

KADİR ALUÇ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ORNİDAZOL'ün FARMASÖTİK PREPERATLARDA ULTRA
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ

KADİR ALUÇ

DANIŞMAN
PROF. DR. ARMAĞAN ÖNAL

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2022

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ORNİDAZOL'ün FARMASÖTİK PREPERATLARDA ULTRA
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ

KADİR ALUÇ

2. DANIŞMAN
DOÇ. DR. CEM ÖNAL

İSTANBUL SAĞLIK VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

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





İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasını sağlayan, her konuda destek veren, tecrübe ve yönlendirmeleriyle çalışmalarında beni aydınlatan Tez Danışmanım Prof. Dr. Armağan Önal'a, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalının tüm değerli öğretim üyelerine, çalışmalar süresince laboratuvar olanaklarından yararlandığım Abdi İbrahim İlaç Sanayi A.Ş.'ye ve destekleri için aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	I
BEYAN.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İTHAF.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XI
ÖZET	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ornidazol	3
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	3
2.1.2. Ornidazol'un Safsızlıkları.....	4
2.1.2.1. Safsızlık A.....	4
2.1.3. Farmakolojik Özellikleri.....	5
2.1.3.1. Etki Mekanizması	5
2.1.3.2. Emilim	5
2.1.3.3. Dağılım	5
2.1.3.4. Eliminasyon ve Atılım	5
2.1.4. Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri.....	6
2.1.4.1. Diğer Yöntemler ile Analizleri	6
2.1.4.2. Spektrofotometrik Yöntem ile Analizleri	6
2.1.4.3. HPLC Yöntemi ile Analizleri	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	8
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler.....	8
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	8
3.1.2. Çözeltiler.....	9

3.1.2.1. Hareketli Faz için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlığı.....	9
3.1.2.2. Ornidazol Safsızlık Analizi için Gereken Çözeltilerin Hazırlığı.....	9
3.2. Aletler ve Diğer Gereçler.....	12
3.3. Safsızlık Analizi Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar.....	13
3.3.1. Dedektör ve Dalga Boyu Seçimi	13
3.3.2. Hareketli Faz ve Gradient Program Seçimi	13
3.3.3. Kolon Seçimi	13
3.3.4. Metot Geliştirme Çalışmaları.....	13
3.4. Geliştirilen Analiz Yöntemin Validasyonu.....	16
3.4.1. Seçicilik	16
3.4.1.1. Çözelti Hazırlığı.....	16
3.4.2. Doğrusal Aralık.....	17
3.4.3. Dedeksiyon Limiti ve Kantitatif Limit (LOD & LOQ)	17
3.4.4. Düzeltme Faktörü	18
3.4.5. Kesinlik.....	19
3.4.5.1. Sistem Kesinliği	19
3.4.5.2. Tekrarlanabilirlik	19
3.4.5.3. Ara kesinlik.....	19
3.4.6. Doğruluk	20
3.4.7. Dayanıklılık	20
3.4.7.1. Analiz Şartlarında Değişiklik.....	20
3.4.7.2. Çözelti Stabilitesi	21
3.4.8. Stres Çalışması.....	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. Yöntemin Geliştirilmesiyle İlgili Bulgular	22
4.1.1. Dalga Boyu Seçimi	22
4.1.2. Hareketli Faz ve Gradient Program Seçimi	23
4.1.3. Kolon Seçimi	24
4.2. Geliştirilen Yöntem için Kromatografik Koşullar	24
4.3. Geliştirilem Yöntemin Validasyonu	25

4.3.1. Seçicilik	25
4.3.2. Doğrusal Aralık.....	29
4.3.3. Dedeksiyon Limiti ve Kantitatif Limit (LOD & LOQ)	34
4.3.4. Düzeltme Faktörü	36
4.3.5. Kesinlik.....	36
4.3.5.1. Sistem Kesinliği	36
4.3.5.2. Tekrarlanabilirlik	37
4.3.5.3. Ara Kesinlik.....	38
4.3.6. Doğruluk	38
4.3.7. Dayanıklılık	41
4.3.7.1. Analiz Şartlarında Değişilik.....	41
4.3.7.2. Çözelti Stabilitesi	42
4.3.8. Stres Çalışması.....	45
5.TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İNTİHAL RAPORU	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1 : Deneme-2 gradient elüsyon programı.....	15
Tablo 3-2 : Deneme-3 gradient elüsyon programı.....	15
Tablo 3-3 : Doğrusal Aralık seviye ve konsantrasyonları	17
Tablo 4- 1: Kolon seçimi çalışmalarına ait sistem uygunluk kriterleri bulguları	24
Tablo 4- 2 : Gradient elüsyon programı.....	25
Tablo 4- 3 : Safsızlık A doğrusal aralık çalışması sonucunda alınan veriler.....	30
Tablo 4-3 Devam : Safsızlık A doğrusal aralık çalışması sonucunda alınan veriler	31
Tablo 4- 4: Ornidazol doğrusal aralık çalışması sonucunda alınan veriler.....	32
Tablo 4- 4 Devam: Ornidazol doğrusal aralık çalışması sonucunda alınan veriler	33
Tablo 4- 5 : Ornidazol için LOD ve LOQ çalışmasından alınan veriler.....	35
Tablo 4- 6 : Safsızlık A için LOD ve LOQ çalışmasından alınan veriler.....	35
Tablo 4- 7: Sistem kesinliği çalışma sonuçları	37
Tablo 4- 8: Aynı gün içerisinde yapılan analizlerin tekrarlanabilirlik çalışmaları	37
Tablo 4- 9: Ara kesinlik çalışma sonuçları	38
Tablo 4- 10: Ornidazol doğruluk çalışması sonuçları.....	39
Tablo 4- 11: Safsızlık A doğruluk çalışması sonuçları.....	40
Tablo 4-12: Analiz şartlarında değişiklik çalışması safsızlık sonuçları	41
Tablo 4- 13: Analiz şartlarında değişiklik çalışması sistem uygunluk sonuçları	42
Tablo 4- 14: Standart çözeltisi stabilite tablosu.....	43
Tablo 4- 15 : 250 mg ve 500 mg Ornidazol içeren Ornisid Film Tablet numune çözeltileri stabilite tablosu	44
Tablo 4- 16: Stres çalışması Sonuçları*	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil-2-1: Ornidazol Kimyasal Formülü	3
Şekil-2-2: Ornidazol FT-IR Spektrumu	3
Şekil-2-3 Safsızlık A Kimyasal Formülü.....	4
Şekil 4-1: Ornidazol'e Ait Spektrum	22
Şekil 4-2 : Safsızlık A'ya Ait Spektrum	22
Şekil 4-3 : İzokritik Akış Ve pH : 3.0 Fosfat Tamponu - Asetonitril İçeren Mobil Faz	23
Şekil 4-4 : Gradient Elüsyon Akış ve pH : 6.5 Asetat Tamponu - Metanol İçeren Mobil Faz.....	23
Şekil 4-5: Çözücü Kromatogramı	25
Şekil 4-6: Plasebo Kromatogramı	26
Şekil 4-7: Ornidazol Standart Çözeltisi Kromatogramı.....	26
Şekil 4-8: Safsızlık A Standart Çözeltisi Kromatogramı.....	27
Şekil 4-9: Ornisid 250 Mg Film Tablet Numune Çözeltisi Kromatogramı.....	27
Şekil 4-10: Ornisid 500 Mg Film Tablet Numune Çözeltisi Kromatogramı	28
Şekil 4-11: Safsızlık A Eklenmiş Ornisid 250 mg Film Tablet Numune Kromatogramı	28
Şekil 4-12: Safsızlık A Eklenmiş Ornisid 500 mg Film Tablet Numune Kromatogramı	29
Şekil 4-13: Safsızlık A Doğrusal Aralık Grafiği	34
Şekil 4- 14: Ornidazol Doğrusal Aralık Grafiği	34
Şekil 4- 15: LOQ Seviyesini İçeren Ornidazol Doğrusal Aralık Grafiği	36
Şekil 4- 16: LOQ Seviyesini İçeren Safsızlık A Doğrusal Aralık Grafiği.....	36
Şekil 4- 17: Tablet Numune Kromatogramı	46
Şekil 4- 18: Tablet Numune Kromatogramı Ornidazol Pik Saflık Eğrisi.....	46
Şekil 4- 19: Tablet Numune Kromatogramı Safsızlık A Pik Saflık Eğrisi.....	46
Şekil 4- 20: Isı Bozundurması Numunesine Ait Kromatogramı.....	47
Şekil 4- 21: Isı Bozundurması Numunesine Ait Ornidazol Pik Saflık Eğrisi.....	47
Şekil 4- 22: Isı Bozundurması Numunesine Ait Safsızlık A Pik Saflık Eğrisi.....	47
Şekil 4- 23: Asit Bozundurması Numunesine Ait Kromatogramı	48
Şekil 4- 24: Asit Bozundurması Numunesine Ait Ornidazol Pik Saflık Eğrisi	48

Şekil 4- 25: Asit Bozundurması Numunesine Ait Safsızlık A Pik Saflık Eğrisi	48
Şekil 4- 26: Baz Bozundurması Numunesine Ait Kromatogramı	49
Şekil 4- 27: Baz Bozundurması Numunesine Ait Ornidazol Pik Saflık Eğrisi	49
Şekil 4- 28: Baz Bozundurması Numunesine Ait Safsızlık A Pik Saflık Eğrisi.....	49
Şekil 4- 29: Oksidasyon Bozundurması Numunesine Ait Kromatogramı.....	50
Şekil 4- 30: Oksidasyon Bozundurması Numunesine Ait Ornidazol Pik Saflık Eğrisi..	50
Şekil 4- 31: Oksidasyon Bozundurması Numunesine Ait Safsızlık A Pik Saflık Eğrisi	50
Şekil 4- 32: Işık Bozundurması Numunesine Ait Kromatogramı.....	51
Şekil 4- 33: Işık Bozundurması Numunesine Ait Ornidazol Pik Saflık Eğrisi.....	51
Şekil 4- 34: Işık Bozundurması Numunesine Ait Safsızlık A Pik Saflık Eğrisi.....	51
Şekil 4- 35: Isı Ve Nem Bozundurması Numunesine Ait Kromatogramı	52
Şekil 4- 36: Isı Ve Nem Bozundurması Numunesine Ait Ornidazol Pik Saflık Eğrisi .	52
Şekil 4- 37: Isı Ve Nem Bozundurması Numunesine Ait Safsızlık A Pik Saflık Eğrisi	52

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

EMA: Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FT-IR: Fourier Dönüşümlü İnfrared

h/h : hacim / hacim

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HPTLC: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

LOD: Gözlenebilme sınırı

LOQ: Tayin Sınırı

mg: miligram

mL: mililitre

PDA : Fotodiyot serili dedektör

PTFE : Politetrafloroetilen

RC : Rejenere Selüloz

RSD: Bağlı Standart Sapma

RRT: Bağlı Alıkonma Zamanı

RT: Alıkonma Zamanı

SD: Standart Sapma

UPLC: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi

UV: Ultraviyole

UV/VIS: Ultraviyole Visible

ÖZET

Aluç, K. (2021). Ornidazol'ün Farnasötik Preparatlarda Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analizi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Gelişen partikül teknolojisi ile birlikte ultra performans sıvı kromatografisi (UPLC) yönteminin daha iyi rezolüsyon, daha seçici ve hızlı analiz süresiyle geleneksel yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) metoduna göre daha ileri bir teknik olduğu bilinmektedir. Ornidazol amebik enfeksiyon tedavisi için kullanılan suda az çözünebilen 5-nitroimidazol türevi bir moleküldür. Bu tez çalışması kapsamında, Ornidazol ve Safsızlık A'nın farnasötik preparatlarda analizi için yeni bir UPLC metodu geliştirmek ve geliştirilen bu metodu valide etmek amaçlanmıştır. Geliştirilen yöntemde; UPLC C₁₈ kolonu (50 x 2.1 mm, 1.7 µm) kullanıldı. Kromatografik ayırmalar, asetonitril ve asetat tamponunun gradient elüsyonu ile 0.4 mL/dk'lık akış hızında gerçekleştirilmiştir. Dalga boyu olarak 312 nm dalga boyu seçilmiştir. Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) yönergelerine göre, farnasötik preparatlar, oksidasyon, termal bozunma ve asidik ve bazik koşullar dahil olmak üzere çeşitli zorunlu bozunma koşullarına maruz bırakıldı. Doğrusallık, Ornidazol için 0.02 ile 0.80 µg/mL ve Safsızlık A (1-(2,3-dihidroksipropil)-2-metil-5-nitroimidazol) için 0.04 ile 1.58 µg/mL aralığında olduğu tayin edilmiştir. Ornidazol için dedeksiyon ve kantitasyon limitlerinin aralıkları sırasıyla 0.014 ve 0.042 µg/mL ve Safsızlık A için dedeksiyon ve kantitasyon limitlerinin aralıkları sırasıyla 0.010 ve 0.029 µg/mL olarak belirlendi. Hesaplanan korelasyon katsayılarının Ornidazol ve Safsızlık A için 0.99'dan yüksek olduğu görülmüştür. Ornidazol ve Safsızlık A için ortalama geri kazanım değerleri % 95.00-% 105.00 aralığında belirlendi. Bu yeni geliştirilen analitik yöntem için elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Geliştirilen yöntem basit, seçici ve tekrarlanabilir olup; Ornidazolün farnasötik preparatları analizlerinde güvenle kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ornidazol, UPLC, Safsızlık Analizi, Validasyon, Farnasötik Preparat.

ABSTRACT

Aluç, K. (2021). Analysis of Ornidazole in Pharmaceutical Preparations by Ultra Performance Liquid Chromatography, Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. Istanbul.

Since the past years with the particle technology developed, Ultra performance liquid chromatography (UPLC) has proven to be an advanced technique from traditional high-performance chromatography (HPLC) with better separation, more selective and faster analysis time. Ornidazole is a slightly soluble in water, 5-nitroimidazole-derived molecule used for treat amebic infection. Within the scope of this thesis to develop and validate a new method, using UPLC to perform a quantitative analysis of Ornidazole and Impurity A in pharmaceutical preparations. In the developed method; a UPLC BEH C₁₈ (50 x 2.1 mm, 1.7 µm) was used as a column. Chromatographic separations were performed at a flow rate of 0.4 mL/min by gradient elution of acetonitrile and acetate buffer. The wavelength of 312 nm was chosen for the detection. According to The International Conference on Harmonization (ICH) guidelines, the pharmaceutical preparation was exposed to various forced degradation conditions, including oxidation, thermal degradation and under acidic and basic conditions. Linearity was carried out to found from between 0.02 to 0.80 µg/mL for Ornidazole and between 0.04 to 1.58 µg/mL for Impurity A. The ranges of the detection and quantitation limits for Ornidazole were found to 0.014 and 0.042 µg/mL respectively and the ranges of the detection and quantitation limits for Impurity A were found to 0.010 and 0.029 µg/mL respectively. The correlation coefficients calculated for Ornidazole and Impurity A were found to be higher than 0.99. Average recovery values for Ornidazole and Impurity A were determined in the range of 95.00%-105.00%. The results obtained for this newly developed analytical method were evaluated statistically. It has been determined that the developed method is simple, selective and reproducible and can be used safely in the analysis of pharmaceutical preparations of Ornidazole.

Keywords: Ornidazole, UPLC, Impurity Analysis, Validation, Pharmaceutical Preparations

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Entamoeba histolytica, amip türü olup; gelişmekte olan ülkeler için ortak olan; insan kalın bağırsaklarının enfeksiyonundan sorumlu enterik bir insan protozoan parazitidir. Yılda yaklaşık 100 milyon vaka, *Entamoeba histolytica* amebik dizanterisi veya kolit ile sonuçlanır ve tedavi edilmezse, karaciğer olmak üzere bağırsak sisteminde apse gelişebilir [1]. Hastalık genellikle kirli su kaynakları ya da yıkanmamış sebzelerden insan bağırsağına yerleşir. Enfeksiyonları çoğu asemptomatik olabileceği gibi; karın ağrısı, kilo kaybı hatta kanlı ishal ile kendini gösterebilir [2].

Entamoeba histolytica, kirlenmiş sulardan insana el yada oral yol ile bulaştıktan sonra bağırsak mukozasını istila eder. Portal yol ile karaciğere veya beyine sıçrayarak burada apseye neden olur. Bu vakalarda hastalığın hızlı ilerlemesi sonucu; hastalık ölüm ile sonuçlanır [3]. Şimdiye kadar *Entamoeba histolytica* bakterisinin sebep olduğu kalın bağırsak hastalığı tedavisinde en önemli ilerleme 5-nitroimidazol türevleri olmuştur [4].

1950 yıllarında nitroimidazol türevi bileşiklerinin üzerinde yapılan klinik çalışmalar ile anaerobik bakteriler ve protozoların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan metronidazol etken maddesinin keşfi duyuruldu. Yapılan bu keşiften sonra daha kuvvetli antiprotozoller elde etmek için araştırmalar yapıldı. Nitroimidazol bileşikleri üzerinde yüksek sıcaklık ve alkil fonksiyonel grupları üzerinde değişiklikler ile bir dizi bileşik elde edilmiştir. Bu bileşiklerden bazıları benzoilmetronidazol, tinidazol, ornidazol, bamnidazol, carnidazol ve dimetridazol içerir [5].

5-nitroimidazol türevi olan metronidazol, geçmiş yıllarda protozoan parazitlerinden biri olan *Entamoeba histolytica* da dahil olmak üzere bağırsak enfeksiyonları için tedavi amaçlı kullanılan bir bileşiktir. Metronidazol tedavi için vucuda alındıktan sonra nitrozo türevleri oluşturan redoks tepkimesi vererek çalışır. Bu redoks döngüsü sırasında oluşan oksidatif stres ile metronidazol tedavisinin güvenli olduğu düşünülmekle birlikte potansiyel kanserojen etkisi nedeniyle halen şüphe taşımaktadır [6].

Entamoeba histolytica tedavisinde kullanılan diğerk bir nitroimidazol türevi olan Ornidazol aktif maddesi deneysel amebik enfeksiyonda metronidazole göre daha aktif olduğu kanıtlanmıştır [7]. Molekül formülü 1-(3-kloro-2hidroksi-propil)-2-metil-5-nitroimidazol olan Ornidazol molekülü; 5-nitroimidazol türevi olmakla birlikte, üzerinde yer alan nitro gruplarının redoks tepkimesiyle indirgenmesi sonucu antimikrobiyolojik özellik kazandığı belirlenmiştir [8,9].

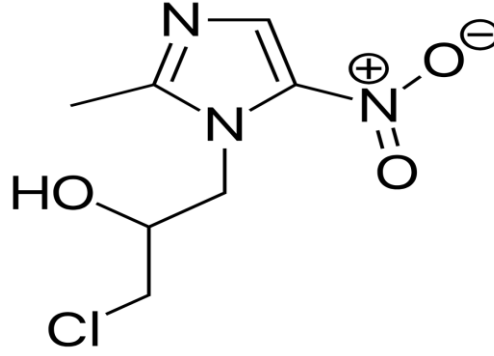
Metronidazole göre alınan doz ayarlamasında hastalığın tedavisi için Ornidazolün daha etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bunun yanında hastalarda görülen yan etkilerin de Metronidazole kıyasla daha hafif olduğu tayin edilmiştir[10].

Literatürde, Ornidazolün farmasötik preparatlardaki analizleri incelendiğinde bu ilaca ait miktar tayini analizlerinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka sıvı kromatografisi (TLC) ve spektrofotometrik yöntemlerin kullanıldığı görülmüştür. Ayrıca Ornidazol'ün farmasötik preparatlardaki safsızlık tayini için literatürde herhangi bir yöntemle rastlanmamıştır. Bu çalışmamızda UPLC yöntemi ile uygulaması daha kolay, analiz süresi açısından hızlı, basit, seçici ve güvenilir UV dedeksiyona dayanan bir ultra performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmesi ve bu geliştirilen yöntemin ilaç maddesinin farmasötik preparatlardaki analizine uygulanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ornidazol

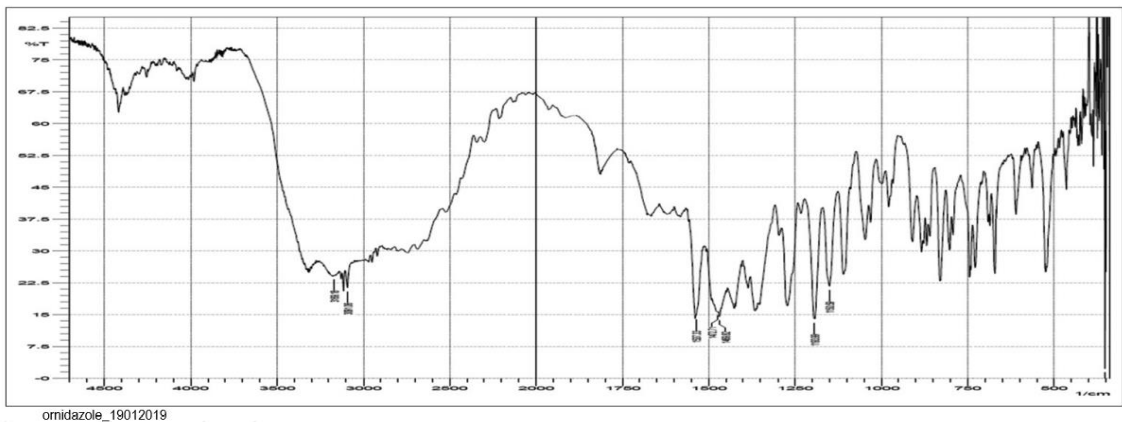
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil-2-1: Ornidazol kimyasal formülü

Ornidazol kimyasal adı 1-(3-kloro-2hidroksi-propil)-2-metil-5-nitroimidazol olup kapalı formülü $C_7H_{10}ClN_3O_3$ dir. Molekül ağırlığı, 219.5 g/mol'dür. Beyaz ya da açık sarımsı kristal toz olan ornidazol suda az, alkolde serbestçe çözünür. Erime derecesi yaklaşık $77.5^{\circ}C$ 'dir [11]. Ornidazol'ün kimyasal formülü Şekil 2-1'de görülmektedir.

Ornidazol fourier dönüşümlü infrared (FT-IR) spektrumu Şekil 2-2'de görülmektedir. Tablo 2-1'de Ornidazol FT-IR spektrumu frekans değerleri gösterilmiştir.



Şekil-2-2: Ornidazol FT-IR spektrumu

Tablo 2-1: Ornidazol için FT-IR frekans değerleri verilmiştir.

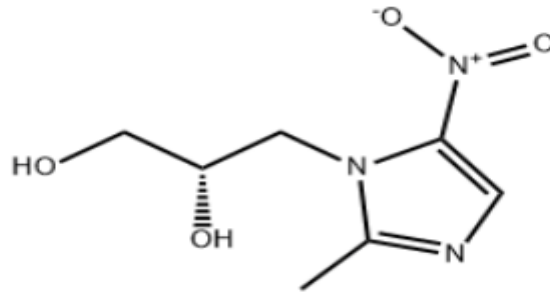
Frekans/cm	Grup
331.55,3165.93	OH
3111.93, 3089.75	=CH
1538.12, 1363.58	NO ₂
1470.62	-C=N, CH ₂
1271.97, 1192.89	C-N
1106.10	CHOH

2.1.2. Ornidazol'un Safsızlıkları

Ornidazol etken madde olarak Avrupa Farmakopesinde ve Amerika Farmakopesinde yer almamaktadır. Bununla birlikte Ornidazol ilaç etken madde üreticisi olan AARTI (India) firmasının Drug Master File (DMF) içeriğinde yer alan Safsızlık A (1-(2,3,dihidroksipropil)-2metil-5nitroimidazol) analitik yöntemin geliştirme çalışmalarında kullanılacaktır. Seçicilik çalışmalarında ve safsızlığa ait limit belirleme çalışmalarında ICH Q3B klavuzunda bulunan Ek-1 “Thresholds for Degradation Products in New Drug Products” yönergelerinden yararlanılmıştır. Mütamadiyen kullanan hastalar için limit % 0.1 olarak hesaplanmış ve tüm çalışmalar bu limite göre yapılmıştır.

2.1.2.1. Safsızlık A

Kimyasal adı 1-(2,3-dihidroksipropil)-2-metil-5-nitroimidazol'dür (Şekil 2-3). Molekülün kapalı formülü C₇H₁₁N₃O₄ ve molekül ağırlığı 201.18 g/mol'dür.

**Şekil-2-3 Safsızlık A kimyasal formülü**

2.1.3. Farmakolojik Özellikleri

2.1.3.1. Etki Mekanizması

Trichomonas vaginalis, *Entamoeba histolytica* ve *Giardia lamblia* (*Giardia intestinalis*) ve aynı zamanda *Bacteroides* ve *Clostridium* türleri, *Fusobacterium* türleri gibi belirli anaerobik bakteriler ve anaerob koklara karşı etkilidir [12].

Ornidazol, protozoan bakterilerinden kaynaklı hastalıkların tedavisinde kullanılan 5-nitroimidazol türevlerinden biridir. Nitroimidazol türevi olan Ornidazol ilaç etken maddesi oral yollardan alındıktan sonra *Entamoeba histolytica* tedavisi için hücrelere difüzyon yoluyla giriş yapar. Ornidazol'un kimyasal yapısında olan nitro bileşikler sayesinde bir redoks tepkimesi gerçekleşir. Bu kimyasal reaksiyon sonucu oluşan yan ürünlerin sitotoksik etkisi ile DNA sarmalında oluşan hata ve düzenlenmesiminin engellenmesi sonucu hücre ölümü gerçekleşir. Ornidazol'un üzerinde yer alan nitro grupları ile hastalığın tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır [13,14,15].

2.1.3.2. Emilim

Oral uygulamadan sonra ornidazol hızla emilir. Ortalama absorpsiyonu %90'dır. 3 saat içinde pik plazma konsantrasyonlarına ulaşılır[12]. Yapılan çalışmalarda Ornidazol hastaya uygulanmasından sonra 1.54 ± 0.81 saat sonra kandaki ortalama konsantrasyon $C_{Maks} 32.67 \pm 4.45 \mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiş, referans ürün için ise 1.79 ± 0.89 saat sonra kandaki ortalama konsantrasyon $C_{Maks} 31.55 \pm 5.04 \mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Farklı formülasyona sahip ilaçlar için anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Ornidazol'un emilimi için açlık tokluk farkı olmamasına rağmen, tok karına alınan Ornidazol'un emilimi daha hızlıdır [13,16].

2.1.3.3. Dağılım

Ornidazol ilaç etken maddesi vucutta bir çok dokuda yaygın olarak gözlenebilir. Bağırsak dokularında $8.7 \mu\text{g/g}$, karın duvarlarında 3.6 ila $4.4 \mu\text{g/g}$ olarak tespit edilmiştir [17].

2.1.3.4. Eliminasyon ve Atılım

Ornidazol karaciğerde başlıca 2-hidroksimetil ve a-hidroksimetil metabolitlerine metabolize olur [12]. Ornidazol'un alınan konsantrasyonun bir kısmı idrarla atılmaktadır. Değişmeden kalan kısım ise dışkı yoluyla vucuttan bertaraf edilir. Yarı ömrü yaklaşık 13 saattir. Alınan tek dozun, %85'i ilk 5 gün içinde çoğu metabolize

olarak atılır. İdrarla atılan kısım %63 iken; yaklaşık %22'lik bir kısmı dışkı ile atılır. Dozun %4'ü ise değişmeyen bileşik olarak idrarla atılmaktadır [16,18].

2.1.4. Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri

2.1.4.1. Diğer Yöntemler ile Analizleri

Phatak ve arkadaşları, farmasötik preparatlarda Ornidozol ve Mikonazolefrom'un yan yana tayini için Gaz kromatografisi (GC) yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, durgun faz olarak 60m x 0.25mm %5 fenil polisiloksan ile %95 dimetil polisiloksan kolon ve dedektör olarak kütle dedektörü kullanarak yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Doğrusal aralık, Ornidazol için 50–150 µg/mL ve Ofloksasin için 50–150 µg/mL olarak belirlenmiştir [19].

2.1.4.2. Spektrofotometrik Yöntem ile Analizleri

Puranik ve arkadaşları, Ofloksasin ve Ornidozol'un yan yana farmasötik preparatlarda tayini için bir yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde mobil faz olarak diklorometan-metanol-amonyak çözeltisi ve durgun faz silika jel 60F₂₅₄ plağı kullanılmıştır. Dalga boyu olarak 318 nm dalga boyu seçilmiştir. Doğrusal aralık, Ornidazol için 50-250 ng/spot ve Ofloksasin için 20-100 ng/spot olarak belirlenmiştir [20].

Mazumder ve arkadaşları, farmasötik preparatlarda Ornidazol'un miktar tayini için bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem için etanol çözücü olarak kullanılmıştır. Dalga boyu olarak 310 nm seçilmiştir. Doğrusal aralık 5-25 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ornidozol için yapılan çalışmada geri kazanım değerleri % 96.30 - % 98.00 aralığında tayin edilmiştir [21].

Venkateswarlu ve arkadaşları, hammadde ve farmasötik preparatlarda Ornidazol üzerindeki nitro(NO₂) gruplarının azaltılması işlemleri yapılarak iki ayrı spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Ornidazol için 5 - 55 µg/mL doğrusallık çalışması yapılmıştır. Yöntemde iki ayrı türevlendirme belirtecinden biri Potasyum Ferrisiyanid-Demir 3 iken, diğer türevlendirme aracı olarak 2,2-Bipridil-Demir 3 reaktifleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmada 570 nm dalga boyu seçilmiştir [22].

2.1.4.3. HPLC Yöntemi ile Analizleri

Kothapalli ve arkadaşları, farmasötik preparatlarda Gatilfoksasin ve Ornidozol'un yan yana analizi için bir HPLC metodu geliştirmişlerdir ve bu yöntemi dissolüsyon analizlerine uygulamışlardır. Kromatografik ayırmalar, C₁₈ kolon kullanarak, asetonitril-trietilamin karışımının pH 3.0'e ayarlandığı fosfat tamponunun hareketli faz olarak kullanıldığı; 1.0 mL/dakika akış hızında, 300 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Doğrusal aralık, Ornidozol için 2-24 µg/mL ve Gatilfoksasin için 5-60 µg/mL olarak belirlenmiştir. Gatilfoksasin ve Ornidozol için yapılan çalışmadan geri kazanım değerleri % 98.0 - % 102.0 aralığında tayin edilmiştir [23].

Puranik ve arkadaşları, Ofeksasin ve Ornidozolün yan yana farmasötik preparatlarda tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntem için fosfat tamponu-asetonitril-metanol içeren karışımın pH'ını 3.0'a ayarlayarak hareketli faz oluşturmuş, durgun faz için 250x4.6mm C₁₈ kolon kullanmışlardır. Dalga boyu olarak 318 nm dalga boyu seçilmiştir. Doğrusal aralık, Ornidozol için 5-100 µg/mL ve Ofeksasin için 2-400 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ofeksasin ve Ornidozol için yapılan çalışmadan geri kazanım değerleri % 100.47 - % 99.32 olarak tayin edilmiştir [24].

Shelke ve arkadaşları, farmasötik preparatlarda Sefiksim ve Ornidozol'un yan yana olarak tayini için 150x4.6mm C₈ kolon ve su-asetonitril karışımı bir hareketli faz yardımıyla 1.0 mL/dak akış hızında 288 nm dalga boyu kullanılarak HPLC'de yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Doğrusal aralık, Ornidozol için 250-750 µg/mL ve Sefiksim için 100-300 µg/mL olarak belirlenmiştir. Sefiksim ve Ornidozol için yapılan çalışmadan geri kazanım değerleri % 99.86 - % 100.28 olarak tayin edilmiştir [25].

Du ve arkadaşları, ornidozolün aktif metabolitlerini (M3, M6, M16-1, ve M16-2) insan plazmasında tayini için elektrospray iyonizasyon kaynaklı kütle spektrofotometresi kullanarak UPLC'de yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntem için 100x4.6mm, 5µ C₁₈ kolon kullanmışlardır. Hareketli faz olarak metanol-amonyum asetat ve formik asit karışımı ile yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Doğrusal aralık, Ornidozol için; 100-30000 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ornidozol için yapılan çalışmadan geri kazanım değerleri % 96.0 - % 99.9 aralığında tayin edilmiştir [26].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve A.Ş. Esenyurt ArGe merkezinde 2019-2021 yılları arasında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Çalışma süresince kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler aşağıdaki gibidir.

Ornidazol¹,

Ornidazol Safsızlık A (1-(2,3-dihidroksipropil)) 2 methyl-5 nitrpimidazole)¹,

Ornisid 250 mg film kaplı tablet®²,

Ornisid 500 mg film kaplı tablet ®²,

Sodyum Asetat (HPLC saflığında)³,

Trietilamin (HPLC saflığında)³,

Ortofosforik Asit (HPLC saflığında)³,

Asetik Asit (HPLC saflığında)⁴,

Metanol (HPLC saflığında)⁴,

Hidroklorik Asit (%37'lik)⁴,

Sodyum Hidroksit⁴,

Hidrojen Peroksit⁴,

Ultra saf su (HPLC saflığında),

¹ AARTI, India

² Abdiibrahim Ilac, İstanbul, Türkiye

³ Isolab, İstanbul, Türkiye

⁴ Merck, E. Merck A.G. Darmstadt, Almanya

3.1.2. Çözeltiler

3.1.2.1. Hareketli Faz için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlığı

Tampon Çözeltisi

16.4 gram susuz sodyum asetat 900 mL saf su içeren balona alınır. Susuz asetik asit ile pH 6.5'a ayarlanır. Üzerine saf su ilave edilerek son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

Hareketli Faz A

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

Hareketli Faz B

Metanol

Çözücü

500 mL tampon çözelti üzerine 500 mL metanol ilave edilerek son hacim 1000 mL'ye tamamlandı. (Tampon : methanol, 50:50, h/h) Degaze edildikten sonra 0.45µm mebran filtreden süzülür.

3.1.2.2. Ornidazol Safsızlık Analizi için Gereken Çözeltilerin Hazırlığı

Stok Ornidazol Standart Çözeltisi:

10 mg Ornidazol çalışma standardı 50 mL'lik balon jojeye hassas olarak tartılır. Yaklaşık 25 mL çözücü ilave edilerek 5 dakika ultrasonik banyoda çözülür ve hacmine çözücü ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2 mL alınarak 100 mL'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücü ile tamamlanır (Stok Standart_{Ornidazol} : 4 µg/mL).

Ornidazol Standart Çözeltisi:

Stok standart çözeltiden 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücü ile tamamlanır (Standart Çözelti_{Ornidazol} : 0.4 µg/mL). 0.45 µm PVDF filtreden süzülür.

Safsızlık A Stok Standart Çözeltisi

2.0 mg Safsızlık A çalışma standardı 250 mL'lik balon jojeye tartılır. Yaklaşık 10 mL çözücü ilave edilerek 5 dakika ultrasonik banyoda çözülür, hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır (C_{Safsızlık A}: 8 µg/mL).

Safsızlık A Safsızlık Standart Çözeltisi

Safsızlık A safsızlık stok standart çözeltisinin 1 mL'si alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarılır, hacmine çözücü ile tamamlanır, karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtre ile süzülür (C Safsızlık A: 0.8 µg/mL).

Farmasötik Preparat-1 (250 mg Ornidazol içeren tablet):

20 adet Ornisid 250 mg Film Tablet numunelerinin ortalama tablet ağırlığı belirlenir ve ezilerek toz haline getirilir. Bu toz karışımdan yaklaşık 264 mg tablet tozu (200 mg Ornidazol'e eşdeğer) 500 mL'lik balon jojeye hassas olarak tartılır. Yaklaşık 100 mL çözücü ilave edilerek 30 dakika mekanik çalkalayıcıda çözülür ve çözücü ile tamamlanır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülür (400 µg/mL Ornidazol).

Farmasötik Preparat-2 (500 mg Ornidazol içeren tablet):

20 adet Ornisid 500 mg Film Tablet numunelerinin ortalama tablet ağırlığı belirlenir ve ezilerek toz haline getirilir. Bu toz karışımdan 264 mg tablet tozu (200 mg Ornidazol'e eşdeğer) 500 mL'lik balon jojeye hassas olarak tartılır. Yaklaşık 100 mL çözücü ilave edilerek 30 dakika mekanik çalkalayıcıda çözülür ve çözücü ile tamamlanır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülür (400 µg/mL Ornidazol).

Farmasötik Preparat-1 Plasebo çözelti:

Yaklaşık 64 mg Ornisid 500 mg Film Tablet plasebosu (Plasebo içeriği : Hidroksipropil metil selüloz E-15, Mikrokristalin selüloz (Tip 102), Kurutulmuş nişasta, Magnezyum stearate, Opadry White II, Talk, PEG 4000, PVA, Titanyum dioksit) 500 mL'lik balon jojeye hassas olarak tartılır. Yaklaşık 100 mL çözücü ilave edilerek 30 dakika mekanik çalkalayıcıda çözülür ve hacmine çözücü ile tamamlanır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülür.

Farmasötik Preparat-2 Plasebo çözelti:

Yaklaşık 64 mg Ornidazol 500 mg Film Tablet plasebosu (Plasebo içeriği : Hidroksipropil metil selüloz E-15, Mikrokristalin selüloz (Tip 102), Kurutulmuş nişasta, Magnezyum stearate, Opadry White II, Talk, PEG 4000, PVA, Titanyum dioksit) 500 mL'lik balon jojeye hassas olarak tartılır. Yaklaşık 100 mL çözücü ilave edilerek 30

dakika mekanik çalkalayıcıda çözülür ve hacmine çözücü ile tamamlanır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülür.

Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltileri Hazırlığı

Farmasötik Preparat-1 (250 mg Ornidazol içeren tablet)

20 adet Ornisid 250 mg Film Tablet ezilerek toz haline getirilir. Bu toz karışımdan yaklaşık 256 mg tablet tozu (200 mg Ornidazol'e eşdeğer) 50 mL'lik balon jojeye hassas olarak tartılır. Yaklaşık 10 mL çözücü ilave edilerek 30 dakika mekanik çalkalayıcıda çözülür ve hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtre ile süzülür. Bu çözeltiden 1 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılır, üzerine 1 mL Safsızlık A safsızlık stok çözeltisi ilave edilip çözücü ile hacmine tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtre ile süzülür ($C_{\text{Ornidazol}}$: 400 µg/mL, $C_{\text{Safsızlık A}}$: 0.8 µg/mL).

Farmasötik Preparat-2 (500 mg Ornidazol içeren tablet)

20 adet Ornisid 500 mg Film Tablet ezilerek toz haline getirilir. Bu toz karışımdan yaklaşık 256 mg tablet tozu (200 mg Ornidazol'e eşdeğer) 50 mL'lik balon jojeye hassas olarak tartılır. Yaklaşık 10 mL çözücü ilave edilerek 30 dakika mekanik çalkalayıcıda çözülür ve hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtre ile süzülür. Bu çözeltiden 1 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılır, üzerine 1 mL Safsızlık A safsızlık stok çözeltisi ilave edilip çözücü ile hacmine tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtre ile süzülür ($C_{\text{Ornidazol}}$: 400 µg/mL, $C_{\text{Safsızlık A}}$: 0.8 µg/mL).

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

1. UPLC Cihazı (Waters ACQUITY UPLC System, Binary Pump)

- Binary Solvent Manager LC pompa sistemi
- PDA Detektör (Photo Diode Array)
- Empower 3 LC Sistem yazılımı
- Sample Manager Otomatik numune örnekleyicisi
- Kolon fırını
- Analitik kolon: Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 x 50 mm, 1.7 µm; Waters, USA).
- Lenova dizüstü bilgisayar
- Xerox C235 Yazıcı

2. Yazılımlar

- Empower 3 programı
- MS Office Word Programı
- MS Office Excel Programı

3. Mobil faz süzme ünitesi (Millipor, 0,5 µ)

4. pH Metre (Mettler Toledo)

5. Çoklu Karıştırıcı (Memmert)

6. Isolab Mezür (1000 mL, 2000 mL) (Wertheim, Almanya)

7. Teraziler (Mettler Toledo XPR36C)

8. Ultrasonik banyo (Sonorex Super)

9. Ultra saf su cihazı (Sartorius Arium® pro)

10. Otomatik pipetler (Adamas-Beta 10, 1000 µL ve 5000 µL lik)

11. Çoklu karıştırıcı (Prowhite)

12. Balonjojeler (5,10, 25, 50, 100 ve 500 mL 'lik)

13. Dereceli ve transfer pipetler

3.3. Safsızlık Analizi Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

Ornidazol'un ilgili safsızlıklar için literatür taramaları yapıldı. Yapılan incelemeler sonrasında UPLC sistemi ile Ornidazol ve safsızlıklarının yan yana analizlerinin yapılmasına karar verilmiştir. Analizin yapılabilmesi için dalgaboyu, kolon özelliği, mobil faz, akış hızı, kolon sıcaklığı gibi kromatografik koşullar için denemeler yapılarak analize uygun şartlar belirlendi.

3.3.1. Dedektör ve Dalga Boyu Seçimi

Ornidazol ışığı absorblayabilen bir kimyasal yapıya sahip olması sebebiyle; seçilecek yöntemde kullanılacak dedektör içinde; ışığın absorpsiyonu ölçebilen tekniğe uygun olarak PDA (Photo Diode Dedector) veya Ultraviyole Visible (UV/Vis) dedektör seçildi. PDA dedektör anlık olarak birden fazla dalga boyunda ölçüm yapabilen bir dedektör olduğu için; Ornidazol ve Safsızlık A için spektrumlar alınarak; maksimum dalga boyu seçiminde faydalanıldı. Sonuçlar Bölüm 4.1.1'de sunulmuştur.

3.3.2. Hareketli Faz ve Gradient Program Seçimi

Ornidazol ve en uygun gradient programının tespiti için, çeşitli oranlarda asetonitril, metanol ve tampon karışımı kullanılarak, hareketli faz sistemleri ile denemeler yapıldı. Yapılan çalışmalara ait sonuçlar Bölüm 4.1.2'de yer almaktadır.

3.3.3. Kolon Seçimi

Literatürde HPLC için kullanılan kolonlar incelendi. UPLC sisteminde geliştirilen yöntem için; değişik uzunluklarda (5 cm- 10 cm) ve farklı özelliklerde (C₈ ve C₁₈) kolonlarla çalışmalar yapıldı. Uygun gradient program ile birlikte, kolon ve hareketli faz Ornidazol etken maddesi ve ilgili safsızlıkların ayrışması da kullanılarak belirlendi. Sonuçlar Bölüm 4.1.3'de verilmiştir.

3.3.4. Metot Geliştirme Çalışmaları

Safsızlık metodunun geliştirilebilmesi için belirli parametrelerde yapılan değişiklikler aşağıda verilmiştir.

Deneme-1:**Kromatografik Şartlar**

Kullanılan Cihaz	: UPLC; UV ve PDA dedektör
Kolon	: BEH C ₁₈ (50 mm x 2.1 mm) , 1.7 µm
Kolon Sıcaklığı	: 25°C
Numune Sıcaklığı	: 25°C
Mobil Faz	: pH 3.0 (Trietilamin-Ortofosforikasit tamponu) : Asetonitril (60:40)
Akış Hızı	: 0.5 mL/dk
Dalga Boyu	: 312 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 3 µL
Loop Hacmi	: 10 µL
Analiz Süresi	: 5 dakika

Deneme-2 :**Kromatografik Şartlar**

Kullanılan Cihaz	: UPLC; UV ve PDA dedektör
Kolon	: BEH C ₈ (50 mm x 2.1 mm) , 1.7 µm
Kolon Sıcaklığı	: 40°C
Numune Sıcaklığı	: 25°C
Mobil Faz A	: 0.2M pH 6.5 Sodyum Asetat Tamponu
Mobil Faz B	: Asetonitril
Çözücü	: 0.2M pH 6.5 Sodyum Asetat Tamponu: Asetonitril (50:50,h/h)
Akış Hızı	: 0.4 mL/dk
Dalga Boyu	: 312 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 5 µL
Loop Hacmi	: 10 µL
Analiz Süresi	: 5 dakika

Tablo 3-1 : Deneme-2 gradient elüsyon programı

Zaman (dk.)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	90	10
2.0	55	45
3.0	55	45
4.0	90	10
5.0	90	10

Deneme-3 :**Kromatografik Şartlar**

Kullanılan Cihaz	: UPLC; UV ve PDA dedektör
Kolon	: BEH C ₁₈ (50 mm x 2.1 mm) , 1.7 µm
Kolon Sıcaklığı	: 50°C
Numune Sıcaklığı	: 25°C
Mobil Faz A	: 0.2M pH 6.5 Sodyum Asetat Tamponu
Mobil Faz B	: Metanol
Çözücü	: 0.2M pH 6.5 Sodyum Asetat Tamponu:Metanol (50:50,h/h)
Akış Hızı	: 0.4 mL/dk
Dalga Boyu	: 312 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 5 µL
Loop Hacmi	: 10 µL
Analiz Süresi	: 5 dakika

Tablo 3-2 : Deneme-3 gradient elüsyon programı

Zaman (dk.)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	90	10
2.0	55	45
3.0	55	45
4.0	90	10
5.0	90	10

3.4. Geliştirilen Analiz Yöntemin Validasyonu

Ön hazırlık çalışmaları sonucunda en iyi sonuçlar Deneme 3 ile elde edilmiştir. Bu çalışmaya ait sonuçlar Bölüm 4.1’de verilmiştir. Ornidazol’un farmasötik preparatlarda safsızlıkları için geliştirilen yönteminin tamamlanmasıyla, geliştirilen analitik yöntem için validasyon ICH kılavuzu Q2(R1)’e göre yapıldı [27].

3.4.1. Seçicilik

Yeni geliştirilen bu yöntem için; metodun analiz edilen örnek içerisinde; Ornidazol, olası bozunma ürünleri ve Ornidazol’e ait safsızlıkların birbirinden ayrılması ve farklı seviyelerde ölçme yeteneğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Seçicilik çalışmasında özgünlüğün kanıtlanması için; çözücü ve tablet plasebosundan gelecek herhangi bir pikin; etkin madde, olası bozunma ürünleri ve Safsızlık A ile herhangi bir girişimin olmadığını göstererek kanıtlanabilir.

Ayrıca yapılan bu çalışmada Ornidazol ve Safsızlık A pikleri için pik saflığı parametreleri de incelenmiştir. Yapılan çalışma için standart, çözücü, tablet plasebolari, Ornisid Fort 500 mg Film Tablet, Ornisid 250 mg Film Tablet numuneleri, Safsızlık A ilave edilmiş numune çözeltileri ve Safsızlık A çalışma standardı enjekte edildi. Verilen enjeksiyonlara ait kromatogramlar ve pik saflık indeks değerleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.1’de sunulmuştur.

3.4.1.1. Çözelti Hazırlığı

Standart, placebo, numune ve safsızlık eklenmiş numune çözeltileri hazırlıkları Bölüm 3.1.2.2.’de anlatıldığı gibidir.

Kabul Ölçütleri

- Ornidazol standart ve numune çözeltileri kromatogramlarında Ornidazol ve Safsızlık A piklerinin alıkonma zamanında çözücü ve plasebolardan herhangi bir girişim olmamalıdır.
- Ornidazol standart, numune çözeltileri ve Safsızlık A eklenmiş numune çözeltilerindeki Ornidazol ve Safsızlık A piklerinin pik saflık endeksleri uygun olmalıdır.
- Ornidazol standart, numune çözeltileri ve Safsızlık A eklenmiş numune çözeltilerindeki; Ornidazol ve Safsızlık A piklerinin arasındaki ayrışma minimum 4.0 olmalıdır.

3.4.2. Doğrusal Aralık

Doğrusal aralık, geliştirilen yöntemin kabul edilebilir duyarlılık içinde cevap ilişkisini kanıtlamak için belirli bir konsantrasyonlar arasında analiz edilerek doğrusal bir ilişki vermesiyle kanıtlanabilir. ICH Q2 klavuzunda yer alan bilgiler ışığında lineer cevap ilişkisini kanıtlamak için en az 5 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanması gerekir. Elde edilen konsantrasyona karşılık gelen pik alanları için korelasyon katsayısı (r) 0.995'ten az olmamalıdır.

Aşağıda belirtilen konsantrasyonlara denk gelecek şekilde Bölüm 3.1.2.2'de yer alan Stok Ornidazol Standart çözeltisi ve Safsızlık A Stok Standart çözeltilerinden uygun seyreltmeler yapılarak çözeltiler hazırlanır.

Tablo 3-3 : Doğrusal Aralık seviye ve konsantrasyonları

Çözelti Adı	Doğrusal Aralık Seviyesi	Ornidazol Konsantrasyon (µg/mL)	Safsızlık A Konsantrasyon (µg/mL)
Seviye-1	% 5	0.02	0.04
Seviye-2	% 10	0.04	0.08
Seviye-3	% 20	0.08	0.16
Seviye-4	% 40	0.16	0.32
Seviye-5	% 80	0.32	0.64
Seviye-6	% 100	0.40	0.80
Seviye-7	% 160	0.64	1.28
Seviye-8	% 200	0.80	1.60

8 farklı konsantrasyona karşılık gelen seviye çözeltilerinden 5'er enjeksiyon yapılacaktır. Her bir seviye için kaydedilen alanlar ile en küçük kareler yöntemi kullanılarak doğrusal aralık denklemi ve grafiği hesaplanacaktır. Bu çalışma için elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.2'de sunulmuştur.

3.4.3. Dedeksiyon Limiti ve Kantitatif Limit (LOD & LOQ)

ICH Q2 klavuzunda yer alan bilgiler ışığında; numune içindeki analitin kabul edilebilir bir doğruluk ve kesinlik ile belirlenebildiği (LOQ) ve dedekte edilebildiği (LOD) en düşük miktarlar tayin edilir. LOD seviyesini içeren determinasyon eğrisi

yardımıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplanır. Hesaplama aşağıdaki formüller yardımıyla yapılır.

$$\text{Dedeksiyon Limiti (DL)} = \frac{3.3 \times \sigma}{S}$$

σ = Standart sapma (regresyon doğrusunun artıklarının standart sapması veya y-kesim noktasının standart sapması)

S = Regresyon doğrusunun eğimi

$$\text{Kantitatif Limit (QL)} = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

σ = Standart sapma (regresyon doğrusunun artıklarının standart sapması veya y-kesim noktasının standart sapması)

S = Regresyon doğrusunun eğimi

Belirlenen LOQ değer için hazırlanan çözeltiden 6 ardışık enjeksiyon yapılır ve % RSD değeri hesaplanır. Sonuçlar Bölüm 4.3.3’de verilmiştir.

Kabul Ölçütleri

- LOQ seviyesine karşılık gelen seviyeden verilen 6 ardışık enjeksiyondan elde edilen bağıl standart sapma (% RSD) değeri maksimum % 5.0 olmalıdır.
- LOD seviyesine karşılık gelen çözeltiden verilen ardışık 2 enjeksiyon dedekte edilmelidir.

3.4.4. Düzeltme Faktörü

Düzeltme faktörü, ilgili safsızlık için veya bozunma ürününün kromatogramında verdiği alana karşılık etkin madde cinsinden hesaplanmasını sağlamak için gereklidir. Düzeltme faktörü, etkin madde ve bilinen safsızlıkların doğrusal aralık parametresinin tayininde yapılan lineer regresyon analizi sonucu elde edilen eğrilerin eğimlerinin oranından elde edilir. Sonuçlar Bölüm 4.3.4’de sunulmuştur.

Hesaplama

$$RF = \frac{m_N}{m_S}$$

RF : Düzeltme faktörü

mS : Safsızlık A çözeltisinin regresyon eğrisinin eğimi

mN : Ornidazol çözeltisinin regresyon eğrisinin eğimi

3.4.5. Kesinlik

3.4.5.1. Sistem Kesinliği

% 100 çalışma konsantrasyonunda hazırlanan Ornidazol standart çözeltisinden ardışık 6 enjeksiyon yapılır. Enjeksiyonlardan elde edilen pik alanları ve aralarındaki relatif standart sapma değeri ölçülür. Sonuçlar Bölüm 4.3.5.1’de sunulmuştur.

Kabul Ölçütleri

- Ornidazol standart çözeltisinden elde edilen 6 enjeksiyon için bağıl standart sapma (%RSD) değeri 2.0’dan fazla olmamalıdır.
- Elde edilen enjeksiyonlar için sistem uygunluk parametreleri (Alıkonma zamanı, simetri faktörü, teorik plaka sayısı) raporlanır.

3.4.5.2. Tekrarlanabilirlik

Bölüm 3.1.2’de anlatılan çözeltiler ile çözücü, plasebo, standart, Ornisid 250 mg Film Tablet ve Ornisid 500 mg Film Tablet numunesi ve Bölüm 3.4.1.1’de anlatıldığı şekilde 6 adet safsızlık eklenmiş Ornisid 250 mg Film Tablet ve Ornisid 500 mg Film Tablet numuneleri hazırlanarak safsızlık tayini analizi yapılır. Sonuçlar Bölüm 4.3.5.2’de sunulmuştur.

Kabul Ölçütleri

- Safsızlık A eklenmiş numunler için elde edilen sonuçlar arasında bağıl stadandart sapma % 4.0’dan fazla olmamalıdır.

3.4.5.3. Ara kesinlik

Ara kesinlik farklı koşulların analitik yöntem üzerindeki etkisini araştırmak amaçlı olarak; farklı cihaz, farklı lot numaralı kolon, farklı gün ya da farklı analist ile Bölüm 3.1.2’de anlatılan çözeltiler ile çözücü, plasebo, standart, Ornisid 250 mg Film Tablet ve Ornisid 500 mg Film Tablet numunesi ve Bölüm 3.4.1.1’de anlatıldığı şekilde 6 adet safsızlık eklenmiş Ornisid 250 mg Film Tablet ve Ornisid 500 mg Film Tablet numuneleri hazırlanarak safsızlık tayini analizi yapılır. Bu parametre için elde edilen bulgular Bölüm 4.3.5.3’de sunulmuştur.

Kabul Ölçütleri

- Safsızlık A eklenmiş numunler için elde edilen sonuçlar arasında bağıl stadandart sapma % 4.0'dan fazla olmamalıdır.

3.4.6. Doğruluk

Ornidazol'un farmasötik preparatlarda safsızlıklarının tayini için geliştirilen yönteminin doğruluğunu belirleyebilmek için standart katma yöntemi uygulandı. Bunun için iki farklı formdaki (250 mg-500 mg) tablet tozundan ayrı ayrı 264 mg tam olarak tartıldı ve 500 mL'lik balonjojeye aktarıldı. % 100 Ornidazol konsantrasyonundaki numune çözeltileri üzerine linerlik seviyesine göre % LOQ, % 100, % 200 seviyelerine denk gelecek şekilde 3 farklı konsantrasyonda Ornidazol Safsızlık A stok standart çözeltisinden ilave edildi.

Herbir seviye için 3'er adet olmak üzere toplam 9 adet numune hazırlanır. Numuneden gelen safsızlıkları tayin edebilmek için safsızlık ilave edilmeden 2 adet numune hazırlanır. Elde edilen alan değerleri ile geri kazanım değerleri hesaplandı. Bu parametre için sonuçlar Bölüm 4.3.6'de verilmiştir.

Kabul Ölçütleri

- Safsızlık A eklenmiş numunelerin her bir seviye için geri kazanım sonuçları % 95.0 - % 105.0 arasında olmalıdır.
- Tüm seviyeler için elde edilen geri kazanım sonuçları arasındaki bağıl standart sapma % 4.0'den fazla olmamalıdır.

3.4.7. Dayanıklılık

3.4.7.1. Analiz Şartlarında Değişiklik

Geliştirilen yöntemde yapılacak kromatografik şartlardaki küçük değişiklikler ile yöntemin dayanıklılığı ölçülür. Yapılan değişiklikler sonucu analiz yönteminin sonuçlarının güvenilirliği gösterilir. Her bir değiştirilecek analiz parametresi için çözücü, standart, numune enjeksiyonları verilir. Çalışmada elde edilen sonuçlar ve pik performans parametreleri tekrarlanabilirlik sonuçları ile karşılaştırılır.

Geliştirilen yöntem için yapılan değişiklikler :

- Kolon sıcaklığı değişikliği (± 2 °C)
- Filtre etkisi (PTFE, RC)
- Akış hızı değişikliği (± 0.05 mL/dak)

Yapılan analizlerde elde edilen sonuçlarla yöntemin dayanıklılık parametresi için farklı şartlar uygulandığında alınacak sonuçlar test edilmiştir. Yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.7.1’ de verilmiştir.

3.4.7.2. Çözelti Stabilesi

En az 48 saat boyunca belirli zaman aralıklarında standart ve numune saklama şartları (25 °C) sabit tutularak analiz edilir. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.7.2’de verilmiştir.

Kabul Ölçütleri

- Çalışılan numuneler için belirli zaman aralıklarında çözeltiler sonucu % 95.0 - % 105.0 arasında ise çözeltiler stabil sayılır.

3.4.8. Stres Çalışması

Safsızlık A dışında oluşabilecek potansiyel bozunma ürünlerinin tayini için; geliştirilen yöntemin stres koşulları olan asit, baz, sıcaklık, ışık, ısı ve nem, oksidasyon koşullarına maruz bırakılarak çalışma yapılmıştır. Stres çalışmasında Ornidazol, Safsızlık A ve oluşan degradasyon ürünlerinin ayrımının sağlanması ve pik saflık dereceleri incelenmiştir. Stres çalışmasına ait sonuçlar Bölüm 4.3.8’de sunulmuştur.

Kabul Ölçütleri

- Çalışma esnasında oluşacak ikincil pikler ile Oridazol ve Safsızlık A pikleri arasında herhangi bir girişim olmamalıdır.

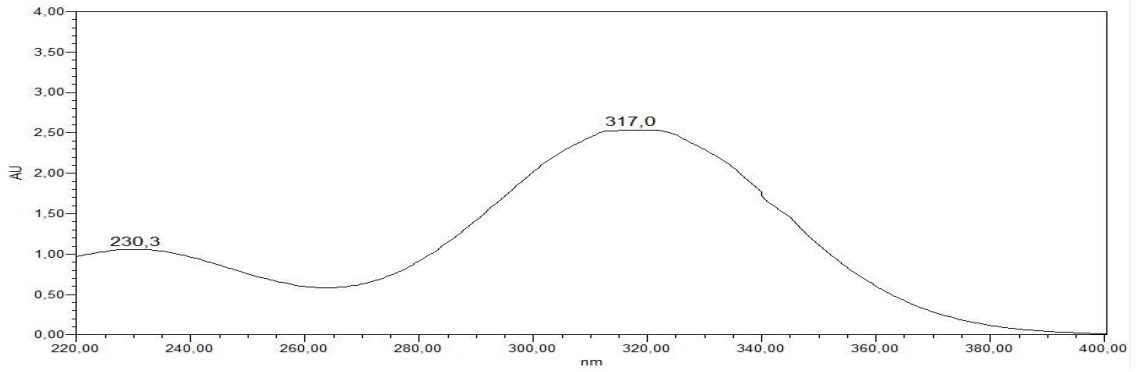
4. BULGULAR

4.1. Yöntemin Geliştirilmesiyle İlgili Bulgular

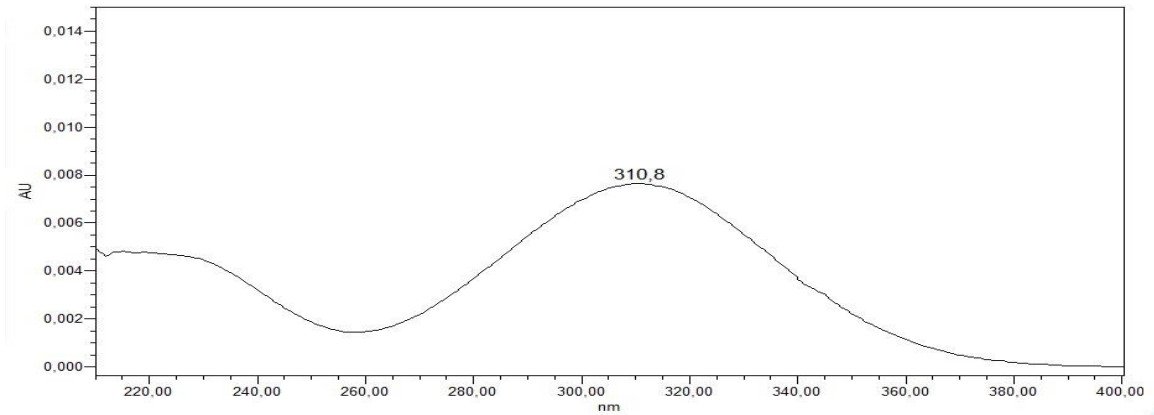
Ornidazol için farmasötik preparatlarda; analiz metodunun geliştirilmesi için bir dizi kromatografik çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar ile alınan sonuçlar bu bölümde ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

4.1.1. Dalga Boyu Seçimi

Ornidazol ve Safsızlık A için geliştirilen yönteme ait kromatografik şartlarla maksimum absorbans verdiği dalga boyunun tespit edilebilmesi için 200-400 nm dalga boyları arasında PDA dedektörü kullanarak tarama yaptırıldı. Yapılan çalışma sonucunda Ornidazol, Safsızlık A' nın maksimum absorbans verdiği 312 nm dalga boyu seçildi. Yapılan çalışmada Ornidazol ve Safsızlık A standart çözeltilerine ait spektrum sonuçları Şekil 4-1 ve Şekil 4-2'de sunulmaktadır.



Şekil 4-1: Ornidazol'e ait spektrum

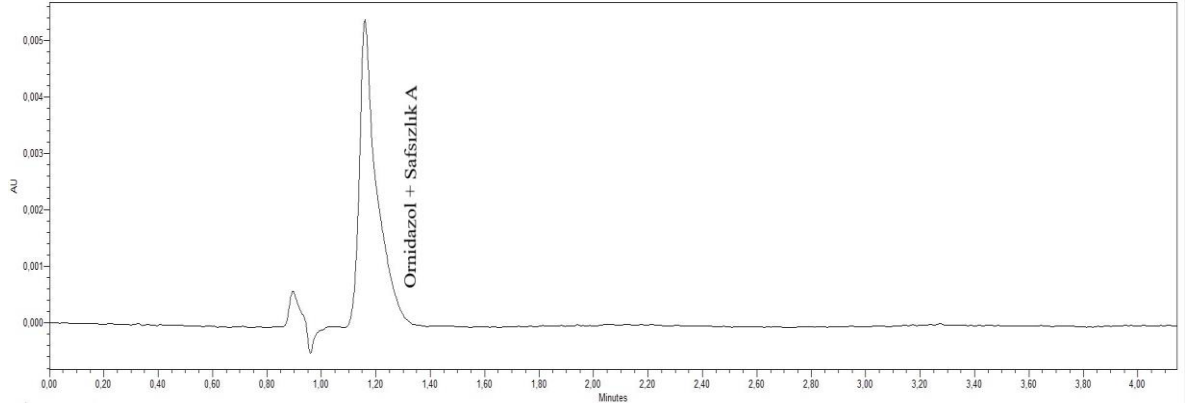


Şekil 4-2 : Safsızlık A'ya ait spektrum

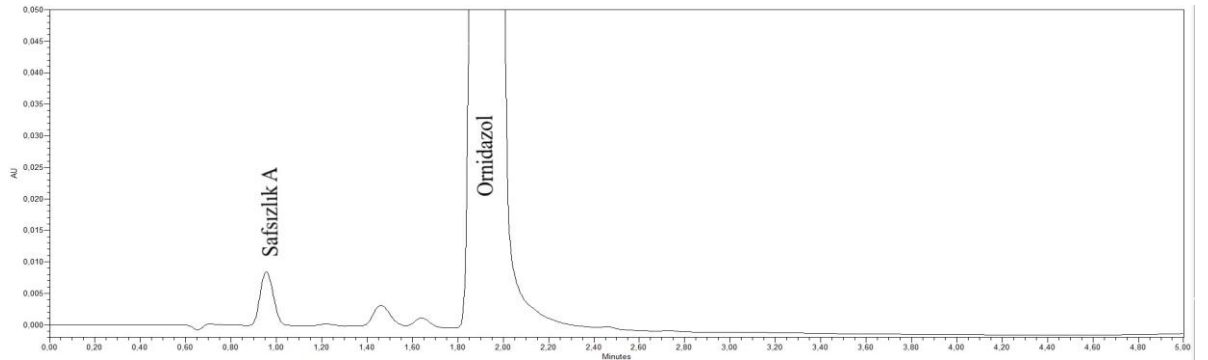
4.1.2. Hareketli Faz ve Gradient Program Seçimi

Hareketli faz için literatürde yer alan pH 3.0 (triethylamin-ortofosforik asit içeren) fosfat tamponu-asetonitril karışımı izokratik akış ile denendi ve Ornidazol ve Safsızlık A için pik şekilleri bozuk ve iki pik arasında iyi bir rezolüsyon elde edilememiştir. Tampon denemeleri ile birlikte izokratik akış yerine gradient elüsyon programı kullanılarak ve asetonitril yerine metanol seçilerek yapılan denemelerde Ornidazol piki ve Safsızlık A pik şekli daha keskin elde edilirken; iki pik arasında da belirgin rezolüsyon elde edilmiştir.

Asetonitril ve izokratik akış ile yapılan çalışmaya ait kromatogram ve metanol kullanılarak uygulanan gradient elüsyona ait kromatogram örnekleri sırasıyla Şekil 4-3 ve Şekil 4-4'de sunulmuştur.



Şekil 4-3 : İzokratik akış ve pH : 3.0 Fosfat Tamponu - Asetonitril içeren mobil faz



Şekil 4-4 : Gradient elüsyon akış ve pH : 6.5 Asetat Tamponu - Metanol içeren mobil faz

4.1.3. Kolon Seçimi

Uygulanan gradient elüsyonda rezolüsyon ve pik şekilleri incelendi. Tablo 4.1’de sistem uygunluk kriterleri yer almaktadır. Çalışmada en iyi sistem uygunluk kriterlerini sağlayan BEH C₁₈ kolon seçilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4-1’de sunulmuştur.

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

	Ornizadazol				Safsızlık A		
	Alan	Rezolüsyon	Kuyruklanma Faktör	Teorik Plaka Sayısı	Alan	Kuyruklanma Faktör	Teorik Plaka Sayısı
BEH C ₁₈	11571	8.8	1.0	10032	31723	1.1	6056
BEH C ₈	9390	8.3	1.2	8245	29347	1.3	5152

4.2. Geliştirilen Yöntem için Kromatografik Koşullar

Yöntemin geliştirilmesi çalışmasından elde edilen sonuçlar doğrultusunda aşağıda yer alana kromatografik koşullar belirlenmiştir.

Deneme-3 :

Kromatografik Şartlar

Kullanılan Cihaz	: UPLC; UV ve PDA dedektör
Kolon	: BEH C ₁₈ (50 mm x 2.1 mm) , 1.7 µm
Kolon Sıcaklığı	: 50°C
Numune Sıcaklığı	: 25°C
Mobil Faz A	: 0.2M pH 6.5 Sodyum Asetat Tamponu
Mobil Faz B	: Metanol
Çözücü	: 0.2M pH 6.5 Sodyum Asetat Tamponu:Metanol (50:50,h/h)
Akış Hızı	: 0.4 mL/dk
Dalga Boyu	: 312 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 5 µL
Loop Hacmi	: 10 µL
Analiz Süresi	: 5 dakika

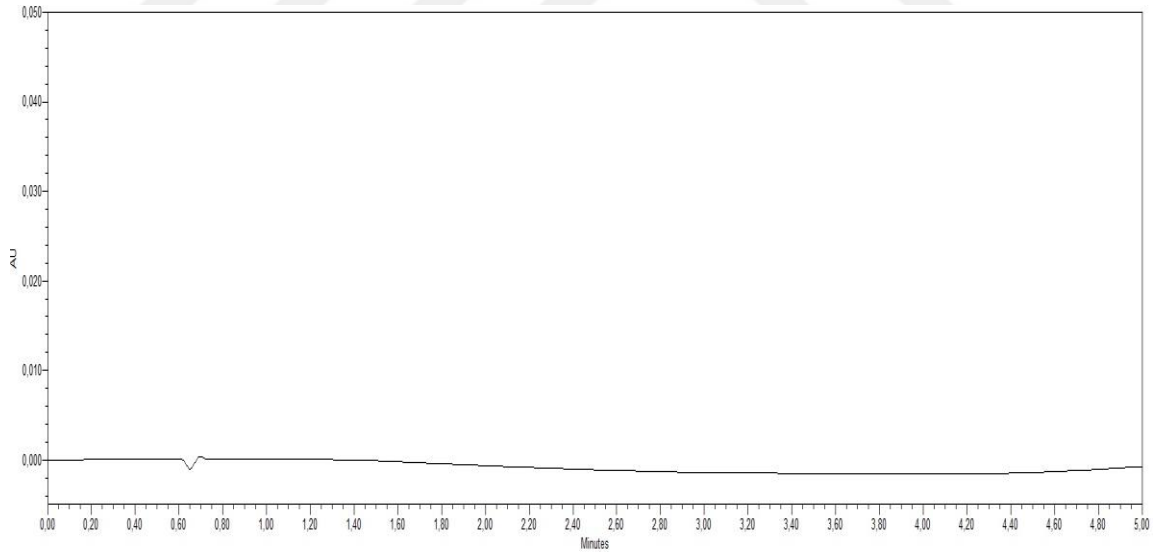
Tablo 4- 2 : Gradient elüsyon programı

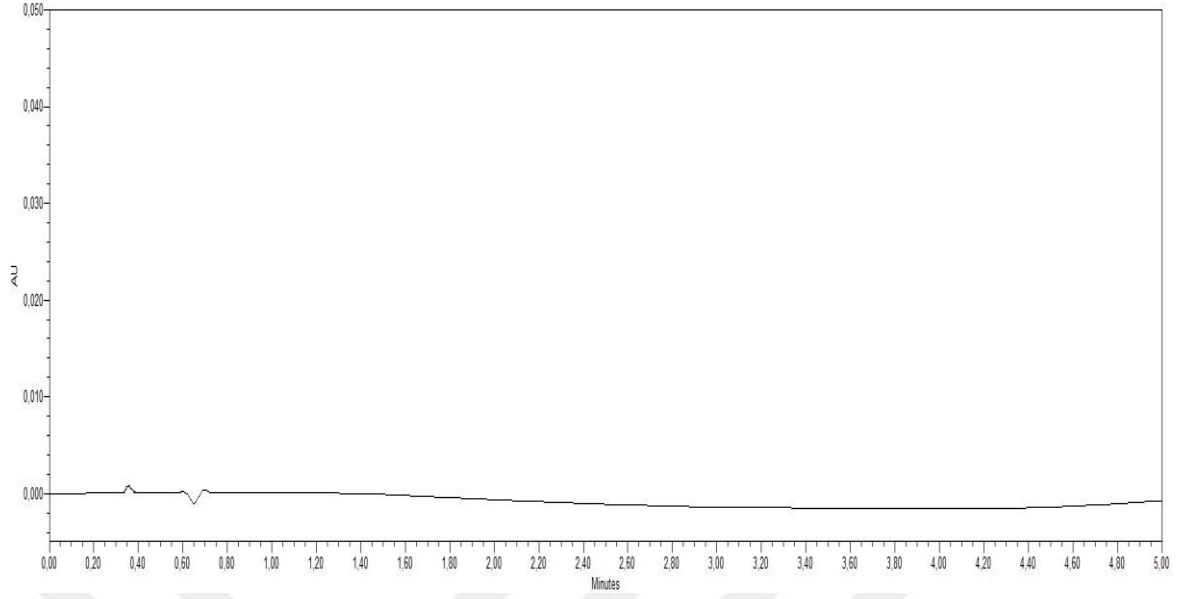
Zaman (dk.)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	90	10
2.0	55	45
3.0	55	45
4.0	90	10
5.0	90	10

4.3. Geliştirilem Yöntemin Validasyonu

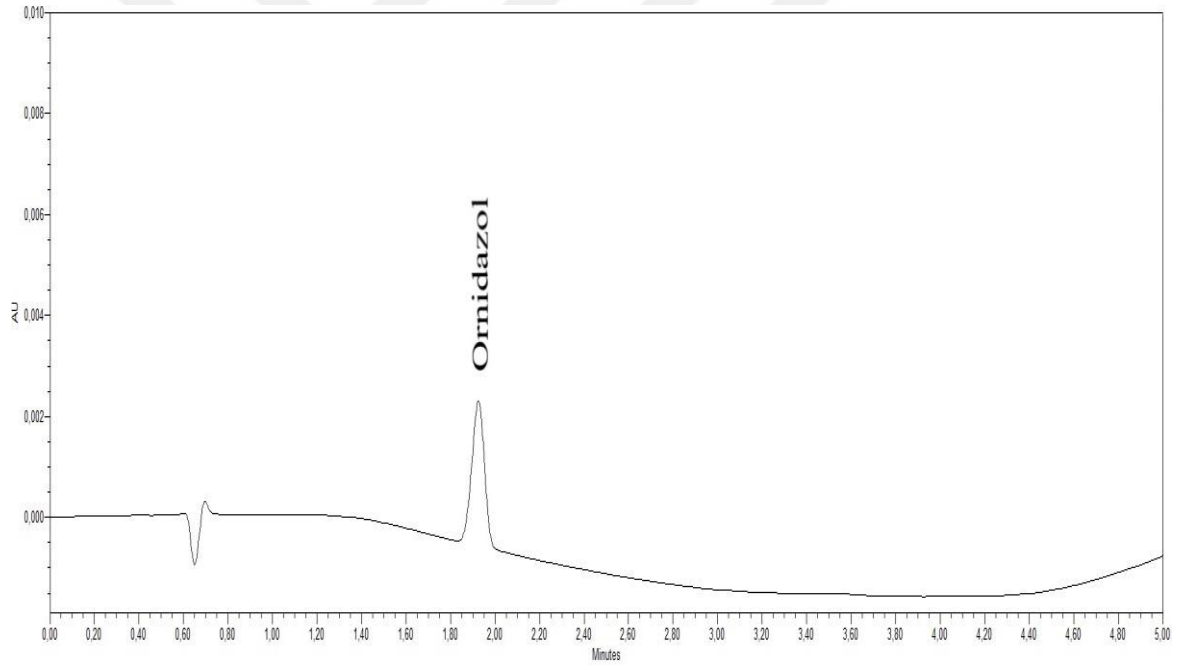
4.3.1. Seçicilik

Yöntem için yapılan seçicilik çalışmasında Bölüm 3.4.1’de belirtilen çözeltiler enjekte edilmiştir. Ornidazol ve Safsızlık A piklerinin birbirinden ayrıldığı; çözücü ve tablet plasebosundan herhangi bir girişimin olmadığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra Ornidazol ve Safsızlık A pikleri saflık dereceleri de incelenmiş ve saf oldukları tespit edilmiştir. Seçicilik çalışması için verilen enjeksiyonlara ait kromatogramlar Şekil 4-5 ve Şekil 4-12 arasında verilmiştir.

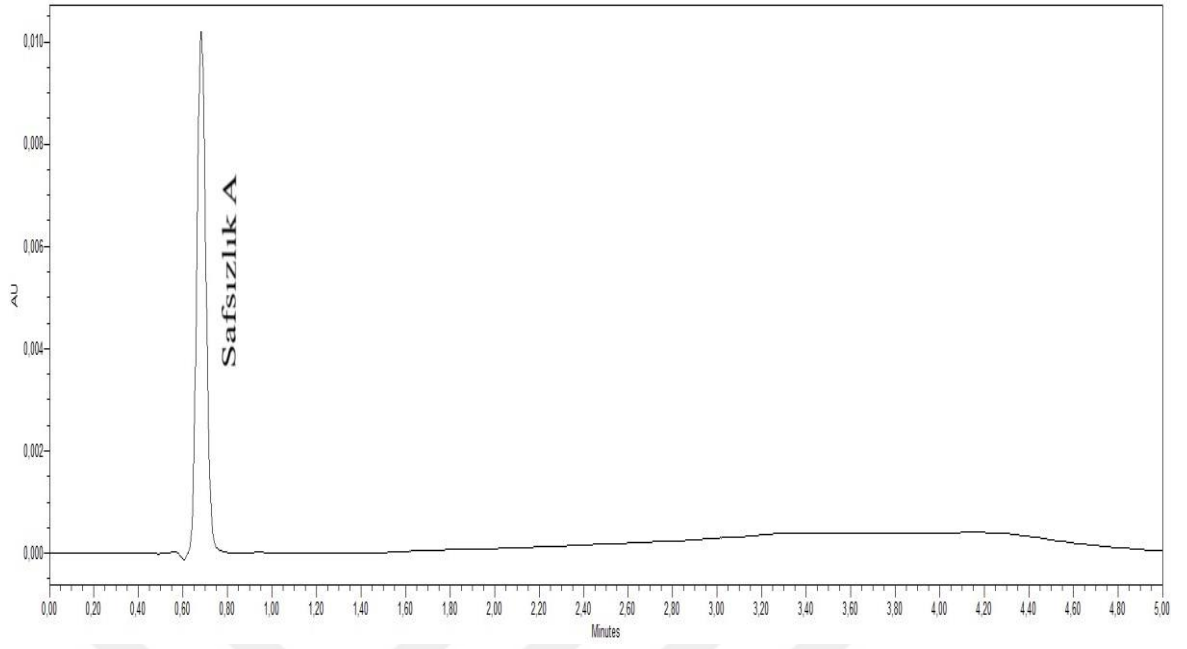
**Şekil 4-5: Çözücü kromatogramı**



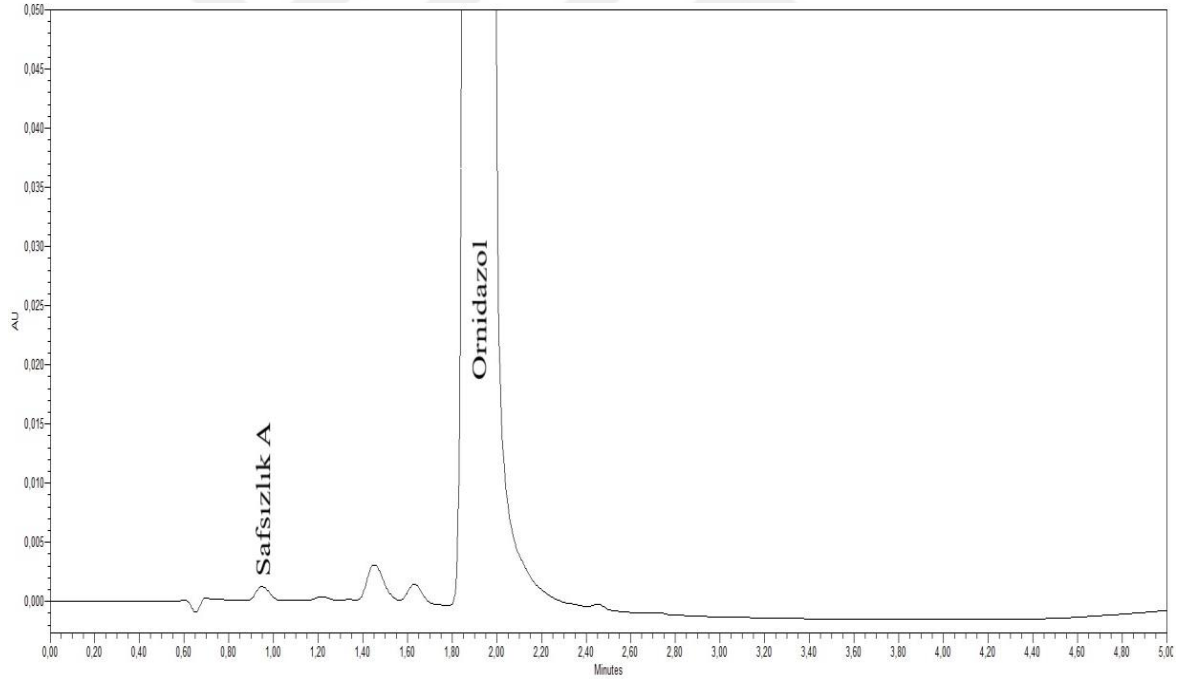
Şekil 4-6: Plasebo kromatogramı



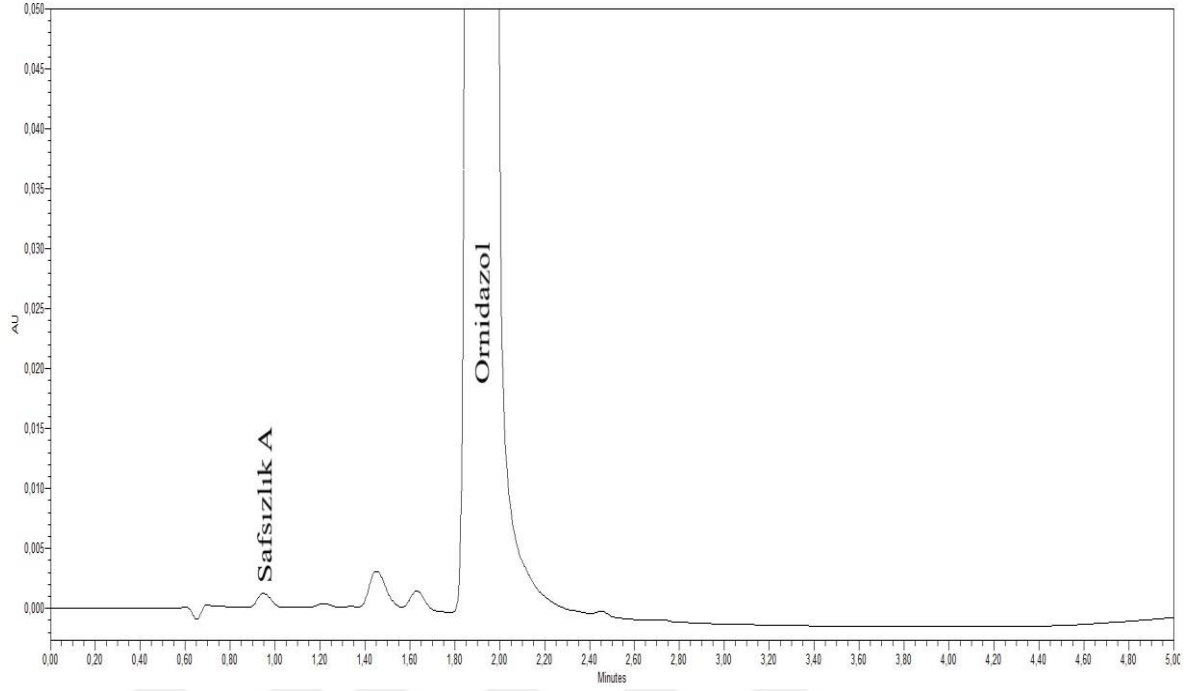
Şekil 4-7: Ornidazol standart çözeltisi kromatogramı



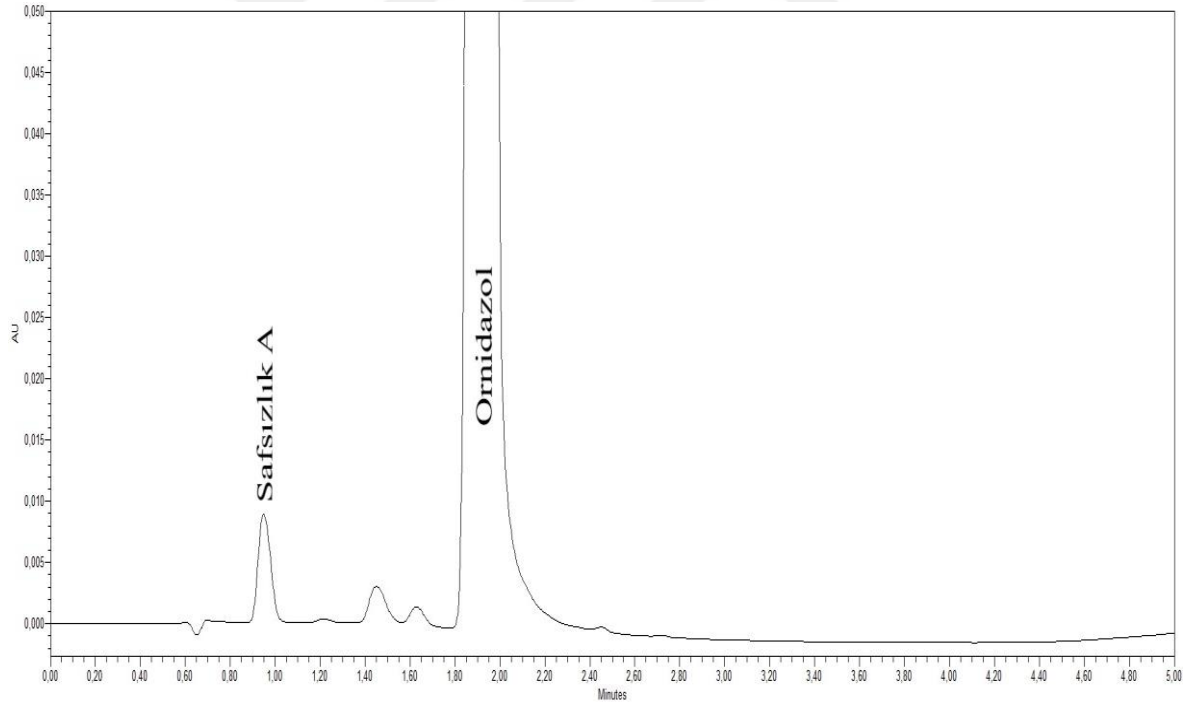
Şekil 4-8: Safsızlık A standart çözeltisi kromatogramı



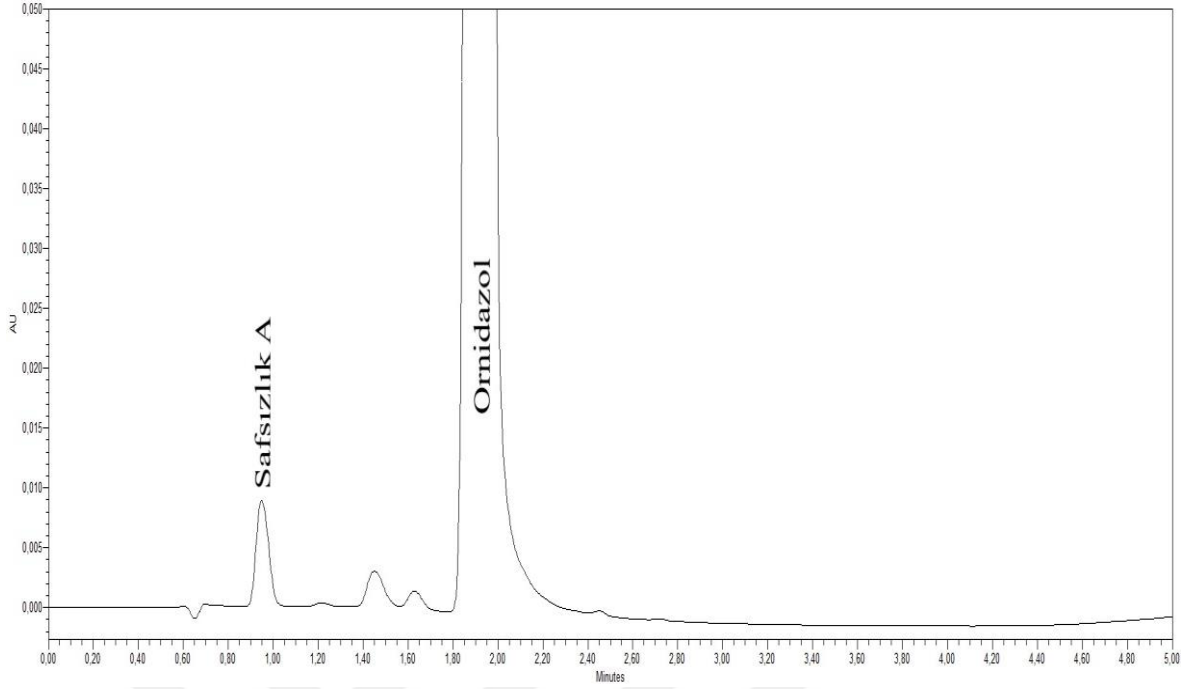
Şekil 4-9: Ornisd 250 mg Film Tablet numune çözeltisi kromatogramı



Şekil 4-10: Ornisd 500 mg Film Tablet numune çözeltisi kromatogramı



Şekil 4-11: Safsızlık A eklenmiş Ornisd 250 mg Film Tablet numune kromatogramı



Şekil 4-12: Safsızlık A eklenmiş Ornidazol 500 mg Film Tablet numune kromatogramı

4.3.2. Doğrusal Aralık

Ornidazol için 0.02– 0.80 $\mu\text{g/mL}$ ve Safsızlık A için 0.04– 1.58 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlar aralığında 8 farklı konsantrasyonda Ornidazol ve Safsızlık A içeren çözeltiler hazırlandı ve ardışık 5'er enjeksiyon verilerek çalışma yapıldı. Belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerden elde edilen verileri Tablo 4-3 ile Tablo 4-4 arasında sunulmuştur.

Analiz sonucunda elde edilen pik alanları ortalaması, konsantrasyon bilgileri ile en küçük kareler yöntemini kullanarak eğim, kesim noktası belirlendi. Şekil 4-13 ve Şekil 4-14 arasında doğrusallık grafikleri oluşturuldu.

Tablo 4- 3 : Safsızlık A doğrusal aralık çalışması sonucunda alınan veriler

Safsızlık A					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	% RSD
% 5	0.04	1672	1628	29.30	1.80
		1630			
		1617			
		1630			
		1591			
% 10	0.08	3195	3244	53.67	1.65
		3297			
		3223			
		3199			
		3306			
% 20	0.16	6502	5485	43.88	0.68
		6481			
		6411			
		6524			
		6505			
% 40	0.32	12940	12958	146.25	1.13
		13101			
		13098			
		12895			
		12755			
% 80	0.63	25326	25236	195.87	0.78
		25301			
		25372			
		25290			
		24890			

Tablo 4-3 Devam : Safsızlık A doğrusal aralık çalışması sonucunda alınan veriler

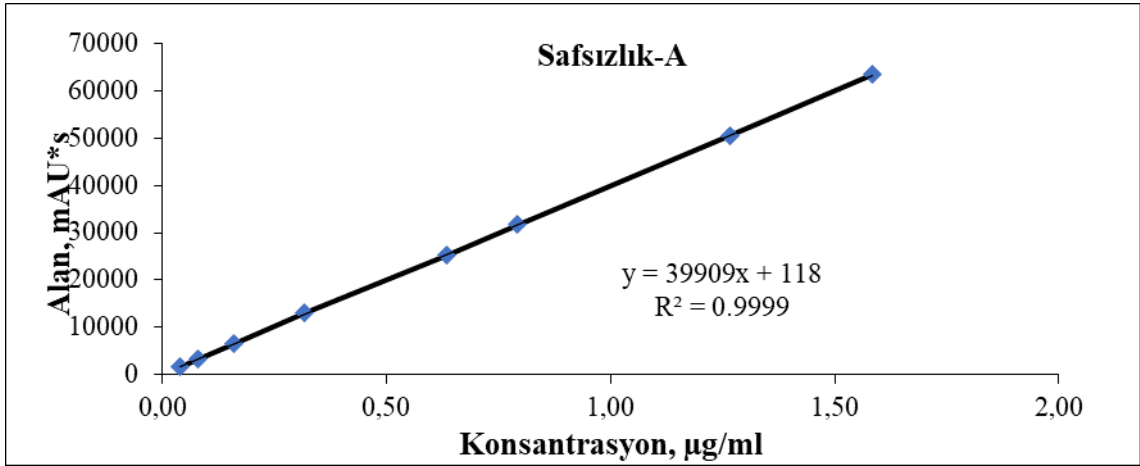
Safsızlık A					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	% RSD
% 100	0.79	31658	31776	108.73	0.34
		31690			
		31756			
		31885			
		31893			
% 160	1.27	50589	50588	269.48	0.53
		50788			
		50230			
		50432			
		50901			
% 200	1.58	63697	63419	557.67	0.88
		62486			
		63857			
		63729			
		63328			

Tablo 4- 4: Ornidazol doğrusal aralık çalışması sonucunda alınan veriler

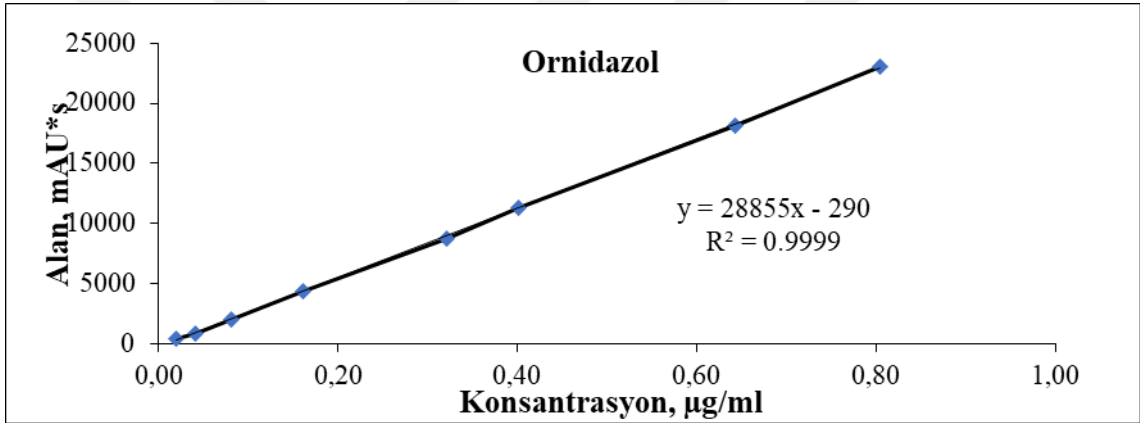
Ornidazol					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	% RSD
% 5	0.02	371	369	9.60	2.60
		363			
		366			
		361			
		385			
% 10	0.04	867	882	10.01	1.13
		890			
		892			
		884			
		879			
% 20	0.08	2045	2042	19.20	0.94
		2023			
		2041			
		2073			
		2030			
% 40	0.16	4401	4423	24.44	0.55
		4446			
		4419			
		4451			
		4399			
% 80	0.32	8766	8800	28.39	0.32
		8794			
		8842			
		8810			
		8787			

Tablo 4- 4 Devam: Ornidazol doğrusal aralık çalışması sonucunda alınan veriler

Ornidazol					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	% RSD
% 100	0.40	1120	11283	57.69	0.51
		11315			
		11301			
		11208			
		11350			
% 160	0.64	18101	18128	119.26	0.66
		17990			
		18292			
		18199			
		18056			
% 200	0.80	23001	23085	91.55	0.40
		22995			
		23125			
		23164			
		23190			



Şekil 4-13: Safsızlık A doğrusal aralık grafiği



Şekil 4-14: Ornidazol doğrusal aralık grafiği

4.3.3. Dedeksiyon Limiti ve Kantitatif Limit (LOD & LOQ)

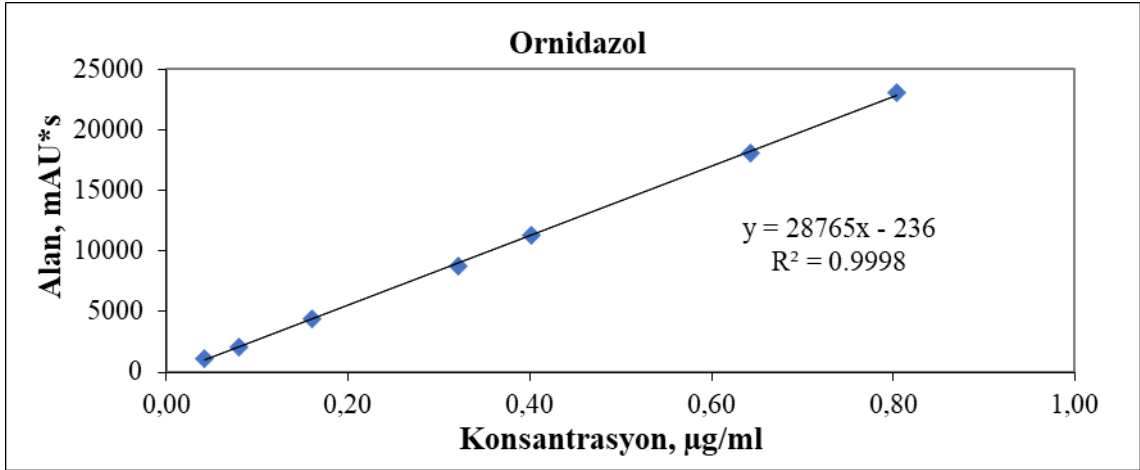
Kalibrasyon eğrisinin doğru denklemi kullanılarak; Ornidazol ve Safsızlık A için LOD ve LOQ değerleri tespit edildi. Ornidazol için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla; 0.014 µg/ml ve 0.042 µg/ml olarak tespit edildi. Safsızlık A için; LOD ve LOQ değerleri sırasıyla; 0.010 µg/ml ve 0.029 µg/ml olarak tespit edildi. LOD doğrulaması için 2 enjeksiyon ve LOQ doğrulaması için 6 enjeksiyon ile yapılan çalışmaya ait veriler Tablo 4-5 ve Tablo 4-6'de sunulmuştur. Şekil 4-15 ve Şekil 4-16 arasında LOQ seviyesini içeren doğrusallık grafikleri oluşturuldu.

Tablo 4- 5 : Ornidazol için LOD ve LOQ çalışmasından alınan veriler

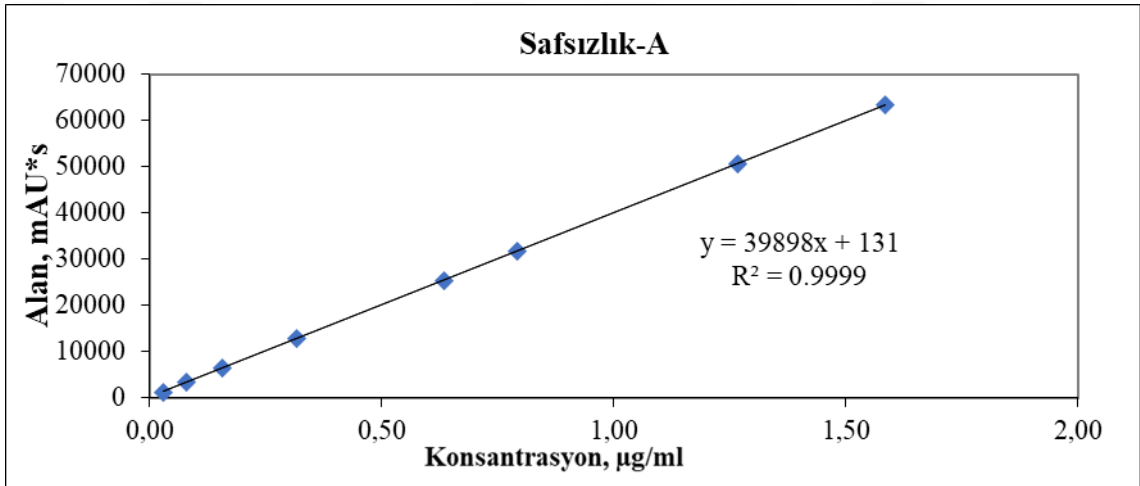
Çözelti	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	% RSD
LOD	0.014	390 401	396	7.78	1.97
LOQ	0.042	1170 1135 1162 1181 1156 1193	1166	20.23	1.73

Tablo 4- 6 : Safsızlık A için LOD ve LOQ çalışmasından alınan veriler

Çözelti	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	% RSD
LOD	0.010	533 528	531	3.54	0.67
LOQ	0.029	1240 1245 1301 1285 1277 1236	1264	27.20	2.15



Şekil 4- 15: LOQ seviyesini içeren Ornidazol doğrusal aralık grafiği



Şekil 4- 16: LOQ seviyesini içeren Safsızlık A doğrusal aralık grafiği

4.3.4. Düzeltme Faktörü

Safsızlık A'nın miktar olarak doğru hesaplanabilmesi için regresyon eğrilerinden yararlanılmıştır. Ornidazol için hesaplanan eğim değerinin (39898), Safsızlık A için hesaplanan eğim değerine (29765) bölünmesi ile düzeltme faktörü **0.72** olarak bulunmuştur.

4.3.5. Kesinlik

4.3.5.1. Sistem Kesinliği

% 100 çalışma konsantrasyonunda hazırlanan Ornidazol çalışma standart çözeltisinden ardışık 6 enjeksiyon yapıldı. Enjeksiyonlardan elde edilen pik alanları ve aralarındaki relatif standart sapma değeri ölçüldü. Yapılan çalışmaya için elde edilen veriler Tablo 4-7'de sunulmuştur.

Tablo 4- 7: Sistem kesinliği çalışma sonuçları

Ornidazol					
Enjeksiyon	Simetri Faktörü	Kolon Plaka Sayısı	Rezolüsyon*	Retensiyon Zamanı (dakika)	Alan
1	0.96	6226	10.11	1.940	11703
2	0.96	6228	10.14	1.940	11689
3	0.96	6170	10.07	1.940	11716
4	0.96	6133	10.12	1.940	11687
5	0.96	6222	10.05	1.942	11692
6	0.96	6106	10.03	1.939	11719
Ortalama		6181	10.09	1.940	11701
SD		-	-	0.001	13.96
%RSD		-	-	0.05	0.12

*Safsızlık A ile Ornidazol pikleri arasında yer alan rezolüsyon değerleridir.

4.3.5.2. Tekrarlanabilirlik

%100 konsantrasyonda olacak şekilde Safsızlık A eklenerek hazırlanan 250 mg ve 500 mg tablet numune çözeltilerinden 6'şar adet hazırlandı. Aynı gün içerisinde Bölüm 3.1.2'de anlatılan çözeltiler ile çözücü, plasebo, Ornidazol çalışma standardı numuneleri hazırlanarak analiz yapıldı. Analizden elde edilen sonuçlar Tablo 4-8'da sunulmuştur.

Tablo 4- 8: Aynı gün içerisinde yapılan analizlerin tekrarlanabilirlik çalışmaları

	Ornidazol (µg/mL)			Safsızlık A (µg/mL)		
	Standart	250 mg Tablet	500 mg Tablet	Standart	250 mg Tablet	500 mg Tablet
Alınan Konsantrasyon	0.40	400	401	0.81	0.82	0.81
Bulunan Konsantrasyon	0.41	402	399	0.80	0.80	0.81
Standart Sapma	0.04	0.21	0.12	0.03	0.02	0.01
% RSD	1.25	1.19	1.44	1.35	1.22	0.70

4.3.5.3. Ara Kesinlik

Farklı gün, farklı cihaz, farklı lot numaralı kolon ya da farklı analist ile Bölüm 3.4.5.3’de anlatıldığı gibi; %100 konsantrasyonda olacak şekilde Safsızlık A eklenerek hazırlanan 250 mg ve 500 mg tablet numune çözeltilerinden 6’şar adet hazırlandı. Bölüm 3.1.2’de anlatılan çözeltiler ile çözücü, plasebo, Ornidazol çalışma standardı numuneleri hazırlanarak analiz yapıldı. Analizden elde edilen sonuçlar Tablo 4-9’da sunulmuştur.

Tablo 4- 9: Ara kesinlik çalışma sonuçları

	Ornidazol (µg/mL)			Safsızlık A (µg/mL)		
	Standart	250 mg Tablet	500 mg Tablet	Standart	250 mg Tablet	500 mg Tablet
Alınan	0.40	400	401	0.81	0.82	0.81
Konsantrasyon	0.41	402	399	0.80	0.80	0.81
Bulunan	0.04	0.21	0.12	0.03	0.02	0.01
Konsantrasyon	1.25	1.19	1.44	1.35	1.22	0.70
Standart						
Sapma						
% RSD						

4.3.6. Doğruluk

Tablet numunelerinde safsızlıklarının tayini için geliştirilen yönteminin doğruluğunu belirleyebilmek amacıyla standart katma yöntemi uygulandı. Doğruluk parametresi çalışmaları Bölüm 3.4.6’da anlatıldığı gibi çalışıldı.

% LOQ, % 100 ve % 200 seviyelerine denk gelecek konsantrasyonda Ornidazol ve Safsızlık A standart çözeltilerinden ilave edilerek herbir seviye için 3’er adet ve 2’şer enjeksiyon olmak üzere toplam 9 adet numune hazırlandı. Yapılan çalışma için geri kazanımlar hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4-10 ve Tablo 4-11’de verilmiştir.

Tablo 4- 10: Ornidazol doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama % Geri Kazanım	SD	% RSD
% LOQ	0.04	98.3	99.6	1.41	1.42
	0.04	98.2			
	0.04	98.3			
	0.04	101.8			
	0.04	99.9			
	0.04	100.9			
% 100	0.42	99.2	100.2	0.89	0.89
	0.42	98.7			
	0.40	100.7			
	0.40	100.7			
	0.41	100.9			
	0.41	100.9			
% 200	0.80	102.2	100.8	1.41	1.40
	0.80	102.9			
	0.80	100.3			
	0.80	101.0			
	0.81	98.9			
	0.81	99.5			

Tablo 4- 11: Safsızlık A doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama % Geri Kazanım	SD	% RSD
% LOQ	0.03	96.3	98.7	1.40	1.42
	0.03	98.2			
	0.03	99.3			
	0.03	98.7			
	0.03	101.0			
	0.03	98.4			
% 100	0.81	99.2	99.6	0.38	0.39
	0.81	99.7			
	0.80	100.0			
	0.80	100.2			
	0.80	99.4			
	0.80	99.2			
% 200	1.61	101.1	100.3	0.89	0.89
	1.61	101.5			
	1.58	100.0			
	1.58	99.2			
	1.60	99.3			
	1.60	100.9			

4.3.7. Dayanıklılık

4.3.7.1. Analiz Şartlarında Değişiklik

Geliştirilen yöntemde kromatografik şartlarda yapılacak analiz şartlarında küçük değişiklikler Bölüm 3.4.7.1’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Değişiklikler sonucu metodun güvenilirliği test edilmiştir. Burada kullanılan çözeltiler Bölüm 3.4.5.2 Tekrarlanabilirlik çalışmasında belirtilen şekilde hazırlandı.

Yapılan çalışma sonucunda, Tablo 4-12’de değişen analiz şartlarının Safsızlık A sonuçlarına ve Tablo 4-13’de sistem uygunluk parametlerine olan etkisi incelenmiştir.

Tablo 4-12: Analiz şartlarında değişiklik çalışması safsızlık sonuçları

Analiz Şartları	Safsızlık A (%)	Maksimum Bilinmeyen Safsızlık (%)	Toplam Safsızlık (%)
Normal şartlar	0.03	0.01	0.07
Akış Hızı (0.35 dakika/mL)	0.04	0.02	0.07
Akış Hızı (0.45 dakika/mL)	0.04	0.02	0.07
Kolon sıcaklığı değişimi (48°C)	0.03	0.01	0.07
Kolon sıcaklığı değişimi (52°C)	0.03	0.01	0.07
Filtre Değişimi (PTFE)	0.03	0.02	0.08
Filtre Değişimi (RC)	0.03	0.01	0.07

Tablo 4- 13: Analiz şartlarında değişiklik çalışması sistem uygunluk sonuçları

Analiz Şartları	Teorik Plaka Sayısı	Simetri Faktörü	Rezolüsyon*	Retensiyon Zamanı (dakika)	Alan
Normal şartlar	6181	0.96	10.09	1.940	11701
Akış Hızı (0.35 dakika/mL)	6370	0.97	10.13	2.020	12451
Akış Hızı (0.45 dakika/mL)	5976	0.95	10.01	1.903	10339
Kolon sıcaklığı değişimi (48°C)	6195	0.95	9.55	1.954	11042
Kolon sıcaklığı değişimi (52°C)	6058	0.93	9.85	1.924	11936
Filtre Değişimi (PTFE)	6085	0.97	10.05	1.925	10987
Filtre Değişimi (RC)	6181	0.96	10.09	1.945	11701

* Safsızlık A ile Ornidazol pikleri arasında yer alan rezolüsyon değerleridir.

4.3.7.2. Çözelti Stabilitesi

Çözelti stabilitesinin saptanması için Bölüm 3.4.7.2’de belirtilen şekilde oda sıcaklığı (25 °C) koşullarında bekletilen Ornidazol, Safsızlık A çalışma standartları ve numune çözeltileri; 48 saat boyunca belirli zaman aralıklarında sisteme enjekte edildi. Elde edilen alan değerleri kaydedildi. Pik alanları arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi. Sonuçlar Tablo 4-14 ve Tablo 4-15’de verilmiştir.

Tablo 4- 14: Standart çözeltisi stabilite tablosu

Oda Koşulları (25 °C)				
Saat	Ornidazol (Alan)	% Uyum	Safsızlık A (Alan)	% Uyum
0	11704	-	31885	-
2	11546	98.7	31767	99.6
6	11835	101.1	31605	99.1
12	11989	102.4	31499	98.8
18	12075	103.2	31335	98.3
24	12156	103.9	31205	97.9
48	12093	103.3	30973	97.1

Tablo 4- 15 : 250 mg ve 500 mg Ornidazol içeren Ornisid Film Tablet numune çözeltileri stabilite tablosu

Oda Koşulları (25 °C)				
Saat	250 mg Tablet	% Uyum	500 mg Tablet	% Uyum
	Numunesi Safsızlık A (Alan)		Numunesi Safsızlık A (Alan)	
0	33704	-	32798	-
2	33224	98.6	33021	100.7
6	33653	99.8	33196	100.5
12	33199	98.5	32721	99.8
18	33628	99.8	32691	99.7
24	33047	98.1	32903	100.3
48	33381	99.0	32305	98.5

4.3.8. Stres Çalışması

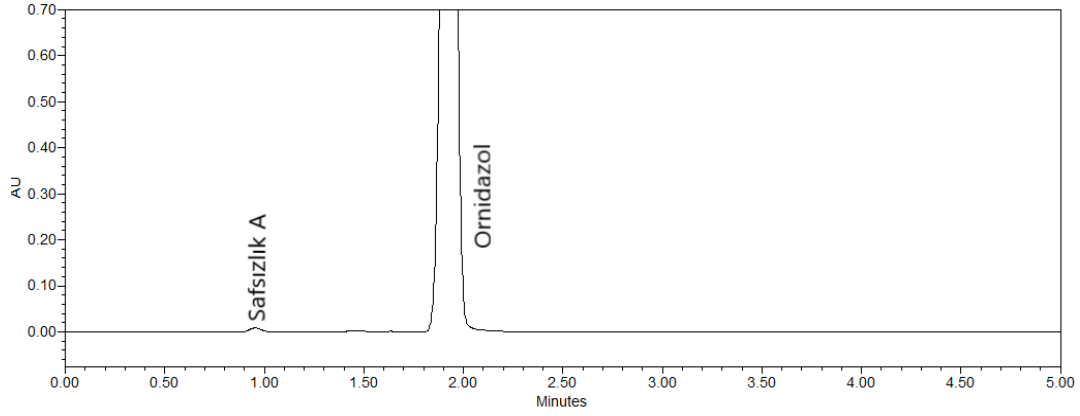
Stres koşulları olarak seçilen Bölüm 3.4.8’de belirtilen koşullarda çalışmalar için tablet numune hazırlıkları tekrarlanabilirlik parametresinde anlatıldığı gibi yapılmıştır. Aşağıda belirtilen sürelerde stres koşullarına maruz bırakılmış numuneler sisteme enjekte edildi. Tüm stres koşulları için Ornidazol ve Safsızlık A için piklerin saf olduğu kanıtlanmıştır. Sonuçlar Tablo 4-16’da sunulmuştur.

- Asit Ortam (1 N HCl) : 2 saat
- Bazik Ortam (1 N NaOH) : Bekletmeden
- Oksidasyon Ortamı (% 30’ luk H₂O₂) : 9 saat
- Sıcaklık Bozundurması (80°C) : 2 gün
- Isı ve Nem Bozundurması (40°C, % 75 RH) : 7 gün
- Işık (fotostabilite kabini) Bozundurması :UV ışık 200 W/m, 1.2 milyon luks (Gün ışığı)

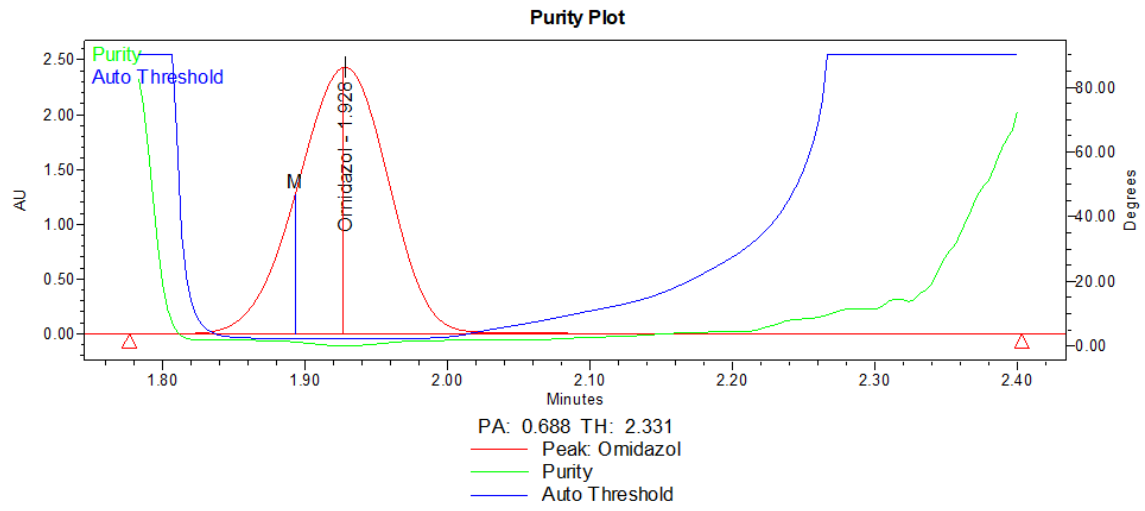
Tablo 4- 16: Stres çalışması Sonuçları*

Safsızlık Adı	Başlangıç (%)	1 N HCl 2 saat Bekletilerek (%)	1 N NaOH Bekletmeden (%)	%30 Peroksit 9 saat (%)	Işık 3 Gün (%)	40 °C % 75 RH 7 gün (%)	80 °C 2 gün (%)
Safsızlık A	0.037	1.113	3.524	0.057	0.037	0.036	0.040
Maksimum Bilinmeyen Safsızlık	< LOQ	25.6	40.2	12.2	0.079	0.069	< LOQ
Toplam safsızlık	0.037	27.1	44.5	13.0	0.145	0.133	0.040

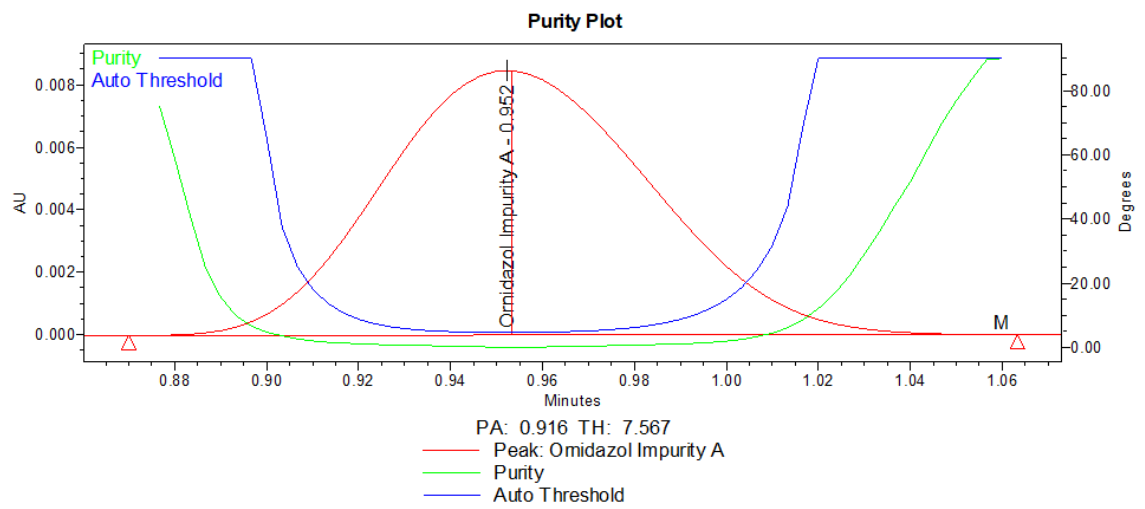
* n=2 numune



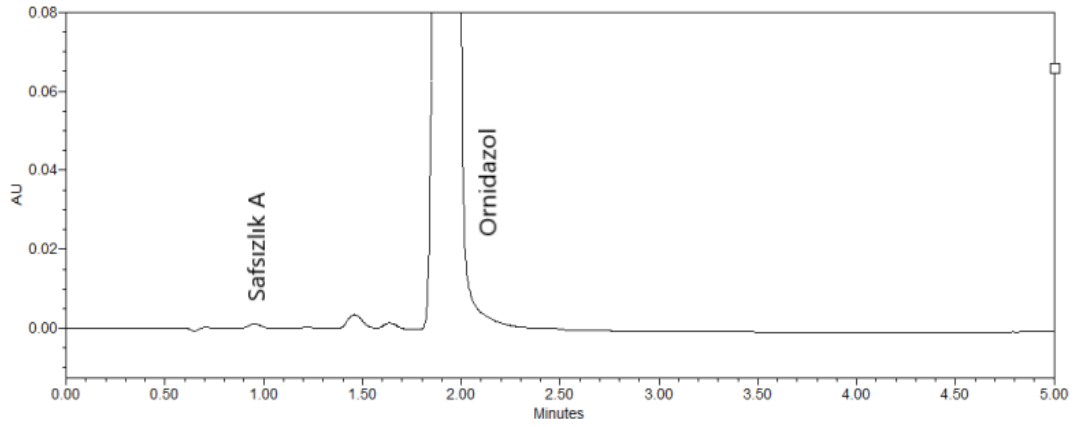
Şekil 4- 17: Tablet Numune Kromatogramı



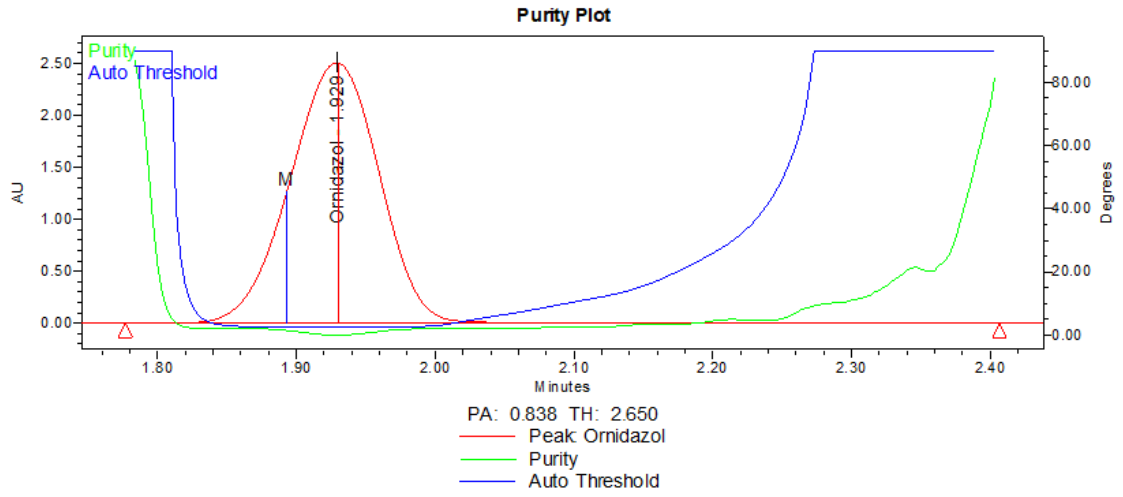
Şekil 4- 18: Tablet Numune Kromatogramı Ornidazol pik saflık eğrisi



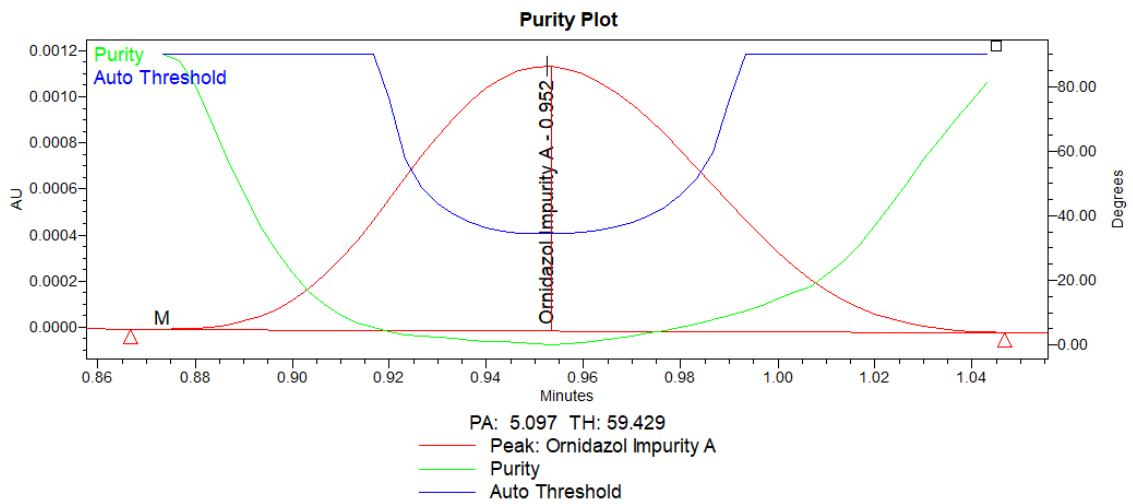
Şekil 4- 19: Tablet Numune Kromatogramı Safsızlık A pik saflık eğrisi



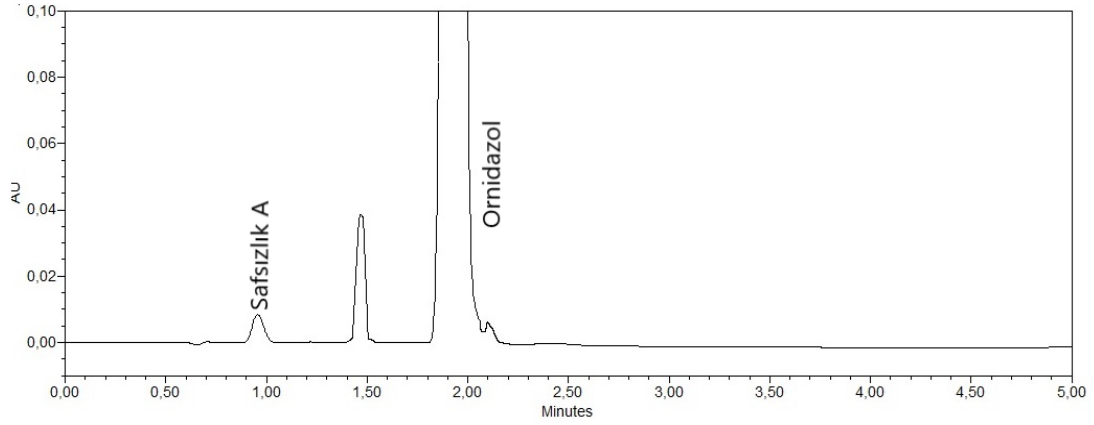
Şekil 4- 20: Isı bozundurması numunesine ait kromatogramı



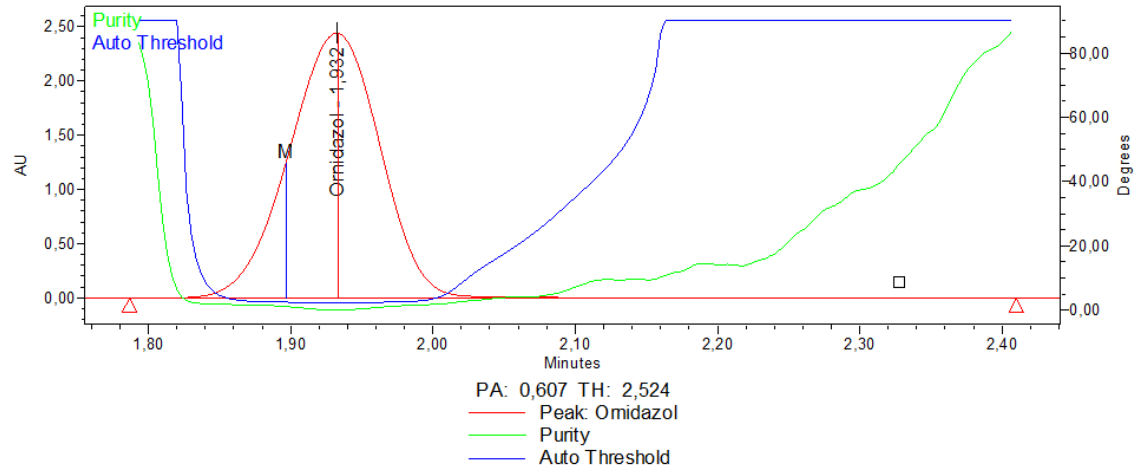
Şekil 4- 21: Isı bozundurması numunesine ait Ornidazol pik saflık eğrisi



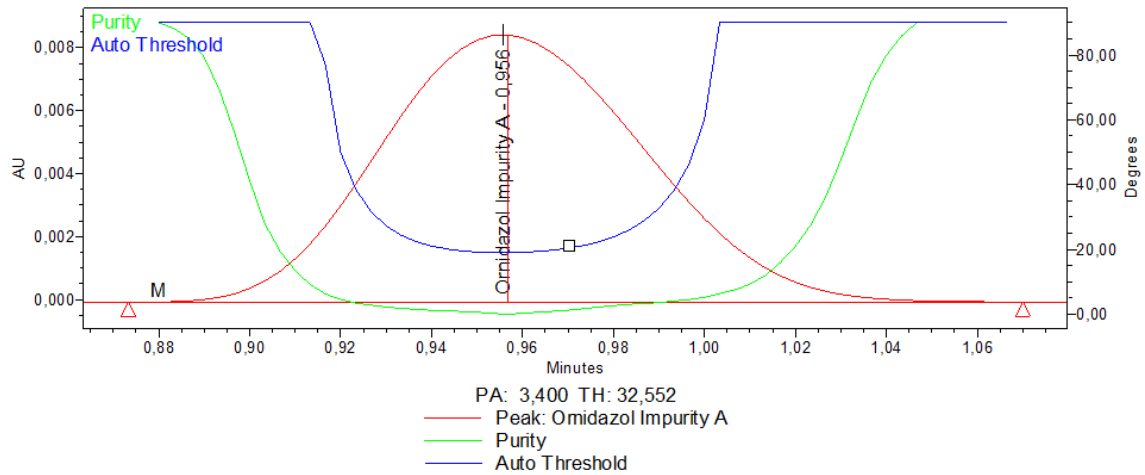
Şekil 4- 22: Isı bozundurması numunesine ait Safsızlık A pik saflık eğrisi



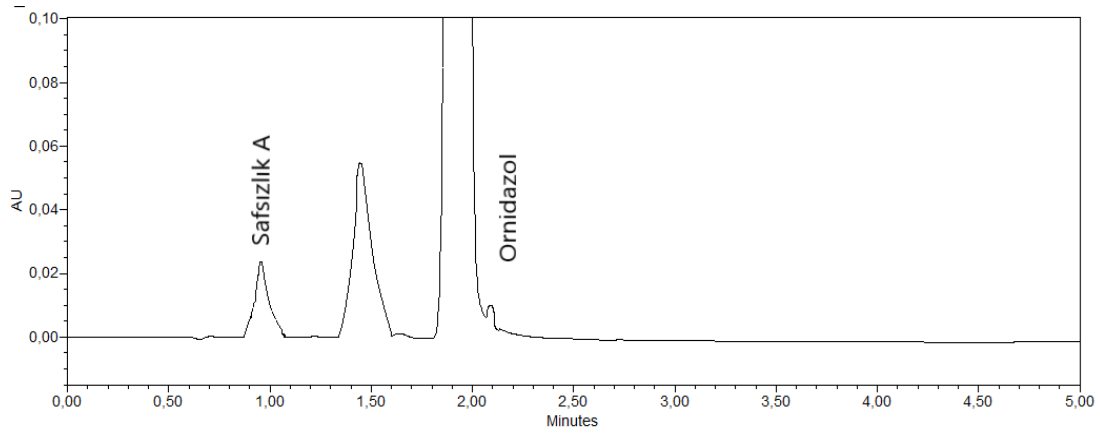
Şekil 4- 23: Asit bozundurması numunesine ait kromatogramı



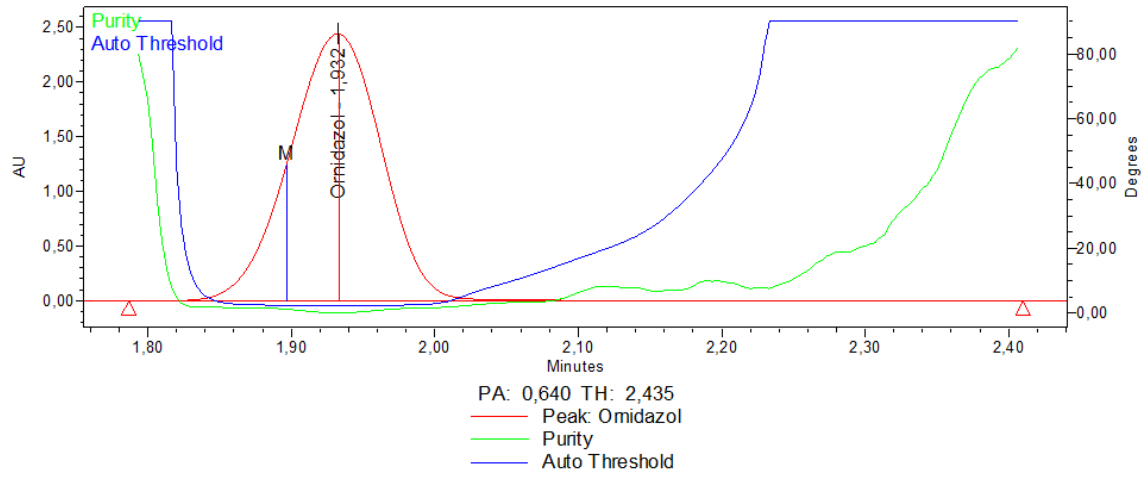
Şekil 4- 24: Asit bozundurması numunesine ait Ornidazol pik saflık eğrisi



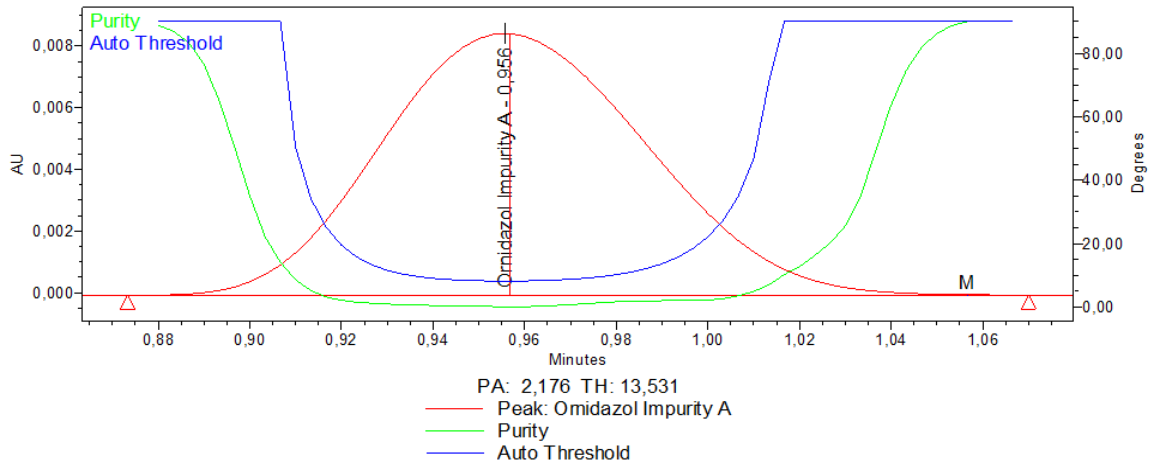
Şekil 4- 25: Asit bozundurması numunesine ait Safsızlık A pik saflık eğrisi



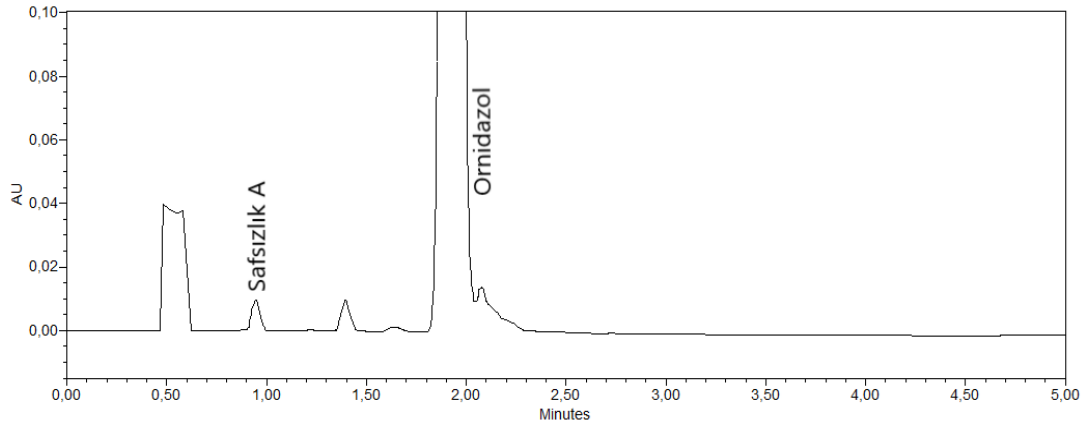
Şekil 4- 26: Baz bozundurması numunesine ait kromatogramı



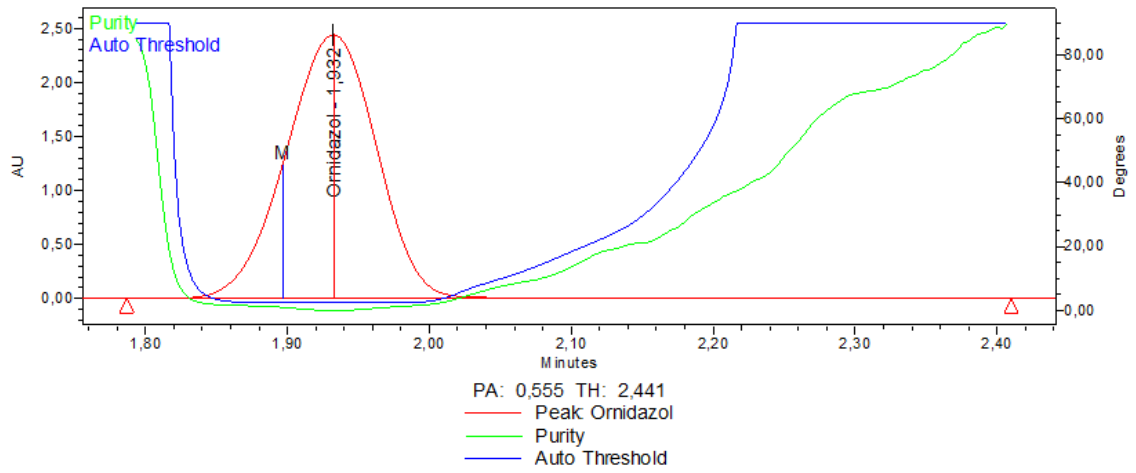
Şekil 4- 27: Baz bozundurması numunesine ait Ornidazol pik saflık eğrisi



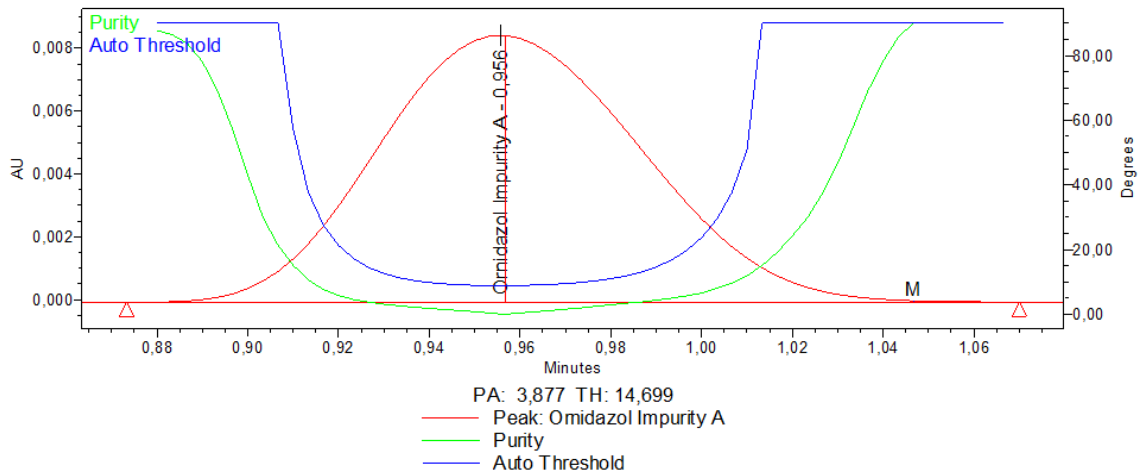
Şekil 4- 28: Baz bozundurması numunesine ait Safsızlık A pik saflık eğrisi



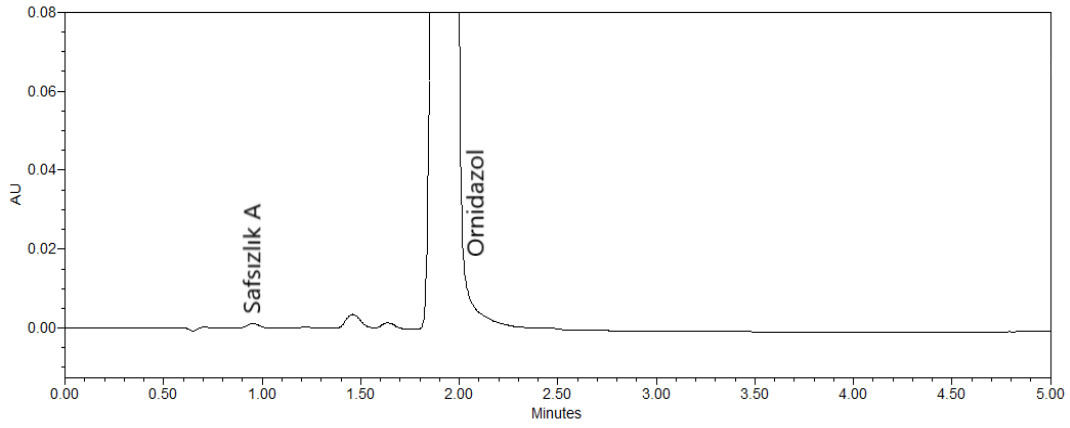
Şekil 4- 29: Oksidasyon bozundurması numunesine ait kromatogramı



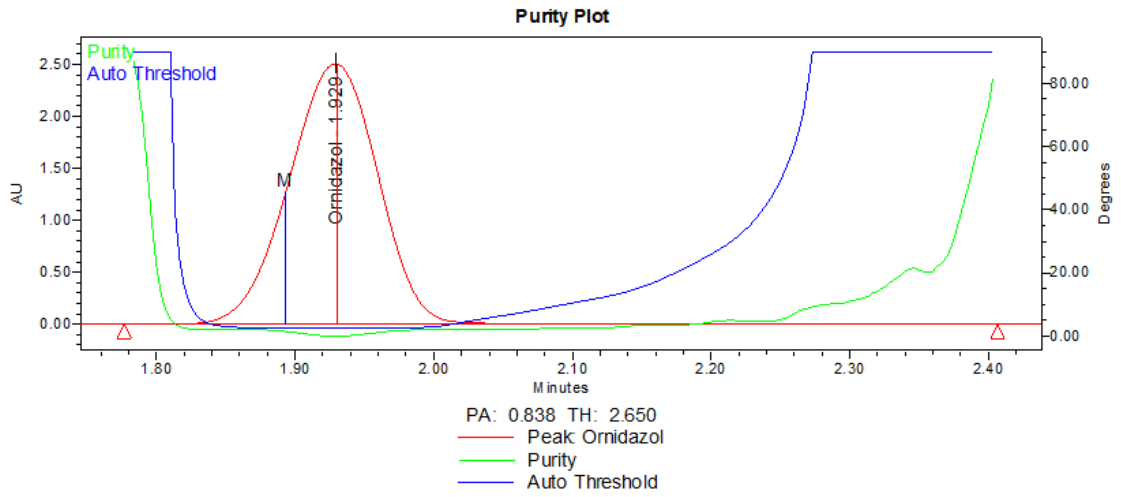
Şekil 4- 30: Oksidasyon bozundurması numunesine ait Ornidazol pik saflık eğrisi



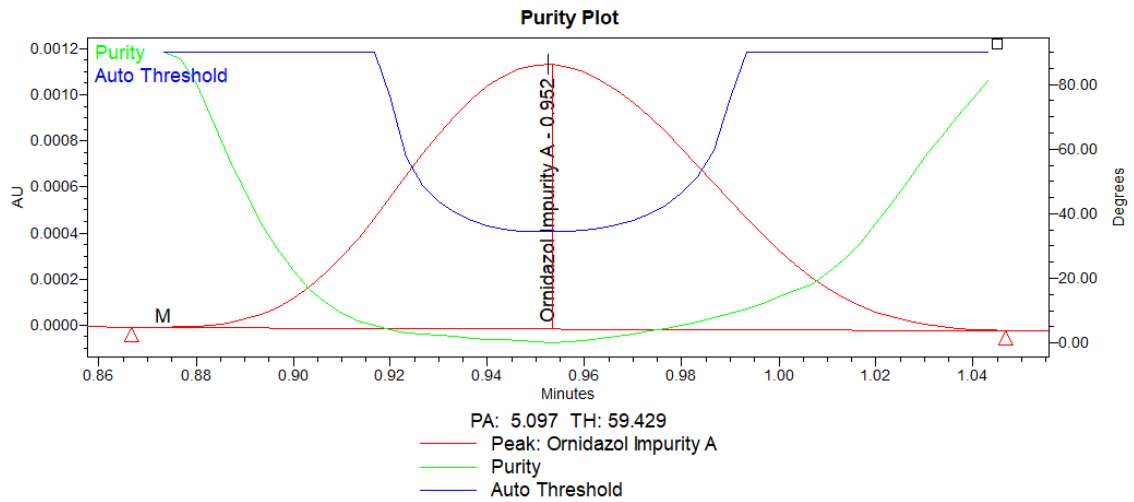
Şekil 4- 31: Oksidasyon bozundurması numunesine ait Safsızlık A pik saflık eğrisi



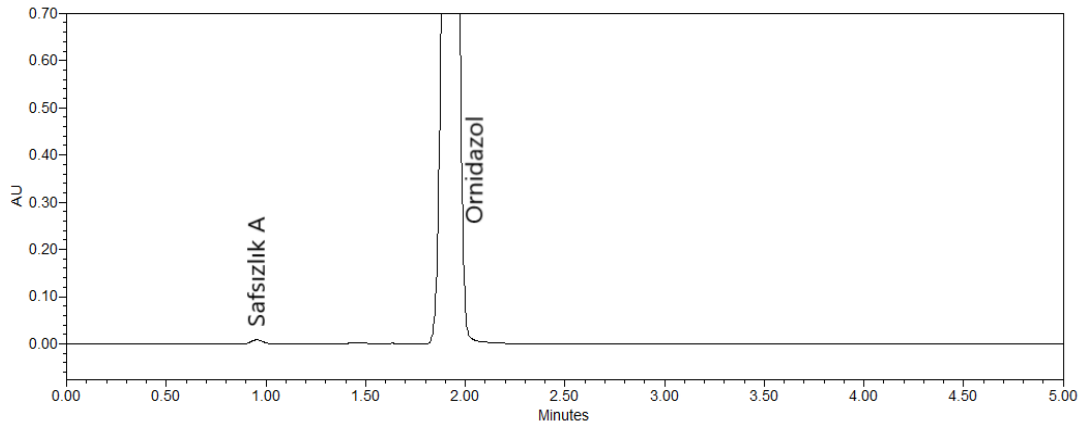
Şekil 4- 32: Işık bozundurması numunesine ait kromatogramı



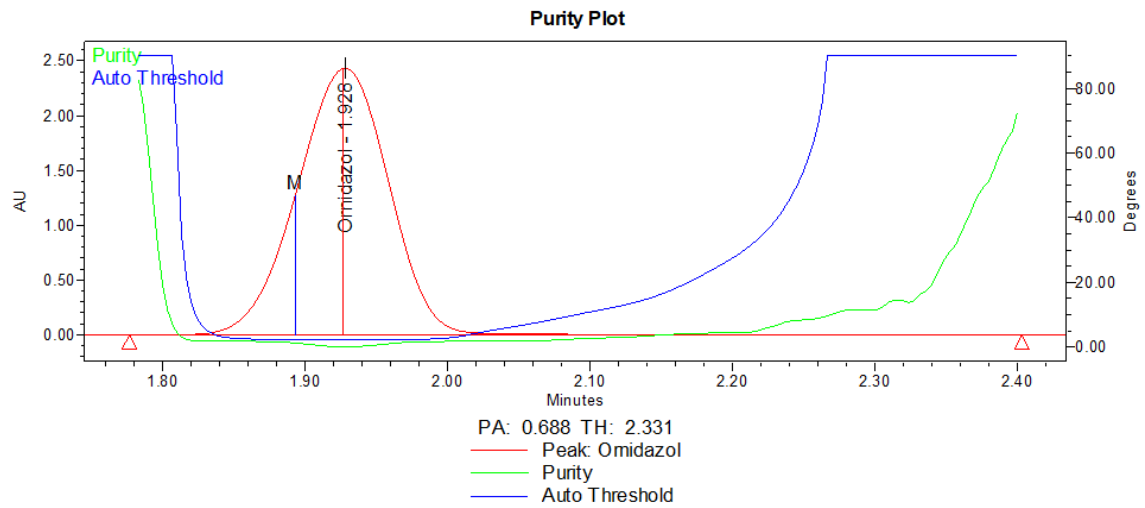
Şekil 4- 33: Işık bozundurması numunesine ait Ornidazol pik saflık eğrisi



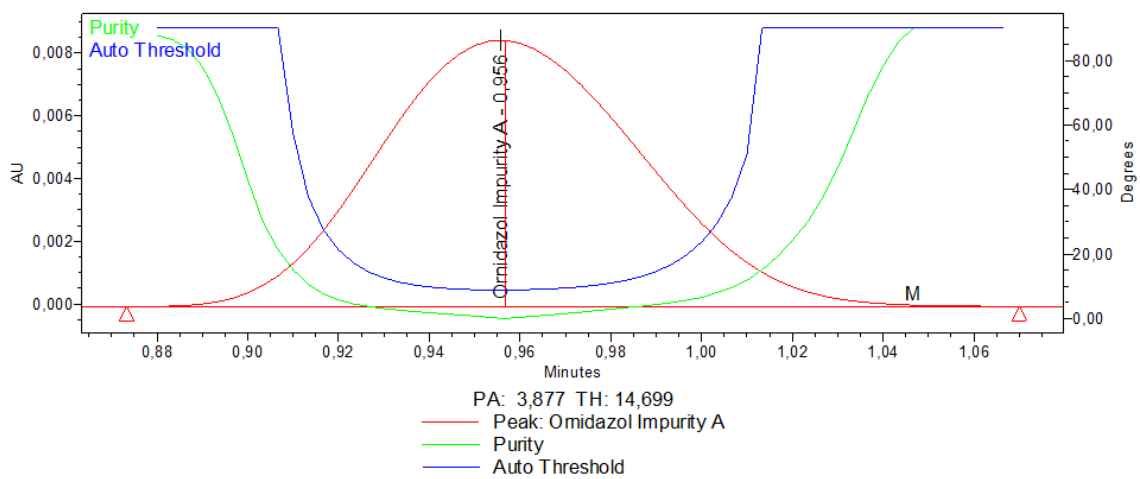
Şekil 4- 34: Işık bozundurması numunesine ait Safsızlık A pik saflık eğrisi



Şekil 4- 35: Isı ve Nem bozundurması numunesine ait kromatogramı



Şekil 4- 36: Isı ve Nem bozundurması numunesine ait Ornidazol pik saflık eğrisi



Şekil 4- 37: Isı ve Nem bozundurması numunesine ait Safsızlık A pik saflık eğrisi

Geliştirilen yöntemin stres koşulları altında; ısı ve nem, oksidasyon, asit, baz, ısı ve ışık stres koşullarına maruz bırakılmıştır. Bu koşullar altında oluşabilecek safsızlıklar tayin edilmiştir. Stres koşulları altında pik saflığı; Ornidazol ve Safsızlık A pikleri için gösterilmiştir. Stres koşulları altında Ornidazol pikinin bozunmasına karşılık yeni safsızlıklar oluşmuş ve Safsızlık A pikinde de bozunma olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmayla geliştirilen yöntemin stress koşullarında da Ornidazol, Safsızlık A ve potansiyel oluşabilecek safsızlıklar için seçici ve tayin edebilir özellikte olduğu kanıtlanmıştır.



5.TARTIŞMA

Entamoeba histolytica bir amip türü olarak gelişen dünyada özellikle temiz su kaynaklarına ulaşamamasında kaynaklı olarak; gelimek olan ülkelerde hastalığa sebep olabilmektedir. Bu amip türü temiz su kaynağı olmaması ve meyve sebzelerin doğru yıkanmaması sonucu insan vücuduna yerleşmektedir. Hastalığı taşıyan kişilerde teşhis ve tedavi yapılmazsa; hastalık ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir.

Hastalığa sebep olan bu amip türü insan bağırsağına yerleştikten sonra asemptomatik olarak kişinin normal hayat standartlarını etkilemeyebilir. Bazı hastalarda kilo kayıplarına karın ağrısına ve ishal gibi septomlarla da kendisini gösterebilmektedir.

1950 yıllarda geliştirilen nitroimidazol türevleri hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Nitroimidazol türevi olan Metranidazol ile hastalığın önüne geçilmiş olsada; farklı yan etkiler ortaya kondığı için bu molekül üzerinde teknolojik olarak geliştirme çalışmaları yapılmıştır.

Metronidazol molekülü üzerinde bulunan nitro grupları; hastalığın önlenmesinde önemli bir rolü vardı. Fakat oluşan kimyasal tepkimeler sonucu Metronizol'un güvenli olduğu düşünülse; potansiyel kansorejen etkisi olduğu şüphesini korumaktadır.

Ornidazol nitroimidazollerin geliştirilmesi çalışmasında keşfedilmiş, günümüzde Entamoeba histolytica amip bakterisinin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalardan Ornidazol'un bu hastalık için Metranizdol'e kıyasla daha güvenli ve etkili olduğu ortaya konmuştur.

Oridazol Avrupa Farmakopesi ve Amerika Farmakopesinde yer almayan ilaç etken maddesi için literatür taramalarına bakıldığında; herhangi bir safsızlık tayini çalışmasının bulunmadığı görülmüştür. Ornidazol ile yapılan ilaç etken tayini yöntemleri için UV/VIS Spektrofotometre, HPLC gibi teknikler kullanılmıştır.

Bu çalışmada UPLC metodu kullanılarak; Ornidazol içeren farmasötik preparatlarda; safsızlık tayini analizlerinin hızlı, güvenli ve rutin çalışmalarda çabuk cevap veren rahatlıkla kullanılabilen bir safsızlık tayini yöntemi geliştirmek ve bu yöntemi valide etmek amaçlanmıştır.

Geliştirilen safsızlık tayini yöntemi için; UPLC Acquity BEH C₁₈ (50 mm x 2.1 mm) , 1.7 µm kolon ile 0.4 ml/dakika akış hızı kullanılarak yapılmıştır.. Hareketli faz A olarak sodyum asetat içeren ve asetik asit ile pH 6.5'e ayarlanmış tampon çözeltiden

yararlanılmıştır. Hareketli faz B için Asetonitril kullanılmıştır. Analiz süresini kısaltmak; Ornidazol ve Safsızlık A arasındaki ayrışmayı güçlü kılmak için gradient elüsyon programı ile çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar UPLC cihazı ile; PDA ve UV dedektör kullanılarak, 312 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Ornidazol ve ilgili safsızlıkları için geliştirilen yönteme; spesifiklik, doğrusal ve aralık, düzeltme faktörü, dedeksiyon limiti ve kantitatif limit, kesinlik, doğruluk, dayanıklılık ve stres parametreleri uygulandı. Elde edilen tüm sonuçlar kabul ölçütlerine göre değerlendirildi. Sonuçlar; tablolar ve şekiller ile ayrıntılı olarak verilmiştir.

Geliştirilen yöntemin seçicilik parametresinde, Ornidazol'un ve Safsızlık A'nın birbirleriyle girişim yapmadığı kanıtlanmıştır. Kullanılan çözücü ve farmasötik preparatlara ait plasebolardan da herhangi bir pik gözlemlenmemiştir.

Belirlenen çalışma koşullarında doğrusal aralık; Ornidazol ve Safsızlık A için sırasıyla, 0.02– 0.80 µg/mL ve 0.04 ve 1.58 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Yöntemin doğruluğunu kanıtlamak amacıyla; farmasötik preparat numune çözeltileri üzerine Safsızlık A çözeltisi katılarak LOQ, %100 ve % 200 aralığında numuneler hazırlanmış ve geri kazanım değerleri %96.3 - %101.5 arasında bulunmuştur. Yine yöntemin doğruluğunu kanıtlamak için farmasötik preparat plasebo numune çözeltileri üzerine Ornidazol çözeltisi katılarak LOQ, %100 ve % 200 aralığında numuneler hazırlanmış ve geri kazanım değerleri %98.2 - %102.9 arasında bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemin kesinliğini kanıtlamak için, farmasötik preparat numune çözeltileri üzerine %100 konsantrasyona denk gelecek şekilde Safsızlık A çözeltileri ilave edilmiştir. Farklı günlerde, farklı UPLC cihazı, farklı kolon kullanılarak analizler yapılmış ve Safsızlık A eklenmiş numunler için elde edilen sonuçlar arasında bağıl stadandart sapma % 4.0'den fazla olmadığı kanıtlanmıştır.

Dayanıklılık parametresinde; analiz şartlarında yapılan değişiklikler sonucu filtre değişikliği, akış hızı ve kolon sıcaklıkları değişikliğine karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

Geliştirilen yöntemde çözelti stabilitesinin belirlenebilmesi amacıyla Ornidazol standart, Safsızlık A ve % 100 konsantrasyonda olacak şekilde Safsızlık A eklenmiş Ornisid 250 mg ve 500 mg tablet numune çözeltilerinin alan değişimi gözlenmiştir.

Standart ve numune çözeltilerinin oda koşulları (25 °C) altında 48 saat boyunca stabil kaldıkları tespit edilmiştir.

Stres çalışmasında Ornidazol içeren tablet numunesi; sıcaklık, UV ışığı, asit, baz, oksidasyon, ısı ve nem zorlayıcı koşulları uygulanmıştır. Tablet numunelerine 1N NaOH stress koşulu altında bekletilmeden uygulama yapıldığında bozunma gerçekleşmekte ve Safsızlık A ve bilinmeyen safsızlıkların arttığı gözlemlenmiştir. Numuneye 1N HCl stress koşulu altında 2 saat bekletilerek uygulama yapıldığında Safsızlık A ile birlikte bilinmeyen safsızlıkların sonuçlarının arttığı gözlemlenmiştir. Asit ve baz stress koşullarında; başlangıç numunesi Safsızlık A sonuçlarına göre artış, diğer stress koşullarında gözlemlenmemiştir.

Ornidazol içeren tablet numune çözeltilerine % 30'luk H₂O₂ stres koşuluna 9 saat boyunca maruz bırakıldığında Safsızlık A sonucunda artış gözlemlenmezken; bilinmeyen safsızlık sonucunda artışlar görülmüştür. 3 günlük (200 W/m, UV ışık; 1.2 milyon luks,gün ışığı) ışık bozundurması; 7 günlük ısı ve nem (40 °C % 75 RH) bozundurması ve 2 günlük (80 °C) sıcaklık bozundurması sonucunda numunede Safsızlık A dahil tüm safsızlıklarda bozunma miktarlarında anlamlı artışlar gözlemlenmemiştir. Tüm stres koşulları altında Ornidazol için oluşan safsızlıklara karşılık madde kayıpları, asit bozundurmada % 27.1, baz bozundurmada % 44.5, oksidatif bozundurma % 13.0, ışık bozundurmada % 0,145, 40 °C % 75 ısı ve nem bozundurmada % 0.133 ve 80 °C sıcaklık bozundurmada % 0.040 olarak tespit edilmiştir.

Geliştirilen Ornidazol safsızlık tayini metodu stress koşulları altında test edilmiş ve stres koşullarındaki değişimleri yansıttığı kanıtlanmıştır. Geliştirilen yöntemin stabilite ayırt edici özelliği ispatlanmıştır.

Sonuç olarak; geliştirilen yöntem ile Ornidazol içeren farmasötik preparatlarda; güvenilirliği yüksek, hızlı sonuç veren, uygulanabilirliği kolay ve tekrarlanabilirliği yüksek, literatürde yer almayan ICH yönergelerine uygun UPLC yöntemi geliştirilmiş ve validasyonu yapılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Cornick, S., & Chadee, K. (2017). *Entamoeba histolytica*: host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue Barriers*, 5(1), e1283386.
2. Kantor, M., Abrantes, A., Estevez, A., Schiller, A., Torrent, J., Gascon, J., ... & Ochner, C. (2018). *Entamoeba histolytica*: updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018.
3. Meyer, A. C., & Birbeck, G. L. (2007). Parasitic Infections. *Neurobiology of disease*, 453-472.
4. Leimer, R., BR, L., & GJ, M. P. (1980). Short-term treatment of acute intestinal amoebiasis with ornidazole.
5. Sharma, S., & Anand, N. (1997). Nitroheterocycles. In *Pharmacochemistry Library* (Vol. 25, pp. 421-438). Elsevier.
6. Leitsch, D., Kolarich, D., Wilson, I. B. H., Altmann, F., & Duchêne, M. (2007). Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. *PLoS biology*, 5(8), e211.
7. Kurt, Ö., Girginkardeşler, N., Balcioğlu, I. C., Özbilgin, A., & Ok, Ü. Z. (2008). A comparison of metronidazole and single-dose ornidazole for the treatment of dientamoebiasis. *Clinical microbiology and infection*, 14(6), 601-604.
8. Sköld, M., Gnärpe, H. A. K. A. N., & Hillström, L. (1977). Ornidazole: a new antiprotozoal compound for treatment of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sexually Transmitted Infections*, 53(1), 44-48.
9. Soares, M. F. D. L. R., Soares-Sobrinho, J. L., de Silva, K. E. R., Alves, L. D. S., Lopes, P. Q., Correia, L. P., ... & Rolim-Neto, P. J. (2011). Thermal characterization of antimicrobial drug ornidazole and its compatibility in a solid pharmaceutical product. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 104(1), 307-313.
10. Oren, B., Schgurensky, E., Ephros, M., Tamir, I., & Raz, R. (1991). Single-dose ornidazole versus seven-day metronidazole therapy of giardiasis in Kibbutzim children in Israel. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(11), 963-965.

11. Ornidazole | C7H10ClN3O3 - PubChem (nih.gov)
12. Abdiibrahim İlaç San. Ve Tic. A.Ş Ksa Ürün Bilgisi (KÜB). Abdiibrahim İlaç San. Ve Tic. A.Ş., 04.09.2018, [ornisid-fort-500-mg-film-kapli-tablet.pdf](https://www.abdiibrahim.com.tr/ornisid-fort-500-mg-film-kapli-tablet.pdf) ([abdiibrahim.com.tr](https://www.abdiibrahim.com.tr))
13. Lamp KC, Freeman CD, Klutman NE, Lacy MK. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials, Clin. Pharmacokinet., 36, 353-373, 1999.
14. Edwards DI. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanism of resistance, J. Antimicrob. Chemother., 31, 201-210, 1993.
15. Breccia A, Cavalleri B, Adams GE. Nitroimidazoles: Chemistry, Pharmacology, and Clinical Application, Plenum Press, USA, 1982.
16. Martindale, The Extra Pharmacopoeae, 29th. Ed., The Pharmaceutical Press, London, 674-675, 1989.
17. Hizarcıolu, Y. S., Zeynep, A. Y., & Ozyazici, M. (2004). Bioavailability file: ornidazole. Fabad J Pharm Sci, 29, 133-144.
18. Rossignol JF, Maisonneuve H, Cho YW. Nitroimidazoles in the treatment of trichomoniasis, giardiasis, and amebiasis, Int. J. Clin. Pharmacol. Toxicol., 22, 63-72, 1984.
19. Phatak, H., & Vaidya, V. (2016). A rapid gas chromatography-mass spectroscopy method for simultaneous quantification of ornidazole and miconazole from cream formulations: development, validation and application. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 7(7), 2976.
20. Puranik, M., Bhawsar, D. V., Rathi, P., & Yeole, P. G. (2010). Simultaneous determination of ofloxacin and ornidazole in solid dosage form by RP-HPLC and HPTLC techniques. Indian journal of pharmaceutical sciences, 72(4), 513.
21. Rana, M., Nath, L. K., Giri, T. K., Choudhury, P. K., Kar, A. K., & Sarkar, M. K. (2011). Spectrophotometric method development and determination of ornidazole in bulk and tablet dosage form. International Journal of PharmTech Research, 3(1), 153-156.
22. Tulasamma, P., Govind, V., & Venkateswarlu, P. (2011). Spectrophotometric determination of ornidazole in pure and pharmaceutical formulations. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2(1), 44-48.

23. Paramane, S., Kothapalli, L., & Thomas, A. (2007). Simultaneous RP-HPLC estimation of gatifloxacin and ornidazole in tablet dosage forms. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 69(4), 525.
24. Puranik, M., Bhawsar, D. V., Rathi, P., & Yeole, P. G. (2010). Simultaneous determination of ofloxacin and ornidazole in solid dosage form by RP-HPLC and HPTLC techniques. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 72(4), 513.
25. Rao, V. J., Devika, G. S., & Petchi, R. R. (2010). A validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of cefixime trihydrate and ornidazole in tablet dosage forms. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 1(2), 34-39.
26. Du, J., Ma, Z., Zhang, Y., Wang, T., Chen, X., & Zhong, D. (2014). Simultaneous determination of ornidazole and its main metabolites in human plasma by LC–MS/MS: application to a pharmacokinetic study. *Bioanalysis*, 6(18), 2343-2356.
27. European Medicines Agency. (1995). ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
28. Jain, D. K., Vijay, P., Laxmi, B., Nilesh, J., & Maheshwari, R. K. (2014). " Solid as solvent"-novel technique for spectrophotometric analysis of ornidazole tablets using melted phenol as solvent. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4(40), 26-29.
29. Hussain, S., & Shaikh, T. (2016). Ultra high performance liquid chromatography (UPLC): a new trend in analysis. *World journal of pharmaceutical research*, 3, 387-394.
30. Marcus, Y., Tal, N., Ronen, M., Carmieli, R., & Gurevitz, M. (2016). The drug ornidazole inhibits photosynthesis in a different mechanism described for protozoa and anaerobic bacteria. *Biochemical Journal*, 473(23), 4413-4426.