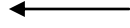


Adınızı soyadınızı giriniz

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)

**FAVİPİRAVİR'İN KROMATOĞRAFİK OLARAK
FARMASÖTİK PREPARATLARDA ANALİZİ**

DİDEM YAZGI

**DANIŞMAN
PROF.DR.ARMAĞAN ÖNAL**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, desteğini ve yardımını esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Armağan Önal'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca anlayış ve bilgisini esirgemeyen yöneticim Ünal Atamer'e,

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalının tüm değerli öğretim üyelerine,

Hayatımın her anında olduğu gibi tez çalışmam sırasında da manevi desteğini esirgemediğim yanımda olan başta ablam olmak üzere canım aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
İTHAF.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	X
ABSTRACT.....	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Etki Mekanizması	3
2.2. Farmakokinetik Özellikleri	3
2.3. Yan Etkileri.....	3
2.4. Favipiravir'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	4
2.4.1. Favipiravir.....	4
2.4.2. Safsızlıklar	5
2.5. Geliştirilmiş Analitik Yöntemler	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	8
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	8
3.1.2. Çözeltiler.....	9
3.2. Aletler ve Diğer Gereçler.....	10
3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar	11
3.3.1. Dedektör ve Dalga Boyu seçimi	11
3.3.2. Kolon seçimi	11
3.3.3. Hareketli faz seçimi	12
3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	12
3.4.1. Seçicilik.....	12
3.4.2. Doğrusallık.....	12
3.4.3. Gözlenebilme ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)	13

3.4.4. Kesinlik	14
3.4.5. Doğruluk	14
3.4.6. Sağlamlık	14
3.4.7. Çözelti Stabilitesi	15
3.4.8. Stres Çalışması.....	15
3.5. Favipiravir'in Farmasötik Preparatlarda Analizi	16
3.5.1. Geliştirilen Yöntem ile Analiz	16
3.5.2. Kıyas Yöntemi ile Analiz.....	16
4. BULGULAR.....	17
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Bulgular	17
4.1.1. Dalga Boyu Seçimi Çalışmalarına Ait Bulgular	17
4.1.2. Kolon Seçimi Çalışmalarına Ait Bulgular	18
4.1.3. Hareketli Faz Seçimi Çalışmalarına Ait Bulgular.....	18
4.2. Geliştiren Yönteme Ait Kromatografik Şartlar.....	20
4.3. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	21
4.3.1. Seçicilik.....	21
4.3.2. Doğrusallık.....	23
4.3.3. Gözlenebilme ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)	28
4.3.4. Kesinlik	28
4.3.5. Doğruluk	29
4.3.6. Sağlamlık	33
4.3.7. Çözelti stabilitesi.....	33
4.3.8. Stres Çalışması.....	34
4.4. Favipiravir'in Farmasötik Preparatlarda Analizi	39
4.4.1. Geliştirilen Yöntem ile Analizi	39
4.4.2. Kıyas Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar Sonucu Elde edilen Bulgular	40
5. TARTIŞMA	41
KAYNAKLAR	43
HAM VERİLER	45
FORMLAR	46
PATENT HAKKI İZNİ	47
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	48

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3- 1: Stres koşulları.....	15
Tablo 4- 1: Kolon seçimi çalışmalarına ait sistem uygunluk parametreleri bulguları....	18
Tablo 4- 2: Hareketli faz seçimi çalışmasına ait sistem uygunluk parametreleri bulguları	19
Tablo 4- 3: Pik saflık sonuçları.....	23
Tablo 4- 4: Favipiravir doğrusallık çalışmasının verileri	24
Tablo 4- 5 : Safsızlık A doğrusallık çalışmasının verileri	25
Tablo 4- 6 : Safsızlık B doğrusallık çalışmasının verileri	26
Tablo 4- 7: Aynı gün içerisinde yapılan analizlerin kesinlik çalışmaları	28
Tablo 4- 8: Ara kesinlik sonuçları	29
Tablo 4- 9: Favipiravir doğruluk çalışması sonuçları.....	30
Tablo 4- 10: Safsızlık A doğruluk çalışması sonuçları.....	31
Tablo 4- 11: Safsızlık B doğruluk çalışması sonuçları	32
Tablo 4- 12: Sağlamlık çalışması sonuçları.....	33
Tablo 4- 13: Standart çözeltisi stabilite tablosu (Oda şartlarında 48 saat)	34
Tablo 4- 14: Bozundurma çalışması sonuçları	39
Tablo 4- 15: Geliştirilen yöntem ile yapılan çalışmaların sonuçları.....	39
Tablo 4- 16: Kıyas yöntemi çalışmaları bulguları	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2- 1: Favipiravir'in kimyasal formülü	4
Şekil 2- 2 : Favipiravir'in FT-IR spektrumu.....	5
Şekil 2- 3: Safsızlık A kimyasal formülü.....	6
Şekil 2- 4: Safsızlık B kimyasal formülü.....	6
Şekil 4- 1: Favipiravir'e ait spektrum	17
Şekil 4- 2:Safsızlık A'ya ait spektrum.....	17
Şekil 4- 3: Safsızlık B'ye ait spektrum	18
Şekil 4- 4: Hareketli faz seçimi çalışmasına ait bir kromatogram örneği.....	19
Şekil 4- 5: Çözücüye ait kromatogram	21
Şekil 4- 6: Plaseboya ait kromatogram	21
Şekil 4- 7: Safsızlık A'ya ait kromatogram	22
Şekil 4- 8: Safsızlık B'ye ait kromatogram	22
Şekil 4- 9: Standarda ait kromatogram	23
Şekil 4- 10: Favipiravir doğrusallık grafiği	27
Şekil 4- 11: Safsızlık A doğrusallık grafiği	27
Şekil 4- 12: Safsızlık B doğrusallık grafiği	27
Şekil 4- 13: Asit ile bozundurma çalışmasına ait kromatogram.....	35
Şekil 4- 14: Asit ile bozundurma çalışmasına ait pik saflığı	35
Şekil 4- 15: Baz ile bozundurma çalışmasına ait kromatogram	36
Şekil 4- 16: Baz ile bozundurma çalışmasına ait pik saflığı.....	36
Şekil 4- 17: Isı ile bozundurma çalışmasına ait kromatogram.....	36
Şekil 4- 18: Isı ile bozundurma çalışmasına ait pik saflığı	37
Şekil 4- 19: Peroksit ile bozundurma çalışmasına ait kromatogram	37
Şekil 4- 20: Peroksit ile bozundurma çalışmasına ait pik saflığı	37
Şekil 4- 21: UV ışığı ile bozundurma çalışmasına ait kromatogram	38
Şekil 4- 22: UV ışığı ile bozundurma çalışmasına ait pik saflığı	38

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BP: İngiliz Farmakopesi

EP: Avrupa Farmakopesi

FT-IR: Fourier Dönüşümlü İnfrared

h/h : hacim / hacim

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

LOD: Gözlenebilme sınırı (Nitelik sınırı)

LOQ: Tayin Sınırı (Nicelik sınırı)

mg : miligram

mL : mililitre

N : Teorik plaka sayısı

PDA : Fotodiyot serili dedektör

RSD: Bağlı Standart Sapma

S/N: sinyal / gürültü oranı

Safsızlık A: 6-fluoro-3-oxo-3,4-dihydropyrazine-2-carbonitrile

Safsızlık B: 6-bromo-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide

SD: Standart Sapma

T.E : Tespit edilemedi

USP: Amerikan Farmakopesi

UV: Ultraviyole

UV/VIS : Ultraviyole Visible

µg : mikrogram

ÖZET

Didem Yazgı (2021). Favipiravir'in kromatografik olarak farmasötik preparatlarda analizi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu tez çalışması kapsamında favipiravirin farmasötik preparatlarda tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi kullanılarak bir miktar tayini metodu geliştirilmiş ve geliştirilen metodun validasyonu başarı ile tamamlanmıştır. Kromatografik ayırmalar, C18 kolonda hareketli faz A olarak 10 mM potasyum dihidrojen fosfat pH 4.0 tamponu:asetonitril (90:10) ve hareketli faz B olarak asetonitril kullanılmıştır. Hareketli faz akış hızı 1,5 mL/dakikadır. Çalışmada Fotodiyot serili dedektör (PDA) kullanılmış ve dalga boyu 238 nm seçilmiştir. Doğrusallık aralığı 0.5-3 µg/mL'dir. Gözlenebilme ve tayin sınırları sırasıyla 0,07 µg/mL ve 0,2 µg/mL bulunmuştur. Doğruluk çalışmaları sınır değerin %50'si ve %150'si arasında yapılmıştır. Geliştirilen metot favipiravir'in safsızlıklarına ve stres çalışması sonucunda oluşan bozunma ürünlerinin analizinde de başarı ile uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Favipiravir, Safsızlık , HPLC, Validasyon, Farmasötik Preparat

ABSTRACT

Didem Yazgı (2021). Determination of favipiravir by chromatographic method in pharmaceutical preparations, Istanbul University Institute of Health Sciences, Analytical Chemistry, USA. Master Thesis. Istanbul.

In this study, a method was developed and validated by using high performance liquid chromatography method for determination of favipiravir and its impurities in pharmaceutical preparations. Chromatographic separations were carried out on the C18 column using 10 mM potassium dihydrogen phosphate pH 4.0 : acetonitrile as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B. Mobile phase flow rate was 1.5 mL/min. PDA detector was used at 238 nm. Linear range was 0.5 – 3 µg/mL. Detection and quantitation limits were found 0.07 µg/mL and 0.2 µg/mL, respectively. Accuracy studies were carried out within 50% and 150% of the limit value. Validated method is fast, precise and reproducible. This method can be used determination of favipiravir impurities for film coated tablets.

Keywords: Favipiravir, Impurity, HPLC, Validation, Pharmaceutical Preparation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde pnömoni salgınını bilim adamları, şiddetli akut solunum sedromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) olarak bildirmiştir. Daha sonra Dünya Sağlık Örgütü tarafından koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) olarak adlandırdı. Kısa sürede tüm dünyaya yayılan koronavirüs, alfakoronavirüs ve betakoronavirüs olarak katagorize edilmiş bir virüs grubudur [1].

Favipiravir, $C_5H_4FN_3O_2$ kapalı formüle sahip olan 157.10 g/mol ağırlığında kimyasal adı 6-Fluoro-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide olan bir bileşiktir [2]. T-705 olarak da adlandırılan Favipiravir, influenza ve diğer birçok RNA-bağımlı RNA polimerazını seçici ve güçlü inhibe eden bir anti viral ilaç türüdür [3]. Japonya menşei olan Toyama Chemical Co., Ltd. firması tarafından bulunan bu etken dirençli influenza vakalarında terapötik kullanım için onaylı modifiye edilmiş bir pirazin analogudur. RNA polimeraz (RdRp) enzimlerini hedefler. İnfluenza A ve B'nin replikasyonunu inhibe etmekle kalmayan Favipiravir, nöramidaz inhibitörlerine dirençli influenza suşları için alternatif bir seçenek olabilir [4]. Şimdi de COVID-19 tedavisinde kullanılan ilaçların arasında yer almaktadır [5].

Katı oral dozaj formu olan bu ilaç aç karnına alınır. Favipiravirin oral biyoyararlanımı $> \% 95$ 'tir. Yapılan araştırmalar sonucu aç karna, yemekle veya yemekten 30 dakika sonra uygulanması konusunda anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Plazma yarılanma ömrü 4 saattir. Karaciğer fonksiyon bozukluğu olan kişilerde kan konsantrasyonu takip edilerek doz ayarlaması yapılmalıdır. En sık gözlenen yan etkiler: diyare, serum ürik asit düzeyinde artış, serum transaminaz (ALT, AST, ALP) ve total bilirubin düzeylerinde artış ve nötrofil düzeyinde azalmadır. Sindirim sistemi yan etkileri (bulantı, gaz artışı) ve psikiyatrik semptomlarda görülebilir [5].

Farmakopelerde yer almayan Favipiravir ile ilgili yapılan literatür araştırmaları sonucu 4 adet yayınlanmış çalışma bulunmuştur. Yayınlanan çalışmalardan ikisi Favipiravirin farmasötik preparatlardaki tayinine dayanan çalışmalardır [6,7]. Diğer iki yayın ise safsızlık tayini çalışmasıdır ve analiz süresi 60 dakikadır [8,9].

Bu yüksek lisans tezi kapsamında Favipiravir ve safsızlıklarının farmasötik preparatlarda HPLC yöntemi ile UV/PDA dedeksiyonuna dayanan bir miktar tayini metodu geliştirilmesi planlanmıştır. Bu yöntemin Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH, *International Conference Harmonization Q2(R1)*) klavuzuna göre validasyonu yapılmış ve ayrıca geliştirilen metod ilaç maddesinin farmasötik preparatlardaki analizine başarıyla uygulanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etki Mekanizması

Bir guanozin pürin nükleotid analogu olan favipiravir hücre içinde fosforibozilasyona uğrar ve favipiravir ribofuranosil-5B-trifosfat (Favipiravir- RTP) olarak adlandırılan aktif formuna dönüşür. Favipiravir-RTP rdp'nın potent bir inhibitörüdür. Sadece RNA virüslerine etkilidir. DNA'ya bağımlı RNA polimeraza ve DNA polimeraza 215 etkisizdir, DNA virüslerine ve insan hücrelerine etki göstermez [10].

Favipiravir, viral replikasyon ve transkripsiyonu doğrudan inhibe etmesi ve viral RNA polimerazı hedef alan spesifik etki mekanizması ile diğer antivirallerden ayrılır [11].

2.2. Farmakokinetik Özellikleri

Eliminasyonunda yer alan ana enzim, favipiraviri inaktif M1 metabolitine dönüştüren aldehid oksidazdır. Hidrofilik bir metabolit olan M1 esas olarak renal yolla atılır. Favipiravir aynı zamanda aldehit oksidazı inhibe etmektedir. Bu da karmaşık zamana ve doza bağımlı farmakokinetiğine yol açar. Bu nedenle yeterli kan seviyesini elde edebilmek için oral yükleme gereklidir [11].

Katı oral dozaj formu olan bu ilaç aç karnına alınır. Favipiravirin oral biyoyararlanımı > % 95'tir. Yapılan araştırmalar sonucu aç karna, yemekle veya yemekten 30 dakika sonra uygulanması konusunda anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Plazma yarılanma ömrü 4 saattir. Karaciğer fonksiyon bozukluğu olan kişilerde kan konsantrasyonu takip edilerek doz ayarlaması yapılmalıdır [5].

2.3. Yan Etkileri

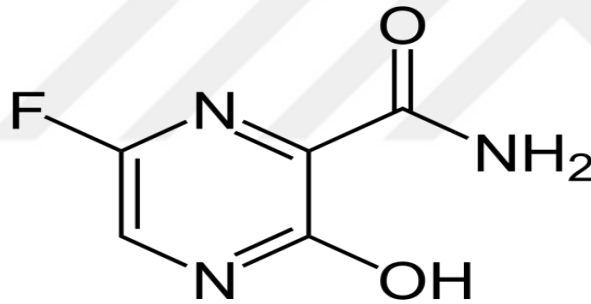
En sık gözlenen yan etkiler: diyare, serum ürik asit düzeyinde artış, serum transaminaz (ALT, AST, ALP) ve total bilirubin düzeylerinde artış ve nötrofil düzeyinde azalmadır. Sindirim sistemi yan etkileri (bulantı, gaz artışı) ve psikiyatrik

semptomlarda görülebilir. Esas olarak böbreklerden atılır, ancak üretici tarafından herhangi bir doz ayarlaması önerilmemektedir. Doz azaltması yapılacaksa yükleme dozu aynı şekilde uygulanır, ancak idame doz azaltılabilir. Gebelikte kullanılmamalıdır; teratojeniktir. Süte geçer [5]. Doğurganlık çağındaki kadınlar için tedavinin bitiminden 7 gün sonrasına kadar kontrasepsiyon önerilmektedir [11].

2.4. Favipiravir'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

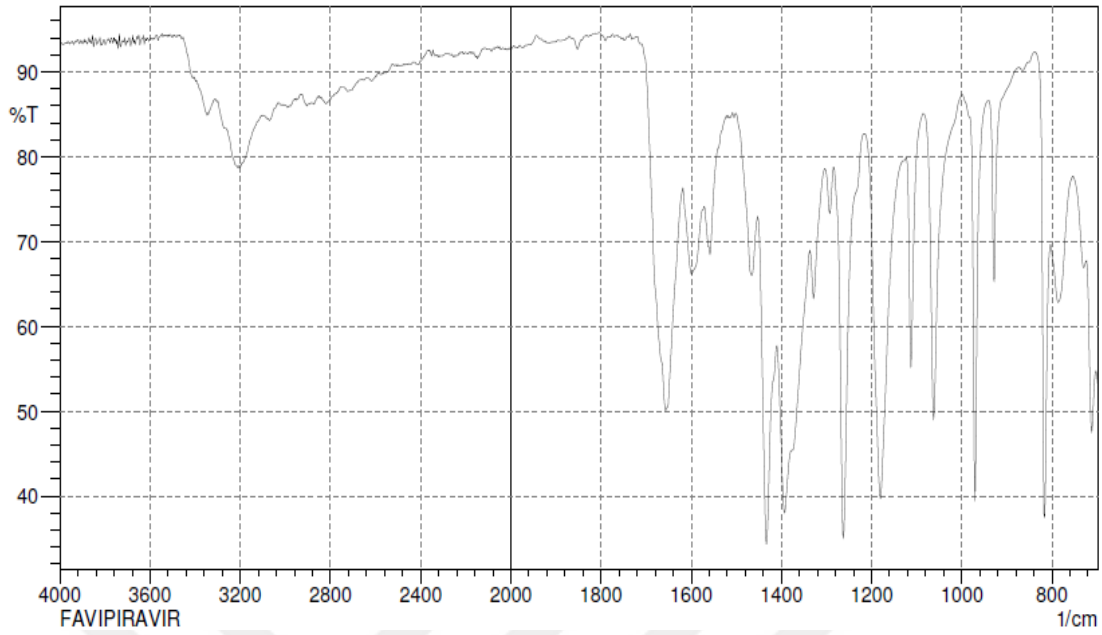
2.4.1. Favipiravir

Favipiravir kimyasal adı 6-Fluoro-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide olup kapalı formülü $C_5H_4FN_3O_2$ dir (Şekil 2-1). Molekül ağırlığı 157.10 gr/mol'dür. Beyaz – açık sarı toz olan favipiravir metanol ve asetonitrilde kısmen, su ve etanolde ise az çözünür. Favipiravir higroskopik değildir. Erime noktası $187^{\circ}C - 193^{\circ}C$ olup, asitlik sabiti (pKa) ise 5.1 dir [2].



Şekil 2- 1: Favipiravir'in kimyasal formülü

Favipiravir'in Fourier Dönüştümlü İnfrared (FT-IR) spektrumu Şekil 2.2'de görülmektedir.



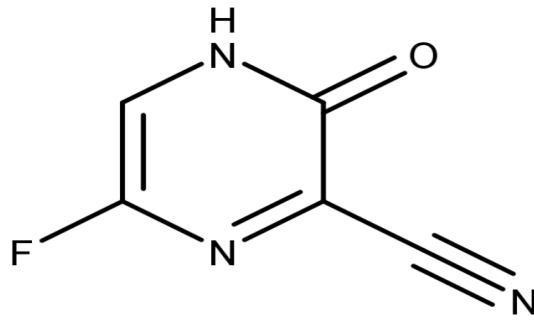
Şekil 2- 2 : Favipiravir'in FT-IR spektrumu

2.4.2. Safsızlıklar

Favipiravir'in Avrupa Farmakopesi (EP) , Amerikan Farmakopesi (USP) ve İngiliz Farmakopesi (BP)'nde monografi bulunmamaktadır. Literatür araştırmalarında ise tanımlı herhangi bir safsızlığa rastlanmamıştır. Etken madde sentez aşamaları incelenmiş ve temel olarak iki adet safsızlık tespit edilmiştir.

2.4.2.1. 6-fluoro-3-oxo-3,4-dihydropyrazine-2-carbonitrile (Safsızlık A)

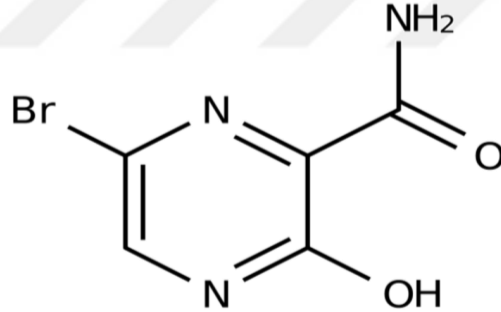
Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) adı 5-fluoro-2-oxo-1*H*-pyrazine-3-carbonitrile olup kapalı formülü $C_5H_2FN_3O$ 'dir (Şekil 2-3). Molekül ağırlığı 139.09 gr/mol'dür [12].



Şekil 2- 3: Safsızlık A kimyasal formülü

2.4.2.2. 6-bromo-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide (Safsızlık B)

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) adı 5-bromo-2-oxo-1*H*-pyrazine-3-carboxamide olup kapalı formülü $C_5H_4BrN_3O_2$ 'dir (Şekil 2-4). Molekül ağırlığı 218.01 gr/mol'dür [13].



Şekil 2- 4: Safsızlık B kimyasal formülü

2.5. Geliştirilmiş Analitik Yöntemler

EP, USP ve BP 'nde yer almayan Favipiravir'in literatürde HPLC ve spektrofotometrik yöntemlere ait çalışmalar bulunmaktadır.

Bulduk İ., Inertsil ODS-3V C18 (4.6 mm x 250 mm, 5.0 µm) kullanarak, potasyum dihidrojen fosfat (pH 2,3) ve asetonitril (90:10, v/v) ile favipiravir miktar tayini çalışması gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada dalga boyu 323 nm ve akış hızı 1.5

ml/dakika olarak tanımlanmıştır. Analiz süresi 15 dakika olarak belirlenmiş ve doğrusallık aralığı 10-100 µg/mL'dir. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 1,20 ve 2,60 µg/mL olarak bulunmuştur [6].

Safa M. Megahed ve arkadaşları Ultraviyole (UV) dedektörlü çalışmalara alternatif olarak spektrofotometrik bir yöntem geliştirmiştir. Bu çalışma Favipiravir'in 0.2 M borat tamponu (pH 8.0) içinde doğal fluoresansına dayanır. Ölçümler 361 nm eksitasyon ve 432 nm emisyon dalga boyunda yapılmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 9,44 ve 28,60 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen metot farmasötik preparatlarda ve insan plazmasında da başarılı olarak uygulanmıştır [7].

CN104914185A ve CN104914185B patentlerinde Favipiravir safsızlık tayini çalışmasına rastlanmıştır. pH 7,0 fosfat tamponu ve asetonyitril ile gradient akış programında yapılan çalışmada doğrusallık aralığı 1-10 µg/mL'dir. LOD ise 0,2 µg/mL'dir. Sabit faz olarak C18 kolon kullanılmıştır. Analiz süresi 60 dakikadır [8,9].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda 2020-2021 yılları arasında gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Çalışma sırasında kullanılan kimyasal maddeler aşağıdaki gibidir:

Favipiravir¹

Favimol 200 mg Film Kaplı Tablet²

6-fluoro-3-oxo-3,4-dihydropyrazine-2-carbonitrile¹

6-bromo-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide¹

Potasyum dihidrojen fosfat³

ortofosforik asit³

Sodyum hidroksit³

Hidroklorik asit³

Hidrojen peroksit³

Asetonitril (HPLC saflığında)³

Yüksek saflıkta su (HPLC saflığında)

¹ Honour Lab Limited, Hindistan

² Neutec Ilac, Türkiye

³ Merck, E. Merck A.G. Darmstadt, Almanya

3.1.2. Çözeltiler

3.1.2.1. Hareketli Faz Çözeltileri Hazırlanışı

Tampon Çözeltisi

1.4 g potasyum dihidrojen fosfat saf su ile çözüldü ve son hacim 1000'ye tamamlandı. Bu çözelti pH 4.0'a orto-fosforik asit ile ayarlandı.

Hareketli Faz A

900 mL tampon üzerine 100 mL asetonitril ilave edilerek son hacim 1000 mL'ye tamamlandı. Tampon: asetonitril (90:10, h/h)

Hareketli Haz B

Asetonitril

3.1.2.2. Favipiravir Standart ve Numune Çözeltileri Hazırlanışı

Stok çözeltisi:

2 mg favipiravir, 2 mg safsızlık A ve 2 mg safsızlık B tartıldı ve 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 20 mL hareketli faz A ilave edilerek çözüldü ve hacmine hareketli faz A ile seyreltilti ($C_{\text{Favipiravir}} : 0,04 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{safsızlık A}} : 0,04 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{safsızlık B}} : 0,04 \text{ mg/mL}$)

Standart çözeltisi

5,0 mL stok çözeltisi, 100 mL balon jojeye alındı ve hacmine hareketli faz A ile seyreltilti. ($C_{\text{Favipiravir}} : 0,002 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{safsızlık A}} : 0,002 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{safsızlık B}} : 0,002 \text{ mg/mL}$)

Stok safsızlık A çözeltisi:

2 mg safsızlık A tartıldı ve 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 20 mL hareketli faz A ilave edilerek çözüldü ve hacmine hareketli faz A ile seyreltilti ($C_{\text{safsızlık A}} : 0,04 \text{ mg/mL}$).

Safsızlık A çözeltisi

5,0 mL stok safsızlık A standart çözeltisi, 100 mL balon jojeye alındı ve hacmine hareketli faz A ile seyreltilti ($C_{\text{safsızlık A}} : 0,002 \text{ mg/mL}$).

Stok safsızlık B çözeltisi:

2 mg safsızlık B tartıldı ve 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 20 mL hareketli faz A ilave edilerek çözüldü ve hareketli faz A ile seyreltilti ($C_{\text{safsızlık B}} : 0,04 \text{ mg/mL}$).

Safsızlık B çözeltisi

5,0 mL stok safsızlık B standart çözeltisi, 100 mL balon jojeye alındı ve hacmine hareketli faz A ile seyreltilti ($C_{\text{safsızlık B}} : 0,002 \text{ mg/mL}$).

Favipiravir film kaplı tablet numune çözeltisi

50 mg favipiravir'e eşdeğer miktarda film kaplı tablet tozu tartıldı ve 25 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 10 mL hareketli faz A ilave edilerek 30 dakika ultra sonik banyoda tutuldu ve hacmine hareketli faz A ile seyreltilti (2 mg/mL).

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

1. HPLC aleti (LC-20AT)

- Dedektör PDA (Photodiode Array Dedector) (SPD-M20A)
- Degasser (DGU-20A5R)
- Pompa (LC-20AT)
- Autosampler (SIL-20ACHT)
- Kolon Fırını (CTO-10ASP)
- Analitik Kolon : InertSustainSwift C18 (250 mm x 4,6 mm) , 5 μm
- HP masaüstü bilgisayar
- HP Laserjet 1100 Yazıcı

2. Yazılımlar

- LC Solution Programı
- MS Office Word Programı
- MS Office Excel Programı

3. Mobil faz süzme ünitesi (Millipor, 0,5 μ)
4. Teraziler (Denver Insrument TB 2150)
5. Ultrasonik banyo (Elma Ultrasonic LC 30 H)
6. Ultra saf su cihazı (Younglin instrument)
7. Otomatik pipetler (Eppendorf 1000 μ L lik)
8. Balonjojeler (50 ve 100 mL lik)
9. Dereceli ve transfer pipetler
10. Mezür (1000 mL)

3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

Literatür çalışmaları incelendikten sonra HPLC sisteminde favipiravir ve safsızlıkların yan yana analizleri yapılmasına karar verilmiştir. Analiz yönteminin geliştirilmesi aşamasında aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

3.3.1. Dedektör ve Dalga Boyu seçimi

Işığı absorblayabilen yapıya sahip olması sebebiyle metot geliştirme çalışmalarında Ultraviyole Visible (UV/VIS) veya PDA dedektörlerin kullanılması ön görülmüştür. Aynı anda çoklu dalga boyu ölçme avantajına sahip olduğu için PDA dedektör kullanıldı. Dalga boyu seçimi için etken madde ve safsızlıkların standart çözeltilerinin spektrumu alınmıştır.

3.3.2. Kolon seçimi

Literatürdeki çalışmalarda da kullanılan C18 kolon ile çalışmaya başlandı. İki farklı kolon ile denemeler yapıldı. Sonuçlar Bölüm 4.1.2 'de verilmiştir.

3.3.3. Hareketli faz seçimi

Etken maddenin pKa değeri göz önünde bulundurularak tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Hareketli faz seçim çalışmalarında tampon çözeltisinin yanında asetonyitril ve metanol denenmiştir.

3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Geliştirilmesi tamamlanan yöntemin validasyonu ICH Kılavuzu Q2 (R1)'ye göre yapıldı [14].

3.4.1. Seçicilik

Özgünlük, olası bileşenlerin varlığında analiti kesin olarak değerlendirmektir. Bunlar safsızlıklar, bozunmalar ya da matrisler olabilir. Safsızlık tayininde, seçicilik, etken madde veya ürünü uygun safsızlık seviyelerine ekleyerek ve bu safsızlıkları ayrı ayrı ve/veya numune içerisinde diğer bileşimlerden ayrıldığını göstererek sağlanabilir. Pik saflık testleri, analit pikinin birden fazla bileşene ait olmadığını göstermek için yararlı olabilir [14].

Safsızlık piklerinin çözücü, plasebo, etken madde ve diğer safsızlık pikleri ile girişimi analiz edildi. Çalışma sonunda elde edilen kromatogramlar ve pik saflık değerleri Bölüm 4.3.1 'de verilmiştir.

3.4.2. Doğrusallık

Analitik bir prosedürün doğrusallığı, numune içerisindeki analiz edilen maddenin belirli bir konsantrasyon aralığında elde edilen test sonucu ile doğrusal olması olarak açıklanır. En az 5 farklı konsantrasyon gereklidir [14].

Stok çözelti seyreltilerek 5 farklı konsantrasyonda standart çözeltileri hazırlandı ve her bir standart çözeltiden 6 ardışık enjeksiyon verildi. Her bir safsızlık için en küçük kareler yöntemi kullanılarak doğrusallık denklemleri elde edildi. Çalışmanın bulguları Bölüm 4.3.3'de verilmiştir.

%25 standart çözeltisi :

1,25 mL stok çözeltisi, 100 mL balon jöjeye alındı ve hacmine hareketli faz A

ile seyreltildi. ($C_{\text{Favipiravir}}$: 0,0004 mg/mL, $C_{\text{safsızlık A}}$: 0,0004 mg/mL, $C_{\text{safsızlık B}}$: 0,0004 mg/mL)

%50 standart çözeltisi :

2,5 mL stok çözeltisi, 100 mL balon jojeye alındı ve hacmine hareketli faz A ile seyreltildi. ($C_{\text{Favipiravir}}$: 0,001 mg/mL, $C_{\text{safsızlık A}}$: 0,001 mg/mL, $C_{\text{safsızlık B}}$: 0,001 mg/mL)

%80 standart çözeltisi :

4,0 mL stok çözeltisi, 100 mL balon jojeye alındı ve hacmine hareketli faz A ile seyreltildi. ($C_{\text{Favipiravir}}$: 0,0016 mg/mL, $C_{\text{safsızlık A}}$: 0,0016 mg/mL, $C_{\text{safsızlık B}}$: 0,0016 mg/mL)

%100 standart çözeltisi :

5,0 mL stok çözeltisi, 100 mL balon jojeye alındı ve hacmine hareketli faz A ile seyreltildi. ($C_{\text{Favipiravir}}$: 0,002 mg/mL, $C_{\text{safsızlık A}}$: 0,002 mg/mL, $C_{\text{safsızlık B}}$: 0,002 mg/mL)

%150 standart çözeltisi :

7,5 mL stok çözeltisi, 100 mL balon jojeye alındı ve hacmine hareketli faz A ile seyreltildi. ($C_{\text{Favipiravir}}$: 0,003 mg/mL, $C_{\text{safsızlık A}}$: 0,003 mg/mL, $C_{\text{safsızlık B}}$: 0,003 mg/mL)

3.4.3. Gözlenebilme ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

Gözlenebilme sınırı (LOD) bir numunedeki tespit edilebilen ancak nicel kesin bir değer olarak belirlenemeyen en küçük analit miktarıdır. Tayin sınırı (LOQ) bir numunedeki uygun hassasiyet ve doğrulukta kantitatif olarak belirlenebilen en düşük analit miktarıdır. Özellikle safsızlıkların ve/veya bozunma ürünlerinin belirlenmesinde kullanılır. LOD değeri için S/N 3:1, LOQ değeri için S/N 10:1 kullanılmıştır[14].

Standart çözeltiden seyreltme yapılarak ard arda enjeksiyonlar yapıldı ve sinyal / gürültü (S/N) değerleri hesaplatıldı. LOD ve LOQ belirlendi. LOQ değerlerine ait

çözeltiden 6 enjeksiyon yapılarak enjeksiyon tekrarlanabilirliği incelendi. % RSD değerleri hesaplatıldı. Bulgular Bölüm 4.3.2’de verilmiştir.

3.4.4. Kesinlik

3.4.4.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışma aralığını kapsayan 9 ölçüm (3 farklı konsantrasyon / 3 tekrar) ve % 100 test konsantrasyonundan en az 6 ölçüm kullanılarak değerlendirilmelidir. [14].

% 100’ü seviyesinde etken madde, safsızlık A ve safsızlık B ilavesi yapılarak numune çözeltileri hazırlandı. Sonuçlar Bölüm 4.3.4.1’de verilmiştir.

3.4.4.2. Ara Kesinlik

Ara kesinliğin belirlenmesi prosedürün kullanılmasının amaçlandığı koşullara bağlıdır. Farklı günler, analistler, ekipman gibi rastgele olayların analitik prosedürün kesinliği üzerindeki etkilerini belirlenmesidir [14].

Farklı günlerde ve farklı cihazda safsızlık tayini yapılmıştır. Sonuçlar Bölüm 4.3.4.2’de verilmiştir.

3.4.5. Doğruluk

Doğruluk, analitik prosedürün belirtilen aralığı boyunca yapılır. Çalışma aralığını kapsayan en az 3 farklı konsantrasyon seviyesinde en az 9 ölçüm yapılarak değerlendirilmelidir. (Örneğin, 3 farklı konsantrasyon / 3’er enjeksiyon) [14].

Metodun doğruluğunu kanıtlamak için tablet çözeltisine %50, %100 ve %150’lik konsantrasyonlarda favipiravir ve safsızlıklar ilave edildi. Geri kazanım değerleri hesaplandı. Çalışma sonuçları Bölüm 4.3.5’de verilmiştir.

3.4.6. Sağlamlık

Sağlamlığın değerlendirilmesi metot geliştirme aşamasında yapılmalıdır ve çalışılan prosedürün türüne bağlıdır. Yöntem parametrelerindeki kasıtlı varyasyonlara

göre bir analizin güvenilirliği gösterilmelidir. Ölçümler koşullardaki değişikliklere duyarlıysa, analitik koşullar kontrol edilmeli veya prosedüre bir önlem ifadesi dahil edilmelidir [14].

Yapılan varyasyonlar aşağıdaki gibidir:

Hareketli faz pH değişimi

Hareketli faz A'nın pH'ı ± 0.1 değiştirildi.

Kolon sıcaklığı değişimi

Kolon sıcaklığı ± 2 °C değiştirildi.

Dalga Boyu değişimi

Dalga boyu 235 nm ve 240 nm'ye değiştirildi.

Sonuçlar Bölüm 4.3.6'da yer almaktadır.

3.4.7. Çözelti Stabilitesi

Oda sıcaklığında 48 saat bekletilen standart çözeltisi belirli aralıklarla sisteme enjekte edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.7'de verilmiştir.

3.4.8. Stres Çalışması

Numunelere stres koşulları (asit, baz, ısı, oksidasyon) uygulanarak stres çalışması yapılmıştır (Tablo 3-1). Stres çalışması sonuçları Bölüm 4.2.8'de verilmiştir.

Tablo 3- 1: Stres koşulları

Stres Koşulları	Bozunma Ajanı	Bekleme Süresi
Bozundurulmamış numune	-	-
Asidik Bozundurma	0,1 N HCl	1 saat
Bazik Bozundurma	0,1 N NaOH	1 saat
Isı Bozundurması	Isı (80 °C)	1 saat
Oksidatif Bozundurma	% 0,3 H ₂ O ₂	1 saat
UV Işığı Altında Bozundurma	360 nm	12 saat

3.5. Favipiravir'in Farmasötik Preparatlarda Analizi

3.5.1. Geliştirilen Yöntem ile Analiz

Bu yöntemin tablet analizlerinde uygulanabilirliğini görmek için geliştirilen bu yöntemin kromatografik koşulları ile analiz edilir. Sonuçlar Bölüm 4.4.1'de verilmiştir.

3.5.2. Kıyas Yöntemi ile Analiz

Bu çalışmada geliştirilen yöntem, literatürde bulunan İ. Bulduk'un geliştirdiği HPLC yöntemi ile kıyaslandı [6].

Mobil faz olarak 50 mM potasyum dihidrojen fosfat (pH 2,3) ve asetonitrilin (90:10, h/h) karışımı kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk., dalga boyu 323 nm ve kolon sıcaklığı 30°C'dir.

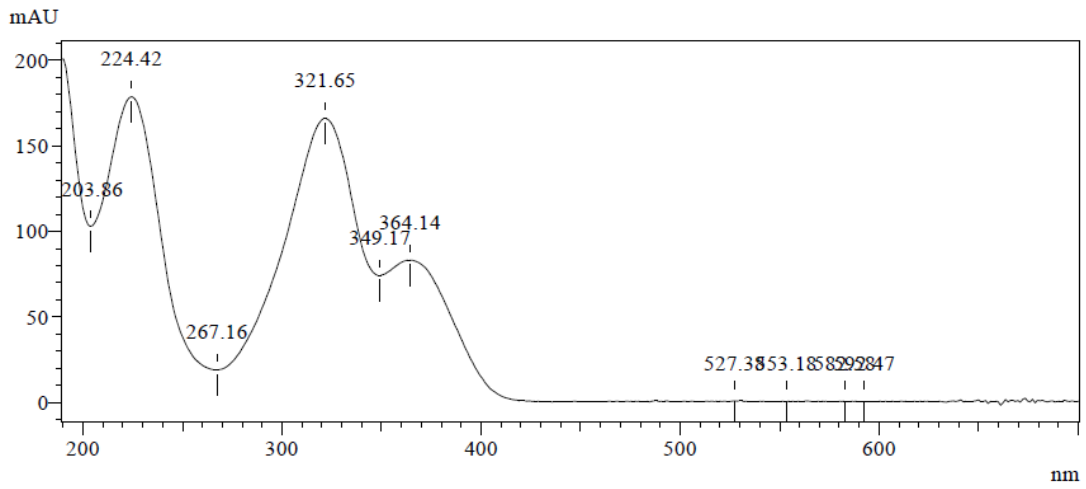
Favipiravir film kaplı tablet kullanılarak 50 µg/mL favipiravir içeren konsantrasyonda numune çözeltisi hazırlandı. İşlem 5 kez tekrarlandı. Ölçü eğrisi denklemi yardımı ile konsantrasyon hesabı yapıldı. Geri kazanım değerleri bu çalışmada geliştirilen yöntem ile kıyaslandı. Sonuçlar Bölüm 4.4.2'de verilmiştir.

4. BULGULAR

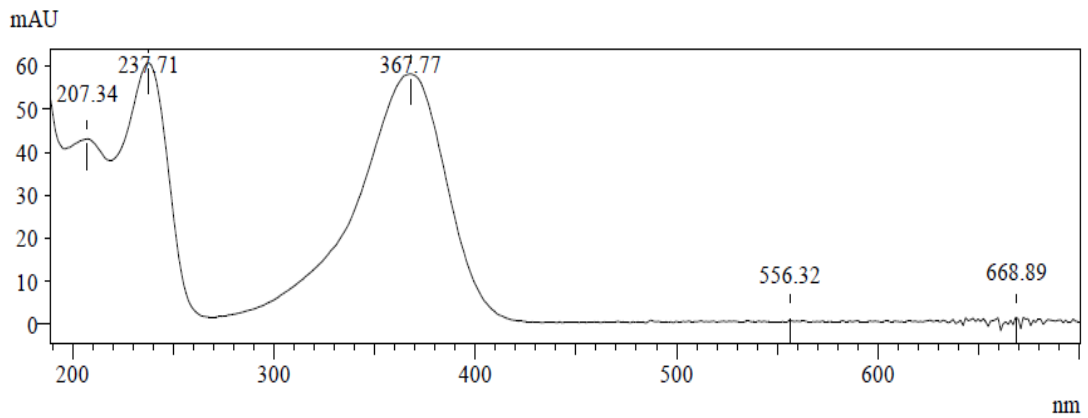
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Bulgular

4.1.1. Dalga Boyu Seçimi Çalışmalarına Ait Bulgular

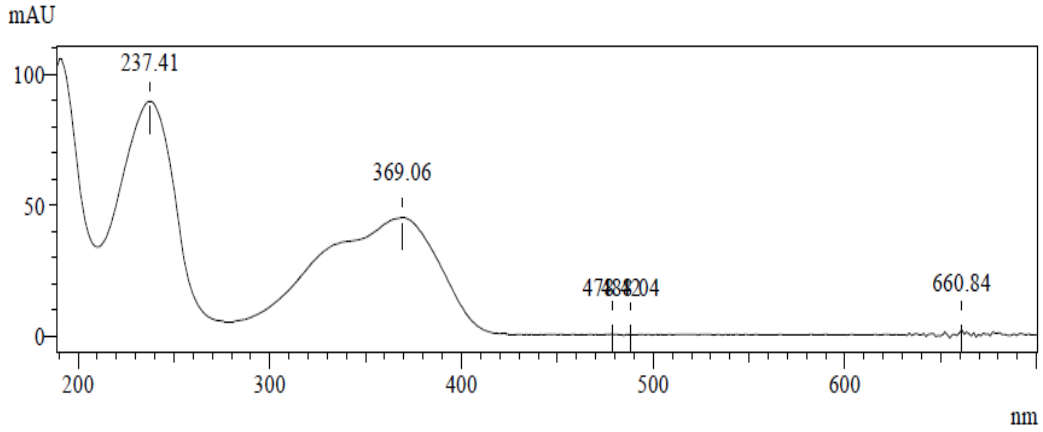
Geliştirilen yöntemin dalga boyu seçimi olarak safsızlık A ve safsızlık B'nin maksimum absorbans verdiği 238 nm dalga boyu seçilmiştir. Etken madde ve safsızlık standart çözeltilerinin spektrum sonuçları Şekil 4-1 ve Şekil 4-3 arasında yer almaktadır.



Şekil 4- 1: Favipiravir'e ait spektrum



Şekil 4- 2:Safsızlık A'ya ait spektrum



Şekil 4- 3: Safsızlık B'ye ait spektrum

4.1.2. Kolon Seçimi Çalışmalarına Ait Bulgular

Literatür taramalarına göre iki farklı C18 kolon kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.1'de sistem uygunluk parametreleri yer almaktadır. Çalışmada en iyi değerler veren InertSustainSwift C18 kolon seçilmiştir.

Tablo 4- 1: Kolon seçimi çalışmalarına ait sistem uygunluk parametreleri bulguları

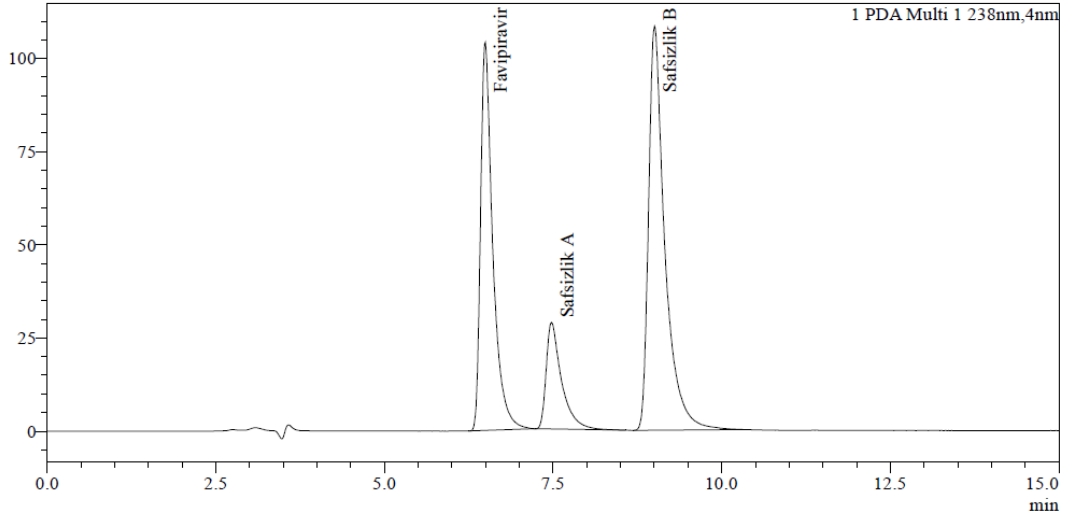
	Favipiravir			Safsızlık A			Safsızlık B		
	Alan	Kuyruklanma Faktör	Teorik Plaka Sayısı	Alan	Kuyruklanma Faktör	Teorik Plaka Sayısı	Alan	Kuyruklanma Faktör	Teorik Plaka Sayısı
InertSustainSwift C18	642330	1,1	14744	362942	1,1	14056	746113	1,1	14361
ACE C18	585221	1,2	5986	329967	1,2	5052	672175	1,2	5142

4.1.3. Hareketli Faz Seçimi Çalışmalarına Ait Bulgular

Hareketli faz seçiminde tampon çözeltisi ile birlikte metanol ve asetonitril denenmiştir. Sistem uygunluk parametrelerine bakıldığında asetonitril ile hazırlanan

hareketli fazlar ile daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Metanol kullanılan çalışmanın kromatogram örneği Şekil 4-2’de ve Tablo 4-4’de verilmiştir.

Literatür araştırması ve yapılan çalışmalar sonucu Favipiravir’in suda az çözündüğü görülmüştür ve çözücü olarak hareketli faz A denenmiştir.



Şekil 4- 4: Hareketli faz seçimi çalışmasına ait bir kromatogram örneği

Tablo 4- 2: Hareketli faz seçimi çalışmasına ait sistem uygunluk parametreleri bulguları

	Metanol kullanılarak hazırlanan mobil faz ile			Asetonitril kullanılarak hazırlanan mobil faz ile		
	Favipiravir	Safsızlık A	Safsızlık B	Favipiravir	Safsızlık A	Safsızlık B
Alan	1311901	451334	1819752	642330	362942	746113
Kuyruklanma Faktörü	1,7	1,9	1,7	1,1	1,1	1,1
Teorik Plaka Sayısı	6486	5848	7682	14744	14056	14361

4.2. Geliştiren Yönteme Ait Kromatografik Şartlar

Yapılan denemeler sonucu aşağıdaki kromatografik şartlar elde edilmiştir.

Kromatografik Şartlar

Kolon	:	InertSustainSwift C18 (250 mm x 4,6 mm) , 5 µm
Kolon Sıcaklığı	:	25 °C
Akış Hızı	:	1.5 mL/dk
Dalga Boyu	:	238 nm
Enjeksiyon Hacmi	:	20 µL
Analiz Süresi	:	10 dakika

Kromatografik ayırmalarda analiz süresini kısaltmak ve daha iyi rezolüsyonu sağlamak için gradient elüsyon yapılmıştır. Gradient elüsyon programı aşağıda verilmiştir.

Gradient Programı

Zaman (dk.)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	98	2
1,5	98	2
2,0	90	10
7,0	90	10
8,0	98	2
10,0	98	2

Hareketli Faz A

900 mL tampon üzerine 100 mL asetonitril ilave edilerek son hacim 1000 mL'ye tamamlandı. Tampon: asetonitril (90:10, h/h)

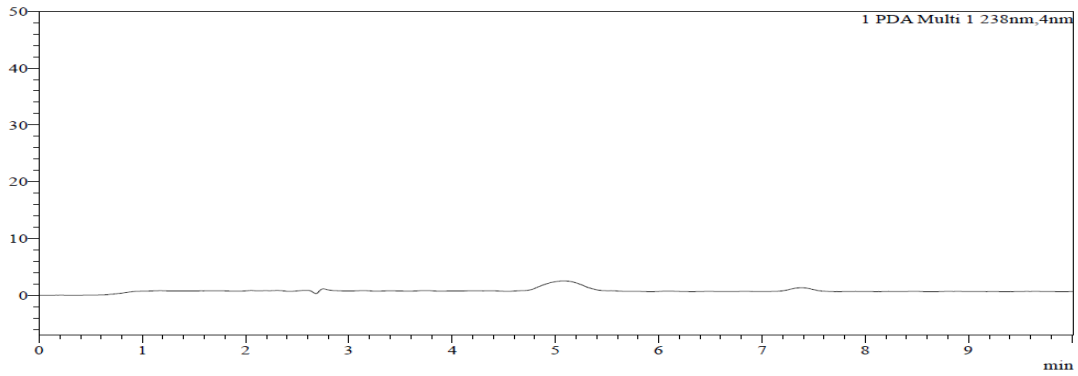
Hareketli Faz B

Asetonitril

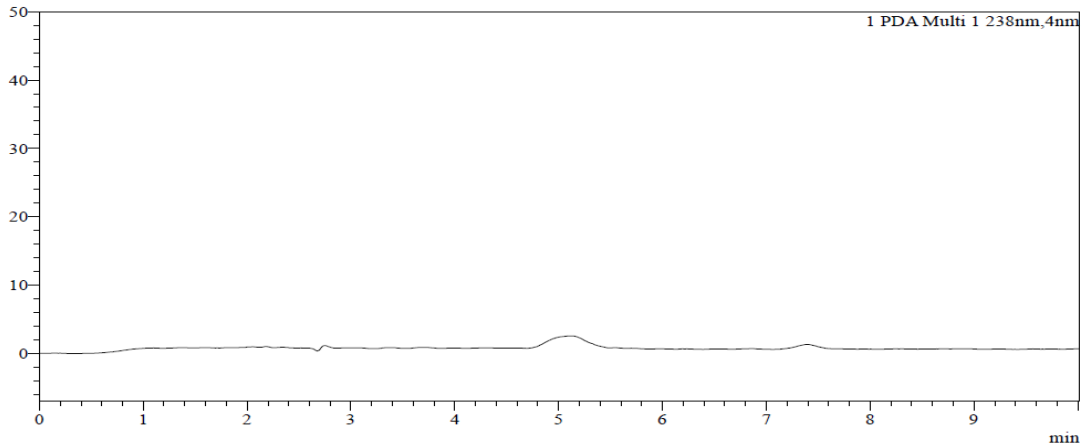
4.3. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

4.3.1. Seçicilik

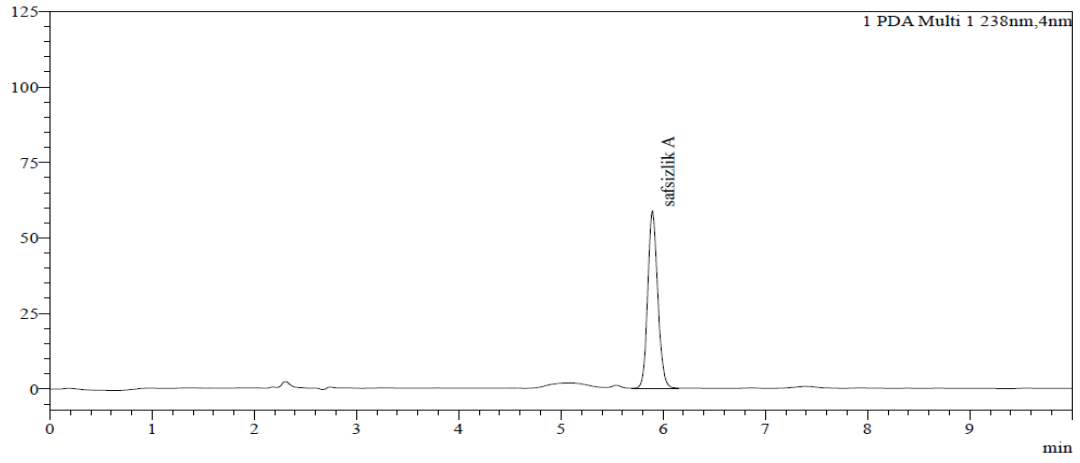
Seçicilik enjeksiyonlarından elde edilen kromatogramlarda, ana pik ile herhangi bir pikin girişimi olmadı belirlenmiştir. İlgili kromatogramlar Şekil 4-5 ve Şekil 4-9 arasında verilmiştir. Seçicilik çalışmasına ait pik saflık indeksleri Tablo 4-3’de yer almaktadır.



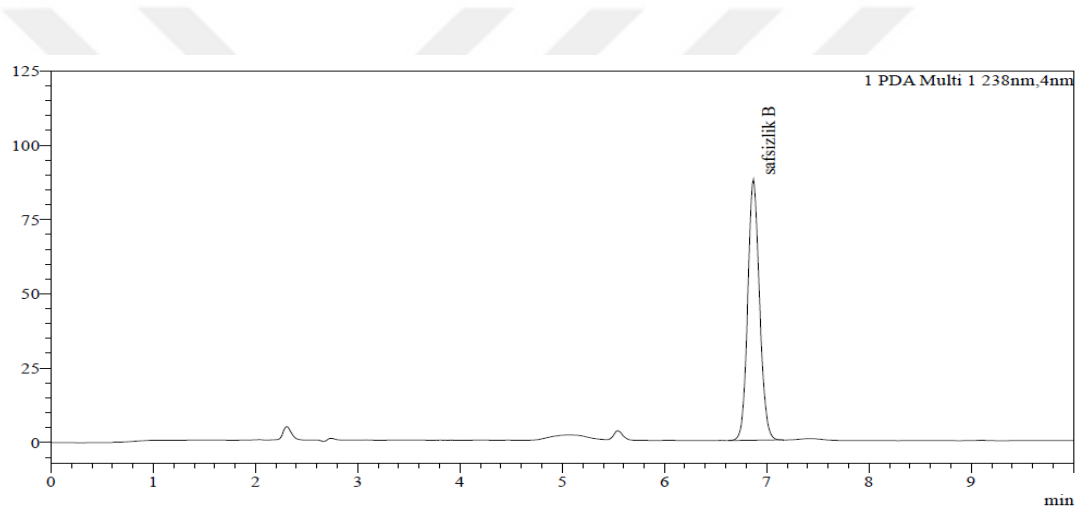
Şekil 4- 5: Çözücüye ait kromatogram



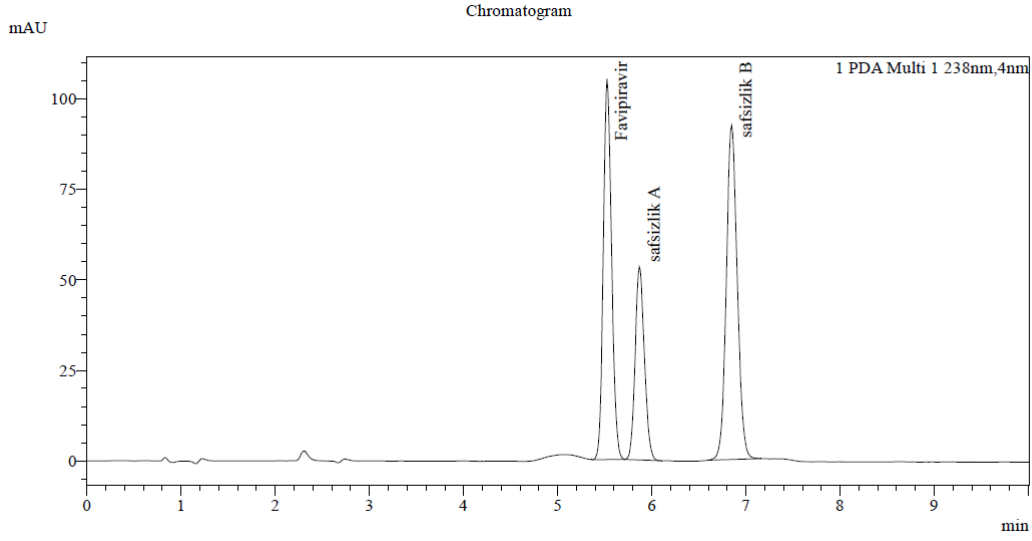
Şekil 4- 6: Plaseboya ait kromatogram



Şekil 4- 7: Safsızlık A'ya ait kromatogram



Şekil 4- 8: Safsızlık B'ye ait kromatogram



Şekil 4- 9: Standarda ait kromatogram

Tablo 4- 3: Pik saflık sonuçları

Çözelti Adı	Pik Saflıkları		
	Favipiravir	Safsızlık A	Safsızlık B
Blank	-	-	-
Plasebo	-	-	-
Standart	0,999986	0,999999	1,000000

4.3.2. Doğrusallık

Favipiravir, safsızlık A ve safsızlık B için 0.5-3 µg/mL konsantrasyon aralığında 5 farklı konsantrasyonda standart çözeltileri Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı gibi hazırlanarak çalışıldı. Favipiravir, Safsızlık A ve safsızlık B doğrusallık çalışmalarının verileri Tablo 4-4 ve Tablo 4-6 arasında verilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak Şekil 4-10 ve Şekil 4-12 arasında doğrusallık grafikleri oluşturuldu.

Tablo 4- 4: Favipiravir doğrusallık çalışmasının verileri

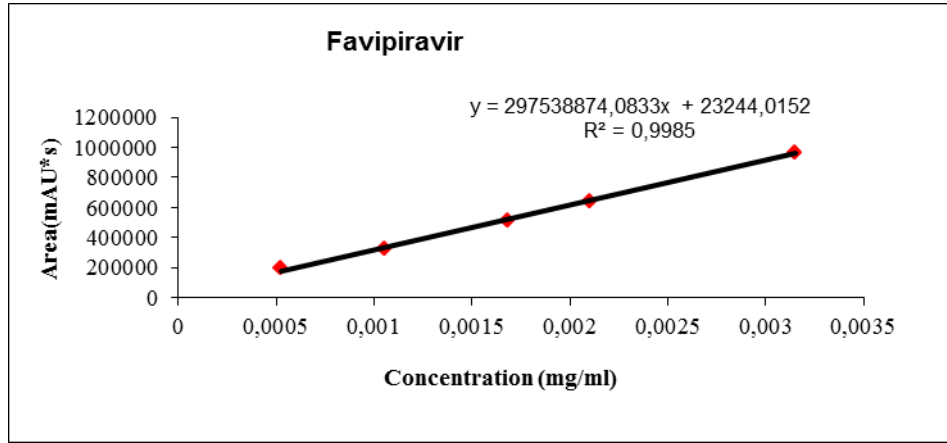
Favipiravir					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	RSD
% 25	0,5025	195609	195180	287,55	0,15
		195224			
		194819			
		195060			
		195187			
% 50	1,005	323328	322558	305,29	0,09
		322587			
		322719			
		323133			
		322613			
% 80	1,608	516856	516851	252,28	0,05
		517112			
		516476			
		516765			
		517047			
% 100	2,01	642330	643121	525,25	0,08
		642919			
		643604			
		643568			
		643184			
% 150	3,015	969392	968778	439,89	0,05
		968375			
		969082			
		968450			
		968592			

Tablo 4- 5 : Safsızlık A doğrusallık çalışmasının verileri

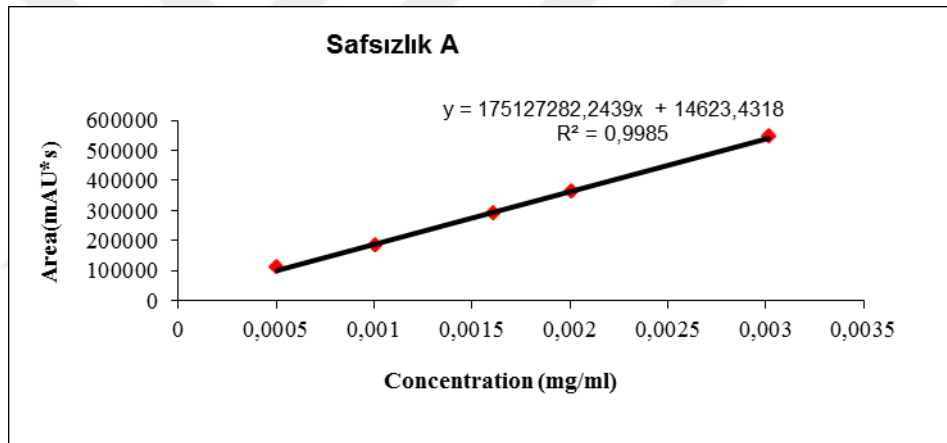
Safsızlık A					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	RSD
% 25	0,5025	110814	111503	556,16	0,50
		111416			
		111188			
		112245			
		111832			
% 50	1,005	182888	183036	359,03	0,20
		182900			
		182978			
		183661			
		182751			
% 80	1,608	293475	292995	323,64	0,11
		293078			
		293001			
		292806			
		292613			
% 100	2,01	362942	364142	781,93	0,21
		363772			
		364691			
		364802			
		364505			
% 150	3,015	546826	547065	586,68	0,11
		546429			
		546696			
		547732			
		547643			

Tablo 4- 6 : Safsızlık B doğrusallık çalışmasının verileri

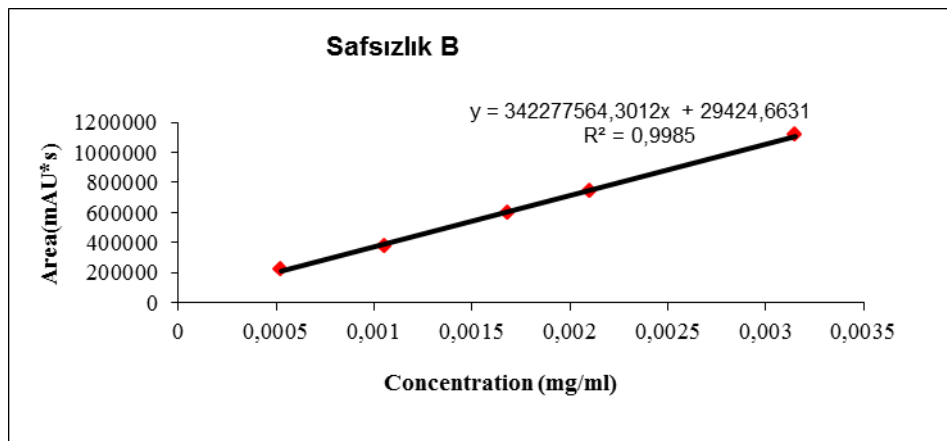
Safsızlık B					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	RSD
% 25	0,525	227630	227246	593,37	0,26
		227364			
		227943			
		226732			
		226501			
% 50	1,05	372826	373186	390,85	0,10
		372985			
		373083			
		373842			
		373196			
% 80	1,68	596644	597160	631,54	0,11
		597509			
		597795			
		597516			
		596337			
% 100	2,1	746113	744360	1003,02	0,12
		743589			
		744153			
		744055			
		743890			
% 150	3,15	1116381	1116241	487,84	0,04
		1116955			
		1116297			
		1115727			
		1115847			



Şekil 4- 10: Favipiravir doğrusallık grafiği



Şekil 4- 11: Safsızlık A doğrusallık grafiği



Şekil 4- 12: Safsızlık B doğrusallık grafiği

4.3.3. Gözlenebilme ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

Standart çözeltisi kullanılarak LOD ve LOQ belirlendi. Standart çözeltisi 10 kat seyreltilerek LOQ, 30 kat seyreltilerek LOD çözeltisi hazırlanmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırayla 0,07 µg/mL ve 0,2 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.3.4. Kesinlik

4.3.4.1. Tekrarlanabilirlik

% 100'ü seviyesinde etken madde, safsızlık A ve safsızlık B ilavesi yapılarak numune çözeltileri hazırlandı. Aynı gün içerisinde yapılan analizlere ait standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4-7'de verilmiştir.

Tablo 4- 7: Aynı gün içerisinde yapılan analizlerin kesinlik çalışmaları

	Favipiravir (µg/mL)		Safsızlık A (µg/mL)		Safsızlık B (µg/mL)	
	Standart	200 mg Tablet	Standart	200 mg Tablet	Standart	200 mg Tablet
Alınan	2,12	2,05	2,09	2,03	2,11	2,07
Konsantrasyon						
Bulunan	2,17	2,09	2,06	2,01	2,08	2,03
Konsantrasyon						
Standart Sapma	0,04	0,03	0,02	0,01	0,02	0,03
% RSD	1,65	1,37	1,02	0,70	1,01	1,38

4.3.4.2. Ara Kesinlik

Farklı günde % 100'ü seviyesinde etken madde, safsızlık A ve safsızlık B ilavesi yapılarak numune çözeltileri hazırlandı. Standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4-8'de verilmiştir.

Tablo 4- 8: Ara kesinlik sonuçları

	Favipiravir (µg/mL)		Safsızlık A (µg/mL)		Safsızlık B (µg/mL)	
	Standart	200 mg Tablet	Standart	200 mg Tablet	Standart	200 mg Tablet
Alınan	2,09	2,25	2,00	2,05	2,02	2,04
Konsantrasyon						
Bulunan	2,11	2,31	2,05	2,00	2,07	2,01
Konsantrasyon						
Standart Sapma	0,01	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02
% RSD	0,67	1,86	1,75	1,75	1,73	1,05

4.3.5. Doğruluk

Tablet çözeltisine %50, %100 ve %150’lik konsantrasyonlarda favipiravir ve safsızlıklar ilave edildi ve beşer enjeksiyon verildi. Geri kazanım değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4-9 - Tablo 4-11 arasında verilmiştir.

Tablo 4- 9: Favipiravir doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama % Geri Kazanım	SD	RSD
%50	1,20	98,3	100,6	1,53	1,52
	1,20	99,2			
	1,12	101,8			
	1,12	101,8			
	1,08	100,9			
	1,08	101,9			
% 100	2,21	99,10	100,2	1,15	1,15
	2,21	98,64			
	2,11	100,47			
	2,11	100,47			
	2,16	100,39			
	2,16	100,39			
% 150	3,10	102,2	101,4	0,54	0,53
	3,10	101,9			
	3,06	101,3			
	3,06	101			
	3,27	100,9			
	3,27	101,2			

Tablo 4- 10: Safsızlık A doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama % Geri Kazanım	SD	RSD
%50	1,06	99,4	100,3	1,55	1,54
	1,06	99,8			
	1,02	101,7			
	1,02	100,8			
	1,04	102,2			
	1,04	98,0			
% 100	2,15	99,1	99,3	1,00	1,00
	2,15	99,1			
	2,18	98,2			
	2,18	98,5			
	2,12	100,5			
	2,12	100,6			
% 150	3,10	101,7	101,5	0,41	0,41
	3,10	101,7			
	3,05	100,9			
	3,05	102,0			
	3,11	101,2			
	3,11	101,2			

Tablo 4- 11: Safsızlık B doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama % Geri Kazanım	SD	RSD
%50	1,04	97,5	98,5	0,80	0,81
	1,04	97,8			
	1,01	99,3			
	1,01	99,5			
	1,03	98,0			
	1,03	98,6			
% 100	2,17	98,3	98,6	1,38	1,40
	2,17	98,4			
	2,19	97,3			
	2,19	97,2			
	2,10	100,4			
	2,10	100,2			
% 150	3,20	101,7	101,5	0,30	0,29
	3,20	101,6			
	3,18	101,0			
	3,18	101,3			
	3,17	101,5			
	3,17	101,7			

4.3.6. Sağlamlık

Numune çözeltisi kesinlik parametresinde hazırlanan numune çözeltisi gibi hazırlanmıştır. Tablo 4-12’de değişen analiz şartlarının safsızlık A ve safsızlık B sonuçlarına etkisi incelenmiştir.

Tablo 4- 12: Sağlamlık çalışması sonuçları

Analiz Şartları	Safsızlık A (%)	Safsızlık B (%)
Normal şartlar	0,095	0,105
Hareketli Faz pH değişimi (pH 3,9)	0,101	0,108
Hareketli Faz pH değişimi (pH 4,1)	0,106	0,110
Kolon sıcaklığı değişimi (23°C)	0,098	0,115
Kolon sıcaklığı değişimi (27°C)	0,103	0,104
Dalga Boyu Değişimi (235 nm)	0,094	0,105
Dalga Boyu Değişimi (240 nm)	0,092	0,104

4.3.7. Çözelti stabilitesi

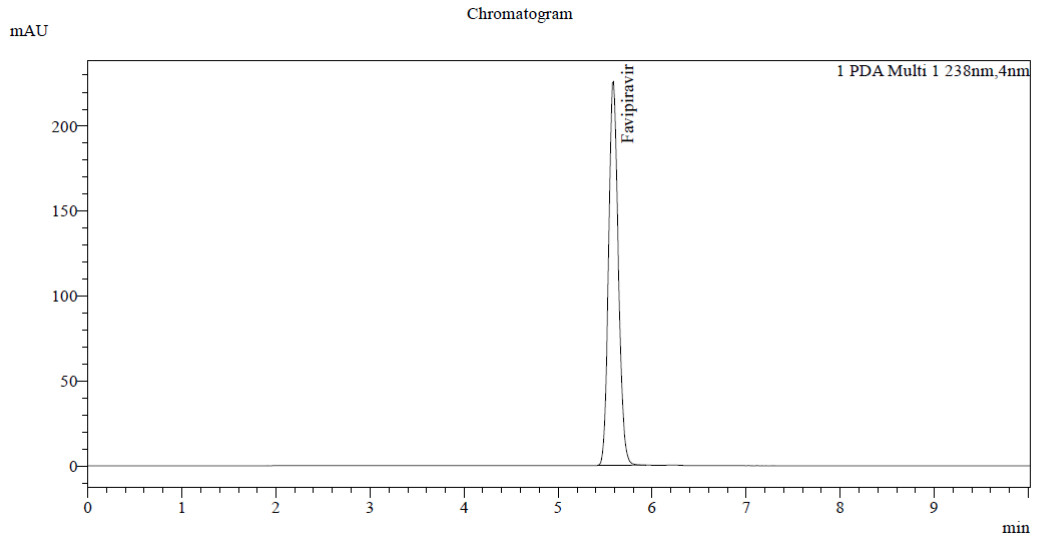
Oda sıcaklığında bekletilen standart çözeltisi 48 saat boyunca belirli zaman aralıklarında sisteme enjekte edildi ve alan değerleri kaydedildi. Pik alanları arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi. Sonuçlar Tablo 4-13 ve Tablo 4-14’de verilmiştir.

Tablo 4- 13: Standart çözeltisi stabilite tablosu (Oda şartlarında 48 saat)

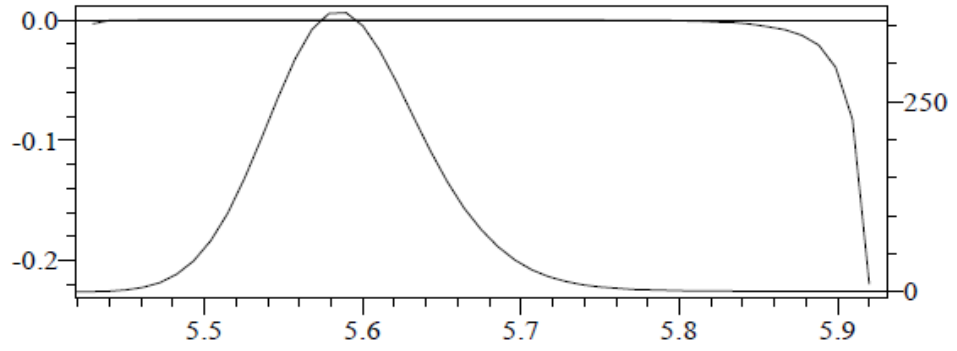
Saat	Favipiravir (µg/mL)	Safsızlık A (µg/mL)	Safsızlık B (µg/mL)
0	2,27	2,11	2,06
1	2,28	2,11	2,05
3	2,26	2,11	2,05
9	2,27	2,12	2,06
24	2,27	2,11	2,05
48	2,26	2,13	2,04
SD	0,01	0,01	0,01
% RSD	0,33	0,40	0,37

4.3.8. Stres Çalışması

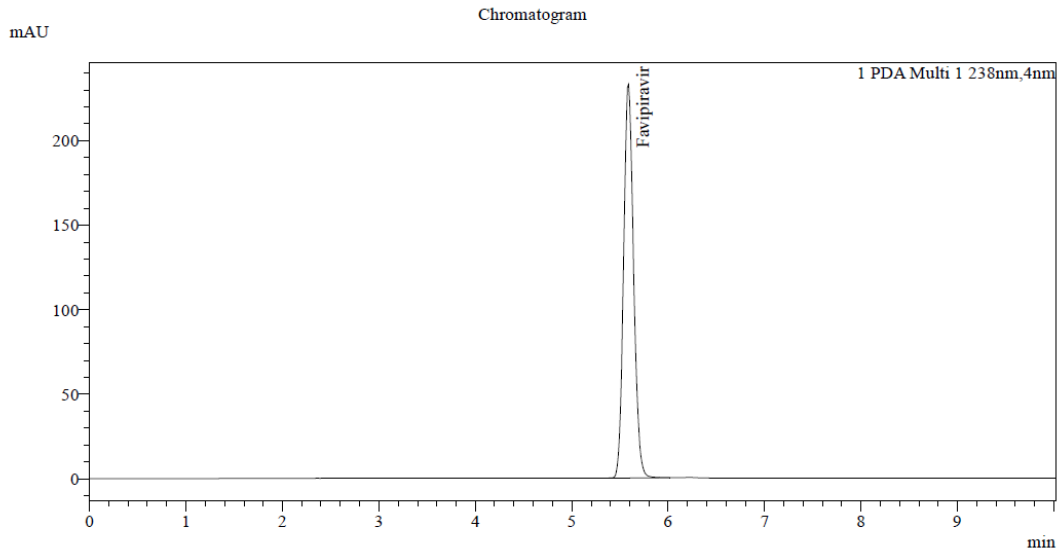
Stres çalışması sonucu her bir koşul altında pikler saf olarak elde edilmiştir. Stres çalışması sonuçları Şekil 4-13 – 4-22 arasında verilmiştir.



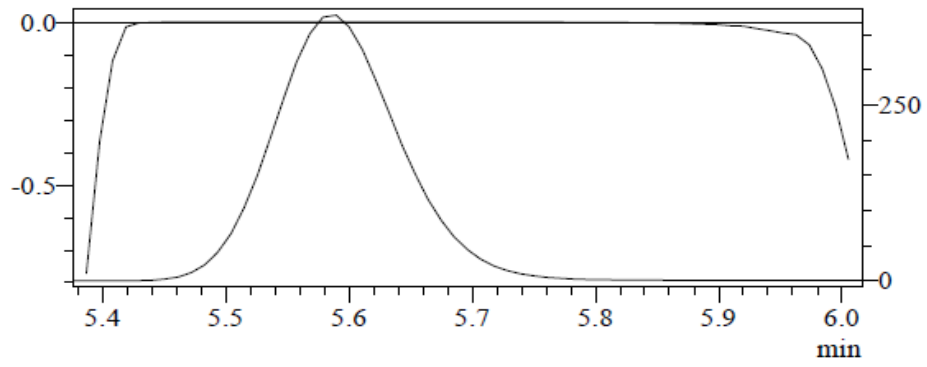
Şekil 4- 13: Asit ile bozundurma çalışmasına ait kromatogram



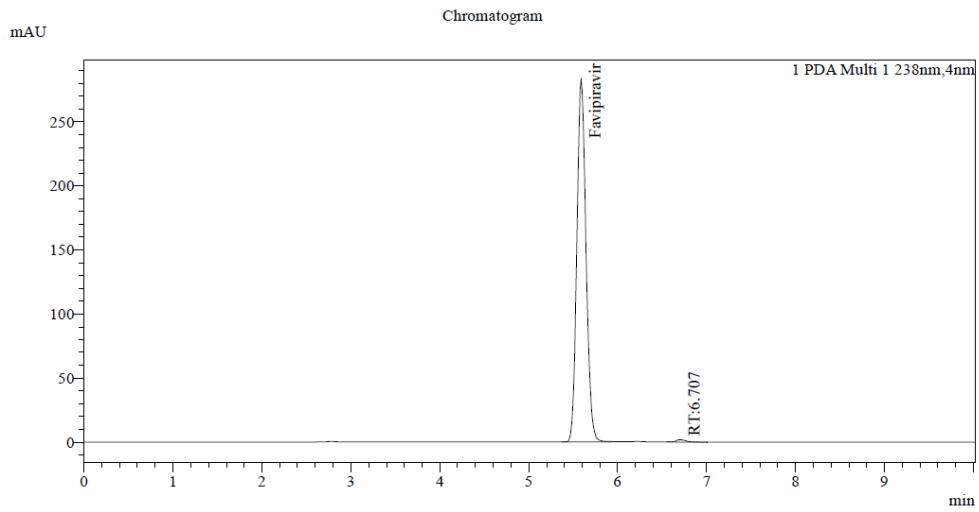
Şekil 4- 14: Asit ile bozundurma çalışmasına ait pik saflığı



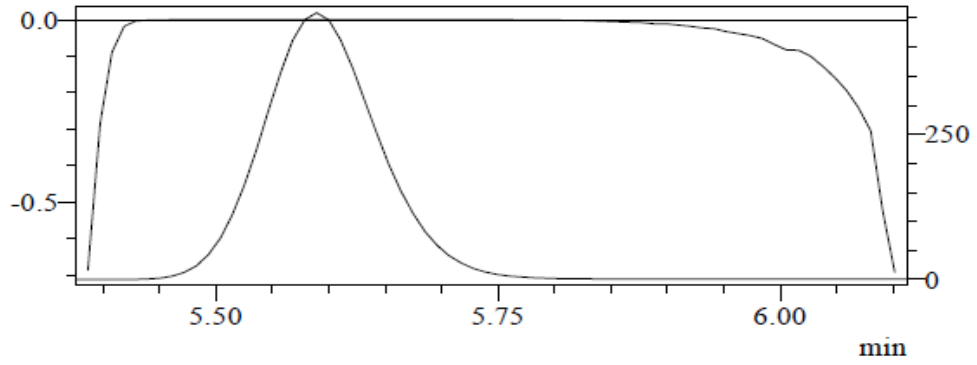
Şekil 4- 15: Baz ile bozundurma çalışmasına ait kromatogram



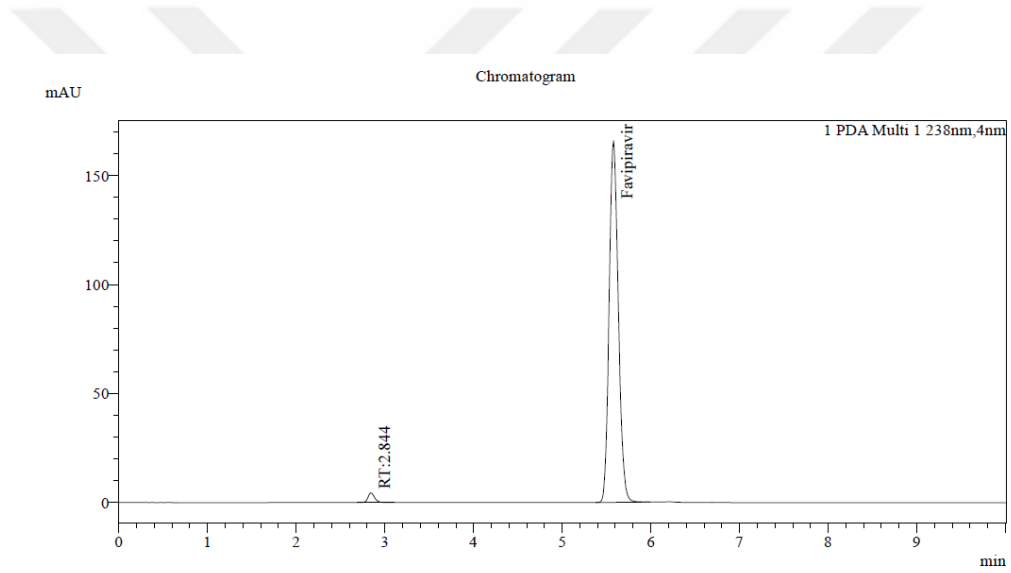
Şekil 4- 16: Baz ile bozundurma çalışmasına ait pik saflığı



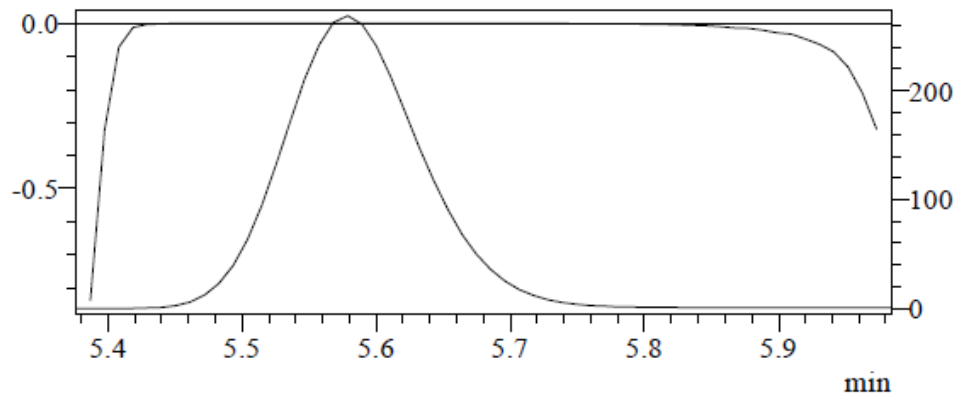
Şekil 4- 17: Isı ile bozundurma çalışmasına ait kromatogram



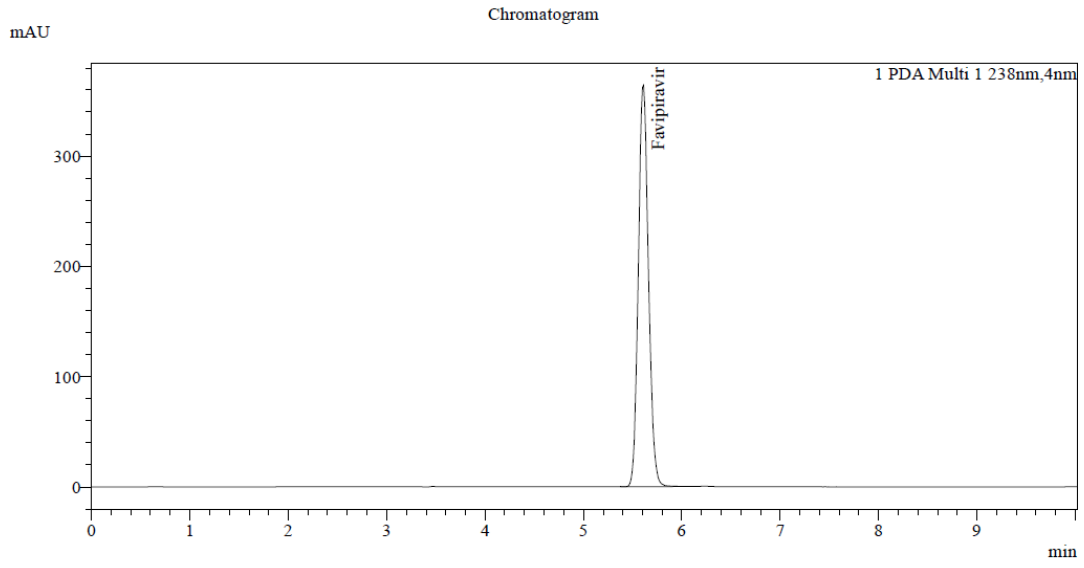
Şekil 4- 18: Isı ile bozundurma çalışmasına ait pik saflığı



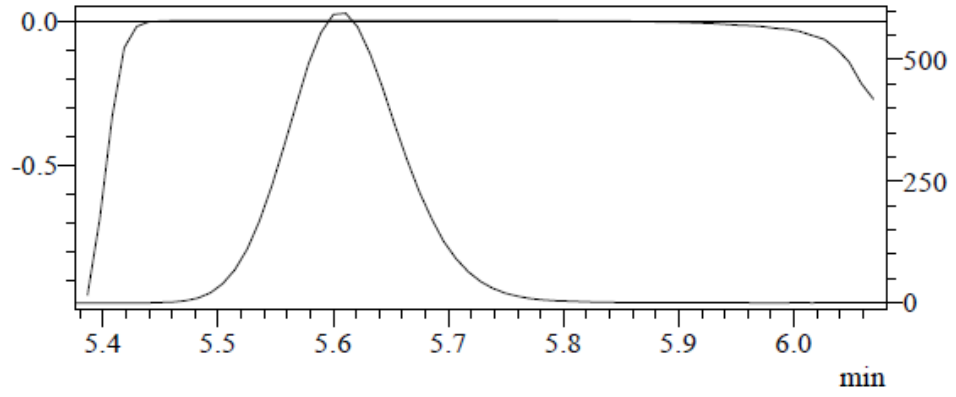
Şekil 4- 19: Peroksit ile bozundurma çalışmasına ait kromatogram



Şekil 4- 20: Peroksit ile bozundurma çalışmasına ait pik saflığı



Şekil 4- 21: UV ışığı ile bozundurma çalışmasına ait kromatogram



Şekil 4- 22: UV ışığı ile bozundurma çalışmasına ait pik saflığı

Tablo 4- 14: Bozundurma çalışması sonuçları

Stres Koşulları	% Bozunma	Purity Treshold
Bozundurulmamış numune	-	1,000
Asidik Bozundurma	-	1,000
Bazik Bozundurma	-	1,000
Isı Bozundurması	0,65	1,000
Oksidatif Bozundurma	1,87	1,000
UV Işığ Altında Bozundurma	-	1,000

4.4. Favipiravir'in Farmasötik Preparatlarda Analizi

4.4.1. Geliştirilen Yöntem ile Analizi

Geliştirilen yöntemin farmasötik preparatlarda uygulanabilirliğini kanıtlamak için Bölüm 3.5.1'deki gibi çalışıldı. Sonuçlar Tablo 4-15'de verilmiştir.

Tablo 4- 15: Geliştirilen yöntem ile yapılan çalışmaların sonuçları

	Favipiravir (%)
Numune 1	99,0
Numune 2	100,0
Numune 3	99,5
Numune 4	100,1
Numune 5	99,3
Ortalama	99,58
Standart Sapma	0,47
% RSD	0,31

4.4.2. Kıyas Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar Sonucu Elde edilen Bulgular

Bu çalışmada geliştirilen yöntem ile elde edilen sonuçlar ile kıyas yöntemi ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçların ortalama, standart sapma ve % bağıl sapma değerleri Tablo 4-16’de verilmiştir.

Karşılaştırmalar Microsoft Excel programı kullanılarak t-testi (Student t-testi) ve F testi (Fisher test) uygulanarak yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde geliştirilen yöntem ile kıyas yöntemi arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

Tablo 4- 16: Kıyas yöntemi çalışmaları bulguları

Favipiravir		
	Geliştirilen Yöntem	Kıyas Yöntemi
Ölçüm	Geri Kazanım %	Geri Kazanım %
1	99,0	100
2	100,0	99,4
3	99,5	99,3
4	100,1	99,9
5	99,3	99,5
Ortalama	99,58	99,62
Standart Sapma	0,47	0,47
% RSD	0,31	0,31
Varyans	0,217	0,097
Güven Aralığı	0,41	0,27
Güven Sınırları	99,17-99,99	99,34-99,89
f testi	F değeri	2,24
	F kritik	6,39
t testi	t değeri	0,88
	t kritik	2,31

5. TARTIŞMA

Kimyasal adı 6-Fluoro-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide olan Favipiravir, influenza ve diğer birçok RNA-bağımlı RNA polimerazını seçici ve güçlü inhibe eden bir anti viral ilaç türüdür. COVID-19'un tedavisinde kullanılan ilaçların arasında yer almaktadır.

Favipiravir EP, USP ve BP'nde yer almamaktadır. Literatürde çalışmalar incelendiğinde etken madde ve safsızlıkların miktarlarının yan yana analizlenmesi için kullanılan yöntemlerin 60 dk. olduğu gözlenmiştir [8,9]. Bu çalışmaya başlarken amacımız favipiravirin farmasötik preparatlarda rutin analizlerde rahatlıkla kullanılabilen analiz süresi kısa bir safsızlık tayini yöntem geliştirmek ve bu yöntemi valide etmektir.

Bu çalışmada InertSustainSwift C18 (250 mm x 4,6 mm), 5 µm kolon kullanılmıştır. Hareketli faz A olarak pH 4.0 potasyum dihidrojen fosfat tampon çözeltisi : asetonitril (90:10) (h:h) karışımı hazırlanmıştır ve hareketli faz B olarak asetonitril kullanılmıştır. Analiz süresini kısaltmak ve yüksek rezolüsyon elde etmek için gradient program hazırlanmıştır. Çalışmalar 1.5 mL/dk. akış hızında ve 238 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Geliştirilen yeni yöntemi valide etmek amacıyla seçicilik, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, sağlamlık ve stres çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar şekiller ve tablolar ile ayrıntılı verilmiştir.

Seçicilik parametresinde geliştirilen yöntemde çözücü ve plasebonun pik vermediği görülmüştür. Standart ve numune çözeltilerinde ise piklerin girişim yapmadığı saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada yapılan geliştirmeler sonucu literatürdeki safsızlık çalışmalarına göre (60 dk.) daha kısa analiz süresi (10 dk.) elde edilmiştir.

Doğrusallık çalışmasında iki safsızlığın da 0,5-3 mg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur.

Doğruluk parametresi çalışmaları için safsızlıkların %50, %100 ve %150'sini içeren numune çözeltileriyle geri kazanım değerlendirilmesi yapılmıştır. Sonuçlar %97,5 - %102,2 arasında yer almaktadır.

Kesinlik çalışması için safsızlık A ve B ilavesi yapılarak hazırlanan numune çözeltileri enjekte edilerek standart sapma ve bağıl standart sapma hesaplanmıştır.

Sağlamlık parametresinde yöntemde yapılan değişiklikler sonucu anlamlı değişiklikler olmamış ve yöntemin sağlam olduğu ispat edilmiştir.

Bozundurma çalışması numunelere asit, baz, peroksit, ısı ve UV ışığı etki şartları altında uygulanmıştır. Elde edilen çözeltiler PDA dedektör kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda ısı ile safsızlık B'nin olduğu gözlenmiştir. Asit ve baz ile bozundurmaya dirençli, ısı ile bozundurmada madde kaybı % 0,67 ve oksidatif bozundurma ile madde kaybı % 1,87'dir.

Geliştirilen bu yöntemin farmasötik preparatlarda uygulanabilirliğini kanıtlamak için tabletlere geliştirilen metot uygulandı. Tekrarlanabilirlik ve geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bağlı standart sapma değeri % 0,31, geri kazanım değeri % 99,58 olarak tespit edilmiştir.

Geliştirilen yöntem ile kıyas yöntemi arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Hesaplamalar sonucu f ve t testi değerleri f ve t kritik değerlerinden düşük olduğu tespit edilmiştir. f değeri 2,24 ve t değeri 0,88 bulunmuştur.

Özetle, rutin analizlerde favipiravir ve safsızlıkların yan yana analizinde kolaylıkla ve güvenle kullanılabilecek hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Geliştirilen bu yöntem ilaç maddesinin farmasötik preparatlardaki analizine de başarıyla uygulanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Z. D. Bilgin *Et Al.* , "Liquid Chromatographic Methods for COVID-19 Drugs, Hydroxychloroquine and Chloroquine ," *Journal Of Chromatographic Science* , vol.1, no.1, pp.1-10, 2020
2. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency : Avigan (favipiravir) Review Report (2014). <https://www.pmda.go.jp/files/000210319.pdf>
3. Y. Furuta *Et Al.* , "Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor", *Antiviral Research*, vol.100, 2, pp.446-454, 2013
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.015>
4. <https://go.drugbank.com/drugs/DB12466>
5. <https://covid19.saglik.gov.tr/TR-66538/covid-19-sars-cov2-enfeksiyonu-tedavisinde-kullanilacak-ilaclara-iliskin-bilgilendirme-favipiravir-200-mg-tablet.html>
6. I. Bulduk, "HPLC-UV method for quantification of favipiravir in pharmaceutical formulations", *Acta Chromatographica*, pp.209-215, 2020
<https://doi.org/10.1556/1326.2020.00828>.
7. S. M. Megahed *Et Al.*, "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*, pp.1386-1425,2020
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119241>
8. China patent (CN104914185B). A kind of Favipiravir has the HPLC assay method of related substance. 21.09.2016.
9. China patent (CN104914185A). HPLC method for measuring related substances in Favipiravir. 16.09.2015.
10. https://www.ttb.org.tr/kutuphane/covid19-rapor_6/covid19-rapor_6_Part23.pdf
11. S. Z. Tatlı *Et Al.*, COVID-19 pandemisinde psikofarmakolojik tedavi", *Klinik Psikiyatri*, pp.52-66, 2020
<https://jag.journalagent.com/kpd/pdfs/KPD-56823-REVIEW-TATLI.pdf>
12. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Fluoro-3-oxo-3_4-dihydropyrazine-2-carbonitrile

13. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Bromo-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide#section=3D-Conformer>
14. ICH. (2005). Q2 (R1), harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedures: text and methodology, In *Proceedings of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*



HAM VERİLER



FORMLAR

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI