

IŞIL EVCİL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

COVID-19 TEDAVİSİNDE KULLANILAN
FAVİPİRAVİR'İN TABLETLERDEN TAYİNİ İÇİN UV
SPEKTROMETRİK VE SPEKTROFLUORİMETRİK
YÖNTEMLER

IŞIL EVCİL

DANIŞMAN
DOÇ.DR. SENA ÇAĞLAR ANDAÇ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Tezli Yüksek Lisans (örgün eğitim) programında Yüksek Lisans öğrencisi Işıl EVCİL tarafından Doç. Dr. Sena ÇAĞLAR ANDAÇ'ın danışmanlığında hazırlanan "COVID-19 Tedavisinde Kullanılan Favipiravir'in Tabletlerden Tayini için UV Spektrometrik ve Spektrofluorimetrik Yöntemler" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 20 /12/2022 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Armağan ÖNAL
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Jüri-Danışman

Doç. Dr. Sena ÇAĞLAR ANDAÇ
İstanbul Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi,
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Elif ÖZDEMİR
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya
Anabilim Dalı

İTHAF

Babam İsmail DEMİR'e ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini esirgemeyen, bilgisi ve yönlendirmeleriyle çalışmalarına ışık tutan Tez Danışmanım Doç.Dr. Sena Çağlar Andaç'a, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalının tüm değerli öğretim üyelerine, deneylerimde bana destek veren Analitik Kimya Doktora Programı Öğrencisi Hüseyin Pehlivanoglu'na, arge departmanında görev aldığım Mcg Pharma İlaç San. ve Tic. Ltd. 'ye ve Favipiravir etken maddesi üreticisi Biophore firmasına ve eşim Gürol Evcil'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-37985

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
İTHAF	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	X
ABSTRACT.....	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Favipiravir Klinik Farmakolojisi	2
2.1.1. Etki Mekanizması	2
2.1.2. Farmakokinetik özellikler.....	3
2.1.2.1. Emilim	3
2.1.2.2. Dağılım	4
2.1.2.3. Atılım.....	4
2.1.3. Favipiravir'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	4
2.2.Favipiravir'e Ait Geliştirilmiş Analitik Yöntemler	5
3. GEREÇ VE YÖNTEM	8
3.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	8

3.1.1.	UV Spektrofotometrik Metot için Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	8
3.1.2.	Spektrofluorimetrik Metot için Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	8
3.2Çözeltiler	9
3.2	Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler	10
3.3	Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar	10
3.4	Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	11
3.4.1	Seçicilik	11
3.4.1.2.	Spektrofluorimetrik için Çözelti Hazırlığı.....	11
3.4.2	Doğrusallık	12
3.4.3	Kesinlik.....	13
3.4.4	Doğruluk ve Geri Kazanım	14
3.4.5	Çözelti Stabilesi.....	14
3.4.6	Metot Karşılaştırma	15
4.	BULGULAR.....	16
4.1	Analiz yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Bulgular	16
4.2	Geliştirilen Yöntemin Validasyonu İle İlgili Bulgular	17
4.2.1	Seçicilik	17
4.2.2	Doğrusallık	18
4.2.3	Kesinlik.....	22
4.2.3.2	Spektrofluorimetrik Yöntem Kesinlik	23
4.2.4	Doğruluk ve Geri Kazanım	24
4.2.5	Çözelti Stabilesi.....	26
5.	TARTIŞMA	30
	KAYNAKLAR	32
	İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	37

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Favipiravir'in Literatürdeki Analitik Metot Yayınları	6
Tablo 3-1: UV Spektrofotometrik Metot ile Doğrusallık Çalışması Hazırlığı.....	13
Tablo 3-2: Spektrofluorimetrik Yöntem ile Doğrusallık Çalışması Hazırlığı.....	14
Tablo 3-3: HPLC Metot için Gradient Programı	16
Tablo 4-1: UV Spektrofotometrik Yöntem Doğrusallık Çalışması Verileri.....	20
Tablo 4-2: UV Spektrofotometrik Yöntem Doğrusallık Çalışması Sonuçları.....	20
Tablo 4-3: Spektrofluorimetrik Yöntem Doğrusallık Çalışması Verileri.....	22
Tablo 4-4: Spektrofluorimetrik Yöntem Doğrusallık Çalışması Sonuçları.....	22
Tablo 4-5: UV Spektrofotometrik Yöntem Aynı/Farklı Gün Kesinlik Sonuçları.....	23
Tablo 4-6: UV Spektrofotometrik Yöntem Aynı/Farklı Gün Kesinlik Sonuçları Özet..	24
Tablo 4-7: Spektrofluorimetrik Yöntem Aynı/Farklı Gün Kesinlik Sonuçları.....	24
Tablo 4-8: Spektrofluorimetrik Yöntem Aynı/Farklı Gün Kesinlik Sonuçları Özet.....	25
Tablo 4-9: UV Spektrofotometrik Yöntem Geri Kazanım Sonuçları	25
Tablo 4-10: UV Spektrofotometrik Yöntem Geri Kazanım Sonuçları Özet	26
Tablo 4-11: Spektrofluorimetrik Yöntem Geri Kazanım Sonuçları.....	26
Tablo 4-12: Spektrofluorimetrik Yöntem Geri Kazanım Özet Sonuçlar.....	27
Tablo 4-13: Favipiravir Standart Çözeltisi İçin Çözelti Stabilitesi (UV-323 nm).....	27
Tablo 4-14: Favipiravir Test Çözeltisi İçin Çözelti Stabilitesi (UV-323 nm).....	27
Tablo 4-15: Spektrofluorimetrik Yöntem Favipiravir Standart Çözelti Stabilitesi	28
Tablo 4-16: Spektrofluorimetrik Yöntem Favipiravir Test Çözelti Stabilitesi	28
Tablo 4-17: UV Spektrofotometrik ile HPLC Metotların Karşılaştırmalı İstatiksel Değerlendirmesi	29
Tablo 4-18: Spektrofluorimetrik ile UV Spektrofotometrik Metotların Karşılaştırmalı İstatiksel Değerlendirmesi.....	30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Favipiravir'in Etki Mekanizması	4
Şekil 2-2: Favipiravir'in Kimyasal Formülü	5
Şekil 2-3: Favipiravir'in ¹ H NMR Spektrumu	6
Şekil 4-3: 20 µg/mL Favipiravir Sulu Çözeltisine Ait UV Spektrumu	17
Şekil 4-2: 2,5 ng/mL Favipiravir Sulu çözeltisine Ait Floresans Spektrumu	18
Şekil 4-3: Plasebo Çözeltisine Ait UV Spektrumu	18
Şekil 4-4: Standart Çözeltisine Ait UV Spektrumu	19
Şekil 4-5: Standart Çözeltisine Ait UV Floresans Spektrumu	19
Şekil 4-6: UV Spektrofotometrik Yöntem ile Favipiravir 323 nm'de Doğrusallık Grafiği	21
Şekil 4-7: UV Spektrofotometrik Yöntem ile Favipiravir 230 nm'de Doğrusallık Grafiği	21
Şekil 4-8: Spektrofluorimetrik Yöntem ile Doğrusallık Grafiği	23

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

CAS: Kaliforniya Bilimler Akademisi

DCGI: Hindistan Genel İlaç Kontrol

EM: Emisyon

EX: Eksitasyon

FAV: Favipiravir

HPLC: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

LOD: Tespit Limiti

LOQ: Tayin Limiti

mg: miligram

mL: mililitre

MDCK: Madin Darby Canine Kidney

NMR: Nükleer Manyetik Rezonans

nm: Nanometre

ng: Nanogram

µg : mikrogram

RdRp: RNA bağımlı RNA polimeraz

RSD: Bağlı Standart Sapma

RTP: Ribofuranosil-5B-Trifosfat

RNA: Ribonükleik Asit

RMP: Ribofuranosil-5B-Monofosfat

SD: Standart Sapma

TLC: İnce Tabaka Kromatografisi

UV: Ultraviyole

ÖZET

Işıl Evcil (2022), COVID-19 Tedavisinde Kullanılan Favipiravir'in Tabletlerden Tayini için Ultraviyole (UV) Spektrometrik ve Spektrofluorimetrik Yöntemler, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Favipiravir (FAV), son yüzyılım en önemli salgınlarından biri olan COVID-19'un tedavisinde kullanılan bir antiviral ilaçtır. Salgında çeşitli ülkelerde tedavide kullanılan bu ilacın hassas ve pratik analizlerinin hem halk sağlığı hem de bilimsel literatüre katkıları düşünülerek bu tez çalışması planlanmıştır. Çalışma kapsamında FAV'in tabletlerden tayini için bir UV-spektrofotometrik, bir de spektrofluorimetrik (FL) metot geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Her iki yöntemde de yeşil bir analiz yapılmış ve çözücü olarak su kullanılmıştır. Ölçümlerde UV spektrofotometrik yöntem için maksimum absorpsiyon dalgaboyu olarak 230 nm, FL yöntemde ise 370/452 nm eksitasyon/emisyon dalga boyları saptanmıştır. < 0,99 korelasyon katsayılarına sahip yöntemler için doğrusallık aralıkları, UV için 5,0-30,0 µg/mL ve FL için 0,5-9,0 ng/mL olarak belirlenmiştir. LOD; LOQ değerleri UV ve FL metot için sırasıyla, 1,20; 3,70 µg/mL ve 0,10; 0,30 ng/mL olarak hesaplanmıştır. UV metoda ait geri kazanım ve kesinlik % RSD değerleri sırasıyla, % 100,18 -%100,47 ve 0,26-0,80 aralıklarında bulunmuştur. FL ölçümlerde FAV çözeltilerinin bağlı flüoresanslarının hesaplanmasında Kinin çözeltisinin flüoresans değerleri kullanılmıştır. Yönteme ait doğruluk ve kesinlik % RSD sonuçları % 99,67- %100,00 ile 0,6-0,9 arasındadır. Çözeltilerin bir haftaya kadar ölçülmüş ve stabil oldukları görülmüştür. Geliştirilen UV metot sonuçları, üretici firma tayin metodu olan HPLC metodu ile, geliştirilen FL metot ile elde edilen sonuçlar da UV metot ile kıyaslanmış metotlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sonuç olarak son dönem COVID-19 tedavisinde kullanılan Favipiravir'in tabletlerden tayini için geliştirilen UV ve FL metotlar sırasıyla mikromolar ve pikomolar seviyesindeki hassasiyetleri ve kullanılan cihazların uygulama kolaylığı itibarıyla kalite kontrol ve rutin analizlerde kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Favipiravir, UV spektrofotometre, Spektrofluorimetre, validasyon, COVID-19

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-37985

ABSTRACT

Işıl Evcil (2022), Determination of COVID-19 DRUG Favipiravir Tablets by UV Spectrophotometric and Spectrofluorometric methods, Istanbul University Institute of Health Sciences, Analytical Chemistry, Master Thesis, Istanbul.

Favipiravir (FAV) is an antiviral drug used in the treatment of COVID-19, one of the most important pandemics of the last century. This thesis was planned by considering the contributions of sensitive and practical analyzes of this drug, which is used in treatment in various countries during the pandemic, to both public health and scientific literature. Within the scope of the study, a UV-spectrophotometric and a spectrofluorimetric (FL) method were developed and validated for the determination of FAV from tablets. In both methods, a green analysis was performed and water was used as the solvent. In the measurements, the maximum absorption wavelength was 230 nm for the UV spectrophotometric method, and the excitation/emission wavelengths of 370/452 nm for the FL method. Linearity ranges for methods with correlation coefficients < 0.99 were determined as 5.0-30.0 $\mu\text{g/mL}$ for UV and 0.5-9.0 ng/mL for FL. LOD; LOQ values for the UV and FL method were Calculated as 1.20; 3.70 $\mu\text{g/mL}$ and 0.10; 0.30 ng/mL . The recovery and precision % RSD values of the UV method were found to be between 100,18% -100.47% and 0.26-0.80%, respectively. The fluorescence values of the quinine solution were used to calculate the relative fluorescence of FAV solutions in FL measurements. The accuracy and % RSD precision results of the method are between 99.67%-100.00% and 0.6-0.9%. The stability of the solutions up to one week was measured and found to be stable. There was no significant difference between the developed UV method results, the HPLC method, which is the manufacturer's determination method, and the results obtained with the developed FL method and the UV method and the methods compared. As a result, UV and FL methods developed for the determination of Favipiravir from tablets, which are used in the treatment of recent COVID-19, can be used in quality control and routine analyzes due to their micromolar and picomolar sensitivity, respectively, and the ease of application of the devices used.

Keywords: Favipiravir, UV Spectrophotometer, Fluorescence Spectrometer, validation, COVID-19

This study was funded by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University. Project number: TYL-2021-37985.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya’da ilk kez Çin’in Wuhan kentindeki hastanelerde, 12 Aralık 2019 tarihinde başladığını varsaydığımız COVID-19 salgını, yüzyılın en yaygın halk sağlığı krizi haline gelmiştir ve etkileri halen devam etmektedir [1]. SARS-CoV2 bir RNA virüsüdür ve özellikle RNA polimeraz inhibitörü olan antivirüsler koronavirüs tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır [2]. Bu virüse karşı yeni ve spesifik bir antiviral ajanın sıfırdan keşfi, uzun ve zorlu bir zaman çizelgesi gerektireceği için diğer viral enfeksiyonlara karşı halihazırda kullanımda olan ilaçlar bu hastalığın tedavisinde de denenmeye başlanmıştır. Favipiravir (FAV), Japonya’da Toyama Chemical Co., Ltd. firması tarafından keşfedilmiş bir anti-influenza ajanı iken COVID-19 tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır [3].

FAV, COVID-19 tedavisinde ilk olarak Çin’de kullanılmaya başlanmıştır. Pandeminin Avrupa’ya yayılmasıyla İtalya’da sonrasında Japonya, Rusya, Ukrayna, Özbekistan, Moldova ve Kazakistan, Suudi Arabistan, BAE, Türkiye, Bangladeş ve son olarak Mısır’da tedavide kullanılmıştır [3]. Hafif ve orta dereceli COVID-19 vakalarının tedavisinde çeşitli faydalar gösterdiği çeşitli raporlarda gösterilmiştir [2,3]. 26 Kasım 2022 tarihi itibarıyla; bu ilacın COVID-19 tedavisindeki faydasını değerlendirmek için Clinicaltrials.gov’da kayıtlı 58 çalışma bulunmaktadır [4].

Pandeminin etkisinin artarak devam ettiği ve tez önerisinin verildiği dönemde tabletlerden FAV tayini için geliştirilecek analitik yöntemlerin hem literatüre katkı hem de halk sağlığına olabilecek olumlu etkisi düşünülerek, az sayıdaki mevcut metotlardan [18, 20, 21] daha düşük hassasiyetlere sahip ve güvenilir metotların geliştirilmesine dayanan bu tez önerisi verilmiştir. Tez kapsamında FAV ilaç etken maddesinin tabletlerden analizlerinde, UV spektrofotometrik ve spektrofluorimetrik olmak üzere iki farklı analitik yöntemeye dayanan, iki farklı doğruluk aralığında tayin metodu geliştirilmiş ve geliştirilen yöntemler ICH kılavuzuna göre valide edilerek 200 mg FAV içeren film kaplı tablet formuna başarıyla uygulanmıştır. Literatürde halen bu tez kapsamında geliştirilen UV spektrofotometrik ve spektrofluorimetrik metotların hassasiyetine sahip bir analitik metot bulunmamaktadır.

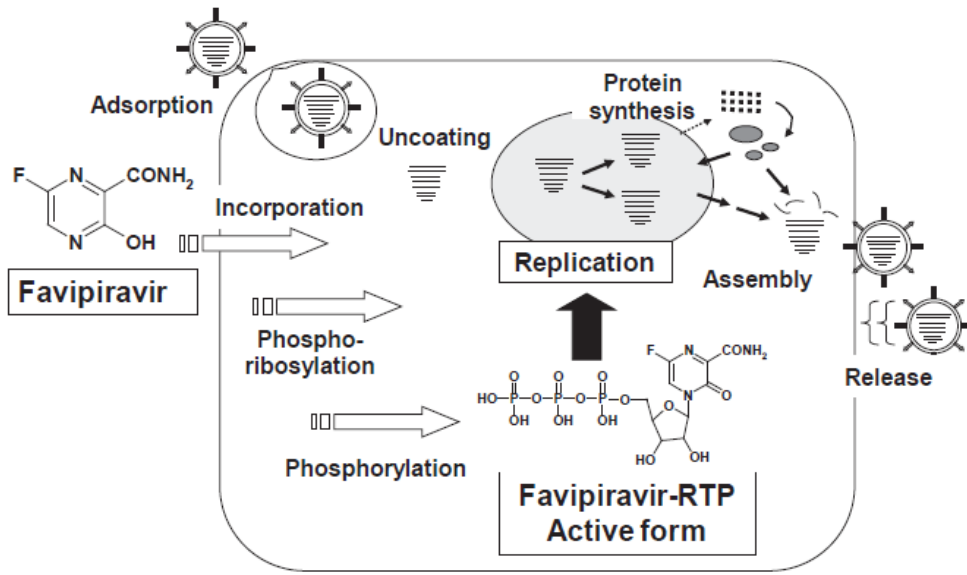
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Favipiravir Klinik Farmakolojisi

2.1.1. Etki Mekanizması

FAV, RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) tarafından bir substrat olarak tanınan favipiravir-RTP (favipiravir ribofuranosil-5B-trifosfat) aktif formu olmak üzere hücre içi bir fosforibosilasyona uğrar ve RNA polimeraz aktivitesini inhibe eder. RdRp'nin katalitik alanı, çeşitli RNA virüsleri arasında korunduğundan, bu etki mekanizması, FAV'nin daha geniş bir anti-viral aktivite spektrumunun temelini oluşturur. FAV, mevcut anti-influenza ilaçlarına dirençli suşlar da dahil olmak üzere, influenza virüslerinin çok çeşitli tip ve alt tiplerine karşı etkilidir. FAV'nin tümü ölümcül hemorajik ateşe neden olduğu bilinen arenavirüsler, bunyavirüsler ve filovirüsler gibi diğer RNA virüslerine karşı anti-viral aktiviteler göstermesi dikkat çekicidir. Bu benzersiz anti-viral profiller, favipiraviri spesifik olarak tedavi edilemeyen RNA viral enfeksiyonları için potansiyel olarak ümit verici bir ilaç haline getirmiştir [5].

FAV, antiviral etkinlik periyodunu belirleme testinde, en çok viral proliferasyon döngüsünün ortasında ortaya çıkan, viral genom replikasyonunu inhibe etmiştir. FAV'nin anti-viral aktivitesi, pürin nükleositlerinin varlığında zayıflamıştır veya pürin bazları, FAV'nin pirimidin nükleozitlerinden ziyade pürin nükleositleriyle rekabet ettiğini gösterir. Madin Darby Canine Kidney (MDCK) hücreleri, influenza virüsünün bir in vitro tahlili olarak iyi bir şekilde kullanılmaktadır. MDCK hücreleri favipiravir ile tedavi edilip, hücresel metabolitler yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edildiğinde favipiravir-RTP, favipiravir ribofuranoz (favipiravir-R) ve favipiravir ribofuranosil-5B-monofosfat (favipiravir- RMP) saptanmıştır. Bu sonuçlar, FAV'nin aktivasyonunun, hücrelere dahil edildikten sonra gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 2-1. Favipiravir'in Etki Mekanizması [5]

2.1.2. Farmakokinetik özellikler

Japonya İlaç ve Tıbbi Cihaz Ajanının Mart 2014 tarihli raporuna göre, ^{14}C işaretli veya işaretli FAV, farelere, sıçanlara, köpeklere ve maymunlara oral veya intravenöz olarak uygulanmış ve ilacın farmakokinetiği araştırılmıştır. Bu amaçla FAV ile tedavi edilen hayvanlardan alınan biyolojik numunelerdeki ilaç konsantrasyonları, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) -UV yöntemiyle ve ^{14}C etiketli FAV ile tedavi edilen hayvanlardan alınan biyolojik numunelerdeki radyoaktivite seviyeleri, sıvı sintilasyon sayacı ve radyoaktivite detektörlü HPLC ile belirlenmiş, radyoaktivitenin doku dağılımı, otoradyoluminografi ile görüntülenmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir [6].

2.1.2.1. Emilim

8 mg/kg FAV'nin tek bir oral veya tek intravenöz dozu uygulanana dişi farelerde FAV ve favipiravir hidroksitin plazma konsantrasyonları, oral ve intravenöz uygulama arasında benzer şekilde zamanla değişmiştir. 0 zamanından sonsuza kadar plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altındaki alan, oral olarak tedavi edilen farelerde 37,3 $\mu\text{g}\cdot\text{sa}/\text{mL}$ ve intravenöz olarak tedavi edilen farelerde 38,3 $\mu\text{g}\cdot\text{sa}/\text{mL}$ olarak bulunmuş ve biyoyararlanım %97,6 olarak hesaplanmıştır [6].

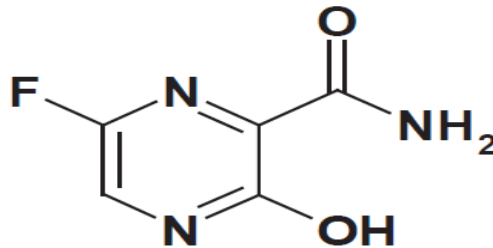
2.1.2.2. Dağılım

¹⁴C işaretli FAV'nin pigmentli (Long-Evans) farelerde 20 mg/kg'lık tek bir oral dozu takiben doku dağılımı, tüm vücut otoradyoluminografisi ile ölçüldüğünde, albino farelerdekine benzer olduğu ve FAV'nin pigmentli dokusuna (gözler, deri, kürk) özgü dağılımı veya kalıcılığının olmadığı gözlenmiştir [6].

2.1.2.3. Atılım

Aç erkek sıçanlara 20 mg/kg ¹⁴C işaretli FAV'nin tek bir oral dozunun ardından, 96 saate kadar idrarda, dışkıda ve solunan havadaki kümülatif radyoaktivite atılım oranı, dozlanan radyoaktivitesi sırasıyla (ortalama) % 83,06, % 19,97 ve % 0,04 olmuştur. Erkek maymunlara 20 mg/kg ¹⁴C işaretli FAV'nin tek bir oral dozunun ardından kümülatif radyoaktivite atılımı 24 saate kadar idrar ve dışkıdaki oranı, dozlanan radyoaktivitenin sırasıyla %91,14 ve %4,32'si olmuştur [6].

2.1.3. Favipiravir'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

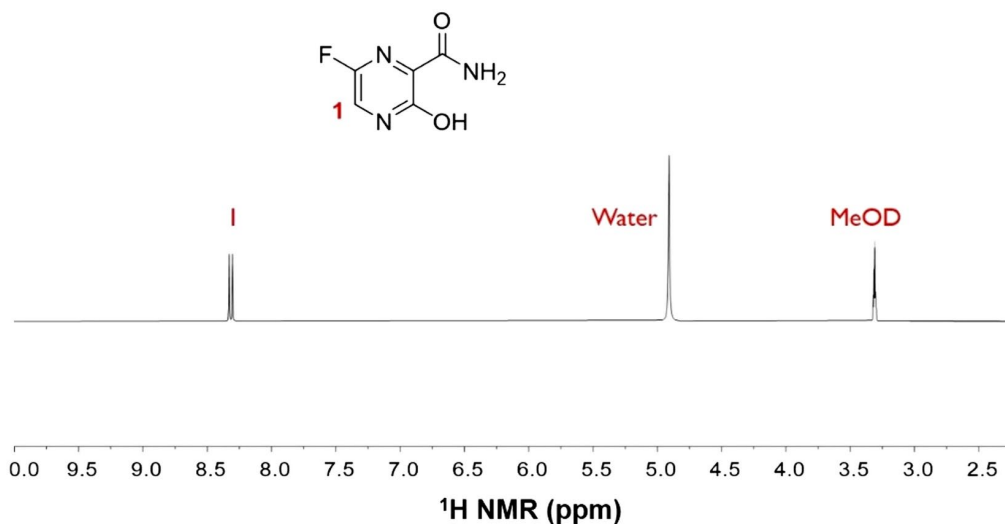


Şekil 2-2. Favipiravir'in Kimyasal Formülü [5]

FAV, C₅H₄FN₃O₂ kapalı kimyasal formülüne sahip olan, molekül ağırlığı 157,104 g/mol olan bir pirazin analogudur. IUPAC'a göre adı 5-floro-2-okso-1H-pirazin-3-karboksamid'dir. CAS numarası 259793-96-9 olan Favipiravir etken maddesinin ilaç dozaj formu tablettir [5].

FAV ilaç etkin maddesi beyazdan açık sarıya kadar renk aralığında tozudur. Asetonitril ve netanolde biraz çözünür, suda ve etanolde az çözünür. pH 2-5 arasında az çözünür ve pH 5,5-6,1 arasında biraz çözünür. Erime noktası 187 °C ile 193°C arasındadır, hidroksil grubu nedeniyle asitlik sabiti (pKa) 5,1 'dir. 25°C'de su/oktanol içinde favipiravirin partisyon oranı, pH 2 ila 4'te 1-oktanol fazında ve pH 5 ila 13'te su fazında dağılıma eğilimindedir [6].

FAV'nin ¹H NMR spektrumu Şekil 2-3'te görülmektedir.



Şekil 2-3. Favipiravir'in ^1H NMR Spektrumu [7]

2.2. Favipiravir'e Ait Geliştirilmiş Analitik Yöntemler

FAV için literatürde farklı türden 25 adet analitik metoda [8-32] rastlanmıştır. Bu metotlardan 2 tanesi spektrofotometri 2 tanesi de UV spektrometri ile çalışılmıştır. Literatürdeki mevcut metotlar hakkındaki detaylı bilgiler Tablo 2-1'de verilmiştir. Bu yayınlardan 13 tanesi HPLC-UV [8-20], 3 tanesi LC-MS/MS [22-24], 2 tanesi TLC [25,26], 6 tanesi elektrokimyasal [27-32], 2 tanesi UV spektrofotometrik [16,17], 2 tanesi spektrofotometrik metottur. HPLC metotları genellikle C18 analitik kolonların ve polar mobil fazların kullanıldığı ters faz ayrılmaya dayanmaktadır. HPLC-UV kullanılan iki çalışmada sonuçlar geliştirilen UV spektrofotometrik metot [18,19], bir HPLC çalışmasında da spektrofotometrik [20] metot ile kıyaslanmıştır.

Tablo 2-1. Favipiravir'in Literatürdeki Analitik Metot Yayınları (11.2022)

Analit	Analiz Yöntemi	Doğrusallık Aralığı	Çalışanlar /kurum/Yer	Yayın Tarihi	Kaynak
İnsan Plazmasında Favipiravir	HPLC-UV	25-80000 ng/mL	Fotouh R Mansour vd./ Tanta Üniversitesi Eczacılık Fakültesi /Mısır	06.2022	[8]
İnsan Plazmasında Favipiravir	HPLC-UV	25-100000 ng/mL	Abdallah, IA vd./ Tanta Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi /Mısır	06.2022	[9]
İnsan Plazmasında Favipiravir	HPLC-UV	0,2-3,2 μg /mL	Duse, PV vd. /YB Chavan Coll Pharm/Hindistan	11.2021	[10]
Favipiravir Sıçan	HPLC-UV	0,1-200,0 μg /mL	Aguilar Carrasco, JC vd. / Meksika Sağlık	11.2021	[11]

Serumunda			Bakanlığı/Meksika		
İnsan Plazmasında Favipiravir	HPLC-UV	0,1-100,0 µg /mL	Abdallah, IA vd. / Sadat City Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/Mısır	01.2022	[12]
Favipiravir	HPLC-UV	0,062 – 4,000 µg/mL	Nishanth, V. V. G. Vd./ JSS Academy of Higher Education and Research/ Hindistan	06.2022	[13]
Favipiravir Tablet	HPLC-DAD	6,25-250,00 µg /mL	Marzouk HM vd. / Cario Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/ Mısır	06.2022	[14]
Favipiravir Tablet	HPLC-DAD	10-100 µg /mL	Taskın, D / Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Eczacılık Fakültesi/Türkiye	09.2022	[15]
Favipiravir	HPLC-DAD	Ulaşılamadı	Hailat, M vd. / Al Zaytoonah Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/ Ürdün	10.2022	[16]
Favipiravir	HPLC-PDA	10-60 µg /mL	Nadendla,R vd. / Chalapathi Enstitüsü/Hindistan	03.2021	[17]
Favipiravir Tablet	HPLC-UV + UV Spektrofotometrik	10– 60 µg/mL	Bulduk, I / Uşak Üniversitesi, Kimya Bölümü/ Türkiye	10.2020	[18]
Favipiravir Molnupiravir	HPLC-UV + UV Spektrofotometrik	6,0–22,0 µg /mL	Sharaf YA vd. / Zagazig Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi / Mısır	04.2022	[19]
İnsan Plazmasında Favipiravir	HPLC-UV+ Spektrofluorimetrik	10-100 µg/mL 20-350 ng/mL	Mikhail, IE vd. / Mansoura Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi / Mısır	06.2021	[20]
İnsan Plazmasında Favipiravir	Spektrofluorimetrik	48-192 ng/mL	Megahed, SM vd. / Tanta Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi /Mısır	03.2021	[21]
İnsan Plazmasında Favipiravir	UPLC-MS/MS	50-10000 ng/mL	Abd allah, FI vd. /Al Azhar Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/ Mısır	09.2022	[22]
İnsan Plazmasında Favipiravir	UPLC-MS/MS	0,25-16,00 µg /mL	Rezk, MR vd. / Cairo Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi /Mısır	07.2021	[23]
İnsan Plazmasında Favipiravir	LC-MS/MS	100,0-20000,0 ng/mL	Morsy, MI vd. / Zi Diligence Kalite Kontrol Servisleri/Mısır	05.2021	[24]

İnsan Plazmasında Favipiravir ve Remdesivir	TLC-Densiyometri	0,08 – 5,00 µg/band	Noureldeen, Deena A. M. vd. / Nanda Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/ Mısır	03.2022	[25]
Favipiravir Molnupiravir Ritonavir	HPTLC	3,75-100,00 µg /mL	Saraya, RE vd. /Port Said Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/Mısır	07.2022	[26]
Favipiravir Tablet ve Serumda	Elektro Kimyasal Sensör	Ulaşılamadı	Dindar, CK vd. / Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/ Türkiye	12.2021	[27]
İnsan Plazmasında Favipiravir	Elektro Kimyasal Sensör	1,0 x 10 ⁻⁸ - 5,5 x 10 ⁻⁵ Molar	Mohammed, MA vd./ İlaç Kontrol ve Araştırması Ulusal Birliği/ Mısır	08.2021	[28]
Favipiravir kan Serumunda	Elektro Kimyasal Sensör	Ulaşılamadı	Galal,A vd./ Cairo Üniversitesi, Kimya Bölümü/ Mısır	11.2021	[29]
Favipiravir İnsan idrarında	Elektrokimyasal Sensör	0,01- 0,10mg/mL 0,1-20,0 mg/mL	Allahverdiyeva, S vd./ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Biyokimya Bölümü/ Türkiye	05.2021	[30]
İnsan İdrar ve Plazmasında Favipiravir	Voltametrik Sensör	0,005 to 0,009 0,009 to 1,950 mu M	Mehmandoust, M vd. / Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi / Türkiye	12.2021	[31]
İnsan Plazmasında Favipiravir	Grafen Kuantum noktası/Hemin Konjuge Sensör	Uygulama Yok	Hazarika, I vd. / Gauhati Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/ Hindistan	12.2021	[32]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Yüksek Lisans tezine ait deneysel çalışmalar İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarı ve Mcg Pharma İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti. Arge Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Spektrofluorimetrik metot için yapılan analizler İstinye Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Çalışma sırasında kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler her iki metot için ayrı ayrı aşağıda verilmiştir.

3.1.1. UV Spektrofotometrik Metot için Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Favipiravir Çalışma standardı ¹

Favipiravir İlaç Etkin Maddesi ²

Favimol 200 mg/tablet Film kaplı Tablet ³

Favipiravir Tablet Plasebosu ⁴

Metanol ⁵

Asetonitril ⁶

Sodyum Hidroksit ⁷

Hidroklorik Asit (%37) ⁸

Hidrojen Peroksit (%3) ⁹

Saf Su ¹⁰

3.1.2. Spektrofluorimetrik Metot için Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Favipiravir Çalışma standardı ¹

Favipiravir İlaç Etkin Maddesi ²

Favimol 200 mg/tablet Film kaplı Tablet ³

Favipiravir Tablet Plasebosu ⁴

Kinin Çalışma Standardı ⁵

0.05 M Sülfirik Asit ⁶

Saf Su ¹⁰

¹ Biophore India Pharmaceuticals Private Limited Company (Telangana, India)

² Biophore India Pharmaceuticals Private Limited Company (Telangana, India)

³ Neutec İlaç San. ve Tic. A.Ş.

⁴ Mcg Pharma İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti

⁵ Sigma

⁶ Sigma

⁷ Fisher Chemical

⁸ VWR Chemicals

⁹ Merck

¹⁰ Elga Purelab Flex-4 water sistemi ile üretilmiştir.

3.2 Çözeltiler

3.1.1 UV Spektrofotometrik Metot için Çözeltiler

Stok Standart Çözeltisi Hazırlığı

“20 mg FAV çalışma standardı” 100 mL “balon jojeye hassas tartılarak aktarılır”. “Üzerine 50 mL saf su” “ilave edilerek karıştırılır ve 10” “dakika ultrasonik banyoda sonike edilir”. Daha sonra saf su ile hacmine tamamlanan çözelti karıştırılır.

Tablet Çözeltisi Hazırlığı

“10 adet tablet havanda toz” “haline getirilir. Ortalama 1 tablete” “eş değer miktarda tablet tozu” “100 mL balon jojeye aktarılır.” “50 mL saf su eklenerek” “karıştırılır ve 10 dakika ultrasonik” “banyoda sonike edilir. Daha sonra” “100 mL hacmine su ile” tamamlanarak karıştırılır. Bu çözeltinin 1 mL’si “100 mL balon jojeye aktarılır.” “Su ile hacmine tamamlandıktan sonra” karıştırılır ve filtrelendir.

3.1.2 Spektrofluorimetik Yöntem için Çözeltiler

Stok Standart Çözeltisi Hazırlığı

“20 mg FAV çalışma standardı” 100 mL “balon jojeye hassas tartılarak aktarılır”. “Üzerine 50 mL saf su” “ilave edilerek karıştırılır ve 10” “dakika ultrasonik banyoda sonike edilir”. Bu çözeltinin 0,5 mL’si 100 mL balon jojeye aktarılır. “Su ile hacmine tamamlandıktan sonra” karıştırılır. Bu çözeltinin 1 mL’si 100 mL balon jojeye aktarılır. “Su ile hacmine tamamlandıktan sonra” karıştırılır.

Tablet Çözeltisi Hazırlığı

“10 adet tablet havanda toz” “haline getirilir. Ortalama 1 tablete” “eş değer miktarda tablet tozu” “100 mL balon jojeye aktarılır.” “50 mL saf su eklenerek” “karıştırılır ve 10 dakika ultrasonik” “banyoda sonike edilir. Daha sonra” “100 mL

hacmine su ile” tamamlanarak karıştırılır. Bu çözeltinin 0,5 mL’si “100 mL balon jøjeye aktarılır.” “Su ile hacmine tamamlandıktan sonra” karıştırılır. Bu çözeltinin 1 mL’si “100 mL balon jøjeye aktarılır.” “Su ile hacmine tamamlandıktan sonra” karıştırılır. Bu çözeltinin 1 mL’si 10 mL balon jøjeye aktarılır. “Su ile hacmine tamamlandıktan sonra” karıştırılır ve filtrelendir.

İç standart (Kinin Çözeltisi) Hazırlığı

1 ng/mL konsantrasyonunda kinin, 0,05 M sülfürik asit çözücü olarak kullanılarak hazırlanır.

3.2 Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler

1. Spektrofotometre (Shimadzu UV-160 A)
2. Spektrofluorimetre (JASCO FP – 8300)
3. Teraziler (Mettler H 20, Mettler Toledo AB-204)
4. Girdap karıştırıcı (Stuart Scientific Autovortex SA6)
5. Santrifüj (Janetzki T5 ve Hettich EBA 8S)
6. Ultrasonik banyo (Ultrasonic LC 30H)
7. 1 cm lik kuvars küvetler (OS 1000) (10x10x45 mm)
8. Ultra saf su cihazı (Younglin Instrument)
9. Örnek süzme filtresi (Anotec, 0,20 µm)
10. Otomatik pipetler (Microlit, 10-100 µL, 100-1000 µL)
11. Reaksiyon tüpleri (Vidalı, kapaklı, 12 mL lik)
12. Dereceli ve transfer pipetler
13. Balonjojeler (5, 10, 25, 50 mL lik)

3.3 Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

FAV’nin metanol, asetonitril ve su gibi çeşitli çözücülerde hazırlanan çözeltileri kullanılarak UV spektrumları alınmış, çözücünün su seçildiği durumlarda istenilen hassasiyetlere ulaşılacağı gözlenmiş ve çevreye dost yeşil bir UV spektrofotometrik analiz gerçekleştirilmiştir. Yöntemin hassasiyetinin daha da artırılarak biyolojik sıvılardaki hassas analizlere de uygulanabilirliğinin gösterilmesi için FAV’nin doğal floresansının ölçümüne dayanan bir spektrofluorimetrik yöntem de geliştirilmiş ve her iki yöntem de tablet analizlerine uygulanmış ve valide edilmiştir.

FAV 20 µg/mL sulu çözeltisinin, UV spektrofotometre ile 190 – 400 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır ve şekil 3-1 ‘deki spektrum elde edilmiştir. 230

nm ve 323 nm’de olmak üzere iki farklı maksimum absorpsiyon gözlenmiş ve linearite çalışmasında her iki dalga boyu da kullanılarak iki farklı aralık belirlenmiştir.

Spektrofluorimetrik metotla yapılan çalışmada, bağıl fluoresans hesaplanması ve tekrarlanabilir sonuçlar alınabilmesi için ölçümler kinin çözeltisine karşı yapılmıştır. Favipiravir sulu çözeltisi ve Kinin Çözeltisi için EX/EM dalgaboyları sırasıyla 370/452 nm ve 249/457 nm olarak belirlenmiştir.

3.4 Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Metot geliştirilmesi tamamlandıktan sonra “metodun validasyonu ICH Kılavuzu Q2 (R1)’ye göre yapılmıştır” [33].

3.4.1 Seçicilik

Spesifiklik, analiz edilecek maddenin matris etkisi ve katkı maddelerinin varlığında, ürün içinde tartışmaya yer vermeksizin kesin olarak tayin edilebilirliğidir. Seçicilik testi için Blank çözeltisi olarak saf su, tablet için plasebo çözeltisi, standart çözeltisi ve test çözeltisi spektrum taraması gerçekleştirildi.

3.4.1.1. UV Spektrofotometrik için Çözelti Hazırlığı

Blank Çözeltisi Hazırlığı

Saf su blank olarak okutulur.

Standart Çözeltisi Hazırlığı

Stok standart çözeltisinin 1 mL’si 10 mL balon jöjeye aktarılır. Hacmine saf su ile tamamlanarak karıştırılır ve filtrelendir.

Çalışma sonunda elde edilen spektrumlar bölüm 4.2’de verilmiştir.

3.4.1.2. Spektrofluorimetrik için Çözelti Hazırlığı

Blank Çözeltisi Hazırlığı

Saf su blank olarak okutulur.

Standart Çözeltisi Hazırlığı

Stok standart çözeltisinin 1 mL’si 10 mL balon jöjeye aktarılır. Hacmine saf su ile tamamlanarak karıştırılır ve filtrelendir.

Çalışma sonunda elde edilen spektrumlar bölüm 4.2’de verilmiştir.

3.4.2 Doğrusallık

Analitik metodun doğrusallığı, numunedeki etken maddenin belirlenen konsantrasyon aralığında, çıkan sonuçların doğrusal olması anlamına gelmektedir. Doğrusallık çalışması belirlenen konsantrasyonlarda minimum 5 farklı konsantrasyonu içermelidir.

3.4.2.1. UV Spektrofotometrik Doğrusallık Çalışması

FAV doğrusal cevap ilişkisini kanıtlamak için 323 ve 230 nm için sırasıyla 5,0-30,0 and 5,0-20,0 µg/mL konsantrasyon aralıklarında, 6 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin absorbansları ölçülmüştür.

Bölüm 3.4.1.1’de hazırlanışı anlatılan Stok standart çözeltileri Tablo 3-1’de belirtilen oranlarda seyreltme yapılarak FAV doğrusallık çözeltileri hazırlanmıştır.

Tablo 3-1. UV Spektrofotometrik Metot ile Doğrusallık Çalışması Hazırlığı

Çözelti Adı	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg/mL)
Linearite-1	0,250/10	5,0
Linearite-2	0,375/10	7,5
Linearite-3	0,500/10	10,0
Linearite-4	0,750/10	15,0
Linearite-5	1,000/10	20,0
Linearite-6	1,500/10	30,0

Her bir standart çözeltinin derişiminden ardışık 1’er spektrum alınmış ve elde edilen absorbanslar ile en küçük kareler yöntemine göre doğrusallık denklemleri hesaplanmıştır.

Sonuçlar ve doğrusallık grafikleri bölüm 4.2.2.1’de verilmiştir.

3.4.2.2. Spektrofluorimetrik Doğrusallık Çalışması

FAV doğrusal cevap ilişkisini kanıtlamak için 370/452 nm eksitasyon (EX)/Emisyon (EM) dalga boylarında 0,5-9,0 ng/mL konsantrasyon aralıklarında, 6 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin absorbansları ölçülmüştür.

Bölüm 3.4.1.2’de hazırlanışı anlatılan Stok standart çözeltileri Tablo 3-2’de belirtilen oranlarda seyreltme yapılarak FAV doğrusallık çözeltileri hazırlanmıştır.

Tablo 3-2. Spektrofluorimetrik Yöntem ile Doğrusallık Çalışması Hazırlığı

Çözelti Adı	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (ng/mL)
Linearite-1	0,5/10	0,5
Linearite-2	1,0/10	1,0
Linearite-3	2,5/10	2,5
Linearite-4	5,0/10	5,0
Linearite-5	7,5/10	7,5
Linearite-6	9,0/10	9,0

Her bir standart çözeltinin derişiminden ardışık 1’er spektrum alındı ve elde edilen intansiteler ile en küçük kareler yöntemine göre doğrusallık denklemleri hesaplandı. Sonuçlar ve doğrusallık grafikleri bölüm 4.2.2.2’de verilmiştir.

3.4.3 Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten yapılan ardışık örneklemelemlerden elde edilen ölçüm serileri arasındaki saçınımın derecesi olarak tarif edilir.

3.4.3.1 UV Spektrofotometrik Kesinlik Çalışması

Kesinlik çalışması aynı gün ve farklı günler olmak üzere, 3 farklı konsantrasyon (5,0 µg/mL , 10,0 µg/mL , 15,0 µg/mL) FAV ile gerçekleştirilmiştir. Her konsantrasyon için 3’er kere spektrum alındı. Çözelti hazırlanışları bölüm 3.4.2.1’deki doğrusallık çözeltilerindeki şekildedir.

Sonuçlar bölüm 4.2.3.1’de verilmiştir.

3.4.3.2 Spektrofluorimetrik Kesinlik Çalışması

Kesinlik çalışması aynı gün ve farklı günler olmak üzere, 3 farklı konsantrasyon (0,5 ng/mL , 1,0 ng/mL , 9,0 ng/mL) FAV’nin ile gerçekleştirilmiştir. Her

konsantrasyon için 6'şar kere spektrum alınmıştır. Çözelti hazırlanışları bölüm 3.4.2.2'deki doğrusallık çözeltilerindeki şekildedir.

Sonuçlar bölüm 4.2.3.2'de verilmiştir.

3.4.4 Doğruluk ve Geri Kazanım

Bir analitik metodun doğruluğu, belirlenen bir konsantrasyona göre, numune çözeltisindeki analiz edilen maddenin alt ve üst konsantrasyonlarında geri kazanımlarının belli bir aralıkta olmasıdır [33].

3.4.4.1 UV Spektrofotometrik Geri Kazanım

Yeni elde edilen yöntemin doğruluğu, standart ekleme ile çalışıldı. Bu yöntemde aktif farmasötik bileşen, 5,0 µg/mL baz konsantrasyonuna, üç ayrı konsantrasyonda (5,0µg/mL , 10,0 µg/mL , 15,0 µg/mL) daha eklenme yapılarak çalışılmıştır. Sonuç olarak 10,0 µg/mL , 15,0 µg/mL ve 20,0 µg/mL konsantrasyonlarındaki çözeltilerin 3'er defa spektrumu alınmıştır.

Sonuçlar bölüm 4.2.4.1'de verilmiştir.

3.4.4.2 Spektrofluorimetrik Geri Kazanım

Yeni elde edilen yöntemin doğruluğu, standart ekleme ile çalışılmıştır. Bu yöntemde aktif farmasötik bileşen, 1,0 ng/mL baz konsantrasyonuna, üç ayrı konsantrasyonda (0,5 ng/mL , 1,0 ng/mL , 9,0 ng/mL) daha eklenme yapılarak çalışılmıştır. Sonuç olarak 1,5 ng/mL , 2,0 ng/mL ve 10,0 ng/mL konsantrasyonlarındaki çözeltilerin 3'er defa spektrumu alınmıştır.

Sonuçlar bölüm 4.2.4.2'de verilmiştir.

3.4.5 Çözelti Stabilitesi

Numune ve standart çözeltilerinin belirlenen koşullarda ne kadar süre ile stabil kaldığının ve ne kadar süre kullanılabilir olduğunun ölçüldüğü çalışmalardır.

Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı şekilde standart ve test çözeltisi hazırlanmıştır. 1 hafta boyunca belirli zaman aralıklarında saklama şartları sabit tutularak spektrum alınmıştır. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.2.5'te verilmiştir.

3.4.6 Metot Karşılaştırma

UV Spektrofotometrik metot ile karşılaştırma çalışmasında, tez çalışmasında kullanılan FAV etkin maddesi üreticisi Biophore India Pharmaceuticals şirketi tarafından daha önce geliştirilen HPLC-UV metodu kullanılmıştır.

20 µg/mL FAV tablet test çözeltisi Bölüm 3.1.1’de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Kolon olarak Poroshell 120 EC-C18 (150 × 4.6mm, 4.0µm) kullanılmıştır. Trifloroasetik asit/Su (A) ve asetonitril (B) gradient programda mobil faz olarak kullanılmıştır. Gradient program tablo 3-3’te görüldüğü gibi 31 dakikadır. 1 mL/dakika akış ile 230 nm dalga boyunda çalışılmıştır.

Tablo 3-3. HPLC Metot için Gradient Programı

Zaman (dakika)	Mobil Faz A %	Mobil Faz B %
0.0	95	5
8.0	80	20
13.0	50	50
23.0	5	95
26.0	5	95
26.1	95	5
31.0	95	5

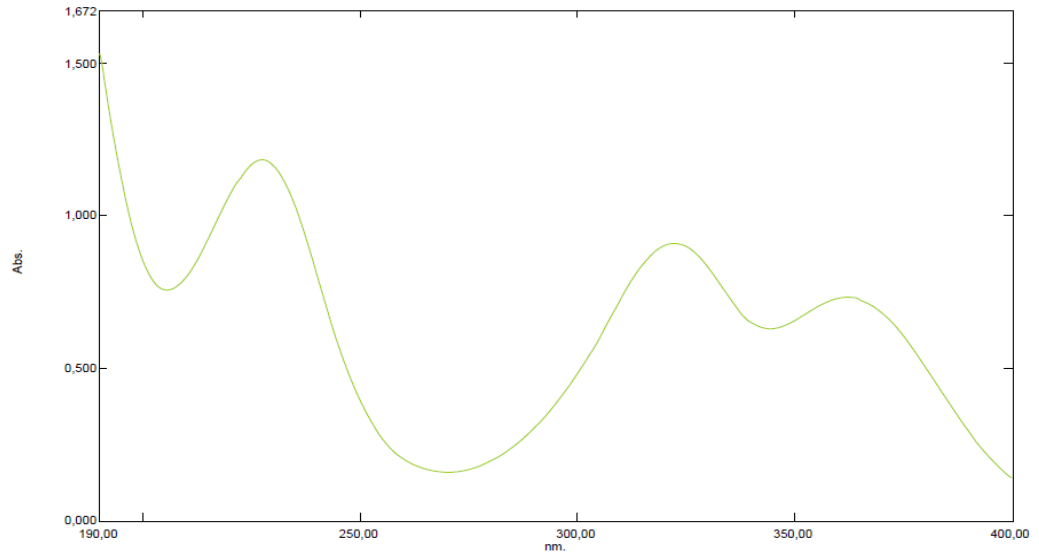
Spektrofluometrik metot ile karşılaştırma metodu olarak, bu tez çalışmamızda geliştirme ve validasyon parametrelerini sunduğumuz UV spektrofotometrik metot ile gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar bölüm 4.2.6’da verilmiştir.

4. BULGULAR

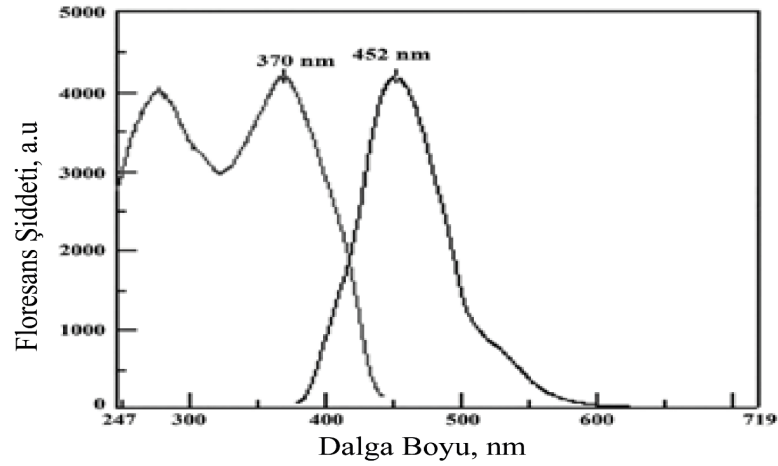
4.1 Analiz yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Bulgular

UV Spektrofotometrik ile geliştirilen yöntemin dalga boyu seçimi olarak Favipiravir'in maksimum absorbans verdiği 230 nm ve 323 nm olarak iki dalga boyu seçilmiştir. 20 µg/mL konsantrasyonunda FAV'nin sulu çözeltisinin spektrumu Şekil 4-1 'de verilmiştir.



Şekil 4-1. 20 µg/mL Favipiravir Sulu Çözeltisine Ait UV Spektrumu

Spektrofluorimetrik ile geliştirilen yöntemin dalga boyu seçimi olarak Favipiravir'in maksimum floresans şiddeti verdiği 370/452 nm EX/ EM dalga boyları olarak gerçekleştirilmiştir. 2,5 ng/mL konsantrasyonunda FAV'nin sulu çözeltisinin spektrumu Şekil 4-2 'de verilmiştir.

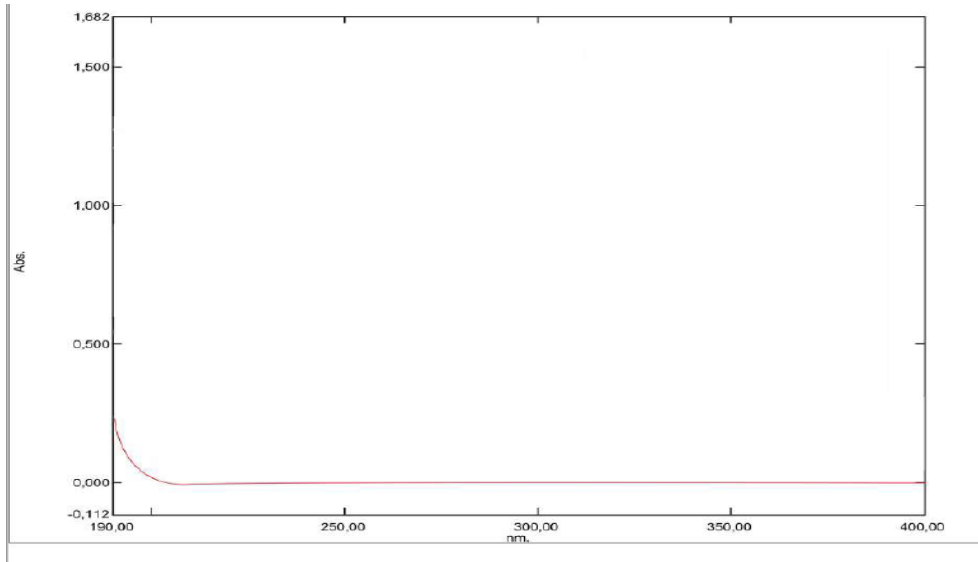


Şekil 4-2. 2,5 ng/mL Favipiravir'in sulu çözeltisinin Floresans Spektrumu

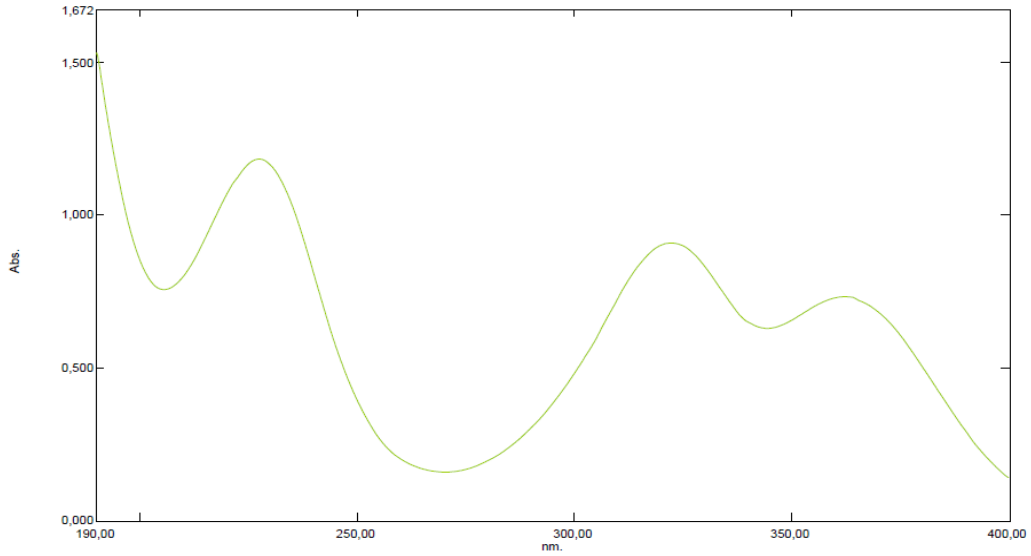
4.2 Geliştirilen Yöntemin Validasyonu İle İlgili Bulgular

4.2.1 Seçicilik

UV Spektrofotometrik analiz için seçicilik okumalarından elde edilen spektrumlarda, plasebo çözeltisinden 230 nm ya da 323 nm'de herhangi bir absorbans elde edilmemiştir. Çözeltilere ait spektrumlar Şekil 4-3 ile Şekil 4-4 arasında yer almaktadır.

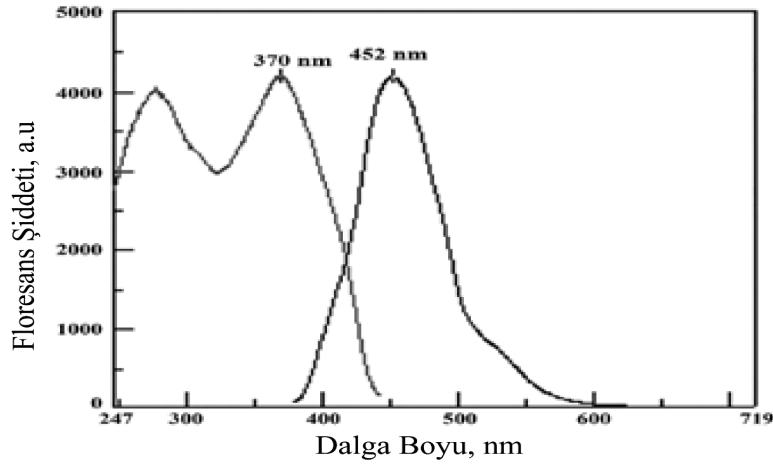


Şekil 4-3. Plasebo Çözeltisine Ait UV Spektrumu



Şekil 4-4. Standart Çözeltisine Ait UV Spektrumu

Spektrofluorimetrik analiz için seçicilik okumalarından elde edilen spektrumlarda, plasebo çözeltisinden 370/452 nm EX/ EM dalga boylarında herhangi bir intensite elde edilmemiştir. Çözeltilere ait spektrumlar Şekil 4-5 ile Şekil 4-6 arasında yer almaktadır.



Şekil 4-5. Standart Çözeltisine Ait Floresans Şiddeti Spektrumu

4.2.2 Doğrusallık

4.2.2.1 UV Spektrofotometrik Metot ile Doğrusallık

FAV tayini yönteminde lineer cevap ilişkisini kanıtlamak için Bölüm 3.5.2' de “belirtilen çözeltiler hazırlanmış her bir” konsantrasyondan 1'er okuma yapıp,

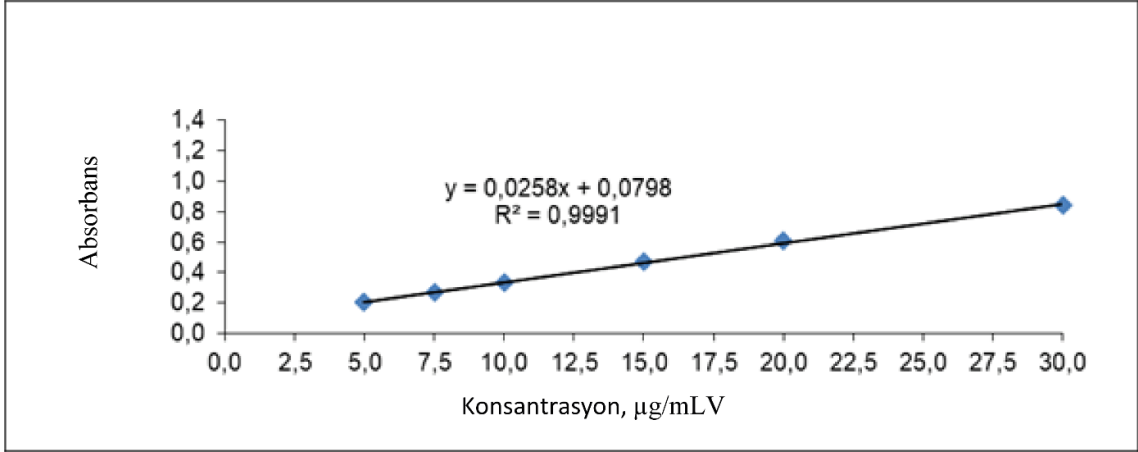
absorbanslar 230 nm ve 323 nm’de “belirlenerek en küçük kareler yöntemine” “göre doğrusallık denklemleri elde edilmiştir.” Elde edilen doğrusallık grafikleri Şekil 4-6 ile 4-7 arasında, sonuçlar Tablo 4-1 ve Tablo 4-2’de verilmiştir.

Tablo 4-1. UV Spektrofotometrik Yöntem Doğrusallık Çalışması Verileri

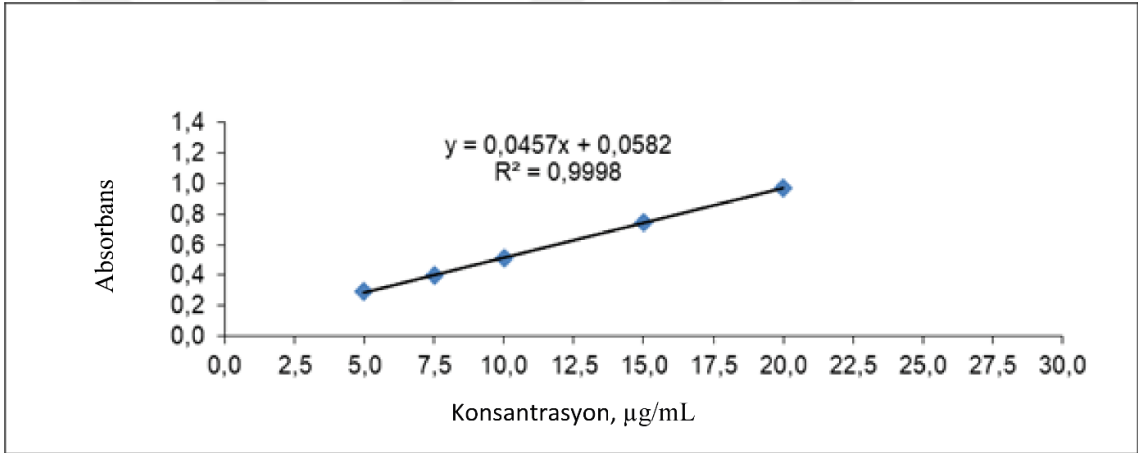
Konsantrasyon (µg/mL)	Absorbans (323 nm)	Absorbans (230 nm)
5	0,20700	0,29100
7,5	0,27000	0,39920
10	0,33400	0,51000
15	0,47000	0,74500
20	0,60800	0,97300
30	0,84500	-

Tablo 4-2. UV Spektrofotometrik Yöntem Doğrusallık Çalışması Sonuçları

Dalga Boyu	323 nm	230 nm
Eğim	0,0258	0,0457
Kesim	0,0798	0,0582
Korelasyon Katsayısı	0,9991	0,9998
Beers Yasası Gereği Aralık	5,0-30,0 µg/mL	5,0-20,0 µg/mL
Regresyon Eşitliği	$y = 0,0258x + 0,0798$	$y = 0,0457x + 0,0582$
LOD	1,20 µg/mL	0,27 µg/mL
LOQ	3,70 µg/mL	0,80 µg/mL



Şekil 4-6. UV Spektrofotometrik Yöntem ile Favipiravir 323 nm’de Doğrusallık Grafiği



Şekil 4-7. UV Spektrofotometrik Yöntem ile Favipiravir 230 nm’de Doğrusallık Grafiği

Doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen verilerden ve gerçekleştirilen regresyon analizinden doğrusallık denklemi eğimi, y-kesim noktası, korelasyon katsayısı (R), korelasyon katsayısının karesi (R^2) hesaplatılmıştır. Konsantrasyon ve alanlar arasındaki korelasyon katsayısı 0,99’den büyüktür. Favipiravir için 323 nm’de 5,0-30,0 µg/mL, 230 nm’de 5,0-20,0 µg/mL konsantrasyonları aralığında dedektör yanıtı ile konsantrasyonlar arasında doğrusal bir ilişki olduğu kanıtlanmıştır.

y : Alan

a : eğim

b : kesme noktası

x : Konsantrasyon, mg/mL

Doğrusallık çalışmasında 323 nm’de daha geniş bir konsantrasyon aralığında (5,0-30,0 µg/mL) doğrusal olduğu ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, bu aşamadan sonra çalışmamızda kalan validasyon parametreleri için, yalnızca 323 nm dalga boyundaki sonuçlar tartışılmıştır.

4.2.2.2 Spektrofluorimetrik Metot ile Doğrusallık

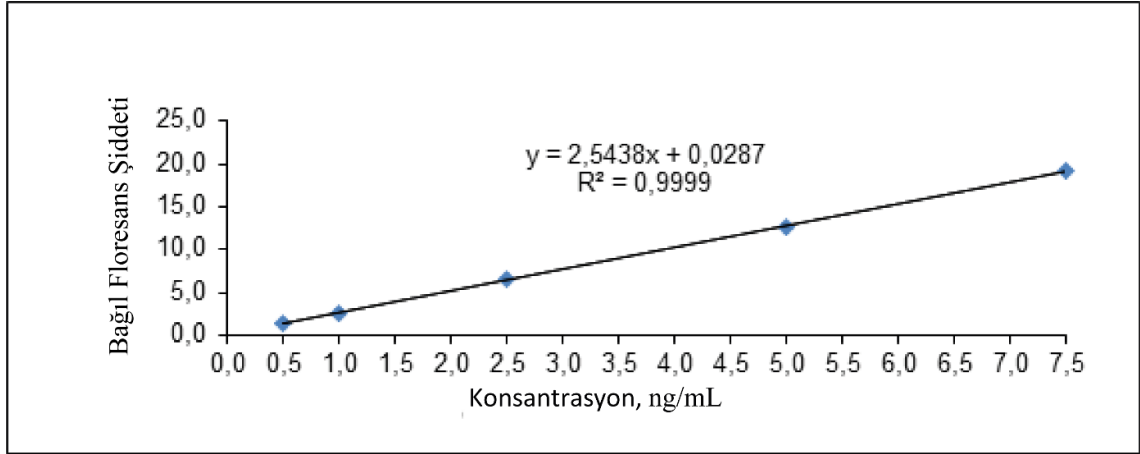
FAV tayini yönteminde lineer cevap ilişkisini kanıtlamak için Bölüm 3.4.2.2’ de “belirtilen çözeltiler hazırlanmış her bir” konsantrasyondan 1’er okuma yapıp, intensiteler 370/452 nm eksitasyon (EX)/Emisyon (EM) dalga boylarında “belirlenerek en küçük kareler yöntemine” “göre doğrusallık denklemleri elde edilmiştir.” Elde edilen doğrusallık grafiği , sonuçlar Tablo 4-3 ve Tablo 4-4’de verilmiştir.

Tablo 4-3. Spektrofluorimetrik Yöntem Doğrusallık Çalışması Verileri

Çözelti Adı	Konsantrasyon (ng/mL)	Bağlı Floresans Şiddeti
Linearite-1	0,5	1,370
Linearite-2	1,0	2,551
Linearite-3	2,5	6,436
Linearite-4	5,0	12,550
Linearite-5	7,5	19,153
Linearite-6	9,0	22,980

Tablo 4-4. Spektrofluorimetrik Yöntem Doğrusallık Çalışması Sonuçları

Dalga Boyu	370 nm (EX)/452 nm (EM)
Eğim	2,5438
Kesim	0,0287
Korelasyon Katsayısı	0,99987
Doğrusallık Aralığı	0,5-9,0 ng/mL
Regresyon Eşitliği	$y = 2,5438x + 0,0287$
LOD	0,101ng/mL
LOQ	0,304 ng/mL



Şekil 4-8. Spektrofluorimetrik Yöntem ile Doğrusallık Grafiği

4.2.3 Kesinlik

4.2.3.1 UV Spektrofotometrik Kesinlik

“Farklı konsantrasyon seviyelerinde farklı günlerde” “gerçekleştirilen kesinlik çalışmalarımıza ait sonuçlar” Tablo 4-5 ve 4-6’da verilmiştir. RSD değerlerinin en fazla % 0.9 ve %0.8 olması numunelerimizin saçınım derecesinin oldukça yakın olduğunun da göstergesidir. “Aynı gün ya da farklı” “günlerde elde edilen sonuçlar arasında” “kayda değer bir farklılık gözlemlenmemiştir.”

Tablo 4-5. UV Spektrofotometrik “Yöntem Aynı/Farklı Gün Kesinlik Sonuçları”

Okuma Sayısı	Aynı Gün Sonuçları (µg/mL)			Farklı Gün Sonuçları (µg/mL)		
	5,0 µg/mL	10,0 µg/mL	15,0 µg/mL	5,0 µg/mL	10,0 µg/mL	15,0 µg/mL
1	5,05	10,01	15,11	4,98	9,93	15,00
2	5,03	9,97	15,13	4,95	10,05	14,99
3	4,95	10,03	14,99	5,00	9,97	15,09
4	4,97	9,98	15,15	5,03	9,98	15,04
5	5,04	10,03	15,04	4,93	10,04	15,03
Ortalama	5,01	10,00	15,08	4,98	9,99	15,03
SD	0,04	0,03	0,07	0,04	0,05	0,04
% RSD	0,90	0,28	0,44	0,80	0,50	0,26

Tablo 4-6. UV Spektrofotometrik “Yöntem Aynı/Farklı Gün Kesinlik Sonuçları Özet”

Gerçek Konsantrasyon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aynı Gün		Farklı Gün	
	Bulunan Konsantrasyon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD (%)	Bulunan Konsantrasyon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD (%)
5,0	5,01	0,90	4,98	0,80
10,0	10,02	0,28	9,99	0,50
15,0	15,08	0,44	15,03	0,26

(n=5)

4.2.3.2 Spektrofluorimetrik Yöntem Kesinlik

“Farklı konsantrasyon seviyelerinde farklı günlerde” “gerçekleştirilen kesinlik çalışmamıza ait sonuçlar” Tablo 4-7 ve Tablo 4-8’de verilmiştir. RSD değerleri % 1,9 ve %1,8 ‘dir. % 2,0 ‘dan “küçük kalarak kabul kriterlerine uygundur.” “Aynı gün ya da farklı” “günlerde elde edilen sonuçlar arasında” “kayda değer bir farklılık gözlemlenmemiştir.”

Tablo 4-7. Spektrofluorimetrik “Yöntem ile Aynı/Farklı Gün Kesinlik” Sonuçları

Okuma Sayısı	Aynı Gün Sonuçları (ng/mL)			Farklı Gün Sonuçları (ng/mL)		
	0,5 ng/mL	1,0 ng/mL	9,0 ng/mL	0,5 ng/mL	1,0 ng/mL	9,0 ng/mL
1	0,502	1,02	8,90	0,504	1,03	8,97
2	0,512	1,00	8,74	0,507	0,98	9,12
3	0,498	0,99	8,99	0,490	1,01	9,05
4	0,495	0,98	9,00	0,499	0,99	9,10
5	0,500	1,02	9,05	0,500	1,02	9,05
Ortalama	0,494	1,02	9,03	0,503	1	9,08
SD	0,500	1,005	8,952	0,501	1,005	9,062
% RSD	0,007	0,02	0,12	0,006	0,02	0,05

Tablo 4-8. Spektrofluorimetrik “Yöntem ile Aynı/Farklı Gün Kesinlik” Sonuçları Özet

Gerçek Konsantrasyon (ng mL ⁻¹)	Aynı Gün		Farklı Gün	
	Bulunan Konsantrasyon (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	Bulunan Konsantrasyon (ng mL ⁻¹)	RSD (%)
0,5	0,500	1,3	0,501	1,2
1,0	1,005	1,8	1,005	1,9
9,0	8,952	1,3	9,052	0,6

4.2.4 Doğruluk ve Geri Kazanım

4.2.4.1 UV Spektrofotometrik Yöntem ile Geri Kazanım

Bölüm 3.4.4.1’de “anlatıldığı gibi çalışılan geri kazanım” parametresine ait sonuçlar Tablo 4-9 ve Tablo 4-10 ’da verilmiştir. Geri kazanım % 100,18 -%100,47 aralığında oldukça verimli bulunmuştur.

Table 4-9. UV Spektrofotometrik Yöntem Geri Kazanım Sonuçları (323 nm)

Alınan Miktar (µg/ml)	Eklene n Miktar (µg/ml)	Bulunan Miktar (µg/ml)	Gerçek Miktar (µg/ml)	% Geri Kazanım	Ortalama (µg/ml)	SD
5,0	5,0	10,02	5,02	100,40		
5,0	5,0	10,09	5,09	101,80	5,02	0,07
5,0	5,0	9,96	4,96	99,20		
5,0	10,0	15,04	10,04	100,40		
5,0	10,0	15,15	10,15	101,50	10,04	0,11
5,0	10,0	14,93	9,93	99,30		
5,0	15,0	20,11	15,11	100,73		
5,0	15,0	19,96	14,96	99,73	15,03	0,08
5,0	15,0	20,01	15,01	100,07		

Table 4-10. UV Spektrofotometrik “Yöntem Geri Kazanım Sonuçları Özet”

Başlangıç Miktarı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Eklene Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Toplam Bulunan Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Gerçek Bulunan Miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (Mean \pm SD)*	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
5	5	10,06	5,02 \pm 0,07	100,47	1,30
	10	15,04	10,04 \pm 0,11	100,40	1,10
	15	20,03	20,03 \pm 0,08	100,18	0,51

4.2.4.2 Spektrofluorimetrik Yöntem ile Geri Kazanım

Bölüm 3.4.4.1’de “anlatıldığı gibi çalışılan geri kazanım” parametresine ait sonuçlar Tablo 4-11 ve Tablo 4-12’de verilmiştir. Geri kazanım % 100,00 -%99,67 aralığında oldukça verimli bulunmuştur.

Tablo 4-11. Spektrofluorimetrik Yöntem Geri Kazanım Sonuçları

Alınan Miktar (ng/mL)	Eklene Miktar (ng/mL)	Bulunan Miktar (ng/mL)	Gerçek Miktar (ng/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama (ng/ml)	SD
1,00	0,50	1,504	0,50	100,80	0,50	0,01
1,00	0,50	1,505	0,51	101,00		
1,00	0,50	1,491	0,49	98,20		
1,00	1,00	2,010	1,01	101,00	1,00	0,02
1,00	1,00	2,000	1,00	100,00		
1,00	1,00	1,980	0,98	98,00		
1,00	9,00	10,030	9,03	100,33	8,98	0,04
1,00	9,00	9,960	8,96	99,56		
1,00	9,00	9,950	8,95	99,44		

Table 4-12. Spektrofluorimetrik “Yöntem Geri Kazanım Özet Sonuçlar”

Başlangıç Miktarı (ng mL ⁻¹)	Eklenen Miktar (ng mL ⁻¹)	Toplam Bulunan Miktar (ng mL ⁻¹)	Gerçek Bulunan Miktar (ng mL ⁻¹) (Mean± SD)*	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
	0,5	1,500	0,500±0,01	100,00	1,56
1	1,0	1,997	0,997±0,02	99,67	1,53
	9,0	9,980	8,980±0,04	99,78	0,49

4.2.5 Çözelti Stabilitesi

Belirli zaman aralıklarında saklama şartları (25 °C) sabit tutularak standart ve numune çözeltileri okumalarında elde edilen sonuçlar Tablo 4-13 ve Tablo 4-16 arasında verilmiştir.

Tablo 4-13. Favipiravir Standart “Çözeltisi İçin Çözelti Stabilitesi (UV-323 nm)”

Gün	Abs.	% Değişim
Başlangıç	0,608	-
1.Gün	0,608	0
3. Gün	0,605	0,5
5. Gün	0,600	1,3
7. Gün	0,610	0,3

Tablo 4-14. Favipiravir Test “Çözeltisi İçin Çözelti Stabilitesi (UV-323 nm)”

Gün	Abs.	% Değişim
Başlangıç	0,600	-
1.Gün	0,601	0,2
3. Gün	0,615	1,8
5. Gün	0,612	1,5
7. Gün	0,555	0,8

Tablo 4-15. Spektrofluorimetrik Yöntem Favipiravir Standart Çözelti Stabilitesi

Gün	Floresans Şiddeti	% Değişim
Başlangıç	3976	-
1.Gün	3999	0,6
3. Gün	4012	0,9
5. Gün	3956	0,5
7. Gün	3967	0,2

Tablo 4-16: Spektrofluorimetrik Yöntem Favipiravir Test Çözelti Stabilitesi

Gün	Floresans Şiddeti	% Değişim
Başlangıç	4067	
1.Gün	4123	1,4
3. Gün	4095	0,7
5. Gün	4012	1,4
7. Gün	3989	1,9

Standart çözeltileri ve numune çözeltileri bir hafta boyunca stabil olduğu belirlenmiştir.

4.2.6 Metot Karşılaştırma

4.2.6.1 UV Spektrofotometrik Metot ile HPLC-UV Metot Karşılaştırması

Her bir metot için 5'er numune üzerinden elde edilen sonuçlarla "ortalama sonuç, SD, RSD değerleri" hesaplanmıştır. Elde edilen SD ve ortalama değerler üzerinden T-test ve F-test uygulanmıştır. Sonuçlar tablo 4-17'de bulabilirsiniz.

Tablo 4-17'deki "sonuçlar incelendiğinde, F ve t" "değerlerinin % 95 güven aralığında tablodaki" değerlerden düşük olması, HPLC metodu ile geliştirilen UV spektrofotometrik "metot arasında anlamlı bir fark" olmadığını göstermiştir.

Tablo 4-17. UV Spektrofotometrik ile HPLC Metodun Karşılaştırmalı İstatiksel Değerlendirmesi

Numune	UV Spektrofotometrik (%)	HPLC (%)
1	100,10	99,93
2	99,70	99,88
3	100,30	99,72
4	99,80	99,97
5	100,30	99,66
Mean	100,04	99,832
SD	0,28	0,14
RSD	0,28	0,13
t: 1,499	n ₁ =n ₂ =5	t _{tablo} :2,306
F: 4,269	P:0,05	F _{tablo} :6,388

4.2.6.2 Spektrofluorimetrik Metot ile UV Spektrofotometrik Metot Karşılaştırması

Her bir metot için beşer numune ile elde edilen sonuçlar ile SD, RSD ortalama sonuç, , değerleri” hesaplandı. Elde edilen ortalama değerler ve SD üzerinden F-test ve T-test uygulandı, Sonuçlar tablo 4-18’de bulabilirsiniz.

Tablo 4-18’deki “sonuçlar incelendiğinde, F ve t” “değerlerinin % 95 güven aralığında tablodaki” değerlerden düşük olması, UV spektrofotometrik metodu ile geliştirilen spektrofluorimetrik “metot arasında anlamlı bir fark” olmadığını göstermiştir.

Tablo 4-18. Spektrofluorimetrik ile UV Spektrofotometrik Metotların Karşılaştırmalı İstatiksel Değerlendirmesi

Numune	Spektrofluorimetrik (%)	UV Spektrofotometrik (%)	
1	99,9	100,10	
2	99,5	99,70	
3	100,1	100,30	
4	100,3	99,80	
5	100,5	100,30	
Mean	100,06	100,04	
SD	0,38	0,28	
RSD	0,38	0,28	
	t: 0,28	n ₁ =n ₂ =5	t _{tablo} :2,45
	F: 1,82	P:0,05	F _{tablo} :9,27

5. TARTIŞMA

FAV influenza tedavisinde kullanılan, RNA polimeraz inhibitörü bir antiviral ilaçtır. Bir RNA virüsü olan SARS-CoV2 virüsü ile başlayan COVID-19 pandemisi süresince de, hafif ve orta şiddetli koronavirüs tedavisinde etkili olduğu görülmüştür.

Literatürde FAV tablet tayini için genel bilgiler kısmında detayları verilen kromatografik, elektrokimyasal ve spektrofotometrik metotlar bulunmaktadır. Bu metotlar arasında özellikle kromatografik ve elektrokimyasal analizler zaman alıcı metot geliştirme aşamalarına ve nispeten komplike cihazlara gereksinim duymaktadır. Tez kapsamında geliştirilen analitik metotlarda en temel ölçüm tekniklerinden olan UV-spektrometri ve seçiciliği ve hassasiyeti dolayısıyla kütle spektrofotometrik detektörlerle zaman zaman yarışan spektrofluorimetri kullanılmıştır. Geliştirilen metotlara ait sonuçlar kıyas metotları ile karşılaştırılmış ve metotlar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

FAV, yapısında bir benzen halkası ve flüorür grubu içeren, 157 g/mol gibi oldukça düşük molekül ağırlığına sahip küçük bir moleküldür. Doğal flüoresansa ve UV absorpsiyonuna sahip olması, maddenin tabletlerden analizleri için ilk başvuru yöntemlerin spektrofotometrik yöntemler olmasına neden olmuştur. Her iki metotta da çözücü olarak suyun kullanılması ile çevre dostu bir analiz gerçekleştirilmiştir.

Literatürde FAV tabletlerde UV-spektrofotometrik metot ile geliştirilmiş olan iki metottan biri olan en hassas metot 6-22 µg/mL konsantrasyon aralığında olup, LOD ve LOQ parametreleri incelenmemiştir. Tez çalışması kapsamında geliştirilen UV-spektrofotometrik metot, 0,9991 korelasyon katsayısına sahip, 5-30 µg/mL konsantrasyon aralığında 1,2 µg/mL LOD ve 3,7 µg/mL LOQ konsantrasyonlarına sahiptir. Geliştirilen UV spektrofotometrik yöntem seçicilik, kesinlik, çözelti stabilitesi, doğrusallık ve doğruluk parametreleri açısından valide edilmiştir. Üç ayrı konsantrasyon (5, 10, 15 µg/mL) için gün içi ve günler-arası analizlerin standart sapmaları sırasıyla 0,04/0,04, 0,03/0,05 ve 0,07/0,04; RSD değerleri ise %0,9/0,8, %0,3/%0,5 ve %0,4-0,3 olarak bulunmuştur. 3 farklı konsantrasyon için elde edilen geri kazanım değerleri % 100,18-%100,47 arasında bulunmuştur. Tabletler ayrıca etken madde üreticisi firma tarafından geliştirilen HPLC-UV metodu ile de analiz edilmiş, her iki yöntemle bulunan sonuçlar t ve F testleri uygulanarak istatistiksel olarak kıyaslandığında aralarında

ortalamalar ve standart sapmalar açısından % 95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Literatürde FAV tabletlerde spektrofotometrik metot ile geliştirilmiş olan en hassas metot 20-350 ng/mL konsantrasyon aralığında olup, bu tez çalışmasında 0,5-9 ng/mL konsantrasyon aralığında bir metot geliştirilmiş, LOD seviyesi 0,1 ng/mL ve LOQ seviyesi 0,3 ng/mL konsantrasyonlarında bulunmuştur. Yöntemin 0,5-9 ng/mL konsantrasyon aralığındaki doğrusallık çalışmasında korelasyon katsayısı 0,99987 dir. Geliştirilen spektrofotometrik yöntem seçicilik, kesinlik, çözelti stabilitesi, doğrusallık ve doğruluk yönünden valide edilmiştir. Üç ayrı konsantrasyon (0,5, 1,0, 9,0 ng/mL) için gün içi ve günler-arası analizlerin standart sapmaları sırasıyla 0,50/0,50, 1,00/1,00 ve 8,95/9,06 ve RSD değerleri sırasıyla %1,3/1,2 %1,8/%1,9 ve %1,3-0,6 olarak bulunmuştur. 3 farklı konsantrasyon için geri kazanım değerleri ise % 100,00 -%99,67 arasında elde edilmiştir. Her iki yöntemin de çözelti stabilitesi 7 gün boyunca ölçülmüş ve elde edilen sonuçlara göre çözeltilerin bir hafta dayanıklı olduğu görülmüştür. Kıyas metodu olarak tabletler tez kapsamında geliştirilen UV-spektrofotometrik yöntem ile de analiz edilmiştir. Her iki yöntemle bulunan sonuçlar t ve F testleri uygulanarak istatistiksel olarak kıyaslandığında aralarında % 95 olasılık düzeyinde ortalama ve standart sapmalar açısından anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Bu tez çalışmasında, toplam 58 klinik çalışması olan ve birçoğu güncel olarak devam eden, literatürde mevcut favipiravir tablet tayinine ait UV spektrofotometrik ve spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiş, sonuçlar kıyas metotları ile karşılaştırılmış ve ICH kılavuzuna göre valide edilmiştir. Tez kapsamında geliştirilen, Favipiravirin tabletlerde rutin analizlerinde kullanılabilecek ve biyolojik sıvı analizlerinde de uygulanabilirliği olabilecek metotlarla elde edilen sonuçlar iki farklı uluslararası kongrede sözlü olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Centers for Disease Control and Prevention. (2022, August 16). *CDC Museum Covid-19 Timeline*. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved November 30, 2022, from <https://www.cdc.gov/museum/timeline/covid19.html>
2. Al-Ardhi, F. M., Novotny, L., Alhunayan, A., & Al-Tannak, N. F. (2022). Comparison of remdesivir and favipiravir - the anti-covid-19 agents mimicking purine RNA constituents. *Biomedical Papers*, 166(1), 12–20. <https://doi.org/10.5507/bp.2021.063>
3. Agrawal, U., Raju, R., & Udwadia, Z. F. (2020). Favipiravir: A new and emerging antiviral option in COVID-19. *Medical Journal Armed Forces India*, 76(4), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2020.08.004>
4. *Search of: Favipiravir - list results*. Home - ClinicalTrials.gov. (n.d.). Retrieved November 30, 2022, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=favipiravir&term=&cntry=&state=&city=&dist=>
5. FURUTA, Y., KOMENO, T., & NAKAMURA, T. (2017). Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 93(7), 449–463. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.027>
6. Pharmaceutical and Food Safety Bureau Ministry of Health, Labour and Welfare, E. and L. D. (2014, March 4). Review of *Report on the Deliberation Results*. 1–172.
7. Jeong, H. J., Min, S., Chae, H., Kim, S., Lee, G., Namgoong, S. K., & Jeong, K. (2020). Signal amplification by reversible exchange for COVID-19 antiviral drug candidates. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71282-6>
8. Abdallah, I. A., Hammad, S. F., Bedair, A., Elshafeey, A. H., & Mansour, F. R. (2022). Determination of favipiravir in human plasma using homogeneous liquid–liquid microextraction followed by HPLC/UV. *Bioanalysis*, 14(4), 205–216. <https://doi.org/10.4155/bio-2021-0219>
9. Abdallah, I. A., Hammad, S. F., Bedair, A., Abdelaziz, M. A., Danielson, N. D., Elshafeey, A. H., & Mansour, F. R. (2022). A gadolinium-based magnetic ionic liquid for supramolecular dispersive liquid–liquid microextraction followed by

- HPLC/UV for the determination of favipiravir in human plasma. *Biomedical Chromatography*, 36(6). <https://doi.org/10.1002/bmc.5365>
10. V. Duse, P., & G. Baheti, K. (2021). Bioanalytical method development and validation for the determination of favipiravir in spiked human plasma by using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 275–281. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i47a33014>
 11. Aguilar Carrasco, J. C., Gutierrez-Lopez, A., Daniela Cruz-Cruz, M., Ignacio Aguilar-Carrasco, J., & Pantic, I. (2021). A Simple, Sensitive and Economical HPLC-UV Method for Determination of Favipiravir in Microsamples of Rat Plasma and its Application in a Pharmacokinetic Study. *LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY*, 40(10), 2431–2438.
 12. Abdallah, I. A., Hammad, S. F., Bedair, A., & Mansour, F. R. (2022). Menthol-assisted homogenous liquid-liquid microextraction for HPLC/UV determination of favipiravir as an antiviral for covid-19 in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 1189. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123087>
 13. Nishanth G, V. V., Spandana, T., Sri, C. D., Nataraj, V., Vikram, P. R. H., & Gurupadaya, B. M. (2022). Multivariate optimization for determination of favipiravir, a SARS-COV-2 molecule, by the reverse-phase liquid chromatographic method using a QBD approach. *Journal of Chromatographic Science*. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmac041>
 14. Marzouk, H. M., Rezk, M. R., Gouda, A. S., & Abdel-Megied, A. M. (2022). A novel stability-indicating HPLC-dad method for determination of favipiravir, a potential antiviral drug for covid-19 treatment; application to degradation kinetic studies and in-vitro dissolution profiling. *Microchemical Journal*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106917>
 15. TAŞKIN, D. (2022). Development and validation of a rapid HPLC-dad method for determination of favipiravir in pharmaceutical formulation. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 12(3), 648–652. <https://doi.org/10.33808/clinexphealthsci.992869>
 16. Hailat, M., Al-Ani, I., Zakareia, Z., Al-Shdefat, R., Al-Meanazel, O., Anwer, M. K., Hamad, M., Abu Rayyan, W., Awad, R., & Abu Dayyih, W. (2022). Development and validation of HPLC-dad method for the determination of favipiravir and

- studying the impact of vitamin C on the pharmacokinetics of COVID-19 antiviral drug favipiravir. *Separations*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/separations9100303>
17. Nadendla, R., & Patchala, A. (2021). A validated high performance liquid chromatographic method for the quantification of favipiravir by PDA Detector. *International Journal of Life Science and Pharma Research*, 11(2), 181–188. <https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2021.11.2.p181-188>
 18. Bulduk, İ. (2021). Comparison of HPLC and UV Spectrophotometric Methods for Quantification of Favipiravir in Pharmaceutical Formulations. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 20(3), 57–65. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.114199.14725>
 19. Sharaf, Y. A., El Deeb, S., Ibrahim, A. E., Al-Harrasi, A., & Sayed, R. A. (2022). Two green micellar HPLC and mathematically assisted UV spectroscopic methods for the simultaneous determination of Molnupiravir and favipiravir as a novel combined covid-19 antiviral regimen. *Molecules*, 27(7). <https://doi.org/10.3390/molecules27072330>
 20. Mikhail, I. E., Elmansi, H., Belal, F., & Ibrahim, A. E. (2021). Green micellar solvent-free HPLC and spectrofluorimetric determination of favipiravir as one of COVID-19 antiviral regimens. *Microchemical Journal*, 165, 106189. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106189>
 21. Megahed, S. M., Habib, A. A., Hammad, S. F., & Kamal, A. H. (2021). Experimental Design Approach for development of spectrofluorimetric method for determination of favipiravir; a potential therapeutic agent against COVID-19 virus: Application to spiked human plasma. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 249. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119241>
 22. Abd Allah, F. I., Abdelhmaid, A., Himida, M., Elkashlan, A. M., & El-Attar, A. A. M. M. (2022). Fully validated UPLC–MS/MS method for quantifying favipiravir in human plasma boosted lean six sigma: An application for a bioequivalence study. *Biomedical Chromatography*, 36(9). <https://doi.org/10.1002/bmc.5381>
 23. Rezk, M. R., Badr, K. A., Abdel-Naby, N. S., & Ayyad, M. M. (2021). A novel, rapid and simple UPLC–MS/MS method for quantification of favipiravir in human plasma: Application to a Bioequivalence Study. *Biomedical Chromatography*, 35(7). <https://doi.org/10.1002/bmc.5098>

24. Morsy, M. I., Nouman, E. G., Abdallah, Y. M., Zainelabdeen, M. A., Darwish, M. M., Hassan, A. Y., Gouda, A. S., Rezk, M. R., Abdel-Megied, A. M., & Marzouk, H. M. (2021). 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 199. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114057>
25. Noureldeen, D. A. M., Boushra, J. M., Lashien, A. S., Hakiem, A. F. A., & Attia, T. Z. (2022). Novel environment friendly TLC-densitometric method for the determination of anti-coronavirus drugs “Remdesivir and favipiravir”: Green assessment with application to pharmaceutical formulations and human plasma. *Microchemical Journal*, 174. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.107101>
26. Saraya, R. E., Deeb, S. E., Salman, B. I., & Ibrahim, A. E. (2022). Highly sensitive high-performance thin-layer chromatography method for the simultaneous determination of molnupiravir, favipiravir, and ritonavir in pure forms and pharmaceutical formulations. *Journal of Separation Science*, 45(14), 2582–2590. <https://doi.org/10.1002/jssc.202200178>
27. Kanbeş Dindar, Ç., Bozal-Palabiyik, B., & Uslu, B. (2021). Development of a diamond nanoparticles-based Nanosensor for detection and determination of antiviral drug favipiravir. *Electroanalysis*, 34(7). <https://doi.org/10.1002/elan.202100571>
28. Mohamed, M. A., Eldin, G. M. G., Ismail, S. M., Zine, N., Elaissari, A., Jaffrezic-Renault, N., & Errachid, A. (2021). Innovative electrochemical sensor for the precise determination of the new antiviral COVID-19 treatment favipiravir in the presence of coadministered drugs. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 895, 115422. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115422>
29. Galal, A., Ahmed, Y. M., Ahmed, M. H. M., & Atta, N. F. (2021). Electrochemistry and determination of an antiviral drug at ionic liquids crystals-carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Journal of The Electrochemical Society*, 168. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac39d6>
30. Allahverdiyeva, S., Yunusoğlu, O., Yardım, Y., & Şentürk, Z. (2021). 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*, 1159. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338418>
31. Mehmandoust, M., Khoshnavaz, Y., Tuzen, M., & Erk, N. (2021). Voltammetric sensor based on bimetallic nanocomposite for determination of favipiravir as an antiviral drug. *Microchimica Acta*, 188(12). <https://doi.org/10.1007/s00604-021-05107-2>
32. Hazarika, I., Kalita, T., Deka, P., Gogoi, S. K., Althubeiti, K., Thakuria, R., & Gogoi, B. (2021). Soot-based reduced graphene quantum dot/hemin conjugate for favipiravir sensing. *ACS Applied Nano Materials*, 4(12), 13927–13937. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c03235>
33. *Validation of analytical procedures text and methodology Q2(R1)*. (n.d.). Retrieved November 30, 2022, from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

COVID-19 TEDAVİSİNDE KULLANILAN FAVİPİRAVİRİN TABLETLERDEN TAYİNİ İÇİN UV SPEKTROMETRİK VE SPEKTROFLUORİMETRİK YÖNTEMLER

ORJİNALLİK RAPORU

% 18 BENZERLİK ENDEKSİ	% 17 İNTERNET KAYNAKLARI	% 4 YAYINLAR	% 7 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	------------------------------------	------------------------	--------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 7
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 2
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
5	eceyda.com İnternet Kaynağı	% 1
6	www.bakbutrend.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Cranfield University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	Submitted to Ataturk Universitesi Öğrenci Ödevi	<% 1