

EMEL ÖZMEN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

TENOFOVİR DİSOPROKSİL FUMARAT'IN
FARMASÖTİK PREPARATLARDA UPLC İLE TAYİNİ

EMEL ÖZMEN

DANIŞMAN
PROF.DR.ARMAĞAN ÖNAL

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2022

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini esirgemeyen, bilgisi ve yönlendirmeleriyle çalışmalarına ışık tutan 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 aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	İ
TEŞEKKÜR.....	İİ
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.KLİNİK FARMAKOLOJİSİ	4
2.1.1.ETKİ MEKANİZMASI.....	4
2.1.2.EMİLİM.....	4
2.1.3.DAĞILIM	5
2.1.4.BİYOTRANFORMASYON VE ELİMİNASYON.....	5
2.1.5.ATILIM	6
2.2.TENOFOVİR DİSOPROKSİL FUMARAT'IN FİZİKSEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	6
2.2.1.TENOFOVİR DİSOPROKSİL FUMARAT'IN SAFSIZLIKLARI	7
2.2.1.1.SAFSIZLIK A (MONO-POC PMPA).....	7
3.1.TENOFOVİR DİSOPROKSİL FUMARAT VE SAFSIZLIKLARININ YANYANA TABLETLERDE TAYİNİ İÇİN GELİŞTİRİLMİŞ ANALİTİK YÖNTEMLER.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1.KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZÜCÜLER.....	22
3.1.1.ÇÖZELTİLER	23
3.1.1.1.MOBİL FAZ İÇİN KULLANILAN ÇÖZELTİLER.....	23
3.1.1.2.TENOFOVİR DİSOPROKSİL FUMARAT SAFSIZLIK ANALİZİ İÇİN HAZIRLANAN ÇÖZELTİLER	23
3.2.ALETLER VE DİĞER GEREÇLER	27

3.3.ANALİZ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR.....	28
3.3.1.DEDEKTÖR VE DALGA BOYU SEÇİMİ.....	28
3.3.2.KROMATOĞRAFİK KOŞULLARIN BELİRLENMESİ.....	28
3.3.3.METOT GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI.....	28
3.4.GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN VALİDASYONU	30
3.4.1.SEÇİCİLİK	31
3.4.1.1.ÇÖZELTİ HAZIRLIĞI.....	31
3.4.2.DOĞRUSALLIK	31
3.4.3.DÜZELTME FAKTÖRÜ (RESPONS FACTOR (RF))	35
3.4.4.GÖZLENEBİLME SINIRI (LOD) VE TAYİN SINIRI (LOQ)	35
3.4.5.KESİNLİK	36
3.4.5.1.SİSTEM KESİNLİĞİ	36
3.4.5.2.TEKRARLANABİLİRLİK	36
3.4.5.3.ARA KESİNLİK.....	37
3.4.6.DOĞRULUK VE GERİ KAZANIM	37
3.4.7.SAĞLAMLIK.....	38
3.4.8.ÇÖZELTİ STABİLİTESİ.....	38
3.4.9.STRES ÇALIŞMASI.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1.ANALİZ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ İLE İLGİLİ BULGULAR	40
4.1.1.DALGA BOYU SEÇİMİ ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR.....	40
4.1.2.METOT GELİŞTİRMEYE AİT BULGULAR	44
4.1.3.SEÇİCİLİK	46
4.1.4.DOĞRUSALLIK	54
4.1.5.DÜZELTME FAKTÖRÜ (RF)	66
4.1.6.GÖZLENEBİLME VE TAYİN SINIRI (LOD VE LOQ).....	66
4.1.7.KESİNLİK	75
4.1.7.1.SİSTEM KESİNLİĞİ	75
4.1.7.2.TEKRARLANABİLİRLİK	76
4.1.7.3.ARA KESİNLİK.....	77
4.1.8.DOĞRULUK VE GERİ KAZANIM	78
4.1.9.SAĞLAMLIK.....	86

4.1.10.ÇÖZELTİ STABİLİTESİ	87
4.1.11.STRES ÇALIŞMASI	89
TARTIŞMA	92
KAYNAKLAR	95



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Spektrofotometrik Analiz Yöntemleri	11
Tablo 2-2: RP-HPLC /UPLC Analiz Yöntemleri	12
Tablo 3-1 Doğrusallık Çalışması için Tenofovir disoproksil fumarat Çözelti Hazırlığı	32
Tablo 3-2 Doğrusallık Çalışması için nPOC- POC Çözelti Hazırlığı	32
Tablo 3-3 Doğrusallık Çalışması için iPr-POC-PMPA Çözelti Hazırlığı	33
Tablo 3-4 Doğrusallık Çalışması için MOC-POC-PMPA Çözelti Hazırlığı.....	33
Tablo 3-5 9- Doğrusallık Çalışması için Propilen Adenin Çözelti Hazırlığı.....	33
Tablo 3-6 Doğrusallık Çalışması için MONO-POC-PMPA Çözelti Hazırlığı.....	34
Tablo 3-7 Doğrusallık Çalışması için Dimer Çözelti Hazırlığı	34
Tablo 3-8 Doğrusallık Çalışması için Mixed Dimer Çözelti Hazırlığı.....	34
Tablo 4-1: Çözücü Seçicilik sonuçları.....	51
Tablo 4-2: Sistem Uygunluğu Seçicilik sonuçları	51
Tablo 4-3: Standart ve numune Seçicilik sonuçları	52
Tablo 4-4: Spiked numune seçicilik sonuçları.....	53
Tablo 4-5: Safsızlık Standartları Seçicilik Sonuçları.....	54
Tablo 4-6: Tenofovir disoproksil fumarat doğrusallık çalışmasının verileri.....	55
Tablo 4-7:Safsızlık nPOC-POC-PMPA Doğrusallık Çalışmasının Verileri	56
Tablo 4-8: Safsızlık iPR-POC-PMPA Doğrusallık Çalışmasının Verileri	57
Tablo 4-9: MOC-POC-PMPA doğrusallık Çalışmasının verileri.....	58
Tablo 4-10: Safsızlık 9-Propilen Adenin Doğrusallık Çalışmasının Verileri.....	59
Tablo 4-11 : Safsızlık MONO-POC-PMPA Doğrusallık Çalışmasının Verileri.....	60
Tablo 4-12: Dimer Doğrusallık Çalışmasının Verileri	61
Tablo 4-13: Mixed Dimer Doğrusallık Çalışmasının Verileri.....	62
Tablo 4-14: Düzeltme Faktörü (RF) ve Bağlı alıkonma zamanı (RRT).....	66
Tablo 4-15: Tenofovir disoproksil fumarat için LOQ sonuçları	67
Tablo 4-16: Tenofovir disoproksil fumarat için LOD sonuçları.....	67
Tablo 4-17: nPOC-POC-PMPA için LOQ sonuçları.....	68
Tablo 4-18: nPOC-POC-PMPA İçin LOD sonuçları	68
Tablo 4-19: iPR-POC-PMPA İçin LOQ sonuçları	69
Tablo 4-20: iPR-POC-PMPA İçin LOD sonuçları	69

Tablo 4-21: MOC-POC-PMPA İçin LOQ sonuçları	70
Tablo 4-22: MOC-POC-PMPA İçin LOD sonuçları	70
Tablo 4-23: 9-Propilen Adenin İçin LOQ sonuçları	71
Tablo 4-24: 9-Propilen Adenin İçin LOD sonuçları	71
Tablo 4-25: MONO-POC-PMPA İçin LOQ sonuçları	72
Tablo 4-26: MONO-POC-PMPA İçin LOD sonuçları	72
Tablo 4-27: Dimer İçin LOQ sonuçları	73
Tablo 4-28: Dimer İçin LOD sonuçları	73
Tablo 4-29: Mixed Dimer İçin LOQ sonuçları	74
Tablo 4-30: Mixed Dimer İçin LOD sonuçları	74
Tablo 4-31: LOQ & LOD: Özet Tablo	75
Tablo 4-32: Sistem Kesinliği Parametre sonuçları	75
Tablo 4-33: Aynı gün içerisinde yapılan Tenofovir disoproksil fumarat tablet numunesi sonuçları	76
Tablo 4-34: Aynı gün içerisinde yapılan %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş tablet numune sonuçları	76
Tablo 4-35: Arakesinlik numune sonuçları	77
Tablo 4-36: Arakesinlik %100 Konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş tablet numune analizlerinin sonuçları	77
Tablo 4-37: Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçlarının karşılaştırılması	78
Tablo 4-38: MONO-POC-PMPA doğruluk sonuçları	79
Tablo 4-39: 9-Propilen Adenin doğruluk sonuçları	80
Tablo 4-40: MOC-POC-PMPA doğruluk sonuçları	81
Tablo 4-41: iPR-POC-PMPA Doğruluk sonuçları	82
Tablo 4-42: MIXED DIMER Doğruluk sonuçları	83
Tablo 4-43: nPOC-POC-PMPA Doğruluk sonuçları	84
Tablo 4-44: DIMER Doğruluk sonuçları	85
Tablo 4-45: Sağlamlık numune* çalışması sonuçları	86
Tablo 4-46: Standart Çözeltisi İçin Çözelti Stabilitesi	87
Tablo 4-47 Numune* İçin Çözelti Stabilitesi	88
Tablo 4-48: Stres çalışması sonuçları*	89

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Tenofovir disoproksil fumarat'ın Kimyasal Formülü	6
Şekil 2-2: Tenofovir disoproksil fumarat'ın IR Spektrumu.....	7
Şekil 2-3: Safsızlık A (MONO-POC-PMA) kimyasal formülü.....	7
Şekil 2-4: Safsızlık C (Moc-POC PMPA) kimyasal formülü.....	8
Şekil 2-5: Safsızlık D (iPr-POC PMPA) kimyasal formülü	8
Şekil 2-6: Safsızlık H (nPOC-POC PMPA) kimyasal formülü	8
Şekil 2-7: Safsızlık I (Mix Dimer) kimyasal formülü.....	9
Şekil 2-8: Safsızlık J (Dimer) kimyasal formülü	9
Şekil 2-9: Safsızlık K (9-Propenil Adenin) kimyasal formülü	10
Şekil 4-1: Tenofovir disoproksil fumarat standart Çözeltilisinin spektrumu.....	40
Şekil 4-2: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış MONO-POC-PMPA Safsızlığına ait spektrum	41
Şekil 4-3: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış 9-Propenyladenin safsızlığına ait spektrum	41
Şekil 4-4: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış MOC-POC-PMPA safsızlığına ait spektrum	42
Şekil 4-5: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış iPr-POC-PMPA Safsızlığına ait spektrum	42
Şekil 4-6: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış nPOC-POC-PMPA Safsızlığına ait spektrum	43
Şekil 4-7: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış safsızlık Dimer Safsızlığına ait spektrum	43
Şekil 4-8: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış Mix safsızlık Dimer Safsızlığına ait spektrum	44
Şekil 4-9: Deneme 4 ile elde edilen UPLC kromatogramı (C _{Tenofovir disoproksil fumarat} : 3 mg/mL) 46	
Şekil 4-10: Çözücüye ait kromatogram	46
Şekil 4-11: Mobil faz A ait kromatogram.....	46
Şekil 4-12: Plaseboya ait kromatogram	46
Şekil 4-13: Standarta ait kromatogram	47
Şekil 4-14: Fumarik asite ait kromatogram	47

Şekil 4-15: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış MONO-POC-PMPA Safsızlığına ait kromatogram.....	47
Şekil 4-16: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış 9-Propenyladenin Safsızlığına ait kromatogram.....	48
Şekil 4-17: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış MOC-POC-PMPA Safsızlığına ait kromatogram.....	48
Şekil 4-18: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış iPr-POC-PMPA Safsızlığına ait kromatogram.....	48
Şekil 4-19: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış nPOC-POC-PMPA Safsızlığına ait kromatogram.....	49
Şekil 4-20: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış Dimer Safsızlığına ait kromatogram.....	49
Şekil 4-21: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış Mix Dimer Safsızlığına ait kromatogram.....	49
Şekil 4-22: % 100 konsatrasyonunda nPOC-POC-PMPA, iPr-POC-PMPA, MOC-POC-PMPA, MONO-POC-PMPA, 9-Propenyladenin, safsızlık Dimer ve Mixed Dimersafsızlık katılmış numuneye ait kromatogram.....	50
Şekil 4-23: Numuneye ait kromatogram.....	50
Şekil 4-24: Tenofovir disoproksil fumarat doğrusallık grafiği.....	63
Şekil 4-25: nPOC- POC- PMPA Standardı doğrusallık grafiği.....	63
Şekil 4-26: iPR-POC-PMPA Standardı doğrusallık grafiği	63
Şekil 4-27: MOC-POC-PMPA Standardı doğrusallık grafiği	64
Şekil 4-28: 9-Propilen AdeninStandardı doğrusallık grafiği	64
Şekil 4-29: MONO-POC-PMPA Standardı doğrusallık grafiği	64
Şekil 4-30: Safsızlık Dimer Standardı doğrusallık grafiği.....	65
Şekil 4-31: Mixed Dimer Safsızlık standardı doğrusallık grafiği.....	65
Şekil 4-32: Oksidatif bozundurma numunesine ait kromatogram	90
Şekil 4-33: Asidik bozundurma numunesine ait kromatogram	90
Şekil 4-34: Isı bozundurması numunesine ait kromatogram	90
Şekil 4-35: Isı ve nem bozundurması numunesine ait kromatogram.....	91
Şekil 4-36: Bazık bozundurma numunesine ait kromatogram.....	91
Şekil 4-37: Işık bozundurma numunesine ait kromatogram	91

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BP: İngiliz Farmakopesi

Cmaks: İlacın kanda ulaştığı maksimum konsantrasyondur

EMA: Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı

EP: Avrupa Farmakopesi

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FT-IR: Fourier Dönüşümlü İnfrared

h/h : hacim / hacim

HBV: Hepatit B Virüsü

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HIV: Human Immunodeficiency Virus / İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

LOD: Gözlenebilme sınırı (Nitelik sınırı)

LOQ: Tayin Sınırı (Nicelik sınırı)

mg: miligram

mL: mililitre

PDA: Fotodiyot serili dedektör

PVDF: Polivinilidenflorit

µg : mikrogram

RSD: Bağıl Standart Sapma

RT: Alıkonma Zamanı

TDF: Tenofovir disoproksil fumarat

SD: Standart Sapma

T.E: Tespit edilemedi

UPLC: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi

USP: Amerikan Farmakopesi

UV: Ultraviyole

ÖZET

Emel Özmen (2022), Tenofovir disoproksil fumarat'ın farmasötik preparatlarda UPLC ile tayini, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Bu tez çalışması kapsamında Tenofovir disoproksil fumarat (TDF) ve ilgili maddelerinin farmasötik preparatlarda tayini için ultra performanslı sıvı kromatografisi yöntemi kullanılarak bir yöntem geliştirilmiş ve geliştirilen metodun validasyonu başarı ile tamamlanmıştır. Kromatografik ayırmalar, gradient elusyonla, C18 kolonda, mobil faz A: pH 4,6 asetat tamponu ve mobil faz B: Asetonitril kullanımıyla, 0,2 mL/dak akış hızında, PDA ve UV dedektör kullanılarak 260 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Doğrusal aralık 0,13–51 µg/mL arasındadır. Gözlenebilme ve tayin sınırları sırasıyla her bir safsızlık için 0,045 µg/mL ve 0,99 µg/mL aralığında bulunmuştur. Doğruluk çalışmaları sınır değeri LOQ seviyesi, %100, %120 ve %240 arasında yapılmıştır. Geliştirilen bu metot ilaç etken maddesinin ve tablet formunun safsızlıklarının stres çalışması sonucunda oluşan bozunma ürünlerinin analizinde de başarı ile uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Tenofovir Disoproksil fumarat, safsızlık, UPLC, validasyon, farmasötik preparat*

ABSTRACT

Emel Özmen (2022), Determination of Tenofovir disoproxil fumarate in pharmaceutical preparations by UPLC, Istanbul University Institute of Health Sciences, Analytical Chemistry USA, Master Thesis, Istanbul.

An ultra performance liquid chromatographic method was developed for the determination of Tenofovir disoproxil fumarate related substances in pharmaceutical formulation. The validation of the developed method has been successfully completed. Chromatographic separations were performed by gradient elution with C18 column using mobile phase A: pH 4,6 acetate buffer and: mobile phase B: Acetonitrile using 0,2 mL/min flow rate. It was carried out at 260 nm wavelength using PDA and UV detector. The linear range is between 0,13– 51 µg/mL. The limit of quantification were found as 0,045 µg/mL and 0,99 µg/mL, respectively. Accuracy studies were carried out between LOQ level, 100%, 120% and 240%. This developed method has also been successfully applied to drug substance and its impurities in the pharmaceutical formulation and the analysis of the degradation products formed as a result of the stress study.

Keywords: *Tenofovir Disoproxil fumarate, impurity, UPLC, validation, pharmaceutical preparation*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tenofovir disoproksil fumarat (TDF) $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P \cdot C_4H_4O_4$ kapalı kimyasal adı, molekül ağırlığı 635,5 g/mol ve açık adı [[[1R)-2(6-Amino- 9H-purin-9-yl)-1-metiletoksi] metil] fosfat, bis(izopropiloksikarboniloksimetil ester), fumarat (1:1); CAS Reg.No. 202138-50-9 ile adlandırılan, hemen hemen beyaz kristal toz olan bir bileşiktir.[1] Tenofovir Çek Cumhuriyeti Bilimler Akademisi Organik Kimya ve Biyokimya Enstitüsü'nde görev alan uzman kimyacı Antonin Holy tarafından 1976 senesinde yapılan çalışmalar sonucu ilk defa sentezlenmiştir.

1976'dan itibaren Tenofovir'in gelişmesine katkıda bulunan Holy bu ilacın basit enfeksiyonların tedavisinde kullanımı için patentini 1985 yılında almıştır. 1993 yılında Belçikalı doktor ve biyolog olan Erik De Clercq ve diğer araştırmacılar, hücre kültüründe Tenofovir'in HIV'e karşı aktivitesini incelemişler ve Gilead Sciences şirketi ile ortak olarak yaptıkları çalışmada HIV ile enfekte olmuş hastalarda Tenofovir'in tedavi potansiyelini araştırmışlardır. 1997 yılında ise Gilead Sciences şirketi ile Kaliforniya Üniversitesinde konu ile ilgili uzmanlar Tenofovir'i insanlara enjeksiyon yoluyla vererek etki mekanizmalarını belirlemişlerdir. Tenofovir disoproksil fumarat HIV tedavisi için 26 Ekim 2001, Kronik hepatit B tedavisi için ise 11 Ağustos 2008 tarihinde Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanarak, ilaç sektöründeki yerini almıştır.[2]

Tenofovir disoproksil fumaratın bulk numune ve farmasötik preparatlardaki safsızlık tayini analizleri araştırıldığında literatürde UPLC yönetimine rastlanmamıştır. Tenofovir disoproksil fumarat literatürdeki çalışmalar incelendiğinde etken madde ve safsızlıkların yan yana miktar tayini için 2 adet HPLC [3,4] metodu vardır ve bu yöntemlerde analiz sürelerinin 60 ve 80 dakika olduğu görülmüştür.

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

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Klinik Farmakolojisi

2.1.1.Etki mekanizması

Tenofovir disoproksil fumarat, ön ilaç olan Tenofovir disoproksilin fumarat tuzudur. Tenofovir disoproksil absorbe edilir ve bir nükleozid monofosfat (nükleotid) analogu olan etkin madde Tenofovir'e dönüştürülür. Tenofovir daha sonra yapısal olarak eksprese edilen hücrel enzimler aracılığıyla aktif metaboliti olan Tenofovir difosfata dönüştürülür. Tenofovir difosfatın intrasellüler yarı-ömrü, akti ve periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMK'ler) 10 saat, dinlenme halindeki periferik kan mononükleer hücrelerinde ise 50 saattir. Tenofovir difosfat, doğal deoksiribonükleotid substratı ile doğrudan bağlanma yarışmasına girerek HIV-1 revers transkriptaz ve HBV polimerazları inhibe eder ve DNA'ya girdikten sonra DNA zincirini sonlandırır. Tenofovir difosfat sellüler polimerazlar α , β ve γ 'nın zayıf bir inhibitörüdür. 300 μ mol/l'ye kadar olan konsantrasyonlardaki Tenofovir, in vitro tayinlerde, mitokondriyal DNA sentezi ya da laktik asit üretimi üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. [RX media 2021]

2.1.2. Emilim

HIV ile enfekte hastalara Tenofovir disoproksil fumarat'ın oral uygulanmasından sonra, Tenofovir disoproksil fumarat hızla emilir ve Tenofovir'e dönüştürülür. HIV ile enfekte hastalara yiyeceklerle birlikte birden çok Tenofovir disoproksil fumarat dozu uygulanması, sırasıyla 326 (%36,6) ng/mL, 3324 (%41,2) ng/mL ve 64,4 (%39,4) ng/mL olan ortalama (varyasyon katsayısı (CV) %'si) Tenofovir C_{maks}, EAAve C_{n1jn} değerleriyle sonuçlanmıştır. Maksimum Tenofovir Konsantrasyonları, aç karnına doz verildikten sonra 1 saat içinde veya yiyecek ile alındığında iki saat içinde gözlenmiştir. Açlık halindeki hastalarda Tenofovir disoproksil fumarattan Tenofovir'in oral biyoyararlanımı yaklaşık %25'tir. Yağ içeriği yüksek yemek, Tenofovir EAA'sında yaklaşık %40 ve C_{maks}'ta yaklaşık %14'lük bir artışla oral biyoyararlanımı artırmıştır. Ancak, Tenofovir disoproksil fumarat'ın hafif bir yiyeceklerle birlikte uygulanmasının Tenofovir' in farmako kinetiği üzerinde anlamlı bir

etkisi olmamıştır. Tenofovir disoproksil fumarat'ın ilk dozundan sonra, serumdaki medyan Cmaks 213 ila 375 ng/mL arasında değişmiştir. [RX media 2021]

2.1.3. Dağılım

İntra venöz uygulama sonrasında, Tenofovir'in kararlı durum dağılım hacminin yaklaşık 800 mL/kg olduğu tahmin edilmektedir. Tenofovir disoproksil fumarat'ın oral uygulanmasından sonra Tenofovir, böbrek, karaciğer ve bağırsak içeriği gibi birçok dokuya en yüksek konsantrasyonlarda dağılmaktadır (klinik öncesi çalışmalar). 0,01 ila 25 [^]ıg/mL Tenofovir konsantrasyonu aralığında Tenofovir'in, plazma veya serum proteinine in vitro protein bağlanması sırasıyla %0,7 ve %7,2'den daha azdır. [RX media 2021]

2.1.4. Biyotransformasyon ve Eliminasyon

İn vitro çalışmalar, Tenofovir disoproksil fumarat'ın veya Tenofovir'in CYP450 enzimleri için substratları olmadığını belirlemiştir. Ayrıca, in vivo gözlenenden önemli ölçüde daha yüksek Konsantrasyonlarda (yaklaşık 300 kat), Tenofovir, ilaç biyotransformasyonu ile ilgili CYP450 izoformlarının (CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2E1 veya CYP1A1/2) aracı olduğu in vitro ilaç metabolizmasını inhibe etmemiştir. 100 μ mol/L konsantrasyondaki Tenofovir disoproksil fumarat, CYP1A1/2 substrat metabolizmasında küçük (%6) ancak istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Diğer herhangi bir CYP450 izoformu üzerinde etkisi yoktur. Bu verilere dayanarak, Tenofovir disoproksil fumarat ve CYP450 tarafından metabolize edilen tıbbi ürünleri kapsayan klinik olarak anlamlı etkileşimlerin görülmesinin olası olmadığı söylenebilir. [RX media 2021]

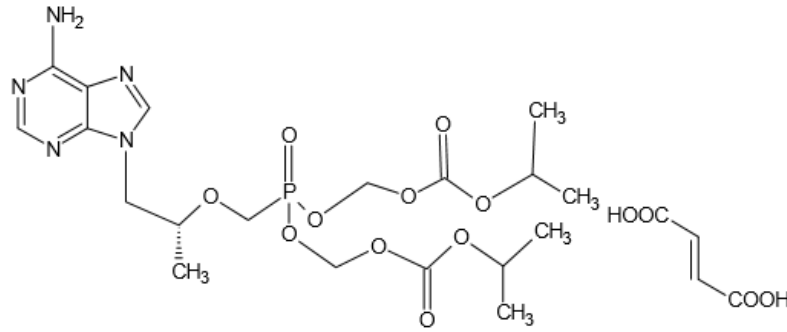
Tenofovir hem glomerüler filtrasyon hem de aktif tübüler sekresyon ile esasen böbreklerden atılır; intravenöz uygulama sonrasında idrarda atılan dozun yaklaşık %70-80'i değişmemiş haldedir. Toplam klerensin yaklaşık 230 mL/saat/kg (yaklaşık 300 mL/dak) olduğu tahmin edilmektedir. Renal klerensin ise yaklaşık 160 mL/saat/kg (yaklaşık 210 mL/dak) olduğu tahmin edilmektedir ve glomerüler filtrasyon hızından fazladır. Bu da aktif tübüler sekresyonun Tenofovir eliminasyonunun önemli bir parçası olduğunu göstermektedir. Oral uygulamadan sonra, Tenofovir'in terminal yarılanma ömrü yaklaşık 12 ila 18 saattir. Çalışmalar, Tenofovir'in etkin tübüler sekresyon

yolunun, organik anyon taşıyıcıları (hOAT) 1 ve 3 ile proksimal tübül hücresine alındığını ve birden çok ilaca dirençli protein 4 (MRP 4) ile idrara atıldığını göstermişti. [RX media 2021]

2.1.5. Atılım

İlaç büyük oranda safra yoluyla ve ince barsaktan bakteriyal glukronida etkisiyle serbest molekül formunda (tuz olmayan etken bazı) olarak enteroheptik dolaşıma katılıp feçesle atılmaktadır. [RX media 2021]

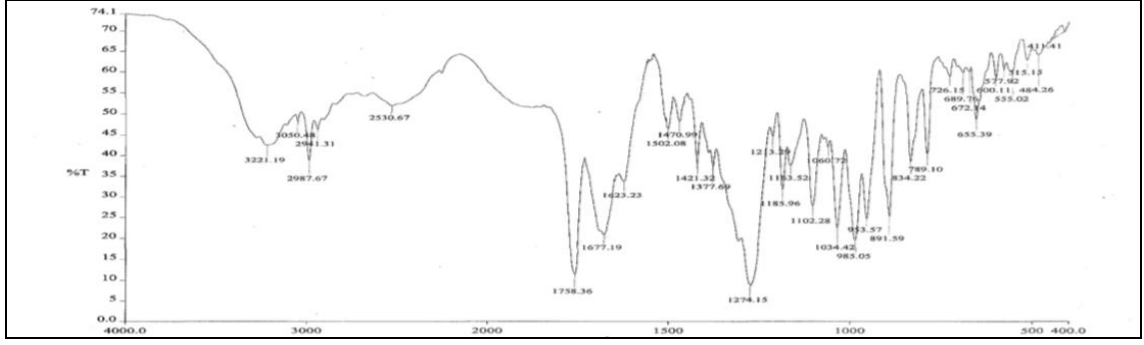
2.2. Tenofovir disoproksil fumarat'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-1: Tenofovir disoproksil fumarat'ın Kimyasal Formülü

Tenofovir disoproksil fumarat, izomerizm sergiler. Beyaz ya da beyazımsı kristalize toz görünümündedir. [[(1R)-2(6-Amino- 9H-purin-9-yl)-1-metiletoksi] metil] fosfat, bis (izopropiloksikarboniloksimetil ester), fumarat (1:1). Bir kiral merkez içerir ve stereo kimyasal notasyonlu yapıdadır. Kapalı formülü ise; $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P \cdot C_4H_4O_4$ şeklinde (Şekil 2-1) olup moleküler ağırlığı 635,5'dir. Suda az çözünür, metanolde çözünür, diklorometanda çok az çözünür [1]. Tenofovir disoproksil fumarat bir prodrug olup tenofovirin ester türevi olan bisizoproksikarboniloksimetil fumarik tuzudur [2].

Tenofovir disoproksil fumarat infrared (FT-IR) spektrumu Şekil 2-2'de görülmektedir.



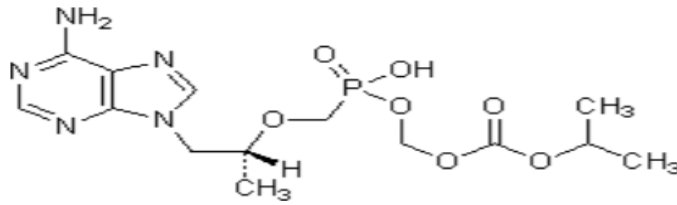
Şekil 2-2: Tenofovir disoproksil fumarat'ın IR Spektrumu

2.2.1. Tenofovir disoproksil fumarat'ın Safsızlıkları

Tenofovir disoproksil fumarat monografı, The International Pharmacopoeia (4, Edition) ve IP (Tenofovir Disoproksil fumarat monograph, Indian Pharmacopoeia, 5th ed., Ministry of Health and Family Welfare, Delhi, India 2007, pp. 1782–1783) monografında yer almaktadır. Bu monograflarda yer alan safsızlıklar, geliştirilecek analitik metodun seçicilik çalışmalarında kullanılacaktır.

2.2.1.1. Safsızlık A (MONO-POC PMPA)

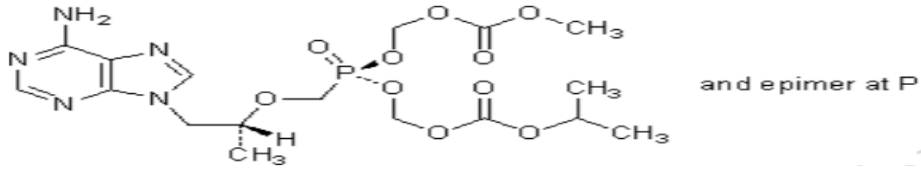
Kimyasal adı (1-metiletil) (8R)-9-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-hidroksi-8-metil-5-okso-2,4,7- trioksa-5-λ5- fosfanonanoat (tenofovir monosoproksil) (Şekil 2-3). Kapalı formülü $C_{14}H_{32}N_5O_7P$ 'dir. Molekül ağırlığı 403,33 g/mol'dür. [1].



Şekil 2-3: Safsızlık A (MONO-POC-PMA) kimyasal formülü

2.2.1.2. Safsızlık C (Moc-POC PMPA)

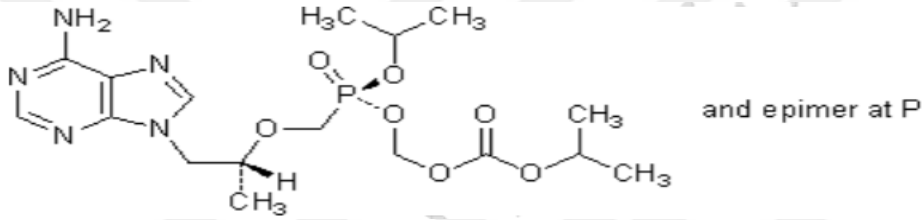
Kimyasal adı methyl (1- metiletil) (5RS)-5-{[(1R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-1-metiletoksi]metil}-5-okso-2,4,6,8-tetraoksa-5-λ 5 - fosfanonandioat, (Şekil 2-4). Kapalı formülü $C_{17}H_{26}N_5O_{10}P$ 'dir. Molekül ağırlığı 491,40 g/mol'dür. [1].



Şekil 2-4: Safsızlık C (Moc-POC PMPA) kimyasal formülü

2.2.1.3. Safsızlık D (iPr-POC PMPA)

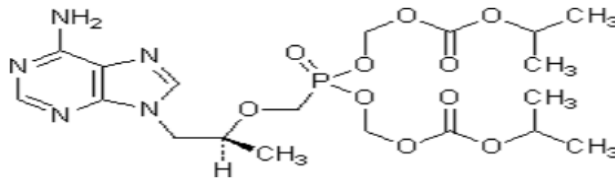
Kimyasal adı (1- metiletil) (5RS,8R)-9-(6-amino-9H-purin-9-yl)-8-metil-5-(1-metiletoksi)-5-okso-2,4,7-trioksa-5-λ 5 - fosfanondioat, (Şekil 2-5). Kapalı formülü $C_{17}H_{28}N_5O_7P$ 'dir. Molekül ağırlığı 445,42 g/mol'dür. [1].



Şekil 2-5: Safsızlık D (iPr-POC PMPA) kimyasal formülü

2.2.1.4. Safsızlık H (nPOC-POC PMPA)

Kimyasal adı. 1- metiletil propil (5RS)-5-{[(1R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-1-metiletoksi]metil}-5-okso-2,4,6,8- tetraoksa -5-λ 5 - fosfanondioat, (Şekil 2-6). Kapalı formülü $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P$ 'dir. Molekül ağırlığı 519,45 g/mol'dür. [1]. TDF sentezinden oluşan ara üründür.

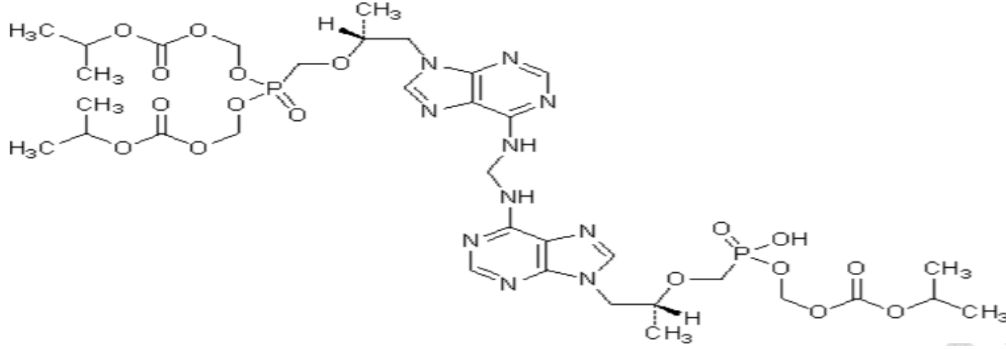


Şekil 2-6: Safsızlık H (nPOC-POC PMPA) kimyasal formülü

2.2.1.5. Safsızlık I (Mix Dimer)

Kimyasal adı bis(1-metiletil) 5-{[(1R)-2-(6-{{9-[(2R)-5-hidroksi-2,11-dimetil-5,9-diokso-3,6,8,10- tetraoksa-5-λ 5 - fosfadodesil]-9H-purin-6-yl}}amino)metil]amino}-9H-purin-9-yl)-1- metiletoksi]metil}-5-okso-2,4,6,8-tetraoksa-

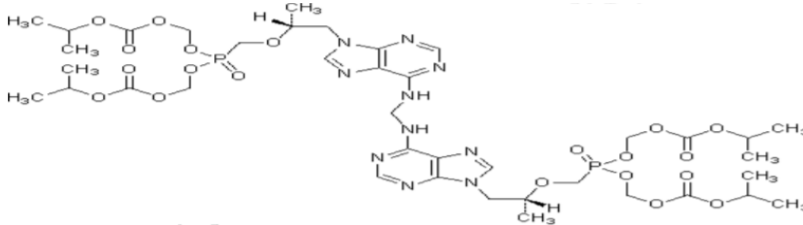
5-λ 5 - fosfanonandioat (tenofovir di- and monosoproksil heterodimer), (Şekil 2-7). Kapalı formülü $C_{34}H_{52}N_{10}O_{17}P_2$ 'dir. Molekül ağırlığı 934,78 g/mol'dür. [1]. TDF sentezinden oluşan ara üründür.



Şekil 2-7: Safsızlık I (Mix Dimer) kimyasal formülü

2.2.1.6.Safsızlık J (Dimer)

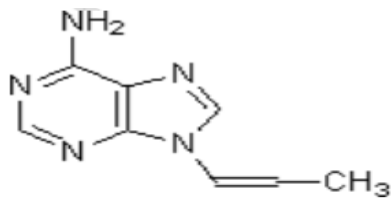
Kimyasal adı tetrakis(1-metiletil) 5,5'-(metilenbis {imino-9H-pürin -6,9-diyl[(2R)-propan-1,2- diyl] oksimetilen })bis[5-okso-2,4,6,8-tetraoksa-5-λ 5 - fosfanonandioat] (tenofovir disoproksil dimer), (Şekil 2-7). Kapalı formülü $C_{39}H_{60}N_{10}O_{20}P_2$ 'dir. Molekül ağırlığı 1050,9 g/mol'dür. [1]. TDF sentezinden oluşan ara üründür.



Şekil 2-8: Safsızlık J (Dimer) kimyasal formülü

2.2.1.7.Safsızlık K (9-Propenil Adenin)

Kimyasal adı 9-(prop-1-enil)-9H-purin-6-amin (Şekil 2-8). Kapalı formülü $C_8H_9N_5$ 'dir. Molekül ağırlığı175,19 g/mol'dür. [1]. TDF sentezinden oluşan ara üründür.



Şekil 2-9: Safsızlık K (9-Propenil Adenin) kimyasal formülü

ICH Q3B (R2) kılavuzu ek 1 karar ağacına göre, Tenofovir disoproksil fumarat maksimum günlük alım dozunun 300 mg olduğu göz önüne alındığında, bitmiş ürünlerdeki safsızlık limitleri % 0,2 olarak hesaplanır. MONO poc PMA safsızlığı için limit “*World Health Organisation, Tenofovir monograph; 4th ed.*” [1]. % 1,0 olarak alınmıştır.



2.3. İlaç Maddelerinin Analizine ait Geliştirilmiş Analitik Yöntemler

Tenofovir disoproksil fumarat ve safsızlıklarının tablet formülasyonlarında yanyana analizi için “World Health Organisation, Tenofovir monograph; 4th ed.” ve literatürlerde kayıtlı 2 adet HPLC yöntemine rastlanmıştır.

2.3.1. Tenofovir disoproksil fumarat’a ait Tabletlerde Geliştirilmiş Analitik Yöntemler

Tenofovir disoproksil fumarat’ın ve diğer bazı ilaç maddeleriyle kombinasyonlarının tablet preparatlarında tayini için literatürlerde spektrofotometrik [5–17], yüksek performanslı sıvı kromatografik (HPLC) [18–22,24-42,45-46,48] ve ultra hızlı sıvı kromatografik (UPLC) [23,43,44,47] yöntemleri mevcuttur. Tablo 2-1 ve Tablo 2-2 de geliştirilen bu metotlara ait ayrıntılar verilmiştir.

Tablo 2-1: Spektrofotometrik Analiz Yöntemleri

Farmasötik Preparatdaki Etken Maddeler	Dalga Boyu	Kalibrasyon aralığı	Kaynak
TDF tablet	UV dalga boyu 260 nm	TDF:4 – 40 µg / mL	[5]
Efavirenz/TDF/ Lamivudin tablet	Efavirenz :247 nm , TDF :260nm, ve Lamivudin: 272 nm	Efavirenz : 5-20 µg /mL TDF 10-40 µg/mL, ve Lamivudin: 5-20 µg/mL	[6]
Efavirenz/TDF/ Lamivudin tablet	Efavirenz :247nm, TDF :260nm, ve Lamivudin: 272 nm	%25 ila %150	[7]
TDF/ Emtrisitabin tablet	Emtrisitabin: 255-265 nm TDF: 272-286 nm	2 – 20 µg/mL	[8]
TDF/ Emtrisitabin tablet	281 nm ve 210 nm	4 – 24 µg/ mL	[9]
Efavirenz/TDF/ Emtrisitabin tablet	Efavirenz :240nm , TDF :241nm, ve Emtrisitabin: 260 nm	Efavirenz :6,67 µg/mL TDF :40, 10-60 µg/mL Emtrisitabin :20-120 µg/mL	[10]
Emtrisitabin /TDF/, Kobikistat/ Elvitegravir	Emtrisitabin: 283 nm TDF: 259 nm Kobikistat : 240 Elvitegravir:258 nm	Emtrisitabin: 4–24 µg/mL, TDF:10–50 µg/mL, Kobikistat:10–120 µg/mL Elvitegravir :2–10 µg/mL	[11]
Emtrisitabin /TDF/ Rilpivirin HCl (RPV)	Emtrisitabin: 240,8 nm, TDF: 257,6 nm, Rilpivirin HCl: 305,6 nm,	Emtrisitabin: 4-12 µg/mL TDF:6-18 µg/mL Rilpivirin HCl 0,5-1,5 µg/mL	[12]
Emtrisitabin /TDF	Emtrisitabin 278,0-283,0nm TDF :258,0- 262,0 nm	Emtrisitabin :5-25 µg/mL TDF :10–50µg/mL	[13]
TDF	260 nm, 273 nm	5-40 micro/ mL	[14]
Efavirenz/TDF/ Lamivudin tablet	Efavirenz :247, TDF :259 and Lamivudin :272 nm,	10-60, 5-30, 5-30 µg/mL,	[15]
Emtrisitabin /TDF	Emtrisitabin: 281 nm TDF :259 nm	TDF :6-48 µg/mL Emtrisitabin :4-32 µg/mL	[16]
Emtrisitabin /TDF	Oran türev yönteminde 271,07 ve 302,17 nm, Tenofovir disoproksil fumarat (TDF) ve Emtricitabine (EM) belirlemek için birinci dereceden türev yönteminde 224,38 ve 306,88 nm seçilmiştir,	İlk iki yöntem için TDF için -21 µg/mL ve Emtrisitabin için 2-14 µg/mL ve üçüncü yöntem için aralık 6-30 µg/mL TDF ve 4-20 µg/mL Emtrisitabin.	[17]

Tablo 2-2: RP-HPLC /UPLC Analiz Yöntemleri

Farmasötik Preparatdaki Etken Maddeler	Kolon	Mobil faz	Akış Hızı (mL/dk)	Dedeksiyon	Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı(LOQ)	Kalibrasyon Aralığı	Kaynak
Emtrisitabin /TDF/Elvitegravir/Ko bisistat-tablet	C18 (250 mm x4,6mm,5um)	A=KH ₂ PO ₄ (0,02M) pH 2,5, B=Asetonitril	1,0	UV detektör 240 nm	Emtrisitabin LOD: 0,02 µg/mL LOQ : 0,06µg / mL TDF LOD: 0,03 µg / mL LOQ : 0,09µg / mL Elvitegravir LOD: 0,75 µg / mL LOQ : 2,25 µg / mL Kobisistat LOD: 3 µg / mL LOQ : 9 µg / mL	Emtrisitabin: 20-240 µg / mL TDF: 30-360 µg / mL Elvitegravir ve Kobisistat: 15-180 µg / mL	[18]
Emtrisitabin /TDF - tablet	C18 (150mm×4,6mm, 5 µm)	tampon (pH 2,5): Metanol (30:70 h/h)	1,0	UV detektör 272 nm	Emtrisitabin LOD: 2,98 µg/mL LOQ : 9,98 µg / mL TDF LOD: 2,96 µg / mL LOQ : 9,96 µg / mL	Emtrisitabin: 20 µg/ mL –100 µg/ mL TDF: 30 µg/ mL –150 µg/ mL	[19]
Emtrisitabin /TDF/ Rilpivirin -tablet	C18 (250 mm× 4,6 mm, 5µm)	0,01N Potasyum dihidrojen fosfat ve Asetonitril 65:35 (h/h)	1,0	UV detektör 265 nm	Emtrisitabin: LOD: 0,1017 µg/mL LOQ : 0,3038 µg/mL TDF LOD: 0,3037 µg/mL LOQ : 0,9204 µg / mL Rilpivirin LOD: 0,00868 µg/mL LOQ :0,02630 µg/mL	Emtrisitabin: 20–100 µg/ mL TDF: 30–150 µg/ mL Rilpivirin: 2,5–12,5 µg/ mL	[20]

Farmasötik Preparatdaki Etken Maddeler	Kolon	Mobil faz	Akış Hızı (mL/dk)	Dedeksiyon	Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı(LOQ)	Kalibrasyon Aralığı	Kaynak
Emtrisitabin /TDF/Elvitegravir/Ko bisistat-tablet	C18 (100mm × 4,6 mm, 5 µm)	% 0,1 trifloroasetik asit ve Asetonitrilin gradient karışımı	1,0	UV detektör 240 nm	Emtrisitabin LOD: 0,01 µg/mL LOQ : 0,03µg / mL TDF LOD: 0,01 µg / mL LOQ : 0,03µg / mL Elvitegravir LOD: 0,005 µg / mL LOQ : 0,01 µg / mL Kobisistat LOD: 0,1 µg / mL LOQ : 0,3 µg / mL	Emtrisitabin: 25-250 µg / mL TDF: 100-350 µg / mL Elvitegravir ve Kobisistat: 12,5-200 µg / mL	[21]
Emtrisitabin /TDF/ Rilpivirin -tablet	C18 (150mm × 4,6 mm, 5µm)	Asetonitril ve Fosfat tamponu pH 3 60:40 (h/h)	1,0	UV detektör 260 nm	Emtrisitabin: LOD: 0,1017 µg/mL LOQ : 0,3038 µg/mL TDF LOD: 0,3037 µg/mL LOQ : 0,9204 µg / mL Rilpivirin LOD: 0,00868 µg/mL LOQ :0,02630 µg/mL	Emtrisitabin: 8–48 µg/ mL TDF: 12–72 µg/ mL Rilpivirin: 1–6 µg/ mL	[22]
Emtrisitabin /TDF-tablet	C18(100 mm × 2,1mm, 1,8 µm)	PH 6 ve metanol 45:55(h/h) % 0,68 potasyum dihidrojen ortofosfat tamponu	1,2	UV detektör 261 nm	-	Emtrisitabin: 10 - 100 µg/mL TDF: 15 - 150 µg/mL	[23]
Emtrisitabin /TDF-tablet	C18 (250 mm× 4,6 mm, 5µ)	Metonal ve fosfat tampon pH 2,5 65:35(h / h)	1,0	UV detektör 261 nm	Emtrisitabin: LOD: 1,396 µg/mL LOQ : 4,231 µg/mL TDF LOD: 1,336 µg/mL LOQ : 4,050 µg / mL	Emtrisitabin: 5,0–25,0 mg /mL TDF:5,0–25,0 mg/ mL	[24]

Farmasötik Preparatdaki Etken Maddeler	Kolon	Mobil faz	Akış Hızı (mL/dk)	Dedeksiyon	Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı(LOQ)	Kalibrasyon aralığı	Kaynak
Emtrisitabin /TDF-tablet	C18 (250 mm× 4,6 mm, 5µ)	10 mM fosfat tamponu (pH 6,8): Asetonitril; 40: 60 (h / h)	1,0	UV detektör 260 nm	Emtrisitabin: LOD: 1,54 µg/mL LOQ : 4,54 µg/mL TDF LOD: 4,60 µg/mL LOQ : 13,65 µg / mL	Emtrisitabin: 5,0–25,0 mg /mL TDF:5,0–25,0mg / mL	[25]
Emtrisitabin /TDF-tablet	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Asetonitril: potasyum dihidrojen fosfat tampon (pH 3,0±0,05): trietilamin 70:30:0,5(h/h)	1,0	UV detektör 260 nm	Emtrisitabin: LOD: 0,015 µg/mL LOQ : 0,039 µg/mL TDF LOD: 0,045 µg/mL LOQ : 0,117 µg / mL	Emtrisitabin: 5,0–50,0 mg /mL TDF:5,0–50,0mg / mL	[26]
Lamivudin /TDF-tablet	C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Asetonitril:Metanol: Su 30:50:20 (h/h/h)	1,0	UV detektör 258 nm	Lavimudin: LOD: 0,0099 µg/mL LOQ : 0,0299 µg/mL TDF LOD: 0,0328 µg/mL LOQ : 0,0994 µg / mL	Lavimudin: 2,0–12,0 µg/mL TDF: 2,0–12,0 µg/mL	[27]
Emtrisitabin /TDF-tablet	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	0,1% triflora asetik asit (TFA) tampon ve metanol 39:61 (h/h)	1,2	UV detektör 261 nm.	Emtrisitabin: LOD: 0,48 Åµg/mL LOQ : 0,56 Åµg/mL TDF LOD: 1,64 Åµg/mL LOQ : 1,89 Åµg/mL	Emtrisitabin: 20–100,0 Å µg/mL TDF:30–150,0 Å µg/mL	[28]
Emtrisitabin /TDF/Kobikistat/Elvit egravir-tablet	C18 (250mm×4,6 mm, 5 µm)	Ortofosforik asit tampon: Asetonitril 55:45 (h/h)	1,0	PDA detektör 240 nm	-	Emtrisitabin: 20–120 µg/ mL TDF: 30–180 µg/ mL Kobikistat: 15–90 µg/ mL Elvitegravir 15–90 µg/ mL	[29]

Farmasötik Preparatdaki Etken Maddeler	Kolon	Mobil faz	Akış Hızı (mL/dk)	Dedeksiyon	Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı(LOQ)	Kalibrasyon aralığı	Kaynak
Emtrisitabin /TDF-tablet	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Metanol: fosfat tampon pH-3 (70:30 h/h)	1,0	UV detektör 258 nm		Emtrisitabin: 30,0-70,0 µg/ mL TDF:30,0-70,0 µg/ mL	[30]
Emtrisitabin /TDF/Dolutegravir tablet	Biphenyl (250mm x4,6 mm, 5 µm)	A= Ammonyum Asetat (10 mmol) pH 3,0, B= Asetonitril, ammonyum asetat (10 mmol) pH 3,0 and metanol 70:15:15% h/h/h	HPLC: 0,6 UPLC:0,3 LC-QDa:0,6	260 nm	Emtrisitabin: LOD: 0,016 µg/mL LOQ : 0,052 µg/mL TDF LOD: 0,253 µg/mL LOQ : 0,758 µg/mL Dolutegravir: LOD: 0,0125 µg/mL LOQ : 0,0412 µg/mL	Emtrisitabin: 500– 3000 µg/ mL TDF: 500– 3000 µg/ mL Dolutegravir: 500– 3000 µg/ mL	[31]
FTC/TDF/Kobikistat, Elvitegravir-tablet	C18 (250mm x4,6 mm, 5 µm)	0,05M Fosfat tampon pH 3,0 and Asetonitril 95:5	1,0	DAD detektör 240 nm	FTC: LOD: 0,18 µg/ mL LOQ : 0,5455 x10 ⁻² µg/ mL TDF: LOD: 0,5602 µg /mL LOQ : 1,6975 µg /mL Kobikistat: LOD: 0,9668µg /mL LOQ : 2,9298 µg /mL Elvitegravir: LOD: 0,1239 µg /mL LOQ : 0,3755 µg /mL	FTC: 10,0–60,0 µg /mL TDF: 15,0–90,0 µg /mL Kobikistat: 7,5–45 µg /mL Elvitegravir: 7,5–45 µg /mL	[32]

Farmasötik Preparatdaki Etkin Maddeler	Kolon	Mobil faz	Akış Hızı (mL/dk)	Dedeksiyon	Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı(LOQ)	Kalibrasyon aralığı	Kaynak
TDF-tablet	C18 (250mm x 4,6 mm x 5 µm)	Ortofosforik asit (pH 3,0): Asetonitril: etanol (40: 50:% 10 h / h)	0,9	UV detektör 254 nm		10,0–60,0 µg /mL	[33]
TDF / Lamivudin-tablet	C18 (250mm x 4,6 mm, 5µm)	Asetonitril ve fosfat tamponu pH 3,5 (80:% 20 h / h)	1,2	UV detektör 260 nm.	Lamivudin: LOD: 0,4632 µg/ mL LOQ : 1,544 µg/ mL TDF: LOD: 1,46 µg /mL LOQ : 4,29 µg /mL	Lamivudin: 15,0–35,0 µg /mL TDF: 15,0–35,0 µg /mL	[34]
TDF / Lamivudin-tablet	C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	6,5 mmol Fosfat tamponu pH 2,5 ve Asetonitril (50:50 h / h)	1,0	UV detektör 260 nm	Lamivudin: LOD: 3,35 µg/ mL LOQ : 10,14 µg/ mL TDF: LOD: 3,55 µg /mL LOQ : 10,75 µg /mL	Lamivudin: 60,0–140,0 µg /mL TDF: 180,0–420,0 µg /mL	[35]
TDF tablet	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Metanol: su (60:40, h / h)	1,0	UV detektör 260 nm	TDF: LOD: 0,01 µg/ mL LOQ : 0,03 µg/ mL	TDF: 4–20,0 µg /mL	[36]
Efavirenz/TDF/ Lamivudine-tablet	C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	10 mmol fosfat tamponu (pH 5,0) ve metanol (30:70)	1,0	UV detektör 254 nm	Efavirenz: LOD: 0,02 µg/ mL LOQ : 0,07 µg/ mL TDF : LOD: 0,01 µg/ mL LOQ : 0,1 µg/ mL Lamivudine: LOD: 0,018 µg/ mL LOQ : 0,05 µg/ mL	Efavirenz: 2,0-12,0 µg /mL TDF: 1,0 – 6,0 µg / mL Lamivudine: 1,0 – 6,0 µg / mL	[37]

farmasötik Preparatdaki Etken Maddeler	Kolon	mobil faz	Akış Hızı (mL/dk)	Dedeksiyon	Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı(LOQ)	Kalibrasyon aralığı	Kaynak
Efavirenz/TDF/ Lamivudine-tablet	C18(250mm x 4,6 mm, 5µm)	Asetonitril: 50 mmol fosfat tamponu (pH 5,0)	1,0	UV detektör 256 nm	Efavirenz: LOD: 0,1 µg/ mL LOQ : 0,3 µg/ mL TDF : LOD: 0,1 µg/ mL LOQ : 0,5 µg/ mL Lamivudine: LOD: 0,05 µg/ mL LOQ : 0,2 µg/ mL	Efavirenz: 10,0-50,0 µg /mL TDF: 5,0 – 25,0 µg / mL Lamivudine: 5,0 – 25,0 µg / mL	[38]
Efavirenz/TDF/ Emtrisitabin tablet	C18(250mm x 4,6 mm, 5µm)	A: 0,02M Sodyum dihidrojen ortofosfat MONOhidrat B: metanol ve su (85:15)	1,5	UV detektör 265 nm	Efavirenz: LOD: 0,08 µg/ mL LOQ : 0,15 µg/ mL TDF : LOD: 0,07 µg/ mL LOQ : 0,12 µg/ mL Emtrisitabin: LOD: 0,06 µg/ mL LOQ : 0,14 µg/ mL	Efavirenz: 20,0-360,0 µg /mL TDF: 12,0 – 180,0 µg / mL Emtrisitabin: 8,0 – 120,0 µg / mL	[39]
Efavirenz/TDF/ Emtrisitabin tablet	C 8 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	tampon pH: 7,0 Asetonitril ve metanol (40:40:20 h / h)	1,0	UV detektör ile 262 nm	-	Efavirenz: 30,0-300,0 µg /mL TDF: 15,0 – 150,0 µg / mL Emtrisitabin: 10,0 – 100,0 µg / mL	[40]
Efavirenz/TDF/ Emtrisitabin tablet	C18 (100mm x 4,6mm,3,5µm)	0,1M orto fosforik asit tamponu ve Asetonitril	0,5	UV dedektör 265 nm	-	Efavirenz: 30,0-180,0 µg /mL TDF: 75,0 – 450,0 µg / mL Emtrisitabin: 50,0 – 300,0 µg / mL	[41]

farmasötik Preparatdaki Etken Maddeler	Kolon	mobil faz	Akış Hızı (mL/dk)	Dedeksiyon	Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı(LOQ)	Kalibrasyon aralığı	Kaynak
Efavirenz/TDF/ Emtrisitabin tablet	C8 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	tampon pH 2,4 ± 0,02 ve Asetonitril 70:30 h/ h	1,0	UV detektör 252 nm	Efavirenz: LOD: 37,82 µg/ mL LOQ : 114,60 µg/ mL TDF : LOD: 10,56 µg/ mL LOQ : 32,01 µg/ mL Emtrisitabin: LOD: 6,07 µg/ mL LOQ : 18,40 µg/ mL	Efavirenz: 600,13 – 1800,39 µg / mL TDF: 300,54 – 900,44 µg /mL Emtrisitabin: 200,46 – 601,38 µg /mL	[42]
Lamivudin/ Efavirenz/TDF/ Doravirin tablet	Phenyl (50 mm×2,1 mm, 1,7 µm)	su ve Asetonitril 50: 50 (h / h)	0,4	UV detektör ile 238 nm	Efavirenz: LOD: 0,32 µg/ mL LOQ : 0,97 µg/ mL TDF : LOD: 0,10 µg/ mL LOQ : 0,29 µg/ mL Lamivudin: LOD: 0,15 µg/ mL LOQ : 0,44 µg/ mL Doravirin: LOD: 0,04 µg/ mL LOQ : 0,11 µg/ mL	Efavirenz: 15 – 90 µg / mL TDF: 7,5 – 45 µg / mL Lamivudin: 7,5 – 45 µg / mL Doravirin: 2,5 – 15 µg / mL	[43]
Elvitegravir, Kobisistat, Emtrisitabin, Tenofovir disoproxil fumarat tablet	C18 (50mm x 2,1 nm, 1,8 µm)	700mL Asetonitril ve 300 mL %0,1 Orto Fosforik Asit (70:30 h/h)	0,3	PDA detektör ile 252 nm	-	Elvitegravir: 75 – 225 µg / mL TDF: 150 – 450 µg / mL Kobisistat: 75 – 225 µg / mL Emtrisitabin: 100 – 300 µg / mL	[44]

farmasötik Preparatdaki Etken Maddeler	Kolon	mobil faz	Akış Hızı (mL/dk)	Dedeksiyon	Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı(LOQ)	Kalibrasyon aralığı	Kaynak
Efavirenz/TDF/ Emtrisitabin tablet	C18(250mm x 4,6 mm, 5µm)	pH 3,5 tampon :Asetonitril gradient	1,5	UV detektör256 nm	Efavirenz: LOD: 0,18 µg/ mL LOQ : 0,61 µg/ mL TDF : LOD: 0,26 µg/ mL LOQ : 0,85 µg/ mL Emtrisitabin: LOD: 0,36 µg/ mL LOQ : 1,19 µg/ mL	Efavirenz: 60,0 – 900 µg / mL TDF: 24,5 – 367,5 µg / mL Emtrisitabin: 20,0 – 300,0 µg / mL	[45]
Efavirenz/TDF/ Emtrisitabin tablet	CN, (250mm x 4,6 mm, 5 µm)	Metanol- pH 4,5 tampon gradient	1,5	UV detektör 260 nm.	-	Efavirenz: 200 – 280 µg / mL TDF: 80 – 160 µg / mL Emtrisitabin: 40,0 – 120,0 µg / mL	[46]
Efavirenz/TDF/ Emtrisitabin tablet	C18 (100mm × 3 mm, 1,7 µm)	0,01 N Fosfat tamponu pH 4,5 ve Asetonitril 40:60, h/h)	0,4	UV detektör 262 nm	Efavirenz: LOD: 0,911 µg/ mL LOQ : 2,76 µg/ mL TDF : LOD: 0,601 µg/ mL LOQ : 1,82 µg/ mL Emtrisitabin: LOD: 0,330 µg/ mL LOQ : 0,100 µg/ mL	Efavirenz: 150 – 900 µg / mL TDF: 75 – 450 µg / mL Emtrisitabin: 50,0 – 300,0 µg / mL	[47]

farmasötik Preparatdaki Etkin Maddeler	Kolon	mobil faz	Akış Hızı (mL/dk)	Dedeksiyon	Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı(LOQ)	Kalibrasyon aralığı	Kaynak
Efavirenz/TDF/ Lamivudin tablet	Fenil, (250mm x 4,6 mm, 5 µm)	Metanol- tampon(%0,1 h/h formic asit) (73:27; /h/h)	1,0	UV detektör 260 nm	Efavirenz: LOD: 2,3 µg/ mL LOQ : 6,8 µg/ mL TDF : LOD: 1,7 µg/ mL LOQ : 5,2 µg/ mL Lamivudin: LOD: 1,9 µg/ mL LOQ : 5,8 µg/ mL	Efavirenz: 20 – 60 µg / mL TDF: 15 – 45 µg / mL Lamivudin: 15,0 – 45,0 µg / mL	[48]

3.1. Tenofovir disoproksil fumarat ve safsızlıklarının yanyana tabletlerde tayini için geliştirilmiş analitik yöntemler

World Health Organisation, Tenofovir monografı; 4th ed. The International Pharmacopoeia; 2012, Tenofovir disoproksil fumarat ve safsızlıklarını HPLC-UV yöntemi ile etken maddede analiz etmişlerdir. C18 kolunu (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), Asetonitril-tetrabutilamonyum/fosfat tamponu (pH:6,0)-su çözelti karışımından oluşan mobil faz A (2:20:78 h/h/h) ve mobil faz B (65:20:15 h/h/h) gradient kullanımı ile 1 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Kolon fırını 30 °C'ye ayarlanmış ve dedeksiyon 260 nm dalgaboyuna ayarlanmıştır. Analiz süresi 80 dakika olarak belirlenmiş ve doğrusallık aralığı 0,1-0,15 mg /mL'dir. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 0,03 ve 0,1 µg/mL olarak bulunmuştur. [3]

C. Babu ve arkadaşları, Tenofovir disoproksil fumarat ve Lamivudin safsızlıklarını HPLC-UV yöntemi ile tabletlerde analiz etmişlerdir. C18 kolunu (150 mm x 4,6 mm, 3,5 µm), mobil faz A: amonyum asetat tamponu (pH: 5,0±0,05), mobil faz B: metanol: amonyum asetat tamponu (pH: 5,0±0,05) (20:80 h/h) gradient kullanımı ile 1 mL/dk akış hızında 260 nm dalgaboyuna gerçekleştirilmiştir. Analiz süresi 60 dakika olarak belirlenmiş ve doğrusallık aralığı LOQ seviyesinden başlayarak -% 150 olup her safsızlık için ayrı konsantrasyonlarda analiz yapılmıştır. Her safsızlık için doğruluk aralığı % 94,4 ile % 108,3' tür. [4]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez Çalışması Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve A.Ş. Esenyurt Ar-Ge merkezinde yapılmıştır.

3.1.Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Çalışma sırasında kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler aşağıdaki gibidir:

Tenofovir disoproksil fumarat ¹

Fumarik Asit (EP)

Npoc-poc-PPMA ¹

Ipr-poc-PPMA¹

MONO-poc-PPMA¹

Moc-poc-PPMA ¹

9-Propenly Adenine ¹

Dimer¹

Mixed Dimer¹

Tenofovir disoproksil fumarat Hammadde (Seri no: TF0151109) ¹

TENOVİRAL 245 mg Film tablet²

Amonyum Asetat ³

Asetik asit ³

Asetonitril (HPLC Grade)³

Yüksek saflıkta su (HPLC saflığında)

¹HETERO INDIA

²Abdi İbrahim İlaç Sanayi

³JT Baker

3.1.1. Çözeltiler

3.1.1.1. Mobil faz için Kullanılan Çözeltiler

pH 4,6 tamponu : 3,85 g amonyum asetat 1000 mL deiyonize su içerisinde çözülür.

pH: $4,6 \pm 0,05$ 'e derişik glasiyel asetik asit ile ayarlanır. 0,22 μ 'luk membran filtreden süzülerek degaze edilir.

mobil faz A: pH 4,6 asetat tamponu

mobil faz B : Asetonitril

Çözücü: pH 4,6 Tamponu : Asetonitril (70 : 30) oranında karıştırılır.

3.1.1.2. Tenofovir Disoproksil fumarat Safsızlık Analizi için Hazırlanan Çözeltiler

Stok Standart Çözelti Hazırlığı

60,0 mg Tenofovir disoproksil fumarat çalışma standardı 100 mL'lik balon joje içerisine tartılır. 25 mL çözücü ilave edilerek ultrasonik banyoda 5 dakika çözülür ve hacmine çözücü ile tamamlanır. (C_{TDF} : 0,60 mg /mL)

Standart Çözelti Hazırlığı

1 mL stok standart çözeltisi 100 mL'lik balon joje içerisine alınır ve hacmine çözücü ile tamamlanır. 0,22 μ m'luk PVDF filtreden süzülerek hazırlanır. (C_{TDF} : 0,0060 mg/mL)

Fumarik Asit Standart Çözeltisi

11,0 mg Fumarik asit safsızlık standartı 20 mL'lik balon jojeye tartılır. Yaklaşık 5 mL çözücü ilave edilerek 5 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine çözücü ile tamamlanır. 0,22 μ PVDF filtreden süzülerek hazırlanır.

($C_{\text{Fumarik asit}}$: 0,55 mg /mL)

Safsızlık Stok Çözeltilerinin Hazırlığı

nPOC-POC-PMPA Safsızlık Stok Çözeltisi

1,2 mg nPOC-POC-PMPA safsızlık standartı 10 mL'lik balon jojeye tartılır. Yaklaşık 5 mL çözücü ilave edilerek 5 dk ultrasonik banyoda çözülür, hacmine çözücü ile tamamlanır. ($C_{\text{nPOC-POC-PMPA}}: 0,12 \text{ mg /mL}$)

iPr-POC-PMPA Safsızlık Stok Çözeltisi

1,2 mg iPr-POC-PMPA safsızlık standartı 10 mL'lik balon jojeye tartılır. Yaklaşık 5 mL çözücü ilave edilerek 5 dk ultrasonik banyoda çözülür, hacmine çözücü ile tamamlanır. ($C_{\text{iPr-POC-PMPA}}: 0,12 \text{ mg /mL}$)

MOC-POC-PMPA Safsızlık Stok Çözeltisi

1,2 mg MOC-POC-PMPA safsızlık standartı 10 mL'lik balon jojeye tartılır. Yaklaşık 5 mL çözücü ilave edilerek 5 dk ultrasonik banyoda çözülür, hacmine çözücü ile tamamlanır. ($C_{\text{MOC-POC-PMPA}}: 0,12 \text{ mg /mL}$)

MONO-POC-PMPA Safsızlık Stok Çözeltisi

2,1 mg MONO-POC-PMPA safsızlık standartı 5 mL'lik balon jojeye tartılır. Yaklaşık 2,5 mL çözücü ilave edilerek 5 dk ultrasonik banyoda çözülür, hacmine çözücü ile tamamlanır. ($C_{\text{MONO-POC-PMPA}}: 0,42 \text{ mg/mL}$)

9-Propilen Adenin Safsızlık Stok Çözeltisi

1,2 mg 9-Propilen Adenin safsızlık standartı 10 mL'lik balon jojeye tartılır. Yaklaşık 5 mL çözücü ilave edilerek 5 dk ultrasonik banyoda çözülür, hacmine çözücü ile tamamlanır. ($C_{\text{9-Propilenadenin}}: 0,12 \text{ mg/mL}$).

Dimer Safsızlık Stok Çözeltisi

1,2 mg Dimer safsızlık standardı 10 mL'lik balon jojeye tartılır. Yaklaşık 5 mL çözücü ilave edilerek 5 dk ultrasonik banyoda çözülür, hacmine çözücü ile tamamlanır. ($C_{\text{Dimer}}: 0,12 \text{ mg/mL}$)

Mixed Dimer Safsızlık Stok Çözeltisi

1,2 mg Mixed Dimer safsızlık standardı 10 mL'lik balon jojeye tartılır. Yaklaşık 5 mL çözücü ilave edilerek 5 dk ultrasonik banyoda çözülür, hacmine çözücü ile tamamlanır. ($C_{\text{Mixed Dimer}}: 0,12 \text{ mg /mL}$)

Safsızlık Standart Çözeltileri Hazırlığı

nPOC-POC-PMPA Safsızlık Standart Çözeltisi

nPOC-POC-PMPA safsızlık stok çözeltisinin 1,0 mL'si, 20 mL 'lik balon jojeye aktarılarak hacmine çözücü ile tamamlanır. 0,22 µ PVDF filtreden süzülerek hazırlanır. (C_{nPOC-POC-PMPA}: 6 µg/mL)

iPr-POC-PMPA Safsızlık Standart Çözeltisi

iPr-POC-PMPA safsızlık stok çözeltisinin 1,0 mL'si, 20 mL 'lik balon jojeye aktarılarak hacmine çözücü ile tamamlanır. 0,22 µ PVDF filtreden süzülerek hazırlanır. (C_{iPr-POC-PMPA}: 6 µg/mL)

MOC-POC-PMPA Safsızlık Standart Çözeltisi

MOC-POC-PMPA safsızlık stok çözeltisinin 1,0 mL'si, 20 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacmine çözücü ile tamamlanır. 0,22 µ PVDF filtreden süzülerek hazırlanır. (C_{MOC-POC-PMPA}: 6 µg/mL)

MONO-POC-PMPA Safsızlık Standart Çözeltisi

MONO-POC-PMPA safsızlık stok çözeltisinin 1,0 mL'si, 20 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacmine çözücü ile tamamlanır. 0,22 µ PVDF filtreden süzülerek hazırlanır. (C_{MONO-POC-PMPA}: 21 µg/mL)

9-Propilen Adenin Safsızlık Standart Çözeltisi

9-Propenyladenine safsızlık stok çözeltisinin 1,0 mL'si 20 mL 'lik balon jojeye aktarılarak hacmine çözücü ile tamamlanır. 0,22 µ PVDF filtreden süzülerek hazırlanır. (C_{9- Propilenadenin}: 6 µg/mL)

Dimer Safsızlık Standart Çözeltisi

Dimer safsızlık stok çözeltisinin 1,0 mL'si 20 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacmine çözücü ile tamamlanır. 0,22 µ PVDF filtreden süzülerek hazırlanır. (C_{Dimer}: 6 µg/mL)

Mixed Dimer Safsızlık Standart Çözeltisi

Mixed Dimer safsızlık stok çözeltisinin 1,0 mL'si 20 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacmine çözücü ile tamamlanır. 0,22 µm PVDF filtreden süzülerek hazırlanır. (C_{Mixed Dimer}: 6 µg/mL)

Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi Hazırlığı

20 adet Tenofovir disoproksil 245 mg Film Kaplı tablet ortalama tablet ağırlığı belirlenir ve ezilerek toz haline getirilir. Bu toz karışımdan yaklaşık 2880,0 mg tablet tozu (yaklaşık 1200 mg Tenofovir disoproksil fumarat'a eşdeğer) tartılarak 100 mL'lik balon jojeye aktarılır, bir miktar çözücü eklenerek 10 dakika ultrasonik banyoda çözülür ve hacmine çözücü ile tamamlanıp karıştırılır. 0,45 µm'lik PVDF filtreden süzülür. Bu çözeltiden 5,0 mL alıp 20 mL 'lik balon jojeye konulur ve üzerine 1,0 mL nPOC-POC-PMPA, iPr-POC-PMPA, MOC-POC-PMPA, MONO-POC-PMPA, 9-Propilen Adenin, Dimer ve Mixed Dimer safsızlık stok çözeltilerinin herbirinden ilave edilip çözücü ile hacmine tamamlanır. 0,22 µm PVDF filtre ile süzülür ve süzülerek hazırlanır. (C_{nPOC-POC-PMPA}: 6 µg/mL, C_{iPr-POC-PMPA}: 6 µg/mL, C_{MOC-POC-PMPA}: 6 µg/mL, C_{MONO-POC-PMPA}: 21 µg/mL, C_{9-Propilen Adenin}: 6 µg/mL, C_{Dimer}: 6 µg/mL, C_{Mixed Dimer}: 6 µg/mL, C_{Tenofovir disoproksil fumarat}: 3,0 mg /mL)

Tenofovir Disoproksil 245 mg Film Tablet için Plasebo Hazırlığı

Yaklaşık 420,0 mg plasebo 50 mL'lik balon jojeye aktarılır, bir miktar çözücü eklenerek 10 dakika ultrasonik banyoda çözülür ve hacmine çözücü ile tamamlanıp karıştırılır. 0,45 µm'lik PVDF filtreden süzülür. Bu çözeltiden 5,0 mL alıp 10 mL'lik balonjojeye konulur ve çözücü ile hacmine tamamlanarak karıştırılır. 0,22 µm'lik PVDF filtreden süzülerek hazırlanır ve UPLC'ye aktarılır.

Tenofovir Disoproksil 245 mg Film Tablet Numune Çözeltisi Hazırlığı

20 adet Tenofovir disoproksil 245 mg film tablet ortalama tablet ağırlığı belirlenir ve ezilerek toz haline getirilir. Bu toz karışımdan yaklaşık 720,0 mg tablet tozu (yaklaşık 300 mg Tenofovir disoproksil fumarata eşdeğer) tartılarak 50 mL'lik balon jojeye aktarılır, 20 mL çözücü eklenerek 10 dakika ultrasonik banyoda çözülür ve hacmine çözücü ile tamamlanıp karıştırılır. 0,45 µm'lik PVDF filtreden süzülür. Bu çözeltiden 5,0 mL alıp 10 mL'lik balonjojeye konulur ve çözücü ile hacmine

tamamlanarak karıştırılır. 0,22 µm'lik PVDF filtreden süzülerek hazırlanır ve UPLC sistemine verilir. (CTenofovir disoproksil fumarat: 3,0 mg/mL)

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

Waters - Alliance UPLC Sistemi UV ve PDA dedektörlü (ABD)

Seperation Module 2695 (numuneleyici, enjeksiyon ünitesi, pompa, degazer)

Kolon Fırını 186001791

Dedektör UV/Visible 2487

Dedektör PDA (Photodiode Array Dedector) 2996

Empower Yazılımı (versiyon 2)

Empower Yazılımı (versiyon 3)

1. Yazılımlar:

MS Office XP Excel

MS Office XP Word

Cambridge ChemDraw programı (Cambridge, ABD)

Vega in-silico platform versiyon 1,1,4

2. UPLC Kolonu:

Acquity BEH C18 (100 mm x 2,1 mm iç çap, 1,7 µm)

3. Elga Purelab Flex 2 Su Saflaştırma Sistemi (Saint-Maurice, Fransa)

4. Millipore hareketli faz süzme filtresi 0,45 µm (Massachusetts, ABD)

5. Analitik Teraziler

Mettler Toledo AX204 Terazi (Goettingen, Almanya)

Mettler Toledo UMX-2 Terazi (Goettingen, Almanya)

6. Transonic 890 ultrasonik Banyo

7. Waters Vida kapaklı HPLC Vialleri 2 mL (Massachusetts, ABD)

8. Cam Malzemeler:

Isolab Balonjoje (5, 10, 100, 200, 250 mL) (Wertheim, Almanya)

Isolab Mezür (500 mL, 1000 mL) (Wertheim, Almanya)

Isolab Beher (500 mL, 1000 mL) (Wertheim, Almanya)

3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

Literatür çalışmaları incelendikten sonra UPLC sisteminde TDF ve safsızlıklarının yan yana analizlerinin yapılmasına karar verilmiştir. Analiz yönteminin geliştirilmesi aşamasında aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

3.3.1. Dedektör ve Dalga Boyu Seçimi

Işığı absorblayabilen yapıya sahip olması sebebiyle metot geliştirme çalışmalarında Ultraviyole Visible (UV/VIS) veya PDA dedektörlerin kullanılması ön görülmüştür. Aynı anda çoklu dalga boyu ölçme avantajına sahip olduğu için PDA dedektör kullanıldı. Dalga boyu seçimi için etken madde ve safsızlıkların standart çözeltilerinin spektrumu alınmıştır. Sonuçlar bölüm 4.1.1’de verilmiştir.

3.3.2. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Literatür çalışmaları göz önüne alınarak HPLC çalışmaları, Fenil, C8, C18 100 mm boyundaki kolonlarda, çeşitli oranlarda Asetonitril ve 50 mM amonyum asetat (pH 4,6) mobil faz sistemleri uygulanarak denendi. Denemeler bölüm 3.3.3’de yer almaktadır.

3.3.3. Metot Geliştirme Çalışmaları

Geliştirilen metotda kullanılan mobil faz karışımları ve bunlara ait kromatografik şartlar aşağıda verilmiştir.

Deneme 1:

Kromatografik Şartlar

Kullanılan Cihaz	: HPLC; UV ve PDA dedektör
Kolon	: İnertsil fenil-3, 100 mm x 4,6 mm, 3µm
Mobil faz A	: pH 4,6 amonyum asetat tamponu :Asetonitril (97:3)
Mobil faz B	: pH 4,6 amonyum asetat tamponu:Asetonitril (40:60)
Akış Hızı	: 1,5 mL /dk
Dalga Boyu	: 262 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 5 µL

Gradient Programı:

Zaman (dk.)	Mobil faz A	Mobil faz B
0	95	5
25	50	50
35	0	100
40	0	100
45	95	5
50	95	5

Deneme 2:**Kromatografik Şartlar**

Kullanılan Cihaz: UPLC; UV ve PDA dedektör

Kolon: BEH C₈ 1,7 µm, 2,1mm x 100 mm

Mobil Faz : 50 mM amonyum asetat tampon :Asetonitril (72:28, h/h)

Akış Hızı : 0,3 mL/dakika

Kolon fırın sıcaklığı: 25°C

Dalga Boyu : 260 nm

Enjeksiyon Hacmi: 2 µL

Deneme 3:**Kromatografik Şartlar**

Kullanılan Cihaz: UPLC; UV ve PDA dedektör

Kolon: BEH Fenil 1,7 µm 2,1 x 100 mm

Mobil Faz: 50 mM amonyum asetat tampon:Asetonitril (72:28, h/h)

Akış Hızı: 0,3 mL/dakika

Kolon fırın sıcaklığı: 25°C

Dalga Boyu : 260 nm

Enjeksiyon Hacmi: 2 µL

Deneme 4:**Kromatografik Şartlar**

Kullanılan Cihaz: UPLC; UV ve PDA dedektör

Kolon : Acquity, BEH C₁₈, 100 mm x 2,1 mm, 1,7µ

Mobil faz A: pH 4,6 asetat tamponu

Mobil faz B: Asetonitril

Akış Hızı : 0,2 mL /dk

Dalga Boyu: 260 nm

Loop Hacmi: 5 µL

Enjeksiyon Hacmi: 2 µL

Kolon Sıcaklığı: 25° C

Autosampler Sıcaklığı: 5° C

Gradient Programı:

Zaman (dk.)	Mobil faz A	Mobil faz B
0	72	28
0,3	72	28
1,0	67	33
5,0	67	33
7,0	40	60
9,0	72	28
10,0	72	28

Ön hazırlık çalışmaları sonucunda en iyi sonuçlar Deneme 4 ile elde edilmiştir. Bu çalışmaya ait sonuçlar bölüm 4.1.2' de verilmiştir.

3.4.Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Metot geliştirilmesi tamamlandıktan sonra metodun validasyonu ICH Kılavuzu Q2 (R1)'ye göre yapıldı. [50]

3.4.1. Seçicilik

Seçicilik testi için mobil faz, çözücü, plasebo, standart, numune, Fumarik asit, nPOC-POC-PMPA safsızlık, iPr-POC-PMPA safsızlık, MONO-POC-PMPA safsızlık, MOC-POC-PMPA safsızlık ve 9-Propenil adenine, safsızlık Dimer safsızlık, Mixed safsızlık Dimer safsızlık ve %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş Tenofovir disoproksil fumarat numune çözeltileri enjekte edildi.

3.4.1.1.Çözelti Hazırlığı

Standart, plasebo ve numune çözeltileri hazırlıkları 3.2.3' de anlatıldığı gibidir.

Kabul Kriteri

- Sistem uygunluk çözeltisinde iPr-POC-PMPA ve MOC-POC-PMPA, nPOC-POC-PMPA ve Tenofovir disoproksil fumarat arasındaki rezolüsyon en az 1,5 olmalıdır.
- Standart ve numune çözeltisi kromatogramlarında Tenofovir disoproksil fumarat ve safsızlık piklerinin alıkonma zamanında çözücü ve mobil fazdan gelen herhangi bir pik olmamalıdır.
- Standart, numune ve %100 konsantrasyonda safsızlık eklenmiş numune Çözeltisindeki Tenofovir disoproksil fumarat ve safsızlık piklerinin spektrumları piklerin diğer pikler ile girişim yapmadığını göstermelidir.

Seçicilik testi için mobil faz, çözücü, plasebo, standart, numune, Fumarik asit, nPOC-POC-PMPA safsızlık, iPr-POC-PMPA safsızlık, MONO-POC-PMPA safsızlık, MOC-POC-PMPA safsızlık ve 9-Propilen Adenin, safsızlık Dimersafsızlık, Mixed safsızlık Dimer safsızlık ve % 100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş Tenofovir disoproksil fumarat numune çözeltileri enjekte edilir. Çalışma sonunda elde edilen kromatogramlar ve pik saflık değerleri bölüm 4.1.3 'de verilmiştir.

3.4.2. Doğrusallık

Analitik metodun doğrusallığı, numunedeki etken maddenin belirlenen Konsantrasyon aralığında, çıkan sonuçların doğrusal olması anlamına gelmektedir.

Lineer cevap ilişkisini kanıtlamak için LOQ seviyesi ile spesifikasyonun %240'ı arasında 5 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin konsantrasyon aralığında pik alanları ölçüldü.

Tablo 3-1 Doğrusallık Çalışması için Tenofovir disoproksil fumarat Çözelti Hazırlığı

Tenofovir disoproksil fumarat Standardı			
Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg/mL)
Linearite-1	LOQ	-	-
Linearite-2	% 40	1/25	2,4
Linearite-3	% 50	1/20	3,0
Linearite-4	% 60	1,5/25	3,6
Linearite-5	% 120	3/25	7,2

Tablo 3-2 Doğrusallık Çalışması için nPOC- POC Çözelti Hazırlığı

nPOC- POC- PMPA Standardı			
Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg/mL)
Linearite-1	LOQ	-	-
Linearite -2	% 60	3/25 x 5/20	3,0
Linearite -3	% 75	3/20 x 5/20	3,6
Linearite -4	% 90	3/10 x 3/20	4,5
Linearite -5	% 180	3/10 x 6/20	9,0

Tablo 3-3 Doğrusallık Çalışması için iPr-POC-PMPA Çözelti Hazırlığı

iPr-POC-PMPA Standardı			
Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL /mL)	Konsantrasyon (µg/mL)
Linearite-1	LOQ	-	-
Linearite -2	% 60	3/25 x 5/20	3,0
Linearite -3	% 90	3/10 x 3/20	4,5
Linearite -4	% 150	1,5/10 x 9/20	7,5
Linearite -5	% 240	4/10 x 6/20	12,0

Tablo 3-4 Doğrusallık Çalışması için MOC-POC-PMPA Çözelti Hazırlığı

MOC-POC-PMPA Standardı			
Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL /mL)	Konsantrasyon (µg/mL)
Linearite-1	LOQ	-	-
Linearite -2	% 60	3/25 x 5/20	3,0
Linearite -3	% 90	3/10 x 3/20	4,5
Linearite -4	% 150	1,5/10 x 9/20	7,5
Linearite -5	% 240	3/10 x 6/20	12,0

Tablo 3-5 9- Doğrusallık Çalışması için Propilen Adenin Çözelti Hazırlığı

9-Propilen Adenin Standardı			
Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg/mL)
Linearite-1	LOQ	-	-
Linearite -2	% 20	1,0/100	1,2
Linearite -3	% 50	0,5/20	3,0
Linearite -4	% 100	1,0/20	6,0
Linearite -5	% 120	1,5/25	7,2

Tablo 3-6 Doğrusallık Çalışması için MONO-POC-PMPA Çözelti Hazırlığı

MONO-POC-PMPA Standardı			
Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg/mL)
Linearite-1	LOQ	-	-
Linearite -2	% 10	0,5/100	2,1
Linearite -3	% 50	0,5/20	10,5
Linearite -4	% 100	1,0/20	21,0
Linearite -5	% 240	3,0/25	50,4

Tablo 3-7 Doğrusallık Çalışması için Dimer Çözelti Hazırlığı

Dimer Standardı			
Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg/mL)
Linearite-1	LOQ	-	-
Linearite -2	% 50	1/20 x 5/10	3,0
Linearite -3	% 75	3/20 x 2,5/10	4,5
Linearite -4	% 90	3/20 x 3/10	5,4
Linearite -5	% 120	4/20 x 3/10	7,2

Tablo 3-8 Doğrusallık Çalışması için Mixed Dimer Çözelti Hazırlığı

Mixed Dimer Standardı			
Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg/mL)
Linearite-1	LOQ	-	-
Linearite -2	% 25	1/20 x 5/10	1,3
Linearite -3	% 50	3/20 x 2,5/10	2,5
Linearite -4	% 90	3/20 x 3/10	4,5
Linearite -5	% 120	4/20 x 3/10	7,2

İşlem: Her bir standart çözeltinin derişiminden ardışık 5 şer enjeksiyon yapıldı ve elde edilen alanları ile en küçük kareler yöntemine göre doğrusallık denklemleri hesaplandı. Sonuçlar ve doğrusallık grafikleri bölüm 4.1.4’de verilmiştir.

3.4.3. Düzeltme Faktörü (respons factor (RF))

Düzeltme faktörü, ilgili madde veya bozunma ürününün kromatogramındaki cevabın etkin madde cinsinden miktarlandırılmasını sağlamak için gereklidir.

İşlem

Düzeltme faktörü, etkin madde ve bilinen safsızlıkların lineerlik parametresinin tayininde yapılan lineer regresyon analizi sonucu elde edilen eğrilerin eğimlerinin oranından elde edilir. Düzeltme Faktörü (RF) ve Bağlı Alıkonma Zamanı (RRT) sonuçları bölüm 4.1.5’de verilmiştir. RF hesabı Denklem 3-1 de verilmektedir.

Hesaplama (Denklem 3-1)

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

RF : Düzeltme faktörü

mS : Her bir safsızlık Çözeltilisinin regresyon eğrisinin eğimi

mN : Tenofovir disoproksil fumarat Çözeltilisinin regresyon eğrisinin eğimi

3.4.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Numune içindeki analitin kabul edilebilir bir doğruluk ve kesinlik ile belirlenebildiği (LOQ) ve dedekte edilebildiği (LOD) en düşük miktarlar tespit edildi. LOD seviyesini içeren kalibrasyon eğrisi yardımıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplandı. [50] Hesaplama aşağıdaki formüller yardımıyla yapıldı (Denklem 3-2 ve Denklem 3-3). Sonuçları bölüm 4.1.6’da verilmiştir.

$$\text{Gözlenebilme Sınırı (LOD)} = \frac{3,3.s}{S} \quad (\text{Denklem 3-2})$$

$$\text{Tayin Sınırı (LOQ)} = \frac{10.\sigma}{S} \quad (\text{Denklem 3-3})$$

σ = Standart sapma (interseptin standart sapması)

S = Regresyon denkleminin eğimi

Kabul Kriteri

-LOQ değeri belirlendikten sonra yapılan enjeksiyonlardan elde edilen kromatogramlardaki her bir alanları için bağıl standart sapma (% RSD) değeri maks. % 5,0 olmalıdır.

- LOD seviyesindeki pikler dedekte edilebilir olmalıdır.

3.4.5. Kesinlik

3.4.5.1.Sistem Kesinliği

İşlem

%100 çalışma konsantrasyonunda hazırlanan standart çözeltisinden ardışık 6 enjeksiyon yapıldı. Enjeksiyonlardan elde edilen pik alanları ve aralarındaki bağıl standart sapma değeri ölçüldü.

Kabul Kriteri

Tenofovir disoproksil fumarat standart çözeltisinden ardışık 6 enjeksiyon yapıldı. Elde edilen alanlar ile bağıl standart sapma değeri (%RSD) hesaplandı. Standart Sapma (SD), güven aralığı (%95) ve sistem uygunluk parametreleri (Alıkonma Zamanı, Simetri Faktörü, Teorik Plaka Sayısı) raporlandı. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.1.7.1' de verilmiştir.

3.4.5.2.Tekrarlanabilirlik

Bölüm 3.2' de anlatıldığı şekilde çözücü, plasebo 2 adet standart, 2 adet Tenofovir disoproksil fumarat tablet numunesi ve 6 adet %100 Konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş tablet numune çözeltileri hazırlanarak safsızlık tayini analizi yapıldı.

Kabul Kriteri

-Safsızlık eklenmiş numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon limitleri içinde olmalıdır.

-6 adet safsızlık eklenmiş numunenin analiz sonuçları arasındaki bağıl standart sapma % 4,0'dan büyük olmamalıdır.

Elde edilen sonuçlar bölüm 4.1.7.2' de verilmiştir.

3.4.5.3.Ara Kesinlik

Farklı bir günde, farklı UPLC cihazı kullanarak, farklı seri numaralı kolon ile bölüm 3,2'de anlatıldığı şekilde 2 adet standart, 2 adet numune ve 6 adet %100 Konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş tablet numunesi hazırlanarak analiz yapıldı.

Kabul Kriteri

- Safsızlık eklenmemiş numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon limitleri içinde olmalıdır.

- 6 adet safsızlık eklenmiş numunenin analiz sonuçları arasındaki bağıl standart sapma % 4,0'dan büyük olmamalıdır.

- Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik analizlerinden elde edilen 2 adet numunenin % safsızlık sonuçları arasındaki bağıl standart sapma (% RSD) %4,0'den büyük olmamalıdır.

Elde edilen sonuçlar bölüm 4.1.7.3' de verilmiştir.

3.4.6. Doğruluk ve Geri Kazanım

Metodun doğruluğu Tenofovir disoproksil 245 mg Film tablet numune çözeltisine safsızlıklar ilave edilerek % LOQ, %100, %120 olacak şekilde ve MONO POC PMPA için % 240 seviyelerinde çalışıldı. Her bir seviye için 3'er adet olmak üzere toplam 9 adet numune hazırlandı.

Kabul Kriteri

- Çalışılan her numunenin % geri kazanımı % 95,0 ile % 105,0 arasında olmalıdır.

- Çalışılan 9 adet numunenin geri kazanımları arasındaki bağıl standart sapma (% RSD) % 4,0'den büyük olmamalıdır.

Elde edilen sonuçlar bölüm 4.1.8’ de verilmiştir.

3.4.7. Sağlamlık

Sağlamlığın değerlendirilmesi metot geliştirme aşamasında yapılmalıdır ve çalışılan prosedürün türüne bağlıdır. Yöntem parametrelerindeki kasıtlı varyasyonlara göre bir analizin güvenilirliği gösterilmelidir. Ölçümler koşullardaki değişikliklere duyarlıysa, analitik koşullar kontrol edilmeli veya prosedüre bir önlem ifadesi dahil edilmelidir.

İşlem

Bölüm 3.2.3’ de tarif edildiği şekilde 2 adet standart, 2 adet numune ve 2 adet %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi hazırlanarak ve analiz şartları değiştirilerek safsızlık analizi yapıldı. Metodun yapılan değişikliklere karşı dayanıklılığı test edildi.

Yapılan değişiklikler aşağıdaki gibidir:

Akış Hızı	: 0,15 mL /dak ve 0,25 mL/dak
Tampon pH	: pH 4,5 ve pH 4,7
Dalga Boyu	: 255 nm ve 265 nm

Elde edilen sonuçlar bölüm 4.1.9’de verilmiştir.

3.4.8. Çözelti Stabilitesi

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

Bölüm 3.2.3’de anlatıldığı şekilde, standart ve Tenofovir disoproksil 245 mg Film tablet numunesi çözeltisi hazırlandı. En az 48 saat boyunca belirli zaman aralıklarında saklama şartları sabit tutularak enjekte edildi. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.1.10’da verilmiştir.

Kabul Kriteri:

Çalışma sonucunda % 95,0 - %105,0 olan değerler için çözelti stabil sayılır.

3.4.9. Stres Çalışması

Safsızlık veya bozunma ürünü standartları mevcut değilse ve/veya geliştirilen analitik metodun farklı stress koşullarına maruz kalmış numune matriksinde oluşabilecek safsızlıklar ile etken maddenin spesifik olarak ayrılıp ayrılamadığının ölçüldüğü çalışmalardır. Örnek olarak uygulanabilecek stress koşulları, ışık, ısı, nem, asit / baz hidrolizi ve oksidasyondur.

Bölüm 3.2’ de anlatıldığı şekilde hazırlanan standart çözeltileri hazırlandı ve numune çözeltileri asitik, bazik, hidroliz, sıcaklık ve sıcaklık-nem koşullarında stress koşullarına tabi tutulan numuneler analiz edildi. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.1.11’de verilmiştir.

Kabul Kriteri:

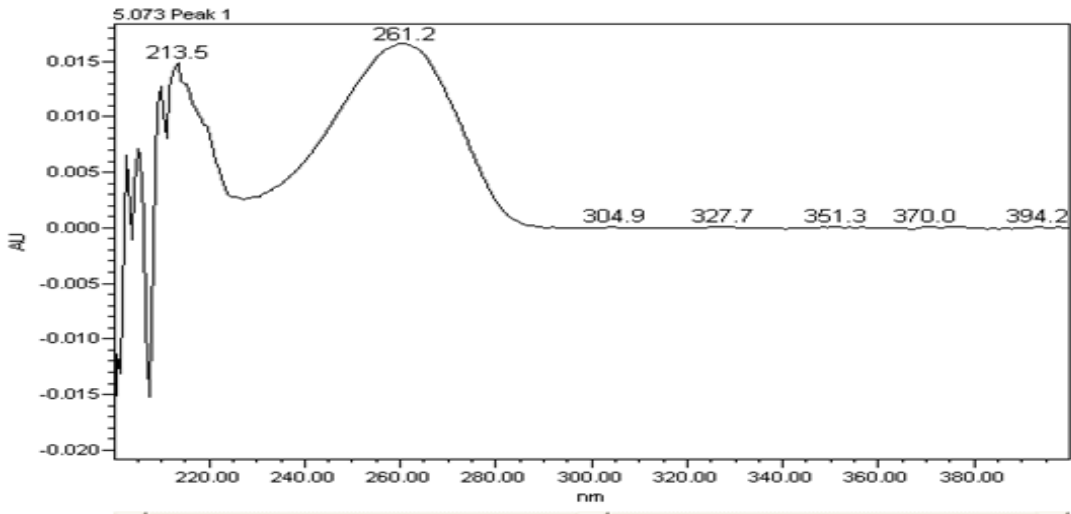
Stres çalışmaları esnasında oluşan yabancı piklerle etken madde ve safsızlık pikleri arasında herhangi bir girişim olmamalıdır.

4. BULGULAR

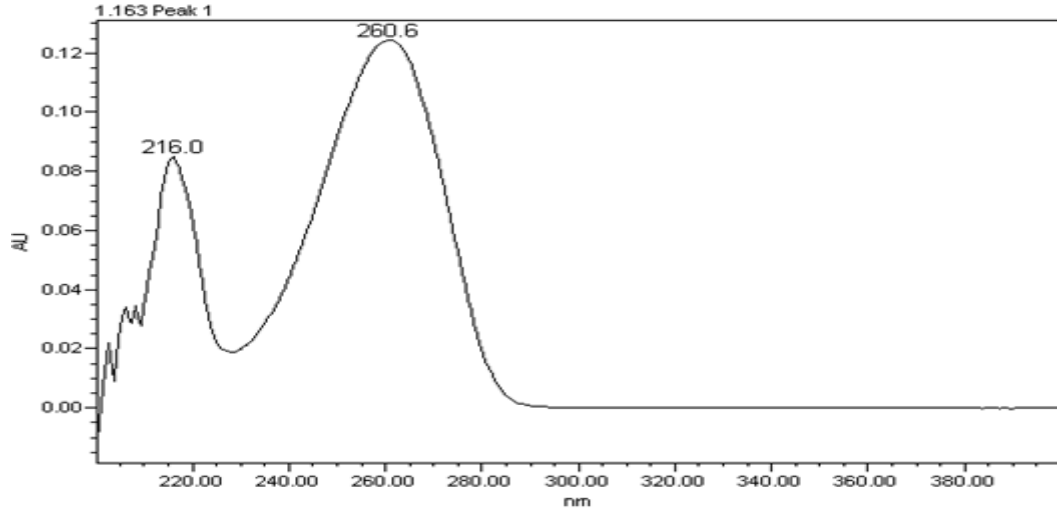
4.1. Analiz yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Bulgular

4.1.1. Dalga Boyu Seçimi Çalışmalarına ait Bulgular

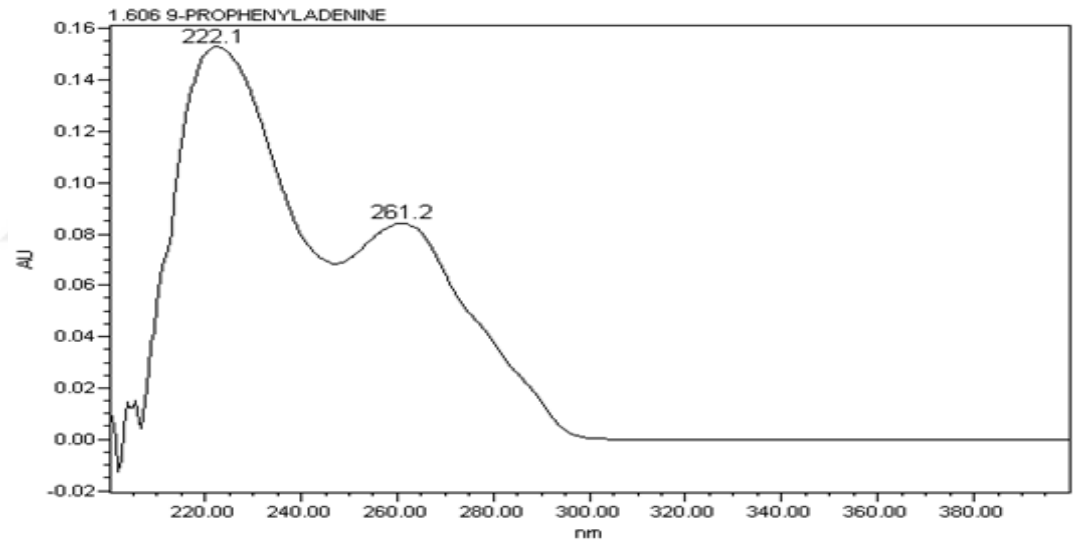
Geliştirilen yöntemin dalga boyu seçimi olarak TDF'nin maksimum absorbans verdiği 260 nm dalga boyu seçilmiştir. Etken madde ve safsızlık standart Çözeltilerinin spektrum sonuçları Şekil 4-1 ve Şekil 4-8 arasında yer almaktadır.



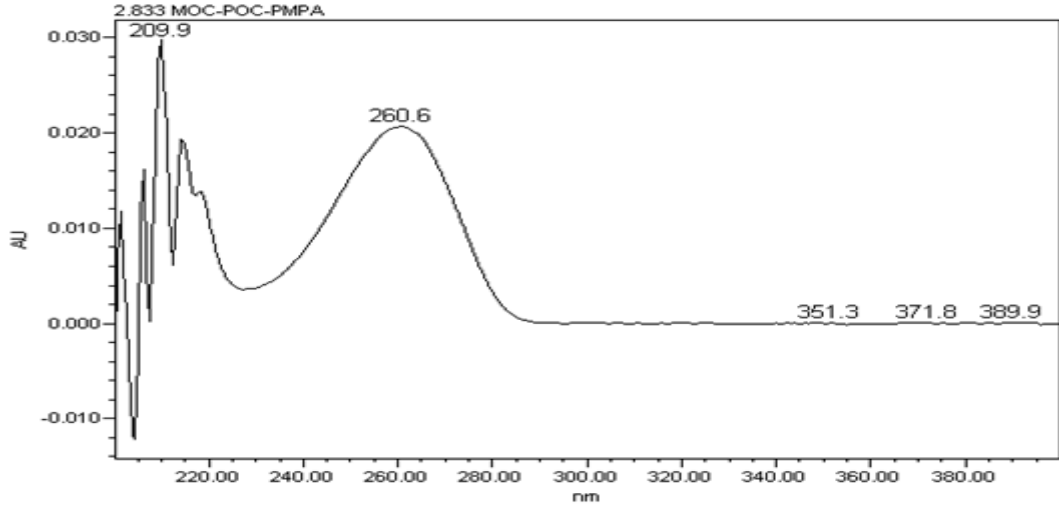
Şekil 4-1: Tenofovir disoproksil fumarat standart Çözeltilisinin spektrumu



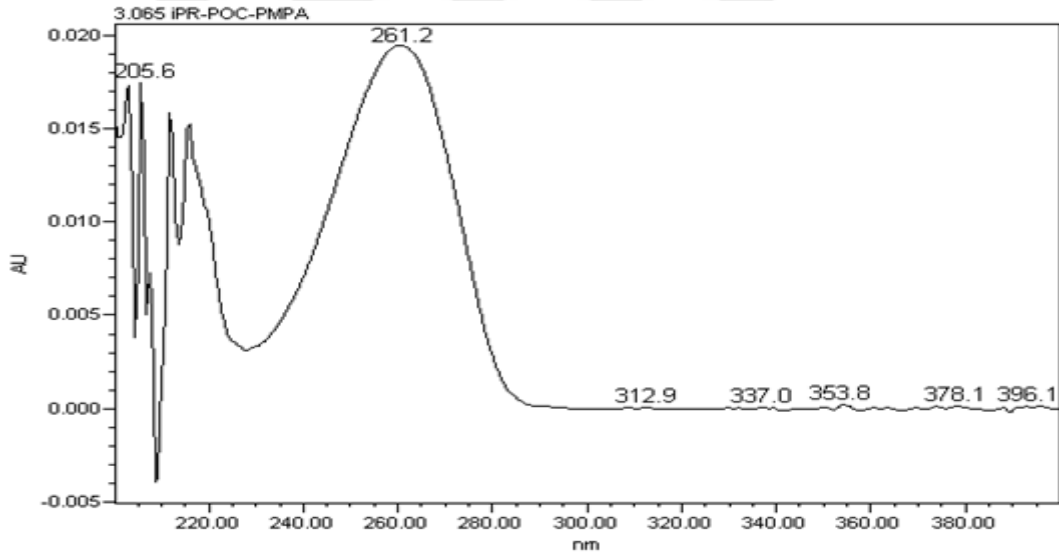
Şekil 4-2: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış MONO-POC-PMPA Safsızlığına ait spektrum



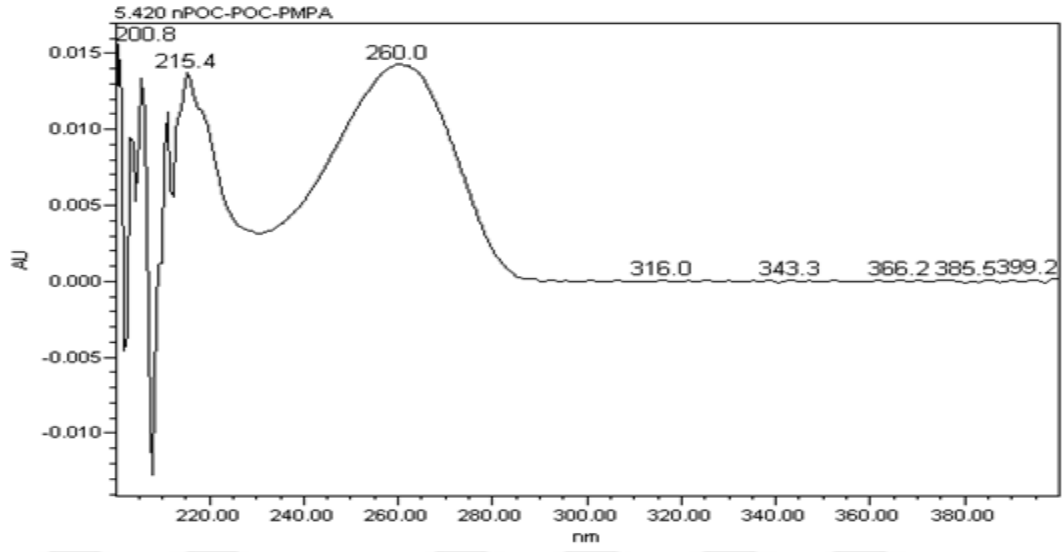
Şekil 4-3: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış 9-Propenyladenin safsızlığına ait spektrum



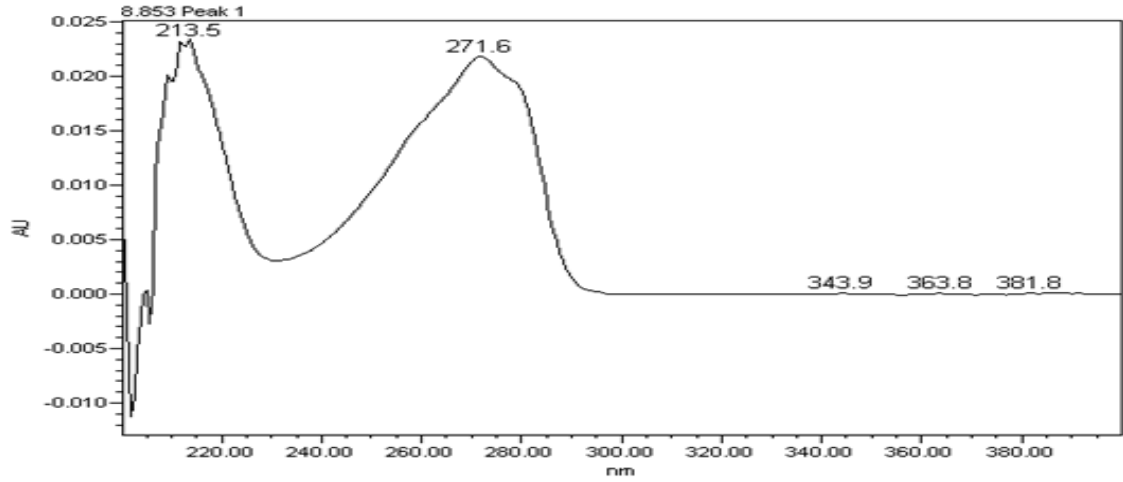
Şekil 4-4: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış MOC-POC-PMPA safsızlığına ait spektrum



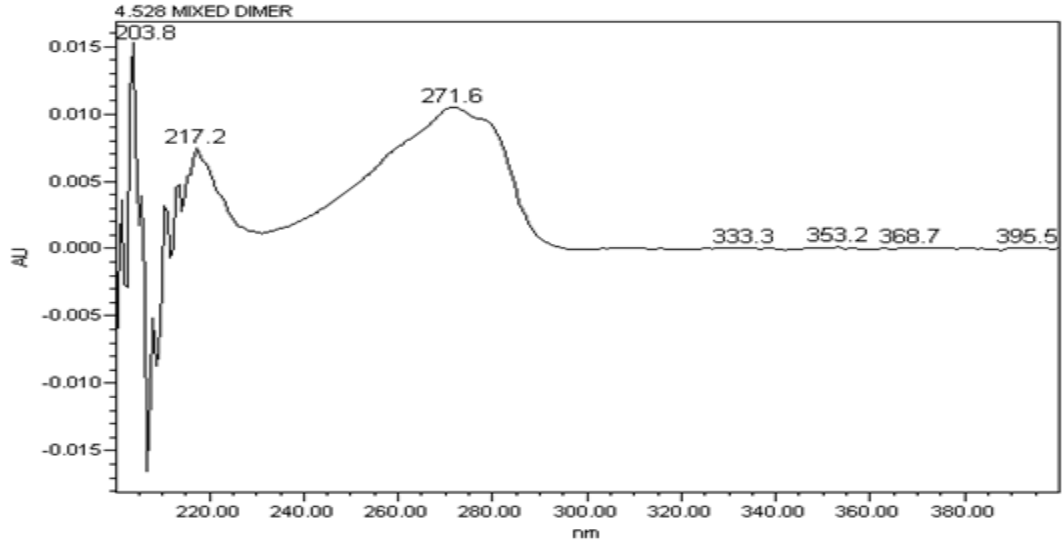
Şekil 4-5: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış iPr-POC-PMPA Safsızlığına ait spektrum



Şekil 4-6: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış nPOC-POC-PMPA Safsızlığına ait spektrum



Şekil 4-7: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış safsızlık Dimer Safsızlığına ait spektrum



Şekil 4-8: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış Mix safsızlık Dimer Safsızlığına ait spektrum

4.1.2. Metot Geliştirmeye ait Bulgular

Geliştirilen yönteme ait elde edilen kromatografik şartlar ve gradient elüsyon profili aşağıda verilmiştir. Bu çalışma sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 4.9’ da bulunmaktadır.

Kromatografik Şartlar

Kullanılan Cihaz: UPLC; UV ve PDA dedektör

Kolon : Acquity, BEH C₁₈, 100 mm x 2,1 mm, 1,7µ

Mobil faz A: pH 4,6 Asetat tamponu

Mobil faz B: Asetonitril

Akış Hızı: 0,2 mL /dk

Dalga Boyu: 260 nm

Loop Hacmi: 5 µL

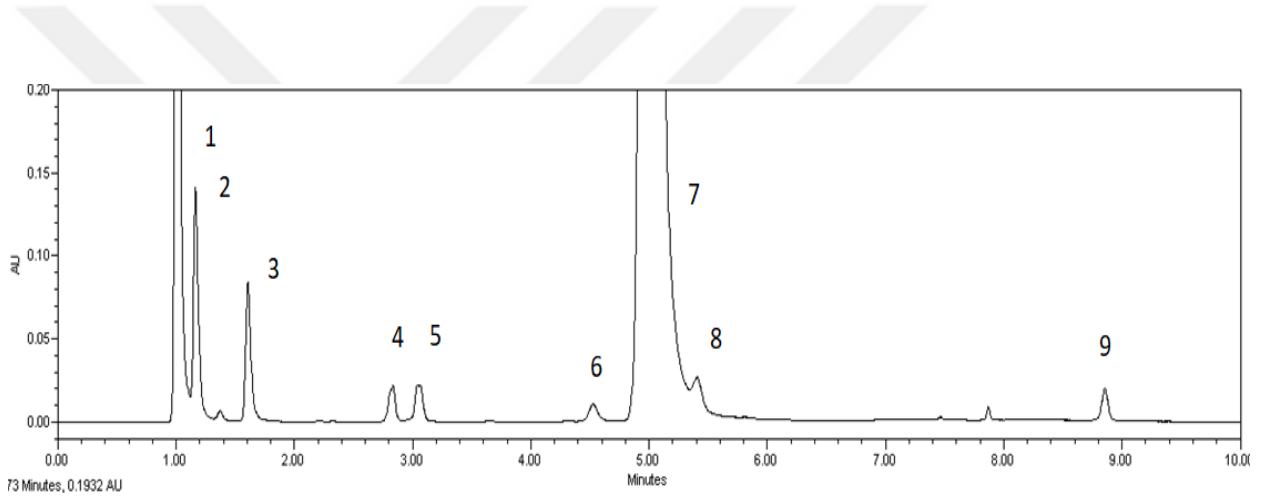
Enjeksiyon Hacmi: 2 µL

Kolon Sıcaklığı: 25° C

Autosampler Sıcaklığı: 5° C

Gradient Programı:

Zaman (dk.)	Mobil faz A	Mobil faz B
0	72	28
0,3	72	28
1,0	67	33
5,0	67	33
7,0	40	60
9,0	72	28
10,0	72	28



1- Fumarik Asit

2-safsızlık A (MONO-POC-PMA)

3-safsızlık K (9-Propenil Adenin)

4-safsızlık C (Moc-POC PMPA)

5-safsızlık D (iPr-POC PMPA)

6-safsızlık I (Mix Dimer)

7-Tenofovir disoprosil

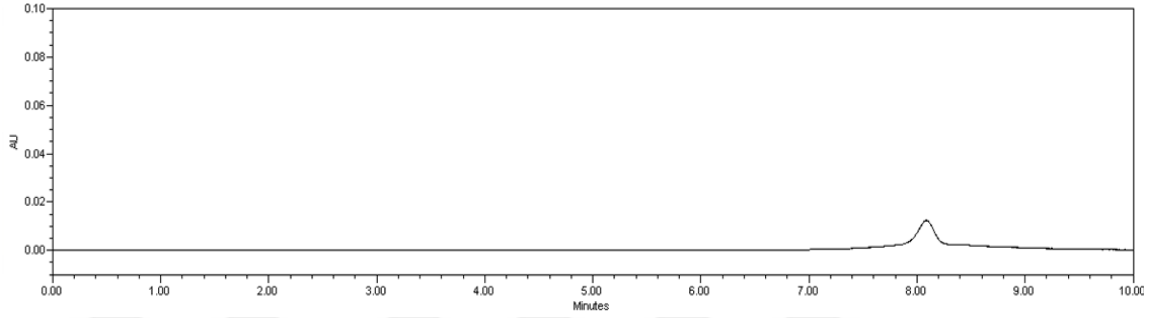
8-safsızlık H (nPOC-POC PMPA)

9-safsızlık J (Dimer)

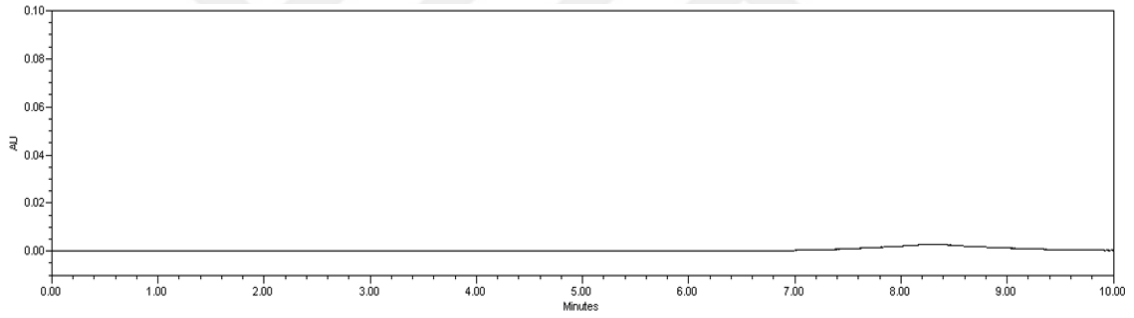
Şekil 4-9: Deneme 4 ile elde edilen UPLC kromatogramı (C_{Tenofovir disoproksil fumarat}: 3 mg/mL)

4.1.3. Seçicilik

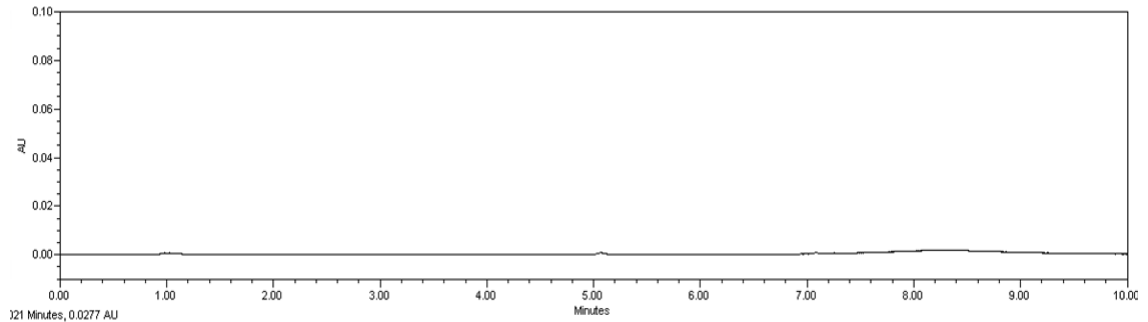
Seçicilik enjeksiyonlarından elde edilen kromatogramlarda, ana pik ile herhangi bir pikin girişimi olmadığı belirlenmiştir. Çözeltilere ait kromatogramlar Şekil 4-10 ile Şekil 4-23 'de verilmiştir. Seçicilik parametrelerine Tablo1-Tablo5'de verilmiştir.



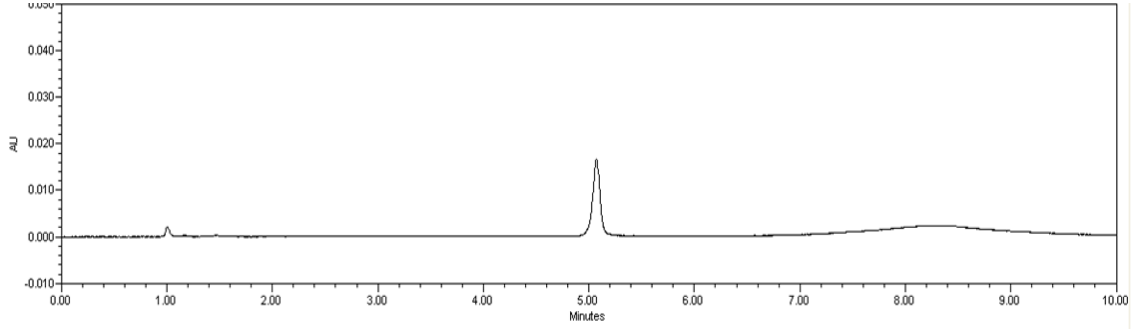
Şekil 4-10: Çözücüye ait kromatogram



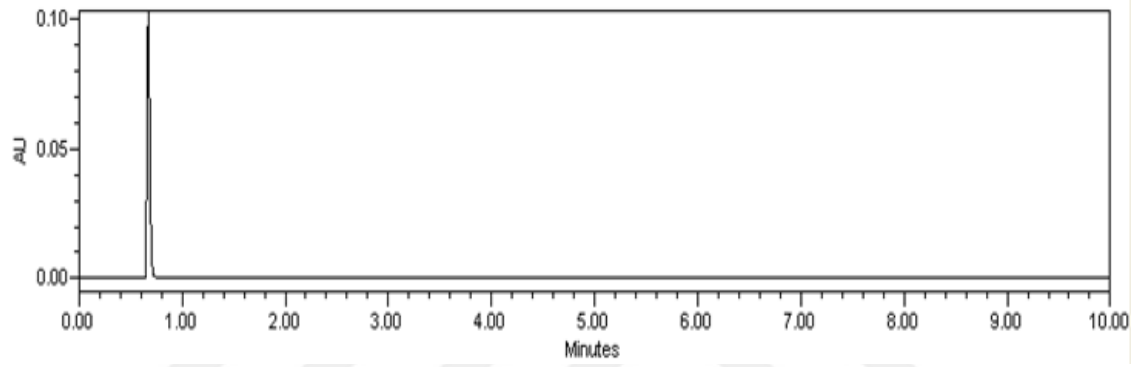
Şekil 4-11: Mobil faz A ait kromatogram



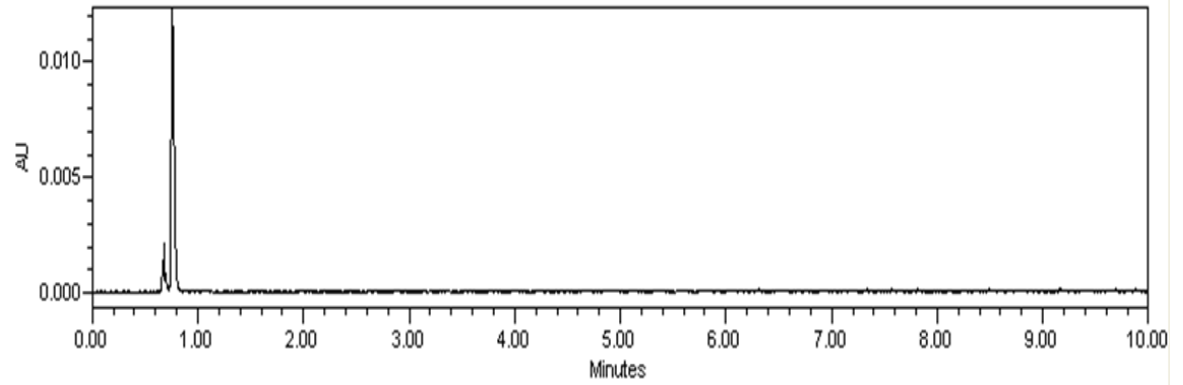
Şekil 4-12: Plaseboya ait kromatogram



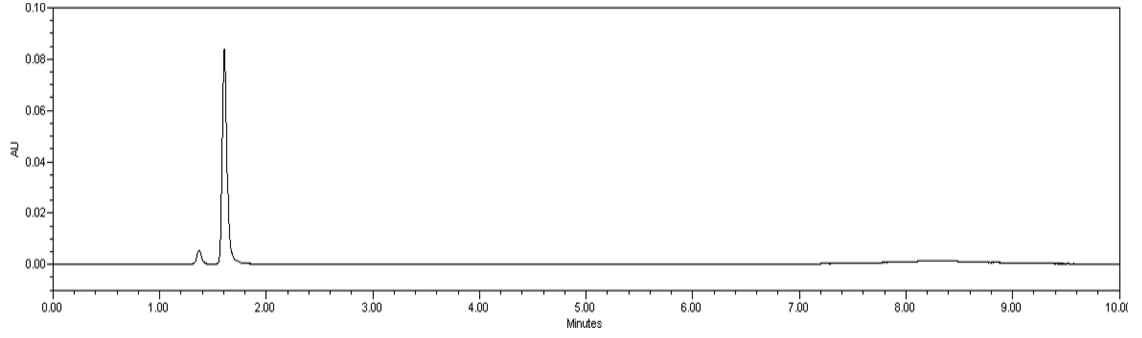
Şekil 4-13: Standarta ait kromatogram



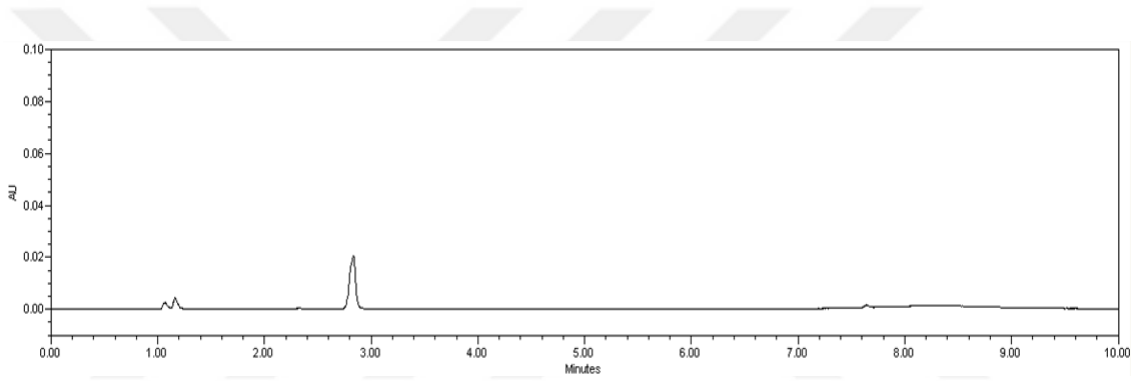
Şekil 4-14: Fumarik asite ait kromatogram



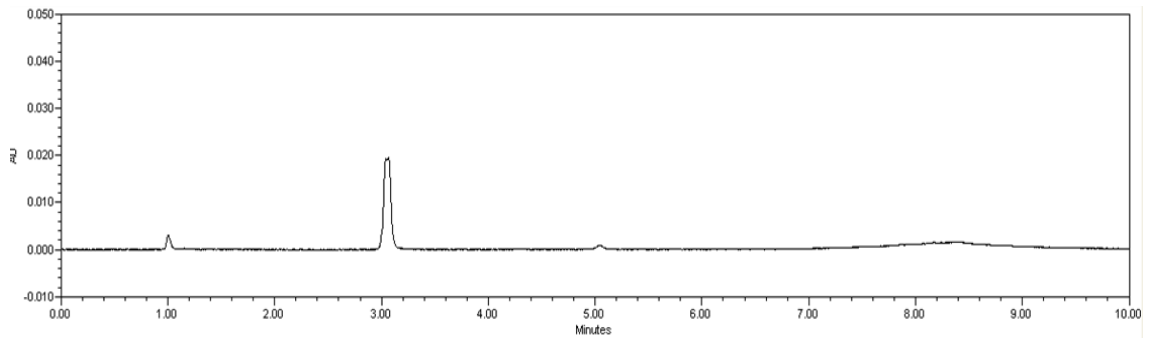
Şekil 4-15: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış MONO-POC-PMPA Safsızlığına ait kromatogram



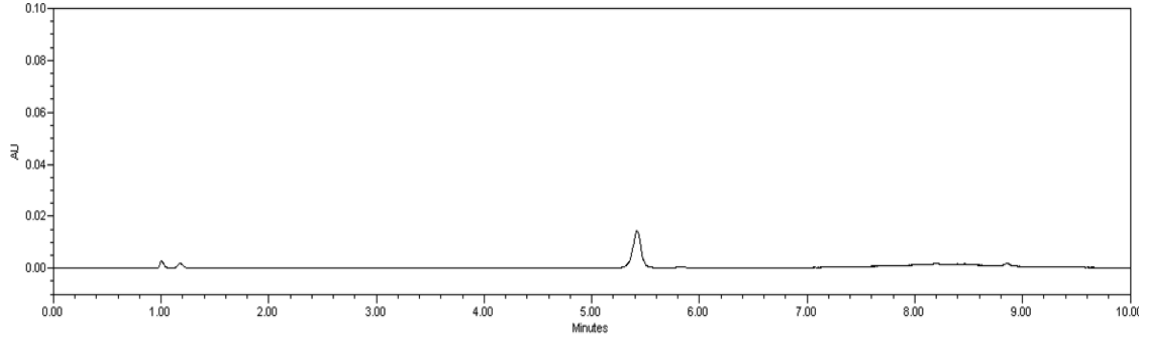
Şekil 4-16: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış 9-Propenyladenin Safsızlığına ait kromatogram



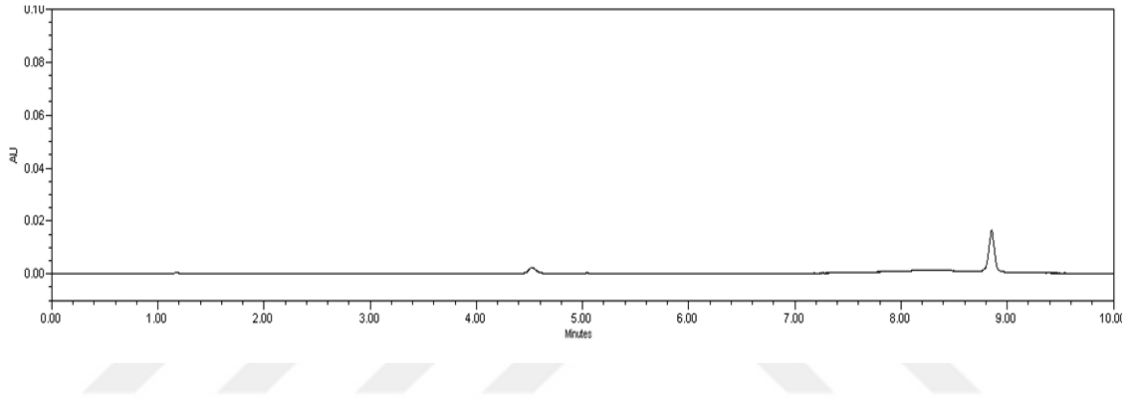
Şekil 4-17: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış MOC-POC-PMPA Safsızlığına ait kromatogram



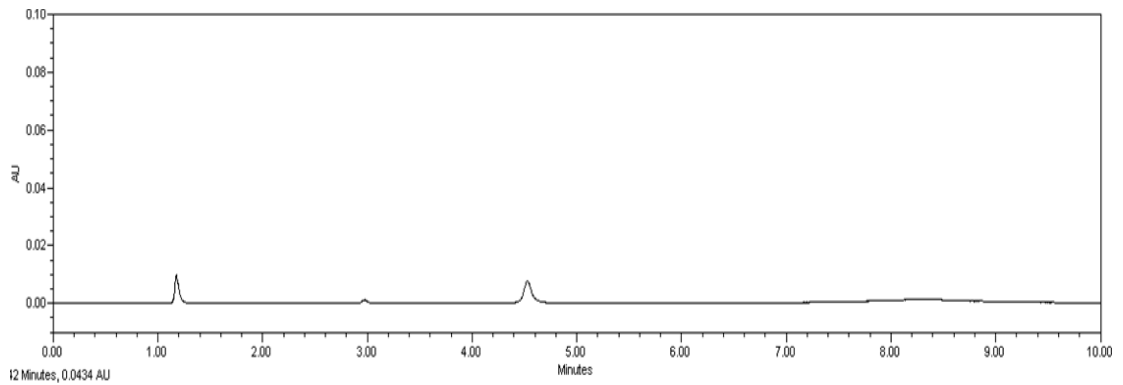
Şekil 4-18: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış iPr-POC-PMPA Safsızlığına ait kromatogram



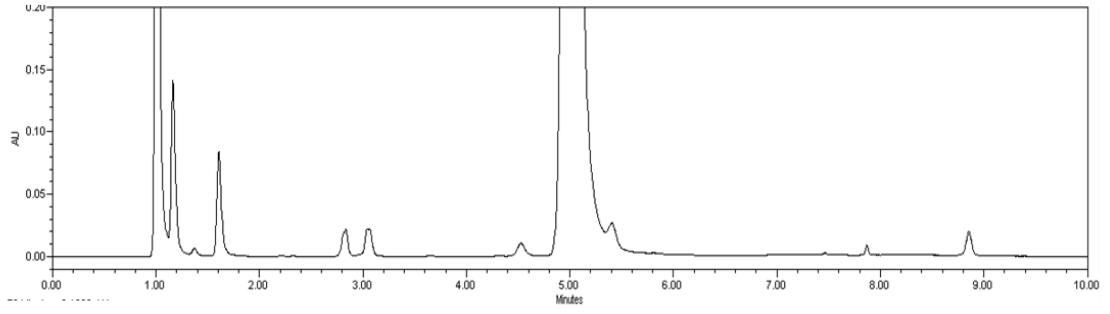
Şekil 4-19: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış nPOC-POC-PMPA Safsızlığına ait kromatogram



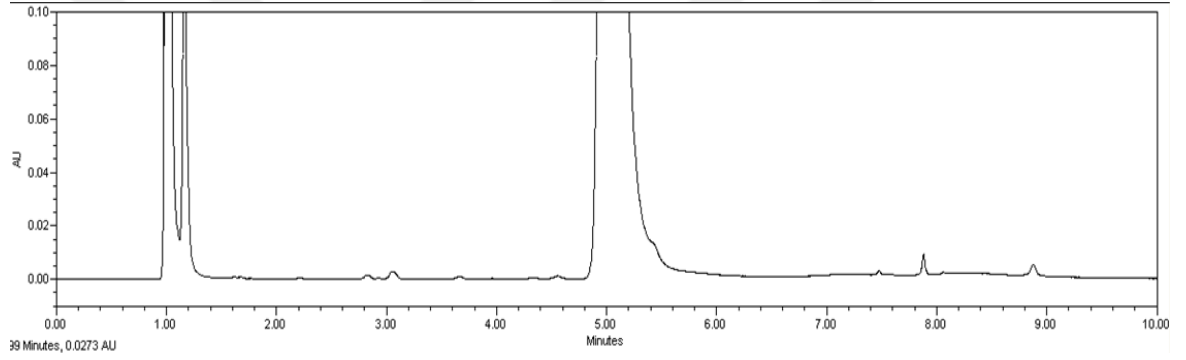
Şekil 4-20: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış Dimer Safsızlığına ait kromatogram



Şekil 4-21: % 100 konsatrasyonunda hazırlanmış Mix Dimer Safsızlığına ait kromatogram



Şekil 4-22: % 100 konsatrasyonunda nPOC-POC-PMPA, iPr-POC-PMPA, MOC-POC-PMPA, MONO-POC-PMPA, 9-Propenyladenin, safsızlık Dimer ve Mixed Dimersafsızlık katılmış numuneye ait kromatogram



Şekil 4-23: Numuneye ait kromatogram

Tablo 4-1: Çözücü Seçicilik sonuçları

Çözelti Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Purity Angle	Purity Threshold	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı	Rezolüsyon
çözücü	TE	-	-	-	-	-	-
mobil faz	8,085	-	-	-	-	-	-
plasebo	TE	-	-	-	-	-	-

Tablo 4-2: Sistem Uygunluğu Seçicilik sonuçları

Çözelti Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Purity Angle	Purity Threshold	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı	Rezolüsyon
Sistem Uygunluğu							
MOC-POC- POC-PMPA	2,835	67180	-	-	-	-	-
iPR-POC-PMPA	3,043	98050	-	-	-	-	1,82
TDF	5,009	25251344	-	-	-	-	2,76
nPOC-POC- PMPA	5,412	40025	-	-	-	-	2,37
nPOC-POC- PMPA	5,421	14303	0,338	0,755	0,90	25370	-
DIMER	8,853	57935	0,242	0,476	0,93	148628	-

Tablo 4-3: Standart ve numune Seçicilik sonuçları

Çözeltili Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Purity Angle	Purity Threshold	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı	Rezolüsyon
Standart							
TDF	5,073	81556	0,255	0,515	0,91	28178	-
Numune							
Fumarik Asit	1,006	2603962	0,049	0,333	1,32	3878	-
MONO-POC- PMPA	1,163	303328	0,180	0,385	1,37	4745	2,38
9- Propilenadenin	1,610	746	5,184	42,913	0,97	11102	6,96
Bilinmeyen	1,675	744	-	-	-	-	1,12
Bilinmeyen	2,213	1597	-	-	-	-	8,61
MOC-POC- PMPA	2,835	5541	2,493	16,259	0,83	11062	7,06
iPR-POC-PMPA	3,049	11939	1,035	8,657	1,27	9792	1,86
Bilinmeyen	3,661	3726	-	-	-	-	5,46
MIXED DIMER	4,554	5151	3,081	19,244	1,23	21338	7,90
TDF	5,019	25411128	2,273	5,665	1,27	8267	2,70
nPOC-POC- PMPA	5,439	5079	1,844	13,837	1,12	64142	2,74
Bilinmeyen	7,477	3203	-	-	-	-	28,93
Bilinmeyen	7,880	15786	-	-	-	-	7,63
Bilinmeyen	8,059	1007	-	-	-	-	3,78
DIMER	8,878	15161	0,929	5,715	0,97	142699	11,82

Tablo 4-4: Spiked numune seçicilik sonuçları

Çözelti Adı	Altkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Purity Angle	Purity Threshold	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı	Rezolüsyon
Spiked Numune							
Fumarik Asit	1,006	2643440	5,801	7,001	1,32	3911	-
MONO-POC- PMPA	1,164	341912	22,623	49,088	1,41	4335	2,34
9- Propilenadenin	1,607	266403	34,562	90,000	1,41	6808	3,07
MOC- POC_PMPA	2,834	81562	71,449	90,000	0,83	11338	5,65
iPR-POC-PMPA	3,066	89518	68,726	90,000	0,87	10119	2,04
MIXED DIMER	4,525	57790	55,622	90,000	1,17	19392	8,01
TDF	4,974	25182427	7,466	7,688	1,63	8082	2,57
nPOC-POC- PMPA	5,411	53935	65,454	90,000	1,18	31670	2,55
DIMER	8,855	72729	53,818	90,000	0,95	147702	13,96

Tablo 4-5: Safsızlık Standartları Seçicilik Sonuçları

Çözelti Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Purity Angle	Purity Threshold	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
Fumarik Asit	1,006	2624596	0,03	0,305	1,38	3850
MONO-POC- PMPA	1,162	346891	0,163	0,249	1,50	4416
9- Propilenadenin	1,606	265849	0,058	0,350	1,35	6663
MOC- POC_PMPA	2,833	83533	0,575	1,608	0,88	11109
iPR-POC-PMPA	3,065	92211	0,211	0,458	0,89	9557
MIXED DIMER	4,528	41185	0,509	0,824	1,14	19335
nPOC-POC- PMPA	5,421	14303	0,338	0,755	0,90	25370
DIMER	8,853	57935	0,242	0,476	0,93	148628

4.1.4. Doğrusallık

Tenofovir disoproksil fumarat, nPOC- POC- PMPA, iPr-POC-PMPA, MOC- POC-PMPA, Dimer, Mixed Dimer, MONO-POC-PMPA ve 9-Propilen Adeniniğin LOQ ile % 240'ı arasında farklı konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltileri bölüm 3,7,2'de anlatıldığı gibi hazırlanarak çalışıldı. Doğrusallık çalışmalarının verileri Tablo 4-6 ve Tablo 4-13 arasında verilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak Şekil 24 ve Şekil 4-31 arasında doğrusallık grafikleri oluşturulmuştur.

Tablo 4-6: Tenofovir disoproksil fumarat doğrusallık çalışmasının verileri

Tenofovir disoproksil fumarat Standardı					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	RSD
LOQ (%11)	0,6397	9037	9041	12,5	0,14
		9060			
		9044			
		9026			
		9037			
% 40	2,468	41993	41933	234,8	0,56
		41655			
		42129			
		41719			
		42169			
% 50	2,9658	50193	50359	166,1	0,33
		50499			
		50363			
		50193			
		50548			
% 60	3,5793	62139	62456	329,6	0,53
		62366			
		62326			
		63012			
		62436			
%120	7,1315	104427	104414	475,3	0,46
		104280			
		103841			
		104364			
		105159			

Tablo 4-7:Safsızlık nPOC-POC-PMPA Doğrusallık Çalışmasının Verileri

nPOC- POC- PMPA					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL	Alan	Ortalama Alan	SD	RSD
LOQ (% 5)	0,251	2647	2614	46,3	1,77
		2658			
		2543			
		2595			
		2627			
% 60	2,907	34739	34672	249,8	0,72
		34500			
		34930			
		34333			
		34858			
% 75	3,607	43899	43458	319,4	0,73
		43260			
		43538			
		43056			
		43538			
% 90	4,630	50816	52113	909,2	1,74
		52842			
		52392			
		51559			
		52955			
%180	10,897	128682	128954	444,5	0,34
		129652			
		128528			
		129108			
		128800			

Tablo 4-8: Safsızlık iPr-POC-PMPA Doğrusallık Çalışmasının Verileri

iPr-POC-PMPA Standardı					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	RSD
LOQ (% 19)	0,992	13615	13615	9,7	0,07
		13629			
		13615			
		13601			
		13615			
% 60	3,161	46672	46693	34,0	0,07
		46687			
		46658			
		46702			
		46746			
% 90	4,739	70081	70069	28,4	0,04
		70066			
		70051			
		70036			
		70110			
% 150	7,111	105549	105549	23,5	0,02
		105564			
		105534			
		105519			
		105579			
% 240	11,523	168723	168714	20,9	0,01
		168692			
		168739			
		168723			
		168692			

Tablo 4-9: MOC-POC-PMPA doğrusallık Çalışmasının verileri

MOC-POC-PMPA Standardı					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL	Alan	Ortalama Alan	SD	RSD
LOQ (% 16)	0,873	11050	10940	119,3	1,09
		11013			
		10875			
		10762			
		11000			
% 60	3,244	41975	42304	392,0	0,93
		42223			
		42106			
		42979			
		42236			
% 90	4,822	63125	62771	493,6	0,79
		61940			
		62709			
		62969			
		63112			
%150	7,266	90852	91958	1024,8	1,11
		92244			
		93497			
		91966			
		91232			
% 240	11,944	145159	144006	1933,9	1,34
		143909			
		145251			
		140685			
		145027			

Tablo 4-10: Safsızlık 9-Propilen Adenin Doğrusallık Çalışmasının Verileri

9-Propilen AdeninStandardı					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	RSD
LOQ (% 2)	0,133	4496	4510	18,4	0,41
		4526			
		4516			
		4486			
		4526			
% 20	1,207	47146	47376	211,9	0,45
		47593			
		47193			
		47358			
		47590			
% 50	3,086	118178	118298	198,8	0,17
		118370			
		118111			
		118221			
		118610			
% 100	6,034	234087	234552	1493,4	0,64
		233729			
		237212			
		233803			
		233928			
% 120	7,221	283651	283951	313,5	0,11
		284005			
		284049			
		283651			
		284399			

Tablo 4-11 : Safsızlık MONO-POC-PMPA Doğrusallık Çalışmasının Verileri

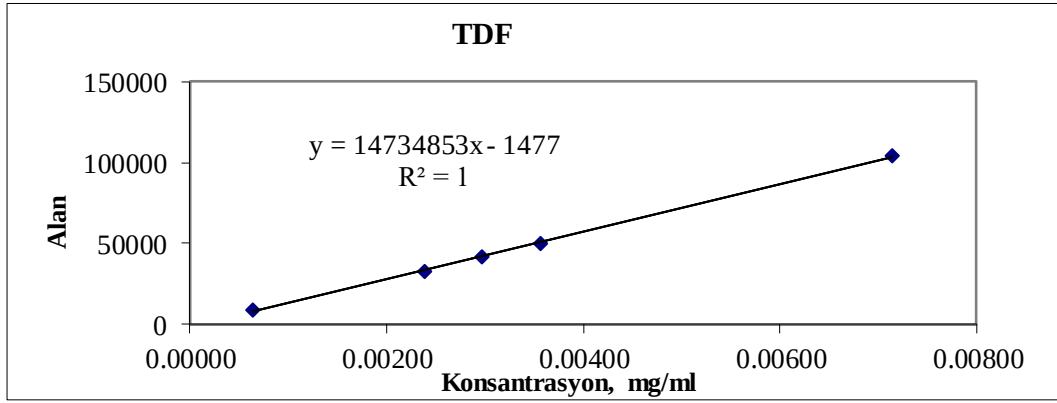
MONO-POC-PMPA Standardı					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	RSD
LOQ (% 5)	0,986	17900	17966	100,3	0,56
		18064			
		17827			
		17992			
		18046			
%10	2,132	28599	28934	421,3	1,46
		29262			
		28805			
		28520			
		29484			
% 50	10,458	148315	147934	1304,3	0,88
		146845			
		149930			
		147863			
		146716			
% 100	21,071	292766	294049	858,3	0,29
		294305			
		295147			
		294127			
		293900			
% 240	51,003	800263	808394	8308,6	1,03
		798551			
		812990			
		813957			
		816208			

Tablo 4-12: Dimer Doğrusallık Çalışmasının Verileri

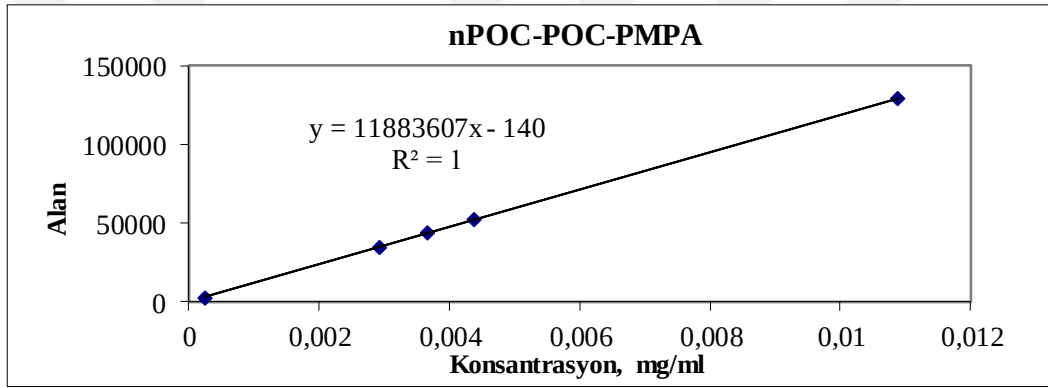
DimerStandardı					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	RSD
LOQ (% 24)	1,426	15144	14957	107,6	0,72
		14871			
		14913			
		14944			
		14913			
% 50	2,910	32324	32090	451,0	1,41
		31287			
		32313			
		32214			
		32313			
% 75	4,375	48135	47901	513,0	1,07
		48168			
		46986			
		48146			
		48070			
% 90	5,275	57605	57607	51,5	0,09
		57561			
		57605			
		57572			
		57692			
% 120	7,340	74067	73900	469,0	0,63
		74087			
		73080			
		73997			
		74268			

Tablo 4-13: Mixed Dimer Doğrusallık Çalışmasının Verileri

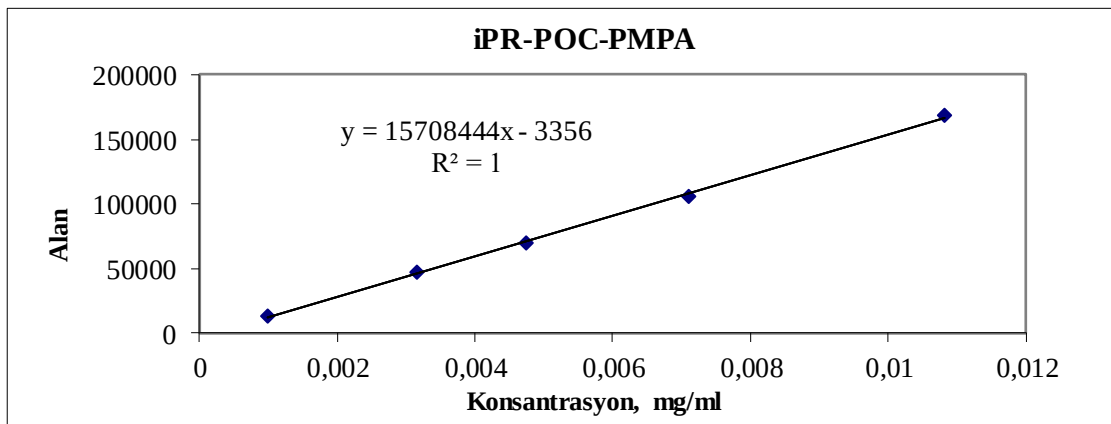
Mixed Dimer Standardı					
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	Ortalama Alan	SD	RSD
LOQ (% 11)	0,569	6005	6031	82,0	1,36
		5919			
		6006			
		6111			
		6113			
% 25	1,309	16182	16307	123,3	0,76
		16431			
		16435			
		16192			
		16294			
% 50	2,610	32726	32878	139,3	0,42
		32990			
		32978			
		32971			
		32726			
% 90	4,719	58984	58523	284,1	0,49
		58562			
		58441			
		58227			
		58401			
% 120	7,180	86453	86448	27,7	0,03
		86405			
		86477			
		86441			
		86465			



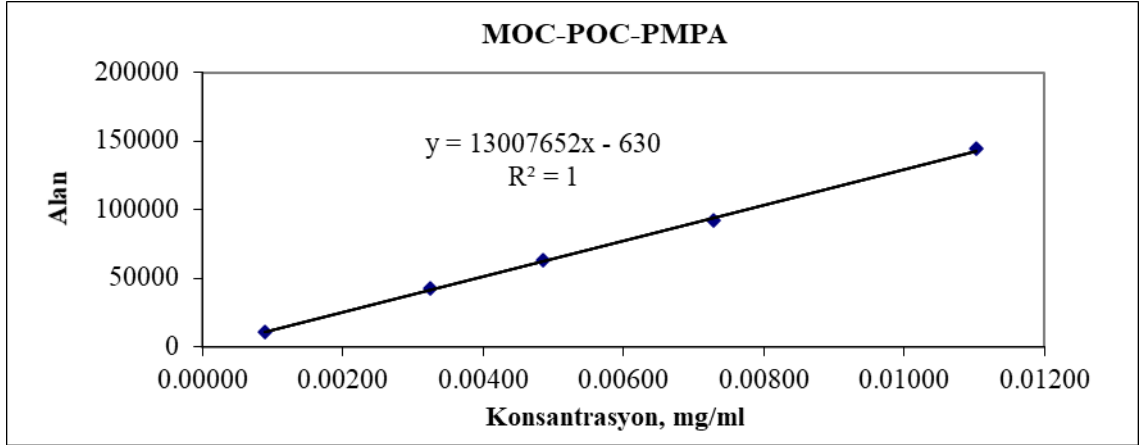
Şekil 4-24: Tenofovir disoproksil fumarat doğrusallık grafiği



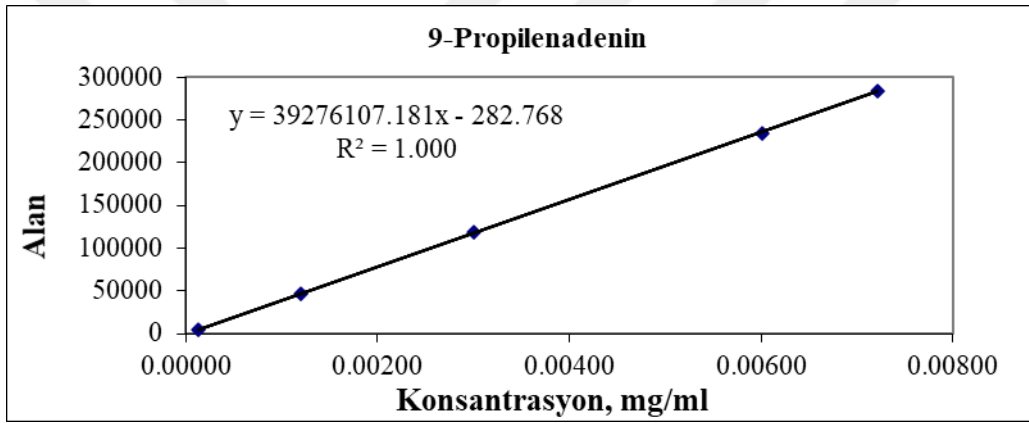
Şekil 4-25: nPOC- POC- PMPA Standardı doğrusallık grafiği



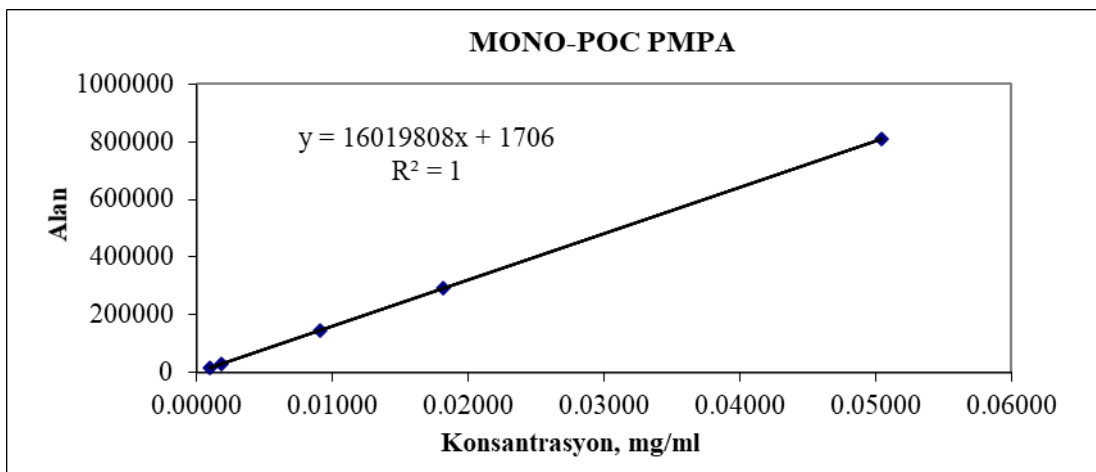
Şekil 4-26: iPR-POC-PMPA Standardı doğrusallık grafiği



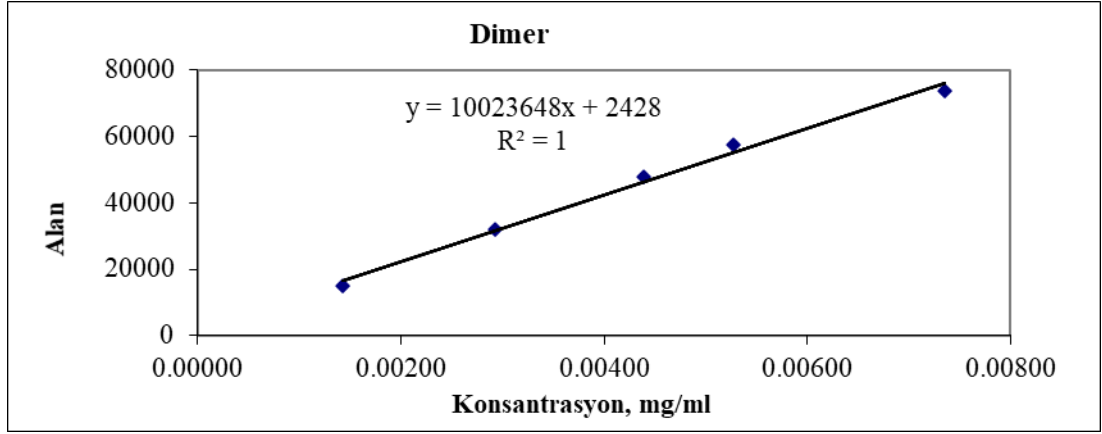
Şekil 4-27: MOC-POC-PMPA Standardı doğrusallık grafiği



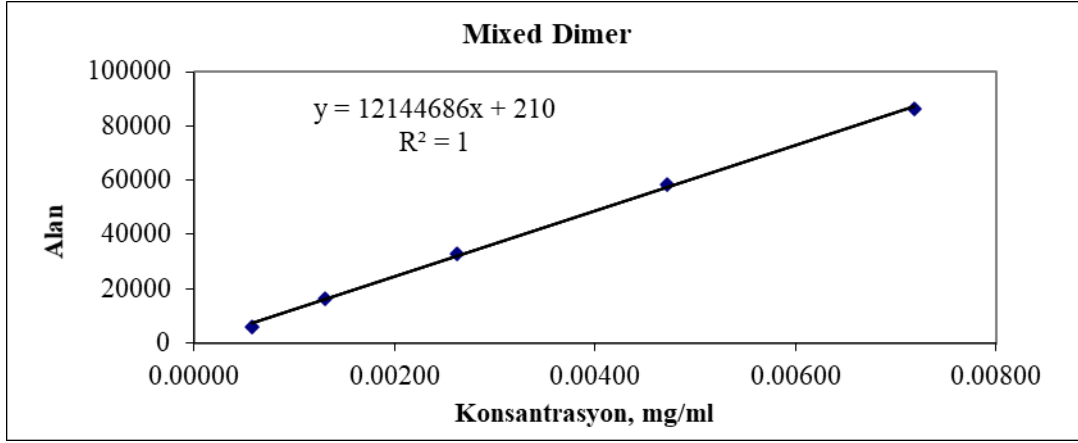
Şekil 4-28: 9-Propilen AdeninStandardı doğrusallık grafiği



Şekil 4-29: MONO-POC-PMPA Standardı doğrusallık grafiği



Şekil 4-30: Safsızlık Dimer Standardı doğrusallık grafiği



Şekil 4-31: Mixed Dimer Safsızlık standardı doğrusallık grafiği

Doğrusallık parametresinde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen pik alanları ve ilgili konsantrasyon değerleri $y = mx + b$ eşitliği ile bulunur. Tenofovir disoproksil fumarat için ve tüm bilinen safsızlıklar için korelasyon katsayısı 0,99 değerinin üstünde olduğu görülmüştür. % Y-kesim noktası değeri ise %2'den küçük bulunmuştur. Tenofovir disoproksil fumarat için ve safsızlıklar için 0,13-51 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları aralığında, dedektör yanıtı ile konsantrasyonlar arasında doğrusal bir ilişki olduğu kanıtlanmıştır.

y : Alan

a : eğim

b : kesme noktası

x : Konsantrasyon, mg/mL

4.1.5. Düzeltme Faktörü (RF)

Düzeltme faktörü, ilgili madde veya bozunma ürününün kromatogramındaki cevabın etkin madde cinsinden miktarlandırılmasını sağlamak için doğrusallık parametresinin tayininde yapılan lineer regresyon analizi sonucu elde edilen eğrilerin eğimlerinin oranından elde edildi. Düzeltme faktörü ve bağıl alıkonma zamanı verileri Tablo 4-14’de verilmiştir.

Tablo 4-14: Düzeltme Faktörü (RF) ve Bağıl alıkonma zamanı (RRT)

Madde Adı	Eğim	RF	RRT
Tenofovir disoproksil fumarat	14537798	1,00	1,00
MONO-POC PMPA	16052768	0,91	0,23
9-Propilen Adenin	39246354	0,37	0,32
MOC-POC PMPA	12883227	1,13	0,56
iPR-POC PMPA	15615428	0,93	0,61
MIXED DIMER	12099929	1,20	0,92
nPOC-POC PMPA	11928680	1,22	1,08
DIMER	10128190	1,44	1,72

4.1.6. Gözlenebilme ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

Numune içindeki analitin kabul edilebilir bir doğruluk ve kesinlik ile belirlenebildiği (LOQ) ve dedekte edilebildiği (LOD) en düşük miktarlar tespit edildi. LOD seviyesini içeren determinasyon eğrisi yardımıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

-LOQ seviyesi belirlendikten sonra bu seviyede ardışık 6 enjeksiyon yapıldı Alanlar kaydedilerek bağıl standart sapma hesaplandı.

-LOD seviyesi belirlendikten sonra bu seviyede ardışık 2 enjeksiyon yapıldı. Alanlar kaydedilerek bağıl standart sapma hesaplandı.

Sonuçlar, Tablo 4-15 - Tablo 4-30 arasında verilmiştir.

Tablo 4-15: Tenofovir disoproxil fumarat için LOQ sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOQ (%)	Pik Alanı
LOQ -1	0,64	0,021	8996
LOQ -2			9086
LOQ -3			9137
LOQ -4			9149
LOQ -5			9014
LOQ -6			9047
ORTALAMA			9072
% RSD			0,70

Tablo 4-16: Tenofovir disoproksil fumarat için LOD sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon(μg/mL)	LOD (%)	Pik Alanı
LOD-1	0,21	0,007	2685
LOD-2			2594
ORTALAMA			2640

Tablo 4-17: nPOC-POC-PMPA için LOQ sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOQ (%)	Pik Alanı
LOQ -1	0,25	0,008	2624
LOQ -2			2604
LOQ -3			2735
LOQ -4			2578
LOQ -5			2655
LOQ -6			2640
ORTALAMA			2639
% RSD			2,05

Tablo 4-18: nPOC-POC-PMPA için LOD sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOD (%)	Pik Alanı
LOD-1	0,083	0,003	891
LOD-2			980
ORTALAMA			936

Tablo 4-19: iPR-POC-PMPA İçin LOQ sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOQ (%)	Pik Alanı
LOQ -1	0,99	0,033	13585
LOQ -2			13644
LOQ -3			13565
LOQ -4			13561
LOQ -5			13443
LOQ -6			13483
ORTALAMA			13547
% RSD			0,54

Tablo 4-20: iPR-POC-PMPA İçin LOD sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOD (%)	Pik Alanı
LOD-1	0,36	0,012	4530
LOD-2			4477
ORTALAMA			4504

Tablo 4-21: MOC-POC-PMPA İçin LOQ sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOQ (%)	Pik Alanı
LOQ -1	0,88	0,029	10930
LOQ -2			10949
LOQ -3			10933
LOQ -4			10903
LOQ -5			10797
LOQ -6			10843
ORTALAMA			10893
% RSD			0,55

Tablo 4-22: MOC-POC-PMPA İçin LOD sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOD (%)	Pik Alanı
LOD-1	0,29	0,010	4799
LOD-2			4733
ORTALAMA			4771

Tablo 4-23: 9-Propilen Adenin İçin LOQ sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOQ (%)	Pik Alanı
LOQ -1	0,13	0,004	4539
LOQ -2			4480
LOQ -3			4600
LOQ -4			4507
LOQ -5			4544
LOQ -6			4531
ORTALAMA			4534
% RSD			0,89

Tablo 4-24: 9-Propilen Adenin İçin LOD sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOD (%)	Pik Alanı
LOD-1	0,045	0,002	1487
LOD-2			1571
ORTALAMA			1529

Tablo 4-25: MONO-POC-PMPA İçin LOQ sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOQ (%)	Pik Alanı
LOQ -1			17939
LOQ -2			17993
LOQ -3			17920
LOQ -4	0,99	0,033	18090
LOQ -5			17970
LOQ -6			18003
ORTALAMA			17986
% RSD			0,33

Tablo 4-26: MONO-POC-PMPA İçin LOD sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOD (%)	Pik Alanı
LOD-1			5902
LOD-2	0,336	0,011	5935
ORTALAMA			5919

Tablo 4-27: Dimer İçin LOQ sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOQ (%)	Pik Alanı
LOQ -1	1,4	0,047	14920
LOQ -2			14993
LOQ -3			14853
LOQ -4			14997
LOQ -5			15001
LOQ -6			14967
ORTALAMA			14955
% RSD			0,39

Tablo 4-28: Dimer İçin LOD sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOD (%)	Pik Alanı
LOD-1	0,47	0,016	4886
LOD-2			4885
ORTALAMA			4886

Tablo 4-29: Mixed Dimer İçin LOQ sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOQ (%)	Pik Alanı
LOQ -1	0,58	0,019	5964
LOQ -2			6098
LOQ -3			6028
LOQ -4			5988
LOQ -5			6044
LOQ -6			6149
ORTALAMA			6045
% RSD			1,14

Tablo 4-30: Mixed Dimer İçin LOD sonuçları

Çözelti Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	LOD (%)	Pik Alanı
LOD-1	0,19	0,006	1864
LOD-2			1861
ORTALAMA			1863

- LOQ değeri belirlendikten sonra yapılan 6 enjeksiyonda elde edilen alanlar arasındaki bağıl standart sapma (% RSD) değeri %5,0'den küçüktür.

- LOD seviyesindeki pikler dedekte edilebilirdir.

- Belirlenen LOQ ve LOD değerleri Tablo 4-31'de özetlenmiştir.

Tablo 4-31:LOQ &LOD: Özet Tablo

Madde Adı	Eğim (S)	Standart Sapma (σ)	LOQ (%)	LOD (%)
Tenofovir disoproksil fumarat	14427596	939,6	0,021	0,007
MONO-POC PMPA	16303168	1928,5	0,033	0,011
9-Propilenadenin	38687780	554,9	0,004	0,002
MOC-POC PMPA	12801814	1131,3	0,029	0,010
iPR-POC PMPA	15385565	1701,4	0,033	0,012
MIXED DIMER	12209758	706,2	0,019	0,006
nPOC-POC PMPA	11917745	298,3	0,008	0,003
DIMER	10412899	1486,9	0,047	0,016

4.1.7. Kesinlik**4.1.7.1. Sistem Kesinliği**

%100 çalışma konsantrasyonunda hazırlanan standart çözeltisinden ardışık 6 enjeksiyon yapılır. Enjeksiyonlardan elde edilen pik alanları ve aralarındaki bağıl standart sapma değeri ölçüldü. Sistem kesinliği parametreleri Tablo 4-32’de verilmiştir.

Tablo 4-32: Sistem Kesinliği Parametre sonuçları

Enjeksiyon No	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
1	5,276	80013	1,1	25831
2	5,265	79756	1,1	25823
3	5,264	79936	1,1	25831
4	5,265	79764	1,1	25869
5	5,265	79828	1,1	25878
6	5,265	79653	1,1	25867
ORTALAMA	5,267	79825	1,1	25850
SD	0,005	131,0	-	-
% RSD	0,09	0,16	-	-

4.1.7.2. Tekrarlanabilirlik

Çözeltileri hazırlıkları 3.2.3’de anlatılan, çözücü, plasebo, 2 adet standart, 2 adet Tenofovir disoproksil fumarat tablet numunesi ve 6 adet %100 Konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş tablet numune çözeltileri hazırlanarak safsızlık tayini analizi yapıldı. Sonuçlar Tablo 4-33 ve Tablo 4-34’ de verilmiştir.

Tablo 4-33: Aynı gün içerisinde yapılan Tenofovir disoproksil fumarat tablet numunesi sonuçları

Numune No	MONO- POC- PMPA %	9-PROPİLEN ADENİN %	MOC- POC- PMPA %	iPr- POC- PMPA %	MIXED DİMER %	nPOC- POC- PMPA %	DİMER %
1	0,552	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,023	0,059
2	0,554	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,020	0,023	0,062
ORTALAMA	0,553	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,020	0,023	0,061

Tablo 4-34: Aynı gün içerisinde yapılan %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş tablet numune sonuçları

Numune No	MONO- POC- PMPA %	9-PROPİLEN ADENİN %	MOC- POC- PMPA %	iPr- POC- PMPA %	MIXED DİMER %	nPOC- POC- PMPA %	DİMER %
1	0,675	0,209	0,223	0,201	0,195	0,204	0,207
2	0,666	0,208	0,222	0,202	0,192	0,201	0,207
3	0,668	0,208	0,223	0,204	0,191	0,201	0,208
4	0,669	0,220	0,223	0,203	0,192	0,200	0,208
5	0,671	0,219	0,224	0,203	0,192	0,200	0,208
6	0,670	0,221	0,223	0,204	0,192	0,199	0,207
Ortalama	0,670	0,214	0,223	0,203	0,192	0,201	0,208
SD	0,003	0,006	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001
% RSD	0,46	3,00	0,28	0,58	0,195	0,204	0,207

-Safsızlık eklenmemiş numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon limitleri içindedir.
-6 adet safsızlık eklenmiş numunenin analiz sonuçları arasındaki bağıl standart sapma % 4,0'den küçüktür.

4.1.7.3. Ara Kesinlik

2 adet standart, 2 adet numune ve 6 adet %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş tablet numunesi hazırlanarak farklı analiz yapıldı. Sonuçlar Tablo 4-35 ve Tablo 4-37' de verilmiştir.

Tablo 4-35: Arakesinlik numune sonuçları

Numune No	MONO- POC- PMPA %	9-PROPİLEN ADENİN %	MOC- POC- PMPA %	iPr- POC- PMPA %	MIXED DİMER %	nPOC- POC- PMPA %	DİMER %
1	0,551	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,019	<LOQ	0,057
2	0,553	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,019	<LOQ	0,059
ORTALAMA	0,552	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,019	<LOQ	0,058

Tablo 4-36: Arakesinlik %100 Konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş tablet numune analizlerinin sonuçları

Numune No	MONO- POC- PMPA %	9-PROPİLEN ADENİN %	MOC- POC- PMPA %	iPr- POC- PMPA %	MIXED DİMER %	nPOC- POC- PMPA %	DİMER %
1	0,717	0,213	0,212	0,218	0,196	0,213	0,205
2	0,701	0,213	0,210	0,217	0,195	0,199	0,209
3	0,705	0,213	0,210	0,217	0,194	0,201	0,208
4	0,707	0,209	0,210	0,217	0,193	0,212	0,209
5	0,707	0,212	0,210	0,216	0,193	0,214	0,212
6	0,709	0,213	0,211	0,217	0,194	0,201	0,214
Ortalama	0,708	0,212	0,211	0,217	0,194	0,207	0,210
SD	0,005	0,002	0,001	0,001	0,001	0,007	0,003
% RSD	0,75	0,76	0,40	0,29	0,60	3,39	1,50

Tablo 4-37: Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçlarının karşılaştırılması

Numune No	MONO-POC-PMPA %	9-PROPİLEN ADENİN %	MOC-POC-PMPA %	iPr-POC-PMPA %	MIXED DİMER %	nPOC-POC-PMPA %	DİMER %
1	0,675	0,209	0,223	0,201	0,195	0,204	0,207
2	0,666	0,208	0,222	0,202	0,192	0,201	0,207
3	0,668	0,208	0,223	0,204	0,191	0,201	0,208
4	0,669	0,220	0,223	0,203	0,192	0,200	0,208
5	0,671	0,219	0,224	0,203	0,192	0,200	0,208
6	0,670	0,221	0,223	0,204	0,192	0,199	0,207
7	0,717	0,213	0,212	0,218	0,196	0,213	0,205
8	0,701	0,213	0,210	0,217	0,195	0,199	0,209
9	0,705	0,213	0,210	0,217	0,194	0,201	0,208
10	0,707	0,209	0,210	0,217	0,193	0,212	0,209
11	0,707	0,212	0,210	0,216	0,193	0,214	0,212
12	0,709	0,213	0,211	0,217	0,194	0,201	0,214
Ortalama	0,689	0,213	0,217	0,210	0,193	0,204	0,209
SD	0,020	0,005	0,007	0,007	0,002	0,006	0,002
% RSD	2,93	2,15	3,03	3,55	0,80	2,82	1,15

-Safsızlık eklenmemiş numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon limitleri içindedir.

-6 adet safsızlık eklenmiş numunenin analiz sonuçları arasındaki bağıl standart sapma % 4,0'dan küçüktür.

-Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik analizlerinden elde edilen 12 adet numunenin % safsızlık sonuçları arasındaki bağıl standart sapma (% RSD) % 4,0'den küçüktür.

4.1.8. Doğruluk ve Geri Kazanım

Tenofovir disoproksil 245 mg Film tablet numune Çözeltilisine safsızlıklar ilave edilerek % LOQ, % 100, %120 ve MONO POC PMPA için % 240 seviyelerinde gösterildi. Her bir seviye için 3'er adet olmak üzere toplam 9 adet numune hazırlandı ve 2'şer enjeksiyon yapıldı. Sonuçlar Tablo 4-38 ve Tablo 4-44'de verilmiştir.

Tablo 4-38: MONO-POC-PMPA doğruluk sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama	SD	%RSD
LOQ	1	0,986	0,993	100,6	0,081	0,082
	2	0,986	0,993			
	3	0,986	0,992			
	4	0,986	0,991			
	5	0,986	0,992			
	6	0,986	0,993			
% 100	1	21,000	20,818	97,9	0,69	0,67
	2	21,000	20,800			
	3	21,000	20,710			
	4	21,000	20,728			
	5	21,000	20,529			
	6	21,000	20,547			
% 240	1	51,003	51,462	101,6	0,60	0,61
	2	51,003	51,411			
	3	51,003	52,074			
	4	51,003	52,125			
	5	51,003	51,870			
	6	51,003	51,921			

Tablo 4-39: 9-Propilen Adenin doğruluk sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama	SD	%RSD
LOQ	1	0,133	0,135	101,9	0,76	0,78
	2	0,133	0,135			
	3	0,133	0,137			
	4	0,133	0,137			
	5	0,133	0,135			
	6	0,133	0,135			
% 100	1	6,000	6,028	103,4	0,50	0,51
	2	6,000	6,028			
	3	6,000	6,023			
	4	6,000	6,022			
	5	6,000	6,221			
	6	6,000	6,215			
% 120	1	7,200	7,231	101,3	0,08	0,08
	2	7,200	7,231			
	3	7,200	7,231			
	4	7,200	7,230			
	5	7,200	7,230			
	6	7,200	7,231			

Tablo 4-40: MOC-POC-PMPA doğruluk sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama	SD	%RSD
LOQ	1	0,873	0,869	98,2	1,0	0,98
	2	0,873	0,868			
	3	0,873	0,850			
	4	0,873	0,849			
	5	0,873	0,853			
	6	0,873	0,854			
% 100	1	6,000	6,234	103,9	0,19	0,19
	2	6,000	6,228			
	3	6,000	6,222			
	4	6,000	6,216			
	5	6,000	6,246			
	6	6,000	6,240			
% 120	1	7,200	7,322	101,5	0,26	0,27
	2	7,200	7,315			
	3	7,200	7,315			
	4	7,200	7,322			
	5	7,200	7,286			
	6	7,200	7,279			

Tablo 4-41: iPR-POC-PMPA Doğruluk sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama	SD	%RSD
LOQ	1	0,992	0,869	100,1	0,50	0,50
	2	0,992	0,998			
	3	0,992	0,999			
	4	0,992	0,993			
	5	0,992	0,992			
	6	0,992	0,987			
% 100	1	6,000	6,150	103,2	0,64	0,66
	2	6,000	6,144			
	3	6,000	6,204			
	4	6,000	6,198			
	5	6,000	6,234			
	6	6,000	6,228			
% 120	1	7,200	7,416	103,0	0,41	0,42
	2	7,200	7,409			
	3	7,200	7,387			
	4	7,200	7,380			
	5	7,200	7,452			
	6	7,200	7,445			

Tablo 4-42: MIXED DIMER Doğruluk sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama	SD	%RSD
LOQ	1	0,569	0,586	100,9	3,15	3,18
	2	0,569	0,586			
	3	0,569	0,586			
	4	0,569	0,586			
	5	0,569	0,551			
	6	0,569	0,551			
% 100	1	6,000	5,964	98,3	0,88	0,87
	2	6,000	5,958			
	3	6,000	5,880			
	4	6,000	5,874			
	5	6,000	5,850			
	6	6,000	5,844			
% 120	1	7,200	6,984	96,7	0,41	0,40
	2	7,200	6,991			
	3	7,200	6,926			
	4	7,200	6,919			
	5	7,200	6,970			
	6	7,200	6,962			

Tablo 4-43: nPOC-POC-PMPA Doğruluk sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama	SD	%RSD
LOQ	1	0,251	0,246	97,9	0,10	0,10
	2	0,251	0,246			
	3	0,251	0,245			
	4	0,251	0,246			
	5	0,251	0,245			
	6	0,251	0,245			
% 100	1	6,000	5,964	98,4	0,76	0,75
	2	6,000	5,958			
	3	6,000	5,886			
	4	6,000	5,880			
	5	6,000	5,880			
	6	6,000	5,862			
% 120	1	7,200	7,092	98,4	0,31	0,30
	2	7,200	7,100			
	3	7,200	7,106			
	4	7,200	7,106			
	5	7,200	7,056			
	6	7,200	7,063			

Tablo 4-44: DIMER Doğruluk sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	Ortalama	SD	%RSD
LOQ	1	1,426	1,440	100,1	0,96	0,96
	2	1,426	1,442			
	3	1,426	1,412			
	4	1,426	1,410			
	5	1,426	1,432			
	6	1,426	1,430			
% 100	1	6,000	6,192	103,5	0,28	0,29
	2	6,000	6,186			
	3	6,000	6,216			
	4	6,000	6,210			
	5	6,000	6,228			
	6	6,000	6,222			
% 120	1	7,200	7,294	99,8	1,19	1,19
	2	7,200	7,286			
	3	7,200	7,164			
	4	7,200	7,157			
	5	7,200	7,099			
	6	7,200	7,106			

Doğruluk Çalışması sonucunda elde edilen her bir safsızlığa ait doğruluk sonuçları % 95,0 -105,0 limitleri dahilinde bulunmuştur.

4.1.9. Sağlamlık

2 adet standart, 2 adet numune ve 2 adet %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi hazırlanarak ve analiz şartları değiştirilerek safsızlık analizi yapıldı.

Aşağıda özet Tablosu (Tablo 4-45) verilen analiz şartları değiştirilerek analizler yapıldı ve metodun analiz şartlarına karşı dayanıklılığı test edildi.

Tablo 4-45: Sağlamlık numune* çalışması sonuçları

	MONO- POC PMPA	9- PROPİLENAD ENİN	MOC- POC PMPA	iPR- POC PMPA	MIXED DIMER	nPOC- POC- PMPA	DIMER
Normal Şartlar	0,670	0,238	0,210	0,203	0,192	0,210	0,208
Akış 0,15 mL /dk	0,695	0,206	0,180	0,186	0,176	0,214	TE
Akış 0,25 mL /dk	0,698	0,201	0,181	0,183	0,172	0,210	0,279
Dalgaboyu 255 nm	0,477	0,193	0,166	0,173	0,143	0,161	0,226
Dalgaboyu 265 nm	0,532	0,203	0,173	0,173	0,228	0,171	0,360
tampon pH 4,5	0,793	0,210	0,222	0,233	0,236	0,223	0,265
tampon pH 4,7	0,810	0,224	0,220	0,234	0,243	0,260	0,269

*n=2 numune

TE:Tespit Edilemedi.

Metot, dalga boyu, Akış Hızı ve tampon pH değişikliğine karşı hassastır.

4.1.10. Çözelti Stabilesi

Belirli zaman aralıklarında saklama şartları (5 °C) sabit tutularak standart ve numune çözeltilerinden enjekte edilen sonuçlar Tablo 4-46 ve Tablo 4-47’de verilmiştir.

Tablo 4-46: Standart Çözeltisi İçin Çözelti Stabilesi

Saat	Alan	% Geri Kazanım
Başlangıç	81069	-
2, Saat	82007	101,2
4, Saat	81776	100,9
8, Saat	82041	101,2
10, Saat	82464	101,7
12, Saat	81846	101,0
18, Saat	81665	100,7
30, Saat	81608	100,7
42, Saat	81661	100,7
54, Saat	82141	101,3
64, Saat	82443	101,7

Tablo 4-47 Numune* İçin Çözelti Stabilitesi

Saat	MONO-POC- PMPA		9- PROPİLENADENİN		MOC- POC- PMPA		iPR-POC- PMPA		MIXED DIMER		nPOC-POC- PMPA		DIMER	
	Alan	%	Alan	%	Alan	%	Alan	%	Alan	%	Alan	%	Alan	%
Başlangıç	242782	-	4011	-	4661	-	11521	-	6889	-	7624	-	16515	-
3.Saat	247976	102,1	3964	98,8	4616	99,0	11439	99,3	6740	97,8	7696	100,9	16568	100,3
5. Saat	252398	104,0	3994	99,6	4641	99,6	11380	98,8	6782	98,4	7706	101,1	16596	100,5
7. Saat	256985	105,9	4026	100,4	4633	99,4	11415	99,1	6752	98,0	7555	99,1	16748	101,4
9. Saat	260747	107,4	3962	98,8	4633	99,4	11378	98,8	6811	98,9	7404	97,1	16720	101,2

*n=2 numune

Standart çözeltisinin 64 saat, numune çözeltisinin 5 saat boyunca stabil olduğu belirlenmiştir.

4.1.11. Stres Çalışması

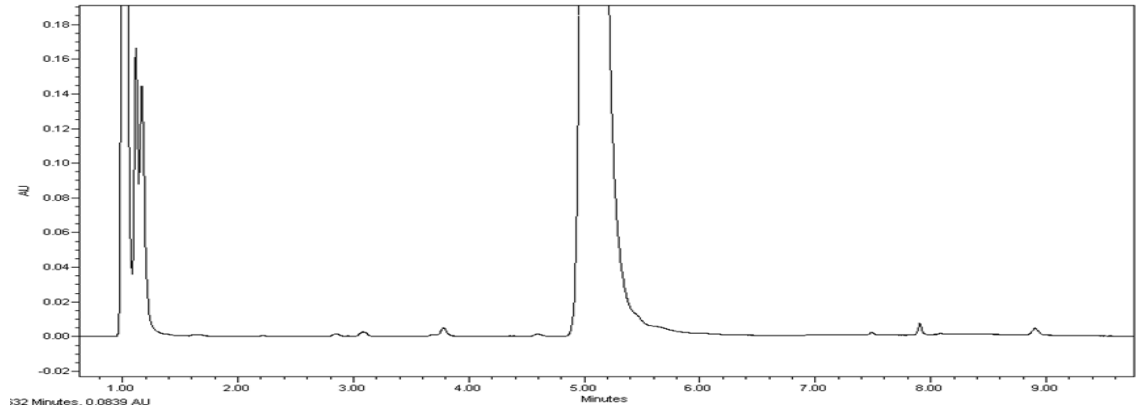
Stres testi için aşağıda belirtilen stres koşullarına maruz bırakılmış numune, belirtilen sürelerde enjekte edildi. Sonuçlar Tablo 4-48' de yer almaktadır. Bozundurma numunelerine ait kromatogramlar Şekil 4-32 ve Şekil 4-37'de verilmiştir.

- Asit Ortam (0,1 N HCl) : Bekletmeden
- Bazik Ortam (0,1 N NaOH) : Bekletmeden
- Oksidasyon Ortamı (% 5,0' lik H₂O₂) : 2 Saat
- Işık (fotostabilite kabini) Bozundurması (1,2 milyon lux) :3 gün
- Isı Bozundurması (80°C) : 2 gün
- Isı ve Nem Bozundurması (40°C, % 75 RH) : 7 gün

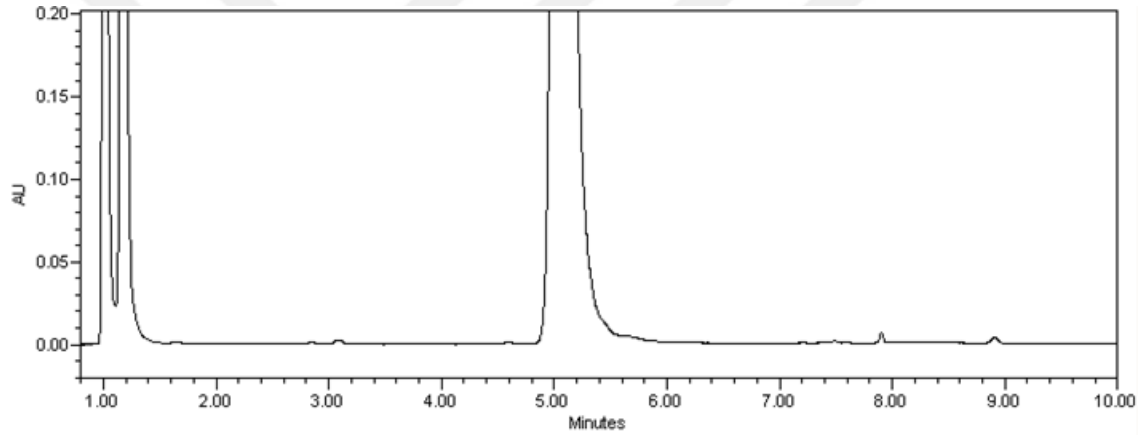
Tablo 4-48: Stres çalışması sonuçları*

Safsızlık Adı	Başlangıç (%)	0,1 N HCl Bekletmeden (%)	0,1 N NaOH Bekletmeden (%)	%5 Peroksit 2 saat (%)	Işık 3 Gün (%)	40 °C % 75 nem 7 gün (%)	80 °C 2 gün (%)
MONO-POC-PMPA	0,553	6,424	13,771	6,098	0,599	0,694	15,750
9-Prohenyl adenine	0,004	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,248
Moc-POC PMPA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,706
iPr-POC PMPA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,023
Mixed Dimer	0,020	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,161	0,707
nPOC-POC PMPA	0,023	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,021
Dimer	0,061	0,052	0,050	0,059	0,051	0,199	14,592
Herbir bilinmeyen safsızlık (maks)	0,039	0,037	0,032	0,039	0,037	0,048	11,267
Toplam safsızlık	0,668	6,513	13,853	6,234	0,686	1,101	55,803

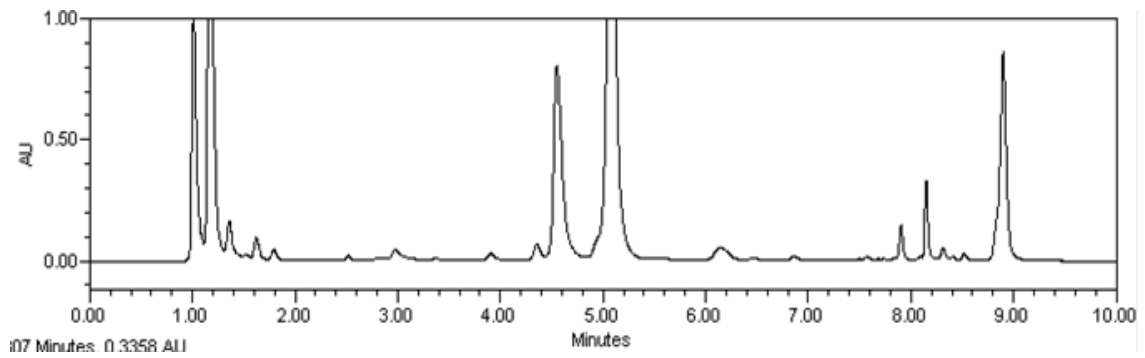
*n=2 numune



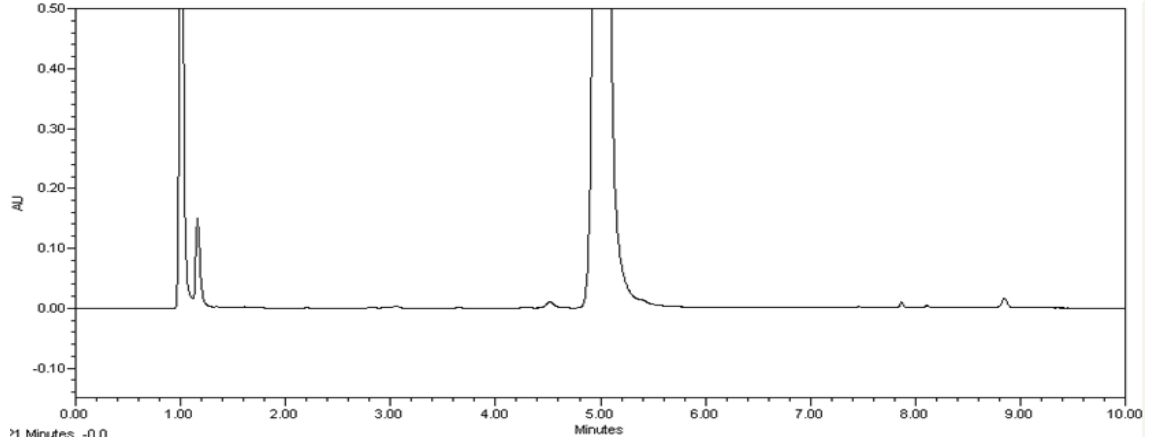
Şekil 4-32: Oksidatif bozundurma numunesine ait kromatogram



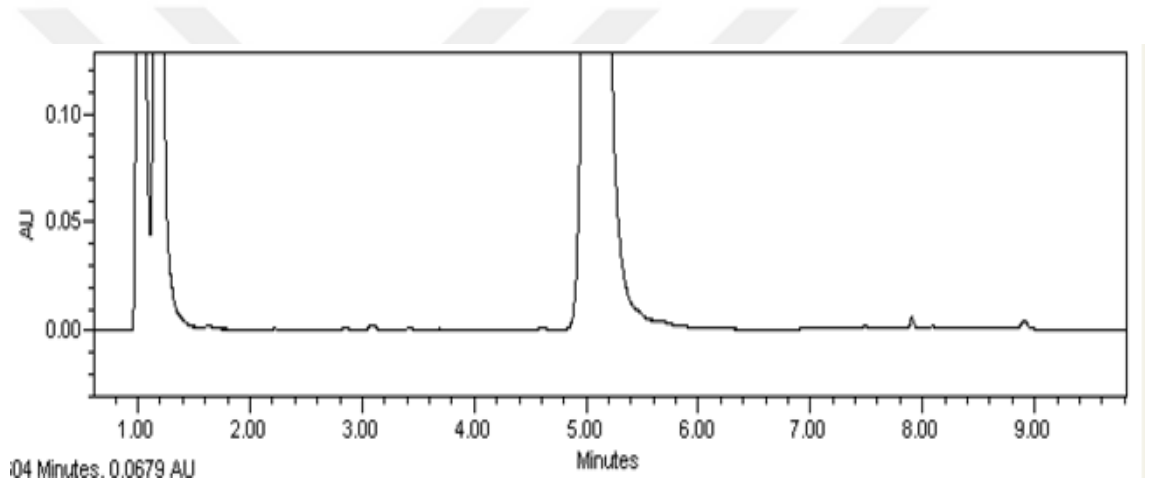
Şekil 4-33: Asidik bozundurma numunesine ait kromatogram



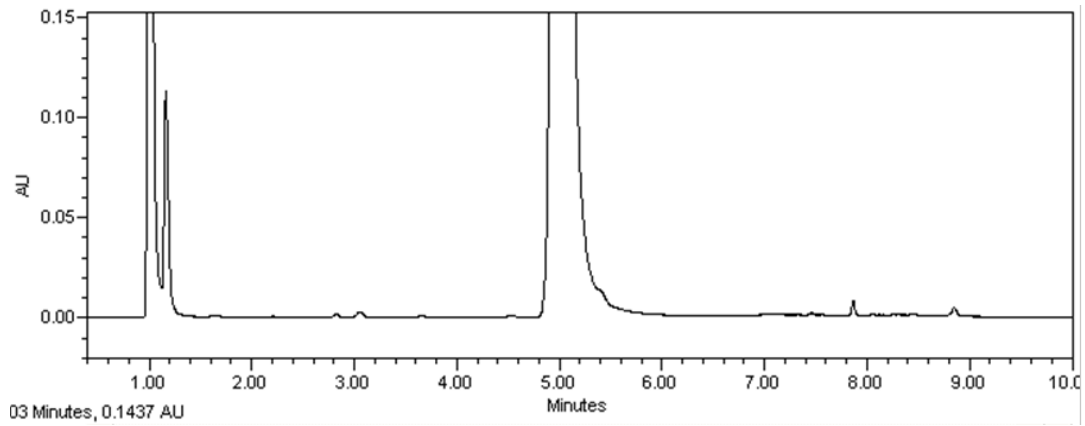
Şekil 4-34: Isı bozundurması numunesine ait kromatogram



Şekil 4-35: Isı ve nem bozundurması numunesine ait kromatogram



Şekil 4-36: Bazik bozundurma numunesine ait kromatogram



Şekil 4-37: Işık bozundurma numunesine ait kromatogram

TARTIŞMA

Tenofovir disoproksil fumarat, hepatit B virüsünü veya HIV ya da her ikisini tedavi etmek için kullanılan antiviral veya antiretroviral bir ilaçtır. Tenofovir disoproksil fumarat, genellikle NRTI olarak bilinen bir nükleotid revers transkriptaz inhibitörüdür ve virüslerin kendilerini yeniden üretmesi içinesas olan enzimlerin (hepatit B’de DNA polimeraz, HIV’de revers transkriptaz;) normal çalışmasını engelleyerek çalışır.

Tenofovir disoproksil fumarat EP, USP ve BP’de yer almamaktadır. World Health Organisation, Tenofovir Monograph; 4th ed. The International Pharmacopoeia; 2012’de yer almaktadır. Tenofovir disoproksil fumarat literatürdeki çalışmalar incelendiğinde etken madde ve safsızlıkların yan yana miktar tayini için 2 adet HPLC [3,4] metodu vardır ve bu yöntemlerde analiz sürelerinin 60 ve 80 dakika olduğu görülmüştür. Bu çalışmaya başlarken amacımız Tenofovir disoproksil fumarat ve safsızlıklarının farmasötik preparatlarda rutin analizlerde rahatlıkla kullanılabilen UPLC ile analizine dayanan, analiz süresi kısa bir safsızlık tayini metodu geliştirmek ve bu yöntemi valide etmektir.

Bu çalışmada UPLC Acquity BEH C18 (100 mm x 2,1 mm iç çap, 1,7 µm) kolon kullanılmıştır. Analizler, mobil faz A olarak pH 4,6 asetat tamponu Çözeltilisi, mobil faz B olarak da asetonitrilin gradient elüsyonu ile gerçekleştirilmiştir. Akış Hızı 0,2 mL/dk ’dır. Çalışmalar, PDA ve UV dedektör kullanılarak 260 nm dalga boyunda yapılmıştır. Analiz süresi etken madde ve 7 adet safsızlık için 10 dakikada tamamlanmıştır.

Safsızlık tayini metoduna spesifiklik, doğrusallık ve aralık, düzeltme faktörü, LOD ve LOQ, kesinlik, doğruluk, sağlamlık ve stres parametreleri uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Şekiller ve tablolar ile ayrıntılı verilmiştir.

Geliştirilen yöntemin seçicilik parametresinde, etken madde, safsızlıkların birbirleriyle girişim yapmadığı saptanmıştır. Çözücü ve plasebonunda pik vermediği gözlenmiştir.

Belirlenen çalışma koşullarında doğrusal aralık, etken madde ve herbir safsızlık için 0,13– 51 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Gözlenebilme ve tayin sınırları sırasıyla her bir safsızlık için 0,045 µg/mL ve 0,99 µg/mL aralığında bulunmuştur.

Yöntemin doğruluğunu belirlemek amacıyla tablet numune çözeltisinin üzerine safsızlık çözeltisi katılarak LOQ, %100, % 120 ve % 240 aralığında numuneler hazırlanmış ve geri kazanım değerleri %98,2 - %102,2 arasında bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemin kesinliğini ölçmek için, tablet çözeltisi üzerine %100 konsantirasyonda olacak şekilde safsızlık çözeltileri ilave edilmiştir. Farklı günlerde, farklı UPLC cihazı, farklı kolon kullanılarak analizler yapılmış ve sonuçların bağlı standart sapma değerleri her bir safsızlık için %4'ün altında saptanmıştır.

Sağlamlık parametresinde yöntemde yapılan değişiklikler sonucu dalga boyu, akış hızı ve tampon pH değişikliğine karşı hassas olduğu tespit edilmiştir.

Stres çalışması numunelere asit, baz, oksidasyon, ısı, UV ışığı, ısı ve neme maruz bırakılarak uygulanmıştır. Numuneye 0,1N NaOH bekletilmeden bozundurma uygulandığında bozunma gerçekleşmekte ve MONO-POC-PMPA artmaktadır. Numuneye 0,1 N HCl ile bekletilmeden bozundurma uygulandığında bozunma gerçekleşmekte ve MONO-POC-PMPA safsızlığı artmaktadır. Numune %5'lik H₂O₂ ile 2 saat bozundurma uygulandığında bozunma gerçekleşmekte ve MONO-POC-PMPA safsızlığı artmaktadır. 3 günlük UV ışığı bozundurması sonucunda numunede önemli bir bozunma tespit edilmemiştir. 7 günlük ısı ve nem bozundurması sonucunda numunede bozunma gerçekleşmekte ve MONO-POC-PMPA ve Dimer safsızlığı artmaktadır. 2 günlük ısı (80 °C) bozundurması sonucunda numunede tüm safsızlıklarda artış tespit edilmiştir. Madde kayıpları, asit bozundurmada %6,5, baz bozundurmada % 13,9, oksidatif bozundurma % 6,2, ışık bozundurmada % 0,686, 40 °C % 75 nem bozundurmada % 1,101 ve 80 °C bozundurmada % 55,8 olarak bulunmuştur.

Metot stres koşullarındaki değişimleri yansıtmaktadır ve stabilite ayırt edici özelliği ispatlanmıştır.

Çözelti stabilitesinin belirlenebilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, örneklerin standart için 64 saat ve numune için 5 saat stabil kaldıkları tespit edilmiştir.

Özet olarak Tenofovir disoproksil fumarat ve safsızlıklarının miktar tayini metoduna spesifiklik, doğrusalılık ve aralık, düzeltme faktörü, LOD ve LOQ, kesinlik, doğruluk, sağlamlık ve stres parametreleri uygulanarak metot validasyonu başarıyla tamamlanmıştır. Tüm sonuçlar limitlere uygundur. Tenofovir disoproksil fumarat ve

safsızlıklarının yan yana analizinde kullanılabilecek hızlı, tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği yüksek literatürde mevcut olmayan bir UPLC yöntemi geliştirilmiştir.



KAYNAKLAR

1. World Health Organisation, Tenofovir Monograph; 4th ed. The *International Pharmacopoeia*; 2012,
2. Kübra Kurt, Lale Dönbak, Ahmet Kayraldız, AİDS Tedavisinde Tenofovir disoproksil fumarat, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümü, Kahramanmaraş/Turkey *American Chemical Society* 81, 4347-4351, 1959
3. C. Babu, N. Devanna, K. V. N. Suresh Reddy, Validated gradient Stability Indicating RP-HPLC Method for The Simultaneous Quantification of 11 Related Substances in the Combined Dosage Forms of Lamivudine and Tenofovir Disoproxil fumarate *Vol 9, Issue 4, 2017*
<https://doi.org/10.22159/ijap.2017v9i4.19001>
4. Kumar P, Mittan DS, Kumar N, Development of UV spectroscopic method for the estimation of tenofovir in bulk and solid dosage forms, *Anal Chem Indian J* 2013;13:33-5,
5. Vidyadhara S, Sasidhar RLC, Rao BV, Kumari PR, Simultaneous UV spectrophotometric method for the determination of tenofovir, efavirenz and lamivudine in bulk and combined dosage form, *Asian J Pharm Anal* 2016;6:253-
6. Srinath A, Sneha B, Alladi A, Ahmed R, Kulkarni RG, Method development and validation for simultaneous estimation of lamivudine, tenofovir and efavirenz in combined tablet dosage form by RP-HPLC and UV-spectroscopic method, *Int J Pharm Sci Res* 2014;5:5491-7,
7. Rajan V, Rele, Simultaneous spectrophotometric estimation of emtricitabine and Tenofovir disoproksil fumarate by area under curve method in combined dosage form, *Asian J, Research Chem*, 2021; 14(1):67-72, doi: 10.5958/0974-4150,2021,00011,0
8. Anandakumar K, Kannan K, vetrichelvan T, Development and validation of emtricitabine and Tenofovir disoproxil fumarate in pure and in fixed dose combination by UV spectrophotometry, *Digest J Nanomaterials Biostructures* 2011;6:1085-90

9. Sri KV, Yadla DK, Shalem M, Sirisha VRK, Simultaneous estimation and validation of emtricitabine, Tenofovir disoproxil fumarate and efavirenz in pharmaceutical dosage form by UV-spectrophotometry, *Chem Sci Rev Lett* 2017;6:2581-9,
10. Harini U, Pawar AKM, Development and validation of stability indicating simultaneous UV spectrophotometric method for determination of emtricitabine, Tenofovir disoproxil fumarate, cobicistat, and elvitegravir in pure and pharmaceutical dosage form, *Asian J Pharm Clin Res* 2018;11:177-84
11. venkatesan S, Kannappan N, Simultaneous spectrophotometric method for determination of emtricitabine and Tenofovir disoproxil fumarate in three-component tablet formulation containing rilpivirine hydrochloride, *Int Scholarly Res Notices* 2014, <https://doi.org/10.1155/2014/541727>
12. Behera A, Parida A, Meher AK, Dannana GS, Moitra SK, Chandra SS, Development and validation of spectrophotometric method for determination of emtricitabine and Tenofovir disoproxil fumarate in bulk and tablet dosage form, *Int J PharmTech Res* 2011;3:1874-82
13. Shirkhedkar AA, Bhirud CH, Surana SJ, Application of UV-spectrophotometric methods for estimation of Tenofovir disoproxil fumarate in tablets, *Pak J Pharm Sci* 2009;22:27-9,
14. Sharma R, Mehta K, Simultaneous spectrophotometric estimation of Tenofovir disoproxil fumarate and Lamivudine in three component tablet formulation containing efavirenz, *Indian J Pharm Sci* 2010;72:527-30
15. Choudhari VP, Ingale S, Gite SR, Tajane DD, Modak VG, Ambekar A, Spectrophotometric simultaneous determination of Tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine in combined tablet dosage form by ratio derivative, first order derivative and absorbance corrected methods and its application to dissolution study, *Pharm Methods* 2011;2:47–52
16. Ashour HK, Belal TS, New simple spectrophotometric method for determination of the antiviral mixture of emtricitabine and Tenofovir disoproxil fumarate, *Arabian J Chem* 2017;10:1741-7
17. Raghu Ram Jampala¹, V. Kiran Kumar², Appala Raju Nemala, Development and Application of Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Elvitegravir, Tenofovir disoproxil fumarate, Emtricitabine, and

Cobicistat in Fixed Dosage Form *Published 18 July 2014 Chemistry Pharmaceutical methods* DOI:10,5530/PHM.2014,1,2

18. MD Abdul Sattar, Suneetha Achanta, Analytical Method Development and Validation for the Determination of Emtricitabine and Tenofovir disoproxil fumarate Using Reverse Phase HPLC Method in Bulk and tablet Dosage Form Vol. 10(5), 2018, 1207-1212
19. Ashok G, Mondal S, Development and validation of stability indicating method for the simultaneous quantification of Emtricitabine, Tenofovir disoproxil fumarate and Rilpivirine hydrochloride in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC, *Saudi J Med Pharm Sci* 2018;4:175
20. Gummaluri RK, Parthasarathi TVN, Anjanamadhulika G, Simultaneous method for determination of emtricitabine, Tenofovir disoproxil fumarate, elvitegravir and cobicistat in tablets by HPLC, *Indian J Pharm Sci* 2016;78:532-7,
21. Pranitha D, Vanitha C, Francis P, Raja MA, Vardan PV, Surendar M, et al, Simultaneous estimation of emtricitabine, Tenofovir disoproxil fumarate, and rilpivirine in bulk form by RP-HPLC method, *J Pharm Res* 2012;5:4600-2,
22. Gopal NM, Sridhar C, Reverse phase UPLC method for simultaneous estimation of Emtricitabine and Tenofovir in tablet dosage form, *J Sci Res Pharm* 2017;6:11-7,
23. Basha A, Sireesha D, Anil D, Talla R, Haque MA, Harshini S, et al, Method development and validation for simultaneous estimation of Tenofovir disoproxil fumarate and Emtricitabine in pharmaceutical dosage form by RP-HPLC method, *Int J Innovative Pharm Sci Res* 2015;3:1537-45,
24. Reddy BRY, Reddy MT, Reddy BSC, Simultaneous estimation of emtricitabine and Tenofovir disoproxil fumarate in tablet dosage form by reverse phase high-performance liquid chromatography, *SOJ Chromatograph Sci* 2015;1:6,
25. Sharma R, Gupta P, A validated RP-HPLC method for simulataneous estimation of emtricitabine and Tenofovir disoproxil fumarate in a tablet dosage form, *Eurasian J Anal Chem* 2009;4:276-84,
26. Anandakumar Karunakarana, Kannan Kamarajanb and vetrichelvan A validated RP - HPLC method for simulataneous estimation of Lamivudine and Tenofovir disoproxil fumarate in pure and in tablet dosag Form Received: 10/08/2010; Accepted: 16/08/2011

27. Purnima VB, Reddy TVB, Suneetha Y, Ramachandran D, Simultaneous determination of antiretroviral drugs emtricitabine and Tenofovir disoproxil fumarate by a stability indicating RP-HPLC method, *Int J Pharm Pharm Sci* 2015;7:390-8,
28. Khaleel N, Rahaman SA, A validated stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of Tenofovir disoproxil fumarate, cobicistat, emtricitabine and elvitegravir in bulk and pharmaceutical dosage form, *Int J Pharm* 2015;5:991-1002,
29. Komaroju D, Reddy GN, Dhanalakshmi K, Method development and validation for simultaneous estimation of emtricitabine and Tenofovir disoproxil fumarate in pure and tablet dosage form by using RP-HPLC, *Int J Pharma Res Rev* 2013;2:1-11,
30. Jagadabi V, Kumar PVN, Pamidi S, Ramaprasad LA, Pavani G, Identification and quantification of potential impurities using LC-PDA coupled with new qda mass detector in a new single tablet regimen containing dolutegravir, emtricitabine and Tenofovir disoproxil fumarate tablets used in hiv-1 prevention, *Int Res J Pharm* 2019;10:91-104,
31. Nagasarapu MR, Dannana GS, Development and validation of stability-indicating HPLC-DAD method for simultaneous determination of Emtricitabine, Elvitegravir, Cobicistat and Tenofovir in their tablet dosage forms, *Indian J Pharm Edu Res* 2016;50:205-11,
32. Nandini K, Muneer S, Sekhar KBC, Kiran BSS, Stability indicating RP-HPLC method development and validation for the quantification of Tenofovir disoproxil fumarate in bulk and its dosage form, *Int J PharmTech Res* 2016;9:240-9,
33. Dubbaka A, Sireesha D, Bakshi V, Analytical method development and validation for the simultaneous estimation of lamivudine and Tenofovir disoproxil fumarate by RP-HPLC method, *MOJ Proteomics Bioinform* DOI: 10.15406/mojpb.2016.04.00134
34. Sonawane PH, Panzade PS, Kale MA, Simultaneous estimation of lamivudine and Tenofovir disoproxil fumarate in bulk and combined pharmaceutical dosage form by HPLC method, *Asian J Biomed Pharm Sci* 2013;3:27-30,

35. Havele S, Dhaneshwar SR, Development and validation of a stability-indicating LC method for the determination of Tenofovir disoproxil fumarate in pharmaceutical formulation, *Songklanakarin J Sci Technol* 2012;34:615-22,
36. Bhavsar DS, Patel BN, Patel CN, RP-HPLC method for simultaneous estimation of Tenofovir disoproxil fumarate, lamivudine, and efavirenz in combined tablet dosage form, *Pharmaceutical Methods* 2012;3:73-8,
37. Sumanth KS, Rao AS, Shankar DG, A new gradient RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of lamivudine, Tenofovir disoproxil fumarate and efavirenz in pharmaceutical dosage forms, *Int J Pharm Chem Biol Sci* 2018;8:195-203,
38. Raju NA, Begum S, Simultaneous RP-HPLC method for the estimation of the emtricitabine, Tenofovir disoproxil fumarate and efavirenz in tablet dosage forms, *Res J Pharm Tech* 2008;1:522-
39. Rezaei M, Ramazani A, Hokmabadi F, Simultaneous estimation and validation of Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine and efavirenz by RP-HPLC method in combined tablet dosage form, *Curr Pharm Anal* 2019;15:561-7,
40. Sreelatha P, Devi BR, Development and validation of stability-indicating HPLC method for simultaneous estimation of Tenofovir, Emtricitabine and Efavirenz in fixed dose combination drug product *Asian J Res Chem* 2018;11:23-31,
41. Varma PSRCHNPD, Rao AL, Stability-indicating RP-HPLC method for the simultaneous estimation of Efavirenz, Tenofovir and Emtricitabine in pharmaceutical formulations, *Indian J Pharm Pharmacol* 2014;1:1-19,
42. Prasanthi Chengalva, Madhavi Kuchana, Development and Validation of Ultra Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Estimation of Lamivudine, Tenofovir disoproxil fumarate, Doravirine and Efavirenz in Bulk and Pharmaceutical Formulations DOI: 10.36468/*pharmaceutical-sciences*.732
43. Juluri Krishna Dutta Tejaswi, R. Govinda Rajan, RP-UPLC method development and validation for simultaneous estimation and forced degradation studies of elvitegravir, cobicistat, emtricitabine and Tenofovir disoproksil fumarate in solid dosage form *Tejaswi and Rajan, IJPSR, 2019; Vol. 10(6): 2730-2738, DOI:10.13040/IJPSR.0975-8232,10(6).2730-38*
44. Prashant S. Devrukhakar, Roshan Borkar, Nalini Shastri, and K. V. Surendranath, Validated Stability-Indicating RP-HPLC Method for the

Simultaneous Determination of Tenofovir, Emtricitabine, and a Efavirenz and Statistical Approach to Determine the Effect of Variables *Research Article | Open Access Volume (2013) |Article ID 878295 |* <https://doi.org/10.1155/2013/878295>

45. Ramaswamy, A., Arul Gnana Dhas, A.S. Development and validation of analytical method for quantitation of Emtricitabine, Tenofovir, Efavirenz based on HPLC. *Arabian Journal of Chemistry (2014)*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.08.007>
46. Sravanthi T, & Madhavi N. Stability indicating UPLC method to quantify Emtricitabine, Tenofovir, and Efavirenz simultaneously in tablets: Method establishment. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, (2020). 11(1), 120-128, <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i1.1795>
47. Ramreddy Godela, Vijayalaxmi Kammari, Sowjanya Gummadi and Durgaprasad Beda. Concurrent estimation of lamivudine, Tenofovir disoproxil fumarate, and Efavirenz in blended mixture and triple combination tablet formulation by a new stability indicating RP-HPLC method *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00249-9>
48. ICH Q3B (R2), Impurities in New Drug Products, 2 Haziran 2006 https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf
49. ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005 Kasım,Erişim,10,02,2016; http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
50. Q2(R1) 6.3 Based on the Standard Deviation of the Response and the Slope.