

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

**ANTİVİRAL ETKİLİ FAVİPİRAVİR'İN YEŞİL
KROMATOĞRAFİ İLE ANALİZİ**

Ecz. Ayşenur FİZAN

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2023

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

**ANTİVİRAL ETKİLİ FAVİPİRAVİR'İN YEŞİL
KROMATOĞRAFİ İLE ANALİZİ**

Ecz. Ayşenur FİZAN

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN**

ANKARA

2023

**ANTİVİRAL ETKİLİ FAVİPİRAVİR'İN YEŞİL KROMATOĞRAFI İLE
ANALİZİ**

Ecz. Ayşenur FİZAN

Danışman: Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN

Bu tez çalışması 23.08.2023 tarihinde jürimiz tarafından Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. İ. Murat PALABIYIK
(Ankara Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun bulunmuştur.

28 Ağustos 2023

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi /H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü /Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü /Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

23.08.2023

Ecz. Ayşenur FİZAN

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir; gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Ecz. Ayşenur FİZAN

TEŞEKKÜR

Hazırlamış olduğum tezimin her aşamasında sahip olduğu kıymetli bilgi ve birikimleriyle bana destek olan danışman hocam Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN'a,

Teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma,

Bu günlere gelmemi sağladıkları için sevgili annem ve babama,

Bu uzun ve zorlu süreçte gerek mesleki gerek manevi destek olan yol arkadaşım Hüseyin BAYDAR'a ve sevgili meslektaşlarım Ecz. Binnaz BABA ve Ecz. Betül TOPÇU'ya,

Yüksek lisans sürecimde desteklerinden ötürü TÜBİTAK BİDEB 2210-A programına,

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

ÖZET

Fizan, A. Antiviral Etkili Favipiravir'in Yeşil Kromatografi ile Analizi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023. Günümüzde yapılan bilimsel araştırmalar arasında, çevre ve insan sağlığı güvenliğini ön planda tutan analizlerin gerçekleştirilebilmesi için geliştirilen yeşil kromatografi tekniği önemli bir yer tutmaktadır. Yeşil kromatografik analiz süreçleri, zararlı çözücülerin tüketiminin azaltılması veya daha çevre dostu çözücülerle değiştirilmesi gibi temellere dayanabilmektedir. Bu çalışmada, COVID-19 tedavisinde de kullanılan antiviral etkili Favipiravir (FAV)'in farmasötik preparattan yeşil kromatografik analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirilmiş ve ICH kılavuzu doğrultusunda valide edilmiştir. Geliştirilen yöntemde; iç standart olarak Parasetamol (PAR) kullanılmış olup analizlerin tümü Zorbax C8 (150 × 4.6 mm, i.ç., 5 µm) analitik kolon kullanılmıştır. Kromatografik ayırım için hareketli faz olarak kullanılan 30 mM derişiminde sodyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 4.2) ve etanol 97:3 h/h oranında karıştırılmış ve akış hızı olarak 1 mL.dk⁻¹ olarak belirlenmiştir. UV dedektör kullanılarak 290 nm dalga boyunda sinyaller kaydedilmiştir. Favipiravir ve parasetamolün seçilen optimize edilen kromatografik şartlardaki alıkonma zamanları sırasıyla 5.1 ve 8.2 dakikadır. Geliştirilen yöntemler, ICH Q2R1 analitik yöntem validasyon rehberinde belirtilen kararlılık, özgünlük, doğrusallık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, tutarlılık ve sağlamlık parametrelerine göre valide edilerek güvenilirliği kanıtlanmıştır. Favipiravir için doğrusallık aralığı 1-100 µg.mL⁻¹ olarak tespit edilmiş olup gözlenebilme sınırı (LOD); 0.57 µg.mL⁻¹, alt tayin sınırı (LOQ) ise, 0.90 µg.mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Bu tezde, geliştirilen ve valide edilen yöntem, Favipiravir içeren tablet preparatlarından analizine uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Favipiravir, yeşil kromatografi, HPLC, farmasötik analiz, tablet.

ABSTRACT

Fizan, A. Simultaneous Analysis of Antiviral Effective Favipiravir by Green Chromatography, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Analytical Chemistry Program Master Thesis, Master of Sciences Thesis, Ankara, 2023. Among the scientific researches carried out today, the green chromatography technique, which has been developed to carry out analyzes that prioritize environmental and human health safety, has an important place. Green chromatographic analysis processes can be based on reducing the consumption of harmful solvents or replacing them with more environmentally friendly solvents. In this study, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the green chromatographic analysis of the antiviral effective favipiravir, which is also used in the treatment of COVID-19, which is used as an internal standard, from the pharmaceutical preparation and validated in accordance with the ICH guideline. In the developed method; Paracetamol (PAR) was used as internal standard and Zorbax C8 (150 × 4.6 mm i.d., 5 µm) analytical column was used for all analyzes. Sodium dihydrogen phosphate buffer (pH 4.2) and ethanol at a concentration of 30 mM, which was used as the mobile phase for chromatographic separation, were mixed at a rate of 97:3 v/v, and the flow rate was determined as 1 mL.min⁻¹. Signals were recorded at a wavelength of 290 nm using a UV detector. The retention times of favipiravir and paracetamol at the selected optimized chromatographic conditions are 5.1 and 8.2 minutes, respectively. The developed methods have been validated according to the stability, originality, linearity, sensitivity, accuracy, precision, consistency and robustness parameters specified in the ICH Q2R1 analytical method validation guide, and their accuracy and reliability have been proven. A linearity range of 1-100 µg.mL⁻¹ was determined for favipiravir, and the limits of detection (LOD); 0.57 µg.mL⁻¹, and the lower limit of detection (LOQ) was found to be 0.90 µg.mL⁻¹. The method developed and validated in this thesis was applied to the analysis of tablet preparations containing favipiravir.

Keywords: Favipiravir, green chromatography, HPLC, pharmaceutical analysis, tablet.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yeşil Kimya	3
2.2. Kromatografi	6
2.2.1. Kromatografik Parametreler	10
2.2.2. Hareketli Faz Bileşiminin Ayırma Etkisi	16
2.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	16
2.2.4. HPLC Cihazı	17
2.3. COVID-19 (<i>SARS-CoV2</i>)	20
2.4. Antiviral İlaçlar	20
2.5. Favipiravir	21
2.5.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	21
2.5.2. Farmakolojik Özellikleri	22
2.5.3. Farmakodinamik Özellikler	22
2.5.4. Farmakokinetik Özellikleri	22
2.5.5. Endikasyonları	23
2.5.6. Yan Etkileri	24
2.5.7. İlaç Etkileşimleri	24
2.5.8. Kaynaklarda Yer Alan Analiz Yöntemleri	24
3. GEREÇLER VE YÖNTEM	28
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler	28

3.1.1. Cihazlar	28
3.1.2. Kimyasal maddeler	28
3.1.3. Sarf Malzemeler	29
3.1.4. Analizi Yapılan Farmasötik Preparatlar	29
3.2. Deney Hazırlıkları	29
3.2.1. Etkin Maddenin Saflığı	29
3.2.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.2.3. Farmasötik Preparatların Analize Hazırlanması	31
3.2.4. Sentetik Preparatların Hazırlanması	31
3.3. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi	31
3.3.1. HPLC	31
3.3.2. Yöntemin Validasyonu Çalışmaları	32
4. BULGULAR	37
4.1. HPLC Sisteminin Optimizasyonu	37
4.1.1. Sabit Faz	37
4.1.2. Hareketli Fazın Belirlenmesi	37
4.2. Farmasötik Preparattan Favipiravirin Analiz Yönteminin Validasyonu	49
4.2.1. Sistem Uygunluk	49
4.2.2. Analit Çözeltilerinin Kararlılığı	49
4.2.3. Özgünlük	50
4.2.4. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı	52
4.2.5. Doğruluk ve Kesinlik	55
4.2.6. Duyarlılık	56
4.2.7. Geri Kazanım	56
4.2.8. Tekrarlanabilirlik	56
4.2.9. Sağlamlık ve Tutarlılık	58
4.3. Farmasötik Preparatların Analizi	59
5. TARTIŞMA	61
5.1. HPLC Yöntemi	61
5.1.1. Organik Çözücü Etkisi	62
5.1.2. Tampon Derişimi ve pH Etkisi	63
5.1.3. Akış Hızı	63
5.1.4. Enjeksiyon Hacmi Etkisi	64
5.1.5. Kolon Sıcaklığı Etkisi	64

5.1.6. İç Standart Seçimi	64
5.1.7. HPLC Yönteminin Validasyonu	64
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	69
7. KAYNAKLAR	70
8. EKLER	
EK 1. Korrelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü	
EK 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
EK 3. t – Testi	
EK 4. Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi	
EK 5. Friedman Testi: Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi	
EK 6. Sertifikalar	
EK 7. Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AO	Aldehit oksidazın
BH	Bağlı Hata
BSS	Bağlı Standart Sapma
C _{maks}	Maksimum derişim
C _s	Analitin sabit fazdaki molar derişimi
C _M	Analitin hareketli fazdaki molar derişimi
dk	Dakika
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
F	Hacimsel akış hızı
FAV	Favipiravir
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GA	Güven aralığı
H	Teorik tabaka yüksekliği
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IDU	5-sübstitüe-2'-deoksiüridin
IS	İç standart
K	Dağılım katsayısı
k'	Kapasite faktörü
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar

N	Teorik tabaka sayısı
NaH ₂ PO ₄	Sodyum dihidrojen fosfat
OAT	Organik Anyon Taşıyıcı
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı
PAO	Pik asimetri oranı
PAR (IS)	Parasetamol (İç Standart)
PTFE	Politetrafloroetilen
r	Korelasyon katsayısı
RAKT	Regresyondan ayrılış kareler toplamı
RASD	Regresyondan ayrılış serbestlik derecesi
Ref.	Referans
RKT	Regresyon kareler toplamı
RNA	Ribonükleik asit
RSD	Regresyon serbestlik derecesi
RTP	Ribofuranozil-5'-trifosfat
R ²	Tanımlayıcılık katsayısı
R _s	Ayırıcılık
S / G	Sinyal / Gürültü
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma
t _m	Ölü zaman
t _R	Alıkonma zamanı
USP	Amerikan Farmakopesi
UV	Ultraviyole (Morötesi)
V ₀	Ölü hacim
V _m	Kolondaki hareketli faz hacmi

V_R	Alıkonma hacmi
V_S	Kolondaki sabit faz hacmi
W	Pik zemin genişliği
YOAKT	Y ortalamadan ayrılış kareler toplamı
YOASD	Y ortalamadan ayrılış serbestlik derecesi
α	Seçicilik
$S_{\bar{x}}$	Standart hata
μ	Evren ortalaması
μm	mikrometre
μL	Mikrolitre
\bar{X}	Aritmetik ortalama

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Optimum verimlilik; ideal hız, minimum H değerini gösteren Van Deemter grafiği.	13
2.2. HPLC bölümlerinin gösterimi.	17
2.3. Favipiravir kimyasal yapısı.	22
4.1. Etanol oranı ile k' ve α değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol: 30 mM NaH ₂ PO ₄ , pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹ , Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).	39
4.2. Etanol oranı ile N'nin değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol: 30 mM NaH ₂ PO ₄ , pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹ , Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).	39
4.3. Hareketli faz pH'sı ile k' ve α değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH ₂ PO ₄ , Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹ , Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).	41
4.4. Hareketli faz pH'sı ile PAO ve R _s 'nin değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH ₂ PO ₄ , Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹ , Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).	41
4.5. Hareketli faz tampon derişimi ile k' ve α 'nın değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH ₂ PO ₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹ , Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).	43
4.6. Hareketli faz tampon derişimi ile PAO ve R _s 'nin değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH ₂ PO ₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹ , Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).	43
4.7. Hareketli faz akış hızı ile PAO ve k' değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH ₂ PO ₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).	45
4.8. Hareketli faz akış hızı ile N'nin değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH ₂ PO ₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).	45

Şekil	Sayfa
4.9. Enjeksiyon hacmi ile N'nin değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH ₂ PO ₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹ , Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).	46
4.10. Enjeksiyon hacmi ile PAO'nun değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH ₂ PO ₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹ , Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).	47
4.11. Kolon sıcaklığı ile PAO'nun değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH ₂ PO ₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹ , Kolon C8 Zorbax, Dedektör: UV 290 nm).	48
4.12. Kolon sıcaklığı ile k'nün değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH ₂ PO ₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹ , Kolon C8 Zorbax, Dedektör: UV 290 nm).	48
4.13. Hareketli faz, Plasebo+IS standart çözelti, FAV standart+IS standart çözelti ve Favimol tablet numunesi+IS standart çözeltilerine ait kromatogramlar (Kromatografik koşullar: Kolon C8 Zorbax (150 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) kolon, Etanol : 30 mM (pH 4.2) NaH ₂ PO ₄ (3:97, h/h), Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹ , Dedektör: UV 290 nm.).	51
4.14. FAV' a ait pik saflık bilgisi.	51
4.15. FAV'a ait kalibrasyon grafiği.	52
4.16. FAV'ın tabletten analizi için kalibrasyon eğrisinin doğrusallık kontrol grafiği (n=6).	54

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Anastas ve Warner tarafından önerilen yeşil kimyanın 12 ilkesi.	4
2.2. Kromatografi türleri ve ayırma mekanizmaları.	9
2.3. Çeşitli matrislerde gerçekleştirilmiş analiz yöntemleri.	26
3.1. Sistem uygunluk test kriterleri.	36
4.1. Organik çözücü miktarının FAV kromatografik parametreleri üzerine etkisi.	38
4.2. Hareketli fazdaki tampon pH'sının kromatografik parametrelere etkisi.	40
4.3. Hareketli fazdaki tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi.	42
4.4. Akış hızı değişikliğinin FAV kromatografik parametrelerine etkisi.	44
4.5. 6 Tabletten FAV analizi için sistem uygunluğa ait test bulguları.	49
4.6. Analit çözeltilerinin kararlılıkları.	50
4.7. FAV'ın analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ve doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü.	53
4.8. Tabletten FAV analizi için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin özellikleri.	53
4.9. FAV'ın doğrudan kalibrasyon ve standart ekleme kalibrasyon denklemleri.	54
4.10. FAV analizine ait gün içi ve günler arası analiz sonuçları (n=6).	55
4.11. FAV'ın analizine geri kazanım analiz sonuçları (n=6).	56
4.12. HPLC yönteminin tekrarlanabilirliğine ve enjeksiyon tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları (FAV: 20.0 µg.mL ⁻¹ , n=10).	57
4.13. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait sağlamlık bulguları (Eklenen 20 µg.mL ⁻¹ FAV, n=3).	58
4.14. Geliştirilen HPLC yöntemine ait tutarlılık bulguları (Eklenen 30.0 µg.mL ⁻¹ FAV, n=6).	59
4.15. Farmasötik preparattan FAV analizi sonuçları (n=6).	60

1. GİRİŞ

Kromatografi, bir karışımın bileşenlerini ayırmak ve analiz etmek için kullanılan güçlü ve çok yönlü bir ayırma tekniğidir. Analitik kimyanın temel tekniklerinden biri olan kromatografi, başta ilaç sanayi, çevre, gıda olmak üzere birçok alanda karışımdaki bileşenlerin doğru şekilde ayrılmasının, tanımlanmasının ve miktar tayini yapılmasının gerekli olduğu durumlarda kritik rol oynar. Bu yöntem; sabit faz ve hareketli fazlar arasında her bir bileşenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak farklı davranışları sonucunda ayrılması temeline dayanır. En yaygın olarak kullanılan kromatografik yöntem ise; Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemidir.

HPLC; çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip maddelerin, çözücü karışımlarından oluşan hareketli faz ve sabit bir faz üzerinde, yüksek basınç yardımı ile farklı hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri prensibine dayanır. HPLC ile yapılan analizlerde yöntem geliştirme ve validasyon sonrasında örnekler uygulama başarısı dikkate alınırken analizci ve çevre güvenliği ikinci plana atılır. Özellikle geniş uygulama alanı olan sıvı kromatografik yöntemlerin zararlı çözücü kullanımı göz önüne alındığında bu alanda iyileştirici çalışmaların yapıldığı yeşil kromatografik yöntemler ön plana çıkmaktadır. Sürdürülebilir veya çevre dostu kromatografi olarak da bilinen yeşil kromatografi, kromatografik analizlerde çevre dostu yaklaşım ve tekniklerin uygulanmasını ifade eder. Yeşil kromatografinin önemi, kromatografik süreçlerin çevresel etkisini azaltma ve sürdürülebilir analitik uygulamaları teşvik etme potansiyelinde yatmaktadır.

Hareketli faz olarak kullanılan asetonitril ve metanol gibi zararlı organik çözücüler, maruz kalan operatörün sağlığına zarar vermesinin yanı sıra, analiz sonrasında oluşan atığın bertaraf edilmesi için uygun atık yönetimini de gerektirmektedir. Çevresel kirliliğine neden oldukları ve insan hayatını tehdit ettiklerinden dolayı organik çözücü içeriğinin yeşil veya daha yeşil çözücüler olarak adlandırılan çevre ve insan sağlığına zararı olmayan çözücülerle yer değiştirilmesi, daha küçük çaplı kolonlar veya minyatürleştirilmiş cihazların kullanılması yeşilleştirme yaklaşımlarından birkaçı olarak sayılabilir.

İlaç analizlerinde, doğaya en az zarar verecek ve analizci için güvenli kullanım uyum süreçlerini de kapsayan, yeşil kromatografi olarak adlandırılan metotların geliştirilmesi, valide edilmesi ve farmasötik preparat analizine uygulanması amacıyla gerçekleştirilen bu tezde; yeşil kromatografide hareketli fazdaki insan ve çevre sağlığına zararlı çözücülerin daha az zararlı çözücülerle değiştirilerek antiviral etkili favipiravirin analizine yönelik HPLC yöntemi geliştirilmesi planlanmaktadır. Bu analiz ile kromatografik ayırım kalitesinde ödün vermeden yeşil analizlerin yapılabilirliği test edilecek olup gelecekte araştırmacıları bu alanda çalışmalar yapmak için teşvik edeceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yeşil Kimya

Büyüyen sanayileşme süreci, dünya ekonomisinin gelişiminin en önemli bileşenini oluşturmaktadır. Küresel hükümet politikaları, endüstriyel faaliyetlerin büyümesinin gezegenimizde neden olabileceği çevresel etkilere yeterince çözüm bulamamaktadır (1). Endüstrideki gelişim ile doğru orantılı olarak artan çevresel bozulma ve kirlilik uzun yıllar boyunca ekonomik gelişim yanında göz ardı edilmiştir. Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı (OECD) ülkelerinin Çevre Bakanlarının 1985 yılındaki toplantısında, üç ana konuda Ekonomik Kalkınma ve Çevre, Kirliliğin Önlenmesi ve Kontrolü ve Çevresel Bilgi ve Ulusal İncelemeler başlıkları altında çeşitli kararlar alınmış olup; bu ana temalara dayalı müdahaleler, kimyasal ürün riskinin azaltılması ve kirliliğin önlenmesi ve kontrolü konularını içermektedir (2). Toksik kimyasal ürünlerin risklerini kontrol ederek bu maddelerle ilgili sorunları önlemek için ilk etapta bu toksik ürünlerin üretilmemesi en doğru yaklaşımdır. Oluştuktan sonra bertarafının kolay olmadığı kimyasal atıkların mümkünse minimize edilmesi, daha da ötesinde daha az toksik olanlarıyla yer değiştirilmesi önem kazanmıştır. ABD Çevre Koruma Ajansı, 1991 yılında, bu maddelerle ilgili ilk etapta bu ürünlerin üretilmemesinin doğru olacağını altını çizmiş olup, sorunları önlemek için zehirli kimyasal ürünlerin risklerini kontrol etme konusunda yeni bir felsefe ve politika rapor eden “Kirliliği Önlemek için Alternatif Sentetik Yollar” programını başlatmıştır (3). 1992'den beri, çevre dostu çözümler ve daha güvenli kimyasal bileşikler gibi diğer konuların dahil edilmesiyle birlikte o zamana kadar yeterince önem verilmeyen yeşil kimya kavramı endüstri ve araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır (4).

Yeşil kimyanın ana fikri, analizci sağlığına ve çevreye yönelik tehditleri en aza indirmek için kimyasalların planlanması, üretimi ve uygulanması sırasında zararlı maddelerin kullanımını, üretimini en aza veya sıfıra indirmek için kimyasal beceri ve bilginin kullanılmasıdır (5). 1998'de Paul Anastas ve John Warner, yeşil kimya için önerdikleri 12 ilkeyi içeren ilk kılavuzu yayınlamıştır (Tablo 2.1.) (6).

Tablo 2.1. Anastas ve Warner tarafından önerilen yeşil kimyanın 12 ilkesi (6).

	İlke	İlkenin Açıklaması
1	Önleme	Atık oluşumunun önlenmesi ile ilgilidir. Atık oluşumundan kaçınmak, oluşuktan sonra bertaraf etmeye çalışmaktan daha kolaydır.
2	Atom ekonomisi	Son ürüne proses sırasında kullanılan reaktiflerin olabildiğince dahil edebilmesi için sentetik yöntem planlanmalıdır.
3	Daha güvenli kimyasal sentez	Sentetik yöntemler, mesleki ve çevresel toksisitesi düşük olan veya toksisitesi olmayan maddeleri kullanmak ve üretmek üzere tasarlanmalıdır. Bu nedenle, toksik çözücülerin düşük veya hiç toksik olmayan çözücülerle değiştirilmesi tavsiye edilir.
4	Daha güvenli kimyasalların tasarımı	Tasarlanan kimyasalların toksisitesine büyük önem verilmelidir. İşlevlerini yerine getirmeleri gerekirken aynı zamanda mümkün olan en düşük toksisiteyi de sunmalıdırlar.
5	Daha güvenli çözücülerin ve yardımcı maddelerin kullanımı	Çözücülerin ve diğer reaktiflerin kullanımından mümkün olduğunca kaçınılmalıdır. Mümkün olmadığında ise bu maddeler zararsız olmalıdır.
6	Enerji verimliliği	Kimyasal işlemlerde enerji tüketimi minimuma indirilmeli ve deneylerin ortam sıcaklığı ve basıncında gerçekleştirilmesi için sentetik yöntemlerin üzerinde çalışarak geliştirilmelidir.
7	Yenilenebilir hammadde kullanımı	Ekonomik ve teknik olarak mümkün olduğunda, yenilenemeyen hammaddeler yerine yenilenebilir hammaddeler kullanılmalıdır.
8	Türevlendirmenin azaltılması	Gereksiz türevlendirme süreçleri; ilave reaktif kullanımını gerektirdiklerinden ve sonucunda atık oluşturduklarından, kaçınılmalı veya en aza indirilmelidir.
9	Kataliz	Mümkün olduğunca seçici katalitik reaktiflerin kullanımı, stokiyometrik reaktiflerin kullanımından daha iyidir.
10	Bozunma ürünleri tasarımı	Kimyasallar, amaçlanan fonksiyonlarını yerine getirdikten sonra zararsız yan ürünlere dönüşebilmeleri ve böylece çevrede kalıcı olmalarını önleyecek şekilde tasarlanmalıdır.
11	Çevre kirliliğinin önlenmesi için gerçek zamanlı analiz	Zararlı maddelerin oluşumunu önlemek için analitik yöntemler gerçek zamanlı olarak izlenmelidir.
12	Kazaların önlenmesi	Kimyasal bir proseste hem maddeler hem de kullanım şekli kaçak, patlama ve yangın gibi olası kazaları en aza indirecek şekilde seçilerek daha fazla iş ve çevre güvenliği hedeflenmelidir.

Yeşil kromatografi, kromatografik yöntemlere uygulanan çevre dostu veya sürdürülebilir uygulamaları tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Analitik performansı korunurken veya geliştirirken; kromatografinin çevresel etkisini azaltmak için çeşitli yaklaşımları kapsamaktadır.

Yeşil kimya temelleri üzerine inşa edilmiş olan yeşil kromatografik yöntemlerin temelleri ise aşağıdaki noktalarla çizilmiştir:

1-Azaltılmış çözücü tüketimi: Yeşil kromatografi, daha çevreci, daha az toksik ve daha sürdürülebilir seçenekler gibi alternatif çözücülerin kullanımını teşvik etmekte ve ayrıca mikro ölçekli kromatografi gibi tekniklerle çözücü kullanımını en aza indirmektedir. Bu, tehlikeli atık oluşumunu azaltıp, solvent bertarafı ile ilgili maliyeti düşürmektedir.

2- Enerji verimliliği: Yeşil kromatografi, analiz sırasında daha düşük enerji tüketimine yol açan, enerji verimli ekipman ve tekniklerin geliştirilmesini ve kullanılmasını vurgulamaktadır. Örneğin, kolon tasarımı ve parçacık teknolojisindeki gelişmeler daha hızlı ayırmalara imkan vererek zamandan ve enerjiden tasarruf edilmesini sağlamaktadır.

3- Atık oluşumunun en aza indirilmesi: Yeşil kromatografi, analitik süreç sırasında atık oluşumunu en aza indirecek stratejilerin benimsenmesini teşvik etmektedir. Bu yaklaşım, geri dönüştürülebilir bileşenlerin kullanılmasını, fazla kimyasal kullanımını azaltmak için numune hazırlamanın optimize edilmesini ve mümkün olduğunda solventlerin geri dönüştürülmesini içermektedir.

4- Yenilenebilir kaynakların kullanımı: Yeşil kromatografi, biyobazlı sabit fazlar gibi yenilenebilir kaynakları ayırma işlemine dahil etmeyi amaçlamaktadır. Bu, petrol türevi malzemelere olan bağımlılığı azaltarak ve sürdürülebilirliğe katkıda bulunmaktadır.

5- Daha düşük çevresel etki: Yeşil uygulamaları benimseyen kromatografik yöntemler, ekosistemlerin ve insan sağlığının korunmasına yardımcı olarak çevresel ayak izlerini önemli ölçüde azaltabilmektedir.

6- Yönetmeliklere uyum: Birçok bölge ve endüstri, atık bertarafı ve çevresel etki konusunda giderek daha sıkı düzenlemeler uygulamaktadır. Yeşil kromatografi uygulamak, bu düzenlemelerle uyumludur ve sürdürülebilir uygulamalara olan bağlılığı göstermektedir

7- Geliştirilmiş kamu algısı: Tüketiciler ve paydaşlar çevre sorunları konusunda giderek daha fazla bilinçlendikçe çevre dostu uygulamaları benimsemek, bir kuruluşun itibarını ve marka imajını artırmaktadır.

8- Uzun vadede maliyet tasarrufu: Yeşil kromatografiye geçiş için ilk yatırım maliyetleri söz konusu olabilirken, azaltılmış atık bertaraf giderleri ve daha düşük organik çözücü tedarik maliyetleri gibi uzun vadeli faydalar, genel maliyet tasarruflarına yol açabilmektedir.

Yeşil kromatografinin avantajlarının, ayırma yöntemine ve uygulanan belirli çevre dostu yaklaşımlara bağlı olarak değişebileceğini kabul etmek çok önemlidir. Teknoloji ve uygulamalar ilerledikçe, yeşil kromatografinin faydaları muhtemelen daha da önemli hale gelecektir ve sürdürülebilirliğe, çevre bilincine öncelik veren analitik laboratuvarlarında daha sık uygulanmaya çalışılacaktır (6).

2.2. Kromatografi (7)

Kromatografi, en çok kullanılan analitik yöntemlerden biri olup kimyasal bileşiklerin ayrılması, tanınması ve tayin edilmesi için kullanılır. Bu yöntemde, maddeler karışmayan iki faza dağılmaktadır. Bu iki fazdan sabit faz, bir kolon içinde veya düz bir yüzeyde tutturulurken, ikinci faz olan hareketli faz ise sabit fazın üzerinden veya arasından hareket etmektedir. Kromatografi, gaz veya sıvı hareketli faz kullanılarak bir karışımdaki bileşenlerin, sabit faz ile hareketli faz arasındaki ilgilerine göre ayrıldığı bir yöntemdir. Böylece, karışımdaki bileşenlerin birbirlerinden ayrılmasıyla hem nitel hem de nicel analizler yapılabilir. Sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha yüksek olduğu durumda sıvı kromatografisi normal faz olarak; sabit faz polaritesinin hareketli faz polaritesinden düşük olduğu kromatografi ise ters faz olarak tanımlanır.

İlk olarak 1892 yılında Reed tarafından ortaya atılan bir teori, bir karışımın bir kolon aracılığıyla ayrıştırılabileceğini öne sürmüştür. 1906'da Tswett adlı araştırmacı, klorofil pigmentlerini ayırmak için kolon kromatografisini kullanarak bu teoriyi kanıtlamıştır. Bu ayırmada kalsiyum karbonat sabit faz olarak kullanılmış ve bu şekilde ilk defa katı-sıvı kromatografisi uygulanmıştır. 1938 yılında Rus araştırmacı Izmailov, daha sonra 1950'de Stahl isimli araştırmacılar ince tabaka kromatografisini bulmuştur. 1941'de Martin-Synge, daha sonra sıvı-sıvı kromatografisinin gelişiminin yolunu açan kolon dağılma kromatografisinin temel ilkelerini tanımlamıştır. Martin-James adlı araştırmacı ise hareketli faz olarak gazı kullanarak, mevcut yöntemlerden ayırılmış, gaz-sıvı kromatografisinin gelişimine katkıda bulunarak, çığır açan araştırması ile 1952 yılında Nobel Ödülü ile onurlandırılmıştır. 1967 yılında Huber ve Hulsman isimli araştırmacılar, kolon özelliklerini, pompa sistemlerinin hassasiyetlerini ve dedektörlerin hassasiyetlerini iyileştirerek yüksek performanslı sıvı kromatografisinin temellerini oluşturmuşlardır.

Sıvı kromatografinin temel ilkeleri şunlardır:

1. Ayırma Prensipleri: Sıvı kromatografisi, analit bileşenlerinin sabit faz ve hareketli faz ile farklı etkileşimine dayanır. Sabit faz, bir katı (kolon kromatografisinde) veya bir sıvı (ince tabaka kromatografisinde) olabilir. Hareketli faz sabit fazın içinden veya üzerinden ilerlerken, analitin bileşenleri iki faza olan ilgilerine göre ayrılmaktadır.

2. Sabit Faz: Sabit faz, sıvı kromatografisinin kritik bir bileşenidir. Analit ile etkileşime giren belirli kimyasal özelliklere sahip maddelerdir. Yaygın sabit faz malzemeleri, kolon kromatografisinde veya ince tabaka kromatografisinde katı destek üzerine kaplanan silis, alümina veya diğer bağlı fazları içermektedir.

3. Hareketli Faz: Hareketli faz, analiti sabit faz boyunca taşıyan sıvı veya sıvıların karışımıdır. Ayırma gereksinimlerine bağlı olarak tek bir çözücüden veya bir çözücü karışımından oluşabilir. Analitlerin alıkonma zamanlarını, dolayısıyla kapasite faktörü, seçiciliği ve kolon etkinliğini en fazla etkileyen kromatografik bileşendir. Hareketli faz kromatografik ayırmada elüsyon gücünü etkilemektedir. Ayrıca vizkozite, bastırılabilirlik, dedektörle geçimlilik, kolon ile geçimlilik, numune ile etkileşimler,

saflık ve içinde çözünmüş gaz oranı da hareketli faz tipi belirlenirken dikkat edilmesi gereken noktalar. Hareketli fazın cihaza verilmeden önce süzülmesi gerekir. Süzme işlemi için 0.45 µm gözenek çapına sahip membran veya teflon filtreler kullanılır.

4. Alıkonma Süresi: Analiti oluşturan bileşenlerin enjeksiyonu ile birlikte kromatografik sistemden geçerek dedektöre ulaşması için geçen süre, alıkonma süresi olarak tanımlanır. Alıkonma süresi, analit ile sabit faz arasındaki etkileşimin gücüne bağlıdır ve analit bileşenlerini belirlemek ve tayini için kullanılmaktadır.

5. Elüsyon: Elüsyon sıvı kromatografide, bileşenlerin birbirlerinden ayrılıp detektöre ulaşmaları olarak tanımlanır. Bileşenlerin elüsyon sırası, kromatografik sistemde saptandıkları veya ayrıştırıldıkları sırayı ifade eder. Numune kolona enjekte edilir ve bileşenleri kolonda bulunan iki faz arasında dağılır. Sabit faz ile daha güçlü etkileşime sahip bileşenler daha geç, daha zayıf etkileşime sahip olanlar ise daha erken ayrılır. Elüsyon sırasında, sürekli taze çözücü ilavesi, maddenin kolondan ayrılmasını sağlar. Kolondan sürekli geçirilen hareketli faz, numuneyi kolonda ilerlemeye zorlar ve eş zamanlı olarak hareketli faz ile sabit fazın yeni bölümleri arasında numune tekrar bölüşülür, böylece numunenin hareketli ve sabit faz arasında dağılımı gerçekleşmektedir.

6. Dedekte etme: Ayırma işleminden sonra ayrılan bileşenler dedektöre ulaşır ve analiz edilir. Sıvı kromatografisinde, UV-GB dedektörleri, floresan dedektörleri, kütle spektrometreleri ve kırılma indeksi dedektörleri dahil olmak üzere çeşitli dedektörler kullanılmaktadır.

7. Kromatogram: Bir kromatogram, dedektörden elde edilen analit cevabının zaman veya hacim üzerinden grafiksel gösterimidir. x ekseninde alıkonma süresi ve y ekseninde dedektör cevabı ile ayrılmış bileşenlere karşılık gelen tepe noktalarını (pik) göstermektedir. Kolonda ayrımı gerçekleşen her analitin, özelliğine bağlı olarak seçilen dedektör yardımıyla kromatogramda oluşturduğu bir piki vardır.

Kromatografik yöntemler için farklı sınıflandırma şekilleri mevcuttur. Uygulama yöntemlerine göre düzlemsel ve kolon olmak üzere ikiye ayrılır. Kolon kromatografisinde, sabit faz ince bir kolonda tutulur ve basınç altında, sabit fazın

içinden hareketli faz geçirilir. Düzlemsel kromatografide ise düz bir plakaya veya bir kağıdın gözeneklerine tutturulmuş sıvı sabit faz kullanılır. Hareketli faz, kapiller etkisi veya yer çekimi etkisiyle sabit fazın arasından ilerler. Her bir kromatografi türü aynı temel prensiplere dayanır. Kromatografiyi sınıflandırmanın daha temel bir yolu, kullanılan sabit ve hareketli fazlar ile bu fazlar arasında maddelerin transfer görevini yapan denge türleri dikkate alarak yapmaktır. Bu sınıflandırmada sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve süperkritik akışkan kromatografisi gibi türler bulunmaktadır. Kullanılan hareketli fazlar sırası ile; sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır. Sıvı kromatografisi hem kolonlar hem de düz yüzeylerde uygulanabilirken, gaz kromatografisi ve süperkritik akışkan kromatografisi yalnızca kolonlar üzerinde uygulanabilmektedir. Tablo 2.2.'de kromatografi türleri ve ayırma mekanizmaları gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Kromatografi türleri ve ayırma mekanizmaları.

Sınıflandırma	Yöntem	Sabit Faz	Denge tipi
Sıvı Kromatografisi	Sıvı-sıvı veya dağılma	Katı üzerine adsorplanmış sıvı	Karışmayan sıvılar arasında dağılma
	Sıvı-bağlı faz	Katı üzerine bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı yüzey arasında dağılma
	Sıvı-katı veya adsorpsiyon	Katı	Adsorpsiyon
	İyon değişimi	İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	Boyut eleme	Polimer bir katının gözeneklerindeki sıvı	Dağılma/eleme
Gaz Kromatografisi	Gaz-sıvı	Katı yüzeyine adsorplanmış sıvı	Gaz ve sıvı arasında dağılma
	Gaz-bağlı sıvı	Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı faz arasında dağılma
	Gaz-katı	Katı	Adsorpsiyon
Süperkritik Akışkanlı Kromatografisi		Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Süperkritik akışkan ve bağlı yüzey arasında dağılma

Elüsyon işlemi, çözünmüş bileşenlerin sabit fazda, çözücünün kolondan sürekli geçirilerek hareketi sağlanarak ayrılmasının sağlanması ve kolon sonunda toplanmasıdır. Hareketli faz, numunenin belli bir kısmını taşıyan çözücünün kolonda hareket etmesini sağlayarak, numunenin hareketli faz ile sabit fazın farklı bölgeleri arasında dağılmasını sağlamaktadır. Kolona devamlı taze çözücü verilmesi, hareketli faz ve sabit faz arasında madde transferinin sürekli olmasını sağlar ve çözünmüş maddelerin kolonun içerisinde aşağı doğru taşınmasını sağlamaktadır. Ancak, çözünen maddeler sadece hareketli fazda hareket eder, bu nedenle kolonda göç etmeleri ortalama hızları, hareketli fazda geçirdikleri süreyle orantılıdır.

Sabit faz tarafından daha güçlü tutulan bileşenler, kolondan daha yavaş elüe olurlar. Bu hız farkı nedeniyle, karışımı oluşturan bileşenler kolon boyunca bantlar halinde ayrılır. Ayrılan bileşenler, yeterli miktarda hareketli fazla birlikte kolondan elüe edilir. Kolonun sonuna, bileşene veya analit çözeltisinin değişen özelliğine tepki veren bir dedektör yerleştirilir. Dedektörden alınan sinyal, zaman veya elüsyon için kullanılan hareketli faz hacmine bağlı olarak grafiğe dönüştürülür. Bu grafik, kromatogram olarak adlandırılır ve hem kalitatif hem de kantitatif analizde kullanılmaktadır.

Kromatografik yöntemlerle yapılan analizlerde elde edilen kromatogramlardaki pikler belirli parametreler ve kabul kriterlere göre değerlendirilir. Analiz edilen elde edilen piklerin kromatografik açıdan uygunlukları, kabul kriterlerine göre değerlendirilerek optimizasyon çalışması yapılmaktadır.

2.2.1. Kromatografik Parametreler

Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Numunenin kolona enjekte edildikten sonra dedektöre ulaşmaya kadar geçirdiği zamana alıkonma zamanı (t_R) denir.

Alıkonma hacmi (V_R) ise, bir maddenin kolondan elüe olması için gereken hareketli faz hacmidir. Aşağıdaki şekilde hesaplanmaktadır;

$$V_R = t_R F \quad (2.1)$$

F: Hacimsel akış hızı

Alıkonma hacmi, kromatografik parametre olan dağılım katsayısı (K) ile doğrudan ilişkilidir.

$$V_R = V_m + KV_s \quad (2.2)$$

V_m : Kolondaki hareketli faz hacmi

V_s : Kolondaki sabit faz hacmidir.

K ise; analitin sabit fazdaki molar derişiminin (C_s) hareketli fazdaki derişimine (C_m) oranı ile hesaplanmaktadır.

$$K = C_s / C_m \quad (2.3)$$

Bir maddenin kapasite faktörü (k'); alıkonma hacmi ve ölü hacmi değerleri kullanılarak eşitlik 2.4.'te olduğu gibi hesaplanabilir;

$$k' = (V_R - V_0) / V_0 \quad (2.4)$$

Eğer elüsyon sırasında, hacimsel akış hızı (F) sabitse k' eşitlik 2.5.'te olduğu gibi hesaplanabilir;

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.5)$$

Kolon ile herhangi bir etkileşmeye girmeyen maddeler ölü hacim (boş hacim) (V_0) olarak ifade edilirler.

Dağılımdaki derişimlere bağlı olan k' , K ile doğrudan ilişkilidir.

$$k' = K \times V_s/V \quad (2.6)$$

k' bir analizde seçilen hareketli faz bileşenlerinin oranına göre maddelerin alıkonma zamanı ve ölü hacimlerinin yer aldığı eşitlikle hesaplanan bir parametredir. İyi bir ayırım için her bir analitin optimum k' 'nin 1 – 10 arasında olması beklenir. Madde kolonda az tutunuyorsa ve piki çok erken kromatogramda gözleniyorsa $k' < 1$

olarak hesaplanırken; $k' > 10$ olursa analitlerin kolonda çok fazla tutunduğu varsayılarak analiz süresini uzattığı düşünülür.

Seçicilik

Bir karışımdaki maddenin ayrımını değerlendirmede kullanılan seçicilik (α) faktörü iki bileşenin k' oranına eşittir.

$$\alpha = k'_2/k'_1 = (t_{R2} - t_0)/(t_{R1} - t_0) \quad (2.7)$$

Bu eşitlikte, k'_1 göreceli kısa alıkonma zamanına sahip analitin k' olarak tanımlanırken, k'_2 daha uzun alıkonma zamanına sahip analitin k' 'nü temsil etmektedir. Alıkonma parametresine bağlı olan seçicilik için sabit ve hareketli faz özellikleri etkili olur. İki analitin kromatografik olarak ayrılmasında hesaplanan seçicilik değerinin en az 1 olması istenmektedir.

Kolon Etkinliği

Bir kolonun etkinliği, pikin genişliği ile doğrudan ilişkilidir. Yüksek verimli kolonlar, daha dar piklerin oluşmasına katkıda bulunurlar ve maddelerin ayrımını sağlamayı daha kolaylaştırmaktadır. Keskin sivri pikler, dar pik genişlikleriyle birlikte yüksek ayırıcılık, başarılı bir kromatografik analiz olarak tanımlanabilir. Pik genişliklerinin dar olması kolonda oluşabilecek teorik tabakalarının da dar olması olarak tanımlanır. Dar batların elde edildiği bir analizde kolon boyunca çok sayıda tabaka gözlenecektir. Eşitlik 2.8'de yer alan eşitliğe göre belirli uzunluktaki (L) bir kolonda, azalan teorik tabaka yüksekliği (H) değerinin, ters orantılı olan teorik tabaka sayısının (N) arttıracığı görülmektedir. N'deki artış ise kolonun istenen ayrımı yapmasının başarı ölçütü olarak kabul edilebilmektedir.

$$N = L / H \quad (2.8)$$

Teorik olarak bu denklemlerle verilen kolon etkinliği ayrıca t_R ve taban genişliği ile de hesaplanabilir. t_R 'yi ve taban genişliğini etkileyecek tüm analiz parametreleri bu hesapta rol oynamaktadır. Özellikle hareketli faz bileşimi, oranı, akış hızı ve kolon boyu etkili olan önemli değişkenlerdendir. Aşağıdaki eşitlik N'yi hesaplamak için kullanılabilir.

$$N = 16 (t_R / w)^2 \quad (2.9)$$

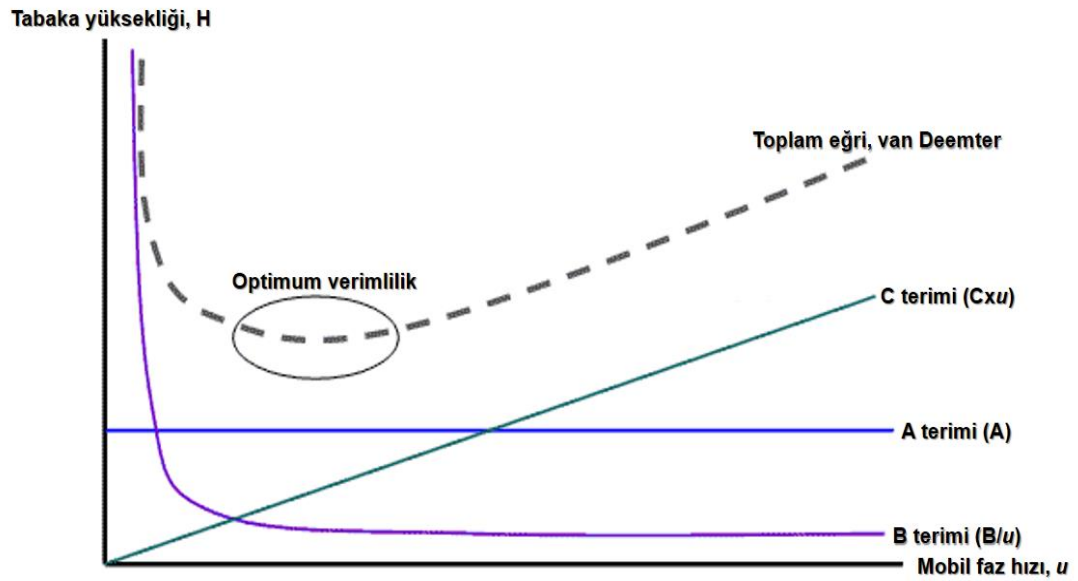
t_R : Alıkonma zamanı

w : Pik zemin genişliği (Pik yüksekliğinin % 10'undaki genişliğidir)

Pik genişliğinin ölçülmesinde karşılaşılabilecek hatalardan kaçınmak için N 'nin değerinin hesaplanmasında kullanılan diğer bir eşitlik ise, pikin tabandan tepe noktasına olan mesafenin yarı yüksekliğindeki pik genişliği olan $w_{1/2}$ değerinin kullanılmasıdır.

$$N = 5.54 (t_R / w_{1/2})^2 \quad (2.10)$$

Matematiksel olarak kromatografik kolondaki ayırma mekanizmasına ve performansına dair bileşenlerin akış hızı ile değişimi, Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter'in 1950'li yıllarda yaptığı çalışmalarla sonuçlanan ve kendi adıyla anılan eşitliğin bulunmasıyla başlamıştır (Bkz. Şekil 2.1. ve Eşitlik 2.11.).



Şekil 2.1. Optimum verimlilik; ideal hız, minimum H değerini gösteren Van Deemter grafiği.

$$H = A + B/u + Cu \quad (2.11)$$

H : Teorik tabaka yüksekliği (cm)

A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu

B: Boyuna difüzyon

C: Fazlar arasındaki kütle aktarımı

u: Çizgisel hız

Kromatografik kolonun etkinliğini sağlamak amacıyla, ayırimda akış hızının optimum değerinin belirlenmesi gerekmektedir. Kolonun etkinliğini artırmak için H değerini azaltmak için çeşitli önlemler alınabilir. Eşitlik 2.11'e göre A değerinin akış hızından bağımsız olduğu görülmektedir. Madde moleküllerinin kolonda farklı yollar izlemesi, onların hızlarının da farklı olmasına neden olur. Tüm moleküller kolon boyunca ilerlerken kromatografik bantta genişleme meydana gelmesine Eddy difüzyonu denir. A değeri, kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikler halinde kullanılmasıyla azaltılabilir.

Boyuna difüzyon (B), özellikle akış hızı düşük olduğunda önemli hale gelir ve bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleriyle doğru orantılı olarak artar. Kolon sıcaklığının azaltılması ve kolona basınç uygulanması ile B değeri küçülmektedir.

Fazlar arasındaki kütle aktarımı (C), akış hızı yüksek olduğunda önemli hale gelen kütle aktarımını temsil eder. Akış hızının artmasıyla bileşenlerin iki faz arasındaki dağılım dengelerine ulaşma süresi azalır ve dolayısıyla tam bir dağılım dengesine ulaşamaz. Hareketli sıvı fazın düşük viskoziteye sahip olması, kolon sıcaklığının artırılması ve sabit fazın ince bir sıvı filmle kaplıysa bu filmin kalınlığının çok küçük olması ile C değeri küçülmektedir.

Ayırıcılık

Kromatografik işlemlerde, kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi ayırıcılık (R_s) kavramıyla ifade edilir. İki maddenin kolonda ayrılabilirliğinin nicel ölçüsüdür. Eşitlik (2.12) ve (2.13) ile ifade edilebilir:

$$R_s = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2) \quad (2.12)$$

$$R_s = (1/4) [(\alpha-1) / \alpha] [k' / (k'+1)] N^{1/2} \quad (2.13)$$

Kromatografik analizlerde, iki pikin birbirinden tamamen ayrıldığı ve en uygun ayırıcılığın sağlandığı durumu ifade etmek için $R_s \geq 1.5$ değeri kullanılır.

Genellikle seçicilikle orantılı olarak ayırıcılığın da artış göstermesi beklenir. Ancak belirli bir seçicilik değerinden sonra, farklı alıkonma sürelerine sahip madde pikleri elde edilmesine rağmen toplam ayırıcılıkta gerçek bir iyileşme olmayabilir. Kromatografik ayırımın başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için α değerinin 1'den büyük olması gerekmektedir. $\alpha = 1$ olduğunda ise iki bileşiğin ayırımı sağlanamaz. Seçicilik, hareketli faz ve sabit fazın bileşiminden etkilenir. Yakın pikler arasında seçicilik değeri 1'e yakındır.

N olarak da adlandırılan kolon etkinliği, pik genişliği ile ilişkili olup akış hızı, kolon uzunluğu ve dolgu maddesinin tanecik boyutu gibi faktörlere bağlı olarak değişir. Etkinlik faktörü, pik genişliğiyle ilişkilidir. Ayırıcılık, N'nin kareköküne bağlı olduğu için N'deki büyük değişiklikler, ayırıcılıkta küçük değişikliklere yol açar. Hareketli fazın özelliklerinden etkilenen k' 'nin ayırıcılık üzerindeki etkisi, seçicilik kavramından türetilmiştir ve seçiciliğin etkisine benzer. $k' = 0$ olduğunda herhangi bir ayırım gerçekleşmez. Ayrıca, k' değeri arttıkça $k'/(k'+1)$ değeri 1'e yaklaşır ve k' 'deki artışın toplam ayırıcılığa etkisi azalır.

Pik Simetrisi

Analitin, hareketli fazdaki denge derişimi (C_m) ile sabit fazdaki denge derişimi (C_s) arasındaki ilişki, grafik üzerinde gösterildiğinde bir dizi ilişki ortaya çıkar. K değeri, tüm C_m değerlerinde sabit olduğundan ötürü kromatografik bant, tüm derişimlerde aynı hızda hareket eder ve simetrik bir elüsyon pikine ulaşılmaktadır.

Doğrusal olmayan durumlar, nicel analizi zorlaştırır ve alıkonma sürelerinin nitel analizde kullanılmasını engeller. Bu nedenle, kromatografik koşullar genellikle simetrik bir elüsyon pikinin sağlandığı şekilde düzenlenir. İyi bir ayırma işleminde, Pik Asimetri Oranı (PAO) değerinin 1.5'den küçük olması hedeflenmektedir (8).

2.2.2. Hareketli Faz Bileşiminin Ayırma Etkisi

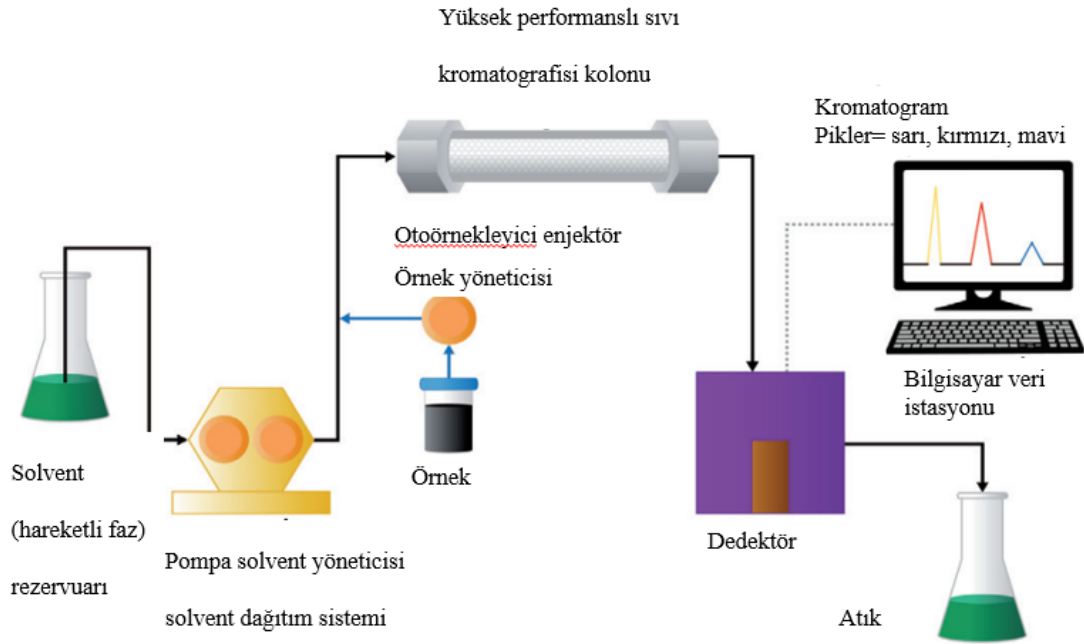
Sıvı kromatografisinde, uygun çözücü seçilerek maddenin k' değiştirilebilir ve iyi bir ayırım elde edilebilir. Eğer birden fazla madde aynı k' ile elüe ediliyorsa, bu durum hareketli fazın seçiciliğinin yeterli olmadığını gösterir ve seçiciliğin optimize edilmesi gerekmektedir. Ayırım kalitesini artırmak için hareketli faz çözeltilerine eklenen maddelere düzenleyici denir. Ters-faz sıvı kromatografisi genellikle su ve organik çözücülerin karışımından oluşan hareketli fazları kullanılırken, kısmen düşük polariteli çözücüler organik düzenleyici olarak kullanılmaktadır. Organik düzenleyici tipini değiştirerek yeterli seçicilik elde etmek mümkün olsa da kullanılacak çözücü sayısı sınırlı olmasına rağmen seçiciliğin iyileştirilmesi için bazı durumlarda bu yöneme başvurulabilir. Ters faz tekniğinde tamponlar da düzenleyici olarak kullanılmaktadır. Zayıf asit ve bazların seçiciliğinin optimize edilebilmesi için hareketli fazın pH değerinin titizlikle ayarlanması gerekir. Bazik numunelerdeki piklerin kuyruklanmasını azaltmak için ise trietilamin gibi iyon çifti reaktifleri veya sülfonik asit türevleri gibi asitler, hareketli faza eklenerek kullanılmaktadır.

2.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Yüksek performanslı/basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), bir karışımı oluşturan bileşenleri ayırmak, tanımlamak ve tayin etmek için genellikle analizlerde kullanılan spesifik bir kolon kromatografisidir (9). HPLC sisteminde başlıca sabit fazı içeren bir kolon, hareketli fazın/fazların kolon boyunca ilerlemesini sağlayan bir pompa ve maddelerin alıkonma sürelerine cevap veren bir dedektör yer almaktadır (10).

2.2.4. HPLC Cihazı

HPLC cihazı, enjektör, pompa, kolon, dedektör ve kaydedici kısımlarından meydana gelir ve bu bileşenler Şekil 2.2.'de gösterilmiştir. Organik çözücü ve tamponlardan etkilenmemesi için tüm malzemeler korozyona dayanıklı malzemelerden yapılmıştır.



Şekil 2.2. HPLC bölümlerinin gösterimi (11).

Pompalar

Pompa, hareketli fazın kolon boyunca hareketini sağlamak için kullanılır. Hareketli fazın pompalanma hızı sabit olmalıdır, bu sayede akışın sabit ve deneylerin tekrarlanabilir olması sağlamaktadır. Pompalar iki çeşittir;

1. Sabit basınçlı pompalar: İlk olarak geliştirilen pompalardır. Bu tür pompalarda hareketli faz bir rezervuarda bulunur ve inert bir gaz, örneğin azot, kullanılarak basınç altında tutulur. Bu basınç, hareketli fazın hareketini sağlamaktadır.

2. Sabit hacimli pompalar: Basınç, bir motor tarafından sağlanır. Sistemdeki geçirgenlik herhangi bir nedenden dolayı bozulursa veya çözücünün viskozitesi değişirse, iç basınç değişiklikleri motor tarafından sağlanan basınç değişiklikleri ile

dengelemeye çalışılır. Özellikle gradiyent elüsyonlarında bu tür pompalar kullanılması önerilmektedir.

Enjektörler

İki tip enjeksiyon tipi vardır: Manuel ve oto-örnekleyiciler. Manuel enjeksiyon valflerinde, numune yükleme ve enjeksiyon için iki farklı konum mevcuttur. Yükleme kısmında, "loop" olarak bilinen bir hazne, basınçlı ortamdan izole edilir ve istenen numune miktarı bir şırınga kullanılarak "loop" içine çekilir. Enjeksiyon kısmında ise, "loop" tekrar yüksek basınçlı ortama dönerek numunenin sisteme transferini sağlamaktadır.

Programlanabilir oto-enjeksiyon sistemleri, hassas bir motorla hareket ettirilen şırıngalar kullanarak numune "loop"unu doldurmak için kullanılır. Otomatik olarak robot kol yardımıyla vialden enjektöre çekilen analiz edilecek çözeltilerden istenilen miktarda numune hacmi "loop"a doldurulur. Otomatik olan bu sistemde 1-25 µL arasındaki hacimlerin vialden alınarak kolona verilebilmektedir. Az miktarda olan örneklerle çalışmada düşük numune hacmini sisteme verebilme özelliğiyle ve numune kaybının en düşük seviyede olmasından dolayı manuel sisteme göre daha avantajlıdır. Ayrıca, istenilen sayıda ardışık enjeksiyon yapmak ve programlanan bir analiz serisinin cihaz tarafından kaydedilen yöntem çerçevesinde yapması da mümkün olmaktadır.

Kolonlar

Kromatografik ayırımlar için geliştirilmiş kolonlar genellikle paslanmaz çelikten yapılmış olup, iç çapları genellikle 1-10 mm arasında değişirken, uzunlukları 10-30 cm arasında olabilmektedir. Son yıllarda, yüksek performans gösteren, daha küçük boyutlu, mikro kolonlar analizciler tarafından daha fazla tercih edilmektedir. Bu mikro kolonların uzunluğu genellikle 1-10 cm arasında, iç çapları ise 1-3 mm arasında, dolgu maddesi taneciklerinin çapı ise 1.7-10 µm arasında değişmektedir. Bu durum sistem performansını büyük ölçüde etkileyen bir özelliktir. Kolonların ömrü kullanıma bağlı olarak değişmekle birlikte, ömürlerini uzatmak için ön kolon kullanılması tavsiye edilmektedir. Tanecikler, preparatif amaçlar için kullanılan gözenekli yapılar ve

analitik amaçlar için kullanılan pellicüler yapıda olabilirler. Preparatif ayırım amacıyla poröz dolgu maddesi kullanıldığında yüksek kapasite sağlanmaktadır. Kromatografik ayırım amacıyla kullanılan dolgu maddesi ise kütle aktarımı daha hızlı, etkinlik daha yüksek ve kolonun yeniden dengelemesi çok daha hızlı gerçekleşmektedir.

-OH gruplarını içeren polar özellik gösteren silika ve alümina gibi katı maddeler normal faz sıvı kromatografisinde kullanılır. Ancak, -OH grubu yerine $C_{18}H_{35}$ gibi bir hidrokarbon bağlandığında katı yüzey apolar özellik kazanır ve ters faz sistemlerde kullanılabilir.

Dedektörler

HPLC sisteminin en önemli bileşenlerinden biri olan dedektörler, Maddeye Yönelik Dedektörler ve Çözeltiye Yönelik Dedektörler olmak üzere iki başlık altında sınıflandırılırlar:

a. Maddeye Yönelik Dedektörler: Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler ve en yaygın kullanılan türleri aşağıda verilmiştir:

1. Fotometrik dedektörler (UV, GB, IR fotometreleri)
2. Floresans dedektörler
3. Elektrokimyasal dedektörler
4. Ayırım sonrası tepkime dedektörleri
5. Radyoaktivite dedektörleri
6. Elektron yakalayıcı dedektörler
7. Kütle spektrometresi

b. Çözeltiye Yönelik Dedektörler: Çözeltinin içindeki maddeye değil, maddenin çözeltisine özgü dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1. Refraktif indeks dedektörleri

2. Dielektrik sabiti dedektörleri

3. Kondüktivite dedektörleri

4. Yoğunluk dedektörleri

2.3. COVID-19 (*SARS-CoV2*)

Aralık 2019'da Wuhan şehri, şiddetli akut solunum sendromu Koronavirüs 2 (*SARS-CoV-2*)'nin neden olduğu büyük bir salgın yaşamıştır (12-14). Koronavirüs; yüzeylerinde karakteristik “taç benzeri” sivri uçlar bulunan zarflı, pozitif tek sarmallı bir RNA virüsü olup *Coronaviridae* familyasından ve *Orthocoronavirinae* alt familyasına aittir ve kuşlar, memeliler ve insanlarda hastalığa yol açabilir (15, 16). COVID-19'un klinik özellikleri ateş, solunum semptomları, nefes darlığı, öksürük ve pnömونيye içermektedir (17, 18). Alt solunum yolu, *SARS-CoV-2* enfeksiyonunun birincil hedefidir. Koronavirüs hastalığına yakalanan yetişkinlerin, genellikle bu hastalığın erken evresinde hem CD4 + hem de CD8 + T hücresi alt gruplarında büyük bir düşüş ile ortaya çıkması önemlidir (12, 19). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre *SARS-CoV-2* ile enfekte olmuş birey sayısı yaklaşık 768 milyona ulaşmıştır (20).

2.4. Antiviral İlaçlar

Virüsler, çoğalmak ve yeni viral parçacıklar üretmek için konakçı hücrelere dayanan hücre içi parazitlerdir. Antiviral ilaçlar, viral yaşam döngüsünün çeşitli aşamalarını hedeflemek ve viral replikasyon ve yayılmaya müdahale etmek için geliştirilmiştir. Antiviral ilaçların geliştirilmesi, çeşitli viral enfeksiyonların tedavisine ve önlenmesine yardımcı oldukları için modern tıpta önemli bir başarı olmuştur.

Antiviral ilaçların hedefi, virüslerin çoğalmasını engellemektedir. Bunu, viral replikasyonun çeşitli aşamalarında yer alan spesifik viral enzimleri veya proteinleri hedefleyerek yaparlar. İlaçlar, bu kritik süreçlere müdahale ederek yeni viral partiküllerin üretimini sınırlayabilir, vücuttaki viral yükü azaltabilir ve potansiyel olarak enfeksiyonun şiddetini ve süresini azaltmaktadır.

Antiviral tedavinin birincil amacı, enfekte bireydeki viral yükü azaltmaktır. Bunu yaparak, bağışıklık sistemi enfeksiyonu daha etkili bir şekilde kontrol edebilir

ve hastanın semptomları hafifletilebilir. Bazı durumlarda, antiviral ilaçlar viral enfeksiyonların, özellikle de vücuttan tamamen yok edilemeyen virüslerin neden olduğu semptomların yönetilmesine yardımcı olabilir. Bu ilaçlar, viral replikasyonu baskılayabilir ve virüsün ciddi hasara neden olmasını engelleyerek daha hafif semptomlar ve daha iyi sonuçlar sağlayabilir.

Antiviral ilaçlar, virüsün vücutta çoğalmasını ve yayılmasını hedefleyerek viral enfeksiyonları tedavi etmek için tasarlanmış ilaçlardır. Antiviral ilaçlar, bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkili olan antibiyotiklerin aksine, özellikle virüslere karşı etkilidir. Spesifik ilaca ve etki mekanizmasına bağlı olarak viral enfeksiyonları önlemek veya mevcut enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılabilirler.

Antiviral ilaçlar ayrıca belirli viral enfeksiyonların bulaşmasını önlemede rol oynayabilir. Enfekte bir bireydeki viral yükü azaltarak, virüsü başkalarına yayma şansı azaltılabilir.

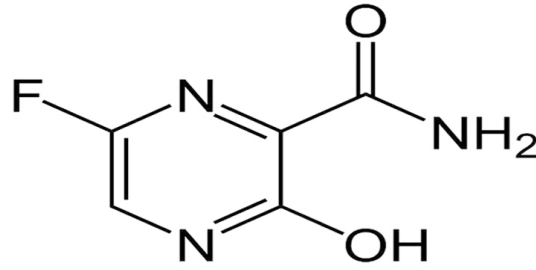
Antiviral ilaçlar, etki biçimlerine ve hedefledikleri viral yaşam döngüsünün belirli aşamalarına göre birkaç kategoride sınıflandırılabilir. Bunlar; nükleozit/nükleotit analogları, proteaz, polimeraz, neuraminidaz, füzyon, integras ve RNA-RNA'ya bağlı polimeraz inhibitörleri olarak sıralanmaktadır. Antiviral ilaçların, hedef almak için tasarlandıkları virüse özgüdürler. Bazı antiviral ilaçlar, birden fazla virüse karşı etkili geniş bir aktivite spektrumuna sahip olabilirken, diğerleri yalnızca tek bir virüs türüne karşı etkilidir. Antiviral ilaçların seçimi ve kullanımı, spesifik viral enfeksiyona ve ilacın güvenlik ve etkinlik profiline bağlıdır (21).

5-sübstitüe-2'-deoksiüridin (IDU)'nun tanımlanmasıyla, viral enfeksiyonların tedavi edilebileceği fikri 1959 yılında ortaya atılmıştır (22). Antiviral ilaçların sınıflandırılması, spesifik bir viral replikasyon basamağının inhibisyonu için belirli bir virüs hedefinin tanımlanması esasına dayanır (21, 23).

2.5. Favipiravir

2.5.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Favipiravir (FAV), 5-floro-2-okso-1H-pirazin-3-karboksamid yapısındadır. Kimyasal formülü $C_5H_4FN_3O_2$ olan FAV'ın açık formülü Şekil 2.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Favipiravirin kimyasal yapısı (24).

FAV beyaz/açık sarı renkte bir tozudur. Molekül ağırlığı 157.1 g/mol; asetonitril ve metanolde eser miktarda, su ve etanolde biraz çözünür; erime noktası 187-193 °C arasında; pKa değeri 5.1 ve logP değerleri 0.25 ve 0.49'dur (25, 26).

2.5.2. Farmakolojik Özellikleri

FAV bir ön ilaçtır ve ribozile ve fosforile edilerek hücre içinde aktif metaboliti olan T-705RTP'ye dönüşerek etki göstermektedir (27, 28). Bu antiviral ajan, Ribonükleik asit (RNA) bağımlı RNA polimeraz inhibitörü olarak etki göstererek influenza A ve Ebola, Batı Nil virüsü, Sarıhumma virüsü, Lassa virüs gibi infeksiyon etkenlerine karşı etkinliği gösterilmiştir (27, 29-31).

2.5.3. Farmakodinamik Özellikler

Ön ilaç olarak işlev gören FAV, aktif formu olan RTP'ye dönüşmek için hücre içinde ribosilasyon ve fosforilasyona uğramaktadır (32, 33). FAV-RTP, nihai olarak viral transkripsiyonu ve replikasyonu önleyen RNA polimerazına bağlanır ve inhibe etmektedir (32, 34).

2.5.4. Farmakokinetik Özellikleri

FAV oral yolla vücuda alındıktan sonra % 97.6 biyoyararlanım düzeyi ile kan dolaşımına ulaşmaktadır (27). FAV'ın önerilen doz şeması için ortalama kan derişimi (C_{maks}) 51.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 'dir. Maksimum plazma derişimine oral uygulamadan 2 saat sonra geldiği ve ardından 2-5.5 saatlik kısa bir yarılanma ömrü ile hızla düştüğü yapılan çalışma ile gösterilmiştir (33).

FAV'ın insanda; plazma proteinlerine bağlanması % 54 (35), insan serum albümini ve a1-asit glikoproteine bağlanma yüzdeleri sırasıyla % 65.0 ve % 6.5 olarak bulunmuştur (36). Dağılma hacminin 15 - 20 L olduğu bildirilmiştir (37).

FAV daha yüksek bir dozda veya çoklu dozlarda verildiğinde, aldehit oksidazın (AO) geri dönüşümsüz inhibisyonunun meydana geldiği ve besinlerle alındığında Cmaks üzerindeki etkisinin azaldığı görülmüştür (36).

Karaciğerde esas olarak aldehit oksidaz ve kısmen de ksantin oksidaz tarafından metabolizasyona uğrar ve böbrekler tarafından atılan inaktif bir oksidatif metabolit olan T-705M1 üretilmektedir (33).

Klinik Kullanımı ve Dozu

Pandemik influenza virüsü enfeksiyonlarının tedavisinde FAV için önerilen oral doz: 1. gün: günde iki kez 1600 mg; 2-5. günler: Günde iki kez 600 mg şeklindedir (38).

2.5.5. Endikasyonları

1990'ların sonunda Japon şirketi Toyama Chemical Co. tarafından geliştirilmiş olan FAV, viral RNA-polimerazı inhibe eden güçlü bir antiviral ajandır (39). Favipiravirin; dirençli influenza virüsü, arenavirüsler, bunyavirüsler, flovirüsler, sarı humma, Batı Nil, Batı at ensefaliti, ayak ve ağız hastalığı virüsü, norovirüs ve kuş gribi birçok RNA virüsüne karşı anti-viral etkiler sergilediği gösterilmiştir (40-43).

COVID-19'un hızlı yayılması ve yıkıcı etkilerinden ötürü araştırmacıları antiviral ilaçları keşfetmeye sevk etmiştir ancak yeni bir ilacın onaylanma sürecinin uzunluğundan dolayı diğer bir seçenek olan Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı FAV geniş spektrumlu anti-viral kapsamı nedeniyle tedavi süreçlerinde değerlendirilmiştir. Şubat 2020'de Çin'de yeni influenza'nın tedavisi için onaylanan ve COVID-19'un deneysel tedavisi için Çin popülasyonunda araştırılmaya hala devam edilmektedir (44-48).

Ülkemizde ise, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan ve 22.03.2020 tarihinde güncellenen “COVID-19 Erişkin Hasta Yönetimi ve Tedavisi Rehberi” ve

Kamu Hastaneleri Genel Müdürlüğü Tedarik Planlama, Stok ve Lojistik Yönetimi Daire Başkanlığı Hastane Eczacılığı Yönetim Birimi tarafından yayımlanan ve 14.04.2020 tarihinde güncellenen “*COVID-19 Tedavisinde Kullanılacak İlaçlara İlişkin Bilgilendirme: Favipiravir 200 mg*” kılavuzuna göre olası/kesin COVID-19 hastalarına yönelik tedavi prosedürleri belirlenmiştir (49, 50).

2.5.6. Yan Etkileri

FAV ve metaboliti, FAV hidroksit organik anyon taşıyıcı (OAT) 1 ve 3’ü inhibe ederek tübüler ürik asit sekresyonunu azalttığından ötürü en sık gözlenen yan etki hiperürisemidir (36). Diğer yan etkiler arasında hafif ila orta şiddette diyare, transaminazlarda asemptomatik artış ve nötrofil sayısında azalma yer almaktadır (33).

2.5.7. İlaç Etkileşimleri

FAV; pirazinamid, repaglinid, teofilin, sitalopram, zaleplon, famsiklovir ve sulindak gibi ilaçlarla kullanıldığında dikkatle izlenmelidir (37, 51). Pirazinamid ve diğer ürik asit düzeyini arttıran ilaçlarla ile birlikte kullanımda hiperürisemi riski artmaktadır. Repaglinid CYP2C8 enzimi ile metabolize olduğu için FAV ile birlikte kullanımda, repaglinid düzeyinde ve etkilerinde artış beklenmektedir. Teofilin FAV’ın kan düzeyini ve etkilerini arttırabilir (28).

Parasetamol ile birlikte kullanımda parasetamolün etkisini arttırabilmektedir (28). Asetaminofen ile birlikte alındığında ise önerilen maksimum günlük asetaminofen dozu 3 g'dır (52). Asiklovir, FAV’ın aktif formuna geçişini ve dolayısıyla antiviral etkinliğini geciktirebilmekte ve azaltabilmektedir (28).

Aldehit oksidazı inhibe eden ilaçlar arasında potansiyel bir ilaç etkileşimi riski oluşur ve FAV’ın dikkatle izlenmesi gerekir. Yaşlılarda dikkatle uygulanması ve izlenmesi gerekirken çocuklarda henüz klinik çalışmalar yürütülmemiştir (53).

2.5.8. Kaynaklarda Yer Alan Analiz Yöntemleri

İ. Bulduk (54), FAV’ın tabletten analizi için C18 kolonu ve 50 mM potasyum dihidrojen fosfat (pH 2.3) ve asetonitril (90:10, v/v) karışımını içeren hareketli faz kullanarak 15 dk çalışma süresi kapsamında HPLC yöntemi geliştirmiştir. Doğrusallık

aralığı 10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1.20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ve 3.60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ bulunmuştur.

Elizabeth Challenger ve ark. (55), insan plazmasında FAV miktarının belirlenmesi için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Elüsyon, su içinde % 0.2 formik asit ve metanol içinde % 0.2 formik asitten oluşan bir gradiyent hareketli faz kullanılarak, Synergi Polar-RP (150 × 2.1 mm i.ç., 4 μm) kolon ile gerçekleştirilmiştir.

Cahaya Azzahra Rahmadhani ve ark. (56), tam kanda FAV'ın HPLC-DAD ile ölçümü için yöntem geliştirmişlerdir. Sabit faz olarak C18 kolon (Waters, Sunfire™ 250 × 4.6 mm i.ç., 5 μm) ve asetronitril - % 0.2 formik asit - 20 mM sodyum dihidrojen fosfat (pH 3.5) içeren gradiyent hareketli faz olarak kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Safa M Megahed ve ark. (57) ise, insan plazmasında FAV'ın belirlenmesi için hızlı, sağlam, hassas ve yeşil spektrofiorimetrik yöntemin geliştirilmesi için çalışma yapmışlardır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 9.44 ng.mL^{-1} ve 28.60 ng.mL^{-1} bulunmuştur. Yöntemin yüksek duyarlılığı, FAV'ın 48-192 ng/mL aralığında belirlenmesine olanak sağlamıştır. Önerilen spektrofiorimetrik yöntemin analitik eko ölçüğe göre çevre dostu olduğu kanıtlanmıştır.

Çeşitli matrislerden gerçekleştirilen çalışmalar kapsamlı olarak Tablo 2.3.'te verilmiştir.

Tablo 2.3. Çeşitli matrislerde gerçekleştirilmiş analiz yöntemleri.

Matriks	Yöntem ve Çalışma Koşulları	Kullanılan Hareketli Faz	Kullanılan Kolon	Ref.
Tablet	HPLC Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹ Dedektör dalga boyu: 323 nm Kolon sıcaklığı: 30 °C Alıkonma Süresi: <15 dk	50 mM potasyum dihidrojen fosfat (pH 2.3) ve asetonitril (90:10, h/h)	C18 (4.6 × 250 mm i.ç., 5 µm)	(54)
Plazma ve doku	HPLC -PDA Akış hızı: 1.5 mL.dk ⁻¹ Dedektör dalga boyu: 360 nm Kolon sıcaklığı: 30 °C Enjeksiyon hacmi: 100 µL	100 mM trietilamonyum fosfata% 1 asetonitril ilave edilmiştir.	C-18 (4.6 × 25 mm i.ç., 5 µm)	(58)
Tablet	HPLC-MS/MS LC-DAD Akış hızı: 0.5 mL.dk ⁻¹ Kolon sıcaklığı: 30 °C Enjeksiyon hacmi: 1 µL	Hareketli faz A: H ₂ O + % 0.1 formik Asit Hareketli faz B: Metanol + %0.1 formik Asit	C18 (1 × 50 mm i.ç., 5 µm)	(59)
İnsan plazması ve tablet	HPLC-UV Dedektör dalga boyu: 436 nm Akış hızı: 1.0 mL.dk ⁻¹	0.02 M Brij-35, 0.15 M SDS, ve 0.02 M Disodyum hidrojen fosfat karışımı fosforik asit ile pH 5'e ayarlanmıştır.	C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm)	(47)
Tablet	LC-MS Kolon sıcaklığı: 25 °C Enjeksiyon hacmi: 5 µL Akış hızı: 0.6 mL.dk ⁻¹	Metanol + % 0.2 asetik asit (20:80, h/h)	C18 (50 × 4.6 mm i.ç., 3.5 µm)	(60)
İnsan Plazması	UPLC-MS/MS Kolon sıcaklığı: 25 °C Akış hızı: 0.35 mL.dk ⁻¹ Enjeksiyon hacmi: 2 µL	10 mM Amonyum format+ % 0.1 formik asit ve metanol; 0-1 dk (98:2), 1.1-2 (10:90), 2.1-4.5 (98:2) olmak üzere gradiyent elüsyon yapılmıştır.	C18 (100 × 2.1 mm i.ç., 1.8 µm)	(61)
Tablet	HPLC - UV Dedektör dalga boyu: 320 nm	50 mM Potasyum dihidrojen fosfat (pH 2.3) ve asetonitril (90:10, h/h).		(62)

(Ref.: Referans)

Kaynaklarda yer alan yöntemlerin tümünde uluslararası kaynaklarda toksik olduğu belirtilen asetonitrile yer verilmiştir. Asetonitril düşük viskozitesi, yüksek oranda suyla neredeyse tamamen karışabilirliği ve UV absorbans değerinin düşük olması nedeniyle analitik kimyacılar tarafından uzun yıllardır en çok tercih edilen hareketli faz bileşenidir. Bu iyi özelliklerinin yanında kolay alev alan, uçuculuğu yüksek ve çeşitli çevre ajansları tarafından toksik kimyasallar listelerinde yer alan bir çözücüdür. Yeşil kimya yaklaşımı ile bakıldığında analizcilerin tercih etmemesi, yerine daha çevre ve analizci dostu kimyasalların yer verilmesi ve mecburen kullanılacaksa miktarının minimum düzeyde tutulması gerekmektedir. Yeşilleştirme yaklaşımlarında yer alan “toksik atık oluşturma veya mümkün olduğunca az oluşturma” yaklaşımı ile bakıldığında ise endüstride kullanılan milyarlarca litre asetonitril atığının bertaraf edilme sorunu ortaya çıkmaktadır.

Asetonitril en fazla çalışılan ortamdaki havaya daha sonra ise suya, toprağa karışarak doğal kaynaklara ve insan sağlığına zarar verebilmektedir. Ciltten temasla absorbe olması da mümkündür. Nefes yoluyla asetonitril maruziyeti mukoz membranda tahrişe, halsizlik ve titremeye yol açabilmektedir. Hem dermal hem de solunumla alınması siyanür zehirlenmesi gerçekleştirmektedir (63-65).

FAV’ın analizi için bu tez kapsamında geliştirilip valide edilen yöntemde hareketli faz bileşiminde kullanılan etanol hem çevre ve analizci dostu yapısı (66) hem de hareketli faz içinde düşük oranda bulunması ile yeşil kromatografi için çok uygun bir hareketli faz bileşeni olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada dizi diyot dedektörlü Shimadzu marka HPLC (Shimadzu LC - 20AB pompa sistemi, Shimadzu SPD - M20A DAD dedektör, Shimadzu SIL - 20AC oto örnekleyici) kromatografi cihazı kullanılacaktır. Kromatografik ayırımlar 30 mM derişiminde sodyum dihidrojen fosfat tamponu (NaH_2PO_4) (pH 4.2) ve toksik olmayan etanol 97:3 h/h oranında karıştırılmış ve akış hızı olarak $1 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ belirlenmiştir. Geliştirilip optimize edilen yeşil kromatografik yöntem ICH (67) kılavuzu doğrultusunda valide edilerek FAV’ın preparatından analiz için uygulanacaktır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEM

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

3.1.1. Cihazlar

HPLC sistemi

- Pompa Shimadzu LC - 20AB
- Oto örnekleyici Shimadzu SIL - 20AC
- UV Dedektör Shimadzu SPD - M20A
- Kolon Fırını Shimadzu CTO - 20AC
- Data analizörü LC Solution software (Shimadzu)
- Otomatik mikropipet Eppendorf (10-100/100-1000 μ L)
- pH metre Mettler Toledo MA 235
- Hassas terazi Mettler Toledo AG 285
- Ultrasonik banyo Bandelin, Sonorex, RK514 BH
- Santrifüj Hettich, EBA 20
- Vorteks karıştırıcı IKA Vorteks Genius 3
- Saf su sistemi Barnstead NanoPure Diamond
- Buzdolabı Bosch
- Manyetik karıştırıcı Hotplate Stirrer

3.1.2. Kimyasal maddeler

Favipiravir $C_5H_4FN_3O_2$

Parasetamol $C_8H_9NO_2$

Etanol	C ₂ H ₆ O (ISOLAB Chemicals, Sigma-Aldrich)
Sodyum dihidrojen fosfat	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O, Merck

3.1.3. Sarf Malzemeler

Kolon	Nucleosil 100-5 C18 (150 × 4,6 mm i.ç., 5 µm)
Otomatik pipet ucu	100 ve 1000 µL
Vial	Cam, 1 mL
Mikro santrifüj tüpü	2 mL
Şırınga tipi filtre	PTFE, 0.45 µm
Şırınga	2 mL
Balon joje	10, 100, 500 ve 1000 mL'lik, pyreks
Spatül	Metal
Tartım kabı	Cam
Mezürler	100 ve 1000 mL'lik

3.1.4. Analizi Yapılan Farmasötik Preparatlar

Favimol ® (tablet)	Neutec İlaç Sanayi Ticaret A.Ş.
--------------------	---------------------------------

3.2. Deney Hazırlıkları

3.2.1. Etkin Maddenin Saflığı

FAV etkin maddesi Atabay İlaç Şirketi tarafından sertifikası (Ek 6) ile birlikte sağlanmıştır.

3.2.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

FAV stok çözeltisi (1000 µg.mL⁻¹): 10.0 mg standart FAV hassas terazide tartılıp balon joje (10.0 mL) içerisine alınıp üzerine hareketli faz ilavesiyle ultra sonik

banyoda 5 dk tutularak çözünmesi sağlandıktan sonra hacmi yine hareketli fazla 10.0 mL olan balon joje hacmine kadar tamamlanmıştır.

Parasetamol (iç standart, IS) stok çözeltisi (1000 µg.mL⁻¹): 10.0 mg PAR hassas terazide tartılıp balon jojeye (10.0 mL) aktarılarak ultrasonik banyo yardımıyla tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra suyla 10.0 mL olan balon joje hacmine kadar tamamlanmıştır.

Çalışma standartları: FAV stok çözeltisinden belli hacimlerde alınarak doğrusallık aralığına giren FAV çalışma standartları hazırlanmıştır. Vial içerisine istenilen derişimi sağlamak için alınan hesaplanan FAV hacmi ve 10.0 µL IS ilave edilerek hareketli faz ile vial içerisinde 1000 µL'ye seyreltilmesiyle günlük olarak hazırlanmıştır.

30 mM Fosfat tamponu: Hareketli fazda kullanılan fosfat tamponunu hazırlamak için 4.6803 g NaH₂PO₄ tartılıp, 1000 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. Balon jodede belli hacimde suda ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmesi sağlandıktan sonra hacmi 1000 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

5.0 N Sodyum hidroksit çözeltisi: 20.0 g NaOH tartılarak yaklaşık 80.0 mL su ile ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlandıktan sonra su ile 100.0 mL'ye tamamlanmıştır.

1.0 N HCl çözeltisi: 1 litrelik balonjoje içerisine bir miktar su ilave edildikten sonra derişik % 37.5'lik HCl çözeltisinden üzerine 8.44 mL eklenmiş ve su ile hacmine tamamlanmıştır.

Urasil stok çözeltisi (1000 µg.mL⁻¹): 10 mL'lik balon jojeye hassas terazide tartılan 10.0 mg urasil ilave edilir. Bir miktar saf suda ultrasonik banyoda tutularak çözüldükten sonra hacmi 10.0 mL'ye tamamlanmıştır. Bu stok çözeltiden vial alınan 10 µL hareketli fazla 1.0 mL'ye seyreltilir. Urasil enjeksiyonu ile elde edilen pikin alıkonma zamanı kromatografik parametrelerin hesaplanmasında kullanılan sistemin ölü hacim (t₀) zamanı olarak kabul edilmiştir.

3.2.3. Farmasötik Preparatların Analize Hazırlanması

FAV'ın farmasötik preparatından yeşil kromatografik analizi için 10 adet Favimol® (200.0 mg) tablet havanda toz haline getirildikten sonra bir tablete eşdeğer ağırlıktaki miktarı tartılarak 100.0 mL'lik balon jøjeye alınmıştır. Üzerine 80 mL su ilave edilip, ultrasonik banyoda 15 dk tutularak çözünmesi sağlandıktan sonra su ile hacmi 100.0 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden bir miktarı falkon tüpüne alınıp santrifüjlenmiş ve üstte kalan berrak santrifügattan alınan 50.0 mL'lik kısım, hareketli faz ilavesiyle 100.0 mL'ye seyreltilmiştir. Hazırlanan numune çözeltilisinden bir viale alınan 10.0 µL'lik kısma 10.0 µL parasetamol iç standardı (1000 µg.mL⁻¹'lik stoktan) ilave edilerek hacmi hareketli faz ile 1.0 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.4. Sentetik Preparatların Hazırlanması

Sentetik tablet preparatı hazırlanırken toplam hacim 100.0 mL olacak şekilde etkin ve yardımcı maddeler eklenmiştir. Plasebo, FAV standartı eklenmeden, oranları kaynaklardan (68) bulunan, yardımcı maddeler povidon (% 5), koloidal silikon dioksit (% 1), krospovidon (% 0.1), sodyum stearil fumarat (% 0.2) ve opadry sarı [hipromelloz, titanyum dioksit (E171), polietilen glikol / makrogol, sarı demir oksit (E172)] eklenerek hazırlanmıştır. Sentetik preparat; plaseboya 200.0 mg FAV ilave edilerek toplam hacim 100.0 mL olacak şekilde su ile çözülerek hazırlanmıştır.

3.3. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi

3.3.1. HPLC

HPLC Deneyinin Yapılışı ve Kromatografik Koşulların Saptanması

Yeşilleştirilmiş kromatografik koşulların optimize edilmesi için, hareketli fazda bulunan organik çözücü oranı, pH değeri, akış hızı ve enjeksiyon hacmi gibi faktörlerin FAV'ın ters-faz sıvı kromatografisiyle ayrılmasına olan etkileri araştırılmıştır. UV dedektörde hem etkin madde hem de iç standardın birlikte aynı kromatogramda cevap verdikleri, en uygun pik yüksekliklerinin gözlemlendiği dalga boyu çalışma dalga boyu olarak seçilmiştir. FAV'ın yeşil kromatografik analizleri Zorbax C8 (150 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) analitik kolon yardımıyla, oda sıcaklığında (22-25°C) gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz bileşimi olarak etanol/fosfat tamponundan (30 mM,

pH: 4.2 NaH₂PO₄) 3:97 oranında kullanılarak ayırım sağlanmıştır. Tüm deneyler boyunca analizler öncesinde HPLC sisteminden 20 dk (akış hızı: 1 mL.dk⁻¹) HPLC kalitesinde su geçirilmiştir. Daha sonra, 20 dk hareketli faz geçirilerek kolon ve dedektörün dengelendiği; böylece kromatogramlarda gözlenen gürültünün en aza indiği ve sabit kaldığı bir zemine ulaşıncaya analizlere başlanmıştır.

Hareketli fazdaki etanol miktarının saptanması için % 1, % 2, % 3, % 4 ve % 5 oranları, fosfat içeriğinin belirlenmesi için 20, 30 ve 40 mM derişimleri denenmiştir. Ayrıca hareketli faz pH'sının taranması için 4.0, 4.2 ve 4.6 pH değerlerinde hazırlanmış hareketli fazlar kullanılmış olup; optimum akış hızının belirlenmesinde 0.8, 1.0 ve 1.2 mL.dk⁻¹ akış hızları test edilmiştir. Optimizasyon parametrelerine ait tüm noktalar kromatografik parametrelere ve kabul kriterlerine göre test edilerek optimum kromatografik parametreler tespit edilmiştir.

3.3.2. Yöntemin Validasyonu Çalışmaları

Yöntem validasyonu için doğrusallık, özgünlük, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, tutarlılık, kararlılık ve geri kazanım parametreleri incelenmiştir (67, 69-71) ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (72).

Kararlılık

Stok çözeltilerin kararlılığını test etmek için kararlılığın her koşulu için 10.0 µg.mL⁻¹ FAV ve IS derişine sahip 3 farklı çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra test edilen her zaman dilimi ve koşulda elde edilen değerler % kalan miktar cinsinden hesaplanıp kararlılık sonuçları değerlendirilmiştir. Buzdolabında (+4 °C) tutulan FAV stok çözeltilerinin 2 aylık (uzun dönem) kararlılık çalışması için sürenin sonunda çözeltilerin analizi yapılarak taze hazırlanmış çözelti sonuçları ile kıyaslanmıştır. FAV çözeltilerinin kısa dönem kararlılık testi için, 48 saat oda sıcaklığında (karanlık, aydınlıkta) ve buzdolabında (+4 °C) saklanan aynı derişimdeki (n=3) standart çözeltilerin analizi yapılmıştır. Tüm çözeltilerden elde edilen alan değerleri ile taze hazırlanmış çözeltilerden elde edilen veriler % kalan miktar hesaplanarak ve çözeltilerin kısa ve uzun dönem kararlılıkları tespit edilmiştir.

FAV stok çözeltilerinin ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) kısa dönem kararlılığının saptaması için çözeltiler, aydınlık, karanlık ve $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 8, 24 ve 48 saat bekletilmiştir. Uzun dönem kararlılık testi ise buzdolabında $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2 ay bekletilerek yapılmıştır. Belirtilen saklama koşullarında bekletilen stok çözeltilerden hazırlanan $10.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ derişimindeki FAV çalışma standartları analiz edilmiştir ($n = 3$).

Özgünlük (Seçicilik)

Analit cevabının numunedeki diğer bileşenler varlığında analiz edilebilmesinin ölçütü olan özgünlük parametresinin incelenebilmesi için, hareketli faz, plasebo, standart ve numune (farmasötik preparat) analizlerine ait kromatogramlar karşılaştırılmıştır. FAV'ın farmasötik preparat içindeki yardımcı maddeler ile girişim yapıp yapmadığı araştırılmıştır. Ayrıca özgünlüğünü göstermek amacıyla numune çözeltilisine standart ekleme çalışması da yapılmıştır. Numune kromatogramında elde edilen piklerin pik saflık indeks verileri de piklerin saflıkları kontrol edilmiştir.

Doğrusallık ve Aralık

Miktar tayini için kullanılacak doğrusallık aralığının belirlenmesi amacıyla FAV için $1.0 - 100.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim aralığı test edilmiştir. Doğrusallık aralığı 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 ve $100.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim düzeylerindeki hazırlanıp ölçülen kalibrasyon çözeltileri ile belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrileri FAV derişimine karşı FAV pik alanı/IS pik alanı oranının grafikte geçirilmesiyle oluşturulmuş ve oluşturulan kalibrasyon doğrunun doğrusallıktan ayrılışı istatistiksel olarak incelenmiştir.

Doğruluk

Gün içi, günler arası ve geri kazanım çalışmaları ile geliştirilen kromatografik yöntemin doğruluk çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Gün içi ve günler arası doğruluk çalışmalarında, aynı gün içinde FAV'ın düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı derişimde ($2.00, 20.0, 40.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) 6 tekrarlı olarak hazırlanan çözeltilerin analizlerinden elde edilen cevapların bağıl hata (BH) değerleri hesaplanmıştır.

Geri kazanım çalışması için hazırlanan sentetik preparat çözeltilerinin (n=6) tekrarlı analizleri ile elde edilen veriler değerlendirilmiş ve sonuçlar eklenen miktara karşılık yüzde geri kazanılan miktar olarak ifade edilmiştir.

Kesinlik

Analizler sonucunda elde edilen verilerin birbirine yakınlığını olarak ifade edilen kesinlik parametresi, kromatografik sayısal verilerin veya hesaplanan miktar değerlerinin bağıl standart sapma (BSS) ile açıklanmaktadır. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları, FAV'ın düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı derişimdeki (2.0, 20.0, 40.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 6 bağımsız çözeltilerden elde edilen cevapların BSS değerlerinin hesaplanması ile yapılmıştır.

Tekrarlanabilirlik

Yöntemin tekrarlanabilirlik çalışmalarında; doğrusallık aralığına giren 20.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FAV içeren 10 ayrı çözeltili hazırlanarak aynı gün içinde analizleri yapılmıştır.

FAV'ın analizinde enjeksiyon (cihaz) tekrarlanabilirliği için ise, 20.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FAV içeren bir çözeltilinin aynı vialden 10 kez tekrarlanan enjeksiyonu ile yapılmıştır. Yöntem ve cihaz tekrarlanabilirliği verileri elde edilen pik alanlarının BSS değerleri ile sunulmaktadır.

Gözlenebilme Sınırı ve Alt Tayin Sınırı

Analiz yönteminin FAV'ı kılavuzlara uygun olarak yeterli duyarlılıkta analiz edebilirliği gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) ile sunulmuştur. LOD, sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğunda gözlemlenebilen FAV derişimi, LOQ ise, (S/G) oranının 10 olduğunda tayin edilebilen FAV derişimi olarak alınmıştır (67).

LOD hesaplanmasında Eşitlik 3.1 kullanılmıştır.

$$\text{LOD} = 3.3 (\text{SS/S}) \quad (3.1)$$

SS: Oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin y-kestiriminin standart sapması,

S: Oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin ortalamasıdır.

LOQ hesaplanmasında Eşitlik 3.2 kullanılmıştır.

$$LOQ = 10 (SS/S) \quad (3.2)$$

SS: Oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin y-kestiriminin standart sapması,

S: Oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin ortalamasıdır.

Sağlamlık ve Tutarlılık

Geliştirilen HPLC yönteminin küçük ve kasti değişikliklerden etkilenme kapasitesinin sınanmasına sağlamlık testi adı verilir. $30.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ derişiminde hazırlanan FAV çözeltilerinin geliştirilen yöntem parametrelerinde yapılan küçük ve kasti değişiklikler varlığında yapılan analizleri, optimize edilen şartlarda yapılan analiz sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Bunun için; etanol oranı, tampon derişimi ve pH'sı, dalga boyu, akış hızı ve kolon sıcaklığı parametrelerdeki küçük derişimlerin sonucu ne kadar etkilediği incelenmiştir.

Tutarlılık ise kesinlik başlığı altında ara kesinlik olarak da ifade edilebilen bir terim olup farklı cihaz ve/veya analizci derişiminin analiz sonuçları üzerine etkisini araştırmaktadır. Bu çalışmasında; analizci A ve analizci B olmak üzere iki farklı analizcinin etkisi, $30.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ derişimde FAV standart çözeltilerinin (n=6) ayrı ayrı analiz edilip istatistiksel karşılaştırmaları yapılarak değerlendirilmiştir.

Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen yöntem 200.0 mg FAV içeren Türkiye piyasasında satılan Favimol® tablet preparatlarına uygulanmıştır. Farmasötik preparatların analize hazırlanması kısmında (Bkz. 3.2.3.) anlatıldığı gibi hazırlanan FAV içeren farmasötik preparata ait 6 farklı çözeltili geliştirilen yöntem ile analiz edilmiş ve sonuçlar ortalama, standart sapma (SS), BSS ve güven aralıkları ile verilmiştir.

Sistem Uygunluk Testi

Geliştirilen yöntemin ilgili analitin analizi için uygun kromatografik parametreleri üretebildiğinin testi olan sistem uygunluk testi için USP'deki kriterler

temel alınmıştır (73). USP’de belirtilen (Tablo 3.1.) enjeksiyon kesinliği, k' , R_s , N ve PAO’ya göre değerlendirilmektedir. Test için aynı standart çözeltinin 6 tekrarlı enjeksiyonu sonucunda elde edilen veriler kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Sistem uygunluk test kriterleri (73).

Test edilen parametre	Sınır değeri
Enjeksiyon kesinliği	$BSS < \% 1, n > 5$
Kapasite faktörü	$k' > 2$
Ayırıcılık	$R_s \geq 1.5$
Pik asimetri oranı	≤ 1.5
Teorik tabaka sayısı	$N \geq 2000$

(BSS: Bağıl standart sapma, k' : Kapasite faktörü, R_s : Ayırıcılık, N : Teorik tabaka sayısı, n : Enjeksiyon sayısı)

4. BULGULAR

4.1. HPLC Sisteminin Optimizasyonu

FAV'ı HPLC kullanarak analiz etmek için en uygun kromatografik şartları saptamak amacıyla, farklı değişkenlerin ayırma işlemi üzerindeki etkisini değerlendirmek için bir araştırma yürütülmüştür. Bu değişkenler arasında hareketli fazın türü ve miktarı, akış hızı, enjeksiyon hacmi, tampon derişimi ve kolon sıcaklığı yer almaktadır.

4.1.1. Sabit Faz

FAV'ın analizi için C18 Inertsil ODS (150 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Inertsil HILIC, Chromolith Performance RP-18e 100-3 mm ve ACE Excel 3 C18 kolonları denenmiş fakat uygun alıkonma değerleri elde edilememiştir. Bu çalışmada FAV'ın kromatografik ayırımı için Zorbax C8 (150 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) analitik kolon denenmiş ve deneylerin geri kalanı için sabit faz olarak seçilmiştir.

4.1.2. Hareketli Fazın Belirlenmesi

Hareketli faz bileşimini belirlemek için, organik çözücünün türü, oranı ve akış hızı gibi çeşitli faktörlerin FAV'ın kromatografik ayırımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

FAV'ın Ayırımına Organik Çözücü Türü ve Derişiminin Etkisi

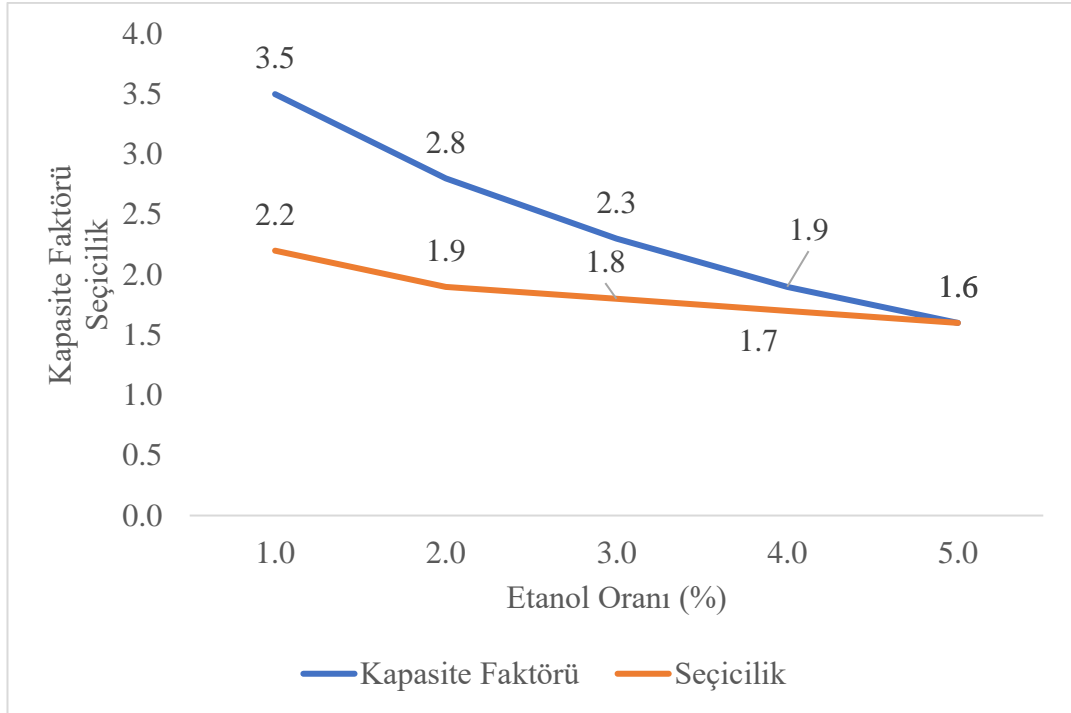
FAV'ın analizi için uygun optimum koşulların bulunması amacıyla, organik çözücü miktarının belirlenmesi için yeşil çözücülerden olan etanol; hacimce % 1, % 2, % 3, % 4 ve % 5 oranında, hareketli faza eklenmiştir (Şekil 4.1., Şekil 4.2. ve Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Organik çözücü miktarının FAV kromatografik parametreleri üzerine etkisi.

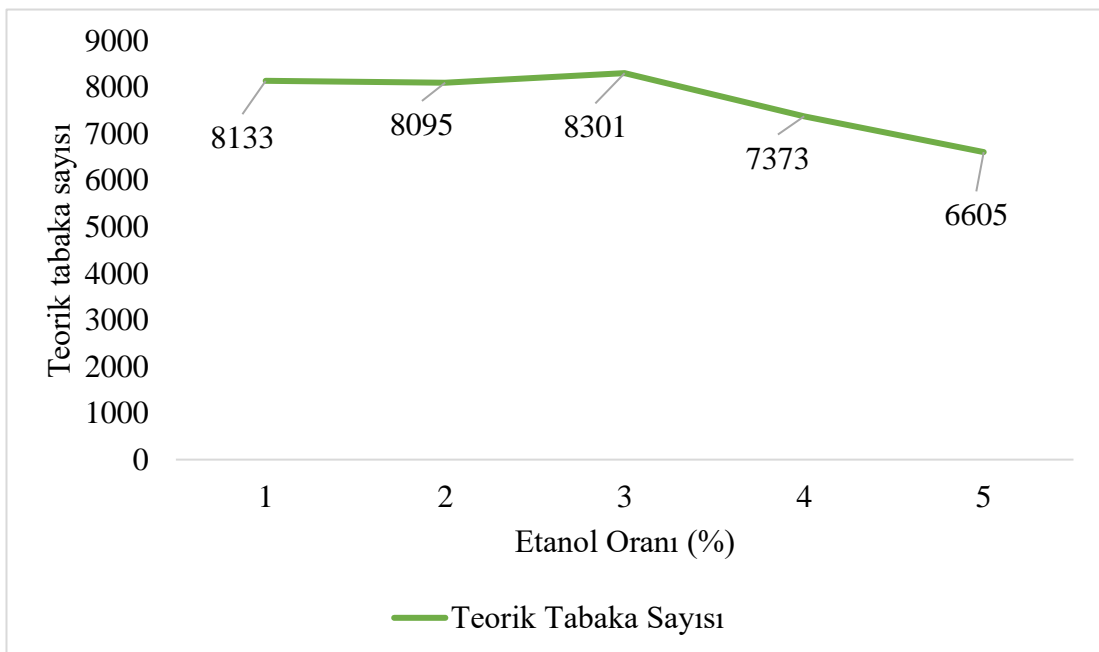
	FAV				IS				FAV-IS	
	t (dk)	k'	PAO	N	t (dk)	k'	PAO	N	α	R _s
Etanol (%)										
1	6.6	3.5	1.3	8133	12.9	7.8	1.0	1011	2.2	13.7
2	5.5	2.8	1.3	8095	9.0	5.2	1.0	9728	1.9	10.7
3	4.9	2.3	1.2	8301	7.5	4.2	1.1	9685	1.8	9.5
4	4.3	1.9	1.2	7373	6.3	3.3	1.1	8522	1.7	8.1
5	3.8	1.6	1.2	6605	5.4	2.7	1.1	7738	1.7	6.8

(Etanol: Etanol, t: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, α : Seçicilik, R_s: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAO: Pik Asimetri Oranı, t₀= 1.46 dk)

Etanolün % 1-5 arasında değişen oranları için k', α ve N'nin kriterlere uygunluğu temelinde en iyi sonuçların elde edildiği şart tespit edilmeye çalışılmıştır (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.). α ve k' açısından analiz süresinin fazla uzamaması göz önünde bulundurularak α ve k' en uygun olduğu % 3 değeri seçilmiştir.



Şekil 4.1. Etanol oranı ile k' ve α değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH_2PO_4 , pH: 4.2, Akış hızı: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$, Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30°C , Dedektör: UV 290 nm).



Şekil 4.2. Etanol oranı ile N 'nin değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH_2PO_4 , pH: 4.2, Akış hızı: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$, Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30°C , Dedektör: UV 290 nm).

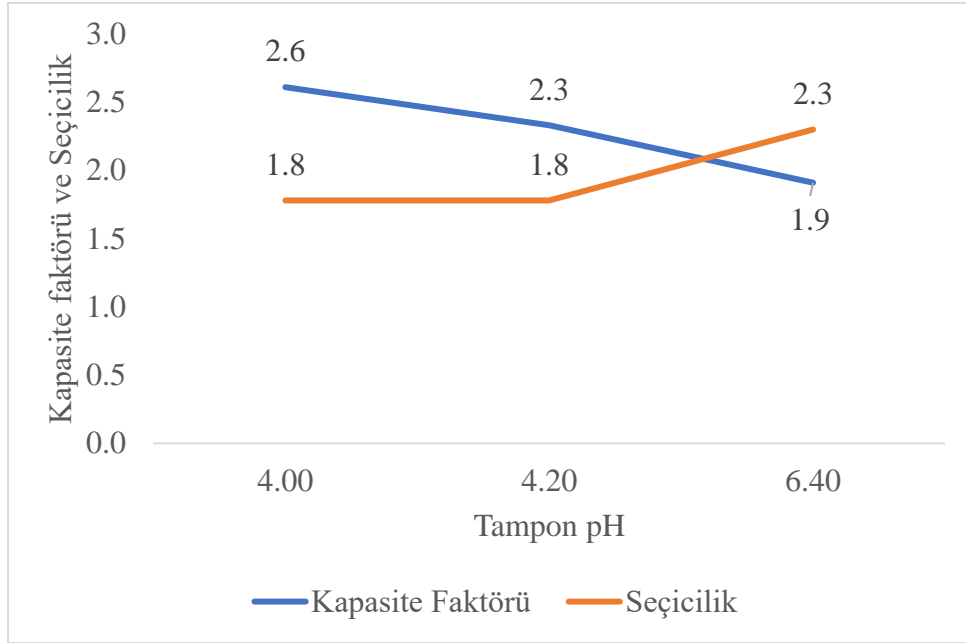
Hareketli Faz pH' sının Belirlenmesi

FAV'ın farmasötik preparatlardan analizinde kullanılacak hareketli fazın pH değerinin kromatografik parametrelerine etkilerinin incelenmesi amacıyla etanol:30 mM NaH₂PO₄ tamponu (3:97, h/h), akış hızı 1.0 mL.dk⁻¹ sabit tutularak gerçekleştirilmiştir. En uygun pH değerinin belirlenebilmesi için hareketli fazın pH değeri sırasıyla 4.0, 4.2 ve 4.6 olarak ayarlanmış ve kromatografik parametreler hesaplanmıştır (Tablo 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.). Artan pH değerleri ile alıkonma zamanları, dolayısıyla kapasite faktörleri azalmıştır. PAO'ları pH değeri ile önce azalıp sonra artmaktayken; α ve R_s değerlerinde artış gerçekleşmiştir. Denenen farklı pH değerleri arasından, PAO'nun düşüklüğü ve N'nin yüksekliği sebebiyle pH 4.2 hareketli faz pH'sı olarak seçilmiştir.

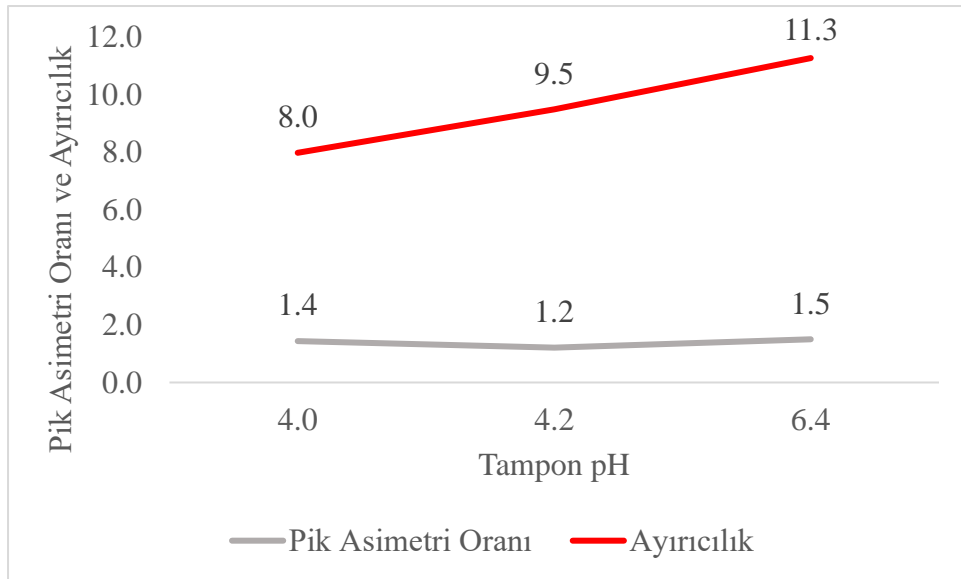
Tablo 4.2. Hareketli fazdaki tampon pH'sının kromatografik parametrelere etkisi.

Tampon pH	FAV				IS				FAV-IS	
	t (dk)	k'	PAO	N	t (dk)	k'	PAO	N	α	R _s
4.0	5.3	2.6	1.4	7596	8.2	4.6	1.2	8600	1.8	8.0
4.2	4.9	2.3	1.2	8301	7.5	4.2	1.1	9685	1.8	9.5
4.6	4.3	1.9	1.5	6287	7.9	4.4	1.3	9048	2.3	11.3

(t: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, α : Seçicilik, R_s: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAO: Pik Asimetri Oranı, t₀= 1.46 dk)



Şekil 4.3. Hareketli faz pH'sı ile k' ve α değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH₂PO₄, Akış hızı: 1.0 mL.dk⁻¹, Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30°C, Dedektör: UV 290 nm).



Şekil 4.4. Hareketli faz pH'sı ile PAO ve R_s 'nin değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH₂PO₄, Akış hızı: 1.0 mL.dk⁻¹, Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30°C, Dedektör: UV 290 nm).

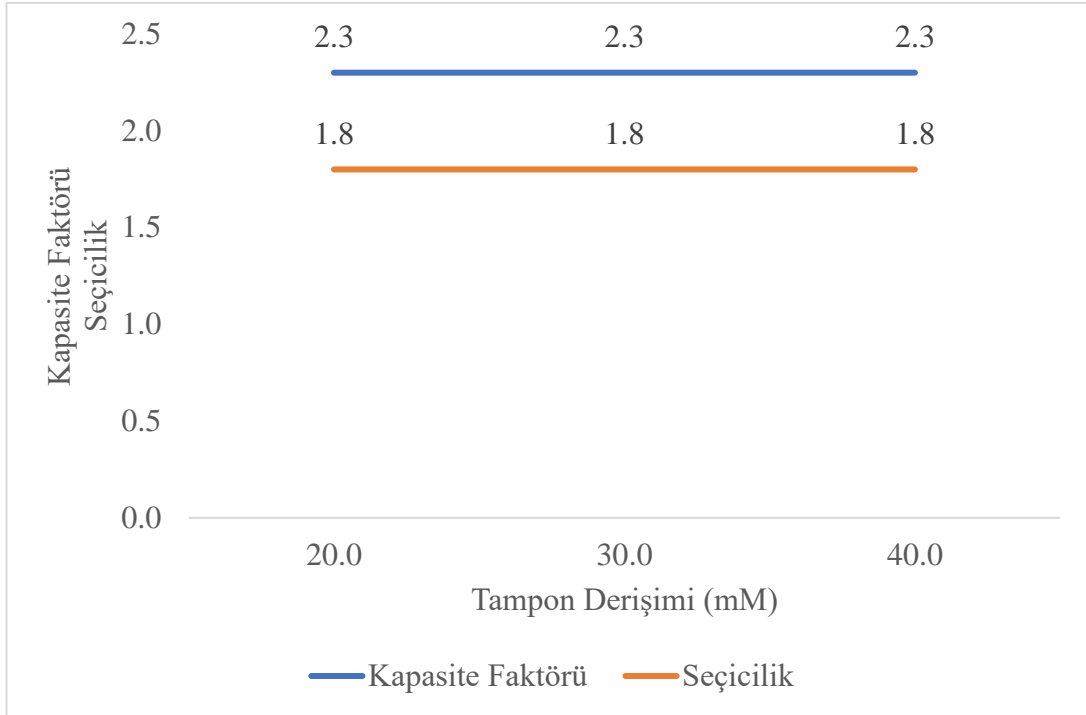
Hareketli Faz Tampon Derişiminin Belirlenmesi

Fosfat tamponu derişiminin FAV analizine etkilerinin araştırılması için pH'sı 4.2 olan, etanol: 20, 30 ve 40 mM derişimlerindeki NaH_2PO_4 tamponları (3:97, h/h) $1.0 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ akış hızında kullanılmıştır. Artan tampon derişimi ile k' artıp sabit kalırken ve PAO sabit kalmış, k' , α 'nın azaldığı saptanmıştır (Tablo 4.3., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.). FAV için, k' , N ve R_s en yüksek olan 30 mM tampon derişimi seçilmiştir.

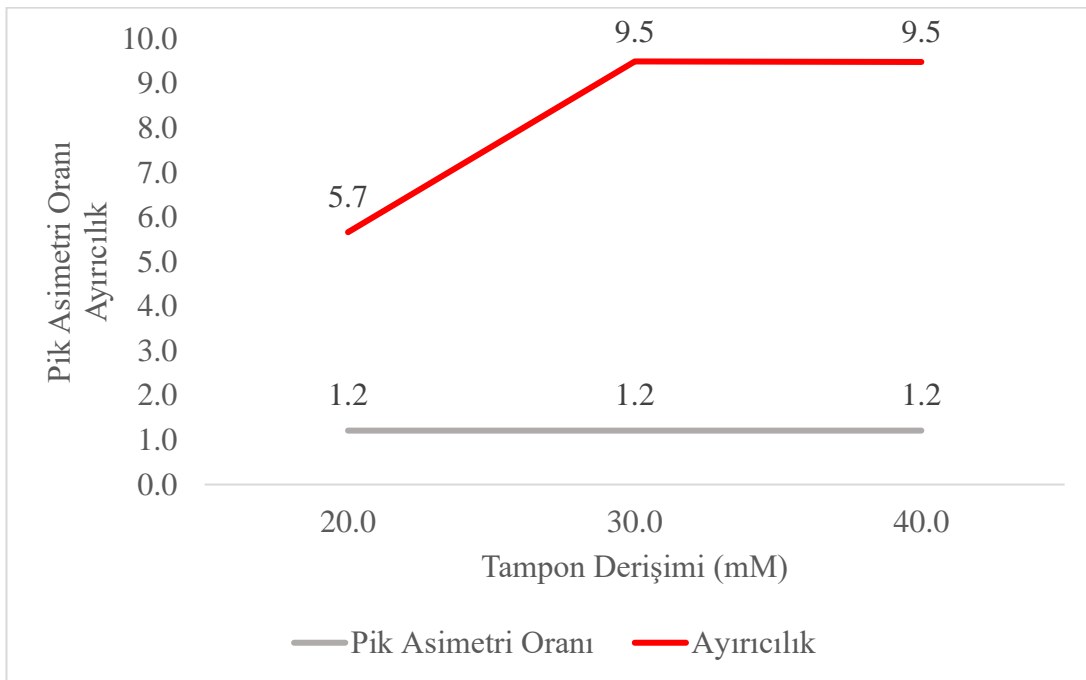
Tablo 4.3. Hareketli fazdaki tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi.

Tampon Derişimi	FAV				IS				FAV-IS	
	t (dk)	k'	PAO	N	t (dk)	k'	PAO	N	α	R_s
20	4.8	2.3	1.2	8222	7.6	4.2	1.1	9677	1.8	5.7
30	4.9	2.3	1.2	8301	7.5	4.2	1.1	9685	1.8	9.5
40	4.9	2.3	1.2	8272	7.5	4.1	1.0	9886	1.8	9.5

(t: Alınma zamanı, k' : Kapasite faktörü, α : Seçicilik, R_s : Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAO: Pik Asimetri Oranı, $t_0= 1.46 \text{ dk}$)



Şekil 4.5. Hareketli faz tampon derişimi ile k' ve α 'nın değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH₂PO₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk⁻¹, Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).



Şekil 4.6. Hareketli faz tampon derişimi ile PAO ve R_s 'nin değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH₂PO₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk⁻¹, Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).

Hareketli Faz Akış Hızının Belirlenmesi

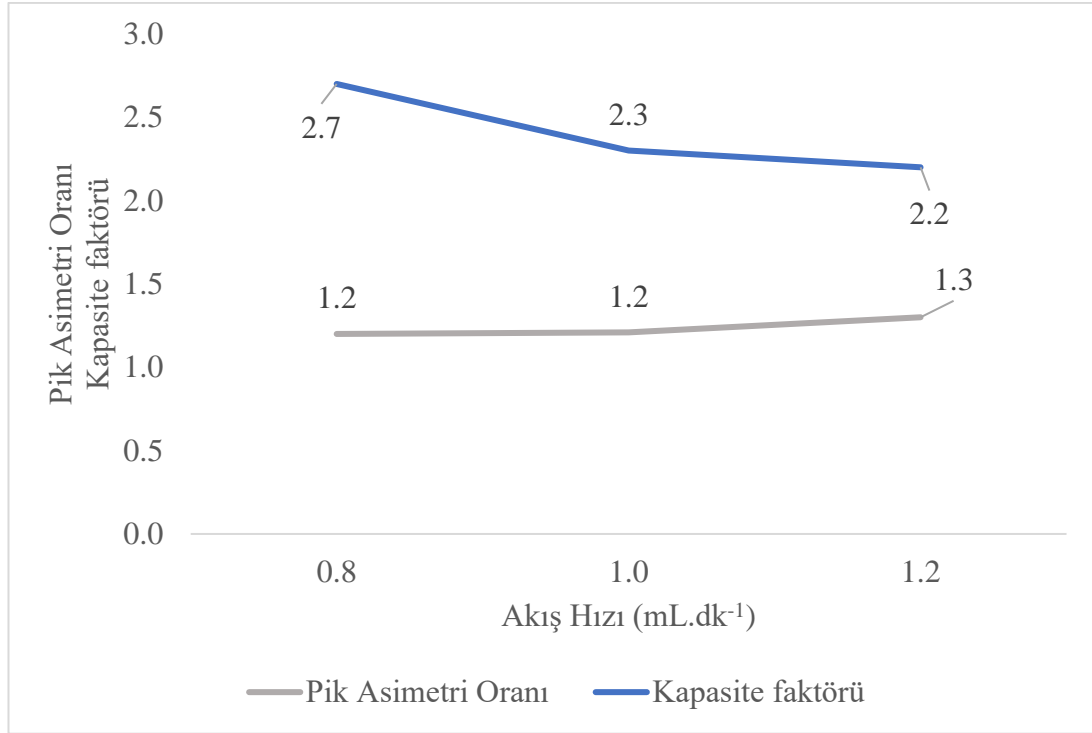
Hareketli faz akış hızının FAV'ın t_R ve pik şekline olan etkisini araştırmak için, 3:97 (v/v) oranında etanol ve 30 mM NaH_2PO_4 tampon karışımından oluşan, pH değeri 4.2 olan bir hareketli faz kullanılmıştır. Hareketli fazın kolondan 0.8, 1.0 ve 1.2 mL.dk⁻¹ akış hızlarında geçirilmesiyle, FAV'ın ayırma verimliliğini araştırmak için akış hızı değişiminin kromatografik parametreler üzerindeki etkisi incelenmiştir.

PAO'nun, k' , N'nin ve R_s 'nin en uygun olduğu değer göz önüne alınarak akış hızı 1.0 mL dk.⁻¹ olduğunda ulaşılmıştır (Tablo 4.4., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.). Bu verilerin ışığı altında hareketli faz akış hızı 1.0 mL dk.⁻¹ olarak seçilmiştir.

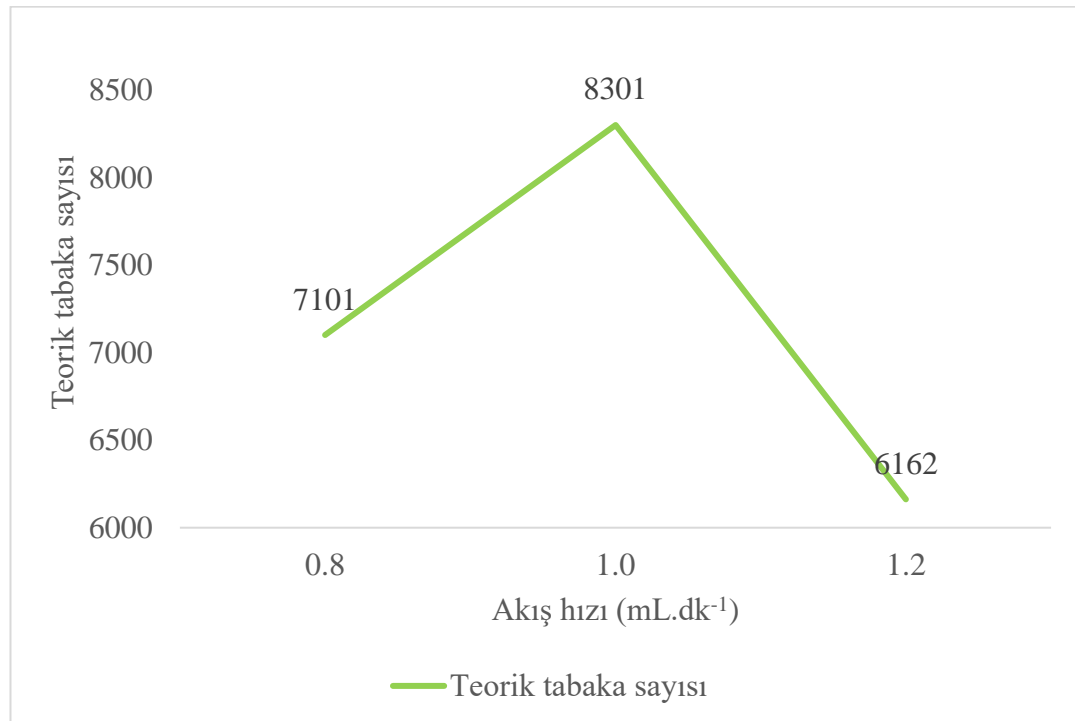
Tablo 4.4. Akış hızı değişikliğinin FAV kromatografik parametrelerine etkisi.

Akış hızı (mL.dk ⁻¹)	FAV				IS				FAV-IS	
	t (dk)	k'	PAO	N	t (dk)	k'	PAO	N	α	R_s
0.8	5.4	2.7	1.2	7101	8.8	5.0	1.2	8122	1.9	10.4
1.0	4.9	2.3	1.2	8301	7.5	4.2	1.1	9685	1.8	9.5
1.2	4.7	2.2	1.3	6162	7.2	3.9	1.1	8169	1.8	7.6

(t: Alınma zamanı, k' : Kapasite faktörü, α : Seçicilik, R_s : Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAO: Pik Asimetri Oranı, t_0 = 1.46 dk)



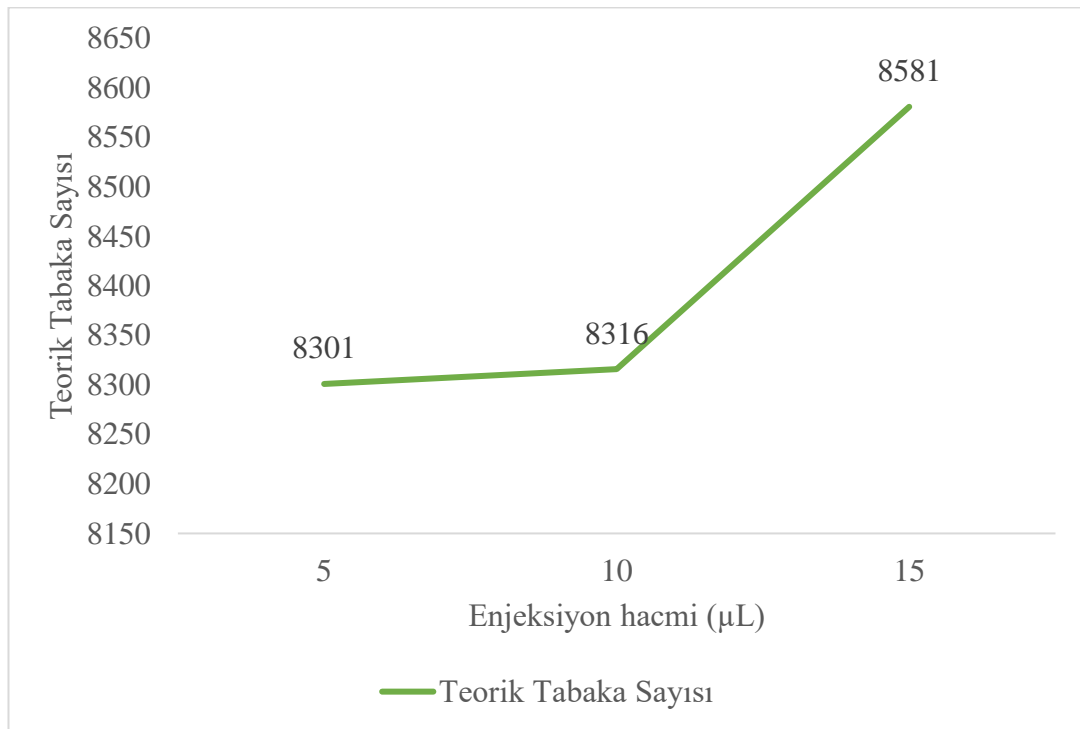
Şekil 4.7. Hareketli faz akış hızı ile PAO ve k' değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH₂PO₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).



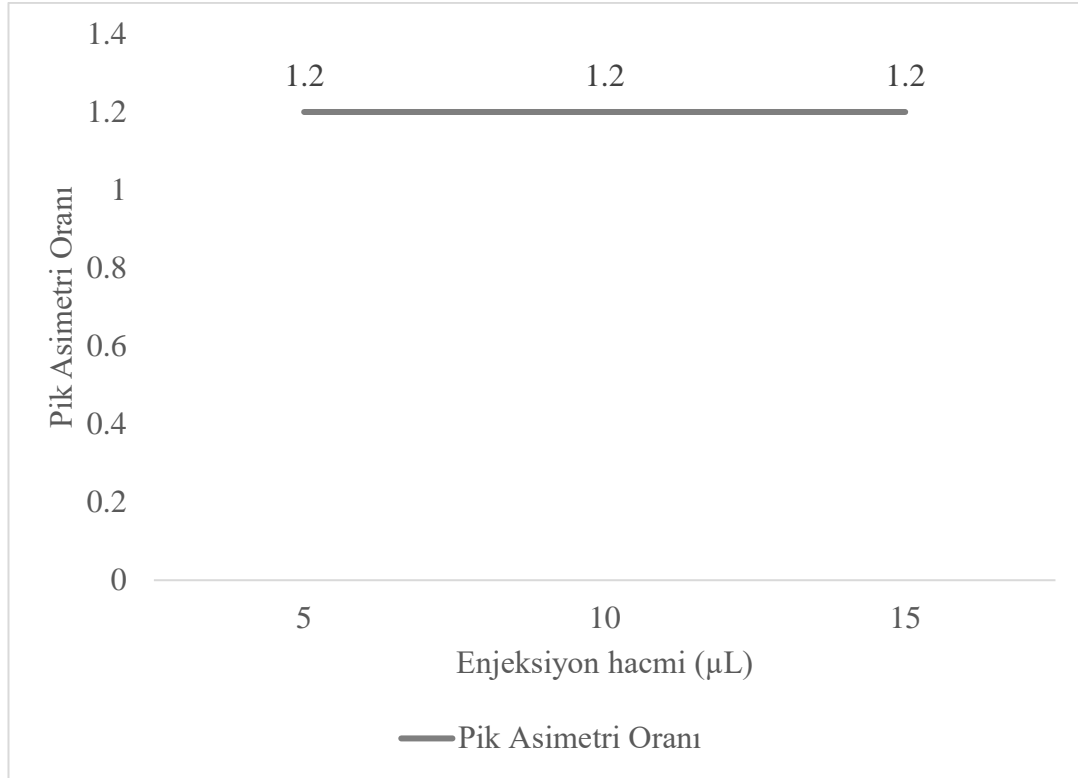
Şekil 4.8. Hareketli faz akış hızı ile N 'nin değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH₂PO₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).

Enjeksiyon Hacminin Belirlenmesi

Enjeksiyon hacminin FAV analizini nasıl etkilediğini incelemek için standart FAV enjeksiyonları, 3:97 (h/h) oranında etanol ve 30 mM NaH₂PO₄ tampon karışımı içeren bir hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1.0 mL.dk⁻¹ olarak sabit tutulmuş ve parametrelere göre 5 µL ve 10 µL hacimler arasında uç farklılıklar olmamasından ötürü yeşil kimya çerçevesinde daha az örnekle çalışılması açısından enjeksiyon hacmi 5 µL seçilmiştir (Şekil 4.9. ve Şekil 4.10).



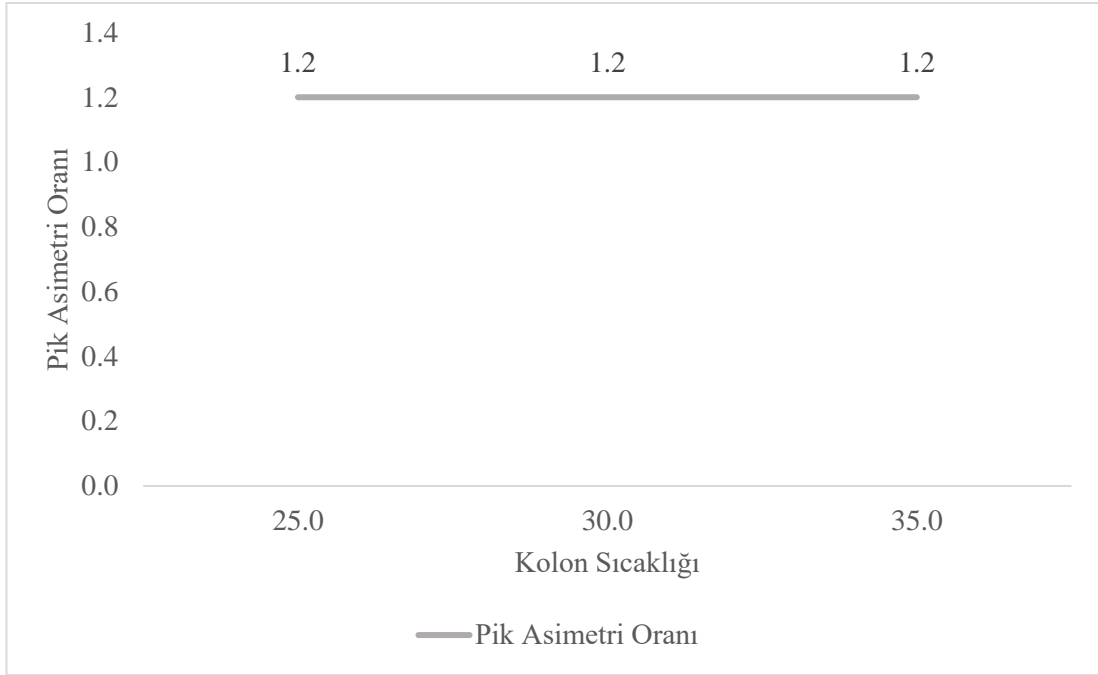
Şekil 4.9. Enjeksiyon hacmi ile N'nin değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH₂PO₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk⁻¹, Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).



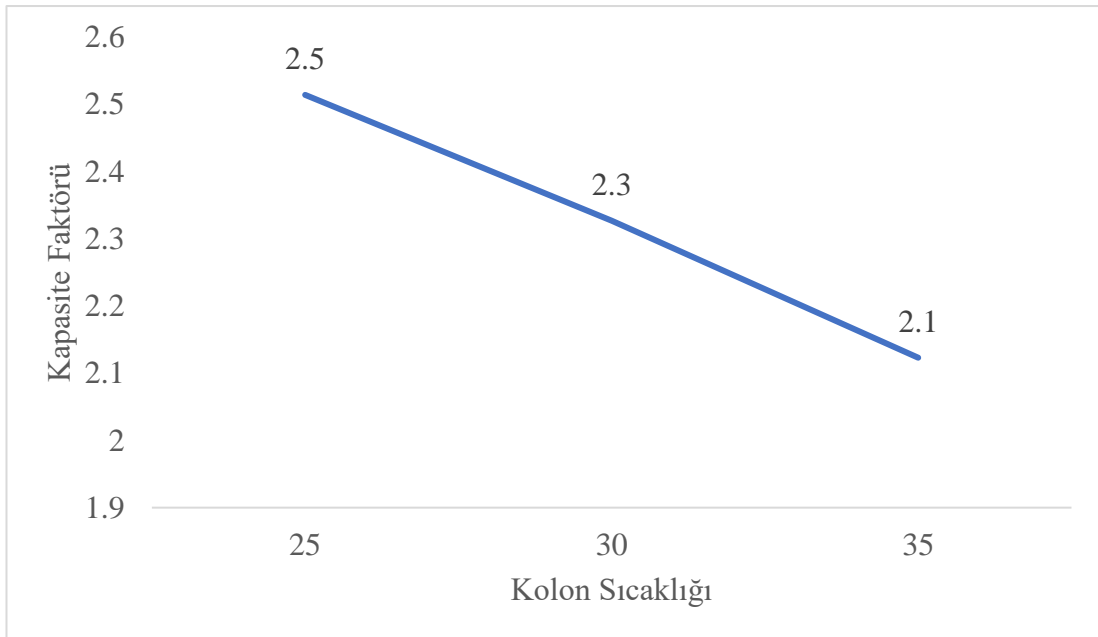
Şekil 4.10. Enjeksiyon hacmi ile PAO'nun değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH₂PO₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk⁻¹, Kolon C8 Zorbax, Kolon sıcaklığı: 30 °C, Dedektör: UV 290 nm).

Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

Kolon sıcaklığının FAV'ın analizi üzerindeki etkisi, kolon sıcaklığı 25°C, 30°C ve 35°C'ye ayarlanarak araştırılmıştır ve HPLC kullanılarak FAV analizi için optimal kromatografik koşullar belirlenmiştir (Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.). Analiz için seçilen hareketli faz etanol ve 30 mM NaH₂PO₄ tamponunun (pH 4.2) 3:97 (h/h) oranında karıştırılmış, akış hızı 1.0 mL.dk⁻¹ olarak ayarlanmış ve kolon sıcaklığı değiştirilerek pik üzerindeki etkisi test edilmiştir. UV dedektörü, en yüksek pik alanına sahip dalga boyuna karşılık gelen 290 nm'de absorbansı ölçmek üzere ayarlanmıştır. Bu koşullar altında FAV'ın alıkonma zamanı 5.1 dakika olarak bulunmuştur.



Şekil 4.11. Kolon sıcaklığı ile PAO'nun değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH₂PO₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk⁻¹, Kolon C8 Zorbax, Dedektör: UV 290 nm).



Şekil 4.12. Kolon sıcaklığı ile k'nün değişimi (Kromatografik koşullar: Etanol : 30 mM NaH₂PO₄ (3:97, h/h), pH: 4.2, Akış hızı: 1.0 mL.dk⁻¹, Kolon C8 Zorbax, Dedektör: UV 290 nm).

İç Standart Seçimi

HPLC yöntemi kullanılarak FAV'ın eş zamanlı analizi için iç standart (IS) olarak parasetamol (PAR) seçilmiştir. Bu analiz için seçilen hareketli faz; etanol ve 30 mM NaH₂PO₄ tamponunun (pH 4.2) 3:97 (v/v) oranında karışımı içermektedir. Hareketli fazın akış hızı 1.0 mL.dk⁻¹ olarak ayarlanmıştır. FAV ve IS pikleri belirtilen kromatografik koşullar altında UV dedektörü kullanılarak 290 nm'ye ayarlanmış ve FAV ve IS'nin alıkonma süreleri sırasıyla 5.1 ve 8.2 dakika olarak bulunmuştur.

4.2. Farmasötik Preparattan Favipiravirin Analiz Yönteminin Validasyonu

Bu aşamadan itibaren FAV etken maddesinin PAR iç standardı varlığında ICH (67) standartlarında yer alan validasyon deneylerine başlanmıştır.

4.2.1. Sistem Uygunluk

FAV analiz yönteminin sistem uygunluk testi için elde edilen veriler USP tanımlamaları esasında hesaplanarak verilmiştir (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. 6 Tabletten FAV analizi için sistem uygunluğa ait test bulguları.

Test edilen parametre	FAV	IS
Enjeksiyon kesinliği (n=6)	0.10	0.34
k'	2.36	4.60
R _s	9.38	
PAO	1.26	1.16
N	8170	9230

4.2.2. Analit Çözeltilerinin Kararlılığı

FAV'ın çözelti kararlılığının belirlenmesi için Bölüm 3.3.2.'de verilen koşullarda bekletilen FAV çözeltisinin HPLC ile analizi yapılmış ve bulunan sonuçlar aynı derişimdeki yeni hazırlanmış çözelti sonuçları ile karşılaştırılmıştır. FAV standart

çözeltisinin ($20.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) oda sıcaklığında, aydınlıkta en az 8 saat, karanlıkta en az 24 saat kararlı olduğu tespit edilirken $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de en az 48 saat kararlı olduğu bulunmuştur. Uzun dönem stabilite çalışmasında ise $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de en az 2 ay kararlı bir şekilde saklanabildiği ve anlamlı bir bozunma olmadığı saptanmıştır ($p < 0.05$, Tablo 4.6.)

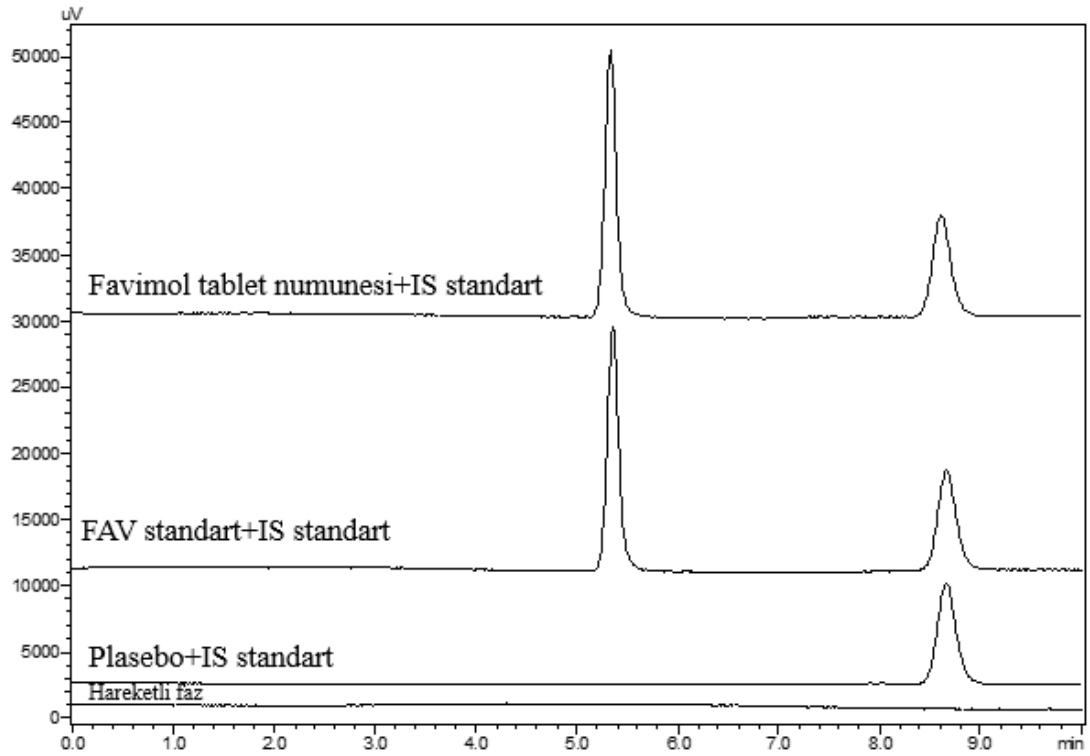
Tablo 4.6. FAV çözeltisinin kararlılıkları.

Süre (saat)	Aydınlık	Karanlık	Buzdolabı ($+4 \text{ }^\circ\text{C}$)	Süre (ay)	Uzun dönem ($+4 \text{ }^\circ\text{C}$)
	% Kalan	% Kalan	% Kalan		% Kalan
0	100.0	100.0	100.0	0	100.0
8	98.9	98.9	100.2	2	98.9
24	97.9	98.6	101.1		
48	97.8	97.6	101.1		

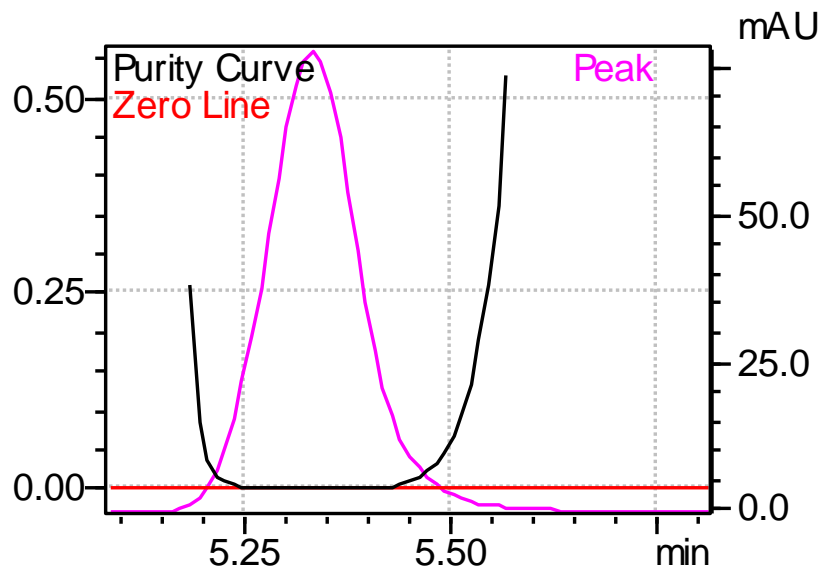
Sonuçlar Friedman iki yönlü varyans analizine göre ($p < 0.05$) test edilmiştir. Bkz. Ek 5.

4.2.3. Özgünlük

Yöntemin özgünlüğü; FAV standartı, plasebo, $10.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ FAV eklenmiş sentetik preparat ve tablet numunelerine ait çözeltilerin optimize yöntemle analizinden elde edilen kromatogramlar veya spektrumlar karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Amaç, FAV'ın farmasötik preparatta bulunan ekşiyanlarla herhangi bir etkileşiminin olup olmadığını belirlemektir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Hareketli faz, Plasebo+IS standart çözelti, FAV standart+IS standart çözelti ve Favimol tablet numunesi+IS standart çözeltilerine ait kromatogramlar (Kromatografik koşullar: Kolon C8 Zorbax (150×4.6 mm i.ç., $5 \mu\text{m}$) kolon, Etanol : 30 mM (pH 4.2) NaH_2PO_4 (3:97, h/h), Akış hızı: 1.0 mL.dk⁻¹, Dedektör: UV 290 nm.).

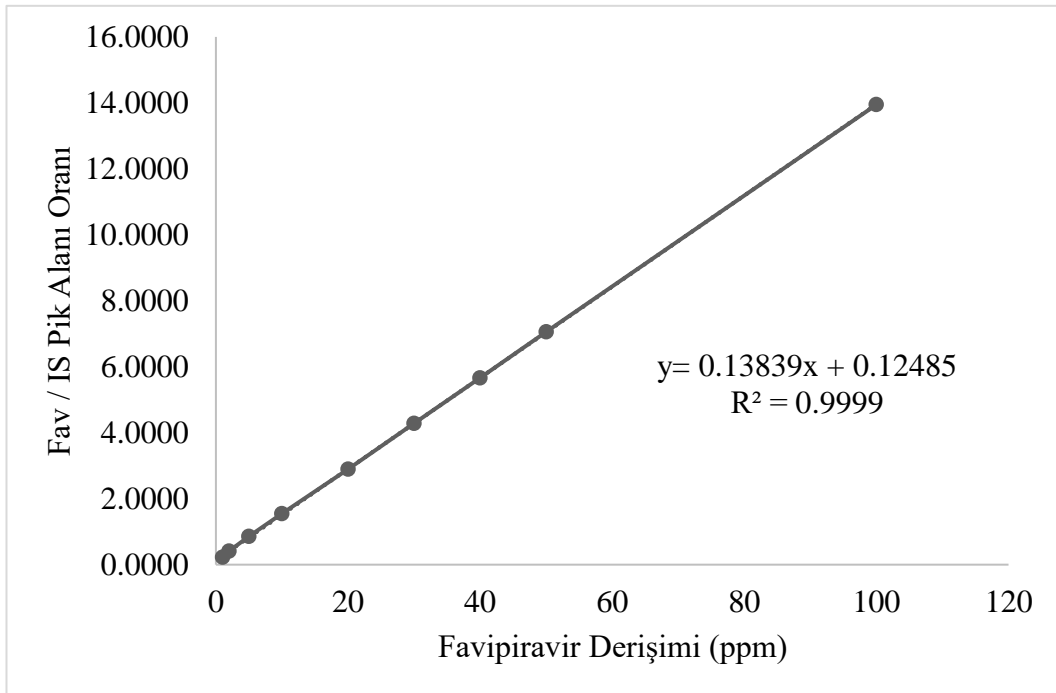


Şekil 4.14. FAV' a ait pik saflık bilgisi (Pik saflık indeksi: 1.0000).

Bulgulardan, HPLC yöntemi ile FAV'ın analizi için tablet preparatındaki cevaplarının herhangi bir matriks bileşeni, yan maddeler veya çözücü piklerinden etkilenmediği saptanmıştır.

4.2.4. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı

FAV derişimi, FAV pik alanlarının IS pik alanı oranına karşı grafiğe geçirilmesiyle FAV için 1.0-100.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında doğrusal kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir (Şekil 4.15. ve Tablo 4.7.).



Şekil 4.15. FAV'a ait kalibrasyon grafiği.

Tablo 4.7. FAV'ın analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ve doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü.

Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü						
n	r	S _r	t _H	t _T		
6	0.99994237	1.44071E-05	336025.2147	2.78		
t _H >t _T : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değer değildir (p<0.05).						
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F _H	F _T
79.856	79.703	-0.153	-0.038	79.856	-2087.32	7.709
F _H >F _T : Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır. (p<0.05)						

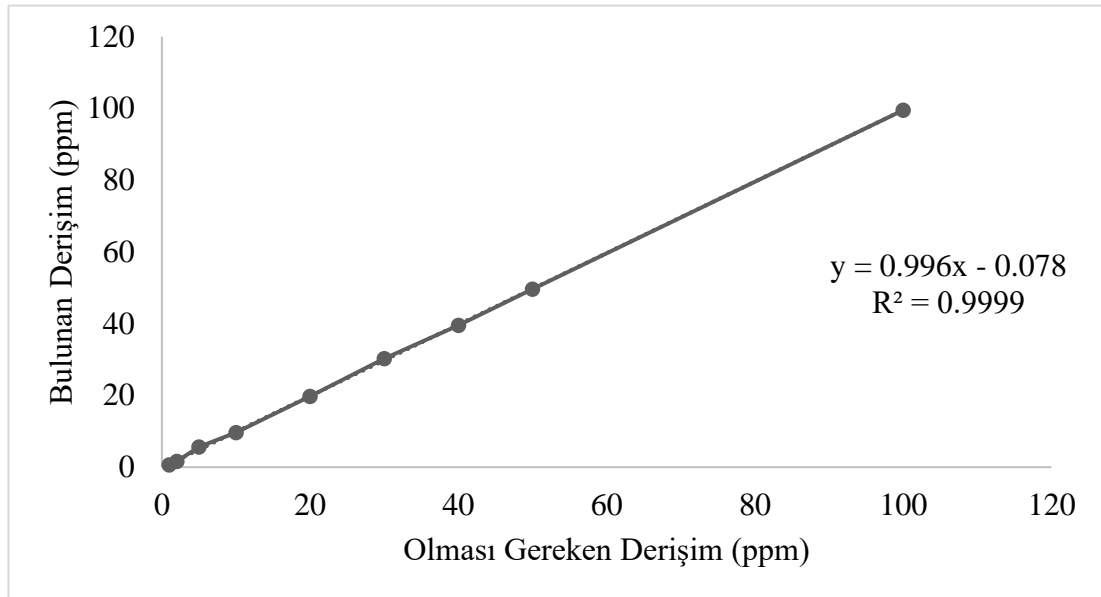
İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 1.

FAV için oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin özellikleri Tablo 4.8.'de verilmiştir.

Tablo 4.8. Tabletten FAV analizi için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin özellikleri.

Regresyon denklemi	*y= 0.13839x + 0.12485
Eğimin standart hatası	0.046059543
Kesişimin standart hatası	0.045939886
Korelasyon katsayısı (r)	0.9999
Tanımlayıcılık katsayısı (R ²)	0.9999
Doğrusallık aralığı	1.0-100 µg.mL ⁻¹
Gözlenebilme sınırı (µg.mL ⁻¹)	0.57 µg.mL ⁻¹
Tayin alt sınırı (µg.mL ⁻¹)	0.90 µg.mL ⁻¹

*y = ax + b; x: µg.mL⁻¹ biriminde derişim, y: Pik alan oranı, a: Eğim, b: Kesişim



Şekil 4.16. FAV'ın tabletten analizi için kalibrasyon eğrisinin doğrusallık kontrol grafiği.

Geliştirilen yöntemin matriks bileşenlerinden etkilenip etkilenmediğinin, dolayısıyla doğrudan kalibrasyon eğrisinin miktar tayini hesaplanmasında kullanıma uygun olduğu matriks etkisini inceleyen standart ekleme yöntemiyle test edilmiştir. Belirli miktarda numune üzerine standart eklenerek eklenen derişime karşı pik alan oranları grafiğe geçirilerek oluşturulan bu eğrinin denklemi ve regresyon katsayısı Tablo 4.9.'da verilmektedir.

Tablo 4.9. FAV'ın doğrudan kalibrasyon ve standart ekleme kalibrasyon denklemleri.

Favipiravir	Doğrudan Kalibrasyon Yöntemi	Standart Ekleme Yöntemi
Regresyon denklemi	$y = 0.13839x + 0.12485$	$y = 0.1403x + 1.3104$
Tanımlayıcılık Katsayısı (R^2)	0.9999	0.9992

4.2.5. Doğruluk ve Kesinlik

2.0, 20.0 ve 40.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olmak üzere 3 farklı derişimde 6 farklı seride hazırlanan FAV çözeltileri ile gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen veriler Tablo 4.10.'da verilmektedir. Buna göre doğruluk için % BH değerleri kesinlik için ise % BSS değerleri incelenmiştir.

Tablo 4.10. FAV analizine ait gün içi ve günler arası analiz sonuçları (n=6).

FAV miktarı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Günler Arası ¹		Gün İçi ²	
	Bulunan miktar	% BH	Bulunan miktar	% BH
2.00	1.96	1.90	2.01	-0.37
	2.03	-1.61	2.01	-0.66
	1.96	1.77	2.03	-1.61
	2.01	-0.37	1.96	1.90
	2.03	-1.61	2.01	-0.37
	1.96	1.77	1.96	1.77
\bar{X}	1.99±0.01		2.00±0.01	
SS	0.03		0.03	
BSS (%)	1.72		1.41	
20.00	19.99	0.07	20.25	-1.26
	19.61	1.97	19.62	0.88
	20.28	-1.40	19.95	0.27
	19.74	1.31	19.77	1.14
	19.84	0.80	19.68	1.58
	19.62	1.88	19.81	0.93
\bar{X}	19.85±0.10		19.85±0.09	
SS	0.26		0.23	
BSS (%)	1.29		1.14	
40.00	40.40	-1.00	39.62	0.94
	40.52	-1.30	39.81	0.48
	39.31	1.73	39.31	1.73
	40.21	-0.52	40.40	-1.00
	39.62	0.94	40.01	-0.03
	39.51	1.22	39.35	1.63
\bar{X}	39.93±0.21		39.75±0.17	
SS	0.51		0.42	
BSS (%)	1.28		1.05	

¹ Günler arası çalışmaları; üç derişim seviyesinde 6 ayrı çözeltili kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

² Gün içi çalışmaları; üç derişim seviyesinde 6 ayrı çözeltili kullanılarak aynı günde yapılmıştır. \bar{X} : Ortalama±standart hata, SS: Standart sapma, BH: Bağlı Hata, BSS: Bağlı standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

4.2.6. Duyarlılık

Bölüm 3.3.2.'de anlatılan Eşitlik 3.1. ve Eşitlik 3.2.'deki gibi hesaplanan LOD ve LOQ değerleri sırasıyla $0.57 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $0.90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.2.7. Geri Kazanım

200 mg FAV içeren sentetik preparatlara ait geri kazanım değerleri Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11. FAV'ın analizine geri kazanım analiz sonuçları (n=6).

Eklenen Etkin Madde Miktarı	Bulunan Miktar ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Geri Kazanım
200.0 mg	196.31	98.15
	197.24	98.62
	201.10	100.55
	199.38	99.69
	197.40	98.70
	197.58	98.79
	\bar{X} : 198.17 \pm 0.72 SS: 1.75 BSS: % 0.88 GA: 196.33-200.01	\bar{X} : 99.08 \pm 0.36 SS: 0.88 BSS: % 0.44 GA: 98.17-100.00

\bar{X} : Ortalama \pm Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA: Güven aralığı (İstatistiksel hesaplamalar için bkz. Ek 2).

4.2.8. Tekrarlanabilirlik

FAV'ın analizi için yöntem ve enjeksiyon tekrarlanabilirlik bulguları aşağıdaki Tablo 4.12.'de verilmiştir.

Tablo 4.12. HPLC yönteminin ve enjeksiyonunun tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları (FAV: 20.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, n=10).

Bulunan Miktar ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
HPLC yönteminin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları	Enjeksiyon tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları
20.67	19.95
20.55	19.61
20.71	19.98
20.25	19.74
20.59	19.84
19.99	19.77
20.70	19.82
20.67	19.90
19.82	19.38
19.99	19.95
\bar{X} : 20.39 \pm 0.11 SS: 0.35 BSS: % 1.71 GA: 20.14-20.64	\bar{X} : 19.79 \pm 0.06 SS: 0.19 BSS: % 0.93 GA: 19.93-19.66

\bar{X} : Ortalama \pm standart hata, SS: Standart Sapma. BSS: % Bağıl Standart Sapma, GA: Güven aralığı ($\alpha=0.05$) (Bkz. Ek 2).

4.2.9. Sağlamlık ve Tutarlılık

Sağlamlık testi kapsamında, yöntem parametrelerindeki küçük ve kasti değişikliklerin analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. Tablo 4.13.'te değiştirilen parametreleri ve elde edilen sonuçları göstermektedir.

Tablo 4.13. Farmasötik preparat analizi için geliştirilen HPLC yöntemine ait sağlamlık bulguları (Eklenen $30.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ FAV, $n=3$).

	FAVİPİRAVİR		
	Bulunan ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	BSS (%)	t_{hesap}
Optimum koşullar	31.32±0.31	0.33	-
Etanol Oranı % 2.7	31.52±0.36	1.99	1.20
Etanol Oranı % 3.3	31.45±0.34	1.89	0.85
Tampon Derişimi 27 mM	31.43±0.19	1.03	2.38
Tampon Derişimi 33 mM	30.95±1.48	1.72	-0.14
Tampon pH'sı 4.0	33.09±0.73	1.91	2.69
Tampon pH'sı 4.4	29.77±1.92	1.76	0.52
Dalga boyu 287 nm	31.02±0.99	1.96	-0.25
Dalga boyu 293 nm	30.30±0.45	1.90	1.03
Akış Hızı 0.9 mL.dk^{-1}	30.09±0.54	1.61	-0.16
Akış Hızı 1.1 mL.dk^{-1}	30.09±0.51	1.39	-0.08
Kolon Sıcaklığı $24.0 \text{ }^\circ\text{C}$	30.04±0.40	1.65	-0.13
Kolon Sıcaklığı $26.0 \text{ }^\circ\text{C}$	30.58±1.48	1.80	0.09

BSS: % Bağlı Standart Sapma. Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır: $t_{\text{tablo}} = 2.776 > t_{\text{hesap}}$ ($p > 0.05$) (Bkz. Ek 3.).

Tutarlılık değerlendirmesi için Tablo 4.14.'te verilen iki farklı analizi sonuçları incelenmiştir.

Tablo 4.14. Geliştirilen HPLC yöntemine ait tutarlılık bulguları (Eklenen $30.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ FAV, $n=6$).

Eklenen Miktar	1. Analizci		2. Analizci	
	Bulunan $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Geri Kazanım (%)	Bulunan $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Geri Kazanım (%)
$30.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$	30.41	101.37	30.24	100.81
	31.24	104.14	30.96	103.21
	30.92	103.05	29.95	99.84
	30.41	101.37	29.52	98.40
	30.01	100.03	30.39	101.29
	30.58	101.93	30.82	102.73
\bar{X}	30.59 ± 0.18	101.98 ± 0.59	30.31 ± 0.22	101.05 ± 0.73
SS	0.43	1.44	0.54	1.79
BSS (%)	1.41	1.41	1.78	1.78
İki analizcinin bulguları için Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $t_{\text{hesap}} = 15 > t_{\text{tablo}} = 2, p > 0.05$				

\bar{X} : Ortalama \pm standart hata, SS: Standart sapma; BSS: Bağıl standart sapma (Bkz Ek 2); t_{hesap} : Hesaplanan t değeri; t_{tablo} : $n=6$ serbestlik derecesindeki teorik t değeri; p: Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. Ek 4).

4.3. Farmasötik Preparatların Analizi

Farmasötik preparat analizinde, madde / IS alan oranları standart FAV derişimlerine karşı çizilerek grafiğe geçirilmiştir. Bu grafiklere dayanarak standart eğriler oluşturulmuş ve regresyon denklemleri bulunmuştur. Bu denklemler kullanılarak farmasötik preparatlarda bulunan FAV miktarları hesaplanmıştır.

Farmasötik preparatlardan FAV analizi için HPLC ile elde edilen bulgular Tablo 4.15.'te sunulmuştur.

Tablo 4.15. Farmasötik preparattan FAV analizi sonuçları (n=6).

Etiket Miktarı	Bulunan (mg)
Favimol® 200 mg	198.35
	199.85
	198.29
	201.63
	200.33
	199.31
\bar{X}	199.63±0.52
SS	1.27
BSS (%)	0.64
GA	198.29-200.96

\bar{X} : Ortalama± Standart hata; SS: Standart Sapma; BSS: Bağıl Standart Sapma, GA: Güven aralığı ($\alpha=0.05$) (Bkz. Ek 2)

5. TARTIŞMA

Kalite kontrol laboratuvarlarında araştırmacılar tarafından genellikle kısa sürede doğru sonuçlar elde edilen, uygulaması kolay ve uygun şekilde valide edilen HPLC analiz yöntemleri kullanılır. Araştırma, özellikle T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından onaylanmış ve yerel ilaç pazarında bulunan yaygın olarak kullanılan bir farmasötik bileşik olan FAV içeren tablet formülasyonlarını hedef almıştır. Çalışmanın temel amacı, tablet formundaki farmasötik preparatlarda bulunan FAV miktarını belirlemek üzere analiz etmek için, yeşil kimya prensiplerine uyularak basit, güvenilir ve doğrulanmış bir HPLC yöntemi geliştirmek ve uygulamak amaçlanmıştır. Analiz için Neutec Pharmaceutical Company'den temin edilen FAV standardı kullanılmış olup ve saflığı üreticiler tarafından verilen sertifika doğrulanmıştır. 2019 yılında ortaya çıkıp tüm dünyaya yayılan pandemi esnasında ülkemizde ve tüm dünyada acil kullanım onayı alınarak hemen hemen her hastaya verilmiştir. Bu derece yaygın kullanıma sahip preparatın endikasyonu olan COVID-19 gücünü yitirmesine rağmen ileride oluşabilecek diğer viral pandemiler için de kullanımını olasıdır. Bu çalışmada geliştirilip valide edilen kromatografik yöntem ile hem farmasötik preparatın kalite kontrol analizlerine katkıda bulunurken hem de araştırmacılara konvansiyonel bir kromatografik yöntemin kaliteden herhangi bir kayıp yaşanmaksızın çevre ve analizci dostu yeşil çözücüler ve yaklaşımlar kullanılarak yapılabileceğini gösterilmiştir.

5.1. HPLC Yöntemi

HPLC, çok çeşitli bileşenleri tespit etmek, miktarlarını ölçmek ve çeşitli numuneler arasındaki farklılıkları belirlemek üzere, bileşenlerin bir hareketli faz içinde sabit bir faz üzerinde ayrılmasını temel alarak analizlerde yüksek hassasiyet ve ayırım sağlayan, özellikle farmasötik, kimyasal, gıda ve çevre endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan bir kromatografi tekniğidir. FAV'ın analizi için C18 Inertsil ODS (150 × 4.6 mm i.ç., 5 µm), Inertsil HILIC, Chromolith Performance RP-18e 100-3 mm ve ACE Excel 3 C18 kolonları denenmiş fakat uygun t_R değerleri elde edilememiştir.

İ. Bulduk (54), FAV'ın tablettten analizi için 50 mM potasyum dihidrojen fosfat (pH 2.3) ve asetonitril (90:10, v/v) karışımını içeren hareketli faz kullanarak 15 dk çalışma süresi kapsamında FAV'ı 7.7 dk'de analiz ederek, LOD ve LOQ değerlerinin

sırasıyla $1.20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $3.60 \mu\text{g mL}^{-1}$ hesaplandığı HPLC yöntemini geliştirmiştir; Elizabeth Challenger ve ark. (55), insan plazmasında FAV miktarının belirlenmesi için su içinde % 0.2 formik asit ve metanol içinde % 0.2 formik asitten oluşan bir gradiyent hareketli faz kullanarak LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir; Cahaya Azzahra Rahmadhani ve ark. (56), tam kanda FAV'ın HPLC-DAD ile ölçümü için asetonitril - % 0.2 formik asit - 20 mM sodyum dihidrojen fosfat (pH 3.5) içeren gradiyent hareketli faz kullanarak yöntem geliştirmişlerdir; Safa M Megahed ve ark. (57), insan plazmasında FAV'ın belirlenmesi için hızlı, sağlam, hassas ve yeşil spektrofotometrik yöntemin geliştirilmesi için çalışma yapmışlardır.

Araştırmacılar ve sanayi tarafından etanolün hareketli faz bileşeni olarak yer aldığı yöntemlere ait kaynaklara sık rastlanmamaktadır. FAV analizi için geliştirilen yeşilleştirilmiş bu çalışmada, asetonitril yerine etanol kullanılmış ve daha kısa sürede analiz gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışması ile hareketli faz replasmanının başarı ile uygulanabileceği ve rutin analizlerde de kullanılabilceği kanıtlanmış olup araştırmacıları yeşil kromatografiye teşvik edeceği düşünülmektedir.

5.1.1. Organik Çözücü Etkisi

HPLC analizinde maddelerin tutulmasını etkileyen birincil faktörler arasında hareketli faz olarak kullanılan organik çözücünün türü ve derişimi yer almaktadır. Yeşil kimya kapsamında, tercih edilen organik çözücü olarak etanol seçilmiştir. FAV'ın alıkonma zamanı, hareketli faz bileşeni olarak etanolün değişik oranlarda ilave edilmesiyle hazırlanan hareketli fazlarla test edilmiştir. Bu kapsamda hareketli faz oranı analiz maddemizin alıkonma zamanı üzerinde etkili olmuştur. Alıkonma zamanının direk yer aldığı kromatografik parametreler olan α ve N verilerini de içeren en iyi oran tespit edilmiştir. Bu çalışmada analiz süresini uzatmadan en iyi kromatografik ayırımın elde edilmesi şeklinde ilerlenmiştir.

Etanol derişiminin % 3'ten % 4'e derişimi sırasında FAV maddesinin t_R ve k' azalmış, % 4 ve % 5 etanol derişiminde FAV için k' 'nin 2'nin altına düştüğü belirlenmiştir. Öte yandan, % 1 ve % 2 oranlarında etanol kullanıldığında iki madde arasındaki α ve R_s yüksek, ancak N ve PAO'nun % 3 oranına göre düşük olduğu ve t_R daha uzun olduğu gözlenmiş ve % 3 etanol oranının kullanılmasına karar verilmiştir.

Bu etanol oranında, $\alpha > 1$, $N \geq 2000$, $R_s \geq 1.5$ kromatografik değerlendirme kriterleri sağlanmaktadır (Bkz. Tablo 4.1.).

5.1.2. Tampon Derişimi ve pH Etkisi

Alıkonmaya ve pik şekline kullanılan hareketli faz pH'sının etkisini incelemek amacıyla pH taraması yapılmıştır. Pik şekillerinin tampon çözelti hazırlanıp ölçüldüğü pH'da keskin ve dar olması ile uygun t_R 'ye sahip olmasından dolayı pH aralığı dar tutulmuştur. Farklı pH'ların kromatografik parametrelere etkisini incelemek için pH 4.0, 4.2 ve 4.6 olarak hazırlanan fosfat tamponu çözeltilerinin hareketli faz olarak kullanıldığı analizler yapılmıştır. Kromatografik optimizasyon parametreleri için analizde 4.2 olarak seçilen pH değerinde, k' , PAO ve N değerlerinin, diğer pH seviyelerinde yapılan analizlerde elde edilen verilerden daha fazla kabul kriterlerini karşıladığı görüldüğünden çalışmalara tampon pH'sı 4.2 seçilerek devam edilmiştir (Bkz. Tablo 4.2.).

Tampon derişimini belirlemek amacıyla farklı derişimlerde hazırlanan 20, 30 ve 40 mM derişimlerindeki NaH_2PO_4 tamponları (3:97, h/h) $1.0 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ akış hızında en iyi pik şekillerinin elde edilmesi amacıyla denenmiştir. Beklendiği gibi tampon derişimi t_R üzerinde etki göstermezken PAO'da ve dolayısıyla N parametrelerinde beklenen değişiklikler gözlenmemiştir. Bundan dolayı en yüksek N'nin gözlendiği 30 mM derişimi optimum tampon derişimi olarak kabul edilmiştir.

5.1.3. Akış Hızı

Kromatografik parametrelere akış hızı etkisini incelemek için belirlenen hızlar 0.8, 1.0 ve $1.2 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ olup; bu işlem esnasında t_R , PAO ve N üzerindeki etkiler gözlenmiştir. Akış hızı arttırıldığında; PAO'da $0.8 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ ve $1.0 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ akış hızında değişiklik olmazken; $1.2 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ akış hızında az da olsa artış gerçekleşmiştir, t_R ise azaldığından dolayı k' de akış hızı ile birlikte azalmaktadır. Sonuç olarak, t_R gözetilerek PAO değerinin 1'e en yakın olduğu, N'nin en yüksek olduğu hareketli faz akış hızı $1.0 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ çalışma akış hızı olarak seçilmiştir (Bkz. Tablo 4.4.).

5.1.4. Enjeksiyon Hacmi Etkisi

Sabit bir madde derişiminde kromatografik sisteme verilen kütle miktarını belirleyen enjeksiyon hacminin artışı kütle miktarını artmasına ve kolonda aşırı madde yüklenmesiyle ilişkili olarak, doğrusal ideal kromatografik koşullarda sapmanın meydana gelmesi ile pik kuyruklanması ve/veya t_R kaymasına sebep olması beklenir. FAV için artan enjeksiyon hacmi ile t_R 'leri dolayısıyla k' 'leri değişmezken; 10 μ L enjeksiyon hacminde PAO'nun en az olduğu ve 15 μ L ve daha fazla hacminde enjeksiyon yapıldığında PAO'nun arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, 5 μ L enjeksiyon hacminde N ve PAO'ları kabul edilebilir değerler olduğundan yeşil kimya prensipleri kapsamında enjeksiyon hacmi minimum olanın seçilmesi uygun bulunmuştur.

5.1.5. Kolon Sıcaklığı Etkisi

Kolon sıcaklığı artışı hareketli faz viskozitesini düşürerek ve k' ile PAO'da değişikliklere sebep olmaktadır. Kolon sıcaklığının FAV pikin k' ve PAO üzerine etkisini incelemek için farklı sıcaklıklarda (25°C, 30°C ve 35°C) deneyler yapılmıştır. PAO'da ve analiz süresinde büyük değişiklikler olmaksızın k' 'deki artış dikkate alınarak 2.5 k' değerinin kaydedildiği 25°C optimum kolon sıcaklığı olarak seçilmiştir.

5.1.6. İç Standart Seçimi

Denenen çeşitli maddeler arasından FAV için geliştirilip optimize edilen yöntemle analizi yapıldığında FAV ile aynı kromatografik pencerede uygun cevabı olan PAR, iç standart olarak (8.2 dk) olarak seçilmiştir.

5.1.7. HPLC Yönteminin Validasyonu

Geliştirilen HPLC yönteminin sistem uygunluğu, k' , R_s , ayırım, N ve PAO, R_s ve enjeksiyon kesinliği bazında değerlendirilmiştir. Test için aynı standart çözeltinin 6 tekrarlı enjeksiyonundan elde edilen veriler kullanılmış ve elde edilen değerlerin (Bkz. Tablo 4.17.) kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu görülmüştür ($k' > 1$, $N \geq 2000$, $R_s \geq 1.5$, % BSS < % 1 ve PAO < 1.5).

Sistem uygunluğu tespit edilen analiz için ICH Q2R1 (67) kriterlerine göre validasyon çalışmasında kararlılık, özgünlük, doğrusallık ve aralık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, sağlamlık ve tutarlılık validasyon parametreleri test edilmiştir.

Validasyon çalışması öncesi yapılan kararlılık çalışması ile hazırlanan stok ve standart çözeltinin kararlılığı belirlenmiş ve sonuçlar doğrultusunda, stok ve standart çözeltilerinin ne kadar sürede hangi ortamda saklanması gerektiğine karar verilmiştir.

Kararlılık

Çalışmalarımız süresince çalışma standart çözeltileri günlük olarak hazırlanmıştır. FAV stok standart çözeltilerinin aydınlıkta, karanlıkta ve soğukta 0, 8, 24 ve 48 saatlik kısa dönem ve 2 aylık uzun dönem kararlılık çalışmaları sonucunda FAV maddelerinin cevaplarındaki değişimler izlenmiştir (Bkz. Tablo 4.6.). Deneyler sonucunda yüzde kalan miktarlar hesaplandığında hazırlanan FAV standart çözeltilerinin +4 °C buzdolabı ortamında kararlı olduğu tespit edildiğinden standart çözelti hazırlandıktan sonra buzdolabında muhafaza edilmiş ve 2 ay sonunda yenisi hazırlanmıştır. Ayrıca günlük çalışma çözeltileri de her çalışma öncesinde bu stoktan seyreltilerek hazırlanmıştır.

Özgünlük

Özgünlük geliştirilen yöntemin FAV maddesini diğer maddelerin varlığından etkilenmeden analiz edebilme yetisidir. FAV standartı, plasebo, sentetik numune, tablet numunelerine ait kromatogramlar karşılaştırıldığında matriksten kaynaklanan herhangi bir girişim etkisi bulunmamıştır (Bkz. Şekil 4.13.). Ayrıca FAV pikine ait pik saflık indeksinin 1 olması da pikin saf olduğunu kanıtlamaktadır (Bkz. Şekil 4.14.). Doğrudan kalibrasyon ve iç standart ekleme yöntemleriyle elde edilen kalibrasyon denklemlerinin eğrilerinin benzer olması yöntemin matriks etkisinde olmadan miktar tayini yapabildiğini göstermektedir.

Doğrusallık

HPLC yönteminde FAV pik alan oranlarının derişime karşı grafiğe geçirilmesi elde edilen kalibrasyon eğrileri 1.0-100.0 µg.mL⁻¹ aralığında doğrusal ve korelasyon

katsayılarının önemli bir değer olduğu istatistiksel olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.15., Tablo 4.7. ve Tablo 4.8., $p < 0.05$). Tanımlayıcılık katsayılarının da FAV için 1.0000'e yakın bir değer olan 0.9999 olarak bulunması çizilen kalibrasyon eğrilerinin doğrusal olduğunu göstermektedir (Bkz. Tablo 4.8.).

FAV'ın tabletten analizi için, olması gereken derişimin bulunan derişime karşı grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisinin doğrusallık kontrol grafiği elde edilmiştir ve tanımlayıcılık katsayısı 0.999 bulunmuştur. Belirli miktarda numune üzerine standart eklenerek eklenen derişime karşı pik alan oranları grafiğe geçirilerek oluşturulan bu eğrinin denklemini ve regresyon katsayısı Tablo 4.9.'da verilmiştir.

Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu hem gün içi hem de günler arası çalışmalarla ve geri kazanım deneyleriyle değerlendirilmiştir. Bu amaçla, bağımsız FAV numuneleri 3 farklı derişimde tekrarlı ($n=6$) analizleriyle çalışılmıştır: 2.0, 20.0 ve 40.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Geliştirilen yöntemin gün içi analizlerinden elde edilen % BH değerleri FAV için 0.03 ile 1.90 arasında değişmektedir. Günler arası sonuçlardan elde edilen verilere göre ise FAV için % BH değerleri 0.07 ile 1.97 arasında hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.10.). Analitik sonuçların en yüksek % BH değeri olan 2'yi geçmemesi (69, 70) koşulu göz önüne alındığında önerilen kromatografik yöntemin doğru olduğu gösterilmiştir.

Analiz sonucunda, geri kazanım sentetik preparat çözeltisine eklenen maddenin ne kadarının tayin edilebildiğini belirlemek amacıyla her biri tek bir derişimde hazırlanan 6 farklı çözeltiden geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. FAV için geri kazanım % 99.08 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.11.). Bulunan geri kazanım değerlerinin kabul edilebilir sınırlar (% 98-102) içinde olması analizlerin doğruluğunu göstermektedir (40).

Yöntemin kesinliği ise hem gün içi ve günler arası kesinlik deneyleri hem de cihaz ve yöntem tekrarlanabilirliği çalışmalarıyla test edilmiştir. Gün içi ve günler arası çalışmada test edilen 3 farklı derişim seviyesinde 6 bağımsız çözeltinin analizi yapılmış ve sonuçların % BSS değerleri hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemin gün içi analizlerinden elde edilen % BSS değerleri 1.05 ile 1.41 arasında iken; günler arası

sonuçlar için, % BSS değerleri 1.28 ile 1.72 arasında hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.10.). En yüksek % BSS değerinin en fazla 2 (69, 70) olması koşuluna dikkat edildiğinde, yöntemin kesinliğinin yüksek olduğu saptanmıştır.

Yöntemin tekrarlanabilirliği çalışmasında, 20.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FAV içeren 10 farklı çözeltinin analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir (Tablo 4.12.). Elde edilen % BSS değeri 1.71 olup, % 2'den düşük olması (70) sonuçların tekrarlanabilir olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca, cihazın tekrar aynı sonuçları retebilirliği, aynı gün içinde aynı vialden 20.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FAV içeren bir çözeltinin 10 tekrarlı enjeksiyonu gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. FAV pik alanları için % BSS değerleri, % 0.93 olarak hesaplanması, % 1'den az bulunduğu için (74, 75) bu, cihazın sürekli olarak tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini gösterir.

Duyarlılık

S/G oranı 3 olduğunda saptanabilen en kk derişim olan yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD), FAV için 0.57 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; S/G oranı 10 olduğunda saptanabilen en kk derişim LOQ ise, 0.90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bulgular geliştirilen yöntemin farmasötik preparattan analiz için yeterli duyarlılıkta (69, 71) olduğunu göstermektedir.

Sağlımlık ve Tutarlılık

Yöntemin sağlımlığı, hareketli faz etanol oranı, tampon pH'ı, tampon derişimi ve akış hızı gibi yöntem parametrelerindeki kk değişikliklerin FAV miktarının belirlenmesi üzerindeki etkisi araştırılarak incelenmiştir. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, $t_{\text{hesap}} < t_{\text{tablo}} = 2.776$ ($p > 0.05$) olduğu ve sonuçların bu değişikliklerden etkilenmediği belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.13.).

Tutarlılık alışması için FAV için doğrusallık aralığında bir derişimde iki farklı analist tarafından hazırlanan 6 farklı çözeltinin analiz sonuçları arasında istatistiksel karşılaştırma yapılmıştır. Her iki madde için t-testi sonuçları, hesaplanan t değerinin (t_{hesap}) tablodaki t değerinden (t_{tablo}) büyük olduğunu ve p değerinin 0.05'ten büyük olduğunu göstermiştir (Bkz. Tablo 4.14.). Bu, iki analist tarafından elde edilen deneysel sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir.

Farmasötik Preparat Analizi

FAV içeren farmasötik preparatların analizi için geliştirilen yöntem valide edildikten sonra, tableten FAV analiz sonuçları için % BSS değeri % 0.64 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.15.). Bu % BSS değerlerinin kabul kriteri olarak (69) % 2'nin altında olması, yöntemin tablet preparatlarında FAV analizi yüksek analitik kesinlik sergilediğini göstermiştir.

Önerilen yönteme ait validasyon bulguları tableten FAV analizi için kılavuzlar çerçevesinde tam validasyonla geçerli kılınmıştır. Bu yöntem HPLC kullanan analizciler için etanolla de deney yapılabilirliğinin gösterilmesi açısından teşvik edicidir. Alternatif hareketli faz bileşeni olan etanol sayesinde hem çevre hem de analizci güvenliği analiz kalitesi kadar ön plana alınmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, COVID-19 tedavisinde de kullanılan antiviral etkili FAV ve IS olarak kullanılan PAR'ın farmasötik preparattan yeşil kromatografik yöntemle analizi için HPLC yöntemi geliştirilmiş ve ICH kılavuzu doğrultusunda valide edilmiştir. Geliştirilen yöntemde analizlerin tümü Zorbax C8 (150 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) analitik kolonda gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım için hareketli faz olarak kullanılan 30 mM derişiminde sodyum dihidrojen fosfat tamponu (NaH₂PO₄) (pH: 4.2) ve toksik olmayan etanol 97:3 h/h oranında karıştırılmış ve akış hızı olarak 1 mL.dk⁻¹ belirlenmiştir. UV dedektör kullanılarak 290 nm dalga boyuna sinyaller kaydedilmiştir. Geliştirilip optimize edilen yöntem ICH Q2R1 analitik yöntem validasyon rehberinde belirtilen özgünlük, kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, tutarlılık ve sağlamlık parametrelerine göre valide edilerek yöntemin doğruluk ve güvenilirliği kanıtlanmıştır.

Yeşil kromatografi, kromatografik yöntemlere uygulanan çevre dostu veya sürdürülebilir uygulamaları tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Analitik performansı korurken veya geliştirirken kromatografik yöntemin çevresel etkisini azaltmak için çeşitli yaklaşımları kapsamaktadır. Toksik kimyasal ürünlerin risklerini kontrol ederek bu maddelerle ilgili sorunları önlemek için ilk etapta bu toksik ürünlerin üretilmemesi en doğru yaklaşımdır. Bu nedenle yüksek hacimlerde kullanılan hareketli fazların ihtiva ettiği toksik hareketli faz bileşenlerinden arınmış bir analiz tercih edilmiş olacaktır.

Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntem araştırmacılara yeşil analizlerin yapılabilirliğini yaşanan büyük pandemide hasta olan hemen her bireyin kullandığı bir preparat üzerinden validasyon ve miktar tayini ile gösterilmiştir. Gelişen teknoloji ve endüstri ile birlikte çevre ve analizci dostu yaklaşımların giderek artacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Tobiszewski M, Mechlińska A, Zygmunt B, Namieśnik J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2009;28(8):943-51.
2. Linthorst JA. An overview: origins and development of green chemistry. *Foundations of Chemistry*. 2010;12(1):55-68.
3. Woodhouse EJ, Breyman S. Green Chemistry as Social Movement? *Science, Technology, & Human Values*. 2005;30(2):199-222.
4. Farias LA, Fávaro DIT. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. *Química Nova*. 2011;34:1089-93.
5. Anastas PT. Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 1999;29(3):167-75.
6. Anastas PT, Warner JC. Green chemistry. *Frontiers*. 1998;640:1998.
7. Skoog D, Holler FJ, Neiman TA. *Enstrümantal Analiz İlkeleri (1 bs.)*. Ankara: Bilim Yayıncılık; 1998.
8. Krstulovic AM, Brown PR. *Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*. New York: John Wiley and Sons. ; 1982.
9. Martin M, Guiochon G. Effects of high pressure in liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2005;1090(1-2):16-38.
10. Xiang Y, Liu Y, Lee ML. Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. *J Chromatogr A*. 2006;1104(1-2):198-202.
11. Wiese S, Teutenberg T, Schmidt T. A general strategy for performing temperature-programming in high performance liquid chromatography-Prediction of segmented temperature gradients. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218:6898-906.
12. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*. 2020;395(10229):1054-62.
13. Cheng ZJ, Shan J. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection*. 2020;48(2):155-63.
14. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020;323(13):1239-42.
15. Perlman S. Another Decade, Another Coronavirus. *N Engl J Med*. 2020;382(8):760-2.
16. Shanmugaraj B, Siritwattananon K, Wangkanont K, Phoolcharoen W. Perspectives on monoclonal antibody therapy as potential therapeutic intervention for Coronavirus disease-19 (COVID-19). *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2020;38(1):10-8.

17. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55(3):105924.
18. Zhang JJ, Dong X, Cao YY, Yuan YD, Yang YB, Yan YQ, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*. 2020;75(7):1730-41.
19. Liu J, Liu Y, Xiang P, Pu L, Xiong H, Li C, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Severe Illness Patients with 2019 Novel Coronavirus in the Early Stage. 2020.
20. World Health Organization 2023 [Available from: <https://covid19.who.int/>].
21. Algül Ö, Dar B, Öksüz Z. Antiviral ilaçlardaki gelişmeler ve değerlendirilmesi. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*. 2019;9.
22. Küçük A, Yildirim Y. Antiviral İlaçlar. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 2019;30:100-8.
23. Clercq ED. Molecular Targets for Antiviral Agents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;297(1):1-10.
24. Woolhouse M, Scott F, Hudson Z, Howey R, Chase-Topping M. Human viruses: discovery and emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012;367(1604):2864-71.
25. [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/492405#section=Related-Records>].
26. Kalite Kontrol Bölümü Hammadde Analiz Raporu. Atabay Kimya Sanayi ve Ticaret A.Ş.; 18.08.2021.
27. Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, Shiraki K, Smee DF, Barnard DL. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res*. 2013;100(2):446-54.
28. Du YX, Chen XP. Favipiravir: Pharmacokinetics and Concerns About Clinical Trials for 2019-nCoV Infection. *Clin Pharmacol Ther*. 2020;108(2):242-7.
29. Oestereich L, Lüdtke A, Wurr S, Rieger T, Muñoz-Fontela C, Günther S. Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antiviral Res*. 2014;105:17-21.
30. Sissoko D, Laouenan C, Folkesson E, M'Lebing AB, Beavogui AH, Baize S, et al. Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea. *PLoS Med*. 2016;13(3):e1001967.
31. Bouazza N, Treluyer JM, Foissac F, Mentré F, Taburet AM, Guedj J, et al. Favipiravir for children with Ebola. *Lancet*. 2015;385(9968):603-4.
32. Furuta Y, Komeno T, Nakamura T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2017;93(7):449-63.

33. Madelain V, Nguyen TH, Olivo A, de Lamballerie X, Guedj J, Taburet AM, et al. Ebola Virus Infection: Review of the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drugs Considered for Testing in Human Efficacy Trials. *Clin Pharmacokinet.* 2016;55(8):907-23.
34. Venkataraman S, Prasad B, Selvarajan R. RNA Dependent RNA Polymerases: Insights from Structure, Function and Evolution. *Viruses.* 2018;10(2).
35. Mentré F, Taburet AM, Guedj J, Anglaret X, Keïta S, de Lamballerie X, et al. Dose regimen of favipiravir for Ebola virus disease. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(2):150-1.
36. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA). Report on the Deliberation Results Avigan [Internet]. Evaluation and Licensing Division, Pharmaceutical and Food Safety Bureau Ministry of Health, Labour and Welfare. [cited 04 March 2014]. Available from: <https://www.pmda.go.jp/files/000210319.pdf>.
37. Nguyen TH, Guedj J, Anglaret X, Laouénan C, Madelain V, Taburet AM, et al. Favipiravir pharmacokinetics in Ebola-Infected patients of the JIKI trial reveals concentrations lower than targeted. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(2):e0005389.
38. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(11):1061-9.
39. Acquavia MA, Foti L, Pascale R, Nicolò A, Brancaleone V, Cataldi TRI, et al. Detection and quantification of Covid-19 antiviral drugs in biological fluids and tissues. *Talanta.* 2021;224:121862.
40. Furuta Y, Takahashi K, Shiraki K, Sakamoto K, Smee DF, Barnard DL, et al. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res.* 2009;82(3):95-102.
41. Segura Guerrero NA, Sharma S, Neyts J, Kaptein SJF. Favipiravir inhibits in vitro Usutu virus replication and delays disease progression in an infection model in mice. *Antiviral Res.* 2018;160:137-42.
42. Hayden FG, Shindo N. Influenza virus polymerase inhibitors in clinical development. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(2):176-86.
43. Rocha-Pereira J, Jochmans D, Dallmeier K, Leyssen P, Nascimento MS, Neyts J. Favipiravir (T-705) inhibits in vitro norovirus replication. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;424(4):777-80.
44. Dong L, Hu S, Gao J. Discovering drugs to treat coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Drug Discov Ther.* 2020;14(1):58-60.
45. Li G, De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(3):149-50.
46. Cai Q, Yang M, Liu D, Chen J, Shu D, Xia J, et al. Experimental Treatment with Favipiravir for COVID-19: An Open-Label Control Study. *Engineering (Beijing).* 2020;6(10):1192-8.

47. Mikhail IE, Elmansi H, Belal F, Ehab Ibrahim A. Green micellar solvent-free HPLC and spectrofluorimetric determination of favipiravir as one of COVID-19 antiviral regimens. *Microchem J.* 2021;165:106189.
48. Mirtaleb MS, Mirtaleb AH, Nosrati H, Heshmatnia J, Falak R, Zolfaghari Enameh R. Potential therapeutic agents to COVID-19: An update review on antiviral therapy, immunotherapy, and cell therapy. *Biomed Pharmacother.* 2021;138:111518.
49. COVID-19 Erişkin Hasta Yönetimi ve Tedavisi 2020 [Available from: [https://hastane.deu.edu.tr/images/hastanemizden-haberler/corona/COVID19-Hasta Yo netimi ve Teda visi.pdf.pdf.pdf.pdf](https://hastane.deu.edu.tr/images/hastanemizden-haberler/corona/COVID19-Hasta_Yo_netimi_ve_Teda_visi.pdf.pdf.pdf.pdf)].
50. COVID-19 (SARS-CoV2 Enfeksiyonu) TEDAVİSİNDE KULLANILACAK İLAÇLARA İLİŞKİN BİLGİLENDİRME 2020 [Available from: https://covid19rehberi.com/wp-content/uploads/2020/04/FAVIPIRAVIR_200_MG_TABLET.pdf].
51. Obach RS, Huynh P, Allen MC, Beedham C. Human liver aldehyde oxidase: inhibition by 239 drugs. *J Clin Pharmacol.* 2004;44(1):7-19.
52. Zhao Y, Harmatz JS, Epstein CR, Nakagawa Y, Kurosaki C, Nakamura T, et al. Favipiravir inhibits acetaminophen sulfate formation but minimally affects systemic pharmacokinetics of acetaminophen. *Br J Clin Pharmacol.* 2015;80(5):1076-85.
53. Joshi S, Parkar J, Ansari A, Vora A, Talwar D, Tiwaskar M, et al. Role of favipiravir in the treatment of COVID-19. *Int J Infect Dis.* 2021;102:501-8.
54. Bulduk İ. HPLC-UV method for quantification of favipiravir in pharmaceutical formulations. *Acta Chromatographica.* 2020.
55. Challenger E, Penchala SD, Hale C, Fitzgerald R, Walker L, Reynolds H, et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for quantification of favipiravir in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2023;233:115436.
56. Azzahra Rahmadhani C, Harahap Y, Aisyah Rahmaniana T. HPLC-DAD quantification of favipiravir in whole blood after extraction from volumetric absorptive microsampling devices. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2023;1215:123547.
57. Megahed SM, Habib AA, Hammad SF, Kamal AH. 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. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2021;249:119241.
58. Gowen BB, Sefing EJ, Westover JB, Smee DF, Hagloch J, Furuta Y, et al. Alterations in favipiravir (T-705) pharmacokinetics and biodistribution in a hamster model of viral hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2015;121:132-7.
59. Method for multiple COVID-19 drugs analysis by LC-MS/MS. ALSA CHIM a Shimadzu Group Company; 2020.
60. Morsy MI, Nouman EG, Abdallah YM, Zainelabdeen MA, Darwish MM, Hassan AY, et al. A novel LC-MS/MS method for determination of the potential antiviral candidate favipiravir for the emergency treatment of SARS-CoV-2 virus in

human plasma: Application to a bioequivalence study in Egyptian human volunteers. *J Pharm Biomed Anal.* 2021;199:114057.

61. Rezk M, Badr K, Badr A, Abdel-Naby N, Magy, Ayyad M. A novel, rapid and simple UPLC-MS/MS method for quantification of favipiravir in human plasma: Application to a bioequivalence study. *Biomedical Chromatography.* 2021.

62. Allahverdiyeva S, Yunusoğlu O, Yardım Y, Şentürk Z. First electrochemical evaluation of favipiravir used as an antiviral option in the treatment of COVID-19: A study of its enhanced voltammetric determination in cationic surfactant media using a boron-doped diamond electrode. *Analytica Chimica Acta.* 2021;1159:338418.

63. U.S. Environmental Protection Agency. Health and Environmental Effects Profile for Acetonitrile. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH.; 1985.

64. U.S. Department of Health and Human Services. Hazardous Substances Data Bank [Internet]. National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD. 1993.

65. U.S. Environmental Protection Agency. Health Effects Assessment for Acetonitrile, Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH. . 1987.

66. Prat D, Hayler JD, Wells A. A survey of solvent selection guides. *Green Chemistry.* 2014;16:4546-51.

67. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) Harmonized Tripartite Guideline. ICH Committee S.2005.

68. Handbook of Pharmaceutical Excipients (Third bs.). Washington DC: American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press. 2000.

69. Ermer J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;24(5-6):755-67.

70. Green J. A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.*1996.

71. Shabir GA, John Lough W, Arain SA, Bradshaw TK. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* 2007;30(3):311-33.

72. Alpar R. Spor Bilimlerinde Uygulamalı İstatistik. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.

73. The United States Pharmacopeia : USP 24 : the National Formulary : NF 19 : by authority of the United States Pharmacopoeial Convention, Inc., meeting at Washington, D.C., March 9-12, 1995 ; prepared by the Committee of Revision and published by the Board of Trustees. Rockville, Md.: United States Pharmacopoeial Convention Rockville, Md.; 1999.

74. Shabir G, Lough WJ, Arain S, Bradshaw T. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies - J LIQ CHROMATOGR RELAT TECHNO.* 2007;30:311-33.

75. Ermer J, Ploss HJ. Validation in pharmaceutical analysis. Part II: Central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;37(5):859-70.

8. EKLER

EK 1. Korrelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

Bulunan korrelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu test edilmiştir.

Testin yapımında işlemler:

1. Ho: Korrelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ($r = 0$).
2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{S_r}$$

$$S_r = \sqrt{\left[\frac{1-r^2}{n-2} \right]} \text{ (Korelasyon katsayısının standart hatası)}$$

3. Yanılma olasılığı olarak $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi = $n - 2$
5. $\alpha = 0.05$ düzeyinde ve 4. Madde de bulunan serbestlik derecesinde tablo t değerine bakılır.
6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
7. Karar: Korrelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir ($t =$ Hesapla bulunan değer, $p < 0.05$) veya korrelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir ($t =$ Hesapla bulunan değer, $p > 0.05$).

Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamları bulunur:
 - a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

$$RKT = \frac{\left[\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n} \right]^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

$$YOAKT = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

c) Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı \Rightarrow RAKT = YOAKT - RKT

2. Serbestlik dereceleri bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1

b) Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi \Rightarrow YOASD = n-1

c) Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi \Rightarrow RASD = YOASD – RSD

3. Kareler ortalamaları bulunur:

a) Regresyon Kareler Ortalaması \Rightarrow RKT / RSD

b) Regresyondan Ayrılış Kareler Ortalaması \Rightarrow RAKO = RAKT / RASD

4. H_0 = Derişim ile detektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

5. Yanılma olasılığı $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.

6. $F = RKO / RAKO$

7. $p = 0.05$ düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: Derişim ile detektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır (F = Hesapla bulunan, $p < 0.05$) veya doğrusal değildir (F = Hesapla bulunan, $p > 0.05$).

Kesişimin Sıfırdan Ayrılışının Önem Kontrolü

1.

$$S_{yx} = \frac{\sum y^2 - (\sum x)^2/n}{n-1} \left[\frac{(1-r)^2(n-1)}{n-2} \right]^{1/2}$$

2. $S_{H(a)} = (S_{yx})^2 \left[(1/n) + \bar{x} / (\sum x^2 - (\sum x)^2/n) \right]$

3. $H_0 =$ Kesişim değeri (a) sıfıra eşittir.

4. Yanılma olasılığı $p = 0.05$ seçilmiştir.

5. $t_H = a / S_{H(a)}$

6. $\alpha = 0.05$ düzeyinde t_T değerleri bulunur.

3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

4. Karar: Kesişim değeri sıfıra eşittir ($t_H =$ Hesapla bulunan, $p > 0.05$) veya Kesişim değeri sıfırdan farklıdır ($t_H =$ Hesapla bulunan, $p < 0.05$).

EK 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

$$\text{Bağıl Standart Sapma} = (SS \div \bar{X}) \times 100$$

SS: Standart Sapma

\bar{X} : Aritmetik ortalama

% Bağıl Hata Hesaplanması

$$\% \text{ Bağıl Hata (\%BH)} = \left| \frac{(\text{Olmaması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar})}{\text{Olmaması gereken miktar}} \right| \times 100$$

Standart Hata Hesaplanması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

SS: Standart sapma

n: Ölçüm sayısı

%Geri Kazanım Hesaplanması

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olmaması gereken miktar}} \times 100$$

Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması

$$\mu = \bar{X} \pm S_{\bar{x}}t \text{ veya } \bar{X} - S_{\bar{x}} < \mu < \bar{X} + S_{\bar{x}}$$

μ : Evren ortalaması, \bar{X} : Örneklem ortalaması

$S_{\bar{x}}$: Standart hata, t: Seçilen yanılma düzeyi (α) ve

n-1 serbestlik derecesindeki t tablosundaki değer.

EK 3. t – Testi

İki ortalama arasında fark olup olmadığını test eder.

$$s^2 = [(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2]/(n_1 + n_2 - 2)$$

$$t = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) / s\sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}$$

n_1 : 1. yöntemin ölçüm sayısı, n_2 : 2. yöntemin ölçüm sayısı

s_1 : 1. yöntemin standart sapması, s_2 : 2. yöntemin standart sapması

\bar{X}_1 : 1. yöntemin ortalaması, \bar{X}_2 : 2. yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi = $n_1 + n_2 - 2$

1. H_0 = İki ortalama arasında fark yoktur.

2. $\alpha=0.05$ yanılma düzeyinde ve $n_1 + n_2 - 2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.

3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

4. Karar:

a) Ortalamalar arasında fark yoktur ($t =$ Hesaplanan değer, $p > 0.05$).

b) Ortalamalar arasında fark vardır ($t =$ Hesaplanan değer, $p < 0.05$).

EK 4. Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi

Aynı örneklerin değişik iki durumdaki ölçüm sonuçları arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde $n < 25$ ise uygulanan önemlilik testidir.

H_0 = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha = 0,05$ yanılma düzeyi seçilmiştir.

Test istatistiğinin hesaplanması:

İki yöntemden elde edilen sonuçlar iki sütun şeklinde yan yana yazılır. Sağda yeni bir sütuna satırlar arasındaki farklar +/- işaretleriyle birlikte yazılır. Ardından farklar küçükten büyüğe doğru sıralanır ve sıra no. verilir. Sıra numaralarının önüne farklardaki +/- işaretleri yazılır. + ve - işaretli sıra no. grupları arasında işareti sayıca fazla olan grup toplanır. Elde edilen değer, hesapla bulunan T değeridir (T_H).

Ölçüm sayısı (n) serbestlik derecesindeki tablo T değerine bakılır.

Karar:

a) $T_H > T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur ($T_H =$ Hesaplanan T değeri, $p > 0,05$).

a) $T_H < T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark vardır ($T_H =$ Hesaplanan T değeri, $p < 0,05$).

EK 5. Friedman Testi: Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi

Yöntemlerin karşılaştırılmasında, yöntemler arasında fark bulunup bulunmadığını kontrol etmek için Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analiz testi uygulanır.

1. Kareler toplamları bulunur.

a) Genel kareler toplamı (GnKT):

$$GnKT = \sum_x 2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

b) Gruplar arası kareler toplamı (GAKT):

$$GAKT = \sum \left[\frac{(\sum x_j)^2}{n_j} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

c) Denekler arası kareler toplamı (DAKT):

$$DAKT = \sum \left[\frac{(\text{Her bir satır toplamı})^2}{\text{Her bir satırdaki ölçüm sayısı}} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

d) Etkileşim (hata) kareler toplamı \Rightarrow HKT = GnKT – GAKT – DAKT

2. Serbestlik derecelerinin bulunması:

a) Genel serbestlik derecesi \Rightarrow GnSD = $n_j \times k - 1$

b) Gruplar arası serbestlik derecesi \Rightarrow GASD = $k - 1$

c) Denekler arası serbestlik derecesi \Rightarrow DASD = $n_j - 1$

d) Hata serbestlik derecesi \Rightarrow HSD = $(n_j - 1) \times (k - 1)$

3. Kareler ortalamasının bulunması:

a) Gruplar arası kareler ortalaması \Rightarrow GAKO = GAKT / GASD

b) Denekler arası serbestlik derecesi \Rightarrow DAKO = DAKT / DASD

c) Hata kareler ortalaması \Rightarrow $HKO = HKT / HSD$

4. $H_0 =$ Yöntemler arasında fark yoktur.

$H_1 =$ En az bir ölçüm diğerlerinden farklıdır.

5. Yanılma olasılığı $p = 0.05$ seçilmiştir.

6. $F = GAKO / HKO$

7. $\alpha = 0.05$ düzeyinde GASD ve HSD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: Yöntemler arasında fark yoktur ($F =$ Hesapla bulunan, $p < 0.05$) veya yöntemlerden en az biri farklıdır ($F =$ Hesapla bulunan, $p > 0.05$)

EK 6. Sertifikalar

Analiz No: (Analysis No.)	Defter No: (Logbook No.)	Sayfa No : (Page No.)	Miktar : (Quantity)	Hammadde Adı (Raw material Name)	FAVİPİRAVİR		
588	AAI.166	078	86,00 KG				
Teslim No: (Delivery No.)	Parti No : (Batch No.)	Kap Adedi: (Number of Containers)	Nümunne Adedi : (Number of Samples)	Analiz Adedi : (Number of Analysis)	Namuneyi Alan: (Sampled By)	Çretici Firma: (Manufacturer Firm)	
58821	PT218704	1	1	1	SERKAN GÖNÜL	A.E.Ş.	
Testler (Tests)		Sonuçlar (Results)		Spesifikasyonlar (Specifications)		Referans Metotlar (Reference Method)	
Görünüş (Description)		Sarı renkte toz.		Beyaz renkte hafif sarı renge kadar toz. White to light yellow powder		PH EUR Geçerli baskı PH EUR Current Edition	
Çözünürlük (Solubility)		Uygun Conform		Asetonitril ve etanolda eser miktarda çözünür, su ve etanolda biraz çözünür. Sparingly soluble in acetonitrile and in ethanol, and slightly soluble in water and in ethanol.		PH EUR Geçerli baskı PH EUR Current Edition	
Tepkisi (Identification)		a)Uygun Conform b)Uygun Conform c)Erime Noktası/Melting Point: 190.8 °C		a) IR, standardla uyumlu./Infrared absorption spectrophotometry, meet comply with standard b) HPLC: Alkoksima zamanı, standart İravisipiravirin alkoksima zamanı ile benzer olmalıdır./The retention time of the sample should corresponds to those of the Standard İravisipiravirin c) Erime noktası: 187-193°C/Melting point		PH EUR Geçerli baskı (2.2.24), (2.3.1) PH EUR Current Edition	
Ağır Metaller (Heavy Metals)		≤20 ppm		≤20 ppm		USP Geçerli Baskı (231) USP Current Edition	
Su (Water)		0,46		≤0,5 %		PH EUR Geçerli baskı (2.2.7) PH EUR Current Edition	
Yakam Bakiyesi (Residue On Ignition)		0,03		≤0,1 %		USP Geçerli Baskı (231) USP Current Edition	
Miktar Tayini (Assay)		100,99%		98.0-102.0% (kuru madde (dried substance))		In House	
İlgili Bileşenler (Related Substances)		ND		Favisipiravirin impt (3-6-Ökloropirazin-2-karbonitril) : Max 0,05 % Bilinmeyen tek imptirite /Unknown single impurity : Max 0,05 %		USP Geçerli Baskı USP Current Edition	
Bakiye Çözümleri (Residual Solvent)		≤LOQ		Etilanol : Max 5000ppm		In House	
Düşünceler (Thoughts)							
Analizi Yapan (Analysed By)						Kabul (Accepted)	
Kontrol Eden (Controlled By)						Red (Rejected)	
ADDRESS : TEL : FAX : E-mail :		Avsahiden, Köföncü Sokak No. 1 Kadıköy 34718 İstanbu - TURKEY +90 216 328 89 83 / 90 216 328 98 33 +90 216 348 33 77 info@atabay.com					

EK 7. Tez Çalışması Orijinallik Raporu

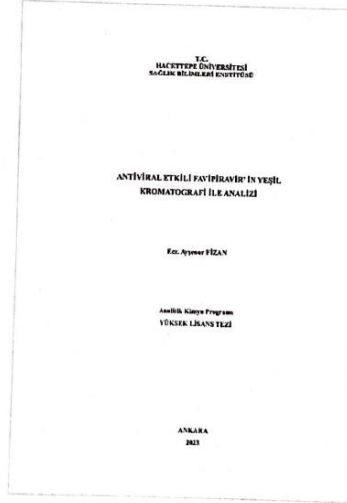


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Ayşenur FİZAN
Ödev başlığı: Ayşenur Fizan YL Tezi
Gönderi Başlığı: ANTİVİRAL ETKİLİ FAVİPİRAVİR'İN YEŞİL KROMATOĞRAFİ İLE A...
Dosya adı: Ay_enur_F_ZAN_YL_TEZ.pdf
Dosya boyutu: 1.33M
Sayfa sayısı: 103
Kelime sayısı: 20,464
Karakter sayısı: 126,394
Gönderim Tarihi: 28-Ağu-2023 11:52ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2152649648



28.08.2023 12:40

Turnitin - Orijinallik Raporu - ANTİVİRAL ETKİLİ FAVİPİRAVİR' İN YEŞİL KROMATOĞRAFI İLE ANALİZİ

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 28-Ağu-2023 12:34 +03
 NUMARA: 2152649648
 Kelime Sayısı: 20464
 Gönderildi: 1

ANTİVİRAL ETKİLİ FAVİPİRAVİR' İN YEŞİL
 KROMATOĞRAFI İLE ANALİZİ Ayşenur Fizan
 tarafından

Benzerlik Endeksi
 %20

Kaynağa göre Benzerlik
 İnternet Sources: %19
 Yayınlar: %2
 Öğrenci Ödevleri: %7

2% match (01-Ağu-2023 tarihli öğrenci ödevleri)
 Submitted to Hacettepe University on 2023-08-01

1% match (25-Şub-2023 tarihli internet)
<http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/56847.pdf>

1% match (03-Nis-2022 tarihli internet)
<http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/52582.pdf>

1% match (05-May-2022 tarihli internet)
<http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/51167.pdf>

1% match (21-Tem-2023 tarihli öğrenci ödevleri)
 Submitted to Hacettepe University on 2023-07-21

1% match (17-Haz-2022 tarihli internet)
http://openaccess.iste.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12508/1974/ozlem_gul.pdf

1% match (04-Nis-2023 tarihli internet)
http://openaccess.iste.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12508/2571/mehmet_lutfi_yola.pdf?isAllowed=y&sequence=1

1% match (22-Tem-2022 tarihli internet)
<https://acikensim.sakarya.edu.tr/bitstream/handle/20.500.12619/80215/T05057.pdf>

1% match (17-May-2016 tarihli öğrenci ödevleri)
 Submitted to TechKnowledge Turkey on 2016-05-17

1% match (01-Kas-2021 tarihli internet)
<https://9lib.net/document/zowdrry8-%C3%BCn%C4%A1vers%C4%A1tes%C4%A1-b%C4%A1p%C4%A1mle%C4%A1-enst%C4%A1t%C3%BCs%C3%BC-preparatlarından-maddes%C4%A1n%C4%A1n-performanslı-kromatograf%C4%A1s%C4%A1-bel%C4%A1riennes%C4%A1.html>

1% match (07-May-2019 tarihli internet)
<https://open.itu.edu.tr/bitstream/11527/8888/1/12418.pdf>

1% match (Emre Kara, Ahmet Çağkan İnkaya, Kutay Demirkan, Serhat Ünal. "COVID-19 Tedavisinde Favipiravir Kullanımı", Flora the Journal of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, 2021)
 Emre Kara, Ahmet Çağkan İnkaya, Kutay Demirkan, Serhat Ünal. "COVID-19 Tedavisinde Favipiravir Kullanımı", Flora the Journal of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, 2021

1% match (18-Nis-2023 tarihli internet)
https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=IYNTE8UNMTObZO7U97cQIA&no=kKK8hOrhI3CL_e9L-2C5Sg

< 1% match (26-Mar-2021 tarihli öğrenci ödevleri)
 Submitted to Hacettepe University on 2021-03-26

< 1% match (29-Ara-2021 tarihli internet)
<https://acikensim.sakarya.edu.tr/bitstream/handle/20.500.12619/79944/T06192.pdf?seq=>

< 1% match (22-Tem-2022 tarihli internet)
<https://acikensim.sakarya.edu.tr/bitstream/handle/20.500.12619/80162/T05358.pdf>

< 1% match (13-Eki-2015 tarihli öğrenci ödevleri)
 Submitted to TechKnowledge Turkey on 2015-10-13

< 1% match (09-Oca-2021 tarihli internet)
<https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12575/36987/10095241.pdf?isAllowed=y&sequence=1>

< 1% match (12-Haz-2021 tarihli internet)

https://www.turnitin.com/newreport_printview.asp?eq=1&eb=1&esm=5&oid=2152649648&sid=0&n=0&m=2&svr=6&r=86.83894416176865&lang=tr

1/21

9. ÖZGEÇMİŞ

