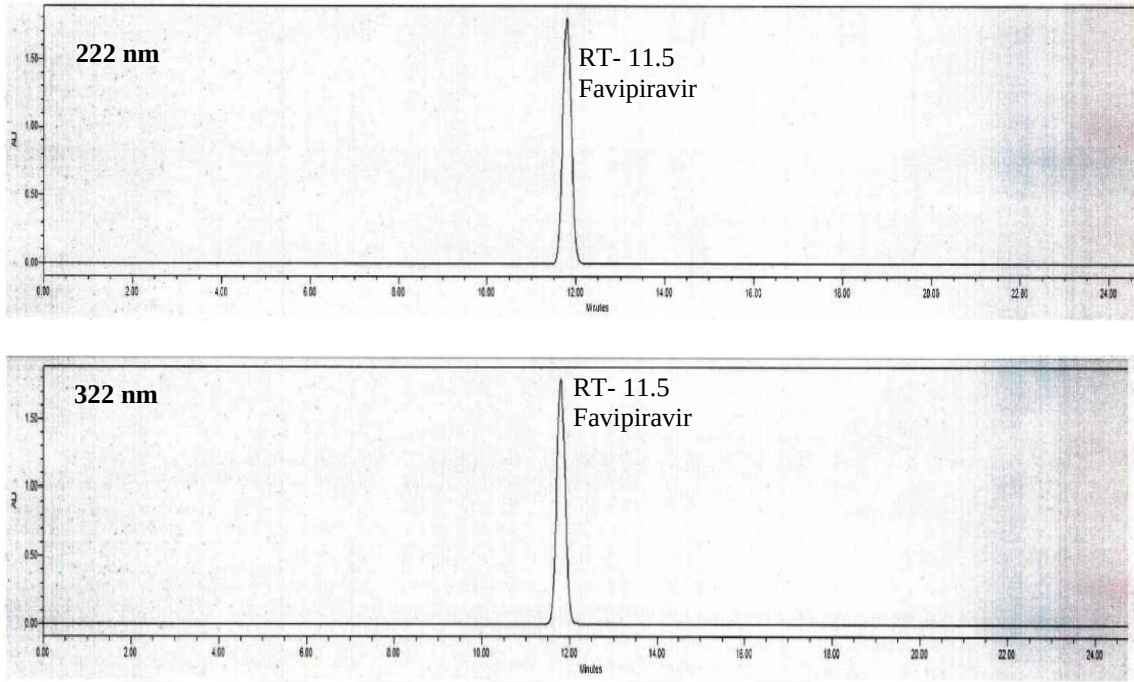
Tablo 4-3. Kolon seçimi çalışmasında denenen kolonların özellikleri (Waters Corporation, 2016; Phenomenex Inc., 2016)

Kolon Türü	Uzunluk & İç Çap (mm)	Partikül Büyüklüğü (µm)	Karbon Yüğü (%)	Por Büyüklüğü (Å)	pH Aralığı
Kinetex® EVO C18	250 x 4.6	5	11	100	1-12
XBridge® C8	250 x 4.6	5	13	130	1-12

Waters marka HPLC cihazı (PDA Dedektör) kullanılarak, Bölüm 3.1.1'deki analitik yöntem şartları ve Bölüm 3.1.2'de verilen çözelti hazırlama prosedürleri ile gerçekleştirilen kolon deneme çalışmaları sonucunda, **Kinetex® EVO C18 100Å 250 x 4.6 mm, 5 µm** kolonunun bu analitik yöntemde ayrımı sağlayacak sabit faz olarak seçilmesine karar verilmiştir. Yapılan deneme enjeksiyonlarında görülmüştür ki, her iki kolon ile yapılan çalışmalarda her iki dalga boyunda da Favipiravir piki saftır, kromatogramlardaki safsızlık pikleri için ayırım sağlanmıştır ve safsızlık % sonuç değerleri farklılık göstermemektedir. Ancak denenen C18 kolon, pik keskinliği ve Favipiravir alıkonma zamanını daha öne çekerek enjeksiyon süresinin kısalmasına katkı sağlaması gerekçesi ile, C8 kolona üstünlük sağlamıştır. Farklı kolonlar ile yapılan Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (Odaşartı) Numune Çözeltisi enjeksiyonlarına ait kromatogramlar Şekil 4-5 ve Şekil 4-6'da; bu enjeksiyonlara ait sayısal sonuçlar Tablo 4-4'te görülmektedir.



Şekil 4-5. Kinetex® EVO C18 kolon ile yapılan numune çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$) enjeksiyonuna ait kromatogramlar (222 nm & 322 nm)



Şekil 4-6. *XBridge*[®] C8 kolon ile yapılan numune çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$) enjeksiyonuna ait kromatogramlar (222 nm & 322 nm)

Tablo 4-4. *Kinetex*[®] EVO C18 ve *XBridge*[®] C8 kolonlar ile yapılan numune çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$) enjeksiyonlarından elde edilen sayısal sonuçlar

Favipiravir Pik Saflığı					
	<i>Kinetex</i> [®] <i>EVO</i> <i>C18</i>		<i>XBridge</i> [®] <i>C8</i>		Pik Saflığı İçin Kabul Kriteri*
	222 nm	322 nm	222 nm	322 nm	
Saflık Açısı	0.123	0.128	0.210	0.250	
Saflık Eşik Değeri	0.234	0.248	0.320	0.411	Saflık Açısı, Saflık Eşik Değerinden küçük olmalıdır.
% Safsızlık Sonuçları					
	222 nm		322 nm		
	<i>Kinetex</i> [®] <i>EVO</i> <i>C18</i>	<i>XBridge</i> [®] <i>C8</i>	<i>Kinetex</i> [®] <i>EVO</i> <i>C18</i>	<i>XBridge</i> [®] <i>C8</i>	
RRT 0.51	0.020	0.019	-	-	
RRT 0.76	0.008	0.008	0.008	0.008	
RRT 1.11	0.002	0.002	0.002	0.002	
RRT 1.18	0.004	0.003	0.002	0.002	
RRT 1.99	0.003	0.003	0.002	0.002	

*Waters marka cihazlardaki Millennium32 yazılımı (double-index algorithm) ile sağlanan pik saflığı kriteridir.

Kinetex® EVO C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm, 100Å) kolon ile elde edilen sonuçlara bakıldığında enjeksiyon tekrarlanabilirliğinin sağlandığı, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı değerlerinin kabul kriterlerini karşıladığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-5'te görülmektedir.

Tablo 4-5. Kinetex® EVO C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm, 100Å) kolon ile yapılan enjeksiyonlardan elde edilen sistem uygunluk sonuçları

Standart Çözeltileri ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005 \text{ mg/ml}$) 222 nm			
	Kabul Kriterleri*	Deneysel Sonuç	Kabul Kriterine Uygunluk
Tekrarlanabilirlik (%RSD)	≤ 2.0	0.55	Uygundur
Kuyruklanma Faktörü	≤ 2.0	1.23	Uygundur
Teorik Plaka Sayısı	> 2000	16051	Uygundur

*Kabul Kriterleri: Amerikan Farmakopesi, <621> Chromatography (U.S. Pharmacopeia, 2017)

4.1.3. Hareketli Faz ve Çözücü Seçimi

Hareketli fazın belirlenmesi aşamasına, bu çözeltinin iki bileşeninden biri olan tampon çözeltisinin ne olması gerektiği düşünülmüş ve başlanmıştır. Bu bağlamda ilk olarak Tablo 4-6'dan (Agrahari, Bajpai, & Nanda, 2013; Snyder, Kirkland, & Glajch, 1998) yola çıkılarak, Favipiravir molekülü için geliştirilen bu analitik yöntemin spesifik olarak belirlenmiş dalga boyu olan 222 nm'ye yakın dalga boylarında vereceği absorbans bakımından oldukça düşük etkiye sahip fosfat tamponu (10 mM) ve fosforik asit (%0.1) çözeltisi ile çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmüştür. Ayrıca Tablo 4-7'den (Agrahari, Bajpai, & Nanda, 2013; LoBrutto & Kazakevich, 2007) görülebileceği gibi, fosfat tamponunun UV-cut off değeri 200'den küçüktür ve 3 farklı pKa değerine sahip olması ile 3 farklı pH aralığında etkin tamponlama özelliği gösterebilmektedir. % 0.1 Fosforik asit çözeltisi de 222 nm'de absorbans vermemektedir (Tablo 4-6) ve etkinlik gösterdiği pH değeri ise 2.0'dır (Dolan, 2011); Her iki çözeltinin de Favipiravir molekülünün noniyonize olacağı pH'larda etkin tamponlama özelliği gösterebilmeleri, denemek için ön planda tutulmaları gerektiği düşüncesini desteklemiştir.

İkinci aşama ise, ters faz tekniğine dayalı olan yöntemimizde hareketli fazın diğer bileşeni olarak kullanılabilecek organik solventin belirlenmesi olmuştur. Bu noktada, Tablo 4-6'dan görülebileceği üzere 222 nm'ye en yakın dalga boyu olan 220 nm'de ve tabloda verilen diğer dalga boylarında daha düşük absorbans veren asetonitril, metanol ve izopropanol değerlendirilmiştir. Bu çözeltilerden ilk olarak izopropanol elenmiştir; çünkü ters faz kromatografisi ile HPLC'de kullanıldığında yüksek viskozitesi ile asetonitril ve metanole göre yüksek geri basınç yaratacaktır. Geriye kalan organik solventlerden metanol ve asetonitril değerlendirilirken ise sahip oldukları UV-cut off değerlerine bakılmıştır. Asetonitril'e ait UV-cut off değeri (190 nm), metanole ait UV-cut off değerinden (205 nm) düşüktür (Snyder, Kirkland, & Glajch, 1998). Böylelikle, Tablo 4-6'daki gibi hem 220 nm'de hem de buna yakın dalga boylarında metanole göre çok daha düşük absorbans veren ve böylelikle girişim yaparak pik saflığına olumsuz etki yaratmayacak olan asetonitril, tampon çözeltinin yanında kullanılacak organik solvent olarak belirlenmiştir.

Tablo 4-6. 222 nm'ye yakın değerlerde bazı çözeltilerin verdiği absorbanslar (Agrahari, Bajpai, & Nanda, 2013; Snyder, Kirkland, & Glajch, 1998)

	215 nm	220 nm	230 nm
<i>Solventler</i>			
Asetonitril	0.01	0.01	<0.01
Metanol	0.37	0.24	0.11
İzopropanol	0.24	0.19	0.08
Tetrahidrofuran	1.8	1.54	0.94
<i>Asit ve Bazlar</i>			
Asetik Asit (% 1)	2.43	2.17	0.87
Hidroklorik Asit (6 mM), (% 0.02)	-	-	-
Fosforik Asit (% 0.1)	-	-	-
Trifloroasetik Asit (% 0.1, Distile Su)	0.34	0.20	0.06
Trifloroasetik Asit (% 0.1, ACN)	0.38	0.37	0.25
Dibazik Amonyum Fosfat (50 mM)	0.02	<0.01	-
Trietilamin (% 1)	2.45	2.37	1.96
<i>Tamponlar ve Tuzlar</i>			
Amonyum Asetat (10 mM)	0.29	0.15	0.02
Amonyum Bikarbonat (10 mM)	<0.01	-	-
Disodyum EDTA (1 mM)	0.04	0.03	0.03
Monobazik Potasyum Fosfat (10 mM)	0.01	<0.01	-
Dibazik Potasyum Fosfat (10 mM)	-	-	-

Tablo 4-7. Ters faz kromatografisinde kullanılan bazı tampon çözeltilerinin özellikleri (Agrahari, Bajpai, & Nanda, 2013; LoBrutto & Kazakevich, 2007)

Tampon Çözeltileri	pKa	Etkin Olduğu pH Aralığı	UV cut-off (nm)
Trifloroasetik Asit	0.5	1.5'e kadar	210
Fosfat	2.1	1.1-3.1	< 200
	7.2	6.2-8.2	
	12.3	11.3-13.3	
Formik Asit	3.8	2.8-4.8	210
Asetik Asit	4.8	3.8-5.8	210
Sitrat	3.1	2.1-4.1	230
	4.7	3.7-5.7	
	5.4	4.4-6.4	
Trisamino metan	8.1	7.1-9.1	205
Dietilamin	10.5	9.5-11.5	235
Trietilamin	10.8	9.8-11.8	200
Amonyum Hidroksit	9.3	8.3-11.3	200
Amonyum Bikarbonat	6.4	5.4-7.4	200
	10.3	9.3-11.3	

Kullanılacak tampon çözelti yukarıda anlatıldığı şekilde belirlendikten sonra, bu çözeltinin konsantrasyonunu belirleme aşamasına gelinmiştir. Günümüzde genel olarak tercih edilen tampon çözeltisi konsantrasyonu 10 – 20 mM'dır (Dong, 2006). Çoğu uygulamada hareketli fazdaki tampon konsantrasyonunun 5 - 10 mM olması da yeterli olabilmektedir (Dolan, 2011). Önerilen ya da tercih edilen bu konsantrasyon aralığının düşük olmasının nedeni, içeriğinde tuz olan tampon çözeltilerinin zamanla dedektör, pompa, kolon giriş ve çıkışları gibi analizin devamlılığını etkileyebilecek bölgelerde çökme yapabilme olasılığını düşük tutmaktır. Kullanılacak organik solvent ile birlikte çökme ihtimali daha da artmaktadır. Ayrıca, molaritenin artması pik simetrisini de olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Dolayısıyla, meydana gelebilecek tüm olumsuzluklardan kaçınmak için daha yüksek değerlere çıkmadan yöntemde kullanılacak tampon çözeltisinin konsantrasyonu için 10 mM belirlenmiş ve denemelere bu şekilde başlanmıştır. Ek olarak yine aynı sebepten, tamponun yanında hareketli fazın diğer bileşeni olarak kullanılacak organik solventin (asetonitril) oranı için toplam hacmin 1/10'u seçilmiş ve bu oran ile çalışmalara başlanmıştır. Öngörülüp ilerlemeye karar verilen bu organik solvent miktarı, yöntemin geliştirilmesinin ilerleyen aşamalarında farklı oranlar denenerek de en uygun oran olarak kesinleştirilmiştir. Hareketli fazı

oluşturan bileşenlerin nihai oranları için yapılan ek çalışmalar bu bölümün son kısmında anlatılmıştır.

Kullanılacak tampon çözeltisinin (10 mM KH_2PO_4) pH'sının belirlenmesi kapsamında iki ana nokta vardır. Bunlardan ilki, bir tamponun en verimli çalışacağı pH aralığı olarak o tamponun sahip olduğu pKa değerinin ± 1 aralığındaki değerlerde çalışmaktır (Dolan, 2011). Tablo 4-7'de belirtildiği gibi Fosfat tamponu 3 ayrı pKa değerine sahiptir (2.1, 7.2 ve 12.3); bu da demektir ki, bahsedilen tampon çözeltisinin etkili olduğu pH aralıkları 1.1-3.1, 6.2-8.2, 11.3-13.3'tür ve bu aralıklar onun tamponlama özelliği gösterdiği pH değerlerini yansıtmaktadır (Agrahari, Bajpai, & Nanda, 2013; LoBrutto & Kazakevich, 2007). İkincisi ise, çalışılacak molekülün pKa değerini bilmek ve bu değer ± 2 aralığından belirlenecek pH'ın hareketli faz tamponunun etkin olduğu pH aralığında kalmasına dikkat etmektir. Bu bağlamda, asidik moleküllerin pKa değerinin en azından 2 birim altında; bazik moleküller için en azından 2 birim üstünde bir pH belirlemek önemlidir (Dolan, 2011). Molekül yapısı ve pKa değeri (5.1) ile polar yapıda olduğu görülen Favipiravir'in daha az polarite göstereceği (noniyonize), kendi pKa değerinden düşük pH'larda çalışılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Polar bir molekül için daha düşük pH değerlerinde çalışmak ters faz kromatografisinde kolon içerisinde iyi tutunma yani verimli bir analiz anlamına gelecektir. Aksi düşünüldüğünde kolonda tutunma istenen düzeyde sağlanamayacağından, polar bir molekül için ters faz kromatografisi elverişli bir ayırma tekniği olarak kullanılamayacaktır. Dolayısıyla, hem Favipiravir molekülünün noniyonize olacağı hem de kullanılacak fosfat tamponunun etkili olduğu pH aralıklarından biri içerisinde kalan (1.1 – 3.1) pH 3.0 değerinin hareketli fazın bileşenlerinden biri olan tampon çözeltisinin nihai pH'ı olarak belirlenmesine ve bu şekilde ilerlenilmesine karar verilmiştir.

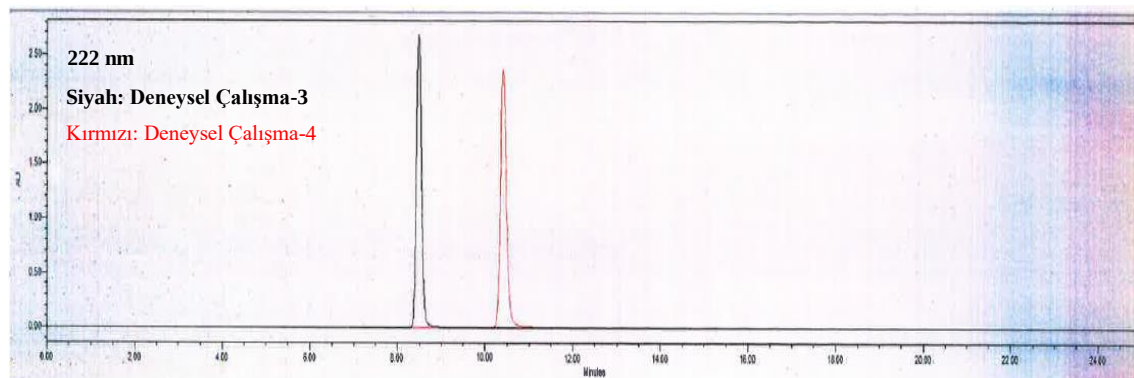
Düşük pH'ya sahip hareketli faz çözeltisinin gerektiği ters faz sıvı kromatografi uygulamalarında pH 2'deki iyi tamponlama özelliği ve 222 nm'de Favipiravir pikine girişim yaratmayacak olması sayesinde bu bölümün en başında deneneceği söylenen çözeltilerden biri olan % 0.1 Fosforik asit çözeltisi için de deneme çalışmaları yapılmıştır. Denemelerde, 3.2.2 Kolon Seçimi bölümünde karar verilen kolon ile, Bölüm 3.1.1 & 3.1.2'de verilen analitik yöntem şartları ve çözelti hazırlama prosedürleri sabit tutularak, farklı hareketli faz ve farklı çözücüler kullanılmıştır. Waters marka HPLC cihazı kullanılarak yapılan bu çalışmalar ve varılan sonuçlar aşağıda anlatılmaktadır.

Tablo 4-8. Hareketli faz ve çözücünün nihaileştirilmesi için yapılan deneysel çalışmalar

Deneysel Çalışmalar*		Çözücü		
		90:10 (h/h) (10 mM KH ₂ PO ₄ pH=3.0:ACN)	90:10 (h/h) (Distile Su:ACN)	90:10 (h/h) (%0.1 Fosforik Asit:ACN)
Hareketli Faz	90:10 (h/h) (10 mM KH ₂ PO ₄ pH=3.0:ACN)	Deneysel Çalışma-1	Deneysel Çalışma-2	-
	90:10 (h/h) (%0.1 Fosforik Asit:ACN)	-	Deneysel Çalışma-3	Deneysel Çalışma-4

*Bu çalışmalar için analitik yöntem şartları Bölüm 3.1.1 'de belirtildiği gibidir. Enjeksiyon verilen numune çözeltileri, 3.1.2 Çözeltilerin Hazırlanışı bölümünde anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Buradaki tüm deneysel çalışmaların hareketli faz ve çözücüsü için ise tabloda belirtilenler kullanılmıştır.

Tablo 4-8’de verilen Deneysel Çalışma-3 ve 4’te hareketli faz olarak hacimce 90:10 oranında %0.1 Fosforik Asit:ACN; çözücü olarak sırasıyla hacimce 90:10 oranında Distile Su:ACN ve hacimce 90:10 oranında %0.1 Fosforik Asit:ACN kullanılmıştır. Bu deneysel çalışmalara ait Şekil 4-7’de verilen karşılaştırmalı kromatogramda ve Tablo 4-9’deki sayısal bulgulara görüldüğü gibi çözücü olarak hacimce 90:10 oranında %0.1 Fosforik Asit:ACN kullanmak diğer çözücüye göre Favipiravir alıkonma zamanını ötelemiş ve Favipiravir piki için daha büyük değerde bir kuyruklanma faktörü elde edilmiştir. Dolayısıyla, hareketli fazın hacimce 90:10 oranında %0.1 Fosforik Asit:ACN çözeltisinin olduğu durumda aynı çözelti çözücü olarak kullanılmamalı bunun yerine alıkonma zamanını öne çekmesi ve daha küçük kuyruklanma faktörüne sebep olması gerekçeleriyle 90:10 oranında Distile Su:ACN çözeltisini çözücü olarak kullanılmalıdır.

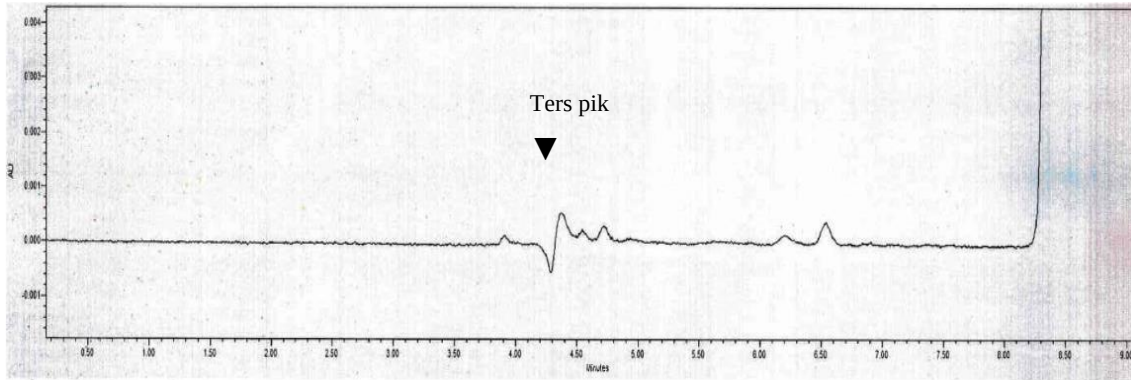


Şekil 4-7. Deneysel çalışma-3 ve 4’e ait karşılaştırmalı kromatogram

Tablo 4-9. Deneysel çalışma-3 ve 4'e ait sayısal bulgular

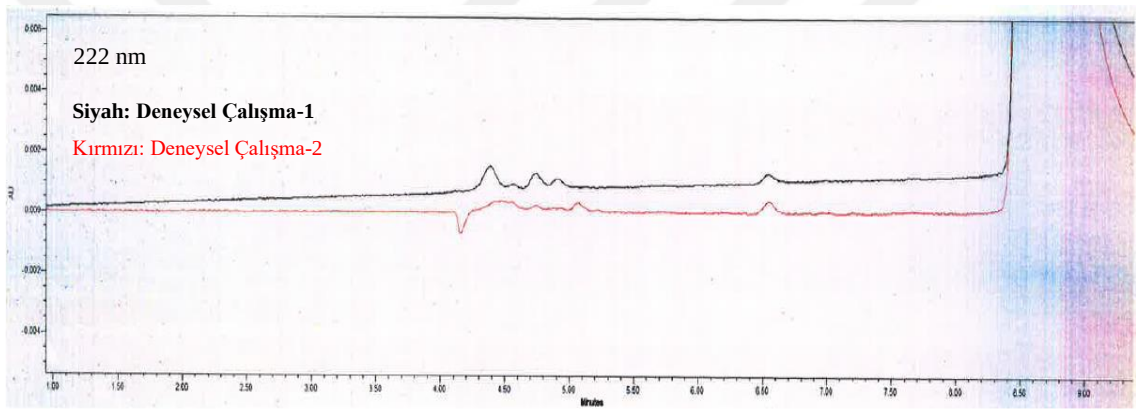
	Favipiravir Alıkonma Zamanı	Favipiravir Pik Alanı	Favipiravir Kuyruklanma Faktörü
Deneysel Çalışma-3	8.4 dakika	22565985	1.26
Deneysel Çalışma-4	10.4 dakika	24022747	1.29

Ancak, hacimce 90:10 oranında Distile Su:ACN çözücüsünü kullanmanın diğer çözücüye göre sistem ile daha az uyumlu olabileceği düşünülmüş ve var olabilecek uyumsuzluğun göstergesi olarak herhangi bir ters pik varlığı ilgili çalışmanın kromatogramından kontrol edilmiştir. Düşünüldüğü gibi de çözücü olarak hacimce 90:10 oranında Distile Su:ACN çözeltilisinin kullanıldığı durumda, 222 nm'nin bu analitik yöntem için nihaileştirilmesine sebep olan RRT 0.51 safsızlığının bulunduğu bölgede ters pik varlığı tespit edilmiştir. İlgili kromatogram Şekil 4-8'de verilmiştir. Deneysel Çalışma-3 ve 4 sonucunda, tespit edilen sistem uyumsuzluğu, alıkonma zamanının ötelenmesi ve kuyruklanma faktörünün artış göstermesi nedenleriyle, hareketli faz ve/veya çözücü içeriğinde %0.1 Fosforik Asit çözeltilisinin kullanılmamasına karar verilmiştir.



Şekil 4-8. Deneysel çalışma-3'teki çözücü & hareketli faz uyumsuzluğu (ters pik varlığı)

Deneyisel Çalışma-1 ve 2’de ise hareketli faz olarak hacimce 90:10 oranında 10 mM KH_2PO_4 pH=3.0:ACN, çözücü olarak sırasıyla hacimce 90:10 oranında 10 mM KH_2PO_4 pH=3.0:ACN ve hacimce 90:10 oranında Distile Su:ACN kullanılmıştır. Aynı hareketli fazın ve farklı çözücülerin kullanıldığı bu iki çalışmada Favipiravir alıkonma zamanı aynıdır; ancak hacimce 90:10 oranında Distile Su:ACN çözücüsünün kullanıldığı Deneyisel Çalışma-2’den elde edilen kromatogramda ters pik varlığı gözlenmiş ve Favipiravir pikinin kuyruklanması daha büyük değerde elde edilmiştir. Bu çalışmalara ait karşılaştırmalı kromatogramlar Şekil 4-9’da ve sayısal bulgular Tablo 4-10’da görülmektedir.



Şekil 4-9. Deneyisel çalışma-1 ve 2’ye ait karşılaştırmalı kromatogram

Tablo 4-10. Deneyisel çalışma-1 ve 2’ye ait sayısal bulgular

	Favipiravir Alıkonma Zamanı	Favipiravir Pik Alanı	Favipiravir Kuyruklanma Faktörü
Deneyisel Çalışma-1	8.6 dakika	21959629	1.22
Deneyisel Çalışma-2	8.6 dakika	22622407	1.34

Uygulanan Deneyisel Çalışma-1 ve 2 göstermiştir ki, hareketli faz olarak hacimce 90:10 oranında 10 mM KH_2PO_4 pH=3.0:ACN’nin kullanıldığı durumda, çözücü olarak hacimce 90:10 oranında 10 mM KH_2PO_4 pH=3.0:ACN kullanılması sistemde çözücü-hareketli faz uyumsuzluğu yaratmamıştır, Favipiravir’in alıkonma zamanı Deneyisel Çalışma-2 ile aynıdır ve Favipiravir pikinin kuyruklanma faktörü bu çalışmaya göre daha

küçüktür. Dolayısıyla Deneysel Çalışma-1’de kullanılan hareketli faz ve çözücünün bu analitik yöntem için en uygun hareketli faz ve çözücü olduğuna karar verilmiştir.

Numune ve standart çözeltilerinin hazırlanışında kullanılacak çözücü (seyreltme çözeltisi) Favipiravir’in çözünürlüğü açısından da değerlendirilmiştir. Favipiravir molekülünün sudaki bilinen çözünürlüğü 8.7 mg/ml’dir (Drugbank, 2021). Bölüm 3.2.6 ve bu bölüme ait bulguları içeren Bölüm 4.1.6’da nasıl belirlendikleri detaylıca anlatılan olan nihai Favipiravir konsantrasyonları (numune çözeltisi için 0.5 mg/ml; standart çözeltisi için 0.0005 mg/ml) bu değerin altında kalmaktadır. Bu da içeriğinde büyük bir oranda distile su bulunan (90:10 (h:h), 10 mM KH_2PO_4 pH=3.0:ACN) hareketli faz çözeltisinin çözücü olarak kullanılmasının önünde Favipiravir çözünürlüğü açısından bir engel olmadığını göstermektedir.

Son olarak, bu bölümün başında daha çok çökme oluşumunu önlemek amacıyla belirlenip denemelere başlanan hacimce 90:10 Tampon Çözeltisi:ACN oranının nihaileştirilmesi için de farklı oranlar denenmiştir. Bu denemeler önceki aşamada karar verilen tampon çözeltisi ve organik solvent (10 mM monobazik potasyum fosfat tamponu pH: 3.0 & asetonitril) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tablo 4-11’de verilen Oran-3 denendiğinde, kromatogramdaki son safsızlık piki dakika 24.7’de gelmektedir; ancak diğer denenen oranlara bakıldığında aynı RRT’ye sahip safsızlığın kolondan ayrılma süresi daha kısa olmaktadır. Dolayısıyla Oran-3 birleşimi elenmiştir. Kalan diğer oranlar detaylıca incelendiğinde ise, pik ayrımlarının ve şekillerinin elverişli olması her iki oran denemesinde ortak olsa da Favipiravir pik saflığının Oran-1’de sağlanması ve daha az miktarda organik solvent kullanmak sebepleriyle bu oranın kullanılmasına karar verilmiştir. Hareketli faz için farklı oran denemeleri sonucunda elde edilen Favipiravir’e ve kromatogramdaki spesifik safsızlıklara ait alıkonma zamanı değerleri Tablo 4-11’de görülmektedir.

Tablo 4-11. Hareketli faz çözeltisi için denenen farklı tampon ve organik oranları sonucunda elde edilen alıkonma zamanları (dakika)

	Alıkonma Zamanı (dakika)		
	Oran-1 [90:10 (h:h) Tampon:ACN]	Oran-2 [85:15 (h:h) Tampon:ACN]	Oran-3 [95:5 (h:h) Tampon:ACN]
Favipiravir	8.6	7.1	12.4
RRT 0.51	4.4	3.6	6.3
RRT 0.76	6.5	5.4	9.4
RRT 1.11	9.6	7.9	13.8
RRT 1.18	10.2	8.4	14.6
RRT 1.99	17.1	14.1	24.7

Oran denemeleri 3.1.1 Analitik Yöntem Şartları ile gerçekleştirilmiş olup, enjeksiyon verilen numune çözeltisi 3.1.2 Çözeltilerin Hazırlanışı bölümünde anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Bu çalışma Waters marka HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

4.1.4. Analiz Süresinin Belirlenmesi

Analizde kullanılacak kolonun ve hareketli fazın belirlenmesinden sonra bu şartlarda yapılan enjeksiyonlarda kromatogramdaki en son safsızlık olarak gözlenen RRT 1.99 safsızlığının yaklaşık 17.1 dakika alıkonma zamanına sahip olduğu görülmüştür. Bu değer düşünülerek analiz süresi olarak RRT 1.99 safsızlığına ait alıkonma zamanının 1.5 katına yakın bir değer olan 25 dakika belirlenmiştir. Belirlenen bu sürenin analiz süresi olarak kesinleştirilmesi için, $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$ koşuluna 7 gün boyunca maruz bırakılan Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tabletler ile 3.1.2 bölümünde anlatılan prosedüre uygun şekilde bir numune çözeltisi hazırlanmış ve Shimadzu marka HPLC cihazı (DAD Dedektör) kullanılarak ek bir çalışma gerçekleştirilmiştir. 25 dakikalık analiz süresi sabit tutularak, hazırlanan numune çözeltisinden (*Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet - $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN} / 7 \text{ Gün}$*) ve seyreltme çözeltisinden Tablo 4-12’de verilen şekilde enjeksiyonlar yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlarda Favipiravir pik alanı ve pik saflığının yanı sıra herhangi bir safsızlığın bir sonraki enjeksiyona taşınma ihtimali bu safsızlığın farklı enjeksiyonlardaki pik alanları kontrol edilerek değerlendirilmiştir. Elde edilen enjeksiyonlara ait tüm kromatogramlar Şekil 4-10 ve Şekil 4-11’de verildiği gibidir. Elde edilen sayısal bulgular ise Tablo 4-13 ve Tablo 4-14’te verilmiştir.

Tablo 4-12. Analiz süresinin belirlenmesi çalışmasında yapılan ardışık enjeksiyonlar

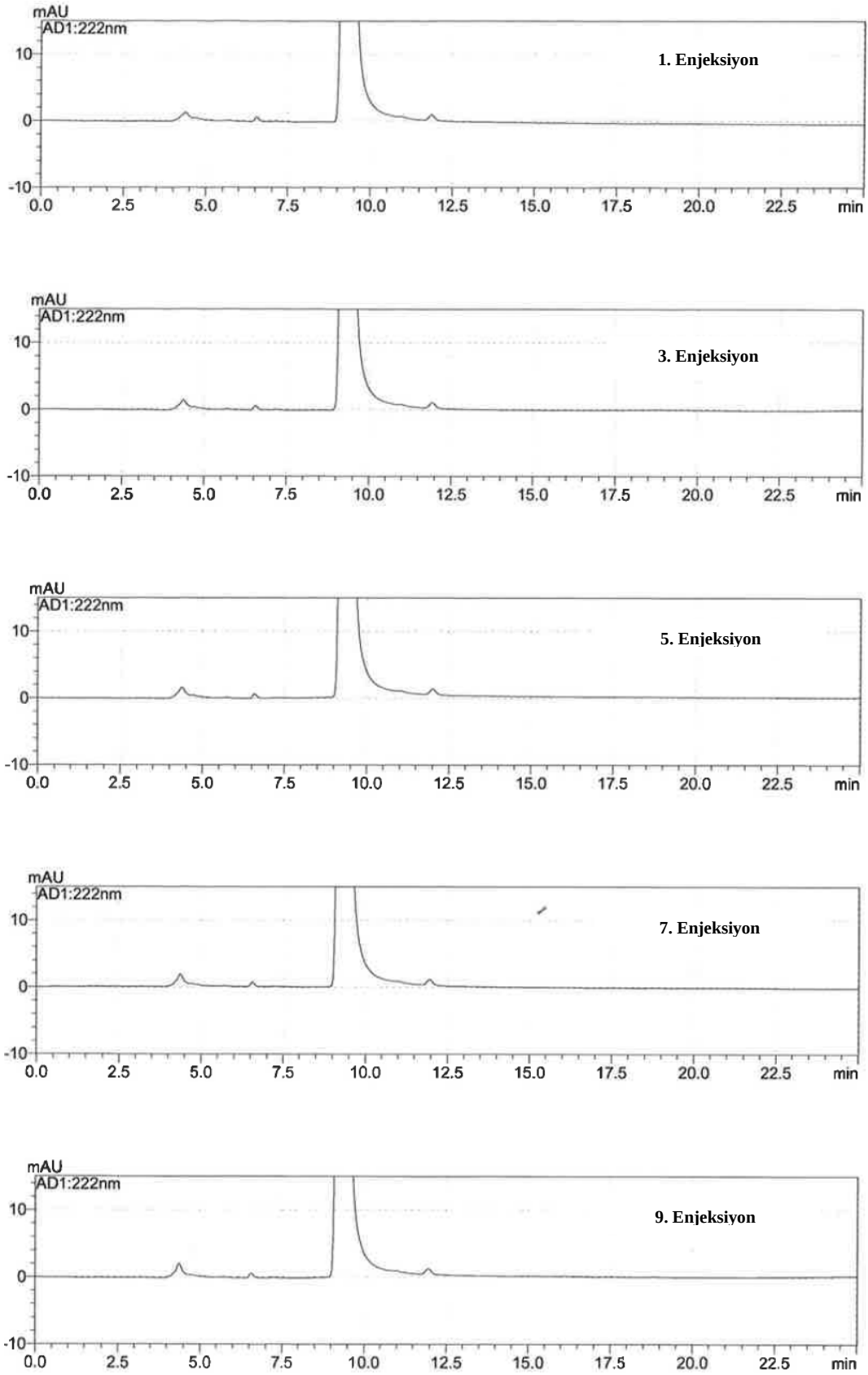
Enjeksiyon Sırası	Enjeksiyon Verilen Çözelti	Enjeksiyon Süresi
1. Enjeksiyon	Numune Çözeltisi	25 dakika
2. Enjeksiyon	Seyreltme Çözeltisi	25 dakika
3. Enjeksiyon	Numune Çözeltisi	25 dakika
4. Enjeksiyon	Seyreltme Çözeltisi	25 dakika
5. Enjeksiyon	Numune Çözeltisi	25 dakika
6. Enjeksiyon	Seyreltme Çözeltisi	25 dakika
7. Enjeksiyon	Numune Çözeltisi	25 dakika
8. Enjeksiyon	Seyreltme Çözeltisi	25 dakika
9. Enjeksiyon	Numune Çözeltisi	25 dakika
10. Enjeksiyon	Seyreltme Çözeltisi	25 dakika

Shimadzu marka HPLC (DAD Dedektör) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4-13. Analiz süresinin belirlenmesi çalışmasındaki numune çözeltisi ($70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN} / 7 \text{ Gün}$) enjeksiyon sonuçları

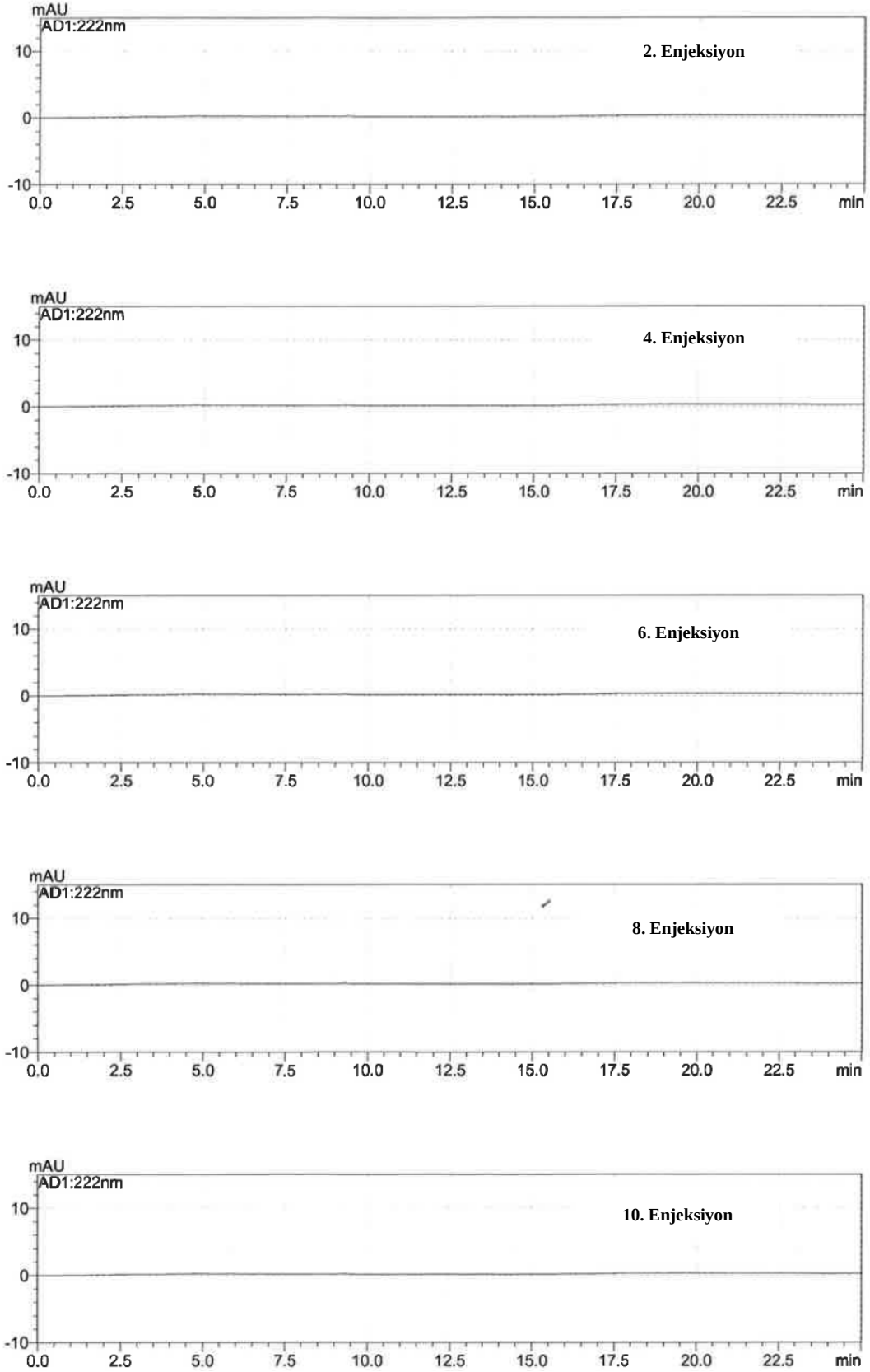
Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN} / 7 \text{ Gün}$					
	1. enjeksiyon	2. enjeksiyon	3. enjeksiyon	4. enjeksiyon	5. enjeksiyon
Favipiravir	99.883	99.886	99.884	99.885	99.886
RRT 0.51	0.079	0.078	0.079	0.079	0.078
RRT 0.76	0.027	0.026	0.027	0.027	0.026
RRT 1.11	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
RRT 1.18	0.004	0.004	0.004	0.003	0.004
RRT 1.99	0.005	0.004	0.004	0.004	0.004

Shimadzu marka HPLC (DAD Dedektör) cihazı ile alınan sonuçlardır.



Şekil 4-10. Analiz süresinin belirlenmesi çalışmasındaki numune çözeltisi enjeksiyonları

Shimadzu marka HPLC (DAD Dedektör) cihazı ile alınan kromatogramlardır.



Şekil 4-11. Analiz süresinin belirlenmesi çalışmasındaki seyreltme çözeltisi enjeksiyonları

Shimadzu marka HPLC (DAD Dedektör) cihazı ile alınan kromatogramlardır.

Tablo 4-14. Analiz süresinin belirlenmesi çalışmasındaki numune çözeltisi ($70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN} / 7 \text{ Gün}$) enjeksiyonlarından alınan Favipiravir alıkonma zamanı, pik alanı ve pik saflığı sonuçları

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi $70^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C} / \%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}) / 7 \text{ Gün}$					
Çözeltiler (Favipiravir / 222 nm)	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pik Saflığı (Peak Purity Index)	Saflık Eşik Değeri (Single Point Threshold)	Pik Saflığı Kabul Kriteri*
1. enjeksiyon	9.235	21297891	0.999849	0.997503	
2. enjeksiyon	9.264	21313851	0.999999	0.999965	Pik saflığı (peak purity index) değeri 0.99 – 1.00 aralığında olmalıdır.
3. enjeksiyon	9.304	21294784	0.999979	0.998503	
4. enjeksiyon	9.278	21272802	0.999989	0.999962	
5. enjeksiyon	9.282	21278034	0.999995	0.997271	

Shimadzu marka HPLC (DAD Dedektör) cihazı ile alınan sonuçlardır.

**Shimadzu marka cihazlardaki Chromquest yazılımı (single-index algorithm) ile sağlanan pik saflığı kriteridir.*

4.1.5. Numune ve Standart Çözeltileri için Filtre Seçimi

Bölüm 4.1.3'te anlatıldığı üzere yöntem için belirlenen hareketli faz (seyreltme çözeltisi) hacimce 90:10 oranında birleştirilmiş 10 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi (pH 3.0) ve asetonitril'dir. Bu çözeltinin su oranı yüksektir. Dolayısıyla ilk aşamada, denenecek filtrelerin hidrofilik olmasına dikkat edilmiştir. İkinci aşamada, filtrelerin hareketli fazı (seyreltme çözeltisi) oluşturan bileşenler ile kimyasal açıdan uyumluluklarına bakılmıştır. Üçüncü aşama ise, por çapını belirlemek olmuştur. Geliştirilen analitik yönteme ait nihai kolonun (Bölüm 4.1.2 Kolon Seçimi) dolgu malzemesini oluşturan partikül boyutunun 5 μm olması, numune filtresinin por çapı büyüklüğünü 0.45 μm olarak belirleyerek ilerlemede ana nokta kabul edilmiştir. Çünkü filtre por çapı büyüklüğünün 0.45 μm olması, 5 μm boyutunda partiküllere sahip kolonların tıkanmaması ve analiz verimliliği açısından HPLC yöntemi için uygundur. Dolayısıyla, bu por çapına sahip olan farklı membran tipleri seçilerek enjeksiyon yapılacak çözeltilerin filtrasyon işleminde denenmiştir. Denenen filtrelerin çözeltiler ile

kimyasal uyumlulukları Tablo 4-15'te; membranlarının hidrofilik özellikleri ile por çapı büyüklükleri Tablo 4-16'da verilmiştir.

Tablo 4-15. Denenen filtrelerin çözeltiler ile kimyasal olarak uyumlulukları (Merck, 2020; Macherey-Nagel, 2020)

Filtrelerin Özellikleri		
	Sulu Çözeltiler	Asetonitril
Chromafil® PET-45/25 0.45 µm Turuncu Filtre	+	+
Millipore Millex®-LCR Hidrofilik PTFE 0.45 µm Beyaz Filtre	+	+
Millipore Millex®-HV Hidrofilik PVDF 0.45 µm Sarı Filtre	+	+

+ : Uyumludur

Tablo 4-16. Denenen filtrelerin özellikleri

Filtrelerin Özellikleri		
	Membran Tipi	Membran Özelliği
Chromafil® PET-45/25 0.45 µm Turuncu Filtre	Polyester	Hidrofilik
Millipore Millex®-LCR Hidrofilik PTFE 0.45 µm Beyaz Filtre	Politetrafloroetilen	Hidrofilik
Millipore Millex®-HV Hidrofilik PVDF 0.45 µm Sarı Filtre	Poliviniliden diflorür	Hidrofilik

Standart çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005 \text{ mg/ml}$) ve Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet numune çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$), Tablo 4-16'da özellikleri verilen Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu, Millipore Millex®-LCR Hidrofilik PTFE 0.45 µm beyaz ve Millipore Millex®-HV Hidrofilik PVDF 0.45 µm sarı filtreden süzülerek viallenmiş ve enjeksiyon verilmiştir. Aynı çözeltiler, bir de referans olarak kullanmak üzere filtrelenmeden enjeksiyon verilmiştir. Elde edilen Favipiravir pik alanları ile bu alanların fitreleme yapılmadan verilen enjeksiyonlardan elde edilen pik alanları ile % cinsinden uyumu Tablo 4-17'de gösterilmektedir.

Tablo 4-17. Filtre seçimi çalışması sonuçları

Standart Çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005 \text{ mg/ml}$)		
	Favipiravir Pik Alanı (~ 9 dakika)	Filtresiz enjeksiyona göre % Uyum
Filtresiz	23578	-
Chromafil® PET-45/25 0.45 µm Turuncu Filtre	23520	100.2
Millipore Millex®-LCR Hidrofilik PTFE 0.45 µm Beyaz Filtre	23282	101.3
Millipore Millex®-HV Hidrofilik PVDF 0.45 µm Sarı Filtre	23341	101.0
Numune Çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$)		
Filtresiz	21029550	-
Chromafil® PET-45/25 0.45 µm Turuncu Filtre	21020670	100.0
Millipore Millex®-LCR Hidrofilik PTFE 0.45 µm Beyaz Filtre	21002697	100.1
Millipore Millex®-HV Hidrofilik PVDF 0.45 µm Sarı Filtre	20991011	100.2
Diğer Çözeltiler İçin Filtre Seçimi Çalışması (Favipiravir Alıkonma Zamanında Pik Varlığı Kontrolü)		
Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi		
Filtresiz	-	-
Chromafil® PET-45/25 0.45 µm Turuncu Filtre	-	-
Millipore Millex®-LCR Hidrofilik PTFE 0.45 µm Beyaz Filtre	-	-
Millipore Millex®-HV Hidrofilik PVDF 0.45 µm Sarı Filtre	-	-
Seyreltme Çözeltisi (Hareketli Faz Çözeltisi)		
Filtresiz	-	-
Chromafil® PET-45/25 0.45 µm Turuncu Filtre	-	-
Millipore Millex®-LCR Hidrofilik PTFE 0.45 µm Beyaz Filtre	-	-
Millipore Millex®-HV Hidrofilik PVDF 0.45 µm Sarı Filtre	-	-

Filtre seçimi çalışması Shimadzu marka (DAD Dedektör) HPLC cihazı ile yapılmıştır.

Ek olarak, bu çalışma sırasında Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet'e ait yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ve seyreltme çözeltisi (hareketli faz çözeltisi) de aynı filtrelerden geçirilerek ve filtrelenenmeden ayrı ayrı enjeksiyon verilmiştir. Bu enjeksiyonlar değerlendirilirken ilk aşamada, Favipiravir alıkonma zamanında bir pik olup olmadığı filtreleme işleminin yapılmadığı enjeksiyona göre kıyaslanarak kontrol edilmiş ve verilen enjeksiyonlarda bu alıkonma zamanında bir pik tespit edilmediği görülmüştür. Bu durum, Favipiravir pik saflığının tüm enjeksiyonlarda sağlanmasıyla da

desteklenmiştir. Aynı enjeksiyonlar, bu çözeltilerin içeriğinde olmayıp, kullanılan filtrelerden gelebilecek pik oluşumlarını kontrol etmek için de değerlendirilmiş ve denenen hiç bir filtre çeşidinin kromatogramlarında ek bir pik oluşumuna rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışmanın da sonuçları Tablo 4-17’de verilmiştir.

Bölüm 3.1.1’de verilen analitik yöntem şartları ve Bölüm 3.1.2’de verilen çözelti hazırlama prosedürleri ile gerçekleştirilen bu çalışmada Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu, Millipore Millex®-LCR Hidrofilik PTFE 0.45 µm beyaz ve Millipore Millex®-HV Hidrofilik PVDF 0.45 µm sarı filtreleri kullanılarak verilen enjeksiyonlar değerlendirildiğinde, standart çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.0005 \text{ mg/ml}$) ve Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet numune çözeltisi ($C_{\text{Favipiravir}} = 0.5 \text{ mg/ml}$) için denenen tüm filtreler, filtreleme yapılmadan verilen enjeksiyonlara göre Favipiravir pik alanları açısından % 98.0 - % 102.0 uyum aralığında kalmaktadır. Ayrıca, filtrelerin her biri Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet’e ait yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ve seyreltme çözeltisi (hareketli faz çözeltisi) için uygun olmakla birlikte, standart ve numune çözeltilerinin her ikisinde Favipiravir pik alanı için en iyi % uyuma (standart çözeltisi için: % 100.2; numune çözeltisi: % 100.0) sahip olan **Chromafil® PET-45/25 0.45 µm turuncu filtre** yöntemde kullanılmak üzere nihaileştirilmiştir. Nihaileştirilen şırınga ucu filtre çeşidinin membran tipi olan Polyester (PET), polar ve nonpolar çözeltiler için uygun olmakla birlikte, organik çözücü ve su karışımlarının çözücü olarak kullanıldığı HPLC yöntemleri için özellikle elverişlidir (Hichrom Ltd., 2018).

4.1.6. Numune ve Standart Çözeltileri Konsantrasyonları ile Safsızlık Spesifikasyonlarının Belirlenmesi

Favipiravir molekülü içeren bir farmasötik form için önerilen maksimum günlük alım dozu 3200 mg/gün’dür (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2014). maksimum günlük alım dozu 1 g’dan fazla olan ilaçlar için raporlama limiti % 0.05, bilinmeyen safsızlık limiti % 0.10; bilinen safsızlık limiti % 0.15 olarak belirlenmiştir (Tablo 4-18). Bu sayılar değerlendirilerek ürün kalitesi gereği safsızlık limitleri kapsamı, bilinmeyen safsızlık ve toplam safsızlık limitleri olarak belirlenmiştir.

Tablo 4-18. ICH Q3B (R2)'ye göre ilaç formları için safsızlık limitleri (European Medicines Agency, 2006)

Raporlama Limiti	
Maksimum Günlük Alım Dozu	Limit
≤ 1 g	% 0.1
> 1 g	% 0.05
Bilinmeyen Safsızlık Limiti	
Maksimum Günlük Alım Dozu	Limit
< 1 mg	% 1.0 yada 5 µg (TGA*) (Hangisi daha düşükse)
1 mg – 10 mg	% 0.5 yada 20 µg (TGA*) (Hangisi daha düşükse)
> 10 mg-2 g	% 0.2 yada 2 mg (TGA*) (Hangisi daha düşükse)
> 2 g	% 0.10
Bilinen Safsızlık Limiti	
Maksimum Günlük Alım Dozu	Limit
< 10 mg	% 1.0 yada 50 µg (TGA*) (Hangisi daha düşükse)
10 mg – 100 mg	% 0.5 yada 200 µg (TGA*) (Hangisi daha düşükse)
> 100 mg-2 g	% 0.2 yada 3 mg (TGA*) (Hangisi daha düşükse)
> 2 g	% 0.15

TGA*: Toplam Günlük Alım

Tablo 4-18'deki ICH Q3B (R2) klavuzuna göre belirlenen bilinmeyen safsızlık limiti (% 0.10), çalışılabilecek konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi aşamasında ana nokta olarak kabul edilmiştir. Numune ve standart çözeltisi konsantrasyonlarının saptanabilmesi için bu limitten yola çıkılarak Favipiravir'e ait % LOQ değerinin (Numune konsantrasyonu % 100 kabul edilerek LOQ konsantrasyonuna karşılık gelen % cinsinden değer) yine bu klavuza göre belirlenen raporlama limitinin (%0.05) altında veya eşit olması ve her iki çözeltide de Favipiravir pik saflığının sağlanabilmesi etkili olmuştur. Favipiravir konsantrasyonu nihai olarak numune çözeltisi için 0.5 mg/ml; limit seviyesi çözeltisi için 0.0005 mg/ml olarak belirlenmiştir. Her iki konsantrasyonda da Favipiravir pik saflığı sağlanmıştır. Limit seviyesi konsantrasyonundaki çözeltiye ait kromatogramlardan elde edilen S/N değeri 108.17 olarak tespit edilmiştir. Bu değer baz alınarak limit seviyesi çözeltisinin seyreltilmesi ile elde edilen LOQ seviyesi çözeltisinin Favipiravir konsantrasyonu 0.00003 mg/ml, S/N değeri 10.52 ve %LOQ ise 0.006 (raporlama limiti: % 0.05'in altında) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu sayısal değerler ve Favipiravir pik saflığı, belirlenen numune çözeltisi konsantrasyonunun çalışmak için uygun olduğunu kanıtlamıştır.

Toplam safsızlık limiti, Avigan® 200 mg Film Tablet (Seri No: PC1021, Japonya) referans ürünü kullanılarak yapılan stres/stabilite çalışmaları ile karşılaştırılmalı olarak ve Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (FAAR1-V-01, ARİS) ürününün stres/stabilite sonuçları için matematiksel olarak yapılan değerlendirmeler sonucu % 0.5 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalarda değerlendirmeler, kromatogramlarda düzenli artış gösteren en yüksek % sonuca sahip RRT 0.51 safsızlığı üzerinden yapılmıştır. Toplam safsızlık limitinin kalite açısından değerlendirilmek üzere orijinal ürün ile kıyaslanarak belirlenmesi noktasında ‘Guidance for Industry ANDAS: Impurities in New Drug Products’ klavuzu baz alınmıştır (U.S. Food and Drug Administration, 2010).

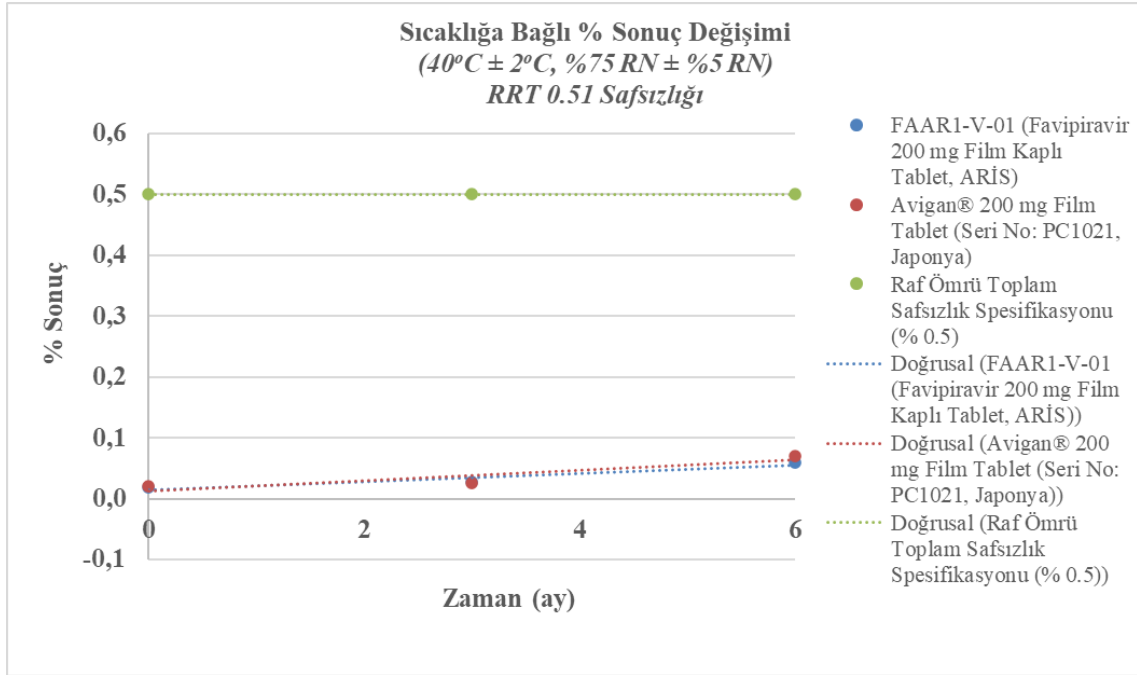
Bu amaçla Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (FAAR1-V-01, ARİS) ve Avigan® 200 mg Film Tablet (Seri No: PC1021, Japonya) referans ürününün hızlandırılmış dönem 40°C ve 70°C analiz sonuçları Tablo 4-19, Tablo 4-20, Tablo 4-21 ve Tablo 4-22’de, her iki sıcaklıkta RRT 0.51 safsızlığı için sıcaklığa bağlı % Sonuç değişimi grafikleri de Şekil 4-12 ve Şekil 4-13’te görülmektedir.

Tablo 4-19. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (FAAR1-V-01) analiz sonuçları (Hızlandırılmış dönem, 40°C ± 2°C, %75 RN ± %5 RN)

40°C ± 2°C, %75 RN ± %5 RN Koşulu	Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet		
	Seri No: FAAR1-V-01		
	Başlangıç	3.ay	6.ay
RRT 0.51	0.019	0.027	0.060

Tablo 4-20. Avigan® 200 mg Film Tablet (Seri No: PC1021, Japonya) analiz sonuçları (Hızlandırılmış dönem, 40°C ± 2°C, %75 RN ± %5 RN)

40°C ± 2°C, %75 RN ± %5 RN Koşulu	Avigan® 200 mg Film Tablet		
	Seri No: PC1021		
	Başlangıç	3.ay	6.ay
RRT 0.51	0.020	0.025	0.070



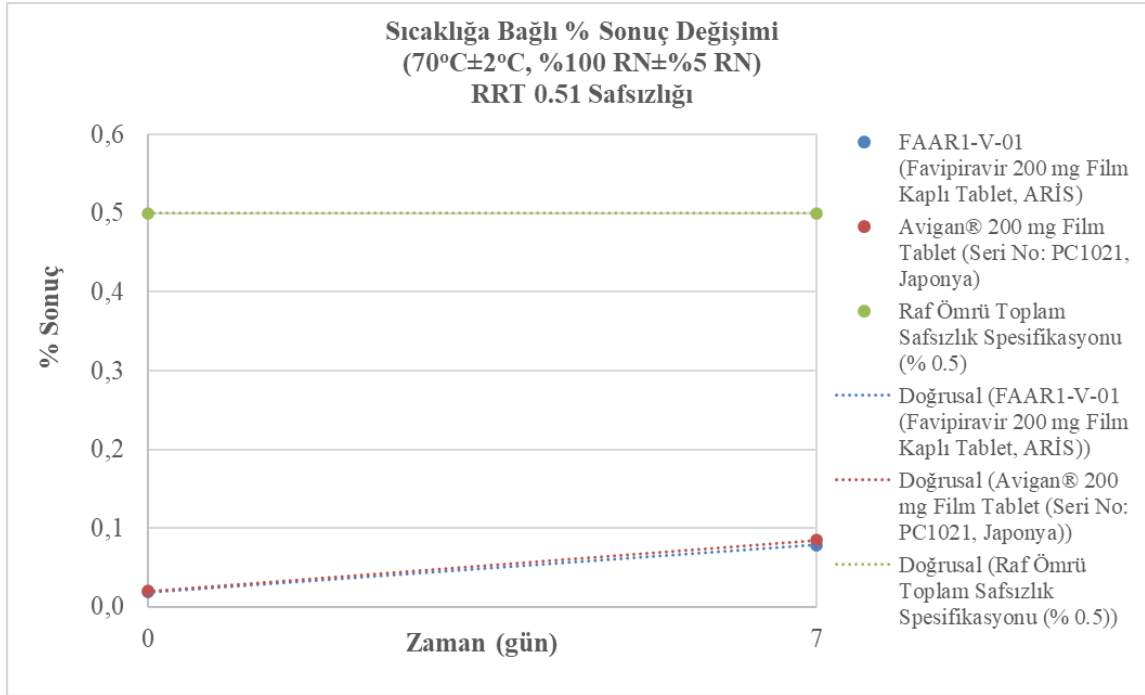
Şekil 4-12. RRT 0.51 Safsızlığı için sıcaklığa bağlı % Sonuç değişimi grafiği (Hızlandırılmış dönem, $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%75 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$)

Tablo 4-21. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (FAAR1-V-01) analiz sonuçları (Koşul: $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$)

$70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$ Koşulu	Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet	
	Seri No: FAAR1-V-01	
	Başlangıç	7.gün
RRT 0.51	0.019	0.079

Tablo 4-22. Avigan® 200 mg Film Tablet (Seri No: PC1021, Japonya) analiz sonuçları (Koşul: $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$)

$70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%100 \text{ RN} \pm \%5 \text{ RN}$ Koşulu	Avigan® 200 mg Film Tablet	
	Seri No: PC1021	
	Başlangıç	7.gün
RRT 0.51	0.020	0.085

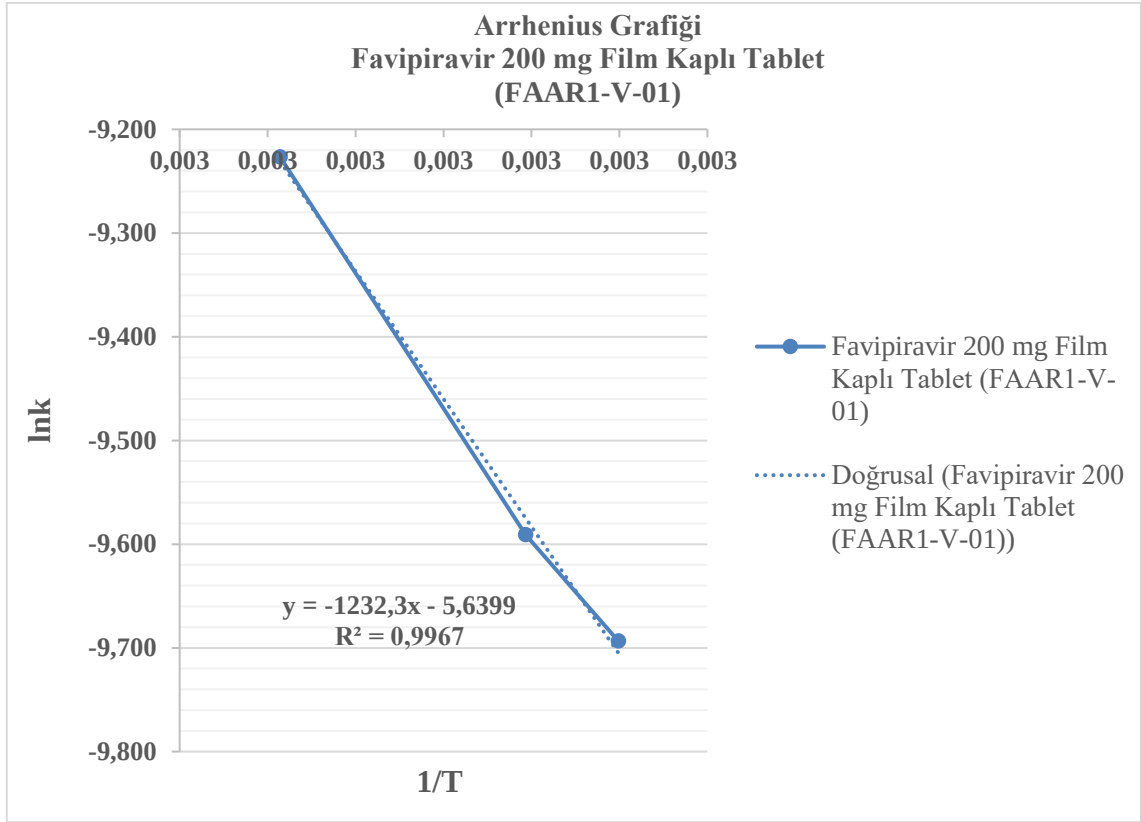


Şekil 4-13. RRT 0.51 Safsızlığı için sıcaklığa bağlı % Sonuç değişimi grafiği (Koşul: 70°C ± 2°C, %100 RN±%5 RN)

Belirlenen toplam safsızlık limitinin uygunluğunun kontrol edilmesi sırasında, referans ürünün ilgili bileşikler spesifikasyonlarından bağımsız olarak, Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet ürününün RRT 0.51 safsızlığı üzerinden Tablo 4-23'te verilen 30 °C ve 40 °C sıcaklık stres koşullarındaki 6 aylık analiz sonuçları ve 70 °C sıcaklık stres koşulundaki 7 günlük analiz sonuçları Arrhenius Eşitliği ($\ln k = \ln A - E_a / R \times T$) ile değerlendirilmiştir. Bu sayede RRT 0.51 safsızlığının sıcaklık değişimine karşı davranışı belirlenmiştir. Elde edilen Arrhenius Grafiği Şekil 4-14'te verilmiştir.

Tablo 4-23. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (FAAR1-V-01) sıcaklık stres/stabilite analiz sonuçları

RRT 0.51 Safsızlığı	Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet				
	Seri No: FAAR1-V-01				
	Başlangıç	3.gün	7.gün	3.ay	6.ay
30°C ± 2°C, %65 RN ± %5 RN	0.019	-	-	0.025	0.056
40°C ± 2°C, %75 RN ± %5 RN	0.019	-	-	0.027	0.060
70°C ± 2°C, %100 RN ± %5 RN	0.019	0.039	0.078	-	-



Şekil 4-14. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet (FAAR1-V-01) ürününe ait Arrhenius Grafiği

Toplam safsızlık limitinin % 0.5 olarak belirlendiği FAAR1-V-01 ürünü için, artışı en yüksek olan RRT 0.51 safsızlığının 3 farklı sıcaklık koşulundaki stres stabilite sonuçları ile elde edilen Şekil 4-14'teki Arrhenius Grafiği'ne göre bu ürünün raf ömrü yaklaşık 72 ay elde edilmektedir. Avigan® 200 mg Film Tablet referans ürününün belirlenen raf ömrü ise 60 aydır (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2014). Belirlenen toplam safsızlık limiti ile grafikten alınan matematiksel sonuç, referans ürünün raf ömrünü karşılamaktadır. Bu da belirlenen toplam safsızlık limitinin bu ürün için kalite standartları içerisinde raf ömrünü karşılayabileceğini göstermektedir.

4.2. Geliştirilen Yöntemin Valide Edilmesi Sürecinde Elde Edilen Bulgular

Bu bölümde koşullarının nasıl belirlendiği yukarıda ayrıntılarıyla anlatılan yöntemin validasyonu için Bölüm 3.3'te tarif edilen validasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

4.2.1. Spesifiklik Bulguları

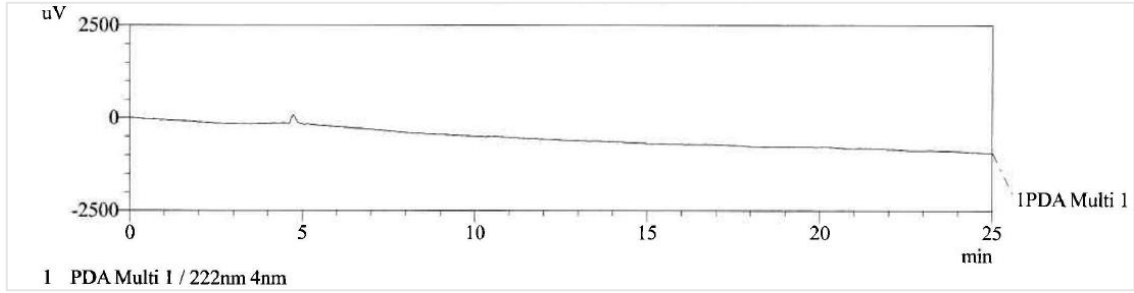
Bölüm 3.3.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen *spesifiklik* parametresine ait bulgulara bu çalışmanın kabul kriterine uygun şekilde standart çözeltisi, numune çözeltisi ve Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltisindeki Favipiravir piki ile ayrı ayrı enjeksiyon verilen diğer tüm çözeltilerin kromatogramlarından elde edilen pikler arasında bir girişim bulunmadığı saptanmıştır.

Enjeksiyon verilen çözeltilere ait Favipiravir alıkonma zamanı, pik alanı, pik saflığı (peak purity index) ve saflık eşik (single point threshold) değerleri raporlanmıştır. Spesifiklik çalışmasına ait sayısal değerler Tablo 4-24'te, kromatogramlar ise Şekil 4-15, Şekil 4-16, Şekil 4-17, Şekil 4-18, Şekil 4-19, Şekil 4-20, Şekil 4-21 ve Şekil 4-22'de görülmektedir.

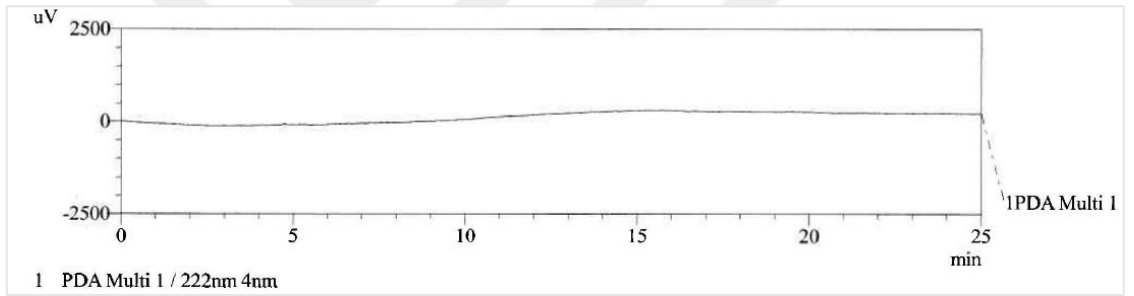
Tablo 4-24. Spesifiklik çalışması - sayısal bulgular

Çözeltiler (Favipiravir / 222 nm)	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pik Saflığı (Peak Purity Index)	Saflık Eşik Değeri (Single Point Threshold)
Hareketli Faz Çözeltisi (Seyreltme Çözeltisi)	-	-	-	-
Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi	-	-	-	-
Standart Çözeltisi	9.257	23187	0.999949	0.993503
Numune Çözeltisi	9.248	21328856	0.999999	0.999964
Favipiravir + Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi	9.261	23592	0.999962	0.988149

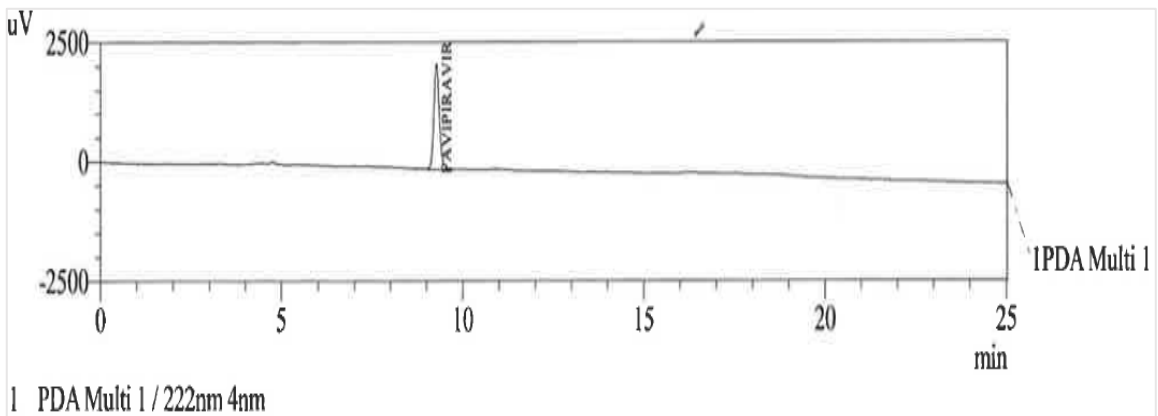
Enjeksiyon verilen çözeltilerden elde edilen kromatogramlarda Favipiravir pik saflığına bakılmış olup kromatogramlarda Favipiravir piki saftır. Pik purity index (pik saflığı) değeri 0.99 ile 1.00 arasında saptanmıştır.



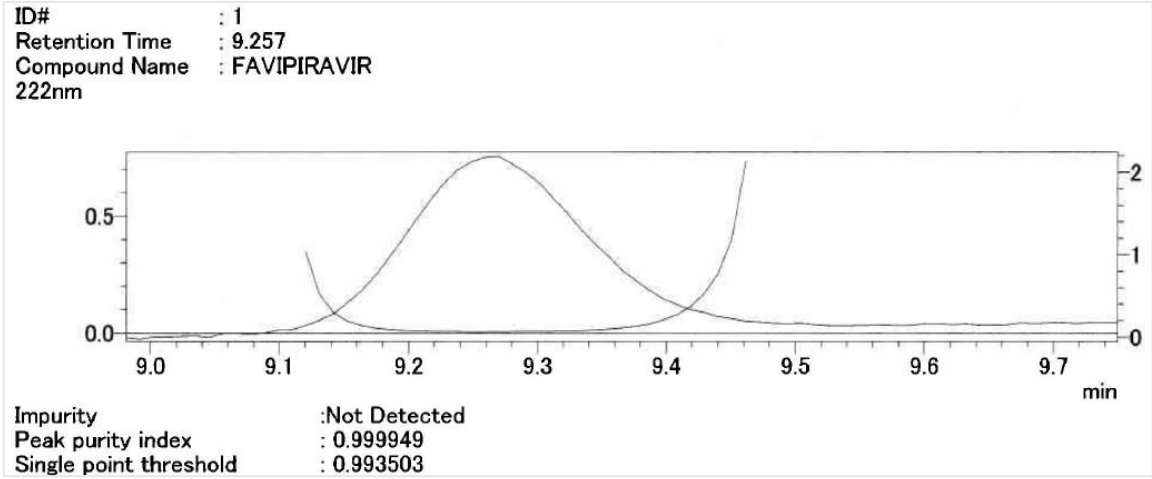
Şekil 4-15. Hareketli faz çözeltisine (seyreltme çözeltisi) ait kromatogram



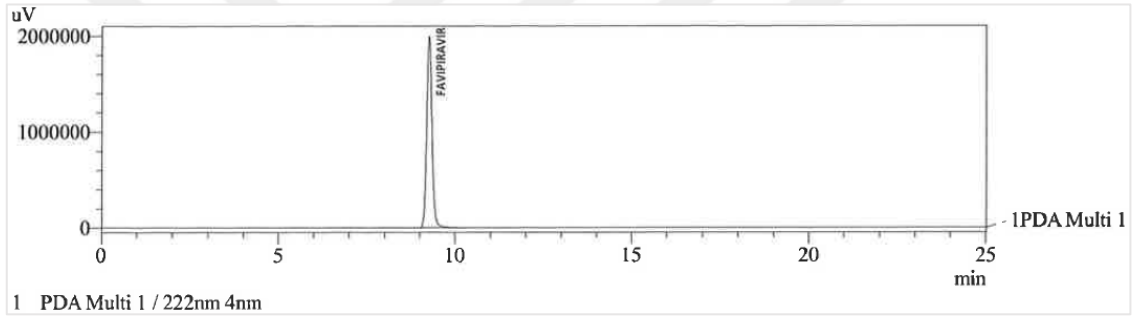
Şekil 4-16. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisine ait kromatogram



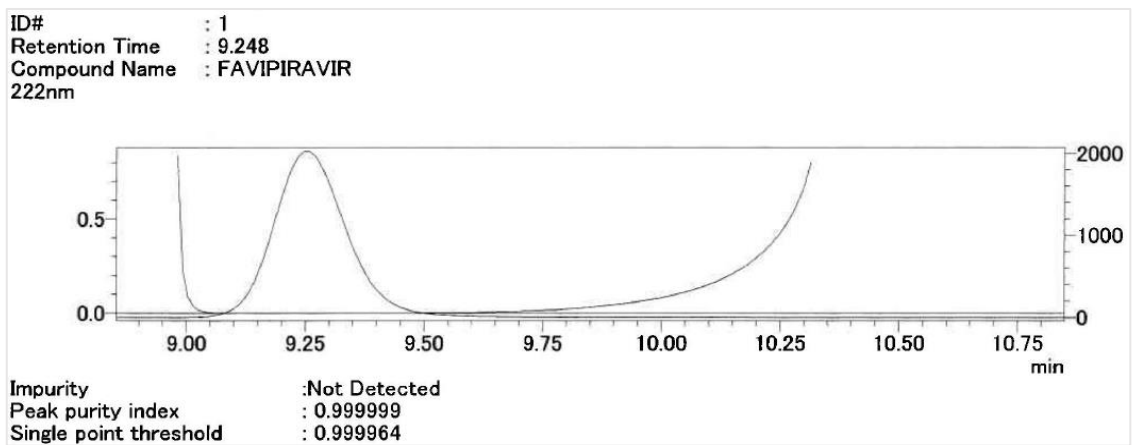
Şekil 4-17. Standart çözeltisine ait kromatogram



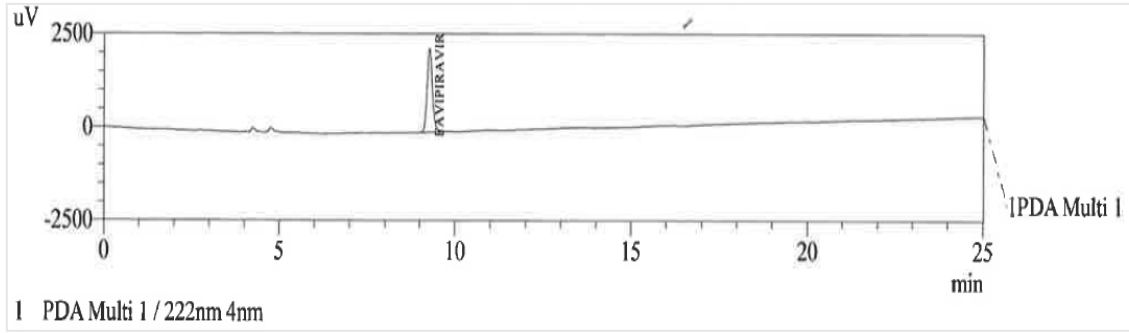
Şekil 4-18. Standart çözeltisine ait Favipiravir pik saflığı



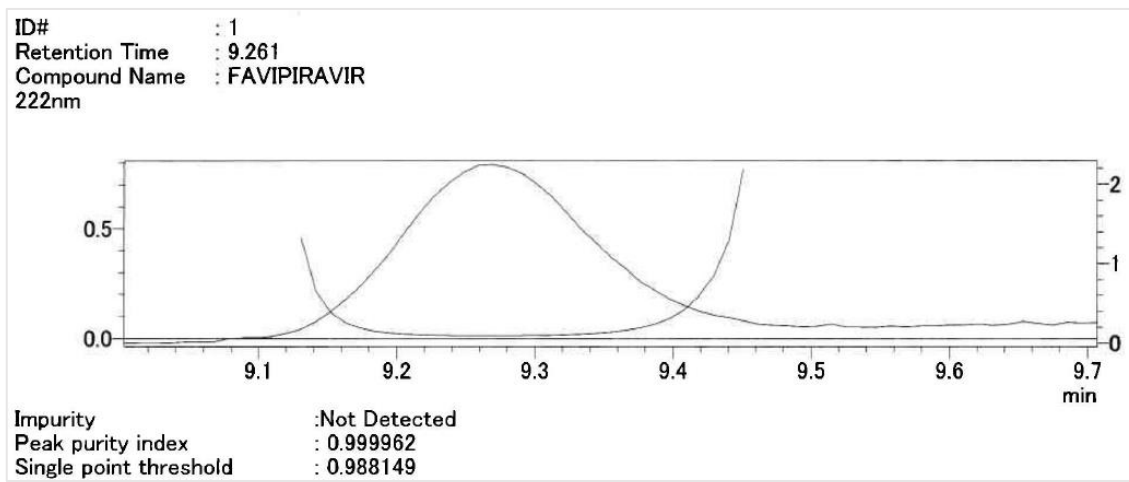
Şekil 4-19. Numune çözeltisine ait kromatogram



Şekil 4-20. Numune çözeltisine ait Favipiravir pik saflığı



Şekil 4-21. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltisine ait kromatogram



Şekil 4-22. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltisine ait Favipiravir pik saflığı

4.2.2. Sistem Uygunluğu Bulguları

Bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen **sistem uygunluğu** parametresinde, standart ve numune çözeltilerinden ayrı ayrı verilen 6 ardışık enjeksiyona ait tüm kromatogramlardaki Favipiravir pikine ait alanlar, alıkonma zamanları ile pik alanları arasındaki standart sapma ve % RSD değerleri raporlanmıştır. Ayrıca, standart çözeltisi ile yapılan enjeksiyonlar için, Favipiravir’e ait pik alanı ve alıkonma zamanı verilerine ek olarak kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı değerleri de raporlanan sonuçlar arasında yer almaktadır.

Standart ve numune çözeltileri ile elde edilen tüm sonuçlar sistem uygunluk kabul kriterlerinin sınırları içerisindedir.

Standart çözeltisi ile yapılan ardışık enjeksiyonlardan elde edilen sistem uygunluk çalışmasının sonuçları Tablo 4-25’te verilmiştir. Bu çalışma ile alınan sonuçlar, 4.2.5

Doğrusallık ve Aralık parametresinde % 100 doğrusallık seviyesine ait sonuçlar ile aynıdır.

Numune çözeltisi ile yapılan ardışık enjeksiyonlardan elde edilen sistem uygunluk çalışmasının sonuçları Tablo 4-26’da verilmiştir.

Tablo 4-25. Yöntem validasyonu sistem uygunluk çalışması standart çözeltisi verileri

STANDART ÇÖZELTİSİ				
<i>Favipiravir</i>				
Enjeksiyon Sırası	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
1	23014	9.31	1.28	15878
2	22759	9.29	1.26	16127
3	22874	9.29	1.25	16051
4	23096	9.28	1.25	15993
5	22946	9.28	1.26	16208
6	23058	9.27	1.25	16031
Ortalama	22958	9.28	1.26	16048
SD	125.68	0.01	0.01	113.16
% RSD	0.55	0.15	1.00	0.71

Tablo 4-26. Yöntem validasyonu sistem uygunluk çalışması numune çözeltisi verileri

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi		
<i>Favipiravir</i>		
Enjeksiyon Sırası	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı (dakika)
1	21301259	9.27
2	21259875	9.27
3	21253882	9.27
4	21257021	9.27
5	21248495	9.26
6	21255396	9.27
Ortalama	21262655	9.27
Std. Sapma	19286.80	0.003
% RSD	0.09	0.03

4.2.3. Teşhis Edilebilme Alt Sınırı Bulguları

Bölüm 3.3.3’te anlatıldığı gibi gerçekleştirilen *teşhis edilebilme alt sınırı* parametresinde, verilen LOD çözeltisi enjeksiyonuna ait S/N (signal-to-noise) oranı

hesaplanmıştır. Hesaplanan değer, 3:1 oranına yakın tespit edilmiş olup, istenen kabul kriteri sağlanmıştır.

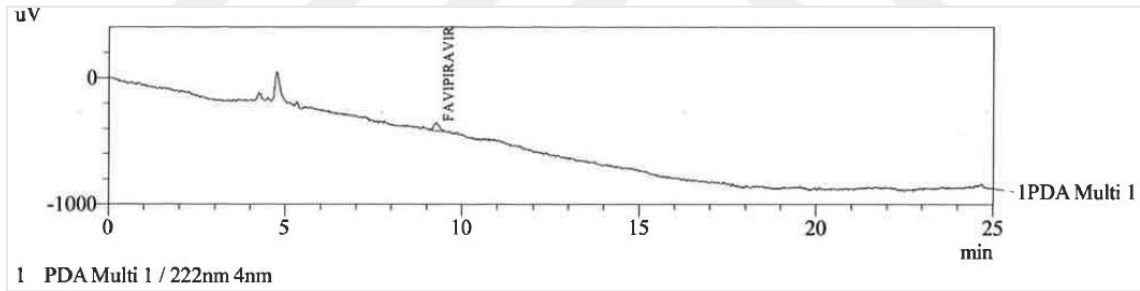
S/N oranı ile birlikte, Favipiravir LOD seviyesi konsantrasyonu, %LOD ve bu seviyedeki Favipiravir pik alanı raporlanmıştır.

Elde edilen sayısal sonuçlar Tablo 4-27’de; LOD seviyesine ait kromatogram Şekil 4-23’te verilmiştir.

Tablo 4-27. Yöntem validasyonu Favipiravir teşhis edilebilme alt sınırı (LOD) sonuçları

Teşhis Edilebilme Alt Sınırı (LOD) <i>Favipiravir</i>			
Konsantrasyon (mg/ml)	%LOD*	Alan	S/N Oranı
0.00001	% 0.002	663	3.59

*Numune konsantrasyonu %100 kabul edilerek hesaplanan LOD yüzdesidir.



Şekil 4-23. Favipiravir LOD seviyesi kromatogramı

4.2.4. Kantitatif Tayin Sınırı Bulguları

Bölüm 3.3.4’te anlatıldığı gibi gerçekleştirilen *kantitatif tayin sınırı* parametresinde, LOQ çözeltisi enjeksiyonlarından elde edilen S/N (signal-to-noise) oranı hesaplanmıştır. S/N oranı 10:1’e yakın bulunmuş; bu seviyeden verilen ardışık enjeksiyonlarda Favipiravir pik alanları arasındaki %RSD 10.0’un altında saptanmıştır. Böylelikle istenen tüm kabul kriterleri karşılanmıştır.

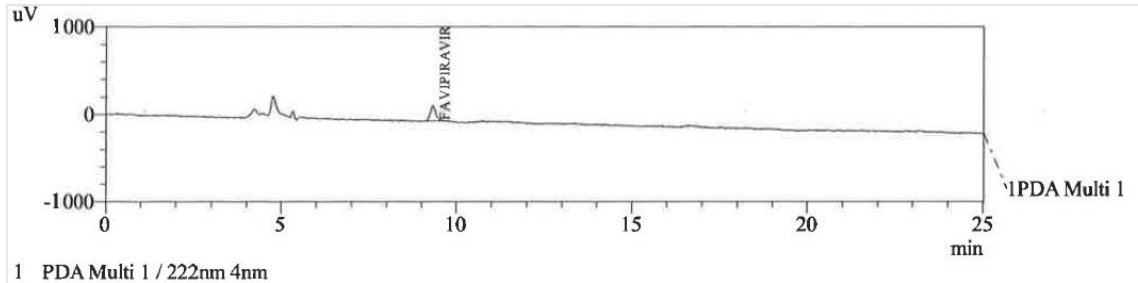
S/N oranı ile birlikte, bu çözeltinin 6 ardışık enjeksiyonundan elde edilen Favipiravir pik alanları ve ortalaması, pik alanları arasındaki standart sapma ve bağıl standart sapma, %LOQ ve Favipiravir LOQ seviyesi konsantrasyonu raporlanmıştır.

Elde edilen sayısal sonuçlar Tablo 4-28’de; LOQ seviyesine ait kromatogram Şekil 4-24’te verilmiştir.

Tablo 4-28. Yöntem validasyonu Favipiravir kantitatif tayin sınırı (LOQ) sonuçları

Kantitatif Tayin Sınırı (LOQ)			
Favipiravir			
Enjeksiyon Sırası	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı (dakika)	
1	1959	9.30	
2	1858	9.30	
3	1837	9.31	
4	1920	9.30	
5	1922	9.32	
6	1842	9.32	
Ortalama	1890	9.31	
SD	50.64	0.01	
% RSD	2.68	0.10	
Kantitatif Tayin Sınırı (LOQ)			
Favipiravir			
Konsantrasyon (mg/ml)	% LOQ*	Alan	S/N Oranı
0.00003	% 0.006	1890	10.27

*Numune konsantrasyonu %100 kabul edilerek hesaplanan LOQ yüzdesidir.



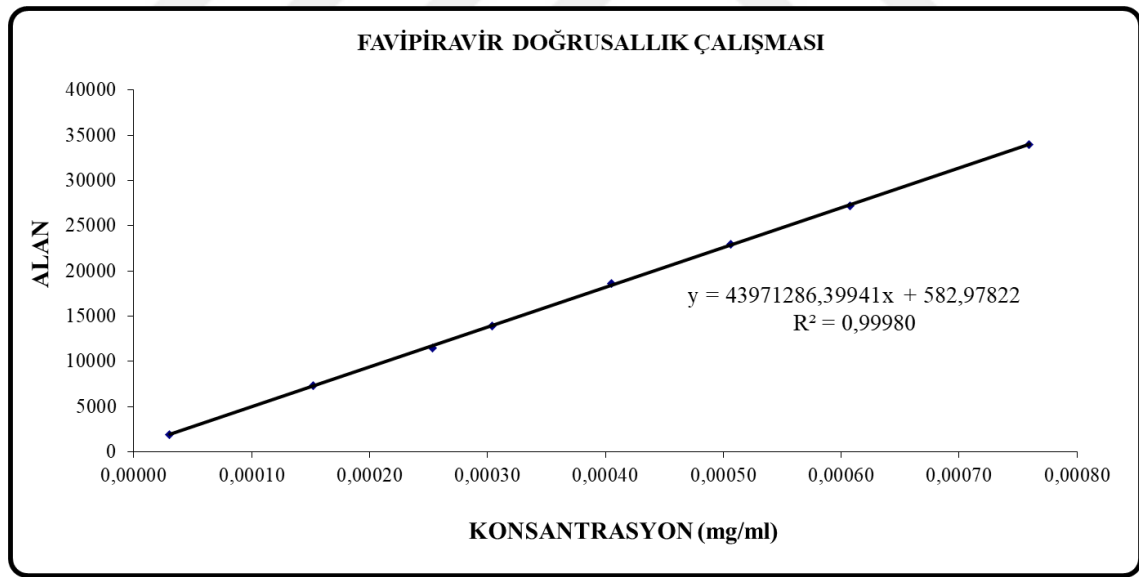
Şekil 4-24. Favipiravir LOQ seviyesi kromatogramı

4.2.5. Doğrusallık ve Aralık Bulguları

Bölüm 3.3.5'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilen *doğrusallık ve aralık* parametresinde, her bir seviye için verilen enjeksiyonlardan ilgili seviyedeki Favipiravir konsantrasyon değerine karşılık Favipiravir pik alanları elde edilmiştir. Elde edilen pik alanlarının ortalaması, pik alanları arasındaki standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin Favipiravir konsantrasyonlarına karşılık gelen Favipiravir pik alanları kullanılarak bir doğrusallık grafiği çizilmiş ve oluşan doğrunun denklemi en küçük kareler yöntemine göre elde edilmiştir. Alansal olarak elde edilen cevaplar orantılı olmakla birlikte, konsantrasyonlara karşılık gelen sinyallerin kesişimi olan noktalar, çizilen grafikteki doğrunun üzerinde yer almaktadır.

Bu çalışma aynı zamanda Favipiravir molekülünün geliştirilen analitik yöntemde doğrusal olduğu en uygun konsantrasyon aralığının saptanmasında da kullanılmıştır.

Elde edilen tüm sonuçlar Tablo 4-29, Tablo 4-30 ve Şekil 4-25'te verilmiştir.



Şekil 4-25. Favipiravir doğrusallık grafiği ve denklemi

Tablo 4-29. Yöntem validasyonu Favipiravir doğrusallık çalışması verileri

Favipiravir Doğrusallık Çalışması					
Seviye (%)	Konsantrasyon (mg/ml)	Alan	Ortalama Alan	SD	% RSD
% LOQ	0.00003	1959	1890	50.64	2.68
		1858			
		1837			
		1920			
		1922			
		1842			
% 30	0.00015	7216	7343	114.55	1.56
		7438			
		7376			
% 50	0.00025	11522	11473	125.87	1.10
		11567			
		11330			
% 60	0.00030	13869	13934	56.72	0.41
		13971			
		13963			
% 80	0.00041	18480	18651	152.92	0.82
		18774			
		18700			
% 100	0.00051	23014	22958	125.68	0.55
		22759			
		22874			
		23096			
		22946			
		23058			
% 120	0.00061	26976	27188	235.28	0.87
		27146			
		27441			
% 150	0.00076	34133	33938	169.89	0.50
		33820			
		33862			

Analitik yöntem validasyonu doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen veriler kullanılarak Microsoft Office 365 Excel (Sürüm 2009) programı aracılığıyla Favipiravir doğrusallık denklemi, denklemin eğimi, y-ekseni kesim noktası, korelasyon katsayısı (R), belirleme (determinasyon) katsayısı (R²), y-kesim noktası kriteri (%) hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Y-kesim noktası} = \frac{Y_{\text{kesim noktası}}}{\%100 \text{ seviyesindeki alan}} \times 100$$

Tablo 4-30. Favipiravir doğrusallık grafiği ve denklemine ait sayısal bulgular

Doğrusallık denklemi	$y=43971286.39941x+582.97822$
Eğim	43971286.39941
y-ekseni kesim noktası	582.97822
Korelasyon katsayısı (R)	0.99990
Belirleme (determinasyon) katsayısı (R²)	0.99980
y-kesim noktası kriteri (%)	2.54

Raporlanan değerlerden belirleme (determinasyon) katsayısı 0.99980 elde edilmiş olup kabul kriterini ($R^2 \geq 0.999$) karşılamaktadır. Y-kesim noktası kriteri (%), 2.54 elde edilmiş olup kabul kriterini (standart çözeltisinin verdiği sinyalin $\pm$ % 20.0 aralığı) karşılamaktadır.

Yapılan doğrusallık çalışmasının sonucunda, Favipiravir molekülünün geliştirilen analitik yöntemde lineer olduğu % LOQ - % 150 (0.00003 mg/ml – 0.00075 mg/ml) konsantrasyonları, yöntemin uygun çalışma aralığı olarak belirlenmiştir. Analitik yöntem için doğrusallık parametresinde oluşturulan bu konsantrasyon aralığı doğruluk çalışmasında da uygunluk göstermiştir.

4.2.6. Doğruluk Bulguları

Bölüm 3.3.6’da anlatıldığı gibi gerçekleştirilen **doğruluk** parametresinde, hazırlanan 2 farklı standart çözeltisinin enjeksiyonlarına ait Favipiravir pik alanları arasındaki uyum ile 6 tekrarlı enjeksiyon verilen standart çözeltisi-1’e ait Favipiravir pik alanları arasındaki % RSD, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı değerleri sistem uygunluk kriterleri içerisinde tespit edilerek raporlanmıştır. Hazırlanan % LOQ, % 100 ve % 150 seviyelerindeki her bir ve ortalama geri kazanım değeri % 90.0 - % 110.0 limiti içerisinde saptanmış olup, ilgili kabul kriteri karşılanmıştır.

Favipiravir geri kazanım çözeltilerine ait konulan/bulunan konsantrasyonlar, % geri kazanım sonuçları, bu sonuçlara ait standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri ile % 95 güven aralığı hesaplanarak raporlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar Tablo 4-31 ve Tablo 4-32’de verilmiştir.

Tablo 4-31. Yöntem validasyonu doğruluk çalışması için enjeksiyon verilen standart çözeltilerine ait veriler

Standart çözeltisi-1 ve 2'ye ait Favipiravir pik alanları arasındaki % Uyum	
100.9	
Standart çözeltisi-1 enjeksiyonlarına ait veriler (6 ardışık enjeksiyon)	
Kuyruklanma Faktörü	1.24
Teorik Plaka Sayısı	15871
% RSD	0.80

Tablo 4-32. Yöntem validasyonu doğruluk çalışması verileri

	Favipiravir Konulan Konsantrasyon (mg/ml)	Favipiravir Bulunan Konsantrasyon (mg/ml)	Favipiravir Geri Kazanım (%)	Ortalama Geri Kazanım (%)	SD	% RSD
% L O Q	0.000030	0.000032	106.67	106.30	1.11	1.05
	0.000030	0.000032	106.67			
	0.000030	0.000032	106.67			
	0.000030	0.000032	106.67			
	0.000030	0.000032	106.67			
	0.000030	0.000032	106.67			
	0.000030	0.000031	103.33			
	0.000030	0.000032	106.67			
	0.000030	0.000032	106.67			
% 1 0 0	0.00050	0.00048	96.00	96.22	0.67	0.69
	0.00050	0.00048	96.00			
	0.00050	0.00048	96.00			
	0.00050	0.00049	98.00			
	0.00050	0.00048	96.00			
	0.00050	0.00048	96.00			
	0.00050	0.00048	96.00			
	0.00050	0.00048	96.00			
	0.00050	0.00048	96.00			
% 1 5 0	0.00075	0.00073	97.33	95.85	0.80	0.84
	0.00075	0.00072	96.00			
	0.00075	0.00071	94.67			
	0.00075	0.00072	96.00			
	0.00075	0.00072	96.00			
	0.00075	0.00071	94.67			
	0.00075	0.00072	96.00			
	0.00075	0.00072	96.00			
	0.00075	0.00072	96.00			
Tüm Enjeksiyonlara Ait Sonuçlar				99.46	5.00	5.03
% 95 Güven Aralığı				97.48		
				101.44		

4.2.7. Kesinlik Bulguları

4.2.7.1. Tekrarlanabilirlik Bulguları

Bölüm 3.3.7.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen **tekrarlanabilirlik** parametresinde, enjeksiyon verilen 2 farklı standart çözeltisine ait sonuçların hepsi sistem uygunluk kabul kriterleri içerisinde yer almaktadır. Bu çalışmada kullanılan standart çözeltileri doğruluk çalışmasındakiler ile aynı olup, verileri Tablo 4-31’de verildiği gibidir.

Birbirinden bağımsız hazırlanan 6 adet Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltisi üzerinden yapılan değerlendirme sonunda her bir ve ortalama geri kazanım değeri % 90.0 - % 110.0 limiti içerisinde; elde edilen geri kazanım sonuçları arasındaki %RSD ise 10.0’ın altında saptanmış olup, ilgili kabul kriterleri karşılanmıştır. Bu çözeltilerin Favipiravir’e ait konulan/bulunan konsantrasyonları, Favipiravir % geri kazanım sonuçları, bu sonuçların standart sapması, bağıl standart sapması ve % 95 güven aralığı hesaplanarak raporlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-33’de verilmiştir.

Tablo 4-33. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltileri ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışması verileri

Favipiravir + Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltileri ile Tekrarlanabilirlik Çalışması				
<i>Favipiravir % Geri Kazanımı</i>				
Çözeltiler	Pik Alanı	Konulan Konsantrasyon (mg/ml)	Bulunan Konsantrasyon (mg/ml)	% Geri Kazanım
N-1	23393	0.000501	0.000491	98.00
N-2	23421	0.000501	0.000491	98.00
N-3	23426	0.000501	0.000491	98.00
N-4	23452	0.000501	0.000492	98.20
N-5	23386	0.000501	0.000491	98.00
N-6	23490	0.000501	0.000493	98.40
Ortalama Geri Kazanım (%)				98.10
SD				0.17
% RSD				0.17
% 95 Güven Aralığı				97.93
				98.28

Birbirinden bağımsız hazırlanan 6 adet numune çözeltisi üzerinden yapılan değerlendirme sonunda; % safsızlık sonuçlarının raporlama limitinin (% 0.05) altında

kalması sebebiyle, sonuçlar arasındaki standart sapma, bağıl standart sapma ve % 95 güven aralığı hesaplanmamıştır; ancak her bir numune çözeltisinin safsızlık değerlendirmesi sayısal değer olarak ayrı ayrı raporlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-34'te verilmiştir.

Tablo 4-34. Numune çözeltileri ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışması verileri

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltileri ile Tekrarlanabilirlik Çalışması						
<i>% Safsızlık Sonuçları</i>						
Safsızlıklar	Numune 1	Numune 2	Numune 3	Numune 4	Numune 5	Numune 6
RRT 0.51	0.016	0.017	0.016	0.015	0.017	0.016
RRT 0.76	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.005
RRT 1.11	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002	0.002
RRT 1.18	0.005	0.005	0.005	0.006	0.005	0.006
RRT 1.99	0.001	0.003	0.002	0.002	0.001	0.004
Her Bir Bilinmeyen Safsızlık*	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA
Toplam Safsızlık*	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA

*Raporlama Limitinin (% 0.05) altında kalan safsızlıklar dahil edilmeden hesaplanmıştır.

RLA: Raporlama Limitinin Altında

Safsızlık spesifikasyonları Bölüm 4.1.6'da verilmiştir.

4.2.7.2. Ara Kesinlik Bulguları

Bölüm 3.3.7.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen **ara kesinlik** parametresinde, hazırlanan 2 farklı standart çözeltisinin enjeksiyonlarına ait Favipiravir pik alanları arasındaki uyum ile 6 tekrarlı enjeksiyon verilen standart çözeltisi-1'e ait Favipiravir pik alanları arasındaki % RSD, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı değerleri sistem uygunluk kriterleri içerisinde tespit edilerek raporlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-35'te verilmiştir.

Farklı bir analist tarafından farklı bir günde gerçekleştirilen Ara Kesinlik çalışması ile birbirinden bağımsız hazırlanan 6 adet Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltisi üzerinden yapılan değerlendirme sonunda; her bir ve ortalama geri kazanım değeri % 90.0 - % 110.0 limiti içerisinde; elde edilen geri kazanım sonuçları

arasındaki % RSD ise 10.0'ın altında saptanmış olup, ilgili kabul kriterleri karşılanmıştır. Bu çözeltilerin Favipiravir'e ait konulan/bulunan konsantrasyonları, Favipiravir % geri kazanım sonuçları, bu sonuçların standart sapması, bağıl standart sapması ve % 95 güven aralığı hesaplanarak raporlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-36'da verilmiştir.

Tablo 4-35. Yöntem validasyonu ara kesinlik çalışması için enjeksiyon verilen standart çözeltilerine ait veriler

Standart çözeltisi-1 ve 2'ye ait Favipiravir pik alanları arasındaki % Uyum	
98.2	
Standart çözeltisi-1 enjeksiyonlarına ait veriler (6 ardışık enjeksiyon)	
Kuyruklanma Faktörü	1.21
Teorik Plaka Sayısı	16011
% RSD	0.86

Tablo 4-36. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltileri ile gerçekleştirilen ara kesinlik çalışması verileri

Favipiravir + Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltileri ile Ara Kesinlik Çalışması				
Favipiravir % Geri Kazanımı				
Çözeltiler	Pik Alanı	Konulan Konsantrasyon (mg/ml)	Bulunan Konsantrasyon (mg/ml)	% Geri Kazanım
N-1	26404	0.000504	0.000498	98.81
N-2	26260	0.000504	0.000496	98.41
N-3	26191	0.000504	0.000494	98.02
N-4	26273	0.000504	0.000496	98.41
N-5	26218	0.000504	0.000495	98.21
N-6	26247	0.000504	0.000495	98.21
Ortalama Geri Kazanım (%)				98.35
SD				0.27
% RSD				0.28
% 95 Güven Aralığı				98.06
				98.63

Bu çalışma ile 3.3.7.1 Tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen Favipiravir % geri kazanım sonuçları arasındaki % RSD 10.0'ın altında bulunmuş olup, istenen kabul kriteri karşılanmıştır. Her iki çalışmadan alınan verilerin birlikte değerlendirilmesiyle elde edilen sonuçların ortalaması, sonuçlar arasındaki standart sapma, bağıl standart sapma, % 95 güven aralığı hesaplanarak raporlanmıştır. Alınan bu sonuçlar Tablo 4-37'de verilmiştir.

Tablo 4-37. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltileri ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik & ara kesinlik çalışmalarının birlikte değerlendirilmiş verileri

12 farklı Favipiravir geri kazanım sonucunun ortalaması (%)	98.23
12 farklı Favipiravir geri kazanım sonucunun SD'si	0.25
12 farklı Favipiravir geri kazanım sonucunun RSD'si (%)	0.25
Güven Sınırı	0.16
(%) Güven Aralığı	98.07
	98.38

Favipiravir % geri kazanımı için gerçekleştirilen Ara Kesinlik ve 3.3.7.1 Tekrarlanabilirlik çalışmasına ait sonuçların uyumu F-test ve t-test ile de gösterilmiştir. Uygulanan istatistiksel testlere ait veriler Tablo 4-38 ve Tablo 4-39'da verilmiştir.

Farklı bir analist tarafından farklı bir günde gerçekleştirilen Ara Kesinlik çalışması ile birbirinden bağımsız hazırlanan 6 adet numune çözeltisi üzerinden yapılan değerlendirme sonunda; % safsızlık sonuçlarının raporlama limitinin (% 0.05) altında kalması sebebiyle, sonuçlar arasındaki standart sapma, bağıl standart sapma ve % 95 güven aralığı hesaplanmamış ve sonuçların uyumu için F-test ve t-test uygulanmamıştır; ancak her bir numune çözeltisinin safsızlık değerlendirmesi sayısal değer olarak ayrı ayrı raporlanmıştır. 3.3.7.1 Tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen safsızlık sonuçlarının bu limitin altında kalması sebebiyle her iki çalışmaya ait sonuçların karşılaştırılmasına dair standart sapma, bağıl standart sapma, % 95 güven aralığı hesabı ve istatistiksel uyum testleri yapılmamıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-40'ta verilmiştir.

Tablo 4-38. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltileri ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmalarından elde edilen Favipiravir % geri kazanım sonuçları için uyum testi - 1 – *F-test*

F-Test Varyanslar İçin İki Örnek		
% Geri Kazanım Favipiravir	Ara Kesinlik Çalışması	Tekrarlanabilirlik Çalışması
Ortalama	98.35	98.10
Varyans	0.07	0.03
Gözlem	6.00	6.00
df	5.00	5.00
F	2.64	
P(F<=f) tek-uçlu	0.16	
F Kritik iki-uçlu	5.05	

Her iki çalışmanın uyumunu kanıtlayan *f-test* kriteri [$F < F_{\text{Kritik iki-uçlu}}$] sağlanmıştır.

Tablo 4-39. Favipiravir + yardımcı madde (plasebo) çözeltileri ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmalarından elde edilen Favipiravir % geri kazanım sonuçları için uyum testi – 2 – *t-test*

t-Test: Farklı Varyanslar Varsayarak İki Örnek		
% Geri Kazanım Favipiravir	Ara Kesinlik Çalışması	Tekrarlanabilirlik Çalışması
Ortalama	98.35	98.10
Varyans	0.07	0.03
Gözlem	6.00	6.00
Öngörülen Ortalama Farkı	0.00	
df	8.00	
t Stat	1.87	
P(T<=t) tek-uçlu	0.05	
t Kritik tek-uçlu	1.86	
P(T<=t) iki-uçlu	0.10	
t Kritik iki-uçlu	2.31	

Her iki çalışmanın uyumunu kanıtlayan *t-test* kriteri [$t_{\text{stat}} < t_{\text{kritik iki-uçlu}}$] sağlanmıştır.

Tüm bu sonuçlar, yöntemin birbirinden bağımsız olarak, farklı günde/kişilerce hazırlanan çözeltiler için farklı sonuçlar vermediğini göstermektedir.

Tablo 4-40. Numune çözeltileri ile gerçekleştirilen ara kesinlik çalışması verileri

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltileri ile Ara Kesinlik Çalışması						
% Safsızlık Sonuçları						
Safsızlıklar	Numune 1	Numune 2	Numune 3	Numune 4	Numune 5	Numune 6
RRT 0.51	0.017	0.016	0.014	0.015	0.016	0.015
RRT 0.76	0.012	0.010	0.010	0.011	0.010	0.010
RRT 1.11	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004
RRT 1.18	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.004
RRT 1.99	0.002	0.001	0.001	0.002	0.003	0.002
Her Bir Bilinmeyen Safsızlık*	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA
Toplam Safsızlık*	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA

*Raporlama Limitinin (% 0.05) altında kalan safsızlıklar dahil edilmeden hesaplanmıştır.

RLA: Raporlama Limitinin Altında

Safsızlık spesifikasyonları Bölüm 4.1.6'da verilmiştir.

4.2.8. Sağlamlık Bulguları

Bölüm 3.3.8'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen sağlamlık çalışmalarında yöntemin akış hızı, kolon sıcaklığı ve dalga boyu parametrelerindeki değişikliklerde ve farklı seri numaralı kolonlar kullanıldığında elde edilen sonuçlar incelenmiştir.

Akış hızı, kolon sıcaklığı, dalga boyu ve farklı seri numaralı kolon parametrelerinin her birinde, standart çözeltisinden verilen 6 ardışık enjeksiyonun Favipiravir pik alanları ortalaması, alıkonma zamanı, pik alanları arasındaki standart sapma, % RSD, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı raporlanmıştır. Başlangıç ve değişim sonunda Favipiravir pik alanları arasındaki % değişim değerleri ile standart çözeltisi enjeksiyonlarından elde edilen tüm veriler Tablo 4-41 ve Tablo 4-42'de verilmiştir.

Tablo 4-41. Standart çözeltisi için akış hızı, kolon sıcaklığı ve dalga boyu değişimi sonuçları

Standart Çözeltisi					
Favipiravir					
Ortalama Pik Alanı	Pik Alanları Arasındaki SD	Pik Alanları Arasındaki %RSD	Alıkonma Zamanı (dakika)	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
Başlangıç Şartları*					
23980	192.70	0.80	9.23	1.241	15871
Akış Hızı Değişimi – 1 0.45 ml/dakika					
26577	285.25	1.07	10.29	1.245	16133
Akış Hızı Değişimi – 2 0.55 ml/dakika					
21945	167.42	0.76	8.42	1.251	15735
Kolon Sıcaklığı Değişimi – 1 28 °C					
23710	111.06	0.47	9.32	1.241	15991
Kolon Sıcaklığı Değişimi – 2 32 °C					
23795	197.40	0.83	9.15	1.239	16041
Dalga Boyu Değişimi – 1 215 nm					
19553	59.60	0.30	9.23	1.252	15831
Dalga Boyu Değişimi – 2 230 nm					
22283	130.87	0.59	9.23	1.241	15879
Favipiravir Pik Alanı % Değişim Sonuçları					
					% Değişim
Akış Hızı Değişimi – 1 0.45 ml/dakika					10.83
Akış Hızı Değişimi – 2 0.55 ml/dakika					8.49
Kolon Sıcaklığı Değişimi – 1 28 °C					1.13
Kolon Sıcaklığı Değişimi – 2 32 °C					0.77
Dalga Boyu Değişimi – 1 215 nm					18.46
Dalga Boyu Değişimi – 2 230 nm					7.08

*Bölüm 3.1.1'de verilen Analitik Yöntem şartlarını temsil etmekte olup, bu şart için kullanılan kromatografik kolona ait seri numarası H20-113547'dir.

Tablo 4-42. Standart çözeltisi kolon değişimi sonuçları

Standart Çözeltisi					
<i>Favipiravir</i>					
Ortalama Pik Alanı	Pik Alanları Arasındaki SD	Pik Alanları Arasındaki %RSD	Alıkonma Zamanı (dakika)	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
Başlangıç Şartları*					
23322	128.96	0.55	9.21	1.252	15854
Kolon Değişimi					
<i>Kinetex® EVO C18 250 x 4.6 mm, 5 µm, 100Å (Seri No: H19-377918)</i>					
23418	145.73	0.62	9.62	1.240	18974
Favipiravir Pik Alanı % Değişim Sonuçları					
					% Değişim
Kolon Değişimi					
<i>Kinetex® EVO C18 100Å 250 x 4.6 mm, 5 µm (Seri No: H19-377918)</i>					0.41

*Bölüm 3.1.1’de verilen Analitik Yöntem şartlarını temsil etmekte olup, bu şart için kullanılan kromatografik kolona ait seri numarası H20-113547’dir.

Bölüm 3.3.8’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen parametrelerin her birinde, numune çözeltisinden verilen 3 ardışık enjeksiyondan elde edilen Favipiravir pikinin ortalama alanı, alıkonma zamanı, pik alanları arasındaki standart sapma, % RSD raporlanmıştır. Başlangıç ve değişim sonunda Favipiravir pik alanları arasındaki % değişim değerleri ile numune çözeltisi enjeksiyonlarından elde edilen tüm veriler Tablo 4-43 ve Tablo 4-44’te verilmiştir.

Standart çözeltisi için, her bir değişim sonucunda sistem uygunluk kabul kriterleri sağlanmıştır.

Standart ve numune çözeltilerinin her ikisi için, uygulanan değişimlerden kolon değişimi ile kolon sıcaklığı değişimlerinin ikisinde de Favipiravir pik alanlarının başlangıç şartlarına göre % değişimi 5.0’dan küçüktür; akış hızı ve dalga boyu değişimleri başlangıç şartlarına göre değerlendirildiğinde ise, elde edilen % değişim 5.0’dan fazladır.

Uygulanan değişimler, numune çözeltileri safsızlık sonuçları (%) açısından değerlendirildiğinde, spesifikasyon limitlerini aşan sonuçlar alınmamış olup başlangıç şartlarında elde edilen safsızlık sonuçları (%) ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 4-43. Numune çözeltisi sağlamlık parametresi sonuçları

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi					
<i>Favipiravir</i>					
	Ortalama Pik Alanı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanları Arasındaki SD	Pik Alanları Arasındaki % RSD	Başlangıca Göre % Değişim
Başlangıç Şartları*	21302722	9.21	9453.40	0.04	-
Akış Hızı Değişimi – 1 0.45 ml/dakika	23652161	10.29	4646.85	0.02	11.03
Akış Hızı Değişimi – 2 0.55 ml/dakika	19332363	8.42	11748.22	0.06	9.25
Kolon Sıcaklığı Değişimi – 1 28 °C	21184959	9.33	8258.53	0.04	0.55
Kolon Sıcaklığı Değişimi – 2 32 °C	21099816	9.14	11879.44	0.06	0.95
Dalga Boyu Değişimi – 1 215 nm	17680305	9.21	3673.19	0.02	17.00
Dalga Boyu Değişimi – 2 230 nm	18928591	9.21	4976.18	0.03	11.14
Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi					
<i>Favipiravir</i>					
	Ortalama Pik Alanı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanları Arasındaki SD	Pik Alanları Arasındaki % RSD	Başlangıca Göre % Değişim
Başlangıç Şartları*	20862711	9.19	19707.19	0.09	-
Kolon Değişimi Kinetex® EVO C18 100Å 250 x 4.6 mm, 5 µm (Seri No: H19- 377918)	20724816	9.62	6976.33	0.03	0.66

*Bölüm 3.1.1’de verilen Analitik Yöntem şartlarını temsil etmekte olup, bu şart için kullanılan kromatografik kolona ait seri numarası H20-113547’dir.

Tablo 4-44. Numune çözeltisi sağlamlık parametresi safsızlık sonuçları (%)

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi							
	Başlangıç Şartları*	0.45 ml/dakika	0.55 ml/dakika	28 °C	32 °C	215 nm	230 nm
RRT 0.51	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.011	0.004
RRT 0.76	0.006	0.004	0.004	0.004	0.003	0.007	0.006
RRT 1.11	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002	0.001	0.004
RRT 1.18	0.003	0.003	0.005	0.006	0.006	0.003	0.003
RRT 1.99	0.002	DE	DE	0.002	0.001	0.002	0.002
Her Bir Bilinmeyen Safsızlık**	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA
Toplam Safsızlık**	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA
Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi							
	Başlangıç Şartları*			Kolon Değişimi			
RRT 0.51	0.009			0.010			
RRT 0.76	0.006			0.010			
RRT 1.11	0.002			0.001			
RRT 1.18	0.004			0.005			
RRT 1.99	0.003			0.002			
Her Bir Bilinmeyen Safsızlık**	RLA			RLA			
Toplam Safsızlık**	RLA			RLA			

*Bölüm 3.1.1'de verilen Analitik Yöntem şartlarını temsil etmekte olup, bu şart için kullanılan kromatografik kolona ait seri numarası H20-113547'dir.

**Raporlama Limitinin (% 0.05) altında kalan safsızlıklar dahil edilmeden hesaplanmıştır.

RLA: Raporlama Limitinin Altında, DE: Dedekte Edilmedi (Safsızlık spesifikasyonları Bölüm 4.1.6'da verilmiştir)

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde şu sonuca varılmaktadır:

Yöntem; kolon sıcaklığı ve kolon değişimine karşı sağlam iken, 0.5 ml/dakika akış hızı ve 222 nm dalga boyu yöntem için spesifiktir.

4.2.9. Çözelti Stabilitesi Bulguları

Bölüm 3.3.9’da anlatıldığı gibi gerçekleştirilen çözelti stabilitesi çalışmasında, HPLC koşullarında ve buzdolabı koşullarında (2–8°C) bekletilen standart ve numune çözeltilerinden belirtilen saatlerde 3’er enjeksiyon verilmiştir. Öncelikle, her iki çözeltide de Favipiravir pik alanlarının başlangıçtaki ve ilgili saatteki sonuçlarına bakılarak aralarındaki değişim % cinsinden hesaplanmış, alınan bu sonuçlar ile Favipiravir ortalama pik alanları raporlanmıştır. Ardından, ilgili koşulda ve saatlerde enjeksiyon verilen numune çözeltilerinin safsızlık sonuçları kontrol edilerek raporlanmıştır. Alınan sonuçlar Tablo 4-45, Tablo 4-46, Tablo 4-47 ve Tablo 4-48’de verilmiştir.

Tablo 4-45. Buzdolabı koşullarında (2-8 °C) Favipiravir pik alanı değişimleri

Süre (saat)	Buzdolabı Koşulları (2-8 °C)			
	Standart Çözeltisi		Numune Çözeltisi	
	Ortalama Alan	% Değişim	Ortalama Alan	% Değişim
Başlangıç	23022	-	21271672	-
6	23104	0.36	21223460	0.23
21	23114	0.40	21222567	0.23
27	23126	0.45	21230951	0.19
45	22864	0.68	21179818	0.43

Tablo 4-46. HPLC koşullarında Favipiravir pik alanı değişimleri

Süre (saat)	HPLC Koşulları			
	Standart Çözeltisi		Numune Çözeltisi	
	Ortalama Alan	% Değişim	Ortalama Alan	% Değişim
Başlangıç	23022	-	21271672	-
4	23288	1.16	21195768	0.36
19	23316	1.28	20978312	1.38
27	23321	1.30	20986148	1.34
45	23337	1.37	20789536	2.27

Tablo 4-47. Buzdolabı koşullarında (2 – 8 °C) numune çözeltisi safsızlıklarının % sonuç verileri

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi					
<i>Buzdolabı Koşulları (2 – 8 °C)</i>					
	Başlangıç	4. Saat	19. Saat	27. Saat	45. Saat
RRT 0.51	0.018	0.046	0.098	0.104	0.134
RRT 0.76	0.006	0.007	0.006	0.006	0.006
RRT 1.11	0.002	0.002	0.003	0.003	0.002
RRT 1.18	0.002	0.002	0.004	0.004	0.005
RRT 1.99	0.003	0.002	0.002	0.003	0.003
Her Bir Bilinmeyen Safsızlık*	RLA	0.065	0.098	0.104	0.134
Toplam Safsızlık*	RLA	0.065	0.098	0.104	0.134

*Raporlama Limitinin (% 0.05) altında kalan safsızlıklar dahil edilmeden hesaplanmıştır.

RLA: Raporlama Limitinin Altında (Safsızlık spesifikasyonları Bölüm 4.1.6'da verilmiştir)

Tablo 4-48. HPLC koşullarında numune çözeltisi safsızlıklarının % sonuç verileri

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi					
<i>HPLC Koşulları</i>					
	Başlangıç	6. Saat	21. Saat	27. Saat	45. Saat
RRT 0.51	0.018	0.102	0.234	0.295	0.427
RRT 0.76	0.006	0.007	0.006	0.006	0.006
RRT 1.11	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003
RRT 1.18	0.002	0.004	0.008	0.010	0.014
RRT 1.99	0.003	0.002	0.003	0.002	0.002
Her Bir Bilinmeyen Safsızlık*	RLA	0.102	0.234	0.295	0.427
Toplam Safsızlık*	RLA	0.102	0.234	0.295	0.427

*Raporlama Limitinin (% 0.05) altında kalan safsızlıklar dahil edilmeden hesaplanmıştır.

RLA: Raporlama Limitinin Altında (Safsızlık spesifikasyonları Bölüm 4.1.6'da verilmiştir)

Numune çözeltisine ait Tablo 4-47 ve Tablo 4-48 verileri değerlendirildiğinde, RRT 0.51 safsızlığına ait sonuçların buzdolabı koşulları için 27. saatten itibaren; HPLC koşulları için 6. saatten itibaren spesifikasyon limitlerinin dışına çıktığı görülmüştür. Bu nedenle her iki koşul için her saat enjeksiyon verilmek üzere 6 saatlik bir kontrol analizi daha yapılmıştır. Bu çalışmaya ait veriler Tablo 4-49 ve Tablo 4-50’de görülmektedir.

Favipiravir pik alanlarının sonuçları değerlendirildiğinde; standart ve numune çözeltisinin başlangıç ve enjeksiyon saatlerindeki sonuçları arasındaki % değişim her iki koşulda da 45 saat boyunca 5.0’ın altında saptanmıştır. Numune çözeltisi safsızlıklar açısından değerlendirildiğinde; buzdolabı koşullarında (2 – 8 °C) 19 saat boyunca her bir bilinmeyen safsızlık ve toplam safsızlık açısından spesifikasyon limitlerini aşan sonuçlar gözlenmemiştir; ancak RRT 0.51 safsızlığı düzenli bir artış göstermiştir. Aynı safsızlık HPLC koşullarında numune çözeltisi sonuçlarını 6. saatten itibaren spesifikasyonlar açısından limit dışına çıkarmaktadır. Bu nedenle, her iki koşulda ek olarak gerçekleştirilen 6 saatlik çözelti stabilitesi çalışması ile numune çözeltisinin safsızlık sonuçları açısından stabil kaldığı süre belirlenmiştir.

Tablo 4-49. Buzdolabı koşullarında (2 – 8 °C) numune çözeltisi safsızlıklarının ilk 6 saatlik % sonuç verileri

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi							
Buzdolabı Koşulları (2 – 8 °C)							
	Başlangıç	1. Saat	2. Saat	3. Saat	4. Saat	5. Saat	6. Saat
RRT 0.51	0.018	0.018	0.018	0.025	0.045	0.070	0.077
RRT 0.76	0.007	0.007	0.006	0.006	0.006	0.007	0.006
RRT 1.11	0.003	0.002	0.003	0.003	0.002	0.003	0.002
RRT 1.18	0.002	0.003	0.004	0.004	0.005	0.004	0.005
RRT 1.99	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003	0.002	0.003
Her Bir Bilinmeyen Safsızlık*	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA	0.070	0.077
Toplam Safsızlık*	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA	0.070	0.077

*Raporlama Limitinin (% 0.05) altında kalan safsızlıklar dahil edilmeden hesaplanmıştır.

RLA: Raporlama Limitinin Altında (Safsızlık spesifikasyonları Bölüm 4.1.6’da verilmiştir)

Tablo 4-50. HPLC koşullarında numune çözeltisi safsızlıklarının 6 saatlik % sonuç verileri

Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tablet Numune Çözeltisi							
HPLC Koşulları							
	Başlangıç	1. Saat	2. Saat	3. Saat	4. Saat	5. Saat	6. Saat
RRT 0.51	0.019	0.018	0.018	0.030	0.046	0.092	0.105
RRT 0.76	0.006	0.007	0.006	0.006	0.007	0.007	0.006
RRT 1.11	0.002	0.002	0.003	0.002	0.002	0.003	0.002
RRT 1.18	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005
RRT 1.99	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003
Her Bir Bilinmeyen Safsızlık*	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA	0.092	0.105
Toplam Safsızlık*	RLA	RLA	RLA	RLA	RLA	0.092	0.105

*Raporlama Limitinin (% 0.05) altında kalan safsızlıklar dahil edilmeden hesaplanmıştır.

RLA: Raporlama Limitinin Altında (Safsızlık spesifikasyonları Bölüm 4.1.6'da verilmiştir)

Gerçekleştirilen tüm çalışmalar değerlendirildiğinde şu sonuçlara varılmaktadır:

Standart çözeltisi HPLC koşulları ve buzdolabı koşullarında (2 – 8 °C) 45 saat boyunca stabildir.

Numune çözeltisi HPLC koşulları ve buzdolabı koşullarında (2 – 8 °C) 2 saat boyunca safsızlıklar açısından stabil kalan sonuçlar vermektedir; numune çözeltilerinin hazırlandıktan sonra taze bir şekilde enjeksiyon verilmesi oldukça önemlidir.

4.3. Tabletlerde Favipiravir Analizi Bulguları

4.3.1. Geliştirilen Yöntem İle Tabletlerde Favipiravir Analizi Bulguları

Bu kısımda Bölüm 3.4'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen tabletlerde Favipiravir analizi çalışmalarından elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

HPLC sistemine enjekte edilen numune çözeltilerinden elde edilen tabletteki Favipiravir miktar tayinine ait tüm sonuçlar Tablo 4-51'de verilmiştir.

Tablo 4-51. Favipiravir 200 mg Film Kaplı Tabletlerin geliştirilen yöntem ile elde edilen Favipiravir miktar tayini analiz sonuçları

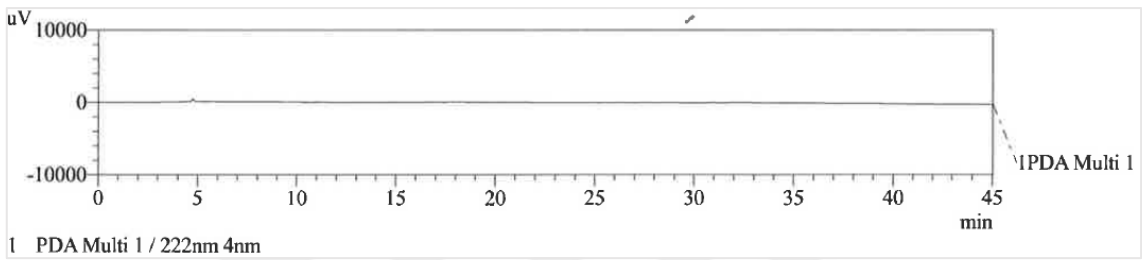
Numune Çözeltileri	Etiket Değeri (mg)	Konulan Konsantrasyon (mg/ml)	Bulunan Konsantrasyon (mg/ml)	Bulunan Sonuç (%)	Bulunan Sonuç (mg)
Numune-1	200	0.0500	0.0500	100.1	200.2
Numune -2		0.0500	0.0504	100.8	201.6
Numune -3		0.0500	0.0504	100.7	201.4
Numune -4		0.0500	0.0501	100.3	200.5
Numune -5		0.0500	0.0502	100.3	200.6
Numune -6		0.0500	0.0502	100.5	200.9
Ortalama			0.0502	100.4	200.9
SD			0.00	0.27	0.54
% RSD			0.27	0.27	0.27

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, geliştirilen analitik yöntem ile etiket değerinin (200 mg Favipiravir) tabletten miktar tayini analizlerinde sağlandığı görülmektedir.

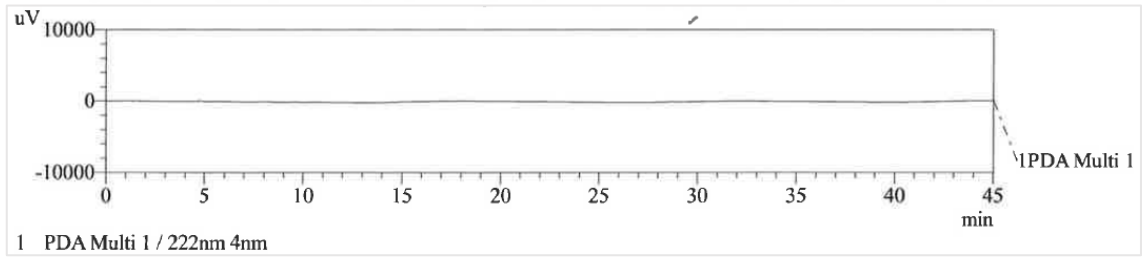
4.4. Bozundurma ve Stres Çalışmaları Bulguları

Bu kısımda Bölüm 3.5'te ayrıntılarıyla anlatıldığı şekilde yapılan bozundurma çalışmalarından elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

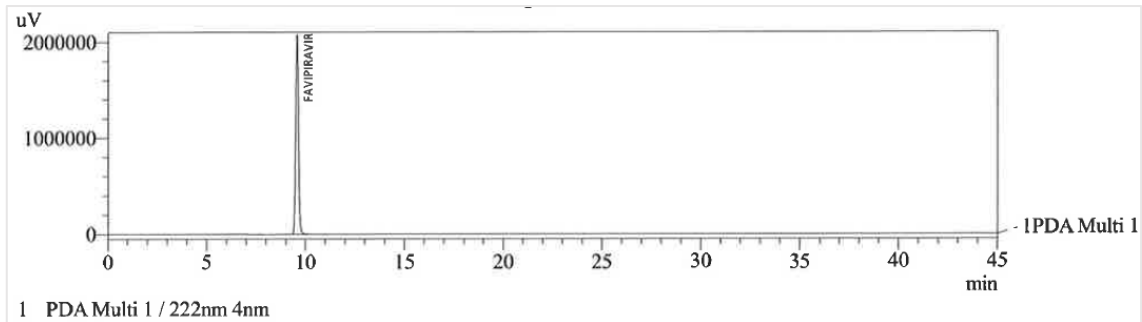
Bozundurma ve stres çalışmalarının başlangıcında HPLC sistemine enjekte edilen plasebo ve hareketli faz kromatogramları Şekil 4-26 ve Şekil 4-27'de görülmektedir. Referans numune çözeltisi kromatogramı Şekil 4-28'de ve referans numune çözeltisinde ölçülen Favipiravir pik saflığı da Şekil 4-29'da verilmiştir.



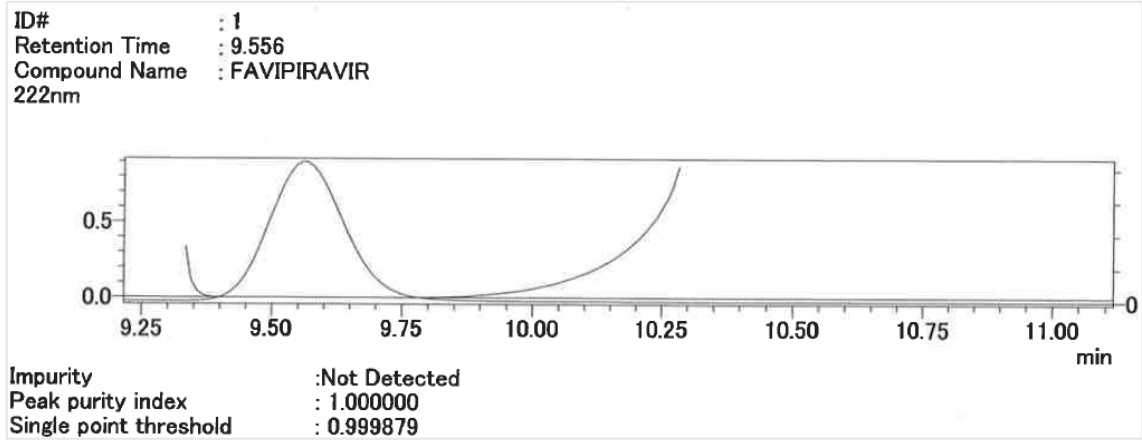
Şekil 4-26. Referans yardımcı madde (plasebo) çözeltisi kromatogramı



Şekil 4-27. Hareketli faz çözeltisi (seyreltme çözeltisi) kromatogramı



Şekil 4-28. Referans numune çözeltisi kromatogramı



Şekil 4-29. Referans numune çözeltisi Favipiravir pik saflığı

Normal koşul numunesine ait yüzde alan sonuçları Tablo 4-52’de ve Favipiravir pik saflığı için elde edilen sayısal bulgular Tablo 4-53’te görülmektedir. Normal koşul numunesi verileri ile daha sonra sırasıyla verilecek olan bozundurma çalışmalarının verileri karşılaştırılacaktır.

Tablo 4-52. Bozundurma çalışmasında referans olarak kullanılan normal koşul numunesi

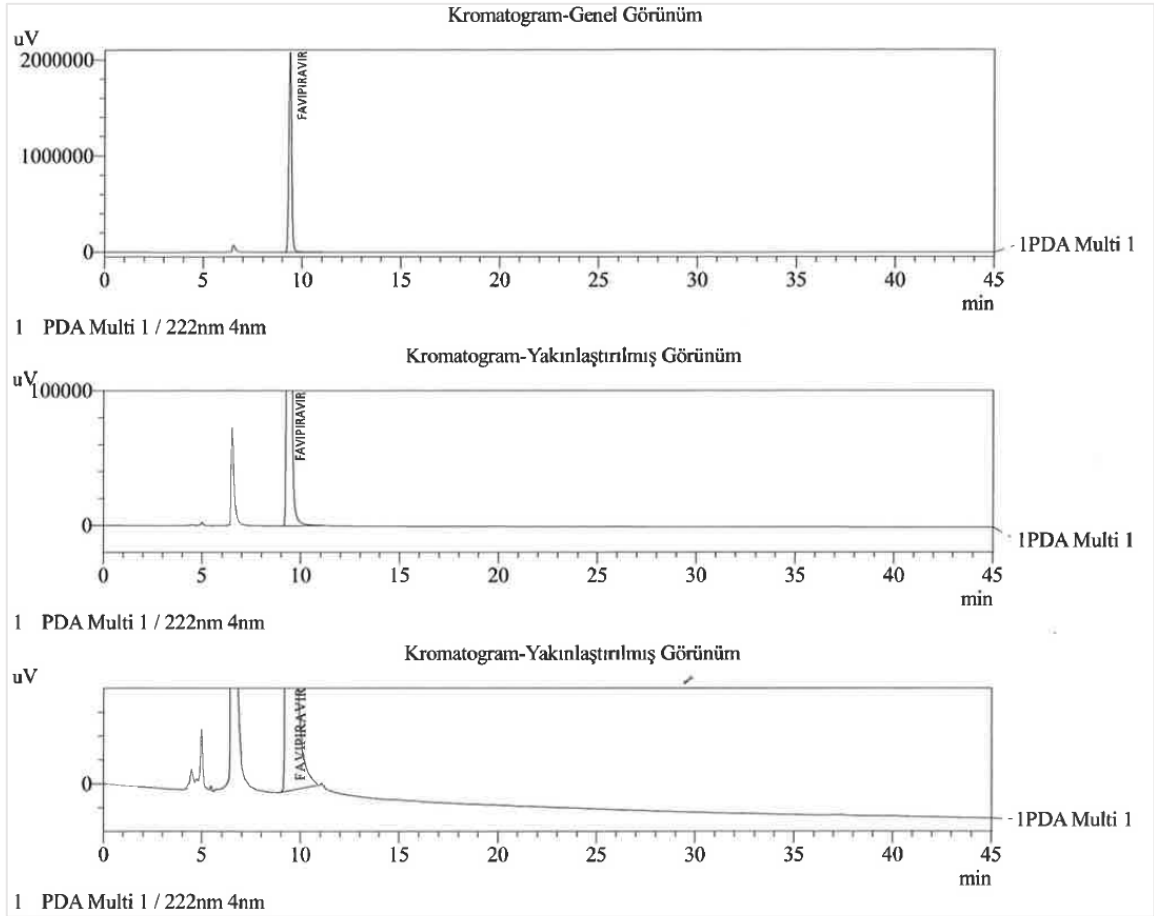
Normal Koşul Numunesine Ait Sonuçlar Tablosu	
	% Alan
Favipiravir	99.867
RRT 0.51	0.018
RRT 0.76	0.013
RRT 1.11	0.001
RRT 1.18	0.005
RRT 1.99	0.003
TOPLAM	99.914

Tablo 4-53. Bozundurma ve stres çalışmalarında Favipiravir pik saflığı için sayısal bulgular

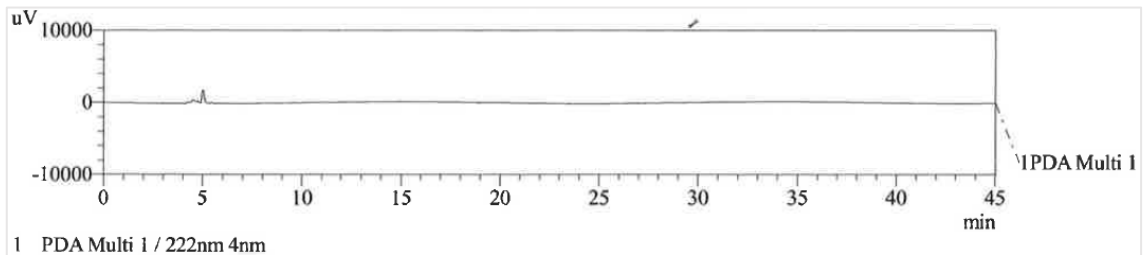
Bileşenler (Favipiravir / 222 nm)	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Saflığı (Peak Purity Index)	Saflık Eşik Değeri (Single Point Threshold)
Referans Çözeltiler			
Hareketli Faz Çözeltisi (Seyreltme Çözeltisi)	-	-	-
Referans Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi	-	-	-
Referans Numune Çözeltisi	9.556	1.000000	0.999879
Alkali Bozundurma Çalışması <i>0.1 N NaOH / 4 saat 60°C</i>			
Boş Çözelti	-	-	-
Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi	-	-	-
Numune Çözeltisi	9.385	0.999998	0.999993
Asidik Bozundurma Çalışması <i>0.1 N HCl / 4 saat 60°C</i>			
Boş Çözelti	-	-	-
Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi	-	-	-
Numune Çözeltisi	9.405	1.000000	0.999999
Oksidatif Bozundurma Çalışması <i>%3 H₂O₂ / 4 saat 60°C</i>			
Boş Çözelti	-	-	-
Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi	-	-	-
Numune Çözeltisi	9.413	1.000000	0.999999
Sıcaklık Etkisi Çalışması <i>70°C ± 2°C, %100 RN ± %5 RN / 7 Gün</i>			
Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi	-	-	-
Numune Çözeltisi	9.511	1.000000	0.999949
Nem Etkisi Çalışması <i>5 ml Distile Su / 8 Saat</i>			
Boş Çözelti	-	-	-
Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi	-	-	-
Numune Çözeltisi	9.537	1.000000	0.999998
Fotodegradasyon Çalışması <i>Fotostabilite Kabini (500 W/m²) / 7 Gün</i>			
Yardımcı Madde (Plasebo) Çözeltisi	-	-	-
Numune Çözeltisi	9.524	0.999998	0.999998

4.4.1. Alkali Bozundurma Bulguları

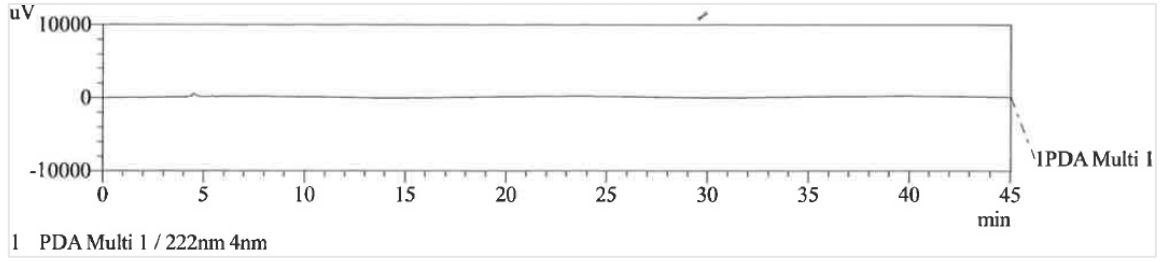
Alkali koşullardaki bozundurma çalışmaları sonucunda elde edilen numune çözeltisi, plasebo ve boş çözelti kromatogramları sırasıyla Şekil 4-30, Şekil 4-31 ve Şekil 4-32’de, alkali bozundurma pik saflığı Şekil 4-33’te ve alkali koşullardaki bozundurma çalışmasına ait yüzde alan sonuçları ise Tablo 4-54’te görülmektedir.



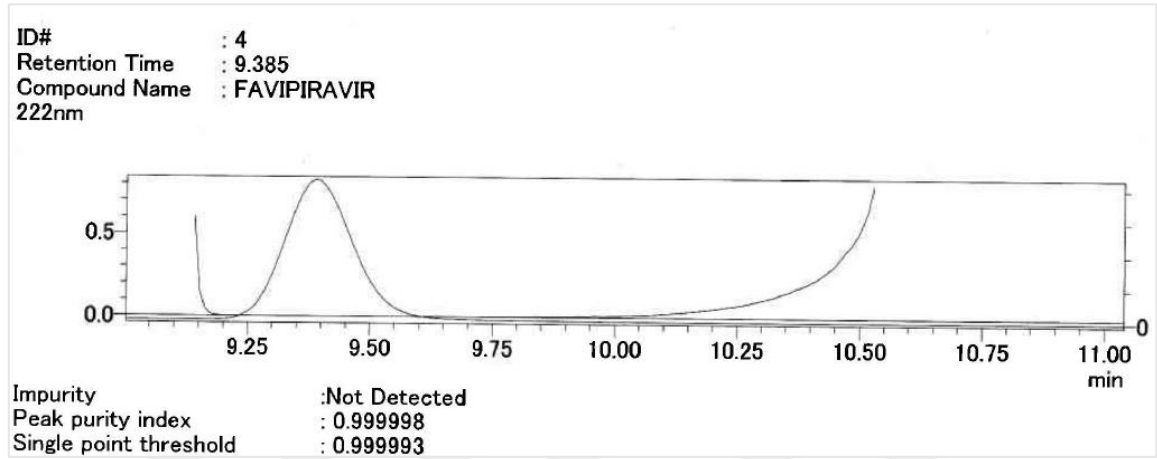
Şekil 4-30. Numune çözeltisi ile alkali bozundurma çalışması kromatogramları



Şekil 4-31. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ile alkali bozundurma çalışması kromatogramı



Şekil 4-32. Alkali bozundurma çalışması boş çözelti kromatogramı



Şekil 4-33. Numune çözeltisi ile alkali bozundurma çalışması Favipiravir pik saflığı

Tablo 4-54. Alkali koşullardaki bozundurma çalışmasına ait sonuçlar

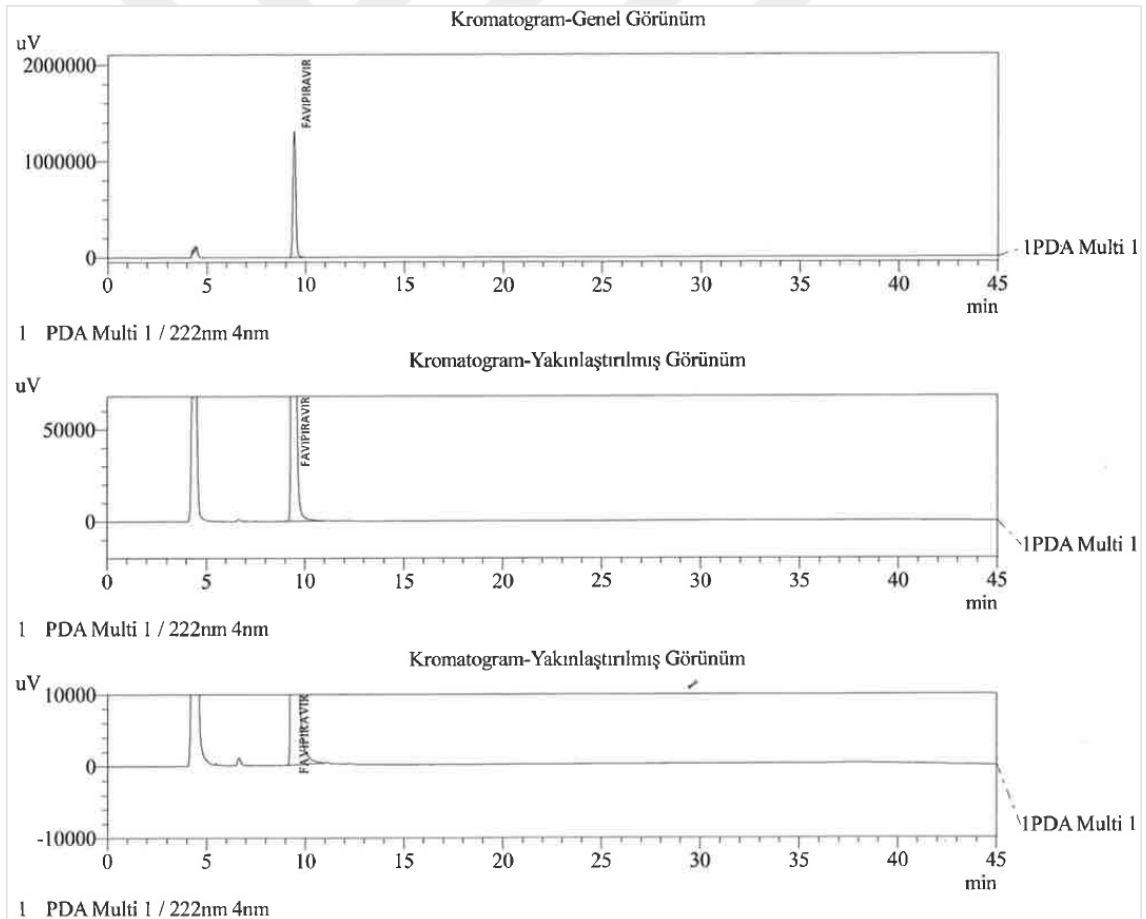
Alkali Koşullardaki Bozundurma Çalışmasına Ait Sonuçlar Tablosu 0.1 N NaOH / 4 Saat 60 °C	
	% Alan
Favipiravir	95.699
RRT 0.51	0.051
RRT 0.54	0.128
RRT 0.76	4.082
RRT 1.11	0.001
RRT 1.18	0.005
RRT 1.99	0.003
TOPLAM	99.969

Tablo 4-54'te görüldüğü üzere alkali koşullar altında gerçekleştirilen bozundurma çalışmasında normal koşul numunesindeki safsızlıklara ek olarak yalnızca RRT 0.54 safsızlığı dedekte edilmiştir. Bu safsızlığa ait sonuç her bir bilinmeyen safsızlık limitini

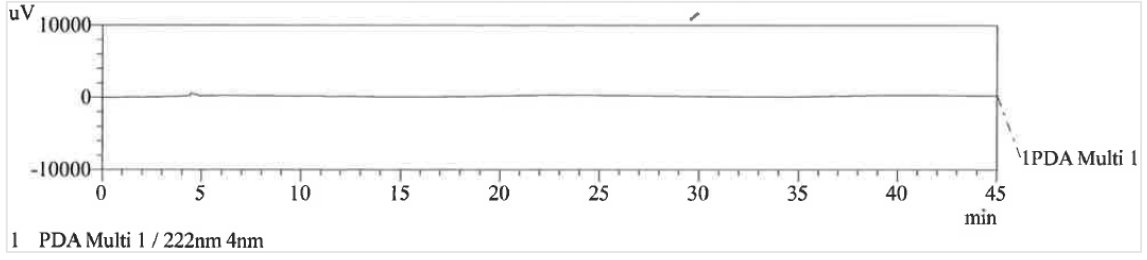
(% 0.10) aşmaktadır. RRT 0.54 safsızlığı ile normal koşul numunesinde de saptanan RRT 0.76 safsızlığı sonucu itibariyle bu koşula ait major safsızlıklardır. Normal koşul numunesinde de saptanan bir diğer safsızlık olan RRT 0.51, asidik koşullar ile artış gösterse de sonucu her bir bilinmeyen safsızlık limitinin altında kalmaktadır.

4.4.2. Asidik Bozundurma Bulguları

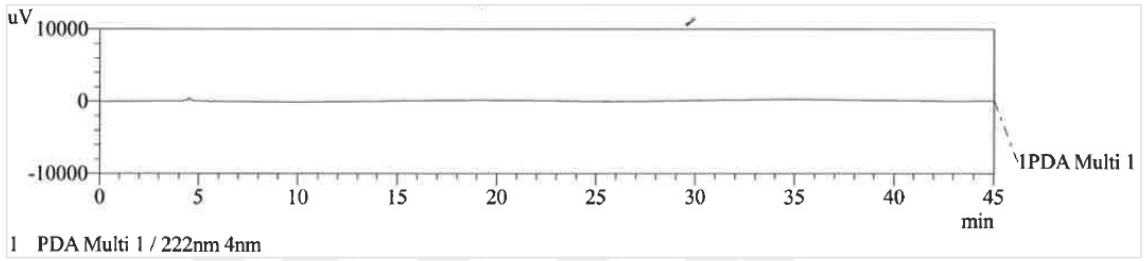
Asidik koşullardaki bozundurma çalışmaları sonucunda elde edilen numune çözeltisi, plasebo ve boş çözelti kromatogramları sırasıyla Şekil 4-34, Şekil 4-35 ve Şekil 4-36'da, asidik bozundurma pik saflığı Şekil 4-37'de ve asidik koşullardaki bozundurma çalışmasına ait yüzde alan sonuçları ise Tablo 4-55'te görülmektedir.



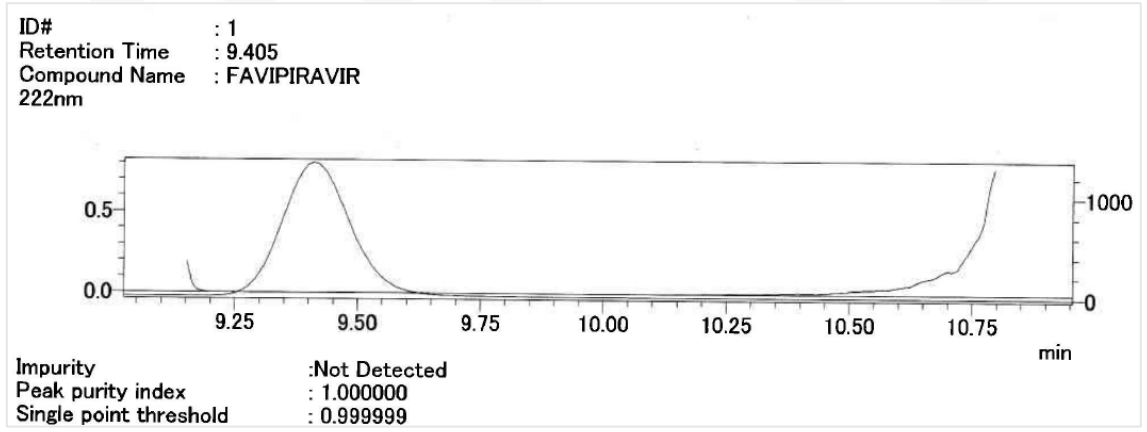
Şekil 4-34. Numune çözeltisi ile asidik bozundurma çalışması kromatogramları



Şekil 4-35. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ile asidik bozundurma çalışması kromatogramı



Şekil 4-36. Asidik bozundurma çalışması boş çözelti kromatogramı



Şekil 4-37. Numune çözeltisi ile asidik bozundurma çalışması Favipiravir pik saflığı

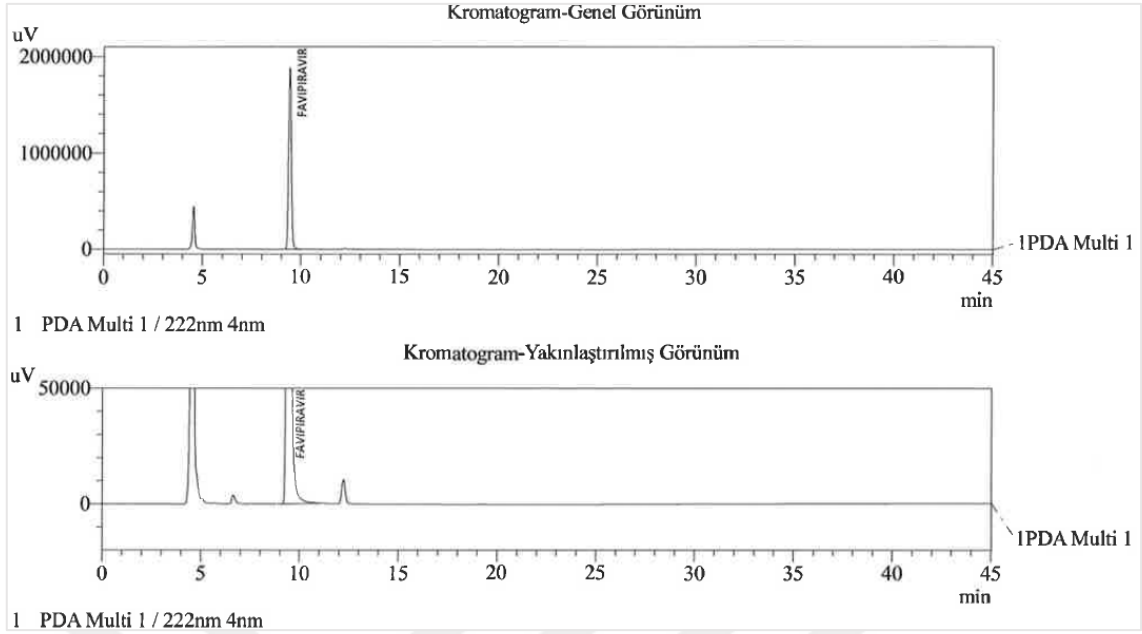
Tablo 4-55. Asidik koşullardaki bozundurma çalışmasına ait sonuçlar

Asidik Koşullardaki Bozundurma Çalışmasına Ait Sonuçlar Tablosu <i>0.1 N HCl / 4 Saat 60 °C</i>	
	% Alan
Favipiravir	88.261
RRT 0.51	11.617
RRT 0.76	0.082
RRT 1.11	0.001
RRT 1.18	0.006
RRT 1.99	0.003
TOPLAM	99.980

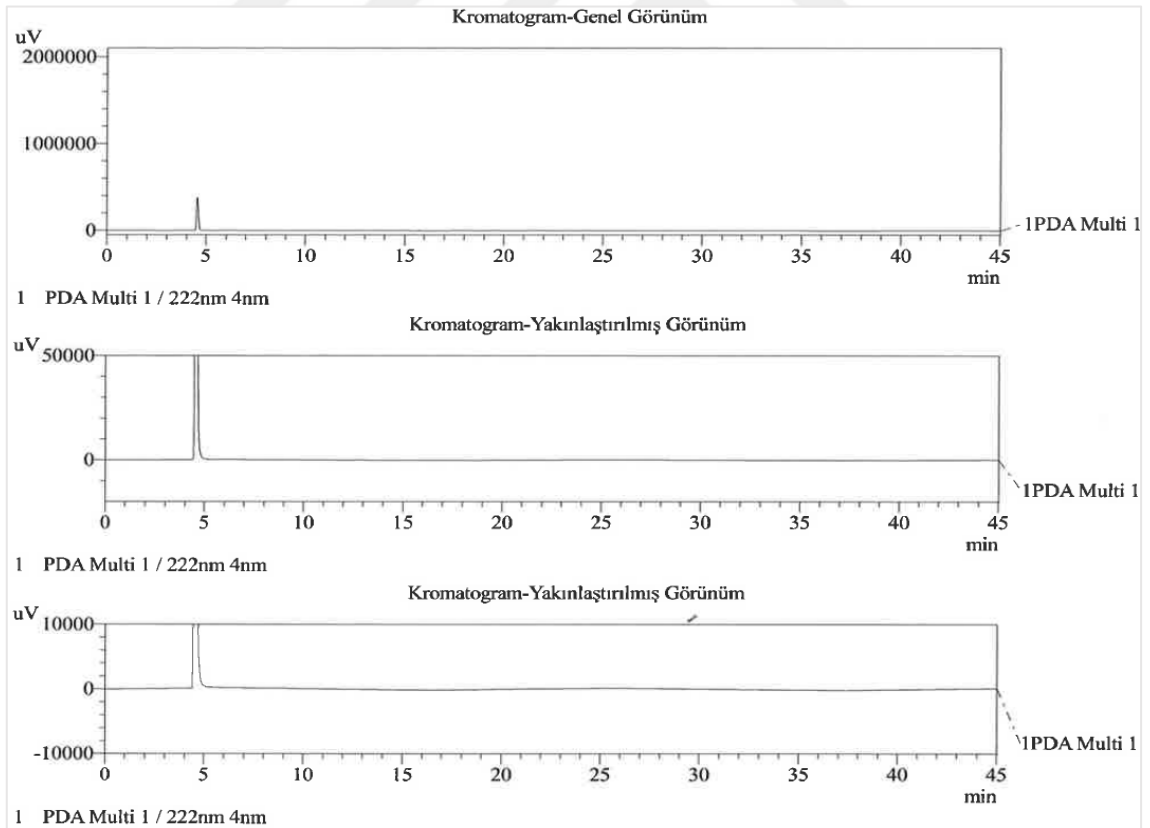
Tablo 4-55'te görüldüğü üzere asidik koşullar altında gerçekleştirilen bozundurma çalışmasında normal koşul numunesindeki safsızlıklara ek bir safsızlık saptanmamıştır. Ancak, RRT 0.51 safsızlığı sonucu itibarıyla bu koşula ait major safsızlıktır. Normal koşul numunesindeki safsızlıklardan RRT 0.76 ve RRT 1.18 ise asidik koşullarda artış gösteren safsızlıklardır; ancak her iki safsızlığın bu koşuldaki sonuçları, her bir bilinmeyen safsızlık limitinin altında kalmaktadır.

4.4.3. Oksidatif Bozundurma Bulguları

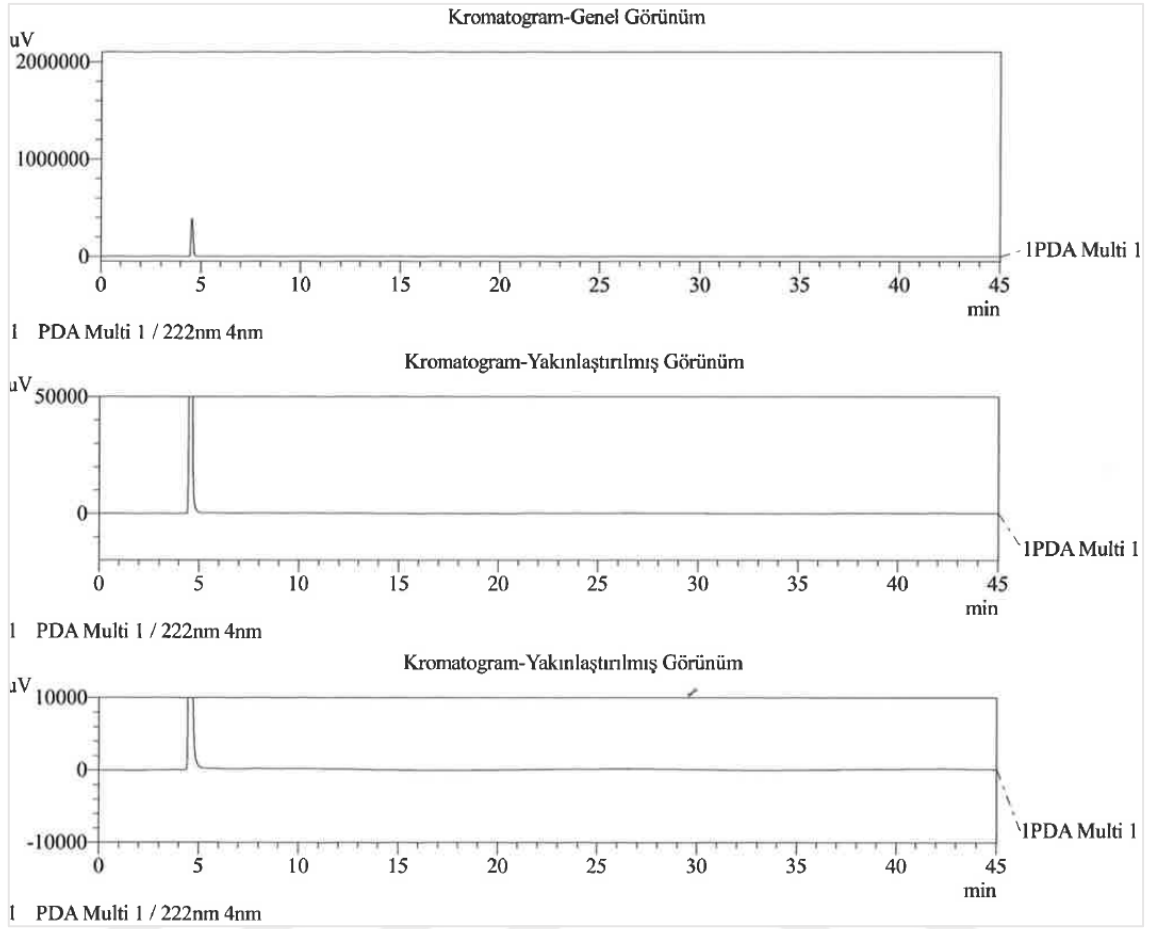
Oksidatif koşullardaki bozundurma çalışmaları sonucunda elde edilen numune çözeltisi, plasebo ve boş çözelti kromatogramları sırasıyla Şekil 4-38, Şekil 4-39 ve Şekil 4-40'ta, oksidatif bozundurma pik saflığı Şekil 4-41'de ve bu koşullardaki bozundurma çalışmasına ait yüzde alan sonuçları ise Tablo 4-56'da görülmektedir.



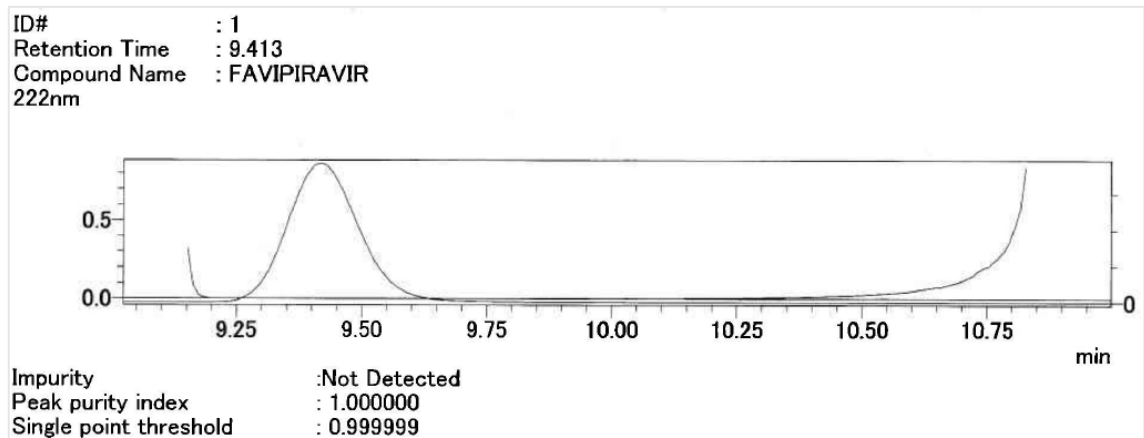
Şekil 4-38. Numune çözeltisi ile oksidatif bozundurma çalışması kromatogramları



Şekil 4-39. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ile oksidatif bozundurma çalışması kromatogramları



Şekil 4-40. Oksidatif bozundurma çalışması boş çözelti kromatogramları



Şekil 4-41. Numune çözeltisi ile oksidatif bozundurma çalışması Favipiravir pik saflığı

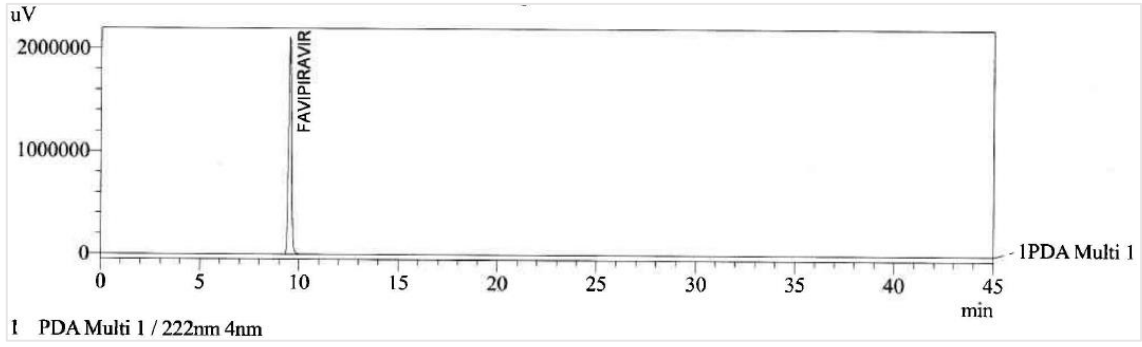
Tablo 4-56. Oksidatif koşullardaki bozundurma çalışmasına ait sonuçlar

Oksidatif Koşullardaki Bozundurma Çalışmasına Ait Sonuçlar Tablosu <i>%3 H₂O₂ / 4 Saat 60 °C</i>	
	% Alan
Favipiravir	94.120
RRT 0.51	4.789
RRT 0.57	0.074
RRT 0.63	0.007
RRT 0.76	0.206
RRT 0.84	0.007
RRT 1.11	0.001
RRT 1.18	0.004
RRT 1.31	0.570
RRT 1.99	0.019
TOPLAM	99.897

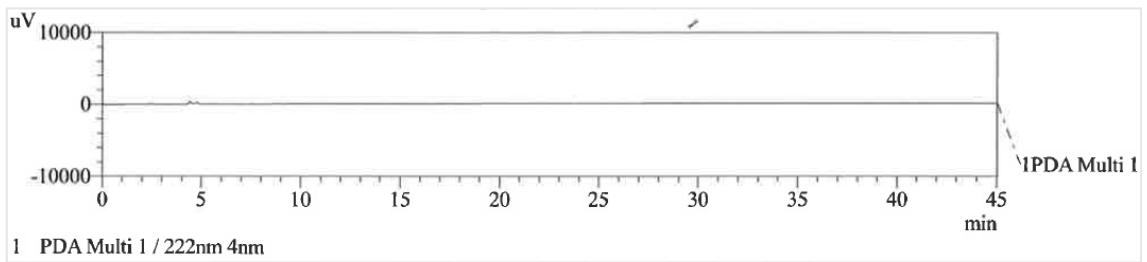
Tablo 4-56’da görüldüğü üzere oksidatif koşullar altında gerçekleştirilen bozundurma çalışmasında normal koşul numunesindeki safsızlıklara ek olarak RRT 0.57, RRT 0.63, RRT 0.84 ve RRT 1.31 safsızlıkları dedekte edilmiştir. RRT 0.57, RRT 0.63 ve RRT 0.84 safsızlıklarının sonuçları her bir bilinmeyen safsızlık limitinin (% 0.10) altındadır. Ancak, RRT 0.51, RRT 0.76 ve RRT 1.31 safsızlıkları sonuçları itibariyle bu koşula ait major safsızlıklardır. Normal koşul numunesindeki safsızlıklardan biri olan RRT 1.99, sonucu itibariyle artış gösterse de her bir bilinmeyen safsızlık limitinin altında sonuç vermiştir.

4.4.4. Sıcaklık Etkisi Bulguları

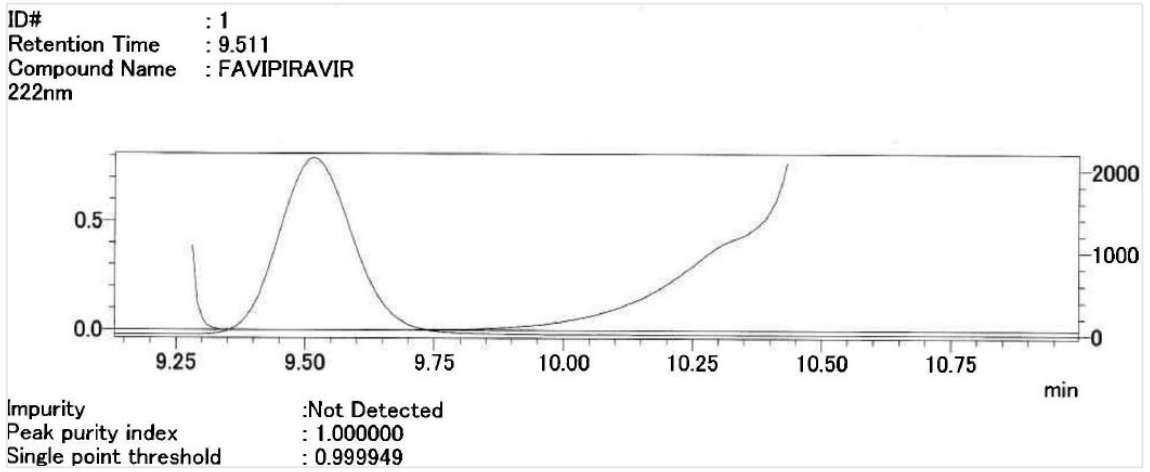
Sıcaklık etkisi ile bozundurma çalışmaları sonucunda elde edilen numune çözeltisi ve plasebo kromatogramları Şekil 4-42 ve Şekil 4-43’te, sıcaklıkla bozundurma pik saflığı Şekil 4-44’te ve ilgili koşullardaki bozundurma çalışmasına ait yüzde alan sonuçları ise Tablo 4-57’de görülmektedir.



Şekil 4-42. Numune çözeltisi ile sıcaklık etkisi çalışması kromatogramı



Şekil 4-43. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ile sıcaklık etkisi çalışması kromatogramı



Şekil 4-44. Numune çözeltisi ile sıcaklık etkisi çalışması Favipiravir pik saflığı

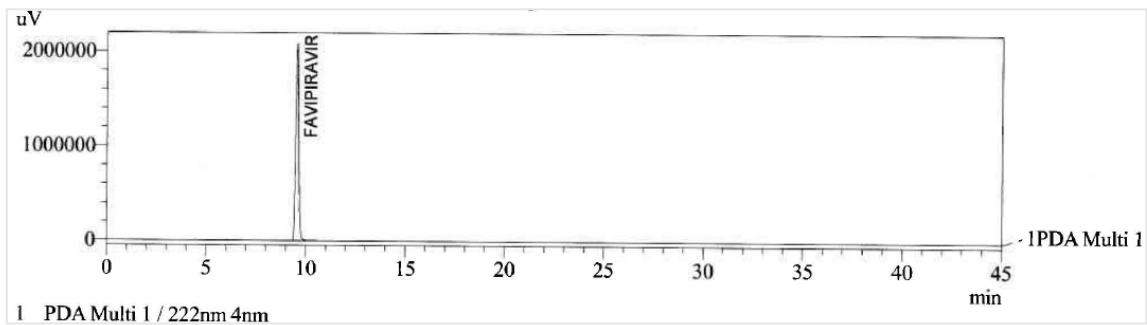
Tablo 4-57. Sıcaklık etkisi çalışmasına ait sonuçlar

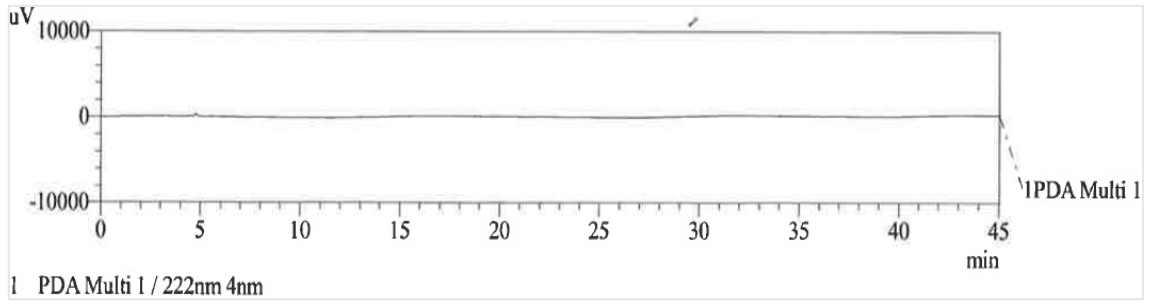
Sıcaklık Etkisi Çalışmasına Ait Sonuçlar Tablosu <i>70°C ± 2°C, %100 RN ± %5 RN / 7 Gün</i>	
	% Alan
Favipiravir	99.830
RRT 0.51	0.070
RRT 0.54	0.005
RRT 0.76	0.017
RRT 1.11	0.001
RRT 1.18	0.005
RRT 1.31	0.012
RRT 1.99	0.006
RRT 2.07	0.030
TOPLAM	99.976

Tablo 4-57’de görüldüğü üzere sıcaklık etkisi çalışmasında normal koşul numunesindeki safsızlıklara ek olarak RRT 0.54, RRT 1.31 ve RRT 2.07 safsızlıkları dedekte edilmiştir. Normal koşul numunesinde de saptanan RRT 0.51, RRT 0.76 ve RRT 1.99 safsızlıkları sıcaklık etkisi ile sonuçları artış gösterse de, bu çalışma sonucunda alınan tüm safsızlık sonuçları belirlenen her bir bilinmeyen safsızlık limitinin (% 0.10) altında kalmıştır. Ancak RRT 0.51 safsızlığı, bu koşulda gösterdiği artış ile raporlama limitinin üzerinde (% 0.05) sonuç vermiştir.

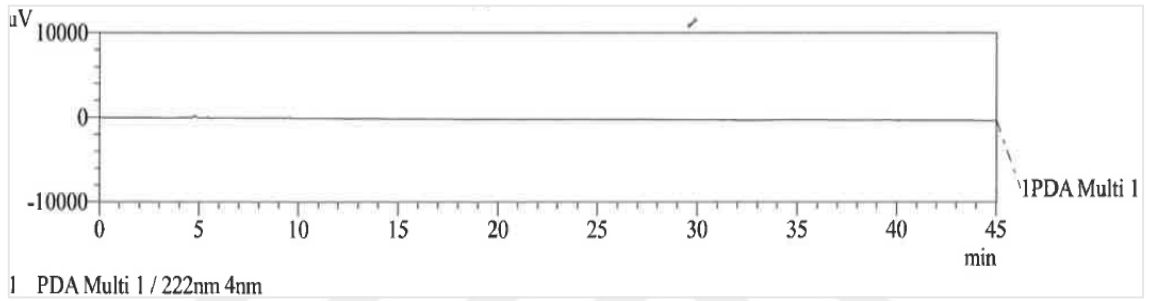
4.4.5. Nem Etkisi Bulguları

Nem etkisi ile bozundurma çalışmaları sonucunda elde edilen numune çözeltisi, plasebo ve boş çözelti kromatogramları sırasıyla Şekil 4-45, Şekil 4-46 ve Şekil 4-47’de, nem etkisi bozundurma pik saflığı Şekil 4-48’de ve ilgili koşullardaki bozundurma çalışmasına ait yüzde alan sonuçları ise Tablo 4-58’de görülmektedir.

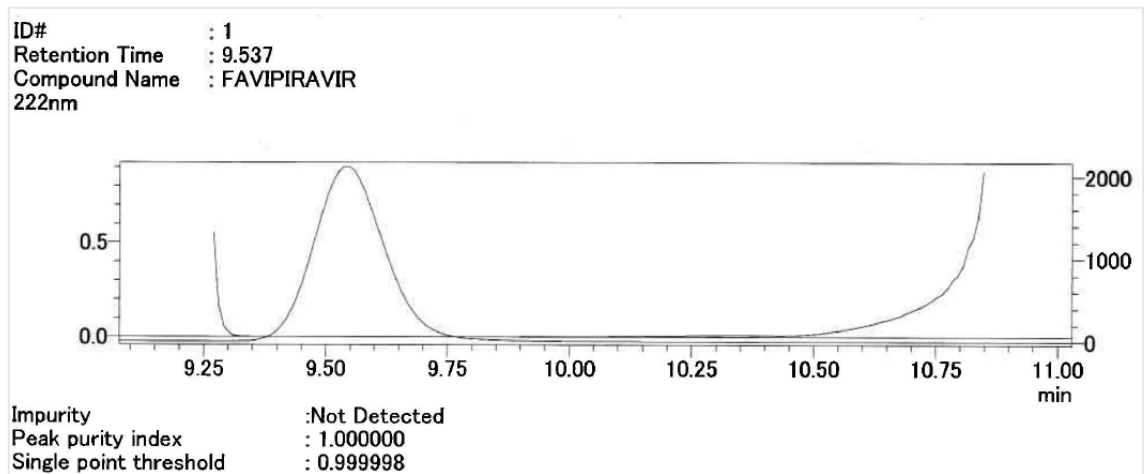
**Şekil 4-45. Numune çözeltisi ile nem etkisi çalışması kromatogramı**



Şekil 4-46. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ile nem etkisi çalışması kromatogramı



Şekil 4-47. Nem etkisi çalışması boş çözelti kromatogramı



Şekil 4-48. Numune çözeltisi ile nem etkisi çalışması Favipiravir pik saflığı

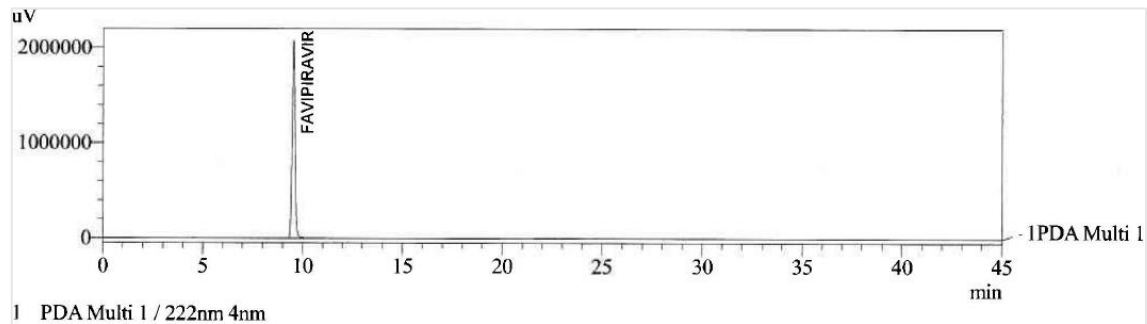
Tablo 4-58. Nem etkisi çalışmasına ait sonuçlar

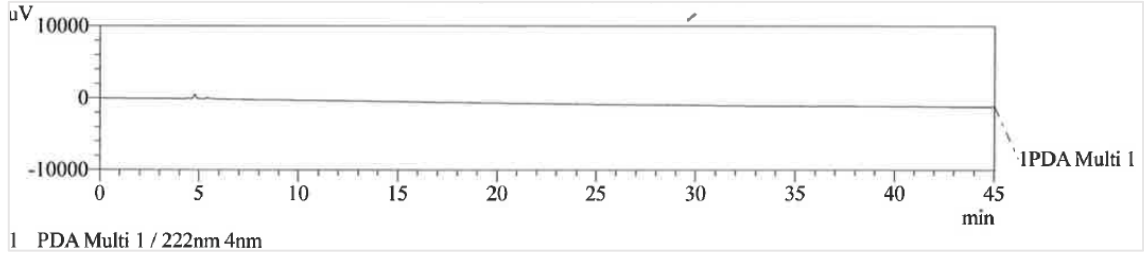
Nem Etkisi Çalışmasına Ait Sonuçlar Tablosu <i>5 ml Distile Su / 8 Saat</i>	
	% Alan
Favipiravir	99.833
RRT 0.51	0.090
RRT 0.54	0.029
RRT 0.76	0.012
RRT 1.11	0.001
RRT 1.18	0.005
RRT 1.31	0.010
RRT 1.99	0.003
TOPLAM	99.983

Tablo 4-58’de görüldüğü üzere nem etkisi çalışmasında normal koşul numunesindeki safsızlıklara ek olarak RRT 0.54 ve RRT 1.31 safsızlıkları dedekte edilmiştir. Her iki koşulda ortak olarak saptanan safsızlık RRT 0.51’dir; ancak nem etkisi ile sonucunun artış göstermesi ve bu sonucun her bir bilinmeyen safsızlık limitine (% 0.10) yakın olması sebepleri ile dikkatli olunması gereken bir safsızlıktır. Yine de, bu çalışma sonucunda alınan tüm safsızlık sonuçları belirlenen her bir bilinmeyen safsızlık limitinin altında kalmıştır.

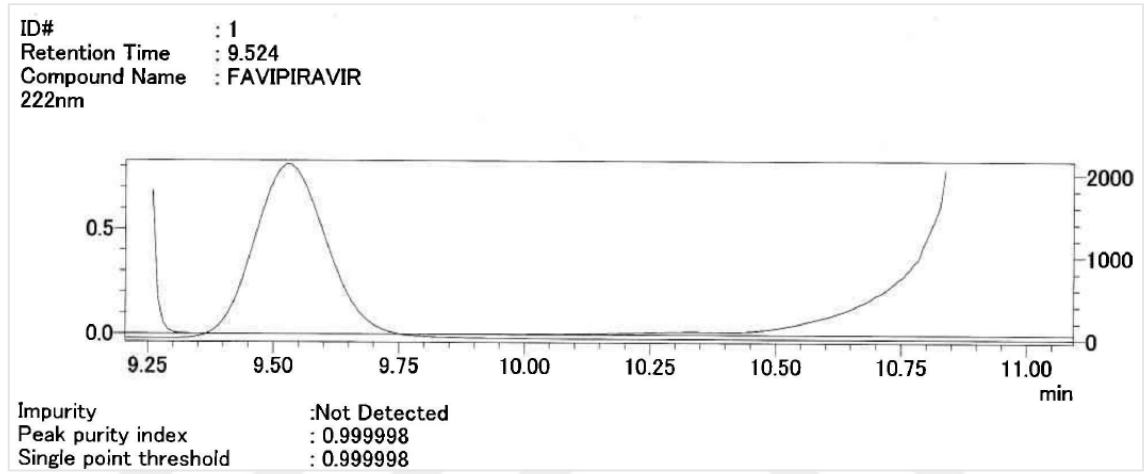
4.4.6. Fotodegradasyon Çalışması Bulguları

Fotodegradasyon ile bozundurma çalışmaları sonucunda elde edilen numune çözeltisi ve plasebo kromatogramları sırasıyla Şekil 4-49 ve Şekil 4-50’de, ışık etkisi bozundurma pik saflığı Şekil 4-51’de ve ilgili koşullardaki bozundurma çalışmasına ait yüzde alan sonuçları ise Tablo 4-59’da görülmektedir.

**Şekil 4-49. Numune çözeltisi ile fotodegradasyon çalışması kromatogramı**



Şekil 4-50. Yardımcı madde (plasebo) çözeltisi ile fotodegradasyon çalışması kromatogramı



Şekil 4-51. Numune çözeltisi ile fotodegradasyon çalışması Favipiravir pik saflığı

Tablo 4-59. Fotodegradasyon çalışmasına ait sonuçlar

Fotodegradasyon Çalışmasına Ait Sonuçlar Tablosu Fotostabilite Kabini (500 W/m ²) / 7 Gün	
	% Alan
Favipiravir	99.864
RRT 0.51	0.080
RRT 0.54	0.027
RRT 0.76	0.016
RRT 1.11	0.001
RRT 1.18	0.003
RRT 1.31	0.003
RRT 1.99	0.007
TOPLAM	100.001

Tablo 4-59’da görüldüğü üzere fotodegradasyon çalışmasında normal koşul numunesindeki safsızlıklara ek olarak RRT 0.54 ve RRT 1.31 safsızlıkları dedekte

edilmiştir. Her iki koşulda ortak olarak saptanan RRT 0.51 safsızlığı, fotodegradasyon ile sonucunun artış göstermesi ve bu sonucun her bir bilinmeyen safsızlık limitini (% 0.10) zorlayabilecek nitelikte olması sebepleri ile dikkatli olunması gereken bir safsızlıktır. Her iki koşulda ortak olarak saptanan diğer safsızlıklar RRT 0.76 ve RRT 1.99 ise, fotodegradasyon ile artış gösteren safsızlıklardır. Buna rağmen, bu çalışma sonucunda alınan tüm safsızlık sonuçları belirlenen her bir bilinmeyen safsızlık limitinin altında kalmıştır.



5. TARTIŞMA

Covid-19, yeni keşfedilen bir koronavirüsün neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Toplum sağlığını kısa sürede ve şiddetli bir biçimde etkileme gücüne sahip olan bu hastalığın tedavisi için ülkeler çeşitli ilaçlara başvurmuştur ve başvurmaya da devam etmektedir. Favipiravir etken maddeli ilaçlar, bunların içerisinde ilk sıralarda yer almaktadır. Bu noktada bu ilaçların üretimini yapmak ülkeler için kaçınılmaz hale gelmiştir. Bununla birlikte, üretilen ilacın kalite açısından güvenilirliğinin kontrolünü sağlayabilecek analitik yöntemlere gereksinim duyulmaktadır.

Yapılan literatür araştırmalarında farmasötik preparatlarda CN104914185A ve CN104914185B patentlerinde verilen yöntemler dışında Favipiravir safsızlık tayini yapan bir HPLC yöntemine rastlanmamıştır. Bu patentlerde verilen yöntem ile kıyaslama yapılırsa, analiz süresi 60 dakika olan bu yöntem tez çalışması ile geliştirilen yöntemle göre daha uzundur, LOD değeri %0.1 ve doğrusallık çalışmasından elde edilen r^2 değeri 0.9996 olarak raporlanmıştır. Bu tez çalışmasında aynı parametrelerden elde edilen veriler LOD: %0.002; r^2 : 0.9998 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler yöntemin doğrusallığının ve gözlenebilirlik sınırının daha iyi olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında geliştirilen analiz yöntemi ile Favipiravir ve bu etken maddeyi içeren farmasötik preparatlarda oluşan/oluşabilecek safsızlıklar birlikte tayin edilebilmekte ve bu safsızlıkların hangi koşul kaynaklı oldukları, yapılan tüm detaylı bozundurma ve stres çalışmalarından alınan sonuçlar ile desteklenerek açıklanabilmektedir. Ancak, birebir olarak aynı amaca hizmet edecek şekilde safsızlık tayininin bozundurma çalışmaları ile detaylandırılarak verildiği analitik yöntemlerin literatürde yer almaması yöntemimizin çoğu açıdan kıyaslanamamasına sebep olmuştur.

Bu tez çalışmasında yapılmış tüm detaylı çalışmalar ile Favipiravir içeren katı dozaj formundaki ilaçların bozundurma çalışmaları yapılarak elde edilmiş safsızlıklarının HPLC ile tayinini gerçekleştirebilen bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin, birden fazla safsızlığı Favipiravir etken maddesine girişim yapmayacak şekilde ayırması, az oranda organik çözücü kullanımı ile yeşil kimyaya katkısı, HPLC yöntemi kullanılarak safsızlık tayini yapan analitik yöntemlerin sürelerine kıyasla daha kısa sürede tayini sağlama, belirlenen düşük tampon çözeltisi konsantrasyonunun (10 mM) analiz verimliliğine katkı sağlama, yöntemin oral yoldan alınan katı dozaj formundaki

farmasötik preparatların safsızlık tayininde uygulanabilmesi açılarından yararlı olduğu düşünülmüştür.

Yöntemin geliştirilmesine öncelikle molekül yapısı incelenerek başlanmıştır. Moleküle uygun olacak şekilde dedektör tipi ve ayırma yöntemi belirlenmiştir. Hemen ardından bu yöntemin katı dozaj formundaki farmasötik bir preparatta uygulanacağı göz önünde bulundurularak hem etken maddeyi hem de preparat içeriğindeki yardımcı maddeleri çözebilecek bir çözücü kullanılmış ve etken maddenin en yüksek absorbans verdiği dalga boyu değerleri UV-spektrofotometre aracılığıyla saptanmıştır. Favipiravir için maksimum absorpsiyon veren dalga boyları belirlendikten sonra, HPLC kolon seçimi, hareketli faz ve çözücü seçimi, analiz süresinin belirlenmesi, numune ve standart çözelti konsantrasyonlarının ve her bir bilinmeyen safsızlık limitinin ICH klavuzuna uygun şekilde; toplam safsızlık limitinin ise sıcaklık etkisi (6 aylık stres/stabilite koşulları) ile düzenli olarak en yüksek artışı gösteren safsızlığın sonuçları kullanılarak Arrhenius eşitliği/grafiği yardımıyla belirlenmesi, karar verilen konsantrasyonlara sahip çözeltiler için filtrenin belirlenmesi gibi önemli noktalar adına tüm detaylı çalışmalar aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

Tüm şartlar belirlendikten sonra valide edilen bu yöntemde sabit faz olarak Kinetex® EVO C18 100Å (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolonu; hareketli faz ve çözücü olarak 10 mM KH₂PO₄ tamponu ve asetonitril hacimce 90:10 oranında birleştirilerek kullanılmıştır. Yöntemde hareketli faza ait akış hızı 0.5 ml/dakika, kolon fırını sıcaklığı 30 °C, dedektör dalga boyu 222 nm olarak kullanılmıştır. Bu koşullarda Favipiravirin alıkonma zamanı 9 dakika ve alkali, asidik, oksidatif koşullarda oluşan majör safsızlıkların alıkonma zamanları ise yaklaşık olarak 4, 5, 7, 12 dakika (RRT 0.51, 0.54, 0.76, 1.31) olarak elde edilmiş ve analiz 25 dakikalık bir sürede tamamlanmıştır. Yapılan validasyon sonunda, yöntemin doğrusallık gösterdiği aralık 0.00003 – 0.00075 mg/ml, kantitatif tayin sınırı (LOQ) 0.00003 mg/ml, teşhis edilebilme alt sınırı (LOD) 0.00001 mg/ml olarak saptanmıştır. Yöntemin tekrarlanabilirliğini ölçümlemek için farklı gün ve farklı analist tarafından gerçekleştirilen kesinlik çalışmalarından alınan sonuçlarda %RSD 0.25 olarak elde edilmiş ve sonuçlar arasındaki uyum istatistiksel testler ile desteklenmiştir. Tablet formu içeriğindeki yardımcı madde karışımlarına Favipiravir'in eklenmesi yoluyla 3 farklı seviyede (%LOQ, %100, %150) gerçekleştirilen geri kazanım çalışmaları sonucunda, etken maddenin %5.03 RSD ile ortalama %99.46 geri kazanımı

sağlanmıştır. Analizlenecek numune çözeltilerinin analizlendiklerinde safsızlıklar açısından en doğru sonuçları verebilmeleri için, hazırlandıktan hemen sonra cihaza verilmelerinin uygun olduğu görülmüştür. Çünkü, numune çözeltilerinin HPLC koşullarında stabil kaldığı en uygun sürenin 2 saat olduğu yapılan detaylı çalışmalar ile saptanmıştır.

Valide edilen yönteminin tayin gücünün saptanabilmesi için Favipiravir etken maddesine sahip farmasötik preparatlar, alkali, asidik, oksidatif koşullar altında tutulmuş, yüksek sıcaklık, nem ve fotodegradasyona maruz bırakılmıştır. Bu etkilere maruz bırakılan farmasötik katı dozaj formunun safsızlık analizleri, geliştirilip valide edilen yöntem ile başarıyla gerçekleştirilmiştir. Alkali, asidik ve oksidatif koşullarda majör safsızlıklar dedekte edilmiştir. Aynı farmasötik preparatların yüksek sıcaklık, nem ve ışık altında tutulduklarında alınan analiz sonuçlarına bakıldığında, bu etkiler sonucunda artış gösteren safsızlıklar ayrı ayrı saptanabilmiş olmakla birlikte, oluşan safsızlık sonuçlarının her bir bilinmeyen safsızlık limitinin (% 0.10) altında kalması, preparatların bu stres koşullarına karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir.

Özetle bu tez çalışmasında, oral yoldan alınan katı dozaj formundaki farmasötik preparatlardan Favipiravir ve olası bozundurma safsızlıklarının tayinini sağlayabilen, verimliliği, tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği yüksek, özellikle içinde bulunan Covid-19 salgını sürecinde tedavi için üretilecek Favipiravir etken maddeli farmasötik preparatların safsızlık analizinde kullanılmak üzere kolaylığı açısından ilaç endüstrisinde tercih edilebilecek yetkinlikte bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Agrahari, V., Bajpai, M., & Nanda, S. (2013). Essential Concepts of Mobile Phase Selection for Reversed Phase HPLC. *Research Journal of Pharmacy and Technology*(6), 459-464.
- Baranovich, T., Wong, S. S., Armstrong, J., Marjuki, H., Webby, R. J., Webster, R. G., & Govorkova, E. A. (2013). T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro. *Journal of Virology*, 87(7), 3741-3751. doi:http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02346-12
- Bilgin, Z. D., Evcil, I., Yazgı, D., Binay, G., Okuyucu Genç, C., Gülşen, B., . . . Çağlar Andaç, S. (2020). Liquid Chromatographic Methods for COVID-19 Drugs, Hydroxychloroquine and Chloroquine. *Journal of Chromatographic Science*, 1-10. doi:10.1093/chromsci/bmaa110
- Bulduk, İ. (2020). HPLC-UV method for quantification of Favipiravir in pharmaceutical formulations. *Acta Chromatographica*. doi:10.1556/1326.2020.00828
- Cuiyan, L., Yuanyuan, Z., Lichao, B., Yangjin, L., & Lei, L. (2015). Content Determination of Favipiravir Tablets by HPLC. *China Pharmacist*(7), 1231-1233.
- Delong, L., Abdelnabi, R., & Neyts, J. (2018). Favipiravir as a potential countermeasure against neglected and emerging RNA viruses. *Antiviral Research*(153), 85-94. doi:10.1016/j.antiviral.2018.03.003
- Dolan, J. (2011). *A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection*. Mart 2, 2021 tarihinde ACE-Hplc: https://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_BufferSelection.pdf adresinden alındı
- Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for Practising Scientists*. New-York: Wiley-Interscience.
- Drugbank. (2021, Şubat 21). *Favipiravir*. Mart 1, 2021 tarihinde <https://go.drugbank.com/drugs/DB12466> adresinden alındı
- Drugbank. (2021, Şubat 21). *Favipiravir Predicted MS/MS Spectrum - 10V, Positive (Annotated) (DB12466)*. Mart 10, 2021 tarihinde https://go.drugbank.com/spectra/ms_ms/256308 adresinden alındı
- European Medicines Agency. (1995, Temmuz). *ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Mart 12, 2021 tarihinde <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1->

validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf adresinden alındı

- European Medicines Agency. (2006, Haziran). *ICH Topic Q 3 B (R2) Impurities in New Drug Products*. 21 Şubat, 2021 tarihinde https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-3-b-r2-impurities-new-drug-products-step-5_en.pdf adresinden alındı
- Furuta, Y., Gowen, B. B., Takahashi, K., Shiraki, K., Smee, D. F., & Barnard, D. L. (2013). Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Research*(100), 446-454. doi:10.1016/j.antiviral.2013.09.015
- Furuta, Y., Takahashi, K., Kuna-Maekawa, M., Sangawa, H., Uehara, S., Kozaki, K., . . . Shiraki, K. (2005). Mechanism of Action of T-705 against Influenza Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*(49), 981-986. doi:10.1128/AAC.49.3.981-986.2005
- Guangling, F., Wenjuan, D., Yuxiao, D., Ren-Yang, Z., Yan, G., Chong-Gang, D., & Jinrui, S. (2015). *Çin Patent No. CN104914185A*.
- Guangling, F., Wenjuan, D., Yuxiao, D., Ren-Yang, Z., Yan, G., Chong-Gang, D., & Jinrui, S. (2016). *Çin Patent No. CN104914185B*.
- Hichrom Ltd. (2018). Sample Preparation Syringe Filters Catalogue 9. Şubat 27, 2021 tarihinde https://www.hichrom.com/assets/HichromCat9-pdfs/Syringe_Filters_p318.pdf adresinden alındı
- Kamu Hastaneleri Genel Müdürlüğü. (2020, Temmuz 2). *COVID-19 (Sars-Cov2 Enfeksiyonu) Tedavisinde Kullanılacak İlaçlara İlişkin Bilgilendirme (Favipiravir 200 mg Tablet)*. Aralık 24, 2020 tarihinde Covid-19 Tedavi: <https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/37219/0/favipiravir-200-mg-tablet--guncelleme-tarihi-14042020pdf.pdf> adresinden alındı
- Kiso, M., Takahashi, K., Sakai-Tagawa, Y., Shinya, K., Sakabe, S., Le, Q. M., . . . Kawaoka, Y. (2010). T-705 (Favipiravir) Activity against Lethal H5N1 Influenza A Viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*(107), 882-887.
- LoBrutto, R., & Kazakevich, Y. (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. New-Jersey: Wiley-Interscience.

- Macherey-Nagel. (2020, Ocak). *Chemical compatibility of CHROMAFIL® products*. Mart 25, 2021 tarihinde <https://www.mn-net.com/media/pdf/1d/35/b4/Tabelle-Probenfiltration-Filtermaterial-Bestaendigkeit-EN.pdf> adresinden alındı
- Madelain, V., Nguyen, T. H., Olivo, A., de Lamballerie, X., Guedj, J., Taburet, A.-M., & Mentre, F. (2016). Ebola virus infection: review of the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs considered for testing in human efficacy trials. *Clinical Pharmacokinetics*(55), 907-923.
- Megahed, S. M., Habib, A. A., Hammad, S. F., & Kamal, A. H. (2020). Experimental design approach for development of spectrofluorimetric method for determination of favipiravir; a potential therapeutic agent against COVID-19 virus: Application to spiked human plasma. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1386-1425. doi:10.1016/j.saa.2020.119241
- Merck. (2020, Nisan). *Chemical Compatibility of Filter Components*. Mart 25, 2021 tarihinde <file:///C:/Users/busra.gulsen/Downloads/membrane-chemical-compatibility-ds2532en-mk.pdf> adresinden alındı
- Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. (2014, Mart 4). *Report on the deliberation results, Avigan 200 mg Tablet*. <https://www.pmda.go.jp/files/000210319.pdf> adresinden alındı
- Phenomenex Inc. (2016). *HPLC/UHPLC Column Phase Selection Chart*. Şubat 18, 2021 tarihinde <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/92eff453-0e25-40c7-8580-88e7433d6716.pdf> adresinden alındı
- RXMediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. (2020, Mart 27). *Favipiravir*. Mart 15, 2021 tarihinde <https://www.eczanet.com/> adresinden alındı
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (1998). *Practical HPLC Method Development* (2. b.). New York: Wiley-Interscience.
- T.C. Sağlık Bakanlığı. (2020, Temmuz 20). *Covid-19 Bilgilendirme Platformu*. Aralık 20, 2020 tarihinde Covid-19 Nedir?: <https://covid19.saglik.gov.tr/TR-66300/covid-19-nedir-.html> adresinden alındı
- U.S. Food & Drug Administration. (1994, Kasım). *Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods*. Aralık 25, 2020 tarihinde <https://www.fda.gov/media/75643/download> adresinden alındı
- U.S. Food and Drug Administration. (2010, Kasım). *Guidance for Industry ANDAS: Impurities in Drug Products*. Mart 23, 2021 tarihinde

<https://www.fda.gov/files/drugs/published/ANDAs--Impurities-in-Drug-Products.pdf> adresinden alındı

U.S. Food and Drug Administration. (2015, Temmuz). *Analytical Procedures and Method Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry*. Ocak 19, 2021 tarihinde <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf> adresinden alındı

U.S. Pharmacopeia. (2017, Ağustos 1). <621> *Chromatography*. Mart 5, 2021 tarihinde https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B_1_en-US?source=Search%20Results&highlight=621 adresinden alındı

U.S. Pharmacopeia. (2017, Ağustos 1). *Validation of Compendial Procedures*. Şubat 12, 2021 tarihinde USP-NF <1225> Validation of Compendial Procedures adresinden alındı

Watanabe, T., Kiso, M., Fukuyama, S., Nakajima, N., Imai, M., Yamada, S., . . . Kawaoka, Y. (2013). Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*(501), 551-555. doi:10.1038/nature12392

Waters Corporation. (2016, Aralık). *HPLC Columns Capabilities Brochure*. Şubat 18, 2021 tarihinde <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003995en.pdf> adresinden alındı

Yegorova, A. V., Scrypynets, Y. V., Leonenko, I. I., Umetskaya, I. V., & Voitiuk, O. D. (2020). Determination Of Favipiravir Residues On The Surfaces Of Pharmaceutical Manufacturing Equipment By Hplc, Luminescence And Spectrophotometry. *Odesa National University Herald. Chemistry*(25), 45-55. doi:10.18524/2304-0947.2020.4(76).216925

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

COVID-19 TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARDAN FAVİPİRAVİR'İN VE BOZUNDURMA SAFSIZLIKLARININ HPLC YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 4	% 1	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
2	dspace.vutbr.cz İnternet Kaynağı	<% 1
3	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	"Methods for Stability Testing of Pharmaceuticals", Springer Science and Business Media LLC, 2018 Yayın	<% 1
5	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Submitted to Inonu University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1
8	repozitorij.pharma.unizg.hr İnternet Kaynağı	